



UNIVERSITY OF
EASTERN FINLAND

Uimavesien hygieeninen laatu merenrantalaidunten läheisyydessä

Eveliina Nurmi

Ympäristötiede

Itä-Suomen yliopisto

Luonnontieteiden, metsätieteiden

ja tekniikan tiedekunta

Ympäristö- ja biotieteiden laitos

08.05.2023

Itä-Suomen yliopisto, Luonnontieteiden, metsätieteiden ja tekniikan tiedekunta

Ympäristö- ja biotieteiden laitos

Ympäristötiede

Nurmi, Eveliina: Uimavesien hygieeninen laatu merenrantalaidunten läheisyydessä

Pro gradu -tutkielma, 72 sivua, 0 liitettä (0 sivua liitteitä)

Tutkielman ohjaajat: Apulaisprofessori, dosentti, FT Tarja Pitkänen (Terveysten ja hyvinvoinnin laitos ja Helsingin yliopisto), FM Anna-Maria Hokajärvi (Terveysten ja hyvinvoinnin laitos) ja yliopistonlehtori, dosentti, FT Eila Torvinen (Itä-Suomen yliopisto, Ympäristö- ja biotieteiden laitos)

Toukokuu 2023

Asiasanat: rantalaidunnus, saastelähdejäljitys, suolistoperäinen indikaattorimikrobi, taudinaiheuttajamikrobi, uimavesi

TIIVISTELMÄ

Laidunnus on uhanalaiseen perinnebiotooppeihin kuuluvien merenrantaniittyjen tärkein ja kustannustehokkain hoitomuoto. Merenrantalaidunnuksesta hyötyvät avoimilla niityillä viihtyvien kasvien, lintujen ja hyönteisten lisäksi laiduntavat eläimet ja alueen maisema. On kuitenkin herännyt huoli laiduntavien eläinten ulosteen vaikutuksesta alapuolisen vesistön ja mahdollisesti lähellä sijaitsevien uimarantojen hygieeniseen laatuun. Tässä tutkielmassa selvitettiin nautojen ja lampaiden laiduntamien merenrantalaidunten vaikutusta lähistöllä sijaitsevien uimavesien hygieeniseen laatuun. Lisäksi tutkittiin merenpohjan pintasedimentin roolia ranta-alueilla lannan ulosteperäisiä mikrobeja pidättävänä aineksena.

Näytteenottokohteita oli kaksi, jotka sijaitsivat Pohjois-Pohjanmaalla. Kummassakin kohteessa otettiin vesi- ja pintasedimenttinäytteitä laidunten edustojen pintavesistä, eläinten juomavesistä, laidunten läheisyydessä sijaitsevilta uimarannoilta, sekä kontrolliuimarannoilta, joiden läheisyydessä ei laidunnettu. Näytteitä otettiin kahden uimakauden aikana yhteensä kolme kertaa kummastakin kohteesta. Näytteistä analysoitiin suolistoperäistä saastumista osoittavat indikaattoribakteerit *Escherichia coli* ja suolistoperäiset enterokokit, zoonoottisista

taudinaiheuttajista lämpökestoiset kampylobakteerit, salmonella, enterohemorraaginen *Escherichia coli* (EHEC) ja *Cryptosporidium*-alkueläin. Saastelähdejäljityksellä selvitettiin, miten laiduntavat eläimet ja luonnon lintupopulaatiot vaikuttavat pintaveden hygieeniseen laatuun tutkimuskohteissa. Uimarannoille tehtiin terveystarkastus Uimavesiopas-työkalun avulla skenaarioissa, joissa uimaveden laatu vastasi laidunten edustojen pintavesiä, eläinten juomavesiä, rantalaidunten läheisyydessä sijaitsevia uimavesiä ja kontrolliuimavesiä.

Indikaattoribakteerien lukumäärät jäivät kaikissa pinta- uima ja kontrolliuimavesissä alle uimavesiasetuksissa määritellyn yksittäisen valvontatutkimustuloksen toimenpiderajan. Eläinten juomavesissä havaittiin suurempia lukumääriä indikaattoribakteereita verrattuna muihin näytetyyppeihin ($p < 0,05$). Kampylobakteereita havaittiin uimavesissä (1/6), kontrolliuimavesissä (2/9) ja eläinten juomavesissä (6/9). Kontrolliuimavesistä havaittiin myös salmonellaa (1/9). EHEC-bakteeria ei havaittu vesinäytteistä, kun taas *Cryptosporidium*-geenimarkkeria havaittiin kaikista näytetyypeistä, mutta löydöksiä ei voitu varmistaa. Tutkituista vesinäytteistä havaittiin lintujen, lokkien ja märehäntäjien ulosteeseen viittaavia geenimarkkereita. Markkereiden geenikopiolukumäärissä ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja eri näytetyyppien välillä, paitsi yleistä ulosteperäistä saastumista indikoivaa markkeria havaittiin enemmän eläinten juomavesissä verrattuna pinta- ja kontrolliuimavesiin ($p < 0,05$).

Laiduntavalla eläinlajilla (nauta ja lammas) ei havaittu olevan vaikutusta suolistoperäisten mikrobien lukumääriin laidunten edustojen pintavesissä ($p > 0,05$). *Cryptosporidium*-alkueläimen geenimarkkeria ja yleistä lintumarkkeria lukuun ottamatta kaikkia ulosteperäisiä mikrobeja havaittiin useammin vesinäytteistä verrattuna sedimenttinäytteisiin. *C. jejuni* -bakteerin todettiin aiheuttavan 0,4–1,2 tautitapausta päivässä 100 uimaria kohden hankkeessa mukana olleilla uimarannoilla. Suurin infektioriski todettiin silloin, kun uimaveden *C. jejuni* lukumäärät vastasivat eläinten juomavesiä (1,5–2,4 tautitapausta/päivä/100 uimaria). Tämän tutkielman tulosten perusteella tutkimuskohteiden rantalaitumet eivät lisänneet ulosteperäisten mikrobien määrää pintavesissä, ja laitumilta peräisin olevien taudinaiheuttajien aiheuttama infektioriski läheisten uimarantojen käyttäjille jäi pieneksi normaalitilanteessa. Lisää tietoa kaivataan kuitenkin erilaisista kohteista ja runsaiden sateiden vaikutuksista laidunten mikrobipäästöihin.

University of Eastern Finland, Faculty of Science, Forestry and Technology

Department of Environmental and Biological Sciences

Environmental Science

Nurmi, Eveliina: Hygienic quality of bathing waters near coastal grazing sites

M.Sc. thesis, 72 pages, 0 appendices (0 pages)

Thesis instructors, Associate professor, docent, PhD Tarja Pitkänen (National Institution of Health and Welfare, University of Helsinki), M.Sc. Anna-Maria Hokajärvi (National Institution of Health and Welfare) and Senior Lecturer, docent, PhD Eila Torvinen (University of Eastern Finland, Department of Environmental and Biological Sciences)

May 2023

Keywords: bathing water, coastal grazing, faecal indicator bacteria, pathogen, quantitative microbial source tracking

ABSTRACT

Grazing is the most important and cost-efficient way of maintenance in the coastal meadows, which is a critically endangered biotope. Coastal grazing benefits plants, birds and insects that thrive in open meadows. In addition to that, grazing benefits the livestock and improves the landscape of the area. On the other hand, concerns have arisen about the impact of the faeces of grazing animals on the hygienic quality of the nearby waterbody and possibly nearby bathing areas. This thesis investigated the impact of coastal grazing sites on nearby bathing sites. In addition to that, the role of the bottom sediment as a substance for the retention of faecal microbes in coastal areas was studied.

Samples were collected from two locations from Northern Ostrobothnia, Finland. Surface water samples and sediment samples were collected in front of the pastures, and from the drinking water points of the animals, bathing sites located close to the grazing sites and control bathing sites. Faecal indicator bacteria, thermotolerant campylobacters, salmonella, enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) and *Cryptosporidium* spp. were analysed from the samples. Quantitative microbial

source tracking methods were used to investigate the effect of grazing animals and bird populations on the microbial quality of the surface water. Quantitative microbial risk assessment of bathing waters was conducted with Uimavesiopas web tool in scenarios where the pathogen numbers of the bathing waters were equivalent to the pathogen numbers found in the surface waters in front of the grazing sites, animal drinking waters, bathing sites located near the grazing sites and control bathing sites.

The numbers of faecal indicator bacteria in surface and bathing waters were below the action limits determined by Finnish bathing water regulations. In animal drinking waters, the numbers of faecal indicator bacteria were higher compared to the other water types ($p < 0,05$). *Campylobacter* were detected in bathing waters (1/6), control bathing waters (2/9) and animal drinking waters (6/9). *Salmonella* was detected from control bathing water (1/9). EHEC was not detected from water samples, while *Cryptosporidium* gene marker was detected from all water sample types, but these findings were not confirmed. Genetic markers referring to the faeces of birds, gulls and ruminants were found in all the water sample types examined. No statistically significant differences in gene copy numbers of faecal markers were found between sample types, except the general faecal marker was found in higher gene copy numbers in animal drinking water compared to the surface waters and control bathing waters ($p < 0,05$).

The species of the grazing animal had no statistically significant effect on the numbers of faecal microbes in the surface waters in front of the grazing sites ($p > 0,05$). All faecal microbes were found more frequently in water samples compared to the surface sediment samples, except for the *Cryptosporidium* spp. gene marker and general bird faecal marker. In the studied bathing sites, *C. jejuni* caused 0,4–1,2 infection cases in a day per 100 beach users. Risk of infection was highest (1,5–2,4 cases of infection per day) when the *C. jejuni* numbers were equivalent to the numbers in animal drinking water. This study indicates that the grazing sites in the study area did not increase the numbers of faecal microbes in surface waters and the risk of infection caused by the pathogens originating from grazing sites was low in normal conditions. However, more information is needed from different sites and the impact of heavy rains on the microbial emissions of grazing sites.

Esipuhe

Tämä pro gradu -tutkielma tehtiin Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen asiantuntijamikrobiologian yksikön vesimikrobiologian laboratoriotiimissä Kuopiossa maaliskuun 2022 ja toukokuun 2023 välisenä aikana. Tutkielma oli osa Luonnonvarakeskuksen koordinoimaa ”Merenrantalaidunnusta luonnon ja ihmisten hyväksi” -hanketta, joka tehtiin yhteistyössä Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen, Helsingin yliopiston ja ProAgria Oulun kanssa. Hanketta rahoitti Euroopan maaseudun kehittämisen maatalousrahasto. Hankkeeseen kuuluvista näytteenotoista vastasi Luonnonvarakeskus, vesinäytteiden mikrobiologisista analyyseistä vastastasi Terveyden ja hyvinvoinnin laitos ja pintasedimenttinäytteiden mikrobiologisista analyyseistä vastasi Helsingin yliopisto. Tutkielman ohjasivat Terveyden ja hyvinvoinnin laitokselta Tarja Pitkänen ja Anna-Maria Hokajärvi, sekä Itä-Suomen yliopistolta Eila Torvinen.

Haluan kiittää ohjaajiani Tarja Pitkästä, Anna-Maria Hokajärveä ja Eila Torvista asiantuntevasta ohjauksesta ja hyvistä neuvoista matkan varrella. Suuret kiitokset myös kaikille hankkeessa mukana olleille, erityisesti Marika Laurilalle, Annastiina Rytköselle ja näytteenotossa mukana olleille. Erityiskiitos Tiina Heiskaselle erinomaisesta perehdytyksestä laboratorioanalyyseihin ja avusta niiden toteuttamisessa. Haluan kiittää myös Kristiina Valkamaa, Aleksi Kolehmaista ja Anssi Lipposta, jotka antoivat hyviä neuvoja erinäisissä ongelmatilanteissa matkan varrella. Lopuksi haluan kiittää vielä Tarja Rahkosta avustamisesta laboratorioanalyyseissä.

Kuopiossa 5.5.2023

Eveliina Nurmi

Lyhenteet ja määritelmät

cDNA	Complementary DNA, komplementaarinen DNA
Cry18S	<i>Cryptosporidium</i> -alkueläimen sukutason analyysi
DALY	Disability adjusted life year, tautitaakka
DEUF	Dead-end ultrafiltration, suuren tilavuuden ultrasuodatus
EU	Euroopan unioni
GC	Gene copy, geenikopio
GenBac3	Yleistä ulosteperäistä saastumista osoittava markkeri
GFD	Yleinen lintumarkkeri
Gull4	Lokkimarkkeri
MALDI TOF MS	Matrix-assisted laser-desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry, matriisiavusteinen laser-desorptio/ionisaatio-lentoaika massaspektrometria
MMM	Maa- ja metsätalousministeriö
MPN	Most probable number, todennäköisin lukumäärä
mtDNA	Mitokondriaalinen DNA
PCR	Polymerase chain reaction, polymeerasiketjureaktio
PMY	Pesäkettä muodostava yksikkö
QMRA	Quantitative microbial risk assessment, kvantitatiivinen mikrobiologinen riskinarviointi
qPCR	Quantitative PCR, kvantitatiivinen PCR
rRNA	Ribosomaalinen RNA
RT-qPCR	Real Time qPCR, raaliaikainen qPCR
Rum2Bac	Märehtijämarkkeri
SheepCytB	Lammasmarkkeri
STM	Sosiaali- ja terveysministeriö
WHO	World Health Organization, Maailman terveysjärjestö

Sisältö

1	Johdanto.....	1
2	Kirjallisuuskatsaus.....	3
2.1	Rantalaidunnus	3
2.1.1	Merenrantaniityt.....	3
2.1.2	Viljelijöiden elinkeino ja rantalaidunten ravinnekuormitus.....	5
2.1.3	Rantalaidunnuksen ongelmakohdat.....	7
2.2	Zoonoottiset taudinaiheuttajamikrobit pintavesissä.....	8
2.2.1	Kampylobakteeri.....	8
2.2.2	Salmonella.....	10
2.2.3	EHEC.....	12
2.2.4	<i>Cryptosporidium</i>	13
2.3	Uimavesien laatu ja monitorointi	15
2.3.1	Uimaveden laadunvalvonta	15
2.3.2	Suolistoperäisten indikaattorimikrobien valvontamenetelmät.....	18
2.3.3	Saastelähdejäljitys	20
3	Työn tavoitteet.....	23
4	Aineisto ja menetelmät.....	24
4.1	Näytteenottopaikat ja näytteenotto.....	24
4.2	Näytteiden esikäsittely	26
4.3	Suolistobakteerien havaitseminen ja lukumäärän määrittäminen viljelymenetelmillä	27
4.2.1	<i>Escherichia coli</i>	27
4.2.3	Lämpökestoiset kampylobakteerit.....	29
4.2.4	Salmonella.....	30

4.4	Molekyylibiologiset analyysit.....	30
4.5	Terveysriskinarviointi uimavesille.....	33
4.6	Tilastolliset menetelmät	34
5	Tulokset.....	35
5.1	Säätiedot näytteenoton aikana.....	35
5.2	Indikaattorimikrobit vesi- ja pintasedimenttinäytteissä	36
5.3	Zoonoottiset taudinaiheuttajat vesi- ja pintasedimenttinäytteissä	38
5.4	Saastelähdejäljitys.....	41
5.5	Kvantitatiivinen mikrobiologinen riskinarviointi	49
6	Tulosten tarkastelu.....	51
6.1	Suolistomikrobilukumäärät tutkimuksen kohdealueilla.....	51
6.2	Naudoista ja lampaista peräisin oleva ulosteperäinen vesistökuormitus	54
6.3	Suolistoperäiset mikrobit ranta-alueiden pintasedimentissä.....	55
6.4	Infektoriski rantalaidunten läheisyydessä olevilla uimarannoilla.....	56
6.5	Tulosten luotettavuuteen vaikuttavat tekijät.....	57
7	Johtopäätökset.....	59
	Lähteet.....	60

1 Johdanto

Maatalouden tehostuessa 1900-luvun puolivälistä alkaen laidunnuksen ja niiton avulla avoimena pysyneiden niittyjen määrä alkoi vähetä umpeenkasvun myötä. Luontotyyppinä tällaiset perinnebiotoopit ovat suurimmaksi osaksi luokiteltu erittäin uhanalaisiksi. Merenrantaniityt kuuluvat näihin erittäin uhanalaisiin perinnebiotooppeihin, ja niiden tärkein ja kustannustehokkain hoitomuoto on laidunnus. Laidunnetut merenrantaniityt ovat monimuotoisia elinympäristöjä, joilla viihtyy useita uhanalaisia eliölajeja, kuten mustapyrstökuiri ja nelilehtivesikuusi. Uhanalaisten lajien lisäksi merenrantaniittyjen laiduntamisesta hyötyvät laiduneläimet, joille luonnonlaitumet mahdollistava lajityypillisen käyttäytymisen.

Laadultaan hyvät vesialueet ovat tärkeitä sekä talouden, että väestön hyvinvoinnin ja terveyden näkökulmasta. Suomessa suurin osa aikuisväestöstä harrastaa erilaisia vesiin liittyviä vapaa-ajantoimintoja, kuten uintia ja kalastusta. Pintavesissä esiintyy kuitenkin erilaisia taudinaiheuttajamikrobeita, joille voi altistua vesien virkistyskäytön yhteydessä. Osa taudinaiheuttajista esiintyy pintavesissä luonnostaan, mutta merkittävä osa on kuitenkin peräisin ulosteesta. Pintavesien ulosteperäinen saastuminen voi olla peräisin useista lähteistä, kuten yhdyskuntien jätevesistä, maataloudesta ja villieläimistä. Euroopassa uimavesien mikrobiologista laatua valvotaan ulosteperäistä saastumista osoittavien bakteereiden avulla.

Vaikka merenrantaniittyjen laidunnuksen maisemalliset hyödyt ovat merkittävät, laidunnuksen mahdolliset vaikutukset alapuolisen vesistön mikrobiologiseen laatuun ovat herättäneet huolta, sillä laiduntavien eläinten ulosteen tiedetään sisältävä ihmisille infektioitauteja aiheuttavia mikrobeja. Tämän pro gradu -tutkielman tavoitteena oli selvittää millaisia vaikutuksia merenrantalaitumilla voi olla lähellä sijaitsevien uimavesien hygieenisen laatuun, ja samalla hälventää epätietoisuutta rantalaidunnuksen vaikutuksista alapuolisen vesistön mikrobiologiseen laatuun. Lisäksi tavoitteena oli selvittää vaikuttaako laiduntava eläinlaji

alapuoliseen vesistöön päätyvien suolistoperäisten mikrobien määrään, sekä tutkia pintasedimentin roolia ranta-alueilla lannan ulosteperäisiä mikrobeja pidättävänä aineksena.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Rantalaidunnus

2.1.1 Merenrantaniityt

Perinnebiotoopit ovat perinteisen maa- ja karjatalouden muovaamia ympäristöjä, joihin kuuluvat muun muassa erityyppiset niityt, kuten merenrantaniityt, hakamaat, metsälaitumet ja nummet (Vainio ym. 2001). Perinteinen hoito muodostuu pääosin niitosta ja laidunnuksesta ja useimmat perinnebiotoopit tarvitsevat säännöllistä ja pitkäjänteistä hoitoa säilyäkseen.

Hoitotoimenpiteiden loppuminen ja heikkeneminen tarkoittavat perinnebiotoopille tyypillisen monimuotoisen lajiston muuttumista ja jopa häviämistä (Lehtomaa ym. 2018).

Perinnebiotooppien vähentyminen on ollut voimakasta Euroopassa erityisesti 1950-luvulta 2000-luvun alkupuoliskolle (Joyce 2014). Syitä voimakkaaseen vähenemiseen ovat maatalouspolitiikan muutokset, perinnebiotooppien vähäinen tuottavuus viljelijälle, sekä maatalouden tehostumisesta johtuva vähäisempi maa-alan tarve.

Merenrantaniityt kuuluvat perinnebiotooppeihin ja Euroopan neuvoston luontodirektiivin 92/43/EY mukaisesti suojeltaviin luontotyypppeihin (Luontodirektiivi 92/43/EY, Lehtomaa ym. 2018). Ne ovat aiemmin säännöllisesti laidunnettuja tai niitettyjä, ja nykyisin harvahkoja alle 1,7 m korkeita ruovikoita, joiden alla niittykasvillisuutta on jäljellä vähintään 30 %. Hoidetulla merenrantaniityllä kasvillisuus on matalaa ja avointa muodostaen tyypillisesti rantaviivan suuntaisia vyöhykkeitä, joita on aina enemmän kuin yksi (kuva 1). Suomessa merenrantaniittyjä esiintyy mantereen rannoilla ja saarissa Suomenlahdelta Perämerelle, mutta niiden hoito on keskittynyt pääosin Perämeren rannikolle (Lehtomaa ym. 2018). Kokonaan tai osin säilyneitä merenrantaniittyjä arvioidaan olevan 6 200 hehtaaria, yksittäisen alueen koon vaihdellessa alle hehtaarista yli sataan hehtaariin. Perinteisen niiton ja laidunnuksen loputtua merenrantalaidunten määrä on vähentynyt noin 60 %, kun verrataan 1960-luvun tilanteeseen. 1990-luvulla maatalouden ympäristökorvauksen ansiosta uudelleen alkaneen rantalaidunnuksen vuoksi niittyjen keskikoko on kasvanut Perämeren rannikolla merkittävästi (Lehtomaa ym. 2018).

Laidunnus on todettu näiden niittyjen kustannustehokkaimmaksi hoitomuodoksi. Nykyään merenrannoilla laiduntavat eläimet ovat pääosin lihakarjaa ja laidunnuspaine vaihtelee liian suuresta liian alhaiseen.



Kuva 1. Tyypillistä maisemaa laidunnetulla merenrantaniityllä. Kuva: Marika Laurila, Luonnonvarakeskus.

Merenrantaniityt ovat yleensä runsaslajisia ympäristöjä, joille on kehittynyt niille ominainen monimuotoinen eliöstö, jota sekä laidunnus että niitto lisäävät (Lehtomaa ym. 2018). Biodiversiteetin runsaus merenrantalaitumilla perustuu siihen, että hoitotoimenpiteet vähentävät valoa tarvitsevien matalakasvuisten kasvien kannalta haitallista kilpailua (Kose ym. 2021). Sen lisäksi, että lajien runsaus kertoo merenrantalaitumen ennallistamisen menestyksestä, myös kasvillisuuden tasaisuus on tärkeä parametri. Monimuotoisen kasvillisuuden lisäksi niityillä pesii ja ruokailee useita uhanalaisia ja silmälläpidettäviä lintulajeja, ja avointa ympäristöä pesinnälle vaativille vesi- ja rantalinnuille merenrantaniityt ovat tärkeitä pesimäympäristöjä. Etelänsuosirri ja mustapyrstökuiri ovat tyypillisiä merenrantalaidunten uhanalaisia lintulajeja (Satomaa 2021). Laiduntava karja voi olla myös uhka pesiville rantalinnuille tallomisen vuoksi. Lintujen pesintää voidaan kuitenkin suojella valitsemalla laidunnuksen aloitusajankohta pesintä huomioiden ja laiduntamalla lohkoissa. Perämeren rannikon

rantalaitumilla tutkijat ja lintuharrastajat ilmoittavat paikkatietona lintujen pesien paikat, jota viljelijä voi hyödyntää laidunnusta suunnitellessa. Laidunten lantakasat houkuttelevat myös monia hyönteisiä, kuten lantakuoriaisia ja kärpäsiä ravinnonhakuun ja lisääntymään (Vainio 2022). Lantakuoriaisten ja kärpäsen toukkien ansiosta lantakasojen sisältämät ravinteet päätyvät nopeammin maaperään ja samalla ne vähentävät lannasta aiheutuvia metaanipäästöjä (Vainio 2022, Slade ym. 2016). Myös uhanalaisia hyönteislajeja, kuten heinäsirkoja, tavataan perinteisillä laidunmailla (Schwarz ja Fartmann 2022).

On havaittu, että karjan tyypillä ja laidunnuksen intensiteetillä on vaikutus perinteisten laidunten biodiversiteettiin (Tóth ym. 2016). Lämpimien laiduntamilla alueilla havaittiin olevan alhaisempi lajien runsaus kuin nautalaitumilla, ja tämän arvioidaan johtuvan eläinten eri ruuanhankintatavoista: lampaat syövät tarkemmin ruohokasveja ja ruokailukorkeus on matalampi, kun taas nautojen ruokailu ei ole kovin spesifiä ja ne syövät vaihtelevilta korkeuksilta. Hylätyn merenrantaniittyjen ennallistamisen alkaessa biodiversiteetin runsastuminen alkaa näkymään vasta pidemmällä aikavälillä (Kose ym. 2021). Hoitamattomilla niityillä järviruoko on tyypillinen runsastuva kasvi (Huuskonen ym. 2022). Vaikka ennallistamisen päämääränä pidetään tyypillisesti uhanalaisten lintu- ja sammakolajien suojelua, merenrantalaitumen kasvillisuuden ominaisuudet kertovat kuitenkin tehokkaammin ennallistamisen onnistumisesta: uhanalaiset eläimet palaavat alueelle vasta kasvillisuuden toiminnallisuuden palaututtua (Kose ym. 2021).

2.1.2 Viljelijöiden elinkeino ja rantalaidunten ravinnekuormitus

Nykyään merenratalaidunnuksessa on tärkeää sovittaa yhteen biodiversiteetin hoito ja karjan tuottavuus (Niemelä ym. 2008). Merenrantalaitumilla ravinnon määrä ja laatu ovat yleisesti heikompia kuin hoidetuilla laitumilla, minkä vuoksi on arvioitu, että pienemmät nautakarjarodut kuten Hereford, saattaisivat pystyä paremmin hyödyntämään laidunten ravintoa. Sekä biodiversiteetin, että tuotannon tehokkuuden kannalta on tärkeää, että eläinten tiheys ja laidunnuskauden pituus mitoitetaan oikein. Merenrantalaitumen ylläpitoon riittävä eläintiheys voi olla 0,4 eläintä hehtaarilla, kun taas entisöintivaiheessa suurempi tiheys voi olla tarpeen (Niemelä ym. 2008). Laidunkauden aloitus kesäkuun puolivälissä vaikuttaa olevan optimaalisin;

aikaisempi aloitus saattaa haitata lintujen pesintää, mutta myöhäisempi aloitus vaikuttaa negatiivisesti ravinnon laatuun.

Laidunnetulla merenrantaniityllä karja kierrättää ja vähentää kasvillisuuden biomassaa ja samalla siihen sitoutuneita ravinteita (Huuskonen ym. 2022). Vaikka osa ravinteista palaa ulosteen ja virtsan mukana takaisin laitumelle, on osa ravinteista sitoutunut eläinten kasvuun. Yhden hehtaarin kokoisella merenrantalaitumella kolmen kuukauden laidunkauden aikana emolehmä ja vasikka -parin kasvuun sitoutuu keskimäärin 2 kg typpeä ja 0,6 kg fosforia. Ympäristösopimuksissa on lähtökohtaisesti kielletty lisärehun tuominen karjalle, joten kaikki eläinten käyttämä ravinto on peräisin laitumelta, joskin välttämättömiä kivennäisaineita voidaan eläimille tarjota. Taulukossa 1 on vertailtu hoidetun ja hoitamattoman merenrantaniityn biomassaan sitoutuneita ravinteita. Perämerellä on aiemmin tutkittu ravinnepitoisuuksia rantalaidunten vaikutusalueella (Soininen 2020). Rantalaidunkohteiden fosforipitoisuudet olivat pääosin verrokkikohteita pienempiä, typpipitoisuuksissa ei havaittu eroa. Vaikka tutkimuksen aineiston perusteella ei voitu sanoa varmaksi, että laitumet vähentäisivät vesistön ravinnekuormitusta, tulokset antavat kuitenkin viitteitä siitä, että laidunnuspaine ei ole liian suuri. Liian suuri laidunnuspaine voi johtaa maaperän eroosioon, ja sitä kautta lisätä ravinnevalumia vesistöön (Niemelä 2012, Julian ym. 2017).

Taulukko 1. Hoidetun ja hoitamattoman merenrantaniityn kasvillisuuteen sitoutuneet ravinteet hehtaarin kokoisella laitumella. (Huuskonen ym. 2022)

	Hoidettu merenrantaniitty	Hoitamaton merenrantaniitty
Biomassa (kuiva-aineen massa)	2600 kg	10000 kg
Biomassaan sitoutunut typpi	37 kg	90 kg
Biomassaan sitoutunut fosfori	3,9 kg	9 kg

2.1.3 Rantalaidunnuksen ongelmakohdat

Soinisen (2020) opinnäytetyössä havaittiin, että merenrantalaitumet saattavat aiheuttaa merkittävää ulosteperäistä saastumista lähellä sijaitsevilla uimarannoilla erityisesti sateiden aikaan. Työssä tutkittiin kolmea Perämeren rannikolla ja merenrantalaitumen läheisyydessä sijaitsevaa uimarantaa uimakausien 2018 ja 2019 aikana. Kahdella uimarannalla havaittiin uimakauden 2019 aikana saastumistapahtuma, jossa suolistoperäisten indikaattorimikrobien lukumäärät ylittivät uimavesiasetusten laatuvaatimukset (STM 2008a). Saastelähdejäljityksen tulosten perusteella toisen saastumistapauksen todettiin olevan peräisin läheisellä laitumella laiduntaneiden nautojen ulosteesta. Tutkimus antoi lisäksi viitteitä siitä, että merenrantalaidunten laiduneläimistä peräisin olevien ulostebakteereiden määrät ovat suurempia laidunkauden loppupuolella verrattuna laidunkauden alkuun (Soininen 2020). Osa ulosteperäisistä mikrobeista voi olla zoonoottisia eli ihmisille ja eläimille tauteja aiheuttavia. Yleisimpiä zoonoottisia taudinaiheuttajamikrobeja ovat kampylobakteerit, salmonella, *Cryptosporidium*-alkueläimet ja enterohemorraaginen *Escherichia coli* -bakteeri (EHEC) (Caprioli ym. 2005, Jacobsen ja Bech 2012, Santín 2013, Pitkänen ja Hänninen 2017).

Eläinten ulosteesta aiheutuvan uimaveden saastumisen aiheuttama terveysriski on yleensä pienempi kuin ihmisen ulosteen aiheuttama terveysriski riippuen ulosteen alkuperästä (Soller ym. 2010). Tuoreen karjan lannan aiheuttama riski ei näytä eroavan merkittävästi ihmisen ulosteen aiheuttamasta riskistä, kun taas tuoreen loikin, kanan ja sian ulosteen aiheuttama riski uimavesissä näytti olevan merkittävästi pienempi verrattuna ihmisperäiseen ulosteeseen. Ero ihmisperäisen ja muista lähteistä tulevan ulosteperäisen saastumisen aiheuttaman riskin välillä johtuu luultavasti tautia aiheuttavien taudinaiheuttajamikrobien esiintymisen ja lukumäärän eroista (Soller ym. 2014). Esimerkiksi ihmisten suolistovirukset ovat merkittävä sairastumisten aiheuttaja, mutta niitä esiintyy pääosin vain ihmisen ulosteessa. Erona on myös se, että puhdistetun asumajäteveden purkamisesta luonnonvesiin aiheutuva saastuminen on usein jatkuvaa, kun taas eläimistä peräisin oleva ulosteperäinen saastuminen on yleensä ajoittaista, liittyen esimerkiksi pintavalumiin rankkasateiden yhteydessä (Soller ym. 2015).

Laurilan (2022) tekemässä kyselyssä selvitettiin ihmisten suhtautumista rantalaidunnukseen. Kysely oli kohdennettu henkilöille, jotka ovat tekemisissä rannikkoluonnon kanssa muun muassa asuinpaikkansa, elinkeinonsa tai vapaa-ajan harrastusten vuoksi (Laurila 2022). Kyselyn tulosten perusteella suurin osa vastanneista piti rantalaidunnusta positiivisena asiana, joskin huolenaiheitakin nousi esille. Kyselyyn vastasi 195 henkilöä, joista 60 % oli sitä mieltä, että rantalaidunnus on hyvä asia. Osin huonona tai huonona asiana sitä piti 40 % vastaajista. Alueen asukkaat ja mökkeilijät näyttävät suhtautuvan luontoharrastajia ja metsästäjiä suopeammin merenrantalaitumiin. Kyselyssä laidunten positiivisiksi puoliksi koettiin maisemalliset hyödyt ja positiiviset luontovaikutukset, kun taas negatiivisiksi puoliksi nähtiin veden laadun heikkeneminen ja alueen käytön rajoittuminen.

2.2 Zoonoottiset taudinaiheuttajamikrobit pintavesissä

Zoonoottiset taudinaiheuttajat voivat aiheuttaa tautia sekä eläimille että ihmisille (Ruokavirasto 2022). Tartunta voi tapahtua suoraan yksilöstä toiseen tai epäsuorasti esimerkiksi veden, elintarvikkeiden tai hyönteisten välityksellä. Ihmiselle infektioita aiheuttavista mikrobeista yli puolet on zoonoottisia ja on arvioitu, että uusista taudinaiheuttajista zoonoottisia on jopa 75 % (Taylor ym. 2001). Tässä työssä keskitytään neljään zoonoottiseen suolistomikrobiin, joiden tiedetään aiheuttaneen vesivälitteisiä infektioita ja vesiepidemioita.

2.2.1 Kampylobakteeri

Kampylobakteerit ovat *Campylobacteraceae* heimon kuuluvia gram-negatiivisia bakteereita, jotka eivät muodosta itiöitä ja joita tunnetaan 29 lajia ja 12 alalajia (Pitkänen ja Hänninen 2017). *Campylobacter jejuni* ja *Campylobacter coli* ovat tärkeimmät kampylobakteeri-infektioiden aiheuttajat ihmisillä ja ne kuuluvat lämpökestoisiin kampylobakteereihin. Myös *Campylobacter lari* ja *Campylobacter upsaliensis* -lajit ovat lämpökestoisia, eli ne voivat kasvaa lämpötilan ollessa 30–42°C mikroaerofiilisissa olosuhteissa, jossa happea on 3–10 % ja hiilidioksidia 5–10 % ilman tilavuudesta. Solut ovat ohuita kierteisiä sauvoja. Kierteinen muoto ja solun toisessa päässä sijaitseva siima saavat aikaa kampylobakteereille tyypillisen korkkiruuvimaisen liikkeen.

Suurin osa kampylobakteerilajeista elää tasalämpöisten eläinten suoliston alaosassa, sukupuolielimissä ja suuontelossa (Pitkänen ja Hänninen 2017). Jotkin kampylobakteerilajit ovat opportunisteja tai zoonoottisia taudinaiheuttajia, ja kampylobakteerit kuuluvatkin maailmanlaajuisesti yleisimpiin bakteeriperäisiin vatsatautien aiheuttajiin. Kehittyneissä maissa kampylobakteeri aiheuttaa akuutin vatsataudin, jonka tyypillisiin oireisiin kuuluvat ripuli, kuume, pahoinvointi ja vatsakipu. Kampylobakteerin infektiivinen annos on alhainen, muutama sata solua, ja taudin inkubaatioaika on yleensä 2–5 päivää. Kampylobakteereita esiintyy globaalisti sekä ihmisillä, että eläimillä, kuten naudoilla, lampailla ja linnuilla (Pitkänen ja Hänninen 2017). Yleensä leviäminen tapahtuu ulosteella saastuneen juomaveden tai elintarvikkeiden välityksellä, mutta myös luonnonvesissä uiminen voidaan laskea potentiaalisesti tartunnan lähteeksi. Suomessa kampylobakteerit ovat norovirusten lisäksi yleisin vesiepidemioiden aiheuttaja (THL 2023). Ihmisten väliset kampylobakteeritartunnat eivät ole yleisiä (Pitkänen ja Hänninen 2017).

Vaikka jätevedellä saastunut juomavesi onkin yleisin kampylobakteeri-infektion lähde, on luonnonvesissä uiminen tunnustettu infektion riskitekijä, vaikkakin uimisen ja infektion yhdistäminen on haastavaa (Schönberg-Norio ym. 2004, Pitkänen ym. 2013). Vedestä peräisin olevien infektioiden alkuperä on yleensä tuore ulosteperäinen saastuminen, joka on peräisin tyypillisesti jätevedestä, karjan ulosteesta tai luonnon lintupopulaatioista, sillä kampylobakteerit eivät kykene lisääntymään ympäristössä (Pitkänen 2013). Kampylobakteeri-solut kestävät huonosti epäsuotuisia oloja isännän ulkopuolella (Jones 2001). Erään tutkimuksen mukaan *C. jejuni* ja *C. coli* säilyttivät 5 °C:ssa vesiympäristössä hyvin viljeltävyytensä 60 päivän ajan, mutta lämpötilan noustessa 15 °C:een yläpuolelle, solut menettivät viljeltävyytensä nopeasti (Thomas ym. 1999). Toisessa tutkimuksessa puolestaan havaittiin, että kesäisin, jolloin suoran auringonvalon määrä on suurimmillaan, kampylobakteerien inaktivaatioaika jokivedessä oli lyhyempi kuin talvella ja keväällä (Rodríguez ja Araujo 2012). Heikosta säilyvyydestä huolimatta kampylobakteereita esiintyy yleisesti pintavesissä (Hokajärvi ym. 2013). Eri puolilla maailma kampylobakteerien esiintyminen pintavesissä on vaihdellut 30–80 % välillä (taulukko 2).

Taulukko 2. Kampylobakteerin esiintyminen pintavesissä bakteeriviljelymenetelmällä analysoituna.

Alue ja vesityyppi	Positiivisten osuus (positiivisten/kaikkien tutkittujen näytteiden lkm.)	Viite
Tšekki, pintavedet	38 % (21/56)	Strakova ym. 2022
Alankomaat, uimavedet	33 % (10/30)	Mulder ym. 2020
Alankomaat, pintavedet maatalouden vaikutusalueella	80 % (24/30)	Mulder ym. 2020
Suomi, uimavedet	58 % (29/50)	Hokajärvi ym. 2013
Kanada, pintavedet	43 % (80/186)	Jokinen ym. 2010

2.2.2 Salmonella

Salmonellat kuuluvat Enterobacteriaceae heimoon ja *Salmonella* sukuun, johon kuuluu kaksi lajia: *Salmonella enterica* ja *Salmonella bongori* (Hasan ym. 2019). *S. enterican* alle kuuluu kuusi alalajia, jotka on edelleen jaettu serotyyppeihin joita tunnetaan yli 2500. Ihmisiä infektoivista patogeeneistä suurin osa kuuluu *S. enterican* alalajiin enterica. Salmonellat ovat gram-negatiivisia ja fakultatiivisesti anaerobisia sauvoja, jotka eivät fermentoi laktoosia. Niillä on uintisiimoja, joiden ansiosta suurin osa kannoista on liikkuvia, joskin liikkumattomia kantoja tiedetään olevan runsaasti. Suurin osa salmonelloista kasvaa lämpötilan ollessa 5–47 °C, mutta optimilämpötila on 35–37 °C (Fatica ja Schneider 2011).

Salmonellojen aiheuttamat infektiot ovat joko yleis- tai suolistoinfektioita (Hasan ym. 2019). Yleisinfektioita aiheuttavat *S. enterica* serotyypit *S. typhi* ja *S. paratyphi* ja näiden kantajana toimii lähes yksinomaan ihminen (Eng ym. 2015). Muut *S. enterica* serotyypit aiheuttavat suolistoinfektioita, joiden oireisiin kuuluvat muun muassa ripuli ja pahoinvointi. Näiden kantajiin kuuluu laaja joukko tasalämpöisiä eläimiä (Eng ym. 2015). Euroopan Unionin alueella salmonellat ovat kampylobakteerin jälkeen toiseksi yleisin zoonoottista alkuperää olevien infektioiden aiheuttaja (EFSA ja ECDC 2018). Salmonellojen aiheuttaman suolistoinfektion inkubaatioaika on

yleensä 12–72 tunnista jopa viikkoon infektiivisen annoksen ollessa suuri, jopa 100 000 solua (Hasan ym. 2019). Suuren infektiivisen annoksen vuoksi saastumisen on oltava merkittävää, jotta vesivälitteisiä salmonellainfektioita ilmenee (Laine ym. 2011).

Salmonella päätyy ympäristöön infektoituneen kantajan ulosteen mukana ja altistuminen tapahtuu suun kautta (Hasan ym. 2019). Salmonellojen aiheuttamat suolistoinfektiot ovat yleensä peräisin ulosteella saastuneesta ruuasta, kuten kanan lihasta, mutta myös vesivälitteisiä infektioita on raportoitu (Laine ym. 2011, Clayton ym. 2017, Christidis ym. 2020). Salmonella säilyy hyvin vähäravinteisessa ympäristössä ja sillä tiedetään olevan myös reservaatteja ympäristössä (Hasan ym. 2019). Vedessä salmonella menettää elinkykynsä tyypillisesti kuukaudessa, mutta esimerkiksi biofilmien tiedetään parantavan selviytymistä vesiympäristössä (Steele ja Odumeru 2004, Gaertner ym. 2011). Salmonellan on raportoitu selviytyvän hyvin maaperässä, lannassa sekä vedenpohjan pintasedimentissä (You ym. 2006, Islam ym. 2004, Moore ym. 2003). Jokien korkea virtaaman ja runsaiden sateiden on havaittu olevan yhteydessä salmonellahavaintoihin pintavesissä (Wilkes ym. 2011). On siis mahdollista, että salmonellan merkittävänä lähteenä pintavesissä toimii sadevesien valumat, minkä lisäksi vapautuminen vedenpohjan pintasedimentistä on mahdollista. Uimavesissä salmonellojen esiintyvyys on ollut alle 20 %, mutta esimerkiksi maatalouden vaikutusalueella salmonellan esiintyvyys on ollut jopa 80 % (taulukko 3).

Taulukko 3. Salmonellan esiintyminen pintavesissä

Alue ja vesityyppi	Menetelmä	Positiivisten osuus (positiivisten/kaikkien tutkittujen näytteiden lkm.)	Viite
EU, uimavedet	Useita	18 % (178/990)	Farrell ym. 2021
Kanada, pintavesi	Rikastus ja viljely	13 % (24/186)	Jokinen ym. 2010
USA, maaseudun pintavedet	Rikastus ja viljely	80 % (58/72)	Haley ym. 2009
Uusi-Seelanti, uimavesi	Rikastus ja ELISA	10 % (69/725)	Till ym. 2008

2.2.3 EHEC

Escherichia coli -bakteerit ovat *Enterobacteriaceae* heimoon kuuluvia gram-negatiivisia sauvoja, jotka elävät pääasiassa kommensaaleina selkärankaisten isäntien suolistossa (Garcia-Aljaro ym. 2017). Suolistoinfektioita aiheuttavat *E. coli* -bakteerit voidaan luokitella kuuteen pääryhmään: enteropatoogeeninen EPEC, enterotoksinen ETEC, enteroaggregatiivinen EAEC, enteroinvasiivinen EIEC, hajanaisesti tarttuva DAEC ja enterohemorraginen EHEC (Kaper ym. 2004). Näistä EHEC on zoonoottinen ja liitetty erityisesti kehittyneisiin maihin (Garcia-Aljaro ym. 2017). EHEC:n kyky aiheuttaa infektioita perustuu kykyyn tuottaa shiga-toksiineja (Kaper ym. 2004) ja se on shiga-toksiinia tuottavien *E. coli* -bakteereiden (Shiga toxin-producing *E. coli*, STEC) alaryhmä, joka aiheuttaa veristä paksusuolentulehdusta ihmisillä (Delannoy ym. 2013). Kaikki STEC kannat tuottavat vähintään toista shiga-toksiinityyppiä (stx1 ja stx2) (Paton ja Paton 2002). Termejä EHEC ja STEC käytetään usein sekaisin kirjallisuudessa. STEC:n serotyyppejä tunnetaan yli 400, ja yleisin tartuntojen aiheuttaja on serotyyppi O157:H7 (Garcia-Aljaro ym. 2017 ja Ameer ym. 2023).

EHEC:n infektiivinen annos on alhainen, alle 100 solua riittää aiheuttamaan infektion ja oireet kehittyvät tyypillisesti kolmessa päivässä (Ho ym. 2013). Tyypillisiin oireisiin kuuluvat vatsakivut,

sekä ripuli tai verinen ripuli, mutta kantaja voi olla myös oireeton. Osalle infektion saaneista kehittyy vakava hemolyttis-ureeminen oireyhtymä. EHEC, kuten myös *E. coli*, leviää ympäristöön infektoituneen kantajan ulosteen mukana, joihin kuuluvat muun muassa ihmiset, naudat, siat, lampaat ja luonnon lintupopulaatiot (Garcia-Aljaro ym. 2017). Tärkeimmäksi kantajaksi on tunnistettu märehitjät ja erityisesti nauta. Kotieläimet voivat toimia myös oireettomina kantajina (Caprioli ym. 2005). Vaikka ruuasta peräisin olevat tartunnat ovat yleisimpiä, myös vedestä peräisin olevia tartuntoja on raportoitu (Garcia-Aljaro ym. 2017). Kanadan Walkertonissa *E. coli* O157:H7 aiheutti suuren epidemian, kun nautojen ulosteesta peräisin olevia mikrobeja päätyi kaivoon runsaiden sateiden ja tulvien vuoksi (BGOSHU 2000). Myös uimavesiin liitettyjä epidemioita on raportoitu (Rangel ym. 2005).

STEC voi säilyä viikoista kuukausiin ulosteella saastuneessa vedessä (Wang ja Doyle 1997, Ferens ja Hovde 2011). Vesiympäristössä säilymistä suosivat alhainen lämpötila ja biofilmit (Wang ja Doyle ym. 1998, Vogeleeer ym. 2014). STEC:n säilymistä lannassa ja maaperässä suosii mikrobiyhteisön alhainen diversiteetti (Vogeleeer ym. 2014). Pintavesissä EHEC-bakteerien esiintyvyyden on eri tutkimuksissa arvioitu olevan 2–8 % (Jokinen ym. 2010, Bonetta ym. 2011, Cooley ym. 2014). Pintavesissä esiintymisen on havaittu olevan kausittaista ja yhteydessä erityisesti sateisiin ja nautakarjan länäoloon valuma-alueella (Ahmed ym. 2009, Cooley ym. 2014, Xie ym. 2022).

2.2.4 *Cryptosporidium*

Cryptosporidium-suvun lajit ovat *Cryptosporidiidae* heimoon kuuluvia yksisoluisia alkueläimiä, joita tunnetaan 44 lajia ja yli 120 genotyyppiä (Betancourt 2019, Ryan ym. 2021). *Cryptosporidium* on ehdoton suolistoloinen eli parasiitti, joka ottaa suurimman osan tarvitsemista ravinteista isännältään (Chalmers ym. 2019). Sen elinkiertoon kuuluvat samassa isännässä tapahtuva aseksuaalinen ja seksuaalinen vaihe, jonka jälkeen neljästä infektiivisestä sporotsoiitista muodostuvat ookystat voivat levitä ympäristöön. *Cryptosporidium*-alkueläinten isäntinä toimii laaja joukko selkärankaisia eläimiä ja osa lajeista on varsin isäntäspesifejä (Feng ym. 2018). Ihmisten infektiosta suurimman osan aiheuttavat lajit *Cryptosporidium hominis* ja *Cryptosporidium parvum* (Feng ym. 2018). Näistä *C. parvum* on zoonoottinen ja sen pääisäntiä

ovat nuoret märehitjät, kuten nauta, lammas ja vuohi (Betancourt ym. 2019). Naudoille tyypillisiä lajeja ovat *C. parvum*, *Cryptosporidium bovis* ja *Cryptosporidium ryanae*, ja lampaille tyypillisiä lajeja puolestaan ovat *C. parvum* -lajin lisäksi *Cryptosporidium xiaoi* ja *Cryptosporidium ubiquitum* (Vuorisalmi 2022).

Cryptosporidium-alkueläimen ookystat leviävät ympäristöön ulosteen mukana ja tartunta tapahtuu suun kautta (Ryan ym. 2021). Tartuntareitti on tyypillisesti joko suora kontakti ulosteeseen tai saastuneiden elintarvikkeiden, talousveden tai uimaveden välityksellä (Thompson ym. 2016). *Cryptosporidium*-alkueläin on yleisin vesiepidemioita aiheuttava alkueläin ja sen osuus suolistotulehduksista maailmanlaajuisesti on merkittävä (Betancourt 2019, Ryan ym. 2021). Euroopassa *Cryptosporidium*-alkueläimen aiheuttamat infektiot on liitetty pääosin eläinkontakteihin ja uimavesiin, mutta myös juomavesiin ja elintarvikkeisiin liitettyjä infektiota on tavattu (Widerström ym. 2014, Robertson ym. 2019, ECDC 2021). Euroopassa infektioiden aiheuttaja on tyypillisesti *C. parvum* -laji (Betancourt 2019). Suomessa *C. parvum* -lajin aiheuttamat infektiot ovat viime vuosina nousseet merkittävästi erityisesti Pohjanmaalla, ja infektiot tapahtuvat pääsääntöisesti maatiloilla (Suominen ym. 2023). *Cryptosporidium*-alkueläimet aiheuttavat kryptosporidioosia (Betancourt 2019). Terveillä ihmisillä oireisiin kuuluu äkillinen ripuli, vatsakipu, huonovointisuus ja matala kuume, ja oireet kestävät 2–4 viikkoa (Betancourt 2019). Lapsilla ja immuunipuutteisilla henkilöillä taudinkuva voi olla vakavampi. Infektiivinen annos vaihtelee lajien välillä, *C. parvum* -lajilla sen on arvioitu vaihtelevan <10–1000 ookystaan (Okhuysen ym. 1999). *Cryptosporidium*-alkueläimen ookystia päätyy pintavesiin jätevesien ja eläinten ulosteen mukana erityisesti voimakkaiden sateiden yhteydessä (Betancourt 2019). Ookystat ovat erittäin kestäviä; ne selviävät kuukausia kosteassa ympäristössä ja sietävät korkeita klooripitoisuuksia (Chalmers ym. 2019). *Cryptosporidium*-ookystien esiintymisessä pintavesissä on suurta vaihtelua eri tutkimusten välillä (taulukko 4).

Taulukko 4. *Cryptosporidium*-alkueläimen esiintyminen pintavesissä

Alue ja vesityyppi	Menetelmä	Positiivisten näytteiden osuus	Lukumäärä ookystaa/litra	Viite
Belgia, jokivesi	ISO 15553:2006	95 %	5,2 (0,05–31,3)	Burnet ym. 2014
Australia, uimavesi	qPCR	37 % (19/52)	0–80	Loganthan ym. 2012
Suomi, pintavesi	IC-PCR	7,4 % (4/54)	NA	Rimhanen-Finne ym. 2002

2.3 Uimavesien laatu ja monitorointi

Luonnonvesien virkistyskäytöllä on paljon positiivisia vaikutuksia väestön terveydelle ja hyvinvoinnille (World Health Organization 2021). Virkistyskäyttömahdollisuuksien lisäksi luonnonvedet parantavat alueen maisema-arvoa. Uiminen kuuluu veneilyn ja kalastuksen ohella suosituimpiin vapaa-ajan aktiviteetteihin Suomessa ja maailmalla (Cordell 2012, MMM 2016). Uimavesien mikrobiologinen laatu heikkenee tyypillisesti ulosteperäisen saastumisen vuoksi, jolloin luonnonvesissä uiminen voi aiheuttaa terveystarvikkeen uimareille (WHO 2021). Ulosteperäinen saastuminen voi olla peräisin useista erityyppisistä kuormituslähteistä, kuten jätevesien purkamisesta, hulevesistä, maatalouden valumista, uimareista tai villieläinpopulaatioista (Byappanahalli ym. 2012, Kauppinen ym. 2017). Uimaveden välityksellä leviävät infektioriskit on tunnettava ja veden laadun muutoksiin on reagoitava, jotta voidaan hyödyntää uimisesta aiheutuvat positiiviset vaikutukset väestölle.

2.3.1 Uimaveden laadunvalvonta

Uimavesien mikrobiologista laatua valvotaan kansanterveyden suojelemiseksi useissa maissa, mukaan lukien Euroopan unionin (EU) jäsenvaltioissa (Tiwari ym. 2021). Euroopan unionin uimavesidirektiivi 2006/7/EC velvoittaa jäsenvaltioitaan määrittelemään uimakauden pituuden, kaikki alueellaan olevat uimavedet, joissa odotetaan käyvän uimakauden aikana merkittävä

määrä uimareita, sekä ottamaan seurantanäytteitä ennen uimakautta ja sen aikana. Uimakauden jälkeen uimaveden laatuluokka on määriteltävä ja säädösten piirissä oleville uimarannoille on laadittava uimavesiprofiili, jossa kuvataan uimaveden ominaisuudet ja tekijät, jotka vaikuttavat haitallisesti sen laatuun. Myös kvantitatiivista mikrobiologista riskinarviointia (quantitative microbiological risk assessment, QMRA) on ehdotettu sisällytettäväksi uimavesiprofiiliin (Federigi ym. 2020, Valkama 2022). QMRA-menetelmässä mallinnetaan matemaattisesti taudinaiheuttajamikrobien aiheuttamaa infektioriskiä. Menetelmän etuna on nopeus ja edullisuus verrattuna epidemiologisiin tutkimuksiin, minkä lisäksi riskiä voidaan arvioida myös alhaisilla riskitasoilla (WHO 2021). Sitä on sovellettu talousveden yhteydessä, ja Hollannissa lainsäädäntö vaatii, että talousvesijärjestelmät käyvät läpi QMRA-menettelyn. Uimavesien riskinhallinnassa sitä on sovellettu esimerkiksi Australiassa ja Yhdysvalloissa. Suomessa uimaveden laatuvaatimuksista ja valvonnasta säädetään sosiaali- ja terveysministeriön (STM) asetuksessa 177/2008 yleisille uimarannoille, joilla arvioidaan uimakauden aikana käyvän päivittäin vähintään 100 uimaria päivässä ja STM:n asetuksessa 354/2008 pienille yleisille uimarannoille, joilla arvioidaan käyvän uimakauden aikana alle 100 uimaria päivässä. Uimavesidirektiivin mukaiset laatuluokitukset ja uimavesiprofiilit on määriteltävä asetuksen 177/2008 mukaisille yleisille uimarannoille.

Uimavedessä esiintyy useita erilaisia taudinaiheuttajia, jotka voivat olla peräisin jätevedestä, eläinten ulosteesta tai ympäristöstä (Tiwari ym. 2021). Ulosteella saastuneet uimavedet ovat yhteydessä sairastumisiin, tyypillisesti suolisto- ja hengitystieinfektioihin (WHO 2021). Mahdollisten taudinaiheuttajien lukumäärän sekä työläiden ja kalliiden analyysimenetelmien vuoksi suolistoperäisiä indikaattoribakteereita, *E. coli* -bakteeria ja suolistoperäisiä enterokokkeja, käytetään laajasti uimavesien ulosteperäisen saastumisen ja uimareille aiheutuvan terveysriskin arviointiin (Uimavesidirektiivi 2006/7/EEC, USEPA 2010, Tiwari ym. 2021). Ideaalinen indikaattorimikrobi ei itse aiheuta tautia, se esiintyy laajasti ja suurina lukumäärinä tasalämpöisten eläinten suolistossa, säilyy ympäristössä kuten taudinaiheuttajat, eikä lisäänty ympäristössä (Ishii ja Sadowsky 2008). Lisäksi indikaattorimikrobin analysoimiseksi käytettävissä olevien määrittämenetelmien on oltava nopeita ja vaivattomia, jotta ne soveltuvat rutiinimonitorointiin. Uimavesidirektiivin mukaiset uimarannat luokitellaan neljään luokkaan

(erinomainen, hyvä, tyydyttävä ja huono) neljän viimeisimmän uimakauden indikaattoribakteerien valvontatutkimustuloksista laskettujen prosenttipisteiden perusteella (STM 2008a, taulukko 5). Lisäksi uimavesiasetuksessa 177/2008 on säädetty yksittäisen valvontatutkimustuloksen toimenpiderajat, jotka pätevät myös asetuksen 354/2008 mukaisilla pienillä yleisillä rannoilla (taulukko 6). Vaikka indikaattoribakteerien raja-arvot on asetettu erikseen rannikon ja sisämaan uimavesille, ne edustavat samaa riskitasoa, ja ero raja-arvoissa johtuu indikaattoribakteerien erilaisesta säilymistä rannikon suolaisemmissa ja sisämaan makeissa vesissä (Valvira 2008).

Taulukko 5. Uimaveden laadun arviointiin ja luokitukseen käytetyt raja-arvot (STM 2008a).

Vesityyppi	Muuttuja	Erinomainen laatu (pmy/mpn/100 ml)	Hyvä laatu (pmy/mpn/100 ml)	Tyydyttävä laatu (pmy/mpn/100 ml)
Sisämaan uimavedet	Suolistoperäiset enterokokit	200*	400*	330**
Sisämaan uimavedet	<i>E. coli</i>	500*	1000*	900**
Rannikon uimavedet	Suolistoperäiset enterokokit	100*	200*	185**
Rannikon uimavedet	<i>E. coli</i>	250*	500*	500**

*Perustuu 95. prosenttipisteeseen.

**Perustuu 90. prosenttipisteeseen.

Taulukko 6. Yksittäisen valvontatutkimustuloksen toimenpiderajat (STM 2008a ja STM 2008b).

Vesityyppi	Muuttuja	Toimenpideraja, (pmy/mpn/100 ml)	Menetelmä
Sisämaan uimavedet	Suolistoperäiset enterokokit	400	ISO 7899-1:1998 tai ISO 7899-2
Sisämaan uimavedet	<i>E. coli</i>	1000	ISO 9308-3 tai ISO 9308-1
Rannikon uimavedet	Suolistoperäiset enterokokit	200	ISO 7899-1 tai ISO 7899-2
Rannikon uimavedet	<i>E. coli</i>	500	ISO 9308-3 tai ISO 9308-1

2.3.2 Suolistoperäisten indikaattorimikrobien valvontamenetelmät

Escherichia coli -bakteerit kuuluvat *Enterobacteriaceae*-heimoon ja ne ovat gram-negatiivisia fakultatiivisesti anaerobisia sauvoja (kappale 2.2.3). Muista koliformisista bakteereista ne eroavat sillä, että ne tuottavat β -D-galaktosidaasientsyymien lisäksi β -D-glukoronidaasientsyymiä, johon niiden standardoidut analyysimenetelmät perustuvat (Percival ja Williams 2014). *E. coli* -bakteeri kuuluu tasalämpöisten eläinten normaaliin suolistomikrobistoon, mutta myös patogeenisiä kantoja esiintyy, kuten EHEC (Harwood ym. 2017, kappale 2.2.3.). Uimavesidirektiivissä on määritetty kaksi analyysimenetelmää *E. coli* -bakteerille: ISO 9308-1:2014 mukainen kalvosuodatusmenetelmä ja ISO 9308-3:1998 mukainen pienen mittakaavan MPN-menetelmä nestemäisellä kasvualustalla (Uimavesidirektiivi 2006/7/EEC). Lisäksi EU:n jäsenvaltiot voivat käyttää myös vaihtoehtoisia valvontamenetelmiä, mikäli ne on todettu yhtä luotettavaksi kuin uimavesidirektiivissä mainitut menetelmät (Uimavesidirektiivi 2006/7/EEC). Standardin ISO 9308-2:2012 mukaisen Colilert-18 Quanti-Tray -menetelmän on havaittu tuottavan vastaavia tuloksia ISO 9308-3:1998 mukaisen menetelmän kanssa, joten sitä voidaan käyttää uimavesien laadunvalvontaan Suomessa (Tiwari ym. 2016). Kalvosuodatusmenetelmässä käytetyn kromogeenisen koliformiagarkasvualustan selektiivisyys on alhainen, minkä vuoksi se soveltuu heikosti paljon taustamikrobeita sisältäville pintavesille (Tiwari ym. 2021). Pienen mittakaavan

MPN-menetelmä puolestaan sopii hyvin taustamikrobeita sisältäville näytteille, mutta ongelmana menetelmässä on pieni näytetilavuus (10 ml), mikä voi olla ongelma *E. coli* -bakteerin lukumäärien ollessa alhaisia. Colilert-18 Quanti-Tray -menetelmä soveltuu hyvin kaikenlaisille vesille ja sen etuna ISO 9308-3:1998 mukaiseen MPN-menetelmään on uimavesille soveltuvampi näytetilavuus (100 ml) ja lyhyempi inkubaatioaika (18 h) (Tiwari ym. 2016).

Suolistoperäiset enterokokit ovat gram-positiivisia fakultatiivisesti anaerobisia kokkeja (Harwood ym. 2017). Ne voivat kasvaa epäsuotuisissakin olosuhteissa. Suurin osa suolistoperäisistä enterokokeista kuuluu useiden tasalämpöisten eläinten normaaliin suolistomikrobistoon, mutta myös ympäristössä eläviä lajeja tiedetään esiintyvän (Byappanahalli ym. 2012). Useissa tutkimuksissa on havaittu korrelaation enterokokkilukumäärien ja uimaveden liitettyjen vatsatautien välillä, kun ulosteperäinen saastuminen on peräisin pistelähteestä.

Uimavesidirektiivissä on määritetty kaksi analyysimenetelmää suolistoperäisille enterokokeille: ISO 7899-1:1998 mukainen MPN-menetelmä ja ISO 7899-2:2000 mukainen kalvosuodatusmenetelmä (Uimavesidirektiivi 2006/7/EEC). MPN-menetelmä perustuu suolistoperäisten enterokokkien kykyyn hydrolysoida 4-methylumbelliferyl-b-D-glukosidia nestemäisellä alustalla talliumasetaatin, nalidiksiinihapon ja 2,3,5-trifenyylitetrazoliumkloridin läsnä ollessa (Tiwari ym. 2021). Menetelmä soveltuu pinta- ja jätevesille (ISO 7899-1:1998). Kalvosuodatusmenetelmä on kuvattu tarkemmin kappaleessa 4.2.2, ja se soveltuu parhaiten puhtaammille vesille, mutta on sovellettavissa kaikille vesille, joissa ei ole liiaksi kiinteää ainesta tai taustamikrobeja (ISO 7899-2:2000).

Suolistoperäisiin indikaattorimikrobien käyttöön liittyy kuitenkin rajoitteita. Uimavesissä esiintyviä taudinaiheuttajia on runsaasti, ja ne voivat olla bakteereita, viruksia tai alkueläimiä, eikä indikaattorimikrobien esiintymisen ei ole aina havaittu olevan yhteydessä taudinaiheuttajamikrobien esiintymisen kanssa (Harwood ym. 2005, Ishii ym. 2014, Tiwari ym. 2021). Indikaattoribakteerien on havaittu joitain taudinaiheuttajamikrobeja pidemmän säilymisen lisäksi myös mahdollisesti kykenevän lisääntymään tietyissä ympäristöolosuhteissa, kuten hiekassa, pintasedimenteissä ja vesikasvillisuudessa. Tällöin valvontamittauksissa saadut tulokset saattavat olla todellista ulosteperäistä saastumista suurempia (Byappanahalli ym. 2012).

E. coli -bakteereja ja suolistoperäisiä enterokokkeja esiintyy kaikkien tasalämpöisten eläimien ja ihmisten ulosteissa. Tämän vuoksi ne eivät kerro mitään ulosteen alkuperästä, ja siten ne saattavat yliarvioida todellisen riskin, sillä ulosteen alkuperällä on merkitystä terveysriskin suuruuden kannalta (Soller ym. 2010). Lisäksi on havaittu, että indikaattorimikrobien yhteys terveysvaikutuksiin ei ole kovin hyvä, mikäli ulosteperäinen saastuminen on peräisin hajakuormituslähteistä, kuten maatalouden valumista ja hulevesistä (Fewtrell ja Kay 2015).

2.3.3 Saastelähdejäljitys

Mikäli uimavedessä havaitaan ulosteperäistä saastumista, ulosteen alkuperän tunnistaminen auttaa hallintatoimien kohdistamisessa ja terveysriskin arvioinnissa (Harwood ym. 2007, Valkama 2022). Saastelähdejäljityksellä tarkoitetaan menetelmiä, jotka pyrkivät määrittämään ulosteperäisen saastumisen alkuperän pintavesissä (Roslev ja Bukh 2011). Menetelmiä on useita erilaisia, ja ne voidaan jakaa kirjastosta riippuvaisiin ja riippumattomiin menetelmiin. Suurin osa menetelmistä keskittyy jätevedestä peräisin olevan ulostekontaminaation erottamiseen muista kontaminaatiolähteistä, mutta myös eri eläinlajeille ja -ryhmille on kehitetty menetelmiä (Harwood ym. 2014).

Menetelmäkehityksen alkuvaiheessa kirjastosta riippuvaiset menetelmät olivat vallitsevia (Boehm ym. 2013). Kirjastosta riippuvaiset menetelmät perustuvat siihen, että ulosteperäisten mikrobien tietyt fenotyyppiset tai genotyyppiset ominaisuudet voidaan liittää tiettyihin eläimiin tai eläinryhmiin (Mott ja Smith 2011). Suurin osa kirjastosta riippuvaisista menetelmistä hyödyntää *E. coli* -bakteeria ja suolistoperäisiä enterokokkeja. Ensin muodostetaan kirjasto halutuista ulostenäytetyypeistä, jonka jälkeen ympäristöstä eristettyjä kantoja verrataan näihin. Kirjastosta riippuvaisia menetelmiä ovat muun muassa antibioottiresistenssianalyysi, hiilen lähteen hyödyntäminen ja 16S rRNA geenin tyypitys. Näiden menetelmien etuna on mahdollinen yhdistäminen ulosteperäisten indikaattorien rutiinimonitorointiin ja kirjaston koostaminen valuma-aluekohtaisesti. Menetelmien suurimmat ongelmat liittyvät kirjastoihin: niiden muodostaminen on työlästä, eikä ole olemassa konsensusta siitä, miten kirjasto tulisi muodostaa.

Kirjastoista riippumattomiin menetelmiin kuuluvat kemialliset ja molekulaariset markkerit (Harwood ym. 2017). Tällä hetkellä lupaavaksi menetelmäksi on osoittautunut PCR-menetelmillä havaittavat geneettiset markkerit, joihin tässä työssä keskitytään. Menetelmän perustana on se, että tiettyyn isäntään liitettävien geneettisten markkereiden esiintyminen kertoo ulosteen olevan peräisin tietystä isäntälajista. Tämä perustuu siihen, että suoliston selektiivinen paine suosii erityyppisiä mikrobeja ja niiden ominaisuuksia isännästä riippuen (Roslev ja Bukh 2011). Geneettiset markkerit voidaan luokitella esitumallisiin ja aitotumallisiin markkereihin, sekä virusmarkkereihin. Tyypillisiä geneettisiä esitumallisia markkereita ovat isäntäspesifin bakteerin 16S rRNA -geenialue, joka on erittäin konservoitunut alue bakteerien genomissa, mutta myös muita nukleinihapposekvenssejä voidaan käyttää (Harwood ym. 2017). Isäntäspesifillä tarkoitetaan tässä yhteydessä sitä, että kyseisen markkerin läsnäolo indikoi, että ulostekontaminaatio on peräisin tietystä isäntälajista (McLellan ja Eren 2014). Isäntäspesifillä voidaan kirjallisuudessa myös viitata siihen, että kyseistä markkeria esiintyy kaikissa isäntälajin yksilöissä, eikä ollenkaan muiden lajien yksilöissä. Isäntäspesifisistä bakteereista tyypillisimpiä ovat *Bacteroidales*-lahkon bakteerit, mutta myös esimerkiksi enterokokkeja, *Helicobacter* spp. ja *Catelicoccus* spp. on käytetty markkereina (Harwood ym. 2017). Tasalämpöisten eläinten ulosteessa on myös viruksia, jotka ovat tyypillisesti erittäin isäntäspesifejä, minkä vuoksi niitä voidaan käyttää saastelähdejäljitykseen (Roslev ja Bukh 2011). Virusmarkkereita on kehitetty jätevedestä peräisin olevalle ulostesaastumiselle (CrAssphage ja paprikavirukset), sekä eri eläinlajeilta peräisin olevalle ulosteelle (sian adenovirukset ja nautojen polyomavirukset) (Ahmed ja Harwood 2017). Aitotumalliset markkerit perustuvat siihen, että ulosteen mukana ympäristöön pääty myös isännän suoliston epiteelin soluja, joiden ansiosta isäntä voidaan havaita suoraan (Roslev ja Bukh 2011). Mitokondrio-DNA-sekvenssit (mtDNA) ovat eräs mielenkiintoinen aitotumallisten markkereiden tyyppi, sillä ne voidaan suunnitella erittäin lajispesifisiksi. MtDNA-markkereita on kehitetty muun muassa ihmiselle, lampaalle ja koiralle (Schill, Mathes 2008, Caldwell, Levine 2009, Stea ym. 2015).

Hyvää saastelähdemarkkeria esiintyy laajasti kohdelajin tai -lajien suolistossa, ja sitä ei esiinny ollenkaan tai esiintyy merkittävästi vähäisemmässä määrin muiden lajien suolistossa ja sen esiintyvyydessä ei ole ajallista tai paikallista vaihtelua (Roslev ja Bukh 2011, Harwood ym. 2017).

Käytännössä tällaista ideaalista markkera ei kuitenkaan ole, vaan näihin geneettisiin markkereihin liittyy vielä useita rajoitteita (Roslev ja Bukh 2011). Tasalämpöisten eläinten suoliston mikrobipopulaatio muuttuu yksilön eliniän aikana, sukupolvien välillä ja maantieteellisesti. Absoluuttista isäntäspesifisyyttä ei käytännössä tavata, vaan usein markkera esiintyy muissakin kuin kohdeisännässä hetkellisesti tai pienempinä lukumäärinä. Mitokondrio-DNA puolestaan voi päätyä ympäristöön ulosteen lisäksi muitakin reittejä pitkin. Vaikka saastelähdejäljitykseen liittyy edelleen paljon avoimia kysymyksiä ja menetelmiä ei ole standardoitu, se on oikein käytettynä hyödyllinen osa uimavesien laadun valvontaan ja monitorointiin käytettävää työkalupakkia (Mott ja Smith 2011, Harwood ym. 2017).

Geenimarkkereiden havaitsemiseen voidaan käyttää perinteistä PCR-menetelmää tai kvantitatiivista PCR-menetelmää (qPCR) ja viime vuosina suurin kiinnostus on kohdistunut qPCR-menetelmiin (Harwood ym. 2014, Rytönen ym. 2021). Kvantitatiivisessa menetelmässä qPCR-laite sisältää lämpöblokin lisäksi fluoresenssia mittavaan sensorin, jonka avulla monistuvaa kohde-DNA:ta mitataan koko monistumisreaktion ajan joko epäspesifin (SYBR) tai spesifin (TaqMan) fluoresenssileiman avulla (Harwood ym. 2017). Menetelmä perustuu oletukseen, että kohde-DNA:n alkuperäisen määrän ja mitatun fluoresenssin välillä on logaritmisesti lineaarinen suhde ja nukleiinihapon määrä saadaan selville standardisuoran avulla. PCR-menetelmillä voidaan monistaa ainoastaan DNA-molekyylejä, jota on kritisoitu siitä, että se säilyy ympäristössä pitkään ja se voidaan yhdistää myös kuolleisiin soluihin (Keer ja Birch 2003). Ribosomaalista RNA:ta (rRNA) pidetään potentiaalisena kohdemolekyylinä, sillä sitä on runsaasti bakteerisoluisissa, mikä mahdollistaa suuremman havaitsemisherkkyuden, sen määrä on suurempi aktiivisissa soluissa ja se hajoaa nopeasti solun siirtyessä stationäärivaiheeseen tai joutuessaan ympäristöön (Pitkänen ym. 2013). RNA voidaan kääntää komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA) käänteiskopiointientsyymien avulla, jonka jälkeen cDNA:ta voidaan monistaa PCR-menetelmillä kuten DNA:ta (Rytönen ym. 2021). Tutkimuksissa on havaittu, että rRNA-templaatti tuottaa qPCR-menetelmässä suurempia kopiolukumääriä verrattuna DNA-templaattiin ja rRNA-pohjaisen qPCR-menetelmän huomattiin olevan yhteneväisempiä viljelymenetelmillä saatujen tulosten kanssa (Pitkänen ym. 2013, Kapoor ym. 2015).

3 Työn tavoitteet

Tutkielman tavoitteena oli selvittää millaisia vaikutuksia nautojen ja lampaiden laiduntamalla merenrantalaitumilla voi olla lähistöllä sijaitsevien uimavesien hygieeniseen laatuun, sekä hälventää epätietoisuutta rantalaidunten hygieenisistä vesistövaikutuksista. Tässä tutkielmassa vesien hygieenistä laatua arvioitiin zoonoottisten taudinaiheuttajamikrobien (lämpökestoiset kampakyobakteerit, salmonella, *Cryptosporidium* spp. ja EHEC), suolistoperäisestä saastumisesta kertovien indikaattorimikrobien, sekä suolistoperäistä saastumisen lähdettä osoittavien saastelähdemarkkerien avulla. Työn tuloksia hyödynnettiin arvioitaessa rantalaidunten vesistölle aiheuttaman hygieenistä riskiä. Työ toteutettiin osana Luonnonvarakeskuksen koordinoimaa ”Merenrantalaidunnusta luonnon ja ihmisten hyväksi - Rantalaidun” -hanketta.

Tarkastelukohteina oli kaksi uimarantaa Pohjois-Pohjanmaalla, joiden läheisyydessä sijaitsi sekä lammas- että nautalaidun. Mittauskertoja oli kummassakin kohteessa kolme, joista yksi oli kesällä 2021 ja kaksi kesällä 2022.

Työn yksityiskohtaiset tavoitteet (1–4) olivat:

1. Tutkia, päätyykö rantalaitumilta vesistöihin laiduntavien eläinten lannasta peräisin olevia mikrobeja, sekä selvittää saastelähdemarkkerien avulla lammas- ja nautalaidunten roolia vesistön ulosteperäisessä saastumisessa.
2. Arvioida eroavatko vesistöihin päätyvien suolistoperäisten mikrobien lukumäärät lammas- ja nautalaidunten välillä.
3. Selvittää toimiiko merenpohjan orgaaninen aines ranta-alueilla lannan mikrobeja pidättävänä aineksena.
4. Arvioida rantalaitumien läheisyyden vaikutusta uimavesien suolistoperäisten taudinaiheuttajamikrobien aiheuttamaan uimarien terveysriskin suuruuteen Uimavesiopas-työkalun avulla.

4 Aineisto ja menetelmät

4.1 Näytteenottopaikat ja näytteenotto

Näytteenottokohteet (2 kpl) sijaitsivat Perämeren rannikolla. Kummassakin tutkimuskohteessa oli nautalaidun, lammaslaidun, niiden läheisyydessä sijaitseva yleinen uimaranta, sekä laitumen läpi kulkeva oja, jota eläimet käyttivät juomavetenä. Lisäksi kummallekin kohteelle valittiin kontrolliuimarannat, joiden läheisyydessä ei ollut laidunnusta. Näytepisteet (21 kpl), sekä niiden vesiteitse mitatut etäisyydet laitumelle ja uimarannalle on esitetty taulukossa 7. Eläinten juomavesipisteet olivat laitumen läpi kulkevia ojia, jotka laskivat Perämereen. Eläinten juomavesipisteiden oli tarkoitus kuvastaa laitumelta peräisin olevaa kuormitusta, mutta käytännössä näiden ojien kuormitus oli peräisin myös muista valuma-alueen kuormituslähteistä. Jokaisesta pisteestä otettiin näyte kolme kertaa: laidunkauden 2021 lopulla, laidunkauden 2022 alkupuolella ja laidunkauden 2022 lopulla. Kohteen 2 nautalaitumen edustan pisteestä 4 ei tutkittu näytettä laidunkauden 2021 lopulla, sillä se otettiin tutkimukseen mukaan vasta laidunkauden 2022 näytteenottoja varten. Kaikista näytepisteistä pyrittiin ottamaan pintasedimenttinäyte, vesinäyte, sekä suuren tilavuuden näyte DEUF (Dead-End ultrafiltration) -menetelmällä (Smith ja Hill 2009). Kohteen 1 nautalaitumen juomavesipisteestä otettiin ainoastaan vesinäyte ja suuren tilavuuden näyte, sillä pintasedimenttinäytettä ei ollut pohjakasvillisuuden vuoksi mahdollista ottaa, minkä lisäksi kohteessa 1 ei ollut erillistä lammaslaitumen juomavesipistettä, sillä lampaat saivat juomavetensä lammaslaitumen edustan pisteessä 1. DEUF-näytettä ei saatu otettua laidunkauden 2022 alkupuolella kohteesta 1 ja laidunkauden 2022 loppupuolella kummastakaan kohteesta. Näytteenottoja edeltävien seitsemän vuorokauden lämpötila- ja sademäärähavainnot kerättiin Ilmatieteen laitoksen sivuilta kolmelta sääasemalta, jotka sijaitsivat kohteiden läheisyydessä (Ilmatieteen laitos 2022).

Taulukko 7. Rantalaidun-hankkeen näytepisteet.

Näytetyyppi	Näytepiste	Etäisyys lähimpään laitumeen	Etäisyys lähimpään uimarantaan
Pintavesi	Lammaslaidun, kohde 1, laidunedustan piste 1	120 m	510 m
Pintavesi	Lammaslaidun, kohde 1, laidunedustan piste 2	390 m	250 m
Pintavesi	Lammaslaidun, kohde 1, laidunedustan piste 3	500 m	120 m
Pintavesi	Nautalaidun, kohde 1, laidunedustan piste 1	260 m	2300 m
Pintavesi	Nautalaidun, kohde 1, laidunedustan piste 2	260 m	1600 m
Pintavesi	Nautalaidun, kohde 1, laidunedustan piste 3	190 m	850 m
Juomavesi	Nautalaidun, kohde 1, eläinten juomavesipiste	0 m	2300 m
Uimavesi	Uimaranta, kohde 1	630 m*/370 m**	0 m
Kontrolliuimavesi	Kontrolliuimaranta 1, kohde 1	15000 m	15000 m
Pintavesi	Lammaslaidun, kohde 2, laidunedustan piste 1	270 m	640 m
Pintavesi	Lammaslaidun, kohde 2, laidunedustan piste 2	440 m	340 m
Pintavesi	Lammaslaidun, kohde 2, laidunedustan piste 3	500 m	310
Juomavesi	Lammaslaidun, kohde 2, eläinten juomavesipiste	0 m	750 m
Pintavesi	Nautalaidun, kohde 2, laidunedustan piste 1	700 m	2400 m
Pintavesi	Nautalaidun, kohde 2, laidunedustan piste 2	650 m	1700 m
Pintavesi	Nautalaidun, kohde 2, laidunedustan piste 3	780 m	1200 m
Pintavesi	Nautalaidun, kohde 2, laidunedustan piste 4	140 m	2700 m
Juomavesi	Nautalaidun, kohde 2, eläinten juomavesipiste	110 m***	2000 m
Uimavesi	Uimaranta, kohde 2	340 m*/2 km**	0 m
Kontrolliuimavesi	Kontrolliuimaranta 2, kohde 2	1,2 km*/3 km**	1000 m
Kontrolliuimavesi	Kontrolliuimaranta 3, kohde 2	16 km*/14 km**	16 km

*Etäisyys lammaslaitumeen

**Etäisyys nautalaitumeen

***Näyte on otettu ojan yläjuoksulta ennen laidunta

Laiduneduspisteiden ja kohdeuimarantojen näytteet otettiin veneestä käsin, pois lukien kohteen 2 nautalaitumen edustan piste 4, josta näyte haettiin kahlaamalla. Kontrolliuimarannoilta näytteet otettiin kahlaamalla. Vesinäytteet ja suuren tilavuuden DEUF-näytteet otettiin kustakin pisteestä yhtäaikaaisesti kahden henkilön toimesta siten, että näytteenottajat olivat alle 2 metrin etäisyydellä toisistaan. Viljelyanalyysjä varten otettiin vesinäytteitä noin 3 litraa steriloihisiin muovipulloihin ja molekyylibiologisia analyysjä varten otettiin näytteitä noin 2 litraa steriileihin kertakäyttöisiin muovipulloihin. Näytteet otettiin 20 cm syvyydeltä veden pinnasta, paitsi kohteen 2 lampaiden juomavesipisteestä näyte jouduttiin ottamaan aivan pinnasta veden mataluuden vuoksi. DEUF-näytettä varten otettiin ensin 10 litraa näytevettä kloorattuun ja näytevedellä huuhdeltuun kanisteriin, josta se pumpattiin letkupumpun (Geopump™ Peristaltic Pumps, Geotech Environmental Equipment, Colorado, Yhdysvallat) avulla DEUF-patruunan läpi (Asahi Kasei Medical Europe, Saksa). Pintasedimenttinäytteet otettiin samoista pisteistä kuin vesinäytteet vesinäytteenoton jälkeen sedimenttinäytteenottimella, jonka näytteenottopinta-ala oli 15x15 cm (Petite Ponar®, WildCo, Florida, Yhdysvallat) tai metallilapiolla, mikäli sedimenttinäytteenotinta ei ollut mahdollista käyttää. Näytteenotin ja lapio puhdistettiin 80 % etanolilla ennen jokaista näytettä. Pintasedimenttinäytteet siirrettiin ensin 80 % etanolilla puhdistettuun muoviasiaan, josta otettiin 50 ml:n osanäyte kertakäyttöisellä muovilusikalla kertakäyttöiseen sentrifuugiputkeen (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Yhdysvallat).

4.2 Näytteiden esikäsittely

Vesi- ja DEUF-näytteet toimitettiin THL:n vesimikrobiologian laboratorioon Kuopioon kylmälaukuissa siten, että analyysit oli mahdollista aloittaa 24 tunnin sisällä näytteenotosta. Vesinäytteistä mitattiin lämpötila niiden saavuttua laboratorioon, minkä jälkeen kaikki näytteet säilytettiin 4 °C:ssa pimeässä analyysien aloittamiseen asti. Viljelyanalyysjä varten vesinäytettä

suodatettiin 0,45 µm kalvosuodattimelle (47 mm, 0,45 µm, GN-6 Metrical®, PALL Corporation, New York, Yhdysvallat). Analyysikohtaiset suodatustilavuudet on esitetty kappaleessa 4.3. Mikäli suodatettu tilavuus oli alle 50 ml, käytettiin kantovetenä fosfaattipuskuria (0,04 g KH₂PO₄, 0,25 g MgSO₄ x 7 H₂O, 0,008 g NaOH 1000 ml deionisoitu vesi ja 0,2 ml Tween 80). Kolmannen näytteenoton yhteydessä vesinäytteistä suodatettiin lisäksi maksimitilavuus polykarbonaattisuodattimelle (PC) (47 mm, 0,4 µm, Whatman, Iso-Britannia) molekyylibiologisia analyysejä varten. Suuren tilavuuden näytteet saapuivat laboratorioon DEUF-patruunoissa, jotka eluoiitiin pumppaamalla eluointiliuosta näytteen kanssa vastakkaiseen suuntaan Inkinen ym. (2019) mukaisesti (Inkinen ym. 2019). Eluaatin sisältämä biomassa suodatettiin Millipore Express plus -suodattimille (Express) (47 mm, 0,22 µm, Merck, Saksa). PC- ja Express-suodattimet säilytettiin -80 °C:ssa nukleiinihappojen eristykseen asti.

Pintasedimenttinäytteet toimitettiin THL:n vesimikrobiologian laboratorioon ja Helsingin yliopiston Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osaston laboratorioon kuten vesi- ja DEUF-näytteet. Viljelyanalyysejä varten pintasedimenttinäytteet suspensioitiin 1:10 fosfaattipuskuriin, jolloin 10 ml suspensiota vastasi 1 g pintasedimenttiä. Kolmannella näytteenottokerralla näytteistä tehtiin lisäksi vastaava suspensio steriiliin deionisoituun veteen Colilert-18-menetelmää varten. Pintasedimenttinäytteiden molekyylibiologiset analyysit tehtiin Helsingin yliopiston laboratoriossa. Molekyylibiologisia analyysejä varten pintasedimenttinäytteistä tallennettiin neljään 1,5 ml Eppendorf-putkeen (Eppendorf, Saksa) 250 mg näytettä, jotka säilytettiin -80 °C nukleiinihappojen eristykseen asti.

4.3 Suolistobakteerien havaitseminen ja lukumäärän määrittäminen viljelymenetelmillä

4.2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli -bakteerin lukumäärä määritettiin kalvosuodatusmenetelmällä käyttäen pintalevitykseen tarkoitettua väriä muodostavaa kromogeenistä alustaa, johon oli taustakasvun inhiboimiseksi lisätty vankomysiiniä ja kefsulodinia (Chromocult Coliform Agar with *E. coli*

Coliform selective supplement, CC-VK) (Merck, Saksa). CC-VK-alustan saatavuusongelman vuoksi elokuun 2022 näytteet analysoitiin Colilert® -18 Quanti-Tray -menetelmällä (Idexx Laboratories, Yhdysvallat) (ISO 9308-2:2012). Vesinäytteitä suodatettiin 10 ml ja 100 ml kalvosuodattimelle (kappale 4.2), joka asetettiin CC-VK alustalle. Pintasedimenttinäytesytesuspension suodatustilavuudet olivat 1 ml ja 10 ml. CC-VK alustoja inkuboitiin 36 ± 2 °C:ssa 21–24 h ajan, jonka jälkeen *E. coli* -pesäkkeiksi laskettiin siniset ja violetit pesäkkeet. Lopullinen tulos laskettiin painotettuna keskiarvona ja ilmoitettiin vesinäytteille muodossa pesäkkeen muodostavaa yksikköä (pmy)/100 ml. Mikäli tulos jäi alle havaitsemisrajan, se ilmoitettiin muodossa <1 pmy/100 ml. Pintasedimenttinäytteiden tulokset ilmoitettiin muodossa pmy/g (märkäpaino).

Colilert®-18 Quanti-Tray -menetelmällä analysoitiin vesinäytteistä 100 ml:n tilavuus ja tarvittaessa 10 ml. Steriiliin deionisoituun veteen tehtyä pintasedimenttisuspensiota otettiin analyysiin 10 ml. Näytteisiin liuotettiin yksi ampulli/näyte Colilert®-18-reagenssia. Reagenssin sisältävät näytteet kaadettiin 100 ml:n Quanti-Tray/2000-liuskoihin (Idexx Laboratories, Yhdysvallat), jotka suljettiin Quanti-Tray sealer -sulkijalaitteella (Idexx Laboratories, Yhdysvallat). Liuskoja inkuboitiin 36 ± 2 °C:ssa 18–22 h. *E. coli* -bakteereiksi laskettiin kaikki keltaiset, UV-valossa (365 nm) fluoresoivat kaivot. Tulokset määritettiin SFS-EN ISO 9308-2:2012 standardissa olevan todennäköisin lukumäärä (most probable number, mpn) -taulukon mukaan ja lopullinen tulos ilmoitettiin muodossa mpn/100 ml. Mikäli tulos jäi alle havaitsemisrajan, se ilmoitettiin muodossa <1 mpn/100 ml, yli havaitsemisrajan oleva tulos ilmoitettiin muodossa >2419,6 mpn/100 ml. Pintasedimenttinäytteiden tulokset ilmoitettiin muodossa mpn/g (märkäpaino).

4.2.2 Suolistoperäiset enterokokit

Suolistoperäiset enterokokit laskettiin standardin SFS-EN ISO 7899-2:2000 mukaisella menetelmällä. Vesinäytteistä suodatettiin 10 ml ja 100 ml kalvosuodattimelle (kappale 4.2), joka asetettiin Slanetz & Bartley -alustalle (S&B) (Oxoid, Iso-Britannia). Pintasedimenttinäytteiden suspensiota suodatettiin tilavuudet 1 ml ja 10 ml. S&B alustoja inkuboitiin 36 ± 2 °C:ssa 44 ± 4 h ajan. Inkuboinnin jälkeen suodattimilta laskettiin tyypilliset punaiset, punaruskeat ja vaaleanpunaiset kohonneet pesäkkeet. Heti laskennan jälkeen tyypillisiä pesäkkeitä sisältävä

suodatin siirrettiin steriileillä pinseteillä 44 °C:een esilämmitetylle sappi-eskuliini-atsidi-alustalle (BEA) (Merck, Saksa), jota inkuboitii 44,0 ± 0,5 °C kahden tunnin ajan. Suolistoperäisiksi enterokokeiksi laskettiin pesäkkeet, jotka muodostivat kullanuskeasta mustaan olevan värireaktion BEA-alustalla. Lopullinen tulos laskettiin painotetulla keskiarvolla ja ilmoitettiin vesinäytteille muodossa pmy/100 ml. Mikäli tulos jäi alle havaitsemisrajan, se ilmoitettiin muodossa <1 pmy/100 ml. Pintasedimenttinäytteiden tulokset ilmoitettiin muodossa pmy/g (märkäpaino).

4.2.3 Lämpökestoiset kampylobakteerit

Lämpökestoisten kampylobakteerien esiintyminen vesinäytteissä analysoitiin rikastusmenetelmällä standardin ISO 17995:2019 mukaisesti, jolla on mahdollista saada parhaimmillaan semikvantitatiivinen tulos. Laitumen edustojen näytteitä suodatettiin kalvosuodattimelle 117–1600 ml (mediaani 1100 ml). Uimarantanäytteistä suodatettiin tilavuudet 10 ml, 100 ml ja 1000 ml. Suodattimia inkuboitii Bolton- ja Preston-rikastusliemipulloissa kaasunkehittimen (BD GasPak™ EZ Campy Container System Sachets, Becton, Dickinson and Company, Yhdysvallat) sisältämissä inkubointikolveissa mikroaerofiilisissä olosuhteissa 37 ± 1 °C:ssa 44 ± 4 h ajan. Rikastuksen jälkeen rikastuslientä siirrostettiin muunnellulle puuhiili-kefoperatsoni-deoksikolaatti-agar-alustalle (modified charcoal-cefoperazone-ceoxycholate agar, mCCDA) (Oxoid, Iso-Britannia) 10 µl hajotusviljelmänä, jonka jälkeen alustoja inkuboitii mikroaerofiilisesti standardista poiketen 37 ± 1 °C:ssa 44 ± 4 h ajan. mCCDA-alustalta otettiin tyypillisiä litteitä ja kiiltäväpintaisia pesäkkeitä jatkoon verialustalle (Oxoid, Iso-Britannia). Puhdasviljelmää inkuboitii mikroaerofiilisesti standardista poiketen 37 ± 1 °C:ssa noin 2 vuorokauden ajan.

Verialustalla kasvatetuille puhdasviljelmille tehtiin standardin ISO 17995:2019 mukaisista varmistustesteistä liikkuvuus-, aerobisuus- ja hippuraattitestit. Lämpökestoisille kampylobakteereille tehtiin lajintunnistus Ruokaviraston ohjeen mukaisesti 24 tunnin puhdasviljelmistä matriisiavusteisella laser-desorptio/ionisaatio-lentoaika massaspektrometria -menetelmällä MALDI Biotyper® smart -laitteella (MALDI-TOF MS) (Bruker, Yhdysvallat). Käytetty rikastusmenetelmä on havaitsemismenetelmä, joten lopulliset tulokset ilmoitettiin muodossa

havaittu tai ei havaittu/näytetilavuus. Uimavesinäytteistä tutkittiin kolme tilavuutta, joten niistä oli mahdollista saada standardin ISO 17995:2019 mukainen semikvantitatiivinen tulos.

4.2.4 Salmonella

Salmonella analysoitiin vesinäytteistä standardiin ISO 19250:2010 perustuvalla rikastusmenetelmällä. Laitumen edustojen vesinäytteitä suodatettiin kalvosuodattimelle 100–825 ml (mediaani 520 ml). Uimarantanäytteistä suodatettiin tilavuudet 10 ml, 100 ml ja 1000 ml. Suodatin siirrettiin ei-selektiiviseen esirikastukseen lasipulloon, jossa oli 100 ml huoneenlämpöistä puskuroitua peptonivettä (buffered peptone water, BPW) (Oxoid, Iso-Britannia). Esirikastusliemiä inkuboitiiin 36 ± 2 °C:ssa 18 ± 2 h. Inkuboinnin jälkeen esirikastetta siirrostettiin 100 µl kolmena pisarana muunnellulle puolikiinteälle Rappaport-Vasilliadis-alustalle (modified semi-solid Rappaport Vassiliadis agar, MSRV) (Oxoid, Iso-Britannia), jota inkuboitiiin $41,5 \pm 1$ °C:ssa 24 ± 3 h. Mikäli maljalla ei esiintynyt tyypillistä kasvua, jatkettiin inkubointia 24 h ajan $41,5 \pm 1$ °C:ssa. MSRV-maljalta otettiin salmonellalle tyypillisestä kasvustoa 1 µl siirrostukset hajotusviljelynä selektiivisille ksyloosi-lysiini-deoksikolaatti- (Xylose-lysine-deoxycholate agar, XLD) (Oxoid, Iso-Britannia) ja Brilliance Salmonella -alustoille (BRS) (Oxoid, Iso-Britannia), joita inkuboitiiin 36 ± 2 °C:ssa 24 ± 3 h. XLD- ja BRS-maljoilta otettiin tyypillisiä pesäkkeitä jatkoon ei-selektiiviselle tryptoni-soija-agar-alustalle (tryptone soya agar, TSA) (Oxoid, Iso-Britannia). TSA-alustoja inkuboitiiin 36 ± 2 °C:ssa 24 ± 3 h. Tyypillisille pesäkkeille tehtiin sukutason tunnistus MALDI-TOF MS -menetelmällä kuten lämpökestoisille kampylobakteereille. Salmonella-tulokset ilmoitettiin muodossa havaittu tai ei havaittu/näytetilavuus. Uimavesinäytteistä tutkittiin tilavuudet 10 ml, 100 ml ja 1000 ml, joten niistä oli mahdollista saada standardin ISO 19250:2010 mukainen semikvantitatiivinen tulos.

4.4 Molekyylibiologiset analyysit

Vesinäytteiden molekyylibiologiset analyysit tehtiin THL:n vesimikrobiologian laboratoriossa Kuopiossa. Express-suodattimelle suodatetusta DEUF-eluaatista tai PC-suodattimelle konsentroidusta vesinäytteestä eristettiin nukleiinihapot joko KingFisher mL -laitteella (KF-laitte)

(Thermo Fisher Scientific, Yhdysvallat) käyttäen Chemagic DNA Plant Kit -eristyskittiä (Perkin Elmer, Yhdysvallat) tai ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit -eristyskitillä (Zymo Research, Yhdysvallat). Express-suodattimille tallennettu näytetilavuus oli 380–6700 ml (mediaani 2800 ml), kun taas PC-suodattimilla tallennettu näytetilavuus oli 25–200 ml (mediaani 74 ml). Ensimmäisen näytteenottokerran näytteet eristettiin KF-laitteella ja Chemagic-eristyskitillä Inkinen ym. (2019) mukaan. Toisen ja kolmannen näytteenottokerran näytteet eristettiin Zymo-eristyskitillä valmistajan ohjeen mukaisesti. Eluointitulavuus oli 100 µl, josta otettiin 30 µl eluaattia DNAasi-käsittelyyn RNA:n puhdistamiseksi kokonaisnukleiinihaposta TURBO DNA-free DNase -kitillä (Thermo Fisher Scientific, Yhdysvallat) valmistajan ohjeen mukaan. Puhdistetulle RNA:lle tehtiin cDNA-synteesi SuperScript IV VILO Master Mix -kitillä (Thermo Fisher Scientific, Yhdysvallat) kahdelle RNA-tilavuudelle (8 µl ja 0,8 µl) Rytönen ym. (2021) mukaisesti.

Pintasedimenttinäytteiden molekyylibiologiset analyysit tehtiin Helsingin yliopiston Eläinlääketieteellisen tiedekunnan Elintarvikehygienian ja ympäristöterveyden osastolla. Eristykseen otettiin 220–300 mg (mediaani 250 mg) pintasedimenttinäytettä, josta eristettiin nukleiinihapot ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit -eristyskitillä valmistajan ohjeen mukaan kuten vesinäytteille. RNA:n puhdistus tehtiin samoin kuin vesinäytteille. cDNA-synteesi tehtiin SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit -kitillä (Bioline, Yhdysvallat) kahdelle RNA-tilavuudelle (8 µl ja 0,8 µl) valmistajan ohjeen mukaisesti.

Vesinäytteiden RT-qPCR-analyysit tehtiin QuantStudio 6 Flex Real-time PCR system -laitteella (Thermo Fisher Scientific, Yhdysvallat) ja pintasedimenttinäytteiden RT-qPCR analyysit CFX96 C1000 Touch -laitteella (Bio-Rad Laboratories, Yhdysvallat). Taulukossa 8 on esitetty tässä työssä käytetyt qPCR-analyysit. Vesinäytteiden TaqMan-analyyseille käytettiin TaqMan Environmental Master Mix 2.0 -reagenssia (Thermo Fisher Scientific, Yhdysvallat) ja SYBR Green -analyyseille Power SYBR Green PCR Master Mix -reagenssia (Thermo Fisher Scientific, Yhdysvallat). Pintasedimenttinäytteiden TaqMan-analyyseille käytettiin SensiFast Probe No-ROX Mix -reagenssia ja SYBR Green -analyyseille SensiFAST Sybr No-ROX Mix -reagenssia (Bioline, Yhdysvallat). Vesinäytteiden RT-qPCR-ajo-olosuhteet valittiin Rytönen ym. (2021) mukaan. Vesi-

ja pintasedimenttinäytteiden ajo-olosuhteet on esitetty taulukossa 9. Standardit, laimennokset, tulosten tarkastelu ja laskeminen tehtiin kuten Rytkönen ym. (2021).

Taulukko 8. Työssä käytetyt qPCR-analyysit.

Analyysi, kohde	Templaatti	Kemia	Viite
GenBac3, yleinen <i>Bacteroidales</i>	DNA ja cDNA	TaqMan	Siefring ym. 2008
GFD, lintuspesifinen <i>Helicobacter</i>	DNA ja cDNA	SYBR Green	Green ym. 2012
Rum-2-Bac, märehitijäspesifinen <i>Bacteroidales</i>	DNA ja cDNA	TaqMan	Mieszkin ym. 2010
Gull4, lokkispesifinen <i>Catelliboccus marimammalium</i>	DNA ja cDNA	TaqMan	Ryu ym. 2012
SheepCytB, lampaan mitokondriaalinen sytokromi B	DNA	TaqMan	Schill ja Mathes 2008
Cry18S, <i>Cryptosporidium</i> spp.	DNA ja cDNA	TaqMan	Jothikumar ym. 2008
<i>stx1</i> , EHEC	DNA	TaqMan	ISO/TS 13136:2012
<i>stx2</i> , EHEC	DNA	TaqMan	ISO/TS 13136:2012
<i>eae</i> , EHEC/Enteropathogenic <i>E. coli</i>	DNA	TaqMan	ISO/TS 13136:2012
<i>invA</i> , <i>Salmonella</i> spp.	DNA	TaqMan	Galán ym. 1992

Taulukko 9. Vesinäytteiden ajo-olosuhteet TaqMan- ja SYBR Green -analyysille.

Vaihe	TaqMan, vesi	SYBR Green, vesi	TaqMan, pintasedimentti	SYBR Green, pintasedimentti
Polymeraasin aktivaatio	10 min/95 °C	10 min/95 °C	2 min/95 °C	2 min/95 °C
	40 kierrosta:			
Denaturaatio	15 s/95 °C	15 s/95 °C	10 s/95 °C	5 s/95 °C
Pidentyminen	1 min/60 °C	1 min/60 °C	20 s/60 °C	20 s/60 °C

4.5 Terveysriskinarviointi uimavesille

Terveysriskinarviointi suoritettiin molemmille tutkimuskohteille erikseen avoimen Uimavesiopas verkkotyökalun avulla (Uimavesiopas 2021). Terveysriskinarviointi tehtiin kampylobakteerilla (*C. jejuni*), sillä muista Uimavesioppaan sisältämistä taudinaiheuttajamikrobeista ei tehty varmennettuja havaintoja hankkeen aikana. Terveysriskinarvioinnin tavoitteena oli selvittää kuinka suuren infektioriskin *C. jejuni* aiheuttaa uimavedessä, jonka *C. jejuni*-bakteerin lukumäärät vastasivat tässä työssä havaittuja lukumääriä laitumen edustojen pintavesissä, eläinten juomavesissä, laitumen läheisyydessä sijaitsevilla uimavesillä ja kontrolloituimavesillä.

Uimavesiopas on vapaan lähdekoodin verkkopohjainen uimaveden kvantitatiiviseen mikrobiologiseen riskinarviointiin tarkoitettu työkalu (Meriläinen ym. 2021). R-kielillä tehty malli perustuu todennäköisyyksiin ja se ottaa huomioon rannalla kävijöiden lukumäärän ja ikäjakauman, sekä uimisen aikana niellyn veden määrän. Ikäjakauma vaikuttaa niellyn veden määrään, vedessä vietettyyn aikaan ja sairastumisalttiuteen. Mallissa on mukana kuusi mikrobia (kampylobakteeri, *E. coli* O1517:H7, rotavirus, norovirus, *Cryptosporidium* spp. ja *Giardia* spp.), jotka aiheuttavat niellessä suolistoinfektioita (Uimavesiopas 2021). Malliin syötetään uimarannan päivittäinen kävijämäärä ja mikrobien arvioitu määrä uimavedessä litraa kohden. Tuloksena saadaan nieltyjen mikrobien määrä ikäryhmittäin, tautitaakka (disability adjusted life years, DALY), uimaveden aiheuttamien tautitapausten määrä päivässä, uimaveden mikrobeista sairastuneiden osuus rannan käyttäjistä ja tautitapausten määrä eri ikäryhmille.

Uimarantojen osalta uimavesioppaaseen syötetyt *C. jejuni*-bakteerin määrät perustuivat kunkin uimarannan analyysituloksiin. Alle havaitsemisrajan olleille tuloksille määritettiin ensin alamääritysraja 1000 ml kohden, ja lukumääränä käytettiin kyseisen alamääritysrajan puolikasta (kaava 1) (Valkama 2022). Semikvantitatiiviset tulokset muutettiin kvantitatiivisiksi laskemalla tuloksista vaihteluvälin keskiluku (Valkama 2022). Määritetyistä mikrobituloksista laskettiin minimi-, maksimi- ja keskiarvo, joista kukin syötettiin erikseen Uimavesiopas-työkaluun. Tuloksista laskettiin keskiarvot ja -hajonnat jokaiselle skenaariolle. Laidunten edustojen pintavesistä ja eläinten juomavesistä ei tehty semikvantitatiivista kampylobakteerianalyysiä, joten näissä näytteissä *C. jejuni*-lukumäärät arvioitiin *E. coli*-tulosten perusteella. *E. coli*-

bakteeria on aiemmin käytetty juomavesien QMRA-menettelyssä indikaattorina kamylobakteereille (Valkama 2022). Laidunten edustojen pintavesien ja eläinten juomavesien *E. coli* -tulosten keskilukua verrattiin uimavesien vastaavaan lukuun. Keskilukujen suhteen avulla määritettiin kerroin, jonka avulla laidunedustojen pintavesien ja eläinten juomavesien *C. jejuni* -lukumäärät saatiin kertomalla uimavesien *C. jejuni* -lukumäärät kyseisellä kertoimella. Tämä tehtiin kummallekin kohteelle erikseen.

Havaitsemisrajan alapuolella olevien tulosten muuttaminen (pmy/1000 ml):

$$0,5 \times ((1/\text{tutkittu tilavuus (ml)}) * 1000) \quad (\text{Kaava 1})$$

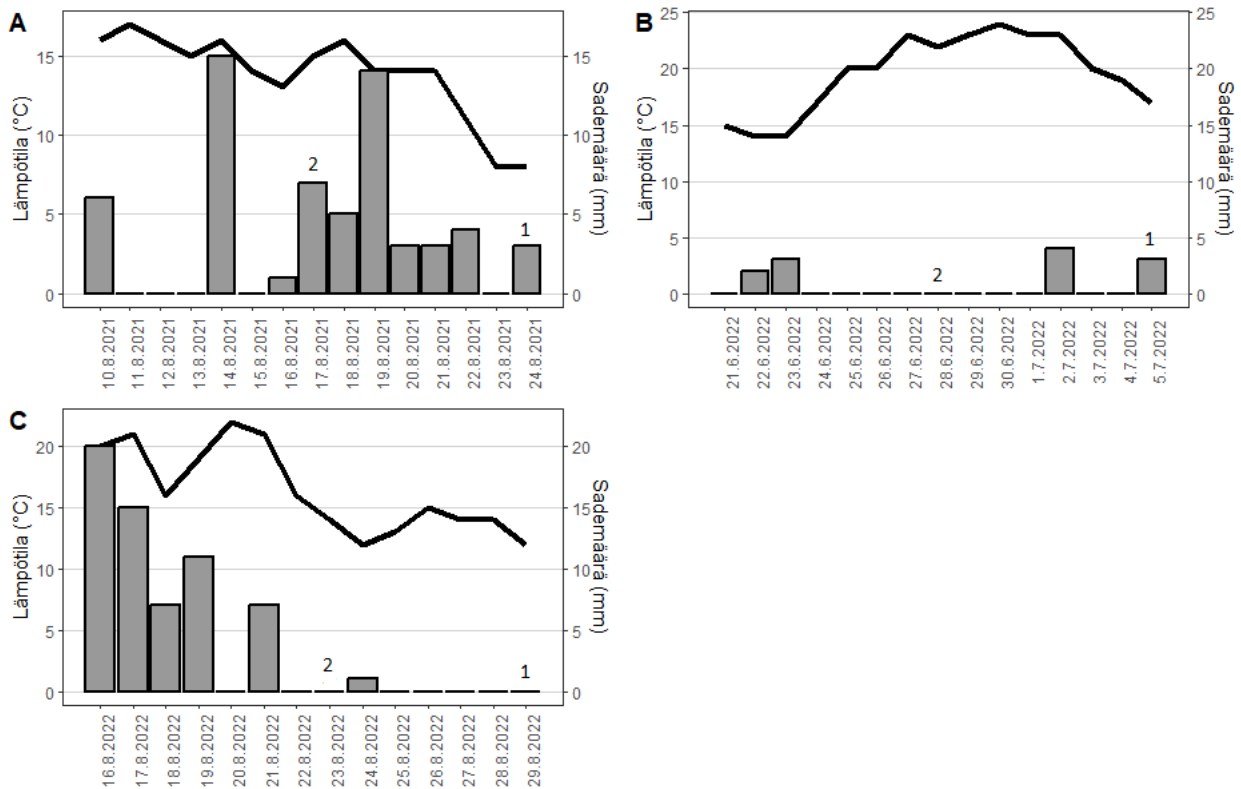
4.6 Tilastolliset menetelmät

Aineiston käsittely ja pylväskuvaajat tehtiin Microsoft Excel -ohjelmalla (Microsoft® Excel® for Microsoft 365 MSO, version 2208). Muut kuvaajat ja tilastolliset analyysit tehtiin R-ohjelmalla (versio 4.2.2). Kuvaajia ja tilastollista tarkastelua varten määritysrajan ylittäneille tuloksille tehtiin LOG₁₀-muunnos. Pintavesien, eläinten juomavesien, uimavesien ja kontrolliuimavesien keskinäistä eroavaisuutta tutkittiin ei-parametrisella Kruskal-Wallis-testillä, sillä aineisto ei ollut normaalisti jakautunut. Post-hoc analyysi tehtiin FSA-pakettiin (Ogle ym. 2023) kuuluvalla Dunn-testillä ja Bonferroni-korjauksella. Pintasedimentti- ja vesinäytteiden välinen vertailu, sekä lammas- ja nautalaidunten edustojen pintavesinäytteiden vertailu tehtiin Kruskal-Wallis-testillä. Tulos tulkittiin tilastollisesti merkitseväksi, mikäli p-arvo oli alle 0,05.

5 Tulokset

5.1 Sää tiedot näytteenoton aikana

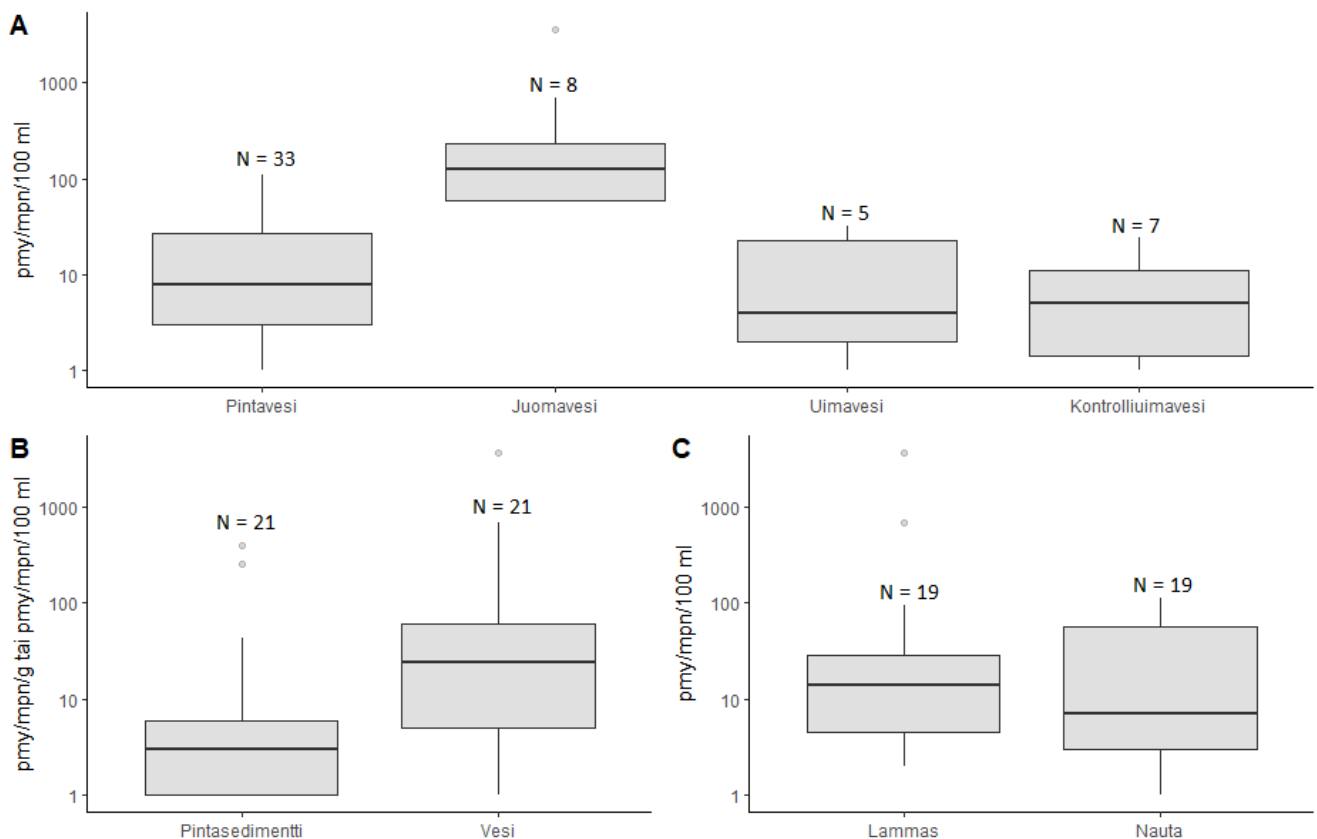
Lämpötila- ja sadantatiedot kerättiin kolmelta näytteenottokohteelta lähimpänä sijaitsevalta havaintoasemalta. Laidunkauden 2021 lopulla sademäärät olivat suurempia verrattuna muihin näytteenottoajankohtiin (kuva 2A). Myös laidunkauden 2022 lopun näytteenottoa kohteessa 2 edelsi runsaat sateet (kuva 2C). Laidunkauden 2022 alkupuolen näytteet otettiin kuivan ja lämpimän sääjakson aikana (kuva 2B).



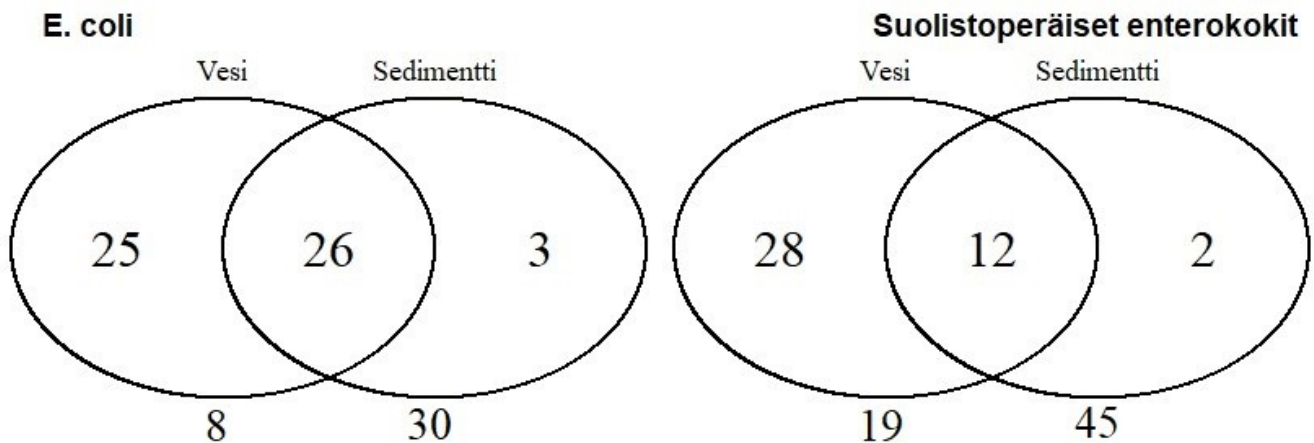
Kuva 2. Näytteenottojen ajankohdat ja sää tiedot näytteenottoa edeltävältä seitsemältä vuorokaudelta laidunkauden 2021 lopulla (A), laidunkauden 2022 alkupuolella (B) ja laidunkauden 2022 lopulla (C). Musta yhtäjaksoinen viiva kuvaa lämpötilaa ja harmaat palkit sademäärää. Kuvassa numero 1 tarkoittaa kohteen 1 näytteenottoa ja numero 2 kohteen 2 näytteenottoa.

5.2 Indikaattorimikrobit vesi- ja pintasedimenttinäytteissä

Pintavesissä suurin havaittu *E. coli* -lukumäärä oli 110 pmy/100 ml, eläinten juomavesissä 3 600 pmy/100 ml, rantalaitumien läheisyydessä sijaitsevien uimarantojen uimavesissä 32 pmy/100 ml ja kontrolliuimavesissä 24 pmy/100 ml. Eläinten juomavesien *E. coli* -lukumäärät olivat tilastollisesti merkitsevästi suurempia verrattuna pinta-, uima- ja kontrolliuimavesiin ($p \leq 0,001$) (kuva 3A). Vesinäytteistä tehtiin *E. coli* -havaintoja useammin kuin pintasedimenttinäytteistä (kuva 4). *E. coli* -bakteerin lukumäärät vaihtelivat kummassakin matriisissa (kuva 3B). Lammas- ja nautalaidunten edustalta otettujen pintavesinäytteiden välillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa *E. coli* -bakteerin lukumäärissä (Kuva 3C).

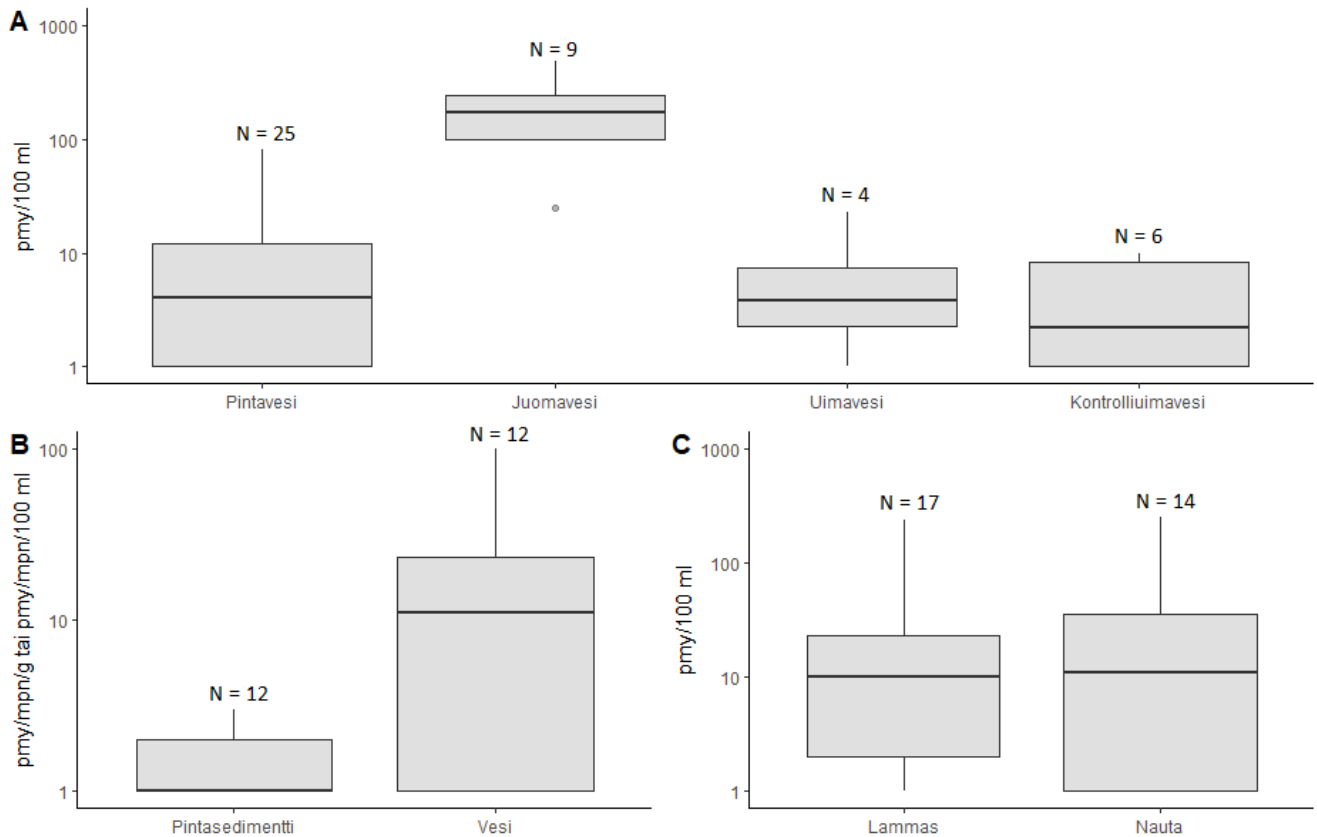


Kuva 3. *E. coli* -bakteerin lukumäärät tutkituissa vesinäytteissä (A), pintasedimentti- ja vesinäytteissä (B) ja lammas- ja nautalaidunten edustoilta otetuista pintavesinäytteistä (C). Kuvassa on esitetty määrittämissä rajan ylittävät tulokset. B-kuvassa on esitetty ainoastaan ne näytteet, joista on määrittämissä rajan ylittävä tulos kummassakin matriisissa. C-kuvasta on poistettu pisteen kohteen 1 nautojen juomavesipisteen tulokset, sillä kyseisessä kohteessa ei ollut lampaiden juomavesipistettä.



Kuva 4. Indikaattoribakteereille positiivisten näytteiden lukumäärät vesi- ja pintasedimenttinäytteissä. Ympyrän ulkopuolella olevat luvut kuvaavat näytteitä, joissa ei kyseistä bakteeria havaittu.

Pintavesistä määritetty suurin suolistoperäisten enterokokkien lukumäärä oli 80 pmy/100 ml, eläinten juomavesistä 480 pmy/100 ml, rantalaitumen läheisyydessä sijaitsevista uimavesistä 23 pmy/100 ml ja kontrolliuimavesistä 10 pmy/100 ml. Suolistoperäisten enterokokkien lukumäärät olivat tilastollisesti merkitsevästi suurempia eläinten juomavesissä verrattuna uimavesiin ($p < 0,05$), sekä pinta- ja kontrolliuimavesiin ($p < 0,01$) (kuva 5A). Suolistoperäisiä enterokokkeja havaittiin useammin vesinäytteistä kuin pintasedimenttinäytteistä (kuva 4), mutta niiden lukumäärät vaihtelivat enemmän vesinäytteissä kuin pintasedimenttinäytteissä (kuva 5B). Lammas- ja nautalaidunten edustoilta otettujen pintavesinäytteiden enterokokkitulosten välillä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa (kuva 5C).

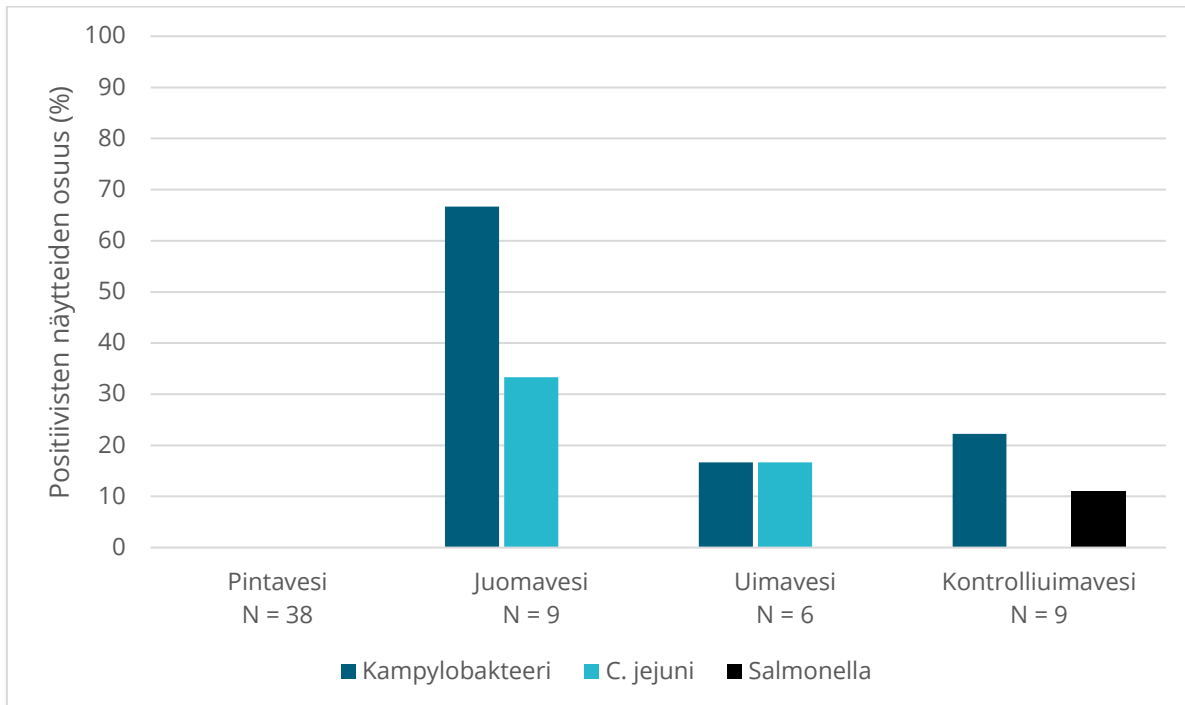


Kuva 5. Suolistoperäisten enterokokkien lukumäärät tutkituissa vesinäytteissä (A), pintasedimentti- ja vesinäytteissä (B) ja lammas- ja nautalaidunten edustoilta otetuista pintavesinäytteistä (C). Kuvassa on esitetty määrittämissä rajan ylittävät tulokset. B-kuvassa on esitetty ainoastaan ne näytteet, joista on määrittämissä rajan ylittävä tulos kummastakin matriisista. C-kuvasta on poistettu pisteen kohteen 1 nautojen juomavesipisteen tulokset, sillä kyseisessä kohteessa ei ollut lampaiden juomavesipistettä.

5.3 Zoonoottiset taudinaiheuttajat vesi- ja pintasedimenttinäytteissä

Vesinäytteistä havaittiin viljelymenetelmällä kamylobakteereita ja salmonellaa (kuva 6). Taudinaiheuttajamikrobeita ei havaittu yhdestäkään laidunten edustoilta otetusta pintavesinäytteestä (kuva 6). Eläinten juomavesistä tehtiin kuusi (67 %) kamylobakteerihavaintoa, joista kolme osoittautui *C. jejuni* -lajiksi ja loput *C. lari* -lajiksi. Uimavesistä (kohde 2) havaittiin yhdestä näytteestä *C. jejuni* -lajia (1–10 pmy/1000 ml). Kontrolliuimavesien molemmat kamylobakteerihavainnot osoittautuivat lajintunnistuksessa *C.*

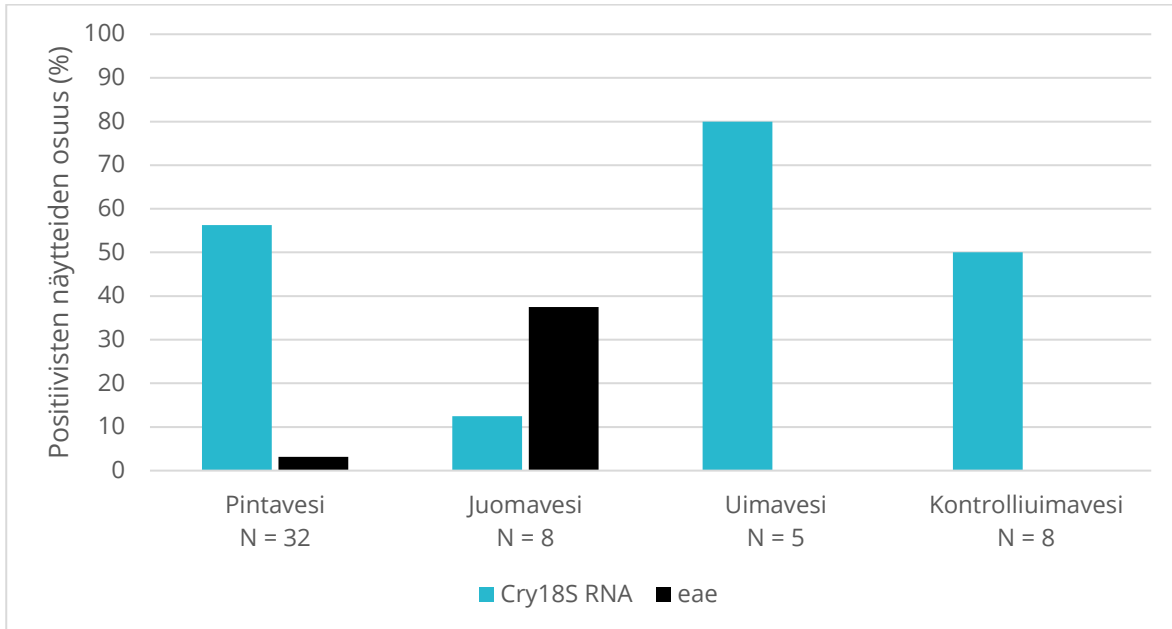
lari -lajiksi, ja lisäksi yhdessä kontrolliuimarannoilta otetuista näytteistä havaittiin salmonellaa (1–10 pmy/1000 ml). Pintasedimenttinäytteistä ei analysoitu taudinaiheuttajia viljelymenetelmillä.



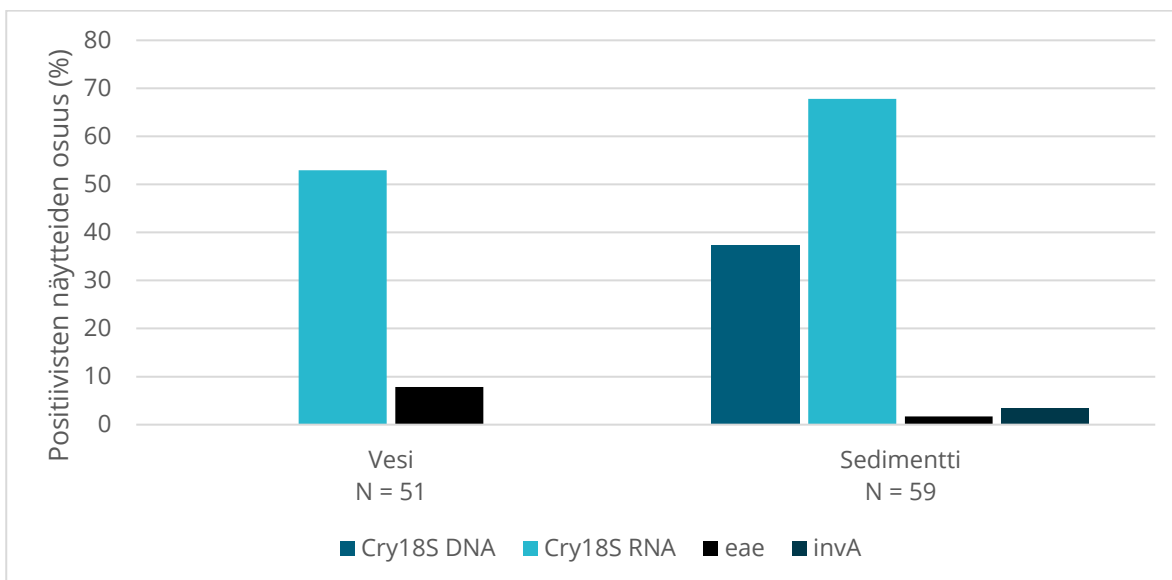
Kuva 6. Viljelymenetelmillä havaittujen taudinaiheuttajien osuudet tutkituissa vesinäytteissä.

Yhdestäkään vesinäytteestä ei havaittu *Cryptosporidium* spp. DNA:ta (Cry18S DNA), mutta *Cryptosporidium* spp. RNA-löydöksiä (Cry18S RNA) tehtiin jokaisesta vesinäytetypistä (kuva 7). Positiivisten näytteiden osuus oli suurin uimavesissä (80 %) ja pienin eläinten juomavesissä (13 %). Vesinäytteistä saatiin kaksi määritysrajan ylittänyttä tulosta Cry18S RNA-pohjaisella analyysillä nautojen juomavedestä (6 500 GC/100 ml) ja kontrolliuimavedestä (10 000 GC/100 ml). EHEC/STEC:iin liitettyjä *stx1*- ja *stx2*-geenejä ei löydetty yhdestäkään vesinäytteestä, mutta yksittäisiä *eae*-geenilöydöksiä tehtiin pinta- ja juomavesinäytteistä (kuva 7). Salmonellan *invA*-geeniä ei havaittu yhdestäkään vesinäytteestä. Pintasedimenttinäytteissä havaittiin vesinäytteiden tapaan *Cryptosporidium* spp. RNA:ta ja *eae*-geeniä, minkä lisäksi havaittiin *Cryptosporidium* spp. DNA:ta ja kolmesta näytteestä salmonellan *invA*-geeniä (kuva 8). Cry18S RNA-pohjaisella analyysillä tehtiin enemmän havaintoja vesinäytteistä verrattuna pintasedimenttinäytteisiin, mutta pintasedimenttinäytteen ollessa positiivinen, oli todennäköistä,

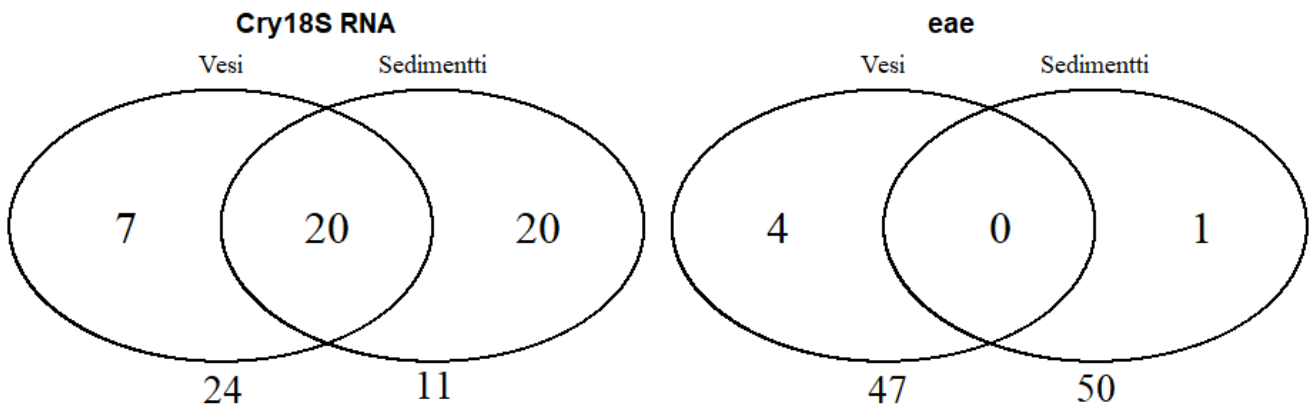
että myös vesinäyte oli positiivinen (kuva 9). *Eae*-geeniä ei havaittu molemmissa matriiseissa yhtäaikaisesti.



Kuva 7. qPCR-menetelmillä havaittujen taudinaiheuttajien osuudet tutkituissa vesinäytteissä. Cry18S = *Cryptosporidium* spp. sukutason analyysi, eae = EHEC/EPEC:n liitetty *eae*-geeni.



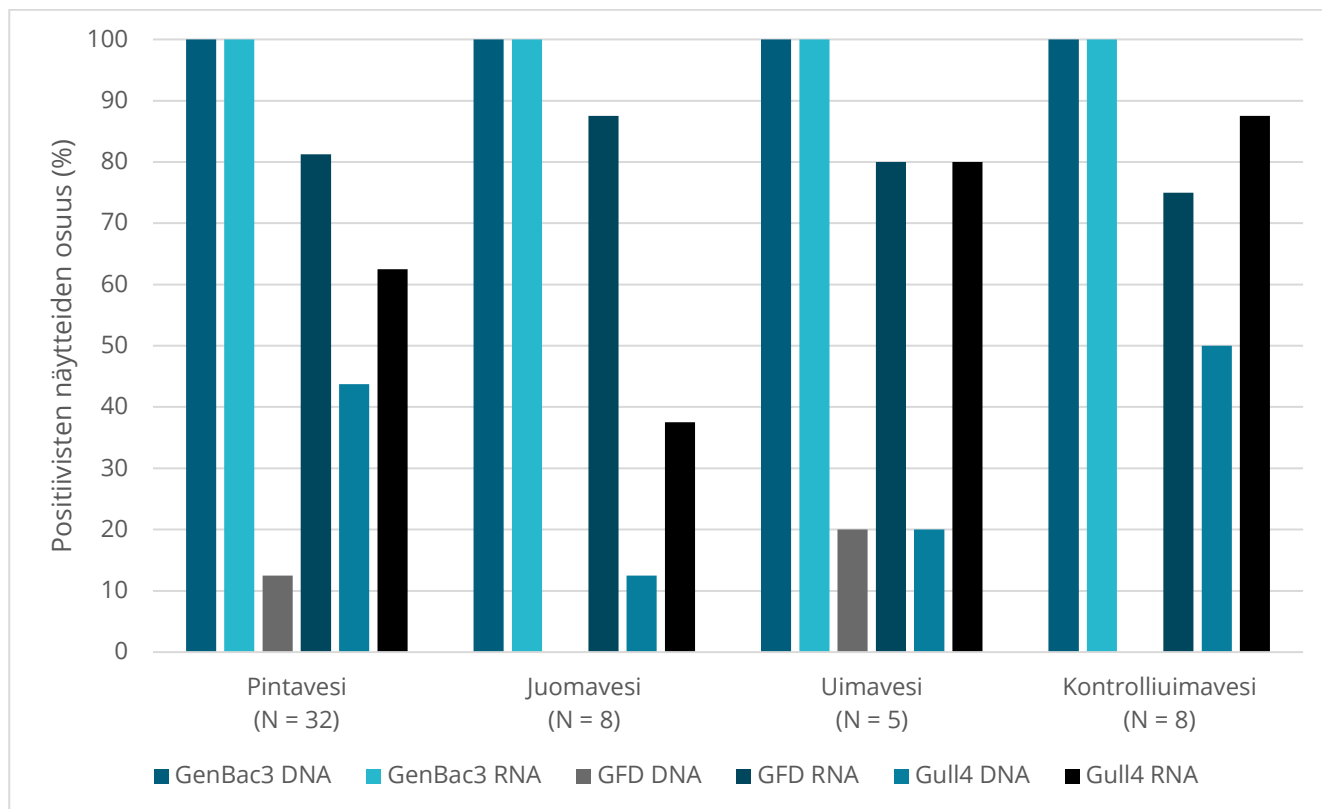
Kuva 8. qPCR-menetelmillä havaitut taudinaiheuttajat vesi- ja pintasedimenttinäytteissä. Cry18S = *Cryptosporidium* spp. sukutason analyysi, eae = EHEC/EPEC:n liitetty *eae*-geeni, invA = salmonellaan liitetty *invA*-geeni.



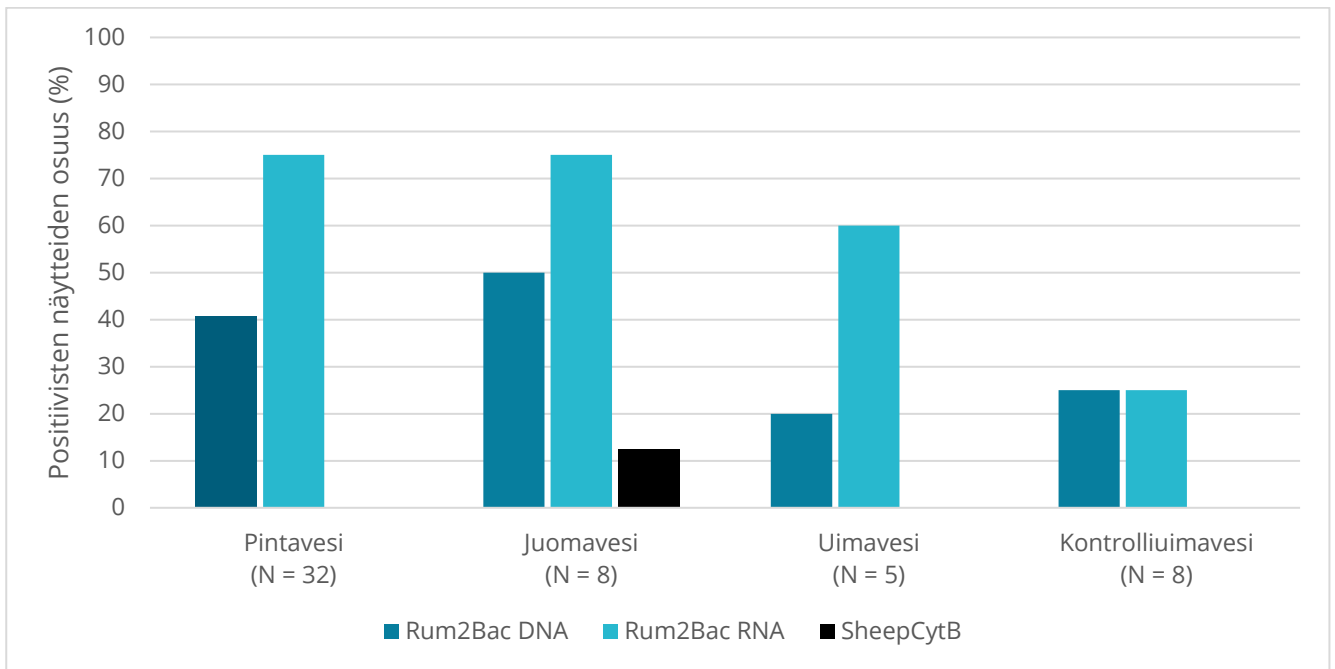
Kuva 9. *Cryptosporidium* sukutason RNA-pohjaiselle analyysille (Cry18S RNA) ja EHEC/EPEC:n liitetulle *eae*-geenille positiivisten näytteiden lukumäärät vesi- ja pintasedimenttinäytteissä. Ympyrän ulkopuolella olevat luvut kuvaavat näytteitä, joissa ei kyseistä mikrobia havaittu.

5.4 Saastelähdejäljitys

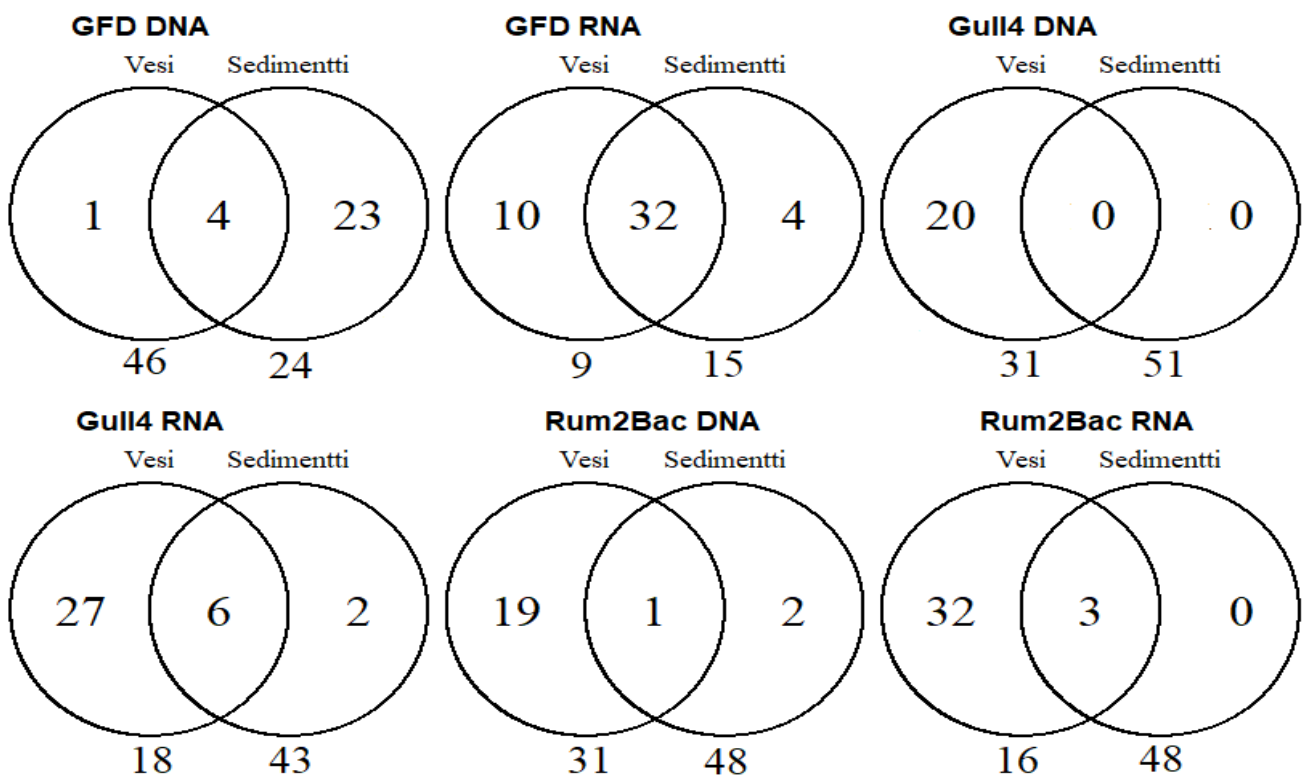
Yleistä ulosteperäistä saastumista osoittavaa markkeria (GenBac3) havaittiin kaikista vesinäytteistä sekä DNA-, että RNA-pohjaisella analyysillä (kuva 10). Lintu- ja lokkimarkkeria havaittiin RNA-pohjaisella analyysillä huomattavasti useammin verrattuna DNA-pohjaiseen analyysiin (kuva 10). Märehtijämarkkeria havaittiin DNA-pohjaisella analyysillä harvemmin tai yhtä usein kuin RNA-pohjaisella analyysillä (kuva 11). Pinta-, juoma- ja uimavesissä märehtijämarkkerille positiivisten näytteiden osuus RNA-pohjaisella analyysillä oli 60–75 %, kun vastaava luku kontrolliuimavesissä oli 25 %. DNA-pohjaisella analyysillä märehtijämarkkerille positiivisten näytteiden osuus oli laidunten edustoilla sijaitsevilla uimarannoilla kontrolliuimarantoja pienempi. Yleisen lintumarkkerin (GFD) DNA-pohjaisella analyysillä tehtiin huomattavasti enemmän havaintoja pintasedimenttinäytteistä verrattuna vesinäytteisiin, kun taas RNA-pohjaisella analyysillä suurimmasta osaa näytepisteistä havaintoja tehtiin kummastakin näytematriisista (kuva 12). Lokki- ja märehtijämarkkeria havaittiin tyypillisesti pelkästään vesinäytteestä (kuva 12). Lammasmarkkeria havaittiin kerran lampaiden juomavesipisteen vesinäytteestä, jolloin myös pintasedimenttinäytteestä tehtiin havainto.



Kuva 10. Havaittujen yleistä ulosteperäistä saastumista osoittavan markkerin (GenBac3), lintumarkkerin (GFD) ja loppimarkkerin (Gull4) osuudet tutkituissa vesinäytteissä.

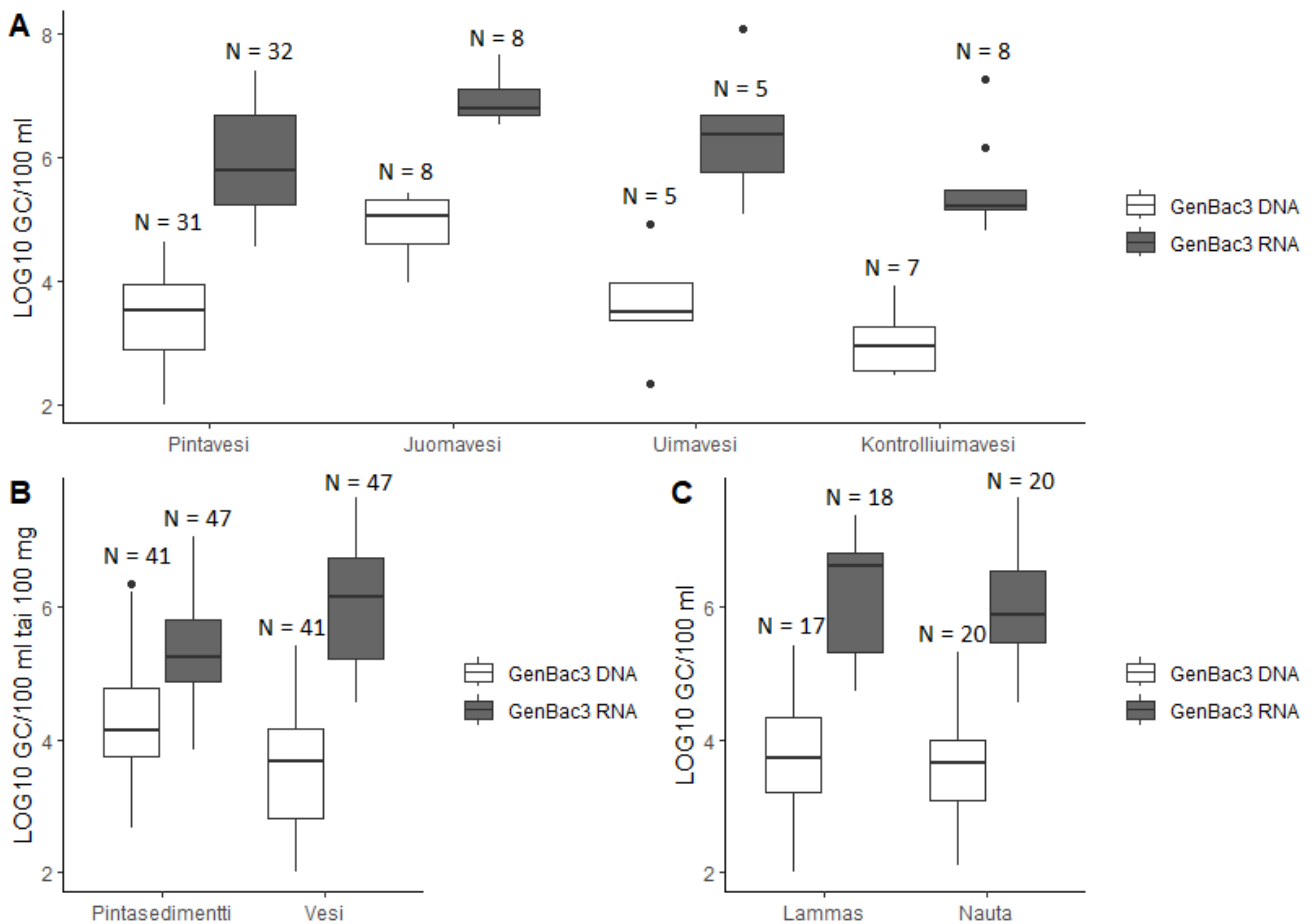


Kuva 11. Havaittujen märehitjämakkereiden (Rum2Bac) ja lammasmakkereiden (SheempCytB) osuudet tutkituissa vesinäytteissä.



Kuva 12. Eri saastelähdejäljitysmakkereille positiivisten näytteiden lukumäärät vesi- ja pintasedimenttinäytteissä. Ympyrän ulkopuolella olevat luvut kuvaavat näytteitä, joissa ei kyseistä markkeraa havaittu.

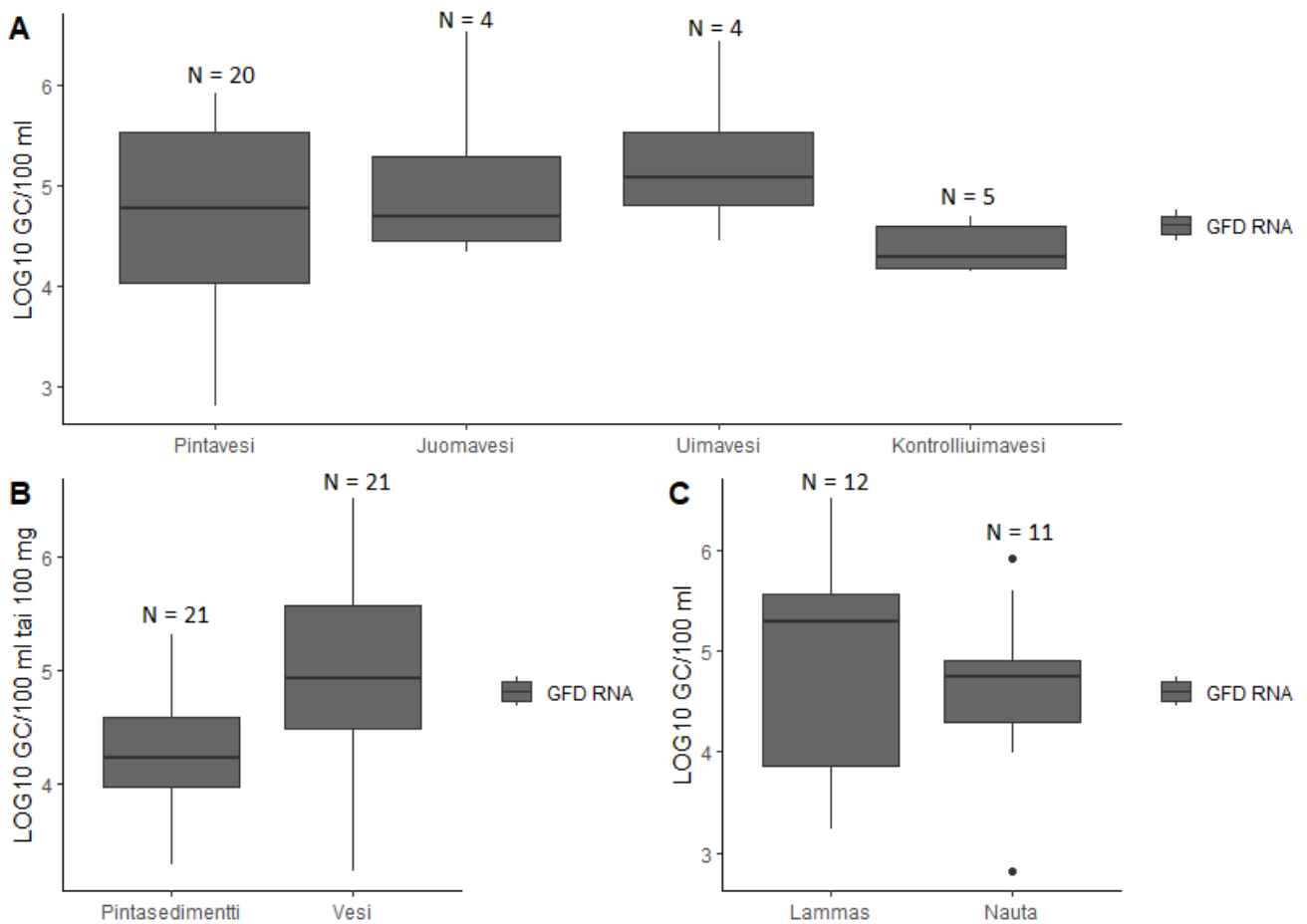
Kaikkien tutkittujen markkereiden osalta DNA:n geenikopiolukumäärät (gene copy, GC) olivat pienempiä verrattuna RNA:n geenikopiolukumääriin (kuvat 13–16). GenBac3 DNA-pohjaisella analyysillä eläinten juomavesissä havaitut geenikopiolukumäärät olivat tilastollisesti merkitsevästi suurempia verrattuna laidunten edustojen pintavesiin ja kontrolliuimavesiin ($p < 0,001$) (kuva 13A). RNA-pohjaisella analyysillä tehtiin vastaava havainto ($p < 0,05$). Uimavesissä havaitut geenikopiolukumäärät eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi muista tutkituista vesinäytetyypeistä (kuva 13A). Vesi- ja pintasedimenttinäytepareja tutkittaessa havaittiin, että molemmissa matriiseissa RNA-geenikopiolukumäärät olivat suurempia verrattuna DNA-geenikopiolukumääriin (kuva 13B). Kummassakin matriisissa geenikopiolukumäärissä oli vaihtelua näytteiden välillä. Lammas- ja nautalaidunten edustoilta otettujen vesinäytteiden osalta GenBac3-analyysillä saaduissa geenikopiolukumäärissä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa (kuva 13C).



Kuva 13. GenBac3-markkerin geenikopiolukumäärät tutkituissa vesinäytteissä (A), pintasedimentti- ja vesinäytteissä (B) ja laidunten edustoilta otetuissa pintavesinäytteissä (C). Kuvissa on esitetty määrittämissä ylittävät tulokset, joille on tehty LOG₁₀-muunnos. B-kuvassa on esitetty ainoastaan ne näytteet, joista saatiin määrittämissä ylittävä tulos kummastakin matriisista. C-kuvasta on poistettu kohteen 1 nautojen juomavesipisteen tulokset, sillä kyseisessä kohteessa ei ollut lampaiden juomavesipistettä.

Yleisen lintumarkkerin (GFD) geenikopiolukumäärissä ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja eri vesinäytetyyppien välillä (kuva 14A). Vesi- ja pintasedimenttinäyteparien vertailussa havaittiin, että RNA-pohjaisella analyysillä lintumarkkerin geenikopiolukumäärissä oli suurempaa vaihtelua vesinäytteissä verrattuna pintasedimenttinäytteisiin (kuva 14B). Yleisen lintumarkkerin DNA-pohjaisella analyysillä määrittämissä ylittäviä tuloksia saatiin ainoastaan pintasedimenttinäytteistä (25/59), joiden vaihteluväli oli 90–46 000 GC/100 mg (mediaani 2 100 GC/100 mg). Lammas- ja nautalaidunten edustoilta otettujen vesinäytteiden

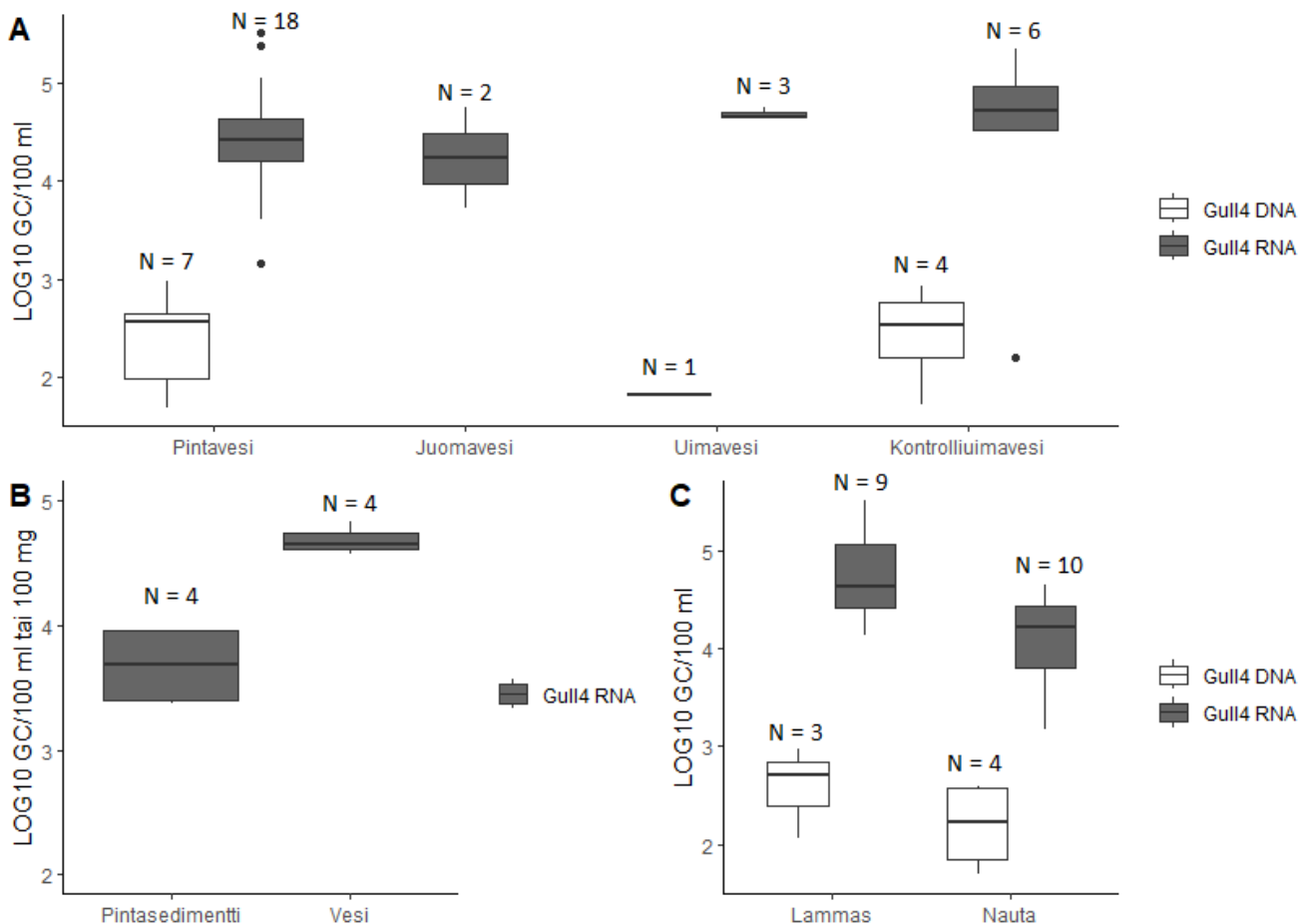
geenikopiolukumäärissä ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa RNA-pohjaisella analyysillä (kuva 14C).



Kuva 14. GFD-markkerin geenikopiolukumäärät tutkituissa vesinäytteissä (A), pintasedimentti- ja vesinäytteissä (B) ja laidunten edustoilta otetuissa pintavesinäytteissä (C). Kuvissa on esitetty määritysrajan ylittävät tulokset, joille on tehty LOG₁₀-muunnos. B-kuvassa on esitetty ainoastaan ne näytteet, joista saatiin määritysrajan ylittävä tulos kummastakin matriisista. C-kuvasta on poistettu kohteen 1 nautojen juomavesipisteen tulokset, sillä kyseisessä kohteessa ei ollut lampaiden juomavesipistettä.

Lokkispesifistä markkeria (Gull4) havaittiin enemmän ja useammin RNA-pohjaisella analyysillä, verrattuna DNA-pohjaiseen analyysiin (kuva 15). Laidunten edustojen pintavesien ja kontrolliuimavesien geenikopiolukumäärät eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi DNA- ja RNA-pohjaisilla analyyseillä (kuva 15A). Muiden ryhmien vertailua ei tehty, sillä määritysrajan ylittäneiden positiivisten näytteiden lukumäärä jäi pieneksi. Lokkimarkkerista tehtiin neljä

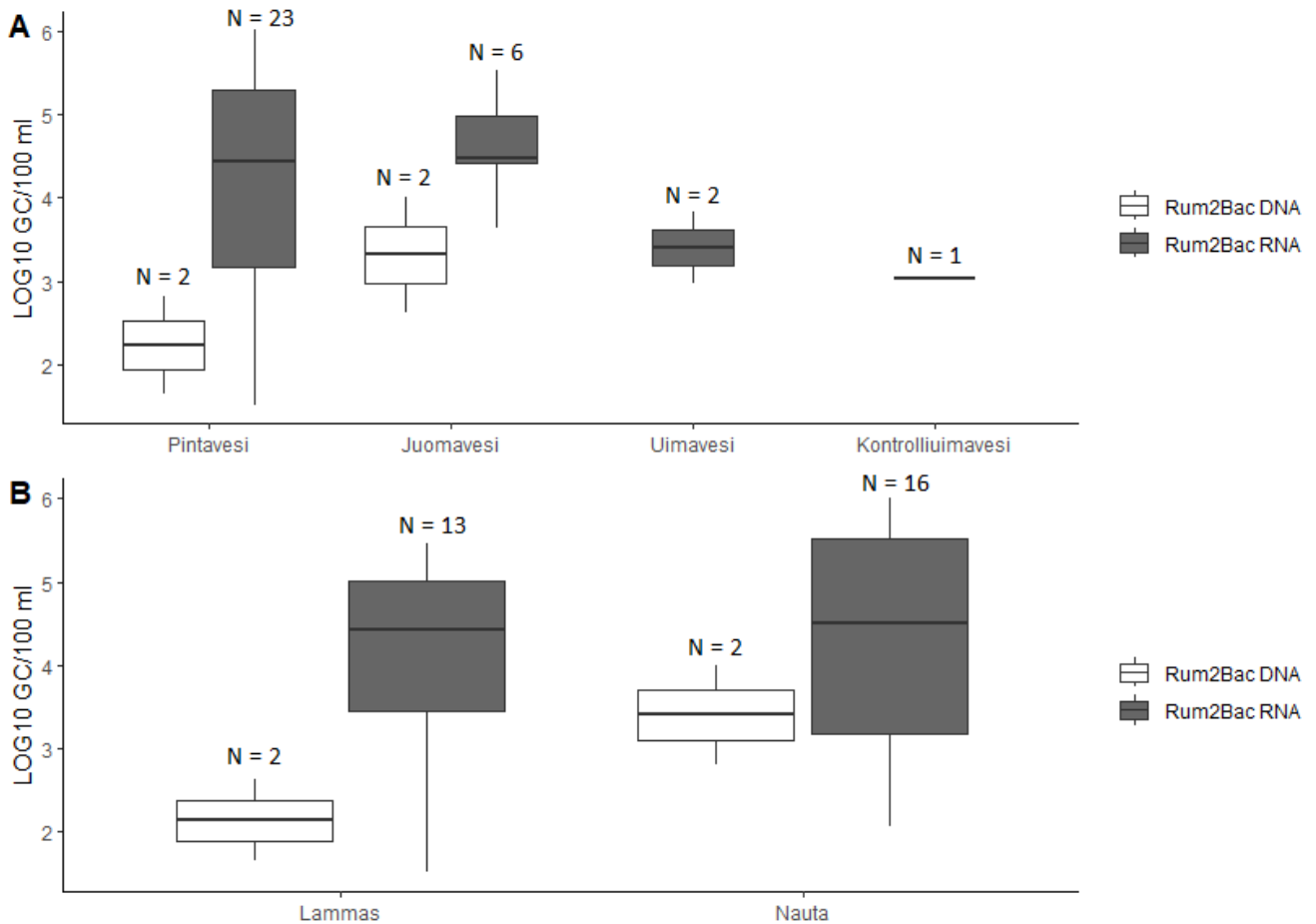
määritysrajan ylittänyttä havaintoa yhtäaikaaisesti saman näytepisteen vesi- ja pintasedimenttinäytteestä (kuva 14B). Lammaslaidunten edustoilta otetuista pintavesinäytteistä Gull4-markkerin RNA-pohjaisella analyysillä saadut geenikopiolukumäärät olivat tilastollisesti merkitsevästi suurempia verrattuna nautalaidunten edustojen pintavesiin ($p < 0,05$) (kuva 15C).



Kuva 15. Lokkispesifin markkerin (Gull4) geenikopiolukumäärät tutkituissa vesinäytteissä (A), pintasedimentti- ja vesinäytteissä (B) ja laidunten edustoilta otetuissa pintavesinäytteissä (C). Kuvissa on esitetty määritysrajan ylittävät tulokset, joille on tehty LOG₁₀-muunnos. B-kuvassa on esitetty ainoastaan ne pisteet, joista saatiin määritysrajan ylittävä tulos kummastakin matriisista. C-kuvasta on poistettu kohteen 1 nautojen juomavesipisteen tulokset, sillä kyseisessä kohteessa ei ollut lampaiden juomavesipistettä.

Märehtijäspesifistä markkeria (Rum2Bac) havaittiin enemmän ja useammin RNA-pohjaisella analyysillä verrattuna DNA-pohjaiseen analyysiin (kuva 16). Tutkittujen vesinäytetyyppien välillä ei havaittu RNA-pohjaisella analyysillä tilastollisesti merkitsevää eroa geenikopiolukumäärissä

(kuva 16A). Laiduntavalla eläinlajilla ei havaittu olevan vaikutusta märehijämarkkerin geenikopiolukumääriin RNA-pohjaisella analyysillä laitumen edustojen pintavesissä (kuva 16B). Märehijämarkkerista tehtiin määritysrajan ylittävä havainto samasta näytepisteestä sekä vedestä, että pintasedimentistä otetusta näytteestä ainoastaan kerran RNA-pohjaisella analyysillä, jolloin vesinäytteen geenikopiolukumäärä oli 330 000 GC/100 ml ja pintasedimenttinäytteen vastaava luku oli 23 000 GC/100 mg. DNA-pohjaisella analyysillä tehtiin kummastakin matriisista vain yksittäisiä määritysrajan ylittäneitä havaintoja. RNA-pohjaisella analyysillä tehtiin 33 määritysrajan ylittänyttä havaintoa vesinäytteistä, joissa geenikopiolukumäärät olivat välillä 32–1 000 000 GC/100 ml (mediaani 7 000 GC/100 ml). Pintasedimenteistä tehtiin ainoastaan yksi määritysrajan ylittänyt havainto RNA-pohjaisella analyysillä.



Kuva 16. Rum2Bac-markkerin geenikopiolukumäärät tutkituissa vesinäytteissä (A) ja laidunten edustoilta otetuissa pintavesinäytteissä (B). Kuvissa on esitetty määrittämissä rajan ylittäneet tulokset, joille on tehty LOG_{10} -muunnos. B-kuvasta on poistettu kohteen 1 nautojen juomavesipisteen tulokset, sillä kyseisessä kohteessa ei ollut lampaiden juomavesipistettä.

5.5 Kvantitatiivinen mikrobiologinen riskinarviointi

Terveysriskinarviointi tehtiin kummallekin kohteelle erikseen siten, että vertailtiin kamylobakteerin aiheuttaman suolistotulehduksen riskiä skenaarioissa, joissa uimavesi vastasi *C. jejuni*-bakteerin lukumääriltään laidunten edustojen pintavesiä, eläinten juomavesiä, laidunten läheisyydessä sijaitsevia uimavesiä, sekä kontrolliuimavesiä. Taulukossa 10 on kuvattu terveystarkinnarvioinnissa käytetyt lähtöarvot eri skenaarioissa. Kohteessa 1 *E. coli*-lukumäärän mediaani oli 0,58-kertainen pintavesissä ja 12-kertainen eläinten juomavesissä verrattuna uimavesiin. Kohteessa 2 *E. coli*-lukumäärän mediaani oli 1,1-kertainen pintavesissä ja 9-

kertainen eläinten juomavesissä verrattuna kohteen uimavesiin. Näiden kertoimien avulla saatiin arviot *C. jejuni*-bakteerin lukumääristä laidunten edustojen pintavesissä ja eläinten juomavesissä.

Taulukko 10. Uimavesiopas-verkkotyökaluun syötetyt lähtöarvot eri skenaarioissa. K1=kohde 1, K2=kohde 2.

Skenaario	Kävijämäärä	Mikrobi	pmy/1000 ml		
			min	ka	max
K1: uimaranta	100	<i>C. jejuni</i>	0,23	0,23	0,23
K1: kontrolliuimaranta	100	<i>C. jejuni</i>	0,23	0,23	0,23
K1: pintavesi	100	<i>C. jejuni</i>	0,13	0,13	0,13
K1: eläinten juomavesi	100	<i>C. jejuni</i>	2,7	2,7	2,7
K2: uimaranta	100	<i>C. jejuni</i>	0,23	1,8	5,0
K2: kontrolliuimaranta	100	<i>C. jejuni</i>	0,23	0,23	0,23
K2: pintavesi	100	<i>C. jejuni</i>	0,24	2,0	5,4
K2: eläinten juomavesi	100	<i>C. jejuni</i>	2,0	16	45

C. jejuni-bakteerin aiheuttamat kokonaistautitapaukset ja tautitaakka päivässä kussakin skenaariossa on kuvattu taulukossa 11. Kohteessa 1 kampylobakteerin aiheuttama infektioriski oli samansuuruinen uimarannoilla ja kontrolliuimarannoilla (keskimäärin 0,4 tapausta/päivä/100 uimaria). Laitumen edustojen pintavesissä riski oli hieman pienempi (0,3 tapausta/päivä/100 uimaria), ja eläinten juomavesissä suurempi (1,5 tapausta/päivä/100 uimaria). Kohteessa 2 kampylobakteerin aiheuttama terveysriski oli suurempi uimarannalla verrattuna kontrolliuimarantaan. Kohteen 2 laidunten edustojen pintavesissä vastaavassa uimavedessä infektioriski oli hieman uimavesiä suurempi. Rannan käyttäjälle kaikista suurin infektioriski aiheutui, kun uimaveden *C. jejuni*-lukumäärät vastasivat eläinten juomavesiä kohteessa 2 (2,4 tapausta/päivä/100 uimaria). Tautitaakka ei yhdessäkään skenaariossa ylittänyt 0,01 DALY/päivä.

Taulukko 11. Kampylobakteerin aiheuttamat suolistotulehdukset ja tautitaakka eri skenaarioissa. K1=kohde 1, K2=kohde 2.

Skenaario	Tautitapaukset/d keskimäärin	Tautitapaukset/d enintään	DALY/d enintään
K1: uimaranta	0,4 ± 0,2	1,1	0,0
K1: kontrolliuimaranta	0,4 ± 0,2	1,1	0,0
K1: pintavesi	0,3 ± 0,1	0,9	0,0
K1: eläinten juomavesi	1,5 ± 0,3	2,7	0,01
K2: uimaranta	1,2 ± 0,3	3,1	0,01
K2: kontrolliuimaranta	0,4 ± 0,2	1,1	0,0
K2: pintavesi	1,3 ± 0,3	3,1	0,01
K2: eläinten juomavesi	2,4 ± 0,4	4,6	0,01

6 Tulosten tarkastelu

6.1 Suolistomikrobilukumäärät tutkimuksen kohdealueilla

Suolistoperäisten indikaattoribakteerien lukumäärät pinta-, uima- ja kontrolliuimavesissä eivät ylittäneet uimavedelle asetettua yksittäisen valvontatutkimustuloksen toimenpiderajaa, mutta eläinten juomavesissä lukumäärät ylittivät sekä yleisiä, että pieniä yleisiä rantoja velvoittavan yksittäisen valvontatutkimustuloksen toimenpiderajan rannikon uimavesille neljässä näytteessä (STM 2008a, STM 2008b, taulukko 6). Tässä tutkimuksessa mukana olleet uimarannat kuuluivat pieniin yleisiin uimarantoihin, joille ei tehdä uimavesiprofiilia ja siihen kuuluvaa uimaveden laatuluokitusta (taulukko 5). Kampylobakteereja on havaittu Suomessa ja maailmalla yleisesti uimavesistä ja pintavesistä (Hokajärvi ym. 2013, Mulder ym. 2020). Myös salmonellaa on havaittu maailmalla pinta- ja uimavesistä (Jokinen ym. 2010, Farrell ym. 2021). Tässä tutkimuksessa eläinten juomavesistä, uimavesistä ja kontrolliuimavesistä tehdyt kampylobakteeri- ja salmonellahavainnot voivat olla peräisin eläimistä, sillä näitä bakteereita esiintyy monien eri tasalämpöisten eläinten suolistossa (Kingsley ja Baumler 2000, Pitkänen ja Hänninen 2017). C.

jejuni -havainnot voivat olla peräisin laiduntavista eläimistä, sillä tiedetään, että naudat ja lampaat voivat toimia *C. jejuni* -bakteerin kantajina (Stanley ja Jones 2003). *C. lari* yhdistetään tyypillisesti luonnon lintupopulaatioihin, mutta sitä on eristetty myös nautojen ulosteesta (Brown ym. 2004, Pitkänen ja Hänninen 2017). *C. lari* -bakteerin tiedetään aiheuttavan infektioita ihmisillä, mutta sen osuus kamylobakteerien aiheuttamista infektioista on merkittävästi *C. jejuni* -bakteeria pienempi (ECDC 2021). Vaikka nautojen ja lampaiden tiedetään toimivan salmonellan kantajina, tässä työssä tehty salmonellahavainto on luultavimmin peräisin muista lähteistä, sillä kyseinen havainto tehtiin kontrolliuimarannalta, jonka läheisyydessä ei ollut laidunnusta (Hutchison ym. 2004).

Viljelymenetelmien lisäksi tässä tutkimuksessa hyödynnettiin molekyylibiologisia menetelmiä. DNA-pohjaisten analyysien lisäksi osa menetelmistä (Cry18S, GenBac3, GFD, Gull4 ja Rum2Bac) soveltui myös RNA-pohjaiseen analyysiin. RNA:n esiintyminen näytteessä viittaa siihen, että solut ovat elinkykyisiä ja aktiivisia, mutta toisaalta RNA:n esiintyminen ilman DNA-havaintoja viittaa siihen, että kyseisen markkerin esiintyminen on vain vähäistä (Pitkänen ym. 2015). Toisaalta pelkän DNA:n esiintyminen viittaa vanhempaan ulosteperäiseen kontaminaatioon, sillä DNA säilyy ympäristössä RNA:ta paremmin (Keer ja Birch 2003).

Cryptosporidium-alkueläimen RNA:ta havaittiin pinta-, uima- ja kontrolliuimavesistä suuressa osassa näytteitä (≥ 50 %), mutta DNA:ta ei havaittu vesinäytteissä lainkaan. *Cryptosporidium*-alkueläinten esiintymistä rantalaitumilla on tutkittu hiljattain Suomessa, ja havaittiin, että suurin osa (81 %) ulostenäytteistä oli *Cryptosporidium*-positiivisia sukutason tuloksia antavalla qPCR-analyysillä, mutta sekvensoiduista näytteistä ainoastaan 6,7 % oli positiivisia, mikä viittaa siihen, että kyseinen analyysi antaa epäspesifisiä tuloksia (Jothikumar ym. 2008, Vuorisalmi 2022). Tämän perusteella osa vesinäytteiden sukutason analyysillä tehdyistä RNA-havainnoista saattaa olla vääriä positiivisia havaintoja. Kirjallisuudessa *Cryptosporidium*-alkueläin on tyypillinen löydös pintavesistä (Betancourt 2019). EHEC on pääosin naudoista peräisin oleva taudinaiheuttaja, jonka esiintymistä tässä työssä tutkittiin analysoimalla näytteistä shiga-toksiinin (*stx1*, *stx2*) ja intimiinin tuotantoon (*eae*) liitetyjä geenejä (ISO/TS 13136:2012, Garcia-Aljaro ym. 2017). Jommankumman shiga-toksiinin tuotantoon liitetyt geenin ja *eae*-geenin havainto samasta

näytteestä olisi tulkittu EHEC-havainnoksi. Tässä työssä ei havaittu yhdestäkään näytteestä shiga-toksiinin tuotantoon liitettyjä geenejä. *Eae*-geenilöydöksiä kuitenkin tehtiin, mikä viittaa enteropatogeenisen *E. coli* -bakteerin (EPEC) läsnäoloon näytteissä (Wani ym. 2009). Tyypillisiä EPEC-kantoja on tavattu ainoastaan ihmisillä, mutta epätyypillisiä EPEC-kantoja tavataan myös eläimillä, kuten lampailla, ja ne voivat myös aiheuttaa tautia ihmisissä (Moura ym. 2009, Croxen ym. 2013).

Tässä työssä käytetyt yleistä ulosteperäistä saastumista osoittava markkeri (GenBac3), yleinen lintumarkkeri (GFD), lokkimarkkeri (Gull4), märehelijämarkkeri (Rum2Bac) ja lammasmakkeri (SheepCytB) on aiemmin todettu toimiviksi Suomen vesialueilla (Rytkönen ym. 2021). Jokaisella markkerilla positiivisten näytteiden osuudet ja geenikopiolukumäärät olivat suurempia RNA-pohjaisella analyysillä verrattuna DNA-pohjaiseen analyysiin, kuten kirjallisuuden perusteella oli odotettavissa (Pitkänen ym. 2013, Rytkönen ym. 2021). Rytkönen ym. (2021) mukaan yleistä ulosteperäistä saastumista osoittava markkeri erottaa heikosti linnuista peräisin olevan ulosteperäisen saastumisen, joten rinnalla suositeltiin käytettäväksi yleistä lintumarkkeria tunnistamaan linnuista peräisin olevaa ulosteperäistä saastumista. Tässä työssä yleistä ulosteperäistä saastumista osoittavaa markkeria havaittiin kaikista vesinäytteistä sekä DNA- että RNA-pohjaisilla menetelmillä. Yleistä lintumarkkeria havaittiin RNA-pohjaisella analyysillä 75–88 % näytteitä näytetyypistä riippuen. Yleisin lintumarkkerin ominaisuuksiin kuuluu selvästi heikompi herkkyys DNA-pohjaisella analyysillä, mikä selittää vähäiset havainnot (Rytkönen ym. 2021). Yleistä ulosteperäistä saastumista osoittavan markkerin geenikopiolukumäärät olivat merkitsevästi suurempia eläinten juomavesissä verrattuna pinta- ja kontrolliuimavesiin, mikä viittaa siihen, että juomavesissä oli enemmän ulosteperäistä kuormitusta kuin muissa vesinäyttepisteissä. Suurempi ulosteperäinen kuormitus eläinten juomavesipisteinä toimineissa ojissa on peräisin laiduntavien eläinten lisäksi myös muualta ojan valuma-alueelta.

Lokkispesifistä markkerista (Gull4) saatiin varsin niukasti määritysrajan ylittäviä tuloksia, mutta positiivisten näytteiden osuus pinta-, uima- ja kontrolliuimanäytteissä (DNA: 20–50 %, RNA: 63–88 %), sekä *C. lari* -havainnot viittaavat siihen, että alueen lintu- ja lokkiyhdykunnat vaikuttavat pintaveden hygieeniseen laatuun näytteenottokohteissa. Lokkien tiedetään lisänneen

suolistoperäisten enterokokkien lukumääriä ja *C. lari* -bakteerin havaintoja Suomen uimavesissä (Pitkänen ym. 2015, Tiwari ym. 2018). Tässä työssä märehitijämarkkera (Rum2Bac) havaittiin RNA-pohjaisella analyysillä 75 % pintavesinäytteitä ja 60 % uimavesinäytteitä, kun Rytönen ym. (2021) vastaavat luvut ovat n. 60 % ja n. 40 %. Geenikopiolukumäärät olivat pintavesien osalta samankaltaiset kummassakin työssä. Vaikka märehitijämarkkerista tehtiin useita havaintoja RNA-pohjaisella analyysillä, DNA-pohjaisella analyysillä tehtyjen havaintojen vähäisen määrän perusteella märehitijöiden aiheuttama ulosteperäinen saastuminen jäi vähäiseksi pintavesissä. Suomen pintavesissä ei aiemmassa tutkimuksessa havaittu kertaakaan lammasspesifiä markkera (SheepCytB) (Rytönen ym. 2021). Tässä työssä kyseistä markkera havaittiin hankkeen aikana yhdestä lampaiden juomavesinäytteestä. Lintujen ja laiduneläinten ulosteen lisäksi pintavesissä havaitut ulosteperäiset mikrobit tai niiden geenimarkkerit voivat päätyä pintavesiin esimerkiksi jätevesien, taajama-alueiden hulevesien ja valuma-alueen valumien mukana (Byappanahalli ym. 2012, WHO 2021). Lisäksi uimarannoilla rannan käyttäjät voivat toimia ulosteperäisten mikrobien lähteenä (Kauppinen ym. 2017).

6.2 Naudoista ja lampaista peräisin oleva ulosteperäinen vesistökuormitus

Indikaattorimikrobien lukumäärät eivät tässä tutkimuksessa eronneet toisistaan nauta- ja lammaslaidunten edustoilta otetuista pintavesinäytteissä. Laiduntavalla eläinlajilla ei havaittu olevan vaikutusta saastelähdejäljitysmarkkereiden havaintoihin tai geenikopiolukumääriin, muuten kuin loppimarkkerin RNA-pohjaisen analyysin osalta, jonka geenikopiolukumäärät olivat suurempia lammaslaidunten edustojen pintavesissä. On kuitenkin huomattava, että loppimarkkeri ei kuvaa laiduntavista eläimistä peräisin olevaa ulosteperäistä kuormitusta. Erityisesti havaittiin, että märehitijä markkerin (Rum2Bac) esiintymisessä ja geenikopiolukumäärissä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa lammas- ja nautalaidunten välillä. Märehitijämarkkerin on todettu havaitsevan sekä nautan, että lampaan ulosteen, mutta nautan ulosteen on havaittu sisältävän suuremmat geenikopiolukumäärät verrattuna lampaiden ulosteeseen (Rytönen ym. 2021).

Kirjallisuuteen verrattuna on yllättävää, että laiduntavalla eläinlajilla ei tässä työssä havaittu olevan vaikutusta laiduneläinten lannasta peräisin olevien ulosteperäisten mikrobien määrään pintavesissä. Tiedetään, että naudat tyypillisesti laiduntavat myös vesirajassa, menevät veteen ja jopa ulostavat suoraan sinne, kun taas lampaat viihtyvät kuivilla alueilla, eivätkä mene kovin lähelle vesistöä (Niemelä 2012). Naudat myös tuottavat ulostetta lampaita enemmän, nautojen arvioidaan erittävän ulostetta hieman alle 10 kg vuorokaudessa, kun lampailla vastaava luku on alle kilogramman (Atwill ym. 1998). Toisaalta lampaiden ruokailutottumukset altistavat maaperää eroosiolle nautojen ruokailutottumuksia voimakkaammin, mikä voi johtaa suurempiin valumiin lammaslaitumilta (Julian ym. 2017).

6.3 Suolistoperäiset mikrobit ranta-alueiden pintasedimentissä

Tämän tutkimuksen perusteella pintasedimentti ei pääosin toiminut tutkimuskohteissa ranta-alueilla voimakkaasti ulosteperäisiä mikrobeja pidättävänä aineksena. Ainoastaan *Cryptosporidium*-sukutason ja yleisen lintumarkkerin DNA-pohjaisilla analyyseillä tehtiin enemmän havaintoja pintasedimenttinäytteistä verrattuna vesinäytteisiin. Löydös oli yllättävä, sillä kirjallisuudessa on havaittu, että indikaattoribakteerit ja taudinaiheuttajat selviytyvät pidempään pintasedimenteissä verrattuna vesimatriisiin (Korajkic ym. 2019). Myös saastelähdejäljitysmarkkereissa on havaittu parempaa säilyvyyttä pintasedimenteissä verrattuna vesimatriisiin sekä makeissa vesissä, että merivesissä (Brown ja Boehm 2015, Kim ja Wuertz 2015).

Tyypillisesti ulosteperäiset mikrobit päätyvät pohjan pintasedimenttiin kiinnittyneinä hiukkasiin, joiden mukana laskeutuminen on tehokasta (Korajkic ym. 2019). Ulosteperäisten mikrobien säilymistä pintasedimentissä tukevat useat tekijät, kuten pintasedimentin pieni hiukkaskoko ja korkea orgaanisen hiilen pitoisuus (Garzio-Hadzick ym. 2010, Chandran ym. 2011). Tässä työssä ei kuitenkaan otettu huomioon pintasedimentin ominaisuuksia. Suolistoperäisten *Bacteroidales*-lahkon bakteerien solujen ja DNA:n on havaittu säilyvän parhaiten pintasedimentissä, jossa olosuhteet ovat anaerobiset ja lämpötila alhainen (6 °C) (Kim ja Wuertz 2015). Suolistoperäisten

mikrobien säilyminen pintasedimentissä mahdollistaa sen, että pintasedimentti voi toimia ulosteperäisten mikrobien lähteenä pintavesissä.

6.4 Infektoriski rantalaidunten läheisyydessä olevilla uimarannoilla

Tässä työssä tutkittiin zoonottisen *C. jejuni* -bakteerin aiheuttamaa suolistotulehduksen riskiä ja sen aiheuttamaa tautitaakkaa uimarannan käyttäjille, sillä muista Uimavesioppaan sisältämistä taudinaiheuttajista ei tehty hankkeen aikana varmennettuja havaintoja. Infektoriskiä tutkittiin skenaarioissa, joissa uimavesi vastaisi *C. jejuni* -lukumääriltään laidunten edustojen pintavettä, eläinten juomavettä, laitumen läheisyydessä sijaitsevien uimarantojen vettä ja kontrolliuimarantojen vettä. Kohteessa 2 rantalaitumen läheisyydessä sijaitsevan uimarannan vesi aiheutti kontrolliuimarantoja suuremman, mutta eläinten juomavesiä pienemmän infektoriskin. *C. jejuni* -bakteerin aiheuttama infektoriski oli samansuuruinen tai hieman suurempi laidunten läheisyydessä sijaitsevilla uimarannoilla verrattuna kontrolliuimarantoihin. Laitumen edustojen pintavesissä infektoriski oli samansuuruinen tai pienempi verrattuna uimarantoihin.

Tässä työssä havaitut infektoriskit olivat pieniä ja samaa luokkaa kuin Suomen sisämaan uimavesille aiemmin tehdyssä tutkimuksessa (Valkama 2022). On kuitenkin tärkeää huomata, että mikrobiologiselta laadultaan erinomainenkin uimavesi voi aiheuttaa infektoriskin rannan käyttäjille. Tämän lisäksi on havaittu, että indikaattoribakteerien lukumäärä ei aina korreloi taudinaiheuttajien lukumäärän kanssa (Kauppinen ym. 2017). Kohteen 1 uimavesistä ei tehty hankkeen aikana yhtään *C. jejuni* -havaintoa, joten infektoriski oli pienin mahdollinen. Tässä työssä suurin keskimääräinen infektoriski aiheutui, mikäli uimavesi vastaisi mikrobiologiselta laadultaan kohteen 2 eläinten juomavettä (2,4 tautitapausta päivässä 100 uimaria kohden). Tyypillisesti jätevedestä tai uimareista peräisin olevan noroviruksen on havaittu aiheuttavan vastaavan suuruista infektoriskiä Suomessa sisämaan uimarannoilla (Valkama 2022).

Vaikka rannan käyttäjille aiheutuva infektoriski näyttää normaalitilanteessa olevan varsin pieni, ei tämän tutkimuksen pohjalta voida sanoa mitään esimerkiksi siitä, miten erilaiset sään ääri-

ilmiöt, kuten rankkasateet vaikuttavat laitumelta vesistöön päätyvien taudinaiheuttajien lukumääriin, jolloin myös uimareille aiheutuvan terveysriskin suuruus voi hetkellisesti muuttua. Tiedetään, että esimerkiksi tulvien ja rankkasateiden yhteydessä pinta- ja uimavesien mikrobiologinen laatu heikkenee (Ahmed ym. 2009, Federigi ym. 2017). Ilmastonmuutoksen vuoksi on myös mahdollista, että sademäärät lisääntyvät erityisesti Pohjois-Suomessa, mikä voi johtaa myös lisääntyviin valumiin rantalaitumilta (Ruosteenoja ja Jylhä 2021). Myös hellejaksojen odotetaan lisääntyvän ilmastonmuutoksen vuoksi ja helteisellä säällä uimarannan käyttäjien määrän voidaan odottaa kasvavan (Ruosteenoja ja Jylhä 2021, Valkama 2022). Mikäli uimaveden hygieeninen laatu on heikkoa, hellejaksojen aikana uimavedessä esiintyville taudinaiheuttajille altistuu suurempi määrä ihmisiä.

6.5 Tulosten luotettavuuteen vaikuttavat tekijät

Tässä työssä esitettyjen tulosten luotettavuuteen vaikuttavat tekijät on otettava huomioon johtopäätöksiä tehdessä. Ensinnäkin näytteenottoja ei suoritettu samoin jokaisessa näytepisteessä. Kontrolliuimarannoilta, eläinten juomavesipisteistä ja kohteen kaksi nautalaitumen edustan pisteestä 4 näytteitä ei voitu ottaa veneestä käsin kuten muista pisteistä, vaan ne jouduttiin ottamaan kahlaamalla. Pisteistä, joista näytteet otettiin kahlaamalla, jouduttiin pintasedimenttinäytteet olosuhteiden pakosta ottamaan osaksi muovilapiolla sedimenttinoutimen sijaan. Vesinäytteet otettiin kuitenkin samoin jokaisella näytteenottokerralla, eläinten juomavesipisteiden sedimenttinäytteenotossa oli vaihtelua näytteenottokertojen välillä. Erilaisilla näytteenottotavoilla saattaa olla vaikutusta tuloksiin. Lisäksi on huomattava, että vesinäytteenotto erosi uimavesiasetuksen vaatimuksista, jonka mukaan uimavesinäytteet on otettava 30 cm:n syvyydeltä kohdasta, jossa vesipatsaan syvyys on vähintään 1 metri (STM 2008a). Tässä työssä vesinäytteet otettiin 20 cm:n syvyydeltä, eikä vesipatsaan syvyyttä varmistettu. Suuren tilavuuden näytteet epäonnistuivat laidunkauden 2022 alussa kohteesta 1 ja laidunkauden 2022 lopussa molemmista kohteista. Laidunkauden 2022 lopun suuren tilavuuden näytteet korvattiin ottamalla talteen vesinäytettä molekyylibiologisia analyysejä varten, mutta tämä pienensi tutkittua näytetilavuutta merkittävästi.

Näytteenottoon liittyvien tekijöiden lisäksi tuloksiin voivat vaikuttaa analyysimenetelmiin liittyvät tekijät. Kasvatusalustan toimitusvaikeuksien vuoksi *E. coli* -bakteerin analyysimenetelmää vaihdettiin kesken hankkeen. Lisäksi nukleiinihappojen eristysmenetelmä jouduttiin vaihtamaan kesällä 2022 otetuille näytteille. Indikaattoribakteerien viljelymenetelmissä käytetty kalvosuodatusmenetelmä osoittautui haastavaksi tulkittavaksi pintasedimenttinäytteiden osalta, sillä suodattimen pinnalle jäänyt sakka vaikeutti pesäkkeiden laskentaa, ja mahdollisesti vaikutti myös pesäkkeiden kasvuun. Lisäksi pintasedimenttinäytteiden molekyylibiologiset analyysit tehtiin eri laboratorioissa kuin vesinäytteiden vastaavat analyysit. Tilastollisten tarkastelujen kannalta näytteiden lukumäärä jäi varsin pieniksi erityisesti rantalaitumen läheisyydessä sijainneiden uimarantojen ja kontrolliuimarantojen osalta.

Tässä työssä ei ole tutkittu tai otettu huomioon muita tekijöitä laiduneläinten ja lintupopulaatioiden lisäksi, jotka vaikuttavat pinta- ja uimavesien ulosteperäisen saastumisen määrään näytteenottokohteissa. Eläinten juomavesinäytteistä saatuja tuloksia tulkittaessa on huomioitava se, että kyseessä on laitumen läpi kulkevat ojat, joiden ulosteperäinen kuormitus on peräisin koko ojan valuma-alueelta. Ne eivät siis kuvaa pelkästään laitumilta peräisin olevaa ulosteperäistä kuormitusta kovin hyvin. Terveysriskin arvioinnissa laitumen edustojen pintavesien ja eläinten juomavesien osalta käytettiin arviota *C. jejuni* lukumääristä perustuen *E. coli* -bakteerin lukumäärien perusteella, sillä kyseisistä pisteistä ei tehty semikvantitatiivista kampakylobakteerianalyysiä. *E. coli* -bakteeria on käytetty indikaattorina aiemmin *C. jejuni* -bakteerille juomavesissä (Lund 1996, Valkama 2022).

7 Johtopäätökset

Tutkimuskohteissa ei havaittu rantalaidunten aiheuttavan normaalitilanteessa merkittävää ulosteperäistä saastumista lähistöllä sijaitsevassa vesistössä. Suolistoperäisten mikrobien lukumäärät ja geenikopiolukumäärät eivät tässä työssä eronneet tilastollisesti merkitsevästi laidunten edustojen pintavesissä verrattuna uima- ja kontrolliuimavesiin. Lisäksi havaittiin, että tutkimuksessa mukana olleissa kohteissa laiduntavalla eläinlajilla (lammas vs. nauta) ei ollut vaikutusta suolistoperäisten mikrobien lukumääriin laidunten edustojen pintavesissä ja eläinten juomavesissä.

Tämän tutkimusten tulosten perusteella pintasedimentti ei toiminut tutkituilla ranta-alueilla suolistoperäisiä mikrobeja pidättävänä aineksena. *Cryptosporidium*-alkueläimen ja yleisen lintumarkkerin DNA-pohjaista analyysiä lukuun ottamatta kaikkia tutkittuja mikrobeja havaittiin enemmän vesinäytteistä verrattuna pintasedimenttinäytteisiin. Tulos oli ristiriidassa aiempien tutkimusten kanssa ja vaatii lisää tutkimusta useammanlaisissa kohteissa. Tulevissa tutkimuksissa olisi tärkeää ottaa huomioon myös pintasedimentin ominaisuudet.

Terveysriskinarvioinnin perusteella *C. jejuni* -bakteerin aiheuttama terveysriski jäi normaalitilanteessa vähäiseksi rantalaidunten läheisyydessä sijainneilla uimarannoilla, joissa *C. jejuni* aiheutti keskimäärin 0,4–1,2 tautitapausta päivässä 100 uimaria kohden. Tautitapausten lukumäärää oli samaa luokkaa, mikäli uimaveden *C. jejuni* -bakteerin lukumäärät vastasivat lukumääriä kontrolliuimavesissä ja laidunten edustojen pintavesissä. Eläinten juomavesiä vastaavissa uimavesissä infektioriski oli hieman suurempi, 1,5–2,4 tautitapausta päivässä 100 uimaria kohden.

Tämän tutkimuksen perusteella rantalaidunten vaikutus alapuolisen vesistön hygieeniseen laatuun jäi vähäiseksi, mutta on otettava huomioon se, että tulokset pätevät tutkimuskohteissa näytteenottojen aikaisissa olosuhteissa. Erytisen tärkeää on huomioida mahdollisten sään ääri-ilmiöiden, kuten rankkasateiden, vaikutukset rantalaitumilta alapuoliseen vesistöön päätyvien suolistoperäisten mikrobien lukumääriin. Tulevissa tutkimuksissa on tarpeellista tutkia erilaisten sääolojen vaikutusta rantalaidunten valumiin.

Lähteet

Ahmed W., Sawant S., Huygens F., Goonetilleke A. ja Gardner T. 2009. Prevalence and occurrence of zoonotic bacterial pathogens in surface waters determined by quantitative PCR. *Water research* 43(19): 4918-4928.

Ahmed W. ja Harwood V. 2019. Human and animal enteric viral markers for tracking the sources of faecal pollution. Teoksessa Rose J.B. ja Jiménez-Cisneros B. (toim.). *Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project)*. (A.Farnleitner, and A. Blanch (toim.)). Part 2: Indicators and Microbial Source Tracking Markers. Michigan State University. UNESCO.

Ameer M.A., Wasey A. ja Salen P. 2023. *Escherichia Coli (E Coli 0157 H7)*. Teoksessa StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Luettu 29.4.2023.

Atwill E.R., Li X., Grace D. ja Gannon, V. 1998. Rangeland Cattle and the Risk of Waterborne *Cryptosporidium parvum* Infection in Humans. Texas A&M University Libraries.

Betancourt W. 2019. *Cryptosporidium spp.* Teoksessa Rose J.B. ja Jiménez-Cisneros B. (toim.). *Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management, Global Water Pathogen Project*. (Fayer R. ja Jakubowski W. (toim.)). Part 3: Specific Excreted Pathogens: Environmental and Epidemiology Aspects - Section 3: Protists), Michigan State University, UNESCO.

Boehm A.B., Van De Werfhorst L. C., Griffith J.F., Holden P.A., Jay J.A., Shanks O.C., Wang D. ja Weisberg S.B. 2013. Performance of forty-one microbial source tracking methods: A twenty-seven lab evaluation study. *Water research* 47(18): 6812-6828.

Bonetta S., Borelli E., Bonetta S., Conio O., Palumbo F. ja Carraro E. 2011. Development of a PCR protocol for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella spp.* in surface water. *Environmental monitoring and assessment* 177(1-4): 493-503.

Brown K.I. ja Boehm A.B. 2015. Comparative decay of *Catelicoccus marimalium* and enterococci in beach sand and seawater. *Water research* 83: 377-384.

Brown P.E., Christensen O.F., Clough H.E., Diggle P.J., Hart C.A., Hazel S., Kemp R., Leatherbarrow A.J.H., Moore A. ja Sutherst J. 2004. Frequency and spatial distribution of environmental *Campylobacter spp.* *Applied and Environmental Microbiology* 70(11): 6501-6511.

Bruce-Grey-Owen Sound Health Unit (BGOSHU). 2000. The investigative report of the Walkerton outbreak of waterborne gastroenteritis.

Burnet J., Penny C., Ogorzaly L. ja Cauchie H. 2014. Spatial and temporal distribution of *Cryptosporidium* and *Giardia* in a drinking water resource: Implications for monitoring and risk assessment. *The Science of the total environment* 472: 1023-1035.

Byappanahalli M.N., Nevers M.B., Korajkic A., Staley Z.R. ja Harwood V.J. 2012. Enterococci in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76(4): 685-706.

Caldwell J.M. ja Levine J.F. 2009. Domestic wastewater influent profiling using mitochondrial real-time PCR for source tracking animal contamination. *Journal of microbiological methods* 77(1): 17-22.

Caprioli A., Morabito S., Brugere H. ja Oswald, E. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research* 36: 289–311.

Chalmers R.M., Davies A.P. ja Tyler K. 2019. *Cryptosporidium*. *Microbiology Society* 165: 500–502.

Chandran A., Varghese S., Kandeler E., Thomas A., Hatha M. ja Mazumder A. 2011. An assessment of potential public health risk associated with the extended survival of indicator and pathogenic bacteria in freshwater lake sediments. *International journal of hygiene and environmental health* 214(3): 258-264.

Christidis T., Hurst M., Rudnick W., Pintar K.D.M. ja Pollari F. 2020. A comparative exposure assessment of foodborne, animal contact and waterborne transmission routes of *Salmonella* in Canada. *Food control* 109: 106899.

Clayton J. L., Manners J., Miller S., Shepherd C., Dunn J. R., Schaffner W., ja Jones T. F. 2017. Water Quality Survey of Splash Pads After a Waterborne Salmonellosis Outbreak — Tennessee, 2014. *Journal of Environmental Health* 79(10): 8–13.

Cooley M.B., Quiñones B., Oryang D., Mandrell R.E. ja Gorski L. 2014. Prevalence of shiga toxin producing *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and *Listeria monocytogenes* at public access watershed sites in a California Central Coast agricultural region. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4: 30–.

Cordell H.K. 2012. Outdoor recreation trends and futures: a technical document supporting the Forest Service 2010 RPA assessment. Teoksessa Asheville: Department of Agriculture Forest Service. 2012: 167.

Croxen M.A., Law R.J., Scholz R., Keeney K.M., Wlodarska M. ja Finlay B.B. 2013. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 26(4): 822-880.

Delannoy S., Beutin L. ja Fach P. 2013. Discrimination of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) from Non-EHEC Strains Based on Detection of Various Combinations of Type III Effector Genes. *Journal of Clinical Microbiology* 51(10): 3257-3262.

Eng S., Pusparajah P., Ab Mutalib N., Ser H., Chan K. ja Lee L. 2015. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science* 8:3: 284-293

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2022. Campylobacteriosis. Teoksessa ECDC. Annual epidemiological report for 2021. Tukholma.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2021. Cryptosporidiosis. Teoksessa ECDC. Annual epidemiological report for 2018. Tukholma.

European Food Safety Authority (EFSA) ja European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2018. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA Journal 16(12):5500, 262 pp.

Farrell M.L., Joyce A., Duane S., Fitzhenry K., Hooban B., Burke L.P. ja Morris D. 2021. Evaluating the potential for exposure to organisms of public health concern in naturally occurring bathing waters in Europe: A scoping review. Water research 206: 117711.

Fatica M.K. ja Schneider K.R. 2011. Salmonella and produce: Survival in the plant environment and implications in food safety. Virulence 2(6): 573-579.

Federigi I., Bonadonna L., Bonanno Ferraro G., Briancesco R., Cioni L., Coccia A.M., Della Libera S., Ferretti E., Gramaccioni L., Iaconelli M., La Rosa G., Lucentini L., Mancini P., Suffredini E., Vicenza T., Veneri C., Verani M. ja Carducci A. 2020. Quantitative Microbial Risk Assessment as support for bathing waters profiling. Marine pollution bulletin 157: 111318.

Federigi I., Verani M. ja Carducci A. 2017. Sources of bathing water pollution in northern Tuscany (Italy): Effects of meteorological variables. Marine pollution bulletin 114(2): 843-848.

Feng Y., Ryan U. M., ja Xiao L. 2018. Genetic Diversity and Population Structure of Cryptosporidium. Trends in Parasitology 34(11): 997-1011.

Ferens W. A. ja Hovde C. J. 2011. Escherichia coli O157:H7: Animal Reservoir and Sources of Human Infection. Foodborne Pathogens and Disease 8:4: 465-487.

Fewtrell L. ja Kay D. 2015. Recreational Water and Infection: A Review of Recent Findings. Current Environmental Health Reports 2(1): 85-94.

Gaertner J.P., Mendoza J.A., Forstner M.R.J. ja Hahn D. 2011. Recovery of Salmonella from biofilms in a headwater spring ecosystem. Journal of water and health 9(3): 458-466.

Galan J.E., Ginocchio C. ja Costeas P. 1992. Molecular and functional characterization of the Salmonella invasion gene i3vA : homology of InvA to members of a new protein family. Journal of bacteriology 174(13): 4338-4349.

Garcia-Aljaro C., Momba M. ja Muniesa M., 2017. Pathogenic members of Escherichia coli & Shigella spp. Shigellosis. Teoksessa Rose J.B. ja Jiménez-Cisneros B. (toim.). Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management, Global Water Pathogen Project (Pruden A., Ashbolt N. ja Miller J. (toim.). Part 3:

Specific Excreted Pathogens: Environmental and Epidemiology Aspects - Section 2: Bacteria). Michigan State University, UNESCO.

Garzio-Hadzick A., Shelton D.R., Hill R.L., Pachepsky Y.A., Guber A.K. ja Rowland R. 2010. Survival of manure-borne *E. coli* in streambed sediment: Effects of temperature and sediment properties. *Water research* 44(9): 2753-2762.

Green H.C., Dick L.K., Gilpin B., Samadpour M. ja Field, K.G. 2012. Genetic Markers for Rapid PCR-Based Identification of Gull, Canada Goose, Duck, and Chicken Fecal Contamination in Water. *Applied and Environmental Microbiology* 78(2): 503-510.

Haley B.J., Cole D.J. ja Lipp E.K. 2009. Distribution, Diversity, and Seasonality of Waterborne *Salmonellae* in a Rural Watershed. *Applied and Environmental Microbiology* 75(5): 1248-1255.

Harwood V.J., Levine A.D., Scott T.M., Chivukula V., Lukasik J., Farrah S.R. ja Rose J.B. 2005. Validity of the Indicator Organism Paradigm for Pathogen Reduction in Reclaimed Water and Public Health Protection. *Applied and Environmental Microbiology* 71(6): 3163-3170.

Harwood V.J., Staley C., Badgley B.D., Borges K. ja Korajkic A. 2014. Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes. *FEMS microbiology reviews* 38(1): 1-40.

Harwood V., Shanks O., Korajkic A., Verbyla M., Ahmed W. ja Iriarte M. 2017. General and host-associated bacterial indicators of faecal pollution. Teoksessa J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros, (toim.). *Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project)*. (A. Farnleitner ja A. Blanch (toim.). Part 2: Indicators and Microbial Source Tracking Markers), Michigan State University, UNESCO.

Hasan R., Nordin A.C., Shakoor S., Keenum I. ja Vinneras B. 2019. *Salmonella*, Enteric Fevers, and Salmonellosis. Teoksessa J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros (toim.). *Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project)*. (A. Pruden, N. Ashbolt ja J. Miller (toim.). Part 3: Specific Excreted Pathogens: Environmental and Epidemiology Aspects - Section 2: Bacteria), Michigan State University, UNESCO.

Ho N.K., Henry A.C., Johnson-Henry K. ja Sherman, P.M. 2013. Pathogenicity, Host Responses and Implications for Management of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Infection. *Canadian Journal of Gastroenterology* 27(5): 281-285.

Hokajärvi A., Pitkänen T., Siljanen H.M.P., Nakari U., Torvinen E., Siitonen A. ja Miettinen, I.T., 2013. Occurrence of thermotolerant *Campylobacter* spp. and adenoviruses in Finnish bathing waters and purified sewage effluents. *Journal of water and health* 11(1): 120-134.

Hutchison M.L., Walters L.D., Avery S.M., Synge B.A. ja Moore A. 2004. Levels of zoonotic agents in British livestock manures. *Letters in applied microbiology* 39(2): 207-214.

- Huuskonen A., Uusi-Kämppä J. ja Laurila M. 2022a. Naudat hoitavat Perämeren rantoja. *Nauta* 02/2022: 40-42.
- Huuskonen A., Uusi-Kämppä J. ja Laurila M. 2022b. Ravinnekierto merenrantalaitumilla. Luonnonvarakeskus.
- Ilmatieteen laitos. 2022. Havaintojen lataus. <https://www.ilmatieteenlaitos.fi/havaintojen-lataus>.
- Inkinen J., Jayaprakash B., Siponen S., Hokajärvi A., Pursiainen A., Ikonen J., Ryzhikov I., Täubel M., Kauppinen A., Paananen J., Miettinen I.T., Torvinen E., Kolehmainen M. ja Pitkänen T. 2019. Active eukaryotes in drinking water distribution systems of ground and surface waterworks. *Microbiome* 7: 99.
- International Organization for Standardization (ISO). 2010. Water quality – Detection of *Salmonella* spp. (ISO 19250:2010).
- International Organization for Standardization (ISO). 2012. Water quality – Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria – Part 2: Most probable number method (ISO 9308-2:2012).
- International Organization for Standardization (ISO). 2012. Microbiology of food and animal feed. Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens. Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups (ISO/TS 13136:2012)
- International Organization for Standardization (ISO). 2019. Water quality – Detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* spp. (ISO 17995:2019).
- Ishii S., Nakamura T., Ozawa S., Kobayashi A., Sano D. ja Okabe S. 2014. Water Quality Monitoring and Risk Assessment by Simultaneous Multipathogen Quantification. *Environmental science and technology* 48(9): 4744-4749.
- Ishii S. ja Sadowsky M.J. 2008. *Escherichia coli* in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health. *Microbes and environments* 23(2):101-108.
- Islam M., Morgan J., Doyle M.P., Phatak S.C., Millner P. ja Jiang, X. 2004. Fate of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Applied and Environmental Microbiology* 70(4): 2497-2502.
- Jacobsen C.S. ja Bech T.B. 2012. Soil survival of *Salmonella* and transfer to freshwater and fresh produce. *Food research international* 45(2): 557-566.
- Jokinen C.C., Schreier H., Mauro W., Taboada E., Isaac-Renton J.L., Topp E., Edge T., Thomas J.E. ja Gannon, V.P.J. 2010. The occurrence and sources of *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 in the Salmon River, British Columbia, Canada. *Journal of water and health* 8(2): 374-386.

- Jones K. 2001. Campylobacters in water, sewage and the environment. *Journal of applied microbiology* 90(S6): 68S-79S.
- Jothikumar N., Da Silva A.J., Moura I., Qvarnstrom Y. ja Hill V.R. 2008. Detection and differentiation of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* by dual TaqMan assays. *Journal of medical microbiology* 57(9): 1099-1105.
- Joyce C.B. 2014. Ecological consequences and restoration potential of abandoned wet grasslands. *Ecological engineering* 66: 91-102.
- Julian J.P., De Beurs K.M., Owsley B., Davies-Colley R.J. ja Ausseil, A.G.E. 2017. River water quality changes in New Zealand over 26 years: Response to land use intensity. *Hydrology and Earth System Sciences* 21(2): 1149-1171.
- Kaper J.B., Nataro J.P. ja Mobley H.L.T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology* 2(2): 123-140.
- Kapoor V., Pitkänen T., Ryu H., Elk M., Wendell D. ja Santo Domingo, J.W. 2015. Distribution of Human-Specific Bacteroidales and Fecal Indicator Bacteria in an Urban Watershed Impacted by Sewage Pollution, Determined Using RNA- and DNA-Based Quantitative PCR Assays. *Applied and Environmental Microbiology* 81(1): 91-99.
- Kauppinen A., Al-Hello H., Zacheus O., Kilponen J., Maunula L., Huusko S., Lappalainen M., Miettinen I., Blomqvist S. ja Rimhanen-Finne R. 2017. Increase in outbreaks of gastroenteritis linked to bathing water in Finland in summer 2014. *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles* 22(8): 13-20.
- Keer J.T. ja Birch L. 2003. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *Journal of Microbiological Methods* 53(2): 175-183.
- Kim M. ja Wuertz S. 2015. Survival and persistence of host-associated Bacteroidales cells and DNA in comparison with *Escherichia coli* and *Enterococcus* in freshwater sediments as quantified by PMA-qPCR and qPCR. *Water research* 87: 182-192.
- Kingsley R.A. ja Baumler A.J. 2000. Host adaptation and the emergence of infectious disease: the *Salmonella* paradigm. *Molecular microbiology* 36(5): 1006-1014.
- Korajkic A., Wanjugi P., Brooks L., Cao Y. ja Harwood, V.J. 2019. Persistence and Decay of Fecal Microbiota in Aquatic Habitats. *Microbiology and molecular biology reviews* 83(4).
- Kose, M., Heinsoo, K., Kaljund, K. and Tali, K., 2021. Twenty years of Baltic Boreal coastal meadow restoration: has it been long enough? *Restoration ecology*, 29(4), pp. n/a.
- Laine J., Huovinen E., Virtanen M.J., Snellman M., Lumio J., Ruutu P., Kujansuu E., Vuento R., Pitkänen T., Miettinen I., Herrala J., Lepistö O., Anttonen J., Helenius J., Hänninen M., Maunula L.,

Mustonen J. ja Kuusi, M. 2011. An extensive gastroenteritis outbreak after drinking-water contamination by sewage effluent, Finland. *Epidemiology and infection* 139(7): 1105-1113.

Laurila M. 2022. Kokemuksia ja näkemyksiä rantalaiduntamisesta. <https://rantalaidun.luke.fi/>. Luettu 28.4.2023.

Lehtomaa L., Ahonen I., Hakamäki H., Häggblom M., Jantunen J., Jutila H., Järvinen C., Kempainen R., Kandelin H., Laitinen T., Lipponen M., Mussaari M., Pessa J., Raatikainen K.J., Raatikainen K., Tuominen S., Vainio M., Vieno M. ja Vuomajoki M. 2018. Perinnebiotoopit. Teoksessa Kontula T. ja Raunio A. (toim.) Suomen luontotyyppien uhanalaisuus 2018. Luontotyyppien punainen kirja - Osa 2: Luontotyyppien kuvaus.

Loganthan S., Yang R., Bath A., Gordon C. ja Ryan, U. 2012. Prevalence of *Cryptosporidium* species in recreational versus non-recreational water sources. *Experimental parasitology* 131(4): 399-403.

Luontodirektiivi 92/43/EY. Neuvoston direktiivi luontotyyppien sekä luonnonvaraisen eläimistön ja kasviston suojelusta.

Maa- ja metsätalousministeriö (MMM). 2016. Kasvua vesiosaamisesta ja vesiluonnonvarojen kestävästä hyödyntämisestä.

McLellan S.L. ja Eren A.M. 2014. Discovering new indicators of fecal pollution. *Trends in microbiology* 22(12): 697-706.

Meriläinen P., Tuomisto J.T., Kauppinen A., Hokajärvi A.-M. ja Pitkänen T. 2021. Uimavesien riskinarviointi – työkalu terveystieteiden arvioimiseen. *Vesitalous* 5/2021.

Mieszkin S., Yala J., Joubrel R. ja Gourmelon M. 2010. Phylogenetic analysis of Bacteroidales 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR. *Journal of applied microbiology* 108(3): 974-984.

Moore B.C., Martinez E., Gay J.M. ja Rice D.H. 2003. Survival of *Salmonella enterica* in freshwater and sediments and transmission by the aquatic midge *Chironomus tentans* (Chironomidae: Diptera). *Applied and Environmental Microbiology* 69(8): 4556-4560.

Mott J. ja Smith A. 2011. Library-Dependent Source Tracking Methods. Teoksessa Hagedorn C., Blanch A.R ja Harwood V.J. (toim.). *Microbial Source Tracking: Methods, Applications and Case Studies*. New York: Springer New York, pp. 31-59.

Moura R.A., Sircili M.P., Leomil L., Matté M.H., Trabulsi L.R., Elias W.P., Irino K. ja Pestana De Castro A. F. 2009. Clonal Relationship among Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Different Animal Species and Humans. *Applied and Environmental Microbiology* 75(23): 7399-7408.

- Mulder A.C., Franz E., De Rijk S., Versluis M.A.J., Coipan C., Buij R., Müskens G., Koene M., Pijnacker R., Duim B., Bloois, Van Der Graaf-Van L., Veldman K., Wagenaar J.A., Zomer A.L., Schets F.M., Blaak H. ja Mughini-Gras L., 2020. Tracing the animal sources of surface water contamination with *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Water research* 187: 116421.
- Niemelä M., Huuskonen A., Jaakola S., Joki-Tokola E. ja Hyvärinen M. 2008. Coastal meadows as pastures for beef cattle. *Agriculture, ecosystems and environment* 124(3): 179-186.
- Niemelä M. 2012. Eläimet rantaan – kyllä vai ei? Opas kestävään rantalaiduntamiseen. *Natureship-julkaisuja*.
- Ogle D.H., Doll J.C., Wheeler A.P. ja Dinno A. 2023. FSA: Simple Fisheries Stock Assessment Methods. R package version 0.9.4.
- Okhuysen P.C., Chappell C.L., Crabb J.H., Sterling C.R. ja Dupont H.L. 1999. Virulence of Three Distinct *Cryptosporidium parvum* Isolates for Healthy Adults. *The Journal of infectious diseases* 180(4): 1275-1281.
- Paton A. ja Paton J. 2002. Direct Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Multiplex PCR for *stx sub(1)*, *stx sub(2)*, *eae*, *ehxA*, and *saa*. *Journal of clinical microbiology* 40(1): 271-274.
- Percival S.L. ja Williams D.W. 2014. *Escherichia coli*. 2. painos. Teoksessa Percival S.L., Yates M.V., Williams D.D., Chalmers R. ja Gray N. (toim.). *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks*: 89–117. Elsevier/Academic Press, Amsterdam.
- Pitkänen T. 2013. Review of *Campylobacter* spp. in drinking and environmental waters. *Journal of microbiological methods* 95(1): 39-47.
- Pitkänen T. ja Hänninen M. 2017. Members of the family *Campylobacteraceae*: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*. Teoksessa J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros (toim.). *Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project)*. (A. Pruden, N. Ashbolt and J. Miller (toim.). Part 3: Specific Excreted Pathogens: Environmental and Epidemiology Aspects - Section 2: Bacteria), Michigan State University, UNESCO.
- Pitkänen T., Hokajärvi A., Kauppinen A., Tiwari A., Zacheus O. ja Miettinen I.T. 2015. Vesivarojen saastelähteiden jäljitysmenetelmien kehitys. Loppuraportti. Työpaperi 16/2015. Terveystieteiden tutkimuskeskus ja ympäristöterveyslaitos. ISSN 2323-363X.
- Pitkänen T., Ryu H., Elk M., Hokajärvi A., Siponen S., Vepsäläinen A., Räsänen P. ja Santo Domingo, J.W. 2013. Detection of Fecal Bacteria and Source Tracking Identifiers in Environmental Waters Using rRNA-Based RT-qPCR and rDNA-Based qPCR Assays. *Environmental science and technology* 47(23): 13611-13620.

- Rangel J. M., Sparling P. H., Crowe C., Griffin P. M., ja Swerdlow D. L. 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerging Infectious Diseases* 11(4): 603–609.
- Rimhanen-Finne R., Hörman A., Ronkainen P. ja Hänninen M. 2002. An IC-PCR method for detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in natural surface waters in Finland. *Journal of Microbiological Methods* 50: 299–303
- Robertson L.J., Temesgen T.T., Tysnes K.R. ja Eikås J.E. 2019. An apple a day: an outbreak of cryptosporidiosis in Norway associated with self-pressed apple juice. *Epidemiology and Infection* 147: e139.
- Rodríguez S. ja Araujo R. 2012. Effect of environmental parameters on the inactivation of the waterborne pathogen *Campylobacter* in a Mediterranean river. *Journal of water and health* 10(1): 100-107.
- Roslev P. ja Bukh A.S. 2011. State of the art molecular markers for fecal pollution source tracking in water. *Applied microbiology and biotechnology* 89(5): 1341-1355.
- Ruokavirasto. 2022. Zoonoosit. <https://www.ruokavirasto.fi/zoonoosikeskus/zoonoosit/>. Luettu 28.4.2023.
- Ruosteenoja K. ja Jylhä K. 2021. Projected climate change in Finland during the 21st century calculated from CMIP6 model simulations. *Geophysica* 56(1): 39–69.
- Ryan U.M., Feng Y., Fayer R. ja Xiao, L. 2021. Taxonomy and molecular epidemiology of cryptosporidium and giardia - a 50 year perspective (1971-2021). *International Journal of Parasitology* 51: 1099–1119.
- Rytkönen A., Tiwari A., Hokajärvi A., Uusheimo S., Vepsäläinen A., Tulonen T. ja Pitkänen T. 2021. The Use of Ribosomal RNA as a Microbial Source Tracking Target Highlights the Assay Host-Specificity Requirement in Water Quality Assessments. *Frontiers in microbiology* 12: 673306.
- Ryu H., Griffith J.F., Khan I.U.H., Hill S., Edge T.A., Toledo-Hernandez C., Gonzalez-Nieves J. ja Santo Domingo J. 2012. Comparison of Gull Feces-Specific Assays Targeting the 16S rRNA Genes of *Catellibacterium marimammalianum* and *Streptococcus* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 78(6): 1909-1916.
- Santín M. 2013. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. *New Zealand veterinary journal* 61(1): 1-10.
- Satoma M. 2021. Monimuotoiset maatalousympäristöt houkuttelevat mustapyrstökuirin pesimispuuhiin. *Ketonoidanlukko* 2021: 11-13.
- Schill W.B. ja Mathes M.V. 2008. Real-Time PCR Detection and Quantification of Nine Potential Sources of Fecal Contamination by Analysis of Mitochondrial Cytochrome b Targets. *Environmental science and technology* 42(14): 5229-5234.

- Schönberg-Norio D., Takkinen J., Hänninen M., Katila M., Kaukoranta S., Mattila L. ja Rautelin H. 2004. Swimming and Campylobacter infections. *Emerging Infectious Diseases* 10(8): 1474-1477.
- Schwarz C. ja Fartmann T. 2022. Traditional grazing management creates heterogeneous swards and fosters grasshopper densities. *Insect science* 0: 1–14.
- Siefring, S., Varma, M., Atikovic, E., Wymer, L. and Haugland, R.A., 2008. Improved real-time PCR assays for the detection of fecal indicator bacteria in surface waters with different instrument and reagent systems. *Journal of water and health*, 6(2), pp. 225-237.
- Slade E.M., Riutta T., Roslin T. ja Tuomisto H.L. 2016. The role of dung beetles in reducing greenhouse gas emissions from cattle farming. *Scientific Reports* 6(1): 18140–18140.
- Smith C.M. ja Hill V.R. 2009. Dead-End Hollow-Fiber Ultrafiltration for Recovery of Diverse Microbes from Water. *Applied and Environmental Microbiology* 75(16): 5284-5289.
- Soininen V. 2020. Rantalaiduntamisen vaikutukset rannikon uimavesiin: Saastelähteiden jäljittäminen ja rannikon vesien rehevöityneisyys. <https://urn.fi/URN:NBN:fi:amk-202003314217>.
- Soller J.A., Schoen M.E., Bartrand T., Ravenscroft J.E. ja Ashbolt N.J. 2010. Estimated Human Health Risks from Exposure to Recreational Waters Impacted by Human and Non-Human Sources of Faecal Contamination. *Water Research* 44: 4674–4691.
- Soller J.A., Schoen M.E., Varghese A., Ichida A.M., Boehm A.B., Eftim S., Ashbolt N.J. ja Ravenscroft J.E. 2014. Human health risk implications of multiple sources of faecal indicator bacteria in a recreational waterbody. *Water research* 66: 254-264.
- Soller J., Bartrand T., Ravenscroft J., Molina M., Whelan G., Schoen M. ja Ashbolt N. 2015. Estimated human health risks from recreational exposures to stormwater runoff containing animal faecal material. *Environmental modelling and software: with environment data news* 72: 21-32.
- Sosiaali- ja terveysalan lupa- ja valvontavirasto (Valvira). 2008. Soveltamisopas uimavesiasetukseen 177/2008.
- Sosiaali- ja terveysministeriö (STM). 2008a. Sosiaali- ja terveysministeriön asetus yleisten uimarantojen uimaveden laatuvaatimuksista ja valvonnasta 177/2008.
- Sosiaali- ja terveysministeriö (STM). 2008b. Sosiaali- ja terveysministeriön asetus pienten yleisten uimarantojen uimaveden laatuvaatimuksista ja valvonnasta 354/2008.
- Stanley K. ja Jones K. 2003. Cattle and sheep farms as reservoirs of Campylobacter. *Journal of applied microbiology* 94(s1): 104-113.

- Stea E.C., Truelstrup Hansen L., Jamieson R.C. ja Yost C.K. 2015. Fecal Contamination in the Surface Waters of a Rural- and an Urban-Source Watershed. *Journal of environmental quality* 44(5): 1556-1567.
- Steele M. ja Odumeru J. 2004. Irrigation water as source of foodborne pathogens on fruit and vegetables. *Journal of Food Protection* 67(12): 2839-2849.
- Strakova N., Shagieva E., Ovesna P., Korena K., Michova H., Demnerova K., Kolackova I. ja Karpiskova R. 2022. The effect of environmental conditions on the occurrence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in wastewater and surface waters. *Journal of applied microbiology* 132(1): 725-735.
- Suomen Standardisoimisliitto (SFS). 1998. Veden laatu. *Escherichia coli* ja koliformibakteerien havaitseminen ja laskeminen. Osa 3: Pienen mittakaavan MPN (todennäköisin lukumäärä) liuosmenetelmä *Escherichia coli* havaitsemiseen ja laskemiseen pinta- ja jätevesistä. (ISO 9308-3:1998).
- Suomen Standardisoimisliitto (SFS). 1999. Veden laatu. Suolistoperäisten enterokokkien havaitseminen ja laskeminen. Osa 1: Pienen mittakaavan MPN (todennäköisin lukumäärä) liuosmenetelmä pinta- ja jätevesille. (ISO 7899-1:1998).
- Suomen Standardisoimisliitto (SFS). 2000. Veden laatu. Suolistoperäisten enterokokkien havaitseminen ja laskeminen. Osa 2: Kalvosuodatusmenetelmä (SFS-EN ISO 7899-2:2000).
- Suomen Standardisoimisliitto (SFS). 2017. Veden laatu. *Escherichia coli* -bakteerin ja koliformisten bakteerien lukumäärän määrittäminen. Osa 1: Kalvosuodatusmenetelmä vesille, joissa on vähän taustabakteeristöä (SFS-EN ISO 9308-1:2014/A1:2017).
- Suominen K.A., Björkstrand M., Ollgren J., Autio T.J. ja Rimhanen-Finne R. 2022. Cryptosporidiosis in Finland is predominantly of domestic origin: investigation of increased reporting, 1995-2020. *Infectious diseases* 55(2): 116-124.
- Taylor L.H., Latham S.M. ja Woolhouse M.E.J. 2001. Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 356(1411): 983-989.
- Terveyden ja hyvinvoinnin laitos (THL). 2023. Vesiepidemiat. https://thl.fi/fi/web/ymparistoterveys/vesi/vesiepidemiat#Mitka_mikrobit_aiheuttavat_vesiepidemioita. Luettu 22.4.2023.
- Thomas C., Hill D.J. ja Mabey M. 1999. Evaluation of the effect of temperature and nutrients on the survival of *Campylobacter* spp. in water microcosms. *Journal of applied microbiology* 86(6): 1024-1032.
- Thompson R. C. A., Koh W. H., ja Clode P. L. 2016. *Cryptosporidium* — What is it? *Food and Waterborne Parasitology* 4: 54-61.

Till D., McBride G., Ball A., Taylor K. ja Pyle E. 2008. Large-scale freshwater microbiological study: rationale, results and risks. *Journal of water and health* 6(4): 443-460.

Tiwari A., Niemelä S.I., Vepsäläinen A., Rapala J., Kalso S. ja Pitkänen T. 2016. Comparison of Colilert-18 with miniaturised most probable number method for monitoring of *Escherichia coli* in bathing water. *Journal of water and health* 14(1): 121-131.

Tiwari A., Hokajärvi A., Santo Domingo J.W., Kauppinen A., Elk M., Ryu H., Jayaprakash B. ja Pitkänen T. 2018. Categorical performance characteristics of method ISO 7899-2 and indicator value of intestinal enterococci for bathing water quality monitoring. *Journal of water and health* 16(5): 711-723.

Tiwari A., Oliver D.M., Bivins A., Sherchan S.P. ja Pitkänen T. 2021. Bathing Water Quality Monitoring Practices in Europe and the United States. *International journal of environmental research and public health* 18(11): 5513.

Tóth E., Deák B., Valkó O., Kelemen A., Miglécz T., Tóthmérész B. ja Török, P. 2016. Livestock Type is More Crucial Than Grazing Intensity: Traditional Cattle and Sheep Grazing in Short-Grass Steppes. *Land degradation and development* 29: 231–239.

Uimavesidirektiivi 2006/7/EEC. Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 2006/7/EY uimaveden laadun hallinnasta ja direktiivin 76/160/ETY kumoamisesta.

Uimavesiopas. 2021. <http://fi.opasnet.org/fi/Uimavesiopas>.

U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). 2012. Recreational Water Quality Criteria. Washington, DC, Yhdysvallat.

Vainio H. 2022. Ihana lanta on monien hyönteisten elinehto. <https://rantalaidun.luke.fi/blogi/ihana-lanta-on-monien-hyonteisten-elinehto/>. Luettu 28.4.2023.

Vainio M., Kekäläinen H., Alanen A. ja Pykälä, J. 2001. Suomen perinnebiotoopit. Suomen ympäristö 537. ISSN 1238-7312

Valkama K. 2022. Jätevesien ja valumavesien aiheuttamat vesivälitteiset infektioriskit pintavesissä. <http://urn.fi/urn:nbn:fi:uef-20220158>.

Vogeleer P., Tremblay Y.D.N., Mafu A.A., Jacques M. ja Harel J. 2014. Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology* 5: 317.

Vuorisalmi V. 2022. *Cryptosporidium* -alkueläimen esiintyminen rantalaitumilla. <http://urn.fi/URN:NBN:fi:hulib-202210113604>.

Wang G. ja Doyle M.P. 1998. Survival of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7 in Water. *Journal of Food Protection* 61(6): 662–667.

- Wani S.A., Hussain I., Fayaz I., Mir M.A. ja Nishikawa Y. 2009. Subtype analysis of stx1, stx2 and eae genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and typical and atypical enteropathogenic *E. coli* (EPEC) from lambs in India. *The veterinary journal* 182(3): 489-490.
- Widerström M., Schönning C., Lilja M., Lebbad M., Ljung T., Allestam G., Ferm M., Björkholm B., Hansen A., Hiltula J., Långmark J., Löfdahl M., Omberg M., Reuterwall C., Samuelsson E., Widgren K., Wallensten A. ja Lindh J. 2014. Large Outbreak of *Cryptosporidium hominis* Infection Transmitted through the Public Water Supply, Sweden. *Emerging Infectious Diseases* 20(4): 581-589.
- Wilkes G., Edge T.A., Gannon V.P.J., Jokinen C., Lyautey E., Neumann N.F., Ruecker N., Scott A., Sunohara M., Topp E. ja Lapen, D.R., 2011. Associations among pathogenic bacteria, parasites, and environmental and land use factors in multiple mixed-use watersheds. *Water research* 45(18): 5807-5825.
- World Health Organization (WHO). 2021. Guidelines on safe recreational water quality: volume 1 coastal and fresh waters. WHO, Geneva
- Xie Y., Zhu L., Lyu G., Lu L., Ma J. ja Ma J. 2022. Persistence of *E. coli* O157:H7 in urban recreational waters from Spring and Autumn: a comparison analysis. *Environmental science and pollution research international* 29(26): 39088-39101.
- You Y., Rankin S.C., Aceto H.W., Benson C.E., Toth J.D. ja Dou Z. 2006. Survival of *Salmonella enterica* Serovar Newport in Manure and Manure-Amended Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 72(9): 5777-5783.