

Regine Isabel Bøe

# Fekal kildesporing i nordre deler av Kviteseidvatn ved bruk av molekylærbiologiske metoder og vannkjemiske analyser

---



Universitetet i Sørøst-Norge  
Fakultet for teknologi, naturvitenskap og maritime fag  
Institutt for natur, helse og miljø  
Postboks 235  
3603 Kongsberg

<http://www.usn.no>

© 2023 Regine Isabel Bøe

Denne avhandlingen representerer 60 studiepoeng

Forsidebildet viser Kviteseidvatn – fotografert av Regine Isabel Bøe

# Sammendrag

I denne masteroppgaven har formålet vært å kildespore fekal forurensning i to områder i nordre del av Kviteseidvatn.

1. Sundkilen - en delvis adskilt innsjødel av Kviteseidvatn i nordøst, hvor avløpet til Kviteseid kloakkrensaneanlegg føres ut på ca. 20 m.
2. Straumen – området nordvest i Kviteseidvatn hvor vassdraget mulig kan forurennes av sigevann fra Litveit kloakkslam-komposteringsanlegg.

Det vil kunne være mulig å spore fekal påvirkning også ved vannkjemiske analyser, som en økning i konsentrasjoner av blant annet fosfor, nitrogen og lett nedbrytbart organisk stoff.

Også forhøyede konsentrasjoner av tungmetaller vil kunne være indikasjon på en slik forurensning. Sikreste indikasjon på fekal forurensning er å analysere på bakteriell fekal forurensning fra varmblodige dyr, som påvisning av indikatorbakterien *Escherichia coli* (*E.coli*). I denne masteroppgaven er det benyttet en relativt ny molekylærbiologisk metode, Real-Time Quantitative Polymer Chain Reaction (qPCR), som gjør det mulig å kunne spore kilden til den fekale forurensningen. Primersett med genetiske markører avledet fra vertsspesifikke *Bacteroidales* 16s rRNA gensekvenser som målgruppe ble brukt til å finne fekal forurensning fra generell *Bacteroidales*, menneske, drøvtygger, hest, hund og gris.

Undersøkelsene kan ikke utelukke at de klart høyere konsentrasjonene av Total-N, Total-P, Na<sup>+</sup> og Cl<sup>-</sup>, samt de gjennomgående høyere tungmetallkonsentrasjonene i Sundkilen i noen grad kan skyldes utslipp fra Kviteseid rensaneanlegg, mens det ikke lot seg gjøre å dokumentere kjemisk spor av fekal forurensning i sigevannet fra Litveit på vannkvaliteten i hovedvassdraget, nedstrøms influensområdet (Straumen).

Av de 36 prøvene som ble tatt i perioden august-oktober 2022 ble det påvist fekal forurensning gjennom hurtigmetoden Colilert®-18 Quanti-Tray® og Colilert®-18 Quanti-Tray®/2000 i 23 av prøvene.

Kontaminering fra generell *Bacteroidales*, menneske, drøvtygger og hund ble påvist i varierende grad. På stasjon B utenfor Kviteseid renseanlegg ble det påvist kontaminering fra menneske under alle tre prøvetakninger, noe som indikerer at anlegget var en kilde til fekal forurensning under prøvetakningsperioden. Det antas ikke at Litveit slamhånderingsanlegg forårsaket fekal forurensning i vassdraget, men det anbefales å ta flere prøver for å gjøre en endelig konklusjon da feilkilder kan ha forårsaket falsk-negative resultater.

# Abstract

The purpose of this master thesis has been to track microbial sources of fecal contamination in two areas within the northern parts of Kviteseidvatn.

1. Sundkilen - a relatively separated part of Kviteseidvatn in the northeast, where the drainage of Kviteseid sewage treatment plant leads out about 20 m.
2. Straumen – area northwest of Kviteseidvatn where the lake possibly can be contaminated by leachate from Litveit sewage sludge treatment plant.

It is possible to trace fecal contamination with water chemical analysis, like an increase of phosphorus, nitrogen and easily degradable organic matter. Increased values of heavy metals can also be an indicator of fecal contamination. Although, the most accurate way to trace fecal contamination is to analyse for bacteria from warm blooded animals, like the indicator bacteria *Escherichia coli* (*E.coli*). This master thesis have used a relatively new method within molecular biology, Real-Time Quantitative Polymer Chain Reaction (qPCR), which makes it possible to track the source of fecal contamination. Primers that target genetic markers strained from host specific *Bacteroidales* 16s rRNA sequences have been used to find fecal contamination from general *Bacteroidales*, human, ruminant, horse, dog and pig.

The investigations cannot exclude that the higher concentrations of Total-N, Total-P, Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> and heavy metals in Sundkilen in some degrees were influenced by Kviteseid sewage treatment plant, while it was not documented any chemical traces of fecal contamination in the leachate from Litveit sewage sludge treatment plant on the water quality downstream the influence area (Straumen).

23 out of 36 samples taken August-October 2022 were fecal contaminated, analysed through Colilert®-18 Quanti-Tray® and Colilert®-18 Quanti-Tray®/2000. Contamination from general

*Bacteroidales*, human, ruminant and dog was proven in variable degrees. Station B outside Kviteseid sewage treatment plant had fecal contamination from human at all three samplings, which indicates that the treatment plant was a source of fecal contamination during the sampling period. It is assumed that Litveit sewage sludge treatment plant did not influence Kviteseidvatn, but it is recommended to take more samples to make a final conclusion due to sources of error that may have caused false-negative results.

# Innholdsfortegnelse

<b>Innledning .....</b>	<b>9</b>
<b>Material og metoder .....</b>	<b>14</b>
<i>Områdebeskrivelse .....</i>	<i>14</i>
<i>Prøvetakning .....</i>	<i>18</i>
<i>Vannkjemiske analyser.....</i>	<i>20</i>
<i>Fekal kildesporing.....</i>	<i>21</i>
<b>Resultater .....</b>	<b>24</b>
<i>Vannkjemiske analyser.....</i>	<i>24</i>
<i>Fekal kildesporing.....</i>	<i>26</i>
<b>Diskusjon .....</b>	<b>30</b>
<b>Konklusjon .....</b>	<b>38</b>
<b>Vedlegg .....</b>	<b>49</b>

# Forord

Denne masteravhandlingen representerer slutten av et 5-årig løp som student på Universitet i Sørøst-Norge, avdeling Bø. Det har vært 5 lærerike, morsomme og til tider frustrerende år. Jeg er utrolig takknemlig for å ha fått jobbet med et så spennende prosjekt som jeg synes denne oppgaven har vært. Gjennom Synne Kleiven var jeg så heldig å få deltidsjobb hos SGS Analytics i Porsgrunn, hvor jeg har hatt 100 % stilling siden februar. Takk til min fantastiske arbeidsplass som tilrettelegger for at jeg skal få fullført min skolegang.

Jeg vil gi en stor takk til min veileder Espen Lydersen som alltid er til stedet når man trenger gode råd. En stor takk går også til Melanie Schreier, Mona Sæbø, Tone Jøran Oredalen og Andrew Jenkins for hjelp til den molekylærbiologiske biten, både på laboratoriet og senere i prosessen.

Frode Bergan, Jørn Henrik Sønstebø, Karin Brekke Li, Sofie Geck Sevatdal, Tom Aage Årnes og Marijanne Holtan ved universitetet har vært til stor hjelp under felt-og laboratoriearbeid. Jeg vil takke for et godt samarbeid med Kviteseid kommune, Kviteseid brannvesen, Cowi og Renovest. En takk går også til Nome videregående skole, avdeling Søve, for sitt bidrag av fekal materiale til prosjektet.

En siste takk går til min ektemann Thomas Eriksen. Tusen takk for at du har tatt deg av hus, barn og dyr så jeg har fått tid til å gjennomføre dette.

Porsgrunn, 08.04.2023

Regine Isabel Bøe



# Innledning

Rent drikkevann er et fundamentalt krav for god helse. Ifølge menneskerettserklæringen (1948) skal alle mennesker ha tilgang til rent drikkevann. På tross av dette dør det ca. 829 000 mennesker i utviklingsland (LLMIC-land) hvert år grunnet manglende tilgang til sanitærtjenester og rent drikkevann (WHO, 2022). Urbanisering og befolkningsvekst i LLMIC-land har forbigått utvikling av infrastruktur (Wang et al., 2022). Manglende renseløsninger for avløp bidrar til fekal forurensning av miljøet og øker risiko for eksponering av sykdommer (Ngure et al., 2014; Robb et al, 2017).

I 2018 ble det estimert at befolkning i urbane byer ville øke med 68% innen 2050 (United Nations, 2018). Rask befolkningsvekst sammen med klimautfordringer skaper globale bekymringer knyttet til drikkevannskvalitet og renskapasitet i kommende år (IPCC, 2023; Ma et al., 2022; Moreira og Bondelind, 2017). Ifølge Chang et al (2020) vil økende intensitet av ekstremvær, som for eksempel tørke eller nedbør, kombinert med høyere temperaturer true drikkevannskvalitet i overflatevann. En undersøkelse fra 2022 påpeker at ekstremvær i form av oversvømmelse vil ha en høyere negativ innvirkning på vannkvalitet enn tørke, med en signifikant påvirkning på LLMIC-land (Zou et al., 2022).

I Norge er det lovfestede krav til drikkevannskvalitet gjennom forskrift om vannforsyning og drikkevann (2016) med blant annet 0 antall/100 ml som grenseverdi for *Escherichia coli* (*E.coli*) og intestinale enterokokker. Badevannskvalitet blir delt inn i ulike grupper, fra ``ikke akseptabel`` til ``god``, med minimum 4 prøvetakninger gjennom sesongen (Tabell 1) (EU`s badevannsdirektiv, 2006; Statens helsetilsyn, 1994).

**Tabell 1.** Vannkvalitetsnormer for friluftsbad i Norge. (Hentet fra: [www.fhi.no](http://www.fhi.no))

Parameter	God	Mindre god	Ikke akseptabel	Anbefalt prøvetakingshyppighet, minimum *
<b>Mikrobiologiske:</b>				
Termotolerante koliforme bakterier/100 ml	< 100	100-1000	> 1000	én gang pr. uke
Fekale streptokokker/100 ml	< 100	100-1000	> 1000	én gang pr. uke
<b>Fysisk-kjemiske</b>				
pH ferskvann	5,0-9,0			
pH saltvann	7,0-8,3			
Fargetall ferskvann	< 25			**
Fargetall saltvann				ikke fastsatt
Siktedyp, m	> 2	1-2	< 1	to ganger pr. mnd.
Turbiditet, FTU	< 2	2-5	> 5	
Temperatur, °C				***

Selv om Norge har lovfestede krav til vannkvalitet i drikke- og badevann har det ved flere tilfeller blitt påvist grenseoverskridende mengder tarmbakterier i både drikkevann og badevann ( Boger, 2019; Drægni, 2022; NTB, 2018; Oskarsen, 2021).

Oralt inntak av fekal forurenset vann er ikke nødvendigvis helsefarlig, men noen typer bakterier kan være sykdomsfremkallende. Et eksempel er enterohemoragiske *E.coli* (EHEC), som kan forårsake blodig diaré og hemolytisk-uremisk syndrom med nyresvikt (Folkehelseinstituttet, 2010; Morabito, 2014).

For å kunne minimere helserisikoen knyttet til tarmbakterier i vann er det viktig å ha kunnskap om ulike fekale kilder og andre prosesser som kan påvirke forurensningen.

Fekal forurensning med human opprinnelse kan komme fra brudd eller overløp på ledningsnett, utslipp fra kommunale renseanlegg, mangel på toalett ved offentlige badestrender (Møre-Nytt, 2018), avløpsslam eller utslipp fra spredt bosetning med mangelfulle renseløsninger (Paruch et al., 2017).

Basert på 66 studier fra drikkevannsbårne sykdomsutbrudd i perioden 2000-2014 skal utslipp av avløpsvann ha vært hovedårsaken til fekal forurensning av overflatevann i Europa, Nord-Amerika og New Zealand (Moreira & Bondelind, 2017).

Ikke-human opprinnelse kan komme fra alle slags typer dyr, og forurensningen kan forekomme fra for eksempel fugl i strandsoner, rotter i kloakksystem eller avrenning fra jordbruksområder (Paruch et al., 2017; Uusi-Kämppä & Heinonen-Tanski, 2008).

Geografi, værforhold, feltkapasitet, størrelse på nedbørfelt og terrengtype har mye å si for avrenningsgraden til en innsjø (COWI, 2015). Ulik grad av bebyggelse, jordbruksområder, husdyrtetthet og aktiviteter i nedbørfelt vil kunne påvirke sannsynligheten av fekal forurensning i en resipient. For å minimere fekal forurensning av overflatevann kan man gjøre tiltak, men det kan være kostbart, tidskrevende og unyttig hvis man ikke vet kilden til den aktuelle forurensningen.

Miljø-DNA (eDNA) blir brukt i økende grad i undersøkelser av vann fordi det er en sensitiv, kostnadsbesparende og ikke-invaderende metode (Kumar et al., 2020; Murakami et al., 2019). DNA-fragmenter fra for eksempel hår, hud, jord, avføring og vann kan brukes til å detektere målgrupper som ulike dyrearter, parasitter eller patogene bakterier (Oredalen et al., 2022; Paruch et al., 2017; Verstraete et al., 2014). eDNA med Real-Time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) har blitt brukt til fekal kildesporing i flere land (Foley et al., 2009; Kauppinen et al., 2019; Nshimiyimana et al., 2017; Nguyen et al., 2018), inkludert Norge hvor den første studien ble utgitt i 2017 (Paruch et al., 2017).

I motsetning til tradisjonell overvåkning av overflatevann med fekale indikatorbakterier som *E.coli* eller intestinale enterokokker (Byappanahalli et al., 2012; Paruch og Mæhlum, 2012), kan man med fekal kildesporing detektere hvilken art den aktuelle forurensningen kommer fra.

Ved deteksjon av *E.coli* i overflatevann kan man konkludere med tilstedeværelse av fersk fekal forurensning fordi denne bakteriegruppen lever i tarmsystem og formerer seg normalt ikke i miljøet utenfor (Paruch og Mæhlum, 2012). *E.coli* har derimot dårlig vertsspesifikke egenskaper og er derfor ikke godt egnet til fekal kildesporing (Paruch og Paruch, 2022). Blant mange utprøvde genetiske markører til fekal kildesporing i vann er vertsspesifikke genetiske markører avledet fra *Bacteroidales* 16S rRNA gensekvenser en av de mest utbredte metodene (Paruch et al., 2017). Med analysemetoden qPCR kan man detektere og kvantifisere (Klymus et al., 2019) fekal forurensning, og skille det fra menneske og ulike dyrearter som hest, ku, og gris (Paruch et al, 2017).

Selv om bakteriologiske analyser er den sikreste metoden for å påvise fekal forurensning, finnes det også andre parametere som kan indikere kontaminering av resipientvann. Kjemiske parametere som TOC (totalt organisk karbon), fosfor (P), Nitrogen (N) og tungmetaller har ikke en eksklusiv fekal opprinnelse, men tidligere studier har vist at forhøyede konsentrasjoner av nevnte parametere i en resipient kan skyldes utslipp av avløpsvann eller slam (Geng et al., 2020; Lakshmanan et al., 2014).

Formålet med denne masteroppgaven har vært å bruke molekylærbiologiske metoder med vannkjemiske analyser som støtteparametere for å kildespore mulig fekal forurensning i Sundkilen og nordre deler av Kviteseidvatn. I Sundkilen var målet å dokumentere og kildespore en eventuell fekal forurensning fra kloakkrenseanlegget nær Kviteseid sentrum (St.B i Figur 2), mens hovedfokus i nordre del av Kviteseidvatn var mulig påvisning og kildesporing av fekal forurensning fra slamkomposteringsanlegget ved Litveit (Stasjon 1-5 i Figur 2). I tillegg var intensjonen å kunne kildespore annen fekal forurensning fra mennesker og ulike typer dyr ved stasjoner utenfor selve nærområdet til de ulike kloakkhåndteringsanleggene.

# Material og metoder

## Områdebeskrivelse

Bandak, Straumen, Kviteseidvatn, Sundkilen og Flåvatn (Vassdragsnr. 016.BC1) er regulert innenfor samme høydeintervall 72-69,46 moh. (Tabell 2), og har derfor samme høyde på vannspeilet. Det er kun nordre deler av Kviteseidvatn, Strengen og Sundkilen, som inngår i denne undersøkelsen. Kviteseidvatn er en stor og dyp innsjø (13,34 km<sup>2</sup>, maks dyp: 201m) lokalisert i Vestfold og Telemark fylke (Figur 1) med et stort nedbørsfelt (2983,5 km<sup>2</sup>), mens Sundkilen er liten, moderat dyp innsjø (2,5 km<sup>2</sup>, maks dyp: 40 m) med et relativt lite nedbørsfelt (362 km<sup>2</sup>). Nedbørsfeltet til Sundkilen ble tilnærmet halvert ifm. overføring av vann fra øvre deler av nedbørsfelt til nabovassdrag i vest ifm. Sundsbarmreguleringen i 1970 (Tabell 2). Dette gjorde at også hydrologisk oppholdstid i Sundkilen økte fra 0,13 år til 0,28 år.

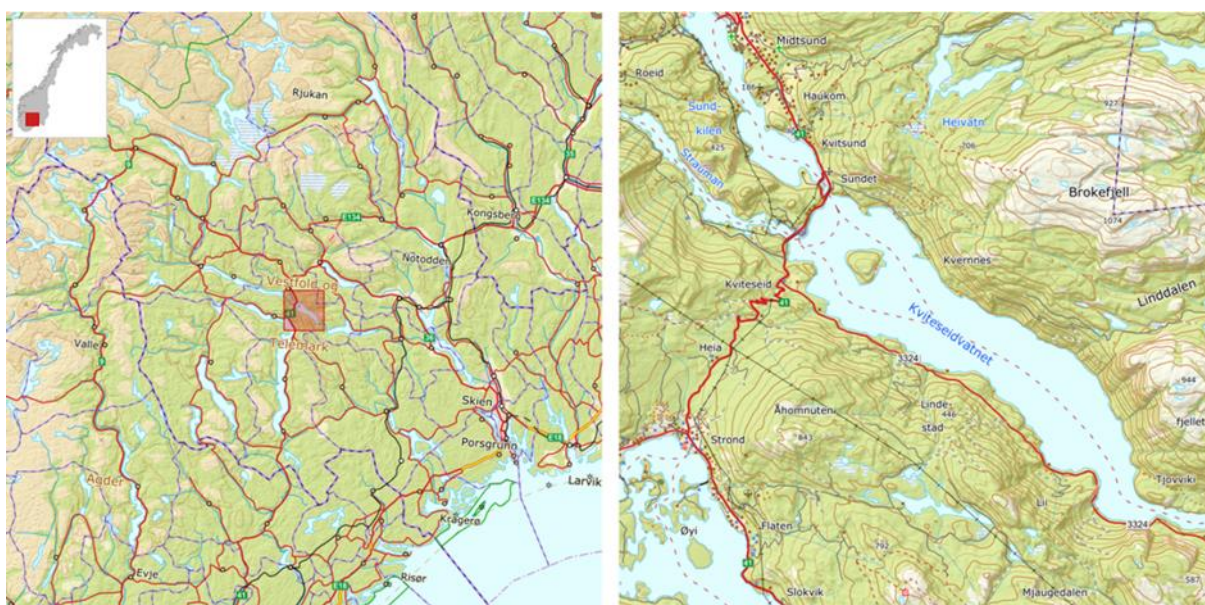
Høydeforskjellen i nedbørsfeltet til Kviteseid varierer fra 72 til 1720 moh. Skog utgjør 44,3% av arealet, 38,7% er snaufjell, 9,1% vann, 5,83 myr, 0,12% bre og 0,08% urban bebyggelse.

Høydeforskjellen i nedbørsfeltet til Sundkilen varierer fra 72 til 1347 moh. Skog utgjør 79,6% av arealet, 4,79% er snaufjell, 4,89% vann, 3,85 myr, og 0,02% urban bebyggelse (NIVA, u.å).

Middel årstemperatur og nedbørmengde er hhv 0,32°C og 1026,2 mm. Middel sommer- (mai-september) og vinter-temperatur (Oktober-April) er hhv 6,37°C og -4,0°C, mens middel sommer- og vinter-nedbørmengde er hhv 438,1 mm og 588,1 mm. Berggrunnen i området rundt stasjonene består i hovedsak av ryolitt, granittisk gneis, kvartsitt og basalt (NGU, u.å.).

**Tabell 2.** Morfometriske data over aktuelle innsjøer i området. Data er i hovedsak hentet fra NVE Atlas (<https://atlas.nve.no/html5Viewer/?viewer=nveatlas>), i tillegg til <sup>1</sup> Rognerud et al. 1979 og <sup>2</sup> Skulberg, 1969.

Innsjø	m asl.	Nedbørsfelt km <sup>2</sup>	Innsjø areal km <sup>2</sup>	Innsjø volum km <sup>3</sup>	Hydrologisk oppholdstid (år)	Middeldyp m	Maks dyp m
Bandak	72–69,46	2545,7	26,40	3,170	1,092	121	325
Kviteseidvatnet	72–69,46	2983,5	13,34	1,280	0,412	92	201
Sundkilen -før regulering <sup>1,2</sup>	72–69,46	362,0	2,50	0,035	0,130	14	40
Sundkilen -etter regulering <sup>1,2</sup>	72–69,46	181,0	2,50	0,035	0,280	14	40
Flåvatn	72–69,46	3250,6	19,48	1,260	0,390	67,5	152



**Figur 1.** Kart over Kviteseidvatnet og Sundkilen (nordøstre del av Kviteseidvatn) ([www.snl.no](http://www.snl.no)).

I disse undersøkelsene har en valgt å ta vannprøver for fysisk/kjemiske analyser i tillegg til bakteriologiske prøver fra områder som kan være påvirket av næringsstoffer og fekal forurensning i følgende 3 områder (Figur 2): Sundkilen, Straumen- (oppstrøms og nedstrøms slamkomposteringsanlegget) og i grunnvannsbrønner nedstrøms slamkomposteringsanlegget. I Sundkilen er det følgende 3 stasjoner som primært er fokusert på:

- Stasjon A: Kviteseid brygge
- Stasjon B: Kviteseid renseanlegg
- Stasjon C: Kvitsund badeplass

I Straumen, mellom Bandak og Kviteseidvatn, er det følgende 3 stasjoner som primært er fokusert på:

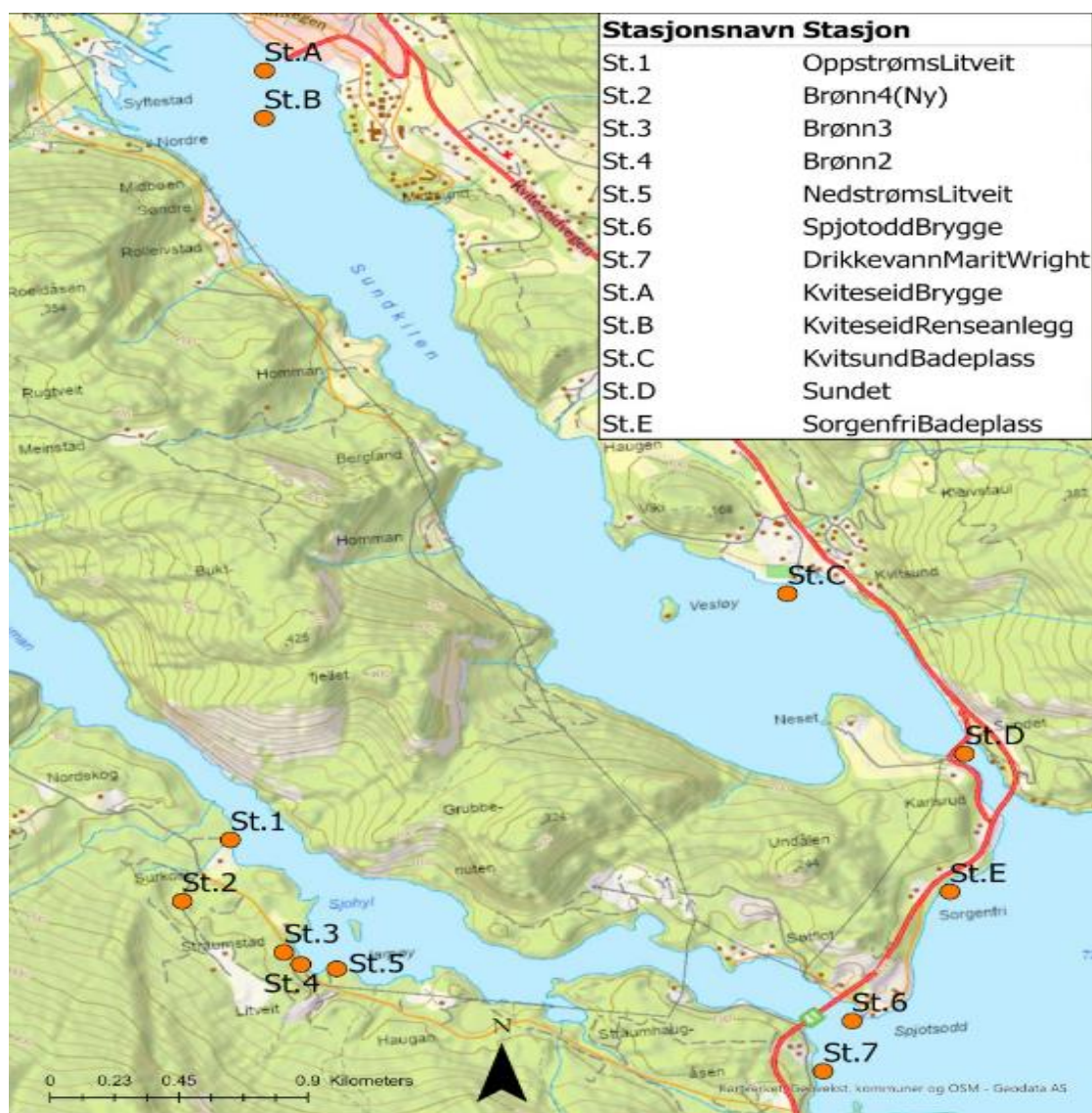
- Stasjon 1: Oppstrøms Litveit (slamkomposteringsanlegget)
- Stasjon 5: Nedstrøms Litveit
- Stasjon 6: Spjotodd brygge (utløp av Straumen til Kviteseidvatn)

Fra grunnvannet i løsmasser nedstrøms Litveit slamkomposteringsanlegg har følgende grunnvannsbrønner inngått:

- Stasjon 2: Ny brønn etablert i 2020, bakgrunnsnivå, dvs brønn som ikke skal være påvirket av anlegget.
- Stasjon 3: Grunnvannsbrønn påvirket av anlegget, oppstrøms veien.
- Stasjon 4: Grunnvannsbrønn påvirket av anlegget, nedstrøms veien.

De andre prøvestasjonene, St. 7 (privat drikkevannsinntak, Marit Wright) ble tatt inn da det sporadisk er påvist *E.coli* i dette området, mens Stasjon E (Sorgenfri) er en offentlig badeplass, som Kviteseid kommune prøvetar under badesesongen sommerstid. Stasjon D (Sundet) ble også prøvetatt og analysert.





**Figur 2.** Kart over nordre deler av Kviteseidvatn, Straumen (St. 1-7) og Sundkilen (St.A-D), samt badestranda Sorgenfri (St. E) i Kviteseidvatn, prøvetatt 16. august, 14. september og 18. oktober 2022. St. 2,3,4 er grunnvannsbrønner for overvåking av sigevann fra slamkomposteringsanlegget på Litveit. St.1 og St.5 er hhv oppstrøms og nedstrøms grunnvannsbrønnene. I Sundkilen har en primært fokusert på de 3 innerste stasjonene (St. A,B og C) da St. D ligger i Sundet og er svært grunn og derfor vanskelig å prøveta. Kartet er produsert i ArcGIS Pro versjon 2.6.1.

## Prøvetakning

Prøvetakning ble utført 16 august, 14 september og 18 oktober 2022 på 12 ulike stasjoner i Kviteseid kommune.

Stasjonene A, B, C, D, E, 6 og 7 ble prøvetatt fra motorbåt. Vannprøvene ble tatt med en Limnos vannhenter (Volum: 1.7 L) fra hhv 0, 1, 2, 3, 4 og 5 m. dyp, hvor alle dyp ble samlet i et stort 20 L blandkar. Fra dette blandekaret ble det fra hver stasjon tatt ut følgende

vannprøver:

- 1 stk. 1000 mL plasflaske for Klorofyll-a analyse,
- 1 stk 500 mL plastflaske for makrokjemiske analyser
  - pH, ledningsevne,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ , TOC, Tot-N og Tot-P
- 1 stk 100 mL glassflaske tilsatt 1 mL kons.  $\text{HNO}_3$  for tungmetallanalyser
  - Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Hg og Pb

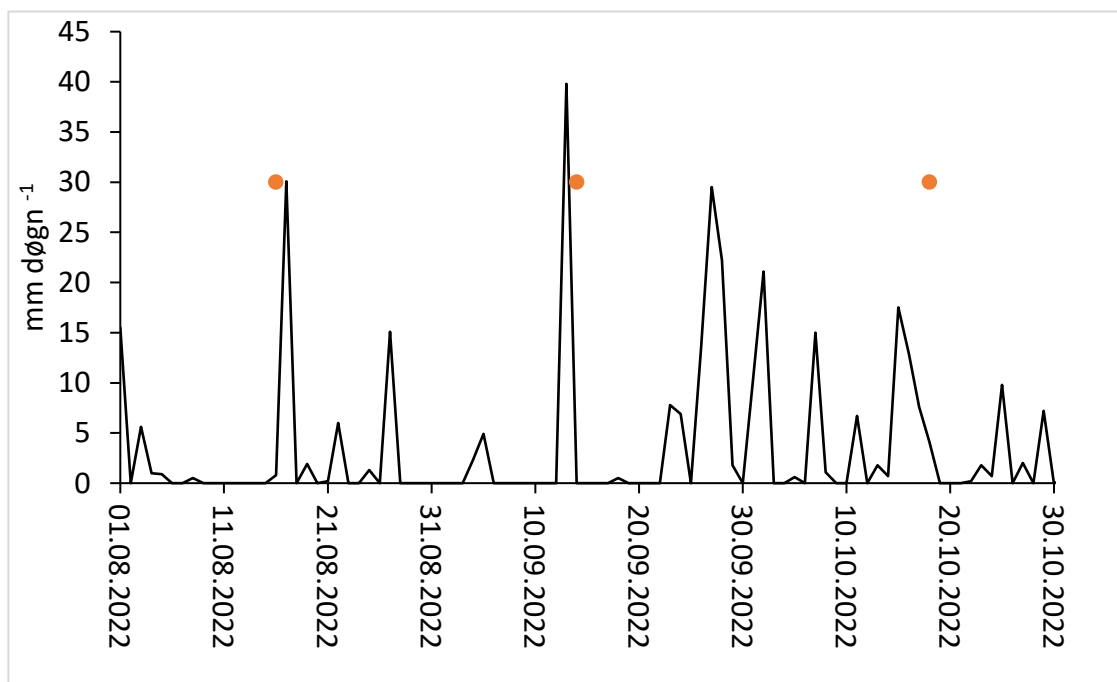
På de samme 7 stasjonene ble det også brukt en EXO2 Multiparameter Sonde (YSI-logger) for måling av vanntemperatur, pH turbiditet, ledningsevne og klorofyll-a på ulike dyp ned til ca. 10 m. Secciskive ble brukt på alle stasjoner for å måle siktedyp og farge.

Prøvene til de mikrobiologiske og molekylærbiologiske analysene ble tatt på 500 mL sterile plastflasker (3 paralleller per stasjon), hvor sterile hansker ble benyttet for å unngå kontaminering.

Stasjon 1 og 5 ble tatt fra land ved hjelp av en håndholdt prøvetakningsstang i august og oktober, mens i september ble ikke slik prøvetakningsstang benyttet, kun forsiktig vading 2-3 m ut fra land. Stasjon 2, 3 og 4 er grunnvannsbrønner og ble prøvetatt ved hjelp av pumpe og slange. Flasker som tidligere er beskrevet ble brukt ved alle prøvetakninger.

Prøvene ble fraktet i lystette kjølebager til Universitetet i Sørøst-Norge, avdeling Bø, og lagret mørkt og kaldt til analyse. De fekale prøvene ble opparbeidet innen 8 timer fra prøvetakning.

I løpet av prøvetakningsperioden var det variable vær- og nedbørsforhold (figur 3). Uken i forkant av første prøvetakning (16. august) var det ingen nedbør, men på selve dagen kom det store mengder som vises på målingene dagen etter (30,1 mm). I september var det mye nedbør (39,8 mm) dagen i forkant av prøvetakning og uken før siste prøvetakning i oktober var det moderate mengder (17,5 mm på det meste).



**Figur 3.** Nedbørsmengder (mm dogn<sup>-1</sup>) målt på Moen værstasjon (SN 32850, Kviteseid kommune) i perioden 1. august - 30. oktober 2022. (www.seklima.no) Punktene angir prøvetakingsdatoene.

## Vannkjemiske analyser

Vannkjemiske analyser ble utført på Universitetet i Sørøst-Norge, avdeling Bø.

Følgende analyse metoder ble benyttet:

pH: NS-EN ISO 10523

Ledningsevne (K<sub>25</sub>): NS-ISO 7888

Klorofyll-a: NS-4766

Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> : NS-EN ISO 1491

TOC: NS-EN 1484

Tot-P: NE-EN 1189

Tot-N: NS-EN 4743

Fe, Mn, Pb, Cd, Hg, Zn, Cr, As, Cu, Ni : Intern metode ICP-MS

## Fekal kildesporing

Prøvene (n=36) til mikrobiell kildesporing ble analysert for *E.coli* gjennomført med hurtigmetoden Colilert®-18 Quanti-Tray® (ISO standard 9308-2) og Colilert®-18 Quanti-Tray®/2000 (IDEXX, USA.) Denne metoden inkluderer også koliforme bakterier.

Parallelt ble alle vannprøvene (n=36) filtrert ved bruk av MicroFunnel™ ST engangs 300 mL filtertrakter med 0,45 µm porestørrelse. Filter ble umiddelbart overført til Power Water DNA Bead Tube, tilhørende DNeasy® PowerWater® Kit (QIAGEN, Tyskland). Prøvene ble oppbevart på -18 °C i 3-5 måneder før videre analysering.

DNA ble ekstrahert fra de filtrerte prøvene med påvist innhold av *E.coli* (n=23) ved bruk av samme DNeasy® PowerWater® Kit som beskrevet over ved filtrering av prøvene, med produsentens instruksjoner.

Positive kontrollprøver av menneske, hest, ku, hund og gris var avføring fra friske individer i nærområdet. Kontrollprøvene ble prøvetatt januar 2023 med sterile hansker og oppbevart i sterile 200 mL plastrør på -18 °C i ca. en måned. Prøvene (n=5) ble ekstrahert med QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Tyskland). For å øke konsentrasjon av DNA ble det tilsatt 25 µl buffer ATE istedenfor 200 µl som er produsentens anbefaling. DNA fra kontrollprøvene ble derfor ekstrahert i 3 paralleller for å unngå for lite volum til videre analyse. Konsentrasjon av ekstrahert DNA ble målt med NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, USA). Positive kontroller ble fortynnet i en 1:10 serie.

For QPCR-analysen ble det brukt spesifikke primersett (Tabell 3).

**Tabell 3.** Oversikt over spesifikke primersett til ulike målgrupper som er brukt til analysering av 23 vannprøver fra Kviteseidvatn.

Målgruppe	Primer navn	Sekvens (5'-3')	Amplicon størrelse (bp)	Annealing temp °C	Referanse
Bacteroidales	AllBac 296f	GAGAGGAAGGTCCCCAC	106	60	Layton et al. (2006)
	AllBac 412r	CGCTACTGGCTGGTTCAG			
Menneske	BacH_f	CTTGGCCAGCCTTCTGAAAG	93	61	Reischer et al. (2007)
	BacH_r	CCCCATCGTCTACCGAAAATAC			
Drøvtygger	BacR_f	GCGTATCCAACCTTCCCG	118	60	Reischer et al. (2006)
	BacR_r	CATCCCCATCCGTTACCG			
Hest	Hor_f	GCCAGCCGTAAAATAGTCGG	96	60	Tambalo et al. (2012)
	Hor_r	CAATCGGAGTTCTTCGTGATATCTA			
Hund	BacCan-545f1	GGAGCGCAGACGGGTTTT	145	60	Kildare et al, 2007
	BacUni-690r2	AATCGGAGTTCCTCGTGATATCTA			
Gris	Pig-2-Bac41F	GCATGAATTTAGCTTGCTAAATTTGAT	116	60	Mieszkin et al, 2009
	Pig-2-Bac163Rm	ACCTCATACGGTATTAATCCGC			

Alle vannprøver (n=23) og positive kontroller (n=6) ble analysert i triplikater mars 2023 ved bruk av StepOnePlus™ (Thermo Fisher Scientific, USA). Hvert primersett med tilhørende positiv kontroll hadde en egen kjøring med vannprøver, inkludert sterilt vann i triplikater som negativ kontroll.

Hver brønn hadde 25 µL reaksjonsblanding bestående av 5 µL prøve (eller sterilt vann= negativ kontroll), 12,5 µL Power SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA), og 0,25 µL av forward og reverse primer tilhørende gjeldende primersett (10 µM). Det ble skrevet kjøreskjema i forkant av QPCR-analysene for å unngå pipetteringsfeil. Oppsett på kjøringene med antall sykluser og steg varierte for de ulike målgruppene (Tabell 4).

**Tabell 4.** qPCR-oppsett for ulike primersett brukt til å analysere vannprøver (n=23) fra Kviteseidvatn.

<b>Målgruppe</b>	<b>QPCR-oppsett</b>
Bacteroidales	95 C° i 6 min. 45 cycle: 95 C° i 15 sek. 61 C° i 15 sek. 72 C° i 45 sek.
Menneske	95 C° i 6 min. 55 cycle: 95 C° i 30 sek. 55 C° i 30 sek. 72 C° i 1 min.
Drøvtygger	95 C° i 6 min. 45 cycle: 95 C° i 15 sek. 61 C° i 15 sek. 72 C° i 45 sek.
Hest	95 C° i 6 min. 45 cycle: 95 C° i 15 sek. 61 C° i 15 sek. 72 C° i 45 sek.
Hund	95 C° i 10 min. 45 cycle: 95 C° i 15 sek. 60 C° i 1 min.
Gris	95 C° 10 min. 45 cycle: 95 C° 15 sek 60 C° 1 min

# Resultater

## Vannkjemiske analyser

Vannkjemiske resultater for Sundet utgår da vannprøven ble kontaminert med sediment under prøvetakning.

Statistisk ser man at det er signifikant høyere pH og konsentrasjoner av alle uorganiske ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) utenom  $\text{SO}_4^{2-}$  og organiske makrokjemiske parametere (TOC) i Sundkilen sammenliknet med Straumen-Kviteseidvatn (Tabell 5 og vedlegg 1).

**Tabell 5.** Fysiske og kjemiske data fra grunnvannsbrønner og 3 ulike stasjoner i Sundkilen og i hovedvassdraget (Straumen) prøvetatt i 2022. Alle prøvene er blandprøver fra 0-5 m dyp, utenom grunnvannsprøvene som er tatt fra brønn.

Stasjon	Dato	Vassdrag	pH	K <sub>25</sub> μS cm <sup>-1</sup>	Chl-a μg L <sup>-1</sup>	Ca <sup>2+</sup> mg L <sup>-1</sup>	Mg <sup>2+</sup> mg L <sup>-1</sup>	Na <sup>+</sup> mg L <sup>-1</sup>	K <sup>+</sup> mg L <sup>-1</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> mg L <sup>-1</sup>	Cl <sup>-</sup> mg L <sup>-1</sup>	TOC mg L <sup>-1</sup>	Tot-N μg L <sup>-1</sup>	Tot-P mg L <sup>-1</sup>
Kviteseid brygge	16.08.2022	Sundkilen	6,85	37,20	1,83	4,39	0,50	2,16	0,53	2,78	3,85	3,92	261	3
Kviteseid brygge	14.09.2022	Sundkilen	7,16	36,10	2,98	4,74	0,48	1,88	0,49	2,78	3,49	3,61	218	2
Kviteseid brygge	18.10.2022	Sundkilen	7,15	37,80	0,78	5,01	0,51	2,06	0,42	1,02	3,21	7,00	443	5
Kviteseid renseanlegg	16.08.2022	Sundkilen	6,87	37,10	2,26	4,45	0,48	2,17	0,56	2,49	3,81	3,90	276	2
Kviteseid renseanlegg	14.09.2022	Sundkilen	7,02	36,10	3,01	4,71	0,47	1,89	0,42	2,72	3,44	3,57	231	2
Kviteseid renseanlegg	18.10.2022	Sundkilen	7,19	32,60	0,83	5,00	0,50	2,04	0,42	1,04	3,18	6,91	490	5
Kvitsund badeplass	16.08.2022	Sundkilen	7,10	33,50	1,86	4,12	0,43	1,92	0,50	2,24	3,45	3,72	338	2
Kvitsund badeplass	14.09.2022	Sundkilen	7,14	34,10	3,40	4,47	0,44	1,78	0,40	1,99	3,28	3,62	224	2
Kvitsund badeplass	18.10.2022	Sundkilen	7,16	37,00	0,76	4,89	0,49	2,03	0,41	1,01	3,11	6,67	438	4
Oppstrøms Litvedt	16.08.2022	Straumen	6,69	12,94	0,65	1,88	0,18	0,71	0,14	2,77	1,91	1,54	98	2
Oppstrøms Litvedt	14.09.2022	Straumen	6,66	13,39	1,45	1,90	0,19	0,75	0,14	2,86	1,94	1,75	113	2
Oppstrøms Litvedt	18.10.2022	Straumen	6,74	12,85	1,54	2,02	0,20	0,72	0,16	2,00	1,88	1,78	121	2
Nedstrøms Litvedt	16.08.2022	Straumen	6,61	13,58	1,77	1,94	0,18	0,72	0,14	2,71	1,90	1,46	75	2
Nedstrøms Litvedt	14.09.2022	Straumen	6,76	14,07	1,44	2,02	0,19	0,72	0,16	2,78	1,93	1,49	114	2
Nedstrøms Litvedt	18.10.2022	Straumen	6,94	14,03	1,86	2,04	0,20	0,72	0,16	2,83	1,94	1,76	139	2
Spjotodd brygge	16.08.2022	Straumen	6,60	14,93	0,75	2,10	0,20	0,84	0,15	2,42	2,24	1,65	101	2
Spjotodd brygge	14.09.2022	Straumen	6,60	14,72	1,43	2,14	0,20	0,76	0,17	1,90	1,95	1,60	131	2
Spjotodd brygge	18.10.2022	Straumen	6,87	14,06	0,95	2,05	0,20	0,72	0,16	2,86	1,98	1,74	132	2
Brønn 2	16.08.2022	Grunnvannsbrønn	6,73	159,50		19,70	2,91	4,57	3,92	3,55	8,22	1,62	2550	5
Brønn 2	14.09.2022	Grunnvannsbrønn	6,89	175,70		21,78	3,23	4,84	4,33	3,79	8,64	1,67	3370	2
Brønn 2	18.10.2022	Grunnvannsbrønn	6,69	175,40		21,80	3,33	4,74	4,20	3,62	9,30	1,6	3340	2
Brønn 3	16.08.2022	Grunnvannsbrønn	6,65	149,10		20,92	1,78	4,50	2,62	6,78	5,26	2,24	8320	1100
Brønn 3	14.09.2022	Grunnvannsbrønn	7,25	153,90		20,09	2,06	4,61	2,98	9,29	4,91	2,07	2260	20
Brønn 3	18.10.2022	Grunnvannsbrønn	6,66	153,10		19,90	2,05	4,85	3,07	9,55	4,85	2,1	2450	7
Brønn 4 (NY)	16.08.2022	Grunnvannsbrønn	6,98	83,50		9,32	1,22	2,85	0,76	3,46	16,05	0,79	1510	8
Brønn 4 (NY)	14.09.2022	Grunnvannsbrønn	6,01	60,80		11,51	1,38	3,21	0,80	3,81	22,89	0,63	1900	97
Brønn 4 (NY)	18.10.2022	Grunnvannsbrønn	6,65	29,70		3,33	0,42	1,51	0,33	3,82	3,65	1,01	399	13



Total konsentrasjonen av ulike tungmetaller (surgjort med HNO<sub>3</sub> til pH =1) viser også signifikant høyere konsentrasjoner av de fleste undersøkte tungmetallene (Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As,) i Sundkilen sammenliknet med Straumen-Kviteseidvatn (Tabell 6 og vedlegg 1), mens det ikke ble funnet signifikante forskjeller mellom lokalitetene for Cd, Hg og Pb, de normalt mest giftige tungmetallene. I forhold til tilstandsklasser for metaller (Tabell 7), ligger konsentrasjonene av Ni og As i tilstandsklasse I, Cu, Cr, Pb, Hg og Cd i tilstandsklasse II, og Zn i tilstandsklasse III i Sundkilen.

**Tabell 6.** Konsentrasjoner av tungmetaller fra grunnvannsbrønner og stasjoner i Sundkilen og i hovedvassdraget (Skiensvassdraget). Tungmetallprøvene ble surgjort med HNO<sub>3</sub> i felt, og er derfor total konsentrasjoner. Alle prøvene er blandprøver fra 0-5 m dyp, utenom grunnvannsprøvene som er tatt fra brønn.

Stasjon	Dato	Vassdrag	Cr	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Hg	Pb
			µg L <sup>-1</sup>	µg L <sup>-1</sup>	µg L <sup>-1</sup>	µg L <sup>-1</sup>	µg L <sup>-1</sup>	µg L <sup>-1</sup>	µg L <sup>-1</sup>	µg L <sup>-1</sup>	µg L <sup>-1</sup>	µg L <sup>-1</sup>
Kviteseid brygge	16.08.2022	Sundkilen	0,119	8,3	31,6	0,402	1,30	6,28	0,098	0,021	0,019	0,243
Kviteseid brygge	14.09.2022	Sundkilen	0,282	10,1	50,9	0,542	1,70	9,34	0,113	0,039	0,045	0,546
Kviteseid brygge	18.10.2022	Sundkilen	0,175	21,2	111,0	0,508	1,59	14,42	0,115	0,058	0,045	0,715
Kviteseid renseanlegg	16.08.2022	Sundkilen	0,128	8,2	31,8	0,450	1,37	5,56	0,097	0,014	0,026	0,136
Kviteseid renseanlegg	14.09.2022	Sundkilen	0,159	9,5	38,7	0,476	1,13	6,46	0,086	0,014	0,051	0,092
Kviteseid renseanlegg	18.10.2022	Sundkilen	0,170	19,7	100,5	0,305	1,38	12,25	0,131	0,049	0,052	0,394
Kvitsund bade plass	16.08.2022	Sundkilen	0,129	6,5	28,4	0,216	1,04	10,97	0,100	0,038	0,018	0,247
Kvitsund bade plass	14.09.2022	Sundkilen	0,118	6,1	24,1	0,301	6,85	6,55	0,094	0,014	0,048	0,185
Kvitsund bade plass	18.10.2022	Sundkilen	0,140	20,0	80,2	0,267	1,31	7,30	0,110	0,037	0,044	0,806
Oppstrøms Litvedt	16.08.2022	Straumen	0,096	3,0	8,4	0,124	0,60	6,53	0,095	0,029	0,040	0,436
Oppstrøms Litvedt	14.09.2022	Straumen	0,061	4,9	19,1	0,038	0,40	4,38	0,050	0,020	0,041	0,072
Oppstrøms Litvedt	18.10.2022	Straumen	0,165	3,0	15,7	0,077	0,59	18,58	0,041	0,073	0,040	0,385
Nedstrøms Litvedt	16.08.2022	Straumen	0,086	4,0	17,3	0,046	0,47	5,70	0,032	0,025	0,017	0,381
Nedstrøms Litvedt	14.09.2022	Straumen	0,075	17,1	25,2	0,076	0,52	8,04	0,060	0,047	0,040	0,152
Nedstrøms Litvedt	18.10.2022	Straumen	0,096	6,6	16,4	0,064	0,62	14,67	0,064	0,075	0,035	0,156
Spjotodd brygge	16.08.2022	Straumen	0,095	1,8	7,5	0,172	0,45	3,48	0,043	0,007	0,021	0,057
Spjotodd brygge	14.09.2022	Straumen	0,081	2,3	9,1	0,263	0,56	8,12	0,051	0,033	0,037	0,118
Spjotodd brygge	18.10.2022	Straumen	0,064	2,8	12,3	0,128	0,54	4,19	0,041	0,009	0,037	0,101
Brønn 2	16.08.2022	Grunnvannsbrønn	0,165	486,7	256,3	0,573	2,76	5,33	0,22	0,103	0,013	0,401
Brønn 2	14.09.2022	Grunnvannsbrønn	0,246	530,7	15,4	0,997	2,93	5,42	0,04	0,158	0,031	0,331
Brønn 2	18.10.2022	Grunnvannsbrønn	0,228	469,1	37,0	0,646	11,4	10,60	0,06	0,143	0,038	0,685
Brønn 3	16.08.2022	Grunnvannsbrønn	0,679	1989,0	19578,6	4,869	4,00	23,58	0,31	0,086	0,064	7,795
Brønn 3	14.09.2022	Grunnvannsbrønn	0,528	1754,6	3688,1	1,761	2,58	25,37	0,08	0,145	0,049	0,955
Brønn 3	18.10.2022	Grunnvannsbrønn	0,417	1667,2	2538,7	1,685	1,14	13,49	0,08	0,124	0,043	0,565
Brønn 4 (NY)	16.08.2022	Grunnvannsbrønn	0,229	45,8	47,4	0,291	1,01	3,63	0,13	0,037	0,036	0,206
Brønn 4 (NY)	14.09.2022	Grunnvannsbrønn	5,653	262,7	878,0	3,867	15,0	12,72	0,28	0,118	0,042	3,131
Brønn 4 (NY)	18.10.2022	Grunnvannsbrønn	1,565	356,8	234,3	0,945	9,15	32,38	4,89	0,178	0,037	14,525

**Tabell 7.** Tilstandsklasser for metaller i ferskvann ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Øvre grense for klasse II tilsvarer AA-EQS, som er grenseverdien for kroniske effekter ved langtidseksponering, og øvre grense for klasse III tilsvarer MAC-EQS, som er grenseverdien for akutt toksiske effekter ved korttidseksponering (Direktoratgruppen vanndirektivet 2018).

Substans	Klasse I Bakgrunn	Klasse II AA-EQS	Klasse III MAC-EQS	Klasse IV	Klasse V Omfattende toksisk effekt
Kadmium	0 - 0,003	0,003 - 0,08	0,08 - 0,45	0,45 - 4,5	< 4,5
Bly	0 - 0,02	0,02 - 1,2	1,2 - 14	14 - 57	> 57
Nikkel	0 - 0,5	0,5 - 4	4 - 34	34 - 67	> 67
Kvikksølv	0 - 0,001	0,001 - 0,047	0,047 - 0,07	0,07 - 0,14	> 0,14
Kopper	0 - 0,3	0,3 - 7,8	0,3 - 7,8	7,8 - 15,6	> 15,6
Sink	0 - 1,5	1,5 - 11	1,5 - 11	11 - 60	> 60
Arsen	0 - 0,15	0,15 - 0,5	0,5 - 8,5	8,5 - 85	> 85
Krom	0 - 0,1	0,1 - 3,4	0,1 - 3,4	0,1 - 3,4	> 3,4

## Fekal kildesporing

DNA fra generell *Bacteroidales* ble påvist på alle prøvene (n=23) som ble analysert med qPCR (Tabell 8). Ingen stasjoner fikk påvist kontaminering fra hest eller gris, mens fra hund ble det bare påvist én gang utenfor Kviteseid renseanlegg. Denne stasjonen er også den eneste som fikk påvist kontaminering fra menneske under alle 3 prøvetakninger i tillegg til flest ulike kilder under samme prøvetakning i oktober (generell *Bacteroidales*, menneske, drøvtygger og hund). Generell *Bacteroidales* og menneske ble påvist i august, september og oktober mens hund og drøvtygger kun var til stede i oktober. Under feltarbeid ble det observert et rikt fugleliv både på innsjøen og på land.

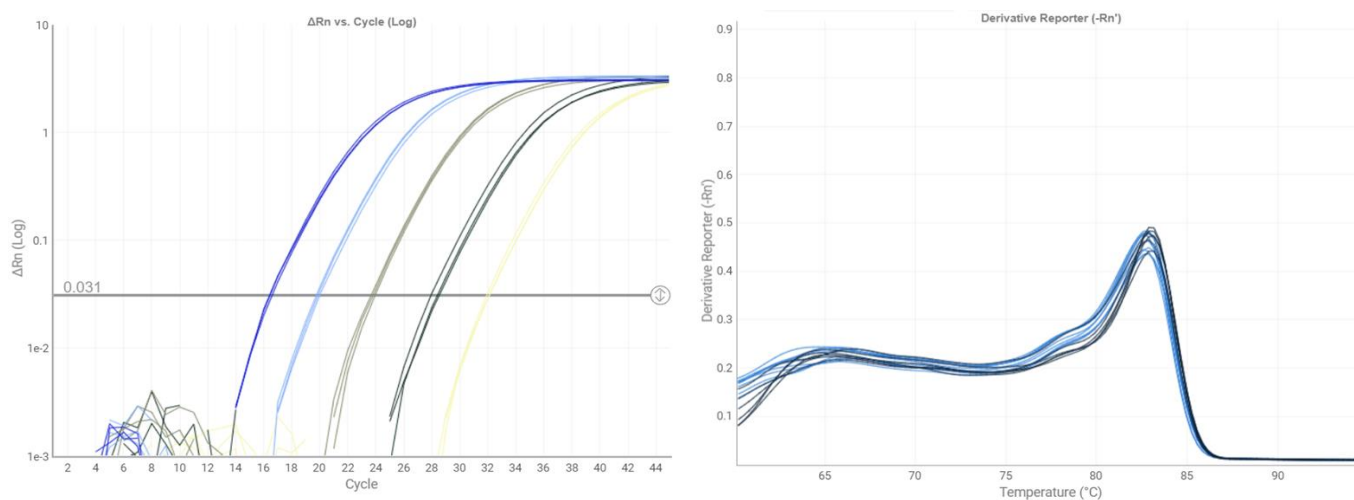
Det ble ikke påvist *E.coli* fra brønn 2, 3 eller 4 under noen av prøvetakningene (Tabell 8). Den høyeste verdien av *E.coli* var nedstrøms Litveit (>2419 MPN/100 mL) i august. Utenom denne er det lave (< 21 MPN/100 mL) konsentrasjoner.

Mengden av koliforme bakterier er generelt høyere enn *E.coli* ved tilnærmet alle stasjoner. I dette prosjektet er det kun *E.coli* som blir regnet som indikator på fersk fekal forurensning. Koliforme bakterier er en stor gruppe, med stadig flere undergrupper. De kan ha fekal kilde, men de kan også komme fra jord eller planterester (Paruch et al., 2017).

**Tabell 8.** Resultater fra Colilert®-18 Quanti-Tray®/2000 og fekal kildesporing med qPCR fra 12 stasjoner i Kviteseidvatn prøvetatt i 2022. Markert X betyr påvist målgruppe. Stasjoner markert i grått er ikke analysert med q-PCR

Stasjon	Dato	Vassdrag	Fekal kildesporing					<i>E.coli</i> MPN/100ml	Koliforme MPN/100ml
			<i>Bacteroidales</i>	Menneske	Drøvtygger	Hest	Hund		
Kviteseid brygge	16.08.2022	Sundkilen	X	X				5	517
Kviteseid brygge	14.09.2022	Sundkilen	X					20	1986
Kviteseid brygge	18.10.2022	Sundkilen	X		X			9	93
Kviteseid rensesanlegg	16.08.2022	Sundkilen	X	X				14	>2419
Kviteseid rensesanlegg	14.09.2022	Sundkilen	X	X				11	1733
Kviteseid rensesanlegg	18.10.2022	Sundkilen	X	X	X		X	10	30
Kvitsund bade plass	16.08.2022	Sundkilen	X	X				2	1986
Kvitsund bade plass	14.09.2022	Sundkilen	X					1	613
Kvitsund bade plass	18.10.2022	Sundkilen	X	X	X			3	10
Oppstrøms Litvedt	16.08.2022	Straumen	X					17	921
Oppstrøms Litvedt	14.09.2022	Straumen	X					20	328
Oppstrøms Litvedt	18.10.2022	Straumen						<1	16
Nedstrøms Litvedt	16.08.2022	Straumen	X	X				>2419	>2419
Nedstrøms Litvedt	14.09.2022	Straumen	X					5	613
Nedstrøms Litvedt	18.10.2022	Straumen	X					4	37
Spjotodd brygge	16.08.2022	Straumen	X					1	251
Spjotodd brygge	14.09.2022	Straumen						<1	866
Spjotodd brygge	18.10.2022	Straumen	X					7	33
Drikkevann-Marit Wrigh	16.08.2022	Hovedvassdrag						<1	249
Drikkevann-Marit Wrigh	14.09.2022	Hovedvassdrag	X					1	255
Drikkevann-Marit Wrigh	18.10.2022	Hovedvassdrag	X		X			4	27
Sorgenfri bade plass	16.08.2022	Hovedvassdrag						<1	461
Sorgenfri bade plass	14.09.2022	Hovedvassdrag	X					2	649
Sorgenfri bade plass	18.10.2022	Hovedvassdrag	X					2	10
Sundet	16.08.2022	Hovedvassdrag	X					2	>2419
Sundet	14.09.2022	Hovedvassdrag	X					1	921
Sundet	18.10.2022	Hovedvassdrag	X	X	X			4	25
Brønn 2	16.08.2022	Grunnvannsbrønn						<1	3
Brønn 2	14.09.2022	Grunnvannsbrønn						<1	<1
Brønn 2	18.10.2022	Grunnvannsbrønn						<1	<1
Brønn 3	16.08.2022	Grunnvannsbrønn						<1	<1
Brønn 3	14.09.2022	Grunnvannsbrønn						<1	<1
Brønn 3	18.10.2022	Grunnvannsbrønn						<1	<1
Brønn 4 (NY)	16.08.2022	Grunnvannsbrønn						<1	<1
Brønn 4 (NY)	14.09.2022	Grunnvannsbrønn						<1	<1
Brønn 4 (NY)	18.10.2022	Grunnvannsbrønn						<1	<1

Alle primerpar (n=6) amplifiserte ved analysering med fekal materiale fra gjeldende målgruppe (Figur 4 og vedlegg 2).



**Figur 4.** Amplifikasjonskurve (venstre) og smeltekurve (høyre) for positiv kontroll (ku-materiale) med generell bacteriodales primerpar. Kontrollen er fortynnet 1:10 med et utgangspunkt på 221,9 ng/ $\mu$ l DNA. På amplifikasjonskurven går DNA-mengden fra høyest til lavest fra venstre mot høyre. Gjennomsnittlig  $T_m$  (smeltetemperatur) er 83 °C.

Mengde DNA ekstrahert fra vannprøvene (n=23) varierte fra 4,2 til 14,1 ng/μl. DNA fra positive kontroller (n=5) varierte fra 10,2 til 221,9 ng/μl (Tabell 9).

**Tabell 9.** Filtrert prøvevolum og resultater fra NanoDrop™ Lite for stasjoner prøvetatt i 2022 med *E.coli* >1 MPN/100ml (n=23), samt resultater for positive kontrollprøver.

Stasjon	Dato	Filtrert volum (ml)	A260 (10mm)	A260/A280	ng/μl
Oppstrøms Litvedt	16.08.2022	1070	0.150	1.52	7.5
Oppstrøms Litvedt	14.09.2022	1100	0.129	1.58	6.5
Badeplass- Strømsadbukti	16.08.2022	1050	0.138	1.51	6.9
Badeplass- Strømsadbukti	14.09.2022	910	0.141	1.42	7.0
Badeplass- Strømsadbukti	18.10.2022	810	0.132	1.25	6.6
Spjotodd brygge	16.08.2022	1030	0.105	1.48	5.3
Spjotodd brygge	18.10.2022	960	0.110	1.31	5.5
Marit Wright	14.09.2022	900	0.084	1.60	4.2
Marit Wright	18.10.2022	1030	0.134	1.42	6.7
Kviteseid rensanlegg	16.08.2022	870	0.176	1.68	8.8
Kviteseid rensanlegg	14.09.2022	750	0.147	1.78	7.3
Kviteseid rensanlegg	18.10.2022	890	0.282	1.58	14.1
Kvitsund badeplass	16.08.2022	710	0.129	1.62	6.4
Kvitsund badeplass	14.09.2022	650	0.142	1.71	7.1
Kvitsund badeplass	18.10.2022	950	0.268	1.56	13.4
Sundet	16.08.2022	1010	0.125	1.50	6.2
Sundet	14.09.2022	450	0.099	1.66	5.0
Sundet	18.10.2022	1010	0.282	1.60	14.1
Sorgenfri badeplass	14.09.2022	1050	0.097	1.54	4.8
Sorgenfri badeplass	18.10.2022	1200	0.112	1.36	5.6
Kviteseid brygge	16.08.2022	650	0.147	1.78	7.3
Kviteseid brygge	14.09.2022	700	0.145	1.83	7.2
Kviteseid brygge	18.10.2022	940	0.242	1.53	12.1
<b>Positive kontrollprøver (fra avføring)</b>					
Menneske			0.572	2.30	28.6
Ku			4.439	2.07	221.9
Hest			0.364	2.53	18.2
Hund			0.205	1.95	10.2
Gris			0.253	1.77	12.6

## Diskusjon

Sundkilen har en vannkemi som er svært ulik det en finner i hovedvassdraget, Bandak-Straumen-Kviteseidvatn. Dette skyldes flere faktorer, blant annet at nedbørfeltet til Sundkilen består av større andel skog og myr og mindre andel snaufjell enn i det resterende nedbørsfeltet til Kviteseidvatn. Samtidig befinner mye av Kviteseids befolkning og jordbruksaktivitet i kommunen i nedbørsfeltet til Daleåi og rundt Sundkilen. Også to kloakkrensaneanlegg ligger i nedbørsfeltet, Kviteseid og Morgedal rensaneanlegg. At også omtrent halvparten av vannmengdene ble overført til Sundsbarm reguleringen i 1970, bidro til å doble oppholdstiden for vannet innsjøen.

Vannkjemisk medfører disse ovenfornevnte ulikheter til at den totale konsentrasjonen av løste komponenter i Sundkilen i blandprøver fra 0-5 m, målt som  $K_{25}$  (elektrolytisk ledningsevne), gjennomsnittlig var > 2,5 ganger høyere,  $36,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ , enn i Straumen,  $14,0 \mu\text{S cm}^{-1}$ , i 2022.  $K_{25}$  målt i Straumen i 2022, var ikke vesentlig forskjellig fra det som ble målt i Kviteseidvatn i 1975/1976,  $16,0 \mu\text{S cm}^{-1}$  (Rognerud et al., 1979).

Det finnes noe ledningsevne data fra Sundkilen fra 1966/1967, blant annet fra 0 m, 1 m og 4 m dyp (Skulberg, 1969). Basert på justert  $K^{25}$ , som angitt i rapporten til  $K^{25}$  (dagens standard), var gjennomsnittsverdien for  $K^{25}$  i Sundkilen høsten 1966 og 1967 ( $n = 59$ ) på  $20,4 \pm 1,8 \mu\text{S cm}^{-1}$ . Brekke og Oredalen (1985) rapporterte om betydelige høyere  $K^{25}$  verdier i Sundkilen høsten 1985 på  $22,0 - 30,8 \mu\text{S cm}^{-1}$ , selv om dette fortsatt er klart lavere enn det som ble målt i 2022.

Det som derimot er interessant er den betydelige nedgangen som er registrert for Tot-P og Klorofyll-a i Sundkilen over tid. Allerede i 1967 ble det antydnet en viss grad av eutrofiering, siden blågrønnalgen *Anabaena Flos-Aquae* var forholdsvis vanlig i denne innsjøen (Skulberg, 1967).

For perioden 1976-1978, rapporterte Rognerud et al. (1979) Tot-P og Klorofyll-a konsentrasjoner i Sundkilen på hhv  $10,4 \mu\text{g P L}^{-1}$ , og  $3,1 \mu\text{g P L}^{-1}$ , og på hhv  $5,4 \mu\text{g P L}^{-1}$ , og  $1,3 \mu\text{g P L}^{-1}$  i Straumen-Kviteseidvatn.

I 2022 la gjennomsnittsverdiene for Tot-P, Tot-N og Klorofyll-a på hhv  $3 \pm 1,32 \mu\text{g P L}^{-1}$ ,  $324 \pm 107 \mu\text{g N L}^{-1}$  og  $1,97 \pm 1,03 \mu\text{g L}^{-1}$  i Sundkilen, og på  $< 2 \mu\text{g P L}^{-1}$ ,  $114 \pm 20 \mu\text{g N L}^{-1}$  og  $1,32 \pm 0,43 \mu\text{g L}^{-1}$  i Straumen-Kviteseidvatn. Det finnes lite historisk data på Tot-N i Sundkilen og Straumen, men data fra Sundkilen i 1985, viser Tot-N verdier mellom  $140\text{-}290 \mu\text{g N L}^{-1}$  (Brekke og Oredalen, 1987) og i underkant av  $300 \mu\text{g N L}^{-1}$  i Straumen-Kviteseidvatn i 1976-1980 (Rognerud et al., 1979). Dette indikerer kun mindre endringer av Tot-N konsentrasjoner over tid i de to undersøkte innsjø-lokalitetene.

Hovedårsaken til nedgang i konsentrasjoner av Tot-P og Klorofyll-a, fra 1970/1980 og fram til i dag, skyldes trolig i første omgang etablering av kloakkrensaneanlegget i Kviteseid (1977) og i Morgedal (1979). Den betydelige nedgangen som har funnet sted for Tot-P indikerer at rensegraden har bedret seg over tid. Renseanlegg i Kviteseid rapporterte i 2021 om 95,8% renseeffekt på fosfor (P) og 92,0% renseeffekt av organisk stoff (målt som kjemisk oksygenforbruk KOF). Tilsvarende rapporterte anlegget i Morgedal om 89,6% renseeffekt for fosfor og 93,0 % renseeffekt for KOF i 2021 (Driftsassistansen, 2022).

At det ikke er tilsvarende nedgang for nitrogenkomponenter i innsjølokalitetene (målt som Tot-N), skyldes blant annet at renseanleggene ikke har krav på nitrogen rensing og at det fortsatt kommer betydelige mengder N, som  $\text{NO}_3^-$  og  $\text{NH}_4^+$  med nedbøren, både som våt og tørrdeposisjon.

Konsentrasjonen av tungmetaller er gjennomgående betydelig høyere i grunnvannsbrønnene enn ute i selve vassdraget. De til dels ekstremt høye konsentrasjonene av Mn og Fe i Brønn 3, som også er påvist tidligere (Cowi, 2018), var ikke mulig å spore ut i hovedvassdraget (Straumen) nedstrøms influensområdet fra Brønn 3.

Statistiske tester viste ingen signifikante forskjeller, hverken makrokjemiske eller i forhold til tungmetaller, mellom stasjon oppstrøms og nedstrøms influensområdet for Litveit avfallsdeponi. Dette tyder på at grunnvannsbelastning fra slamkomposteringsanlegget på resipienten (Straume-Kviteseidvatn) er ubetydelig, basert på den prøvetakingsperioden som analysert og rapportert her.

Selv om vi ikke finner *E.coli* i noen av grunnvannsbrønnene, kommer det klart fram at grunnvannet i influensområdet (brønn 2 og 3) er påvirket av høy organisk belastning, spesielt dokumentert i brønn 3. Dette er nok hovedårsaken til de svært høye konsentrasjonene av de redoksfølsomme metallene, jern og mangan i dette grunnvannet. Også andre analyserte tungmetaller viser noe høyere nivåer i grunnvannsprøvene sammenliknet med overflatevannet det drenerer til.

Under prøvetaking i september var all skog rundt brønn 4 hugget. Dette er trolig årsaken til den betydelige økningen i Tot-P, Tot-N, som er målt i september 2022. Vannkjemiske



endringer som følge av hogst vil trolig kunne påvises over flere år, hvor også flere andre parametere vil påvirkes (Berge og Traaen, 1985, Rognan. 2019).

På alle stasjonene analysert med qPCR (n=23) ble det påvist kontaminering fra generell *Bacteroidales*, noe som var forventet da dette primerparet ikke er vertsspesifikke og bakteriegruppen *Bacteroidales* finnes i tarmsystemet til varmblodige dyr, inklusiv mennesker (Paruch et al., 2017). På stasjonene hvor det eksklusivt ble påvist kontaminering fra generell *Bacteroidales* tyder det på at det finnes fekal forurensning fra andre kilder enn de som ble analysert for i dette prosjektet. Kildene kan være andre typer husdyr eller ville dyr. Siden det ble observert mye fugl under prøvetakning kan det tenkes at de har bidratt til fekal forurensning blant stasjonene. Tidligere forskning har vist at ville fugler kan være en signifikant bidragsyter til fekal forurensning i vann (Corrigan et al., 2021; Jiang et al., 2007).

Det er mange bekker på begge sider av innsjøen, spesielt i området Sundkilen. Det kan være overflateavrenning fra nedbørfeltet i tillegg til at bekker kan føre med seg forurensning til innsjøen. De fleste undergruppene til *Bacteroidales* vokser under anaerobe forhold og har kort levetid ved tilførsel av oksygen (Coyne et al., 2019). Derfor virker det sannsynlig at påvisning av denne bakteriegruppen skyldes innsjønære kilder, men det kan ikke konkluderes da qPCR er en sensitiv analyse som også kan fange opp DNA fra dødt materiale (Masters et al., 1994).

Oktober var den eneste måneden det ble påvist kontaminering fra drøvtygger. Dette kan komme fra husdyrhold og landbruksaktiviteter, eller fra ville dyr som elg, hjort og rådyr. Kontaminering fra hund ble kun påvist én gang i oktober på Kviteseid renseanlegg. Dette er

også stasjonen det ble påvist flest ulike kilder under samme prøvetakning (Generell *bacteroidales*, menneske, drøvtygger og hund) samt menneske under alle tre prøvetakninger. Stasjonen oppstrøms (Kviteseid brygge) hadde kun kontaminering fra menneske påvist i august. Disse resultatene kan tyde på at vannet fra renseanlegget er forurenset av fekal materiale. Det kan være grunnet dårlige renseløsninger, brudd på vannledninger eller urensset overvann. Siden området rundt også består av både bebyggelse og skog, kan det ikke utelukkes at det kommer fra andre steder enn renseanlegget.

DNA fra menneske ble påvist i varierende grad under alle prøvetakninger. Under badesesongen (august) var det to av tre badeplasser som var fekal forurenset av menneske (Kvitsund badeplass og Nedstrøms Litveit). Nedstrøms Litveit i august var også der det var mest *E.coli* (>2419 MPN/100 mL). Under prøvetakning ble det observert benker på stranden, så det kan tenkes at denne badeplassen blir benyttet en del under badesesongen. Mangel på offentlig toalett kan føre til fekal forurensning fra mennesker som oppholder seg på området. Til dags dato finnes det ikke et klart svar som tilsier at Litveit slamhåndteringsanlegg tilførte fekal forurensning Kviteseidvatn under prøvetakningsperioden, men resultatene fra dette prosjektet tyder på at det ikke var det. Nedstrøms influensområdet ble det kun funnet kontaminering fra menneske i august, men siden dette også er en badeplass kan man ikke vite sikkert hvor kilden kommer fra. Hvis det skal utføres lignende undersøkelser i fremtiden anbefales det å ta flere prøver over en lenger tidsperiode slik at man får et større datasett å gå ut ifra. Da vil man også lettere kunne se eventuelle variasjoner mellom sesong og værforhold. Det ville vært interessant og laget en bidragsprofil over de ulike kildene så man kan se hvem som bidrar mest på de ulike stasjonene. Undersøkelser som dette bør gjøres i

tett samarbeid med lokalkjente som kanskje har mer informasjon enn det man finner via kart og offentlige dokumenter.

Det ble ikke påvist *E.coli* fra brønn 2, 3 og 4 under noen av prøvetakningene. Siden brønn 2 og 3 ligger innenfor influensområdet til slamkomposteringsanlegget kan det tyde på at anlegget har et tilstrekkelig rensesystem og/eller at bakteriene ikke overlever grunnet forholdene. Den høyeste verdien av *E.coli* var på Badeplass-Strømstadbukti (< 2419 MPN/100 mL) i august. Siden dette var innenfor badesesongen kan det være grunnet mye menneskelig aktivitet, men siden dette var den mest regntunge dagen kan det også være kontaminering grunnet høy overflateavrenning fra nedbørsfeltet. Bortsett fra denne er det lave (< 21 MPN/100 mL) mengder *E.coli*. Det tyder på at det var lite forurensing av fekalt materiale til nordre deler av innsjøen i prøvetakningsperioden.

Det er verdt å vite at dette er verdier som kan svinge veldig, spesielt etter værforhold. Derfor kan man ikke si noe om forurensningsgraden til innsjøen generelt, men kun forholdende under prøvetakning.

Som beskrevet tidligere indikerer påvisning av *E.coli* fersk tilførsel av fekalt materiale.

Ulempen er at man ikke kan vite hvor kilden kommer fra. Derimot kan man ikke ved bruk av qPCR vite om tilførselen er fersk eller ikke grunnet amplifisering av DNA fra både dødt og levende materiale. Derfor er disse to metodene gode å bruke sammen i et prosjekt som dette, da man kan bruke Colilert®-18 Quanti-Tray®/2000 til å finne en eventuell fersk fekal forurensning, og deretter qPCR til å detektere de ulike bidragsgiverne.

Alle primerparene (n=6) amplifiserte med positive kontrollprøver. Ideelt vil man kun ha en smeltetopp på smeltekurvene, dette er et godt tegn på at primerne er spesifikke for det produktet man leter etter. Som beskrevet tidligere er det brukt SYBR green til disse analysene. Dette er et fluoreserende fargestoff som gir signaler ved binding til dobbeltrådet DNA. SYBR green binder seg uspesifikt og kan derfor produsere falsk positive resultater ved å binde seg til for eksempel primer-dimere eller andre uønskede produkter (Cao og Shockey, 2012). På smeltekurvene til drøvtygger, hest og gris ser man at de har mer enn en smeltetopp. Allikevel kan det ikke konkluderes med at det er amplifisert uspesifikke produkter. Visse regioner innenfor samme ampikon kan denaturere ved ulike temperaturer grunnet ulik ionestyrke, og derfor skape to smeltetopper selv om det er amplifisert kun ett og samme produkt (Peacock og Walter, 1962). Ved å bruke Gel-elektroforese på qPCR-produktet kan man se om det er amplifisert uspesifikt eller spesifikt (Downey, 2014), noe som ikke ble utført i dette prosjektet. Dette kan ha vært en mulig feilkilde under tolkning av qPCR-resultater og ha produsert falsk-negative som ble tolket til å være uspesifikk amplifisering.

Bruk av avføring som positiv kontroll er enkelt og billig, men ulempen er at man ikke kan kvantifisere resultatene fordi man ikke vet antall genkopier i standardene. Resultatene fra NanoDrop™ Lite viser kun mengde generelt DNA, ikke kun *Bacteroidales*.

Resultatene fra NanoDrop™ Lite sier noe om mengde DNA, men også renhet. Ved ekstrahering av DNA er det også ulike rensesregime og dette er viktig for å fjerne eventuelle PCR-inhibitorer fra både fekal materiale og vann. PCR-inhibitorer kan forårsake falsk-negative resultater. Optimal 260/280 ratio for DNA er 1,80 og resultater under 1,70 frarådes å bruke. Det er heller ikke anbefalt å bruke NanoDrop™ Lite for prøver med < 10 ng/μl DNA, hvor Qubit

er en foretrukket metode. Siden flesteparten av vannprøvene hadde lave DNA-konsentrasjoner, ville det vært foretrukket å bruke Qubit for mer presise tall. Dette ble ikke gjort da DNA-mengden i vannprøvene ikke ville vært tilstrekkelig til alle analysene som skulle gjennomføres. Resultatene fra NanoDrop<sup>TM</sup>Lite tyder på utilstrekkelig renhet for DNA-et på flere av vannprøvene og derfor kan ikke falsk-negative resultater utelukkes.

Potensielle feilkilder under feltarbeid eller analyser kan påvirke kredibiliteten til resultatene. I dette prosjektet ble det tatt forhåndsregler for å unngå kontaminering, som å bruk egnet frakk, sterilisere benker før bruk og bruke sterilt utstyr. Laboratoriene som er brukt under dette prosjektet brukes også av mange ulike personer, inkludert studenter under opplæring. Derfor kan det være uoppdagede feilkilder, som for eksempel forurensning av humant DNA. Det er uvisst når utstyr og instrumenter er sist kalibrert. Menneskelige feil som tolkning av resultater og feiltasting på tastatur kan heller ikke utelukkes.

Fekal kildesporing med qPCR anses som en god metode, men med et behov for standardiserte metoder for prøvetakning og analysering som kan øke kunnskap og utvikling i Norge. Dette gjør det også lettere å kunne sammenligne resultater mellom laboratorier (Paruch og Paruch, 2022). Selv om forurenset drikkevann ikke er et like stort problem i Norge som i LLMIC-land kan fekal kildesporing være et nyttig verktøy for norsk vannforvaltning, spesielt for drikke -og badevann hvor det tidligere er dokumentert fekal forurensning.

## Konklusjon

Fekal kildesporing med qPCR på vannprøver fra Straumen tyder på at Litveit slamhånderingsanlegg ikke tilførte fekal forurensning til vassdraget under prøvetakningsperioden, men det anbefales å ta flere prøver over en lengre tidsperiode. Vannkjemiske analyser ga ingen indikasjoner på forurensning fra Litveit til vassdraget. Derimot ble det påvist fekalt materiale fra menneske utenfor Kviteseid renseanlegg fra alle tre prøvetakninger, noe som tyder på at det kan ha vært forurensning fra anlegget. Det ble påvist eksklusivt generell *Bacteroidales* på flere stasjoner som konkluderes med å være fra andre arter enn de som ble brukt i dette prosjektet, med fugl som en trolig bidragsyter. Det kan ikke konkluderes at Kviteseidvatn ikke forurenset resipientvannet, men trolig skyldes de høyere konsentrasjonene i Sundkilen hovedsakelig ulikheter i nedbørfelt og ulik oppholdstid på vannet. Fekal kildesporing med qPCR oppfattes som en god metode for vannforvaltning i Norge, spesielt med hensyn til bade -og drikkevann. Det er et behov for standardiserte prosedyrer som kan bidra til utvikling og kunnskap av fekal kildesporing i Norge. For fremtidige prosjekter anbefales det å gjøre gode forundersøkelser ved valg av primersett, lage bidragsprofil for ulike kilder og ha en lenger prøvetakningsperiode for å bedre kunne se sesongvariasjoner.

## Referanser/litteraturliste

Berge, D. & Traaen, T. (1985) Skogbruk og vannforurensing – en problemanalyse. Niva rapport-O84117, 44s. [https://niva.brage.unit.no/niva-xmloi/bitstream/handle/11250/204032/1700\\_72dpi.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://niva.brage.unit.no/niva-xmloi/bitstream/handle/11250/204032/1700_72dpi.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Boger, C. (2019) Bymiljøetaten fraråder bading i Oslofjorden på grunn av bakterier, *Vårt Oslo*. Tilgjengelig fra: <https://vartoslo.no/bymiljoetaten-christian-boger-ecoli-bakterier/bymiljoetaten-frarader-bading-i-oslofjorden-pa-grunn-av-bakterier/207858> (Hentet: 03.11.2022).

Brekke, H. & Oredalen, T.J. Forurensningssituasjonen i Sundkilen i Telemark 1985. Telemark Distriktshøgskole, Hovedoppgåve, INHM, 54 s + Appendiks.

Byappanahalli, M.N., Nevers, M.B., Korajkic, A., Staley, Z.R. & Harwood, V.J. (2012) Enterococci in the environment, *Microbiology and molecular biology reviews*, 76 (4). DOI: 10.1128/MMBR.00023-12

Corrigan, J.A., Butkus, S.R., Ferris, M.E., & Roberts, J.C. (2021) Microbial Source Tracking Approach to Investigate Fecal Waste at the Strawberry Creek Watershed and Clam Beach, California, USA, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(13). DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph18136901>

Cowi (2015) Gjennomgang av avrenningsfaktorer. *Miljødirektoratet*. Tilgjengelig fra: <https://www.miljodirektoratet.no/globalassets/publikasjoner/M293/M293.pdf> (Hentet: 30.01.2023)

Cowi AS (2018). Renovest IKS. Litveit avfallsdeponit – revidert overvåkingsplan. Oppderagsnr. A118112-01

Cowi, (2022) *Årsrapport miljøovervåking Litveit avfallsdeponi 2022*. Rapport nr. RAP002

Coyne, M.J., Béchon, N., Matano, L.M., McEneaney, V.L., Chatzidaki-Livanis, M. & Comstock, L.E. (2019) A family of anti-Bacteroidales peptide toxins wide-spread in the human gut microbiota, *Nature Communications*, 10. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11494-1>

De Forente nasjoner, (1948). *VERDENSERKLÆRINGEN FOR MENNESKERETTIGHETER*.

Tilgjengelig fra:

file:///C:/Users/Regine/Downloads/Verdenserkl%C3%A6ringen%20om%20menneskerettighet er.pdf (Hentet: 26.04.2023)

Direktoratsgruppen vanndirektivet 2018. Veileder 02:2018. Klassifisering av miljøtilstand i vann. <https://www.vannportalen.no/veiledere/klassifiseringsveileder/>

Downey, N. (2014) *Explaining multiple peaks in qPCR melt curve analysis*. Tilgjengelig fra: <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/interpreting-melt-curves-an-indicator-not-a-diagnosis> (Hentet: 29.04.2023)

Driftsassistansen (2022) Driftsassistansen i Telemark -avløp- Årsmelding 2021, 476 s.

Drægni, I. (2022) Fraråder bading på populær badeplass, *TV 2 Nyheter*. Tilgjengelig fra: <https://www.tv2.no/nyheter/innenriks/frarader-bading-pa-populaer-badeplass/14909500/> (Hentet: 03.11.2022).

Europaparlamentets och Rådets Direktiv (2006) *Förvaltning av badvattenkvaliteten och om upphävande av direktiv 76/160/EEG*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/badevann/eus-badevannsdirektiv-pa-svensk.pdf> (Hentet: 03.11.2022).

Foley, S.L., Lynne, A.M. & Nayak, R. (2009) Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens, *Infection, Genetics and Evolution*, 9 (4). DOI: 10.1016/j.meegid.2009.03.004



Folkehelseinstituttet (2010) *E. coli-enteritt (inkludert EHEC-infeksjon og HUS) - veileder for helsepersonell*. Tilgjengelig fra:

<https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/e.-coli-enteritt-inkludert-ehec-inf/> (Hentet: 03.11.2022).

Folkehelseinstituttet (2018) *Bakterier i drikkevann*. Tilgjengelig fra:

<https://www.fhi.no/nettpub/stoffer-i-drikkevann/smittestoffer-i-drikkevann/bakterier-i-drikkevann/> (Hentet: 03.11.2022).

Forskrift til matloven, helseberedskapsloven og folkehelseloven (2016) *Forskrift om vannforsyning og drikkevann (drikkevannsforskriften)*. Tilgjengelig fra:

<https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2016-12-22-1868> (Hentet: 03.11.2022).

Geng, H., Xu, Y., Zheng, L., Gong, H., Dai, L. & Dai, X. (2020) An overview of removing heavy metals from sewage sludge: Achievements and perspectives, *Environmental Pollution* 266 (2).

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115375>

IDEXX (u.å) *Quanti-Tray system*. Tilgjengelig fra: <https://www.idexx.co.za/en-za/water/water-products-services/quant-tray-system/> (Hentet: 03.02.2023)

IPCC (2023) *SYNTHESIS REPORT OF THE IPCC SIXTH ASSESSMENT REPORT (AR6)*. Tilgjengelig

fra: [https://www.ipcc.ch/report/ar6/syr/downloads/report/IPCC\\_AR6\\_SYR\\_LongerReport.pdf](https://www.ipcc.ch/report/ar6/syr/downloads/report/IPCC_AR6_SYR_LongerReport.pdf)

(Hentet: 11.05.2023)

Jiang, S.C., Chu, W., Olson, B.H., He, J., Choi, S., Zhang, J., Le, J.Y. & Gedalanga, P.B. (2007)

Microbial source tracking in a small southern California urban watershed indicates wild animals and growth as the source of fecal bacteria, *Applied Microbiology and Biotechnology*,

76. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1047-0>

Kauppinen, A., Pitkänen, T., Al-Hello, H., Maunula, L., Hokajärvi, A., Rimhanen-Finne, R. & Miettinen, I.T. (2019) Two Drinking Water Outbreaks Caused by Wastewater Intrusion Including Sapovirus in Finland, *Environmental Research and Public Health*, 16 (22). DOI: 10.3390/ijerph16224376

Kildare, B.J., Leutenegger, C.M., McSwain, B.S., Bambic, D.G., Rajal, V.B. & Wuertz, S. (2007) 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal Bacteroidales: A Bayesian approach, *Water Research* 41(16). Tilgjengelig fra: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy2.usn.no/science/article/pii/S0043135407004162> (Hentet: 01.04.2023)

Klymus, K.E., Merkes, C.M., Allison, M.J., Goldberg, C.S., Helbing, C.C., Hunter, M.E., Jackson, C.A., Lance, R.F., Mangan, A.M., Monroe, E.M., Piaggio, A.J., Stokdyk, J.P., Wilson, C.C. & Richter, C.A. (2019) Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays, *Environmental DNA* 2 (3). DOI: 10.1002/edn3.29

Lakshmanan, R., Sanchez-Dominguez, M., Matutes-Aquino, J.A., Wennmalm, S. & Rajarao, G.K. (2014) Removal of Total Organic Carbon from Sewage Wastewater Using Poly(ethylenimine)-Functionalized Magnetic Nanoparticles, *American Chemical Society Journals* 30 (4). DOI: <https://doi-org.ezproxy1.usn.no/10.1021/la404076n>

Layton, A., McKay, L., Williams, D., Garrett, V., Gentry, R. & Sayler, G. (2006) Development of Bacteroides 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water, *Applied Environmental Microbiology*, 72(6). DOI: 10.1128/AEM.01036-05.

Ma, B., Hu, C., Zhang, J., Ulbricht, M. & Panglisch, s. (2022) Impact of Climate Change on Drinking Water Safety, *ACS Publications* 2 (2). DOI: 10.1021/acsestwater.2c00004

Masters, C.I., Shallcross, J.A., & Mackey, B.M. (1994) Effect of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction, *Applied Microbiology*, 77(1). DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb03047.x>

Mieszkin, S., Furet, J., Corthier, G. & Gourmelon, M. (2009) Estimation of Pig Fecal Contamination in a River Catchment by Real-Time PCR Using Two Pig-Specific Bacteroidales 16S rRNA Genetic Markers, *Applied and Environmental Microbiology* 75(10). DOI: 10.1128/AEM.02343-08

Morabito, S. (2014) *Pathogenic Escherichia Coli: Molecular and Cellular Microbiology*. 1 Utgave. Norfolk: Caister Academic Press

Moreira, N. & Bondelind, M. (2017). Safe drinking water and waterborne outbreaks. *Journal of Water and Health* 15(1): 83-96. DOI: <http://dx.doi.org/10.2166/wh.2016.103>

Murakami, H., Yoon, S., Kasai, A., Minamoto, T., Yamamoto, S., Sakata, M.K., Horiuchi, T., Sawada, H., Kondoh, M., Yamashita, Y. & Masuda, R. (2019) Dispersion and degradation of environmental DNA from caged fish in a marine environment, *Fisheries Science*, 85. DOI: <https://doi-org.ezproxy1.usn.no/10.1007/s12562-018-1282-6>

Mæhlum, L. (u.å) *Kviteseidvatnet*. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/Kviteseidvatnet> (Hentet: 21.09.2022)

Møre-Nytt (2018) *Avføring rundt nausta*. Tilgjengelig fra: <https://www.morenytt.no/nyheiter/i/w8eXp4/avforing-rundt-nausta> (Hentet: 16.04.2023)

Nevina (u.å) *Nedbørfelt-indeks*. Tilgjengelig fra: <https://nevina.nve.no/> (Hentet: 09.11.2022)

Ngure, F.M., Reid, B.M., Humphrey, J.H., Mbuya, M.N., Pelto, G. & Stoltzfus, R.J. (2014) Water, sanitation, and hygiene (wash), environmental enteropathy, nutrition, and early child development: making the links, *The New York Academy of Sciences*, 1308(1). DOI: <https://doi.org/10.1111/nyas.12330>

Nguyen, K.H., Senay, C., Young, S., Nayak, B., Lobos, A., Conrad, J. & Harwood, V.J. (2018) Determination of wild animal sources of fecal indicator bacteria by microbial source tracking (MST) influences regulatory decisions, *Water Research*, 114. DOI: 10.1016/j.watres.2018.07.034

Norges Geologiske undersøkelse (u.å) *Nasjonal berggrunnsdatabase*. Tilgjengelig fra: [https://geo.ngu.no/kart/berggrunn\\_mobil/](https://geo.ngu.no/kart/berggrunn_mobil/) (Hentet: 21.09.2022)

Norsk Klimaservicesenter (u.å) *Observasjoner og værstatistikk*. Tilgjengelig fra: <https://seklima.met.no/> (Hentet: 05.01.2023)

Nshimiyimana, J.P., Cruz, M.C., Thompson, R.J. & Wuertz, S. (2017) Bacteroidales markers for microbial source tracking in Southeast Asia, *Water Research*, 118. DOI: 10.1016/j.watres.2017.04.027

NTB (2018) E. coli-bakterier funnet i drikkevannet i Bergen, *Sykepleien*. Tilgjengelig fra: <https://sykepleien.no/2018/07/e-coli-bakterier-funnet-i-drikkevannet-i-bergen> (Hentet: 03.11.2022)

Oredalen, T.J., Mo, T.A., Jenkins, A., Haugan, N. & Sæbø, M. (2022) Use of environmental DNA to detect the myxozoan endoparasite *Tetracapsuloides bryosalmonae* in large Norwegian lakes, *Environmental DNA*. DOI: 10.1002/edn3.338

Oskarsen, T.H. (2021) Funn av E. coli i drikkevann, *Dagsavisen*. Tilgjengelig fra: <https://www.dagsavisen.no/rogalandsavis/nyheter/2021/06/23/funn-av-e-coli-i-drikkevann/> (Hentet: 29.01.2023).

Paruch, A.M & Mæhlum, T. (2012) Specific features of Escherichia coli that distinguish it from coliform and thermotolerant coliform bacteria and define it as the most accurate indicator of faecal contamination in the environment, *Ecological Indicators*, 23. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.03.026>

Paruch, A.M., Paruch, L. & Mæhlum, T. (2017) *Kildesporing av fekal vannforurensing med molekylærbiologiske metoder - Eksempler på undersøkelser i Norge (NIBIO-rapport 3/66/2017)*. Ås: NIBIO. Tilgjengelig fra: [https://nibio.brage.unit.no/nibio-xmlui/bitstream/handle/11250/2441094/NIBIO\\_RAPPORT\\_2017\\_3\\_66.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://nibio.brage.unit.no/nibio-xmlui/bitstream/handle/11250/2441094/NIBIO_RAPPORT_2017_3_66.pdf?sequence=2&isAllowed=y) (Hentet 30.08.2022).

Paruch, L. & Paruch, A (2022) An Overview of Microbial Source Tracking Using Host-Specific Genetic Markers to Identify Origins of Fecal Contamination in Different Water Environments, *Water*, 14(11). DOI: <https://doi.org/10.3390/w14111809>

Paruch., L. & Paruch., A. (2022) An Overview of Microbial Source Tracking Using Host-Specific Genetic Markers to Identify Origins of Fecal Contamination in Different Water Environments, *Water* 14(11). DOI: <https://doi.org/10.3390/w14111809>

Peacock., A.R. & Walker. I.O (1962) The thermal Denaturation of Sodium Deoxyribonucleate, *Journal of Molecular Biology*, 5.

Qiagen (u.å) *DNeasy PowerWater Kit Handbook*. Tilgjengelig fra: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=75765ef9-2a6f-4f5d-a36b-dbd9beb43079&lang=en> (Hentet: 25.02.2023)

Qiagen (u.å) *QIAamp Fast DNA Stool Mini Handbook*. Tilgjengelig fra: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=2a3f2c0b-2e8a-49fd-b442-829108ae1a4a&lang=en> (Hentet: 25.02.2023)

Reischer, G.H, Kasper, D.C., Steinborn, R., Mach, R.L. & Farnleitner, A.H (2006) Quantitative PCR method for sensitive detection of ruminant fecal pollution in freshwater and evaluation of this method in alpine karstic regions, *Applied Environmental Microbiology* 72(8). DOI: 10.1128/AEM.00364-06.

Reischer, G.H., Kasper, D.C, Steinborn, R., Farnleitner, A.H. & Mach, R.L. (2007) A quantitative real-time PCR assay for the highly sensitive and specific detection of human faecal influence in spring water from a large alpine catchment area, *Applied Microbiology*, 44(4). Tilgjengelig fra: <https://doi-org.ezproxy2.usn.no/10.1111/j.1472-765X.2006.02094.x> (Hentet: 01.04.2023)

Robb, K., Null, C., Teunis, P., Yakubu, H., Armah, G., & Moe, C.L. (2017) Assessment of fecal ex-posure pathways in low-income urban neighborhoods in Accra, Ghana: rationale, de- sign, methods, and key findings of the SaniPath study. *American journal of tropical medicine and hygiene* 97 (4) DOI: 10.4269/ajtmh.16-0508

Rognan, Y. (2019) Ny E18: Effekter på vannkvalitet og biologiske kvalitetselement i Åbyelva og Høenstjenna, Bamble, Telemark. En vurdering av vannforskriftens føringer for å begrense påvirkning i anleggsfasen. Masteroppgave ved Universitetet Sørøst Norge.  
<https://openarchive.usn.no/usn-xmlui/handle/11250/2611006?show=full>

Rognerud, S., Berge, D. & Johannessen, M. (1979) *TELEMARKSVASSDRAGET, hovedrapport fra undersøkelsene i perioden 1975-1979*. Rapportnummer: 0-70112

Rognerud, S., Berge, D. & Johannessen, M. (1979). Telemarkvassdraget – Hovedrapport fra undersøkelsene i perioden 1975.1979. Niva rapport O-470112, 82 sider.

Rohrlack, T. 2022. *Paleolimnologiske undersøkelser og vurdering av interngjødsling i fem eutrofe innsjøer i Vestfold og Telemark fylke. – MINA fagrapport 76*

Roseth, R., Kværner, J., Rognan, Y., Reinemo, J., & Mæland, T. (2018) *Overvåking av grunnvann påvirket av jordbruk. Haslemoen, Rimstadmoen, Horpestad og Lærdal*. NIBIO rapport nr. 4/117/20118

Skulberg, O. (1969). Vassdragsundersøkelser i forbindelse med Sundsbarmreguleringen. 1. Daleåi og Morgedalsåi-vassdragene. Niva Rapport, O-127/65 og O-113/65.

Statens Helsetilsyn (1994) *Nye vannkvalitetsnormer for friluftsbad*. Tilgjengelig fra: <https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/badevann/vannkvalitetsnormer-for-friluftsbad-ik-21-1994.pdf> (Hentet: 03.11.2022).

Tambalo, D.D, Fremaux, B., Boa, T. & Yost, C.K (2012) Persistence of host-associated Bacteroidales gene markers and their quantitative detection in an urban and agricultural mixed prairie watershed, *Water Research* 46(9). Tilgjengelig fra: <https://www.sciencedirect.com.ezproxy2.usn.no/science/article/pii/S0043135412001522> (Hentet: 01.04.2023)

Thermo Fisher Scientific (u.å) *Power SYBR® Green PCR Master Mix and Power SYBR® Green RT-PCR Reagents Kit, user guide*. Tilgjengelig fra: [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fcms\\_042179.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fcms_042179.pdf) (Hentet: 01.04.2023)

Thermo Fisher Scientific (u.å) *StepOne and StepOnePlus Real-Time PCR Systems*. Tilgjengelig fra: [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fbrochures%2Fcms\\_042763.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fbrochures%2Fcms_042763.pdf) (Hentet: 01.04.2013)

Thermo Fisher Scientific. (2012). *NanoDrop Lite User Guide* (269-275200). Thermo Fisher Scientific. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FCAD%2Fmanuals%2FUser-Guide-2752-NanoDrop-Lite-UG.pdf> Hentet: 01.04.2023)

United Nations (2018) *The Sustainable Development Goals Report*. Tilgjengelig fra: <https://unstats.un.org/sdgs/files/report/2018/thesustainabledevelopmentgoalsreport2018-en.pdf> (Hentet: 16.04.2023)

Uusi-kämpä, J. & Heinonen-Tanski, H. (2008) Evaluating Slurry Broadcasting and Injection to Ley for Phosphorus Losses and Fecal Microorganisms in Surface Runoff, *Journal of Environmental Quality*, 37 (6). DOI: 10.2134/jeq2007.0428

Verstraete, K., Coillie, E.V., Werbrouck, H., 1, Weyenberg, S.V., Herman, L., 1, Favero, J., Rijk, P.D., Zutter, L.D., 3, Joris, M., Heyndrick, M. & DeReu, K. (2014) A qPCR Assay to Detect and Quantify Shiga Toxin-Producing *E. coli* (STEC) in Cattle and on Farms: A Potential Predictive Tool for STEC Culture-Positive Farms, *Toxins* 6 (4). DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins6041201>

Wang, Y., Mairinger, W., Raj, S.J., Yakubu, H., Siesel, C., Green, J., Durry, S., Joseph, G., Rahman, M., Amin, N., Hassan, M.Z., Wicken, J., Dourng, D., Larbi, E., Adomako, L.A.B., Senayah, A.K., Doe, B., Buamah, R., Tetteh-Nortey, J.N.N., Kang, G., Karthikeyan, A., Roy, S., Brown, J., Muneme, B., Sene, S.O., Tuffuor, B., Mugambe, R.K., Bateganya, N.L., Surrridge, T., Ndashe, G.M., Ndashe, k., Ban, R., Schrecongost & Moe, A.C.L. (2022) Child development: making the links. *The New York Academy of Sciences* 1308 (1) DOI: <https://doi-org.ezproxy1.usn.no/10.1111/nyas.12330>

World Health Organization (2022) *Sanitation*. Tilgjengelig fra: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sanitation> (Hentet: 14.04.2023).

Zou, X., Peng, x., Zhao, X., & Chang, C. (2022) The impact of extreme weather events on water quality: international evidence, *Natural Hazards* 1 (21). DOI: <https://doi-org.ezproxy1.usn.no/10.1007/s11069-022-05548-9>



# Vedlegg

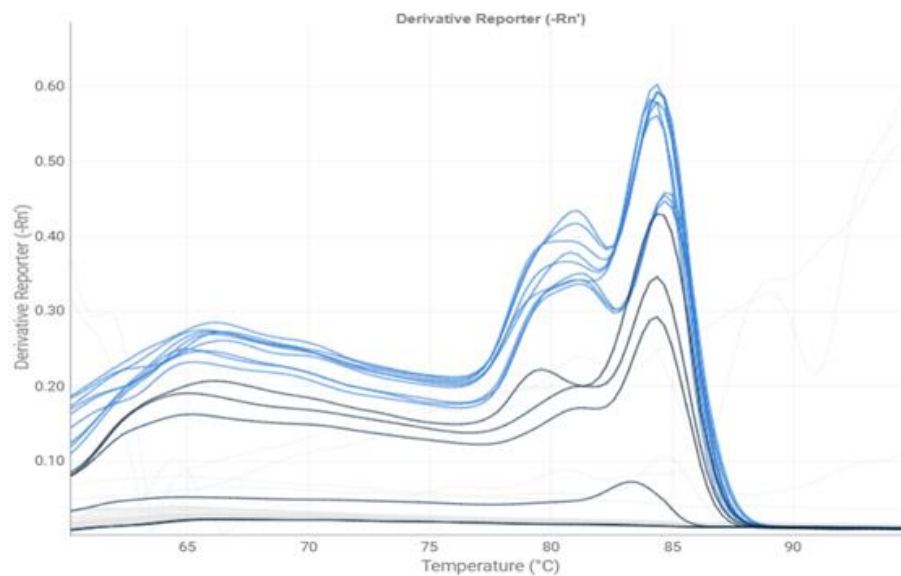
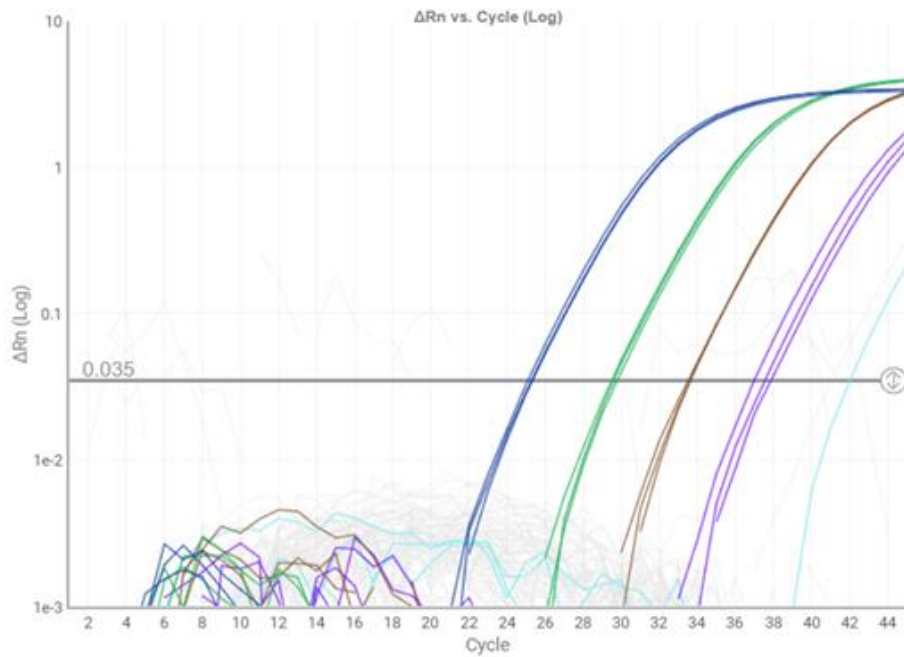
## Vedlegg 1. Oversikt over statistiske tester

Parameter	Enhet	Statistisk metode	Lokalitet A	Lokalitet B	p-verdi
			Sundkilen	Straumen	
pH	-log [H <sup>+</sup> ]	Mann Whitney Pair T-test	<b>7,14</b>	<b>6,69</b>	<b>0,0013</b>
K <sub>25</sub>	μS cm <sup>-1</sup>	Mann Whitney	<b>36,1</b>	<b>14,03</b>	<b>0,0004</b>
		Pair T-test	<b>35,72 ± 1,86</b>	<b>13,84 ± 0,72</b>	<b>&lt; 0,0000</b>
Ca <sup>2+</sup>	mg L <sup>-1</sup>	Mann Whitney	<b>4,71</b>	<b>2,02</b>	<b>0,0004</b>
	mg L <sup>-1</sup>	Pair T-test	<b>4,64 ± 0,30</b>	<b>2,01 ± 0,09</b>	<b>&lt; 0,0000</b>
Mg <sup>2+</sup>	mg L <sup>-1</sup>	Mann Whitney	<b>0,48</b>	<b>0,20</b>	<b>0,0004</b>
	mg L <sup>-1</sup>	Pair T-test	<b>0,48 ± 0,03</b>	<b>0,19 ± 0,008</b>	<b>&lt; 0,0000</b>
Na <sup>+</sup>	mg L <sup>-1</sup>	Mann Whitney	<b>2,03</b>	<b>0,72</b>	<b>0,0004</b>
	mg L <sup>-1</sup>	Pair T-test	<b>1,99 ± 0,13</b>	<b>0,74 ± 0,04</b>	<b>&lt; 0,0000</b>
K <sup>+</sup>	mg L <sup>-1</sup>	Mann Whitney	<b>0,42</b>	<b>0,16</b>	<b>0,0004</b>
	mg L <sup>-1</sup>	Pair T-test	<b>0,46 ± 0,06</b>	<b>0,15 ± 0,01</b>	<b>&lt; 0,0000</b>
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	mg L <sup>-1</sup>	Mann Whitney	2,24	2,77	0,0934
	mg L <sup>-1</sup>	Pair T-test	2,01 ± 0,78	2,57 ± 0,38	0,061
Cl <sup>-</sup>	mg L <sup>-1</sup>	Mann Whitney	<b>3,44</b>	<b>1,94</b>	<b>0,0004</b>
	mg L <sup>-1</sup>	Pair T-test	<b>3,42 ± 0,27</b>	<b>1,96 ± 0,11</b>	<b>&lt; 0,0000</b>
TOC	mg L <sup>-1</sup>	Mann Whitney	<b>3,90</b>	<b>1,65</b>	<b>0,0004</b>
	mg L <sup>-1</sup>	Pair T-test	<b>4,77 ± 1,58</b>	<b>1,64 ± 0,12</b>	<b>0,0002</b>
Tot-N	μg L <sup>-1</sup>	Mann Whitney	<b>276</b>	<b>114</b>	<b>0,0004</b>
	μg L <sup>-1</sup>	Pair T-test	<b>324 ± 107</b>	<b>114 ± 20</b>	<b>&lt; 0,000</b>
Tot-P	μg L <sup>-1</sup>	Mann Whitney	<b>2</b>	<b>alle &gt; 2</b>	
	μg L <sup>-1</sup>	Pair T-test	<b>3 ± 1,32</b>	<b>2 ± 0</b>	<b>&lt; 0,005</b>
Klorofyll-a	μg L <sup>-1</sup>	Mann Whitney	1,86	1,44	0,122
		Pair T-test	1,97 ± 1,03	1,32 ± 0,43	0,109
Cr <sub>total</sub>	μg L <sup>-1</sup>	Mann Whitney	<b>0,14</b>	<b>0,085</b>	<b>0,003</b>
		Pair T-test	<b>0,158 ± 0,051</b>	<b>0,091 ± 0,031</b>	<b>0,013</b>
Mn <sub>total</sub>	μg L <sup>-1</sup>	Mann Whitney	<b>9,53</b>	<b>3,03</b>	<b>0,005</b>
		Pair T-test	<b>12,2 ± 6,2</b>	<b>5,1 ± 4,8</b>	<b>0,028</b>
Fe <sub>total</sub>	μg L <sup>-1</sup>	Mann Whitney	<b>38,70</b>	<b>15,70</b>	<b>0,001</b>
		Pair T-test	<b>55,3 ± 33,3</b>	<b>14,6 ± 5,8</b>	<b>0,006</b>
Ni <sub>total</sub>	μg L <sup>-1</sup>	Mann Whitney	<b>0,402</b>	<b>0,077</b>	<b>0,001</b>
		Pair T-test	<b>0,385 ± 0,116</b>	<b>0,110 ± 0,072</b>	<b>0,001</b>
Cu <sub>total</sub>	μg L <sup>-1</sup>	Mann Whitney	<b>1,37</b>	<b>0,54</b>	<b>0,0004</b>
		Pair T-test	<b>1,96 ± 1,84</b>	<b>0,53 ± 0,07</b>	<b>0,047</b>
Zn <sub>total</sub>	mg L <sup>-1</sup>	Mann Whitney	7,30	6,53	0,48
		Pair T-test	8,79 ± 3,1	8,19 ± 5,1	0,646

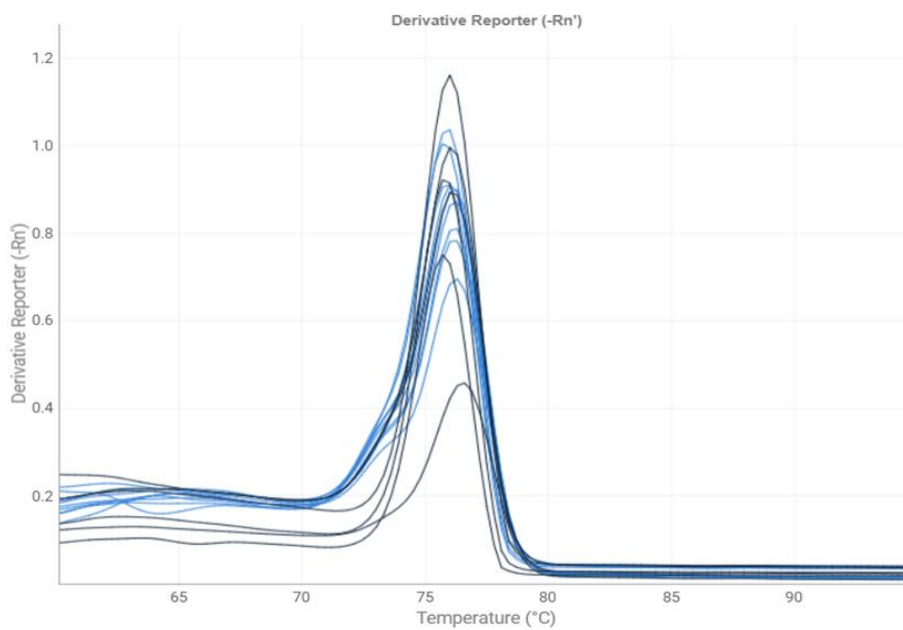
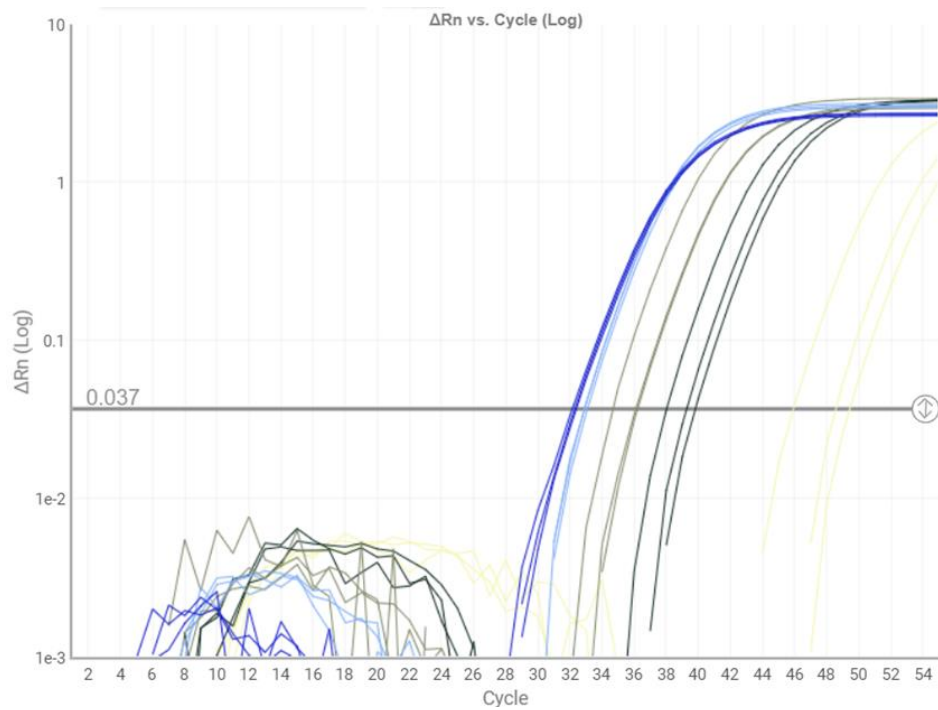
**Vedlegg 1 forts.**

As <sub>total</sub>	mg L <sup>-1</sup>	Mann Whitney	<b>0,100</b>	<b>0,050</b>	<b>0,001</b>
		Pair T-test	<b>0,105 ± 0,013</b>	<b>0,053 ± 0,019</b>	<b>0,0002</b>
Cd <sub>total</sub>	mg L <sup>-1</sup>	Mann Whitney	0,037	0,029	1,00
		Pair T-test	0,032 ± 0,017	0,035 ± 0,025	0,66
Hg <sub>total</sub>	mg L <sup>-1</sup>	Mann Whitney	0,05	0,04	0,133
		Pair T-test	0,039 ± 0,014	0,034 ± 0,008	0,2590
Pb <sub>total</sub>	µg L <sup>-1</sup>	Mann Whitney	0,247	0,152	0,112
		Pair T-test	0,373 ± 0,259	0,207 ± 0,150	0,146

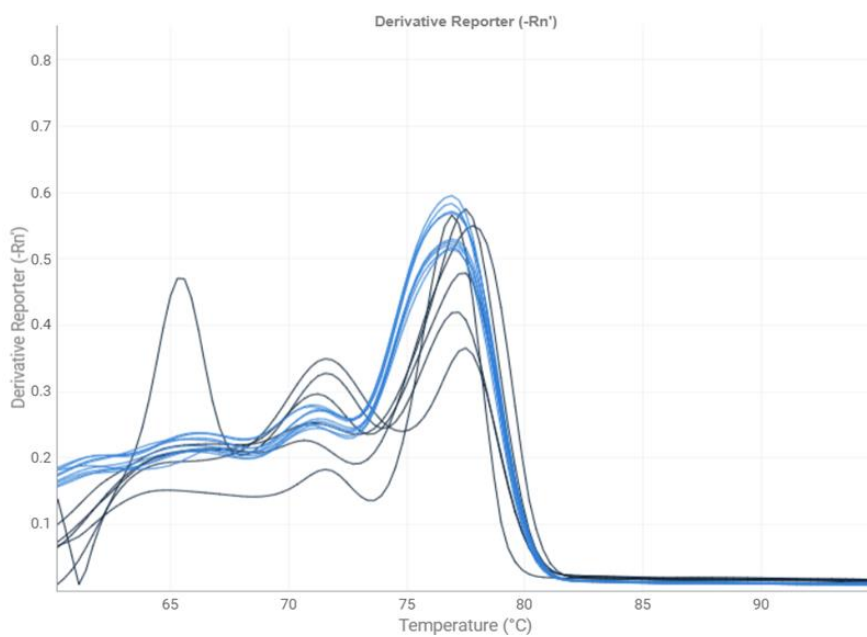
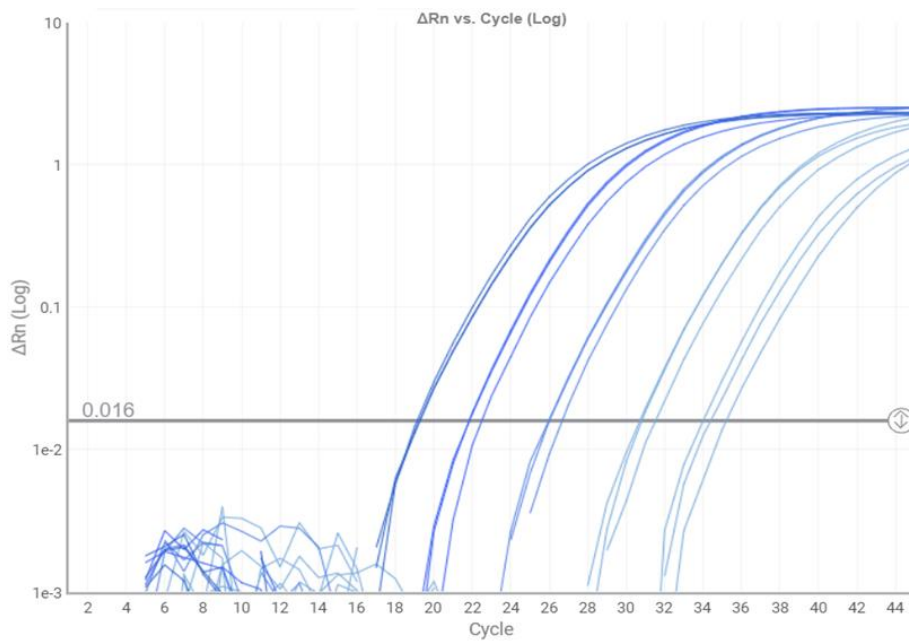
**Vedlegg 2.** Amplifikasjonskurve (øverst) og smeltekurve (nederst) for positiv kontroll med hest primerpar. Kontrollen er fortynnet 1:10 med et utgangspunkt på 18,2 ng/μl DNA. På amplifikasjonskurven går DNA-mengden fra høyest til lavest fra venstre mot høyre. Gjennomsnittlig  $T_m$  er 84 °C.



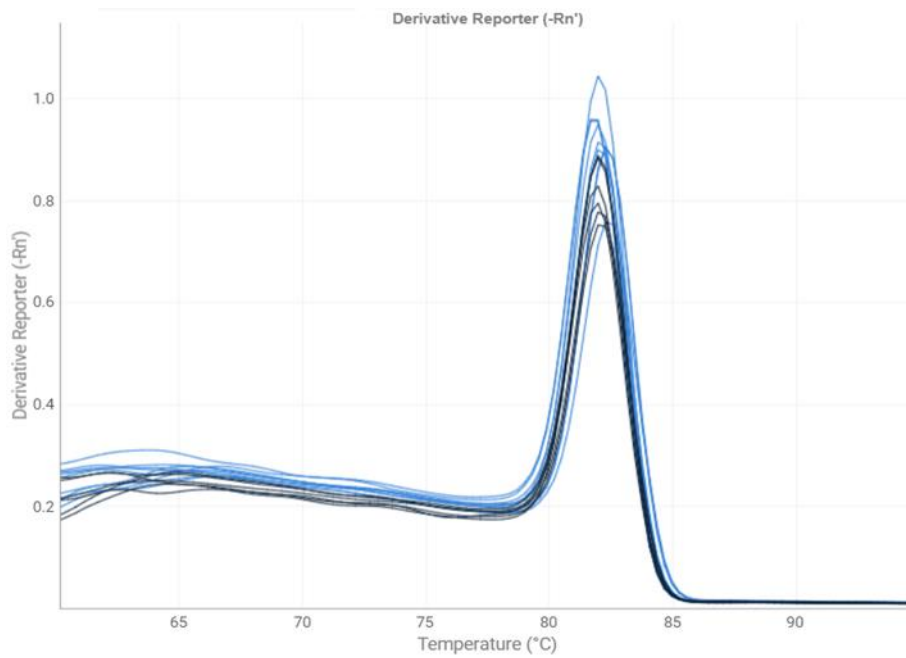
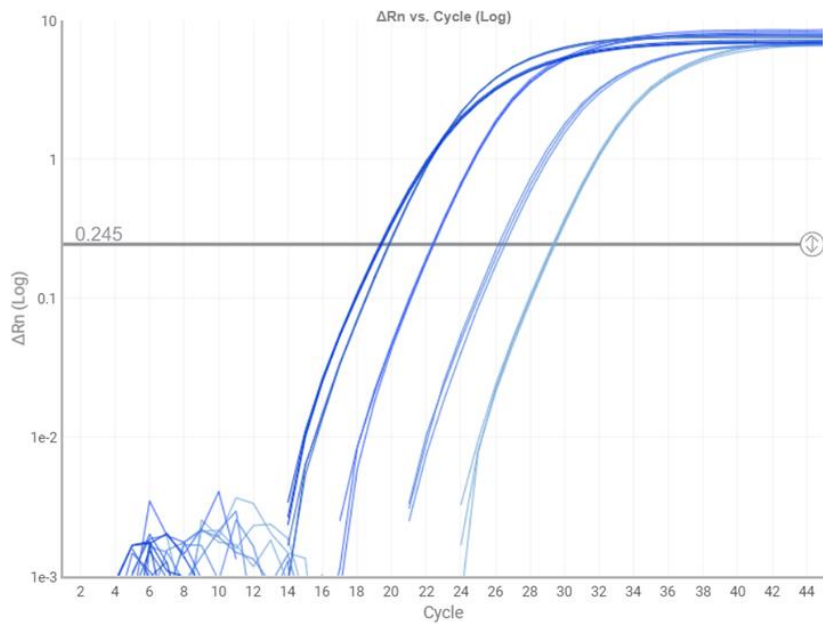
**Vedlegg 2 forts.** Amplifikasjonskurve (øverst) og smeltekurve (nederst) for positiv kontroll med menneske primerpar. Kontrollen er fortynnet 1:10 med et utgangspunkt på 28,6 ng/ $\mu$ l DNA. På amplifikasjonskurven går DNA-mengden fra høyest til lavest fra venstre mot høyre. Gjennomsnittlig  $T_m$  er 76 °C.



**Vedlegg 2 forts.** Amplifikasjonskurve (øverst) og smeltekurve (nederst) for positiv kontroll med Drøvtygger primerpar. Kontrollen er fortynnet 1:10 med et utgangspunkt på 221,9 ng/ $\mu$ l DNA. På amplifikasjonskurven går DNA-mengden fra høyest til lavest fra venstre mot høyre. Gjennomsnittlig  $T_m$  er 77 °C.



**Vedlegg 2 forts.** Amplifikasjonskurve (øverst) og smeltekurve (nederst) for positiv kontroll med gris primerpar. Kontrollen er fortynnet 1:10 med et utgangspunkt på 12,6 ng/ $\mu$ l DNA. På amplifikasjonskurven går DNA-mengden fra høyest til lavest fra venstre mot høyre. Gjennomsnittlig  $T_m$  er 82 °C.



**Vedlegg 2 forts.** Amplifikasjonskurve (øverst) og smeltekurve (nederst) for positiv kontroll med hund primerpar. Kontrollen er fortynnet 1:10 med et utgangspunkt på 10,2 ng/ $\mu$ l DNA. På amplifikasjonskurven går DNA-mengden fra høyest til lavest fra venstre mot høyre. Gjennomsnittlig  $T_m$  er 82 °C.

