

Suvi Tyynelä

## Öljyllä pilaantuneen meriympäristön biopuhdistus:

Rauta-mangaanisaostumien bakteerien PAH-hajotusgeenin  
määrittäminen ja öljyn hajotuksen seuranta

## **ALKULAUSE**

Tämä opinnäytetyö tehtiin Suomen ympäristökeskuksessa, Merikeskuksen Mallit ja innovaatiot -yksikössä. Haluan kiittää kaikkia työhön osallistuneita henkilöitä. Lämmin kiitos johtavalle tutkijalle Kirsten Jørgensenille ja tutkijalle Pirjo Yli-Hemmingille opinnäytetyön ohjauksesta ja tuesta sekä mahdollisuudesta toteuttaa työ. Suuret kiitokset avusta myös erikoistutkija Jouni Lehtorannalle, kemisti Timo Sara-aholle, kemisti Sami Huhtalalle ja laboratoriomestari Anne Markkaselle. Haluan kiittää myös kaikkia laboratorion työntekijöitä, joilta sain apua ja neuvoa.

Lisäksi suuri kiitos myös koulun ohjaavalle opettajalle lehtori Jarmo Palmille opinnäytetyön ohjauksesta.

Kiitän myös läheisiäni, joilta sain apua ja tukea sekä kannustusta työn aikana.

Helsingissä 27.10.2011

Suvi Tyynelä

Tekijä(t) Otsikko  Sivumäärä Aika	Suvi Tyynelä Öljyllä pilaantuneen meriympäristön biopuhdistus: Rauta-mangaanisaostumien bakteerien PAH-hajotusgeenin määrittäminen ja öljyn hajotuksen seuranta  42 sivua + 1 liite 27.10.2011
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko
Koulutusohjelma	Laboratorioala
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaaja(t)	FM Jarmo Palm FM Pirjo Yli-Hemminki Dos. Kirsten Jørgensen
<p>Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia Itämeren rauta-mangaanisaostumien bakteerien öljyn ja PAH-yhdisteiden hajotuskykyä. Opinnäytetyö tehtiin Suomen ympäristökeskuksessa, Merikeskuksen Mallit ja innovaatiot -yksikössä. Työ toteutettiin hankkeessa, joka on nimeltään Itämeren rauta-mangaanisaostumien hyödyntäminen saastuneiden maiden ja merisedimenttien kunnostuksessa.</p> <p>Rauta-mangaanisaostumia eli konkretioita löytyy useilta valtamerien alueilta. Ne peittävät myös Itämeren merenpohjaa laajoilla alueilla. Konkretioiden muodostuvat rauta- ja mangaanikerroksista. Ne ovat huokoisia, ja voivat olla onttoja sisältä. Konkretioiden mikrobioryhmä on runsas ja niillä voi olla kyky haitallisten aineiden poistamisessa.</p> <p>Tutkimusta varten laboratorioon koottiin koeasetelma, jossa konkretioiden oli käsitelty raaka-öljyllä. Käsitellyt olivat hapellisissa ja hapettomissa olosuhteissa 10 °C:ssa. Koeyksiköt purettiin säännöllisin väliajoin, ja niistä otettiin näytteet molekyylibiologiin ja kemiallisiin analyysihin. Vesinäytteestä määritettiin liukoisten metallien, raudan ja mangaanin, pitoisuus sekä pinta-aktiivisten aineiden läsnäolo. PAH-hajotusgeenin kopiomäärää konkretiobakteereissa tutkittiin kvantitatiivisella PCR-menetelmällä. Lisäksi öljyn hajoamista seurattiin GC-FID-menetelmällä.</p> <p>Opinnäytetyön tulosten perusteella havaittiin öljyn hajoamista hapellisissa ja hapettomissa olosuhteissa. Öljyn hiilivetyjen pitoisuus alueella C<sub>10</sub>–C<sub>40</sub> laski. Lisäksi anaerobisissa olosuhteissa raudan ja mangaanin pitoisuudet kasvoivat, mikä osaltaan voi kertoa öljyn hajoamisesta. Mittausten perusteella PAH-hajotusgeenin määrässä tapahtui muutos grampositiivisten bakteerien joukossa hapellisissa olosuhteissa, mikä voi antaa viitteitä niiden PAH-yhdisteiden hajotuskyvystä.</p> <p>Opinnäytetyön tuloksilla saatiin kuvaa rauta-mangaanisaostumien bakteerien öljyn ja PAH-yhdisteiden hajotuskyvystä. Samalla tulokset toimivat pohjana muille konkretiobakteerien öljyn hajotuskokeille.</p>	
Avainsanat	Biopuhdistus, rauta-mangaanisaostuma, PAH-yhdisteet, qPCR

Author(s) Title	Suvi Tyynelä Bioremediation of petroleum contaminated marine environment: Determination of iron-manganese concretions bacteria's PAH- gene and degradation of petroleum
Number of Pages Date	42 pages + 1 appendix 27.10.2011
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Specialisation option	
Instructor(s)	Jarmo Palm, M.Sc. Pirjo Yli-Hemminki, M.Sc. Kirsten Jørgensen, Dos.
<p>The aim of this thesis was to study the Baltic Sea iron-manganese concretions micro-organisms ability to degrade petroleum and PAH compounds. The study was carried out at the Finnish Environment Institute, Marine Research Centre, Modelling and Innovations Unit. The study was part of project call Iron-manganese concretions in bioremediation of contaminated soils and sediments.</p> <p>Iron-manganese concretions are found in several oceans. Concretions cover vast areas of the bottom surface of the Gulf of Finland. Concretions are formed from manganese and iron oxide layers. They are porous and their center can be hollow. The microbial community in concretions is very abundant and they may have the ability to remove harmful substances.</p> <p>The research was done in a laboratory by treating the concretions with crude oil. The experiment was carried out in conditions with and without oxygen at 10 °C. Samples were extracted regularly for molecular biological and chemical tests. The concentration of dis-soluble metals, manganese and iron, and surfactant production were determined from the liquid sample. Quantitative PCR was used to determine the abundance of the PAH-degrading gene. GC-FID-method was in turn used to follow the petroleum degradation.</p> <p>The result of this thesis provides evidence that petroleum was degraded in conditions with and without oxygen. The concentration of petroleum hydrocarbons in the range of C<sub>10</sub> to C<sub>40</sub> decreased. The concentration of manganese and iron increased in anoxic conditions. This can reveal the degradation of petroleum. There were some changes in the quantity of the PAH-gene in the aerobic gram-positive bacteria. This can indicate their ability to degrade PAH compounds.</p> <p>The study provides information about micro-organisms in iron-manganese concretions and their ability to degrade petroleum and PAH compounds. In addition the results can serve as information to other experiments on concretion bacteria's ability to degrade petroleum.</p>	
Keywords	Bioremediation, concretion, PAH-compounds, qPCR

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Öljyhiilivedyt	2
2.1	Öljyhiilivetyjen rakenne	2
2.2	Polysykliset aromaattiset hiilivedyt	3
2.3	Öljyn biohajoaminen	4
2.3.1	Aerobinen hajoamisreitti	5
2.3.2	Anaerobinen hajoamisreitti	7
2.3.3	PAH-yhdisteiden hajoamiseen osallistuvia geenejä	8
3	Biopuhdistus	11
3.1	<i>In situ</i> -menetelmä	11
3.2	<i>Ex situ</i> -menetelmä	12
4	Rauta-mangaanisaostumat	13
4.1	Muodostuminen	14
4.2	Mikrobisto	15
5	Öljyn biohajoamisen tutkimusmenetelmiä	18
6	Aineistot ja menetelmät	20
6.1	Koeasetelma ja näytteenotto	20
6.2	Analyysimenetelmät	20
6.2.1	Kvantitatiivinen PCR	21
6.2.2	Drop-collapse-menetelmä	22
6.2.3	Kahdenarvoisen raudan, kokonaisraudan ja -mangaanin määrittäminen	22
6.2.4	Öljyn hiilivetyjen määrittäminen GC-FID-menetelmällä	23
7	Tulokset	24
7.1	Kvantitatiivinen PCR	24
7.2	Drop-collapse-menetelmä	30
7.3	Kahdenarvoisen raudan määrittäminen	30
7.4	Kokonaisraudan ja -mangaanin määrittäminen	31
7.5	Öljyn hiilivetyjen määrittäminen GC-FID-menetelmällä	34

8	Tulosten tulkinta	36
8.1	Kvantitatiivinen PCR	36
8.2	Drop-collapse-menetelmä	37
8.3	Kahdenarvoisen raudan määrittäminen	37
8.4	Kokonaisraudan ja -manganin määrittäminen	37
8.5	Öljyn hiilivetyjen määrittäminen GC-FID-menetelmällä	38
9	Yhteenveto	39
	Lähteet	40
	Liite	
	Liite 1. Koeasetelma	

## 1 Johdanto

Mikrobeja esiintyy runsaasti valtamerien pohjalla olevien mineraalien pinnoilla kuten rauta-mangaanisaostumissa. Nämä niin sanotut konkretioiden tarjoavatkin hyvän kasvualustan mikrobisyhteisöille, jotka pystyvät mangaanin ja raudan hapettamiseen ja pelkistämiseen. Konkretioiden sisältävät runsaasti mikrobeja, ja ne muodostavat monipuolisen mikrobisyhteisön. Tiedetään, että metallien pelkistämiseen kykenevät mikrobit voivat tehokkaasti poistaa haitallisia aineita. Konkretioiden mikrobeilla voi olla myös kyky haitallisten aineiden poistamiseen. [1.]

Tämä opinnäytetyö suoritettiin Suomen ympäristökeskuksessa, Merikeskuksen Mallit ja innovaatiot -yksikössä. Työ toteutettiin hankkeessa, joka on nimeltään Itämeren rauta-mangaanisaostumien hyödyntäminen saastuneiden maiden ja merisedimenttien kunnostuksessa. Hankkeen tavoitteena on osoittaa, että rauta-mangaanisaostumia voidaan hyödyntää maaperän ja pohjasedimentin haitallisten aineiden poistamisessa tai inaktivoinnissa. Samalla tuloksia voidaan soveltaa raudan ja mangaanin kiertotutkimuksissa.

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää millainen kyky konkretioiden mikrobeilla on hajottaa öljyä, ja pystyvätkö ne hajottamaan öljyn myrkyllisimpiin yhdisteisiin kuuluvia PAH-yhdisteitä. Öljyn hajoamista seurattiin sekä molekyylibiologisin että kemiallisin menetelmin. Kokeessa seurattiin muun muassa PAH-hajotusgeenin kopiomäärää konkretibakteereissa ja öljyhiilivetyjen pitoisuutta alueella C<sub>10</sub>–C<sub>40</sub>.

Öljyonnettomuudet aiheuttavat vakavia seurauksia ympäristöön kuten eläimiin, kasveihin tai kaloihin. Näillä onnettomuuksilla voi olla myös vaikutuksia ihmisten elinkeinoon ja elinketjuun. Nopea ja tehokas biopuhdistaminen on tärkeää, jotta luonto saadaan palautumaan ennalleen. Maaperän ja sedimentin bioremediaatiomenetelmät ovat olleet jo jonkin aikaa kiinnostuksen kohteena, ja niitä kehitellään edelleen. Vaikka joitakin metodeja on kehitetty, on etenkin *in situ* -bioremediaatiotekniikoita vähän pilaantuneille sedimenteille. Konkretioiden tarjoama vaihtoehto haitallisten aineiden poistamiseen öljyonnettomuuksissa.

## 2 Öljyhiilivedyt

Öljy on erilaisten hiilivetyjen seos, joka on muodostunut miljoonien vuosien kuluessa, kun biologinen aines on hajonnut. Syvälle sedimentin alle hautautuneet kasvien ja meren eliöiden jäänteet ovat muuttuneet kovassa kuumuudessa ja paineessa raakaöljyksi. Hiilivetyjen lisäksi raakaöljy sisältää happea, typpeä, rikkiä sekä erilaisia metalleja. Siihen on myös sekoittunut vettä, suolaa ja sedimenttiä. Raakaöljyn koostumus vaihtelee. Se voi olla kullanruskeaa, kevyttä ja pienimolekyylistä tai tummaa, raskasta ja suurimolekyylistä öljyä. [2, s. 275.]

### 2.1 Öljyhiilivetyjen rakenne

Hiilivety on orgaaninen yhdiste, joka koostuu hiili- ja vetyatomeista. Hiilivedyt jaetaan tyydyttyneisiin ja tyydyttymättömiin yhdisteisiin. Alkaanit ovat tyydyttyneitä hiilivetyjä. Ne muodostavat yksinkertaisia sidoksia (C-C) ja voivat olla rakenteeltaan suoraketjuisia eli alifaattisia, haarautuneita tai rengasrakenteisia eli syklisiä. Alkaaneita sanotaan myös parafiineiksi. Niiden molekyylikaava on  $C_nH_{2n+2}$ , ja yksinkertaisin alkaani on metaani  $CH_4$ . Alkaaneita käytetään polttoaineina, voiteluaineina ja liuottimina. [2, s. 274.]

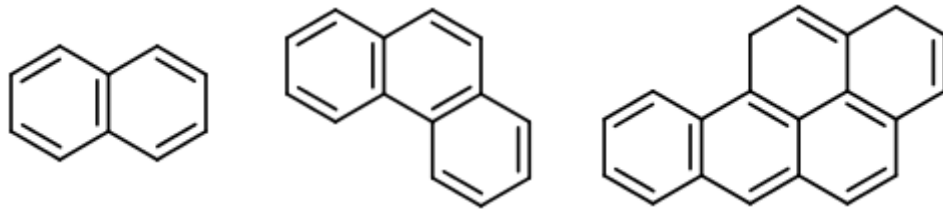
Tyydyttymättömät hiilivedyt eli alkeenit muodostavat kaksoissidoksia (C=C) ja niitä kutsutaan olefiineiksi. Niiden molekyylikaava on  $C_nH_{2n}$ . Yksinkertaisin alkeeni on eteeni  $C_2H_4$ , ja niitä saadaan öljynjalostuksen jatkojalostustuotteena. Alkyynit muodostavat taas kolmoissidoksia (C≡C), ja ovat myös tyydyttymättömiä. Niiden molekyylikaava on  $C_nH_{2n-2}$ , ja yksinkertaisin alkyyni on etyyni eli asetyleeni  $C_2H_2$ . Asetyleeniä valmistetaan maakaasusta ja maaöljystä. [2, s. 274–277.]

Alisykliset ja aromaattiset hiilivedyt kuuluvat rengasmaisiin eli syklisiin hiilivetyihin. Alisyklisiin kuuluvat sykloalkaanit ja -alkeenit. Maaöljy sisältää syklopentaania ja sykloheksaania, joita on bensiinijakeessa. Aromaattisia hiilivetyjä (areenit) kutsutaan bentseeniksi. Bentseenirengas muodostuu kuudesta hiili- ja vetyatomista. Sen molekyylikaava on  $C_6H_6$ . Kuusiatomisessa rengasrakenteessa yksöis- ja kaksoissidokset vuorottelevat. Ne eivät ole kovin reaktiivisia ja käyttäytyvät tyydyttyneiden hiilivetyjen tapaan. Aromaattisia hiilivetyjä ovat esimerkiksi bentseeni, tolueeni, ksyleeni ja naftaleeni. Bentseeniä esiintyy raakaöljyissä ja sitä syntyy polttoprosesseissa. [2, s. 277.]



## 2.2 Polysykliset aromaattiset hiilivedyt

Polysykliset aromaattiset hiilivedyt eli PAH-yhdisteet koostuvat myös hiilestä ja vedystä. Ne muodostuvat kahdesta tai useammasta yhteen liittyneestä bentseenirenkaasta. Yksinkertaisin PAH-yhdiste on naftaleeni. Muita PAH-yhdisteitä ovat esimerkiksi fenantreeni, koroneeni tai bentso(a)pyreeni (kuva 1). PAH-yhdisteitä on lukuisia erilaisia. Niitä on jopa tuhansia. Osa on synteettisiä. Niiden määrää lisää isomeria. Tavallisimmat yhdisteet sisältävät viisi tai kuusi bentseenirengasta. [3.]



Kuva 1. PAH-yhdisteitä: naftaleeni, fenantreeni ja bentso(a)pyreeni.

PAH-yhdisteet ovat kiinteitä, rasvaliukoisia aineita. Ne eivät siis liukene veteen. Tästä syystä ne ovatkin vaikeasti hajotettavia. PAH-yhdisteitä syntyy epätäydellisen palamisen seurauksena, ja niitä tuottavat muun muassa teollisuus, liikenne tai metsäpalot. Erilaiset öljyt, kuten kivihiiliperäiset öljyt, moottoriöljy ja dieselöljyt, sisältävät PAH-yhdisteitä. Raakaöljy sisältää huomattavan paljon polyaromaattisia yhdisteitä. Öljyn myrkyllisimmät komponentit ovat PAH-yhdisteiden joukossa. Yhdisteitä löytyy ympäristöstä ja ilmasta. Ne ovat hyvin pysyviä, ja ne kerääntyvät maaperään sekä vesistöihin ja sieltä sedimentteihin. PAH-yhdisteet ovat ympäristölle ja terveydelle vaarallisia. Etenkin meriympäristössä ne luetaan vaarallisimpiin aineisiin. Ne aiheuttavat syöpää ja mutaatioita. [3.]

PAH-yhdisteet pääsevät kulkeutumaan elimistöön hengitysteiden, ihon ja ruuansulatuselimistön kautta. Sieltä ne kulkeutuvat vereen ja kudoksiin. PAH-yhdisteet eivät oikeastaan itse aiheuta syöpää vaan niiden aineenvaihduntatuotteet. PAH-yhdisteet muuttuvat aktiiviseen, syöpävaaralliseen muotoon aineenvaihdunnan jälkeen. Ne vaurioittavat solujen toimintaa ja makromolekyylejä. Syntyneet tuotteet voivat reagoida DNA:n kanssa, mikä aiheuttaa mutaatioita ja solu ei lopulta pysty enää jakautumaan normaalisti. [3; 4.]

### 2.3 Öljyn biohajoaminen

Öljihiilivedyt ovat luonnon oma tuote, ja ne ovat olleet olemassa miljoonia vuosia. Ei olekaan ihme, että monet mikro-organismit pystyvät käyttämään niitä hiilen- ja energianlähteenään. Bakteerit, sienet, levät ja kasvit pystyvät hajottamaan öljyn hiilivetyyhdisteitä. Ne hajottavat haitallisia aineita käyttämällä niitä hyväkseen ravinnon ja energian lähteenä tai hajottamalla ne toiseen muotoon ilman, että hyötyvät itse. Biohajoamisen edellytyksenä on öljy-yhdisteiden alhainen pitoisuus, biosaatavuus, suotuisat ympäristöolosuhteet ja oikeanlaiset mikrobit. Ympäristön lämpötila, pH, maalaji, ravinne-, happi- ja vesipitoisuus vaikuttavat hajoamisen tehokkuuteen. Hajoaminen voi olla aerobista tai anaerobista. [5, s. 9.]

Hajoamisessa tapahtuvat biologiset reaktiot perustuvat hapetus- ja pelkistysreaktioihin (redox-reaktiot). Redox-olosuhteet määräävät minkä tyyppisiä hajotusprosesseja tapahtuu. Hajotustoiminta on sitä nopeampaa mitä korkeampi haitta-ainepitoisuus on. Pitoisuuden pienentyessä myös hajoaminen hidastuu. Usein hajoamisessa saattaa syntyä välituotteina entistä haitallisempia yhdisteitä. Öljihiilivedyillä tämä ei kuitenkaan aiheuta ongelmia, koska pienimolekyyliset yhdisteet hajoavat suurimolekyylisiä nopeammin, eikä pienimolekyylisiä yhdisteitä pääse kertymään. [6, s. 9.]

Hiilivetyjen koko ja rakenne vaikuttaa siihen, miten hyvin mikrobit pystyvät käyttämään näitä yhdisteitä. Korkeina pitoisuuksina kevyet alifaattiset ja aromaattiset yhdisteet ovat toksisia mikrobeille. Ne toimivat liuottimina ja vaurioittavat solukalvoja. [6, s. 15.]

Koska mikrobit voivat käyttää pilaantuneen kohteen öljyhiilivetyjä, alkavat ne usein rikastumaan. Tämä johtaa yleensä öljyhiilivetyjen tehokkaaseen hajoamiseen. Öljy-yhdisteiden lyhytketjuiset alkaanit hajoavat nopeasti, kun taas haaroittuneet alkaanit hitaammin. Siksi esimerkiksi polttoöljy, joka sisältää kevyitä fraktioita, hajoaa nopeammin. Kun taas voiteluöljy, joka koostuu raskaista fraktioista, hajoaa hitaammin. Osa öljy-yhdisteistä on lähes pysyviä, koska ne ovat niin vaikeasti hajoavia. Öljyn hajoaminen voi estyä, jos tietynlaisia ravinteita ei ole saatavilla. Onkin havaittu, että ravinnelisyys edistää biohajoamista. [6, s. 16.]

Öljihiilivetyjen biohajoaminen saattaa hidastua, jos niiden biosaatavuus on huono. Öljihiilivedyt sitoutuvat usein maapartikkeleihin, kun taas mikrobit tarvitsevat ravintonsa liukoisessa muodossa. Tämän vuoksi mikrobit tuottavat pinta-aktiivisia yhdisteitä, joiden avulla orgaaniset yhdisteet saadaan käyttöön. Biohajoaminen hidastuu yleensä ajan kuluessa, koska haitta-aineiden pitoisuudet pienentyvät ja helpoimmin hajoavat yhdisteet on käytetty. Ölji-yhdisteet eivät useinkaan hajoa täydellisesti. [6, s. 16, 18.]

PAH-yhdisteiden hajoaminen on hidasta. Tämä johtuu siitä, että ne ovat suurimolekyyllisiä, kompleksisia ja veteen liukenemattomia yhdisteitä sekä niiden taipumuksesta sitoutua maapartikkeleihin. Tämä voi kuitenkin riittää haitta-aineiden leviämisen estämiseen, mikäli aineiden liukeneminen veteen on hitaampaa kuin biohajoaminen. PAH-yhdisteiden tiedetään hajoavan hapellisissa ja hapettomissa olosuhteissa. Niiden hajoamisnopeuksista *in situ* ei ole tietoa, mutta puoliintumisajan on arveltu olevan 2–9 vuotta. [6, s. 18–19.]

### 2.3.1 Aerobinen hajoamisreitti

Aerobinen hajoaminen on öljyhiilivetyjen yleisin hajoamistapa ja usein myös tehokkain. Hajoaminen vaatii happea, joten se tapahtuu aina hapellisissa oloissa. Monet aerobiset bakteerit pystyvät nopeasti hajottamaan haitta-aineita hapellisissa olosuhteissa. Niillä on happeen perustuva metabolia, ja saadakseen energiaa ne käyttävät happea substraattien hapettamiseen. Aerobisessa hajoamisessa hiilivety hapetetaan, ja elektronien vastaanottajana toimiva happi pelkistetään. Täydellisessä hajoamisessa eli mineraalisaatiossa syntyy hiilidioksidia, vettä ja suoloja. [5, s. 9; 7, s. 1.]

Useat sienet ja bakteerit pystyvät hajottamaan alkaaneja. Ne voivatkin hajota täydellisesti. Helpoimmin hajoavat alkaanien keskipituiset hiiliketjut ( $C_{10}$ – $C_{24}$ ). Alkaanien hajoamisen käynnistää oksygenaasientsyymi. Mono-oksygenaasi saa aikaan, että happimolekyylin toinen atomi liittyy alkaaniin, ja muodostuu primaarinen alkoholi. Dioksygenaasi taas liittää alkaaniin molemmat happiatomit. Tästä seuraa epävakaa hydroperoksidaasi, joka pelkistyy alkoholiksi ja vedeksi. Alkoholit muuttuvat aldehydiksi kautta rasvahapoksi, joka hajoaa edelleen. Syntyneet yhdisteet liittyvät trikarboksyylihapposykliin. Lopuksi syntyy vettä, hiilidioksidia sekä ATP-energiaa. [5, s. 9.]

Alkeenien biohajoaminen on vaikeampaa kuin alkaanien. Hajoaminen voi tapahtua samojen periaatteiden mukaan. Koska kaksoissidokset ovat yksinkertaisia reaktiivisempia, voivat alkeenit hapettua myös epoksidaatiolla. Muodostunut epoksidi voi hajota ensin dioliksi, sitten karboksyylihapoksi ja rasvahapoksi ja lopulta primaarialkoholiksi. Alkeenit hajoavat myös anaerobisesti. [5, s. 9.]

Sykloalkaanien mikrobiologinen hajotus on vaikeaa. Monosykliset yhdisteet, kuten syklopentaani tai sykloheksaani ovat monille mikrobeille myrkyllisiä niiden lipidikalvoja liot-tavan vaikutuksen vuoksi. Jotkut organismit kuitenkin kasvavat sykloheksaanilla. Tällöin heksaanista syntyy hydroksylaation seurauksena rengasrakenteinen alkoholi. Dehydrogenaation avulla siitä muodostuu ketoni, joka hapettuu laktoniksi ja lopulta dikarbok-syylihapoksi. Tämä hajoaa edelleen  $\beta$ -oksidaatiolla. Alkyyli-substituoidut sykloalkaanit hajoavat helpommin kuin vastaavat substituomattomat hiilivedyt. [5, s. 10.]

Aromaattiset yhdisteet voivat myös hajota biologisesti. Tästä ovat esimerkkinä tolueni, bentseeni ja ksyleeni. Kun useimmat aromaattiset yhdisteet hajoavat, ne muodostavat välituotteena 1,2-dihydroksibentseeniä, ja lopputuotteena syntyy orgaaninen happo. Mainittu bentseeni voi hajota mukonihapoksi, joka hajoaa butaanidihapoksi ja asetyyli-koentsyymi-A:ksi. Vaihtoehtoisesti toisessa hajoamisreitissä rengas aukeaa hydroksyyli-ryhmien vierestä, ja lopputuotteeksi saadaan 2-oksopropaanihappoa ja asetaldehydiä. [5, s. 10.]

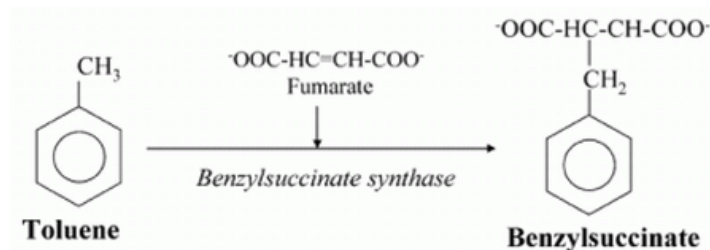
Kymmenien bakteeri-, sieni- ja levälajien tiedetään voivan hajottaa polyaromaattisia hiilivetyjä. Tämä tapahtuu oksygenaasientsyymien avulla. Ensimmäinen pysyvä ha-joamistuote on yksi tai kaksi hydroksyyli-ryhmää sisältävä PAH. Hajoamisnopeuteen vaikuttaa aromaattisten renkaiden määrä, pitoisuus ja ympäristön olosuhteet. Mitä pie-nempi PAH-molekyylillä on, sitä useampi mikrobi voi käyttää sitä hyväkseen. Kaksi- ja kolmirenkaisien yhdisteiden, kuten naftaleenin ja fenantreenin hajoaminen on nopein-ta, ja niiden hajoamisreitit tunnetaan. Neljä- ja viisirenkaisien yhdisteiden hajoamisreit-tejä ei vielä tunneta. Niiden hajoaminen on mahdollista, mutta se kestää useita vuosia. Yli viisirenkaiset yhdisteet voivat hajota bakteerien ja sienten toimesta, mutta tällöin ne käyttävät hiilenlähteenään jotakin toista yhdistettä. [5, s. 10.]

### 2.3.2 Anaerobinen hajoamisreitti

Anaerobisia hajoamisreittejä on tutkittu vasta vähän aikaa, eivätkä ne ole vielä yhtä tunnettuja kuin aerobiset reitit. On kuitenkin osoitettu, että suuri määrä mikrobeja pystyy käyttämään hyväksi tyydyttyneitä ja aromaattisia hiilivetyjä hapettomissa olosuhteissa. Anaerobinen hajoaminen on paljon hitaampaa kuin aerobinen hajoaminen. Anaerobisessa hajotuksessa mikrobit käyttävät elektronin vastaanottajana jotain toista yhdistettä hapen sijasta. Tällöin ne pelkistävät esimerkiksi rautaa, nitraattia tai sulfiitteja. Niitä kutsutaankin nitraatin-, raudan- tai sulfaatinpelkistäjiksi. Anaerobisesti hajoavia hiilivetyjä ovat muun muassa alifaattiset ja haarautuneet alkaanit ( $>C_6$ ) tai aromaattiset yhdisteet kuten bentseeni, tolueeni, naftaleeni ja fenantreeni. [8, s. 262; 9, s. 512.]

Tolueenin anaerobista hajoamista on tutkittu eniten. Sen hajoaminen osoitettiin ensimmäiseksi puhdasviljelmän bakteerilla nimeltä *Geobacter metallireducens*. Se hajotti tolueenin täydellisesti hiilidioksidiksi pelkistämällä kolmenarvoista rautaa. *Geobacter*-lajin onkin osoitettu olevan hallitseva kolmenarvoista rautaa pelkistävästä lajeista, kun ympäristö on hapeton, mesofiilinen ja hiilivedyillä pilaantunut. Raudan lisäksi *G. metallireducens* voi käyttää nitraattia, mangaania tai humusyhdisteitä elektronin vastaanottajana. [10, s. 439.]

Yksi tolueenin hajoamisreiteistä tapahtuu entsyymien nimeltä bentsyylisukkinaattisyntaasin toimesta. Siinä tolueenin metyyli-ryhmään lisätään fumaraatti, jolloin muodostuu bentsyylisukkinaatti. Tämä on esitetty kuvassa 2. Bentsyylisukkinaatti hajoaa edelleen asetyyli-KoA:ksi ja bentsoyyli-KoA:ksi, joka muistuttaa rasvahapojen hajoamista  $\beta$ -oksidatiossa. [10, s. 439.]



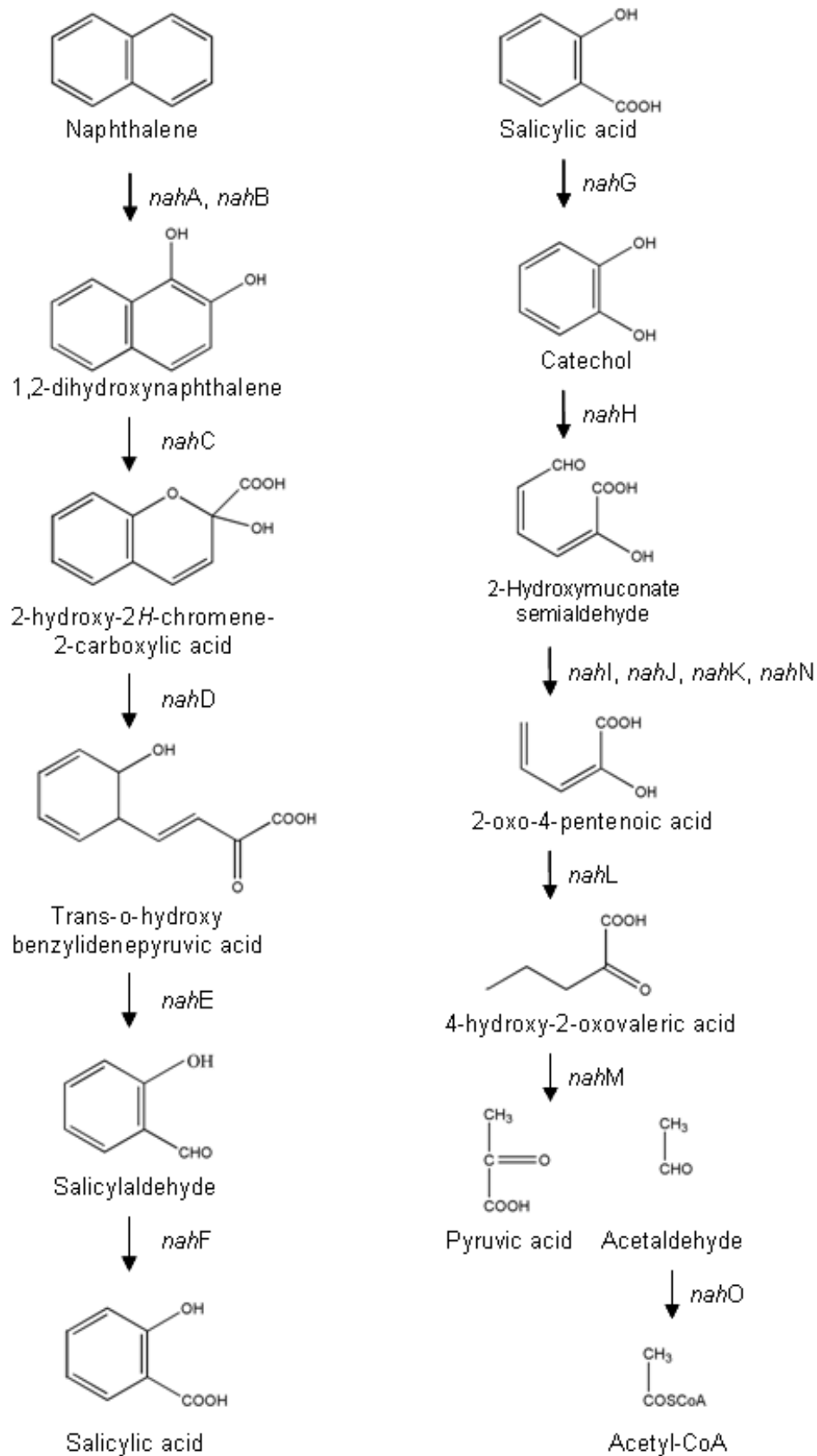
Kuva 2. Bentsyylisukkinaattin muodostuminen tolueenin hajotuksessa [10, s. 439].

Alkaanien anaerobista hajoamista ei tunneta vielä kovin hyvin. On kuitenkin pystytty osoittamaan, että sulfaatin, klooraatin ja nitraatin pelkistäjät, sekä metanogeeniset bakteerit pystyvät hajottamaan pitkäketjuisia alkaaneja, kuten heksadekaania anaerobisissa olosuhteissa. Monet alkaanien anaerobiset hajottajat kuuluvat proteobakteereihin. Ensimmäisenä osoitettiin, että alkaanin anaerobiseen hajotukseen kykenevä bakteeri oli sulfaatin pelkistäjä. [11, s. 1–3.]

Anaerobisen alkaanien hajotuksen käynnistäviä mekanismeja on useita. Serge Mbadin-ga ym. [11] esittelee artikkelissaan kaksi yleistä mekanismia: fumaraatin lisäyksen ja karboksylaation. Fumaraatin lisäys *n*-alkaanin muodostaa 1-metyylialkyyli-sukkinaatin. Syntyneestä tuotteesta muodostuu edelleen 2-metyylialkyyylimalonyyli-KoA, joka mahdollistaa 4-metyylialkanoyyli-KoA:n dekarboksylaation. Muodostunut rasvahappo hajotetaan  $\beta$ -oksidatiossa, ja asetyyli-KoA hapetetaan edelleen hiilidioksidiksi. Karboksylaatiosta taas alkaanin hajotus rasvahapoksi tapahtuu epäorgaanisen hiilen ( $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ ) avulla. Anaerobinen hajotus käynnistyy, kun epäorgaaninen hiili liitetään *n*-alkaanin kolmanteen hiileen. [11, s. 8–9.]

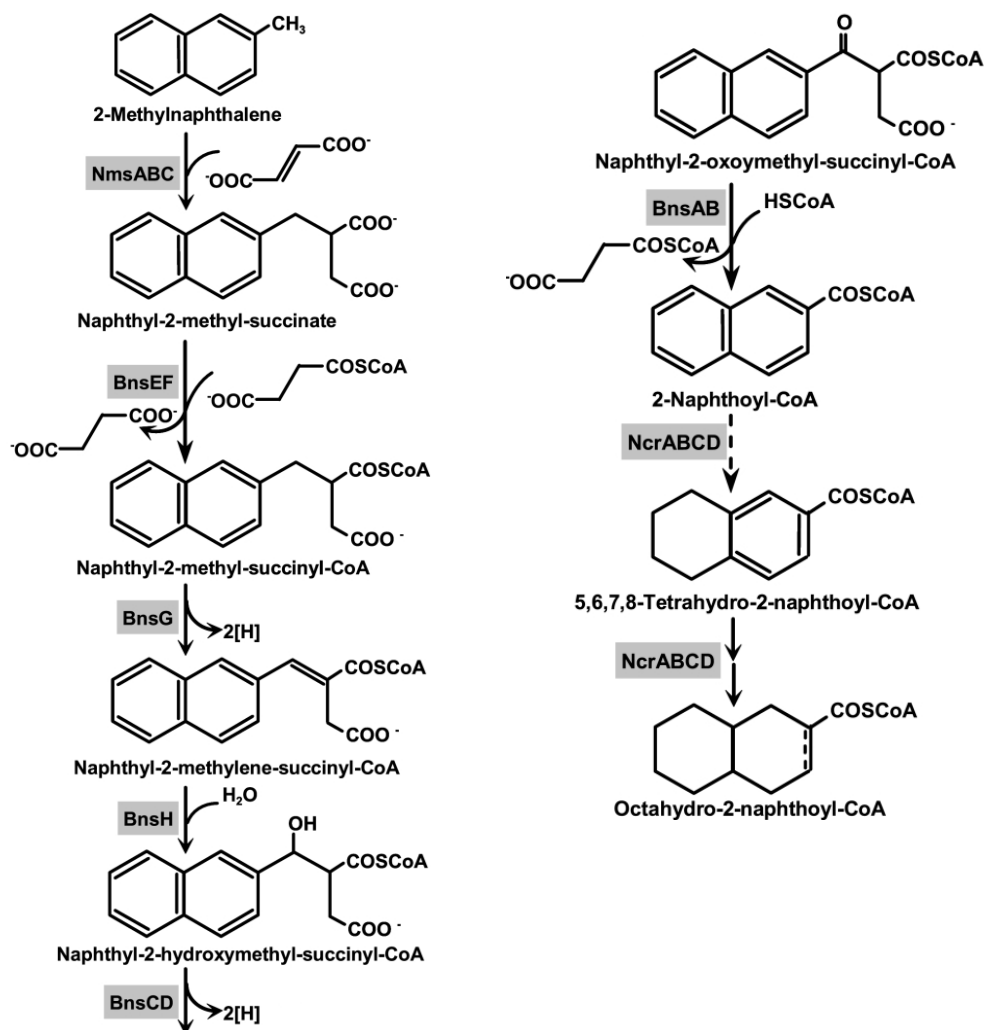
### 2.3.3 PAH-yhdisteiden hajoamiseen osallistuvia geenejä

PAH-yhdisteiden aerobiseen hajoamiseen osallistuvia geenejä on tutkittu esimerkiksi naftaleenilla. Tunnetuin on *Pseudomonas putida* G7-kannan NAH7-plasmidi, joka koodaa naftaleenin hajoamisreittiä. Hajotukseen osallistuvat geenit ovat kahdessa operonissa, joista toinen operoni koodaa ylempää reittiä ja toinen alemmaa reittiä. Ylemmällä reitillä operoni *nal* koodaa naftaleenin reittiä salisylaatiksi. Alemmalla reitillä operoni *sal* koodaa salisylaatia, joka muuttuu *meta*- tai *orto*-reitit kautta asetaldehydiksi ja pyruvaatiksi sekä lopuksi asetyylikoentsyymi-A:ksi. Ylempi reitti koostuu 10 geenistä (*nah AaAbAcAdBFCQED*) ja alempi reitti 11 geenistä (*nah GTHINLOMKJY*). Molempia operoneja säätelee geeni *nahR*. Reaktio alkaa, kun naftaleenidioksygenaasi tuo molekyylläisen hapen aromaattiselle atomille. Kuvassa 3 on esitetty naftaleenin biohajoaminen ja siihen osallistuvat geenit. [12, s. 928–929.]



Kuva 3. Naftaleenin aerobiseen hajotukseen osallistuvat geenit. Vasen esittää ylempää reittiä ja oikea alempaa reittiä [13, s. 24].

PAH-yhdisteiden anaerobiseen hajoamiseen osallistuvista geeneistä on vielä vähän tietoa. Tutkimusta on tehty muun muassa sulfaattia pelkistävällä N47-kannalla, joka pystyy anaerobisesti hajottamaan naftaleenia ja 2-metyyli-naftaleenia. 2-metyyli-naftaleenin on esitetty hajoavan 2-naftyyli-KoA:ksi, joka edelleen hajoaa asetyyli-KoA:ksi ja hiilidioksidiksi. Alkureaktio on samanlainen kuin toluenin hajotuksessa. Naftyyli-2-metyylisukkinaattisyntaasi, Nms, katalysoi fumaraatin lisäyksen metyyliiryhmään. Nms koostuu  $\alpha$ -,  $\beta$ - ja  $\gamma$ -alaysiköistä, joita koodaavat geenit *nmsABC*. *Bns*-geeniklusteri koodaa taas entsyymejä, jotka osallistuvat  $\beta$ -oksidatioon muuttaakseen naftyyli-2-metyyli-sukkinaatin 2-naftoyyli-KoA:ksi. Tämä klusteri sisältää kahdeksan geeniä, jotka ovat *bnsABCDEFGH*. *Ncr*-geeniklusteri sisältää geenit *ncrABCD*. Nämä koodaavat puolestaan entsyymejä, jotka vastaavat 2-naftoyyli-KoA:n hajoamisesta asetyyli-KoA:ksi ja hiilidioksidiksi. Tähän osallistuu myös 16 muuta geeniä. Ehdotettu hajoamisreitti on esitetty kuvassa 4. [14, s. 295.]



Kuva 4. Anaerobiseen 2-metyyli-naftaleenin hajoamiseen osallistuvat geenit. Reaktio alkaa ensin vasemmalta ja jatkuu oikealla. [14, s. 296.]



### 3 Biopuhdistus

Biopuhdistus eli bioremediaatio tarkoittaa ympäristön puhdistamista mikrobin, kasvien tai sienien avulla. Ympäristökohde voi olla esimerkiksi saastunut maa, vesi, pohjavesi tai sedimentti. Organismit voivat puhdistaa haitalliset aineet vaarattomiksi tai vähemmän myrkyllisemmiksi hajottamalla ne biologisesti metabolian avulla. Hajoaminen tapahtuu aerobisesti tai anaerobisesti. Hajottajamikrobit voivat olla luonnon omia alkupe räisiä mikrobeja tai ne on voitu eristää ja kasvattaa muualla. Kun mikrobit tuodaan muualta saastuneeseen kohteeseen, puhutaan *bioaugmentaatiosta*. Puhdistamista taas kasvien avulla kutsutaan *fytoaugmentaatioksi*.

Kuten jo aikaisemmin mainittiin, ympäristön olosuhteilla, kuten lämpötilalla, ravinteilla, hapella tai pH:lla, on vaikutusta biohajoamiseen. Usein tarvitaan keinoja lisäämään mikrobikasvua ja hajotustoimintaa, jotta saadaan tehokkaampaa ja nopeampaa puhdistusta. Biostimulaatiossa lisätään puhdistettavaan kohteeseen ravinteita ja happea auttamaan mikrobeja hajotuksessa. Tärkeimmät ravinteet ovat hiili, typpi ja fosfori. Jotkut saasteet saattavat olla hitaasti hajoavia tai ne eivät hajoa ollenkaan. Kun haitta-aine hajoaa luonnollisesti ilman ihmisen toimenpiteitä, kutsutaan sitä luontaiseksi puhdistumiseksi (eng. natural attenuation). Pilaantuneiden alueiden luontainen puhdistumiskyky voi olla merkittävä. Luontaista puhdistusprosessia voidaan seurata, jolloin puhutaan monitoroidusta luontaisesta puhdistumisesta (MLP). [15, s. 1166; 16, s. 287.]

*In situ* ja *ex situ* ovat erilaisia bioremediaatiomenetelmiä. Yleensä käytetään jompaa-kumpaa menetelmää, mutta ne voidaan myös yhdistää käyttämällä ensin toista menetelmää ja jatkamalla toisella. Menetelmän valintaan vaikuttaa kontaminaatityyppi, sen laajuus, ympäristökohde ja sijainti sekä kustannukset ja aikataulu [17].

#### 3.1 *In situ* -menetelmä

*In situ* -menetelmässä bioremediaatio tapahtuu paikan päällä, saastuneessa kohteessa. Pilaantunutta maata ei siirretä, jolloin vältetään kalliilta kuljetuskustannuksilta. Menetelmä on hyvä ja taloudellinen vaihtoehto, mutta puhdistuminen voi olla hankalaa, kun pilaantunut kerros on paljon pinnan alaista kerrosta syvemmällä. Menetelmä on kuitenkin usein kannattava, koska se ei haittaa maan luonnollista toimintaa paljon. Kun halu-

taan arvioida *in situ* -menetelmän tehokkuutta, voidaan seurata hapen kulutusta tai hiilidioksidin muodostumista. [15, s. 1167–1168; 16, s. 287.]

Bioilmaaminen (*bioventing*, *biosparging*) ja hajottajamikrobien lisääminen (*bioaugmentaatio*) ovat esimerkkejä *in situ* -tekniikoista. Bioilmaaminen eli *bioventing* on yleisin menetelmä. Mikrobien biohajotusta stimuloidaan lisäämällä puhdistettavaan kohteeseen ilmaa ja ravinteita ilmakaivojen tai kanavien avulla. Tätä tekniikkaa käytetään pohjaveden yläpuolisille kerroksille. Menetelmässä käytetään pieniä ilmamääriä, jotta vältetään haitta-aineiden haihtumiselta ja pääsystä ilmakehään. Menetelmää voidaan käyttää pintaa syvemmillä kerroksilla, ja se toimii yksinkertaisille hiiliyhdisteille. Toisessa ilmastustekniikassa (*biosparging*) happea injektoidaan pohjaveden pinnan alaisille alueille. Tämä lisää pohjaveden happikonsentraatiota ja kiihdyttää biologista puhdistumista. [15, s. 1168.]

Happi ja ravinteet voidaan myös lisätä nesteeseen, jota kierrätetään pilaantuneella alueella. Menetelmää voidaan käyttää maaperän lisäksi myös pohjaveden kunnostuksessa. Koska happi liukenee huonosti veteen, pohjaveteen lisätty ilma ei välttämättä ole tehokasta. Hapen puuttuessa anaerobiset olosuhteet tulevat nopeasti vallitseviksi. Hapen tilalla voidaan käyttää vaihtoehtoisia elektronin vastaanottajaa käyttämällä esimerkiksi nitraatin tai sulfaatin lisäystä. Nämä liukenevat veteen hyvin. [15, s. 1168; 16, s. 297.]

Hajottajamikrobien lisäämisessä (*bioaugmentaatio*) puhdistettavaan kohteeseen tuodaan muualla kasvatettuja tai eristettyjä hajottajamikrobeja. Tämä voi lisätä hajoamisen nopeutta, jos ympäristön omat mikrobit ovat huonosti hajottavia tai niitä on vähän. Vaatimuksena on, etteivät mikrobit muokkaa ympäristöä vaarallisemmaksi tai muuta tai vahingoita sen ekologiaa. Ongelmana on kuitenkin usein, etteivät laboratoriossa kasvatetut mikrobit selviydy luonnon oloissa. Parhaimmin toimivat hajottajamikrobit löytyvät yleensä pilaantuneilta alueilta ja ne ovat luonnon omia mikrobeja. [15, s. 1168.]

### 3.2 *Ex situ* -menetelmä

*Ex situ* -menetelmässä pilaantunut maa-aines kaivetaan tai vesi kerätään ja siirretään muualle käsittelyyn. Menetelmä on vanha ja paljon käytetty. Sillä on kuitenkin huonoja puolia kuten kalliit käsittely- ja kuljetuskustannukset. Vaarallisten aineiden kaivaminen,

käsittely ja kuljetus voivat myös aiheuttaa riskejä. Toimenpiteet voivat haitata ja aiheuttaa epätasapainoa maan luonnolliseen toimintaan eikä ongelma välttämättä häviä vaan siirtyy paikasta toiseen. Joskus *ex situ* -menetelmä on kuitenkin ainoa vaihtoehto ja *in situ* -menetelmää parempi. Haitta-aineiden pitoisuudet saattavat olla liian suuret tai ne eivät hajoa. Ne voivat aiheuttaa myös varaa ihmisille tai eläimille. *Ex situ* -menetelmän hyviä puolia on, että se on kontrolloitavissa ja usein nopea. [15, s. 1163, 1167.]

Maaperä- (*landfarming*) ja maakasakäsittely (*biopiles*), kompostointi tai bioreaktori ovat esimerkkejä käytettävistä *ex situ* -menetelmistä. Maaperäkäsittelyssä kaivettu maa levitetään ohueksi kerrokseksi alustalle ja maata ajoittain käännellään, kunnes haitalliset aineet ovat hajonneet. Tavoitteena on saada stimuloitua mikrobien aerobista hajotusta. Kompostoinnissa saastunutta maata kompostoidaan yhdessä vaarattomien orgaanisten aineiden kuten maatalousjätteiden kanssa. Maakasakäsittelyssä koottuihin ja aidattuihin maakasoihin johdetaan ilmaa, mikä myös lisää aerobisten mikrobien aktiivisuutta. Saastunut maa tai vesi voidaan myös pumpata liete- tai vesireaktoriin. Bioreaktoriin lisätään ravinteita ja happea stimuloimaan mikrobihajotusta. Kun bioremediaatio on valmis, liete voidaan kuivata. [15, s. 1168.]

Kaikissa menetelmissä voidaan käyttää hyväksi kohteen omia hajottajamikrobeja tai muualta lisättyjä mikrobeja. Menetelmät ovat usein monitoroituja, ja toimintaa pystytään säätelemään. Hapen ja ravinteiden lisäksi mikrobien aktiivisuutta voidaan lisätä säätämällä kosteutta, lämpöä ja pH:ta. Syntyneet tuotteet voidaan kerätä talteen ja hävittää. Näin luontoon ei pääse vaarallisia sivutuotteita.

#### **4 Rauta-mangaanisaostumat**

Rauta-mangaanisaostumia eli konkretioita löytyy useilta valtamerien alueilta kuten Atlantin, Intian ja Tyynenmeren alueilta. Ne peittävät myös Itämeren merenpohjaa laajoilla alueilla. Konkretiot muodostuvat rauta- ja mangaanikerroksista ja ovat huokoisia sekä usein onttoja sisältä. Ne sisältävätkin pääosin rautaa (27 %) ja mangaania (5 %), mutta ne sisältävät myös muita metalleja, kuten kuparia, nikkeliä, sinkkiä tai kalsiumia. Lisäksi niissä on jonkin verran fosforia ja radioaktiivisia aineita, muun muassa radiumia. Konkretiot kierrättävät metalleja ja fosforia. Niitä on olemassa kaikenkokoisia ja eri-

muotoisia esimerkiksi pieniä pippurimaisia, pallomaisia tai isoja lohkareita (kuva 5). Niiden koko voi vaihdella millimetreistä useihin senttimetreihin. [18, s. 103.]



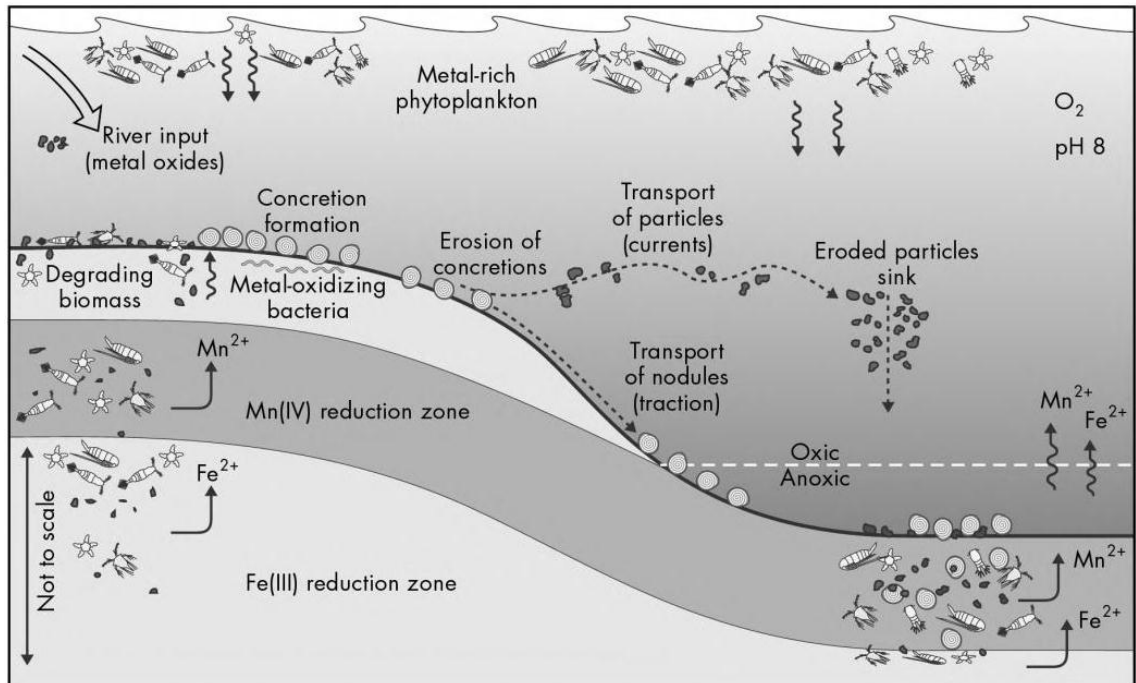
Kuva 5. Rauta-mangaanisaostumia.

#### 4.1 Muodostuminen

Rauta ja mangaani saostuvat usein yhdessä, ja ne muodostavat ferromangaanioksideita. Tunnettuja ferromangaanisaostumia ovat kerrokselliset konkretiot ja noduulit, joita muodostuu maaperässä, järvien sedimenteissä ja meren pohjalla. Tyynellä valtamerellä, syvän meren sedimenteissä, on arviolta  $10^{12}$  tonnia konkretioita, ja vuosittain niitä muodostuu  $6 \cdot 10^6$  tonnia. New Yorkissa, Oneidan järveen,  $20 \text{ km}^2$  alueelle sedimentin pohjalle on kerääntynyt  $10^6$  tonnia konkretioita, jotka ovat halkaisijaltaan keskimäärin 15 senttimetriä. Itämeressä Suomenlahdella arvioidaan konkretioiden määrän olevan 10 % meren pohjapinta-alasta. [18, s. 103; 19, s. 151–152.]

Useat mikrobiologisesti katalysoidut reaktiot osallistuvat konkretioiden muodostumiseen. Kuvassa 6 on esitetty rauta-mangaanisaostumien mahdollinen muodostuminen. Liuennut rauta ja mangaani rikastuvat syanobakteerimaiseen ja levämäiseen planktoniin. Biomassa ja metallit kuljetetaan sedimentin pohjalle ja upotetaan, missä anaerobinen respiraatio puolioksisessa kerroksessa vapauttaa metallit huokosveteen. Samanaikaisesti rauta ja mangaani pelkistyvät. Sedimentin ja veden rajapinnassa nouseva diffuusio helpottaa metallien mikrobiologista uudelleenhapettumista, jolloin metallit yhdistyvät ytimen muotoiseksi. Jatkuva mangaanin ja raudan lisääntyminen konkretion pintaan muodostaa kerroksia. Virtaus saattaa kuljettaa konkretioita anoksisille alueille,

jossa mangaani ja rauta uudelleen vapautuvat veteen pelkistymisen ja liukenemisen seurauksena. Osa pelkistyneistä metalleista kulkeutuu takaisin veden pinnalle, jolloin kiertokulku jatkuu. [19, s. 152.]



Kuva 6. Rauta-mangaanisaostumien muodostuminen [19, s. 152].

Konkretioiden saavutetaan mangaanin ja raudan meriveden kautta tai sedimentin välityksellä. Valtamerikonkretion kasvunopeus voi vaihdella 1 mm:stä 10 cm:iin miljoonassa vuodessa. Itämeressä kasvunopeus on paljon nopeampi, arviolta 0,03–0,06 mm vuodessa. Bakteerien määrän arvioidaan olevan  $10^7$  solua  $\text{mm}^3$ :ssä. Vielä ei tiedetä, kuinka iso rooli mikrobeilla on mineraalisatiossa, mutta tiedetään, että mangaania hapettava bakteeri, *Metallogenium sp.* pystyy laboratorio-olosuhteissa muodostamaan konkretion muutamassa kuukaudessa. [19, s. 152–153.]

#### 4.2 Mikrobisto

Konkretioiden tarjoavat hyvän kasvualustan mikrobeille. Ne tarjoavat paikan metallien pelkistämiseen ja hapettamiseen, tuovat turvaa ja ravinteita. Kokeissa on pystyttykin osoittamaan, että konkretioiden mikrobit osallistuvat aktiivisesti metallioksidien liukenemiseen ja muodostamiseen. Niiden mikrobiyhteisö on monipuolinen ja runsas. Populaation tiheys voi olla keskimäärin  $6,7 \cdot 10^7$  solua kuivapainogrammaa kohden. Ne koos-

tuvat pääosin tuntemattomista lajeista. Sekvenssit ovat lähellä sukua meren pohjasta ja sedimentistä löytyneille sekvensseille sekä rautaa hapettavalle biofilmille ja pilaantuneille alueille. Suurimman mikrobiryhmän muodostavat proteobakteerit. Konkretioista eristetyissä mikrobeissa, mangaanin hapetuskokeissa, löytyi bakteereita kuten *Sphingomonas*, *Pseudomonas* ja *Bacillus*. [18, s. 103.]

Vaikka konkretioiden mikrobiryhmä on runsas, erityisen mielenkiintoisia ovat niiden muodostumiseen ja liukenemiseen osallistuvat raudan ja mangaanin hapettajat ja pelkistäjät. Etenkin raudan pelkistäjät ovat kiinnostavia, koska niiden tiedetään käyttävän orgaanisia haitta-aineita energian ja hiilen lähteenään. Ne voivat olla tärkeitä haitallisten aineiden hajottajia pinnan alaisissa olosuhteissa kuten meren pohjalla ja sedimenteissä. [19, s. 72.]

*Shewanella putrefaciens* ja *Geobacter metalloreducens* olivat ensimmäisiä organismeja, joiden raportoitiin elävän anaerobisesti pelkistämällä raudan tai mangaanin oksideja. Myös *Pseudomonas*- ja *Bacillus*-lajin tiedetään pystyvän pelkistämään mangaania. Osa näistä on fakultatiivisia anaerobeja. Hapen läsnä ollessa ne käyttävät happea elektronin vastaanottajana, kun taas osa vaihtaa mangaanin tai raudan pelkistämiseen, kun se on mahdollista. Monet voivat myös hyödyntää useita elektronin vastaanottajia. Lisäksi *G. metalloreducens* -bakteerin tiedetään pystyvän käyttämään butyraattia, propionaattia, laktaattia, sukkiinaattia ja asetaattia hiilen lähteenä. [19, s. 68–69.]

Raudan ja mangaanin oksideja pelkistävät bakteerit eivät voi kuljettaa mineraalioksideja plasmamembraanin läpi elektroninsiirtoketjuun. Siksi metallia pelkistävä bakteerin tulee kiinnittyä mineraalien pinnalle. Tämän jälkeen elektronit kuljetetaan sytoplasmasolun ulkomembraanille, missä sytokromi c kuljettaa elektronit mineraalin pinnalle. [19, s. 69.]

Ainakin kolmen bakteerisuvun tiedetään pystyvän käyttämään energianlähteenään raudan hapetusta. Näitä ovat *Gallionella*, *Leptothrix* ja *Marinobacter*. *Thiobacillus ferrooxidans* on tunnetuin raudanhapettajabakteeri. Se kasvaa autotrofisesti ja käyttää ferroutrautaa tai rikkiyhdisteitä elektronin vastaanottajana. Aerobinen raudan hapetus tuottaa vain vähän energiaa, joten bakteereiden on hapetettava suuria määriä rautaa kasvaakseen. Ferrorauta hapettuu nopeasti neutraalissa pH:ssa, mutta ei alhaisessa pH:ssa. Siksi useimmat raudan hapettajat ovat ehdottomasti asidofiileja eli ne viihtyvät happa-

massa ympäristössä. *T. ferrooxidans* käyttää hyväkseen hapanta ympäristöä. Koska ympäristön pH on paljon alhaisempi kuin solunsisäinen pH, saa se aikaan luonnollisen protonigradientin, jota voidaan käyttää hyväksi ATP:n tuotannossa. Raudan hapettuminen kuluttaa protoneja ja nostaa pH:ta. [20, s. 282, 284; 21, s. 753.]

Osa bakteereista pystyy hapettamaan mangaania. Monet mangaanin hapettajat käyttävät sopivaa ligandia, joka helpottaa hapetusprosessia tai auttaa Mn(IV) oksideja kertymään solun pintaan. Toisessa prosessissa taas Mn(II) ja MnO<sub>2</sub> pari muodostavat korkean elektrodipotentiaalin, jolloin Mn(II) elektronit kuljetetaan periplasmaan ja sieltä elektronin siirtoketjuun sytokromi c:lle. Siellä elektronit pelkistävät hapen plasmamembraanin sisäpinnalla. Vaikka sytokromi c:n elektrodipotentiaali on negatiivisempi kuin Mn(II)/MnO<sub>2</sub> parin, korkea oksidaasin aktiivisuus pitää sytokromi c:n melkein kokonaan hapettuneena, mikä tekee sytokromin elektrodipotentiaalin positiivisemmaksi. [19, s. 90.]

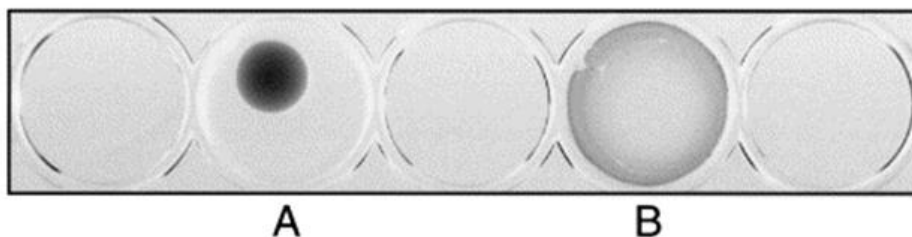
Mangaanin hapettajiin, kuten myös pelkistäjiin, kuuluu gram-positiivisia ja gram-negatiivia bakteereja. Ne voivat olla kokkeja, sauvoja, vibrioita tai spirillejä ja osa niistä muodostaa itiöitä. Mangaanin hapetus ja pelkistys voi olla entsyymattista tai entsyymit eivät osallistu reaktioon. Vaikka joukko bakteereja pystyy hapettamaan mangaania, vain harva pystyy muuntamaan sen energiaksi. Näitä lajeja ovat *Pseudomonas* ja *Bacillus*. [22, s. 391–394, 351; 19, s. 90.]

## 5 Öljyn biohajoamisen tutkimusmenetelmiä

Öljyn biohajoamista voidaan tutkia erilaisilla molekyylibiologisilla ja kemiallisilla menetelmillä. Biohajoamisen osoittavia tekijöitä on monia ja niitä voidaan seurata lukuisilla menetelmillä. Öljyn biohajoamisesta voi kertoa muun muassa muutokset hajottajamikrobien lukumäärässä ja toiminnassa tai geenien aktiivisuudessa. Öljyn hajoamisesta voidaan saada tietoa myös seuraamalla hajoamistuotteita tai haitta-aineiden pitoisuuksien muutoksia. Tärkeää kuitenkin on, että biohajoamista seurataan useilla eri menetelmillä, jotta siitä saadaan luotettavaa tietoa.

Kvantitatiivisella reaaliaikaisella PCR-menetelmällä (qPCR) voidaan seurata geenien kopioluvun määrää. qPCR:ssä voidaan monistaa näytteestä tiettyä geeniä ja mitata monistuvan tuotteen määrää. Tämä onnistuu fluoresoivan merkkiaineen avulla. Näytteen fluoresenssi mitataan, jolloin syntyvän tuotteen määrää voidaan seurata koko reaktion ajan. Reaktiossa seurataan logaritmista vaihetta, jolloin fluoresenssin määrä kasvaa lineaarisessa suhteessa tuotteen määrään. Jos geenien, kuten PAH-hajotusgeenin lukumäärissä tapahtuu muutoksia, se voi kertoa öljynhajotuksesta.

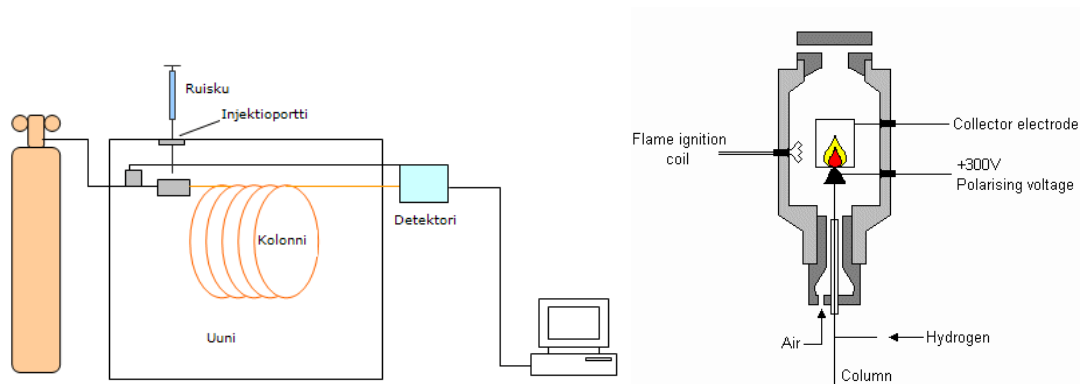
Pinta-aktiivisten aineiden läsnäolo voi myös kertoa öljyn hajotuksesta. Näitä aineita tuottavat mikro-organismit voidaan määrittää esimerkiksi drop-collapse-menetelmällä. Menetelmässä pisara solususpensiota tiputetaan öljyllä valellulle pinnalle. Jos pisara sisältää pinta-aktiivisia aineita, se hajoaa, kun taas pisara, joka ei sisällä niitä säilyy ehjänä. Pinta-aktiiviset aineet lisäävät öljyn ja veden välistä rajapintaa. Tämä saa pisaran leviämään. Jos pinta-aktiivisuus puuttuu, näyte pysyy pisarana, koska öljyn pinta on hydrofobinen (vesipakoinen). Polaariset vesimolekyylit hylkivät hydrofobista pintaa. Kuvassa 7 on esitetty drop-collapse-menetelmä. Näyte A ei sisällä pinta-aktiivisia aineita, ja se muodostaa pisaran öljyn pinnalle. Näyte B taas sisältää, jolloin pisara on levinnyt. [23, s. 851–853.]



Kuva 7. Drop-collapse-menetelmä [24].



Kun halutaan tietoa öljy-yhdisteiden pitoisuuksissa tapahtuvista muutoksista, voidaan öljyn hiilivedyt määrittää GC-FID-menetelmällä. Lyhenne tulee englanninkielen sanoista gas chromatography ja flame ionization detector. Ne tarkoittavat suomeksi kaasukromatografiaa ja liekki-ionisaatiotektoriä (kuva 8). Kaasukromatografia sopii höyrystyvien yhdisteiden tutkimiseen. Sillä voidaan erottaa, ja tunnistaa haihtuvia yhdisteitä ja se soveltuu kvantitatiiviseen määrittämiseen. Sen liekki-ionisaatiotektori havaitsee kaikki yhdisteet, jotka ionisoituvat vety-ilmaliekissä. Yhdisteet palavat hapettavassa liekissä, ja syntyy elektroneja sekä ioneja. Ne johdetaan sähkökentässä kollektorielektrodille, jolloin muodostunut sähkövirta voidaan mitata. Tällä kemiallisella menetelmällä on helppo seurata öljy-yhdisteiden määrää. [25, s. 183, 193.]



Kuva 8. Kaasukromatografialaitteisto ja liekki-ionisaatiotektori [26; 27].

Öljyn biohajoamisen seurauksena syntyvät tuotteet, kuten metabolian sivutuotteet, voi osaltaan kertoa öljyn hajoamisesta. Näitä tuotteita on lukuisia erilaisia. Voidaan muun muassa seurata hiilidioksidin tai metaanin tuottoa. Lisäksi voidaan mitata kahdenarvoisen raudan tai mangaanin määrää, mikä voi kertoa öljy-yhdisteiden anaerobisesta hajouksesta. Kahdenarvoinen rauta voidaan esimerkiksi määrittää spektrofotometrisesti. Menetelmässä ferrotsiini [FZ,3-(2-pyridyyli)-5,6-bis(4-fenyyliisulfonihappo natriumsuola)] ja kahdenarvoinen rauta reagoivat yhdessä, jolloin muodostuu purppuranpunainen värireaktio. Tämän absorbanssi voidaan mitata aallonpituudella 562 nm. [28, s. 1.]

## 6 Aineistot ja menetelmät

### 6.1 Koeasetelma ja näytteenotto

Laboratorioon koottiin koeasetelma, jossa teflonkorkillisiin lasipulloihin punnittiin noin 10 g konkretioita, jotka käsiteltiin noin 10 mg:lla raakaöljyä. Pulloihin lisättiin keinote-koista murtovettä 10 ml niin, että konkretiot melkein peittyivät. Inkubaatio toteutettiin hapellisissa ja hapettomissa olosuhteissa pimeässä ja 10 °C:ssa. Hapettomat olosuhteet luotiin kaasuttamalla pulloja typpellä viiden minuutin ajan. Hapellisia pulloja ilmas- tettiin pumpulla viikon välein. Pullot olivat tasoravistelijassa, jonka nopeus oli noin 70 rpm.

Koe luotiin 19 viikoksi ja se sisältää 8 sarjaa. Opinnäytetyössä ehdittiin analysoida 6 sarjaa. Koeasetelma on esitetty liitteessä 1. Pulloja oli yhteensä 52, joista hapellisia pulloja oli 24, hapettomia 12 ja negatiivisia 16. Jokaisessa sarjassa oli kolme rinnak- kaista näytettä hapellisissa olosuhteissa. Lisäksi negatiivisena kontrollina toimi autokla- voidut konkretiot (KC=killed control), ja näyte, johon konkretioita ei lisätty ollenkaan, vaan se sisälsi pelkän veden ja öljyn. Neljä sarjaa sisälsi hapettomissa olosuhteissa olevat kolme rinnakkaista näytettä.

Koeyksiköt purettiin säännöllisesti näytteenottoa varten aluksi kahden viikon välein. Seitsemän viikon jälkeen näytteenotto suoritettiin kuukauden välein. Näytteet otettiin liukoisten metallien, mangaanin ja raudan, sekä pinta-aktiivisten aineiden ja öljyn mää- ritystä varten. Totaali-DNA kerättiin talteen PAH-hajotusgeenin mittausta varten.

### 6.2 Analyysimenetelmät

Konkretioista eristettiin totaali-DNA FastDNA Spin Kit for soil -reagenssarjan (MP Bio- medicals) avulla ja käyttämällä FastPrep Instrument -laitetta. DNA-pitoisuus mitattiin Qaunt-iT Hs assay Kit ja Qubit fluorometrin (Invitrogen) avulla.

### 6.2.1 Kvantitatiivinen PCR

Näytteistä määritettiin gram-positiivisten ja gram-negatiivisten bakteerien PAH-hajotusgeenin (PAH-RHD<sub>o</sub>) kopioluvut kvantitatiivisen PCR-menetelmän avulla. Monistaminen suoritettiin taulukossa 1 esitettyjen alukkeiden (Thermo Fisher Scientific) avulla.

Taulukko 1. qPCR-reaktiossa käytettyjen alukkeiden kohdegeenit ja sekvenssit [29].

Aluke	Kohdegeeni	Sekvenssi
PAH-RHD <sub>o</sub> GN F	Gram-negatiivinen PAH-RHD <sub>o</sub>	5'-GAG ATG CAT ACC ACG TKG GTT GGA-3'
PAH-RHD <sub>o</sub> GN R	Gram-negatiivinen PAH-RHD <sub>o</sub>	5'-AGC TGT TGT TCG GGA AGA YWG TGC MGT T-3'
PAH-RHD <sub>o</sub> GP F	Gram-positiivinen PAH-RHD <sub>o</sub>	5'-CGG CGC CGA CAA YTT YGT NGG-3'
PAH-RHD <sub>o</sub> GP R	Gram-positiivinen PAH-RHD <sub>o</sub>	5'-GGG GAA CAC GGT GCC RTG DAT RAA-3'

qPCR-reaktio sisälsi taulukossa 2 esitetyt reagenssit. Reaktiossa käytettiin Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) -reagenssia (Thermo Fisher Scientific). Se sisälsi kaikki reaktioon tarvittavat aineet lukuun ottamatta alukkeita ja näytettä. qPCR-reaktiosta tehtiin sopiva seos, jota pipetoitiin 96-kuoppalevyille 15 µl. Templaatin määrä oli 10 µl, ja se oli laimennettu 1:10. Reaktion kokonaistilavuus oli 25 µl. Negatiivisena kontrollina käytettiin steriiliä vettä. Standardeina oli 10<sup>6</sup>-10<sup>0</sup> ja 3·10<sup>-1</sup> geenikopiota kohdegeeniä.

Taulukko 2. qPCR-reaktioseos.

Reagenssi	Konsentraatio	V(µl) 1x
Maxima 2x	1x	12,5
PAH-RHD <sub>o</sub> GN/GP F	0,4 µM	1
PAH-RHD <sub>o</sub> GN/GP R	0,4 µM	1
Steriili vesi	→15 µl:aan	0,5

Ennen ajoa varmistettiin, että kaikki reagenssit olivat kuopassa käyttämällä 96-kuoppalevy tasoravistelijassa nopeuden ollessa 2000 rpm. DNA:n monistaminen suoritettiin 7300 Real-Time PCR System -laitteella (Applied Biosystem). Gram-positiivisille ja gram-negatiivisille bakteereille oli omat ajo-ohjelmat. Ajo-ohjelma on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. qPCR-ajo-ohjelma gram-positiivisille ja gram-negatiivisille bakteereille.

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika
1. Alkudenaturaatio	95	10 min
2. Denaturaatio	95	15 s
3. Sitoutuminen GN/GP	57/54	30 s
4. Pidentyminen	72	30 s
5. Sulamispiste GN/GP	83/86	27 s
6. Vaiheet 2–5 toistetaan 42 kertaa		

qPCR-tuotteet tarkistettiin agarosigeelielektroforeesilla, koska sulamiskäyräanalyysissä näkyi useampi monistunut tuote. Ajo suoritettiin 1,5 % agarosigeelillä ja 0,5 x TBE puskurilla. Standardina käytettiin Generuler 100 bp DNA ladder:a ja latauspuskurina 6 x DNA Loading Dye:ta (Fermentas). Standardia pipetoitiin 2 µl ja näytteitä 5 µl. Värjäys suoritettiin 10 000 x SYBR Safe DNA Gel Stain -värin avulla.

#### 6.2.2 Drop-collapse-menetelmä

Drop-collapse-menetelmää varten 96-mikrokuoppalevyn kansi (polystyreeni, 12,7 x 8,5 cm, Thermo Scientific) huuhdeltiin kuumalla vedellä, 70 % EtOH:illa ja tislattulla vedellä. Kannen annettiin kuivua, minkä jälkeen jokainen kaivo (Ø 8 mm) käsiteltiin 2 µl:lla raakaöljyä. Öljyn annettiin kuivua 24 tuntia. Näytettä pipetoitiin 5 µl kaivon keskelle 45 asteen kulmassa. Negatiivisena kontrollina oli milliQ-vesi, ja positiivisena kontrollina oli 20 %:nen SDS-liuos (natriumdodekyylisulfaatti) sekä laimennettu nestesaippua, joka sisälsi natriumdodekyylisulfaattia. Tulokset luettiin 1 minuutin kuluttua.

#### 6.2.3 Kahdenarvoisen raudan, kokonaisraudan ja -mangaanin määrittäminen

Näytteistä määritettiin kahdenarvoisen raudan pitoisuus. Nestemäistä näytettä otettiin noin 100 µl koeputkeen, jossa oli 3 ml 0,5 g/l ferrotsiinin käyttöliuosta [FZ,3-(2-pyridiyyli)-5,6-bis(4-fenyylisulfonihappo natriumsuola)].  $Fe^{2+}$ -absorbanssi mitattiin Hitachi U-2000 -spektrofometrillä aallonpituudella 562 nm.

Kokonaisraudan ja -mangaanin määrä analysoitiin ICP-OES-menetelmällä (inductively coupled plasma - optical emission spectrometer) näyttemäärän ollessa 200 µl. Mittaukset suoritti Suomen ympäristökeskuksen kemisti.

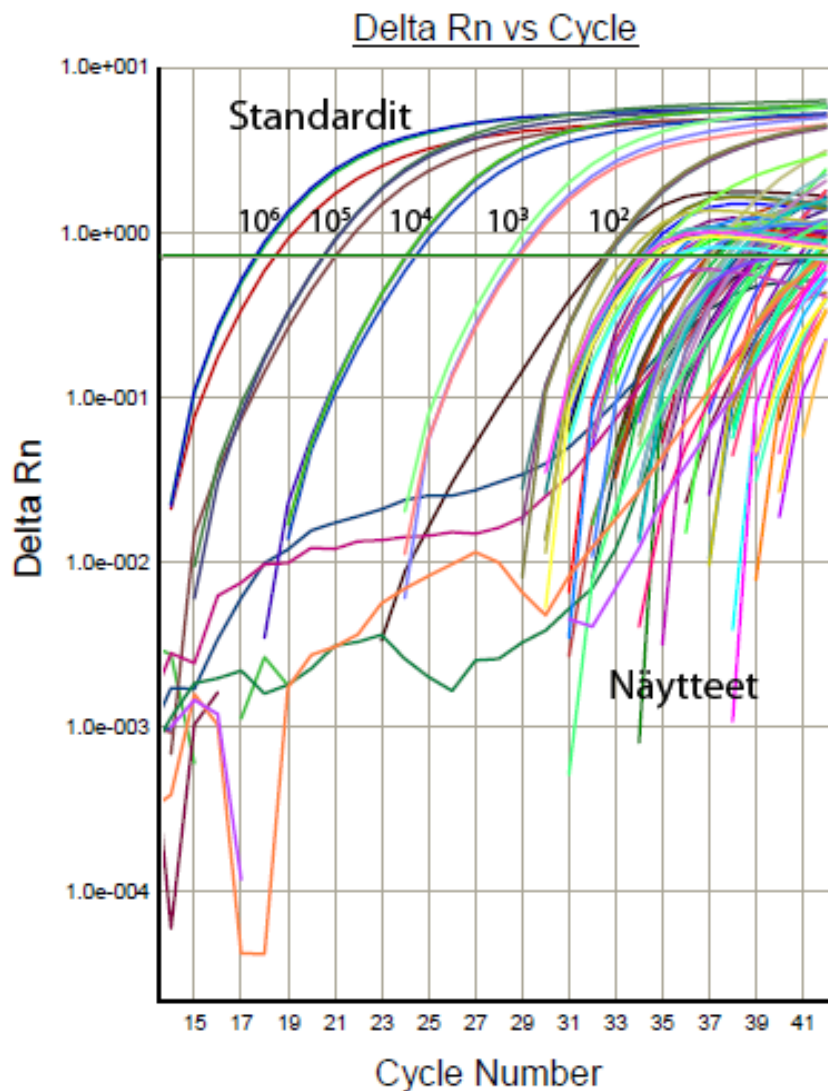
#### 6.2.4 Öljyn hiilivetyjen määrittäminen GC-FID-menetelmällä

Öljyn hiilivedyt ( $C_{10}$ – $C_{40}$ ) määritettiin vedestä käyttämällä neste-nesteuuttoa ja analysoimalla kaasukromatografisesti liekki-ionisaatiotektorilla. Vesinäyte uutettiin heksaanilla puolen tunnin ajan magneettisekoituksessa. Orgaaninen faasi otettiin talteen, ja siitä poistettiin vesi natriumsulfaatilla. Näyte analysoitiin GC-FID:llä määrittämällä kiehumispistealueella 175–525 °C olevien hiilivetyjen ( $C_{10}$ – $C_{40}$ ) kokonaispinta-ala standardien avulla. Mittauksen suoritti Suomen ympäristökeskuksen laboratoriomestari.

## 7 Tulokset

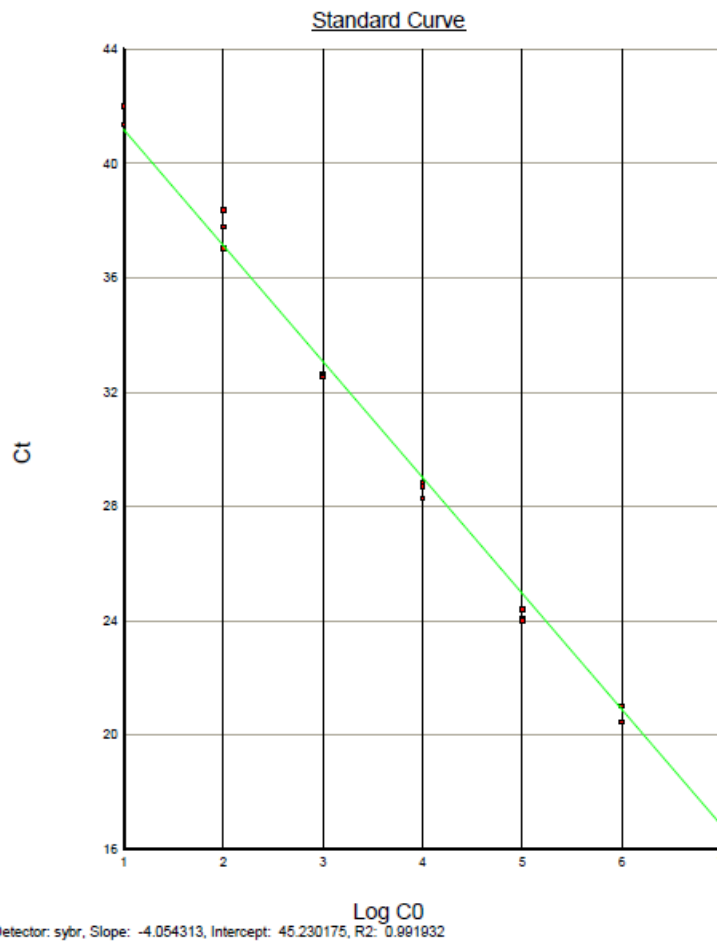
### 7.1 Kvantitatiivinen PCR

Kvantitatiivisella PCR-menetelmällä tutkittiin gram-positiivisten ja gram-negatiivisten bakteerien PAH-hajotusgeenin kopioluvun määrää. Monistuminen tarkistettiin amplifikaatiokäyrästä. Kuvassa 9 on esimerkki standardien ja gram-positiivisten bakteerien amplifikaatiokäyristä. Näytteet monistuivat PCR-syklin 30 jälkeen.



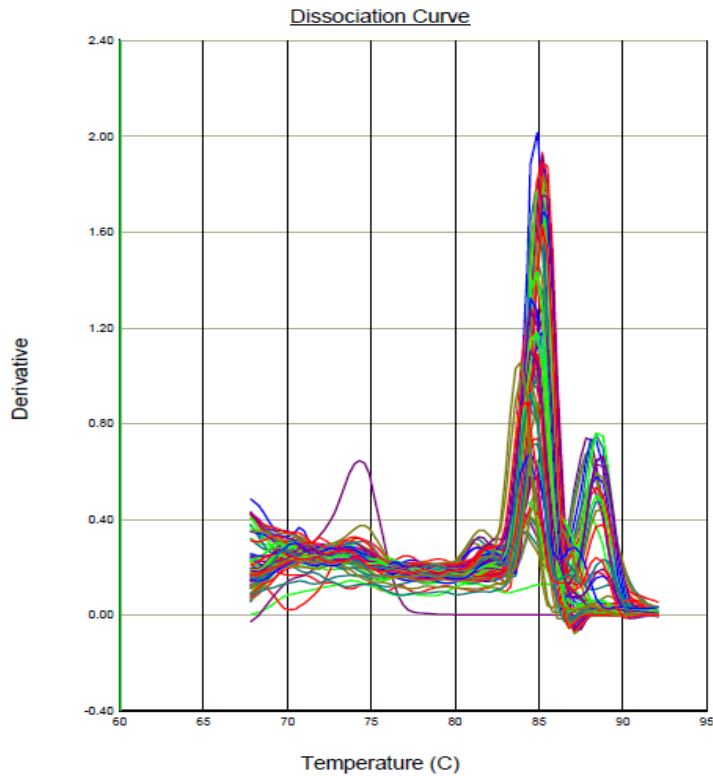
Kuva 9. Gram-positiivisten bakteerien monistuminen sarjoissa 2–5. Vasemmassa reunassa näkyy standardien ja oikealla näytteiden amplifikaatiokäyrät. Standardeina käytettiin  $10^6$ – $10^0$  ja  $3 \cdot 10^{-1}$  geenikopiota kohdegeeniä. Selkeyden vuoksi pienimpiä standardeita ei merkitty kuvaan. Näytteet monistuivat pienempien standardien mukaan.

Standardireaktioiden avulla saatiin standardikuvaaja (kuva 10). Vakioreaktiot onnistuivat jokaisessa ajossa hyvin. Esimerkiksi sarjojen 2–5 gram-positiivisten bakteerien suoran korrelaatiokerroin oli 0,9919 ja kulmakerroin -4,054.



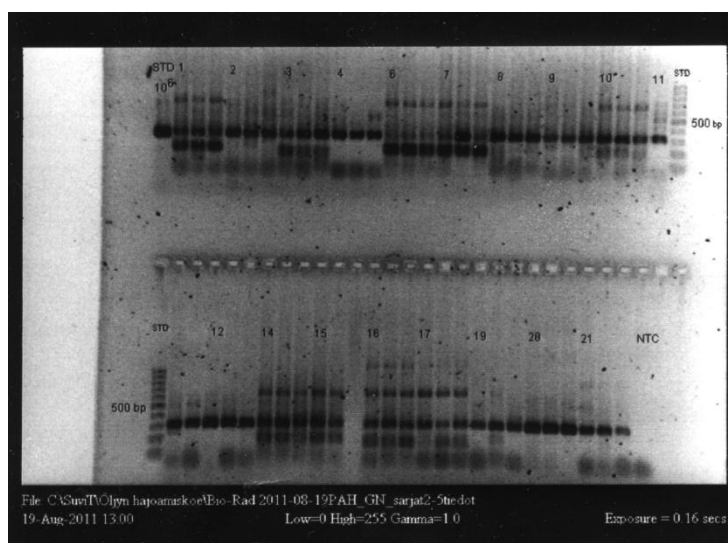
Kuva 10. Sarjojen 2–5 gram-positiivisten bakteerien standardikuvaaja.

Standardireaktioiden ja -kuvaajan avulla voitiin määrittää näytteiden geenikopioluvut. Ensimmäisen sarjan jälkeen sarjoissa 2–6 oli epäspesifistä monistumista sekä gram-positiivisten että gram-negatiivisten bakteerien joukossa. Tämä todettiin sulamiskäyrä-analyysin ja agarosigeelielektroforeesiajon perusteella. Näiden analyysien perusteella valittiin oikean tuotteen omaavat näytteet, joille laskettiin geenikopioluvut. Näytteet, joissa oli monistunut useampi tuote, hylättiin. Joillakin mittauskerroilla kokeen jokaisessa rinnakkaisessa oli epäspesifistä monistumista, jolloin koko mittauspiste hylättiin. Kuvassa 11 on esitetty gram-negatiivisten bakteerien sulamiskäyräanalyysin tulos sarjassa 6. Kuvasta käy ilmi, että toinenkin tuote monistui.



Kuva 11. Gram-negatiivisten bakteerien sulamiskäyräanalyysi sarjassa 6. Oikean tuotteen sulamislämpötila on 85 °C:ssa. Epäspesifinen tuote näkyy noin 87 °C:ssa.

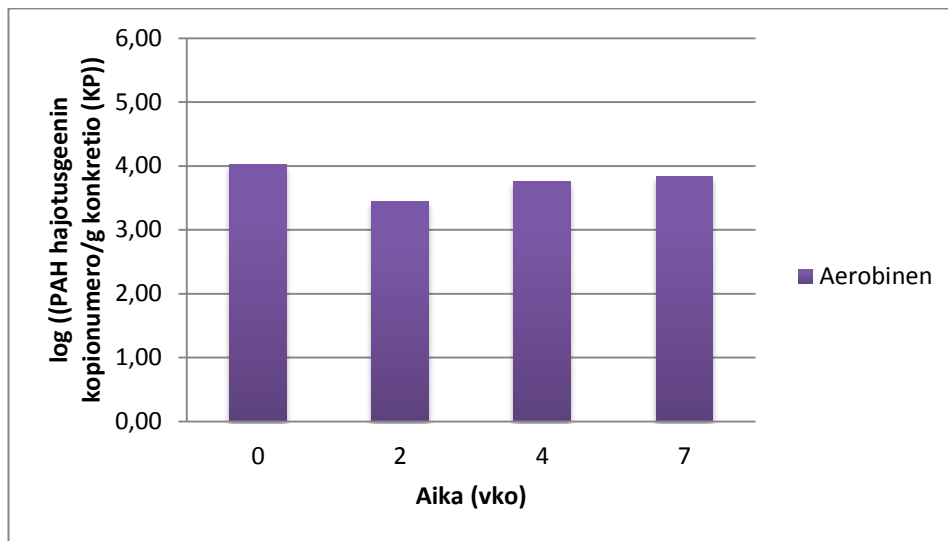
Myös agarosigeelielektroforeesilla tehty analyysi kertoi epäspesifisestä monistumisesta (kuva 12). Oikean tuotteen koko on noin 300 bp. Kuvassa näkyy kuitenkin, että qPCR-reaktiossa on monistunut tuote, jonka koko noin 200 bp. Myös yli 500 bp kokoinen tuote on nähtävissä.



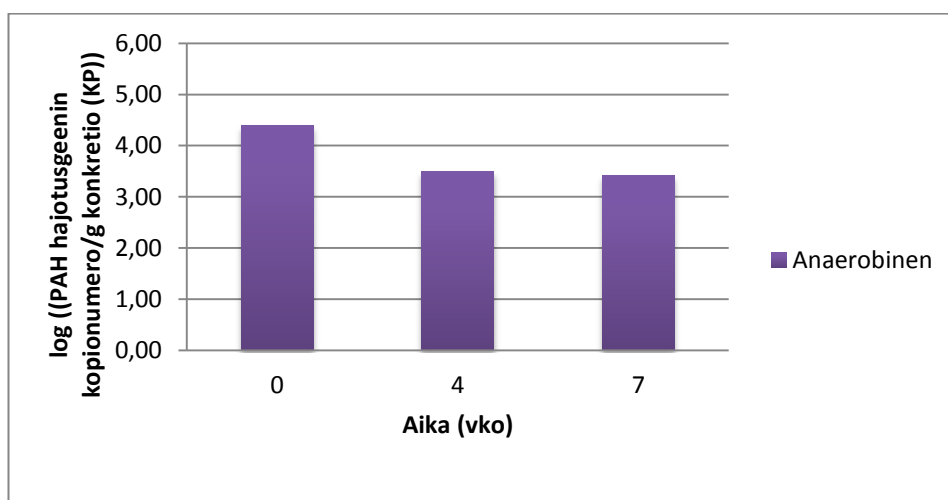
Kuva 12. Sarjojen 2–5 gram-negatiivisten bakteerien agarosigeelielektroforeesi-ajon geelikuva.



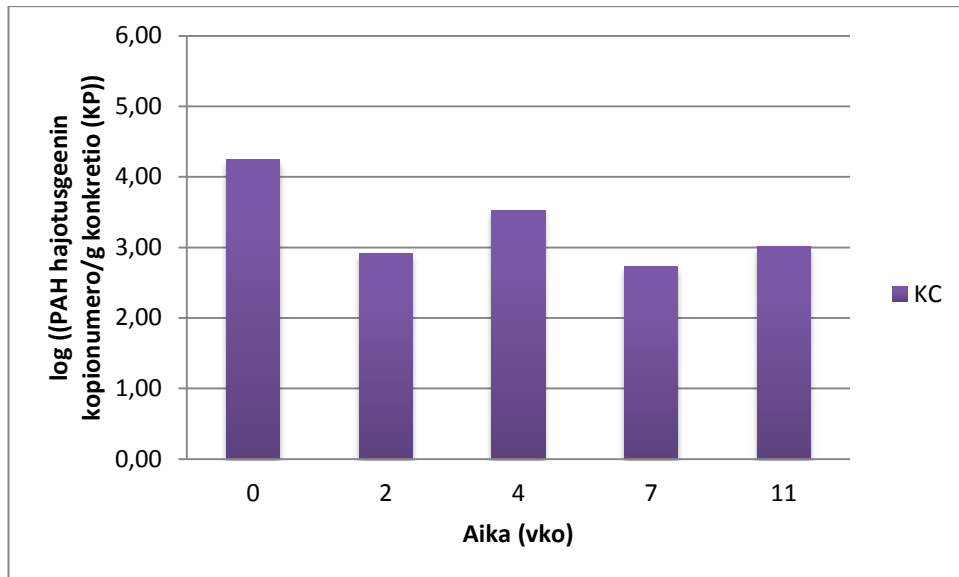
Oikean tuotteen omaaville näytteille laskettiin geenikopioluvut. Sekä aerobisissa että anaerobisissa olosuhteissa olevien näytteiden geenikopioluvut määritettiin. Autoklavoidut konkretioidut (KC) toimivat negatiivisena kontrollina. Onnistuneista rinnakkaisista näytteistä laskettiin keskiarvo ja niistä otettiin logaritmi. Geenikopioluvut laskettiin konkretion kuivapainoa kohden. Kuviissa 13–15 on esitetty gram-negatiivisten bakteerien ja negatiivisen kontrollin PAH-hajotusgeenin kopionumerot. Näytteiden geenikopioluku ei muuttunut huomattavasti ajan suhteen eikä poikennut negatiivista kontrollista. Määrä oli noin log 4 geenikopiota grammassa konkretion kuivapainoa kohden koko kokeen ajan.



Kuva 13. Gram-negatiivisten bakteerien PAH-hajotusgeenin kopionumerot ajan suhteen aerobisissa olosuhteissa.

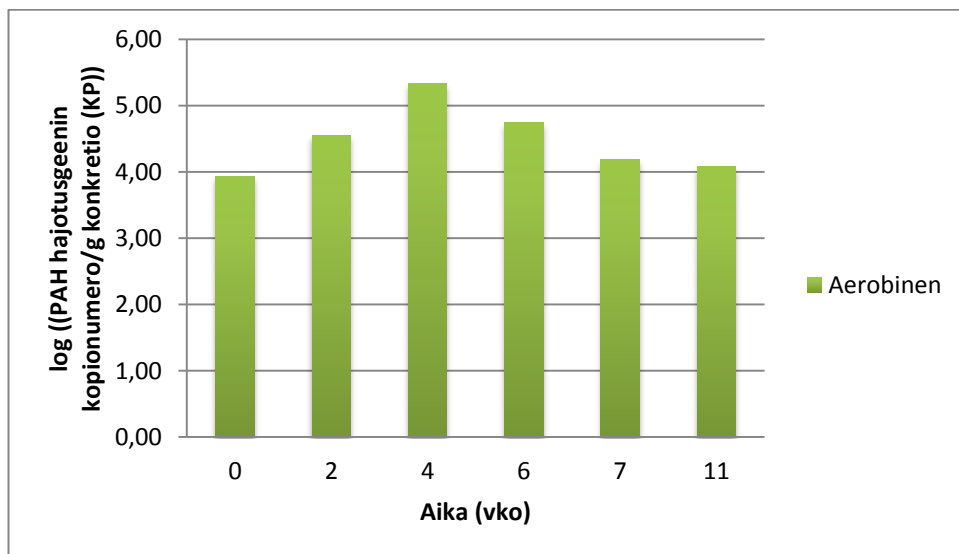


Kuva 14. Gram-negatiivisten bakteerien PAH-hajotusgeenin kopionumerot ajan suhteen anaerobisissa olosuhteissa.



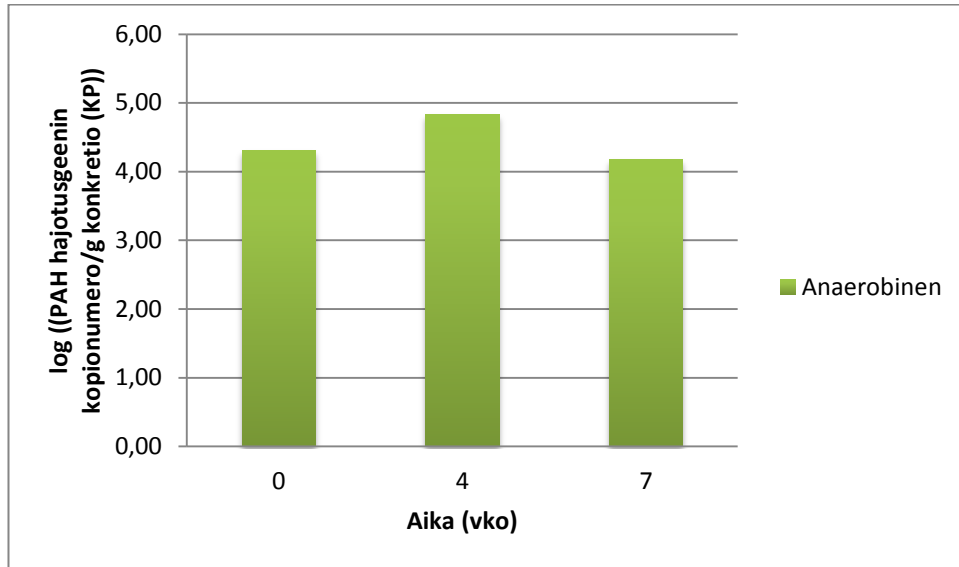
Kuva 15. Negatiivisen kontrollin PAH-hajotusgeenin kopionumerot ajan suhteen.

Gram-positiivisten bakteerien PAH-hajotusgeenin kopioluku oli samaa luokkaa kuin gram-negatiivisilla bakteereilla. Aerobisissa olosuhteissa oli kuitenkin havaittavissa geenin kopiomäärän nousu viikolla 4. Tällöin määrä oli yli log 5 geenikopiota grammassa konkretion kuivapainoa kohden (kuva 16).

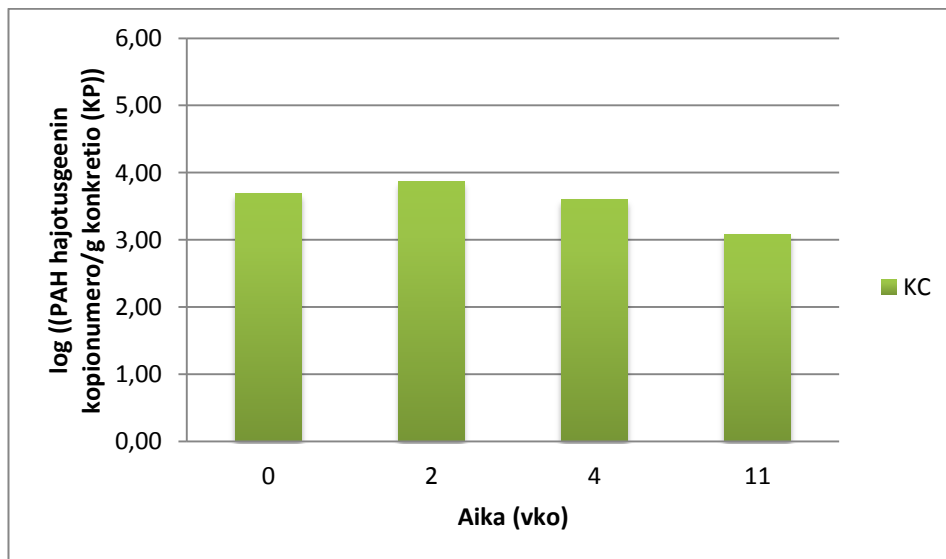


Kuva 16. Gram-positiivisten bakteerien PAH-hajotusgeenin kopionumerot ajan suhteen aerobisissa olosuhteissa.

Anaerobisissa olosuhteissa tai negatiivisessa kontrollissa ei tapahtunut suuria muutoksia geenien kopioluvuissa (kuvat 17 ja 18).



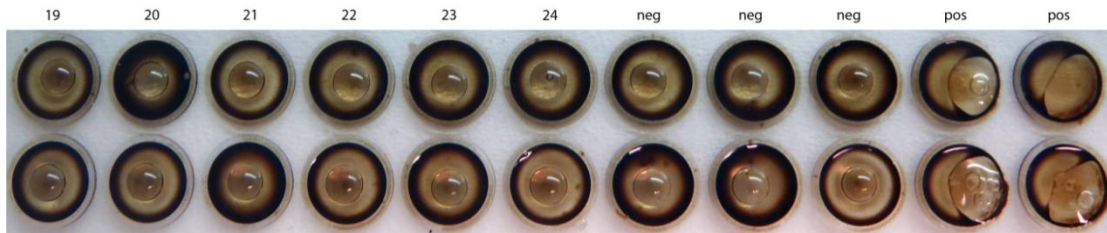
Kuva 17. Gram-positiivisten bakteerien PAH-hajotusgeenin kopionumerot ajan suhteen anaerobisissa olosuhteista.



Kuva 18. Negatiivisen kontrollin PAH-hajotusgeenin kopionumerot ajan suhteen.

## 7.2 Drop-collapse-menetelmä

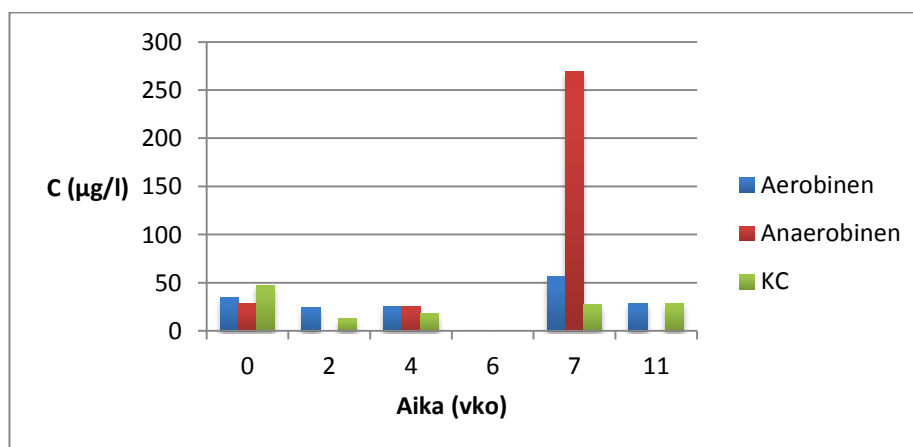
Pinta-aktiivisten aineiden läsnäolo analysoitiin drop-collapse-menetelmällä. Sarjoista 1–6 otetut nestemäiset näytteet säilyivät pisaranmuotoisena, kun taas positiivisten kontrollien pisara levisi. Näin ollen kaikki kokeen näytteet olivat negatiivisia. Yhdessä sarjassa ei havaittu pinta-aktiivisia aineita. Kuvassa 19 on esitetty sarjan 5 tulokset.



Kuva 19. Sarjan 5 tulokset. Kokeesta suoritettiin rinnakkaiset analyysit. Näytteet 19–21 ovat hapellisista ja 22–24 hapettomista näytteistä. Negatiivisina kontrolleina toimivat killed control (KC), vesi-öljy-kontrolli ja pelkkä vesi. Positiivisina kontrolleina ovat 20 %:nen SDS- ja saippua-liuos.

## 7.3 Kahdenarvoisen raudan määrittäminen

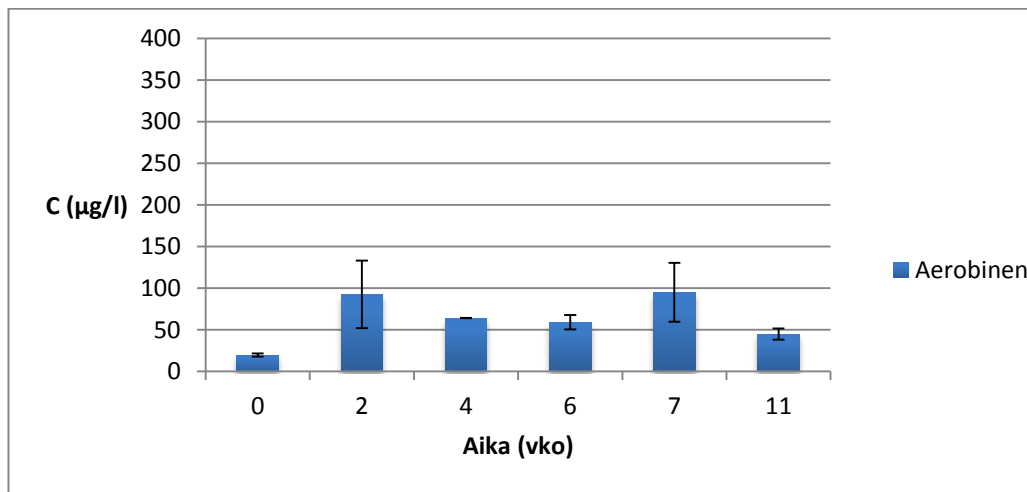
Näytteiden  $\text{Fe}^{2+}$ -pitoisuus mitattiin spektrofotometrisellä menetelmällä. Näytteistä laskettiin keskiarvo ja piirrettiin kuvaaja (kuva 20). Aerobisissa olosuhteissa ja negatiivisessä kontrollissa ei tapahtunut muutoksia. Anaerobisissa olosuhteissa kahdenarvoisen raudan määrä nousi viikolla 7. Merkittävä nousu havaittiin vain yhdessä näytteessä, ja sen pitoisuus oli  $757 \mu\text{g/l}$ . Otettaessa huomioon myös rinnakkaiset näytteet ( $12 \mu\text{g/l}$  ja  $39 \mu\text{g/l}$ ) keskiarvoksi saatiin  $269 \mu\text{g/l}$ .



Kuva 20.  $\text{Fe}^{2+}$ -pitoisuudet ajan suhteen. Pitoisuudet on laskettu kolmen rinnakkaisen näytteen keskiarvoista. Negatiivisessä kontrollissa ei ollut rinnakkaisia.

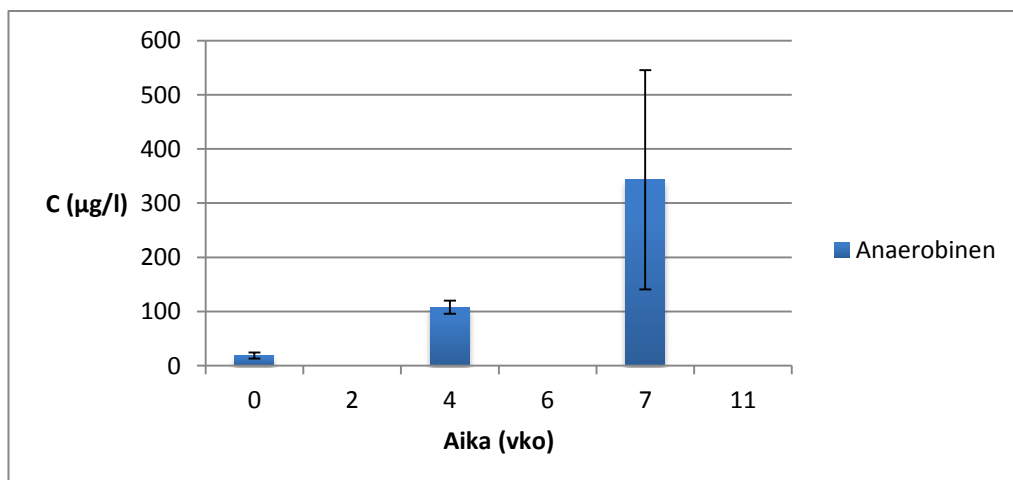
#### 7.4 Kokonaisraudan ja -mangaanin määrittäminen

Kokonaisraudan ja -mangaanin pitoisuudet määritettiin ICP-OES-menetelmällä. Rinnakkaisten näytteiden pitoisuudet vaihtelivat huomattavasti. Monissa näytepisteissä vain yhdessä rinnakkaisessa näytteessä oli merkittävä pitoisuuden nousu. Kolmelle rinnakkaiselle näytteelle laskettiin keskiarvo ja piirrettiin kuvaaja. Virhepalkit piirrettiin kuvaamaan rinnakkaisten näytteiden hajontaa. Kokonaisraudan määrä aerobisissa olosuhteissa ei muuttunut huomattavasti kokeen aikana. Enimmillään se oli 95 µg/l (kuva 21).



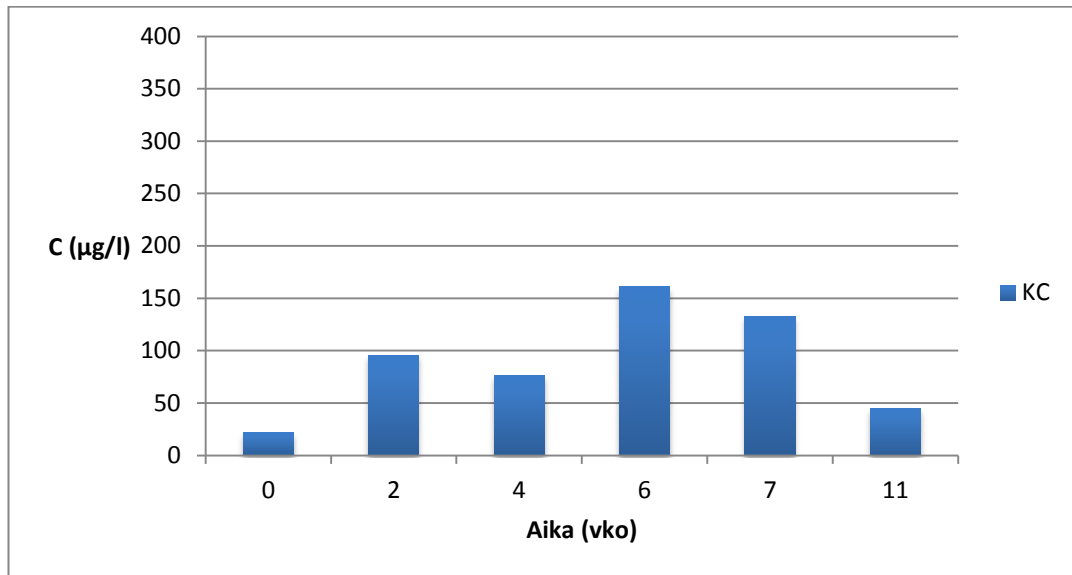
Kuva 21. Kokonaisraudan pitoisuus ajan suhteen aerobisissa olosuhteissa.

Anaerobisissa näytteissä kokonaisraudan pitoisuus nousi viikolla 7. Tällöin pitoisuus oli 343 µg/l (kuva 22).



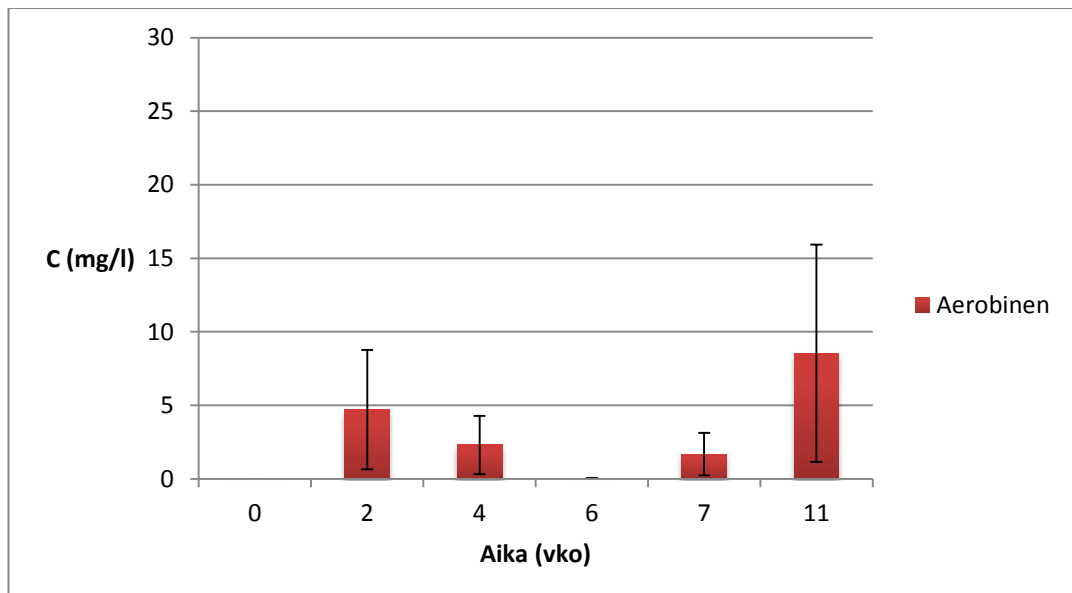
Kuva 22. Kokonaisraudan pitoisuus ajan suhteen anaerobisissa olosuhteissa.

Negatiivisessa kontrollissa raudan määrä pysyi melko samansuuruisena koko kokeen ajan. Pientä hajontaa oli havaittavissa. Määrityksessä ei ollut rinnakkaisia näytteitä. Pitoisuus oli enimmillään 161 µg/l (kuva 23).



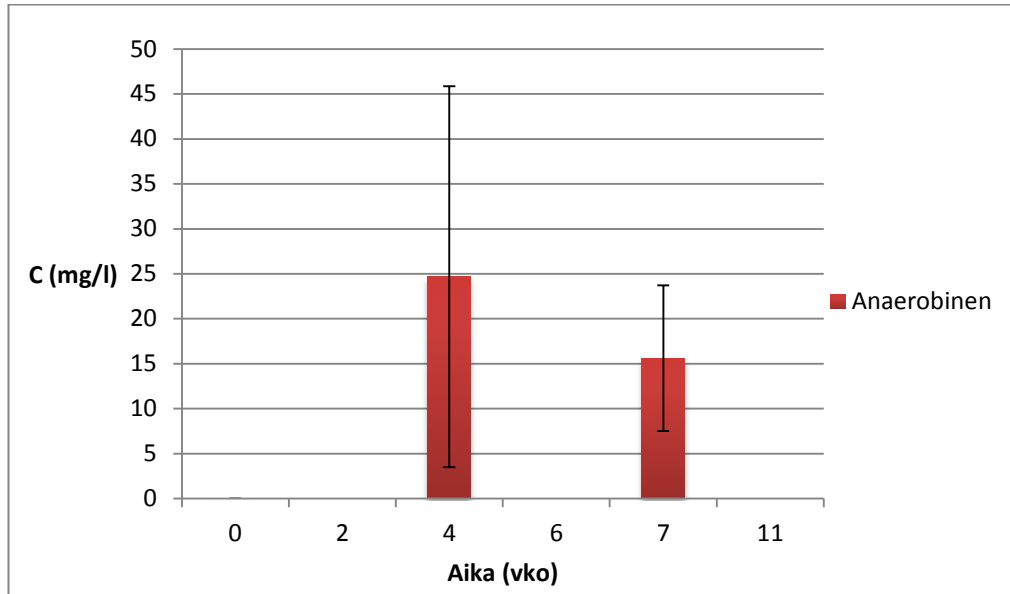
Kuva 23. Kokonaisraudan pitoisuus ajan suhteen negatiivisessa kontrollissa.

Kokonaismangaanin määrät olivat raudan määriä korkeimpia. Aerobisissa näytteissä pitoisuus oli enimmillään 9 mg/l (kuva 24).



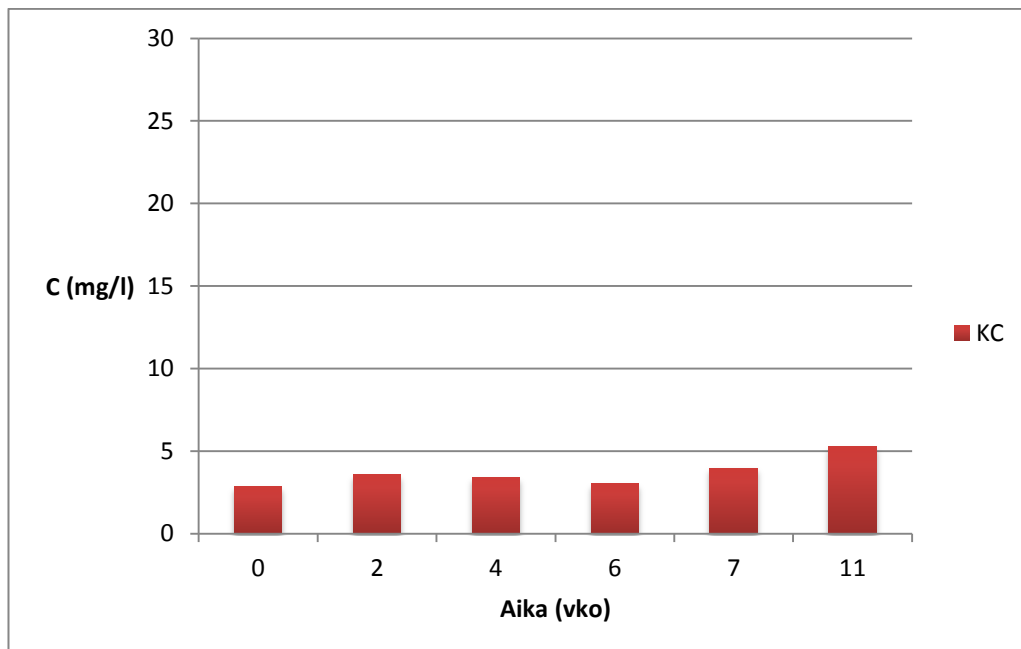
Kuva 24. Kokonaismangaanin pitoisuus ajan suhteen aerobisissa oloissa.

Anaerobisissa oloissa mangaanin pitoisuus nousi viikolla 4. Pitoisuus oli silloin 25 mg/l (kuva 25).



Kuva 25. Kokonaismangaanin pitoisuus anaerobisissa olosuhteissa.

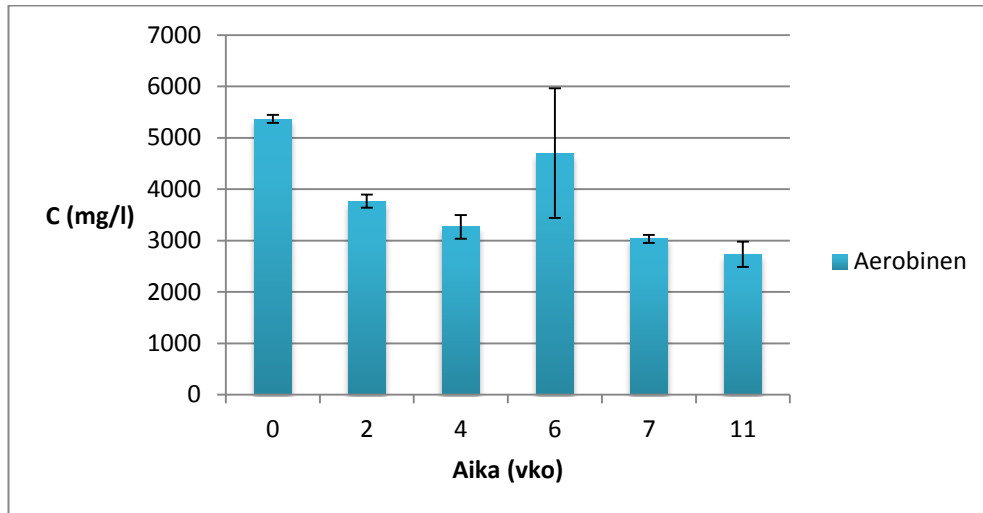
Negatiivisessa kontrollissa kokonaismangaanin pitoisuus oli enimmällään 5 mg/l (kuva 26). Määrittämissä ei ollut rinnakkaisia näytteitä.



Kuva 26. Kokonaismangaanin pitoisuus ajan suhteen negatiivisessa kontrollissa.

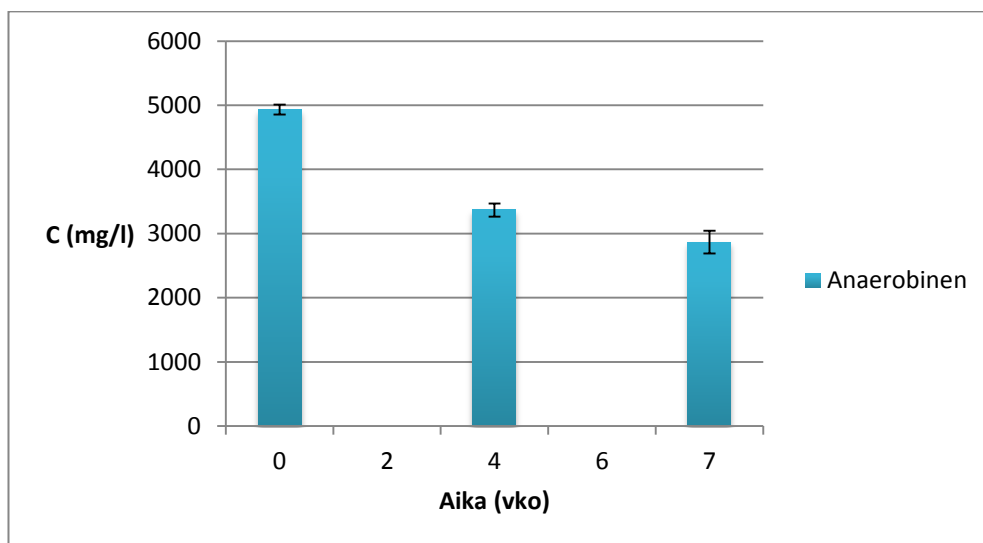
## 7.5 Öljyn hiilivetyjen määrittäminen GC-FID-menetelmällä

Öljyn hiilivedyt alueella  $C_{10}$ – $C_{40}$  määritettiin kaasukromatografisesti liekki-ionisaatiodetektorilla. Rinnakkaisista näytteistä laskettiin keskiarvot, ja tuloksista piirrettiin kuvaajat. Virhepalkit osoittavat kolmen rinnakkaisen näytteen hajonnan. Negatiivisissa kontrolloissa ei käytetty rinnakkaisia näytteitä. Aerobisissa olosuhteissa öljyn pitoisuus oli alussa 5367 mg/l, ja 11 viikon jälkeen pitoisuus oli 2733 mg/l (kuva 27).



Kuva 27. Öljyn pitoisuus ajan funktiona aerobisissa koeolosuhteissa.

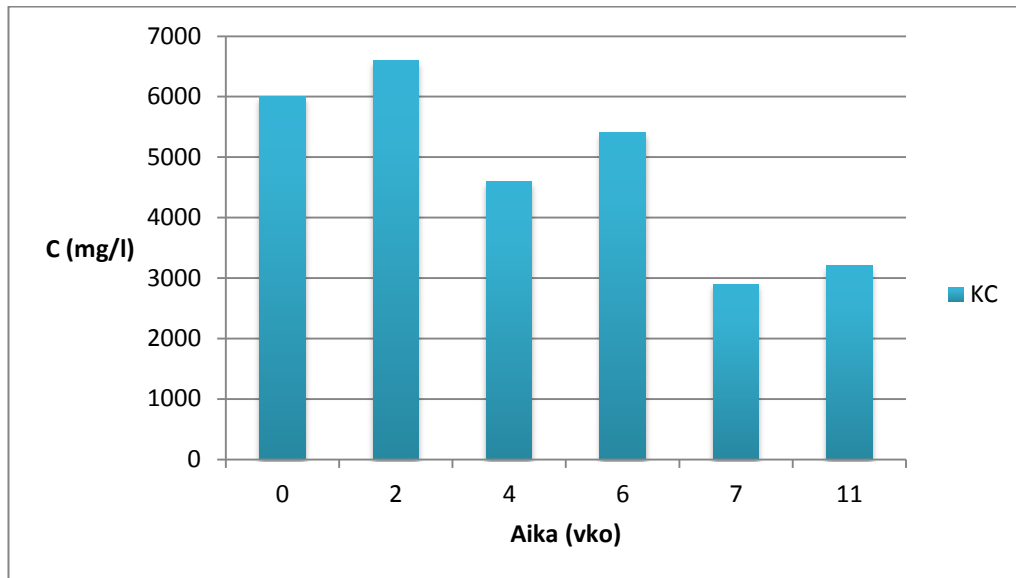
Anaerobisissa olosuhteissa öljyn pitoisuus oli alkutilanteessa 4933 mg/l, ja 7 viikon jälkeen se oli 2867 mg/l (kuva 28).



Kuva 28. Öljyn pitoisuus ajan funktiona anaerobisissa koeolosuhteissa.

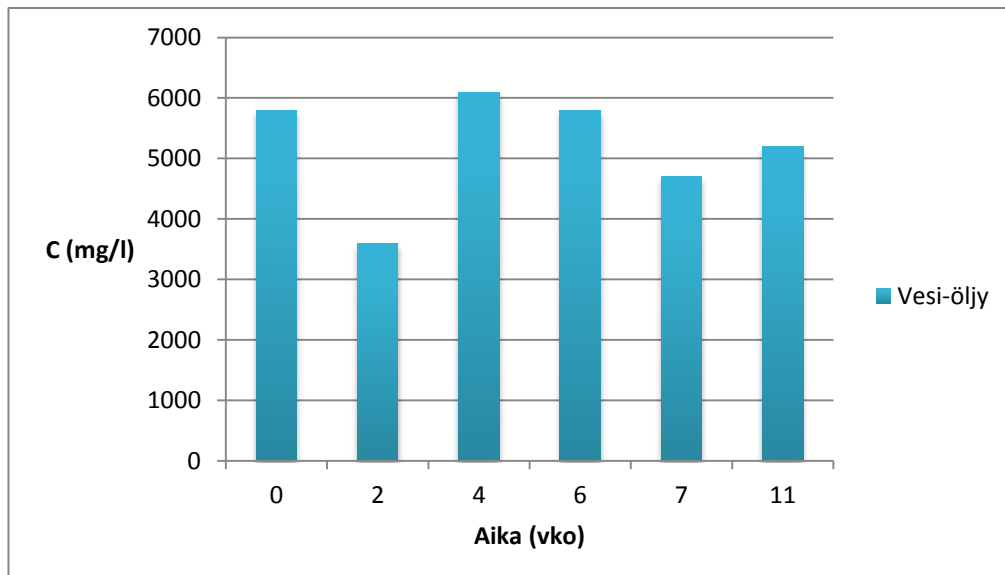


Negatiivisen kontrollin pitoisuus laski myös. Alkutilanteessa pitoisuus oli 6000 mg/l, ja 11 viikon jälkeen pitoisuus oli 3200 mg/l (kuva 29).



Kuva 29. Negatiivisen kontrollin öljyn pitoisuus ajan funktiona.

Toisen negatiivisen kontrollin, vesi-öljy-kontrollin, pitoisuudessa ei tapahtunut juurikaan muutosta. Ainoastaan viikolla 2 oli havaittavissa pitoisuuden lasku. Öljyn pitoisuus oli alussa 5800 mg/l, ja 11 viikon jälkeen pitoisuus oli 5200 mg/l (kuva 30).



Kuva 30. Öljyn pitoisuus ajan funktiona vesi-öljy-kontrollissa.

## 8 Tulosten tulkinta

### 8.1 Kvantitatiivinen PCR

Bakteerien PAH-hajotusgeenin (PAH-RHD<sub>a</sub>) kopiolukujen määrissä ei tapahtunut suuria muutoksia. Luku oli noin log 4 geenikopiota grammassa konkretion kuivapainoa kohden, mikä on pieni määrä. Näytteissä tapahtui paljon epäspesifistä monistumista ensimmäisen sarjan jälkeen. Epäspesifisen tuotteen tulos vaikutti geenikopiolukuihin, jolloin ei saatu luotettavaa kuvaa tutkittavan geenin kopioluvuista. Siksi vai osalle näytteistä pystyttiin laskemaan geenin kopiomäärä. Näytteitä kokeiltiin laimentaa enemmän, mutta se ei vaikuttanut tulokseen.

Epäspesifisen monistumisen ajateltiin johtuvan alukkeista. Kvantitatiivinen PCR on usein hyvä ja tarkka menetelmä, kun halutaan arvioida esimerkiksi bakteerien biohajotusta. Tähän tarkoitukseen löytyy monia hyvin spesifisiä alukkeita. Ne saattavat kuitenkin karsia tutkittavaa joukkoa juuri suuren spesifisyytensä takia. PAH-alukkeiden suunnittelijat eivät olleet halunneetkaan tehdä alukkeista liian spesifisiä, koska silloin ne eivät välttämättä detektoi kaikkia PAH-yhdisteiden hajottajia. Tämän kuitenkin arveltiin vaikuttavan kokeessa ilmenneihin epäspesifisiin monistumisiin. Kokeessa saattoi myös hajota PAH-yhdisteiden kaltaisia yhdisteitä, joilla on samankaltainen hajoamisreitti. Tämä voi osaltaan vaikuttaa epäspesifisyyteen.

PAH-RHD<sub>a</sub> kuuluu aerobiseen PAH-metaboliaan, joten geenikopiolukujen muutokset pitäisi näkyä aerobisissa näytteissä. Geenikopioiden määrät olivat samaa luokkaa aerobisissa ja anaerobisissa näytteissä sekä negatiivisessa kontrollissa gram-negatiivisten bakteerien joukossa koko kokeen ajan. Gram-positiivisten bakteerien geenikopioluvuissa oli kuitenkin havaittavissa nousu aerobisissa olosuhteissa viikolla 4. Tämä voi antaa viitteitä gram-positiivisten bakteerien PAH-yhdisteiden hajotuskyvystä.

Mittaamiseen käytetty aika oli melko lyhyt. PAH-yhdisteet ovat hitaasti hajoavia, joten niiden seuraamiseen olisi hyvä käyttää enemmän aikaa. Lisäksi tällä menetelmällä ei voida pelkästään arvioida PAH-yhdisteiden hajoamista, mutta menetelmällä voidaan saada käsitys hajotuksen etenemisestä ja tehokkuudesta.

## 8.2 Drop-collapse-menetelmä

Pinta-aktiivisia aineita ei havaittu drop-collapse-menetelmällä. Tulokseen saattoi vaikuttaa se, että koe on aikaisemmin tehty puhdasviljelmän bakteereille. Kyseisiä bakteereita oli kasvatettu olosuhteissa, jotka suosivat pinta-aktiivisia aineita tuottavia mikroorganismeja. Testi ei luultavasti soveltunut tähän kokeeseen. Näytteet otettiin suoraan koeyksiköistä, eikä se riittänyt osoittamaan tutkittavia aineita. Tulos saattoi johtua siitä, että pinta-aktiivisten aineiden pitoisuus oli niin pieni, ettei niitä pystytty havaitsemaan tai niitä ei erittynyt ollenkaan.

## 8.3 Kahdenarvoisen raudan määrittäminen

Anaerobisissa olosuhteissa kahdenarvoisen raudan määrä nousi viikolla 7, jolloin pitoisuus oli 269 µg/l. Tämä kertoo siitä, että anaerobisissa oloissa rautaa on käytetty elektronien vastaanottajana orgaanisen aineen hajotuksessa, jolloin se on pelkistynyt. Määrä ei ole suuri, mutta muutos saattaa kertoa anaerobisesta öljyn hajotuksesta. Syy siihen, ettei raudan määrän nousua havaittu aerobisissa oloissa on siinä, että hapellisissa oloissa rauta hapettuu heti eikä kahdenarvoista rautaa kerry.

## 8.4 Kokonaisraudan ja -mangaanin määrittäminen

Kokonaisraudan määrät olivat pieniä. Hapellisissa olosuhteissa pitoisuus pysyi melko samana koko kokeen aikana. Enimmillään se oli 95 µg/l. Anaerobisissa olosuhteissa kokonaisraudan määrä nousi, jolloin pitoisuus oli 343 µg/l, mikä on samaa luokkaa kuin Fe<sup>2+</sup>-määrittämisessä. Negatiivisen kontrollin raudan määrässä ei tapahtunut huomattavia eroja. Pientä hajontaa oli havaittavissa. Pitoisuus oli enimmillään 161 µg/l.

Kokonaismangaanin määrät olivat korkeita. Mangaani pelkistyy helpommin, kuin rauta ja siksi sen pitoisuudet olivat korkeita. Aerobisissa näytteissä se oli enimmillään 9 mg/l. Anaerobisissa oloissa pitoisuus nousi kokeen keskipaikkeilla. Tällöin pitoisuus oli 25 mg/l, mutta se laski myöhemmin, jolloin pitoisuus oli 16 mg/l. Tämä voi johtua siitä, että rautaa pelkistettiin tällöin enemmän. Negatiivisessa kontrollissa pitoisuus oli enimmillään 5 mg/l.

Kokonaismanganin ja -raudan rinnakkaisissa näytteissä oli suurta hajontaa. Tämä johtuu siitä, että ympäristönäytteet ovat hyvin vaihtelevia, eikä kaikissa näytteissä välttämättä ole samoja mikrobeja. Tulokset antavat viitteitä siitä, että kokeen joissakin konkretioissa on mikrobeja, jotka voivat hyödyntää anaerobisissa oloissa rautaa ja mangaania. Tämä voi kertoa öljyn anaerobisesta hajotuksesta.

#### 8.5 Öljyn hiilivetyjen määrittäminen GC-FID-menetelmällä

Öljyhiilivetyjen pitoisuus laski niin aerobisissa kuin anaerobisissa olosuhteissa. Myös negatiivisessa kontrollissa pitoisuus laski. Syytä tähän ei tiedetä. On mahdollista, että öljy on pidättäytynyt konkretioissa eikä uuttunut kunnolla. Toisessa negatiivisessa kontrollissa, joka ei sisältänyt konkretioita, ei tätä ilmiötä tapahtunut. Ainoastaan kokeen alussa, viikolla 2, oli huomattavissa pitoisuuden alenemista. Tämä voi johtua siitä, että käsittelyn tai mittaamisen aikana on tapahtunut virhe. Muuten negatiivisessa kontrollissa ei tapahtunut huomattavia muutoksia.

Ei tiedetä, laskiko aerobisissa ja anaerobisissa olosuhteissa olevien näytteiden öljyn pitoisuus biohajoamisen seurauksena vai oliko öljy sitoutunut konkretioihin kuten toisessa negatiivisessa kontrollissa. Menetelmää ei ole ennen käytetty konkretioille, joten sitä pitää luultavasti vielä kehittää ja selvittää mikä osuus konkretioilla on öljyn sitoutumiseen. Huokoinen konkretio voi sitoa öljyä vain tietyn määrän. Seurattaessa koetta pidempään öljyn biohajoamisen ja pidättäytymisen ero saadaan selville. Anaerobisesta öljyn hajotuksesta saatiin viitteitä liukoisten metallien määrittämisessä, joten voidaan päätellä, että biohajoamista on kuitenkin tapahtunut.

## 9 Yhteenveto

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia Itämeren rauta-mangaanisaostumien bakteerien öljyn hajotuskykyä. Koska PAH-yhdisteet ovat öljyn myrkyllisimpiä yhdisteitä ja sen vuoksi ongelmallisia, kokeessa haluttiin seurata konkretiobakteerien PAH-geenin kopiomäärää. Tällä haluttiin saada tietoa, löytyisikö konkretioiden bakteereilta kyky hajottaa näitä yhdisteitä. Lisäksi tuloksilla haluttiin saada tietoa, joka auttaisi tulevaisuudessa arvioimaan, voidaanko rauta-mangaanisaostumia hyödyntää meriympäristön biopuhdistuksessa.

Työ toteutettiin molekyylibiologisin ja kemiallisin menetelmin. PAH-hajotusgeenin kopiomäärää seurattiin kvantitatiivisella PCR-menetelmällä ja öljyhiilivetyjä GC-FID-menetelmällä. Lisäksi seurattiin liukoisten metallien, mangaanin ja raudan, määrää sekä pinta-aktiivisten aineiden esiintymistä.

Tulosten perusteella havaittiin gram-positiivisten bakteerien PAH-hajotusgeenin kopioluvuissa muutoksia aerobisissa olosuhteissa. Tämä voi antaa viitteitä gram-positiivisten bakteerien PAH-yhdisteiden hajotuskyvystä. Gram-negatiivisten bakteerien joukossa ei havaittu muutoksia. PAH-yhdisteet hajoavat hitaasti, joten niiden mittaamiseen käytetty aika olisi hyvä olla pidempi. Muut mittaukset antoivat viitteitä aerobisesta ja anaerobisesta öljyn hajoamisesta. Anaerobisissa olosuhteissa mangaanin ja raudan määrissä tapahtui muutoksia. Lisäksi öljyhiilivetyjen pitoisuus laski kokeen edetessä.

Opinnäytetyön tavoitteissa onnistuttiin. Työn tuloksilla saatiin kuvaa rauta-mangaanisaostumien bakteerien öljynhajotuskyvystä. Tulokset voivat myös auttaa tulevaisuudessa arvioimaan voidaanko konkretioita hyödyntää biopuhdistuksessa. Samalla tulokset toimivat pohjana muille konkretiobakteerien öljyn hajotuskokeille. Lopullisista tuloksista ei ole vielä tietoa, koska tutkimuksia vielä jatketaan.

Tulevaisuudessa qPCR-menetelmää voisi yrittää kehittää epäspesifisen monistumisen takia. Aktiivisia geenejä voisi taas seurata tutkimalla RNA:ta. Myös GC-FID-menetelmää olisi hyvä kehittää konkretioille. Lisäksi PAH-yhdisteiden pitoisuuksia voisi tulevaisuudessa seurata, jotta niiden hajoamisesta saadaan lisää tietoa. Tulevissa öljynhajotuskokeissa voisi myös kokeilla ravinnelisäystä biohajoamisen edistämiseksi.

## Lähteet

- 1 Suomen ympäristökeskus. 2010. Itämeren rauta-mangaanisaostumien hyödyntäminen saastuneiden maiden ja merisedimenttien kunnostuksessa – COMICS. Verkkodokumentti. [www.ymparisto.fi/default.asp?contentid=366549&lan=fi&clan=fi](http://www.ymparisto.fi/default.asp?contentid=366549&lan=fi&clan=fi). 19.10.2010. Luettu 2.7.2011.
- 2 Antila, Anna-Maija, Karppinen, Maarit, Leskelä, Markku, Mölsä, Heini & Pohjakallio, Maija. 2008. Tekniikan kemia. Helsinki: Edita.
- 3 Työterveyslaitos. 2005. Kemikaalit ja työ. Selvitys työympäristön kemikaaliriskeistä. Verkkodokumentti. [www.ttl.fi/fi/kemikaaliturvallisuus/ainekohtaista\\_kemikaalitietoa/kemikaalit\\_ja\\_ty%C3%B6/Documents/Kemikaalit\\_jaTyo.pdf](http://www.ttl.fi/fi/kemikaaliturvallisuus/ainekohtaista_kemikaalitietoa/kemikaalit_ja_ty%C3%B6/Documents/Kemikaalit_jaTyo.pdf). 21.10.2010. Luettu 12.07.2011.
- 4 Ositum. Polysykliset aromaattiset hiilivedyt (PAH). Verkkodokumentti. [www.ositum.fi/index.php?p=PAH](http://www.ositum.fi/index.php?p=PAH). Luettu 12.07.2011.
- 5 Sillanpää, Pekka. 2007. Suomen ympäristö 2. Öljyhiilivedyillä saastuneen maan puhdistaminen puiden avulla. Verkkodokumentti. [www.ymparisto.fi/download.asp?contentid=64453](http://www.ymparisto.fi/download.asp?contentid=64453). Luettu 20.7.2011.
- 6 Tuomi, Pirjo & Vaajasaari, Kati. 2004. Monitoroidun luontaisen puhdistumisen (MLP) käyttö pilaantuneiden alueiden kunnostuksessa. Verkkodokumentti. [www.environment.fi/download.asp?contentid=21426&lan=fi](http://www.environment.fi/download.asp?contentid=21426&lan=fi). 10.8.2004. Luettu 25.8.2011.
- 7 Enso bottles, LLC. Aerobic and Anaerobic Biodegradation. Verkkodokumentti. [www.ensobottles.com/pdf/Aerobic Anaerobic Biodegradation\\_20090430.pdf](http://www.ensobottles.com/pdf/Aerobic%20Anaerobic%20Biodegradation_20090430.pdf). Luettu 20.7.2011.
- 8 Widdel, Friedrich & Rabus, Ralf. 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. Verkkodokumentti. [www.mumm-research.de/download\\_pdf/widdel\\_rabus\\_curr\\_op\\_2001.pdf](http://www.mumm-research.de/download_pdf/widdel_rabus_curr_op_2001.pdf). Luettu 29.8.2011.
- 9 Van Hamme, Jonathan, Singh, Ajay & Ward, Owen. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. Verkkodokumentti. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC309048/pdf/0023.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC309048/pdf/0023.pdf). Luettu 29.8.2011.
- 10 Chakraborty, R & Coates J. 2004. Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. Teoksessa Alexander Steinbüchel (toim.) Applied Microbiology and Biotechnology. Berlin: Springer, s. 437–446.
- 11 Mbadanga, Serge, Wang, Li-Ying, Zhou, Lei, Liu, Jin-Feng, Gu, Ji-Dong & Mu, Bo-Zhong. 2010. Microbial communities involved in aerobic degradation of alkanes. Verkkodokumentti. [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830510002027](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830510002027). Luettu 29.8.2011.

- 12 Peng, Ri-He, Xiong, Ai-Sheng, Xue, Yong, Fu, Xiao-Yan, Gao, Feng, Zhao, Wei, Tian, Yong-Sheng & Yao, Quan-Hong. 2008. Microbial biodegradation of poly-aromatic hydrocarbons. Verkkodokumentti. [onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6976.2008.00127.x/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6976.2008.00127.x/pdf). Luettu 6.10.2011.
- 13 Nyysönen, Mari. 2009. Functional genes and gene array analysis as tools for monitoring hydrocarbon biodegradation. Väitöstyökirjatutkimus. Faculty of Biosciences Department of Biological and Environmental Sciences University of Helsinki. Verkkodokumentti. [www.doria.fi/bitstream/handle/10024/46831/function.pdf?sequence=1](http://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/46831/function.pdf?sequence=1). Luettu 6.10.2011.
- 14 Selesi, Draženka, Jehmlich, Nico, von Bergen, Martin, Schmidt, Frank, Rattei, Thomas, Tischler, Patrick, Lueders, Tillmann & Meckenstock Rainer U. 2009. Combined Genomic and Proteomic Approaches Identify Gene Clusters Involved in Anaerobic 2-Methylnaphthalene Degradation in the Sulfate-Reducing Enrichment Culture N47. Verkkodokumentti. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2798259/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2798259/). Luettu 6.10.2011.
- 15 Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. Verkkodokumentti. [www.iupac.org/publications/pac/2001/pdf/7307x1163.pdf](http://www.iupac.org/publications/pac/2001/pdf/7307x1163.pdf). Luettu 4.10.2011.
- 16 Jørgensen, Kirsten. 2007. *In situ* Bioremediation. Teoksessa Allen I. Laskin, Sima Sariaslani & Geoffrey M. Gudd Applied Microbiology, Volume 61. Academic Press, s. 285-305.
- 17 Environment Canada Ontario Region. Ex-Situ Remediation Technologies for Contaminated Sites. Verkkodokumentti. [www.on.ec.gc.ca/pollution/ecnpd/tabs/tab23-e.html](http://www.on.ec.gc.ca/pollution/ecnpd/tabs/tab23-e.html). 19.11.2002. Luettu 4.10.2011.
- 18 Yli-Hemminki, Pirjo, Jørgensen, Kirsten & Lehtoranta, Jouni. 2011. Ferromanganese concretions as microhabitats in the Gulf of Finland. Bulletin of the Geological Society of Finland, Vol 83, Special Issue 1. Verkkodokumentti. [www.geologinenseura.fi/bulletin/Special\\_Issue\\_1\\_2011/Bulletin\\_Abstrakt2011\\_netti.pdf](http://www.geologinenseura.fi/bulletin/Special_Issue_1_2011/Bulletin_Abstrakt2011_netti.pdf). Luettu 21.5.2011.
- 19 Konhauser, Kurt. 2009. Introduction to geomicrobiology. USA: Blacwell Science Ltd.
- 20 Salkinoja-Salonen, Mirja ym. 2002. Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.
- 21 Weber, Karrie A., Achenbanch, Laurie A. & Coates, John D. 2006. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. Nature reviews. Microbiology. London: Nature publishing group.
- 22 Ehrlich, Henry Lutz. 1996. Geomicrobiology. Third Edition, Revised and Expanded. New York: Marcel Dekker, Inc.
- 23 Tugrul, Tugba & Cansunar, Emir. 2004. Detectin surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. Verkkodokumentti. [journals2005.pasteur.ac.ir/WJMB/21\(6-7\).pdf](http://journals2005.pasteur.ac.ir/WJMB/21(6-7).pdf). Luettu 8.6.2011.

- 24 Bodour, Adria & Miller-Maier, Raina. 1998. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. Verkkodokumentti. [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701298000311](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701298000311). Luettu 8.6.2011.
- 25 Jaarinen, Soili & Niiranen, Jukka. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Edita.
- 26 Opetushallitus. Laboratorioanalyysit. Kaasukromatografia. Verkkodokumentti. [www.03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat\\_2-5\\_kaasukromatografia.html](http://www.03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-5_kaasukromatografia.html). Luettu 28.8.2011.
- 27 Albany College of Pharmacy and Health Sciences. Organic Chemistry II. Verkkodokumentti. <http://organicchem.org/oc2web/lab/exp/nabh4/nabh4des.html>. Luettu 28.8.2011.
- 28 Mäkinen, Visa & Yli-Hemminki, Pirjo. Suomen ympäristökeskus. 2009. Laboratorion menetelmäohje nro B214. Vesinäytteen kahdenarvoisen raudan ( $\text{Fe}^{2+}$ ) määrittäminen spektrofotometrisesti.
- 29 Cébron, Aurélie, Norini, Marie-Paule, Beguiristain, Thierry & Leyval, Corinne. 2008. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD $\alpha$ ) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. Verkkodokumentti. [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701208000286](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701208000286). Luettu 9.5.2011.



## Koeasetelma

Sarja	Aika (vko)	Olosuhde	Näyte	Konkretio (g)	Öljy (g)
1	0	Happi	0	10,005	0,011
		Happi	0	10,029	0,011
		Happi	0	10,012	0,010
		Hapeton	0	10,060	0,012
		Hapeton	0	10,011	0,013
		Hapeton	0	10,050	0,010
		KC	0	10,086	0,010
		Vesi-öljy	0	0,000	0,010
2	2	Happi	1	10,090	0,008
		Happi	2	10,032	0,009
		Happi	3	10,042	0,009
		KC	4	10,045	0,009
		Vesi-öljy	5	0,000	0,010
3	4	Happi	6	10,029	0,009
		Happi	7	10,052	0,009
		Happi	8	10,047	0,010
		Hapeton	9	10,057	0,011
		Hapeton	10	10,040	0,009
		Hapeton	11	10,072	0,009
		KC	12	10,160	0,010
		Vesi-öljy	13	0,000	0,010
4	6	Happi	14	10,029	0,008
		Happi	15	10,020	0,009
		Happi	16	10,057	0,009
		KC	17	10,081	0,009
		Vesi-öljy	18	0,000	0,010
5	7	Happi	19	10,076	0,010
		Happi	20	10,008	0,009
		Happi	21	10,074	0,008
		Hapeton	22	10,044	0,008
		Hapeton	23	10,002	0,008
		Hapeton	24	10,043	0,009
		KC	25	10,298	0,009
		Vesi-öljy	26	0,000	0,009
6	11	Happi	27	10,062	0,010
		Happi	28	10,063	0,009
		Happi	29	10,012	0,008
		KC	30	10,166	0,010
		Vesi-öljy	31	0,000	0,008
7	15	Happi	32	10,001	0,010
		Happi	33	10,024	0,009
		Happi	34	10,096	0,009
		KC	35	10,314	0,009
		Vesi-öljy	36	0,000	0,010
8	19	Happi	37	10,097	0,010
		Happi	38	10,001	0,009
		Happi	39	10,026	0,010
		Hapeton	40	10,023	0,010
		Hapeton	41	10,011	0,009
		Hapeton	42	10,003	0,009
		KC	43	10,098	0,009
		Vesi-öljy	44	0,000	0,009