

Vesijohtoverkoston reaaliaikainen mikrobivalvonta

Sotkamo, 29.3.2018

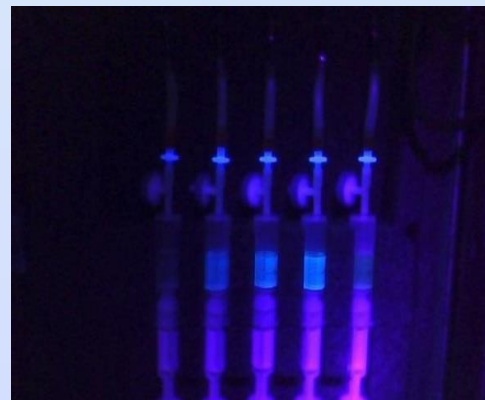
Esitys pohjautuu dos. Elias Hakalehdon esitykseen, FT, MMM

Bioteknisen mikrobianalytiikan dosentti, Itä-Suomen yliopisto

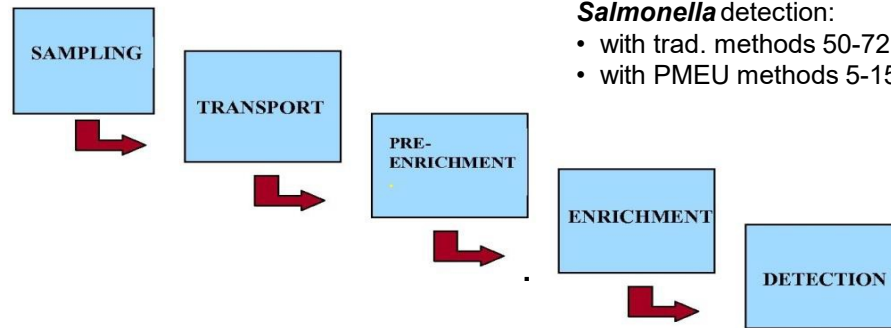
Mikrobiologisen agroekologian dosentti, Helsingin yliopisto

Toimitusjohtaja, Finnoflag Oy

Portable Microbe Enrichment Unit (PMEU) for immediate start of sample processing on site

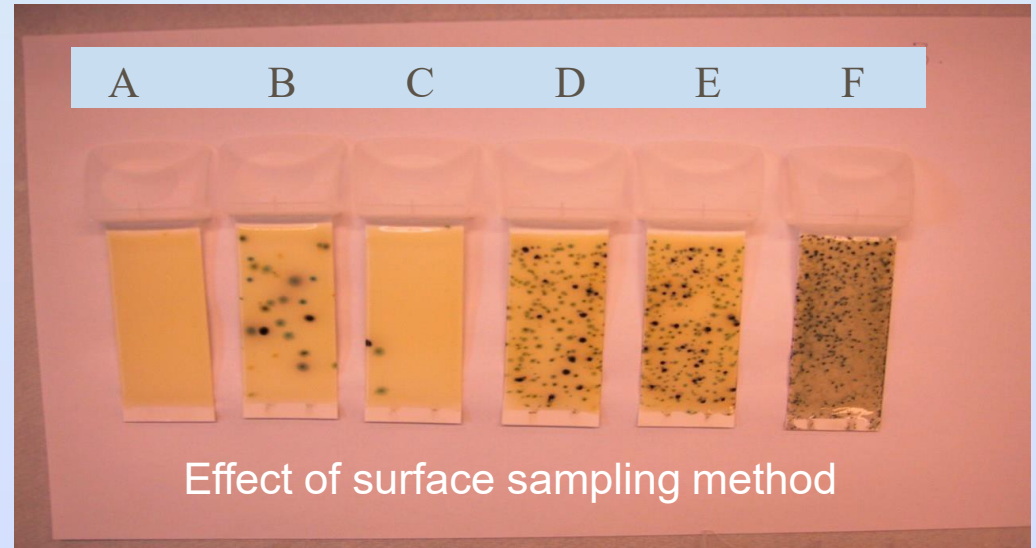
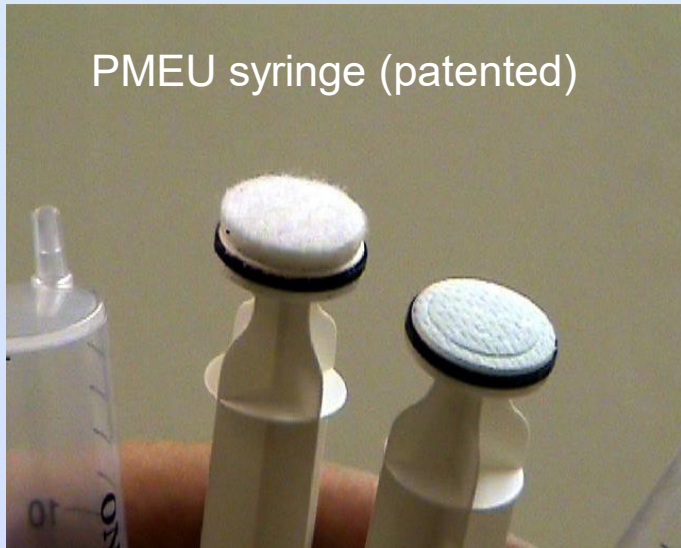


Microbe Detection Process



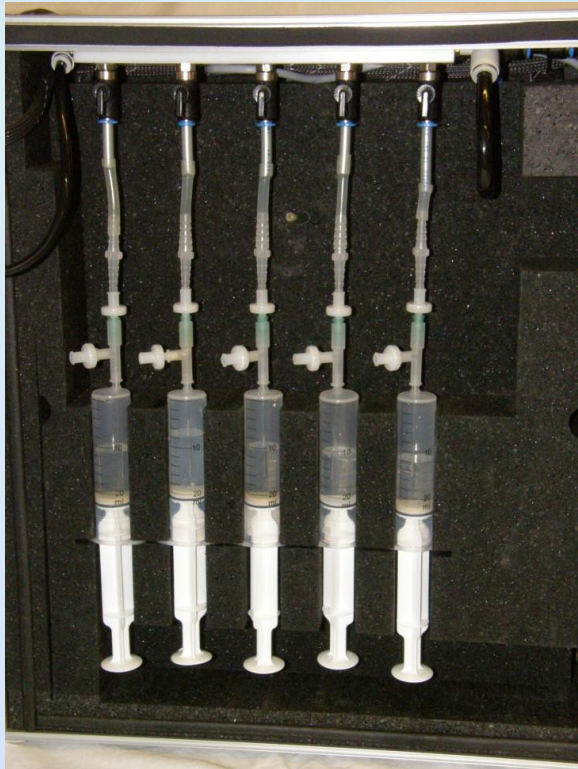
Salmonella detection:

- with trad. methods 50-72 hours
- with PMEU methods 5-15 hours



PMEU versions

PMEU Spectrion®



Syringes in the PMEU



Coliline PMEU with Automated
Sample Collection System



PMEU Scentrion®

PMEU-teknologian käyttösovelluksia

A. TALOUSVESI

B. TEOLLISUUDEN KÄYTTÖVESI

C. UIMA- JA VIRKISTYSVEDET

D. LUONNONVEDET

E. RISKITEKIJÖIDEN

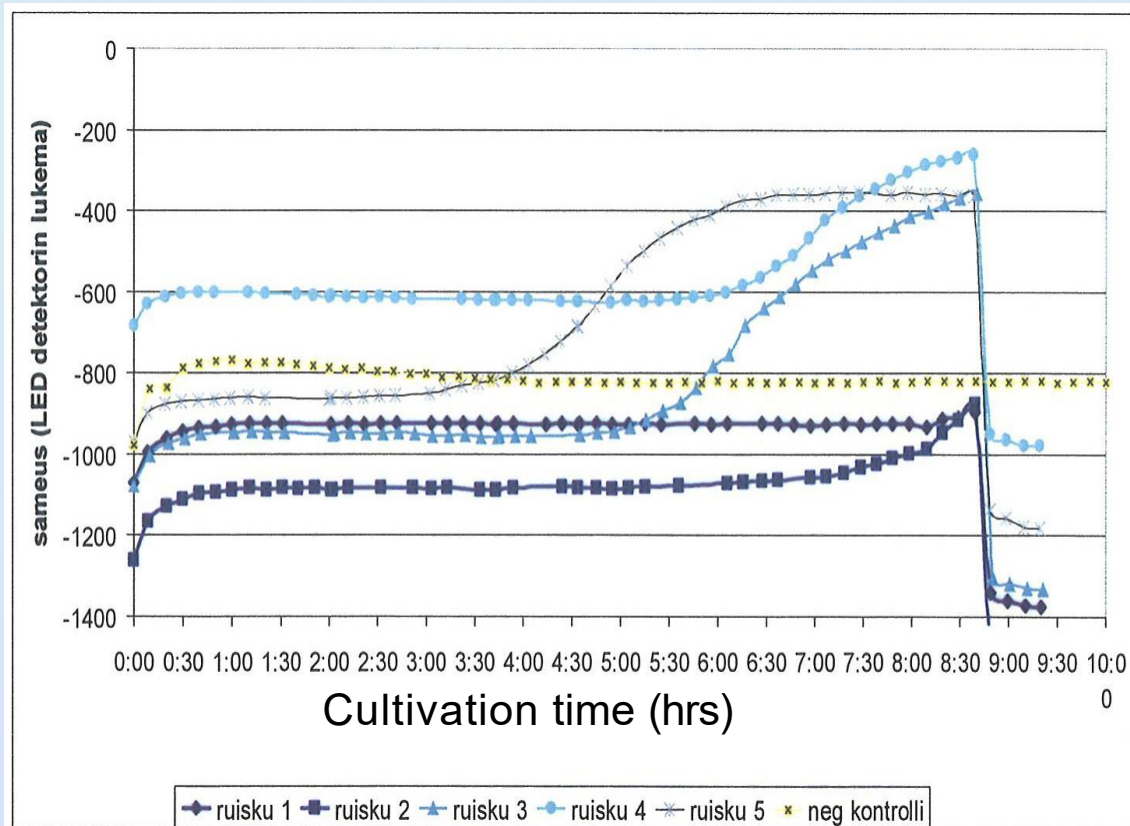
(ESIM.ANTIBIOOTTIRESISTENTIT KANNAT)

MONITOROINTI

Escherichia coli – validation cultures

PMEU SPECTRION®

SALO, S. & WIRTANEN, G. (2010). VTT. P.O.B. 1000, FI-02044 VTT



In the beginning of the cultivation in 37 °C the amount of *E. coli* bacteria was 2-4 cfu / ml in the syringe #1 (lowest concentration) and 10⁵ cfu / ml in the syringe #5 (highest concentration). In the end the concentrations were 10⁶ cfu / ml and 10⁸ cfu / ml, respectively.

Etävalvonta lisää turvallisuutta

- Puhtaan veden online-seuranta perustuu ensisijaisesti fysikaalis-kemiallisiin parametreihin
- Käyttöveden mikrobiologinen saastuminen on akuuttien terveysvaikutusten osalta usein merkittävämpi uhka kuin kemiallisten parametrien kohoaminen
- Sameuden ym. seuranta voi antaa viitteitä mikrobiologisesta ongelmasta, mutta varmistus saadaan usein vasta viiveellä
- Mikrobiologisen ongelman mahdollisimman nopea havaitseminen etävalvonnan avulla lisää vesihuollon turvallisuutta

Vesinäytteistä saatavien mikrobimäärien luotettavuuden edellytykset

- ONNISTUNUT NÄYTTEENOTTO
- VÄLITÖN RIKASTUSVILJELYN ALOITUS
- OIKEAT VILJELYOLOSUHTEET JA SELEKTIO (ESIM. HYGIENIAINDIKAATTORIT)
- ETÄSEURANTA VEDENJAKELUVERKOSTOSSA, TEOLLISUUDEN TUOTANTOLINJASTOILLA JA EPIDEMIOIDEN YHTEYDESSÄ
- REAALIAIKAINEN RIKASTUSVILJELYN TULOSSEURANTA
- KONTROLLINÄYTTEIDEN TUTKIMUS JA JATKOANALYYSIT

PMEU:n käyttöesimerkkejä vesilaitosprojekteissa:

Kuopion Vesi (2004):
KUOPION VEDENJAKELUJÄRJESTELMÄN JA –
VERKOSTON HYGIENIAKARTOITUS PMEU –
RIKASTUSLAITETTA KÄYTTÄEN

Tampereen vesi (2010):
PMEU SPECTRION® –MIKROBIEN RIKASTUSLAITTEEN
KÄYTTÖ HETEROTROFISTEN BAKTEERIEEN
OSOITTAMISEEN TAMPEREEN VERKOSTOVEDESTÄ

Turun Vesi (2010):
PMEU SPECTRION® –MIKROBIEN RIKASTUSLAITTEEN
KÄYTTÖ HETEROTROFISTEN BAKTEERIEEN
OSOITTAMISEEN TURUN VERKOSTOVEDESTÄ



Uusi mikrobikartoitusmenetelmä auttoi etsimään vesijohtoverkoston ongelmakohtat

Vesijohtoveden mikrobiologisen laadun hallinta on tärkeää. Kuopion Vesi halusi selvittää vesijohtoverkostonsa mikrobiolannetta ja löytää mahdolliset ongelmakohtat, jotka voittalain tulosten avulla ja ennakkovasti korjata. Apuun tilanteessa tuli silinjärveläinen Finnnotag Oy, jonka mikrobiologiset kenttälaboratoriotilaa tilanne saatiin luotettavasti, kustannustehokkaasti ja valvottomasti selvitettyä. –Yhteydenpito ja yhteistyö paikallisen suorittajan kanssa tuntui helpolta, kehuu Kuopion Veden vesihuoltokemisti Pentti Keränen.

Kuopion Vesiin on 85 000 asukasta, jotka kuluttavat 16 200 m³ vettä vuorokaudessa. Hietteen saaresta kuluu vettä ranta-alueille pohjoisella, jota jatketaan 5 km pitkän ligan kautta hionninan vesilaitokselle, jossa vesi kuluu kemiallisen käsitelyn läpi ja on sen jälkeen valmiina toimittamaan asutusta. Hietteen saaresta kuluu vettä ranta-alueille pohjoisella, jota jatketaan 5 km pitkän ligan kautta hionninan vesilaitokselle, jossa vesi kuluu kemiallisen käsitelyn läpi ja on sen jälkeen valmiina toimittamaan asutusta.

Pöytä verkko – mikä löytyi ongelmakohtat?

Puhdasvesiverkosto on yhteensä 420 km. Kuopion Vesiin on 85 000 asukasta, jotka kuluttavat 16 200 m³ vettä vuorokaudessa. Hietteen saaresta kuluu vettä ranta-alueille pohjoisella, jota jatketaan 5 km pitkän ligan kautta hionninan vesilaitokselle, jossa vesi kuluu kemiallisen käsitelyn läpi ja on sen jälkeen valmiina toimittamaan asutusta.

–Käytännössä mikrobiologian avulla löydettiin ongelmakohtat ja niiden syyt.

–Käytännössä mikrobiologian avulla löydettiin ongelmakohtat ja niiden syyt.

–Käytännössä mikrobiologian avulla löydettiin ongelmakohtat ja niiden syyt.

–Käytännössä mikrobiologian avulla löydettiin ongelmakohtat ja niiden syyt.

Kartoitus oli nopeasti ja vaihtelevasti – lopputulokset konkreettisesti toimintasuunnitelmaa.

Kartoitus tehtiin heinäkuun 2004 yhtenäisessä kymmenessä näytteenotuspisteessä. Pisteiden joukossa oli potentiaalisia ongelmakohtat sekä vettä myös hionnintalaitoksen pumpusta vesi ja järtänyt näytteet otettiin jokaiselta pisteeltä neljä kertaa noin viikon välein, jotta mahdolliset muutokset saatiin selville. Lisäksi työn aikana myös vettä otettiin, josta otettiin näytteitä myös lämpötilan ja suhteellisen kosteuden mittaamiseksi.

Kartoituksen tulos oli kokonaisarvosuoritus, jossa yhden kuluksen –Arvosuoritus määritteli, mikä oli hionnintalaitoksen lämpötila ja suhteellinen kosteus, josta otettiin näytteitä myös lämpötilan ja suhteellisen kosteuden mittaamiseksi.

–Käytännössä mikrobiologian avulla löydettiin ongelmakohtat ja niiden syyt.

–Käytännössä mikrobiologian avulla löydettiin ongelmakohtat ja niiden syyt.

–Käytännössä mikrobiologian avulla löydettiin ongelmakohtat ja niiden syyt.

–Käytännössä mikrobiologian avulla löydettiin ongelmakohtat ja niiden syyt.

–Monet mikrobit olivat niin harvakuulia tai heikkokuntaisia, että ne eivät nähtyneet silmällä. Tällöin näytteenotto-ohjelmaa selvitettiin, jotta löydettiin ongelmakohtat.

–Käytännössä mikrobiologian avulla löydettiin ongelmakohtat ja niiden syyt.

–Käytännössä mikrobiologian avulla löydettiin ongelmakohtat ja niiden syyt.

–Käytännössä mikrobiologian avulla löydettiin ongelmakohtat ja niiden syyt.

–Käytännössä mikrobiologian avulla löydettiin ongelmakohtat ja niiden syyt.

–Käytännössä mikrobiologian avulla löydettiin ongelmakohtat ja niiden syyt.

–Käytännössä mikrobiologian avulla löydettiin ongelmakohtat ja niiden syyt.

–Käytännössä mikrobiologian avulla löydettiin ongelmakohtat ja niiden syyt.

–Käytännössä mikrobiologian avulla löydettiin ongelmakohtat ja niiden syyt.

–Käytännössä mikrobiologian avulla löydettiin ongelmakohtat ja niiden syyt.

–Käytännössä mikrobiologian avulla löydettiin ongelmakohtat ja niiden syyt.

–Käytännössä mikrobiologian avulla löydettiin ongelmakohtat ja niiden syyt.

–Käytännössä mikrobiologian avulla löydettiin ongelmakohtat ja niiden syyt.

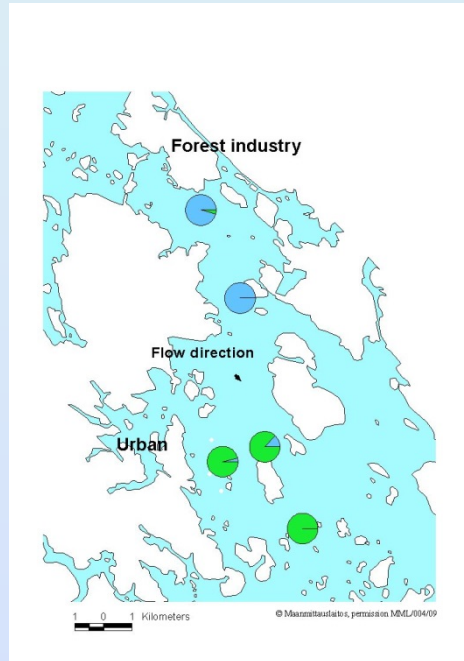
–Käytännössä mikrobiologian avulla löydettiin ongelmakohtat ja niiden syyt.

PMEU:n käyttöesimerkkejä vesistöprojekteissa:

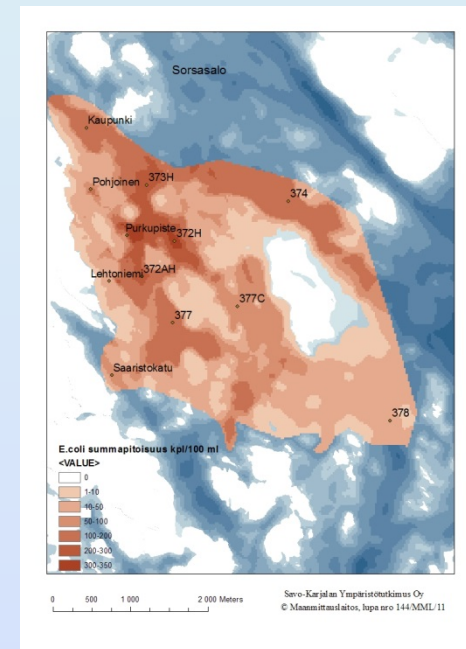
Stromsdalin Juankosken tehtaan jätevesipäästöjen sisältämien *Klebsiella*-bakteerien säilymisen ja kulkeutumisen esiselvitys (2005)

Hygieniabakteeritutkimus Porovedellä ja virta-asemilla (2006)

Indikaattoribakteeritutkimuksia Kallavedellä (2005-2011)



Heitto L, Heitto A & Hakalehto E. 2009. Tracing wastewaters with faecal enterococci. (Poster). 2nd European Large Lakes Symposium. Norrtälje, Sweden.



Bakteeritutkimukset Kuopion Lehtoniemen puhdistamon ja Savon Sellun edustalla

Kaasujen ja mikrobien vuorovaikutus

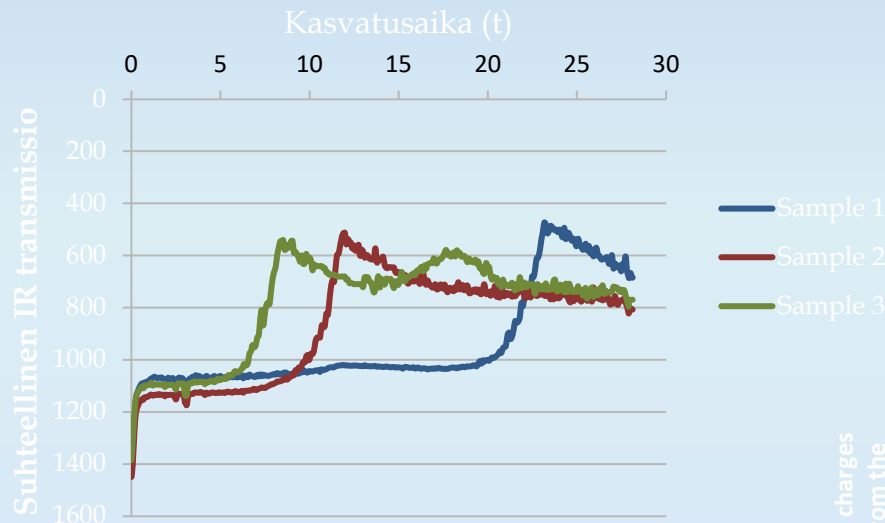


The PMEU Spectrion® laitetta käytetään bakteerien ja muiden mikrobien kasvatukseen sekä kasvun osoittamiseen ja seuraamiseen joko UV-valolla, näkyvällä valolla tai IR-sensoreilla.

Kuvan tutkimusasetelmassa PMEU Spectrion®-laitteessa ruiskusta emittoituva kaasu johdetaan seuraavaan ruiskuun. (Kuvat: Kevin King)

Hakalehto E. 2013. Interactions of *Klebsiella* sp. with other intestinal flora. In: Pereira LA & Santos A. (eds) *Klebsiella* infections: Epidemiology, pathogenesis and clinical outcomes. Nova Science Publishers, Inc. New York, USA.

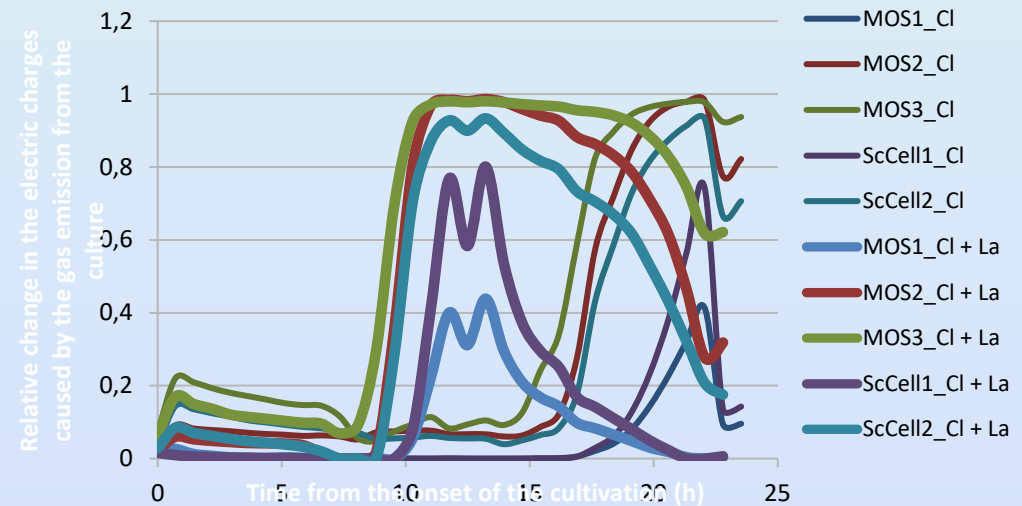
Hiilidioksidi nopeuttaa kasvua



Ruiskusta toiseen johdetun hiilidioksidin vaikutus klostridien kasvuun PMEU-laitteessa

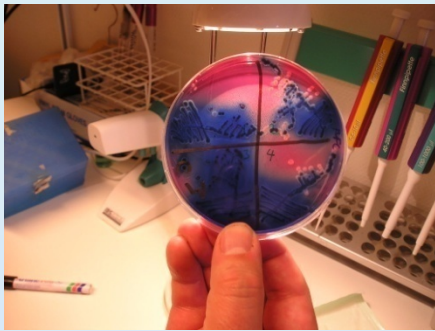
Hakalehto, E. & Hänninen, O. 2012: Gaseous CO₂ signal initiate growth of butyric acid producing *Clostridium butyricum* both in pure culture and in mixed cultures with *Lactobacillus brevis*. *Can. J. Microbiol.* 58: 928-931.

Ohuet viivat = *C. butyricum*
Paksut viivat = *C. butyricum* yhdistettynä *L. brevis* kasvustoon



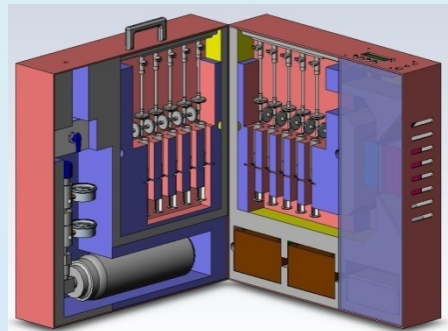
CO₂ stimuloi voihappoa tuottavan *Clostridium butyricum* -bakteerin kasvun alkamista sekä puhtasviljelmässä että sekaviljelmässä yhdessä *Lactobacillus brevis* -bakteerin kanssa

PERINTEISET VILJELYMENETELMÄT

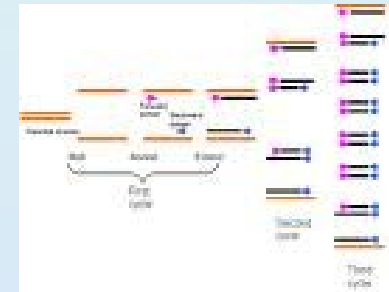


- kalvosuodatus
- maljaviljelyt
- MPN "most probable number" liemiputket
- Colilert™ ym. selektiiviset alustat

KIIHDYTETTY RIKASTUSVILJELY (PMEU)



MOLEKYYYLI- BIOLOGIAN MENETELMÄT



- immunoassayt
- PCR
- bioanturit, sirut

VESIHYGIENIAN TESTAUSMENETELMÄT

Polaris-hanke – mittava kansallinen yhteistyöhanke

- Vuosina 2009-2012 toteutetussa Polaris-hankkeessa (Vedenlaadun kokonaisjärjestelmän kehittäminen) tutkittiin yhtenä osa-alueena vesien automatisoitua mikrobiologista etäseurantaa.
- Mukana Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, Geologinen tutkimuskeskus, Itä-Suomen yliopisto, Oulun yliopisto, Ilmatieteen laitos ja Savonia ammattikorkeakoulu
- Yhteistyötahoja mm. Maa- ja metsätalousministeriö, Sosiaali- ja terveysministeriö, Vesilaitosyhdistys, 4 kunnallista vesilaitosta sekä useita yrityksiä
- Laajoja testejä mikrobiologisen etäseurannan kehittämiseksi

Polaris-hanke

- mikrobiologisen seurannan menetelmiä -

- PMEU Spectrion® (Finnoflag Oy)
- Coliline PMEU (valmistaja: Samplion Oy; markkinoija: Berner Oy)
 - automatisoitu mikrobiologinen etäseuranta



PMEU Spectrion®



Coliline PMEU

Coliline PMEU – suomalainen ratkaisu vesien mikrobivalvontaan

- Koliformiset bakteerit keltaisen värin detektiolla
- *E. coli* fluoresenssidetektorilla
- Näytteenotto automaattisesti UVAS-hälytyksestä
- Etäseuranta



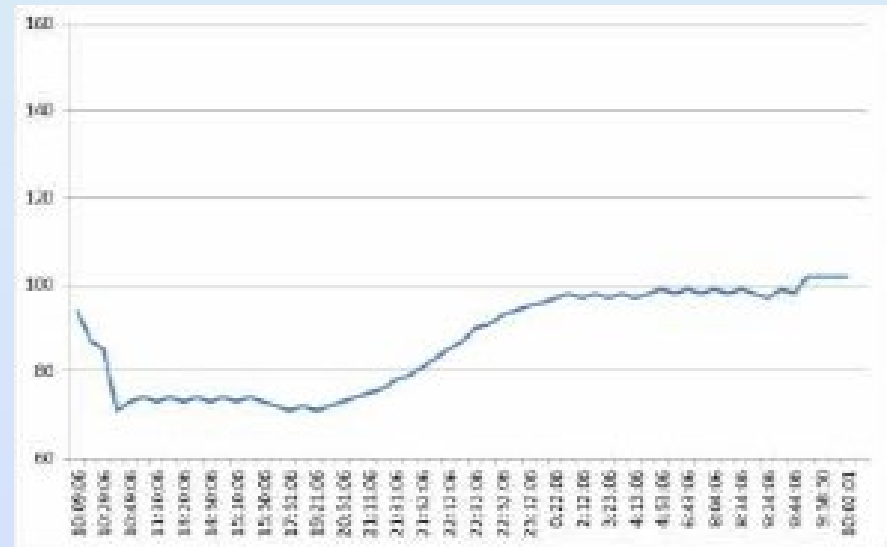
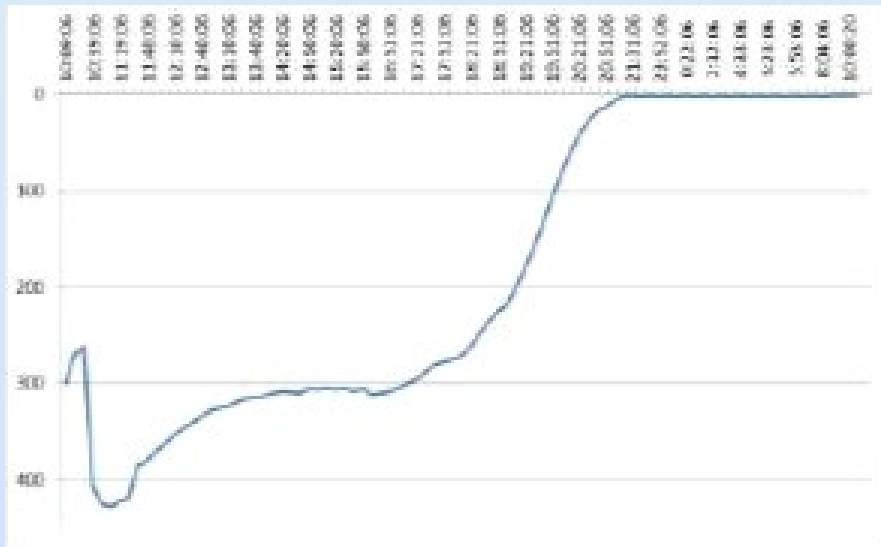
Automatisoitu näytteenotto ja analyysin aloitus

- Näytepisteessä jatkuva sivuvirta laitteen läpi
- Mikrobianalyysaattori kytketty online-sensoriin
- Näytteenotto käynnistyy online-sensorin hälytysrajan ylityksestä
- Kasvatus ja analyysi alkavat välittömästi näytteenoton jälkeen
- Analyysaattori lämpenee mikrobien kasvatuslämpötilaan
- Detektorit mittaavat mikrobikasvua



Automaattinen havaitseminen

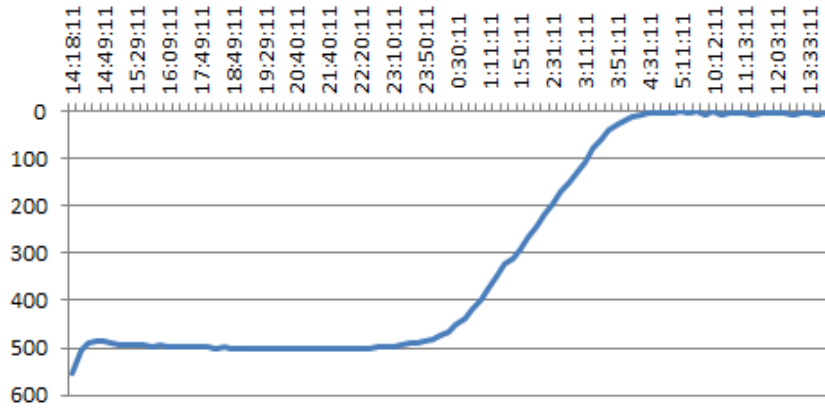
- Detektoreille voidaan asettaa hälytysraja
- Hälytysrajan ylityksestä ilmoitus G4-verkon kautta esim. sähköpostiin tai tekstiviestillä
- Verkkoyhteyden kautta voi mikrobianaalysaattoria ohjata ja mikrobikasvustoa seurata etänä
- Datan siirto ja tallennus G4-verkon välityksellä



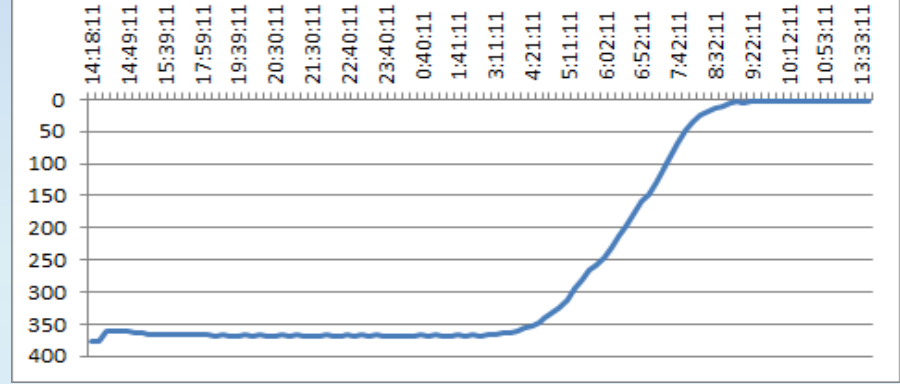
Polaris-projektissa tehdyt testaukset vesilaitosympäristössä

- Alkutestaukset laboratoriossa
- Testaukset Polaris-kohteissa
 - Raakavesi, havaintoputket, pohjavesikaivot
 - Laitokselta lähtevä vesi
 - Referenssianalyysit laboratoriossa
 - Hälytys sameudesta tai absorbanssista
- Pilot-vesilaitoskokeet
 - Raakaveden UVAS hälytykseen perustuva näytteenotto
 - Ohjelmoidusti hiekkasuodatuksen jälkeen

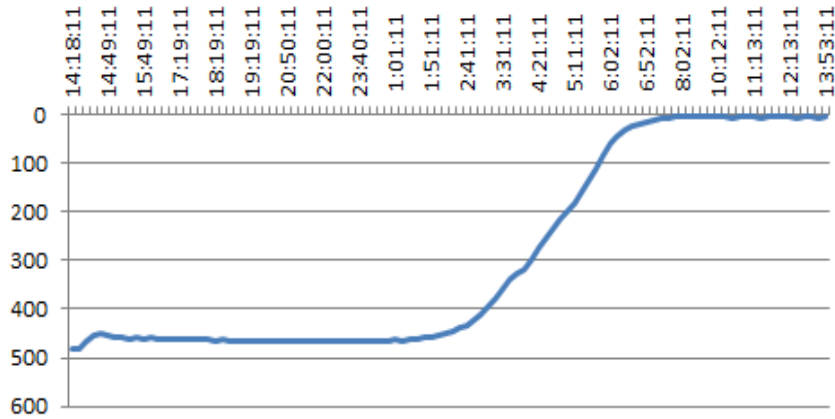
**E. coli lähtöpitoisuus 13 000 cfu/100 ml
keltainen väri**



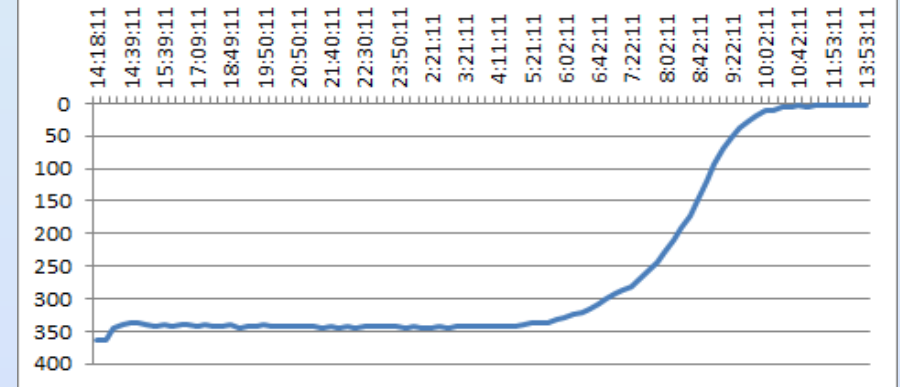
**E. coli lähtöpitoisuus 130 cfu/ 100 ml
keltainen väri**



**E. coli lähtöpitoisuus 1300 cfu/ 100 ml
keltainen väri**

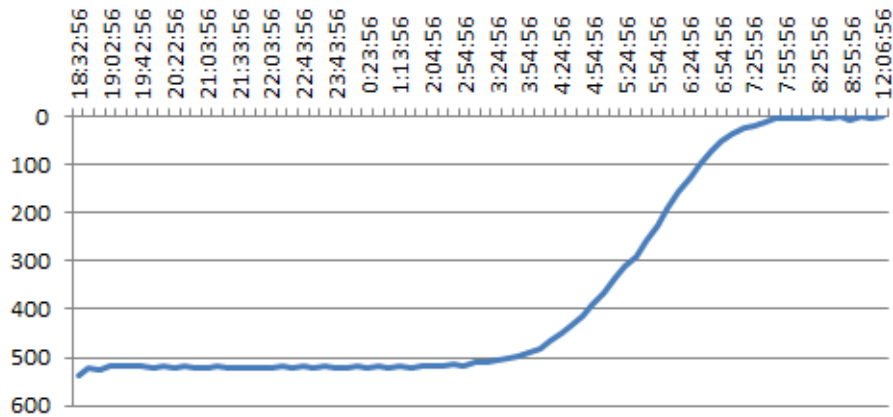


**E. coli lähtöpitoisuus 13 cfu/ 100 ml
keltainen väri**

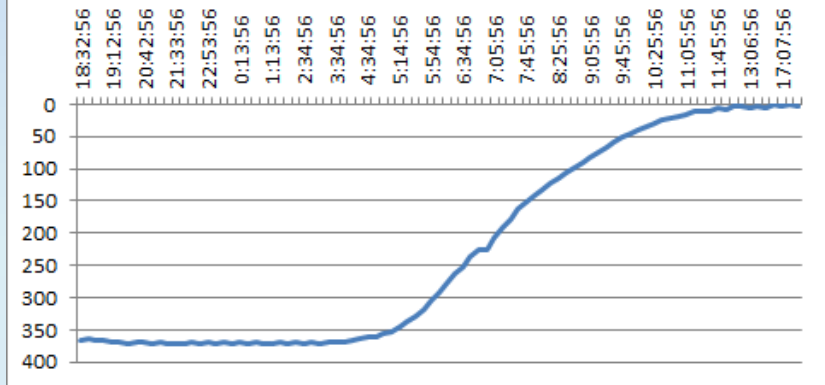


Kasvun toteamisajankohta suoraan verrannollinen lähtötilanteen mikrobikonsentraation kanssa

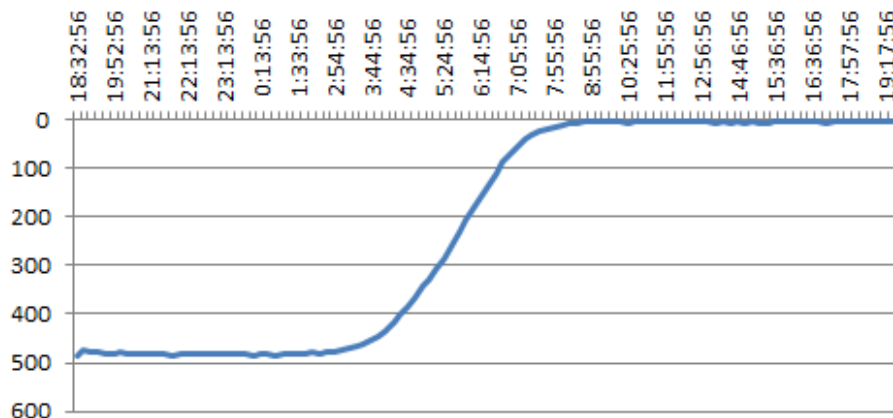
**E 627 lähtöpitoisuus 2800 cfu/100 ml
keltainen väri**



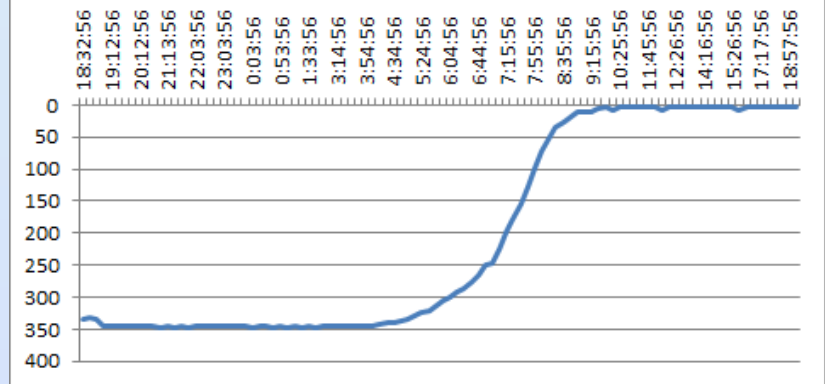
**E 648 lähtöpitoisuus 1500 cfu/ 100 ml
keltainen väri**



**E 631 lähtöpitoisuus 2900 cfu/100 ml
keltainen väri**



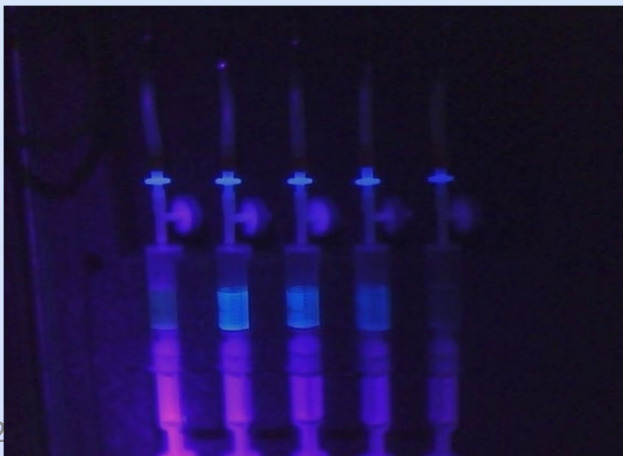
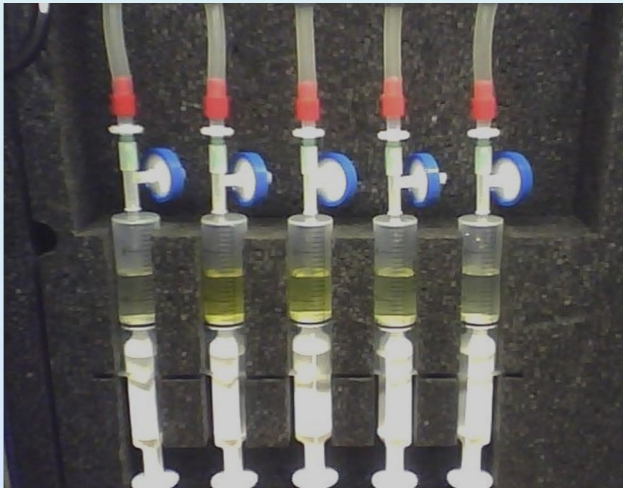
**JP1 lähtöpitoisuus 500 cfu/ 100 ml
keltainen väri**



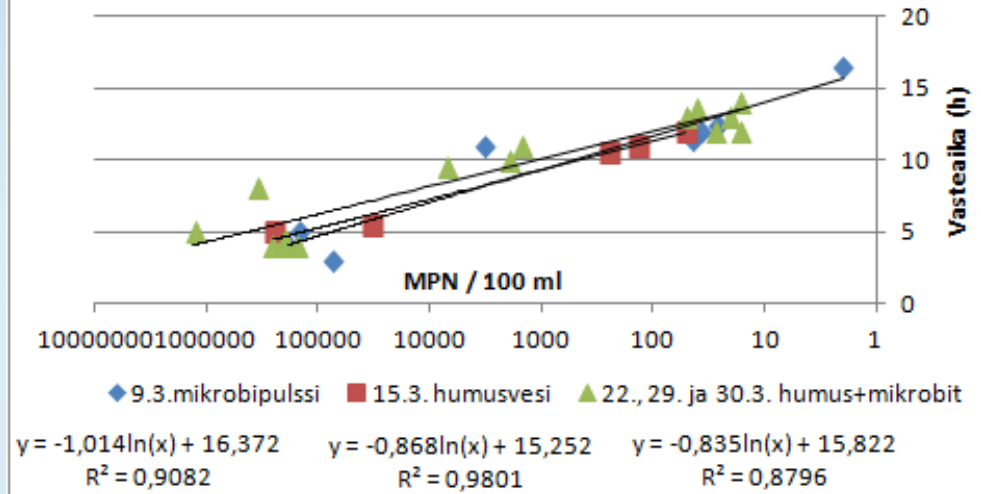
Kasvun toteamisajankohta suoraan verrannollinen
lähtötilanteen mikrobikonsentraation kanssa

VASTEAJAT PILOT-AJOISSA

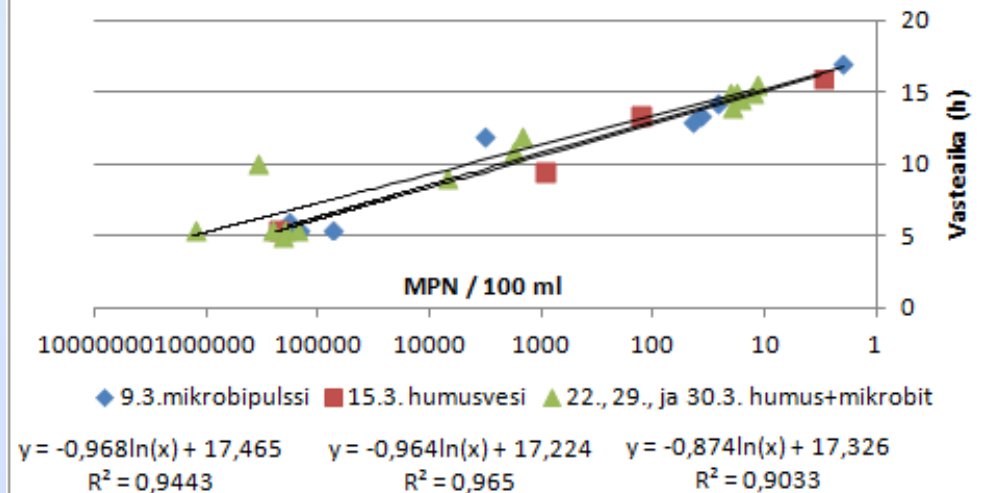
1-10 MPN/100 ml	15-18 tuntia
10-100 MPN/100 ml	13-14 tuntia
100-1000 MPN/100 ml	10-12 tuntia
1000-10 000 MPN/100 ml	alle 10 tuntia



Koliformiset bakteerit (n=28)



E. coli (n=27)



Online-mittauksessa huomioitavaa

- Sensorien valinta
 - valinta, lukumäärä ja sijoittelu riippuu käytettävissä olevista resursseista
- Hälytysrajat ja toimenpiteiden ennakointi
- Reaaliaikaisuuden hyödyntäminen, datan käsittely
 - Mittaustulosten seuraamisesta huolehdittava
 - Varattava aikaa, nimettävä vastuuhenkilöt
- Mittareiden huolto ja kalibrointi (referenssimittaukset)
 - mittareiden säännöllistä huolto tärkeää



Coliline PMEU -käyttökokemuksia

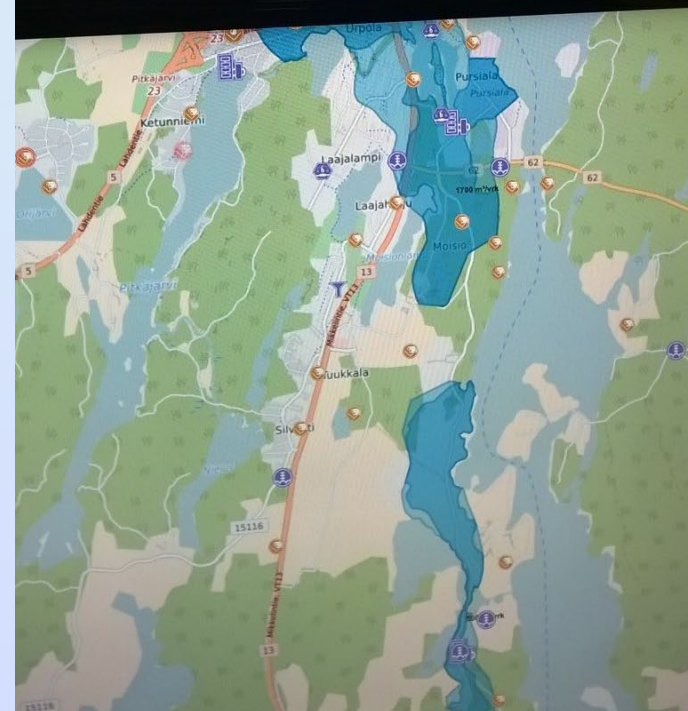
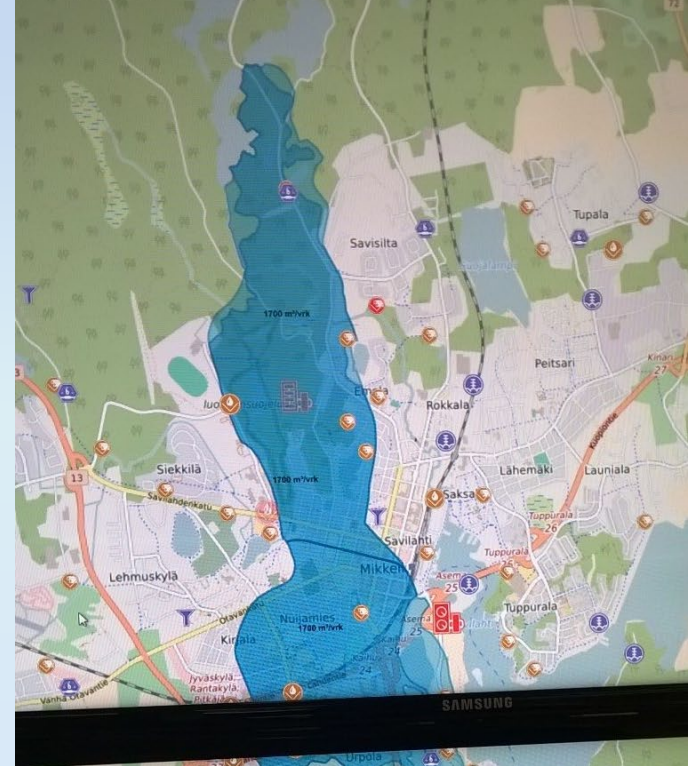
- Mikkelin Vesilaitoksella Coliline PMEU käytössä vesitorniin asennettuna
- Tässä vaiheessa näytteenotto viikon välein
- kasvatuksen etäseuranta verkkoyhteyden välityksellä
- Kasvutulokset sähköpostiin
- Mikäli bakteerikasvua ei todeta, huoltohenkilökunta käy vaihtamassa näytepullot 4 viikon välein
- Koulutus, huolto ja käyttäjätuki ulkoistettu

22.9.2021



Veden mikrobiologisen laadun etävalvonta

- Kasvukäyriä mahdollista seurata etänä tietokoneella tai älypuhelimella
- Hälytysrajan ylittyessä tulee automaattisesti hälytys valittuihin sähköpostiosoitteisiin
- Hälytyksen tullessa voidaan kasvukäyriä tarkastella ja tarvittaessa ohjelmoida uusintanäyte
- Hälytys voidaan liittää osaksi vesilaitoksen tilannekuvajärjestelmää
- kuvat Mikkelin Vesilaitokselta

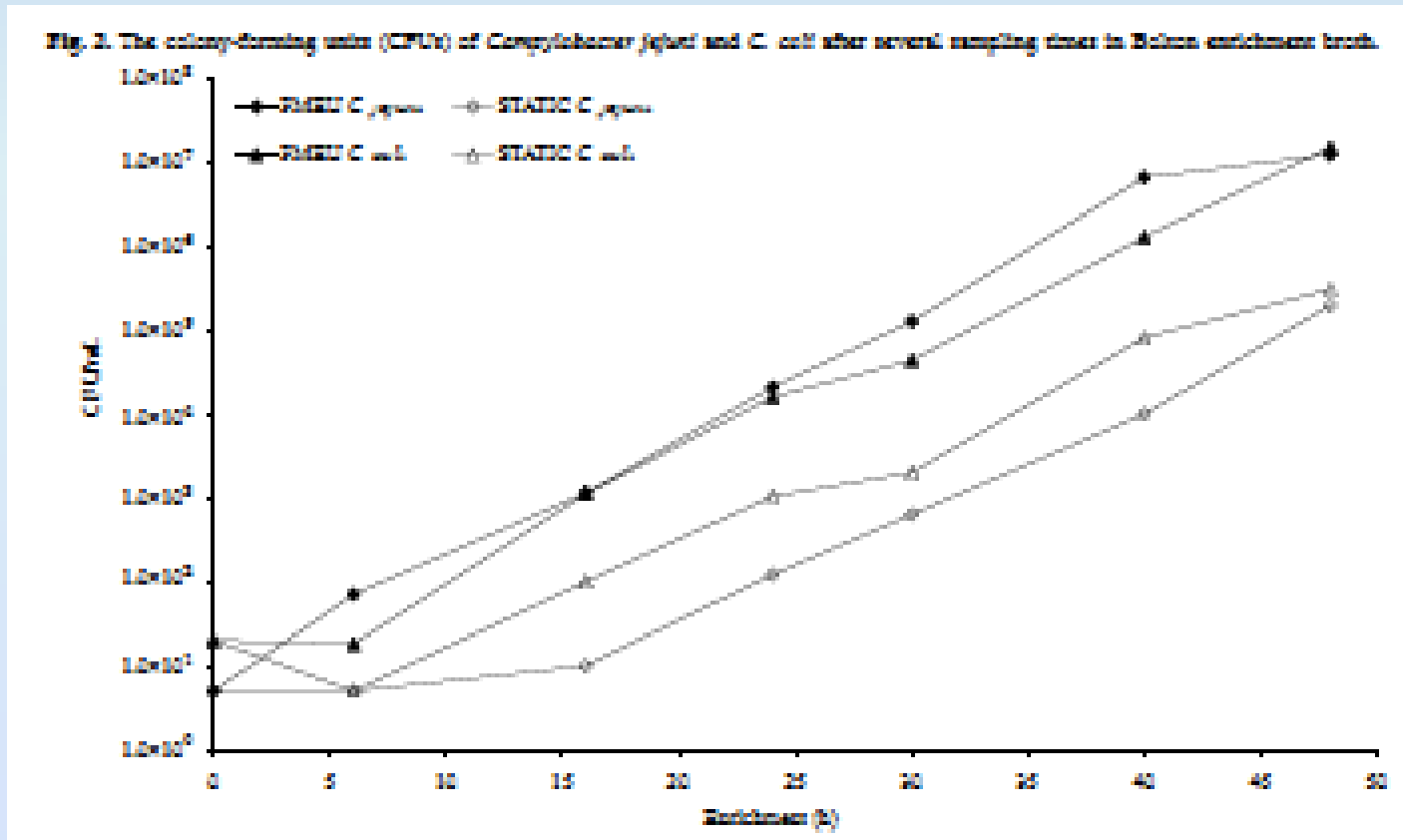


Vesilaitostarkkailun lisäksi PMEU-menetelmä sopii myös ympäristövalvontaan sekä **ympäristöstä aiheutuvien riskien havaitsemiseen vedenjakelussa**

“The magnificent interdependence of man, his microbes, and the environment emphasizes the high relevance of the microbiological surveillance systems in safeguarding our health as well as product or production hygiene. As a matter of fact, the current idea of screening solely some specific organisms, such as fecal coliforms or enterococci, as the indicators of the microbial condition of the environment, should be replaced by a more versatile view on the potential microbial indicators.”

Hakalehto E. 2015. Bacteriological indications of human activities in the ecosystems. In: Armon R. & Hänninen O. (eds.) *Environmental indicators*. Germany: Springer Verlag.

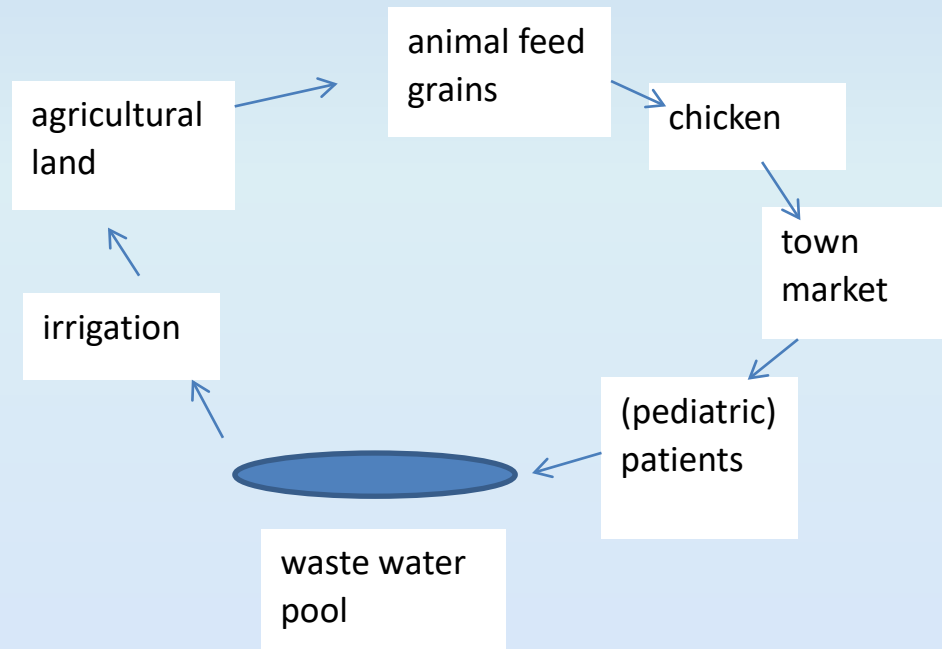
Kampylobakterien osoituksen nopeuttaminen



Pitkänen T, Bräcker J, Miettinen I, Heitto A, Pesola J & Hakalehto E. 2009. Enhanced enrichment and detection of thermotolerant *Campylobacter* species from water using the Portable Microbe Enrichment Unit (PMEU) and Real-time PCR. *Can J Microbiol*, 55: 849-858.

Raakavesilähteen tarkkailu Burkina Fasossa

kampylobakteerien genotyyppien distribuutio

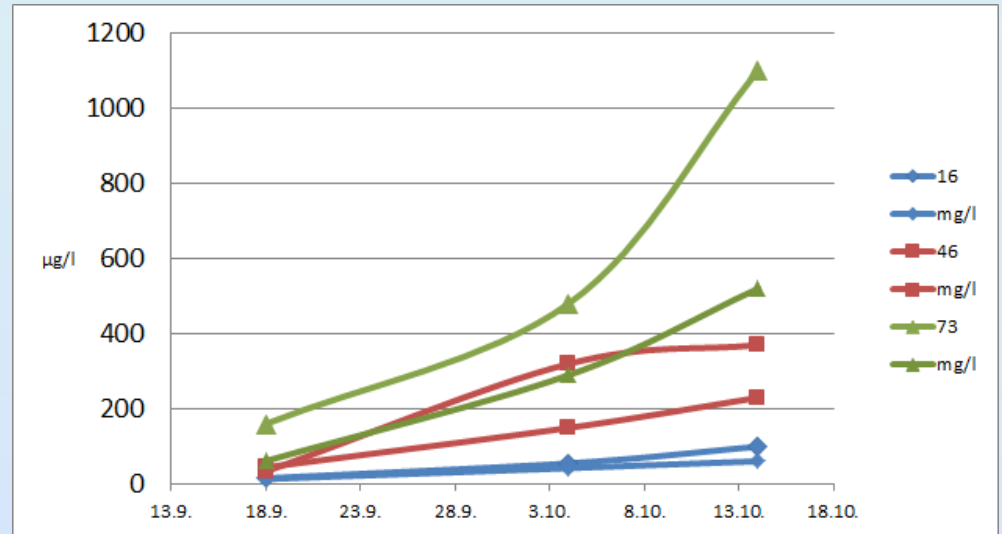
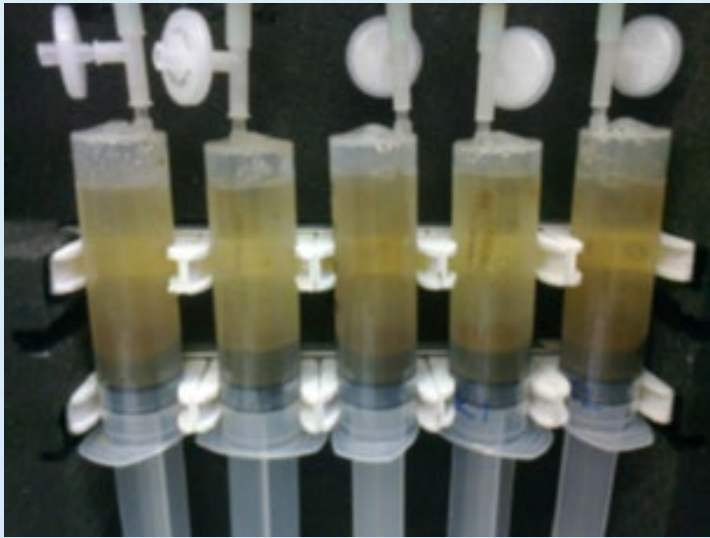


Hakalehto E. 2015. Hazards and prevention of food spoilage. In: Hakalehto E. (ed.) *Microbial Food Hygiene*. New York, NY, USA: Nova Science Publishers, Inc.

Hakalehto E, Nyholm O, Bonkougou IJO, Kagambega A, Rissanen K, Heitto A, Barro N & Haukka K. 2014. Development of microbiological field methodology for water and food-chain hygiene analysis of *Campylobacter* spp. and *Yersinia* spp. in Burkina Faso, West Africa. *Pathophysiology*, 21: 219-229.

PMEU ympäristötutkimuksissa

Fosfaatin vapautuminen sedimentistä eri sulfaattipitoisuuksilla



Heitto L, Heitto A, Torssonen J, Hakalehto E. 2015. Effect of sulphate concentration on phosphate mobilization from lake sediment - an experimental study. Poster Presentation in 21st International Conference on Environmental Indicators (ICEI 2015). Windsor, Canada.

Journal of Environmental Indicators, 9: 39-40.

Mycobacterium sp. *tunnistuksen nopeutus*

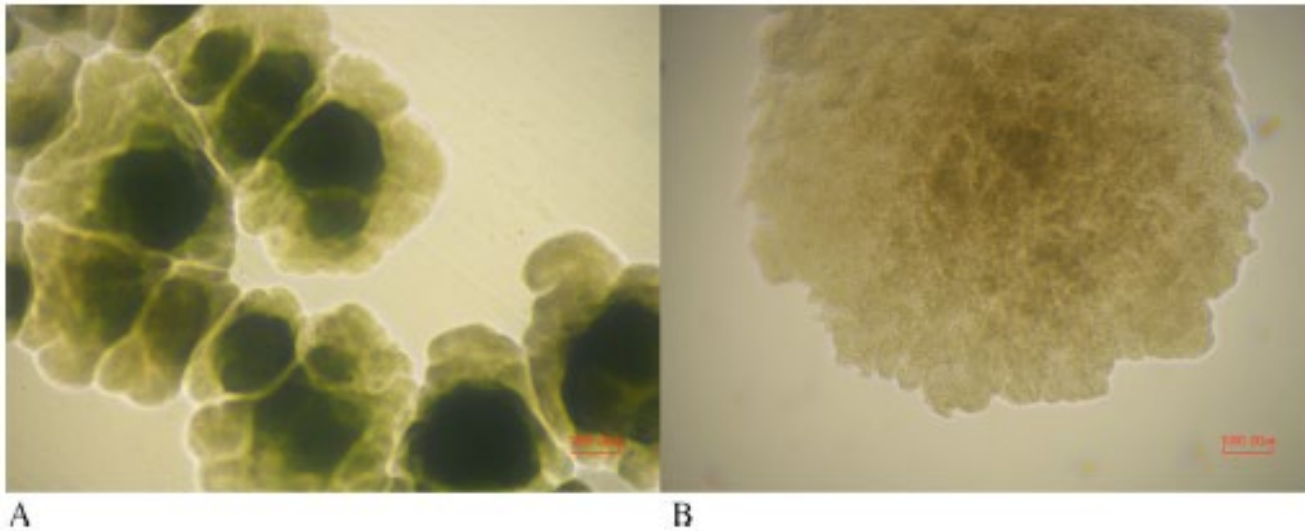


Fig. 3. (A and B) Close images of the mycobacterial colonies. On the left growth of *Mycobacterium* sp. E40 isolated from river water on CromAgar™ medium. On the right a colony of *M. marinum* strain ATCC 927 grown on M7H9 agar (1.25%).

Hakalehto E. 2013. Enhanced mycobacterial diagnostics in liquid medium by microaerobic bubble flow in Portable Microbe Enrichment Unit. *Pathophysiology* 20: 177–180.

Hakalehto E. 2013. Enhanced mycobacterial diagnostics in liquid medium by microaerobic bubble flow in Portable Microbe Enrichment Unit.
Pathophysiology 20: 177–180.

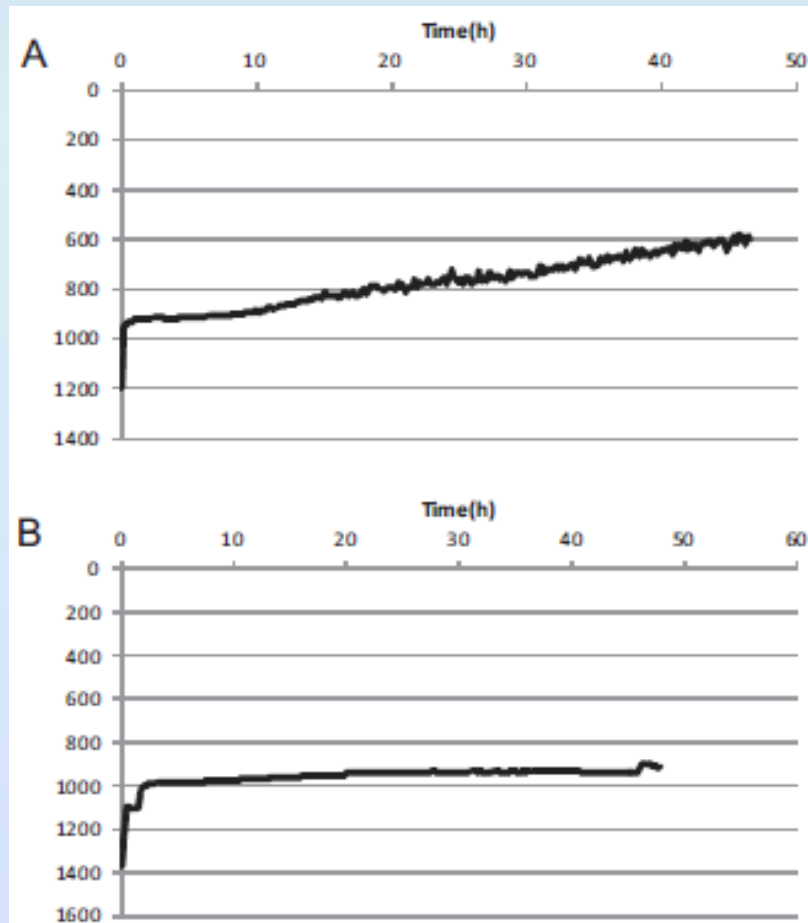
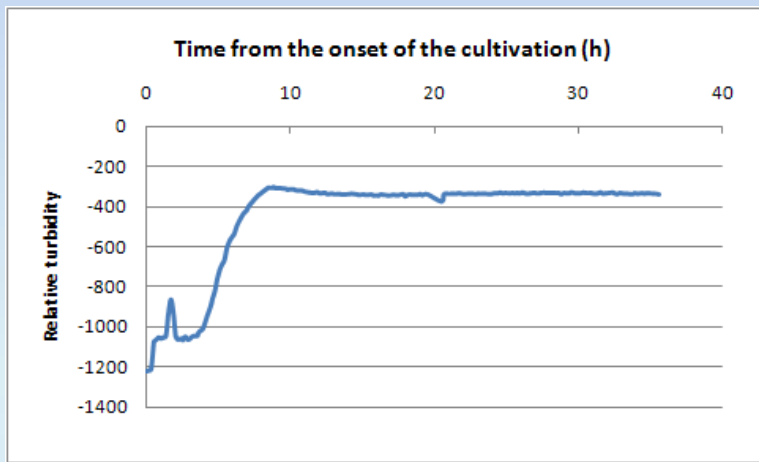


Fig. 1. Growth curves on *M. fortuitum* from PMEU Spectrion[®] analysis. The culture with gas bubble flow above (A), with static reference culture below (B). In the former one A case, the onset of growth was recorded in less than 12 h.

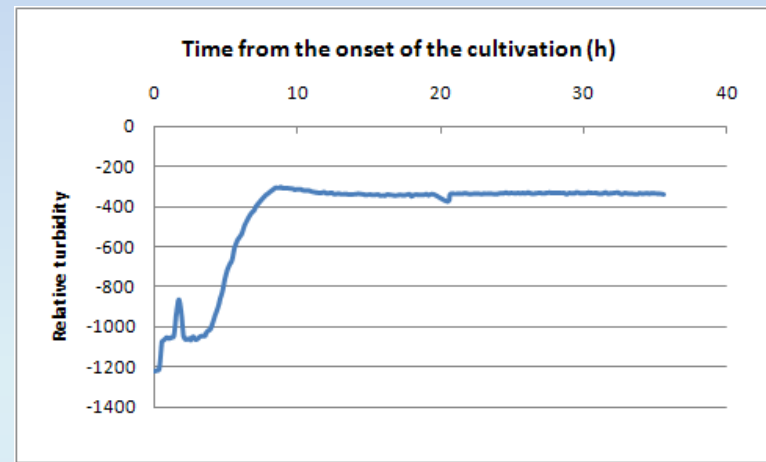
Muodostavatko vedenpuhdistamot riskin antibioottiresistenssin leviämiseksi?



a)



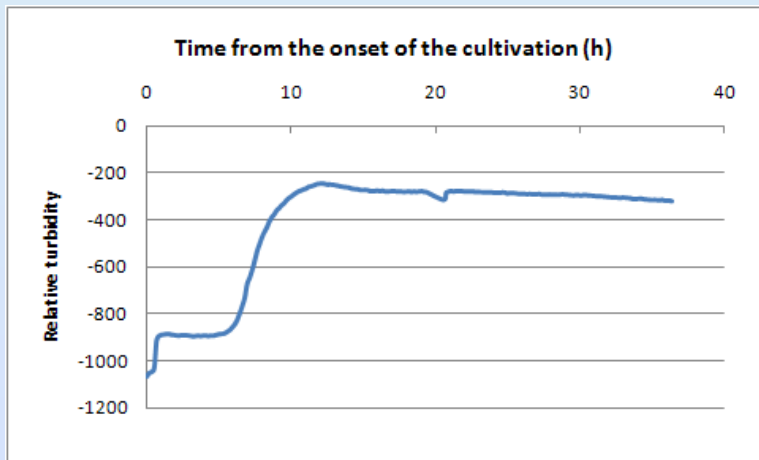
b)



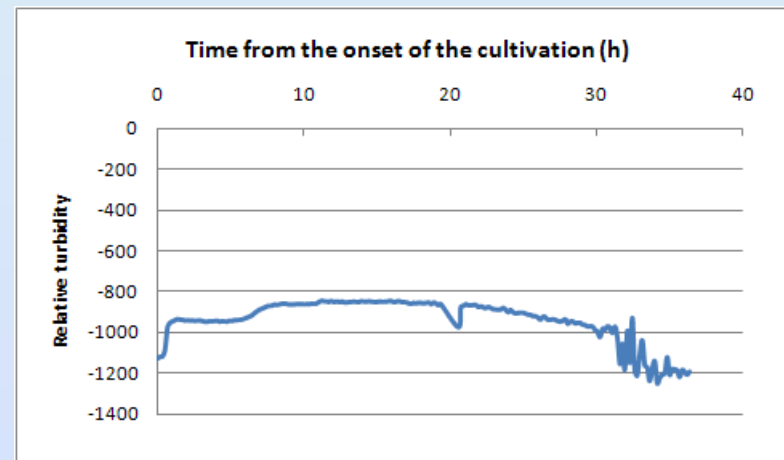
Growth of *Enterobacter cloacae* in the PMEU Spectrion® in TYG medium in presence of different antibiotics:

a) control (no antibiotic), b) penicillin G, c) cefuroxime, d) netilmicin.

c)



d)



Hakalehto, E. 2011. Antibiotic resistance traits of facultative *Enterobacter cloacae* strain studied with the PMEU (Portable Microbe Enrichment Unit). In: Antonio Méndez-Vilas (ed.) *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, Formatex Research Center, Badajoz, Spain: Microbiology Series N:o3. Vol. 2. pp.786-796.

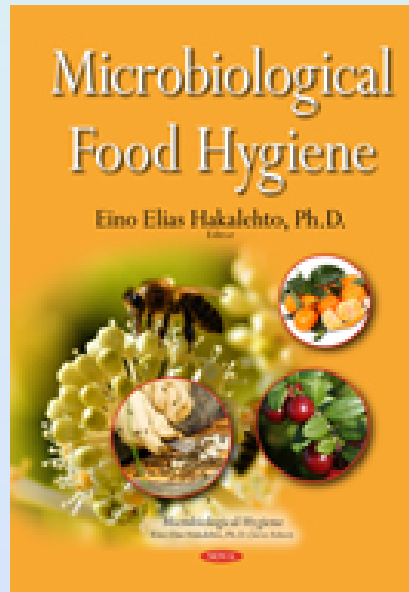
Microbiological Hygiene –kirjasarja

toim. Elias Hakalehto

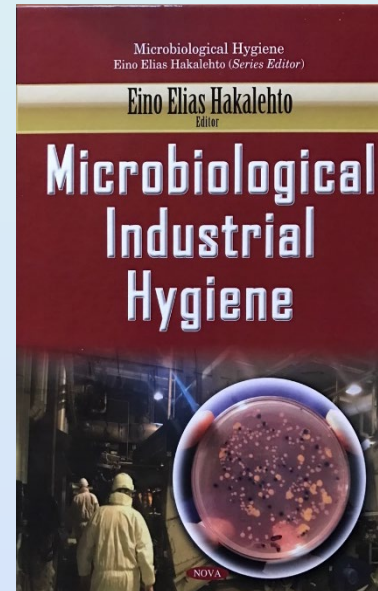
kustantaja: Nova Science Publisher Inc., New York, USA



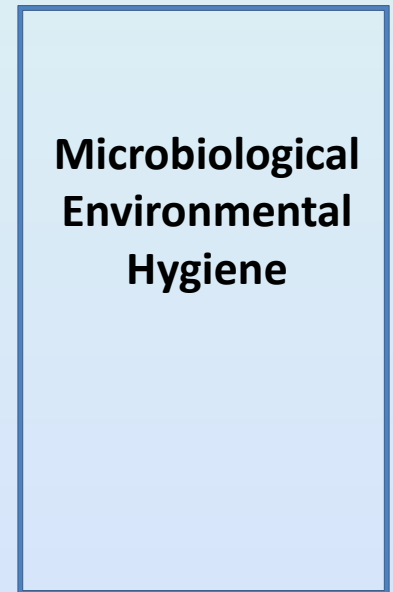
Tammikuu 2015



Joulukuu 2015



2016



2017

**AUTOMAATTINEN ETÄVALVONTA
ON KEINO VASTATA
VESIEN MIKROBITURVALLISUUDEN
JA
YMPÄRISTÖTERVEYDEN
HAASTEISIIN
NYT JA TULEVAISUUDESSA**

KIITOS!

