



Foto: Adam M. Paruch

## Implementering av molekylærbiologiske metoder for kildeopsporing av fekal vannforurensning og vurdering av helsefare

Adam M. Paruch, Lisa Paruch og Trond Mæhlum, Bioforsk Jord og miljø, Ås  
Kontakt: adam.paruch@bioforsk.no

**Bioforsk har testet ut molekylærbiologiske metoder for sporing av fekale forurensningskilder som også gir grunnlag for å vurdere toksisiteten til visse bakterier. Det har stor betydning å utvikle effektive metoder som raskt kan oppdage og spore kilden til en *E. coli* smitte for å redusere eksponering og minimalisere helserisiko. Dette gjelder alle områder som ligger i risikozonen for fekal forurensning, særlig vannforekomster som benyttes til drikkevann og bading.**

Også innen matproduksjon (agroindustri og landbruk med vanning og organisk gjødsling), og i kartlegging av forurensningskilder i forbindelse med tiltaksgjennomføring i regi av Vannforskriften, kan dette være viktig. Metoden anvender såkalte vertsspesifikke genetiske markører fra *Bacteroidales* 16S rRNA for sporing av fekale forurensningskilder sammen med deteksjon av patogene Shigatoksinproduserende *E. coli* (STEC) i forurenset vann. Metoden kan spore om forurensninger kommer fra mennesker og/eller dyr (f.eks. beitedyr som storfe og hest, vilt eller fugler), og påvise om forurenset vann inneholder STEC patogener og utgjør en helserisiko.



Utslipp. Foto: Adam M. Paruch

### Bakgrunn

En rekke sektorer kan bidra til vannforurensning, blant annet næringsliv, bebyggelse og landbruk. I forhold til bebyggelse og landbruk, er det spesielt fokus på fekale indikatorbakterier og næringsstoff som påvirker vannkvaliteten. En av de mest anvendte indikatorbakterier for fekal forurensning er *Escherichia coli* (*E. coli*) som vanligvis vokser i tykktarmen hos varmblodige dyr og mennesker, og har derfor en eksklusiv fekal opprinnelse.

De fleste stammer av *E. coli* er ufarlige, men det er også mange typer som forårsaker sykdommer (også dødelige) hos mennesker og dyr, som f. eks. Shigatoksinproduserende *E. coli* (STEC). STEC gruppen har over 200 ulike serotyper, inkludert Enterohemorrhagisk *E. coli* (EHEC) som er svært sykdomsfremkallende. I tillegg representerer STEC den eneste typen som overføres mellom dyr og mennesker (zoonotiske bakterier) gjennom mat- og vannbåren smitte.

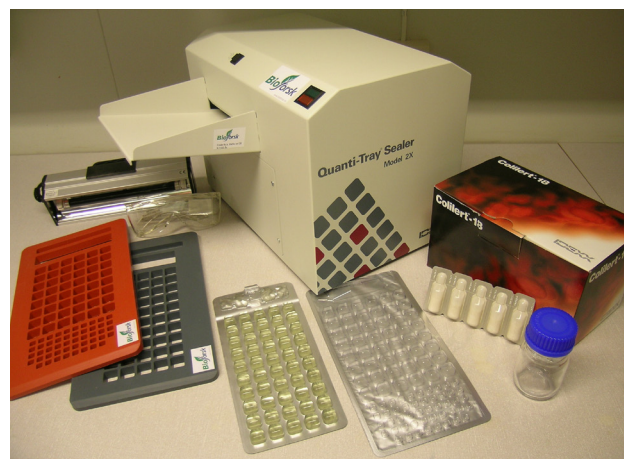
Det finnes flere mikrobielle metoder for å påvise *E. coli*, men ingen metoder kan skille på om den faktiske forurensningskilden er mennesker eller dyr eller angi patogenitet (positiv eller negativ).

### Konsept for fekalkildesporing

Informasjon om kildene er nødvendig for å kunne iverksette effektive tiltak mot tilførsler av fekale bakterier til vannforekomster og dermed redusere eksponering og helserisiko. Bioforsk har testet ut molekylærbiologiske metoder for sporing av fekale forurensningskilder sammen med deteksjon av STEC i forurenset vann.

### Fekal forurensning

Fekal forurensning betyr at forurensingen kommer fra mennesker eller dyrs avføring (f. eks. husdyr, vilt eller fugler). Forurensingen skjer hovedsakelig via lekkasje fra avløpsledninger, mangelfulle rensanlegg for spredt bosetting, avløpsslam, husdyrgjødsel og annen avføring med animalsk fekal opprinnelse. Fra disse kildene kan et høyt antall av *E. coli* bakterier forurense vannkilder direkte (drikkevann, vanning og bading) eller indirekte fra jord og vegetasjon via jordbruksavrenning, vanning og organisk gjødsling, særlig etter kraftig nedbør med påfølgende avrenning.



Colilert®-18 / Quanti-Tray®. Foto: Adam M. Paruch

### Metodikk

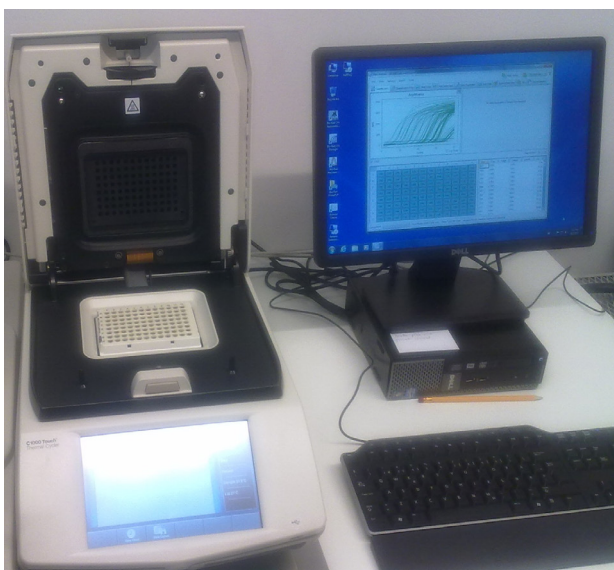
Metoden for fekalkildesporing består av to steg: 1 - påvisning av fekal forurensning gjennom analyser av *E. coli* og 2 – DNA tester for sporing av forurensningskilder og deteksjon av STEC patogener. Steg 1 gjennomføres med hurtigmetoden Colilert®-18 / Quanti-Tray® (ISO standard 9308-



2:2012). Metoden er en standard 18-timers test for undersøkelse av vannprøver. Steg 2 fokuserer kun på de fekal-positive prøvene fra steg 1. Disse blir videre analysert i DNA-tester baserte på qPCR (real-time quantitative polymerase chain reaction) metoder. De molekylærbiologiske metodene anvender vertsspesifikke genetiske markører som stammer fra *Bacteroidales* 16S rRNA gener for fekal kildeprosporing. I tillegg blir topp syv STEC serogrupper (O157:H7, O26, O45, O103, O111, O121 and O145) detektert ved qPCR analyser ved påvisning av stx1/stx2 og eae-gener. Vi har utviklet og validert en evalueringsmodell for å profilere bidragssamspill fra hver forurensningskilde.



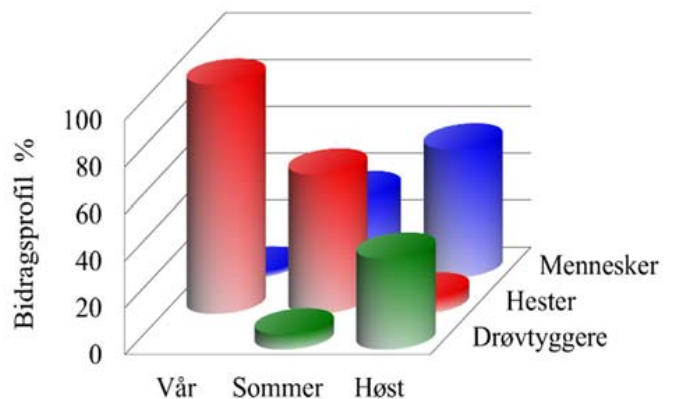
Resultat fra Colilert®-18 / Quanti-Tray®.



Bilde fra qPCR påvisning av vertsspesifikk markør.

### Erfaring og referanse

Så langt vi kjenner til har ikke slike metoder blitt benyttet til kildeprosporing av forurensninger i vann i Norge tidligere. Bioforsk testet i 2013 metoden i et typisk norsk jordbrukslandskap med dyrket mark og utslipp fra avløpsanlegg og husdyr på beite. Vertsspesifikke markører for mennesker (BacH) og utvalgte dyr, særlig drøvtyggere (BacR) og hester (BacHor) ble benyttet. Resultatene fra qPCR analysene viste hvor i nedbørfeltet fekal forurensning av vann fra dyr og/eller mennesker dominerte. Normalisering av mengder av ulike markører ble utført for å kunne sammenligne bidragseffekten. Et samlet bilde av forurensningene kunne deretter beskrives basert på det relative overskudd av markørene. På denne måten kan en spore kildene i vannforurensningen og spesielt fremheve den mest dominerende kilden.



Bidragsprofil av markører i fekal vannforurensning i et undersøkt nedbørsfelt.

De fleste stammer av *E. coli* er ufarlige, men det i tillegg ble STEC påvist i vannprøvene. Disse patogene bakteriene viste høy korrelasjon ( $R^2=0.928$ ) med markør for drøvtyggende husdyr (BacR). Våre undersøkelser så langt viser at denne typen molekylærbiologiske analyser kan være nyttige instrumenter for kildeprosporing og påvisning av helseserisiko ved fekal forurensning av vannforekomster.

## Samfunnsnytte og FoU

Molekylærbiologiske metoder for fekalkildesporing i vann har et stort anvendelsespotensiale i både FoU-prosjekter og overvåkningsprogrammer for forurensinger som truer helse og miljø. Vann til konsum, bading og vanning kan spores for fekalkilder. Vertsspesifikke genetiske markører (f.eks. drøvtyggere, hester, svin, fugler, osv.) kan bli implementert i standard tester. Slike analysemetoder kan brukes for å iverksette tiltak som kan begrense utslipp av fekal forurensning. Dette kan beskytte mennesker og miljø fra potensielt sykdomsfremkallende *E.coli* og andre organismegrupper som finnes i fekalier fra mennesker og dyr. Bioforsk foreslår derfor at metoden testes ut i samarbeid med myndigheter som har ansvar for miljø, helse og trygg mat.



Utslipp. Foto: Adam M. Paruch

Les også TEMA nr. 12 april 2014: [Spredt avløp i jordbrukslandskapet](#) av Anne-Grete Buseth Blankenberg, Marianne Bechmann, Lisa Paruch og Adam Paruch. Dette TEMA-arket ser på betydningen av spredt avløp for vannkvaliteten i utvalgte jordbruksområder gjennom ulike årstider. Det gir også informasjon om en metodikk som kan påvise tilførsler fra spredt avløp.

BIOFORSK TEMA  
vol 9 nr 19  
ISBN-13 nummer:  
978-82-17-01280-1  
ISSN nummer: ISSN 0809-8654

Ansvarleg redaktør:  
Forskningsdirektør Nils Vagstad

[www.bioforsk.no](http://www.bioforsk.no)