

 *Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



TEKNIikka JA LIIKENNE

Laboratorioala

OPINNÄYTETYÖ

ÖLJY-YMPÄRISTÖISSÄ ESIINTYVIEN RIKKIVETYÄ TUOTTAVIEN BAKTEERIEEN OSOITUSMENETELMÄN KEHITYS JA OPTIMOINTI.

**Työn tekijä: Markus Utriainen
Työn ohjaajat: Jarmo Palm
Jaakko Simell**

Työ hyväksytty: ____ . ____ . 2011

**Jarmo Palm
Lehtori**



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



ALKULAUSE

Tämä opinnäytetyö tehtiin Kemira OYJ:n Espoon Tutkimuskeskukselle. Haluan kiittää projektissa mukana olleita henkilöitä.

Helsingissä 2.6.2011

Markus Utriainen

TIIVISTELMÄ

Työn tekijä: Markus Utriainen	
Työn nimi: Öljy-ympäristöissä esiintyvien rikkivetyä tuottavien bakteerien osoitusmenetelmän kehitys ja optimointi.	
Päivämäärä: 2.6.2011	Sivumäärä: 33 s. + 3 liitettä
Koulutusohjelma: Laboratorioanalyttikko	Suuntautumisvaihtoehto:
Työn ohjaaja: Lehtori Jarmo Palm	
Työn ohjaaja: Tutkija Jaakko Simell	
<p>Tämä opinnäytetyö tehtiin Kemira Oyj:n tutkimuskeskuksessa Espoossa. Työn tarkoituksena oli kehittää edullinen, nopea ja luotettava menetelmä sulfaattia pelkistävien bakteerien osoittamiseksi keinotekoisesta merivedestä.</p> <p>Sulfaattia pelkistävät bakteerit viihtyvät samoissa ympäristöissä, joista kerätään öljyä: merivedestä, meren sedimenteistä sekä maaperästä. Öljy-ympäristöistä yleisimmin tavatut mikrobit ovat useimmiten fermentoivia, metanogeenisiä ja sulfaattia pelkistäviä. Näistä eniten on tutkittu sulfaattia pelkistäviä lajeja, koska ne tuottavat myrkyllistä ja tuotantolaitteistoa korrodoivaa rikkivetyä. Sulfaatinpelkistäjiä tunnetaan useammasta kymmenestä mikrobisuvusta, kaikille on yhteistä vaatimus hapettomista kasvuolosuhteista ja kyky pelkistää sulfaattia sulfidiksi (esim. rikkivety). Tyypillisesti lajit ovat hidaskasvuisia ja monia lajeja ei pystytä kasvattamaan laboratoriossa ollenkaan.</p> <p>Öllyteollisuudessa käytetään useasti merivettä apuna pumpattaessa öljyä. Raakaöljy saadaan liikkumaan pumppaamalla kovalla paineella käsiteltyä merivettä maaperään tai sedimenttiin. Näin öljy saadaan liikkumaan porauskaivoihin, joista se kerätään talteen. Merivedessä oleva sulfaatti toimii sulfaatinpelkistäjien metaboliassa elektronien vastaanottajana ja siten edistää sulfaatinpelkistäjien kasvua ja lisää rikkivedyn tuottoa.</p> <p>Opinnäytetyössä sulfaatinpelkistäjien osoittaminen merivedestä tehtiin ei-spesifisillä mittausten menetelmillä, kuten ATP-luminometrialla ja kasvu-ympäristön sulfidipitoisuuksien mittaamisilla. Kokeissa käytetty bakteeristo kasvatettiin fermentorissa, jossa kierrätettiin keinotekoisista merivettä. Fermentorissa oli huokoisesta kivimateriaalista tehtyjä kuulia, joiden pinnalle mikrobit muodostivat biofilmikerroksen. Testimenetelmää on tarkoitus myöhemmin kehittää edelleen biosidien tehon testaamiseen.</p> <p>Opinnäytetyössä luotiin vahva perusta lopullisen testimenetelmän luomiseen. Kasvatusolosuhteet ja välineistö saatiin optimoitua mahdollistaen lyhyemmät kasvatusajat. Kokeiden toistettavuutta ja luotettavuutta saatiin lisättyä huomattavasti yhdistämällä bioluminesenssin ja rikkivedyn mittauksen tuloksia.</p>	
Avainsanat: sulfaattia pelkistävät bakteerit, öljynporaus, bioluminesenssi, rikkivety, biosidi	

Name: Markus Utrainen	
Title: Development and Optimization of Detection Method for Hydrogen Sulfide-producing Bacteria Present in Oil Environments.	
Date: 2 June 2011	Number of pages: 33 + 3 attachments
Degree Programme: Bachelor of Laboratory Sciences	Specialization: Biosciences
Instructor: Jarmo Palm	
Supervisor: Jaakko Simell	
<p>This thesis was carried out in Kemira Oyj's R & D Center in Espoo, Finland. The purpose of this thesis was to develop an affordable, fast and reliable method to show sulphate reducing bacteria.</p> <p>Sulphate reducing bacteria thrive in the same environments as oil. These environments include sea water, marine sediments and soils. Oil environments; most commonly apprehended microbes are usually fermenting, methanogenic and sulfate-reducing. From these, the most studied microbes are sulfate-reducing, mainly because they produce harmful hydrogen sulfide. The oil industry uses frequently sea water for pumping oil. Crude oil will move by pumping treated sea water with high pressure in to the soil or sediment. This moves the oil to the drilling well where it is collected.</p> <p>Testing started with measurements which could be measured from each SRB species, ATP luminescence and the H₂S concentration in the growth environment. The bacteria from the sample were grown in a fermenter, where the conditions simulated sea conditions. The final test model would also include biocide efficacy testing of these microbes.</p> <p>Within this thesis the method was not completed, but the format of the test frames was very well limited. The culture media in use was modified to provide a large growth in two days. Also, the equipment was to agree on the in-situ work.</p> <p>Bioluminescence proved somewhat problematic for the method, because the amount of ATP alone can be interpreted in many different ways. However, combined with the measurement of H₂S, the growth results were interpreted more reliably. The biggest problem of Hydrogen sulphide measurement was its high amount which increased rapidly to dangerous levels with its growth.</p>	
Keywords: sulphate reducing bacteria, oil drilling, Bioluminescence, hydrogen sulfide, biocide.	

ALKULAUSE

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

1	JOHDANTO	2
2	TEORIA	4
2.1	Rikin biogeokemiallinen kierto	4
2.1.1	<i>Rikin kierto maalla, meressä ja ilmassa</i>	4
2.1.2	<i>Sulfaattia pelkistävät bakteerit ja niiden metabolia</i>	5
2.2	Biofilmi	8
2.3	Bioluminesenssi	9
2.3.1	<i>Adenosiinitrifosfaatti (ATP)</i>	9
2.3.2	<i>Bioluminometria</i>	10
2.4	Rikkivety (H₂S)-mittaus	10
2.4.1	<i>Kaupallisten kittien toimintaperiaate</i>	11
2.4.2	<i>Rikkivedyn vaarallisuus</i>	10
2.5	Biosidit	11
3	TOTEUTUS	13
3.1	Fermentori	13
3.2	Kasvatusalustat	13
3.3	ATP-MITTAUKSET	14
3.3.1	<i>Kasvatusliemen ja kivien suhde</i>	14
3.3.2	<i>ATP-mittaus vs. viljely</i>	15
3.4	Rikkivety (H₂S) - mittaukset	16
3.5	Ongelmat	17
4	TULOKSET	18
4.1	Tulosten esittely ja arviointi	18
4.1.1	<i>Kasvatusalustat</i>	18
4.1.2	<i>Kasvatusliemen ja kivien suhde</i>	18
4.1.3	<i>ATP-mittaus vs. viljely</i>	222
4.1.4	<i>Rikkivety (H₂S) -mittaukset</i>	224
4.2	Ongelmat	227
5	YHTEENVETO	227
	VIITELUETTELO	229



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

TYÖOHJE (HACH LANGE)

LIITE 1.2 METHOD 8131-KITIN TYÖOHJE (HACH LANGE)

LIITE 1.3 LUMIKEM ATP-PROCESS KITIN TYÖOHJE (KEMIRA)

...sena oli kehittää edullinen, nopea ja luotettava menetelmä sulfaattia pelkistävien bakteerien (SRB, engl. Sulfate Reducing Bacteria) osoittamiseksi. Tutkimuksen lähtökohtana olivat öljyteollisuus ja sen ympäristöt sekä niissä tavatut SRB-mikrobit.

Öljyteollisuudessa käytetään useasti merivettä apuna pumpattaessa öljyä maaperästä tai meren pohjasta. Öljyä on sekoittuneena maaperään ja meren sedimentteihin, josta se saadaan liikkumaan pumpaamalla kovalla paineella käsiteltyä merivettä maaperään. Tätä käsiteltyä vettä kutsutaan injektiovedeksi. Tällä tekniikalla saadaan öljy liikkumaan porauskaivoihin, joiden kautta öljy kerätään talteen. Veden avulla paine saadaan pidettyä maaperässä tai sedimentissä vakaana. Injektiovesi on käsiteltävä ennen maahan pumpausta. Siitä pyritään poistamaan kaikki mikrobit ja happi, koska nämä heikentävät raakaöljyä sekä altistavat käsittelylaitteiston korroosiolle. Tyypillisesti injektioveden käsitellään aluksi nopeavaikutteisilla klooriyhdisteillä, joilla tapetaan vedessä elävät mikrobit. Kloorikäsittelyn jälkeen vedestä poistetaan happi ja säännöllisesti veteen lisätään myös pitkäkestoisempaa biosidia. [3.]

Koska monet sulfaattia pelkistävät bakteerit viihtyvät merivedessä, meren sedimenteissä sekä maaperässä, ne ovat öljyteollisuudelle suuri uhka. Öljy-ympäristöistä yleisimmin tavatut mikrobit ovat useimmiten fermentoivia, metanogeenisiä ja sulfaattia pelkistäviä. Näistä eniten on tutkittu sulfaattia pelkistäviä, koska ne tuottavat haitallista rikkivetyä. Näitä vastaan on myös kehitetty monia erilaisia tuhoaineita, biosidejä. Suurin osa biosideistä ei kuitenkaan tehoa tarpeeksi biofilmeissä eläviin bakteereihin. Biofilmin suojassa SRB:t pystyvät rauhassa tuottamaan rikkivetyä, joka aiheuttaa korroosiota välineistöön. Rikkivety (H_2S) aiheuttaa myös öljykentän happamoitumisen, mikäli sitä kerääntyy suuriksi pitoisuuksiksi, lähinnä maahan pumpattavaan injektioveteen. Rikkivety aiheuttaa myös vakavan terveysriskin teollisuudessa työskenteleville henkilöille ja sen poistaminen lopputuotteesta (raakaöljystä tai maakaasusta) lisää huomattavasti tuotantokustannuksia. SRB:iden on lisäksi osoitettu osallistuvan maaöljyn hiilivetyjen hajotukseen, jolloin ne voivat heikentää kerättävän raakaöljyn laatua ja määrää [11].

stäviä bakteereja on tutkittu enemmän viimeisen 30 vuoden iden toiminnasta, monipuolisuudesta ja esiintymisestä on kasvanut huomattavasti. Tähän (sulfaattia pelkistävien) kategoriaan kuuluvia bakteereja on tavattu joka puolelta maailmaa, ja ne ovatkin yksi sopeutuvimpia lajistoja. Ne kykenevät elämään korkeissa lämpötiloissa, suurissa paineissa ja hyvin suolaisissa olosuhteissa sekä käyttämään metaboliassaan hyödyksi monia yhdisteitä. Yksi syy, miksi näistä mikrobeista on vähän tietoa, on se, että niiden viljeleminen ja tutkiminen normaaleissa laboratorioolosuhteissa on haastavaa. Varsinkin DNA-tekniikan kehittyminen on auttanut suuresti mikrobien läsnäolon todentamisessa. Esimerkkinä monta sataa metriä merenpohjan alapuolelta tutkitusta näytteestä löydettiin sulfaattia pelkistäviä bakteereja [12], jotka tunnistettiin sekvenssien perusteella.

Tämän tutkimuksen suurimmat haasteet ovatkin juuri SRB:n tunnistaminen/erottaminen muista mikrobeista sekä mikrobimäärän kasvattaminen riittävän suureksi mahdollisimman lyhyessä ajassa niiden havaitsemista varten. Samalla kuitenkin on tarkoitus, että havainto pystytään tekemään mahdollisimman pienestä määrästä mikrobeja. Tämä valmis testi pitäisi toteuttaa mahdollisimman taloudellisesti, ja olla myös toteutettavissa *in situ*.

2.1 RIKIN BIOGEOKEMIAINEN KIERTO

2.1.1 Rikin kierto maalla, meressä ja ilmassa

Rikki on tärkeä ainesosa bio- sekä geokemiallisesti. Kun vulkaaniset, fossiiliset tai eloperäiset aineet palavat, niistä siirtyy palamistuotteina ilmakehään rikkiä ja rikkiyhdisteitä. Ilmakehästä ne laskeutuvat vesistöihin sekä maaperään ja kasvillisuuteen, ja tällöin rikkiä tavataan pääsääntöisesti yhdisteinä. Maaperässä esiintyy runsaasti rikkipitoisia mineraaleja sekä kivilajeja. Veden mukana yhdisteitä kulkeutuu pohjasedimentteihin sekä maaperään, joista mikrobit käyttävät yhdisteitä raaka-aineena omiin soluosiinsa ja rakenteisiinsa. Maaperästä ja mikrobeista rikkiyhdisteitä kulkeutuu kasveihin ja edelleen eläimiin. Kasveista (ja eläimistä) ne siirtyvät luonnollisesti eläimiin ja ihmisiin. Mikrobit palauttavat rikkiä takaisin maaperään, vesistöihin ja ilmakehään kuolleista kasveista ja eläimistä. [1;4.]

Rikki on välttämätön alkuaine kaikille eläville organismeille ja se muodostaa noin 1 % eliöiden kuivapainosta. Suurin osa maailman rikistä on kuitenkin sitoutuneena maa- ja kallioperään sekä meriin. Kuitenkin määrällisesti rikin kierron päätehtäviä toimittavat sulfaatilla hengittävät bakteerit ja arkit, sekä rikkiyhdisteitä hapettavat autotrofiset bakteerit ja arkit. Ne tuottavat toisilleen ravintoa ja niitä tavataan toistensa läheisyydestä ekosysteemeissä. Rikin kierto on hyvin moninainen johtuen sen hapetusasteista (luonnossa useimmin -2, 0 ja +6) sekä herkästä reaktiivisuudesta. Monet biologiset reaktiot joutuvat kilpailemaan kemiallisten reaktioiden kanssa. Erilaiset teollisesti tuotetut rikkiyhdisteet (esim. pesuaineissa) jäävät kierron ulkopuolelle niiden huonon biohajoavuuden takia, joka johtuu kovalenttisesta -C-S-sidoksesta. [1;4.]

bakteerit ja niiden metabolia

Luonnetaan jo yli 40 bakteerisukua, joista löytyy sulfaattia pelkistäviä lajeja. Sulfaatin pelkistykseen kykenevät myös muut mikrobiryhmät, esim. arkkibakteereista *Archeoglobus* -suvun edustaja. Rikkiyhdisteitä pelkistävät bakteerit käyttävät myös erilaisia epäorgaanisia rikkiyhdisteitä, rasvahappoja, aminohappoja, alkoholeja, mineraaleja ja jopa alkuainerikkiä elektronien vastaanottajana hapettomassa soluhengityksessä. Muutamat lajit pystyvät tarpeen vaatiessa nitraattihengitykseen. Yksi sulfaatinpelkistäjien laajan levinneisyyden salaisuuksista lienee niiden kyky elää erilaisilla energianlähteillä. Vaihteleva metabolia on varmasti yksi syy, miksi näitä mikrobeja tavataankin lähes joka maailman kolkasta. Hyvin suurista suolapitoisuuksista, korkeista lämpötiloista ja syvältä merenpohjan alta, suuren paineen alaisuudesta, on kaikista tehty havaintoja sulfaattia pelkistävästä bakteereista. Kaikkia lajeja pidetään yleisesti anaerobeina, mutta jo v. 1990 Dilling ja Cypionka [10] havaitsivat että SRB:t voivat käyttää happea terminaalisena elektronin vastaanottajana, ja jopa saamaan ATP:tä tästä prosessista. Toinen tutkimus, jossa Cypionka oli mukana osoitti näiden bakteerien kuluttavan ensin happea, vaikka saatavilla oli nitraattia ja rikkiyhdisteitä [15]. Mutta kasvua hapen avulla ei ole koskaan osoitettu, joten uskotaan että nämä bakteerit kuluttavat myrkyllisen hapen ensin pois ympäristöstään. Juomavedessä, biofilmin suojassa, sulfaattia pelkistävät bakteerit pysyivät elävinä jopa 72 päivän ajan [13], joten olosuhteiden salliessa SRB:t ovat hyvinkin happea kestäviä.

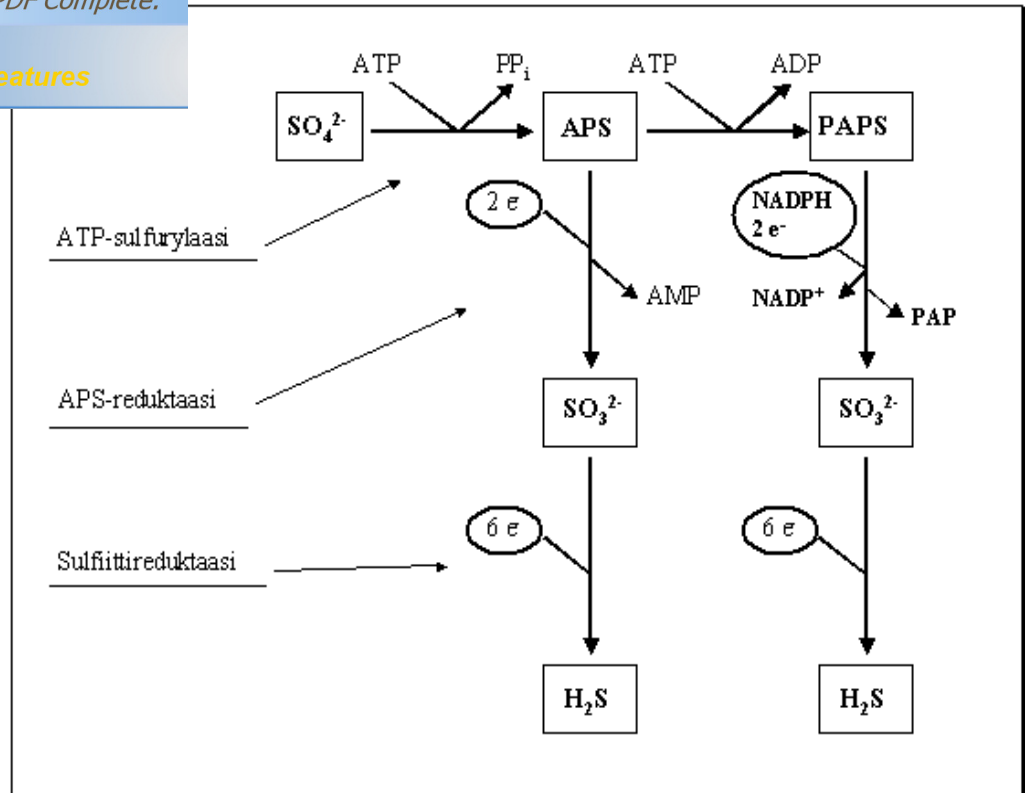
SRB:t jakaantuvat neljään haaraan: 1. Delta-proteobakteerit 2. Gram negatiiviset, joilla suuri G+C-suhde 3. Thermodesulfobakteerit 4. Arkkieliöt.

Grampositiivisia, sulfaattia pelkistäviä bakteerisukuja öljy-ympäristöistä on tavattu ainoastaan yksi suku; *Desulfotomaculum*, joka on läheistä sukua klostrideille; yhteisenä piirteenä endosporien muodostus [14]. *Desulfotomaculum* -suvun bakteereilla on korkea optimilämpötila (60 - 65°C), poislukien *D.halophilum*, ja ne ovat epätäydellisiä hapettajia, poislukien *D.kuznetsovii*. Gramnegatiivisiä SRB-sukuja on useampia, näistä käytetään nimitystä Delta-proteobakteerit: *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfomicrobium*, *Desulfafacinu*, *Thermodesulfobacterium*. Kaikki edelliset ovat epätäydellisiä hapettajia ja käyttävät vain tiettyjä substraatteja (mm. pyruvaatti, laktaatti, vety-ioni). Delta-proteobakteereihin kuuluvat SRB:t kestävät, tai jo-

rkeita suolapitoisuuksia (yleensä 1 - 5 %). *Desulfomicrobium* kasvavaa jopa 8 % suolapitoisuudessa. Kolmas haara käsittää *Thermodesulfobakteerit*, joita on tavattu kahta lajia öljy-ympäristöistä: *T. commune* ja *T. thermophilum*. Molemmat pystyvät kasvamaan jopa 80 °C:ssa ja hyödyntävät metaboliassaan vain rajallisen määrän yhdisteitä (mm. H₂, laktaatti, pyruvaatti). Neljäs haara on arkkieliöt, tarkemmin *Achaeglobus*-suku. Lajin kolmesta suvusta kaksi on sulfaattia pelkistävää, mutta vain *A. fulgidus* on tavattu öljy-ympäristöstä. [6.]

Jotkut lajit muodostavat itiöitä, joka on bakteerin kemikaaleja, kuumuutta, happamuutta ja säteilyä kestävä lepomuoto. Itiöissä on vain 15% vettä ja energiavarastona itiöillä on 3-fosfo-glyseraattia, joka toimii fosfolipidisynteesin raaka-aineena. Itiöt eivät sisällä ATP:tä. Esim. *Desulfotomaculum*-bakteerin itiöt saattavat kestää elintarvikkeessa tunninkin autoklavoinnin (121 °C). Olosuhteiden muuttuessa suotuisimmiksi itiöt alkavat kasvaa ja tuottaa rikkivetyä. [1.]

Sulfaattihengityksessä mikrobit aktivoivat ensin adenosiniinifosfaatin (ATP) avulla sulfaatin adenosiinifosfosulfaatiksi (APS), koska sulfaattia ei voi pelkistää vesiympäristössä. Sulfaatti/sulfiitti redoksi-parin potentiaali on matalampi kuin vetykaasun hajoamisen, mutta APS:n redokspotentiaali on korkeampi jolloin mikrobit voivat käyttää orgaanisista hapoista ottamiaan elektroneja tai vetyatomeja. APS pelkistyy adenosiinifosfosulfaattireduktaasi-entsyymien avulla. Sulfaatin pelkistäminen sulfiitiksi kuluttaa energiaa, mutta jatkoreaktiot tuottavat energiaa ja niitä suorittavat monet muutkin bakteerit (myös fakultatiiviset). Sulfaatinpelkistäjät ottavat energiaa käymistuotteista kuten maito- ja etikkahaposta, käyttämällä sulfaattia ja muita rikkiyhdisteitä. Sulfaattihengitys mukautuu aina hieman sen mukaan, mitä lähtöaineita on tarjolla. Sulfaattihengityksen lähtöaineina voi olla yli sata eri molekyyliä, joita nämä lajit voivat hyödyntää sulfaattihengityksessä; tämä vaikeuttaa laatimasta yleistä SRB-lajiston hengitysmallia. Osa yhdisteistä hapettuu periplasmassa, toiset sytoplasmassa. [1.] (Kuva 1.)



Kuva 1. Sulfaattihengityksen kaavakuva ilman välituotteita [7].

Vesistöjen pohjasedimenteissä kehitty aina rikkivetyä, koska sinne laskeutuvat kuolleet kasvit ja kalat tuovat sinne ravintoa sulfaattia pelkistäville bakteereille. Merivedessä muodostuu biofilmejä, ja niissä rikkivetyä, myös kaikkiin vedenalaisiin rakennelmiin kuten satamiin, laivojen pohjiin sekä muihin veden pinnan alla sijaitseviin pintoihin. Biofilmin suojissa muodostuu rikkivetyä sekä voimakkaasti happamat olosuhteet, jotka aiheuttavat korroosiota. [1;6.]

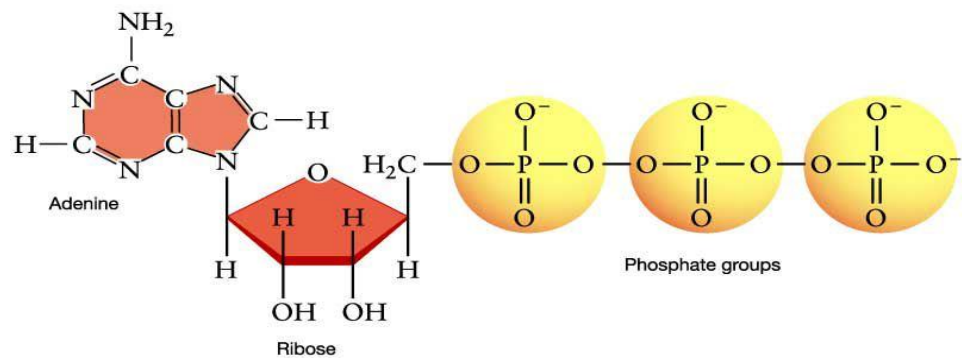
oitetaan joko elottomaan (esim. kivet, muovit) tai elolliseen (esim. iho, juuri, suolisto) pintaan tarttunutta mikrobikasvustoa. Kiinnittyneet mikrobit toimivat eri tavalla kuin vapaasti liikkuvat/uivat mikrobisolut. Jopa niiden metaboliassa voi huomata muutoksia. Biofilmeissä elää suurin osa luonnossa elävistä mikrobeista, se suojaa bakteereja (ja arkkeja) saalistajilta ja viruksilta. Bakteerit pärjäävät pienemmällä ravintomäärällä ja ne pystyvät torjumaan paremmin ympäristön haitalliset olosuhteet. Mikrobit pystyvät jopa luomaan itselleen edullisemmat olosuhteet biofilmiin. Vapaana olevia bakteereja esiintyy lähinnä merissä ja vesistöissä, sekä runsasravinteisissä ympäristöissä kuten veri ja maito tai erilaiset teollisuuden prosessivedet. Biofilmien rakenne vaihtelee ympäristön mukaan; runsasravinteisissa ja muutenkin edullisissa ympäristöissä rakenne on löyhä ja helposti mekaanisesti irrottavissa. Jos olosuhteet ovat ankarat ja vähäravinteiset, solut ovat kiinnittyneet hyvin tiivisti pintaan sekä toisiinsa. Luonnossa biofilmit sisältävät aina eri lajin edustajia, mutta bioprosesseissa voidaan käyttää yhden lajin biofilmiä. Eri lajeilla on erilaiset kyvyt tarttua eri pintoihin, ja tiettyjä lajeja kutsutaankin *tarttujamikrobeiksi*. Ne pystyvät tarttumaan muovi- ja teräspintoihin niin tehokkaasti, ettei niitä saa pois pesuaineilla, lipeällä tai mekaanisesti hankaamalla. Tarttuminen perustuu mikrobin solupinnan rakenneominaisuuksiin, fimbrioihin, kapseliaineeseen, limapolysakkarideihin, S-kerroksiin ja muihin solupinnan molekyyliin. Biofilmissä olevat mikrobit säätelevät pysymistä, irrottautumista ja siirtymistään viestintäjärjestelmällä. Biofilmin kasvusta aiheutuu haittaa ihmiselle ja prosesseille. Vesijärjestelmien ja elintarvikkeprosessien saastuminen sekä materiaalien korrosio on yleensä biofilmi-mikrobien aikaansaamaa. [1.]

2.3 Bioluminesenssi

2.3.1 Adenosinitrifosfaatti (ATP)

ATP eli adenosinitrifosfaatti on pieni orgaaninen molekyyli, joka toimii kaikissa maapallolla elävissä eliöissä kytkentämekanismina energiaa tuottavien ja sitä vaativien reaktioiden välillä. ATP-molekyyli (Kuva 2.) sisältää viisi osaa: adeniinimäksen, sokeriosan ja siihen liittyneet kolme fosfaattiryhmää. Tämä molekyyli rakenne on hyvin pysymätön ja ATP-molekyyli pyrkiikin luovuttamaan yhden fosfaattiryhmän hajoen adenosinidifosfaatiksi (ADP) ja ortofosfaatiksi (P_i). ATP pystyy joissakin reaktioissa lohkaisemaan samankaltaisesti kaksi fosfaattia, muuttuen näin adenosinimonofosfaatiksi (AMP) ja pyrofosfaatiksi (PP_i). [2.]

Luovuttamalla fosfaattiryhmän ATP pystyy aktivoimaan muita yhdisteitä. Yhdisteestä tulee pysymätön, joten se voi osallistua helpommin muihin kemiallisiin muunnoksiin. Esim. glukoosin hapetuksessa vapautuva energia tallennetaan ATP:na. ATP:n, ADP:n ja P_i :n reaktioseoksessa on varastoituneena energiaa silloin kun ATP:n pitoisuus on suurempi kuin tasapainotilassa. Tasapainotilassa ATP:n suhteellinen pitoisuus on hyvin pieni. [2.]

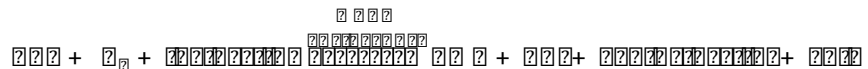


Kuva 2. Adenosinitrifosfaatin kemiallinen rakenne [8].

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

a perustuu lusiferaasi-entsyymiin, joka on tavallisesti eristetty bakteerista tai tulikärpäsestä. Sen katalysoidessaan reaktiota lusiferiinin ja ATP-molekyylin kanssa syntyy valoa jonka laite havaitsee. Valon määrät ovat hyvin pieniä, joten se monistetaan valomonistinputkessa tai fotodiodilla. Yleensä laitteet antavat tulokset suhteellisena valomääränä, ns. RLU:na (Relative Light Unit). Suhteellinen valomäärä tarkoittaa, että tulos on määritettävä tunnetun standardin avulla. Näytteen antama tulos suhteutetaan standardin antamaan tulokseen josta voidaan määrittää ATP:n todellinen määrä. Ennen mittausta ATP on kuitenkin saatava vapautumaan soluista, joten solut on lyysattava. Tämä tapahtuu yleensä kemiallisesti.

Valoa tuottava reaktio:



2.4 Rikkivety (H₂S)-määritys

2.4.1 Rikkivedyn vaarallisuus

Rikkivety on vaarallinen soluhengitysmyrkky. Rikkivety ärsyttää jo pienissä pitoisuuksissa limakalvoja ja hengitysteitä. Ärsytys kohdistuu etenkin silmiin aiheuttaen side- ja sarveiskalvon punoitusta ja tulehdusta. Silmän ärsytysoireet ilmenevät rikkivedyn pitoisuuksissa 10 - 20 ppm (15 - 30 mg/m³) ja polttavaa kipua, kyynelvuotoa sekä näön sumenemista ilmenee, kun pitoisuus ylittää 50 - 100 ppm (70 - 140 mg/m³). Samalla esiintyy nenän ja kurkun kuivumista ja ärsytystä; altistumisen jatkuessa ilmenee vetistä vuotoa nenästä, yskää, käheyttä ja hengenahdistuksen tunnetta. Rikkivety lamaanuttaa hajuaistin 100 - 150 ppm:n (140 - 210 mg/m³) pitoisuuksissa, mikä lisää äkillisen myrkytyksen vaaraa suurissa pitoisuuksissa. Altistuminen suuremmille pitoisuuksille aiheuttaa voimakkaan ärsytyksen lisäksi päänsärkyä, huimausta, pahoinvointia, heikkoutta ja sekavuutta. Altistuminen rikkivedylle 500 ppm:n (750 mg/m³) pitoisuudessa aiheuttaa viidessä minuutissa vakavia hermostollisia oireita ja tajuttomuutta, hengityskeskukseen lamaanutumisen ja kuoleman jopa puolessa tunnissa. Altistuminen yli 300 ppm:n (400 mg/m³)

oi aiheuttaa keuhkopöhön. Yli 1 000 ppm:n (1 400 mg/m³) pi-
taa välittömästi tajuttomuuden ja kuoleman hengityksen la-
maannuttua. Vakavista äkillisistä myrkyksistä toipuneilla on yksittäisissä
tapauksissa todettu hermostollisia jälkioireita, kuten heikentynyttä muistia ja
keskittymiskykyä sekä erilaisten hermostovaurioiden aiheuttamia oireita.
Yleensä toipuminen on kuitenkin ollut täydellistä. [9.]

Rikkivedyn krooniset vaikutukset ovat kiistanalaisia. Pitkäaikaisesti altistu-
neilla työntekijöillä on kuvattu esiintyneen tarkoin määrittelemättömiä oireita,
kuten väsymystä, päänsärkyä, huimausta ja ärtyneisyyttä limakalvojen ärsy-
tysoireiden lisäksi. Henkilö, jolle on pitkäaikaisen rikkivetyaltistumisen seu-
rauksena kehittynyt ns. kaasusilmä eli krooninen silmän sidekalvontulehdus,
saattaa saada oireita jopa alle 1 ppm:n rikkivetypitoisuuksissa. [9.]

2.4.2 Kaupallisten kittien toimintaperiaate.

Tutkimuksessa käytettiin kahta kaupallista kittiä mittaamaan nesteestä siihen
liuennutta rikkiä ja tiettyjä yleisimpiä rikkiyhdisteitä. Molemmat kitit perustui-
vat rikkiyhdisteiden reagointiin dimetyyli-p-fenyleenidiamiinin kanssa, jonka
seurauksena, suoraan tai välillisesti, seuraa sininen väri. Muodostunut väri
on suoraan verrannollinen rikin määrään. Molemmat kitit ovat yleisesti käy-
tettyjä mm. jätevesien tutkimuksissa. Kittien tarkemmat tiedot ja ohjeet ovat
liitteenä. (Liite 1 ja 2)

2.5 Biosidit

Käsitteellä biosidivalmiste tarkoitetaan yhtä tai useampaa tehoainetta sisäl-
tävää valmistetta, joka kemiallisesti tai biologisesti tuhoaa, torjuu tai tekee
haitattomaksi vahingollisia eliöitä, estää niiden vaikutusta tai rajoittaa muulla
tavoin niiden esiintymistä. Pelkästään fysikaalisesti vaikuttavia valmisteita ei
kuitenkaan katsota biosidisiksi valmisteiksi. [5.]

Biosidin tehoaineena voi olla myös pieneliö. Biosideja ovat esimerkiksi tuho-
laistorjunta-aineet, desinfiointiaineet, teollisuudessa käytettävät säilytys- ja
suoja-aineet sekä alusten kiinnittymisenestoaineet. Suomessa biosidit on ja-

terryhmään, joista vastaavat Sosiaali- ja terveysalan lupa- ja
(Valvira) ja Suomen ympäristökeskus (SYKE).

Öljyteollisuus asettaa biosidien käytölle erityiset olosuhteet ja vaatimukset. Biosidien käyttö on yhteinen tekijä kaikissa maailman öljynporauskohteissa, ja useimmat porauksen vaiheet sisältävät biosidikäsittelyitä. Biosidien tarkoituksena on varmistaa lopputuotteen korkea laatu ja saanto, estämällä mikrobiperäinen korroosio sekä mikrobien ja biofilmin kerääntyminen laitteistoon. Öljyteollisuudessa useasti käytettyjä tehoaineita ovat kvaternääriset ammoniumyhdisteet, formaldehydi, glutaraldehydi ja tetraakis(hydroksimetyyli)- fosfoniumsulfaatti(THPS). [5.]

Biosidien käyttöä määrittelee veden kierrätys, onko sitä ja miten se on toteutettu. Veden kierrätyksessä biosidin määrät ovat pienempiä koska altistus on jatkuvaa eikä ulkopuolisen kontaminaatiolähteen vaaraa ole. Jos kierrätystä ei ole, pitää jokaiselle injektiovedelle ja porauskohteelle määrittää biosidien käyttö erikseen. Ei ole olemassa valmista mallia käsittelylle. Injektiovedessä biosidin on oltava stabiili pitkiäkin aikoja, sekä kestettävä pH:n vaihteluja. Toinen kriteeri on reagointi muiden vedenkäsittelyaineiden kanssa, ne saattavat yhdessä aiheuttaa herkästi esimerkiksi sakkaantumista tai biosidin tehokkuuden vähenemistä. Myös vaahtoutumista tavataan joidenkin biosidien kohdalla, ja laitteistosta riippuen se voi olla rajoittava tekijä. Yleinen turvallisuus on tekijä, mikä on otettava huomioon käsittelyn ja mahdollisen onnettomuuden varalle. Yksi tärkeä biosidien valintakriteeri on, että ne eivät saa vaikuttaa lopputuotteen laatuun. [5.]

3.1 Fermentorin

Fermentorin tarkoituksena oli tuottaa sulfaattia pelkistäviä bakteereja sisältävällä biofilmillä peitetyjä huokoisesta kivimateriaalista tehtyjä kuulia.

Öljynporauslautalta saadun injektiovesinäytteen bakteerikantaa kasvatettiin suljetussa 20 litran muoviastiassa, johon oli liitetty vesipumppu. Pumpun säiliöosaan laitettiin steriloituja huokoisia kiviä 3 x 0,7 l. Kivet olivat kaupallisesti saatavilla olevia pyöreitä ja huokoisia, ja niistä suodatettiin halkaisijaltaan 8 - 12 mm kiviä fermentoriin. Kompleksin kokonaisnestetilavuus oli tällöin lähes 23 l. Fermentorissa pyörivä neste käsitti 3 l vesinäytettä ja 20 l keinotekoista merivettä (3,5 % Instant Ocean + steriili hanavesi) johon oli lisätty Na-asettaattia ja -laktaattia lopulliseen pitoisuuteen 20 mM sekä 23 g Natioglukolaattia hapen poistamiseksi. Pohjana veden koostumukselle oli pohjanmeri jonka keskimääräinen suolapitoisuus on 3,5%. Viikottain tehty 10 % veden vaihto ravinteineen (ks. yllä) toi fermentoriin happipiikin, mutta muuten olosuhteet fermentorissa olivat anaerobiset. Lämpötila kasvatusastiassa oli 20 - 24 °C. Fermentorin mukaili meriveden ja sedimentin luonnonmukaisia olosuhteita jotka vaihtelevat runsashappisista hapettomiin.

3.2 Kasvatusalustat

ATP- ja rikkivetymittauksien rinnalle haluttiin viljely, joka tukisi muiden mittausten tulkintaa ja antaisi lisätietoa fermentorin lajistosta. Kasvualustaksi valittiin R2-agar (Merck, 1004160500), josta kokeiltiin kahta muunnelmaa, sekä pintalevitys- että maljavalu-tekniikat. R2-agar on vähäravinteinen kasvualusta, joka on kehitetty (juoma)veden kokonaisbakteeriluvun määrittämiseksi. Tarkoituksena oli valita kasvualusta, joka tuottaisi suurimman pesäkeluvun.

Valitusta R2-agarista valmistettiin 3 erää: yhteen lisättiin 2,5 g NaCl:a, yhteen 3,5 g Instant Ocean-merisuolaa ja kolmas erä oli alkuperäinen R2-agar. Näytteenä käytettiin 64 päivää kasvatettua nestettä fermentorista, josta val-

nnossarja 10^0 - 10^{-3} . Näistä viljeltiin pinta- ja maljaviljelynä, kai-
2-agar-variaatiolle. Maljoja kasvatettiin huoneenlämmössä 2
d pussitettuna.

3.3 ATP-MITTAUKSET

3.3.1 Kasvatusliemen ja kivien suhde

Testi 1:

Ensimmäisessä testissä tarkkailtiin kuinka nopeasti eri määrästä kiviä ha-
vainnoidaan mikrobien kasvua, ja mikä olisi hyvä kivien ja kasvatusliemen
suhde. Kasvatusliemenä käytettiin Instant Oceania (35 g/l) johon oli lisätty
13,3 ml/l 3M Na-asettaattia ja 3M Na-laktaattia sekä 1g/l Na-tioglykolaattia
(tästä seoksesta käytettiin työnimeä Osterivesi). Sarjoja oli neljä kappaletta
ja jokaisessa viisi rinnakkaista:

1.	2.	3.	4.	
50 ml	10 ml	10 ml	10 ml	Kasvatuslientä
10 kpl	10 kpl	3 kpl	1 kpl	Kiviä

Ensimmäiseen sarjaan käytettiin 100 ml:n laboratoriapulloa, sarjoihin 2, 3, ja
4 lasisia 15 ml:n koeputkia. Sarja 3 tehtiin anaerobiseksi lisäämällä mineraa-
liöljyä liemen pinnalle. Ennen kokeen alkua kivet huuhdeltiin kolme kertaa
200 ml:lla steriiliä hanavettä. Tämän jälkeen kivet jaettiin sarjoihin aseptises-
ti. Kasvua seurattiin ATP-process-lite-kitillä (valmistaja, tuot.numero) [liite 3]
kuudessa mittauspisteessä: 0 h, 8 h, 24 h, 32 h, 48 h ja 72 h. Käytetty laite
oli 3Mi Clean-Tracei NG . luminometri. Ensimmäisen mittauksen jälkeen
putket ja pullot asetettiin 100 rpm ravistukseen.

Testi 2:

Testissä tutkittiin kasvatusliemen ja hapen läsnäolon vaikutusta kasvuun.
Toisessa testissä vaihdettiin kaikissa sarjoissa liemen ja kivien määrää yh-
teneväisiksi. Ensimmäisten tulosten pohjalta päädyttiin käyttämään yhdis-
telmää 15 ml lientä + 3 kpl kiviä. Astia vaihdettiin korkilliseen vial-pulloon

oli 23 ml. Sarja 1 suljettiin anaerobiksi mineraaliöljyllä. Jokai-
tehtiin viisi rinnakkaista mittausta. Mittauspisteitä oli neljä: 0 h,
8 h, 24 h ja 48 h. Valmistelut ennen mittauksen alkua olivat kuten ensimmäi-
sessä testissä, ja mittaus suoritettiin ATP-process-lite-kitillä [Liite 3].

Taulukko 1. Testi 2:n mittaussarjat.

<u>Sarja:</u>	1.	2.	3.
<u>Olosuhteet</u>	Anaerobi	Aerobi	Aerobi
<u>Kasvatusliemi</u>	Osterivesi	Osterivesi	R2A-liemi

3.3.2 ATP-mittaus vs. viljely

Testi 3:

Testissä vertailtiin viljelyiden antamaa tulosta kasvatusmaljoille (R2A-Merck) viljeltyjen tuloksiin. Tehtiin kaksi sarjaa, sarjat 1 ja 2 edellisestä testistä, molemmista 5 rinnakkaista. Valmistelut ennen mittausta toteutettiin kuten edellä. Molempiin sarjoihin sisältyi referenssinä pelkkä kasvatusliemi. Mittauspisteitä oli kaksi: 0 h ja 24 h, 0 h -hetkellä viljeltiin pintaviljelynä jokaisesta rinnakkaisesta sekä referenssistä 10^{-1} ja 10^{-2} laimennokset. Mittauspisteessä 24 h viljeltiin 10^{-2} ja 10^{-3} laimennokset.

Rikkivedyn mittaukseen käytettiin Hach Langen spektrofotometrisiä kittejä LCW 053 (detektointi 0,1 - 2,0 mg/ l) [Liite 1] ja Method 8131 (detektointi 5 . 800 µl/ l) [Liite 2]. Laitteena käytettiin Hach Langen DR 5000 UV-VIS-spektrofotometriä.

Rikkivety(H₂S)-testi 1

Kokeen tarkoituksena oli selvittää kuinka paljon rikkivedyn määrä kasvaa kun kasvatusliemena on osterivesi. Ensin 64 päivää osterissa olleita kiviä siirrettiin 3 kpl vial-pulloon, jossa oli 22 ml tuoretta osterivettä. Testi toteutettiin kolmella rinnakkaismäärityksellä. Jokaiseen mittaukseen tarvittiin 10 ml näytettä, joka korvattiin aina 10 ml:lla osterivettä. Tämän lisäyksen tarkoituksena oli antaa mikrobeille lisää ravintoa, jotta rikkivetypitoisuudet olisivat tarpeeksi suuria. Mittauspisteitä valittiin 3 kpl: 0 h, 24 h ja 48 h. Mittaukset suoritettiin Method 8131 (5 . 800 µl/l) -kitillä. Näytepulloja säilytettiin testin ajan 100 rpm ravistelussa huoneenlämmössä.

Rikkivety(H₂S)-testi 2

Osa 1:

Testissä kokeiltiin uutta kasvatuslientä, jonka ajateltiin antavan hyvin nopean kasvun, ja olisi spesifi halutuille mikrobeille. Valmistettiin yhdistelmä R2-liemestä ja Instant Oceanista, joka sai työnimen OM-liemi. Aluksi käytettävät kivet esikäsiteltiin, 4 h (100ml / 30 kiveä) ravistelussa tuoreessa Instant Oceanissa, josta ne siirrettiin OM-liemeen (100 ml / 15 kiveä) joka suljettiin silikoniöljyllä. Testissä oli kaksi rinnakkaista näytettä. Mittaukset suoritettiin 24 h ja 48 h, LCW 053 (0,1 . 2,0 mg/l) -kitin ohjeen mukaisesti. Laite nollattiin OM-liemellä.

Osa 2:

Testi toistettiin pitemmällä 16 h esikäsitelyajalla, ja valmisteluita muutettiin myös loppuastian osalta vial-pulloihin, jossa oli OM-lientä 20 ml ja 3 kiveä. Jokaiselle mittauspisteelle, 24 h, 48 h ja 120 h, valmistettiin oma vial-pullo.

minimoimaan hapen vaikutus kasvustoon. Näytteistä valmistet-
kkaismääritystä, laite nollattiin OM-liemellä.

Rikkivety(H₂S)-testi 3:

Tässä vaiheessa tutkimuksia haluttiin kokeilla, ns. valmista testiä jossa oli parametreinä ATP- ja H₂S-mittaus sekä 4 kpl eri biosidejä. Testillä haettiin tuloksista yhdenmukaisuutta biosidien määrän sekä ATP- ja H₂S-mittauksien välillä. Myös biosidien tehokkuutta ja annostelua tarkkaillaan tuloksista. Aluksi käytettävät kivet +pestiin+, 4 h (100ml / 30 kiveä) ravistelussa tuorees- sa Instant Oceanissa, johon oli lisätty biosidiä 200 ppm tai 1000 ppm. Tes- tissä oli mukana 4 eri biosidivalmistetta. Pesun jälkeen kivet siirrettiin OM- liemeen (100 ml / 15 kiveä) joka suljettiin silikoniöljyllä. Mittaukset suoritettiin 24 h, 48 h ja 120 h, LCW 053 (0,1 . 2,0 mg/ l) -kitillä. Mittauspisteet valikoi- tiin edellisten testien tulosten perusteella.

3.5 Ongelmat

Tutkittaessa Biosidi A:n vaikutusta steriloituihin akvaariokiviin Instant Oceanissa, huomattiin että pohjalle muodostui valkoista sakkaa. Tämä ta- pahtui myös referensseissä, jotka tehtiin ilman akvaariokiviä. Tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia, hajottaako biosidi akvaariokiviä 80 rpm ravistuksessa enemmän. Tämän havainnon pohjalta tehtiin uusi tutkimus, jossa verrattiin muutamaa eri biosidiä ja NaOH:a, pitoisuuksina 100,1000 ja 10000 ppm. Havainnot kirjattiin 0 h ja 24 h jälkeen.

H₂S-mittauksessa haluttiin varmistaa etteivät biosidit häiritse mittauksen oi- keellisuutta. Mittauksessa käytettiin neljää eri biosidiä, kustakin 500 ppm ja 2000 ppm pitoisuudet. Mittauksessa käytettiin näytteenä R2-lientä, johon oli lisätty 3,5 g/l Instant Oceania, johon kyseiset biosidipitoisuudet lisättiin. Mit- taukset toteutettiin kittien ohjeiden mukaisesti.

4.1 Tulosten esittely ja arviointi

4.1.1 Kasvatusalustat

Maljoilla havaittiin yhteensä 4 erilaista pesäkettä, joista jokaisessa versiossa esiintyi 3 kerrallaan. Pelkässä R2-agarissa oli yksi pesäke mikä ei esiintynyt maljoissa, joihin oli lisätty suolaa. Pesäkkeiden koko oli pienin tavallisessa R2-agarissa ja suurin maljoissa, joihin oli lisätty Instant Oceania. Pesäkkeiden kokoverailu tehtiin pintavalu-maljojen perusteella.

Viljelyvertailusta saatiin odotettu tulos, kun eniten fermentorin olosuhteita muistuttava kasvualusta (R2-Agar+3,5 % Inst.O) antoi suurimman pesäkeluvun. Tämä kasvatusalusta otettiin käyttöön fermentorin ylläpitoseurantaan, sekä myöhempiin tutkimuksiin. (Taulukko 1.)

Taulukko 2. Kasvatusalustavertailun pesäkemäärät (cfu/ ml).

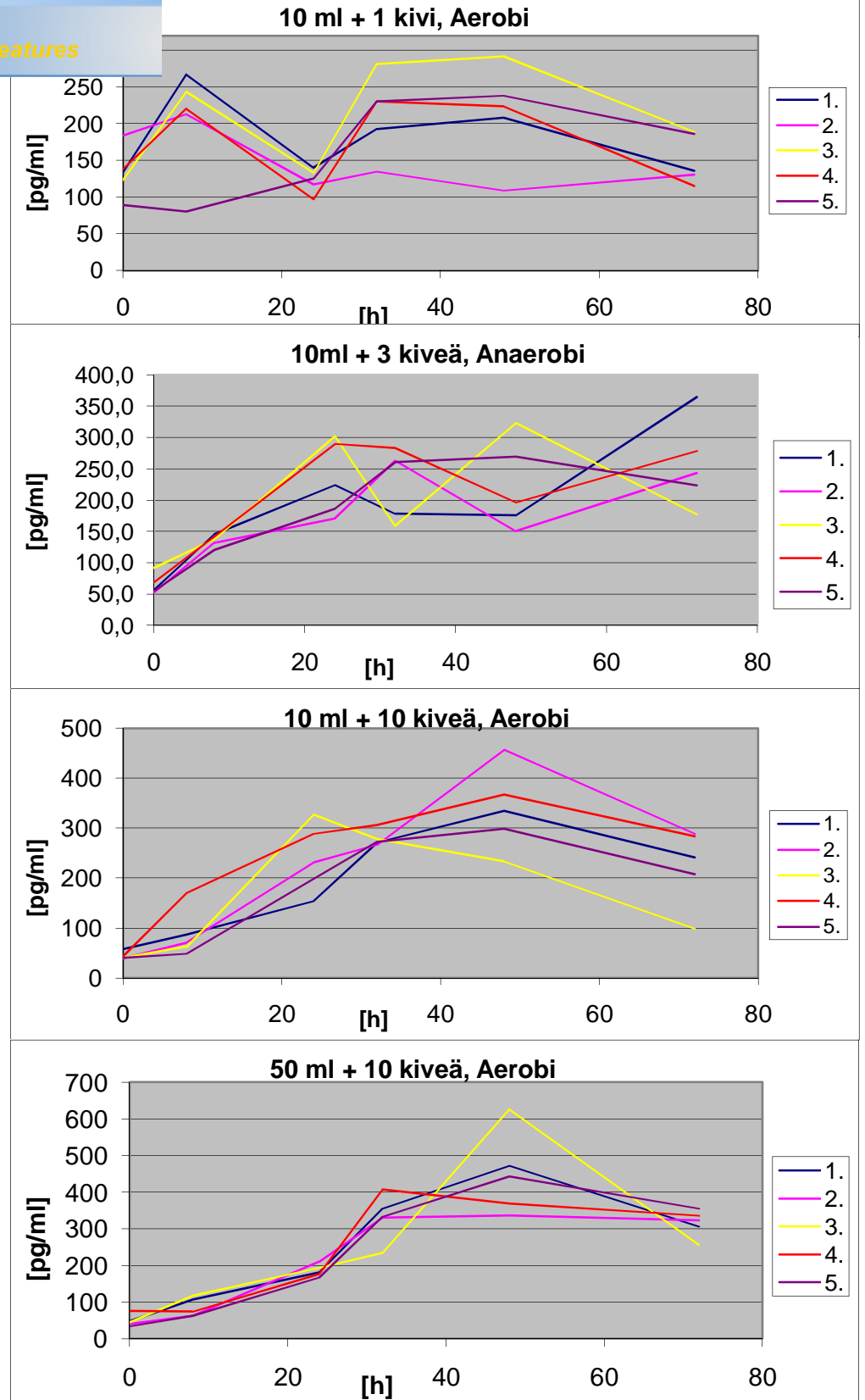
	R2A		R2A+2,5% NaCl		R2A+3,5% Inst.Ocean	
	Pinta	Malja	Pinta	Malja	Pinta	Malja
10 ⁰	~ 700	>1000	~ 650	>1000	>1000	-
10 ⁻¹	~ 300	>1000	~ 200	~ 450	~ 500	-
10 ⁻²	140	~ 300	52	~250	~100	-
10 ⁻³	13	50	3	115	30	-

4.1.2 Kasvatusliemen ja kivien suhde

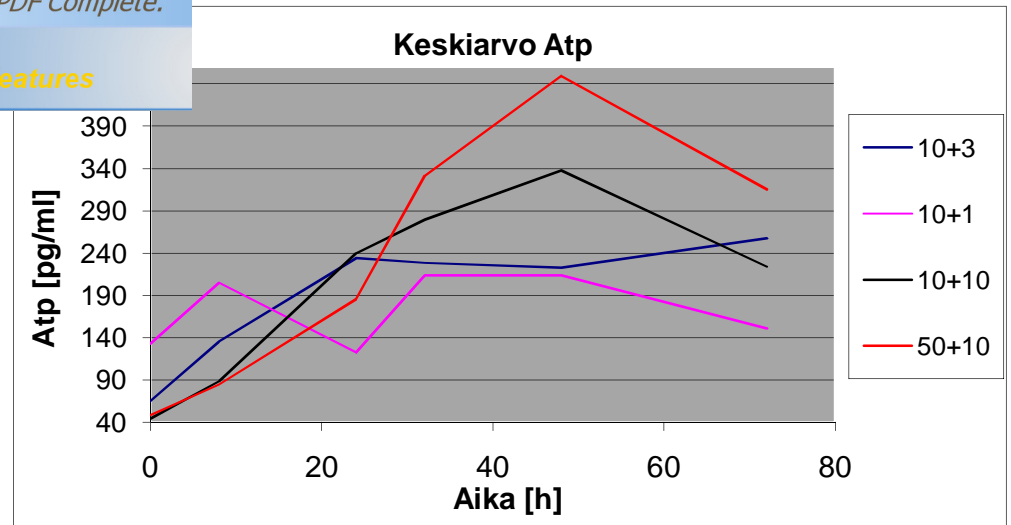
Testi 1:

Ensimmäisestä luminometrisestä testistä saatiin hyvin vaihtelevat tulokset. Johdonmukaisesti suurimmat arvot tulivat sarjasta, jossa oli suurin määrä ravinneliestä. Huomionarvoista oli, että vain anaerobisessa sarjassa kasvu jatkui seurannan loppuun asti. Kaikissa kolmessa aerobisessa sarjassa kasvua tapahtui 48 h asti, joskin kuitenkin jo hidastunutta, vrt. 24h mittauspisteeseen, jonka jälkeen lähes jokaisessa sarjassa mittausarvot kääntyivät laskuun. Tehtiin päätös että jatkossa seuranta-aika rajataan 48 h. Toinen asia mikä vaikeutti päätelmiä testistä, oli rinnakkaisten sarjojen saman mittauspisteiden välinen vaihtelu. Saatiin jopa kaksi kertaa suurempia arvoja rinnakkaisista sarjoista samassa mittauspisteessä. Vain sarja 50 ml +10 kiiveä tuotti kohtuullisen yhtäläisen tuloksen.

[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

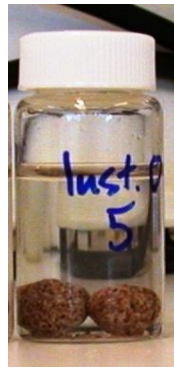


Kuvaaja 1. Testi 1:n neljän kasvatussarjan ATP-mittauksien tulokset



Kuvaaja 2. Testi 1:n kasvatussarjojen ATP-mittauksien keskiarvot

Tarkasteltaessa kokonaiskasvua keskiarvokuvaajasta (Kuvaaja 2), saatiin suurimmat arvot sarjoista 50ml+10 kiveä ja 10 ml+ 3 kiveä. Sarja 10 ml+ 1 kivi ei juurikaan tuottanut kasvua, joten kiviä olisi oltava enemmän. Sarjassa 10 ml+ 10 kiveä oli liikaa kiviä kasvatusliemeen verrattuna lyhyellä kasvatusajalla. Tästä linjattiin että seuraavaan testiin sarjojen koko olisi 15 ml+ 3 kiveä. Myös astiat haluttiin yhtenäistää, ja valittiin suljettavat vial-pullot (V=23 ml) (Kuva 2).



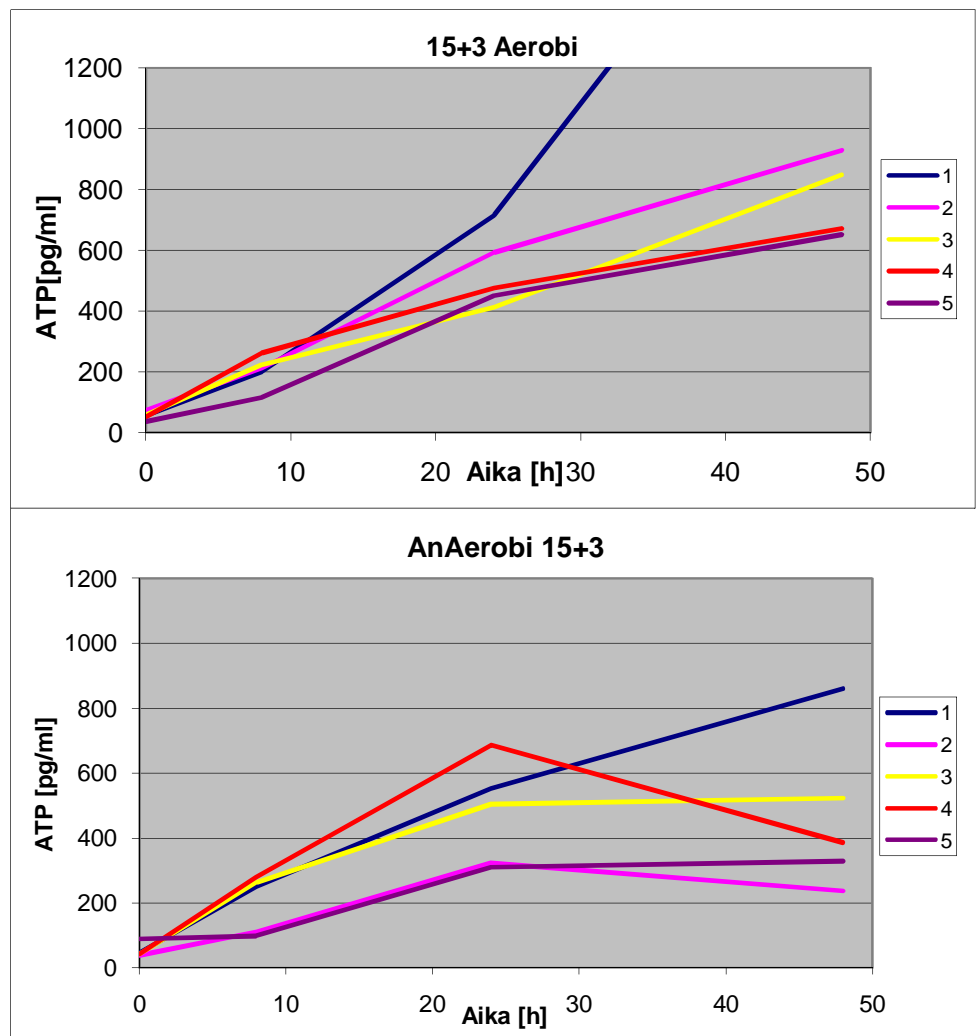
Kuva 2. Suljettava vial-pullo

Testi 2:

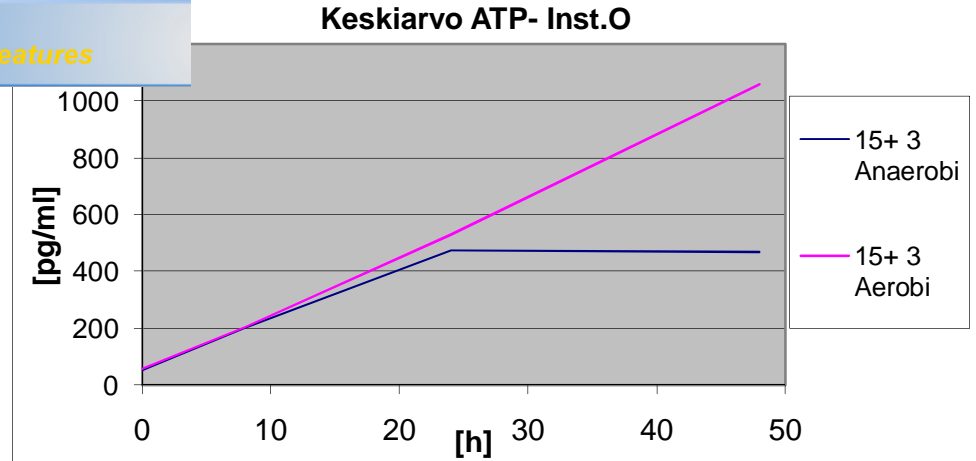
Testin suurimpana antina oli R2-liemen kasvutehokkuus verrattuna Osterive-teen. Kuten ensimmäisessäkin testissä, antoivat osterivedelliset sarjat hyvin epätasaisen tuloksen. Viimeisessä mittauspisteessä anaerobi-sarjassa oli jopa nelinkertainen ero suurimman ja pienimmän tuloksen välillä. Kuvaajasta 4 huomaa, kuinka 48 h-kasvatuksen jälkeen ATP-tasot eivät olleet saavuttaneet merkittävää kasvua, joten tällä kasvatusliemellä ei olisi käyttöä nopean

iseksi. Osterivesi päätettiin jättää pois testien kasvatusliemeksi keskittyä R2-liemeen.

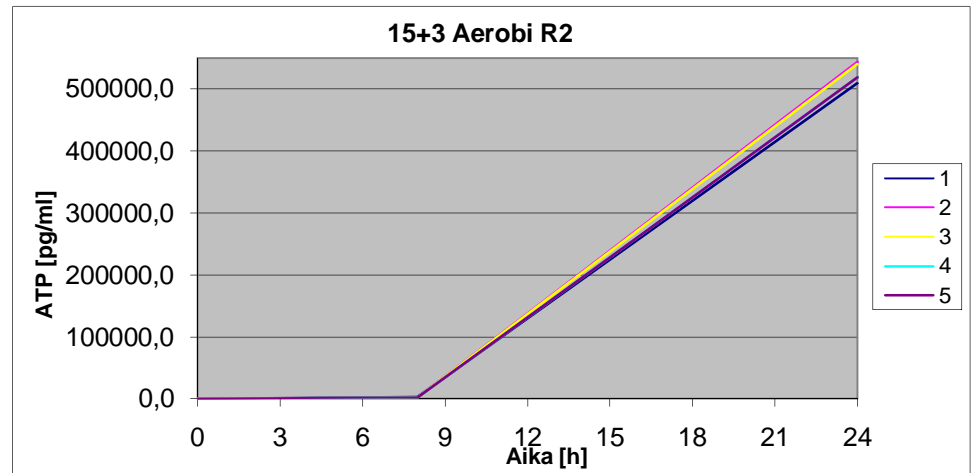
Toinen testin antama informaatio oli, kun havaittiin että käytettäessä R2-lientä ATP-mittari antoi jo hetkellä 0 h monikymmenkertaisen lukeman verrattuna Osteriveteen. Tämän jälkeen autoklavoitiin kyseinen R2-liemi ja mitattiin ATP-taso, ja tulokseksi saatiin 285 pg/ml. Tämä liemi autoklavoitiin uudestaan ja tulokseksi saatiin 260 pg/ml. Tämän jälkeen mitattiin valmistettiin uusi R2-liemi ja mitattiin autoklavoinnin jälkeen saaden tulokseksi 250 pg/ml. Asiaa ei kuitenkaan tutkittu sen tarkemmin, huomioitiin vain että R2-liemi antaa vääristymän tulokseen steriilinäkin. Tämä kuitenkin oli vain murto-osa siitä arvosta, minkä 48 h kasvu tuotti. Mutta tämä oli hyvä havainto ja se pystyttiin jatkotesteissä huomioimaan. (Kuvaajat 3. 5.)



Kuvaaja 3. Testi 2. Instant Ocean-sarjojen kasvukäyrät



Kuvaaja 4. 15 ml +3 kiveä Inst.Oceanissa-sarjojen kasvukäyrien keskiarvot



Kuvaaja 5. Testi 2:n R2-liemi-sarjan kuvaaja

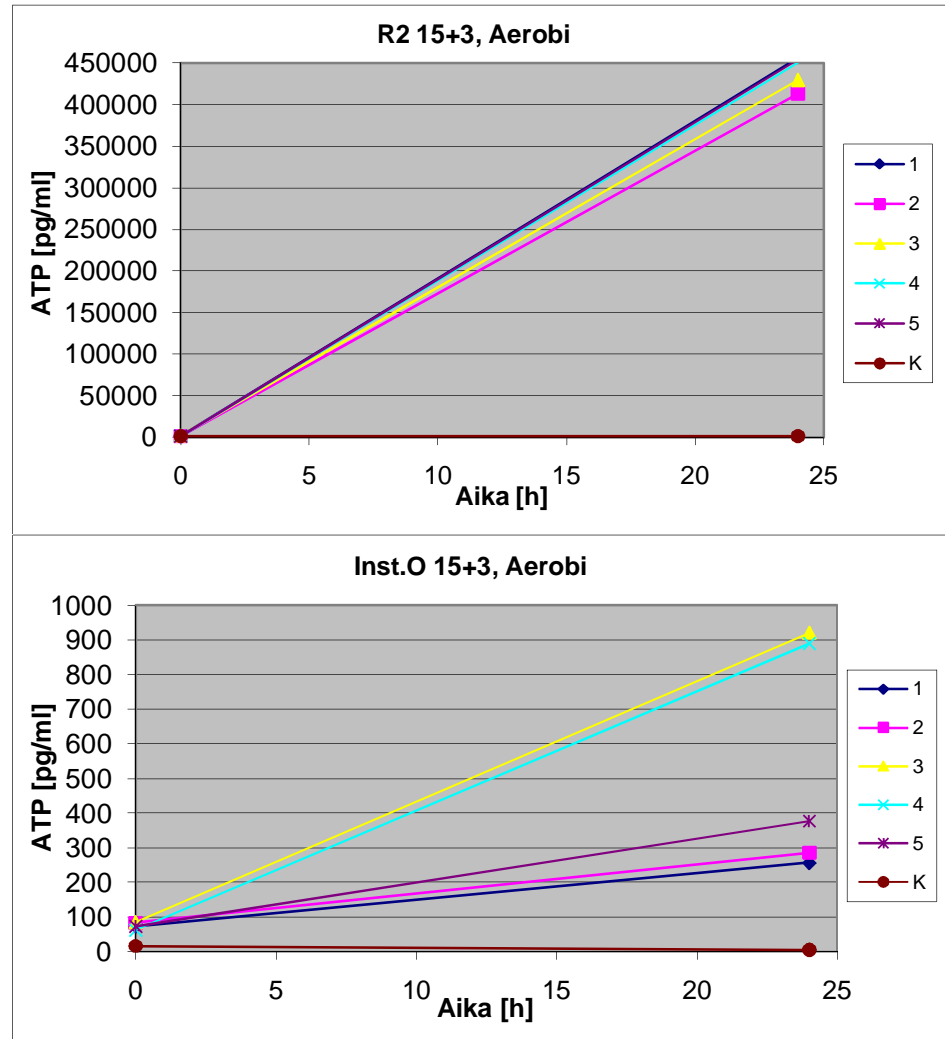
4.1.3 ATP-mittaus vs. viljely

Testi 3:

Viljelyt antoivat kaikki tulokseksi täyteen kasvaneen maljan, eli 0 h $1,0 \cdot 10^{-3}$ ja 24 h $1,0 \cdot 10^{-4}$. Silmämääräisesti tarkasteltaessa kasvusto oli kaikissa maljoissa yhtäläistä pesäkkeiden ulkonäön perusteella. Viljelytulosten ero oli, että R2-sarjan viljelyt antoivat paksumman peitteen maljoille. Tämän perusteella voidaan olla varmoja testin toimivuudesta. Maljoissa olleiden pesäkkeiden ja kasvuston perusteella molemmat kasvatusliemet tuottivat samaa lajistoa.

[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

soitti nyt jälleen, että on siirryttävä R2-liemen käyttämiseen. Kaksi viidestä Instant Ocean-sarjasta antoi jopa kolminkertaisen tuloksen rinnakkaisten välillä, joten toistettavuus on huono Instant Oceanilla, kun taas kaikki R2-liemi-sarjan pitoisuuksissa oli suurimman ja pienimmän arvoissa 10 % ero. Yhteenvetona näistä sarjoista saatiin tulokseksi sarja, joka antaa voimakkaan ja tasaisen kasvun suhteellisen pienellä määrällä kiviä ja kasvatuslientä. (Kuvaaja 6.)

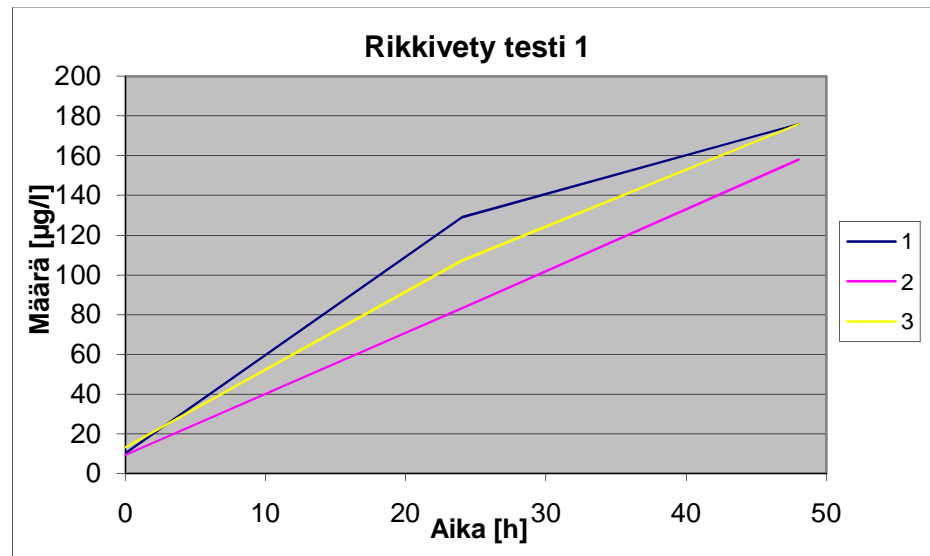


Kuvaaja 6. ATP-Testi 3. kasvun kuvaajat

Tulokset

-testi 1:

Tulokset ensimmäisestä testistä olivat lupaavat. Kasvukäyrät olivat tasaisesti nousevia ja pitoisuuksien vaihteluväli viimeisessä mittauspisteissä 1 - 20 µg. Kuitenkaan kokonaismääräisesti lukema ei ole suuri. Varovainen arvio testistä onkin, ettei tämä kokoluokka ole tarvittavan suuri antamaan luotettavaa tulosta. Testi toistettiin, mutta tulokseksi saatiin ettei 24 h jälkeen ollut tapahtunut kasvua, joten testin uusinta keskeytettiin. Päätettiin kasvattaa testin volyymiä isompien pitoisuuksien saamiseksi. (Kuvaaja 7.)

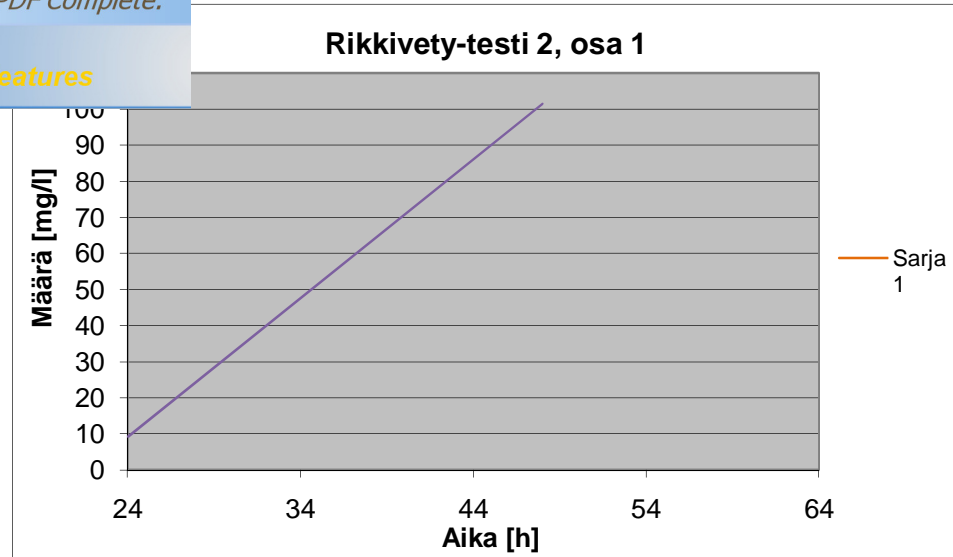


Kuvaaja 7. Rikkivedyn pitoisuudet kasvatusliemessä.

Rikkivety (H₂S) -testi 2:

Osa 1:

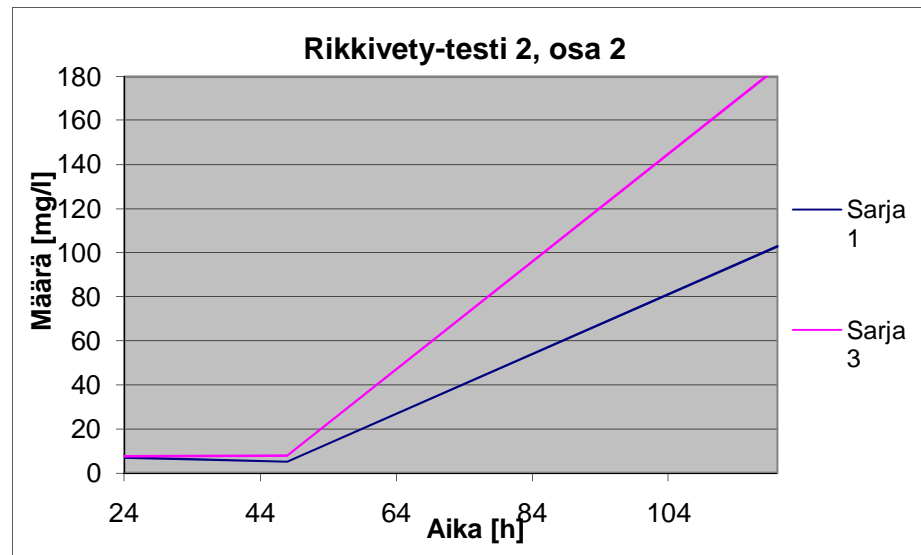
Kasvatusliemenä käytettiin OM -lientä ja kokoluokkana 100 ml / 15 kiveä korkeudessa erlenmyer-pullossa. Kasvu oli jopa odotettua suurempaa, ja 48 h näytettä jouduttiinkin laimentamaan runsaasti. Toinen rinnakkaisnäyte epäonnistui liian pienen silikoniöljysuojakerroksen hajotessa, johtaen runsaaseen happivuorovaikutukseen. Toisen näytteen tulos oli kuitenkin hyvin mieluinen, mutta koska yksittäinen tulos ei ole luotettava, päätettiin mitaus uusia. (Kuvaaja 8)



Kuvaaja 8a. Rikkivedyn pitoisuus testi 2, osa 1.

Osa 2:

Tässä osiossa oli siis kasvatusliemenä OM-liemi ja kokoluokkana 20 ml / 3 kiveä suljettavassa vial-pullossa. Muutoksen tarkoituksena oli estää edellisen osion epäonnistuminen, ja minimoida hapen vaikutus kasvatusaikana. Tulokset hieman yllättivät, koska rikkivety pitoisuudet alkoivat nousta vasta 48 h jälkeen. Tämä on luultavasti seurausta kivien esikäsitteilyn pidennyksestä.

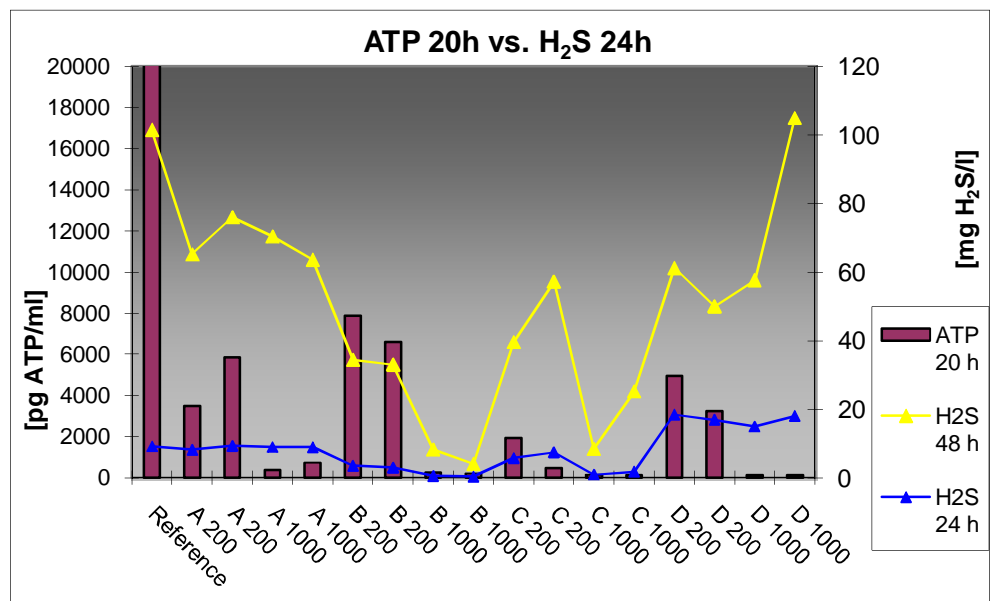


Kuvaaja 8b.

-testi 3:

okseksi paljon odotettuja tuloksia. ATP-määrät olivat huomattavasti suuremmat 200 ppm-pitoisuuksissa kuin 1000 ppm-pitoisuuksissa. Myös rikkivetymäärät kasvavat lähes kaikissa pisteissä johdonmukaisesti. Ainoa poikkeus on biosidi D:n toisessa 1000 ppm näytteessä. Siinä rikkivedyn määrä oli alussa suurempi kuin referenssin, ja lopussa päätyivät samalle tasolle.

Vertailtaessa arvoja ATP:n ja H₂S:n välillä, huomataan etteivät pitoisuudet kasva samassa suhteessa. Näin on ainakin biosidi A:n kohdalla, 200 ppm pisteessä on ATP:n mukaan enemmän kasvua kuin 1000 ppm näytteissä. Kuitenkin H₂S-arvot ovat kyseisellä biosidilla hyvin samanlaiset kaikissa mittauspisteissä. Biosidi B käyttäytyi kaikkien arvojen mukaan odotetusti, rinnakkaisarvot ovat kaikissa mittauksissa samaa luokkaa, 200 ppm pitoisuus antaa kaikilla suuremmat arvot kuin 1000 ppm pitoisuus. Biosidi C ja D 1000 ppm sarjoissa H₂S-pitoisuudet ovat melkein kaikissa pisteissä hyvin korkeat ATP-pitoisuuksiin nähden, 200 ppm sarjoissa pitoisuudet ja kasvu ovat odotetun mukaiset. ATP ja H₂S -arvot kasvavat loogisesti toisiinsa nähden, korkea ATP-pitoisuus → korkea H₂S kasvu.



Kuvaaja 9. Yhdistelmä-testin tulokset.

Biosidien aiheuttama virhe H₂S-kittien on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Virhemittauksen tuloksien keskiarvot.

	5-800 µl/l	0,1-2,0 mg/l
A 500 ppm	50	-0,002
A 2000 ppm	5	-0,042
B 500 ppm	47	0,006
B 2000 ppm	42	0
C 500 ppm	2	-0,040
C 2000 ppm	2	-0,045
D 500 ppm	10	-0,004
D 2000 ppm	9	-0,005
Ref.	10	0,002

Määrittäminen toteutettiin kahdella rinnakkaisella, joista laskettiin keskiarvo. Taulukon 3 tulosten perusteella biosidit eivät aiheuta näillä pitoisuuksilla merkittävää virhettä. Ns. tyhjiä näytteistä vain yksi antoi tulokseksi nollan, joten pienillä pitoisuuksilla pitää huomioida, ettei tulos ole biosidin aiheuttama virhe.

5 YHTEENVETO

Työn tarkoituksena oli kehittää edullinen, nopea ja luotettava menetelmä sulfaattia pelkistävien bakteerien (SRB, engl. Sulfate Reducing Bacteria) osoittamiseksi. Tutkimuksen lähtökohtana oli öljyteollisuus ja sen ympäristöt sekä niissä tavatut SRB-mikrobit.

Koska menetelmän kehitys aloitettiin samalla kuin tämä opinnäytetyö, tiedettiin että kehitys kestäisi todennäköisesti kauemmin kuin tämä työ. Monella tavalla menetelmää saatiin kuitenkin vietyä eteenpäin. Jo alkutesteissä todettiin, ettei fermentorin kasvatusliemi riittänyt tuottamaan itse testissä luotettavia tuloksia. Kasvu tyrehtyi 24 - 48 h jälkeen suhteellisen pieniin kasvu-

n työn aikana saatiin kehitettyä uusi kasvatusliemi joka tuotti n sekä H₂S-pitoisuuden.

Välineistö onnistuttiin pitämään pienenä, luminometri ja spektrometri, ja astiaksi löydettiin tarpeeksi pieni ja suljettava pullo. Testauksen suorittamisen kohteessa pitäisi näin ollen onnistua helposti.

ATP-mittauksissa luotettavuutta vähensi sen spesifisyys. Testi ei erottele mitenkään eläviä ja kuolleita soluja, ja vapaan ATP:n mittausta pitäisikin ottaa mukaan testaukseen. Vapaa ATP saattaa aiheuttaa todellisuutta suuremman lukeman. Toinen tähän liittyvä kysymys on SRB-bakteereille ominainen APS-molekyylillä, joka toimii sulfaattihengityksessä. Myös ADP ja AMP-molekyylien vaikutusta mittauksessa ei tiedetty. Tämä saattaa aiheuttaa todellisuutta alemman lukeman. Asiaan pyydettiin bioluminesenssi-testin valmistajalta selvitystä, jota ei tämän opinnäytetyön ajan puitteissa saatu. Tämän mittauksen tarkoituksena on kuitenkin antaa suuntaa antava tulos mikrobien määrästä ja kasvuvauhdista.

Toinen mittausmenetelmistä, rikkivetymittaus, antoi hyviä tuloksia. Kuitenkin verrattaessa saatuja tuloksia ATP:n määriin, saatiin näistä päinvastaiset tulokset. Tähän testaukseen haastetta tuo kokonaismäärän hallinta. Jos kasvatusliemi on liian tehokasta, H₂S-pitoisuudet voivat kasvaa liiankin korkeiksi. Toinen haaste oli selvittää, koska rikkivedyn muodostuminen alkoi, koska tuloksista huomattiin että se voi vaihdella jopa vuorokaudella.

- nen, Mirka ym., Mikrobiologian perusteita, Gummerus Kirjapaino Oy, Jyväskylä 2002.
- [2] Heino, Jyrki . Vuento, Matti, Biokemian ja solubiologian perusteet, WSOY 2007.
- [3] Wilfried, Paulus, Directory of Microbicides for Protection of Materials, Springer, Hollanti 2005.
- [4] Madigan Michael ym. Brock Biology of microorganisms 12th edition, Pearson, San Francisco 2009.
- [5] *Kemikaalilaki KemL12 §, (KemL 1198/1999)*
- [6] Barton Larry L. . Hamilton W. Allan, Sulphate-reducing Bacteria - Environmental and Engineered Systems, Cambridge University Press, Cambridge 2007
- [7] Anttila Jani, *Rikin pelkistys*, Kuva, WWW-dokumentti.
http://www.mv.helsinki.fi/home/jvanttil/mikro400_files/image006.gif, luettu 11.4.2011
- [8] Dale Thomas, The Science of Running, Kuva, WWW-dokumentti http://runscience.blogspot.com/2009_10_01_archive.html, luettu 12.05.2011
- [9] *OVA-ohje: Rikkivety . tiivistelmä, verkkodokumentti*
Saatavissa: <http://www.ttl.fi/ova/trikkvet.html>, luettu 23.4.2011
- [10] Dilling, W. and Cypionka, H. (1990) Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 71, 123-128.
- [11] Yehuda Cohen, *Bioremediation of oil by marine microbial mats*, Int Microbiol (2002) 5: 189. 193.
- [12] Bale SJ, Goodman K, Rochelle PA, Marchesi JR, Fry JC, Weightman AJ, Parkes RJ (1997), *Desulfovibrio profundus sp nov, a novel barophilic sulfate-reducing bacterium from deep sediment layers in the Japan Sea*. International Journal of Systematic Bacteriology 47: 515-521.
- [13] Bade, K., Manz, W. and Szewzyk, U. (2000), *Behavior of sulfate reducing bacteria under oligotrophic conditions and oxygen stress in particle-free systems related to drinking water*. FEMS Microbiology Ecology, 32: 215. 223.
- [14] Watanabe, K., Y. Kodama, and N. Kaku. 2002. *Isolation and Characterization of a Sulfur-Oxidizing Chemolithotroph Growing on Crude Oil under*



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*


[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

ditions. Applied and Environmental Microbiology, January

12


- [15] Krekeler, D. and Cypionka, H. (1995), The preferred electron acceptor of *Desulfovibrio desulfuricans* CSN. FEMS Microbiology Ecology, 17: 271. 27

LIITE 1_LCW 053-KITIN TYÖOHJE (HACH LANGE)



LCW 053

0.1 – 2.0 mg/l



71

900 mg/l: $S_2O_8^{2-}$ SQT
700 mg/l: SO_3^{2-}
20 mg/l: Li^+
2 mg/l: CH^+

LCW 053 sulfide

! *Let a.u.b. op de "Uitgaat datum" (zie datatabel). Veiligheidsadvies en houdbaarheidsdatum op de verpakking.*

Principe
Dimethyl-p-terfenylendiamina reageert met waterstofsulfaat tot een intermediäre verbinding die overgaat in kaucornethyleendiam.
Dit kaucornethyleendiam wordt door lizertill-chloor geoxideerd tot methyleendiam.

Toepassingsgebied
Aanbevelen

Storingen
De, in **71** genoemde ionen, zijn tot aan de aangegeven concentratie afzonderlijk onderzocht en storen niet. De invloed van het cumulatief effect en rijkheid van andere ionen is niet door ons onderzocht.
De storingen zijn overgenomen uit DIN 38 405 D 26, pag. 1.

De meetresultaten zijn, via een standaardisatietoets, te controleren (verduuring en/of standaardisatie).

pH-waarde monster 3 – 10
Temperatuur monster/voegsel 15 – 25°C
De analyse moet onmiddellijk na de monstername worden uitgevoerd.

72

Phase check the "Expiry Date" (see data table). Safety advice and expiry date on package.

Principe
Dimethyl-p-phenylendiamine reageert with hydrogen sulphide to form an intermediate compound which turns into kaucornethylene blue. The kaucornethylene blue is oxidized to methylene blue by nonillil ions.

Range of Application
Waste water

Interferences
The ions listed in **71** have been individually checked up to the given concentrations and do not cause interference. We have not determined qualitative effects and the interferes of other ions. This list of interferences has been taken from DIN 38 405 D 26 p. 1.

The measurement results must be subjected to plausibility checks (value and/or spike the sample).

pH sample 3 – 10
Temperature sample/segments 15 – 25°C
The analysis must be carried out immediately after the sample has been taken.

LCW 053 sulphide

Datatabel / Data table

LP21W	06/1990	06/1990
LCW 05371 • F1 = 0 • F2 = 1.47 • K = 0		06/1990
DMANIS 302020560/90S		06/1990
LCW 05371 • L: 0.055 mm • Foc: 1 • F1 = 0 • F2 = 1.25 • K = 0		06/1990
FSIS 40000/9000		06/1990
LCW 05371 • L: 0.055 mm • Foc: 1 • F1 = 0 • F2 = 3.164 • K = 0.024		06/1990
CMANES 1007/LPQ 138		06/1990
LCW 05371 • L: 0.055 mm • F = 1.25		06/1990
CMANES 1007/LPQ 210		06/1990
LCW 05371 • L: 0.055 mm • F1 = 1.26		06/1990

73 Sample Sulphide

LANGE
FOR WATER QUALITY

LCW 053
0.1 – 2.0 mg/l



900 mg/l SO_4^{2-} , SCN⁻
700 mg/l SO_4^{2-}
20 mg/l F^-
2 mg/l Cl^-

B **Bite "Ausgabedatum" (s. Datentabelle) beachten. Sicherheitshinweise und Verfallsdatum auf der Packung.**

LCW 053 Sulfid

F **Vérifier la date d'édition pour table des données. Conseils de sécurité et date de péremption sur l'emballage.**

LCW 053 Sulfure

I **Si prega di verificare la "Data di Edizione" (vedi tabella dati). Avvertenze e data di scadenza sulla confezione.**

LCW 053 Solfuri

Principe
Dinitryl-p-phenylendiamin reagiert mit Schwefelwasserstoff zu einer Zweischwefelbindung, die in Leucomethylenblau übergeht. Das Leucomethylenblau wird durch Eisen(II)-Ionen zu Methylthiolen oxidiert.

Anwendungsbereich
Abwasser

Störungen
Die in **T1** aufgeführten Ionen wurden bis zu den angegebenen Konzentrationen ebenfalls überprüft und stören nicht. Die summarische Wirkung sowie der Einfluss weiterer Ionen wurden von uns nicht ermittelt.
Angabe der Störungen entnehmen DIN 38 405 D 28 S. 1.

Messergebnisse sind durch eine Plausibilitätskontrolle zu überprüfen (Vorbereitung und/oder Aufstockung).

pH-Wert Probe 3 – 10
Temperatur Probe/Passgenauigkeit 15 – 25°C
Die Analyse muss unmittelbar nach Probenahme erfolgen.

Principe
La dinitryl-p-phenylendiamine réagit avec l'hydrogène sulfuré et forme une sulfuration intermédiaire qui se transforme en bleu de leucométhylène. Le bleu de leucométhylène est oxydé par les ions fer(II) en bleu de méthylène.

Domaine d'application
Eaux de rejet

Perturbations
Les ions mentionnés dans **T1** ont été vérifiés séparément. Ils n'interfèrent pas jusqu'aux concentrations indiquées. Nous n'avons cependant pas étudié l'effet cumulatif et l'influence d'ions supplémentaires. Mention des perturbations selon DIN 38 405 D 28 p. 1.

Les résultats des mesures sont à vérifier par un contrôle de plausibilité (dilution et/ou addition).

pH échantillon 3 – 10
Température échantillon/résultat 15 – 25°C
L'analyse doit être réalisée immédiatement après la prise d'échantillon.

Principio
Dinitryl-p-terfenilammina forma con l'idrogeno solforato un composto intermedio che si trasforma in blu di "Bianco". Questo viene poi ossidato con ioni ferro(II) in blu di metilene.

Applicazione
Acque di scarico

Interferenze
Gli ioni elencati in **T1** sono stati verificati separatamente fino alle concentrazioni specificate e non causano interferenze. Non sono stati verificati eventuali effetti cumulativi e l'influenza di altri ioni.
vedere DIN 38 405 D 28 pag. 1.

I risultati sono da verificare con un controllo di plausibilità o/o addizione addizionali.

pH campione 3 – 10
Temperatura campione/risultato 15 – 25°C
Fare l'analisi subito dopo aver prelevato il campione.

Datentabelle / Table des données / Таблицы данных

T1	$\text{P}_1 = 0 + \text{F}_2 = 1,47 \cdot \text{M} = 0$	06/1990
384005/601/606		06/1990
T2	$\text{L} = 696 \text{ nm}$; $\text{F}_{\text{sc}} = \text{P}_1 = 0 + \text{F}_2 = 1,25 \cdot \text{M} = 0$	06/1990
00/9/000		06/1990
T3	$\text{L} = 696 \text{ nm}$; $\text{P}_{\text{sc}} = \text{P}_1 = 0 + \text{F}_2 = 3,154 \cdot \text{K} = 0,004$	06/1990
169 / 4/94 338		06/1990
T4	$\text{L} = 606 \text{ nm}$; $\text{F} = 1,26$	06/1990
100 / 4/93 210		06/1990
T5	$\text{L} = 696 \text{ nm}$; $\text{F}_1 = 1,26$	06/1990



Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

Auswertung / Evaluation / Lettura / Meeting

	Filter	Eprom	Test	Leervert (siehe Arbeitsgang)	Analysekuvette
LASA 1 / plus	Filter - Filter - Filter - Filter	- auswählen - choisir - seleccionar - oproopen - select	Leervert (siehe Arbeitsgang) Valeur à blanc (voir mode opératoire) Blanco (vedere la metodica) Blanko (zie werkwijze) Blank-value (see procedure)	✓	✓ ✓ ✓ ✓
LASA 20	690 nm	- :18 - :22	S-id 1 LCM 053 S-id 1 LCM 053	✓	✓ ✓ ✓

¹ Sluis
¹ Sluis
¹ Sluis

	Filter	Test	Faktor	Kontrollnr.	Leervert (siehe Arbeitsgang)	Analysekuvette
Lp1W	Filter - Filter - Filter - Filter	- auswählen - choisir - seleccionar - oproopen - select	Faktor - Factor - Factor - Factor	No. de contrôle No. di controllo Controlgeetal Control no.	Leervert (siehe Arbeitsgang) Valeur à blanc (voir mode opératoire) Blanco (vedere la metodica) Blanko (zie werkwijze) Blank-value (see procedure)	✓ ✓ ✓ ✓
Lp2W	690 nm	--	1,47	--	3	✓ ✓ ✓

¹ Sluis
¹ Sluis
¹ Sluis

	Mode 1	Mode 2	Kontrollnr.	Leervert (siehe Arbeitsgang)	Analysekuvette
CADAS 100 LPGA158	Symbol - Symbolo - Simbolo - Symbol	053	No. de contrôle No. di controllo Controlgeetal Control no.	Leervert (siehe Arbeitsgang) Valeur à blanc (voir mode opératoire) Blanco (vedere la metodica) Blanko (zie werkwijze) Blank-value (see procedure)	✓ ✓ ✓ ✓
CADAS 100 LPGA210	TEST	053	--	9	✓ ✓ ✓

	Eprom	Mode	Test	Kontrollnr.	Leervert (siehe Arbeitsgang)	Analysekuvette
330S / 50S	Filter - Filter - Filter - Filter	- auswählen - choisir - seleccionar - oproopen - select	Leervert (siehe Arbeitsgang) Valeur à blanc (voir mode opératoire) Blanco (vedere la metodica) Blanko (zie werkwijze) Blank-value (see procedure)	8	✓ ✓ ✓ ✓	✓ ✓ ✓ ✓

N TYÖOHJE (HACH LANGE)

Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features

Sulfide

★Method 8131

Methylene Blue Method¹ (5 to 800 µg/L)

Scope and Application: For testing total sulfides, H₂S, HS⁻, and certain metal sulfides in groundwater, wastewater brines, and seawater; USEPA Approved for reporting wastewater analysis²

¹ Adapted from *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*.

² Procedure is equivalent to USEPA method 376.2 and Standard Method 4500-S²⁻-D for wastewater.



Test Preparation

Before starting the test:

Analyze samples immediately. Do not preserve for later analysis.

Avoid excessive agitation of samples to minimize sulfide loss.

Some sulfide loss may occur if dilution is necessary.

Sulfide 2 reagent contains potassium dichromate. The final solution will contain hexavalent chromium (D007) at a concentration regulated as a hazardous waste by Federal RCRA. Refer to the current MSDS for safe handling and disposal instructions.

Collect the following items:

	Quantity
Sulfide 1 Reagent	2 mL
Sulfide 2 Reagent	2 mL
Water, deionized	25 mL
Pipet, serological, 10-mL	1
Pipet Filler, safety bulb	1
Sample Cells, 1-inch square, 10 mL, matched pair	2
Stopper for 18-mm tube	2

Note: Reorder information for consumables and replacement items is on page 4.

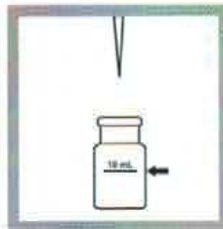
Method 8131



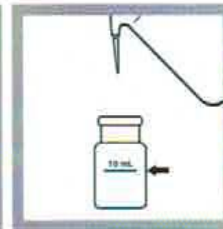
1. Select the test.



2. Insert the Multi-cell Adapter with the 1-inch square cell holder facing the user.



3. **Prepared Sample:** Avoiding excess agitation of the sample, use a pipet add 10 mL of sample to a square sample cell.



4. **Blank Preparation:** Measure 10 mL of deionized water into a second square sample cell.

[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

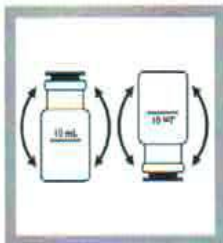
Sulfide (5 to 800 µg/L)



5. Use the calibrated dropper to add 0.5 mL of Sulfide 1 Reagent to each cell. Swirl to mix.



6. Use the calibrated dropper to add 0.5 mL of Sulfide 2 Reagent to each cell.



7. Cap the cell and immediately invert to mix. A pink color will develop, then the solution will turn blue if sulfide is present.



8. Press **TIMER>OK**. A five-minute reaction period will begin.



9. When the timer expires, wipe the blank and insert it into the cell holder with the fill line facing the user.



10. Press **ZERO**.
The display will show:
0 µg/L S²⁻



11. Wipe the prepared sample and insert it into the cell holder with the fill line facing the user.
Results are in µg/L S²⁻.

Determining Soluble Sulfides

Determine soluble sulfides by centrifuging the sample in completely filled, capped tubes and analyzing the supernatant. Insoluble sulfides are then estimated by subtracting the soluble sulfide concentration from the total sulfide result.

Sulfide (5 to 800 µg/L)

Interferences

Table 1 Interfering Substances and Levels

Interfering Substance	Interference Levels and Treatments
Strong reducing substances (sulfite, thiosulfate and hydrosulfite)	Interferes by reducing the blue color or preventing its development.
Sulfide, high levels	High concentrations of sulfide may inhibit full color development and require sample dilution. Some sulfide loss may occur when the sample is diluted.
Turbidity	For turbid samples, prepare a sulfide-free blank as follows. Use it in place of the deionized water blank in the procedure. <ol style="list-style-type: none"> 1. Measure 25 mL of sample into a 50-mL Erlenmeyer flask. 2. Add Bromine Water dropwise with constant swirling until a permanent yellow color just appears. 3. Add Phenol Solution dropwise until the yellow color just disappears. Use this solution to replace the deionized water in step 4 of the procedure.

Sample Collection, Storage, and Preservation

Collect samples in clean plastic or glass bottles. Fill completely and cap tightly. Avoid excessive agitation or prolonged exposure to air. Analyze samples immediately.

Method Performance

Precision
Standard: 520 µg/L S²⁻

Program	95% Confidence Limits of Distribution
690	504–538 µg/L S ²⁻

Sensitivity

Portion of Curve	ΔAbs	ΔConcentration
Entire range	0.010	5 µg/L S ²⁻

Summary of Method

Hydrogen sulfide and acid-soluble metal sulfides react with N,N-dimethyl-p-phenylenediamine sulfate to form methylene blue. The intensity of the blue color is proportional to the sulfide concentration. High sulfide levels in oil field waters may be determined after proper dilution. Test results are measured at 665 nm.

Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features

Sulfide (5 to 800 µg/L)

Consumables and Replacement Items

Required Reagents

Description	Quantity/Test	Unit	Cat. No.
Sulfide Reagent Set (100 tests), includes:	—	—	22445-00
(2) Sulfide 1 Reagent	2 mL	100 mL MDB	1816-32
(2) Sulfide 2 Reagent	2 mL	100 mL MDB	1817-32
Water, deionized	25 mL	4 liters	272-56

Required Apparatus

Description	Quantity/Test	Unit	Cat. No.
Pipet, serological, 10-mL	1	each	532-38
Pipet Filler, safety bulb	1	each	14651-00
Sample Cells, 1-inch square, 10 mL, matched pair	2	2/pkg	24954-02
Stopper, for 18-mm Tube	2	6/pkg	1731-06

Optional Reagents and Apparatus

Description	Unit	Cat. No.
Bromine Water	29 mL	2211-20
Phenol Solution	29 mL	2112-20
Stopper, for 18-mm Tube	25/pkg	1731-25



FOR TECHNICAL ASSISTANCE, PRICE INFORMATION AND ORDERING:
In the U.S.A. – Call toll-free 800-227-8224
Outside the U.S.A. – Contact the HACH office or distributor serving you.
On the Worldwide Web – www.hach.com; E-mail – techhelp@hach.com

HACH COMPANY
WORLD HEADQUARTERS
Telephone: (970) 669-3050
FAX: (970) 669-2932

Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features

LumiKem™

Test Kit Instructions

LumiKem Process Lite Test Kit
LKM-PROL-100

Bringing You the Next Generation in Microbiological Testing!

LumiKem technology is exclusive to Kemira and includes cutting-edge equipment, test kits and software that allow you to optimize your microbiological management practices in any municipal or industrial application. LumiKem test kits are based on 2nd Generation Adenosine Triphosphate (ATP) measurements, providing information on total microorganisms in a matter of minutes.

In this test kit instruction guide, you will learn...

- Where this kit can be used;
- How LumiKem technology works;
- How to handle and store components of this kit;
- How to perform tests;
- How to calculate and interpret results; and
- Where to find more information and how to contact us.

Choosing the Right Test Kit



LKM-PROL-100 Test Kit

LumiKem test kits are available in 6 formats, each tailored for specific applications:

- **LumiKem Water (LKM-WTR):**
For low-solids water-based samples, such as drinking, cooling and oilfield waters.
- **LumiKem Organic (LKM-ORG):**
For low-solids organic-based samples, such as fuel, oily brine, lubricants and latex polymers.
- **LumiKem Deposits (LKM-DEP):**
For measuring deposits and surfaces, including corrosion products and slimes.
- **LumiKem Process (LKM-PRO):**
For high-solids process fluids, including papermaking process and pulping wash waters.
- **LumiKem Pigments (LKM-PIG):**
For chemical product testing, such as slurries, adhesives, and other coatings.
- **LumiKem Wastewater (LKM-WBIO/WBLK):**
For wastewater and bioprocessing samples, whether influent, bioreactor or effluent.

All kits require the LumiKem Equipment Set (Product # LKM-SYS). One equipment set is compatible with all kit formats. See the product catalogue for details.

NOTE: Users are advised to use each test kit for its design application, and not to cross-apply test kits. Although different LumiKem test kits may contain certain similar components, not all components can be interchanged between kits. Contact support for more information.

Kemira Chemicals Inc.
1950 Vaughn Road
Kennesaw, GA 30144
United States
Tel: +1-770-436-1542
www.kemira.com

Kemira R&D and Technology
Luoteisrinne 2
P.O. Box 44, FI-02271
Espoo, Finland
Tel: +358-10-8611

© Kemira 2010

Document v1.1

Page 1 of 6



Test Kit Instructions – LumiKem Process Lite

LumiKem™

Where Can This Test Kit be Used?

The LumiKem Process Lite (**LKM-PROL**) test kit is designed for moderate bioburden water samples. Using a single analysis, you will be able to quickly estimate total microbiological concentration in applications such as:

- ✓ Cooling Water
- ✓ Process Waters
- ✓ Treated Wastewater
- ✓ Environmental Water

...and more! In general, the ALB test kit will provide the basic means to estimate ATP concentration in most of these applications, but lacks the sensitivity to detect microorganisms in make-up waters or the robustness to measure large populations in heavily-contaminated wastewater. For complete reliability in your quantification of ATP, choose one of the other forms of LumiKem Process test kits:

- LumiKem Process Standard (**LKM-PRO-50**) provides materials to perform 50 analyses each of Total ATP (or **tATP™**: living plus dead biomass) and Dissolved ATP (or **dATP™**: dead biomass only). This provides the most accurate indication of living microorganisms only via Cellular ATP and allows computation of the Biomass Stress Index to assess microbial population health.
- LumiKem Process tATP Only (**LKM-PROt-100**) provides materials to perform only 100 analyses of **tATP**. Use this kit when no differentiation between living and dead microbes is required.

How Does LumiKem Work?

LumiKem test kits are based on the measurement of ATP. ATP is a direct and interference-free indicator of total biomass. ATP is measured using the firefly luciferase assay, where a sample containing ATP is introduced to a solution containing the enzyme Luciferase, which naturally occurs in the tails of fireflies, to produce light. The light is detected in a **luminometer** as Relative Light Units (RLU).



The LumiKem Process Lite test kit utilizes a 1-minute dilution-based analysis to measure a parameter called Total ATP (**tATP™**). tATP represents ATP from both living and dead microorganisms in suspension in a fluid

and therefore is an indication of the planktonic population.

LumiKem Process Lite is optimized to measure down to **20 pg ATP/mL** using standard procedures and equipment. For enhanced sensitivity, select from one of our 6 core test kits mentioned on Page 1.

Getting Started

LumiKem test kits contain all of the consumable materials to run their specified number of tests (last 2 or 3 digits of product code). To use these test kits, you will also require the LumiKem Equipment Set (**LKM-SYS**) and (optionally) access to the LumiKem Portal software package. For more information on getting started, consult your local Kemira representative.



LumiKem Portal Software



LKM-SYS Equipment Set

NOTE: Different luminometers may be compatible with LumiKem test kits. Contact support for consultation.

Test Kit Instructions – LumiKem Process Lite

LumiKem[®]

Test Kit Contents and Storage

When you receive your LumiKem Process Lite test kit, utilize the following guidelines for material storage:

LumiKem Process Lite Test Kit Contents & Storage

Component (Label Color)	Store At	Shelf Life
KemiZyme Lite (Brown) Dropper (KZL-8mL) <i>Luciferase Enzyme Reagent, 8mL</i>	4°C*	4 mo*
KemiCal 1 (Blue) Dropper (KC1-5mL) <i>1 ng/mL ATP Standard, 5mL</i>	20°C	12 mo
KemiLyse Lite (Red) Dropper (KLL-5mL) <i>ATP Extraction Reagent, 5mL</i>	20°C	12 mo
100 to 1000µL Blue Pipette Tips, 100/rack (LKM-PT1-100R)**	-	-
12x55mm Test Tubes, 50/pkg (LKM-CT12-50)	-	-

* KemiZyme Lite shelf life can be extended to 6 months when frozen, or can be left at room temperature for as long as 3 weeks during routine use. Note that the KemiZyme Lite supplied in LumiKem Process Lite kits is NOT interchangeable with other forms of KemiZyme (i.e. KemiZyme[®], KemiZyme, and KemiZyme[™]).

** Pipette tips supplied in complete test kits are compatible with most Fisherbrand and Eppendorf adjustable micropipettors.

Preparing to Test

- New to LumiKem technology? Visit the training section within LumiKem Portal or on www.lumikem.com for video demonstrations, use guidelines, and more!
- Be certain to allow KemiZyme Lite to reach ambient temperature prior to use!
 - For room temperature (15 to 25 °C) storage, no warming is required.
 - For refrigerator (2 to 8 °C) storage, let stand at ambient for at least 1 hour prior to testing.
 - For freezer (-10 to -20 °C) storage, let stand at ambient for at least 2 hours prior to testing.
- KemiZyme Lite exposure to temperatures between 30 and 40 °C should be limited to 1-2 hours. Prolonged exposure will result in accelerated activity loss. Never expose to temperatures > 40°C.
- For more information on KemiZyme Lite storage and handling, consult the KemiZyme Lite insert.
- If you are new to the use of micropipettors, consult the Micropipetting Fundamentals training materials on the LumiKem Portal.
- Avoid analysis contamination by always using a new pipette tip for each pipetting step.
- Avoid usage of expired test kit components. Contact your local Kemira representative to replace expired components.
- Because ATP and bacteria are present on skin, do not touch the surface of pipette tips.
- Ensure that all assay tubes are clean inside and outside. Do not mark on assay tubes as this may impact light detection by the luminometer.
- Microbiological characteristics of most samples will begin to change immediately upon collection. Analyze samples **within 2 hours of collection** whenever possible.
- If samples cannot be tested within 2 hours of collection, store refrigerated (2 to 8 °C) and test within 24 hours of collection. Ensure that samples are first allowed to reach ambient temperature prior to testing.
- Perform ATP analyses on the same sample used for measuring other parameters for reliable interpretation.
- Waste reagent can be discarded as general waste in most cases. Consult MSDS for more information. Download MSDS and other product documentation from the LumiKem Portal or at www.lumikem.com.

Test Kit Instructions – LumiKem Process Lite

LumiKem

Diagnostics and Troubleshooting

- LumiKem test kits are the most robust and quantitative ATP test kits available. If you suspect you are encountering interferences in your application of these kits, first check to ensure you are using the correct kit type for your sample. If you are unsure or feel you have unique testing requirements, contact support for assistance.
- When testing samples that yield low RLU values (i.e. $RLU_{ATP} \leq 50$ when using a Kikkoman Lumitester C-100 or C-110), it is recommended that you account for background noise in the test procedure prior to the final calculations.
 - To assess background noise, simply follow the procedure without adding any of the ATP-containing sample into the analysis.
 - Correct for background noise by subtracting the background RLU (RLU_{bg}) from the measured RLU (RLU_{ATP}) prior to executing calculations.
 - Typical RLU_{bg} when using a Kikkoman Lumitester C-100 or C-110 are ≤ 10 . If high RLU_{bg} are consistently observed, repeat assays in an area out of direct sunlight or intense lighting. If problems still occur, contact support for assistance.
 - A single RLU_{bg} may be used for multiple analyses much like a single KemiCal 1 RLU (RLU_{KC1}).
- If dropper bottles become plugged or you encounter difficulty dispensing drops, remove and discard the dropper tip and use a pipettor to measure and dispense the reagent.

Step 1 – KemiCal 1 Calibration

The KemiCal 1 (KC1) Calibration converts luminometer RLU values into actual ATP concentrations. Perform one KemiCal 1 calibration per day or for each set of samples analyzed at once. Be sure that KemiZyme Lite is allowed to reach ambient temperature prior to use.

PROCEDURE: Add 2 drops (100 μ L) from the Blue KemiCal 1 Dropper and 8 drops (400 μ L) from the Brown KemiZyme Lite Dropper to a new 12x55mm test tube (the Assay Tube), swirl gently five times, immediately insert into the luminometer and measure. Record RLU_{KC1} for use in the final calculations.



NOTE: If $RLU_{KC1} \leq 1,000$ using a Kikkoman Lumitester C-100 or C-110, it is recommended to obtain a new bottle of KemiZyme Lite for maximum sensitivity.

NOTE: RLU_{KC1} will fall over time for the same batch of KemiZyme Lite. This is because of decreased luciferase enzyme activity. When followed, the guideline above ensures that there is sufficient activity to meet the specified detection limit.

Step 2 – tATP Analysis

The Total ATP (tATP) analysis measures ATP from both living and dead cells. Perform one tATP analysis on each sample you wish to test.

2.1 – EXTRACTION

Using a new pipette tip, add 0.1mL of well-mixed sample into a fresh 12x55mm Assay Tube. Add 2 drops (100 μ L) from the Red KemiLyse Lite Dropper. Mix the tube gently and allow at least 1 minute for incubation.



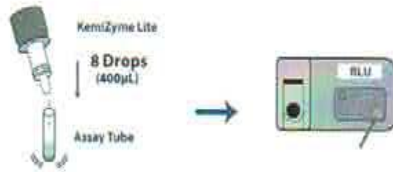
TIP: tATP Extracts are stable for up to 8 hours prior to proceeding to the assay step.

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features

Test Kit Instructions – LumiKem Process Lite LumiKem

2.2 – ASSAY

Add 8 drops (400µL) from the Brown KemiZyme Lite Dropper to the Assay Tube, mix gently, and insert into the Luminometer. Read and record RLU_{ATP} for use in the final calculations.



NOTE: If RLU_{ATP} ≤ 10 on a Kikkoman Lumimeter C-100 or C-110, you are below the low-detection limit. Report tATP (pg ATP/mL) = 0 in the final calculations.

NOTE: When RLU_{ATP} ≤ 50 on a Kikkoman Lumimeter C-100 or C-110, it is recommended that you measure and subtract RLU_{bg} from your measurement. See Diagnostics and Troubleshooting. When possible, repeat the test procedure with a larger volume of sample to achieve a higher RLU_{ATP} and greater accuracy.

Final Calculations

Following completion of all sample measurements, RLU values must be converted to ATP concentrations using the following calculations. For easy calculations, use LumiKem Capture software located on the LumiKem Portal. For manual calculations, see below.

Total ATP (tATP) – measures all ATP within a sample, including ATP from living cells in addition to ATP that has been released from dead cells.

$$tATP (pg\ ATP/mL) = \frac{RLU_{ATP}}{RLU_{CAL}} \times 2,000 (pg\ ATP/mL)$$

To communicate results on the same basis as traditional culture tests, tATP results are converted into Microbial Equivalents (ME's). This is based on the established conversion that 1 E. coli-sized bacteria contains 0.001 pg (1 fg) of ATP.

$$tATP (ME/mL) = tATP (pg\ ATP/mL) \times \frac{1ME}{0.001pg\ ATP}$$

NOTE: For more discussion on the quantity of ATP per cell, visit www.lumikem.com

Because many traditional culture-based methods report results in a similar fashion, it is sometimes convenient to report tATP results in ME/mL using Scientific Notation (i.e. ## x 10ⁿ) or on a Log₁₀ format for comparison purposes.

Interpretation Guidelines

Once tATP results are calculated, microbial control can be evaluated. ATP-based measurements are extremely sensitive to changes in total microbial quantity. In general, processes will have the best microbial control when **tATP is minimized!**

LumiKem test kits can be used to audit microbial quantity to reveal differences at different process locations in an effort to quickly assess the 'hot spots' within a process that require more immediate attention.

For process control, daily monitoring using LumiKem test kits will give you true total microbial quantity parameters to trend over time against process characteristics and performance.

When utilizing ATP test kits it is important to remember that every process is different. During **audits**, relative comparisons from point to point are a reliable means to assess your process, while for **daily monitoring** it is important to establish a baseline trend before making control decisions. To get started, Kemira provides the following tATP guidelines in units of **pg tATP per mL**:

LumiKem Pigments Interpretation Guidelines

Application	Good Control (pg cATP/mL)	Preventive Action (pg cATP/mL)	Corrective Action (pg cATP/mL)
Papermaking Processes (Product Quality Control)	< 1,000	1,000 to 10,000	≥ 10,000
Papermaking Processes (Process Odor Control)	< 10,000	10,000 to 100,000	> 100,000

NOTE: These interpretation guidelines are designed for generic risk management guidance **only**. Users are encouraged to establish their own control ranges on which to base process decisions. Kemira and its affiliates do not accept any liability for any decision or assessment taken or made as a consequence of using this test kit.

Test Kit Instructions – LumiKem Process Lite

LumiKem™

Ordering Information

- New to LumiKem? Start by ordering the LumiKem Equipment Set (**LKM-SYS**) and the LumiKem Process Lite test kit (**LKM-PROL-100**).
- To reorder kits, contact your local Kemira representative and use catalogue number **LKM-PROL-100**.
- To inquire about other products and services, to request a quotation or to place an order, contact your local Kemira representative today!
- If you do not have a local representative, contact us at one of the following locations:

Kemira Chemicals, Inc.
1950 Vaughn Road
Kennesaw, GA 30144
United States
Tel: +1-770-436-1542
Fax: +1-770-436-3432

Kemira R&D and Technology
Espoo R&D Center, Microbe Control Laboratory
Luoteisrinne 2, P.O. Box 44
FI-02271, Espoo
Finland
Tel: +358-10-8611
Fax: +358-10-862-2000

www.kemira.com

LumiKem is a trademark of Kemira. Lumitester is a trademark of Kikkoman Corporation. All other trademarks are the property of LuminUltra Technologies Ltd.