

Opinnäytetyö (AMK)

Prosessi- ja materiaalitekniikka

2018

Pasi Laaksonen

# SULFAATINPELKISTYMISEN TUTKIMINEN HAPETTOMIEN OLOSUHTEIDEN TOIMINTAMALLILLA LABORATORIO- OLOSUHTEISSA

Pasi Laaksonen

# SULFAATINPELKISTYMISEN TUTKIMINEN HAPETTOMIEN OLOSUHTEIDEN TOIMINTAMALLILLA LABORATORIOOLOSUHTEISSA

Tämä opinnäytetyö liittyy Suomen ympäristökeskuksen ja Turun ammattikorkeakoulun yhteistyöprojektiin. Tarkoitus oli tutkia hapettomien olosuhteiden toimintamallilla luonnonveden sulfaatinpelkistymistä laboratorio-olosuhteissa. Opinnäytetyö jakautui kahteen osaan, hapettomien olosuhteiden toimintamallin toteuttamiseen ja sulfaatinpelkistymisen kannalta oleellisten laboratoriotulosten tulkintaan. Hapettomien olosuhteiden toimintamalli toteutettiin glovebox-tekniikalla. Suljettuna systeeminä käytettiin atmosfääriteltoja, joihin luotiin hapettomat olosuhteet typpikaasulla. Tässä opinnäytetyössä käsitellään erilaisia käytännön toteutuksessa huomioitavia asioita.

Laboratoriotutkimus käsitti yhteensä 28 koeyksikköä, jotka sisälsivät koevettä ja sedimenttiä Maarian altaalta, joka on tekojärvi Turun alueella. Koeyksiköihin luotiin eroavaisuuksia sulfaatti-, dekstroosi- ja formaliinilisäyksillä. Sulfaatti- ja sulfidipitoisuudet mitattiin koeyksiköistä kahdesti, ensimmäisen ja toisen näytteenottokerran välissä oli kahden kuukauden mittainen inkubaatiojakso hapettomissa olosuhteissa. Tämä opinnäytetyö käsittelee myös inkubaation aikana ilmenneitä, sulfaatinpelkistymiseen viittaavia visuaalisia muutoksia eri koeyksiköissä. Laboratoriotulosten perusteella sulfaatinpelkistymistä tapahtui selkeästi koeyksiköissä 1-12. Nämä koeyksiköt sisälsivät sekä koevettä että sedimenttiä, mutta eivät kuitenkaan olleet formaliinikäsitteltyjä. Tulosten perusteella mikrobitoiminnan katsottiin olevan merkittävässä roolissa sulfaatinpelkistymisen kannalta.

## ASIASANAT:

sulfaatinpelkistyminen, sulfaatti, sulfidi, inkubaatio, typpiatmosfääri, atmosfääritelto

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Chemical and Materials Engineering

2018 | 54

Pasi Laaksonen

# SULPHATE REDUCTION LABORATORY EXPERIMENT BY OXYGEN-FREE PROCEDURE

This thesis is related to a cooperation project between the Finnish Environment Institute and Turku University of Applied Sciences. The purpose was to study sulphate reduction occurring in natural waters by performing an oxygen-free procedure in a laboratory environment. The thesis is divided into two parts, discussing the execution of the oxygen free procedure, and reporting laboratory results affecting sulphate reduction, respectively the oxygen free procedure was created with glovebox technology. Atmospheric tents were used as isolation chambers and nitrogen gas was used to produce the oxygen-free atmosphere. Different practical aspects related to working with atmospheric tents are discussed in this thesis.

The laboratory research included a total of 28 test units which contained test water and sediment from Maarian allas, which is an artificial lake located in Turku. Differences were created by additions of sulphate, dextrose and formaline. Sulphate and sulfide concentrations were measured twice from the test units, and oxygen-free two-month incubation period was implemented before the second measurements. Visual changes, indicating to sulphate reduction, in the test units during the incubation, are also discussed in this thesis. According to the laboratory results, sulphate reduction occurred clearly in test units 1-12. These test units contained both water and sediment, and were not treated with formalin. The results showed that microbial activity was an important factor for sulphate reduction.

## KEYWORDS:

sulphate reduction, sulphate, sulfide, incubation, nitrogen atmosphere, atmospheric tent

# SISÄLTÖ

<b>1</b>	<b>JOHDANTO</b>	<b>8</b>
1.1	Opinnäytetyön tavoitteet	8
1.2	Tutkimuksen lähtökohdat	9
<b>2</b>	<b>SULFAATINPELKISTYMINEN</b>	<b>13</b>
2.1	Sulfaatti osana rikin kiertoa	13
2.2	Sulfaatinpelkistäjäbakteerit	17
<b>3</b>	<b>HAPETTOMAT OLOSUHTEET OSANA TUTKIMUSTA</b>	<b>22</b>
3.1	Glovebox-tekniikka	22
3.1.1	Historia	23
3.1.2	Merkitys sedimenttitutkimukselle	24
3.1.3	Typpikaasu	28
3.2	Hapettomien olosuhteiden toimintamalli	29
<b>4</b>	<b>LABORATORIOTUTKIMUS</b>	<b>34</b>
4.1	Koeyksiköt	34
4.1.1	Kokoaminen	34
4.1.2	Inkubaation valmistelut	37
4.1.3	Sulfaatinpelkistyminen inkubaation aikana	38
4.2	Tulokset	44
4.2.1	Sulfaatti ja sulfidi	44
4.2.2	Muiden tulosten merkitys sulfaatinpelkistykseen	47
	<b>YHTEENVETO</b>	<b>48</b>
	<b>LÄHTEET</b>	<b>50</b>

## LIITTEET

Liite 1. Tulokset ennen inkubaatiota määritetyille koeyksikkönäytteille

Liite 2. Tulokset ennen inkubaatiota määritetyille koevesi- ja sedimenttinäytteille

Liite 3. Tulokset inkubaation jälkeen määritetyille koeyksikkönäytteille

## KUVAT

Kuva 1 Fosforin vapautuminen sedimentistä sulfaattimäärän ollessa niukka (Lehtoranta;ym., 2/2013).....	11
Kuva 2 Fosforin vapautuminen sedimentistä sulfaattimäärän ollessa runsas (Lehtoranta;ym., 2/2013).....	12
Kuva 3 Sedimenttinäytteitä Saaristomereltä (Lehtoranta;ym., 2/2013) .....	13
Kuva 4 Rikin kierto pohjasedimentissä (Borg, 2014) .....	14
Kuva 5 Sulfaatin pelkistymistavat (Muokattu lähteestä Madigan & Brock, 2009) .....	17
Kuva 6 Soluseinän rakenne gram-positiivisella SRB-bakteerilla (Muokattu lähteestä Varjos, 2000) .....	19
Kuva 7 Soluseinän rakenne gram-negatiivisella SRB-bakteerilla (Muokattu lähteestä Varjos, 2000) .....	19
Kuva 8 Hahmotelma tutkimuksen kenttäolosuhteissa käytetystä atmosfäärilaatikosta (Burone;ym., 6/2005) .....	26
Kuva 9 Hahmotelma tutkimuksen laboratorio-olosuhteissa käytetystä atmosfäärilaatikosta (Burone;ym., 6/2005) .....	27
Kuva 10 Brasilialaisen sedimenttitutkimuksen tulokset.....	27
Kuva 11 Typpiatmosfäärin luominen atmosfääriltaan .....	30
Kuva 12 Ioninvaihtovälineistöä typpiatmosfäärissä .....	31
Kuva 13 Sulfidimittausvälineistöä typpiatmosfäärissä.....	31
Kuva 14 Tarpeelliset välineet näytteiden pipetointiin typpiatmosfäärissä.....	32
Kuva 15 Ruiskusuodattamista typpiatmosfäärissä .....	33
Kuva 16 Näytteitä ja suodatusvälineistöä tukialustalla typpiatmosfäärissä .....	34
Kuva 17 Hapen poisto koeyksiköistä typpikaasulla .....	37
Kuva 18 Koeyksiköt 1-9 inkubaation aloituspäivänä noin 10h kokoamisen jälkeen .....	39
Kuva 19 Koeyksiköt 10-18 inkubaatin aloituspäivänä noin 10h kokoamisen jälkeen ...	39
Kuva 20 Koeyksiköt 19-28 inkubaation aloituspäivänä noin 10h kokoamisen jälkeen ...	39

Kuva 21 Koeyksiköt 7-9 viikko 2.....	41
Kuva 22 Koeyksiköt 10-12 viikko 2.....	41
Kuva 23 Koeyksiköt 19-21 viikko 2.....	42
Kuva 24 Koeyksiköt 7-9 viikko 4.....	43
Kuva 25 Koeyksiköt 10-12 viikko 4.....	43

## KAAVIOT

Kaavio 1 Koeyksiköiden sulfaattipitoisuudet.....	46
Kaavio 2 Koeyksiköiden sulfidipitoisuudet .....	46

## TAULUKOT

Taulukko 1 Tunnettuja sulfaatinpelkistäjiä ja niiden ominaisuuksia. Ryhmä I edustaa epätäydellisiä ja ryhmä 2 täydellisiä hapettajia (Muokattu lähteestä Varjos, 2000). ....	21
Taulukko 2 Laboratoriotutkimuksen koeyksiköt. ....	36

## SANASTO JA LYHENTEET

SRB	Sulfaatinpelkistäjäbakteerit
Redox-potentiaali	Pelkistymispotentiaali
Elektronidonori	Elektronin luovuttaja
Elektroniakseptori	Elektronin vastaanottaja
Isolaatio	Eristäminen
Sedimentti	Kerrostunut pohja-aines luonnonvesissä
Koeyksikkö	1000 ml säilöpullo, jossa oli Maarian altaan vettä ja tietty sulfaatti ja hiililisäystaso, koeyksiköt 1-20 sisälsivät sedimenttiä ja 21-28 pelkästään koevettä
Tapettu kontrolli	Formaliinilisäyksellinen koeyksikkö
Inkubaatio	2 kuukauden ajanjakso, jossa koeyksiköitä säilytettiin valvotuissa olosuhteissa
Glovebox-tekniikka	Hapettomien olosuhteiden toimintamallin perusta
Atmosfäärilaatikko	Muotonsa säilyttävä suljettu systemi olosuhteiden isolaatioon
Atmosfääritelta	Suljettu systeemi, jonka muoto vaihtelee kaasutäytön ja tukirakenteiden perusteella
Tyypiatmosfääri	Typpikaasulla luodut olosuhteet, jotka sisälsivät happea korkeintaan 3 tilavuusprosenttia
SYKE	Suomen ympäristökeskus
LSVY	Lounais-Suomen vesi- ja ympäristötutkimus

# 1 JOHDANTO

## 1.1 Opinnäytetyön tavoitteet

Tämä opinnäytetyö jakautui kahteen osioon, joista ensimmäinen liittyi sulfaatinpelkistyksen tutkimiseen laboratorio-olosuhteissa. Laboratoriotutkimustulosten ja aikaisemman kirjallisuustiedon pohjalta oli tarkoitus pohtia, mitkä eri tekijät vaikuttivat sulfaatinpelkistymiseen koejakson aikana. Laboratoriotutkimukseen koottiin yhteensä 28 koeyksikköä, joiden sisältö vaihteli sulfaatti- ja orgaanisen hiilen pitoisuuksien mukaan. Tietyt koeyksiköt sisälsivät formaliinilisäyksen mikrobitoiminnan poistamiseksi. Koeyksiköissä oli myös sedimenttittömiä verrokkeja. Koeyksiköiden vesi ja sedimentti noudettiin Maarian altaalta. Kappale ”Laboratoriotutkimus” käsittelee tarkemmin koeyksiköiden kokoamista.

Koeyksiköistä otettiin vuorokausi kokoamisen jälkeen näytteet, joista analysoitiin sulfaatti- ja sulfidipitoisuuksien lisäksi liukoisen kokonaisfosforin, ammoniumtypen, nitraatin, mangaanin, raudan ja rikin pitoisuudet. Myös pH-arvot ja sähkönjohtavuudet mitattiin näytteistä. Näiden määritysten jälkeen koeyksiköistä poistettiin happi typpikaasulla ja ne laitettiin seuraavaksi kahdeksi kuukaudeksi pimeään huoneenlämpöön. Inkubaatiojakson aikana oli tarkoitus kiinnittää huomioita niihin koeyksiköiden visuaalisiin muutoksiin, jotka voisivat viitata sulfaatinpelkistymiseen. Näitä havaintoja käsitellään osakappaleessa ”Sulfaatinpelkistyminen inkubaation aikana”.

Samat määrytykset suoritettiin inkubaation jälkeen. Tulosten perusteella oli tarkoitus pohtia, mitkä eri tekijät vaikuttivat sulfaatinpelkistymiseen eri koeyksiköissä, mikäli sitä oli havaittavissa. Jos sulfaatinpelkistymistä ei ollut havaittavissa, tarkoitus arvioida, oliko syynä esimerkiksi formaliinilisäyksellisissä koeyksiköissä mikrobiologisen toiminnan mahdollinen puuttuminen.

Opinnäytetyön toinen osio liittyi sulfaattitutkimuksen kannalta oleellisen hapettomien olosuhteiden toimintamallin suunnitteluun, koska Turun ammattikorkeakoulun laboratoriotiloissa ei ole aikaisemmin tehty vesianalyysyjä hapettomissa olosuhteissa. Ennen inkubaatiota suoritettavat analyysit tehtiin hapen läsnä ollessa, mutta hapettomat mittaolosuhteet oli SYKE:n mukaan ehdottoman tärkeää ottaa käyttöön inkubaation jälkeisiin mittauksiin, koska esimerkiksi sulfidin ja ammoniumtypen arvioitiin hapettuvan herkästi hapen läsnä ollessa. Toimintamallin osalta päädyttiin käyttämään gloveboxtekniikkaa. Suljettuna systeeminä käytettiin atmosfääritelttoja. Hapettomat



olosuhteet järjestettiin typpikaasulla ja happipitoisuutta määritysten aikana seurattiin kannettavalla happimittarilla. Hapettomien olosuhteiden toimintamallia käsitellään osakappaleessa ”Hapettomien olosuhteiden toimintamalli”.

## 1.2 Tutkimuksen lähtökohdat

Makeiden vesistöjen rehevöitymistutkimuksissa on kiinnitetty huomiota hapettuneen rikkiyhdisteen eli sulfaatin rooliin rehevöitymisessä, koska aikaisemmat tutkimukset viittaavat sen lisäävän liukoisen fosforin vapautumista sedimenteistä. Makeisiin vesistöihin sulfaatti päätyy liukenevina mineraaleina ja hapettuneiden sulfidien myötä. Esimerkiksi maatalouden lannoitteet ja pesuaineet lisäävät makeiden vesistöjen sulfaattikuormaa (Lehtoranta;ym., 2/2013). Tämä johtuu siitä, että niiden valmistuksessa käytetään rikkihappoa, joka liittyy oleellisesti sulfaattikuormitukseen, koska sulfaatti on rikkihapon anioni. Rikkihappopäästöt kattavatkin ihmisten aiheuttamista sulfaattikuormituksista suurimman osan (Ekholm, 2017).

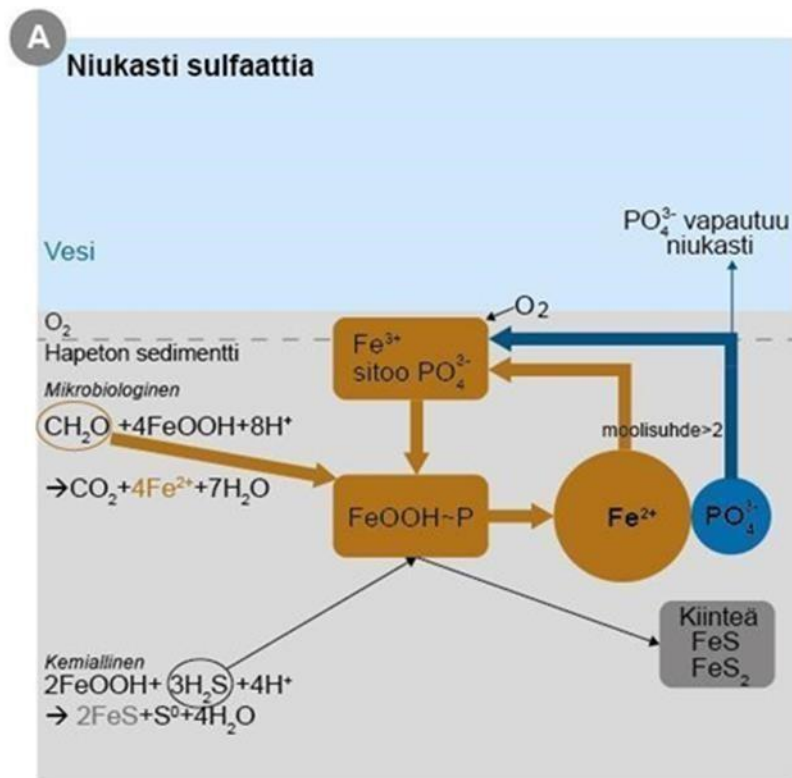
Sulfaatin ei olla ajateltu olevan sellaisenaan vesiekosysteemille haitallinen yhdiste, lukuun ottamatta niitä vesikasveja ja -eliöitä, joille sen olemassaolo on haitaksi. Ongelmia kuitenkin ilmaantuu jo siinä vaiheessa, kun olosuhteet muuttuvat hapettomiksi. Anaerobiset olosuhteet johtavat, mikrobien ja orgaanisen hiilen kanssa, sulfaatin mikrobiologiseen pelkistymiseen sulfidiksi, koska se toimii tällaisissa olosuhteissa elektroniakseptorina eli elektronin vastaanottajana. Puhutaan dissimilatorisesta sulfaatin pelkistymisestä. Tämän johdosta syntynyt rikkivety muodostaa esimerkiksi anaerobisille Itämeren alueille kerääntymiä pohjaa lähellä oleviin vesikerroksiin. Lisäksi se on bakteereille myrkyllistä jo pieninäkin pitoisuuksina. (Lehtoranta;ym., 2/2013) Myrkyllisyys perustunee siihen, että rikkivety läpäisee bakteerien solumembraanin (Varjos, 2000).

Tutkimuksen kannalta oleellisin huomio on kuitenkin se, että fosforin ja raudan biogeokemiallisten kiertojen muutokset johtuvat ainakin epäsuorasti rikin hapetus- ja pelkistymisreaktioista. Sulfaattikuormituksen huomattavin vaikutus on se, että sulfidit, jotka muodostuvat sulfaattien pelkistymisen seurauksena, katkaisevat liukoista fosforia sitovan raudan kierron sedimentissä, mistä seuraa, että sulfaatti luokitellaan rehevöitymistä sääteleväksi tekijäksi. Vaikka yhteys sulfaatin ja rehevöitymisen välillä on noussut esille tieteellisessä kirjallisuudessa jo pidemmän aikaa, sen yleinen tiedostaminen on vielä hataraa. Aikaisemmat tutkimukset eivät myöskään ole tarjonneet

aukotonta teoriaa sille, mikä tarkalleen on mekanismi sulfaatin ja rehevöitymisen välillä (Lehtoranta;ym., 2/2013).

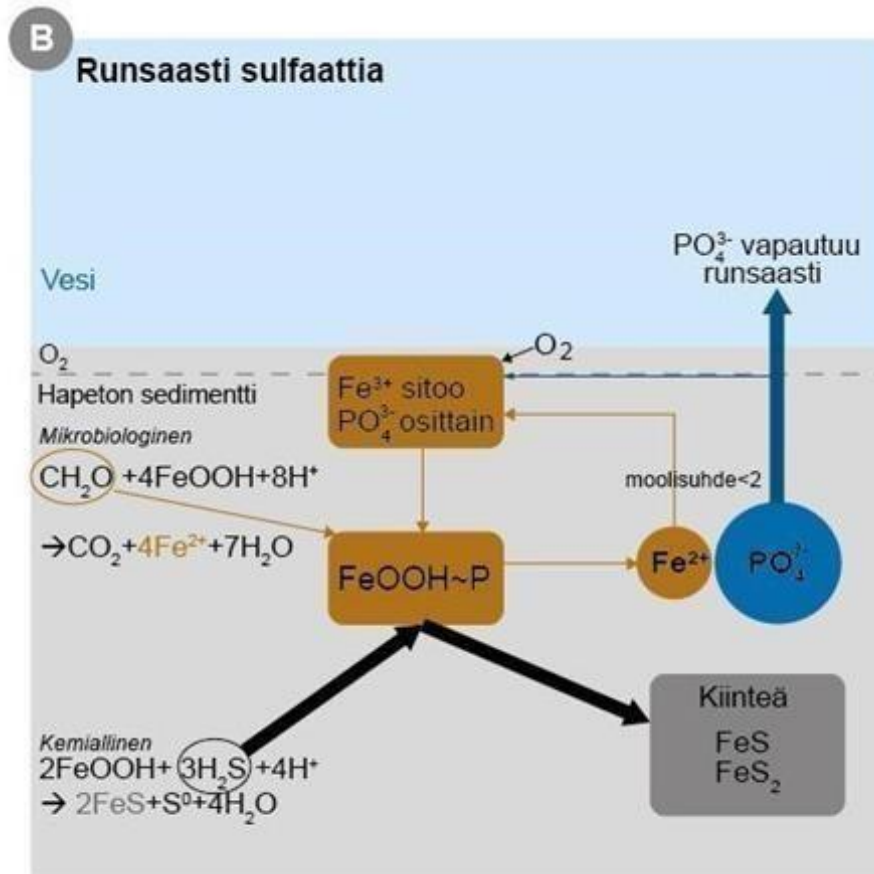
Sedimentin sisältäessä orgaanista hiiltä ja sulfaattia, voidaan raudan ja fosforin kierto jaotella kahteen ääriskenaarioon, joista ensimmäisessä sulfaattimäärä on niukka ja toisessa runsas. Molemmat tilanteet sisältävät sekä mikrobiologisia että kemiallisia reaktioita. Mikrobit pelkistävät sulfaatit sulfideiksi. Kun sulfaattia on niukasti, ovat mikrobiologisen raudan pelkistymisreaktion seuraukset riittävät pidättämään suurimman osan fosforista sedimentissä. Vastaavasti, kun sulfaattia on runsaasti, sedimentissä tapahtuu enemmän kemiallista reaktiota, joka edesauttaa fosforin vapautumista sedimentistä veteen, mikä lisää rehevöitymisriskiä (Lehtoranta;ym., 2/2013).

Mikrobiologisessa raudan pelkistysreaktiossa sedimentin rautaoksidien rauta pelkistyy orgaanisen aineksen vaikutuksesta kahdenarvoiseksi rautaioneiksi, samalla rautaoksideihin sitoutunut fosfori vapautuu reaktion myötä ortofosfaatteina. Sekä rautaionit että ortofosfaatit ovat vapautuneena sedimentin huokosvedessä. Diffuusion myötä rautaionit siirtyvät eli diffundoituvat sedimentin pintakerrokseen ja hapettuvat rautaoksideiksi, jotka sitovat ympäristöstään vapaita ortofosfaatteja. Lähtökohtaisesti, kun sulfaattia on niukasti, on mikrobiologinen raudan pelkistymisreaktio huomattavampi kemialliseen raudan pelkistysreaktioiden määrään verrattaessa ja liukoista rautaa syntyy runsaasti vapautuviin ortofosfaatteihin nähden (kuva 1). Näin ollen rauta pystyy sitomaan fosforia erittäin tehokkaasti, mistä edelleen seuraa se, että ortofosfaatteja voi vapautua sedimentistä veteen vain niukasti (Lehtoranta;ym., 2/2013).



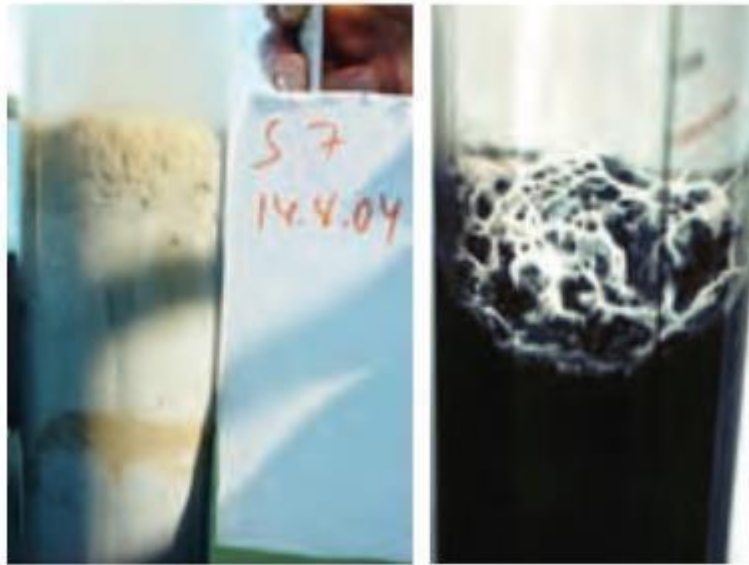
Kuva 1 Fosforin vapautuminen sedimentistä sulfaattimäärän ollessa niukka (Lehtoranta;ym., 2/2013)

Kemiallisessa raudan pelkistysreaktiossa mikrobien sulfaateista pelkistämät sulfidit reagoivat sedimentin rautaoksidien kanssa, muodostaen vapaiden rautaionien sijaan kiinteitä rautasulfideja. Mikrobiologisen reaktion tapaan rautaoksideista vapautuu sedimentin huokosveteen ortofosfaatteja. Kun sulfaattia on runsaasti (kuva 2), on lähtökohtaisesti tämä kemiallinen reaktio huomattavammassa asemassa mikrobiologiseen raudan pelkistysreaktioon nähden. Tämä tarkoittaa sitä, että liukoista kahdenarvoista rautaa on sedimentin huokosvedessä vain niukasti. Raudan kierto sedimentissä tyrehtyy ja ortofosfaatteja pääsee vapautumaan veteen runsaasti, koska liukoista rautaa on erittäin rajoitettu määrä sitomaan sitä (Lehtoranta;ym., 2/2013).



Kuva 2 Fosforin vapautuminen sedimentistä sulfaattimäärän ollessa runsas (Lehtoranta;ym., 2/2013)

Kuvassa 3 esitetään kahta eri sedimenttinäytettä Saaristomereltä, vasemman puoleisen näytteen ruskea pintakerros kertoo sen sisältävän runsaasti rautaoksideja, jotka kykenevät sitomaan fosforia sedimentin huokosvedestä. Oikeanpuoleinen näyte on värjäytynyt mustaksi runsaan sulfaatinpelkistymisen myötä syntyneiden sulfidien takia, tällaisella sedimentillä fosforin sitomiskyky on olematonta (Lehtoranta;ym., 2/2013).



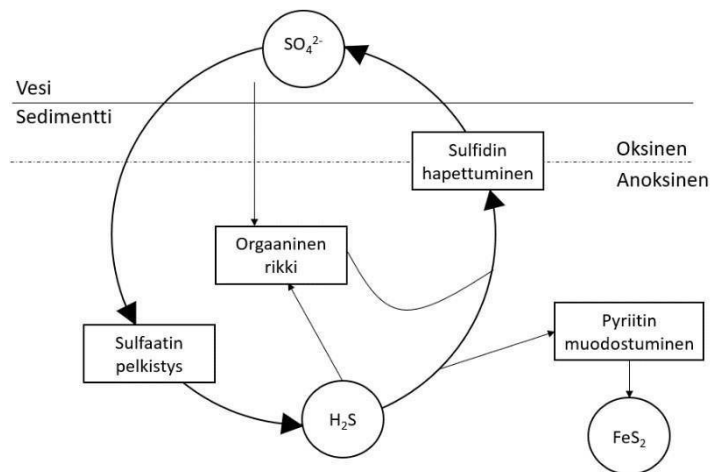
Kuva 3 Sedimenttinäytteitä Saaristomereltä (Lehtoranta;ym., 2/2013)

## 2 SULFAATINPELKISTYMINEN

### 2.1 Sulfaatti osana rikin kiertoa

Rikki on yksi luonnossa esiintyvistä yleisistä alkuaineista. Sitä on olemassa niin kaasumaisessa, nestemäisessä, kiinteässä, orgaanisessa kuin epäorgaanisessakin muodossa. Hapetusluvultaan rikki voi olla -2 tai +6. Hapettuneimmassa muodossaan rikki on sulfaattina, joka on rikkioksidianionien pysyvin muoto. Mikro-organismeille rikki on elintärkeä, niiden metabolisissa reaktioissa tarvittava alkuaine. Bakteerit tarvitsevat rikkiä esimerkiksi assimilatoriseen sulfaatinpelkistykseen. Ihmiset ovat toiminnallaan lisänneet luonnon eri rikkiyhdisteiden määrää. Esimerkiksi polttoaineteollisuuden fossiiliset polttoaineet muodostavat rikkiyhdisteitä palamistuotteina (Varjos, 2000).

Happosateiden koetellessa maailmaa 1970-luvulla, kiinnostui ympäristötutkimus rikin kierrosta ja sulfaateista (Ekholm, 2017). Sulfaatinpelkistyminen on biologinen ilmiö ja se on näkynyt esimerkiksi korroosio-ongelmina viemäreissä. Luonnon vesistöissä sulfaatinpelkistymistä tapahtuu pohjasedimentin hapettomissa olosuhteissa. Ilmiöllä on merkittävä rooli rikin kiertokulussa ja pelkistykseen osallistuvan orgaanisen materiaalin mineralisaatiossa eli muuttumisessa orgaanisesta aineesta epäorgaaniseksi. Kuva 3 hahmottelee rikin kiertoa järvien sedimentissä (Borg, 2014).



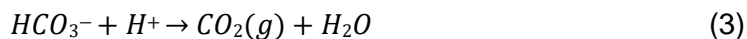
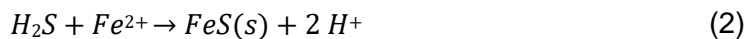
Kuva 4 Rikin kierto pohjasedimentissä (Borg, 2014)

Sulfaatinpelkistys voidaan jakaa kahteen eri kategoriaan: assimilatorinen ja dissimilatorinen sulfaatinpelkistys. Assimilatorisessa pelkistymisessä sulfaatti hajoaa rakenneosikseen, tämä reaktio vaatii myös energiaa. Se on myös yleisempi sulfaatin pelkistysmuoto. Kun puhutaan sulfaatinpelkistäjäorganismeista, liittyvät ne dissimilatoriseen pelkistymiseen. Tässä reaktiossa organismit pyrkivät tuottamaan energiaa aineenvaihduntaansa. Organismit muodostavat orgaanisesta yhdisteestä divetyksulfideita ja vetykarbonaattia reaktion 1 mukaisesti (Borg, 2014):

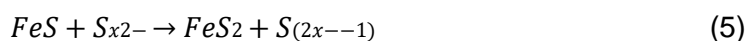


Reaktio 2 kuvaa, kuinka syntynyt sulfidi saostaa liuennutta kaksiarvoista rautaa rautasulfideiksi, tämän yhteydessä reaktiossa 1 syntynyt vetykarbonaatti neutraloi

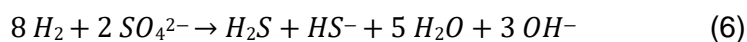
rautasulfidien muodostumisen yhteydessä syntyvän happamuuden, kuten reaktio 3 osoittaa (Borg, 2014):



Sulfidit kykenevät saostamaan myös muita kahdenarvoisia metalli-ioneita. Muodostuneet rautasulfidit voivat reagoida edelleen pyriitiksi, kun saatavilla on polysulfideita tai alkuainerikkiä, kuten reaktiot 4 ja 5 osoittavat (Borg, 2014):



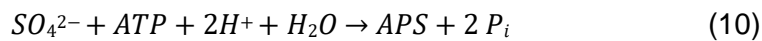
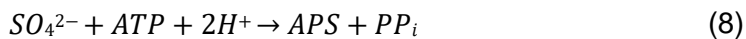
Sulfaatinpelkistys vaatii onnistuakseen elektronidonorin, hiiltä ja hapettomat olosuhteet. Hapettomien olosuhteiden merkitys liittyy redox-potentiaaliin, jonka täytyy olla riittävän alhainen, jotta sulfaatin pelkistys olisi mahdollinen. Sekä elektronien että hiilen lähteenä voivat toimia molekyylit, jotka ovat orgaanisia. Vaihtoehtoisesti vety voi toimia elektronien lähteenä, mutta tällöin hiili on saatava muualta, esimerkiksi hiilidioksidista tai hiilimonoksidina. Vedyn toimiessa substraattina, korvautuvat reaktiot 1 ja 3 reaktioilla 6 ja 7. Divetyysulfidin lisäksi syntyy vetysulfidi-ioneita ja hydroksidi-ioneita, jotka muodostavat jälkimmäisessä reaktiossa vetyionien kanssa vettä (Borg, 2014):



Sulfaatin pelkistyminen sulfidiksi edellyttää 8 elektronin vastaanoton. Kemiallisesti sulfaatti on melko stabiili, eikä sen pelkistäminen onnistu ennen sen aktivoimista. Sulfaatti voi aktivoitua kahdella eri tavalla, nämä tavat määrittävät myös sen, onko kyseessä assimilatorinen vai dissimilatorinen sulfaatinpelkistyminen. Ensin mainitussa

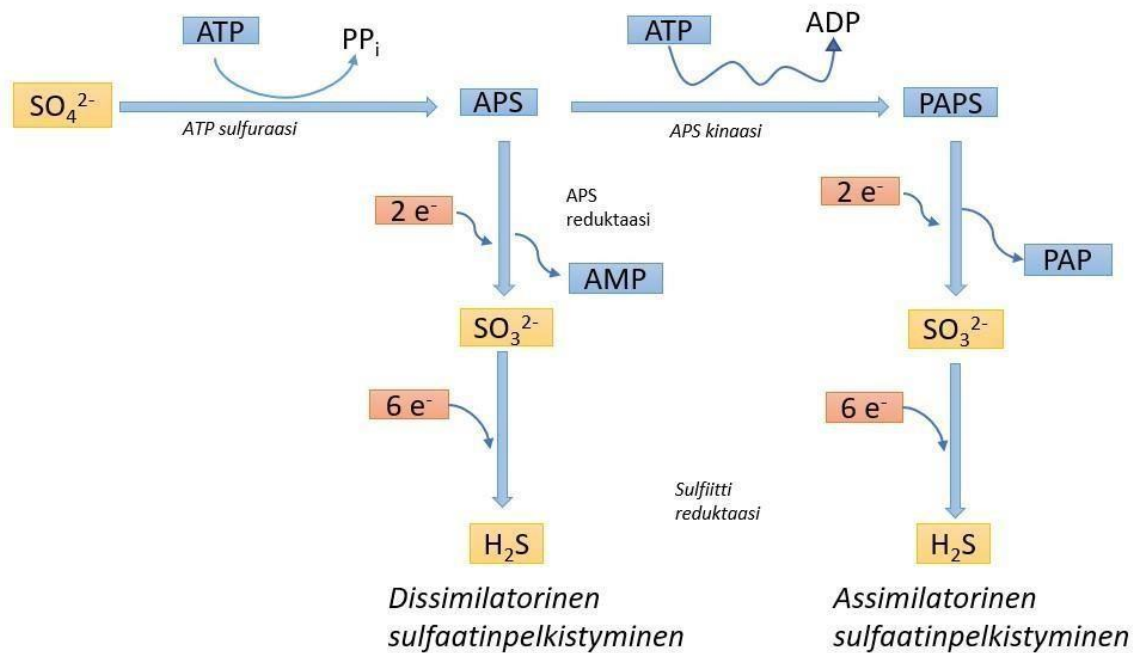
tapauksessa sulfaatti on aktivoituna muotoon APS (adenosiinifosfosulfaatti) ja jälkimmäisessä PAPS (fosfoadenosiinifosfosulfaatti) (Madigan;ym., 2009).

Aktivoinnin suorittaa katalysoitu ATP (adenosiinitrifosfaatti) sulfurylaasi, jossa sulfaattiioni kiinnittyy ATP:n fosfaattiin, muodostaen adenosiinifosfosulfaatin (APS), lisäksi sulfyraasissa muodostuu pyrofosfaattia (PPi). Jos sulfaatti tarvitsee aktivoida assimilatoriseen pelkistykseen, saa APS yhden fosfaatin lisää ylimääräiseltä ATP:ltä, muuttuen fosfoadenosiinifosfosulfaatiksi (PAPS), kyseessä on tällöin APS kinaasi, ylimääräisen ATP:n luovuttaessa fosfaatin, jää siitä jäljelle ADP (adenosiinidifosfaatti) (Madigan;ym., 2009). Sulfaatin mahdolliset pelkistymistuotteet ovat sulfidi tai rikkivety. Tapahtumapaikkana sulfatinpelkistykselle toimii bakteerin sytoplasma, mikä edellyttää sen, että sulfaatin pitää läpäistä solumembraani. APS syntyy reaktioiden 8 ja 9 mukaisesti, reaktio 10 on näiden kahden summa (Varjos, 2000):



Dissimilatorisessa sulfaatinpelkistymisessä, APS:n sisältämä sulfaatti pelkistyy APS reduktaasin myötä ensin suoraan sulfiitiksi ( $SO_3^{2-}$ ), sillä se vastaanottaa 2 elektronia. Samalla rakenteesta irtoaa AMP (adenosiinimonofosfaatti). Myös assimilatorisessa reaktiossa sulfaatti pelkistyy sulfiitiksi, tässä tapauksessa PAPS hajoaa sulfiitiksi ja PAP:ksi (fosfoadenosiinifosfaatti). Molemmassa reaktiossa sulfidit muodostuvat sulfiitista sulfiittireduktaasilla, jonka aikana sulfiitti vastaanottaa loput 6 elektronia ja pelkistyy sulfidiksi. Assimilatorisessa sulfaatinpelkistyksessä muodostuneet divetyksulfidit muuttuvat välittömästi aminohappomuotoon ja muiksi orgaanisiksi rikkiyhdisteiksi (Madigan;ym., 2009). Sulfaatinpelkistymistavat on esitelty kuvassa 5.





Kuva 5 Sulfaatin pelkistymistavat (Muokattu lähteestä Madigan & Brock, 2009)

## 2.2 Sulfaatinpelkistäjäbakteerit

Sulfaatti ja rikki ovat elektroniakseptoreita laajalle anaerobiselle *Deltaproteobakteeriryhmälle*, joka hyödyntää orgaanisia yhdisteitä tai vetyä elektronidonoreina, sulfaatin ja rikin pelkistyminen tuottavat molemmat sulfideita. Tästä bakteeriryhmästä tunnetaan yli 40 sukua, jotka jaotellaan dissimilatiivisiin sulfaatin- ja rikinpelkistäjäbakteereihin. Dissimilatiivinen pelkistyminen tarkoittaa sulfaatin ja rikin käyttöä energiantuottamiseen (Madigan;ym., 2009).

Sulfaatinpelkistäjäbakteerit voidaan jaotella ryhmiin 1 ja 2. Ryhmä 1 hyödyntää elektronidonoreina laktaattia, pyruvaattia, etanolia ja tiettyjä rasvahappoja sulfaattien pelkistämiseksi sulfideiksi. Ryhmä 2 on erikoistunut rasvahappojen hapettamiseen. Sulfaatinpelkistäjäbakteerit ovat pitkälti obligaatteja eli ehdottomia anaerobeja (Madigan;ym., 2009).

Sulfaatinpelkistäjäbakteerit ovat levittäytyneet laajalti vesien ja maaperän alueille, jotka ovat mikrobiologisen hajoamisen myötä muuttuneet hapettomiksi. *Desulfovibrio* on

tutkituin SRB-suku, jota esiintyy yleisesti vesistöjen sedimenteissä, jotka sisältävät runsaasti orgaanista materiaalia ja riittävät pitoisuudet sulfaattia (Madigan;ym., 2009).

Dissimilatiiviset rikinpelkistäjäbakteerit kykenevät pelkistämään alkuainerikkiä sulfideiksi, mutta ne eivät kuitenkaan pysty pelkistämään sulfaatteja, kuitenkin useat sulfaatinpelkistäjäbakteerit pystyvät pelkistämään sulfaatin lisäksi myös alkuainerikkiä. *Desulfuromonas*-lajit kasvavat anaerobisesti yhdistämällä asetaatin tai etanolin hapettamisen rikin pelkistämiseen sulfideiksi. Rikinpelkistäjäbakteerit esiintyvät pitkälti samoilla alueilla kuin sulfaatinpelkistäjäbakteerit. Yleensä ne tekevät yhteistyötä sulfideita rikiksi hapettavien bakteerien kanssa, esimerkki tällaisesta ryhmästä on niin kutsuttu ”vihreä rikkibakteeristo”. Näiden kahden bakteerisuvun yhteistyö aiheuttaa rikin anaerobisen kierron, jossa rikin muoto vaihtelee sulfidin ja alkuainerikin välillä (Madigan;ym., 2009).

SRB-suvut ovat elinympäristöiltään varsin moninainen mikrobiryhmä, joka saattaa edustaa jopa maapallomme varhaisimpia eliömuotoja. Tämä mikrobiryhmä menestyy niin kylmissä kuin termofiilisissäkin olosuhteissa, esimerkki kuumissa lähteissä. Luonnonvesissä sulfaatinpelkistäjiä esiintyy pohjasedimentissä, kosteikoissa, liejukoissa ja soilla (Vestola;ym., 2008).

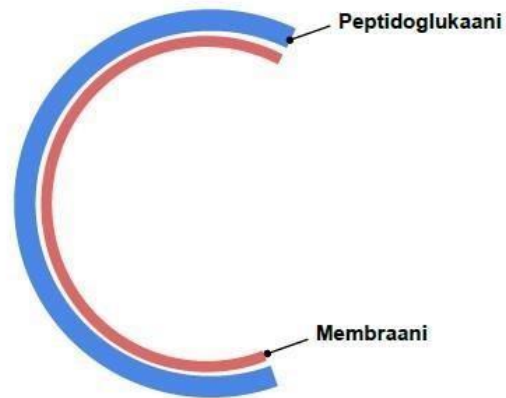
Rikin kiertokulkuun osallistumisen lisäksi sulfaatinpelkistäjät ovat merkittävässä roolissa esimerkiksi orgaanisen aineksen kierrossa. Tälle mikrobiryhmälle on ominaista orgaanisten ja epäorgaanisten yhdisteiden hengittäminen anaerobisesti, käyttämällä elektronien vastaanottajina sulfaatteja (Vestola;ym., 2008).

Sulfaatinpelkistäjät voidaan jakaa kahteen ryhmään: epätäydellisiin ja täydellisiin hapettajiin. Epätäydelliset hapettajat osallistuvat orgaanisten happojen ja alkoholien asetaatiksi hapettamiseen. Toinen ryhmä hengittää orgaanisia yhdisteitä hiilidioksidiksi (Vestola;ym., 2008).

Sulfaatinpelkistäjät voivat olla soluseinärakenteensa perusteella gram-positiivista tai gram-negatiivista sukua. Kuvista 6 ja 7 näkee eroavaisuuden näiden kahden välillä (Varjos, 2000). Gram-negatiivisella bakteerilla on yksi peptidoglukaanikerros, kun taas gram-positiivisella bakteerilla näitä on useampia. Gram-positiivinen bakteeri koostuu lisäksi teikkohapoista, proteiineista ja polysakkarideista. Gram-negatiivisella suvulla on peptidoglukaanikerroksen vieressä biologinen lipopolysakkaridikerros, näiden kahden kerroksen väliin jäävä tila on periplasmaa (Solunetti, 2018). Vielä 26 vuotta sitten ei

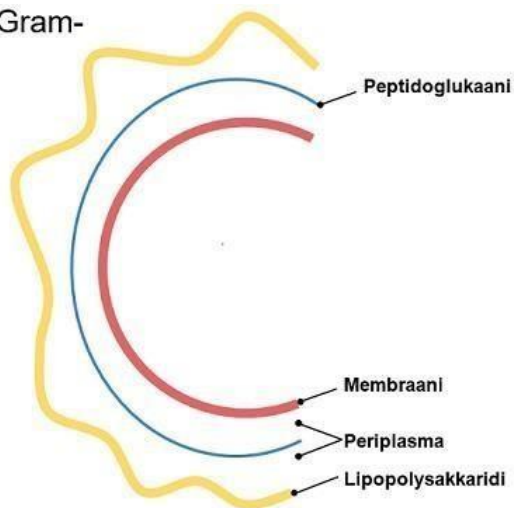
tunnettu kuin yksi gram-positiivinen sulfaatinpelkistäjä-suku: *Desulfomaculum* (Varjos, 2000).

Gram+



Kuva 6 Soluseinän rakenne gram-positiivisella SRB-bakteerilla (Muokattu lähteestä Varjos, 2000)

Gram-



Kuva 7 Soluseinän rakenne gram-negatiivisella SRB-bakteerilla (Muokattu lähteestä Varjos, 2000)

Bakteerien kasvu edellyttää tietyntyyppiset olosuhteet. Ympäristön keskeisimpiä muuttujia ovat happi- ja suolapitoisuuden lisäksi vallitseva pH, lämpötila ja paine. Lämpötilan suhteen eri organismit voidaan jaotella psykro-, meso- ja termofiileiksi (Varjos, 2000). Neljänneksi ryhmäksi luokitellaan hypertermofiilit. Psykrofiilit menestyvät 0-15 °C:ssa, mesofiilit noin 37 °C:ssa, termofiilit yli 55 °C:ssa ja hypertermofiilit saattavat elää vielä jopa yli 100 °C:ssa. Esimerkiksi *E. coli* luokitellaan mesofiiliksi, jonka ihanteellisissa olosuhteissa lämpötila on 39 °C (Solunetti, 2018). Sulfaatinpelkistäjäbakteereita esiintyy sekä mesofiilisinä että termofiilisinä mikro-organismeina, jaottelu tapahtuu niitä parhaiten suosivien lämpötilojen perusteella (Varjos, 2000).

Bakteerit jaotellaan myös sen mukaan, miten ne tarvitsevat ja sietävät happea: hapestariippuvaiset aerobit, hapestahyötyvät mutta myös hapettomasti elävät fakultatiiviset aerobit, pienellä happimäärällä menestyvät mikroaerofiilit sekä viimeinen, anaerobisissa olosuhteissa elävät ehdottomat anaerobit, jotka eivät siedä hapellisia olosuhteita. Sulfaatinpelkistäjäbakteerit edustavat ehdottomia anaerobeja, jotka vahingoittuvat tai jopa kuolevat hapellisissa olosuhteissa (Varjos, 2000).

Sulfaatinpelkistäjäbakteerit käyttävät nimensä mukaisesti sulfaattia elektroniakseptorina. Elektronidonoriina SRB:t voivat hyödyntää muun muassa rasvahappoja, alkoholeja ja vetyä. Vesistöjen hapettomien olosuhteiden lisäksi sulfaatinpelkistäjäbakteereita voi esiintyä myös maaperässä (Varjos, 2000).

Sulfaatinpelkistäjäbakteerit jakautuvat ensisijaisen ravintoaineen, eli hiilen ja energian lähteen, perusteella kahteen ryhmään: epätäydellisiin ja täydellisiin hapettajiin. Epätäydelliset hapettajat muodostavat asetaatteja orgaanisista pitkäketjuisista hapoista ja alkoholeista. Täydelliset hapettajat hengittävät orgaanisia yhdisteitä, kuten asetaatteja, muodostaen hiilidioksidia (Varjos, 2000).

Vuoteen 1992 mennessä erilaisia dissimilatorisia sulfaatinpelkistäjäbakteerisukuja oli tunnistettu kahdeksantoista. Suvut määritetään ensisijaisesti SRB-ominaisuuksien, eli niiden substraatin käytön, morfologian, biokemiallisen tyypityksen ja genetiikan perusteella. Esimerkiksi sulfaatinpelkistäjäbakteerin rasvahappokoostumus liittyy biokemialliseen tyypitykseen. Taulukossa 1 on esitelty, miten nämä 18 sukua on vielä jaoteltu kahteen eri ryhmään eli epätäydellisiin ja täydellisiin hapettajiin. Ensimmäinen ryhmä muodostaa sulfaatista rikkivetyä, käyttäen esimerkiksi laktaattia elektronidonorinaan. Toinen ryhmä tuottaa sulfideja, pelkistämällä sulfaatteja. Toinen ryhmä hyödyntää toiminnassaan eritoten asetaattia (Varjos, 2000).

Taulukko 1 Tunnettuja sulfaatinpelkistäjiä ja niiden ominaisuuksia. Ryhmä I edustaa epätäydellisiä ja ryhmä 2 täydellisiä hapettajia (Muokattu lähteestä Varjos, 2000).

Ryhmä	Sulfaatinpelkistäjä suku	Ominaisuuksia
I	<i>Desulfovibrio</i>	Sauvoja, gram-negatiivinen, 12 lajia
	<i>Desulfomicrobium</i>	Sauvoja, gram-negatiivinen, 2 lajia
	<i>Desulfobotulus</i>	Vibrio, gram-negatiivinen, 1 laji
	<i>Desulfotomaculum</i>	Sauvoja, gram-positiivinen, 4 lajia
	<i>Desulfomonile</i>	Sauvoja
	<i>Desulfobacula</i>	Soikeita ja kokkeja, 1 laji
	<i>Archaeoglobulus</i>	Arkki, 2 lajia, optimilämpötila 83 °C
	<i>Desulfobulus</i>	Soikeita, gram-negatiivinen, 3 lajia
	<i>Thermodesulfobacterium</i>	Pieniä sauvoja, gram-negatiivinen, termofiilinen
II	<i>Desulfobacter</i>	Sauvoja, gram-negatiivinen, 4 lajia
	<i>Desulfobacterium</i>	Sauvoja, 3 lajia
	<i>Desulfococcus</i>	Pallomaisia, gram-negatiivinen, 2 lajia
	<i>Desulfonema</i>	Suuria, gram-negatiivinen, 2 lajia
	<i>Desulfosarcina</i>	Gram-negatiivinen, 1 laji
	<i>Desulfoarculus</i>	Vibrio, gram-negatiivinen
	<i>Desulfacinum</i>	Soikeita ja kokkeja, gram-negatiivinen
	<i>Desulforhabdus</i>	Sauvoja, termofiilinen
	<i>Thermodesulfoforhabdus</i>	Gram-negatiivinen, termofiilinen

Sulfaatinpelkistäjät tarvitsevat kasvaakseen ja toimintansa ylläpitämiseen tietyntyyppiset olosuhteet, jonka muuttujia ovat vallitsevan pH:n ja lämpötilan lisäksi elektronidonorit, muut ravinteet ja redox-potentiaali. Lisäksi inhibiittorit ja muiden organismien läsnäolo voivat vaikuttaa sulfaatinpelkistäjien toimintaan. Kun huomioidaan muut anaerobisissa olosuhteissa elävät bakteerit, vaikuttavat vallitsevien olosuhteiden sulfaatti- ja orgaanisen aineksen pitoisuudet siihen, minkälainen kilpailukyky SRB-suvuilla on niitä vastaan. Olosuhteissa vallitseva pH harvemmin estää sulfaatinpelkistäjiä toimimasta, sillä ne yleensä kestävät vaihtelua 5-8,5 pH:n väliltä. Redox-potentiaalin on oltava alle 100 mV, jotta sulfaatinpelkistäjien toiminta olisi mahdollista, yleensä se riittää, että

olosuhteet ovat hapettomat ja sisältävät sulfidi-ioneita. Hapettomat olosuhteet ovat ekologiselta näkökulmalta biologisen sulfaatinpelkistymisen selkäranka (Borg, 2014).

Inhibiittorit voivat rajoittaa sulfaatinpelkistymistä. Rikkivety on huomattavin SRB-sukujen toimintaa rajoittava tekijä, sitä syntyy etenkin sulfaatinpelkistymisen myötä. Lisäksi kadmiumin kaltaiset raskasmetallit ja molybdaatti ovat SRB-sukujen toimintaa mahdollisesti inhihoivia tekijöitä (Borg, 2014).

Sulfaatinpelkistyminen on myös riippuvainen muista saatavilla olevista elektroninvastaanottajista, sillä sulfaatti ei ole kovinkaan suosiollinen. Suosiollisin elektroninvastaanottaja on nitraatti, jonka jälkeen käytetään järjestyksessä mangaanioksidia ja rautaoksidia. Vasta näiden loppumisen jälkeen alkaa sulfaatinpelkistys. Viimeisenä elektroninvastaanottajalistalla on karbonaatti (Borg, 2014).

### 3 HAPETTOMAT OLOSUHTEET OSANA TUTKIMUSTA

#### 3.1 Glovebox-tekniikka

Tieteellisissä tutkimuksissa on olemassa materiaaleja ja käytännönkokeita, jotka edellyttävät tietynlaisia, kontrolloitavissa olevia olosuhteita. Tällaisiin tilanteisiin on kehitetty olosuhteiden isolaatioon mahdollistava glovebox-tekniikka, joka mahdollistaa sen, että tutkijat kykenevät käsittelemään myös sellaisia materiaaleja, joita on välttämätöntä pitää tarkoin kontrolloiduissa olosuhteissa. Ylipaineistettu suljettu systeemi voi suojata materiaaleja esimerkiksi ilmankosteudelta. Glovebox-tekniikan käyttäjäkuntaan kuuluu erilaisia tieteellisiä laitoksia, kuten lääketieteelliset tutkimuslaboratoriot (Terra Universal, 2014).

Sana "glovebox" merkitsee atmosfäärilaatikkoa, joka pitää sisällään suljetun systeemin ja jonka valmistuksessa on käytetty esimerkiksi akryyliä, PVC-muovia tai ruostumatonta terästä. Lisäksi atmosfäärilaatikon rakenteisiin kuuluu portteja yhdelle tai useammalle hansikasarille, joiden kautta on mahdollista käsitellä sen sisältöä (Terra Universal, 2014).

Glovebox-tekniikka voidaan karkeasti jaotella isolaatioon ja kontrollointiin. Isolaatio suojaa atmosfäärilaatikon sisällä olevaa näytettä ulkopuoliselta ympäristöltä ja kontrollointi suojaa ulkopuolista ympäristöä näytteeltä. Isolaatioon tähtäävään

atmosfääriilaatikkoon muodostetaan ylipaine, ylimäärä kaasua poistuu ympäröivään ympäristöön venttiilien kautta. Kontrollointiin mahdollistavissa atmosfääriilaatikoissa on alipaine. Siitä poistuvat kaasut ohjataan ulkopuoliseen keräysyksikköön tai suodattimeen, koska esimerkiksi sen sisällä syntynyttä haitallista pölyä tai höyryä ei terveyssyistä ole turvallista vapauttaa sellaisenaan atmosfääriilaatikkoon ympäröivään ympäristöön (Terra Universal, 2014).

### 3.1.1 Historia

Glovebox-tekniikkaa on tietävästi kehitetty alkujaan 1940-luvulla militaarillisille laitoksille, jotka suorittivat tutkimuksia radioaktiivisilla materiaaleilla. Atmosfääriilaatikoiden materiaalina käytettiin tuolloin pääasiassa terästä ja ne sisälsivät pienehkön ikkunan, josta oli mahdollista nähdä niiden sisältö. Myös hansikasparille rakennetut portit olivat suhteellisen kapeita. Näillä ratkaisuilla pyrittiin pienentämään tutkijoiden altistumista atmosfääriilaatikoiden haitalliselle sisällölle. Myöhemmin hansikasporteja laajennettiin helpottamaan työskentelyä, joka näkyi esimerkiksi työergonomian kohenemisena käsien liikkuvuuden paranemisen myötä (Terra Universal, 2014).

Glovebox-tekniikan potentiaalia erilaisten materiaalien käsittelyssä alettiin hyödyntää toista maailmansotaa edeltävinä vuosina nousujohteisesti, ennen kaikkea lääketeollisuudessa. Rokotteiden ja lääkkeiden tuottaminen helpottui huomattavasti, koska gloveboxtekniikan tarjoamat isolaatiomahdollisuudet mahdollistivat erilaisten virusten ja patogeenien käsittelyn farmaseuttisissa tutkimuksissa. Myöhemmin 1960- ja 1970-luvuilla glovebox-tekniikkaa alettiin hyödyntää myös NASA:n tutkimuskeskuksissa, esimerkiksi kuusta tuotujen kiviläytöiden käsittelyyn (Terra Universal, 2014).

Kehitystä glovebox-tekniikassa on vuosien saatossa tapahtunut huomattavasti. Alkujaan se käsitti yksinkertaisen muovihansikkailla ja pienehköllä ikkunalla varustetun teräslaatikon, mutta tänä päivänä se tarjoaa ratkaisuja lukuisiin monimutkaisiin käytännön sovelluksiin, kuten sairaaloiden keskoslasten hoitolaitteistoon. Mutta vaikka glovebox-tekniikka tarjoaa atmosfääriilaatikoita lukuisiin eri käyttötarkoituksiin, on niiden perus käyttöidea tiettyjen olosuhteiden luomisesta ja kontrolloimisesta säilynyt samana (Terra Universal, 2014).

Atmosfääriilaatikoiden materiaalivalinnat ovat kokeneet merkittäviä muutoksia vuosikymmenten aikana. Perinteisempiä materiaaleja ovat olleet teräs, muovi ja kumi.

Materiaalitekniikan kehityksen myötä markkinoille on ilmestynyt myös sellaisina atmosfääri laatikoita, joiden valmistuksessa on käytetty materiaalina esimerkiksi erilaisia polymeerejä, ruostumatonta terästä ja kuitulasia (Terra Universal, 2014).

Tämän päivän atmosfääri laatikot valmistetaan pitkälti kohteen vaatimien edellytyksien mukaisesti. Lähtökohtia voivat olla esimerkiksi tilavaatimukset, käyttötarkoitus ja tulevan käyttäjäkunnan tarpeisiin soveltuvat ergonomiset vaatimukset. Lopputuote voi olla pienestä, PVC-muovista valmistetusta kannettavasta avaruussukkulaolosuhteisiin mitoitettua atmosfääri laatikosta aina massiivisiin, useamman tutkijan käyttötarpeet täyttävä lääketieteellisen tutkimuskeskuksen atmosfääri laatikoihin (Terra Universal, 2014).

Myös glovebox-tekniikassa käytettyjen suojahansikkaiden materiaalit ovat kehittyneet vuosikymmenten aikana. Perinteiset materiaalit ovat olleet muovi ja kumi, mutta nykypäivän materiaalitekniikan kehittymisen myötä materiaalivalikoima on huomattavasti monipuolisempi ja erilaisiin käyttökohteisiin soveltuva. Esimerkiksi butyyliä käytetään elektroniikkateollisuudessa staattisen sähkön estämiseen. Kemianteeniikassa nitriitti on erittäin käytetty suojahansikasmateriaali, koska se tarjoaa hyvän suojan kemikaalien käsittelyyn (Terra Universal, 2014).

### 3.1.2 Merkitys sedimenttitutkimukselle

Sedimentin kemiallisten yhdisteiden kiertoa on laajalti tutkittu biologisten ja kemiallisten reaktioiden osalta. Näytteenotto sedimentin huokosvedestä on haasteellista ja edellyttää erityisjärjestelyitä, väärät käsittelyolosuhteet voivat aiheuttaa analyysituloksiin vaikuttavia kemiallisia muutoksia sedimentin huokosveteen. Huomioitavin asia on se, että hienojakoisimmat sedimentin esiintymät ovat anaerobisia ja hapettuvat voimakkaasti, mikäli ne altistuvat ilmalle. Sedimentin hapettuminen johtaa siihen, että redox-potentiaaliltaan herkimmat sedimentin huokosveteen liuenneet aineet voivat altistua voimakkailla kemiallisilla muutoksilla. Huokosveden tietyt aineet edellyttävätkin anaerobisia olosuhteita sekä huokosveden näytteenotosta aina analysointiin asti (Burone;ym., 6/2005).

On tärkeää, että sedimentti, josta huokosvesinäyte kerätään, on koko näytteenkeruu- ja näytteenkäsittelyprosessin aikana anaerobisessa ympäristössä. Glovebox-tekniikka soveltuu erinomaisesti sedimenttinäytteiden käsittelyyn, koska sillä on mahdollista luoda jatkuva inertti hapeton atmosfääri. Glovebox-tekniikka käsittää suljetun, joko laatikko- tai



telttasysteemin, johon voidaan luoda tietyillä inerteillä kaasuilla anaerobiset olosuhteet. Tällaiset kaasut eivät itsessään reagoi sedimentissä olevien ainesosien kanssa. Inerttejä kaasuja ovat esimerkiksi typpi- ja argonkaasu (Burone;ym., 6/2005).

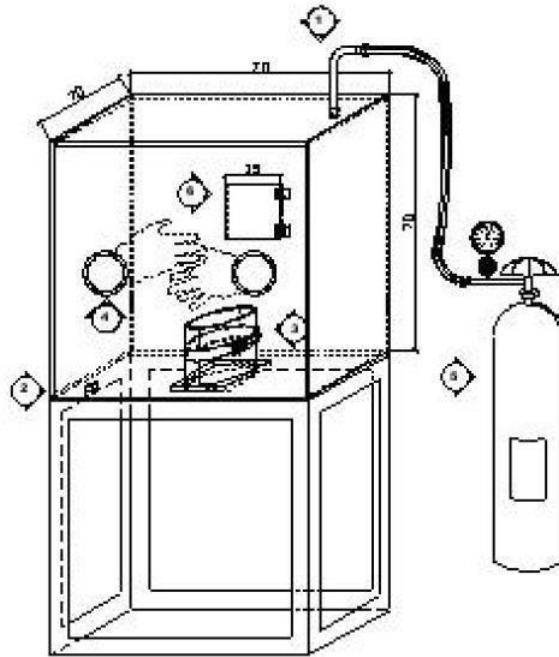
Brasilialaisessa meritieteen tutkimuslehdessä julkaistiin vuonna 2005 artikkeli, jossa esiteltiin tutkimusta, jossa vertailtiin kahta eri menettelytapaa ammoniumtyypen määrittämiseksi sedimentin huokosvedestä. Ammoniumtyppi on typen pelkistynein muoto, joten se on erityisen herkkä reagoimaan hapen kanssa. Näin ollen tutkimuksessa haluttiinkin saada selville se, kuinka paljon happi käytännössä aiheuttaa virhettä analyysituloksiin (Burone;ym., 6/2005).

Ensimmäisessä menettelyssä määritykset suoritettiin hapettomissa ja toisessa hapellisissa olosuhteissa. Sedimenttinäytteet otettiin pistekuormitusalueelta, jossa esiintyi korkeita ammoniumtyypen pitoisuuksia. Hapeton atmosfääri toteutettiin gloveboxtekniikalla siten, että kenttä- ja laboratorio-olosuhteisiin oli rakennettu omat atmosfäärilaatikkonsa, joissa hapen poistoon oli käytetty typpikaasua. Tutkimuksessa esitettiin laskelmat, mikä on tarpeellinen kaasumäärä hapettomien olosuhteiden luomiseksi. Happimittaria tutkimuksessa ei käytetty hapen mittaamiseen, vaan tietoa typpikaasun tarvittavasta määrästä käytettiin hyödyksi (Burone;ym., 6/2005).

Tutkimuksessa sedimenttinäytteet haettiin Kaakkois-Brasilian Ubatuban lahdelta, neljältä eri siihen kytköksissä olevalta joelta. Jokaisella näytteellä oli samanlainen granulometrinen rakenne. Jokaisesta sijainnista otettiin 6 näytettä, jotka jaettiin ryhmiin G1 ja G2. G1-ryhmän näytteet käsiteltiin ja analysoitiin hapettomissa olosuhteissa, sen sijaan G2-ryhmän näytteille tehtiin käsittelyt ja analyysit normaalissa happiatmosfäärissä. G2ryhmä muodosti niin sanotun kontrolliryhmän. Ammoniumtyppipitoisuudet määritettiin sekä hapellisissa että hapettomissa olosuhteissa. Tutkimuksessa käytettiin kahta läpinäkyvää, akryylistä valmistettua atmosfäärilaatikkoa, joista ensimmäistä käytettiin näytteenottoaikalla näytteenkäsittelyyn ja toista laboratorio-olosuhteissa analyysiin (Burone;ym., 6/2005).

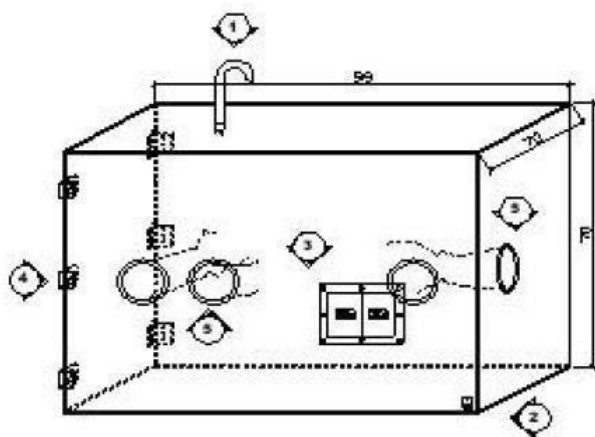
Sedimenttinäytteet otettiin veneellä, johon oli valmiiksi asennettu atmosfäärilaatikko. Kuva 8 hahmottelee mallin veneellä käytetystä prototyypistä: laatikko oli leveydeltään ja korkeudeltaan 70 cm pitkä ja se käsitti sisään tulon typpikaasulle, ulostulon hapelle, vastaanottoaukon sedimenttinäytteille, laatikon sisällön käsittelyä mahdollistavan hansikasparin ja sekundäärisen työskentelyikkunan. Kuvassa 9 hahmoteltua prototyyppiä käytettiin laboratorio-olosuhteissa näytteiden analysoimiseen, se oli 99 cm leveä ja 70 korkea ja sisälsi kenttalaatikon tavoin tulovirrat typpikaasulle ja hapella. Erona

kenttälaitteeseen oli se, että laitteessa oli 4 hansikasparia, eli kahden henkilön oli mahdollista työskennellä saman aikaisesti. Tämä versio sisälsi lisäksi virtalähteen (Burone;ym., 6/2005).



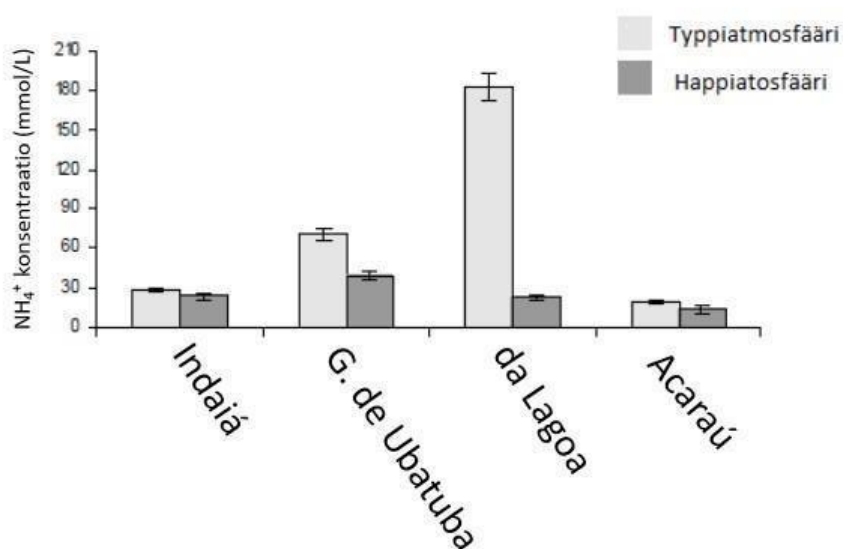
*Kuva 8 Hahmotelma tutkimuksen kenttäolosuhteissa käytetystä atmosfäärilaitteesta (Burone;ym., 6/2005)*

Ennen näytteenottoa veneessä oleva atmosfäärilaitteisto täytettiin typpikaasulla ja G1-ryhmän sedimenttinäytteet siirrettiin siihen kuvasta 9 erottuvan sisääntulon kautta suoraan näytteenotossa käytetyn näytteenottajan näyteputken kautta. G1-ryhmän näytteet käsiteltiin typpi-atmofäärissä ja siirrettiin hapettomiin pulloihin, minkä jälkeen pullot asetettiin -20 °C lämpötilaan. G2-näytteille tehtiin pulloon siirto ja jäädytys hapellisissa olosuhteissa (Burone;ym., 6/2005).



Kuva 9 Hahmotelma tutkimuksen laboratorio-olosuhteissa käytetystä atmosfäärilaatikosta (Burone;ym., 6/2005)

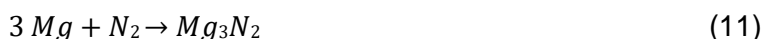
G1-ryhmän näytteet käsiteltiin kuvan 9 mukaisessa atmosfäärilaatikossa typpi-atmofääriin ollessa läsnä, sedimentin huokosvesinäytteitä oli säilytetty näytteenoton jälkeen hapettomissa pulloissa. Vastaavasti G2-näytteet altistuivat hapelle laboratorioanalyyysien aikana. Tämän tutkimuksen tulokset näkyvät kuvassa 10, josta erottaa, että hapella on ollut vaikutusta tuloksiin. Etenkin keskimmäisten näytteiden kohdalla tämä osoittaa sen, että glovebox-tekniikalla on hyvinkin suuri merkitys tutkimuksissa, jossa tutkitaan hapelle herkkiä sedimentin huokosveden aineita (Burone;ym., 6/2005).



Kuva 10 Brasilialaisen sedimenttitutkimuksen tulokset

### 3.1.3 Typpikaasu

Typpikaasu ( $N_2$ ) on yksi yleisimmistä glovebox-tekniikassa hapettoman atmosfäärin luomisessa käytetyistä kaasuista (Burone;ym., 6/2005). Se on väritön, hajuton ja mauton kaasu, jonka osuus ilmassa on 78,09 tilavuusprosenttia. Se on syttymätön, eikä edistä palamisreaktioita. Se on kevyempää kuin ilma ja jossain määrin veteen liukenevaa. Sitä pidetään yleisesti inerttinä eli reagoimattomana kaasuna. Tämä kuitenkin pätee vain tietyissä olosuhteissa. Typpikaasu on stabiili normaalissa ilmanpaineessa ja tavanomaisimmissa lämpötiloissa. Esimerkiksi korkeissa lämpötiloissa typpikaasu kykenee muodostamaan nitrideitä aktiivisten metallien, kuten magnesiumin kanssa (Universal industrial gases Inc., 2018), kuten reaktio 11 näyttää:



Luonnollisen biologisen aktiivisuuden myötä typpikaasu voi muodostaa hapen kanssa typen oksideita, vedyn kanssa ammoniakkia ja typpisulfideita rikin kanssa (Universal industrial gases Inc., 2018). Katalysoidussa reaktiossa typpikaasu muodostaa vetykaasun kanssa ammoniakkia. Tätä reaktiota kutsutaan Haber-Bosch-menetelmäksi, jossa reaktio 12:sta mukaisesti typpi- ja vetykaasusta muodostetaan ammoniakkia erittäin korkeassa lämpötilassa (LibreTexts Chemistry, 2016):



Molekyylinä typpikaasu on melko stabiili, koska siinä kaksi typpiatomia sitoutuu toisiinsa kovalenttisella kolmoissidoksella, jonka purkaminen on hankalaa. Kolmoissidos perustuu oktektisääntöön, jonka mukaan atomi tarvitsee täyden valenssikuoren, eli yhteensä 8 elektronia. Kolmoissidoksen myötä typpikaasu pyrkii pidättäytymään oktetissaan, eikä näin ollen reagoi helposti muiden yhdisteiden ja atomien kanssa (LibreTexts Chemistry, 2016).

Teollisuudessa typpikaasu on yksi käytetyimmistä kaasuista. Sitä käytetään lukuisilla teollisuudenaloilla, kuten kemikaali-, lääke-, ja maaöllyteollisuudessa. Sitä käytetään sen reagoimattomien ominaisuuksien takia hyödyksi niin sanottuna peitekaasuna erilaisille käytännönsovelluksille. Tällaista peitekaasua voidaan käyttää suojaamaan helposti syttyviä tai räjähtäviä aineita ilmalta. Esimerkiksi tietyt kemikaalit heikentyvät laadultaan happiatmosfäärissä, säilytysolosuhteina typpi-atmosfääri estää tällaisten reagenssien altistumisen hapelle (Universal industrial gases Inc., 2018).

### 3.2 Hapettomien olosuhteiden toimintamalli

Tämän opinnäytetyön kannalta keskeiseen laboratorio-olosuuteen ei ollut ennestään olemassa toimintamallia siihen, miten vesinäytteitä voisi käsitellä Turun ammattikorkeakoulun laboratoriotiloissa hapettomasti. Inkubaation jälkeisiin työvaiheisiin päätettiin soveltaa glovebox-tekniikkaa. Atmosfäärilaatikoita ei niiden kalliin hinnan vuoksi ollut rajoitetun budjetin puitteissa mahdollista hankkia, vaan päädyttiin tilaamaan halvempia 520 litran kokoluokan atmosfääriteltoja.

Käyttämämme atmosfääritelto olivat materiaaliltaan hiottua polyeteenimuovia. Teltta sisältää läpivientiportteja, joiden kautta telttaan sai typpikaasuletkun lisäksi esimerkiksi elektronisten laitteiden käyttöä varten sähköjohtoja. Läpivientiportit otettiin käyttöön siten, että niiden päädyistä leikattiin saksilla riittävän kokoinen pala pois, letkujen ja johtojen kiinnityksen jälkeen kaasuvuodot estettiin teippaamalla vuotokohtat umpeen. Atmosfääriteltoissa oli yhteensä neljä hansikasporttia, suuaukoissa oli niiden sulkuun ja aukaisemiseen tarkoitettu muovinen kappale.

Typpi-atmosfäärin luomiseksi atmosfääriteltojen sisään johdettiin kuvan 11 mukaisesti kevyellä kaasuvirtauksella typpikaasua siten, että täyttöaika oli minimissään 5 ja enintään 10 minuuttia, minkä jälkeen typpikaasu poistettiin teltasta, suuaukko pyrittiin aukaisemaan siten, että typpikaasu pääsi vapautumaan lattian kohden. Tällä menettelytavalla pyrittiin minimoimaan hapen pääsy telttaan. Tämä käsittely toistettiin kolme kertaa, neljännellä täytöllä hapen pitoisuus teltassa saatiin SYKE:n määrittelemälle rajalle, alle kolmeen tilavuusprosenttiin. Happipitoisuuden tarkistamiseen käytettiin kannettavaa Protégé ZM happimittaria.



*Kuva 11 Typpi-atmosfäärin luominen atmosfääriteltaan*

Tutkimuksessa oli käytössä 5 kappaletta kuvan 11 mukaisia 520 litran atmosfääriteltoja, joissa jokaisessa oli mahdollisuus kahden henkilön yhtäaikaiseen työskentelyyn. Teltat merkittiin kirjaimilla A, B, C, D ja E, joista kolme ensimmäistä varattiin näytteenottoon, näytteiden ruiskusuodatukseen, suodossäynteiden ottoon ja analyysistä riippuen joko näytekestävyöintiin tai koko näytteenkäsittelyyn laiteanalyysiin asti. Telttoissa D ja E suoritettiin pH- ja johtokyky mittaukset sekä sulfidimittaukset ja tarpeellinen ioninvaihto nitraatti- ja sulfaattimäärityksiin. Kuvissa 12 ja 13 on esitetty, miten sulfidimittauksissa ja ioninvaihdossa tarvittava välineistö sijoitettiin atmosfääriteltaan.



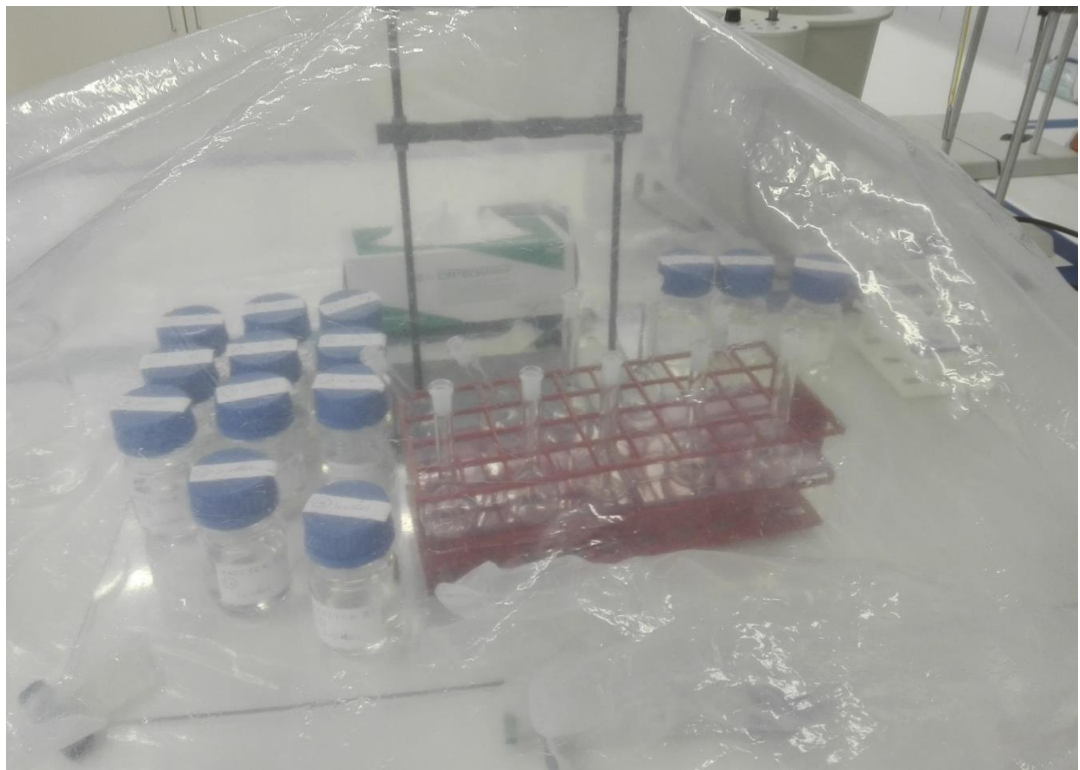
Kuva 12 Ioninvaihtovälineistöä typpiatmosfäärissä



Kuva 13 Sulfidimittausvälineistöä typpiatmosfäärissä



Atmosfääriteltoilla työskentelyn aikana ilmeni työergonomiaan ja käytännön työskentelyyn liittyviä ongelmia. Teltan hansikkaat osoittautuivat haasteellisiksi käyttää tarkkuutta vaativissa tehtävissä, suurimmaksi ongelmaksi osoittautui mittapullojen käsittely, jo 25 ml kokoluokan mittapullot tuottivat ongelmia. Koska laboratoriotutkimuksissa tarvitsi käyttää pienimmillään 10 ml mittapulloja, projektiryhmämme kehitti seuraavanlaisen käytännön ratkaisun näiden käsittelyyn: 10 ml mittapullot aseteltiin koeputkitelineisiin siten, että niiden alla oli tasainen telineen mittojen mukaan paloiteltu akryylilevy. Tämä esti sen, että mittapulloista lähtisi näytettä tai muuta nestemäistä sisältöä pois niiden kaatuessa. Tasainen alusta vastaavasti mahdollisti mittapullojen täyttämisen merkkiin ilman, että niitä tarvitsisi erikseen poistaa telineestä. 25 ml mittapulloille valmistettiin vastaavanlainen tukirakennelma Falcon-putki telineestä, jonka näkee kuvasta 14.



*Kuva 14 Tarpeelliset välineet näytteiden pipetointiin tyypiatmosfäärissä*



Myös työergonomia liittyi teltan hansikkaiden käyttöön. Alustavat testikokeilut atmosfääriteltoilla edellyttivät staattista työskentelyasentoa, näin ollen oli oleellista, että teltan työtaso saataisiin tarjoamaan mahdollisimman ergonomiset edellytykset työskentelyyn. Tämä ongelma pyrittiin ratkaisemaan liikuteltavilla toimistopöydillä, joiden korkeutta oli mahdollista säätää ja joihin työskentelijän oli mahdollista nojata kyynärpäillä, esimerkiksi ruiskusuodattamisen aikana. Tilanne, jossa atmosfääriteltassa on yhtäaikaaisesti 2 henkilöä ruiskusuodattamassa näytteitä, näkyy kuvassa 15.



*Kuva 15 Ruiskusuodattamista typpi-atmofäärissä*

Kuvassa 16 on esitetty työtaso ratkaisu teltoille A, B ja C. Toinen työergonomiaan liittyvä käytännön ongelma liittyi atmosfääriteltojen pitkäaikaiseen käyttöön, käsien poistaminen hansikkaista osoittautui hankalaksi alustavien työskentelytestien perusteella. Tämä ongelma ratkaistiin sillä, että teltoissa työskennellessä pyrittiin käyttämään puuvillahanskoja. Tutkimuksen aikana teltoihin oli tarkoitus sijoittaa myös melko kookasta välineistöä, kuten pH- ja johtokyky mittauksiin liittyvä temperointihaude. Tällaisten laitteiden kohdalla epäiltiin, että terävät kulmat voisivat mahdollisesti puhkoa atmosfääriteltan seinämiä, joten tällaiset kulmat peitettiin letkumateriaalilla, lisäksi painavan laboratoriolaitteiston alle aseteltiin vaahtomuovin kappaleita pehmusteeksi.



*Kuva 16 Näytteitä ja suodatusvälineistöä tukialustalla typpi-atmosfäärissä*

## 4 LABORATORIOTUTKIMUS

### 4.1 Koeyksiköt

#### 4.1.1 Kokoaminen

Laboratoriotutkimus käsitti yhteensä 28 koeyksikköä, jotka valmistettiin 1000 ml säilöpulloihin. Turun ammattikorkeakoulun vesitutkimusryhmä suoritti näytteenhaun koeyksiköihin tarvittavan sedimentin ja koeveden osalta Maarian altaalta 14.1.2018. Sekä sedimentti että koevesi pyrittiin homogenisoimaan isoissa ämpäreissä sekoittamalla ennen koeyksiköiden valmistusta. Koeyksiköihin 1-20 punnittiin noin 175 grammaa märkää sedimenttiä ja koevettä siten, että kokonaistilavuudeksi saatiin noin litra. Koeyksiköihin 21-28 ei lisätty sedimenttiä, pelkästään koevettä punnittiin noin 1000 gramman verran.

Koeyksiköt on listattu taulukkoon 2. Lyhenteet kuvaavat sen, mistä sedimentti/koevesi oli peräisin (MA= Maarian allas, PJ= Paattistenjoki) sekä hiili- ja sulfaattitasot, esimerkiksi "0S0C" merkitsi tasoa nollaa sekä hiilelle että sulfaatille. Taso 0 tarkoitti sitä hiilen tai sulfaatin pitoisuutta, joka koevesi- ja sedimenttilisäysten myötä koeyksiköihin muodostui sellaisenaan. Tiettyihin koeyksiköihin säädettiin sulfaatille tasoja 1-2 väliltä, hiilellä oli koeyksiköissä ainoastaan kaksi tasoa, 0 ja 1. K-merkintä ilmoitti "tapetusta kontrollista", eli koeyksiköstä, josta on pyritty formaliinilisäyksellä poistamaan mikrobitoiminnan vaikutus. Hiililisäys suoritettiin dekstroosilla, tason 1 lisäysmääräksi laskettiin 0,75 grammaa, joka vastasi noin 2 massaprosenttia koeyksiköissä käytetyn sedimentin kuivamassasta. Sulfaattilisäyksiin käytettiin natriumsulfaattiliuosta, jonka konsentraatio oli 16 g/l. Sulfaattitason 1 koeyksiköihin tätä natriumsulfaattiliuosta lisättiin 1,5 ml ja tason 2 koeyksiköihin 5,0 ml.

Taulukko 2 Laboratoriotutkimuksen koeyksiköt.

No.	Koodi	Sulfaattitaso	Hiilitaso	Muuta
1	MA0S0C R1	0	0	
2	MA0S0C R2			
3	MA0S1C R1	0	1	
4	MA0S1C R2			
5	MA1S0C R1	1	0	
6	MA1S0C R2			
7	MA1S1C R1	1	1	
8	MA1S1C R2			
9	MA2S0C R1	2	0	
10	MA2S0C R2			
11	MA2S1C R1	2	1	
12	MA2S1C R2			
13	MA0S0CK R1	0	0	Tapetut kontrollit
14	MA0S0CK R2			
15	MA0S1CK R1	0	1	
16	MA0S1CK R2			
17	MA2S0CK R1	2	0	
18	MA2S0CK R2			
19	MA2S1CK R1	2	1	
20	MA2S1CK R2			
21				
22	PJ0S0C R1	0	0	ei sedimenttiä
23	PJ0S0C R2			
24	PJ2S0C R1	2	0	
	PJ2S0C R2			
25	PJ0S1C R1	0	1	
26	PJ0S1C R2			
27	PJ2S1C R1	2	1	
28	PJ2S1C R2			

#### 4.1.2 Inkubaation valmistelut

Näytteenoton jälkeen jokaisesta koeyksiköstä oli tarkoitus poistaa happi, mikä suoritettiin typpikaasulla. Typpikaasu johdettiin koeyksikköpulloihin typpikaasupullosta siten, että pääletkun virtaus jaettiin muovisella välikappaleella edelleen kolmeen letkuun, joiden kautta kaasua saatiin kolmeen koeyksikköön kerralla, tämä jako näkyy kuvassa 17. Välikappaleeseen kiinnitetyt letkut päättyivät huokosiin sintteri-osiin, jotka päästivät typpikaasun koeyksiköihin sekoittumista tehostavana kuplituksena. Sedimenttiä sisältävät koeyksiköt typetettiin ensin, koska sintterit sotkeutuivat sedimenttimateriaalista. Näiden koeyksiköiden typetyksen jälkeen sintterit puhdistettiin ultraäänihauteessa, jotta niihin koeyksiköihin, joihin ei lisätty sedimenttiä, päätyisi materiaalia sedimentistä.



Kuva 17 Hapen poisto koeyksiköistä typpikaasulla

Jokaiseen koeyksikköön johdettiin typpikaasua noin 10 minuutin ajan, minkä jälkeen mitattiin typpikäsittelyn jälkeinen happipitoisuus ja suljettiin pullot korkeilla. Typpikaasun virtaus ei liikuttanut sedimenttiä sisältäneiden koeyksiköiden pohjalla ollutta sedimenttikerrosta, mutta aiheutti sen yläpuolella olevaan veteen voimakkaan hapetta poistavan kierron. Happipitoisuudet laskivat melko alhaisiksi, jokaisen koeyksikön veden happipitoisuudeksi mitattiin alle 0,5 ppm. Koeyksiköiden typpikäsittelyn jälkeen koeyksiköihin 13-20 lisättiin 37 massaprosenttista formaldehydiä 20,0 ml. Suljetut koeyksiköt siirrettiin valolta suojattuun paikkaan, jossa niitä säilytettiin seuraavat 2 kuukautta, alkaen 16.1 ja päättyen 12.3.2018.

Koeyksikköpullot sijoitettiin suljettaviin kaappeihin numerojärjestyksessä. Tarkoitus oli, että jokaista koeyksikköpulloa sekoitetaan kerran viikossa siten, että sekoitus tapahtui ravistamisen sijaan pullojen puolittaisella 180 asteen kääntelyllä, yhteensä 20 kertaa jokaista koeyksikköä kohden. Ennen sekoitusta koeyksiköt kuvattiin dokumentointia varten. Kuvaus- ja sekoituspäiviksi määriteltiin jokaisen viikon tiistait.

#### 4.1.3 Sulfaatinpelkistyminen inkubaation aikana

Inkubaatiojakson aikana oli tarkoitus seurata koeyksiköissä tapahtuvia visuaalisia muutoksia, jotka voisivat viitata sulfaatinpelkistymiseen. Kuvat 18,19 ja 20 näyttävät koeyksiköiden tilanteen inkubaation aloituspäivänä, noin 10 tuntia kokoamisen jälkeen. Kuvista näkee, että sedimenttiä sisältävät koeyksiköt näyttivät visuaalisesti melko identtisiltä, myöskään pelkkää koevettä sisältävissä koeyksiköissä ei ollut nähtävää eroa.





Kuva 18 Koeysiköt 1-9 inkubaation aloituspäivänä noin 10h kokoamisen jälkeen



Kuva 19 Koeysiköt 10-18 inkubaatin aloituspäivänä noin 10h kokoamisen jälkeen



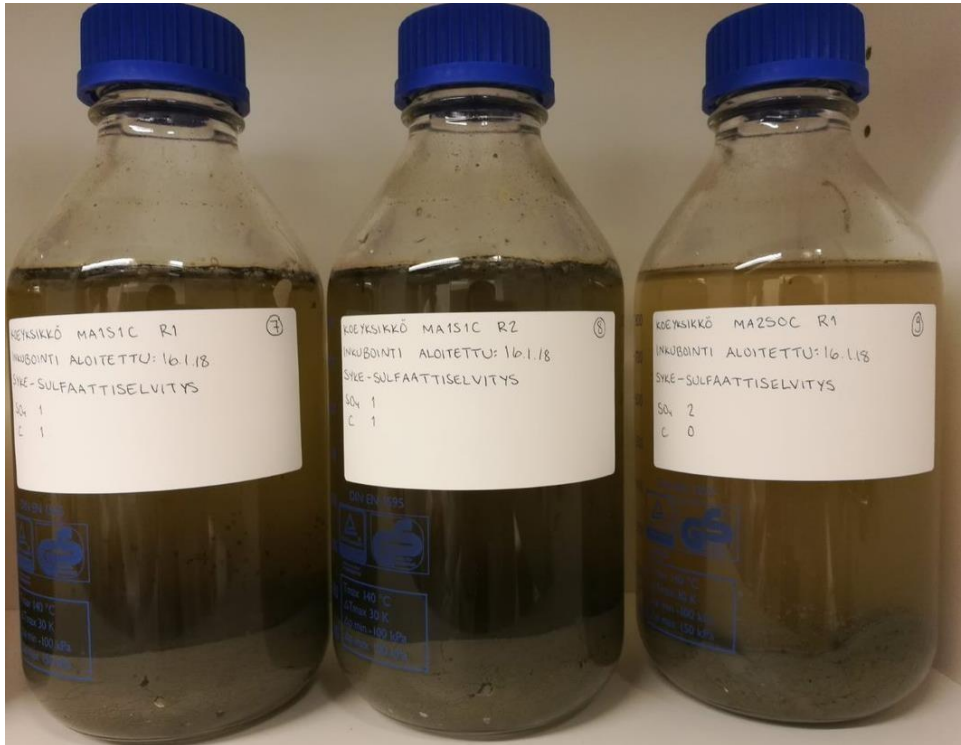
Kuva 20 Koeysiköt 19-28 inkubaation aloituspäivänä noin 10h kokoamisen jälkeen

Vasta 2 viikkoa inkubaation aloittamisesta alkoi koeyksikössä erottua sulfaatinpelkistymiseen viittaavia muutoksia. Koeyksiköiden 7-8 ja 11-12 vesi oli mustunut, mikä oli erittäin voimakasta jälkimmäisellä parilla. Mustuneet viikon 2 koeyksiköt on esitelty kuvissa 21 ja 22. Mustuminen selittyy sillä, että näissä koeyksiköissä on sekä sulfaatti- että hiililisäykset, koeyksiköiden 11-12 kohdalla sulfaattilisäys oli kaksinkertainen 7-8 verrattaessa, joten näissä mustuminen on ollut huomattavasti voimakkaampaa. Mustuminen saattoi viitata rautasulfidien muodostumiseen, sillä niitä muodostuu sulfaatinpelkistymisen myötä syntyneiden sulfidien ja liukoisen raudan reagoidessa keskenään, kuten kappaleessa

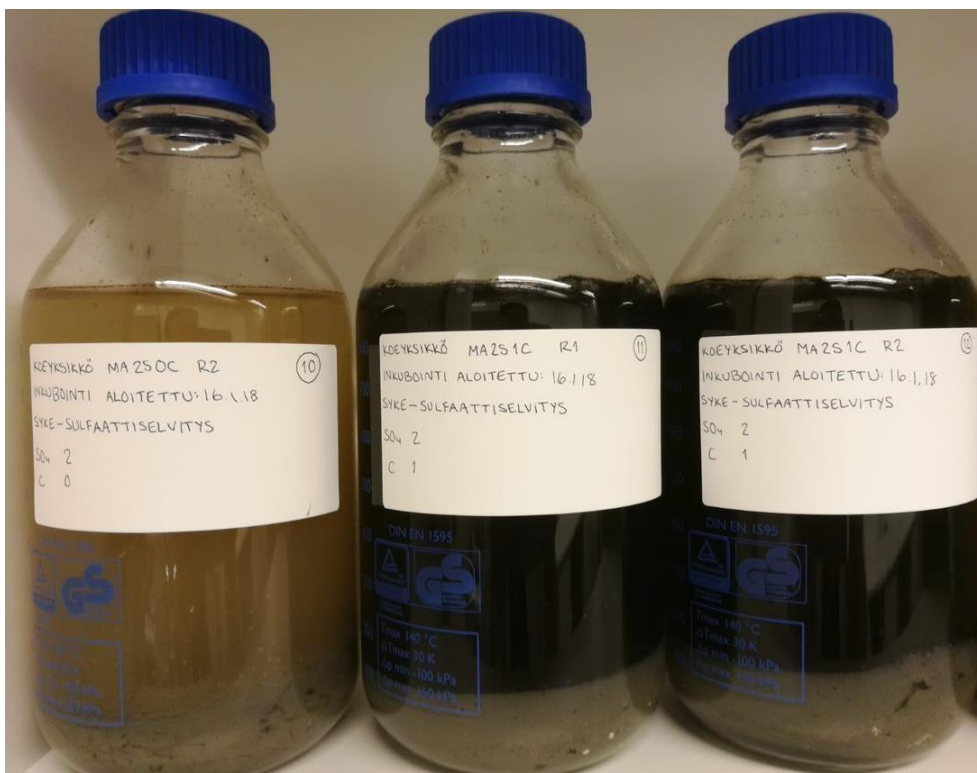
"Sulfaatinpelkistyminen" käsiteltiin. Se, miksi musta väri erottui vesikerroksessa, saattoi selittyä sillä, että koeyksiköitä sekoitettiin kerran viikossa.

Tapetuissa kontrolleissa, joissa oli vastaavat hiili- ja sulfaattitasot, ei vesi ollut mustunut, minkä voi olettaa olevan mikrobitoiminnan puuttumisesta kiinni. Nämä tapetut kontrollit olivat koeyksiköitä 19-20 ja niiden tilanteen näkee kuvasta 23. Viikolla 2 mustuneiden koeyksiköiden sedimenttikerrokseen oli muodostunut myös alumiinivärisiä partikkeleita, tällaisia partikkeleita ei kuitenkaan muodostunut tapettuihin kontrolleihin, joten myös ne kytkeytynevät mikrobiologiseen toimintaan. SYKE:n asiantuntijoiden mielestä nämä partikkelit saattoivat olla elementaarista rikkiä, joka osaltaan liittyy sulfaatinpelkistymiseen, joka on osa rikin kiertoa, kuten kappaleessa "Sulfaatinpelkistyminen" käsiteltiin.





Kuva 21 Koeyksiköt 7-9 viikko 2



Kuva 22 Koeyksiköt 10-12 viikko 2

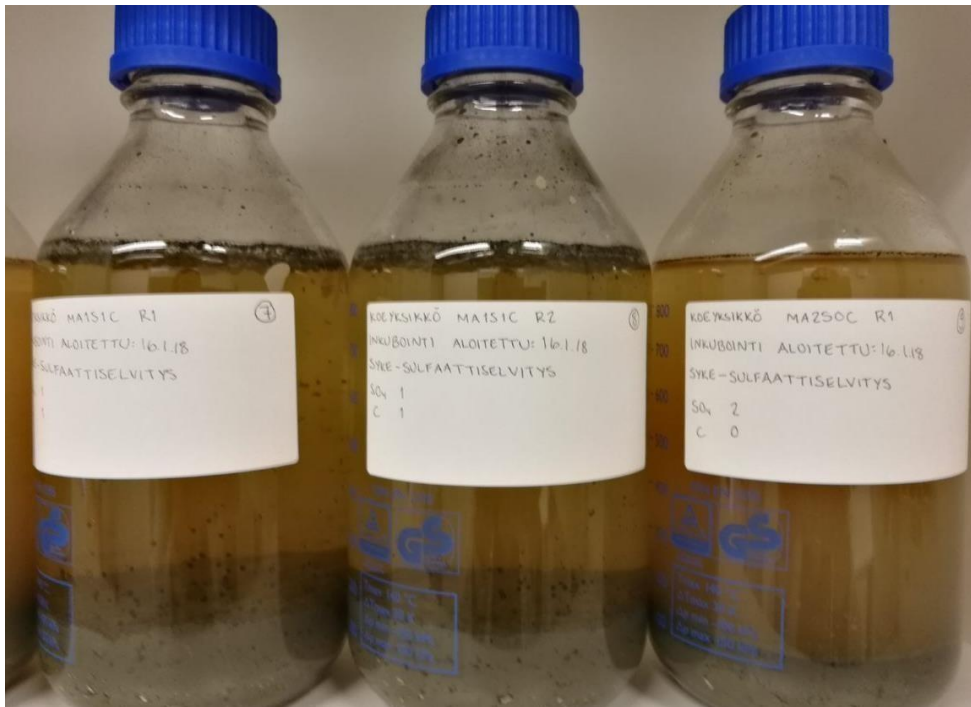


Kuva 23 Koeyksiköt 19-21 viikko 2

Viikolla 3 koeyksiköiden 1-12 sedimentteihin oli muodostunut lisää alumiininvärisiä partikkeleita, joita oli ilmaantunut huolimatta siitä, mitkä olivat sulfaatti- ja hiilitasot. Tämä havainto vahvistaa sen, että tällaisten partikkelien muodostuminen on kytköksissä mikrobiologiseen toimintaan, koska niitä ei tarkastelujakson aikana muodostunut tapettuihin kontrolleihin.

Viikolla 4 huomio kiinnittyi edelleen koeyksiköihin 7-8 ja 11-12, sillä tähän mennessä näiden koeyksiköiden vesi oli kirkastunut. Huomiota herättivät myös selkeät mustat pisteet pullon seinämällä. Tällaisia mustia pisteitä alkoi esiintymään tarkastelujakson loppuun mennessä myös muissa 1-12 numeron koeyksiköissä. Viikon 4 tilanne koeyksiköiden 7-8 ja 11-12 näkyy 24 ja 25. SYKE:n astiantuntijoiden mukaan koeyksiköissä esiintyneet mustat pisteet saattoivat olla peräisin mangaanin hapettumisesta tai rautasulfideista. Jos kyse olisi ollut mangaanin hapettumisesta, olisi se saattanut olla merkki siitä, että koeyksiköihin olisi päässyt happea. Koeyksiköiden seinämille rautasulfidit olisivat voineet päätyä viikoittaisen sekoittamisen myötä. Tähän

ei kuitenkaan vielä tarkastelujakson viikolla 4 osattu ottaa sen tarkemmin kantaa ennen inkubaation jälkeisiä tuloksia.



Kuva 24 Koeyksiköt 7-9 viikko 4



Kuva 25 Koeyksiköt 10-12 viikko 4

Tarkastelujakson viimeisillä viikoilla ei koeyksiköille vaikuttanut tapahtuneen enää merkittäviä visuaalisia muutoksia sulfaatinpelkistymiseen liittyen. Alumiinivärisiä partikkeleita esiintyi jokaisessa koeyksikössä, lukuun ottamatta tapettuja kontrolleja ja sedimenttömiä koeyksiköitä. Näiden partikkelien kohdalla muutos perustui silmämääräisesti niiden kokoon ja esiintyvyyteen, esimerkiksi koeyksiköissä 1-3 näiden määrä vaikutti olevan runsaimmillaan 13.2, 6.3 mennessä niiden määrä vaikutti laskeneen merkittävästi.

Tarkastelujakson päätteeksi otetuista kuvista toimitettiin kooste Suomen ympäristökeskuksen arvioitavaksi. Lähtötilanteessa koeveden väri oli melko ruskeaa, sen perusteella SYKE arvioi, että inkubaation jälkeisissä määrityksissä rautapitoisuudet saattavat olla korkeita, minkä vuoksi sulfaattimäärityksiä varten oli välttämätöntä suunnitella suodosnäytteille ioninvaihdon toteutus, koska korkeat rautapitoisuudet häiritsevät näitä määrityksiä. SYKEN:n mukaan kuvien perusteella ei voinut selvästi sanoa, onko sulfaatinpelkistymistä tapahtunut, vaan vasta inkubaation jälkeisistä määrityksistä ja mahdollisesti rikkivedyn hajusta arvioitiin saatavan vahvistus tähän.

## 4.2 Tulokset

### 4.2.1 Sulfaatti ja sulfidi

Ennen inkubaatiota jokaisesta koeyksiköstä otettiin 110 ml näytteet, jotka suodatettiin 0,45 µm huokoskoon ruiskusuodattimilla lasisiin näytepulloihin. Suodosnäytteistä määritettiin sulfaatti- ja sulfidipitoisuudet happiatmosfäärissä. Sulfaatti analysoitiin ionikromatografilla ja sulfidi sulfidielektrodilla. Lähtöoletus oli se, että koeyksiköiden sulfaattilisäysten tulisi erottua määrityksistä, sulfidipitoisuuksien odotettiin vastaavasti olevan pieniä. Sulfaattilisäysten perusteella koeyksiköiden sulfaattipitoisuuksien olisi pitänyt nousta siten, että tasolla 1 konsentraation muutos on noin 24 ppm ja tasolla 2 noin 80 ppm koevesien sulfaattipitoisuuksiin verrattaessa. Saadut tulokset erosivat näistä arvioista hieman, mutta tulosten rinnakkaisuus oli kuitenkin melko hyvä, kuten liitteessä 1 olevasta taulukosta näkee.

Pelkästä koeyksiköiden kokoamiseen käytetystä koevedestä lähetettiin näytteitä LSVY:lle analysoitavaksi sulfaattipitoisuuksien osalta. Sulfaattipitoisuudet määritettiin myös Turun ammattikorkeakoulun laboratoriossa. Jotta LSVY:lle teetätetyistä koevesien sulfaattimäärityksistä saatavat tulokset olisivat olleet mahdollisimman vertailukelpoisia

Turun ammattikorkeakoulun laboratoriossa saatuihin tuloksiin nähden, LounaisSuomen vesi- ja ympäristötutkimus Oy:lle lähetettiin vastaavia ruiskusuodattimia, jollaisia projektiryhmämme käytti koeyksikkövesien suodattamisessa. Teetätetyissä analyyseissä molemmille koevesille saatiin 10 ppm tulokset, eli käytännössä eroa ei ollut merkittävästi verrattuna Turun ammattikorkeakoulussa saatuihin tuloksiin. LSVY:n määrittämät tulokset koeveden sulfaattipitoisuuksille on esitetty liitteessä 2.

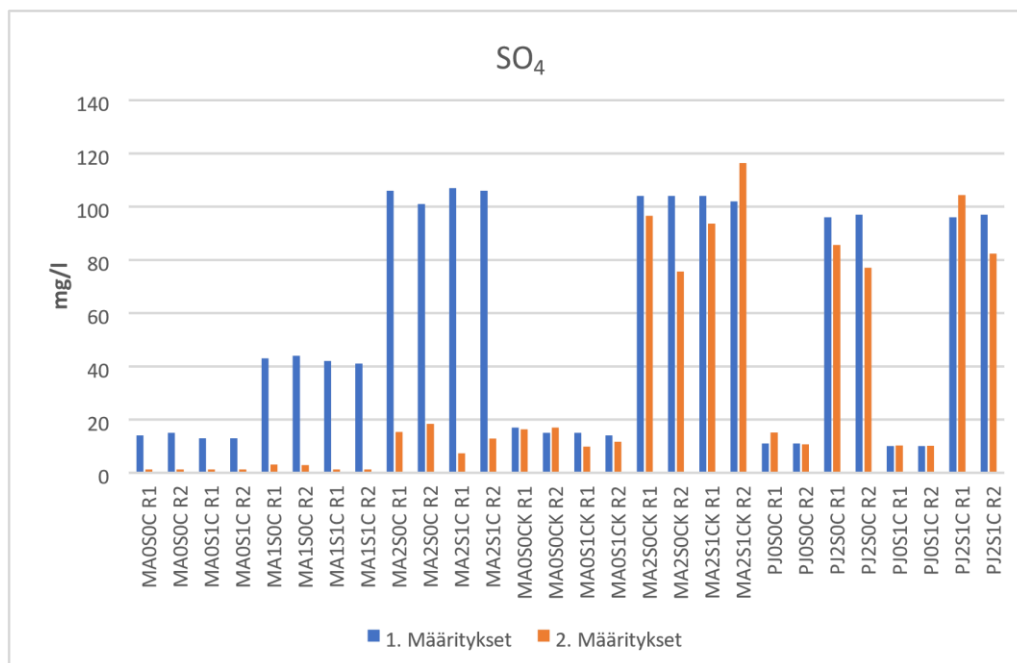
Ennen inkubaatiota suoritetuissa koeyksiköiden sulfidimittauksissa oli huomattavia ongelmia, sillä sulfidielektrodin kalibrointiin valmistetun standardisuoran kolme alhaisinta pistettä aiheuttivat siinä määrin virhettä regressiosuoran korrelaatiokertoimelle, että standardisuoran riittävän selitysasteen takaamiseksi ne oli pakko hylätä. Sulfidipitoisuudet arvioitiin erittäin pieniksi. Tulos kuitenkin määritettiin jokaisen koeyksikön kohdalla alle 0,1 ppm:ksi, koska tarkkoja pitoisuuksia ei pystytty ilmoittamaan luotettavasti. Inkubaation jälkeisten tulosten taulukko on esitetty kokonaisuudessaan liitteessä 3. Tulosten perusteella sulfaatinpelkistymistä on tapahtunut selkeästi koeyksiköissä 1-12.

Tapetuissa kontrolleissa sulfaattipitoisuuksissa on myös havaittavissa muutoksia, kun niitä vertaa ennen inkubaatota saatuihin tuloksiin. Erot jäivät kuitenkin huomattavasti pienemmiksi kuin koeyksiköissä 1-12. Myöskään sedimenttömissä koeyksiköissä ei sulfaattipitoisuuksien osalta ollut tapahtunut merkittävää muutosta. Varmin todiste sille, että koeyksiköissä 1-12 oli tapahtunut dissimilatorista sulfaatinpelkistymistä, varmistui viimeistään näytteenoton aikana: atmosfääriteltoista, joissa näitä kyseisiä koeyksiköitä oli käsitelty, vapautui voimakas rikkivedylle ominainen mädänneen kananmunan haju.

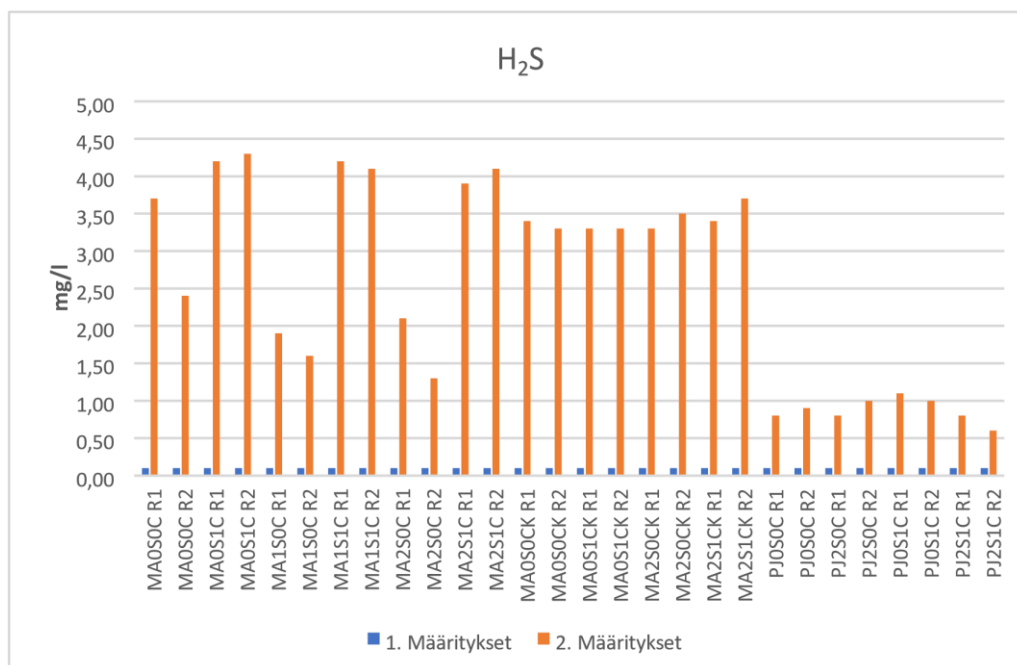
Sulfidipitoisuuksissa on koeyksiköiden 1-12 kohdalla tapahtunut jokseenkin epätasaisesti muutosta, mutta näiden perusteella voi kuitenkin arvioida sulfaatinpelkistymistä tapahtuneen. Sulfidipitoisuudet ovat myös tapetuissa kontrolleissa merkittävästi korkeammat. Myös sedimenttömissä koeyksiköissä sulfidipitoisuudet kasvoivat, kun inkubaation jälkeisiä tuloksia vertaa ennen inkubaatiota saatuihin tuloksiin. Tulosten perusteella sulfidipitoisuudet olisivat siis nousseet jokaisen koeyksikön kohdalla. Inkubaation jälkeisen koeyksiköiden näytteenoton jälkeen jokaisesta näytteenottoon käytetystä atmosfääriteltasta vapautui ilmaan vahva rikkivedyn haju, mikä osaltaan vahvistaa sen, että sulfidipitoisuudet olivat nousseet jokaisessa koeyksikössä. On kuitenkin huomioitava, että vaikka jokaisesta näytteenottoon käytetystä atmosfääriteltasta vapautui vahvaa rikkivedyn hajua, ei hajun perusteella voi kuitenkaan päätellä, että sitä olisi vapautunut jokaisesta yksittäisestä koeyksiköstä.

Koeyksikökohtaiset erot sulfaatti- ja sulfidipitoisuuksissa on esitetty kaaviossa 1 ja 2.

Kaavio 1 Koeyksiköiden sulfaattipitoisuudet



Kaavio 2 Koeyksiköiden sulfidipitoisuudet



Tapettujen kontrollien sulfidipitoisuuksien merkittävä nousu on erikoista, koska näissä koeyksiköissä sulfaattipitoisuuksissa ei vaikuttanut olevan merkittävää muutosta. Sulfideita voi muodostua myös rikin muista esiintymismuodoista, kuten kappaleessa

”Sulfaatinpelkistyminen” esitettiin. Inkubaation jälkeisissä määryyksissä ei kuitenkaan saatu tuloksia kokonaisrikille, koska käytetyssä analyysimenetelmässä ilmeni ongelmia, joiden koettiin aiheuttavan liikaa virhettä kokonaisrikin tuloksiin. Näin ollen laboratoriotutkimuksen tuloksista ei pystytty päättämään, mistä tapettujen kontrollien sulfidit olivat peräisin, kun huomioidaan se, että sulfaatinpelkistymistä ei sulfaattipitoisuuksien perusteella vaikuttanut tapahtuneen. Myös sedimenttiä sisältämättömissä koeyksiköissä sulfidipitoisuudet nousivat, mutta eivät kuitenkaan siinä määrin kuin koeyksiköissä 1-12 ja tapetuissa kontrolleissa.

#### 4.2.2 Muiden tulosten merkitys sulfaatinpelkistykseen

Inkubaation jälkeisissä määryyksissä koeyksiköiden pH-tasot erosivat tapettujen kontrollien ja neljän viimeisen sedimenttittömän koeyksikön osalta ennen inkubaatiota suoritetuista arvoista huomattavasti, kuten liitteiden 1 ja 3 taulukoista ilmenee. Koeyksiköillä 1-12 pH-tasot olivat lähellä ennen inkubaatiota saatuja arvoja, näissä myös sulfidipitoisuudet nousivat, minkä voi olettaa tarkoittavan ainakin jossain määrin rautasulfidien muodostumista.

Kuten kappaleessa ”Sulfaatinpelkistyminen” todettiin, rautasulfidien muodostuminen laskee veden pH-tasoa, mutta tässä reaktiosarjassa syntyneet vetykarbonaatit kuitenkin neutraloivat tämän syntyneen happamuuden. Koeyksiköiden 1-12 kohdalla siis pH-tason säilyminen voisi olla tällä periaatteella selitettävissä. Tapetuissa kontrolleissa sen sijaan pH-taso laski merkittävästi. Sulfaatinpelkistymistä ei kuitenkaan tulosten perusteella ollut havaittavissa.

Rautapitoisuudet olivat inkubaation jälkeisissä määryyksissä erittäin korkeita, mikä puolestaan ei varsinaisesti tue sitä, että esimerkiksi koeyksiköissä 1-12 olisi tapahtunut sulfaatinpelkistymistä. SYKE:n asiantuntijoiden mukaan liukoinen rauta reagoi herkästi sulfidien kanssa, muodostaen rautasulfideita, joiden ei pitäisi näkyä liukoisen raudan analyyseissä. Tämän perusteella liukoista raudan pitoisuuksien ei odotettu olevan liitteen 3. mukaisten pitoisuuksien mukaisia. SYKE:n asiantuntijat arvioivat, että ainoa selitys näin korkeille liukoisen raudan pitoisuuksille selittyyne sedimentin mahdollisesti sisältämällä korkeilla rautapitoisuuksilla.

Liukoisen kokonaisfosforin osalta koeyksiköissä 1-12 oli selkeästi tapahtunut sulfaatinpelkistymistä, sillä liukoisen kokonaisfosforin pitoisuudet nousivat erittäin korkeiksi niistä arvoista, jotka määritettiin näille koeyksiköille ennen inkubaatiota.



Vastaavasti sulfaattipitoisuudet olivat laskeneet alhaisiksi. Liukaisen kokonaisfosforin pitoisuudet eivät olleet nousseet tapetuissa kontrolleissa ja sedimentittömissä koeyksiköissä, mikä osaltaan tukee sitä, että näissä koeyksiköissä ei sulfaatinpelkistymistä ollut tapahtunut.

Myös nitraatin osalta tulokset viittaavat sulfaatinpelkistymiseen koeyksiköiden 1-12 kohdalla, koska näissä koeyksiköissä nitraattipitoisuudet olivat laskeneet ennen inkubaatiota määritetyistä tasoista alle määritysrajan. Kuten kappaleessa "Sulfaatinpelkistyminen" todettiin, nitraatti kuluu hapettomissa olosuhteissa ennen sulfaattia mikrobiologisen hengittämisen kautta. Tulokset viittaavatkin siihen, että näiden koeyksiköiden kohdalla mikrobit ovat kuluttaneet nitraatin ennen sulfaatin hengittämistä. Myös tapetuissa kontrolleissa nitraattipitoisuudet olivat pitkälti laskeneet alle määritysrajojen, mutta näissä ei kuitenkaan ollut sulfaattitasoissa muutosta, mikä viittaa siihen, että mikrobitoimintaa näissä on esiintynyt, mutta sulfaatinpelkistäjien toiminta ei kuitenkaan ole ollut mahdollista.

Tapettujen kontrollien sulfidipitoisuudet ja nitraatin kulutus voisivat viitata siihen, että sulfidit ovat peräisin jostain muusta rikin muodosta sulfaatin sijaan. Kysymykseksi jää, onko tapetuissa kontrolleissa voinut olla esimerkiksi rikinpelkistäjäbakteeriston toimintaa. Kuten "Sulfaatinpelkistyminen" kappaleessa todettiin, rikinpelkistäjäbakteerit pystyvät pelkistämään rikkiä sulfideiksi, mutta eivät kuitenkaan kykene pelkistämään sulfaatteja. Tämä voisi selittää sen, miksi sulfaattien määrä ei ole muuttunut, mutta sulfidien sen sijaan on. SYKEN:n asiantuntijoiden mukaan pelkkä formaliinilisäys ei täysin hiljennä mikrobitoimintaa. On siis voinut esimerkiksi olla mahdollista, että rikinpelkistäjäbakteerit ovat pystyneet toimimaan formaliinilisäyksestä huolimatta.

Tässä tutkimuksessa oli tarkoitus saada myös kokonaisrikille tulokset inkubaation jälkeisissä määrityksissä. Tämä ei kuitenkaan ollut mahdollista, koska käytetyllä analyysimenetelmällä ei saatu luotettavia tuloksia. Kokonaisrikin tuloksista olisi mahdollisesti voinut löytyä selitys tapettujen kontrollien sulfidipitoisuuksille.

## YHTEENVETO

Turun ammattikorkeakoulussa ei ennen tämän opinnäytetyön kirjoittamista ollut olemassa toimintamallia vesimääritysten tekemiseen hapettomasti. Lähtiessäni etsimään mahdollisia ratkaisuja tällaisen toimintamallin toteuttamiseen, gloveboxtekniikka oli käytännössä ainoa varteenotettava vaihtoehto. Aikaisempaa



tutkimustietoa tällaiseen tekniikkaan liittyen löytyi hyvin rajallisesti. Termi "glovebox" on mainittuna lukuisissa tieteellisissä tutkimuksissa, mutta sen merkitystä tuloksiin ei juurikaan ole käsitelty.

Opinnäytetyön rungon suunnittelu oli useamman viikon rupeama, lopulta päädyin yhdistämään aiheen "Hapettomat olosuhteet" toimintamallin ja sulfaatinpelkistymisen välille. Sulfaatinpelkistyminen oli lopulta varsin helppo ottaa osaksi tätä opinnäytetyötä, koska se liittyy oleellisesti hapettomiin olosuhteisiin. Hapettomien olosuhteiden toimintamallilla oli vastaavasti huomattava merkitys laboratoriotutkimuksessa, jossa tavoitteena oli estää hapen vaikuttaminen sulfidipitoisuuksiin.

Laboratoriotutkimuksessa koeyksiköiden inkubaation aikaista dokumentaatiota ei suunniteltu riittävän tarkasti. Esimerkiksi kuvaamisessa käytetyt kamerat ja kuvakulmat vaihtelivat. Tämä johti siihen, että tietyt kuvasarjat ovat huonolaatuisempia kuin muut. Tulevaisuudessa tällainen dokumentaatio onkin syytä toteuttaa siten, että kuvaaja, kamera ja kuvakulmat ovat tutkimuksen alusta loppuun samat.

Atmosfääriteltoilla työskentely oli kokonaisuutena onnistunut. Käytännön ongelmat liittyivät lähinnä työergonomiaan ja pienten lasiastioiden kanssa työskentelyyn. Tulevissa tutkimuksissa työskentelyolosuhteisiin on syytä kiinnittää huomiota, sillä työskentely voi olla hyvinkin staattista. Atmosfääriteltoissa käytettävien pienten lasiastioiden, kuten mittapullojen ja dekantterilasien, käyttö on mahdollisuuksien mukaan pyrittävä minimoimaan. Tutkimuksessa käytetty Falcon-putkitelineestä rakennettu tukiteline toimi lähinnä keskikokoisille mittapulloille, pienempien mittapullojen kanssa tämä ei ollut kovinkaan toimiva ratkaisu.

Tämän opinnäytetyön tuloksia hyödynnetään Suomen ympäristökeskuksen hankkeessa, jossa tutkitaan eri sulfaattitasojen vaikutusta liukoisen fosforin vapautumiseen sedimentistä. Ennen tutkimusta oli lähtöoletus, että sulfaattipitoisuuksien noustessa myös liukoisen kokonaisfosforin pitoisuudet nousisivat voimakkaammin. Tulosten perusteella voinee olettaa, että esimerkiksi tutkimuksessa käytetyn Maarian altaan pohjasedimentti sisältää jo itsessään riittävän potentiaalin fosforin runsaalle vapautumiselle. Kysymykseksi jääkin, onko lisääntyneellä sulfaattikuormituksella käytännössä merkitystä luonnonvesien rehevöitymisessä?

## LÄHTEET

- Borg, S. 2014. *Kaivoksen suotovesien käsittely sulfaatinpelkistäjäorganismeilla*. Diplomityö, Tampereen teknillinen yliopisto. Viitattu 6.1.2018  
<https://dspace.cc.tut.fi/dpub/bitstream/handle/123456789/22395/Borg.pdf?sequence=3>
- Burone, L.; Saraiva, E.; Valente, P.; & Pires-Vanin, A. M. 2005. *A chemical analysis of sediment pore water in oxygen-free atmosphere: application to a contaminated area*. São Paulo: Brazilian Journal of Oceanography. Viitattu 20.2.2018  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1679-87592005000100007](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-87592005000100007)
- Ekholm, P. 2017. *San Pellegrino ja Savijoki – sulfaatit vesissämme. Saaristomeren vedenlaadun parantaminen peltojen kipsikäsittelyllä*. Viitattu 27.12.2017  
<http://blogs.helsinki.fi/save-kipsihanke/2017/08/28/san-pellegrino-ja-savijoki-sulfaatit-vesissamme/>
- Lehtoranta, J.; & Ekholm, P. 2013. *Sulfaatti - salakavala rehevöittäjä*. Viitattu 15.11.2017 [http://www.vesitalous.fi/wp-content/uploads/2013/04/Vesitalous\\_02\\_2013.pdf](http://www.vesitalous.fi/wp-content/uploads/2013/04/Vesitalous_02_2013.pdf)
- LibreTexts Chemistry. 2016. *Chemistry of Nitrogen*. Viitattu 23.2.2018  
[https://chem.libretexts.org/Core/Inorganic\\_Chemistry/Descriptive\\_Chemistry/Elements\\_Organized\\_by\\_Block/2\\_p-Block\\_Elements/Group\\_15%3A\\_The\\_Nitrogen\\_Family/Z%3D007\\_Chemistry\\_of\\_Nitrogen\\_\(Z%3D7\)](https://chem.libretexts.org/Core/Inorganic_Chemistry/Descriptive_Chemistry/Elements_Organized_by_Block/2_p-Block_Elements/Group_15%3A_The_Nitrogen_Family/Z%3D007_Chemistry_of_Nitrogen_(Z%3D7))
- Madigan, M.; & Brock, T. 2009. *Brock biology of microorganisms*. San Francisco (CA) : Pearson Benjamin Cummings cop. 2009.
- Solunetti. 2018. *Gram-värijäys*. Viitattu 29.1.2018  
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/gram-varjays/2/>
- Solunetti. 2018. *Lämpötila*. Viitattu 29.1.2018  
[http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/lampotila\\_1/3/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/lampotila_1/3/)
- Terra Universal. 2014. *The Complete History of the Glovebox*. Viitattu 13.2.2018  
<https://www.terrauniversal.com/blog/all-terra-blogs/complete-history-glovebox/>

Universal industrial gases Inc. 2018. *Nitrogen (N<sub>2</sub>) Properties, Uses and Applications Nitrogen Gas and Liquid Nitrogen*. Viitattu 23.2.2018  
<http://www.uigi.com/nitrogen.html>

Varjos, M. 2000. *Metallipitoisten jätevesien käsittely sulfaatinpelkistäjäbakteereilla: bakteerien rikastaminen ja karakterisointi*. Diplomityö, Tampereen teknillinen korkeakoulu.

Vestola, E.; & Mroueh, U.-M. 2008. *Sulfaatinpelkistykseen hyödyntäminen happamien kaivosvesien käsittelyssä: Opas louhoskäsittelyn hallintaan*. Espoo: VTT tiedotteita 2008. Viitattu 2.2.2018 <https://docplayer.fi/9513420-Sulfaatinpelkistykseen-hyodyntaminen-happamien-kaivosvesien-kasittelyssa-elina-vestola-ulla-maija-mroueh-opas-louhoskasittelyn-hallintaan.html>

Liite 1. Tulokset ennen inkubaatiota määritetyille koeyksikkönäytteille

		pH	Johtokyky (µS/cm)	Liennut kok-P (µg/l)	NH <sub>4</sub> -N (µg/l)	NO <sub>3</sub> -N (mg/l)	SO <sub>4</sub> (mg/l)	Fe (µg/l)	Mn (µg/l)	S (ppm)	H <sub>2</sub> S (mg/l)
1	MA0S0C R1	6,7	124	80	355	8,8	14	129	897	18,3	< 0,1
2	MA0S0C R2	6,9	124	44	350	7,7	15	105	875	-	
3	MA0S1C R1	6,8	129	42	40	2,8	13	132	1087	18,2	
4	MA0S1C R2	6,9	125	52	35	1,5	13	99	1023	18,7	
5	MA1S0C R1	7,1	180	52	353	2,2	43	103	925	29,4	
6	MA1S0C R2	7,0	180	88	368	3,2	44	150	935	29,4	
7	MA1S1C R1	6,9	181	42	25	3,6	42	116	1101	29,9	
8	MA1S1C R2	6,9	180	52	70	2,1	41	660	1100	29,2	
9	MA2S0C R1	7,0	309	62	325	3,8	106	124	1106	53,4	
10	MA2S0C R2	7,0	309	54	325	4	101	188	1115	53,2	
11	MA2S1C R1	7,1	310	44	43	1,6	107	106	1230	53,6	
12	MA2S1C R2	7,0	309	36	28	1,5	106	119	1248	53,8	
13	MA0S0CK R1	7,2	122	52	268	3	17	102	795	20,9	
14	MA0S0CK R2	7,1	120	50	258	3,1	15	487	777	21,0	
15	MA0S1CK R1	7,0	121	40	33	1,3	15	252	953	21,5	
16	MA0S1CK R2	6,9	122	48	35	1,8	14	152	974	21,1	
17	MA2S0CK R1	7,1	308	44	250	5,4	104	228	1037	56,2	
18	MA2S0CK R2	7,2	308	348	228	8,9	104	168	1022	56,1	
19	MA2S1CK R1	6,8	308	54	40	2,5	104	183	1327	56,9	
20	MA2S1CK R2	6,8	322	44	68	3,2	102	239	1352	56,5	
21	PJ0S0C R1	7,3	125	50	90	4,1	11	335	26,8	21,5	
22	PJ0S0C R2	7,5	119	44	65	4,1	11	376	25,8	22,0	
23	PJ2S0C R1	7,4	302	46	143	7	96	359	23,6	55,3	
24	PJ2S0C R2	7,5	303	56	53	5,7	97	363	21,9	56,4	
25	PJ0S1C R1	7,3	119	20	23	3	10	365	22,4	23,0	
26	PJ0S1C R2	7,5	122	20	35	2,7	10	348	20,9	23,5	
27	PJ2S1C R1	7,4	300	18	13	4	96	317	21,8	58,0	
28	PJ2S1C R2	7,4	302	16	33	3,6	97	322	20,5	58,3	

## Liite 2. Tulokset ennen inkubaatiota määritetyille koevesi- ja sedimenttinäytteille

LSVSY:n tulokset									
	Koevesi 1	Koevesi 2	Huom						
pH	6,9 7,3	7 7,4							
Johtokyky (µS/m)	116 120	116 120							
Sameus (FNU)	99	99							
Kiintoaine (mg/l)	88	88							
Alkaliteetti (mmol/l)	0,59	0,58							
DOC (mg/l)	14	15							
kok-P (mg/l)	0,19	0,2							
Liuennut kok-P (µg/l)	47 44	46 43							
Liuennut PO <sub>4</sub> suodatettu (mg/l)	0,037	0,042							
kok-N (mg/l)	1,4	1,5							
NH <sub>4</sub> -N (µg/l)	45 35	45 34							
NO <sub>3</sub> -N (mg/l)	5,8 0,74	5,1 0,75							
NO <sub>2</sub> -N (mg/l)	0,015	0,015							
SO <sub>4</sub> (mg/l)	11 10	12 10							
Fe (mg/l)	1,68 6,0	1,18 6,3	Näyte suodatettu Näyte suodattamaton						
Mn (mg/l)	0,056 0,049	0,051 0,050	Näyte suodattamaton						

	Sedimentti 0	Sedimentti 1	Sedimentti 2
Kuiva-aine %	16,7 -	- 17,0	- 17,6
Hehkutusjäännös (mg/g) märkäpaino	151	-	-
Fe (g/kg) märkäpaino	-	363	372
Mn (g/kg) märkäpaino	-	6,8	6,83
kok-P (mg/kg) kuivapaino	-	1959	1929
dit. Fe (g/kg) märkäpaino	-	3,35	3,12
dit. P (mg/kg) märkäpaino	-	168	169
TC (g/kg ka)	-	34	34
N (g/kg ka)	-	4,3	3,9

Liite 3. Tulokset inkubaation jälkeen määritetyille koeyksikkönäytteille

		pH	Johtokyky (µS/cm)	Liuennut kok-P (µg/l)	NH4-N (µg/l)	NO3-N (mg/l)	SO4 (mg/l)	Fe (mg/l)	Mn (mg/l)	S (mg/l)	H2S (mg/l)
1	MA0S0C R1	7,0	442	4344	8200	< 1,25	< 1,25	38,6	5,5		3,7
2	MA0S0C R2	7,0	441	4208	7700	< 1,25	< 1,25	40,7	5,4		2,4
3	MA0S1C R1	6,9	763	4296	> 6500	< 1,25	< 1,25	107	12,7		4,2
4	MA0S1C R2	6,9	771	4728	11500	< 1,25	< 1,25	99,5	12,5		4,3
5	MA1S0C R1	7,1	454	4408	6400	< 1,25	3,1	35,1	5,1		1,9
6	MA1S0C R2	7,1	462	4496	7000	< 1,25	2,9	34,8	5,2		1,6
7	MA1S1C R1	6,9	783	4696	10075	< 1,25	< 1,25	109	11,6		4,2
8	MA1S1C R2	6,9	792	4528	9225	< 1,25	< 1,25	102	11,9		4,1
9	MA2S0C R1	7,2	507	4952	6125	< 1,25	15,3	29,8	4,9		2,1
10	MA2S0C R2	7,2	507	5408	5850	< 1,25	18,4	30,4	4,9		1,3
11	MA2S1C R1	6,9	822	5472	8325	< 1,25	7,3	90,0	9,7		3,9
12	MA2S1C R2	6,9	823	4720	9375	< 1,25	12,9	88,6	9,6		4,1
13	MA0S0CK R1	4,7	434	14	7,5	< 1,25	16,3	2,31	8,1		3,4
14	MA0S0CK R2	4,8	440	14	10,0	< 1,25	17	4,99	8,3		3,3
15	MA0S1CK R1	4,7	528	48	5,0	< 1,25	9,8	23,7	9,2		3,3
16	MA0S1CK R2	4,7	516	12	5,0	< 1,25	11,7	19,9	8,9		3,3
17	MA2S0CK R1	4,7	575	8	5,0	< 1,25	96,5	1,7	8,0		3,3
18	MA2S0CK R2	4,6	568	10	7,5	16,5	75,6	0,9	7,8		3,5
19	MA2S1CK R1	4,9	635	20	5,0	< 1,25	93,6	21,1	8,7		3,4
20	MA2S1CK R2	4,8	628	14	5,0	2	116,4	17,2	8,4		3,7
21	PJ0S0C R1	7,1	118	58	12,5	4,6	15,1	0,30	< 0,010		0,8
22	PJ0S0C R2	7,1	117	56	10,0	4,2	10,7	0,31			0,9
23	PJ2S0C R1	7,2	299	58	17,5	7,5	85,6	0,24			0,8
24	PJ2S0C R2	7,2	313	62	17,5	6,3	77	0,35			1,0
25	PJ0S1C R1	4,1	151	16	15,0	< 1,25	10,3	3,1	0,035		1,1
26	PJ0S1C R2	4,1	150	22	17,5	< 1,25	10,1	3,1	0,034		1,0
27	PJ2S1C R1	4,0	335	22	17,5	< 1,25	104,4	3,2	0,033		0,8
28	PJ2S1C R2	4,0	332	20	12,5	< 1,25	82,3	3,1	0,031		0,6