

Bevattningsvatten

Kunskapsunderlag



Folkhälsomyndigheten



Denna titel kan laddas ner från: www.livsmedelsverket.se/bestall-ladda-ner-material/.

Citera gärna Livsmedelsverkets texter, men glöm inte att uppge källan. Bilder, fotografier och illustrationer är skyddade av upphovsrätten. Det innebär att du måste ha upphovsmannens tillstånd att använda dem.

© Livsmedelsverket, 2019.

Författare:

Livsmedelsverket: Jakob Ottoson, Rikard Dryselius, Mia Egervärn, Karin Jacobsson och Åsa Svanström. FOI: Mats Forsman, Jon Ahlinder och Moa Hägglund. Folkhälsomyndigheten: Caroline Schönning och Anneli Carlander. RISE: Charlotta Löfström och Jimmy Kjellén. SVA: Josefine Elving. SLU: Beatrix Alsanius och Lars Mogren..

Rekommenderad citering:

Livsmedelsverket, FOI, Folkhälsomyndigheten, RISE, SVA och SLU. 2019. S 2019 nr 02: Bevattningsvatten.
Livsmedelsverkets samarbetsrapport. Uppsala.

S 2019 nr 02

ISSN 1104-7089

Omslag: Livsmedelsverket

Förord

Denna rapport är ett kunskapsunderlag som tagits fram inom ramen för projektet ”Kontaminering av ätbara vegetabilier med förorenat bevattningsvatten – riskbaserade riktlinjer och konsensus i övervakningen”. Projektet finansierades av Myndigheten för samhällsskydd och beredskap (MSB) och pågick 2015 – 2017. Förutom Livsmedelsverket deltog Folkhälsomyndigheten, Totalförsvarets forskningsinstitut (FOI), Jordbruksverket, Research Institutes of Sweden (RISE), Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA) samt Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) i projektgruppen¹. Ett särskilt tack till Bengt Gunnarsson och John Wikström för hjälp med provtagningen.

Det har skett en trend under de senaste decennierna med fler fall och utbrott orsakade av ätbara vegetabilier. Vidare är utbrotten ofta svåra att spåra; sällan kan man fastställa orsaken till föroreningen, men bevattningsvatten anses vara en viktig källa. På flera håll inom landet konkurrerar bevattningen med vattenuttag för andra behov men även konkurrens mellan odlare förekommer. Med torrare klimat på många ställen i Sverige under växtsäsong ökar trycket på vattentäkterna vilket riskerar att försämra kvaliteten på vattnet samt leda till en begränsning av uttaget vilket riskerar produktkvaliteten.

Det finns ett behov av vägledning. Detta blev tydligt vid den workshop som hölls drygt halvvägs in i projektet till vilken odlare, bransch och kontrollmyndigheter var inbjudna. Syftet med workshopen var dels att redogöra för vad vi hade gjort inom projektet, men framför allt att få reda på vilka behov som finns, vilket i huvudsak var två saker: 1. Tydliga riktlinjer från ansvariga myndigheter, samt 2. Enkel och tillgänglig information. Detta fick till följd att vi under det sista året av projektet fokuserade på att ta fram lättillgängligt material inom några särskilda delar där vi i projektgruppen ansåg att det fanns såväl behov som tydliga vinster i form av säkrare produktion av högkvalitativa vegetabilier:

1. Rädd för vatten – ta prover! – Analyser och provtagningsintervall²
2. Vattenrening för ökad hygien vid odling av frilandsgroänsaker och bär
3. Håll bevattningsrören rena – skötsel av utrustning för bevattning
4. Anläggning av bevattningsmagasin – samla in vatten under vintern
5. Lagar och regler vid uttag av vatten för bevattning

Dessa är publicerade i serien LTV-fakultetens faktablad som ges ut av Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) och är till för att användas i utbildningsyfte eller direkt av odlare.

Jakob Ottoson, projektledare, augusti 2018

¹ Medverkande forskare: Livsmedelsverket: Jakob Ottoson, Rikard Dryselius, Mia Egervärn, Karin Jacobsson och Åsa Svanström. FOI: Mats Forsman, Jon Ahlinder och Moa Häggglund. Folkhälsomyndigheten: Caroline Schönning och Anneli Carlander. RISE: Charlotta Löfström och Jimmy Kjellén. SVA: Josefine Elving. SLU: Beatrix Alsanius och Lars Mogren.

² Detta underlag fanns framtaget av SLU (som ingick i projektgruppen) sedan tidigare och bedömdes fortfarande vara aktuellt.

Innehåll

Förord.....	3
Ordlista.....	7
Sammanfattning.....	9
Summary.....	10
Irrigation water.....	10
Inledning.....	11
Syfte och avgränsningar.....	11
Livsmedelshygien i primärproduktion.....	11
Bakgrund.....	12
Bedömning av vattenkvalitet.....	13
Indikatorer för bedömning av vattenkvalitet.....	13
Riktlinjer och regelverk inom EU för bedömning av vattenkvalitet.....	14
Svenska regler och råd för bedömning av vattenkvalitet.....	15
Kvalitetssäkringssystem.....	16
IP frukt & grönt.....	16
Global GAP.....	17
Nationella branschriktlinjer.....	17
Lagar och regler om vattenuttag.....	18
Undersökningar.....	19
Bevattningssystem och provtagning.....	19
Resultat från provtagningar av vatten.....	21
Mikrobiologisk kvalitet vid vattenkälla.....	21
Mikrobiologisk kvalitet vid spridare.....	22
Mikrobiologisk kvalitet före och efter transport i rörsystem.....	25
Mikrobiologisk kvalitet före och efter lagring i magasin.....	25
Mikrobiologisk kvalitet före och efter desinficering med UV/fotokatalys.....	26
Förekomst av bakteriofager.....	27
Resultat från provtagning av grödor.....	28
Mikrobiologisk kvalitet på grödor.....	28
Resultat – sammanfattning.....	31
Vattenkvalitet hos svenska odlare.....	31
Förorening av grödor hos svenska odlare.....	31
Amplikonsekvensering som komplement till traditionella indikatorer.....	32
Kvantitativ riskvärdering.....	33

Faroidentifiering.....	33
Farokarakterisering	33
Exponeringsuppskattning.....	34
Riskkarakterisering	35
Känslighetsanalys	37
Dataluckor	37
Riskhanteringsåtgärder	39
Dammar.....	39
Vattenkvalitet och provtagning.....	39
Vattenrening.....	40
Utrustning.....	40
Karenstider	41
Sköljning	41
Slutsatser	42
Förekomst av patogener och indikatorer.....	42
Riskvärdering.....	42
Riskhantering.....	43
Referenser	44
Bilaga 1. Mikrobiologiska analysmetoder	48
Vatten.....	48
Grödor	48
Bilaga 2. Amplikonsekvensering.....	50
Bakteriesamhällen i vatten och livsmedel.....	53
Karakterisering av diversiteten i bevattningsvatten	53
Signaler för fekalier och potentiella patogener i bevattningsvatten	55
Korrelationsanalyser	57
Källspårningsanalyser	58

Ordlista

Amplikonsekvensering – Sekvensering av ett specifikt DNA- eller RNA-segment (amplikon). I projektet sekvenserades ett specifikt uppförökat segment av 16S rDNA vilket ger svar på vilka bakteriefamiljer och/eller släkten som finns i ett prov

Bakteriofager – Virus som infekterar bakterier. Analys av bakteriofager gjordes inom projektet som en indexorganism (se nedan) för närvaro av tarmvirus såsom norovirus som orsakar vinterkräksjuka.

Borra – (Djup)borrad brunn, i vilket vattnet oftast har en bra mikrobiologisk kvalitet.

E. coli – *Escherichia coli*, är en bakterieart som främst lever och förökar sig i tarmen hos varmblodiga djur. De allra flesta *E. coli*-bakterier är harmlösa, men vissa stammar kan orsaka magsjuka. Dessutom är *E. coli* den bakterieart som orsakar flest urinvägsinfektioner och blodförgiftningar i Sverige. I projektet analyserades *E. coli* som en fekal indikator (se nedan).

ESBL-bildande *E. coli* – *E. coli*-bakterier som kan producera enzym (extended spectrum beta-lactamase) vilket gör dem resistent mot flera typer av betalaktamantibiotika såsom penicilliner och cefalosporiner. En eventuell infektion med ESBL-bildande *E. coli* är särskilt svårbehandlad.

Fekala indikatorer – Organismer som analyseras i syfte att mäta avföringspåverkan i ett prov, t.ex. *E. coli* och enterokocker. Närvaro av fekal förorening innebär större sannolikhet för förekomst av magsjukesframkallande mikroorganismer.

Fotokatalys – Rening av vatten med hjälp av UV-ljus och titandioxidmembran. En fotokatalytisk process leder till nedbrytning av föroreningar till vatten och koldioxid. Dock erhålls sällan full nedbrytning genom fotokatalys.

Indikatororganismer – Organismer som analyseras för ett specifikt syfte såsom att 1. bedöma hur effektiv en beredningsprocess är eller förutsättningar för mikrobiologisk tillväxt (generella indikatorer), 2. närvaro av fekal förorening (fekala indikatorer) eller 3. Organismer som efterliknar beteendet hos vissa sjukdomsframkallande mikroorganismer och därmed indikerar närvaro av dessa (index- och modellorganismer).

Koliforma bakterier – definieras som alla aeroba och fakultativt anaeroba, gramnegativa, icke sporbildande, stavformiga bakterier som förjäser laktos med gasbildning inom 48 timmar vid 35 - 37 °C; omfattar bland annat släktena *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* och *Klebsiella*. I projektet analyserades koliforma bakterier som en generell indikator (se ovan).

Shigatoxinproducerande *E. coli* (STEC) – Specifika stammar av *E. coli* som har förmågan att producera shigatoxin. Infektion med STEC kan ge allt ifrån milda symptom till blodig diarré samt leda till njursvikt. Sjukdomen hos människa benämns enterohemorragisk *E. coli* (EHEC).

Triplikat – Tre oberoende prover (replikat) från en provtagningskälla (t.ex. tre salladshuvuden från ett fält) tagna vid samma tillfälle. Ett salladshuvud utgör ett replikat.

Sammanfattning

Livsmedel från växtriket kan i vissa fall sprida mikrobiologisk smitta. Bär, bladgrönt och groddar medför en särskild risk. Det beror på att de ofta äts råa eller efter minimal tillredning. Vi värmer dem inte innan vi äter dem.

Om livsmedlen är kontaminerade är det med stor sannolikhet orsakat av bevattningen. Vattnet kan ha varit påverkat av avföring. Det kan också bero på spillning från vilda djur. Även naturgödsel kan förorena produkterna vid stänk från jord.

Syftet med detta projekt var att se över kvaliteten på vatten för bevattning i Sverige. Vi ville koppla det till mikrobiologiska risker och utifrån det ta fram underlag till nationella råd och riktlinjer. Målet är ”en säkrare produktion av ätfärdiga bär och grönsaker som bättre förebygger sjukdomsutbrott”.

Det visade sig att kvaliteten på vattnet generellt sett var god hos odlarna i projektet. Det samma gäller grödor. I vatten hittade vi enstaka sjukdomsframkallande mikroorganismer och ESBL-bildande *E. coli*. Dessa hittade vi dock endast i ytvatten som var mer förorenade av avföring och spillning. Men endast ett fåtal prov på gröda visade på högre fekal förorening. Majoriteten av dessa kom från en och samma odlare, som bevattnade med vatten från en damm. Vi hittade inga patogener på grödor. Däremot var ett prov på vitkål positivt för ESBL-bildande *E. coli*.

Vi gjorde en kvantitativ riskvärdering av Shigatoxinproducerande *E. coli* (STEC) från isbergssallat. Den visade att även en liten förorening orsakad av avföring och utan påvisade STEC-bakterier i bevattningsvattnet kan utgöra en risk för mag-och tarminfektion. Riskvärderingen kan användas som underlag för att föreslå mikrobiologiska kriterier, till exempel på vattenkvalitet. Vi behöver dock beakta osäkerheterna med värderingen. De viktigaste osäkerheterna var utsöndringen av och patogeniciteten hos STEC från infekterade nötkreatur. Hur mycket av dessa fastnar på den bevattnade grödan? Hur stor är sannolikheten att infekteras vid låga doser (enstaka STEC-bakterier)? Och hur stor är risken av stänk från jord?

Det finns olika åtgärder att ta till för att minska sannolikheten för utbrott och sjukdomsfall. Dessa är 1. Kriterier för vattenkvalitet. 2: Rening av vatten som inte uppnår dessa kriterier. 3. Införa en uppehållstid mellan sista bevattning och skörd. 4. Dessutom kan konsumenterna skölja produkterna innan de konsumerar dem. Det är också viktigt att se till att hålla utrustningen ren, exempelvis rör och munstycken. På så vis undviks föroreningar och tillväxt av bakterier.

Om ytvatten måste användas för bevattning under de sista två veckorna innan skörd bör ett provtagningsprogram utformas. Proven bör då visa på låg fekal förorening samt avsaknad av *Salmonella*. I bästa fall bör ytvatten renas före bevattning. Detta kan göras till exempel med hjälp av fotokatalys, UV-ljus eller filtrering. De sista två dagarna före skörd bör dock endast vatten av dricksvattenkvalitet användas.

I en framtid med sjunkande grundvattennivåer, torrare somrar och blötare vintrar finns ett behov av att samla in vatten för bevattning. Det bör göras under höstregn och vårflooder, samt vintertid. Vattnet får sedan lagras i magasin. Vatten från bevattningsmagasin kan behöva renas innan det används för bevattning beroende på hur skyddat magasinet är från föroreningar.

Summary

Irrigation water

Vegetable products such as berries, leafy greens and sprouts pose a particular risk of transmitting infectious diseases since they are eaten raw. Irrigation using faecally contaminated water is the most likely source of infectious agents but wild animal faeces and manure can also contaminate the products from soil. The purpose of this project was to provide an overview of irrigation water quality in Sweden, link it to microbiological risks and, based on this information, develop data for national guidelines with the aim of safe production of edible berries and vegetables that better prevent disease outbreaks.

The quality of both water and crops was generally good at the farms included in the project. Pathogens and ESBL-producing *E. coli* were occasionally found in water. However, these were only isolated from surface water samples that were more polluted with respect to faecal indicators. Only a few crop samples showed higher faecal contamination. The majority of these samples were from one farmer using pond water for irrigation. No pathogens were detected on the crops. However, one cabbage sample tested positive for ESBL-producing *E. coli*.

A quantitative risk assessment of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) from iceberg lettuce showed that even low faecal contamination and the absence of detected pathogens in irrigation water can still pose a risk of gastrointestinal infection. This risk assessment can provide the basis for microbiological criteria, for example, with regard to water quality. However, the uncertainties associated with the risk assessment need to be taken into account. The main uncertainties were 1: the excretion and pathogenicity of STEC from infected cattle, 2: the proportion of these that adhere to the irrigated crop, 3: the likelihood of being infected at low doses (single STEC bacterium) and 4: the importance of soil contamination.

Various measures that can reduce the likelihood of foodborne outbreaks and disease cases are 1: criteria for water quality, 2: purification of water not achieving these criteria, 3: residence time between irrigation and harvest and 4: consumers rinsing the produce. It is also important for farmers to keep equipment such as pipes and nozzles clean to avoid contamination and bacterial growth.

If surface water is used for irrigation (for example, in the absence of a safe groundwater supply), during the two weeks prior to harvest, a sampling programme should be implemented to ensure low faecal contamination and the absence of Salmonella. However, only water of drinking water quality should be used two days prior to harvest. It would be preferable for surface water to undergo purification before irrigation. This can be achieved, for example, by photocatalysis, UV light or filtration.

In a future with decreasing groundwater levels, drier summers and rainier winters, there is a need to collect water for irrigation during the autumn rains, spring floods and wintertime to be stored in reservoirs for later use. Water from reservoirs may need purification before being used for irrigation, depending on how protected the reservoir is from contamination.

N.B. The title of the publication is translated from Swedish, however no full version of the publication has been produced in English.

Inledning

Syfte och avgränsningar

Syftet med detta projekt var att skapa en översikt över bevattningsvattenkvalitet i Sverige, koppla denna till mikrobiologiska risker och utifrån detta ta fram underlag till nationella råd och riktlinjer. Målet är en säkrare produktion av ätbara bär och grönsaker som bättre förebygger sjukdomsutbrott.

- Projektet avsåg att undersöka den mikrobiologiska kvaliteten på bevattningsvatten, men inte sköljvatten och annat processvatten som senare i produktionen kan kontaminera produkten.
- Projektet avsåg att undersöka den mikrobiologiska kvaliteten på bevattningsvatten för odling av ätbara grönsaker och bär och inte för produkter som normalt upphettas innan förtäring.
- Projektet avsåg endast att ta fram underlag till råd och riktlinjer, men inga nya regler, till aktörer och verksamhetsutövare. Syftet är att verksamhetsutövare, baserat på detta, ska ta fram sina egna (bransch)riktlinjer.
- Inga nya analysmetoder utvecklades inom ramen för projektet eftersom befintlig metodik hos de samverkande myndigheterna redan täckte projektets behov. Däremot användes mer avancerad metodik (amplikonsekvensering) i analyserna än vad som är brukligt vid analys av vatten och livsmedel. Detta gjordes i syfte att framgent kunna utveckla nya metoder för att identifiera faror och spåra utbrott.

Livsmedelshygien i primärproduktion

Grönsaks- och bär odlare och andra inom primärproduktion betecknas som livsmedelsföretagare och är ansvariga för säkerheten av sina produkter. För att uppnå en hög skyddsnivå för människors hälsa bygger livsmedelslagstiftningen på riskanalys (förordning (EG) 178/2002). Lagstiftningen är målinriktad och beskriver därför inte vad som rent praktiskt behöver göras i verksamheten för att uppfylla målen utan alla företagare ska ha rutiner för en säker och hygienisk produktion, inklusive rutiner för egenkontroll, så att målen i lagstiftningen uppfylls (LRF, 2014). För att förhindra kontaminering med smittämnen via bevattningsvatten ska det vatten som används vid produktion av växtprodukter vara tillräckligt rent - dricksvatten eller rent vatten - för att inte medföra en hälsorisk för konsumenter (bilaga I till förordning (EG) 852/2004 om livsmedelshygien). Som stöd till företagen för att uppnå detta har ett antal riktlinjer och kvalitetssäkringssystem tagits fram på olika nivåer (se nedan).

Bakgrund

Andelen livsmedelsburna utbrott som kan spåras till konsumtion av vegetabilier har ökat under de senaste decennierna. Denna ökning kan inte enbart förklaras av en ökad konsumtion (EFSA 2013b). Vegetabilier, särskilt bär, bladgrönt och groddar, medför en särskild risk avseende spridning av mikrobiologisk smitta eftersom de ofta äts råa eller efter minimal tillredning och inte genomgår värmebehandling. Detta åskådliggjordes av det stora utbrottet av *E. coli* O104:H4 i Tyskland 2011 som kunde härledas till förorenade groddar (Buchholz, *et al.*, 2011). Ett utbrott som ledde till att drygt 3 800 personer insjuknade varav 54 avled (EFSA, 2013a). I Sverige insjuknade 135 personer 2005 i enterohemorragisk *E. coli* (EHEC) efter konsumtion av isbergssallat (Soderstrom, *et al.*, 2008).

Att spåra smittämnen till ätfärdiga vegetabilier är dock mycket svårt. Vanligtvis hinner blandningar av produkter konsumeras och dessutom är hållbarheten ofta kortare än den tid det tar att upptäcka smitta hos konsument. Detta gör det svårt att peka ut en specifik produkt, eftersom eventuellt 'bevismaterial' redan är försvunnet när en utbrottsutredning påbörjas (Lynch, *et al.*, 2009, Mikhail, *et al.*, 2018). Verifierade utbrott har oftast orsakats av frysta hallon kontaminerade med norovirus (EFSA, 2014a). Detta beror sannolikt på att det är en av få ätfärdiga vegetabilier som förses med förlängd hållbarhet genom infrysning utan föregående värmebehandling, vilket medför att material finns kvar för provtagning under utredning.

Parallellt med och delvis på grund av svårigheter med smittspårning vet man relativt lite om hur smittämnen når bär och grönsaker. En särskilt tillsatt expertpanel inom EFSA har dock gjort bedömningen att avföringspåverkat vatten som används för bevattning och även besprutning av bär och grönsaker sannolikt utgör en särskilt stor risk (EFSA, 2013b, EFSA, 2014a, EFSA, 2014b). Ett flertal större EHEC-utbrott som har skett i bland annat USA (tomater, bladgrönsaksblandning, spenat) (Crowe, *et al.*, 2015), Kanada (sallat) (Tatarym, *et al.*, 2014), Finland (sallat) (Nousiainen, *et al.*, 2016) och Sverige (sallat) (Soderstrom, *et al.*, 2008) stödjer denna bedömning.

Trots uppenbara risker och återkommande kriser orsakade av förorenat bevattningsvatten är kunskapen om dess kvalitet låg i Sverige. Avsaknad av regelverk och tydliga riktlinjer innebär att enskilda aktörer och producenter själva avgör både om och hur kvaliteten på bevattningsvattnet ska bedömas. I vissa fall nyttjas kvalitetsindikatorer och gränsvärden i råd och regelverk avseende annat vatten, som exempelvis bassäng- och strandbad eller dricksvatten från enskild brunn, för kvalitetsbedömning (se vidare nedan) (Alsanius, 2014). Flera av dessa indikatorer är dock inte anpassade för att bedöma avföringspåverkan, och därmed inte heller möjlig förekomst av tarmsmitta. Därför kan värdet av analyserna vara mycket begränsat ur riskhänseende. Behovet av bättre kunskap om och en riskbaserad övervakning av bevattningsvattens kvalitet är därför stort.

Bedömning av vattenkvalitet

Indikatorer för bedömning av vattenkvalitet

Inventering av föroreningskällor i och kring vattentäkten ger ett viktigt underlag avseende potentiellt föroreningstryck på och sannolika mikrobiologiska risker i bevattningsvattnet. En övervakning av vattenkvaliteten är nödvändig för att bedöma denna påverkan. Direkt mätning av sjukdomsframkallande mikroorganismer är svårt eftersom de ofta förekommer i låga halter och är både kostsamma och tidskrävande att analysera. Därför övervakas vanligtvis mer lättanalyserade indikatorer som på olika sätt och i olika grad kan relateras till förorening och risk (Tabell 1).

Indikatororganismerna kan delas upp i tre olika typer (Anon, 2017b):

- Generella mikrobiologiska indikatorer används för att bedöma effektivitet i beredningsprocesser och förutsättningar för mikrobiologisk tillväxt.
- Fekala indikatorer antyder närvaro av fekal förorening och därmed risk för förekomst av sjukdomsframkallande mikroorganismer.
- Index- och modellorganismer omfattar organismer som indikerar närvaro av respektive efterliknar beteende hos sjukdomsframkallande mikroorganismer. Till exempel är *E. coli* indexorganism för Salmonella och somatiska kolifager modellorganism för patogena tarmvirus.

Tabell 1. Indikatoranalyser och generell kommentar om deras egenskaper

Parameter/analys	Kommentar
Odlingsbara mikroorganismer, 22 °C, 3d	Generell mikrobiologisk indikator med begränsad koppling till fekal förorening. Kraftigt förhöjda halter kan i vissa fall indikera risk. Analystid tre dygn.
Koliforma bakterier	Svag fekal indikator eftersom många arter förekommer och kan tillväxa i miljön, till exempel i ett bevattningsmagasin. Kan indikera ytvattenpåverkan av ett grundvatten. Analystid 18-24 h.
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	Viktig fekal indikator med ytterst begränsad förmåga att tillväxa i miljön. God korrelation till förekomsten av STEC och Salmonella i internationella studier. Analystid 18-24 h.
Intestinala enterokocker	Viktig fekal indikator med begränsad förmåga att tillväxa i miljön. Överlever längre än <i>E. coli</i> och är ett bra komplement i ett övervakningsprogram. Analystid 24-48 h.
<i>Clostridium perfringens</i>	Sporbildare med lång överlevnad. Svagare fekal indikator eftersom den även förekommer i förmultnande växter och jord. Analystiden är 18-24 h för presumtiva <i>C. perfringens</i> och 48 h för konfirmerade.
Somatiska kolifager	Bakteriofager är virus som infekterar bakterier och används som indikator för virusförekomst. Analystid 6-18 h.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Indikator för desinfektionseffekt och bakteriell tillväxt i bassängbad. <i>P. aeruginosa</i> är även potentiellt patogen. Analystid 18-24 h

Riktlinjer och regelverk inom EU för bedömning av vattenkvalitet

I maj 2017 publicerade EU-kommissionen en vägledning om hantering av mikrobiologiska risker med färska frukter och grönsaker i primärproduktionen genom god hygien (EU, 2017). Som stöd för odlarnas faroanalys med avseende på bevattnings-vattnet finns en riskmatris som kombinerar typ av vattenkälla med bevattningssätt och huruvida grödan konsumeras tillagad eller inte (Tabell 2). I denna rekommenderas olika provtagningsfrekvenser (hög risk, månatlig; medium, två per år; låg, en gång per år) med tröskelvärden för *E. coli* (100 till 10 000 CFU/100 ml) för vad som är en acceptabel vattenkvalitet för användning i olika typer av verksamheter. Vägledningen rekommenderar bl.a. att vatten som används för bevattning inom två veckor före skörd av färska frukter och grönsaker som kan ätas utan tillagning bör vara av dricksvattenkvalitet när det är möjligt (Tabell 2).

Tabell 2. Tröskelvärden för bevattningsvattnets mikrobiologiska kvalitet vid odling av färska frukter och grönsaker som sannolikt förtärs utan tillagning fram till två veckor före skörd. Därefter bör vatten av dricksvattenkvalitet användas om så är möjligt (EU, 2017)

Användning	Vattenkälla						Indikator <i>E. coli</i> (CFU/100 ml)
	Obehandlat ytvatten ¹	Grundvatten från brunnar ¹	Obehandlat regnvatten	Behandlat slam/yt-/avloppsvatten	Desinficerat vatten	Kommunalt vatten	
Bevattning där vattnet kommer i direkt kontakt med den ätliga delen	x	x	■	●	●	◆	100
inte kommer i direkt kontakt med den ätliga delen	x	x	■	●	●	◆	1 000

¹ Ytvatten och grundvatten från brunnar (t.ex. borrhål) kan vara av god mikrobiologisk kvalitet och uppfylla gränsvärdet på 100 CFU/100 ml utan behandling. Djupborrade brunnar uppfyller i regel dricksvattenkvalitet.

X = bör inte användas; om odlaren inte har något annat val än att använda det bör högfrekvent testning genomföras eller vattenrening/desinfektion övervägas, med tröskelvärden för *E. coli*; ■ = Kan användas men omfattas av provtagning. Odlaren bör utföra tester med medelhög frekvens, med tröskelvärden för *E. coli*; ● = Kan användas men omfattas av provtagning. Odlaren bör utföra tester med låg frekvens, med tröskelvärden för *E. coli*; ◆ = Kan användas utan någon provtagning eller analys eller endast med sådan analys som krävs för att övervaka vattendesinfektion.

Det finns ett fåtal länder inom EU som tillämpar egna regelverk och riktlinjer för bedömning av bevattningsvattnets hygieniska kvalitet, t.ex.:

- Tyskland (Anon, 1999) tillämpar ett regelverk som grupperar vattenkvaliteten i fyra klasser utifrån hur växtprodukterna ska användas (Tabell 3).
- Finland (Anon, 2011) tillämpar mikrobiologiska gränsvärden baserade på motsvarande gränsvärden för badvatten. Finland har också ett inhemskt kvalitetssäkringssystem där reglerna kring bevattning är bestämda i Jord- och skogsbruksministeriets förordning om livsmedelshygien vid primärproduktion av livsmedel. Lagstiftningen håller för närvarande på att ses över (Tabell 3).
- Den irländska livsmedelsmyndigheten, FSAI (2016) har nyligen tagit fram riktlinjer med en riskmatris som liknar den i EU-kommissionens vägledning (Tabell 2), fast med tätare provtagningsfrekvens än vad vägledningen rekommenderar (se ovan).

De flesta regelverk och riktlinjer bygger främst på undersökningar av olika indikatorbakterier. Det är dock otydligt vad som ligger till grund för bestämmelserna i de olika underlagen och det finns inte heller någon konsensus mellan underlagen vad gäller t.ex. parametrar, gräns-/riktvärden, provtagningssätt eller provtagningsfrekvens (Alsanius, 2014).

Tabell 3. Gränsvärden för vattnets mikrobiologiska kvalitet enligt regelverk och riktlinjer i Tyskland och Finland

Land (Standard)	Vattenkälla	Användning	<i>E. coli</i> (cfu/100ml)	Intestinala enterococker (cfu/100ml)	Salmonella
Tyskland (DIN 19650)	Ej def.	Bevattning av frilands- och växthusodlade kulturer för färskkonsumtion (klass 2)	≤ 200	≤ 100	Ej påvisad i 100 ml
Finland (1368/2011)	Ej def.	Bevattning av grödor där vattnet kommer i direkt kontakt med den ätliga delen	≤ 300	≤ 200	-

Svenska regler och råd för bedömning av vattenkvalitet

Det finns inget svenskt regelverk som styr hygienisk kvalitet av bevattningsvatten. Däremot finns regelverk för bedömning av andra typer av vatten; dricksvattnets kvalitet regleras genom Livsmedelsverkets föreskrifter (Livsmedelsverket, 2001) och kvaliteten på badvatten regleras genom Havs- och vattenmyndighetens föreskrifter och allmänna råd (HAV, 2012). Gränsvärden för mikroorganismer i dessa vattentyper finns angivna i Tabell 4 vid sidan om Livsmedelsverkets råd om enskild dricksvattenförsörjning samt Folkhälsomyndighetens allmänna råd om bassängbad (Livsmedelsverket, 2015; Folkhälsomyndigheten, 2014). I råden finns för mikroorganismer angivna riktvärden, vilka bör användas som underlag för bedömning av den typen av vattenprov (Tabell 4). Det är dock inte tydligt till vilka av dessa riktlinjer från myndigheterna som olika certifieringsorgan hänvisar till (se vidare nedan).

Tabell 4. Gränsvärden för mikrobiologisk kvalitet av olika typer av vatten enligt regelverk och riktlinjer i Sverige

Typ av vatten	Antal mikro-organismer (cfu/ml)	Koliforma bakterier (cfu/100 ml)	<i>E. coli</i> (cfu/100 ml)	Intestinala enterococker (cfu/100 ml)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Dricksvatten (SLVFS 2001:30)		< 10 ¹	Påvisad ¹	Påvisad ¹	
Kustvatten (HVMFS 2012:14)			< 250 ²	<100 ²	
Inlandsvatten (HVMFS 2012:14)			< 500 ²	< 200 ²	
Dricksvatten, enskild (Livsmedelsverket, 2015)		< 500 ¹	< 10 ¹		
Bassängbad (FOHMFS 2014:12)	< 100				Ej påvisad i 100 ml

¹ Gränsvärde för otjänligt vatten ² Utmärkt kvalitet baserat på en 95-percentilsbedömning

Kvalitetssäkringssystem

IP frukt & grönt

IP-standarden (Sigill Kvalitetssystem, 2016) är en standard för kvalitetssäkrad produktion, genom tredjepartscertifiering, av bär, frukt, potatis, frilands- och växthusgrönsaker. De tre definierade nivåerna i standarden innehåller krav baserade på svensk lag och branschriktlinjer inom livsmedelssäkerhet. De kontrollpunkter och verifieringskrav (faroanalys) som ska uppfyllas avseende val och hantering av bevattningsvatten omfattar genomförandet av en årlig riskbedömning av bevattningsvatten som används i ett odlingsföretag, inklusive förslag på åtgärder för att förhindra produktkontaminering från vatten. Vad gäller bedömning av kvaliteten på bevattningsvattnet bygger Sigill Kvalitetssystem sin certifiering på de gränsvärden som anges för mikroorganismer för badvatten enligt Havs- och vattenmyndighetens föreskrifter (HAV, 2011), dock utan att specificera vad som är acceptabelt bevattningsvatten. Vidare finns specifika krav på att tillräckligt många prov ska tas ut för analys och, där så är relevant, att enbart använda vatten av dricksvattenkvalitet vid bevattning 48 h eller mindre före skörd (Sigill Kvalitetssystem, 2016). Standarden med tillhörande stödmaterial håller för närvarande på att uppdateras.

Global GAP

Global GAP (2017) är en global standard för god odlingssed. Grundtanken är att reglerna för odling ska vara desamma världen över, för att underlätta internationell handel. Precis som IP Sigills standard är detta en tredjepartscertifiering, vilket i detta fall innebär kontroll av internationellt erkända och oberoende kontrollorgan (ISO/IEC). Den del av standarden som täcker växtodling innehåller kontrollpunkter och efterlevnadskriterier för kvalitetssäkrad produktion av frukt och grönsaker. Vattenkälla, vattenkvalitet och bevattningstillfällen är exempel på kontrollpunkter som finns listade. Standarden innehåller dock inga riktvärden för hygienisk kvalitet på bevattningsvattnet, förutom i de fall behandlat avloppsvatten, misstänkt förorenat vatten (t.ex. på grund av utsläpp uppströms om källan) eller återvunnet vatten används som källa för bevattningsvattnet. Kravet är i sådant fall att Världshälsoorganisationen WHO:s riktlinjer (WHO, 2006b) för behandlat avloppsvatten uppfylls.

Nationella branschriktlinjer

Lantbrukarnas Riksförbund (LRF) har gett ut nationella branschriktlinjer för frilandsodling av grönsaker och bär (LRF, 2014). Riktlinjerna omfattar bl.a. användning av bevattningsvattnet och beskriver vad odlingsföretagen kan göra för att uppfylla livsmedelslagstiftningen. Ett beslutsträd för bedömning av bevattningsvattnets kvalitet (låg eller hög risk för kontamination) rekommenderas som stöd i arbetet med att göra en faroanalys. Kommunalt vatten eller grundvatten anses medföra låg risk. För att uppnå avsedd standard med potentiellt förorenat grundvatten, ytvatten eller dammar krävs däremot ett tillförlitligt bevattningssystem, att ingen bevattning sker 48 h innan skörd samt att man gör regelbundna analyser av vattnet, även vid extrem väderlek. I annat fall rekommenderas att byta vattenkälla (LRF, 2014). Inga specifika gränsvärden för mikroorganismer anges i riktlinjerna.

Lagar och regler om vattenuttag

Enligt SMHIs utredningar och scenarier för ett förändrat framtida klimat ökar avrinningen vintertid medan somrarna i stora delar av landet kommer att bli varmare och torrare. I många områden inom Sverige blir tillgången på ytvatten för bevattning mycket begränsad under perioder då behovet är som störst (SMHI, 2017). Många vattendrag med små eller medelstora avrinningsområden och låg vattenföring kan under dessa perioder bli torrlagda, eller vattenflödena så låga att något uttag för bevattning inte tillåts eftersom det biologiska livet riskerar att påverkas negativt. Under de senaste åren har bevattningen ökat, framför allt inom jordbruket. Tidigare bevattnades huvudsakligen potatis, fältodlade köksväxter och betesvallar medan även slättervallar, stråsåd, oljeväxter, sockerbetor samt bär- och fruktodlingar bevattnas idag. På flera håll inom landet konkurrerar bevattningen med vattenuttag för andra behov men även konkurrens mellan odlare förekommer. Enligt Miljöbalken 11 kapitlet är uttag av vatten för bevattning en vattenverksamhet som kräver tillstånd (vattendom) eller, om det gäller små uttag av ytvatten, anmälan (SFS, 1998). Enligt Förordning (1998:1388) om vattenverksamhet m.m. (SFS, 1998) räcker det med anmälan i följande fall:

- vattendrag – högst 600 m³/dygn, dock högst 100 000 m³/år eller utförande av anläggning för detta.
- sjö – högst 1000 m³/dygn dock högst 200 000 m³/år eller utförande av anläggning för detta.

Om det är uppenbart att varken allmänna eller enskilda intressen skadas genom uttaget behövs vare sig tillstånd eller anmälan. Det är Havs- och vattenmyndigheten som har det centrala ansvaret för tillsynsvägledningen beträffande vattenverksamhet medan Länsstyrelserna utövar tillsynen direkt gentemot den som bedriver verksamheten. Länsstyrelsen kan dock överlåta tillsynen till kommunen. Ett faktablad som hjälp för vägledning i processen om att söka tillstånd eller anmäla uttag av vatten har tagits fram inom ramen för projektet (Alsanius & Jakowlew, 2017a).

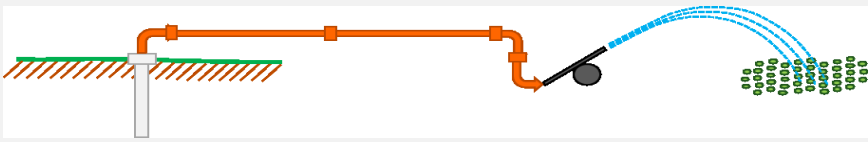
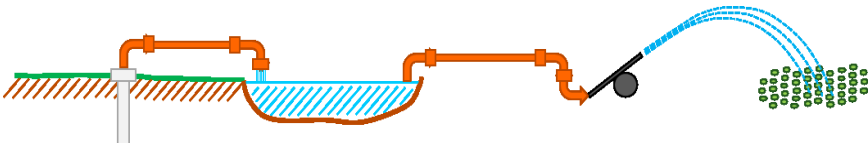
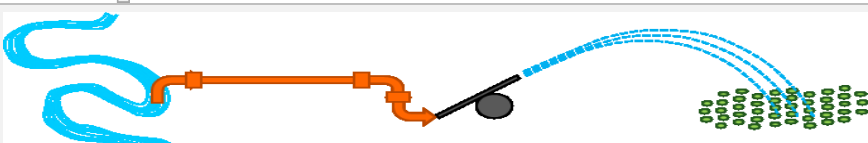
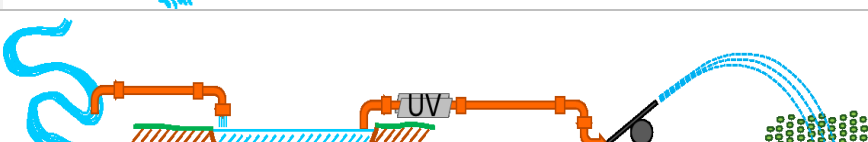
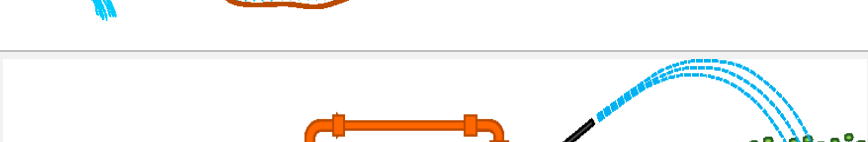
Flera Länsstyrelser har tagit fram egna riktlinjer med intentionen att främja en hållbar utveckling av hälsosam och god miljö. Riktlinjerna gäller även vattenuttag från sjöar som utgör en del av ett vattensystem. Till exempel delas vattendrag i Skåne och Blekinge in i två kategorier, A och B. Som kategori A klassas särskilt värdefulla vattendrag (Anon, 2008, Anon, 2017a). Bevattningsuttag från sådana vattendrag får inte förekomma vid flöde som motsvarar flöde på 30 % av årsmedelvattenföring eller lägre. Uttag av vatten får inte heller ske om det föreligger risk att flödet på nedströmsliggande sträcka blir mindre än så. Vattenuttag för bevattning från vattendrag kategori B får inte förekomma när vattenföringen understiger 25 l/s per meter åbredd ”baserad på vattendragets bredaste punkt från uttagsstället och nedströms” (Anon, 2008, Anon, 2017a). Årsmedelvattenföringen är i regel högre än flödet under vegetationsperioden vilket begränsar möjligheterna för vattenuttag. Däremot kommer vatten i samband med snösmältning och nederbörd under tidig vår och höst att flöda i diken, bäckar, åar och dräneringssystem. Detta vatten kan samlas in i anlagda magasin för att sedan utnyttjas under bevattningssäsongen. Ett faktablad om anläggning av dammar har tagits fram inom ramen för projektet (Alsanius & Jakowlew, 2017b).

Undersökningar

Bevattningsystem och provtagning

Under 2015 och 2016 togs prover hos 21 olika odlare varav 17 i Skåne, tre i Halland och en i Uppland. Vattenprover togs sammanlagt vid 29 tillfällen; åtta under 2015 och 21 under 2016. På fyra platser togs prover vid mer än ett tillfälle. Vid varje provtagnings-tillfälle togs vattenprov i triplikat på två platser i bevattningssystemet; så nära vatten-källan och så nära spridaren som möjligt. De olika typer av system som användes av odlarna som deltog i projektet finns beskrivna i Figur 1.

På en del platser togs under 2016 prov i triplikat på grödor som bevattnats ovanifrån. Exempel på grödor som provtogs är olika typer av sallat (isberg, rucola, roman, grön krispsallat, lollo rosso, röd huvudsallat), spenat, kålsorter (savoykål, blomkål, vitkål), kryddor (gräslök, dill, persilja), jordgubbar, zucchini och kronärtskockblad.

System	Schematisk överblick	n
Borra Rör Spridare		12
Borra Rör Damm Spridare		5
Å Rör Spridare		5
Å Rör Damm UV Spridare		4
Damm Rör Spridare		3

Figur 1. De olika vattensystem som förekom inom projektet samt antalet provtagningsomgångar (n) på varje system (R. Dryselius).

Samtliga prover analyserades för indikatororganismerna koliforma bakterier, *E. coli*, enterokocker och sporer av *Clostridium perfringens* samt för de sjukdomsframkallande bakterierna Salmonella, Campylobacter och STEC (shigatoxin-producerande *E. coli* också kallade VTEC eller EHEC). Dessutom undersöktes förekomsten av ESBL-bildande *E. coli* vilket är *E. coli* som är resistent mot så kallade betalaktamantibiotika såsom vanligt penicillin. De är i sig inte mer sjukdomsframkallande än vanliga *E. coli* men är vid infektion svårare att behandla och kan dessutom föra över sin antibiotikaresistens till mer särpräglade sjukdomsframkallande bakterier (Brolund & Sandegren, 2015).

Vattenproverna analyserades också för bakteriofager som är virus som infekterar vissa typer av bakterier. Dessa brukar användas som modell för hur tarmvirus som infekterar människor skulle bete sig i en viss situation, såsom i en vattentäkt och ett bevattningssystem. Bakteriofagerna som användes i dessa undersökningar infekterar vissa *E. coli* bakterier och används även som en indikator för fekal påverkan. Mikrobiologiska analysmetoder beskrivs i Bilaga 1.

Resultat från provtagningar av vatten

Mikrobiologisk kvalitet vid vattenkälla

Av de 29 bevattningssystem som provtogs använde 17 vatten från brunnar medan tolv tog ytvatten från å (nio) eller damm (tre). Tre av de nio åvattnen provtogs inte direkt från källan utan från en uppsamlingsdamm. Analys av indikatororganismer visade på betydlig lägre förekomst och halt i vattnen från brunnarna än i ytvattnen (Tabell 5). I vatten taget i eller i nära anslutning till brunnarna påträffades indikatororganismerna *E. coli* och Enterokocker, som båda har en tydlig fekal koppling, i låga halter i ett respektive två av vattnen vilket tyder på visst inläckage av förorenat ytvatten. I ett av dessa fall var dock vattnet taget ca 500 meter från brunnen vilket innebär att föroreningen även kan ha nått vattnet via rörledningen. Avseende ytvattenkällorna innehöll samtliga dessa båda fekala indikatororganismer och vanligtvis i betydligt högre halter än de positiva brunnarna (Tabell 5). En *E. coli*-halt över 100 MPN/100 ml uppmättes dock bara vid tre tillfällen. Även förekomst och halter av koliforma bakterier och *C. perfringens* var betydligt högre i ytvattnen än i vattnen från brunnarna. Med tanke på de få antal prov som analyserats från respektive källa, ofta under detektionsnivå eller låga halter (brunnar) kan inte några långtgående slutsatser dras.

Tabell 5. Förekomst och halter av indikatororganismer i vattenkällan. I tabellen visas antal och andel prover där indikatororganismer påträffats i minst ett av tre replikat om 100 ml samt medelhalter för dessa uppdelat utifrån om vattenkällan är en brunn eller ett ytvatten (å och damm)

Provtyp	Parameter	Koliformer	<i>E. coli</i>	Enterokocker	<i>C. perfringens</i>
Brunn (n=17)	antal/(%) positiva	8/(47)	1/(5,9)	2/(12)	2/(12)
	medelhalt och spridningsintervall (MPN/100 ml)	30 0-270	0,3 0-4,5	0,3 0-5,2	0,04 0-0,33
Ytvatten (n=12)	antal/(%) positiva	12/(100)	12/(100)	12/(100)	11(92)
	medelhalt och spridningsintervall (MPN/100 ml)	2400 270-4700	150 6,7-1200	210 3,4-2130	7,7 0-13

Vad gäller förekomst av ESBL-bildande *E. coli* samt de tre sjukdomsframkallande mikroorganismerna *Campylobacter*, *Salmonella* och Shigatoxin-producerande *E. coli* (STEC) återfanns ingen av dessa i vattnen från brunnarna (Tabell 6). I ytvattnen däremot återfanns samtliga fyra organismtyper. *Campylobacter* var vanligast med åtta positiva prover följt av STEC (sex positiva prover), ESBL-bildande *E. coli* (fyra positiva prover) och slutligen *Salmonella* (ett positivt prov). I två av de tolv testade ytvattnen återfanns ingen av dessa organismer medan ett av vattnen innehöll samtliga fyra (ej visat). Sammantaget belyser resultaten att kvaliteten på vatten från brunnar håller en betydligt högre mikrobiologisk kvalitet än ytvatten från åar och dammar.

Tabell 6. Förekomst av av ESBL-bildande *E. coli*, *Campylobacter*, *Salmonella* och Shigatoxin-producerande *E. coli* (STEC) i vattenkällan. Tabellen visar antal och andel prover där organismgrupperna påträffats i minst ett av tre replikat om en liter uppdelat på om vattenkällan är en brunn eller ett ytvatten (å och damm)

Provtyp	Parameter	ESBL-bildande <i>E. coli</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>Salmonella</i>	STEC
Brunn (n=17)	antal/(%) positiva	0/(0)	0/(0)	0/(0)	0/(0)
Ytvatten (n=12)	antal/(%) positiva	4/(33)	8/(67)	1/(8,3)	6/(50)

Mikrobiologisk kvalitet vid spridare

Vid 22 tillfällen togs prover vid vattenspridare eller vattenpost i fält varav tretton härrörde från brunnar och nio från ytvatten. Av de tretton vattnen från brunnar hade tio transporterats direkt via ledningssystem till spridare medan tre samlats upp i en reservoardamm på vägen. För ytvattnen härrörde två från dammar och sju från åar. Tre av åvattnen hade mellanlagrats i uppsamlingsdammar och sedan desinficerats med UV-ljus eller fotokatalys på vägen till spridaren.

Sammantaget var förekomst och halter av indikatororganismer betydligt lägre i vattnen från spridare om det härrörde från brunnar än om ytvatten använts som källa (Tabell 7). I fem respektive fyra av de 13 vattnen med ursprung i brunnar detekterades de fekala indikatorerna *E. coli* och Enterokocker och medelhalterna låg på 2,8 respektive 1,1 MPN/100 ml. Huvuddelen av och även de allra mest förorenade vattnen som härrörde från brunnar hade mellanlagrats i damm. Bland proverna med ytvatten som källa detekterades fekal förorening i nästan samtliga och då i halter som i medeltal var 40-80 gånger högre än i vattnen härrörande från brunnar. Av ytvattnen var det endast bland de tre som behandlats med UV-ljus som en eller flera av indikatororganismerna inte detekterades.

Tabell 7. Förekomst och halter av indikatororganismer vid spridare. I tabellen visas antal och andel prover där indikatororganismer påträffats i minst ett av tre replikat om 100 ml samt medelhalter för dessa uppdelat utifrån om vattenkällan är en brunn eller ett ytvatten (å och damm). Brunns- eller ytvattnen är i sin tur uppdelade i underkategorier beroende på om de mellanlagrats i damm eller inte eller ifall de behandlats med UV-ljus eller inte

Provtyp	Parameter	Koliformer	<i>E. coli</i>	Enterokocker	<i>C. perfringens</i>
Alla brunns-vatten (n=13)	antal/(%) positiva	11/(85)	5/(39)	4/(31)	2/(15)
	medelhalt och <i>spridningsintervall</i> (per 100 ml)	370 0-2400	2,8 0-20	1,1 0-12	4,4 0-56
Brunn utan damm (n=10)	antal/(%) positiva	8/(80)	2/(20)	1/(10)	0/(0)
	medelhalt och <i>spridningsintervall</i> (per 100 ml)	12 0-71	0,17 0-1,4	0,07 0-0,67	0 -
Brunn med damm (n=3)	antal/(%) positiva	3/(100)	3/(100)	3/(100)	2/(67)
	Medelhalt och <i>spridningsintervall</i> (per 100 ml)	1600 42-2400	12 0,33-20	4,5 0,67-12	19 56
Alla ytvatten (n=9)	antal/(%) positiva	8/(89)	7/(78)	8/(89)	8/(89)
	medelhalt och <i>spridningsintervall</i> (per 100 ml)	1200 0-2400	120 0-780	93 0-590	12 0-52
Ytvatten utan UV (n=6)	antal/(%) positiva	6/(100)	6/(100)	6/(100)	6/(100)
	medelhalt och <i>spridningsintervall</i> (per 100 ml)	1800 780-2400	180 11-780	140 7,2-590	17 2-52
Ytvatten med UV (n=3)	antal/(%) positiva	2(67)	1(33)	2(67)	2(67)
	medelhalt och <i>spridningsintervall</i> (per 100 ml)	74 0-220	18 0-53	0,78 0-1,3	0,89 1,7

Avseende förekomst av sjukdomsframkallande mikroorganismer och ESBL-bildande *E. coli* i vattnen från spridare återfanns någon av dem i tre av de 13 vattnen från brunnar varav två var positiva för *Campylobacter* och ett positivt för ESBL-bildande *E. coli* (Tabell 8) Två av fynden (ett av *Campylobacter* och ett av ESBL) gjordes i vatten som mellanlagrats i damm och båda dessa vatten hade även förhöjda halter av indikatororganismer. För det tredje positiva bevattningsvattnet från brunn (fynd av *Campylobacter*) hade vattnet transporterats direkt till spridaren via rörledning och i detta prov

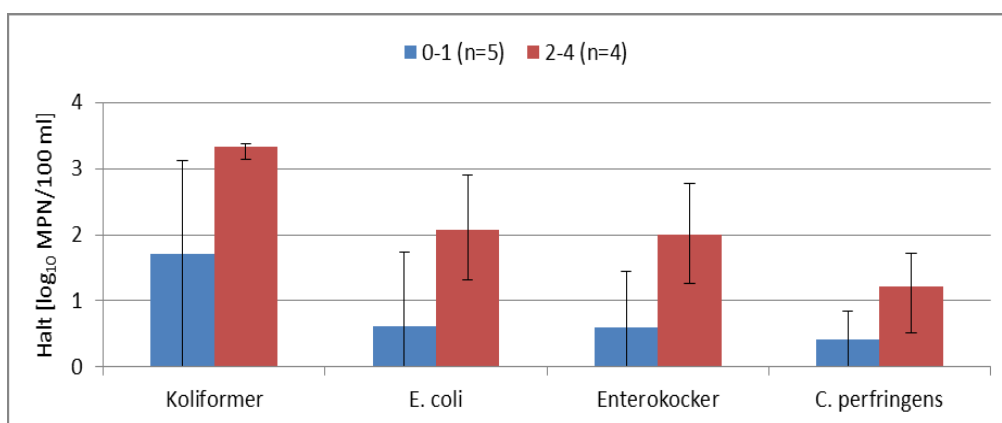
detekterades varken *E. coli*, Enterokocker eller *C. perfringens*. Provet innehöll dock en förhållandevis hög halt koliforma bakterier (71 MPN/100 ml) vilket kan indikera ett inläckage från den omgivande miljön eller tillväxt i ledningssystemet.

Av de nio prover med ytvatten som ursprungskälla återfanns ESBL-bildande *E. coli* i tre, *Campylobacter* i sex, *Salmonella* i ett och *STEC* i tre (Tabell 8). Ett av vattnen innehöll samtliga fyra organismtyper och detta vatten hade även klart högst halter av de fekala indikatorerna *E. coli* (780 MPN/100 ml) och Enterokocker (590 MPN/100 ml), vilket tyder på en relativt färsk fekal förorening. I tre av ytvattnen kunde ingen av patogenerna återfinnas. Av dessa hade två desinficerats med UV-ljus eller fotokatalys på vägen till spridaren medan det tredje hade en damm som ursprunglig vattenkälla.

Tabell 8. Förekomst av av ESBL-bildande *E. coli*, *Campylobacter*, *Salmonella* och Shigatoxin-producerande *E. coli* (*STEC*) vid spridare. Tabellen visar antal och andel prover där organismgrupperna påträffats i minst ett av tre replikat om en liter uppdelat på om vattenkällan är en brunn eller ett ytvatten (å och damm)

Provtyp	Parameter	ESBL-bildande <i>E. coli</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>Salmonella</i>	<i>STEC</i>
Brunn (n=13)	antal/(%) positiva	1/(7,7)	2/(15)	0/(0)	0/(0)
Ytvatten (n=9)	antal/(%) positiva	3/(33)	6/(67)	1/(11)	3/(33)

För att undersöka eventuella samband mellan indikatorhalter och förekomst av sjukdomsframkallande mikroorganismer och ESBL-bildande *E. coli* i ytvattnen vid spridaren delades proverna upp i två grupper; en där ingen eller endast en av organismerna detekterats och en där två till fyra av dem återfunns. Genomsnittshalterna för samtliga indikatororganismer var högre i proverna där mer än en typ av sjukdomsframkallande mikroorganismer och ESBL-bildande *E. coli* detekterats (Figur 2).



Figur 2. Jämförelse av halter indikatororganismer mellan ytvatten vid spridare där ingen eller en (i blått) eller två till fyra (i rött) av organismtyperna ESBL-bildande *E. coli*, *Campylobacter*, *Salmonella* eller *STEC* påträffats. För att minimera effekten av enskilda mätningar åskådliggörs halterna som medelvärden av logaritmerad data. Felstaplarna anger intervallet för enskilda mätvärden inom respektive grupp.

Mikrobiologisk kvalitet före och efter transport i rörsystem

Vid jämförelse av indikatorhalter i prover tagna i eller i närhet till källa (Tabell 5) med de som tagits vid eller i närhet till spridare (Tabell 7) framgår det att kvaliteten på brunnsvattnen verkar försämrats under sin transport genom bevattningssystemen. För att undersöka detta närmare jämfördes prover tagna i början och i slutet av elva bevattningssystem med brunn som källa och direkttransport till spridare via rörsystem (Tabell 9). I eller i närhet till brunnarna syntes ingen fekal påverkan eftersom varken *E. coli*, Enterokocker eller *C. perfringens* kunde påvisas. I sex av dessa elva prover påträffades dock koliforma bakterier vilket antyder viss ytvattenpåverkan i eller i närhet till brunnarna. Efter transport genom rörsystem hade förekomst och halter av koliforma bakterier ökat från i medeltal 37 till 210 per 100 ml. I tre av de elva bevattningssystemen hade även någon eller några av indikatorerna *E. coli*, Enterokocker och *C. perfringens* tillkommit och dessutom påträffades *Campylobacter* och ESBL-bildande *E. coli* i varsitt vatten. Sammantaget antyder detta att vattnet kan förorenas på sin väg genom bevattningssystemet vilket antingen kan bero på inläckage eller, alternativt, att det funnits föroreningar i rörsystemet.

Tabell 9. Förekomst och halter av indikatororganismer i eller i närheten till brunn respektive spridare i samma bevattningssystem. Tabellen visar antal och andel prover där indikatororganismer påträffats i minst ett av tre replikat om 100 ml samt medelhalter för dessa uppdelat utifrån om provtagningen gjorts i eller i närhet till brunn respektive spridare

Provplats	Parameter	Koliformer	<i>E. coli</i>	Enterokocker	<i>C. perfringens</i>
I eller i närhet till brunn (n=11)	antal/(%) positiva	6/(54)	0/(0)	0/(0)	0/(0)
	Medelhalt och spridningsintervall (per 100 ml)	37 0-270	0 -	0 -	0 -
I eller i närhet till spridare (n=11)	antal/(%) positiva	9/(82)	3/(27)	2/(18)	1/(9,1)
	Medelhalt och spridningsintervall (per 100 ml)	210 0-2200	1,5 0-15	1,1 0-12	0,09 0-1,0

Mikrobiologisk kvalitet före och efter lagring i magasin

Analysen av vattenkvalitet vid spridare visade att brunnsvattnen som mellanlagrats i damm hade sämre genomsnittlig kvalitet än vatten som transporterats via rörledning direkt till spridare (Tabell 7). För att undersöka om mellanlagringen kan ha bidragit till denna kvalitetsförsämring jämfördes prover tagna före med prover tagna i eller efter reservoardamm från fem bevattningssystem med brunn som vattenkälla. Som framgår av Tabell 10 var både halter och andelen positiva prover för samtliga indikatorer högre i/efter reservoardamm än före. Dessutom påvisades *Campylobacter* i tre av proverna tagna i/efter damm medan inga *Campylobacter* kunde detekteras före damm. Sammantaget visar resultaten att mellanlagring i öppna dammar kan ha en negativ inverkan på vattenkvaliteten som innebär en risk för kontaminering med sjukdomsframkallande mikroorganismer, framförallt *Campylobacter*.

Tabell 10. Förekomst och halter av indikatororganismer i brunsvatten provtaget före eller i/efter mellanlagring i reservoardamm. Tabellen visar antal och andel prover där indikatororganismer påträffats i minst ett av tre replikat om 100 ml samt medelhalter för dessa uppdelat utifrån om provtagningen gjorts före eller i/efter mellanlagring i magasin

Provplats	Parameter	Koliformer	<i>E. coli</i>	Enterokocker	<i>C. perfringens</i>
Brunnsvatten före magasin (n=5)	antal/(%) positiva	3/(60)	1/(20)	3/(60)	2/(40)
	Medelhalt och spridningsintervall (per 100 ml)	21 0-110	0,90 0-4,5	1,1 0-5,2	0,13 0-0,33
Brunnsvatten efter magasin (n=5)	antal/(%) positiva	5/(100)	4/(80)	5/(100)	3/(60)
	Medelhalt och spridningsintervall (per 100 ml)	1500 42-2400	56 0-200	36 0,67-89	12 0-56

Mikrobiologisk kvalitet före och efter desinficering med UV/fotokatalys

Hos ett par av odlarna där vattenprover samlades in användes desinficering med UV-ljus eller fotokatalys (Alsanius & Löfström, 2017; Alam 2014) för att förbättra kvaliteten på bevattningsvattnet. Vid sammanlagt fyra tillfällen togs prover före och efter reningen, tre gånger hos den ena odlaren och en gång hos den andra. Vid tre tillfällen togs prover ur uppsamlingsdamm precis före desinfektion och vid ett från å som föregick både uppsamlingsdamm och desinfektion. Provtagningen efter fotokatalys/UV-ljus gjordes vid tre tillfällen ur spridare efter det att vattnet transporterats i rörledning och vid ett direkt efter reningssteget.

Före desinfektion påträffades samtliga indikatorer i alla fyra prover i halter på alltifrån någon enstaka bakterie per 100 ml för *C. perfringens* till drygt 8 000 för koliforma bakterier (Tabell 11). Därtill påträffades *Campylobacter* i tre av vattnen och STEC i ett (ej visat). Efter reningen var halterna för samtliga indikatorer kraftigt reducerade och i flera fall detekterades enskilda indikatororganismer inte alls. Vid jämförelse av medelhalterna av indikatorer före och efter fotokatalys/UV hade de reducerats runt 100 gånger för *E. coli* och koliforma bakterier, 35 gånger för Enterokocker och sju gånger för *C. perfringens*. Detta stämmer väl överens med premisser om att sporer av *C. perfringens* är mer stresståliga än Enterokocker som i sin tur är mer tåliga än *E. coli* och koliforma bakterier. I ett av vattnen där *Campylobacter* påträffats före reningen återfanns organismen även efter denna.

På grund av att relativt få prover undersökts samt att flera av vattnen kan ha ändrat karaktär under passage i rörsystem både före och efter fotokatalys/UV-behandling är det svårt att dra säkra slutsatser om hur väl desinfektionen verkligen fungerar. Utifrån resultaten är det dock tydligt att vattenreningen har en tydligt positiv effekt på bevattningsvattnets kvalitet.

Tabell 11. Förekomst och halter av indikatororganismer i ytvatten provtaget före eller efter fotokatalys/UV-desinfektion. Tabellen visar antal och andel prover där indikatororganismer påträffats i minst ett av tre replikat om 100 ml samt medelhalter för dessa uppdelat utifrån om provtagningen gjorts före eller efter desinfektion med fotokatalys/UV-ljus

Provplats	Parameter	Koliformer	<i>E. coli</i>	Enterokocker	<i>C. perfringens</i>
Före rening	antal/(%) positiva	4/(100)	4/(100)	4/(100)	4/(100)
(n=4)	Medelhalt och spridningsintervall (per 100 ml)	4200 460-8300	19 6,7-34	36 6,6-67	5,6 0,67-13
Efter rening	antal/(%) positiva	3/(75)	1/(25)	3/(75)	3(75)
(n=4)	Medelhalt och spridningsintervall (per 100 ml)	56 0-220	0,17 0-0,67	1,0 0-1,7	0,79 0-1,7

Förekomst av bakteriofager

Vid flertalet av provtagningarna under 2016 undersöktes även förekomst av bakteriofager, det vill säga virus som infekterar och förökar sig i bakterier. De två olika bakteriofagtyperna somatiska kolifager och F-specifika fager, som båda har *E. coli*-bakterier som värd och därför används som indikatorer för fekal förorening, analyserades. Sammanlagt analyserades 33 olika vattenprover för förekomst av bakteriofager. Av dessa var sex positiva för somatiska kolifager och i tre av dessa kunde även F-specifika fager påvisas.

Sammanlagt 17 prover togs i eller i närhet till källa varav tio från brunnar och sju från ytvatten. I brunnsvattnen återfanns inga bakteriofager medan det i tre av ytvattnen (en damm och två åar) detekterades enstaka, eller i ett fall 37 bakteriofager av båda typer i 10 ml vatten. Två av dessa tre bevattningssystem provtogs också nedströms i rörsystem och vid spridare och även i dessa prover kunde bakteriofager detekteras och då i jämförbara halter med vad som återfunnits vid källan. Det sjätte och sista provet som var positivt för bakteriofager härrörde från en brunn och var provtaget vid en vattenpost i fält.

Avseende halter av övriga indikatorer i proverna där bakteriofager påträffats så avvek inte dessa nämnvärt från jämförbara prover där bakteriofager inte påträffats. Inte heller syntes något tydligt samband mellan förekomst av bakteriofager och sjukdomsframkallande bakterier inklusive ESBL-bildande *E. coli*.

Resultat från provtagning av grödor

Prov av grödor samlades in vid 18 tillfällen under perioden maj till augusti 2016. För ett få ett representativt urval från varje odling provtogs grödan från tre olika platser på varje odlingsfält. I möjligaste mån provtogs ätfärdiga grödor, det vill säga sådana som kan konsumeras direkt utan tillagning.

Mikrobiologisk kvalitet på grödor

Vid de 18 provtagningstillfällena samlades en till fyra grödor in vilket genererade 54 analyser av grödeprov i triplikat (Tabell 12). Totalt analyserades 20 olika typer av gröda, i de flesta fall vid något enstaka tillfälle men för spenat och jordgubbar vid så många som tio tillfällen. Av indikatororganismerna var koliforma bakterier vanligast förekommande och påträffades i 42 av 54 analyserade grödeprover. De fekala indikatorerna *E. coli* och Enterokocker detekterades vid nio tillfällen vardera medan *C. perfringens* kunde påvisas vid åtta av 51 tillfällen. Inga fynd gjordes av de sjukdomsframkallande mikroorganismerna *Campylobacter*, *Salmonella* eller *STEC* men vid ett tillfälle detekterades ESBL-bildande *E. coli*. Av de grödor som bevattnats med ytvatten, inklusive grundvatten som är mellanlagrat i damm, var 16 % (15/93) positiva för någon av de fekala indikatorerna. Motsvarande siffra för grödor bevattnade med vatten från borrhållar var 14 % (11/78) (ej visat).

Vad gäller kopplingar mellan förekomst av indikatorer och typen av gröda som analyserats är det svårt att dra några slutsatser. De nio positiva proverna för *E. coli* respektive Enterokocker påträffades i åtta olika typer av grödor vardera och för *C. perfringens* var samtliga åtta positiva prover spridda bland olika typer av gröda. Även för koliforma bakterier är det svårt att se något tydligt mönster eftersom de återfanns på samtliga grödor utom tre vid åtminstone något tillfälle. Det höga antalet prover som visade positivt för koliforma bakterier kan ha berott på kontaminering från marken eftersom många av grödorna var både sandiga och jordiga då de inkom för analys. Detta antagande styrks av att de sandiga och jordiga proverna i flera fall hade halter av koliforma bakterier som översteg en miljon bakterier per gram (ej visat).

Sammanställningen nedan visar förekomst i ett eller fler av tre provreplikat tagna från samma odlingsfält men säger ingenting om halter eller förekomst på enskilda provreplikat. För att ge en tydligare bild av detta redovisar Tabell 13 resultat för enskilda analyser, andelen av dessa som visat positivt för de olika indikatororganismerna, de högsta halterna som uppmätts samt medianvärden av halter på de positiva proverna. Koliforma bakterier var inte bara vanligast förekommande på grödorna utan även den indikatororganism som detekteras i klart högst halter som i flera fall var högre än 10^6 CFU/g. Av de övriga indikatorerna påträffades Enterokocker i flest prover och högst halter som i ett par fall översteg 1 000 CFU/g. Både *E. coli* och *C. perfringens* påträffades något mer sällan än Enterokocker och det var bara för *E. coli* som halter över 100 CFU/g kunde uppmätas vilket skedde vid tre tillfällen.

Tabell 12. Typ av grödor som provtagits, antal analyser i triplikat av respektive gröda samt antal fynd av indikatororganismer och sjukdomsframkallande mikroorganismer inklusive ESBL-bildande *E. coli* som gjorts i minst ett av de tre provreplikaten

Typ av gröda	Antal analyser	Koliforma bakterier	<i>E. coli</i>	Enterokocker	<i>C. perfringens</i>	Patogener ^a
Gräslök	2	0	0	0	0	0
Isbergssallat	2	2	1	1	1	0
Spenat	10	7	1	1	0	0
Ärtskott	1	0	0	0	0	0
Ruccola	1	0	0	0	0	0
Dill	4	4	0	1	1	0
Vitkål	5	5	2	1	0 ^b	1
Jordgubbar	10	5	0	1	1	0
Blomkål	2	2	1	0	0	0
Broccoli	2	2	0	0	- ^b	0
”Sallat”	1	1	0	0	0	0
Purjolök	1	1	0	0	1	0
Romansallat	1	1	1	0	1	0
Lollo Rosso	2	2	1	1	1	0
Krispsallat	2	2	0	2	1	0
Röd huvudsallat	1	1	1	1	1	0
Kronärtskockblad	1	1	0	0	0	0
Zucchini	1	1	1	0	0	0
Savoykål	1	1	0	0	0	0
Persilja	4	4	0	0	0	0
Totalt	54	42	9	9	8^b	1
(% positiva prover)		(78)	(17)	(17)	(16)	(1,9)

^a Inklusive ESBL-bildande *E. coli*; ^b För tre prover, ett av vitkål och två av broccoli, saknas analysdata för *C. perfringens*.

En jämförelse mellan prover tagna tidigt eller sent på odlingsäsongen indikerar en bättre kvalitet på grödorna som provtagits i början på odlingsäsongen (Tabell 13). Under maj-juni uppgick andelen positiva resultat för koliforma bakterier till drygt 40 % medan nästan 90 % av proverna var positiva i augusti. Vid fynd var dessutom halterna avsevärt högre under den senare delen av säsongen med en median på 4 300 CFU/g, vilket kan jämföras med 1 232 CFU/g under vårsäsongen. För indikatororganismerna med tydligare fekal koppling syns också en högre andel positiva prover i augusti jämfört med maj-juni. Samtidigt saknas entydighet avseende när de högsta uppmätta halterna påträffas samt när medianvärdena för positiva prover är som högst. I sammanhanget bör det dock understrykas att antalet prover som var positiva för *E. coli*, Enterokocker och *C. perfringens* är lågt vilket gör att enstaka fynd kan ha stor inverkan på jämförelsen. Som exempel kan nämnas att fyra grödor som provtogs hos en odlare i augusti ligger bakom tio av totalt 15 prover som var positiva för *E. coli* och/eller Enterokocker under höstsäsongen. Dessa grödor var bevattnade med vatten från en damm.

Tabell 13. Fynd av koliforma bakterier, *E. coli*, Enterokocker och *C. perfringens* i enskilda provreplikat och uppdelat utifrån säsong då proverna tagits. Utöver antalet/andelen positiva prover redogör tabellen även för högsta uppmätta halt samt medianvärden för de positiva proverna. Notera att detektionsgränsen varierar och är 10 CFU/g för koliforma bakterier, *E. coli* samt *C. perfringens* och 100 CFU/g för Enterokocker

Parameter	Säsong	Koliforma bakterier	<i>E. coli</i>	Enterokocker	<i>C. perfringens</i>
Antal analyserade prover	Vår	98	99	99	99
	Höst	63	63	63	54
Antal/(%) positiva prover	Vår	40/(41)	3/(3,0)	4/(4,0)	2/(2,0)
	Höst	56/(89)	8/(13)	11/(18)	10/(18)
Högsta uppmätta halt (antal/g)	Vår	>10 ⁶	410	300	10
	Höst	>10 ⁶	270	15000	30
Median för positiva prover (antal/g)	Vår	1200	40	100	10
	Höst	4300	10	300	10

Sammantaget visar resultaten från analyserna av grödor att det framförallt är koliforma bakterier som återfinns på grödorna medan fynd av *C. perfringens* och de mer fekalt relaterade indikatorerna *E. coli* och Enterokocker påträffas mer sällan. I vissa fall finns det en samstämmighet mellan provreplikat från samma odlingsfält, men det verkar även vara relativt vanligt med sporadisk förekomst av föroreningar (data visas inte). Vid kontroll av gröda bör man därför inte förlita sig på enskilda stickprov för att bedöma om ett parti är förorenat eller inte utan istället analysera flera prover från samma odlingsfält.

Resultat – sammanfattning

Vattenkvalitet hos svenska odlare

Vatten från brunnar håller en högre kvalitet än ytvatten från åar och dammar. Fekala indikatorer påvisades i några enstaka prov, men i låga halter i brunnarna. I ytvatten förekom indikatorbakterier i större utsträckning. Liksom i EU-projektet Veg-i-trade (Ceuppens, *et al.*, 2015) påvisas patogener i mindre utsträckning vid låga *E. coli*-halter. I korthet var de viktigaste resultaten:

- Inget vatten från borrade brunnar innehöll ESBL-bildande *E. coli*, *Campylobacter*, *Salmonella* eller Shigatoxin-producerande *E. coli* (STEC) i detekterbara halter.
- I ytvattnen återfanns samtliga fyra patogener: *Campylobacter* var vanligast med åtta positiva prover ($n = 36$) följt av STEC (6/36), ESBL-bildande *E. coli* (4/36) och *Salmonella* (1/36). I två av de tolv testade ytvattnen återfanns ingen av dessa organismer medan ett av vattnen innehöll samtliga fyra.
- I fem respektive fyra av de 13 vattnen med ursprung i brunnar detekterades de fekala indikatorerna *E. coli* och Enterokocker och medelhalterna låg på 2,8 respektive 1,1 MPN/100 ml efter spridare. Huvuddelen av de förorenade vattnen som härrörde från brunnar hade mellanlagrats i damm.
- Bland proverna med ytvatten som källa detekterades fekal förorening i nästan samtliga och då i halter som i medeltal var 40 - 80 gånger högre än i vattnen från brunnar. Av ytvattnen var det endast de som behandlats med fotokatalys/UV-ljus som en eller flera av indikatororganismerna inte detekterades.
- Reduktionen för fotokatalys/UV-ljus var runt 100 gånger för *E. coli* och koliforma bakterier, 35 gånger för Enterokocker och sju gånger för *C. perfringens*.
- Efter transport genom rörsystem hade förekomst och halter av koliforma bakterier ökat från i medeltal 37 till 210 per 100 ml. I tre av de elva bevattnings-systemen hade även någon eller några av indikatorerna *E. coli*, Enterokocker och *C. perfringens* tillkommit. Dessutom påträffades *Campylobacter* och ESBL-bildande *E. coli* i varsitt vatten efter men inte innan bevattningssystemet.

Förorening av grödor hos svenska odlare

Sammantaget visar resultaten från analyserna av grödor att det framförallt är koliforma bakterier som återfinns på grödorna medan fynd av *C. perfringens* och de mer fekal relaterade indikatorerna *E. coli* och enterokocker påträffas mer sällan.

- Inga fynd gjordes av de sjukdomsframkallande mikroorganismerna *Campylobacter*, *Salmonella* eller STEC men vid ett tillfälle detekterades ESBL-bildande *E. coli*.
- Av de grödor som bevattnats med ytvatten, inklusive grundvatten som är mellanlagrat i damm, var 16 % (15/93) positiva för någon av de fekala indikatorerna. Motsvarande siffra för grödor bevattnade med vatten från borrade brunnar var 14 % (11/78).
- De fekala indikatorerna *E. coli* och Enterokocker detekterades vid nio tillfällen ($n = 54$) vardera medan *C. perfringens* kunde påvisas i åtta av 51 prov.
- I vissa fall finns det en samstämmighet mellan provreplikater från samma odlingsfält, men det verkar även vara relativt vanligt med sporadisk förekomst av föroreningar.
- Vid kontroll av gröda bör man inte förlita sig på enskilda stickprov för att bedöma om ett parti är förorenat utan istället analysera flera prover från samma odlingsfält.

Amplikonsekvensering som komplement till traditionella indikatorer

Amplikonsekvensering är en metod som bygger på att en del av det totala DNA:t sekvenseras. Analysen fokuserar på att studera diversitet inom bakteriesamhällen genom att i detalj undersöka skillnader i 16S rDNA-genen som återfinns i de flesta bakteriers arvsmassa (McLellan & Eren, 2014). För bakgrund och resultat av analyserna med amplikonsekvensering, läs bilaga 2.

I korthet; överlag erhöles svaga korrelationer mellan de framtagna kvalitetsmåten från amplikondata och traditionella indikatorer. Amplikondata kan dock komplettera vanliga indikatoranalyser.

- Ett sätt att utnyttja sekvenseringsdata är att använda hela spektrat av taxonomiska enheter som signal och jämföra mot kända signaturer av olika föroreningar. Denna metod identifierade häst som den fekala källan till de kontaminerade romansallatsproverna.
- Fekal påverkan av vildfågel kunde detekteras på blomkål från samma gård. Dock var inte bevattningsvattnet påverkat, utan det är troligare att kontaminationen skett på annat sätt.
- Framtida arbeten inom området kan innefatta utveckling och framtagande av PCR-baserade markörer för vattenkvalitet för att detektera fekal förorening av bevattningsvattnet på plats.

Kvantitativ riskvärdering

Även om resultaten i fler studier (Ceuppens, *et al.*, 2015, Johannessen, *et al.*, 2015) visar på låg sannolikhet att hitta patogener i vattnet, än mindre på gröda, vid *E. coli*-halter lägre än 100 MPN/100 ml i bevattningsvattnet betyder det inte att produkten är riskfri. Detta eftersom fler av patogenerna, såsom STEC, kan orsaka sjukdom vid låga halter. Därför gjordes en kvantitativ riskvärdering för att se vilken effekt bevattning med ytvatten av olika kvalitet kan ha med avseende på sannolikheten för infektion orsakad av STEC.

Faroidentifiering

Vegetabilier kan bli kontaminerade av bakterier, virus och parasiter via bevattning och jord/gödsel (Hofmann, *et al.*, 2014). Baserat på sju olika kriterier rankade EFSA (2013) betydelsen för olika kombinationer av patogener och icke-animaliska livsmedel. De tre topprankade grupperna var: (1) *Salmonella* spp. och bladgrönsaker, (2) *Salmonella* spp. och lök- och stjälkgrönsaker; *Salmonella* spp. och tomater; *Salmonella* spp. och meloner; och patogena *E. coli* och färska skid- och baljväxter eller gryn; (3) norovirus och bladgrönsaker, *Salmonella* spp. och groddar; och *Shigella* spp. och färska skid- och baljväxter eller gryn. Sverige har dock en låg förekomst av salmonella i sina djurbesättningar och under svenska förhållanden är det STEC i bladgrönt som klassas högst, följt av norovirus på bär (Livsmedelsverket, 2017). Detta eftersom konsekvenserna kan bli allvarliga efter infektion av STEC O157:H7 klad 8 som finns i Sverige och som orsakade det ehec-utbrott som skedde 2005 (Soderstrom, *et al.*, 2008). Det finns däremot inga rapporterade virusutbrott från svenska bär.

Farokarakterisering

Shigatoxinproducerande *E. coli* kan orsaka enterohaemorrhagisk *E. coli*-infektion, EHEC; Ofta börjar sjukdomen med magkramper och diarré, men sällan feber. Illamående och kräkningar kan förekomma. Efter två till tre dygn kan diarrén bli blodblandad. Sjukdomen går normalt över inom en vecka. Hos cirka fem procent av patienterna (framför allt barn under fem år och äldre personer) kan hemolytiskt uremiskt syndrom (HUS) utvecklas. HUS innebär sönderfall av röda blodkroppar och njursvikt, vilket ofta kräver intensivvårdsbehandling och dialys. Även koagulations- och blödningsrubbingar samt neurologiska symtom kan uppstå (Folkhälsomyndigheten, 2017). I denna riskvärdering har en dos-responsmodell för livsmedelsburen shigellos från Strachan, *et al.* (2005) använts i den kvantitativa modellen (Ekvation 1). Exponeringen för en bakterie beräknas orsaka sjukdom i var hundra person. Från 1 000 fall bedöms folkhälsobördan vara 158 DALY³ (Mangen, *et al.*, 2015).

Ekvation 1: $P_{inf} = 1 - (1 + Dos/15,04)^{-0,16}$

³ Disability Adjusted Lifeyears (DALY) är ett kvantitativt mått på sjukdomsbördan i en population som är lika med summan av antalet förlorade år på grund av för tidig död och antalet år som levs med funktionsnedsättning.

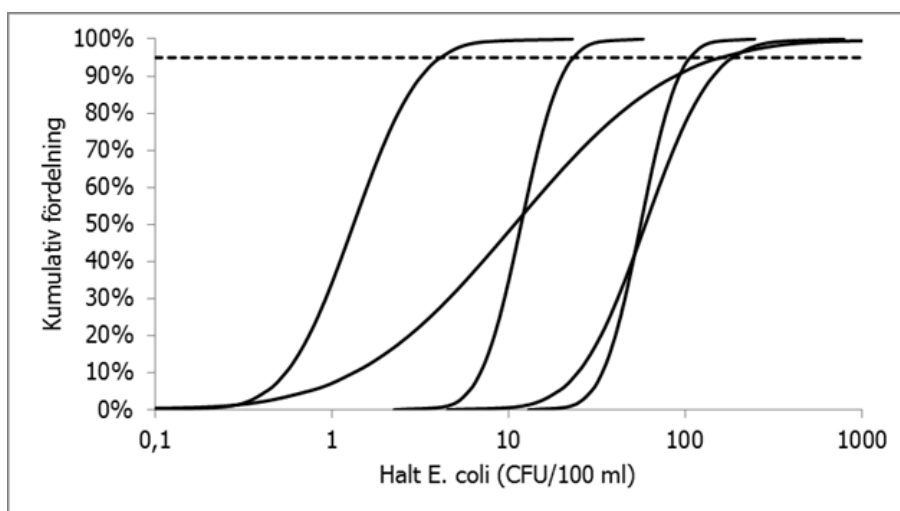
Exponeringsuppskattning

Det angreppssätt som har antagits är att vattnet som hamnar på grödan är den viktigaste spridningsvägen. Beräkningen baseras på en vattenkvalitet (mätt som *E. coli* från nötkreatur) vid sista bevattning samt inaktivering baserat på olika upphållstider enligt modell från Ottoson, *et al.* (2011). Antalet fall baseras på att all odling sker med ytvatten av denna kvalitet med avseende på *E. coli*, som i stor utsträckning används som indexorganism för STEC-förekomst i vatten, jord och på gröda (Ceuppens, *et al.*, 2015). För att uppskatta halten STEC användes samma kvot som i Ottoson, *et al.* (2011) där det i medeltal går en STEC på 79 *E. coli* ($10^{\text{risknormal}(-1,9; 1,3; \text{truncate } 0; -7)}$) i gödsel från positiva besättningar (Riskbeta (34; 339), Eriksson *et al.*, 2005). Alla STEC antogs vara patogena.

Halten *E. coli* i vattnet: Vattenkvaliteten simulerades från ett antal badvatten som alla är klassade som utmärkta med avseende på förekomsten av *E. coli* (Figur 3). I den provtagning som görs bedöms vattnet med avseende på resultaten under en fyraårsperiod där 95e percentilen i en lognormalfördelning inte ska ligga över 500 CFU/100 ml (EU, 2006).

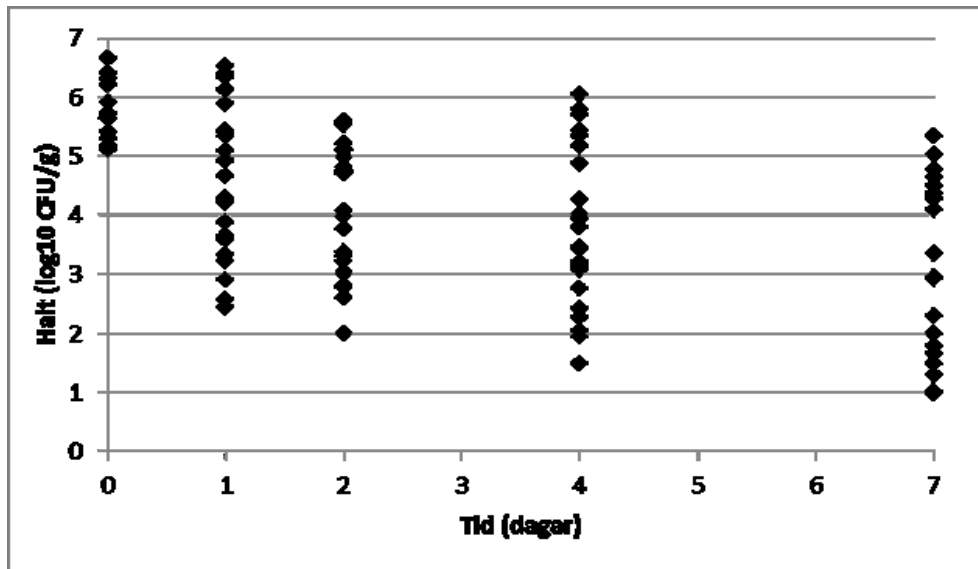
Fastläggning på gröda: Vid bevattning av olika grödor har det visat sig att för isbergssallat fastnar 10,8 ml vatten per 100 g bladgrönt (Shuval, *et al.*, 1997). Det antas att alla bakterier i den vattenmängden blir kvar på grödan efter att vattnet har avdunstat.

Inaktivering under karenstid: I Ottoson, *et al.* (2011) gjordes kontrollerade försök under svenska förhållanden på överlevnaden av *E. coli* O157 vid olika temperaturer och ljusintensiteter. Det gick dock inte att anpassa någon linjär modell till försöksdata på sallat utan reduktionen bedömdes som halten vid provtagningstillfället – halten efter applicering. Prov på sallat togs efter 1, 2, 4 och 7 dygn (Figur 4). I scenario 1:1 användes 2 dagars uppehållstid och dubbla inaktiveringen efter sju dagar för att harmonisera med EU (2017) för att jämföra exponeringen mellan olika gränsvärden och uppehållstider.



Figur 3. Kumulativa fördelningar av halten *E. coli* från sex inlandsbad som alla levde upp till en utmärkt badvattenkvalitet med avseende på parametern *E. coli*, d.v.s. 95e percentilen (streckad linje) < 500 CFU/100 ml. Effekten på antal fall som bevattning med dessa 48 timmar innan skörd visas i Tabell 14.

Konsumtion: En portion sallat har uppskattats till 20 g (Perez, 2017). Med en total svensk produktion av isbergssallat motsvarande 24 000 ton (Jordbruksverket, 2016) innebär detta drygt en miljard portioner. Sköljning i det egna köket kan ge motsvarande 10 gånger minskad risk (8 – 12) (Ottoson, *et al.*, 2011), denna räknades dock inte in i riskvärderingen.



Figur 4. Halten *E. coli* O157 på isbergssallat med avseende på tid efter bevattning vid temperaturer från 11 – 25 °C och ljusintensiteter mellan 0 – 600 mml/m² · s (Ottoson, *et al.*, 2011).

Riskkaraktärisering

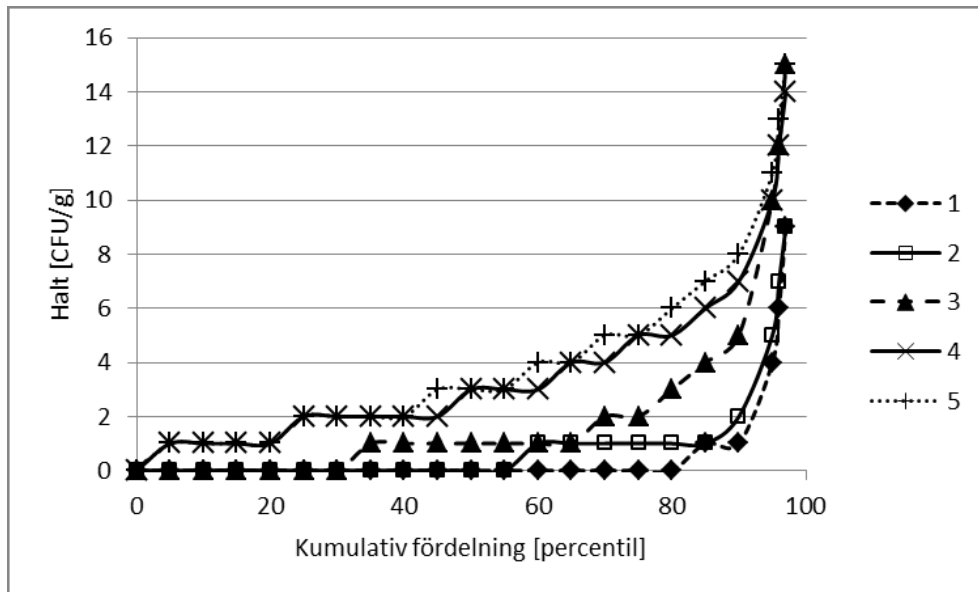
Scenario 1:1: Sannolikheten för infektion ligger mellan $10^{-8,3}$ och $10^{-6,6}$ per portion. Om all isbergssallat som produceras i Sverige (24 000 ton; cirka en miljard portioner) bevattades med ytvatten som lever upp till utmärkt badvattenkvalitet med avseende på *E. coli* (Figur 3) leder det till mellan 5 och 267 infektioner per år (Tabell 14). Dessa siffror ger en överskattning av risken eftersom samtliga *E. coli* i bevattningsvattnet antas komma från nötkreatur som utsöndrar högpatogena STEC. Alltså togs inte hänsyn till det uppströmsarbete (identifiering av föroreningskällor) som förväntas av odlaren enligt (IP Fukt och Grönt, Global GAP och LRF, se ovan). Sett till riskhantering för dricksvatten ger ett funktionellt vattenskyddsområde med övervakning av råvattenkvaliteten som mest 0,75 log avdrag på den barriärhöjd som krävs (Svenskt Vatten, 2015). Eftersom det i rikt odlingslandskap kan vara svårt att helt begränsa påverkan från betesdjur eller gödselspridning gjordes en nedräkning motsvarande 0,5 log för en inventering och en minskning i P_{inf} med cirka 2/3 (Tabell 14). Vidare sker större delen av produktionen i Sverige med grundvatten av god eller mycket god kvalitet där *E. coli* sällan påvisas. Den haltreducerande effekten av sköljning av produkten har inte heller tagits med i riskkaraktäriseringen. Med en uppehållstid mellan sista bevattning (med ytvatten) och skörd på två veckor, såsom EU (2017) föreslår, skulle potentiellt alla fall kunna undvikas. Detta bygger dock på att det finns möjlighet till en annan vattenkälla, alternativt rening av vattnet under denna period eftersom 14 dagar utan vatten skulle påverka såväl produktens kvalitet som den kvantitet som kan produceras avsevärt (Markland, *et al.*, 2017).

Tabell 14. Halten *E. coli* i bevattningsvatten uttryckt som en fördelning baserat på ett antal strandbadvatten (inland) och sannolikheten för infektion (P_{inf}) som konsumtion av 20 g isbergssallat medför, samt antalet infektioner/år vid två respektive 14 dagars uppehållstid mellan sista bevattning och skörd. En uppströms inventering kan reducera risken motsvarande 60 – 70 %

<i>E. coli</i> ^a [log CFU/100 ml]	P_{inf} (90 % CI) [log ₁₀ per portion]	Infektioner (90 % CI) [per år]		Inventering ^c [per år]
		2 dagar ^b	14 dagar ^b	
0,123 ± 0,30	-8,3 (-8,8 -7,8)	5 (2 – 16)	0 (0 – 10)	2
1,072 ± 0,18	-7,3 (-7,6 -7,0)	47 (24 – 92)	0 (0 – 89)	15
1,035 ± 0,71	-7,4 (-8,5 -6,2)	43 (3 – 629)	0 (0 – 111)	14
1,776 ± 0,30	-6,6 (-7,1 -6,1)	236 (76 – 733)	0 (0 – 430)	74
1,831 ± 0,33	-6,6 (-7,1 -6,0)	267 (77 – 933)	0 (0 – 528)	85

^a Fördelningar från badvattenrapporteringen, ^b Upphållstid mellan sista bevattning och skörd, ^c Inventering av föroreningskällor som ger motsvarande 0,5 log reduktion av halten STEC

Scenario 1:2: Det finns sedan ett tag mer avancerade modeller för att bedöma mikrobiologiska halter på grödor och hur de kan påverkas av stänk från jord vid bevattning och regn samt vad upprepad bevattning ger för halter i slutändan, jämfört med antagandet att sista bevattningen har enskilt störst betydelse (Allende, *et al.*, 2017). Med svenska data på soltimmar och regndagar under juni månad samt vattenkvaliteter enligt samma fem fördelningar som i Tabell 14 införda i modellen av Allende, *et al.* (2017) bedömdes föroreningen på babyspenat (Figur 5). Störst betydelse för hög kontaminering hade stänk från jord som kommer från såväl regn som vid bevattning. Det var dock en tydlig tendens att vattenkvaliteten vid lägre föroreningsgrad av grödan gjorde skillnad (Figur 16). Vidare riskerar upprepad bevattning med vatten av dålig kvalitet att förorena marken som vid ett senare skede kan hamna på plantan, då överlevnaden av STEC i jord är bättre än på planta (Bezanson, *et al.*, 2012).



Figur 5. Kvaliteten på bevattningsvatten (1-5, se Tabell 14) och kumulativ halt (*E. coli*/g) på bevattnad babyspenat (1a – 98e percentilen).

Känslighetsanalys

Fler olika ingångsparametrar i modellen för scenario 1:1 hade signifikant betydelse för utkomsten i form av sannolikheten för infektion. Störst betydelse hade STEC-inaktiveringen på grödan under upphållstiden mellan sista bevattning och skörd följt av kvoten STEC:*E. coli*, vattenkvaliteten, fastläggningen på grödan och STEC-prevalensen i nötbесättningar.

Dataluckor

Som synes i Tabell 14 är konfidensintervallet ganska brett med stor variation i uppskattningen av antalet fall. Där ingångsparametrarna är osäkra och samtidigt har stor betydelse för utfallet är det viktigt att kunna förbättra informationen för att kunna göra bättre skattningar av risken. Vi har identifierat fyra kunskapsluckor där bättre data är önskvärda:

1. *Utsöndring av STEC från infekterade djur*: Bättre data på förekomsten av STEC samt halter på utsöndring av infekterade djur eller i gödsel skulle bidra till en säkrare kvot för förhållandet STEC:*E. coli*, vilket i sin tur ger en bättre precision i bedömningen. Även patogeniciteten hos olika STEC varietter. I en svensk kartläggning på kött var inte någon av påvisade STEC av högpatogen typ (Flink, 2016).
2. *Andelen av bakterierna i bevattningsvattnet som faktiskt fastnar på grödan*: Att mäta den ökade vikten efter bevattning är ett bra angreppssätt och data från Shuval, *et al.* (1997) är använt i olika riskvärderingar (Hamilton, *et al.*, 2006, WHO, 2006, Ottoson, *et al.*, 2011), men hur bra stämmer det och vad händer vid upprepade bevattningar?
3. *Stänk från jord till gröda*: I ett alternativt tillvägagångssätt modellerades den fekala föroreningen på gröda mätt som *E. coli* som en funktion av bevattningsvatten och stänk från jord (Figur 16). Det visade sig att stänk hade störst betydelse för kontamineringen vid hög förorening. Däremot är det inte klart huruvida bevattningsvattnet kan vara en viktig anledning till ackumuleringen av *E. coli* i jord förutsatt korrekt hantering av jordförbättrare (gödsel och slam) eller vid användning av konstgödsel (WHO, 2006, EU, 2017).
4. *Dos-responsmodell*: Vi använde inte någon fördelning på dos-responsmodellen vilket gör att den inte finns med i känslighetsanalysen. Den bygger på data från utbrott där en större andel

av den exponerade befolkningen har fått symtom (Strachan, *et al.*, 2005). Sannolikheten för infektion som bestämmer den acceptabla risken på populationsnivå ligger dock i ett intervall där det saknas data på responsen. Sätter man in en dos på en bakterie i Ekvation 1 får man en sannolikhet för infektion motsvarande 0,01, det vill säga att var hundra person får EHEC efter exponering för en STEC-bakterie. Är detta ett rimligt antagande eller gör vi en överskattning av risken?

En annan faktor som stack ut i känslighetsanalysen är inaktiveringen på grödan under karenstiden mellan sista bevattning och skörd. Detta speglar förmodligen till största delen en naturlig variation beroende på framför allt temperatur, solinstrålning samt vilken mikrobiota som finns på plantan. Troligtvis skulle inte ytterligare undersökningar ge information som bättre kan visa på hur väl uppehållstiden ger önskvärd säkerhet.

Riskhanteringsåtgärder

Dammar

I en damm sker en avskiljning av mikroorganismer genom sedimentering samt en inaktivering som är beroende av framför allt temperatur och UV-ljus (Reinoso, *et al.*, 2011, Verbyla & Mihelcic, 2015). I många länder används dammar som ett efterpoleringsteg för sekundärt renat avloppsvatten (Verbyla & Mihelcic, 2015) samt utnyttjas för rening av dagvatten i Sverige (Blecken, 2016). I ett arktiskt klimat (Kanada) har reningseffekten uppmätts till 2 – 3 log (99 – 99,9 %) av indikatorbakterier (Huang, *et al.*, 2017). Dammar kan skapas genom: i) Sjöreglering, dämning vid utloppet, ii) Uppdämning i ett vattendrag, iii) Fyllning av friliggande anlagt magasin med ytvatten från intilliggande vattendrag med självfall under högvattenperioden, grund-, dränerings- eller ytvatten med hjälp av pumpning och/eller självfall eller vatten från en högre i vattendraget belägen uttagspunkt, samt, iv) grävning i områden med hög grundvattennivå (Alsanius & Jakowlew, 2017b). Med vallar som skyddar från ytvattentillrinning samt skydd för åtkomst för vilda djur kan vatten som samlas in under höst- och vårflooder användas under odlingsäsongen med en förbättrad kvalitet. Däremot försämrades kvaliteten på från början rena grundvatten under lagring i dammar (Tabell 10). Ett faktablad som vägleder processen för konstruktionen av bevattningsmagasin (dammar) har tagits fram inom ramen för projektet (Alsanius & Jakowlew, 2017b).

Vattenkvalitet och provtagning

Ett bra grundvatten håller i regel dricksvattenkvalitet där fekala indikatorbakterier inte påvisas (Tabell 5). I dessa fall behövs inte frekvent regelbunden provtagning. Riskperioder för en sämre kvalitet är framförallt under höstregn när marken är mättad vilket innebär en sämre reduktion av mikroorganismer under filtreringen (Lindberg & Lindqvist, 2005, EU, 2017). Kvaliteten på ytvatten flukturerar däremot snabbare än grundvatten och kan, beroende på föroreningskällor i avrinningsområdet, utgöra en risk för kontaminering av produkten (Anon, 2017b). Därför är det viktigt med en inventering över vilka möjliga källor till föroreningar som finns - de viktigaste är utsläpp av avloppsvatten och gödsel till vattentäkten - och se till att dessa inte påverkar vattnet vid uttagspunkten. För att få en bild av hur väl vattnet är skyddat från föroreningar under växtsäsong är bör ett provtagningsprogram sättas upp. *E. coli* som indikator för patogenförekomst är väl fastslagen (Castro-Ibanez, *et al.*, 2015, Ceuppens, *et al.*, 2015) men kan kompletteras med de mer tåliga intestinala enterokockerna (Tabell 1) samt Salmonella som modellpatogen (Alsanius, *et al.*, 2010). Analys av *E. coli* samt fekala enterokocker går att göra hos de flesta laboratorierna som utför vattenanalyser till ett rimligt pris (som analys för strandbadvatten). Laboratorierna erbjuder i regel även analys för salmonellaförekomst (Anon, 2017b).

Ett faktablad som vägledning för provtagning av ytvatten för bevattning har tidigare tagits fram av medlemmar inom projektet (Alsanius, *et al.*, 2010). I detta föreslås att man vid kontroll av ytvatten tar fem enskilda prover under en trettiodagarsperiod som analyseras för *E. coli*, intestinala enterokocker

samt *Salmonella* spp. Salmonella bör inte påvisas i 100 ml prov medan det geometriska medelvärdet⁴ bör vara ≤ 77 MPN/100 ml för *E. coli* och 20 MPN/100 ml för intestinala enterokocker för bevattning av grödor som konsumeras råa (Alsanius, *et al.*, 2010). Sista två dagarna innan skörd bör det vid behov av vattning ske med vatten av dricksvattenkvalitet, alternativt ytvatten som har renats med hjälp av filtrering eller fotokatalys/UV-ljus (se nedan).

Vattenrening

Genom adekvat behandling av bevattningsvattnet kan dess hygieniska kvalitet förbättras. I ett faktablad som tagits fram inom projektet beskrivs två grundläggande tekniker för rening av bevattningsvatten vid frilandsproduktion, nämligen fotokemi (fotokatalys, UV) och filtrering (mekanisk filtrering, långsamfiltrering) (Tabell 15, Alsanius & Löfström, 2017). Fler av de provtagningsplatser som har varit med i projektet använder sig av fotokatalys eller UV-ljus i fält. Reduktionen i dessa har motsvarat 1 - 2 log (90 - 99 %) av indikatorbakterier, men lägre för de UV-tåliga clostridiesporerna (Tabell 11).

Tabell 15. Egenskaper hos olika vattenreningstekniker som används vid produktion av frilandsgrönsaker (Alsanius & Löfström, 2017)

Reningstyp	On-line applikation	Reningsgrad ^a	Klarar mycket partiklar	Behov av plats	Behov av underhåll	Pris ^e
Mekanisk filtrering	Ja	Låg	Ja	Låg	Låg ^d	Låg
Långsamfiltrering	Nej	Hög ^b	Ja	Hög	Låg	Låg
Fotokatalys UV	Ja	Hög ^{b,c}	Nej	Låg	Regelbunden	Hög

^a Med avseende på mikroorganismer, ^b Flödes hastighet resp. exponeringstid är avgörande för reningsgrad, ^c Strålarnas spektrum, lamptyp samt styrka är avgörande för reningsgrad, ^d Förutsatt att filtret är utrustat med automatisk backspolning, ^e För investering

Utrustning

Vattnet kan kontamineras på sin väg från källan till spridaren. Vidare kan en bakteriell tillväxt ske i stillastående vatten. I de system inom projektet där vatten togs direkt från en borrhåll gjordes provtagning nära källan och efter spridaren. En viss försämring av kvaliteten med avseende på indikatororganismer kunde uppmätas efter utrustningen även om den var liten (Tabell 9). Ett faktablad för vikten av god hygienpraxis med avseende på ledningssystemen är framtagna inom ramen för projektet med tips om hur man kan rengöra rör och munstycken samt råd till odlare att: i) Spola igenom bevattningsutrustningen några minuter innan bevattningen påbörjas för att skölja ur systemet samt ii) Konstruera ett bevattningssystem som inte förorenas av jord och ytvatten och där det inte finns sektioner där vatten riskerar att blir stillastående då det gynnar bakteriell tillväxt (Mogren, *et al.*, 2017).

⁴ Det geometriska medelvärdet fås genom att beräkna (det aritmetiska) medelvärdet av log₁₀-värdena uttryckta som CFU/100 ml. Ta sedan antilog av detta värde (10⁴ CFU/100 ml).

Karenstider

Att använda sig av en uppehållstid mellan sista bevattning och skörd ger en möjlighet till naturlig minskning av patogener på grödan då de utöver den temperaturrelaterade inaktivering som sker konkurrerar med en välanpassad mikrobiota samt utsätts för UV-ljus. Variationen i denna reduktion är dock stor men de flesta studier tyder på en relativt snabb inaktivering under de första två till tre dygnen som senare planar ut (Ottoson, *et al.*, 2011, Bezanson, *et al.*, 2012, Markland, *et al.*, 2013). Vid en uppehållstid på två veckor sedan sista bevattning, vilket EU (2017) föreslår, bedöms reduktionen uppgå till cirka 6 log (99,9999 %) (Ottoson, *et al.*, 2011, Allende, *et al.*, 2017) vilket bör generera en säker produkt vid bevattning med mer förorenat vatten; max 100 MPN *E. coli*/100 ml (EU, 2017).

Sköljning

I ett vetenskapligt underlag till Livsmedelsverkets råd till konsumenter om hygien i det egna köket gjordes en sammanställning av experimentella studier som beräknat reduktionen av bakterier och virus i sköljning med vatten. Reduktionen ligger mellan 20 % och > 99 % beroende på vilken patogen från vilket livsmedel som har studerats (Ottoson, 2018). För bladgrönsaker, som håller mer vatten än många andra grönsaker, är den haltreducerande effekten mellan 50 och 95 % beroende på hur länge och noggrant konsumenten sköljer. Två studier där sköljning under kranvatten 15 s utvärderades gav en haltreducering motsvarande 1,41 log (96 %) för *Listeria innocua* (Kilonzo-Nthenge, *et al.*, 2006) och 1,16 log (93 %) för *E. coli* O157 (Pangloli, *et al.*, 2009) från isbergssallat, men > 99 % reduktion av *Listeria innocua* från tomat och äpple (Kilonzo-Nthenge, *et al.*, 2006). Norovirusreduktionen, mätt som minskning av genomkopior efter 30 s sköljning, var 0,77 log (83 %) från isbergssallat, 1,15 log (93 %) från perillblad (Bae, *et al.*, 2011) och mellan 0,1 och 1,5 log (21 – 97 %) från olika bär. Lägst var haltreduktionen av norovirus från hallon (Butot, *et al.*, 2008).

Slutsatser

Förekomst av patogener och indikatorer

- Kvaliteten på såväl vatten som grödor var generellt sett god hos odlarna i projektet.
- I vatten gjordes enstaka fynd av patogener och ESBL-bildande *E. coli*, endast i ytvatten som var mer förorenade med avseende på fekala indikatorer.
- På gröda gjordes inga fynd av patogener. Ett prov på vitkål var däremot positivt för ESBL-bildande *E. coli*.
- Endast ett fåtal prov på gröda visade på högre fekal förorening (> 100 CFU/g). Majoriteten av dessa kom från en och samma odlare som bevattnade med vatten från en damm.
- Bakteriofager som indikator för virusförekomst tillförde inte någon information utöver det som erhålls från de bakteriella fekala indikatorerna. Framför allt behövs en effektiv metod för koncentrerat av bakteriofager från vatten om parametern ska vara med i ett eventuellt provtagningsprogram.
- Med amplikonsekvensering kan man påvisa icke-odlingsbara bakterier på familje- eller genusnivå. Med sekvensdata från olika föroreningskällor kan metoden användas som verktyg för spårning (Bilaga 2).

Riskvärdering

- Även låg fekal förorening och avsaknad av påvisade patogener i bevattningsvatten kan utgöra en risk för mag-tarminfektion vilket visades med hjälp av kvantitativ mikrobiologisk riskvärdering.
- Riskvärderingen kan användas som ett underlag för att föreslå mikrobiologiska kriterier, till exempel med avseende på vattenkvalitet, men osäkerheterna förknippade med värderingen behöver beaktas.
- De viktigaste osäkerheterna är utsöndringen av och patogeniciteten hos STEC från infekterade djur, hur stor andel av dessa som fastnar på den bevattnade grödan, sannolikheten att infekteras vid låga doser (enstaka bakterier) samt vikten av stänk från jord.
- Vid karenstider mellan sista bevattning och skörd sker en inaktivering av patogener. Denna kan variera betydligt beroende på väder (temperatur och solstrålning) samt vilka bakterier som redan finns på grödan och konkurrerar med patogenerna om plats och näring.

Riskhantering

- Olika åtgärder som kan minska risken för utbrott och sjukdomsfall är kriterier för vattenkvalitet, rening av vatten som riskerar att inte uppnå denna kvalitet, uppehållstid mellan sista bevattning och skörd samt sköljning hos konsumenten. Det är också viktigt att se till att hålla utrustningen, såsom rör och munstycken, rena för att undvika föroreningar och tillväxt av bakterier.
- Rekommendationerna från EU är att man under de sista två veckorna innan skörd av ätfärdiga vegetabilier inte bör använda annat än vatten av dricksvattenkvalitet (om så är möjligt). Fram till dess bör halten *E. coli* i vattnet inte överstiga 100 MPN/100 ml vid bevattning ovanifrån, 1 000 MPN/100 ml vid droppbevattning.
- Om ytvatten måste användas för bevattning (till exempel vid avsaknad av säker grundvattentäkt) under de sista två veckorna innan skörd bör ett provtagningsprogram utformas som påvisar låg fekal förorening samt avsaknad av salmonella. Sista två dagarna före skörd bör dock endast vatten av dricksvattenkvalitet användas.
- I bästa fall bör ytvatten genomgå rening före bevattning. Detta kan göras till exempel med hjälp av fotokalys, UV-ljus eller filtrering.
- Denna rapport begränsades till att behandla vatten för bevattning men kan även omfatta vatten som används vid besprutning med växtskyddsmedel. Däremot bör sköljnings- och processvatten, efter skörd, alltid vara av dricksvattenkvalitet.
- I en framtid med sjunkande grundvattennivåer, torrare somrar och blötare vintrar finns ett behov av att samla in vatten för bevattning under höst- och vårfloder, samt vintertid, att lagras i magasin för senare användning. Vatten från bevattningsmagasin kan behöva rening innan det används för bevattning beroende på hur skyddat magasinet är från föroreningar.

Referenser

- Alam, M (2014) Microbial status of irrigation water for vegetables as affected by cultural practices. PhD thesis in Biosystems and Technology. Sveriges lantbruksuniversitet 2013:97, Alnarp.
- Allende A, Castro-Ibanez I, Lindqvist R, Gil MI, Uyttendaele M & Jacxsens L (2017) Quantitative contamination assessment of *Escherichia coli* in baby spinach primary production in Spain: Effects of weather conditions and agricultural practices. *Int J Food Microbiol* **257**: 238-246.
- Alsanius B (2014) Hygien och bevattningsvatten. Rapportserie Landskap, Trädgård, Jordbruk 2014:10. Sveriges Lantbruksuniversitet. Alnarp.
- Alsanius B & Jakowlew G (2017a) Lagar och regler vid uttag av vatten för bevattning. *LTV-fakultetens faktablad* 2017:34. Sveriges Lantbruksuniversitet. Alnarp.
- Alsanius B & Jakowlew G (2017b) Anläggning av bevattningsmagasin. *LTV-fakultetens faktablad* 2017: 37. Sveriges Lantbruksuniversitet. Alnarp.
- Alsanius B & Löfström C (2017) Vattenrening för ökad hygien vid odling av frilandsgroänsaker och bär. *LTV-fakultetens faktablad* 2017: 33. Sveriges Lantbruksuniversitet. Alnarp.
- Alsanius B, Kristensen L & Gustafsson P (2010) Rädd för vatten - ta prover! *LTJ-fakultetens faktablad* 2010:17. Sveriges Lantbruksuniversitet. Alnarp.
- Anon; (1999) Bewässerung. Hygienische Belange von Bewässerungswasser. DIN 19650, Berlin: Beuth, 1999. P. 4.
- Anon (2007) Verotoxinbildande *E. coli*, VTEC bakteriers smittvägar, förekomst samt risker för folkhälsan. Livsmedelsverket, Jordbruksverket, Statensveterinärmedicinska anstalt och Smittskyddsinstitutet, Uppsala.
- Anon (2008) Bakgrund till och tillämpning av riktlinjerna för vattenuttag för bevattning m.m. Länsstyrelsen i Skåne, Malmö.
- Anon (2011) Jord- och skogsbruksministeriets förordning om livsmedelshygien vid primärproduktion av livsmedel. Dokument 1368/2011, Helsingfors.
- Anon (2017a) Information om och riktlinjer för vattenuttag för bevattning m.m. Länsstyrelsen i Blekinge, Karlskrona.
- Anon (2017b) Handbok dricksvattenrisker. Mikrobiologiska risker i ytråvatten. Livsmedelsverket, Folkhälsomyndigheten, Totalförsvarets forskningsinstitut, Sveriges lantbruksuniversitet, Statens veterinärmedicinska anstalt. Uppsala.
- Bae JY, Lee JS, Shin MH, Lee SH & Hwang IG (2011) Effect of wash treatments on reducing human norovirus on iceberg lettuce and perilla leaf. *J Food Prot* **74**: 1908-1911.
- Bezanson G, Delaquis P, Bach S, *et al.* (2012) Comparative examination of *Escherichia coli* O157:H7 survival on romaine lettuce and in soil at two independent experimental sites. *J Food Prot* **75**: 480-487.
- Blecken G (2016) Kunskapssammanställning Dagvattenrening. Svenskt Vatten Rapport Nr. 2016-05. Stockholm.
- Brolund A & Sandegren L (2016) Characterization of ESBL disseminating plasmids. *Infect Dis (Lond)* **48**: 18-25.
- Buchholz U, Bernard H, Werber D, *et al.* (2011) German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *N Engl J Med* **365**: 1763-1770.
- Butot S, Putallaz T & Sanchez G (2008) Effects of sanitation, freezing and frozen storage on enteric viruses in berries and herbs. *Int J Food Microbiol* **126**: 30-35.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K & Madden TL (2009) BLAST+ architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**: 421.

- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, *et al.* (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* **6**: 1621-1624.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, *et al.* (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* **7**: 335-336.
- Castro-Ibanez I, Gil MI, Tudela JA, Ivanek R & Allende A (2015) Assessment of microbial risk factors and impact of meteorological conditions during production of baby spinach in the Southeast of Spain. *Food Microbiol* **49**: 173-181.
- Ceuppens S, Johannessen GS, Allende A, *et al.* (2015) Risk Factors for Salmonella, Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Campylobacter Occurrence in Primary Production of Leafy Greens and Strawberries. *Int J Environ Res Public Health* **12**: 9809-9831.
- Crowe SJ, Mahon BE, Vieira AR & Gould LH (2015) Vital Signs: Multistate Foodborne Outbreaks - United States, 2010-2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **64**: 1221-1225.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, *et al.* (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5069-5072.
- EFSA (2013a) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal* **11**: 3129
- EFSA (2013b) Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). *EFSA Journal* **11**: 3025.
- EFSA (2014a) Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (Salmonella and Norovirus in berries). *EFSA Journal* **12**: 3706.
- EFSA (2014b) Scientific opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2. Salmonella and norovirus in leafy greens eaten raw as salads. *EFSA Journal* **12**: 3600.
- Elith J & Leathwick J (2009) Species Distribution Models: Ecological Explanation and Prediction Across Space and Time. *Ann Rev Ecol Evol Sys* **40**: 677-697.
- Eriksson, E., A. Aspan, A. Gunnarsson & I. Vagsholm. (2005). Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) 0157 in Swedish dairy herds. *Epidemiol. Infect.* **133**: 349-358.
- EU (2006) Europarlamentets och rådets direktiv 2006/7/EG av 15 februari 2006 om förvaltning av badvattenkvaliteten och om upphävande av direktiv 76/160/EEG. *Europeiska unionens officiella tidning L* **64**: 37-51.
- EU (2017) Kommissionens meddelande om vägledning för hantering av mikrobiologiska risker med färsk frukt och grönsaker i primärproduktionen genom god hygien. *Europeisk unionens officiella tidning C* **163**: 1-40.
- Flink C, Förekomst av shigatoxinproducerande *Escherichia coli* (STEC) i svenskt nötkött. Livsmedelsverket 2016-06-09. Uppsala.
- Folkhälsomyndigheten (2014) Folkhälsomyndighetens allmänna råd om bassängbad, FoHMSF 2014:12. Solna.
- Folkhälsomyndigheten (2017) Sjukdomsinformation om enterohemorragisk *E. coli*-infektion (EHEC). URL: <https://www.folkhalsomyndigheten.se/smittskydd-beredskap/smittsamma-sjukdomar/enterohemorragisk-e-coli-infektion-ehcc/>. Uppdaterad 2013-10-17, access 2017-12-08. Folkhälsomyndigheten, Solna.
- FSAI (2016) Fresh Produce Safety in Primary Production in Ireland. Guidance note number 31. Food Safety Authority of Ireland. Dublin.
- Gelman A, Lee D & Gou J (2015) Stan: A Probabilistic Programming Language for Bayesian Inference and Optimization. *J Edu Beh Stat* **40**: 530-543.
- Gilbert JA, Jansson JK & Knight R (2014) The Earth Microbiome project: successes and aspirations. *BMC Biol* **12**: 69.
- Global GAP (2017) Integrated farm assurance. All Farm Base - Crops Base - Fruit and Vegetables. Control points and compliance criteria. English version 5.1.

- Hamilton AJ, Stagnitti F, Premier R, Boland AM & Hale G (2006) Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3284-3290.
- HAV (2011) Havs- och vattenmyndighetens föreskrifter och allmänna råd (HVMFS 2012:14) om badvatten. Göteborg.
- Hofmann A, Fischer D, Hartmann A & Schmid M (2014) Colonization of plants by human pathogenic bacteria in the course of organic vegetable production. *Front Microbiol* **5**: 191.
- Huang Y, Truelstrup Hansen L, Ragush CM & Jamieson RC (2017) Disinfection and removal of human pathogenic bacteria in arctic waste stabilization ponds. *Environ Sci Pollut Res Int*. DOI: 10.1007/s11356-017-8816-9
- Johannessen GS, Eckner KF, Heiberg N, Monshaugen M, Begum M, Okland M & Hogasen HR (2015) Occurrence of *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Salmonella* and Shiga-Toxin Producing *E. coli* in Norwegian Primary Strawberry Production. *Int J Environ Res Public Health* **12**: 6919-6932.
- Jordbruksverket (2016) Trädgårdsundersökningen. Sveriges officiella statistik Statistiska meddelanden. Jordbruksverket rapport JO 28 SM 1701, Jönköping.
- Kilonzo-Nthenge A, Chen FC & Godwin SL (2006) Efficacy of home washing methods in controlling surface microbial contamination on fresh produce. *J Food Prot* **69**: 330-334.
- Knights D, Kuczynski J, Charlson ES, *et al.* (2011) Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking. *Nat Methods* **8**: 761-763.
- Li J, Jia H, Cai X, *et al.* (2014) An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol* **32**: 834-841.
- Lindberg T & Lindqvist R (2005) Riskprofil - Dricksvatten och mikrobiologiska risker. Livsmedelsverket Rapport 28-2005, Uppsala.
- Livsmedelsverket (2001) Livsmedelsverkets föreskrifter om dricksvatten. SLVFS 2001:30, Uppsala.
- Livsmedelsverket (2015) Råd om enskild dricksvattenförsörjning. Livsmedelsverket, Uppsala.
- Livsmedelsverket (2017) Klassning av livsmedelsföretag och foderföretag inom primär-produktionen, prioritering och urval av kontrollobjekt. Livsmedelsverket, Uppsala.
- LRF (2014) Nationella branschriktlinjer för livsmedelssäkerhet vid produktion av frilandsodlade bär och grönsaker. LRF Trädgård. Lantbrukarnas Riksförbund, Stockholm.
- Lynch MF, Tauxe RV & Hedberg CW (2009) The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiol Infect* **137**: 307-315.
- Mangen MJ, Bouwknegt M, Friesema IH, *et al.* (2015) Cost-of-illness and disease burden of food-related pathogens in the Netherlands, 2011. *Int J Food Microbiol* **196**: 84-93.
- Markland SM, Shortlidge KL, Hoover DG, *et al.* (2013) Survival of pathogenic *Escherichia coli* on basil, lettuce, and spinach. *Zoonoses Public Health* **60**: 563-571.
- Markland SM, Ingram D, Kniel KE & Sharma M (2017) Water for Agriculture: the Convergence of Sustainability and Safety. *Microbiol Spectr* **5**. doi: 10.1128/microbiolspec.PFS-0014-2016.
- McLellan SL & Eren AM (2014) Discovering new indicators of fecal pollution. *Trends Microbiol* **22**: 697-706.
- Mikhail AFW, Jenkins C, Dallman TJ, *et al.* (2018) An outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 associated with contaminated salad leaves: epidemiological, genomic and food trace back investigations. *Epidemiol Infect* **146**: 187-196.
- Mogren L, Alsanius B & Löfström C (2017) Håll bevattningsrören rena. *LTV-fakultetens faktablad* 2017: 35.
- Newton RJ, Bootsma MJ, Morrison HG, Sogin ML & McLellan SL (2013) A microbial signature approach to identify fecal pollution in the waters off an urbanized coast of Lake Michigan. *Microb Ecol* **65**: 1011-1023.
- Nousiainen LL, Joutsen S, Lunden J, Hanninen ML & Fredriksson-Ahomaa M (2016) Bacterial quality and safety of packaged fresh leafy vegetables at the retail level in Finland. *Int J Food Microbiol* **232**: 73-79.

- Ottoson J (2018) Riskvärderingsrapport - Handhygien, rengöring och korskontamination. Livsmedelsverket rapport 5-2017 del 2b, Uppsala.
- Ottoson JR, Nyberg K, Lindqvist R & Albiñ A (2011) Quantitative microbial risk assessment for *Escherichia coli* O157 on lettuce, based on survival data from controlled studies in a climate chamber. *J Food Prot* **74**: 2000-2007.
- Pangloli P, Hung YC, Beuchat LR, King CH & Zhao ZH (2009) Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 on produce by use of electrolyzed water under simulated food service operation conditions. *J Food Prot* **72**: 1854-1861.
- Reinoso R, Blanco S, Torres-Villamizar LA & Becares E (2011) Mechanisms for parasites removal in a waste stabilisation pond. *Microb Ecol* **61**: 684-692.
- SFS (1998) Miljöbalk. Miljö- och energidepartementet, Dokument 1998:808.
- SFS (1998) Förordning (1998:1388) om vattenverksamhet m.m. Miljö- och energidepartementet, Dokument 1998:1388.
- Shuval H, Lampert Y & Fattal B (1997) Development of a risk assessment approach for evaluating wastewater reuse standards for agriculture. *Water Sci Technol* **35**: 15-20.
- Sigill Kvalitetssystem (2016) Standard för kvalitetssäkrad produktion av bär, frukt, potatis, frilands- och växthusgrönsaker med tillval för klimatcertifiering. Sigill kvalitetssystem AB. IP Standard, version 2016:1. Stockholm.
- SMHI (2017) Förändrade framtida vattenförhållanden. <https://www.smhi.se/klimat/framtidens-klimat/vattenforhallanden-1.32795>. Uppdaterad 2016-11-08, access 2017-12-08. Sveriges meteorologiska och hydrologiska institut, Norrköping.
- Soderstrom A, Osterberg P, Lindqvist A, *et al.* (2008) A large *Escherichia coli* O157 outbreak in Sweden associated with locally produced lettuce. *Foodborne Pathog Dis* **5**: 339-349.
- Strachan NJ, Doyle MP, Kasuga F, Rotariu O & Ogden ID (2005) Dose response modelling of *Escherichia coli* O157 incorporating data from foodborne and environmental outbreaks. *Int J Food Microbiol* **103**: 35-47.
- Svenskt Vatten (2015) Förenklad MBA, Mikrobiologisk BarriärAnalys. Svenskt Vatten Rapport P112. Stockholm.
- Tataryn J, Morton V, Cutler, J, Whitfield Y, Billard B, Gad RR & Hexemer A (2014) Outbreak of *E. coli* O157:H7 associated with lettuce served at fast food chains in the Maritimes and Ontario, Canada, Dec 2012. *Can Commun Dis Rep* **40(Suppl 1)**: 2-9.
- Verbyla ME & Mihelcic JR (2015) A review of virus removal in wastewater treatment pond systems. *Water Res* **71**: 107-124.
- WHO (2006a) Drinking water guidelines. World Health Organization. Geneva.
- WHO (2006b) Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. World Health Organization. Geneva.
- Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, *et al.* (2012) Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**: 222-227.

Bilaga 1. Mikrobiologiska analysmetoder

Vatten

E. coli och koliforma bakterier analyserades med Colilert-18 (IDEXX) och Enterokocker med Enterolert-E (IDEXX) enligt tillverkarens instruktioner. För analys av sporer av *C. perfringens* (egentligen sporer från sulfitreducerande bakterier) användes EN 26 461-2 "Vattenundersökningar – bestämning av sporer från sulfitreducerande anaeroba bakterier (i resultatdelen kallat *Clostridium perfringens*) – del 2: membranfiltermetod" med följande modifieringar: 1) Istället för Tryptos-sulfitagar användes Tryptos-sulfit-cycloserin-agar (TSC) och 2) vattnet upphettas till 80°C istället för 75 °C. Båda modifieringarna gjordes för att överensstämna med den metod som användes för livsmedelsproverna (se nedan).

För *Campylobacter*, *Salmonella*, STEC och ESBL-bildande *E. coli* användes interna metoder där 1 l vatten filtrerades genom 0,22 µm (*Campylobacter*) eller 0,45 µm (övriga) 90 mm nitrocellulosamembran (MicronSep, Maine Manufacturing). En gemensam filtrering gjordes för *Salmonella* och STEC varefter filtret placerades i 250 ml buffrat peptonvatten (BPV) och inkuberades vid 37 °C över natten. Därefter fortsattes analyserna som nedan för livsmedel. För *Campylobacter* placerades filtret i 100 ml Boltonbuljong i en flaska där en mikroaerofil miljö erhöles genom att korken skruvades åt hårt. Efter inkubering i 37 °C i 48 h följdes "NMKL No. 119, Termotolerant *Campylobacter* - Påvisning, semi-kvantitativ och kvantitativ bestemmelse i levnedsmidler og drikkevand". För ESBL-bildande *E. coli* användes den interna metoden "MI.m196.2 ESBL-producerande *E. coli* i vatten" där filtret inkuberas i BPV med 1 µg/ml Cefotaxime och analyserades enligt nedan för livsmedel.

I de kvantitativa analyserna av bakteriofager användes 10 ml vatten som filtrerats genom 0,45 µm. Provet blandades med värdstam och smält blodagarbas (BAB) varpå blandningen överfördes i petriskålar. Efter inkubering i 37 °C i 18 timmar räknades antalet synliga plack och resultaten registrerades uttryckt som PFU (plaque-forming units) per 10 ml provvolym. Analys av bakteriofager bygger på bildandet av plack där de fager som förekommer i provet har infekterat värdstammen och bildar en klar zon. För bestämning av antalet f-specifika fager och somatiska kolifager analyserades vattenprover mot värdstammarna *Salmonella enterica* serotyp Typhimurium WG49 (ATCC 700730) respektive *E. coli* (ATCC 13706). Som positiv kontroll för analyserna användes bakteriofagerna MS2 (ATCC 15597-B1) och PhiX 174 (ATCC 13706-B1).

Grödor

För kvantitativa analyser användes 10 g livsmedel som homogeniserades i 90 g peptonvatten (PV). *E. coli* och koliforma bakterier analyserades genom utspridning på Chromocult® Coliform ES-agar (ej standardmetod, detektionsgräns 10 cfu/g). För enterokocker användes "NMKL No. 68 Enterococcus. Bestemmelse i næringsmidler och fôr" (detektionsgräns 100 cfu/g). För analys av *C. perfringens* (egentligen sporer från sulfitreducerande anaeroba bakterier) användes "NMKL No. 56. Anaerobic sulphite reducing bacteria. Determination in foods" med upphettning till 80 °C (valfri i metoden,

detektionsgräns 10 CFU/g). Dessutom används Trypton-Sulfit-Cycloserin (TSC)-agar istället för järnsulfitagar för att resultatet skulle kunna jämföras med vattenproverna.

I de kvalitativa analyserna användes 25 g livsmedel. Salmonella analyserades enligt ”NMKL No 71. Salmonella” och Campylobacter enligt ”NMKL Nr 119 Termotolerant Campylobacter - Påvisning, semi-kvantitativ og kvantitativ bestemmelse i levnedsmidler og drikkevand”. För STEC användes ISO/TS 13136:2012 ”Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups”. PCR kördes först för *Stx*1 och 2-generna. Om någon av dessa var positiv kördes PCR för *eae*-genen. För att ett prov skulle anses vara positivt för STEC krävdes att minst en toxin-gen och *eae* påvisades. Inga försök gjordes för att isolera STEC.

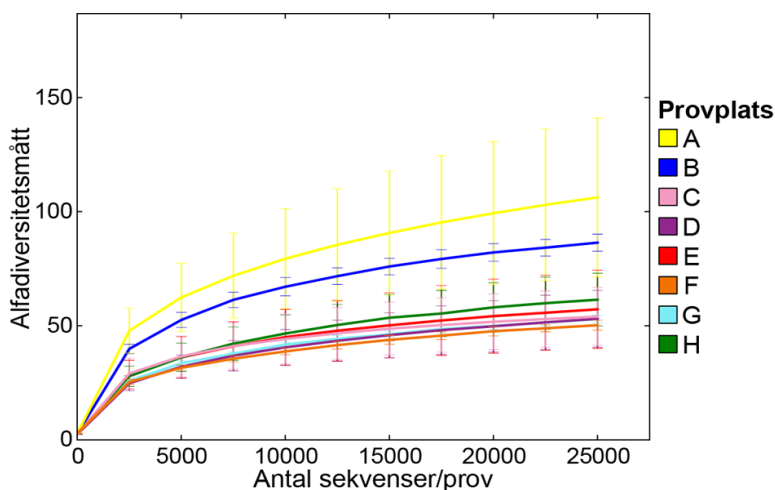
ESBL-bildande *E. coli* analyserades med en intern metod där livsmedlet homogeniserades och sedan inkuberades över natten i BPV (buffrat peptonvatten) med 1 µg/ml Cefotaxime i 37 °C. Därefter ströks ca 10 µl buljong ut på CHROMagarTM ESBL (CHROMagar) och CHROMagarTM CTX (CHROMagar med 1 µg/ml Cefotaxim). Rosa-röda kolonier renströks och artbestämdes med MALDI-TOF och/eller API 20E (BioMérieux). För *E. coli* verifierades ESBL-produktionen med E-test (ct/ctl och tz/txl, BioMérieux). All artidentifiering av Campylobacter gjordes med MALDI-TOF. Salmonella identifierades först med API 20E (BioMérieux) och resultatet verifierades med MALDI-TOF.

Bilaga 2. Amplikonsekvensering

Amplikonsekvensering är en metod som bygger på att en del av det totala DNA:t sekvenseras. Analysen fokuserar på att studera diversitet inom bakteriesamhällen genom att i detalj undersöka skillnader i 16S rDNA-genen som återfinns i de flesta bakteriers arvsmassa (McLellan & Eren, 2014). Det är främst någon av 16S rDNA-genens variabla regioner som brukar studeras, till exempel V4-regionen. Denna region har sekvenserats i enlighet med Earth Microbiome-projektets metod (Caporaso, *et al.*, 2012), som syftar till att systematiskt karaktärisera global mikrobiell diversitet (Gilbert, *et al.*, 2014).

När DNA:t sekvenserats bearbetas och analyseras sekvenserna i QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology), som är en analyskedja för att genomföra analys av sekvensdata genom att kombinera olika verktyg som finns tillgängliga (Caporaso, *et al.*, 2010). Till att börja med sker kvalitetsfiltrering av datat som sedan mappas mot referensdatabasen GreenGenes (DeSantis, *et al.*, 2006) och delas in i taxonomiska enheter. Utifrån de taxonomiska enheterna kan diversiteten i och mellan prover undersökas. Varje enhet har en taxonomisk tilldelning och bakteriesammansättningen i proverna kan visualiseras genom detta och det är även möjligt att filtrera datat utefter taxonomisk tillhörighet.

Kvaliteten på sekvenseringen säkerställs med hjälp av diversitetkurvor. Alfadiversitet är ett mått på diversitet av organismer inom ett prov eller en miljö där målsättningen är att undersöka en delmängd i datat och se hur diversiteten påverkas av att öka på datat med fler sekvenser, d.v.s. skapa en alfadiversitetskurva av delmängder i datat. Efter en viss mängd data planar alfadiversitetskurvan ut, vilket betyder att antalet sekvenser är tillräckligt för att fånga upp huvuddelen av variationen inom provet. Med hänsyn till alfadiversitetskurvorna är det erhållna sekvensdjupet i vattenproverna tillräckligt för att ge tillförlitliga resultat vid analys av sekvensdatat (Figur B2.1), där de flesta proverna innehöll mer än 50 000 sekvenser, långt mer än när kurvorna i Figur B2.1 planar ut.



Figur B2.1. Känslighetsanalys av erhållna bakteriesamhällen där ett antal sekvenser slumpmässigt väljs ut (x-axeln) och diversiteten undersöks via måttet PD whole tree (fylogenetisk diversitet). Där kurvan planar ut så har diversiteten mättats i provet.

Definition av vattenkvalitet

Tre olika sätt att definiera vattenkvalitet utifrån sekvensdata togs fram och undersöktes.

1. Delmängden av taxonomiska enheter definieras dels utifrån Världshälsa-organisationens lista över patogena bakterier (WHO, 2006a), där dessa definieras på genusnivå och sekvenser som tillhör dessa filtreras ut.
2. Sekvenser tillhörande kända fekala familjer som har visats vara starkt kopplade till humana fekalier filtreras ut på familjenivå (Newton, *et al.*, 2013).
3. Utgående från databasen integrated gene catalog (IGC) som tagits fram utifrån 1 267 fekalieprover från totalt 1 070 personer världen runt (Li, *et al.*, 2014). Databasen består av sekvenserna från totalt 9 879 896 gener och sekvenserna i vattenproverna mappas mot dessa med hjälp av blastn (Camacho, *et al.*, 2009).

Korrelationsanalyser

För att dra slutsatser om hur diversiteten i bakteriefamiljer varierar med avseende på försöksdesignvariabler, som exempelvis närvaro av damm, tidpunkt på bevattningssäsong, UV-rening, provtagningsomgång, provtagningsplats längs bevattningskedjan, implementerades en species distribution model (SDM) (Elith & Leathwick, 2009) i mjukvaran Stan (Gelman, *et al.*, 2015) som använder Bayesiansk metodik för att skatta parametrar i modellen. Stan användes även för att korrelera olika signaler i amplicondatat med indikator- och patogendata.

Källspåringsanalys

Ett bibliotek bestående av ett antal potentiella föroreningskällor, såsom fekalieprover från olika djurslag och inkommande avloppsvatten, har byggts upp i ett tidigare MSB-finansierat projekt (Anon, 2017b) för att kartlägga den unika taxonomiska profil som finns för vardera källan. De föroreningskällor som finns representerade i biblioteket är avlopp, får, gris, hund, häst, höns, kalv, ko och vildfågel. Proverna i biblioteket är insamlade från olika platser i Sverige där en geografisk spridning, spridning över året vid provtagningsstillfälle samt en åldersspridning, när det gäller

djurkällorna, har eftersträvat. Innan biblioteket tillämpas i källspårningssyfte kompletteras det med en grupp rena bakgrundsprover bestående av typiska miljövatten. Syftet med denna grupp är att definiera den naturliga bakgrunden i vattnet som ska källspåras, där proverna exempelvis kan samlas in uppströms en misstänkt föroreningskälla. Genom att göra detta reduceras risken för falska positiva resultat på grund av att en del bakterier existerar både i bakgrundsvattnet och i föroreningskällorna.

Ett publikt tillgängligt program, SourceTracker (Knights, *et al.*, 2011), har använts för att genomföra källspårning. SourceTracker använder ett Bayesianskt ramverk för att skatta proportionen av data (antal sekvenser från det potentiellt kontaminerade provet) som härrör från de olika källorna som finns representerade i biblioteket. Som standard utförs beräkningen tio gånger per prov och ett medelvärde tillsammans med dess standardavvikelse rapporteras för vardera provet och källorna i biblioteket. Om resultatet av en källspårningsanalys ger 1 % avlopp, betyder det att 1 % av de sekvenser som detta prov består av härrör från avlopp med störst sannolikhet, såsom taxasammansättningen för avlopp är representerat i biblioteket.

Syftet med amplikonsekvenseringen

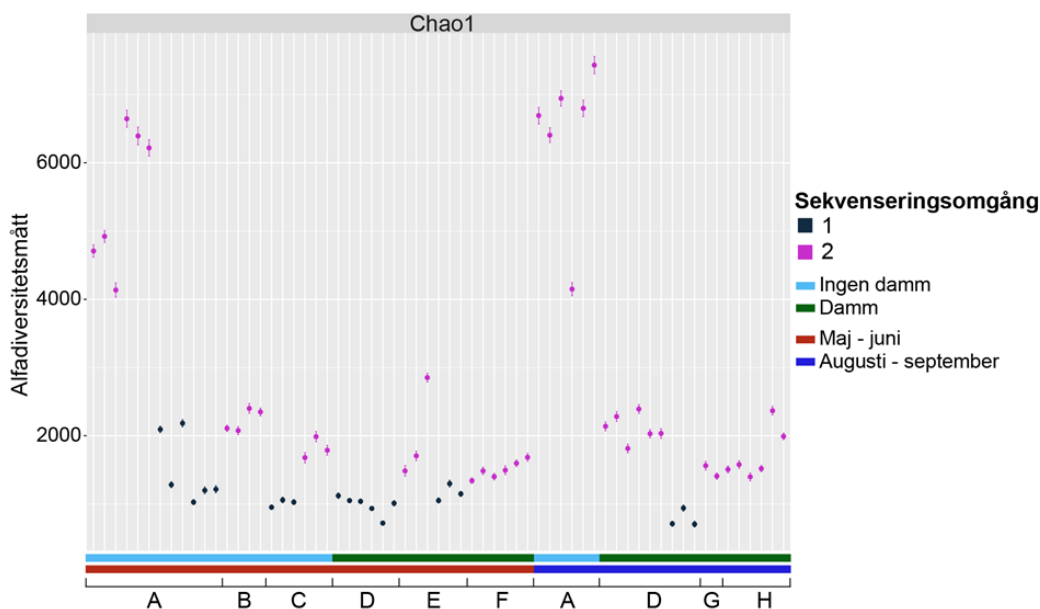
Eftersom väldigt lite är känt om bakteriediversiteten i bevattningsvatten så är det av intresse att undersöka den med en sekvensbaserad metod som har förutsättningar att skatta bakteriesammansättningen i proverna. Bakteriesammansättningen kan, i sin tur, ge information om ett prov avviker från den normala sammansättningen i bevattningsvatten i området eller för vattentypen. Dessa avvikelser kan ses som en signatur och användas i övervakningssyfte, för källspårning, eller för att ta fram specifika PCR-markörer för vattenkvalitet. Utöver att skapa en överblick över bakteriesammansättningen i bevattningsvatten har vattenkvaliteten undersökts genom att definiera olika mått för kvalitet baserat på sekvensdata och korrelationen mellan dessa och traditionella, odlingsbaserade mått som fekala indikatorbakterier (*E. coli*, enterokocker) och patogener (t.ex. *Campylobacter* spp.). De frågeställningar som framförallt undersöks är: (i) hur ska amplikondata tolkas med avseende på vattenkvaliteten och hur korrelerar de framtagna signalerna mot klassiska indikatorer för vattenkvalitet, (ii) om det går att detektera någon effekt av när på bevattningssäsongen proverna är tagna för vattenkvaliteten, samt (iii) om mellanlagring av bevattningsvatten i damm eller att användandet av damm som källa påverkar vattenkvaliteten. Att undersöka detta är av intresse för att få kännedom om hur ett bevattningssystem, exempelvis med eller utan lagring i damm, påverkar vattenkvaliteten och även hur väl det traditionella övervakningssystemet med odling av exempelvis *E. coli* korrelerar med andra kvalitetsdefinitioner och förekomst av patogener.

Vattenkvaliteten på de insamlade brunsvattnen bedömdes som mycket bra i Livsmedelsverkets mikrobiologiska analyser och behandlas inte här eftersom vi fokuserar på att detektera signaler som kan kopplas samman med sämre vattenkvalitet. Fokus för analys genom sekvenseringsdata ligger därför på de å- och dammvatten som samlats in i projektet, totalt 63 prover fanns tillgängliga för dataanalyser. Av totalt 63 prover så härstammar 35 av dessa prover antingen direkt i/eller efter lagring i damm och 28 med åvatten som källa, 40 av proverna var tagna på våren/försommaren och 23 sensommaren/hösten.

Bakteriesamhällen i vatten och livsmedel

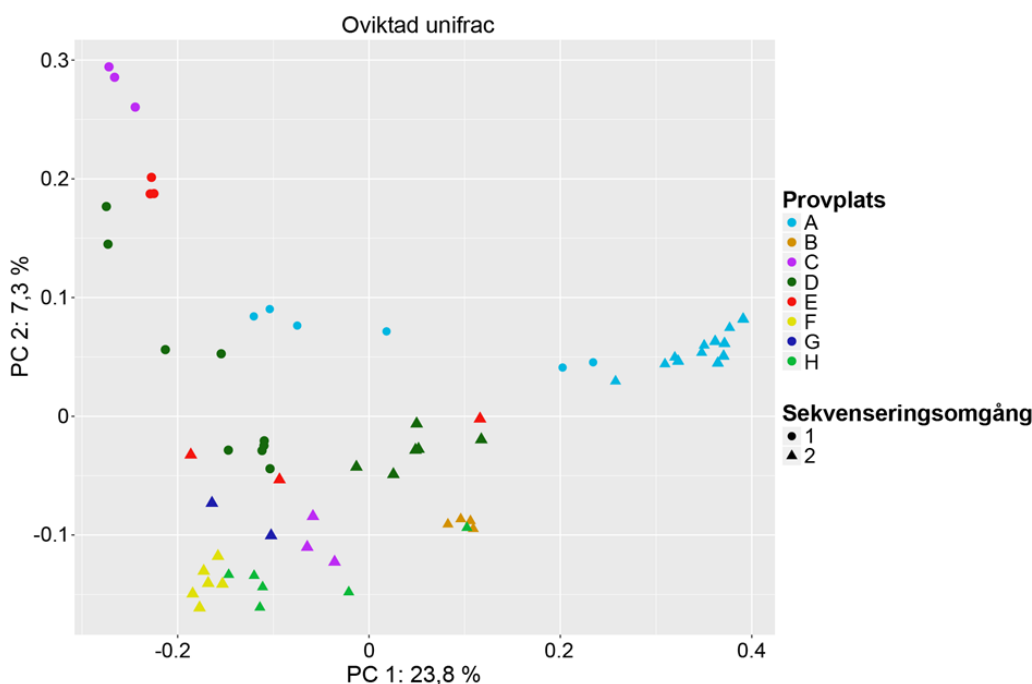
Karaktärisering av diversiteten i bevattningsvatten

Förutom alfadiversitetskurvor där diversiteten undersöks på olika sekvensdjup, d.v.s. olika antal sekvenser inkluderas (Figur B2.2), kan även den totala alfadiversiteten baserat på alla sekvenser i provet tas fram. Att alfadiversiteten, som ofta är direkt proportionell mot antalet bakteriearter, skiljs åt mellan proverna kan användas som en indikation på att någonting har förändrats över tid eller mellan olika provplatser. Visualisering av alfadiversiteten i vattenproverna visar att det finns en variation i diversitet (Figur B2.2). I figuren framgår att det finns en skillnad i diversitet kopplat till att proverna sekvenserades i två olika omgångar. Prover som ingick i den andra sekvenseringsomgången har högre diversitet än de som ingick i den första: det är viktigt att undersöka denna typ av skillnader för att korrigera för detta i senare analyser. Skillnaden i diversitet som orsakats av sekvenseringsomgång kan bero på att den andra omgången innehöll färre prover. Detta medförde att dessa prover sekvenserades djupare, med fler sekvenser per prov, vilket resulterade i en högre diversitet. Samtliga prover från alla platser förutom de två första provtagningarna från provplats A har ungefär samma nivå av diversitet inom provet, det varierar något men det är ingen tydlig skillnad i diversitet kopplad till säsong eller om proverna varit i en damm eller inte. De två första provtagningarna för provplats A är tagna under 2015 medan den tredje, med avsevärt lägre diversitet, är provtagen året därpå. En skillnad mellan de två provomgångarna med hög diversitet och resterande är att dessa hade flest positiva utslag för patogener (campylobacter, ESBL-bildande *E. coli*, salmonella eller STEC) och även höga värden för indikatororganismerna (enterokocker, koliformer och *E. coli*) som tagits fram genom odling.



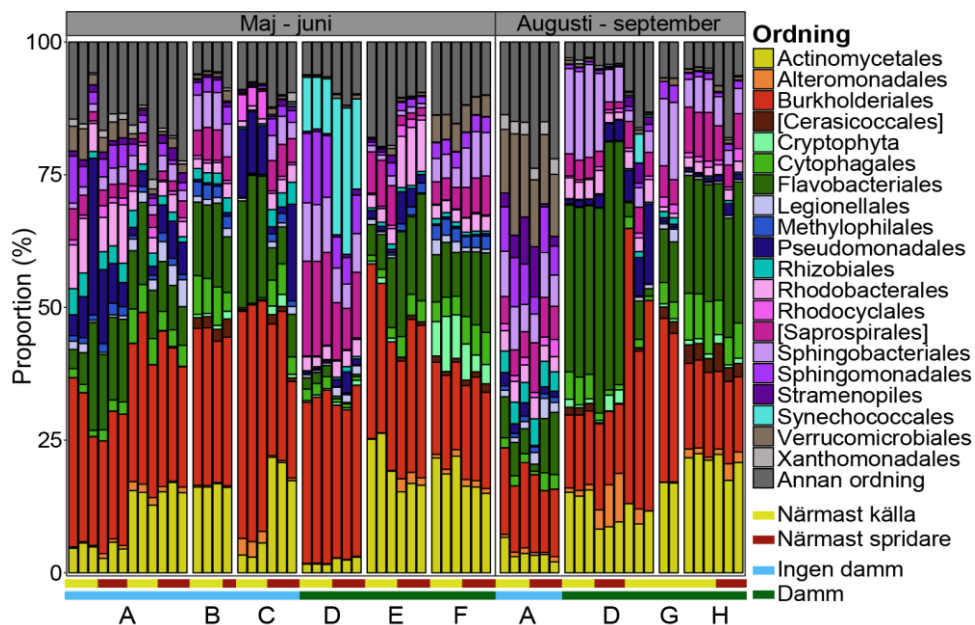
Figur B2.2. Alfadiversitet, via måttet Chao 1, där den skattade medeldiversiteten samt standardfelet i varje prov är visualiserat. Proverna är uppdelade efter provplats (A-I), efter säsong (maj-juni och augusti-september) samt efter om proverna varit i en damm eller inte.

I en ordinationsanalys (PCoA) visualiseras betadiversiteten, till skillnad från alfadiversitet är det diversiteten mellan prover som visualiseras baserat på taxonomisk sammansättning. I visualiseringen av betadiversiteten ses att den första komponenten (PC 1), som är den komponent som förklarar mest variation i datat, skiljer ut en grupp av prover från provplats A som placeras längst till höger i figuren (Figur B2.3). I alfadiversitetsanalysen ses en skillnad i sekvenseringsomgång, den andra komponenten (PC 2) som näst mest förklarar variationen i bakteriesammansättning åt. I övrigt hamnar de flesta prover från samma provtagningsplats tillsammans, där störst skillnad ses för provplats C och E. De biologiska replikaten är för det mesta nära varandra: en viss naturlig variation kan finnas mellan dessa prover eftersom det är separata prover, men att de hamnar så nära varandra tyder på en bra reproducerbarhet på analyserna och därmed tillförlitliga resultat.



Figur B2.3. Skillnad i bakteriesammansättning mellan prover visualiserad genom de två största principalkomponenterna (PC) erhållna från en Principal Coordinate Analysis (PCoA). Använt avståndsmått är oviktad unifrac, som inkorporerar fylogenetiskt avstånd mellan taxonomiska enheter i proverna. Proverna är plottade i olika färger efter plats och symbol beroende på vilken sekvenseringsomgång provet kördes i.

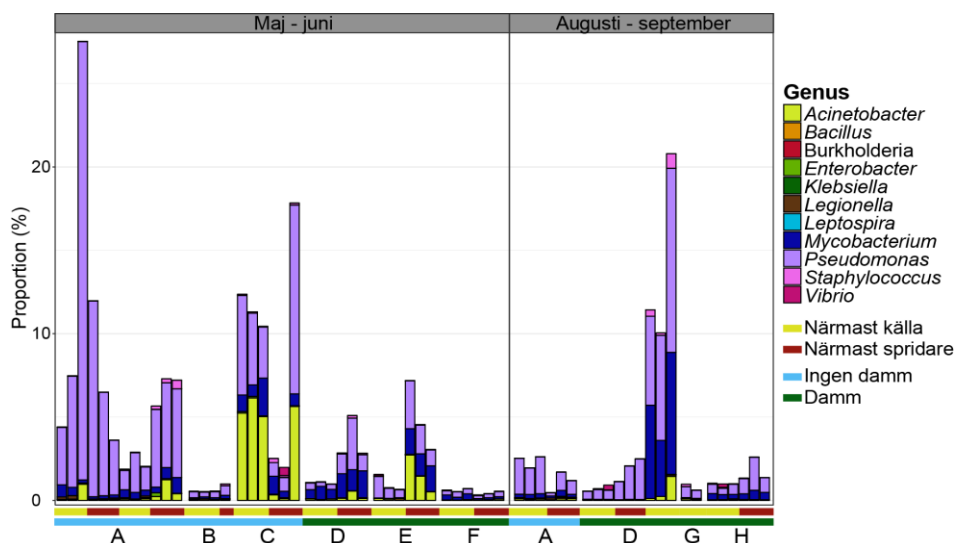
En genomgång av den totala bakteriesammansättningen i de undersökta proverna visar på att de dominerande grupperna, på den taxonomiska nivån ordning, utgörs av *Actinomycetales*, *Burkholderiales*, *Flavobacteriales*, *Sphingobacteriales* och *Sphingomonadales* (Figur B2.4). Dessa grupper påträffades i samtliga prover. Proportionen av andra grupper varierade över plats, där exempelvis ordningen *Verrucomicrobiales* påträffades i hög frekvens i samhällen från plats A, medan ordningen *Synechococcales* var överrepresenterad i samhällen från plats D.



Figur B2.4. Erhållen bakteriesammansättning på den taxonomiska nivån ordning i samtliga å- och dammprover, uppdelade efter säsong, med/utan damm, samt plats.

Signaler för fekalier och potentiella patogener i bevattningsvatten

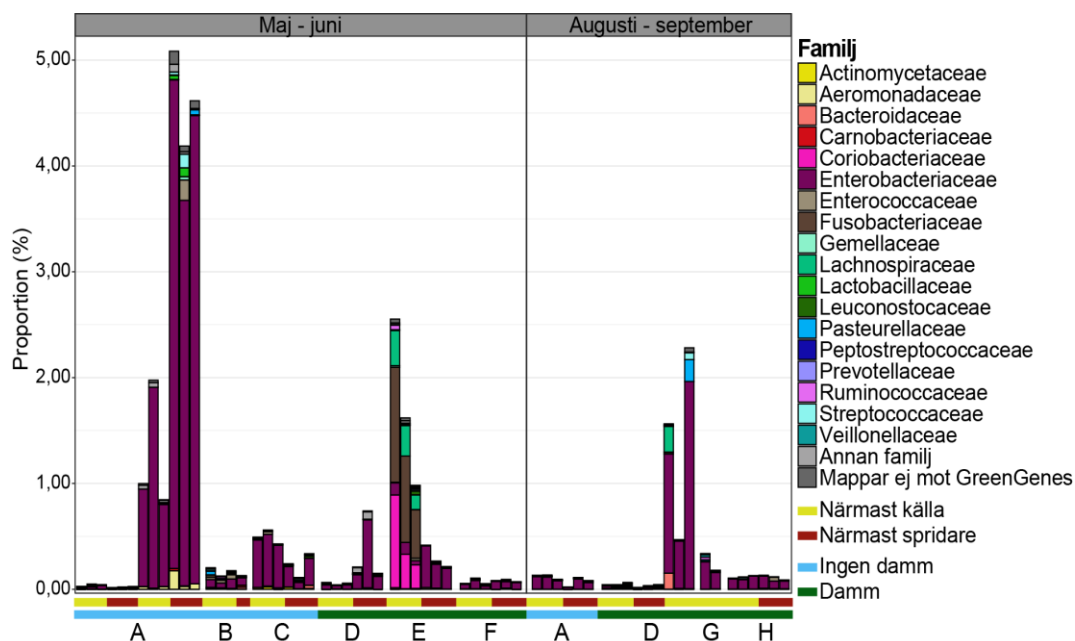
I samtliga bakteriesamhällen detekterades potentiellt patogena genus (Figur B2.5). Signalerna varierade i frekvens mellan 0,3 % och 27,0 %. Det genus som förekom i högst frekvens var *Pseudomonas*, som kunde detekteras i samtliga samhällen, fördelat på totalt 45 taxonomiska enheter. *Mycobacterium* och *Staphylococcus* kunde också detekteras i samtliga samhällen, fast i betydligt lägre frekvens, fördelat på 10 respektive 1 taxonomisk enhet. I vissa samhällen detekterades *Acinetobacter*, *Enterobacter* (plats A), *Legionella*, *Bacillus*, *Klebsiella* och *Leptospira*.



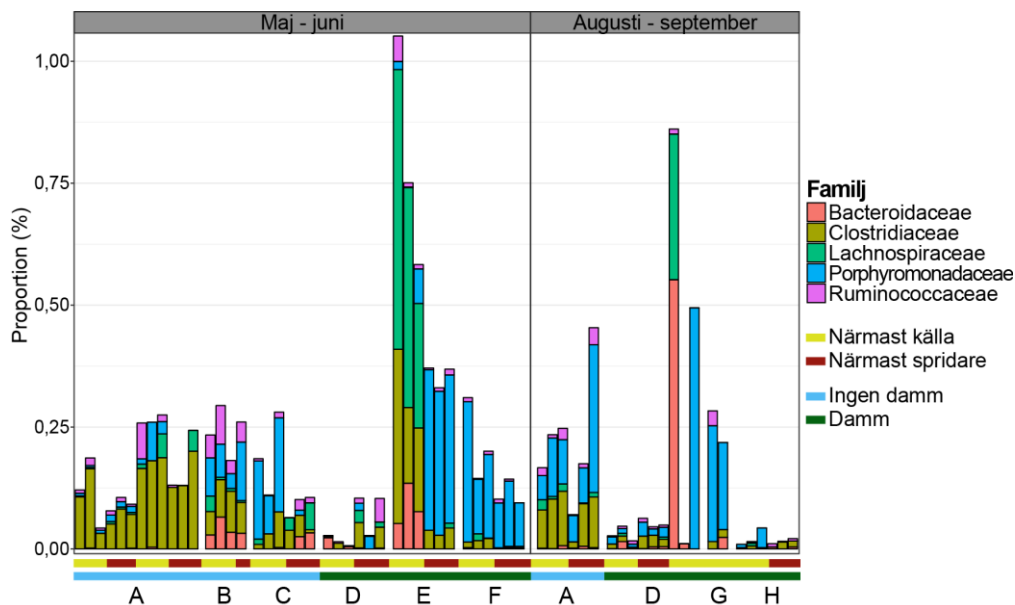
Figur B2.5. Observerade sekvenser som mappas till potentiellt patogena genus enligt WHO's definition uppdelat efter säsong, med/utan damm, samt plats. Visas på den taxonomiska nivån genus.

För fekaliassocierade sekvenser utifrån IGC-databasen så detekterades dessa i samtliga samhällen (Figur B2.6). Signalen var i medeltal mindre än motsvarande för patogena bakterier, och förekom mellan 0,02 % och 5,1 % av det totala antalet sekvenser. Familjen *Enterobacteriaceae* var den vanligast förekommande med över 2 000 sekvenser i samhällen från plats A. Totalt bestod *Enterobacteriaceae*-signalen av 146 taxonomiska enheter och det genus inom *Enterobacteriaceae* som förekom i högst frekvens var *Erwinia*. Andra familjer, som inte detekterades i alla prover inkluderar *Fusobacteriaceae* (plats E), *Aeromonadaceae* (plats A), *Lachnospiraceae* (plats E och D), *Bacteroidaceae* (plats D), *Lactobacillaceae* (plats A) och *Pasteurellaceae* (plats D).

De sekvenser som mappade till de fördefinierade fekal associerade familjerna var färre i medelfrekvens (0,2 %) än motsvarande för patogena genus (3,3 %) och IGC databasen (0,6 %) (Figur B2.7). Frekvensen varierade från 0,0065 % till 1,1 %. Ingen av familjerna detekterades i samtliga samhällen. I medeltal var *Porphyromonadaceae* vanligast förekommande med frekvens 0,09 %, fördelat över 32 taxonomiska enheter från genusen *Paludibacter*, *Dysgonomonas*, *Parabacteroides* och *Porphyromonas*. Denna familj dominerade signalen från platserna E (närmast spridare), F och G. *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Bacteroidaceae* samt *Ruminococcaceae* förekom med medelfrekvenser på 0,06 %, 0,04 %, 0,03 % och 0,01 %, respektive.



Figur B2.6. Observerade sekvenser som mappas till IGC databas innehållande bakteriella gensekvenser extraherade från humanfekalier uppdelat efter säsong, med/utan damm, samt plats. Visas på den taxonomiska nivån familj.



Figur B2.7. Observerade sekvenser som mappas till fekaliassocierade bakteriefamiljer uppdelat efter säsong, med/utan damm, samt plats. Visas på den taxonomiska nivån familj.

Korrelationsanalyser

Projektets insamlade analysdata uppvisar stor variation beroende på var proverna togs (i/efter damm eller åvatten) samt när på året provtagningen skedde och om detta medförde beroenden i datat, t.ex. om någon specifik bakteriegrupp kan kopplas till själva försöksdesignen? Vidare så är det viktigt att jämföra alla de vattenkvalitetsmått som finns tillgängliga för att utröna vad som kan vara lämpligt att använda för mått i rutinundersökningar av bevattningsvatten. Idag genomförs rutinundersökningar med att mäta *E. coli* halt. De kvalitetsmått på vatten som är undersökta listas i Tabell B1.

Tabell B1. Vattenkvalitetsmått tillgängliga för delprojektet amplikonsekvensering

Kvalitetsmått	Förkortning	Typ	Nivå
Patogena genus	patogen	amplikon	genus
Humanassocierade sekvenser	IGC	amplikon	Inte applicerbart
Fekaliassocierade familjer	fekalie	amplikon	familj
<i>E.coli</i>	E. coli	odling	art
Enterokocker	Enterokocker	odling	genus
<i>Campylobacter</i> spp.	Campylobacter	odling	genus/art
Shigatoxinproducerande <i>E. coli</i>	STEC	odling	art/stam
ESBL-bildande <i>E. coli</i>	ESBL	odling	art/stam

Erhållna parameterskattningar visar att för det sekvensbaserade datat så är IGC-signalen positivt korrelerad till patogensignalen ($r = 0,48$) medan alfadiversiteten är negativt korrelerad till IGC ($r = -0,54$), motsvarande signifikansnivå $\alpha = 0,05$ i ett tvådelat t-test. För en lägre signifikansnivå ($\alpha = 0,1$), var även IGC och fekal-signalerna positivt korrelerade. Odlad *E. coli* är positivt korrelerad till odlad halt av enterokocker ($r = 0,67$). I övrigt täckte alla skattade sannolikhetsintervall nollnivån för både $\alpha = 0,05$ och $\alpha = 0,1$. Dock verkar *E. coli* vara den indikatorn som samkorrelerar med *Campylobacter* spp. samt alfadiversitet, *E. coli* och Enterokocker vara bäst som markör för närvaro av STEC. Ingen kvalitetsindikator gav positiv korrelation mot närvaro av ESBL-bildande *E. coli*.

För att undersöka enskilda fekalt associerade bakteriefamiljer, som utgjorde IGC-signalen, anpassades en SDM till datat, där provtagningsomgång, användning av UV-strålning, lagring i damm, tidig eller sen bevattningssäsong var prediktorer i modellen. För de fekalt associerade familjerna var *Prevotellaceae* och *Methanobacteriaceae* negativt associerade med damm medan *Pasteurellaceae* var positivt associerade med damm, motsvarande signifikansnivå $\alpha = 0,05$ i ett tvåsidigt t-test. Ingen association kunde identifieras mellan familj och bevattningssäsong. Effekten av UV gav negativ effekt på familjerna *Coriobacteriaceae* (fylum Actinobacteria), *Prevotellaceae*, *Bacteroidaceae* (fylum Bacteroidetes), *Pasteurellaceae* (fylum Proteobacteria), *Gemellaceae*, *Veillonellaceae*, *Lachnospiraceae*, samt *Ruminococcaceae* (fylum Firmicutes). Dock identifierades en positiv effekt av UV på familjerna *Leuconostocaceae* (fylum Firmicutes), *Actinomycetaceae* samt *Bifidobacteriaceae* (fylum Actinobacteria). Provtagningsomgång och sekvenseringsomgång förklarade en betydande del av variationen i närvaro/frånvaro av fekala familjer, vilket illustrerar vikten av att justera för dessa faktorer i analysen. Bland annat så var elva av 18 familjer associerade till sekvenseringsomgång och mellan fyra till sex familjer var associerade till olika provtagningsomgångar.

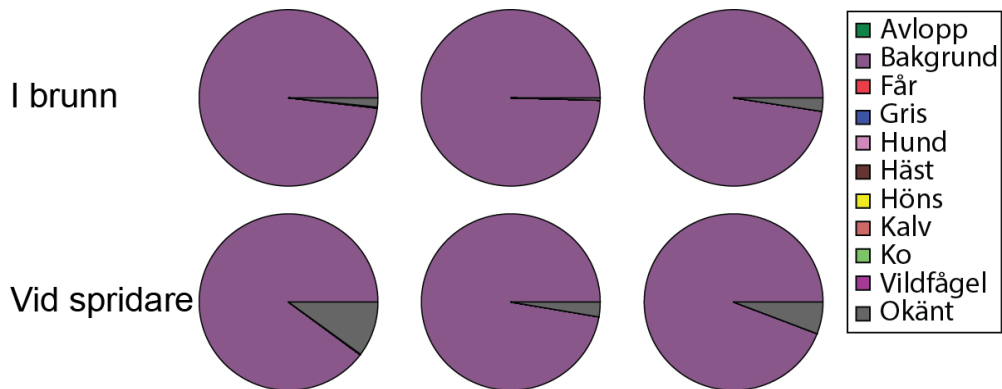
Källspårningsanalyser

För att undersöka om föroreningen på grödan tillförts via bevattningstvattnet genomfördes källspårningsanalys på dessa. De grödor som analyserats är romansallad, sallad, blomkål och purjolök. Proverna är tagna i biologiska triplikat, det vill säga att tre separata prover har tagits av vardera provursprung och dessa har analyserats var för sig. Källspårnings-resultatet är väldigt likt över de biologiska trippelproven vilket betyder bra reproducerbarhet i analysen (Figur B2.8). Andelen som klassades till okänt, det vill säga sekvenser som källspårningsalgoritmen inte lyckades klassa till någon av referensgrupperna i biblioteket, var låg i de flesta prover. I purjolöksproverna var däremot andelen okänt hög: detta kan bero på jord på proverna som inte finns representerat som källa i biblioteket. Den generellt sett låga halten av okänt gav en bra förutsättning för att tolka resultatet av analysen.

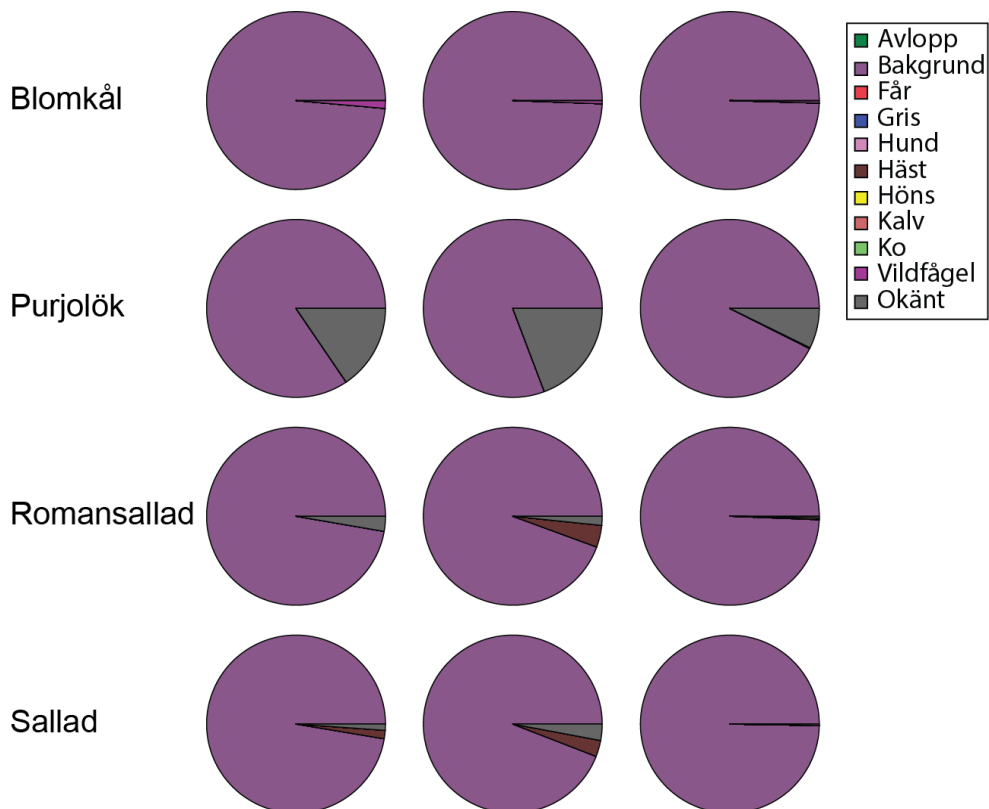
För proverna tagna i brunnen klassades nästan hela proverna till bakgrund med en låg andel okänt (Figur B2.8). Vattenproverna som är tagna vid spridaren hade en något högre andel okänt, detta tyder på att den bakteriella sammansättningen i proverna förändras något jämfört med brunnsproverna vilket stämmer överens med indikatororganismerna som är något högre vid spridare, framför allt koliformer (Tabell 7). För de roman- och isbergssallatsprover som var fekalt förorenade (Tabell 12) ses en fekal signal vilken matchar häst bäst i fyra av de sex proverna (Figur B2.8). Tydligaste signalen till häst ses i prov B av romansallad, vilket stämmer överens med halten *E. coli* som är högst i detta prov. För att undersöka osäkerheten i de erhållna källspårningsresultaten så genomfördes en källspårningsanalys där hästgruppen exkluderats ur biblioteket. Detta gjordes för att undersöka om proverna klassades till någon annan fekal källa då häst inte finns tillgänglig som källa. När detta gjordes klassades proverna bara till bakgrunden och till okänt, ingen annan fekal källa identifierades, vilket betyder att

hästgruppen inte maskerar någon annan fekal signal i proverna. I proverna tagna från purjolök ses ingen fekal påverkan, medan proverna från blomkål visar en fekal påverkan av vildfågel.

Vatten

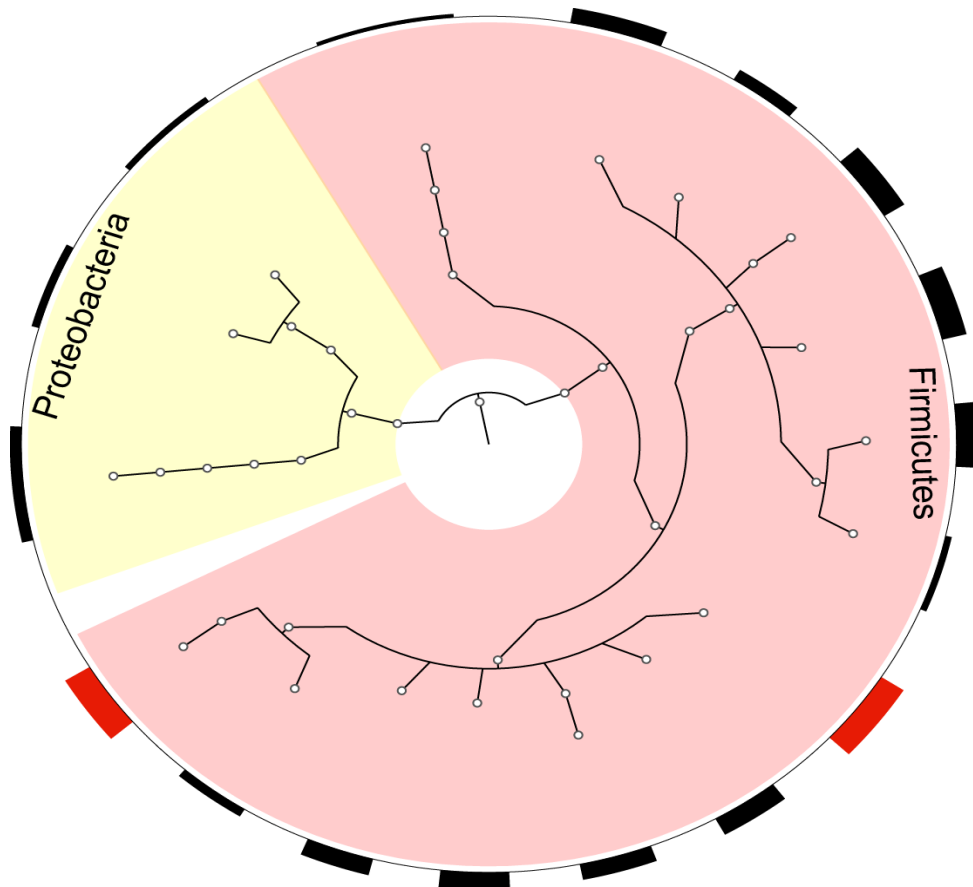


Vegetabilier



Figur B2.8. Resultat av källspåringsanalys för vatten och fyra olika grödor insamlade hos en odlare. Vattnet är provtaget på två olika ställen, dels direkt i brunnen och även efter rampen vid åkern. För såväl vattnet som grödorna har tre prover samlats in och analyserats separat.

Signalen till varje källa i biblioteket går att undersöka närmare genom att studera den taxonomiska sammansättningen på signalen och sannolikheterna att de taxonomiska enheterna härstammar från källan så som den är representerad i biblioteket. Detta har gjorts för hästsignalen och den för romansalladsprov B visualiserats i Figur B2.9. Hästsignalen kommer från ett fåtal taxonomiska enheter men det är ändå en tydlig signal till häst där 4,0 % av sekvenserna i provet klassificerades till källan. Signalen kommer nästan uteslutande från fylumet Firmicutes: detta fylum är ofta förekommande i fekalieprover (Yatsunenko, *et al.*, 2012).



Figur B2.9. Visualisering av taxonomin för den del av romansalladsprov B som ger upphov till hästsignalen. Staplarna i den yttre cirkeln visar sannolikheten att sekvenserna i den taxonomiska enheten tillhör hästgruppen så som den är representerad i biblioteket, staplar som är rödfärgade har en sannolikhet $\geq 70\%$.

Denna rapport redovisar den mikrobiologiska kvaliteten på bevattningsvatten och de bevattnade grödorna hos ett urval av svenska odlare. Dessutom presenteras en riskvärdering av konsumtion av sallat bevattnat med ytvatten av olika kvalitet.

Syftet var att skapa en översikt över kvaliteten på bevattningsvatten i Sverige samt att koppla denna kvalitet till mikrobiologiska risker. Även tillgången till vatten har beaktats. Med detta underlag kan olika organisationer ta fram nationella råd och (bransch)riktlinjer som leder till en säkrare produktion av högkvalitativa vegetabilier i ett förändrat klimat.

Den huvudsakliga målgruppen var odlare, rådgivare och certifieringsorgan. Dessutom finns det innehåll av intresse för kontrollmyndigheter såsom Länsstyrelsen i län med många kontrollobjekt (odlare).

Livsmedelsverket är Sveriges expert- och centrala kontrollmyndighet på livsmedelsområdet. Vi arbetar för säker mat och bra dricksvatten, att ingen konsument ska bli lurad om vad maten innehåller och för bra matvanor. Det är vårt recept på matglädje.