

Opinnäytetyö (AMK)

Bio-ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2015

Milla Toivonen

VEDEN PUHTAUDEN
ARVIOINTI *ALIIVIBRIO*
FISCHERI -
VALOBAKTEERITESTILLÄ

– Kenttäkäyttöisen BioTox –menetelmän
kehittäminen



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

2015 | 42 sivua

Ohjaajat: Juha Lappalainen, FT; Kai Rosenberg, FK

Milla Toivonen

VEDEN PUHTAUDEN ARVIOINTI ALIIVIBRIO FISCHERI -VALOBAKTEERITESTILLÄ – KENTTÄKÄYTTÖISEN BIOTOX –MENETELMÄN KEHITTÄMINEN

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää nopea ja yksinkertainen ISO-standardiin 11348-3 pohjautuva menetelmä veden puhtauden määrittämiseen. Työn toimeksiantajana oli maskulainen ympäristömittauksia tarjoava yritys. Menetelmän on tarkoitus helpottaa veden puhtauden arviointia myös silloin, kun mittauksia ei voi suorittaa laboratorio-olosuhteissa ja antaa käyttäjistä riippumatta luotettavia tuloksia. Työssä käytettiin bakteerireagenssia, kolmea eri referenssikemikaalia sekä vesinäytteitä. Bakteerireagenssi työssä oli kylmäkuivattu *Aliivibrio fischeri* (BioTox kit) ja referenssikemikaaleina käytettiin 3,5-dikloorifenolia, sinkkisulfaattia ja kaliumdikromaattia. Työn tarkoituksena oli luoda yksinkertainen testimenetelmä, jolla yhdellä reagenssiannoksella pystytään määrittämään sekä kontrollinäyte että testinäyte ja erottamaan valobakteerille toksiset näytteet puhtaista näytteistä.

Työ aloitettiin suorittamalla mittauksia ISO-standardin mukaisesti vesiliuoksissa. Täten saatiin tutkittua myös valmistettujen referenssiluosten pitoisuudet ja niiden vaikutus käytettävissä olleeseen bakteerireagenssiin. Referenssiluoksien tarkoituksena oli toimia myrkyllisinä näytteinä tutkimuksessa. Tämän jälkeen siirryttiin testaamaan menetelmää, jossa mittaukset tehtiin toimeksiantajan kehittämällä menetelmällä suurilla referenssikemikaalipitoisuuksilla. Pitoisuuksia pienennettäessä huomattiin alkuperäisen menetelmän antavan vääriä negatiivisia tuloksia referenssikemikaaleista ja siksi testimenetelmään tehtiin muutoksia. Näin saadulla menetelmällä saatiin erotettua myrkylliset näytteet vesinäytteistä kun käytettiin 50 % inhibition aiheuttavia pitoisuuksia.

Opinnäytetyössä saatiin kehitettyä menetelmä, joka tietyin rajoituksin toimii luotettavasti vesinäytteiden mittauksissa. Jotta menetelmän toimivuus erilaatuisilla vesillä ja eri käyttäjillä voitaisiin varmistaa, tarvitaan lisää materiaalia eri muuttujien huomioimiseksi.

ASIASANAT:

Aliivibrio fischeri, bioluminesenssi, ympäristökemia, luminometri, kenttämenetelmä, ISO-standardi, BioTox

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2015 | 42 pages

Instructors: Juha Lappalainen, PhD ; Kai Rosenberg M.Sc.

Milla Toivonen

DETERMINATION OF WATER PURITY USING ALIIVIBRIO FISCHERI LUMINESCENT BACTERIA TEST –DEVELOPMENT OF FIELD-USE BIOTOX METHOD

The objective of this Bachelor's thesis was to study and develop a rapid and user-friendly test method to determine water purity. The method was to be based on ISO standard 11348-3. The aim was to find a reliable protocol and to use reference substances represented in the ISO standard as a model for different toxic compounds.

The thesis was commissioned by a private company focused on developing measurement techniques for environmental monitoring. The method would later be utilized commercially for example in industry.

The method was to aid water quality determination when measuring can not be performed in laboratory conditions, and to produce reliable results independent of the user. A bacterial reagent, three different reference chemicals and different water samples were used. The bacterial reagent was freeze dried *Aliivibrio fischeri* from a BioTox kit and the reference substances were 3,5- dichlorophenol, zink sulfate and potassium dichromate. The objective was to create a simple protocol which would catch all samples toxic for photobacterium by using a single dose of reagent for both the test sample and the control sample.

The first measurements were performed by using a method in aqueous solutions in compliance with the ISO standard. The aim was to determine that the reference chemicals gave expected results with the standard protocol. These reference chemicals and their dilutions were used as toxic samples in the study. After that the commissioner's method was studied by using high concentrations of toxic reference chemicals. When lowering the concentrations it was found that the method produced false negatives for the reference substances and the test protocol was altered. With this altered method toxic samples were found at concentrations inducing 50 % inhibition.

As a result of this thesis a new rapid method for water purity determination was developed. This method is reliable within certain limitations when monitoring water quality. Further studies must be performed to ensure that the method is not user dependent.

KEYWORDS:

Aliivibrio fischeri, luminescence, luminometer, environmental chemistry, Bio-Tox, field method, ISO-standard

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET	6
1 JOHDANTO	7
2 VESI	8
2.1 Vesien laadun tutkiminen	8
2.2 Tällä hetkellä käytössä olevat pikamenetelmät	9
3 ISO –STANDARDI	11
3.1 ISO 11348-3 Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of <i>Vibrio fischeri</i> (Luminescent bacteria test) — Part 3: Method using freeze-dried bacteria	11
3.2 Referenssikemikaalit	11
3.3 Häiriötekijät	12
3.4 <i>Aliivibrio fischeri</i>	13
3.5 <i>Euprymna scolopesin</i> ja <i>Aliivibrio fischerin</i> symbioosi	14
3.6 <i>Aliivibrio fischerin</i> bioluminesenssi	15
4 LUMINOMETRISET MITTAUKSET	16
4.1 Luminometrian edut	16
4.2 Luminometrin toimintaperiaate	16
4.3 Työssä käytetyt luminometrit	17
5 TYÖN SUORITUS JA TULOKSET	19
5.1 Menetelmän kehittäminen	19
5.2 Tarvittavien liuosten valmistus	19
5.3 Ensimmäiset mittaukset ja EC50-arvon määrittäminen	20
5.4 Tikkumenetelmän luominen	26
5.5 Lopullinen menetelmä	37
6 PÄÄTELMÄT	39
LÄHTEET	41

LIITTEET

Liite 1. 7.3.2014-25.3.2014 Suoritettujen mittausten tulokset	
Liite 2. 7.4.2014-10.4.2014 Suoritettujen tikkumittausten tulokset	
Liite 3. 29.4.2014 Suoritettujen tikkumittausten tulokset	
Liite 4. 30.4.2014 Suoritettujen tikkumittausten tulokset	
Liite 5. 02.05.2014 Suoritettujen tikkumittausten tulokset	

KUVAT

Kuva 1 <i>Aliivibrio fischeri</i> ¹⁹	13
Kuva 2 Flaviinimononukleotidin pelkistyminen	15
Kuva 3 Bioluminesenssin muodostuminen	15
Kuva 4 Luminometrin toiminta	17
Kuva 5 Mittausten tulosten keskiarvot	25
Kuva 6 Toimeksiantajan toimittama menetelmäohje	27
Kuva 7 Kymmenkertaisilla EC50-arvoilla suoritettujen mittausten tulosten keskiarvot	30
Kuva 8 10.4.2014 EC50-arvoilla suoritettujen mittausten tulokset	31
Kuva 9 29.4.2014 Suoritettujen mittausten keskiarvo	34
Kuva 10 30.4.2014 suoritettut mittaukset 29.4.2014 tehdyistä tikuista (Keskiarvot)	35
Kuva 11 2.5.2014 Suoritettujen mittausten ensimmäisen mittaussarjan tulokset	36
Kuva 12 2.5.2014 suoritettujen mittausten toisen mittaussarjan tulokset	37

TAULUKOT

Taulukko 1 <i>Aliivibrio fischeri</i> ominaisuuksia ¹⁹	14
Taulukko 2. Referenssikemikaalien valmistus, määrät ja pitoisuudet	20
Taulukko 3 Referenssikemikaalien pitoisuudet, joiden tulisi aiheuttaa 20 %-80 % luminesenssin inhibitio näytteessä ¹⁰	21
Taulukko 4 7.3.2014 dikloorifenolilla suoritettujen mittausten tulokset.	23
Taulukko 5. ISO 11348-3:n mukaiset EC-arvot	25
Taulukko 6 7.4.2014 kaliumdikromaatilla suoritettut mittaukset	29
Taulukko 7. 10.4.2014 Dikloorifenolilla suoritettut mittaukset, pitoisuus mittauksessa 2,27mg/l	32
Taulukko 8 7.3.2014-25.3.2014 suoritettujen mittausten tulokset	43
Taulukko 9 7.4.2014-9.4.2014 Suoritettujen tikkumittausten tulokset	44
Taulukko 10 10.4.2014 Suoritettujen mittausten tulokset	44
Taulukko 11 29.4.2014 Suoritettujen tikkumittausten tulokset	45
Taulukko 12 30.4.2014 Suoritettujen tikkumittausten tulokset. (Samat tikut kuin 29.4.2014)	46
Taulukko 13 02.05.2014 Suoritettujen tikkumittausten tulokset	47

KÄYTETYT LYHENTEET

EC50-arvo	Pitoisuus, joka on myrkyllinen 50 %:lle koe-eliöitä
EC20-arvo	Pitoisuus, joka on myrkyllinen 20 %:lle koe-eliöitä
RLU	Relative light units
DCP	Dikloorifenoli
ZnSO ₄	Sinkkisulfaatti
K ₂ Cr ₂ O ₇	Kaliumdikromaatti
ATP	Adenosiinitrifosfaatti

1 JOHDANTO

Tämä opinnäytetyö tehtiin Aboatox oy:n toimeksiannosta kevään ja kesän 2014 aikana. Työn käytännön osuus suoritettiin Turun ammattikorkeakoulun biotekniikan laboratoriossa keväällä 2014.

Työn tarkoituksena oli kehittää helppokäyttöinen kenttämenetelmä veden puhtauden määrittämiseen. Työ aloitettiin mittaamalla kemikaalien EC50-arvoja ja suorittamalla testit ISO-standardin ohjeiden mukaisesti. Tämän jälkeen aloitettiin tikkumenetelmän kehittäminen ja mittauksien suorittaminen tikulla. Tikkujen mukana ollessa tutkittiin mittauksen luotettavuutta referenssikemikaalien sellaisilla pitoisuuksilla, jotka aiheuttavat ISO-standardin mukaisella menetelmällä vähintään 50 % valontuoton vähenemisen. Mukana mittauksissa käytettiin vesinäytteitä sekä natriumkloridin suolaliuosta.

Menetelmällä haluttiin olevan mahdollista selvittää, onko jokin näyte myrkyllinen vai ei. Tarkoituksena ei siis ollut saada aikaan menetelmää, jolla voidaan tarkasti määrittää, miten myrkyllinen joku vesinäyte on. Menetelmällä voidaan löytää selkeästi *Aliivibrio fischerille* myrkylliset vesinäytteet puhtaiden vesinäytteiden joukosta, ja vaikka myrkyllisyyden mekanismit vaihtelevat lajista ja organismista toiseen, myrkyllisyys yhteen organismiin usein ennakoii myrkyllisyyttä myös muihin organismeihin. Siten luminesenssin väheneminen bakteerisolussa voi tehokkaasti ennustaa myrkyvaikutuksia myös kehittyneemmällä organismeilla.¹

2 VESI

Vesi on välttämätön kaikelle elämälle ja käyttämämme veden laadulla on suora vaikutus terveyteen. Myös veden käyttämisellä on merkitys veden hyvän laadun ylläpitämisessä, ja veden laatu voi huonontua esimerkiksi kemiallisen käsittelyn, verkostossa seisomisen tai vesijärjestelmän käytön tai rakenteellisten ongelmien vuoksi. Suomessa valvotaan muun muassa talous- ja uimavesiä, sekä seurataan teollisuuden jätevesien laatua.²

Väestönkasvu, kaupungistuminen, hyvänlaatuisten vesivarojen niukkuus ja kasvavat lannoitteiden hinnat ovat syitä siihen, että jätevesiä käytetään yhä enenevässä määrin vesiviljelyssä ja maanviljelyssä.³

Vaikka iso osa veden laadun aiheuttamista terveysriskeistä liittyy veden mikrobiologiseen laatuun, ei myöskään kemiallisten haittojen riskejä pidä aliarvioida. Muun muassa lannoitteiden ja rikkaruohomyrkkujen liikakäyttö aiheuttavat suoraan riskin syrjäisimmillä alueilla. Tämän riskin määrittäminen on tällä hetkellä hintavaa ja varsinkin kehittyvässä maissa usein myös haastavaa.⁴

2.1 Vesien laadun tutkiminen

Sekä talousvesien että jätevesien laatua seurataan eri tavoin. Myös luonnonvesien ja uimavesien laatua tarkkaillaan. Jätevesien koostumus riippuu siitä, onko kyseessä teollisuudesta peräisin oleva jätevesi, vai kotitalouksista peräisin oleva jätevesi.

Jätevesistä mitataan muun muassa kemiallista ja biologista hapen kulutusta. Biologiseen puhdistukseen tarvitaan sopivassa suhteessa fosforia ja typpeä, jota aktiivilietteessä olevat mikrobit poistavat. Jätevesistä määritellään myös raskasmetallipitoisuudet, sillä raskasmetallit ovat haitallisia aktiivilietteen mikrobeille ja vaikeuttavat siten biologista jätevedenpuhdistusta. Lisäksi jätevedenpuhdistamoille tulevasta jätevedestä tutkitaan pH, sähkönjohtavuus, kokonaisfosfori, kokonaistyyppi, kiintoaine, ammoniumtyppi KMnO_4 -luku ja

alkaliteetti. Myös jätevedenpuhdistamoilta lähtevää vettä tutkitaan eri mittauksin.⁵

Vesien myrkyllisyyden määrittämiseen on kehitetty erilaisia menetelmiä. Näissä menetelmissä yhteistä on se, että niissä käsitellään nestemäisiä näytteitä, mutta muun muassa määrittämiseen käytettävät testiorganismit vaihtelevat. Näille menetelmille yhteistä on myös se, että testin tekemiseen tarvitaan laboratorio-olosuhteet. Ennen varsinaisia mittauksia vesinäytteistä pitää määrittää muun muassa pH, veden kovuus, happipitoisuus, ammoniakkipitoisuus sekä suolapitoisuus johtokyky mittauksen avulla. Lisäksi näytteiden säilytyslämpötila on tärkeä. Lisäksi tulee huolehtia siitä, että testiorganismien, esimerkiksi vesikirppujen, säilytys- ja kuljetusolosuhteet ovat sellaiset, etteivät ne vaikuta testien tuloksiin.⁶

Kuitenkin, esimerkiksi teollisuudessa ja maissa, joissa on vasta kehittymässä oleva infrastruktuuri, olisi käyttöä nopealle ja luotettavalle menetelmälle, jonka avulla vesien laatua voitaisiin seurata nopeasti ja helposti.

2.2 Tällä hetkellä käytössä olevat pikamenetelmät

Tällä hetkellä eri yrityksiltä löytyy erilaisia pikamenetelmiä veden laadun määrittämiseen. Usein menetelmät ovat raskaita, niissä käytetään useita eri kemikaaleja ja niissä on monia eri vaiheita. Nämä pikamenetelmät vaativat myös usein resursseja sekä ajallisesti, että laitteistollisesti.

Pikamenetelmissä voidaan mitata eri kemikaaleja erillisin mittauksin.⁷ Vaikka yksittäiseen testiin kuluva aika olisikin lyhyt, se, että testejä joudutaan suorittamaan useampi, pidentää mittauksiin kuluvaan aikaan huomattavasti.

Lähimpänä nyt kehitettyä menetelmää on Microbiotestin Toxkit. Kyseessä on tunnissa valmistuva pikamenetelmä, jossa mittaukset tehdään nesteestä ja testin voi suorittaa +15-+25 °C:ssa. Menetelmässä käytettävä luminoiva bakteeri on sama, kuin tutkitussa menetelmässä. Testiajasta 30 minuuttia kuluu bakteerin esivalmisteluun ja 30 minuuttia on varsinaista näytteen kontaktiaikaa.

Menetelmässä valmistellaan 1 ml bakteerisuspensiota, joka voidaan jakaa neljäksi 200 µl:n osioksi siten, että kustakin 1 ml:n bakteerisuspensiosta voidaan mitata joko kaksi erillistä näytettä, tai yhdestä näytteestä kaksi rinnakkaista näytettä. Menetelmässä tarvitaan siis kahta eri kokoista pipettiä, niiden kärkiä sekä putkia bakteerisuspension, kontrolliliuosten ja näyteliuosten säilyttämiseen.⁸

3 ISO –STANDARDI

Standardit ovat dokumentteja joissa käydään läpi vaatimukset, spesifikaatiot, ohjeistukset ja joita voidaan käyttää järjestelmällisesti jotta voidaan varmistaa että materiaalit, tuotteet, prosessit ja palvelut ovat sopivia tehtäviinsä. Kansainväliset ISO-standardit varmistavat tuotteiden ja palveluiden laadun, luotettavuuden ja turvallisuuden. Ne ovat myös työkaluja joiden avulla voidaan vähentää kustannuksia minimoimalla jätemäärät ja virheet ja kasvattamalla tuottoa.⁹ ISO-standardit neuvovat siis tavan tehdä asioita toistettavasti ja luotettavasti.

3.1 ISO 11348-3 Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) — Part 3: Method using freeze-dried bacteria

ISO 11348-3 kuvailee menetelmän, jolla voidaan määrittää vesinäytteen aiheuttama *Vibrio fischeri* luminesenssin inhibitio käyttäen pakastekuivattua bakteeria. Menetelmää voidaan soveltaa mm. jäteveteen, pinta- ja pohjaveteen, makeaan veteen, suolaiseen veteen sekä yksinkertaisiin veteen liotettuihin aineisiin. Standardissa on ilmoitettu konsentraatiot, joilla referenssikemikaalit aiheuttavat 20 % ja 50% valontuoton häviämät näyteliuoksessa. Näitä arvoja kutsutaan EC20- ja EC50-arvoiksi.¹⁰

3.2 Referenssikemikaalit

ISO-standardissa käytettävät referenssikemikaalit ovat kaliumdikromaatti, sinkkisulfaatti ja 3,5-dikloorifenoli.¹⁰ Referenssikemikaalit edustavat raskasmetallia, hapettavaa yhdistettä ja orgaanista yhdistettä.

Kaliumdikromaatti on epäorgaaninen, hapettava raskasmetalliyhdiste, jota käytetään hapettimena teollisuudessa ja laboratorioissa. Kyseinen yhdiste on haitallinen ihmisen terveydelle ja luonnolle. Kaliumdikromaattia käytetään myös

sementissä parantamaan sen rakennetta ja tiheyttä, hopean puhtauden määrittämisessä sekä puunkäsittelyssä väriaineena.¹¹

Sinkkisulfaatti on epäorgaaninen yhdiste, jonka sovellutuksia ovat mm. rikkaruohomyrkyt, eläinrehut, maalien ja lannoitteiden valmistus ja hampaidenhoitotuotteet.¹² Sinkkisulfaatin myrkyllisyys perustuu sinkkiin, joka on myrkyllisyydestään huolimatta myös välttämätön hivenaine.¹³ Korkeat sinkkipitoisuudet selkeästi haittaavat bakteerien kasvua ja vain muutamat bakteerit kykenevät selviämään, kun ne altistetaan korkeille sinkkipitoisuuksille. Tämä johtuu pääasiassa siitä, että raskasmetallit muuntavat nukleiinihappojen ja proteiinien konformaatorakenteita ja muodostavat proteiinimolekyylien kanssa yhdisteitä tehden ne toimimattomiksi. Tämä johtaa solukasvun hidastumiseen ja entsyymien inaktivoitumiseen sekä solukalvon hajoamiseen.¹⁴

Dikloorifenoleita käytetään mm. desinfiointiaineina ja hyönteismyrkkyinä. Kloorifenolit voivat estää epäorgaanisen fosfaatin muuntamisen ATP:ksi vaikuttamatta elektronien kuljetukseen. Tällöin solut hengittävät, mutta koska uutta ATP:tä ei enää muodostu, se kuluu pian loppuun.¹⁵

3.3 Häiriötekijät

Referenssikemikaalien lisäksi myös muut tekijät voivat vaikuttaa luminesenssin heikkenemiseen testattavassa näytteessä. Tutkittavien myrkkujen tulee olla vesiliukoisia, jotta luminesenssin väheneminen olisi luotettava. Näytteen sameus tai värillisuus vähentää luminesenssiä absorboimalla ja sirottamalla valoa, näitä vaikutuksia voidaan vähentää näytteiden esikäsittelyllä. Bioluminesenssi vaatii myös happea, joten hapen määrä vaikuttaa bioluminesenssiin ja matala happipitoisuus voi olla estävä. Myös väärällä pH:lla voi olla myrkyllinen vaikutus: pH:n tulee olla 6,0 ja 8,5 välillä, jotta pH ei vaikuta bakteerin luminesenssiin. Lisäksi suolakonsentraatiolla on suuri merkitys, näytteessä tulee olla riittävä NaCl-konsentraatio, mutta jos näytteen suolakonsentraatio nousee liian korkeaksi, seurauksena voivat olla testin onnistuminen kannalta kriittiset hyperosmoottiset vaikutukset.¹⁰

3.4 *Aliivibrio fischeri*

Aliivibrio fischeri (tunnettiin aiemmin nimellä *Vibrio fischeri*) on merissä elävä, sukuun *Vibrio* kuuluva gramnegatiivinen ja sauvanmuotoinen bakteeri, joka elää useimmiten symbioosissa merieläinten kanssa, mutta esiintyy myös yksin.¹⁶ *Aliivibrio fischeri* on fakultatiivinen anaerobi, eli se kykenee elämään myös anaeroobeissa olosuhteissa käyttämällä tyypeä elektroninsiirtoketjussa soluhengityksessä.¹⁷

*Aliivibrio fischeri*llä on luminoiva ominaisuus, jota hyödynnettiin myös tässä työssä. Bioluminesenssin tuottamiseen välttämättömät proteiinit koodataan geeniryhmässä, jota kutsutaan *lux* operoniksi.¹⁸



Kuva 1 *Aliivibrio fischeri*¹⁹

Aliivibrio fischeri ei ole patogeeninen ihmisille, mutta joillekin meren selkärangattomille se voi olla patogeeninen. Vibrioiden suvun kolme lajia ovat patogeenisia myös ihmiselle. *Aliivibrio fischeri*n ominaisuuksia on kuvattu taulukossa 1. Ominaisuudet pätevät kannalle, joka ei elä symbioosissa isäntäeliön kanssa, vaan on esimerkiksi laboratoriossa kasvatettu kanta. Symbioosissa elävällä kannalla nämäkin ominaisuudet ovat poikkeavat.¹⁹

Taulukko 1 *Aliivibrio fischeri* ominaisuuksia ¹⁹

Kasvulämpötila	35 °C
Kahdentumisaika (h)	0,5
Solukoko (µm)	1,2*1,7
Flagellaatio	3-8 polaarista flagellaa
Migraationopeus mm/h	4,0-5,0

3.5 *Euprymna scolopes*in ja *Aliivibrio fischeri*in symbioosi

*Aliivibrio fischeri*in isäntäeläin on *Euprymna scolopes*, joka on pieni, pääasiassa Hawajilla elävä mustekala. Villinä *Euprymna scolopes* elää keskimäärin kahdesta kolmeen kuukauteen, vankeudessa elinikä pitenee kolmesta viiteen kuukauteen. ²⁰

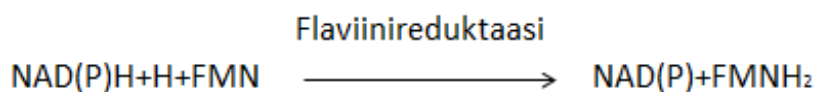
Aliivibrio fischeri on isäntäeläimensä *Euprymna scolopes*in kanssa sopeutunut elämään muut poissulkevassa symbioosissa. ²¹ Mustekala hyötyy tästä symbioosista käyttämällä bioluminoivaa bakteeria suoja värityksenä: mustekalan noustessa merenpintaan bioluminesenssi simuloi kuunvaloa, jolloin mustekalasta ei jää saalistajille havaittavaa varjoa. Lisäksi mustekala käyttää bioluminesenssia valonaan saalistaessaan meren pimeydessä. ²²

Vastakuoriutuneilla mustekaloilla ei ole bakteerikantaa, joten niiden täytyy hankkia se ympäröivistä vesistä. Vaikka bakteerisolujen tiheys merivedessä on hyvin pieni, jo muutaman minuutin päästä syntymästään bakteerit ovat asuttaneet kohde-eläimen. Lopullinen solutiheys on saavutettu noin vuorokauden kuluessa bakteerien inokulaatiosta. Tutkimuksissa on todettu, että natiivikannat asuttavat mustekalan tehokkaammin, kuin ei-natiivit kannat. ²³ Symbioosissa mustekalan valoelin turpoaa ja *Aliivibrio fischeri* puolestaan menettää flagellansa ja solukoko pienentyy. ²⁴

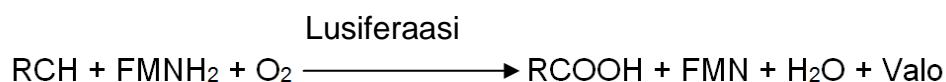
3.6 *Aliivibrio fischeri* bioluminesenssi

Bioluminesenssi on elävän organismin kykyä tuottaa valoa. Sitä esiintyy monilla merieläimillä, sekä joillakin kuivalla maalla asuvilla eliöillä. Valontuottoon on monia erilaisia mekanismeja ja lusiferiinista ja lusiferaasista on monia eri muotoja, mutta kaikki bioluminesenssireaktiot vaativat käyttöönsä molekulaarista happea. Bakteereista peräisin oleva lusiferaasi on monitoiminen entsyymi, jota tarvitaan sekä bioluminesenssiin että aerobisiin hengitysreaktioihin.

Bioluminesenssin syntyminen on kemiallinen reaktio, jossa lusiferiini hapettuu lusiferaasin katalysoimassa reaktiossa. Kaikissa valoreaktioissa hapettava pigmentti on lusiferiini, mutta lusiferiinin kemiallinen rakenne vaihtelee riippuen valontuottajasta. Katalysaattorina reaktiossa toimii adenosiinitrifosfaatti ja reaktio tuottaa valon lisäksi vettä, oksilusiferiinia ja karboksyyliiryhmän. Lusiferaasi on entsyymi, joka on heterodimeeri koostuen alfa- ja beta-alayksiköistä, joita koodaavat geenit *luxA* ja *luxB*. *LuxCDE* muodostaa rasvahapporeduktaasikompleksin, entsyymit, joita tarvitaan pitkäketjuisten rasva-aldehydien muodostukseen. Entsyymi, jota tarvitaan vähentämään flaviinimononukleotidia, on koodattu *luxG* geenissä. Pelkistyneellä flaviinimononukleotidilla (FMNH₂) on tärkeä osa bioluminesenssireaktiossa. FMN pelkistyy reaktiossa nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatin kanssa flaviinireduktaasientsyymillä ollessa läsnä.¹



Kuva 2 Flaviinimononukleotidin pelkistyminen



Kuva 3 Bioluminesenssin muodostuminen

4 LUMINOMETRISET MITTAUKSET

Kemi- ja bioluminesenssiin perustuvat mittaukset ovat kasvattaneet suosiotaan viime vuosina. Kemiluminesenssissa emittoituva valo on peräisin kemiallisesta reaktiosta ja bioluminesenssissa valoreaktiota katalysoi entsyymi nimeltään lusiferaasi. Luminometri on laite, jota käytetään laboratorioissa sekä tutkimukseen että laadunvalvontaan teollisuudessa. Luminesenssiin perustuvat menetelmät ovat levinneet laajalti, sillä ne ovat herkkiä ja helposti toistettavia.²⁵ Luminometrit ovat eräänlaisia fotometrejä, joista puuttuu valon lähde eli lamppu, sillä ne mittaavat näytteen itsensä emittoivaa valon määrää.

Luminometrit voivat olla kuoppalevyluminometrejä, jotka ovat hyödyllisiä käsiteltäessä useita eri näytteitä samanaikaisesti, tai putkiluminometrejä, joilla voidaan mitata näytteitä yksi putki kerrallaan.

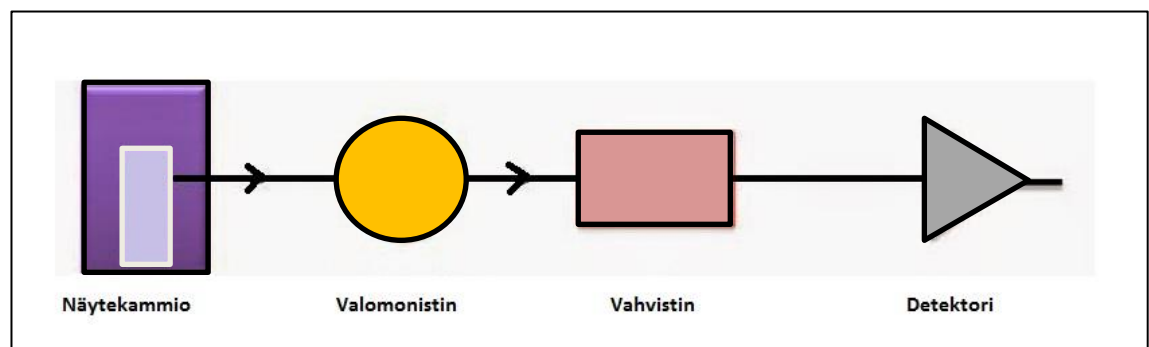
4.1 Luminometrian edut

Luminometrialla on selkeitä etuja verrattuna muihin analytiikkamenetelmiin. Erittäin korkea herkkyys, laaja toimintaväli, edulliset laitekustannukset ja uusien menetelmien kehittäminen ovat kasvattaneet luminometriaan perustuvien menetelmien suosiota. Luminometrinen mittaus on jopa 100 000 kertaa herkempi kuin absorptiospektroskopia ja vähintään 1 000 kertaa herkempi kuin fluorometria. Hyvä luminometri voi havaita jopa 0,6 pikogramman määrän adenosiinitrifosfaattia tai 0,1 femtogrammaa lusiferaasia, eli tämän määrän reaktiossa tuottaman valon.²⁶

4.2 Luminometrin toimintaperiaate

Näkyvä valo koostuu miljardeista fotoneista, joita emittoituu bioluminesenssi- ja kemiluminesenssireaktioista. Kaikissa luminometreissa on näytekammio, detektori, signaalin prosessointimenetelmä ja signaalin näyttö.

Näytekammio sisältää näytteen ja tuo sen detektorin havaittavaksi. Näytekammion tulee olla valolta tiivis, jotta vältetään taustavalon aiheuttamat vääristymät. Mahdollisimman suuren tehokkuuden aikaansaamiseksi näytekammion tulee olla mahdollisimman lähellä detektoria. Suuri optinen tarkkuus on toivottavaa, jotta saadaan optimaalinen suhde taustan ja signaalin välille. Tarkkojen tulosten saamiseksi ja taustahäiriön minimoimiseksi käytetään valomonistinputkia, jotka monistavat näytteestä tulevaa valoa, ja joiden avulla voidaan tutkia vähäistäkin määrää valoa emittoivia näytteitä.²⁶ Kuvassa 4 on esitetty yksinkertaistettu kuva signaalin kulusta luminometrissä.



Kuva 4 Luminometrin toiminta

Suurin osa nykyaikaisista luminometreista mittaa joko fotonien määrää tai virtaa. Sekä fotonien määrää mittaavissa, että virtaa mittaavissa laitteissa fotonien tulee osua valomonistinputkiin, jotta ne aiheuttavat halutun reaktion ja näkyvät signaalin voimakkuudessa. Koska kaikki fotonit eivät kuitenkaan ohjaudu valomonistinputkille, kumpikaan mittaustapa ei kerro kaikista näytteestä emittoituvista fotoneista. Fotonien määrää mittaava menetelmä mittaa jo hyvin matalaa valomäärää, mutta valomaksimi, jonka se kykenee mittaamaan, on myös suhteellisen matala. Luminometrin ilmoittaman lukeman yksikkö on RLU, eli relative light unit.²⁶

4.3 Työssä käytetyt luminometrit

Työssä käytettiin kahta erilaista luminometriä. Toista käytettiin nestemäisten näytteiden mittaamiseen ja toista lopullisen, kuivan menetelmän, testaamiseen.

Nestemittauksissa käytetty laite oli Lumitester C-100, kun taas kuivan menetelmän varsinaiseen testaukseen käytettiin luminometria Titertek-Bertholf FB14. Lisäksi muutamia tarkistusmittauksia tehtiin kannettavalla Kikkoman PD 20 – mittarilla. Kaikki luminometrit olivat putkiluminometrejä, joissa jokainen näyte mitataan erikseen kukin omassa putkessaan. Luminometriä antamat tulokset eivät olleet suoraan verrannollisia, mutta niiden antamia tuloksia voidaan vertailla keskenään, kun arvot muutetaan prosenteiksi. Tämän vuoksi myös varsinaiset laitteiden antamat RLU arvot ovat toissijaisia, ja tässä työssä tuloksia käsitellään prosenttiosuuksien kautta. Testauksessa käytetyissä laitteissa detektorina on valomonistinputki.

5 TYÖN SUORITUS JA TULOKSET

5.1 Menetelmän kehittäminen

Menetelmän kehittämisessä lähdettiin periaatteesta, että lopputuloksen tulisi olla mahdollisimman yksinkertainen ja toistettava, huolimatta siitä, ettei testejä tehtäisi laboratorio-olosuhteissa ja tekijänä olisi laboratoriotyöskentelyyn tottumaton henkilö. Lisäksi välineiden tulisi olla yksinkertaisia, ja koska kyseessä olisi kittinä toimitettava tuote, tulisi välineiden olla myös kyllin edullisia. Toimeksiantajalla oli käsitys siitä, millainen menetelmän tulisi olla, ja tätä menetelmää lähdettiin tutkimaan ja myöhemmin soveltamaan. Koska menetelmän tuli olla kaupallisesti kannattava, oli menetelmä suunniteltu niin, että yhdestä reagenssiannoksesta voitiin tehdä tasan yksi mittaus ja yksi kontrolli. Näyte haluttiin kaadettavan reagenssiin, jotta reagenssi tuhoutuisi näytteen vaikutuksesta, sitä ei näin ollen laimennettaisi, ja käytettäisi yhteen mittaukseen tarkoitettua reagenssia useampaan näytteeseen. Toisaalta uudenlainen tapa valmistaa ja pakata reagenssi mahdollistaa myös sen, että yhden reagenssiannoksen käyttäminen yhteen näytteeseen on helppoutensa lisäksi taloudellisesti kannattavaa.

Kun mittaukset suoritettiin ISO standardin 11348-3 protokollan mukaisesti, mittauksissa mitattiin näytteen aiheuttama inhibitio 30 minuutin kontaktiajan jälkeen +15 °C:een reaktiolämpötilassa. Tarkoituksena oli löytää menetelmä, jolla tulokset olisivat luotettavia kontaktiajasta ja lämpötilasta huolimatta.

5.2 Tarvittavien liuosten valmistus

Käytetyt reagenssit saatiin toimeksiantajan toimittamasta BioTox -kitistä. Tästä kitistä saatiin myös natriumkloridi-tabletti, joka liuotettiin milliQ-veteen 20 % NaCl-liuoksen aikaansaamiseksi. Tätä suolaliuosta käytettiin myöhemmin näytteiden suolapitoisuuden säätöön, ja siitä valmistettiin edelleen 2 % suolaliuos. 2 % suolaliuoksen pH tarkistettiin ja säädettiin välille 6,7-7. Tästä

suolaliuoksesta valmistettiin varastoliuokset referenssikemikaaleista. Varastoliuoksia varten referenssikemikaaleja punnittiin ja niistä valmistettiin liuokset oheisen taulukon mukaisesti. Sinkkisulfaattia kuivattiin eksikkaattorissa yön yli ennen punnitsemista, jotta voitiin olla varmoja, että punnittu sinkkisulfaattimäärä sisälsi oikean määrän sinkkiä. Punnitukset tehtiin analyysiväällä.

Taulukko 2. Referenssikemikaalien valmistus, määrät ja pitoisuudet

Kemikaali	Punnitusmäärä (mg)	Liuosmäärä (ml)	Pitoisuus (mg/l)
3,5-dikloorifenoli	34	50	680
Sinkkisulfaatti	19,3	100	193
Kaliumdikromaatti	105,8	100	1058

Myöhemmin näistä varastoliuoksista valmistettiin työssä käytettävät laimennokset käyttäen 2 % suolaliuosta. Laimennokset tehtiin laimennossarjoina virheiden välttämiseksi ja toistettavuuden lisäämiseksi. Työssä käytettiin pipettiä koko ajan laimennoksien tekemiseen, aluksi myös näytteiden käsittelyyn. Tarkemmin lopullista menetelmää tutkiessa näytteiden ottamisessa käytettiin ruiskua. Kunkin mittaussarjan mittaukset tehtiin aina samassa lämpötilassa, jotta välttyttäisiin lämpötilan aiheuttamilta ongelmilta. Käytettävät liuokset säilytettiin jääkaapissa ja suolaliuoksen pH tarkistettiin joka päivä ennen laimennosten valmistamista. Kerran huomattiin selkeä inhibitio myös nollanäytteissä, jolloin valmistettiin uusi suolaliuos vaikka pH olikin kohdallaan.

5.3 Ensimmäiset mittaukset ja EC50-arvon määrittäminen

Aluksi haluttiin testata referenssikemikaaliliuosten ja reagenssin toimivuus testaamalla luminesenssin vähenemistä eri pitoisuuksilla. Koska bakteerin alkuperä, eli se onko bakteeri pakastekuivattu, nestekuivattu vai tuoreena

valmistettu, vaikuttaa siihen, millaisia EC50-tuloksia referenssikemikaalit antavat, tutkittiin referenssikemikaalien vaikutus pitoisuuksilla, jotka on esitelty taulukossa. Näillä pitoisuuksilla kemikaalien tulisi aiheuttaa 20 %-80 % inhibitio 30 minuutin kontaktiajan jälkeen testisuspensiossa.

Taulukko 3 Referenssikemikaalien pitoisuudet, joiden tulisi aiheuttaa 20 %-80 % luminesenssin inhibitio näytteessä ¹⁰

Referenssikemikaali	Pitoisuus testisuspensiossa (mg/l)
3,5- dikloorifenoli	3,4
Sinkki (II)	2,2 (Pätee, kun sinkkisulfaatin pitoisuus on 9,67)
Kromi (IV)	18,7 (Pätee, kun kaliumdikromaatin pitoisuus on 52,9)

Mittauksissa käytettiin putkiluminometriä ja ISO-standardin mukaista menetelmää. Bakteerireagenssipelletti resuspensoitiin yhteen pullolliseen (12,5 ml) + 4 °C :sta reagenssilaimenninta ja jätettiin kylmiöön inkuboitumaan 30 minuutiksi. Kun bakteeripelletti on resuspensoitu, nousee valontuotto aluksi erittäin nopeasti ja aiheuttaa tämän vuoksi vaikeuksia valontuoton laskua mitattaessa. Tämän vuoksi reagenssia inkuboitiin vielä yksi tunti + 15 °C:een lämpötilassa, jotta välttäisiin valontuoton nousun aiheuttamalta häiriöltä mittauksissa. Tällä aikaa valmistettiin mittauksia varten laimennokset, joita myöskin inkuboitiin +15 °C:ssa, jotta vältettäisiin äkillisten lämpötilojen muutosten haitalliset vaikutukset bakteerisoluihin.

Tämän jälkeen pipetoitiin mittauskyvetteihin 200 µl bakteerisuspensiota ja jatkettiin inkubointia +15 °C:ssa 15 minuutin ajan. Inkuboinnin jälkeen putkien luminesenssi mitattiin ja välittömästi mittauksen jälkeen putkeen pipetoitiin 200 µl näytettä ja putket asetettiin +15 °C:een inkuboitumaan puoleksi tunniksi. Puolen tunnin päästä putkien luminesenssi mitattiin uudelleen ja tuloksista laskettiin inhibitio. Tulosten arviointia varten laskettiin myös korjauskerroin, joka kertoo luminesenssin luonnollisesta laskusta ajan kuluessa.

Mittauksista tehtiin aina rinnakkaismääritykset ja referenssikemikaalien lisäksi kussakin mittasarjassa oli myös nollanäytteitä korjauskertoimen (kf) määrittämistä varten. Mittausten tulokset löytyvät taulukoista liitteistä. Taulukoissa korostettu pitoisuudet, joiden standardin mukaan tulisi aiheuttaa 20 %-80 % inhibitio. Korjauskertoimen arvon kuuluu olla välillä 0,6-1,8, jotta tulokset voitiin ottaa huomioon. Laitteen antamista RLU arvoista laskettiin inhibitioprosentti.

Laskuissa käytettiin seuraavia kaavoja:

$$\text{korjauskerroin } KF = IC_{30}/IC_0$$

$$\text{inhibitioarvo } INH \% = 100 - 100 \times (IT_{30} / KF \times IT_0),$$

joissa IC_{30} on kontrollin luminesenssi (RLU) kontaktiajan (30min) jälkeen

IC_0 kontrollin alkuperäinen luminesenssiarvo (RLU)

IT_{30} näytteen luminesenssi

(RLU) kontaktiajan (30min) jälkeen

IT_0 näytteen alkuperäinen luminesenssi (RLU).¹⁰

Taulukossa 4 on nähtävillä esimerkkinä ensimmäisten dikloorifenolilla suoritettujen mittausten raakadata tulokset, sekä tuloksista laskettu inhibitioprosentti.

Esimerkkinä ensimmäinen 3,39 mg/l pitoisuudella mitattu näyte.

$$\text{Korjauskerroin } KF = 26,98/34,81 = 0,77$$

$$\text{Inhibitioarvo } INH\% = 100 - 100 \times (8,55/0,77 \times 30,62) = 63,75$$

Taulukko 4 7.3.2014 dikloorifenolilla suoritettujen mittausten tulokset.

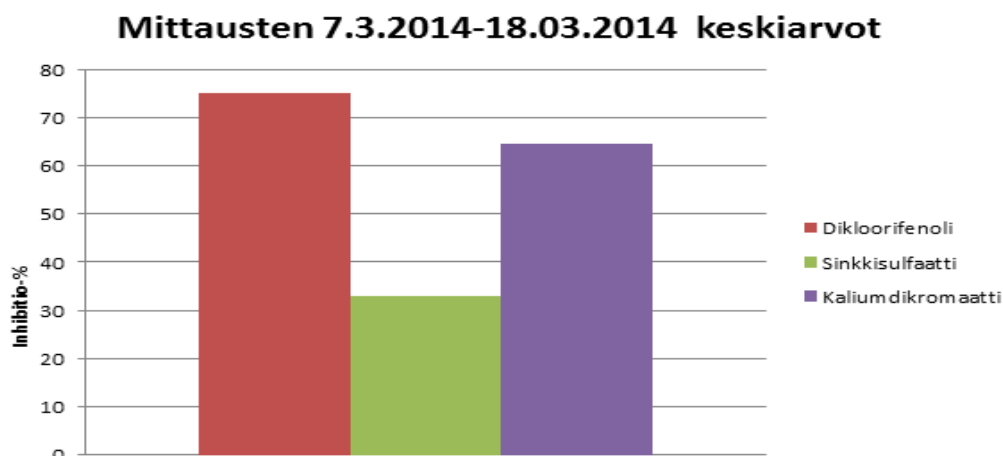
Konsentraatio mittauksessa mg/l	Näyte	RLU (t=0)	RLU (t=30min)	INH%	KF= 0,770306
0	N=Nolla	34,81	26,98		
0	N	32,41	24,8		
3,39	DCP	30,62	8,55	63,75	
3,39	DCP	33,43	9,907	61,53	
1,70	DCP	29,71	23,17	-1,24	
1,70	DCP	28,61	22,4	-1,64	
0,85	DCP	29,33	30,6	-35,44	
0,85	DCP	31,33	32,2	-33,42	
0,42	DCP	31,17	35,57	-48,14	
0,42	DCP	38,75	44,72	-49,82	

Ensimmäisiä mittauksia suoritettiin 7.3., jolloin päästiin tutustumaan ensimmäistä kertaa standardin mukaiseen menetelmään. Koska dikloorifenolin pitoisuuksien näytteissä tuli olla hyvin pieniä, suoritettiin mittaussarja dikloorifenolilla kahteen otteeseen samalla pitoisuudella.

Koska 07.03.2014 suoritetuissa mittauksista kemikaalien pitoisuudet olivat olleet matalat, nostettiin pitoisuuksia kun mittauksia tehtiin 10.03.2014. Verrattaessa sinkkisulfaatin antamia inhibitioita kahdessa eri mittaussarjassa, huomattiin samalla, 9,67 mg/l pitoisuudella hyvin suuri ero mittaussarjojen välillä. Jatkettiin edelleen samalla menetelmällä

Kaliumdikromaatin ja dikloorifenolin huomattiin antavan hyvin toistettavia tuloksia sinkkisulfaatilla tehtyjen mittausten tuloksien ollessa hyvin epätasaisia. Tämä voidaan selittää sillä, että sinkin vaikutusmekanismista johtuen sinkki tarttuu myös kuolleisiin bakteerisoluihin, jolloin vaikutus eläviin ja siten luminoiviin bakteereihin jää odotettua vähäisemmäksi. Tämä voitiin todeta myös jo alkuaan matalammista luminesenssiarvoista osassa rehydratuista bakteeripelleteistä.

Huolimatta sinkin epätasalaatuisista tuloksista, todettiin reagenssien toimivan odotetunlaisesti. Suoritetuista mittauksista laskettiin EC50- ja EC20-arvot käyttämällä toimeksiantajan tarjoamaa laskentataulukkoa. Lopulta kuitenkin mittauksissa käytettiin vain taulukon 5 arvoja, eli vain standardin osoittamilla EC-arvoilla oli merkitystä. Sinkkisulfaatin osalta osa tuloksista oli hieman ennakoitua alhaisempia ja dikloorifenolin osalta hieman korkeampia. Näissä mittauksissa käytetty bakteerireagenssi osoittautuikin hieman epätasalaatuiseksi, joten tuloksia voidaan selittää sillä. Kuten aikaisemmin mainittua, sinkkisulfaatin hieman matalampia tuloksia voidaan selittää sillä, että bakteerisuspensiossa oli yllättävän iso osa jo ennalta kuolleita soluja, jolloin osa sinkistä hakeutui jo kuolleisiin soluihin. Tulosten avulla saatiin kuitenkin todettua valmistettujen referenssikemikaaliliuosten ja käytettävissä olevan reagenssin sopivuus haluttuun menetelmään.



Kuva 5 Mittausten tulosten keskiarvot

Kuvassa 5 ovat standardissa esitellyjen mittausmenetelmän tulosten keskiarvot. Tarkemmat tulokset löytyvät liitteestä 1. Kuvaajaan on kerätty kaikista mittaussarjoista ne pitoisuudet, joiden tulisi aiheuttaa 20 %- 80 %:in alenema luminesenssissa. Kuvasta on helposti pääteltävissä tulosten asettuvan kaikilla kemikaaleilla haluttuun haarukkaan.

Taulukko 5. ISO 11348-3:n mukaiset EC-arvot

Referenssikemikaali	Pitoisuus näytteessä (mg/l)
3,5-dikloorifenoli	
EC ₂₀	2,32
EC ₅₀	3,36
Zn (II)	
EC ₂₀	1,08
EC ₅₀	2,17 (ZnSO ₄ pitoisuus 9,7)
Cr (IV)	
EC ₂₀	3,6
EC ₅₀	18,71 (K ₂ Cr ₂ O ₇ pitoisuus 52,9)

Huolimatta siitä, että menetelmä ei sinällään vaatinut vaativia toimenpiteitä, työhön käytetty aika kunkin mittaussarjan kohdalla oli sängen pitkä. Lisäksi työ

vaati tarkkuutta pipetoinneissa ja luonnollisestikin pipettejä ja muuta laboratoriovarustusta, kuten esimerkiksi lämpöhauteen. Lisäksi menetelmän toimivuus vaati kirkkaita liuoksia, ja erilaisten muuttujien, kuten pH, lämpötila, suolapitoisuus, tarkkaa huomioimista.

5.4 Tikkumenetelmän luominen

Menetelmästä haluttiin mahdollisimman yksinkertainen, jotta testien tulokset olisivat luotettavia myös kokemattomien henkilöiden tekeminä. Menetelmän haluttiin olevan myös tarpeeksi herkkä, jotta varmasti myrkylliset näytteet havaittaisiin puhtaiden näytteiden joukosta. Menetelmän inkubointi haluttiin suorittaa ”kuivissa” olosuhteissa, joten oli päädytty käyttämään tikkuja reaktioalustoina. *Aliivibrio fischerin*, sekä menetelmän herkkyyden takia tikkuina ei voitu käyttää tavallisia, valkaistuja pumpulipäisiä puikkoja. Mahdolliset valkaisuaineen jäämät olisivat saattaneet vaikuttaa testibakteereihin haitallisesti ja mahdolliset tikusta irtoavat kuidut puolestaan vaikuttaa mittaustuloksiin. Tikun tulisi olla kaikin puolin inertti, jotta menetelmän tulokset olisivat luotettavia, tämän vuoksi tikkuina oli päädytty käyttämään elektroniikkateollisuudessa käytettäviä kangaspäällysteisiä tikkuja. Koska valon määrään on vaikutusta vain soluilla, jotka kiinnittyvät tikun pintaan, ei nestemäärän vaihtelulla tikkuissa ollut merkitystä.

Aluksi mittauksia tehtiin toimeksiantajan suunnitteleamalla menetelmällä. Menetelmää suunniteltaessa oli pyritty siihen, että nestemäistä reagenssia tai nestemäisiä näytteitä ei tarvitsisi säilyttää tarpeettoman pitkään. Näin välttyttäisiin nesteiden läikkymiseltä, mikä vähentäisi mahdollisuutta valobakteerin kulkeutumiseen ei-toivottuihin paikkoihin. Menetelmän haluttiin olevan yksinkertainen ja nopea, mutta tietyt seikat määrittivät menetelmän maksiminopeuden. Koska esimerkiksi sinkkisulfaatin myrkyllinen vaikutus vaatii sen pääsyä soluun, näkyy todellinen inhibitio vasta tietyn ajan kuluttua. Toisaalta myös kuolleet bakteerisolut vievät osansa sinkkisulfaattimolekyyleistä, eli mikäli kuolleita soluja on paljon, inhibitio on odotettua pienempi, sillä

vaikutusta kuolleisiin soluihin ei voi huomata. Tämän vuoksi inkubointiaikaa ei juuri voitu lyhentää, vaan se pidettiin noin 30 minuutin pituisena. Toisaalta menetelmä voitiin suorittaa nopeastikin, ilman tunnin alkuinkubointia bakteerin resuspennoinnin jälkeen, sillä kontrollinäytteen ja varsinaisen näytteen valontuoton kasvun voitiin olettaa olevan sama. Kuvassa 6 on esitetty toimeksiantajan toimittama ohje, jonka mukainen menetelmä oli tarkoitus saada toimimaan.

Menetelmää tutkittiin aluksi siten, että referenssikemikaalien pitoisuudet näytteissä olivat kymmenkertaiset aikaisemmin mitattuihin EC50-arvoihin nähden. Mittaukset suoritettiin toimeksiantajan tarjoamalla, aikaisempaa herkemällä putkiluminometrillä. Mittauksissa tutkittiin myös bakteerireagenssin laimentumisen vaikutusta tuloksiin. Mittauksissa käytettiin toimeksiantajan tarjoamia välineitä, joissa näytteenottimina toimivat aikaisemmin mainitut tikut, jotka oli asetettu pareittain pillin sisään siten, että pillin molemmissa päissä, ja siten näytenäytteen suojana, oli muoviset mittauskyvetit, kuten kuvasta 6 voi huomata.

BioTox™ Single Shot test

ABOATOX



INSTRUCTIONS FOR USE:

- Rehydrate one vial of the reagent with 6 drops of Reagent Diluent
- take a swab, moisten it with the reagent and put back to place with tip outside the handle. Put the cuvette back to place
- take 1 ml sample from the water with the syringe to the sample cup
- add 2 drops of Sample Diluent to the cup, mix gently
- pour the contents of the sample cup to the reagent vial
- moisten the second swab with with the solution, put back to place with tip outside the handle. Put the cuvette back to place. Mark the cuvette with permanent marker
- measure. If needed, fold the handle and cut before the measurement (FB14 Luminometer)
- Repeat the measurement for both vials after 30 min, calculate inhibition. Reduced light output vs. control = toxic

Kuva 6 Toimeksiantajan toimittama menetelmäohje

Työ aloitettiin, kuten aikaisemmissa mittauksissa, rehydraamalla bakteeri rehydrausliuksella. Tämän jälkeen otettiin 500 µl bakteerisuspensiota putkeen, ja kasteltiin näytetikun pää reagenssisuspensiolla ja näytetikku pudotettiin kyvetiinsä näytepää alaspäin. Seuraavaksi reagenssisuspensioon lisättiin 1 ml näytettä, kastettiin tikku reagenssi-näyteseoksessa ja asetettiin tikku omalle paikalleen pillin sisään. Toimeksiantajan ohjeessa neuvottiin suorittamaan mittaus myös välittömästi, kun tikku oli kastettu reagenssi-näyteseokseen, jotta voitiin määrittää se, voidaanko mittausta suorittaa tällä tavalla. Koska näytteen sisältämät kemikaalit vaikuttivat niin nopeasti, todettiin ettei näytteiden mittaaminen ajanhetkellä 0 antanut mitään hyödyllistä lisäinformaatiota. Tällä menetelmällä voitiin ajanhetken $t=0$ kontrollina käyttää pelkästään bakteerisuspensioon kastettua tikkua, jolloin mittauksia tarvitsisi suorittaa vain ajanhetkellä $t=30$ min. Mittauksia tehtiin kuitenkin myös ajanhetkellä $t=0$, jolloin saatiin kerättyä lisätietoa valontuoton laskusta kontaktiajan kuluessa.

Kaikki mittaukset suoritettiin siis pareittain, eli jokaista näytetikku vastasi kontrollitikku, jota käytettiin lähtötason määrittämiseen. Jokaisesta näytteestä tehtiin rinnakkaismääritykset ja jokaista referenssikemikaalia vastasi myös yksi nollakontrolli, jossa näytteenä toimi 2 % suolaliuos. Nollanäytteitä tuli yksi per mittaussarja siten, että kussakin mittaussarjassa oli yksi nollanäyte ja kaksi kemikaalinäytettä. Esimerkkinä taulukossa 6 ensimmäinen 7.4.2014 kaliumdikromaatilla suoritettu mittaussarja, jossa kaliumdikromaatin pitoisuus oli kymmenkertainen EC50-arvoon nähden. Jokaisen näytetikun (taulukossa aina alempi) antamaa valontuottoa verrattiin vain ja ainoastaan omaan kontrollitikkiunsa (taulukossa aina ylempi, merkitty ctrl)

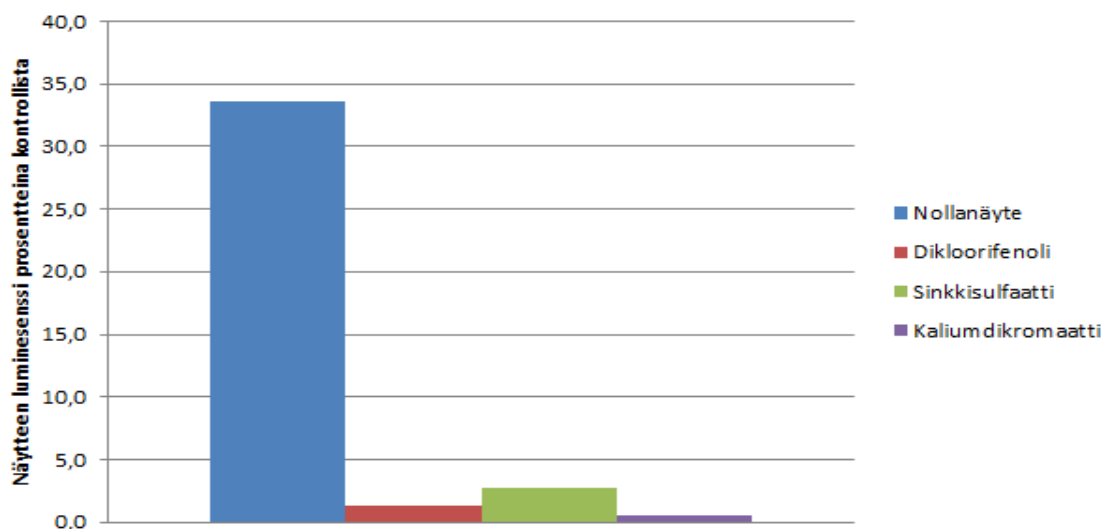
Taulukko 6 7.4.2014 kaliumdikromaatilla suoritettut mittaukset

Näyte	RLU (t=30min)	INH%
N Ctrl	2050496	
N	785088	
K ₂ Cr ₂ O ₇ Ctrl	1731618	
K ₂ Cr ₂ O ₇	3425	99,5
K ₂ Cr ₂ O ₇ Ctrl	1782022	
K ₂ Cr ₂ O ₇	3310	99,5

Mittauksissa huomattiin selkeästi alhaisempi valontuotto myrkyllisille näytteille altistetuissa tikuissa verrattuna nollanäytteelle altistetuissa tikuissa. Nollanäytteiden avulla pyrittiin määrittämään kullekin tapaukselle laimentumiskerroin, jonka todettiin olevan lähellä teoreettista 0,33. Laimennuskertoin vaihteli välillä 0,31-0,48.

Mittauksia jatkettiin, jotta saatiin toistoja myös korkeille myrkkyykonsentraatioille. Mittaussarjoja suoritettiin useita, ja tulokset olivat kaikista hyvin samankaltaisia. Liitteessä 2 on nähtävissä näiden mittaussarjojen tulokset.

10xEC50 -arvoilla suoritettujen mittausten tulosten keskiarvot

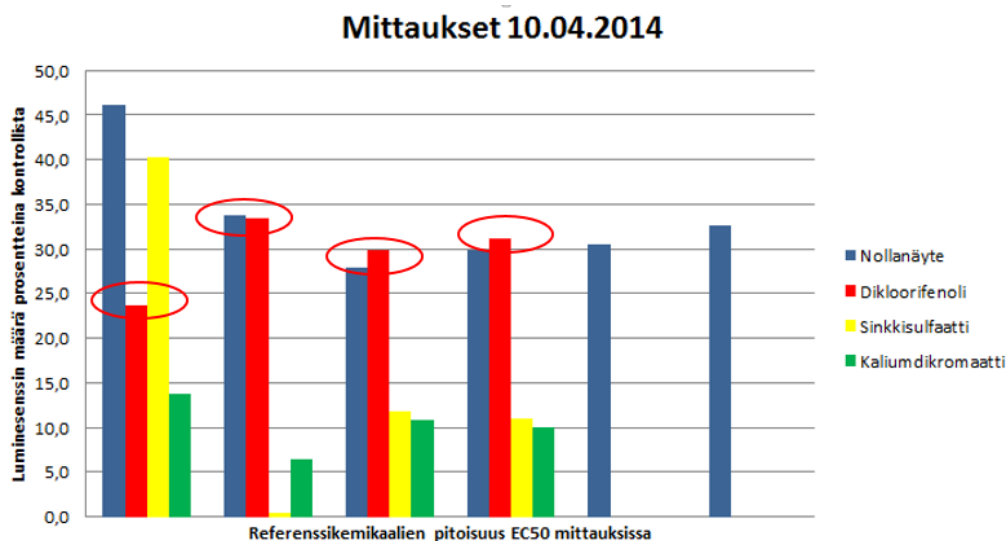


Kuva 7 Kymmenkertaisilla EC50-arvoilla suoritettujen mittausten tulosten keskiarvot

Korkeilla pitoisuuksilla menetelmän toimivuus oli erinomainen. Mittauksissa havaittiin selkeä ero nollanäytteiden ja myrkyllisten näytteiden välillä. Koska erot nollanäytteiden ja myrkyllisten näytteiden välillä todettiin erittäin selkeiksi, todettiin tarkoituksenmukaiseksi jatkaa kyseisellä menetelmällä.

Seuraavaksi siirryttiin käyttämään referenssikemikaalien osalta mittauksissa EC50-arvoja. Aluksi näytepitoisuudet valittiin siten, että mittauksessa referenssikemikaalin pitoisuus oli työn ensimmäisessä osassa määritetty EC50-arvo. Pienemmillä pitoisuuksilla jouduttiin ongelmiin erityisesti dikloorifenolin kanssa. Dikloorifenolin taipumus kiinnittyä pintoihin aiheutti sen, että pienemmillä pitoisuuksilla osa dikloorifenolista jäi todennäköisesti kiinni tikun pintaan, eikä päässyt solujen sisälle aiheuttamaan myrkyllisiä vaikutuksia. Inhibitio huomattiin kyllä nesteessä, mutta tikussa inhibitio saattoi olla jopa negatiivinen.

Kuvassa 8 on nähtävissä selkeästi, miten dikloorifenolinäytteiden luminesenssin määrä ei juuri eroa nollanäytteistä. Samaa ongelmaa on havaittavissa myös ensimmäisessä sinkkisulfaatinäytteessä, mutta jatkomittauksissa ongelma havaittiin ainoastaan dikloorifenolinäytteissä.



Kuva 8 10.4.2014 EC50-arvoilla suoritettujen mittausten tulokset

Taulukossa 7 on nähtävissä ensimmäisten dikloorifenolin EC50-arvoilla suoritettujen mittausten tulokset. Nämä tulokset löytyvät tarkemmin myös liitteestä 2. Tuloksissa on nähtävissä, että nollanäytteiden ja myrkyllisten näytteiden eroa ei luminesenssin määrästä voi huomata. Taulukossa Ctrl merkitty rivi kertoo aina kontrollitikon tuloksista ja seuraavana on sitä vastaava näytetikku. RLU(t=30min) sarakkeeseen on merkitty luminometrillä mitattu luminesenssi 30 minuutin kontaktiajan jälkeen. Luminesenssi % -sarakeessa on puolestaan kontrollin avulla laskettu näytetikussa jäljellä olevan luminesenssin määrä seuraavalla kaavalla:

$$\text{Luminesenssi \%} = \frac{RLU(t=30min)}{RLU(t=30min)Ctrl} \times 100 \%$$

Taulukko 7. 10.4.2014 Dikloorifenolilla suoritettut mittaukset, pitoisuus mittaauksessa 2,27mg/l

Näyte	RLU (t=30min)	Luminesenssi %
Nollanäyte Ctrl	1720684	
Nollanäyte	792543	46,1
DCP Ctrl	1473094	
DCP	347720	23,6
DCP Ctrl	1423449	
DCP	476916	33,5

Esimerkkinä on taulukon 7 mukaisesti 10.4. suoritettujen mittausten dikloorifenolin ensimmäisen mittaussarjan nollanäytteen luminesenssi %=

$$\frac{792543}{1720684} \times 100 \% = 46,1 \%$$

Mittausten tuloksissa oli nähtävissä kemikaalista riippumatta jonkin verran hajontaa. Hajontaa löytyi kaikista näytteistä, mutta koska menetelmän ei ollut tarkoituskaan olla kvantitatiivinen, vaan pelkästään kvalitatiivinen, hajonta ei aiheuttanut toimenpiteitä.

Dikloorifenolin antamien tulosten vuoksi mittauksissa päätettiin ensin testata eripituisia inkubointiaikoja, mutta tällä ei ollut merkitystä. Testattiin myös menetelmän muuttamista siten, että näytetikku kastettaisiin vasta, inkubointiajan kuluttua. Tämän toimintatavan ottamista lopulliseen menetelmään ei tosin edes harkittu, sillä tarkoituksena oli päästä täysin eroon nestemäisien näytteiden säilytyksestä ja kuljetuksesta. Harkittiin menetelmän muuttamista siten, että reaktiossa tutkittaisiin pieniä nestemuodossa olevia näytteitä esimerkiksi kapillaareissa tai siirrostussilmukalla otetuissa vesipisaroissa. Nämä vaihtoehdot kuitenkin hylättiin, sillä tikkujen käsittely oli todettu näppäräksi, ja testeissä siirrostussilmukoiden käyttö osoittautui jo ennen varsinaisia analyyskejä kömpelöksi ja epävarmaksi. Toisaalta vesinäytteiden käsittelyssä käytettyjen kapillaariputkien käyttäminen nostaisi testien hintaa huomattavasti.

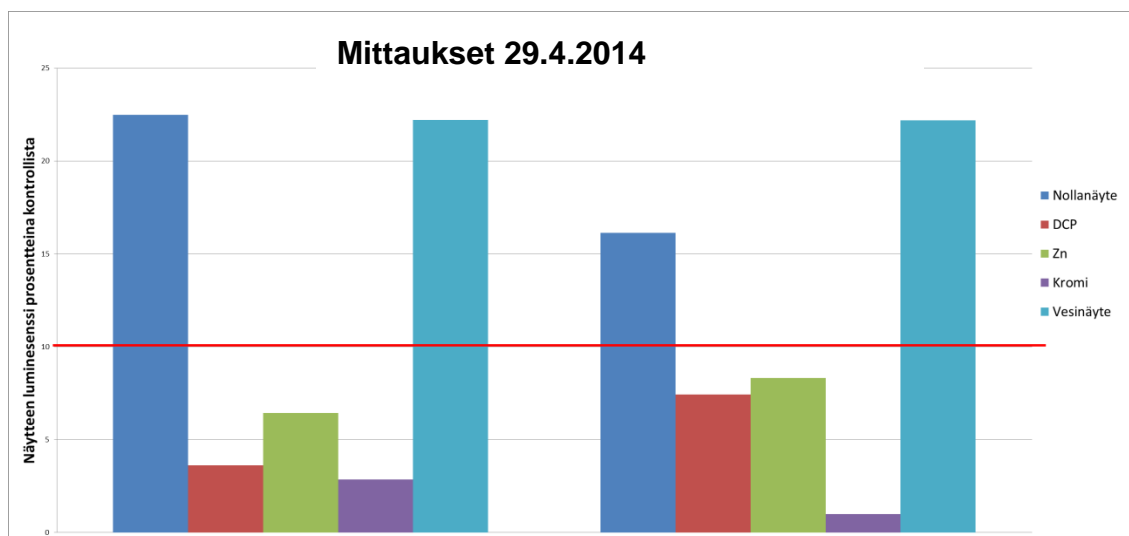
Todettiin myös, että tarkoituksenmukaisinta on käyttää ISO-standardin antamia EC50-pitoisuuksia nimenomaan siten, että se näytepitoisuus, joka standardin mukaisella menetelmällä aiheutti 50 % häviön luminesenssissa, oli näytepitoisuus myös tikkumenetelmässä. Koska näytteen määrä suhteessa reagenssin määrään on tikkumenetelmässä suurempi, myös kemikaalin pitoisuus mittauksessa oli korkeampi. Mikäli tämä ei olisi toiminut, pohdittiin myös menetelmän herkkyyden kasvattamista lisäämällä näytetilavuutta edelleen.

Dikloorifenolin ominaisuuksien vuoksi päätettiin tehdä muutos menetelmään, ja päätettiin lisätä yksi tikun kastaminen näytteeseen menetelmän alkuun. Näiden muutosten avulla saatiin viimeisistä mittauksia lupaavia tuloksia. Mittauksia suoritettiin sekä alkuperäisellä tavalla, jossa näytetikku kastettiin vain kerran, sekä uudella menetelmällä, jolloin näytetikku kastettiin kerran näytteeseen ennen sen kastamista näyte-reagenssisuspensioon. Näiden mittausten pohjalta mietittiin yhä testin herkkyyden lisäämistä kasvattamalla näytteen tilavuutta, mutta tämän todettiin olevan turhaa ja aiheuttavan riskin lisäämällä mahdollisuutta väärien tulosten esiintymiseen. Päädyttiin siihen, että menetelmän muuttamisen aiheuttama vaikutus olisi riittävä, jotta testillä voitaisiin mitata luotettavia tuloksia.

Menetelmää viimeisiä kertoja testattaessa käytettiin Single-Shot – menetelmää varten valmistettuja pieniä bakteeripellettejä. Pelletit rehydrattiin kuudella tippapullosta annostellulla pisaralla kylmää reagenssilaimenninta. Bakteerisuspensiota sekoitettiin kontrollitikulla, joka asetettiin omaan kyvetiinsä. Tämän jälkeen näytekuppiin otettiin 1 ml:n näyte ruiskulla ja näytteeseen lisättiin 2 pisaraa näytelaimenninta tippapullosta annosteltuna. Näytelaimentimen tarkoituksena oli säätää näytteen suolakonsentraatio bakteerireagenssille sopivaksi. Näytettä sekoitettiin näytetikulla, minkä jälkeen näyte kaadettiin bakteerireagenssiputkeen ja tätä suspensiota sekoitettiin niin ikään näytetikku apuna käyttäen. Näytetikku asetettiin kontrollitikun kanssa samaan kyvetiin näytepää kyvetin toisessa päässä. Tikkuja inkuboitiin puoli tuntia huoneen lämmössä. Nämä tikut mitattiin tikkujen ollessa samassa

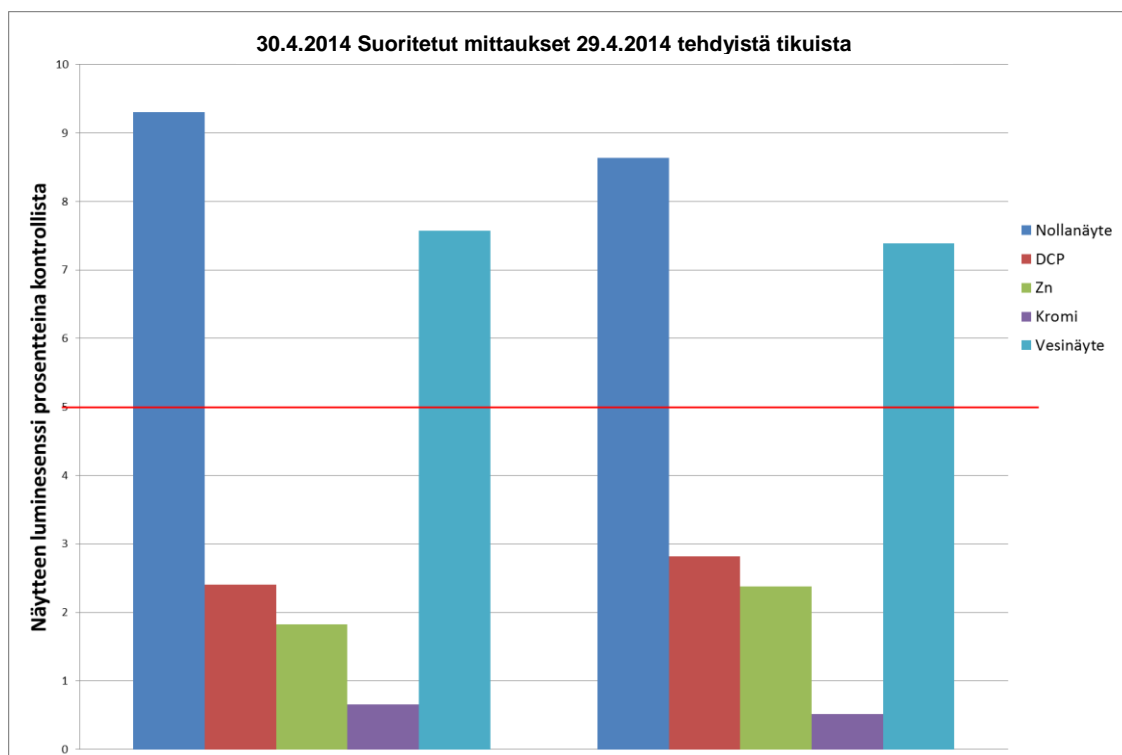
putkessa, ensin toinen pää mittauskammiossa, minkä jälkeen kyvetti käännettiin ylösalaisin näytekammioon, jotta voitiin mitata toisen tikun valontuotto. Mittauksissa nollanäytteiden lisäksi käytettiin näytteinä sekä tavallista vesijohtovettä, että milliQ- vettä. Kuvissa 8 ja 9 näkyvissä oleva vesinäyte on vesijohtovettä. Mittauksia tehdessä testattiin myös menetelmää, jossa tikut pelkästään kastettiin, eikä niitä käytetty sekoittamiseen. Näin tehtyjen mittausten tulokset olivat kuitenkin selkeästi huonommat.

Mittausten perusteella pystyttiin määrittämään raja, jonka alapuolelle jääviä luminesenssiarvoja antavat näytteet ovat todennäköisesti myrkyllisiä. Rajaksi täsmentyi 10 % kontrollista. Kuvassa 9 on nähtävissä 29.4.2014 suoritettujen mittausten tulosten keskiarvot, näissä mittauksissa oli poikkeuksetta erotettavissa myrkylliset ja myrkyttömät näytteet. Mittaustulokset esitetty tarkemmin liitteessä 3.



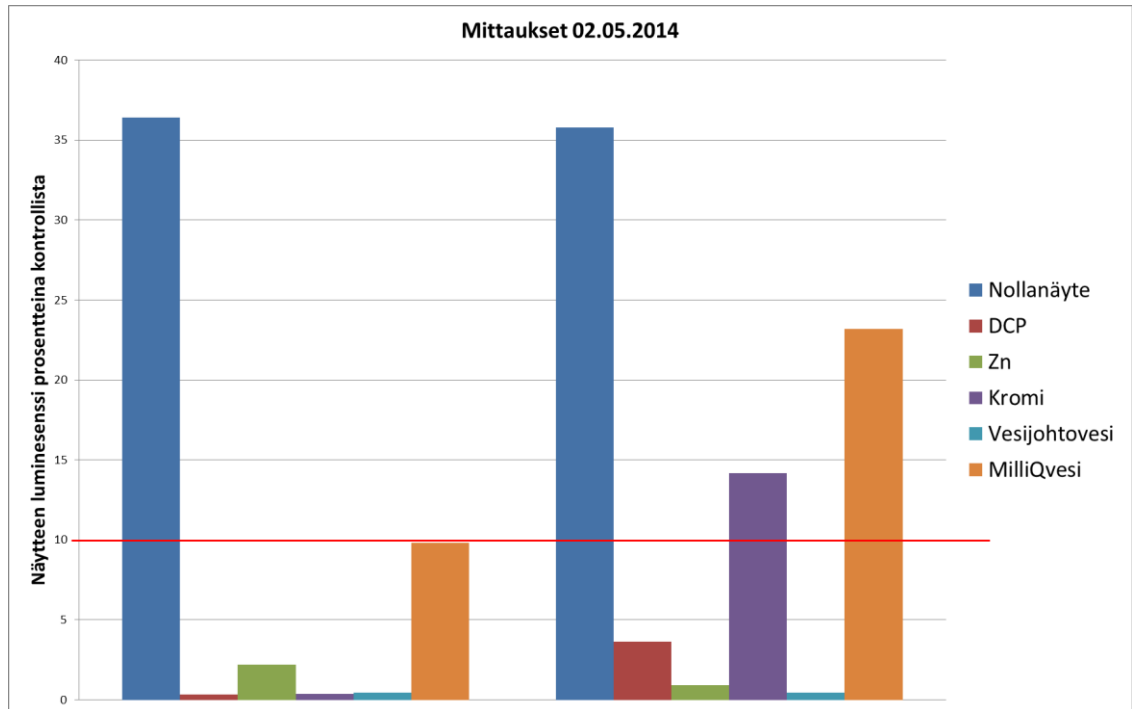
Kuva 9 29.4.2014 Suoritettujen mittausten keskiarvo

Mittaukset samoista, 29.4.2014 mitatuista tikusta suoritettiin vielä uudelleen seuraavana päivänä, kun tikkuja oli säilytetty jääkaapissa yön yli. Näissäkin mittauksissa ero myrkyttömien ja myrkyllisten näytteiden välillä oli selkeä, mutta raja-arvo oli matalampi, 5 %, kuten kuvasta 10 voi huomata. Tarkemmat tulokset on esitelty liitteessä 4.



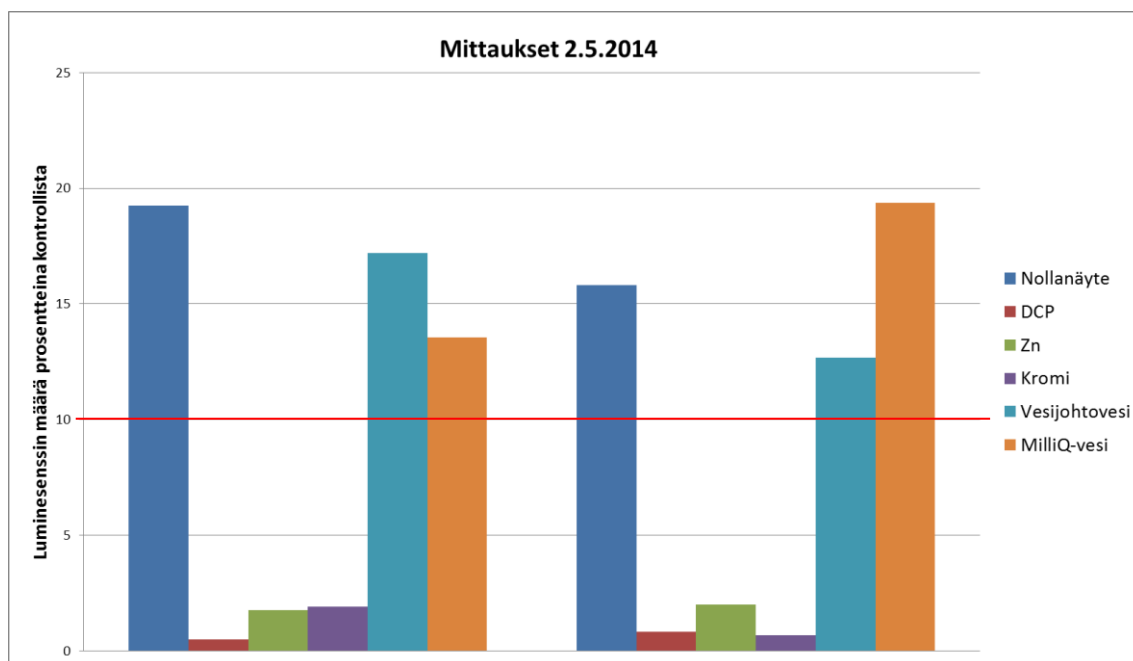
Kuva 10 30.4.2014 suoritetut mittaukset 29.4.2014 tehdyistä tikuista (Keskiarvot)

Uudella menetelmällä saadut tulokset siis olivat erittäin lupaavia. Poikkeuksiakin löytyi: Kuvassa 10 on nähtävissä toiseksi viimeisen mittaussarjan tulokset. Tässä mittaussarjassa toisen krominäytteen luminesenssi nousi raja-arvoa korkeammalle ja toisaalta vesijohtovesinäytteissä ei ollut lainkaan havaittavaa luminesenssia ja lisäksi toinen milliQ-vesinäyte jäi täpärästi rajan alle. Nämä epäsäännöllisyydet ovat selitettävissä esimerkiksi huonolla sekoituksella, sekä sillä, että vesijohtovesinäytteet otettiin putkistossa seisoneesta vedestä ensivesinäytteinä naisten pukuhuoneen vesihanasta. Vesinäytteistä ei myöskään tarkistettu pH:ta ennen mittausten suorittamista. Koska vettä ei juoksettu ennen vesinäytteiden ottoa, on mahdollista että veteen oli putkistossa seisossa kertynyt jotain mittauksiin vaikuttavaa, tai hanasta mahdollisesti huuhtoutui näytteeseen esimerkiksi saniteettitilojen siistimisessä käytettäviä puhdistusaineita. Nollanäytteiden ja milliQ-vesinäytteiden osalta luminesenssi oli kuitenkin selkeästi yli 10 %:n rajan.



Kuva 11 2.5.2014 Suoritettujen mittauksien ensimmäisen mittaussarjan tulokset

Viimeisissä mittauksissa otettiin juoksuuttua vettä samasta hanasta kuin ensimmäisessä mittaussarjassa. Lisäksi kiinnitettiin huomiota näytteiden sekoittamiseen tikuilla niin, että näytteet sekoittuivat varmasti kunnolla. Tässä mittaussarjassa onkin nähtävissä parhaiten erot myrkyllisten ja myrkyttömien näytteiden välillä. Kahden viimeisen mittaussarjan perusteella raja-arvon voisi laskea niinkin alas kuin 5 %, jolloin myös 2.5.2014 tehdyn ensimmäisen mittaussarjan tuloksissa alle 10 % raja-arvon jäävä milliQ-vesinäyte olisi raja-arvojen sisällä. Toisaalta aikaisemmat mittaukset näyttävät, että myrkyllisissäkin näytteissä valontuotto voi olla yli 5 %:n. Viimeisen mittaussarjan tulokset nähtävissä kuvassa 11. Viimeisen päivän molemmat mittaussarjat on esitetty liitteessä 5.



Kuva 12 2.5.2014 suoritetujen mittausten toisen mittaussarjan tulokset

5.5 Lopullinen menetelmä

Lopullinen menetelmä luotiin viimeisten mittausten perusteella. Päädyttiin siihen, että viimeisiä mittauksia suoritettaessa käytettävä menetelmä oli tutkituista vaihtoehdoista paras. Vaikka suolaliuosta lisättiin kaksi pisaraa jo valmiiksi suolaliuoksista valmistettuihin näytteisiin, vaikutusta ei huomattu lopullisissa tuloksissa. Lisäksi varmistettiin, että hyvät tulokset vaativat näytteen sekoittamisen tikulla, pelkkä tikun kastaminen ei siis ollut riittävä. Menetelmää käytettäessä tulisi toimia seuraavalla tavalla: Rehydrata bakteeripelletti lisäämällä pelletin päälle 6 pisaraa reagenssilaimenninta. Ottaa tikku kyvetistä, sekoittaa bakteerisuspensiota tikulla ja asettaa tikku takaisin kyvetiin näytepää kyvetin pohjaa kohti. Ottaa ruiskulla näytekuppiin 1 ml:n suuruinen näyte, ja lisätä 2 pisaraa näytelaimenninta tippapullosta. Tämän jälkeen tulee ottaa toinen tikku, jolla tulee sekoittaa näytettä, minkä jälkeen näytekupin sisältö kaadetaan bakteerireagenssiputkeen. Tätä suspensiota sekoitetaan näytetikulla, minkä jälkeen tikku asetetaan kyvetiin näytepää kontrollitikkuun nähden vastakkaisessa päässä. 30 minuutin jälkeen luetaan tulokset molemmista tikuista, jos näytetikun valontuotto on alle 10 % kontrollista, näyte

on myrkyllinen. Mikäli näyte luetaan vasta seuraavana päivänä, on myrkyllisen näytteen valontuotto alle 5 % kontrollista. Mikäli mittaukset suoritetaan vasta seuraavana päivänä, tulee tikut säilyttää jääkaapissa.

6 PÄÄTELMÄT

Täysin uudenlaisen konseptin tutkiminen on haastavaa ja edessä on yllättäviäkin tilanteita. Menetelmässä haasteita aiheutti yhdiste, jonka ei odottanut tuottavan vaikeuksia. Dikloorifenoli, joka liuoksissa osoittautui kaliumdikromidin kanssa kaikista luotettavimmaksi oikeiden tulosten antajaksi, oli tikkumenetelmässä erittäin haastava. Toisaalta sinkki, joka liuosmittauksissa antoi hyvin vaihtelevia tuloksia, osoittautui tikkumittauksissa erittäinkin luotettavaksi.

Tutkimuksen perusteella kehitetty mittausmenetelmä soveltuu vesinäytteiden laadun arviointiin. Mittausmenetelmää ei kuitenkaan saatu kehitettyä niin tarkaksi, että sillä olisi voitu löytää ne pitoisuudet, jotka aiheuttavat 20 % inhibition ISO-standardin mukaisissa mittauksissa. 50 % inhibition aiheuttavat näytteet sillä voitiin seuloa suhteellisen luotettavasti. Ongelmia tuottaa *Aliivibrio fischeri* herkkyys: esimerkiksi kloorijäämät vesijohtovesinäytteessä saattaa antaa ymmärtää, että vesi on myrkyllistä, vaikka näin ei olekaan. Lisäksi mahdolliset raskasmetallijäämät esimerkiksi lyijyputkista saattavat laskea luminesenssia 10 %:n raja-arvon alle. Lisäksi pH:lla on suuri vaikutus valontuottoon, mikä pitää huomioida näytteitä valittaessa.

Menetelmää ei sinällään ole tarkoitettu juomaveden laadun arviointiin, mutta kloorin poistaminen näytteestä on yksinkertaista, ja tämä kloorin poistaminen näytteestä onkin kehityksen alla. Ehdoton etu kilpailijoihin nähden on menetelmän nopeus: näytteestä tulokseksi puolessa tunnissa. Lisäksi menetelmän etuna voidaan pitää erinomaisen helppoa liikuteltavuutta ja sitä, että asiakkaalle on mahdollista saada toimitettua 20 testiä kirjekuudessa, mikä sekä nopeuttaa että helpottaa asiakkaan toimintaa. Microbiotestin esittelemään versioon nähden menetelmä säästää aikaa ja välineistöä: mittaukset voi suorittaa täysin ilman pipettejä, niiden kärkiä ja eri tilavuuksien pohtimista. Näytetikkujen käsittely verrattuna nestemäisiin näytteisiin on selvästi helpompaa: näytteiden kaatumista ei tarvitse pelätä, koeputkitalineelle ei ole tarvetta vaan näytteet voivat levätä vaakatasossa esimerkiksi pöydällä, tai

kulkea mukana laukussa seuraavaan näytteenottoaikaan. Näytteenotto ei siis ole sidoksissa aikaan, eikä paikkaan. Lisäksi kontrollin ja näytteen säilyttäminen yhdessä altistaa ne samanlaisille olosuhteille keskenään, jolloin eliminoidaan esimerkiksi erilaisten lämpötilojen vaikutukset.

Menetelmä ei vaadi suuri panostuksia laitteistoon, mittaukset voidaan suorittaa ilman pipettiä tai käyttäen maksimissaan kolmea erilaista pipetinkärkeä. Menetelmän tuloksiin ei vaikuta esimerkiksi näytteen sameus.

Myös tulosten laskeminen on uutta menetelmää käytettäessä erittäin yksinkertaista: tarvitaan vain tulokset sekä kontrollitikuista että näytetikuista. Mittausten tekemiseen kuluva aika on erittäin pieni, ja laskutoimitukset ovat erittäin nopeita ja yksinkertaisia.

Kaupallista sovellusta varten vaaditaan vielä lisätietoa: hyödyllistä olisi menetelmän tutkiminen eri henkilöiden toimesta niin, että varmistettaisiin, ettei henkilön taidoilla ole merkitystä tulosten kannalta. Lisäksi useammat toistot raja-arvojen mahdolliseksi täsmentämiseksi eivät olisi pahitteeksi.

Erittäin positiivista kyseisessä menetelmässä on myös sen pehmeys, vaikka itse työssä käytetyt referenssikemikaalit ovatkin haitallisia, kehitetyn menetelmän kemikaalit ovat lähinnä suolaliuoksia ilman suuria haittavaikutuksia. Käytettävän bakteerireagenssin herkkyys sekä se, että kyseessä on natiivi kanta, minimoivat myös menetelmän käytön mahdolliset biologiset vaaratekijät.

LÄHTEET

- 1 Parvez, S.; Venkataraman, S.; Mukherji, S. 2006. Review on advantages of implementing luminescence inhibition test. *Environment international*. Vol. 32 265-268 Elsevier.
- 2 THL 2014. Vesi. Viitattu 1.2.2015. <http://www.thl.fi/fi/web/ymparistoterveys/vesi>.
- 3 WHO 2015. Wastewater use. Viitattu 1.2.2015 http://www.who.int/water_sanitation_health/wastewater/en/.
- 4 World Health Organization staff. 1997. Guidelines for drinking-water quality: Surveillance and control of community supplies. Vol. 3. World Health Organization.
- 5 Opetushallitus 2014. Mitä se vesi oikein onkaan? Viitattu 1.2.2015. http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/ymparistoanalyysit_mita_se_vesi_oikein_onkaan.html.
- 6 EPA 2002 Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms Viitattu 1.2.2015. http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/wet/disk2_index.cfm.
- 7 La Motte Company 2015. Water and wastewater testing products Viitattu 10.4.2 <http://www.lamotte.com/en/water-wastewater>.
- 8 Microbiotest. Toxi Screening test Bench Protocol. Menetelmäohje.
- 9 International Organization for Standardization 2014. Standards viitattu 1.11.2014. <http://www.iso.org/iso/home/standards.htm>.
- 10 International Organization for Standardization. 2007. ISO-11348-3 Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Aliivibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) —. SFS.
- 11 Tech-FAQ 2014 Potassium Chromate. Viitattu 10.12.2015. <http://www.tech-faq.com/potassium-dichromate.html>.
- 12 TUKES 2014 Kemikaalien EU-riskiarviointi ja -vähennys. Viitattu 1.12.2014 <http://www.tukes.fi/Tiedostot/Kemikaalituotteet/tietokortit/7733-02-0.pdf>.
- 13 National Pesticide information Center 2012 Zinc Sulfate General Fact sheet. Viitattu 1.12.2014. <http://npic.orst.edu/factsheets/zns04gen.html>.
- 14 Bong, C.; Malfatti, F.; AZAM, F.; Obayashi, Y. & Suzuki, S. 2010. The Effect of Zinc Exposure on the Bacteria Abundance and Proteolytic Activity in Seawater Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry-Biological Responses to Contaminants. 57-63 *Terrapub*.
- 15 National Center for Biotechnology Information 2014 3,5-dichlorophenol. Viitattu 12.1.2014 http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3_5-dichlorophenol#section=Metabolism-Metabolites.
- 16 Ruby, E. G., McFall-Ngai, M. J. 1999. Oxygen-utilizing reactions and symbiotic colonization of the squid light organ by *Aliivibrio fischeri*. *Trends in microbiology*. Vol 7 414-420. ScienceDirect.
- 17 Dunn, A.K. 2012. *Aliivibrio fischeri* Metabolism: Symbiosis and Beyond. *Advances in Microbial Physiology* 37-68. Elsevier.

- 18 Herring, P.J. & Widder, E.A. 2001. Bioluminescence in Plankton and Nekton. In: Steele, J.H., Thorpe, S.A. and Turekian, K.K. editors, Encyclopedia of Ocean Science, Vol. 1, 308-317. Academic Press.
- 19 Dunlap, P. ; Kita-Tsukamoto, K. ; Waterbury, J.B. ; Callahan, S.M. 1995 Isolation and characterization of a visibly luminous variant of *Aliivibrio fischeri* strain ES114 from the sepiolid squid *Euprymna scolopes*. Archives of Microbiology. 164 194-202.
- 20 University of Michigan. 2014. *Euprymna scolopes viitattu* 12.1.2015. http://animaldiversity.org/accounts/Euprymna_scolopes/.
- 21 Thompson, F.L., Austin, B., Swings, J. The biology of Vibrios. 2006. ASM press.
- 22 Ruby, E. G., McFall-Ngai, M. J. 1999 Oxygen-utilizing reactions and symbiotic colonization of the squid light organ by *Aliivibrio fischeri*. Trends in microbiology. Volume 7. 414-420. ScienceDirect .
- 23 McFall-Ngai, M. J. 2000. Negotiations between animals and bacteria: the 'diplomacy' of the squid-vibrio symbiosis. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 126. 471-480. Elsevier.
- 24 Visick, K., Ruby, E. G. 2006. *Aliivibrio fischeri* and its host: it takes two to tango. Current Opinion in Microbiology. Volume 9. 632-638. ScienceDirect.
- 25 Luminometers.info. 2014. Viitattu 28.12.2014 <http://www.luminometers.info/>.
- 26 Communication Technology. 2014. An Introduction to Chemiluminescence and Bioluminescence Measurements. Viitattu 28.12.2014. <http://www.commtec.com/Library/Tutorials/CTD/Chemiluminescence%20and%20Bioluminescence%20Measurements%20.pdf>.

7.4.2014-10.4.2014 suoritettujen tikkumittausten tulokset

Taulukko 9 7.4.2014-9.4.2014 Suoritettujen tikkumittausten tulokset

Näyte	Pitoisuus mittauksessa (mg/l)	Inhibitio %									
		7.4.2014		8.4.2014				9.4.2014			
DCP	33,9	95,8	97,4	94,1	95,6	97,4	98,1	94,9	82,5	97,5	98,2
K ₂ Cr ₂ O ₇	529,0	99,5	99,5	99,4	99,3	98,1	98,4	93,7	97,7	98,7	98,5
ZnSO ₄	96,5	26,4	18,4	94,9	-579	96,0	93,6	95,9	96,7	95,4	95,6

Taulukko 10 10.4.2014 Suoritettujen mittausten tulokset

Näyte	Pitoisuus (mg/l) mittauksessa	10.4.2014 Luminesenssi prosentteina kontrollista						Keskiarvo
Nollanäyte		46	34	28	30	30	33	33
DCP	2,3	24	34	30	31			30
ZnSO ₄	20,6	40	0	12	11			16
K ₂ Cr ₂ O ₇	35,3	14	6	11	10			10

29.4.2014 Suoritettujen tikkumittausten tulokset

Taulukko 11 29.4.2014 Suoritettujen tikkumittausten tulokset

Näyte	Pitoisuus (mg/l) mittauksessa	29.4.2014 Luminesenssi prosentteina kontrollista				Keskiarvo
		18	27	19	13	
Nollanäyte		18	27	19	13	19
DCP	6,8	2	5	9	6	6
ZnSO ₄	9,7	9	3	9	7	7
K ₂ Cr ₂ O ₇	52,9	5	1	1	1	2
Vesinäyte		18	26	22	23	22

30.4.2014 Suoritettujen tikkumittausten tulokset

Taulukko 12 30.4.2014 Suoritettujen tikkumittausten tulokset. (Samat tikut kuin 29.4.2014)

Näyte	Pitoisuus (mg/l) mittauksessa	30.4.2014 Luminesenssi prosentteina kontrollista				Keskiarvo
		12	7	7	10	
Nollanäyte		12	7	7	10	9
DCP	6,8	3	2	2	4	3
ZnSO ₄	9,7	1	3	3	2	2
K ₂ Cr ₂ O ₇	52,9	0	1	0	1	1
Vesinäyte		8	7	9	6	7

02.05.2014 Suoritetujen tikkumittausten tulokset

Taulukko 13 02.05.2014 Suoritetujen tikkumittausten tulokset

Näyte	Pitoisuus (mg/l) mittauksessa	02.05.2014 Luminesenssi prosentteina kontrollista						Keskiarvo
Nollanäyte		27	23	36	36	16	19	26
DCP	6,8	24	26	0	4	0	1	6
ZnSO ₄	9,7	7	9	2	1	2		4
K ₂ Cr ₂ O ₇	52,9	2	2	0	14	2	1	4
Vesijohtovesi		20	28	0	0	17	13	12
Milli-Q-vesi		7	15	10	23	19	14	16