



TAMPEREEN
AMMATTIKORKEAKOULU

FLUORESEINIDIASETAATTIMENETELMÄN TOIMIVUUS SAVEN ANAEROBIMIKROBIEN AKTIIVISUUDEN MÄÄRITYKSESSÄ

Linda Parkkinen

Opinnäytetyö
Toukokuu 2017
Energia- ja ympäristötekniikka
Laboratoriotekniikan koulutus



TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Energia- ja ympäristötekniikka
Laboratoriotekniikan koulutus

PARKKINEN, LINDA:

Fluoreseiinidiasetaattimenetelmän toimivuus saven anaerobimikrobien aktiivisuuden määrittämisessä

Opinnäytetyö 51 sivua, joista liitteitä 8 sivua

Toukokuu 2017

Opinnäytetyö tehtiin Tampereen teknillisellä yliopistolla Kemian ja biotekniikan laboratoriossa osana laajempaa projektia. Työn tavoitteena oli testata samassa laboratoriossa aikaisemmin käytettyä tapaa analysoida bentoniittisävinäytteiden mikrobiaktiivisuutta. Erityisesti oltiin kiinnostuneita anaerobisista bakteereista kuten sulfaatinpelkistäjistä, jotka ovat projektin kannalta tärkeä mikrobiryhmä. Tätä varten oli valittu maanäytteille tarkoitettu Gillian Adamin ja Harry Duncanin (2000) kehittämä fluoreseiinidiasetaatti- eli FDA-menetelmä. Työssä haluttiin varmistaa aikaisemmin saadut alustavat tulokset bentoniittisävien mikrobiaktiivisuudesta kyseistä menetelmää käyttäen.

Menetelmässä maanäytettä inkuboitiin puskuriliuoksessa ja fluoreseiinidiasetaatissa, minkä jälkeen FDA:n hydrolysaation tuloksena syntyneen fluoreseiinin pitoisuus mitattiin UV/VIS-spektrofotometrillä. Fluoreseiinin pitoisuus on suoraan verrannollinen näytteen mikrobiaktiivisuuteen. Tarkoitus oli todeta tämän menetelmän toimivuus aktiivisten sulfaatinpelkistäjä- ja muiden anaerobisten bakteerien avulla, ja tutkia saven vaikutuksia menetelmän lopputuloksiin. Haluttiin myös selvittää natrimbentoniittisäven mikrobiaktiivisuus.

Käytössä olleista bentoniittisävistä ei saatu tuloksia fluoreseiinin muodostumisesta. Havaittiin kuitenkin, että savella oli alentava vaikutus fluoreseiinipitoisuuksiin. Syyksi tälle paljastui saven adsorboiva vaikutus FDA:ta kohtaan. Todettiin myös, että tässä työssä käytetty FDA-menetelmä ei soveltunut hapellisissa oloissa pidetyille kuiville savinäytteille, joiden mikrobikanta on mahdollisesti mennyt lepotilaan säilytysoloista johtuen.

Saven adsorboiva vaikutus vaatii lisätutkimuksia, sillä sen selvittämisestä on hyötyä menetelmän hionisessa sopivaksi kuiville savinäytteille. Myös näytteiden alhaiset mikrobimäärät vaikuttivat todennäköisesti tuloksiin. Savessa olleet anaerobit olivat mahdollisesti kuolleet tai inaktivoituneet usean kuukauden säilytyksen aikana, sillä ne olivat tämän ajan olleet tekemisissä hapen kanssa. Jatkossa savinäytteet kannattaa säilyttää anaerobisissa oloissa, mikäli niistä halutaan selvittää anaerobimikrobien aktiivisuutta.

Asiasanat: savi, anaerobi, fluoreseiinidiasetaatti, spektrofotometria, sulfaatinpelkistäjäbakteeri, fluoreseiini

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Engineering

PARKKINEN, LINDA:

Suitability of Fluorescein Diacetate Method for Detecting the Activity of Anaerobic Bacteria in Clay

Bachelor's thesis 51 pages, appendices 8 pages
May 2017

This thesis was done in Tampere University of Technology, in Laboratory of Chemistry and Biotechnics. The objective of this thesis was to detect anaerobic bacteria, such as sulfate reducers, in bentonite clays, and to confirm previously claimed results related to microbial activities in bentonite clay samples. The method used was Gillian Adam's and Harry Duncan's (2000) fluorescein diacetate method, which is used for measuring microbial activity of soil and clay samples.

The working principle of the method is to incubate clay with potassium phosphate buffer and fluorescein diacetate, also known as FDA. As a result, fluorescein should be formed from FDA by microbial enzymatic reactions. Concentration of the formed fluorescein was to be measured spectroscopically. The amount of formed fluorescein is proportional to the number of microbes in the sample. Purpose of this thesis was to first have the method validated by using active sulfate reducing and other anaerobic bacteria. Activity of the bacteria was analyzed with sulfate analysis conducted with an ion chromatograph. Having validated the method, the effect of the clay samples on the bacteria was to be tested. Finally, the method was tested on bare clays.

It was found that the added clay had diminishing effects towards fluorescein concentrations, the reason being the adsorption of FDA. Also, the FDA method itself was not suitable for the clay samples because of the potentially low microbial activity. This might be due to the aerobic storing conditions, which might have had caused the death, or inactivation, of the anaerobes in the samples.

In the future, it would be advisable to preserve these samples in anaerobic conditions. It might wake up the inactive bacteria and further analysis could be conducted. Following the results of this thesis, it is also suggested that other methods should be tried for detecting low microbial activities. In the future, the adsorbing properties of the clay samples should be tested further because it could help with finding a more suitable method.

Key words: clay, anaerobe, fluorescein, spectrophotometry, sulfate reducing bacteria, fluorescein diacetate

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	TEORIA	7
2.1	Mikrobit maaperässä	7
2.2	Anaerobit: Sulfaatinpelkistäjäbakteerit	8
2.3	Mikrobien detektointi ja analysointi	11
2.3.1	Fluoreseiinidiasetaatti- eli FDA- menetelmä	12
2.3.2	Ultravioletti- ja näkyvän valon spektrofotometria eli UV/VIS- spektrofotometria	13
2.3.3	Ionikromatografia (IC)	15
3	MÄÄRITYSMENETELMÄT JA TYÖN SUORITUS	18
3.1	Opinnäytetyön kulku tiivistettynä	18
3.2	Vertailumikrobikanta	19
3.2.1	Postgate-kasvatukset	19
3.2.2	Sulfaatin kulutuksen mittaaminen IC:llä	21
3.3	FDA- menetelmän testaus	22
3.3.1	Menetelmä	22
3.3.2	Testaus mikrobikasvatusliuoksilla: kokeet 1 ja 2	25
3.3.3	Testaus mikrobikasvatusliuoksilla ja savella: kokeet 3 ja 4	26
3.3.4	Testaus pelkällä savella: kokeet 5 ja 6	27
4	TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO	29
4.1	Vertailumikrobikanta	29
4.2	FDA- menetelmän testaus	30
4.2.1	Testaus mikrobikasvatusliuoksilla: kokeet 1 ja 2	30
4.2.2	Testaus mikrobikasvatusliuoksilla ja savella: kokeet 3 ja 4	33
4.2.3	Testaus pelkällä savella: kokeet 5 ja 6	35
4.3	Yhteenveto	36
5	POHDINTA	38
5.1	Mikrobikasvatusliuokset	38
5.2	FDA- menetelmän sopivuus saville	39
5.3	Yhteenveto	40
	LÄHTEET	41
	LIITTEET	44
	Liite 1. Mikrobikasvatusliuosten sulfaattipitoisuudet	44
	Liite 2. Käyrän 1 kalibrointidata	48
	Liite 3. Käyrän 2 kalibrointidata	49
	Liite 4. Käyrän 3 kalibrointidata	50

1 JOHDANTO

Tämä opinnäytetyö tehtiin Tampereen teknillisessä yliopistossa liittyen ydinjätteen loppusijoitukseen. Ydinjätettä mahdollisesti ympäröivän saven mikrobien tutkiminen on tärkeää alueen biologisissa ja kemiallisissa olosuhteissa tapahtuvien muutosten selvittämiseksi. Sijoiuspaikalla savi tulee olemaan pääosin anaerobisissa olosuhteissa, ja vetty ajan myötä pohjaveden vaikutuksesta. Peruskallion halkeamissa elävien mikrobien tuottamat yhdisteet saattavat pahimmassa tapauksessa kulkeutua saven läpi ydinjätteen vaikutuspiiriin, joten mikrobien aktiivisuudella ja ominaisuuksilla saattaa mahdollisesti olla vaikutuksia ympäristössä sijaitsevaan ydinjätteeseen. Esimerkiksi sulfaatinpelkistäjäbakteerien tuottama divetyysulfidi saattaa aiheuttaa korroosiota ydinjätettä varastoiviin kuparikapseleihin. Nämä vaikutukset halutaan tiedostaa ennen ydinjätteen loppusijoitusta.

Tässä opinnäytetyössä oli tavoitteena tutkia anaerobisten bakteerien, kuten sulfaatinpelkistäjien aktiivisuutta natriumbentoniittisavesta, jota saatetaan sijoittaa kyseiselle ydinjätteen loppusijoiuspaikalle. Yhdessä kokeessa käytettiin myös kalsiumbentoniittia. Määrityksissä tuli tutkia fluoreseiinidiasetaatti- eli FDA-menetelmän toimivuutta ja soveltuvuutta savinäytteiden mikrobien aktiivisuuden analysointiin. Näistä tutkimuksista saatujen tulosten perusteella saadaan lisää tietoa bentoniittisavissa mahdollisesti olevien bakteerien aktiivisuudesta, joka saattaa vaikuttaa projektin muiden savilla tehtyjen kokeiden tuloksiin. Muissa kokeissa on tähän asti oletettu, että savien mahdollisesti sisältämät bakteerit eivät ole aktiivisia.

Tarkoituksena oli aloittaa tutkimukset toteamalla kokeissa käytettävän FDA-menetelmän toimivuus. Toteamiseen käytettiin muun muassa sulfaatinpelkistäjiä sisältäviä anaerobisia pohjavesibakteerikasvatuksia, joiden sulfaatinpelkistäjien aktiivisuus vahvistettiin seuraamalla kasvatusten sulfaattipitoisuuksia ionikromatografiilla. Menetelmän toimivuuden toteamisen jälkeen tutkittiin saven vaikutuksia bakteerien tuottamaan analyysivasteeseen. Tarkoituksena oli myös tehdä viimeiset tutkimukset pelkillä savilla Na-bentoniittisavessa elävien bakteerien aktiivisuuden selvittämiseksi.

2 TEORIA

2.1 Mikrobit maaperässä

Maaperällä tarkoitetaan hienojakoista materiaalia, joka peittää Maan pintaa, ja joka erottuu selvänä erillisenä kerroksena peruskalliosta. Se muodostuu useasta eri komponentista, kuten kivimurskasta, hiekasta, lasin murusista ja elävistä organismeista. Myös maan pinnanmuodot (topografia) ja ilmasto vaikuttavat maaperään. Maaperän koostumus on karkeasti ottaen 40 % epäorgaanisia mineraaleja, 5 % orgaanisia aineita, 50 % ilmaa ja vettä sekä 5 % mikro- ja makro-organismeja. Jos maaperämateriaalin hiukkaskoko pienempi kuin 0,002 mm, sitä kutsutaan saveksi. (Madigan, Martinko, Stahl & Clark 2012, 706-707.) Tässä tekstiosiossa kerrotaan yleisesti maaperästä, johon savikin siis lukeutuu.

Riippumatta maantieteellisestä sijainnista, maaperän eri bakteerien pääjaksojen suhteet toisiinsa nähden pysyvät melko samanlaisina, mutta jaksojen sisäisen lajistot vaihtelevat. Bakteerien määrään vaikuttavat vähentävästi esimerkiksi maanviljely ja teollisuus torjunta-aineiden, pienen kasvi- ja puutiheyden sekä lannoitteiden takia. Saastuneen ja saastumattoman saven bakteeripääjaksojen suhteet toisiinsa ovat keskenään samankaltaisia, mutta kuten maantieteellistenkin vaihteluiden kohdalla, on saastuneen saven lajisto poikkeava puhtaan maaperän bakteerilajistosta. Noin kolmannes maaperän bakteereista on *proteobacteria*-bakteereja, riippumatta maaperän saastuneisuusasteesta. Proteobakteereista noin kahdeksasosa kuuluu *deltaproteobacteria*-ryhmään, johon kuuluvat esimerkiksi maaperässä yleiset sulfaatinpelkistäjäbakteerit. (Madigan ym. 2012, 708-709.)

Pohjavettä löytyy maaperän ja kallioperän kohtaamisalueilta. Pohjavesiympäristön uskotaan kattavan hyvinkin suuren osan koko Maapallon mikrobibiomassasta. Pohjavettä sisältävästä maanalaisesta ympäristöstä käytetään termiä pinnanalainen elinympäristö. Pinnanalaisessa elinympäristössä maaperän mikrobit ovat suorassa vuorovaikutuksessa pohjaveden sisältämien aineiden kanssa. Vedellä kyllästetyssä maaperässä ainoa tarjolla oleva happi on lähtöisin vedestä. Tämä happi kuluu nopeasti pois aerobisten mikro-organismien kuluttamana, jolloin maaperästä tulee hapeton eli anaerobinen. (Madigan ym. 2012, 708-710.)

Saastuminen esimerkiksi ydinjätteen seurauksena aiheuttaa haittoja maaperälle ja sen eliöille. Saastunutta maaperää voidaan kuitenkin puhdistaa haitallisista yhdisteistä mikrobien avulla. (Azubuike, Chikere & Chijioke 2016, 1.) Radioaktiivisten yhdisteiden liukoisuutta ja myrkyllisyyttä pystytään muuntamaan mikrobien entsyymaattisilla pelkistysreaktioilla. Esimerkiksi radionuklidien pelkistetyt muodot ovat vähemmän vesiliukoisia kuin hapettuneet muodot, jotka liukenevat helposti pohjaveteen. (Prakash, Gabanl, Chandel, Ronen & Singh 2013, 349-350.) Useat sulfaatinpelkistäjät kuten *Desulfovibrio desulfuricans* pystyvät pelkistämään uraania U(VI):sta U(IV):ksi käyttäen elektroninluovuttajanaan vetyä tai laktaattia. Sulfaatin läsnäololla ei ole vaikutusta uraanin pelkistykseen, vaan sulfaatin ja uraanin pelkistys tapahtuu yhtäaikaaisesti. (Lovley & Phillips 1991, 850.)

Mikrobeilla on myös haitallisia vaikutuksia ydinjätteen loppusijoitukseen. Mikrobien haitat kohdistuvat muun muassa ydinjätteen säilytyskapseleihin. Kapselien ulkopinta on valmistettu kuparista, jonka pitäisi estää pohjaveden korrosiivista vaikutusta kapselin sisältöön (Posiva Oy). Esimerkiksi sulfaatinpelkistäjäbakteerien tuottamalla divetyksulfidilla on kuitenkin korrosiivisia vaikutuksia ydinjätettä ympäröivään kuparikapseliin (Bomberg, Nyssönen & Itävaara 2010, tiivistelmä).

2.2 Anaerobit: Sulfaatinpelkistäjäbakteerit

Anaerobit ovat mikrobeja, jotka eivät pysty kasvamaan hapellisissa olosuhteissa. Anaerobit käyttävät aineenvaihdunnassaan elektroninluovuttajinaan hapen sijasta muita yhdisteitä. Yleisin ryhmä anaerobeja ovat fakultatiiviset anaerobit, jotka sieltävät happea ympäristössään, mutta eivät vaadi sitä. Obligaatit anaerobit puolestaan eivät kasva hapellisissa olosuhteissa. (Hentges 1996, kappale 17.) *Deltaproteobacteria*-ryhmän mikrobit, kuten sulfaatinpelkistäjäbakteerit, ovat lähes kaikki obligaatteja anaerobeja (Madigan ym. 2012, 538).

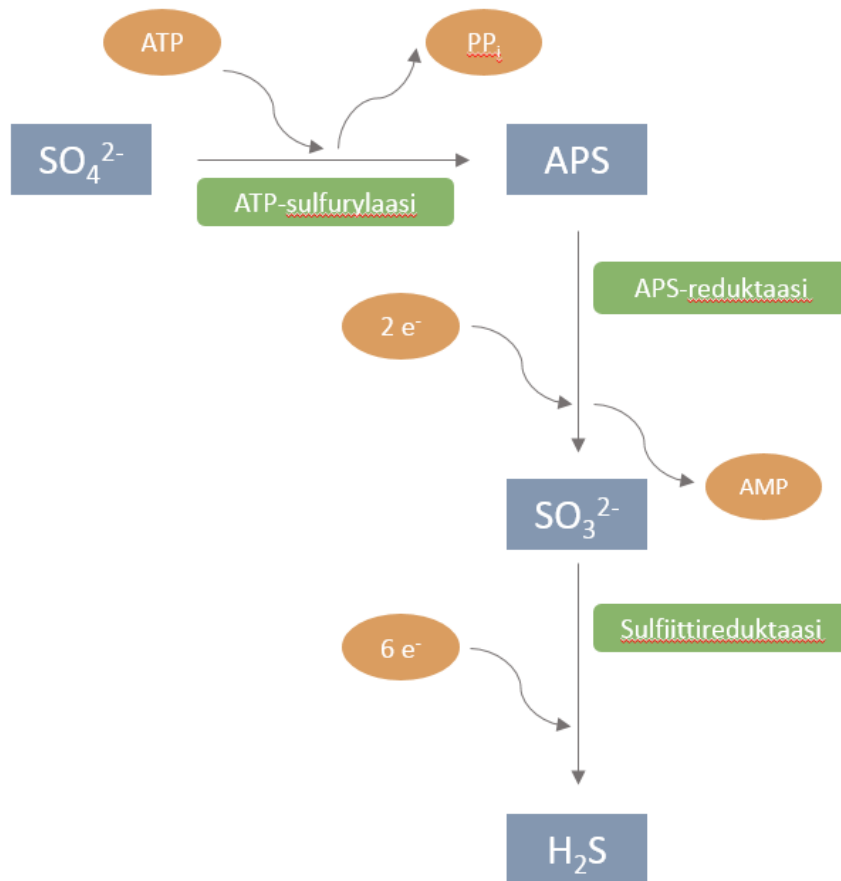
Jotkin anaerobit, kuten sulfaatinpelkistäjät, ovat tyypillisesti kemolitotrofeja, eli ne pelkistävät aineenvaihduntansa seurauksena epäorgaanisia aineita. Kemolitotrofit saavat kaiken tarvitsemansa hiilen hiilidioksidista, ja joten ne selviävät ilman valoa. (Oren 2009, 1.) Esimerkiksi sulfaatinpelkistäjäbakteerit pelkistävät sulfaattia divetyksulfidiksi (Bomberg ym. 2010, 6). Tässä tapauksessa sulfaatti toimii elektronien vastaanottajana

hapen sijasta. Sulfaatti on huomattavasti elektronegatiivisempi yhdiste kuin happi, eikä pelkistyessään vapauta yhtä suurta määrää energiaa. Elektronegatiivisten yhdisteiden hapettaminen onkin tyypillistä obliigaateille anaeroobeille. (Madigan ym. 2012, 411.)

Anaerobeja löytyy esimerkiksi maa- ja vesiympäristöistä, jotka ovat muuttuneet anaerobisiksi muun muassa mikrobien hajotustoiminnan seurauksena. Anaerobisissa pinnanalaisissa ympäristöissä vety pystyy toimimaan elektroninluovuttajana useille mikrobeille, kuten sulfaatinpelkistäjille. Pinnanalaisissa elinympäristöissä vedynlähteitä voivat olla esimerkiksi radioaktiivisten aineiden, kuten toriumin ja uraanin, aiheuttama veden radiolyysi. (Madigan ym. 2012, 538; 710-711.) Radiolyysi tarkoittaa aineen molekyylien hajoamista radioaktiivisen säteilyn seurauksesta (Le Caër 2011, 235). Myös erilaisten mineraalien hapetus vapauttaa vetyä. Syvältä otetuista maaperänäytteistä onkin havaittu, että suurin osa kyseisen elinympäristön mikrobeista on vetyä elektroninluovuttajana käyttäviä sulfaatinpelkistäjäbakteereja. (Madigan ym. 2012, 538; 710-711.)

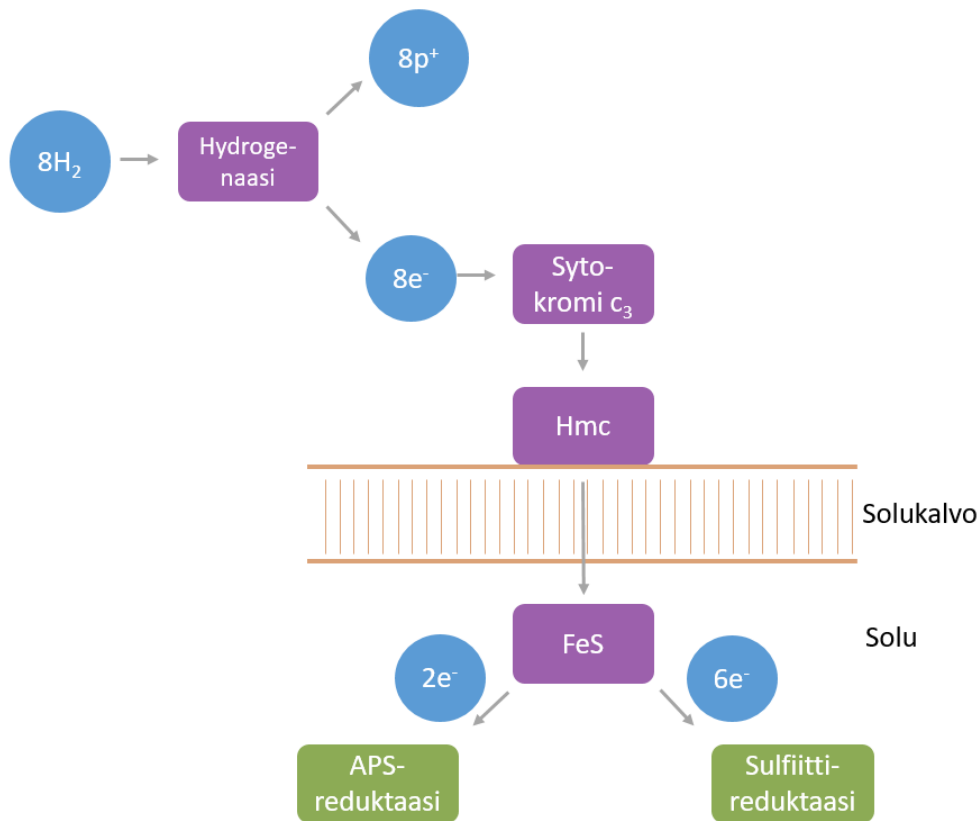
Sulfaatinpelkistys voi olla assimilatiivista tai dissimilatiivista. Monet sulfaatinpelkistäjät, kuten *Desulfovibrio*-ryhmän edustajat pelkistävät sulfaattia divetyysulfidiksi dissimilatiivisesti (Madigan ym. 2012, 538). Dissimilatiivisessa sulfaatinpelkistyksessä divetyysulfidia syntyy paljon ja sitä erittyy vapaana yhdisteenä ympäristöön. Dissimilatiivista sulfaatinpelkistystä on harvinaisempaa kuin assimilatiivisen sulfaatinpelkistys. (Bomberg ym. 2010, 11.)

Sulfaatti ei ole energiatehokas pelkistin, mutta sopiva määrä energiaa ATP:n (adenosiinitrifosfaatti) muodostamiseksi saadaan hapettamalla NADH:ta (nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi) tai FADH:ta (flaviiniadeniinidinukleotidi) tuottavia elektroninluovuttajia, kuten vety ja laktaatti. Pelkistymiseen sulfaatti vaatii kahdeksan elektronia, ja ennen tätä se on aktivoitava. Aktivoituminen tapahtuu yhdistämällä sulfaatti ATP:n fosfaattiosaan ATP-sulfurylaasientsyymin avulla. Näin syntyy adenosiinifosfosulfaattia (APS). Kun kyseessä on dissimilatiivinen sulfaatinpelkistys, APS-reduktaasientsyymi pelkistää APS:n suoraan sulfiitiksi (SO_3^{2-}), jolloin vapautuu adenosiinimonofosfaattia (AMP). Tämän jälkeen sulfiitireduktaasientsyymi pelkistää sulfiitin divetyysulfidiksi. (Madigan ym. 2012, 411). Kuviossa 1 on esitetty sulfaatin eli SO_4^{2-} :n dissimilatiivinen pelkistyminen divetyysulfidiksi eli H_2S :ksi.



KUVIO 1. Sulfaatin dissimilaatiivinen pelkistyminen divetyusulfidiksi (Madigan ym. 2012, muokattu)

Nämä pelkistysreaktiot vaativat elektroneja, jotka ovat peräisin ulkoisista lähteistä sekä mikrobien omasta kataboliasta. Mikäli elektroninluovuttaja on vety, se hapetetaan protoniksi ja elektroni hydrogenaasi-entsyymillä. Sieltä elektronit siirtyvät sytokromi- c_3 :lle, joka toimittaa ne eteenpäin sytokromikompleksiproteiinille eli Hmc:lle. Proteiinisukkulat kuljettavat elektronit solukalvon läpi Hmc:lta solun sisällä sijaitsevalle rautarikkiproteiinille eli FeS:lle, joka jakelee elektronit APS- ja sulfittireduktaaseille. (Madigan ym. 2012, 411.) Kyseinen elektronienkulku on nähtävissä kuviosta 2.



KUVIO 2. Sulfaatin pelkistykseen tarvittavien elektronien kulkureitti

Orgaanisten yhdisteiden hapetuksen seurauksena vetyä vapautuu myös solun sisällä. Näin ky esimerkiksi laktaatin hapetuksessa pyruvaatista asetaatiksi. Vapautuva vety kulkeutuu jälleen hydrogenaasille, minkä jälkeen kiertokulku jatkuu kuten edellä. Kuviosta 1 huomataan, että sulfaatin pelkistäminen divetyysulfidiksi vaatii kahdeksan elektronia. Vastaavasti hydrogenaasilta vapautuneet kahdeksan protonia mahdollistavat kahden ADP:n muuntumisen ATP:ksi. Lisäksi pyruvaatin hapettaminen asetaatiksi tuottaa yhden ATP-molekyylin. Näin ollen sulfaatin pelkistäminen divetyysulfidiksi tuottaa kahdesta kolmeen ATP:ta riippuen käytetystä elektroninluovuttajasta. *Desulfovibrio*-ryhmän bakteerit eivät kykene hapettamaan asetaattia tai muita rasvahappoja hiilidioksidiksi (Madigan ym. 2012, 411 & 538).

2.3 Mikrobin detektointi ja analysointi

Mikrobin määrää ja aktiivisuutta voidaan analysoida monella tapaa, kuten ATP:n ja koentsyymi- F_{420} :n määrien mittauksella. Myös mikrobibiomassojen ja populaatiokokojen mittauksia on mahdollista suorittaa. Nämä menetelmät kuluttavat kuitenkin paljon aikaa

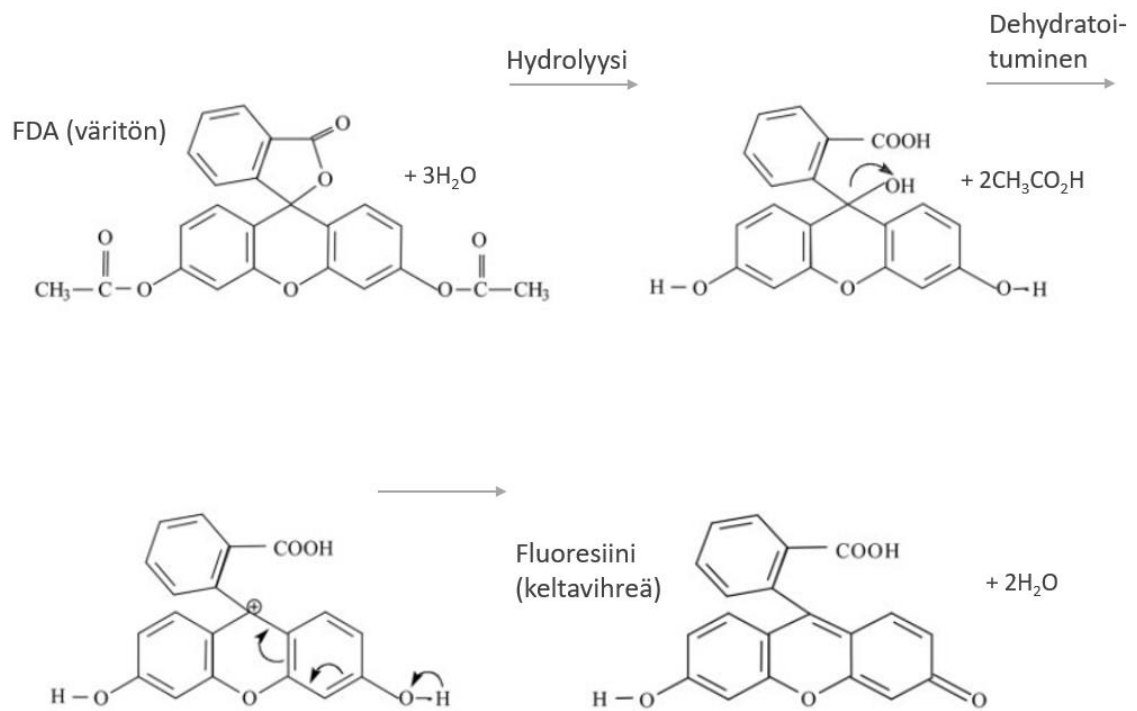
ja resursseja. Fluoreseiinidiasetaatti- eli FDA-menetelmä on edellä mainittuja nopeampi ja helpompi tapa analysoida mikrobiaktiivisuutta. (Jiang, Huang, Lu, Liu & Yan 2016, 424.)

FDA-menetelmä on erinomainen tapa arvioida maaperän mikrobien kokonaisaktiivisuutta, sillä suurimmalla osalla maaperän bakteereista on entsyymejä, joita vaaditaan FDA-menetelmän toimimiseksi (Adam & Duncan 2000, 944). Sulfaatinpelkistäjäbakteerit ovat yleisiä maaperän hapettomissa kerroksissa (Madigan ym. 2012, 708-709), joten FDA-menetelmän tulisin toimia myös sulfaatinpelkistäjäbakteerien aktiivisuuden selvittämiseen.

FDA:n hydrolysoitumistuotetta fluoreseiinia voidaan detektoida spektrofotometrisesti UV-VIS-spektrometrillä. (Green, Stott & Diack 2004, 693-694.) Jotta fluoreseiinia syntyisi, täytyy näytteissä olevan mikrobien olla aktiivisia. Sulfaatinpelkistäjät pelkistävät sulfaattia rikkivedyksi (Madigan ym. 2012, 411.), joten sulfaattimääriä mittaamalla pystytään seuraamaan mikrobikasvatuksen sulfaatinpelkistäjien aktiivisuuden kasvua. Ionikromatografi sopii hyvin mikrobikasvatusten sulfaattipitoisuuksien analysointiin (Soto, Ledo, Calderón, Marín & Galarraga 1998, 45).

2.3.1 Fluoreseiinidiasetaatti- eli FDA-menetelmä

FDA-menetelmässä FDA hydrolysoidaan fluoreseiiniksi. FDA on yhdiste, jota hyvin monet solukalvon entsyymit pystyvät hydrolysoimaan. (Jiang ym. 2016, 424.) Tällaisia entsyymeitä ovat mikrobien vapaat entsyymit eli eksoentsyymit, sekä solukalvon entsyymit. Tyypiltään nämä entsyymit ovat proteaaseja ja lipaaseja, jotka lukeutuvat epäspesifeihin esteraaseihin. Kyseiset entsyymit ovat myös erittäin yleisiä kudosten hajottajaentsyymejä. Koska yli 90 % maaperän energiakierrosta kulkee bakteerihajottajien kautta, esiintyy näitä entsyymejä suurella osalla maaperän bakteereista. (Schnürer & Rosswall 1982, 1256.) Fluoreseiinidiasetaatin hydrolysaatio fluoreseiiniksi löytyy kuviosta 3.



KUVIO 3. FDA:n hydrolysaatio fluoreseiiniksi (Adam & Duncan 2000, muokattu)

FDA:ssa fluoreseiinimolekyylisiin on liittynyt kaksi asetaattiradikaalia. FDA:sta saadaan fluoreseiinia hydrolyysi- ja dehydraatioreaktioiden kautta. Hydrolyysissä FDA-molekyylisiin liittyy kolme vesimolekyyliä ja siitä irtoaa kaksi molekyyliä etaanihappoa. Dehydraation kautta jäljelle jää fluoreseiinimolekyyli, joka fluoresoi vihertävänä aallonpituudella 490 nm. Fluoreseiinin konsentraatio voidaan mitata spektrofotometrisesti (Adam & Duncan 2000, 943.)

2.3.2 Ultravioletti- ja näkyvän valon spektrofotometria eli UV/VIS-spektrofotometria

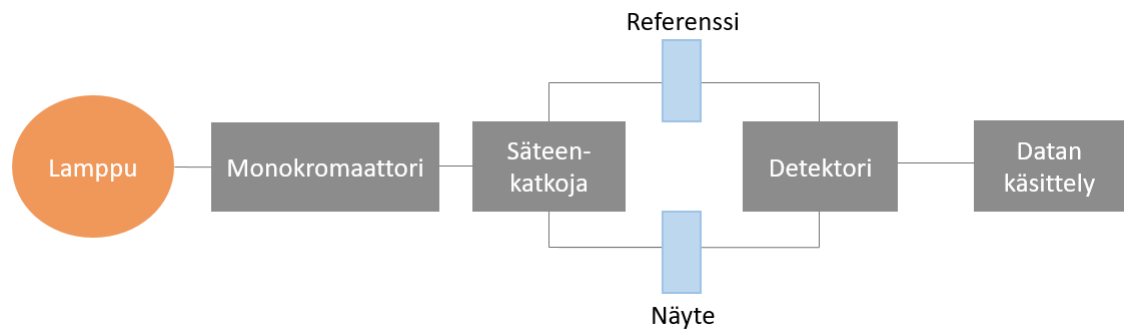
Kun mitataan valon avulla kemikaalien pitoisuuksia, puhutaan spektrofotometriasta (Harris 2010, 394). Jokainen yhdiste absorboi valoa (LibreTexts™ 2015). Absorptiosta vastaavat kromoforit, jotka absorboivat valoa tietyllä aallonpituudella (Harris 2010, 397). Spektrofotometriassa voidaan analysoida kvalitatiivisesti, mitä aallonpituutta näyte absorboi, ja näin päätellä absorboiva yhdiste. On myös mahdollista tehdä kvantitatiivisia analyysejä mittaamalla näytteen läpi kulkevan valonsäteen intensiteetti, ja siten määrittää kyseisen näytteen konsentraatio. (Ocean Optics Inc. 1989-2017.) UV/VIS-

spektrofotometrillä voidaan mitata aallonpituuksia näkyvän- ja ultraviolettivalon aallonpituuksilta välillä 185-700 nm (LibreTexts™ 2015).

Spektrofotometria perustuu myös valon hiukkasluonteeseen, jolla voidaan selittää fotonin absorboituminen aineeseen. Absorptiossa fotonit virittävät kohdemateriaalissa elektronin korkeammalle viritystilalle alkuperäiseen verrattuna. Viritystilasta purkautuessa elektroni palautuu takaisin alemmalle viritystilalle ja emittoi fotonin. Tämä tapahtumaa kutsutaan emissioksi. (Harris 2010, 395.)

Lambert-Beerin laki mittaa valon absorboitumista aineeseen. Absorptio riippuu aineen konsentraatiosta, näytekerroksen paksuudesta ja kullekin aineelle tyypillisestä molaarisesta kaasuvakiosta. Absorbanssi on suoraan verrannollinen aineen konsentraatioon. Transmittanssi puolestaan kertoo aineeseen tulleen ja sen läpäisseen aallonpituuksien suhteen. Absorbanssi on kääntäen logaritmisesti verrannollinen transmittanssiin (Harris 2010, 396).

Deuteriumlamppu toimii UV-säteilyn lähteenä, ja volframi-, tai volframi-halogenilamppu näkyvän valon lähteenä (Harris 2010, 447). Lampun valo kulkeutuu monokromaattorille, jolla valosta erotellaan haluttu aallonpituus (Jaarinen & Niiranen 2008, 57). Monokromaattoriin kuuluu sisäänmenorako, peilejä, hila ja ulostulorako. Hila hajottaa lampun valonsäteen eri aallonpituuksiin. Tätä tapahtumaa kutsutaan valon diffraktioksi. Hila muodostaa useimmiten useamman kopion saman aallonpituuden valonsäteestä. Kaksisädespektrofotometrissa hilaa ja sitä seuraavia peilejä voidaan taivutella siten, että vain haluttu valonsäde saadaan ohjattua näytteeseen, ja toisien kertalukujen kopiot samasta aallonpituudesta saadaan karsittua pois. (Harris 2010, 450.)
Kuviossa 4 nähdään tyypillisen kaksisädespektrofotometrin rakenne.



KUVIO 4. Esimerkkikuva kaksisädespektrofotometrin rakenteesta (LibreTexts 2016, muokattu)

Näytteen absorbanssin selvittämiseksi tarvitaan tietoon näyteastian eli kyvetin aiheuttaman tausta-absorbanssin osuus. Tausta aiheutuu matriisin absorptiosta ja kyvetistä lähteivistä heijastuksista. Kaksisädespektrofotometreissa säteenhalkoja hajottaa säteilyn kahteen osaan, joista toinen ohjataan näyte- ja toinen referenssikyvettiin läpi useita kertoja minuutissa. Näin saadaan selville sekä taustan, että kokonaisabsorbanssin suuruus, joiden avulla laite laskee näytteeseen absorboituneen säteilyn määrän. (Harris 2010, 446.)

Detektori reagoi siihen osuviin fotoneihin tuottaen sähköisen signaalin. Yksi yleinen detektorityyppi on fotodiodidetektori. Fotodiodidetektorit tunnistavat ja tallentavat siihen osuneen säteilyn aallonpituusalueen vain sekunnin murto-osassa. Tässä detektorissa *n*- ja *p*-tyypin silikonista valmistetut diodirivit luovat varauksen, joka purkautuu osittain valonsäteen osuessa detektoriin. Valonsäteen intensiteetti analysoidaan sen perusteella, kuinka paljon virtaa tarvitaan, että diodirividetektori saadaan uudelleenvarattua entiseen tilaansa. (Harris 2010, 457.)

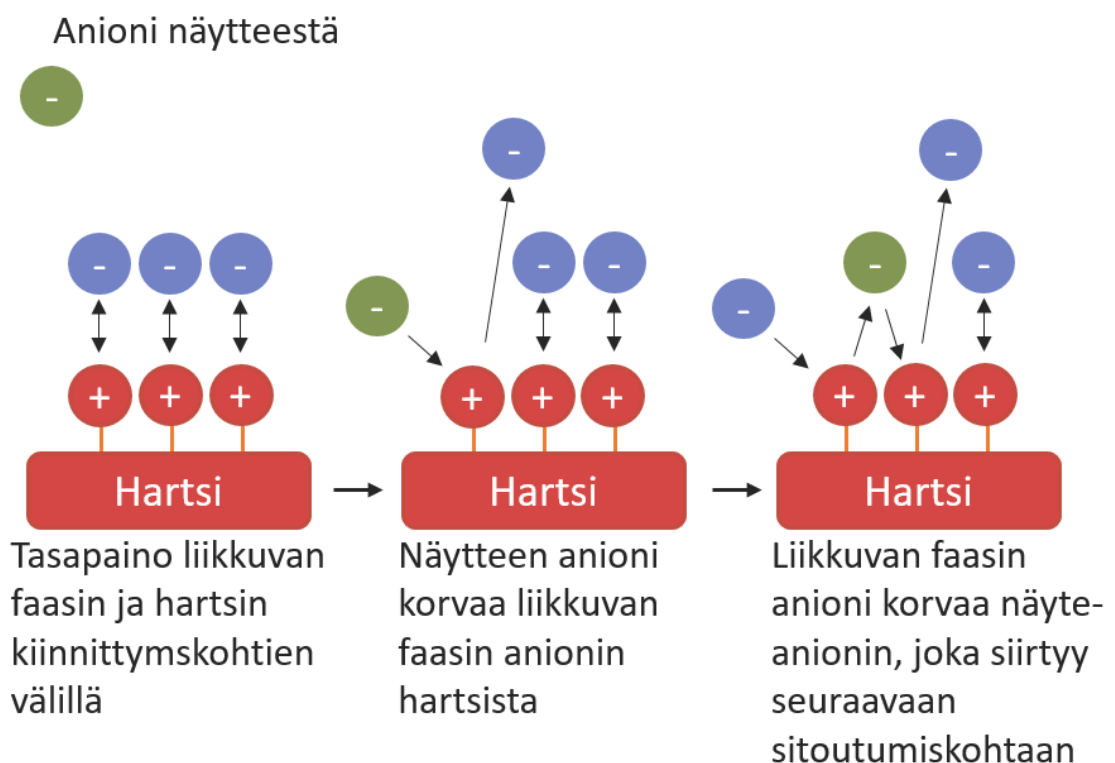
2.3.3 Ionikromatografia (IC)

Kromatografia perustuu näytteen komponenttien erottamiseen toisistaan liikkuvan- ja stationäärifaasin avulla. Faasit voivat olla kiinteitä, nestemäisiä tai kaasuja kromatografian lajista riippuen. Faasit ovat kromatografiakolonnissa tai -levyllä, ja ne

ovat jatkuvassa vuorovaikutuksessa keskenään. Näytteiden partitio- ja adsorptiotaipumukset vaikuttavat niiden erottumiseen. (Jaarinen & Niiranen 2008, 141.)

Ionikromatografiaa käytetään yleisesti vesianalyyseihin. Sen avulla voidaan määrittää näytteistä useita kationeja ja anioneja. Ionikromatografilla yletään miljardisosan eli ppb:n tarkkuuteen. (Bruckner 2017.) Perusteena ionikromatografialle on nestekromatografian ioninvaihtometodi. Detektori mittaa ionien määrää sähköjohtavuuden vaihteluiden perusteella. (Materials Evaluation and Engineering 2014.)

Ionikromatografiassa ionivuorovaikutukset stationäärifaasin ja näytekomponenttien välillä ovat voima, joka erottaa näytteen komponentit toisistaan. Varatut hiukkaset tarttuvat vastakkaisesti varattuun stationäärifaasiin. (Jaarinen & Niiranen 2008, 141-142.) Stationäärifaasi on ioninvaihtohartsia, joka sijaitsee kolonnissa. Kolonni on paineistettu, ja näyte kulkee kolonnin läpi eluentin mukana. (Bruckner 2017.) Kuviossa 5 näkyy ionien sitoutuminen ja vaihtuminen ioninvaihtohartsiin.



KUVIO 5. Ionien sitoutuminen ioninvaihtohartsiin (Shimadzu 2017, muokattu)

Stationäärifaasissa on rajattu määrä sitoutumispaikkoja ioneille. Ne ionit, joilla on korkea affiniteetti kolonnin sitoutumispaikkoja kohtaan, viettävät kauemmin aikaa kolonnissa kuin ionit, joiden affiniteetti on pienempi. (Materials Evaluation and Engineering 2014.) Myös ionien liukoisuus liikkuvaan faasiin eli eluenttiin vaikuttaa ionien erottumiseen (Jaarinen & Niiranen 2008, 141-142). Ionien erottumiseen ja kolonnista ulos kulkeutumiseen kulunutta aikaa kutsutaan retentioajaksi, jonka perusteella ionit tunnustetaan toisistaan. (Bruckner 2017.)

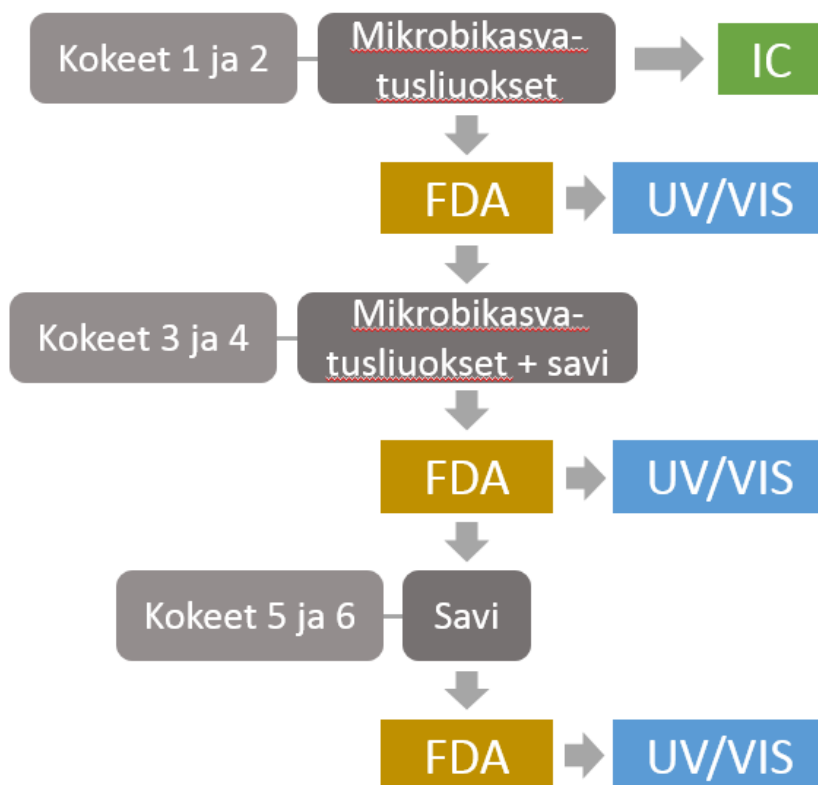
Detektori mittaa eluentin sähkönjohtavuutta määrittääkseen eluoituneiden ionien määrää ajan funktiona. Datasta muodostetaan kromatogrammi, jossa tulokset ovat yleensä esitetty kromatogrammipiikkeinä. Kullakin ionilla on menetelmälle tyypillinen retentioaika, eli kyseisen ionin piikki esiintyy kromatogrammissa samalla menetelmällä aina samalla aikavälillä. Piikin koko on funktio sen ionin konsentraatiolle, jota piikki edustaa. (Materials Evaluation and Engineering 2014.)

3 MÄÄRITYSMENETELMÄT JA TYÖN SUORITUS

3.1 Opinnäytetyön kulku tiivistettynä

Laboratoriossa tehtävän osuuden tavoite oli kokeilla Adamin ja Duncanin (2000) kehittämän FDA-menetelmän toimivuutta kuiville ja jauhetuille bentoniittisavinäytteille. Työ suoritettiin kolmessa osassa, joista ensimmäisessä menetelmää testattiin itse valmistetuilla anaerobisilla mikrobikasvatusliuoksilla, jotka sisälsivät esimerkiksi sulfaatinpelkistäjäbakteereita. Toisessa vaiheessa kokeiltiin savinäytteiden lisäyksen tuomaa vaikutusta kasvatusliuosten mikrobien tuottamaan fluoreseiinikonsentraatioon, ja kolmannessa kokeiltiin menetelmän toimivuutta pelkille savinäytteille.

Ensimmäisessä ja toisessa osassa käytetyt mikrobikasvatusliuokset valmistettiin Postgate-mediaan. Kasvatusliuosten sulfaatinpelkistäjien aktiivisuutta seurattiin mittaamalla sulfaatin kulutusta ionikromatografilla. Toisessa osassa savena käytettiin natriumbentoniittia, ja kolmannessa osassa sekä natrium- että kalsiumbentoniittia. Alla olevassa kuviossa 6 on selventävä kaavio työn kulusta.

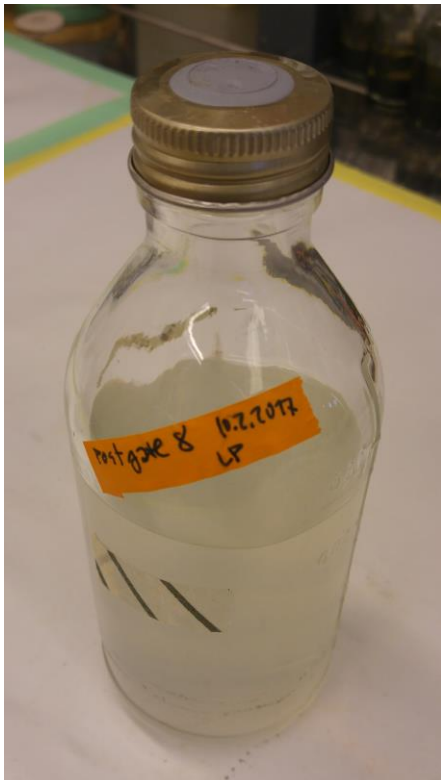


KUVIO 6. Opinnäytetyön kulku

3.2 Vertailumikrobikanta

3.2.1 Postgate-kasvatukset

FDA-menetelmän toimivuuden testausta varten valmistettiin vertailumikrobikanta muun muassa sulfaatinpelkistäjäbakteereista anaerobiviljelmänä. Viljelmän mikrobit olivat peräisin jo olemassa olevista anaerobikasvatuksista, joissa oli todettu kasvavan sulfaatinpelkistäjäbakteereja. Kasvatus suoritettiin 500 ml:n infuusiopulloissa, jotka oltiin tehty anaerobiseksi keittämällä ja työttämällä. Pullot oli suljettu kumitulpilla ja metallikorkeilla. Pulloja inkuboitiin huoneenlämmössä pyörivässä ravistelijassa noin 90 rpm:n nopeudella. Kuvassa 1 näkyy yksi kasvatuspulloista.



KUVA 1. Mikrobikasvatuspullo P8 Postgateen valmistettuna (Kuva: Linda Parkkinen 2017)

Kasvatusliuksena toimi muokattu Postgate-media, jonka komponentit ja komponenttien määrät ovat nähtävissä taulukosta 1. Ensimmäisissä mikrobikasvatusliuksissa valmiiseen Postgate-liuospulloon ympättiin eli lisättiin vanhemmista sulfaatinpelkistäjäkasvatuksista 40 ml:aa mikrobiliuosta 360 ml:aa kasvatusmediaa kohden. Mikrobikasvatusliuosten kokonaistilavuus oli siis 400 ml.

TAULUKKO 1. Postgate-kasvatusmedian komponentit ja valmistus (UHP-lyhenne tulee sanoista Ultra High Purity, eli veden puhtaus vastaa tislattua vettä)

Reagenssi/liuos	Määrä / 1 litra
K ₂ HPO ₄	0,5 g
NH ₄ Cl	1 g
Na ₂ SO ₄	1 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,1 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	2 g
Na-laktaatti	2 g
Hiivauute	1 g
Na-resazuriini, 0,1 %	0,5 ml
UHP-vesi	980 ml
Kiehutus, hapen poisto	
FeSO ₄ x 7H ₂ O, 50 g/l	10 ml
Na-tioglykolaatti 10 g/l + askorbiinihappo 10 g/l	10 ml
pH 7,8:aan, hapen poisto, sterilointi	

Postgate-kasvatuksia tehtiin yhteensä kahdeksan pullollista, joista kaksi oli aina rinnakkaiskasvatuksia ja samana päivänä aloitettuja. Kun edellinen Postgate-kasvatuspari alkoi vanhentua, valmistettiin uusi pari Postgate-liuospulloja ympäällä 40 ml mikrobikasvatusliuosta edellisistä Postgate-pulloista. Eri kasvatuspullot oli nimetty koodeilla P1-P8, joista P1 ja P2 olivat aikajärjestyksessä vanhimpia P7:n ja P8:n ollessa uusimpia. Mikrobikasvatuspullojen koodaukset ja niiden selvennykset löytyvät taulukosta 2.

TAULUKKO 2. Mikrobikasvatusliuosten koodaus

Koodi	Valmistuspäivä	40 ml ympätty liuoksesta
P1	22.12.2016	Vanha sulfaatinpelkistäjäkanta
P2	22.12.2016	Vanha sulfaatinpelkistäjäkanta
P3	9.1.2017	P1
P4	9.1.2017	P2
P5	27.1.2017	P3
P6	27.1.2017	P4
P7	14.2.2017	P5
P8	14.2.2017	P6

3.2.2 Sulfaatin kulutuksen mittaaminen IC:llä

Mikrobikasvatuksilla suoritettujen FDA-menetelmän testaukset tulisi suorittaa mikrobien ollessa mahdollisimman aktiivisia, jolloin myös niiden FDA:n hydrolysointi olisi mahdollisimman tehokasta. Postgate-mikrobikasvatusliuoksista mitattiin sulfaattipitoisuutta ionikromatografialla sulfaatinpelkistäjien aktiivisuuden selvittämiseksi. Aktiivisessa kasvunvaiheessa sulfaatinpelkistäjät kuluttivat sulfaattia nopeasti, kun taas kasvun hiipussa sulfaatin määrä liuoksessa tasaantui.

Kasvatuspulloista kerättiin näytteet steriilisti ja anaerobisesti neuloilla, ruiskuilla ja suodattimilla. Ruiskut ja neulat tyytettiin ennen näytteen keräystä, ja näyte otettiin työntämällä neula kasvatuspullon kumitulpan läpi. Pullosta otettu liuostilavuus korvattiin steriilillä typpikaasulla. Kaasun sterilointi tapahtui selluloosa-asettaattisteriilisuodattimen avulla, jonka huokoskoko oli 0,20 µm. Näytteet kerättiin suodattamalla ne ruiskusuodattimen läpi kahden ml:n Eppendorf-putkiin. Nämä suodattimet eivät olleet steriilejä, ja niiden huokoskoko oli 0,4 µm. Näytteitä säilytettiin jääkaapissa viidessä celsiusasteessa analyysipäivään saakka, kuitenkin korkeintaan viikon.

Ennen ionikromatografianalyysia näytteet käsiteltiin laimentamalla ne UHP-vedellä. Laimennus tehtiin siten, että minkään anionin määrä näytteessä ei saisi ylittää konsentraatiota 100 mg/l. Kyseisiin näytteisiin sopiva laimennuskerroin oli 20. Laimennetut näytteet siirrettiin ionikromatografian omiin näyteputkiin, ja näytteistä tehtiin anionianalyysi. Analyysimenetelmän parametrit ovat esillä taulukossa 3.

TAULUKKO 3. Ionikromatografissa käytetyn ajo-ohjelman parametrit

Analyysiaika	20 min
Eluentti	1,9 mM CO ₃ ²⁻ , 1,7 mM HCO ₃ ³⁻
Pumpun virtaus	1 ml/min
Pumpun paine	500-2500 psi
Näytteensyöttäjän syöttönopeus	1,5 ml/min
Kolonnin lämpötila	30 °C
Supressorin virtaus	1 ml/min

Sulfaattipitoisuuksia seurattiin, kunnes kunkin kasvatuspullon sulfaattipitoisuudet olivat tasaantuneet. Käytössä ollut ionikromatografi oli Thermon Dionex ICS-1600. Kromatografiin oli liitetty automaattinen näytteensyöttäjä ja sähkönjohtavuusdetektor.

Ionikromatografissa oli Ionpac AS4A-SC Analytical -kolonni ja Dionex ASRS-300 2mm -supressori. Kuvassa 2 on esitetty kyseinen ionikromatografi.



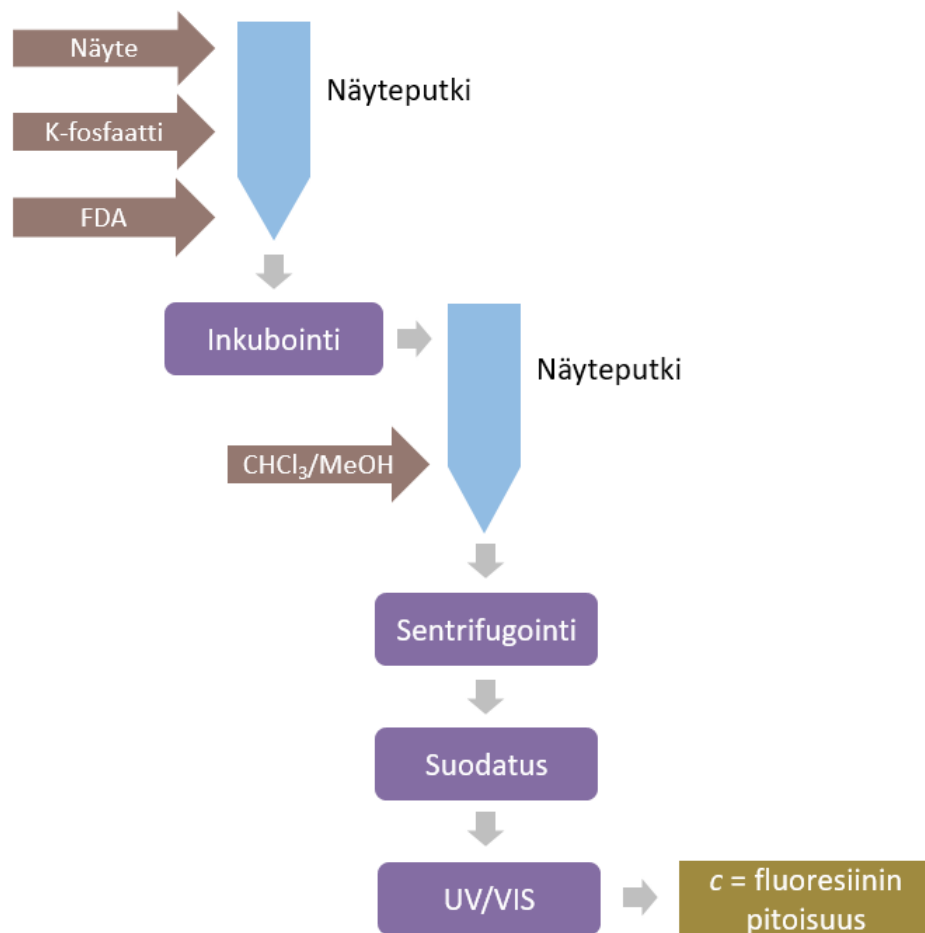
KUVA 2. Sulfaattipitoisuuksien seurannassa käytetty ionikromatografi (Kuva: Linda Parkkinen 2017)

3.3 FDA-menetelmän testaus

3.3.1 Menetelmä

Tässä työssä käytetyssä FDA-menetelmässä oli tarkoitus laimentaa 2 g näytettä 15 ml:lla kaliumfosfaattipuskuriliuosta, ja lisätä joukkoon 200 µl FDA-substraattiliuosta. Tämän jälkeen näytteitä inkuboitiin ravistelevassa inkubaattorissa 30 °C:ssa 20 minuuttia pyörimisnopeudella 100 rpm. Inkuboinnin jälkeen reaktiot tuli pysäyttää 15 ml:lla

kloroformi/metanoliliuosta, ja sentrifugoida nopeudella 2000 rpm kolme minuuttia. Ylin faasi suodatettiin 0,45 µm:n huokoskoon ruiskusuodattimien läpi UV/VIS-kyvetteihin, ja faasin sisältämän fluoreseiinin absorbanssi mitattiin UV/VIS-spektrofotometrillä. Mittausaallonpituutena oli 490 nm. Kyseisen version FDA-menetelmästä ovat kehittäneet Gillian Adam ja Harry Duncan vuonna 2000. Yksinkertaistettu kuvaus menetelmän kulusta löytyy kuvista 7.



KUVIO 7. FDA-menetelmän kulku

Menetelmää testattiin sekä aerobisissa että anaerobisissa oloissa, mutta aerobisten olosuhteiden ei todettu vaikuttavan merkittävästi tuloksiin. Täten osioissa 3.2.2-3.2.4 tehdyt kokeet 1-6 on suoritettu aerobisissa olosuhteissa. Menetelmään vaadittavat liuokset ja niiden tiedot on esitetty taulukossa 4. Kalibrointiliuokset valmistettiin fluoreseiiniliuoksesta, ja ne käsiteltiin kuten näytteet.

TAULUKKO 4. Adamin ja Duncanin (2000) FDA-menetelmään tarvittavat liuokset

Liuos	Valmistus
60 mM K-fosfaatti, pH 7,6	8,7 g K ₂ HPO ₄ & 1,3 g KH ₂ PO ₄ / 1000 ml UHP
CHCl ₃ /MeOH 2:1	666 ml CHCl ₃ + 333 ml MeOH
FDA 1000 µg/ml	0,1 g 3'6'-diasetyylifluoreseiniä / 100 ml asetonia
Fluoreseini 2000 µg/ml	0,2265 g fluoreseininatriumsuolaa / 100 ml K-fosfaatti
Fluoreseini 20 µg/ml	1 ml fluoreseini 2000 mg/l / 100 ml K-fosfaatti

FDA-menetelmää käytettiin pääosin hieman muokattuna. Muokkauksen kohteeksi joutuivat kalibrointi, sentrifugoinnin parametrit, inkubointiaika sekä FDA-substraatin määrä. Kalibrointisuora valmistettiin liuksista, joiden fluoreseinipitoisuudet osuivat välille 0,2-2,0 µg/ml menetelmässä esitetyn 0-5 µg/ml:n sijasta, koska oli tiedossa, että tässä opinnäytetyössä käytettävien savinäytteiden mikrobipitoisuudet ovat alhaisia. Lisäksi yhteen kalibroinneista ei lisätty kloroformi/metanolia. Sentrifugin kierrosnopeutta jouduttiin nostamaan, sillä kiintoaine painui kunnolla sentrifugiputkien pohjalle vasta nopeudella 5000 rpm 10 minuutissa. Myös inkubointiaikaa kokeiltiin pidentää puolella. FDA-substraatin sekä kaliumfosfaattipuskurin määriä muokattiin voimakkaamman fluoreseinivasteen aikaansaamiseksi. Kloroformi-metanolin määrää muutettiin mikäli muiden liuosten tilavuutta muutettiin, sillä kloroformi-metanolin tilavuus tuli olla sama kuin analyysissä käytettyjen muiden liuosten yhteenlaskettu tilavuus.

Tässä työssä käytetty sentrifugi oli malliltaan Sigma 4K15, ja sekoittava inkubaattori malliltaan New Brunswick Scientific C24. Kyseiset laitteet on esitetty kuvassa 3. Savikokeissa käytetyt savet olivat natrium- ja kalsiumbentoniittia, kummatkin kuivattuja siten, että niiden vesipitoisuus oli noin 10 %. Na-bentoniitti oli valmiiksi hienonnettu ja sen raekoko oli noin 0,1-1 millimetriä. Ca-bentoniitti oli puolestaan rakeisempaa ja raekooltaan noin 1-4 millimetriä. Savet säilytettiin viileässä ja pimeässä.



KUVA 3. Tässä opinnäytetyössä käytetyt sentrifugi ja inkubaattori (Kuvat: Linda Parkkinen 2017)

3.3.2 Testaus mikrobikasvatusliuksilla: kokeet 1 ja 2

Tarkoitus oli tutkia FDA-menetelmän toimivuutta osiossa 3.1 kuvatuilla mikrobikasvatusliuksilla. Kokeita varten valmistettiin kalibrointisuora fluoreseiinista. Käyrän 1 kalibrointiliukset valmistettiin sentrifugiputkiiin fluoreseiiniliuksesta, jonka konsentraatio oli $20 \mu\text{g/ml}$. Tämä liuos oli valmistettu $1000 \mu\text{g/ml}$ -fluoreseiiniliuksesta. Standardiliukset käsiteltiin kuten osiossa 3.2.1 on kuvattu. Käyrä 2 valmistettiin samalla tavalla kuin käyrä 1, mutta tällä kertaa tehtiin kloroformi/metanolilisäykset. Fluoreseiinin absorbanssit mitattiin UV/VIS-spektrofotometrillä aallonpituudella 490 nm .

Kokeessa 1 kaksi grammaa kiinteää näytettä korvattiin kahdella millilitralla mikrobikasvatusliuosta, jonka mikrobit olivat aktiivisen kasvun vaiheessa. Kasvatusliuos sekoitettiin 50 ml:n sentrifugiputkissa 15 ml:aan kaliumfosfaattipuskuria ja $0,2 \text{ ml:aan}$ FDA-liuosta. Putkia inkuboitiin 20 minuuttia $30 \text{ }^\circ\text{C:ssa}$ nopeudella 100 rpm , minkä jälkeen niihin lisättiin 15 ml kloroformi/metanolia. Putkia sentrifugoitiin 10 minuuttia nopeudella 5000 rpm , fluoreseiinifaasi suodatettiin $0,45 \mu\text{m}$ huokoskoon ruiskusuodattimien läpi kyvetteihin, ja absorbanssit mitattiin UV/VIS-spektrofotometrillä aallonpituudella 490 nm .

Kokeessa 2 20 millilitrasta mikrobikasvatusliuosta sentrifugoitiin mikrobit pelletiksi nopeudella 5000 rpm 15 minuutin ajan. Nestefaasi pipetoitiin pois, ja jäljelle jäänyttä pellettä käytettiin korvaamaan ohjeessa ollut kaksi grammaa kiinteää näytettä. Pelletin päälle lisättiin 15 ml kaliumfosfaattipuskuria ja 0,2 ml FDA:ta. Koe 2 suoritettiin muilta osin samoin kuin koe 1.

3.3.3 Testaus mikrobikasvatusliuksilla ja savella: kokeet 3 ja 4

Näissä kokeissa oli tarkoitus analysoida, onko saven lisäyksellä vaikutusta mikrobien tuottamaan fluoreseiinipitoisuuteen. Kokeita varten valmistettiin uusi kalibrointisuora nimeltään käyrä 3. Kalibrointia varten näyteputkiin punnittiin kaksi grammaa Na-bentoniittisavea, minkä jälkeen saven joukkoon valmistettiin 20 µg/ml-fluoreseiiniliuoksesta kalibrointiliuokset. Liuokset valmistettiin kuten käyrissä 1 ja 2. Kustakin standardipitoisuudesta valmistettiin kolme rinnakkaisnäytettä. Standardit käsiteltiin samoin kuin näytteet, ja absorbanssit mitattiin UV/VIS-spektrofotometrillä aallonpituudella 490 nm.

Kokeen 3 tarkoituksena oli selvittää saven vaikutus mikrobikasvatusliuosten antamaan fluoreseiinivasteeseen. Mikrobikasvatusliuoksia P5 ja P6 pelletöitiin osion 3.3.2 mukaisesti. Pelletit liuotettiin 15 ml:aan K-fosfaattipuskuria, ja joukkoon punnittiin kaksi grammaa Na-bentoniittisavea. Mukaan lisättiin myös 0,2 ml FDA-liuosta, mikä jälkeen näyteputkia inkuboitii 20 min 30 °C:ssa nopeudella 100 rpm. Inkuboinnin jälkeen hydrolyysireaktiot pysäytettiin 15 ml:lla kloroformi/metanolia, ja näyteputkia sentrifugoitiin nopeudella 5000 rpm 10 minuuttia. Fluoreseiinin absorbanssit mitattiin UV/VIS-spektrofotometrillä aallonpituudella 490 nm.

Kokeessa 4 oli tarkoitus selvittää, adsorboiko savi mahdollisesti FDA:ta tai mikrobeja. Saven todettiin adsorboivan jotakin reagenssia kokeen 3 tulosten perusteella. Aluksi tyhjät sentrifugiputket punnittiin, jotta saatiin selville näyteliuosten massa. Taulukosta 4 löytyy eri sentrifugiputkiin lisättävien reagenssien määrät. Reagenssilisäysten jälkeen putkia inkuboitii 20 minuuttia 30 °C:ssa nopeudella 100 rpm ja kiintoaine sentrifugoitiin alas 10 minuutissa nopeudella 5000 rpm. Savellisista sentrifugiputkista nestefaasi pipetoitiin uusiin putkiin, ja savi hylättiin. Tämän jälkeen jokaiseen näytteeseen lisättiin

5 ml mikrobipellettiliuosta 10 ml:aa fosfaattipuskuria ja 0,2 ml:aa FDA:ta kohden. Taulukosta 4 on myös nähtävissä sentrifugoinnin jälkeen näytteisiin lisättyjen mikrobipellettiliuosten määrät. Näyteputkia inkuboitiiin uudestaan samoilla parametreilla, ja kloroformi/metanolia lisättiin jokaiseen näytteeseen sama määrä kuin niiden yhteenlaskettu muiden liuosten määrä. Taulukosta 4 on nähtävillä myös nämä tilavuudet. Lopuksi näytteitä sentrifugoitiin vielä 10 minuutin ajan nopeudella 5000 rpm ja fluoreseiniifaasit suodatettiin huokoskooltaan 0,45 µm:n ruiskusuodattimella. Näytteiden absorbanssit mitattiin UV/VIS-spektrofotometrillä aallonpituudella 490 nm.

TAULUKKO 5. Kokeen 4 reagenssi- ja liuoslisäykset

Näyte	1	2	3	4
V(K-fosfaatti) (ml)	10	10	10	10
V(FDA) (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2
m(savi) (g)	0	0	2	2
	Inkubointi, sentrifugointi			
V(pellettiliuos) (ml)	5	5	3,15	3,46
	Inkubointi			
V(C ₃ H ₇ OH/MeOH) (ml)	15	15	9,45	10,38
	Sentrifugointi			

3.3.4 Testaus pelkällä savella: kokeet 5 ja 6

Näissä kokeissa FDA-menetelmää kokeiltiin siten, että näytteinä oli pelkästään savea. Tarkoitus oli analysoida, miten kyseinen FDA-menetelmä sopii pelkille savinäytteille. Tulosten laskentaan käytettiin kalibrointia käyrä 3. Menetelmää kokeiltiin Na-bentoniittisaven lisäksi myös Ca-bentoniitilla suurempien fluoreseiniivasteiden aikaansaamiseksi.

Kokeessa 5 näytteenä oli kaksi grammaa Na-bentoniittisavea. Savi punnittiin näyteputkiin ja mukaan lisättiin 15 ml kaliumfosfaattipuskuria sekä 0,2 ml FDA-liuosta. Näyteputkia inkuboitiiin 20 min 30 °C:ssa nopeudella 100 rpm, ja FDA:n hydrolyysireaktiot pysäytettiin 15 ml:lla kloroformi/metanolia. Pysäytyksen jälkeen putkia sentrifugoitiin 10 min nopeudella 5000 rpm, minkä jälkeen fluoreseiniifaasi suodatettiin huokoskooltaan 0,45 µm:n olevan ruiskusuodattimen läpi. Absorbanssit

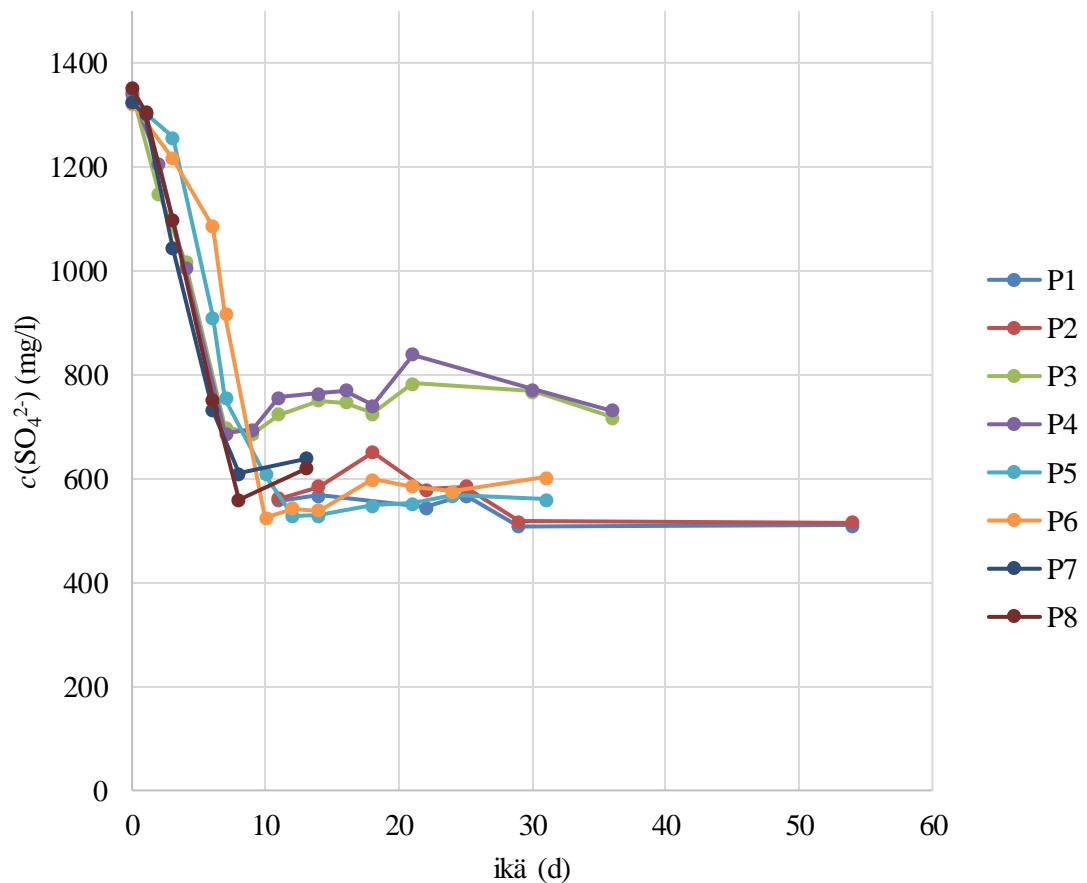
analysoitiin suodatetusta fluoreseiini faasista UV/VIS-spektrofotometrillä aallonpituudella 490 nm.

Kokeessa 6 tutkittiin FDA-menetelmän parametrien muokkauksen vaikutusta saven fluoreseiinipitoisuuksiin. Näytteenä oli edelleen kaksi grammaa savea, mutta tällä kertaa otettiin analyysiin mukaan myös Ca-bentoniittisavi. Lisäksi savet kokeiltiin hienontaa morttelilla FDA-hydrolyysireaktion tehostamiseksi. Koe 6 suoritettiin muuten kuten koe 5, mutta yhteen Na- ja yhteen Ca-bentoniittinäytteeseen lisättiin 0,6 ml FDA-substraattia 0,2 ml:n sijaan. Lisäksi mukana oli kaksi referenssinäytettä nimiltään Na-referenssi ja Ca-referenssi, joista ensimmäinen käsiteltiin kuin Na-bentoniittinäyte ja jälkimmäinen kuten Ca-bentoniittinäyte, mutta kumpaankaan ei lisätty FDA-liuosta.

4 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELO

4.1 Vertailumikrobikanta

Kuviosta 8 nähdään mikrobikasvatuspullojen sulfaattipitoisuudet ajan funktiona. Sulfaatinpelkistäjät kasvavat ja lisääntyvät melko hitaasti, joten aikayksikkönä kuvaajassa on päivä (d). Eri kasvatusliuoksia vastaavat värikoodit näkyvät kuvaajan oikeassa reunassa. Liitteessä 1 on kirjattuna ylös taulukot, joista löytyvät kaikkien mikrobikasvatuspullojen sulfaattipitoisuudet eri aikapisteissä.



KUVIO 8. Mikrobikasvatuspullojen P1-P8 sulfaattipitoisuudet ionikromatografilla mitattuina

Kuvaajan perusteella voidaan sanoa, että sulfaattipitoisuudet kaikissa mikrobikasvatuspulloissa lähtivät jyrkkään laskuun heti mikrobiliuosten pulloon lisäämisen jälkeen. Laskuvaihe kesti seitsemästä kymmeneen päivään.

Sulfaattipitoisuuden lasku merkitsee mikrobiaktiivisuuden nousua, sillä sulfaatinpelkistäjät kuluttavat sulfaattia aineenvaihduntareaktioissaan.

Jyrkän laskun jälkeen sulfaattipitoisuudet tasoittuivat, mikä tarkoitti mikrobien aktiivisen kasvun hiipumista. Sulfaattia mitattiin kahdella pullolla 54 päivän ikäisiksi asti, eikä uutta kasvuvaihetta ollut havaittavissa tähänkään mennessä. Voidaan siis todeta, että yhden kasvupyrähdysen jälkeen sulfaatinpelkistäjämikrobit eivät todennäköisesti ala kasvaa uudelleen ilman jonkinlaista muutosta kasvuolosuhteisiin. Pienet eroavaisuudet peräkkäisissä mittaustuloksissa näkyvät käyrien siksak-muotona, joka selittyy eri lähteiden aiheuttamista mittausvirheistä. Näihin mittausvirheisiin kuuluvat esimerkiksi pipetointivirheet, ionikromatografian päiväkohtaiset vaihtelut ja eroavaisuudet kromatogrammien integroinneissa.

Kuten kuviosta 8 nähdään, sulfaattipitoisuudet eivät laskeneet nolnaan, vaan jäivät 500-650 milligrammaan litrassa. Poikkeuksena mikrobikasvatuspullot P3 ja P4, joiden sulfaattikonsentraatiot jäivät välille 700-850 mg/l. Näiden liuosten valmistusprosessissa on saattanut tulla eroavaisuus muihin liuoksiin nähden. Näyttäisi siltä, että jokin tekijä on tuossa vaiheessa estänyt mikrobien kasvun pidemmälle. Yksi syy tälle voisi olla sulfaatinpelkistyksessä syntyvän sulfidin korkeaksi noussut pitoisuus, joka on inhiboinut bakteerien kasvun.

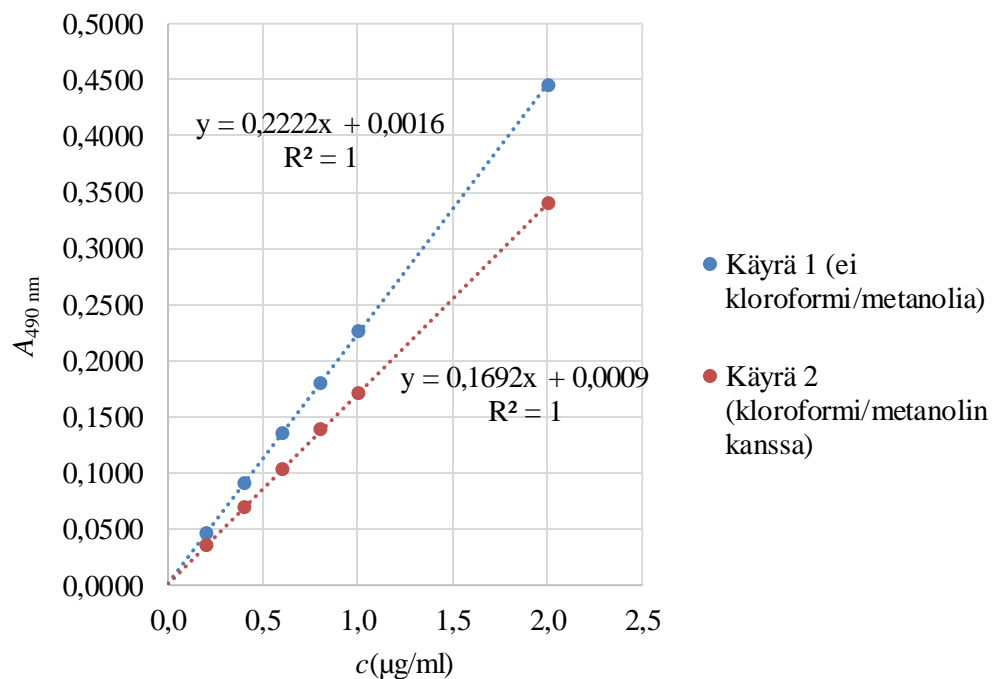
Yhteenvedon voidaan todeta, että kasvatuspullojen mikrobit olivat aktiivisimmillaan kolmesta seitsemän päivän ikäisiksi. Kokeet pyrittiinkin ajoittamaan näille aktiivisen kasvun vaiheille, jolloin niillä tehdyt FDA-analyysit tuottaisivat varmimmin positiivisen tuloksen. Aktiivisessa kasvuvaiheessa olevien mikrobien pääteltiin olevan tehokkaimpia tuottamaan entsyymejä, jotka pelkistävät FDA:ta fluoreseiiniksi.

4.2 FDA-menetelmän testaus

4.2.1 Testaus mikrobikasvatusliuoksilla: kokeet 1 ja 2

Fluoreseinin kalibroitikuvaajat löytyvät kuviosta 9. Käyrän 1 kalibroitiliuoksiin ei lisätty kloroformi/metanolia, mutta käyrän 2 liuoksiin lisättiin. Käyrän 1

kalibrointiliuosten absorbanssit ja konsentraatiot löytyvät liitteestä 2, ja käyrän 2 vastaavat tiedot liitteestä 3. Kuviosta 9 huomataan, että kalibrointiliuokset antoivat alhaisemman absorbanssin, kun liuksissa oli mukana kloroformi/metanolia. Asia voidaan selittää nesteiden tiheyseroilla ja laimentumisvaikutuksilla. Kloroformin tiheys huoneenlämmössä on 1,47 kg/l (Tamro 2016, 5), ja metanolin tiheys 0,79 kg/l (Methanex 2017, 10). Vertailun vuoksi veden tiheys huoneenlämmössä on 1,00 kg/l (USGS 2017). Sentrifugoinnin yhteydessä kloroformifaasi painui siis sentrifugiputken pohjalle, ja K-fosfaattipuskuri-fluoreseiini-metanolifaasi jäi pinnalle. Absorbanssi analysoitiin UV/VIS-spektrofotometrillä ylemmästä faasista, jolloin metanoli vaikutti fluoreseiinin absorbanssiin laimentavasti. Mikäli liuosseoksessa ei olisi ollut kloroformi/metanolia, ei tätä laimentavaa vaikutusta olisi tapahtunut. Mikrobikasvatusliuosten tuottamia fluoreseiinivasteita mitattaessa konsentraatioiden laskuissa käytettiin käyrää 2, koska kloroformi/metanolin lisäys kuului Adamin ja Duncanin (2000) menetelmän näytteenkäsittelyyn.



KUVIO 9. Kalibrointikuvaajat fluoresseiinista ilman savea

Kokeessa 1 näytteenä oli 2 millilitraa mikrobirikastusliuoksia P1 ja P3, ja ne tuottivat erittäin pienet fluoreseiinivasteet. Taulukosta 2 huomataan, että liuos P3 on ympäetty liuksesta P1, eli liuosten mikrobit ovat toistensa jälkeläisiä. Mikrobikasvatusliuokset olivat kokeen 1 aikana iältensä 22 päivää ja kolme päivää, joten jälkimmäinen liuos eli

P3 oli aktiivisen kasvun vaiheessa. Referenssinä käytettiin liuosta, joka oli valmistettu FDA-metodin mukaisesti mutta ilman FDA-substraattiliuosta. Tämän liuoksen absorbanssi oli sama kuin ultrapuhdaan veteen, eli 0,001. UV/VIS-spektrofotometri nollattiin referenssiliuksella ennen mittauksia. Taulukosta 6 on nähtävillä kokeen 1 tulokset.

TAULUKKO 6. Kokeen 1 FDA-tulokset

Näyte	$A_{490\text{ nm}}$	$c(\text{fluoreseiini})$ ($\mu\text{g/ml}$)	Näytetietoja	Liuoksen ikä (d)
P1-1	-0,0259	-0,1236	2 ml liuosta P1	22
P1-2	-0,0296	-0,1402	2 ml liuosta P1	22
P3-1	0,0247	0,1040	2 ml liuosta P3	3
P3-2	0,0332	0,1424	2 ml liuosta P3	3

Näistä tuloksista huomattiin, että aktiivisessa vaiheessa olevat mikrobit kasvatusliuksesta P3 tuottivat pienen määrän fluoreseiinia välillä 0,10-0,14 $\mu\text{g/ml}$. Tämä pitoisuus jäi kuitenkin alle kalibrointisuoran alhaisimman kalibrointiliuoksen pitoisuuden, joka oli 0,2 $\mu\text{g/ml}$. Aktiivisen kasvuvaiheen ylittäneet mikrobit liuksesta P1 eivät kyenneet muuntamaan FDA:ta fluoreseiiniksi niin paljoa, että se olisi tällä menetelmällä tuottanut havaittavan fluoreseiinipitoisuuden. Kahden millilitran näytemäärät inaktiivista eikä myöskään aktiivista mikrobikasvatusliuosta eivät siis riittänyt tuottamaan tarpeeksi suurta fluoreseiinimäärää kalibrointisuoraan nähden.

Kokeessa 2 näytteenä oli 20 millilitrasta mikrobikasvatusliuosta P3 pelletöity mikrobinäyte, jonka tuottama fluoreseiinin määrä osoittautui jo huomattavasti suuremmaksi. Kokeessa käytetty mikrobikasvatusliuos oli iältään kuusi päivää, joten se oli aktiivisen kasvun vaiheessa. Nollaavana referenssiliuksena oli samanlainen liuos kuin kokeessa 1. Kokeen 2 tulokset löytyvät taulukosta 7.

TAULUKKO 7. Kokeen 2 FDA-tulos

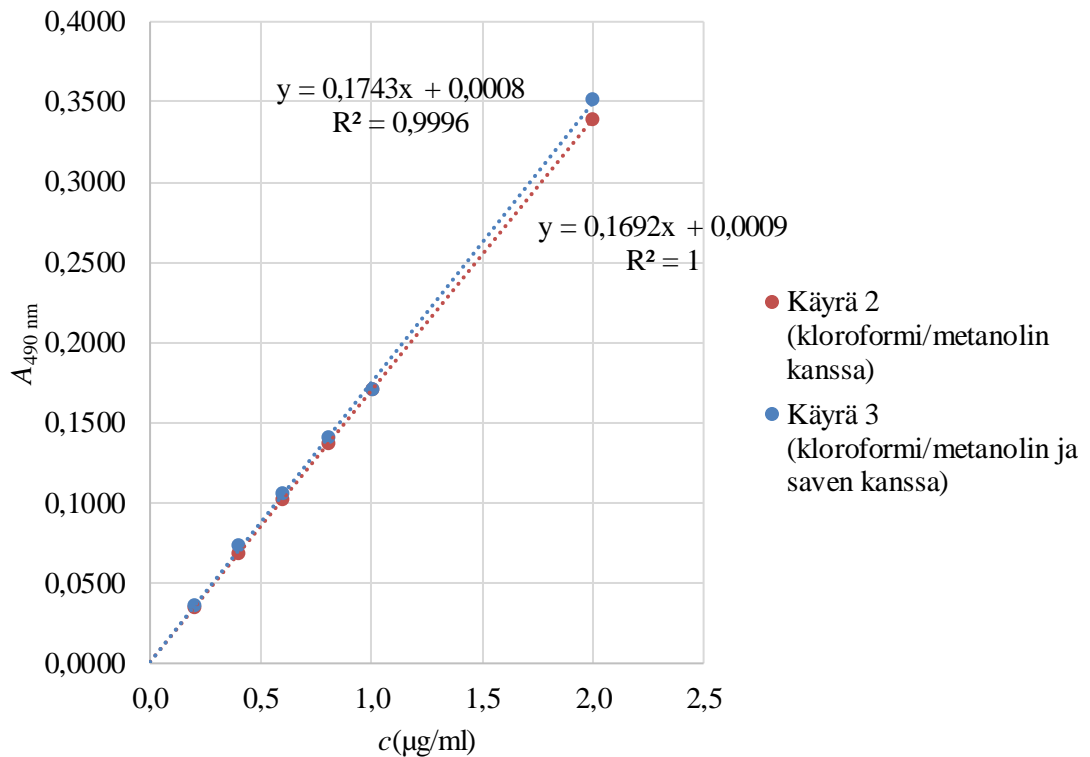
Näyte	$A_{490\text{ nm}}$	$c(\text{fluoreseiini})$ ($\mu\text{g/ml}$)	Näytetietoja	Liuoksen ikä (d)
P3 (p)	0,2163	0,9668	20 ml liuosta P3, pelletöity	6

Kokeessa 2 saatiin hyvin kalibrointisuoralle osuva fluoreseiinipitoisuus 0,97 $\mu\text{g/ml}$. Yksi kalibrointisuoralle osuva tulos riitti todisteeksi siitä, että Adamin ja Duncanin (2000) menetelmä oli toimiva käytössä olleissa laboratorio-olosuhteissa, mikä tällä

mikrobikasvatustestillä oli tarkoituskin osoittaa. Huomattiin myös, että mikrobikasvatusliuosten mikrobien fluoreseiinin tuotto oli melko alhaista, vaikka kuviossa 8 esitetyt sulfaattipitoisuudet viittasivat voimakkaaseen kasvuun. Mahdollisia selityksiä tälle on muun muassa sulfaatinpelkistäjien alhainen biomassa mikrobikasvatusliuoksissa, jolloin FDA:ta hydrolysoivia entsyymejäkin on vähän. Tällöin myös muodostuneen fluoreseiinin määrä jää alhaiseksi. Kokeella 2 saatiin siis vahvistettua kokeen 1 luoksen P3 antama pieni fluoreseiinivaste, joka oli noin kymmenen kertaa pienempi kokeen 2 tulosta. Kokeessa 1 näyte oli myös kymmenen kertaa laimeampi.

4.2.2 Testaus mikrobikasvatusliuoksilla ja savella: kokeet 3 ja 4

Saven kanssa tehty fluoreseiinin kalibrointikäyrä eli käyrä 3 on nähtävillä kuviosta 10. Käyrän 3 kaikkien kolmen rinnakkaisliuoksen absorbanssit on esitetty liitteessä 4. Vertailun vuoksi kuviossa 10 on esillä myös käyrä 2. Kuviosta havaitaan, että saven lisäys standardiliuoksiin ei vaikuttanut merkittävästi fluoreseiinin tuottamiin absorbansseihin. Ero on niin pieni, että sitä voidaan pitää mittausvirheistä johtuvana, sillä mittaukset oltiin tehty esimerkiksi eri päivinä. Käyrien 2 ja 3 samankaltaisuus selittyy sillä, että sentrifugoinnin aikana savi painui sentrifugiputken pohjalle, koska se on raskaampaa kuin mukana olevat nesteet. Fluoreseiinifaasi jäi kokonaan savikerroksen yläpuolelle, jolloin savella ei ollut vaikutusta fluoreseiinifaasin absorbanssiin. Mikäli fluoreseiinifaasiin olisi jäänyt savihiukkasia, olivat ne eroteltu pois viimeistään suodatuksen aikana sentrifugoinnin jälkeen. Käyrä 3 osoittaa myös, että Na-bentoniittisavi ei adsorboinut fluoreseiinia sellaisia määriä, jotka olisivat vaikuttaneet mittaustuloksiin.



KUVIO 10. Kalibrintisuora saven kanssa (käyrä 3) ja ilman savea (käyrä 2)

Kokeessa 3 saven ja mikrobirikastusliuoksen kanssa tehdyt FDA-kokeet tuottivat yllättäviä tuloksia. Saven lisäys näytteisiin vähensi mikrobikasvatusliuoksista valmistettujen pellettien tuottaman fluoreseiniin antamaa absorbanssia moninkertaisesti, kuten taulukosta 8 voidaan huomata. Lisäksi näyttää, että saven lisäys vähensi fluoreseiniin pitoisuutta eri määrän näytekerrasta riippuen, joten vaimentava vaikutus ei ollut tasainen.

TAULUKKO 8. Kokeen 3 FDA-tulokset

Näyte	$A_{490 \text{ nm}}$	$c(\text{fluoreseini})$ ($\mu\text{g/ml}$)	Näytetietoja
P5-1	0,0776	0,4410	2 g savea
P5-2	0,3319	1,8997	ei savea
P6-1	0,0527	0,2980	2 g savea
P6-2	0,3381	1,9353	ei savea

Kuvion 10 perusteella savi ei vaikuta standardiliuoksiin lisättyyn fluoreseiniin. Kuitenkin taulukosta 8 havaitaan, että savella on suuri adsorboiva vaikutus näytteisiin, joihin on lisätty FDA-substraattia ja mikrobikasvatusliuosta. Näytteen P5 kohdalla

saveton liuos antoi 1,90 µg/ml fluoreseiniipitoisuuden, mutta savellinen liuos vain 0,44 µg/ml. Vastaavat tulokset näytteen P6 kohdalla olivat 1,94 µg/ml ja 0,30 µg/ml.

Savi näytti siis adsorboivan joko FDA:ta tai mikrobeja. Kokeessa 4 selvitettiin adsorptiota FDA:n kannalta inkuboimalla savea kaliumfosfaattipuskurin ja FDA-liuoksen kanssa. Tulokset kokeesta 4 löytyvät taulukosta 9. Taulukossa esiintyvistä näytteistä P7-1:een ja P7-2:een ei ole lisätty savea, mutta P7-3:een ja P7-4:een on. Muita reagensseja kaikissa näytteissä on samassa suhteessa.

TAULUKKO 9. Kokeen 4 FDA-tulokset

Näyte	$A_{490\text{ nm}}$	$c(\text{fluoreseini})$ (µg/ml)	Näytetietoja
P7-1	0,0700	0,4083	ei savea
P7-2	0,0723	0,4220	ei savea
P7-3	0,0098	0,0526	2 g savea
P7-4	0,0112	0,0606	2 g savea

Tuloksista nähdään, että savellisten näytteiden P7-1 ja P7-2 fluoreseiniipitoisuudet olivat 0,053 ja 0,061, eli erittäin pienet. Savettomien näytteiden P7-3 ja P7-4 fluoreseiniipitoisuudet olivat 0,41 ja 0,42. Tästä voidaan päätellä, että savi adsorboi FDA:ta. Savellisten näytteiden FDA-pitoisuus oli huomattavasti suurempi kuin savettomien, joten tulokset tästä testistä näyttävät selkeiltä. Lisäksi molemmat rinnakkaismittaukset tuottivat hyvin toistensa kaltaiset tulokset.

4.2.3 Testaus pelkällä savella: kokeet 5 ja 6

FDA-analyseissa pelkällä savella käytettiin kalibroitua käyrä 3, joka löytyy kuviosta 10. Kokeessa 5 näytteenä olleen Na-bentoniittisaven tuottama fluoreseiniikonsentraatio 0,0005 µg/ml vastaa ultrapuhtaan veden fluoreseiniikonsentraatiota, eli fluoreseiniä ei ole muodostunut sellaista määrää, että sitä pystyttäisiin tällä menetelmällä havaitsemaan. Tulokset kokeesta 5 löytyvät taulukosta 10.

TAULUKKO 10. Kokeen 5 tulokset

Näyte	$A_{490\text{ nm}}$	$c(\text{fluoreseiini})$ ($\mu\text{g/ml}$)	Näytetietoja
UHP-vesi	0,0000	-0,0055	pelkkä vesi
Na-bentoniitti	0,0009	-0,0005	2 g savea

Kokeessa 6 saadut tulokset ovat esillä taulukossa 11. Huomattiin, että savinäytteiden Na-bentoniitti ja Ca-bentoniitit 1 ja 2 fluoreseiinikonsentraatiot eivät eronneet merkittävästi Na- ja Ca-referensseistä, joissa ei ollut FDA-substraattia. Saven raekoon pienentämällä ja FDA:n määrän lisäyksellä ei siis ollut vaikutusta savien fluoreseiinipitoisuuksiin tällä menetelmällä. Kokeesta 5 poiketen, savellisten näytteiden fluoreseiinipitoisuudet ovat kuitenkin tällä kertaa korkeammat kuin ultrapuhtaan veden. Savien hienontaminen morttelilla on saattanut muodostaa niin hienojakoista savipölyä, että se on mennyt huokoskooltaan $0,45\ \mu\text{m}$:n suodattimien läpi. Savipöly olisi silloin absorboinut osan spektrofotometrin tuottamasta säteilystä ja saanut aikaan virheellisen korkean absorbanssin ja fluoreseiinikonsentraation.

TAULUKKO 11. Kokeen 6 tulokset

Näyte	$A_{490\text{ nm}}$	$c(\text{fluoreseiini})$ ($\mu\text{g/ml}$)	Näytetietoja
UHP-vesi	0,0000	-0,0054	pelkkä vesi
Na-referenssi	0,0030	0,0119	2 g savea, $V(\text{FDA}) = 0\ \mu\text{l}$
Ca-referenssi	0,0032	0,0134	2 g savea, $V(\text{FDA}) = 0\ \mu\text{l}$
Na-bentoniitti	0,0045	0,0213	2 g savea, $V(\text{FDA}) = 600\ \mu\text{l}$
Ca-bentoniitti-1	0,0017	0,0047	2 g savea, $V(\text{FDA}) = 200\ \mu\text{l}$
Ca-bentoniitti-2	0,0020	0,0062	2 g savea, $V(\text{FDA}) = 600\ \mu\text{l}$

4.3 Yhteenveto

Kokeissa 1-6 saatiin selville jatkotutkimuksia varten olennaisia asioita liittyen saven adsorboiviin ominaisuuksiin. Na-bentoniitti adsorboi huomattavissa määrin FDA:ta, mikä hankaloittaa savessa mahdollisesti olevien mikrobien aktiivisuuden mittaamista. Todettiin myös, että näissä kokeissa tehdyistä muokkaustoimenpiteistä menetelmää kohtaan ei ollut hyötyä savien fluoreseiinikonsentraatioiden havaitsemisessa. Taulukosta 12 löytyy koonti kokeissa 1-6 saaduista tuloksista.

TAULUKKO 12. Kokeiden 1-6 tulokset.

Koe	Näyte	Tulos ($\mu\text{g/ml}$)	Päätelmä
1	P1-1 & P1-2	-0,1319	2 ml liuosta tuottaa aktiivisuudesta riippuen olemattoman tai hyvin pienen vasteen
1	P3-1 & P3-2	0,1232	
2	P3 pelletöity	0,9668	Menetelmä toimii kasvatusliuoksille
3	P5-1 + savi	0,4410	Savi adsorboi FDA:ta tai mikrobeja
3	P5-2	1,8997	
3	P6-1 + savi	0,2980	
3	P6-2	1,9353	
4	P7-1 & P7-2	0,4152	Savi adsorboi FDA:ta
4	P7-3 & P7-4	0,0566	
5	Na-bentoniitti	-0,0005	Na-bentoniitin mikrobit hyvin epäaktiivisia
6	Na-bentoniitti	0,0094	Na- ja Ca-bentoniittien mikrobit hyvin epäaktiivisia
6	Ca-bentoniitti-1	-0,0087	
6	Ca-bentoniitti-2	-0,0072	

Yhteenvedon voidaan sanoa, että Adamin ja Duncanin (2000) FDA-menetelmän havaitsemisraja oli liian korkea Na- ja Ca-bentoniittinäytteille. Menetelmässä luodut olosuhteet eivät saaneet savinäytteiden mikrobeja aktivoitumaan ja entsyymitoiminnallaan muuntamaan FDA:ta fluoreseiiniksi. Menetelmän toimivuus anaerobikasvatuksille ja todennäköisesti myös sulfaatinpelkistäjille saatiin kuitenkin vahvistettua.

5 POHDINTA

5.1 Mikrobikasvatusliuokset

Mikrobikasvatusliuoksissa kasvavat sulfaatinpelkistäjäbakteerit eivät kulutta neet kasvatusliuosten sulfaattia loppuun, vaan mitatut sulfaattipitoisuudet jäivät 500 ja 850 mg/l:n välille. Liuoksissa olevat sulfaatinpelkistäjät näyttivät siis passivoituivan. Sama toistui kaikille kasvatusliuoksille 1-8. Yksi mahdollisuus on, että sulfaatinpelkistäjät tuottivat pelkistysreaktoidensa seurauksena niin paljon sulfidia, että se inhiboi bakteerien kasvun liuoksessa. Reisin, Almeidan, Lemonsin ja Carrondon (1992) mukaan laktaatti-sulfaattimediassa inkuboitujen sulfaatinpelkistäjien inhiboiva divetyysulfidipitoisuus oli 547 mg/l. Liitteessä 1 olevasta taulukosta nähdään, että kasvatusliuoksen P6 aloitussulfaattipitoisuus oli 1325,4 mg/l. Liuoksen sulfaatinkulutus väheni selkeästi pitoisuudessa 527,9 mg/l. Sulfaattia oli siis kulunut 797,5 mg litraa kohden. Tästä määrästä muodostunutta divetyysulfidimäärää ei pystytä laskemaan, sillä kasvatusliuoksen pH:ta mikrobiympäyksen jälkeen ei mitattu. Inhiboivan pitoisuuden muodostuminen oli kuitenkin mahdollista. Mikrobikasvatusliuoksista voisi tehdä sulfidianaalyyisin tämän teorian tutkimiseksi, sekä mitata pH:ta kasvun eri vaiheissa, jotta saataisiin selville muodostuneen divetyysulfidin määrä.

Toinen mahdollisuus on, että kasvatusliuoksista on loppunut sulfaatinpelkistäjien kasvulle jokin oleellinen yhdiste, kuten laktaatti tai glukoosi. Tämän opinnäytetyön ulkopuolella mutta samaan projektiin liittyen on tehty asiaan liittyviä kokeita. Kokeissa lisättiin glukoosia mikrobikasvatusliuoksiin, joissa sulfaatin kulutus oli pysähtynyt. Tulokset näistä kokeista eivät kuitenkaan viittaa sulfaatinpelkistäjien tai muidenkaan mikrobien uuteen kasvuun glukoosilisäysten jälkeen. Inhiboivan sulfidipitoisuuden muodostuminen vaikuttaisi siis todennäköisemmältä näistä kahdesta vaihtoehdosta.

FDA-menetelmän optimoimiseksi voitaisiin vielä kokeilla saven ja mikrobikasvatusliuosten sekoitusta, kuten kokeissa 3 ja 4. Referenssinäytteinä olisi samaa mikrobikasvatusliuosta, mutta ilman savea. Kokeet tehtäisiin kasvatuspulloissa sentrifugiputkien sijasta. Pulloja inkuboitaisiin kuten mikrobikasvatusliuoksia tässä opinnäytetyössä, ja sulfaattipitoisuuksia seurattaisiin ionikromatografiilla. Näin

pystyttäisiin tarkastelemaan saven vaikutusta sulfaatinpelkistykseen, ja siten sulfaatinpelkistäjien aktiivisuuteen.

5.2 FDA-menetelmän sopivuus saviille

Mikäli bentoniittisavien mikrobisto on inaktivoitunut, voitaisiin kokeilla, olisiko niitä mahdollista aktivoida uudelleen. Voitaisiin esimerkiksi kokeilla savien lisäystä anaerobisiin steriileihin Postgate-liuoksiin, joiden sulfaatinkulutusta seurattaisiin ionikromatografilla. Mikäli sulfaattia alkaisi kulumaan, voitaisiin kerätä FDA-analyysejä varten näytteet sekä aktivoidusta savesta että kasvatusliuksesta, ja mitata näiden näytteiden mikrobiaktiivisuudet. Olisi toivottavaa, ettei mikrobien uudelleenaktivoiminen onnistuisi helposti, jotta mikrobit eivät uudelleenaktivoituisi myöskään ydinjätteen loppusijoituspaikalla.

Jos mikrobien uudelleenaktivointi ei onnistu, voitaisiin yrittää etsiä menetelmää mikrobien erottamiseksi savesta. Mikrobit voitaisiin eristää suuresta määrästä savea, konsentroida pelletöimällä ja tehdä FDA-analyysi pelletistä. Näin saataisiin selville, onko savissa jäljellä edes pientä määrää aktiivisia mikrobeja. Mikrobiaktiivisuus savissa on lähtökohtaisestikin alhainen (Schnürer & Rosswall 1982, 1260), joten konsentroitua voisi kokeilla myös tuoreille näytteille fluoreseiniinivasteen nostamiseksi. Pelletit voitaisiin myös puhdistaa ja punnita mikrobien kokonaismäärän selvittämiseksi, jolloin tiedettäisiin, paljonko savessa on inaktiivisia mikrobeja, jotka voisivat oikeissa olosuhteissa aktivoitua.

Voitaisiin myös kokeilla tässä opinnäytetyössä tehtyä koetta 6 siten, että nostettaisiin FDA:n määrä esimerkiksi kahteen millilitraan kahta grammaa näytettä kohden. Näin pystyttäisiin estämään ainakin osan FDA:sta adsorboituminen saveen, ja mahdollistaa mikrobien reaktiot FDA:n kanssa fluoreseiniin muodostamiseksi. Ei ole kuitenkaan varmaa, tuottaisiko FDA:n lisäys tulosta, mikäli savissa on vain inaktiivisia mikrobeja.

Jiangin, Huangin, Lun, Liun ja Yanin (2016, 426) kehittämässä variaatiossa FDA-menetelmästä reaktion pysäyttäjänä käytettiin 15 ml:n kloroformi/metanolin sijasta kahta millilitraa asetonia. Asetonin tiheys $0,79 \text{ g/cm}^3$ (Tamro 2015, 5) on pyöristettynä sama kuin metanolin tiheys $0,79 \text{ g/cm}^3$ (Methanex 2017, 10). Asetoni asettuisi siis samaan

faasiin sentrifugoinnin seurauksena kuin metanoli, eli fluoreseiinifaasiin. Metanolia on 15 ml:sta kloroformi/metanolia noin viisi millilitraa, mikä on enemmän kuin asetonia tarvitsisi käyttää. Fluoreseiinifaasi laimenisi siis vähemmän asetonia käytettäessä, jolloin UV/VIS:lla pystyttäisiin havaitsemaan näytteistä pienempiä fluoreseiinipitoisuuksia.

5.3 Yhteenveto

Tässä opinnäytetyössä tehdyt kokeet viittaavat siihen, että bentoniittisavinäytteissä oli hyvin alhaiset mikrobiaktiivisuudet, joita ei pystytty työssä käytetyllä FDA-menetelmällä havaitsemaan. Opinnäytetyöstä saadut tulokset osoittavat, että projektin muiden testien yhteydessä tehty oletus savien mikrobien inaktiivisuudesta pitää paikkansa. Olisi muutenkin hyvä, että savet eivät sisältäisi aktiivisia mikrobeja, sillä ydinjätteen pakkaamiseen käytettyjen kuparikapselien korroosiota halutaan välttää. Esimerkiksi sulfaatinpelkistäjäbakteerien tiedetään tuottavan kuparia syövyttäviä sulfideja (Bomberg ym. 2010, Tiivistelmä).

On kuitenkin huomioitava, että jo pieni määrä aktiivisia mikrobeita saattaa lisääntyä nopeastikin oikeissa olosuhteissa. Ydinjätteen loppusijoituspaikan olosuhteet on kuitenkin suunniteltu siten, että savi olisi niin kovassa puristuksessa, että mikrobiaktiivisuus olisi siellä äärimmäisen alhainen. Tämän tiedon sekä tässä opinnäytetyössä saatujen tulosten perusteella voidaan todeta, että Na-bentoniittisavien viemiselle ydinjätteen loppusijoituspaikalle ei löytynyt esteitä.

LÄHTEET

- Adam, G. & Duncan, H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. Teoksessa Ritz, K. (ed.) *Soil Biology & Biochemistry* 33. Amsterdam: Elsevier, 943-944.
- Azubuiké, C. C., Chikere C. B & Okpokwasili G. C. 2016. Bioremediation techniques-classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. Dordrecht: Springer Netherlands, 179-180.
- Bomberg, M., Nyssönen, M. & Itävaara, M. 2010. Quantitation and Identification of Methanogens and Sulphate Reducers in Olkiluoto Groundwater. Työraportti. Eurajoki: Posiva Oy.
- Bruckner, M. 2017. Ion Chromatography. Verkkosivu. Päivitetty 2/2017. Tulostettu 3.4.2017. http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/biogeochemical/ic.html
- Green, V. S., Stott, D. E. & Diack, M. 2004. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. Teoksessa Ritz, K. (ed.) *Soil Biology & Biochemistry* 38. Amsterdam: Elsevier, 693-694.
- Harris, D. C. 2010. *Quantitative Chemical Analysis*. 8. painos. New York: W. H. Freeman and Company.
- Hentgens, D. J. 1996. Anaerobes: General Characteristics. Teoksessa Baron, S. (ed.) *Medical Microbiology*. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston, Chapter 17. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7638/>
- Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2008. *Laboratorion analyysitekniikka*. Helsinki: Edita Publishing Oy.
- Jiang, S., Huang, J., Lu, H., Liu, J. & Yan, C. 2016. Optimization for assay of fluorescein diacetate hydrolytic activity as a sensitive tool to evaluate impacts of pollutants and nutrients on microbial activity in coastal sediments. Teoksessa Sheppard, C., Galgani, F., Hutchings, P. & Quintino, V (ed.) *Marine Pollution Bulletin*. Amsterdam: Elsevier, 424-426.
- Le Caër, S. 2011. Water radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H₂ Production under Ionizing Radiation. Teoksessa Hoekstra, A. Y. (ed.) *Water*. Basel: MDPI, 235.
- LibreTexts™. 2015. Spectrophotometry. Verkkosivu. Päivitetty 22.7.2015. Tulostettu 22.5.2017. https://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetics/Spectrophotometry
- LibreTexts™. 2016. Electronic Spectroscopy. Verkkosivu. Päivitetty 18.12.2016. Tulostettu 22.5.2017. https://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy%3A_Application

Lovley, D. R. & Phillips, E. J. P. 1991. Reduction of Uranium by *Desulfovibrio Desulfuricans*. Teoksessa Drake, H., L. (ed.) Applied and Environmental Microbiology. Washington: American Society for Microbiology, 850.

Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D. & Clark, D. 2012. Brock Biology of Microorganisms. San Fransisco: Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Methanex. 2017. Safety Data Sheet according to Regulation (EC) No. 1907/2006 (REACH) as amended. Material name: Methanol. Verkkosivu. Päivitetty 8.2.2017. Tulostettu 14.5.2017. https://www.methanex.com/sites/default/files/safety/SDS-2014/Europe-REACH/Methanol-EU%20SDS_English%20%2B%20Exposure%20Scenario.pdf

Ocean Optics. 1989-2017. Absorbance. Verkkosivu. Tulostettu 22.5.2017. <https://oceanoptics.com/measurementtechnique/absorbance/>

Oren, A. 2009. Chemolithotrophy. New York City: John Wiley & Sons.

Posiva Oy. Final Disposal. Tulostettu 25.5.2017. http://www.posiva.fi/en/final_disposal/basics_of_the_final_disposal/the_final_disposal_canister#.WSqCS8ZRWUm

Prakash, D., Gabani, P., Chandel, A. K., Ronen, Z. & Singh, O. V. 2013. Bioremediation: a genuine technology to remediate radionuclides from the environment. Teoksessa Timmins, K. N., Ramos, J. L., de Vos, W., Vlaeminck, S. E. & Prieto, A. (ed.) Microbial Biotechnology. New York City: John Wiley & Sons, 349-350.

Reis, M. A., Almeida, J. S., Lemons, P. C. & Carrondo M. J. 1992. Effect of hydrogen sulfide on growth of sulfate reducing bacteria. Teoksessa Clarck, D. S. (ed.) Biotechnology and Bioengineering. New York City: John Wiley & Sons, 593.

Schnürer, J. & Rosswall, T. 1982. Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a Measure of Total Microbial Activity in Soil and Litter. Teoksessa Drake, H., L. (ed.) Applied and Environmental Microbiology. Washington: American Society for Microbiology, 1256.

Shimadzu. 2017. Inorganic Anion Detection. Verkkosivu. Päivitetty 2017. Tulostettu 3.4.2017. <http://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lctalk/64intro.html>

Soto, L. M., Ledo, H., Calderón, Y., Marín, J. & Galarraga, F. 1998. Bacterial sulfate production by biodesulfurization of aromatic hydrocarbons, determined by ion chromatography. Teoksessa Breadmore, M. C., Dorsey, J. G., Dugo, P., Fanali, S., Giese, R. W., Lee, H. K., Poole, C. F., Riekkola, M. L., Schoenmakers, P. J. & Sun, Y. (ed.) Journal of Chromatography A. Amsterdam: Elsevier, 45.

Tamro. 2015. Asetoni. Käyttöturvallisuustiedote. Verkkosivu. Päivitetty 1.12.2015. Tulostettu 23.5.2017. <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:sw8DjllgTYQJ:kayttoturvallisuustiedotteet.tamro.fi/webktt/frmPDF.aspx%3FId%3D100956+&cd=1&hl=en&ct=clnk&gl=fi&client=firefox-b-ab>

Tamro. 2016. Kloroformi. Käyttöturvallisuustiedote. Verkkosivu. Päivitetty 15.8.2016. Tulostettu 14.5.2017. <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:r2L->

[OKNV7IwJ:kayttoturvallisuustiedotteet.tamro.fi/webktt/frmPDF.aspx%3FId%3D196184+%&cd=1&hl=en&ct=clnk&gl=fi&client=firefox-b-ab](https://oknv7iwj.kayttoturvallisuustiedotteet.tamro.fi/webktt/frmPDF.aspx%3FId%3D196184+%&cd=1&hl=en&ct=clnk&gl=fi&client=firefox-b-ab)

Thermo Fisher Scientific Inc. 2017. Thermo Scientific Dionex eluent suppressors for ion chromatography. Päivitetty 2017. Tulostettu 23.5.2017.

<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/PS-70690-IC-Eluent-Suppressors-PS70690-EN.pdf>

USGS. 2017. Water Density. Verkkosivu. Päivitetty 23.3.2017. Tulostettu 14.5.2017.

<https://water.usgs.gov/edu/density.html>

LIITTEET

1 (4)

Liite 1. Mikrobikasvatusliuosten sulfaattipitoisuudet

TAULUKKO 13. Mikrobikasvatusliuoksen P1 sulfaattipitoisuudet

P1	
Ikä (d)	$c(\text{SO}_4^{2-})$ (mg/l)
11	557,9
14	568,2
22	543,8
25	568,4
29	507,8
54	509,9

TAULUKKO 14. Mikrobikasvatusliuoksen P2 sulfaattipitoisuudet

P2	
Ikä (d)	$c(\text{SO}_4^{2-})$ (mg/l)
11	562,2
14	585,2
18	650,4
22	579,0
25	585,7
29	517,7
54	514,7

TAULUKKO 15. Mikrobikasvatusliouoksen P3 sulfaattipitoisuudet

P3	
Ikä (d)	$c(\text{SO}_4^{2-})$ (mg/l)
0	1343,3
2	1148,2
4	1018,5
7	697,8
9	686,8
11	723,1
14	750,2
16	746,7
18	724,8
21	782,3
30	767,6
36	716,9

TAULUKKO 16. Mikrobikasvatusliouoksen P4 sulfaattipitoisuudet

P4	
Ikä (d)	$c(\text{SO}_4^{2-})$ (mg/l)
0	1341,9
2	1205,9
4	1005,1
7	687,0
9	694,2
11	756,7
14	763,8
16	769,8
18	741,3
21	839,1
30	770,8
36	730,7

TAULUKKO 17. Mikrobikasvatusliouoksen P5 sulfaattipitoisuudet

P5	
Ikä (d)	$c(\text{SO}_4^{2-})$ (mg/l)
0	1325,4
3	1256,6
6	909,1
7	755,1
10	608,5
12	527,9
14	529,8
18	547,9
21	551,5
24	568,4
31	559,0

TAULUKKO 18. Mikrobikasvatusliouoksen P6 sulfaattipitoisuudet

P6	
Ikä (d)	$c(\text{SO}_4^{2-})$ (mg/l)
0	1321,1
3	1216,2
6	1086,0
7	916,5
10	524,9
12	541,6
14	539,0
18	598,0
21	585,6
24	574,9
31	603,0

TAULUKKO 19. Mikrobikasvatusliouoksen P7 sulfaattipitoisuudet

P7	
Ikä (d)	$c(\text{SO}_4^{2-})$ (mg/l)
0	1323,8
1	1300,4
3	1042,0
6	732,0
8	610,6
13	638,0

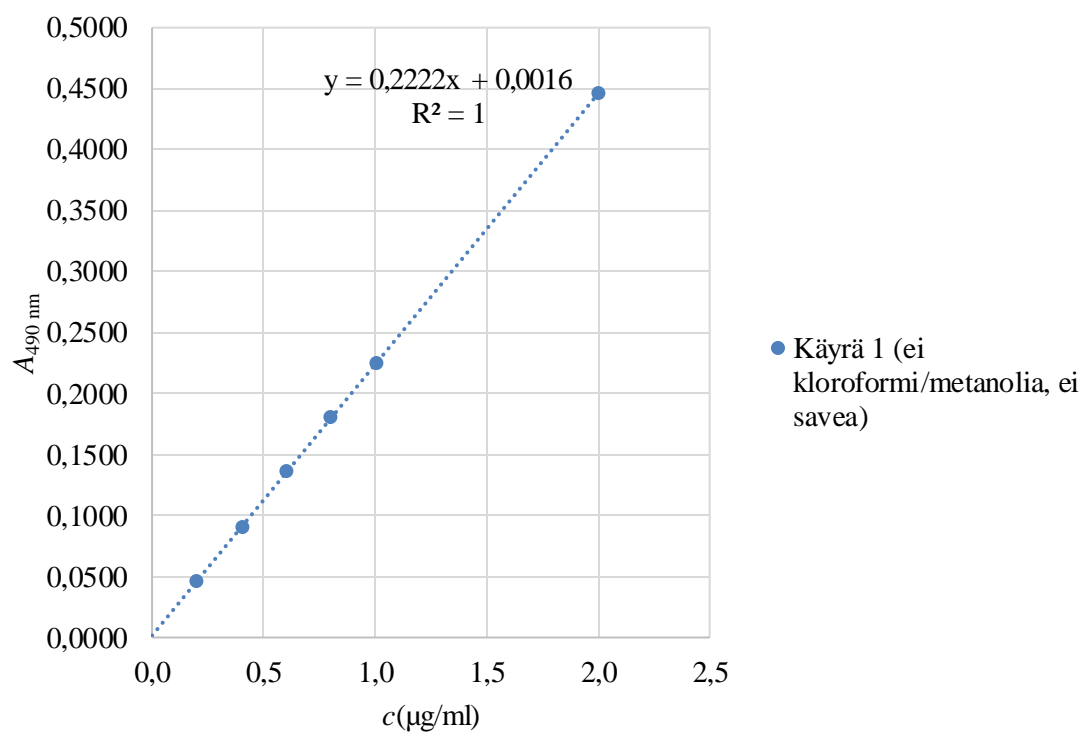
TAULUKKO 20. Mikrobikasvatusliouksen P8 sulfaattipitoisuudet

P8	
Ikä (d)	$c(\text{SO}_4^{2-})$ (mg/l)
0	1351,3
1	1307,4
3	1095,8
6	751,7
8	559,3
13	620,0

Liite 2. Käyrän 1 kalibrointidata

TAULUKKO 21. Kalibrointikäyrän 1 data

Liuos	c ($\mu\text{g/ml}$)	$A_{490\text{ nm}}$
Std 1	0,2	0,0458
Std 2	0,4	0,0896
Std 3	0,6	0,1349
Std 4	0,8	0,1797
Std 5	1,0	0,2249
Std 6	2,0	0,4453

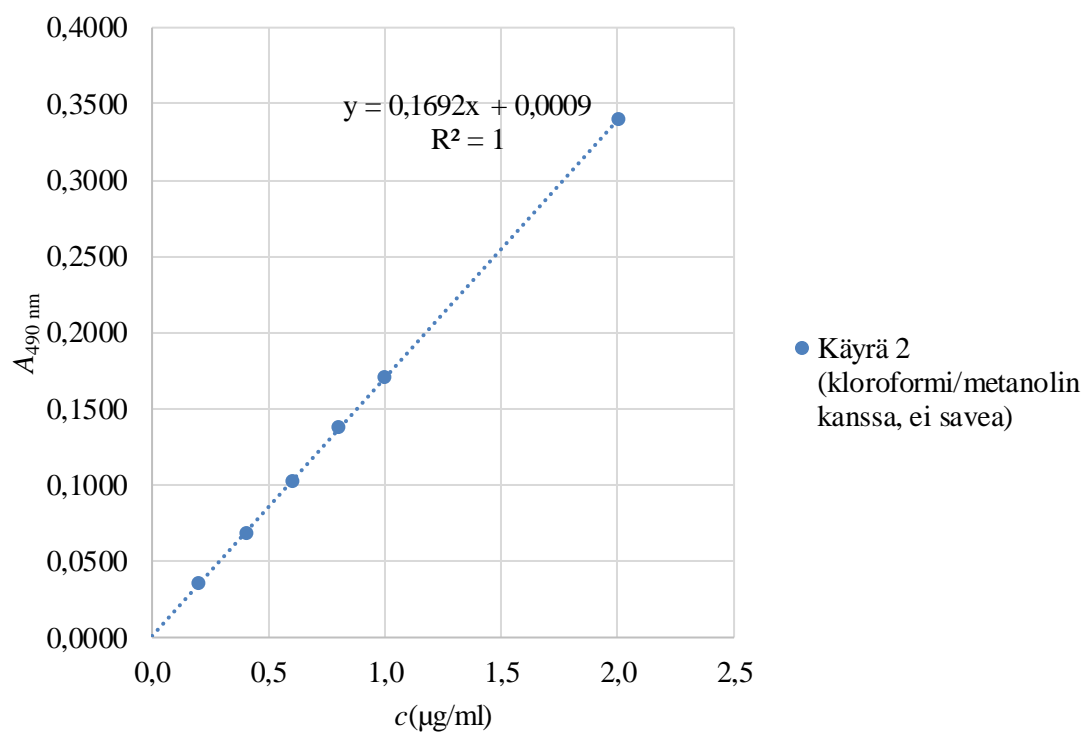


KUVIO 11. Käyrän 1 kalibrointikuvaaja

Liite 3. Käyrän 2 kalibrointidata

TAULUKKO 22. Kalibrointikäyrän 2 data

Liuos	$c(\mu\text{g/ml})$	$A_{490\text{ nm}}$
Std 1	0,2	0,0349
Std 2	0,4	0,0681
Std 3	0,6	0,1021
Std 4	0,8	0,1373
Std 5	1,0	0,1701
Std 6	2,0	0,3392



KUVIO 12. Käyrän 2 kalibrointikuvaaja

Liite 4. Käyrän 3 kalibrointidata

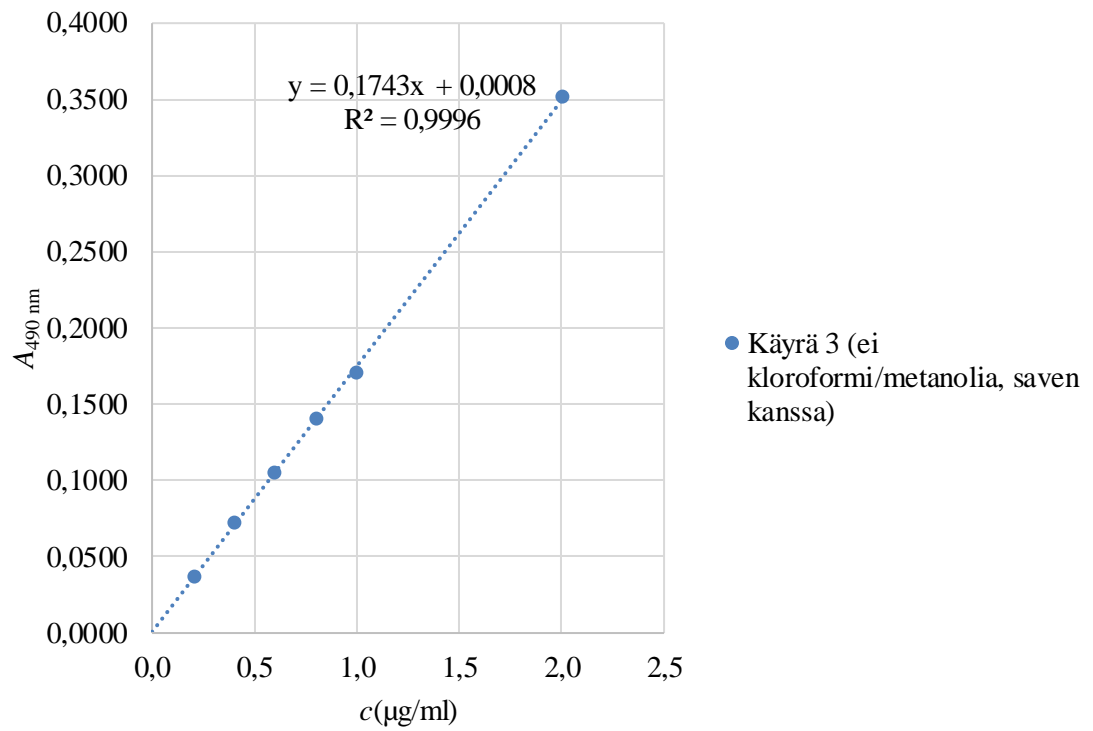
TAULUKKO 23. Kalibrointikäyrän 3 kaikkien rinnakkaisliuosten data

Liuos	c ($\mu\text{g/ml}$)	$A_{490\text{ nm}}$
Std 1-1	0,2	0,0326
Std 1-2	0,2	0,0350
Std 1-3	0,2	0,0411
Std 2-1	0,4	0,0686
Std 2-2	0,4	0,0748
Std 2-3	0,4	0,0744
Std 3-1	0,6	0,1055
Std 3-2	0,6	0,1064
Std 3-3	0,6	0,1043
Std 4-1	0,8	0,1414
Std 4-2	0,8	0,1407
Std 4-3	0,8	0,1379
Std 5-1	1,0	0,1691
Std 5-2	1,0	0,1707
Std 5-3	1,0	0,1731
Std 6-1	2,0	0,3538
Std 6-2	2,0	0,3521
Std 6-3	2,0	0,3473

TAULUKKO 24. Kalibrointikäyrän 3 keskiarvodata kaikista rinnakkaisliuoksista

Liuos	c ($\mu\text{g/ml}$)	$A_{490\text{ nm}}$
Std 1	0,2	0,0362
Std 2	0,4	0,0726
Std 3	0,6	0,1054
Std 4	0,8	0,1400
Std 5	1,0	0,1710
Std 6	2,0	0,3511

2 (2)



KUVIO 13. Käyrän 3 kalibrointikuva