
Svenskt Vatten

UTVECKLING

Rapport
Nr 2022-4

Säkra och snabba ledningsnätsarbeten

Esmeralda Frihammar
Markus Fröjd
Sandy Chan
Lena Meyer-Lind
Josefin Barup

Svenskt Vatten

UTVECKLING

Svenskt Vatten Utveckling (SVU) är kommunernas eget FoU-program om kommunal VA-teknik. Programmet finansieras i sin helhet av kommunerna. Programmet lägger tonvikten på tillämpad forskning och utveckling inom det kommunala VA-området.

Författarna är ensamt ansvariga för rapportens innehåll, varför detta ej kan åberopas såsom representerande Svenskt Vattens ståndpunkt.

Svenskt Vatten Utveckling

Svenskt Vatten AB

POSTADRESS BOX 14057, 167 14 Bromma

BESÖKSADRESS Gustavslundsvägen 12, 167 51 Bromma

TELEFON 08-506 002 00

E-MAIL svensktvatten@svensktvatten.se

www.svensktvatten.se

RAPPORTENS TITEL	Säkra och snabba ledningsnätsarbeten
TITLE OF THE REPORT	Safe and effective maintenance of distribution pipes
FÖRFATTARE	Esmeralda Frihammar, VA SYD, Markus Fröjd, Sweden Water Research AB, Sandy Chan, Sydsvatten AB, Lena Meyer-Lind, VA SYD, Josefin Barup, VA SYD
RAPPORTNUMMER	2022-4
ANTAL SIDOR	47
SAMMANDRAG	Vad händer med dricksvattnets kvalitet under ett arbete i ledningsnätet? Skulle effektivare analysmetoder kunna hjälpa till att ge snabbare och säkrare ledningsarbeten? I rapporten utvärderas flödescytometri som alternativ till 3-dygnsanalys som i dag används för mikrobiologisk analys av vattnet efter ett ledningsarbete. Flödescytometri kan öka kunskapen om biologiska processer i ledningsnätet och kan även utvecklas för att övervaka dricksvattenkvalitet.
SUMMARY	What do we know about the correlation between drinking water quality and new drinking water pipes? Are there methods to measure drinking water quality, other than the ones used today, which could be used to help us perform pipe maintenance work and installations faster and safer? With this report we hope to add to the knowledge about how pipe maintenance works effect the drinking water quality. We also want to generate curiosity for new water quality analysis methods and how these could help us increase efficiency during pipe maintenance works, and thereby reduce the associated costs.
SÖKORD	Odlingsbara mikroorganismer, HPC, FCM, TCC, läckor, ledningsarbeten, biofilm
KEYWORDS	Culturable microorganisms, HPC, FCM, TCC, leakage, pipe maintenance, biofilm
MÅLGRUPPER	Personer verksamma inom VA-sektorn som vill veta mer om hur vi kan utföra säkrare och mer effektiva ledningsnätsarbeten med hjälp av nya metoder för dricksvattenkvalitetsanalys.
RAPPORT	Finns att hämta hem som pdf från Vattenbokhandeln. https://vattenbokhandeln.svensktvatten.se/
UTGIVNINGÅR	2022
UTGIVARE	© Svenskt Vatten AB
REFERENS	Frihammar E., Fröjd M., Chan S., Meyer-Lind L. och Barup J. (2022). Säkra och snabba ledningsnätsarbeten. SVU-rapport 2022-4. Stockholm, Svenskt Vatten.

Om projektet

PROJEKTNUMMER	20-113
PROJEKTETS NAMN	Säkra och snabba ledningsnätsarbeten
PROJEKTETS FINANSIERING	Svenskt Vatten Utveckling, VA SYD, Sydsvatten AB, Sweden Water Research AB, Lunds universitet

Förord

Ett varmare klimat med förändrad vattentillgång och ett stort investeringsbehov i ny infrastruktur för dricksvatten är två av framtidsutmaningarna som driver oss mot att tänka klokt kring hur vi kan utföra snabba och säkra ledningsnätsarbeten på dricksvattennätet. Det här SVU-projektet, ”Säkra och snabba ledningsnätsarbeten”, bygger på författarnas vision och mission om att vi kan skapa smarta lösningar för framtidens kvalitetsmätning vid ledningsarbeten om vi arbetar över yrkeskategorierna och lär av varandra.

Den här rapporten är vårt försök att med nyfikenhet ta reda på mer om de mikrobiologiska processer som sker i en nylagd dricksvattenledning, att undersöka om det finns vinster med snabbare analysmetoder samt att testa om metoden flödescytometri kan vara vägen framåt. Kanske har vi kommit lite närmare svaren – men det vi är mest stolta över är hur vi bidragit till att skapa intresse för frågan. Vi hoppas att rapporten ska bjuda på spännande läsning.

SVU-projektet har genomförts i samverkan mellan VA SYD, Sydvatten AB och Lunds universitet, samt med stöd från konsultbolaget EnviDan AB. Författarna vill därför rikta ett stort varmt tack till alla som på olika sätt bidragit till rapporten, både till kollegor inom de deltagande organisationerna och till branschkollegor. Bland dessa vill vi särskilt nämna:

- Ett stort antal kollegor på Ledningsnätsavdelningen och avdelningen Rörnät på VA SYD, som bidragit med sin kunskap och hjälpt oss att praktiskt utföra våra studier på olika ledningsarbeten.
- Petra Larsson och Leif-Inge Andersson, båda drifttekniker vid VA SYDs dricksvattenenhet, som genom sin nyfikenhet och sitt lösningsfokus möjliggör utveckling i branschen.
- Jonathan Kvist på Jonab Anläggnings AB som genom ett mycket fint samarbete möjliggjorde studien ”Råbylund”.

Vi hoppas att vi genom denna rapport har öppnat dörren till ett vidare och djupare samarbete över yrkeskategorierna där vi lär oss av varandra, genomför effektiva ledningsarbeten, analyserar dricksvattenkvalitet på nya sätt och driver utvecklingen framåt i vår bransch!

Malmö 2022

Josefin Barup, projektledare

Innehåll

Förord.....	2
Sammanfattning.....	4
Summary	5
Ordlista	6
1 Inledning	7
1.1 Syfte och mål.....	7
1.2 Avgränsningar	8
2 Bakgrund	9
2.1 Vattenprovtagning vid ledningsarbeten	9
2.2 Riktlinjer för mikrobiologiska analyser vid ledningsarbeten	9
2.3 Metoder för att analysera dricksvattenkvalitet vid ledningsarbeten	10
2.4 Betydelsen av biofilm i ledningsnät och vid ledningsarbeten	14
3 Snabbare analysmetoder – finns det något att vinna vid ledningsarbeten?	16
3.1 Ledningsarbeten som drar ut på tiden.....	16
3.2 Särskilt kritiska situationer	17
3.3 Spolning.....	17
3.4 Behov av gemensam standard	17
4 Fallstudier: 3-dygnsprov (HPC) och flödescytometri	19
4.1 Fallstudie 1: Råbylund (nyanläggning)	19
4.2 Fallstudie 2: Torna Hällestad (nyanläggning)	24
4.3 Fallstudie 3: Teckomatorp (läcka)	26
4.4 Fallstudie 4: Nevishög (läcka)	29
5 Diskussion	33
5.1 Vad händer med dricksvattenkvaliteten under ett ledningsarbete?.....	33
5.2 Finns det något att vinna på effektivare analysmetoder vid ledningsarbeten?.....	34
5.3 Kan flödescytometri (FCM) vara en bättre metod än 3-dygnsprov för att följa den mikrobiologiska kvaliteten för dricksvattnet vid ledningsarbeten?	35
5.4 Förslag till fortsatt arbete	37
6 Slutsatser	39
Referenser	40
Bilaga A – Fördjupad analys av data från FCM	43
Bilaga B – Datahantering och analys	46

Sammanfattning

Vad händer med dricksvattnets kvalitet under ett arbete i ledningsnätet? Skulle effektivare analysmetoder kunna hjälpa till att ge snabbare och säkrare ledningsarbeten? I rapporten utvärderas flödescytometri som alternativ till 3-dygnsanalys som i dag används för mikrobiologisk analys av vattnet efter ett ledningsarbete. Flödescytometri kan öka kunskapen om biologiska processer i ledningsnätet och kan även utvecklas för att övervaka dricksvattenkvalitet.

Det är viktigt att ledningsarbeten kan utföras snabbt och effektivt för att kostnaderna och tiden med avbrott i vattenförsörjningen ska minimeras. För att så fort som möjligt ringa in en föroreningskälla behövs det snabba och säkra analysmetoder. Nya ledningar provtrycks och spolats. Därefter tas vattenprov, och efter två godkända vattenprover kan ledningen kopplas in på det ordinarie dricksvattnet. Provtagning sker enligt Svenskt Vattens branschstandard och gränsvärden finns i Livsmedelsverkets dricksvattenföreskrifter.

I dag används en standardiserad analysmetod som kallas 3-dygnsprov. Den innebär att man räknar antalet odlingsbara mikroorganismer vid 22 °C. Odlingen sker på agarplattor och analys tiden är 3 dygn. Provet mäter bara cirka 1 procent av alla mikroorganismer i vattnet. På senare år har snabbare metoder utvecklats, men för dem finns det inga vedertagna gränsvärden eller andra riktlinjer att hålla sig till. Flödescytometri (FCM) finns både som onlinebaserad och manuell analys. Onlinebaserad analys tar 30 minuter och manuell tar cirka 45 minuter. FCM upptäcker alla mikroorganismer i vattnet (TCC, totalt antal celler).

Projektet genomfördes i samverkan mellan VA SYD, Sydvatten AB, Lunds universitet och EnviDan AB. Man hade en workshop med representanter från fem VA-huvudmän, intervjuade tre anläggningsentreprenörer samt genomförde fyra fallstudier, två nyanläggningar och två läckor. Under fallstudierna utvärderades FCM som alternativ till 3-dygnsprov.

Workshopen visade att rutiner för provtagning vid ledningsarbeten skiljer sig mellan olika VA-organisationer, och att det behövs en gemensam standard och riktlinjer för hur ett underkänt prov ska hanteras. Enligt de intervjuade entreprenörerna är det mycket vanligt att prover blir underkända. Det krävs ofta spolning i över en månad innan man får godkända prover, och det är svårt att koppla analysresultat till en viss entreprenadhändelse. Generellt upplevs 3-dygnsanalyser som ett vågspel där många faktorer kan påverka utfallet.

Resultaten från fallstudierna visade inte på något tydligt samband mellan odlingsbara mikroorganismer som mäts med 3-dygnsprov och totalt antal celler som mäts med FCM. Därför går det inte att rakt av byta metod från 3-dygnsprov till FCM. Vilken metod som är mest rättvisande för att beskriva vattenkvaliteten är däremot en annan fråga. Om det inte går att jämföra en ny metod med 3-dygnsprov och dess fasta gränsvärden så krävs det ett annat perspektiv, kanske i stället utgå från trender eller basvärden i omgivande ledningsnät insamlade under längre tid.

Författarna drar inga generella slutsatser när det gäller om snabbare analysmetoder skulle effektivisera ledningsarbeten. Men vid ledningsarbeten som planeras under stor tidspress skulle snabbare metoder medverka till att arbetena kan genomföras som planerat. De drar också slutsatsen att FCM har stor potential som metod för att öka kunskapen om biologiska processer under ledningsarbeten och i ledningsnätet generellt. Det finns också stora möjligheter att utveckla metoden för kvalitetsövervakning av dricksvatten.

Summary

What do we know about the correlation between drinking water quality and new drinking water pipes? Are there methods to measure drinking water quality, than the ones used today, which could be used to help us perform pipe maintenance work and installations faster and safer? With this report we hope to add to the knowledge about how pipe maintenance works effect the drinking water quality. We also want to generate curiosity for new water quality analysis methods and how these could help us increase efficiency during pipe maintenance works, and thereby reduce the associated costs.

The report is based on the question if it is possible to, without compromising safety, replace heterotrophic plate counts (i.e., culturable microorganisms) with faster analysis methods with higher precision to safeguard the drinking water quality during pipe maintenance works. Further, the report aims to investigate if there are benefits by having faster analysis methods available. In this report we assess flow cytometry (FCM) as an alternative analysis method to heterotrophic plate counts.

To obtain a clearer picture whether there are any benefits associate with faster analysis methods in pipe maintenance works a workshop was held with representatives from water utilities and interviews with three contractors. During the workshop it was made clear that the routines for sampling and analysis after pipe works varied between the water utilities and contractors and that there is a need for a common standard, as well as guidelines for how to handle a failed sample. The interviewed contractors assess that it is very common for samples to fail. And it also became apparent that there often is the need for flushing for over one month for samples passing quality control to be obtained. The experience is that it is difficult to connect the analysis results to a specific event in the pipe works, and generally the heterotrophic plate count methods are perceived as a gamble where many different factors can affect the outcome.

One purpose with this project was to challenge the current method for analysis of culturable microorganisms, heterotrophic plate counts, through analyses with a new method, flow cytometry (FCM), in four case studies – two leaks and two newly laid pipe sections. FCM can measure the total cell count in a water sample. Both manual and online-based FCM have been used within the project. Another purpose of the project was to assess if online-based FCM would be practically applicable in field studies.

Results from case studies did not, generally, show a clear correlation between culturable microorganisms and total cell counts (as measured by FCM). To simply exchange heterotrophic plate counts with FCM is not easily done. Which methods gives the most relevant answer as to best describe the water quality is, however, a separate question. Heterotrophic plate counts is the currently used method, not the complete answer. If we are unable to reliably compare a new method to heterotrophic plate count methods and their established threshold values a new perspective is needed, such as basing the analysis on comparisons with trends or base level values (values in surrounding network sections collected over longer periods of time).

During the project we have gathered insights into the microbiological processes that take place after pipe works. We have also come across many new questions and ideas during the course of the project.

Ordlista

Basvärden	Normala värden för en viss parameter insamlade under längre tid för en viss plats i ledningsnätet.
Biofilm	Tunt skikt innehållandes mikroorganismer som bildar en beläggning adhesi vilken mikroorganismer kan fästa och växa.
CFU	Colony Forming Units, kolonibildande enheter, mått på antalet bakterier i ett flytande prov (per volymsenhet).
FCM	Förkortning för analysmetoden flödescytometri. I denna SVU-rapport används benämningen FCM också som förkortning för flödescytometer (själva instrumentet). Av sammanhanget framgår om analysmetoden eller instrumentet avses.
Flödescytometri	Metod för att analysera antalet bakterier i ett medium (exempelvis vatten), samt bakteriernas karaktär.
HPC (3-dygnsanalys)	Heterotropic Plate Count, metod för analys av odlingsbara mikroorganismer i dricksvatten vid 22°C (SS-EN ISO 6222). Kallas oftast "3-dygnsanalys" baserat på analys tiden och benämns så i denna rapport.
HPC (7-dygnsanalys)	Heterotropic Plate Count, metod för analys av långsamväxande mikroorganismer i dricksvatten (SS-EN ISO 6222). Kallas oftast "7-dygnsanalys" baserat på analys tiden och benämns så i denna rapport.
Ledningsarbete	Inbegriper alla arbeten på dricksvattenledningar så som förläggning av nya ledningar, förnyelse av befintlig ledning samt lagning av läckor.
Långsamväxande mikroorganismer	Alla aeroba bakterier, jästsvampar och mögelsvampar som kan bilda kolonier under testbetingelserna för 7-dygnsanalys (SS-EN ISO 6222).
Nyanläggning	Nylagd dricksvattenledning, antingen exploatering (ny ledning i nytt område) eller förnyelse (gammal ledning ersätts).
Odlingsbara mikroorganismer	Alla aeroba bakterier, jästsvampar och mögelsvampar som kan bilda kolonier under testbetingelserna för 3-dygnsanalys (SS-EN ISO 6222).
OT	Otjänligt
Planktonisk	Bakterier som växer och är frimående i en lösning, till skillnad från bakterier som växer i en biofilm på en yta.
Polypiggning	Metod för rengöring av en dricksvattenledning. En "pigg" bestående av skumpropp som dränkts in med klor förs genom ledningen med hjälp av vattentryck i syfte att rengöra ledningen.
TMA	Tjänligt med anmärkning

1 Inledning

Vad vet vi om sambandet mellan dricksvattenkvalitet och nya drickvattenledningar? Finns det andra metoder för att mäta vattenkvalitet än de som används idag och skulle dessa andra metoder kunna hjälpa oss att genomföra snabbare och säkrare ledningsarbeten? Genom denna rapport hoppas vi kunna bidra till kunskapsbilden av hur ledningsarbeten påverkar dricksvattenkvaliteten. Vi vill väcka läsarens nyfikenhet för nya analysmetoder för vattenkvalitet samt om, och i så fall hur, dessa kan bidra till effektiva ledningsarbeten och därigenom minskade kostnader.

Att genomföra ledningsarbeten snabbt och effektivt har stor betydelse för förmågan att kunna upprätthålla dricksvattenförsörjningen i ett samhälle. Effektiva ledningsarbeten kan också ha betydelse för andra samhällskostnader än enbart VA-aktörens.

Om det sker en kontaminering av dricksvattnet under ett ledningsnätsarbete kan det ta lång tid (veckor till månader) innan den mikrobiologiska kvaliteten hos vattnet i ledningen stabiliserats. Ett exempel på ett felaktigt utfört ledningsnätsarbete skedde i Lund vintern 2017 och orsakade tillväxt av koliforma bakterier i dricksvattnet. Incidenten medförde en kokrekommendation som varade i sex veckor, en massiv arbetsinsats för VA-personalen, en ansträngd situation för det närliggande universitetssjukhuset samt kostnader för att till slut gräva upp och ersätta ledningen. Efter incidenten fick VA-huvudmannen (VA SYD) motta skadeståndskrav på mångmiljonbelopp från olika verksamheter i staden. Störningen behövde också hanteras under tidspress utifrån att ledningsarbetet var del av ett större infrastrukturprojekt i staden.

Störningen i Lund 2017 visar på vikten av att kunna genomföra kvalitetssäkra ledningsarbeten och på behovet av tillgång till adekvata analysmetoder för att snabbt ringa in en föroreningskälla. Händelsen i Lund är också ett exempel på hur avgörande det kan vara att ett arbete kan avslutas enligt tidplan, och kan genomföras utan störningar, om projektet är en del av ett större infrastrukturprojekt. Även exemplet med läckan i Malmö visar på vikten av att snabbt komma tillbaka till normal drift. Här är snabba analysmetoder en av lösningarna till snabbare omställning.

Erfarenhetsmässigt vet vi att det ibland uppstår situationer där väntetiden på analysresultat är den begränsande faktorn för att kunna avsluta ett arbete i gatan. Därför har vi genomfört det SVU-projekt som ligger till grund för denna rapport. Vi är nyfikna på vad vi kan lära oss om vi överbryggar våra olika VA-kompetenser och rapporten är skriven för att kunna läsas utifrån olika bakgrundskompetens. I inledningen till varje kapitel ges därför som en läsarguide en kort introduktion till kapitlets innehåll.

1.1 Syfte och mål

Syftet med denna rapport är att den ska bidra till att öka kunskapen kring hur VA-branschen kan genomföra säkra och snabba ledningsarbeten genom att använda adekvata och effektiva analysmetoder för dricksvattenkvalitet. Målet har varit att höja intresset för frågan och att bidra till en kunskapshöjning som överbryggar olika yrkeskategorier inom dricksvattenbranschen.

Rapporten utgår från frågan om det går att, utan att kompromissa med säkerheten, ersätta 3-dygnsprov (HPC, dvs. antalet odlingsbara mikroorganismer) med snabbare analysmetoder med högre precision för att säkerställa dricksvattenkvaliteten vid ledningsarbeten. I denna rapport utvärderas flödescytometri (FCM) som alternativ analysmetod till analys av 3-dygnsprover. FCM valdes eftersom metoden är ny i branschen men väl inarbetad hos de VA-aktörer som genomfört projektet. Projektet undersöker antalet odlingsbara mikroorganismer (3-dygns) samt det totala antalet bakterier

efter ett ledningsnätsarbete genom att analysera odlingsbara mikroorganismer med 3-dygnsanalys och totalt antal bakterier (TCC) med FCM.

Rapporten utgår från följande frågeställningar.

1. *Vad händer med dricksvattenkvaliteten under ett ledningsnätsarbete?*
För att besvara denna fråga genomfördes litteraturstudier inom ramen för ett examensarbete (Zamore 2021) samt analys av bakterier i dricksvattnet vid fyra ledningsarbeten. Resultat från litteraturstudien presenteras i avsnitt 2.4 och resultat från fallstudierna (ledningsarbetena) presenteras i kapitel 4.
2. *Finns det något att vinna på snabbare analysmetoder vid ledningsarbeten?*
För att besvara denna fråga hölls dialog (workshop och intervjuer) med VA-huvudmän och entreprenörer. Resultatet presenteras i kapitel 3.
3. *Kan FCM vara en bättre metod än 3-dygnsprov för att följa den mikrobiologiska kvaliteten för dricksvattnet vid ledningsarbeten?* För att besvara denna frågeställning jämfördes resultat från analys av 3-dygnsprov och FCM från fyra ledningsarbeten. Resultatet presenteras i kapitel 4.

1.2 Avgränsningar

Det genomförda SVU-projektet har fokuserat på frågan om det går att, med snabbare analysmetoder, korta tiden som krävs innan en ledning kan tas i drift efter ett ledningsnätsarbete givet att kvalitetsövervakningen med ny metod är lika bra som idag (eller bättre). Övriga aspekter kopplat till att genomföra kvalitetssäkrade ledningsarbeten med goda hygienrutiner samt andra aspekter som påverkar ledningsarbetets genomförandetid behandlas endast perifert i rapporten.

I projektet har FCM använts som exempel på ”ny metod”. Andra nya metoder som finns eller är på väg ut på dricksvattenmarknaden har inte undersökts inom ramen för projektet.

2 Bakgrund

Syftet med detta kapitel är att ge en lägesbild över dagens riktlinjer och rekommendationer för provtagning vid ledningsarbeten, tillsammans med en beskrivning av hur de två VA-organisationer som står bakom rapporten (VA SYD och Sydvatten AB) arbetar med frågan.

Som en del av bakgrundsförståelsen innehåller kapitlet också avsnitt om hur vattenprovtagning vid ett ledningsarbete går till, om vad som analyseras med 3-dygnsprov och flödescytometri (FCM) samt slutligen ett avsnitt om hur biofilmen i ledningsnätet påverkar vattenkvaliteten.

2.1 Vattenprovtagning vid ledningsarbeten

När den nya ledningen är lagd fylls den upp med dricksvatten och trycksätts. Därefter genomförs en provtryckning under ett antal timmar för att kontrollera att alla lednings-skarvar och eventuella andra installationer på ledningen håller tätt. För att garantera att ledningen fylls med ett tjänligt dricksvatten bör ett referensprov ha tagits så nära ledningsarbetet som möjligt.

Efter godkänd provtryckning spolas ledningen, innebärande att vattnet i ledningen omsätts. Beroende på förutsättningarna är det mer eller mindre enkelt att omsätta volymen vatten i ledningen – stora ledningsdimensioner eller begränsade spolmöjligheter gör det svårare att skapa en god omsättning.

Efter spolning tas vattenprov i en bestämd provtagningspunkt. Det är viktigt att hålla en så god hygien som möjligt vid provtagningspunkten för att undvika att vattenprovet kontamineras. Under väntetiden mellan provtagning och analysresultat sätts den nya ledningen vanligtvis ”på rinn”, innebärande att den spolas med ett visst flöde i syfte att inte låta vattnet i ledningen stå stilla utan skapa ett kontinuerligt flöde genom ledningen. Efter godkända vattenprover kan ledningen kopplas på till det ordinarie dricksvattenätet.

Vid läckor är förfaringssättet något annorlunda. Ledningen spolas efter att läckan åtgärdas, men vanligtvis tas endast vattenprov vid misstanke om att en kontaminering av ledningen har skett i samband med rörbrottet. Rutinerna för provtagning i samband med läckor skiljer sig mellan olika VA-bolag, där en del VA-bolag exempelvis alltid tar vattenprov vid läcka på ledning av större dimension.

2.2 Riktlinjer för mikrobiologiska analyser vid ledningsarbeten

Syftet med provtagning av dricksvattnet vid ledningsarbeten är framför allt att kontrollera att ingen kontaminering av ledningen har skett under arbetet. De parametrar som analyseras används som indikation på olika typer av påverkan (Tabell 2.1). Det är viktigt att komma ihåg att analyserna ger begränsad information om vattnets mikrobiologiska sammansättning, både på grund av begränsningar i metoderna i sig men också sett till antalet parametrar som analyseras.

Vid ledningsarbeten utförs som branschstandard provtagning enligt Svenskt Vattens publikation P115 Rengöring av vattenledningar och reservoarer (Svenskt Vatten 2021). Gränsvärden anges i bilaga 3 till Livsmedelsverkets föreskrifter och dricksvatten (SLVFS 2001:30). P115 lämnar visst utrymme för VA-huvudmän att själva utforma sitt specifika provtagningspaket. Bland annat ställs inte krav på analys av 7-dygnsprov och många

VA-huvudmän har valt att exkludera analysen. I P115 beskrivs 7-dygnsanalys snarare som en indikation på tillväxtpotential än på förorening. Ingen tydlig korrelation mellan odlingsbara mikroorganismer (3-dygnsanalys) och hälsofara har observerats (Edberg och Allen 2004; Stelma et al. 2004).

Av de parametrar som ska analyseras enligt P115 är analys av 3-dygnsprov den analys som tar längst tid (Tabell 2.1), följt av analys av *Escherichia coli* (*E. coli*) samt koliforma bakterier med analystider på omkring ett dygn (Svenskt Vatten 2021). Det är inte ovanligt att resultat från 3-dygnsanalyserna visar på förhöjt antal odlingsbara mikroorganismer under en mycket lång tid. Vid dessa tillfällen är det ofta praxis att godkänna att en ledning tas i drift trots att 3-dygnsresultaten visar på högre värden än TMA, men under en nivå som överenskommit med kontrollmyndigheten och i kombination med en sjunkande trend (Svenskt Vatten 2021).

Tabell 2.1

Mikrobiologiska analyser som ofta ingår i provtagningspaket vid ledningsarbeten. Observera att samtliga parametrar med undantag för långsamväxande mikroorganismer är obligatoriska enligt avsnitt A i bilaga 3 i SVLFS 2001:30.

Parameter	Analystid	Gränsvärde för otjänligt (OT) / tjänligt med anmärkning (TMA)	Parametern indikerar
<i>Escherichia coli</i> *	18/21–24 h**	Påvisad i 100 ml (OT)	Fekal påverkan från människor eller djur****
Koliforma bakterier*	18/21–24 h**	>10 CFU/100 ml (OT) 1–9 CFU/100 ml (TMA)	Främst ytvattenpåverkan, men fekal påverkan kan inte uteslutas****
Odlingsbara mikroorganismer*	64–72 h	100 CFU/ml (TMA) eller nedåtgående trend***	Påverkan från vatten eller jord som normalt inte är av fekal ursprung****
Långsamväxande mikroorganismer	7 dygn	5000 CFU/ml (TMA) eller nedåtgående trend***	Mikrobiologisk tillväxt****

* Ska analyseras enligt P115

** Med SS-EN ISO 9308-2:2014 (Colilert)/SS-EN ISO 9308-1:2014 (SLVFS 2001:30)

***SLVFS 2001:20/Svenskt Vatten 2021

****Livsmedelsverket 2021

Både VA SYD och Sydvatten kräver två på varandra följande godkända 3-dygnsprov innan driftsättning. Sydvatten har valt att sänka sin interna gräns till 50 CFU/ml medan VA SYD har gränsen 100 CFU/ml, enligt Livsmedelsverkets riktlinjer för 3-dygnsprov.

VA SYD slutade år 2020 att analysera 7-dygnsprov vid ledningsarbeten. Beslutet baserades på analysresultat från tidigare arbeten som visade att när ett 7-dygnsprov var tjänligt med anmärkning (TMA) var även 3-dygnsprovet TMA. Således hade ledningsarbetet redan underkänts då 7-dygnsproven analyserades och projektägaren redan agerat på 3-dygnsresultatet (Barup och Frihammar 2020).

2.3 Metoder för att analysera dricksvattenkvalitet vid ledningsarbeten

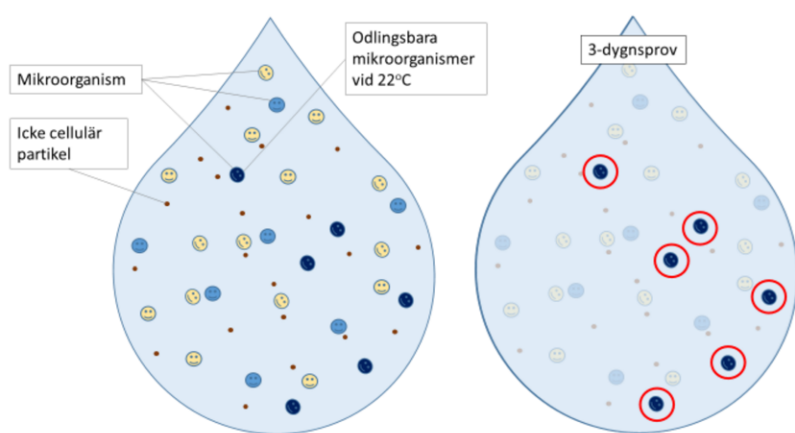
Odlingsbara mikroorganismer finns naturligt i dricksvattnet men onormalt höga halter kan indikera påverkan från vatten eller jord, normalt inte av fekal ursprung men kan peka på läckage, korskoppling, nedsmutsning av anslutningar eller liknande (Livsmedelsverket 2021).

Analys av odlingsbara mikroorganismer med HPC (här benämnt 3-dygnsanalys) har länge varit metoden som används för att uppskatta antalet mikroorganismer i dricksvatten. Dock detekteras endast en liten del av alla mikroorganismer i provet med 3-dygnsanalys och på senare år har nya analysmetoder utvecklats som med större precision analyserar antalet mikroorganismer i ett vattenprov. Dessa inkluderar ATP-mätning, enzymatisk mätning och olika typer av optisk mätning (Favere et al. 2020). Nya metoder som inte är baserade på odling är oftast betydligt snabbare än 3-dygnsanalyser. De flesta nyare analysmetoder är dock fortfarande relativt oprövade inom analys av dricksvatten

och det finns därför inga vedertagna gränsvärden eller andra riktlinjer att förhålla sig till.

3-dygnsanalys utförs enligt svensk standard (SS-EN ISO 6222) genom odling på näringssubstrat med agar vid 22°C. När ungefär tre dygn gått räknas antalet bildade kolonier (CFU/ml) som är stora nog att detekteras i mikroskop (med 4–10 gånger förstorning). Eftersom standarden tillåter ett spann av förstorningar kan resultat från samma prov skilja sig åt beroende på vilket laboratorium som utför analysen.

Vid analys av 3-dygnsprov detekteras aeroba bakterier, jästsvampar och mögelsvampar som kan bilda kolonier under de betingelser som gäller vid odling (SS-EN ISO 6222). Vid odling med en annan metod, exempelvis på ett annat medium, under en annan tidsperiod eller i en annan temperatur hade andra mikroorganismer växt fram. De mikroorganismer som kan odlas på plattor motsvarar endast en liten del av alla mikroorganismer i ett vattenprov. Ofta nämns att ca 1 % av det mikrobiella innehållet i dricksvatten kan odlas på plattor (World Health Organization 2003) och därmed upptäckas med HPC (3-dygnsanalys), se Figur 2.1.



Figur 2.1

Schematisk bild över vad som detekteras vid analys av 3-dygnsprov. Odlingsbara mikroorganismer står för en liten andel av det totala antalet mikroorganismer då inte alla mikroorganismer i ett vattenprov kan odlas under definierade förhållanden. Vattendroppen till vänster symboliserar alla mikroorganismer och droppen till höger de som kommer att bilda kolonier som kan detekteras i analysen.

Flödescytometri (FCM) är en ny analysmetod för dricksvatten, som är oberoende av odling. Metoden är vanlig för analys av blodprover inom klinisk diagnostik och har under senare år fått ökat intresse även inom vattenkvalitetsmätning (Van Nevel et al. 2017).

FCM finns både som onlinebaserad (automatisk provtagning och analys) och manuell analys. Vid manuell analys tas ett prov (manuellt eller automatiskt) som sedan transporteras till och analyseras på laboratorium, där svar ges på cirka 45 minuter. Idag används metoden i Schweiz för analys av bakteriehalt i dricksvattnet vid vattenverk samt i distributionsnätet (Stafford och Bischel 2018).

Även om både 3-dygnsanalys och FCM används för uppskattning av antal mikroorganismer i dricksvattnet är det viktigt att komma ihåg att samma resultat inte ska förväntas från de båda analyserna. Odlingsbara mikroorganismer, som detekteras med 3-dygnsanalys, är en delpopulation av det totala antalet mikroorganismer. Dessa utgör ca 1 % av det totala antalet mikroorganismer medan FCM kan detektera alla mikroorganismer och partiklar (Tabell 2.2) i ett vattenprov.

Metod	Parameter	Analystid	Övrigt
3-dygnsanalys	Odlingsbara mikroorganismer vid 22 °C	3 dygn	ISO-standard finns, godkänd analysmetod för dricksvattenkvalitet enligt Livsmedelsverket, riktlinjer för gränsvärden finns
FCM	Planktoniska mikroorganismer och partiklar	Online: 30 minuter Manuell: Cirka 45 minuter*	Saknas riktlinjer, dyr utrustning, kräver ny kompetens, kräver referensprov

*Beroende på hur många prov som analyseras samtidigt.

Tabell 2.2

Jämförelse av 3-dygnsprov och FCM.

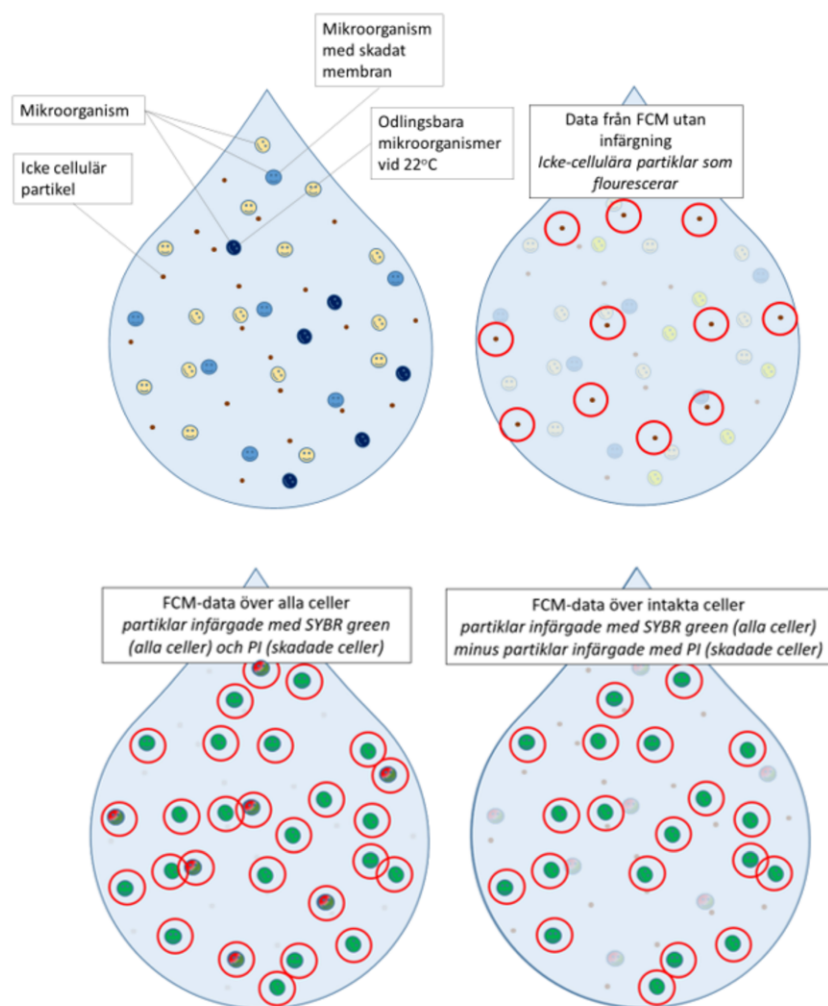
Vid flödescytometrisk analys används laser för att analysera det totala antalet celler (Total Cell Count, TCC) i provet. Reflekerat och emitterat ljus samlas av detektorer och signaler översätts till information om antal celler samt cellers storlek, form och fluorescens.

För att cellerna ska kunna upptäckas krävs infärgning av provet. För att detektera alla celler (TCC) används en färg (SYBR green) som kan passera mikroorganismernas cellmembran. Det finns även möjlighet att identifiera andel intakta respektive skadade celler (Intact Cell Count, ICC) genom att använda propidiumjodid (propidium iodide, PI) som endast kan passera skadade membran. Populationen som färgats med PI representerar skadade celler.

TCC-resultatet säger inte något om huruvida bakterierna är levande eller inte. För att få veta detta används en kombination av TCC och ICC. För att få andel intakta (levande) celler subtraheras populationen med skadade celler från det totala cellantalet. Intakta (levande) celler kan vara en bra parameter för att övervaka vattenverkets beredningsprocesser. En schematisk bild över vilken data som erhålls utan infärgning samt efter infärgning med SYBR green och PI, med och utan skadade celler, presenteras i Figur 2.2.

Det totala antalet celler (TCC) varierar kraftigt mellan olika dricksvatten beroende på råvattenkälla och beredningsprocess. Även andra faktorer, som temperaturvariationer över året, påverkar TCC för ett visst vatten. Exempelvis är normala värden för totalantalet celler/ml i dricksvatten från Sydvatten cirka 200 000 för Ringsjöverket (sjön Bolmen som råvattenkälla) respektive 400 000 för dricksvatten från Vombverket (Vombsjön som råvattenkälla). Cellantalet förändras även under distributionen från vattenverk till kund. Därför kan olika resultat förväntas beroende på var i distributionssystemet provet tas. Detta gör att få slutsatser kring dricksvattenkvaliteten kan dras baserat på endast ett enskilt värde.

Kan FCM användas för att avgöra om ett vattenprov från ett ledningsnätsarbete håller tillräckligt god dricksvattenkvalitet eller ej? Här får man komma ihåg att till skillnad från för odlingsbara mikroorganismer finns inga gränsvärden för TCC/ICC eller andra riktlinjer för hur FCM-resultat ska tolkas. Därför krävs antingen en så kallad baslinje för totalt antal celler i det specifika ledningsnätet (baserat på upprepade mätningar under längre tid) eller ett eller flera referensprov uppströms ledningsarbeten för att kunna tolka FCM-resultatet i provpunkten.

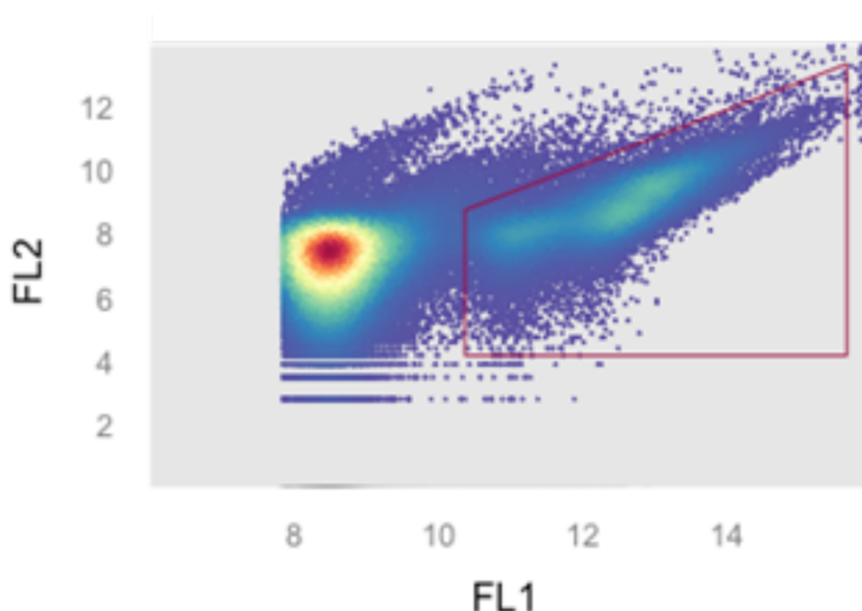


Figur 2.2

Schematisk bild av innehållet i en vattendroppe (uppe till vänster), vad som detekteras med FCM utan infärgning (uppe till höger) samt vad som detekteras med infärgning med PI och SYBR green (nere till vänster) och vilken data som är kvar efter att partiklar infärgade med PI subtraherats från partiklar infärgade med SYBR green (nere till höger).

Den rådata som utgör resultatet av en FCM-analys utgörs av ett spektrum över fluorescens för de partiklar som detekterats (datapunkter). För att kunna identifiera grupper och populationer så som partiklar, celler, intakta celler, celler med relativt hög andel DNA (high nucleic acid, HNA) samt med relativt låg andel DNA (low nucleic acid, LNA) sorteras alla datapunkter baserat på valda egenskaper. Denna sortering kallas för gating. Ett exempel på gating för att sortera ut antal celler presenteras i Figur 2.3. För mer information om hur gating användes i projektet som ligger till grund för den här rapporten hänvisas till examensarbetet som genomförts inom ramen för SVU-projektet (Zamore 2021).

En utökad analys med FCM kan göras genom att jämföra prover med varandra utifrån Bray-Curtis olikhetsvärde. Med Bray-Curtis olikhetsvärde är det möjligt att exempelvis jämföra data från FCM med varandra, för detaljer se Zamore (2021). Bray-Curtis olikhetsvärde anges mellan 0 och 1. Är de jämförda proverna identiska blir Bray-Curtis olikhetsvärde 0 och om data från proverna inte innehåller några likheter är resultatet 1. Denna typ av analys har utförts för en av fallstudierna som ingår i denna rapport, för vilken resultat och analys presenteras i bilaga A.



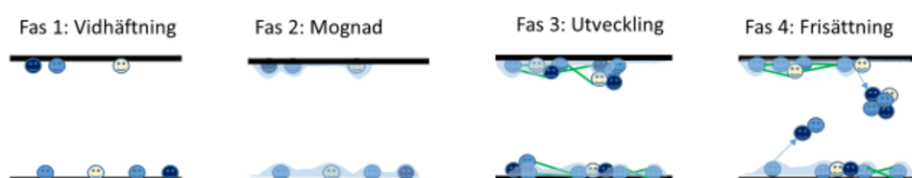
Figur 2.3

Exempel på gating för att välja totalt cellantal. Området innanför den röda linjen antas representera cellerna i provet. FL1 och FL2 representerar olika fluorescensfilter som används för metoden. Figur anpassad från Zamore (2021).

2.4 Betydelsen av biofilm i ledningsnät och vid ledningsarbeten

De flesta bakterier i distributionsnätet är inte planktoniska (fria i vattenfasen), utan lever vid rörens inre väggar som biofilm (Liu et al. 2016). Trots detta saknas fortfarande information om processerna i biofilmen i ledningsnätet (Zamore 2021). Utgångspunkten – och anledningen till detta avsnitt – är den samverkan som sker mellan biofilmen och vattenfasen, där etableringen av biofilmen i exempelvis en nylagd ledning kommer påverka vattnets mikrobiella innehåll och därmed det resultat som fås vid provtagningen.

Etablering av biofilm kan delas upp i följande fyra faser: vidhäftning, utveckling, mognad och frisättning (Hemdan et al. 2021) (Figur 2.4). Dessa fyra faser är inte statiska utan pågår parallellt med varandra där mikroorganismer tillkommer och släpps från biofilmen. I vidhäftningsfasen sker en reversibel beläggning av planktoniska mikroorganismer till ledningsytan. Under mognadsfasen etablerar mikroorganismer en hinna (extracellular polymeric substances, EPS) som ger skydd och god tillväxtmiljö, därför utvecklas en permanent beläggning. Under utvecklingsfasen sker tillväxt av mikroorganismer och mikroorganismerna börjar kommunicera med hjälp av biokemiska signaler. Kommunikationen under utvecklingsfasen möjliggör synkroniserat samarbete mellan olika sorters bakterier i biofilmen. Under den sista fasen, frisättningsfasen, släpps mikroorganismer från biofilmen. Detta sker antingen på grund av biokemiska signaler eller fysiska krafter orsakade av hydrauliska förändringar.



Figur 2.4

Biofilmens faser.

Under fas 1 sker reversibel beläggning av planktoniska mikroorganismer till ledningsnätsytan. Under fas 2 blir den initiala beläggningen mer permanent och det skapas en skyddande hinna (EPS) runt celler. Under fas 3 sker tillväxt och kommunikation mellan celler genom biokemiska signaler. Under fas 4 släpps mikroorganismer från biofilmen antingen på grund av biokemiska signaler eller hydrauliska förändringar.

I en studie av bildning av biofilm koloniserade några få bakteriearter inledningsvis ledningen och efter en vecka började fler bakteriearter fästa vid den initiala biofilmen (Douterelo et al. 2014). I samma studie ökades biofilmsytan trefaldigt mellan dag 14 och 28.

Bildning av biofilm har visats vara starkt beroende av ledningsmaterial, som även påverkar mikrobiell sammansättning (Learbuch et al. 2021, Douterelo et al. 2016). En studie har indikerat att PVC-plast får mest biofilm under gynnsamma förutsättningar för bakterier. I studien hade ledningar i PE lägre mängder biofilm jämfört med PVC och klorerade ledningar i PVC och koppar hade lägst mängd biofilm. Studiens resultat indikerade att biofilmen nådde ett stabilt stadium någon gång mellan fyra och åtta veckor efter bildandet (Learbuch et al. 2021). Både järn och plast visade sig vara lämpliga ytor för tillväxt av biofilm, men sammansättning av biofilmen varierade markant. Struktur av ledningsmaterial och flödeshydrodynamik har också visats ha en betydande påverkan på biofilmbildningen (Cowle et al. 2020).

2.4.1 Spolningens påverkan på biofilm

Hur spolning av en ledning påverkar biofilmen har undersökts i ett experimentellt system av Douterelo et al. (2014). I studien avlägsnades vissa bakteriearter i biofilmen under spolning medan andra förblev fästa i biofilmen. Etablerad biofilm i driftsatta dricksvattenledningar påverkas av spolningen och Douterelo et al. (2016) visade att biofilm som växte efter spolning hade en annan mikrobiell sammansättning än biofilmen innan. Detta föreslås kunna bero på säsongsvariationer i vattnet eller att bakteriesammansättningen i biofilmen som återstår efter spolning påverkar biofilmens tillväxt (Douterelo et al. 2016).

3 Snabbare analysmetoder – finns det något att vinna vid ledningsarbeten?

I detta projekt har vi varit nyfikna på om snabbare analysmetoder för dricksvattenkvalitet är tids- och/eller kostnadsbesparande vid ledningsarbeten, både utifrån VA-huvudmannens och entreprenörens perspektiv. Under hösten 2021 genomfördes därför följande aktiviteter:

- *Workshop med representanter från fem olika VA-huvudmän*, där deltagarna var projektledare eller driftledare med stor erfarenhet av ledningsarbeten. Olika aspekter av hygienrutiner och dricksvattenprovtagning diskuterades, med fokus på att utröna om det ur VA-huvudmannens perspektiv finns fördelar med snabbare svarstider för dricksvattenanalyser.
- *Intervjuer med tre entreprenörer*, där representanterna som intervjuades var erfarna arbets- eller projektledare inom anläggningsprojekt. Fokus låg på att kommentera svarstiderna för dricksvattenanalyser utifrån entreprenörens perspektiv.

I detta kapitel presenteras resultat från workshop och intervjuer samlade under fyra rubriker.

Vid workshopen diskuterades – utöver analysmetoder för kvalitetsmätning – också hur hygienrutiner och arbetssätt är helt avgörande för att undvika kontaminering av dricksvattnet vid ledningsarbeten. Beställarnärvaro under projektets gång, kända och accepterade rutiner och en väl genomarbetad spolplan var några av aspekterna. Frågan om att utföra ledningsarbeten på ett korrekt sätt utifrån hygienaspekt kommer dock inte att fördjupas i denna rapport.

De intervjuade entreprenörerna var av uppfattningen att det är mycket vanligt att prov blir underkända, omfattningen har bedömts till cirka 80 % av proven. Det kan jämföras med resultat från Barup och Frihammar (2020) där 36 % av alla 3-dygnsprov som togs i samband med ledningsarbeten på VA SYDs ledningsnät under perioden maj 2019 till augusti 2020 var TMA. Ofta krävs spolning i över en månad innan godkända prover erhålls. I många tillfällen är det svårt att koppla analysresultaten till en viss entreprenadhändelse – generellt upplevs 3- och 7-dygnsanalyser som ett ”vågspel” där många faktorer kan påverka utfallet.

3.1 Ledningsarbeten som drar ut på tiden

I tidplanen för alla ledningsarbeten måste väntetid för analysvar räknas in. Vid workshopen diskuterades huruvida denna väntetid i normalfallet orsakar problem eller ej. Utföraren planerar för att nyttja väntetiden så effektivt som möjligt, exempelvis genom att flytta arbetslaget till ett annat projekt. Här framkom dock en skillnad mellan mindre och större VA-aktörer. En mindre VA-aktör har inte på samma sätt flera arbeten igång samtidigt och har därmed svårare att använda väntetiden genom att parallellt nyttja personalen i ett annat projekt på orten.

Deltagarna i workshopen var överens om att problem ofta uppstår när vattenproverna inte blir godkända och en planerad inkopplingstid inte kan hållas. Detta kan orsakas av riktiga kringkörningar med andra aktiviteter, speciellt om det utförda arbetet är en del i ett större infrastrukturprojekt. Ledningsarbeten som tar längre tid än vad som kommunicerats kan leda till försämrat tryck för VA-huvudmannen och bidra till en sämre relation mellan

VA-organisationen och externa aktörer. Utdragna ledningsarbeten leder också till längre perioder med spolning och en större mängd spolvatten åtgår.

3.2 Särskilt kritiska situationer

Under workshopen diskuterades situationer i särskilt kritiska projekt och om VA-aktören i dessa situationer skulle vara behjälpt av en kortare väntetid på resultaten från dricksvattenproverna. Dessa särskilt kritiska situationer sammanfattas:

- *Låg spolkapacitet*, antingen på grund av hydrauliska begränsningar eller begränsningar i tillgången på vatten – generellt sett behjälpta av snabbare analyssvar.
- *Problematiska effekter av stillastående entreprenad*, exempelvis svårigheter att upprätthålla dricksvattendistributionen eller att andra projekt/entreprenörer står och väntar – generellt sett behjälpta av snabbare analyssvar.
- *Svårt att avleda spolvatten*, väntetiden innebär då att mer spolvatten behöver avledas förutsatt att ledningen står på rinn – delvis behjälpta av snabbare analyssvar (minskar mängden spolvatten).

En taktik för att minska problemet med otillräcklig spolkapacitet är att inte lägga arbeten under perioder där det finns risk för kapacitetsbrist. Detta kan i praktiken vara svårt att få till och fungerar heller inte för akuta (ej planerade) åtgärder.

3.3 Spolning

Det finns begränsad kunskap kring vilken effekt som spolning av nyanlagda dricksvattenledningar egentligen har avseende att uppnå en god och stabil dricksvattenkvalitet. Baserat på ledningens dimension krävs ett visst flöde för att kunna påverka biofilmen i ledningarna. Flödes hastigheten är alltid som störst i centrum av röret och som lägst närmast rörets väggar. Detta innebär dels att det vattenprov som tas ut inte alltid är representativt för ledningens hygien och dels att det är svårt att ”spola rent” en ledning av större dimension.

Entreprenörerna upplevde också en osäkerhet kring vilken effekt som spolningen egentligen har. När en ledning behöver spolas under lång tid (veckor till månader) innan godkända prover erhålls är det svårt att veta om effekten kommer av själva spolningen eller tiden i sig.

Under workshopen med VA-huvudmännen diskuterades den kommunikativa aspekten av att VA-aktören kan behöva genomföra spolningar under högförbrukning samtidigt som resten av samhället uppmanas att spara på vatten. Långvariga och väl synliga spolningar kan leda till att VA-organisationen inte upplevs som trovärdig i sin kommunikation kring vattenbesparing.

3.4 Behov av gemensam standard

Workshopen inledes med en jämförelse av de olika organisationernas rutiner för kontroll av dricksvattenkvaliteten vid ledningsarbeten. Jämförelsen sammanfattas så här:

- VA-organisationerna har idag olika provtagningsrutiner för kontroll av dricksvattenkvalitet vid ledningsarbeten.
- Endast en av organisationerna angav att de har krav på analys av 7-dygnsprov.
- Flera av organisationerna har tidigare inkluderat analys av 7-dygnsprov.
- Alla organisationer krävde två på varandra godkända 3-dygnsprov, antingen med en eller två dagars mellanrum.
- Vissa av huvudmännen har även infört krav på polypiggning (rengöringsmetod) innan driftsättning av ledning, vilket upplevts ha lett till att tiden innan godkända prover erhålls förkortats, särskilt för stora ledningar.

Inom gruppen uttrycktes ett behov av gemensamma branschstandarder för provtagning och för åtgärder när provresultaten inte är godkända. Ett konkret åtgärdspaket beroende på vilken parameter som överskrider gränsvärdet hade underlättat efterarbetet. Två exempel på aspekter som hade underlättats av standardisering och som nämndes under workshopen:

- Hantering av referensprov. Särskilt viktigt i projekt där ledning förläggs i flera etapper.
- Situationen med godkända prover som sedan efterföljs av ett prov som är TMA. Ska ledningsarbetet betraktas som inkopplingsbart eller inte?

En gemensam standard skulle enligt VA-huvudmännen också vara positiv vid kontakten med entreprenörer. Detta skulle särskilt underlätta när entreprenörer har önskemål om ett annat provtagningsförfarande än VA-organisationen. Vid intervjuerna med entreprenörerna framgick att beställare ställer olika krav. Exempelvis varierar det huruvida 7-dygnsprover inkluderas eller ej. Vissa beställare tar själva prover och vissa beställare vill att entreprenören ansvarar för provtagning. Även tiden mellan två på varandra följande prover samt utformning av den praktiska provtagningen varierar. Ofta förekommer krav på spol- och provtagningsplan som godkänts av beställaren. Det framkom under intervjuerna att mindre beställarorganisationer ofta ställer lägre krav.

En svårighet som lyftes av entreprenörerna är att de generellt upplevde det som problematiskt att hålla en god hygien i provtagningssituationen. Förutsättningar vid olika provpunkter varierar kraftigt och påverkas av väder och förutsättningar i schakten. Ibland upplevs att tillräcklig kunskap hos medarbetarna om hur provtagning ska gå till saknas, vilket kan påverka hur provpunkten utformas och därmed påverka provresultatet. En kontinuerlig provtagning eller snittprov uppfattas som mer rättvisande än dagens punktprov.

En tydlig standard för hur arbete, spolning och provtagning ska gå till skulle, enligt de intervjuade entreprenörerna underlätta avsevärt i entreprenaderna och underlätta mer än snabbare analysresultat. Det skulle även göra spolnings- och provtagningsmomentet mer förutsägbart och lättare att prissätta.

4 Fallstudier: 3-dygnsprov (HPC) och flödescytometri

I det genomförda SVU-projektet ville vi utmana dagens metod för analys av odlingsbara mikroorganismer – 3 dygnsanalys (HPC) – genom att även utföra analyser med en ny metod – flödescytometri (FCM). Avsikten var att jämföra de faktiska analysresultaten från de båda metoderna men också att ta reda på om FCM-onlinemätning ute i fält skulle vara praktiskt genomförbart.

I projektet jämfördes resultat från 3-dygnsanalys (HPC) och analys med flödescytometri (FCM) vid fyra ledningsarbeten. Fallstudierna utgjordes av två nyanläggningar (Råbylund och Torna Hällestad) samt två läckor (Teckomatorp och Nevishög).

I detta kapitel beskrivs metod och resultat för de fyra fallstudierna följt av en sammanfattning av de viktigaste resultaten. Avsnittet för respektive fallstudie är uppdelat i två huvuddelar:

1. Beskrivning av fallstudie – *Ger en förståelse för händelsen, provtagningen och de analyser som genomförts.*
2. Resultat – *Presentation och kortfattad analys av resultat.*

Vår utvärdering av onlinebaserad FCM som metod ute i fält återfinns i rapportens diskussionsdel i kapitel 5.

Fallstudierna representerar verkliga ledningsnätshändelser med olika förutsättningar. Urvalet av nyanläggningar baserades på vilka ledningsarbeten som skedde inom VA SYD under projektets period för datainsamling (vår till höst 2021). Därtill hade projektet sedan tidigare tillgång till data från två större läckor som skedde under 2020.

Vattenproven togs under spolning för samtliga fyra fallstudier. FCM-analysen utfördes online och/eller manuellt. För samtliga fallstudier användes minst en provpunkt och en referenspunkt. Provpunkten valdes så att den låg i flödesriktningen efter ledningsarbetet och referenspunkten valdes för att representera en punkt i ledningen som i teorin bör vara opåverkad av ledningsnätsarbetet. Provtagningar och analyser utfördes av intern personal.

Vilka analyser som utförts vid respektive fallstudie samt vilka resultat som inkluderas i denna rapport presenteras i Tabell 4.1. Olika gater användes vid analys av data från FCM för att få TCC, ICC, Bray-Curtis olikhetsvärde, andel HNA och LNA-celler och bakgrundspartiklar. För information om hur data från FCM analyserats hänvisas till examensarbetet som genomförts som en del av SVU-projektet (Zamore, 2010).

Tabell 4.1

Analysmetoder som använts för fallstudierna.

Fallstudie	Typ av händelse	3-dygnsprov Odlingsbara mikroorganismer	Manuell FCM Totalt antal celler (TCC) + Totalt antal intakta celler (ICC)	Online FCM Totalt antal celler (TCC)	Online FCM Bray-Curtis olikhetsvärde HNA/LNA- celler, bakgrundspartiklar
Råbylund	Nyanläggning	X	X	X	
Torna Hällestad	Nyanläggning	X			
Nevishög	Läcka	X	X*		
Teckomatorp	Läcka	X		X	X

*ICC analyserades inte i Nevishög.

Provpunkt R1. En onlinebaserad flödescytometer placerades i en trälåda inom arbetsområdet (Figur 4.2). Dricksvatten leddes till lådan genom en ca 10 m lång slang (som grävdes ner cirka 1 m under marken med anledning av byggtrafik i området). Därefter leddes vattnet genom en slang till instrumentet.

Prover för manuell analys togs vid en punkt innan den nergrävda slangen varje arbetsdag. Online-analys med flödescytometer utfördes med 2,5 timmars intervall.

Dessvärre saknas data för perioden 13–17 september på grund av att strömförsörjningen till instrumentet oavsiktligt hade stängts av

Referenspunkt R1. Referenspunkten (brandpost) som användes i ledningsnätsprojektet användes också som Referenspunkt R1 i SVU-projektet. Brandposten fanns utanför inhägnat arbetsområde och placering av en onlinebaserad flödescytometer vid referenspunkten var därför inte möjlig hänsyn taget till risken för stöld eller sabotage av instrumentet. Utöver 3-dygnsprov analyserades därför prover från denna provpunkt endast med manuell FCM (4 provtagningstillfällen).

Referenspunkt R2. För Referenspunkt R2 användes vatten från kökskranen i en arbetsbod. Till boden leddes vattnet genom en 10 m lång svart provisorisk PE-ledning ovan mark (Figur 4.3), förutsättningar som dessvärre medförde uppvärmning av dricksvattnet innan det nådde boden. Detta gjorde egentligen punkten mindre lämplig som referenspunkt, men punkten valdes ändå i syfte att kunna placera ett onlineinstrument före den nya ledningen. Prover togs med onlinebaserad FCM med sex timmars intervall. Manuella prover togs från utgående vatten från det onlinebaserade FCM-instrumentet vid fyra tillfällen.



Figur 4.3

Anordning för FCM-analys vid referenspunkt R2 Råbylund. På bilden visas en inkopplad Bactosense onlinebaserad FCM (bNovate technologies). Foto: VA SYD

4.1.2 Resultat Råbylund

I det här avsnittet presenteras en sammanfattning av resultat från mätningar vid ledningsnätsarbetet i Råbylund följt av figurer med data. Data från onlinebaserad FCM saknas vid Provpunkt R1 mellan dag 13 och 18 på grund av att vattenflödet till instrumentet stängdes av dag 13 vilket upptäcktes först dag 18. När flödet till onlinebaserad FCM vid provpunkten startats igen var värden för TCC initialt förhöjda. De förhöjda värdena antogs bero på stillastående vatten i maskinen och togs därför bort vid datahantering.

Odlingsbara mikroorganismer (Figur 4.4)

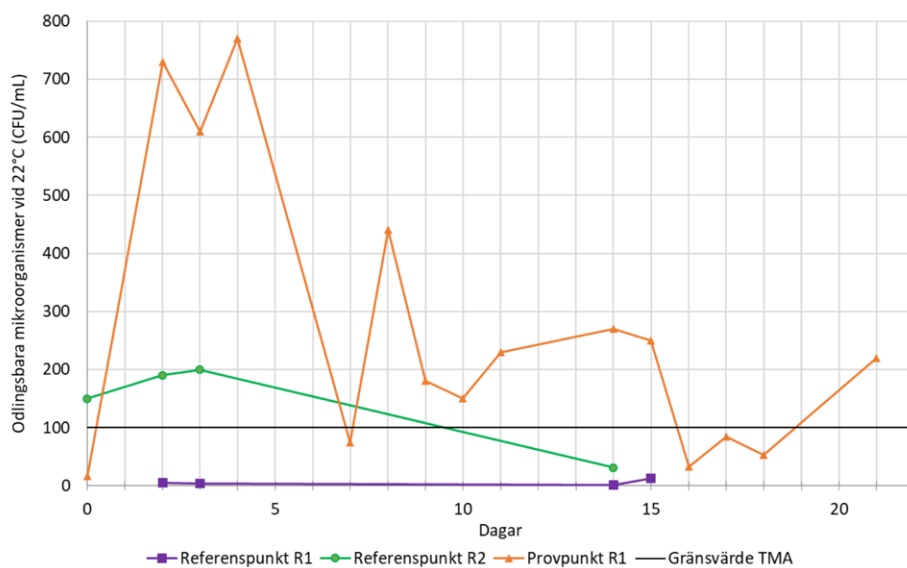
- Vid provpunkt R1 var odlingsbara mikroorganismer huvudsakligen över gränsen för TMA från och med dag tre fram till dag 16, dock med en instabil nedåtgående trend från dag fyra till dag 18.
- Vid provpunkt R1 var odlingsbara mikroorganismer under gränsen för TMA dag 16 till 18 för att sedan efterföljas av ett förhöjt värde på 220 CFU/ml dag 21. Vid denna tidpunkt var ledningen godkänd för påkoppling eftersom två på varandra följande 3-dygnsprov erhållits, och i vanliga fall hade provtagningen avslutats.
- Under hela provperioden var odlingsbara mikroorganismer färre och visade på mer stabila värden vid båda referenspunkterna än vid Provpunkt R1. Detta tyder på att ledningsnätsarbetet har påverkat antalet odlingsbara mikroorganismer.

TCC (Figur 4.5 och Figur 4.6)

- Genomgående var TCC högre vid Provpunkt R1 än vid Referenspunkt R2 både utifrån manuell och onlinebaserad FCM, vilket tyder på att ledningsnätsarbetet har påverkat TCC vid Provpunkt R1.
- Under den period då prover togs vid både Referenspunkt R2 och Provpunkt R1 följde TCC generellt samma trender utifrån både manuell mätning och onlinemätning.
- Både utifrån mätning med manuell och onlinebaserad FCM ökade TCC vid Provpunkt R1 under dag nio. Samtidigt ökade TCC vid Referenspunkt R2 enligt mätningar med onlinebaserad FCM, men inget manuellt prov togs under den dagen. Att ökningen även visades vid Referenspunkt R2 tyder på att ökningen inte orsakats av ledningsnätsarbetet. Detta är information som inte går att utläsa från de manuella mätningarna på grund av att data saknas vid Referenspunkt R2 vid dag nio. Detta visar på en fördel med onlinebaserad FCM i jämförelse med manuell FCM.
- Efter dag nio minskade TCC vid både Referenspunkt R2 och Provpunkt R2. Vid nästa mätning med manuell FCM, dag tio, var TCC tillbaka till värden liknande innan dag nio. Utifrån mätningar med onlinebaserad FCM går det att utläsa att TCC redan inom 10 timmar var tillbaka till värden liknande innan ökningen vid både prov- och referenspunkten.

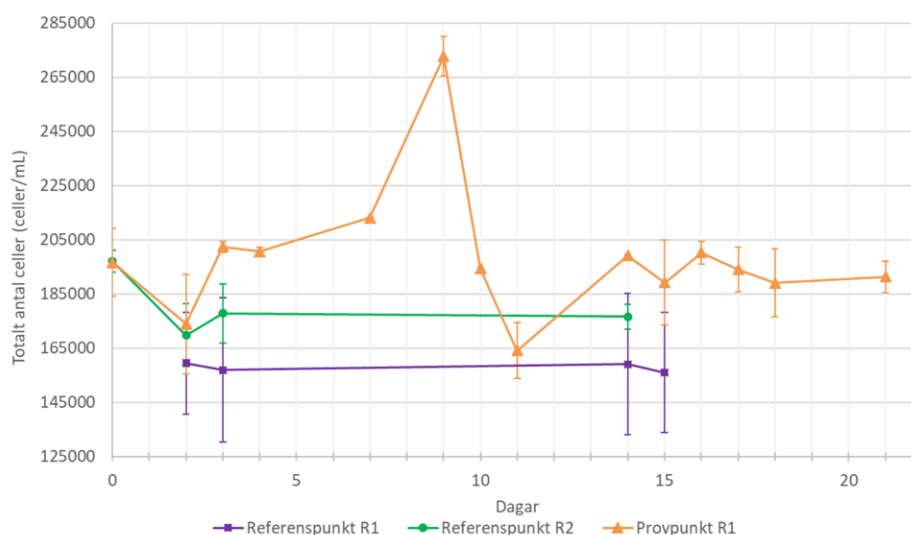
Jämförelse odlingsbara mikroorganismer (Figur 4.4) och TCC (Figur 4.5 och Figur 4.6)

- Under fallstudien Råbylund framgick ingen tydlig korrelation mellan odlingsbara mikroorganismer och TCC:
 - Mellan dag ett och två ökade odlingsbara mikroorganismer från 16 till 739 CFU/ml samtidigt som TCC minskade med cirka 12 % från 197 000 till 174 000 celler/ml vid Provpunkt R1 baserat på resultat från manuell FCM.
 - Mellan dag sju och nio detekterades en ökning av TCC på 28 % med manuell FCM vid Provpunkt R1, samtidigt som odlingsbara mikroorganismer ökade med cirka 240 %.
 - Mellan dag 18 och 21 detekterades stabila värden för TCC med manuell FCM vid Provpunkt R1, samtidigt som odlingsbara mikroorganismer ökade med över 400 % från 53 CFU/ml dag 18 till 220 CFU/ml dag 21.



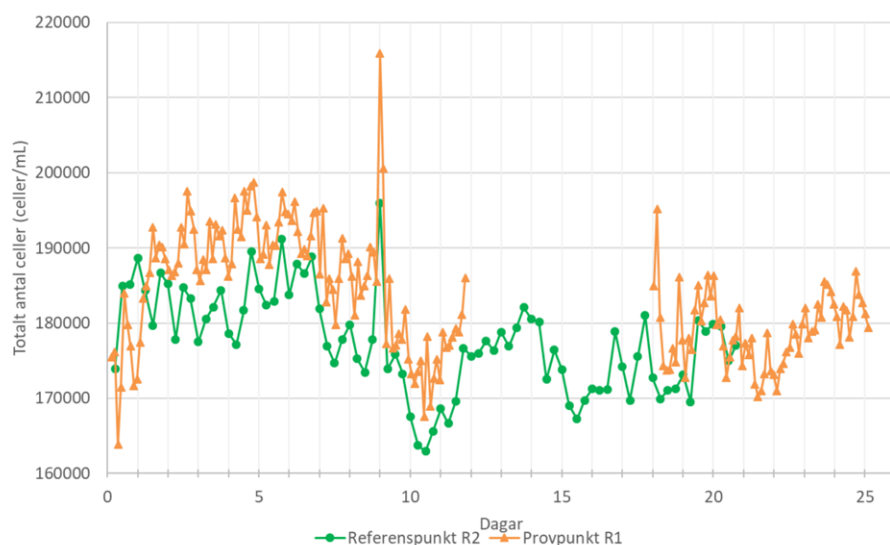
Figur 4.4

Odlingsbara mikroorganismer vid nyanläggningen i Råbylund.



Figur 4.5

TCC från analys med manuell FCM efter nyanläggning i Råbylund.



Figur 4.6

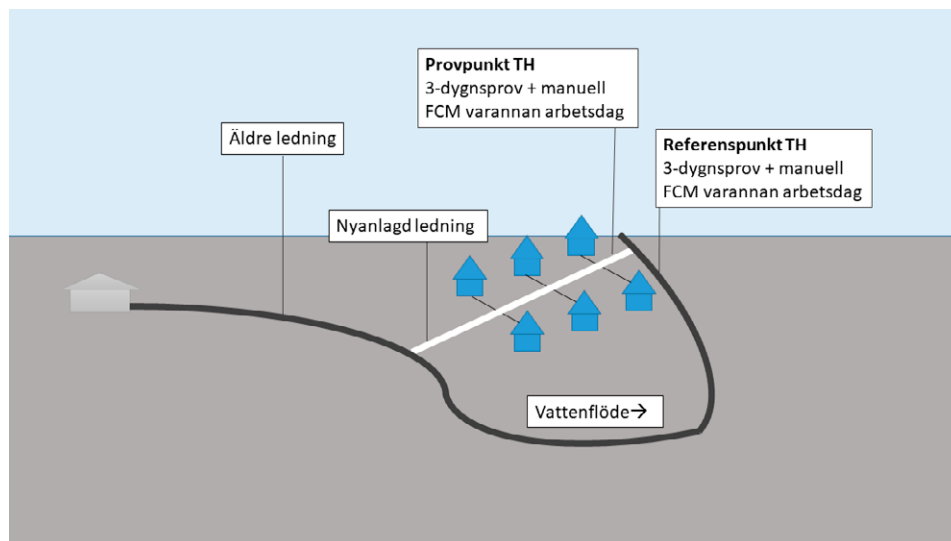
TCC från analys med onlinebaserad FCM efter nyanläggning i Råbylund.

4.2 Fallstudie 2: Torna Hällestad (nyanläggning)

Den andra nyanläggningen bland våra fallstudier utgörs av Torna Hällestad, Lunds kommun.

4.2.1 Beskrivning av fallstudie Torna Hällestad

I Torna Hällestad anlades nya dricksvattenledningar i ett nybyggt område under våren 2021, se schematisk bild i Figur 4.7. Den nyanlagda ledning som valdes ut i studien var en PE-ledning med en diameter 160 mm. Längden på ledningen var cirka 175 m. Analyser utfördes med manuell FCM samt 3-dygnsprov (HPC) med två till sex dagars mellanrum. Provperioden var 23 mars till 16 april 2021.



Figur 4.7

Schematisk bild över prov- och referenspunkt i Torna Hällestad.

Provpunkt TH. Provpunkten var placerad i slutet av den nya ledningen. Den nyanlagda ledningen distribuerade endast vatten till en gata. Detta gör att även små förändringar i vattenförbrukningen kan ha stor påverkan på flödet i ledningen. Alla prover togs under ordinarie arbetstid men exakt tidpunkt för provtagning varierade mellan dagarna.

Referenspunkt TH. En närliggande ledning med diametern 80 mm användes som referenspunkt. Provet togs i en brandpost.

4.2.2 Resultat Torna Hällestad

I det här avsnittet presenteras en sammanfattning av resultat från mätningar vid ledningsnätsarbetet i Råbylund följt av figurer med data.

Odlingsbara mikroorganismer (Figur 4.8)

- Efter att godkända 3-dygnsprov erhållits vid Provpunkt TH fram till dag 14 visade de tre sista proverna på TMA för odlingsbara mikroorganismer. Eftersom två på varandra följande prover redan erhållits för Provpunkt TH cirka två veckor tidigare var ledningen redan inkopplad och levererade dricksvatten till kunderna när proverna visade TMA.
- Odlingsbara mikroorganismer vid Referenspunkt TH var stabila genom hela provperioden. Detta tyder på att den ökning av odlingsbara som skedde mellan dag 17 och 20 kan ha berott på ledningsnätsarbetet.
- Då rundmatning skulle kunna ske vid Provpunkt TH (Figur 4.8) efter idrifttagande av den nya ledningen går det inte att utesluta att en förändring i flödesriktning kan ha påverkat antalet mikroorganismer.

TCC (Figur 4.9)

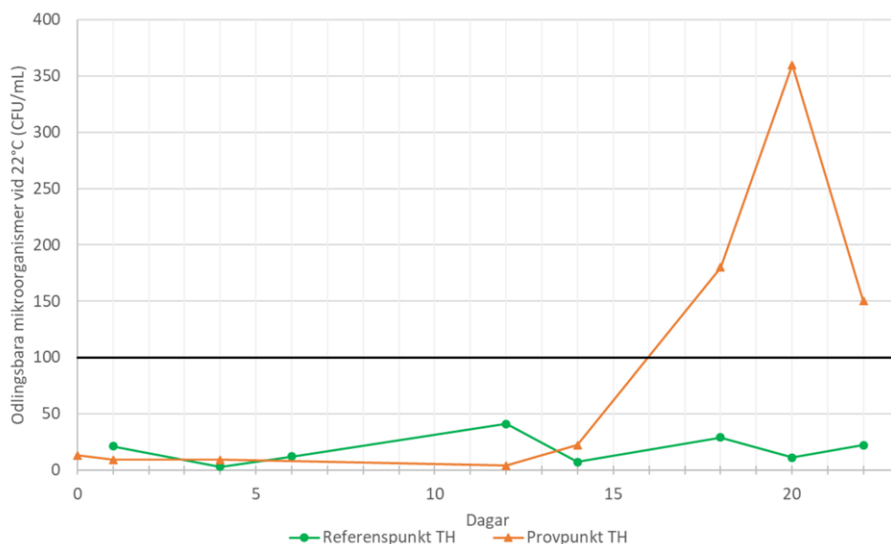
- Under provperioden varierade TCC mellan 370 000 celler/ml och 740 000 celler/ml vid Provpunkt TH och mellan 370 000 celler/ml och 520 000 celler/ml vid Referenspunkt TH.
- TCC ökade vid Provpunkt TH mellan varje provtillfälle från dag fyra till dag 20.
- Samtidigt som ökningen av TCC vid Provpunkt TH mellan dag 14 och 20 skedde en minskning av TCC vid Referenspunkt TH vilket skulle kunna betyda att ökningen vid Provpunkt TH orsakats av ledningsarbetet.

ICC (Figur 4.10)

- Från och med dag 11 följde ICC liknande trend vid Provpunkt TH och Referenspunkt TH.
- Genom hela provperioden var andelen ICC relativt stabil både vid Provpunkt TH och Referenspunkt TH och varierade mellan omkring 50 % till 60 %.

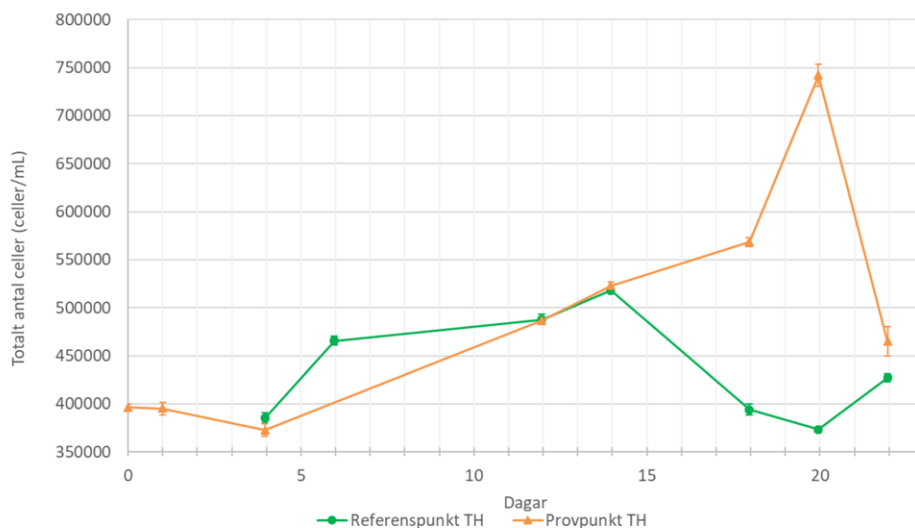
Jämförelse odlingsbara mikroorganismer (Figur 4.8), TCC (Figur 4.9) och ICC (Figur 4.10)

- Vid Provpunkt TH gavs stabila värden för både antal odlingsbara mikroorganismer och TCC i början av provperioden följt av en ökning mellan dag 14 och 20. Storleken på ökningen skiljde sig mellan odlingsbara mikroorganismer och TCC där den procentuella förändringen av antal odlingsbara mikroorganismer var cirka 1600 % medan TCC ökade med cirka 40 %. Samtidig sjönk andel ICC i provpunkten från 55 % dag 13 till 47 % dag 20. Sammantaget tyder dessa förändringar på en förändring i bakteriell sammansättning som kan ha påverkat tillväxt av mikroorganismer.
- Samtidigt som odlingsbara mikroorganismer och TCC minskade mellan dag 20 och 22 ökade andelen ICC från 47 % till 59 %. Denna förändring i både bakteriell halt och sammansättning tyder på att ett skifte i floran och tillväxt kan ha skett, eller att driftförhållanden ändrats (t.ex. via rundmatning eller annan flödesändring).



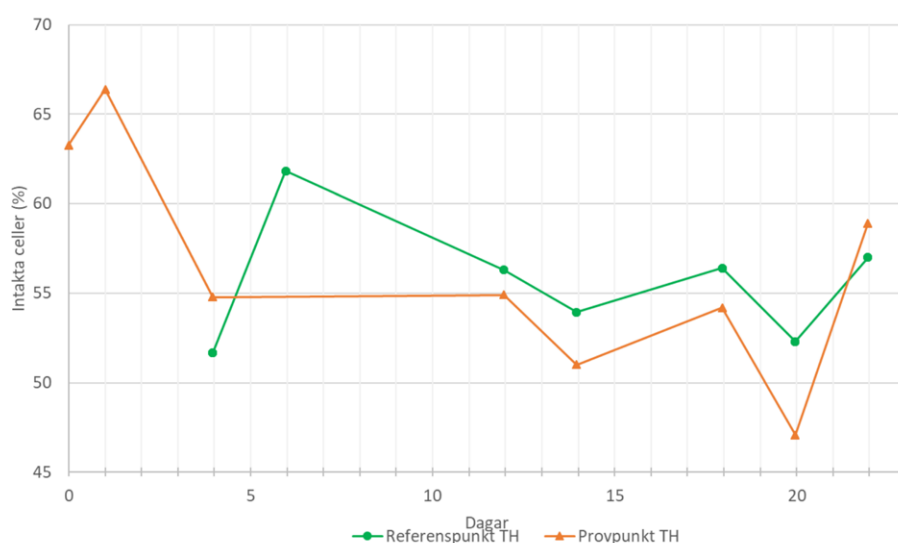
Figur 4.8

Odlingsbara mikroorganismer efter nyanläggning Torna-Hällestad.



Figur 4.9

TCC från analys med manuell FCM efter nyanläggning i Torna-Hällestad.



Figur 4.10

Procentuell andel intakta celler av TCC från analys med FCM efter nyanläggning i Torna Hällestad.

4.3 Fallstudie 3: Teckomatorp (läcka)

Till fallstudierna räknas också två stycken läckor på stora överföringsledningar, den första benämns Teckomatorp.

4.3.3 Beskrivning av fallstudie Teckomatorp

På hösten 2020 uppstod en läcka på en av Sydvattens överföringsledningar (Figur 4.11), mellan orterna Västra Strö och Teckomatorp i Skåne. Ledningen är av fiberglas och har en diameter på 1000 mm. Vid stängning av ledningen uppstod ytterligare en läcka vid Teckomatorp (Figur 4.12). I samband med reparationsarbetet stängdes ledningen av mellan Referenspunkt T1 och strax efter Provpunkt T2. Denna sträcka tömdes och fylldes sedan bakifrån, det vill säga att vatten trycktes från Provpunkt T2 i riktning mot Referenspunkt T1. Ledningen tömdes inte helt på vatten på grund av höjdskillnader i terrängen.

Under spolperioden efter utfört reparationsarbete utfördes 3-dygnsanalyser (HPC) av dricksvatten från två referenspunkter och två provpunkter. Vid en av provpunkterna och en av referenspunkterna analyserades även TCC med onlinebaserad FCM under samma period (Figur 4.12). Utöver TCC analyserades även data från onlinebaserad FCM

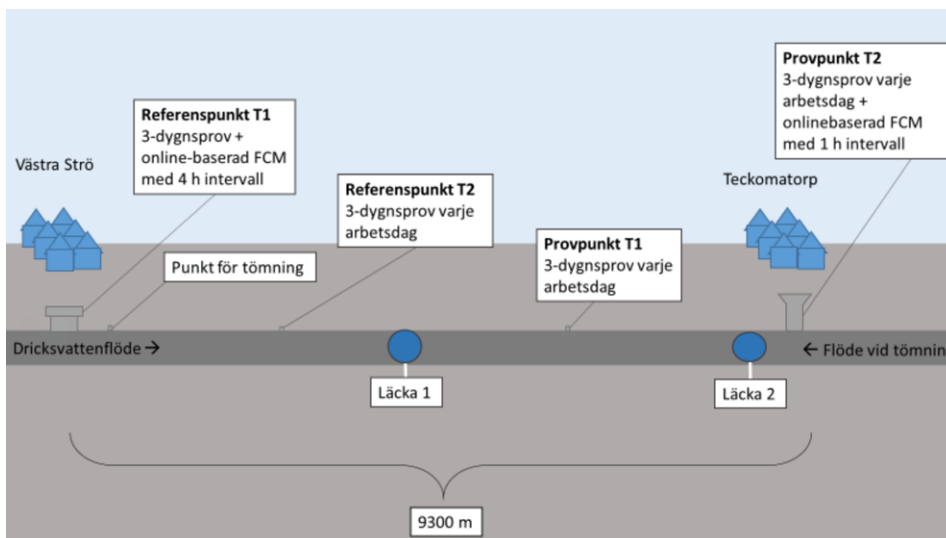
för att identifiera andelen celler med relativt stor mängd DNA (HNA-celler). Vidare togs Bray-Curtis olikhetsvärde för TCC-data fram för att se hur den mikrobiologiska populationen förändras över tiden och hur den skiljde sig mellan prov- och referenspunkt.



Figur 4.11

Läckan i Teckomatorp.

Foto: Sydsvatten



Figur 4.12

Schematisk bild
över provtagning
Teckomatorpläcken.

Provpunkt T1. Den första provpunkten (Provpunkt T1) var belägen nära ledningssträckan där den första läckan uppstod. Den valda punkten var belägen mellan de båda läckorna. Vid denna provpunkt togs endast 3-dygnsprov eftersom det inte var lämpligt att installera ett onlinebaserat FCM-analysinstrument på platsen. För att få tag på vattenprover spolades vatten upp genom en luftningsventil.

Provpunkt T2. Tryckstegringsstationen i Teckomatorp, som är belägen efter de båda läckorna i flödesriktningen, användes som den andra provpunkten, Provpunkt T2. Både analys av 3-dygnsprov och onlinebaserad FCM-analys utfördes på denna provpunkt. Punkten valdes eftersom det var möjligt att installera en onlinebaserad FCM på platsen.

Referenspunkt T1. En kammare i Västra strö, uppströms läckorna, användes som referenspunkt. Vid denna punkt togs 3-dygnsprover samt onlinebaserad FCM.

Referenspunkt T2. Referenspunkt 2 var belägen innan den första läckan där en luftningsventil användes för att spola upp vattnet som skulle analyseras. Referenspunkt T2

ligger inom den del av sträckan som påverkades av avstängningen. Det var inte lämpligt att installera ett onlinebaserat FCM-instrument på denna plats och därför analyserades endast 3-dygnsprover vid denna punkt.

4.3.4 Resultat Teckomatorp

I det här avsnittet presenteras en sammanfattning av resultat från mätningar vid ledningsnätsarbetet i Teckomatorp följt av figurer med data. I början av provperioden var värden för TCC vid Provpunkt T1 förhöjda. De förhöjda värdena antogs bero på förhållanden som rådde precis vid uppstart, då det vatten som fyllts på i ledningen bakifrån spolats tillbaka (Figur 4.12), snarare än att ha en koppling till hur vattenkvaliteten i ledningen påverkades av ledningsnätsarbetet och därför plockades de initialt förhöjda värdena bort.

Odlingsbara mikroorganismer (Figur 4.13)

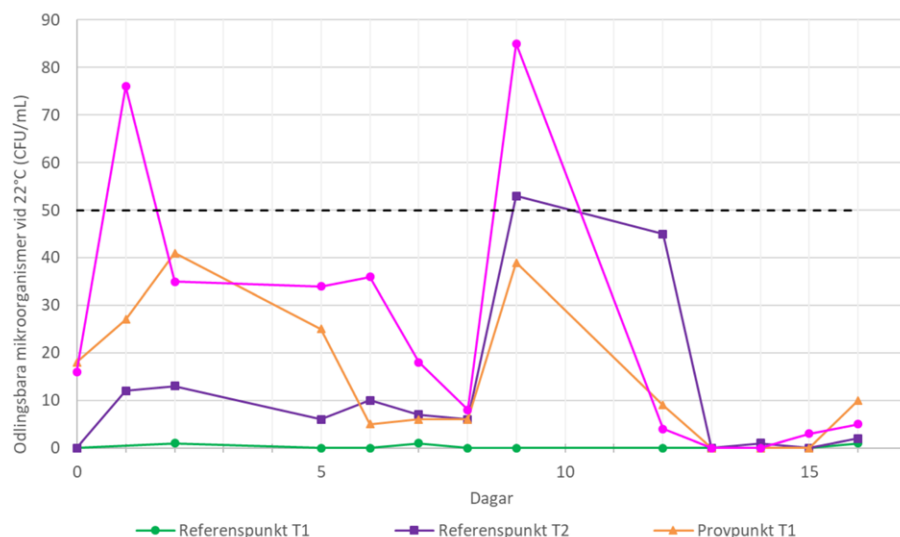
- Odlingsbara mikroorganismer var under 100 CFU/ml för samtliga prov- och referenspunkter genom hela provperioden.
- Dag nio översteg odlingsbara mikroorganismer Sydvattens interna gränsvärde (50 CFU/ml) vid Provpunkt T2 samt Referenspunkt T2 efter att fem respektive sju godkända prover erhöles.
- Odlingsbara mikroorganismer vid Referenspunkt T1 var nära noll och under hela provperioden medan värden för Referenspunkt T2 (som var lokaliserad närmare läckorna) snarare följde samma trend som de två provpunkterna. Detta tyder på att ledningsnätsarbetet påverkat antalet odlingsbara mikroorganismer både vid provpunkterna och vid Referenspunkt T2, vilket inte är förvånande med tanke på att Referenspunkt T2 ligger inom det området som tömts i samband med ledningsarbetet.

TCC (Figur 4.14)

- TCC var konstant högre vid Provpunkt T2 än vid Referenspunkt T1. Generellt följde de två kurvorna samma trend fram till dag 16. Efter dag 16 minskade TCC vid Provpunkt T2 medan TCC vid Referenspunkt T1 förblev stabil.
- Ett resultat som sticker ut är mellan dag sex och sju vid Provpunkt T2, där värden för TCC var instabila med värden mellan 177 000 och 209 000 celler/ml (jämför med TCC vid Referenspunkt T1 som under samma period varierade mellan 166 000 och 173 000 celler/ml).

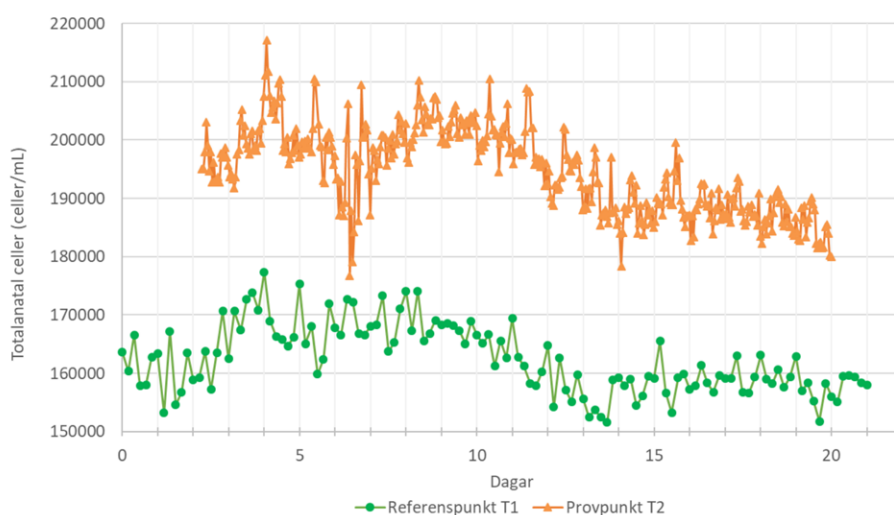
Jämförelse odlingsbara mikroorganismer (Figur 4.13) och TCC (Figur 4.14)

- Resultaten visar inte på någon tydlig korrelation mellan odlingsbara mikroorganismer och TCC.
- Mellan dag sex och sju, då värden för TCC var instabila vid Provpunkt T1, gick odlingsbara mikroorganismer från fem till sex CFU/ml. På samma sätt går det inte att utläsa ett samband mellan de förhöjda värdena för odlingsbara mikroorganismer (>50 CFU/ml) vid Provpunkt T2 utifrån TCC.



Figur 4.13

Odlingsbara mikroorganismer efter reparation av läckor vid Teckomatorp.



Figur 4.14

TCC efter reparation av läckor vid Teckomatorp utan data för uppstartsperioden.

4.4 Fallstudie 4: Nevishög (läcka)

Den sista fallstudien utgjordes av en läcka på en av de stora överföringsledningarna mot Malmö, Nevishög.

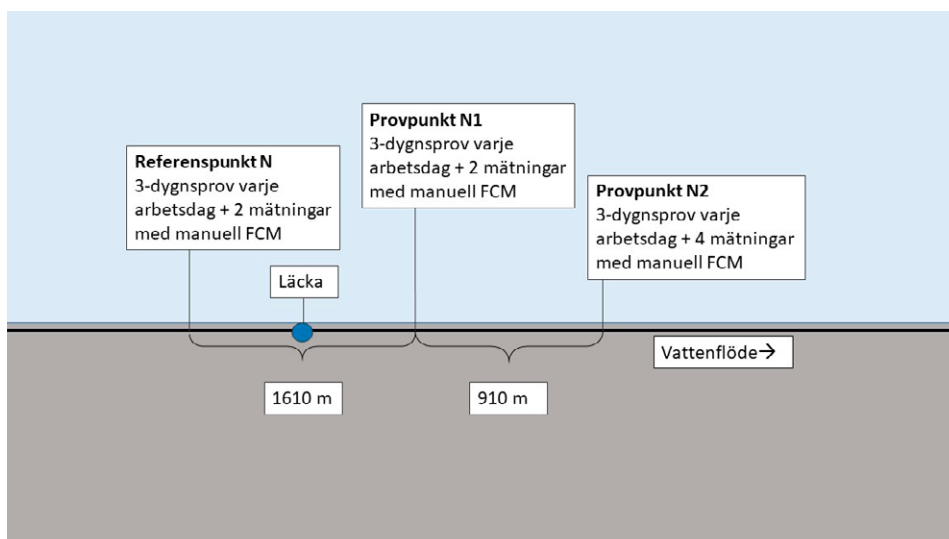
4.4.1 Beskrivning av fallstudie Nevishög

I augusti 2020 inträffade en stor läcka på en överföringsledning i närheten av den lilla orten Nevishög, i höjd med Staffanstorps på väg från Vombverket till Malmö (Figur 4.15). Överföringsledningen är av betong med en diameter på 1100 mm. Efter att läckan reparerats spolades ledningen i cirka två veckor. Under denna tid analyserades prover från två provpunkter och en referenspunkt (Figur 4.16). För samtliga provpunkter togs dagliga 3-dygnsprover. Fyra prover analyserades även med en manuell flödescytometer.



Figur 4.15

Reparationsarbete efter läcka i överföringsledning från Vombverket (Nevishög) till Malmö. Foto: Sydvatten



Figur 4.16

Schematisk bild över prov- och referenspunkter i Nevishög.

Provpunkt N1. En luftningsventil användes som provpunkt N1.

Provpunkt N2. Även för provpunkt N2 användes en luftningsventil.

Referenspunkt N. Som referenspunkt användes vatten från en mätkammare. Vattnet togs via en provkran.

4.4.2 Resultat Nevishög

I det här avsnittet presenteras en sammanfattning av resultat från mätningar vid ledningsnätsarbetet i Nevishög följt av figurer med data. Endast ett fåtal prover i Nevishög analyserades med FCM. Därför kan få slutsatser dras om generella trender för TCC utifrån resultaten.

Odlingsbara mikroorganismer (Figur 4.17)

- Antal odlingsbara mikroorganismer visade på under 100 CFU/ml efter dag sju för Provpunkt N1, respektive dag 11 för Provpunkt N2. Eftersom Sydvatten använder sig av ett internt gränsvärde på 50 CFU/ml, var proverna inte internt godkända förrän dag 11 för Provpunkt 1 och dag 13 för Provpunkt 2.
- Vid Referenspunkt N1 var odlingsbara mikroorganismer stabila under hela provperioden och var som högst 25 CFU/ml. Vid båda provpunkterna ökade mikroorganismer i början av provperioden till värden över gränsen för TMA dag två till 11 (Provpunkt N2) och dag tre till sju (Provpunkt N1). Detta tyder på att ledningsnätsarbetet påverkat antalet odlingsbara mikroorganismer.
- Vid både provpunkt N1 och provpunkt N2 erhöles två på varandra följande godkända prover i början av provperioden som sedan efterföljdes av underkända prov.

TCC (Figur 4.18)

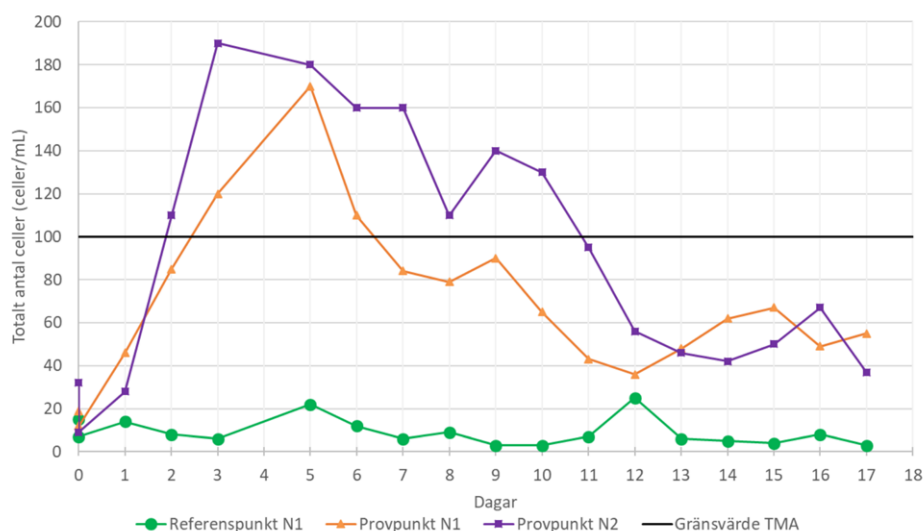
- Vid två tillfällen var TCC högre vid en referenspunkt än vid en provpunkt. Det skedde dag sju då TCC var 379 000 och 443 000 celler/ml vid Provpunkt N2 respektive

Referenspunkt N2.

- Dag sju detekterades det högsta värdet med FCM till drygt 440 000 celler/ml i Referenspunkt N1 och samma dag detekterades ett värde på knappt 380 000 celler/ml i provpunkt N2.

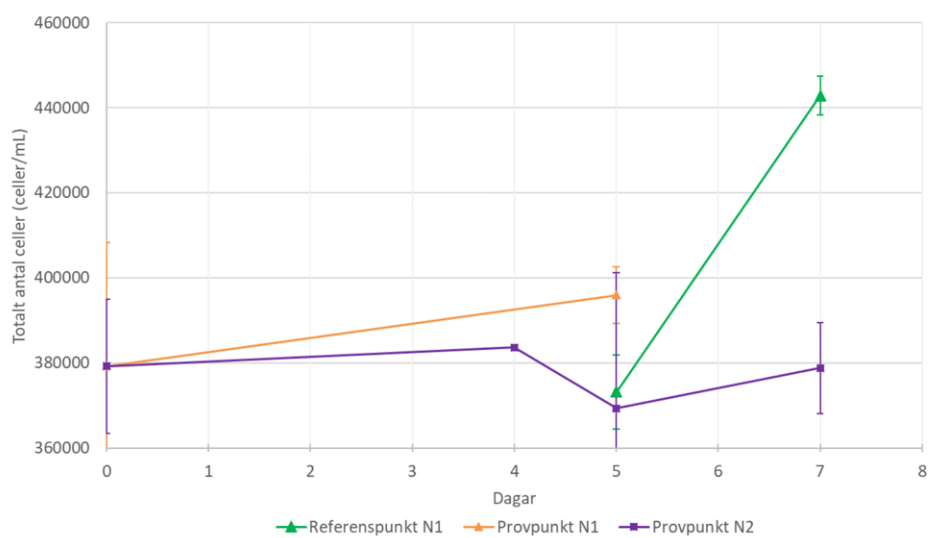
Jämförelse odlingsbara mikroorganismer (Figur 4.17) och TCC (Figur 4.18)

- De prover som analyserades både med avseende på TCC och odlingsbara mikroorganismer i Nevishög visar inte på samma sak gällande vilken av provpunkterna som har högst antal mikroorganismer. Exempelvis skedde en ökning för TCC på cirka 19 % från 373 000 till 443 000 celler/ml mellan dag fem och sju i Referenspunkt N1 samtidigt som odlingsbara mikroorganismer minskade med cirka 73 % från 22 till 6 CFU/ml.



Figur 4.17

Odlingsbara mikroorganismer efter reparation av läcka vid Nevishög.



Figur 4.18
TCC från analys med
manuell FCM efter
reparation av läcka vid
Nevishög.

5 Diskussion

I diskussionskapitlet återvänder vi till de tre frågeställningar som ligger till grund för SVU-projektet och den här rapporten. Frågeställningarna presenterades i det inledande kapitlet men repeteras nedan. Vi använder resultat från workshop och intervjuer (kapitel 3) samt fallstudier (kapitel 4) för att presentera hur vi bidragit till att flytta kunskapsläget i de nämnda frågeställningarna. Vi redovisar också våra tankar kring möjligheter och begränsningar med dagens och framtidens analysmetoder för dricksvattenkvalitet i kontexten provtagning vid ledningsarbeten. Som sista avsnitt presenteras våra förslag till fortsatt arbete och fortsatta studier inom området.

4. *Vad händer med dricksvattenkvaliteten under ett ledningsarbete?*
5. *Finns det något att vinna på snabbare analysmetoder vid ledningsarbeten?*
6. *Kan flödescytometri (FCM) vara en bättre metod än 3-dygnsprov för att följa den mikrobiologiska kvaliteten hos dricksvattnet vid ledningsarbeten?*

Den läsare som, utöver vad som presenteras i detta kapitel, önskar ta del av en fördjupad analys av flödescytometridata hänvisas till Bilaga A.

5.1 Vad händer med dricksvattenkvaliteten under ett ledningsarbete?

Nedan presenteras generella slutsatser som kan dras utifrån fallstudierna om vad som händer med odlingsbara mikroorganismer (mäts med 3-dygnsprov) och totalt antal bakterier (TCC, mäts med FCM) under ett ledningsarbete. Det är viktigt att komma ihåg att odlingsbara mikroorganismer och TCC endast är två av många parametrar som påverkar vattenkvaliteten. Resultaten från fallstudierna ger därför endast information om en liten del av alla förändringar som kan ske med vattenkvaliteten under ett ledningsarbete. Avsnittet avslutas med en diskussion om hur de mikrobiologiska processerna ser ut under ett ledningsarbete.

5.1.1 Vad kan vi utläsa av 3-dygnsresultaten?

Odlingsbara mikroorganismer visar för samtliga fallstudier stabila värden för referenspunkter medan värden för provpunkter varierar (Figur 4.4, Figur 4.8, Figur 4.13 och Figur 4.17). Att referenspunkten genomgående visar på stabila värden samtidigt som resultat från provpunkter ofta varierar indikerar att händelser/förändringar i ledningsnätet påverkar antalen odlingsbara mikroorganismer och kan detekteras med 3-dygnsanalys. Däremot är det svårt att med hjälp av 3-dygnsanalys beskriva vad som händer eller vad de varierande värdena beror på.

5.1.2 Vad kan vi utläsa av resultat från FCM?

För samtliga fallstudier var TCC vid provpunkten generellt högre än vid referenspunkten (Figur 4.5, Figur 4.6, Figur 4.9, Figur 4.14 och Figur 4.18). Detta tyder på att TCC påverkas av ledningsarbeten och FCM bör därför kunna användas för att detektera händelser i ledningsnätet, förutsatt att det finns ett referensvärde eller mätningar vid en referenspunkt att förhålla sig till. Liksom för odlingsbara mikroorganismer är det svårt att veta vad som händer när TCC förändras såväl som orsaken till ändringen.

5.1.3 Hur ser den mikrobiologiska processen ut?

En intressant frågeställning som lyftes under workshopen med olika VA-huvudmän (kapitel 3) är vilket agerande som är det rätta (inkoppling eller ej) då ett eller flera

godkända vattenprov följs av ett eller flera prov som sedan är tjänligt med anmärkning (TMA). En spännande tanke är om vi i vanliga fall avslutar provtagningen innan vi hunnit följa den mikrobiologiska utvecklingen? Av förklarliga skäl avslutas provtagningen när godkända resultat uppnåts. Kunskap om hur vanligt det är att gränsvärden överskrids efter godkännande och påkoppling av ledningar saknas, men Skovhus et al. (2019) menar på att det tar upp till flera veckor innan vattenkvaliteten i en nylagd ledning är stabil.

I våra fallstudier (kapitel 4) fortsatte provtagningen i vissa fall även efter det att godkända provresultat uppnåts och resultaten stödjer litteraturen och tillika VA-huvudmännens erfarenhet, det vill säga att provresultaten fortsätter att variera även efter det att godkända resultat uppnåts. Med detta sagt vill vi poängtera att de mikrobiologiska processerna är mer komplexa än att de låter sig beskrivas med ett visst gränsvärde som uppnås efter en viss tid. Kanske är det mer relevant att förhålla sig till referensprov eller en baslinje än förutbestämda gränsvärden. Vi vill slå ett slag för att utveckla riktlinjer kring användning av referensprov för att förenkla påkoppling vid sjunkande trend snarare än baserat på exakta gränsvärden.

För tre av fallstudierna visade 3-dygnsprov resultatet TMA vid en tidpunkt efter att två på varandra följande godkända prover erhållits. I Teckomatorp, där inga värden över 100 CFU/ml detekterades under provperioden, erhöles värden över Sydvattens interna gräns (50 CFU/ml) efter att två på varandra följande godkända prover, enligt samma gräns.

Det maximala värdet för odlingsbara mikroorganismer var högre efter de två nyanläggningarna än efter läckorna. Även variationen i värden för TCC var större efter nyanläggningarna än efter läckorna. Dock skiljde sig längden på provperioden mellan de olika fallstudierna och maximum för både odlingsbara mikroorganismer och TCC i Torna Hällestad inföll dag 20. Så länge höll inte provtagningen på vid läckorna i Teckomatorp och Nevishög. Det går inte att utesluta att högre värden hade detekterats efter de två läckorna om provtagningsperioden varit längre. Det finns även många andra faktorer utöver vilken typ av händelse som skett som påverkar de mikrobiologiska processerna, så som ledningsdimension och material vilket skiljde sig mellan de fyra fallstudierna.

Genom att jämföra resultat från nya och i branschen etablerade analysmetoder uppstår en spännande fråga – hur ska vi tolka situationen när antal odlingsbara mikroorganismer och TCC inte båda påvisar en händelse? Är det en händelse på ledningsnätet eller inte? Här krävs ökad kunskap om de mikrobiologiska processerna för att kunna bedöma vilken eller vilka analysmetoder som ger den mest rättvisa bilden av dricksvattenkvaliteten och som bör vara gällande.

5.2 Finns det något att vinna på effektivare analysmetoder vid ledningsarbeten?

En del av projektet har varit att samla in bransch-kunniga kollegors erfarenheter kring förutsättningarna för att genomföra effektiva ledningsarbeten. Vi ville veta om snabbare och effektivare analysmetoder kan vara ett sätt att underlätta eller spara resurser i ledningsarbetena, och i så fall under vilka förutsättningar.

5.2.1 Hur påverkas arbetenas tidplan av snabbare analysmetoder?

Sammanfattningsvis kan vi inte dra några generella slutsatser kring att snabbare analysmetoder skulle effektivisera ledningsarbetena i allmänhet. Dock finns det ledningsarbeten som planeras utefter särskilt kritiska resursramar (exempelvis genomförs under stor tidspress) där bedömningen är att snabbare analysmetoder skulle medverka till att arbetena kan genomföras enligt plan. Bland dessa finns situationer kopplade till spolningen, antingen på grund av begränsad spolkapacitet (hydrauliskt, vid spolning av stora ledningar eller begränsad vattentillgång) eller till svårigheter att avleda spolvatten. Situationerna kunde också vara relaterade till projekt där det snabbt uppstår eller

riskerar att uppstå problematiska effekter om entreprenaden står stilla (avsnitt 3.2). I rapportens inledning (kapitel 1) lyfts också aspekten att andra instanser i samhället kan ha kostnader till följd av ledningsnätsarbetet.

Behoven av att utveckla branschstandarder för hantering av vattenkvalitetsfrågor lyftes fram och relateras i denna rapport också till behovet av att branschen förhåller sig nyfiken, ifrågasättande och aktivt undersökande till nya analysmetoder som tillgängliggörs branschen och marknaden.

5.2.2 Vad innebär ”effektivare” analysmetoder?

Effektivitet behöver inte enbart betyda kortare svarstid på analyserna utan effektivitet kan även betyda lägre kostnader och mindre arbetsinsats för provtagning och analys. I syfte att ständigt förbättra etablerade arbetssätt kan det av denna anledning vara intressant att titta på nya analysmetoder, även om kostnaderna för analyser i sig endast utgör en mindre del av projektkostnaderna.

En annan aspekt av ”effektivitet” är om vi undersöker och analyserar rätt saker, vilket är direkt kopplat till kärnfrågan – har det vid arbetet skett någon kontaminering av ledningen som innebär att dricksvattnet kan vara hälsofarligt att konsumera? En analysmetod bör kunna bidra till att besvara denna fråga för att den ska anses vara effektiv att använda vid ledningsarbete.

Varken 3-dygnsanalys eller FCM är bra metoder för att undersöka ”hälsofara”. Då det inte finns något dokumenterat samband mellan hälsa och någon av metoderna är det svårt att svara på huruvida det är ett problem eller inte att höga värden för antingen mikroorganismer (3-dygns) eller det totala cellantalet (med FCM) detekteras. Eftersom oförutsedda ändringar i 3-dygnsprov i praktiken används som en indikator på att en händelse skett kan frågan ställas om siffran verkligen är intressant med bakgrund av att 3-dygnsprov kan visa på kraftigt ökande siffror samtidigt som det totala cellantalet är relativt oförändrat och vice versa. En annan fråga är vilken funktion en indikator på händelse fyller vid ett ledningsnätsarbete där vi vet att det har skett en händelse.

Förslag till intressanta framtida fördjupande studier är om det går att påvisa (i labbskala eller i fält) att exempelvis FCM-parametrarna samvarierar med påvisat hälsofarliga parametrar alternativt med indikatorparametrar (exempelvis med koliforma bakterier) och om det finns situationer i fält som särskilt bör beaktas.

5.3 Kan flödescytometri (FCM) vara en bättre metod än 3-dygnsprov för att följa den mikrobiologiska kvaliteten för dricksvattnet vid ledningsarbeten?

Sammanfattningsvis kan sägas att det, utifrån resultat från fallstudierna, inte verkas finnas någon korrelation mellan odlingsbara mikroorganismer och TCC. Detta stöds även av litteraturen (Siebel et al. 2008, Van Nevel et al. 2017). Ibland detekteras höga toppar med analys av 3-dygnsprov som inte detekteras med FCM och vice versa.

Genomgående för alla fallstudier är att den relativa skillnaden mellan det högsta och lägsta värdet var betydligt större för antalet odlingsbara mikroorganismer än för TCC (Tabell 5.1). Exempelvis är skillnaden mellan högsta värdet för odlingsbara mikroorganismer och TCC i Nevishög 1750 % respektive 3 % gånger det lägsta värdet under de sju första dagarna av provperioden. Detta talar inte nödvändigtvis mot någon av metoderna, men det gör att tolkningen av resultat skiljer sig mellan de två metoderna.

Värdet på TCC kan variera stort mellan olika dricksvatten, medan odlingsbara mikroorganismer ofta ligger nära noll för referensprov. Att TCC kan variera mycket framgår i jämförelsen som presenteras i Tabell 5.1, där värdet för TCC är cirka dubbelt så högt när dricksvattnet kommer från Vombverket än när det kommer från Ringsjöverket. Detta gör att gränsvärden inte kan användas på samma sätt som för odlingsbara mikroorganismer.

Med den kunskap som finns idag om FCM och om distributionssystemen som ingick i fallstudierna är det inte självklart hur resultaten från FCM ska tolkas utifrån ett driftperspektiv. För att kunna dra kvalificerade slutsatser baserat på TCC behövs mer information om distributionssystemet och om hur TCC förväntas bete sig efter ett ledningsnätarbete. Ska en ledning vara godkänd när samma värden visas i provpunkten som i referenspunkten, när det är en nedåtgående trend eller då stabila värden erhållits över en viss tid? Mer kunskap behövs för att besvara frågan.

Fallstudie	Råbylund	Torna Hällestad	Teckomatorp	Nevishög
Odlingsbara mikroorganismer (CFU/ml)	<1 - 750	<1 - 350	<1 - 50	10 - 175
TCC (Totalt antal bakterier/ml)	160 000 - 275 000	375 000 - 750 000	180 000 - 200 000*	370 000 - 380 000
Förhållande mellan min- och maxvärde TCC under provperioden	1:1,7	1:2,0	1:1,1	1:1,03
Typ av händelse	Nyanläggning	Nyanläggning	Läcka	Läcka
Vattenverk	Ringsjöverket	Vombverket	Ringsjöverket	Vombverket

*Värden från onlinebaserad FCM

Tabell 5.1

Jämförelse av högsta och lägsta värden för odlingsbara mikroorganismer och TCC för de fyra fallstudierna.

Under fallstudierna sammanföll godkända 3-dygnsprov med TCC-värden på mellan 189 000 och 523 000 celler/ml vid samma provtillfälle. Det visar på att odlingsbara mikroorganismer inte bör tolkas som en pålitlig indikation på det totala antalet bakterier. Däremot är det möjligt att odlingsbara mikroorganismer korrelerar med en delpopulation som kan identifieras genom vidare analys av data från FCM.

Att rakt av "byta" metod från 3-dygns till FCM låter sig inte enkelt göras. Vilken metod som ger det mest rättvisande svaret för att bäst beskriva vattenkvaliteten är däremot en separat fråga. 3-dygnsanalys är vår vedertagna metod i branschen idag – men inget facit. Vi kan inte jämföra en ny metod med 3-dygns och dess fasta gränsvärden på ett adekvat sätt och därför krävs ett annat perspektiv så som att istället utgå från trender eller basvärden för att kunna nyttja nya metoder.

5.3.1 Jämförelse mellan online eller manuell FCM

Under fallstudierna har både online (fältbaserade) och manuella (laboratiebaserade) flödescytometrar använts, varför det är intressant att resonera kring skillnader och möjligheter mellan de båda varianterna.

Sammanfattningsvis kan sägas att onlinebaserad FCM ger större förståelse för vattenkvaliteten. Fördelen ligger inte i analysmetoden i sig, då den är densamma för både online och manuell mätning, utan i att onlinemätning skapar tydligare och en mer detaljerad bild över förändringarna. Onlinemätningar möjliggör regelbunden och mer frekvent provtagning, vilket ökar chansen att fånga plötsliga och kortvariga händelser, samtidigt som man snabbare får en förståelse för när ett värde återgått till normalnivå. Stickprov kan leda till en missvisande tolkning av resultatet, antingen genom en över-skattning eller en underskattning av dygnsmedelvärdet (Besmer et al. 2016). I praktiken kan konsekvenserna bli att provtagningsperioden drar ut på tiden längre än vad som är nödvändigt eller att påkoppling sker för tidigt. Ett exempel på detta skedde under fallstudien i Råbylund där TCC ökade under dag nio, både enligt mätningar med onlinebaserad och manuell FCM. Utifrån mätningarna med manuell FCM togs nästa prov först efterföljande dag medan prover med onlinemätning visade att TCC var tillbaka på värden liknande de innan ökningen inom 10 timmar. Dessutom togs ett prov vid Referenspunkt R2 med onlinebaserad FCM som visade på en ökning av TCC. Sammantaget visade onlinemätningarna att ökningen var kortvarig och eftersom att referensen också påverkats sannolikt var orelaterad till nyanläggningsarbetet. Den manuella provtagningen kunde

ha föranlett fördröjning av inkoppling och fler provtagningar. I denna typ av situation skulle arbete och kostnader kopplat till en förlängd entreprenad kunna undvikas med hjälp av onlinemätning och användning av referensprov.

När det gäller möjligheter för provtagningsplats ställs högre krav för onlinemätning än för manuell provtagning, där flera kriterier måste vara uppfyllda för att en viss plats ska passa. Detta beror på att instrumentet måste kunna lämnas vid provpunkten utan uppsyn. Nedan listas ett antal kriterier som bör vara uppfyllda för en provpunkt för onlinebaserad FCM, men sannolikt för de flesta onlinebaserade mätinstrument:

- Inbrottssäkert
- Instrumentet ska inte påverkas av väder
- Stabil temperatur som inte är för låg eller hög
- Flödet till instrumentet ska kunna anpassas
- Strömförsörjning finns
- En lösning för avlopp finns
- En kommunikationslösning om instrumentet ska kunna skicka data

Vår slutsats från instrumentuppställningen i Råbylund är att ovanstående kriterier är svåra att uppfylla och att metodiken att undersöka ett ledningsarbete genom att lämna onlineinstrument ute i fält under flera dagar inte är en framkomlig väg. Det vill säga – metoden lämpar sig väl för att i forsknings- eller utvecklingssyfte lära mer om de mikrobiologiska processerna men kommer att vara mycket svår att skala upp för att utgöra ordinarie provtagning vid ledningsarbete.

5.3.2 Att etablera en ny metod i branschen

Många av de utmaningar som kommer med att implementera FCM som analysmetod inom en organisation är kopplade till det faktum att det är en ny metod i branschen och att kompetens, standarder och riktlinjer saknas. Den startsträcka som krävs innan metoden kan användas bör vägas in vid resursplanering inför implementering av FCM, eller andra alternativa (online)instrument för dricksvattenkvalitetsövervakning. För att kunna förstå och tolka resultat från FCM krävs stor kunskap kring dricksvattenkvaliteten i ens eget VA-system. Detta eftersom vad som är normala värden skiljer sig kraftigt mellan olika dricksvatten samt mellan olika anläggningsdelar i distributionssystemet. Potentiellt hade förståelsen för hur resultat från FCM ska tolkas kunnat öka med hjälp av modeller som kan länka FCM till andra parametrar så som exempelvis flödesriktning och vattenålder.

5.4 Förslag till fortsatt arbete

Under projektets gång har vi fått en inblick i de mikrobiologiska processerna som äger rum vid ledningsarbeten. Samtidigt har många nya frågeställningar och idéer väckts under arbetet. Vår förhoppning är att rapporten kommer inspirera till nya projekt och fortsatta studier inom ämnet. Nedan presenteras ett antal förslag på frågeställningar och uppslag för fortsatta studier.

- Följa ledningsarbeten även under en längre tid efter inkoppling. Hur ser det ut veckor eller månader efter inkoppling?
- Hur påverkar biofilm och dess etablering stabiliteten av vattenkvalitet i en nyanlagd ledning?
- Påverkar olika driftparametrar (exempelvis diameter och ledningsmaterial) tiden det tar innan en ledning kan kopplas in?

-
- Vilken effekt har spolning på mikrobiologin i en ledning? Vilka är de optimala förutsättningarna för effektiv spolning? Hade spolning kunnat ersättas med piggnings eller annan metod för rengöring?
 - Går det att använda FCM för att se samband mellan FCM-data och påvisat hälsofarliga parametrar eller indikatorparametrar (exempelvis koliforma bakterier)?
 - Kan mjukvara utvecklas för att underlätta analys av FCM-data?
 - Går det att påvisa (i labbskala eller i fält) att exempelvis FCM-parametrarna samvarierar med påvisat hälsofarliga parametrar alternativt med indikatorparametrar (exempelvis med koliforma bakterier)?
 - Ska en ledning vara godkänd när samma värden visas i provpunkten som i referenspunkten, när det är en nedåtgående trend eller då stabila värden erhållits över en viss tid?
 - Hur kan FCM utvecklas mot en mer robust metod som är mer lämplig att användas i fält?

6 Slutsatser

Nedan presenteras de viktigaste slutsatserna utifrån de tre frågeställningar som låg till grund för SVU-projektet.

Vad händer med dricksvattenkvaliteten under ett ledningsnätsarbete?

- Både totalt antalet bakterier (TCC, mäts med FCM) och odlingsbara mikroorganismer (mäts med 3-dygnsprov) påverkas av ledningsarbeten. Vi kan se att någonting händer men inte vad det beror på.
- Vid flertalet fallstudier erhöles prover som var tjänligt med anmärkning efter det att två på varandra följande prov godkänts. Med detta sagt vill vi poängtera att de mikrobiologiska processerna är mer komplexa än att de låter sig beskrivas med ett visst gränsvärde som uppnås efter en viss tid. Kanske är det mer relevant att förhålla sig till referensprov eller en baslinje än förutbestämda gränsvärden. Vi vill slå ett slag för att utveckla riktlinjer kring användning av referensprov för att förenkla påkoppling vid sjunkande trend snarare än baserat på exakta gränsvärden.

Finns det något att vinna på effektivare analysmetoder vid ledningsarbeten?

- Baserat på fallstudier, workshops och intervjuer kan få generella slutsatser dras kring huruvida snabbare analysmetoder skulle effektivisera ledningsarbetena i allmänhet. Dock finns det ledningsarbeten som planeras utefter särskilt kritiska resursramar (exempelvis under stor tidspress) där bedömningen är att snabbare analysmetoder skulle kunna medverka till att arbetena kan genomföras enligt plan.

Kan FCM vara en bättre metod än 3-dygnsprov för att följa den mikrobiologiska kvaliteten för dricksvattnet vid ledningsarbeten?

- Odlingsbara mikroorganismer och TCC påverkades inte av samma händelser. Detta betyder att:
 - FCM därför inte kan direkt ersätta 3-dygnsprov om det är odlingsbara mikroorganismer som ska mätas.
 - Antalet odlingsbara mikroorganismer inte är en bra indikation på det totala antalet mikroorganismer.
- Det är ofta svårt att hitta tillräckligt bra provpunkter för att onlinebaserad FCM ska kunna användas vid ledningsnätsarbeten.
- FCM har stor potential som metod för att öka kunskapen kring biologiska processer under ledningsarbeten men även i ledningsnätet generellt. Det finns även stora möjligheter att utveckla metoden för kvalitetsövervakning av dricksvatten.

Referenser

- Barup, J., Frihammar, E. (2020). Utvärdering och förslag till framtida arbete: Provtagning och analys på nyanläggningar. VA SYD. Diarienummer: 20/02042
- Besmer, M.D., Epting, J., Page, R.M., Sigrist, J.A., Huggenberger, P. and Hammes, F., (2016). Online flow cytometry reveals microbial dynamics influenced by concurrent natural and operational events in groundwater used for drinking water treatment. *Scientific Reports*, 6(1), pp.1-10.
- Cowle M W., Webster G., Akintunde O B., Bockelmann-Evans B N., och Weightman A J. (2020). Impact of Flow Hydrodynamics and Pipe Material Properties on Biofilm Development Within Drinking Water Systems. *Environmental Technology* (United Kingdom), 41 (28), Taylor & Francis: 3732–44. doi:10.1080/09593330.2019.1619844.
- Douterelo, I., S. Husband, V. Loza, and J. Boxall. (2016). Dynamics of Biofilm Regrowth in Drinking Water Distribution Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 82 (14). American Society for Microbiology 4155–68. doi:10.1128/AEM.00109-16.
- Douterelo, I., R. Sharpe, and J. Boxall. (2014). “Bacterial Community Dynamics During the Early Stages of Biofilm Formation in a Chlorinated Experimental Drinking Water Distribution System: Implications for Drinking Water Discolouration.” *Journal of Applied Microbiology* 117 (1). Blackwell Publishing Ltd: 286–301. doi: 10.1111/jam.12516
- Hammes, Frederik, Michael Berney, Yingying Wang, Marius Vital, Oliver Köster, and Thomas Egli. (2008). Flow-Cytometric Total Bacterial Cell Counts as a Descriptive Microbiological Parameter for Drinking Water Treatment Processes. *Water Research* 42 (1-2). Elsevier Ltd: 269–77. doi:10.1016/j.watres.2007.07.009.
- Learbuch, K. L. G., H. Smidt, and P. W. J. J. van der Wielen. (2021). Influence of Pipe Materials on the Microbial Community in Unchlorinated Drinking Water and Biofilm. *Water Research*, 194 (April), 116922. doi: 10.1016/j.watres.2021.116922.
- Liu, Sanly, Cindy Gunawan, Nicolas Barraud, Scott A. Rice, Elizabeth J. Harry, and Rose Amal. (2016). Understanding, Monitoring, and Controlling Biofilm Growth in Drinking Water Distribution Systems. *Environmental Science and Technology*, 50 (17), 8954–76. doi:10.1021/acs.est.6b00835.
- Livsmedelsverket (2021). Kontrollwiki – Webbplats för fördjupning – Dricksvatten – Kvalitetskrav – Mikrobiologiska parametrar. <https://kontrollwiki.livsmedelsverket.se/artikel/379/mikrobiologiska-parametrar#aktinomyceter> [Hämtad 2022-03-14]
- Sadler, M.C., Senouillet, J., Kuenzi, S., Grasso, L. and Watson, D.C. (2020). Computational surveillance of microbial water quality with online flow cytometry. *Frontiers in Water*, 2, p.45.
- Schleich, C., Chan, S., Pullerits, K., Besmer, M.D., Paul, C.J., Rådström, P. and Keucken, A. (2019). Mapping dynamics of bacterial communities in a full-scale drinking water distribution system using flow cytometry. *Water*, 11(10), pp. 2137.
- Siebel, E., Wang, Y., Egli, T. and Hammes, F. (2008). Correlations between total cell concentration, total adenosine tri-phosphate concentration and heterotrophic plate counts during microbial monitoring of drinking water. *Drinking Water Engineering and Science*, 1(1), pp. 1-6.
- SS ISO 6222:1999. Vattenundersökningar – Bestämning av odlingsbara mikroorganismer – Koloniräkning genom ingjutning i ett näringssubstrat med agar. Stockholm: Svenska institutet för standarder (SIS).

Skovhus, T.L., Søborg, D.A., Ramsay, L.M., Andreasen, J.O., Kristensen, K.B., Hansen, K.L. and Højris, B. (2019). The role of biofilms during commissioning of new drinking water PE pipes in Aarhus, Denmark. In Nordic Drinking Water Biofilm Symposium 2019.

Safford, H.R., Bischel, H.N. (2019). Flow cytometry applications in water treatment, distribution, and reuse: A review. *Water Research*. 15;151:110-133. doi:10.1016/j.watres.2018.12.016.

Svenskt vatten (2019). Svenskt vatten – Vattentjänster – Dricksvatten & hälsa – Riskanalys & provtagning – Mikroorganismer i vatten. <https://www.svensktvatten.se/vattentjanster/dricksvatten/riskanalys-och-provtagning/mikroorganismer-i-vatten/> [Hämtad 2022-06-13]

Svenskt Vatten (2021). P115 Rengöring av vattenledningar och reservoarer. Stockholm: Svenskt Vatten.

Van Nevel, Sam, S. Koetzsch, C. R. Proctor, M. D. Besmer, E. I. Prest, J. S. Vrouwenvelder, A. Knezev, N. Boon, and F. Hammes. (2017). Flow Cytometric Bacterial Cell Counts Challenge Conventional Heterotrophic Plate Counts for Routine Microbiological Drinking Water Monitoring. *Water Research* 113 (April): 191–206. doi:10.1016/j.watres.2017.01.065.

World Health Organization (WHO) (2013). Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety: The Significance of HPCs for Water Quality and Human Health. London, IWA Publishing. ISBN: 1 84339 025 6

Zamore, M. (2021). Exploring Flow Cytometry for Monitoring of Microbial Water Quality During Maintenance of Drinking Water Pipes. Master thesis. Lund University, Faculty of Engineering.

Bilagor

Bilaga A – Fördjupad analys av data från FCM

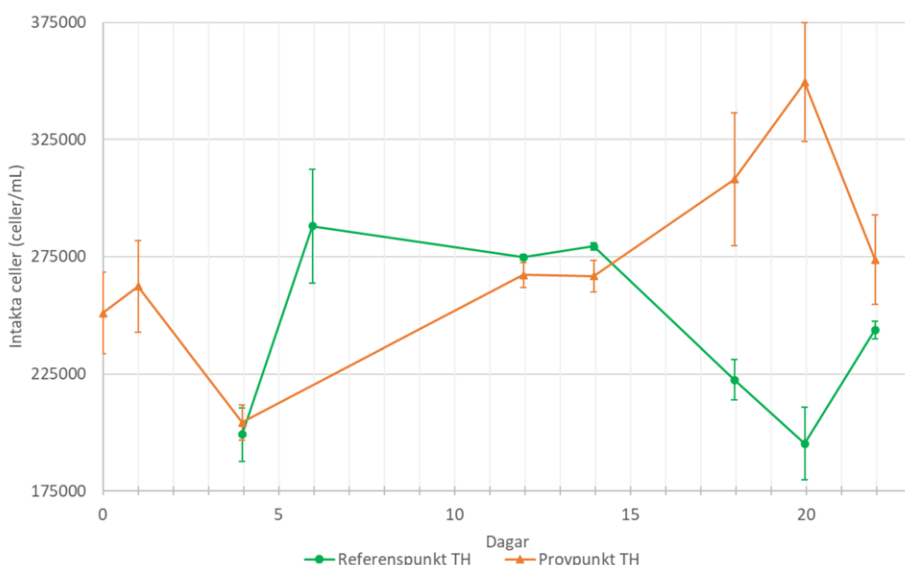
I denna bilaga presenteras fördjupade resultat från analys av data från FCM.

Antal intakta celler (ICC)

Torna Hällestad var den enda fallstudien där antalet intakta celler/ml, ICC, beräknades. Under provperioden följde ICC generellt samma trender som TCC (Figur 4.9) och odlingsbara mikroorganismer (Figur 4.8) även om ICC var omkring hälften så högt som TCC. Under dag 20, där ökning i både odlingsbara mikroorganismer och TCC detekterades, detekteras också en ökning i antal ICC (Figur A.1).

Tittar man endast på antalet ICC så är de inledningsvis relativt jämna och stabila, för att sedan avvika mot varandra från dag 14–20, då ICC i Referenspunkt TH minskar från cirka 275 000 till cirka 195 000, samtidigt som ICC i Provpunkt TH ökar från cirka 275 000 till cirka 350 000 under samma period (Figur). I detta fall ger ICC en liknande bild som TCC.

Både ICC och odlingsbara mikroorganismer inkluderar endast levande organismer där odlingsbara mikroorganismer är en delpopulation av ICC. Givet att andelen ICC/TCC varierar är ICC mer lämplig för att följa tillväxt eller andra förändringar i antalet totala levande mikroorganismer i ett vattenprov.



Figur A.1

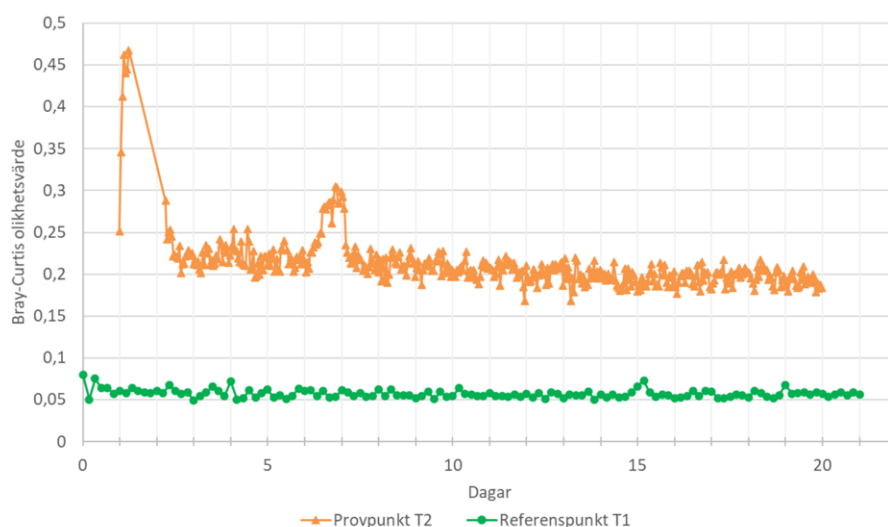
Andel ICC under ledningsarbete i Torna-Hällestad.

HNA/LNA-andel och Bray-Curtis olikhetsvärde

Andel HNA/LNA-celler samt Bray-Curtis olikhetsvärde är två olika fördjupade metoder för analys av sammansättningen av bakterierna detekterade med FCM, vilka användes i fallet Teckomatorp. Både Bray-Curtis olikhetsvärde (Figur A.2) och andel HNA/LNA-celler (Figur A.3) vid Provpunkt T2 och Referenspunkt T1 i fallstudien från Teckomatorp visar generellt på stabila värden under provperioden. Mellan dag sex och sju skedde en ökning för båda parametrarna. TCC visade de mest instabila värdena under ett dygn mellan dag sex och sju. Samtidigt minskade odlingsbara mikroorganismer från 36 till 18 CFU/ml vilket relativt till variationer under provperioden är en liten minskning. Det är möjligt att odlingsbara mikroorganismer var instabila mellan dag sex och sju men att detta inte upptäcktes då att endast ett manuellt prov togs dagligen.

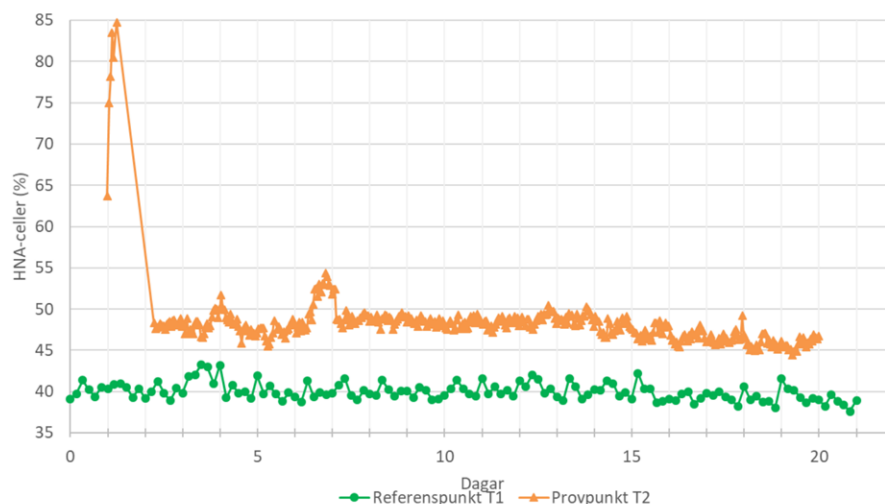
Under den sista delen av provperioden då TCC vid Provpunkt T2 börjar närma sig TCC vid Referenspunkt T1 sker samma sak för Bray-Curtis olikhetsvärde. Att Bray-Curtis olikhetsvärde vid provpunkten närmar sig samma värden som vid referenspunkten skulle kunna tyda på att den mikrobiologiska sammansättningen i biofilmen håller på att stabiliseras och homogeniseras i ledningen.

Samtidigt som ökningen av odlingsbara mikroorganismer mellan dag åtta och nio skedde (Figur 4.13) var värden för Bray-Curtis olikhetsvärde samt andel HNA/LNA-celler stabila. Att ändringar i odlingsbara mikroorganismer inte visas i andel HNA/LNA-celler och Bray-Curtis olikhetsvärde är inte konstigt, då odlingsbara mikroorganismer endast står för en liten andel av det totala antalet celler. För att få större förståelse för hur bakteriesammansättningen i ett vattenprov ändras kan andel HNA/LNA-celler samt Bray-Curtis olikhetsvärde för resultat från FCM användas.



Figur A.2

Bray-Curtis olikhetsvärde under ledningsarbete vid Teckomatorp.



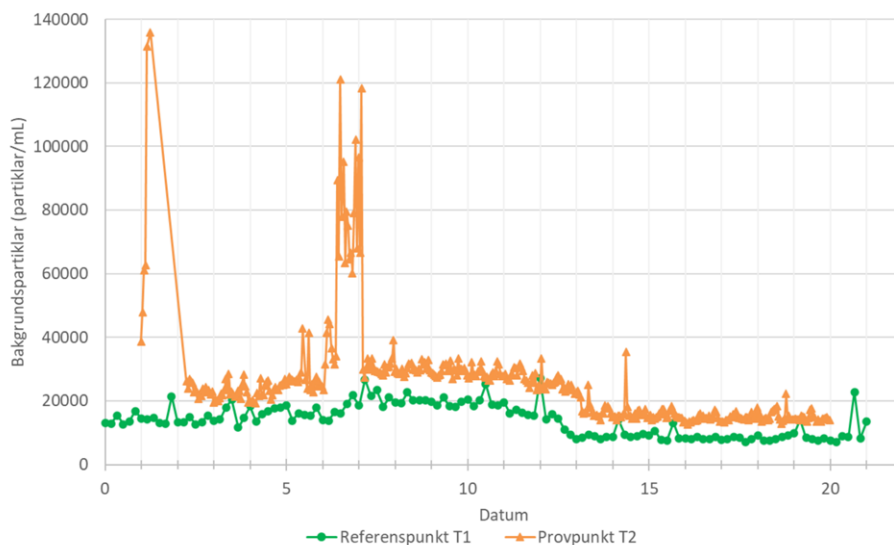
Figur A.3

Andel HNA-celler under ledningsarbete i Teckomatorp.

Bakgrundspartiklar

Det är möjligt att ändra gating för att titta endast på sammansättningen och antalet av partiklar som ej klassificeras som bakterier, kallat bakgrundspartiklar (Figur A.4). Detta kan ge insikt angående händelser i nätet som beror på driftförhållanden snarare än mikrobiologisk tillväxt i ledningen. I detta fall, när man tittar enbart på partiklar i FCM-data kan man utläsa att under perioden som avviker i Bray-Curtis och andel HNA/

LNA-celler mellan dag åtta och nio var även bakgrundspartiklarna förhöjda. Detta kan indikera att något har hänt som inte är direkt kopplat till tillväxt, så som att ledningen påverkats av tryck- eller flödesändringar.



Figur A.4
Bakgrundspartiklar
under ledningsarbete i
Teckomatorp.

Bilaga B – Datahantering och analys

Denna bilaga utgår från Måns Zamores examensarbete *Exploring Flow Cytometry for Monitoring of Microbial Water Quality During Maintenance of Drinking Water Pipes* som utfördes inom ramen för SVU-projektet under våren 2021.

Med flödescytometri mäts fluorescensen för varje partikel med flera detektorer, vilket resulterar i att stora datamängder genereras. Denna data kräver bearbetning för att kunna tolkas, vilket ställer vissa krav på användaren. I det här avsnittet beskrivs metod för datahantering och analys av data från fallstudierna som presenteras i kapitel 3.1.

De metoder som tillämpats för att analysera data är nya för analys av dricksvatten. För analys av data har det statistiska programmeringsspråket R (version 4.0.4) använts (R Core Team 2021). Metoden kan delas upp i fyra huvudsteg: Inläsning och förbehandling av FCS-filer, gating, fingeravtryck och cellräkning. Dessa beskrivs översiktligt i avsnitten 3.2.1 till 3.2.3.

Inläsning och förbehandling av FCS-filer

Flödescytometrifiler av standardformatet Flow Cytometric Standard (.fcs) lästes in med paketet flowCore version 2.3.2 (Ellis et al. 2021). Data renades från anomalivärden som kunde härledas till instrumentvariationer (så som stabilitet i flödes hastighet eller signalöverföring) med flowAI-paketet version 1.20.1 (Monaco et al. 2016). Rådata behölls dock för cellräkning, vilket rekommenderas av Rubbens och Props (2021). Transformation av data utfördes med arcus sinus hyperbolicus-funktionen, som till skillnad från den traditionellt använda logaritmiska transformationen även kan transformera negativa värden.

Gating

Den data som genereras av FCM innehåller alla partiklar som mäts, vilket även inkluderar partiklar som inte är celler. Därför krävs viss handpåläggning för att få information kring det totala antalet celler i provet. Detta görs genom gating, där data delas upp baserat på mätvärden från fluorescensdetektorerna.

För data från fallstudierna användes gating för att exkludera elektroniskt brus samt för att särskilja partiklar från celler med flowCore-paketet. Gatingstrategin baserades på Eawag-metoden (Gatza et al., 2013). För visualisering samt animation av data användes paket flowViz (Ellis et al. 2020) respektive animation (Xie, 2013).

Fingeravtryck

Avancerade metoder för att beräkna flödescytometriska fingeravtryck tillämpades med funktioner från paketet Phenoflow (Props et al. 2018). Fingeravtryck genererades genom att lägga ett rutnät av 256 rutor över datan och därefter räkna antalet celler i varje liten ruta. Därefter tillämpades normering till det lägsta antalet celler, för att bortse från variation som beror på antalet celler. Bray-Curtis olikhetsvärden beräknades med paketet vegan (Oksanen et al. 2020), med samma metod som Favere et al. (2020). Fingeravtrycken har i projektet visualiserats med hjälp av PCoA- samt Bray Curtis olikhetsvärden-figurer.

Cellräkning

Cellräkning genomfördes med hjälp av paketet flowCore. Räkning genomfördes i olika gater, nämligen gater motsvarande totalantal celler (i prover infärgade med endast SYBR green), intakta celler (i prover även infärgade med PI), bakgrundspartiklar (området ovanför cellgaten), samt HNA- och LNA-celler (där cellgaten delades upp i två gater för att särskilja mellan bakterier med mycket respektive lite DNA).

Referenser

- Ellis, B, R. Gentleman, F. Hahne, N. Le Meur, D. Sarkar, and M. Jiang. (2020). *flowViz: Visualization for Flow Cytometry*. Manual.
- Ellis, B, Perry Haaland, Florian Hahne, Nolwenn Le Meur, Nishant Gopalakrishnan, Josef Spidlen, Mike Jiang, and Greg Finak. (2021). *flowCore: flowCore: Basic Structures for Flow Cytometry Data*. Manual.
- Favere, Jorien, Benjamin Buysschaert, Nico Boon, and Bart De Gussemé. (2020). Online Microbial Fingerprinting for Quality Management of Drinking Water: Full-Scale Event Detection. *Water Research*, 170 (March): 115353. doi: 10.1016/j.watres.2019.115353.
- Gatza, E, F Hammes, and E Prest. (2013). Assessing Water Quality with the BD Accuri C6 Flow Cytometer. *White Paper*. BD Biosciences.
- Monaco, Gianni, Hao Chen, Michael Poidinger, Jinmiao Chen, João Pedro de Magalhães, and Anis Larbi. (2016). “flowAI: Automatic and Interactive Anomaly Discerning Tools for Flow Cytometry Data.” *Bioinformatics* 32 (16). doi: 10.1093/bioinformatics/btw191.
- Oksanen, Jari, F. Guillaume Blanchet, Michael Friendly, Roeland Kindt, Pierre Legendre, Dan McGinn, Peter R. Minchin, et al. (2020). *Vegan: Community Ecology Package*. Manual.
- Props, Ruben, Frederiek-Maarten Kerckhof, Pieter Monsieurs, Mohamed Mysara, Lieven Clement, and Nico Boon. (2018). *Phenoflow*. Manual.
- R Core Team. (2021). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Manual. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Rubbens, Peter, and Ruben Props. (2021). Computational Analysis of Microbial Flow Cytometry Data. *mSystems* 6 (1). Doi:10.1128/msystems.00895-20 .
- Xie, Yihui. 2013. Animation: An R Package for Creating Animations and Demonstrating Statistical Methods. *Journal of Statistical Software*, 53 (1): 1–27.

Svenskt Vatten

UTVECKLING

Svenskt Vatten Utveckling

Svenskt Vatten AB

POSTADRESS BOX 14057, 167 14 Bromma

BESÖKSADRESS Gustavslundsvägen 12, 167 51 Bromma

TELEFON 08-506 002 00

E-MAIL svensktvatten@svensktvatten.se

www.svensktvatten.se