

Hovedkontor

Gaustadalléen 21
0349 Oslo
Telefon (47) 22 18 51 00
Telefax (47) 22 18 52 00
Internett: www.niva.no

Sørlandsavdelingen

Televeien 3
4879 Grimstad
Telefon (47) 22 18 51 00
Telefax (47) 37 04 45 13

Østlandsavdelingen

Sandvikaveien 41
2312 Ottestad
Telefon (47) 22 18 51 00
Telefax (47) 62 57 66 53

Vestlandsavdelingen

Postboks 2026
5817 Bergen
Telefon (47) 2218 51 00
Telefax (47) 55 23 24 95

NIVA Midt-Norge

Postboks 1266
7462 Trondheim
Telefon (47) 22 18 51 00
Telefax (47) 73 54 63 87

Tittel Høye koliformtall i vanninntaket skyldes vekst i vannkilden? Sluttrapport fra undersøkelser i Maridalsvannet sommeren 2007	Løpenr. (for bestilling) 5522-2007	Dato 19.12.07
	Prosjektnr. Undernr. O-26315	Sider Pris 20
Forfatter(e) C. Vogelsang	Fagområde Drikkevann	Distribusjon Åpen
	Geografisk område Oslo	Trykket CopyCat

Oppdragsgiver(e) Vann og avløpsetaten i Oslo kommune	Oppdragsreferanse Nils Arne Saltveit
---	---

Sammenheng

Denne studien har forsøkt å besvare hypotesen "Forhøyet antall koliforme bakterier i vanninntaket i august måned skyldes vekst i vannkilden, dvs de skyldes ikke fekal forurensning". Gjennom profilmålinger ute i Maridalsvannet i juni og august 2007, spesifikk identifisering av koliforme bakterier isolert fra vannet og vekstforsøk under kontrollerte betingelser på laben til NIVA har hypotesen med relativt stor sannsynlighet blitt verifisert. De høye koliformtallene på inntaksvannet i august måned skyldtes i all hovedsak tilstedeværelsen av én type bakterium med sannsynlig opphav i naturmiljøet. Fremveksten av bakterien så ut til å være sterkt kontrollert av konkurrerende bakterier og/eller beiting fra zooplankton, men vannkvaliteten og temperaturen så også ut til å kunne ha betydning.

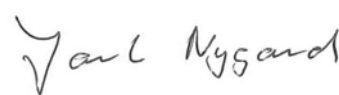
<p>Fire norske emneord</p> <ol style="list-style-type: none"> Koliforme bakterier Maridalsvannet Mikrobielle vekstforsøk Hygienisk barriere 	<p>Fire engelske emneord</p> <ol style="list-style-type: none"> Coliform bacteria Lake Maridalsvann Microbial growth tests Hygienic barrier
---	---



Christian Vogelsang
Prosjektleder



Helge Liltved
Forskningsleder



Jarle Nygård
Fag- og markedsdirektør

Høye koliformtall i vanninntaket skyldes vekst i vannkilden?

Sluttrapport fra undersøkelser i Maridalsvannet
sommeren 2007

Forord

NIVA har gjennomført denne studien på oppdrag for Vann- og avløpsetaten i Oslo kommune ved Nils Arne Saltveit som en oppfølging av fjorårets undersøkelser i Maridalsvannet. Undertegnede (forsker) og Sebastian Hecker (tysk student) var ute og tok inn prøver og gjorde målinger ute i Maridalsvannet i båt lånt av VAV. Inne på NIVA har Ingun Tryland (forsker) og Åse Bakketun (forskningsassistent) bistått med bakteriologiske kvantifiseringer og identifiseringer. Forsvarets forskningsinstitutt ved Tone Aarskaug var behjelpelige med PCR-sekvensering og BLAST-søk for nærmere identifisering av to bakterieisolater. Undertegnede har vært prosjektleder.

Vi takker for all hjertelig bistand ved all kontakt med VAVs ansatte under våre undersøkelser!

Oslo, 19.12.2007

Christian Vogelsang

Innhold

Sammendrag	5
1. Typebestemmelse av koliforme bakterier i vannmagasinet og vanninntak	6
1.1 Prøvetaking og analyser	6
1.2 Resultater: temperatur og turbiditet i vannkilden	8
1.3 Resultater: Forekomst og identifisering av koliforme bakterier i vannkilden og på råvannsinntak	9
2. Vekstforsøk med isolerte bakteriestammer	12
2.1 Resultater med juni-isolater	12
2.2 Resultater med august-isolater	12
3. Oppsummering	15
3.1 Bekreftelse av hypotesen	15
Vedlegg A. Rådata	17
Vedlegg B. Rådata PCR-sekvensering og BLAST-søk	18

Sammendrag

Følgende hypotese skulle besvares: ”*Forhøyet antall koliforme bakterier i vanninntaket i august måned skyldes vekst i vannkilden, dvs de skyldes ikke fekal forurensning*”

På bakgrunn av resultatene fra målinger ute i Maridalsvannet og laboratorieforsøk står det rimelig klart at hypotesen er verifisert:

- Den observerte økningen i koliforme bakterier i tidsrommet fra midten av juni til midten av august skjedde relativt uniformt over hele bassengets utstrekning; i gjennomsnitt en 50x økning (15-190x) og resultatene indikerer at man kan forvente den tilnærmedesvis samme dybdeprofilen uansett hvor man befinner seg i bassenget.
- Alle ti isolater av koliforme bakterier funnet på råvannsinntaket 15.08 var mest sannsynlig identiske og av en slik art at de vil kunne være bestandeler av en naturlig bakterieflora i overflatevann. Dette utelukker mest sannsynlig blant annet måker som kilden til bakterien.
- Bakteriearten som ble isolert som klart dominerende organisme i august var ikke blant isolatene som ble funnet i juni, men dette utelukker ikke dens tilstedeværelse også da. Funnene indikerer derimot at denne bakterien har hatt spesielt gode vekstbetingelser i perioden frem til august.
- Resultatene fra vekstforsøkene antyder at den isolerte koliforme bakterien vil kunne vokse ved relativt lave temperaturer; nedre grense estimert til 5-7 °C. Funn av bakterien på råvannsinntaket sammenfalt med en målbar temperaturøkning i dette vannsjiktet fra 5,0 °C til 5,5 °C.

1. Typebestemmelse av koliforme bakterier i vannmagasinet og vanninntak

1.1 Prøvetaking og analyser

I juni 2007 ble det tatt inn prøver på ulike punkter/målestasjoner og ved ulike dyp i Maridalsvannet (18. juni) og av råvannet inne på Oset vannverk (19. juni) (se Tabell 1 og kartet i Figur 1) for en kartlegging av forekomsten og typeidentifisering av koliforme bakterier i vannkilden på et tidspunkt der man ikke opplever forhøyede konsentrasjoner av koliforme bakterier i råvannsinntaket. I tillegg ble det tatt opp dybdeprofiler for temperatur og turbiditet (mål på partikkelinnhold) ved de samme målestasjonene ute i Maridalsvannet. Etter planen var det tenkt tatt inn tilsvarende prøver i månedsskiftet juli-august når man normalt har opplevd forhøyede konsentrasjoner av koliforme bakterier i vanninntaket til Oset. Pga den unormalt kalde sommeren ble ikke disse profilene/prøvene tatt inn før 15. august (onsdag uke 33) basert på koliformtall fra råvannet til vannverket uken før. Råvannsprøven fra uke 32 viste koliformtall på 100 cfu/100 ml og 80 cfu/100 ml i uke 33.

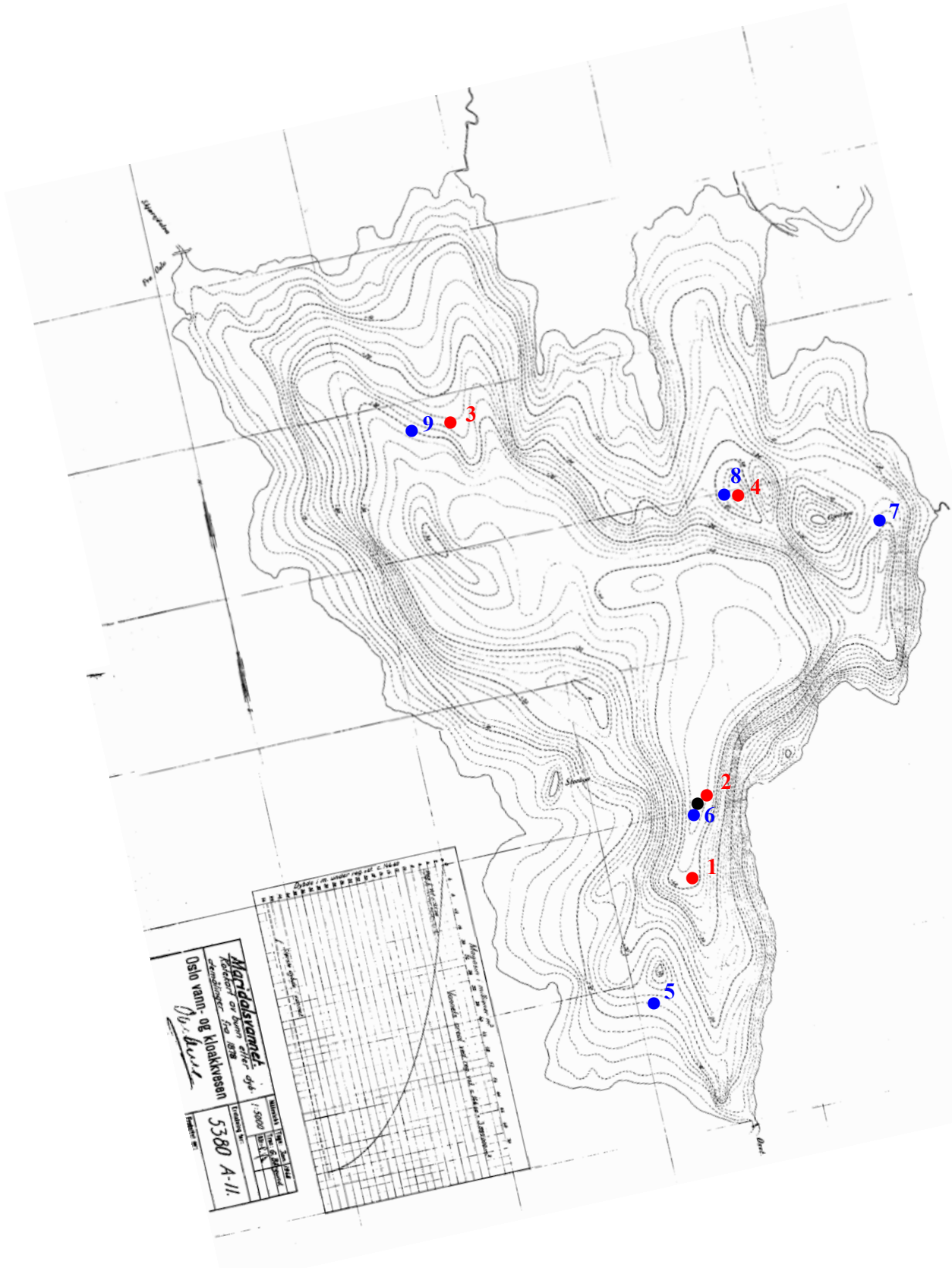
Prøvene ble sendt inn til ekstern lab (Analytica as, som sendte dem videre til Norsk Matanalyse) for å benytte samme analysemetodikk for koliforme bakterier og *E. coli* som på de regulære vannprøvene fra vannverket. I tillegg ble en delprøve fra hver prøve platet ut på m-Endo-medium ved 37°C på NIVA for å dyrke frem koliforme bakterier. Fra agarskålene med positive (= metallglans) kolonier med koliforme bakterier ble det plukket ut 10-12 kolonier (fra hver av prøveseriene i juni og august – i august kun fra inntaksvannet til Oset vannverk) som ble identifisert nærmere med API 20E.

Det var planlagt å gjøre en tilsvarende undersøkelse av vannprøver fra vanninntakene ved Elvåga og Langlia. Ved Elvåga opplevde man ikke noen drastisk økning i koliforme bakterier denne sommeren (liten topp i uke 30 med 12 cfu/100 ml). Ved Langlia fikk man en topp i samme tidsrom som i Maridalsvannet, men i prøven som ankom NIVA i starten av uke 34 ble det ikke funnet noen koliforme bakterier selv om Norsk Matanalyse i en annen delprøve fant 19 cfu/100 ml (og 21 cfu/100 ml *E. coli*!), noe som er en opplagt feilmåling/-rapportering).

Tabell 1. Målestasjoner for dybdeprofiler og prøvetaking i Maridalsvannet. Se også Figur 1.

Målestasjon	Dyp (m)	Nord-koordinat		Øst-koordinat	
		Ved start	Ved slutt	Ved start	Ved slutt
Prøvetaking 18.06.07					
1	1, 5, 15, 35	59°58.568	59°58.621	10°47.061	10°47.064
2	1, 5, 15, 35	59°58.734	59°58.757	10°47.065	10°47.118
3	1, 5, 15	59°59.380	59°59.387	10°46.055	10°46.077
4	1, 5	59°59.243	59°59.341	10°47.080	10°47.118
Råvannsinntak	35	59°58.731		10°47.035	
Prøvetaking 15.08.07					
5	1, 5	59°58.371*		10°46.882*	
6	1, 5, 15, 35	59°58.699*		10°46.973*	
7	1, 5, 15	59°59.218*		10°47.558*	
8	1, 5, 15	59°59.298*		10°47.090*	
9	1, 5, 15	59°59.382*		10°45.804*	
Råvannsinntak	35	59°58.731		10°47.035	

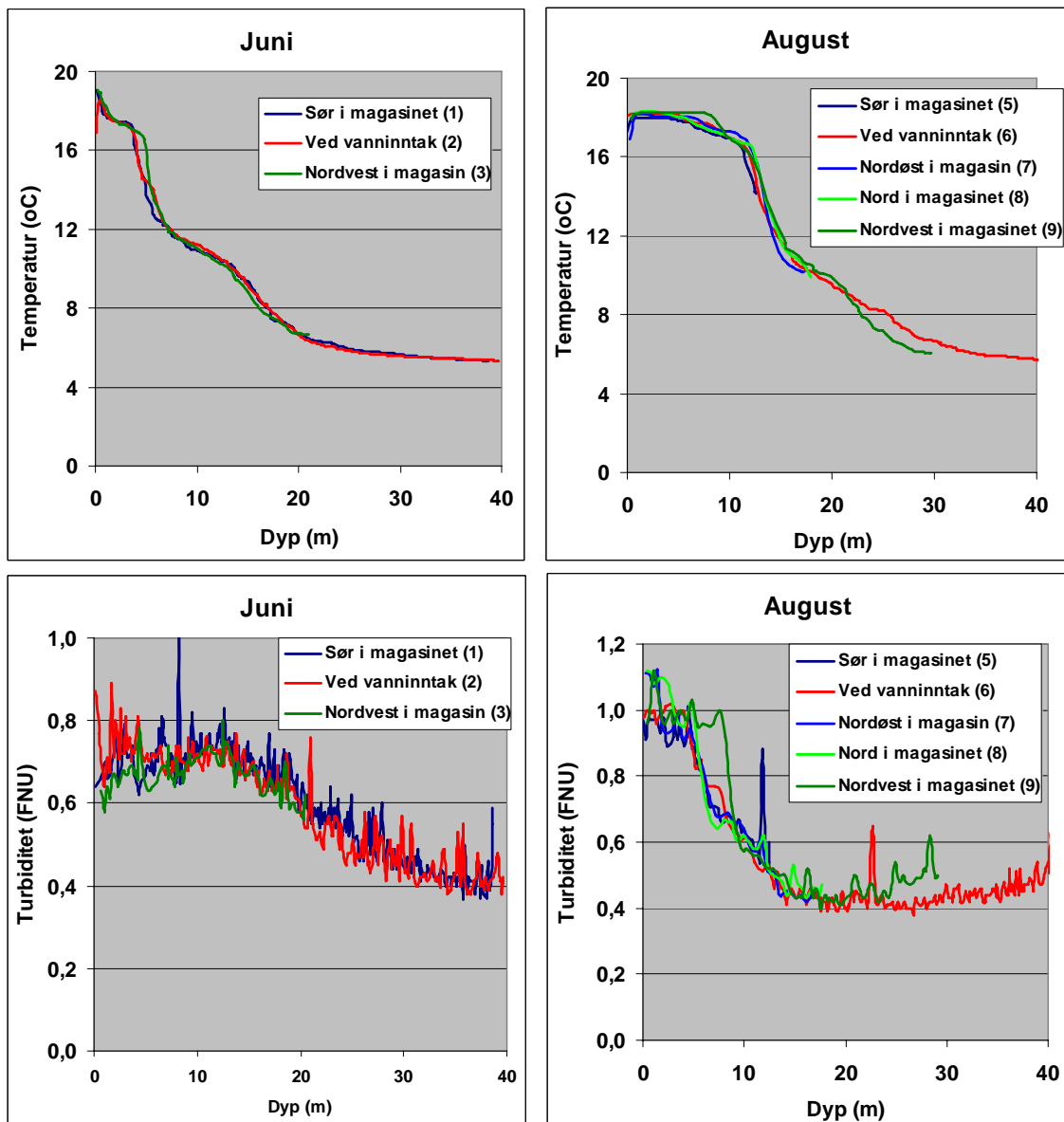
* GPS-koordinatene ser ikke ut til å stemme. Punktene er plassert på kartet i Figur 1 etter beste evne.



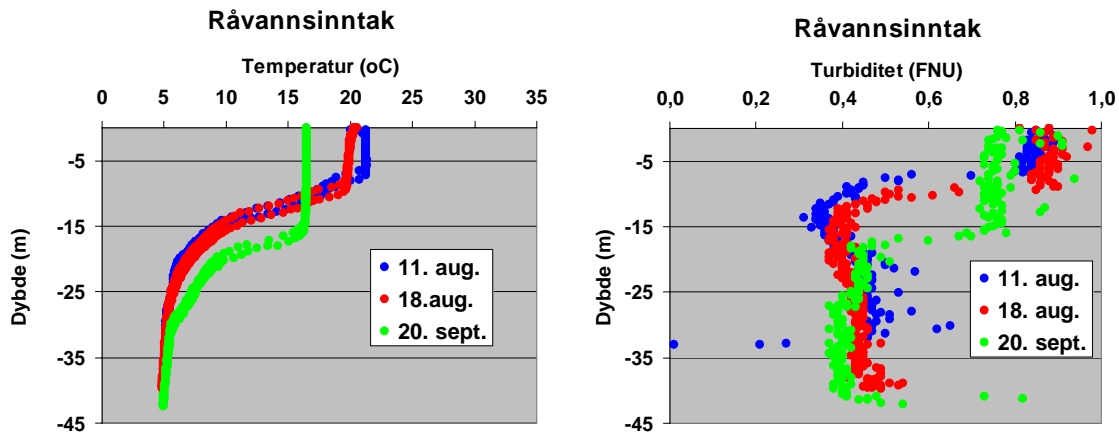
Figur 1. Prøvetakingsstasjoner i Maridalsvannet i juni (røde) og august (blå) 2007. Vanninntakets posisjon merket med sort punkt.

1.2 Resultater: temperatur og turbiditet i vannkilden

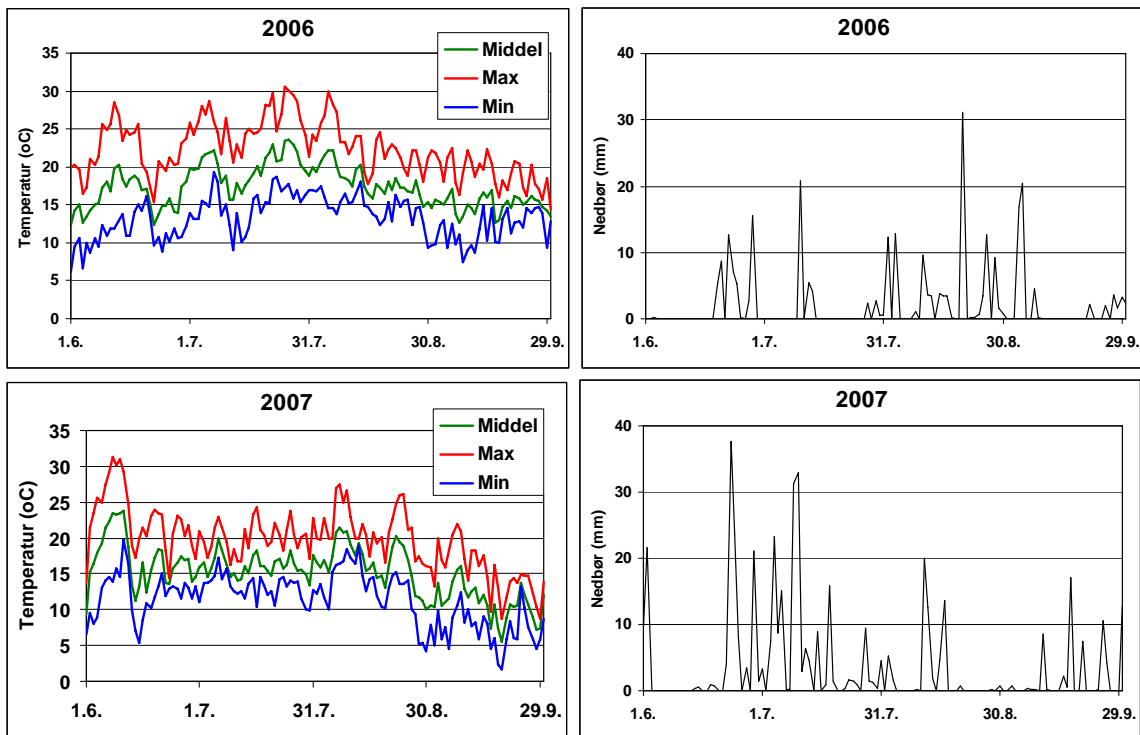
Figur 2 viser dybdeprofilene for temperatur og turbiditet (som et mål på partikkelinnhold) ved de ulike stasjonene i juni og august. Overflatevannet hadde omtrent samme temperatur i juni og august, men sprangsjiktet startet på 11-12 m dyp i august og på 4-5 m dyp i juni. Fra temperaturprofilen for vanninntaket i august ser man at temperaturen ved vanninntaket var i ferd med å øke (resultatene indikerer en svak økning fra 5,0 °C til 5,5 °C i perioden fra juni til august ved vanninntaket). De relativt flate turbiditetsprofilene for juni antyder at det på dette tidspunkt ikke var noe klart sprangsjikt i vannmassene. I august var turbiditetsprofilene brattere, men i motsetning til hva som ble observert i august og september i fjor (se Figur 3) fulgte ikke disse profilene temperaturprofilene (jfr Figur 2). Dette har sannsynligvis sin årsak i den dårlige sommeren (jfr klimadata for 2006 og 2007 i Figur 4).



Figur 2. Dybdeprofiler av temperatur og turbiditet ute i Maridalsvannet 18. juni (3 punkter) og 15. august (5 punkter).



Figur 3. Vertikale profiler av temperatur og turbiditet i vannmassene over råvannsinntaket ved de tre rundene med undersøkelser sensommeren/høsten 2006.

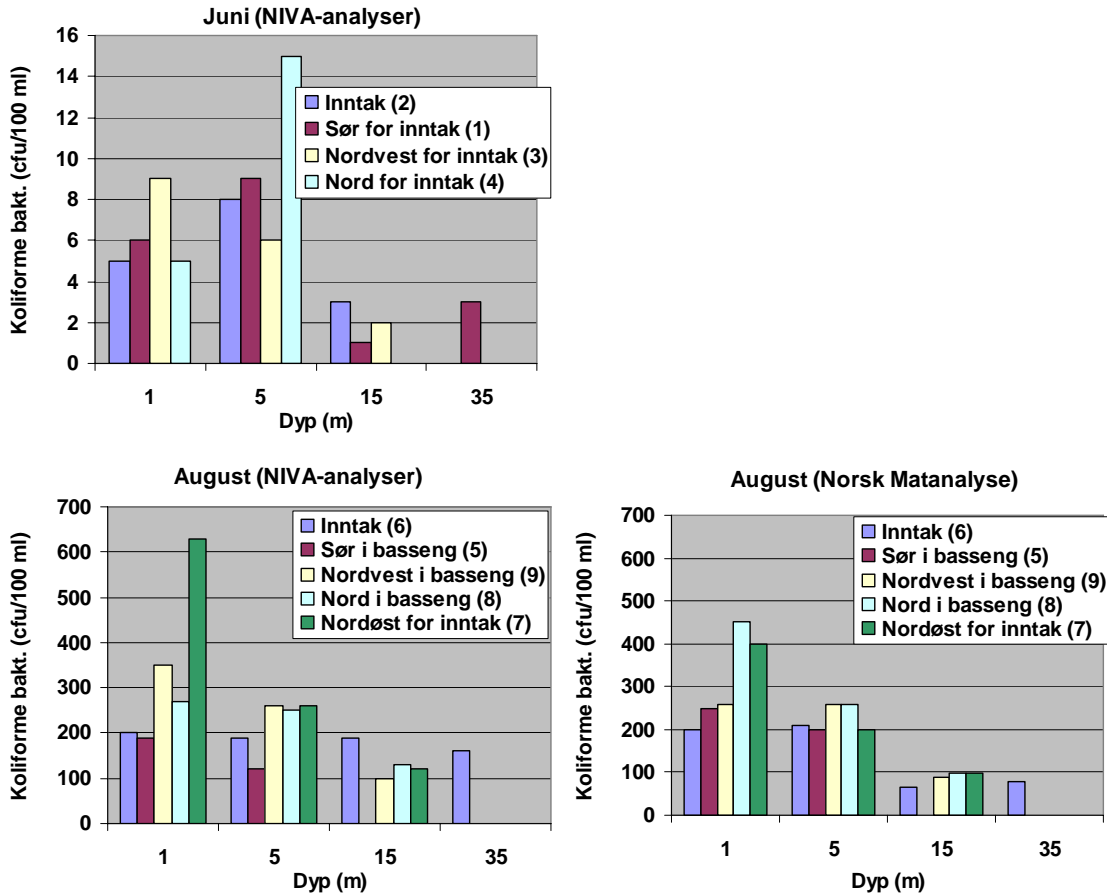


Figur 4. Klimadata for Maridalsvannet i perioden juni-september i 2006 og 2007.

1.3 Resultater: Forekomst og identifisering av koliforme bakterier i vannkilden og på råvannsinntak

Figur 5 viser koliformtallene slik de fremkom ved analysene gjort på NIVA (juni og august) og på Norsk Matanalyse (august). I juni ble sannsynligvis prøvene sendt inn til Norsk Matanalyse (via Analytica) ikke analysert innen tidsfristen og koliformtallene var da unormalt lave sammenlignet med verdiene fra analysene gjort på NIVA (se rådata i Vedlegg A).

Resultatene viser at det hadde skjedd en betydelig generell økning i antall koliforme bakterier i vannmassene fra juni til august og at denne økningen skjedde relativt uniformt over hele bassengets utstrekning; i gjennomsnitt 50x økning (15-190x). I august var det kun ved målestasjonen ved vanninntaket at det ble tatt noen vannprøve ved 35 m dyp, men resultatene indikerer at man kan forvente den tilnærmedesvis samme dybdeprofilen uansett hvor man befinner seg i bassenget.



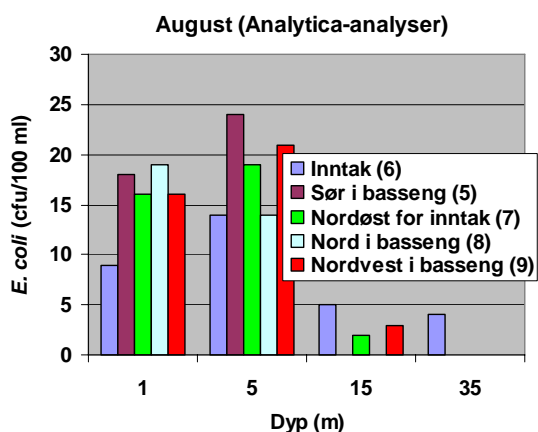
Figur 5. Konsentrasjonen av koliforme bakterier ved ulike dyp ved de ulike målestasjonene ute i Maridalsvannet i juni og august.

Analysene fra Norsk Matanalyse fra juni indikerte at *E. coli* dominerte blant de koliforme bakteriene i disse prøvene (se rådata i Vedlegg 1), mens *E. coli*-tallene fra august-prøvene antydte at den gjennomsnittlige andelen da ikke var større enn ca. 6 % (1,8-12 %) (jfr Figur 6 med Figur 5).

Resultatene fra API 20E-identifiseringen av 10-12 utvalgte koliforme bakteriekolonier (konfirmert positive ved metallglans etter oppdyrking på m-Endo-medium) og bekreftet til en viss grad analyseresultatene fra Norsk Matanalyse; i juni (se Tabell 2) så den dominerende arten ut til å være *Escherichia coli*, men *Enterobacter amnigenus* 2, *E. cloacae*, *Klebsiella oxytoca* og *Hafnia alvei* 2 ble også identifisert (med tilsynelatende god sikkerhet) blant de 12 undersøkte koloniene.

Ved API-identifiseringen av kolonier i prøven fra råvannsinntaket på Oset vannverk gjort i august ble det ikke gjort noen positive identifiseringer av kjente koliforme bakterier, men identifikasjonsprofilene til alle de 10 testede koloniene var identiske (verifisert ved reanalyse) noe som indikerte at alle bakteriekoloniene var av samme art. To av isolatene (der det ene isolatet hadde gitt en en svakt

avvikende identifikasjonsprofil med API 20E i f.h.t de øvrige isolatene ved ett tilfelle) ble sendt til Forsvarets Forskningsinstitutt på Kjeller ved Tone Aarskaug for om mulig nærmere identifisering med molekylærgenetiske metoder (PCR). Resultatene derfra verifiserte at de to isolatene mest sannsynlig var like eller nær beslektet og et BLAST-søk indikerte at det var en jordbakterie som hittil ikke har fått noe navn (resultatene fra PCR-sekvenseringen og BLAST-søket er gitt i Vedlegg B). Dette konfirmerte imidlertid vår antagelse at det her ikke var snakk om noen "vanlig" koliform bakterie av fekal opprinnelse, men en bakterie som har sitt opphav i naturmiljøet. Denne "miljøbakterien" utgjør imidlertid et praktisk problem i og med at den interfererer med koliform-analysen. Dette er langt fra ukjent fra litteraturen, og dette er hovedgrunnen til at man har gått bort fra å benytte koliformanalysen som en indikator på fekal forurensning. Resultatet antyder også at bakterien som fullstendig dominerte i augustprøven tilsynelatende kun var til stede i beskjeden grad i juni-prøvene.



Figur 6. Konsentrasjonen av *E. coli* ved ulike dyp ved de ulike målestasjonene ute i Maridalsvannet i august.

Tabell 2. Resultater fra API 20 E-identifisering av koliform-positive isolater i prøver hentet fra Maridalsvannet 18.6.07. Isolater valgt ut for vekstforsøk merket med lysebrunt.

Isolat	API 20 E		Alternative arter	
	Art	Identifikasjonsgrad	Art	% ID
M1	<i>Escherichia coli 1</i>	Tvilsom – 91,9 %	<i>Escherichia coli 2</i>	5,7 %
M2	<i>Escherichia coli 1</i>	Meget god – 91,0 %	<i>Escherichia coli 2</i> <i>Pantoea spp 1</i>	8,9 % 0,1 %
M3	<i>Escherichia coli 1</i>	Tvilsom – 98,6 %	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	0,5 %
M4	<i>Enterobacter amnigenus 2</i>	Svært god* – 96,4 %	<i>Enterobacter cloacae</i>	3,4 %
M5	<i>Escherichia coli 1</i>	Meget god – 99,8 %	<i>Escherichia coli 2</i>	0,1 %
M6	-	-	-	-
M7	<i>Enterobacter cloacae</i>	God – 97,2 %	<i>Enterobacter amnigenus 1</i>	0,5 %
M8	<i>Enterobacter cloacae</i>	God – 95,1 %	<i>Enterobacter sakazakii</i>	3,0 %
M9	<i>Klebsiella oxytoca</i>	God – 97,7 %	<i>Raoultella ornithinolytica</i> <i>Raoultella planticola</i>	1,5 % ?
M10	<i>Escherichia coli 1</i>	Meget god – 99,7 %	<i>Escherichia coli 2</i>	0,2 %
M11	<i>Hafnia alvei 2</i>	Meget god – 99,1 %	<i>Escherichia coli 2</i> <i>Yersinia ruckeri</i>	0,8 % ?
M12		Uakseptabel	<i>Hafnia alvei 1</i> <i>Escherichia coli 2</i> <i>Enterobacter amnigenus 2</i> <i>Shigella sonnei</i> <i>Hafnia alvei 2</i>	

* Excellent

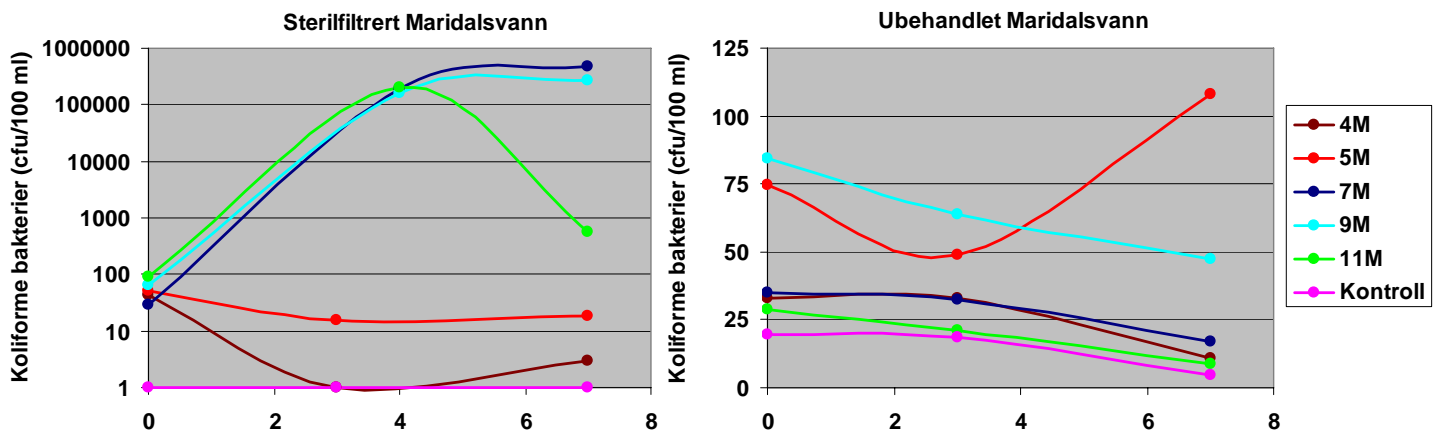
2. Vekstforsøk med isolerte bakteriestammer

Fra de 12 koliform-isolatene funnet i prøvene i juni ble det plukket ut fem tilsynelatende forskjellige arter (merket med lysebrunt i Tabell 2) for videre vekstforsøk på laben. Isolatene ble dyrket opp på nøytralt medium (til sen eksponensiell vekstfase) før de ble overført til enten sterilfiltrert eller ubehandlet overflatevann fra Maridalsvannet uten andre tilsetninger. Det ble benyttet ett isolat per dyrkingskolbe, som ble satt på svak risting i mørke under temperaturkontroll (20°C) og vekstforløpet ble fulgt i én uke. I tillegg ble det satt opp to kontroller (sterilfiltrert og ubehandlet Maridalsvann uten tilsats av isolat).

Tilsvarende vekstforsøk ble gjort med ett av isolatene fra råvannsinntaksprøven fra 15. august. Vekstforsøkene ble da gjort ved ulike vanntemperaturer (4,5 °C, 12 °C, 16 °C og 20 °C) i vann hentet fra nordenden av Maridalsvannet (der Dausjøelva kommer ut i Maridalsvannet) og i sørenden av Maridalsvannet nede ved Oset. Det ble også gjort forsøk med vann fra andre områder i nordenden av Maridalsvannet (nær utløpet av Skjærsjøelva, nær utløpet av Lautabekken) og viktige tilførselsbekker her (Lautabekken nedenfor beverdam), samt tilsats av (et noe tilfeldig utvalg av) naturlig forekommende plantemateriale funnet i området (beverhakk og frø fra trær).

2.1 Resultater med juni-isolater

Resultatene fra vekstforsøkene gjort i sterilfiltrert Maridalsvann (venstre del av Figur 7) viser at isolatene M7, M9 og M11 har potensiale for å kunne vokse i Maridalsvannet. At de samme isolatene ikke vokste i det ubehandlede vannet tyder på at de under normale forhold blir utkonkurrert av andre bakterier i vannet.



Figur 7. Vekstforsøk i sterilfiltrert og ubehandlet Maridalsvann med utvalgte koliforme bakterier isolert fra Maridalsvannet 18. juni. Merk at y-aksen i figuren til venstre er logaritmisk.

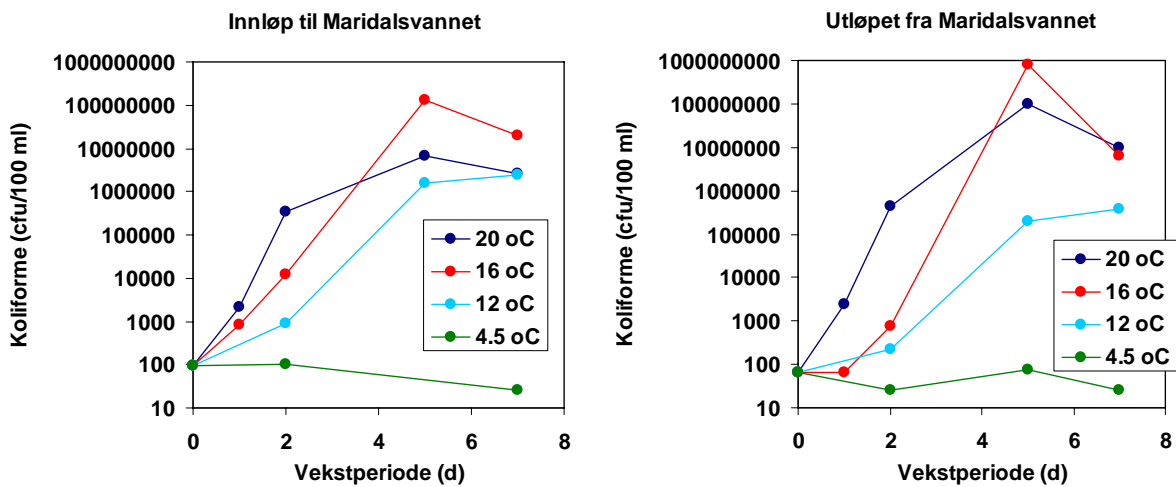
2.2 Resultater med august-isolater

Ett av de 10 identiske isolatene fra råvanninntaksprøven til Oset vannverk 15.08 ble plukket ut til vekstforsøk på laben for å besvare følgende spørsmål:

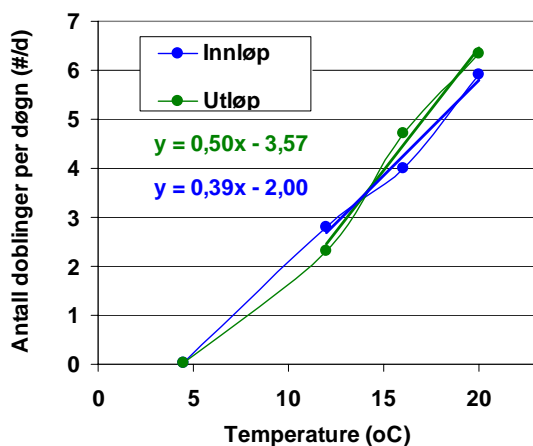
1. I hvilken grad vil bakterien kunne vokse – med og uten – konkurranse fra andre bakterier og beitende organismer?
2. Hvordan temperaturen påvirker veksthastigheten – med og uten – konkurranse fra andre bakterier og beitende organismer?

3. Hvor høy bakterietetthet kan man forvente – med og uten – konkurranse fra andre bakterier og beitende organismer?
4. Er det noen av elvetilløpene eller noen kjemiske komponenter (substrat) i vannet som fremmer veksten mer enn andre?

Figur 8 viser resultatene fra vekstforsøk ved 4 ulike temperaturer over en vekstperiode på 7 dager i sterilfiltrert Maridalsvann. Vekstprofilene viser tydelig at vekstpotensialet til isolatet er høyt i dette vannet, både i vann hentet fra nordenden av Maridalsvannet (innløp) og i sørenden ved Oset (utløp). Som Figur 9 antyder var det en tilnærmet lineær sammenheng mellom den maksimale veksthastigheten, målt som antall doblinger per døgn, og temperaturen i vannet med en forventet minimumstemperatur i vannet på ca 5-7 °C for å få vekst av isolatet. Det må poengteres at det her er snakk om relativt grove estimater for den maksimale veksthastigheten.



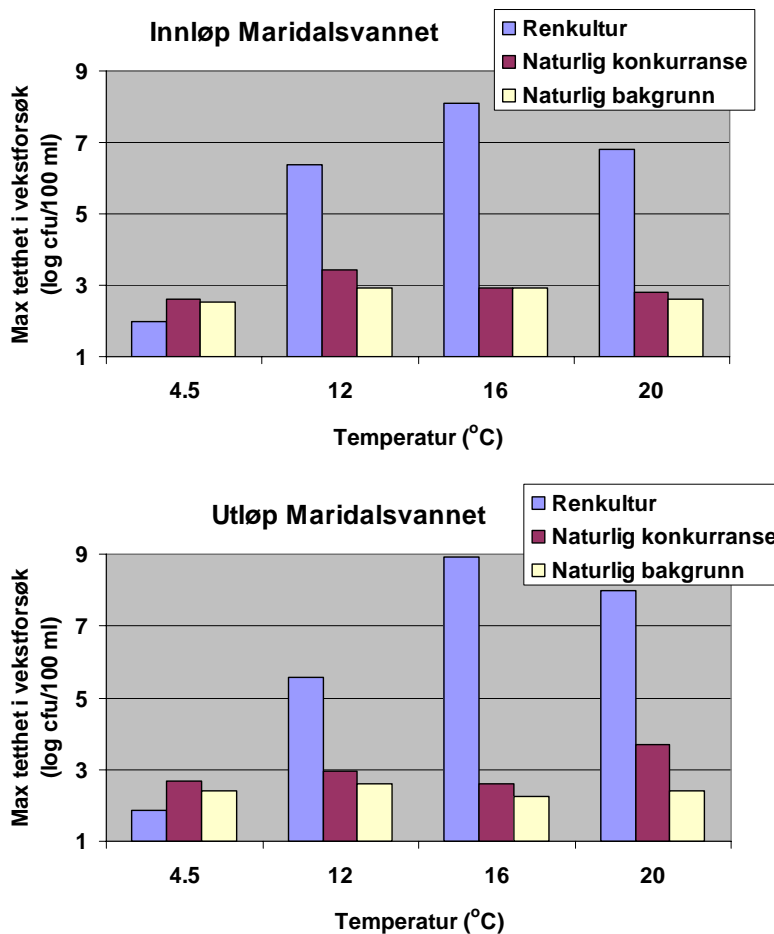
Figur 8. Resultater fra vekstforsøk med isolat fra råvannsinntaket til Oset vannverk 15.08.07 ved 4 ulike temperaturer over en vekstperiode på 7 dager i sterilfiltrert vann fra innløpet til (venstre side) og utløpet fra (høyre side) Maridalsvannet.



Figur 9. Estimert maksimal doblingshastighet (antall doblinger per døgn) for isolatet i sterilfiltrert Maridalsvann i temperaturområdet 4,5-20 °C.

Figur 10 illustrerer effekten av konkurranse med andre normalt forekommende bakterier og beitende organismer i vannet. Figuren viser den høyeste celletettheten (NB: log-skala) av koliforme bakterier oppnådd i løpet av syvdagersperioden i renkultur (sterilfiltrert vann) og med naturlig konkurranse i vann hentet fra nordre del av Maridalsvannet (der Dausjøelva kommer ut i Maridalsvannet) og i vann

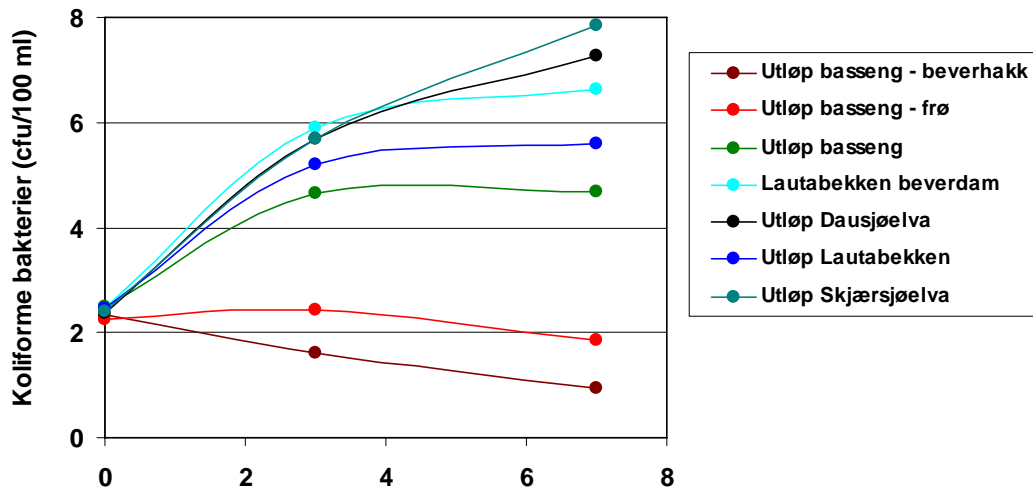
fra sørenden av Maridalsvannet nede ved Oset. Den naturlige bakgrunnen (ingen tilsats av isolat) er tatt med som kontroll. For begge vanntypene var det tydelig at tilstedeværelsen av konkurrerende bakterier og/eller beitende organismer hadde en betydelig effekt på tilveksten av koliforme bakterier. At alle prøvene tatt fra utløpsflaskene med naturlig forekommende konkurranse viste høyere maksimale koliformtall enn den naturlige bakgrunnen gir en viss indikasjon på at hvor vidt vannet kom fra innløpet eller utløpet av Maridalsvannet kunne ha en viss betydning for konkurranseforholdet mellom heterotrofe og øvrige bakterier i vannet. Uten konkurranse fra andre bakterier eller fra beitere kunne man altså forventet så høye celletall som 10^7 - 10^9 cfu per 100 ml for denne isolerte koliforme bakterien. Med konkurrerende bakterier/beitere til stede og korrigert for bakgrunnen var det høyeste celletallet vi fant på 4700 cfu/100 ml, mens gjennomsnittet for alle flaskene i temperaturområdet 12-20 °C var på 1255 cfu/100 ml, men med et standardavvik så høyt som 100%.



Figur 10. Maksimal celletettheten av koliforme bakterier ved ulike vanntemperaturer oppnådd i løpet av syvdagersperioden i renkultur (sterilfiltrert vann) og med naturlig konkurranse i vann hentet fra nordre del av Maridalsvannet (øvre delfigur) og i vann fra sørenden av Maridalsvannet (nedre delfigur). Den naturlige bakgrunnen (ingen tilsats av isolat) er tatt med som kontroll.

For å svare på det fjerde av spørsmålene stilt ovenfor ble det også gjort forsøk med sterilfiltrert vann fra andre områder i nordenden av Maridalsvannet (nær utløpet av Skjærsvjelva, nær utløpet av Lautabekken) og viktige tilførselsbekker her (Lautabekken nedenfor beverdam), samt tilsats av (et noe tilfeldig utvalg av) naturlig forekommende plantemateriale funnet i området (7 g/l beverhakk/flis og 2 g/l frø/kapsler fra trær). Resultatene er vist i Figur 11 og viser at vannkilden tilsynelatende kan ha vesentlig betydning for potensialet for vekst av isolatet. Samtidig indikerer resultatet noe av

problematikken i selve tolkningen av resultatene fra denne typen forsøk. Dette forsøket ble gjort en uke før forsøket beskrevet ovenfor (Figur 10) og vannet hentet fra sørenden av Maridalsvannet ved Oset ble ved begge tilfeller hentet inn på samme sted men altså med én ukes mellomrom. Resultatet fra dette første forsøket vist i Figur 11 antyder at isolatet her har fått veksten begrenset av mangel på substrat (kan være nær sagt hva som helst) og/eller kan være hemmet av en giftvirkning av et eller annet. Det blir kun spekulasjoner å gå videre med en tolkning av dette. Tilsats av beverhakk/flis og frø/kapsler til det samme vannet førte imidlertid til en tydelig svekket vekstevne hos isolatet. Denne effekten vil være konsentrasjonsavhengig, men det ble kun testet én relativt høy konsentrasjon av hver tilsetning.



Figur 11. Veksthastighet av isolat i steriltfiltrert vann hentet fra ulike steder i Maridalsvannet og etter tilsats av beverhakk/flis eller frø/kapsler til utløpsvann fra Maridalsvannet.

3. Oppsummering

3.1 Bekreftelse av hypotesen

Følgende hypotese skulle besvares: ”Forhøyet antall koliforme bakterier i vanninntaket i august måned skyldes vekst i vannkilden, dvs de skyldes ikke fekal forurensning”

Som listet opp i det opprinnelige tilbudet ville hypotesen styrkes (men svekkes ikke nødvendigvis ved fravær) av følgende observasjoner:

- Den horisontale fordelingen av koliforme bakterier i Maridalsvannet er tilnærmet uniform.
- De koliforme bakterier som isoleres fra vannmassene er av en type som vil kunne være bestandeler av en naturlig bakterieflora i overflatevann.
- Man isolerer de samme isolatene både i juni og i august, og den totale (estimerte) mengden av disse har økt vesentlig i denne perioden.
- Disse isolatene vokser i Maridalsvann i mørke under sommerlige temperaturer, som beskrevet for labforsøkene.
- Man ville ikke oppnådd de samme konsentrasjonene av koliforme bakterier i vanninntaket uten at de hadde formert seg i vannkilden.

I det foregående har de fleste av disse punktene blitt verifisert positive:

- Den observerte økningen i koliforme bakterier i tidsrommet fra midten av juni til midten av august skjedde relativt uniformt over hele bassengets utstrekning; i gjennomsnitt en 50x økning (15-190x) og resultatene indikerer at man kan forvente den tilnærmedesvis samme dybdeprofilen uansett hvor man befinner seg i bassenget.
- Alle ti isolater av koliforme bakterier funnet på råvannsinntaket 15.08 var mest sannsynlig identiske og av en slik art at de vil kunne være bestandeler av en naturlig bakterieflora i overflatevann. Dette utelukker mest sannsynlig blant annet måker som kilden til bakterien.
- Bakteriearten som ble isolert som klart dominerende organisme i august var ikke blant isolatene som ble funnet i juni, men dette utelukker ikke dens tilstedeværelse også da. Funnene indikerer derimot at denne bakterien har hatt spesielt gode vekstbetingelser i perioden frem til august.
- Resultatene fra vekstforsøkene antyder at den isolerte koliforme bakterien vil kunne vokse ved relativt lave temperaturer; nedre grense estimert til 5-7 °C. Funn av bakterien på råvannsinntaket sammenfalt med en målbar temperaturøkning i dette vannsjiktet fra 5,0 °C til 5,5 °C.

På bakgrunn av disse resultatene står det rimelig klart at hypotesen er verifisert.

NIVA gjennomfører for tiden også modellsimuleringer med en tredimensjonal modell for bl.a. å bestemme det forventede konsentrasjonsintervallet av koliforme bakterier i vanninntaket i august. Denne modellen vil også kunne ta hensyn til faktorer som at selve vanninntaket vil kunne påvirke strømningsforholdene i området og vil kunne trekke inn vann fra høyere oppe i vannsøylen. Resultatene fra denne simuleringen vil kunne styrke (evt svekke) hypotesen.

Vedlegg A. Rådata

Prøveuttak: 18.06.07

Punkt	Dybde	Analytica/Norsk Matanalyse		NIVA
		Koliforme bakterier	<i>E. coli</i>	Koliforme bakterier
		cfu/100 ml	cfu/100 ml	cfu/100 ml
1	1	1	1	5
	5	3	3	8
	15	<1	<1	3
	35	<1	<1	<1
2	1	<1	<1	6
	5	2	1	9
	15	<1	<1	1
	35	<1	<1	3
3	1	1	<1	9
	5	<1	<1	6
	15	<1	<1	2
4	1	2	2	5
	5	2	1	15
Inntak	35	<1	<1	<1

Prøveuttak: 15.08.07

Punkt	Dybde	Analytica/Norsk Matanalyse		NIVA
		Koliforme bakterier	<i>E. coli</i>	Koliforme bakterier
		cfu/100 ml	cfu/100 ml	cfu/100 ml
5	1	250	18	190
	5	200	24	120
6	1	200	9	200
	5	210	14	190
	15	65	5	190
	35	80	4	160
7	1	400	16	630
	5	200	19	260
	15	97	2	120
8	1	450	19	270
	5	260	14	250
	15	98	<1	130
9	1	260	16	350
	5	260	21	260
	15	87	3	100
Inntak	35	55	1	80

Vedlegg B. Rådata PCR-sekvensering og BLAST-søk

PCR-sekvensering

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

M9-1F TAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAG 60
M9-2F TAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAG 54
M1-1F -----ATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAG 27
M1-2F TAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAG 54
      *****

M9-1F TCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACGCACCTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCG 120
M9-2F TCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACGCACCTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCG 114
M1-1F TCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACGCACCTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCG 87
M1-2F TCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACGCACCTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCG 114
      *****

M9-1F AGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCA 180
M9-2F AGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCA 174
M1-1F AGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCA 147
M1-2F AGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCA 174
      *****

M9-1F TGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTT 240
M9-2F TGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTT 234
M1-1F TGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTT 207
M1-2F TGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTT 234
      *****

M9-1F CCCGGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAA 300
M9-2F CCCGGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAA 294
M1-1F CCCGGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAA 267
M1-2F CCCGGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAA 294
      *****

M9-1F CATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCA 360
M9-2F CATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCA 354
M1-1F CATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCA 327
M1-2F CATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCA 354
      *****

M9-1F CTAAGGTATCTTACCAAATTCGTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCA 420
M9-2F CTAAGGTATCTTACCAAATTCGTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCA 414
M1-1F CTAAGGTATCTTACCAAATTCGTGGATGTCAAGAGTA----- 366
M1-2F CTAAGGTATCTTACCAAATTCGTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCA 414
      *****

M9-1F TCGAATTAACCACATGCTC- 440
BM9-2F TC----- 416
M1-1F -----
A5M1-2F TCGAATTAACCACATGCTCC 435
    
```

BLAST-søk

DQ248272.1	Uncultured soil bacterium clone TB8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	736	736	100%
DQ248291.1	Uncultured soil bacterium clone TD4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	730	730	99%
DQ248285.1	Uncultured soil bacterium clone TA3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	730	730	99%
DQ248279.1	Uncultured soil bacterium clone TA1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	730	730	99%
DQ248278.1	Uncultured soil bacterium clone TB2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	730	730	99%
DQ248276.1	Uncultured soil bacterium clone TA7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	730	730	99%
DQ248275.1	Uncultured soil bacterium clone TA5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	730	730	99%
DQ248262.1	Uncultured soil bacterium clone TC5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	730	730	99%
DQ248245.1	Uncultured soil bacterium clone UC6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	730	730	99%
DQ248277.1	Uncultured soil bacterium clone TA2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	725	725	99%