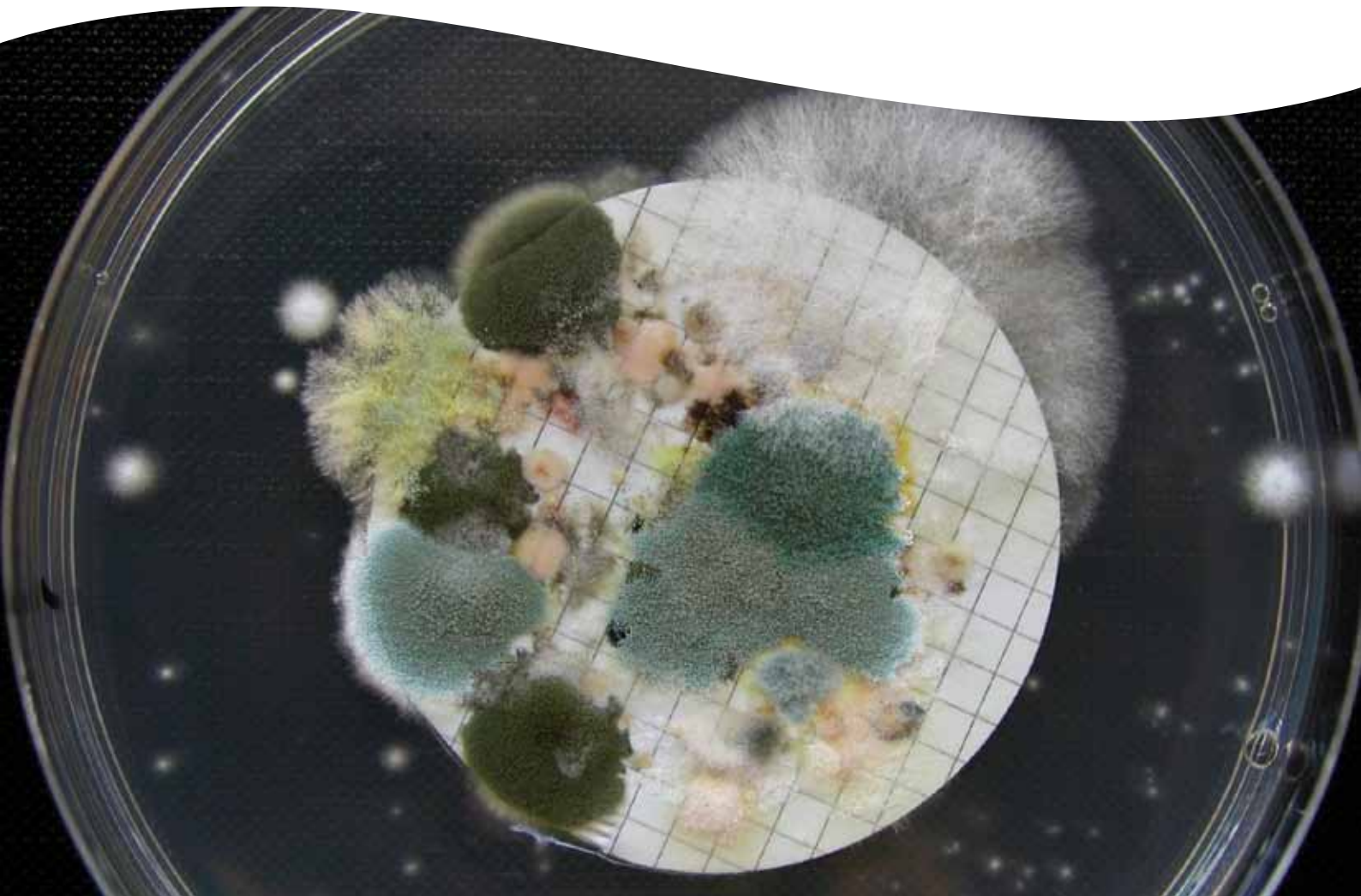


Muggsopp og bakterier i interne drikkevannsledninger

Forsøk med bruk av små PEX-rør for å studere vekst og overlevelse i biofilm



Hovedkontor

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

Sørlandsavdelingen

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

Østlandsavdelingen

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

Vestlandsavdelingen

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

NIVA Midt-Norge

Pirsenteret, Havnegata 9
Postboks 1266
7462 Trondheim
Telefon (47) 22 18 51 00
Telefax (47) 73 54 63 87

Tittel Muggsopp og bakterier i interne drikkevannsledninger. Forsøk med bruk av små PEX-rør for å studere vekst og overlevelse i biofilm.	Løpenr. (for bestilling) 6046-2010	Dato 14. oktober 2010
	Prosjektnr. Undernr. 27178	Sider Pris 28
Forfatter(e) Ingun Tryland, Gunhild Hageskal*, Anne-Marie Bomo og Ida Skaar* (*Veterinærinstituttet)	Fagområde Vannhygiene	Distribusjon Åpen
	Geografisk område	Trykket CopyCat AS
Oppdragsgiver(e) Norges forskningsråd	Oppdragsreferanse NFR/173294	
<p>Sammendrag</p> <p>Det ble gjennomført forsøk i små PEX-rør for å studere biofilmvekst i interne drikkevannsledninger i hushold og næringsmiddelbedrifter. Det ble benyttet ulike vannkvaliteter: råvann (fra Oset/Skullerud), klorert råvann, fullrenset vann (fra Oset/Skullerud) og fullrenset vann tilsatt fosfat. Vannet i rørene ble manuelt erstattet med nytt vann en gang daglig (kun virkedager). Alle rørene ble utsatt for to kontamineringsepisoder; forurenset bekkevann 1:10 ved forsøksstart og forurenset bekkevann tilsatt muggsopp ved dag 15. Hensikten var å undersøke om uønskede bakterier og muggsopp fra kontamineringen ville etablere seg i biofilm i rørene, og om utviklingen av biofilm (mengde og sammensetning) ville være forskjellig i rørene med ulik vannkvalitet.</p> <p>Resultatene viste at dersom uønskede mikrober som muggsopp eller <i>P. aeruginosa</i> tilføres internt ledningsnett, vil de kunne etablere seg og vokse i biofilm på rørvegger eller i vannfasen, selv i næringsfattig/fullrenset vann. Selv lave konsentrasjoner av slike organismer kan være uheldig for næringsmiddelprodusenter fordi organismer som løsner fra biofilmen kan formere seg ytterligere i næringsmidler. Internt ledningsnett bør derfor desinfiseres jevnlig, og spesielt etter mistanke om kontamineringsepisoder. Våre forsøk viste at sterk-klorering (26 mg Cl₂/L tilsatt) eller glovarmt vann (90 °C) inaktiverte både bakterier og muggsopp i biofilmen.</p>		
Fire norske emneord 1. Biofilm 2. Internt ledningsnett 3. Muggsopp 4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fire engelske emneord 1. Biofilm 2. Distribution network 3. Fungi 4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	


Ingun Tryland
Prosjektleder


Helge Liltved
Forskningsleder


Bjørn Faafeng
Seniorrådgiver

Muggsopp og bakterier i interne drikkevannsledninger

Forsøk med bruk av små PEX-rør for å studere vekst og
overlevelse i biofilm

Forord

Arbeidet ble utført som en del av prosjektet "Biofilm, Vannkvalitet og Næringsmiddelproduksjon", et kompetanseprosjekt med brukermedvirkning (KMB) fra Norges forskningsråd (2006-2010). Prosjektet ledes av forskningsleder Ida Skaar ved Veterinærinstituttet. Takk til forskningsassistent Camilla H.C. Hagman (NIVA) for arbeid med ATP-analyser.

Oslo, 13 oktober 2010

Ingun Tryland

Innhold

Sammendrag	5
Summary	6
1. Innledning	7
2. Materialer og metoder	8
2.1 Forsøk for å studere vekst av bakterier og muggsopp i interne drikkevannsledninger	8
2.2 Test av ulike metoder for vask og desinfeksjon av rørene	10
2.3 Analysemetoder	10
2.4 Identifikasjon av bakteriekolonier	11
3. Resultater og diskusjon	12
3.1 Utvikling av biofilm i rørene	12
3.2 Oppvekst av mikrober i vannfasen	16
3.3 Effekt av vask/desinfeksjon av rørene	16
4. Konklusjoner	17
5. Referanser	18

Sammendrag

Små PEX-rør ble brukt som modell for å studere vekst av biofilm i interne drikkevannsledninger i hushold/næringsmiddelbedrifter. Betingelser som kan betegnes som verst tenkelige med hensyn på å fremme mikrobiell vekst i rørene, dvs. romtemperatur, ingen desinfeksjonsrest og lange perioder med stillestående vann, ble benyttet. Rørene ble fylt med vann med ulike vannkvaliteter: råvann (fra Oset/Skullerud i Oslo), klorert råvann, fullrenset vann (fra Oset/Skullerud) og fullrenset vann tilsatt fosfat. Vannet i rørene ble manuelt erstattet med nytt vann en gang daglig (kun virkedager). Alle rørene ble utsatt for to kontamineringsepisoder; forurenset bekkevann 1:10 ved forsøksstart, og forurenset bekkevann tilsatt muggsopp ved dag 15. Hensikten var å undersøke om uønskede bakterier og muggsopp fra kontamineringen ville etablere seg i biofilm i rørene, og om utviklingen av biofilm (mengde og sammensetning) ville være forskjellig i rørene med ulik vannkvalitet. Over forsøksperioden på 36 dager ble det tatt jevnlig målinger av muggsopp, fluorescerende pseudomonader, presumptiv *Aeromonas* spp., *Bacillus* spp., koliforme bakterier, *E. coli*, kimtall, total antall celler og ATP i vannfase og i biofilm på rørveggene.

Undersøkelsen viste at:

- Utviklingen av biofilm var betydelig raskere i rørene tilsatt fosfat (indikerer fosforbegrensning), men etter 3 uker var mengden biofilm omtrent lik i alle rørene.
- Tilsatt muggsopp etablerte seg i biofilm i alle rørene.
- Fluoreserende pseudomonader, flere identifisert som *Pseudomonas aeruginosa*, etablerte seg i biofilm i rørene, mest i rørene tilsatt fosfat, men også små mengder i rørene med klorert råvann og fullrenset vann.
- Små mengder koliforme bakterier ble sporadisk påvist i biofilm i rørene. Det ble ikke påvist *E. coli* eller *Bacillus* sporer i biofilmen, selv om betydelige mengder av disse bakteriene ble tilført i kontamineringsepisodene.

Konklusjon: Dersom uønskede mikrober som muggsopp eller *P. aeruginosa* tilføres internt ledningsnett, vil de kunne etablere seg og vokse i biofilm på rørvegger eller i vannfasen, selv i næringsfattig/fullrenset vann. Selv lave konsentrasjoner av slike organismer kan være uheldig for næringsmiddelprodusenter fordi organismer som løsner fra biofilmen kan oppformere seg ytterligere i næringsmidler. Internt ledningsnett bør derfor desinfiseres jevnlig, og spesielt ved mistanke om kontamineringsepisoder. Våre forsøk viste at sterk-klorering (26 mg Cl₂/L tilsatt) eller glovarmt vann (90 °C) inaktiverte både bakterier og muggsopp i biofilmen.

Summary

Title: Growth and survival of fungi and bacteria in PEX-pipes for distribution of drinking water

Year: 2010

Author: Ingun Tryland, Gunhild Hageskal, Anne-Marie Bomo and Ida Skaar

Source: Norwegian Institute for Water Research, ISBN No.: ISBN 82-577-5781-6

Small PEX-pipes were used as a model system for studying biofilm growth in internal water distribution pipes in houses/food factories. Worst case conditions for promoting microbial growth, i. e. room temperature, no disinfection residual and long periods with stagnant water, were used. The pipes were filled with water of different qualities: raw water, chlorinated raw water, treated (coagulation/filtration) water and treated water added phosphate. The water in the pipes was manually replaced with new water once each working day. Two “contamination-episodes” were simulated; at the start of the experiment contaminated river water (from Gaustadbekken) were added 1:10 to the pipes and after 15 days contaminated river water supplemented with fungal spores were added. The purpose was to investigate if potential harmful bacteria and fungi were able to establish in biofilm in the pipes and whether the development of biofilm (with regard to amount and composition) would be different in the pipes containing water with different qualities. During the 36-days experimental period, samples of biofilm and water were taken frequently and analysed for fungi, fluorescent *Pseudomonas* spp., presumptive *Aeromonas* spp., *Bacillus* spp., coliform bacteria, *E. coli*, heterotrophic plate count, total number of cells, as well as ATP.

We found that:

- Initially, the biofilm growth was much faster in the pipes added phosphate (indicates phosphate limitation), but after 3 weeks the amount of biofilm was approximately equal in all the pipes
- The added fungi established in the biofilm in all the pipes
- Fluorescent *Pseudomonas* spp., several identified as *Pseudomonas aeruginosa*, was found in biofilm in the pipes, most in pipes added phosphate, but also small amounts in tubes containing chlorinated raw water and treated water
- Low numbers of coliform bacteria were occasionally detected in biofilm in the pipes. *E. coli* and *Bacillus* spores were not found in the biofilm even though significant amounts were added in the contamination episodes.

Conclusion: The experiment demonstrated that if potential harmful microbes, like fungi or *P. aeruginosa*, are introduced to the internal water distribution system, they may establish and grow in biofilm in the pipes, even in water previously treated by coagulation and filtration. Even low numbers of such microbes, released from the biofilm, may be problematic for food producers since the microbes may further grow up in several food products and potentially cause food spoilage or food-borne diseases. Internal water distribution systems at such food producers should therefore be washed and disinfected regularly, in particular if contamination is suspected. Our experiments showed that high chlorine doses (26 mg Cl₂/L added overnight) and very hot water (90°C) inactivated both bacteria and fungal spores in the biofilm.

1. Innledning

Biofilm dannes på de fleste overflater i kontakt med vann, for eksempel i rør for distribusjon av drikkevann. En biofilm består hovedsakelig av ulike mikrober (bakterier, sopp, protozoer og etter hvert større mikrober) og klebrige stoffer som skilles ut av mikrobene. De fleste mikrober i biofilm i distribusjonssystemet for drikkevann er ufarlige for mennesker, men sykdomsfremkallende mikroorganismer er også vist å kunne vokse eller overleve (Percival og Walker, 1999; Szewzyk m.fl. 2000). Selv om lave konsentrasjoner av mikroorganismer som løsner fra biofilmen ikke nødvendigvis representerer en helserisiko ved å drikke vannet, kan flere av dem representere et betydelig problem for næringsmiddelprodusenter, ved at de hurtig kan oppformerer i mat og dermed bederve maten eller føre til matbåren smitte. Eksempler på slike mikrober er ulike arter av muggsopp, f.eks. *Penicillium spinulosum*, og bakterier som fluorescerende pseudomonader og *Aeromonas* spp. (Gondrosen og Langeland, 1983; Folkehelseinstituttet, 2004).

Flere faktorer kan påvirke dannelsen av biofilm i drikkevannsledninger, for eksempel tilgjengelige næringsstoffer (deriblant karbonkilde, fosfor), rørmateriale, temperatur, hydrauliske forhold, tilførte mikroorganismer og desinfeksjonsrest (Ollos mfl. 2003; Lethola mfl. 2004).

Den mest brukte strategi for å begrense biofilmvekst på ledningsnett er tilsats av klorforbindelser ved vannbehandlingsanlegget som etterlater en desinfiserende klorrest når vannet distribueres. Dosene som brukes i Norge er generelt lave og ikke effektive for eksempel med hensyn på muggsopp (Hageskal mfl. 2009). Fritt klor er dessuten ofte brukt opp innen vannet når internt ledningsnett.

Som en del av prosjektet Biofilm, Vannkvalitet og Næringsmiddelproduksjon blir to ”strategier” undersøkt for å unngå at muggsopp og problematiske bakterier skal etablere seg i internt ledningsnett i næringsmiddelbedrifter:

- 1) Desinfeksjon av innkommende vann for å unngå at problematiske mikroorganismer tilføres. Det utføres dose-respons forsøk med ulike desinfektanter (klor, kloramin, UV og ozon) med hensyn på å inaktivere ulike muggsopparter.
- 2) Fjerning av humus og næringssalter ved kjemisk felling/fullrensing for å produsere et mer næringsfattig vann. Det undersøkes om dette vil gjøre vannet mere ”bio-stabil” med hensyn på oppvekst av muggsopp og uønskede bakterier.

Resultater fra eksperimenter for å teste strategi 2 blir vist i denne rapporten. Hensikten med eksperimentene var å se nærmere på om ulik vannkvalitet (forutgående vannbehandling, fosforbegrensning) kan påvirke sammensetningen av biofilmen som dannes i interne drikkevannsledninger– med fokus på noen muggsopp og bakterier som kan være problematiske for næringsmiddelprodusenter.

2. Materialer og metoder

2.1 Forsøk for å studere vekst av bakterier og muggsopp i interne drikkevannsledninger

Modellsystem for interne drikkevannsledninger:

Kryssbundet polyetylen (PEX) er nå det mest brukte materiale i drikkevannsledninger i husinstallasjoner. PEX-rør 1.5 cm diameter (1 cm indre diameter) og 30 cm lange (volum 30 ml) med plugg (type snap pack) i begge ender ble benyttet som enkelt modellsystem for å simulere interne drikkevannsledninger i en næringsmiddelbedrift/husholdning. Rørene og pluggene (produktnummer 5116513 og 5116583 fra www.hyttetorget.no) ble vasket godt i springvann før bruk.



PEX-rør (10 stk) med plugg i begge ender.

Rørene ble fylt med vann med ulik vannkvalitet (beskrevet under) og ble lagt i rom ved 20 °C. Vannet i rørene ble skiftet en gang daglig mandag-fredag (hvis ikke annet er beskrevet) ved å helle ut vannet fra rørene og erstatte med nytt. Lørdag og søndag ble det ikke byttet vann. Dette modellsystemet representerer et "worst case" med hensyn på å fremme mikrobiell vekst i vannfase og på rørvegger, dvs. romtemperatur, ingen desinfeksjonsrest og lange perioder med stillestående vann.

Vannkvaliteter:

Totalt ble 10 rør tilsatt vann av ulik kvalitet:

- 2 rør med råvann*
- 2 rør med råvann* som ble tilsatt 0.5 mg Cl₂/L (som natrium hypokloritt), heretter kalt klorert råvann. Etter 30 min kontaktid ble restklor målt til 0.05-0.1 mg/L (fri klor) og 0.08-0.13 mg/L (total klor) med DPD-metoden.

- 3 rør med fullrenset vann*.
- 3 rør med fullrenset vann* tilsatt 5 µg/L fosfor (dvs 23 µg/L Na₂HPO₄).

Alle vannprøvene ble tilsatt natrium thiosulfat (5 mg/L) for å nøytralisere eventuell klorrest før vannet ble fylt på rørene. Dette fordi vi kun ønsket å se på hvordan innholdet av næringsstoffer påvirket veksten og ikke ønsket desinfeksjonsrest i noen av rørene.

*Forsøket ble startet med råvann og fullrenset vann fra Oset vannbehandlingsanlegg. Noen dager etter at forsøket ble startet var det problemer på Oset vannbehandlingsanlegg slik at det rensede vannet kun ble silt og klorert (ikke fullrenset). Fra dag 10 gikk vi derfor over til å bruke råvann og fullrenset vann fra Skullerud vannbehandlingsanlegg (fullstendig oversikt over hvilke vann typer som ble fylt på rørene er vist i vedlegg 1). Bakterietall, total organisk karbon og fosfor i råvann og fullrenset vann fra Oset og Skullerud er vist i vedlegg 2.

Både Oset vannbehandlingsanlegg og Skullerud vannbehandlingsanlegg har såkalt kjemisk fullrensing, dvs. fargefjerning med koagulering (aluminiumsulfat) og filtrering, korrosjonskontroll med CO₂ og kalk, samt slutt desinfeksjon med UV. I tillegg tilsettes også natriumhypokloritt; ved Oset 0.35 mg/L Cl₂, som gir fri restklor på 0.1 mg/L etter 30 min.

Nytt vann ble hentet på vannverket hver mandag og torsdag, og bytte av vann i rørene ble derfor gjort med "ferskt" vann fra vannverket disse dagene. Vannet fra vannverket ble lagret på kjølerom ved 4 °C; bytte av vann på tirsdag og onsdag ble derfor gjort med mandags-vann lagret 1 og 2 døgn på kjølerom, og bytte av vann på fredagen ble gjort med torsdags-vann lagret 1 døgn på kjølerom.

Kontamineringsepisoder:

Alle rørene ble utsatt for to "kontamineringsepisoder"; Dag 0 ble det tilsatt 3 ml forurenset bekkevann fra Gaustadbekken og dag 15 ble det igjen tilsatt 3 ml forurenset bekkevann og 1 ml sopp suspensjon (ca. 10⁴ sopp sporer/rør). Muggsopp suspensjonene ble laget ved å dyrke opp 3 muggarter (*Aspergillus ustus*, *Penicillium spinulosum* og *Cladosporium cladosporioides*) på malt ekstrakt agar (MEA) skåler ved 25 °C i min. 14 dager, for så å skylle skålene med sterilt kranvann slik at sporene fulgte med. Sporesuspensjonene ble fortynnet med sterilt kranvann til en konsentrasjon på ca. 10⁵ sporer/ml. Til slutt ble 3,33 ml av hver av de tre sporesuspensjonene blandet til en suspensjon og tilsatt 90 ml sterilt kranvann til en total mengde på 100 ml og en konsentrasjon på ca. 10⁴ sporer/ml.

Mengden av ulike mikrober i vannet fra Gaustadbekken er vist i vedlegg 2. Hensikten med disse kontamineringsepisodene var å tilføre muggsopp og "uønskede bakterier" for å sjekke om disse mikroorganismene var i stand til å etablere seg i biofilm i vannrørene i konkurranse med naturlig mikroflora og om de ulike vannkvalitetene ville gi preferanse for fremvekst av enkelte arter. Etter forurenningsepisodene ble rørene ristet i minimum 15 minutter for å sikre god omblending i rørene. Rørene ble deretter liggende i 2 døgn før neste vannbytte.

Prøvetakning:

Det ble tatt ukentlige prøver av biofilmen som ble dannet på innsiden av PEX-rørene. Dette ble gjort ved å svabre en overflate på ca 7 cm² inni rørene, som deretter ble løst i 7 ml fosfat-buffer. Mengden mikroorganismer eller ATP i denne biofilmsuspensjonen kunne dermed analyseres per ml som er ekvivalent med per cm². Det ble avmerket hvor det var blitt svabret slik at det ved hvert biofilm-prøveuttak ble svabret på et nytt område. Prøvetakning av biofilmen ble gjort i forbindelse med vannbytte; før nytt vann ble helt på. Det ble foretatt 5 biofilm-uttak; dag 8, 15, 22, 29 og 36. Det ble også tatt prøver av vannfasen før vannbytte på enkelte dager. Fullstendig oversikt over prøveuttak er vist i vedlegg 1.

2.2 Test av ulike metoder for vask og desinfeksjon av rørene

Forsøket med å studere vekst og overlevelse av bakterier og muggsopp i rørene ble avsluttet dag 36. Deretter ble det fylt springvann på alle rørene, med vannbytte mandag, onsdag og fredag de neste 14 dagene. Hensikten var å skape like forhold i alle rørene. Det var nå en veletablert biofilm (bestående av både bakterier og muggsopp) i alle rørene.

Tre ulike vask/desinfeksjonsmetoder ble så testet:

- 2 rør ble skylt med kaldt vann i 2 minutter
- 2 rør ble skylt med varmt vann ($88\pm 2^\circ\text{C}$) i 1 minutt, rørene ble stående med det varme vannet i en time og ble deretter skylt med kaldt vann i 1 minutt.
- 2 rør ble tilsatt 26 mg/L Cl_2 (som natrium hypokloritt), rørene ble stående over natten (18 timer), ble deretter tilsatt natrium thiosulfat (260 mg/L) og skylt 2 min med kaldt vann.

Det ble tatt prøver av biofilmen i rørene før og etter vask/desinfeksjon. Biofilmprøvene ble analysert for muggsopp, kimtall og ATP.

2.3 Analysemetoder

Kimtall (næringsfattig medium):

0.1 ml (eller fortykning i fosfat-buffer) av vannprøve eller biofilmsuspensjon ble platet ut på R2A-agar. Antall kolonier ble talt etter 7 døgns inkubering ved 22°C .

Kimtall (etter NS-EN ISO 6222):

0.1 ml (eller fortykning i fosfat-buffer) av vannprøve eller biofilmsuspensjon ble platet ut på PGA-agar. Antall kolonier ble talt etter 3 døgns inkubering ved 22°C .

***Bacillus* spp.:**

1 ml vannprøve eller biofilmsuspensjon ble pasteurisert i 30 min ved 80°C . 0.1 ml prøve ble deretter platet ut på blodagar. Antall kolonier ble talt etter som *Bacillus* spp. etter 1 døgns inkubering ved 30°C . Hemolytiske kolonier (presumptivt *B. cereus*) ble også registrert.

Fluorescerende pseudomonader (Etter NS 4713):

0.1 ml (eller fortykning i fosfat-buffer) av vannprøve eller biofilmsuspensjon ble platet ut på Kings agar B. Antall fluorescerende kolonier ble talt under UV-belysning etter 3 døgns inkubering ved 22°C .

Presumptivt *Aeromonas* spp.:

0.1 ml (eller fortykning i fosfat-buffer) av vannprøve eller biofilmsuspensjon ble platet ut på RYAN *Aeromonas* medium med ampicillin. Antall matte, mørkegrønne kolonier, 0.5-1.6mm diameter med mørkere senter ble talt som presumptive *Aeromonas* spp. etter 2 døgns inkubering ved 30°C .

***E. coli* og koliforme bakterier:**

Colilert-18 Quantitray metoden ble benyttet for å bestemme antall koliforme bakterier og *E. coli* i vannprøver og biofilmsuspensjon etter fortykning i fosfatbuffer.

Muggsopp

1 ml av vannprøven og 0,1 ml av biofilmsuspensjonen ble sådd ut på Dichloran 18 % glycerol agar (DG18) skåler og strøket ut med en steril L-stav (2 paralleller pr. prøve). Skålene ble deretter inkubert ved 25°C i 3-7 dager, før muggsoppen ble kvantifisert ved å telle antall kolonier pr. skål.

Total count:

Totalt antall celler ble talt ved mikroskopering etter farging med DAPI.

ATP

Mengden ATP i biofilmsuspensjon ble bestemt ved å bruke BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay. Standardkurver for omregning fra LCPS til pg/ml ATP er vist i vedlegg 7.

2.4 Identifikasjon av bakteriekolonier

Ved fjerde biofilm-prøveuttak ble 7 tilfeldig plukkede kolonier fra Kings B agar (fluorescerende pseudomonader) og 10 kolonier fra RYAN Aeromonas medium med ampicillin (presumptiv *Aeromonas* spp.) renstrøket på nutrient agar, testet for oksidase reaksjon og forsøkt identifisert ved hjelp av API 20NE.

3. Resultater og diskusjon

Hovedhensikten med forsøkene var å undersøke i hvilken grad vannkvaliteten (råvann, klorert råvann, fullrenset vann og fullrenset vann tilsatt fosfat) hadde betydning for om uønskede mikroorganismer, tilført ved kontamineringsepisoder, ville etablere seg i biofilm i rørene. Eventuell klor-rest i vannet ble fjernet med natrium thiosulfat fordi vi kun ønsket å se på effekten av næringstoffer.

Som vist i tabell 1 inneholdt Gaustadbekkvannet, som ble benyttet ved de to kontamineringsepisodene, betydelige mengder av *E. coli*, koliforme bakterier, fluorescerende pseudomonader, presumptiv *Aeromonas* spp. og *Bacillus* spp. I tillegg til tilførsel av mikroorganismer i de to forurensningsepisodene ble rørene tilført mikroorganismer fra henholdsvis råvannet, klorert råvann og fullrenset vann ved hvert vannbytte i de ulike rørene. Måling av bakterietall i råvann og fullrenset vann fra Oset og Skullerud fra en (tilfeldig) dag er vist i vedlegg 2; For rørene som ble tilført råvann antas det at det ble tilført et hundretalls organismer pr ml mhp kimtall og mindre mengder av de andre bakteriegruppene. For fullrenset vann antas det at det ble tilført mindre mengder bakterier. Muggsopp ble ikke målt i vannet fra Oset og Skullerud men forventes å sporadisk bli tilført både fra råvann og fullrenset vann.

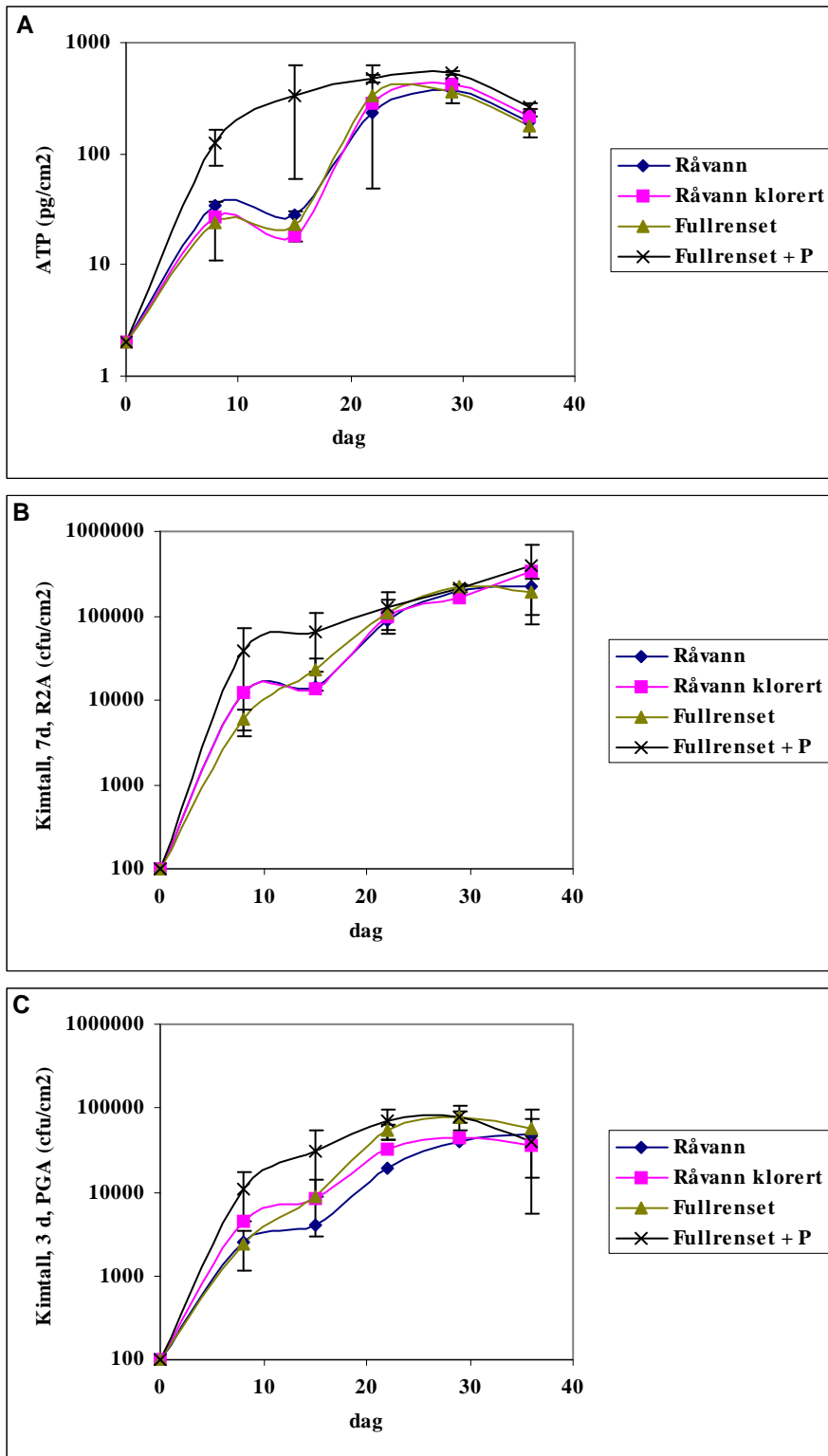
Tabell 1. Mengde bakterier (pr. ml) i vann fra Gaustadbekken. Dette vannet ble benyttet som ”kontaminering”. Ved hver kontamineringsepisode (dag 0 og dag 15) ble 3 ml Gaustadbekkvann tilsatt hvert rør (som totalt inneholdt 30 ml vann). Ved kontamineringsepisoden dag 15 ble det også tilsatt 1 ml muggsoppsuspensjon (ca. 10^4 muggsopp/rør).

	Dag 0	Dag 15
Kimtall R2A, 7 døgn	2950	4000
Kimtall PGA, 3 døgn	2000	3600
Fluorescerende pseudomonader	75	260
Presumtiv <i>Aeromonas</i> spp.	39	290
<i>Bacillus</i> spp.	8 (derav 2 hemolytiske)	200 (derav 5 hemolytiske)
Koliforme bakterier	>120	2400
<i>E. coli</i>	>120	87

3.1 Utvikling av biofilm i rørene

Utviklingen av mengde biofilm var omtrent lik i rørene med råvann, klorert råvann og fullrenset vann, både med hensyn på ATP og kimtall (figur 1A-C). Ved de to første prøveuttakene (dag 8 og 15) var det betydelig mer biofilm (kimtall og ATP) i rørene tilsatt fosfat (fullrenset +P) enn i de andre rørene. Dette indikerer at tilgangen på fosfor var en begrensende faktor for hastigheten for biofilm utvikling i de andre rørene. Fra 3. prøveuttak (dag 21) var mengden biofilm derimot omtrentlig lik i alle rørene, og hadde nådd omtrent maksverdi. Ved de to siste prøveuttakene så det ut ved svabringen/prøveuttak som om det var mer biofilmmasse i rørene med råvann enn i fullrenset vann (kun observert visuelt, ikke kvantifisert). Dette ble ikke gjenspeilet i de mikrobielle analysene; det ble utviklet like mye ATP og kim i rørene med fullrenset vann som i råvann. Dette stemmer med tidligere observasjoner som har vist at selv om råvannet har høyere farge og TOC enn fullrenset vann, så er det hovedsakelig ikke-biotilgjengelige karbonforbindelser som fjernes ved fullrensing, og råvann og fullrenset vann har derfor omtrent samme vekstpotensiale (Tryland, ikke publisert).

Anderson-Glenna og Lund (2008) fant liten forskjell i biofilmvekst i PEX-rør sammenlignet med kontroll av glass, men det kan ikke utelukkes at utlekkingsprodukter fra PEX-rørene eller pluggene kan ha påvirket biofilmveksten i våre forsøk.



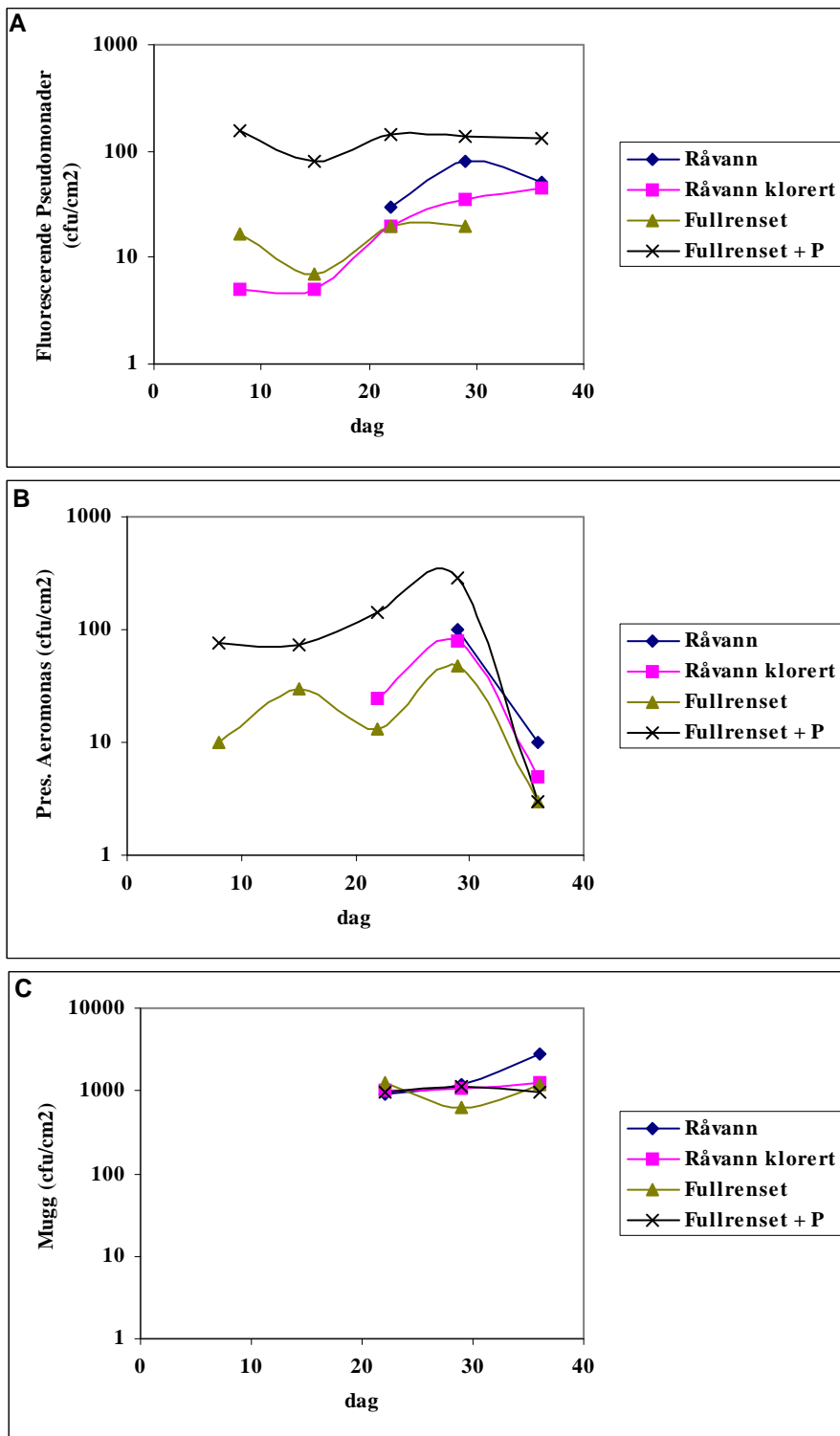
Figur 1. Utvikling av biofilm i rørene med ulik vannkvalitet målt som ATP (figur A), kimtall 7 døgn RZA (figur B) og kimtall 3 døgn PGA (figur C). Hvert punkt er gjennomsnittsverdi for 3 parallelle rør ± standardavvik for fullrenset og fullrenset + P, og for 2 parallelle rør med råvann og klorert råvann.

På tross av at det ble tilført betydelige mengder av *E. coli* og *Bacillus* spp. i de to forurensningsepisodene (tabell 1), så klarte ikke disse bakteriene å etablere seg og vokse i biofilm i rørene; Ved alle biofilm-prøveuttak var mengden *E. coli* og *Bacillus* spp. under deteksjonsgrensen, henholdsvis <1 cfu/cm² og <10 cfu/cm² i alle rør. Koliforme bakterier ble kun sporadisk funnet i biofilm i noen få av rørene (både klorert råvann, fullrenset og fullrenset tilsatt fosfat), og da i lave konsentrasjoner (1-2/cm²).

Fluorescerende pseudomonader etablerte seg i biofilm i rør med alle vannkvaliteter, mest i rørene tilsatt fosfat. Det var ingen signifikant forskjell i rørene med råvann og fullrenset vann (figur 2A). Av 7 tilfeldig plukkede kolonier (isolert fra klorert råvann, fullrenset og fullrenset +P) ble 4 av disse identifisert som *Pseudomonas aeruginosa* vha API 20E (vedlegg 6).

Presumptiv *Aeromonas* spp. etablerte seg også i rør med alle vannkvaliteter (figur 2B), men en betydelig nedgang ble observert ved siste prøveuttak (dag 36). API identifikasjon av 10 tilfeldig plukkede kolonier avslørte at få (kun 1/10) av disse bakteriene virkelig var *Aeromonas* spp. (vedlegg 6). Dette viser at metoden som ble brukt for å påvise *Aeromonas* spp. ikke var spesifikk nok uten ytterligere konfirmeringer til at vi kan trekke konklusjoner med hensyn på *Aeromonas* spp.

Det ble ikke funnet muggsopp (<10 /cm²) i biofilm i noen av rørene ved de to første prøveuttakene. Ved 2. kontamineringsepisode ble muggsopp tilsatt, og etter dette ble muggsopp gjenfunnet i biofilm i alle rørene ved alle prøveuttak (figur 2C).



Figur 2. Påvisning av ”uønskede” mikroorganismer i biofilm i rør med ulik vannkvalitet: A) Fluorescerende pseudomonader, B) Presumptiv *Aeromonas* spp. og C) Muggsopp. Hvert punkt er gjennomsnittsverdi for 3 parallelle rør for fullrenset og fullrenset + P, og for 2 parallelle rør med råvann og klorert råvann. Der det ikke er punkter ble det målt <10 organismer/cm² i alle parallelle.

3.2 Oppvekst av mikrober i vannfasen

Det ble også tatt målinger av mengden mikroorganismer i vannfasen. Alle resultater er vist i vedlegg 3. Etter første forurensningsepisode (fra dag 0 til dag 2 uten vannbytte) var det en betydelig utdøing av koliforme bakterier og *E. coli* og en kraftig oppvekst av heterotrofe bakterier (kimtall), fluorescerende pseudomonader og presumtiv *Aeromonas* spp. i alle rørene. Det er interessant å merke seg at oppveksten av florescerende pseudomonader var høyere i rørene tilsatt fosfat enn i de andre rørene. Dette kan indikere at fosforbegrensning kan være gunstig for å begrense oppveksten av fluorescerende pseudomonader og at forurensning av drikkevann med fosfat (både av vannkilder og via vannbehandlingsprodukter og ved distribusjon) derfor bør unngås. Prøvetakning fra vannfasen utover i forsøket viste at fluorescerende pseudomonader som vokste opp i vannfasen i starten av forsøket etter hvert ble skylt ut ved vannbytterne og ikke klarte å opprettholde veksten i konkurranse med andre heterotrofe bakterier slik at kun mindre mengder etter hvert ble sporadisk påvist i vannfasen (vedlegg 3). Etter forurensningsepisoden der muggsopp ble tilsatt, ble det også funnet små mengder muggsopp i vannfasen (vedlegg 3).

3.3 Effekt av vask/desinfeksjon av rørene

Omfattende skylling av rørene med kaldt vannet fjernet ikke biofilmen som var dannet på innsiden av rørene, verken med hensyn på muggtall, kimtall eller ATP (tabell 2). Det er velkjent at noen sopp sporer tolererer temperaturer på 80 °C. Enda høyere temperaturer, dvs 88±2 °C, fjernet/inaktiverte derimot biofilmen både med hensyn på muggtall, kimtall og ATP (tabell 2). PEX-rør kan periodevis tåle temperaturer på 90 °C, men oppvarming til slike temperaturer er kostbart og ikke alltid praktisk mulig. Også desinfeksjon med høye doser av klor reduserte muggtall, kimtall og ATP i biofilmen til under deteksjonsgrensen (tabell 2). Fritt klor virker korroderende på PEX-rør og høye doser bør ikke brukes for ofte. Dosen brukt i dette forsøket (tilsatt 26 mg/L Cl₂) er innenfor verdien (25-30 mg/l) som anbefales av driftsassistansen til desinfeksjon av nye vannledninger (sterk-klorering). Ved bruk av så høye klordoser er det viktig med grundig utskylning av klorrest før vannet brukes til næringsmiddelformål.

Tabell 2: Muggtall, kimtall og ATP i biofilm i rør før vask og etter ulik vask/desinfeksjon. Hver verdi er gjennomsnitt av to paralleller.

	Muggtall (cfu/cm²)	Kimtall (cfu/cm²)	ATP (pg/cm²)
Før vask	700	60000	76
Etter vask kaldt vann	900	80000	91
Etter vask 88±2 °C oC vann	<10	<10	8
Etter Klorering	<10	<10	<2

*At verdiene etter vask i kaldt vann er høyere enn før vask skyldes nok at biofilmen ikke var jevnt fordelt på flatene, dvs tilfeldigheter ved prøveuttak.

4. Konklusjoner

Dersom uønskede mikrober som muggsopp eller *P. aeruginosa* tilføres internt ledningsnett vil de kunne etablere seg i biofilm på rørvegger, selv i næringsfattig/fullrenset vann. Våre forsøk viste at ved lav vannutskiftning, romtemperatur og ingen desinfeksjonsrest så var fullrenset vann langt fra "bio-stabilt". I det fullrensede vannet var det nok næringsstoffer til at uønskede mikrober vokste/overlevde i vannfase og i biofilm på rørvegger, i samme grad som i råvann. Fullrensing er derimot generelt positivt ved at det fjerner farge og TOC og gjør vannet mer egnet for sluttdesinfeksjon; både med hensyn på effektiv desinfeksjon og mindre dannelse av kloreringsbiprodukter. Vekst av uønskede mikroorganismer i biofilm i internt ledningsnett bør forebygges ved å unngå at slike mikrober tilføres internt ledningsnett; ved desinfeksjon/fjerning på vannverk, ved å unngå forurensning ved distribusjon, eller ved desinfeksjon av innkommende vann. En utforning av internt ledningsnett som hindrer lange strekk med stillestående og temperert vann, er også gunstig. For kritiske abonnenter bør internt ledningsnett desinfiseres jevnlig (hvis mulig), og spesielt etter mistanke om kontamineringsepisoder eller ved høye kimtall. Våre forsøk viste at sterk-klorering (26 mg/L) eller glovarmt vann (90 °C) inaktiverer både bakterier og muggsopp i biofilmen. PEX-rør kan periodevis tåle temperaturer på 90 °C, men oppvarming til slike temperaturer er kostbart og ikke alltid/sjelden praktisk mulig. Fritt klor virker korroderende på PEX-rør og høye doser bør ikke brukes for ofte. Mer arbeid er påkrevd for å bestemme optimale doser av klor eller temperaturer for å fjerne/inaktivere ulike muggsopp i biofilm som er dannet i internt ledningsnett.

5. Referanser

Anderson-Glenna, M.J. and Lund, V. (2008). Bacterial biofilm development within cross linked polyethylene (PEX) pipes used for the distribution of drinking water. Proceedings fra den 6. nordiske drikkevannskonferanse. 9-11 juni 2008.

Folkehelseinstituttet (2004). Vannforsyningens ABC. Kapittel B-Vannkvalitet.

Gondrosen, B. og Langeland, G. (1983). Fluorescerende bakterier i drikkevann. Vann. 3: 359-365.

Hageskal, G., Lima, N. and Skaar, I. (2009). The study of fungi in drinking water. Mycological Research. 113: 165-172.

Lethola, M.J., Juhna, T., Miettinen, I.T., Vartianien, T. and Martikainen, P.j. (2004). Formation of biofilms in drinking water distribution networks, a case study in two cities in Finland and Latvia. Journal of industrial microbiology & biotechnology. 31: 489-494.

Ollos, P.J., Huck, P.M and Slawson, R.M. (2003). Factors affecting biofilm accumulation in model distribution systems. Journal American Water Works Association. 95. 87-

Percival, S.L. and Walker, J.T. (1999). Potable water and biofilms: a review of the public health implications. Biofouling. 14: 99-115.

Szewzyk, U., Szewzyk, R. Manz, W. and Schleifer, K.H. (2000). Microbiological safety of drinking water . Annual review of microbiology. 54: 81-127.

VEDLEGG 1

Forsøk med PEX-rør. Oversikt over dager med vannbytte, ”kontamineringsepisoder” og prøveuttak:

Dato	Dag	Vannbytte (fra hvilken vannkilde):	Kontaminering:	Prøveuttak av:
Man 22/9	0	Start forsøk: Råvann og fullrenset vann fra Oset (+ klorert råvann og fullrenset + fosfat) ble fylt på rør sammen med 1. kontamineringsepisode.	Med 3 ml Gaustadbekkvann*	Gaustadbekkvann*, råvann og rentvann fra Oset
Ons 24/9	2	”Oset-vann” fra kjølerom		Vannfase
Tor 25/9	3	Nytt vann fra Oset, vannbytte. OBS!!! Rentvann fra Oset var kun silt og klorert, ikke fullrenset!!!		
Fre 26/9	4	”Oset-vann” fra kjølerom		
Man 29/9	7	Nytt vann Oset, vannbytte. OBS!!! Rentvann fra Oset var kun silt og klorert, ikke fullrenset!!!		Vannfase
Tir 30/9	8	”Oset-vann” fra kjølerom		1. Biofilm
Ons 1/10	9	”Oset-vann” fra kjølerom		
Tor 2/10	10	Vannbytte med råvann og fullrenset vann fra Skullerud (heretter brukes vann fra Skullerud)		
Fre 3/10	11	”Skullerud-vann” fra kjølerom		
Man 6/10	14	Nytt vann Skullerud		Gaustadbekkvann**, Råvann og Rentvann fra Skullerud
Tir 7/10	15	”Skullerud-vann” fra kjølerom	Med 3 ml Gaustadbekkvann** og 1 ml sopp suspensjon (10^4 /ml)	2. Biofilm
Tor 9/10	17	Nytt vann Skullerud		
Fre 10/10	18	”Skullerud-vann” fra kjølerom		
Man 13/10	21	Prøvetakning vannfase, deretter nytt vann fra Skullerud		Vannfase
Tirs 14/10	22	”Skullerud-vann” fra kjølerom		3. Biofilm
Ons 15/10	23	”Skullerud-vann” fra kjølerom		
Tor 16/10	24	Nytt vann Skullerud		
Fre 17/10	25	”Skullerud-vann” fra kjølerom		
Man 20/11	28	Nytt vann Skullerud		
Tirs 21/10	29	”Skullerud-vann” fra kjølerom		4. Biofilm
Ons 22/10	30	”Skullerud-vann” fra kjølerom		
Tor 23/10	31	Nytt vann Skullerud		
Fre 24/10	32	”Skullerud-vann” fra kjølerom		
Man 27/10	35	Prøvetakning vannfase, deretter nytt vann fra Skullerud		Vannfase
Tir 28/10	36	”Skullerud-vann” fra kjølerom		5. Biofilm
Ons29/10- Ons12/11	37- 51	Fra nå av fylles springvann på rørene med vannbytte man, ons, fre		
Ons 12/11	51	Forsøk med desinfeksjon av rørene		Biofilm

VEDLEGG 2

Bakterietall i inokulum (Gaustadbekken) og vannprøver fra Oset og Skullerud:

	Koliforme MPN/100 ml:	<i>E.coli</i> MPN/100 ml	Presumtiv Aeromonas, cfu/ml	Fluores. Pseud cfu/ml	Bacillus cfu/ml	Kim PGA, 3d 22°C cfu/ml	Kim R2A 7d 22°C cfu/ml
Inokulum (Gaustadbekken) dag 0:	>12 000	>12 000	39	75	8, derav 2 hemolyttisk	2000	2950
Råvann Oset dag 0			4	5	3, derav 1 hemolyttisk	65	390
Rentvann Oset dag 0			<1/100 ml	<5	<1	<10	10
Inokulum (Gaustadbekken) dag 14:	240 000	8 700	290	260	200, derav 5 hemolytt	3600	4000
Råvann Skullerud dag 14	36	1	2	<10	<1	100	130
Rentvann Skullerud dag 14			<1/100 ml	<10	<1	<10	

Fosfor og DOC i inokulum og vannprøver fra Oset og Skullerud:

	Total-P	PO ₄ -P	DOC
	µg P/l	µg P/l	mg C/l
Råvann Oset dag 0	3	<1	3.6
Rentvann Oset dag 0	<1	<1	1.6
Inokulum Gaustadbekken dag 0	10	6	3.2
Råvann Skullerud dag 14	39*	<1	4.4
Rentvann Skullerud dag 14	22*	<1	2.2
Inokulum Gaustadbekken dag 14	163*	4	4.3

* Dette kan muligens være feilmålinger. Total-P i råvannet er tidligere målt til 3 µg P/l og <1 µg P/l i behandlet vann.

VEDLEGG 3

Antall mikrober i vannfasen i de ulike rørene ved ulike prøvetidspunkt:

Kimtall på R2A-agar (talt etter 7 døgn ved 22 °C), oppgitt som cfu/ml:

Prøve	Rør	Dag 0:	Dag 2:	Dag 7:	Dag 21:	Dag 35:
		22.9.08	24.9.08	29.9.08	13.10.08	27.10.08
V1	Rå 1	685	260000	35000	40000	26000
V2	Rå 2	685	240000	25000	65000	27000
V3	Rå + Cl 1	300	250000	30000	70000	27000
V4	Rå + Cl 2	300	220000	48000	35000	95000
V5	Fullr 1	300	200000	35000	129000	38000
V6	Fullr 2	300	280000	38000	137000	58000
V7	Fullr 3	300	280000	80000	139000	47000
V8	Fullr + P1	300	360000	290000	75000	38000
V9	Fullr + P2	300	400000	150000	112000	68000
V10	Fullr + P3	300	380000	450000	170000	89000

Kimtall på PGA-agar (talt etter 3 døgn ved 22 °C), oppgitt som cfu/ml:

Prøve	Rør	Dag 0:	Dag 2:	Dag 7:	Dag 21:	Dag 35:
		22.9.08	24.9.08	29.9.08	13.10.08	27.10.08
V1	Rå 1	265	100000	35000	40000	14000
V2	Rå 2	265	150000	13000	36000	10000
V3	Rå + Cl 1	200	110000	15000	41000	24000
V4	Rå + Cl 2	200	100000	19000	31000	65000
V5	Fullr 1	200	190000	10000	55000	24000
V6	Fullr 2	200	200000	2000	38000	44000
V7	Fullr 3	200	190000	5000	48000	32000
V8	Fullr + P1	200	240000	80000	32000	24000
V9	Fullr + P2	200	300000	73000	58000	32000
V10	Fullr + P3	200	200000	100000	70000	49000

Antall fluorescerende pseudomonader på Kings agar, talt etter 3 døgn ved 22 °C, oppgitt som cfu/ml:

Prøve	Rør	Dag 0:	Dag 2:	Dag 7:	Dag 21:	Dag 35:
		22.9.08	24.9.08	29.9.08	13.10.08	27.10.08
V1	Rå 1	13	290	<10	20	30
V2	Rå 2	13	400	<10	40	<10
V3	Rå + Cl 1	8	440	20	<10	<10
V4	Rå + Cl 2	8	350	30	<10	<10
V5	Fullr 1	8	1000	190	10	<10
V6	Fullr 2	8	300	150	10	<10
V7	Fullr 3	8	410	20	<10	<10
V8	Fullr + P1	8	6000	320	10	20
V9	Fullr + P2	8	2000	180	<10	<10
V10	Fullr + P3	8	5000	310	10	<10

Antall presumptiv *Aeromonas* spp på RYAN agar, talt etter 2 døgn ved 30 °C, oppgitt som cfu/ml:

Prøve	Rør	Dag 0:	Dag 2:	Dag 7:	Dag 21:	Dag 35:
		22.9.08	24.9.08	29.9.08	13.10.08	27.10.08
V1	Rå 1	8	300	20	<10	10
V2	Rå 2	8	470	20	<10	20

V3	Rå + Cl 1	4	1550	60	<10	<10
V4	Rå + Cl 2	4	850	40	10	<10
V5	Fullr 1	4	3750	230	20	20
V6	Fullr 2	4	3700	150	540	80
V7	Fullr 3	4	4000	50	<10	10
V8	Fullr + P1	4	5000	2000	<10	50
V9	Fullr + P2	4	4500	1290	230	30
V10	Fullr + P3	4	4000	1500	40	20

Antall koliforme bakterier (Colilert Quantitray), talt etter 1 døgn ved 37 °C, oppgitt som MPN/100 ml:

Prøve	Rør	Dag 0:	Dag 2:	Dag 7:	Dag 21:	Dag 35:
		22.9.08	24.9.08	29.9.08	13.10.08	27.10.08
V1	Rå 1	>1200	124	30		
V2	Rå 2	>1200			<10	<10
V3	Rå + Cl 1	>1200	207	<10		
V4	Rå + Cl 2	>1200			<10	<10
V5	Fullr 1	>1200	365	20		
V6	Fullr 2	>1200	374		<10	<10
V7	Fullr 3	>1200				
V8	Fullr + P1	>1200	99	<10		
V9	Fullr + P2	>1200	629		20	<10
V10	Fullr + P3	>1200				

Antall *E. coli* (Colilert Quantitray), talt etter 1 døgn ved 37 °C, oppgitt som MPN/100 ml:

Prøve	Rør	Dag 0:	Dag 2:	Dag 7:	Dag 21:	Dag 35:
		22.9.08	24.9.08	29.9.08	13.10.08	27.10.08
V1	Rå 1	>1200	42	<10		
V2	Rå 2	>1200			<10	<10
V3	Rå + Cl 1	>1200	20	<10		
V4	Rå + Cl 2	>1200			<10	<10
V5	Fullr 1	>1200	31	<10		
V6	Fullr 2	>1200	20		<10	<10
V7	Fullr 3	>1200				
V8	Fullr + P1	>1200	20	<10		
V9	Fullr + P2	>1200	20		<10	<10
V10	Fullr + P3	>1200				

Muggtall, talt etter 3-7 døgn ved 25 °C, oppgitt som cfu/ml:

Prøve	Rør	Dag 0:	Dag 2:	Dag 7:	Dag 21:	Dag 28:	Dag 35:
		22.9.08	24.9.08	29.9.08	13.10.08	20.10.08	27.10.08
V1	Rå 1			0	0,5	0,5	4,5
V2	Rå 2			0	0,5	0	0
V3	Rå + Cl 1			0	49	17	2,5
V4	Rå + Cl 2			0	66	0,5	2
V5	Fullr 1			0	22	28	15
V6	Fullr 2			0	5,5	23	0,5
V7	Fullr 3			0	1,5	9	16
V8	Fullr + P1			0	2,5	0	0
V9	Fullr + P2			0	0,5	0	0
V10	Fullr + P3			0	0,5	0	1

***Bacillus* sporer: Ikke påvist i rørene, dvs <10 cfu/ml i alle prøver**

VEDLEGG 4**Antall mikrober i biofilm i de ulike rørene ved ulike prøvetidspunkt:**Kimtall på R2A-agar (talt etter 7 døgn ved 22 °C), oppgitt som cfu/cm²:

Prøve	Rør	Dag 8:	Dag 15:	Dag 22:	Dag 29:	Dag 36:
		30.09.2008	07.10.2008	14.10.2008	21.10.2008	28.10.2008
B1	Rå 1	15000	13000	100000	210000	230000
B2	Rå 2	10000	15000	80000	200000	220000
B3	Rå + Cl 1	7000	8000	80000	130000	200000
B4	Rå + Cl 2	17000	19000	110000	200000	460000
B5	Fullr 1	8000	31000	160000	220000	150000
B6	Fullr 2	5000	24000	92000	200000	130000
B7	Fullr 3	5000	12000	80000	240000	280000
B8	Fullr + P1	10000	57000	200000	200000	270000
B9	Fullr + P2	28000	110000	100000	200000	750000
B10	Fullr + P3	77000	26000	80000	240000	160000

Kimtall på PGA-agar (talt etter 3 døgn ved 22 °C), oppgitt som cfu/cm²:

Prøve	Rør	Dag 8:	Dag 15:	Dag 22:	Dag 29:	Dag 36:
		30.09.2008	07.10.2008	14.10.2008	21.10.2008	28.10.2008
B1	Rå 1	2000	3000	28000	51000	50000
B2	Rå 2	3000	5000	10000	29000	50000
B3	Rå + Cl 1	2000	4000	23000	20000	20000
B4	Rå + Cl 2	7000	13000	40000	66000	50000
B5	Fullr 1	3000	15000	66000	65000	70000
B6	Fullr 2	3000	7000	50000	84000	10000
B7	Fullr 3	1000	4000	45000	90000	90000
B8	Fullr + P1	4000	31000	100000	86000	80000
B9	Fullr + P2	12000	54000	49000	50000	20000
B10	Fullr + P3	17000	9000	60000	100000	20000

Antall fluorescerende pseudomonader på Kings agar, talt etter 3 døgn ved 22 °C), oppgitt som cfu/cm²:

Prøve	Rør	Dag 8:	Dag 15:	Dag 22:	Dag 29:	Dag 36:
		30.09.2008	07.10.2008	14.10.2008	21.10.2008	28.10.2008
B1	Rå 1	<10	<10	40	80	80
B2	Rå 2	<10	<10	20	80	20
B3	Rå + Cl 1	<10	<10	10	10	<10
B4	Rå + Cl 2	10	10	30	60	90
B5	Fullr 1	10	<10	30	50	<10
B6	Fullr 2	<10	10	30	<10	<10
B7	Fullr 3	30	10	<10	10	<10
B8	Fullr + P1	130	120	160	60	10
B9	Fullr + P2	60	80	230	310	250
B10	Fullr + P3	280	40	40	40	<10

Antall presumpitiv *Aeromonas* spp på RYAN agar, talt etter 2 døgn ved 30 °C, oppgitt som cfu/cm²:

Prøve	Rør	Dag 8:	Dag 15:	Dag 22:	Dag 29:	Dag 36:
		30.09.2008	07.10.2008	14.10.2008	21.10.2008	28.10.2008
B1	Rå 1	<10	<10	<10	170	20
B2	Rå 2	<10	<10	<10	30	<10
B3	Rå + Cl 1	<10	<10	<10	10	<10
B4	Rå + Cl 2	<10	<10	50	150	10
B5	Fullr 1	10	<10	40	110	10
B6	Fullr 2	20	90	<10	20	<10
B7	Fullr 3	<10	<10	<10	10	<10
B8	Fullr + P1	120	110	390	170	<10
B9	Fullr + P2	20	110	30	500	10
B10	Fullr + P3	90	<10	10	190	<10

Bacillus sporer: Ikke observert i biofilm, dvs <10 cfu/cm² i alle prøver

E. coli: Ikke observert i biofilm, dvs <1 MPN/cm²

Koliforme bakterier: 1 MPN/cm² funnet i rør 4 dag 8, i rør 6 dag 22 og i rør 9 dag 29. 2 MPN/cm² funnet i rør 5 dag 29

Totalt antall celler talt ved mikroskopi etter DAPI farging (celler/cm²):

Prøve	Rør	Dag 8:	Dag 15:	Dag 22:	Dag 29:	Dag 36:
		30.09.2008	07.10.2008	14.10.2008	21.10.2008	28.10.2008
B1	Rå 1	<16000		87027	66944	257734
B2	Rå 2	<16000		85354	261082	174054
B3	Rå + Cl 1	<16000		75312	333046	60250
B4	Rå + Cl 2	<16000		140582	152298	321703
B5	Fullr 1	<16000		112131	78659	110458
B6	Fullr 2	<16000		56902	82006	33472
B7	Fullr 3	<16000		75312	92048	36819
B8	Fullr + P1	31798		117152	90374	51882
B9	Fullr + P2	42770		87027	16736	200832
B10	Fullr + P3	5579		76986	158992	257734

ATP beregnet som pg ATP/cm²:

Prøve	Rør	Dag 8:	Dag 15:	Dag 22:	Dag 29:	Dag 36:
		30.09.2008	07.10.2008	14.10.2008	21.10.2008	28.10.2008
B1	Rå 1	44	24	331	429	216
B2	Rå 2	24	32	131	330	167
B3	Rå + Cl 1	31	12	192	453	228
B4	Rå + Cl 2	23	25	373	395	199
B5	Fullr 1	19	19	660	338	171
B6	Fullr 2	14	31	146	290	147
B7	Fullr 3	38	19	193	434	219
B8	Fullr + P1	80	222	526	549	276
B9	Fullr + P2	167	660	458	545	274
B10	Fullr + P3	121	136	453	508	255

Muggtall, talt etter 3-7 døgn ved 25 °C, oppgitt som cfu/cm²:

Prøve	Rør	Dag 8:	Dag 15:	Dag 22:	Dag 29:	Dag 36:
		30.09.2008	07.10.2008	14.10.2008	21.10.2008	28.10.2008
B1	Rå 1	<10	<10	1240	960	2870
B2	Rå 2	<10	<10	610	1370	2780
B3	Rå + Cl 1	<10	<10	890	1320	1880
B4	Rå + Cl 2	<10	<10	1110	780	650
B5	Fullr 1	<10	<10	1950	490	660
B6	Fullr 2	<10	<10	880	590	1010
B7	Fullr 3	<10	<10	910	790	1830
B8	Fullr + P1	<10	<10	1100	1310	1020
B9	Fullr + P2	<10	<10	430	750	660
B10	Fullr + P3	<10	<10	1430	1300	1150

VEDLEGG 5

Effekt av vask/desinfeksjon av rørene (13 Nov 2008):				
Rør	Før vask med:	Muggtall/ml	Kimtall/ml, R2A 7 d, 22 °C	ATP, pg/cm²
1A	Kaldt vann	610	65000	92
2A	Klor	220	15000	48
4A	90°C vann	1010	130000	124
5A	Kaldt vann	460	42000	88
6A	Klor	530	65000	48
8A	90°C vann	540	20000	57
Rør	Etter vask med:	Muggtall		
1B	Kaldt vann	890	75000	63
2B	Klor	0	<10	2,6
4B	90°C vann	0	<10	5,5
5B	Kaldt vann	960	96000	119
6B	Klor	0	<10	0,8
8B	90°C vann	0	<10	10,0
<10/ml fluorescerende pseudomonader i alle rør				

VEDLEGG 6

API identifikasjon av kolonier fra Kings B agar (fluorescerende pseudomonader).

Fra biofilmprøveuttak nr 4, dag 29 (21.10.08):

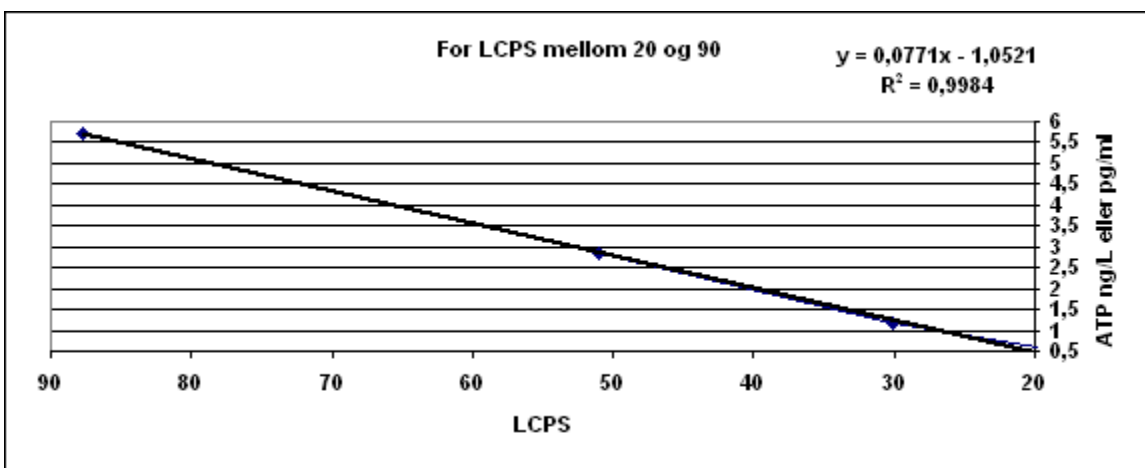
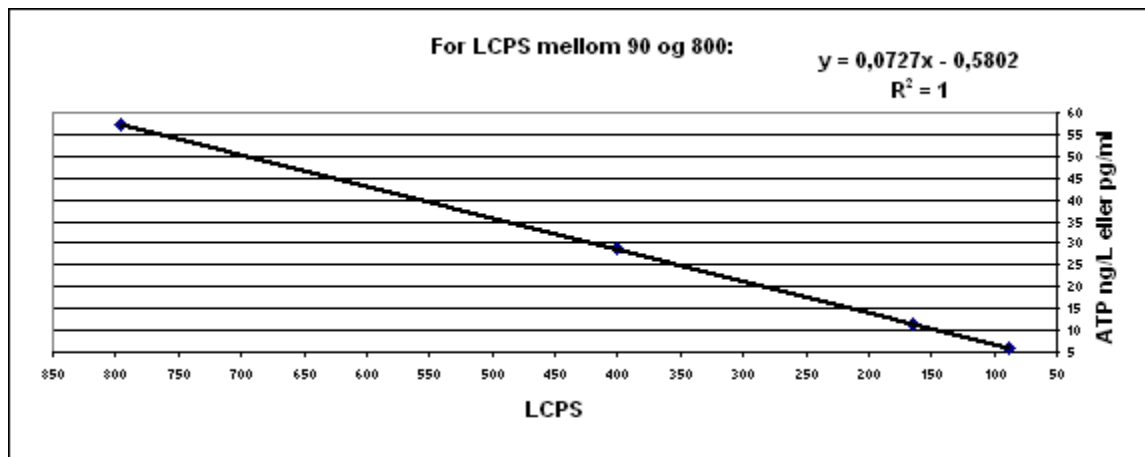
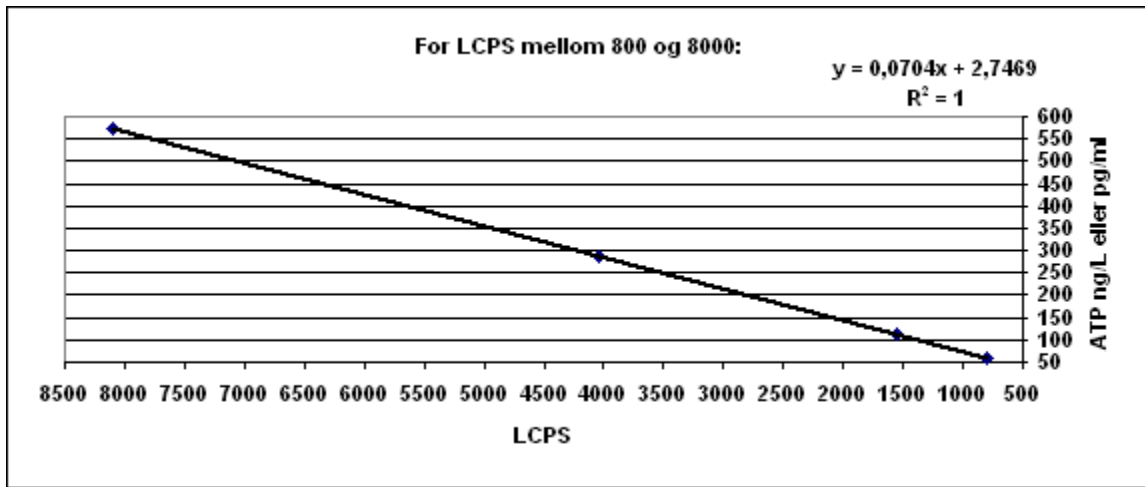
I.D nr:	Isolert fra rør:	Oksidase:	API
P3	4, Råvann klorert	+	<i>P. aeruginosa</i> , Acceptable i.d.
P4	4, Råvann klorert	+	<i>P. aeruginosa</i> , Acceptable i.d.
P5	5, Fullrenset	+	Unaccepted profile
P6	5, Fullrenset	+	Doubtful profile
P7	5, Fullrenset	+	<i>P. aeruginosa</i> , Acceptable i.d.
P8	8, Fullrenset + P	+	Unaccepted profile
P9	8, Fullrenset + P	+	<i>P. aeruginosa</i> , Acceptable i.d.

API identifikasjon av kolonier fra RYAN *Aeromonas* medium med ampicillin (presumptiv *Aeromonas*). Fra biofilmprøveuttak nr 4, dag 29 (21.10.08):

I.D nr:	Isolert fra rør:	Oksidase:	API
A1	1, Råvann	+	Id not valid
A2	4, Råvann klorert	+	Unaccepted profile
A3	5, Fullrenset	+	Low discrimination
A4	6, Fullrenset	+	<i>A. salmonicida</i> , very good identification
A5	6, Fullrenset	-	
A6	8, Fullrenset + P	-	
A7	8, Fullrenset + P	+	<i>Burkholderia cepacia</i> , good identification
A8	8, Fullrenset + P	+	Low discrimination
A9	10, Fullrenset +P	-	
A10	10, Fullrenset +P	+	<i>P. fluorescens</i> , Acceptable i.d.

VEDLEGG 7

Standardkurver for omregning fra LCPS til ATP i ATP-analysen:



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 samfunsliv.



Norsk institutt for vannforskning

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