

# Mikrobiologiset jäljitysmenetelmät vesivarojen saastelähteiden tunnistamiseen



TARJA PITKÄNEN  
erikoistutkija, Terveyden ja  
hyvinvoinnin laitos,  
Vesi ja terveys -yksikkö  
E-mail: tarja.pitkanen@thl.fi

Talous- ja luonnonvesiä saastuttavien mikrobien alkuperä voidaan nyt tunnistaa Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) käyttöönottamilla laboratoriotutkimuksilla. Uuden menetelmävalikoiman avulla voidaan tunnistaa rannikkovesiä, järviä, jokia tai talousvettä pilaavien suolistoperäisten saasteiden alkuperä. Kun veden saastuttaja voidaan tunnistaa nopeasti ja kiistatta, voidaan saastumiseen puuttua viivytyksettä.

Vesivarojen suolistoperäinen saastuminen on maailmanlaajuinen ongelma ja vesivarojen suojeleminen on tärkeää vesivälitteisten terveysriskien vähentämiseksi. Vaikka jätevesien puhdistusmenetelmien kehittyminen on vähentänyt purkuvesistöihin päätyvien suolistomikrobien kuormaa, puhdistettu jätevesi on säilyttänyt asemansa ympäristöön päätyvien suolistomikrobien merkittävänä lähteenä (Perkola ym., 2015). Yhdyskuntien jätevedenpuhdistamoille tulevan jäteveden vuodot ja ristikontaminaatiot, jätevesien ohijuoksutukset ja puhdistetun jäteveden purku alapuolisiin vesistöihin ovat suolistoperäisten mikrobien lähteitä, jotka voivat saastuttaa talousvesiä ja jotka kuormittavat luonnonvesiä.

Hajakuormituksen, kuten karjatalouden pintavalumiin, luonnoneläinten ulosteiden ja kiinteistökohtaisten jätevesijärjestelmien aiheuttaman kuormituksen ja kaupunkialueiden hulevesien merkitys suolistoperäisten mikrobien lähteenä on kasvanut viime vuosina. Jotta saastumisesta aiheutuvia haittoja voidaan vähentää tai jopa ennaltaehkäistä, on saastelähde pystyttävä tunnistamaan nopeasti ja tarkasti. Terveydensuojeluviranomaiset joutuvat selvittämään vuosittain kymmeniä talousveden ja uimaveden mikrobiologisia saastumistapauksia eri puolilla Suomea. Saastelähteiden tunnistamiseen ja hallintaan ei tällä hetkellä ole olemassa erityistä eurooppalaista lainsäädäntöä.

## Suolistoperäisten saastelähteiden identifiointi

*Escherichia coli* (*E. coli*) -bakteerin ja suolistoperäisten enterokokkien uskotaan lähtökohtaisesti olevan aina suolistoperäisiä ja näiden indikaattoribakteerien havaitseminen vedestä on merkki suolistoperäisestä saastumisesta. Vaikka suolistoperäisten indikaattoribakteereiden alkuperä on tasalämpöisten eläinten suolistossa, niitä tavataan laajasti eri ympäristöissä, kuten maassa, sedimenteissä, rantahiekoissa, kasvillisuuden joukossa ja erilaisissa vesi-ympäristöissä. 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.

Nykyaikaiset molekyylibiologiset menetelmät tarjoavat mahdollisuuden saastelähteiden tunnistamiseen (Hagedorn ym., 2011). 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 suolistos-

ta. Myös erilaisille vesilinnuille, kuten lokeille on kehitetty omat isäntäspesifiset markkerit. Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen hankkeen ”*Vesivarojen saastelähteiden jäljitysmenetelmien kehitys*” tavoitteena oli kehittää ja ottaa käyttöön Suomen olosuhteisiin soveltuvia molekyylibiologiaan perustuvia mikrobiologisten saastelähteiden tunnistamismenetelmiä suolistoperäisen saastumisen alkuperän selvittämiseksi (Pitkänen ym., 2015).

## Hankkeen toteutus

Tutkimuksessa perehdyttiin haja-asutusalueiden vesihuollon haasteisiin. Tutkimuksessa otettiin käyttöön geneettiset markkeritestit erottelemaan suolistoperäisten mikrobien lähteistä erityisesti ihmisistä (yhdyskunnista) ja ympäristöstä (eläimistä) peräisin oleva saastuminen (**Taulukko 1**). 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 lokiin ulostenäytteitä ja tutkittiin kunnallisen jätevedenpuhdistamon lähtevää jätevettä.

Kerätyistä näytteistä määritettiin suolistoperäiset indikaattoribakteerit ja osasta näytteitä tutkittiin myös kampylobakteerien, norovirusten ja adenovirusten esiintymistä. Käytetyt tutkimusmenetelmät on kuvattu THL:n palvelusivustolla: [www.thl.fi/vesimikrobiologinen\\_analytiikka](http://www.thl.fi/vesimikrobiologinen_analytiikka) ja tarkemmin hankkeen loppuraportissa (Pitkänen ym., 2015).

Tutkimuksessa havaittiin RNA-pohjaisen RT-qPCR-menetelmän havaitsevan tavanomaista DNA-pohjaista qPCR-menetelmää herkemmin suolistoperäisiä geenimarkkereita (Pitkänen ym., 2013). Tämä ominaisuus on erityisen hyödyllinen tutkittaessa näitä bakteereita Suomen olosuhteissa, joissa saasteet laimenevat usein nopeasti suuriin vesitilavuuksiin.

## Talovesikaivon suolistoperäinen saastuminen

Geenimarkkereiden analyysipatteriston testauksessa Lounais-Suomessa sijaitsevan sikatilalla tutkimuskysymyksenä oli selvittää, onko sikatilan valumavesillä voinut olla vaikutusta naapurikiinteistön talovesikaivon suolistoperäiseen saastumiseen. Lisäksi haluttiin varmistaa käyttöönotetun siolle spesifisen geenimarkkerin toimivuutta.

Sikalan lietteestä todettiin odotusten mukaisesti runsaasti suolistoperäisiä bakteereita: *E. coli*- ja *Bacteroides*-bakteereita ja suolistoperäisiä enterokokkeja. Lietteestä todettiin myös



**Kuva 1.** Saastelähteiden jäljitysmenetelmiä voidaan hyödyntää esimerkiksi uimarantojen virkistyskäyttöä haittaavien vedenlaadun saastumisepisodien syiden selvittämisessä. Valokuva: Tarja Pitkänen, THL.

**Taulukko 1.** Suolistoperäisten bakteerien jäljitykseen käytettävissä olevat molekyyli-mikrobiologiset menetelmät. Menetelmäviitteet ja oligonukleotidisekvenssit on esitetty loppuraportissa Pitkänen ym. (2015).

Testikohde	Menetelmä	Käyttötarkoitus
Yleinen <i>Bacteroidales</i>	GenBac3	Suolistoperäisen saastumisen kokonaismäärän arviointi
Ihmis-spesifinen <i>Bacteroidales</i>	HF183	Ihmisperäisten suolistobakteerien läsnäolon toteaminen ja määrän arviointi
Lokki-spesifinen <i>Catellibacterium</i>	Gull4	Lokkien aiheuttaman ulostesaastutuksen läsnäolon toteaminen ja määrän arviointi
Sorkkaeläin-spesifinen <i>Bacteroidales</i>	Rum-2-Bac	Nautakarjan ja muiden sorkkaeläinten suolistobakteerien läsnäolon toteaminen ja määrän arviointi
Sika-spesifinen <i>Bacteroidales</i>	Pig-2-Bac	Sikojen suolistobakteerien läsnäolon toteaminen ja määrän arviointi
Siipikarja-spesifinen <i>Brevibacterium</i>	CL	Siipikarjan suolistobakteerien läsnäolon toteaminen ja määrän arviointi
<i>Escherichia coli</i>	EC23S857	Pikamenetelmä <i>E. coli</i> -bakteerin geenikopioiden lukumäärän laskemiseksi
<i>Enterococcus spp.</i>	Enterol	Pikamenetelmä enterokokkien geenikopioiden lukumäärän määrittämiseksi
<i>Campylobacter spp.</i>	Camp2	Pikamenetelmä kampakylobakteerin geenikopioiden lukumäärän määrittämiseksi

lämpökestoista kampakylobakteereista lajia *Campylobacter coli*, sioille spesifistä geenimarkkeria ja hieman yllättäen myös ihmisperäistä markkeria. Kaikkia näitä samoja bakteereita ja geenimarkkereita todettiin myös sikatilan sakokaivon jätevesinäytteestä, vaikkakin kampakylobakteerin lajitunnistus jäi tästä näytteestä epävarmaksi.

Myös naapurikiinteistön vesinäytteistä löytyi suolistoperäisiä bakteereita. Sakokaivosta todettiin runsaasti suolistoperäisiä bakteereita: *E. coli*- ja *Bacteroides*-bakteereita ja suolistoperäisiä enterokokkeja sekä ihmisperäistä geenimarkkeria. Naapurin jätevedestä ei kuitenkaan todettu lämpökestoista kampakylobakteereita 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 kampakylobakteereista 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. Tällä perusteella voitiin osoittaa, että sikalan valumavesillä ei ollut vaikutusta talousvesikaivossa todettuun suolistoperäiseen saastumiseen. 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.

### Uimarantaveden mikrobiologiset laatuongelmat

Uimarantaveden mikrobiologista laatua seurataan *E. coli* -bakteerin ja suolistoperäisten enterokokkien avulla. Mikä-

li näiden indikaattoribakteerien lukumäärät ylittävät raja-arvot neljä uimakautta kestävän seurannan aikana, kyseiselle rannalle tulee asettaa suositus uimisen välttämiseksi tai uimakielto uimarien terveyden suojelemiseksi (STM 177/2008). Tässä tutkimuksessa testattiin suolistoperäisten saastelähdemarkkerianalyysien käyttökelpoisuutta uimarantavesien saastumisepisodioiden selvittämisessä (Kuva 1).

Esimerkitapauksessa uimaveden enterokokkilukumäärät (viljelymenetelmä) kohosivat uimakauden aikana ja samaan aikaan uimavedestä todettiin lämpökestoista kampakylobakteereista lajia *Campylobacter lari*. Samanaikaisesti lokki-spesifisen geenimarkkerin todetut kopiolumäärät moninkertaistuivat uimarantavedessä. Uimarantavedestä ei todettu ihmis-, sika- tai nautakarja-spesifisiä geenimarkkereita uimakauden aikana. Tutkimuksessa saadut tulokset tukevat sitä käsitystä, että lähitöllä pesivät lokit aiheuttavat uimaveden laadun heikkenemisen. 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 saastelähteiden jäljitysmenetelmiä sovellettiin ensimmäistä kertaa Suomen vesiympäristössä. Saastelähteiden tunnistaminen on ensiarvoisen tärkeää, jotta haitallisten aineiden mahdollisesti aiheuttamia terveys- ja ympäristöris-

## Tietolaatikko

- Mikrobiologiset jäljitysmenetelmät perustuvat sellaisten suolistobakteereiden tunnistamiseen, jotka ovat aina läsnä tietyn isäntäeläimen ulosteissa, ja joita ei esiinny muualla.
- 'Isäntäspesifisiä' mikrobeja on muun muassa Bacteroidales-lahkon bakteereissa.
- Bakteerit voidaan havaita kvantitatiivisia geenimonistustekniikoita (qPCR) käyttäen.
- Analyysi tehdään laboratorioon toimitetusta, vähintään kahden litran vesinäytteestä.
- 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.

kejä voidaan hallita ja tarvittaessa myös vähentää. Tutkimuksessa kehitetyt saastelähteen jäljitysmenetelmät auttavat selvittämään vesien mikrobiologisia saastumistilanteita entistä tehokkaammin.

Nyt käyttöön otetulla analyysipatteristolla voidaan määrittää, onko vesinäytteessä ihmisestä, nautakarjasta, siipikarjasta, sioista tai lokeista peräisin olevia suolistobakteereita. Analyysipatteristoa on mahdollista laajentaa tulevaisuudessa kattamaan esimerkiksi hulevesien hallinnan kannalta tärkeitä ulosteperäisiä saastelähteitä, kuten kotitalouksien lemmikkieläinten jätösten tai hevostalouden aiheuttama saastekuorma. Saastelähteiden geenimarkkereiden analytiikkaa voidaan soveltaa laajasti Suomessa vesivarojen kuormitusta selvittämissä tutkimuksissa. Saastelähteiden tunnistaminen mahdollistaa toimenpiteiden oikeanlaisen kohdentamisen saastumisen vähentämiseksi tai poistamiseksi. Kehitetyt menetelmiä voidaan käyttää suolistoperäisten saastelähteiden tunnistamiseen talousvesien ja vesivarojen saastumistilanteita selvittäessä. ◆

## Kirjallisuus

Hagedorn C, Blanch AR, Harwood VJ. (2011) *Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies*. Springer Science and Business Media, LLC 2011. 642 pages. doi: 10.1007/978-1-4419-9386-1.

Pirkola N, Pitkänen T, Juntunen J, Kauppinen A, Tuominen S, Kusnetsov J, Nysten T, Hokajärvi A-M, Rosendahl K, Meriläinen P, Huttula T, Happonen M, Miettinen IT. (2015) Kuluttajakemikaalit ja mikrobit Kokemäenjoen vesistöissä. *Ympäristö ja Terveys-lehti*. 2015;3,46:50-55.

Pitkänen T, Hokajärvi AM, Kauppinen A, Tiwari A, Zacheus O, Miettinen IT. (2015) Vesivarojen saastelähteiden jäljitysmenetelmien kehitys. THL, Työpäperi 16/2015. <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-302-517-2>.

Pitkänen T, Ryu H, Elk M, Hokajärvi AM, Sipilä 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.