



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Jenna Toijanen

CCA-kasvatusalusta uudeksi testimenetelmäksi *E. coli* -bakteerien ja koliformisten bakteerien tutkimiseen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

Insinöörityö

9.11.2020

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Jenna Toijanen CCA-kasvatusalusta uudeksi testimenetelmäksi <i>E. coli</i> -bakteerien ja koliformisten bakteerien tutkimiseen 28 sivua + 7 liitettä 9.11.2020
Tutkinto	insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaajat	Yliopettaja Riitta Lehtinen Vedenpuhdistusosaston päällikkö Otto Manninen
<p>Opinnäyte tehtiin Aqva Finland Oy:n vesilaboratoriolle. Opinnäytetyön tavoitteena oli löytää uusi edullisempi testimenetelmä <i>E. coli</i> -bakteerien ja koliformisten bakteerien tutkimiseen vesinäytteistä. Testimenetelmien toimivuutta, hintaeroja, vahvuuksia sekä heikkouksia vertailtiin ennen uuden menetelmän valintaa. Vertailuun valikoituivat IDEXX Colilert*-18-, 3M AQCC Petrifilm- ja VWR CCA-testimenetelmät. Kolmen testimenetelmän kasvatusalustojen soveltuvuuskokeita suoritettiin Aqvan vesilaboratoriossa.</p> <p>Koliformiset bakteerit ovat gramnegatiivisia sauvabakteereita, jotka ovat fakultatiivisesti anaerobisia sekä oksidaasinegatiivisia. Koliformisiin bakteereihin kuuluu monia eri bakteerisukuja, kuten <i>Escherichia</i>-, <i>Klebsiella</i>- ja <i>Citrobacter</i>-sukujen lajit. Koliformiset bakteerit voivat olla peräisin maaperästä, teollisuusjätevesistä tai kasveista, lukuun ottamatta <i>E. coli</i> -bakteeria, joka aina kertoo veden ulosteperäisestä saastumisesta. <i>E. coli</i> -bakteerit ovat lämpökestoisia koliformisia bakteereita, joita tavataan vain ihmisten ja tasalämpöisten eläinten ulosteessa.</p> <p>Testivaiheessa kasvatettiin tunnettuja bakteeripitoisuuden omaavia näytevesiä eri kasvatusalustoilla. 3M AQCC Petrifilm-kasvatusalusta ei soveltunut uudeksi testimenetelmäksi, koska testien aikana selvisi, että alusta ei kestänyt kloorin neutralisointiin käytettävää natriumtiosulfaattia. Uudeksi testimenetelmäksi valikoitui VWR-valmistajan CCA-kasvatusalusta, joka toimi testivaiheessa parhaiten eikä alusta häiriintynyt kloorin neutralisointiaineesta.</p> <p>CCA-kasvatusalustan tulokset olivat onnistuneita. Kasvatusalustalla kasvoi tyypillisiä sinisinä <i>E. coli</i> -bakteeripesäkkeitä sekä punaisia koliformisten bakteerien pesäkkeitä. Punaiset koliformiset bakteeripesäkkeet varmistettiin oksidaasitestillä virhepositiivisen tuloksen varalta.</p> <p>Aqvan vesilaboratorio päätti jatkaa CCA-kasvatusalustan lisätestauksia, jotta se voitaisiin verifioida laboratorion uudeksi viralliseksi testimenetelmäksi. Verifiointin jälkeen FINAS-akkreditointipalvelu arvioi testimenetelmän verifiointisuunnitelman ja hyväksyttää sen vaatimukset täyttäväksi testimenetelmäksi.</p>	
Avainsanat	<i>Escherichia coli</i> , koliformiset bakteerit, CCA-kasvatusalusta, vesinäyte

Author Title Number of Pages Date	Jenna Toijanen CCA Growth Medium as a New Test Method for the Study of <i>E. coli</i> and Coliform Bacteria 28 pages + 7 appendices 9 November 2020
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Program	Biotechnology and Chemical Engineering
Professional Major	Biotechnology and Food Engineering
Instructors	Riitta Lehtinen, Principal Lecturer Otto Manninen, Head of the Water Treatment Unit
<p>This thesis was produced for Aqva Finland Oy's water laboratory. The aim of the thesis was to find a new, more cost-effective test method for the study of <i>E. coli</i> and coliform bacteria in water samples. The functionality, price differences, strengths and weaknesses of the chosen test methods were compared before making an informed decision. The IDEXX Colilert *-18, 3M AQCC Petrifilm and VWR CCA were selected for comparison. The suitability tests of the culture media of the three test methods were performed in the Aqva water laboratory.</p> <p>Coliform bacteria are gram-negative rod bacteria that are facultatively anaerobic as well as oxidase negative. Coliform bacteria include many different genera of bacteria such as <i>Escherichia</i>, <i>Klebsiella</i>, and <i>Citrobacter</i>. Coliform bacteria can be derived from soil, industrial effluents, or plants, except for <i>E. coli</i>, which always indicates fecal contamination in water. <i>E. coli</i> bacteria are heat-resistant coliform bacteria; they are found only in the feces of humans and warm-blooded animals.</p> <p>In the test phase, sample waters with known bacterial concentration levels were grown on different culture media. 3M AQCC Petrifilm medium was found not to be suitable as a new test method because during the tests it was discovered that the medium was not resistant to sodium thiosulfate, which is used for neutralizing chlorine. The VWR CCA medium, which performed best in the test phase and whose medium was not disturbed by the chlorine neutralizer, was selected as the new test method.</p> <p>Test results for CCA medium were successful and the medium grew typical blue <i>E. coli</i> colonies as well as red coliform colonies. Red coliform colonies were confirmed by an oxidase test for a false positive result.</p> <p>The Aqva Water Laboratory decided to continue further testing of the CCA medium to verify it as the laboratory's new official test method. After the verification, the FINAS accreditation service evaluates the verification plan of the test method and approves it as a compliant test method.</p>	
Keywords	<i>Escherichia coli</i> , coliform bacteria, CCA medium, water sample

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Aqva Finland Oy	2
2.1	Vedenpuhdistusyksikkö	2
2.2	Vesilaboratorio	2
3	Koliformiset bakteerit	4
3.1	Koliformisten bakteerien laatuvaatimukset	4
3.2	<i>Escherichia coli</i>	5
3.3	<i>Escherichia coli</i> -bakteerien laatuvaatimukset	5
4	IDEXX Colilert*-18-testimenetelmä	5
4.1	Testimenetelmässä tarvittavat laitteet	6
4.2	Testimenetelmän työvaiheet	7
4.3	Menetelmän vahvuudet ja heikkoudet	8
5	Petrifilm AQCC-kasvatusalusta	9
5.1	Testimenetelmässä tarvittavat laitteet	9
5.2	Testimenetelmän työvaiheet	10
5.3	Menetelmän vahvuudet ja heikkoudet	11
6	<i>E. coli</i> -bakteerien ja koliformisten bakteerien CCA-agaralusta	12
6.1	Testimenetelmän tarvittavat laitteet	12
6.2	Testimenetelmän työvaiheet	13
6.3	Menetelmän vahvuudet ja heikkoudet	14
7	Standardivaatimukset	15
7.1	Kasvatusalustat	15
7.2	Näyteastia	15
7.3	Laitteet	16

8	Uuden menetelmän vaatimat hankinnat ja toimenpiteet	16
8.1	Uusi vesinäytepullo	17
8.2	Työohje uudella CCA-kasvatusalustalla	18
9	CCA-kasvatusalustan soveltuvuuskokeet	19
9.1	Työsuunnitelma	19
9.2	Työssä käytettävät bakteerit	19
9.3	Tarvittavat välineet	20
9.4	Tulosten ilmoittaminen	21
10	Tulokset ja tulosten tulkinta	22
11	Yhteenveto	27
	Lähteet	29
	Liitteet	
	Liite 1. Aqvan vesianalyysin näytteenotto-ohje ja esitietolomake	
	Liite 2. IDEXX-bakteeritestin käyttöohje	
	Liite 3. Petrifilm AQCC-alustan käyttöohje	
	Liite 4. Käyttöohje uudelle CCA-kasvatusalustalle	
	Liite 5. Oksidaasitestin käyttöohje	
	Liite 6. CCA-kasvatusalustan sertifikaattitodistus	
	Liite 7. Työssä käytettävien bakteerien sertifikaattitodistus	

Lyhenteet

AQCC	Aqua Coliform Count, joka tarkoittaa vesinäytteen koliformisten bakteerien määrää.
CCA	Coliforms chromogenic agar eli kromogeeninen koliformiagar-kasvatusalusta.
COD _{Cr}	Chemical oxygen demand with dichromate eli kemiallinen hapen kulutus dikromaattimenetelmällä.
EN	Eurooppalaisen standardisoimisjärjestön vahvistettu standarditunnus.
FINAS	Finnish Accreditation Service eli Suomen akkreditointipalvelu.
ISO	International Organization for Standardization on kansainvälinen standardisoimisjärjestö.
MCE	Mixed cellulose esters eli selluloosaesterisekoitekalvot, jotka ovat tietyntyyppisiä suodatinkalvoja.
MPN	Most probable number, joka on todennäköisin lukumäärä.
PMY	Pesäkettä muodostavaa yksikköä.
SFS	Suomen Standardisoimisliitto
SYKE	Suomen ympäristökeskus
TDS	Total dissolved solids, joka on veden liuenneet kiintoaineet.

1 Johdanto

Tämä insinööriyö on tehty Aqva Finland Oy:n vesilaboratoriolle 10.11.2019–20.10.2020. Aqva Finland Oy on Suomen ensimmäinen vedensuodatuslaitteita myyvä yritys, joka on kehittänyt oman vesilaboratorion suodatuslaitteiden myynnin tueksi. Suodatinlaitteita osataan suositella ja myydä paremmin, kun tiedetään tarkemmin, mitä epäpuhtauksia suodatettavat vedet sisältävät. Laboratorion vesianalyysointien valmistusaika on erittäin nopea verrattuna muihin vesilaboratorioihin. Näytevesien tulokset valmistuvat maksimissaan kahden viikon aikana ja nopeimmillaan tulokset voivat valmistua jopa yhdessä päivässä. Aqva työllistää tällä hetkellä 15 henkilöä, joista kaksi henkilöä työskentelee vesilaboratoriossa.

Tämän insinööriyön aiheena on etsiä Aqva Finlandin vesilaboratoriolle uusi tutkimusmenetelmä *Escherichia coli* -bakteerien ja koliformisten bakteerien tutkimiseen. Työn aikana selvitetään *E. coli* -bakteerien ja koliformisten bakteerien tutkimiseen käytettäviä eri testimenetelmiä ja niiden kasvatuksessa käytettäviä kasvatusalustoja. Testimenetelmien valmistajia, hintoja, vahvuuksia sekä heikkouksia vertailtiin ennen menetelmän valintaa. Insinööriyö sisältää eri kasvatusalustojen soveltuvuuskokeita, valitun menetelmän tutkimussuunnitelman, lopulliset tulokset sekä lopulliseksi tuotteeksi valikoidun menetelmän käyttöohjeen laboratoriotyöntekijöille.

Yritys haluaa uuden tutkimusmenetelmän, joka on edullisempi sekä nopeampi suorittaa, kuin nykyinen laboratorion käytössä oleva *E. coli* -bakteerien ja koliformisten bakteerien testimenetelmä. Opinnäytetyössä vertaillaan IDEXX Colilert*-18-testimenetelmää, AQCC Petrifilm- sekä CCA-kasvatusalustoja. Vesilaboratoriolla on käytössä tällä hetkellä IDEXX Colilert*-18-testimenetelmä, joka jätetään laboratorion käyttöön likaisempien vesien tutkimiseen. Kyseinen testimenetelmä on melko kallis, minkä vuoksi sen rinnalle haluttaan löytää edullisempi testimenetelmä puhtaiden vesien tutkimista varten. Uuden bakteerien kasvatusmenetelmän tulee olla laatustandardien täyttämä, jotta se voidaan ottaa käyttöön akkreditoinnin täyttämäksi testimenetelmäksi. Aqvan vesilaboratoriolla on samanaikaisesti käynnissä akkreditointiprosessi, jonka suorittaa FINAS-akkreditointipalvelu. FINAS tarkistaa kaikkien testimenetelmien toimivuuden sekä koko laboratorion luotettavan toiminnan.

2 Aqva Finland Oy

Aqva Finland Oy on vuonna 2010 perustettu vedensuodatuslaitteistoja kehittävä ja myyvä yritys, joka sijaitsee Helsingin Hermannissa. Yritykseen kuuluu vedenpuhdistusyksikkö, pienkoneiden huolto-osasto nimeltä Aide, julkisten tilojen ratkaisuyksikkö sekä vesilaboratorio. [1.]

2.1 Vedenpuhdistusyksikkö

Aqva Finlandin vedenpuhdistusyksikkö on veden puhdistusmahdollisuuksia myyvä yksikkö, joka suosittelee laitteet asiakkaiden suodatustarpeiden mukaan. Yritys myy suodatinlaitteita moneen eri puhdistustarpeeseen, kuten kunnallis-, kaivo- ja luonnonvesille. [2.] Suodatinlaitteistoja on tarjolla kymmeniä erilaisia ja parhaimman käsityksen tuotteista saa ottamalla yhteyttä vesiasiantuntijoihin tai menemällä paikan päälle yrityksen myymälään ja keskustelemalla omista veden suodatustarpeista. Vesiasiantuntijat osaa- vat neuvoa oikean suodatinratkaisun vesianalyysin avulla. Vesianalyysillä selvitetään, mitä kaikkea asiakkaan vesi sisältää ja mitä siitä olisi hyvä saada suodatettua pois, kuten *E. coli* -bakteerit. [1.]

2.2 Vesilaboratorio

Aqvan vesilaboratorio on perustettu Helsingin Hermannin toimipisteeseen vuonna 2015. Laboratorio perustettiin alkujaan vedenpuhdistusyksikön myynnin tueksi, mutta nykyisin se toimii myös omana yksikkönään. Yrityksen alkuaikoina vedenpuhdistuksen vesiasiantuntijoiden haasteena oli asiakkaiden kaivovedet, jotka haluttiin suodattaa juoma- tai käyttövedeksi, mutta vesien sisältämät epäpuhtausmäärät eivät olleet tiedossa ilman vesianalyysitutkimusta. Asiakkaiden tutkimusvedet saattavat sisältää eri määrän esimerkiksi rautaa tai humusta, jolloin tarvitaan tietynlaiset rautaa tai humusta suodattavat suodattimet. [1.] Vesien laatu myös vaihtelee hyvin laajasti eri vuodenaikoina, jolloin asiantuntijoiden täytyy osata suositella tarpeeksi tehokas suodatin tai suodatinlaitteisto. Vesianalyysi suositellaan tehtävän keväisin, jolloin veden laatu on likaisimmillaan. Vesiasiantuntijat osaavat suositella oikeanlaisen suodatinlaitteiston paremmin silloin kun he tietävät tarkemmin, mitä kaikkea asiakkaan vesi sisältää. [3.]

Vesianalyysit tilataan yrityksen verkkosivuilta tai niitä on ostettavissa myös Hermannissa sijaitsevassa Aqvan myymälässä. Valmistuneet vesianalyysitulokset lähetetään asiakkaan sähköpostiin pdf-muodossa. Laboratorio kirjoittaa testausselosteen tuloksiin myös lausunnon, josta selviää epäpuhtauksien ylittyneet laatusuositus- tai laatuvaatimusrajat. Tulosten sähköpostiviestissä on mukana automaattinen teksti, jossa asiakasta kehoitetaan olemaan yhteydessä Aqvan vesiasiantuntijaan, jos vedessä on havaittu laatusuositus- tai laatuvaatimusrajoja ylittäviä määriä epäpuhtauksia. Vesiasiantuntija suosittelee tulosten perusteella parasta suodatinratkaisua. Vesianalyysin tulokset voi myös käydä syöttämässä yrityksen internetsivustolla olevaan suodatinhakukoneeseen, joka ehdottaa asiakkaan epäpuhtauksille sopivan suodatinlaitteiston. [4.]

Yrityksen sivuilta on tilattavissa eri laajuisia vesianalyysitestejä. Tarjolla on valmiita analyysipaketteja, kuten rengaskaivovesille tarkoitettu analyysipaketti (tuotekoodi LAB11), joka sisältää seuraavat tutkittavat ominaisuudet:

- rauta
- mangaani
- sameus
- suolapitoisuus
- sähkönjohtavuus
- pH
- väriluku
- haju
- koliformiset bakteerit
- *E. coli* -bakteerit
- TDS
- COD_{Cr}.

Yrityksellä on myynnissä yksittäistestejä sekä valmiita analyysipakettikokonaisuuksia. [5.]

Vesianalyysi ja sen pakkaus tilataan ja maksetaan Aqvan verkkosivuilla. Vesianalyysipakkaus tulee noutaa Postin toimipisteestä, kun asiakas on vastaanottanut Postin saapumisilmoituksen. Asiakas täyttää vesianalyysipullon näytevedellä näytteenotto-

ohjeiden mukaisesti valitsemastaan vesipisteestä sekä kirjaa näytetiedot pakkauksen esitietolomakkeeseen. Aqvan näytteenotto-ohje ja esitietolomake löytyy liitteestä 1. Täytetty analyysipakkaus on vietävä Postin toimipisteeseen mahdollisimman pian näytteenotosta. Posti antaa asiakkaalle analyysipakkauksen seurantatunnuksen, jonka avulla asiakas seuraa paketin toimitusta. Laboratorio suosittelee näytteen viemistä Postiin alkuvuokosta, jotta näyte saapuu vesilaboratorioon maanantain ja torstain välisenä aikana. Vesianalyysipakkaus saapuu laboratorioon 24 tunnin sisällä näytteenotosta, jos asiakas on noudattanut vesianalyysin mukana toimitettuja toimitusohjeita. Vesianalyysinäytteen voi viedä suoraan Aqvan toimipisteeseen, mutta näytettä ei suositella vietävän perjantaisin. Aqvan vesilaboratorio ei ole viikonloppuisin auki, jonka vuoksi perjantaina tuotujen näytteiden tutkimuksia ei voida aloittaa samana päivänä. Tutkimusveden bakteerien määrittäminen on aloitettava 24 tunnin sisällä näytteenotosta, jolloin näytteen bakteerit ovat vielä tutkimuskelpoisia ja tulokset ovat akkreditoitusti hyväksytyjä. Tämän vuoksi näytteen analysointi on aloitettava heti sen saavuttua vesilaboratorioon. Asiakas saa valmistuneet tulokset sekä lausunnon sähköpostiin kahden viikon aikana näytteen saapumisesta laboratorioon. [4.]

3 Koliformiset bakteerit

Koliformiset bakteerit ovat gramnegatiivisia sauvabakteereita, jotka ovat fakultatiivisesti anaerobisia sekä oksidaasinegatiivisia. Koliformisiin bakteereihin kuuluu monia eri bakteerisukuja, kuten *Escherichia*-, *Klebsiella*- ja *Citrobacter* -sukujen lajit. Koliformiset bakteerit voivat olla peräisin maaperästä, teollisuusjätevesistä tai kasveista, lukuun ottamatta ulosteperäistä *E. coli* -bakteeria, joka aina kertoo ulosteperäisestä saastumisesta. [6, s. 10–11.]

3.1 Koliformisten bakteerien laatuvaatimukset

Koliformiset bakteerit kuuluvat talousvesiasetuksen jatkuvaan valvontaan. Talousvesien laatuvaatimuksen 683/2017-asetuksen on määrittänyt sosiaali- ja terveysministeriö. Kyseisen asetuksen mukaan hyvässä talousvedessä koliformisten bakteerien laatuvaatimusmäärä tulisi olla 0 pmy/100 ml eli nolla pesäkettä muodostavaa yksikköä sadassa millilitrassa. Sosiaali- ja terveysministeriön kaivovesien 401/2001-asetuksen mukaan

koliformisten bakteerien laatuvaatimuspitoisuus tulee olla alle 100 pmy/100 ml ja kyseisen asetuksen laatusuositus on 0 pmy/100 ml. [6, s. 11.]

3.2 *Escherichia coli*

E. coli -bakteerit ovat lämpökestoisia koliformisia bakteereita, joita tavataan vain ihmisten ja tasalämpöisten eläinten ulosteessa. Sen ilmentyminen tutkittavassa vedessä, kertoo suorasta ulosteperäisestä saastumisesta. *E. coli* -bakteerit ovat gramnegatiivisia sauvabakteereita. [6, s. 7–8.]

3.3 *Escherichia coli* -bakteerien laatuvaatimukset

Kunnallis- ja kaivovesien laatuvaatimus *E. coli* -bakteerien esiintyvyydelle on 0 pmy/100 ml ja pullovesien laatuvaatimusraja on 0 pmy/250 ml. *E. coli* -bakteerit kuuluvat myös talousvesiasetuksen jatkuvaan valvontaan. Jos kyseisiä bakteereita esiintyy edes pienissä määrin tutkittavassa vedessä, saastumisen alkuperä on selvitettävä ja on aloitettava jatkotestien suorittaminen. [6, s. 7–8.]

4 IDEXX Colilert*-18-testimenetelmä

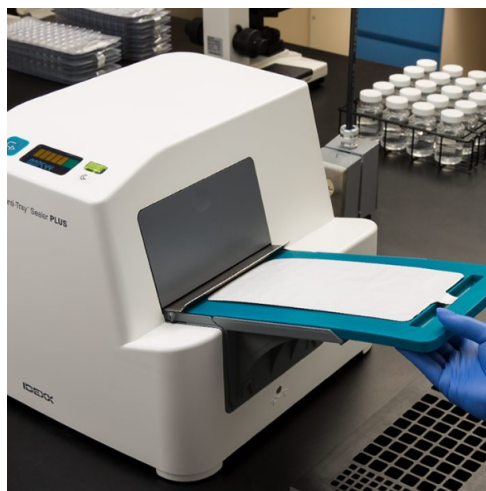
IDEXX Laboratories on vuonna 1983 perustettu yhdysvaltalainen yritys, joka valmistaa testimenetelmiä ensisijaisesti eläinlääkäriasemille sekä meijeri- ja vesilaboratorioiden käyttöön [7, s. 6]. Colilert*-18-testi on yksi IDEXX-yrityksen kehittämistä testimenetelmistä, jonka avulla selvitetään tutkittavan veden koliformisten bakteerien sekä *E. coli* -bakteerien määrä [8]. Testimenetelmän reagenssiampullien myyntipakkaus on sopivan kokoinen pienille tutkimuslaboratorioille. Pakkaus on tilattavissa joko sadan tai kahden sadan ampullin pakkauksissa. Kuvassa 1 on IDEXX-valmistajan Colilert*-18-tuotteen kahden sadan ampullin reagenssipakkaus, joka on käytössä Aqvan vesilaboratoriossa koliformisten bakteerien ja *E. coli* -bakteerien testauksessa.



Kuva 1. IDEXX Colilert*-18-testipakkaus [8].

4.1 Testimenetelmässä tarvittavat laitteet

IDEXX-valmistajan testimenetelmien mukana myydään Quanti-Tray™-kuoppalevyn sulkija (kuva 2), joka sulkee näytevesien kuoppalevyt kuumentamalla. Valmistaja on kehittänyt laitteen vain IDEXX-testimenetelmien käyttöön, minkä vuoksi laitetta ei voi hyödyntää muiden valmistajien testeissä. [9.]



Kuva 2. IDEXX Quanti-Tray™ Sealer PLUS -sulkija käytössä [9].

Menetelmä vaatii myös inkubaattorin, missä näytteitä kasvatetaan tarkassa lämpötilassa. Inkubaattoria käyttäessä, laitteen sisällä tulee olla myös yksi referenssilämpötilamittari, joka tarkistaa koko inkuboinnin ajan, että inkubaattorin lämpötila pysyy stabiilina. [8.]

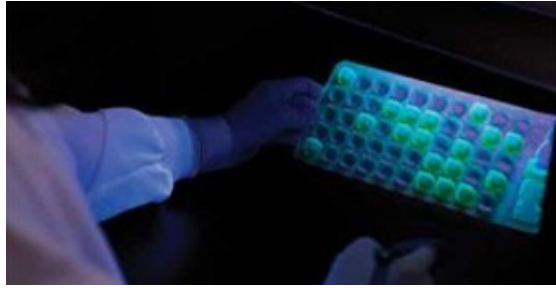
4.2 Testimenetelmän työvaiheet

IDEXX-valmistajan menetelmä sopii luonnonvesille, klooria sisältäville kunnallisvesille, sekä muille hieman likaisemmillekin tutkimusvesille. Tutkittaessa kunnallisvesiä steriiliin näytepullon tulee sisältää kloorin neutralisointiin tarkoitettua natriumtiosulfaattijauhetta. Kloori saattaa tuhoja tutkittavat bakteerit, minkä vuoksi veden kloori neutralisoidaan näytteenottohetkellä natriumtiosulfaatilla. Testimenetelmän työvaiheet ovat melko yksinkertaiset suorittaa. Menetelmän käyttöohjeet löytyvät liitteestä 2. Menetelmä eroaa perinteisestä ravintoagaralustoista siten, että tutkimusveden bakteerit kasvatetaan IDEXX-valmistajan kehittämissä kuoppalevyissä (kuva 3).



Kuva 3. IDEXX-valmistajan Quanti-Tray/2000-kuoppalevy [9].

IDEXX-testimenetelmän tulosten luku on myös erilainen kuin perinteisillä bakteerien kasvatusmenetelmillä, kuten ravintoagarmaljoilta pesäkkeiden laskeminen. Ravintoagarmaljoilta pesäkkeet lasketaan merkitsemällä kynällä pisteitä maljan kanteen ja lasketaan pesäkkeitä samalla kun pisteitä merkitään. Ravintoagarmaljojen laskemiseen on myös kehitetty laskemista helpottavia laitteita. IDEXX-menetelmässä merkitään kuoppalevyn kuopat, jotka muuttuvat inkuboinnin aikana keltaisiksi. Kun keltaiset kuopat on merkitty, kuoppalevy asetetaan kuvassa 4 näkyvän UV-valon alle ja merkitään rasti kaikkiin keltaisiin taskuihin, mitkä myös fluoresoivat UV-valon alla. Keltaiset taskut ovat koliformisten bakteerien määrä tutkimusvedessä ja UV-valon alla fluoresoivat keltaiset taskut ovat *E. coli* -bakteerin määrä. [10, s. 2.]



Kuva 4. Spectroline UV-valokabinetti, jonka avulla nähdään fluoresoivat keltaiset taskut [8].

Kuoppalevyn taskujen merkitsemisen jälkeen lasketaan keltaisten pienten ja isojen taskujen määrät sekä *E. coli* -bakteerien taskujen määrät. Katsotaan IDEXX-valmistajan kehittämästä testimenetelmän laskentataulukosta bakteerien pesäkemäärät 100 ml:ssä näytevetä. Tulos ilmoitetaan esimerkiksi 3,1 mpn/100 ml eli 3,1 most propable number in 100 ml, joka on todennäköisin lukumäärä sadassa millilitrassa koliformisia bakteereita. [10, s. 2.]

4.3 Menetelmän vahvuudet ja heikkoudet

IDEXX-valmistajan Colilert-testimenetelmä on käytössä Aqva Finlandin vesilaboratoriossa. Menetelmän vahvuuksia on sen helppo ja nopea toteutus. Bakteerien laskeminen on tehty helpoksi kuoppalevyn taskujen avulla, eikä niiden laskemiseen kulu liikaa aikaa. Kyseisen testin vahvuus on siinä, että sillä pystytään määrittämään likaisempienkin vesien bakteerimääriä. IDEXX-valmistajan testimenetelmä jää Aqvan vesilaboratorion käyttöön likaisempien vesien tutkimiseen ja puhtaammille näytevesille otetaan käyttöön kalvosuodatusmenetelmä, joka ei puolestaan sovi sameille tai sakkaa sisältäville näytevesille [11, s. 7].

Menetelmän huonoja puolia on, että se vaatii kalliin kuoppalevyn sulkijalaitteen, jota ei voi hyödyntää muihin kuin IDEXX-valmistajan kehittämiin testimenetelmiin. Menetelmässä käytettävät kuoppalevyt, vesinäytepullot, reagenssiampullit sekä vaahdonestoaine tekevät menetelmästä kalliin tuotteen. Kyseinen testi on noin kolme kertaa kalliimpi kuin perinteinen petrimaljalla tehty testi. Reagenssiampullien jauheen liuottamisessa kuluu myös paljon aikaa, varsinkin veden ollessa kylmää, jolloin jauhe liukenee erittäin hitaasti.

5 Petrifilm AQCC-kasvatusalusta

3M-yhtiö on yhdysvaltalainen monialayritys, joka valmistaa erilaisia laboratoriotarvikkeita, kuten Petrifilm-kasvatusalustoja. Petrifilm AQCC eli Aqua Coliform Count -alustoja käytetään koliformisten bakteerien laskentaan pullovesiteollisuudessa, eikä niiden käyttämistä suositella muille tutkittaville testivesille. Valmistaja ilmoittaa, että tutkimukset muilla vesillä on loppukäyttäjän omalla vastuulla. AQCC-alustat eivät valikoituneet Aqvan vesilaboratorion käyttöön, koska alustalla saa selville pelkät koliformiset bakteerit. Käyttöön haluttiin kasvualusta, joka ilmoittaa *E. coli* -bakteerien ja koliformisten bakteerien määrän samalla kasvatusalustalla. Koliformiset bakteeripesäkkeet ilmenevät AQCC-kasvatusalustalla punaisina pesäkkeinä ja niiden ympärille ilmenee kaasukuplia. [12, s. 1.]

5.1 Testimenetelmässä tarvittavat laitteet

Petrifilm-menetelmässä näytevesi suodatetaan suodatinkalvon lävitse ja bakteerit pidättyvät suodatinkalvolle. Menetelmä vaatii kalvosuodatuslaitteiston, läpivirtauspumpun sekä pumpun jäteastian. Kalvosuodatusmekaniikka ei sovellu sameille näytteille, koska veden sakka haittaa bakteerien kasvua suodatinkalvolla. [12, s. 2.]

Kalvosuodatuslaitteessa käytetään MCE- eli selluloosaesterisekoitekalvoja, jotka ovat kokovalkoisia sekä niiden huokoskoko on 0,45 µm. Kalvot ovat steriilisti yksittäispakattuja, ja niitä käsitellessä käytetään steriilejä pinsettejä. [12, s. 2.]

Laitteen osien sterilointiin vaaditaan autoklaavi ja näytteiden inkuboinnissa tarvitaan inkubaattori sekä inkubaattorin lämpötilan tarkistusta varten lämpötilamittari. Kasvatusalustan bakteeripesäkkeiden laskemista voi helpottaa kuvassa 5 näkyvällä solulaskurilla. [12, s. 2.]



Kuva 5. VWR-yrityksen myymä solulaskuri, joka on käytössä Aqvan vesilaboratoriossa [13].

On myös olemassa muita bakteeripesäkelaskentaa helpottavia laitteita ja tarvikkeita, kuten kyniä, jotka laskevat pesäkkeitä samalla kun kasvatusalustan kannen pintaan tökätään kynällä.

5.2 Testimenetelmän työvaiheet

Petriefilm AQCC-alustoille sopii kalvosuodatusmenetelmä tai kostutusmenetelmä. Kostutusmenetelmässä alustalle pipetoidaan vain 1 ml näytevettä [12, s. 2]. Testivaiheessa päädyttiin kuitenkin kokeilemaan kalvosuodatusjärjestelmää, koska menetelmässä suodatetaan 100 ml näytevettä, joka on vaadittu määrä monessa testimenetelmän standardissa.

Menetelmässä käytettävät kalvosuodatuslaitteiston osat pestään tiskikoneessa aina ennen testin aloittamista sekä pesun jälkeen laitteen osat tulee steriloida autoklaavissa. Laitteen osat kääritään folioon ja pakatut osat steriloidaan autoklaavissa 15 minuutin ajan 121 °C asteen lämpötilassa. Nämä puhdistusvaiheet tulee tehdä aina ennen testien aloittamista, jotta mahdolliset kontaminaatiota ja mittausepävarmuutta aiheuttavat tekijät voidaan sulkea pois. Työskentelytasot pyyhitään etanolilla ja tämän jälkeen suodatinlaitteisto kasataan työskentelytasolle. Laitteeseen kytketään kuvassa 6 näkyvä Sartoriuksen läpivirtauspumppu, jonka läpi vesi virtaa nopeudella 4 l/min [14].



Kuva 6. Sartoriuksen Microsart® e.jet -läpivirtauspumppu [14].

Laitteen kasauksen jälkeen näytevedet suodatetaan suodatinkalvoille liitteen 3 käyttöohjeiden mukaisesti. Näytteiden ja tarvikkeiden käsittelyssä tulee noudattaa hygieenisiä työskentelytapoja, jotta näytteet eivät kontaminoidu testivaiheiden aikana.

5.3 Menetelmän vahvuudet ja heikkoudet

AQCC Petrifilm-alustat ovat hyvin ohuita kasvatusalustoja (kuva 7), jonka ansiosta ne vievät erittäin vähän tilaa esim. jääkaapissa tai inkubaattorissa. Inkubaattoriin mahtuu enemmän näytteitä samanaikaisesti kuin laboratorion käytössä olevia kuoppalevyjä.



Kuva 7. Ohut AQCC-Petrifilm-kasvatusalusta ja sen myyntipakkaus [15].

Kloorin neutralisointiaine ei sovellu kyseiselle kasvatusalustalle, minkä vuoksi alustaa ei voitu valita uudeksi testituotteeksi Aqvan laboratorioon. Kyseistä menetelmää voi käyttää puhtaiden vesien tutkimiseen, jotka eivät sisällä klooria, jolloin näiden tutkimusvesien

näytepullojen ei tarvitse myöskään sisältää kloorin neutralisointiainetta. Kyseisellä menetelmällä voi tutkia esimerkiksi klooraamattomia vesiä, kuten kaupalliseen tarkoitukseen pullotettua lähdevettä. [12, s. 1.]

6 *E. coli* -bakteerien ja koliformisten bakteerien CCA-agaralusta

CCA-kasvatusalusta eli kromogeeninen koliformiagar on VWR International Oy -yrityksen valmistama standardit täyttävä valmiiksi valettu kasvatusalusta. Alusta on perinteinen petrimalja, joka on halkaisijaltaan 55 cm ja alustan elatusaine on väriltään kellertävää. VWR on globaali yritys biotieteiden sekä teknologian ja teollisuuden aloilla. VWR verkkokaupan kautta voi ostaa laboratoriolaitteita, kemikaaleja, huoltopalveluita sekä laboratoriotarvikkeita. Yrityksen jakeluverkosto toimii yli 30 maassa. [16.]

6.1 Testimenetelmän tarvittavat laitteet

CCA-alustojen testimenetelmän suorittamisessa tarvitaan samoja laitteita kuin Petrifilm-alustoja käytettäessä. Aqvan vesilaboratorion näytemäärien lisääntyessä tulevaisuudessa liian suuriksi saatetaan siirtyä käsin käytettävästä solulaskurista kuvassa 8 näkyvään automaattiseen pesäkelaskuriin.



Kuva 8. INTERSCIENCE SCAN 1200 -pesäkelaskuri [17].

Automaattinen pesäkelaskuri on kallis sijoitus, mutta jatkossa sitä voidaan hyödyntää muidenkin bakteerisukujen pesäkkeiden laskentaan. Jos laitteeseen ostaa erillisen Petrifilm-alustoille tarkoitetun adapterin, niin tällöin laite soveltuu myös Petrifilm-alustojen pesäkkeiden laskentaan. [17.]

6.2 Testimenetelmän työvaiheet

CCA-alustoille voidaan käyttää kuvassa 9 näkyvää kalvosuodatuslaitteistoa samalla tavalla kuin Petrifilm-alustoille. CCA-alustan työvaiheet ovat myös lähes samat kuin Petrifilm-alustoilla tehtäessä.

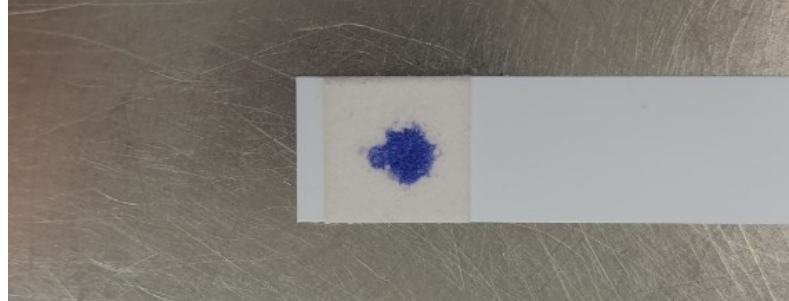


Kuva 9. 6 branch Microsart® Manifold -kalvosuodatinlaitteisto testivaiheessa.

CCA-alustan kasvatuslämpötila ja -aika ovat erilaiset kuin Petrifilm-alustoilla. Alustaa kasvatetaan ylösalaisin ja sitä inkuboidaan 36 ± 2 °C:ssa 21–24 tunnin ajan. Menetelmän tarkemmat käyttöohjeet ja työvaiheet löytyvät liitteestä 4. Petrifilm-alustoja pinotaan enintään 10 kappaletta päällekkäin inkuboinnin ajaksi. Koliformiset bakteerit kasvavat alustalla punaisina pesäkkeinä ja *E. coli* -bakteerit tummansinisinä tai violetteina pesäkkeinä.

Inkuboinnin jälkeen koliformiset bakteerit on varmistettava oksidaasitestillä. Kaikkien koliformisten bakteerien punaiset pesäkkeet on varmistettava negatiivisella oksidaasireaktiolla, koska alustalla saattaa kasvaa monia eri suvun bakteereita, jotka voivat aiheuttaa

virhepositiivisia tuloksia. Tällaisia virhepositiivisia tuloksia antavia bakteereita ovat esim. *Aeromonas*-suvun bakteerit, jotka saattavat myös kasvaa alustalla punaisina pesäkkeinä. Oksidaasiposiitiviset bakteerisuvut aiheuttavat kuvan 10 mukaisen sinisen värimuutoksen oksidaasitestille. Tarkemmat oksidaasitestin työvaiheet löytyvät liitteestä 5.



Kuva 10. Virhepositiivista antavan bakteeripesäkkeen positiivinen oksidaasireaktio [oma kuva].

Koliformiset bakteerit ovat oksidaasinegatiivisia bakteereita, joten näille pesäkkeille ei synny oksidaasireaktiota, jolloin liuskalle ei myös muodostu värimuutosta. Varmistustesti suositellaan tehtäväksi kaikille alustalla punaisina kasvaville pesäkkeille tai vähintään kymmenelle pesäkkeelle. Jos oksidaasireaktio ilmenee tummansinisenä, tällöin on kyse oksidaasiposiitivisista bakteereista, kuten *Aeromonas*-suvun bakteereista. [11, s. 8.]

6.3 Menetelmän vahvuudet ja heikkoudet

CCA-alustojen vahvuus on, että ne täyttävät monet eri standardivaatimukset sekä menetelmän saa validoitua akkreditoituksi testimenetelmäksi laboratorioon myöhemmässä vaiheessa. Alusta ei häiriinny kloorin neutralisointiaineesta eli natriumtiosulfaattijauheesta. Alustan työvaiheissa käytettävä kalvosuodatuslaitteisto on perinteinen laboratoriolaitteisto, joka on ollut jo kauan käytössä eri tutkimuslaboratoriossa, ja sen vuoksi siitä löytyy paljon tutkimusdataa sekä hyväksytyjä standardimenetelmiä. Kalvosuodatusmenetelmä on myös helppo ja nopea suorittaa. Kasvatusalustojen huonoja puolia on valmismaljojen lyhyt säilyvyysaika. CCA-petrimaljat vievät myös enemmän tilaa kuin esim. Petrifilm-alustat, mutta toisaalta ne vievät vähemmän tilaa kuin tällä hetkellä käytössä olevat IDEXX-valmistajan kuoppalevyt. Petrimaljojen pesäkkeitä on myös hieman hitaampi laskea kuin IDEXX-valmistajan menetelmän kuoppalevyn kuoppia, mutta

myöhemmin investoitava automaattinen pesäkelaskuri tulee laskemaan pesäkkeet hetkessä ja se ilmoittaa havaitut pesäkkeiden määrät tietokoneella.

7 Standardivaatimukset

Mikrobiologisia tutkimuksia varten tulee noudattaa SFS-EN ISO 19458 -standardia, jossa eritellään mikrobiologisten vesinäytteiden näytteenottoon liittyvät vaatimukset, kuten vesinäytepullojen materiaalit. [18, s. 12.] Uuden menetelmän käyttöönotossa käydään läpi myös monia muita standardeja, jotka asettavat vaatimuksia menetelmässä käytettävien laitteiden ja kasvatusalustojen osalta.

7.1 Kasvatusalustat

CCA-kasvatusalusta ostettiin VWR International Oy -valmistajalta. Maljat ovat sertifioituja ja niiden mukana toimitettiin laatusertifikaatti, joka löytyy liitteestä 6. CCA-kasvatusalusta on SFS-EN ISO 9308-1 -standardin ehdottama kasvatusalusta. Myös oksidaasitesti on valittu kyseisen standardin pohjalta. [11, s. 9.]

7.2 Näyteastia

SFS-EN ISO 19458 -standardin vaatimukset näyteastialle ovat, että pullon täytyy olla steriili tai vaihtoehtoisesti se täytyy pystyä steriloimaan, joko autoklaavissa, gammasäteilytyksellä tai etyleenioksidilla. Useimmissa tapauksissa näyteastian kooksi riittää 500 ml, mutta tiettyjen bakteerien tutkimiseen voidaan vaatia isompikin näytepullo esim. *Legionella*-bakteerin tutkimiseen tarvitaan yhden litran pullo. [18, s. 12.]

Näytepullon materiaalin tulee olla lasia tai myös erilaiset muovit, kuten polystyreeni, polypropyleeni, polyetyleni tai polykarbonaatti soveltuvat käyttöön. Uudelleen käytettävät pullot ovat yleensä lasia ja kertakäyttöiset pullot ovat muovia. [18, s. 12.]

Kloorilla desinfioidut kunnallisvesinäytteet tulee inaktivoida näytteenoton yhteydessä esim. natriumtiosulfaatin avulla. Eri toimittajilta saa valmiiksi natriumtiosulfaatilla

annosteltuja steriilejä pulloja, jotka on tarkoitettu vain klooripitoisille näytevesille. Kloorin toiminta tulee pysäyttää heti näytteenoton yhteydessä, jotta se ei tuhoa tutkittavia bakteereita ennen kuin mikrobiologinen testi päästään aloittamaan. [18, s. 14.]

7.3 Laitteet

Kalvosuodatusmenetelmää käyttäessä tulee noudattaa SFS 3950- sekä SFS-EN ISO 8199 -standardien asettamia vaatimuksia. SFS 3950 -standardi kertoo kalvosuodatusmenetelmän periaatteen veden mikrobiologisessa tutkimuksessa ja SFS-EN ISO 8199 -standardissa esitetään yleiset testin aikana toteutettavat standardivaatimukset vesien mikrobiologisissa tutkimuksissa.

Monikanavaista suodatinyksikköä ja sen pumppua tulee käyttää SFS 3950 -standardin mukaisesti esim. suodatinlaitteiston osat täytyy steriloida autoklaavissa 15 minuutin ajan ja 121 °C:ssa [19, s. 1].

Laboratorioon täytyi tehdä kalliita hankintoja, ja yksi niistä hankinnoista oli autoklaavi. Autoklaavin vaatimuksia löytyi eri standardeista ja siihen vaadittuja ominaisuuksia tuli paljon esiin prosessin edetessä. Autoklaavin täytyy sisältää sisäänrakennettu höyrykehitin, raportointitulostin, joka sisältää autoklavoinnin aikaiset tiedot, kuten ajan, lämpötilan sekä paineen. Vaadittavia ominaisuuksia on myös bakteerien tappoon soveltuvat ominaisuudet sekä instrumenttien sterilointiin tarvittava kuivausominaisuus. [20, s. 11–12.]

8 Uuden menetelmän vaatimat hankinnat ja toimenpiteet

Menetelmän käyttöönotossa tuli ilmi paljon vaatimuksia, jotka akkreditoidun laboratorion tulee täyttää. Bakteerimenetelmän käyttöönoton aikana Aqvan laboratoriossa oli samanaikaisesti käynnissä akkreditointiprosessi ja kaikki mikrobeihin liittyvät vaatimukset tuli tarkistaa ennen uusien laitteiden ja tarvikkeiden valintaa ja ostoa. Laboratorioon jouduttiin ostamaan vaatimukset täyttävät laitteet ja testimenetelmää varten tarvittavia tarvikkeita, kuten Sartoriuksen kalvosuodatinlaitteisto, suodatinkalvojen pyöreäpäiset pinsetit, vahvaa etanolia, sytytin, autoklaavi sekä monia muita eri hintaluokkaa olevia laitteita ja

tarvikkeita. Laboratorioon tilattiin myös uudet jääkaapit, koska vanhojen jääkaappien lämpötila ei pysynyt tarpeeksi stabiilina. Bakteerien kasvatusalustoja tulee säilyttää 5 ± 3 °C:ssa ja jääkaappien lämpötilavaihtelut tulisi minimoida, koska lämpötilojen vaihtelu aiheuttaa bakteerien kasvua haittaavaa kondenssivettä kasvatusalustoihin.

Laboratoriohenkilökunnan tulee verifioida uusi testimenetelmä standardien mukaisesti, ennen kuin se voidaan ottaa käyttöön laboratoriossa akkreditoiduksi menetelmäksi. Laboratoriohenkilökunta kirjoittaa CCA-kasvatusalustan verifiointisuunnitelman ennen laboratorion akkreditointia, joka luultavasti ajoittuu vuoden 2021 keväälle.

8.1 Uusi vesinäytepullo

Aqva Finlandilla on ollut aikaisemmin käytössä kuvan 11 mukainen vesianalyysipussi, joka ei täyttänyt kaikkia SFS-EN ISO 19458 -standardin asettamia materiaalivaatimuksia. Vanhan vesianalyysipussin tilalle jouduttiin etsimään uusi vaatimukset täyttävä vesinäyteastia.



Kuva 11. Aqva Finlandin vanha vesianalyysipussi ja -pakkaus.

Vanhan vesianalyysipakkauksen hyvä ominaisuus oli, että pakkauksen pystyi lähettämään asiakkaalle kirjeenä suoraan asiakkaan kotiin, jolloin asiakkaan ei tarvinnut hakea pakkausta Postin toimipisteestä. Tämä postitusetu jäi pois, kun siirryttiin standardivaatimukset täyttäviin steriileihin näytepulloihin. Uusien vesinäytepullojen pakkaus ei ole tarpeeksi ohut lähetettäväksi kirjeenä asiakkaalle, vaan se toimitetaan pakettina Postin kautta. Vesianalyysipussin huono puoli oli se, että asiakkailta oli hankaluuksia sen

täyttämässä ja usein laboratorioon saapui vajaita vesinäytepusseja. Tutkittava vesi saattoi loppua kesken analysoinnin, jolloin asiakkaalta täytyi pyytää uusi vesinäyte.

Vesianalyysipullojen hintavertailuita tehtiin monille eri laboratoriovälineitä toimittaville yrityksille ja lopuksi päädyttiin tilaamaan kuvan 12 mukaisia 500 ml:n steriileitä vesinäytepulloja [21].



Kuva 12. Steriili vesinäytepullo eri kokoluokissa [21].

Vesinäytepullojen hyvä puoli on, että ne ovat steriilejä ja ne on helppo täyttää suuren näytteenottoaukon vuoksi. Pullo pysyy hyvin muodossaan asiakkaan ottaessa vesinäytettä esim. järvestä, jolloin pullo täytyy upottaa veden alle näytteenotto-ohjeiden mukaisesti (liite 1), pussilla otettu järvivesinäyte oli asiakkaiden mukaan hyvin haastava toteuttaa.

8.2 Työohje uudella CCA-kasvatusalustalla

Uusille laboratoriotestimenetelmille tulee aina laatia työohje laboratorion työntekijöitä varten. Laboratoriohenkilökunta voi laatia myös tiivistetyn käyttöohjeen testivaihetta varten, mutta ennen menetelmän käyttöönottoa se täytyy verifioida tarkemmin. Käyttöohjeiden tulee olla helppolukuisia ja tarkkoja, jotta henkilökunta pystyy tarkistamaan testimenetelmien käyttöohjekansiosta kyseisen testimenetelmän työvaiheet aina ennen testin aloittamista. Uudelle *E. coli* -bakteereita ja koliformisia bakteereita kasvattavan alustan tiivistetty käyttöohje on liitteessä 4 ja varmistustestin oksidaasitestin käyttöohje löytyy liitteestä 5.

9 CCA-kasvatusalustan soveltuvuuskokeet

Insinööriyön testiosuuden aikana suoritettiin monien eri kasvatusalustojen testauksia. Tässä kappaleessa käydään läpi lopulliseksi valikoidun menetelmän työsuunnitelma, toteutus sekä tulokset.

9.1 Työsuunnitelma

Testi toteutettiin 10.6.–16.10.2020 Aqvan vesilaboratoriossa liitteiden 4 ja 5 työohjeiden mukaisesti. Testin tarkoituksena oli testata kalvosuodatusmenetelmää CCA-kasvatusalustoilla tunnetuilla bakteeripitoisuuksilla. Testi sisälsi 30 kpl CCA-alustoja, joille valmistettiin erilaisia laimennoksia valmistetuista bakteeriliuoksista. Tutkittiin myös kunnalliseden *E. coli*- ja koliformiset bakteeripitoisuudet pelkästä mielenkiinnosta, vaikka kyseisiä bakteereita ei pitäisi löytyä kunnallisvesiverkostosta. Suoritettiin myös kasvatus-testi kahdelle asiakkaan toimittamalle näytevedelle, jotka sisälsivät suuria määriä bakteerikasvua häiritseviä ominaisuuksia, kuten rautaa ja humusta. Testattiin, kuinka likaisia näytteitä voi suodattaa suodatinkalvolle ja milloin kalvon pinnalle jää liikaa bakteerikasvusta häiritsevää epäpuhtautta.

9.2 Työssä käytettävät bakteerit

Soveltuvuuskokeissa käytettiin IDEXX-yritykseltä tilattuja sertifioituja bakteeriantipulleja, joiden sertifikaattitodistus löytyy liitteestä 7. Yrityksellä oli toimitusvaikeuksia koliformisten bakteerien positiivikontrolliantipullien kanssa, ja tämän vuoksi testivaiheeseen ei saatu tilattua tunnettua pitoisuutta sisältäviä koliformisten bakteerien antipulleja. Saatavuusongelman vuoksi työssä tutkittiin asiakkaan toimittamia vesinäytteitä, joiden tiedettiin sisältävän koliformisia bakteereita sekä *E. coli* -bakteereita.

CCA-kasvatusalustan testeihin saatiin tilattua *E. coli* -bakteerien positiivikontrolli, jonka tuotekoodi on *Escherichia coli* ATCC 11775. Ampullin bakteerien hyväksyttävä pitoisuus oli 15–369 mpn/100 ml. Testiä varten tilattiin myös kasvatusalustan negatiivikontrollibakteeri, joka suunnitellusti ei menestynyt alustalla. Negatiivikontrollibakteeriksi valikoitui *Enterococcus faecalis*, joka oli mainittu kasvatusalustan sertifikaatissa liitteessä 6

alustan inhiboivaksi bakteeriksi. Liitteestä 6 kävi ilmi, että *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeri kasvaa alustalla värittöminä pesäkkeinä, joita ei kuulu laskea koliformisiksi pesäkkeiksi. Kyseisellä bakteerilla pystyy kuitenkin suorittamaan oksidaasitestin toimivuuskokeen, jonka vuoksi *Pseudomonas aeruginosa* -bakteeri valittiin testin yhdeksi testibakteeriksi.

Bakteeriantestien tuotekoodit ja tunnetut bakteeripitoisuudet:

- CCA-alustan positiivikontrolli: *Escherichia coli* ATCC 11775, 15–369 mpn/100 ml
- CCA-alustan negatiivikontrolli: *Enterococcus faecalis* NCTC 775, 73–223 mpn/100 ml
- oksidaasitestin positiivikontrolli: *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12951, 301–1925 mpn/100 ml.

Tunnetuille bakteeripitoisuuksille valmistettiin omat kasvatusalustat ja asiakkaan toimitamat näytevedet kasvatettiin omilla kasvatusalustoilla. Tehtiin myös yksi testikasvatus *Pseudomonas*-bakteereille ravinneagarmaljalla, koska ei tiedetty, kuinka hyvin kyseinen bakteeri menestyy CCA-kasvatusalustalla. Oksidaasitestin toimivuutta testaavaan testiin tarvittiin selkeitä *Pseudomonas*-bakteeripesäkkeitä ja niitä saatiin kasvatettua kummallakin kasvatusalustalla.

9.3 Tarvittavat välineet

Suurin osa testivaiheen tarvikkeista tilattiin VWR-toimittajalta.

Testivaiheessa tarvittavia välineitä:

- autoklaavi
- kalvosuodatuslaitteisto
- läpivirtauspumppu

- sytytin
- etanoli
- ultrapuhdas vesi
- 30 kpl CCA-agaralustoja
- 31 kpl 0,45 µm suodatinkalvoja
- 1 kpl ravinneagaralusta
- permanenttitussi
- inkubaattori
- lämpötilamittari.

9.4 Tulosten ilmoittaminen

Lopulliset tulokset lasketaan varmistuneiden pesäkkeiden laskentakaavalla. Testeissä lasketut ja varmistetut bakteeripesäkkeiden määrät sijoitetaan kaavan 1 mukaiseen laskentakaavaan.

$$\text{Lopullinen tulos (pmy/100 ml)} = \frac{V}{N} \cdot A \cdot L, \quad (1)$$

V on varmistuneet pesäkkeet

N on tutkitut pesäkkeet

A on alustava pesäkeluku

L on laimennoskerroin

Kaavalla saadut tulokset ilmoittavat bakteeripesäkkeiden määrän 100 millilitrassa.

10 Tulokset ja tulosten tulkinta

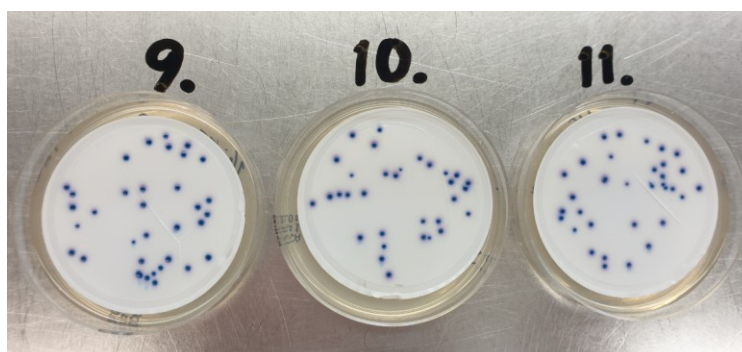
Aseptiset työskentelytavat varmistetaan valmistamalla steriilikontrollialusta ja inkuboinnin jälkeen alustalla ei ilmennyt bakteerikasvustoa. Kunnallisvesinäytteiden kasvualustoissa ei myöskään ilmennyt bakteerikasvustoa. Taulukossa 1 on ilmoitettu näytevesien näytetiedot, käytettyjen bakteeriantipulien tiedot, bakteeriantipulien bakteeripitoisuudet, näytteiden laimennoskertoimet, alustojen lasketut bakteeripesäkkeet sekä lopulliset bakteeripesäkkeet 100 millilitrassa.

Taulukko 1. *E. coli*- bakteerivesien tulokset CCA-kasvatusalustalla

Näytetiedot	Näytteen bakteeriantipulin tiedot	Bakteeripitoisuus (mpn/100 ml)	Laimennoskerroin	Lasketut pesäkkeet (pmy)	Lopullinen tulos (pmy/100 ml)
1. Steriilikontrolli	-	-	1	0	0
2.–6. Kunnallisvesi	-	-	1	0	0
7. <i>E. coli</i> -näytevesi	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	15–369	5	51	255
8. <i>Enterococcus faecalis</i> (negatiivikontrolli)	<i>Enterococcus faecalis</i> NCTC 775	73–223	5	0	0
9. <i>E. coli</i> + <i>Enterococcus</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775 + <i>Enterococcus faecalis</i> NCTC 775	15–369 73–223	10 10	34 0	340 0
10. <i>E. coli</i> + <i>Enterococcus</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775 + <i>Enterococcus faecalis</i> NCTC 775	15–369 73–223	10 10	32 0	320 0
11. <i>E. coli</i> + <i>Enterococcus</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775 + <i>Enterococcus faecalis</i> NCTC 775	15–369 73–223	10 10	33 0	330 0
12. <i>E. coli</i> + <i>Enterococcus</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775 + <i>Enterococcus faecalis</i> NCTC 775	15–369 73–223	20 20	10 0	200 0
13. <i>E. coli</i> + <i>Enterococcus</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775 + <i>Enterococcus faecalis</i> NCTC 775	15–369 73–223	20 20	13 0	260 0
14. <i>E. coli</i> + <i>Enterococcus</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775 + <i>Enterococcus faecalis</i> NCTC 775	15–369 73–223	20 20	17 0	340 0
15. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (oksidiaasitestin positiivikontrolli)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 12951	301–1925	5	123	615
16. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 12951	301–1925	5	121	605
17. <i>E. coli</i> + <i>Enterococcus</i> + <i>Pseudomonas</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775 + <i>Enterococcus faecalis</i> NCTC 775+ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 12951	15–369 73–223 301–1925	20 20 20	16 0 37	320 0 740

18. <i>E. coli</i> + <i>Enterococcus</i> + <i>Pseudomonas</i>	Escherichia coli ATCC 11775 + Enterococcus faecalis NCTC 775+ Pseudomonas aeruginosa NCTC 12951	15–369 73–223 301–1925	20 20 20	20 0 42	400 0 840
19. <i>E. coli</i> + <i>Enterococcus</i> + <i>Pseudomonas</i>	Escherichia coli ATCC 11775 + Enterococcus faecalis NCTC 775+ Pseudomonas aeruginosa NCTC 12951	15–369 73–223 301–1925	10 10 10	32 0 62	320 0 620
20. <i>E. coli</i> + <i>Enterococcus</i> + <i>Pseudomonas</i>	Escherichia coli ATCC 11775 + Enterococcus faecalis NCTC 775+ Pseudomonas aeruginosa NCTC 12951	15–369 73–223 301–1925	10 10 10	26 0 67	260 0 670
21. <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> , ravintoagaralustalla	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> NCTC 12951	301–1925	5	99	495

CCA-kasvatusalustoilla kasvoi tyypillisiä *E. coli* -bakteerien sinisiä pesäkkeitä. Kuvassa 13 on kymmenesosa laimennoksella valmistettuja *E. coli* -näytevesien kasvatusalustoja. Näytteiden 9-11 tulokset olivat hyvin lähellä toisiaan, ja ne olivat onnistuneita kasvatuksia.



Kuva 13. Näytteiden 9–11 kasvatusalustat, joilla kasvaa *E. coli* -bakteeripesäkkeitä.

E. coli -bakteeriampullien bakteeripitoisuudeksi oli ilmoitettu 15–369 mpn/100 ml. Näytteiden 9–11 tulokset olivat tuon tavoitellun pitoisuuden sisällä, joten testiveden laimennokset ja testin suoritus oli tehty onnistuneesti ja alustat toimivat halutunlaisesti *E. coli* -kasvatusten osalta. Näytteiden 9–11 näyteveteen oli *E. coli* -bakteerin lisäksi lisätty negatiivikontrollibakteeria, joka oli *Enterococcus faecalis* -bakteeri. *Enterococcus faecalis* -bakteeripesäkkeitä ei ilmennyt alustalla, joten negatiivikontrollitesti oli onnistunut.

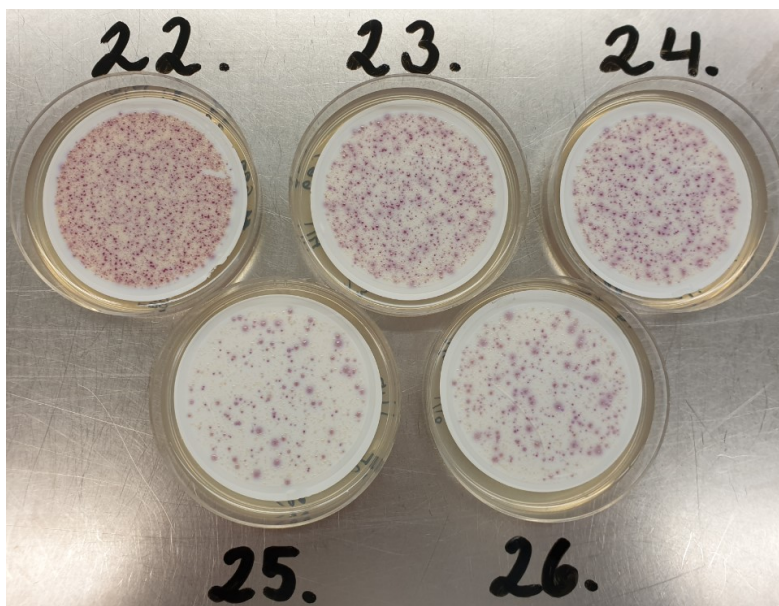
Näytevesien, joihin oli lisätty *E. coli*-, *Pseudomonas aeruginosa*- sekä *Enterococcus faecalis*-bakteeriliuoksia, kasvatusalustat onnistuivat melko hyvin. Tuloksissa oli hieman enemmän hajontaa, ja näytteen 18 pesäkkeiden määrä meni yli tavoitellun bakteeriampullipitoisuuden. Näytteiden 17, 19 ja 20 lopulliset bakteeripitoisuudet olivat halutun pitoisuuden sisällä.

Taulukossa 2 on näytteiden 699 ja 670 testitulokset. Näiden testivesien avulla saatiin kasvatettua koliformisia bakteeripesäkkeitä CCA-alustoille, virallisten bakteeriampullien sijasta. Jokaisesta kasvatusalustasta varmistettiin vähintään kymmenen punaista pesäkettä, ja kaikilta varmistetuilta alustoilta löytyi yksi oksidaasi-positiivinen bakteeripesäke, joka miinustettiin tutkittujen koliformisten bakteerien pesäkeluvusta.

Taulukko 2. Koliformisten bakteerien testikasvatusten tulokset.

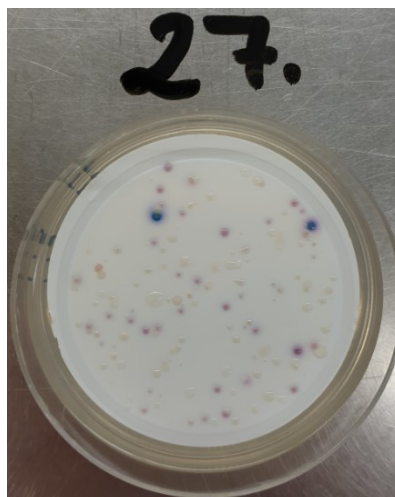
Näyte-tiedot	Laimennos-kerroin	E. coli -pesäkkeet	Koliformiset pesäkkeet	Pesäke-numero	oksidasi-varmistustestin tulos	Alustavat pesäkkeet E. coli + koliformiset	Lopullinen koliformisten bakteerien tulos (pmv/100 ml)
22. Näyte 699	1	0	< 300	-	-	-	Yli määrittysrajan
23. Näyte 699	4	0	< 300	-	-	-	Yli määrittysrajan
24. Näyte 699	4	0	< 300	-	-	-	Yli määrittysrajan
25. Näyte 699	10	0	< 300	-	-	-	Yli määrittysrajan
26. Näyte 699	10	0	< 300	-	-	-	Yli määrittysrajan
27. Näyte 670	1	2	40	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	- - - - - - + - - -	2+40=42	37,8 = 38
28. Näyte 670	4	0	13x4 =52	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	- - + - - - - - - -	0+52=52	187,2 = 187
29. Näyte 670	4	1 x 4 =4	9x4 =36	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	+ - - - - - - - - -	4+36=40	144
30. Näyte 670	10	2x10 =20	8x10 =80	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	- - - - - - - - + -	20+80=100	900

Asiakkaan toimittamasta näytteestä 699 saatiin kasvatettua koliformisia bakteereita, mutta alustalla kasvoi myös paljon virhepositiivista tulosta antavia bakteeripesäkkeitä, jotka eivät olleet koliformisia bakteereita. Näytteen 699 tutkimusvesi sisälsi liikaa bakteereita sekä suodatinkalvolle pidättäytyvää bakteerien kasvua häiritsevää sakkaa, jonka vuoksi alustojen koliformisia bakteeripesäkkeitä ei voitu testata oksidaasitestillä. Kuvassa 14 on näytteen 699 kasvatusalustat eri laimennoksilla ja kuvassa näkyy suodatinkalvolle kerääntynyttä keltaista sakkaa.



Kuva 14. Näytteen 699 22–26 kasvatusalustat eri laimennoksilla.

Näytevesi 670 sisälsi *E. coli* -bakteereita sekä koliformisia bakteereita. Kuvassa 15 on näytteen 670 laimentamaton näytevesi, josta pesäkkeet erottuivat selkeästi.



Kuva 15. Näytteen 670 kasvatusalusta, jossa on koliformisia bakteeripesäkkeitä sekä kaksi *E. coli*-bakteeripesäkettä.

Kasvatusalustalta varmistettiin oksidaasitestillä 10 punaista bakteeripesäkettä, joista yksi osoittautui oksidaasipositiiviseksi pesäkkeeksi, jolloin varmistettuja pesäkkeitä oli 9 kappaletta. Sijoitettiin varmistetut, tutkitut, alustavat pesäkkeet sekä laimennoskertoimet laskentakaavaan 1, jolloin saatiin lopulliseksi tulokseksi 37,8 pmy/100 ml koliformisia bakteereita sekä 2 pmy/100 ml *E. coli*-bakteereita.

$$\text{Lopullinen tulos (pmy/100 ml)} = \frac{9}{10} \cdot 42 \cdot 1 = 37,8 \text{ pmy/100 ml}$$

Tulokset tulee ilmoittaa kokonaislukuina, joten näytteen 27 lopullinen tulos oli 38 pmy/100 ml koliformisia bakteereita.

11 Yhteenveto

Opinnäytetyön tarkoituksena oli vertailla *E. coli* -bakteerien ja koliformisten bakteerien tutkimiseen käytettyjä testimenetelmiä. CCA-kasvatusalustan todettiin olevan sopivin sekä edullisin testimenetelmä puhtaiden vesien tutkimiseen.

Laboratoriohenkilökunta päätti, että tutkittavien vesien väriluvun ollessa yli 10 mg Pt/l, tulee näiden testivesien bakteeritestit suorittaa jatkossa IDEXX-testimenetelmällä. Väriluvun avulla nähdään, kun tutkimusvesi sisältää liikaa suodatinkalvolle pidättäytyvää kasvua häiritseviä ominaisuuksia, kuten humusta. IDEXX-testimenetelmällä jatketaan siis likaisempien vesien bakteeritutkimuksia ja puhtaille tutkimusvesille käytetään CCA-kasvualustaa.

Opinnäytetyön aikana suoritettut testikasvatukset olivat onnistuneita ja CCA-kasvualustoilla saatiin kasvamaan tavoiteltuja selkeitä bakteeripesäkkeitä. *E. coli* -testivesien kasvatukset olivat onnistuneita, ja alustoilta lasketut bakteeripitoisuudet asettuivat bakteerirampullien tunnettujen pitoisuuksien tavoitelluille alueille.

Koliformisten bakteerien testivesien pienimmät laimennokset aiheuttivat melko suurta hajontaa verrattuna laimentamattomaan näytteeseen. Voi olla, että laimentamaton näytevesi 670 sisälsi liikaa bakteerien kasvua inhiboivia ominaisuuksia, jolloin koliformisten bakteerien tulos oli melko matala. Näytteelle suoritettiin laimennoksia ja voi olla, että laimennoksien avulla saatiin vähennettyä näyteveden kasvua häiritseviä tekijöitä ja tämän vuoksi laimennoksien tulokset olivat suurempia kuin laimentamattoman. Koliformisille bakteereille tullaan suorittamaan jatkotutkimuksia tunnetuilla bakteeripitoisuuden omaavilla näytevesillä sekä aiotaan tehdä IDEXX-testimenetelmän ja CCA-kasvualustan välisiä testejä. Tullaa myös testaamaan asiakkaiden näytevesiä kummallakin testimenetelmällä ja tuloksia vertaillaan keskenään.

Laboratoriohenkilökunta aikoo jatkaa CCA-kasvualustan testejä tunnetuilla bakteeripitoisuuksilla ja suorittaa vielä enemmän toistoja kyseiselle testimenetelmälle. Ennen kuin menetelmä saadaan FINAS-akkreditoituksi menetelmäksi, tulee laboratorion osallistua kansainvälisiin SYKE-organisaation järjestämiin interkalibrointeihin, joilla varmistetaan

laboratoriohenkilökunnan yhtenäinen sekä osaava toiminta testin suorittamisen aikana. Laboratorion tulee osallistua akkreditoinnin jälkeenkin tietyin väliajoin interkalibrointeihin.

Laboratoriohenkilökunta tulee laatimaan tarkan verifointisuunnitelman ja kirjoittaa tarkan työhjeen testimenetelmälle. Tämä opinnäytetyö auttoi selvittämään, mistä testimenetelmässä olisi kannattavaa lähteä tekemään verifointisuunnitelmaa sekä onko testimenetelmää kannattavaa akkreditoida FINAS-yrityksellä.

Lähteet

- 1 Historia. 2020. Verkkoaineisto. AQVA Finland Oy. <<https://www.aqva.fi/aqva-historia>>. Luettu 18.2.2020.
- 2 Vedenpuhdistus. 2020. Verkkoaineisto. AQVA Finland Oy. <<https://www.aqva.fi/VEDENPUHDISTUS/ekauppa/gW3/>>. Luettu 24.2.2020.
- 3 Kaivovesianalyysit. 2020. Verkkoaineisto. AQVA Finland Oy. <https://www.aqva.fi/Kaivovesi-analyysit/ekauppa/gW61/?search_group=W61>. Luettu 10.3.2020.
- 4 Vesianalyysit. 2020. Verkkoaineisto. AQVA Finland Oy. <https://www.aqva.fi/Vesianalyysit/ekauppa/gW6/?search_group=W6>. Luettu 15.3.2020.
- 5 Kaivovesianalyysi + bakteerit. 2020. Verkkoaineisto. AQVA Finland Oy. <<https://www.aqva.fi/Kaivovesianalyysi-bakteerit/ekauppa/pLAB11/>>. Luettu 8.4.2020.
- 6 Talusvesiasetuksen soveltamisohje: Osa III Enimmäisarvojen perusteet. 2020. Verkkoaineisto. Valvira, Sosiaali- ja terveysalan lupa- ja valvontavirasto. <https://www.valvira.fi/documents/14444/6739502/Talusvesiasetuksen_soveltamisohje_osa_3.pdf/b9faedd0-cd83-fd94-09e2-452e7e7ee123>. Luettu 10.10.2020.
- 7 2019 Annual Report. 2019. Verkkoaineisto. IDEXX Laboratories, Inc. <<https://www.idexx.com/files/2019-idexx-annual-report.pdf>>. Luettu 14.6.2020.
- 8 Colilert-18. 2020. Verkkoaineisto. IDEXX Laboratories, Inc. <<https://www.idexx.com/en/water/water-products-services/colilert-18/>>. Luettu 15.6.2020.
- 9 Quanti-Tray System. 2020. Verkkoaineisto. IDEXX Laboratories, Inc. <<https://www.idexx.com/en/water/water-products-services/quanti-tray-system/>>. Luettu 20.6.2020.
- 10 Colilert*-18 Test Kit. 2019. Verkkoaineisto. IDEXX Laboratories, Inc. <<https://www.idexx.com/files/colilert-18-procedure-en.pdf>>. Luettu 20.12.2018.
- 11 SFS-EN ISO 9308-1. Escherichia coli -bakteerin ja koliformisten bakteerien lukumäärän määrittäminen. Osa 1: Kalvosuodatusmenetelmä vesille, joissa on vähän taustabakteerista. 2017. Veden laatu. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto SFS ry.

- 12 Petrifilm™. 2016. Verkkoaineisto. 3M Health Care. <<https://multimedia.3m.com/mws/media/7103030/product-instructions-3m-petrifilm-aqua-coli-form-count-plate.pdf>>. Luettu 15.7.2020.
- 13 Hand tally counter. 2020. Verkkoaineisto. VWR International Oy. <<https://fi.vwr.com/store/product/12606867/hand-tally-counter>>. Luettu 18.7.2020.
- 14 Microsart e.jet Fluid Pump 4L/min. 2020. Verkkoaineisto. Sartorius AG. <<https://www.sartorius.com/shop/ww/en/usd/applications-laboratory-microbiological-quality-control-pharmaceutical-quality-control-water-analysis/microsart-e-jet-fluid-pump-4l-min/p/166MP-4>>. Luettu 1.8.2020.
- 15 3M™ Petrifilm™ Aqua Coliform Count Plates. 2020. Verkkoaineisto. 3M Health Care. <https://www.3m.com/3M/en_US/company-us/all-3m-products/~AQUA-COL-3M-Petrifilm-Aqua-Coliform-Count-Plates/?N=5002385+3293785062&rt=rud>. Luettu 5.8.2020.
- 16 Tietoa meistä. 2020. Verkkoaineisto. VWR International Oy. <https://fi.vwr.com/cms/about_vwr>. Luettu 6.8.2020.
- 17 Scan 1200. 2020. Verkkoaineisto. INTERSCIENCE. <<https://www.inter-science.com/colony-counter-scan-1200>>. Luettu 6.8.2020.
- 18 SFS-EN ISO 19458. Näytteenotto mikrobiologista tutkimusta varten. 2016. Veden laatu. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto SFS ry.
- 19 SFS 3950. Kalvosuodatusmenetelmä veden mikrobiologisessa tutkimuksessa. 1979. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto SFS ry.
- 20 SFS-EN ISO/IEC 17025. Testaus- ja kalibrointilaboratorioiden pätevyys. 2017. Yleiset vaatimukset. Helsinki: Suomen Standardisoimisliitto SFS ry.
- 21 Vesinäytepullo steriili PET. 2013. Verkkoaineisto. MediQ. <<http://tuoteluettelo.mediq.fi/n343224/vesinaytepullo-steriili-pet>>. Luettu. 11.8.2020.

LIITTEET

Aqvan vesianalyysin näytteenotto-ohje ja esitietolomake



VESIANALYYSI Kuvaus ja ohjeet



Luotettava ja turvallinen



Oma vesilaboratorio



Helppo ja vaivaton

MYYJÄ

AQVA Finland Oy
Haukilahdenkatu 4
00550 Helsinki
Puh. 010 321 5080
myynti@aqva.fi

Kuvaus

Olet vastaanottanut vesinäytepullon (1 kpl) postitukseen käytettävässä pahvipaketissa. Käytä samaa pahvipakettia näytteen lähettämässä laboratorioon. Täytetyn vesinäytepullon pahvipaketin voi sulkea esimerkiksi teipillä.

Merkitse tilaamasi vesianalyysin tuotekoodi (esim. LAB02) näytteenottokyselylomakkeeseen kohtaan "Ostettu analyysi". Voit tarkistaa tilaamasi vesianalyysin tuotekoodin verkkokaupastamme (www.aqva.fi) kohdasta vesianalyysit. Mikäli tilasit useamman analyysin, merkitse kaikki tuotekoodit lomakkeeseen. Tilatessasi omavalintaisen yksittäisanalyysin, kirjoita tuotekoodin (LAB98) lisäksi sanallisesti valitsemasi tutkittava ominaisuus (esim. rauta). Jos tilasit pelkän analyysipakkauksen (tuotekoodilla LAB99), sinun tulee vielä ostaa verkkosivuiltamme haluamasi vesianalyysi (esim. LAB01 kaivovesianalyysi).

Näytteenotto kannattaa ajoittaa siten, että näytteet ehtivät laboratorioon samana päivänä tai enintään 24 tunnin kuluessa näytteenotosta. Normaalisti esimaksettu analyysipakkaus ehtii postitettuna laboratorioon vaaditun ajan sisällä. Näytteenoton ja tutkimuksen välisen viiveen pitkittyminen (yli 24 tuntia) voi heikentää tutkimustulosten luotettavuutta bakteerien osalta. Käyttäessäsi postilähetystä, selvitä toimipaikkasi myöhäisin toimitusaika, jolla analyysipakkaus ehtii saman päivän kuljetukseen. Näytettä ei suositella lähetettäväksi postitse to–su tai arkipyhää edeltävänä kahtena arkipäivänä. Lähetys on ennalta maksettu ja analyysipaketti tulee viedä Postin toimipisteeseen. Saat Postilta analyysipaketin seurantatunnuksen, joka tulisi säilyttää siihen asti, kunnes saat vesianalyysin valmistuneet tulokset.

Halutessasi voit tuoda analyysipaketin Aqvan toimipisteeseen. Toimita näyte ma–to välisenä aikana, näytettä ei suositella tuotavan perjantaisin. Säilytä näytettä jääkaapissa, jos sitä ei voida toimittaa toimipisteeseen heti näytteenoton jälkeen.

Näytteenotto-ohjeita noudattamalla minimoidaan mahdolliset analyysitulokseen vaikuttavat ulkoiset tekijät. Esimerkiksi seisoneseen veteen liuenneiden yhdisteiden määrä sekä putkistoista irtoavien partikkeleiden vaikutus analyysituloksiin.

Aqvan laboratorion vastuu vesianalyysistä ja vesianalyysin tulosten oikeellisuudesta alkaa vesinäytteen saavuttua laboratorioon.

Yleiset näytteenotto-ohjeet

1. Valitse, minkä vesipisteen kylmävesilinjasta haluat ottaa näytteen. Huomioi mahdollisten suodattimien tai vedenpuhdistimien sijainti. Jos haluat tarkistaa suodattimen toiminnan, ota näyte sen jälkeisestä vesipisteestä. Mikäli näyte halutaan raakavedestä, otetaan näyte ennen suodattimia.
2. Kun otat näytteen, toimi sivun 3 ohjeen "Näytteenoton lisäohjeet" mukaisesti.
3. Pese kädet huolellisesti saippualla ja kuivaa ne hyvin.
4. Irrota näytepullon sinetti ja avaa pullo. Älä koske näytepullon suosaan tai korkin sisäpintaan.
5. Täytä pullo ja jätä sinne pieni ilmatila (hieman yli 500 millilitran merkkiviivan yläpuolelle).
6. Sulje korkki tiukasti, kuivaa pullo ja tarkista ettei korkki vuoda.
7. Täytä näytteenottokyselylomake (sivu 4).
8. Laita pullo ja näytteenottokyselylomake takaisin pahvipakettiin. Sulje paketti esimerkiksi teipillä ulkopuolelta niin, ettei osoitekentät peity.
9. Vie paketti Postin toimipisteeseen tai postitoimistoon.
10. Saat vesianalyysin tulokset sähköpostiisi 14 päivän sisällä näytteen saapumisesta laboratorioon.

Näytteenoton lisäohjeet

AQVAN vesilaboratorio tutkii ainoastaan talouskäyttöön tarkoitettuja vesiä, ei esim. jäte- tai hulevesiä.

Näytteenotto kylmävesihanasta (kunnallisvesi):

Mikäli tarkoituksena on tutkia veden mikrobiologista laatua, poistetaan mahdollinen poresuutin ja suljetun hanan suu steriloidaan kuumentamalla sitä liekillä esim. sytyttimellä 5–10 sekunnin ajan. Steriloinnin jälkeen vettä valutetaan n. 5 sekunnin ajan ennen näytteenottoa. Huomaa, että mikrobiologinen näyte kunnallisvedestä tulee ottaa erilliseen, siihen tarkoitettuun näytepulloon. Näytepullo on noudettavissa Aqvan myymälästä.

Pelkääntäen kemiallisten ominaisuuksien, kuten raskasmetallien analysointi ei edellytä hanan sterilointia. Hana avataan ja kylmää vettä juoksetetaan normaalilla käyttövoimakkuudella n. 5 sekunnin ajan, jonka jälkeen vesinäytepullo täytetään suoraan virtaavasta vedestä.

Pulloon jätetään pieni ilmatila ja korkki suljetaan. Näytteenotto kannattaa ajoittaa aamuun, jolloin vettä ei ole vielä valutettu.

Näytteenotto kaivovedestä:

Näyte otetaan aina kylmävesilinjasta, ellei ole tarkoitus tutkia nimenomaan kuumavesilinjaston tai esimerkiksi lämminvesivaraajaan liittyviä ominaisuuksia vedestä.

Mikäli kaivossa on pumppu, vettä lasketaan hanasta niin kauan, että pumpussa, kalvopainesäiliössä ja putkessa seissyt vesi on varmuudella saatu pois ja vaihdettua (n. 5–10 minuuttia). Tämän jälkeen näytepullo täytetään ja suljetaan korkki.

Jos näyte otetaan suoraan avokaivosta, käytetään näytteenottoon normaalia kyseisen kaivon vedenottamiseen käytettävää puhdasta välinettä (esim. ämpäri). Laskettaessa vedenottovälinettä kaivoon on huolehdittava siitä, ettei pohja-ainesta tai kaivon reunoilla olevaa ainesta joudu näytteeseen.

Näytteenotto lähteestä:

Näytteenotto pyritään ensisijaisesti tekemään virtaavasta vedestä. Vältetään veden sekoittumista ja pohja-aineksen joutumista pulloon. Virtaavassa vedessä pullon suu upotetaan 20–30 cm syvyyteen ja käännetään pullo vastavirtaan. Täytetään pullo siten, että sinne jää pieni ilmatila. Suljetaan korkki ja tarkistetaan ettei se vuoda.

Jos virtausta ei ole, näytepulloon tartutaan pohjasta ja pullo painetaan nopeasti pinnan alle kohtisuorassa pullon suu alaspäin ja täytetään pullo. Käännetään pullo vaakasuoraan ja kuljetetaan veden alla suu edellä. Jätetään pulloon pieni ilmatila ja suljetaan korkki.

Näytteenotto järvestä tai joesta:

Näyte otetaan sekoittamatta vettä tai pohja-ainesta esim. laiturin päästä tai veneestä. Näytepulloon tartutaan pohjasta ja pullo painetaan nopeasti pinnan alle kohtisuorassa pullon suu alaspäin noin 20–30 cm syvyyteen. Käännetään pullo vaakasuoraan ja kuljetetaan veden alla suu edellä.

Jos näyte otetaan virtaavasta jokivedestä, pidetään pullon suuta vastavirtaan. Vältä mahdollisten veden pinnalla olevien roskien joutumista pulloon.

Linjasuodatinpaketin seuranta-analyysi:

L- ja XL-koon linjasuodattimien seurantanäytteenottoon suositellaan käytettäväksi näytteenottohanasettiä (tuotekoodi: LS-NAYTE), joka asennetaan painemittarien kiinnikekierteisiin painemittarin sijaan.

Laske vettä yhdestä vesipisteestä (esim. keittiön hanasta) 5–10 l/min vauhdilla, 5–10 min ajan. Tämän jälkeen näyte otetaan suodatetusta vedestä, pysäyttämättä tai muuttamatta veden virtausta. Toinen näyte otetaan suodattamattomasta vedestä vastaavalla tavalla heti edellisen näytteenoton jälkeen.



Näytteenottokysely

Käytä selkeitä kirjaimia tai tekstaustapaa

Ostettu analyysi (tuotekoodi esim. LAB02): LAB _____ & LAB _____ & LAB _____ & LAB _____ & LAB _____

Aqvan tilausno. (läheteeltä): _____

tai olen ostanut analyysin jälleenmyyjältä (esim. Allergiakauppa): _____

Näytteenottopäivämäärä ja kellonaika: _____

Postituspäivä: _____

Näytteen kuvaus: _____

(esim. järvivesi, merivesi, kunnallisvesi, pora- tai rengaskaivovesi)

Asiakkaan yhteystiedot

Nimi: _____

Maksajan nimi (jos eri hlö.): _____

Osoite: _____

Näytteen postinumero: _____

Puhelinnumero: _____

Sähköposti: _____

Haluan tietoa tarjouksista: Kyllä: Ei:

Tiedot ratkaisuehdotusta varten

Veden käyttäjien määrä: _____ Vesipisteiden määrä: _____

Olemme kiinnostuneet

puhdistamaan: Käyttöveden Juomaveden Molemmat

Käyttökohde: Kesäajan loma-asunto Ympärivuotinen loma-asunto
Omakotitalo Muu, mikä: _____

Onko vesinäyte otettu jo olemassa olevan suodattimen jälkeen, jos kyllä, minkä tyyppisen:

Havaitut ongelmat, onko välittömässä läheisyydessä järveä tai peltoa, muita lisätietoja:

Olen lukenut ja ymmärtänyt

näytteenottoon liittyvät ohjeet, allekirjoitus: _____

Neuvontanumero: 010 321 5080

IDEXX-bakteeritestin käyttöohje

Koliformiset bakteerit ja Escherichia coli

Colilert*-18

Esivalmistelu:

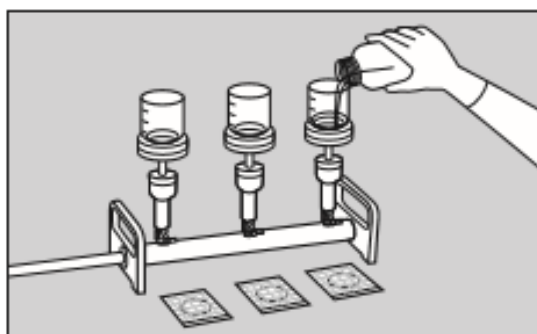
- *Muista aseptinen työskentely*
- *Desinfioi työskentelytaso etanolilla*
- *Laita hanskat ja desinfioi ne etanolilla*

Koliformiset bakteerit ja Escherichia coli:

1. Laita inkubaattori ja Quanti-Tray sulkija päälle
2. Merkitse steriiliin 100 ml:n pulloon asiakkaan koko nimi
3. Kaada 100 ml näytettä steriiliin pulloon
4. Lisää pulloon yksi Colilert*-18 ampulli ja kaksi tippaa vaahdonestoainetta
5. Ravista, kunnes reagenssi on kokonaan liuennut
6. Merkitse kuoppalevyyn asiakkaan nimi, testin päivämäärä, inkuboinnin aloitus- ja lopetusaika
7. Kaada näyte kuoppalevyyn ja sulje kuoppalevy Quanti-Tray sulkijalla
8. Laita inkuboitumaan + 35 (± 0.5) °C 18—22 tunniksi
9. Merkitse ovelle olevaan lämpötilaseurantalomakkeeseen tarvittavat tiedot
10. **Tulosten luku:** merkitse tussilla jokaisen keltaisen kuopan kohdalle poikkiviiva. Katso kuoppalevyä UV-valon alla, merkitse fluoresoiviin (sinisiä UV-valon alla) kuoppiin rasti.
 - Keltaiset kuopat ovat koliformisten bakteerien määrä
 - Keltaiset ja fluoresoivat kuopat ovat E. colin määrä

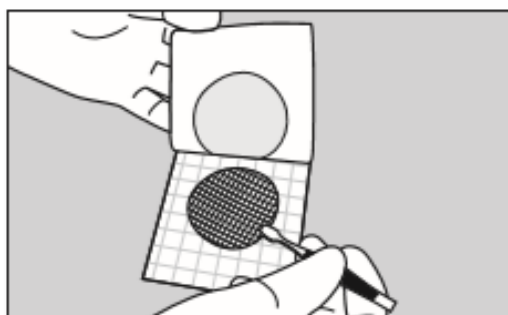
Petrifilm AQCC-alustan käyttöohje

1. Kootaan kalvosuodatuslaitteisto ja asetetaan suodatinsuppiloiden alle suodatinkalvot pinsettien avulla.
2. Kaadetaan 100 ml vettä suppiloihin, kuvan 1 mukaisesti ja käynnistetään imupumppu, joka pumppaa näyteveden suodatinkalvojen lävitse.



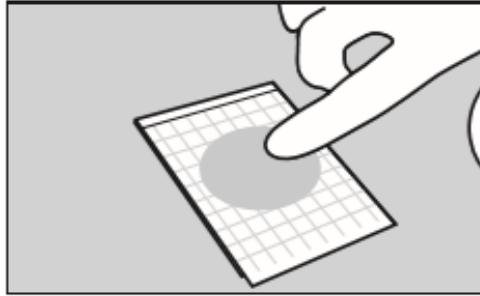
Kuva 1. näyteveden lisääminen kalvosuodattimen suppiloihin

3. Steriloidaan pinsetit etanolin ja liekin avulla. Kun pinsetit ovat jäähtyneet, nostetaan suodatinkalvo varovaisesti Petrifilm-alustalle kuvan 2 mukaisesti, siten ettei suodatinkalvon ja alustan väliin jää ilmakuplia.



Kuva 2. Suodatinkalvon asettaminen Petrifilm-alustalle

4. Lasketaan Petrifilm-alustan suojamuovi alas ja painellaan hieman kalvoa, kuten kuvassa 3 voi nähdä, näin kalvon alle ei jää ilmakuplia.



Kuva 3. Kasvatusalustan ilmakuplien poisto

5. Kirjoitetaan Petrifilm-alustan yläreunaan tarvittavat näytetiedot. Valmistetaan myös yksi steriilikontrolli, jolla varmistetaan hygieeniset työskentelytavat sekä työssä käytettyjen välineiden ja alustojen steriiliys.
6. Laitetaan alustat inkuboitumaan $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$:n lämpötilaan 24 tuntia ± 2 tuntia, alustan kirkas puoli ylöspäin aseteltuna. Petrifilmejä voi asettaa enintään 20 kappaletta päällekkäin inkuboitumaan.
7. Lasketaan alustan punaiset pesäkkeet inkuboinnin päätyttyä.

Käyttöohje uudelle CCA-kasvatusalustalle

1. Ota CCA-kasvatusalustat huoneen lämpöön
2. Laita inkubaattori päälle ja aseta lämpötilaksi 36 ± 2 °C astetta
3. Kasaa autoklavoidut suodatinlaitteiston osat työtasolle ja liitä imupumppu sekä jäteastia laitteistoon
4. Steriloi pyöreäpäiset pinsetit etanolilla ja liekillä
5. Aseta steriili suodatinkalvo kalvosuodattimen suppilon alle pyöreäpäisillä desinfioituilla pinseteillä
6. Kaada näytevettä suppilon 100 ml:n viivaan asti
7. Laita pumppu päälle
8. Sammutetaan pumppu heti kun kaikki näytevesi on mennyt suodatinkalvon lävitse
9. Nostetaan suppilo suodatinkalvon päältä ja siirretään suodatinkalvo steriloiduilla pinseteillä CCA-kasvatusalustalle siten, ettei kalvon ja agarin väliin jää ilmakuplia
10. Merkitään alustan pohjaan näytteen tiedot, päivämäärä ja inkuboinnin aloitus- ja lopetusaika
11. Asetetaan kasvatusalusta inkubaattoriin ylösalaisin
12. Merkitään testin aloituspäivämäärä, -aika ja -lämpötila inkubaattorin seurantalomakkeeseen
13. Merkitään asiakkaan testausselesteeseen testin aloitusaika ja -päivämäärä
14. Inkuboidaan näytettä 21–24 tunnin ajan
15. Merkitään testin lopetuspäivämäärä, -aika ja -lämpötila inkubaattorin seurantalomakkeeseen

Oksidaatitestin käyttöohje

PESÄKKEIDEN VARMISTUS OKSIDAASITESTILLÄ

1. Lasketaan kaikki punaiset ja vaaleanpunaiset pesäkkeet alustaviksi koliformisiksi bakteereiksi
2. Lasketaan tummansiniset ja violetit pesäkkeet, jotka ovat *E. coli* -bakteereita
3. Suoritetaan punaisten pesäkkeiden varmistustesti oksidaasitestillä. Kaikki alustan punaiset pesäkkeet tulee testata tai vähintään 10 pesäkettä:
 - Poimi suodatinkalvolta yksi punainen bakteeripesäke siirrostussilmukalla
 - Levitä bakteeripesäke siirrostussilmukalla oksidaasitestin liuskan värilliselle osalle
 - Odota 20–60 sekuntia, jos tämän ajan jälkeen liuskan väri ei ole muuttunut siniseksi, niin tällöin on kyse oksidaasinegatiivisesta koliformisesta bakteeripesäkkeestä. Jos sininen värireaktio syntyy niin tällöin pesäkettä ei lasketa koliformisten bakteerien pesäkkeiden yhteenlaskettuun tulokseen.

CCA-kasvatusalustan sertifiikaattitodistus



CERTIFICATE OF ANALYSIS

PRODUCT DATA Description CCA COLIFORMS CHROMOGENIC AGAR (ISO) Product code 175452ZA Batch 92352 Presentation 30 Prepared Plates/55 mm Plates for filtration purposes Expiry 29/10/2017 Manufacturing 01/06/2017		COMPOSITION in g / L Composition (g/l): Enzymatic digest of casein..... 1.00 Yeast extract..... 2.00 Sodium chloride..... 5.00 Di-sodium hydrogen phosphate..... 2.70 Sodium dihydrogen phosphate dihydrate..... 2.20 Tryptophan..... 1.00 Sodium pyruvate..... 1.00 Tergitol®7..... 0.15 Sorbitol..... 1.00 6-Chloro-3-indoxyl-β-D-galactopyranoside..... 0.20 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-glucuronic acid..... 0.10 IPTG..... 0.10 Agar..... 13.00																													
PHYSICAL-CHEMICAL TEST Color Pale yellow pH 6,7 (6,8 ± 0,2) Weight 9 (9 ± 2 G)		Microbiological control according to ISO 11133:2014 Result: Satisfactory																													
STERILITY TEST Incubation 48 hours at 30-35°C and 48 hours at 20-25°C: NO GROWTH Check at 7 days after incubation in same conditions		Result: Satisfactory																													
FERTILITY TEST Inoculate: Practical range 100±20 CFU; Min. 50 CFU (Productivity). Microbiological control according to ISO 11133:2014 Aerobiosis. Incubation at 36 ± 2°C, reading at 18-24 h																															
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Microorganism</th> <th>Specification</th> <th colspan="2">CFU Recovery</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>Escherichia coli</i> ATCC® 8739</td> <td>Good (≥70%) Dark-blue to violet colonies</td> <td>81</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td><i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922</td> <td>Good (≥70%) Dark-blue to violet colonies</td> <td>85</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td><i>Citrobacter freundii</i> ATCC® 43804</td> <td>Good (≥70%) Salmon to red colonies</td> <td>96</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 10145</td> <td>Good - Colourless</td> <td>74</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td><i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 10433</td> <td>Inhibited</td> <td>0</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td><i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC® 13048</td> <td>Good - Mauve</td> <td>80</td> <td>100%</td> </tr> </tbody> </table>				Microorganism	Specification	CFU Recovery		<i>Escherichia coli</i> ATCC® 8739	Good (≥70%) Dark-blue to violet colonies	81	100%	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Good (≥70%) Dark-blue to violet colonies	85	100%	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC® 43804	Good (≥70%) Salmon to red colonies	96	100%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 10145	Good - Colourless	74	100%	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 10433	Inhibited	0	0%	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC® 13048	Good - Mauve	80	100%
Microorganism	Specification	CFU Recovery																													
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 8739	Good (≥70%) Dark-blue to violet colonies	81	100%																												
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Good (≥70%) Dark-blue to violet colonies	85	100%																												
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC® 43804	Good (≥70%) Salmon to red colonies	96	100%																												
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 10145	Good - Colourless	74	100%																												
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 10433	Inhibited	0	0%																												
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC® 13048	Good - Mauve	80	100%																												
*Microbiological quality criteria according to European Pharmacopoeia. Maximum acceptable count = 200 CFU		Result: Satisfactory																													

This certificate is an electronic copy of the certificate available in our laboratory and does not require signature.

VWR International bvba/srnl
 Haaxrode Research park Zone 3
 Geldensekadebaan 454
 b-3001 Leuven Tel +32 (0) 16 385 011

Quality release date: 07/06/2017

Työssä käytettävien bakteerien sertifiikaattitodistus

IDEXX Laboratories, Inc.
One IDEXX Drive
Westbrook, ME 04092 USA
Email: water@idexx.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS IDEXX-QC COLIFORM & *E. COLI*

Part # 98-29000-00	Lot # 080219	Kit Expires: 30-Nov-2020
Catalogue # WQC-TCEC		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	Lot # 050819	Expires: 30-Nov-2020
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 12951	Lot # 061319	Expires: 31-Dec-2020
<i>Enterococcus faecalis</i> NCTC 775	Lot # 110218	

Lot Activity:

<i>Escherichia coli</i> :	149 MPN/100 mL with Colilert* and Colisure* Quanti-Tray*/2000 Verified by Quanti-Tray/2000 with n=55; Acceptable Range = 15 - 369
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> :	1113 MPN/100 mL with Pseudalert* Quanti-Tray/2000 Verified by Quanti-Tray/2000, Acceptable Range = 301 - 1925
<i>Enterococcus faecalis</i> :	148 MPN/1 mL with IDEXX SimPlate* for HPC Verified by SimPlate for HPC with n= 30; Acceptable Range = 73 - 223

Other methods may give results outside of the ranges stated above.

Storage Conditions: Frozen ($\leq -10^{\circ}\text{C}$)

This product was performance tested and has met all quality control specifications required for release.

This information is released by NSI.

Name: Lauren Deese

Signature: *Lauren Deese*

Date: 08/05/19

Quality Assurance

Technical Support Inquiries:

IDEXX

1-207-556-4496

1-800-321-0207 (US/CAN)

00-800-4339-9111 (Europe)

Manufactured by:

NSI Lab Solutions, Inc.†

7212 ACC Blvd

Raleigh, NC 27617 USA

Tested Under:



Produced Under:



†This CRM was produced and certified under a quality system accredited to ISO Guide 34:2009 (Certificate #AR-1571) and ISO/IEC 17025:2005 (Certificate # AT-1690)

*Colilert, Colisure, Quanti-Tray and Pseudalert are trademarks or registered trademarks of IDEXX Laboratories, Inc. or its affiliates in the United States and/or other countries.