

Hurtigmetoder for online deteksjon av mikrobiell forurensning i vann



RAPPORT

Hovedkontor

Gaustadalléen 21
0349 Oslo
Telefon (47) 22 18 51 00
Telefax (47) 22 18 52 00

Internett: www.niva.no

NIVA Region Sør

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

NIVA Region Innlandet

Sandvikaveien 59
2312 Ottestad
Telefon (47) 22 18 51 00
Telefax (47) 62 57 66 53

NIVA Region Vest

Thormøhlensgate 53 D
5006 Bergen
Telefon (47) 22 18 51 00
Telefax (47) 55 31 22 14

NIVA Danmark

Njalsgade 76, 4. sal
2300 København S, Danmark
Telefon (45) 39 17 97 33

Tittel Hurtigmatoder for online deteksjon av mikrobiell forurensning i vann	Løpenummer 7288-2018	Dato 03.09.2018.
Forfatter(e) Aina Charlotte Wennberg og Maria Thérèse Hultman	Fagområde Vann og avløp	Distribusjon Åpen
	Geografisk område Norge	Sider 60

Oppdragsgiver(e) Nedre Romerike Vannverk IKS	Markus Rawcliffe
	Utgitt av NIVA Prosjektnummer 180049

Sammendrag

Dagens krav til overvåking av hygienisk vannkvalitet for drikkevann og badevann inkluderer kun dyrkingsmetoder som tar ett til tre døgn å analysere. For bedre å kunne vurdere og håndtere hygienisk risiko er det et ønske om hurtigere metoder for å gi raskere svar og å kunne gjøre hyppigere analyser. Den «ideelle metode» som både gir analyseresultat i nær sanntid, er enkel/billig og samtidig er sensitiv og spesifikk nok til å avgjøre om vannet holder drikkevannskvalitet vil man neppe lykkes med å utvikle i nær fremtid. Likevel, for ulike anvendelser i vannbransjen er det potensial for å ta i bruk og videreutvikle forbedrede metoder, som kan gi betydelig tilleggsverdi sammenlignet med dagens dyrkingsmetoder. I arbeidet med å etablere nye metoder er det viktig å fokusere på hvilke funksjonskrav som er absolutte for ulike anvendelser, deriblant krav om analysetid, deteksjonsgrense og spesifisitet, og basere seg på analyseprinsipp som vil være i stand til å møte disse funksjonskravene. Denne rapporten oppsummerer behovene for forbedrede metoder innen forskjellige bruksområder: kontinuerlig overvåking av råvann, risikokartlegging av råvannskilder, overvåking av rensetrinn på vannbehandlingsanlegg, hendelsesvarsel på ledningsnett, lekkasjesøk fra avløpsnettet og badevannsovervåking. Alternative metoder for hurtig deteksjon av hygienisk vannkvalitet som enten er kommersielt tilgjengelig eller under utvikling er beskrevet under følgende kategorier: Dyrkingsmetoder, enzymbaserte metoder, molekylære metoder, celledetellingsanalyser og sensorer. Verktøy for oppkonsentrering av vannprøver og modellering av vannkvalitet er også beskrevet. Det er gjort en vurdering av hvilke metoder som har størst potensial for bruk eller videreutvikling innen de forskjellige områdene for overvåking av vannkvalitet.

Fire emneord	Four keywords
1. Bakterieanalyse	1. Bacterial analysis
2. Sensorer	2. Sensors
3. Vannbransjen	3. Water utilities
4. Sikkert drikkevann	4. Safe drinking water

Denne rapporten er kvalitetssikret iht. NIVAs kvalitetssystem og godkjent av:

Aina Charlotte Wennberg
Prosjektleder

Adam Lillicrap
Forskningsleder

ISBN 978-82-577- 7023-5
NIVA-rapport ISSN 1894-7948

Hurtigmetoder for online deteksjon av mikrobiell forurensning i vann

Forord

Denne rapporten er skrevet av NIVA i oppdrag fra Nedre Romerike Vannverk IKS i forbindelse med et forprosjekt finansiert av programmet FORKOMMUNE i forskningsrådet (prosjektnummer 280729). Bakgrunnen for prosjektet er ønsket om forbedret analysemetodikk for hygienisk sikkerhet i vannbransjen, identifisert som et av satsningsområdet av Teknologiutviklingsnettverket i Norsk Vann.

Jeg vil takke følgende personer for viktige bidrag til rapporten:

Jan Morten Søraker, Nedre Romerike Vannverk AS

Anna-Lena Beschorner, Oslo Kommune, Vann og Avløpsetaten

Karin U. Sogn, Asker og Bærum Vannverk IKS

Vigørn Bernhard Gregers Arntzen, Fredrikstad Kommune

Christen Ræstad, Kompetansemegler Vestfold

Tor Gunnar Jantsch, Fredrikstad vann-, avløp- og rennvasjonsforetak (FREVAR) KS

Og en spesiell takk til Ingun Tryland, Norsk Vann, for å ta initiativ til søknaden og bidra til prosjektet ved å dele erfaring, innspill, nettverk, rådgiving og diskusjoner.

Rapporten forsøker å dekke to behov:

1. gi vannbransjen en oversikt over hva man kan forvente av resultater fra forskjellige analyseprinsipper
2. gi forskere og metodeutviklere en oversikt over hva som er viktige faktorer ved utvikling av nye metoder

Det har vært en utfordring å dekke begge disse behovene i en rapport uten at den skulle bli for lang, eller inneholde for mye eller for lite detaljer. Løsningen har vært å strukturere kapittelet som beskriver metodene (kapittel 4) slik at man kan velge ønsket detalj-nivå: Hvert avsnitt er innledet med en boks som gir en helhetsvurdering av metodene uten for mye detaljer etterfulgt av en tabell med muligheter og begrensinger. Deretter følger mer detaljerte beskrivelser av metodene med eksempler fra publisert litteratur.

Oslo, August 2018

Aina Charlotte Wennberg



Innholdsfortegnelse

Forord	4
Forkortelser og akronymer	8
1 Bakgrunn	9
1.1 Krav til overvåking av vannkvalitet	9
1.2 Dagens metoder for overvåking av hygienisk vannkvalitet	11
1.3 Morgendagens overvåkingssystem	11
2 Metode: kartlegging av behov og muligheter	12
2.1 Innhenting av informasjon om behov og ønsker	12
2.2 Systematisering av ønsker og formulering av krav	12
2.3 Oversikt over tilgjengelige metoder	12
2.4 Vurdering av metoder opp mot krav	13
3 Behov og funksjonskrav til nye sensorer	13
3.1 Råvannsovervåking	13
3.2 Overvåking av rensetrinn	14
3.3 Ledningsnett – hendelsesvarsel eller overvåking	15
3.4 Avløpsvann – lekkasjesøk	16
3.5 Badevannsovervåking	16
4 Alternative metoder for hurtig deteksjon av mikrobiell forurensing	17
4.1 Dyrkingsmetoder	17
4.2 Enzybaserte analyser	20
4.3 Molekylære analyser	26
4.4 Celletellinganalyser	32
4.5 Sensorer	36
4.6 Oppkonsentreringsmetoder	42
4.7 Modellering	43
5 Hvilke metoder dekker hvilke behov	45
5.1 Råvannsovervåking	45
5.2 Overvåking av rensetrinn på vannbehandlingsanlegg	47
5.3 Ledningsnett – hendelsesvarsel eller overvåking	48
5.4 Avløpsvann – lekkasjesøk	49
5.5 Badevannsovervåking	49
6 Diskusjon / Veien videre	50
Referanser	53

Sammendrag

Dagens krav til overvåking av hygienisk vannkvalitet for drikkevann og badevann inkluderer kun dyrkingsmetoder som tar ett til tre døgn å analysere. Det betyr at publikum stort sett er blitt eksponert for vannet før man får analysesvarene, og metodene benyttes først og fremst for dokumentasjon og trendanalyser. For bedre å kunne vurdere og håndtere hygienisk risiko er det et ønske om hurtigere metoder for å gi raskere svar og å kunne gjøre hyppigere analyser. Den ideelle metode som både gir analyseresultat i nær sanntid, er enkel/billig og samtidig er sensitiv og spesifikk nok til å avgjøre om vannet holder drikkevannskvalitet har vært forsøkt utviklet i flere tiår uten å lykkes. Man vil neppe lykkes med å få frem en slik «ideell metode» i nær fremtid.

Den største utfordringen er å oppnå god nok sensitivitet, uten tidkrevende og gjerne kostbar forbehandling, for å kunne påvise så lave nivåer av hygienisk forurensning at vannet vurderes som helsemessig trygt å drikke. Likevel, for ulike anvendelser i vannbransjen er det potensial for å ta i bruk og videreutvikle forbedrede metoder, som kan gi betydelig tilleggsverdi sammenlignet med dagens dyrkingsmetoder. For noen formål kan det være nyttig med et tidlig varsel om høy grad av mikrobiell forurensning, selv om metoden ikke har den nødvendige presisjonen som kreves for drikkevannsanalyser.

I arbeidet med å etablere nye metoder er det viktig å fokusere på hvilke funksjonskrav som er absolutte for ulike anvendelser, deriblant krav om analysetid, deteksjonsgrense og spesifisitet, og basere seg på analyseprinsipp som vil være i stand til å møte disse funksjonskravene. Denne rapporten oppsummerer behovene/funksjonskravene for forbedrede metoder innen forskjellige bruksområder: kontinuerlig overvåking av råvann, risikokartlegging av råvannskilder, overvåking av rensetrinn på vannbehandlingsanlegg, hendelsesvarsel på ledningsnett, lekkasjesøk fra avløpsnett og badevannsovervåking.

Alternative metoder for hurtig deteksjon av hygienisk vannkvalitet som enten er kommersielt tilgjengelig eller under utvikling er beskrevet under følgende kategorier: Dyrkingsmetoder, enzybaserte metoder, molekylære metoder, celletellingsanalyser og sensorer. Verktøy for oppkonsentrering av vannprøver og modellering av vannkvalitet er også beskrevet.

Basert på krav til forskjellige former for overvåking av vannkvalitet og styrker og svakheter ved metodene, er det gjort en vurdering av hvilke metoder som har størst potensial for bruk eller videreutvikling innen de forskjellige områdene. Det var ikke mulig å konkludere med en metode som var egnet for hver anvendelse fordi alle metodene har noen svakheter i forhold til de absolutte funksjonskravene. Det er derimot gjort en vurdering av styrker og svakheter for de metodene som var mest lovende for hver av anvendelsesområdene. I diskusjonen er det også gjort en vurdering av hvilken tidshorisont man kan forvente for utvikling av forskjellige metoder.

Summary

Title: Rapid methods for online detection of microbes in water

Year: 2018

Author(s): Aina Charlotte Wennberg and Maria Thérèse Hultman

Source: Norwegian Institute for Water Research, ISBN 978-82-577- 7023-5

Today's regulation for monitoring of hygienic water quality requires the use of cultivation methods using indicator bacteria that takes one to three days for analysis. This means that the population in most cases is already exposed to the water by the time the analytical results are known, and that the methods foremost are used for documentation and trend analysis of water quality. It is desirable with more rapid methods to give quicker analytical results and to do more frequent analysis, and more specific analysis to do microbial risk assessments. The development of an ideal method that will both give a real-time result, is easy to use and cost efficient and at the same time sensitive and specific enough to determine if the water is safe for drinking has been attempted for several decades without success. Unfortunately, the "ideal method" will probably not be developed soon either.

The biggest challenge to develop new methods is to achieve the required sensitivity without too extensive and costly pre-treatments to document that the water is of acceptable hygienic water quality for drinking. However, within the water sector, there are other needs for water testing that has the potential to use and develop new and improved methods that can give a considerable added value compared with the standard cultivation methods. For some purposes, an early warning system for high loads of microbial pollution can be useful, even if the method is not sensitive enough to measure drinking water quality.

It is important to focus on what properties of the methods are absolutely required for the intended use during the process of developing new methods. This includes consideration of the time for analysis, detection limits and how specific it needs to be, and base the methods on analytical principles that can meet these absolute requirements. This report summarizes the properties that must be fulfilled to improve the methods within the different uses in the water sector which includes: continuous monitoring of raw water for drinking water, risk assessment of source water, monitoring of drinking water treatment, incident alarms for the distribution system, leakage detection from waste water pipes and bathing water monitoring.

Alternative methods for rapid detection of hygienic water quality, including both commercially available methods and newly developed methods, is described under the following categories: Culture based methods, enzymatic methods, molecular methods, cell counting and sensors. Tools for concentrating water samples and modeling of water qualities are also described.

An assessment of what methods has the biggest potential to be used or developed for the different uses has been based on the requirements of different water monitoring needs and the strengths and weaknesses of the different analytical methods. It was not possible to conclude that a single method was best for any of the intended uses, since all have some weaknesses related to the requirements of that use. However, the strengths and weaknesses of the most promising methods are discussed for each use. A discussion of the time needed for development of the different methods is also given.

Forkortelser og akronymer

ALP	Alkalisk fosfatase (enzym assosiert med totaltall bakterier (levende))
ATP	Adenosin trifosfat (biomolekyl som brukes i energioverføring)
CFU	Koloniformende enhet, kim (Colony forming unit)
EPA metode	Amerikansk standard (United states) Environmental Protection Agency
FCM	Flowcytometer
FHI	Folkehelseinstituttet
FISH	Fluorescerende in situ/i prøve hybridisering
GAL	<i>Beta</i> -D-galactosidase (enzym assosiert med koliforme bakterier)
GUS	<i>Beta</i> -D-glucuronidase (enzym assosiert med <i>E. coli</i>)
ISO	International organization for standardization
MF	Membran filtrering
MFU	Modified Fishman Units (mål på fluorescens)
ml	milliliter (en 1000-dels liter)
MPN	Metode med mest sannsynlig tall (Most probable number)
MST	Mikrobiell kildesporing (Microbial source tracking)
MUF	Methylumbelliferyl. Produkt av enzymreaksjonen til GUS
NASBA	Nukleinsyre sekvens-basert amplifisering (Nucleic acid sequence based amplification)
PCR	Polymerase kjedereaksjon (Polymerases chain reaction) analyse ved amplifisering av spesifikk DNA sekvens)
PI	Propidium iodid (DNA-fargestoff som trenger inn i døde celler)
SFT	Statens forurensingstilsyn, nå Miljødirektoratet
TKB	Termotolerante koliforme bakterier
VBNC	Levende, men ikke dyrkbare organismer (Viable but not culturable)
µl	mikroliter (en 1 000 000-dels liter)

1 Bakgrunn

1.1 Krav til overvåking av vannkvalitet

Det finnes minimumskrav til overvåking av drikkevann og produksjon og distribusjon av drikkevann. For friluftsbad finnes det kun anbefaling for overvåking. Disse kravene og anbefalingene dikterer både analysemetode, tiltaksverdier, grenseverdier og nødvendige deteksjonsgrenser. I tillegg er det krav om risikovurderinger for å sørge for at befolkningen ikke utsettes for mulig helsefare. Det betyr at det ofte vil være nødvendig med analyser utover minimumskravet for å vite om man har tilstrekkelig vannkvalitet til enhver tid.

1.1.1 Drikkevannsforsyning

Drikkevannsforskriften (FOR-2016-12-22-1868) regulerer kravet til overvåking av råvann, renseprosessen i vannverkene, og drikkevann på ledningsnettet.

Paragraf 5 Grenseverdier, konstaterer at: «vannverkseieren skal sikre at drikkevannet er helsemessig trygt, klart og uten fremtredende lukt, smak og farge. Drikkevannet skal ikke inneholde virus, bakterier, parasitter, andre mikroorganismer eller stoffer som i antall eller konsentrasjon utgjør en mulig helsefare og overholde grenseverdiene i vedlegg 1. (...)»

Forskriften inneholder både et minstekrav til antall prøver som skal tas fra råvann (§20) og drikkevannet (§21), samt to vedlegg med parametere som skal analyseres og hvilke tiltaks- og grenseverdier man skal forholde seg til. Tabell 1 og 2 under oppsummerer minstekravene til prøvetaking og de hygieniske analyseparametere (de kjemiske parametere er utelukket i denne rapporten). I tillegg skal vannverkseieren i henhold til §6 «*identifisere farene som må forebygges, fjernes eller reduseres til et akseptabelt nivå for å sikre levering av tilstrekkelige mengder helsemessig trygt drikkevann som er klart og uten fremtredende lukt, smak og farge. (...)»* For å oppfylle kravet i §6 kan det være nødvendig med ytterligere prøvetaking enn hva som er gitt i §20 og §21 som minstekrav, inkludert analyse av andre parametere enn gitt i vedleggene. Det er også et krav om at uttak og analyser av prøver «*skal foretas i samsvar med internasjonale eller nasjonale standarder når slike foreligger. Der vedlegg 1 eller vedlegg 2 angir krav til analysemetoder, skal disse benyttes. Laboratoriene som benyttes, skal være akkreditert for de aktuelle analysene.»*

Tabell 1. Minstekrav til prøvetaking og analyse av råvann (Drikkevannsforskriften §20)

Produsert vann per døgn (m ³)	Råvannsprøver per år	Hygieneparametere
a) Til og med 10	1	<i>E. coli</i>
b) Fra 10 til og med 2 000	4	<i>E. coli</i> ,
c) Fra 2 000 til og med 6 000	8	intestinale enterokokker,
d) Fra 6 000	12	koliforme bakterier

Tabell 2. Minstekrav til prøvetaking av drikkevann (Drikkevannsforskriften §21) inkludert analyseparametere for grenseverdier (Drikkevannsforskriften Vedlegg1) og tiltaksgrenser (Drikkevannsforskriften Vedlegg2) for de hygieniske parameterne.

Produsert vann per døgn (m ³)	Drikkevannsprøver for prøvegruppe A		Drikkevannsprøver per år for prøvegruppe B	
	Antall per år X er m ³ produsert vann per døgn	Parameter med grense- eller tiltaksverdier	Antall per år X er m ³ produsert vann per døgn	Parameter med grense- eller tiltaksverdier
a) Til og med 10 og ingen sårbare abonnenter	1	<i>E. coli</i> Grenseverdi: 0 per 100ml	0	<i>Clostridium perfringens</i> (inkludert sporer) Tiltaksgrense: 0 per 100ml
b) Fra 10 til og med 100, eller mindre med sårbare abonnenter	4	Intestinale enterokokker Grenseverdi: 0 per 100ml	0,5 = 1 hvert annet år	
c) Fra 100 til og med 1000	4	Kimtall 22°C Tiltaksgrense: 100 per ml og ingen unormal endring	1	
d) Fra 1000 til og med 10 000	4 + (3X / 1 000)		1 + (X / 3 300)	
e) Fra 10 000 til og med 100 000	4 + (3X / 1 000)		3 + (X / 10 000)	
f) Fra 100 000	4 + (3X / 1 000)		10 + (X / 25 000)	
		Koliforme bakterier Tiltaksgrense: 0 per 100ml		

1.1.2 Badevannskvalitet, friluftsbad

I Norge har vi ikke en egen forskrift for krav til overvåking av friluftsbad (badestrender), men det finnes Vannkvalitetsnormer fra 1994 (SFT nå Klif) og EUs badevannsdirektiv som har føringer for prøvetaking og grenseverdier se tabell 3 ².

Tabell 3. Grenseverdier for badevann i henhold til norsk norm og EUs badevannsdirektiv

		Utmerket	God	Mindre god / Tilstrekkelig	Ikke akseptabel
Norsk norm	TKB/100ml		<100	100-1000	>1000
	Fekale streptokokker /100ml		<100	100-1000	>1000
EU direktiv ferskvann	Intestinale enterokokker/100ml	200*	400*	330**	
	<i>E. coli</i> /100ml	500*	1000*	900**	
Eu direktiv sjøvann	Intestinale enterokokker/100ml	100*	200*	185**	
	<i>E. coli</i> /100ml	250*	500*	500**	

* Basert på at 95 % av prøvene skal være bedre enn angitt verdi

** Basert på at 90 % av prøvene skal være bedre enn angitt verdi

Den norske normen anbefaler ukentlig prøvetaking i badesesongen, og ekstra prøvetaking om en prøve har dårlige verdier. EUs badevannsdirektiv krever minimum 4 prøver per sesong i minimum 4 år for å gjøre en vurdering av lokaliteten som egnet badestrand ved å beregne 90 eller 95% percentiler, det vil si at 90 til 95% av prøvene må være innenfor denne normen, men man godtar at enkeltverdier er høyere.

Det er kommunen som har ansvar for å følge opp vannkvaliteten på offentlige strender. Det finnes også et sertifiseringssystem kalt blått flagg for strender som oppfyller en rekke kriterier, og et av dem er utmerket vannkvalitet i henhold til EUs badevannsdirektiv³.

1.2 Dagens metoder for overvåking av hygienisk vannkvalitet

Metodene som er pålagt som minstekrav til drikkevann og anbefalte metoder for badevann er beskrevet i Tabell 4.

Tabell 4. Godkjente metoder for drikkevann (D) og badevann (B) for analyse av hygienisk vannkvalitet. EU: anbefalt metode i EUs badevannsdirektiv, MF: membran filtrering, MPN: metode med mest sannsynlig tall, CFU: koloniformende enhet, kim (Colony forming unit).

Parameter		Metode-referanse	Deteksjonsgrense [CFU/100ml]	Metodikk	Inkubasjonstid [døgn]
<i>E. coli</i> og koliforme bakterier	D/B	ISO 9308-1	1	MF	1
	D	ISO 9308-2	1	MPN	1
	B (EU)	ISO 9308-3		Mikrotitter MPN	1
Termotolerante koliforme bakterier	B	NS 4792	1	MF	1
Intestinale enterokokker	B (EU)	ISO 7899-1		Mikrotitter MPN	
	D/B	ISO 7899-2	1	MF	2
Kimtall 22°C	D	ISO 6222	100	Innstøping agar	3
<i>Clostridium perfringens</i>	D	ISO 14189	1	MF	1

Felles for alle metodene er at de baserer seg på dyrking og vekst av bakterier og det derfor er lang inkubasjonstid som ofte resulterer i at prøvesvaret først ankommer etter at befolkningen er eksponert for vannet. Dette er mest kritisk der det er snakk om grenseverdier, men for tiltaksverdier vil det ta uøndvendig lang tid å undersøke om tiltak er tilstrekkelig når man må vente minst ett døgn for nytt analyseresultat.

Selv om drikkevannsforskriftens §5 konstaterer at drikkevannet ikke skal inneholde virus, bakterier, parasitter, andre mikroorganismer eller stoffer som i antall eller konsentrasjon utgjør en mulig helsefare er det ingen analyser av virus og parasitter i lista over minstekrav. Det skyldes i hovedsak at det ikke finnes eller ikke er etablert gode nok rutineanalyser for disse organismene i vann selv om det er kjent at disse organismene kan gi alvorlige sykdomsutbrudd. Det antas at virus er den hyppigste årsaken til vannbåren sykdom. Ut fra risikovurderingen av drikkevannsforsyningen kan det gjøres ytterligere analyser ut fra behov, og en del vannverk analyserer rutinemessig for parasitten *Giardia* og *Cryptosporidium* etter et utbrudd av *Giardia* i Bergen i 2004. Denne metoden krever oppkonsentrering av 10L vann fordi konsentrasjonen av disse parasittene er så lave, men infektiv dose (hvor mange som må til for å gi sykdom) er lav; det holder å få i seg en parasitt for å bli syk.

1.3 Morgendagens overvåkingssystem

Vannbransjen i Norge via teknologiutviklingsnettverket i Norsk Vann har ytret et ønske om forbedret metodikk for hygienisk overvåking. Ideelt burde mikrobielle parametere være en del av et online overvåkingssystem slik at de kan benyttes til risikovurdering i nær samtid.

Morgendagens overvåkingssystem bør ikke være låst til dagens indikatororganismer og analysemetoder. *E. coli* som indikator på sykdomsrisiko har flere begrensinger, både i forhold til at

den dør lettere enn de fleste patogener, den kan formere seg i gunstig miljø og den skiller ut av de fleste varmblodige dyr i forskjellig konsentrasjoner som i forskjellig grad bidrar til mikrobiell risiko. Samtidig er den per nå den beste indikatoren man har på fekal forurensing, siden den finnes i høye konsentrasjoner i fekalier, gir indikasjon på nylig forurensing fordi den dør lett og er relativt enkelt å analysere for. Det vil mest sannsynlig aldri bli mulig å overvåke alle mulige patogener i vannet vårt, så hygienisk trygt vann i fremtiden må fremdeles basere seg på risikovurderinger og overvåking av indikatorer. Men verktøykassa for input til risikovurderingene og utvalget av indikatorer for overvåking er i ferd med å utvides. Det er derfor viktig å komme med krav til hva verktøykassa skal inneholde i fremtiden, og hvordan verktøyene skal valideres og godkjennes.

2 Metode: kartlegging av behov og muligheter

2.1 Innhenting av informasjon om behov og ønsker

Et spørreskjema ble utviklet for å fange opp ønsker og krav til overvåking av hygieniske parametere i den norske vannbransjen. Spørreskjema ble delt i teknologiutviklingsnettverket til Norsk Vann som består av de 10 største kommunene og interkommunale selskapene. I tillegg ble problematikken diskutert med enkelte personer i vannbransjen, både for å utdype hva man ønsker seg og hva som er minimumskrav for at en ny metode skal være nyttig.

2.2 Systematisering av ønsker og formulering av krav

De aktivitetene i vannbransjen hvor mikrobiell analyse er aktuelt ble listet opp og karakterisert i forhold til forventet variasjon i vannkvalitet.

Faktorer som påvirker krav til sensorer for hver av disse er:

- Tid: hyppighet av analysene, analysetid, online eller punktprøve
- Sensitivitet: deteksjonsgrenser, fare for falske positive eller negative resultater
- spesifisitet: indikator, fekal forurensing, levende/død, patogener
- Presisjon: anvendelse av analyseresultatene, konsekvensene av falske positive eller negative resultater
- Resurser: tilgjengelige ressurser ved prøvetakingspunktene, begrensinger i vannmengder, strømuttak, bemanning, kobles mot andre sensorer

Resultatet av denne systematiseringen er presentert i kapittel 3.

2.3 Oversikt over tilgjengelige metoder

For å få en oversikt over aktuelle metoder for mikrobiell forurensing ble det søkt i publiserte fagfelleverderte tidsskrifter i databasen ISI Web of Science Core collection <http://apps.webofknowledge.com/> og hentet inn informasjon fra prosjektrapporter og andre erfaringer fra brukergruppen.

De aktuelle metodene er strukturert i forhold til forskjellige analyseprinsipper, og styrkene og svakhetene til disse er presentert på generelt grunnlag. Deretter presenteres konkrete eksempler på metodene. Dette er presentert i kapittel 4.

I Danmark gjennomførte DTU miljø en undersøkelse i 2015 om hva som fantes av sensorer for mikrobiell drikkevannskvalitet i samarbeid med fire vannverk⁴. De skrev en rapport med oversikt over hvilke metoder som er på markedet, hvilke som er under utvikling/validering og hvilke som er i forskningsfasen. Metodene ble evaluerte i forhold til «den ideelle sensor» for drikkevannsovervåking i tett samarbeid med vannverkene og kan være nyttig for sammenligning med funnene i denne rapporten. Forfatterne av den danske undersøkelsen konkluderte med at «den ideelle sensor» ikke finnes i dag, og at man muligens ikke skal forsøke å finne én sensor som skal dekke alle behov, men forskjellig sensorer eller kombinasjoner av sensorer for å dekke de forskjellige behovene innen drikkevannsbransjen⁴. I vår rapport forsøker vi å indentifisere og differensiere de forskjellige behovene og kravene til sensorer.

2.4 Vurdering av metoder opp mot krav

For hver av de definerte aktivitetene for mikrobiell overvåking i kapittel 3 er metodekategoriene i kapittel 4 vurdert i kapittel 5. For de metodekategoriene som er best egnet er det gjort en videre vurdering av hva som er begrensningen til metodene per i dag, og hvordan de eventuelt kan forbedres.

3 Behov og funksjonskrav til nye sensorer

3.1 Råvannsovervåking

3.1.1 Kontinuerlig overvåking

Råvannet kommer inn til en bygning hvor det vil være mulighet for installasjon av online sensorer, og de er (tidvis) bemannet. Kobling mot andre sensorer som for eksempel turbiditet, pH, temperatur og fargetall vil være naturlig. For flere vannverk vil vannet fraktes fra råvannskilden til renseanlegget via en tunell eller reservebasseng som gir en forsinkelse fra noen timer til et par døgn. For å gi økt informasjon og sikkerhet til drikkevannsforsyningen er det ønskelig at metoden er hurtig (minutter til timer) og helst online. Dataene kan da kontinuerlig benyttes ved vurdering av om renseprosessen på anlegget er tilstrekkelig til å håndtere en betydelig forverret råvannskvalitet, eller om det må settes inn ekstra tiltak i form av stopping av inntaksvann (dersom man har reservebasseng), ekstra klorering eller i verste fall koke-varsel. Hvilke tiltak man må iverksette ved forhøyede verdier av fekal forurensing av råvann kommer an på renseprosessen og hygieniske barrierer ved renseanlegget, vannkilden og risikovurderingen som er gjort av anlegget. Forskjeller i vannkvalitet for grunnvann, store innsjøer, mindre innsjøer og ubeskyttede elver som vannkilder, og tilhørende omfang av vannbehandling og desinfeksjon på vannbehandlingsanlegget, gjør at kravet til spesifisitet og sensitivitet til sensorene vil variere. Grunnvann og store innsjøer med dypvannsinntak vil sjeldent ha konsentrasjoner av *E. coli* over 1-10 per 100ml, mens små innsjøer vil være noe mer sensitive for forurensing og ha noe høyere konsentrasjoner. For disse råvannene vil det være ønskelig med varsel

når konsentrasjonen overstiger 0 per 100ml (og gjerne et kvantifisert antall heller en presence-absence). For elvevann varierer råvannskvaliteten mer, med typiske konsentrasjoner rundt 10-1000 *E. coli* per 100ml. For slike anlegg kan kvantifisering over 100 per 100 ml og varsel når konsentrasjonen overstiger 1000 per 100ml være tilstrekkelig. Overflatevann vil også inneholde en del elementer som kan virke forstyrrende på sensorer, som alger og turbiditet.

Tabell 5. Krav til sensorer for kontinuerlig overvåking av råvann

Parameter	Viktig - krav	Foretrukket
Tid	Hurtig analyse og hyppig prøvetaking	Online
Sensitivitet	«Rene råvann»: 1-100 CFU/100ml <i>E. coli</i> «Betydelig påvirket råvann»: 100-10 000 CFU/100ml	
Spesifisitet	Indikator fekal forurensing	Helst fra human kilde, helst levende, gjerne patogener
Presisjon	Avhengig av tiltak ved mulig overskridelser: tåler noen falske positive, men ønsker ikke falske negative	
Ressurser		Automatisk registrering/logging av resultater– online og koblet mot andre overvåkingsparametere

3.1.2 Risikokartlegging av kilder/tilførselsbekker i nedbørsfelt

I henhold til drikkevannsforskriften §6 skal det gjøres en risikovurdering av vannforsyningen, og man kan sette krav til begrensninger i aktivitet i nedbørsfeltet til drikkevannskilden ifølge §12. Det kan være aktuelt med overvåking eller prøvekampanjer i tilsigsbekker til råvannskilden for å kartlegge forureningskilder. I denne sammenheng vil det være nyttig både å finne ut:

- Er det betydelig fekal forurensing (*E. coli* eller annen indikator)
- Hva er kilden til forurensingen? Mennesker og dyr som kilde har forskjellig smitterisiko og forskjellige avbøtende tiltak er nødvendig
- Er det spesifikke patogener tilstede?

Punkt c) kan være vanskelig å påvise, og kan kompenseres med teoretiske vurderinger av hvilken trussel forskjellige kilder kan utgjøre. For eksempel vil avrenning fra en septiktank/dårlig fungerende avløpsanlegg utgjøre en betydelig trussel, spesielt om en person der får en mage/tarm-infeksjon og skiller ut store mengder smittestoff, mens avrenning fra et skogsområde med ville dyr vil ha færre potensielle smittestoffer. Da er man derimot nødt til å kunne skille mellom avrenning fra menneskelig aktivitet og dyr.

Tabell 6. Krav til sensorer for overvåking av tilførselsbekker til drikkevannskilder

Parameter	Viktig - krav	Foretrukket
Tid		Hurtigere enn dyringsmetodene
Sensitivitet	100-10 000 CFU/100ml	Så lav som mulig på patogener. 10-100 CFU/100ml for fekale indikatorer
Spesifisitet	Fekal forurensing, kildeopsporing	Helst fra human kilde, helst levende, gjerne patogener
Presisjon	Analysen må være spesifikk og pålitelig.	Begrensninger i presisjon kan kompenseres med å ha flere analyser eller støtteparametere
Ressurser	Felt eller lab-analyse av punkt-prøver	

3.2 Overvåking av rensetrinn

Overvåking av effekt av ulike rensetrinn kan enten være en del av den kontinuerlige driftsovervåkingen, eller det kan være nyttig ved uttesting av ny teknologi eller dokumentasjon ved

spesielle driftsbetingelser som under vedlikehold. Ofte vil fysisk/kjemiske sensorer være best egnet for å overvåke at prosessene går «som normalt», siden disse kan gi resultater kontinuerlig og i sanntid, men for å verifisere at «som normalt» er tilstrekkelig kan man også ønske å inkludere mikrobielle parametere. Forskjellige rensetrinn vil ha forskjellige krav til mikrobielle analysemetoder. Rensetrinn som fysisk fjerner partikler (filter, utfelling og sedimentering) vil kunne overvåkes med de fleste metoder som detekterer organismer, mens rensetrinn som er desinfiserende (UV, klor, ozon) krever at analysemetoden også skiller mellom levende og døde organismer. I tillegg er konsentrasjonene etter desinfeksjon lave og krever svært lav deteksjonsgrense til metoden. Begrepet «levende» er også problematisk etter UV-behandling. Bakteriene mister evnen til vekst etter UV-bestråling, men vil fortsatt ha enzymaktivitet og se hele ut (intakt cellemembran). For driftsovervåking er fysisk/kjemiske sensorer for å kontrollere at desinfeksjonsprosessen fungerer til enhver tid, med til enhver tid tilstrekkelig UV-dose og/eller klorrest, langt viktigere enn sporadiske mikrobielle analyser.

Tabell 7. Krav til sensorer for overvåking av rensetrinn

Parameter	Viktig - krav	Foretrukket
Tid	Hurtig analyse og hyppig prøvetaking	Online
Sensitivitet	Ingen levende bakterier etter desinfeksjon (per ml)1-100 CFU/100ml koliforme bakterier over filter/sedimentering 100 CFU/ml kimtall over filter/sedimentering (driftsparameter)	
Spesifisitet	Etter filter/sedimentering: Bakterier og/eller virus, andre indikatorer Etter desinfeksjon (UV, klor, ozon): levende bakterier, andre indikatorer	Indikator fekal forurensing, Levende/død
Presisjon	Høy presisjon	
Resurser		Automatisk registrering/logging av resultater– online

3.3 Ledningsnett – hendelsesvarsel eller overvåking

Har man kontroll på rensetrinnene vil vannet som sendes ut på ledningsnettet være trygt. Drikkevannet kan derimot potensielt forurennes under distribusjon, for eksempel dersom deler av ledningsnettet mister trykket og man får innsug av fremmedvann. Det skjer stadig hendelser (brudd, feilkoblinger, etc.) som fører til at deler av ledningsnettet må stenges i perioder, og man kan få trykkfall i deler av systemet. Prosedyren er da at man spylor gjennom ledningsnettet som har vært stengt i ett døgn før det kan erklæres for trygt (etter at man har tatt en prøve av *E. coli* som er godkjent). Under slike hendelser kunne det være aktuelt med raskere analysesvar for raskere å kunne friskmelde drikkevannet. Generelt er det ønskelig med kontinuerlige sensorer for å fange opp potensiell forurensning på ledningsnettet. Siden det er snakk om krav til drikkevann vil kravet til deteksjonsgrenser for fekale indikatorer være høy (1 CFU/100ml), men andre indikasjoner på inntrenging av fremmedvann kan vurderes dersom de har bedre deteksjonsgrense ved omregning til fortynningsgrad av kloakk.

Tabell 8. Krav til sensorer for overvåking av ledningsnett

Parameter	Viktig - krav	Foretrukket
Tid	Hurtig analyse og hyppig prøvetaking	Online
Sensitivitet	1 CFU/100ml <i>E. coli</i> eller tilsvarende minst 1:1 000 000 fortynnet kloakk	
Spesifisitet	Indikator fremmedvann	Helst fekal forurensing
Presisjon	Høy grad av presisjon	
Resurser		Feltinstrument som kan settes opp på midlertidig lokasjoner med strøm

3.4 Avløpsvann – lekkasjesøk

Det er et kontinuerlig arbeid å vedlikeholde gammelt ledningsnett for avløpsvann, og det er derfor viktig å vite hvor man skal prioritere arbeidet. Høye verdier av *E. coli* eller fosfor i lokale vassdrag kan skyldes overløp/brudd på ledningsnettet, aktivitet av dyr og fugler, eller avrenning fra jorder. Feltbaserte sensorer som skal brukes til å spore kildene til forurensing i vassdrag vil derfor være veldig nyttig. Enten feltkit som gir direkte svar på grad av forurensing så man kan følge forurensingen til et eventuelt punktutslipp, eller analysemetoder som kan analysere mange prøver på kort tid og gi presise svar på hva som forårsaker forurensingen (fra avløpsnett eller ikke).

Tabell 9. Krav til sensorer for lekkasjesøk på avløpsnett

Parameter	Viktig - krav	Foretrukket
Tid		Feltkit analysetid minutter Eller lab analyser timer
Sensitivitet	Kloakk fortynnet 1:1 000, helst 1:10 000	
Spesifisitet	Indikator fekal forurensing	Helst fra human kilde, helst levende, gjerne patogener
Presisjon	Presisjon kan gå på bekostning av hyppige analyser	
Resurser		Feltkit eller lab

3.5 Badevannsovervåking

Det kan være store variasjoner i vannkvaliteten på strender, på grunn av forurensing fra elver, kloakkoverløp/kloakklekkasjer, store flokker med fugler, forskjell i strøm- og vindforhold, oppvirvling av sedimenter eller utskillelse av bakterier fra badende mennesker. Denne variasjonen skjer ofte over tid, og det er vanskelig å si om man bør stenge en strand på grunn av en eller to enkeltprøver som har høye verdier. Om *E. coli* skyldes en flokk fugler eller et overløp med kloakk påvirker også sykdomsrisikoen ved å bade betydelig. Generelt er det høyere risiko dersom kloakk er kilden til *E. coli* fordi badevannet da med større sannsynlighet inneholder humanatogene virus. Mange steder har man valgt å gi en generell oppfordring om ikke å bade ett til to døgn etter kraftig regnvær fordi man har identifisert at kraftige regnskylt ofte fører til midlertidig høye verdier av fekale bakterier. Det ville vært bedre om man i tillegg hadde en metode for automatisk overvåking av badevannskvaliteten så man ikke trengte å reise rundt for prøvetaking, og gjerne med analysesvar samme dag.

Tabell 10. Krav til sensorer for kontinuerlig overvåking av badevann

Parameter	Viktig - krav	Foretrukket
Tid	Hurtig analyse og hyppig prøvetaking	Online eller feltkit
Sensitivitet	100-1000 CFU/100ml	
Spesifisitet	Indikator fekal forurensing	Helst fra human kilde, helst levende, gjerne patogener
Presisjon	Presisjon kan gå på bekostning av hyppige analyser	
Resurser		Feltkit, batteri eller lab

4 Alternative metoder for hurtig deteksjon av mikrobiell forurensing

4.1 Dyrkingsmetoder

4.1.1 Generelle betraktninger for dyrkingsmetoder

Dyrkingsmetodene er fortsatt standard metode for bestemmelse av overholdelse av vannkvalitetskravene selv om det finnes alternativer som er raskere. Fordelen med dyrkingsmetoder er at de kun fanger opp levende bakterier og de har god sensitivitet (1 dyrkbar bakterie per filtrert vannvolum, typisk 100 ml). De har også sine usikkerheter i forhold til hvilke bakterier som vokser, at ingen spesifikke dyrkingsmedier er helt spesifikke, at stressede eller svekkede bakterier ikke nødvendigvis vokser i laboratorier, og for kimtall at kun 0,1-10% av bakteriene i det hele tatt vil detekteres av metodene. Disse usikkerhetene blir allikevel akseptert fordi vi har brukt disse analysene så lenge og har bygd opp tidsserier og lovverket vårt rundt disse.

Fordi dyrkingsmetoder gir svar på om organismene er levende, er lettere å sammenligne mot tidsserier og krever lite infrastruktur for analyse, forskes det fortsatt på hvordan man kan forbedre dyrkingsmetodene ved blant annet å korte ned inkubasjonstiden. Dyrkingsmetodene benyttes på standard indikatorer bakterier, men også på bakteriofager, virus som infiserer bakterier.

Tabell 11. Mulighet og begrensinger for dyrkingsmetoder

Parameter	Muligheter	Begrensinger
Tid	Inkubasjonstiden kan kortes ned til noen timer på bekostning av presisjon	De fleste organismer har en lag-fase før de vokser, må også ha lang nok tid til å pålitelig påvise vekst. Lag-fasen vil variere avhengig av om bakteriene er stresset. En «fersk» <i>E. coli</i> vil kunne vokse opp til påvisbar deteksjon i løpet av 6-7 timer, mens en stresset <i>E. coli</i> kan trenge langt flere timer. Derfor benyttes 18 timer inkubasjonstid for Colilert og for Colifast ALARM ble det vist at 15 timer var nødvendig for å sikre påvisning av 1 <i>E. coli</i> /100 ml i råvannet på Oset (referanse 21 og avsnitt 4.2).
Sensitivitet	Man kan i teorien filtrere så stort volum man ønsker, men standard er 100ml. Deteksjonsgrense er 1 levende celle/virus per volum analysert	
Spesifisitet	Dyrkingsmedier gjøres selektive ved hjelp av inhibitorer, temperatur og enzymatiske reaksjoner	Ingen dyrkingsmetoder for bakterier er helt spesifikke og man vil både ha falske positive og falske negative resultater
Presisjon		For kimtall vil kun 0,01-10% av bakteriene vokse under lab-betingelser, og viable but not culturable (VBNC) bakterier vil ikke detekteres selv om de kan gi sykdom
Resurser	Inkubatorer kan gjøres små og drives av batteri så de kan tas med i felt. Forholdsvist billige forbruksmateriell De norske firmaet Colifast har utviklet helautomatisk metode som tar prøver 1-2 ganger i døgnet med analysesvar etter 8-15 timer. Brukes på flere norske vannverk.	Krever mye manuelt arbeid og i de fleste tilfeller lab-betingelser for sterilt arbeid

4.1.2 Bakteriofager og virus

En av kritikkene mot dagens bruk av *E. coli* som standard indikator-organisme er at det er virus og ikke bakterier som er skyld i størsteparten av vannbårne sykdomsutbrudd, og at virus og bakterier har forskjellig evne til overlevelse i miljøet. Kolifager som er virus som angriper koliforme bakterier er foreslått som en alternativ indikator på fekal forurensing. Dette fordi den finnes i relativt høye konsentrasjoner i fekal forurensing, har flere likehetstrekk med patogene virus enn det bakterier har, og er enkle og billige å detektere med dyrkingsmetoder. Analysetiden er det som trekker ned for potensialet for bruk av kolifager som hurtigmetode, men de kan også detekteres med molekylære metoder.

Bakteriofager er samlebetegnelsen på virus som kan infisere bakterier. Kolifager er virus som infiserer *E. coli*. Det er to hovedgrupper man kan analysere for: F-spesifikke fag som angriper bakterier som kan benytte en phili for overføring av genmateriale mellom bakterier og somatiske kolifag som angriper cellemembranen. Bakteriofager kan enten ha arvestoff i form av RNA eller DNA. Det finnes standard metoder for kvantifisering av bakteriofager: ISO 10705 del 1 beskriver metode for analyse av F-spesifikke RNA-bakteriofager med inkubasjon på 18 ± 2 timer, og del 2 beskriver metode for somatiske kolifager. Det finnes også amerikanske standardmetoder: US EPA metode 1601: To trinns anrikingsmetode for presence/absence av kolifager (F-spesifikke og somatiske) i grunnvann som tar 2 døgn og US EOA metode 1602: innstøping (ett lag) metode for F-spesifikke og somatiske kolifager med inkubasjon på 18 til 24 timer.

Fast Phage er en hurtigmetode for somatiske og male-specific kolifag for presence/absence bestemmelse basert på EPA metode 1601⁵ som er kommersielt tilgjengelig. Testen går ut på at man etter en innledende anrikning av kolifager i 4-5 timer fortsetter med to metoder: standard metoden med dråper som sjekkes for plakk etter inkubering over natt, og en hurtigmetode for samme-dag resultat der de anrikede fagene sammen med *E. coli* overføres til et medium som inneholder et stoff som gir fluorescens etter kontakt med enzymet *beta*-galaktosidase. Ved lysing vil bakteriene slippe ut mye av dette enzymet, og man kan få ett fluorescens-signal etter 1 til 3 timer. Total analysetid for hurtigmetoden er 6 til 8 timer. Fast Phage ble testet ut på en rekke strender i Hawaii som viste seg å ha liten grad av fekal forurensing. Hovedfordelen med Fast Phage var at den var enkel å bruke fordi alle reagensene var inkludert og i et gel-system som ikke trengte oppvarming⁶.

Et annet forskerteam som også baserte seg av samme hurtigmetode (fluorescens etter lytisk utskillelse av *beta*-galaktosidase) klarte å detektere ned til 1log PFU/ml innen kun 3 timer og ned til 0,01 PFU/ml etter 5 timer etter ett oppkonsentreringssteg⁷. Oppkonsentrering ble gjort ved å filtrere 10L vann gjennom et filter kalt Disruptor som baserer seg på elektro-absorpsjon av virus og bakterier. Optimalisering ble gjort for å finne terskelen for fluorescens grunnet lysing av bakterier i forhold til bakgrunnsfluorescens. Alle forsøkene beskrevet i artiklene er gjort med lab-kulturer og rent vann, det er derfor usikkert hvor robust metoden vil være på virkelig vann.

En annen metode dyrket F-spesifikk kolifag i 180 min for deretter å påvise de med antistoffbelagte latex-kuler. Bruk av serotyping (ved hjelp av antistoff) gjør det mulig å identifisere klasser av kolifag som er mer utbredt blant mennesker enn dyr og er en mulig kildeporingsmetode⁸.

Svakheter med metodene

I kloakk er det ca. 10-100 ganger færre dyrkbare kolifager enn *E. coli*^{9, 10}. I en undersøkelse ble det funnet at en stor andel av fekal-prøver (49%) og drikkevannsprøver (79%) var negative for kolifager¹¹.

4.1.3 Bakterier

De tradisjonelle dyrkingsmetodene baserer seg på at bakteriene skal vokse nok til å danne kolonier. Bakterievekst vil derimot i mange tilfeller være synlig lenge før den medgåtte inkubasjonstiden som er standard for dyrkingsmetodene. Noen metoder har tatt utgangspunkt i dette for utvikling av hurtigere dyrkingsmetoder.

Under følger kun tre eksempler på metoder som er utviklet med kort inkubasjonstid, men dette er ikke en fullstendig liste over alle metoder som kan benyttes til å påvise vekst av bakterier. Spesielt i flytende medium vil det være mange måter å påvise bakterier på, men ved lave konsentrasjoner av bakterier (1 celle per analyse) vil det uansett kreves mange timer for påvisning, og metoder som kun påviser vekst vil ikke være like kvantitativt nøyaktige som telling av kolonier. Metoder som måler vekst av bakterier basert på fluorescens fra enzymreaksjoner er omtalt for seg i avsnitt 4.2.

Clostridium perfringens ble benyttet til å overvåke badevannskvalitet med en test som kun krevde 6 timers inkubasjon. Metoden kalles «Fung dobbelt rør»-metoden og gjør det mulig å kvantifisere *C. perfringens* i 10ml vannprøve uten bruk av anaerobt kammer. *C. perfringens* er en indikator på fekal forurensing men kan overleve lenge i vann⁶.

Bakterier som vokser produserer varme, og dette kan i prinsippet også utnyttes til å påvise bakterier. Minikalorimetrisk metode for deteksjon av bakterier i drikkevann benytter seg av spesifikt medium og måler kalorimetrisk om det er vekst innen 5 til 17 timer¹². Studien var først og fremst en demonstrasjon av prinsippet, og de påstår at varmesignalet fra bakteriene var forskjellig for forskjellige bakteriearter, for forskjellig vekstmedium og for ulike vekstbetingelser (anaerob vs. anaerob).

En annen gruppe utviklet et elektronisk feltutstyr for deteksjon av bakterier på 3-12 timer avhengig av konsentrasjon basert på vekst i spesifikt medium¹³.

4.2 Enzymbaserte analyser

4.2.1 Generelle betraktninger for enzymbaserte analyser

Enzymer er proteiner som kan spalte eller syntetisere spesifikke kjemiske bindinger som er nødvendig i metabolismen. Enkelte enzymer er mer universelle hos alle mikroorganismer, mens andre er mer spesifikke for grupper eller arter av bakterier. Enzymbaserte metoder benytter seg enten av målbakteriens enzymer til å spalte en spesifikk kjemikalie som enten gir fargeforandring eller fluorescens etter kontakt med slike enzymer, eller ved å tilsette et enzym som spalter molekyler som produseres hos bakteriene (f.eks ATP). Enzymaktivitet krever generelt kortere inkubasjonstid enn dyrkingsmetoder for å gi målbar respons, men i de fleste tilfeller kreves relativt høye bakteriekonsentrasjon for å gi målbart signal på kort tid. De to største fordelene er hurtigheten og at måling av farge eller fluorescens kan gjøres med enkel instrumentering og lite/ingen prøveopparbeiding. En rekke kommersielle produkter for online overvåking er basert på disse prinsippene. Utfordringene ligger i spesifisitet og deteksjonsgrense når man forsøker å få raskest mulig svar.

Tabell 12. Mulighet og begrensinger for enzymbaserte analyser

Parameter	Muligheter	Begrensinger
Tid	Nær online (få minutter)	Hurtighet påvirker sensitivitet og spesifisitet
Sensitivitet	Ned til 1 CFU/100ml ved dyrking i 15 timer, Ca 1000 CFU/100ml ved direkte påvisning	Sensitiviteten påvirkes i stor grad av bakgrunnsstøy i vannprøven. Alger og andre bakterier kan også ha enzymaktivitet som interfererer
Spesifisitet	Enzymaktivitet av beta-D-glucuronidase (GUS) kombinert med dyrking i selektivt medium ved høy temperatur er relativt spesifikk for <i>E. coli</i>	Direkte enzymaktivitet er ikke spesifikk, se punkt over
Presisjon	Presisjonen kan forbedres ved tilpassing til vannkilden	Best til hendelses-varsling
Resurser	Feltkit eller online	Online instrumentene må følges opp med vedlikehold og rengjøring. Strømuttak og plass

4.2.2 Spesifikke enzymmetoder for analyse av koliforme bakterier og *E. coli*:

De mest utbredte enzymmetodene baserer seg på koliforme bakterier som har enzymet *beta*-D-galactosidase (GAL) og *E. coli*'s *beta*-D-glucuronidase (GUS). Enzymaktiviteten kan måles direkte i prøven, eller etter inkubasjon i spesifikt medium ved høy temperatur (44 °C) for mer selektiv men også mer tidkrevende analyse. Enzymbaserte metoder som ikke inkluderer dyrking vil ikke være spesifikke for *E. coli* fordi disse enzymene også finnes hos andre organismer.

At *E. coli* produserer enzymet *beta*-D-galactosidase (GAL) og at dette kan utnyttes til å identifisere koliforme bakterier har vært kjent siden slutten av 70-tallet¹⁴. Enzymer er proteiner som hjelper til med å bryte veldig spesifikke kjemiske bindinger. Dette kan utnyttes ved å tilsette et kjemikalie som skifter farge eller fluorescerer under UV etter at en slik binding brytes. Det er denne mekanismen som benyttes i IDEXX sine colilert-metoder der de skiller mellom alle koliforme bakterier som har GAL (gir gul farge på medium), og *E. coli* som både har GAL og *beta*-D-glucuronidase (GUS) (gir gul farge og blå fluorescens under UV-lys)¹⁵ etter endt inkubasjonstid (ISO 9308-2). Colilert-metoden baserer seg på most probable number (NPM) for å kvantifisere *E. coli*, men andre forskere fant at det var en

sammenheng mellom fargereaksjonen og konsentrasjonen av fekale bakterier i prøvene, og at dette kan utnyttes til å kvantifisere bakterien direkte. Apte¹⁶ viste i 1995 at det var en lineær relasjon mellom konsentrasjonen av fekale koliformer kvantifisert med membranfiltreringsmetode og farge i prøver av avløpsvann ned til 10³ CFU/ml. Inkubasjonstiden var 60 minutter ved 44,5°C, og prøvene (2,5ml) ble filtrert før analyse i spektrofotometer og korrigert for signal fra en blankprøve. Hurtigmetoder (< 3timer) baserer seg på måling av økning i fluorescens over tid, og beregning av aktivitet per time for å korrelere til bakteriekonsentrasjon.

En utfordring for spesifisiteten er at det finnes flere organismer som har tilsvarende enzymer som de koliforme bakteriene. I overflatevann kan det være alger og andre bakterier som også skiller ut disse enzymene^{17,18}. Metodene som baserer seg på direkte måling av enzymaktivitet innen få minutter har ofte dårlig korrelasjon til dyrkbare *E. coli*^{19,20}. Derfor kan det være nødvendig med dyrking ved 44°C for å selektere for vekst av termotolerante bakterier før analyse av enzymaktivitet. Tryland et al.²¹ fant at forholdet mellom antall *E. coli* og enzymaktivitet fra fekalieprøver fra forskjellige kilder varierer. Fekalier fra mennesker hadde den høyeste enzymaktiviteten mens fekalier fra vadefugler hadde generelt lav enzymaktivitet, selv om det var store individuelle forskjeller.

Det er en rekke teknologier på markedet i dag som baserer seg på enzybasert deteksjon, og som er mer eller mindre automatiske, se Tabell 13. Selv om prinsippene er like for de fleste av disse instrumentene varierer både analysetid, deteksjonsgrenser og hvor automatiserte de er: BACTcontrol og Coliminder gir analysesvar innen 15-75 minutter, men rapporterer da svaret som fluorescensenheter, ikke antall celler. Tecta, CALM, ALARM og colilyzer kan detektere *E. coli* ned til 1 CFU/100ml, men da er analysetiden 12- <24 timer. Instrumentene varierer også i behovet for vedlikehold, pris på reagenser og pris ved innkjøp og service. Dette er blitt evaluert grundig i en rapport fra DTU i forbindelse med metoder for drikkevannsovervåking⁴.

Det norske firmaet **Colifast** har utviklet to instrumenter som kan brukes til automatisk analyse: CALM og ALARM. CALM kan programmeres for bruk til total koliforme, *E. coli* eller *Pseudomonas aeruginosa* ved å justere reagensene, inkubasjonstid og temperatur. Inkubasjonstiden justeres også i forhold til forventet konsentrasjon av målbakterien i prøven; ned til 15-120 minutter ved høye konsentrasjoner og opp til 15 timer ved lave konsentrasjoner. Resultatet kan rapporteres enten som antall bakterier eller tilstede/ikke tilstede. ALARM måler koliforme bakterier, TKB eller *E. coli* i tillegg til turbiditet. Resultatet rapporteres som tilstede eller ikke tilstede i 100ml etter maks 15 timers inkubasjonstid. Medium/reagensene som blir brukt i denne teknologien er verifisert av det amerikanske teknologi verifiserings programmet, ETV, til å ha en spesifisitet på 100% og en sensitivitet på 75%, og metoden er også testet og dokumentert godt i andre studier.

ALARM fra Colifast (Norge) er blitt testet kontinuerlig i to år ved Oslos drikkevannsanlegg Oset²². Vannkilden Maridalsvannet ble overvåket med daglig prøvetaking og analyse av presence/absence av *E. coli* med ALARM i tillegg til ukentlig prøvetaking med standard dyrkingsmetoder for *E. coli*. Maridalsvannet har liten grad av fekal forurensning, og kun 11% av de ukentlige prøvene var positive for *E. coli* med høyeste konsentrasjon på 3 CFU/100ml, mens 18% av de daglige analysene med ALARM var positive for *E. coli*. Daglig prøvetaking og analyse med ALARM fungerte godt for å avgjøre om en positiv prøve skyldtes en tilfeldighet, eller en forurensning som kan påvirke råvannskvaliteten over lengre tid selv om den enkelte prøven ikke alltid samstemte med den ukentlige prøven. Instrumentet trengte kun tilsyn hver 20. dag for etterfylling av reagenser (ca. 0,5 time).

CALM fra Colifast ble testet i 3 uker sommeren 2014 for overvåking av Akerselva nær en badeplass for hjelp til badevannsovervåking²¹. En hurtigmetode for analyse innen 3 timer ble testet: 10ml prøve ble inkubert med medium ved 44°C i 2,5 timer med måling av fluorescens fra GAL aktivitet i 3

delprøver og sammenlignet med lab-analyser av TKB med membranfiltreringsmetoden og mFC agar. Det var ingen signifikant forskjell ($p > 0.05$) mellom CALM og manuell TKB-analyse.

Coliguard ble utviklet av mbOnline, men ble kjøpt opp av MicroLAN i Nederland og byttet navn til **BACTcontrol**. Instrumentet er ment for hurtig analyse av enzymaktivitet med inkubasjonstid på kun 75 minutter. Det ble først utviklet for bruk til koliforme bakterier og *E. coli* med måling av GUS og GAL-aktivitet, men har nylig også blitt testet for måling av totalt antall bakterier ved å måle aktiviteten av alkalisk fosfatase (ALP).

Prototypen av **Coliguard/BACTcontrol** ble testet på to grunnvannsføremønstre i Østerrike i en toårsperiode i 2010-2011 med 4 daglige prøver²³. Instrumentet kunne stilles inn på å filtrere mellom 100ml og 5L vann og ble stilt inn på 1L under dette forsøket og enzymaktiviteten fra GUS og GAL ble målt under inkubering ved 44°C i 75 minutter. Prosessen var helautomatisk og sendte resultatene online, og krevde kun vedlikehold en gang per måned. Enzymaktiviteten korrelerte bedre med turbiditet og UVabs254 enn dyrkbare *E. coli*. Den dårlige korrelasjonen til dyrkbare *E. coli* skyltes antagelig at grunnvannene var godt beskyttet, og at fekal forurensning stort sett var fra dyr og ofte gammel²³. Langvarig testing av BACTcontrol i en bekk (HOAL) i et jordbruksområde i Østerrike viste at kontinuerlig prøvetaking i vann med høy turbiditet krevde mer vedlikehold, og at standard rengjøringsprosedyrer ikke var tilstrekkelig for å hindre biofilmdannelse og større vedlikeholdsoperasjoner. Derfor ble en ny metode for forfiltrering (SAMP-FIL) av vannet testet ut i perioden 2014-2015. Den nye metoden for forfiltrering innebar rask prøvetaking etterfulgt av vasking og tørking av filteret slik at vann ikke ble stående i rørløsingene og gav grunnlag for biofilmdannelse. En betydelig forbedring av BACTcontrol-resultatene kunne sees ved at responsen til nedbørshendelser ble raskere og med sterkere signal sammenlignet med BACTcontrol-enhet med standard forfiltrering. I tillegg kunne vedlikehold begrenses til en gang per 6 måneder²⁴.

ColiMinder er utviklet av VMW i Østerrike. Uttesting og kalibrering av instrumentet til bruk i en bekk i Østerrike (Hydrological Open Air laboratory, HOAL) er beskrevet i Koschelnik et al²⁵. ColiMinder ble testet ut i en underjordisk elv i en 10-dagers periode i 2015 Vietnam i slutten av regntiden i kombinasjon med en rekke overvåkingsparametere og viste lovende resultater som en supplerende on-site, nesten samtidig, metode¹⁹. Instrumentet ble koblet til ett 12-V bilbatteri som strømkilde, og tok automatisk vannprøver (6,5ml) til analyse hver time. Korrelasjonen mellom enzymaktivitet og dyrkbare *E. coli* var svakere enn korrelasjonen mellom enzymaktivitet og turbiditet og partikkel-konsentrasjoner. Det var en sterk korrelasjon mellom enzymaktivitet og vann-temperatur, men med 3 timers forsinkelse: enzymaktiviteten nådde høye verdier 3 timer seinere enn temperatur, og det var daglige svingninger i alle parametere. *E. coli* konsentrasjoner varierte mellom 270 til >24 000 MPN/100ml i testperioden. Selv om GUS aktivitet ikke var direkte korrelert til *E. coli* viste den samme trend, og avviket antas å skyldes ikke dyrkbare *E. coli*¹⁹.

Tabell 13. Kommersielle enzybaserte målemetoder

Navn på metode	Målorganisme	Prinsipp	Analysetid	Enhet	Deteksjons-grense	Nettside
CALM Fra Colifast, Norge	Total koliforme, <i>E. coli</i> og <i>P. aeruginosa</i>	GUS og GAL	4-12 timer eller 15-120 min	Ja/nei, MPN, CFU	1 CFU/100ml eller >500CFU/100ml	colifast.no - CALM
ALARM Fra Colifast, Norge	Koliforme bakterier, TKB eller <i>E. coli</i>	GUS og GAL	6-15 timer	Ja/nei	1 CFU/100ml	colifast.no - ALARM
BACTcontrol Fra MicroLAN (Tidligere ColiGuard fra mbOnline) Nederland	Total koliforme eller <i>E. coli</i> , Enterokokker	GUS, GAL og beta-glucosidase	filtrerer opp til 1000ml, inkuber ved 44°C i 75 min.	pmol MUF ¹ /min/100 ml	0.01 til 8.4 pmol MUF per min og 100 ml i grunnvann ²³	microlan.nl
BACTcontrol Fra MicroLAN Nederland	Total bakterier	Alkalisk fosfatase (ALP)				microlan.nl
Tecta (PDS, B16) Fra Endetec, Canada/Sveits	Total koliforme og <i>E. coli</i>	GUS og GAL	2-18 timer	Ja/nei, nivå av forurensing	1 CFU/100ml	tecta-pds.ca
ColiMinder Fra VMW, Østerrike	Total koliforme, <i>E. coli</i> , total bakterier og enterokokker	GUS, GAL, Alkalisk fosfatase	15 min	MFU/100 ml	0,8 mMFU/100ml <i>E. coli</i> , 0,5 mMFU/100ml enterokokker og total bakterie	v-w-m.at
aquaBio fra ADASA, Spania	Total koliforme og <i>E. coli</i>	GUS + GAL (colilert-18)	3 -12 timer	MPN	1 CFU/100ml	adasaproducts.com
coliLyzer® fra Applitek, Belgia	Total koliforme og <i>E. coli</i>	GUS og GAL	< 24 timer	CFU/100ml	1 CFU/100ml	applitek.com
Bactiquant Fra Mycometer A/S, Danmark	Gram positive og negative bakterier	Hydrolaser	<1time			mycometer.com
ATP-test Fra Aquatools, USA/Frankrike	total bakterier	ATP				aqua-tools.com
EZ-ATP Fra Applitek, Israel/Belgia	total bakterier	ATP		10-15 min	0.5 – 200 pg/ml or 0 – 400 pM ATP	applitek.com

¹ MUF = methylumbelliferyl. Produkt av enzymreaksjonen til GUS

To metoder for online måling av *E. coli* med enzymatisk metode basert på enzymaktiviteten til GUS (**ColiMinder og BACTcontrol**) ble testet i en bekk (HOAL) påvirket av landbruk i Østerrike i perioden 2014-2015. To instrumenter av hver modell ble testet og sammenlignet innad og med hverandre. Instrumentene fungerte bra selv ved høy turbiditet (3 g/L suspendert tørrstoff TSS), men krevde da vedlikehold annenhver uke. Det var liten forskjell mellom parallelle instrumenter, men litt større forskjell mellom ColiMinder og BACTcontrol. Forskjellen skyldes både forskjell i metode og måling av enzymaktivitet, forskjellige prøvetakingspunkt og forskjell i analysetid (1 time for ColiMinder og 3 timer for BACTcontrol). Begge instrumentene hadde en signifikant korrelasjon mellom målt GUS-aktivitet og dyrkbare *E. coli* (R^2 : 0,52 og 0,47, p-value $\leq 0,001$), men korrelasjonen mellom *E. coli* og vannstrøm og konduktivitet var sterkere (R^2 : 0,63 og 0,68, p-value $\leq 0,001$). Korrelasjonen mellom enzymmetodene og *E. coli* var bedre ved nedbørshendelser (opp til R^2 0,8), og den generelle dårlige korrelasjonen skyldes antagelig at elven stort sett var påvirket av landbruk, og ikke avrenning fra avløpsvann. Enzymaktiviteten varierte mellom 0,8 – 170 mMFU/100ml for ColiMinder og 1,1-108 pmol/min/100ml for BACTcontrol, og dyrkbare *E. coli* varierte fra <1 - 780 MPN/100ml²⁰.

TECTA (TM) B16 er utviklet av PatogenDetectionSystem, nå TECTA-PDS og er et automatisk fluorometri-basert deteksjonssystem for *E. coli* og koliforme bakterier. Instrumentet består av to kammer for samtidig analyse av 2 prøver a 100ml og måling av fluorescens automatisk i en periode opp til 18 timer og sender analysesvaret elektronisk. Spesifisitet og sensitiviteten til prototypen av instrumentet ble funnet å være 100% ved sammenligning med membranfiltermetode for 66 prøver med lab-kulturer og grunnvannsprøver²⁶. Instrumentet ble sammenlignet med membranfiltreringsmetoder for badevannsprøver i Canada og var stort sett i overensstemmelse med standardmetodene, bortsett fra at den overestimerte konsentrasjonen av *E. coli* i noen prøver. Fordelen var at den krevde mindre arbeid, og at man fikk svar raskere ved høye konsentrasjoner. Gjennomsnittlig deteksjonstid var på 7 timer, men instrumentet kan detektere overskridelse av badevannskravet i Canada på 4 timer²⁷. I en annen studie ble TECTA instrumentet sammenlignet med IDEXX metode for *E. coli* og enterokokker for badevannsovervåking av 233 vannprøver i perioden 2014-2015 i Australia²⁸. TECTA hadde signifikant korrelasjon (Sperman Rank koeffisient) mot IDEXX metodene for både *E. coli*, koliforme bakterier og Enterokokker (*E. coli* RS = 0.72, p<0.001; total koliforme RS = 0.70, p<0.001; Enterokokker RS = 0.51), men den lavere korrelasjonen for koliforme skyldes at IDEXX gikk over deteksjonsgrensen for noen prøver, og enterokokk-reagensene for TECTA var ikke ferdig utviklet/optimalisert²⁸. Selv om statistisk analyse viser signifikant korrelasjon vil enkeltmålinger kunne variere ganske mye ved sammenligning.

Prinsippene for enzymbaserte, enkle, hurtige eller online målemetoder er utforsket av flere forskergrupper som ikke har ferdigutviklet kommersielle systemer²⁹⁻³⁷. Prinsippene, utfordringene og begrensningene vil være de samme som beskrevet over for de kommersielle modellene: uspesifikk enzymaktivitet og deteksjonsgrenser. Det som er nytt med de andre metodene er hjemmesnekret analysator til lav pris³⁴, analyse av elektrisk spenning i stedet for fluorescens^{36,37}, håndholdt instrument³⁵ eller avlesning med mobiltelefon³³.

4.2.3 Uspesifikk enzymmetode: totaltall bakterier

Fordelen med metoder som detekterer totaltall bakterier er at de ikke trenger å være like sensitive som metodene som detekterer koliforme bakterier fordi det er færre koliforme bakterier enn totaltall bakterier. Dette er også ulempen med metoder for totaltall, fordi bakgrunnsnivåene vil være høye i de fleste vann typer. Selv etter desinfeksjon kan det være igjen rester av enzymaktivitet eller ATP molekyler fra bakteriene som ble drept. Derfor vil det være nødvendig med en kalibreringsperiode for å bestemme bakgrunnsnivåer av totalt bakteriesignal for den aktuelle vannkilden for å etablere hva som er normalt og hva som kan karakteriseres som en hendelse eller uønsket hendelse med forhøyede verdier. Det er to typer totaltall bakteriemetoder som er beskrevet her: ATP som er et biomolekyl produsert av alle levende celler, og alkaline fosfatase (ALP) som er et enzym produsert av de fleste mikrobielle celler.

Bakterier produserer en rekke enzymer, som for eksempel hydrolaser som spalter kjemiske bindinger i kontakt med vann. Mycometer A/S i Danmark har utviklet et instrument, BactiQuant, for måling av totaltall bakterier basert på måling av enzymaktivitet fra hydrolaser. Om det er et spesifikt enzym eller en gruppe enzymer de måler på angir de ikke på sine nettsider eller publikasjoner. De har også ett instrument for måling av sopp, kalt Mycometer som måler på aktiviteten til enzymet *Beta-N-acetylhexosaminidase*, NAHA. Instrumentene er testet av amerikanske ETV og tatt i bruk hos en rekke vannverk. Metoden er manuell, og inkluderer filter for oppkonsentrering og alle reagenser som trengs for å gjøre analyse på noen minutter. Enzymaktiviteten vil variere mellom forskjellige bakterier, så instrumentet må tilpasses vannet det skal overvåkes var erfaringen som ble oppsummert av DANVA i DanskVand i 2010³⁸. BACTcontrol fra MicroLAN er også oppgradert til å analysere på totalbakterier online ved analyse av hydrolasen alkalisk fosfatase med sammenlignbare resultater til måling av ATP³⁹.

Alle levende celler produserer ATP (Adenosin trifosfat) som er et molekyl som overfører energi til enzymatiske reaksjoner. Konsentrasjonen av ATP i en prøve måles ved å tilsette enzymet luciferase fra ildfluer som vil lage et lyssignal som er proporsjonal med mengden ATP tilstede i prøven. Man får kjøpt enkle instrumenter til hygienekontroll av overflater og vann ved måling av ATP, og det er utviklet noen instrumenter som retter seg mot vannbransjen, se tabell 13. For å skille mellom ATP fra intakte celler og ATP skilt ut av døde eller døende celler blir ATP målt både som total ATP etter lysing av celler, og fritt ATP uten lysing av celler. Mikrobiell ATP blir beregnet som differansen mellom total og fritt ATP. I en studie i Danmark fant de at ATP-måling var mer sensitiv enn telling av total bakterier, men mindre sensitiv enn dyrkingsmetodene. Den var derimot mye raskere. Overflatevann fortynnet inntil 1000 ganger og avløpsvann fortynnet 10 000 ganger i drikkevann kunne detekteres som signifikant økning i ATP. Nytteverdien av ATP for overvåking av inntrengning av fremmedvann på ledningsnett vil være avhengig av hvor høyt bakgrunns-signalet i drikkevannet er for hvor stor mengde fremmedvann som må trenge inn før det kan måles⁴⁰.

I en annen studie ble det analysert for intracellulært ATP ved å først fjerne løst ATP med en reagens. Deretter ble ATP ekstrahert fra cellene og målt i en automatisk luminescens-måler som ble optimalisert til å detektere 1 bakterie per 12,5µl prøve. Intracellulært ATP per celle av *E. coli* og *S. aureus* ble bestemt (henholdsvis 3,3 attomol/celle og 1,6 attomol/celle)⁴¹.

4.3 Molekylære analyser

4.3.1 Generelle betraktninger for molekylære analyser

Felles for de molekylære analysene er at de er mer spesifikke og gir raskere svar enn dyrkingsmetodene, men de krever mer arbeid, utstyr og kvalifisert laboratoriepersonell. Det har skjedd en betydelig utvikling innen molekylære metoder som gjør dem både mer tilgjengelige og billigere. Så lenge du vet hva du leter etter, kan du stort sett bestille eller konstruere den molekylære merkelappen du trenger.

Dessverre er de fleste molekylære metodene fremdeles analyse-lab-metoder, og ikke egnet til felt-bruk eller driftsovervåking av renseanlegg per i dag. Det skjer derimot stadig en forbedring av både teknikker og instrumenter for å gjøre dem mindre og billigere. Dessuten kan det være aktuelt å sende prøver til analyselaboratorier for sporadiske analyser for kildesporing eller risikovurderinger, så en forståelse av hva som kan gjøres vil være nyttig.

Felles for metodene er også at analysen foregår i μl -skala, og at dette gir utfordringer for sensitiviteten. Typisk kan man oppkonsentrere mellom 100ml og 10L vann ved enten filtrering eller sentrifugering, for deretter å gjøre en ekstraksjon for å rense bort urenheter og oppkonsentrere ytterligere til mellom 100 μl og 1ml. Gitt oppkonsentrering fra 1L til 100 μl , analyse av 1 μl oppkonsentrert prøve og en teoretisk deteksjonsgrense på 1 celle per analyse har man en teoretisk deteksjonsgrense på 10 celler/100ml. Dessverre er sjelden teoretiske verdier oppnåelige i praksis fordi man alltid vil ha noe tap underveis i prosessen, og statistisk sett må det også mer enn 1 celle til for pålitelig deteksjon hver gang. Dermed er en realistisk deteksjonsgrense rundt 1-10 CFU/ml, som dermed er mer relevant for overvåking av badevann og råvann enn drikkevann. Mer om oppkonsentreringsmetoder er beskrevet i avsnitt 4.6.

Tabell 14. Mulighet og begrensinger for molekylære analyser

Parameter	Muligheter	Begrensinger
Tid	Minutter til timer	Prøveopparbeiding er gjerne tidsbegrensende faktor. Selve analysene tar 10 til 90 minutt
Sensitivitet	Deteksjonsgrense er en organisme per reaksjon, men volum er avhengig av oppkonsentrering og prøveopparbeiding	Analysevolum er gjerne i størrelsesorden 1 μl , som betyr en direkte deteksjonsgrense på 1000/ml eller 100 000 per 100ml
Spesifisitet	Alt er mulig. Alle bakterier, alle <i>enterobacteria</i> , alle <i>E. coli</i> eller spesifikt patogene <i>E. coli</i>	Skiller ikke levende og døde. Virus krever mer av oppkonsentreringsmetoder. Spesifisiteten blir ikke bedre enn markøren man velger, så avhenger av denne
Presisjon	I teorien ingen falske positive, når metodene er optimalisert.	Må være obs på falske negative pga inhibering eller problemer med prøveopparbeidelse. Falske positive dersom metoden ikke er testet godt nok
Resurser	Automatisert robot for prøveopparbeidelse og analyse	Om prosessen ikke er helautomatisert krever prøveopparbeiding erfarent lab-personell, en del arbeidsinnsats og lab-instrumenter

4.3.2 PCR

Polymerase kjedereaksjon (PCR) er en mye brukt metode for spesifikk påvisning og kvantifisering av forskjellige mikroorganismer. Den største fordelen med metoden er at den er spesifikk og lett kan tilpasses de fleste type organismer, inkludert virus, og at den gir svar innen få timer. Utfordringen er at man kun analyserer mellom 0,5 – 5 µl væske, så det kreves en del forarbeid før analyse, inkludert oppkonsentrering og DNA-ekstraksjon for å fjerne stoffer som kan inhibere PCR-reaksjonen. På grunn av dette blir PCR helst brukt på laboratorier med høyt kvalifisert laboratoriepersonell. En annen begrensning er at metoden i utgangspunktet ikke skiller mellom levende og døde bakterier, eller infektiv og ikke infektiv virus. Fordi PCR åpner mulighetene for analyse av «nesten alt» er det desto viktigere å vite hva man ønsker å se etter og hvorfor. I USA er en metode for analyse av Enterokokker i badevann med PCR godkjent som en standard metode (US EPA method 1611).

En polymerase kjedereaksjon (PCR) er en etablert metode der en spesifikk DNA sekvens amplifiseres for å kunne detekteres og kvantifiseres ved hjelp av en varmesyklisk reaksjon. Den amplifiserte DNA-sekvensen er spesifikk og er basert på valgt primer. En primer er en kort sekvens som inneholder to nukleotidsekvenser som markerer start og slutt av den ønskelige amplifiseringssekvensen. Det finnes i dag primere for et mangfold av forskjellige patogener (f.eks. virus, *E. coli* og et stort antall koliforme), noe som har gjort PCR til et kraftig gjenkjennings- og kvantifiseringsverktøy i molekylærbaserte metoder¹. Metoden har vist seg å være sammenlignbar med tradisjonelle dyrkingsmetoder for kvantifisering av fekale indikatorbakterier i prøver fra kyst- og noen innlandsvann¹.

Utvikling av metoden har de siste årene resultert i reeltids-, multipleks- og mikrofluidbaserte PCR-analyser¹. Reeltid eller sanntids-PCR er basert på at ikke-spesifikke fluorescerende fargestoffer binder til det dobbeltrådede DNAet og avgir et fluorescerende signal. Når DNA amplifiseres, øker signalstyrken og kan måles i reeltid noe som har resultert i kortere analysetid. I tillegg er det mulig å kontrollere spesifisiteten hos det amplifiserte sekvensensproduktet med en såkalt smeltekurve.

Samtidig amplifisering av forskjellige organismer i samme prøve kan utføres med multipleks-PCR. Denne metoden er basert på en kombinasjon av forskjellige primere som analyseres samtidig. Multipleks-PCR reduserer bruk av prøvemengde og analysetid i tillegg til at metoden har høy spesifisitet for målorganismen^{1,42}. Metoden krever noen dager til uker for å optimalisere, men er svært effektiv når den er optimalt oppsatt. Metoden har blitt brukt for deteksjon av fekal forurensing (*Bacteroides spp.* og enterokokker) i vannovervåking og vist til rask analysetid (3 timer). Videre krever den høyere deteksjonsgrense sammenlignet med konvensjonelle PCR metoder⁴².

PCR skiller i utgangspunktet ikke mellom DNA fra levende og døde celler, men man kan redusere signalet fra døde celler ved å behandle prøven med et stoff (PMA) som binder seg til DNA utenfor celler eller i ødelagte celler. I en studie der de sammenlignet dyrkingsmetoden enterolert (IDEXX) med PCR for humanassosiert *bacteroides* (H183) og viabel PCR med PMA-PCR for samme markør fant de at PMA-PCR H183 hadde bedre korrelasjon med enterolert enn PCR H183⁴³.

I kommende tekst beskrives de forskjellige applikasjonene for PCR i korthet.

Tradisjonelle indikatorbakterier

PCR metoder er utviklet for de tradisjonelle indikatorbakteriene (*E. coli* og enterokokker), med fordelen at man kan få svar på analysene samme dag. Ulempen er at deteksjonsgrensen er noe

dårligere enn dyrkingsmetodene med mellom 10 og 1000 celler per 100ml drikkevann og at den ikke skiller levende og døde celler. Metoden kan brukes for overvåkning, men ikke for testing av vannkvalitet med krav om <1 CFU/ 100 ml⁴⁴. Sammenligning av IDEXX enterolert dyrkingsmetode med US EPA 1611 PCR metode viste signifikant korrelasjon ($R_s = 0.72$, $p < 0.001$), men en overestimert resultatene fra PCR. Dette var som forventet da PCR metoden også inkluderer døde bakterier²⁸.

Patogener

En annen strategi er å analysere direkte på patogener eller antibiotikaresistente bakterier, noe som Minogue et al. (2013, 2015) utviklet ved hjelp av multipleks qPCR. Denne metoden identifiserte *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia species*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*^{45, 46} *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae* og *Vibrio parahaemolyticus*⁴⁷, med bruk av veletablerte gen-markører for respektive patogener i en og samme prøve og analyse. PCR metoden viste en deteksjonsgrense i størrelsesorden på 3 til 9 genkopier per reaksjon (2µl) for bakterier (*S. maltophilia*, *B. cepacia.*, *P. aeruginosa* og *S. marcescens*)⁴⁶. Denne metoden viser muligheten for å analysere opp til 4 patogener samtidig i samme prøve og analyse med en total analysetid på 4-12h, noe som gjør denne analysen veldig kostnadseffektiv. Utfordringen er at patogener ofte finnes i veldig lave konsentrasjoner, og at lista over patogener er veldig lang om man ønsker å teste for alle. Ulempen med denne metoden er at den er mindre spesifikk en unipleks-qPCR, den har en større sannsynlighet for å rapportere falske negative resultater grunnet lavere sensitivitet. Ulik optimalisering av metoden (valg av primer, amplifiserings temperatur etc.) er grunnen til stor variasjon mellom studier⁴⁸.

Virusindikatorer

Fordelen med PCR-metoder er at de ikke krever dyrking av organismene, bare at man kjenner til DNA-sekvensen. Dermed kan man lettere analysere på virus-DNA, selv om det er noen utfordringer med oppkonsentrering av lave konsentrasjoner i store mengder vann. Fordi konsentrasjonen av patogene virus varierer veldig med sykdomsbildet i befolkningen, mangfoldet av virus-patogener er stort og oppbygningen til virus varierer (DNA, RNA, kapsider etc) er det ønske om en generell virusindikator som finnes i høye konsentrasjoner i avløpsvann fra husholdninger.

Bruk av Torque Teno virus (TTV) har blitt foreslått som indikator på fekale virus i drikkevann med hensyn til PCR analyse⁴⁹. Senere studier har rapportert at denne indikatoren viste dårligere deteksjon enn Adenovirus, dårlig korrelasjon mot patogener og variable konsentrasjoner hos mennesker, noe som gjør den dårlig egnet som indikator⁵⁰. Siden PCR oppdager både smittsomt og inaktivert virus må man i tillegg til PCR gjennomføre en ekstra *in vitro*-metode for å vurdere smitteevne til virus⁴⁹. Analyse av virusindikator med bruk av PCR metoden for å vurdere vannkvalitet har fortsatt stort potensial, men det gjenstår fortsatt utfordringer slik som krav om oppkonsentrering av prøve og faktorer som kan hindre amplifisering av virus under analyse (inhibitorer).

Det Skandinaviske prosjektet VISK så på virus i drikkevannssammenheng og konkluderte med at analyse av virus i vannrensprosessen er nytteløst på grunn av for lave konsentrasjoner, men at analyse av virus i avløpsvann og råvann er anbefalt. Analysene kan gjøres med PCR eller revers transkriptase PCR, men for å skille mellom infektive og ikke infektive virus er man nødt til å bruke dyrking i cellekulturer⁵¹.

Kildesporing

Kildesporing ved hjelp av bakterier kalles MST (Microbial Source Tracking) i litteraturen. Fordi det er relativt få zoonotiske patogener (patogener som smitter fra dyr til mennesker) sammenlignet med humane patogener er man ofte mest interessert i å vite om fekal forurensing stammer fra mennesker

eller dyr, eller man ønsker å vite om man må sette i gang tiltak på avløpsnett eller avrenning av beiteområder om man har en fekalt forurenset vannkilde. PCR er en god metode for kildesporing fordi man kan analysere på bakterier som ikke lett lar seg dyrke i laboratorier, som for eksempel de anaerobe tarmbakteriene i *bacteriodales* slekten. Innen denne slekten finnes det bakterier som nesten utelukkende bor i tarmen til mennesker, eller i tarmen til forskjellige dyregrupper. Man har derimot funnet ut at de ikke er 100% spesifikke for hver dyregruppe/mennesker^{52, 53}. Det er mange etablerte markører og konkurrerende markører som er publisert i litteraturen, men det viktigste er at markørene man velger blir verifisert i området den skal brukes for å sikre at det ikke finnes falske positive i for eksempel sedimenter⁵⁴. I Sverige har de jobbet en del med forskjellige MST-markører, og blant annet sett på hvordan man kan benytte statistiske modeller for å gjøre evaluering av MST-resultater⁵⁵. I Danmark er også kildesporingsmetoder med PCR nå blitt såpass utbredt at enkelte laboratorier kan tilby dem som standard metoder: Kildesporing drikkevann⁵⁶. I Norge har NIBIO utviklet en metode for kildesporing der de ser på forholdstall mellom forskjellige fekale markører for å si hvor stor andel av kildene er humane⁵⁷. Selv om kildesporingsmetodene åpner mange nye muligheter for overvåking er det viktig å huske på at dette også er en indikator-metode og har en del av de samme svakhetene som standard dyrkingsmetode for *E. coli*: varierende utslipp fra enkelt-individer, varierende overlevelse/gjenfinnelse i miljø under forskjellige betingelser, og manglende korrelasjon med patogener⁵⁸.

Automatisering av PCR-analyser

Det har skjedd en stor utvikling innen PCR teknologi i forhold til bedre DNA ekstraksjon. Bedre reagenser som er mindre sensitive for inhibering gir mer robuste analyser. Instrumentene har også blitt raskere og bedre, men det virker ikke som det har vært en utvikling i forhold til å gjøre de mindre, billigere og mer tilgjengelige for et marked utenfor forskningslaboratoriene. Potensialet for et enkelt og automatisk system er allikevel der, som demonstrert i California: En robot for analyse av miljøprøver in-situ gjorde prøvetaking, DNA ekstraksjon og PCR analyse av enterokokker, human spesifikk bakteriodales og algen *Pseudo-nitzschia spp* for samme dag resultater av badevannskvalitet på en strand i California⁵⁹. Roboten var operativ i 45 dager, og resultat av analysene var tilgjengelig på internett innen timer etter prøvetaking og sammenlignbare med de manuelle analysene.

Begrensinger

PCR-metoden er fortsatt kompleks, da det trengs mye forarbeid av prøvene som oppkonsentrering og DNA-ekstraksjon, og deteksjonsgrensen er begrenset av muligheten for oppkonsentrering med god gjenfinningsgrad. Denne metoden er en målrettet analyse, det vil si at analysen kun rapporterer resultater for de primersekvenser som var inkludert i analysen. Dette betyr at et flertall analyser kan være nødvendig for å finne forskjellige eller andre gen-varianter og målorganismer. I tillegg kan valg av ikke-spesifikk primer gi misvisende resultat siden amplifisering av sammenfallende gensekvenser hos andre organismer kan forekomme og gi falske positive resultater. Imidlertid er potensialet for online miljøovervåking begrenset på grunn av at det fortsatt trengs utvikling av robotisert automatisering av prøveopparbeiding, preparering og analysering, hvilket dagens kommersielle PCR kit og instrumenter ikke er optimaliserte for (se review ¹).

4.3.3 NASBA

Nukleinsyre sekvens-basert amplifisering (NASBA) har mange av de samme styrkene og svakhetene som PCR i forhold til deteksjonsgrenser og spesifikke markører. Forskjellen er at NASBA også kan analysere for RNA og at amplifiseringen ikke trenger en avansert varmeblokk for skiftende varmesykluser. Kun genene som er i bruk kopieres over fra DNA til RNA i en organisme, og gjerne i flere kopier. RNA som ikke lenger er ønsket blir ødelagt av enzymer (RNAsaser) som alle celler produserer og som det derfor finnes mye av i miljøet. Det gjør at RNA-baserte metoder i mindre grad detekterer celler som er døde. Dessuten kan man få bedre deteksjonsgrenser med NASBA enn DNA-metodene fordi det kan være flere kopier av RNA enn DNA fra en celle. Det at RNAsaser er så utbredt gjør RNA-ekstraksjon mer sensitiv for falske negative enn DNA-ekstraksjoner fordi RNA kan bli ødelagt før analyse om man ikke er forsiktig.

Nukleinsyre sekvens-basert amplifisering muliggjør amplifisering av RNA fra både RNA og DNA. Denne metoden har tidligere blitt brukt for deteksjon av bakterier og parasitter i mat og i feltprøver⁶⁰. Den fremste fordelen med denne metoden er at reaksjonen skjer isotermt, dvs. på en konstant temperatur, 41°C. Dette har bl.a. muliggjort at analysen kan appliseres i et mikrofluid system, en såkalt on-chip NASAB⁶⁰. Applikasjonen av denne analysen har vist seg å være rask (1-2 t), og å kreve lav mengde prøvevolum. Artikkelforfatterene hevder også at analysen er sensitiv og rapporterer en deteksjonsgrense på 5 fmol/12.5 µl ved analyse av parasitten *Cryptosporidium*⁶¹, men de rapporterer ikke hva 5 fmol av mål-sekvens utgjør i antall celler så det er vanskelig å vurdere hva bruksområdet vil være. On-chip NASAB mikrofluid systemet har videre blitt utviklet og er i ferd med å bli kommersielle produkter for bl.a. analyse av *Cryptosporidium* (CryptoDetect CARD, Rheonix, 2011), virus, bakterier og protozoa (Early Warning Inc.)⁶². Foretaket Early Warning Inc. er i ferd med å utvikle et hel-automatisert online overvåkings-system for patogener inkludert virus, bakterier og protozoa. Dette overvåkingsystemet har muligheten til å filtrere 10L vann og oppkonsentrere dette til en 10 ml prøve. Problematikken rundt filtrering og oppkonsentrering av prøven er bl.a. løst av at filtreringssteget bruker hydrodynamisk kavitasjon for å løse opp klumper i vannprøven. Early Warning Inc.⁶³ rapporterer lavest deteksjonsgrens på 1 celle/100ml ekvivalent til originalt 10L. I tillegg kan en og samme mikrofluid-chip samtidig analysere 25 ulike organismer, rapportere kvantitative resultater og kontrollere viabilitet. Analysetiden fra prøvetaking til ferdig resultat er mindre enn 3 timer. Systemet er relativt stort i størrelse (200 kg, 182 × 139 × 76 cm) og er derfor ikke egnet for å brukes i felt⁶². Forfatterne presiserer at denne informasjonen er hentet fra firmaets nettside, og ikke fra fagfelleurdert tidsskrift eller brukere. Et fagmiljø på Universitetet i Sørøst-Norge (USN) holder også på å etablere hurtigmetode for patogener basert på NASBA-teknologi (personlig kom. Lars Roseng, USN).

4.3.4 Mikromatrise

Mikromatrise er en relativt ny metode for å analysere mange målorganismer fra samme prøve i en og samme analyse. Den største fordelen med analysen er at den dekker mange forskjellige patogener og ikke-patogene organismer (eks. virus, bakterier, protozoa) samtidig. Videre kan den også designes ut i fra hva brukeren er interessert i å vite. Sensitiviteten er dårligere enn andre molekylærbaserte metoder da den er semi-kvantitativ, men mengden informasjon gjør den bedre til for eksempel kildeopsporing og risikoanalyser, da man sparer mye tid på å bare gjennomføre en analyse. Utfordringen med denne analysen er at man trenger mye forarbeid før analyse, slik som oppkonsentrering av prøve, DNA-ekstraksjon for å fjerne stoffer som kan påvirke mikromatriseanalysen, samt design av mikromatrise og preparering av prøve for denne. På grunn av dette blir mikromatrisemetoder brukt på laboratorier med høyt kvalifiserte laboratoriepersonell. I tillegg må resultatene analyseres, noe som krever kvalifisert personell innenfor bioinformatikk. En annen begrensning er at metoden i utgangspunktet ikke skiller mellom levende og døde bakterier, eller infektiv og ikke-infektiv virus.

Mikromatriser har de siste årene blitt brukt for identifisering og karakterisering av mikrobielle populasjoner i vannprøver f.eks. drikkevann, avløpsvann, marint- og ellevann⁶⁴⁻⁶⁷. Foreløpig er mikromatriser forskningsbasert, men kan være en rask måte å søke tusenvis til hundretusenvis forskjellige gener fra ønskelige målorganismer i en miljøprøve. Denne analysen muliggjør identifisering av de patogener som mest sannsynlig vil medføre fare for menneskers helse og i tillegg identifisere potensielle kilder til fekal forurensning⁶⁷.

Mikromatriseteknologi baseres på binding (hybridisering) av nukleinsyresekvenser (mRNA eller DNA) til pre-definerte komplementære sekvenser/biter av enkeltgener (probe) på en mikrochip. Hvert enkelt gen har en spesifikk plass på mikrochipen, der genetisk materiale (mRNA eller DNA) med en overensstemmende sekvens kan hybridiseres. Etter hybridisering måles mengden bundet genetisk materiale i hvert enkelt punkt (og hvor mye av den som finnes tilstede i prøven). Mikromatrisen tilpasses/designes i forkant av brukeren og spesifikke komplementære gensekvenser for patogener og ikke-patogene virus, bakterier og protozoa kan predefineres som mål.

Applikasjon og potensial

Det finnes i dag forskjellige tilnærminger av mikromatriser slik som rRNA, neste generasjons sekvensering (NGS) og MST^{67,68}. Mikromatriser basert på rRNA og NGS har stor nytteverdi når organisme-diversiteten i fekale- og/eller vannprøver skal undersøkes^{69,70}. Fordelen med MST-baserte mikromatriser sammenlignet med rRNA og NGS er at den bedre identifiserer patogener knyttet til menneskelig helse og mikrobiell vannkvalitet⁶⁷. Bruk av mikromatriser for MST har nylig blitt utviklet, og i en studie av Li et. al.⁶⁷ ble ca. 400 sekvenser brukt til å måle både patogener, indikatorer og kildeopsporingsmarkører i ellevann og marint vann etter oppkonsentrering med ultrafiltrering (DEUF). Gjennom bruk av ulike DNA-amplifiseringsmetoder (eks. hel-genoms-amplifisering: whole-genome-amplification (WGA)) før mikromatriseanalysen kunne analysen inkludere tusenvis forskjellige organismer og målgener f.eks. mitokondrie DNA, virulente- og antibiotika resistente gener⁶⁷.

Kombinasjon av ultrafiltrering, WGA og mikromatriseanalysen har oppnådd deteksjonsgrenser for bakterier i størrelsesorden 19-65 genkopier/100ml for bakterier (*E. coli* og *Enterococcus* spp.) og 2-14 genkopier/100ml for virus (Polyomavirus og norovirus)⁶⁷ som tilsier at metoden kan egne seg til mikrobiell overvåking/kartlegging av forurenset vann, men ikke til drikkevann. Samme studie viser at

den samme MST mikromatrisen kan skille mellom opprinnelsen til forskjellige fekal-assosierte patogener i overvann.

Begrensninger

Følsomheten i MST mikromatriser er variabel (21-57%) og falsk-positive resultater (7-11%) kan delvis skyldes lav spesifisitet i det utvalgte predefinerte enkeltgener ⁶⁷. Dette belyser betydningen av å kritisk velge artsspesifikke genmarkører når man utvikler spesialtilpassede mikromatriser. Det finnes derfor en del kritikk mot bruk av kvantitative mikromatriser, da det har blitt påvist lav korrelasjon mellom disse og kvantitative metoder slik som qPCR ⁷¹. Det har derfor blitt foreslått at analysen bør brukes semi-kvantitativt i kombinasjon med kvantitativ verifisering med qPCR ⁶⁷. Følsomheten i mikromatriser er per dags dato lavere enn det som tidligere ble rapportert for mange enkeltgen qPCR analyser ⁶⁷. I tillegg kan ikke mikromatriser skille mellom levende og døde bakterier, eller infektiv og ikke-infektiv virus, noe som krever ytterligere verifisering.

4.3.5 FISH

Fluorescerende in situ/i prøve hybridisering (FISH) bruker fluorescerende markører som er spesifikke for det genetiske materialet RNA i en målorganisme (f.eks. *E. coli*) og at denne kan gjenkjennes i manuelle eller automatiske mikroskopbaserte systemer. Fordelen med å bruke denne typen av molekyllære metoder er at den er mer sensitiv (høyere kopiantall av RNA) enn DNA-baserte markører og den kan differensiere mellom levende og døde celler til en viss grad¹. Den største ulempen med denne analysen er at den trenger konsentrering av prøven før analyse grunnet lave konsentrasjoner av patogener i drikkevann, badevann og avløpsvann. FISH er en komplementerende metode til «flowcytometri».

4.4 Celletellinganalyser

4.4.1 Generelle betraktninger for celletellingsanalyser

Bakterietall i en prøve blir oftest bestemt med dyrkingsmetoder som tar 3 til 10 dager. Telling kan også gjøres i mikroskop manuelt etter farging med f.eks DAPI for å gi totaltall og ikke bare levende celler, men dette krever mye manuelt arbeid. En enkelt telling gir heller ikke så mye informasjon annet enn et øyeblikksbilde. Automatiske metoder for celletelling vil derfor spare tid og gi mer informasjon. Utfordringen kan være lave konsentrasjoner, og å skille bakterier fra andre små partikler. Teknologiene kan grovt deles i to kategorier: automatisert mikroskopiering der man analyserer bilder og flowcytometri som teller partikler, og hvor bakteriene gjenkjennes ved å merke de med fluorescerende fargestoffer. Ved hjelp av fargestoffer kan man i teorien skille levende og døde bakterier, men i praksis vil betegnelsen «intakte celler» være mer korrekt beskrivelse enn levende, fordi intakte celler uten metabolsk aktivitet og uten mulighet til å formere seg også blir farget med «levende» farge.

Tabell 15. Mulighet og begrensinger for celledellingsanalyser

Parameter	Muligheter	Begrensinger
Tid	Nær online, minutter	
Sensitivitet	1-1000 celler/ml	Avhengig av analysetid – lav deteksjonsgrense krever lengre analysetid
Spesifisitet	Celler med DNA, levende bakterier	Patogener/indikatorer har for lav konsentrasjon relativt til andre celler til å måles.
Presisjon		Utfordring å skille levende fra døde bakterier, og kan være utfordrende å skille partikler fra bakterier.
Resurser	Halv-automatisk eller online instrument	Ofte behov for manuell vurdering av resultatene

4.4.2 Mikroskopibaserte metoder

Mikroskopibaserte analyser er veletablerte og har lenge blitt brukt innenfor identifisering og karakterisering av patogener i vann og biota. De siste årene har det skjedd en rask utvikling av kommersielle automatiserte online sensorer som bruker mikroskopibaserte teknologier for identifisering og differensiering av mange forskjellige taksonomiske grupper av patogene bakterier og alger. Teknologier slik som BACMON (Grundfos A/S), HoloSea og FluroSea (4Deep, Resolution Optics Inc.) kan skille mellom bakterielle og ikke-bakterielle partikler og et antall forskjellige organismetyper (eks. *E. coli*, cyanobakterie, *Alexandrium sp.*) i sjø- og innlandsvann, og rapportere om forhøyde målinger i realtid. Andre teknologier har kombinert direktetelling av celler og måling av metabolitter som en indikasjon på en forandring i konsentrasjonen av bakterier i vann (7000 RMS, Mettler Toledo A/S).

Generelt sett er teknologien lovende da det er mulighet for online, realtids og feltmålinger av badevann (marint og innlandsvann), drikkevann og renseanlegg. Ulempen er at den ikke kan identifisere spesifikke bakterier eller patogener, og vil derfor først og fremst kunne være en driftsparameter for renseanlegg. For badevannsovervåking vil teknologien være best egnet til overvåking av skadelige algeoppblomstringer, men ha begrenset nytte for vurdering av fargen for smittsomme sykdommer.

Portable, automatiserte og online mikroskopibaserte systemer har de siste årene blitt utviklet og kommersialisert. Automatisert overvåking med laserbasert (FluroSea - fluorescerende og HoloSea - holografisk)-bildebehandlingsteknologi har vist seg å kunne gi en tidlig advarsel i realtid for skadelig algeoppblomstring, *Alexandrium sp.*, cyanobakterier, *E. coli* og fnokker i vannrenseprosesser og marine kystområder⁷². Systemene fra foretaket 4Deep kan skille mellom taksonomiske grupper av alger basert bl.a. på cellestørrelse (2-2000µm) og har en deteksjonsgrense på 100 celler/ml^{72,73}. Denne automatiserte laserbaserte bildebehandlingsteknologi er siden 2017 under evaluering av Canadas kyst og hav-myndighet⁷⁴ for bruk i overvåking av marin algeoppblomstring i kyst- og havområder. FluroSea og HoloSea er små portable enheter (8-27 kg) som har muligheten til å identifisere mange forskjellige taksonomiske grupper med det automatiserte programmet, og har med suksess identifisert plankton og fnokker i felt⁷³.

Andre foretak har implementert total partikkeltelling med 3D-skanningsoptikk (BACMON, Grundfos A/S) eller måling av metabolitter fra bakterier og sopp slik som NADH og riboflavin i kombinasjon av telling med laser og fluorescerende mikroskopi (7000 RMS,⁷⁵). BACMON (Grundfos A/S) sensoren er et automatisert mikroskop som ved hjelp av matematiske algoritmer skiller mellom bakterielle og ikke-bakterielle partikler (differensiering spesifisitet 78± 14%) egnet for kontroll av vannkvalitet i renseanlegg. Sensoren måler i realtid (10 minutters oppløsning) endringer i partikkelkonsentrasjoner

med en teoretisk deteksjonsgrense av 1.6×10^2 – $1-5 \times 10^6$ partikler/ml i en størrelsesorden av 0.77–3 μm ⁷⁶. Denne sensoren har under en lengre periode blitt validert av forskjellige Danske vannrenseanlegg (HOFOR A/S, Vand A/S og TREFOR Vand A/S). Tilbakemeldingene på sensoren var både positive og negative, der tolking av resultatene var den fremste ulempen. Siden BACMON rapporterte stabile målinger, hadde brukervennlig grensesnitt og krevde lite vedlikehold, ville vannrenseanleggene fortsette å bruke denne teknologien⁴.

Sensoren 7000 RMS fra Mettler Toledo A/S har muligheten til å direkte telle bakterier med laser samtidig som den måler bakterie- og soppmetabolitter i vann. Denne teknologien er utviklet for overvåking av vannkvalitet i farmakologi-industrien⁷⁵ og har ikke blitt validert for overvåking av vannkvalitet i renseanlegg⁴.

Begrensinger

Ulempen med denne teknologien er at den ikke egner seg for analyse av lave konsentrasjoner (<100 celler/ml) og at den heller ikke kan identifisere bakterier som *E. coli* eller patogener. Ingen av de vurderte teknologiene hadde mulighet for å analysere virus. Flere detaljer om kommersielle teknologier som detekterer et bredt spekter av marine mikroorganismer og toksiner finnes i boka "Recent Advances in the Analysis of Marine Toxins" utgitt i 2017⁷³.

4.4.3 FCM

Flowcytometer (FCM) er en avansert partikkelteller som kan gjenkjenne bakterier når de først er merket med en fluorescerende farge. Hvor bra analysen blir avhenger av typen fargestoff. Det vanligste er å farge med SYBRgreen som bindes til DNA i alle bakterier, og eventuelt motfarge med propidium iodid (PI) for å skille ut de bakteriene som helt klart er døde. Man kan også bruke spesifikke merkelapper på patogene bakterier som f. eks. FISH, men patogener finnes gjerne i så lave konsentrasjoner at man får dårlig deteksjon. Analyse av 50-100 μl vannprøve tar bare noen få minutter (2-10min), men man trenger 10-20 minutter for fargereaksjon først. FCM er tatt i bruk som rutineanalyse hos vannverk i Sveits.

Et flowcytometer bruker en væskefilm til å oppkonsentrere vannprøven slik at en og en partikkel passerer sensoren som består av en eller flere laserlys og flere detektorer med filter for fluorescens. For hver partikkel registrerer instrumentet lysspredning som kan si noe om relativ størrelse og form av partiklene, og emitterende fluorescens for gitte bølgelengder. FCM har vært benyttet i helseforskning i mange tiår for telling av blodceller og separering av kreftceller eller sædceller, men har ikke vært like utbredt for miljøanalyser. I denne rapporten er det ikke fokusert på forskjeller i ulike modeller og produsenter av flowcytometer, men heller på noen av anvendelsesområdene innen vannbransjen.

Det finnes etablerte protokoller for bruk av FCM til overvåking av totaltall av bakterier i drikkevann, og intakt celledetall som er totaltall minus bakterier med ødelagt membran: farging av alle celler med SYBRgreen og døde celler med propidium iodid^{77,78}, men det er også andre fargestoffer som kan benyttes til samme funksjon. Utfordringen med levende/død farging er måten bakteriene dør på. Etter klorering blir membranen ødelagt og bakteriene er tydelig døde, men etter UV-desinfeksjon er membranene fortsatt hele og bakteriene vil bli telt som levende selv om de ikke kan vokse⁷⁹.

En annen informasjon man får fra FCM av bakterier farget med SYBRgreen er relativ fluorescensintensitet på de forskjellige bakteriene. Dette kan benyttes til å klassifisere bakteriene i «lav-

nukleinsyre» og «høy-nukleinsyre» grupper som ser ut til både å være knyttet til spesifikke bakteriegrupper og metabolsk aktivitet⁸⁰. Ved bruk av statistisk analyse kan man utvide analysen av fluorescens-intensitet til ikke bare å skille i to klasser, men etablere såkalte fingeravtrykk for spesifikke vannkilder^{81,82}. Det viser seg at sammensetningen av bakterier i en spesifikk vannkilde endrer seg lite over tid, og at dette kan benyttes til å oppdage endringer i vannkilden i form av forurensing eller innsug på ledningsnettet⁸². Artikkelforfatterne kaller metoden sensitiv, men det måtte en 3% endring til for å bli oppdaget, dvs kun 3:100 fortyning av fremmedvann.

FCM kan også benyttes til overvåking av hele drikkevannsprosessen. I en studie på et pilotanlegg så de at ozoneringen ødela bakteriecellene, granulert kullfilter forårsaket gjenvekst av bakterier og membranfilteret fjernet bakteriene fra vannet⁸³. Metoden ga bedre resultat enn ATP-måling fordi den ikke ble påvirket av frigitt ATP fra døde celler, og hadde typisk 10 til 100 ganger høyere verdier enn standard platetelling⁸³. Dette er som forventet, da kun en liten andel bakterier er dyrkbare. I en review som sammenlignet FCM med tradisjonelle metoder ble det også konkludert med at det ikke var noen sammenheng mellom platetelling og FCM og ATP, men at de likevel anbefaler FCM i forhold til platetelling fordi platetellingene har så mange svakheter (de tar lang tid, analyserer kun 1% av bakteriene, mulighet for automatisering)⁸⁴. Automatisering av FCM er også forsøkt med suksess for online overvåking av vannkvalitet med analyse hvert 5. minutt i 24 timer⁸⁵.

FCM er mye testet og tatt i bruk til en viss grad i overvåking av drikkevann og ledningsnett^{79, 82, 84, 86-89}. FCM er også blitt tatt i bruk for å bestemme kilden til vekst i ledningsnettet. I de fleste tilfellene var veksten knyttet til ledningsnett hos husholdningene. FCM ga mer og raskere informasjon enn dyrkingsmetoder for overvåking av punkt-kontaminering av drikkevannsledningsnettet⁸⁷. Etter vedlikehold på ledningsnettet når vannforsyningen må stenges av i en periode, er praksisen å spyle med rent vann i flere timer før man antar vannet er trygt. Måling av bakterier i ledningsnettet med FCM ble benyttet for å finne ut hvor lenge man trengte å spyle før alt fremmedvann var ute av systemet og bakteriesamfunnet var stabilt og tilbake til normalen. Denne målingen gjorde at man kunne spare flere timer med spyling og få et svar på om vannet var trygt uten å vente på dyrkingsmetoden for koliforme bakterier og enterokokker som tar ett til to døgn. FCM var også mer konservativ enn platetellingene siden den så på alle bakterier og ikke bare indikatorbakterier som finnes i lavere konsentrasjoner⁸⁶.

Flowcytometri i kombinasjon med abiotiske faktorer ble brukt i overvåking av tre underjordiske elver brukt til drikkevann i flere måneder⁹⁰. Dynamikken i bakterietall ble overvåket, og de kunne måle hvor lang tid det tok fra nedbørshendelser til vannkvaliteten ble påvirket (0,2 til 6,7 timer)⁹⁰.

Flowcytometri kan også benyttes til deteksjon av spesifikke bakterier, og Chen et al viste at de kunne identifisere 8 forskjellige bakterier i samme assay ved bruk av 5 fluorescerende prober og telling i flowcytometer⁹¹.

Begrensninger

FCM gir mer anvendbare data enn platetelling fordi analysen er så rask at den muliggjør større datainnsamling i tillegg til at den inkluderer alle celler, ikke bare fraksjonen som kan dyrkes opp. Men metoden skiller ikke godt mellom levende og døde bakterier, spesielt etter UV-desinfeksjon. Instrumentet krever en investering for anskaffelse, men er sammenlignbart med platetelling i kostnad for forbruksmaterieell⁸⁴. FCM er relativt enkel i bruk og krever ikke spesialkompetanse for daglig bruk, men riktig vedlikehold er viktig for å få gode resultater over tid. Som de andre metodene for total-tall bakterier kreves det en innkjøringsfase for å forstå hvilke variasjoner man forventer i den aktuelle vannkilden/prøvepunktet, og for fingeravtrykk-analyse kreves det kunnskap for

datanalyse om dette ikke blir integrert i et dataprogram. Analysene blir mer unøyaktig ved lave celletellinger (<1000 celler/ml) enn ved høye.

4.5 Sensorer

4.5.1 Generelle betraktninger for sensorer

Den ideelle metoden for å overvåke mikrobiell forurensing er en online sensor som kan fortelle om vannet er trygt eller ikke. Dessverre har ikke teknologien kommet så langt enda at alle kjemiske og hygieniske parametere kan måles nøyaktig nok ved hjelp av en probe i vann. Det foregår derimot enormt med forskning for å bringe oss nærmere den muligheten, og det er ett vel av avanserte måleprinsipper som anvendes for å utvikle morgendagens biosensorer. Mange av sensorene viser potensiale, både når det gjelder spesifisitet og brukervennlighet, men deteksjonsgrenser er en utfordring. Dette avsnittet tar for seg alt fra de tradisjonelle sensorene for fysisk/kjemisk overvåking og hvordan de kan korreleres mot hygieniske parametere, til nyutviklede sensorer basert på papir eller nanomaterialer.

Tabell 16. Mulighet og begrensinger for sensorer

Parameter	Muligheter	Begrensinger
Tid	Nær online, minutter-timer	Mange biosensorer trenger stadig oppfølging, bruker engangstester
Sensitivitet	Deteksjonsgrense er 10-2000 000 CFU/ml Elektrokjemiske biosensorer er for tilfellet de mest sensitive	Høy konsentrasjon av partikkelformet materiale, organisk/ikke organiske forurensninger og ikke-spesifikke interaksjoner og adsorpsjon kan påvirke sensitiviteten og livslengden på biosensoren
Spesifisitet	Mange vanlige bakterier f.eks. <i>E. coli</i> , <i>Legionella spp.</i> , <i>Listeria spp.</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Vibrio cholera</i> . Finnes men ikke like vanlig for virus (f.eks. poliovirus), protozoa (<i>C. parum</i>)	Komplekse miljøprøver med mange mikrobielle arter tilstede kan påvirke spesifisiteten
Presisjon	Falske negative kan forventes pga dårlige deteksjonsgrenser.	Ugunstige analyseforhold kan utsette biogjenkjenningsselementet (f.eks. antistoff) for akselerert degenerasjon resulterer i tap av selektivitet, bindingsaktivitet og / eller bindende kapasitet
Resurser	I fremtiden tenkes det at man kan ha håndholdte instrumenter, eller online instrumenter.	Forfatterne kjenner ikke til biosensorer som er kommersielt tilgjengelig eller nær å bli det.

4.5.2 Fysikalsk/kjemiske sensorer

En rekke fysikalsk/kjemiske sensorer blir tatt i bruk for online overvåking av drikkevannsproduksjonen i dag. Det er gjort forsøk på å korrelere resultatene av disse sensorene mot hygieniske parametere med varierende resultater. En annen fremgangsmåte er å benytte kjemisk signatur for mikroorganismer for hurtig-online overvåking. Tryptofan-lignende fluorescense er en slik metode som gir hurtig resultat, men som til gjengjeld er lite spesifikk siden den ikke skiller levende og døde celler, eller forskjellige celler.

De tradisjonelle fysikalsk/kjemiske sensorene for overvåking av drikkevannsproduksjonen er pH, temperatur, konduktivitet, turbiditet, UV abs 254nm og partikkelteller. Disse kan benyttes til å fange opp større endringer i vannkvalitet som også kan knyttes til hygieniske parametere. Et eksempel er overvåking av et pilot-drikkevannsledningsnett. Systemet ble kontaminert med en renkultur *E. coli* og forurensningshendelsen overvåket med online sensorene. Turbiditet, konduktivitet og UV hadde signalutslag høyere en bakgrunn ⁹². Utfordringen er at reelle forurensningshendelser kan ha veldig forskjellig karakter, og det er ikke alltid samspill mellom *E. coli* konsentrasjon og andre parametere. I et annet eksempel ble UV-spektrum brukt for gjenkjenning av vaskemidler som kildeproving. Systemet klarte kun å detektere kloakk fortynt 1:10 ⁹³. Bakterier er partikler, så partikkeltellere er blitt brukt som tilnærming til bakterietelling: Online partikkelteller ble sammenlignet med mikroskopitelling av plankton i et drikkevannsreservoar. Man må ha bakgrunnskunnskap om både vannkilden og kombinere partikkelteller med mikroskopitellinger for å ha full nytte av online resultatene ⁹⁴.

En annen fremgangsmåte er å benytte kjemisk signatur for mikroorganismer for å gjøre online overvåking. Fluorescens fra eksitasjon ved 280nm og emisjon ved 360nm er betegnet som tryptofanlignende fluorescens fra organisk materiale i drikkevann. En fluorescens-sensor ble testet ut for å korrelere fluorescens-signal mot forurensningshendelser. Ved konsentrasjoner av TKB under 10CFU/100ml var feilkildene for store til at sensoren var pålitelig, men over denne konsentrasjonen var fluorescens korrelert mot TKB forurensing. Sensoren er testet på drikkevann fra grunnvann og overflatevann i India, Malawi, Sør-Afrika og Zambia ⁹⁵. Det samme analyseprinsippet blir testet ut på Universitetet i Sørøst-Norge (personlig kom. Tao Dong, USN).

4.5.3 Biosensor

Biosensorer til analyse av vann er stort sett på forskningsstadiet. Ingen av sensorene beskrevet i dette kapitlet er kommersialisert, og studiene man finner i litteraturen er stort sett demonstrasjon av analyseprinsipper under rene laboratoriebetingelser. Det gjøres mye forskning på utvikling av sensorer, og mye har skjedd de siste ti årene. Forfatterne mener derfor det er viktig å være klar over hvilke muligheter og begrensinger biosensorer har. Den viktigste begrensningen er deteksjonsgrense. Det er urealistisk at en sensor vil kunne detektere 1 bakterie eller virus i 100ml vann fordi det må være kontakt mellom bakterien og sensoren for å gi signal. Anvendelse innen drikkevann vil derfor ikke være realistisk, mener forfatterne. Men for kildesporing og forurenset vann vil det være potensiale for bruk.

De viktigste kravene til en pålitelig analyse av patogener er spesifisitet, følsomhet, reproduserbarhet og å kunne ha tillit til de gitte resultatene. I tillegg er det ønskelig med en høy deteksjonshastighet, automatisering med «online» rapportering og kostnadseffektivitet.

Prinsippene bak de forskjellige sensorene varierer stort fra rene biosensorer som benytter levende celler, til instrumenter som baserer seg på avansert fysikk som Raman spektroskopi.

Felles for alle sensorene er at de må løse tre oppgaver:

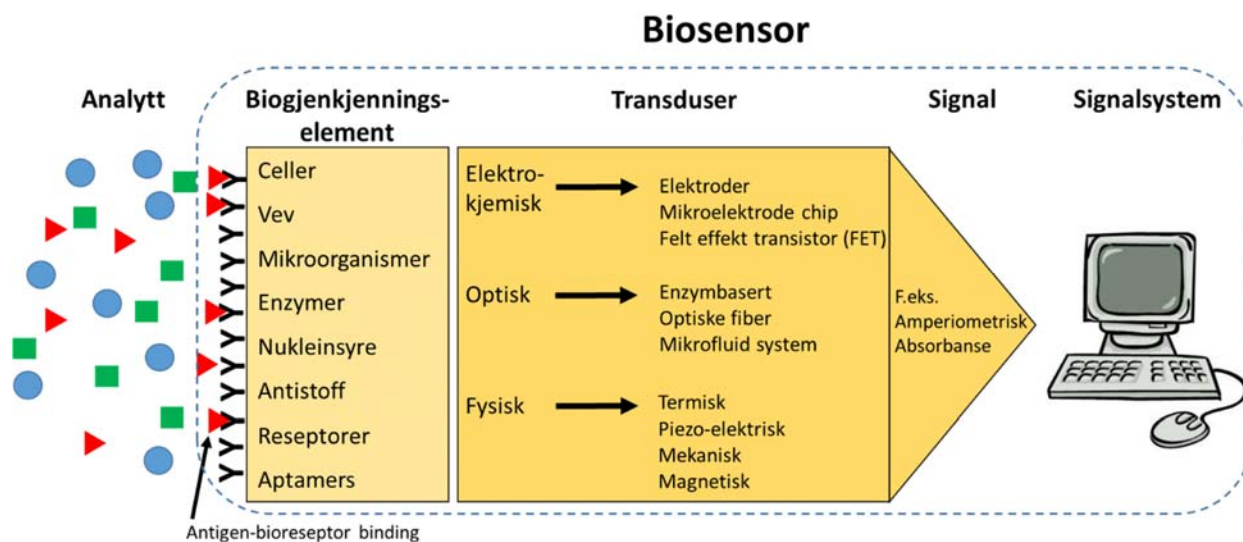
1. Fange eller gjenkjenne bakteriene (antistoff, peptid, polymer, m.f.)
2. Sende et signal om at bakterien er identifisert (nanopartikler, antistoff, m.f.)
3. Tolke signalet slik at det kan avleses (elektrisk puls, spektroskopi, m.f.)

Utfordringen med punkt 1- fange og gjenkjenne, er ofte knyttet til konsentrasjon av organismen som skal detekteres; hvordan kan man sørge for at et fåtall organismer i en stor vannmasse skal feste seg til og detekteres av et biogjenkjenningselement. Presisjonen i biogjenkjenningselementet gir oftest en god og spesifikk binding, men et problem kan også være regenerering og levetid. Levetid er i liten grad vurdert i publikasjonene fordi dette er undersøkelser gjort på et tidlig stadium.

Punkt 2- sende et signal, kan enten være samme partikkel som i punkt 1, eller samme mekanisme som også tolker signalet i punkt 3, eller en egen reporter partikkel som binder seg til partikkelen eller organismen. Utfordringen her kan være spesifisiteten, at man bare sender signal for rett organisme, og at signalet er sterkt nok. Noen sensorer inkluderer signalforsterkende mekanismer.

Utfordringen for punkt 3- tolke signalet, er å få et sterkt og entydig nok signal til å skille det fra bakgrunnen. Hvilken metode som benyttes for å fange opp signalet er også med på å bestemme både størrelse og pris på hele sensoren. Optiske sensorer som leser farge kan være billige og til og med erstattes med lett tilgjengelig teknologi (f.eks. mobilkameraer), men krever til gjengjeld høy signalstyrke for å kunne avleses.

Kort beskrevet er en biosensor en enhet som har integrert biologisk materiale med teknologi gjennom å bruke immobiliserte (festede) biomolekyler fra organismer eller syntetiske reseptorer (biogjenkjenningselement) på en overflate sammen med en fysisk-kjemisk transduser. Spesifisiteten til de brukte biologiske konjugantene (biogjenkjenningselementene) resulterer i sensorer som bare gjenkjenner den ønskede analytten i en prøve. Informasjonen kan gi kvantitative eller semi-kvantitative tall på mengden og tilstedeværelse av mikrobielle populasjoner. Denne teknologien har potensiale for å tilby fordeler i forhold til konvensjonelle metoder f.eks. spesifisitet, robust, minimal prøveforberedelse, brukervennlig grensesnitt, kostnadseffektiv og i visse tilfeller online overvåking⁹⁶. Teknologien er fortsatt under utvikling og hovedsakelig forskningsbasert, men har stort potensial for å bli kommersialisert i framtiden.



Figur 1. Oversikt av de forskjellige komponentene en biosensor kan bestå av. Figuren presenterer de mest brukte/vanligste typene og metodene av biogjenkjenningselementer og transdusere.

Beskrevet i mer detalj fungerer biosensorer slik at analytten binder til et biogjenkjenningselement som består av en spesifikk pre-definert bioreseptor (eks. antistoff, reseptor, enzym), immobilisert på et egnet biomateriale. Biogjenkjenningselementet er videre integrert med en transduser, som vanligst er elektrokjemisk eller optisk-basert. Transduserne forsterker og konverterer den (bio)kjemiske bindingshendelsen til et signal (f.eks. amperimetrisk, fluorescens eller absorbans) og videresender denne til signalanalyse-systemet for videre tolkning (Figur 1)⁹⁷. Intensiteten av generert signal fra transduserne er direkte eller omvendt proporsjonale med analyttkonsentrasjonen i den målte prøven.

Bruk av nanoteknologi i biosensorer f.eks. nanopartikler (NP) har de siste årene blitt intensifisert da de har høy spesifisitet, motstandsdyktighet mot ytre påvirkning og en større overflate som øker interaksjonseffektiviteten⁹⁸. Biosensorer som bruker nanoteknologi er fortsatt forskningsbaserte, men har stort potensiale for framtidig kommersialisering da mange er gjenbrukbare, reproducerbare og svært selektive. Mange av de nylig produserte studiene bruker NP for å 1) separere bakteriene fra den komplekse prøvematriksen gjennom magnetiserte NP, 2) øke kontaktflaten mellom analytt-antistoff/DNA-merka NP, 3) fargeindikator eller 4) bruk som merkestoff⁹⁸.

Biosensorer er oppbygde på forskjellige teknologier og en oversikt (Figur 1), kort beskrivelse av disse forskjellige typer av sensorer, deres potensielle applikasjon og begrensninger beskrives i følgende tekst. Sensorene som presenteres i dette avsnittet er kun forskningsbaserte siden det ikke finnes noe særlig kommersielle biosensorer på markedet ifølge en rapport av Tatari med kolleger (2016)⁴. Mange av de presenterte teknologiene har i framtiden potensiale til å bli online-sensorer, men er foreløpig ikke på et slikt utviklingsstadium. I teorien kan man utvikle biosensor for enhver type bakterie, virus eller parasitt avhengig av hvilket gjenkjenningselement man benytter. For praktisk anvendelse vil det allikevel være mest relevant med indikatororganismer som finnes i relativt høye konsentrasjoner for å få pålitelige målinger.

Biogjenkjenningselement

Biogjenkjenningselementer kan bestå av f.eks. oligonukleotider, antistoff og enzymer, der sistnevnte er det vanligste brukte elementet⁹⁹. Et korrekt designet biogjenkjenningselement bør være svært spesifikt, ha høy affinitet og danne et relative stabilt kompleks med det tiltenkte målet (f.eks. *E. coli*)⁹⁷. De forhåndsdefinerte bioreseptorene vil da binde med de spesifikke komponentene (f.eks. antigen) i analytten. Det er svært viktig at biogjenkjenningselementet er biokompatibelt med den tiltenkte vertresponen (Host response) og den spesifikke analytiske tilnærmingen. Dette for å unngå at giftige eller skadelige effekter oppstår i det biologiske systemet som videre kan påvirke resultatets pålitelighet⁹⁷.

Det finnes to forskjellige typer biogjenkjenningselement, katalytisk- og affinitet-basert. Katalytisk-baserte biosensorer har elektroder som er fiksert/immobilisert med enzymer og er kjemisk katalytiske ved binding til spesifikke komponenter i analytten. Affinitet-baserte biosensorer binder et mål ved hjelp av immobiliserte reseptorer eller antistoff til transduserflaten. Valg av korrekt biogjenkjenningselement er viktig da de er avhengig av hvor stabilt analysemiljøet er, d.v.s. temperaturrendringer og pH, men først og fremst hvor spesifikk analyse man ønsker for å identifisere tiltenkt målorganisme.

Biogjenkjenningselement kan bestå av merket og ikke-merket biosensorer. Bruk av ikke-merket biosensorer har vist seg mer brukervennlig, tidseffektivt og økonomisk og mange metoder bruker derfor dette⁹⁸.

Elektrokjemiske biosensorer

Elektrokjemiske transdusere fungerer på to forskjellige måter, enten oppdager de den initierte kjemiske reaksjonen mellom analytten og bioreseptoren (kjemisk energi) og konverterer disse endringene til lesbare elektroniske signaler, eller de oppdager elektriske endringer i vannoverflater som inneholder biologiske elementer. Elektrokjemiske transdusere er ofte enzym-baserte og reaksjonen baseres på produksjon eller konsumpsjon av elektroner. Denne teknologien er svært sensitiv (lav deteksjonsgrense)⁹⁷ og har blitt utviklet ilt. de siste 10 årene. Elektrokjemisk baserte sensorer betegnes generelt av brukervennlighet, høy følsomhet og kostnadseffektivitet.

Et godt eksempel på dette er papir-baserte biosensorer som har vist framgang med rask analysetid (>90 sek) og lav kostnad, men deteksjonsgrense på 1-200 CFU/ml og 100 pfu/ml henholdsvis for bakterier og virus¹⁰⁰⁻¹⁰³. Mange av disse sensorene bruker enzym- eller antistoff-reaksjoner som biogjenkjenningselement på papiret, og i en studie har de forsøkt å standardisere farge-avlesing v.h.a en mobiltelefon-applikasjon¹⁰¹.

Bruk av nanoteknologi i biosensorer har de siste årene blitt intensifisert og er fremdeles hovedsakelig forskningsbasert. I en nylig utført studie fra 2015 brukte de antistoff-modifiserte NP til å detektere *E. coli* O157:H7¹⁰⁴. Denne moderne metoden anvendte en to-steps tilnærming. Først ble bakteriene separert fra den komplekse prøvematriksen ved å bruke polymer-belagte magnetiske NP etterfulgt av fargeinmerking. Deteksjonsgrensen var 10 CFU/ml med en dynamisk rekkevidde på 10^1 til 10^6 CFU/ml og analysen tok totalt 45 min å gjennomføre. Andre studier med lignende bruk av inkorporerte antistoff-NP har også vist lav deteksjonsgrense (10 CFU/ml) for *Listeria monocytogenes*¹⁰⁵.

Bruk av grafen nano-ark med inkorporert koleratoksin (Ganglioside GM1) har vist potensiale innenfor identifisering av *Vibrio cholera* i vannovervåking. Denne biosensoren har vist seg å være gjenbrukbar, reproducerbar og selektiv i en rekkevidde av konsentrasjoner på 10^{-8} til 10^{-6} M DNA i analyser av vannprøver¹⁰⁶. Videre har bruk av antistoff-modifisert grafen nano-ark minsket deteksjonsgrensen

for *E. coli* til 10 CFU/ml og har blitt foreslått som en kandidat til videre vurdering for miljøovervåking da analysen er rask og reeltids-basert ¹⁰⁷.

Optiske biosensorer

Det finnes to kategorier av optiske sensorer, enten lysmodus (f.eks. absorbanse, fluorescens, luminescens) som brukes til å oppdage analytten i prøven eller måling av spredning av lys forårsaket av prøvene. De enkleste optiske sensorene bruker lysemisjon for å identifisere endringer i lysintensitet eller spektrumforskyvning. En slik endring kan oppstå på grunn av tilstedeværelse av en analytt, eller på grunn av det spesifikke antistoff-antigen(analytt)binding til en lyskilde. Ved nedgang av analyttkonsentrasjon i prøven vil enten et skifte i lysspekter eller et fall i lysintensitet observeres og resulterer i et fargeskifte i prøven.

Det finnes mange forskjellige typer av optiske sensorer slik som infrarød (IR), Raman spektroskopi, fluorescens, luminescens, overflate-plasmonresonanse (SPR), kolorimetri og Evanescent felt-basert fiberoptikk. Mange av metodene er kostnadseffektive, brukervennlige og bruker relativt kort tid å analysere. Mange studier har brukt denne typen av biosensorer for å detektere patogener (f.eks. *E.coli*, *Listeria*, *Salmonella* og *Vibro cholera*) ⁹⁸.

Kolorimetri-basert optisk teknologi er ideelt for utvikling av lav-kostnads biosensorer, hvor de mest sannsynlige patogener er adressert. Metoden er kostnadseffektiv og resultater kan enkelt leses og tolkes av personell uten ekspertise ved å visuelt overvåke fargeforendring ^{98, 100-103, 108-112}. Et eksempel på dette er igjen papir-baserte biosensorer for *E. coli* som skifter farge grunnet spesifikk binding til en fluorescerende DNA markører for *E. coli* ¹¹². Denne brukervennlige biosensoren har høy deteksjonshastighet (5 min), langvarig stabilt resultat (inntil 6 måneder), deteksjonsgrense på 100 CFU/ml og trenger ingen oppkonsentrering innen prøvetaking. Artikkelforfatterne mener at denne teknologien kan appliseres på en mengde forskjellige biogjenkjenningselementer (f.eks. proteiner, antistoffer) som kan produsere kolorimetriske, fluorescerende eller elektrokjemiske signaler. Nanoteknologien har også blitt integrert i denne typen analyse gjennom bl.a. bruk av fargeindikerende NP. I en studie av Bui et al. ¹¹³ lykkes de med å visuelt identifisere enkelte individer av levende patogener slik som *Salmonella*, *Listeria* og *E. coli* O157 i prøver av mat. Denne studien viser til at det finnes mulighet for å utvikle dette til bruk i vannovervåking, men med et potensielt oppkonsentreringssteg i forkant.

Raman-spektroskopi og IR har vist, både separat og i kombinasjon, å gi veldig høy presisjon gjennom å diskriminere mellom forskjellige vibrasjonsmønstre (spesifikke organisme «fingeravtrykk») for et mangfold av prøver basert på kjemisk sammensetning ⁹⁸. Disse teknologiene muliggjør overvåking med reproducerbare målinger over lang tid, korrekt identifisering og karakterisering av forskjellige patogener ⁹⁸. I en studie utført av Al-Qadiri med kolleger ¹¹⁴ rapporterte de både skadet og levende, men ikke dyrkbare patogener ved bruk av IR spektroskopi. Metoder (f.eks. mikrofluid systemer) basert på en kombinasjon av nanoteknologi, IR og Raman-spektroskopi har muliggjort analyser av merkede og umerkede prøver der et mangfold av forskjellige patogener har blitt analysert samtidig med høy presisjon og selektivitet ⁹⁸. Disse mikrofluid systemene har i de siste årene fått en stadig større rolle innenfor biosensor-teknologi (både optisk og elektrokjemisk), da de har stor overflate til volumforhold, multipleksingsmuligheter for patogener, potensiale for reeltidsovervåking og forkortet analysetid ⁹⁸.

Begrensninger

De tekniske utfordringene rundt utforming av biosensorer inkluderer følgende.

1. Manglende egenskap av varmesterilisering av apparatur mellom målinger, noe som kan gi opphav til kryss-kontaminering i biogjenkjenningselement og dermed falske positive resultater ⁹⁷.
2. Stabiliteten av analytten og det biologiske materialet i biogjenkjenningselement (som enzym, celle, antistoff, vev, etc.). Stabiliteten er avhengig av de naturlige egenskapene til molekylet som kan denatureres under ulike prøvetakingsforhold (f.eks. pH, temperatur, UV eller ioner).
3. Cellene i biogjenkjenningselementet kan bli forstyrret av andre molekyler som er i stand til å diffundere gjennom celle-membranen og på den måten påvirke det målte endepunktet indirekte.

De fleste metodene innenfor elektrokjemisk sensorteknologi har begrenset molekylær selektivitet, og man må derfor stole på (bio)molekylær gjenkjenning slik som antistoff-analytt identifisering. I tillegg kan elektroaktive interferenser forstyrre det genererte signalet gjennom f.eks. uønskede redoksreaksjoner, og slik påvirke både sensitiviteten og presisjonen i analysen ⁹⁸. Den fremste begrensningen med optiske sensorer i patogenanalyser er fortsatt den høye deteksjonsgrensen. Men med den raske utviklingen innenfor fotonikkteknologi begynner denne typen av biosensorer å bli mer kompetitiv til de elektrokjemisk-baserte sensorene ⁹⁸.

I de fleste studiene rapporterer artikkelforfatterne «lave deteksjonsgrenser», «høy sensitivitet», «deteksjon av ekstremt lave konsentrasjoner» og tilsvarende uttrykk for å beskrive teknologien sin. Dette må tolkes som relativt gode resultater, sammenlignet med tidligere utviklingsstadier av sensorer hvor sensitiviteten var dårligere. Sammenlignet med reelle konsentrasjoner i vann med lav grad av fekal forurensing er de rapporterte deteksjonsgrensene stort sett fortsatt utilstrekkelige for praktisk bruk.

4.6 Oppkonsentreringsmetoder

De fleste hurtigmetoder sliter med for dårlig deteksjonsgrense til å være egnet til overvåking av vannkvalitet, og spesielt drikkevannsovervåking. Bedre oppkonsentreringsmetoder vil kunne forbedre en rekke metoder, men det er forskjellig krav til oppkonsentrering av bakterier, virus og parasitter. Filtrering er den enkleste og mest brukte metoden for oppkonsentrering, men det kan være problemer med tetting av filter om det er partikler i vannet eller at alle partiklene man fanger sammen med cellene påvirker videre analyse. Derfor vil det oftest være behov for videre behandling og oppkonsentrering etter innledende filtrering. Det at oppkonsentrering må gjøres i flere trinn gjør at den blir vanskeligere å automatisere, og hvert trinn som inkluderes øker sjansen for tap av målorganisme og dårligere gjenfinningsgrad. Dette igjen gjør at analyse av drikkevann med veldig lave konsentrasjoner vil kreve oppkonsentrering av veldig store volum for pålitelig analyse med metodene som kun analyserer små volum vann.

Filtrering

Filtrering kan gjøres enten som «dead-end» hvor alt vannet passerer filteret og partiklene holdes tilbake, eller kryss-strømfiltrering der bare deler av vannstrømmen passerer filteret og resten resirkulerer over og oppkonsentrerer partiklene. Dead-end-filtrering har større fare for å tettes av partikler, og cellene vaskes av filteret sammen med partiklene for videre behandling eller analyse. For kryss-strømfiltrering vil cellene være igjen i en konsentrert vannprøve og man hindrer forhåpentligvis tetting av filteret underveis fordi det er en kontinuerlig skylningseffekt.

Vannprøver fra en marin strand ble oppkonsentrert fra 100L vann på et filter: hul fiber «dead-end» ultrafilter (molekylvekt cut-off 15-20 kDA) i en trailer som stod på stedet. Filtreringen tok ca 50 minutter. Filteret ble fraktet til laben der det ble eluert i 250ml buffer, som så ble filtrert gjennom 3 stablede filter (75, 53 og 38µm) for å fjerne partikler før prøven ble videre oppkonsentrert med sentrifugering, og pellet løst i 4 ml buffer^{115,116}. Oppkonsentreringen i dette tilfellet gikk fra 100L ned til 4 ml (25 000x nominell konsentrering), men krevde da både en kraftig pumpe og filtreringsenhet, samt post-filtrering for fjerning av store partikler og sentrifugering for siste oppkonsentrering. Gjenfinnelsesgraden etter konsentrering ble ikke rapportert. Hulfiber (hollow-fiber) ultrafiltrering er brukt i mange studier for oppkonsentrering av både bakterier og virus med god gjenfinnelsesgrad. I en studie som sammenlignet hullfiber ultrafiltrering med «dead end»-hullfiber ultrafiltrering fant de gjenfinnelsesgrad på 96% for *E. coli* og 100% for polyoma virus¹¹⁷. Begge metodene krevde videre oppkonsentrering med sentrifugering før analyse. I en annen studie oppkonsentrerte de *E. coli* 200 ganger på 15 min med automatisk cross-flow mikrofiltrering (CFM)¹¹⁸.

I stedet for å bruke filter med liten porestørrelse kan man bruke filter med ladning som gjør at organismene fester seg til det. Yang og Griffiths⁷ oppkonsentrerte 10L vann gjennom et filter kalt Disruptor som baserer seg på elektro-absorpsjon av virus og bakterier.

I Danmark tilbyr firmaet Amphi-Back et automatisk prøvetakingsystem som kan filtrere 100L vann over en 24-timersperiode basert på membranfiltrering. Filteret kan deretter brukes til DNA-ekstraksjon for analyse av organismer¹¹⁹. De har også en annen enhet som baserer seg på kryssstrøm filtrering for oppkonsentrering av 100L vann til 100ml¹²⁰.

Etter filtrering

Videre oppkonsentrering etter filtrering kan enten gjøres ved sentrifugering eller immunomagnetisk separasjon. Immunomagnetisk metode for oppkonsentrering går ut på at målorganismen fester seg til antistoffer på magnetiske kuler. Deretter kan man vaske bort uønskede stoffer og organismer før man går videre til spesifikk analyse (f. eks. PCR eller biosensorer). Ved oppkonsentrering av store mengder vann (liter) kan det være nødvendig med filtrering først, og så videre oppkonsentrering med magnetiske kuler fordi filter fanger for mange partikler¹²¹.

4.7 Modellering

Å sette opp en modell for å forutse vannkvalitet krever mye arbeid i form av å hente inn informasjon. Når en modell først er satt opp vil den kunne brukes med liten innsats i ettertid, og være en hjelp i beslutningsprosesser for tiltak ved forventet dårlig vannkvalitet. Kvaliteten på modellen blir aldri bedre enn dataene man legger inn, så det er viktig å kvalitetssikre både analysedataene og vurdere om prøvepunktene gir nødvendig informasjon for å fange opp de sentrale prosessene i modellen.

Tabell 17. Mulighet og begrensinger for modellering

Parameter	Muligheter	Begrensinger
Tid	Online etter oppsats	Å sette opp en god modell er tidkrevende
Sensitivitet	Avgjøres av oppløsning på modellen og kvalitet på input data	Modellen vil gi teoretiske verdier og være et hjelpemiddel i beslutning. Det er viktig med gode måledata som input til modellen
Spesifisitet	Kan i teorien sette opp en modell for de fleste organismer spesifikt	Må ha kvalitetssikrede input data for hva man ønsker å modellere, eller gode korrelasjoner mot faktorer man har data på
Presisjon	Teoretiske verdier	Det er viktig at alle faktorer som kan påvirke vannkvalitet er inkludert i modellen, om det er vær, vind, strømning, aktiviteter eller sykdomsbilde i befolkningen, eller påliteligheten til sensorene
Resurser	Opplæring i å kjøre og tolke modelldata	Betydelig innsats for å kjøre inn modellen

Modellering av badevann

Badevannskvaliteten kan variere mye med tid på grunn av aktivitet fra badende gjester, utslipp fra elver og vind og strømforhold, samt at solskinn gir økt dødelighet for bakterier og virus. En måte for å bedre kunne si noe om badevannskvaliteten mellom de ukentlige prøvetakingene er å forsøke å kartlegge forholdene som påvirker badevannskvaliteten: hva er kildene til forurensning, hvordan fraktes den rundt og hvor fort vil bakterier og virus dø. Kombinerer man alle disse parameterne i en modell kan man forsøke å forutsi badevannskvaliteten. Dette er testet flere steder i verden, blant annet i to studier i Chicago: Modellering av badevannskvalitet på strender basert på hydrologimodell og historiske data på bakterier ga gode prediksjoner av vannkvalitet på 13 av 14 strender ¹²². Et helautomatisert empirisk modelleringssystem ble brukt til å overvåke badevannskvalitet ved strender i Chicago med bedre resultat enn tradisjonell mikrobiologisk overvåkning ¹²³. I North Carolina (USA) ble to etablerte modeller sammenlignet mot dyrkingsmetoder og qPCR metoder for overvåking med gode resultater¹²⁴. Det er også gjort modellering for strender i Oslo der man ikke bare fokuserte på om modellen kunne forutse konsentrasjonene av indikatorbakterier, men koblet disse dataene med kvalitativ mikrobiell risikoanalyse (QMRA) for å si noe om sykdomspotensialet ¹²⁵.

Modellering av elver

Modellering av vannkvalitet i en elv i Tyskland ved hjelp av multi-lineær-prediksjons (MLP)-modeller ble gjort for å forutsi konsentrasjonen av *E. coli*, intestinale enterokokker og somatiske kolifag. To varianter av modellen ble satt opp. Ammonium, turbiditet og solinnstråling var de viktigste parameterne for å estimere konsentrasjon av bakterier, mens klorofyll-a, utslipp og ammonium var viktigst for somatiske kolifag ¹²⁶. Kombinasjon av tracer tilsatt elvesystemet og kildesporing for å dokumentere kildene til høye indikatorkonsentrasjoner ble brukt i en elv i UK ¹²⁷

Overvåking av ledningsnett

Utfordringene med overvåking av ledningsnett er at man trenger mange prober, disse må knyttes opp mot et overvåkingssystem, og de må gi pålitelig avlesing i lang tid med lite vedlikehold. I en studie gjorde de omfattende søk etter billige prober (elektrokjemiske og optiske) og satt opp ett overvåkingsprogram for et drikkevannsnettverk som egnet seg som et tidlig varsel system for forurensningshendelser. En rekke algoritmer ble utviklet for tolking av data ¹²⁸. Det er viktig med prober som er stabile over lang tid og gir pålitelige signaler med minimalt med vedlikehold, men de må også måle på relevante parametere.

5 Hvilke metoder dekker hvilke behov

I dette kapitlet er behov og funksjonskrav fra kapittel 3 koblet mot egenskaper til metodene beskrevet i kapittel 4. For de metodene som ser ut til å møte flest av funksjonskravene til brukergruppen blir det diskutert kort styrker, svakheter og mulige forbedringer for kun disse metodene.

5.1 Råvannsovervåking

5.1.1 Kontinuerlig overvåking

Tabell 18. Metoder for overvåking av råvann

Parameter	Tid	Sensitivitet		Spesifisitet	Presisjon	Resurser
Viktig - krav	Hurtig analyse og hyppig prøvetaking	«Rene råvann»: 1-100 CFU/100ml <i>E. coli</i>	«Påvirket råvann»: 100-10 000 CFU/100ml	Indikator fekal forurensing	Avhengig av tiltak ved mulig overskridelser: tåler noen falske positive, men ønsker ikke falske negative	
Foretrukket	Online			Helst fra human kilde, helst levende, gjerne patogener		Automatisk registrering/logging av resultater– online
Dyrkingsmetoder	☹	☺	☺	☺ / ☹	☹	☹
Enzymbaserte metoder	☺	☹	☺	☹	☹	☺
Molekylære metoder	☹	☹	☺	☺	☺	☹
Celletelling	☺	☹	☹	☹	☹	☺
Sensorer	☺	☹	☹	☺	☹	☹
Modellering	☺	☹	☹	☺	☹	☹

Med fokus på at overvåkingen skal være kontinuerlig og kunne kobles mot andre parametere som logges er det enzymatiske metoder og online celletellingsmetoder som vurderes å ha størst potensiale for å gi økt informasjon om hygieniske forhold i råvannet.

De enzymbaserte metodene har kommet lengst når det gjelder online overvåking. For beskyttede vannkilder med liten grad av fekal forurensing kreves enzymbasert metode med oppdyrking av *E. coli* for å få god nok sensitivitet til å gi økt informasjon om vannkvaliteten. Dessverre betyr det at analyseresultatet ikke er tilgjengelig før etter mange timer. Metoder som ser på total bakterieaktivitet vil gi hurtigere svar, men vil antagelig ikke kunne identifisere hendelser som gir økt fare for fekal forurensing. Der forurensete elver er vannkilden vil det være vesentlig at metoden er hurtig nok til at forurensingen ikke har passert før man får analysesvaret. Utfordringen er at direkte mål på enzymaktivitet fra GUS eller GAL som er den raskeste metoden ikke er spesifikk for fekal bakterier, men korrelasjonen er sterkere jo høyere bakteriekonsentrasjon man har. Metoden vil derfor kreve en lang innkjøringsfase for å avgjøre hvilke nivåer av enzymaktivitet utgjør en reel økning i risiko i forhold til fekal forurensing. En mulig forbedring av metoden ville være å kombinere

den med en automatisk metode for oppkonsentrering og fanging av *E. coli*, f. eks. med immunomagnetiske partikler. Dette er en mye brukt manuell metode på forskningslaboratorier for blant annet analyse av parasitter, men den er ikke utviklet til automatisert bruk.

Celletelling med f. eks flowcytometri kan gjøres hurtig og nærmest online og vil gi nyttig informasjon om inntrenging av overflatevann til grunnvannsforekomster, men vil ha problemer med å skille mellom om økning i bakterietall i en elv skyldes en hendelse med fekal forurensing eller ikke.

Metoder som har størst potensiale dersom de kan bli automatisert er de molekylære metodene, og spesielt qPCR. Molekylære metoder har ønsket spesifisitet, men det kreves fortsatt en del utvikling før disse metodene er automatiske nok, eller er koblet med automatiske metoder for oppkonsentrering, til at deteksjonsgrenser og hurtighet er tilfredsstillende for online overvåking.

5.1.2 Risikokartlegging av råvann basert på kildesporing i tilførselsbekker

Tabell 19. Metoder for risikovurdering av råvann (prøvetaking i tilførselsbekker)

Parameter	Tid	Sensitivitet		Spesifisitet	Presisjon	Resurser
Viktig - krav		«Rene råvann»: 10-100 CFU/100ml <i>E. coli</i>	«Påvirkede tilførselsbekker»: 100-10 000 CFU/100ml	Fekal forurensing, kildesporing	Analysen må være spesifikk og pålitelig	Felt eller lab-analyse av punkt-prøver
Foretrukket	Hurtigere enn dyrkingsmetodene	Så lav som mulig på patogener. 10-100 CFU/100ml for fekale indikatorer		Helst fra human kilde, helst levende, gjerne patogener	Begrensninger i presisjon kan kompenseres med å ha flere analyser eller støtteparametere	
Dyrkingsmetoder	☹	☺	☺	☹	☹	☹
Enzymbaserte metoder	☺	☹	☺	☹	☹	☺
Molekylære metoder	☺	☺	☺	☺	☺	☺
Celletelling	☺	☹	☹	☹	☹	☺
Sensorer	☺	☹	☺	☹	☺	☺
Modellering	☺	☺	☺	☺	☺	☺

Molekylære metoder, spesielt qPCR er godt egnet til risikokartlegging av råvannskilder fordi de er spesifikke og man kan se etter både fekale indikatorer, patogener og kildesporingsindikatorer. Det finnes rutinelaber i Danmark som tilbyr kildesporing med qPCR, og NIBIO i Norge har utviklet et analysesett basert på qPCR for kildesporing. Det er derimot viktig at man vet hva man ønsker å analysere for og hva denne informasjonen kan brukes til. Ingen kildesporingsmarkører er helt spesifikke, og forskjeller i avrenning kan gi stor forskjell fra prøve til prøve.

Modellering av råvannskilder kan også gi nyttig informasjon til risikokartlegging, spesielt om den kombineres med en godt planlagt prøvetakingskampanje for å kartlegge variasjonen i fekale kilder i nedbørsfeltet og kvantitativ risikovurdering av kildene.

Metodene som har størst utviklingspotensialet til bruk i risikokartlegging og kildesporing i felt er biosensorer. Om man leter etter en fekal forurensningskilde ville det vært nyttig å ha en sensor man

kan ta med seg ut i felt og få svar innen minutter. Sensitiviteten til sensorer som skal brukes til dette formålet trenger heller ikke være så god siden man er ute etter å finne prøver med høy grad av forurensing. Utfordringen er at boisesensorene har kommet kortest i utviklingen til kommersielle produkter, så det kreves både forbedring av deteksjonsgrenser og uttesting av robusthet.

5.2 Overvåkning av rensetrinn på vannbehandlingsanlegg

Tabell 20. Metoder for overvåking av rensetrinn

Parameter	Tid	Sensitivitet	Spesifisitet	Presisjon	Resurser
Viktig - krav	Hurtig analyse og hyppig prøvetaking	- 1-100 CFU/100ml koliforme bakterier over filter/sedimentering 100 CFU/ml kimtall over filter/sedimentering (driftsparameter)	Etter filter/sedimentering: Bakterier og/eller virus, andre indikatorer Etter desinfeksjon (UV, klor, ozon): levende bakterier, andre indikatorer	Høy presisjon	
Foretrukket	Online		Indikator fekal forurensing, Levende/død		Automatisk registrering/logging av resultater– online
Dyrkingsmetoder	☹️	😊	😊	😊	☹️
Enzymbaserte metoder	😊	☹️/😊	☹️/😊	☹️	😊
Molekylære metoder	😊	😊	☹️	😊	☹️
Celletelling	😊	☹️/😊	☹️/😊	😊	😊
Sensorer	😊	😊	☹️/😊	😊	😊
Modellering	😊/😊	😊/😊	😊	☹️	😊

Hvilken metode som har potensialet for hjelp til overvåking av renseprosesser kommer an på hvilket rensetrinn man ser på:

For de første trinnene i renseprosessen som inkluderer sedimentering og/eller filtrering kan enzymatiske metoder og celletellingsmetoder være aktuelt.

Dersom råvannet inneholder høy andel fekal forurensing kan spesifikk enzymatisk metode for GUS/GAL med måling av direkte enzymaktivitet gi noe informasjon om effekt av rensing. Både fekale bakterier og alger som kan ha disse enzymene bør reduseres i noe grad i disse trinnene. Enzymatisk metode for totaltall bakterier som hydrolase, ALP og ATP vil muligens også fungere som mål på om det er en reduksjon av bakterier over disse trinnene, men utfordringen vil være at man ofte bytter ut miljøbakteriene i råvannet med filterbakterier fra systemet, og at totaltallet bakterier ikke nødvendigvis er en god indikasjon på om rensetrinnene fungerer optimalt. Dette må i tilfelle testes ut for den spesifikke prosessen, om hvordan forskjellige driftssituasjoner (normal drift, økt påkjenning fra råvann, før og etter rensing av filter, problemer med drift) påvirker måling av totaltall med disse metodene.

Automatiske celletellingsanalyser kan gi mer informasjon om sedimentasjon/filtrering enn enzymatiske metoder for totaltall ved at de enten kan sammenligne bakterielt fingeravtrykk etter filter med FCM, eller ta automatiske bilder som gjenkjenner fnokker, alger og andre problemorganismer.

For overvåking av desinfeksjon er det nødvendig med en metode som skiller levende og døde celler. For oksidative prosesser som klor, kloramin og ozon kan man benytte FCM med fargemetode som skiller intakt/døde celler, men etter UV er det kun dyrkingsmetoder som vil gi pålitelig resultater.

5.3 Ledningsnett – hendelsesvarsel eller overvåking

Tabell 21. Metoder for overvåking av ledningsnett

Parameter	Tid	Sensitivitet	Spesifisitet	Presisjon	Resurser
Viktig - krav	Hurtig analyse og hyppig prøvetaking	1 CFU/100ml <i>E. coli</i> eller tilsvarende 1:1000 0 00 fortynnet kloakk	Indikator fremmedvann	Høy grad av presisjon	
Foretrukket	Online		Helst fekal forurensing		Feltinstrument som kan settes opp på midlertidig lokasjoner med strøm
Dyrkingsmetoder	☹	☺	☺	☺	☹
Enzymbaserte metoder	☺	☺/☹	☺/☹	☺	☺
Molekylære metoder	☺	☹	☺	☺	☹
Celletelling	☺	☺	☺/☹	☹	☺
Sensorer	☺	☹	☺/☹	☺	☺
Modellering	☹	☺	☺	☺	☹

Dersom hurtighet prioriteres vil det igjen være enzymbaserte metoder og celletelling som er de raskeste metodene. Utfordringen er om de er sensitive nok til å fange opp inntrengning av fremmedvann på ledningsnettet. En annen utfordring er at dette er store instrumenter som trenger tilsyn og påfyll av reagenser, og som er dyre i innkjøp. De er derfor ikke egnet til å plasseres for kontinuerlig overvåking mange steder på ledningsnettet, men de kan flyttes ut til et feltlaboratorium i en kortere periode for eksempel i forbindelse med en vedlikeholdsjobb. Ideelt skulle man hatt enkle og rimelige biosensorer til dette, men på grunn av ønskede deteksjonsgrenser er det ikke realistisk at man vil klare å utvikle slike sensorer innen et 10års perspektiv. Vannprøver kan konsentreres på filter og sendes til laboratorier for molekylærbiologisk analyse med analyseresultat innen timer og vil være raskere enn dyrking. Deteksjonsgrenser vil også her være et problem, så en pålitelig oppkonsentreringsmetode er nødvendig.

5.4 Avløpsvann – lekkasjesøk

Tabell 22. Metoder for lekkasjesøk fra avløpsnett

Parameter	Tid		Sensitivitet	Spesifisitet	Presisjon	Resurser
Viktig - krav			Kloakk fortynnet 1:10 00	Indikator fekal forurensing	Presisjon kan gå på bekostning av hyppige analyser	
Foretrukket	Felt kitt analysetid minutter	Eller lab analyser timer		Helst fra human kilde, helst levende, gjerne patogener		Feltkit eller lab
Dyrkingsmetoder	☹️	😊	😊	😊/😞	😊	😊
Enzybaserte metoder	😊	😊	😊/😞	😊	😊	😊
Molekylære metoder	😞/😊	😊	😊/😞	😊	😊	😊
Celletelling	☹️	😊	☹️	☹️	😊	😊
Sensorer	😊	😊	☹️	😊/😞	😊	😊
Modellering	☹️	😊	😊	😊	😊	😊

Den hurtigste og enkleste metoden som er utviklet er enzymatisk metode for GUS/GAL som kan brukes som felt kitt og identifiserer høy konsentrasjon av kloakk. Dyrkingsmetodene tar for lang tid og skiller ikke mellom kildene til fekale indikatorer, så om det er store flokker med dyr eller fugler i området kan man få høye utslag. De molekylærbaserte metodene gir raskere og mer presise svar enn dyrkingsmetodene, så dersom rutinelaboratorier kan påta seg å analysere prøven samme dag (med qPCR eller NASBA) kan man få raske og presise svar på om det er høy konsentrasjon av human fekal forurensing i prøven. En håndholdt biosensor for human indikatorbakterie kan være interessant å forsøke å utvikle man kun ønsker å se etter høye konsentrasjoner av avløpsvann.

5.5 Badevannsovervåkning

Tabell 23. Metoder for kontinuerlig overvåking av badevann

Parameter	Tid	Sensitivitet	Spesifisitet	Presisjon	Resurser
Viktig - krav	Hurtig analyse og hyppig prøvetaking	100-10 000 CFU/100ml	Indikator fekal forurensing	Presisjon kan gå på bekostning av hyppige analyser	
Foretrukket	Online eller felt kitt		Helst fra human kilde, helst levende, gjerne patogener		Feltkit, batteri eller lab
Dyrkingsmetoder	☹️	😊	😊	😊	😊
Enzybaserte metoder	😊	😊/😞	😊	😊/😞	😊
Molekylære metoder	☹️	😊	😊	😊	😊
Celletelling	😊	☹️	☹️	☹️	😊
Sensorer	😊	😊/😞	😊/😞	😊	😊
Modellering	😊	😊	😊	😊	😊

Enzymbaserte felt kitt for GUS/GAL vil gi hurtig svar, men kan bli påvirket av generell enzymaktivitet i overflatevann slik at det må være høy grad av forurensing før man får pålitelig signal. Enzymbasert automatisk prøvetaking med GUS aktivitet etter dyrking vil ha god nok spesifisitet og kunne gi daglig og automatisk overvåking, som vil være en forbedring fra den ukentlige prøven for dyrkingsmetoder.

Molekylære analyser vil gi bedre spesifisitet og man kan se spesielt etter humane fekale kilder eller patogener, men man må sende prøvene til analyse på et laboratorium som kan bli dyrt for hyppige analyse. Det er demonstrert at det går an å sette opp automatisk PCR analyse av badevann med flere analyser per dag, men metoden skiller ikke mellom levende og døde bakterier.

Sensorer kan utvikles til å detektere både fekal forurensing, patogener og humane kilder, men deteksjonsgrenser kan være et problem, i tillegg til problemer med å skille mellom levende og døde.

Modellering av badestrender har blitt gjort med suksess flere steder i verden, og gir gode indikasjoner på hva som påvirker vannkvaliteten på strendene (regnskyll, tidevann, vindretning). Det er mye jobb å sette opp en modell og verifisere den, men det kan være nyttig i forhold til å vite hvor man eventuelt kan sette inn tiltak, og om man bør ha generelle råd om ikke å bade x timer/dager etter nedbørshendelser.

6 Diskusjon / Veien videre

Hvordan verifisere at nye metoder er gode nok?

Det er et ønske om å ha bedre verktøy for overvåking av hygienisk vannkvalitet, men det finnes allerede en del etablerte verktøy som i liten grad tas i bruk. Nye verktøy vil ha nye usikkerheter og begrensninger. Det gjelder å finne ut hva man kan og ikke kan bruke nye verktøy til, og hvordan man skal forholde seg til de nye usikkerhetene. Som tidligere nevnt er det en del svakheter og usikkerheter med de tradisjonelle metodene vi bruker i dag som man ikke tenker på til daglig. Det er derfor også viktig å vite hvordan vi skal teste og verifisere nye metoder: skal de alltid sammenlignes mot de tradisjonelle dyrkingsmetodene som kun er indikatormetoder, eller bør man etablere en ny standard for hvordan nye metoder skal verifiseres, f. eks. mot fortyninger av avløpsvann? Testing av nye metoder på virkelige prøver er også helt vesentlig før de lanseres på markedet fordi det ofte vil være uforutsette ting som kan påvirke enten analysene eller funksjonen av instrumentet.

Hvordan forholde seg til økte datamengder, og hva skal man benytte den til?

En av utfordringene med implementering av nye sensorer og online metoder er den økte datamengden. Hvordan skal man forholde seg til både mengden av data og usikkerheten; hvordan skal man reagere på forhøyede signaler (alarmer), hvordan skille mellom reelle hendelser og feil som skyldes behov for vedlikehold eller andre faktorer som påvirker analysene? Erfaringene som er gjort med bruk av fysikalsk/kjemiske sensorer og erfaringene fra de allerede kommersielle automatiserte metodene basert på enzymaktivitet og celledelling, vil være nyttig å ha med seg for nye metoder for mikrobiologi. En innkjøringsperiode og tilpassing til lokal vannkvalitet kan være nødvendig for de fleste metoder for online analyser.

Hvilket behov skal nye metoder dekke, og hvordan kommunisere dette?

Den viktigste faktoren for utvikling av nye metoder er at de dekker et behov som enten er ytret eller enda ikke kjent, og at den må tilpasses en tiltenkt bruk. Det hjelper ikke om en sensor kan

identifisere spesifikke patogener om den kun analyserer 1µl vannprøve, og risikoscenariet ditt tilsier at det må være mindre enn ett patogen per 10 liter vann for at det skal regnes som trygt. Eller at instrumentet klarer å gjenkjenne celler av *E. coli* i et labforsøk der man kun har tilsatt en renkultur av *E. coli* dersom det ikke klarer å gjenkjenne *E. coli* blant 1000 andre forskjellige bakterier. Mange av sensorene og instrumentene omtalt i denne rapporten er kun på utviklingsstadiet der man skal demonstrere analyseprinsippene, og der labforsøk med renkulturer er nødvendig. Det er vanskelig å gjøre vurdering om metoder som har kommet så kort i utviklingen vil ha en praktisk anvendbarhet i vannbransjen i fremtiden, men det er viktig å gi tilbakemelding til utviklere av metoder hva som er viktige kriterier for at en metode skal være nyttig. Spesielt kravet om realistiske deteksjonsgrenser kan komme som en overraskelse.

Hvordan forholde seg til deteksjonsgrenser?

Den største utfordringen med nye metoder er deteksjonsgrenser og behovet for oppkonsentrering. Det finnes systemer i dag for automatisk oppkonsentrering av prøver ved filtrering. Ofte kreves det videre bearbeiding etter filtreringen før man kan gjøre analyse, enten fordi volumet fremdeles er for stort, og/eller fordi filtreringen også oppkonsentrerte mange uønskede partikler og forbindelser. Om oppkonsentrering vil være hensiktsmessig, eller tilstrekkelig, kommer an på både hensikten med overvåkingen og type metode. Dersom man ønsker å dokumentere drikkevannskvalitet (*«Drikkevannet skal ikke inneholde virus, bakterier, parasitter, andre mikroorganismer eller stoffer som i antall eller konsentrasjon utgjør en mulig helsefare»*) vil metoder som kun analyserer volum i µl-skala krevde oppkonsentrering av urealistisk store volum vann, og med tilsvarende utfordringer for oppkonsentreringsutstyr. For overvåking av råvann hvor man forventer en viss grad av forurensing kan man ha nytte av metoder som ikke klarer kravet om <1CFU/100ml *E. coli* dersom denne gir økt informasjon om variasjonene i vannkvalitet som kan være nyttig for drift av vannrenseanlegget. I et fast prøvepunkt innendørs vil man også ha mulighet til å installere automatiserte enkle oppkonsentreringsenheter som kan forbedre deteksjonsgrensen noe. Derimot vil ikke oppkonsentrering være aktuelt for metoder man ønsker å bruke til felt-undersøkelser. For prøver man ønsker å sende til laboratorier for rutineanalyser er også oppkonsentrering begrenset til det volumet det er praktisk å sende, typisk rundt 1 L.

Hva er mulighetene innen oppkonsentrering?

Forfatterne har tidligere i rapporten påstått at oppkonsentrering vil kunne forbedre deteksjonsgrensene til de fleste metodene. Mulighetene for oppkonsentrering er derimot ikke uendelige, men avhenger både av hva som er håndterbare volum, grad av automatikk og hvor mange trinn man må ha. For automatiserte systemer i tilknytning til f. eks enzymløst instrumenter tilbys filtreringssystemer som oppkonsentrerer opp til 100 ganger, men selv dette krevde utvikling av forfiltrering og automatiske vaskeprosedyrer²⁴. For molekylærbaserte metoder er det normalt med filtrering av opp til 1L vann etterfulgt av DNA/RNA-ekstraksjon fra filter for analyse av bakterier og virus. Dette gir en oppkonsentreringsgrad på 1 000 til 10 000 ganger. Forfatterne mener det kan være mulig å utvikle metoder for å oppkonsentrere kanskje 10-100 ganger utover det som er nevnt her, men da vil volumene begynne å bli lite håndterbare, og det kan også bli et problem med gjennfinningsgraden om man må inkludere flere trinn.

Hva ønsker man å analysere for i fremtiden?

Hvor skal man sette lista for nye metoder? Skal man fokusere på de tradisjonelle indikatorbakteriene og forsøke å finne hurtigere metoder å analysere disse, eller skal fokuset være på mer spesifikke markører for avløpsvann, eller på spesifikke patogener? Med utviklingen i molekylærbiologiske metoder og biosensorer vil det bli mulighet til å gjøre analyser på omtrent hva som helst av organismer som er tilstede i prøven så lenge de finnes i tilstrekkelige konsentrasjoner. Det krever en del arbeid å utvikle og verifisere disse metodene, men de er innenfor hva som er mulig med dagens

teknologi. Det er derfor viktig å sende signaler om hvilke analyser som vil være ønsket og nyttige, og som det kan utvikles et marked for. Automatisering av qPCR-analyser bør kunne la seg gjøre, men det blir ikke gjort før det er et kommersielt marked for det.

Tidshorisonten – hva er mulig å utvikle innen 10 år?

De online-instrumentene som er på markedet i Norge i dag er alle basert på enzym-teknologi som ble oppdaget på 70-tallet. Det har med andre ord gått over 40 år siden prinsippene for analysen ble beskrevet, og fremdeles er instrumentene tatt relativt lite i bruk selv om de har vært på markedet i rundt 20 år. Mikroskopbaserte metoder, FCM og PCR er også metoder som i dag brukes til forskjellige typer overvåking av vann, men i begrenset grad. På den andre enden av skalaen i forhold til utvikling finner vi biosensorene, hvor analyseprinsippene først er demonstrert innen de siste 10 årene, og hvor utviklingen ikke har kommet seg ut fra laboratoriene enda.

Innen 1 til 5 år vil metoder som allerede er tatt i bruk i vannbransjen kunne tas i bruk i større grad, og videreutvikles med tanke på både spesifisitet, automatisering og analysetid, men deteksjonsgrensene vil i stor grad diktere anvendelsesområdene. Enzymbaserte metoder har kommet langt på automatisering, men spesifisitet og analysetid henger sammen for dagens bruk av mål-enzymmer. I fremtiden kan dette muligens forbedres ved hjelp av spesifikk oppkonsentrering, eller på lengre sikt ved analyse av mer spesifikke enzymer. Anvendelsesområdet vil fortsatt være på vann med noe grad av forurensing, og ikke drikkevann. Instrumenter for celledetelling kan i større grad bli automatiserte, og med automatisert programvare for tolkning av data. Anvendelsesområdet vil være på totaltall av bakterier i forbindelse med drikkevannsproduksjon eller distribusjon. PCR og andre molekylærbiologiske metoder tilbys i dag kun som analyser av forskningslaboratorier i Norge, men burde kunne etableres av kommersielle rutineanalyselaboratorier dersom det er et uttalt behov siden dette tilbys av laboratorier i f. eks Danmark⁵⁶. I et lengre perspektiv (>5år) kan det også være mulig å etablere mer automatiserte systemer for DNA/RNA-ekstraksjon og analyse til bruk innen vannbransjen eller kommunene. Anvendelsesområdet er begrenset av deteksjonsgrensene, og av at metodene i liten grad skiller levende og døde celler.

Av nye metoder som kan ha en horisont på under 10 år er mer automatiserte dyrkingsmetoder, automatiserte metoder for prøvetaking og oppkonsentrering og fysikalsk/kjemiske sensorer kombinert med kunstig intelligens (IA). Måling av tryptofan-lignende fluorosens kan for eksempel være en slik enkel sensor som kombinert med læringsalgoritmer vil kunne si noe om grad av mikrobiell forurensing av vann, men utfordringene er både å verifisere metoden og å finne aktuelle bruksområder siden metoden er lite spesifikk.

I et perspektiv på over 10 år kan det tenkes at vi får biosensorer for enten håndholdte felt-analyser eller online overvåking. Selv om det finnes biosensorer på markedet i dag som benyttes innen helse og medisin er vann en så annerledes matris enn pasientprøver med veldig mye lavere konsentrasjoner av målorganismer at det vil være en lang vei å gå. Selv med optimalisert analyse vil deteksjonsgrensene være avhengig av vannmengden som er i kontakt med sensoren, og det er lite sannsynlig at sensorene kan benyttes på annet enn vann med høy grad av fekal forurensing.

Referanser

1. Lopez-Roldan, R.; Tusell, P.; Courtois, S.; Cortina, J. L., On-line bacteriological detection in water. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2013**, *44*, 46-57.
2. FHI <https://www.fhi.no/ml/badevann/badevann--forurensning-og-regler/>.
3. FEE <https://fee.no/blatt-flagg/>
4. Tatari, K.; Corfitzen, C. B.; Albrechtsen, H.-J.; Christensen, S. C. *Sensors for microbial drinking water quality*; Technical University of Denmark: January 2016, 2016.
5. Salter, R. S.; Durbin, G. W.; Conklin, E.; Rosen, J.; Clancy, J., Proposed Modifications of Environmental Protection Agency Method 1601 for Detection of Coliphages in Drinking Water, with Same-Day Fluorescence-Based Detection and Evaluation by the Performance-Based Measurement System and Alternative Test Protocol Validation Approaches. *Applied and Environmental Microbiology* **2010**, *76*, (23), 7803-7810.
6. Fung, D. Y. C.; Fujioka, R.; Vijayavel, K.; Sato, D.; Bishop, D., Evaluation of Fung double tube test for *Clostridium perfringens* and Easyphage test for F-specific RNA coliphages as rapid screening tests for fecal contamination in recreational waters of Hawaii. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* **2007**, *15*, (3), 217-229.
7. Yang, Y.; Griffiths, M. W., A fluorescence-based method coupled with Disruptor filtration for rapid detection of F plus RNA phages. *Let. Appl. Microbiol.* **2014**, *58*, (2), 177-183.
8. Love, D. C.; Sobsey, M. D., Simple and rapid F+ coliphage culture, latex agglutination, and typing assay to detect and source track fecal contamination. *Applied and Environmental Microbiology* **2007**, *73*, (13), 4110-4118.
9. Zhang, K.; Farahbakhsh, K., Removal of native coliphages and coliform bacteria from municipal wastewater by various wastewater treatment processes: implications to water reuse. *Water research* **2007**, *41*, (12), 2816-2824.
10. Haramoto, E.; Fujino, S.; Otagiri, M., Distinct behaviors of infectious F-specific RNA coliphage genogroups at a wastewater treatment plant. *Science of the Total Environment* **2015**, *520*, 32-38.
11. Plummer, J. D.; Long, S. C.; Charest, A. J.; Roop, D. O., Bacterial and viral indicators of fecal contamination in drinking water. *Journal American Water Works Association* **2014**, *106*, (4), E200-E211.
12. Maskow, T.; Wolf, K.; Kunze, W.; Enders, S.; Harms, H., Rapid analysis of bacterial contamination of tap water using isothermal calorimetry. *Thermochimica Acta* **2012**, *543*, 273-280.
13. Grossi, M.; Lazzarini, R.; Lanzoni, M.; Pompei, A.; Matteuzzi, D.; Ricco, B., A Portable Sensor With Disposable Electrodes for Water Bacterial Quality Assessment. *Ieee Sensors Journal* **2013**, *13*, (5), 1775-1782.
14. Warren, L. S.; Benoit, R. E.; Jessee, J. A., RAPID ENUMERATION OF FECAL COLIFORMS IN WATER BY A COLORIMETRIC BETA-GALACTOSIDASE ASSAY. *Applied and Environmental Microbiology* **1978**, *35*, (1), 136-141.
15. Edberg, S. C.; Allen, M. J.; Smith, D. B., RAPID, SPECIFIC, DEFINED SUBSTRATE TECHNOLOGY FOR THE SIMULTANEOUS DETECTION OF TOTAL COLIFORMS AND ESCHERICHIA-COLI. *Toxicity Assessment* **1988**, *3*, (5), 565-580.
16. Apte, S. C.; Davies, C. M.; Peterson, S. M., RAPID DETECTION OF FECAL-COLIFORMS IN SEWAGE USING A COLORIMETRIC ASSAY OF BETA-D-GALACTOSIDASE. *Water Research* **1995**, *29*, (7), 1803-1806.
17. Davies, C. M.; Apte, S. C.; Peterson, S. M.; Stauber, J. L., PLANT AND ALGAL INTERFERENCE IN BACTERIAL BETA-D-GALACTOSIDASE AND BETA-D-GLUCURONIDASE ASSAYS. *Applied and Environmental Microbiology* **1994**, *60*, (11), 3959-3964.

18. Tryland, I.; Fiksdal, L., Enzyme characteristics of beta-D-galactosidase- and beta-D-glucuronidase-positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms and Escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology* **1998**, *64*, (3), 1018-1023.
19. Ender, A.; Goepfert, N.; Grimmeisen, F.; Goldscheider, N., Evaluation of beta-D-glucuronidase and particle-size distribution for microbiological water quality monitoring in Northern Vietnam. *Science of the Total Environment* **2017**, *580*, 996-1006.
20. Stadler, P.; Bloschl, G.; Vogl, W.; Koschelnic, J.; Epp, M.; Lackner, M.; Oismuller, M.; Kumpan, M.; Nemeth, L.; Strauss, P.; Sommer, R.; Ryzinska-Paier, G.; Farnleitner, A. H.; Zessner, M., Real-time monitoring of beta-D-glucuronidase activity in sediment laden streams: A comparison of prototypes. *Water Research* **2016**, *101*, 252-261.
21. Tryland, I.; Braathen, H.; Wennberg, A.; Eregno, F.; Beschorner, A.-L., Monitoring of β -D-Galactosidase Activity as a Surrogate Parameter for Rapid Detection of Sewage Contamination in Urban Recreational Water. *Water* **2016**, *8*, (2), 65.
22. Tryland, I.; Eregno, F. E.; Braathen, H.; Khalaf, G.; Sjolander, I.; Fossum, M., On-line monitoring of Escherichia coli in raw water at Oset drinking water treatment plant, Oslo (Norway). *Int J Environ Res Public Health* **2015**, *12*, (2), 1788-802.
23. Ryzinska-Paier, G.; Lendenfeld, T.; Correa, K.; Stadler, P.; Blaschke, A. P.; Mach, R. L.; Stadler, H.; Kirschner, A. K. T.; Farnleitner, A. H., A sensitive and robust method for automated on-line monitoring of enzymatic activities in water and water resources. *Water Science and Technology* **2014**, *69*, (6), 1349-1358.
24. Stadler, P.; Farnleitner, A. H.; Zessner, M., Development and evaluation of a self-cleaning custom-built auto sampler controlled by a low-cost RaspberryPi microcomputer for online enzymatic activity measurements. *Talanta* **2017**, *162*, 390-397.
25. Koschelnic, J.; Vogl, W.; Epp, M.; Lackner, M., Rapid analysis of β -D-glucuronidase activity in water using fully automated technology. *Water Resources Management* **2015**, *8*, 471.
26. Habash, M.; Johns, R., Comparison study of membrane filtration direct count and an automated coliform and Escherichia coli detection system for on-site water quality testing. *Journal of Microbiological Methods* **2009**, *79*, (1), 128-130.
27. Bramburger, A. J.; Brown, R. S.; Haley, J.; Ridal, J. J., A new, automated rapid fluorometric method for the detection of Escherichia coli in recreational waters. *Journal of Great Lakes Research* **2015**, *41*, (1), 298-302.
28. Schang, C.; Henry, R.; Kolotelo, P. A.; Prosser, T.; Crosbie, N.; Grant, T.; Cottam, D.; O'Brien, P.; Coutts, S.; Deletic, A.; McCarthy, D. T., Evaluation of Techniques for Measuring Microbial Hazards in Bathing Waters: A Comparative Study. *Plos One* **2016**, *11*, (5).
29. Elzein, M.; Alum, A.; Abbaszadegan, M., Biochemical signature assay for use in a biosensor platform to detect bacteria in drinking water biofilms. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* **2013**, *48*, (8), 925-932.
30. Hesari, N.; Alum, A.; Elzein, M.; Abbaszadegan, M., A biosensor platform for rapid detection of E. coli in drinking water. *Enzyme and Microbial Technology* **2016**, *83*, 22-28.
31. Hesari, N.; Yilmazcoban, N. K.; Elzein, M.; Alum, A.; Abbaszadegan, M., A Strategy to Establish a Quality Assurance/Quality Control Plan for the Application of Biosensors for the Detection of E. coli in Water. *Biosensors-Basel* **2017**, *7*, (1).
32. Heery, B.; Briciu-Burghina, C.; Zhang, D.; Duffy, G.; Brabazon, D.; O'Connor, N.; Regan, F., ColiSense, today's sample today: A rapid on-site detection of beta-D-Glucuronidase activity in surface water as a surrogate for E. coli. *Talanta* **2016**, *148*, 75-83.
33. Gunda, N. S. K.; Naicker, S.; Shinde, S.; Kimbahune, S.; Shrivastava, S.; Mitra, S., Mobile Water Kit (MWK): a smartphone compatible low-cost water monitoring system for rapid detection of total coliform and E. coli. *Analytical Methods* **2014**, *6*, (16), 6236-6246.
34. Kim, K.; Myung, H., Sensor Node for Remote Monitoring of Waterborne Disease-Causing Bacteria. *Sensors* **2015**, *15*, (5), 10569-10579.

35. Wildeboer, D.; Amirat, L.; Price, R. G.; Abuknesha, R. A., Rapid detection of Escherichia coli in water using a hand-held fluorescence detector. *Water Research* **2010**, *44*, (8), 2621-2628.
36. Rochelet, M.; Solanas, S.; Betelli, L.; Chantemesse, B.; Vienney, F.; Hartmann, A., Rapid amperometric detection of Escherichia coli in wastewater by measuring beta-D glucuronidase activity with disposable carbon sensors. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *892*, 160-166.
37. Kim, T.; Han, J. I., Fast detection and quantification of Escherichia coli using the base principle of the microbial fuel cell. *Journal of Environmental Management* **2013**, *130*, 267-275.
38. Bjergaarde, N. E.; Sparwath, H.; Østergaard, E.-M.; Jepsen, T.; Bjergbæk, L.; Schmidt, C.; Andersen, P. J.; Lindhardt, B.; Fabricius, A.; Lindholm, A.; Frambøl, C.; Schou, C., Erfaringer med hurtigmetoden BactiQuant. *Dansk Vand* **2010**, *10*, (3), 18-21.
39. Albrachtsen, H.-J.; Arnedo, M. J.; Appels, J.; Baquero, D.; Galofré, B.; Lindhardt, B.; Puigdomènech, C.; Lee, C. O.; Wagner, F. B. In *On-Line monitoring of microbial drinking water quality - on site tests*, NORDIWA, Oslo, Norway, 2018; Oslo, Norway, 2018.
40. Vang, O. K.; Corfitzen, C. B.; Smith, C.; Albrechtsen, H. J., Evaluation of ATP measurements to detect microbial ingress by wastewater and surface water in drinking water. *Water Research* **2014**, *64*, 309-320.
41. Okanojo, M.; Miyashita, N.; Tazaki, A.; Tada, H.; Hamazoto, F.; Hisamatsu, M.; Noda, H., Attomol-level ATP bioluminometer for detecting single bacterium. *Luminescence* **2017**, *32*, (5), 751-756.
42. Agudelo, R. M.; Codony, F.; Adrados, B.; Fittipaldi, M.; Penuela, G.; Morato, J., Monitoring bacterial faecal contamination in waters using multiplex real-time PCR assay for Bacteroides spp. and faecal enterococci. *Water Sa* **2010**, *36*, (1), 127-132.
43. Thulsiraj, V.; Zimmer-Faust, A. G.; Jay, J. A., Use of Viability-Based Methods for Improved Detection of Recent Fecal Contamination in a Microbial Source Tracking Study Near Tijuana, Mexico. *Water Air and Soil Pollution* **2017**, *228*, (2).
44. Krapf, T.; Kuhn, R. M.; Kauf, P.; Gantenbein-Demarchi, C. H.; Fieseler, L., Quantitative real-time PCR does not reliably detect single fecal indicator bacteria in drinking water. *Water Science and Technology-Water Supply* **2016**, *16*, (6), 1674-1682.
45. Minogue, E.; Reddington, K.; Dorai-Raj, S.; Tuite, N.; Clancy, E.; Barry, T., Diagnostics method for the rapid quantitative detection and identification of low-level contamination of high-purity water with pathogenic bacteria. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2013**, *40*, (9), 1005-1013.
46. Minogue, E.; Tuite, N. L.; Smith, C. J.; Reddington, K.; Barry, T., A rapid culture independent methodology to quantitatively detect and identify common human bacterial pathogens associated with contaminated high purity water. *Bmc Biotechnology* **2015**, *15*.
47. Kong, R.; Lee, S.; Law, T.; Law, S.; Wu, R., Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. *Water research* **2002**, *36*, (11), 2802-2812.
48. Botes, M.; de Kwaadsteniet, M.; Cloete, T. E., Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, *405*, (1), 91-108.
49. Griffin, J. S.; Plummer, J. D.; Long, S. C., Torque teno virus: an improved indicator for viral pathogens in drinking waters. *Virology Journal* **2008**, *5*.
50. Plummer, J. D.; Long, S. C.; Liu, Z.; Charest, A. A., Torque Teno Virus Occurrence and Relationship to Bacterial and Viral Indicators in Feces, Wastewaters, and Waters in the United States. *Environmental Engineering Science* **2014**, *31*, (12), 671-680.
51. Håkonsen, T.; Sal, L. S. *WP4 – Virusfjerning i vannverk*; 13. februar 2013, 2013; p 68.
52. Boehm, A. B.; Van De Werfhorst, L. C.; Griffith, J. F.; Holden, P. A.; Jay, J. A.; Shanks, O. C.; Wang, D.; Weisberg, S. B., Performance of forty-one microbial source tracking methods: A twenty-seven lab evaluation study. *Water Research* **2013**, *47*, (18), 6812-6828.
53. Layton, B. A.; Cao, Y.; Ebentier, D. L.; Hanley, K.; Balleste, E.; Brandao, J.; Byappanahalli, M.; Converse, R.; Farnleitner, A. H.; Gentry-Shields, J.; Gidley, M. L.; Gourmelon, M.; Lee, C. S.; Lee, J.;

- Lozach, S.; Madi, T.; Meijer, W. G.; Noble, R.; Peed, L.; Reischer, G. H.; Rodrigues, R.; Rose, J. B.; Schriewer, A.; Sinigalliano, C.; Srinivasan, S.; Stewart, J.; Van De Werfhorst, L. C.; Wang, D.; Whitman, R.; Wuertz, S.; Jay, J.; Holden, P. A.; Boehm, A. B.; Shanks, O.; Griffith, J. F., Performance of human fecal anaerobe-associated PCR-based assays in a multi-laboratory method evaluation study. *Water Research* **2013**, *47*, (18), 6897-6908.
54. Reischer, G. H.; Ebdon, J. E.; Bauer, J. M.; Schuster, N.; Ahmed, W.; Astrom, J.; Blanch, A. R.; Bloschl, G.; Byamukama, D.; Coakley, T.; Ferguson, C.; Goshu, G.; Ko, G.; Husman, A. M. D.; Mushi, D.; Poma, R.; Pradhan, B.; Rajal, V.; Schade, M. A.; Sommer, R.; Taylor, H.; Toth, E. M.; Vrajmasu, V.; Wuertz, S.; Mach, R. L.; Farnleitner, A. H., Performance Characteristics of qPCR Assays Targeting Human- and Ruminant-Associated Bacteroidetes for Microbial Source Tracking across Sixteen Countries on Six Continents. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, (15), 8548-8556.
55. Astrom, J.; Pettersson, T. J. R.; Reischer, G. H.; Norberg, T.; Hermansson, M., Incorporating Expert Judgments in Utility Evaluation of Bacteroidales qPCR Assays for Microbial Source Tracking in a Drinking Water Source. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, (3), 1311-1318.
56. Amphi-Bac <http://amphi-bac.dk/da/produkter-og-services/drikkevand/kildesporing-drikkevand>
57. Paruch, L.; Paruch, A. M.; Blankenberg, A.-G. B.; Bechmann, M.; Maehlum, T., Application of host-specific genetic markers for microbial source tracking of faecal water contamination in an agricultural catchment. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science* **2015**, *65*, 164-172.
58. Tambalo, D. D.; Fremaux, B.; Boa, T.; Yost, C. K., Persistence of host-associated Bacteroidales gene markers and their quantitative detection in an urban and agricultural mixed prairie watershed. *Water Research* **2012**, *46*, (9), 2891-2904.
59. Yamahara, K. M.; Demir-Hilton, E.; Preston, C. M.; Marin, R.; Pargett, D.; Roman, B.; Jensen, S.; Birch, J. M.; Boehm, A. B.; Scholin, C. A., Simultaneous monitoring of faecal indicators and harmful algae using an in-situ autonomous sensor. *Lett. Appl. Microbiol.* **2015**, *61*, (2), 130-138.
60. Girones, R.; Ferrus, M. A.; Alonso, J. L.; Rodriguez-Manzano, J.; Calgua, B.; Correa, A. D.; Hundesa, A.; Carratala, A.; Bofill-Mas, S., Molecular detection of pathogens in water - The pros and cons of molecular techniques. *Water Research* **2010**, *44*, (15), 4325-4339.
61. Esch, M. B.; Locascio, L. E.; Tarlov, M. J.; Durst, R. A., Detection of viable *Cryptosporidium parvum* using DNA-modified liposomes in a microfluidic chip. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, (13), 2952-2958.
62. Bridle, H.; Miller, B.; Desmulliez, M. P. Y., Application of microfluidics in waterborne pathogen monitoring: A review. *Water Research* **2014**, *55*, 256-271.
63. inc, E. w. <http://www.earlywarninginc.com/technologies.php>
64. Alhamlan, F. S.; Al-Qahtani, A. A.; Al-Ahdal, M. N., Recommended advanced techniques for waterborne pathogen detection in developing countries. *Journal of Infection in Developing Countries* **2015**, *9*, (2), 128-135.
65. Lee, D. Y.; Shannon, K.; Beaudette, L. A., Detection of bacterial pathogens oligonucleotide microarray in municipal wastewater using an ind real-time quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods* **2006**, *65*, (3), 453-467.
66. Lee, D. Y.; Lauder, H.; Cruwys, H.; Falletta, P.; Beaudette, L. A., Development and application of an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR for detection of wastewater bacterial pathogens. *Science of the Total Environment* **2008**, *398*, (1-3), 203-211.
67. Li, X.; Harwood, V. J.; Nayak, B.; Staley, C.; Sadowsky, M. J.; Weidhaas, J., A Novel Microbial Source Tracking Microarray for Pathogen Detection and Fecal Source Identification in Environmental Systems. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, (12), 7319-7329.
68. Vuong, N. M.; Villemur, R.; Payment, P.; Brousseau, R.; Topp, E.; Masson, L., Fecal source tracking in water using a mitochondrial DNA microarray. *Water Research* **2013**, *47*, (1), 16-30.

69. Cao, Y. P.; Van De Werfhorst, L. C.; Dubinsky, E. A.; Badgley, B. D.; Sadowsky, M. J.; Andersen, G. L.; Griffith, J. F.; Holden, P. A., Evaluation of molecular community analysis methods for discerning fecal sources and human waste. *Water Research* **2013**, *47*, (18), 6862-6872.
70. Cai, L.; Zhang, T., Detecting Human Bacterial Pathogens in Wastewater Treatment Plants by a High-Throughput Shotgun Sequencing Technique. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, (10), 5433-5441.
71. Chen, Y. X.; Gelfond, J. A. L.; McManus, L. M.; Shireman, P. K., Reproducibility of quantitative RT-PCR array in miRNA expression profiling and comparison with microarray analysis. *Bmc Genomics* **2009**, *10*.
72. 4-deep, R. O. I. <http://4-deep.com/applications/municipal-water/>.
73. Diogène, J.; Campàs, M., *Recent Advances in the Analysis of Marine Toxins*. Elsevier: 2017; Vol. 78.
74. Brown, M.-R. Government of Canada supports Nova Scotia firm through Build in Canada Innovation Program, <https://www.newswire.ca/news-releases/government-of-canada-supports-nova-scotia-firm-through-build-in-canada-innovation-program-641721553.html>.
75. TOLEDO, M. <https://www.mt.com/no/no/home/products/Process-Analytics/Total-Organic-Carbon-TOC-analyzer/thornton-bioburden-analyzer.html#documents>.
76. Hojris, B.; Christensen, S. C. B.; Albrechtsen, H. J.; Smith, C.; Dahlqvist, M., A novel, optical, on-line bacteria sensor for monitoring drinking water quality. *Scientific Reports* **2016**, *6*.
77. Nescerecka, A.; Hammes, F.; Juhna, T., A pipeline for developing and testing staining protocols for flow cytometry, demonstrated with SYBR Green I and propidium iodide viability staining. *Journal of Microbiological Methods* **2016**, *131*, 172-180.
78. Ramseier, M. K.; von Gunten, U.; Freihofer, P.; Hammes, F., Kinetics of membrane damage to high (HNA) and low (LNA) nucleic acid bacterial clusters in drinking water by ozone, chlorine, chlorine dioxide, monochloramine, ferrate(VI), and permanganate. *Water Research* **2011**, *45*, (3), 1490-1500.
79. Nie, X. B.; Liu, W. J.; Chen, M.; Liu, M. M.; Ao, L., Flow cytometric assessment of the effects of chlorine, chloramine, and UV on bacteria by using nucleic acid stains and 5-cyano-2,3-dityltetrazolium chloride. *Frontiers of Environmental Science & Engineering* **2016**, *10*, (6).
80. Bouvier, T.; del Giorgio, P. A.; Gasol, J. M., A comparative study of the cytometric characteristics of High and Low nucleic-acid bacterioplankton cells from different aquatic ecosystems. *Environmental Microbiology* **2007**, *9*, (8), 2050-2066.
81. Koch, C.; Guenther, S.; Desta, A. F.; Huebschmann, T.; Mueller, S., Cytometric fingerprinting for analyzing microbial intracommunity structure variation and identifying subcommunity function. *Nature Protocols* **2013**, *8*, (1), 190-202.
82. Prest, E. I.; Hammes, F.; Kotzsch, S.; van Loosdrecht, M. C. M.; Vrouwenvelder, J. S., Monitoring microbiological changes in drinking water systems using a fast and reproducible flow cytometric method. *Water Research* **2013**, *47*, (19), 7131-7142.
83. Hammes, F.; Berney, M.; Wang, Y.; Vital, M.; Koester, O.; Egli, T., Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Research* **2008**, *42*, (1-2), 269-277.
84. Van Nevel, S.; Koetzsch, S.; Proctor, C. R.; Besmer, M. D.; Prest, E. I.; Vrouwenvelder, J. S.; Knezev, A.; Boon, N.; Hammes, F., Flow cytometric bacterial cell counts challenge conventional heterotrophic plate counts for routine microbiological drinking water monitoring. *Water Research* **2017**.
85. Hammes, F.; Broger, T.; Weilenmann, H. U.; Vital, M.; Helbing, J.; Bosshart, U.; Huber, P.; Odermatt, R. P.; Sonnleitner, B., Development and laboratory-scale testing of a fully automated online flow cytometer for drinking water analysis. *Cytometry Part A* **2012**, *81A*, (6), 508-516.
86. Van Nevel, S.; Buysschaert, B.; De Roy, K.; De Gussemé, B.; Clement, L.; Boon, N., Flow cytometry for immediate follow-up of drinking water networks after maintenance. *Water Research* **2017**, *111*, 66-73.

87. Van Nevel, S.; Buyschaert, B.; De Gussem, B.; Boon, N., Flow cytometric examination of bacterial growth in a local drinking water network. *Water and Environment Journal* **2016**, *30*, (1-2), 167-176.
88. Liu, S.; Gunawan, C.; Barraud, N.; Rice, S. A.; Harry, E. J.; Amal, R., Understanding, Monitoring, and Controlling Biofilm Growth in Drinking Water Distribution Systems. *Environ. Sci. Technol.* **2016**, *50*, (17), 8954-8976.
89. Buyschaert, B.; Byloos, B.; Leys, N.; Van Houdt, R.; Boon, N., Reevaluating multicolor flow cytometry to assess microbial viability. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2016**, *100*, (21), 9037-9051.
90. Page, R. M.; Besmer, M. D.; Epting, J.; Sigrist, J. A.; Hammes, F.; Huggenberger, P., Online analysis: Deeper insights into water quality dynamics in spring water. *Science of the Total Environment* **2017**, *599*, 227-236.
91. Chen, W. W.; Li, Q. Z.; Zheng, W. S.; Hu, F.; Zhang, G. X.; Wang, Z.; Zhang, D. Q.; Jiang, X. Y., Identification of Bacteria in Water by a Fluorescent Array. *Angewandte Chemie-International Edition* **2014**, *53*, (50), 13734-13739.
92. Ikonen, J.; Pitkanen, T.; Kosse, P.; Cizek, R.; Kolehmainen, M.; Miettinen, I. T., On-line detection of Escherichia coli intrusion in a pilot-scale drinking water distribution system. *Journal of Environmental Management* **2017**, *198*, 384-392.
93. Cao, Y. P.; Griffith, J. F.; Weisberg, S. B., Evaluation of optical brightener photodecay characteristics for detection of human fecal contamination. *Water Research* **2009**, *43*, (8), 2273-2279.
94. Scheifhacken, N.; Horn, H.; Paul, L., Comparing in situ particle monitoring to microscopic counts of plankton in a drinking water reservoir. *Water Research* **2010**, *44*, (11), 3496-3510.
95. Sorensen, J. P. R.; Baker, A.; Cumberland, S. A.; Lapworth, D. J.; MacDonald, A. M.; Pedley, S.; Taylor, R. G.; Ward, J. S. T., Real-time detection of faecally contaminated drinking water with tryptophan-like fluorescence: defining threshold values. *Science of the Total Environment* **2018**, *622*, 1250-1257.
96. Capodaglio, A. G., In-stream detection of waterborne priority pollutants, and applications in drinking water contaminant warning systems. *Water Science and Technology-Water Supply* **2017**, *17*, (3), 707-725.
97. Maas, M. B.; Perold, W. J.; Dicks, L. M. T., Biosensors for the detection of Escherichia coli. *Water Sa* **2017**, *43*, (4), 707-721.
98. Kumar, N.; Hu, Y.; Singh, S.; Mizaikoff, B., Emerging biosensor platforms for the assessment of water-borne pathogens. *Analyst* **2018**, *143*, (2), 359-373.
99. Koyun, A.; Ahlatcioğlu, E.; İpek, Y. K., Biosensors and their principles. In *A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones*, InTech: 2012.
100. Gunda, N. S. K.; Dasgupta, S.; Mitra, S. K., DipTest: A litmus test for E. coli detection in water. *Plos One* **2017**, *12*, (9).
101. Meredith, N. A.; Quinn, C.; Cate, D. M.; Reilly, T. H.; Volckens, J.; Henry, C. S., Paper-based analytical devices for environmental analysis. *Analyst* **2016**, *141*, (6), 1874-1887.
102. Khan, M. S.; Pande, T.; van de Ven, T. G. M., Qualitative and quantitative detection of T7 bacteriophages using paper based sandwich ELISA. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2015**, *132*, 264-270.
103. Hossain, S. M. Z.; Ozimok, C.; Sicard, C.; Aguirre, S. D.; Ali, M. M.; Li, Y. F.; Brennan, J. D., Multiplexed paper test strip for quantitative bacterial detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, *403*, (6), 1567-1576.
104. Wang, Y.; Alocilja, E. C., Gold nanoparticle-labeled biosensor for rapid and sensitive detection of bacterial pathogens. *Journal of Biological Engineering* **2015**, *9*.
105. Chen, Q.; Lin, J. H.; Gan, C. Q.; Wang, Y. H.; Wang, D.; Xiong, Y. H.; Lai, W. H.; Li, Y. T.; Wang, M. H., A sensitive impedance biosensor based on immunomagnetic separation and urease catalysis

- for rapid detection of *Listeria monocytogenes* using an immobilization-free interdigitated array microelectrode. *Biosensors & Bioelectronics* **2015**, *74*, 504-511.
106. Karapetis, S.; Nikoleli, G. P.; Siontorou, C. G.; Nikolelis, D. P.; Tzamtzis, N.; Psaroudakis, N., Development of an Electrochemical Biosensor for the Rapid Detection of Cholera Toxin Based on Air Stable Lipid Films with Incorporated Ganglioside GM1 Using Graphene Electrodes. *Electroanalysis* **2016**, *28*, (7), 1584-1590.
107. Jijie, R.; Kahlouche, K.; Barras, A.; Yamakawa, N.; Bouckaert, J.; Gharbi, T.; Szunerits, S.; Boukherroub, R., Reduced graphene oxide/polyethylenimine based immunosensor for the selective and sensitive electrochemical detection of uropathogenic *Escherichia coli*. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2018**, *260*, 255-263.
108. Xu, Y. H.; Liu, M. L.; Kong, N.; Liu, J. Q., Lab-on-paper micro- and nano-analytical devices: Fabrication, modification, detection and emerging applications. *Microchimica Acta* **2016**, *183*, (5), 1521-1542.
109. Sicard, C.; Glen, C.; Aubie, B.; Wallace, D.; Jahanshahi-Anbuhi, S.; Pennings, K.; Daigger, G. T.; Pelton, R.; Brennan, J. D.; Filipe, C. D. M., Tools for water quality monitoring and mapping using paper-based sensors and cell phones. *Water Research* **2015**, *70*, 360-369.
110. Rengaraj, S.; Cruz-Izquierdo, A.; Scott, J. L.; Di Lorenzo, M., Impedimetric paper-based biosensor for the detection of bacterial contamination in water. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2018**, *265*, 50-58.
111. Park, T. S.; Yoon, J. Y., Smartphone Detection of *Escherichia coli* From Field Water Samples on Paper Microfluidics. *Ieee Sensors Journal* **2015**, *15*, (3), 1902-1907.
112. Ali, M. M.; Brown, C. L.; Jahanshahi-Anbuhi, S.; Kannan, B.; Li, Y. F.; Filipe, C. D. M.; Brennan, J. D., A Printed Multicomponent Paper Sensor for Bacterial Detection. *Scientific Reports* **2017**, *7*.
113. Bui, M. P. N.; Ahmed, S.; Abbas, A., Single-Digit Pathogen and Attomolar Detection with the Naked Eye Using Liposome-Amplified Plasmonic Immunoassay. *Nano Letters* **2015**, *15*, (9), 6239-6246.
114. Al-Qadiri, H. M.; Al-Alami, N. I.; Al-Holy, M. A.; Rasco, B. A., Using Fourier transform infrared (FT-IR) absorbance spectroscopy and multivariate analysis to study the effect of chlorine-induced bacterial injury in water. *Journal of agricultural and food chemistry* **2008**, *56*, (19), 8992-8997.
115. Leskinen, S. D.; Lim, D. V., Rapid ultrafiltration concentration and biosensor detection of enterococci from large volumes of Florida recreational water. *Applied and Environmental Microbiology* **2008**, *74*, (15), 4792-4798.
116. Leskinen, S. D.; Harwood, V. J.; Lim, D. V., Rapid dead-end ultrafiltration concentration and biosensor detection of enterococci from beach waters of Southern California. *Journal of Water and Health* **2009**, *7*, (4), 674-684.
117. Li, X.; Harwood, V. J.; Nayak, B.; Weidhaas, J. L., Ultrafiltration and Microarray for Detection of Microbial Source Tracking Marker and Pathogen Genes in Riverine and Marine Systems. *Applied and Environmental Microbiology* **2016**, *82*, (5), 1625-1635.
118. Peskoller, C.; Niessner, R.; Seidel, M., Cross-flow microfiltration system for rapid enrichment of bacteria in water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *393*, (1), 399-404.
119. Amphi-Bac <http://amphi-bac.dk/da/produkter-og-services/drikkevand/alonda>
120. Amphi-Bac <http://amphi-bac.dk/da/produkter-og-services/drikkevand/hivos>
121. Ramadan, Q.; Gijs, M. A. M., Microfluidic applications of functionalized magnetic particles for environmental analysis: focus on waterborne pathogen detection. *Microfluidics and Nanofluidics* **2012**, *13*, (4), 529-542.
122. Nevers, M. B.; Whitman, R. L., Efficacy of monitoring and empirical predictive modeling at improving public health protection at Chicago beaches. *Water Research* **2011**, *45*, (4), 1659-1668.
123. Shively, D. A.; Nevers, M. B.; Breitenbach, C.; Phanikumar, M. S.; Przybyla-Kelly, K.; Spoljaric, A. M.; Whitman, R. L., Prototypic automated continuous recreational water quality monitoring of nine Chicago beaches. *Journal of Environmental Management* **2016**, *166*, 285-293.

124. Gonzalez, R. A.; Noble, R. T., Comparisons of statistical models to predict fecal indicator bacteria concentrations enumerated by qPCR- and culture-based methods. *Water Research* **2014**, *48*, 296-305.
125. Eregno, F. E.; Tryland, I.; Tjomsland, T.; Myrmel, M.; Robertson, L.; Heistad, A., Quantitative microbial risk assessment combined with hydrodynamic modelling to estimate the public health risk associated with bathing after rainfall events. *Science of the Total Environment* **2016**, *548*, 270-279.
126. Herrig, I. M.; Boer, S. I.; Brennholt, N.; Manz, W., Development of multiple linear regression models as predictive tools for fecal indicator concentrations in a stretch of the lower Lahn River, Germany. *Water Research* **2015**, *85*, 148-157.
127. Wyer, M. D.; Kay, D.; Watkins, J.; Davies, C.; Kay, C.; Thomas, R.; Porter, J.; Stapleton, C. M.; Moore, H., Evaluating short-term changes in recreational water quality during a hydrograph event using a combination of microbial tracers, environmental microbiology, microbial source tracking and hydrological techniques: A case study in Southwest Wales, UK. *Water Research* **2010**, *44*, (16), 4783-4795.
128. Lambrou, T. P.; Anastasiou, C. C.; Panayiotou, C. G.; Polycarpou, M. M., A Low-Cost Sensor Network for Real-Time Monitoring and Contamination Detection in Drinking Water Distribution Systems. *Ieee Sensors Journal* **2014**, *14*, (8).

NIVA: Norges ledende kompetansesenter på vannmiljø

NIVA gir offentlig vannforvaltning, næringsliv og allmennheten grunnlag for god vannforvaltning gjennom oppdragsbasert forsknings-, utrednings- og utviklingsarbeid. NIVA kjennetegnes ved stor faglig bredde og godt kontaktnett til fagmiljøer i inn- og utland. Faglig tyngde, tverrfaglig arbeidsform og en helhetlig tilnæringsmåte er vårt grunnlag for å være en god rådgiver for forvaltning og samfunnsniv.



Norsk institutt for vannforskning

Gaustadalléen 21 • 0349 Oslo
Telefon: 02348 • Faks: 22 18 52 00
www.niva.no • post@niva.no