



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Opinnäytetyö

Ulkoilman mikrobitaustan tutkimus

Janina Laine

Bio- ja elintarviketekniikka

2010

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU TIIVISTELMÄ

Koulutusohjelma: Bio- ja elintarviketekniikka	
Tekijä: Janina Laine	
Työn nimi: Ulkoilman mikrobitaustan tutkimus	
Suuntautumisvaihtoehto: Biotekniikka	Ohjaajat: FT Hanna Hänninen FT Tarmo Humppi
Kevät 2010	47 sivua
<p>Ulkoilman mikrobeja havainnoidaan erilaisilla bioaerosolilaitteilla ja niitä saadaan kerättyä näytteenkerääjillä. Ultraviolet Aerodynamic Particle Sizer mittaa aerodynaamista hiukkaskokoa ja hiukkasten ultraviolettifluoresointia. BIO 200 -monitori mittaa fluoresoivia hiukkasia suoraan ilmasta ja AeroTrak-laskuri antaa hiukkasten määrän ja kokojakaumatietoja. Slit To Agar on ilmanäytteenkerääjä, jolla saadaan mikrobit talteen. Pyyhkäisyelektronimikroskooppia (SEM) käytetään muun muassa solujen pintaominaisuuksien tutkimiseen. Tässä työssä SEM-tulosten avulla pystyttiin havainnollistamaan hiukkasten rakennemuotoja ja laskemaan ilman hiukkasmäärää.</p> <p>Mikrobitaustaa tutkitaan Puolustusvoimien Teknillisessä Tutkimuslaitoksessa. Tutkimuksen tarkoituksena on kartoittaa ulkoilman mikrobimäärä eri vuodenaikoina ja selvittää vuodenaikojen vaikutus mikrobitaustaan. Tutkimus päättyy keväällä 2010. Suomen lisäksi Norja ja Ruotsi osallistuvat samaan tutkimukseen. Tässä työssä tarkoituksena oli määrittää ulkoilman bioaerosolien taustan määrä ja analysoida mittauslaitteiden antamia tuloksia. Työ tehtiin Puolustusvoimien Teknillisessä Tutkimuslaitoksessa suojelutekniikan osastolla 12.–14.5.2009.</p> <p>Bioaerosolilaitteilla kerättiin mittaustietoa keväällä 2009. Sää tiedot merkittiin ylös jokaiselta mittauspäivältä. Mikrobit kerättiin näytteenkerääjillä, kasvatettiin ja tehtiin puhdasviljelmät. Puhdasviljelmistä tunnistettiin ulkoilman mikrobeja värjäyksellä, mikroskopoimalla ja määrittämällä solun rasvahappokoostumus kaasukromatografian avulla.</p> <p>Mikrobiologisten näytteenkerääjien tulokset olivat erittäin heikot. Syynä oli se, että vain pieni osa ilman sisältämästä mikrobeista kasvoi kasvatusmaljalla pesäkkeeksi. Tuloksia ei voitu vertailla bioaerosolilaitteiden Ultraviolet Aerodynamic Particle Sizer ja Bio 200 -laitteen antamiin tuloksiin. Ulkoilman kokonaishiukkaspitoisuudet nousivat 4000:sta hiukkasesta kuutiometrillä yhteen miljoonaan hiukkaseen kuutiometrillä, kun hiukkaskoko pieneni 10 µm:stä 0,5–1,0 µm:in. Mikrobin identifiointi aloitettiin työssäni, mutta tulokset saatiin vasta myöhempanä ajankohtana. <i>Bacillus</i>-sukuisia bakteereita analysoitiin näytteistä eniten.</p>	
Hakusanat: aerosolit, fluoresenssi,	
Säilytyspaikka: Turun ammattikorkeakoulun kirjasto	

Degree Programme in Biotechnology and Food Technology

Author: Janina Laine

Title: Survey of outdoor air microbial background

Specialization line
BiotechnologyInstructor(s)
Hanna Hänninen, PhD
Tarmo Humppi, PhD

Spring 2010

47 pages

Outdoor air microbes are researched with different kinds of bioparticle instruments and microbial sampling devices. The ultraviolet Aerodynamic Particle Sizer measures aerodynamic particle size and particle ultraviolet fluorescence. The BIO 200 biological agent monitor measures fluorescent particles in air. The AeroTrak device gives readings on particle number and distribution. The Slit To Agar is a sample collector. Scanning Electron Microscope is used to research cell surface properties. In this study the Scanning Electron Microscope results were used to determine particle numbers.

The study was a part of the Finnish Defence Forces Technical Research Centres research project aiming to characterize outdoor bioaerosols. The main focus of this study was monitoring of the bioaerosol background using realtime aerosol detectors and slit to agar collectors. Besides Finland, Sweden and Norway are also participating in the same research. The target of this thesis was to compare outdoor air particle numbers obtained different instruments in spring 2009.

Measurement was gathered during two periods in spring 2009. Local weather conditions were recorded. Microbes were gathered and grown and a cell culture was prepared. Pure cultures were prepared. Results were obtained by cell staining and photographing. Identification was based on a gas chromatographic analysis of the cellular fatty acid methyl ester. The results of the bioparticle instruments and microbial sampling devices were recorded in a chart and analysed.

The microbial sampling devices did not provide sufficient results for comparison with the results of the Ultraviolet Aerodynamic Particle Sizer and Bio 200 devices. The reason was that the airborne microbes were in dry form and badly damaged due to environmental factors so they did not grow in a colony. The AeroTrak gave a particle number and size distribution result every day. When the particle size was reduced from 10 μm to 1 μm the quantity of the particles rose from 4000 particle/ m^3 to one million particles/ m^3 . The identification of the microbes identify was started during this study but the result was not obtained until after completion of this substudy. The most common bacterial species in Finnish outdoor air, was *Bacillus* sp.

Keywords: aerosols, fluorescence,

Deposit at the Library of Turku University of Applied Sciences

SISÄLTÖ

1	JOHDANTO	7
2	BIOLOGINEN SODANKÄYNTI	7
2.1	Mikrobitaustan tutkimus	8
3	ULKOILMAN MIKROBITAUSTA	9
3.1	Biologiset aerosolit	9
3.1.1	Bakteerit	10
3.1.2	Sienet	11
3.2	Fluoresoivat bakteerit	11
3.3	Torjunta-aine Turex 50 WP	12
3.4	Mikrobien tunnistus	12
3.4.1	Gramvärjäys	13
3.4.2	Kaasukromatografi	13
3.4.3	Mikrobien tunnistaminen Sherlock Microbial Identification System -järjestelmällä	14
4	BIOAEROSOLIEN KERÄYKSEEN SOVELTUVIA LAITTEITA JA MENETELMIÄ	15
4.1	UV-APS	16
4.2	BIO 200 -monitori	17
4.3	SEM ja AeroTrak	18
4.4	Näytekerääjät	20
4.4.1	Slit To Agar	20
4.4.2	BioSampler-keräin	20
4.5	Testinäytteisiin tarvittavat laitteet	21
5	MITTAUSTEN SUORITUS	22

5.1	Työn tarkoitus	22
5.2	Näytteenotot	23
5.3	Mikrobiologiset näytteenotot	25
5.3.1	Kasvualustat ja puhdasviljelmät	25
5.3.2	Slit To Agar -näytteet	26
5.3.3	SEM-näytteet	26
5.3.4	BioSampler-näytteet	26
5.4	Näytteiden viljely	26
5.5	Mikroskopointi ja värjäys	27
5.6	Mikrobien identifiointi	27
5.7	Ruotsin ja Norjan näytteet	30
6	TULOKSET JA NIIDEN ARVIOINTI	31
6.1	UV-APS	31
6.2	BIO 200	33
6.3	SEM- ja BioSampler -näytteet	35
6.4	AeroTrak	36
6.5	ACPLA	37
6.5.1	ACPLA-tulosten ja BIO 200 -laitteen tuloksien vertailu	38
6.5.2	ACPLA-tulosten vertailu UV-APS -tuloksiin	39
6.6	Mikrobien tunnistus	40
7	YHTEENVETO JA TULOSTEN ARVIOINTI	41
8	LÄHTEET	45

LIITTEET

Liite 1. Aikataulu

Liite 2. UV-APS

Liite 3. BIO 200

- Liite 4. SEM-laskut ja tulokset
- Liite 5. AeroTrak
- Liite 6. Mikrobiein tunnistus
- Liite 7. Säätiidot 12.5–14.5.2009
- Liite 8. Säätiidot 25.5–29.5.2009

KUVAT

Kuva 1. Kaasukromatografi	15
Kuva 2. UV-APS	17
Kuva 3. BIO 200 -monitori	18
Kuva 4. SEM-näyte	19
Kuva 5. AeroTrak	19
Kuva 6. Slit To Agar ja maljat	20
Kuva 7. BioSampler	21
Kuva 8. Sonikaattori ja näyteruisku	22
Kuva 9. Näytepaikka	24
Kuva 10. Testimittauksien tulos Slit To Agar -laitteella	25

TAULUKOT

Taulukko 1. Laitteiden ominaisuudet	23
Taulukko 2. Yhteenveto tuloksista	42

KUVIOT

Kuvio 1. Kromatogrammi	14
Kuvio 2. UV-APS:n toiminta	17
Kuvio 3. Mikrobiein identifiointi	30
Kuvio 4. UV-APS:n tulokset	31
Kuvio 5. UV-APS data 1	32
Kuvio 6. UV-APS data 2	33
Kuvio 7. BIO 200 -tulokset	34
Kuvio 8. AeroTrak-tulokset	37
Kuvio 9. mACPLA-tulokset	38

1 JOHDANTO

Puolustusvoimien Teknillinen Tutkimuslaitos (PvTT) on puolustusvoimien teknisen tutkimustoiminnan osaamiskeskus.¹ Laitos tuottaa räjähdete- ja suojelutekniikan, asetekniikan sekä elektroniikka- ja informaatiotekniikan tutkimuspalveluja puolustusvoimien ja maanpuolustuksen kehittämiseksi sekä päätöksenteon avuksi. Laitoksen toimipisteet sijaitsevat Ylöjärvellä ja Riihimäellä.²

PvTT:n räjähdete- ja suojelutekniikan osastoon kuuluu kolme tutkimusalaa: räjähdetekniikka, suojelutekniikka ja kemiantekniikka. Suojelutekniikan toimenkuvaan kuuluu CBRN (chemical, biological, radiological, nuclear) -aseteknologiaan ja asevaikutuksilta suojautumiseen liittyvät asiat.¹ Tutkimus keskittyy kemiallisten ja biologisten taisteluaineiden ilmaisuun ja suojelumateriaalien testaukseen.³

Ulkoilman mikrobitaustaa selvitetään bioaerosolimittareilla, jotka mittaavat ilmassa olevien hiukkasten fluoresointia ja lukumäärää. Eri näytteenottomenetelmillä saadaan kerättyä mikrobeja ulkoilmasta tunnistusta varten. Opinnäytetyöni tarkoituksena oli kartoittaa ulkoilman mikrobitaustaa eri menetelmillä ja vertailla eri laitteista saatuja tuloksia. Tuloksia analysoitiin ja vertailtiin laitteiden tallentamasta dokumentoinnista.

Työ tehtiin PvTT:n suojelutekniikan tutkimuslaitoksella osana Biological Aerosol Background Experiment -tutkimushanketta, jonka tarkoituksena oli määrittää ulkoilman mikrobitaustaa aikavälillä 12.–14.5.2009 Norjassa, Suomessa ja Ruotsissa. Lisätutkimuksia varten otettiin näytteitä myös aikavälillä 18.–29.05.2009.

2 BIOLOGINEN SODANKÄYNTI

Ihmisten tauteja aiheuttavien mikrobien ja toksiinien havaitseminen sekä tunnistus ei ole helppoa. Mikrobien tunnistaminen taisteluolosuhteissa on vaikeaa laitteiden käytettävyyden ja kestävyiden osalta. Kemiallisiksi taisteluaineiksi määritellään yhdisteet, joita käytetään sota-, tuholais- tai sabotaasitoiminnassa aiheuttaen kuolemaa,

toimintakyvyttömyyttä tai muuta vammautumista kohteeseensa.⁴ Kemialliset taisteluaaineet jaetaan myrkyllisyyden mukaan ärsyttäviin, tukehduttaviin ja yleismyrkyllisiin kaasuihin. Ne vaikuttavat hengityselimien kautta. Kasvintuhoaineet kuuluvat myös kemiallisiin taisteluaineisiin. Syövyttävät taisteluaaineet vaikuttavat pisaroina ihon ja varusteiden läpi sekä höyryinä silmien limakalvojen läpi, hermokaasut taas vaikuttavat elintarvikkeiden, ihon tai hengitysilman kautta. Psykokemialliset aineet vaikuttavat ilman tai juomaveden välityksellä.⁵

Kemialliset taisteluaaineet voivat esiintyä kiinteänä, nesteinä, aerosolina tai kaasuina. Biologinen ase on elävien mikrobien ja niiden osien sekä toksiinien käyttöä aseena. Biologinen sodankäynti käyttää biologisia aseita vastustajaa vastaan joko niiden tuhoamiseksi tai vahingoittamiseksi.⁵ Taudinaiheuttajia voidaan levittää vihollisten joukkoon aerosoleina ilman kautta tai elintarvikkeiden ja veden välityksellä. Aerosolien levittämisessä on aina vaara omien joukkojen altistus kyseiselle taudinaiheuttajalle, joten sääolosuhteet tulee aina ottaa huomioon.⁶

Bioaseiksi sopivat sellaiset mikrobit, jotka kestävät ulkoisia ympäristövaikutuksia hyvin ja ovat helposti tarttuvia. Geenimuuntelulla voidaan näitä ominaisuuksia muokata ja tehostaa. Tunnettuja bioasemikrobeja ovat bakteereista *Bacillus anthracis* ja *Yersinia pestis*. *Bacillus anthracis* aiheuttaa pernaruttoa ja *Yersinia pestis* levittää ruttoa. Viruksista esimerkiksi isorokkovirus sekä keltakuume ovat tunnettuja tauteja ja virukset levitetään aerosoleina ilmaan. Toksiineista bioaseina käytetään botuliinitoksiinia ja risiinitoksiinia.⁶

2.1 Mikrobitaustan tutkimus

Biologisten, kemiallisten ja radiologisten uhkien torjuntaan tehtyjä mittalaitteita ja järjestelmiä testataan koko ajan. PVTT:n tutkimusprojektin tavoitteena on selvittää ulkoilman bioaerosolitausta ja se toteutetaan yhteistyössä Suomen, Norjan ja Ruotsin kanssa. Mittaukset tehdään touko-, syys- ja lokakuussa 2009 sekä keväällä 2010. Norjan ja Ruotsin näytteet lähetetään Suomeen tunnistettaviksi. Tutkimustulokset kerätään yhteen, analysoidaan ja julkaistaan. Näin selvitetään, miten vuodenaika vaikuttaa mikrobien määrään ja niiden esiintymiseen ulkoilmassa.

3 ULKOILMAN MIKROBITAUSTA

3.1 Biologiset aerosolit

Aerosolit ovat ilmassa leijuvia hiukkasia. Hiukkaskoon perusteella ne jaetaan hienoihin ja karkeisiin hiukkasiin.⁶ Hienojakoiset pienhiukkaset voidaan jaotella läpimitaltaan alle 2,5 µm:n kokoisiin, alle 10 µm:n kokoisiin hengitettäviin hiukkasiin sekä näitä suurempiin karkeisiin hiukkasiin.⁷

Bioaerosoleja on sekä sisä- että ulkoilmassa. Bioaerosoleja ovat siitepölyhiukkaset, sienten ja bakteerien itiöt, virukset, solujen ja itiöiden palat, sekä lisäksi muu biologinen materiaali. Bioaerosolien koot vaihtelevat laajasti, sillä virukset ovat pienimpiä eläviä partikkeleita, noin 0,02–0,3 µm:n kokoisia. Bakteerien ja sienten itiöiden koko vaihtelee 0,3–100 µm:n välillä.⁸ Siitepöly koostuu suurimmista aerosolihiukkasista, sillä niiden läpimitat ovat yleensä 0,01–0,1 mm.⁹

Partikkeleiden liikkumiseen ja kulkeutumiseen ilmassa vaikuttaa niiden koko. Pienet hiukkaset leijuvat ilmassa, eivätkä laskeudu ollenkaan. Aerosolit vaikuttavat ihmisiin aiheuttamalla hengitysteissä terveysriskejä. Luonnossa vaikutukset ovat näkyvyyden vähentyminen ja partikkeleiden erottuminen maassa. Partikkelien kokojakauma on tutkittava, jotta pystytään selvittämään ympäristön aerosolien alkuperä ja vaikutus.⁹

Hiukkasilla on suuri merkitys monien ympäristölle tärkeiden aineiden kuten rikin, typen ja hiilen kiertokulussa maa-meri-ilmakehäsystemissä.⁷ Ihmisen aiheuttamia hiukkasia ovat öljyn ja kivihiilen palamisessa syntyneet noki ja hiukkaset, sekä kasvien palamisessa syntyneet hiukkaset.¹⁰ Sisäilman partikkelit ovat suurelta osin lähtöisin ulkoilmasta. Haitallisia pienhiukkasia syntyy tupakansavusta, liikenteestä, teollisuudesta ja palamisreaktioista.⁸ Suurin hiukkaslähde sisäilmassa on yleensä ihminen.⁹

3.1.1 Bakteerit

Bakteereja on maassa, vedessä, kasveissa ja eläimissä. Ilmassa bakteerit esiintyvät yleensä vegetatiivisina soluina tai endosporeina eli lepoitioina. Näitä voi olla vesipisaroissa, kasvimateriaaleissa tai eläimistä peräisin olevassa hilseessä.⁹ Bakteerilajeja tunnetaan tuhansia, mutta vain noin sata lajia on ihmiselle patogeenisia. Bakteerisolujen koko vaihtelee 0,5–30 µm:n välillä.⁵

Bakteerisolu koostuu solukalvosta eli plasmamembraanista, joka ympäröi solua. Solukalvo koostuu lipidikaksoiskerroksesta, proteiineista ja niihin kiinnittyneistä hiilihydraateista. Solukalvossa olevien kuljettajaproteiinien avulla solu kerää ympäristöstä ravintoaineita solun sisään, säättää solun ionitasapainoa ja monia muita tapahtumia.¹⁰

Sytoplasma on solukalvon sisällä oleva hyytelömäinen neste, joka koostuu ravintovarastorakkuloista. Ravintovarastorakkulat voivat sisältää lipidejä, tärkkelystä tai glykogenea. Lisäksi solulima sisältää entsyymejä ja muita proteiineja. Solulimassa tapahtuu bakteerien aineenvaihdunta. Solulimassa olevassa nukleoidissa sijaitsee solun kromosonaalinen DNA. Bakteereilla on lisäksi pienempiä kromosomin ulkopuolisia DNA-molekyylejä eli plasmideja.¹¹

Soluseinä sijaitsee solukalvon ulkopuolella. Se tukee solun rakennetta, antaa sille muodon ja suojaa solua. Soluseinä muodostuu sokereista ja aminohapoista koostuneesta mureiinikerroksesta.¹²

Soluseinän ulkopuolella voi joillakin bakteereilla olla kapseli, joka koostuu polysakkarideista. Bakteerisolut voivat tuottaa myös soluseinän ulkopuolelle limaa, joka koostuu sokereista ja polypeptideistä. Kapseli ja limaa suojaavat solua ja auttavat sitä kiinnittymään alustaansa.¹²

Bakteerit liikkuvat värekarvojen avulla. Värekarvat ovat kiinni solukalvossa ja niitä voi olla yksi tai useampi. Bakteerien tarttumakarvat helpottavat bakteerin kykyä tarttua vieraaseen kudokseen.¹²

Bakteerit luokitellaan muun muassa muodon perusteella, jolloin ne jaetaan pyöreisiin kokkeihin, sauvamaisiin basilleihin, serpentiinimäisiin spirilleihin ja kaareviin vibrioihin. Jaotteluperusteena voi olla myös kasvutapa, jolloin ne jaetaan streptokokkeihin, stafylokokkeihin ja diplokokkeihin. Myös rakenteeseen ja biokemiallisiin ominaisuuksiin perustuvaa jakoa käytetään. Esimerkiksi gramvärjäyksessä erotellaan grampositiiviset ja gramnegatiiviset bakteerit. Grampositiivisilla bakteereilla soluseinä on paljon paksumpi kuin gramnegatiivisilla ja lisäksi gramnegatiivisilla soluilla on soluseinän ulkopuolella ulkokalvo.¹¹

3.1.2 Sienet

Sieniä ovat hiivat, homeet ja homesienet. Sienten itiöiden koko on 1,5–30 µm ja suurimmat voivat kulkea pitkiä matkoja tuulussa. Sieni-itiöt ovat resistansseja erilaisille ympäristön vaikutuksille, kuten kuivuudelle, kylmyydelle, kuumuudelle ja UV-valolle.⁹ Sienistä on sekä haittaa että hyötyä ihmisille. Jotkut sienilajit pilaavat elintarvikkeita, mutta joitakin sienilajeja taas hyödynnetään elintarviketeollisuudessa, esimerkiksi juustojen valmistuksessa.¹⁰ Useimmat sieniaerosolit voivat aiheuttaa allergisia reaktioita sekä tauteja, kuten astmaa.⁹ Luonnossa esiintyvien homeiden päätehtävänä on orgaanisen materiaalin hajottaminen ja aineiden vapauttaminen takaisin kiertoon.¹⁰

3.2 Fluoresoivat bakteerit

Fluoresenssi on ominaisuus, jota esiintyy joillakin kemiallisilla aineilla. Aineet hohtavat tietynväristä valoa, kun niitä valaistaan toisella värillä. Fluoresoiva aine on fluorokromia. Fluorokromin elektroni virittyy fotonin vaikutuksesta korkeampaan energiatilaan. Virittynyt elektroni palaa perustilaan samalla luovuttaen energian, jonka sai fotonilta. Virittävä valo ja fluoresenssissa syntyvä emissio voidaan erottaa toisistaan erilaisen aallonpituutensa takia.¹²

Bioperäiset hiukkaset voivat sisältää yhdisteitä, joilla on voimakas fluoresenssitaipumus. Soluissa on itsestään fluoresoivia yhdisteitä kuten klorofylli, porfyriinit, A-vitamiini ja sytoplasman jäännöskappaleet.¹³ Osa proteiinien aminohapoista on rakentunut aromaattisista sivuketjuista, esimerkiksi tyrosiini ja

tryptofaani. Nämä yhdisteet sisältävät delokalisoituneen π elektronin, joka ei kuulu mihinkään tiettyyn sidokseen tai atomiin, vaan se on molekyyliorbitaalilla. Delokalisoituneet elektronit absorboivat useita sähkömagneettisen säteilyn aallonpituuksia, joten elektronit näkyvät ultraviolettivalon alueella.¹⁴

3.3 Torjunta-aine Turex 50 WP

Turex 50 WP on valmistettu *Bacillus thuringiensis* -bakteerista, jota esiintyy luontaisesti maaperässä. Sitä käytetään tuhohyönteisten torjuntaan maa- ja puutarhataloudessa.¹⁵ Pääasiallisesti Turexia käytetään perhostoukkien tuhoamiseen. Toukkien syödessä kaalinlehtiä ne saavat Turex-torjunta-ainetta elimistöönsä. Torjunta-aine aiheuttaa toukkien kuoleman tuhoamalla niiden suolistoa.⁵ Turex ei ole myrkyllinen hyötyhyönteisille, sillä *B. thuringiensis* tuottaa endotoksiineja, mitkä ovat insektsidisiä proteiineja. Näissä proteiineissa on polypeptidejä, joissa on sekä konservoituja että variaabeleja alueita, jotka määräävät spesifisyyden tietyille hyönteislajille.¹⁶ Turex sopii hyvin bioaerosolitutkimuksiin, sillä se leviää biotaisteluaineen tavoin.⁵

3.4 Mikrobien tunnistus

Bioaerosolien keräämiseen tarkoitettuja laitteita on kehitelty, mutta laitteet, joiden herkkyys riittää havaitsemaan kaukaisia biologisten aineiden päästöjä, ovat harvinaisia. Perinteisiä tunnistusmenetelmiä ovat maljalle kerätyt mikrobinäytteet, jotka tunnistetaan alustavasti koon, pesäkemuodon ja eri värjäyksien avulla. Värjäysmenetelmiä ovat esimerkiksi gram-, itiö- ja negatiivivärjäys.⁹

Tarkemmat tunnistukset perustuvat mikrobien fysikaalisiin ja biokemiallisiin ominaisuuksiin. Mikrobeja tunnistetaan esimerkiksi solujen DNA:n perusteella. Mikrobien DNA:ta uutetaan näytteistä ja ne monistetaan polymeeraaniketjureaktiolla (PCR), puhdistettu DNA sekvensoidaan ja mikrobit tunnistetaan sekvenssien samankaltaisuuden perusteella.¹⁰

Erilaiset kromatografiset menetelmät ovat yleisiä yhdisteiden eristämiseen, puhdistamiseen ja määrittämiseen käytettäviä menetelmiä. Mikrobien biokemiallisiin

ominaisuuksiin perustuvat tunnistusmenetelmät vaativat kaasukromatografiaa, massaspektrometriä, HPLC kromatografiaa tai spektrofotometriä.⁹ Tässä työssä mikrobit tunnistetaan kaasukromatografilla solujen rasvahappokoostumuksen perusteella.

3.4.1 Gramvärjäys

Gramvärjäyksessä bakteerit jaetaan kahteen luokkaan, grampositiivisiin ja gramnegatiivisiin. Jako perustuu soluseinien kemiallisen rakenteen eroihin, jolloin mikrobit värjäytyvät eri tavalla.¹⁰ Bakteerien soluseinä koostuu lipidimolekyylien muodostamasta kaksoiskerroksesta, johon on kiinnittynyt proteiineja. Grampositiivisilla bakteereilla on paksumpi soluseinä, peptidoglykaanikerros. Gramnegatiivisilla on lisäksi soluseinän ulkopuolella solukalvoa muistuttava ulkokalvo, joka sisältää lipopolysakkarideja, joissa polysakkaridiketjuun on kiinnittynyt lipidi.¹²

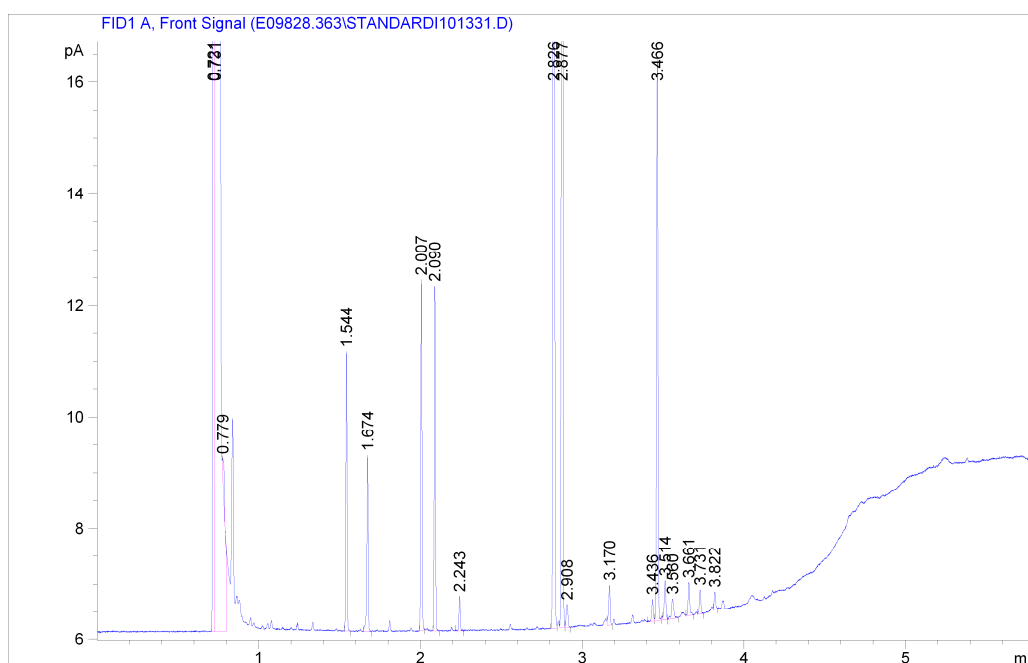
Värjäyksessä käytetään neljää ainetta; Hucerin kristallinviolettiä, lugolin liuosta, 96 % etanolia ja safraniinia. Hucerin kristallinvioletti värjää kaikki solut sinivioleteiksi. Emäksiset aineet kiinnittyvät happamiin molekyyliin värjäten ne. Lugolin liuos muodostaa kristallinvioletin kanssa kristallinvioletti-jodikompleksin, jonka jälkeen alkoholikäsitteily poistaa värin gramnegatiivisista soluista. Gramnegatiivisten bakteerien lipidit ekstrahoituvat, jolloin väri pääsee poistumaan soluista. Grampositiivisiin soluihin alkoholi dehydroloi soluseinää, jolloin läpäisevyys vähenee, mutta väri ei pääse poistumaan soluista. Värinsä menettäneet gramnegatiiviset solut saavat safraniinilla vaaleanpunaisen värin.¹⁷

Preparaateissa voi esiintyä huolellisesta työskentelystä huolimatta epäselvästi värjäytyneitä bakteerisoluja. Tämä voi johtua siitä, että monet bakteerit ovat gramvariaabeleita. Nämä voivat joskus värjäytyä grampositiivisiksi ja joskus gramnegatiivisiksi.¹⁸

3.4.2 Kaasukromatografi

Kaasukromatografilla tutkitaan kemiallisia yhdisteitä esimerkiksi lääke-, elintarvike- ja ympäristöteollisuudessa. Tässä kromatografisessa menetelmässä yhdisteet erotellaan toisistaan kolonnissa eli ohuessa putkessa. Injektorin avulla näyte syötetään laitteelle,

jossa se höyrystyä ja kulkee kantajakaasun mukana kolonniin. Kantajakaasuna voidaan käyttää vetyä, heliumia, argonia tai ilmaa. Näyteseoksen komponentit jakautuvat liikkumattoman faasin ja liikkuvan kantajafaasin välillä. Eri yhdisteet sitoutuvat kantajafaasiin eri tavalla, joten ne kulkeutuvat kolonnin läpi eri nopeuksilla. Näyteseoksen komponenttien erottuessa ne voidaan havaita niiden kuljettua kolonnin läpi. Detektori havaitsee kolonnissa erottuneet yhdisteet ja signaalien avulla saadaan näytekuva eli kromatogrammi (kuvio 1.). Kromatogrammista tunnistetaan näyte erillisellä analyysiohjelmalla vertaamalla retentioaikoja ja piikkejä. Retentioajaksi kutsutaan yhdisteen kulkuaikaa kolonnin läpi.¹⁸



Kuvio 1. Kromatogrammi

3.4.3 Mikrobin tunnistaminen Sherlock Microbial Identification System – järjestelmällä

Solukalvo ympäröi bakteereita ja se on rakentunut proteiineista ja kahdesta lipidikerroksesta. Lipidien hydrofobiset osat ovat vastakkain ja hydrofiiliset osat muodostavat kerroksien molemmiin puolin kontaktipinnan hydrofiilisen veden kanssa. Bakteerit pystytään tunnistamaan solukalvojen kalvolipideistä sen rasvahappokoostumuksen perusteella.¹¹

Microbial IDentification Inc (MIDI) on kehittänyt Sherlockin, mikrobien tunnistusjärjestelmän (Microbial Identification System(MIS)), jolla pystytään tunnistamaan laajalta alalta mikro-organismeja, jopa 1500 lajia aerobisia ja anaerobisia mikrobeja, sekä lisäksi hiivoja. Tunnistus perustuu kaasukromatografiseen (GC) määrittelyyn, jossa analysoidaan solukalvon rasvahapon metyyliestereitä.²⁰

Kaasukromatografiin on yhdistetty Sherlock Microbial Identification System – analyysiohjelma. Laitteen ohjelmisto sisältää spektrikirjaston, johon saatua tulosta verrataan. Sherlock pystyy tunnistamaan mikrobin vain, jos sen rasvahappokoostumuksen profiili pystytään tulkitsemaan ja löytämään kirjastosta. Yhden näytteen identifiointi puhtasviljelmästä kestää 15 minuuttia. Kuvassa 1 on tavallinen kaasukromatografi.¹⁹



Kuva 1. Kaasukromatografi.²⁰

4 BIOAEROSOLIEN KERÄYKSEEN SOVELTUVIA LAITTEITA JA MENETELMIÄ

Bioaerosolien havainnointiin tarkoitetut laitteet mittaavat hiukkasten lukumäärää ja kokojakaamaa. Laitteet myös mittaavat muita optisia mittauksia, kuten ultraviolettifluoresointia ja sirontaa.²¹ Ilmassa leijuvat bioaerosolinäytteet kerätään suoraan kasvatusmaljalle, nesteeseen tai suodattimeen. Nesteeseen ja suodattimelle kerätyt näytteet kasvatetaan maljauksen avulla.²² Yleisin keräin mikrobien määrän mittaamiseen ilmasta on impaktorikeräin. Laitteiden ja menetelmien tehokkuus vaihtelee. Tehokkuuteen vaikuttaa se, kuinka hyvin hiukkaset saadaan kerättyä laitteeseen testiympäristöstä, sekä miten hyvin hiukkaset säilyvät ja saadaan kasvamaan kasvualustalla.⁹

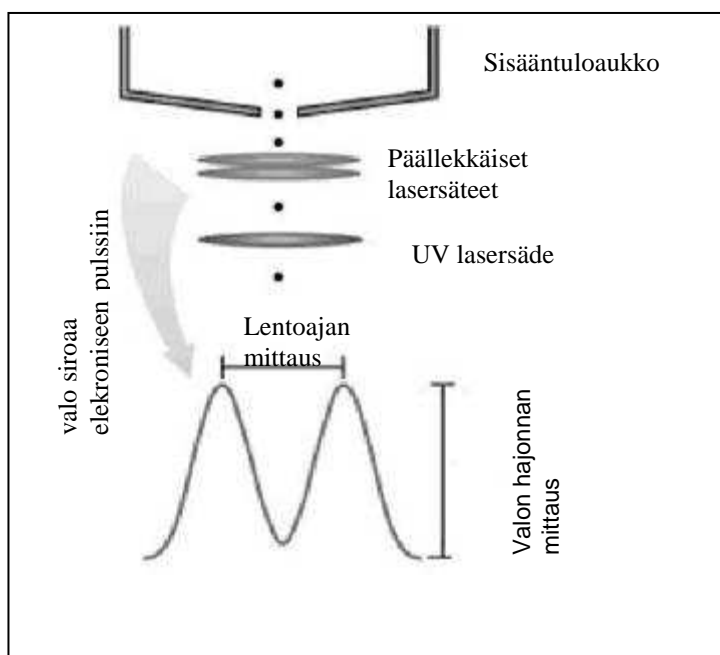
4.1 UV-APS

Ultraviolet Aerodynamic Particle Sizer® mallia 3314 (UV-APS) on partikkelispektrometri, joka mittaa aerodynaamista hiukkaskokoa ja fluoresenssia. Kuvassa 2 on UV-APS kokeen suorituspaikalla.



Kuva 2. UV-APS.

Kuviosta 2 nähdään UV-APS -laitteen periaate. Siihen pystytään sisällyttämään 0,5–15 μm :n kokojakaumat.²⁰

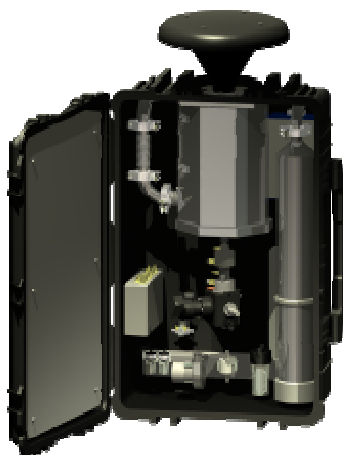


Kuvio 2. UV-APS:n toiminta.

Fluoresenssisäteily mitataan valaisemalla partikkelit ultraviolettilaserteellä sekunniksi aallonpituuden ollessa 420-575 nm. Partikkelit virittyvät hetkellisesti ja varauksen purkautuminen tuottaa fluoresenssisäteilyn, joka mitataan. Partikkelien nopeuteen vaikuttavat niiden aerodynaaminen koko ja UV-laserin ajanmittaus partikkelien välissä perustuu lentoajan mittaamiseen (kuvio 2). Laite mittaa myös valon hajontaa eli partikkeleiden sironnan voimakkuutta. UV-APS:ssa on lisäksi virtuaalinen impaktori, jolla voidaan suodatuksen avulla määrittää testiin tulevien partikkeleiden koko.²¹

4.2 BIO 200 -monitori

Bioperäiset hiukkaset sisältävät yhdisteitä, joilla on voimakas fluoresenssitaipumus. BIO 200 -monitori mittaa näitä fluoresoivia hiukkasia suoraan ilmasta. BIO 200:ssa oleva sirontakanava mittaa hiukkaspitoisuutta ja fluoresenssikanava mittaa hiukkasten fluoresenssitaipumusta. Hiukkasia ei kerätä talteen, vaan ne mitataan suoraan ilmapirtauksesta.²² Kuvassa 3 on BIO 200 -monitori etukansi avattuna.

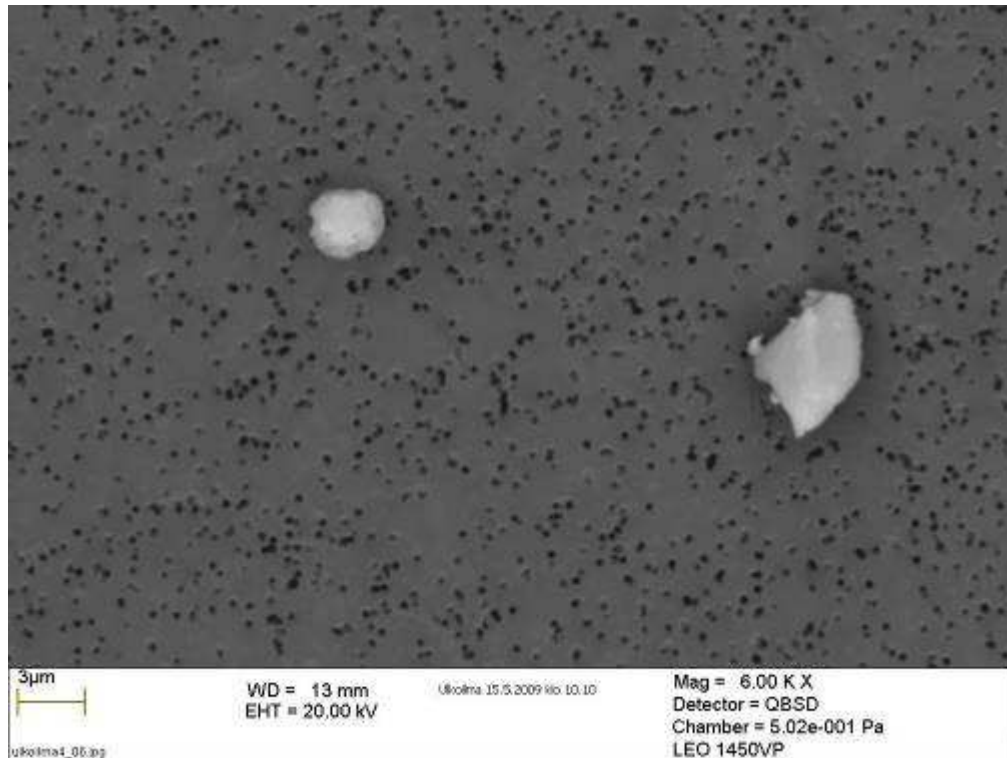


Kuva 3. BIO 200 -monitori.²¹

BIO 200:ssa oleva sirontakanava koostuu primääri- ja sekundääriyksiköstä. Primäärimittausyksikkö havaitsee hiukkasten määrää ja fluoresenssitaiipumusta. Sekundäärisessä yksikössä on kaksi kanavaa ja molemmat mittaavat ilmassa olevien varautuneiden hiukkasten pitoisuutta. UV-varaajalla muodostuu hiukkasiin virta, jota mitataan. Coronavaraajalla mitataan virtaa, joka aiheutuu hiukkasten varaustilasta. BIO 200 -laitteessa on konsentraattori, joka konsentroi yli 2 μm :n hiukkasia. Tämä toiminto parantaa laitteen herkkyyttä haluttuihin hiukkasiin. Tulokset saadaan suoraan reaaliajassa tietokoneeseen, jolla laitetta voidaan hallita.²¹

4.3 SEM ja AeroTrak

Scanning Electron Microscope (SEM) on pyyhkäisyelektronimikroskooppi, jota käytetään muun muassa solujen pintaominaisuuksien tutkimiseen. Näytteet päällystetään jollakin metallilla, yleensä kullalla tai palladiumilla, jonka jälkeen SEM:n elektronisuihku pyyhkii näytettä edestakaisin.¹⁷ Tulokset saadaan kolmiulotteisina kuvina, joista on helppo havainnoida pinnanmuotoja ja pintarakennetta.²² SEM:n avulla pystytään laskemaan hiukkasten määrän litraa kohti, kun tiedetään suodattimen koko ja virtaus, jolla näytteitä imetään suodattimeen. Kuvassa 4 nähdään SEM-näytteen kolmiulotteinen kuva. Kuvan vasemmassa alareunassa nähdään näytteiden koko. Pyyhkäisyelektronimikroskoopilla kyetään jopa 15 x–100 000 x suurennoksiin.⁹



Kuva 4. SEM-näyte.

AeroTrak on suhteellisen pieni hiukkaslaskuri, joka laskee $0,3\ \mu\text{m}$ – $10\ \mu\text{m}$:n kokoisia hiukkasia mitattavasta ilmasta (kuva 5) ja sen toiminta perustuu valon sirontaan. AeroTrakin ottama ilmamäärä on 2,83 litraa minuutissa. Helppokäyttöinen automatisoitu laite mittaa hiukkasia ilmasta 12–24 tuntia ja mittausdata saadaan siirrettyä suoraan tietokoneelle.²³

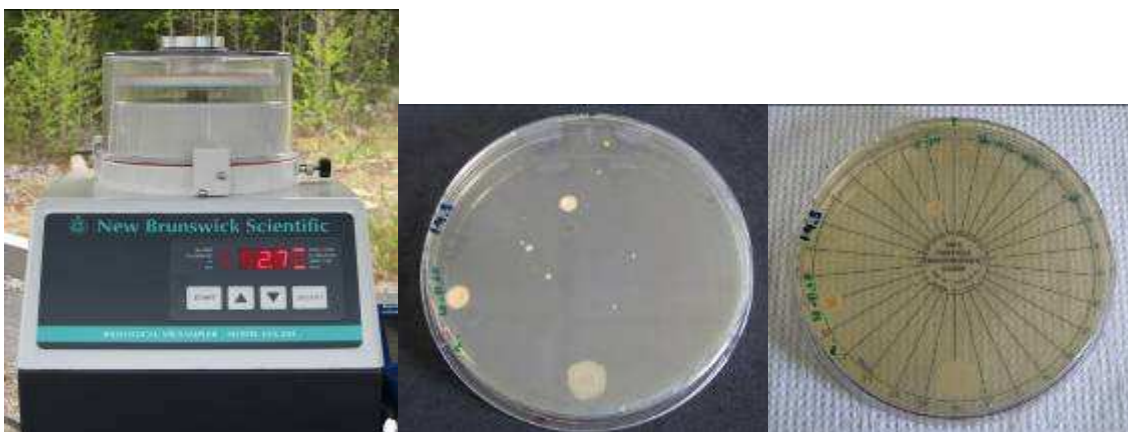


Kuva 5. AeroTrak.²⁴

4.4 Näytekerääjät

4.4.1 Slit To Agar

Slit To Agar (STA) on ilmanäytteenkerääjä, jolla pystytään keräämään ilmassa olevia mikrobikontaminaatioita. Laite imee tunnetun suuruisen ilmamäärän asetetussa ajassa ohuen raon kautta agarmaljalle, joka pyörii alustalla asetetulla nopeudella. Kuvassa 6 on vasemmalla STA-laite. Kuvan 6 keskellä on kuvattu agarmalja tummaa pintaa vasten, jotta pesäkkeet näkyisivät ja kuvan oikeassa reunassa maljan alle on asetettu pitoisuuden määrittystä helpottava viivasto. Kasvatuksen jälkeen maljalta pystytään laskemaan pesäkkeet ajan ja virtauksen suhteen. Pitoisuuden määrittäminen lasketaan pitoisuutena ajan funktiona ja tulokseksi saadaan niin kutsuttu ACPLA-arvo (Agent Containing Particle per Liter of Air).²⁴



Kuva 6. Slit To Agar ja maljat.

4.4.2 BioSampler-keräin

BioSampler on tehokas partikkelikeräin. Laite on lasia ja mediumina voidaan käyttää vettä tai jopa 1000 kertaa viskoosempaa nestettä. Erittäin viskoosinen neste on esimerkiksi erityinen mineraaliöljy. Laite koostuu kolmesta osasta; ilmantuloaukosta, suutinosasta ja keräysputkilosta (kuva 7). Hiukkaset kerätään nesteeseen tai nesteessä oleviin kaasukupliin diffuusion avulla. Laitteessa ei ole omaa sisäänrakennettua pumppua, joten alipaine saadaan aikaan erillisellä pumpulla.⁵ Virtausnopeus on 12,5 litraa minuutissa. Sopiva näytteenkeruu-aika vaihtelee keräysputkioon laitettun

nestemäärän mukaan, 20 ml nestettä kerää hyvin kahden tunnin näytteen ilmasta. Tämän jälkeen suoritetaan näytteiden viljely maljoille, joilla ulkoilman mikro-organismit kasvatetaan.²⁵



Kuva 7. BioSampler keräin.

4.5 Testinäytteisiin tarvittavat laitteet

Testinäytteeksi valittiin torjunta-aine Turex 50 W. Näytteet levitettiin mittausalueelle sonikaattorin avulla, joka muutti liuoksen sumupisaroksi. Kuvassa 8 vasemmalla on sonikaattori ja oikeanpuoleisessa kuvassa näyteruisku ja letku, joka on kiinnitetty sonikaattoriin.



Kuva 8. Sonikaattori ja näyteruisku.

5 MITTAUSTEN SUORITUS

5.1 Työn tarkoitus

Työn tarkoituksena oli tutkia ja määrittää ulkoilman mikrobitaustaa kesällä 2009. Taustan selvittämiseksi tutkittiin partikkeleiden kokojakaumaa, hiukkaspitoisuutta, mikrobien fluoresoivuutta ja määrää ilmassa. Opinnäytetyöni tarkoituksena oli analysoida eri laitteiden antamia tuloksia.

Tutkimushankkeen tavoitteena on selvittää ulkoilmassa olevien mikrobien määrää ja vertailla vuodenaikojen vaikutusta mikrobitaustaan. Tutkimushanke päättyy kesällä 2010. Syyskuussa ja lokakuussa 2009 mitattiin ulkoilman mikrobitaustaa syksyn ilmastossa ja keväällä 2010 mitataan vielä mikrobitaustaa kevään ilmastossa.

Taulukossa 1 on lueteltu käytetyt laitteet ja merkitty laitteen mittaama ominaisuus. Partikkelihiukkasmonitorointiin käytettiin AeroTrak mallia 8220 ja biopartikkelien hiukkasmonitorointiin UV-APS mallia 3314. UV-APS:ssa on virtuaalinen impaktori, joka laitettiin suodattamaan suurimpia yli kahden μm :n partikkeleita. Lisäksi käytettiin

BIO 200 -laitetta mittaamaan biologista hiukkastausta ja hiukkasten fluoresenssitaipumusta (FL).

Mikrobiologiset näytteenottolaitteet olivat Slit To Agar ja BioSampler. STA-laitteesta saatiin ACPLA-arvot ja pesäkkeiden määrä (cfu) maljoilla. Mikrobin tunnistamiseen käytettiin MIDI's Sherlock Microbial Identification -menetelmää. Pyyhkäisyelektronimikroskooppitutkimuksia varten käytettiin imusuodatinta ja näytteet otettiin vaihtelevasti kahden tai kolmen tunnin jaksoissa. SEM-kuvista selvitettiin enimmäkseen hiukkasten rakenteita.

Tutkimuksen aikana sääasema mittasi lämpötilaa, kosteutta, tuulen suuntaa ja -nopeutta sekä aurinkoenergiaa. Sonikaattoria käytettiin testinäytteen levittämiseksi tutkimusalueelle.

Taulukko 1. Laitteiden mitaamat ominaisuudet.

Laitteiden käyttötarkoitus mittauksissa							
Laite	Lkm/ kokojakauma	Fluoresenssi	ACPLA	FL hälytykset	CFU	visualisointi	sää tiedot
UV-APS	x	x					
AeroTrak	x						
BIO 200		x		x			
STA			x		x		
SEM	x					x	
Sääasema							x

Tutkimuksen sijainniksi valittiin paikka, jonka koordinaatit olivat 61°36'11 N ja 23°29'27 E 12.–14.5.2009. Tämän jälkeen mittauksia jatkettiin 18.–29.5.2009 lisätietojen saamiseksi PvTT:n takapihalla, jonka koordinaatit olivat 61°36'20 N ja 23°30'10 E.

5.2 Näytteenotot

Näytteenottopaikaksi 12.–14.5.2009 valittiin asfaltilla päällystetty tasanne Puolustusvoimien koekentältä, jonne rakennettiin sateelta suojaava teline mittalaitteille

(kuva 9.). Sääasema oli telineen läheisyydessä ja säätiedot kirjattiin 30 minuutin välein. Bio 200 -laite ja UV-APS käynnistettiin mittauspäivinä ja liitettiin tietokoneisiin, jolloin ne antoivat ajankohtaista dataa suoraan näytölle samalla tallentaen tiedot. AeroTrak mittasi automaattisesti partikkelilukumäärää koko testin ajan ja data saatiin siirrettyä mittausajan loputtua koneelle tulkintoja varten.

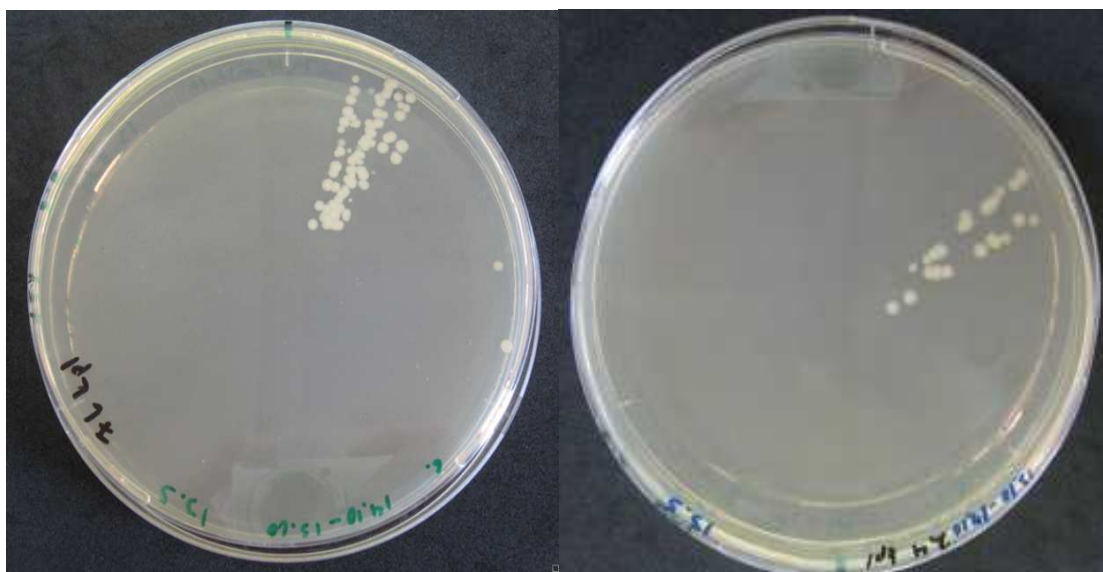


Kuva 9. Näytepaikka.

Näytteenottopaikka siirrettiin lisätutkimuksia varten PvTT:en takapihalle asfaltille, jossa suoritettiin mittauksia 18.–29.05.2009. Sääasema pystytettiin mittalaitteiden läheisyyteen. Erona edelliseen mittauspaikkaan oli se että vieressä oli puita varjostamassa ja moottoriajoneuvoliikennettä enemmän.

Testimittauksia suoritettiin erikseen määriteltynä ajankohtina sonikaattorin avulla. Testibakteerisuspensioina käytettiin 0,1 mg/ml ja 1,0 mg/ml Turex 50 W-liuoksia. Bakteerisuspensiot valmistettiin laimentamalla bakteerijauhoa tislattuun veteen. Turexia sumutettiin sonikaattorilla mittalaitteita kohti muutama minuutti ja selvitettiin reagoivatko laitteet bakteeriin. Kuvasta 10 nähdään, että bakteerista on kasvanut

pesäkkeitä STA-laitteen maljoille. Oikeanpuoleisen kuvan sumutukset tehtiin klo 13.50–13.55 0,1 mg/ml vahvuisesta liuoksesta ja vasemmanpuoleisen kuvan sumutus tapahtui klo 14.15–14.20 1,0 mg/ml vahvuisesta liuoksesta. Vahvempi liuos vasemmanpuoleisessa kuvassa on aiheuttanut enemmän pesäkkeitä. Sumutuksien aikajakso nähdään alustalla pyörineestä maljasta. Molemmat sumutukset kestivät viisi minuuttia ja pesäkkeet muodostavat viiden minuutin pituisen aikajakson molemmissa maljoissa.



Kuva 10. Testimittauksien tulos Slit Agar Samplerilla.

5.3 Mikrobiologiset näytteenotot

5.3.1 Kasvualustat ja puhdasviljelmät

Slit Sampler- ja BioSampler -laitteita varten valmistettiin kasvatusmaljoja. TSA-kasvualustan koostumus oli seuraavanlainen:

Trypticase- Soya Broth (BBL)	30 g/l
Agar-Agar (Merck)	15 g/l

Sabouraud` s agar homemaljojen koostumus oli seuraavanlainen:

1 g/100 ml Peptone

4 g/100 ml glucose
1,5 g/100 ml Agar-Agar (Merck)
pH 5,6.

Liuokset autoklavoitiin ja valettiin petrimaljoille aseptisissä olosuhteissa. Homeet eivät olisi kasvaneet TSA-maljoilla, joten homemaljoja tehtiin muutama erä. Näin saatiin vertailupohjaa ulkoilman homeiden määrästä muihin bakteereihin verrattuna.

5.3.2 Slit To Agar -näytteet

Slit To Agar -näytteiden keruussa virtausnopeudeksi valittiin 30 l/min ja kierrosajaksi 60 minuuttia. Malja asetettiin alustaan ja rakoimpaktori kiersi maljan ympäri. Mittauspäivinä malja vaihdettiin tunnin välein. Mittausajat ovat liitteessä 1.

5.3.3 SEM-näytteet

Tässä työssä SEM:lla määritettiin ulkoilman hiukkasmäärä litraa kohti. SEM-näytteet otettiin imusuodattimella, jossa virtaus oli 23 litraa minuutissa. Suodattimen paksuus oli 0,4 µm. SEM-näytteitä otettiin neljänä eri päivänä ja sen jälkeen suodattimet vietiin kuvattavaksi. Saaduista kuvista laskettiin suodattimilla olevien hiukkasten lukumäärät. Tuloksista saatiin laskettua hiukkasten määrä litraa kohti.

5.3.4 BioSampler-näytteet

BioSamplerin steriloidut lasiosat (kolme kappaletta) koottiin päällekkäin ja keräysputkiloon kaadettiin 20 ml steriloitua vettä. Pumpun letkut kiinnitettiin keräimeen, jonka ansiosta nokka imi ilmaa astian pohjalle. Ilman hiukkaset sekottuivat veteen ja jäivät siihen. Ensimmäinen BioSamplerilla otettu näyteliuos jäättyi keräysosaan kylmän ilman ja imun yhteisvaikutuksesta. Keräysliuokseen lisättiin tämän jälkeen 20 % glyserolia jäätymisen estämiseksi. Näytteenottoajat ovat liitteessä 1.

5.4 Näytteiden viljely

Slit To Agar -maljoista TSA-maljoja viljeltiin 30 °C:een lämpökaapissa kaksi vuorokautta. Homemaljojen viljelyaika oli kolme vuorokautta 30 °C:een lämpökaapissa. Jokainen BioSampler-näyte viljeltiin TSA-maljalle ja Sabouraud`'s agar-homemaljalle

300 µl:n ja 100 µl:n näytemäärinä pintalevityksellä. 0-näyte viljeltiin steriloidusta vedestä, jota käytettiin keräysnesteinä.

Kasvatuksen jälkeen Slit To Agar -maljat kuvattiin ja laskettiin ACPLA. ACPLA-tulokset saatiin laskemalla pesäkkeiden lukumäärät ja vertailemalla aikaa, jolloin pesäkkeet olivat syntyneet alustan pyöriessä. Tutkimuksen ajaksi maljat säilöttiin jääkaappiin.

Puhdasviljelmät luotiin kasvaneista mikrobinäytteistä TSA-maljoille siirtämällä yksi erillinen pesäke uudelle TSA-maljalle ja kasvattamalla maljoja kaksi vuorokautta 30 °C:ssa. Kasvatuksen jälkeen siirrostettiin vielä yksi erillinen pesäke kaikista näytteistä puhtaalle TSA-maljalle. Kasvatus tapahtui samoissa oloissa kuin edellinenkin kasvatus. Näin saatiin puhdasviljelmät jatkotutkimuksia varten. Opinnäytetyötäni varten Suomen näytteistä valittiin seitsemän erilaista pesäkettä Slit To Agar -näytteenkerääjän maljoista, joista kasvatettiin puhdasviljelmät.

5.5 Mikroskopointi ja värjäys

Suomen näytteistä seitsemän pesäkettä tutkittiin valomikroskoopilla ja valokuvattiin. Mikrobien värjäys suoritettiin seuraavasti:

Lasisilmukallinen bakteerisuspensiota kuivatettiin objektiivilasille ja peitettiin Hucerin kristallivioletilla yhdeksi minuutiksi. Preparaatti huuhdottiin nopeasti vesijohtovedessä ja peitettiin Lugolin liuoksella yhdeksi minuutiksi. Preparaatti huuhdeltiin kuten edellä. Pipetoitiin 96 % etanolia preparaatin päälle noin 30 sekunnin ajan, kunnes väriä ei enää liuennut. Preparaatti huuhdeltiin heti vesijohtovedessä, jonka jälkeen se peitettiin safraniinilla 10 sekunniksi. Tämän jälkeen huuhdeltiin preparaatti ja kuivattiin lasi varovasti imupaperilla. Preparaatit kuvattiin valomikroskoopilla.

5.6 Mikrobien identifointi

Seuraavat reagenssit valmistettiin identifointia varten:

Reagenssi 1

Natriumhydroksidi 22,5 g
Metanoli 75 ml
Käänteisosmoosivesi 75 ml

Reagenssi 2
Kloorivetyhappo 6.00 N 81,25 ml
Metanoli 68,75 ml

Reagenssi 3
Heksaani 100 ml
Metyylitertiääributyylieetteri 100 ml

Reagenssi 4
Natriumhydroksidi 5,4 g
Käänteisosmoosivesi 450 ml

Näytteet preparoitiin seuraavasti identifiointia varten:

Vaihe 1

Puhdasviljelmistä otettiin neljän mm:n silmukalla näytettä falconputkeen ja lisättiin 1,0 ml reagenssi 1:stä. Putkia sekoitettiin 5–10 sekuntia, jonka jälkeen putket asetettiin kiehuvaan veteen viideksi minuutiksi. Tämän jälkeen putkia sekoitettiin 5–10 sekuntia ja asetettiin kiehuvaan veteen 25 minuutiksi. Putkien annettiin jäähtyä huoneenlämmössä. Reagenssissa oleva vahva metanoliemäs yhdistettynä kuumuuteen hajottaa solun, jolloin rasvahapot liukenevat solulipideistä ja muuttuvat rasvahapon natriumsuolaksi.²²

Vaihe 2

Putkiin lisättiin kaksi millilitraa reagenssi 2:sta ja sekoitettiin 5–10 sekuntia. Putket asetettiin lämpöhauteeseen 80 °C:een 10 minuutiksi. Putkia jäähdytettiin hetki pakkasessa. Reagenssi 2 metyloi rasvahapon natriumsuolan rasvahapon metyyliesteriksi.²²

Vaihe 3

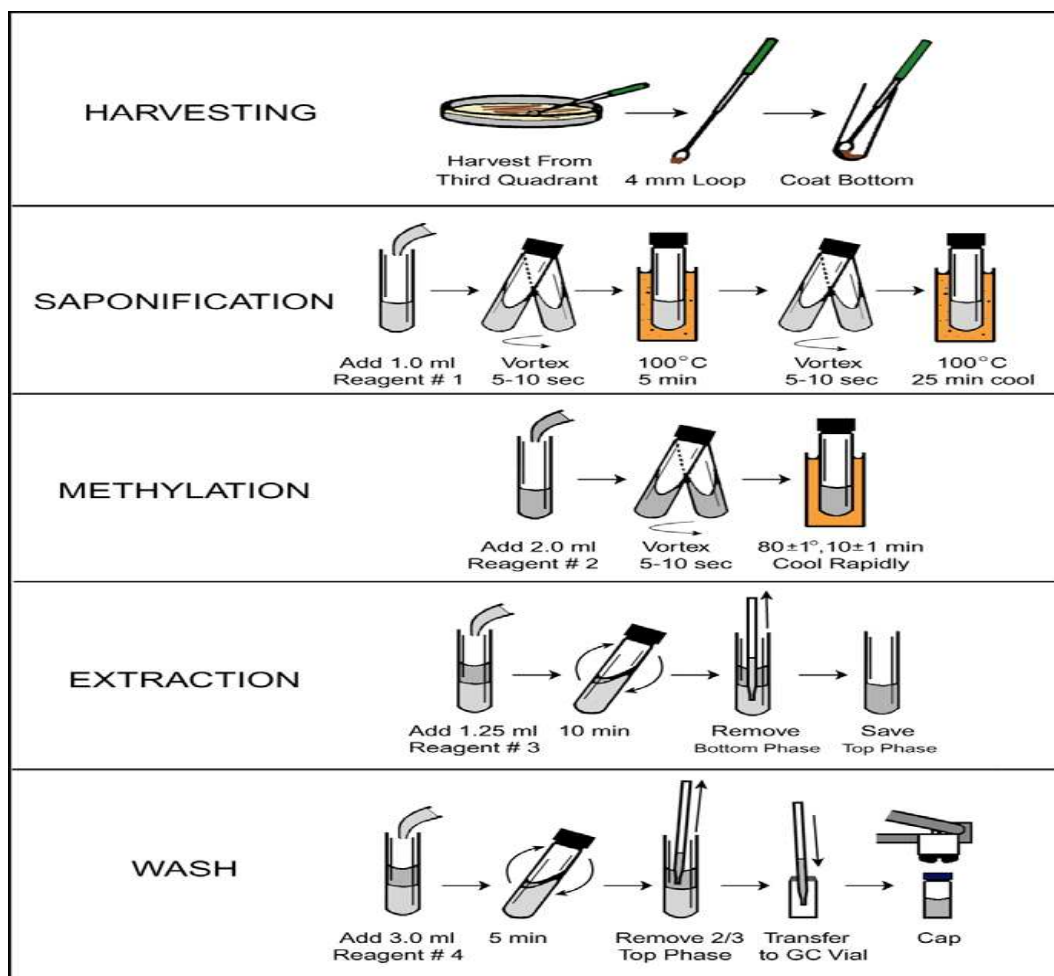
Putkiin lisättiin 1,25 ml reagenssi 3:sta ja sekoitettiin ravistelijassa 10 minuuttia. Yläfaasi säilytettiin ja siirrettiin uuteen putkeen. Rasvahapon metyyliesteri poistettiin happovesifaasista ja siirrettiin orgaaniseen faasiin neste-neste uutolla.²²

Vaihe 4

Orgaaniseen faasiin lisättiin kolme millilitraa reagenssi 4:stä ja ravisteltiin viisi minuuttia. Putkista siirrettiin 2/3 yläfaasia uuteen näyteputkeen, joista kaasukromatografi-määritys tehtiin. Reagenssi 4 laimensi liuosta, jotta saatiin eroteltua rasvahapot jäljelle jäävistä reagensseista. Jäljelle jäävät aineet häiritsevät analyysiä jolloin tuloksia ei saada.²²

Valmistetut näytteet pakastettiin, jotta ne säilyisivät analysointia varten. Näytteiden ajaminen suoritettiin kaasukromatografilla. Näyteputki asetettiin laitteeseen, joka otti putken automaattisesti ja analysoi sen sisällön vertaillen näytteen rasvahappokoostumusta omaan tietokantaansa.

Kuviossa 3 on esitetty edellä kuvatut vaiheet. Puhdas näyte preparoidaan eri reagensseilla ennen kaasukromatografista määritystä. Näyte analysoidaan kaasukromatografilla ja Sherlock-ohjelman avulla. Ennen kaasukromatografista määritystä tietokoneen analyysiohjelmasta valitaan mikrobeille sopiva menetelmä, jolla näytteet saadaan analysoitua.



Kuvio 3. Mikrobin identifiointi.²⁰

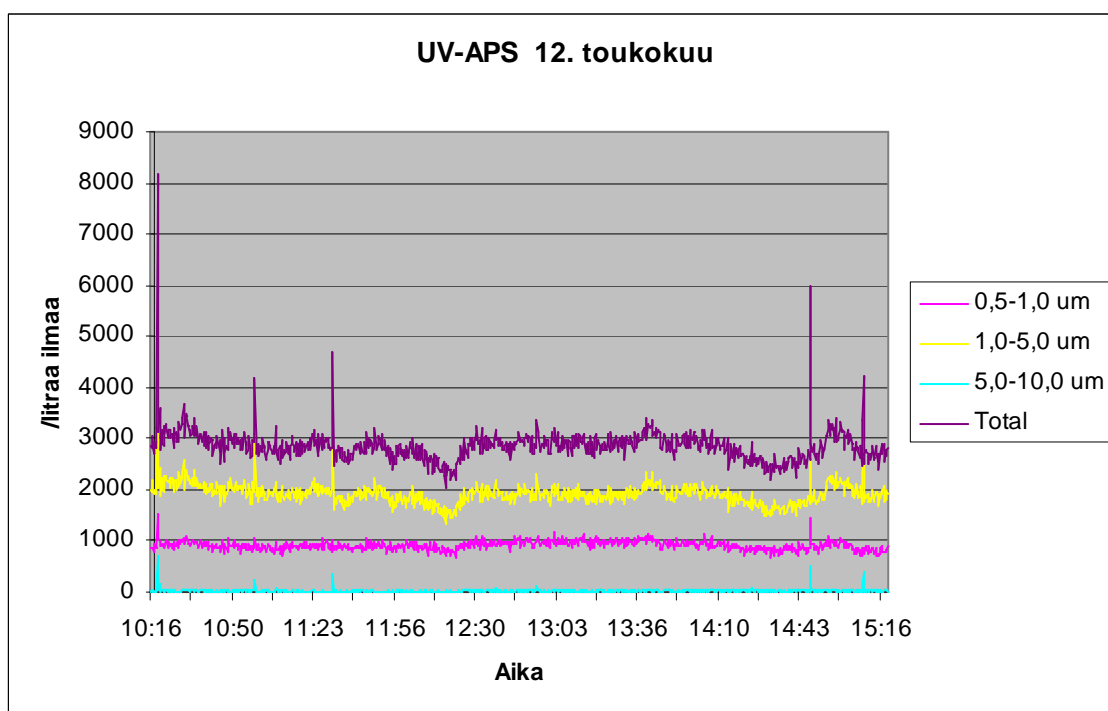
5.7 Ruotsin ja Norjan näytteet

Ruotsin ja Norjan näytteet lähetettiin Ylöjärvelle PvTT:een tunnistettavaksi. Ruotsista näytteitä oli 32 ja Norjasta 30 kappaletta. Näytteet olivat koeputkissa puhtasviljeltyinä agarin pinnalla, joista kasvatettiin näytteet TSA-maljoille tunnistusta varten. Maljoille kasvaneet pesäkkeet kuvattiin valomikroskoopin sisäisen kameran avulla. Lisäksi suoritettiin gramvärjäys tunnistuksen helpottamiseksi. Värjätyt solut kuvattiin myös valomikroskoopilla. Mikrobit tunnistettiin Sherlock[®] Microbial ID System-ohjelmalla.

6 TULOKSET JA NIIDEN ARVIOINTI

6.1 UV-APS

UV-APS -tulokset 12.5.2009 nähdään kuviossa 4. Tulokset on jaoteltu 0,1–1,0 μm :n, 1,0–5,0 μm :n ja 5,0–10,0 μm :n kokoisiin hiukkasiin. Lisäksi on laskettu kokonaispartikkeleiden määrä litrassa ilmaa mittausaikavälillä. UV-APS:n kokonaihiukkasmäärät pysyttelivät useimmiten tasolla 3000–6000 fluoresoivaa hiukkasta litrassa. Hiukkasmäärät kohosivat 27.5.2009 ja 28.5.2009 keskimäärin 13000 fluoresoivaan hiukkaseen litrassa. Loput UV-APS -tulokset on esitetty liitteessä 2.



Kuvio 4. UV-APS -tulokset.

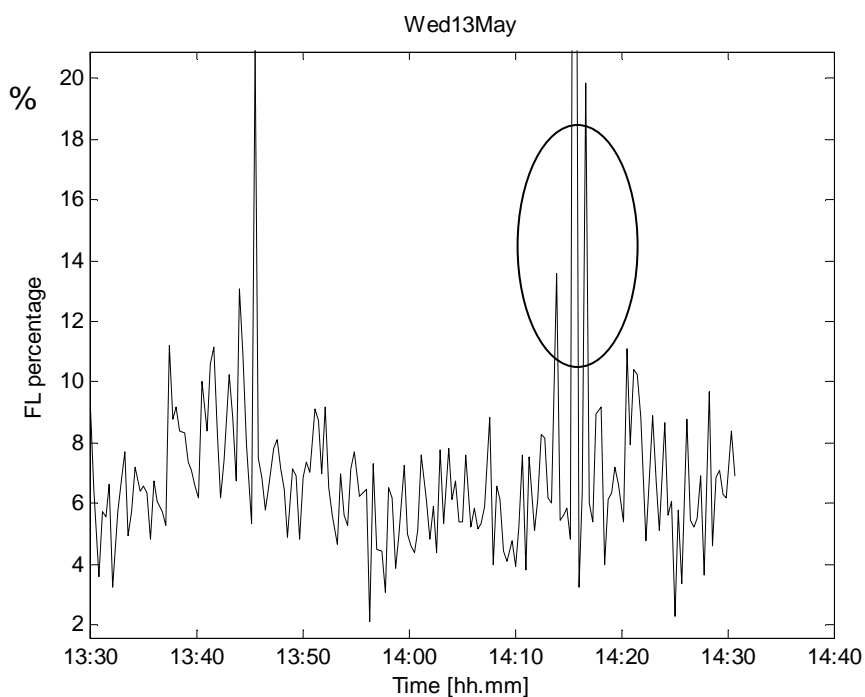
Kuvio 5 ja kuvio 6 esittävät UV-APS -laitteen datakäyrää, jossa on eriteltyä vain 1–5 μm :n kokoiset hiukkaset.

Kuviossa 5 on y-akselilla FL percentage, joka ilmaisee fluoresoivien hiukkasten määrän prosentteina (UV-APS:n fluoresenssikanavat ovat 2–64). Kuviossa 6 on y-akselina $\text{Concentration}_{\text{FL}}$, joka ilmaisee fluoresoivien hiukkasten pitoisuuden vaihtelun.

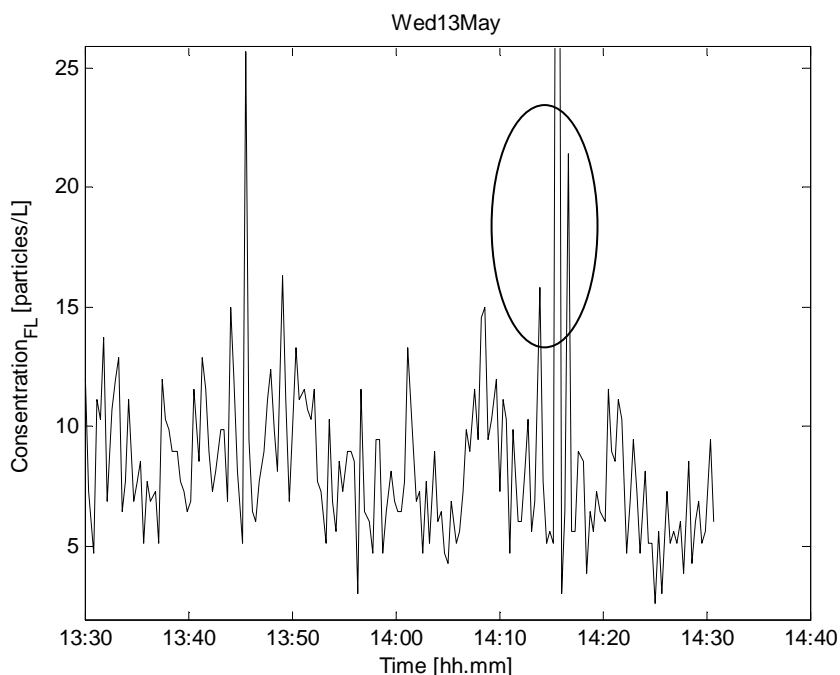
Fluoresoivien hiukkasten määrä kuviossa 5 vaihtelee 4–10 %:n välillä. Kuviossa 6 fluoresoivien hiukkasten pitoisuus vaihtelee 5–15 partikkelia litrassa.

Datakäyristä (kuvio 5 ja kuvio 6) nähdään myös testimittaukset Turexin kanssa 13.05.2009 klo 13.50–13.55, jolloin oli ensimmäinen sumutus. Sumutuksessa käytettiin 1,5 ml Turexia, jonka pitoisuus oli 0,1 mg/ml. Turexin partikkelikoko oli 1,4 μm . Kuvioissa ei tapahtunut suuria muutoksia ensimmäisen sumutuksen yhteydessä.

Seuraava testisumutus oli 13.05.2009 klo 14.15–14.20. Testisumutuksessa käytettiin 1,5 ml Turexia, jonka pitoisuus oli 1,0 mg/ml. Partikkelikoko oli tällöin noin 3,8 μm . Kuvioista 5 ja kuvioista 6 on ympyröity vahvemman testisuspension aiheuttamat signaalit laitekäyrissä.



Kuvio 5. UV-APS data 1. (Lähde: Putkiranta Matti).



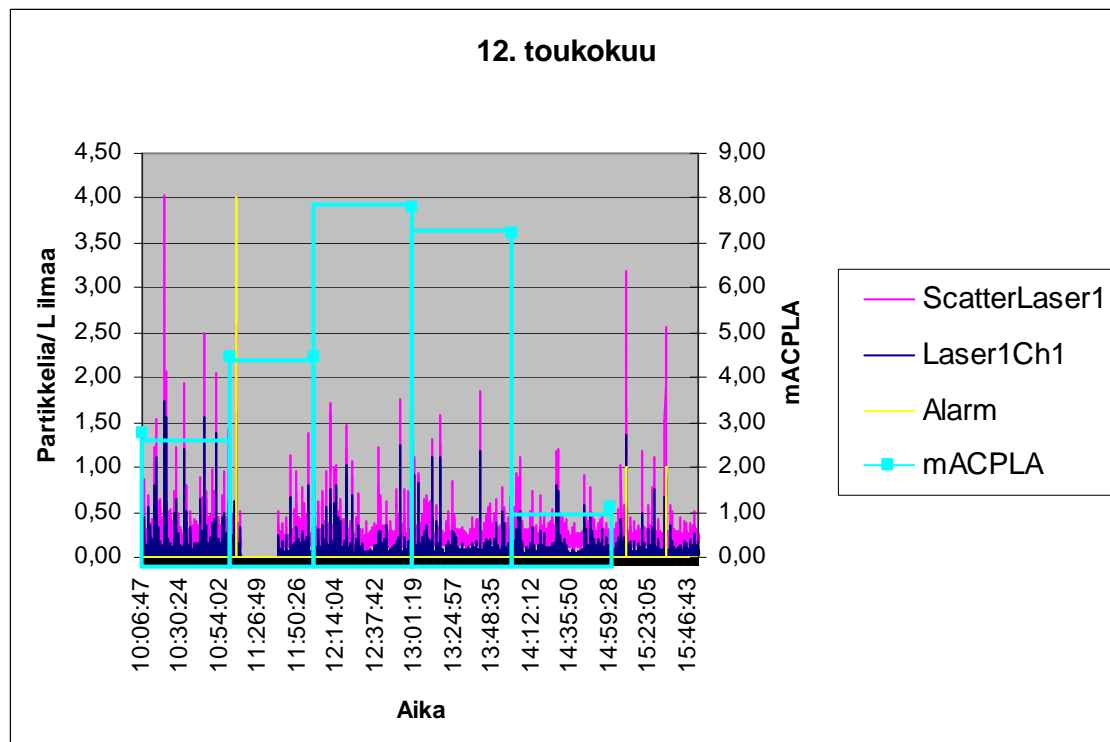
Kuvio 6. UV-APS data 2. (Lähde: Putkiranta Matti).

Liitteissä 2/5–2/9 on loput tietokoneella tehdyt tarkemmat analysoidut kuvaajat, joihin on sisällytetty ainoastaan 1–5 mikrometrin kokoiset hiukkaset. Datakuvaajat antavat tulokset 12.5–14.5.2009 fluoresoivien hiukkasten määrästä prosentteina (FL percentage). Fluoresoivia hiukkasia oli keskimäärin 3–8 %. Datakuvaajat 26.5–29.5.2009 näyttävät sekä fluoresoivien hiukkasten määrän prosentteina että painotetun määrän 1-5 μm :n kokoisista fluoresoivista hiukkasista (FL weighted). Tällä aikajaksolla fluoresoivia hiukkasia oli 2–6 % ja fluoresoivien hiukkasten määrä painotettuna 1-5 μm :n kokosiin hiukkasiin oli 0,1–0,35.

6.2 BIO 200

Kuviossa 7 on 12.5.2009 BIO 200 -laitteella mitatut fluoresoivat hiukkastulokset. Kuvaajassa on Laser1Ch1, mikä kuvaa fluoresoivien hiukkasten antamaa signaalia. ScatterLaser1 ilmoittaa fluoresoivien hiukkasten lukumäärän. Alarm-käyrä näyttää varoitukset korkeasta fluoresointitasosta. mACPLA-pitoisuus kyseiseltä päivältä on merkitty suoraan kuvaajaan oikeanpuoleiseen y-akseliin tunnin ajanjaksoilla, jotta signaalitasoa ja pesäkkeiden lukumäärää pystytään vertaamaan.

Hälytyspiikki on noussut laitteeseen kuviossa 7, mutta heti tämän jälkeen laite lopetti mittaamisen hetkeksi tuntemattomasta syystä.



Kuvio 7. BIO 200-tulos.

Tutkimuksen aikajaksolla fluoresoivien hiukkasten lukumäärä on ollut keskimäärin 0,00–0,50 partikkelia litrassa. Hälytystaso on useimmissa mittauksissa 0, mutta 18.5.2009 sitä herkistettiin asteikkoon -2 ja 19.5.2009 ja 27.5.2009 laitteen herkkyudeksi asetettiin -1. Herkistetyn hälytystason huomasi selkeästi hälytysten kaksinkertaistumisena verrattuna normaaliin tilaan. Loput BIO 200 -tulokset ovat esitetty liitteessä 3.

Hälytystilan ollessa 0 päivän aikana tuli keskimäärin neljä hälytystä. Hälytystaso nostettiin kahtena mittauspäivinä -1:een, jolloin hälytyksiä tuli keskimäärin 17 kappaletta. Hälytystaso nostettiin 18.5.2009 -2:een, jolloin hälytyksiä tuli 12 kappaletta.

6.3 SEM- ja BioSampler -näytteet

SEM-tuloksista laskettiin ilman hiukkaspitoisuus. Laskut suoritettiin suodattimesta otetuista kuvista. Ensin laskettiin suodattimen läpi mennyt ilmamäärä. Ilmamäärät olivat SEM-mittauksissa 15.5.2009 2500 litraa ja 28.–29.5.2009 ilmamäärä oli 2760 litraa. Suodattimien pinta-alat olivat 4,5 cm² ja näytetilavuus laskettiin jakamalla suodattimen läpi mennyt ilmamäärä suodattimen pinta-alalla.

Näytetilavuus (l/cm²) = suodattimen läpi mennyt ilmamäärä(l)/suodattimen pinta-ala (cm²). Esimerkiksi $\frac{2500l}{4,5cm^2} = 556 \text{ l/cm}^2$

Hiukkasten määrä neliösenttimetrissä laskettiin jakamalla hiukkasten lukumäärä SEM-kuvan pinta-alalla.

Hiukkasia/cm² = hiukkasten lukumäärä/kuvan pinta-ala(cm²).

Esimerkiksi $\frac{19}{0,00036cm^2} = 52778 \text{ hiukkasta/cm}^2$

Hiukkasten määrä litrassa saatiin jakamalla edellinen tulos näytetilavuudella.

Hiukkasta/l = hiukkasta/cm² / näytetilavuus (l/cm²).

Esimerkiksi $\frac{2778hiukkasta/cm^2}{556l/cm^2} = 95 \text{ hiukkasta/l}$

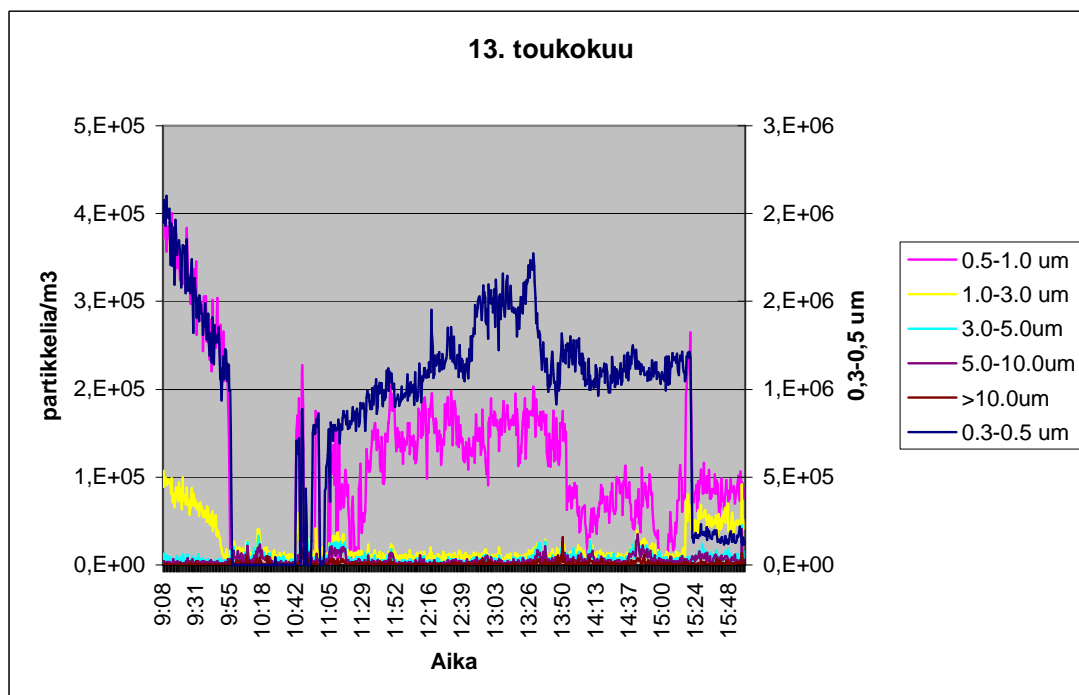
SEM-näytteitä otettiin kaksi 14.5.2009, mutta molemmissa oli suodatin asetettu väärinpäin ja tuloksia ei saatu. Kolmen erillisen päivän mittauksien keskiarvo on 137 hiukkasta litrassa. SEM-laskut ja tulokset on esitetty liitteessä 4.

BioSamplerin tuloksia ei saatu. Viljelmissä ei ollut minkäänlaista kasvua missään näyteerässä.

6.4 AeroTrak

AeroTrak-kuvaajissa (liite 5) tulokset on jaoteltu 0,3–0,5 µm:n, 0,5–1,0 µm:n, 1,0–3,0 µm:n, 3,0–5,0 µm:n, 5,0–10,0 µm:n ja yli 10 µm:n kokoihin hiukkasiin. Kuvioiden oikeanpuoleisiin y-akseleihin on merkitty 0,3–0,5 µm:n kokoisten hiukkasten hiukkasmäärät. Keskimäärin 0,3–0,5 µm:n hiukkasia päivässä oli 1–20 miljoonaa, kun taas isompia, 3,0–5,0 µm:n hiukkasia, oli 30 000–40 000. Suurempia kuin 10 µm:n kokoisia hiukkasia oli enää vain vajaat 4000.

AeroTrak-datan kuvaajissa on pieniä hiukkasia huomattavasti enemmän kuin isompia 5,0–10 µm:n hiukkasia. Pienimpiä hiukkasia, kooltaan 0,3–0,5 µm, on ilmassa eniten ja seuraavaksi ovat 0,5–1,0 µm:n kokoiset hiukkaset noin 1 miljoonan hiukkasen erolla. Pienet hiukkaset kulkeutuvat helposti tuulen mukana ja niiden määrät vaihtelevat samalla tavalla kuvaajissa. Liitteessä 5/2 on kuvaaja 14.5.2009 partikkelidatasta, jolloin ei pienempiä 0,3–1,0 µm:n kokoisia hiukkasia ollut ollenkaan. Myös liitteen 5/4 kuvaajassa ajalta 28.5.2009 on partikkelikato. Syynä voidaan pitää tuulen nopeuden vaihtelua. Mittauspäivänä 14.5.2009 oli kova tuuli, ja 28.5.2009 tuuli oli lähes olematon, jolloin laite ei kyennyt havainnoimaan hiukkasia niin helposti. Loput AeroTrak-tulokset ovat liitteessä 5.



Kuvio 8. AeroTrak-tulokset.

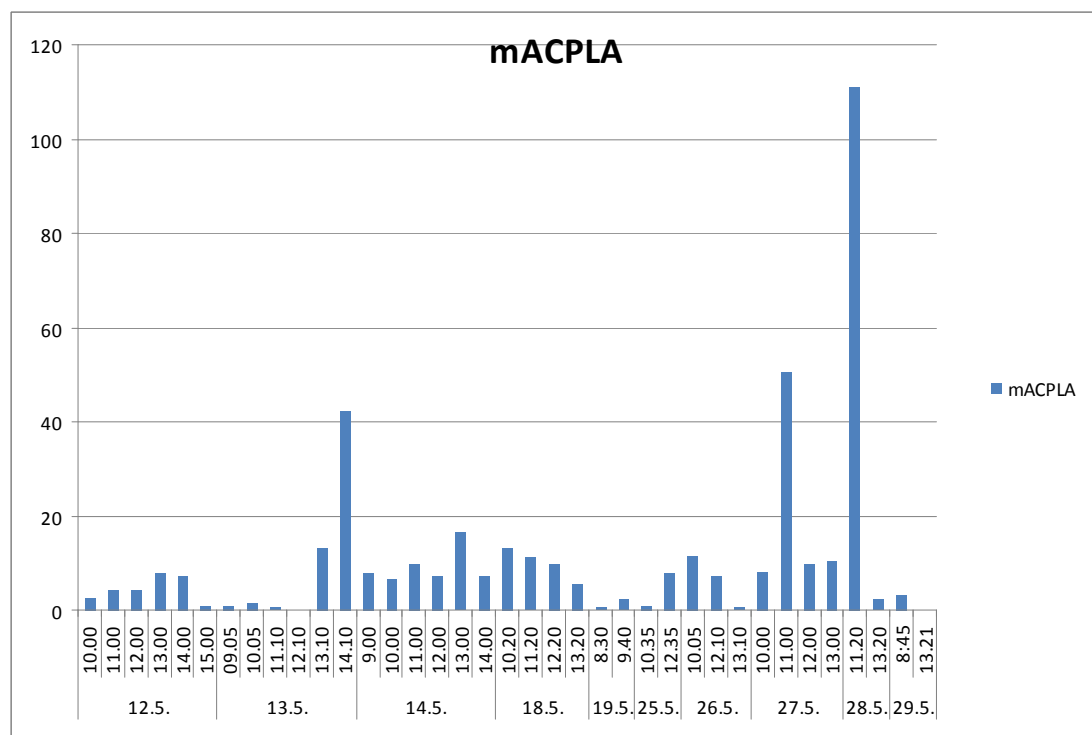
Kuviossa 8 on 1,0–5,0 µm:n kokoisia hiukkasia tasaisesti 1000–100 000 partikkelia/m³ koko mittausajalla, kun taas 0,5–1,0 µm:n hiukkasia on huomattavasti enemmän.

AeroTrak mittasi 28.5.2009 250 000 hiukkasta litrassa, kun otetaan huomioon isojen partikkelien (1–10 µm) keskiarvot (liite 5/4, 28.toukokuu). Hiukkasten määrä oli hieman pienempi 29.5.2009, jolloin saatiin 210 000 hiukkasta litrassa (liite 5/5, 29.toukokuu)

6.5 ACPLA

ACPLA-tulokset kuviossa 9 tarkasteltuna antavat pienen luvun ilmassa olevalle partikkelimäärälle, useimmiten alle 30 pesäkettä maljalla ja ACPLA-arvot jäävät alle 0,02. Silmämääräisesti maljoilta löytyi 3–4 eri lajia. Vuorokauden kasvatuksen jälkeen ei maljalla useimmiten ollut kasvua, vaan tuloksia saatiin vasta 48 tunnin kasvatuksella. Homemaljojen käyttö aloitettiin 18.5.2009 niin, että joka toinen malja STA-laitteella oli homemalja. Homemaljoja kasvatettiin lämpökaapissa kolme vuorokautta. Homeiden pesäkemäärä oli useimmiten hiukan isompi kuin TSA-maljalla. Esimerkiksi 27.5.2009

klo 11.00 suuri ACPLA-arvo johtui homemaljasta. Suuret ACPLA-luvut 13.5.2009 ja 28.5.2009 johtuivat Turex-sumutuksista.



Kuvio 9. mACPLA-tulokset.

Alhainen ACPLA johtui siitä, että ulkoilman mikrobit ovat yleensä kuivuneita sekä valon, hapen ja muiden tekijöiden vammauttamia. Kasvatusmalja sisälsi noin 97 % vettä ja kuivuneet bakteerisolut ainoastaan 10 %. Solu imi sisäänsä nestettä liian nopeasti ja solukalvot repeytyivät. Vain pieni osa ilman sisältämistä mikrobeista kasvoi pesäkkeeksi.¹³ Tästä syystä BioSamplerista ei myöskään kasvanut yhtään pesäkettä. Mikrobit eivät ole kestäneet suoraan nesteeseen joutumista, eivätkä kasvaaneet.

6.5.1 ACPLA-tulosten ja BIO 200 -laitteen tuloksien vertailu

BIO 200 -laitteen kuvaajiin on merkitty ACPLA-arvot, mutta tulosten välillä ei ole yhteyttä. Kuvaajissa hälytykset näkyvät keltaisena. BIO 200 -laitteen antaessa hälytyksen on Slit To Agar -laitteen maljoja ja ACPLA-tuloksia verrattu samasta kohdasta, onko pesäke kasvanut hälytyksen aikana. Hälytykset, jolloin pesäke oli kasvanut BIO 200 -monitorin ilmoittamaan hälytyskohtaan maljalla:

12.5.2009 klo 11:00 yksi pesäke (kuvio 7).

18.5.2009 klo 11:16 kaksi pesäkettä ja klo 14:13 yksi pesäke (liite 3/2).

25.5.2009 klo 14:15- 14:19 kolme pesäkettä homemaljalla (liite 3/3).

26.5.2009 klo 10:47 yksi pesäke (liite 3/4).

27.5.2009 klo 12:11 yksi pesäke, klo 12:29 yksi pesäke, klo 12:20 yksi pesäke, klo 12:54 yksi pesäke, klo 13:10–13:42 neljä pesäkettä homemaljalla (liite 3/4).

ACPLA-tulokset BIO 200 -laitteen hälytyksien kanssa eivät olleet yhteneviä. Kun pesäkeluku oli ACPLA:n mukaan korkea, BIO 200 -laite ei ollut antanut useimmissa tapauksissa hälytystä eikä signaalitason nousua havaittu. Hälytysten sattuessa pesäkkeitä ei löytynyt maljoilta vastaavista ajankohdista kuin muutamassa tapauksessa. BIO 200 -laite ei myöskään reagoinut testisumutukseen ja antanut hälytystä 13.5.2009 klo 14.15 (liite 3/1).

6.5.2 ACPLA-tulosten vertailu UV-APS -tuloksiin

UV-APS -laitteen kokonaishiukkasmäärät eivät korreloineet ACPLA-tulosten kanssa. UV-APS -kuvaajan mukaan (liite 2/3) 26.5.2009 klo 12.00–13.00 pitäisi ACPLA-tuloksissa näkyä jonkinlainen nousu. Kuviosta 9 nähdään, että mACPLA-luku vain laskee kyseisenä ajankohtana. Esimerkiksi UV-APS -kuvaaja 18.5.2009 (liite 2/2) ja ACPLA-arvot 18.5.2009 kuviossa 9 eivät täsmää. Hiukkasten määrän nousee ACPLA-tuloksissa 27.5.2009 klo 10.00–11.00, mutta liitteen 2/3 UV-APS -kuvaajassa 27.5.2009 kokonaishiukkasmäärä pienenee kyseisessä ajankohdassa.

ACPLA-tuloksia ei pystytty yhdistämään BIO 200 -laitteen tuloksiin tai UV-APS -tuloksiin, koska ACPLA:lla saadut pitoisuudet olivat liian heikkoja tulosten vertailuun. Testisumutukset Turexilla eivät myöskään näy riittävän voimakkaasti BIO 200 -laitteen kuvaajissa, eivätkä UV-APS -laitteen kuvaajissa. Kasvatusmaljolla Turex-sumutukset näkyvät hyvin.

Maljakasvatuksista saadut heikot tulokset johtuvat siitä, että vahingoittuneet bakteerit eivät kasvaneet alustalla. Lisäksi UV-APS- ja BIO 200 -laitteet havaitsevat jokaisen

fluoresoivan hiukkasen, joten maljakasvatuksien ja laitteiden antamien tulosten erot ovat näkyviä.

6.6 Mikrobin tunnistus

Suomessa kerättyjen mikrobin värjäys- ja identifiointitulokset ovat liitteessä 6. Mikrobeista valittiin seitsemän pesäkettä TSA-maljoilta tunnistuksia varten. Ainoastaan viisi mikrobia pystyttiin tunnistamaan. Tunnistetut mikrobit nimikoitiin seuraavasti: PvTT 1, PvTT 4, PvTT 5, PvTT 7 ja PvTT 8. Tunnistuksen varmuus näkyy desimaalinumerona ennen mikrobin nimeä. Hyvä tunnistusvarmuus merkitään 0,700-1,000 ja 0,700 alaspäin mikrobin tunnistuksen luotettavuus laskee. Pienissä arvoissa Scherlock-analyysiohjelma on tunnistanut mikrobia vain osan sen rasvahappokoostumuksista, joten tuloksen luotettavuus ei ole paras mahdollinen. Ohjelma antaa ehdotuksia mahdollisista ryhmistä, joihin mikrobi koostumuksensa perusteella voi kuulua. Analysoidut luokitukset Suomen näytteistä:

PvTT 1 =	0.458 Bacillus-pumilus-GC subgroup B 0.416 Bacillus-megaterium-GC subgroup A 0.378 Bacillus-licheniformis (Bacillus subtilis group) 0.360 Staphylococcus-sciuri 0.281 Brevibacillus-parabrevis-GC subgroup A
PvTT 4 =	0.681 Curtobacterium-flaccumfaciens-betae/oortii 0.423 Curtobacterium-flaccumfaciens-flaccumfaciens
PvTT 5 =	0.814 Pseudomonas-fluorescens-biotype C/P. mandelii 0.619 Pseudomonas-putida-biotype B/vancouverensis 0.596 Pseudomonas-fluorescens-biotype G/taetrolens
PvTT 7 =	0.748 Bacillus-atrophaeus 0.564 Bacillus-subtilis
PvTT 8 =	0.792 Paenibacillus-pabuli (Bacillus)

0.716 *Bacillus-simplex*

0.488 *Paenibacillus-validus* (*Bacillus gordonae*)

Näytteelle PvTT 5, PvTT 7 ja PvTT 8 saatiin yli 0,700 arvo näytteen tunnistusvarmuudelle. Tällöin tulosta voidaan pitää luotettavana. PvTT 5:n laji on *Pseudomonas*-bakteeri, PvTT 7 ja 8 kuuluvat *Bacillus*-sukuun. PvTT 1:lle ei saatu selkeää tulosta.

7 YHTEENVETO JA TULOSTEN ARVIOINTI

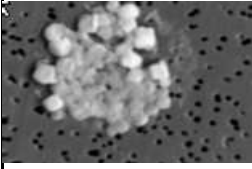
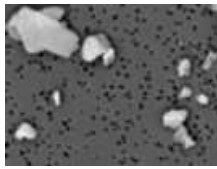
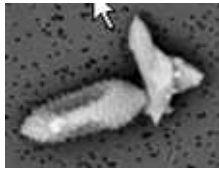

Työn kokeellinen osuus koostui pääpiirteittäin aikataulun mukaisesti BIO 200 -laitteen, UV-APS:n ja AeroTrakin päälle kytkemisestä päivän alkaessa ja Slit To Agar -maljan vaihtamisesta tunnin välein. Maljojen kasvatuksen jälkeen maljat valokuvattiin ja mikrobit kuvattiin valomikroskoopilla. Suomen mikrobinäytteille suoritettiin lisäksi gramvärjäys. SEM- ja BioSampler -näytteenotot suoritettiin aikataulun mukaan.

Säätiedot kirjattiin puolen tunnin välein. Tutkimuksen aikana 12.–14.5.2009 lämpötila oli 8–14 °C ja 18.–29.05.2009 lämpötila oli 12–22 °C. Kosteusprosentti vaihteli molempina mittausajankohtina 40–70 prosenttia. Tuulen nopeus vaihteli 0–6 m/s koko tutkimuksen ajan ja tuulen pääasiallinen suunta oli kaakko-etelä. (liite 7 ja 8) Lämpötilavaihtelu oli vähäistä tutkimuksessa, joten päivien tuloserot ei voida selittää lämpötilan vaikutuksella. Tuulen nopeus vaihteli lähes tyynestä puuskittaiseen kohtalaiseen tuuleen. Mikrobit kulkeutuvat ilmassa tuulen mukana, joten tuulen nopeudella ja suunnalla on ollut vaikutusta mittalaitteiden antamiin hiukkastuloksiin. Taulukossa 2 on esitetty keskiarvot säätiedoista koko tutkimuksen aikana.

Työn tarkoituksena oli analysoida eri laitteilla saatuja tuloksia ja tunnistaa ulkoilman mikrobeja. Mikrobin tunnistus aloitettiin työssäni, mutta varsinaiset tulokset saatiin vasta myöhempänä ajankohtana. Koko tutkimuksen aikana AeroTrak mittasi pienempien 0,5–1,0 µm:n hiukkasten keskiarvoksi 1 034 900 partikkelia/m³. Vastaavat luvut 1,0–3,0 µm:n kokoisille hiukkasille oli 202 200 partikkelia/m³, 3,0–5,0 µm:n hiukkasille 29 600 partikkelia/m³, 5,0–10,0 µm:n hiukkasille 15 550 partikkelia/m³ ja

yli 10 µm:n hiukkasille 3 780 partikkelia/m³ (Taulukko 2). Hiukkasmäärät pienenevät sen mukaan mitä suuremmaksi hiukkaskoko kasvaa.

Taulukko 2. Yhteenveto tuloksista.

Sääolosuhteet	Tuulen nopeus m/s ja suunta	T °C	kosteusprosentti	Lämpösäteily W/m ²	
	0-3 m/s, kaakko-etelä	10-18	40-70	200-700	
Kokonaishiukkakaspitoisuus /kokojaukama (Aerotark) partikkelia/m ³	0.5-1.0 µm	1.0-3.0 µm	3.0-5.0 µm	5.0-10.0 µm	Yli 10 µm
	1 034 900	202 200	29 600	15 550	3 780
APCLA ka	24 h (bakt)	48 h (bakt)	78 h (homeet)		
	0	19	25		
UV-APS (Fluoresenssi)	FL weighted	FL percentage			
	0,1-0,4	4-10 %			
Bio 200 Data (Alarm rate)	12.5.	13.5.	15.5.	18.5.	19.5.
	3 kpl	0 kpl	3 kpl	12 kpl (hälytystaso -2)	1 kpl (hälytystaso -1)
MIDI tulokset (Identifiointi)	Bacillus sp	Pseudomonas sp	Curtobacterium sp	Staphylococcus sp	Micrococcus sp
	3 kpl/5 FI 8 kpl/13 SE 12 kpl/20 NO	1 kpl/5 FI 1 kpl/13 SE 1 kpl/20 NO	1 kpl/5 FI 1 kpl/13 SE 0 kpl/20 NO	0 kpl/5 FI 3 kpl/13 SE 4 kpl/20 NO	0 kpl/5 FI 0 kpl/13 SE 3 kpl/20 NO
SEM kuvia					

Mikrobiologisilla näytteenkerääjillä ei saatu riittävästi tietoa mikrobistasosta. ACPLA-tulokset jäivät erittäin pieniksi, eivätkä vastanneet laitelaskureiden antamia lukemia. Maljoilla ei ollut 24 tunnin kasvatuksen jälkeen pesäkkeitä, joten kasvatusta jatkettiin 48 tuntiin. Bakteeripesäkkeiden keskimääräksi saatiin koko tutkimuksen aikana 19 pesäkettä maljalla. Homemaljojen pesäkkeiden keskimäärä oli 78 tunnin kasvatuksen jälkeen 25 pesäkettä maljalla. (Taulukko 2)

Nestekeräin BioSampler ei tuottanut ollenkaan tulosta. Seuraavissa vastaavanlaisissa tutkimuksissa ulkoilman mikrobit tulisi kerätä vain kalvosuotimille, josta ne laitetaan elvytysliemeen ennen maljalle siirtoa. Elvytysliemen ansiosta mikrobit eivät ime itseensä liian nopeasti vettä ja menehdy. Näin tutkimukseen saadaan suurempi prosentti eläviä mikrobeja ja paremmat mahdollisuudet vertailla tuloksia keskenään.

UV-APS antoi 1-5 µm:n painotetuksi fluoresoivien hiukkasten määrän keskiarvoksi 0,1-0,4 kappaletta ja fluoresoivien hiukkasten prosentuaaliseksi määräksi 4–10 %. BIO 200-monitori hälytti 12.5.2009 ja 15.5.2009 fluoresoivista hiukkasista kolme kertaa. Hälytyksiä ei tullut lainkaan 13.5.2009. Kun hälytystasoa nostettiin -2:een, niin 18.5.2009 hälytysten määrä nousi 12 kappaleeseen. Hälytystason ollessa -1, hälytyksiä tuli 19.5.2009 vain 1 kappale. (Taulukko 2)

Suomen viidestä tunnistetusta näytteestä analysoitiin kolme *Bacillus*-sukuista, yksi *Pseudomonas*-sukuinen ja yksi *Curtobacterium*-sukuinen bakteerilaji. Ruotsin näytteistä saatiin 13 mikrobia tunnistettua luotettavasti ja niistä *Bacillus*-sukuisia oli kahdeksan, *Pseudomonas*-sukuisia yksi, *Curtobacterium*-sukuisia yksi ja *Staphylococcus*-sukuisia kolme kappaletta. Norjan näytteistä tunnistettiin yhteensä 20 mikrobilajia, joista *Bacillus*-sukuisia oli 12, *Pseudomonas*-sukuisia yksi, *Staphylococcus*-sukuisia kolme ja *Micrococcus*-sukuisia kolme kappaletta. Vertailtaessa eri maiden bakteerilajeja huomataan, että *Bacillus*-sukuiset bakteeri ovat vallitseva kanta kaikissa tutkimushankkeen mukana olleista maista. (Taulukko 2)

SEM-näytteistä on neljä erilaista kuvaa taulukko 2:ssa. Kuvissa on erilaisia hiukkasia ulkoilmasta. Kaikkien SEM-näytteiden keskiarvoksi pystyttiin laskemaan 137 hiukkasta litrassa. Tärkeintä SEM-näytteenotoissa oli se, että saatiin visuaalisia kuvia hiukkasista.

Tutkimus jatkuu kevääseen 2010 asti, johon mennessä saadaan kartoitettua mikrobistausta jokaisesta vuodenajasta muutaman päivän jaksolta. Tulokset analysoidaan vastaavalla tavalla kuin omassa tutkimuksessani. Jokaisesta eri vuodenajasta analysoidut tulokset kootaan yhteen ja tulosten perusteella pyritään selvittämään, miten vuodenaika vaikuttaa ilman mikrobistaustan määrään ja laatuun. Samalla saadaan selville miten Ruotsin ja Norjan mikrobistausta eroaa omastamme.

Tuloksia voidaan hyödyntää esimerkiksi tutkittaessa erilaisia biotaisteluaineita ulkoilmassa. Tutkimuksen avulla tiedetään ulkoilman mikrobistaustan vaikutus mittauslaitteiden tuloksissa.

8 LÄHTEET

¹ Puolustusvoimien Teknillinen Tutkimuslaitos. PvTT -Suojan osaamiskeskus. Tutkimuksesta suorituskykyä 2009. PvTT:n esite.

² PvTT Puolustusvoimien Teknillinen Tutkimuslaitos. [viitattu 14.7.2009]. Saatavissa www.mil.fi > Laitokset > Puolustusvoimien Teknillinen Tutkimuslaitos > Esittely.

³ PvTT Puolustusvoimien Teknillinen Tutkimuslaitos. [viitattu 14.7.2009]. Saatavissa www.mil.fi > Laitokset > Puolustusvoimien Teknillinen Tutkimuslaitos > Räjähde ja suojelutekniikka > Suojelutekniikan tutkimusala.

⁴ Raatikainen Petri 2006, Sähköinen bioaerosolikeräin. Diplomityö. Tampereen Teknillinen Yliopisto.

⁵ Sotilaan käsikirja 2006. Edita Prima Oy. Helsinki 2004. s. 293–294

⁶ Ilmakehä (2009). [viitattu 20.7.2009]. Saatavissa www.fmi.fi > tutkimus > ilmasto ja sen muutos.

⁷ Korkeala Hannu, Elintarvikehygieniä: Ympäristöhygieniä, elintarvike- ja ympäristötoksikologia. WSOY s. 411

⁸ Baron Paul A. & Willeke Klaus, 2001. Aerosol measurement: Principles, techniques, and applications. 2nd ed.- New York s. 102, 508–512, 751–756.

⁹ Karttunen, Koistinen, Saltikoff ja Manner, Ilmakehä ja sää. URSA. ISBN 952-5329-17-8 s. 81–82

¹⁰ Heino Jyrki & Vuento Matti, 2002. Solubiologia. WSOY. s. 69

¹¹ Ulmanen, Ylännä, Valste, Viitanen. Geeni. Biologia. WSOY s. 30–37

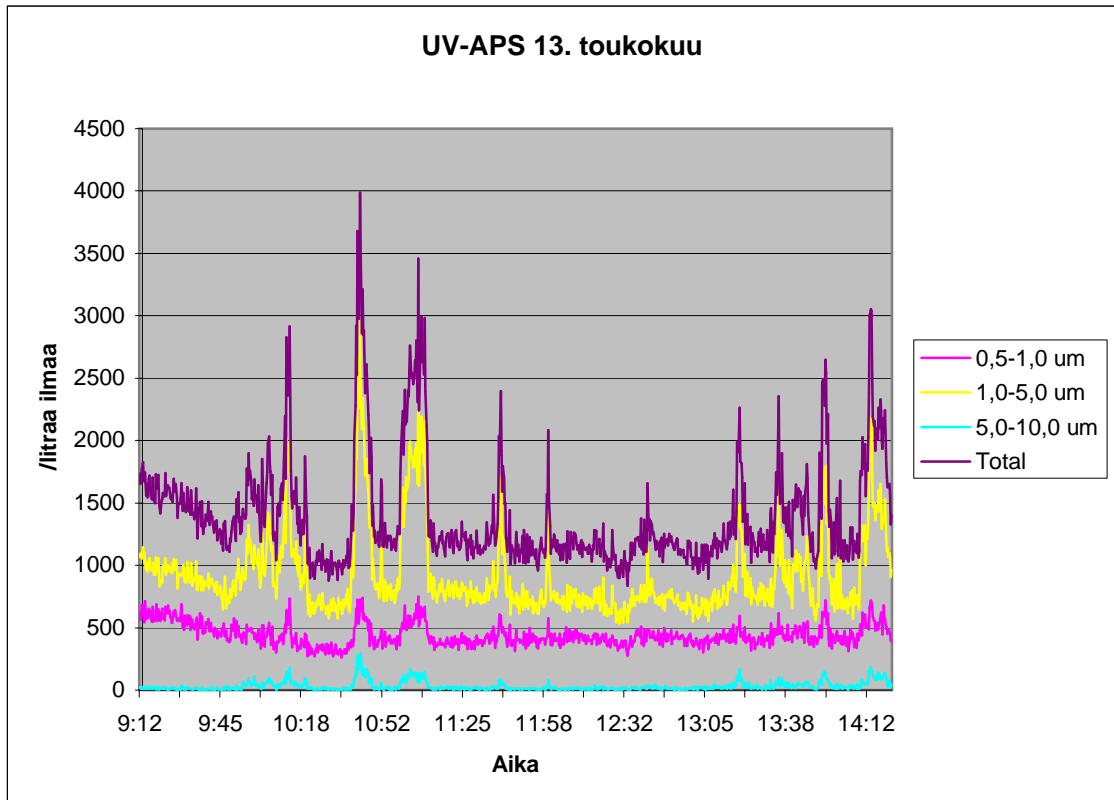
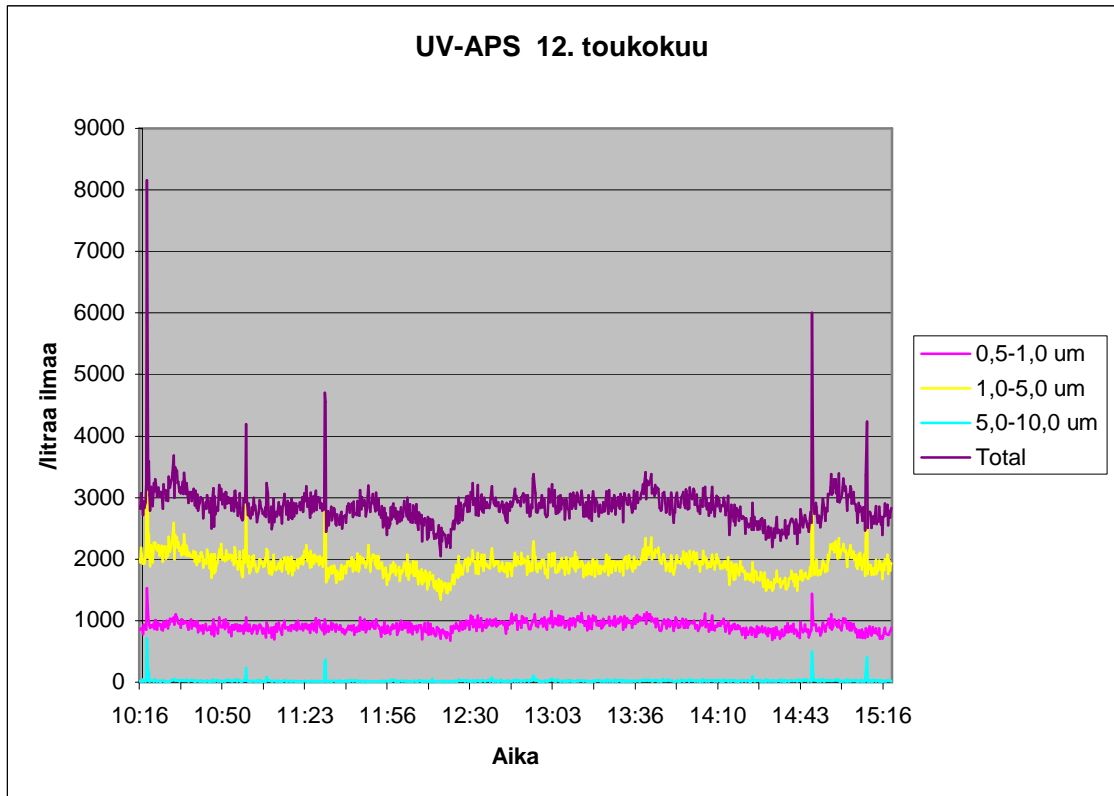
-
- ¹² Heino Jyrki & Vuento Matti, 2007. Solukemian ja solubiologian perusteet. WSOY s. 87
- ¹³ Niemi Mikko, Korhonen L. Kalevi ja Virtanen Ismo, 1997. Solu- ja molekyylibiologia. WEILIN+GÖÖS s.29
- ¹⁴ Berg.M. Jeremy, Tymoczko L. John and Stryer Lubert, 2001. Biochemistry, fifth edition. s. 45
- ¹⁵ Kasvinsuojelu. [viitattu 26.8.09]. saatavissa www.kasvinsuojelu.berner.fi > tuotteet > Turex.
- ¹⁶ Salkinoja-Salonen Mirja, 2000. Mikrobiologian perusteita. Helsinki. Helsingin yliopisto. Julkaisuja 49/2000 s. 77, 546, 703–705
- ¹⁷ Rosenberg K. 2008. Mikrobiologian laboriokurssi. luentomoniste. Turun ammattikorkeakoulu. Kevät 2008.
- ¹⁸ Teknillisten Tieteiden Akatemia, Instrumenttianalytiikka 3. Kromatografia termoaalyysi. Gummerus. s.75-77
- ¹⁹ Sherlock® DNA Microbial Identification System Version 6.0, MIS Operating Manual. November 2005. Part Number: 2080 (11/05). s. 1-3 – 2-13. Saatavissa myös www.midi-inc.com > Sherlock® Microbial ID System (MIS)
- ²⁰ Humppi Tarmo. 20.7.2009. UV-APS manuaali. janina.laine@students.turkuamk.fi
- ²¹ Humppi Tarmo. 25.5.2009. NASU_LOPPURAPORTTI (pdf). janina.laine@students.turkuamk.fi
- ²² Cox Christopher S & Wathes Christopher, Bioaerosols handbook: Physical Aspects of Bioaerosol Particles. Lewis publishers s. 255, 301–303

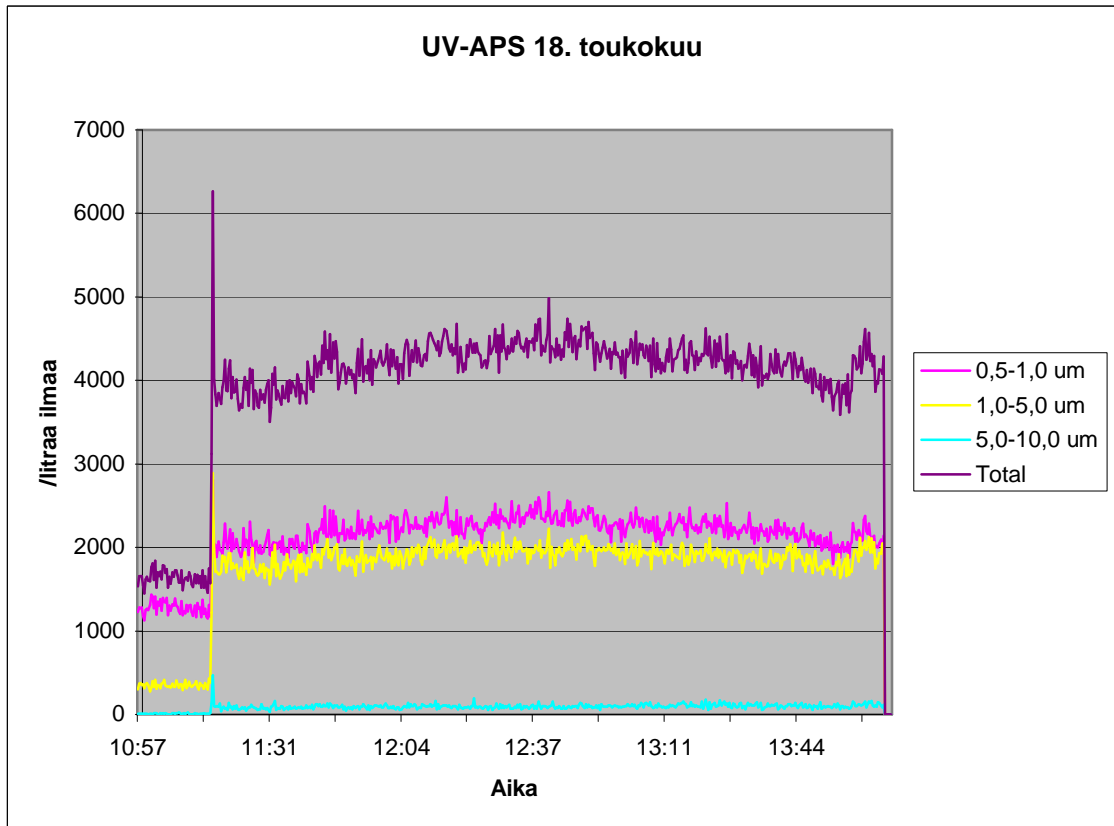
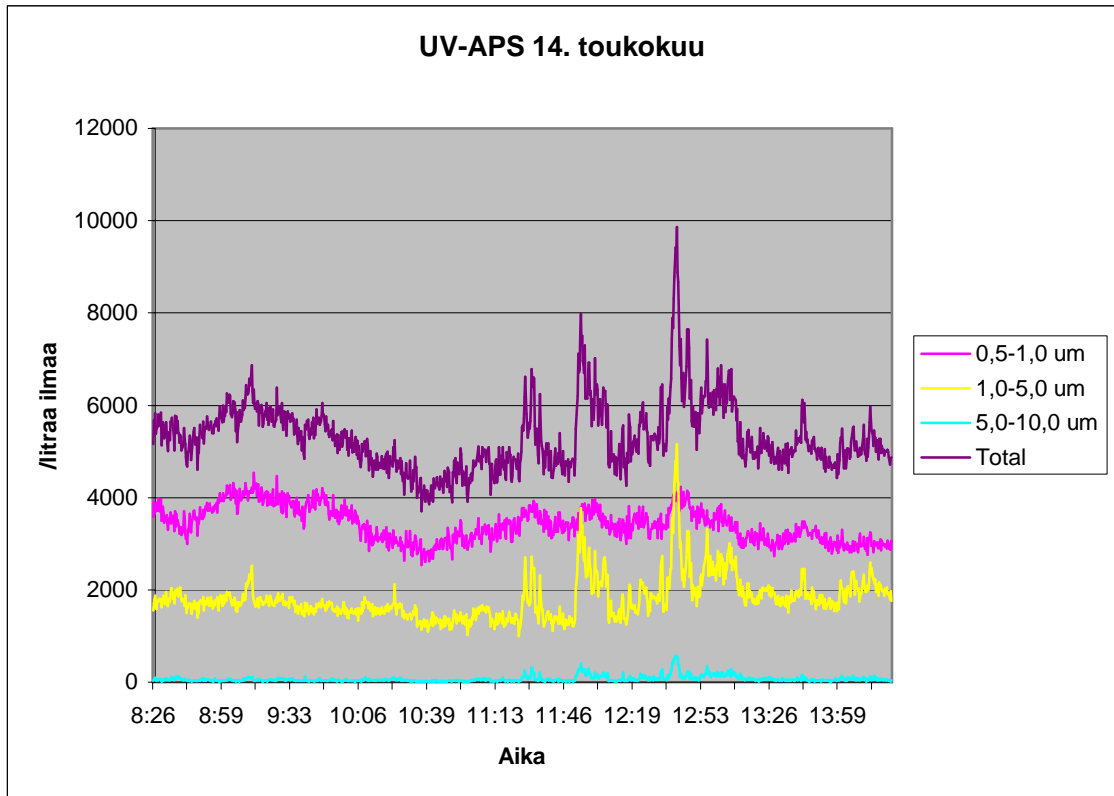
²³ Teknocalor, TSI. [viitattu 14.7.2009]. Saatavissa www.teknocalor.fi > Mittalaitteet > Tuotteet > Sisäilmanlaatu > Hiukkaslaskurit > Aerotrak 8220.

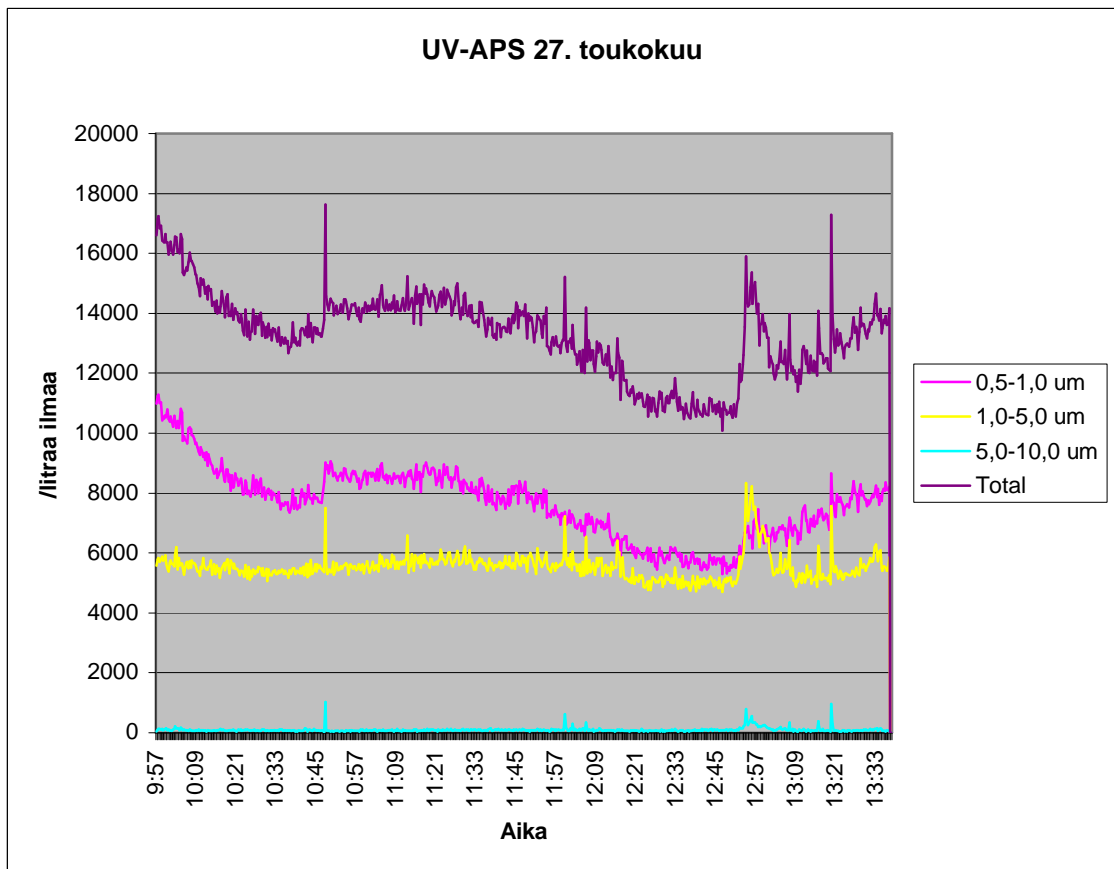
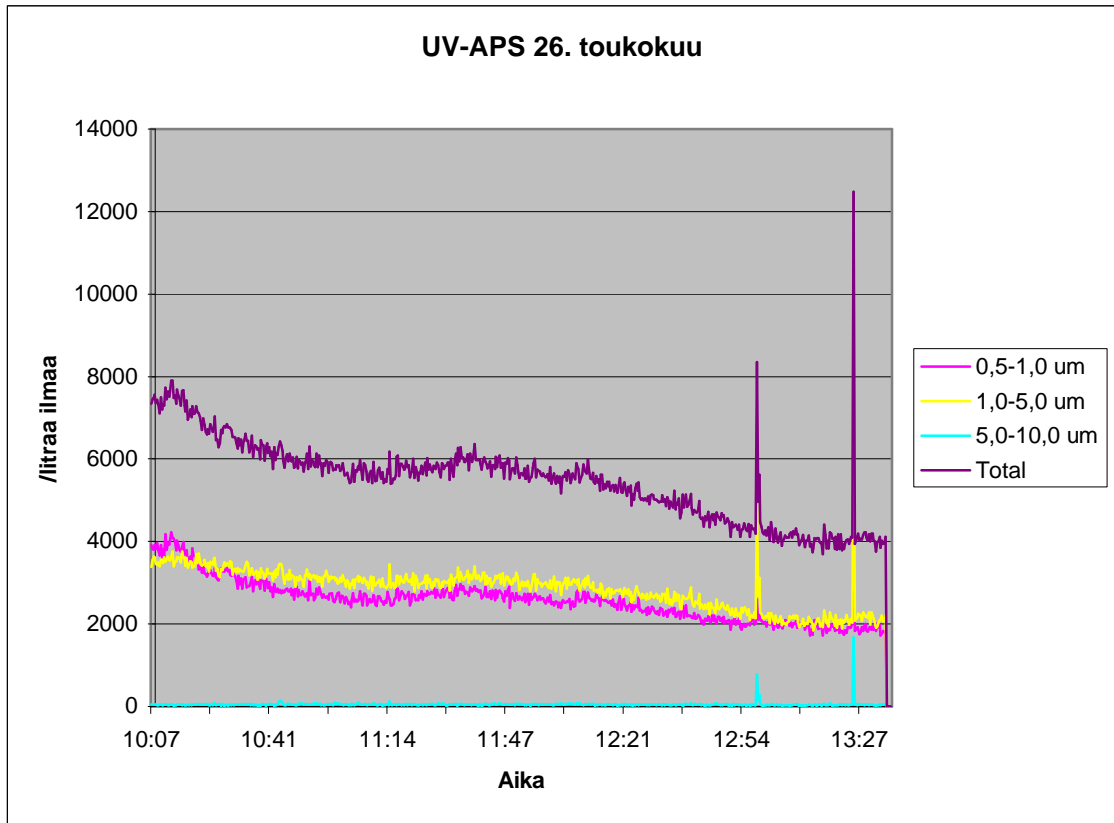
²⁴ NBS Slit-To-Agar Air Samplers, New Brunswick Scientific Co.,Inc. [viitattu 14.7.2009]. Saatavissa www.nbsc.com > refurbished equipment > STA 204.

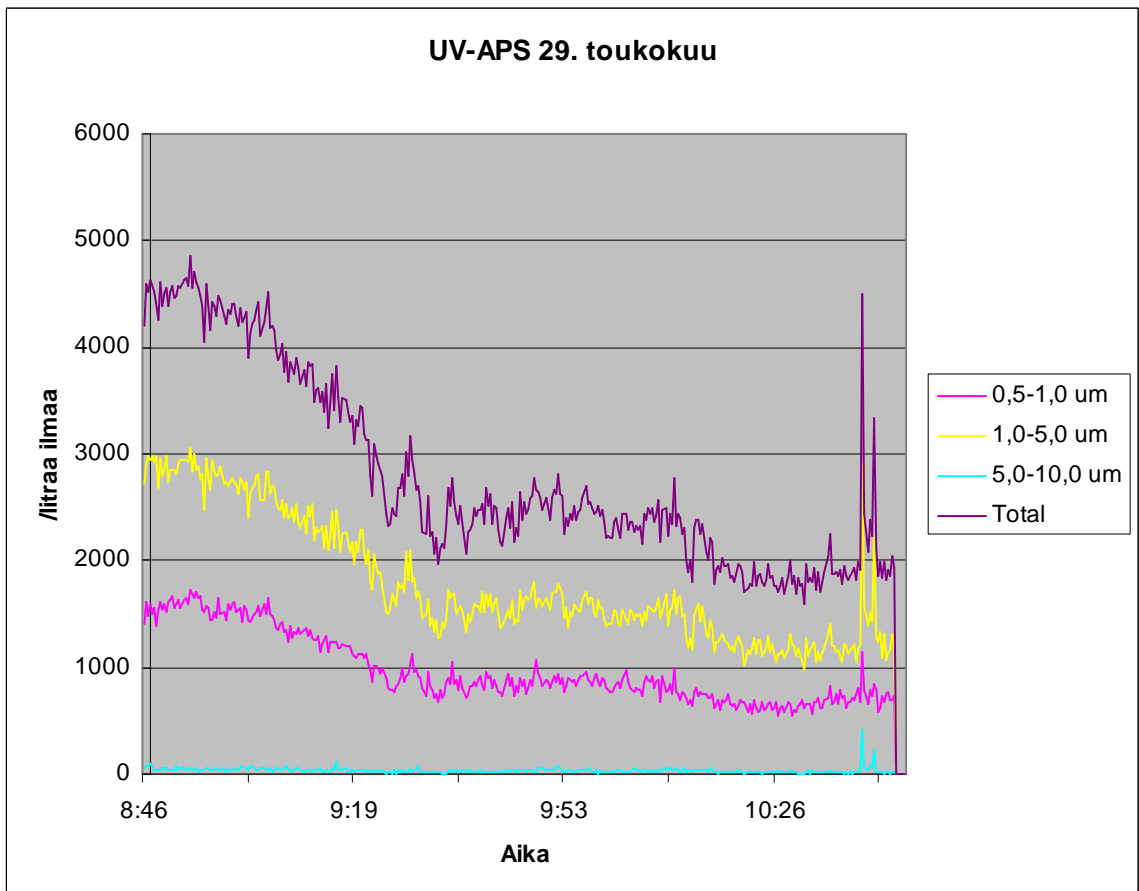
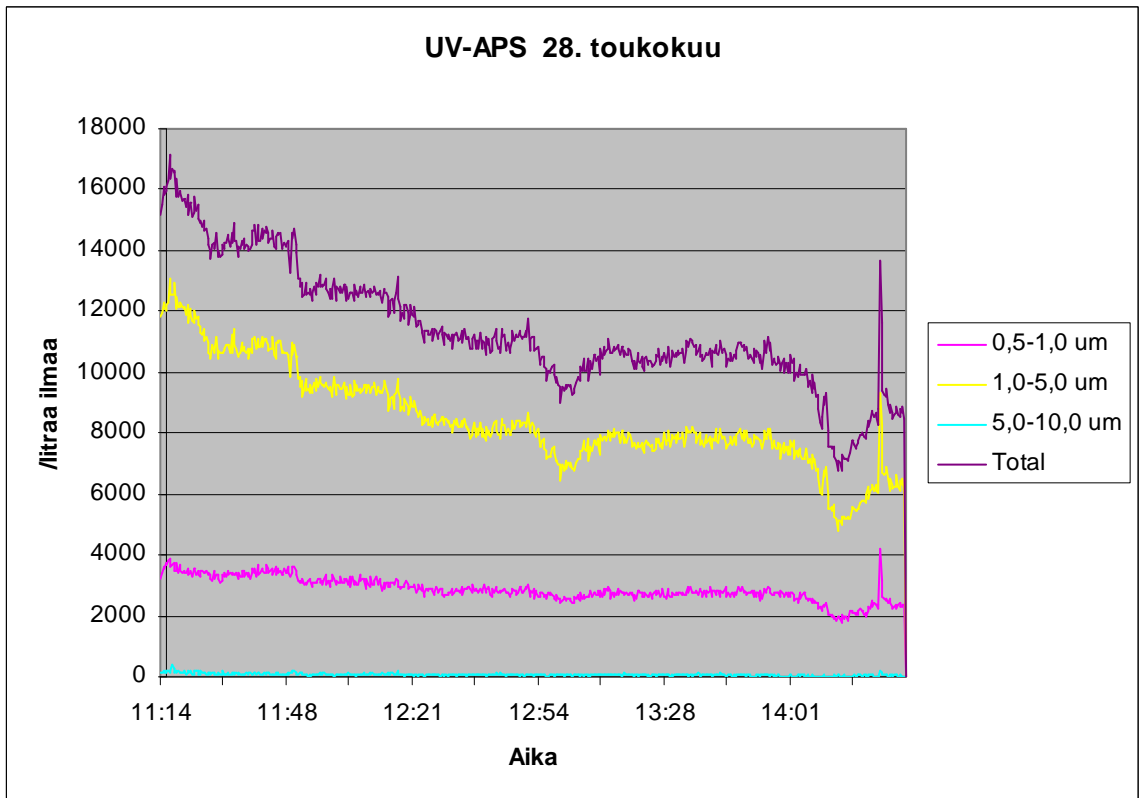
²⁵ SKC BioSampler [viitattu 1.2.2010]. Saatavissa www.skcinc.com > product > BioSampler.

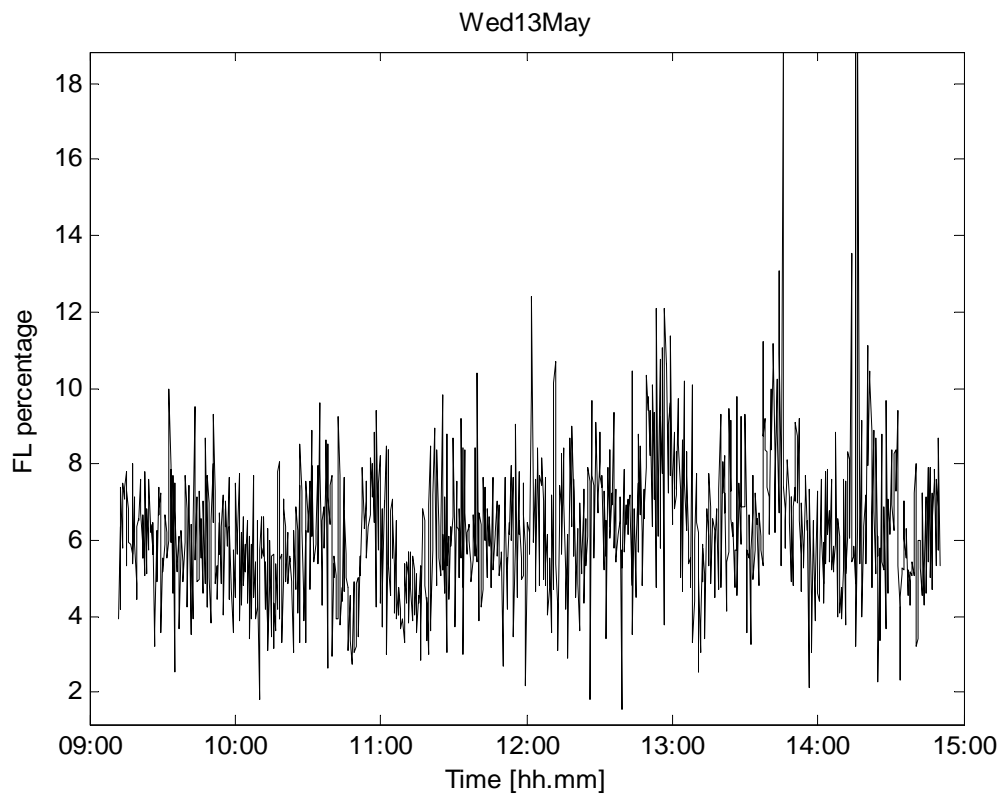
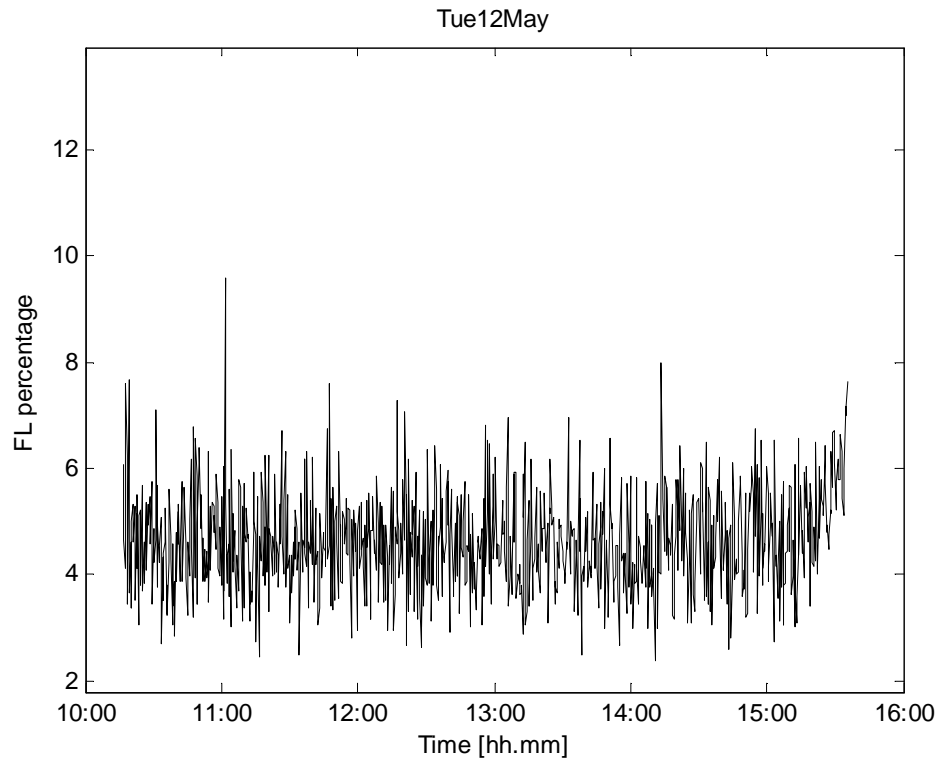
BABE	Päivä	Aloitusaika	Slit aloitettu	Slit lopetettu	Muut mittaukset/ huomiot
Ti	12.5.	10.00	10.00	16.00	
Ke	13.5	09.00	9.05	15.10	Sumutukset 1,5 ml turex 0,1 mg/ml klo 13.50–13.55 Toinen sumutus 1,5 ml turex 1,0 mg/ml klo 14.15–14.20
To	14.5	09.00	9.00	15.00	SEM I näyte klo 8.15–11.00 (flow 18L/min) ei tulosta SEM II näyte klo 13.00–15.00 suodatin väärinpäin, ei tulosta
Pe	15.5	10.10			SEM näyte klo 10.10–12.00 (flow 23 L/min yhteensä 2530 litraa)
Ma	18.5	10.20	10.20	14.20	BioSampler näytteenotto klo 11.20–12.20 ja klo 13.20–14.20 20 ml H ₂ O 14,2 l/min
Ti	19.5	8.30	8.30	10.40	BioSampler näytteenotto klo 9.40–10.40 ja klo 10.40–11.40 20 ml H ₂ O+10 % Gly
Ma	25.5	10.35	10.35	14.35	
Ti	26.5	10.05	10.05	14.10	BioSampler näytteenotto klo 10.15–13.15. 20 ml H ₂ O+10 % Gly (veden lisäys 11.40)
Ke	27.5	10.00	10.00	14.00	
To	28.5	11.20	11.20	13.20	Turex sumutukset 1,0 mg/ml klo 11.25–11.35 ja klo 12.23–12.33. SEM näyte klo 11.20–13.20
Pe	29.5	8.45	8.45	10.50	SEM näyte klo 8.50–10.50

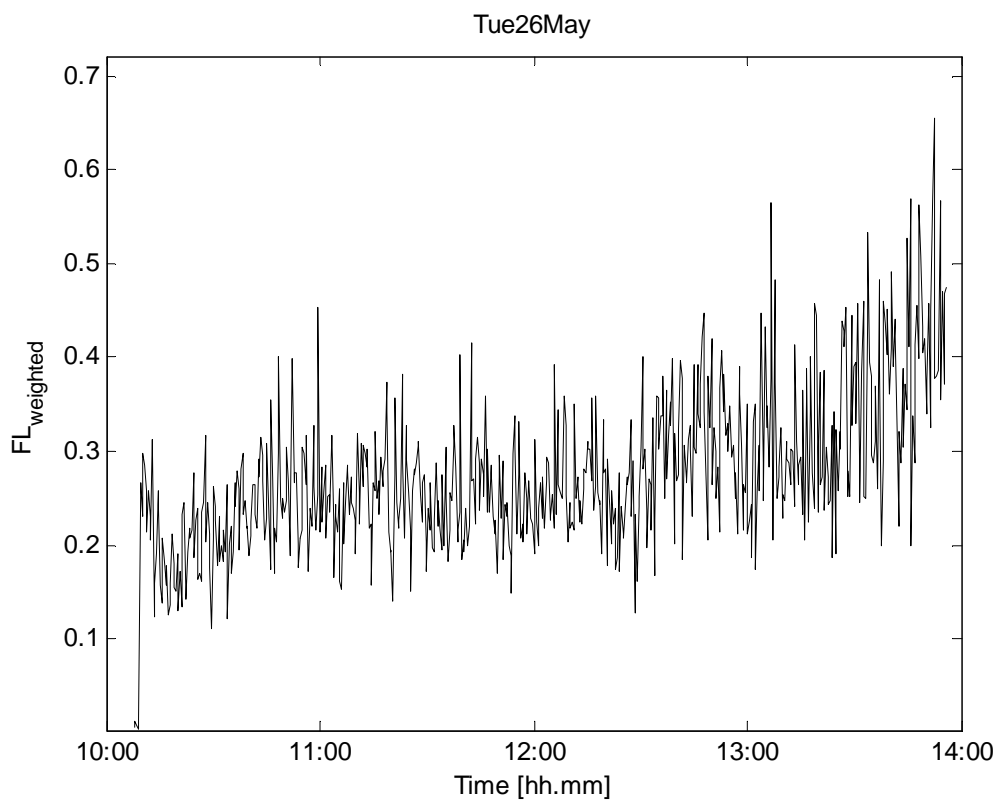
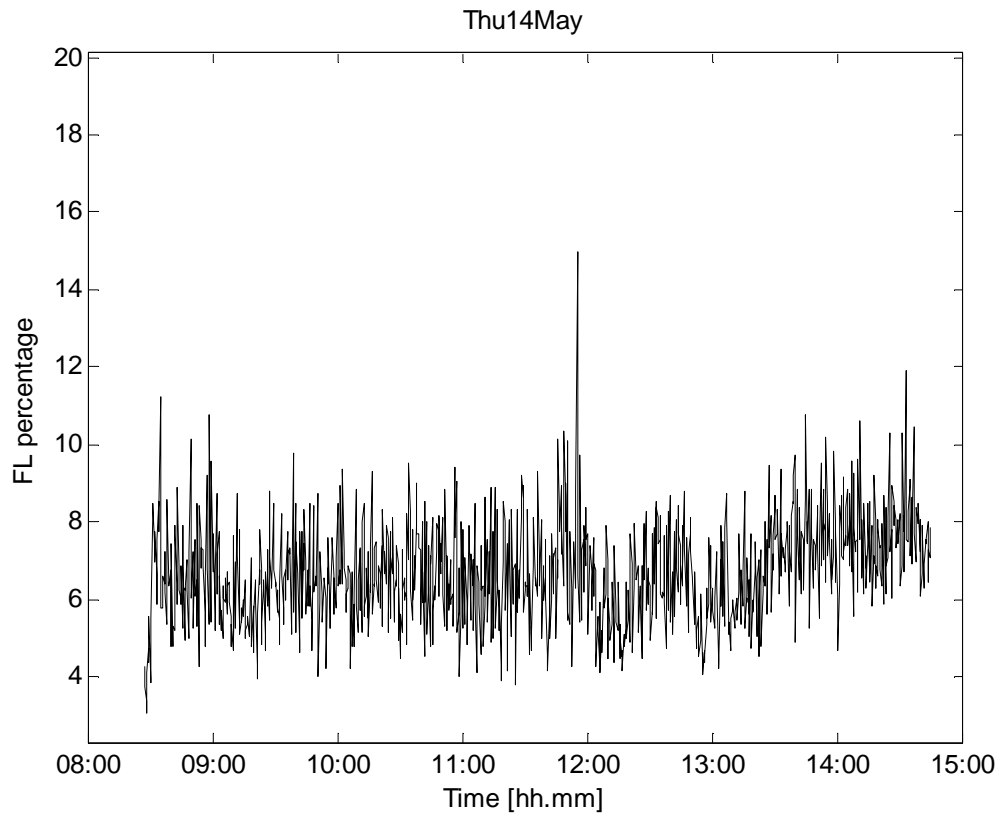


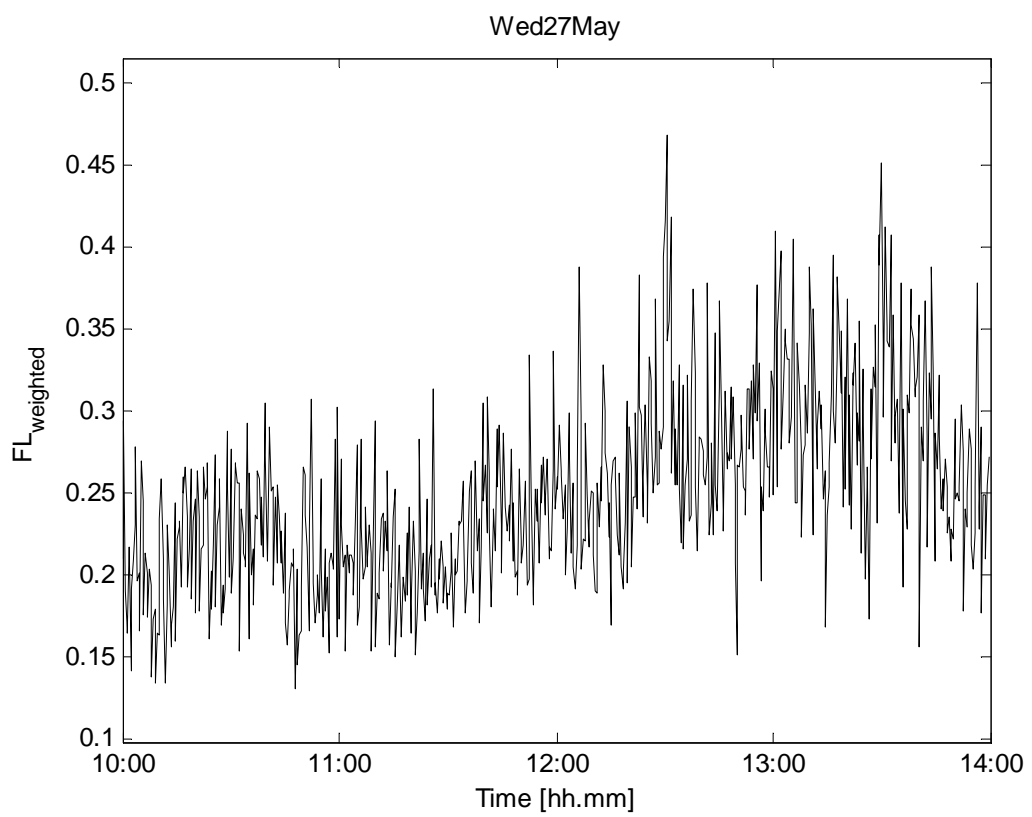
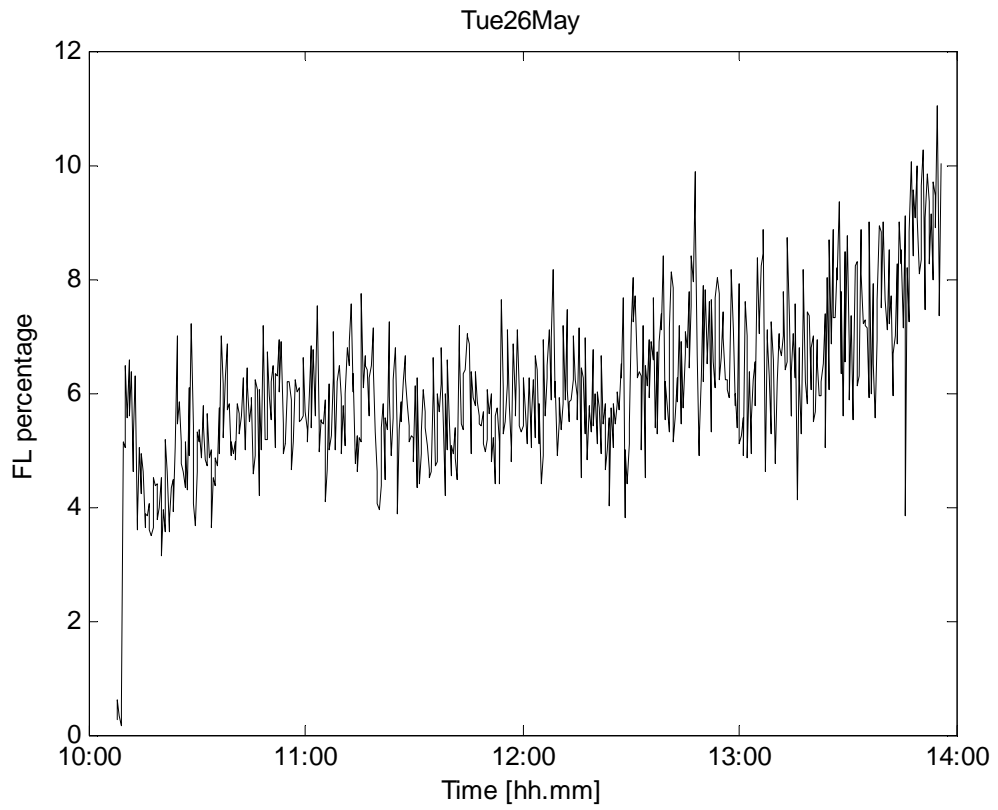


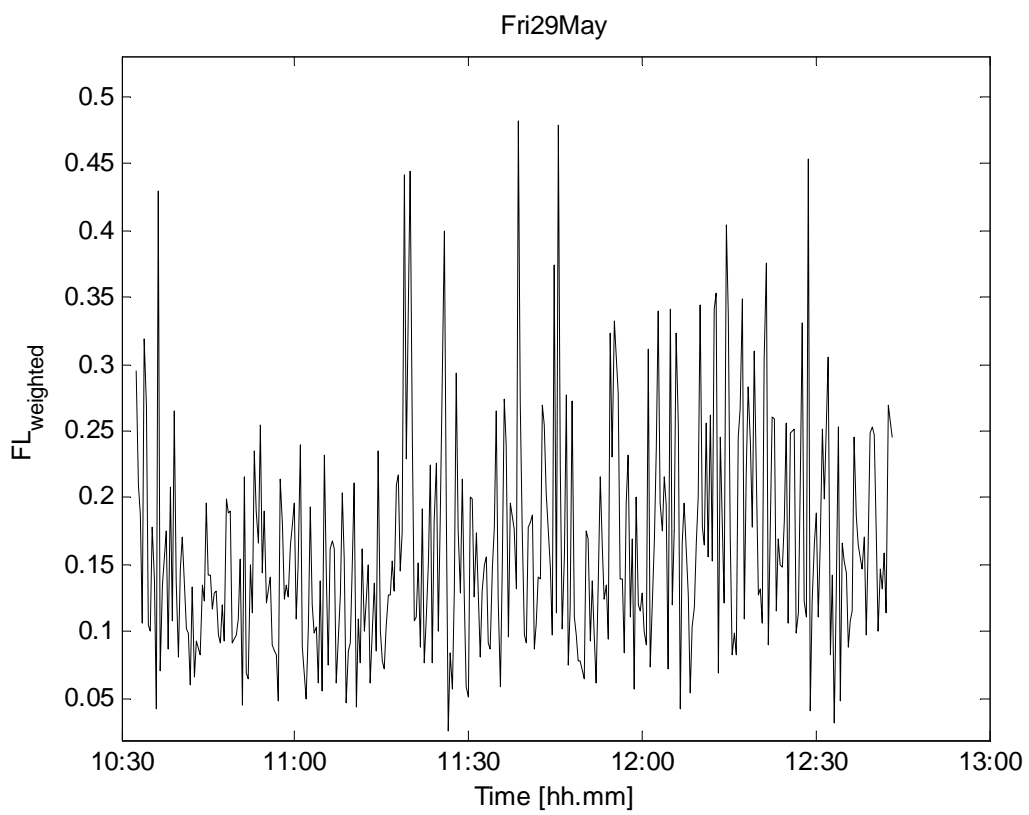
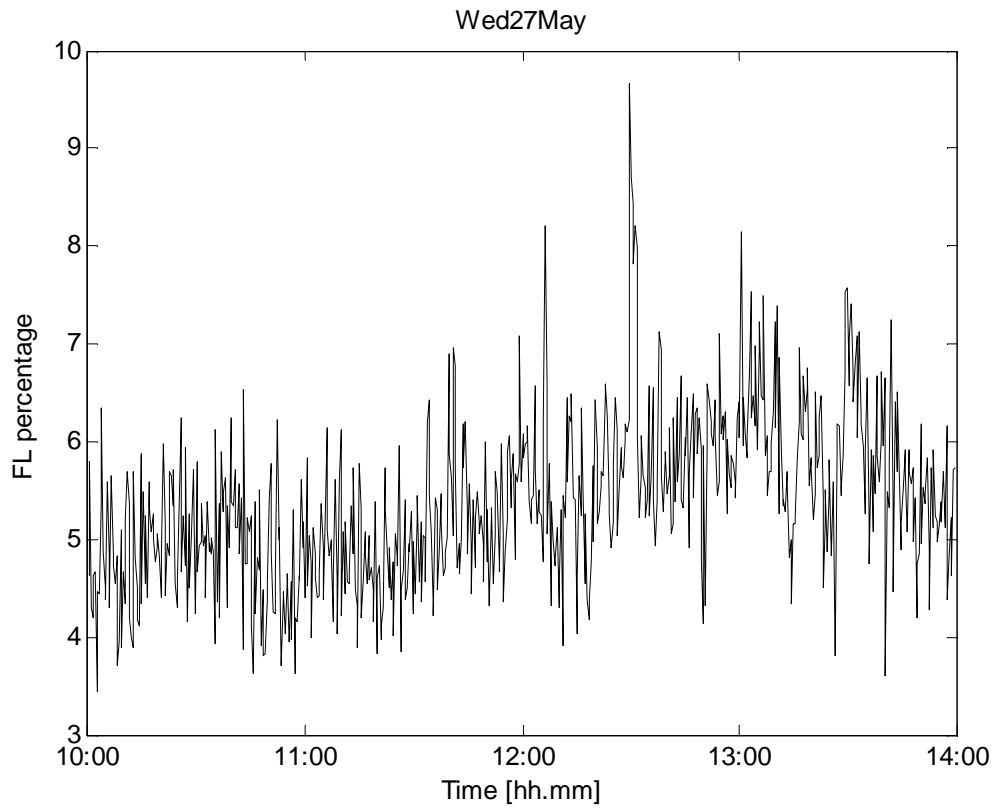


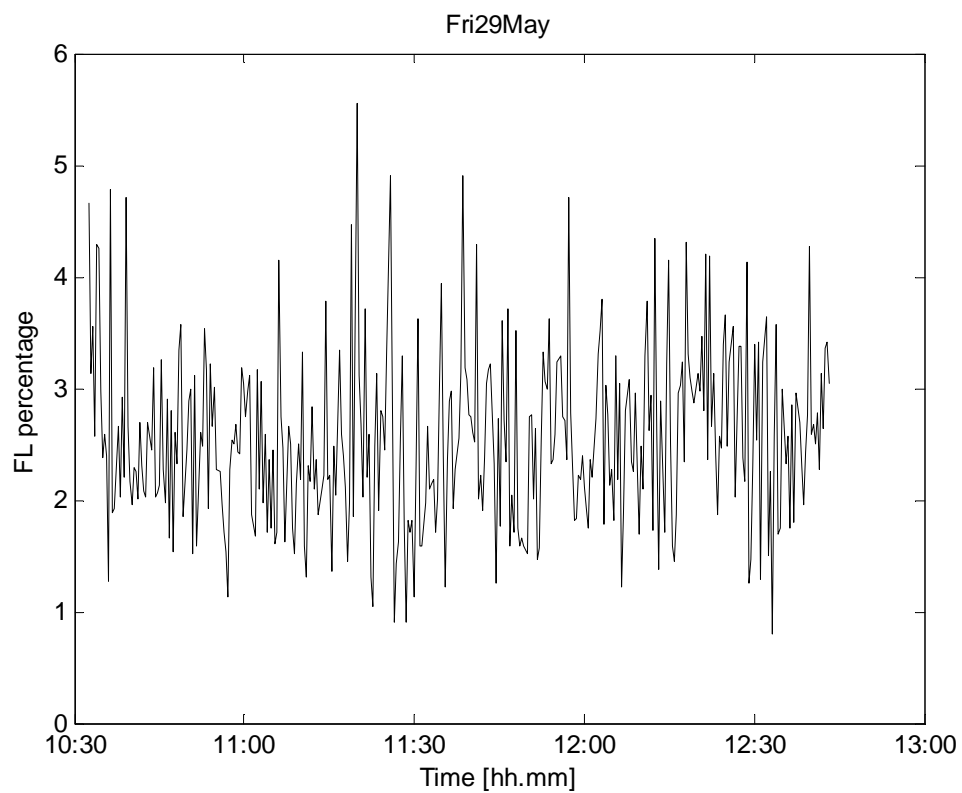


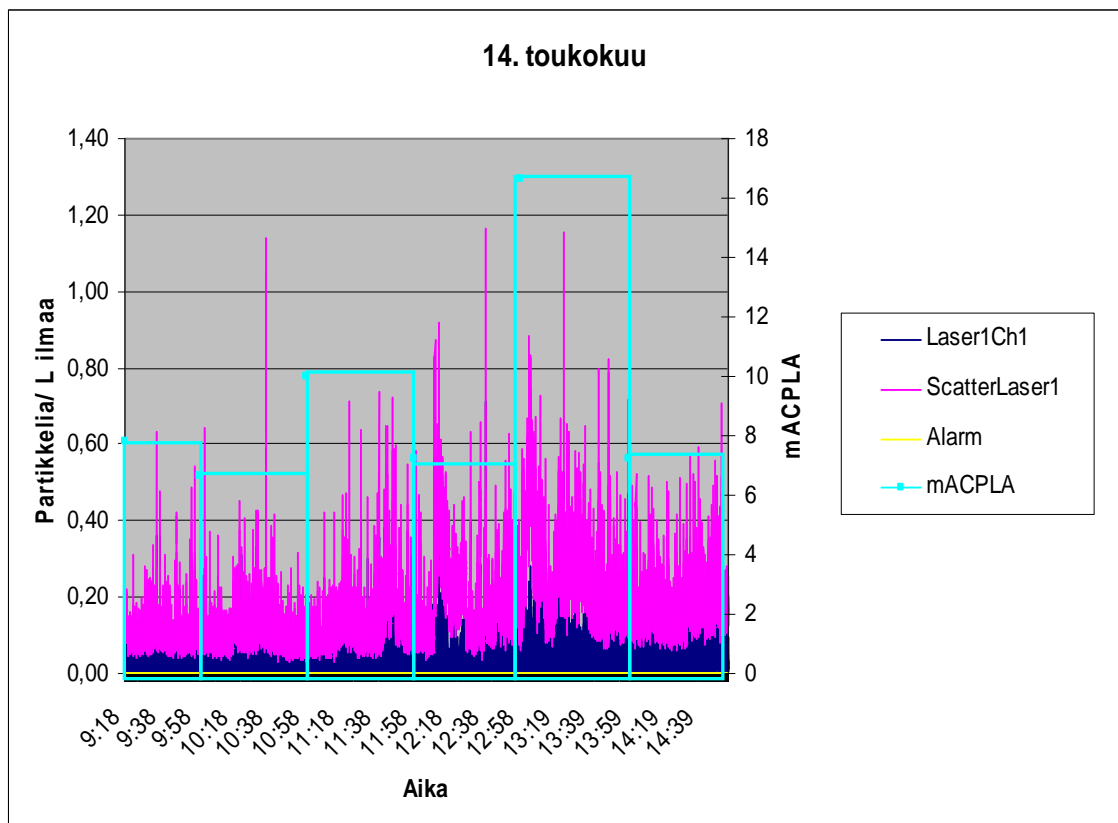
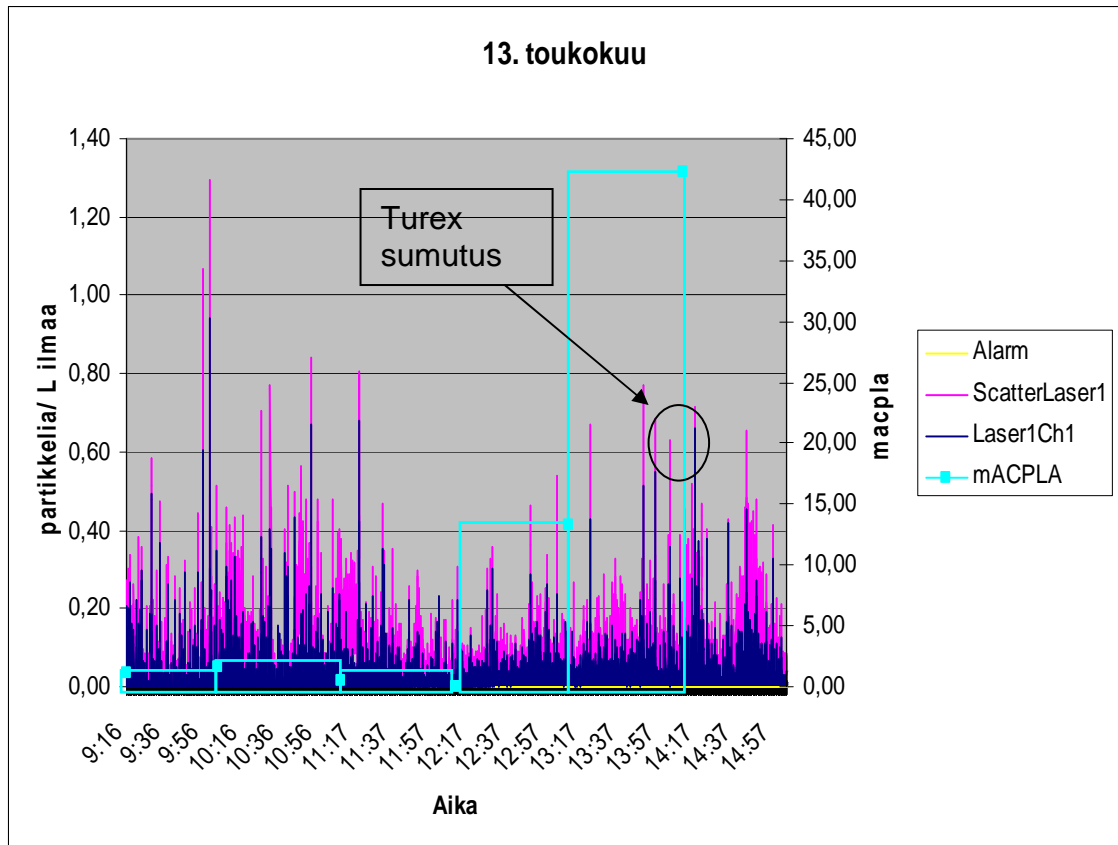


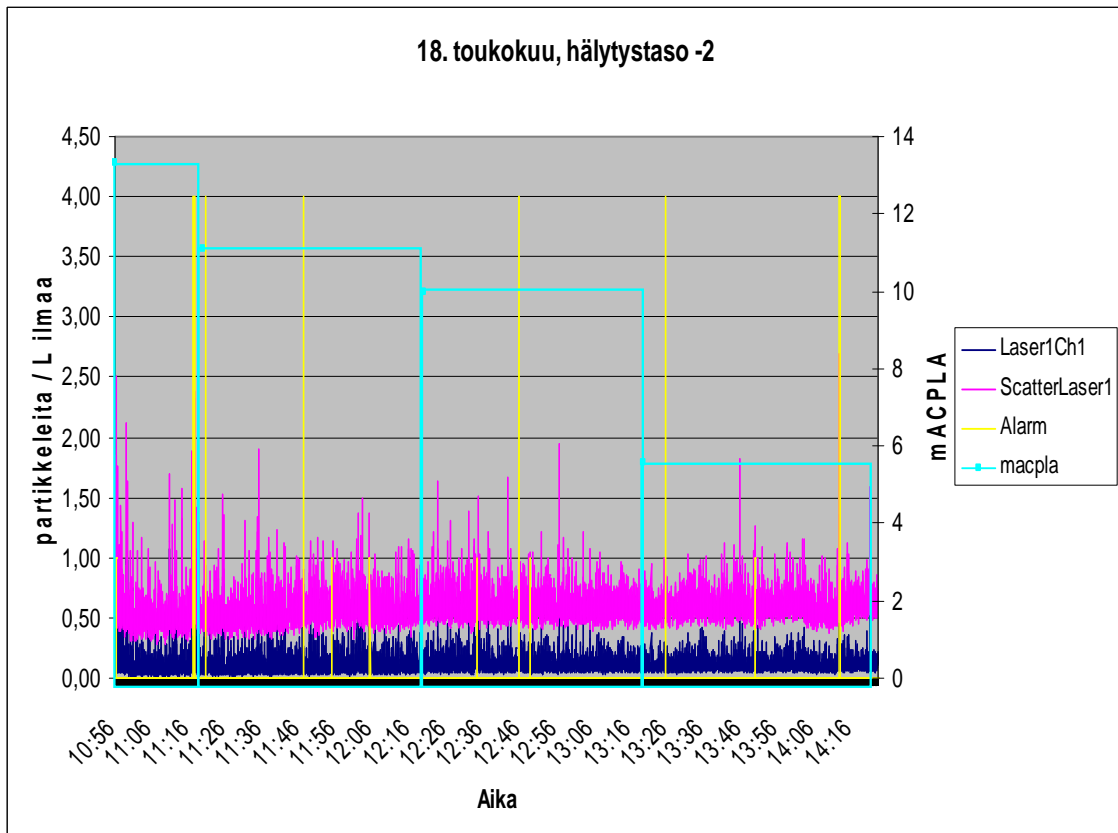
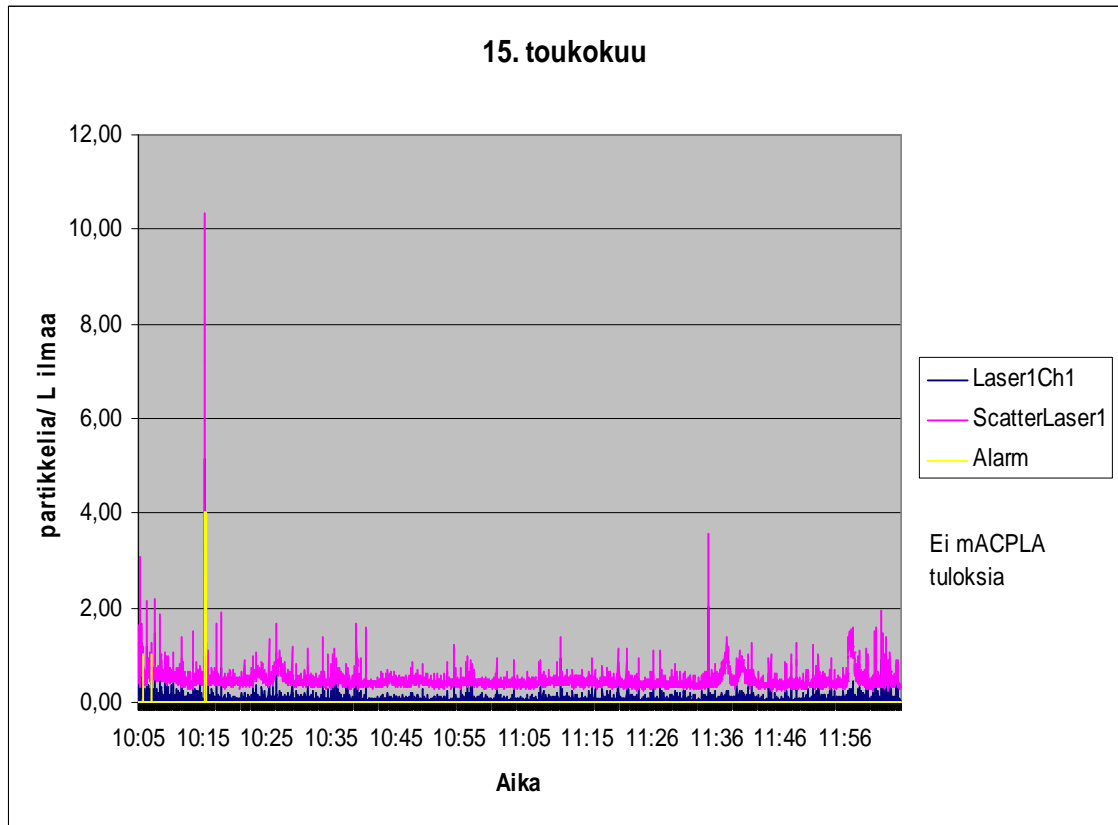


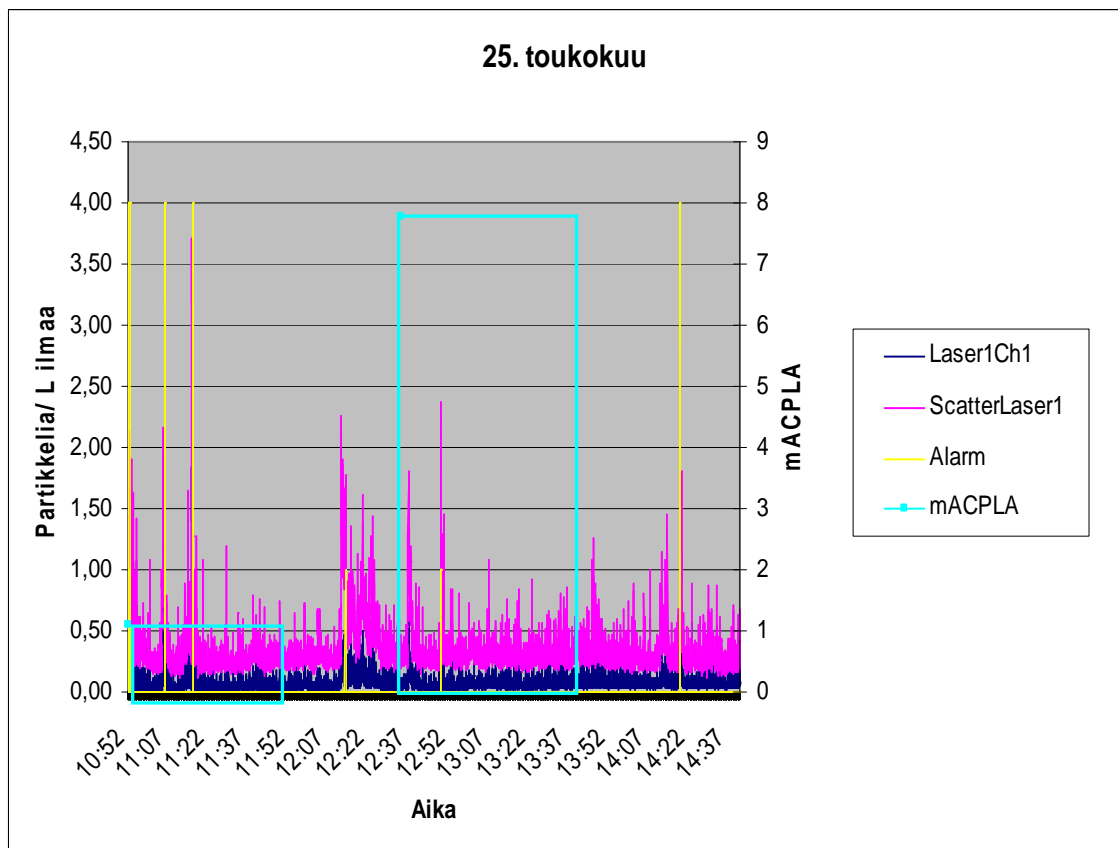
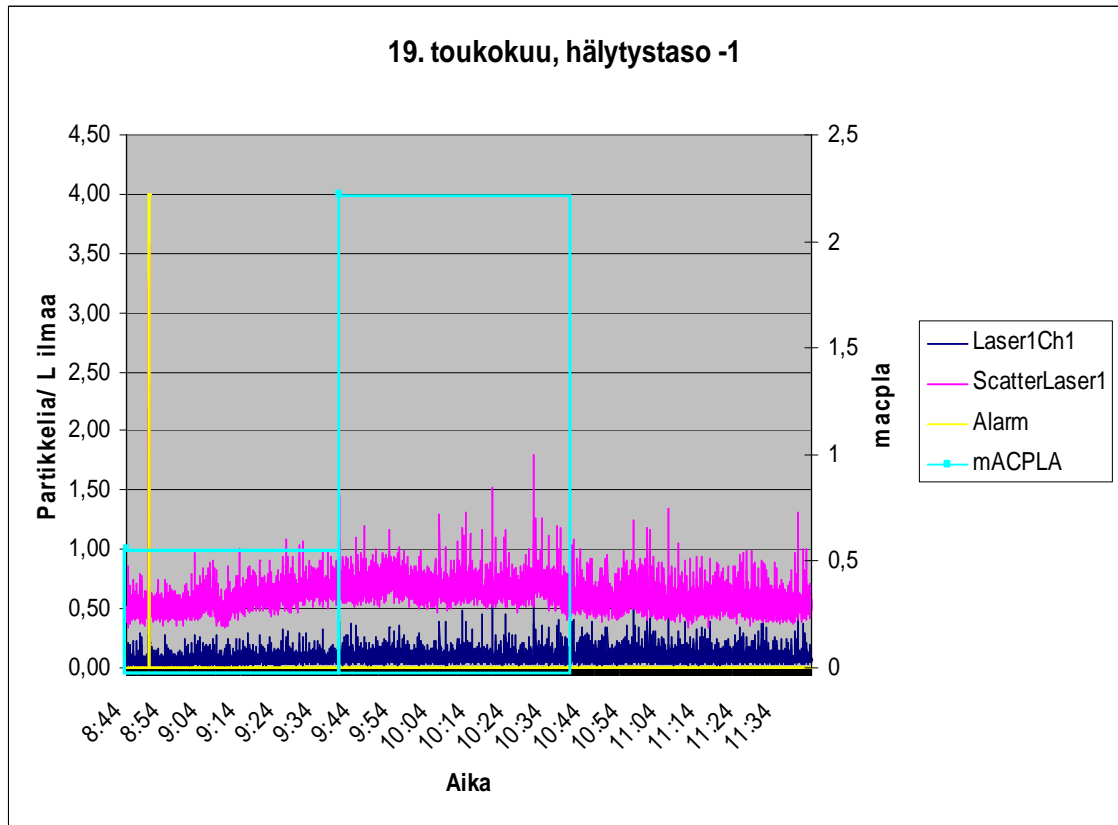


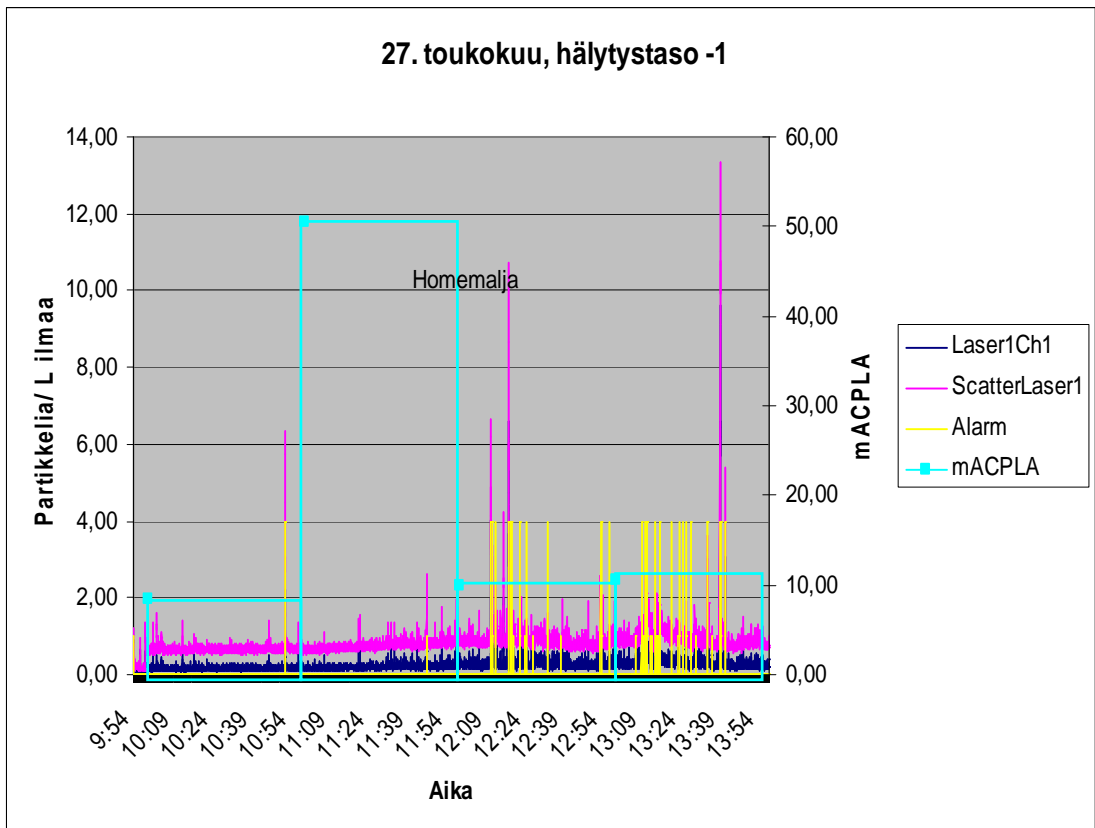
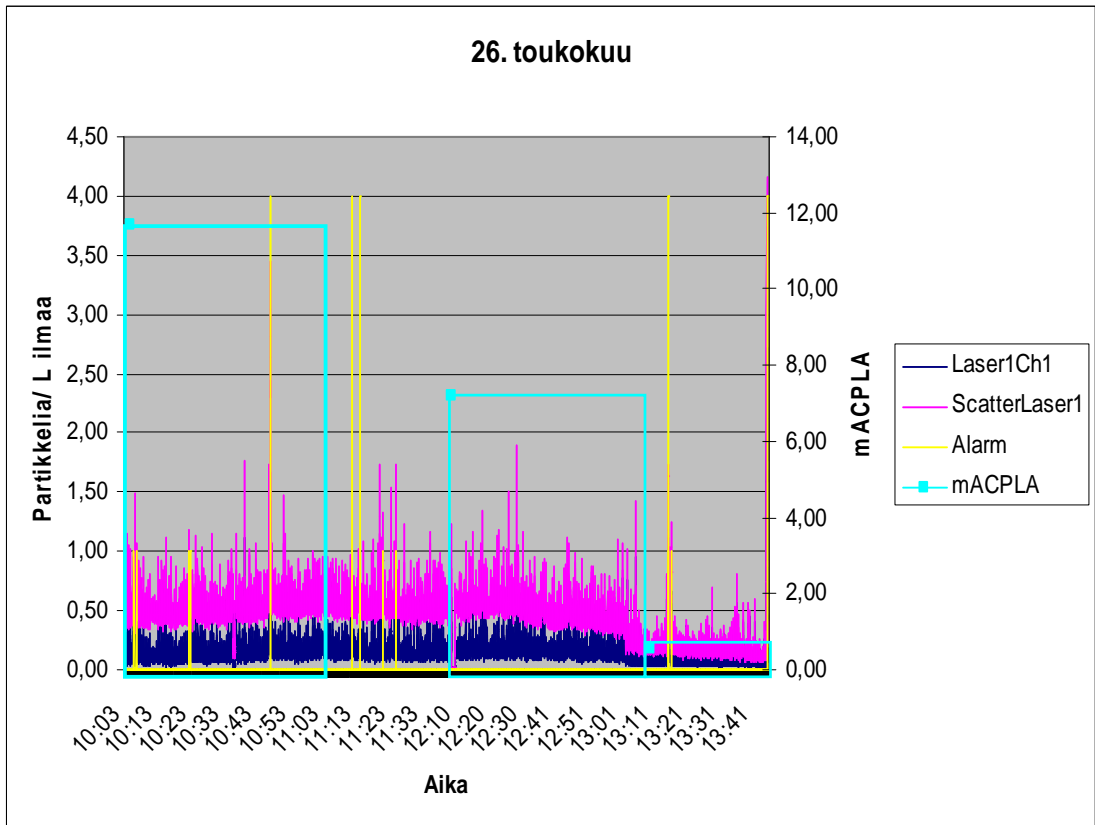


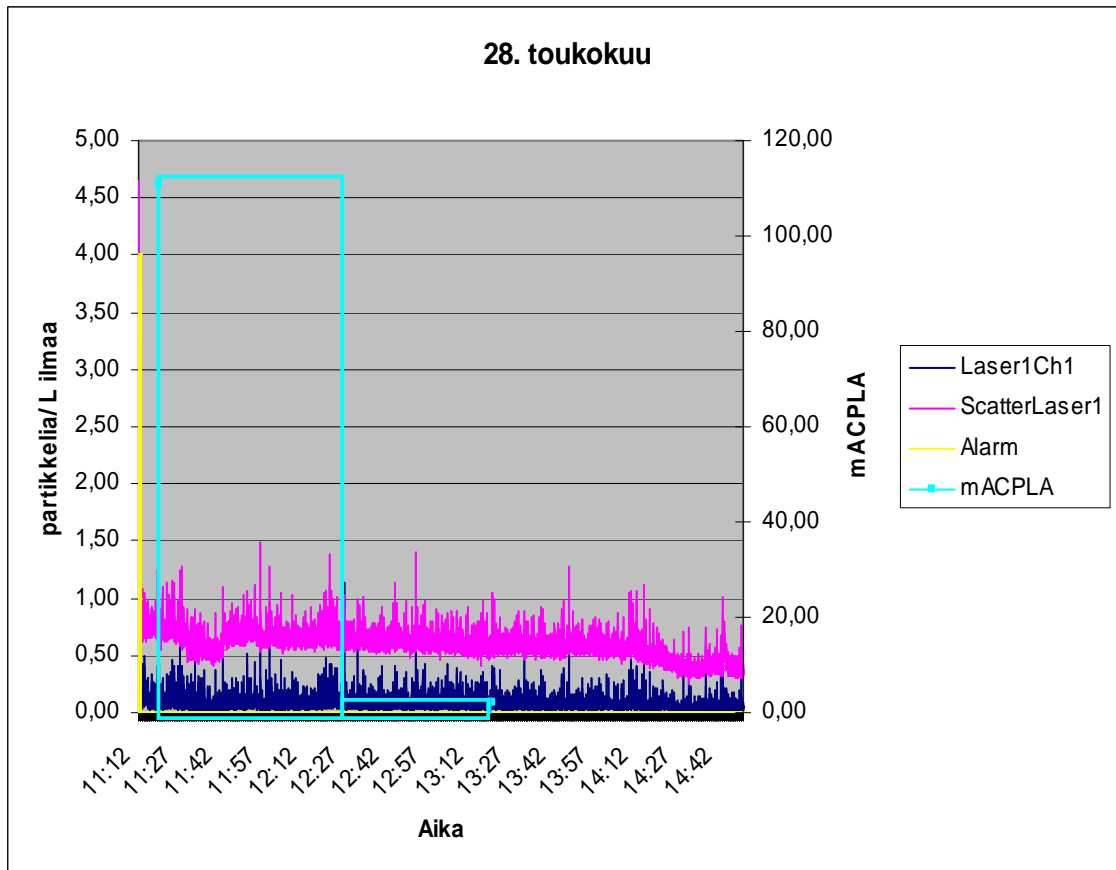




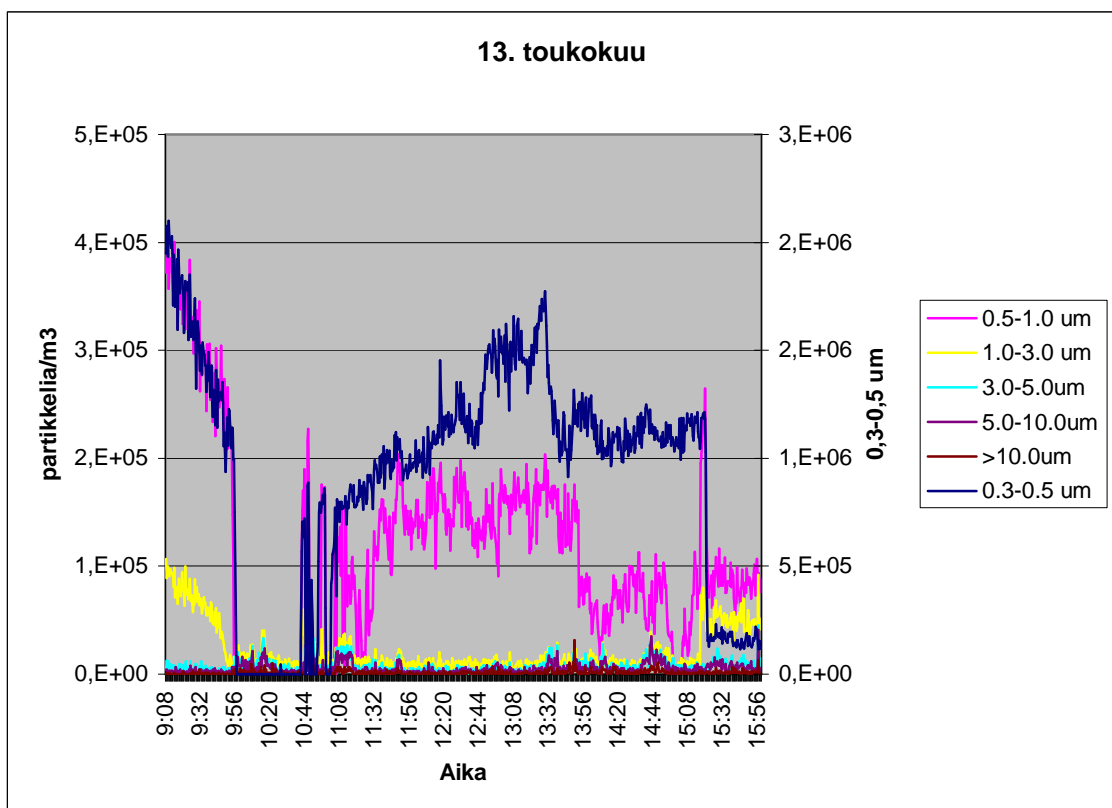
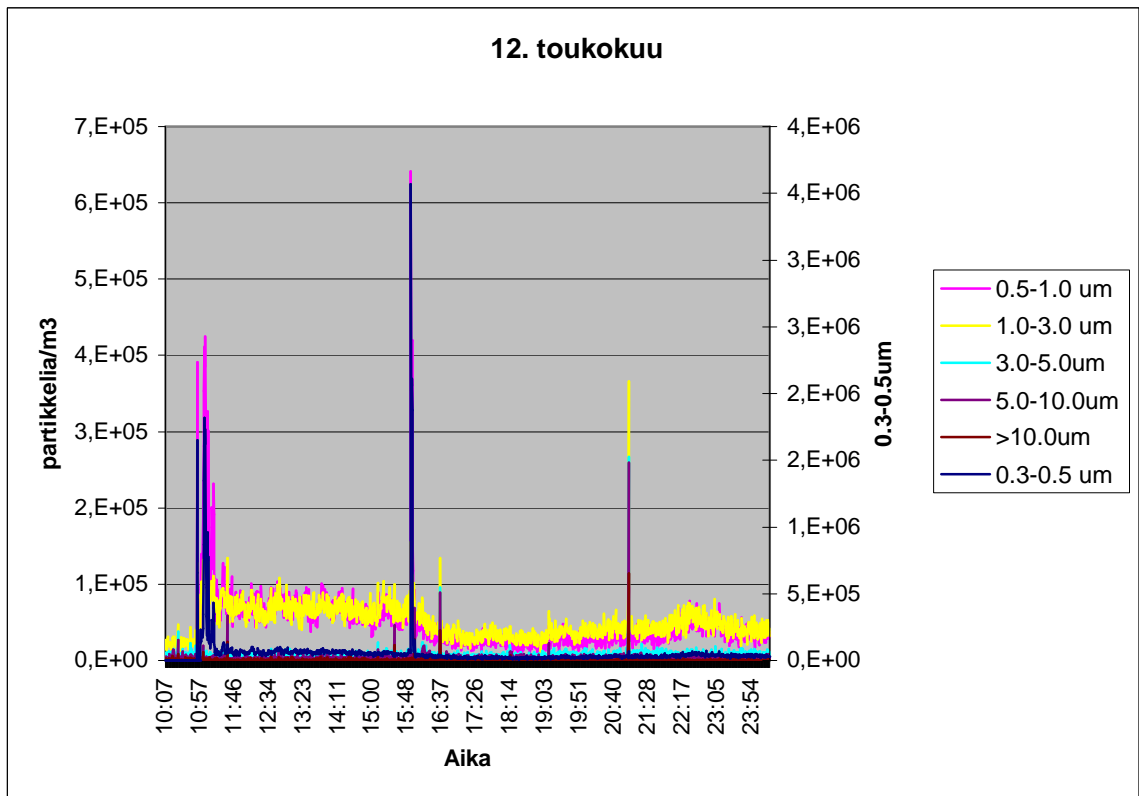


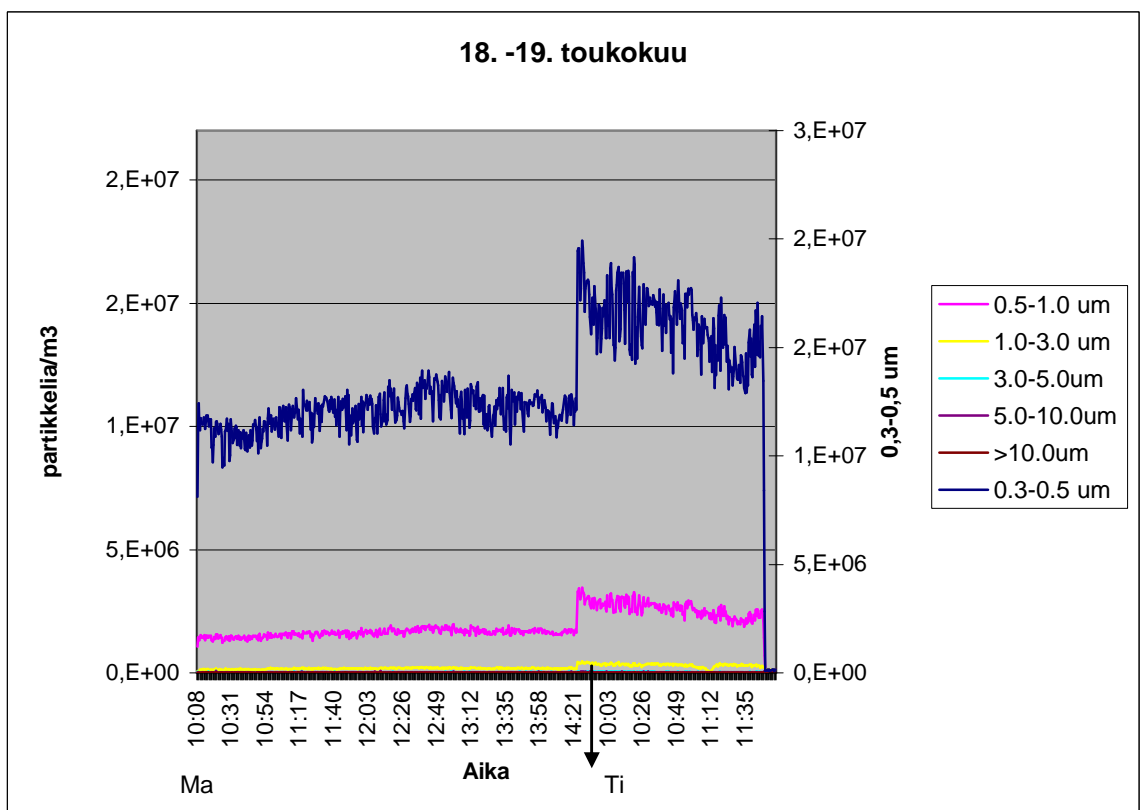
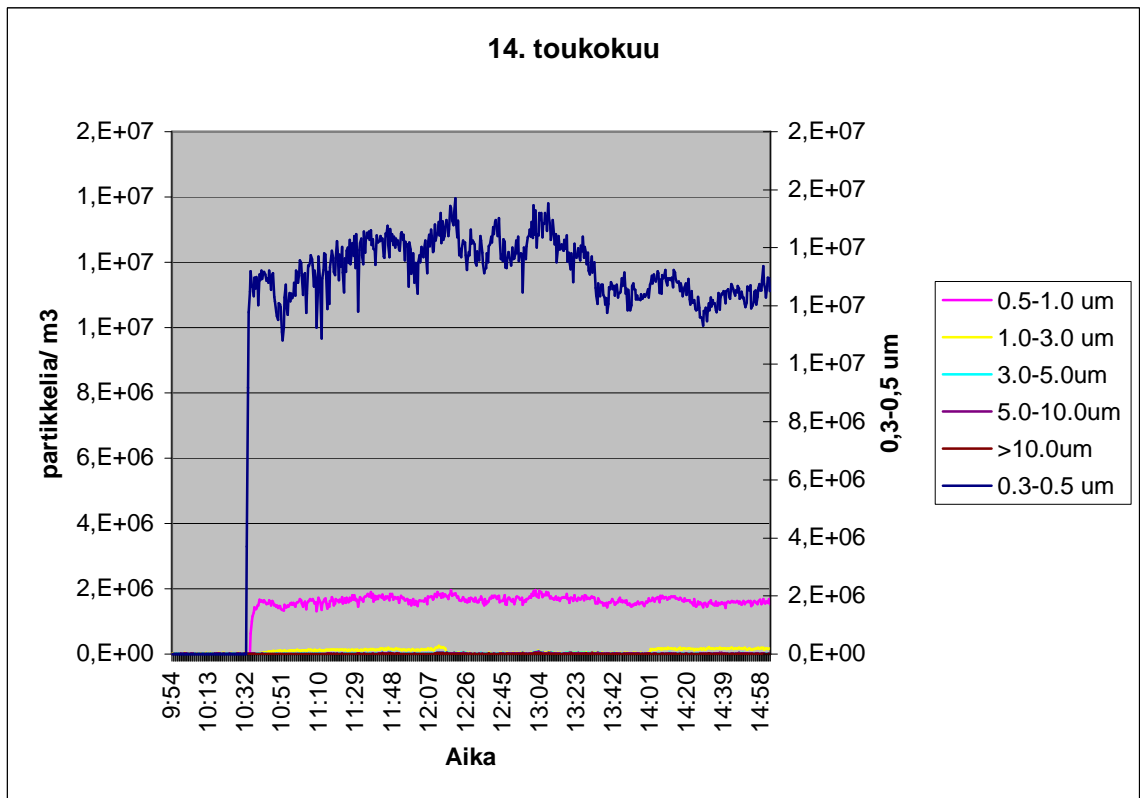


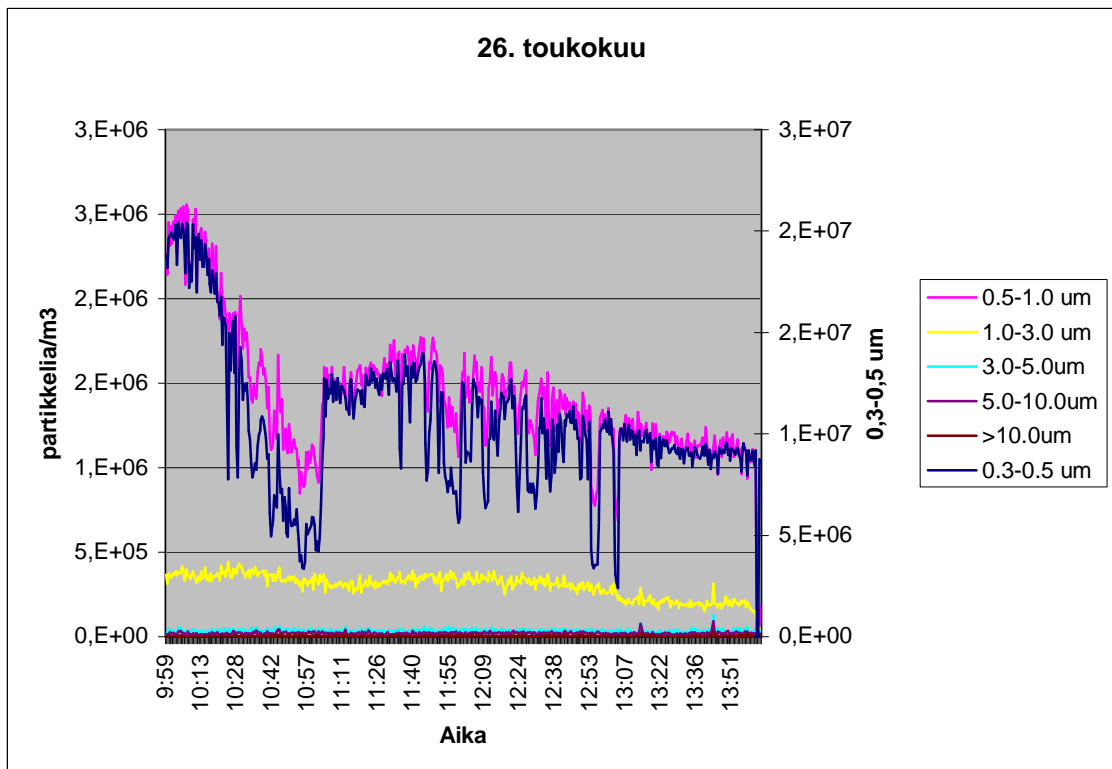
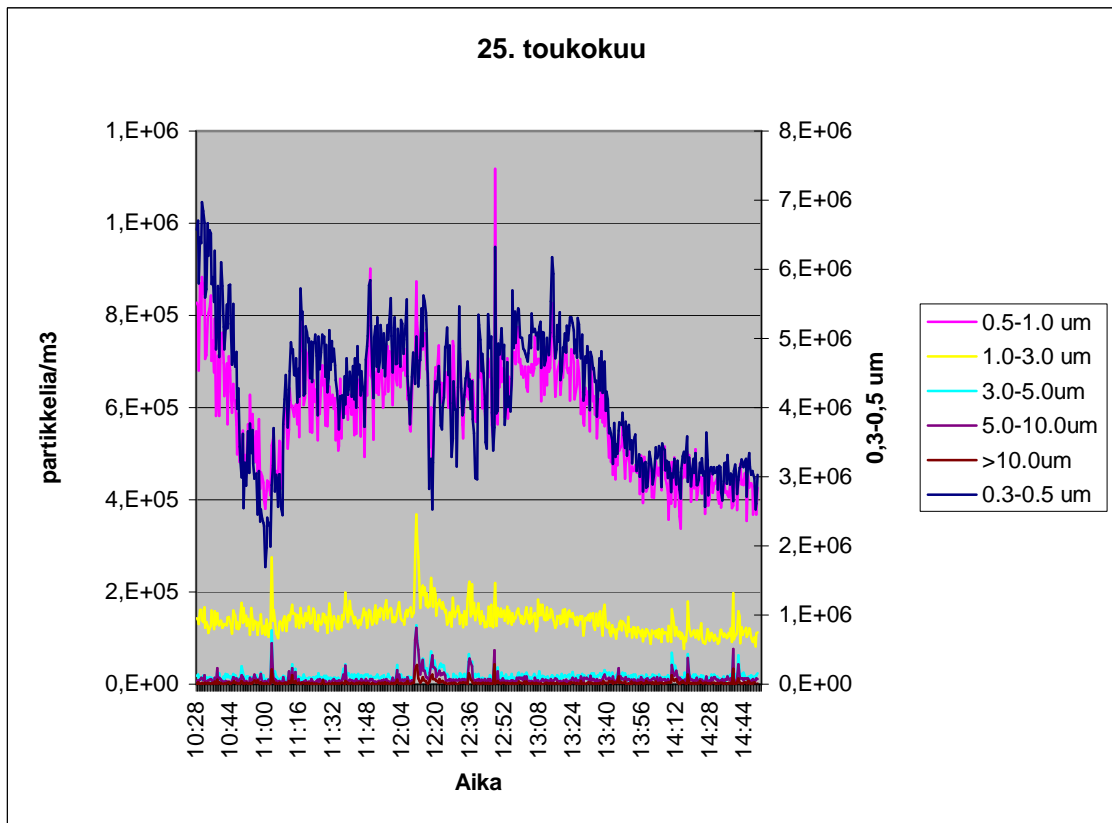


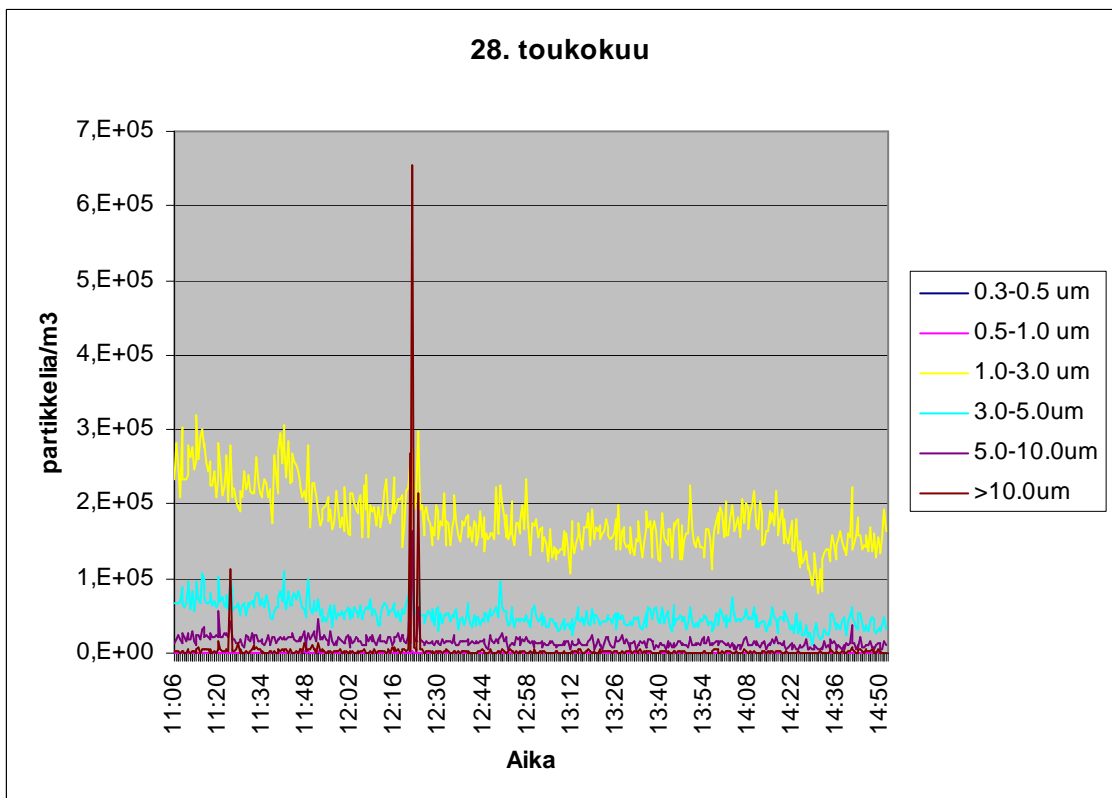
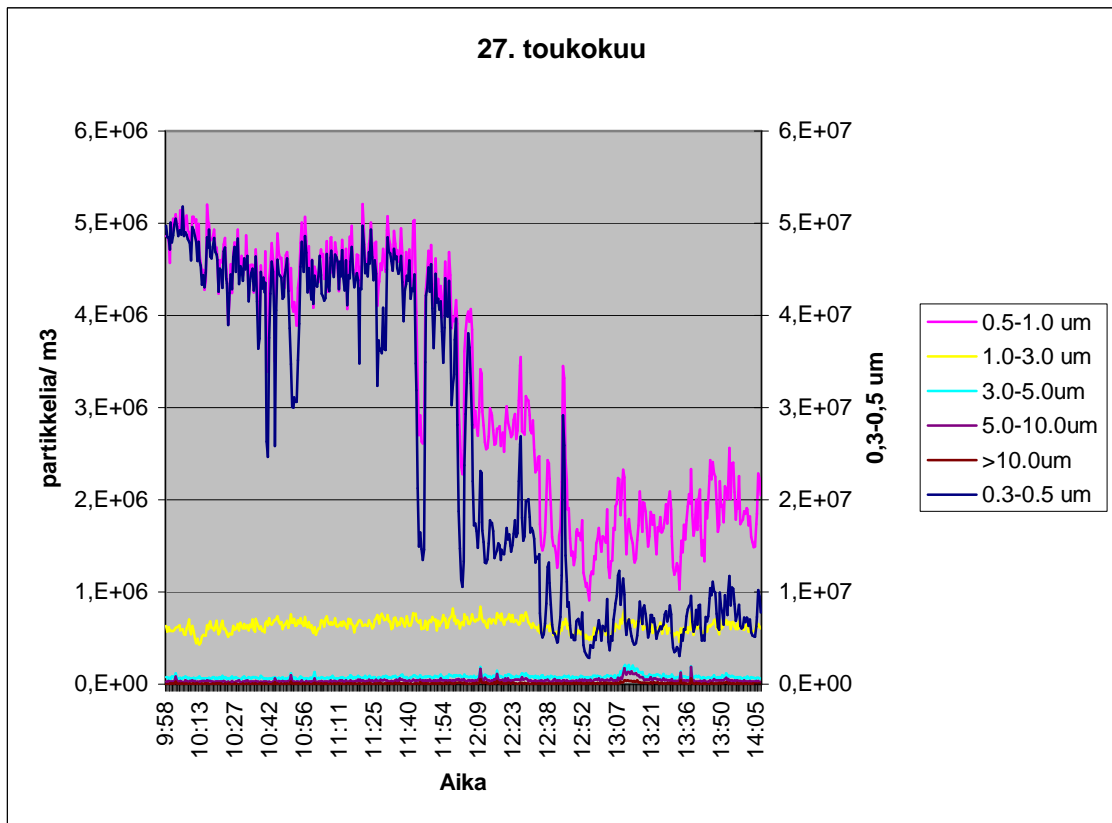


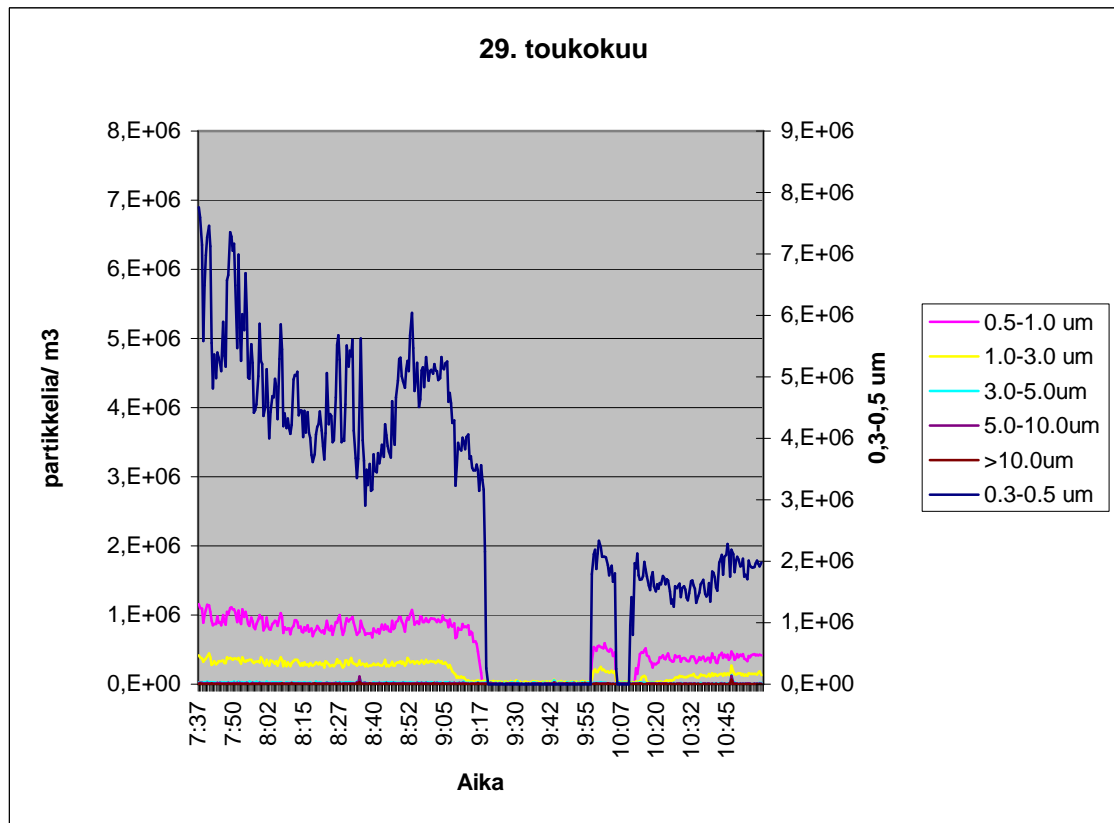
Näytetiedot	lkm	suodattimen läpi mennyt ilmavirta (L)	suodattimen pinta-ala (cm ²)	Näytevolyymi (L/cm ²)	Kuvan pinta-ala (cm ²)	hiukkasia/cm2	hiukkasta/l
15.touko	19	2500	4,5	556	36000	52778	95
15.touko	4	2500	4,5	556	2374,6	168449	303
15.touko	2	2500	4,5	556	1512	132275	238
15.touko	13	2500	4,5	556	18444	70484	127
15.touko	7	2500	4,5	556	6890	101597	183
15.touko	11	2500	4,5	556	20202	54450	98
						15.5 keskimäärin	174
28.touko	268	2760	4,5	613	281650	95154	155
29.touko	149	2760	4,5	613	291600	51097	83
						kaikki keskimäärin	137





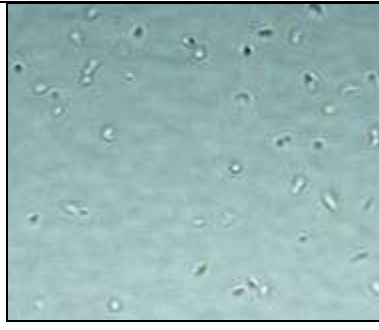
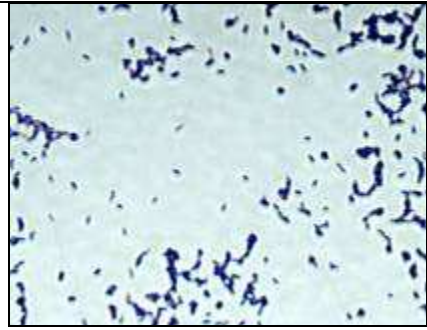



















Pesäkkeet TSA maljalla	Valomikroskooppikuva 100 x öljyimersio	Valomikroskooppikuva gramvärjätty	Tunnistus
			<p>PvTT 1 0.458 Bacillus-pumilus-GC subgroup B 0.416 Bacillus-megaterium-GC subgroup A 0.378 Bacillus-licheniformis (Bacillus subtilis group) 0.360 Staphylococcus-sciuri 0.281 Brevibacillus-parabrevis-GC subgroup A</p>
			<p>PvTT 4 0.681 Curtobacterium-flaccumfaciens-betae/oortii 0.423 Curtobacterium-flaccumfaciens-flaccumfaciens</p>

			<p>PvTT 5 0.814 <i>Pseudomonas-fluorescens</i>-biotype C/P. mandelii 0.619 <i>Pseudomonas-putida</i>-biotype B/vancouverensis 0.596 <i>Pseudomonas-fluorescens</i>-biotype G/taetrolens</p>
			<p>PvTT 7 0.748 <i>Bacillus-atrophaeus</i> 0.564 <i>Bacillus-subtilis</i></p>
			<p>PvTT 8 0.792 <i>Paenibacillus-pabuli</i> (<i>Bacillus</i>) 0.716 <i>Bacillus-simplex</i> 0.488 <i>Paenibacillus-validus</i> (<i>Bacillus gordonae</i>)</p>

