



TERVEYDEN JA
HYVINVOINNIN LAITOS

Tarja Pitkänen
Anna-Maria Hokajärvi
Ari Kauppinen
Ananda Tiwari
Outi Zacheus
Ilkka T. Miettinen

Vesivarojen saastelähteiden jäljitysmenetelmien kehitys

Loppuraportti

TYÖPAPERI

TYÖPAPERI 16/2015

Tarja Pitkänen, Anna-Maria Hokajärvi, Ari Kauppinen,
Ananda Tiwari, Outi Zacheus, Ilkka T. Miettinen

**Vesivarojen saastelähteiden
jäljitysmenetelmien kehitys
Loppuraportti**



TERVEYDEN JA
HYVINVOINNIN LAITOS

© Kirjoittaja ja Terveyden ja hyvinvoinnin laitos

ISBN 978-952-302-517-2 (verkkojulkaisu)

ISSN 2323-363X (verkkojulkaisu)

<http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-302-517-2>

Lukijalle

Vesivarojen suolistoperäinen saastuminen on maailmanlaajuinen ongelma. Jotta saastumisesta aiheutuvia haittoja voidaan vähentää tai jopa ennaltaehkäistä, on saastelähde pystyttävä tunnistamaan nopeasti ja tarkasti. Tässä loppuraportissa esitetään Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen Vesi ja terveys -yksikön ensimmäisiä tuloksia saastelähteiden jäljitysmenetelmien käytöstä Suomessa.

Suomen Kulttuurirahasto, Osk. Huttusen säätiö ja Itä-Suomen yliopisto rahoittivat Tarja Pitkäsen väitöksen jälkeistä tutkimusta Yhdysvaltain ympäristövirastossa, mikä loi pohjan saastelähteiden jäljitysmenetelmien käyttöönotolle. Tutkimushankkeen Suomessa toteutetun osuuden mahdollisti Vesihuoltolaitosten kehittämissäätiön projektirahoitus ja yhteistyö tutkimusnäytteitä toimittaneiden terveydensuojeluviranomaisten kanssa.

Tiivistelmä

Tarja Pitkänen, Anna-Maria Hokajärvi, Ari Kauppinen, Ananda Tiwari, Outi Zacheus, Ilkka T. Miettinen. Vesivarojen saastelähteiden jäljitysmenetelmien kehitys. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos (THL). Työpaperi 16/2015. 19 sivua. Helsinki 2015.

ISBN 978-952-302-517-2 (verkkojulkaisu)

Tässä tutkimuksessa otettiin käyttöön menetelmävalikoima, jolla voidaan tunnistaa vesivarojen suolistoperäiset saastelähteet. Työ suoritettiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksessa (THL) yhteistyössä Yhdysvaltain ympäristöviraston (US EPA) kanssa ajalla 1.1.2012-30.9.2015. Tutkimuksen tuloksena käyttöön otetulla analyysipatteristolla voidaan määrittää suolistoperäisen saastumisen läsnäolo ja onko vesinäytteessä ihmisestä, nautakarjasta, siipikarjasta, sioista tai lokeista peräisin olevia suolistobakteereita. Menetelmät ovat sovellettavissa erityyppisten vesien tutkimiseen, kuten talousvedet ja uimarantavedet.

Talousveden laatua käsitelleessä esimerkkitapauksessa voitiin osoittaa, että erään sikalan valumavesillä ei ollut vaikutusta läheisessä talousvesikaivossa todettuun suolistoperäiseen saastumiseen. Uimarantavesiä tutkittaessa voitiin todentaa, että eräällä rannalla suolistoperäisen saastumisen lähteenä oli läheinen lокkien pesimäalue eikä uimarannalta ollut osoitettavissa jäteveden aiheuttamaa saastutusta.

Tutkimuksessa kehitetyt saastelähteen tunnistamismenetelmät auttavat jatkossa selvittämään vesien mikrobiologisia saastumistilanteita entistä tehokkaammin. Saastelähteiden geenimarkkereiden analytiikkaa voidaan soveltaa laajasti Suomessa vesivarojen kuormitusta selvittävässä tutkimuksissa. Saastelähteiden tunnistaminen mahdollistaa toimenpiteiden oikeanlaisen kohdentamisen saastumisen vähentämiseksi tai poistamiseksi.

Avainsanat: talousvesi, uimavesi, suolistoperäinen saastelähde, jäljitysmenetelmä

Sammandrag

Tarja Pitkänen, Anna-Maria Hokajärvi, Ari Kauppinen, Ananda Tiwari, Outi Zacheus, Ilkka T. Miettinen. Vesivarojen saastelähteiden jäljitysmenetelmien kehitys. [Utveckling av metoder för spårning av källor som förorenar vattenresurser]. Institutet för hälsa och välfärd (THL). Diskussionsunderlag 16/2015. 19 sidor. Helsingfors, Finland 2015.

SBN 978-952-302-517-2 (nätpublikation)

I denna undersökning testades ett antal metoder med hjälp av vilka man kan identifiera intestinala föroreningskällor. Testningen genomfördes vid Institutet för hälsa och välfärd (THL) i samarbete med USA:s miljömyndighet (US EPA) 1.1.2012–30.9.2015. Enligt forskningsresultaten kan man med hjälp av analysmetoderna fastställa förekomsten av intestinala föroreningar och om vattenprover innehåller tarmbakterier från människor, nötdjur, fjäderfä, svin eller måsar. Metoderna kan tillämpas på olika vattentyper, såsom hushållsvatten och badstrandsvatten.

I ett exempel som gällde kvaliteten på hushållsvatten kunde man konstatera att intestinala föroreningar i en hushållsvattenbrunn inte berodde på avrinnande vatten från en närbelägen svingård. I analyserna av badstrandsvatten kunde man konstatera att källan till de intestinala föroreningarna på en strand berodde på ett närbeläget häckningsområde för måsar och inte på avloppsvatten.

De metoder för identifiering av föroreningskällor som utvecklades i undersökning kommer framöver att effektivisera analysen av mikrobiologiska föroreningar i vatten. Analysen av föroreningskällors genmärkorer kan tillämpas i stor skala i utredningar av belastningen på vattenresurser i Finland. Identifieringen av föroreningskällor gör det möjligt att rikta åtgärderna korrekt för att minska eller eliminera föroreningarna.

Nyckelord: dricksvatten, badvatten, intestinal föroreningskälla, identifieringsmetod

Abstract

Tarja Pitkänen, Anna-Maria Hokajärvi, Ari Kauppinen, Ananda Tiwari, Outi Zacheus, Ilkka T. Miettinen. Vesivarojen saastelähteiden jäljitysmenetelmien kehitys. [Development of tracking methods for contamination sources in water]. National Institute for Health and Welfare (THL). Discussionpaper 16/2015. 19 pages. Helsinki, Finland 2015.

ISBN 978-952-302-517-2 (online publication)

In this study, methodology for the source tracking of fecal contamination sources in water was taken into use. The work was carried out at the National Institute for Health and Welfare (THL) in cooperation with the United States Environmental Protection Agency (US EPA) in the period 1.1.2012-30.9.2015. The analytical repertoire in use as a result of this study enables the detection of fecal contamination and characterization in cases where the water sample contains fecal bacteria originating from human, cattle, poultry, swine or gulls. The methods can be applied for different types of water matrixes, such as drinking water and bathing water.

An example case which was related to drinking water quality revealed that run-off water from a swine farm did not have an impact on the water quality of a nearby drinking water well that was suffering from fecal contamination. When studying natural bathing waters, it was found that a nearby large flock of gulls was the source of the fecal contamination of a bathing site. Furthermore, it was proved that contamination from human sewage was absent in the bathing water.

In the future, the source tracking methods developed in this study will improve the efficiency of the microbiological water contamination case investigations. The analysis of the gene markers of the contamination sources can be applied widely in Finland for investigations of pollution in water resources. The identification of the contamination sources enables management to focus actions on decreaseasing or even removing the contamination.

Keywords: drinking water, bathing water, fecal contamination source, source-tracking method

Sisällys

Lukijalle	3
Tiivistelmä.....	4
Sammandrag.....	5
Abstract	6
Tutkimuksen tausta	9
Suolistoperäisen saastumisen indikaattoribakteerit.....	9
Suolistoperäisten saastelähteiden identifiointi	9
Tutkimuksen tavoitteet	11
Tutkimuksen toteutus	12
Tutkimuksen tulokset	14
Talousvesikaivon suolistoperäinen saastuminen	14
Uimarantaveden mikrobiologiset laatuongelmat	15
Tutkimustulosten hyödyntäminen	17
Lähteet.....	18

Tutkimuksen tausta

Vesivarojen suolistoperäinen saastuminen on merkittävä maailmanlaajuinen ongelma ja vakavia epidemioita on yhdistetty saastuneeseen veteen, jota on käytetty juomiseen, ruoan tuotantoon ja virkistyskäyttöön. Vesiturvallisuuden perustana on, että suolistoperäisen materiaalin pääsy vesiin estetään. Vesivarojen suojeleminen on tärkeää vesivälitteisten terveysriskien vähentämiseksi. Jätevesien puhdistamismenetelmien kehittyminen on vähentänyt purkuvesistöihin päätyvien suolistomikrobien kuormaa. Puhdistettu jätevesi on kuitenkin säilyttänyt asemansa ympäristöön päätyvien suolistomikrobien merkittävänä lähteenä. Hajakuormituksen, kuten pintavalun, hulevesien ja kiinteistökohtaisten jätevesijärjestelmien merkitys suolistoperäisen saastumisen lähteenä on kuitenkin kasvanut viime vuosina.

Nykyaikaiset molekyylibiologiset menetelmät tarjoavat mahdollisuuden saastelähteiden tunnistamiseen (Pitkänen et al. 2013; Kapoor et al. 2015). Viime aikoina huomio on kohdistunut erityisesti sellaisiin saastumisen geneettisiin markkereihin, jotka olisivat aina läsnä tietyissä saastelähteissä. Isäntäspesifisiä kvantitatiivisia geenimonistustekniikoita (qPCR) käytettäessä voidaan esimerkiksi testata, löytyykö vedestä markkereita, joita tiedetään löytyvän ainoastaan ihmisten, nautojen, sikojen tai siipikarjan suolistosta (Gourmelon et al. 2010). Myös erilaisille vesilinnuille, kuten lokeille on kehitetty omat isäntäspesifiset markerit. Tämän työn tarkoituksena oli ottaa käyttöön edellä mainitut isäntäspesifiset qPCR-tekniikat, jotka mahdollistavat mikrobiologisten saastelähteiden tunnistamisen (MST) vesivarojen saastumistilanteita selvittäessä.

Suolistoperäisen saastumisen indikaattoribakteerit

Escherichia coli (*E. coli*) -bakteerin ja suolistoperäisten enterokokkien uskotaan lähtökohtaisesti olevan aina suolistoperäisiä. Näiden indikaattoribakteerien havaitseminen vedestä on siten merkki suolistoperäisestä saastumisesta (WHO, 2006). *E. coli* -bakteeria pidetään parhaana tuoreen suolistoperäisen saastumisen indikaattorina (Edberg et al. 2000). Enterokokkien tiedetään kestävän ympäristön bakteerisoluille aiheuttamaa stressiä hieman paremmin kuin *E. coli* -bakteereiden. Enterokokkeja esiintyy suhteellisesti runsaammin eläinten ulosteissa kuin yhdyskuntien jätevesissä (Hokajärvi et al., 2013). Vaikka suolistoperäisten indikaattoribakteereiden alkuperä on tasalämpöisten eläinten suolistossa, niitä tavataan laajasti eri ympäristöissä, kuten maassa, sedimenteissä, rantahiekoissa, kasvillisuuden joukossa ja erilaisissa vesiympäristöissä (Byappanahalli et al., 2012). On tunnettua, että suolistoperäiset bakteerit voivat säilyä pitkään elinkelpoisina sedimenteissä (Ishii, 2007; Whitman, 2003). On jopa havaittu, että makrofytyttinen vihreä levä *Cladophora*, jota esiintyy sekä rannikon että sisämaan vesissä ja vedenalaiset kasvit, *Hydrilla verticillata* ja *Myriophyllum sibiricum* voivat toimia suolistoperäisiksi luultujen indikaattoribakteerien lähteenä (Byappanahalli, et al. 2009; Badgley et al. 2011).

Yhdyskuntien jätevedenpuhdistamoille tulevan jäteveden vuodot ja ristikontaminaatiot, jätevesien ohijuoksuukset ja puhdistetun jäteveden purku alapuolisiin vesistöihin ovat suolistoperäisten mikrobien lähteitä, jotka voivat saastuttaa talousvesiä ja jotka kuormittavat luonnonvesiä. Karjatalouden pintavalumat, luonnoneläinten ulosteet, kiinteistökohtaiset jätevesijärjestelmät ja kaupunkialueiden hulevedet ovat myös merkittäviä suolistoperäisten mikrobien lähteitä. On todellinen haaste tunnistaa suolistoperäisen mikrobien alkuperä vesien saastumistilanteita selvittäessä (Simpson et al., 2002). Saastelähteiden tunnistamiseen ja hallintaan ei tällä hetkellä ole olemassa erityistä eurooppalaista lainsäädäntöä (European Union, 2006).

Suolistoperäisten saastelähteiden identifiointi

Kuten edellä on esitetty, vedessä havaittavat suolistoperäiset indikaattoribakteerit voivat olla peräisin monista erilaisista lähteistä. Mikäli indikaattoribakteerit ovat peräisin luonnon ympäristöistä tai muista kuin ihmisperäisistä lähteistä, niiden esiintyminen saattaa merkitä pienempää riskiä ihmisten terveydelle kuin jos ne olisivat peräisin yhdyskuntien jätevedestä. Riskin suuruuden arvioimiseksi tarvitaan menetelmiä, joiden

avulla voidaan selvittää suolistoperäisen saastumisen alkuperä (Byappanahalli et al., 2012; Scott et al., 2002).

Bakteeriyhteisöjen analysointi eri eläinlajien ulosteista on osoittanut, että eräät anaerobiset bakteerit, kuten bakteerisukujen *Bacteroides*, *Eubacterium* ja *Clostridium* eräät lajit, ovat läsnä suurina lukumäärinä ainoastaan suolistoperäisessä materiaalissa (Wilson & Blitchington, 1996). Näiden lajien tunnistettu isäntäspesifisyys mahdollistaa niiden käytön indikaattorina suolistoperäisten saastelähteiden identifioinnissa (microbial source tracking, MST). Suolistoperäisten saastelähteiden tunnistaminen perustuu isäntäspesifisiksi tunnistettujen geenisekvenssien havaitsemiseen kvantitatiivista PCR-tekniikkaa (qPCR) käyttäen (Lu et al, 2008; Gourmelon, 2010). Saastelähteiden tunnistaminen edellyttää yleensä MST indikaattorien yhdistelmän käyttöä eli tiettyä vesinäytettä testataan usealla rinnakkaisella qPCR-testillä. MST menetelmiä ei ole aiemmin käytetty Suomessa, vaikka niiden käyttö vesivarojen laadunhallinnan työkaluna on jo melko vakiintunutta joissakin muissa maissa, kuten Yhdysvalloissa ja Ranskassa (Simpson et al., 2002; Gourmelon et al., 2007).

Tutkimuksen tavoitteet

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli kehittää ja ottaa käyttöön Suomen olosuhteisiin soveltuvia molekyyli-biologiaan perustuvia mikrobiologisten saastelähteiden tunnistamismenetelmiä suolistoperäisen saastumisen alkuperän selvittämiseksi. Tutkimuksessa haluttiin ottaa käyttöön geneettiset markkeritestit erottelemaan suolistoperäisten mikrobien lähteistä erityisesti ihmisistä (yhdyskunnista) ja ympäristöstä (eläimistä) peräisin oleva saastuminen.

Tutkimuksen toteutus

Hanke toteutettiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen Vesi ja terveys -yksikössä yhteistyössä Yhdysvaltain ympäristöviraston (United States Environmental Protection Agency, US EPA) kanssa. Hankkeen vastuullinen tutkija oli FT Tarja Pitkänen, joka oli päävastuussa hankkeen suunnittelusta, bakteriologisen analytiikan toteuttamisesta ja hankkeen raportoinnista. FM Anna-Maria Hokajärvi oli vastuussa hankkeessa tehtävästä kampylobakteerianalytiikasta, FM Ari Kauppinen vastasi virusanalytiikasta ja DI Ananda Tiwari tutkii vesinäytteistä eristettyjen enterokokkien lajiston ja suolistoperäisten geenimarkkerien esiintymisen yhteyksiä. Dos. Ilkka Miettinen, FT Outi Zacheus ja FT Jorge Santo Domingo ohjasivat tutkimustyötä.

Tutkitut näytteet olivat peräisin tutkimuskohteista eripuolilta Suomea. Näytteitä kerättiin osana Suomen Akatemian rahoittamaa CONPAT-tutkimushanketta. Näytteitä otettiin Kokemäenjoen vesistöstä (ml. Virttaankankaan tekopohjaveden ottamon raakavesi) ja Kokemäenjoen vesistöä purkuvesistönään käyttävien kunnallisten jätevedenpuhdistamoiden lähtevästä jätevedestä (<https://www.thl.fi/fi/tutkimus-ja-asiantuntijatyo/hankkeet-ja-ohjelmat/hankkeet/30133>). Tutkimuksessa perehdyttiin haja-asutusalueiden vesihuollon haasteisiin. Sikojen ulosteille spesifisen MST-indikaattorin toimivuutta testattiin tutkimalla talousvesi-, pintavesi-, kuivatusvesi-, jätevesi-, liete- ja sikojen ulostenäytteitä eräältä keskisuomalaiselta sikatilalta ja sen naapurista. Pintavesien suolistoperäisiä saastelähteitä selvitettiin kolmella eri sisämaan uimarannalla ja kahdella rannikon uimarannalla. Yhdellä näistä rannoista kerättiin myös lокkien ulostenäytteitä ja tutkittiin kunnallisen jätevedenpuhdistamon lähtevää jätevettä.

Kerätyistä näytteistä määritettiin suolistoperäiset indikaattoribakteerit ja eristettiin nukleiinihapot (DNA ja RNA). Osasta näytteistä tutkittiin myös kampylobakteerien, norovirusten ja adenovirusten esiintymistä. Käytetyt tutkimusmenetelmät on kuvattu THL:n palvelusivustolla: www.thl.fi/vesimikrobiologinen_analytiikka. Näytteiden analysoinnissa käytetyt yleiset ja isäntä-spesifiset (RT-)qPCR-menetelmät on esitetty Taulukossa 1. Tutkimusmenetelmä on kuvattu tarkemmin Environmental Science&Technology -lehden julkaisussa Pitkänen et al. (2013).

Kvantitatiivinen qPCR-menetelmä (qPCR) perustuu tutkittavan geenin DNA:n osoittamiseen ja kvantitointiin standardisuoran avulla. RT-qPCR-menetelmässä käytetään geenimonistuksen kohteena bakteerisolujen RNA:ta, joka käännetään ennen qPCR-analyysiä komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA) käänteiskopiointientsyymillä (RT, Reverse Transcriptase) avulla. Tutkimuksessa havaittiin RNA-pohjaisen RT-qPCR-menetelmän havaitsevan tavanomaista DNA-pohjaista qPCR-menetelmää herkemmin suolistoperäisiä geenimarkkereita. Tämä ominaisuus on erityisen hyödyllinen tutkittaessa näitä bakteereita Suomen olosuhteissa, joissa saasteet laimenevat usein nopeasti suuriin vesitilavuuksiin.

Taulukko 1. Yhteenveto oligonukleotidialukkeista ja -koettimista, joita käytettiin MST indikaattorien, suolistoperäisten indikaattoribakteerien ja *Campylobacter* spp. testauksessa TaqMan RT-qPCR- ja qPCR-menetelmissä.

Testikohde (menetelmä)	Aluke- ja koetinsekvenssit (5' → 3' suunnassa)	Koko (bp)	Viite
Yleinen <i>Bacteroidales</i> (GenBac3)	GenBactF3: GGGGTTCTGAGAGGAAGGT GenBactR4: CCGTCATCCTTCACGCTACT GenBactP2: 6FAM-CAATATTCTCACTGCTGCCTCCCGTA-TAMRA	129	Siefring et al. (2008)
Ihmis-spesifinen <i>Bacteroidales</i> (HF183)	HF183-1: ATCATGAGTTCACATGTCCG BthetR1: CGTAGGAGTTTGGACCGTGT BthetP1: 6FAM-CTGAGAGGAAGGTCCCCACATTGGA-TAMRA	167	Haugland et al. (2010)
Lokki-spesifinen <i>Catellibacter</i> (Gull4)	qGull7F: CTTGCATCGACCTAAAGTTTGGAG qGull8R: GGT TCT CTG TAT TAT GCG GTA TTA GCA qGull7P: FAM-ACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGA-TAMRA	116	Ryu et al. (2012)
<i>Escherichia coli</i> (EC23S857)	F: GG TAGAGCACTGTTTGGCA R: TGTCTCCCGTGATAACITTCTC P: 6FAM-TCATCCCGACTTACCAACCCG-TAMRA	88	Chern et al. (2011)
<i>Enterococcus</i> spp. (Enter01)	ECST748F: AGAAATTCCAACGAACCTTG ENC854R: CAGTGCTCTACCTCCATCATT GPL813TQ: 6FAM-TGGTTCTCTCCGAAATAGCTTTAGGGCTA-TAMRA	92	Ludwig & Schleifer (2000)
Sorkkaeläin- spesifinen <i>Bacteroidales</i> (Rum-2-Bac)	BacB2-590F: ACAGCCC GCGATTGATACTGGTAA Bac708Rm: CAATCGGAGTTCTTCGTGAT BacB2-626P: 6FAM-ATGAGGTGGATGGAATTCGTGGTGT-BHQ1	99	Mieszkin et al. (2010)
Sika-spesifinen <i>Bacteroidales</i> (Pig-2-Bac)	Pig-2-Bac41F: GCATGAATTTAGCTTGCTAAATTTGAT Pig-2-Bac163Rm: ACCTCATACGGTATTAATCCGC Pig-2Bac113MGB: 6FAM-TCCACGGGATAGCC-BHQ1	117	Mieszkin et al. (2009)
Siipikarja- spesifinen <i>Brevibacterium</i> (CL)	CLF: CCCGGGAAACTGGGTCTAAT CLR: CCATCCCCAATCGAAAACTT CLP: 6FAM-CCGGATACGACCATCTGCCGCA-TAMRA	78	Ryu et al. (2014)
<i>Campylobacter</i> spp. (Camp2)	campF2: CACGTGCTACAATGGCATAT campR2: GGCTTCATGCTCTCGAGTT campP2: 6FAM-CAGAGAACAATCCGAACTGGGACA-BHQ1	108	Lund et al. (2004)

Tutkimuksen tulokset

Tutkimuksen tuloksena THL:n Vesi ja terveys -yksikössä on nyt käytettävissä analyysipatteristo, jonka avulla vesinäytteistä voidaan määrittää suolistoperäisen saastumisen läsnäolo ja onko vesinäytteessä ihmistä, nautakarjasta, siipikarjasta, sioista tai lokeista peräisin olevia suolistobakteereita. Hankkeessa analysoitiin laaja joukko erityyppisiä vesinäytteitä Suomesta. Tässä raportissa esitetään tuotetusta aineistosta esimerkkitapaukset talousveden ja uimarantaveden suolistoperäisten saastelähteiden tunnistamiseksi.

Talousvesikaivon suolistoperäinen saastuminen

Valittua geenimarkkereiden analyysipatteristoa testattiin Lounais-Suomessa sijaitsevan sikatilan vesinäytteiden, sikojen ulostenäytteiden ja sikatilan naapurikiinteistön alueelta kerättyjen vesinäytteiden avulla. Tutkimuskysymyksenä oli selvittää, onko sikatilan valumavesillä voinut olla vaikutusta naapurikiinteistön talousvesikaivon suolistoperäiseen saastumiseen. Lisäksi haluttiin varmistaa käyttöön otetun sioille spesifisen geenimarkkerin toimivuutta.

Kohteesta kerättiin marraskuussa 2013 yhteensä 5 kpl vesinäytteitä, yksi lietenäyte ja 6 kpl sikojen ulostenäytteitä. Vesinäytteinä kerättiin naapurikiinteistön juomavettä talousvesikaivosta ja jätevettä naapurikiinteistön sakokaivosta. Pintavettä otettiin tutkimukseen läheisestä kasteluvesilammesta. Sikatilalta analyysiin otettiin näyte sikalan lietekuilusta ja lietesäiliön ulkopuolisesta kuivatusvesien näytteenottoaivosta. Sikojen ulostenäytteet kerättiin kuudesta eri karsinasta. Lisäksi tutkittiin sikatilan sakokaivosta otettua jätevettä.

Näytteistä analysoitiin välittömästi niiden saavuttua laboratorioon viljelymenetelmillä *Escherichia coli* -bakteerin, koliformisten bakteerien ja suolistoperäisten enterokokkien pesäkelukumäärät ja taudinaiheuttajabakteereista lämpökestoisten kampylobakteerien ja salmonellan esiintyminen. Näytteistä eristetyistä nukleinihapoista tutkittiin (RT-) qPCR-menetelmillä yleisen suolistoperäisen saastumisen osoittamiseksi *E. coli* -bakteerin, enterokokkien ja *Bacteroides*-suvun bakteereiden kopiolumäärät ja suolistoperäisistä geenimarkkereista ihmis-, sika-, nautakarja- ja lokki-spesifiset markkerit.

Sikalan lietteestä todettiin odotusten mukaisesti runsaasti suolistoperäisiä bakteereita: *E. coli*- ja *Bacteroides*-bakteereita ja suolistoperäisiä enterokokkeja. Lietteestä todettiin myös lämpökestoista kampylobakteereista lajia *Campylobacter coli*, sioille spesifistä geenimarkkeria ja hieman yllättäen myös ihmisperäistä markkeria. Kaikkia näitä samoja bakteereita ja geenimarkkereita todettiin myös sikatilan sakokaivon jätevesinäytteestä, vaikkakin kampylobakteerin lajitunnistus jäi tästä näytteestä epävarmaksi.

Myös naapurikiinteistön vesinäytteistä löytyi suolistoperäisiä bakteereita. Sakokaivosta todettiin myös runsaasti suolistoperäisiä bakteereita: *E. coli*- ja *Bacteroides*-bakteereita ja suolistoperäisiä enterokokkeja sekä ihmisperäistä geenimarkkeria. Naapurin jätevedestä ei kuitenkaan todettu lämpökestoista kampylobakteereita eikä sioille spesifistä geenimarkkeria. Kastelulammen pintavesi sisälsi pienen määrän *Bacteroides*-bakteereita ja suolistoperäisiä enterokokkeja, mutta ei *E. coli*-bakteereita eikä sika- tai ihmisperäisiä geenimarkkereita. Kastelulammen vedestä todettiin lämpökestoista kampylobakteereista lajia *Campylobacter jejuni*, jonka alkuperä ei selvinnyt.

Naapurin talousvesikaivossa todettiin viljelymenetelmillä suolistoperäisiä enterokokkeja ja koliformisia bakteereita, mutta ei *E. coli*-bakteereita. Juomavedestä ei todettu sika- tai ihmisperäisiä saastelähdespesifisiä geenimarkkereita. Talousvesikaivosta havaittiin sen sijaan enterokokkeja ja *Bacteroides*-bakteereita RNA-pohjaisella RT-qPCR-menetelmällä, mutta ei tavanomaisella DNA-pohjaisella qPCR-menetelmällä. Tulos viittaa alhaiseen saastumisen tasoon tutkitussa näytteessä. Jatkossa menetelmän havaitsemisherkyyttä voidaan kasvattaa käyttämällä näytteenotossa suuren tilavuuden konsentrintimenetelmiä, kuten ultrasuodatustekniikkaa, jota parhaillaan testataan THL:ssä Suomen Akatemian rahoittamassa DWDSO-ME-hankkeessa (<https://www.thl.fi/fi/tutkimus-ja-asiantuntijatyo/hankkeet-ja-ohjelmat/hankkeet/11660>).

Kummankaan kiinteistön näytteistä ei todettu lainkaan salmonellaa eikä nautakarja- tai lokki-spesifisiä geenimarkkereita. Tulosten perusteella sikatilan valumavesien tai kummankaan kiinteistön jätevesijärjestelmien ei voitu osoittaa olevan osallisia talousvesikaivon saastumiseen. Tutkimuksia tulisi jatkaa juoma-

vedessä havaittujen enterokokkien ja *Bacteroides*-bakteereiden alkuperän tunnistamiseksi ja poistamiseksi, mikäli kaivo halutaan takaisin talousvesikäyttöön.

Uimarantaveden mikrobiologiset laatuongelmat

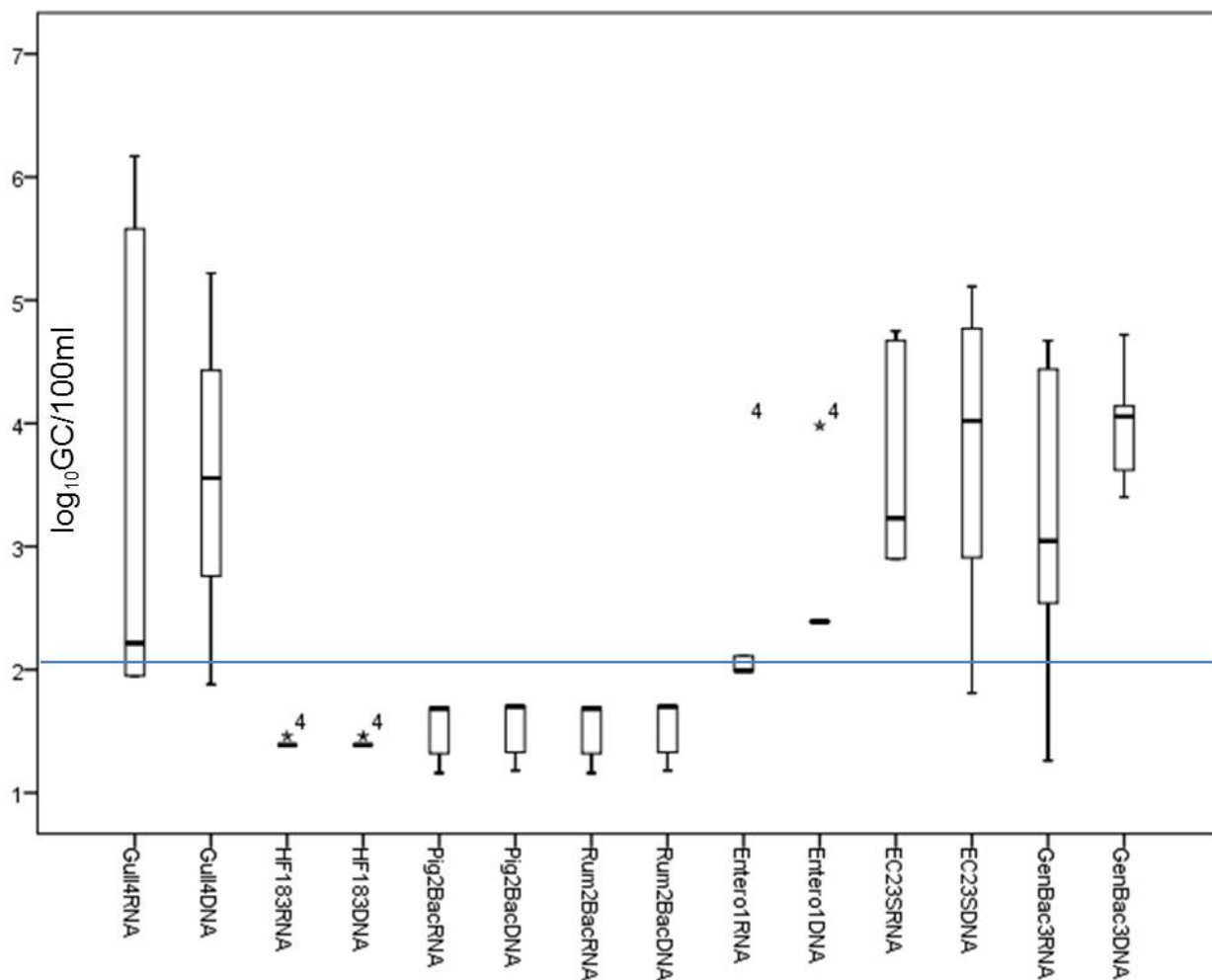
Uimarantaveden mikrobiologista laatua seurataan *E. coli* -bakteerin ja suolistoperäisten enterokokkien avulla. Mikäli näiden indikaattoribakteerien lukumäärät ylittävät raja-arvot neljä uimakautta kestävänsä seurannan aikana, kyseiselle rannalle tulee asettaa suositus uimisen välttämisestä tai uimakielto uimarien terveyden suojelemiseksi (STM 177/2008). Tässä tutkimuksessa testattiin suolistoperäisten saastelähdemarkerianalyysien käyttökelpoisuutta uimarantavesien saastumisepisodien selvittämisessä.

Lokkispesifisen Gull4-markkerin validoimiseksi kerättiin erityyppisiä näytteitä, mukaan lukien 17 kpl lokkien ulostenäytteitä eräältä uimarannalta. Gull4-markkeri perustuu lokkien ulosteissa esiintyvän *Catellibacterium marimammalium* -bakteerin osoittamiseen (Ryu et al., 2012). Menetelmävalidoinnin perusteella lokkimenetelmä on verrattain spesifinen (Taulukko 2.). Jätevesissä voidaan havaita pieniä määriä lokkimarkkeria, mikä voi olla viite joko lokkien ulosteen sekoittumisesta jäteveden joukkoon tai menetelmän lievästä ristiinreagoimisesta. RNA-pohjainen RT-qPCR-menetelmä tuottaa tulokseksi suurempia kopiokumääriä, kuin DNA-pohjainen qPCR-menetelmä (Taulukko 2.).

Taulukko 2. Lokkispesifisen Gull4 (RT-) qPCR-menetelmän validoinnin tulokset keskimääräisinä kopiokumäärinä esitettynä.

Tutkitut näytteet	Lukumäärä	Keskim. tulos (RNA)	Keskim. tulos (DNA)	Yksikkö
- talousvettä	1	Ei todettu	Ei todettu	kopiota / ml
- jätevettä	2	360	n. 2	kopiota / ml
- lokin ulostetta	17	7 200 000	100 000	kopiota / mg
- sikalanäytteitä	10	Ei todettu	Ei todettu	kopiota / mg
- vesikasvinäyte	2	Alle määr. rajan	Alle määr. rajan	kopiota / ml
- rannikon uimarantavesiä	18	3 400	100	kopiota / ml
- sisämaan uimarantavesiä	11	1 000	n. 1	kopiota / ml
Yhteensä	61			

Tässä raportissa esitetään tulokset yhdeltä viidestä eri puolilta Suomea tutkituista uimarannoista. Uimarantavesinäytteitä kerättiin kohteesta yhteensä 6 kpl vuoden 2013 uimakauden ajan kesä-, heinä- ja elokuussa. Näytteistä tutkittiin noro- ja adenovirusten sekä lämpökestoisten kampylobakteerien esiintymistä ja suolistoperäisten enterokokkien pesäkelukumäärät. Suolistoperäisistä saastelähdemarkkereista tutkittiin lokki (Gull4)-, ihmis (HF183)-, sika (Pig-2-Bac)- ja nautakarja (Rum-2-Bac) -spesifiset markkerit. Yleisinä suolistoperäisen saastumisen ilmentäjinä tutkittiin (RT-) qPCR-menetelmillä enterokokit (Enterol), sekä *E. coli* (EC23S)- ja *Bacteroides* (GenBac3) -bakteerit (Kuva 1.). Näytteissä havaittiin varsin runsaasti lokkien ulosteperäistä saastutusta, ja *E. coli*- ja *Bacteroides* -bakteereita. Enterokokkeja havaittiin vain vähän (RT-) qPCR-menetelmällä, vaikka niitä oli todettavissa viljelymenetelmällä. Uimarantavesistä ei todettu ihmis-, sika- tai nautakarja-spesifisiä geenimarkkereita uimakauden aikana.



Kuva 1. Suolistoperäisten bakteerien ja saastelähdespesifisten geneettisten markkereiden pitoisuuksien vaihtelu kesällä 2013 tutkimuskohteesta kerätyissä uimarantavesinäytteissä. Vaakasuora viiva osoittaa analyysimenetelmän määrittämissä raja-arvoissa.

Tutkituista uimarantavesinäytteistä ei todettu ihmisperäistä alkuperää olevia enterisiä viruksia: norovirusia tai adenovirusia. Uimaveden enterokokkilukumäärät (viljelymenetelmä) kohosivat uimakauden aikana ja samaan aikaan uimavedestä todettiin lämpökestoista kampylobakteereista lajia *Campylobacter lari*. Samanaikaisesti lokki-spesifisen geenimarkkerin todetut kopyolukumäärät moninkertaistuivat uimarantavedessä. Tutkimuksessa saadut tulokset tukevat sitä käsitystä, että lähitöillä pesivät lokit aiheuttavat uimaveden laadun heikkenemisen. Tutkimuksissa ei todettu lokkien lisäksi muita mahdollisia saastelähteitä. Vaikuttaa epätodennäköiseltä, että yhdyskuntien tai haja-asutuksen jätevesillä olisi osuutta uimarantaveden saastumiseen kyseisessä kohteessa.

Tutkimustulosten hyödyntäminen

Vesivälitteisten riskien systemiset tarkastelumenetelmät, kuten vesiturvallisuussuunnitelma (Water Safety Plan, WSP) ja kvantitatiivinen mikrobiologinen riskinarviointi (Quantitative Microbial Risk Assessment, QMRA) sekä nopeat ja luotettavat veden laadun uhkien havaitsemis- ja saastelähteen jäljitysmenetelmät ovat avainasemassa terveyden ja ympäristön suojelussa. Tämän tutkimuksen tuloksena mikrobiologisia saastelähteen jäljitysmenetelmiä sovellettiin ensi kertaa Suomen vesiympäristössä. Saastelähteen tunnistaminen on ensiarvoisen tärkeää, jotta haitallisten aineiden mahdollisesti aiheuttamia terveys- ja ympäristöriskejä voidaan hallita ja tarvittaessa myös vähentää. Tutkimuksessa kehitetyt vesivälitteisten mikrobiologisten riskien tunnistamismenetelmät ja saastelähteen jäljitysmenetelmät auttavat selvittämään vesien mikrobiologisia saastumistilanteita entistä tehokkaammin. Saastelähteen geenimarkkereiden analytiikkaa voidaan soveltaa laajasti Suomessa vesivarojen kuormitusta selvittävässä tutkimuksissa. Saastelähteen tunnistaminen mahdollistaa toimenpiteiden oikeanlaisen kohdentamisen saastumisen vähentämiseksi tai poistamiseksi. Kehitetyt menetelmiä voidaan käyttää suolistoperäisten saastelähteen tunnistamiseen talousvesien ja vesivarojen saastumistilanteita selvittäessä.

Lähteet

- Badgley BD, Thomas FIM, Harwood VJ. (2011). Quantifying environmental reservoirs of fecal indicator bacteria associated with sediment and submerged aquatic vegetation. *Environ. Microbiol.* (3) 932–942.
- Byappanahalli M.N., Nevers M.B., Korajkic A., Staley Z.R., and Harwood V.J. (2012). Enterococci in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(4) 685-706.
- Byappanahalli MN, Sawdey R., Ishii S., Shively DA, Ferguson JA, Whitman RL, Sadowsky MJ. (2009). Seasonal stability of *Cladophora* associated *Salmonella* in Lake Michigan watersheds. *Water Res.* (43) 806–814.
- Chern EC, Siefring S, Paar J, Doolittle M, Haugland RA. (2011) Comparison of quantitative PCR assays for *Escherichia coli* targeting ribosomal RNA and single copy genes. *Lett Appl Microbiol.* 52, 298-306.
- Edberg S.C., Rice E.W., Karlin R.J. Allen M.J. (2000). *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology* (88), 106S-116S.
- European Union (2006) The European parliament and the council directive 2006/7/EC of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality and repealing directive 76/160/EEC. *Official J. Eur. Union L* (64) 37-51.
- Gourmelon M., Caprais MP, Mieszkin S., Marti R., Wery N., Jarde E., Derrien M., Jadas-Hecart A., Communal PY., Jaffrezic A., Pourcher AM. (2010). Development of microbial and chemical MST tools to identify the origin of the faecal pollution in bathing and shellfish harvesting waters in France. *Water Res.* 44 (16) 4812-4824.
- Gourmelon, M., Caprais M., Segura R., Mennec C., Lozach S., Piriou J. and Rince A. (2007). Evaluation of two library-independent microbial source tracking methods to identify sources of fecal contamination in French estuaries. *Appl Environ Microbiol* 73 (15) 4857-4866.
- Haugland RA, Varma M, Sivaganesan M, Kely C, Peed L, Shanks OC. (2010) Evaluation of genetic markers from the 16S rRNA gene V2 region for use in quantitative detection of selected *Bacteroidales* species and human fecal waste by qPCR. *Syst Appl Microbiol.* 33, 348-357.
- Hokajärvi A, Pitkänen T, Siljanen H, Nakari U, Torvinen E, Siitonen A, Miettinen I (2013) Occurrence of thermotolerant *Campylobacter* spp. and adenoviruses in Finnish bathing waters and purified sewage effluents. *Journal of Water and Health* 11 (1): 120-134.
- Ishii S., Hansen D.L., Hicks R.E. and Sadowsky M.J. (2007). Beach sand and sediments are temporal sinks and sources of *Escherichia coli* in Lake Superior. *Environ. Sci. Technol.* (41) 2203-2009.
- Kapoor V, Pitkänen T, Ryu H, Elk M, Wendell D, Santo Domingo JW. (2015) Distribution of human-specific *Bacteroidales* and fecal indicators in an urban watershed impacted by sewage pollution using RNA and DNA based quantitative PCR assays. *Appl Environ Microbiol* 80(1):91-99.
- Lu J., Santo Domingo JW, Lamendella R, Edge T, Hill S. (2008). Phylogenetic diversity and molecular detection of bacteria in gull feces. *Appl Environ Microbiol* 74(13) 3969-76.
- Ludwig W, Schleifer K. (2000) How quantitative is quantitative PCR with respect to cell counts? *Syst Appl Microbiol.* 23, 556-562.
- Lund M, Nordentoft S, Pedersen K, Madsen M. (2004) Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 42, 5125-5132.
- Mieszkin S, Yala JF, Joubrel R, Gourmelon M. (2010) Phylogenetic analysis of *Bacteroidales* 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR. *J Appl Microbiol* 108 (3) 1365-2672. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04499.x.
- Mieszkin S, Furet JP, 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. *Appl Environ Microbiol* 75(10) 3045-3054. doi:10.1128/AEM.02343-08.
- Pitkänen T, Ryu H, Elk M, Hokajärvi AM, Siponen S, Vepsäläinen A, Räsänen P, Santo Domingo JW. (2013) Detection of fecal bacteria and source tracking identifiers in environmental waters using rRNA-based RT-qPCR and rDNA-based qPCR assays. *Environ. Sci. Technol.*, 2013, 47 (23), pp 13611–13620. DOI: 10.1021/es403489b.
- Ryu H, Elk M, Khan IU, Harwood VJ, Molina M, Edge TA, Domingo JS. (2014) Comparison of two poultry litter qPCR assays targeting the 16S rRNA gene of *Brevibacterium* sp. *Water Res.* 48:613-21. doi: 10.1016/j.watres.2013.10.015.
- Ryu H, Griffith JF, Khan IUH, Hill S, Edge TA, Toledo-Hernandez C, Gonzalez-Nieves J, Santo Domingo J. (2012) Comparison of gull feces-specific assays targeting the 16S rRNA genes of *Catellibacterium marimammalium* and *Streptococcus* spp. *Appl Environ Microbiol* 78(6) 1909-1916. doi:10.1128/AEM.07192-11.
- Scott T.M., Rose J.B., Jenkins T.M., Farrah S.R. & Lukasik J. (2002). Microbial source tracking: current methodology and future directions. *Appl. Environ Microbiol.* 68(12) 5796-5803.
- Siefring S, Varma M, Atikovic E, Wymer L, Haugland RA. (2008) Improved real-time PCR assays for the detection of fecal indicator bacteria in surface waters with different instrument and reagent systems. *J. Water Health* 6, 225-237.
- Simpson J, Santodomingo J, Reasoner D. (2002). Microbial source tracking: State of the science. *Environ. Sci. Technol.* 36 (24) 5279- 5288.
- Sosiaali- ja terveystieteiden ministeriö. (2008). Sosiaali- ja terveystieteiden asetus 177/2008 yleisten uimarantojen uimaveden laatuvaatimuksista ja valvonnasta. Edita Publishing Oy, Helsinki. <http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2008/20080177>. Whitman RL, Shively DA, Pawlik H, Nevers MB, Byappanahalli MN. 2003. Occurrence of *Escherichia coli* and enterococci in *Cladophora*

- (*Chlorophyta*) in nearshore water and beach sand of Lake Michigan. *Appl. Environ. Microbiol.* (69) 4714–4719.
- WHO, 2006. World Health Organization. Guidelines for safe recreational water environments, Volume 2: Swimming pools and similar environments. Chapter 3: Microbial Hazard 26-59.
- Wilson KH & Blitchington RB (1996). Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(7) 2273-2278.

Tarja Pitkänen, Anna-Maria Hokajärvi
Ari Kauppinen, Ananda Tiwari
Outi Zacheus ja Ilkka T. Miettinen

Vesivarojen saastelähteiden jäljitysmenetelmien kehitys

Loppuraportti



Tässä tutkimuksessa otettiin käyttöön menetelmävalikoima, jolla voidaan tunnistaa vesivarojen suolistoperäiset saastelähteet. Tutkimuksen tuloksena käyttöön otetulla analyysipatteristolla voidaan määrittää suolistoperäisen saastumisen läsnäolo ja onko vesinäytteessä ihmisestä, nautakarjasta, siipikarjasta, sioista tai lokeista peräisin olevia suolistobakteereita. Menetelmät ovat sovellettavissa erityyppisten vesien tutkimiseen, kuten talousvedet ja uimarantavedet.

Talousveden laatua käsitelleessä esimerkkitapauksessa voitiin osoittaa, että erään sikalan valumavesillä ei ollut vaikutusta läheisessä talousvesikaivossa todettuun suolistoperäiseen saastumiseen. Uimarantavesiä tutkittaessa voitiin todentaa, että eräällä rannalla suolistoperäisen saastumisen lähteenä oli läheinen lокkien pesimäalue eikä uimarannalta ollut osoitettavissa jäteveden aiheuttamaa saastutusta.

Tutkimuksessa kehitetyt saastelähteen jäljitysmenetelmät auttavat jatkossa selvittämään vesien mikrobiologisia saastumistilanteita entistä tehokkaammin. Saastelähteiden geenimarkkereiden analytiikkaa voidaan soveltaa laajasti Suomessa vesivarojen kuormitusta selvittävissä tutkimuksissa. Saastelähteiden tunnistaminen mahdollistaa toimenpiteiden oikeanlaisen kohdentamisen saastumisen vähentämiseksi tai poistamiseksi.

