

21.07.2020

Genetisk profilering av bakteriesamfunn – en metode for å spore forurensning til sjø

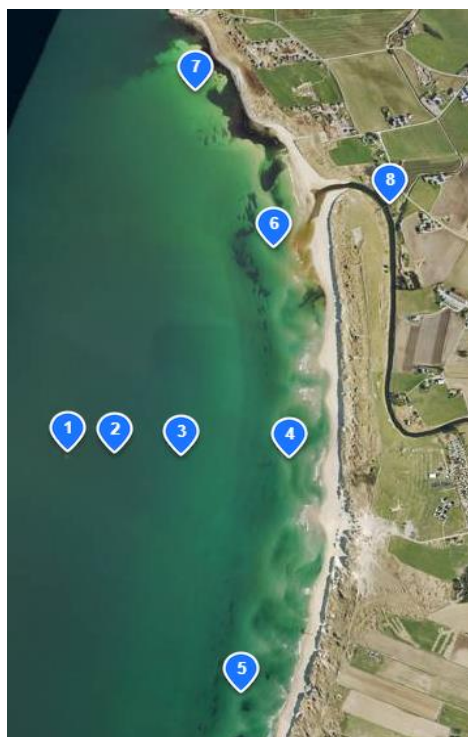
Andrea Bagi¹ og Geir Skogerbø²

¹NORCE Norwegian Research Centre AS, Nygårdsgaten 112, 5008 Bergen; ²IVAR IKS, Breiflåtveien 16/18, 4017 Stavanger,

IVAR IKS har ansvaret for rensing av avløpsvann fra kommunene på Jæren og i Ryfylke. Utslippspunktene fra rensesanleggene kan i noen tilfelle muligvis være i konflikt med nærings- og friluftinteresser, som oppdrettsanlegg og badestrender. Utslippsledningen fra rensenanlegget på Bore har utslippspunkt ca. 1 km utenfor Bore-sanden (figur 1, pkt. 1), som benyttes en del til bading i sommermånedene, og er et godt eksempel på en slik mulig konflikt. I tillegg til utslippsledningen har også Figgjoåna som drenerer et område med høy husdyrtetthet, utløp på stranda. IVAR var interessert i å se om utslippet fra avløpsledningen påvirket bakteriefloraen inne på stranda. Vanlige analyser av tarmbakterier (*E. coli*, termofile koliforme bakterier) viste at disse var til stede både i avløpsvannet og i Figgjoåna, og derfor ikke kunne brukes til å skille de to forurensningskildene.

Det ble derfor bestemt å bruke molekylærgenetiske analyser av hele bakteriesamfunnet i et antall prøvepunkter langs stranda ved Bore (figur 1; prøvepunkt 1 er utslippspunktet for avløpsvannet, prøvepunkt 9 [ikke vist] er selve rensenanlegget). Disse analysene går i korthet ut på at man ekstraherer DNA fra hele bakteriesamfunnet i en prøve. Deretter amplifiseres¹ et segment av DNA som finnes hos de fleste bakterier (16S rDNA), men som også har større og mindre variasjoner i sammensetning (sekvens) og lengde. Man får da et «amplikon», som er et sett med DNA-molekyler fra hver prøve som tilsvarer antallet og typen (bakterieslekten) av de bakterier som var i prøven.

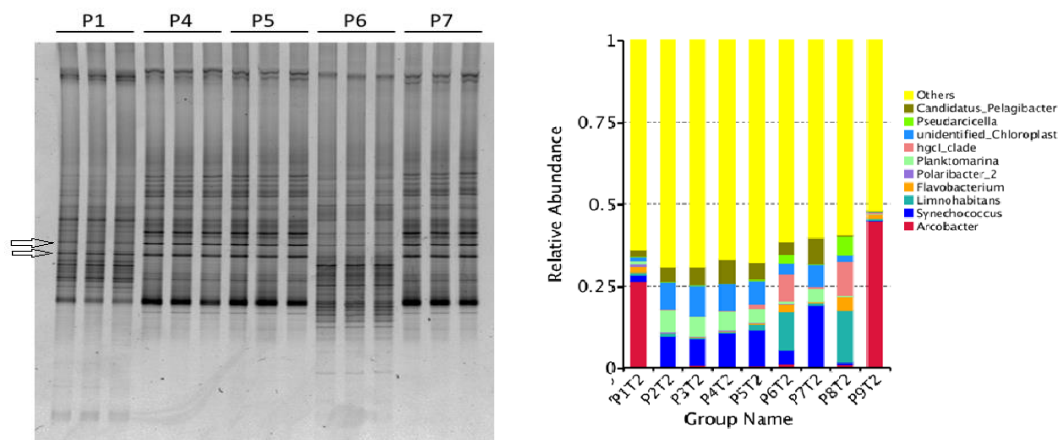
Den videre analysen ble utført DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) eller sekvensering. I DGGE analysen lar man amplikonene vandrer over gel som er slik at DNA-molekyler med ulike sammensetning og/eller lengde vil vandre til ulike punkter i gelen før de «denaturerer» og stopper. Det dannes da bånd i gelen, der hvert bånd [i prinsippet] representerer en bakterietype (slekt), og i intensiteten på båndet tilsvarer den relative mengden av denne bakterietypen i bakteriesamfunnet. Man får da et «fingeravtrykk» av hele bakteriesamfunnet, og kan vurdere den relative innflytelsen fra ulike forurensningskilder på prøvepunktet. Figur 2A viser et eksempel på DGGE av noen amplikoner fra den siste prøvetakingen (11.9.2019). Vi ser at prøvene fra P1 (oppvelling av avløpsvann) er svært forskjellige fra de andre «rene» sjøvannsprøver langs kysten (P4, P5 og P7); dvs. at avløpsvannet har



Figur 1. Oversikt over prøvepunktene

¹ Amplifiseringen, dvs den «kjemiske oppformeringen», blir gjort med PCR (polymerase chain reaction).

sterk på virkning på sjøvannet rundt P1. Dette betyr at avløpsvannforurensning beveger seg ikke i retning mot stranda. Fra DGGEanalysen kommer det også tydelig frem at Figgjoåna (P6) skiller godt fra P1



Figur 2. DGGE og sekvensering av av amplicon fra prøvetakingen 11.9.2019. A (venstre). DGGE. Hvert prøvepunkt er representert med tre replikater. Sammenligner vi P4, P5 og P7 (prøvepunkter langs stranda) ser vi at disse er svært like, og representerer i hovedsak bakteriesamfunnet i sjøvannet ved Bore. Prøve P1 er tatt i oppvellingpunktet over utløpsledningen og er svært forskjellig fra P4, P5. B (høyre). De vanligste bakterietypene i prøvene fra 11.9.2019.

Alternativt kan ampliconene sekvenseres, det vil si at basesammensetningen (ATGC) leses direkte. Sekvensen fungerer da som en «strekkode» som ikke bare gir informasjon om mengdeforholdet mellom ulike bakterietyper, men også informasjon om hvilke bakterieslekter som faktisk finnes i prøven. Sekvenseringsanalysen identifiserte totalt 1175 «bakterietyper» (otu; operational taxonomic units). Figur 2B viser resultatet av sekvensering av ampliconer fra alle prøvepunktene fra prøvetakingen den 11.9.2019 («T2»). Som det fremgår av figuren, er *Arcobacter* den dominerende bakterietypen i avløpsvannet fra renseanlegget (P9). Dette er en bakterieslekt som av og til utgjør en høy andel av bakteriefloraen i avløpsvann. Den har imidlertid den spesielle egenskapen at den (i motsetning til de fleste andre bakterier) sedimenterer lite ut sammen med partikulært materiale i avløpsvannet, og det er derfor mulig at rensemetoden på Bore fører til at den relative andelen av *Arcobacter* i utløpsvannet blir høy. Denne bakterietypen utgjør bare en minimal andel av bakteriesamfunnet i Figgjoåna (P8). Som vi ser er *Arcobacter* fraværende (< 1 %) i alle prøver innover og langs stranda (bortsett fra P6, som er påvirket av Figgjoåna). På den andre siden er heller ikke påvirkningen fra Figgjoåna (representert ved f. eks. *Limnohabitans*, *Flavobacterium* eller *hgcI_clade* (*Actinobacteria*)) spesielt sterk denne dagen.

Oppsummert tyder undersøkelsene på at selv om både utslippspunktet fra avløpsledningen og Figgjoåna kan ha til dels høye TKB-verdier, så gir dette små utslag langs stranda på Bore. En totalvurdering basert på de mikrobiologiske profilene av avløpsvann og elvevann tilsier også at en eventuell påvirkning fra begge ikke er særlig sterk. Prosjektet har således vist at molekylærgenetiske analyser av mikrofloraen kan være et hensiktsmessig redskap for å vurdere påvirkning av potensielle forurensningskilder på ulike deler av resipienten.