

Homeet ja aktinomykeetit (sädesienet) talousvesijärjestelmien biofilmeissä.

Anna Pursiainen

Timo Wortberg

Ilkka Miettinen

Loppuraportti

Terveyden ja hyvinvoinninlaitos
Ympäristöterveyden osasto
Vesi ja terveys -yksikkö

Sisällysluettelo

1 Taustaa ja lähtökohta	3
2 Tavoitteet	3
3 Aineisto ja menetelmät	3
3.1 Biofilmikokeet	3
<i>Biofilmien mittaus</i>	3
<i>Vesilaitosten kuvaukset</i>	4
<i>Analyysit vesi- ja biofilminäytteistä</i>	5
3.2 Desinfiointikokeet	6
<i>Koejärjestelmät</i>	6
<i>Analyysit</i>	7
<i>Koesarjat</i>	7
4 Tulokset	7
4.1 Biofilmikokeet	7
<i>Homeet</i>	7
<i>Aktinomykeetit</i>	8
<i>Heterotrofiset mikrobit ja ATP-pitoisuudet</i>	9
<i>Ravinteet</i>	11
4.2 Desinfiointikokeet	12
4.2.1 Homeet	12
<i>Kloori</i>	12
<i>Vetyperoksidi</i>	13
4.2.2 Aktinomykeetit.....	13
<i>Kloori</i>	13
<i>Vetyperoksidi</i>	14
5 Yhteenveto	15
6 Viitteet	16

1 Taustaa ja lähtökohta

Kansanterveyslaitos on viimeisten 10 vuoden aikana saanut kuntien terveysvalvontaviranomaisilta ja vesilaitoksilta yhä useampia yhteydenottoja, jotka koskivat talous-veden haju- ja makuongelmia. Talousveden laadun heikkenemisen syynä voidaan pitää verkostovedessä esiintyvää mikrobikasvua eli biofilmien muodostumista. Mikrobikasvu saa erilaisen merkityksen siinä vaiheessa, kun verkostojen pinnoille pesiytyy muun mikrobiston joukkoon aktinomykeettiteja (sädesieniä) ja mikrosieniä (homeet ja hiivat). Biofilmeillä kasvavien mikrobien keskinäinen vuorovaikutus voi johtaa siihen, että mikrobit alkavat taistella keskenään elintilasta. Tällaisen vuorovaikutuksen seuraamus voi olla ns. sekundääristen metaboliatuotteiden muodostuminen (Aharonowiz 1978). Varsin hyvin tunnettua on sädesienten tuottamien metabolia-tuotteiden mm. geosmiinin ja metyyliisoborneolin (MIB) aiheuttamat talousveden haju- ja makuhaitat.

KTL:n vuonna 2005 aloittama homeiden ja aktinomykeettien esiintyvyyttä selvittänyt tutkimus on osoittanut, että homeita/aktinomykeettejä esiintyy luultua useammalla paikkakunnalla/vedenottamalla. Tutkimusta jatkettiin kenttäkokein, jotka osoittivat, että homeongelma liittyy useimmiten raakavesien kontaminaatioon ja aktinomykeettien esiintyvyys taas verkostossa tapahtuvaan mikrobikasvuun. Homekantojen tunnistus osoitti, että verkostovesissä esiintyy samoja mikrobeja, joita aiemmin on eristetty kosteusvauriokohteissa sisäilmasta. Tämän projektin päätavoitteena oli oppia ymmärtämään, miksi homeet/aktinomykeetit voivat esiintyä/kasvaa verkostoissa ja millä toimenpiteillä (erityisesti desinfiointi) homeiden/aktinomykeettien esiintymistä voisi rajoittaa.

2 Tavoitteet

Tutkimusprojektilla oli kaksi päätavoitetta:

- a) Selvittää homeiden ja aktinomykeettien kiinnittymistä ja osuutta talousvesiverkoston biofilmeissä.
- b) Tutkia eri desinfiointitapoja biofilmeillä esiintyvien homeiden ja aktinomykeettien torjumiseksi.

3 Aineisto ja menetelmät

3.1 Biofilmikokeet

Biofilmien mittaust

Biofilmien muodostumista seurattiin neljällä kunnallisella vesilaitoksella putkikeräinten (kuva 1) avulla. Tutkimukseen valittiin mukaan vesilaitoksia, joilla tiedettiin aiempien vesihomeprojektien tulosten perusteella esiintyvän vedessä homeita ja aktinomykeettejä. Vesilaitoksella keräimet asennettiin kolmeen eri kohteeseen, joista ensimmäinen kuvasi

vesilaitokselta lähtevää vettä (LV) ja kaksi muuta verkostoon sijoitettua mittauspistettä kuvasi verkostovettä (VP1 ja VP2).



Kuva 1. Verkostoon kytkettävä biofilmikeräin.

Biofilmikeräin koostuu 10 cm pitkistä PVC-muoviosista, jotka on liitetty toisiinsa palloventtiilien avulla. Jokaisella näytteenotokerralla otettiin kolme rinnakkaista 10 cm putkea vesineen. Biofilminäyte sisältää putken sisäpinnalle muodostuneen biofilmin lisäksi putken tilavuuden verran vettä. Näytteenotokertoja oli yhteensä neljä. Kertynyt biofilmi irrotettiin putken sisäpinnalta lasihelmien avulla. Tulokset laskettiin kolmen putken tulosten keskiarvona. Saadut tulokset ilmoitettiin pesäkkeitä muodostavina yksiköinä neliösenttimetriä kohden (cfu/cm²). Tuloksen laskentakaavassa vähennetään vedessä olevien mikrobien määrä.

Vesilaitosten kuvaukset

Tutkimuksessa oli mukana neljä eri puolilta Suomea olevaa vesilaitosta.

- 1) Vesilaitos 1 käyttää raakavetenään pohjavettä. Vettä ei kloorata vaan desinfioidaan UV-käsittelyllä. Näytteenotopisteet sijaitsivat lähellä vedenottamoita sekä toisiaan eli veden viipymä verkostossa ei ollut pitkä.
- 2) Vesilaitoksella 2 käytetään raakavetenä pintavettä, mikä desinfioidaan klooraamalla. Näytteenotopisteet sijaitsivat kauempana (8 ja 12 km vedenottamolta), mutta viipymä ei kuitenkaan ollut vielä merkittävä.
- 3) Vesilaitos 3 käyttää raakavetenään pohjavettä, mikä desinfioidaan UV-käsittelyllä. Vesilaitos toimittaa vettä myös lähikuntiin. Alueen verkostopisteet sijaitsivat viereisen kunnan alueella eli noin 50 kilometrin päässä vedenottamolta. Arvio veden viipymästä verkostopisteissä oli vuorokaudesta puoleentoista vuorokauteen.
- 4) Vesilaitos 4 käyttää raakavetenään pohjavettä, mitä ei desinfioida kloorilla. Tällä laitoksella lähtevää vettä vastaava näytteenotopiste ei ollut vedenottamolla vaan alavesisäiliöllä, joka sijaitsi viiden kilometrin päässä vedenottamolta. Viipymän vedenottamon ja säiliön välillä arvioitiin olevan noin 10-12 tuntia. Verkostopisteet sijaitsivat noin 10 ja 16 kilometrin etäisyydellä vedenottamolta. Veden viipymä verkostopisteissä arvioitiin olevan noin puolitoista – neljä vuorokautta.

Analyysit vesi- ja biofilminäytteistä

Vesi- ja biofilminäytteiden heterotrofisten mikrobien (HPC) määrää tutkittiin pintalevitysviljelymenetelmällä käyttäen R2A-alustoja (Difco). R2A-alustan ravinneoostumus on matalampi kuin standardin SFS-EN ISO 6222 mukaisen TH-agarin, jota yleisemmin käytetään. Ravinneoostumus on kuitenkin suotuisampi talousvedessä kasvaville mikrobeille, siksi tulokset ovat korkeampia kuin TH-maljavalumenetelmällä saatuna.

Homeiden ja aktinomykeettien määrää vesi- ja biofilminäytteissä tutkittiin viljelemällä M2 eli 2 % mallasuutemaljoille (homeet) ja tärkkelys-kaseiini-alustoille (aktinomykeetit). Näytteitä konsentroititiin suodattamalla näytettä 1-300 ml steriilille kalvosuodattimille (Ez-Pak™). Suodattimien huokoskoko oli 0,45 µm. Lisäksi tehtiin pintalevitysviljelyitä. Homeita kasvatettiin seitsemän vuorokautta +25 °C. Aktinomykeettejä kasvatettiin yhteensä 14 vuorokautta +25 °C. Pesäkkeiden ensimmäinen laskenta suoritettiin seitsemän vuorokauden jälkeen. Tulosten ilmoittamiseen käytetään 14 vuorokauden tulosta.

Vesinäytteiden ravinnepitoisuuksia tutkittiin analysoimalla niistä hiili- ja fosforipitoisuuksia. Hiilipitoisuuksista mitattiin orgaanisen hiilen kokonaismäärä (TOC) ja mikrobeille käyttökelpoisen hiilen (AOC) määrä. Fosforipitoisuuksista mitattiin kokonaisfosfori (KOK-P) ja mikrobeille käyttökelpoisen fosforin (MAP) määrä.

TOC-näytteet analysoitiin Kemian laboratoriossa (Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitos, Kuopio) soveltaen standardia SFS-EN 1484 (1997). Pitoisuus ilmoitetaan milligrammoina litrassa.

Kokonaisfosfori näytteet analysoitiin soveltaen standardia SFS EN-ISO 6878. Fosfori pitoisuus ilmoitetaan mikrogrammoina fosfaattifosforia millilitrassa.

Mikrobeille käyttökelpoisen hiilen (AOC) määrä, jolla tarkoitetaan sitä orgaanisen hiilen määrää joka on suoraan mikrobien käytettävissä energian ja solujen hiilen lähteenä (van der Kooij ym. 1982). Analyysin tekemiseen käytettiin standardimenetelmän (APHA ym. 1992) modifikaatiota, jossa näytteisiin lisättiin ravinneliuosta ravinnetasapainon (N, P ym.) ylläpitämiseksi. Aluksi näytteet steriloidtiin +60 °C:ssa 30 minuutin ajan näyteveden omien bakteerien tuhoamiseksi. Tämän jälkeen lisätään kahta bakteeripuhdasviljelmää: *Pseudomonas fluorescens P17* ja *Aquaspirillum NOX*. Näytteitä kasvatetaan + 15 °C:ssa. Viikon kasvatuksen jälkeen bakteerien määriä seurattiin viljelemällä R2A-alustoille kolmena peräkkäisenä päivänä. AOC:n määrä määritettiin näytevedessä kasvavan korkeimman pesäkelukumäärän perusteella. AOC- tulos laskettiin siten, että sekä *Pseudomonas P17* ja *Aquaspirillum NOX* bakteerien kasvu standardoitiin käyttämällä ainoastaan natriumasetaattia mallisubstraattina (van der Kooij 1984). Pitoisuus ilmoitetaan mikrogrammoina asetaatti hiiltä litrassa (µg asetaatti-C/l).

Mikrobeille käyttökelpoisella fosforilla (MAP) tarkoitetaan näyteveden sisältämää epäorgaanista ja orgaanista fosforia, joita mikrobit pystyvät käyttämään solujensa muodostamiseen ja metabolian ylläpitämiseen. Analyysi aluksi näytteet steriloidtiin +60 °C:ssa 30 minuutin ajan näyteveden omien bakteerien tuhoamiseksi. Näytteisiin lisättiin bakteeripuhdasviljelmää: *Pseudomonas fluorescens P17*. Näytteisiin lisättiin epäorgaanisen (N, K, Ca jne) sekä orgaanisen (asetatti) ravinneliuoksen avulla siten, että ainoastaan fosforin pitoisuus rajoitti testiorganismien kasvua. Näytteitä kasvatetaan + 15 °C:ssa. Neljän vuorokauden kasvatuksen jälkeen mikrobin määrää seurattiin viljelemällä R2A-alustoilla viiden vuorokauden ajan. MAP:n määrä määritettiin korkeimman pesäkelukumäärän

perusteella. MAP- tulos laskettiin siten, että *Pseudomonas fluorescens P17* bakteerin kasvu standardoitiin käyttämällä dinatrium-vetyfosfaattia (Na_2HPO_4) substraattina (0-10 $\mu\text{g PO}_4\text{-P/l}$). Pitoisuus ilmoitetaan mikrogrammoina mikrobeille käyttökelpoista fosforia litrassa ($\mu\text{g MAP-P/l}$). Analyysin mittausherkkyyks on 80 ng $\text{PO}_4\text{-P/l}$ (Lehtola ym. 1999).

Veden sekä biofilminäytteiden ATP eli adenosiinitrifosfaatti -pitoisuus määritettiin BioOrbit 1251 luminometrillä, käyttäen kaupallisia lusiini-lusiferaasi reagensseja (BioThema AB, Handen, Ruotsi). ATP on yhdiste, joka sisältää runsaasti energiaa ja toimii osana solujen energiataloutta. Korkea ATP-pitoisuus viittaa aktiiviseen bakteerien toimintaan näytteessä.

Mikrobien kokonaislukumäärä, eli sekä kuolleet että elävät mikrobit, näytteessä määritettiin mikroskooppilaskennalla käyttäen 4',6'-diamidi-2-fenoli-indoli (DAPI)-värjäystä (Porter, K.G. & Feig, Y.S., 1980). Menetelmässä haluttu näytemäärä suodatettiin Nuclepore/Millipore suodattimen läpi, minkä huokoskoko oli 0.2 μm . Tämän jälkeen suodattimen pinnalle jääneet mikrobit värjättiin 4', 6'-diamidi-2-fenoli-indoli (DAPI)-väriaineella. Suodattimien huuhtelun ja kuivauksen jälkeen mikrobien lukumäärä laskettiin 1000 x suurennoksella Olympus BX-51 epifluoresenssimikroskoopilla.

3.2 Desinfiointikokeet

Koejärjestelmät

Desinfiointikokeet tehtiin laboratorio-olosuhteissa Kuopion yliopiston Ympäristötieteenlaitoksen koehallissa PropellaTM biofilmireaktorilla (kuva 2). Reaktorin avulla pystyttiin säätämään mikrobien elinolosuhteita kuten veden lämpötilaa. Biofilmien kehittymistä ja desinfiointikäsitteilyjen vaikutusta biofilmeille pesiytyneisiin mikrobeihin voitiin tutkia reaktorista otettavien testikuponkien avulla.



Kuva 2. PropellaTM biofilmireaktoreita eristetyssä koetilassa.

Desinfiointimenetelmistä tutkimukseen valittiin klooraus ja vetyperoksidi käsittelyt. Kohdemikrobeina käytettiin todellisista verkostoista eristettyjä mikrobeja. Tutkimukseen valittiin kolme homekantaa sekä kaksi aktinomykeettikantaa. Aktinomykeettikantoja valittiin vain kaksi, koska eri kannat näyttävät maljalla kasvaessaan ulkonäöltään hyvin samanlaisilta, ja tästä syystä eri kantoja olisi ollut vaikea erottaa toisistaan. Homeet olivat *Acremonium* (VH 288), *Phialophora* (VH 328) sekä *Pencillium* (VH 475) -sukuihin kuuluvat kannat. Aktinomykeeteistä toinen kuului *Streptomyces* -sukuun (VHS 13) ja toinen oli tunnistamaton kanta (VHS 45). PropellaTM reaktoreita oli kaksi, joista toiseen lisättiin homeita ja toiseen aktinomykeettejä. Molemmille desinfiointiaineille, kloorille ja vetyperoksidille tehtiin omat koesarjansa.

Analyysit

Kokeen aikana reaktoreihin syötettävän veden laatua seurattiin. Vedestä tutkittiin ravinteiden eli hiilen (AOC ja TOC) ja fosforin (MAP ja KOK-P) määrää. Lisäksi reaktoriin menevän sekä reaktorista ulos tulevan veden heterotrofisten mikrobien (HPC) määrää tutkittiin. Homeiden ja aktinomykeettien määrää seurattiin reaktoriin menevästä vedestä. Analyysit tehtiin, kuten aiemmissa kappaleissa on esitetty. Veden virtaama oli säädetty 200 ml/h ja lämpötila reaktorissa pidettiin 15 °C:ssa.

Koesarjat

Ensimmäisessä koesarjassa, jossa desinfiointiaineena käytettiin klooria, reaktoreihin syötettiin talousvettä kolmen viikon ajan. Tänä aikana muodostui biofilmiä testikuponkien pinnoille. Tämän jälkeen tehtiin kontaminaatio reaktoreihin syöttämällä pieni määrä vettä, johon oli siirrostettu home- tai aktinomykeettipesäkkeitä elatusalustalta. Homeille ja aktinomykeeteille annettiin kaksi viikkoa aikaa kiinnittyä biofilmeihin, minkä jälkeen reaktoriin syötettiin klooria biofilmien tuhoamiseksi. Biofilminäytteitä otettiin ennen ja jälkeen kontaminaatiovaiheen sekä desinfioinnin aloittamisen jälkeen. Klooraus aloitettiin annoksella 1 mgCl₂/l ja viikon kuluttua annos nostettiin 4 mgCl₂/l.

Toisessa koesarjassa biofilmien annettiin muodostua kaksi viikkoa, minkä jälkeen tehtiin kontaminaatio samoilla mikrobeilla kuin aiemmassa koesarjassa. Kahden viikon kuluttua kontaminaatiosta aloitettiin desinfiointi vetyperoksidilla ensin annoksella 75 mg/l ja sitten annoksella 250 mg/l.

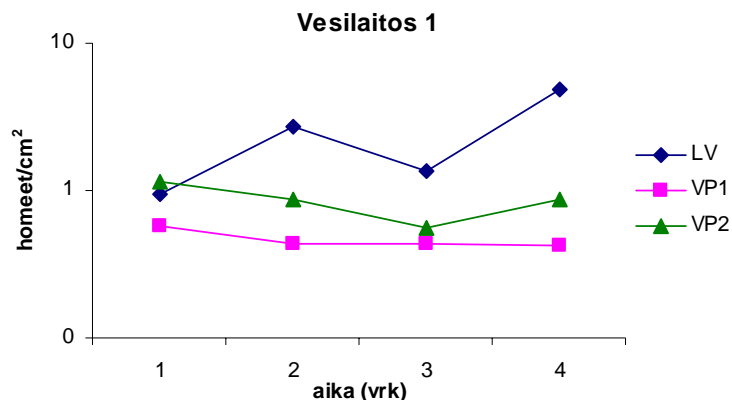
4 Tulokset

4.1 Biofilmikokeet

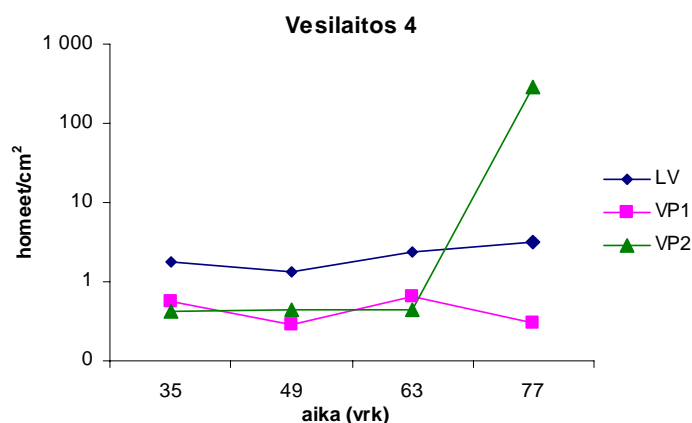
Homeet

Homeiden määrä oli suuressa osassa näytteitä selvästi korkeampi biofilminäytteissä (1-54 cfu/ml) kuin vesinäytteissä (1-694 cfu/ 100 ml). Usein homeiden määrä biofilmeissä veteen verrattuna oli niin alhainen, että tulokset pinta-alaa kohden laskettuna olivat hyvin alhaisia (1-24 cfu/cm²) tai tulosta ei saanut laskettua lainkaan (liite 1). Homeen määrä ei lisääntynyt biofilmin kasvuajan pidentyessä, vaan määrä pysyi alhaisena tai vaihteli eri näytteenottojen

välillä. Ainoastaan vesilaitoksella 1 lähtevä vesi (piste LV) ja vesilaitoksella 4 verkostopisteessä VP2 viimeisellä näytteenotokerralla homeiden määrä oli korkeampi kuin muilla näytteenotokertoilla (kuvat 3-4). Muissa pisteissä homeiden määrät pysyivät tasaisena näytteenottojen välillä.



Kuva 3. Homeiden määrä (homeet/cm²) biofilmissä neljän näytteenotokerran aikana. Vaaka-akselilla biofilmien kasvu-aika (vrk) ja pystyakselilla homeiden määrä pinta-alaa kohden (homeet/cm²). LV=lähtevä vesi, VP1 ja 2=verkostopisteet 1 ja 2

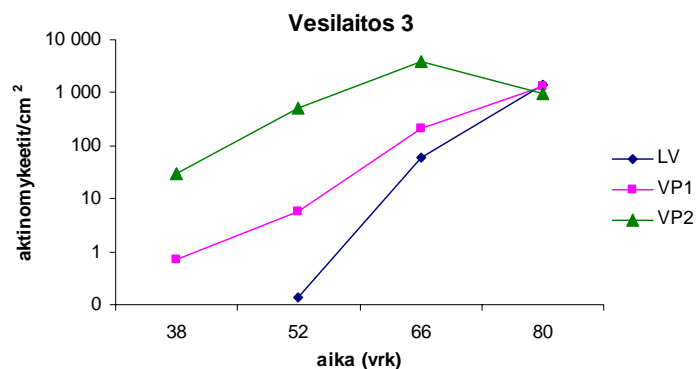


Kuva 4. Homeiden määrä (homeet/cm²) biofilmissä neljän näytteenotokerran aikana. Vaaka-akselilla biofilmien kasvu-aika (vrk) ja pystyakselilla aktinomykeettien määrä pinta-alaa kohden (homeet/cm²). LV=lähtevä vesi, VP1 ja 2=verkostopisteet 1 ja 2

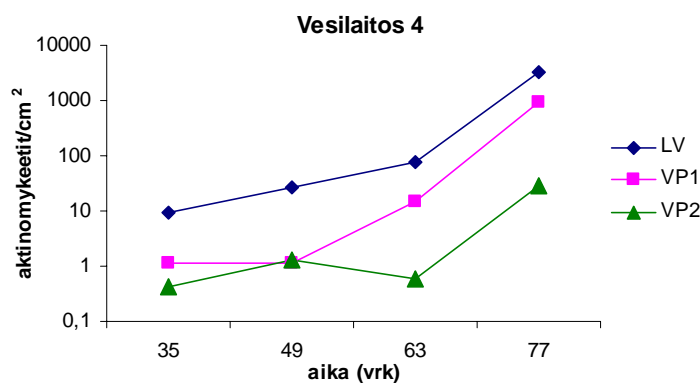
Aktinomykeetit

Aktinomykeettien määrä biofilmeissä lisääntyi kasvuajan suhteen. Erityisesti vesilaitoksilla 3 ja 4 aktinomykeettien määrä biofilmeissä lisääntyi tasaisesti ajan suhteen (kuvat 5-6). Vesilaitoksen 1 biofilmien kasvu-aika oli lyhyempi kuin muilla vesilaitoksilla. Tällä laitoksella aktinomykeettien määrä biofilmeissä näkyi vasta viimeisessä näytteenotossa 69 vuorokauden kasvatuksen jälkeen näytteenotopisteissä LV ja VP1. Näytteenotopisteessä VP2 aktinomykeettien määrä oli hieman korkeampi kaikilla neljällä näytteenotokerralla. Vesilaitoksen 2 vedessä ei todettu lainkaan aktinomykeettejä vedessä eikä biofilmeissä. Muiden vesilaitosten vedessä esiintyi 2-1000 pesäkettä 100 ml kohden. Aktinomykeettimäärät

olivat selvästi korkeampia biofilminäytteissä (cfu/ml) kuin vesinäytteissä (cfu/ 100 ml) (liite 2).



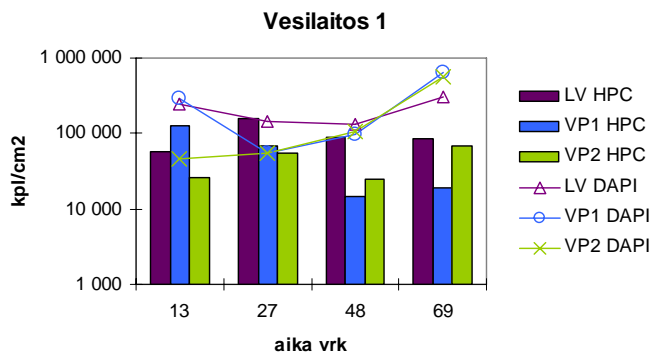
Kuva 5. Aktinomykeettien määrä (aktinomykeetit/cm²) biofilmissä neljän näytteenottokerran aikana. Vaaka-akselilla biofilmiä kasvuaika (vrk) ja pystyakselilla aktinomykeettien määrä pinta-alaa kohden (aktinomykeetit/cm²). LV=lähtevä vesi, VP1 ja 2=verkostopisteet 1 ja 2



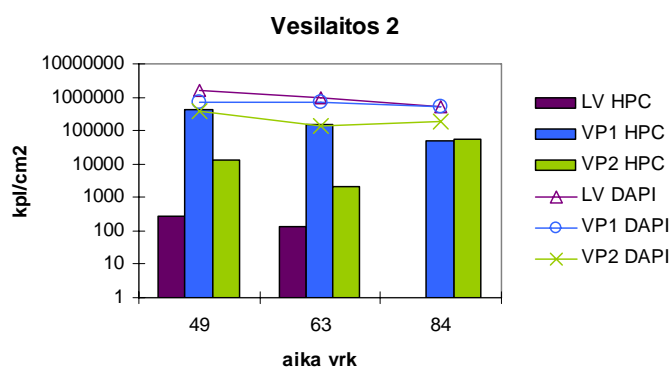
Kuva 6. Aktinomykeettien määrä (aktinomykeetit/cm²) biofilmissä neljän näytteenottokerran aikana. Vaaka-akselilla biofilmiä kasvuaika (vrk) ja pystyakselilla aktinomykeettien määrä pinta-alaa kohden (aktinomykeetit/cm²).

Heterotrofiset mikrobit ja ATP-pitoisuudet

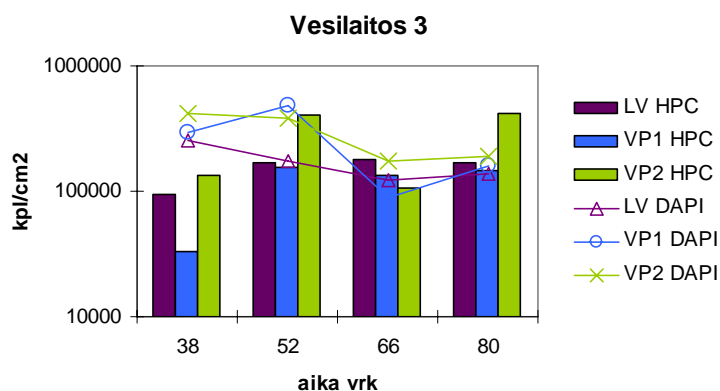
Voimakkain biofilmiä muodostuminen vaihe oli ohi kaikilla vesilaitoksilla jo ennen ensimmäistä näytteenottoa, joka oli vähimmillään 13 ja enimmillään 49 vuorokautta kokeen alkamisesta. Heterotrofisten mikrobitien määrä biofilmeissä oli saavuttanut tasapainotilan, missä biofilmiä määrä ja koostumus vaihtelee esimerkiksi mikrobitien elinkierron mukaan. Biofilmiä määrä ei lisääntynyt näytteenottojen välillä (kuvat 7-10). Kokonaismikrobitilukumäärät (DAPI) ovat yleensä korkeampia kuin viljeltyjen heterotrofisten mikrobitien määrä (HPC). Vesilaitoksen 2 alhaisemmat heterotrofisten mikrobitien määrät biofilmeissä lähtevää vettä kuvaavassa pisteessä (LV) johtuvat todennäköisesti veden desinfioinnista. Kahdessa verkostopisteessä desinfiointiaineen määrä vedessä voi olla jo vähentynyt eikä enää estä yhtä tehokkaasti mikrobitien kasvua.



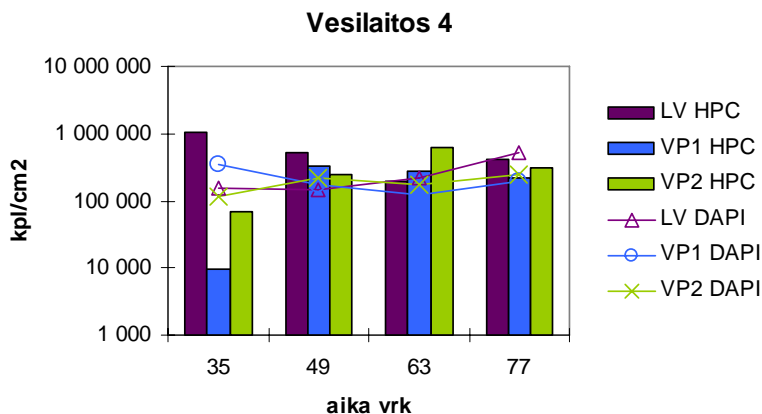
Kuva 7. Heterotrofisten mikrobien (HPC) määrä sekä kokonaismikrobilukumäärä (DAPI) neljällä näytteenotokerralla. Vaaka-akselilla biofilmien kasvu-aika (vrk) ja pystyakselilla mikrobien määrä pinta-alaa kohden (kpl/cm^2). LV=lähtevä vesi, VP1 ja 2=verkostopisteet 1 ja 2



Kuva 8. Heterotrofisten mikrobien (HPC) määrä sekä kokonaismikrobilukumäärä (DAPI) kolmella näytteenotokerralla. Vaaka-akselilla biofilmien kasvu-aika (vrk) ja pystyakselilla mikrobien määrä pinta-alaa kohden (kpl/cm^2). LV=lähtevä vesi, VP1 ja 2=verkostopisteet 1 ja 2



Kuva 9. Heterotrofisten mikrobien (HPC) määrä sekä kokonaismikrobilukumäärä (DAPI) neljällä näytteenotokerralla. Vaaka-akselilla biofilmien kasvu-aika (vrk) ja pystyakselilla mikrobien määrä pinta-alaa kohden (kpl/cm^2). LV=lähtevä vesi, VP1 ja 2=verkostopisteet 1 ja 2



Kuva 10. Heterotrofisten mikrobien (HPC) määrä sekä kokonaismikrobilukumäärä (DAPI) neljällä näytteenotokerralla. Vaaka-akselilla biofilmien kasvu-aika (vrk) ja pystyakselilla mikrobien määrä pinta-alaan kohden (kpl/cm^2). LV=lähtevä vesi, VP1 ja VP2=verkostopisteet 1 ja 2

ATP-pitoisuudet olivat hyvin alhaisia vaihdellen välillä $0,01$ - $1,46 \text{ pmolATP}/\text{cm}^2$ (taulukko 1).

Taulukko 1. ATP-pitoisuuksien keskiarvo eri näytteenotokertoilta vesilaitoksilla 1-4. Yksikkönä $\text{pmolATP}/\text{cm}^2$. LV=lähtevä vesi VP1 ja VP2 = verkostopisteet 1 ja 2

	LV	VP1	VP2
Vesilaitos 1	0,16	0,12	0,11
Vesilaitos 2	0,04	0,85	0,07
Vesilaitos 3	0,08	0,07	0,12
Vesilaitos 4	0,17	0,07	0,22

Ravinteet

Ravinnepitoisuudet (orgaaninen hiili, fosfori, AOC ja MAP) eri vesilaitosten välillä eivät vaihdelleet merkittävästi (taulukko 2). Hiilen määrä oli hieman korkeampi vesilaitoksella 2 kuin muilla vesilaitoksilla. Fosforipitoisuudet olivat selvästi korkeimmat vesilaitoksella 3. Samoin vesilaitoksella 4 fosforin määrä oli hieman korkeampi kuin laitoksilla 1 ja 2.

Taulukko 2. Vesilaitosten näytteenotuspisteiden ravinnepitoisuuksien keskiarvot eri näytteenotokertoilta. (AOC=mikrobeille käyttökelpoinen hiili, TOC=kokonaisorgaaninen hiili, MAP=mikrobeille käyttökelpoinen fosfori, KOK-P=kokonaisfosfori). LV=lähtevä vesi VP1 ja VP2 = verkostopisteet 1 ja 2

		LV	VP1	VP2
Vesilaitos 1	AOC $\mu\text{g}/\text{l}$	76	60	47
	TOC mg/l	0,8	0,8	0,8
	MAP $\mu\text{g}/\text{l}$	0,8	1,0	1,1
	KOK-P $\mu\text{g}/\text{l}$	1,7	1,7	2,7
Vesilaitos 2	AOC $\mu\text{g}/\text{l}$	268	102	83
	TOC mg/l	2,2	2,5	1,5
	MAP $\mu\text{g}/\text{l}$	0,3	0,1	0,2
	KOK-P $\mu\text{g}/\text{l}$	2,4	4,7	1,1

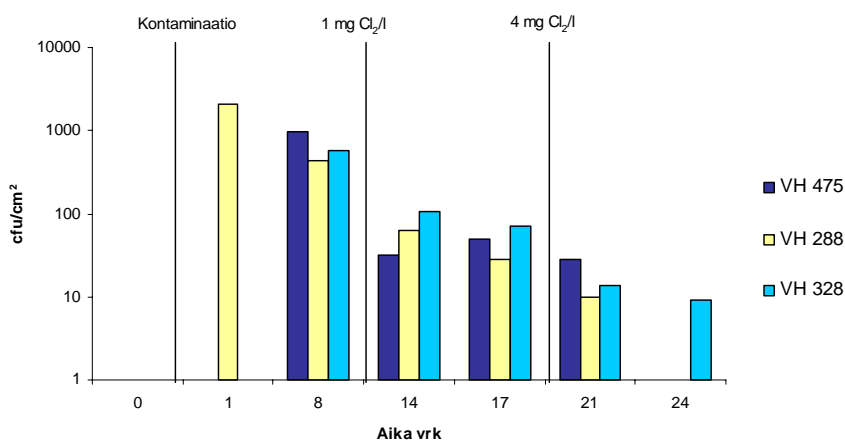
Vesilaitos 3	AOC $\mu\text{g/l}$	86	87	78
	TOC mg/l	0,8	0,9	1,0
	MAP $\mu\text{g/l}$	10,6	9,4	10,2
	KOK-P $\mu\text{g/l}$	11,3	9,8	9,3
Vesilaitos 4	AOC $\mu\text{g/l}$	82	59	60
	TOC mg/l	0,9	0,8	0,8
	MAP $\mu\text{g/l}$	5,1	5,0	5,1
	KOK-P $\mu\text{g/l}$	2,4	3,1	3,2

4.2 Desinfiointikokeet

4.2.1 Homeet

Kloori

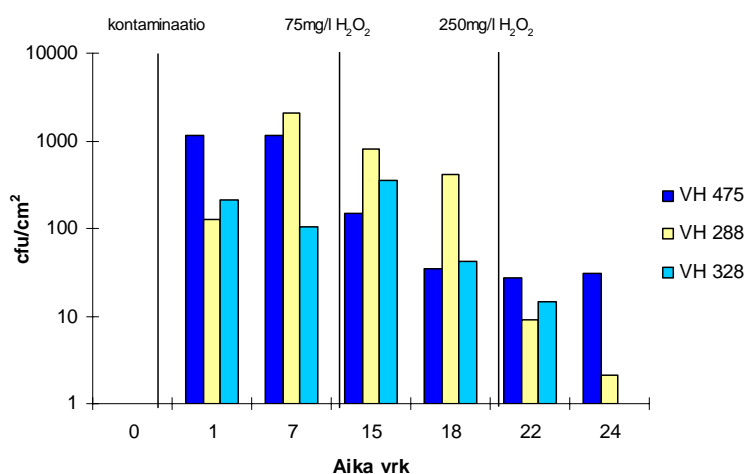
Propella-reaktorin kontaminaatio kolmella homekannalla onnistui, sillä pitoisuus oli tarpeeksi korkea sekä kaikki kolme kantaa esiintyi biofilmeissä ennen desinfioinnin aloittamista (kuva 11). Klooripitoisuuden ollessa $1 \text{ mgCl}_2/\text{l}$ kaikkien kolmen homekannan määrä väheni alkutilanteeseen verrattuna, mutta poistuma ei ollut kovinkaan suuri. Vaikka klooraus jatkui kolme vuorokautta samalla annoksella ennen seuraavaa näytteenottoa, pitoisuus pysyi suunnilleen samana kuin kloorauksen alkuvaiheessa. Klooriannos nostettiin $4 \text{ mgCl}_2/\text{l}$, minkä jälkeen homeiden pitoisuus hieman aleni. Viimeisessä näytteenotossa esiintyi vain homekannan VH 328 (*Phialophora* sp.) pesäkkeitä.



Kuva 11. Homeiden määrä biofilminäytteissä pinta-alaa kohden (cfu/cm^2) desinfiointikokeessa, missä desinfiointiaineena kloori. Vaaka-akselilla aika vuorokausina kontaminaatiosta alkaen.

Vetyperoksidi

Myös toisen koesarjan, jossa käytettiin desinfiointiaineena vetyperoksidia (H_2O_2), kontaminaatio onnistui ja kaikkia kolmea homekantaa esiintyi biofilmissä (kuva 12). Ensimmäinen annos vetyperoksidia ($75 \text{ mg H}_2\text{O}_2/\text{l}$) vähensi hieman homeiden määrää biofilmissä, mutta pitoisuus kuitenkin pysyi samalla tasolla, vaikka desinfiointia jatkettiin seuraavaan näytteenottoon saakka (3 vrk). Vetyperoksidiannoksen nosto ($250 \text{ mg H}_2\text{O}_2/\text{l}$) ei tuhonnut kaikkia biofilmillä olevia homeita vaan pitoisuudet alenivat vain hieman. Eniten aleni kannan VH 288 (*Acremonium* sp.) pitoisuus. Viimeisessä näytteenotossa biofilmeissä ei esiintynyt lainkaan kannan VH 328 (*Phialophora* sp.) pesäkkeitä, vaikka niitä esiintyi Propella-reaktorista ulostulevassa vedessä. Päinvastoin kantaa VH 475 esiintyi biofilmissä, vaikkei sitä esiintynyt reaktorista tulevassa vedessä.

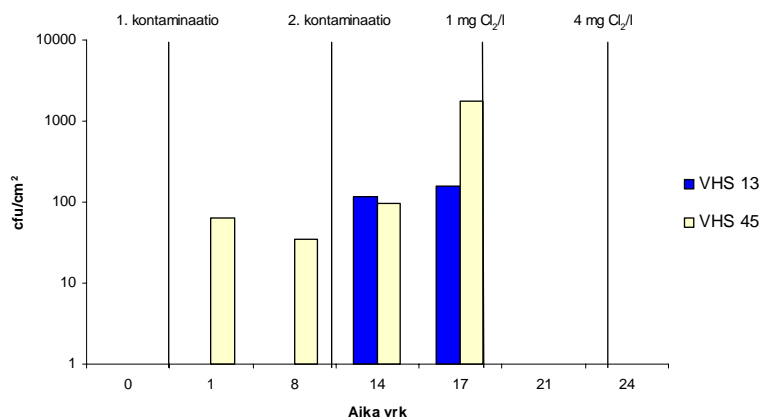


Kuva 12. Homeiden määrä biofilminäytteissä pinta-alaa kohden (cfu/cm^2) desinfiointikokeessa, missä desinfiointiaineena vetyperoksidi. Vaaka-akselilla aika vuorokausina kontaminaatiosta alkaen.

4.2.2 Aktinomykeetit

Kloori

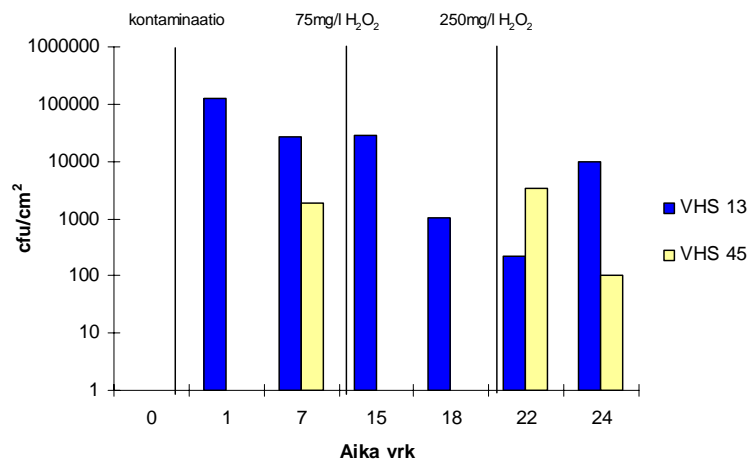
Aktinomykeettien kloorauskokeessa kontaminaatio ei onnistunut kannan VHS 13 osalta, sillä pesäkkeitä ei todettu lainkaan kahdella ensimmäisellä näytteenottokerralla (kuva 13). Tästä syystä tehtiin toinen kontaminaatio kannalla VHS 13. Toisen kontaminaation jälkeen molempien kantojen pesäkkeitä esiintyi biofilminäytteissä. Molemmat aktinomykeetikannat tuhoutuivat biofilmeistä jo alemmalla klooriannoksella ($1 \text{ mgCl}_2/\text{l}$). Eikä annoksen noston jälkeenkään todettu kumpaakaan aktinomykeetikantaa näytteenotoissa.



Kuva 13. Aktinomykeettien määrä biofilminäytteissä pinta-alaa kohden (cfu/cm²) desinfiointikokeessa, missä desinfiointiaineena kloori. Vaaka-akselilla aika vuorokausina kontaminaatiosta alkaen.

Vetyperoksidi

Toisen koesarjan kontaminaatio onnistui paremmin ja molemmat aktinomykeetikannat tulivat esiin näytteenotoissa ennen desinfiointin aloitusta (kuva 14). Alemman desinfiointiannoksen (75 mg H₂O₂/l) jälkeisissä näytteenotoissa kanta VHS 45 ei tullut lainkaan näkyviin, mutta pesäkkeitä ilmeni jälleen desinfiointiannoksen noston jälkeen kahdella viimeisellä näytteenotokerralla. Tähän voi olla syynä se, että kannan VHS 13 runsas kasvu peitti alleen kannan VHS 45 pesäkkeet. Alhaisempi annos ei merkittävästi vähentänyt aktinomykeettien määrää. Samoin annoksen nosto (250 mg H₂O₂/l) ei poistanut aktinomykeettejä biofilmistä.



Kuva 14. Aktinomykeettien määrä biofilminäytteissä pinta-alaa kohden (cfu/cm²) desinfiointikokeessa, missä desinfiointiaineena vetyperoksidi. Vaaka-akselilla aika vuorokausina kontaminaatiosta alkaen.

5 Yhteenveto

Tutkimus osoittaa, että homeet ja aktinomykeetit ovat osa talousvesiverkostojen biofilmejä. Homeiden ja aktinomykeettien kiinnittyminen biofilmeihin on hitaampaa kuin muiden mikrobien. Homeiden määrä biofilmeissä ei lisääntynyt ajan suhteen, vaan pitoisuudessa esiintyi vaihteluita tai se pysyi tasaisena eri näytteenottokerroilla. Aktinomykeettien määrässä taas näkyi kasvua ajan suhteen eli aktinomykeettien määrä oli korkeampi viimeisillä näytteenottokerroilla. On ilmeistä että homeiden esiintyminen liittyi lähinnä niiden sitoutumiseen/irtoamiseen biofilmeihin. Aktinomykeettien kohdalla kyseessä on mikrobien kiinnittymisen jälkeen tapahtuva mikrobikasvu biofilmeissä.

Desinfiointikokeissa homeet biofilmeissä osoittautuivat desinfiointia kestäviksi. Homeet säilyivät alemmalla klooriannoksella (1 mgCl₂/l). Pitkäaikainen korkeampi klooripitoisuus (4 mgCl₂/l) vaikuttaisi tehoavan, sillä viimeisellä näytteenotokerralla esiintyi vain yhden homekannan pesäkkeitä. Käytettäessä vetyperoksidia desinfiointiaineena vaikutusajan sekä annoksen on oltava hyvin suuria, jotta homeiden määrä biofilmissä alenisi merkittävästi.

Kuten aiemmissakin kokeissa on todettu, aktinomykeetit ovat herkempiä kloorille kuin homeet (Pursiainen, 2008). Kokeissa käytetyt kannat VHS 13 (*Streptomyces* sp.) ja VHS 45 tuhoutuivat jo alemmalla klooriannoksella (1 mgCl₂/l). Vetyperoksidia myös aktinomykeetit sietävät paremmin kuin klooria. Suuremmallakaan annoksella aktinomykeettejä ei saatu tuhottua biofilmeistä.

Verrattaessa kloorauksen ja vetyperoksidikäsitelyn tehokkuutta homeisiin ja aktinomykeetteihin, klooraus on tehokkaampi desinfiointikeino. Kloorauksessakin tarvittavat annokset ovat selvästi normaalia vesilaitoskäyttöä korkeampia. Tehokas verkostojen puhdistus edellyttäneee käytännössä ns. shokkikloorausta, jolloin kloorin pitoisuus pidetään useiden tuntien ajan 10 mg Cl₂/l tasolla (VVY, 2006, Vartiainen, 2001).

6 Viitteet

American Public Health Association.1992. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 18th edition. Eds.: A.E., Greenberg, Clesceri, L.S., Eaton, E. D. Victor Graphics, Inc. Baltimore. USA.

Korhonen L.K., Malaska K., Lignell U., Kärkkäinen P., Rintala H., Nevalainen A. ja Miettinen I.T. (2006). Aktinomykeettien ja homeiden esiintyminen verkostovedessä Kansanterveyslaitoksen julkaisuja 15/2006
Saatavana www-muodossa osoitteessa:
http://www.ktl.fi/attachments/suomi/julkaisut/julkaisusarja_b/2006/2006b15.pdf

Lehtola M, Miettinen IT, 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

Porter KG and Feig YS. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25:943-948

Pursiainen, A. 2008. Homeiden ja aktinomykeettien kasvu ja torjunta talousvedessä. Opinnäytetyö Kuopion yliopisto.

van der Kooij D, Visser A and Hijnen WAM. 1982. Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water. *J. Amer. Water Assoc.* 74:540-.

van der Kooij D. ja Hijnen WAM. 1984. Substrate utilization by an oxalate consuming *Spirillum* species in relation to its growth in ozonated water. *Applied Environmental Microbiology*, 47:551-559.

VVY - Vesi- ja viemärlaitosyhdistys. Talousveden klooraus. 2006, Helsinki

Vartiainen, T., Zacheus, O. ja Miettinen I. Vesiepidemiat ja niiden syyt. *Vesitalous* 5/2001:Terveys saatavana www-muodossa osoitteessa:
<http://www.mvtt.fi/Vesitalous/arkisto/2001/vesitalous200105/vepsy.html>

Liite 1

Homeiden määrä vesi (cfu/100 ml) ja biofilminäytteissä (cfu/ml) sekä laskettuna pinta-alaa kohden biofilmissä (cfu/cm²) eri näytteenottokerroilla. LV=lähtevä vesi, VP1 ja 2=verkostopisteet 1 ja 2

HOMEET	Kasvu-aika vrk	LV			VP1			VP2		
		Vedessä cfu / 100 ml	Biofilmissä cfu / ml	Biofilmissä cfu / cm ²	Vedessä cfu / 100 ml	Biofilmissä cfu / ml	Biofilmissä cfu / cm ²	Vedessä cfu / 100 ml	Biofilmissä cfu / ml	Biofilmissä cfu / cm ²
Vesilaitos 1	13	79	3	1	2	1	1	7	3	1
	27	4	6	3	1	1	et	4	2	1
	48	30	3	1	1	1	et	6	1	1
	69	694	16	5	7	1	et	2	2	1
Vesilaitos 2	49	5	1	et	2	4	2	3	1	1
	63	et	1	et	9	1	1	2	1	et
	84	et	2	1	1	3	1	3	16	7
Vesilaitos 3	38	et	et	1	2	1	et	2	1	et
	52	et	et	et	8	2	1	2	5	2
	66	5	54	24	5	3	1	1	1	et
	80	et	et	et	5	2	1	1	1	et
Vesilaitos 4	35	1	4	2	3	1	1	3	1	et
	49	6	3	1	1	1	et	1	1	et
	63	3	5	2	3	2	1	1	1	et
	77	2	7	3	155	2	et	1	668	2

et = ei todettu käytetyissä analyysitilavuuksissa
tai ei tulosta - biofilminäytteet (cfu/ cm²)

Liite 2

Aktinomykeettien määrä vesi (cfu/100ml) ja biofilminäytteissä (cfu/ml) sekä laskettuna pinta-alaa kohden biofilmissä (cfu/cm²) eri näytteenottokerroilla. LV=lähtevä vesi, VP1 ja 2=verkostopisteet 1 ja 2

AKTINOMYKEETIT	Kasvu-aika vrk	LV			VP1			VP2		
		Vedessä cfu / 100 ml	Biofilmissä cfu / ml	Biofilmissä cfu / cm ²	Vedessä cfu / 100 ml	Biofilmissä cfu / ml	Biofilmissä cfu / cm ²	Vedessä cfu / 100 ml	Biofilmissä cfu / ml	Biofilmissä cfu / cm ²
Vesilaitos 1	13	et	et	et	et	et	et	300	30	12
	27	et	et	et	1000	et	et	et	9	4
	48	et	5	2	et	et	et	2500	314	130
	69	1000	1582	687	et	21	9	1	1430	624
Vesilaitos 3	38	3	et	0	64	2	1	71	68	29
	52	2	et	0	23	13	6	et	1138	496
	66	8	136	59	et	472	206	300	9136	3 983
	80	18	3230	1 408	100	3029	1 320	100	2266	988
Vesilaitos 4	35	20	22	9	15	3	1	et	1	0
	49	100	63	27	14	3	1	200	4	1
	63	et	178	78	et	33	15	et	1	1
	77	200	7652	3 336	et	2208	963	et	65	28

et = ei todettu käytetyissä analyysitulavuuksissa
tai ei tulosta - biofilminäytteet (cfu/ cm²)