

	FOI MEMO	
	Projekt/Project	Sidnr/Page no
	Fekal källspårning av bad- och miljövattnen i Steninge	1 (10)
	Projektnummer/Project no	Kund/Customer
	E4580	Halmstads kommun
	FoT-område	
	Inget FoT-område	
Handläggare/Our reference	Datum/Date	Memo nummer/Number
Jon Ahlinder	2020-12-30	FOI Memo 7450

Källspårningsanalys av badvatten i Steninge samt tillflöden

*Jon Ahlinder, Björn Brindefalk, Emelie Salomonsson,
Caroline Öhrman*

FOI MEMO	Datum/Date	Sidnr/Page no
	2020-12-30	2 (10)
Titel/Title		Memo nummer/Number
Källspårningsanalys av badvatten i Steninge samt tillflöden		FOI Memo 7450

Bakgrund

Badplatsen i Steninge, Halmstad kommun, ligger i naturskönt läge och har många besökare under sommaren. Under senare år har det dock uppmätts förhöjda halter av fekala indikatorbakterier i anslutning till badplatsen, vilket ibland har orsakat otjänlig badvattenkvalité och därmed nedstängning. Vilken fekal källa som ligger bakom är oklart eftersom att detta är svårt att avgöra med enbart odlingsbaserade indikatoranalyser. Därför är det önskvärt med mer kunskap kring den källa/de källor som ger upphov till den fekala kontaminationen i syfte att snabbt kunna sätta in motåtgärder. Misstankar har riktats mot dels VA-/dagvattennätet som i sådana fall skulle läcka orenat avloppsvatten ut i tillflödena, dels mot djurhållning då det finns större djurbesättningar inåt land.

Målsättningen med denna undersökning var att med DNA-sekvenseringsteknik avgöra om den försämrade badvattenkvalitén vid Steningebadet utgörs av avlopp eller djurfekalier. Om föroreningen kommer från djur härrör dessa i sådana fall från boskap och/eller fåglar. Ett delmål är att ge en indikation på varifrån den fysiska föroreningen kommer (dvs. vilket tillflöde).

Resultat

Tre huvudsakliga källor för kontaminationen av badvattnet undersöktes:

1. ett dagvattenrör med ursprung i Steninge samhälle norr om badet,
2. en å med en pumpstation som rinner ut i södra änden av badet,
3. från havet.

De provtagningsplatser som valdes ut ses i figur 1, där den ordinarie provtagningsplatsen är viktig eftersom den är en referenspunkt med mycket indikatorbakteriedata tillgängligt från tidigare mätningar. Denna provtagningspunkt ligger vid den huvudsakliga badstranden. Prover från samtliga platser togs veckovis och frös ner där vissa valdes ut för vidare analys baserat på förhöjda indikatornivåer. Provtagningsinformation visas i tabell 1. Vattenkvalitén försämrades under provtagningsperioden, speciellt efter den 22/7 och flera prover hade indikatorvärden som renderade i anmärkningen att vattnet var otjänligt som badvatten (figur 2).

FOI MEMO	Datum/Date	Sidnr/Page no
	2020-12-30	3 (10)
Titel/Title		Memo nummer/Number
Källspåringsanalys av badvatten i Steninge samt tillflöden		FOI Memo 7450

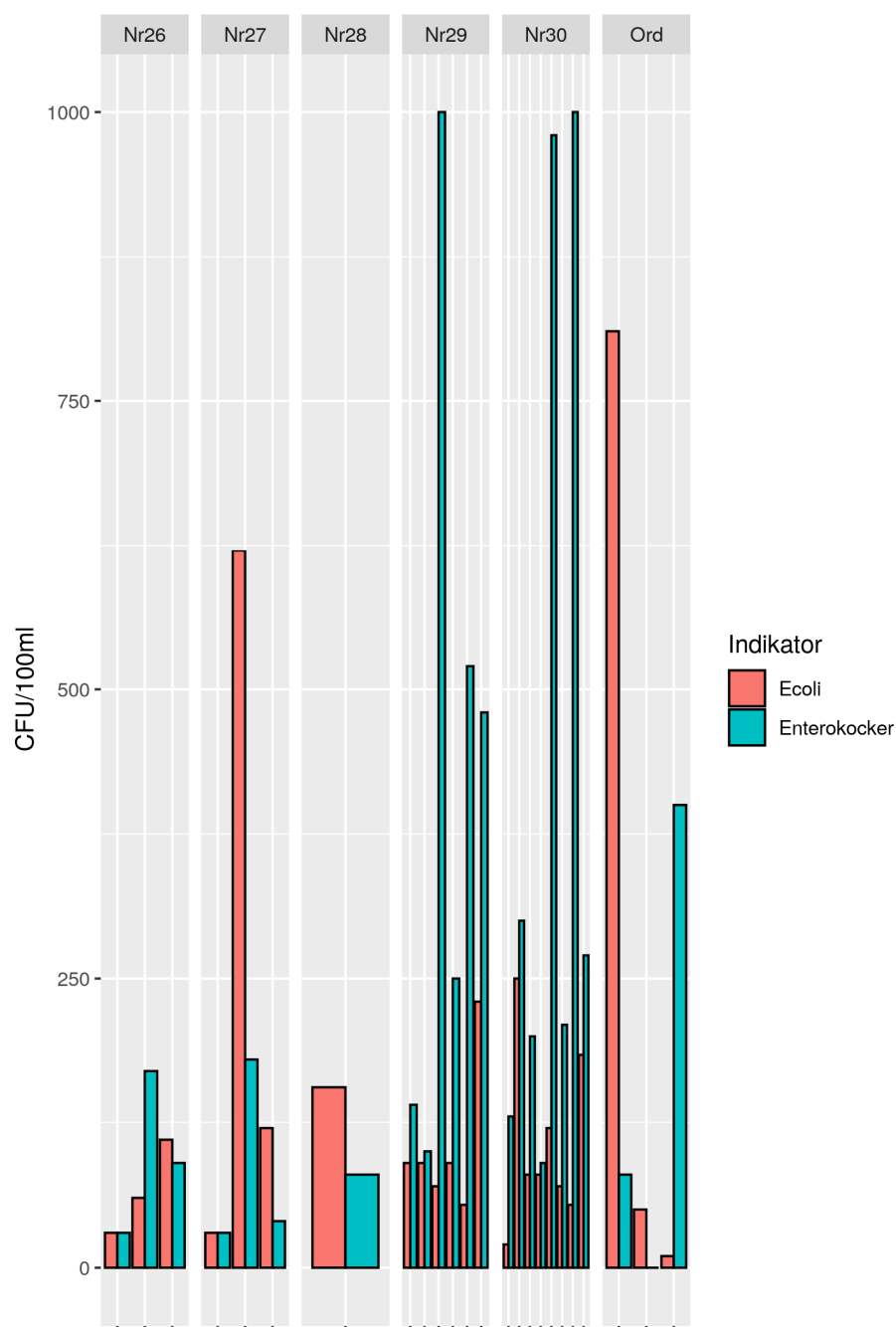
Tabell 1. Provtagningsinformation.

Plats (nummer)	Antal prover sekvenserade	Datum
Ordinarie	3	1/7, 22/7, 19/8
26	3	22/7, 5/8, 19/8
27	3	22/7, 29/7, 19/8
28	1	19/8
29	6	15/7, 22/7, 29/7, 5/8, 19/8
30	8	24/6, 1/7, 15/7, 22/7, 29/7, 5/8, 12/8, 19/8



Figur 1. Karta över provtagningsplatser i studien.

FOI MEMO	Datum/Date	Sidnr/Page no
	2020-12-30	4 (10)
Titel/Title		Memo nummer/Number
Källspåringsanalys av badvatten i Steninge samt tillflöden		FOI Memo 7450



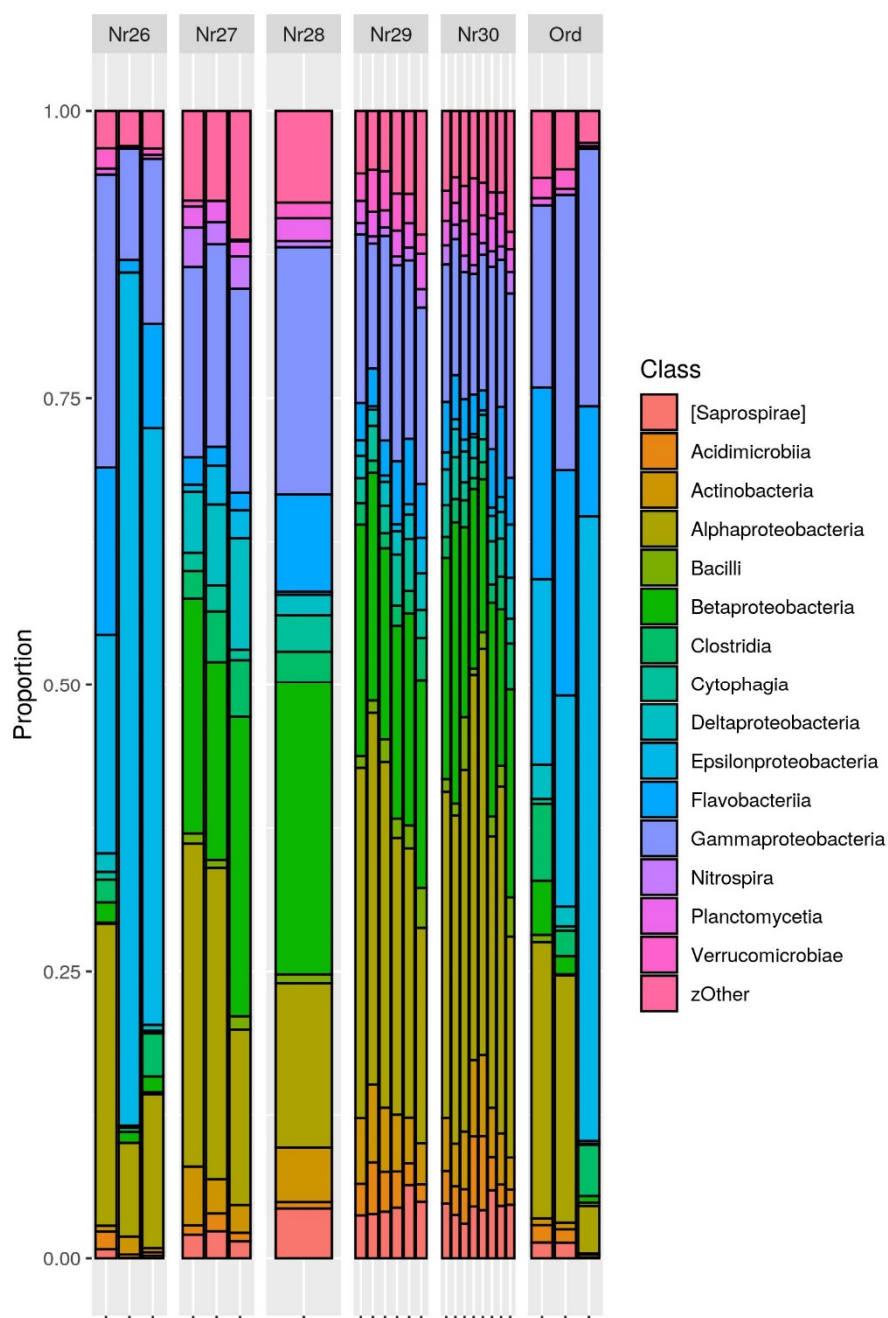
Figur 2. Odlingsbara fekala indikatororganismer (*E. coli* samt Enterokocker) uppmätt som kolonibildande enheter (CFU) / 100 ml, grupperade efter provtagningsplats.

Direkt efter provtagningen frystes samtliga prover in och proven med högst uppmätta indikatorvärden skickades till FOI i Umeå för sekvensering. För att kunna jämföra bakteriesammansättning med relativt opåverkade prover valdes ytterligare tre prover ut (utifrån indikatoranalyserna) Det var prover tagna vid plats 26, 27 och ordinarie plats den 22/7. Totalt sekvenserades 24 prover på en Illumina MiSeq, V3-V4- regionen av 16S rRNA-genen, som är designad för att plocka upp de flesta kända bakteriesläkten.

FOI MEMO	Datum/Date	Sidnr/Page no
	2020-12-30	5 (10)
Titel/Title		Memo nummer/Number
Källspårningsanalys av badvatten i Steninge samt tillflöden		FOI Memo 7450

Totalt genererades 4,9 miljoner 16S-sekvenser som varierade från 80 000 till 460 000 per prov. Den taxonomiska sammansättningen i proverna visas i figur 3 på klassnivå. Resultatet visar att andelen Epsilonproteobakterier varierade mycket mellan platser och fanns i störst andel på plats 26 och på ordinarie provtagningsplats. Denna grupp är intressant och består delvis av kemoorganotrofa organismer som vanligtvis hör hemma i tarmfloran hos människor och djur och bland annat omfattar släktena *Arcobacter*, *Campylobacter* och *Helicobacter*.

FOI MEMO	Datum/Date	Sidnr/Page no
	2020-12-30	6 (10)
Titel/Title		Memo nummer/Number
Källspåringsanalys av badvatten i Steninge samt tillflöden		FOI Memo 7450

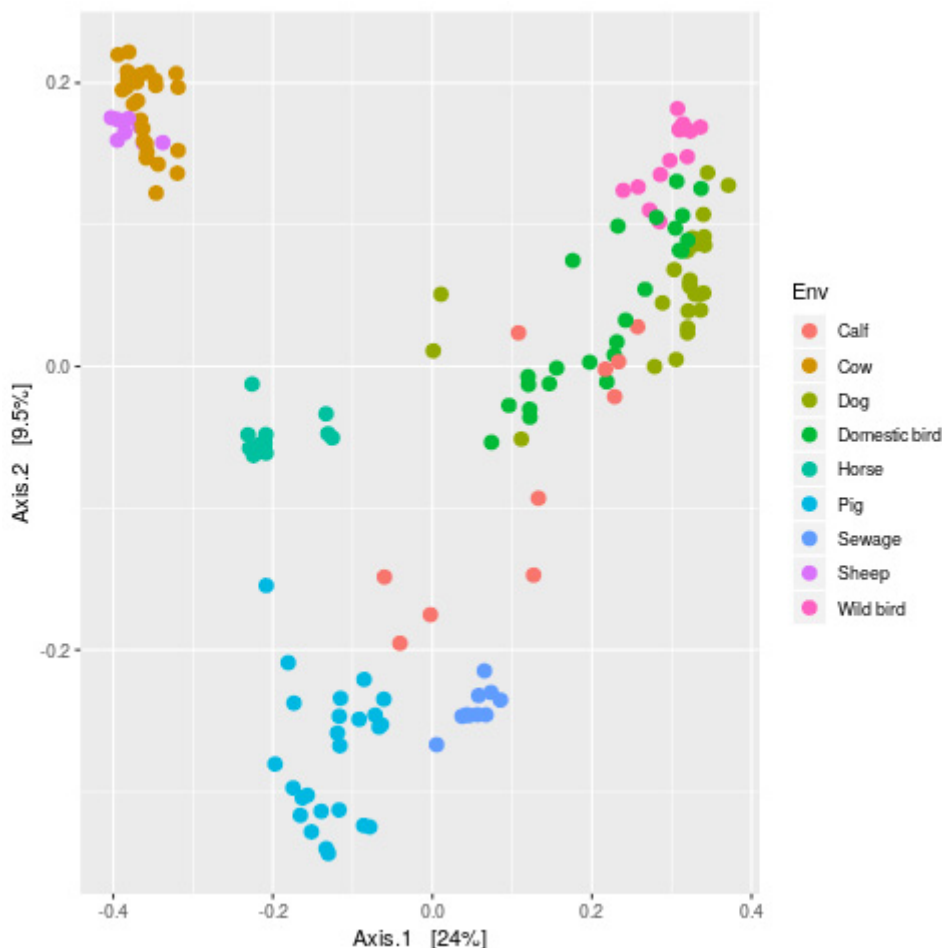


Figur 3. Bakteriesammansättning hos proverna på den taxonomiska nivån klass, där prover är uppdelade efter plats i första hand och sorterade efter datum.

En analys för att spåra källan till förorening utfördes med mjukvaran SourceTracker [Knights *et al.* 2011] på erhållet sekvensdata. Som referensbibliotek i denna analys användes samma uppsättning som i Hägglund *et al.* [2018] där typiska föroreningskällor för svenska förhållanden finns representerade. Prover och vilka källor som dessa prover representerar utifrån referensbiblioteket visualiseras här med en ordinationsanalys (figur

FOI MEMO	Datum/Date	Sidnr/Page no
	2020-12-30	7 (10)
Titel/Title		Memo nummer/Number
Källspåringsanalys av badvatten i Steninge samt tillflöden		FOI Memo 7450

4). För att minska risken för falska positiva detektioner användes även en miljöbakgrund i biblioteket där olika badvatten i tidigare projekt fanns sekvenserade.



Figur 4. Taxonomiska skillnader mellan bakteriesamhällen som ingår i det fekala biblioteket där de två mest informativa principalkomponenterna visas. Varje samhälle är färgat efter fekal källa. Dessa data är hämtat ifrån Hägglund *et al.* [2018] och används i källspåringsanalysen som referenskällor.

På de sex provtagningsplatserna detekterades två fekala källor; avlopp och vildfågelfekalier (som inkluderar skrattnås-, kanadagås- och gråtrutfekalier), se figur 5. I fem av sex provtagningsplatser detekterades någon av dessa fekala källor, men på en plats (nr 27) dock nära brusnivåer. Av dessa fem platser detekterades avlopp på tre platser, vildfågel på tre platser och både avlopp och vildfågel på plats 27, havsvattnet i Norrviken. Avloppsrelaterade bakterier detekterades i två av tre prover tagna på platserna 26 (norra dagvattenröret) och vid ordinarie provtagningsplats (badet), vilket gör det troligt att dessa platser ofta kontamineras av avlopp då indikatornivåerna är förhöjda (ett av de tre proverna på båda platserna var utvalda som negativ kontroll). De bakteriegrupper som låg bakom avloppssignalerna utgjordes av släktena:

- *Treponema* (släkte), *Spirochaetes* (fylum), där vissa arter har visats härstamma ifrån tarmfloran hos människor [Angelakis *et al.* 2019]

FOI MEMO	Datum/Date	Sidnr/Page no
	2020-12-30	8 (10)
Titel/Title		Memo nummer/Number
Källspåringsanalys av badvatten i Steninge samt tillflöden		FOI Memo 7450

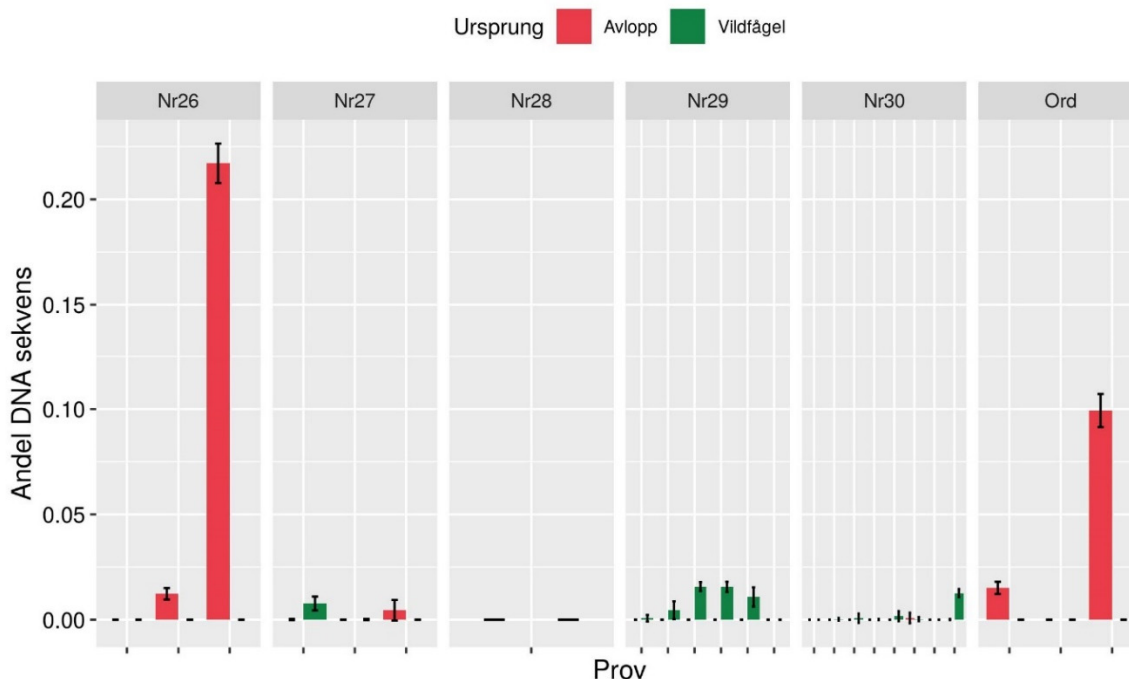
- *Arcobacter* (släkte), Proteobakterier (fylum)
- *Fusobacteriales* (familj), Fusobakterier (fylum) där flera arter existerar i tarmfloran hos människor [Khan *et al.* 2012]
- *Thiothrix* (släkte) som har påträffats i orenat avloppsvatten och slamanläggningar [Hudson *et al.* 1994, Howarth *et al.* 1999]
- *Plaudibacter* (släkte), Bacteroidetes (fylum), där vissa arter har visats härstamma ifrån tarmfloran hos människor [Dioletis *et al.* 2020].

För vildfågelfekaliesignalen stod bland annat dessa bakteriesläkten:

- *Cetobacterium somerae* (art) Fusobacteria (fylum) är en fekalt associerad bakterie hos många djur och människor
- *Chryseobacterium* (släkte), Bacteroidetes (fylum), har påträffats i en mängd olika djur

En vildfågelsignal detekterades i det relativt opåverkade provet på plats 27 den 22/7, då indikatornivåerna var låga.

Den sista provtagningsomgången, från den 19:e augusti 2019, var mest förorenad, med avseende på både fekala indikatorbakterier och på DNA-sekvensering. Det var dock inte möjligt att spåra den fekala källan i vissa av proverna som hade mycket höga indikatorvärden, exempelvis som på plats 30. För att få en bättre uppfattning om ursprung till föroreningen krävs en riktad provtagning över tid samt ett utökat antal platser.



Figur 5. Andel DNA-sekvenser som kan härledas till källorna avlopp (röd) och vildfågel (grön). Standardavvikelsen på skattningen visas som streck vid toppen av stapeln. Proverna är indelade efter provtagningsplats.

FOI MEMO	Datum/Date	Sidnr/Page no
	2020-12-30	9 (10)
Titel/Title		Memo nummer/Number
Källspårningsanalys av badvatten i Steninge samt tillflöden		FOI Memo 7450

Sammanfattning

Under sommaren 2019 uppmättes fekala indikatorbakterier vid Steningebadet. Källspårningsanalys av dessa prover pekar på att den tydligaste källan är humanfekalier, som troligtvis kommer från dagvattenledningar, även om andra tillflöden inte kan uteslutas. Även bakterier som associerar till vildfågelfekalier detekterades. Utökad provtagning är önskvärd för att ytterligare ringa in vilka fysiska källor som bidrar med kontaminationerna och se om dessa är stabila över tid.

FOI MEMO	Datum/Date	Sidnr/Page no
	2020-12-30	10 (10)
Titel/Title		Memo nummer/Number
Källspåringsanalys av badvatten i Steninge samt tillflöden		FOI Memo 7450

Referenser

- Angelakis E, Bachar D, Yasir M, Musso D, Djossou F, Gaborit B et al. (2019) *Treponema* species enrich the gut microbiota of traditional rural populations but are absent from urban individuals, *New Microbes and New Infections*, 27: 14–21.
- Dioletis E, Paiva R, Kaffe E Secor ER, Weiss TR, Fields MR, Ouyang X och Ali A (2020) The Fermented Soy Beverage Q-CAN® Plus Induces Beneficial Changes in the Oral and Intestinal Microbiome, 10.21203/rs.3.rs-26827/v1.
- Howarth R, Unz RF, Seviour EM, Blackall LL, Pickup RW, Jones JG, Yaguchi J och Head IM (1999) Phylogenetic relationships of filamentous sulfur bacteria (*Thiothrix* spp. and Eikelboom type 021N bacteria) isolated from wastewater treatment plants and description of *Thiothrix eikelboomii* sp. nov., *Thiothrix unzii* sp. nov., *Thiothrix fructosivorans* sp. nov. and *Thiothrix defluvii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1817-1827.
- Hudson R, Williams C, Seviour RJ och Soddell JA (1994) Variation in phenotypic characters of type 021N from activated sludge systems. *Water Sci. Technol.* 29, 143-147.
- Hägglund M, Bäckman S, Macellaro A, Lindgren P, Borgmästars E, Jacobsson K, och Ahlinder J. (2018) Accounting for Bacterial Overlap Between Raw Water Communities and Contaminating Sources Improves the Accuracy of Signature-Based Microbial Source Tracking, *Frontiers in Microbiology*, 9 (October), 1–15.
- Khan MT, Duncan SH, Stams AJ, van Dijk JM, Flint HJ, Harmsen HJ (2012). The gut anaerobe *Faecalibacterium prausnitzii* uses an extracellular electron shuttle to grow at oxic-anoxic interphases". *The ISME Journal*. 6 (8): 1578–85.
- Knights D, Kuczynski J, Charlson ES, Zaneveld J, Mozer MC, Collman RG och Kelley ST (2011). Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking. *Nature Methods*, 8(9), 761–763. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1650>.