



Ympäristöterveyden osasto  
Vesi ja terveys -yksikkö

## Testausmenetelmät vesinäytteille Vesi ja terveys -yksikössä

Vesi ja terveys -yksikkö on FINAS-akkreditointipalvelun talousvesien mikrobiologiseen testaamiseen akkreditoima testauslaboratorio T077. Laboratorion pätevyysalue on nähtävissä FINAS-akkreditointipalvelun www-sivuilta: [www.finas.fi](http://www.finas.fi).



## Taudinaiheuttajamikrobimenetelmät

### Bakteerit

#### Vesinäytteen kamylobakteeritutkimus

Termofiiliset kamylobakteerit määritetään standardin ISO 17995:2005 Water quality - Detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* sp. mukaisesti. Näytteet suodatetaan 0,45µm:n kalvoille. Tutkittu tilavuus/näyte on yleensä 4 litraa. Menetelmä on akkreditoitu pätevyysalueella talousvesi.

Raakavesi- ja uimavesinäytteitä inkuboidaan Bolton- ja Preston-rikasteliemissä mikroaerofiilisesti +37 °C, 48 h ja jätevesinäytteitä Preston-rikasteliemissä mikroaerofiilisesti +42 °C, 24 h. Rikasteliemiä viljellään mCCDA-alustoille mikroaerofiilisesti +42 °C, 48 h kamylobakteerien havaitsemiseksi. Menetelmää ei ole akkreditoitu näille matriiseille.

#### Kamylobakteerin identifiointi

Kamylobakteeritulos ja *C. jejuni* -tunnistus voidaan varmistaa sekä alustava muiden kamylobakteerien tunnistus tehdä PCR-pohjaisella REA -analyysillä. Menetelmässä termofiilisille kamylobakteereille ominaista DNA-sekvenssiä monistetaan tutkittavan bakteerikannan puhdasviljelmästä polymeerasiketjureaktion avulla. Mikäli oikean kokoinen tuote monistuu, sitä pilkotaan kahdella restriktioentsyymillä. Alustava lajitunnistus saadaan, kun tutkitun kannan PCR-tuotteen pilkkoutumistuotteiden kokoja verrataan tunnettujen kantojen vastaaviin pilkkoutumistuotteisiin agarosigeelielektroforeesin avulla. Lajitunnistusta ei ole akkreditoitu.

#### Salmonella

Salmonellojen toteaminen vesinäytteistä perustuu standardiin ISO 19259:2010. Menetelmässä salmonellat konsentroidaan kalvosuodatusmenetelmällä ja kalvo siirretään esirikasteeseen. Inkuboinnin jälkeen esirikastetta siirrostetaan selektiivisiin rikasteliemiin, joita inkuboinnin jälkeen viljellään erotteleville kiinteille kasvualustoille. Menetelmää ei ole akkreditoitu.

[www.thl.fi](http://www.thl.fi)

## Virukset

### Adenovirusanalyysi

Adenovirukset eristetään suodattamalla vesinäyte positiivisesti varatun nylonmembraanin läpi. Nylonmembraanista eluoidaan virukset korkean pH:n omaavaan puskuriin. Eluaatti konsentroidaan ja konsentraatista eristetään DNA. Jätevesinäyte konsentroidaan kaksifaasi-erotusmenetelmän avulla (WHO 2003) ja konsentraatista eristetään DNA. Adenoviruksille spesifinen osa DNA:sta monistetaan käyttäen ns. Real Time -PCR-analytiikkaa. Menetelmää ei ole akkreditoitu.

### Vesinäytteen norovirustutkimus

Norovirukset eristetään suodattamalla vesinäyte positiivisesti varatun nylonmembraanin läpi. Nylonmembraanista eluoidaan virukset korkean pH:n omaavaan puskuriin. Eluaatti konsentroidaan ja konsentraatista eristetään RNA. Jätevesinäyte konsentroidaan kaksifaasi-erotusmenetelmän avulla (WHO 2003) ja konsentraatista eristetään RNA. Noroviruksille spesifinen osa RNA:sta monistetaan käänteiskopiointi-PCR-menetelmällä (RT-PCR) käyttäen ns. Real Time -PCR-analytiikkaa. Menetelmää ei ole akkreditoitu.

### Rotavirusanalyysi

Rotavirukset eristetään suodattamalla vesinäyte positiivisesti varatun nylonmembraanin läpi. Nylonmembraanista eluoidaan virukset korkean pH:n omaavaan puskuriin. Eluaatti konsentroidaan ja konsentraatista eristetään RNA. Jätevesinäyte konsentroidaan kaksifaasi-erotusmenetelmän avulla (WHO 2003) ja konsentraatista eristetään RNA. Rotaviruksille spesifinen osa RNA:sta monistetaan käänteiskopiointi-PCR-menetelmällä (RT-PCR) käyttäen ns. Real Time -PCR-analytiikkaa. Menetelmää ei ole akkreditoitu.

## Alkueläimet

### *Giardia ja Cryptosporidium*

Alkueläinten määrittäminen perustuu standardiin ISO 15553. *Giardia* kystat ja *Cryptosporidium* ookystat konsentroidaan suuresta vesinäytetilavuudesta käyttäen menetelmään soveltuvaa patruunasuodatinta. Suodattimelta kystat ja ookystat eluoidaan ja erotetaan muusta materiaalista käyttäen IMS-tekniikkaa. IMS-tekniikka perustuu immunomagneettiseen erotteluun. Lopuksi näytteessä mahdollisesti olevat kystat ja ookystat leimataan spesifisellä merkkiaineella ja voidaan tämän jälkeen tunnistaa mikroskoipoimalla epifluoresenssimikroskopiaa hyödyntäen. Menetelmää ei ole akkreditoitu.

## Indikaattorimenetelmät

### Koliformisten bakteerien ja *E. coli* -bakteerin herkistetty analyysi vedestä

Koliformiset bakteerit ja *E. coli* määritetään standardin SFS 3016 Veden laatu. Koliformisten bakteerien kokonaismäärän määrittäminen kalvosuodatusmenetelmällä mukaisesti käyttäen Les Endo-alustaa sekä niin ikään kalvosuodatusmenetelmällä kromogeenisellä Chromocult-kasvualustalla. Näytteitä suodatetaan yleensä 100 ml ja 1 000 ml kummallekin alustalle. Tutkittu tilavuus on siis yhteensä 2 200 ml/näyte. Menetelmä on akkreditoitu.

### Suolistoperäisten enterokokkien herkistetty analyysi vedestä

Suolistoperäiset enterokokit määritetään standardin SFS-EN ISO 7899-2 Veden laatu. Suolistoperäisten enterokokkien laskeminen. Osa 2: Kalvosuodatusmenetelmä mukaisesti. Tutkitut tilavuudet ovat yleensä 100 ml ja 1000 ml. Menetelmä on akkreditoitu.

### Heterotrofisten bakteerien laajennettu tutkimus vedestä

Heterotrofisen pesäkelukumäärä määritetään standardin SFS-EN ISO 6222 mukaisesti maljavalaen TH -alustoilla ja lisäksi pintaviljelynä R2A-alustoilla käyttäen 7 vuorokauden kasvatusaika (+22 °C). R2A-alustalla saadaan talousveden

mikrobeille edullisen ravinneoostumuksen sekä pitkän inkubointiajan ansiosta suurempia pesäkelukumääriä kuin standardin SFS-EN ISO 6222 mukaisesti määritettynä. Menetelmät ovat akkreditoituja.

### ***Clostridium perfringens***

Klostridit analysoidaan standardiluonnoksen ISO/CD 6461-2 mukaisesti TSC-alustalla anaerobisesti. Vegetatiiviset solut testataan näytteestä ennen esikäsittelyä ja itiöiden testaamista varten näytettä lämpökäsitellään 60 °C 15 minuutin ajan. Sulfiittia pelkistävät klostridit kasvavat TSC-alustalla mustina pesäkkeinä. *C. perfringens* varmistetaan hapan-fosfataasitestillä. Menetelmää ei ole akkreditoitu.

### **Kolifaagit**

Somaattiset ja F-spesifiset kolifaagit määritetään kansainvälisiä standardimenetelmiä (EPA Method 1601, EPA Method 1602) soveltaen kvantitatiivisesti plakkitekniikalla tai kvalitatiivisesti rikastustekniikan avulla. Menetelmiä ei ole akkreditoitu.

## **Homeet, hiivat ja aktinomykeetit (sädesienet)**

### **Homeet ja hiivat**

Homeiden ja hiivojen lukumäärä määritetään membraanisuuodatuksen (steriili Millipore EZ-Pak, 0.45 µm) jälkeen käyttäen 2 % mallasuute (M2)-kasvatusalustoja (Anon 1994)). Suodatetut näytemäärät ovat välillä 1 - 200 ml. Maljoja inkuboidaan 7 vrk:n ajan +25 °C lämpötilassa ennen pesäkkeiden laskentaa. Tulokset ilmoitetaan muodossa: homepesäke/100ml (pesäkeluku / 100 millilitrassa). Menetelmä ei ole akkreditoitu.

### **Aktinomykeetit (sädesienet)**

Aktinomykeettien lukumäärä määritetään membraanisuuodatuksen (steriili Millipore EZ-Pak, 0.45 µm) jälkeen käyttäen tärkkelys-kaseiini-kasvatusalustoja (Kuster and Williams 1964) Suodatetut näytemäärät ovat välillä 1-200 ml. Maljoja inkuboidaan 7 vrk:n ajan + 25 °C lämpötilassa ennen pesäkkeiden laskentaa. Maljat luetaan uudelleen 14vrk:n inkuboinnin jälkeen. Tulokset ilmoitetaan muodossa: aktinomykeetit / 100ml (pesäkeluku / 100 millilitrassa). Menetelmä ei ole akkreditoitu.

## **Mikrobiravinteet**

### **AOC, assimilable organic carbon**

AOC:lla tarkoitetaan sitä orgaanisen hiilen määrää joka on suoraan mikrobien käytettävissä energian ja solujen hiilen lähteenä (van der Kooij ym. 1982). AOC määräys tehdään käyttäen standardimenetelmän (APHA ym. 1992) modifikaatiota, jossa näytteisiin lisätään 100µl ravinneliuosta ravinnetasapainon (N, P ym.) ylläpitämiseksi. AOC mittaus aloitetaan näytteiden kuumasteriloinnilla +60 °C:ssa 30 minuutin ajan. Rinnakkaisiin näytteisiin lisätään kahta bakteeripuhdasviljelmää: *Pseudomonas fluorescens* P17 ja *Aquaspirillum* NOX, joiden määrän kasvua seurataan R2A-agar viljelyillä. AOC:n määrä määritetään näyteveden aikaansaaman maksimaaliseen bakteerien pesäkelukumäärän perusteella. Menetelmää ei ole akkreditoitu.

Mikrobeille käytettävissä olevan hiilen määrä arvioidaan kahdella laskentatavalla:

A. AOC- tulos lasketaan siten, että sekä *Pseudomonas* P17 ja *Aquaspirillum* NOX bakteerien kasvu on standardoitu käyttämällä ainoastaan natriumasettaattia mallisubstraattina (van der Kooij 1984).

B. AOC-tulokset lasketaan myös siten, että *Pseudomonas* P17 bakteerien kasvu on standardoitu käyttämällä natriumasettaattia mallisubstraattina ja *Aquaspirillum* NOX kasvu on standardoitu lisäksi natriumoksaalaattin kanssa (APHA ym. 1992). Lopullinen AOC:n pitoisuus ilmoitetaan tässä tapauksessa sekä asetaatti- että oksalaattihiiltä vastaavana orgaanisen aineen pitoisuutena: µg AOC/l (APHA 1992).

### Mikrobeille käyttökelpoinen fosfori (MAP)

Mikrobeille käyttökelpoisella fosforilla (MAP) tarkoitetaan sitä näyteveden sisältämää epäorgaanista ja orgaanista fosforia, jonka testiorganismi kykenee vedestä ottamaan omien solujensa muodostamiseen ja metabolian ylläpitämiseen. MAP:n määrittäminen aloitetaan näytteiden kuumasteriloinnilla +60 °C:ssa 30 minuutin ajan. Rinnakkaisiin näytteisiin lisätään bakteeripuhdasviljelmä: *Pseudomonas fluorescens* P17, jonka lukumäärän määrän kasvua seurataan R2A-agar viljelyillä. Koeolosuhteet säädetään epäorgaanisen (N, K, Ca jne) sekä orgaanisen (asettaatti) ravinneliuosten avulla siten, että ainoastaan fosforin pitoisuus rajoittaa testiorganismien kasvua. MAP:n määrä määritetään näyteveden aikaansaaman maksimaaliseen bakteerien pesäkelukumäärän perusteella. Analyysin mittausherkkyyys on 80 ng PO<sub>4</sub>-P/l (Lehtola ym. 1999).

MAP- tulos lasketaan siten, että *Pseudomonas* P17 bakteerin kasvu on standardoitu käyttämällä dinatrium-vetyfosfaattia (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) substraattina (0-10 µg PO<sub>4</sub>-P/l). Lopullinen tulos ilmoitetaan fosfaatti-fosforia vastaavana fosforin pitoisuutena (Lehtola ym. 1999). Menetelmää ei ole akkreditoitu.

#### Viitteet:

Lehtola M, Miettinen I, Vartiainen T and Martikainen PJ (1999). A new sensitive bioassay for determination of microbially available phosphorus in water. *Appl. Environ. Microb.* 65(5): 2032-2034

Kuster E and Williams ST. 1964. Selection of media for isolation of streptomycetes. *Nature* 202: 928-929.