

VESIMIKROBIOLOGIAN MITTAUSTEKNIKOIDEN HAASTEET JA TULEVAISUUDEN NÄKYMÄT

Dos. Elias Hakalehto
Itä-Suomen yliopisto

MIKROBIOLOGISTEN VESITUTKIMUSTEN OSA-ALUEITA

LUONNON VEDET

- Järvet
- Joet
- Valumavedet
- Pohjavedet
- Märkä-laskeuma

JUOMA- JA TALOUSVEDET

- Vesijohtovedet
- Pullotetut vedet
- Vesiautomaatit
- Juomavesien varastointi

TEOLLISUUDEN KÄYTTÖVESI

- Elintarviketeollisuus
- Lääketeollisuus
- Kosmeettinen teollisuus
- Kemian teollisuus
- Metsäteollisuus
- Kalanviljely

TUOTTEESEEN TULEVA VESI VS. PESUVEDET YMS.

VIRKISTYS VEDET

- Uima-altaat
- Porealtaat
- Vesipuistot
- Uimalat

JÄTEVEDET

- Asumajäte-vedet
- Teollisuuden jätevedet
- Kaivostoiminnan jätevedet
- Sairaaloiden jätevedet
- Maatalouden kuormitus
- Hajakuormitus

INFEKTIOIDEN, EPIDEMIOIDEN JA LÄÄKEAINERESISTENTTIEN MIKROBIKANTOJEN LEVIÄMINEN ON ESTETTÄVÄ

STANDARDIEN KEHITTYMINEN VESIMIKROBIOLOGIASSA

Vesimikrobiologian (ISO/TC 147/SC4) alan standardien valmistelusta ja ajan tasalla pitämisestä vastaa Terveyden ja hyvinvoinnin laitos (Suomen Ympäristökeskus SYKE. Ympäristöalan menetelmästandardisointi. Toimintakertomus 2009.)

Sosiaali- ja terveydenhuollon hallinnonalan laboratoriotoiminta perustuu pääosaltaan joko kansallisiin lakeihin ja asetuksiin tai kansainvälisiin sopimuksiin, jotka on täytettävä (Sosiaali- ja terveydenhuollon hallinnonalan laboratoriotoimintaa selvittävän työryhmän raportti. STM 31.10.2008).

UHKAT OVAT MONIPUOLISIA, UUSIA MENETELMIÄ TARVITAAN !

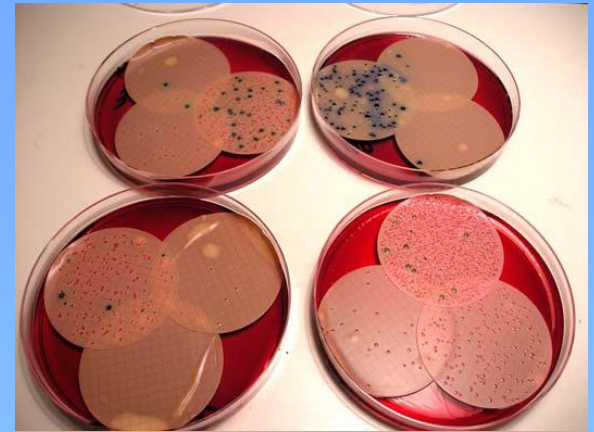
- EPIDEMIAIT, KAUKOKULKEUTUMINEN
- VESIJOHTOVERKOSTOJEN SAASTUMINEN
- UUDET PATOGEENIT, LÄÄKEAINERESISTENSSI

INDIKAATTORIBAKTEERIT

- ovat bakteereita, joita löytyy saastuneista vesistä hyvin erilaisten kuormituslähteiden alapuolelta
- niitä on helppo rikastaa, viljellä, laskea ja käsitellä

Koliformit ja **enterokokit** ovat ihmisten ja lämminveristen eläinten suolistobakteereja. Niitä käytetään yleisesti ulosteperäisen saastutuksen osoittajina. Indikaattoribakteereja löytyy luonnosta myös ympäristöistä, joissa ei ole ulosteperäistä saastumista. Tällöin tarvitaan kehittynyttä analytiikkaa kontaminaatiolähteen arvioimiseen.

PMEU-tekniikka auttaa löytämään indikaattoribakteerit näytteistä, joissa bakteereja on vähän tai joissa bakteerit ovat huonokuntoisia. Se on myös yksi apukeino mikrobien alkuperän selvittämisessä ("source-tracking").



INDIKAATTORIBAKTEERIEIN KÄYTTÖ

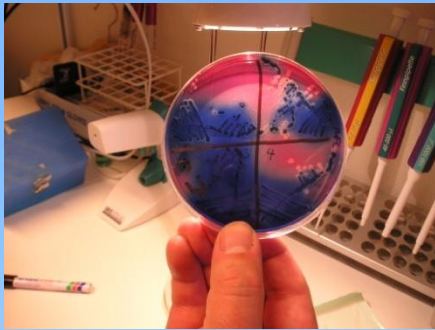
- *Eschericia coli*
- ENTEROKOKIT
- KOKONAISKOLIFORMIT
- *Pseudomonas aeruginosa, Clostridium perfringens*

HETEROTROFINEN KOKONAISPESÄKELUKU

PATOGEENIEN (TAUDINAIHEUTTAJAT) OSOITUS

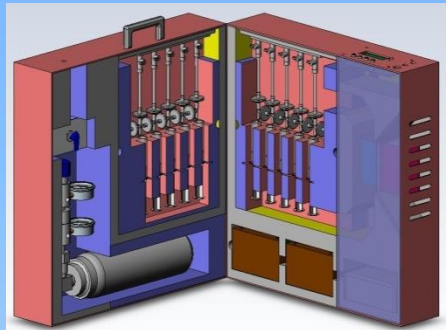
- *Salmonella*
- *Campylobacter*
- VIROLOGISET ANALYYSIT

PERINTEISET VILJELYMENETELMÄT

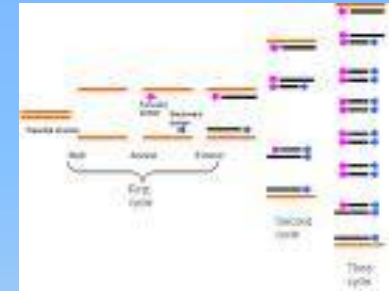


- kalvosuodatus
- maljaviljelyt
- MPN "most probable number" liemiputket
- Colilert™

KIIHDYTETTY RIKASTUSVILJELY (PMEU)



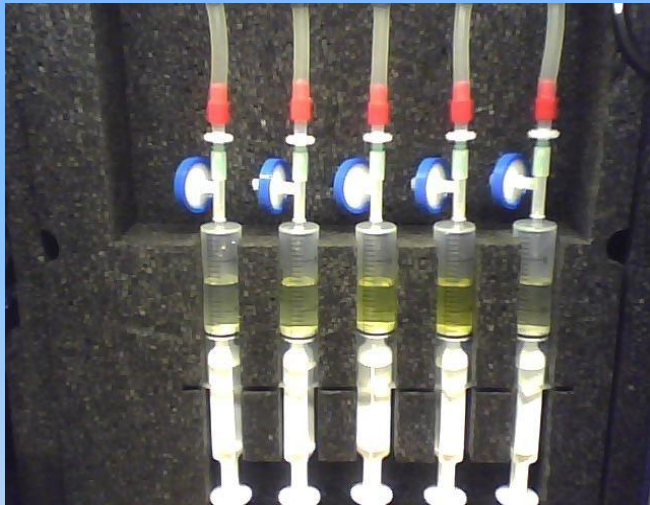
MOLEKYYYLI- BIOLOGIAN MENETELMÄT



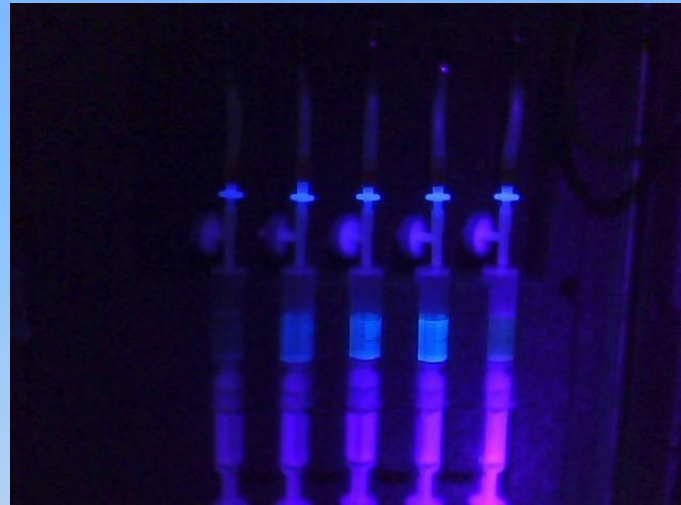
- immunoassayt
- PCR
- bioanturit, sirut

VESIHYGIENIAN TESTAUSMENETELMÄT

PMEU RIKASTUSMENETELMÄN JA COLILERT™ LIEMEN YHDISTETTY KÄYTTÖ

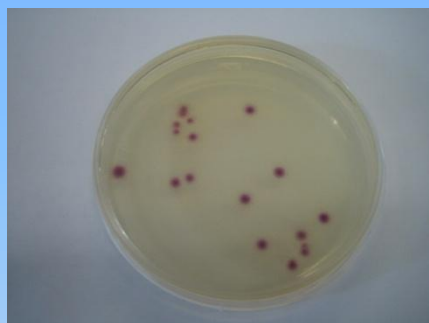


***E.coli* ruiskut rikastumassa Colilert™-liemessä (keltainen väri osoittaa koliformit)**

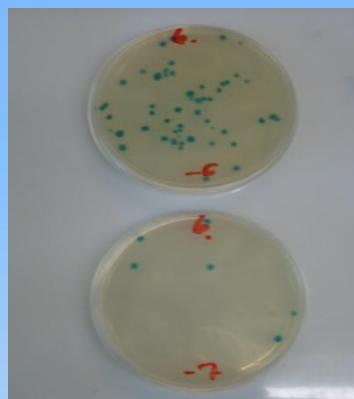


***E.coli* ruiskujen fluoresointi UV-valossa Colilert™-liemessä (fluoresenssi spesifinen *E. coli*lle)**

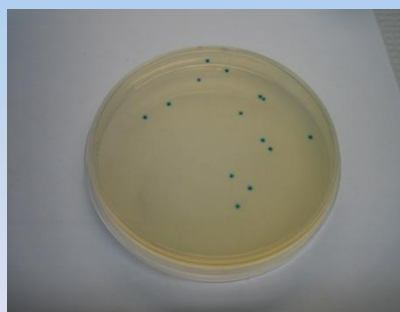
KROMOGEENISET RAVINTOALUSTAT (ChromAGAR™ plates, Becton Dickinson Inc (Invented by Alain Rambach)) OVAT YKSI MAHDOLLISUUS NOPEASSA TUNNISTUKSESSA



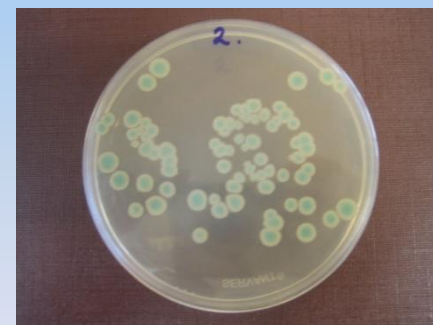
E.coli



Klebsiella mobilis



Enterococcus sp.

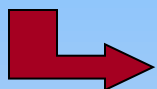


Bacillus cereus

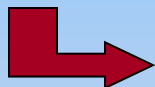
MIKROBIMÄÄRITYSKETJU ON PROSESSI



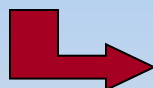
**NÄYTTEEN-
OTTO**



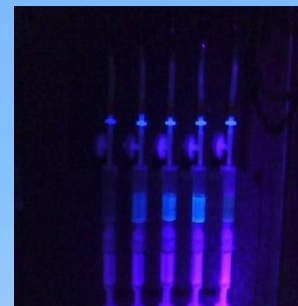
**KULJETUS +
(ESIRIKASTUS)**



**RIKASTUS-
VILJELY**



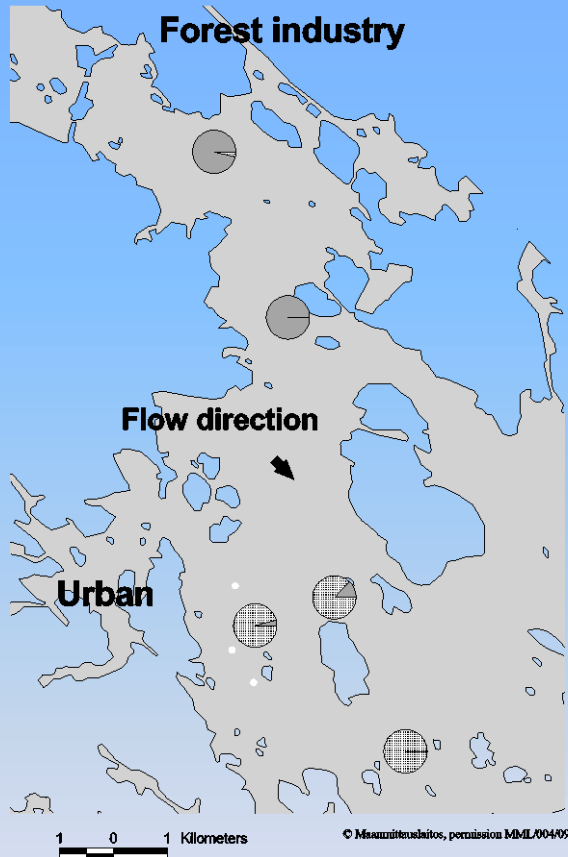
**OSOITUS-
REAKTIO**



ANALYYSI



HAJAUTETTU (ETÄ)VALVONTA, KESKITETYT TULOKSET



	Total plate count cfu/100 ml			coliformic bacteria cfu/100 ml			<i>E.coli</i> cfu/100 ml		
	1 day	2 days	6 days	1 day	3 days	5 days	1 day	3 days	5 days
Sample point 1	0	2000	6000	0	0	0	0	0	0
Sample point 2	0	full	full	0	0	0	0	0	0
Sample point 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sample point 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sample point 5	0	10 000	10 000	0	0	0	0	0	0
Sample point 6	0	0	10 000	0	1000	1000	0	0	0
Sample point 7	0	4000	4000	0	20	20	0	0	0
Raw water	0	0	0	0	20	0	0	0	0
Lake water	full	full	full	full	full	full	full	full	full
Purified water	0	0	0	0	40	0	0	0	0

Vesijohtoverkoston bakteerikartoitus eri näytepisteistä
(Hakalehto et al. 2010)

Enterokokkityyppien osuus järvinäytteissä
(Heitto et al. 2009)

POLARIS – Vedenlaadun kokonaisjärjestelmän kehittäminen

- Lähtökohta: Nykyiset vedenlaadun mittausjärjestelmät eivät kykene havaitsemaan pohjavesien likaantumista. Valtaosassa vesiepidemioista juomaveden likaantuminen paljastuu vasta ensimmäisten sairastapausten tultua ilmi.
- Toteutus: Hankkeessa raakavesien riskien hallintaan sovelletaan riskinarviointia, on-line-mittaustekniikkaa, tehokasta mallinnuksen tukemaa tilannekuvaa ja prosessioptimointia.
- Toteutuksessa mukana kuusi suomalaista alalla toimivaa tutkimuslaitosta, Vesi- ja viemärilaitosyhdistys, 13 alalla toimivaa yritystä sekä kolme suomalaista vesilaitosta.

PMEU-teknologia POLARIS-hankkeessa

- Näytteen rikastaminen PMEU-laitteella, mikä tehostaa ja nopeuttaa bakteerien havaitsemista
- Colilert™ -liemialustan käyttö nopeutetussa koliformien ja *E.coli*:n osoituksessa PMEU-laitteessa
- Bakteerin kasvu on seurattavissa reaaliaikaisesti Internetissä
- Ympäristöstressistä kärsineiden hygienia-indikaattorien ja heterotrofien elpyminen

PMEU Spectrion®



Tiedon päivitys
10 min välein



Polariksen palvelin



Internet



PMEU-teknologia POLARIS-hankkeessa



PMEU Tent



PMEU Tent w/net connection



PMEU toiminnassa Polaris-hankkeen vesilaitostesteissä. Ravintoalustana Colilert TM. Verrokkianalyysit perinteisellä menetelmällä suoritettiin THL:n Vesi- ja terveysyksikön Kuopion laboratoriossa. PMEU:n antamat tulokset ovat olleet hankkeessa mukanaolevien seurattavissa internetin välityksellä reaaliaikaisesti (kasvukäyrät). Polaris - hankkeen jatkon yhteydessä tavoitteena on testata Samplion Oy:n ASCS -järjestelmää (Automated Sample Collection System) vesilaitosympäristössä sekä vesijohtoverkostossa. Valokuva Kevin King.

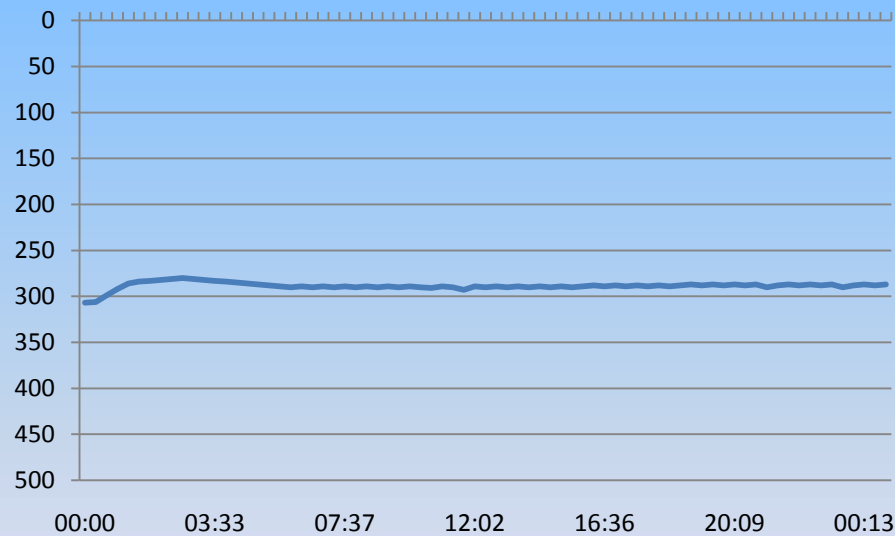
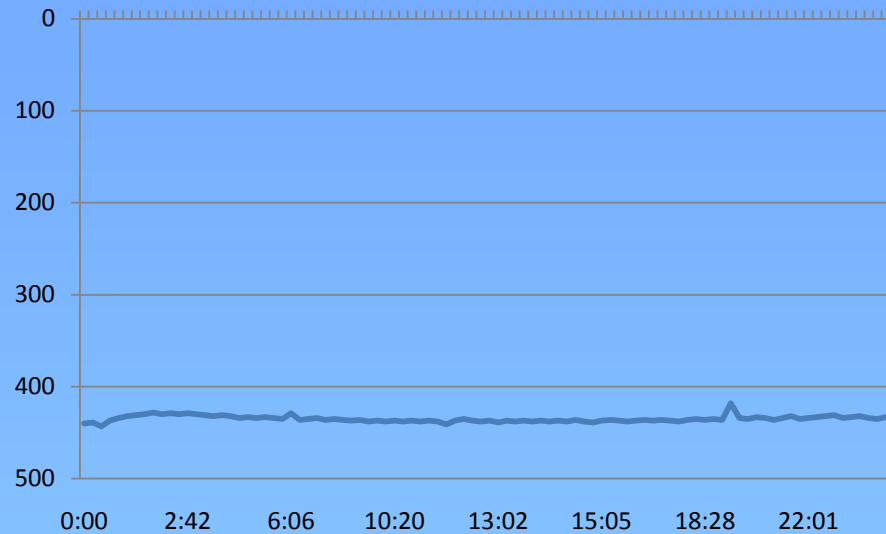
PMEU-teknologia POLARIS-hankkeessa



E.coli:n tunnistus UV-valolla Colilert™ -alustalla

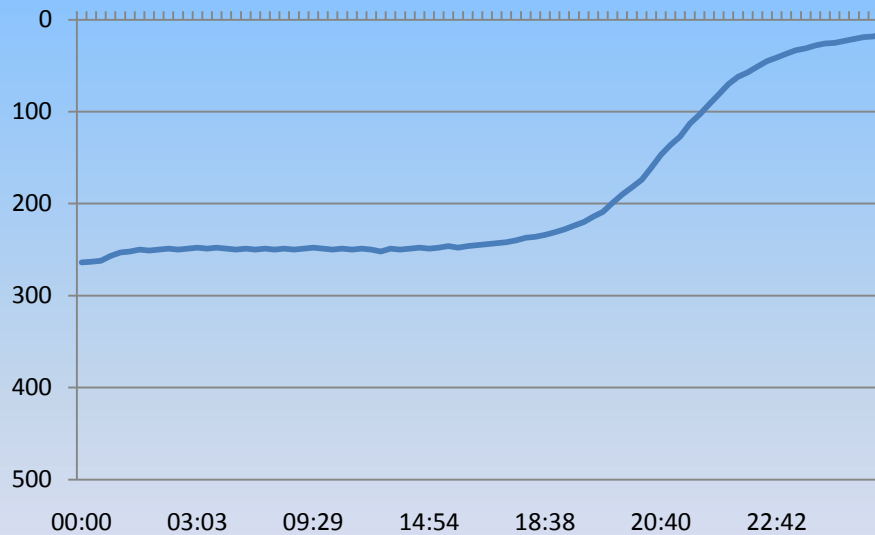
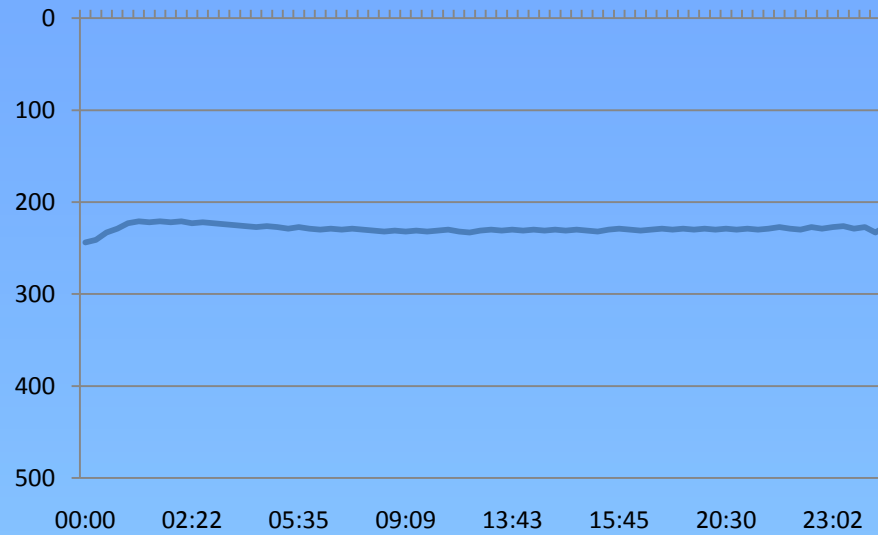
Seuraavissa käyrissä alustavia tuloksia Polaris-hankkeen kenttäkokeista.

25.5.2010



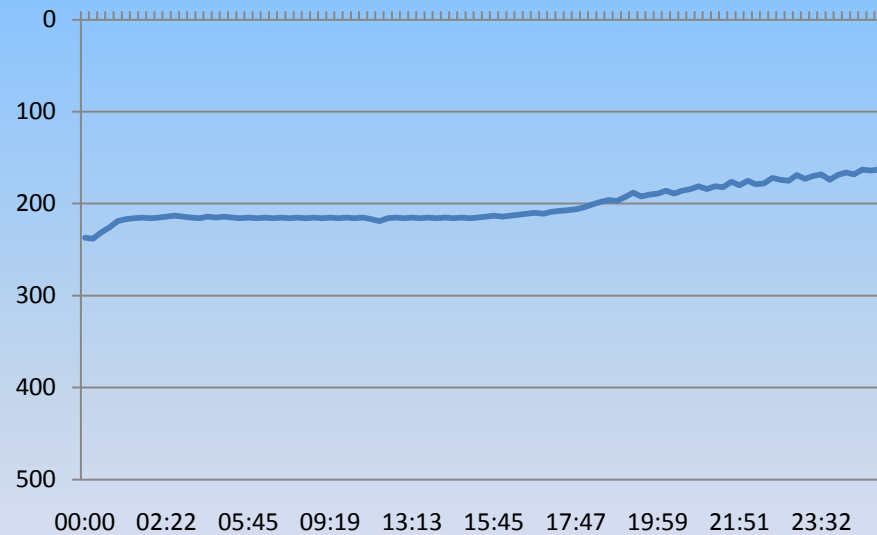
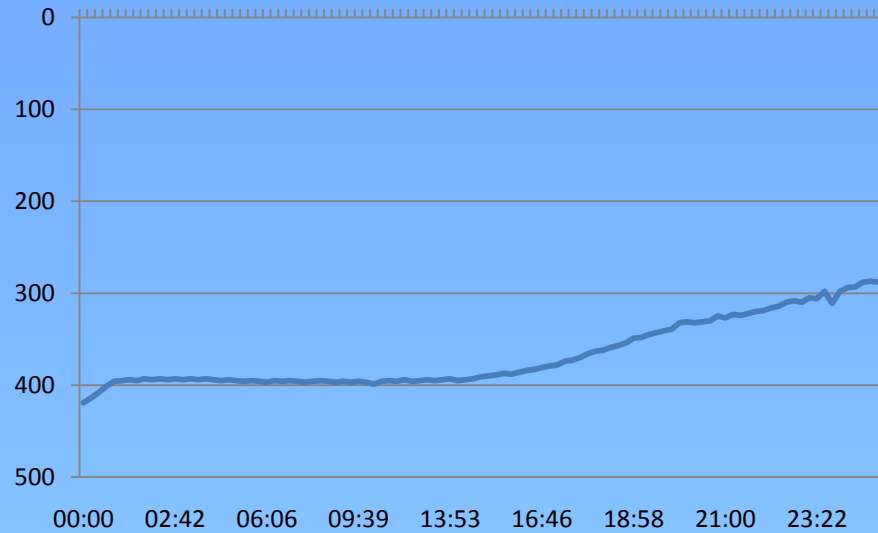
Pohjavesikaivo A, näytetilavuus 100 ml jaettuna kahteen ruiskuun.
Esimerkki puhtaasta vesinäytteestä, ei kasvua 24 t

25.5.2010



Pohjavesikaivo B, näytetilavuus 100 ml jaettuna kahteen ruiskuun. Toisessa kasvua alle 20 tunnissa, lähtöpitoisuus n 1 kpl/100 ml.

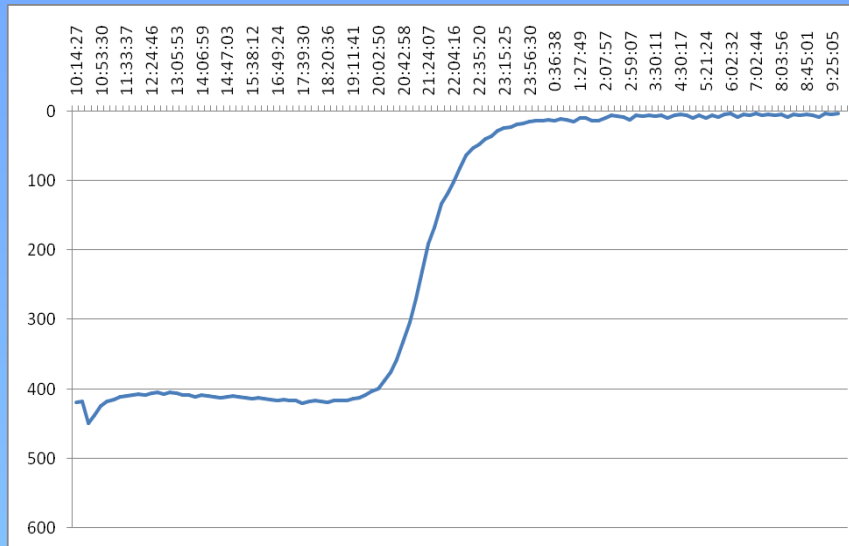
25.5.2010



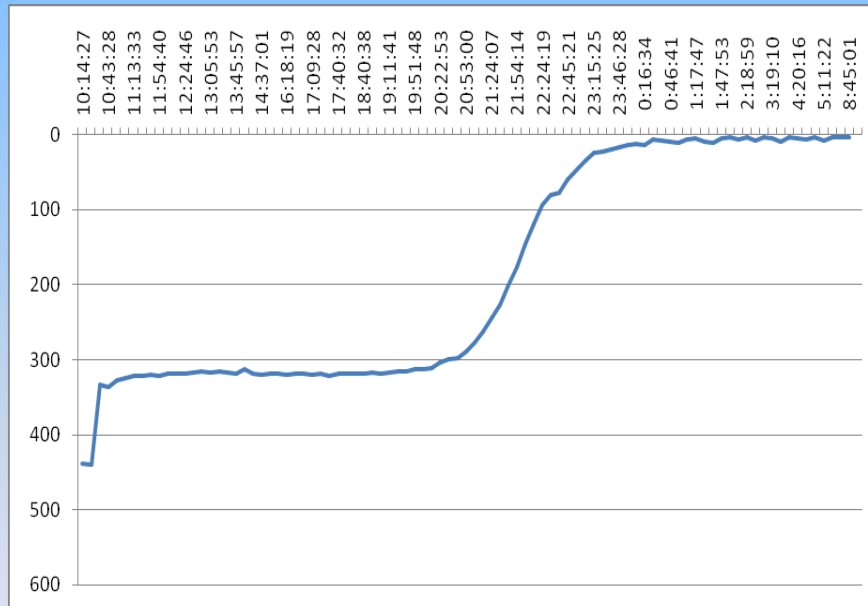
Pohjavesikaivo C, näytetilavuus 100 ml jaettuna kahteen ruiskuun. Epätuypillinen kasvu alkaen n 14-16 tunnin kuluttua kasvatuksen alusta

1.6.2010

Ruisku 9



Ruisku 10

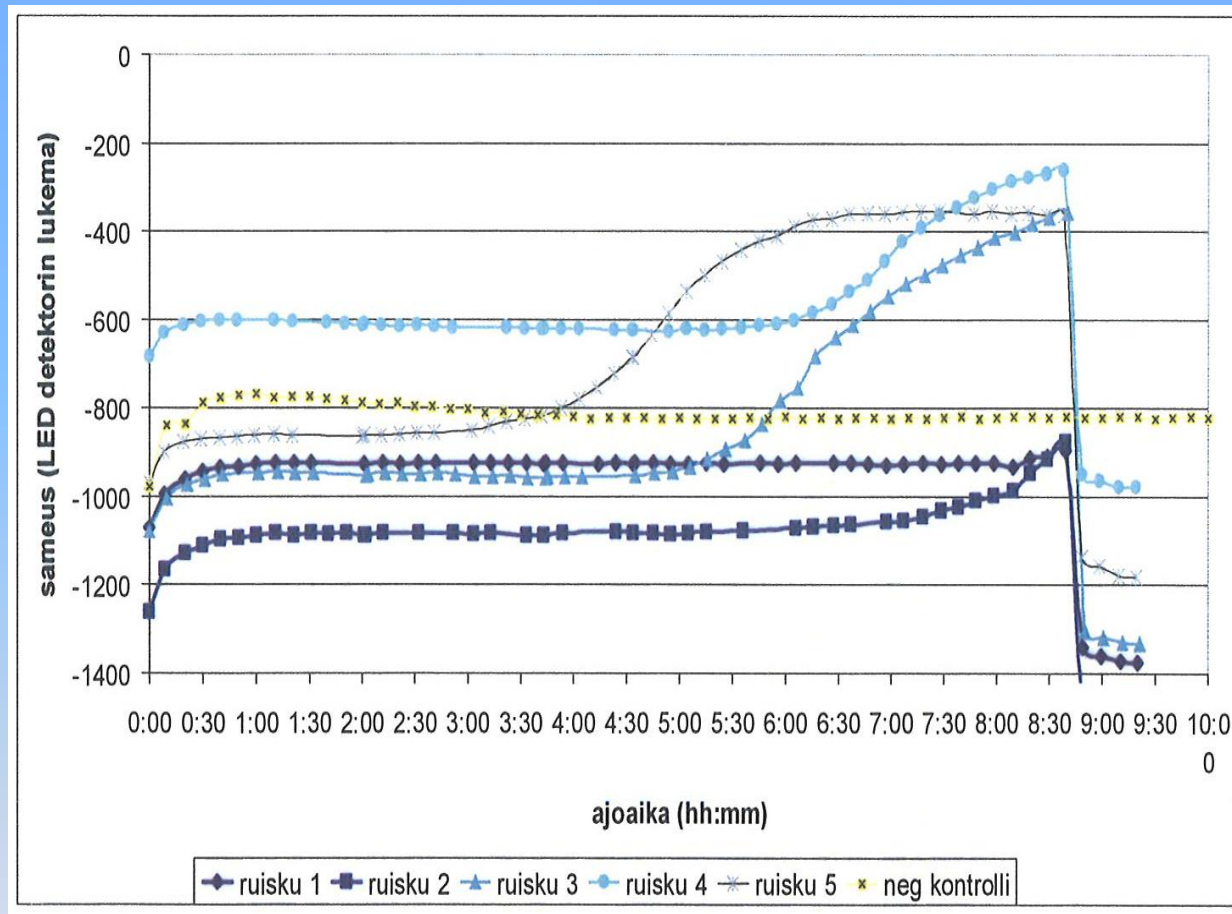


Mikrobikasvua rinnakkaisissa järvivesinäytteissä n 10 tunnin kuluttua kasvatuksen alusta

Dos. Elias Hakalehto, Itä-Suomen yliopisto
"Veden Vaarat", Tampere 25.-26.8.2010

Escherichia coli – VALIDOINTIKASVATUKSET PMEU SPECTRIONISSA

SALO, S. & WIRTANEN, G. (2010). VTT. PL 1000 02044 VTT

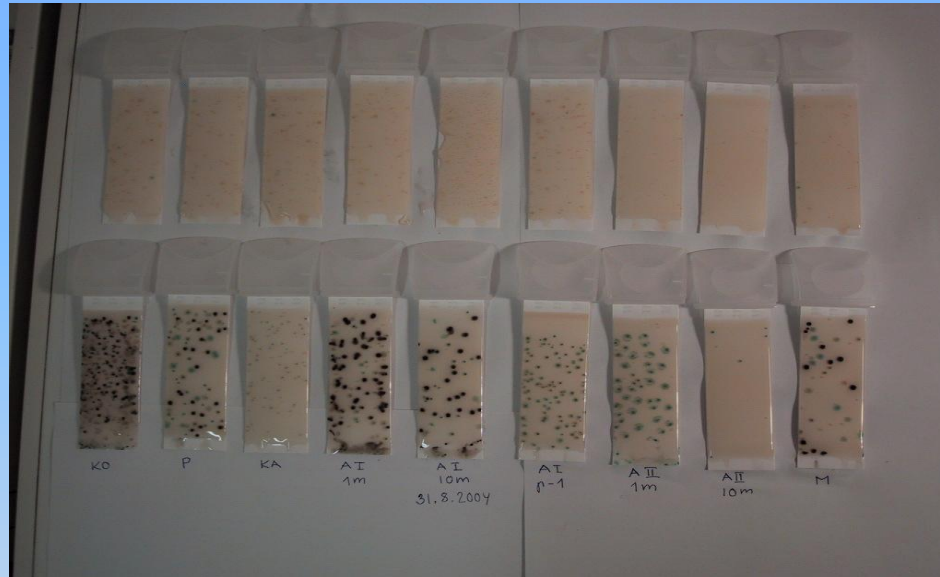


37°C:ssa ajoissa ruiskuihin numero 5 laitettiin kasvatuksen aloitusvaiheessa vahvinta näytelaimennosta, jolloin ruiskuissa oli 10^5 mikrobia/ml ja ajon lopussa mikrobipitoisuus näissä ruiskuissa oli 10^8 mikrobia/ml ja ruiskuihin numero 1 laitettiin kasvatuksen aloitusvaiheessa laimeinta näytelaimennosta, jolloin ruiskuissa oli 2-4 mikrobia/ml ja ajon lopussa mikrobipitoisuus näissä ruiskuissa oli 10^6 mikrobia/ml.

***Campylobacter coli* - KASVATUKSET PMEU- MENETELMÄLLÄ (FINNOFLAG Oy:n laboratorio, 2005)**

- **Kampylobakteerimääriä PMEU:lla vuodelta 2005
(*Campylobacter coli*)**
- **Ylin käyrä osoittaa rikastusviljelyn tuloksen, jossa bakteeripitoisuus oli kasvatuksen lopussa jopa 100 miljardia yksikköä millilitrassa**
- **PMEU-menetelmän tuloksen saantia nopeuttava vaikutus myös nähtävissä**
- **Näiden esikokeiden perusteella tehtiin vesien kampylobakteerien määrittäminen menetelmän validointi yhdessä THL:n (ent.KTL) kanssa**
- **Tämän tieteellisen tutkimustyön tulokset on raportoitu v.2009 Canadian Journal of Microbiology -julkaisusarjassa.**

Puunjalostusteollisuuden jätevesien leviämisen seuranta bakteerien avulla



Ylempi rivi: Viljelymenetelmä (48 t) ilman
esirikastusta

Alempi rivi: PMEU esirikastus 6 t+ 24 t
viljely DryCult™ –alustalla (Orion
Diagnostica)

VESIMIKROBIOLOGIAN MITTAUSTEKNIIKAN HAASTEET

- NÄYTTEENOTON KEHITTÄMINEN SEKÄ JATKUVAAN SEURANTAAN (ASCS) ETTÄ TAVALLISEEN VALVONTANÄYTTEENOTTOON
- YHDISTETTY INDIKAATTORIBAKTEERIEN, PATOGEENIEN JA HETEROTROFISEN KUORMITUKSEN OSOITTAMINEN
- VEDENLAADUN ETÄSEURANTA JA NOPEAN VAROITUSJÄRJESTELMÄN ("EARLY-WARNING") KEHITTÄMINEN
- UUSIEN UHKIEN (ML. ANTIBIOOTTIRESISTENTIT BAKTEERIT) IDENTIFIOINTI
- KUORMITUKSEN ALKUPERÄN SELVITTÄMINEN ("SOURCE-TRACKING")
- YMPÄRISTÖSTRESSISTÄ KÄRSINEIDEN JA PIENTEN SOLUMÄÄRIEN HAVAITSEMINEN
- JATKUVA MENETELMIEN KEHITYS ON VÄLTTÄMÄTÖN

BIOLOGISESSA MONITOROINNISSA YKSIKIN SOLU, ITIÖ TAI VIRUSPARTIKKELI ON POTENTIAALINEN UHKA

Kirjallisuus

Hakalehto, E. 2010. Hygiene monitoring with the Portable Microbe Enrichment Unit (PMEU). 41st R³ –Nordic Symposium. Cleanroom technology, contamination control and cleaning. Espoo Finland. May 2010. VTT Publications 266.

Hakalehto, E., Pesola, J., Heitto, L., Närvänen, A. and Heitto, A. 2007. Aerobic and anaerobic growth modes and expression of type 1 fimbriae in *Salmonella*, *Pathophysiology* 14(1): 61-69.

Hakalehto, E., Pesola, J., Heitto, A., Bhanj Deo, B., Rissanen, K., Sankilampi, U., Humpi, T. and Paakkanen, H. 2009. Fast detection of bacterial growth by using portable microbe enrichment unit (PMEU) and ChemPro100i® gas sensor, *Pathophysiology* 16 (1): 57-62.

Hakalehto, E., Heitto, A., Heitto, L., Humpi, T., Rissanen, K., Jääskeläinen, A., Paakkanen, H. and Hänninen, O. 2010. Monitoring of water distribution system with portable PMEU enrichment unit- Measurement of volatile compounds of coliformic indicator bacteria and *Salmonella* sp. Manuscript in preparation.

Heitto, L., Heitto, A. & Hakalehto, E. 2009. Tracing waste waters with faecal enterococci. Posterisitys European Large Lakes Symposium, Norrtälje 2009.

Pitkänen, T., Bräcker, J., Miettinen, I.T., Heitto, A., Pesola, J. and Hakalehto, E. 2009. Enhanced enrichment and detection of thermotolerant *Campylobacter* species from water using the Portable Microbe Enrichment Unit (PMEU) and realtime PCR. *Canadian Journal of Microbiology*: 55 (7): 849-858.

Wirtanen, G. and Salo, S. 2010. PMEU-laitteen validointi koliformeilla. (Report VTT-S-01705-10) VTT Expert Services Oy, Espoo, Finland