

Kaisa Hytti

Fosfaatin määrittäminen luonnonvesistä

Näytteen esikäsittelyn ja käytetyn analyysilaitteen merkitys

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

5.1.2013

Alkusanat

Opinnäytetyön tekeminen on kuin laskisi kanootilla jokea myötävirtaan. Toisinaan vastaan tulee karikko, ja kanootti täytyy kantaa sen ylitse. Toisinaan taas matka taittuu leppoisasti meloen, ja joskus virta kuljettaa hurjaa vauhtia mukanaan.

Tämä opinnäytetyö ei olisi koskaan valmistunut, jos olisin joutunut sen parissa täysin yksin puurtamaan. Jukka Poika laulussaan toteaa: "annan kiitosta sille, kelle kiitos kuuluu", ja tämän innoittamana haluan lämpimästi kiittää työni ohjaajaa yliopettaja Pekka Lehosta hänen neuvoistaan, ideoistaan ja ajallisesta panoksestaan. Suuret kiitokset kuuluvat myös amanuenssi Tiina Tuloselle hänen avustaan työn toteutuksen suunnittelussa sekä osin myös näytteiden keräämisessä. Haluan kiittää professori Lauri Arvolaa hänen asiantuntemuksestaan ja innoittavasta tuestaan opinnäytetyön toteutuksen aikana. Lämpimät kiitokset erikoislaboratoriomestareille Riitta Ilolalle ja Jaakko Vainionpäälle heidän opastuksestaan ja avustaan laboratoriossa. Haluan kiittää myös tutkimusteknikko Marja-Leena Vitietä ja harjoittelija Maiju Partasta, jotka auttoivat näytteiden keräämisessä. Lisäksi haluan kiittää ja vanhempiani, etenkin äitiäni. Erityiskiitos Joni Niemelle, joka urheana opponointiparinani jaksoi kommentoida ja neuvoa minua työni parissa. Oman pienen kiitoksensa ansaitsee myös Taika-koira, joka oli menossa mukana koko opinnäytetyön ajan, ja jonka kanssa lenkkeillessä sain monesti hyviä ideoita.

Joki on jo melkein laskettu loppuun, mutta rannan sijaan edessäpäin siintää kimmeltävä meri. Rhoninin sanoja lainaten: Vaikka tähänastinen matka ei ole ollut mikään vähäinen saavutus, todellinen seikkailu on vasta edessäpäin.

Porvoossa 28.12.2012

Kaisa Hytti

| | |
|--|--|
| Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika | Kaisa Hytti Fosfaatin määrittäminen luonnonvesistä: Näytteen esikäsittelyn ja käytetyn analyysilaitteen merkitys 46 sivua + 3 liitettä 5.1.2013 |
| Tutkinto | Laboratorioanalyttikko |
| Koulutusohjelma | Laboratorioala |
| Ohjaajat | Amanuenssi Tiina Tulonen Yliopettaja Pekka Lehtonen |
| <p>Tämä opinnäytetyö tehtiin Lammin biologiselle kenttäasemalle. Lammin biologinen asema on osa Helsingin yliopiston bio- ja ympäristötieteellistä tiedekuntaa.</p> <p>Työn tavoitteena oli perehtyä fosfaatin määrittämiseen FIA-laitteistolla ja spektrofotometrillä, määrittämisessä esiintyviin häiriöihin sekä tutkia erilaisten esikäsittelymenetelmien vaikutusta määrittämiseen. Projektille oli tarvetta, sillä tutkimusaseman laboratorio oli aiemmin saanut kahtena vuonna hylättyjä tuloksia FIA-laitteistolla fosfaatin määrittämisessä kansallisissa vertailukokeissa. Fosfaatin määrittämisellä vesinäytteistä on tutkimusasemalla tapahtuvassa tutkimuksessa erittäin tärkeä merkitys.</p> <p>Opinnäytetyössä mittaukset suoritettiin FIA-laitteistolla, jossa oli fosforilinjan detektorina spektrofotometri. Lisäksi tehtiin vertailumittauksia varsinaisella spektrofotometrillä. Työssä tutkittiin näytteiden säilyvyyttä pakastimessa ja jääkaapissa, sekä suodatuksen vaikutusta säilytykseen. Erilaisille näytteille tehtiin kinetiikkakokeita, joissa verrattiin kahden eri menetelmän reagenssien reaktioiden kulkua toisiinsa. Lisäksi perehdyttiin laajaan tausta-aineistoon, jonka avulla pyrittiin saamaan tietoa menetelmän muutoksista.</p> <p>Havaittiin, että jääkaappisäilytys sopi vesinäytteille paremmin kuin pakastus. Lisäksi huomattiin, että eri reagenssien kineettiset kuvaajat poikkesivat toisistaan huomattavasti. Onkin perusteltua olettaa, että FIA-menetelmä ei täysin sovellu fosfaatin määrittämiseen sellaisenaan, vaan menetelmää tulisi muokata jonkin verran. On myös mahdollista, että spektrofotometrisen määrittämisen aikana tapahtuu happohydrolyysiä, joka vääristää saatuja tuloksia.</p> | |
| Avainsanat | vesinäytteet, fosfaattianalyysi, FIA, spektrometria |

| | |
|--|--|
| Author Title Number of Pages Date | Kaisa Hytti Determination of phosphate in natural waters: Significance of the preliminary treatments of the sample and the analytical device 46 pages + 3 appendices 5 January 2013 |
| Degree | Bachelor of Laboratory Services |
| Degree Programme | Laboratory Sciences |
| Instructors | Tiina Tulonen, Amanuensis Pekka Lehtonen, Principal Lecturer |
| <p>This thesis was carried out at the Lammi Biological Research Station, which is part of the Faculty of Biological and Environmental Sciences of the University of Helsinki.</p> <p>The objective was to become familiarized with the determination of phosphate with the FIA-method and spectrophotometric method, and to research the disturbances and the different kinds of preliminary treatments of the method. There was a requirement for this kind of project as the laboratory of the Lammi Biological Station had received failed results in phosphate determination with the FIA-method in the national control experiments twice during earlier years. The determination of phosphate from water samples is one of the key analyses in the biological studies of the station.</p> <p>The analyses of this thesis were performed with the FIA-analyzer, which had a spectrophotometer as the detector in the phosphorous line. Comparison analyses were performed with an actual spectrophotometer. The conservation of the samples in a freezer and refrigerator was examined along side with the effect of filtering of the samples. Kinetic experiments were carried out with various samples with the aim of comparing two sets of different reagents and the differences in their reaction diagrams. Moreover, extensive data of earlier researches was studied in order to find out information about the changes in the analysis method.</p> <p>It was observed that the conservation in the refrigerator suited the water samples better than freezing. It was also observed that the kinetic diagrams of the different reagents differed from each other significantly. Therefore, it is justified to assume that the FIA-method does not suit determination of phosphate as it is, and that the method should be reworked slightly. It is also possible that acid hydrolysis occurs during the spectrophotometric determination of phosphate and that this phenomenon distorts the results.</p> | |
| Keywords | water sampling, phosphate, FIA, spectrophotometer |

Sisällys

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Johdanto ja tavoitteet | 1 |
| 2 | Työn taustaa | 2 |
| 2.1 | Katsaus fosforiin ja sen biologisiin vaikutuksiin | 2 |
| 2.1.1 | Fosforin vesikemiaa ja merkitys eliöille | 2 |
| 2.1.2 | Vesiekosysteemin perusteet | 5 |
| 2.1.3 | Fosforin kierto | 6 |
| 2.1.4 | Fosfaattipitoisuudet tutkituissa vesistöissä | 7 |
| 2.2 | UV/Vis-spektrofotometri | 9 |
| 2.2.1 | Valo sähkömagneettisena säteilynä | 9 |
| 2.2.2 | Laitteen rakenne ja toimintaperiaate | 11 |
| 2.2.3 | Spektrofotometriset mittaukset | 15 |
| 2.3 | FIA-laitteisto | 16 |
| 2.3.1 | Toimintaperiaate | 18 |
| 2.3.2 | Pumput | 19 |
| 3 | Materiaalit ja menetelmät | 20 |
| 3.1 | Käytetty menetelmä | 20 |
| 3.2 | Käytetyt liuokset | 22 |
| 3.3 | Biologisen aseman FIA-laite | 23 |
| 3.4 | Biologisen aseman spektrofotometri | 25 |
| 4 | Työn suunnittelu ja toteutus | 26 |
| 4.1 | Suunnittelu | 26 |
| 4.2 | Suoritettavat kokeet | 27 |
| 4.2.1 | Ensimmäisen koeviikon kokeet | 28 |
| 4.2.2 | Toisen koeviikon kokeet | 28 |
| 4.2.3 | Kolmannen koeviikon kokeet | 29 |
| 5 | Tulokset ja niiden tulkinta | 31 |

| | | |
|-----|--------------------------------|----|
| 5.1 | Ensimmäisen koeviikon tulokset | 31 |
| 5.2 | Toisen koeviikon tulokset | 35 |
| 5.3 | Kolmannen koeviikon tulokset | 40 |
| 6 | Yhteenveto | 44 |
| | Lähteet | 45 |
| | Liite 1. Kalibroititulokset | |
| | Liite 2. Tulostaulukot | |
| | Liite 3. Reagenssilista | |

1 Johdanto

Tässä opinnäytetyössä perehdytään fosforiin ja sen määrittämiseen vesinäytteistä FIA-laitteistolla ja spektrofotometrillä. Työssä tarkastellaan fosforin merkitystä luonnonvesissä, UV/Vis-spektrofotometrin rakennetta ja toimintaa, FIA-laitteiston toimintaa sekä työhön liittyvien kokeiden suunnittelua, toteutusta ja tulosten käsittelyä. Luonnonvesiä tutkittaessa on tarpeen tarkastella myös fosforin esiintymistä ja merkitystä vesiekosysteemissä.

Opinnäytetyö tehtiin Lammin biologiselle asemalle. Biologisen aseman laboratoriossa eräs erittäin käytetty menetelmä on ravinteiden määrittäminen vesinäytteistä. Mittaukset suoritetaan FIA-laitteistolla tuoreista tai pakastetuista näytteistä. Biologisen aseman laboratorio on muutamana vuonna osallistunut kansallisiin seurantakokeisiin, joissa on vertailtu eri laboratorioiden tuloksia erilaisista näytteistä ja menetelmistä, ja saanut näissä seurantakokeissa kahtena vuonna hylättyjä tuloksia fosforin osalta. Selkeää syytä hylättyihin tuloksiin ei kuitenkaan biologisen aseman omissa koemittauksissa selvinnyt. Tarvetta opinnäytetyön tekemiselle siis oli, jotta voitaisiin ymmärtää, mistä hylätyt tulokset johtuvat ja voisiko asialle tehdä jotain. Biologisella asemalla epäiltiin näytteiden esikäsittelymenetelmien, kuten pakastuksen ja suodatuksen, vaikuttavan tuloksiin ja toivottiin, että myös näiden vaikutusta saatuihin tuloksiin tarkasteltaisiin opinnäytetyössä. Työn tavoitteeksi muotoutuikin siis tutkia esikäsittelyn ja käytetyn analyysimenetelmän sekä -laitteen merkitystä fosfaatin määrittämiselle luonnonvesistä.

Lammin biologinen asema sijaitsee Hämeenlinnan kunnassa noin 120 km Helsingistä Lahden suuntaan. Se on yksi kolmesta Helsingin yliopiston bio- ja ympäristötieteellisen tiedekunnan kenttäasemasta yhdessä Kilpisjärven ja Tvärminnen asemien kanssa. Lammin biologisella asemalla on tärkeä merkitys yliopiston kurssitoiminnassa sekä kenttätutkimuksessa luonnontieteellisillä aloilla. Toiminta on vilkasta vuoden ympäri, etenkin kesäaikaan siellä järjestetään paljon kursseja ja seminaareja. Ympäri vuoden suoritetaan etenkin vesistöjen seurantatutkimusta, sekä muita vaihtelevia tutkimusprojekteja. [1.]

2 Työn taustaa

Tässä osiossa kerrotaan hieman fosforin esiintymisestä luonnossa ja sen merkityksestä ekologian kannalta, sekä esitellään fosfaatin määritykseen käytettyjä laitteita.

2.1 Katsaus fosforiin ja sen biologisiin vaikutuksiin

Fosfori kuuluu epämetalleihin ja sen oksideilla hapetusluku on +5 tai +3. Fosforilla on kolme erilaista alkuainemuotoa, joilla on keskenään erilainen kiderakenne. Alkuainefosfori voidaan jaotella kuuluvaksi valkoiseen, punaiseen tai mustaan fosforiin, ja nämä eri muodot poikkeavat toisistaan esimerkiksi reaktiivisuuden suhteen valkoisen fosforin ollessa kaikkein reaktiivisinta. Fosfori on erittäin tärkeä ravinne kasvien kasvun kannalta. Maaperässä on varastoituneena runsaasti fosforia, samoin kuin valtamerissä liuenneena. Näiden lisäksi fosforia on paljon elävissä organismeissa sekä kuolleessa orgaanisessa aineksessa. Maaperän fosforista on kuitenkin suurin osa liukenematonta, ja siksi viljelyksiä lannoitetaan fosforia sisältävillä lannoitteilla, esimerkiksi ammoniumdivetyfosfaatilla $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, jossa on kätevästi sekä fosforia että kasveille myös tärkeää tyyppiä samassa paketissa. [2, s. 954 - 959, s. 942.]

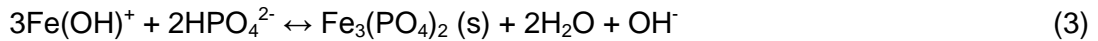
2.1.1 Fosforin vesikemiaa ja merkitys eliöille

Fosforin merkitystä vesistöissä on tutkittu paljon, sillä se on vähäisestä esiintymismäärästään huolimatta erittäin tärkeässä roolissa biologisissa prosesseissa. Fosfori ei esiinny luonnossa vapaana, vaan fosforihapon suoloina. Ihmisen toiminnan seurauksena fosforia päätyy runsaasti luonnonvesistöihin esimerkiksi lannoitteiden ja jätevesien mukana. Yleensä luonnonvesissä fosforia esiintyy hyvin pieninä pitoisuuksina, sillä pääsääntöisesti kaikki veteen päätyvä fosfori menee suoraan yhteyttävien tuottajien käyttöön. Vedessä fosfori esiintyy erilaisina yhdisteinä, esimerkiksi epäorgaanisena fosfaattifosforina tai sitoutuneena orgaaniseen ainekseen. Epäorgaaninen fosfori esiintyy järvissä yleensä ortofosfaattina, PO_4^{3-} . Fosforia esiintyy myös orgaanisina fosforyhdisteinä ja esimerkiksi sitoutuneena epäorgaaniseen ja kuolleeseen orgaaniseen materiaan vedessä. Partikkeleihin sitoutunut fosfori koostuu enimmäkseen elollisten organismien fosforirakenteista, sekä mineraaleista ja maasta liuenneista fosforyhdisteistä, kuten savesta ja karbonaateista. Liuennut fosfori

puolestaan koostuu ortofosfaatista, polyfosfaateista, orgaanisista kolloideista ja joistakin fosforiestereistä. Fosfori voi vedessä muodostaa kompleksiyhdisteitä esimerkiksi raudan, mangaanin, sinkin ja kuparin kanssa. Kokonaisfosforista puhuttaessa tarkoitetaan veden sisältämää fosforia sen kaikissa eri muodoissa, kun taas veden fosfaattifosforipitoisuus kuvastaa tuottajien saatavilla olevan ravinteen määrää. Karuimmissa järvissä kokonaisfosforin pitoisuus voi jäädä 5 µg/l tasolle, kun taas rehevimmissä järvissä pitoisuus voi olla jopa 100 µg/l luokkaa. Fosforin pitoisuuteen vedessä vaikuttavat ihmisen toiminnan lisäksi esimerkiksi vuodenaika ja lämpötila, ja on normaalia, että fosforin määrä vaihtelee rajustikin vesistössä vuoden kierrossa. Järvitutkimuksessa fosforin määrää käytetään järven rehevyyden mittarina yhdessä a-klorofyllipitoisuuden kanssa. [3; 4.]

Vesien sedimenteissä on usein paljon enemmän fosforia kuin itse vedessä. Aerobisissa olosuhteissa fosforia enimmäkseen imeytyy sedimentteihin, sillä tällöin sedimenttien pintaosissa on runsaasti metallioksideja, jotka sitovat fosforia. Anaerobisissa olosuhteissa puolestaan epäorgaanisen fosforin sitoutumiseen ja liukenemiseen vaikuttaa suuresti hapettuminen ja pelkistyminen, hapettomissa olosuhteissa sedimenteistä usein vapautuu fosforia pohjan veteen, kun rautaoksidit pelkistyvät mikrobiologisesti. Hapettomissa oloissa fosforin liukeneminen veteen lisääntyykin voimakkaasti. Fosforia sitoutuu sedimentteihin esimerkiksi rautayhdisteinä ja raudan komplekseina, ja muutamat bakteerilajit voivat vapauttaa fosfaattia näistä yhdisteistä käyttäessään rautaa omiin reaktioihinsa. Jotkin bakteerilajit sitovat fosforia sedimentteihin, mutta niiden vaikutus on huomattavasti pienempi kuin kemiallisen sitoutumisen. Myös pH:n nousu yli 6,5 voi vapauttaa fosfaattia sedimenteistä. Pohjassa esiintyvä turbulenssi nopeuttaa fosforin vapautumista sedimenteistä muualle vesistöön, jolloin vedessä ja sedimenteissä elävät levät hyödyntävät vapautunutta fosforia tehokkaasti. Koeolosuhteissa onkin havaittu, että ilman sedimentin fosforia levien kasvu olisi melko rajoittunutta. [4; 5.]

Seuraavissa reaktioissa havainnollistetaan joitakin raudan ja fosforin välisiä reaktioita. Yhtälöissä 1 ja 2 tarkastellaan vetyfosfaatin reaktiota raudan kanssa. Reaktioiden tuotteena muodostuu väritöntä rautakompleksia [6]. Reaktioyhtälössä 3 voidaan puolestaan nähdä saostumisreaktio rautahydroksidin ja fosfaatin välillä [7]. Raudan ja fosforin monista hapetusasteista johtuen niiden välisiä reaktioita on hyvin monenlaisia.



Ortofosfaatti PO_4^{3-} on ainoa suoraan kasvien hyödynnettävissä oleva epäorgaanisen fosforin muoto. Se on erittäin reaktiivista ja muodostaa helposti monien kationien kanssa hapettavissa olosuhteissa heikosti liukenevia kolloideja, jotka saostuvat eivätkä siten ole tuottajien käytössä. Fosfaattia tavallaan siis katoaa vedestä sedimentoitumisen lisäksi myös sen sitoutuessa epäorgaanisten kolloidien ja partikkelien pinnalle. Suuri osa vesistöjen fosfaatista on sitoutuneena orgaanisiin fosforyyhdisteisiin tai solujen osiin ja soluelimiin sekä elävissä että kuolleissa soluissa, sekä lisäksi sitoutuneena orgaanisiin kolloideihin. Usein joissa ja puroissa liuenneen fosforin määrä on suurempi kuin järvissä, ja erityisen korkeat määrät usein seuraavat sateita ja lumien sulamista. Sedimentaation mukana fosfaattia poistuu tuottajien käytöstä vesiekosysteemeissä, ja siksi sitä on tultava ulkopuolelta lisää, jotta tuottavuutta voitaisiin ylläpitää. Ortofosfaatti päätyy hyvin nopeasti vedestä eliöstön käyttöön, ja siksi ortofosfaatin konsentraatio on vesistöissä yleensä erittäin pieni. [4; 8, s. 93.]

Elävät organismit tarvitsevat fosforia rakennusaineiksi nukleiinihappoihin, fosfolipideihin, ATP:iin ja muihin energiaa sitoviin molekyyliin. Fosforia tarvitaan myös luiden ja hampaiden rakennusaineiksi, ja sitä esiintyy myös entsyymeissä ja vitamiineissa. Biologisesti tärkein fosforyhdiste on fosfaatti, jota kasvit pidättävät itseensä ja käyttävät orgaanisten yhdisteiden synteesissä. Tuottavien kasvien sitoma fosfaatti päätyy biologisten prosessien kautta molekyyliin, ja nämä usein päätyvät kuluttajien ruuaksi ja siten kulkeutuvat ravintoketjussa eteenpäin. [9, s. 1223.]

Vesistöissä fosforia käyttävät bakteerit, levät, syanobakteerit sekä suuremmat vesikasvit. Fosforin kierrätys järvessä mahdollistaa levien paremman tuotannon. On tutkittu, että jos fosfori olisi käytetty vain kerran ja sen käyttäjä olisi hävinnyt ulosvirtauksen tai sedimentaation avulla, saattaisi järven perustuotanto vähentyä jopa kymmenesosaan todellisesta. Toisaalta fosforia päätyy kiertoon myös pohjan sedimenteistä, joten tilanne ei ole täysin stabiili. [4; 10, s. 190.]

2.1.2 Vesiekosysteemin perusteet

Vesistöjen kemiaan vaikuttavat lukuisat erilaiset asiat, ja maailmasta löytyy todella monia erityyppisiä järviä ja jokia. Vesistön kulloiseenkin tilaan vaikuttavat esimerkiksi sitä ympäröivän maaperän geologinen koostumus, sekä vesistön muoto ja syvyys, joka vaikuttaa esimerkiksi pohjalle saapuvan valon määrään. Olennaista on myös vesistön yhteys muihin järviin ja jokiin sekä se, minkälaisien alueiden läpi siihen virtaavat vedet kulkevat. Ihmisen toiminta ja maan käyttö niin järven kuin siihen virtaavien jokienkin varrella vaikuttaa olennaisesti molempien ekosysteemeihin. Kemiallisilla päästöillä voi olla mullistava vaikutus järven herkkään tasapainoon, puhumattakaan mahdollisista vieraiden lajien invaasioista. Monet biologiset prosessit kuten järven perustuotanto, mikrobien ravinnon kierto, biogeokemiallinen kierto ja järvessä vallitsevat ravintoketjut vaikuttavat vesiekosysteemin rakenteeseen.

Vesiekosysteemissä sekä valo että ravinteet rajoittavat perustuotantoa. Perustuotannolla tarkoitetaan sitä auringonvalon energiamäärää, jonka ekosysteemi tiettyä ajanjaksona kykenee muuttamaan kemialliseksi energiaksi, eli orgaaniseksi yhdisteiksi. Valon rooli on erittäin keskeinen kasvien yhteyttämisessä, ja siksi valon määrä vaikuttaa ratkaisevasti kasvien tuotantokapasiteettiin. Näin ollen esimerkiksi kasvin kasvusyvyys vaikuttaa merkittävästi sen tavoittaman valon määrään, ja siten myös sen tuotantoon. Kuitenkin ravinteet rajoittavat tuotantoa paljon tehokkaammin kuin valo. Rajoittava ravinne on sellainen aine, jota lisäämällä tuotanto kasvaisi. Yleisesti ottaen typpi ja fosfori ovat tärkeimmät tuotantoa rajoittavat ravinteet, ja etenkin järviökosysteemeissä juuri fosfori on erittäin tärkeä rajoittava tekijä. [9, G-29, s. 1226.]

Järvissä valon määrä vähenee syvyyden myötä ja aiheuttaa veteen kerrostuksellisuutta. Niissä voi olla myös lämpötilasta johtuva harppauskerros, joka vaikuttaa järven ekologiaan ja kemiallisiin ominaisuuksiin. Tällaisen harppauskerroksen alapuolinen osa on kesällä kylmempää kuin yläpuolinen osa. Kerrostuneet vedet voivat olla keskenään hyvinkin erilaisia, lähellä pohjaa oleva vesi saattaa esimerkiksi olla vähähappista, kun taas pinnan tuntumassa olevassa vedessä on runsaasti happea eliöiden käytössä. Niukkaravinteisissa järvissä on tyypillisesti runsaasti happea, kun taas runsasravinteisissa järvissä puolestaan niukasti. Runsasravinteisissa järvissä orgaanisen materiaalin hajoaminen pohjalla voi nimenomaan aiheuttaa happikatoa. Hapen ja ravinteiden määrä liittyy olennaisesti järvien rehevöitymisongelmaan, ja tätä

ongelmaa on pahentanut lannoitteiden käyttö maanviljelyssä sekä jätevesien päätyminen järviin. [9, s. 1160 - 1163.]

Jokien tilanne järviin nähden on melko erilainen, sillä niissä vesi virtaa ja siten myös vaihtuu jatkuvasti. Niissä on usein myös erilainen eliöstö järviin nähden. Suolan ja ravinteiden määrä kasvaa, kun siirrytään latvavesiltä joen suuhun kohti merta. Latvavesissä puolestaan on tyypillisesti paljon happea. Jokien pohjassa sedimentit usein kerrostuvat lietteeksi. Myös joissa saattaa olla kerrostuneisuutta veden virratessa eri tavalla ja eri nopeudella eri syvyyksissä. [9, s. 1160 - 1163.]

2.1.3 Fosforin kierto

Vaikka järvien ravinnetalouteen kuuluu fosfori olennaisena osana, on kuitenkin täysin mahdotonta tehdä täydellistä selvitystä siitä, miten fosfori tarkalleen ottaen järvessä liikkuu eri alueiden välillä ja miten se kulloinkin on eri eliöryhmien käytettävissä. Tarkasteltaessa järviökosysteemiä voidaan huomata, että ekosysteemin toimintaan vaikuttavat mitä moninaisimmat asiat, ja että nämä asiat vaikuttavat myös fosforin kiertoon järvessä.

Veden kierto luonnossa liittyy olennaisesti fosforin kiertoon, sillä veden mukana fosforiyhdisteitä kulkeutuu tehokkaasti kauaskin siltä alueelta, josta ne alun perin olivat ”kotoisin”. Vettä haihtuu ilmakehään maalta ja vesistöistä auringon energian vaikutuksesta, kondensoituu pilviksi ilmakehässä ja palaa takaisin lopulta sateena. Vesihöyry voi liikkua ilmakehässä alueelta toiselle ja siirtää mukanaan myös siihen sitoutuneita yhdisteitä kauaskin lähtöpaikastaan. Vettä valuu jatkuvasti maalta vesistöihin, ja myös pohjavettä voi valua maanalaisia uomia pitkin vesistöön. Kasvit hengityshaihduttavat merkittäviä määriä vettä ilmakehään, ja pinta- ja pohjavesien virtaus palauttaa vettä lopulta takaisin valtameriin. Vesi on elintärkeää kaikille eliöille ja sen esiintyminen vaikuttaa ekosysteemin prosessien nopeuteen ja etenkin perustuotantoon oleellisesti. Valtameret sisältävät 97 % biosfäärin vesivaroista. Noin 2 % on sidottuna jäätiköihin ja jäljelle jäävä 1 % on järvissä, joissa ja pohjavedessä, merkityksettömän määrän ollessa ilmakehässä. [9, s. 1232; 6, s. 23.]

Epäorgaanista fosforia päätyy maankohoaman seurauksena sedimenteistä maaperään ja kiviin, ja kivien rapautuessa takaisin maaperään. Eniten fosforia onkin varastoituneena sedimentteihin, jotka ovat peräisin merellisistä kerrostumista.

Maaperästä valumavesien myötä fosforia päätyy vesistöihin ja siten vedessä elävien tuottajien käyttöön, joskin maaperästä voi irrota fosforia vesistöihin myös liukenemalla. Vesistöihin päätyy fosforia myös eliöiden jätteiden ja hajoavien kuolleiden eliöiden mukana. Yhteyttävien tuottajien mukana fosforia päätyy niitä syöviin kuluttajiin ja näiden kuonanerityksen ja hajoamisen myötä sitä palautuu takaisin vesistöön. Vesistöissä fosforia päätyy saostumisen ja hajoavien eliöiden mukana sedimentteihin ja siten kierron alkulähteille. Hyvin pieni osa fosfaatista leviää ilmakehän avulla, sillä juuri mikään kaasu ei sisällä sitä. [9, s. 1232 - 1223; 5, s. 93.]

2.1.4 Fosfaattipitoisuudet tutkituissa vesistöissä

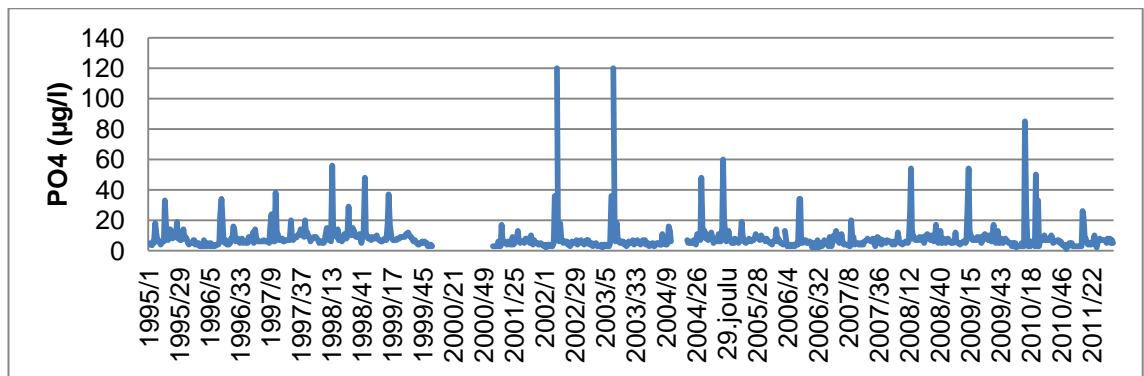
Lammin biologisella asemalla läheisten vesistöjen seuranta on tärkeä osa toimintaa. Biologiselle asemalle haetaan säännöllisesti näytteitä eri järvistä ja puroista, ja näistä näytteistä analysoidaan esimerkiksi liuennutta hiiltä, ravinteita, väriä ja alkaliniteettia. Tutkimuskohteita ovat Valkea-Kotinen Evon alueella, Vanajavesi, Pääjärvi sekä niin kutsuttu purokierros, jossa kerätään näytteitä viidestä Pääjärveen laskevasta joesta ja purosta. Näytteitä kerätään kohteesta riippuen esimerkiksi ämpärillä tai Limnos-noutimella. Vesinäytteiden lisäksi kerätään myös kasvi- ja eläinplanktonnäytteitä. Osa seurantamittauksista kuuluu laajempiin tutkimushankkeisiin.

Biologisella asemalla aloitettiin jatkuvat viikoittaiset seurantamittaukset Pääjärven puroista vuonna 1991. Seurannan tarkoituksena on saada tietoa ulkoisesta ravinnekuormituksesta, ja sen ajallisesta vaihtelusta Pääjärven eri valuma-alueilla. Maastossa on tutkittu esimerkiksi veden korkeutta, lämpötilaa ja virtausta, laboratorioissa näytteistä on puolestaan mitattu pH:ta, ravinteita, kationien määrää ja johtokykyä, sekä mitattu vedestä spektri. Tuloksia on käytetty laskettaessa vuosittaista valuma-alueen kuormitusvaikutusta. Vuosien varrella tutkittavat ojat ja niiden määrät ovat vaihdelleet, mutta tällä hetkellä määrä on vakiintunut viiteen Pääjärveen laskevaan jokeen ja puroon ja Pääjärvestä poisvirtaavaan jokeen.

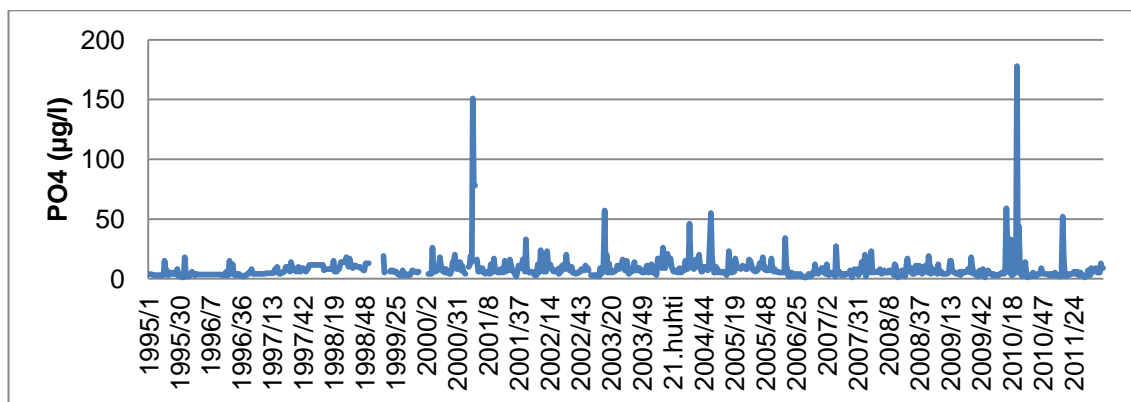
Aseman tekemistä seurantamittauksista löytyi runsaasti dataa vuosien varrelta. Osana opinnäytetyötä haluttiin tarkastella, näkyisikö fosfaatin mittaustuloksista jotain selkeitä muutoksia, jotka voisivat viitata menetelmän vaihtumiseen. Kuvaajia tarkastellessa voidaan kuitenkin todeta, että mitään selkeää ja systemaattista muutosta ei ole havaittavissa. Toisaalta olisi hyvin vaikeaa sanoa, johtuisiko mahdollinen muutos

nimenomaan menetelmän muutoksesta, sillä fosfaatin tuloksiin vaikuttaa merkittävästi esimerkiksi lähiseudulla käytettyjen lannoitteiden määrä ja laatu.

Kuvassa 1 nähdään biologisella asemalla tehtyjen fosfaattimittausten tuloksia Koiransuolenojasta vuosilta 1995 - 2011. Keskimääräinen fosfaattipitoisuus mittaussakson aikana oli 8 µg/l vaihteluvälin ollessa 1 - 120. Kuvassa 2 voidaan nähdä Haarajoesta tehdyt fosforimittaukset. Haarajoen aineiston keskimääräinen fosfaattipitoisuus oli 8 µg/l vaihteluvälin ollessa 1 - 178. Molemmista kuvista 1 ja 2 nähdään, että tulosten perustaso on melko matalalla piikkejä lukuun ottamatta. Kuvaajissa näkyvät korkeat piikit liittyvät mitä todennäköisimmin voimakkaampiin sateisiin. Muilta osin kuvaajien pohjaviiva tasapainoilee mittausten menetelmien määritysrajan molemmiin puolin.



Kuva 1. Fosfaattipitoisuus Koiransuolenojassa vuosina 1995 - 2011. Vuosiluvun jälkeen olevat luvut ovat viikkoja.



Kuva 2. Fosfaattipitoisuus Haarajoessa vuosina 1995 - 2011.

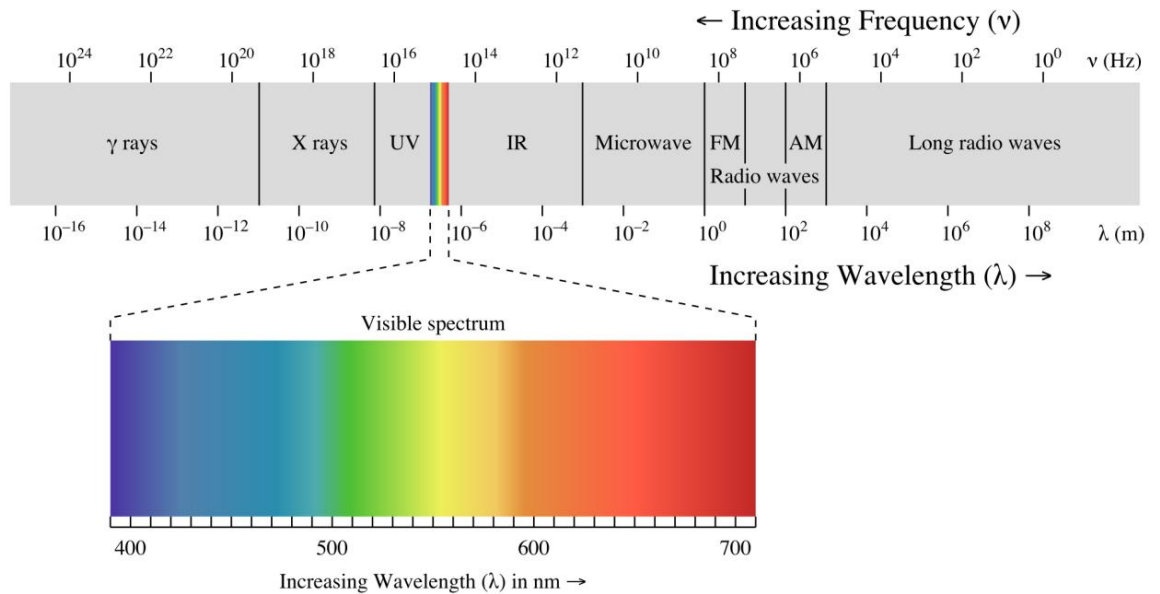
2.2 UV/Vis-spektrofotometri

Biologisella asemalla käytetään fosfaatin määrittämisessä standardoitua ohjetta SFS-EN ISO 6878, joka on varsinaisesti tarkoitettu spektrofotometrillä tehtävälle manuaaliselle menetelmälle. Spektrofotometri on laite, joka mittaa näytteen läpi kulkeeneen valonsäteen intensiteetin muutosta. UV/Vis-spektrofotometri on erikoistunut näkyvän ja UV-valon aallonpituuksien mittaukseen. UV-säteilyn aallonpituus on välillä 100 - 380 nm, näkyvän valon puolestaan 380 - 780 nm. [11, s. 380.]

2.2.1 Valo sähkömagneettisena säteilynä

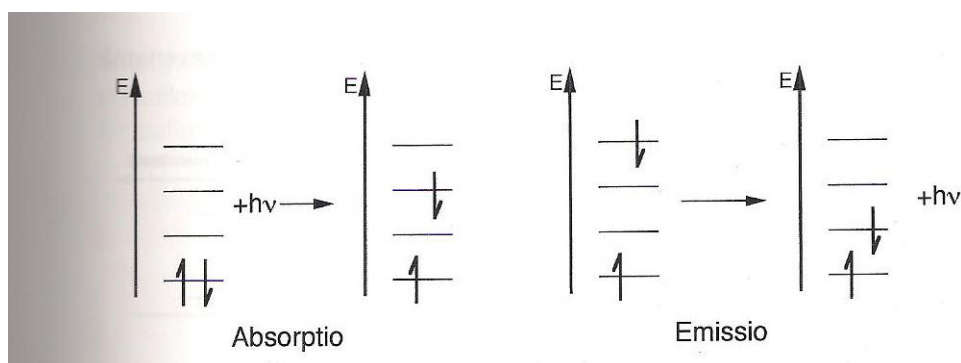
Valo on sähkömagneettista säteilyä, jolla on sekä aaltoluonne että hiukkasluonne. Säteily ei tarvitse väliainetta siirtyäkseen. Valon aaltoluonnetta kuvaavat sen eri laatujen aallonpituuksien erot, kun taas sen hiukkasluonnetta voidaan tarkastella ajattelemalla valon energiaa "valohiukkasten" eli fotonien kautta. Valoa mittaavat parametrit ovat aallonpituus, joka tarkoittaa aaltojen huippujen välimatkaa, sekä taajuus, joka tarkoittaa kokonaisten aaltojen määrää sekuntia kohti. Aallonpituuden yksikkö on nanometri (nm), taajuuden yksikkö puolestaan on hertsi (Hz).

Näkyvän valon spektri on osa sähkömagneettisen säteilyn kokonaisspektriä. Näkyvän valon lisäksi siihen kuuluu gamma-, röntgen-, UV- ja IR-säteily, sekä mikroaallot ja radioaallot. Kuvassa 3 nähdään sähkömagneettisen säteilyn spektri kokonaisuudessaan. Näkyvän valon osuus on hyvin pieni osa koko spektristä. Kuvasta nähdään, että vasemmalle siirryttäessä säteilyn taajuus kasvaa ja oikealle siirryttäessä puolestaan säteilyn aallonpituus. Gammasäteillä aallonpituus on siis pienintä taajuuden ollessa suurinta. Radioaalloilla puolestaan taajuus on pientä, mutta aallonpituudet suuria. [11, s. 379 - 380; 13, s. 6 - 10.]



Kuva 3. Valon kokonaisspektri [12].

Valon absorbanssiksi (A) kutsutaan tilannetta, jossa valofotoni esimerkiksi "imeytyy" johonkin molekyyliin. Tällöin fotoni itse häviää. Molekyylin absorboidessa fotonin sen energia kasvaa ja se siirtyy virittyneeseen tilaan, samalla valonsäteen intensiteetti eli valovoima vähenee. Virittynyt tila ei ole pysyvä, eikä molekyyli viihdy virittyneessä tilassa kovin pitkään. Emissiosta puhutaan silloin, kun molekyyli palaa takaisin perustilalleen virittyneestä tilastaan ja luovuttaa ylimääräisen energian fotonina viritystilän purkautuessa. Tätä ilmiötä on havainnollistettu kuvassa 4.



Kuva 4. Absorptio ja emissio. Absorptiossa elektroni siirtyy korkeammalle energiatasolle eli virittyy, emissiossa viritystila purkautuu. $h\nu$ kuvastaa valokvanttia. [14, s. 49.]

Perustilallaan molekyylin energia on pienin mahdollinen. Mikä tahansa foton ei kuitenkaan saa molekyyliä virittyneeseen tilaan, vaan fotonin energian on oltava yhtä suuri kuin eri energiatilojen välinen ero. Fotonin energia on suoraan verrannollinen säteilyn taajuuteen. Absorption aiheuttamassa viritystilassa molekyylin elektroni siirtyy ylemmälle energiatasolle eli orbitaalille, kuten kuvasta 4 nähdään. Palatessaan takaisin perustilaan voi molekyyli luovuttaa ylimääräisen energian takaisin ympäristöönsä esimerkiksi lämpönä tai emittoituna fotonina. Poistunut energia vastaa viritystilan ja perustilan välistä energiaeroa. [11, s. 380; 14, s. 48 - 49.]

Transmittanssi (T) on suure, joka kertoo kuinka suuri osa alkuperäisestä valosta on kulkenut näytteen läpi. Absorbanssi ja transmittanssi liittyvät olennaisesti toisiinsa, sillä niiden välillä on kaavan 1 mukainen logaritminen yhteys. Kun yhtään valoa ei absorboitu näytteeseen on absorbanssi 0 ja transmittanssi 100 %. [14, s. 52.]

$$A = - \log T \quad (1)$$

Jos aine absorboi näkyvää valoa jollakin aallonpituudella, määräytyy aineen väri tämän aallonpituuden mukaan. Silmällä voidaan havaita absorboitunutta aallonpituutta vastaava vastaväri, esimerkiksi sinisenä näkyvä aine absorboi keltaisen aallonpituuden valoa. Tätä ilmiötä voidaan hyödyntää niin sanotuissa kolorimetrisissä mittauksissa, joissa värilliseen yhdisteeseen pidättyneen valon intensiteettiä voidaan verrata tutkittavan aineen konsentraatioon. [11, s. 382; 13, s. 6 - 10.]

2.2.2 Laitteen rakenne ja toimintaperiaate

UV/Vis-spektrofotometriset mittaukset perustuvat Lambert-Beerin lakiin, jonka perusteella voidaan valon intensiteetin muutoksesta laskea näyteaineen konsentraatio. Laitteella mitataan aineen absorbanssia, joka on suoraan verrannollinen tutkittavan näyteaineen pitoisuuteen, kun tietyt muuttujat tunnetaan.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot b \quad (2)$$

Kaavassa 2 A merkitsee absorbanssia, ε molaarista absorptiokerrointa, c konsentraatiota ja b valotien pituutta. [14, s. 52.]



Kuva 5. Lammin biologisella asemalla käytetty spektrofotometri Shimadzu UV-1800.

Spektrofotometri yksinkertaisimmillaan koostuu säteilylähteestä, monokromaattorista, näytetilasta ja detektorista. Laitetyypit voidaan jakaa yksi- ja kaksisädelaitteisiin. Yksisädelaitteessa mitataan ensin näytteen tausta laitteen muistiin ja sitten vasta varsinainen näyte. Kaksisädelaitteessa puolestaan moottoroidulla säteenjakajalla hajotetaan valonsäde, ja johdetaan se vuorotellen näytetaustan ja näytteen läpi. Tällöin erillistä taustan mittaamista ei tarvita automaattisen korjauksen ansiosta. Kaksisädelaitteellakin on kuitenkin mitattava pohjataso, usein se tehdään mittaamalla molemmissa kyveteissä käytettyä liuotinta. Valonlähteenä spektrofotometrissä käytetään tyypillisesti UV-alueella deuteriumlamppua ja näkyvän valon alueella volframi- tai volframi-halogeenilamppua. Kuvassa 5 on nähtävissä pöytämallinen spektrofotometri, jossa on käytössä läpivirtauskyvetti. [14, s. 55; 11, s. 425.]

Yksi spektrofotometrin oleellisimpia osia on monokromaattori. Monokromaattorin tehtävänä on erottaa kaikista valonsäteiden sisältämistä aallonpituuksista juuri haluttu aallonpituus. Yleensä valitaan kuhunkin mittaukseen sopiva melko kapea aallonpituusalue. Monokromaattorin toiminta perustuu hilaan, jossa on tuhansia pieniä

uria. Hila voi olla heijastava tai valoa läpäisevä komponentti. Kun valo heijastuu hilalta tai säteilee sen läpi, jokainen uurre käyttäytyy kuten itsenäinen valonlähde ja heijastaa eri aallonpituuksia eteenpäin, ja siten valon eri aallonpituudet saadaan erottumaan toisistaan. Vanhoissa laitteissa hilan tilalla käytettiin prismaa. Hilan lisäksi monokromaattoriin kuuluvat valoa ohjaavat peilit, sekä niiden moottorit. Valonlähteestä saapuva valonsäde kulkeutuu monokromaattoriin sisäänmenoraosta. Peilit ohjaavat säteen hilalle, joka hajottaa valon osiin. Kääntömekanismi liikuttaa hilaa ja peilejä ohjaten juuri halutun aallonpituusalueen ulosmenoraolle ja sen kautta näytetilaan. [14, s. 57; 11, s. 429.]

Hilan kykyä erotella eri aallonpituuksia toisistaan kutsutaan resoluutioksi. Paremmalla resoluutiolla voidaan erottaa lähekkäin olevat piikit toisistaan, jolloin saadaan tarkempia tuloksia. Resoluutioon vaikuttaa myös monokromaattorin ulosmenoraon koko. Kapeammalla raolla saadaan parempi resoluutio, kun tietty aallonpituuskaista saadaan monokromaattorista ulos tarkemmin. Samalla signaalin kohinataso kuitenkin usein kasvaa. Jos kohinataso kasvaa liian suureksi, se heikentää pienten signaalien havaitsemista niiden hukkuessa kohinaan. Liian kapea rako ei myöskään ole hyvä, sillä tällöin säteilyn kokonaisintensiteetti voi pienentyä liikaa, jolloin mittauksesta tulee vaikeaa. Liian leveä rako puolestaan vaikuttaa piikkien muotoon, jolloin voi esimerkiksi olla vaikeaa erottaa kahta piikkiä toisistaan. Onkin yritettävä optimoida ulosmenoraon koko niin, että resoluutio olisi riittävän hyvä ilman liian kovaa kohinaa. [11, s. 430 - 431; 14, s. 57.]

Monokromaattorista valonsäde kulkee näytetilaan. Näyte saatetaan valonsäteen tielle kyvetissä, jossa on kaksi täysin yhdensuuntaista optista pintaa joiden läpi valo voi kulkea esteettä. Kyvetin koolla on vaikutusta tuloksien laskemiseen, sillä Lambert-Beerin mukaan absorbanssi on verrannollinen valon kulkemaan matkaan. Yleisin kyvetin paksuus on 10 mm, mutta näytteestä riippuen voidaan käyttää esimerkiksi 1 mm:n tai 20 mm:n kyvettejä. Kyvettejä on myös erimuotoisia, suorakaiteen muotoisista sylinterimäisiin ja pyöreisiin kyvetteihin. Voidaan käyttää myös läpivirtauskyvettejä, jolloin kyvetiin imetään näyte pumpun avulla eikä sitä tarvitse mittausten välissä vaihtaa. Tämä nopeuttaa mittauksia huomattavasti, joskin kontaminaatiovaara on olemassa ja kyvetiä onkin muistettava huuhdella ahkerasti mittausten välillä. Tutkittavia aineita saattaa adsorboitua kyvetin tai letkujen seinämiin, ja tämä mahdollisuus on otettava mittauksia suunniteltaessa huomioon. Toisaalta mittaukset ovat tasavertaisempia keskenään, kun tuloksiin eivät vaikuta kyvettien väliset erot.

Kyvettien materiaali vaihtelee käyttötarkoituksesta riippuen. Näkyvän valon alueella voidaan käyttää lasikyvettejä tai kertakäyttöisiä muovikyvettejä. UV-alueella on käytettävä kvartsikyvettejä. Kyvetissä voi olla käytössä tulppa, jolloin ei tarvitse huolehtia esimerkiksi liuottimien haihtumisesta. Kyveti voi olla myös termостоitu. [14, s. 58 - 59; 11, s. 384.]

Näytteestä valonsäde kulkee detektorille, jonka tehtävänä on muuttaa valosignaali sähköiseksi signaaliksi, jota voidaan käsitellä tietokoneen ohjelmalla. Detektoreja on erilaisia. Käytetyimpiä spektrofotometrin detektoreja ovat valomonistinputket. Niissä valofotoni irrottaa monistinputken valoherkän fotokatodin metallipinnasta elektronin. Irronnut elektroni kiihdytetään sähkökentän yli toiselle elektrodille eli dynodille, jolla on korkeampi potentiaali kuin fotokatodilla. Tällä lisäenergialla elektroni irrottaa dynodilta joukon uusia elektroneja, jotka kiihdytetään taas seuraavalle dynodille. Lopulta elektronien kineettinen energia on paljon korkeampi kuin mitä se alun perin oli. Tätä jatketaan, jolloin yksi elektroni monistuu lukuisiksi elektroneiksi ja sähkösignaali voidaan saada aikaiseksi. Yksi elektroni voi monistua jopa 10^6 elektroniksi ja tällöin erittäin pieni valomäärä saadaan muunnettua helposti mitattavaksi elektroniseksi signaaliksi. Valomonistinputken käyttö rajoittuu alle 900 nm:n alueelle, sillä fotonin energian on oltava riittävän korkea, jotta detektori toimisi. [14, s. 58; 11, s. 433.]

Toinen detektorityyppi on diodirividetektori. Siinä hilalta tuleva säteily johdetaan puolijohteesta valmistetulle diodiriville. Diodit on aseteltu niin, että kukin yksittäinen diodi mittaa itsenäisesti siihen saapuvaa valoa, ja että kukin hilalta saapuva aallonpituus osuu eri diodille. Sen toiminta perustuu diodien varauksen muutokseen fotonien osuessa niihin. Mitä enemmän fotoneja diodiin osuu, sitä pienemmäksi sen sisäinen varaus muuttuu. Jos diodirividetektoria käytetään, on näyte sijoitettu ennen hilaa toisin kuin muissa menetelmissä. Tällöin kaikki aallonpituudet mitataan samanaikaisesti. Valkoista valoa johdetaan näytteen läpi ja sen jälkeen niin sanotulle polykromaattorille, joka hajottaa valonsäteen eri aallonpituuksiksi ja johtaa sen diodirividetektorille. Jokainen diodi mittaa omaa aallonpituuttaan ja kaikki aallonpituudet mitataan samanaikaisesti. Detektorin resoluutio riippuu siitä, kuinka lähellä toisiaan diodit ovat ja kuinka tehokkaasti polykromaattori hajottaa valon osiin. Diodirividetektoria käyttävien laitteiden etuna on se, ettei niissä ole liikkuvia ja kuluvia osia. [14, s. 58; 11, s. 434 - 435.]

Kolmantena detektorityyppinä voidaan mainita niin sanottu CCD-kenno. Nimi on lyhenne sanoista charge coupled device. Se on erittäin herkkä valodetektor, ja sitä käytetään myös esimerkiksi digikameroissa. Detektorissa hyödynnetään samantapaista tekniikkaa kuin diodirividetektorissakin, mutta diodeista saatava tieto varastoidaan tilapäisesti kennoon. Kenno on kaksiulotteinen taso, joka koostuu pikselimäisestä ruudukosta. Kukin diodi on yhteydessä kennon pikseliin. Valonsäde kulkeutuu diodille, joka reagoi valoon päästämällä läpi enemmän sähkövirtaa ja aiheuttaen varauksen sitä vastaavaan kennon pikseliin. Kennossa läpitulut valo siis vastaa pikselissä olevan sähkövarauksen suuruutta. Erittäin valoisa pikseli on korkeasti varautunut, pimeä pikseli lähes varaukseton. Kennon yläosassa on varauksen rekisteröintiosa, joka lukee kunkin pikselin vuorollaan ja samalla nolaa kennon. Varausta voidaan ikään kuin siirtää kennon pinnalla viereisiin pikseleihin, jolloin varaus purkautuu pikseli kerrallaan ulos kennosta muihin elektrodeihin, ja sitä kautta tietokoneelle. CCD-kenno on erittäin tehokas, sillä se tuottaa monta elektronia yhtä fotonia kohti. Sen kohinataso on hyvin matala. [11, s. 436.]

2.2.3 Spektrofotometriset mittaukset

Spektrofotometriä voi käyttää aineen tunnistamiseen tai sen pitoisuuden määrittämiseen. Sillä voidaan tehdä myös kineettisiä mittauksia. Ongelmana aineen tunnistamismittauksissa on se, että monilla aineilla on hyvin samantyyppiset spektrit. Menetelmää voi kuitenkin käyttää tutkimaan onko liuoksessa jotain tiettyä ainetta, tai miten puhdasta yhdiste on. [14, s. 61.]

Absorptiospektristä nähdään, millä aallonpituuksilla näyte on absorboinut valoa. Sen avulla voidaan esimerkiksi päätellä kullekin näytteelle sopiva mittausaallonpituus. Jos absorbanssi on kovin pieni, on pienen muutoksen tarkka määrittäminen vaikeaa. Hyvin suuren absorbanssin määrittäminen on myös hankalaa, sillä näytteen läpi menee niin vähän säteilyä, että sen mittaus on epätarkkaa. Juuri tästä syystä spektrofotometrit ovat yleensä herkimpiä keskimääräisillä absorbanssialueilla 0,4 - 0,9 A. Kvantitatiivisissa mittauksissa käytetty aallonpituus valitaan sen mukaan, missä tutkittavalla yhdisteellä on absorptiomaksimi, sillä tällöin analyysiherkkyys on korkein. Kineettisiä mittauksia puolestaan voidaan tehdä, jos lähtöaineen spektri poikkeaa selvästi tuotteen spektristä. Kineettisiä mittauksia käytetään esimerkiksi entsyymaattisissa tutkimuksissa. [11, s. 382 - 384; 14, s. 62.]

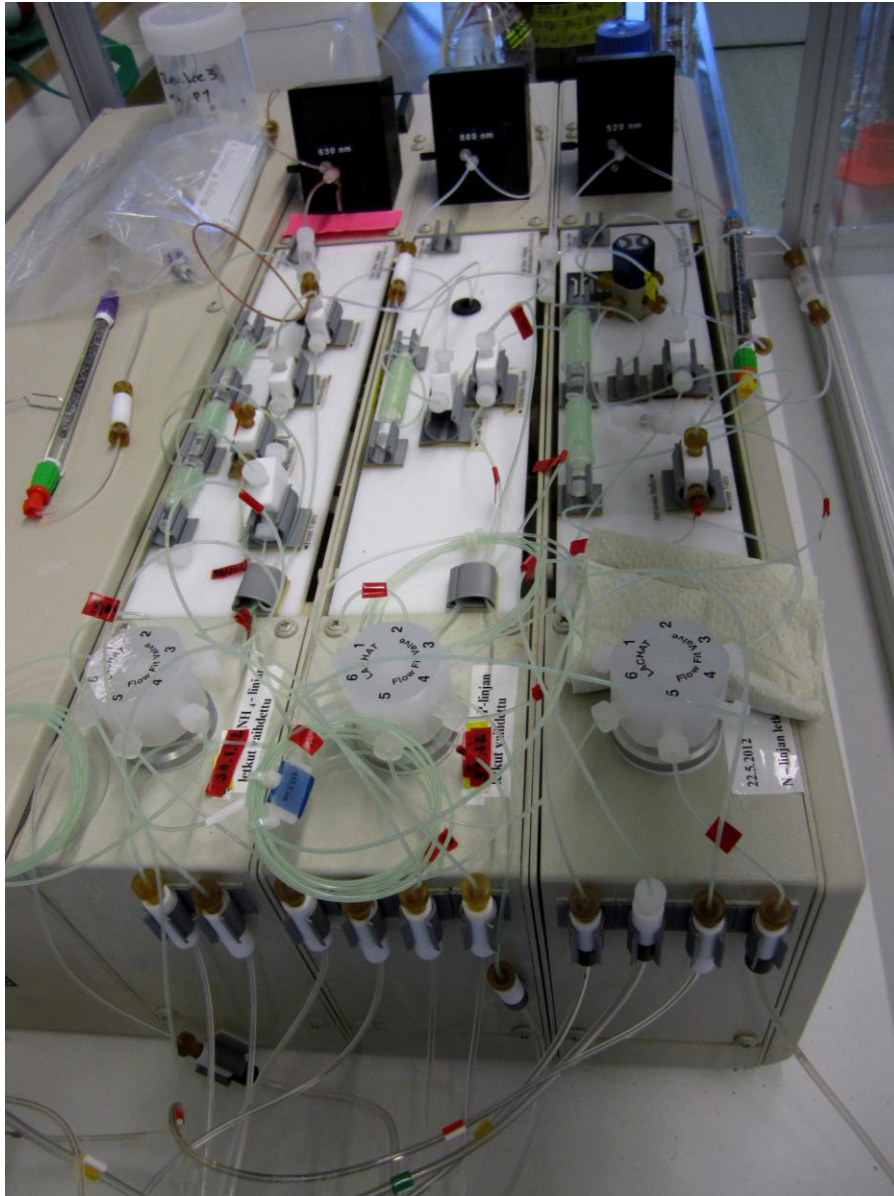
Jos tutkittava aine ei itsessään absorboi, siitä voidaan tehdä absorboiva johdos mittauksia varten. Tällöin johdoksen muodostusreaktion kertoimista voidaan laskea varsinaisen näytteen konsentraatio mittaustulosten perusteella. Reaktiota suunniteltaessa on huolehdittava siitä, etteivät näytetaustan muut aineet reagoi ja vääristä tulosta. Mittausta suunniteltaessa on myös varmistuttava siitä, että ainoastaan tutkittava yhdiste absorboi mittausaallonpituudella, ja ettei näytteessä tapahdu mittauksen aikana kemiallisia reaktioita, jotka voisivat vaikuttaa tulokseen. Myös käytetyn liuottimen valinta on tärkeää ja liuotin on valittava siten, ettei se absorboi tutkittavalla aallonpituudella. Lisäksi on otettava huomioon näytteen konsentraatio, ja tarvittaessa laimennettava se laitteen määritysrajoihin sopivaksi. Ennen varsinaista mittausta tulee mitata kyvetin ja liuottimen aiheuttama perustaso, joka vähennetään varsinaisesta mittaustuloksesta. [14, s. 59 - 62; 11, s. 383 - 384.]

Spektrometrisiä mittauksia voivat häiritä monenlaiset asiat. Jotta Lambert-Beerin laki täysin toteutuisi, tulee mittaolosuhteiden olla vapaita hajavalosta, emissiosta, sironnasta ja heijastuksista. Hajavalolla tarkoitetaan sitä detektorille päätyvää valoa, joka ei ole monokromaattorilta peräisin olevaa haluttua valoa. Hajavaloa saattaa tulla laitteen liitoksista, tai se voi olla monokromaattorilta tulevaa ei-toivottua valoa. Monokromaattorilta saattaa heijastua tutkittavan aallonpituuden kerrannaisia samaan suuntaan halutun aallonpituuden kanssa. Detektorille päätyessään nämä kerrannaiset saattaisivat vääristää tuloksia, ja siksi ei-toivottuja aallonpituuksia usein poistetaan erilaisilla suodattimilla. Suodatin voi yksinkertaisimmillaan olla värillistä lasia. [13, s. 6 - 12; 11, s. 432 - 433.]

2.3 FIA-laitteisto

Biologisella asemalla fosfaattia, nitraattia ja ammoniumtyyppiä määritetään vesinäytteistä pääsääntöisesti FIA-laitteella. FIA on lyhenne sanoista flow injection analyzer, joka vapaasti suomennettuna tarkoittaa virtausinjektioanalysaattoria. FIA on analyysilaitte, jossa tietokoneohjelma ohjaa monitieventtiilejä ja pumppuja niin, että jokainen näyteliuos siirtyy vuorollaan näyteluoppiin. Laitteisto koostuu teflonputkista, joiden halkaisija on tyypillisesti 0,5 mm luokkaa. Käämien pituus on 10 - 200 cm, ja niiden pituutta säätämällä saadaan tarpeeksi pitkä reaktioaika kullekin reaktiolle. Kuvassa 6 on nähtävissä esimerkki FIA-laitteesta, jossa on kolme mittauslinjaa. FIA on erittäin monipuolinen ja helposti muunneltavissa oleva menetelmä, se sopii etenkin

värillisten liuosten analysointiin ja sillä voidaan tehdä nopeita ja toistettavia mittauksia. Lisättävät reagenssit kulkevat mukana näytevirrassa ja reaktion jälkeen näytteet kulkevat detektorille. Menetelmä on kehitetty jo vuonna 1975, ja sitä käytetään paljon lääketieteellisessä tutkimuksessa, vesitutkimuksessa ja teollisuuden prosessien kontrollissa. [14, s. 62; 15; 11, s. 410 - 411.]



Kuva 6. Biologisella asemalla käytetty FIA-laite Ordior Lachat QC 8000 ja sen kolme menetelmäkasettia. Etualalla näkyvät monitieventtiilit ja taka-alalla mustat detektorit.

2.3.1 Toimintaperiaate

FIAssa näyte lisätään jatkuvasti virtaavaan ajoliuokseen, joka on valittu kullekin analyysille sopivaksi. Oikeanlaisten pumppujen vaikutuksesta näyte leviää ajoliuokseen tasaiseksi vyöhykkeeksi, ja siihen voidaan lisätä muita reagenssivirtoja. Lopulta näyte analysoidaan läpivirtausdetektorilla. Pulssiton pumppu ja tarkka injektio varmistavat sen, että näytteen sekoittuminen ajoliuokseen on tarkkaa eikä näytevyöhykkeitä tarvitse erottaa toisistaan esimerkiksi ilmapatsailla näytteiden sekoittumisen pelossa. Vakiotilavuusventtiilit ohjaavat näytteet ja reagenssit oikeisiin jakeluputkistoihin tietokoneen ohjaamina. Mittauksen alussa laite kalibroidaan normaalisti, jonka jälkeen näytteet voidaan ajaa. [15, s. 16.]

FIAlla työskennellessä mahdollisuudet ovat lähes rajattomat. Käyttötarkoituksesta riippuen siihen voidaan liittää erilaisia detektoreja, ja jakeluputkistojen järjestystä muuttamalla siihen voidaan liittää kolonneja, ioninvaihtajia, dialyysiputkia, erilaisia fotokemiallisia reaktoreita, sekoituskammioita, kromatografisia sovelluksia tai lämpöhauteita. Systeemin avulla näytteitä voidaan konsentroida tai laimentaa tarpeen mukaan, tai vaikkapa valmistaa helposti hajoavia reagensseja. Mittauksissa voidaan hyödyntää gradienttiajoa, erilaisia sekoitustekniikoita tai jopa titrausta. [15, s. 16, 140, 342.]

Yleisin detektorityyppi on spektrofotometri, mutta FIA voidaan myös kytkeä esimerkiksi atomiabsorptiospektrofotometriin tai plasmaemissiospektrometriin. Muita kokeiltuja detektoreja ovat IR-spektrometri, reflektometri, polarografi ja potentiometri. Detektorin voi siis perustua esimerkiksi absorbanssiin, luminesenssiin, kemiluminesenssiin tai elektrokemiaan. Jakeluputkistoja voidaan liittää useita rinnakkain, jolloin samalla laitteella voidaan samanaikaisesti analysoida esimerkiksi eri parametreja tai rinnakkaisia näytteitä helposti. [17; 11, s. 410 - 411; 15, s. 336 - 342.]

2.3.2 Pumput

FIAssa käytetyt pumput ovat yleensä peristalttipumppuja, joissa on monta tasaisesti pyörivää pyörää, kuten kuvassa 7. Peristalttipumppu kuuluu syrjäytuspumppuihin. Siinä pumpun rullat puristavat joustavassa letkussa olevaa nestettä ja siten siirtävät nestettä eteenpäin letkussa. Pumpussa ei tarvita venttiilejä, sillä pumpun mekanismi itsessään jo estää takaisinvirtausta letkussa pyörivien rullien muodostaessa pakkosyöttöjärjestelmäksi kutsutun tilan, jossa letkun sisään muodostuu vakuumi. Tämä mahdollistaa sen, etteivät näytevyöhykkeet sekoitu toisiinsa. Pumpun mekanismi ei kosketa lainkaan tutkittavaa liuosta, vaan liuos koskettaa ainoastaan letkun seinämiä. Näin pumppu itsessään ei pääse kontaminoimaan liuosta. Peristalttipumppu soveltuu FIA-järjestelmään hyvin myös siksi, että sen avulla laitteeseen pystytään kytkemään useampia kanavia, joita sama pumppu kykenee pyörittämään. Pumpun huonoihin puoliin voidaan lukea se, että virtaus ei ole koskaan ihan täysin pulssiton. Joustavat letkut kuitenkin jossain määrin kompensoivat satunnaisia paineen vaihteluita. Monet peristalttiset pumput voivat myös aiheuttaa lievää staattista sähköä, joka saattaa häiritä määrittystä käytettäessä ioniselektiivisiä elektrodeja. [15, s. 279 - 280; 16; 18; 19]



Kuva 7. Biologisella asemalla käytetyn FIA-laitteiston pumppu. Kuvassa näkyvät peristalttisen pumpun pyörivät rullat.

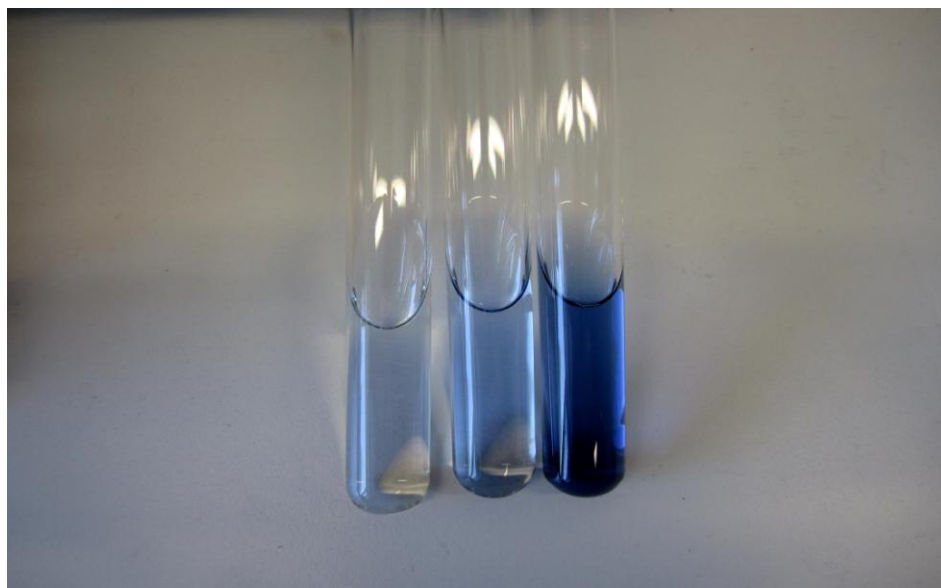
3 Materiaalit ja menetelmät

Tässä osiossa esitellään opinnäytetyössä käytettyjä fosfaatin määrittämenetelmiä, sekä eri menetelmissä käytettyjä reagensseja, laitteita ja välineitä.

3.1 Käytetty menetelmä

Lammin biologisen aseman menetelmä fosforin määrittämistä varten perustuu standardiin SFS-EN ISO 6878. Menetelmä on alun perin tehty manuaalista spektrofotometrillä määrittämistä varten, joten sitä on hieman muokattu FIAn käyttöohjeiden perusteella sopivammaksi. Periaate on kuitenkin sama.

Menetelmä perustuu siihen, että ortofosfaatti-ionit reagoivat happamassa liuoksessa molybdaatin ja antimonin kanssa muodostaen fosfomolybdaattikompleksin. Tämä kompleksi pelkistetään askorbiinihapolla, jolloin muodostuu voimakkaan värinen molybdiinisinikompleksi, joka voidaan mitata aallonpituudella 880 nm ortofosfaatin konsentraation selvittämiseksi (kuva 8). Haluttaessa mitata vesinäytteen kokonaisfosforipitoisuus hydrolysoidaan polyfosfaatit rikkihapolla ortofosfaatiksi, ja käytetään samaa molybdaattireaktiota. Tämä toimii myös joillekin orgaanisille fosforyyhdisteille, mutta parhaiten orgaaniseen ainekseen sitoutunut fosfori saadaan muutettua ortofosfaatiksi persulfaatin avulla. Menetelmää häiritsevät silikaatti, arsenaatti, sulfidit, fluoridit ja jotkin siirtymämetallit kuten rauta ja kupari. [20.]



Kuva 8. Värireaktio.

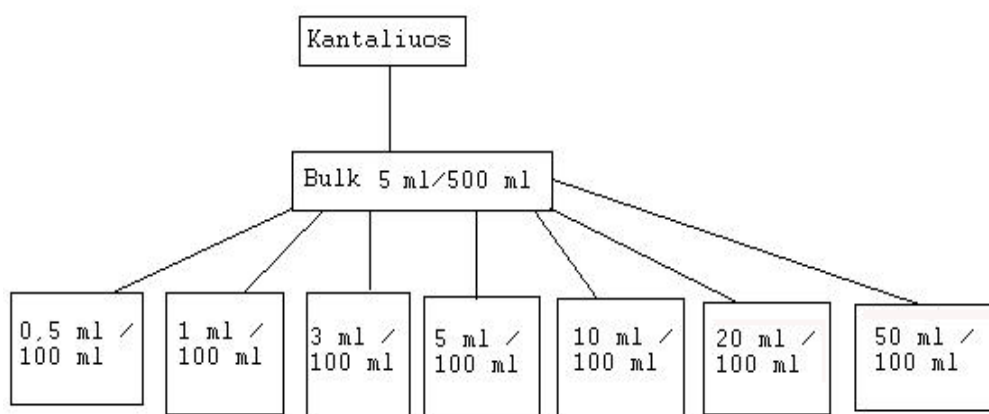
Perinteisesti vesinäytteet on biologisella asemalla ensin suodatettu imusuodatuksella GF/C-kalvosuodattimella, ja sen jälkeen pakastettu. Pakastuksen jälkeen sulatetut näytteet on vielä suodatettu 0,45 µm ruiskusuodattimella ennen analysointia. Tapa sai alkunsa aikana jolloin näytteitä oli niin paljon, ettei niitä ehditty saman päivän aikana analysoimaan ja pakastuksen arveltiin olevan paras säilytystapa. Kiireisimpien aikojenkin jälkeen pakastusta on jatkettu, jotta saadut tulokset olisivat yhdenmukaisia. Menetelmän standardi suosittelee, että näytteet suodatettaisiin neljän tunnin sisällä näytteenotosta ja analysoitaisiin sen jälkeen välittömästi. Pakastusta tai happokestävävointia ei standardissa mainita. Lasiastiat suositellaan happopestäviksi, biologisella asemalla siitä huolehtii astianpesukone, joka huuhtoo tiskit ensin hapolla, sitten pienellä määrällä emästä, ja sen jälkeen käänteisosmoosivedellä useita kertoja. [21.]

Eroavaisuuksia aseman käytäntöjen ja standardin metodin välillä:

- Näytteet suodatetaan viileinä huoneen lämpöön saattamisen sijaan
- Näytteet suodatetaan ensin suuremman huokoskoon kalvosuodattimella ja vasta lopuksi standardin suosittamalla huokoskoolla
- Näytteet pakastetaan
- Suodatinta ei erikseen huuhdella lämmitetyllä vedellä ennen suodatusta
- Suodoksesta ei hylätä ensimmäistä 10 millilitraa
- Standardit ja muut reagenssit valmistetaan FIA-menetelmän käyttöohjeiden mukaan
- Näytteen tilavuus ja standardien tilavuus on myös sovitettu FIA-menetelmää soveltaen
- Näyte ei laitteistossa reagoi kymmentä minuuttia, mutta se kulkee laitteiston lämpöhauteen kautta

3.2 Käytetyt liuokset

Sekä FIAlla että spektrofotometrillä tehtyjä kokeita varten valmistettiin samanlaiset standardiliuokset. Niitä varten punnittiin 0,1365 g kuivattua kaliumdivetyfosfaattia, johon lisättiin 1 ml kloroformia kestävöintiaineeksi ja tämä laimennettiin 1000 ml:ksi MQ-vedellä. Tästä fosfaatin kantaliuoksesta valmistettiin niin sanottu bulk-liuos pipetoimalla 5 ml kantaliuosta ja laimentamalla 500 ml:ksi MQ-vedellä. Bulk-liuoksesta valmistettiin muut standardit menetelmän ohjeiden mukaisesti (kuva 9). Bulk toimi itse kahdeksantena standardina. FIAlla työskennellessä ei erillistä nollaliuosta tarvittu, mutta spektrofotometrillä työskennellessä myös sellainen valmistettiin. Nollana toimi MQ-vesi samanlaisessa mittapullossa kuin muutkin standardit, ja sille tehtiin samat reagenssilisäykset.



Kuva 9. Kalibrintiliuosten laimennuskaavio

Spektrofotometriä varten valmistettiin askorbiinihappoliuos liuottamalla 5 g askorbiinihappoa ja liuottamalla se 50 ml:ksi MQ-vedellä. Molybdaattiliuos valmistettiin liuottamalla 13 g natriummolybdaattia 100 ml:ksi MQ-vettä, tämä puolestaan yhdistettiin liuokseen, jossa 0,35 g kaliumantimonitratraattia oli liuotettu 100 ml:ksi MQ-vettä. Lopuksi liuokseen lisättiin 300 ml 9 M rikkihappoa. Lisäksi valmistettiin sameuden korjausliuos liuottamalla 2:1 suhteessa 4,5 M rikkihappoa ja askorbiinihappoliuosta. Kaikki kolme liuosta säilytettiin jääkaapissa tummassa lasipullossa.

FIA-menetelmää varten valmistettiin askorbiinihappoliuos liuottamalla 15 g askorbiinihappoa ja 0,25 g natriumdodekyylisulfaattia 250 ml:ksi MQ-vedellä. Molybdaattiliuos valmistettiin laimentamalla 11,4 ml väkevää rikkihappoa, 18 ml valmista antimoniliuosta ja 53 ml valmista molybdaattiliuosta 250 ml:ksi MQ-vedellä. Sen valmistukseen käytettiin valmiista kiteistä valmistettuja liuoksia. Sameuden korjausliuosta ei FIAlla työskennellessä käytetty. Lisäysoikeissa käytetty fosfaattiliuos valmistettiin ionikromatografille tarkoitettua fosfaattistandardista laimentamalla liuos noin 80 µg/l vahvuiseksi. Tarkoituksena oli yrittää saada riittävän suuri lisäys näytteeseen ilman kovin suurta vesimäärää.

Liuosten valmistuksessa käytettiin vain analyysipuhtaita reagensseja ja huolellisesti puhdistettuja ja huuhdeltuja astioita. Pipetoinnit tehtiin isommissa tilavuuksissa täyspipeteillä ja pienimmillä tilavuuksilla automaattipipetillä. Liuoksissa käytetyt reagenssit on lueteltu liitteessä 3.

3.3 Biologisen aseman FIA-laite

Lammin biologisella asemalla käytetään Ordior Lachat QC 8000 FIA-laitetta, joka on otettu käyttöön vuonna 1998. Siinä määritykset voidaan tehdä kanavien lukumäärästä riippuen joko rinnakkaismäärityksinä samanaikaisesti tai peräkkäismittauksina. Biologisen aseman laitteessa on kolme kanavaa, joista yhdellä mitataan kokonaisfosforia ja fosfaattifosforia, toisella nitraattia, nitriittiä ja kokonaistyppeä, ja kolmannella ammoniumtyppeä. Kokonaistyyppi ja -fosfori ajetaan eri ajoina kuin muut määritettävät ravinteet, sillä niiden ajoliuokset ja standardit ovat erilaiset. Fosfori- ja ammoniumlinjoissa on käytössä lämpöhauteet, kun taas typpilinjassa on käytössä kadmiumrakeilla täytetty kolonni. Laite on ollut erittäin aktiivisessa käytössä, mutta on silti kestänyt hyvin. Venttiileitä joudutaan toisinaan uusimaan ja letkut vaihdetaan noin kuukauden välein. Aiemmin biologisella asemalla on käytetty FIAn tyyppistä laitetta ravinnemäärityksiin, mutta siinä näytteet kulkivat jatkuvan virtauksen sijaan ilmapatsaiden välissä. [21; 22.]

Laitteen peristalttinen pumppu imee näytettä näyteenvaihtajalta syöttöventtiiliin, ja samanaikaisesti reagensseja pumpataan jatkuvasti systeemin läpi. Näyte lastataan yhden tai useamman syöttöventtiiliin näytesilmukkaan, ja syöttöventtiili kääntyy näytesilmukasta menetelmäkasettiin. Menetelmäkasetiksi kutsutaan laitteen kutakin ajolinjaa, joita voidaan vaihdella ja muuttaa, sekä täydentää erilaisin lisäosin. Kanavien

ja määritettävien parametrien lukumäärästä riippuen menetelmäkasetit voivat olla joko kiinteästi aina samassa kanavassa, tai niitä voidaan vaihdella mittausarjojen välillä. Näyte ja reagenssit yhtyvät menetelmäkasetissa, jossa näyte voi laimentua, konsentroitua, dialysoitua, uuttua, inkuboitua ja muodostaa johdannaisia menetelmästä riippuen. Sekoittuminen reagenssien kanssa tapahtuu pienissä letkuissa virtauksen ollessa tasainen, ja jokaiselle menetelmälle voi säätää toimintaolosuhteet sopiviksi. Varsinaiset reaktiot tapahtuvat menetelmäkasetissa. [22.]

Laitteeseen kuuluu lämmityselementit, joiden lämpötilaa voidaan säätää kanavakohtaisesti. Biologisella asemalla käytetään fosforilinjalle lämpötilaa 37 °C ja ammoniumlinjalle 25 °C. Laitteeseen olisi mahdollista liittää myös ionikromatografiin, mutta tätä menetelmää ei käytetä vaan detektorina laitteessa on spektrofotometri. Laitteen spektrofotometrissä ei ole monokromaattoria, vaan haluttu aallonpituus valitaan yksinkertaisesti sopivan suodattimen avulla. Kullakin ajolinjalla on tarve vain yhden aineen detektiolle. Laitteessa on käytössä automaattinen näytteenäyttävä, joka injektioi oikean määrän näytettä näytetarjottimen koeputkesta laitteistoon ohjausohjelmaan syötetyn järjestyksen mukaan. [22.]

Pumpun letkut ovat kiristimen ja telan välissä mahdollisimman suorana, jotta virtausnopeus olisi tasainen. Pumpausnopeudella on suuri merkitys ajon onnistumisessa, sillä eri nopeudella nestekierron ajoitukset muuttuvat ja seurauksena voi olla esimerkiksi ilmakuplia näytteessä kun näytesilmukka ei täyty oikein. Myös piikkien ajoitus voi muuttua. Näytteen määrä, reagenssien määrä ja virtausnopeus ovat ohjelmoitu siten, että reaktio tapahtuisi oikeassa suhteessa. Letkujen koolla on suuri merkitys virtausnopeuden kannalta, joten sitä ei voida noin vain muuttaa. Lämpöhauteen tarkoituksena on tehostaa värireaktion onnistumista. [22.]

Lammin biologisella asemalla FIA-laitteistoa käytetään jatkuvasti ja paljon. Ravinnemittauksia tehdään viikoittaisten seurantanäytteiden lisäksi tilaustyönä ulkopuolisille, opinnäytteiden ja tutkimushankkeiden yhteydessä sekä asemalla järjestettävien kurssien puitteissa. Tarkkojen ja luotettavien ravinnetulosten saaminen on biologisen tutkimuksen kannalta ensiarvoisen tärkeää.

3.4 Biologisen aseman spektrofotometri

Biologisella asemalla käytetty UV/Vis-spektrofotometri on malliltaan Shimadzu UV-1800. Sitä käytetään runsaasti vesinäytteiden kokonaisspektrien ja värin mittauksessa, sekä klorofyllimäärityksissä. Laitetta ohjaa UV Probe -ohjelmisto. Laitteen mittausalue on 190 - 1100 nm ja detektorina siinä käytetään puolijohteesta valmistettua fotodiodia. Laitteessa on deuteriumlamppu UV-valon tuottamista varten, ja volframi-halogeenilamppu näkyvää valoa varten. [13.]

Biologisella asemalla käytetty laite on kaksisädelaite, jota kuitenkin käytetään yksisädelaitteen tavoin. Laitteessa on käytössä yksi kvartsinen läpivirtauskyvetti, referenssikyvatin valonsäteen edessä on metallilevy. Laitteella on siis mitattava ensin tausta ja sitten vasta varsinaiset näytteet. Näyte imetään kyvetiin peristalttisen pumpun avulla, imuaikaa ja siten imetyn nesteen määrää voidaan säätää ohjelmistosta vapaasti. Kyvetiä tulee huuhdella huolellisesti jokaisen mittauksen välissä, sillä läpivirtauskyvetissä on aina olemassa kontaminaatiovaara. Värillisiä liuoksia mitattaessa on myös huolehdittava siitä, ettei väriaineita adsorboidu kyvetin tai pumpun letkujen pintaan. Läpivirtauskyvetillä työskentely on miellyttävää ja tehokasta, kun kyvetiä ei tarvitse manuaalisesti täyttää ja tyhjentää joka mittauksen välissä. [13.]

Laitteella on mahdollista tehdä hyvin monenlaisia mittauksia. Sillä voidaan mitata näytteen absorbanssi tai spektri halutulla aallonpituudella, tai käyttää absorbanssimittausta kvantitatiivisiin määrityksiin. Laitteella on mahdollista tehdä kineettisiä mittauksia, jolloin voidaan tarkastella esimerkiksi jonkin reaktion etenemistä. Tällöin laite mittaa halutuun väliajain kyvetissä olevan näytteen. Laitetta voidaan käyttää myös biokemiallisiin DNA- ja proteiinimäärityksiin. [23.]

4 Työn suunnittelu ja toteutus

Lähtökohtana opinnäytetyön suunnittelulle ja toteutukselle oli biologisen aseman tarve saada tietää, miksi heidän laboratorionsa on saanut kansallisissa vertailukokeissa liian pieniä fosforianalyysin tuloksia FIAlla. Biologisen aseman laboratorio oli saanut vuosina 2004 ja 2005 hylättyjä tuloksia vertailukokeista. Lisäksi tarkoituksena oli selvittää erilaisten näytteen esikäsittelymenetelmien vaikutusta saatuihin tuloksiin. Samaan aikaan siis tarkasteltiin kahta eri asiaa, joiden kuitenkin arveltiin osittain liittyvän toisiinsa.

4.1 Suunnittelu

Päätettiin jakaa kokeet kolmelle koeviikolle ja suunnitella kutakin viikkoa tarkemmin, kun edellinen koeviikko oli suoritettu. Kokeita suunniteltaessa tuli varsinaisten fosforianalyysien lisäksi ottaa huomioon esimerkiksi näytevesien nouto ja esikäsittely, sekä mitä muita analyysejä näytteille haluttaisiin tehdä. Näytteenottoapaikat yritettiin valita siten, että näytteet saisi kätevästi kerättyä parin tunnin aikana ja tuotua mahdollisimman pian laboratorioon analysoitavaksi.

Näytteistä haluttiin ensisijaisesti tarkastella FIA-menetelmän ja spektrofotometrisen menetelmän välistä eroa. Eri tavoilla säilytetyistä näytteistä tehtiin vertailevia mittauksia saman päivän aikana molemmilla laitteilla, jotta voitaisiin nähdä onko tuloksissa eroa näillä kahdella eri menetelmällä. Työssä tutkittiin eripituisten jääkaappisäilytysjaksojen, pakastuksen ja kestäväönnin vaikutusta fosfaatin mittaustuloksiin. Pakastuskokeiden yhteydessä tutkittiin myös, onko merkitystä sillä, suodatetaanko näyte sekä ennen pakastusta että sen jälkeen. Lisäksi tarkoituksena oli selvittää mahdollista happohydrolyysin vaikutusta tuloksiin tutkimalla kestäväöityjä näytteitä. Kinetiikkakokeilla tarkasteltiin molybdaattireaktiota nimenomaan spektrofotometriä käyttäen. Haluttiin myös tutkia, miten spektrofotometrin tulokseen vaikuttaa, jos laitteella käyttääkin FIAN reagensseja. Tarkoituksena oli myös tehdä lisäskokeita sopiviin näytevesiin, jotta voitaisiin todeta FIAN toimintakunto.

Kokeisiin haluttiin näytteiksi nimenomaan luonnonvesiä, joissa humus ja muut liuenneet aineet saattavat vaikuttaa näytteen käyttäytymiseen ja myös siitä saatuihin tuloksiin. Biologisella asemalla tehdään mittauksia juuri luonnonvesistä ja myös kansallisissa vertailukokeissa oli ollut näytteenä luonnonvesiä. Luonnonvesissä näytteen fosfaattipitoisuuteen vaikuttavat vahvasti esimerkiksi raudan

saostamisvaikutus, sekä toisaalta orgaanisen aineksen sisältämän fosfaatin mahdollinen lisäsvaikutus.

4.2 Suoritetut kokeet

Kokeet suoritettiin kolmen koeviikon sarjana, seuraavaa koetta suunniteltiin aina edellisen kokeen pohjalta. Ennen varsinaisten kokeiden aloittamista suoritettiin joitakin mittauksia molemmilla laitteilla synteettisiä näytteitä käyttäen. Tarkoituksena oli tutustua laitteiden toimintaan ja ohjelmistoihin, sekä varsinaiseen käytettävään menetelmään. Ensimmäiselle koeviikolle valikoitui pelkkiä puronäytteitä, sillä viikoittaisen purokierroksen ansiosta näytteet olivat helposti saatavilla. Toiselle ja kolmannelle koeviikolle haluttiin myös järvinäytteitä. Näytteiden keruupaikat selviävät kuvasta 10.



Kuva 10. Näytteiden keruupaikat ja niiden sijoittuminen biologisen aseman ympäristöön. 1: Ormajärvi. 2: Lovojärvi. 3: Haarajoki. 4: Mustajoki. 5: Luhdanoja. 6: Löyttynoja. 7: Koiransuolenoja.

4.2.1 Ensimmäisen koeviikon kokeet

Ensimmäisellä koeviikolla haluttiin tarkastella FIAn ja spektrofotometrin antamien tulosten välistä eroa, sekä tutkia eri esikäsitelymenetelmien vaikutusta tulokseen. Näytteet kerättiin viidestä Pääjärveen laskevasta uomasta, joista otetaan viikoittaisen purokierroksen aikana seurantanäytteet. Tutkitut purot olivat Mustajoki, Löyttynoja, Luhdanjoki, Koiransuolenoja ja Haarajoki. Vesinäytteistä tehtiin neljä näytesarjaa, joihin kustakin purosta tuli kolme rinnakkaista näytettä kummallekin laitteelle analysoitavaksi. Näytekoeputkia tuli siis yhteensä 120 analysoitavaksi ensimmäiselle koeviikolle.

Näytteistä tehtiin seuraavanlaiset sarjat:

1. Suodatus 0,45 µm ruiskusuodattimella, analysointi heti näytteiden keräyspäivänä
2. Suodatus 0,45 µm ruiskusuodattimella, säilytys 1 vrk jääkaapissa ennen analysointia
3. Suodatus 0,45 µm ruiskusuodattimella, pakastus, suodatus 0,45 µm ruiskusuodattimella sulatuksen jälkeen, analysointi
4. Näytteen pakastus tuoreeltaan, suodatus 0,45 µm ruiskusuodattimella sulatuksen jälkeen, analysointi

Kukin sarja tutkittiin aina samana päivänä sekä FIAlla että spektrofotometrillä. Näytesarjassa samana päivänä tuoreeltaan analysoidut näytteet edustavat ”oikeaa” tulosta, sillä sen katsotaan olevan lähinnä standardimenetelmää. Koejärjestelyllä haluttiin lisäksi tutkia pakastamisen vaikutusta tulokseen, sekä sitä onko pakastamisen ja suodatuksen järjestyksellä merkitystä. Lisäksi selvitettiin, olisiko näytteitä mahdollista säilyttää jääkaapissa vähän aikaa tarvittaessa.

4.2.2 Toisen koeviikon kokeet

Toiselle koeviikolle otettiin näytteitä kolmesta purokierroksen purosta ja lisäksi kahdesta järvestä. Puroista valittiin ne, joissa fosfaattia tuntui esiintyvän eniten. Mukaan haluttiin myös järvinäytteitä, sillä usein järvien ja purojen vesien kemiallisissa ominaisuuksissa on selkeitä eroavaisuuksia. Näytevedet olivat Haarajoki, Mustajoki, Koiransuolenoja, Lovojärvi (näytteet pinnasta ja 3 m syvyydestä) sekä Ormajärvi (näyte pinnasta). Kustakin vedestä tehtiin kuusi näytesarjaa, rinnakkaisia näytteitä oli kolme kustakin vedestä. Koeputkia tuli analysoitavaksi yhteensä 126.

Näytteistä tehtiin seuraavanlaiset sarjat:

1. Suodatus 0,45 µm, analysointi samana päivänä, FIA ja spektrofotometri
2. Suodatus 0,45 µm, säilytys jääkaapissa 1 vrk, analysointi vain FIAlla
3. Suodatus 0,45 µm, säilytys jääkaapissa 2 vrk, analysointi vain FIAlla
4. Suodatus 0,45 µm, säilytys jääkaapissa 5 vrk, analysointi vain FIAlla
5. Imusuodatus GF/C, pakastus, suodatus 0,45 µm, analysointi vain FIAlla
6. Suodatus 0,45 µm, kestäväntä rikkihapolla, säilytys jääkaapissa 2 vrk, analysointi vain FIAlla

Ensimmäiset näytteet tutkittiin sekä FIAlla että spektrofotometrillä, muut näytteet ainoastaan FIAlla. Tämän lisäksi näytteistä mitattiin väri, sameus, DOC (Dissolved Organic Carbon, liuennut orgaaninen hiili), raudan määrä ja pH. Toisella koeviikolla oltiin kiinnostuneita näkemään, minkälaisia tuloksia järvinäytteet antoivat, sekä vertaamaan niitä puronäytteiden tuloksiin. Haluttiin tarkemmin tutkia erilaisten esikäsitteilyjen vaikutusta tuloksiin, esimerkiksi jääkaappisäilytyksen pituuden vaikutusta. Päätettiin tehdä myös koe kestävyillä näytteillä ja toivottiin, että siten olisi mahdollista havaita happohydrolyysin vaikutusta näytteissä.

4.2.3 Kolmannen koeviikon kokeet

Kolmannella koeviikolla haluttiin tarkastella hieman erilaisia asioita ja mittauksetkin olivat toisenlaisia kuin kahtena aiempina viikkona. Normaalin alkumittauksen jälkeen suoritettiin lisäskokeita FIAlla, kinetiikkakoe spektrofotometrillä sekä yritettiin toistaa FIAn menetelmä spektrofotometrillä. Toiveena oli saada hieman tietoa menetelmän soveltuvuudesta laitteille, sekä menetelmässä käytetystä reaktiosta ylipäättäen. Näytevedet kolmannella koeviikolla olivat Koiransuolenoja, Lovojärvi pinta sekä Lovojärvi pohja. Pohjanäyte otettiin niin läheltä pohjaa kuin mahdollista, sillä toiveena oli saada hapetonta vettä jossa fosfaattipitoisuus olisi mahdollisimman korkea.

Näytteet käsiteltiin kaikki samalla tavalla suodattamalla ne GF/C-kalvosuodattimella heti tuoreeltaan. Vettä varattiin noin puolitoista litraa eri mittauksia varten useampaan pulloon. Ennen mittauksia vesi vielä suodatettiin 0,45 µm ruiskusuodattimella. Mittauspäivien välillä näytteitä säilytettiin jääkaapissa.

Ensimmäisenä koepäivänä suoritettiin suodatuksen lisäksi alkumittaus sekä FIAlla että spektrofotometrillä tuoreista näytteistä. Toisena päivänä puolestaan tehtiin lisäyskokeita FIAlla. Mittapulloihin lisättiin fosfaattiliuosta siten, että merkkiin täytettynä lisäyksen fosfaattipitoisuus olisi 8,16 mg/l. Pullot täytettiin merkkiin näytevesillä, sekä yksi sarja tehtiin MQ-vedellä. Lisäksi mitattiin samat näytteet ilman lisäyksiä.

Kolmantena työpäivänä suoritettiin spektrofotometrillä kinetiikkakokeita. Mittausaallonpituus oli 880 nm ja mittausaika 15 ja 30 minuuttia. Spektrofotometriin imettiin kyvetillinen näytevetä heti reaktion alussa ja laite mittasi absorbanssin muutosta halutun ajan. Näin pystyttiin tarkastelemaan reaktion kulkua. Näytteisiin lisättiin vuoron perään sekä manuaalisen menetelmän että FIA-menetelmän reagensseja, jotta voitaisiin tutkia reagenssien välistä eroa mittauksissa. Lisäksi tutkittiin muutama synteettinen näyte ja mitattiin nollanäyte.

Neljäntenä työpäivänä yritettiin toistaa FIAn menetelmä spektrofotometrillä siten, että näytteiden reaktioaika olisi sama ja ne viettäisivät saman ajan lämpöhauteessa kuin FIAnkin menetelmässä. Tämä osoittautui melko haasteelliseksi. Elintarvikeväriliuoksen kanssa oli aiemmin määritetty FIAn ajon eri vaiheet ja kauanko niissä kesti. Vesihautteen lämpötila oli 36 °C ja ajanhallinnassa apuna oli sekuntikello. Reagenssilisäyksestä laskettiin 16 sekuntia lämmityksen alkuun. Lämmitys kesti 10 sekuntia, jonka jälkeen odotettiin vielä 10 sekuntia ennen mittausta. Näytteet sekoitettiin pienissä autoklaavipulloissa, joista ne kaadettiin koeputkiin mittausta varten.

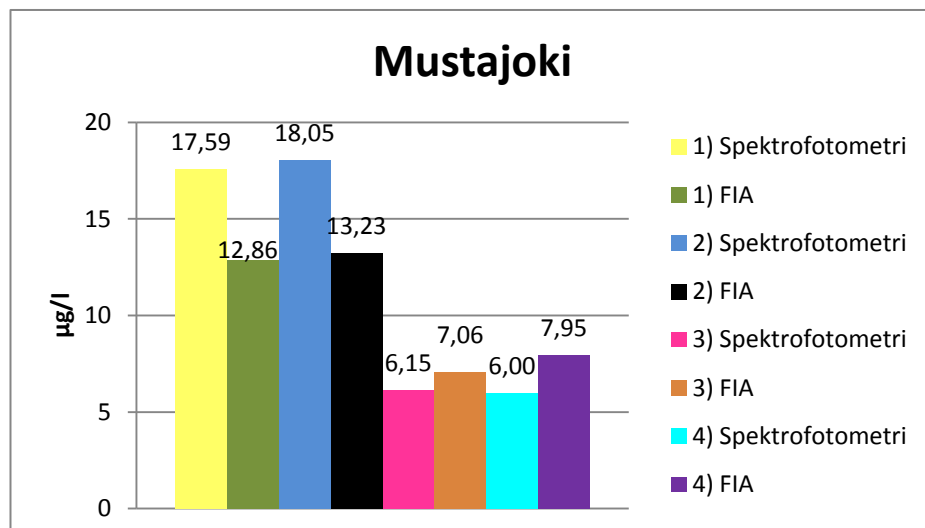
5 Tulokset ja niiden tulkinta

Tässä osiossa esitellään oleellimmat työn tulokset. Tarkemmat tulostaulukot ja kalibroitisuorat voi löytää liitteistä 1 ja 2.

5.1 Ensimmäisen koeviikon tulokset

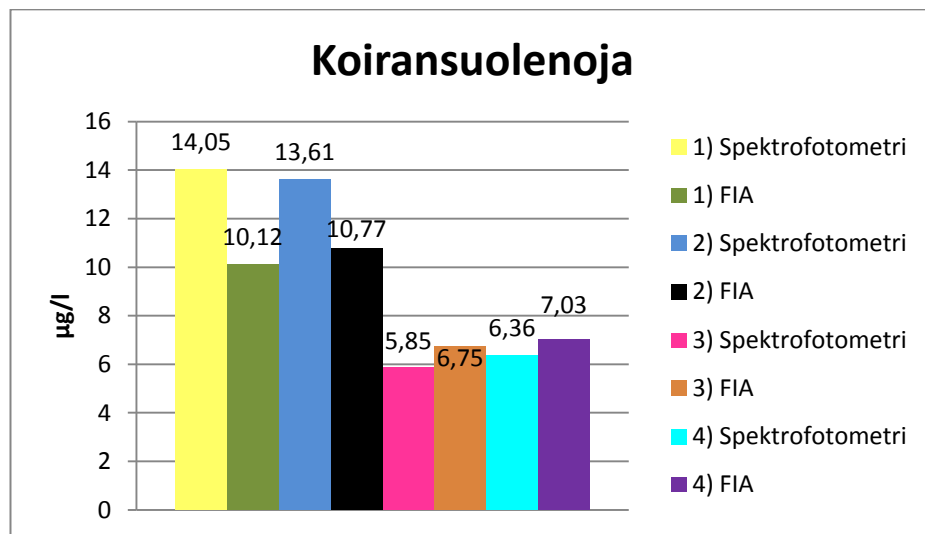
Ensimmäisen koeviikon puronäytteille tehtiin erilaisia säilyvyys- ja esikäsittelykokeita. Kaikki näytteet analysoitiin sekä spektrofotometrillä että FIAlla laitteiden menetelmäkohtaisia ohjeita noudattaen. Tuloksista tehtiin pylväsdiagrammit, joista voi nähdä erilaisilla käsittelyllä saatujen tulosten keskinäisiä suhteita. Kuvissa pylväiden selitteissä olevat numeroiden merkitykset ovat seuraavat:

1. Suodatus 0,45 µm:n ruiskusuodattimella, analysointi heti näytteiden keräyspäivänä
2. Suodatus 0,45 µm:n ruiskusuodattimella, säilytys 1 vrk jääkaapissa ennen analysointia
3. Suodatus 0,45 µm:n ruiskusuodattimella, pakastus, suodatus 0,45 µm:n ruiskusuodattimella sulatuksen jälkeen, analysointi
4. Näytteen pakastus tuoreeltaan, suodatus 0,45 µm:n ruiskusuodattimella sulatuksen jälkeen, analysointi



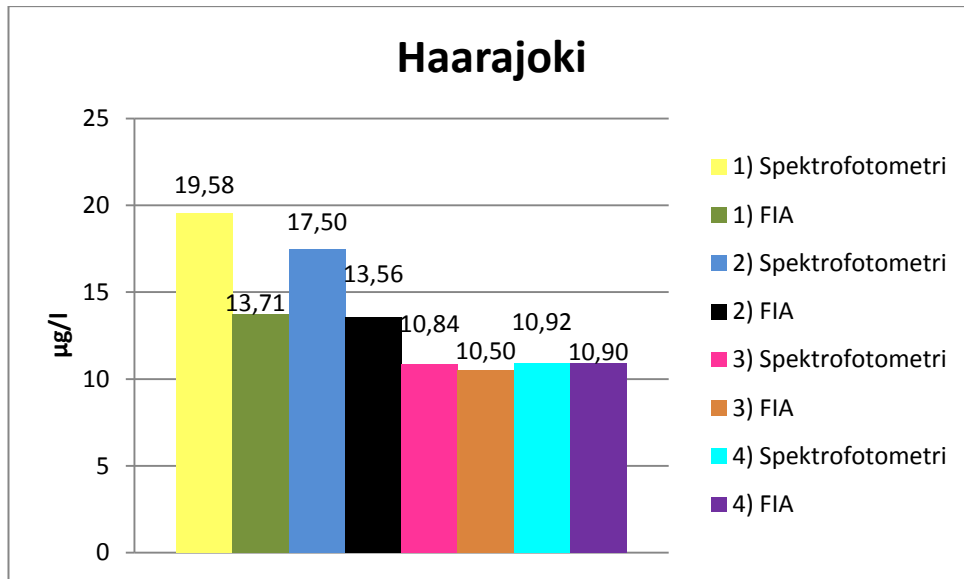
Kuva 11. Mustajoen vesinäytteiden fosfaattitulokset.

Kuvasta 11 voidaan havaita, että ensimmäisenä ja toisena päivänä Mustajoen näytteistä FIAlla saadut tulokset ovat selvästi matalampia kuin spektrofotometrillä saatu tulos. Fosfaatin määrä näytteissä ei näytä vähentyneen, vaikka näytteitä onkin säilytetty yksi yö jääkaapissa. Tulos on itse asiassa hieman korkeampi spektrofotometrillä mitattuna kuin tuoreessa näytteessä. Kun tarkastellaan pakastettujen näytteiden tuloksia havaitaan niiden olevan reilusti matalampia kuin tuoreena mitattujen näytteiden. Fosfaatin määrä näyttää enemmän kuin puolittuneen pakastuksen aikana. Sen sijaan kovinkaan suurta vaikutusta ei näytä olevan sillä, suodatetaanko näyte ennen pakastusta vai ei.



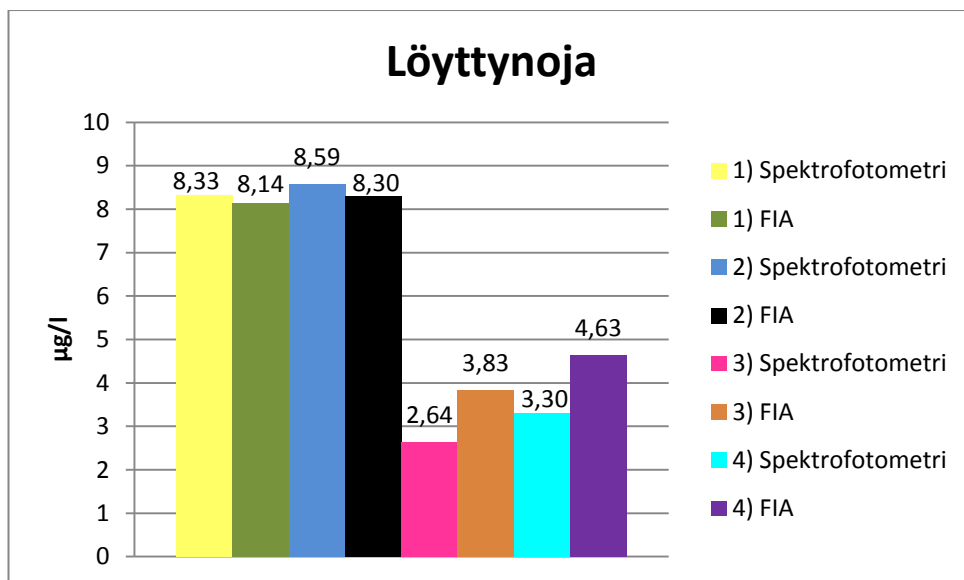
Kuva 12. Koiransuolenojan vesinäytteiden fosfaattitulokset.

Kuvasta 12 huomataan, että Koiransuolenojan tulokset vastaavat Mustajoen tuloksia. FIAlla mitatut tuoreet ja jääkaapissa säilytettyjen näytteiden tulokset ovat selvästi matalampia kuin spektrofotometrisellä menetelmällä mitatut. Pakastettujen näytteiden tulokset ovat yli puolet matalampia kuin tuoreiden näytteiden. Sekä Mustajoessa että Koiransuolenojassa pakastettujen, FIAlla mitattujen näytteiden tulokset ovat aavistuksen verran korkeampia kuin spektrofotometrillä mitatut näytteet. Tämä saattaa selittyä osittain mittausepävarmuudella, sillä määritetyt pitoisuudet ovat hyvin pieniä.



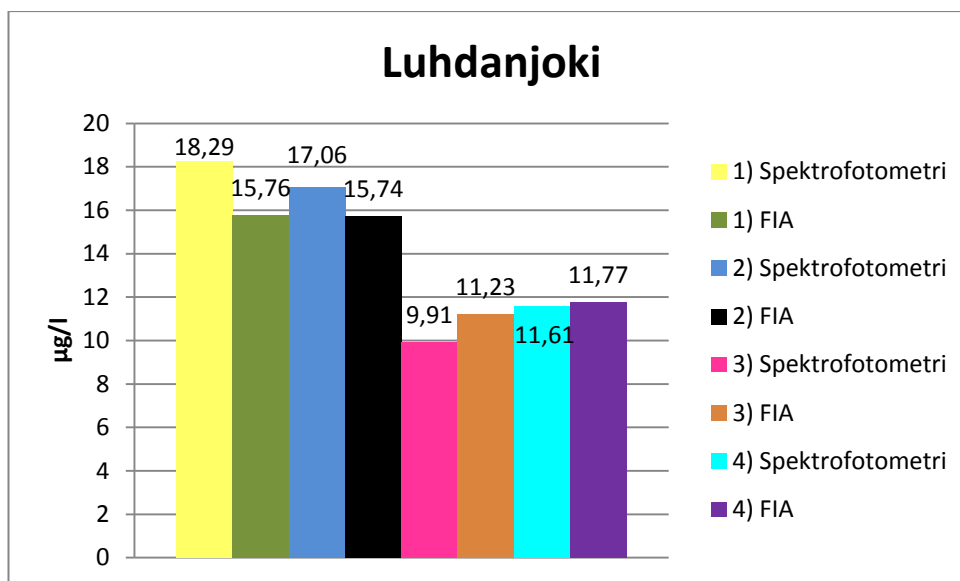
Kuva 13. Haarajoen vesinäytteiden fosfaattitulokset.

Haarajoen tulokset kuvassa 13 poikkeavat hieman kahdesta edellisestä. Voidaan havaita, että pakastetus ei vähentänyt fosfaattipitoisuutta yhtä paljon kuin edellisissä näytevesissä, vaan niissä FIAlla ja spektrofotometrillä mitattujen näytteiden tuloksissa ei ole kovinkaan suurta eroa. Jääkaapissa säilytetyt näytteet vaikuttavat antavan spektrofotometrillä mitattuna hieman matalampia tuloksia kuin tuore näyte.



Kuva 14. Löyttynojan vesinäytteiden fosfaattitulokset.

Löyttynojan tulos poikkeaa edellisistä (kuva 14), sillä tuoreissa näytteissä spektrofotometrillä ja FIAlla mitattujen tulosten ero on hyvin pieni. Jääkaappisäilytys näyttää hieman nostaneen fosfaatin mittaustulosta, mutta pakastettujen näytteiden tulokset ovat jälleen yli puolet matalampia. Suodattamatta pakastettujen näytteiden analyysitulokset fosfaatille ovat hieman korkeampia kuin suodatettuina pakastettujen, joskin pitoisuudet ovat jälleen sen verran pieniä että mittaustarkkuudesta ei voida olla täysin varmoja.



Kuva 15. Luhdanjoen vesinäytteiden fosfaattitulokset.

Kuvassa 15 olevista Luhdanjoen tuloksista nähdään taas eroa sekä tuoreiden että jääkaapissa säilytettyjen näytteiden tuloksissa FIAn ja spektrofotometrin välillä. FIAlla mitatut tulokset ovat hieman matalampia, mutta eivät yhtä selvästi kuin esimerkiksi Mustajoessa. Pakastettujen näytteiden tulosten ero tuoreisiin ei myöskään ole aivan yhtä suuri kuin muissa puroissa, ja suodattamatta pakastetut vaikuttaisivat antavan hieman korkeampia tuloksia kuin suodatettuna pakastetut.

Ensimmäisen koeviikon tuloksista voidaan nähdä, että eroavaisuutta FIAlla ja spektrofotometrillä saaduissa tuloksissa löytyy. Ero ei kuitenkaan ole systemaattista, sillä Löyttynojan näytteessä eroavaisuutta ei juurikaan ole. Vuorokauden säilytys jääkaapissa ei näytä vaikuttavan tulokseen, vaikkakin joissain tapauksissa siten säilytettyjen näytteiden tulokset olivat hieman korkeampia kuin tuoreiden näytteiden. Ensimmäisen viikon tulosten valossa onkin perusteltua sanoa, että jääkaappisäilytys sopisi vesinäytteille paremmin kuin pakastus. Pakastettujen näytteiden kohdalla

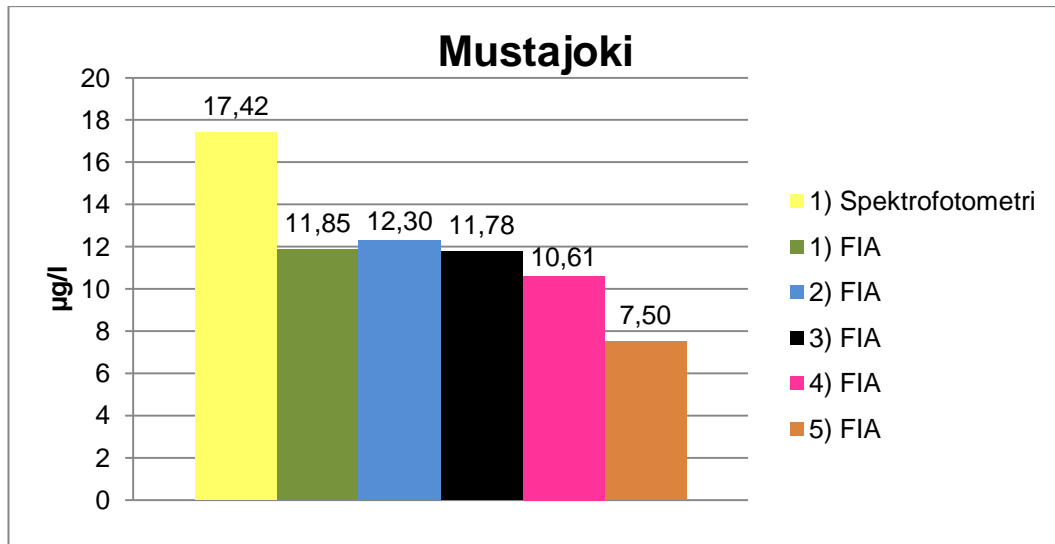
havaitaan, ettei kovin suurta eroa ole sillä, suodatetaanko näytteet myös ennen pakastusta vai ainoastaan sen jälkeen. Kahden näytteen kohdalla suodattamatta pakastetut antoivat hieman suurempia tuloksia. On kuitenkin huomioitavaa, että kovinkaan yksiselitteisiä ja suoria päätelmiä näin suppeasta tulostuloksesta on vaikea tehdä, sillä tuloksiin eivät vaikuta vain käytetyt laitteet ja esikäsittelymenetelmät, vaan myös näytevesien kemialliset ominaisuudet ja näytteen keruuhetken vuodenaika.

5.2 Toisen koeviikon tulokset

Toisella koeviikolla mukana oli puronäytteiden lisäksi myös kaksi järvinäytettä. Mittauksia tehdessä kuitenkin havaittiin, etteivät järvinäytteet sisältäneet juuri nimeksikään fosfaattia. Sen vuoksi niistä saadut tulokset jätettiin tulosten tarkastelussa huomiotta. Toisella koeviikolla tarkoituksena oli tutkia myös kestävyitä näytteitä. Niiden kohdalla puolestaan huomattiin, ettei käytetty FIA-menetelmä sellaisenaan sopinutkaan niille. Laitteen ohjelmisto piirsi varsinaisen mittauspiikin viereen negatiivisen piikin, jonka arveltiin johtuvan nimenomaan happolisäyksestä. Tämän lisäksi ohjelmisto automaattisesti integroi juuri negatiiviset piikit, eikä tätä integrointia onnistuttu muuttamaan. Kestävyiden näytteiden tutkiminen ei siis valitettavasti onnistunut.

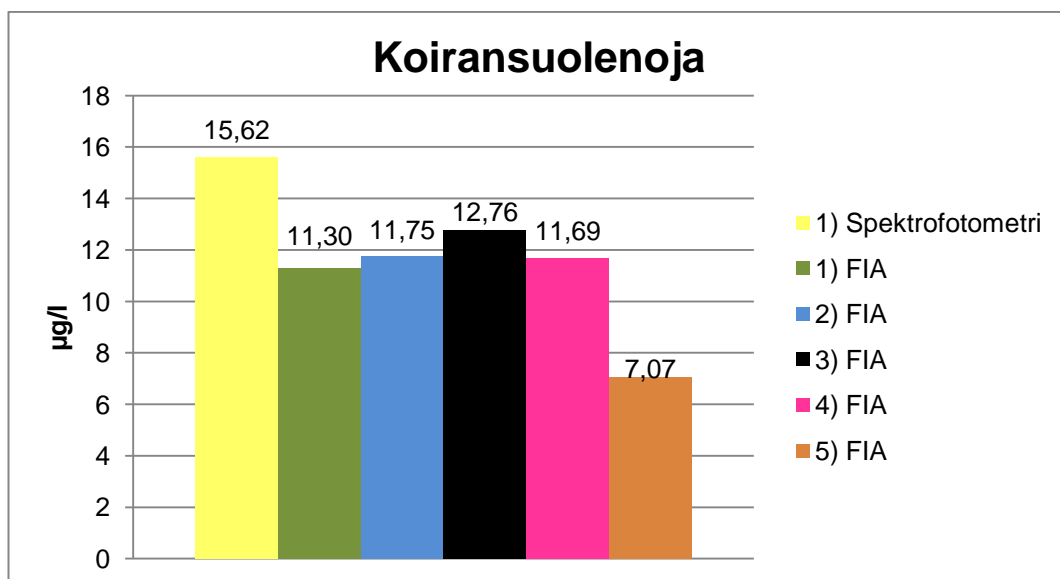
Myös toisen koeviikon tuloksista piirrettiin pylväsdiagrammit. Niiden selitteissä olevien numeroiden merkitykset ovat seuraavat:

1. Tuoreet, 0,45 μm :n ruiskusuodattimella suodatetut näytteet
2. 0,45 μm :n ruiskusuodattimella suodatetut, 1 vrk jääkaapissa säilytetyt näytteet
3. 0,45 μm :n ruiskusuodattimella suodatetut, 2 vrk jääkaapissa säilytetyt näytteet
4. 0,45 μm :n ruiskusuodattimella suodatetut, 5 vrk jääkaapissa säilytetyt näytteet
5. Pakastetut näytteet



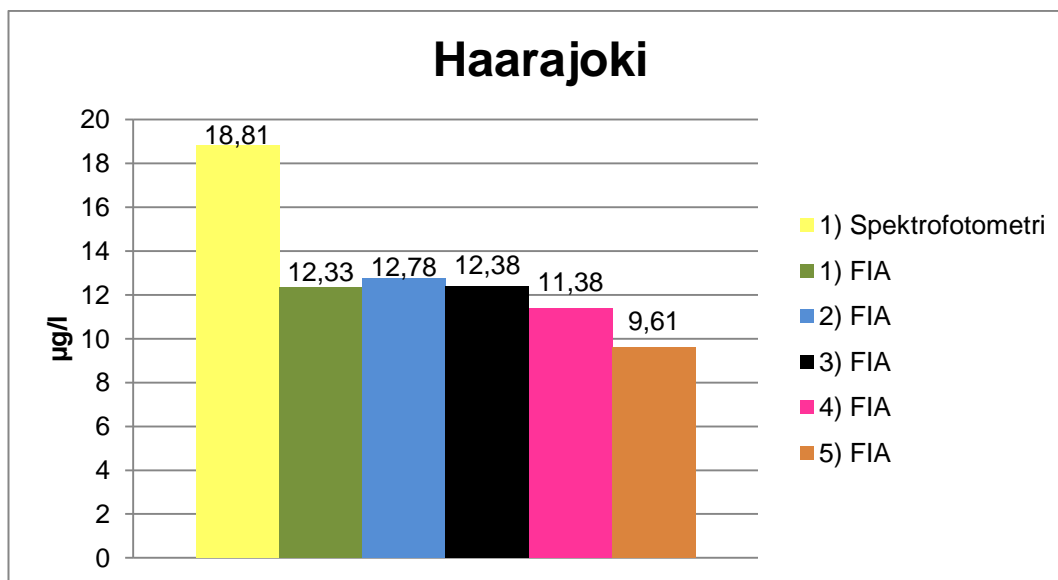
Kuva 16. Mustajoen vesinäytteiden fosfaattitulokset.

Kuvassa 16 nähdään Mustajosta saadut tulokset. Voidaan heti todeta, että FIAlla on jälleen saatu hieman matalampi tulos tuoreesta näytteestä kuin spektrofotometrillä. Kun puolestaan tarkastellaan jääkaapissa säilytettyjen näytteiden tuloksia voidaan huomata, että yksi tai kaksi vuorokautta jääkaapissa ei juurikaan muuta tulosta. Sen sijaan viisi vuorokautta jääkaapissa säilytetyssä näytteessä tulos on jo hieman matalampi. Pakastetun näytteen tulos on lähes puolet matalampi kuin tuoreena FIAlla mitatussa näytteessä, sekä yli puolet matalampi kuin tuoreena spektrofotometrillä mitatussa näytteessä.



Kuva 17. Koiransuolenojan vesinäytteiden fosfaattitulokset.

Kuvassa 17 näkyvät Koiransuolenojan tulokset ovat samankaltaisia kuin Mustajoessakin. Jääkaapissa säilytettyjen näytteiden tulokset ovat lähes yhteneväiset tuoreena FIAlla mitatun näytteen kanssa, joskin kaksi vuorokautta jääkaapissa säilytetyn näytteen tulos on hieman korkeampi kuin muiden. Pakastetun näytteen tulos on jälleen selvästi matalampi kuin tuoreena mitattujen näytteiden.

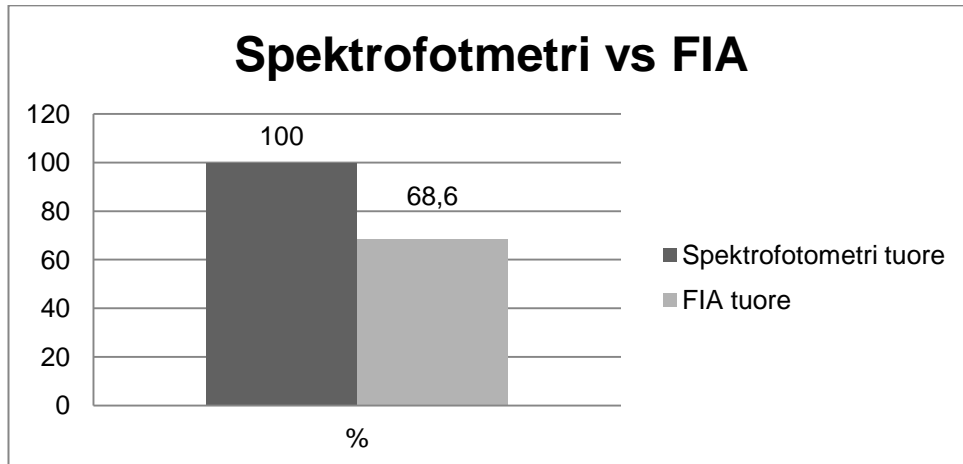


Kuva 18. Haarajoen vesinäytteiden fosfaattitulokset.

Kuvassa 18 on näkyvissä Haarajoen tulokset, jotka eroavat hieman kahden muun puron tuloksista. Pakastetun näytteen tulos ei ole yhtä selkeästi matalampi kuin tuoreena FIAlla mitatun näytteen, toisin kuin esimerkiksi Koiransuolenojan tapauksessa. Jääkaapissa säilytettyjen näytteiden kohdalla vaikuttaa siltä, että fosfaatin määrä näytteessä hieman laskisi säilytyksen keston pidentyessä.

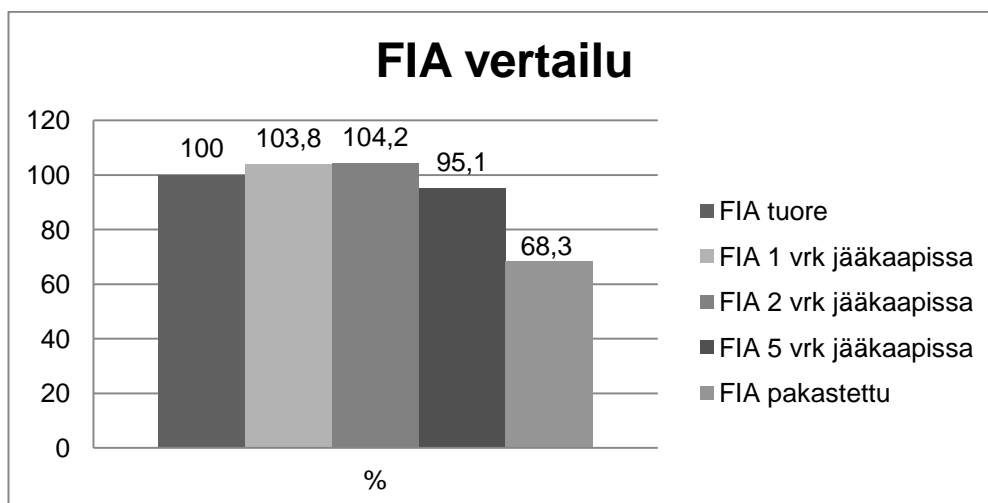
Toisella viikolla säilyvyystestejä tehtiin ainoastaan FIAlla, ja tuloksista voidaan todeta, että kaikkien kolmen puron tapauksessa tuoreesta näytteestä FIAlla mitattu tulos on matalampi kuin spektrofotometrillä tuoreeltaan mitattu tulos. Pakastuksen osalta toisen viikon tulokset tukevat selvästi ensimmäisen viikon tuloksia. Pakastettujen näytteiden tulokset vaikuttaisivat olevan matalampia kuin tuoreiden, ja siksi pakastus näyttäisi olevan huono säilytysmuoto luonnonvesinäytteille. Jääkaapissa puolestaan näytteet tuntuvat säilyvän melko hyvin parikin päivää. Vaikka tulokset eivät sitä tuekaan, on kuitenkin mahdollista, että pidemmässä säilytyksessä vedessä tapahtuu kemiallisia reaktioita, joiden seurauksena fosfaattia esimerkiksi hieman saostuu tai mahdollisesti

adsorboituu säilytysastian pintaan. Koeviikolla näytteissä ei havaittu silminnähtävää sakkua.



Kuva 19. Spektrofotometrisen ja FIA-menetelmän vertailua.

Kuvassa 19 oleva kuvaaja on tehty ensimmäisen ja toisen koeviikon tulosten pohjalta. Siinä vertaillaan tuoreena mitattujen näytteiden tuloksia siten, että spektrofotometrillä mitatut tulokset on oletettu edustavan 100 %:a, johon FIAlla mitatut tulokset on suhteutettu. Keskiarvoja vertailemalla voidaan nähdä spektrofotometrisen menetelmän ja FIA-menetelmien välinen ero. FIAlla määritetyt fosfaattipitoisuudet olivat keskimäärin vain 68,6 % spektrofotometrisen mittauksen fosfaattipitoisuuksista.



Kuva 20. FIA-menetelmällä mitattujen, eri tavalla säilytettyjen näytteiden tuloksia.

Kuvassa 20 on puolestaan vertailtu ensimmäisen ja toisen koeviikon FIAlla mitattuja näytteitä, jotka on käsitelty eri tavoin. Kuvaajaa varten on oletettu tuoreeltaan FIAlla mitattujen näytteiden olevan 100 %, ja suhteutettu muut näytteet siihen. Voidaan nähdä, että jääkaapissa 1 - 2 vuorokautta säilytetyt näytteet antavat hieman korkeampia tuloksia. Viisi vuorokautta jääkaapissa olleiden näytteiden tulokset ovat hieman laskeneet, ja pakastettujen näytteiden tulokset ovat vähän alle puolet tuoreiden näytteiden tuloksista.

Toisella koeviikolla näytevesistä mitattiin myös kationi- ja DOC-pitoisuudet (dissolved organic carbon). Taulukosta 1 nähdään, että Mustajoen ja Haarajoen liuenneen orgaanisen hiilen pitoisuudet ovat suunnilleen samalla tasolla, kun taas Koiransuolenojan näytteessä on alhaisimmat pitoisuudet. Korkein pitoisuus on Haarajoen näytteessä. Taulukossa on esitetty myös muita näytteistä mitattuja tuloksia. Näytteistä Mustajoki oli selvästi samein, ja siinä oli myös eniten rautaa. Mustajoki onkin tunnettu humuspitoisuudestaan. Näytteiden pH oli melko tasainen. Voidaan huomata, että merkittävimmät erot FIAn ja spektrofotometrin välisissä tuloksissa oli niissä vesinäytteissä, joiden rauta- ja humuspitoisuus oli korkein (Haarajoki, Mustajoki, Koiransuolenoja). Vähäisimmät erot puolestaan oli Luhdanjoessa ja Löyttynojassa, joista myös rauta- ja DOC-pitoisuudet olivat matalimpia.

Taulukko 1. Kokoomataulukko

| Joki | pH | Sameus | Rauta | DOC | ero FIA/spektrofotom. | ero tuore/pakastus |
|------------|------|--------|-------|------|--------------------------|-----------------------|
| Luhdanjoki | 7,21 | 9,3 | 0,50 | 5,8 | 14 % | < 50% |
| Löyttynoja | 7,07 | 7,4 | 1,00 | 2,5 | 2 % | > 50 % |
| Haarajoki | 6,68 | 7,8 | 1,33 | 15,3 | 30 % | < 50% |
| Mustajoki | 6,91 | 16,6 | 2,23 | 13,7 | 27 % | noin 50 % |
| Koiras.oja | 7,38 | 7,7 | 1,22 | 8,0 | 28 % | noin 50 % |

Opinnäytetyötä varten oltiin kiinnostuneita saamaan tietoa näytteissä olleen raudan määrästä sen fosfaatinsitomiskyvystä johtuen. Tuloksista voidaan nähdä, että puroista eniten rautaa oli Mustajoen näytteessä. Runsas raudan määrä näytteessä saattaa aiheuttaa pienempiä tuloksia pakastuksen jälkeen, kun rautayhdisteet saostavat fosfaattia vedestä. Toisaalta rautayhdisteistä saattaa vapautua jo alun perin sitoutunutta fosfaattia happohydrolyysin vaikutuksesta happamia reagensseja lisättäessä. Samat näkökulmat pätevät myös liuenneen orgaanisen hiilen tuloksiin, sillä myös orgaaniset hiilyhdisteet voivat sitoa fosfaattia itseensä.

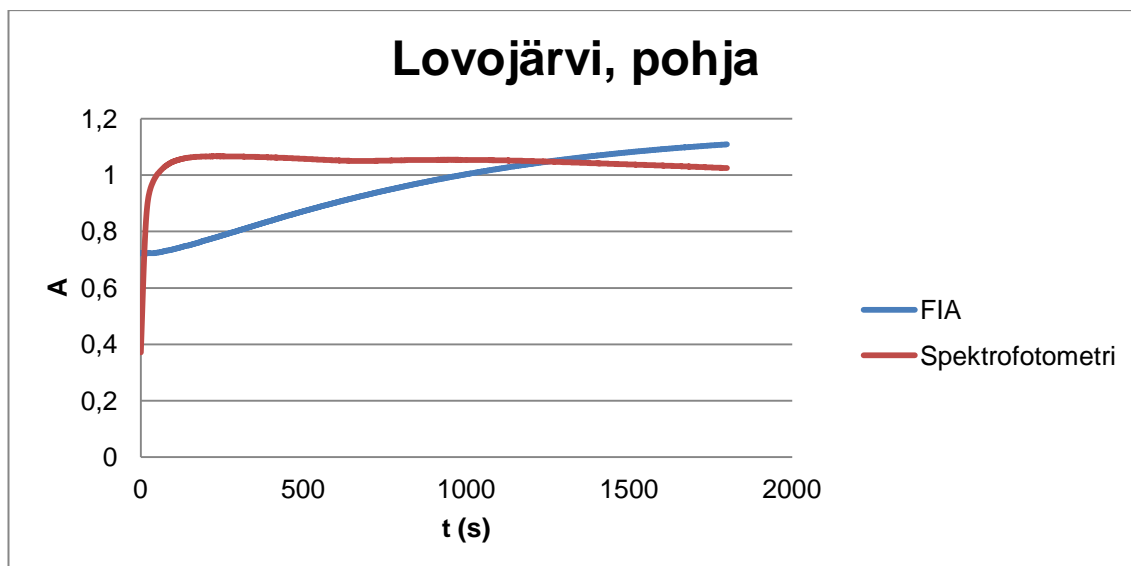
5.3 Kolmannen koeviikon tulokset

Kolmannella koeviikolla tutkittiin kolmea erityyppistä näytettä. Näytteet oli kerätty yhdestä purosta sekä yhdestä järvestä kahdelta eri syvyydeltä. Kaikki koeviikolle suunnitellut kokeet eivät kuitenkaan valitettavasti onnistuneet. FIAN menetelmän toistaminen spektrofotometrillä osoittautui aivan liian kunnianhimoiseksi tehtäväksi. Oli erittäin vaikeaa toistaa menetelmää käsin sekuntikellon kanssa, eikä lämmityskään onnistunut yhtä hyvin kuin FIA-laitteessa. Lisäyskokeita tehtiin, mutta jälkeinpäin kävi ilmi, että inhimillisestä erehdyksestä johtuen näytteisiin oli lisätty niin olemattoman pieniä pitoisuuksia fosfaattistandardia, etteivät tulokset kertoneet oikeastaan mistään muusta kuin näytteiden laimenemisestä. Kinetiikkakokeet onneksi onnistuivat, joten viikko ei mennyt täysin hukkaan.

Aivan aluksi haluttiin selvittää näytteiden fosfaattimäärän perustaso alkumittauksella. Näytteet mitattiin tavalliseen tapaan sekä spektrofotometrillä että FIAlla. Taulukossa 2 nähdään tämän alkumittauksen tulokset, joista heti voidaan havaita että hyvin suurissa pitoisuuksissa FIA antoi korkeamman tuloksen kuin spektrofotometri. Tähän voi syynä olla esimerkiksi spektrofotometrin sameuden korjauksen epäonnistuminen tai se, että näyte oli spektrofotometriselle menetelmälle liian vahvaa. Tuloksista kuitenkin nähdään, minkä verran kussakin näytteessä suunnilleen oli fosfaattia.

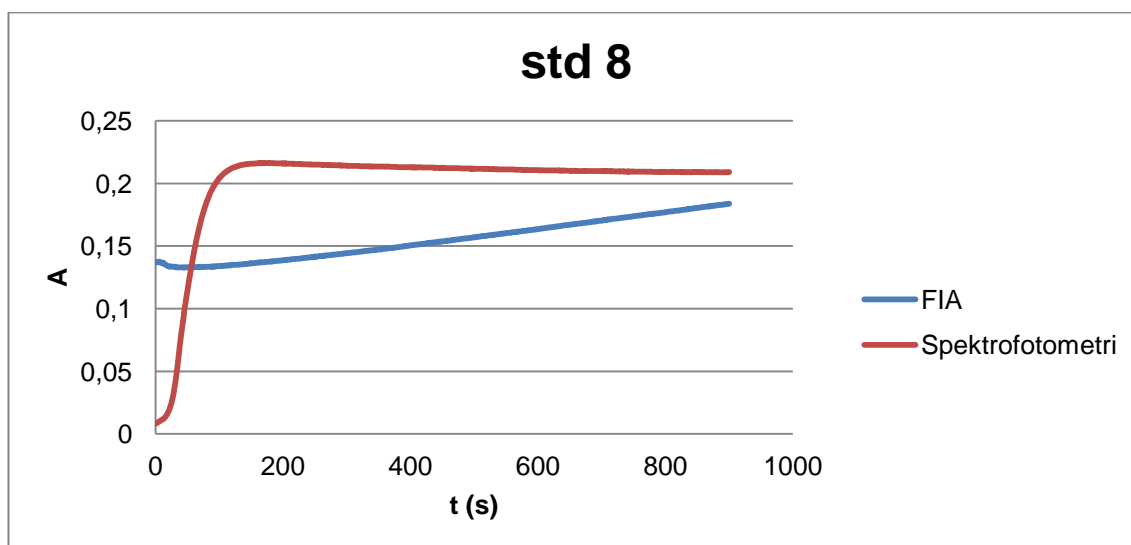
Taulukko 2. Kolmannen koeviikon alkumittaukset.

| Näyte | Spektrofotometri $\mu\text{g/l}$ | FIA $\mu\text{g/l}$ |
|-----------------|----------------------------------|---------------------|
| Koiransuolenoja | 11,58 | 10,27 |
| Lovojärvi pinta | 2,46 | 2,31 |
| Lovojärvi pohja | 1757,53 | 2382,69 |



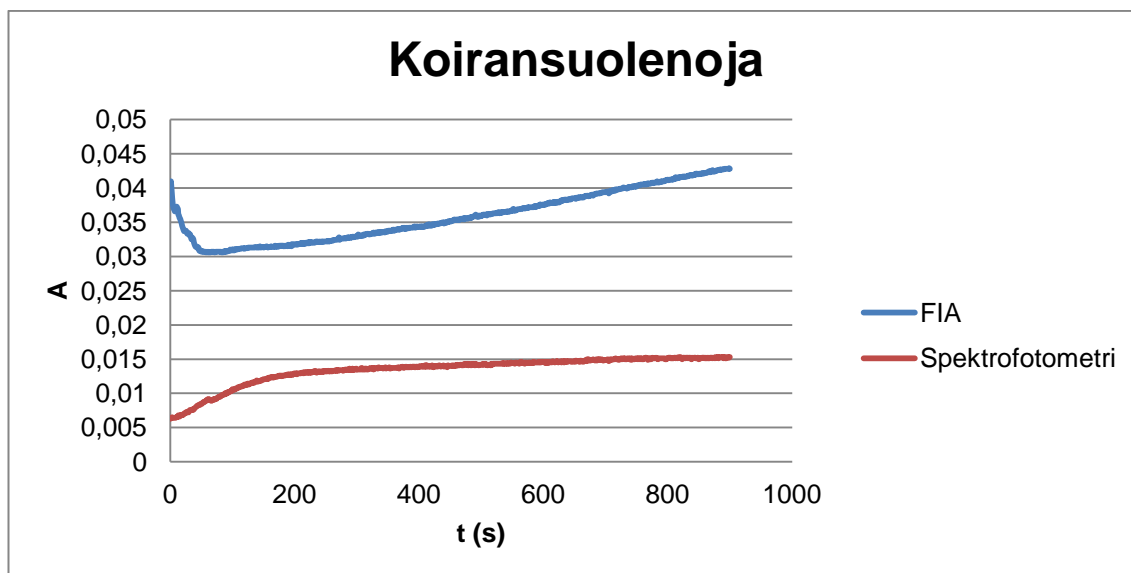
Kuva 21. Lovojärven alusvedestä otettu näyte. Reaktioaika 30 minuuttia.

Seuraavaksi näytteillä haluttiin tehdä kinetiikkakokeita. Kuvaajasta 21 voidaan nähdä, että eri reagenssien reaktiot etenevät aivan eri tavoilla. FIAN reagenssien reaktio näyttää käynnistyvän paljon hitaammin, spektrofotometrin reagenssien reaktio puolestaan pääsee tasapainotilaan melko nopeasti. Näytteenä on Lovojärven alusvedestä otettu vesi, jossa on erittäin runsaasti (n. 1600 mg/l) fosfaattia. Spektrofotometrin reagensseilla saavutettu tasapainotila näyttäisi kestävän melko pitkään ennen kuin se alkaa hiljalleen laskea. FIAN reagenssien reaktio puolestaan ei näytä löytävän tasapainotilaa lainkaan puolessa tunnissa.



Kuva 22. Vahvin standardi, numero 8. Reaktioaika 15 minuuttia.

Toisena näytteenä käytettiin kalibrointiliuosten vahvinta standardia, jossa on fosfaattia 310 $\mu\text{g/l}$. Kuvasta 22 voidaan huomata, että reaktiot etenevät hyvin samaan tapaan kuin Lovojärven näytteessäkin. 15 minuutin aikana FIAn reagenssien reaktio ei näytä saavuttavan lainkaan samaa tasoa spektrofotometrin reagenssien reaktion kanssa. FIAn viiva näyttää myös laskevan alussa hieman ennen kuin se alkaa nousta.

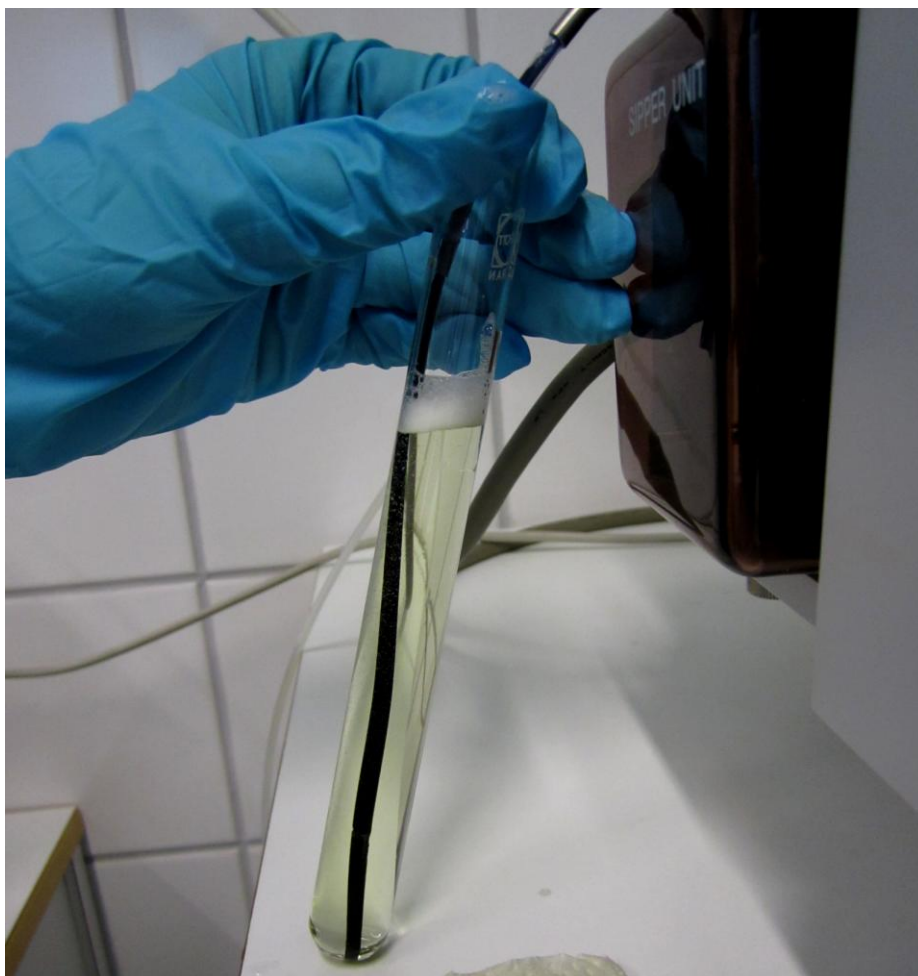


Kuva 23. Koiransuolenojan näyte, reaktioaika 15 minuuttia.

Kolmas näyte oli reilusti laimeampi kuin kaksi edellistä, sillä Koiransuolenojan näytteessä oli vain n. 11 $\mu\text{g/l}$ fosfaattia. Kuvasta 23 nähdään, että reaktioiden profiilit ovat saman tapaiset kuin vahvemmillakin näytteillä mitattaessa, mutta viivojen järjestys on päinvastainen. FIAn reagensseilla näytetään saavan korkeampia absorbanssiarvoja kuin spektrofotometrin reagensseilla. FIAn viivassa nähdään selkeä lasku ennen kuin viiva alkaa jälleen nousta, spektrofotometrin viiva puolestaan näyttää löytävän tasapainotilan melko nopeasti.

Kuvaajien perusteella voidaan sanoa, että reaktiot etenevät hyvin eri tavalla. Luonnollisesti FIAn reagenssit käyttäytyvät hieman eri tavalla FIA-laitetta käyttäessä lämpöhauteesta ja erilaisesta sekoituksesta johtuen, mutta on silti kyseenalaista ehtiikö reaktio tasapainotilaan laitteen huomattavasti lyhyemmässä reaktioajassa. Erikoista on myös FIAn reagenssien kuvaajissa esiintyvä absorbanssin lasku. Spektrofotometrin reagensseilla mahdollisesti tapahtuvaa happohydrolyysiäkään ei voida täysin poissulkea, joskin reaktioiden profiilien perusteella sen täytyisi tapahtua aivan reaktion

alkuvaiheessa. Muussa tapauksessa myös spektrofotometrin viiva kohoaisi pikkuhiljaa pidemmän ajan kuluessa.



Kuva 24. Keltainen värireaktio koeputkessa kinetiikkamittausta tehdessä.

Kinetiikkamittauksia tehdessä huomattiin erikoinen ilmiö, jota havainnollistaa kuva 24. FIAn reagensseja käytettäessä laimeissa liuksissa tapahtui keltainen värireaktio riippumatta siitä, oliko koeputkessa lainkaan fosfaattia vai ei. Menetelmän mukaan molybdaatin reagoidessa fosfaatin kanssa pitäisi muodostuvan kompleksin olla aluksi väriltään keltaista, ja sen jälkeen se askorbiinihapolla pelkistyy siniseksi. Laimeat liuokset kuitenkin jäivät keltaiseksi, ja keltainen väri havaittiin myös silloin, kun näytteenä oli MQ-vettä tai näyte puuttui kokonaan. Voidaan olettaa tämän johtuvan siitä, että FIAlla käytetyt reagenssit ovat liian vahvoja. Tällöin värireaktio saattaa ilmetä silloinkin, kun ei pitäisi.

6 Yhteenveto

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää, mitkä asiat näytteen esikäsittelyssä ja käytetyssä analyysimenetelmässä vaikuttavat fosfaatin määrittelyyn luonnonvesinäytteistä. Vesinäytteitä tutkittiin tekemällä niille erilaisia suodatuksia ja säilyvyyskokeita, suorittamalla mittauksia sekä FIAlla että spektrofotometrillä, sekä kineettisillä mittauksilla spektrofotometrillä reaktion kulun selvittämiseksi.

Kolmen koeviikon tuloksena saatiin paljon arvokasta tietoa luonnonvesien fosfaattimäärittelyksestä. Säilyvyyskokeissa todettiin, että pakastus on huono säilytysmenetelmä näytteille ja että jääkaappisäilytys voisi sopia paremmin silloin, kun näytteitä ei voida analysoida heti. Säilytys ei kuitenkaan ollut kaikissa näytteissä yksiselitteistä, vaan erilaisten vesien kemialliset ja muut mahdolliset ominaisuudet tuntuivat vaikuttavan tuloksiin melko paljon. Säilytyksen suhteen olisikin vielä paljon tutkittavaa ja selvitettävää, etenkin kun samoista puroista otetut näytteet saattavat käyttäytyä aivan eri tavoilla eri vuodenaikoina.

Kinetiikkakokeista nähtiin, että kahdella eri menetelmällä suoritettavat reaktiot etenevät eri tavoilla. On hyvin todennäköistä, ettei FIAlla käytetty menetelmä sovellu laitteelle sellaisenaan, vaan se kaipaisi jonkin verran muokkaamista ja optimointia parhaan tarkkuuden saavuttamiseksi. Reaktioaika saattaa olla liian lyhyt ja reagenssit mahdollisesti liian vahvoja. Toisaalta happamat reagenssit saattavat aiheuttaa joissakin näytteissä happohydrolyysiä, jolloin tulos saattaa olla korkeampi kuin näytteen todellinen fosfaattipitoisuus. Itse laitteen mittauskäytössä tuskin on vikaa, sillä synteettisesti valmistettujen näytteiden mittaaminen on asemalla onnistunut ihan hyvin.

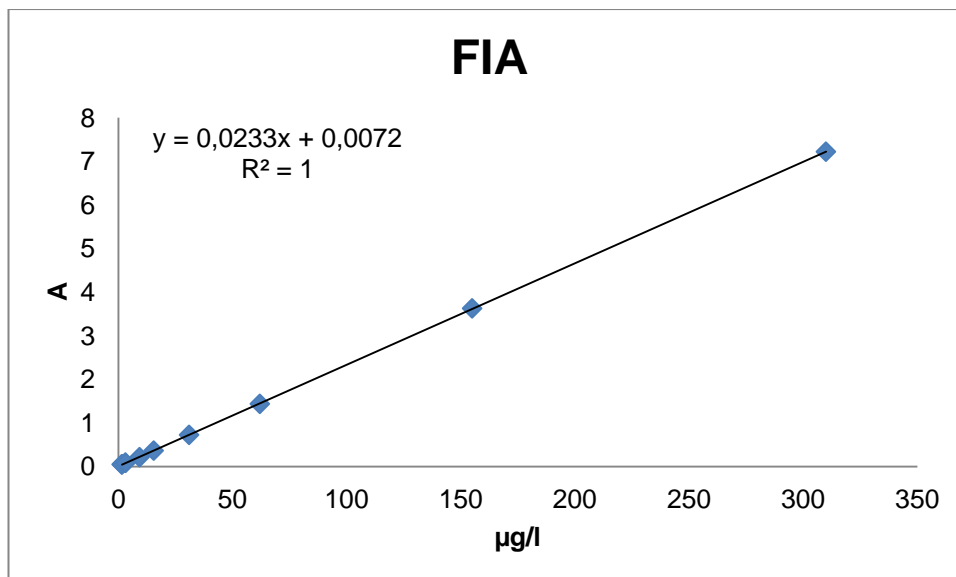
Projekti oli erittäin mielenkiintoinen, mutta se ei valitettavasti onnistunut kaikilta osin niin hyvin kuin olisi voinut toivoa. Erityisesti jäi harmittamaan lisäskokeiden epäonnistuminen ja niistä saatavien tulosten puuttuminen. Myös paljon muita tutkimusideoita jouduttiin jättämään opinnäytetyöstä pois ajanpuutteen vuoksi. Projektissa olisikin ollut mielenkiintoista tekemistä vaikka kuinka paljon, ja jatkotutkimuksia on varmasti tehtävä esimerkiksi säilyvyyskokeiden osalta tulosten varmentamiseksi. Tuntuu, että ylipäätään fosfaatissa ja sen määrittelyssä olisi vielä paljon tutkittavaa tieteen eri aloille.

Lähteet

- 1 Lammin biologisen aseman kotisivut. 2003. Verkkodokumentti. Helsingin yliopisto. <<http://www.helsinki.fi/lammi/>> Luettu 9.8.2012.
- 2 Zumdahl, S. & Zumdahl, S. 2003. Chemistry, 6th Edition. Boston: Houghton Mifflin company.
- 3 Fosfori veden laatua kuvaavana muuttujana. 11.1.2011. Verkkodokumentti. <<http://www.ymparisto.fi/default.asp?node=17448&lan=fi>> Valtion Ympäristöhallinto. Luettu. 13.8.2012.
- 4 Wetzel, R. 2001. Limnology: Lake and River Ecosystems, 3rd Edition. San Diego: Academic Press. S. 239 – 288.
- 5 Ravinteiden kierto. 10.11.2009. Verkkodokumentti. <<http://www.ymparisto.fi/default.asp?node=1821&lan=fi>> Valtion ympäristöhallinto. Luettu 6.8.2012.
- 6 Fytianos, K., Voudrias, E. & Raikos, N. 1998. Modelling of Phosphorous Removal from Aqueous and Wastewater Samples Using Ferric Ion. Environmental Pollution 101/1998, s. 123 – 130. Elsevier Science Ltd.
- 7 Phosphate Precipitation With Ferrous Ion. 1971. Water Pollution control research Series 09/71. US environmental protection agency.
- 8 Wetzel, R. & Likens, G. 2000. Limnological Analyses, 3rd edition. New York: Springer.
- 9 Reece, J., Urry, L., Cain, M., Wasserman, S., Minorsky, P. & Jackson, R. 2008. Campbell Biology, 8th Edition. San Francisco: Pearson Education.
- 10 Magnuson, J., Kratz, T. & Benson, B. 2006. Long-Term dynamics of Lakes in the Landscape – Long-Term Ecological Research on North Temperate Lakes. New York: Oxford university press.
- 11 Harris, D. 2007. Quantitative Chemical Analysis, 7th Edition. New York: W. H. Freeman and Company.
- 12 EM spectrum.svg. Verkkodokumentti. <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:EM_spectrum.svg> Wikimedia Commons. Luettu 28.12.2012.
- 13 Shimadzu Spectrophotometer UV-1800 instruction manual system user's guide.
- 14 Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka, 5. painos. Helsinki: Edita
- 15 Růžička, J. & Hansen, E. 1988. Flow Injection Analysis, 2nd edition. New York: John Wiley & Sons.
- 16 ThermoFischer - Peristaltiset- ja letkupumput. Verkkodokumentti. <<http://www.finnosalo.fi/thermofisher>> Finnsalo Oy. Luettu 23.7.2012.

- 17 Tyson, J. 1985. Flow Injection Analysis Techniques for Atomic-Absorption Spectrometry, A Review. Analyst: May 1985, vol 110, s. 419 – 428.
- 18 Peristaltic and Sinusoidal Pumps – how they work. Verkkodokumentti. <<http://www.watson-marlow.com/us/support/Key-Facts/>> Watson-Marlow Pumps Group. Luettu 23.7.2012.
- 19 Peristaltic Pumps – A lot more than just heavy duty. 2012. Verkkodokumentti. <<http://www.verdeflex.com/news/single/artikel/new-dura-45/>> Verdeflex. Luettu 21.7.2012.
- 20 SFS-EN ISO 6878. Water quality – Determination of phosphorous – ammonium molybdate spectrometric method. Suomen standardoimisliitto. Vahvistettu 18.10.2004.
- 21 Ilola, R. 2012. Erikoislaboriomestari, Lammin biologinen asema, Helsingin yliopisto, Lammi. Keskustelu 9.8.2012.
- 22 Ordior Lachat OQ 8000 FIA-käyttöohje.
- 23 UV 1800. 2012. Verkkodokumentti. <<http://www.ssi.shimadzu.com/products/product.cfm?product=uv1800>> Shimadzu Scientific Instruments. Luettu 29.8.2012.

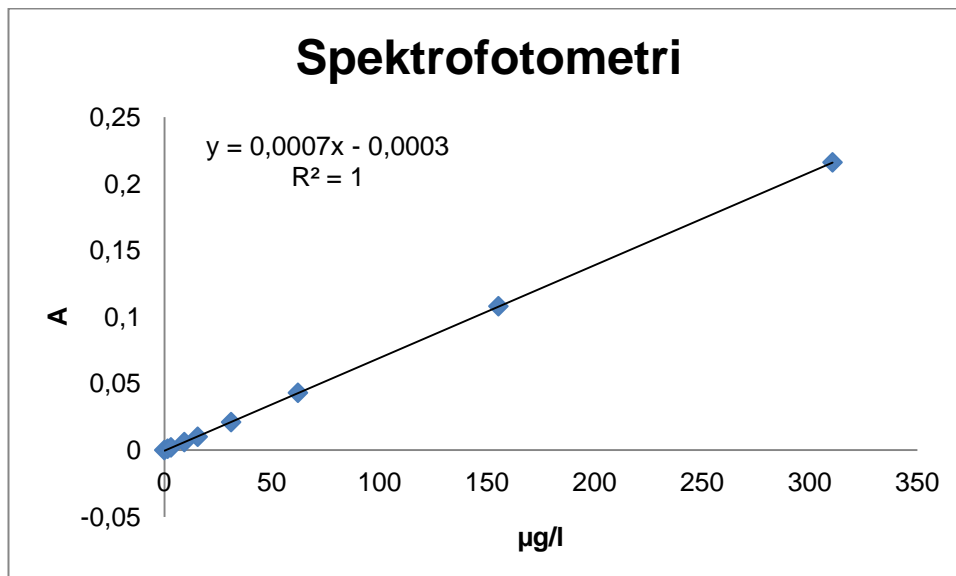
Kalibrointitulokset



Kuva 1. FIAN kalibrointisuora

Taulukko 3. Kalibroinnin tulokset

| Std | µg/l | area |
|-----|------|---------|
| 1 | 1,55 | 0,0509 |
| 1 | 1,55 | 0,04595 |
| 2 | 3,1 | 0,08398 |
| 2 | 3,1 | 0,08609 |
| 3 | 9,3 | 0,2135 |
| 4 | 15,5 | 0,3643 |
| 5 | 31 | 0,7251 |
| 6 | 62 | 1,436 |
| 7 | 155 | 3,626 |
| 8 | 310 | 7,219 |



Kuva 2. Spektrofotometrin kalibrintisuora

Taulukko 4. Kalibroinnin tulokset

| Std | µg/l | A0 |
|-----|--------|-------|
| 0 | 0 | 0 |
| 1 | 1,553 | 0,001 |
| 2 | 3,106 | 0,002 |
| 3 | 9,319 | 0,006 |
| 4 | 15,532 | 0,01 |
| 5 | 31,064 | 0,021 |
| 6 | 62,128 | 0,043 |
| 7 | 155,32 | 0,108 |
| 8 | 310,64 | 0,216 |

Tulostaulukot

Näissä taulukoissa on listattuna kunkin koeviikon tulokset mittauspäivien perusteella.

Taulukko 5. Ensimmäisen koeviikon tulokset

| Näyte | 11.7. Spek | 11.7. FIA | 12.7. Spek | 12.7. FIA | 13.7 Spek | 13.7. FIA | 31.7. Spek | 31.7. FIA |
|----------------|---------------|-----------|---------------|-----------|--------------|-----------|---------------|-----------|
| Mustajoki 1 | 17,486 | 13,05579 | 17,104 | 13,21702 | 6,017 | 7,130631 | 5,674 | 7,92093 |
| Mustajoki 2 | 17,771 | 12,79399 | 17,453 | 13,46809 | 6,282 | 7,022523 | 6,027 | 7,953488 |
| Mustajoki 3 | 17,508 | 12,7382 | 19,594 | 12,99574 | 6,149 | 7,031532 | 6,292 | 7,981395 |
| Löyttynoja 1 | 8,415 | 8,141631 | 8,541 | 8,67234 | 2,27 | 3,823874 | 3,201 | 4,689767 |
| Löyttynoja 2 | 8,306 | 8,175966 | 8,629 | 7,897872 | 2,865 | 3,902252 | 3,378 | 4,714419 |
| Löyttynoja 3 | 8,262 | 8,103004 | 8,585 | 8,319149 | 2,777 | 3,756306 | 3,334 | 4,495814 |
| Luhdanoja 1 | 18,055 | 15,98712 | 17,038 | 15,52766 | 9,654 | 11,35586 | 11,149 | 11,74884 |
| Luhdanoja 2 | 18,448 | 15,37339 | 17,038 | 15,82979 | 9,962 | 11,11261 | 11,679 | 11,65581 |
| Luhdanoja 3 | 18,361 | 15,91845 | 17,104 | 15,87234 | 10,117 | 11,22523 | 11,988 | 11,90233 |
| Koirans. oja 1 | 14,207 | 10,16738 | 13,5 | 10,88936 | 6,017 | 6,761261 | 6,314 | 6,776744 |
| Koirans. oja 2 | 13,901 | 10,03004 | 13,565 | 10,62979 | 5,709 | 6,423423 | 6,225 | 7,32093 |
| Koirans. oja 3 | 14,032 | 10,1588 | 13,762 | 10,78298 | 5,819 | 7,076577 | 6,534 | 6,981395 |
| Haarajoki 1 | 22,011 | 13,6824 | 17,454 | 13,68511 | 10,888 | 10,64865 | 10,553 | 10,84186 |
| Haarajoki 2 | 18,207 | 13,66524 | 17,476 | 13,64681 | 10,888 | 10,57658 | 11,06 | 10,75349 |
| Haarajoki 3 | 18,535 | 13,77682 | 17,563 | 13,3617 | 10,734 | 10,28378 | 11,149 | 11,11163 |

Taulukko 6. Toisen koeviikon tulokset

| Näyte | Spek 25.7 | FIA 25.7 | FIA 26.7 | FIA 27.7 | FIA 30.7 | FIA 31.7 |
|----------------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Mustajoki 1 | 17,106 | 11,89868 | 12,35091 | 11,53917 | 10,53555 | 6,353488 |
| Mustajoki 2 | 17,323 | 11,59471 | 12,04761 | 11,74194 | 10,72986 | 29,68837 |
| Mustajoki 3 | 17,824 | 12,05286 | 12,50475 | 12,05069 | 10,57346 | 8,637209 |
| Koirans. oja 1 | 15,539 | 11,39207 | 11,84541 | 12,61751 | 11,82938 | 6,897674 |
| Koirans. oja 2 | 15,582 | 11,04846 | 11,50255 | 12,7788 | 11,5782 | 7,148837 |
| Koirans. oja 3 | 15,735 | 11,46256 | 11,91575 | 12,87097 | 11,66825 | 7,148837 |
| Haarajoki 1 | 18,825 | 12,42731 | 12,87838 | 12,52535 | 11,21327 | 9,939535 |
| Haarajoki 2 | 18,847 | 12,36123 | 12,81244 | 12,34101 | 11,46919 | 9,64186 |
| Haarajoki 3 | 18,76 | 12,19383 | 12,64541 | 12,2765 | 11,4455 | 9,24186 |
| Lovo 3 m 1 | 2,721 | 0,123348 | 0,601425 | 1,499539 | 1,765403 | 1,136279 |
| Lovo 3 m 2 | 2,851 | 0,29163 | 0,769337 | 1,910138 | 1,645972 | 1,100465 |
| Lovo 3 m 3 | 2,634 | 0,264758 | 0,742524 | 0,527742 | 1,846445 | 1,406977 |
| Lovo pinta 1 | 2,59 | 0,282379 | 0,760107 | 1,641014 | 1,227962 | 1,914419 |
| Lovo pinta 2 | 2,807 | 0,296035 | 0,773733 | 1,739631 | 1,370616 | 1,795349 |
| Lovo pinta 3 | 2,546 | 0,34185 | 0,819447 | 1,658986 | 1,891943 | 1,623721 |
| Ormajärvi 1 | 1,784 | -0,55903 | -0,07946 | 0,468433 | 1,251659 | 1,804186 |
| Ormajärvi 2 | 1,784 | -1,39295 | -0,91154 | 0,116129 | -0,07626 | 1,567907 |
| Ormajärvi 3 | 1,763 | -0,37621 | 0,102963 | 0,334562 | 2,099052 | 1,320465 |

Taulukko 7. Kolmannen koeviikon alkumittaus

| Näyte | Spek 12.9 | FIA 12.9 |
|----------------|-----------|----------|
| Koirans. oja 1 | 11,249 | 9,932039 |
| Koirans. oja 2 | 11,708 | 11,57767 |
| Koirans. oja 3 | 11,796 | 9,296117 |
| Lovo pinta 1 | 2,408 | 2,33301 |
| Lovo pinta 2 | 2,276 | 2,221359 |
| Lovo pinta 3 | 2,692 | 2,369903 |
| Lovo pohja 1 | 1737,858 | 2382,699 |
| Lovo pohja 2 | 1769,284 | 2384,641 |
| Lovo pohja 3 | 1765,432 | 2380,272 |

Reagenssilista

Listassa on lueteltu opinnäytetyön liuosten valmistukseen käytetyt reagenssit, niiden molekyylikaavat, valmistajat, kataloginumerot sekä puhtausprosentit.

- Kaliumdivetyfosfaatti, KH_2PO_4 (Riedel-de Haën; 73320; 99,5 %)
- Rikkihappo, H_2SO_4 (Fluka; 4294M; 95 - 97 %)
- Askorbiinihappo, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ (Sigma-Aldrich; 82750; 99,7 - 100,5 %)
- Ammoniummolybdaatti, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Riedel-de Haën; 03350; 99 %)
- Kaliumantimonitartaatti, $\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2\cdot x\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich; 03818MA; 99+ %)
- Kloroformi, CHCl_3 (Riedel-de Haën; 8040S; 99,0 - 99,4 %)
- Natriumdodekyylisulfaatti, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{OSO}_2\text{ONa}$ (Fluka; 1112913 23904044; $\geq 98,0$ %)
- Fosfaattistandardi (Fluka; 49227; 326,3 ppm P)