

Spektrofotometrinen kokonaistoksisuusanalyysi *Escherichia coli*
biosensorilla.

Progradututkielma
Turun yliopisto
Biokemianlaitos
Biokemia
10/2018

Juho Myllymäki

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

TURUN YLIOPISTO
BIOKEMIAN LAITOS

MYLLYMÄKI, JUHO :Spektrofotometrinen kokonaistoksisuusanalyysi *Escherichia coli* biosensorilla.

pro gradu tutkielma, 81s.

Biokemia

10.2018

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

Kemikaalien toksisten vaikutusten arvioiminen, varsinkin niiden yhteisvaikutusten mittaaminen, on hyvin haasteellista. Tässä työssä koe-eläimiä korvaamaan käytettiin *Escherichia coli* K-12 (pEGFP_{lux}ABCDEamp) biosensoria. Perinteisesti optisen tiheyden avulla on tappokokeissa mitattu solujen määrä, mutta menetelmä ei erottele eläviä tai kuolleita soluja. Bioluminesenssi on riippuvainen rasva-aldehydien hapettumisesta rasvahapoiksi, joten se mittaa elävissä soluissa tapahtuvan rasva-aineenvaihdunnan määrää.

EGFP (enhanced green fluorescent protein) on fluoresoiva proteiini, joka ei tarvitse lisättyä substraattia toimiakseen. Fluoresenssi kertoo muodostuneen proteiinin määrän. Tiosyanaatti on tärkeä syanidimyrkytyksen indikaattori ja osa immuunijärjestelmää. Ilmavirran mukana kulkeutuvat lukuisat myrkyt ovat potentiaalinen terveydellinen ongelma.

E. coli -solujen kasvu ei ollut päivästä toiseen täsmälleen samanlaista. Tämä ongelma ratkaistiin kasvattamalla bakteerit yhdessä kasvatuksessa ja jakamalla ne tappokokeita varten. Ravinneliuoksen suuren taustafluoresenssin takia täytyi bakteerimassa puhdistaa ravinneliuoksesta ennen fluoresenssin mittausta. Lisäksi ilmavirran mukana kulkeutuville myrkyille ja tiosyanaatille kehitettiin mittaus menetelmiä.

Tutkimuksessa todettiin, että luminesenssi oli herkin mittaustapa. Osalle mitatuista yhdisteistä ei soveltunut vain luminesenssiin perustuva mittaus. Lähtökohtaisesti yhdistämällä mittausmenetelmiä saadaan enemmän informaatiota solujen toiminnasta, kuin millään yksittäisellä mittausmenetelmällä. Tutkimuksessa havaittiin eroja kasvufaasissa ja stationäärifaasissa olevien bakteerien herkkyydelle eri myrkkyjä kohtaan.

Fluoresenssi osoittautui toimivaksi tavaksi arvioida liuottimen vaikutusta, joskin työläämmäksi kuin bioluminesenssi tai optisen tiheyden mittaaminen. Tutkimuksessa onnistuttiin kehittämään kvalitatiivinen testi tiosyanaatille sekä seeruminäytteestä. että bakteerikasvatuksesta. Tutkimuksessa kehitettiin myös Ilmavirran mukana kulkeutuvien myrkkyjen spektrofotometrinen kokonaistoksisuus mittausta, millä saatiin havaittua ilmassa kulkeutuvia myrkyllisiä yhdisteitä. Mittalaitteen valmistaminen *in situ* -mittaukseen olisi seuraava looginen askel eteenpäin.

Asiasanat: luminesenssi, fluoresenssi, biosensori ja myrkyllisyys

Sisällys

0 Lyhenteet.....	1
1 Kirjallisuuskatsaus.....	2
1.1 Biosensorina bioluminoiva ja fluoresoiva bakteeri.....	3
1.1.1 Maljat.....	4
1.1.2 OD.....	4
1.1.3 Bioluminesenssin tuotto.....	8
1.1.4 Fluoresenssi.....	10
1.1.5 Tiosyanaattimittaus.....	13
1.2 Bakteerin kuolemisen määrittely.....	18
1.3 Metallionit ja puolimetallioksidit.....	18
1.4 Liuottimet.....	21
1.5 Antibiootit.....	24
1.6 halogeenit, pseudohalidit ja radikaalit.....	26
1.7 Hapot ja emäkset.....	28
1.8 Tensidit.....	29
1.9 Ilmavirran mukana kulkeutuvien myrkkyjen spektrofotometrinen kokonaistoksisuus mittaus.....	30
1.10 Työn tavoitteet.....	34
2 Materiaalit ja menetelmät.....	36
2.1 Spektrofotometrinen kokonaistoksisuusmäärittely.....	36
2.1.1 Fluoresenssi.....	37
2.1.2 Tiosyanaattimittaus.....	37
2.1.3 Ilmavirran mukana kulkeutuvien myrkkyjen spektrofotometrinen kokonaistoksisuus mittaus....	37
2.2 Maljat.....	38
3 Tulokset.....	39
3.1 Spektrofotometrinen kokonaistoksisuusmäärittely.....	42
3.1.1 Fluoresenssi.....	46
3.1.2 Tiosyanaattimittaus.....	48
3.1.3 Ilmavirran mukana kulkeutuvien myrkkyjen	

spektrofotometrinen kokonaistoksisuus mittaus....	49
3.2 Maljat.....	51
4 Tulosten tarkastelu.....	52
4.1 Spektrofotometrinen kokonaistoksisuusmääritys.....	53
4.1.1 Fluoresenssi.....	53
4.1.2 Tiosyanaattimittaus.....	54
4.1.3 Ilmavirran mukana kulkeutuvien myrkkujen spektrofotometrinen kokonaistoksisuus mittaus....	55
4.2 Maljat.....	56
5 Päätelmät.....	58
6 Lähteet.....	61

0 Lyhenteet

<i>Escherichia coli</i> K-12 pEGFP _{lux} ABCDEamp	<i>E.coli-lux</i>
Liquid broth agar	LA
Liquid broth	LB
Trikloorietikkahappo	TCAA
Green fluorescent protein	GFP
Enhanced green fluorescent protein	EGFP
Volatile organic compound	VOC
Flaviinimononukleotidi	FMN
colony forming units	CFU
optical density	OD
Semi volatile organic compound	SVOC
Iminothioazolidinekarboksyylihappo	ITCA
Aminothioazolidinekarboksyylihappo	ATCA
Metyylimalonihappouria ja homokysteiniuria tyyppin c proteiini	MMACHC
Wasserstoffionenexponent	pH
Counts per second	CPS

1 Kirjallisuuskatsaus

Tutkittaessa yhdisteen myrkyllisyyttä, yleensä tutkitaan yhden yhdisteen vaikutusta kerrallaan. Kuitenkin altistumme jatkuvasti useiden yhdisteiden sekoituksille, emme yksittäisille, laboratorio-olosuhteissa oleville puhtaille aineille. Aineet voivat vaikuttaa toistensa myrkyllisyyksiin antagonistisesti, synergeettisesti, additiivisesti tai eivät lainkaan. Tätä, mahdollista vaikutusta, kutsutaan ”koktail vaikutukseksi”. Assosiaatio-teoriaan perustuvassa tutkimuksessa arvioidaan, että yli 150 000 kemikaalilla, joita löytyy ihmisten elinympäristöstä, olisi ennalta tuntematon terveysvaikutus koktail vaikutuksen kautta. (Delfosse ja muut 2016)

Kemiallisten altisteiden aiheuttamia terveyshaittojen kannalta olennaisia seikkoja ovat altistumistaso, altistumistie ja altistumisaika. Tunnetun epäpuhtauden pitoisuus voidaan määrittää tarkasti kemiallisilla mittauksilla. Sen sijaan varsinainen kokonaisaltistuminen on aina arvio. Yleinen altistumistapa on hengitysilman sisältämän kaasun, höyryn tai pölyn päätyminen keuhkojen kautta verenkiertoon ja siitä edelleen kohde-elimeen. (Elonen ja muut 2001)

Osa aineista, kuten liuotinainehöyryt, imeytyvät käytännössä tehokkaasti verenkiertoon. Pölyn hengittäminen on yleinen altistumistapa useille erilaisille yhdisteille, jopa monet kaasut, kuten typpi- tai rikkioksidit, päätyvät hengitysteihin pölyhiukkasiin adsorpoituneina. Tähän vaikuttavat ainakin epäpuhtauksien ajallinen ja paikallinen vaihtelu, hiukkasten kokojakauman ja liukoisuusominaisuuksien vaihtelu, biologiset tekijät sekä kemikaalien erilaiset imeytymistiet hengitysteitse, silmistä, ihon läpi, ruoansulatuskanavasta limakalvoilta ja mahdollisista haavoista. (Elonen ja muut 2001)

Osa yhdisteistä rikastuvat elimistöön ja osan aiheuttamat vaikutukset kertyvät altistuksen pitkittyessä. Tällaisten yhdisteiden terveysriskiä on vaikea arvioida yksinkertaisella kemiallisella mittauksella. Tällaisten kemikaalien tapauksessa elimistöön joutuneen kuorman arviointi biologisesta näytteestä voi olla

hyödyllisempää. Teoriassa kemikaalin pitoisuus ilmassa voi vaihdella nopeasti, jolloin kattavan otannan saaminen on haasteellista. Usein kemikaalien pitoisuuksien muutokset elimistössä ovat hitaita. Näennäisesti samankaltaisissa altistumistilanteissa eri yksilöiden elimistöihin voi imeytyä huomattavastikin toisistaan poikkeavia määriä kemikaaleja. (Elonen ja muut 2001)

Näytteiden ottaminen ihmisestä tai muista eläimistä kuitenkin edellyttää, että ne ovat altistuneet jo jollekin. Optimitilanteessa riskit selvitetään jo ennen niiden realisoitumista altistuneina eläiminä tai ihmisinä. Tätä varten on kehitetty erilaisia biosensoreita, joita käyttämällä vältetään potentiaalisesti vahingoittamasta ihmisiä tai koe-eläimiä. Paljon testejä voidaan tehdä nisäkässoluilla, jotka ovat peräisin joko ihmisestä, hiirestä, kissasta, koirasta tai siasta. Nisäkässoluista voidaan havaita mm. hapenkulutuksen kiihtyminen, lämmöntuoton kasvu, maitohapon liikatuotto soluissa, pH:n (saks. Wasserstoffionenexponent, pH) lasku, glukoosin kulutuksen nousu, pelkistysekvivalenttien kertyminen soluihin, happiradikaalien tuotto, myrkyllisten solun sisäisten aineenvaihduntatuotteiden muodostuminen, solujen nekroosi, apoptoottisen solukuoleman kiihtyminen ja K^+ -ionien pois vuoto solusta. (Salkinoja-Salonen 2016)

Tässä työssä käytetään bioluminoiviin ja fluoresoiviin bakteereihin perustuvaa biosensoria. Toisin kuin nisäkäs soluja bakteereja on huomattavasti helpompi kasvattaa. Lisäksi bioluminesenssin avulla niitä voidaan seurata reaaliajassa (Atosuo ja muut 2013).

1.1 Biosensorina bioluminoiva ja fluoresoiva bakteeri

Bioluminoivia bakteereja on tutkittu bentseenin, tolueenin, ksyleenin, kloorifenolien, arsenikin, antimonin, hopean, kuparin, anti-mikrobialisten yhdisteiden tehokkuuden arvioinnissa, immunologiassa, vesinäytteiden toksikologisissa arvioissa, antibioottien tehokkuudenarvioinnissa, avaruustutkimuksessa ja biofilmin happipitoisuuden mittarina. Bioluminoivat bakteerit eivät yksittäisen yhdisteen

pitoisuuden mittauksessa päihitä kemiallisia menetelmiä, mutta ne kykenevät reagoimaan samanaikaisesti useisiin yhdisteisiin. (Willardson ja muut 1998; Gillian ja muut 1999; Tauriainen ja muut 1997; Jivko ja muut 2003; Atosuo ja muut 2013; Woutersen ja muut 2011; Vlasova ja muut 2003; Rabbow ja muut 2003 Sasaki; ja muut 2013)

Useimmat sovellutukset on suunniteltu niin, että spesifinen vaste saa aikaan bioluminesenssin ja/tai fluoresoivan proteiinin tuoton (Woutersen ja muut 2011). Tässä työssä käytetyt bakteerit tuottavat bioluminesenssia ja fluoresoivaa proteiinia konstitutiivisesti, eivätkä ne tarvitse spesifistä vastetta signaalin tuottoon. Tämän ansiosta nämä bakteerit reagoivat mihin tahansa niiden kasvua, bioluminesenssia tai fluoresenssia haittaaviin tekijöihin. (Atosuo ja muut 2013)

1.1.1 Malja

Agarin käyttö petrimaljoissa on yli 120-vuotias keksintö ja edelleen ruutiini käytössä laboratorioissa (Grant 1897). Ongelma on, että kaikkea mikrobialtistusta ei voida luotettavasti mitata pesäkkeitä muodostavina yksikköinä (engl. Colony forming units, CFU). Verrattaessa CFU:sta saatua lukua pyyhkäisyelektronimikroskoopilla tai fluoresenssimikroskoopilla saatuihin tuloksiin: on CFU:n arvo huomattavasti todellista pienempi. Varsinkin bakteeri-itiöiden osalta vaihtelu on suurta ja vain kuudes osa saattoi tuottaa CFU:lle vasteen. (Karlsson ja Malmberg 1989) Eräs CFU:n alhaista tulosta selittävä tekijä saattaa olla agarin ja fosfaatin väliset reaktiotuotteet, jotka syntyvät autoklaavauksen aikana (Tanaka ja muut 2014).

Bakteereja voidaan kasvattaa myös nestemäisissä kasvatusliuoksissa. Tämä on yleisempi tapa, kun niitä halutaan kasvattaa suurempia määriä. CFU:n mittaaminen kasvatusliuoksesta ei käytännössä ole kovinkaan järkevää, koska tulokset saadaan aikaisintaan seuraavana päivänä. Mikroskopoimalla nopea kasvuisilla bakteereilla saattaa tulokset saada jo 12 tunnissa. (Nelson ja Cox 2008)

1.1.2 Optinen tiheys

Yleisesti ottaen säteilyenergia, tässä tapauksessa fotonin, törmätessä kirkkaaseen kappaleeseen säteilyenergia heijastuu, absorpoituu ja transmittoituu. Fotonin värähtelytaajuuden ollessa yhteensopiva atomin elektronipilven kanssa fotonin energia siirtyy molekyyliin. Fotonit heijastuvat ja transmittoituvat, kun fotonien värähtelytaajuudet eivät ole yhteensopivia vuorovaikutuksen kohteen kanssa. Tällaisen fotonin törmäyksen seurauksena atomin elektronit alkavat värähtelemään vain hetkellisesti pienellä värähtelylaajuudella, mistä seuraa fotonin uudelleen emittoituminen. Transmittoituessa elektronien värähtelyt siirtyvät atomilta toiselle, kunnes ne ovat kulkeneet molekyylin läpi. Heijastuessa elektronien vibraatioenergia ei siirry atomilta toiselle, vaan se uudelleen emittoituu samasta paikasta. Usein tällä aallolla on sama värähtelytaajuus ja värähtelylaajuus. (Brady ja muut 1950; Atkins ja de Paula 2014)

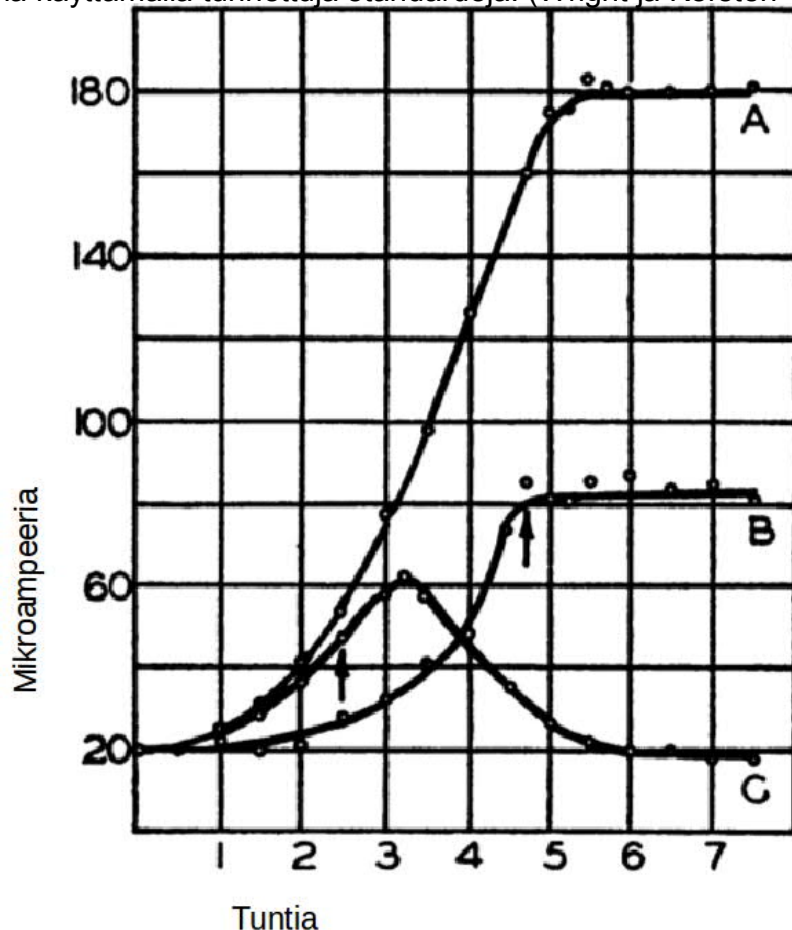
Valosäteen eksponentiaalinen intensiteetin väheneminen valosäteen törmätessä liuoksen komponentteihin riippuu absorptio- ja sirontavakioista. Aineilla, joiden absorptiovakio on lähellä nollaa, on spektrofotometrillä saatu absorptiokäyrä käytännössä sirontakäyrä. Sirontakäyrästä saadaan selville hiukkasten kokoa ja jakaumaa, mutta tämä ei kerro niiden absorptiosta tai liukoisuudesta. Sirontavakionkin ollessa lähellä nollaa tulee näennäisestä absorptiovakioista suuri. (Brady ja muut 1950)

Sironnan aiheuttama virhe on usein riippuvainen konsentraatiosta ja kokeelliset tulokset tietyillä pitoisuuksilla seuraavat Lambertin-Beerin lakia. Suurimmat ongelmat tulevat liuosten valmistuksesta, jotta hiukkaset joka suspensiossa olisivat toistettavasti täsmälleen samanmuotoisia, kokoisia, värisiä ja yhtä tasaisesti jakautuneita eripuolille liuosta. (Brady ja muut 1950)

Turbidometria perustuu liuoksessa olevien hiukkasten turbiditeetin mittaukseen. Turbiditeetin eli sameuden, joka syntyy halutun tuotteen hienojakoisista tasaisesti jakautuneista hiukkasista. (Brady ja muut 1950) Tämän työn tapauksessa hiukkaset

ovat *Escherichia coli*-bakteerin soluja tai tappokokeissa käytetyn yhdisteen reagoinnin seurauksena syntyneitä muita yhdisteitä.

Usein sameutta mitataan transmittoituneesta valosta. Tässä turbiditeetin mittaus menee päällekkäin muiden prosessien, kuten absorptioon kanssa. Nefelometrinen mittaus pidetään tarkempaan tapaan määrittää liuoksen sameutta. Siinä liuosta mitataan 90° asteen kulmassa valonsäteeseen nähden, jolloin vain sameuden aiheuttama valon siroama pääsee detektorille saakka. (Brady ja muut 1950) 90° asteen kulmassa kasvatuksesta tehty turbiditeetti-mittauksen esimerkkikuvaaja kuvassa 1. Tällä tavalla tehdyistä turbiditeetti-mittauksista voidaan tehdä keskenään verrattavissa olevia käyttämällä tunnettuja standardeja. (Wright ja Kersten 1937)



Kuva 1. Turbiditeetti-mittauksen esimerkki kasvatus. Y-akselilla on μ ampeerit. X-akselilla on aika tunteina. Kasvatuksessa *Staphylococcus Aureus* 37 °C asteen

lämpötilassa LB-mediumissa (engl. Liquid Broth, LB) Käyrä A on normaali kasvatus. Käyrä B on kasvatus, johon on lisätty antiseptistä ainetta nuolen osoittamassa kohdassa kasvatusta. Käyrä C on kasvatus, johon on lisätty bakteriofagia nuolen osoittamassa kohdassa kasvatusta. Kuvatekstit on suomennettu lähteestä (Wright ja Kersen 1937).

Muitakin virheenlähteitä on olemassa, kuin edellä mainitut. Liuotinvaikutus voi muuttaa absorptiospektriä ja emissiospektriä. (Brady ja muut 1950) Yleensä absorption oletetaan johtavan valon muuttumiseen lämpöliikkeeksi, mutta myös muut fotokemialliset prosessit ovat mahdollisia. Yleisimmät fotokemialliset prosessit on koottu taulukkoon 1. (Atkins ja de Paula 2014)

Taulukko 1. Yleisimmät fotokemialliset prosessit. *S on perustila. T on triplettilila. M on kolmas määrittelemätön molekyyli. Q on vaimennin. hv on fotoni. * on virittynyt tila. Koottu lähteestä.(Atkins ja de Paula 2014).*

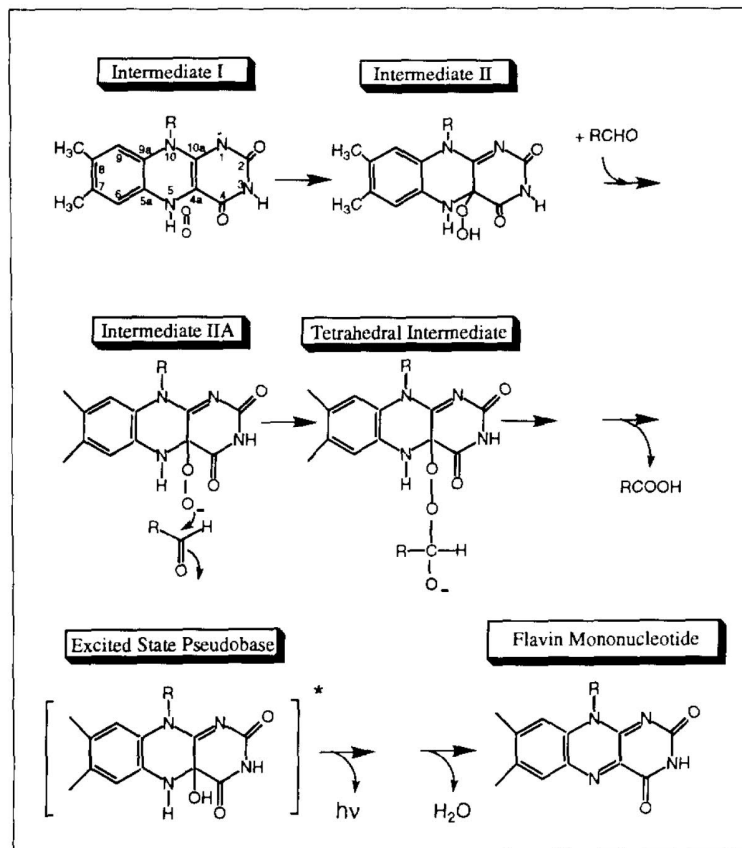
<u>Prosessin nimi</u>	<u>Kemiallinen reaktio</u>
Primäärinen absorptio	$S + hv \rightarrow S^*$
Virittyneen tilan absorptio	$S^* + hv \rightarrow S^{**}$ $T^* + hv \rightarrow T^{**}$
Fluoresenssi	$S^* \rightarrow S + hv$
Stimuloitu emissio	$S^* + hv \rightarrow S + 2hv$
Systemien välinen siirtymä	$S^* \rightarrow T^*$
Fosforesenssi	$T^* \rightarrow S + hv$
Sisäsiirtymä	$S^* \rightarrow S$
Törmäyksen indusoima emissio	$S^* + M \rightarrow S + M + hv$
Sammutus	$S^* + Q \rightarrow S + Q$ $T^* + Q \rightarrow T + Q$
Resonanssienergiansiirto	$S^* + Q \rightarrow S + Q^*$
Elektroninsiirto	$S^* + Q \rightarrow S^{+/-} + Q^{-/+}$
Elektronin energian siirto (singlet-singlet)	$S^* + S \rightarrow S + S^*$
Elektronin energian siirto (triplet-triplet)	$T^* + T \rightarrow T + T^*$

Virittynyt dimeerin muodostuminen	$S^*+S \rightarrow (SS)^*$
Energian yhdistyminen (singlet-singlet)	$S^*+S^* \rightarrow S^{**}+S$
<u>Energian yhdistyminen (triplet-triplet)</u>	<u>$T^*+T^* \rightarrow T^{**}+T$</u>

Niinpä mittaamme valon vähenemistä liuoksessa, riippumatta sen aiheuttamasta ilmiöstä. Tätä kutsutaan optiseksi tiheydeksi (engl. Optical density, OD). Optinen tiheys on riippuvainen valonpituudesta. Käytetyksi valonpituudeksi valittiin 620nm. Varhaisin optiseen tiheyteen perustuva sovellutus oli hiivan kasvatus liuoksessa. (Stier ja muut 1934) Optisen tiheyden muutosta kasvatuksen aikana voidaan havainnoida reaaliajassa (Atosuo ja muut 2013).

1.1.3 Bioluminesenssi

Bioluminesenssin tuotto on *E. coli* K-12 pEGFP_{lux}ABCDEamp:ssa Lac-promoottorin säätelemä (myöhemmin tekstissä *E. coli-lux*). LuxABCDE ei tarvitse mitään lisättyä yhdistettä signaalin tuottoon, sillä geenit luxC, luxD ja luxE tuottavat reaktioon (kuva 2) tarvittavan rasva-aldehydi substraatin. (Atosuo ja muut 2013) Lux A ja lux B muodostavat dimeerin, jossa varsinainen valoreaktio tapahtuu. (Baldwin ja muut 1995) Lisäksi siinä on beetalaktamaasia, joka on bakteerin tuottama entsyymi. Beetalaktamaasit hydrolysoivat penisilliinien ja kefalosporiinien beetalaktonirenkaan (Elonen ja muut 2001). Tässä tapauksessa Beetalaktamaasit pilkkovat ampisilliinia selektiopaineen ylläpitämiseksi.

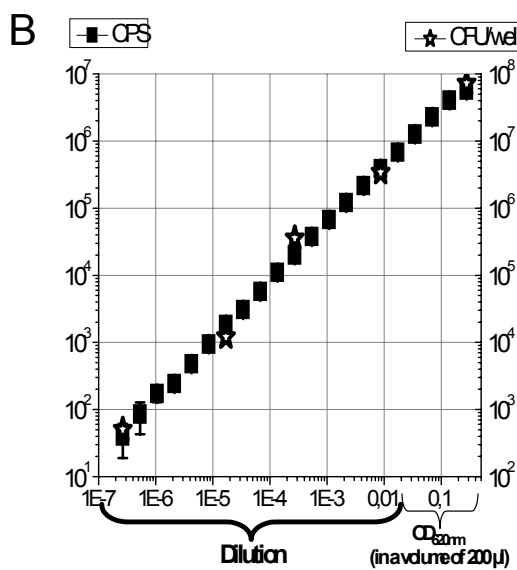


Kuva 2. Bioluminoivien bakteerien bioluminesenssi reaktio. Bakteerien lusiferaasi on flaviinin monoksygenaasi, johon $FMNH_2$ sitoutuu reversiibelisti ja 1:1 stoikiometrisesti. Entsyymiin sitoutunut flaviini (välituote I) reagoi O_2 kanssa. Tämän reaktion seurauksena syntyy C4a peroksidihydroflaviini (välituote II). Kun rasva-aldehydiä ei ole saatavilla C4a peroksidihydroflaviini hajoaa ilman valoemissiota tuottaen FMN ja H_2O_2 (ei esitetty kuvassa). Parhaana selityksenä valoa tuottavalle reaktiolle pidetään, että C4a peroksidihydroflaviini reagoi rasva-aldehydi substraatin karbonyylin hiiliatomin kanssa tuottaakseen tetraedrisen välituotteen. Tämä välituote hajoaa toistaiseksi tuntemattomalla mekanismilla virittyneeseen tilaan (merkitty kuvassa symbolilla *). Virittyneen tilan flaviini palautuu normaali tilaan emittoituaan fotonin. (Baldwin ja muut 1995)

Bioluminesenssin valo syntyy reaktiossa esiintyvistä $FMNH_{2,n}$ reaktiovälituotteista ennen niiden dehydratoitumista flaviinimononukleotidiksi (Baldwin ja muut 1995). Todennäköisenä rasva-aldehydinä pidetään tetradecanaalia, sen ollessa kineettisesti suotuisin, mutta ei ainoa vaihtoehto (Ulitzur ja Hastings 1979). Rasva-

aldehydi pitoisuus on havaittu bioluminesenssia tuottavan reaktion (kuva 2) rajoittavaksi tekijäksi (Atosuo ja muut 2013).

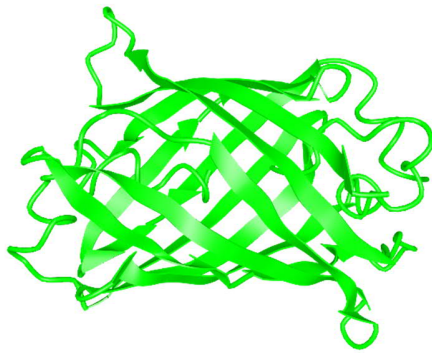
Bioluminesenssin, OD_{620} :n ja CFU:n välillä on yhteys (kuva 3). Tämä yhteys on olemassa bakteerien ollessa logaritmisessa kasvufaasissa. Kuvasta 3 huomataan bioluminesenssin kulkevan lineaarisesta huomattavasti pienempiin solupitoisuuksiin, kuin OD_{620} :n avulla on mahdollista mitata. Bioluminesenssia voidaan OD_{620} :n tavoin mitata reaaliajassa toisin kuin CFU:ta. (Atosuo ja muut 2013)



Kuva 3: Optisen tiheyden, bioluminesenssin ja CFU:n suhde *E.coli-lux*:lla. *E. coli-lux* kasvatusta kuoppalevyllä LB_{AMP} 200 μ l käyttäen logaritmisessa kasvufaasissa olevia soluja. OD_{620} ja Bioluminesenssi mitattiin 5 h ajan kasvatuksen ollessa 37 °C asteen lämpötilassa. Bioluminesenssi (CPS (engl. Counts per second, CPS) ■) ja (OD_{620} □) mitattiin tasaisin väliajoin 300 min mittaisen kasvatuksen ajan 37C asteessa. CPS (■) ja CFU:ta (solua/ml (★)). Testissä taustasignaali oli bioluminesenssille 128 ± 8 CPS ($n=20$) ja 0.03 ± 0.007 OD_{620} :lle ($n=20$). Keskimääräinen yhden *E. coli-lux* solun bioluminesenssi on 0.09 CPS/solu. CPS ja OD_{620} ovat kolmesta rinnakkaisesta kuopasta. (Atosuo ja muut 2013)

1.1.3 Fluoresenssi

Vihreä fluoresoiva proteiini (engl. Green fluorescent protein, GFP) on löydetty *Aequorea victoria*:sta. Sen fluorofori sijaitsee 11-säikeisen β -tynnyn proteiinin keskellä olevassa α -kaksoiskierteessä, jota ympäröivä proteiini toimii steerisenä esteenä suojaen fluoroforia. GFP:n rakenne on esitetty kuvassa 3. (Ormö ja muut 1996) GFP:n rakenne suojaa fluoroforia myös fotolyttiseltä sammumiselta ja se kestää tätä useita orgaanisia molekyylejä paremmin. GFP:n fluoresoinnin tapahtuessa bakteerin sisällä suojaavat myös bakteerin antioksidantit myös GFP:tä hapettumiselta. (Tsien 1998)



Kuva 4. GFP:n kolmiulotteinen rakenne. GFP:n 11-säikeisen β -tynnyn ja sen sisällä oleva α -kaksoiskierteen kolmiulotteinen rakenne. GFP:n rakenne on esitettyinä

kahdesta eri kuvakulmasta. Kuva on muokattu lähteestä (Ormö ja muut 1996)

GFP ja sen variantit eivät tarvitse muuta ulkoista tekijää, kuin viritysvälin fluoresenssi signaalin tuottamiseksi. Tarkat fluoresenssi arvot riippuvat proteiinin kemiallisesta ympäristöstä. GFP:n ja sen varianttien fluoresenssi on riippuvaista pH:sta. Lisäksi varaukselliset ionit, varsinkin Ca^{2+} -ionit, voivat vaikuttaa sen toimintaan. (Elsiger ja muut 1999)

Tässä työssä käytetään GFP:n varianttia, paranneltua vihreää fluoresoivaa proteiinia (engl. Enhanced Green Fluorescing protein, EGFP) on hyvin pitkälti GFP:n kaltainen. EGFP:n ja GFP:n välillä on joitain pieniä eroja. GFP:llä on kaksi eksitaatio huippua 395nm–397nm ja 470nm–475nm EGFP:n eksitaation huippu on 488nm. Emissiossa erot ovat pienempiä GFP:n ollessa 504nm ja EGFP:n 507nm–509nm. Rakenteellisesti nämä erot eivät ole kovinkaan suuria: kaksi mutaatiota F64L ja S65T GFP:n fluoroforiin, niin siitä tulee EGFP. EGFP:n F64L-mutaatio tehostaa sen toimintaa korkeammissa lämpötiloissa ja S65T-mutaatio nopeuttaa proteiinin fluoroforin hapettumista noin nelinkertaisesti. (Tsien 1998)

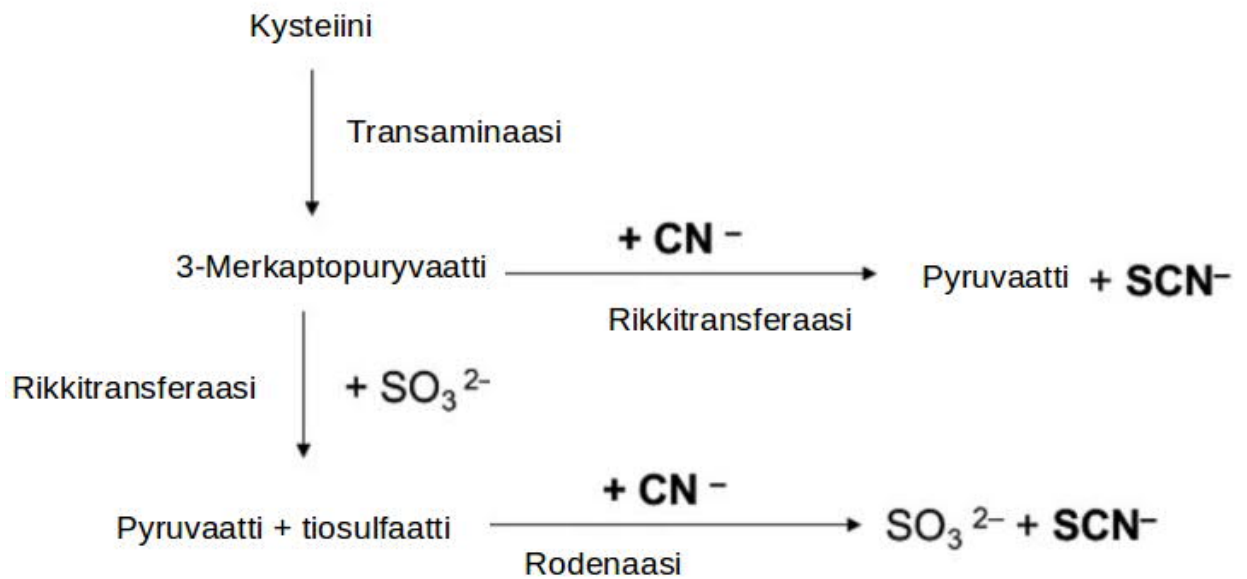
GFP:n ja sen varianttien havaittavuuteen vaikuttaa GFP:n pitoisuus. Proteiinien pitoisuuteen vaikuttaa niiden tuotto, hajoaminen ja mahdollinen päätyminen solun ulkopuolelle. Liukoisuus ja solun sisällä tapahtuva proteiinien mahdollinen aggregoituminen. Proteiinin oikean laskostumisen estyminen on myös mahdollista, johtuen ympäristötekijöistä, kuten toisista proteiineista. Myös lämpötilalla on merkittävä vaikutus fluoroforin hapettumissyklin kestoon ja proteiinin laskostumiseen. Mittalaitteen ominaisuuksilla on suuri merkitys, kuten viritysvälin tehokkuus, optisten suodattimien laatu, peilien laatu, taustasignaali, herkkyys ja detektorin pimeävirta. Luonnollisesti soluilla, astioilla ja käytetyillä kemikaaleilla voi olla autofluoresenssia. Mittauksessa käytetyt emissio ja eksitaatio aallonpituudet vaikuttavat suuresti fluoresenssin ominaisuuksiin. (Tsien 1998)

1.1.5 Tiosyanaatti

Ihminen altistuu ympäristöstä tulevalle syanidille monista lähteistä: Tulipalojen ja tupakan savu, teolliset prosessit, eräät kemikaalit ja biologiset prosessit, jotka tuottavat syanidia tai siksi hajoavia yhdisteitä. Nitriilejä käytetään paljon kemianteollisuudessa ja ne hajoavat syanidiksi. Monet kultakaivokset, käyttävät syanidia elohopeaa ympäristöystävällisempänä vaihtoehtona kullin liuottamiseen. (Jaszczak ja muut 2017) Sekä eukaryooteista, että prokaryooteista löytyy lajeja, jotka tuottavat tuottavat syanidia. Eukaryooteissa kasvien tiedetään tuottavan syanidia eteenisynteesin osana (Eyjólfsson 1970). Prokaryooteista tunnetaan laajalle levinnyt syanidisyntetaasia tuottava geeni hcnABC. (Laville ja muut 1998)

Syanidi-ionin puoliintumisaika ihmisessä on noin 2 tuntia (Jaszczak ja muut 2017). Vakavan akuutin syanidi myrkytyksen jälkeen esiintyy neurologisia oireita, jotka muistuttavat Parkinsonin tautia. Tupakan savun sisältämän syanidiä epäillään aiheuttavan tupakka-amblyopiaa. Pitkäkestoisessa altistuksessa matalalle syanidipitoisuudelle, tiedetään johtavan useisiin haittavaikutuksiin keskushermostossa. Kasvien tuottamien syanidiglykosidien tiedetään aiheuttavan trooppista ataksista neuropatiaa ja alaraajojen osittaista jäykkää halvaantumista. Kun jodin saanti on vähäistä, esiintyy myös kilpirauhasen vajaatoimintaa, struumaa, ja kretinismia.

Ihmisessä syanidista muuttuu maksassa noin 80 % huomattavasti vähemmän vaaralliseksi tiosyanaatiksi. Tiosulfaatin ja syanidin välinen reaktio tapahtuu hitaasti ilman entsyymiäkin emäksisissä olosuhteissa, mutta fysiologisissa olosuhteissa entsyymikatalyysia tarvitaan sen tapahtumiseen. Syanidin muuttuminen tiosyanaatiksi on esitetty kuvassa 5. Tiosyanaatti ihmisessä sitoutuu plasman albumiiniin, kunnes se erittyy pois kehosta. Tiosyanaatin puoliintumisaika on noin 6 vuorokautta. (Jaszczak ja muut 2017)

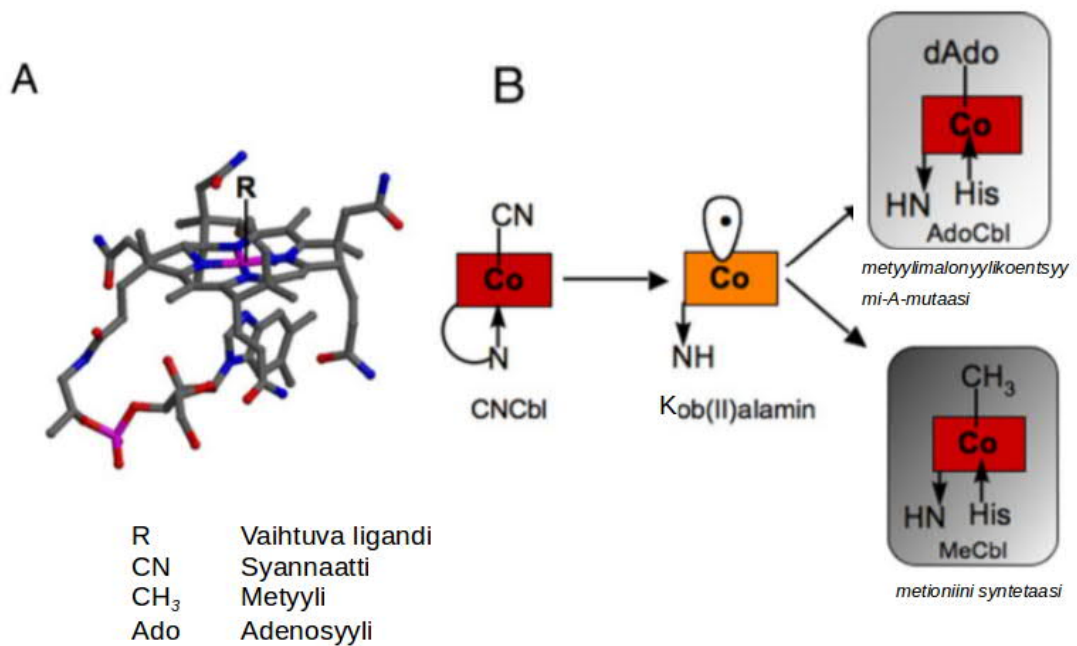


Kuva 5. *Elimistössä tapahtuva tiosyanaatin muodostuminen syanidista. Tiosyanaatti muodostuu entsyymaattisesti 3-merkaptopyruvaatti rikkitransferaasin siirtäessä rikkiatomin 3-merkaptopyruvaatille. Vaihtoehtoisesti rodenaasi katalysoi tiosulfaatin ja syanidin välistä reaktiota muodostaen tiosyanaattia. Rodenaasin kautta tapahtuva reaktio on ihmisessä normaalioloissa vallitseva tiosyanaatin muodostumisen reaktiotie. Tekstit on käännetty suomeksi. (Riedel ja muut 2013)*

Tiosyanaattia kuuluu laktoperoksidaasi-vetyperoksidi-pseudohalidi järjestelmässä osana ihmisen immuunipuolustusta. Jodilla on synergeettinen vaikutus tiosyanaatin, mutta fysiologisissa pitoisuuksissa tiosyanaatti vastaa suurimmasta osasta antimikrobiaalista vaikutusta. (Schlorke ja muut 2016) Tiosyanaatti-ioni myös kilpailevasti inhiboi jodi-ionin ottoa kilpirauhaseen Na^+/I^- symportin avulla (Sande ja muut 2003).

Syanidi voi myös reagoida hydroksyylikobalamiinin kanssa muodostaen syanokobalamiinia. (Jaszczak ja muut 2017) Syanokobalamiini on kemiallisesti varsin vakaa, mutta ihmisessä muuntuu hitaasti takaisin hydroksyylikobalamiiniksi uudelleen vapauttaen sitomansa syanidin. Metyylimalonihappouria ja

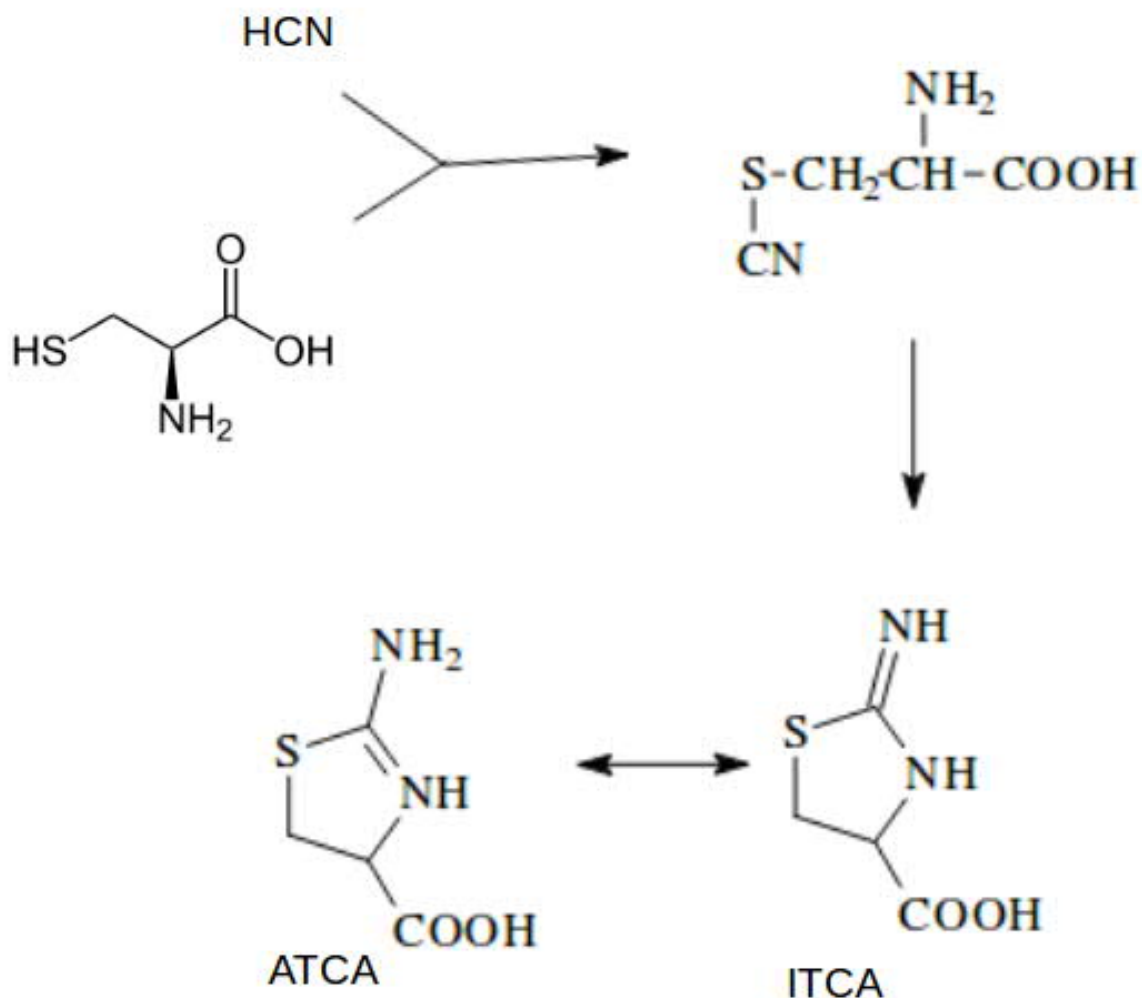
homokysteiniuria tyypin c proteiini (engl. Methylmalonic aciduria and homocystinuria type C protein, MMACHC) katalysoi syanokobalamiinin muuttumisen hydroksyylikobalamiiniksi. MMACHC muuntaa myös metyylikobalamiinin ja deoksyadenosyylikobalamiinin takaisin hydroksyylikobalamiiniksi. MMACHC roolia muihin kobalamiinijohdoksiin ei ole tutkittu. Tämä reaktio tapahtuu kuvassa 6.(Kim ja muut 2008)



Kuva 6. B₁₂ vitamiinin ja sen johdannaisten rakenteita. Kuvassa vasemmalla on kobalamiinin rakenne, joka on merkitty symbolilla (A). Kobalamiinin rakenteesta on neljä kuudesta ligandista paikallaan korriini renkaasta. Kuvassa korriinirenkaan alapuolella on 5,6-dimetyyli-1H-benzimidazoli ligandiin. Korriini renkaan yläpuolella on vaihtuva ligandi, jonka paikka on merkitty R:llä. CnCbl tarkoittaa syanokobalamiinia. AdoCbl tarkoittaa adenosyylikobalamiinia. MeCbl tarkoittaa metyylikobalamiinia. Kuvassa oikealla on syanokobalamiinin entsymaattinen yläligandin poisto, joka on merkitty symbolilla (B). Tässä tapauksessa syanokobalamiinin desyanaatio. Yläligandin poistosta syntyneitä kobalamiinia, voivat muut entsyymit, kuten metioniini syntetaasi (MeCbl) ja

metyyylimalonyylikoentsyymi-A-mutaasi (AdoCbl), käyttää substraattina. Kobalamiinin eri muotojen erot Uv-näkyvän absorptiospektrissä on havainnollistettu laatikoiden väreillä punainen tai oranssi. (Kim ja muut 2008)

Osa syanidista hajoaa hapettumalla eri reaktioiteitä pitkin. Keuhkoissa hyvin pieni osa syanidista voi haihtua takaisin ilmaan. Loput reagoivat kysteiinin kanssa muodostaen iminothioazolidinekarboksyylihappoa (engl. 2-iminothiazolidine-4-carboxylic acid, ITCA) tai hapettuvat muurahaishapoksi. ITCA on tasapainossa tautomeerinsä aminothioazolidinekarboksyylihapon (engl. 2-aminothiazolidine-4-carboxylic acid, ATCA) kanssa. ITCA:n ja ATCA: muodostuminen on esitetty kuvassa 7. (Jaszczak ja muut 2017) ITCA ja ATCA kertyvät maksaan ja aikanaan ne erittyvät pois ihmisestä enimmäkseen virtsan mukana. (Logue ja muut 2005) ITCA:n tiedetään vaurioittavan hermosoluja pieninäkin pitoisuuksina ja se voi selittää osan syanidin neurologisista terveyshaitoista (Kim ja muut 2008).



Kuva 7. ITCA:n ja ATCA:n muodostuminen syanidista. Ensin syanidi ja L-kysteiini reagoivat muodostaen syanokysteiniä. Seuraavaksi syanokysteini syklisoituu fysiologissa oloissa iminothiazolidinekarboksyylihapoksi (ITCA). Aminothiazolidinekarboksyylihapo (ATCA) on tautomeerinä jatkuvassa tasapainotilassa ITCA:n kanssa. Muokattu lähteestä (Jaszczak ja muut 2017).

Ihmisen tavoin myös *E. coli*-bakteerit tuottavat rodenaaseja, jotka katalysoivat tiosulfaatin ja syanidin välistä reatiota. Näin saadaan vähemmän vaarallista tiosyanaattia. (Cheng ja muut 2008) *E. coli*-bakteerit eivät kykene syntetisoimaan kobalamiinia *de novo*, mutta pystyvät kierrättämään jo olemassa olevaa

kobalamiinia ja sen kaltaisia yhdisteitä tehokkaasti (Lawrence ja Roth 1995).

1.2 Bakteerin elämästä ja kuolemasta

Bakteerien kuoleman havainnointi ei ole yksiselitteinen asia. Kasvu ja solunjakautuminen kertovat solun olevan elossa, mutta niiden puuttuminen ei välttämättä kerro niiden olevan kuolleita, vaan ne voivat myös olla dormantteja dormantissa tilassa. Bakteereja jotka selvästi jakautuvat voidaan viljellä ja sen takia helposti havaita, kuten tässä työssä käytettyä *E. coli*-lux. Toisaalta kaikkia bakteereja ei osata viljellä lainkaan ja silti nekin ovat joskus eläneet. Kun bakteerit on altistettu myrkylle, ne voivat myös oikeissa oloissa toipua siitä. Myrkystä voi seurata niin vakava vahinko bakteerille, ettei se enää ole maljalla viljeltävissä, ainakaan hetkellisesti. (Bogosian ja Bourneuf 2001) Tällaisessa tapauksessa CFU antaisi väärän negatiivisen tuloksen.

Tässä työssä bakteeria kutsutaan kuolleeksi, jos se ei jakaannu ja sillä ei ole bioluminesenssi signaalia merkinä aktiivisesta rasva-aineenvaihdunnasta. Riippumatta siitä voisiko bakteeri toisiin oloihin siirrettäessä elpyä. Optisen tiheyden mittauksesta oletetaan bakteerien jakautuessa niiden olevan viljeltäviä eli elossa.

1.3 Metallionit ja puolimetallioksidit

Metalli-ioneilla ja puolimetallioksidoilla on useita anti-mikrobialisia ominaisuuksia, jotka perustuvat eri mekanismeihin. Suolojen lisääminen voi tappaa hyperosmoottisen shokin avulla, mutta metallien myrkyllisyys tapahtuu eri mekanismein paljon pienemmillä pitoisuuksilla. Metallionit voivat reagoida proteiinien kanssa, häiritä solukalvon toimintaa, muodostaa happiradikaaleja, muuttaa hapetus-pelkistys tasapainoa, häiritä ravinteiden saantia soluihin sekä aiheuttaa vaurioita DNA:han. (Lemire ja muut 2013)

Biologisessa mielessä arseeni (As)-yhdisteet luokitellaan yleensä epäorgaanisiin,

orgaanisiin ja kaasumaiseen arsiiniin (H_3As). Arseenin yhdisteitä on käytetty ja käytetään hyönteismyrkyissä, lääke-, säilöntä-, kuivaus- ja väriaineena. Lisäksi sitä käytetään metalli ja elektroniikka teollisuudessa. Ihmisessä suurin osa epäorgaanisesta As_2O_3 hapettuu As_2O_5 :ksi, mutta pelkistyminenkin on mahdollista. As_2O_5 pidetään ihmiselle vähiten vaarallisena epäorgaanisena As-yhdisteenä. (Fowler ja muut 2015) As ei ole ihmiselle välttämätön alkuaine (Nelson ja Cox 2008). As^{3+} -ionin tiedetään tuottavan happiradikaaleja *E. coli*:ssa, As^{3+} -ionit ovat mutageenisia *E. coli*:lle, As^{3+} -ioni aiheuttaa glutationin, glutaredoksiinin ja thioiredoksiinin antioksidatiivisen kapasiteetin vähenemisen ja As^{3+} -ionit reagoivat proteiinien tioliryhmien kanssa (Lemire ja muut 2013).

Boorin (B) yhdisteitä on käytetty jo antiikin aikana lasin valmistuksessa. Nykyisin sitä käytetään myös saippuoissa, hyönteismyrkyissä, puun suoja-aineena, lannoitteissa, valkaisuaineena, metallurgiassa (Bailar ja muut 1973), liimoissa, piilolinssien desinfiointissa, värjäyksessä ja palonsuoja-aineena (Petrucci ja muut 2007). Boori ei ole ihmiselle välttämätön alkuaine. (Nelson ja Cox 2008). Boorihappo kykenee imeytymään ihon läpi ja on ihmiselle munuaistoksinen (Elonen ja muut 2001). Boorin aiheuttaman toksisuuden tarkkaa mekanismia bakteereille ei tunneta, mutta sillä tiedetään olevan lukuisia kemiallisia reaktioita fysiologiassa oloissa. Boorihappo voi reagoida teoriassa minkä tahansa hydroksyyliiryhmän kanssa, joka ei ole steerisesti estynyt. (Bailar ja muut 1973) Useilla eri bakteerilajeilla tehdyssä tutkimuksessa boorihapon on havaittu inhiboivan biofilmin muodostusta (Sayin ja muut 2016)

Hopea (Ag) on jalometalli, jota käytetään kolikoissa, palkinnoissa ja elektroniikassa sähkönjohtimena. Hopeanitraatti on hopean tärkein kaupallinen muoto, jota käytetään kemikaalina, katalyyttinä, muiden hopea kemikaalien lähtöaineena, pinnoituksessa, lääketieteessä ja pattereissa. Hopea-ioni esiintyy yleensä I^- hapetusasteella. (Petrucci ja muut 2007) Ag^+ -ionien tiedetään reagoivan rautarikkiproteiinien rauta-rikki-klustereiden kanssa, Ag^+ -ionit inhiboivat rauta-rikki dehydrataaseja *in vivo* ja *in vitro* bakteriostaattisesti. Ag^+ -ionin tiedetään

adsorpoituvan solukalvoon *E.coli*:ssa ja heikentävän sitä, ja Ag⁺-ioni aiheuttaa glutationin, glutaredoksiinin ja thioiredoksiinin antioksidatiivisen kapasiteetin vähenemisen (Lemire ja muut 2013). Hopea ei ole ihmiselle välttämätön alkuaine (Nelson ja Cox 2008).

Kadmiumia (Cd) ja sen yhdisteitä käytetään teräksen pinnoitukseen, alhaisen lämpötilan juotoksiin, pattereihin, aurinkopaneeleihin, pigmentteihin, alumiini juotoksiin ja neutroni suojusta.(Petrucci ja muut 2007). Cd²⁺-ioni aiheuttaa glutationin, glutaredoksiinin ja thioiredoksiinin antioksidatiivisen kapasiteetin vähenemisen, Cd²⁺-ionien tiedetään hapettavan solukalvon lipidejä, Cd²⁺-ionit ovat mutageenisia *E.coli*:lle ja Cd²⁺-ionit inhiboivat rauta-rikki dehydrataaseja *in vivo* ja *in vitro* bakteriostaattisesti (Lemire ja muut 2013). Kadmium ei ole ihmiselle välttämätön alkuaine (Nelson ja Cox 2008).

Kobolttia (Co) käytetään kestmangneeteissa ja metalliseoksissa (Petrucci ja muut 2007). Kobolttia bakteerit käyttävät luonnostaan B₁₂ vitamiinin valmistamiseen. Co²⁺-ioni on vapaana liuoksessa todennäköisin muoto. Co³⁺ esiintyy lähinnä kompleksien osana. (Nies 1999) Koboltti on ihmiselle välttämätön alkuaine (Nelson and Cox 2008). Co²⁺-ioni aiheuttaa glutationin, glutaredoksiinin ja thioiredoksiinin antioksidatiivisen kapasiteetin vähenemisen, Co²⁺-ionit ovat mutageenisia *E. coli*:lle ja Co²⁺-ionit inhiboivat rauta-rikki dehydrataaseja *in vivo* ja *in vitro* bakteriostaattisesti (Lemire ja muut 2013).

Kuparilla (Cu) on laaja-alaisia anti-mikrobiaalisia vaikutuksia sekä kupari-ionina että metallina. Kuparin ominaisuudet on tunnettu jo muinaisessa Egyptissä. (Borkow ja Gabbay 2009) Metallisen kuparin vaikutus tulee joko kupari-patinasta irtoavista ioneista tai vahingosta solukalvoon (Mathews ja muut 2013). Kupari yhdisteitä käytetään fungisideina, puun säilöntäaineina, estämään sammaloitumista, suojaamaan laivan runkoa "antifouling paints", etana myrkkynä ja anti-mikrobiaalisena pinnoitteena. Kupari on ihmiselle välttämätön alkuaine ja sen anti-mikrobiaaliset ominaisuudet ovat moninaiset viruksille, prokaryooteille ja

eukaryooteille (Nelson ja Cox 2008; Borkow ja Gabbay 2009). Bakteereissa Cu^{2+} -ionien tiedetään tuottavan happiradikaaleja *E. coli*:ssa, Cu^{2+} -ionit reagoivat proteiinien tioliryhmien kanssa, Cu^{2+} -ionien tiedetään hapettavan solukalvon lipidejä ja katalysoivan hydroksyyliiradikaalin muodostusta *in vivo* (Lemire ja muut 2013).

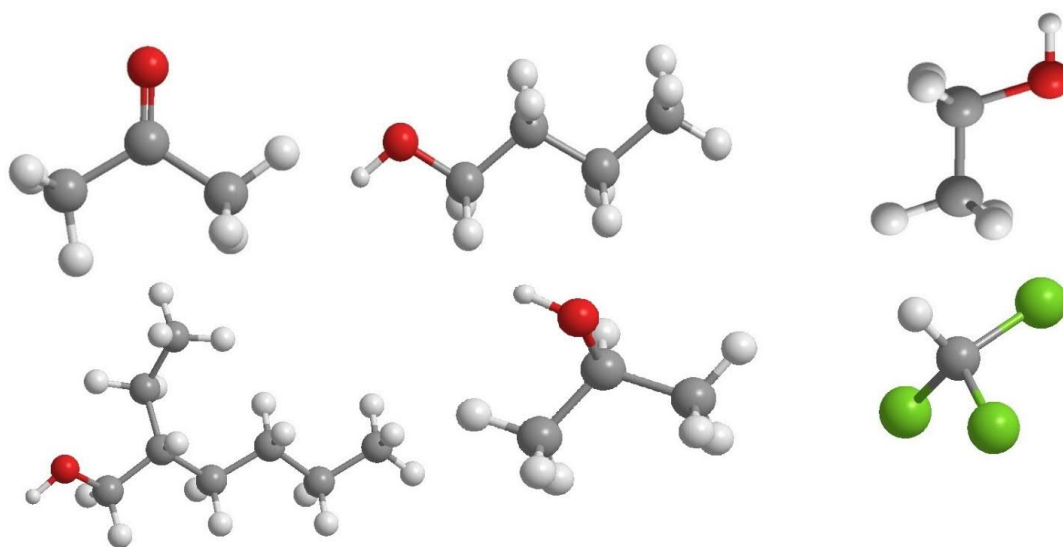
Lyijyä (Pb) käytetään akuissa, lasissa, lasituksissa, keramiikassa, säteilysuojissa, juotoksissa, ammuksissa ja elektroniikassa. Sitä on käytetty myös polttoaineen lisäaineena ja pigmenttinä. Lyijy esiintyy liuoksessa yleensä II^+ hapetusasteella, myös IV^+ hapetusaste on lyijylle teoriassa mahdollinen, mutta IV^+ on voimakas hapetin ja pelkistyy helposti. (Petrucci ja muut 2007). Lyijy ei ole ihmiselle välttämätön alkuaine (Nelson ja Cox 2008). Pb^{2+} -ionit inhiboivat rauta-rikki dehydrataaseja *in vivo* ja *in vitro* bakteriostaattisesti ja Pb^{2+} -ionit pystyvät syrjäyttämään Zn^{2+} -ionin δ -aminolevuliinihappo dehydrataasista bakterisidisesti (Lemire ja muut 2013).

Rauta (Fe) on taloudellisesti tärkeä metalleissa, kuten teräksessä, ja on tunnettu tuhansien vuorien ajan. Rauta II -ionit hapettuvat spontaanisti happamissa vesiliuoksissa Fe^{3+} -ioneiksi, jos liuoksessa on läsnä happea. Fe^{3+} -ionit sakkaavat fosfaatti-ioneja pois liuoksesta ja tätä menetelmää käytetään jätevesien puhdistukseen. (Petrucci ja muut 2007). Fe^{3+} -ionit reagoivat proteiinien tioliryhmien kanssa (Lemire ja muut 2013). Rauta on ihmiselle välttämätön alkuaine (Nelson ja Cox 2008).

Sinkki (Zn) on ihmiselle välttämätön alkuaine (Nelson ja Cox 2008). Messinki on taloudellisesti ja historiallisesti tärkeä sinkin ja kuparin seos, jota käytetään ainakin kolikoissa, hienomekaniikassa, koristeissa ja kelloissa. Sinkkisulfaattia käytetään kuitujen värjäyksessä, eläinten lisäravinteena, puun suoja-aineena ja teräksen pinnoituksessa. (Petrucci ja muut 2007) Zn^{2+} -ioni aiheuttaa glutationin, glutaredoksiinin ja thioiredoksiinin antioksidatiivisen kapasiteetin vähenemisen ja Zn^{2+} -ionit inhiboivat rauta-rikki dehydrataaseja *in vivo* ja *in vitro* bakteriostaattisesti (Lemire ja muut 2013).

1.4 Liuottimet

Vaikka kaikkia tässä työssä tutkittuja liuottimia syntyy luonnossa, biologisten prosessien yhteydessä, ovat kemialliset synteesit osalle yleisempi valmistustapa. Liuottimien rakenteet on esitetty kuvassa 8. Etanolin valmistus fermentoimalla on onnistunut jo tuhansien vuosien ajan. Asetonia ja 1-butanolia osataan valmistaa myös fermentoimalla *Clostridium acetobutylicum*:lla tärkkelystä (Beesch 1953). Monet anaerobiset bakteerit tuottavat isopropanolia (Patel ja muut 1980). Trikloorimetaania ei yleisesti pidetä mikrobien tuottamana yhdisteenä, mutta *Sinorhizobium meliloti*:n kannan 1021 on raportoitu tuottavan tetrakloorieteeniä ja trikloorimetaania (Weigold ja muut 2015). Kaikkien liuottimien antimikrobiaalinen vaikutus perustuu ainakin osittain niiden kykyyn vaurioittaa solukalvoa (Mcdonell ja Russel 1999). Tässä työssä käytettyjen liuottimien rakenteet on esitetty kuvassa.



Kuva 8. liuottimien rakenteet. Vasemmalla ylhäällä asetoni. Keskellä ylhäällä 2-butanoli. Oikealla ylhäällä etanoli. Vasemmalla alhaalla 2-etyyliheksanoli. Keskellä alhaalla 2-propanoli. Oikealla alhaalla trikloorimetaani. Valkoisella on merkitty vety-, punaisella happi-, mustalla hiili- ja vihreällä klooriatomit.

Asetoni on yksinkertaisin ja teollisesti tärkein ketoni. Sitä käytetään teollisuudessa

paljon liuottimena, lakoissa, maaleissa, muoveissa sekä kynsilakanpoistoaineena. Käytännössä kaikki asetoni on peräisin fossiilista polttoaineista, vaikka sitä voidaan valmistaa Asetoni-Butanoli-Etanoli-fermentaatiolla. Asetoni liukenee kaikissa sekoitus suhteissa veteen.(Petrucci ja muut 2007).

1-Butanoli on primäärinen alkoholi, ja sitä käytetään pääasiallisesti kemianteollisuuden raaka-aineena. 1-Butanolia ei käytetä yleisesti antiseptisenä aineena (Mcdonell ja Russel 1999). Käytännössä suurin osa butanolista on peräisin fossiilista polttoaineista, vaikka sitä voidaan valmistaa Asetoni-Butanoli-Etanoli-fermentaatiolla. (Petrucci ja muut 2007).

Etanoli on alkoholi, jota käytetään nautinto-aineena alkoholipitoisissa juomissa. Sitä voidaan valmistaa fermentoimalla teoriassa, mistä tahansa sokeripitoisesta aineesta (Nelson ja Cox 2008). Teollisesti sitä valmistetaan eteenistä veden additioreaktiolla, rikkihapon katalysoimana. Etanoli liukenee kaikissa sekoitus suhteissa veteen. (Petrucci ja muut 2007) Antiseptinä etanoli ei tehoa kaikkiin itiöihin, mikä rajoittaa sen hyödyllisyyttä desinfiointissa (Mcdonell ja Russel 1999).

2-Etyyliheksanolia käytetään liuottimena maaleissa, lakoissa, musteessa, kumissa, paperissa, muoveissa, hartseissa, kuiva siivouksessa ja tekstiilien käsittelyssä (Putus ja muut 2004). Japanissa 2-etyyliheksanolille suositetaan 1ppm rajaa akuuteissa altistuksissa (Azuma ja muut 2016). Etyyliheksanolia vapautuu mikrobien hajottaessa muovinpehmenintä Di(2-etyyliheksyyli)ftalaattia tai hydraulikkaneesteissä käytettyä 2-ethyyliheksanolin ja adipiinihapon diesteriä. (Nalli ja muut 2006). Etyyliheksanolia on havaittu vapautuvan myös kosteusvaurioisista rakennuksista (Eduar ja muut 2012).

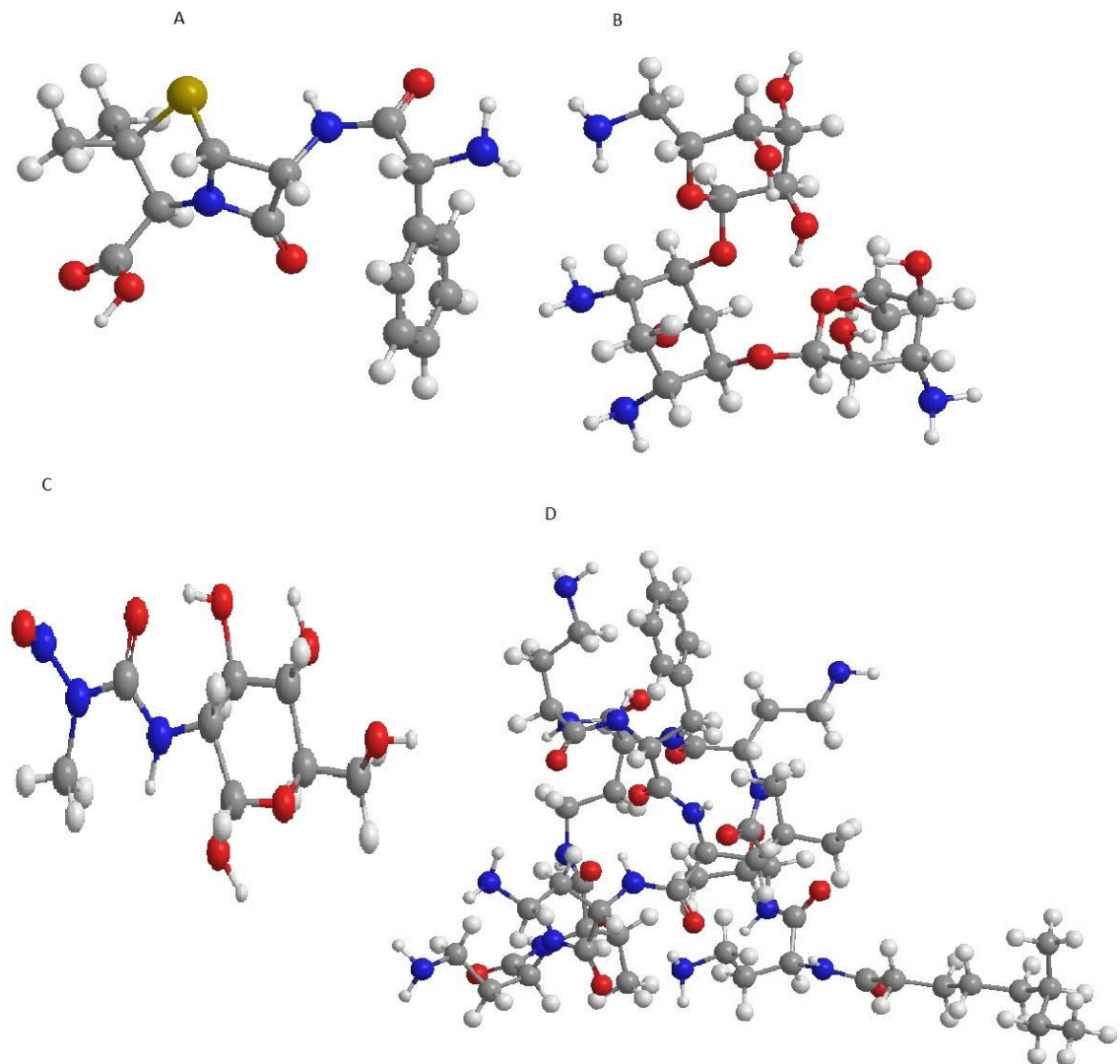
2-Propanoli on yksinkertaisin sekundäärinen alkoholi. Etanolia ja 2-propanolia pidetään yhtä tehokkaina antimikrobiaalisina aineina (Penna ja muut 2001). 2-Propanolia pidetään lipofiilisempänä hieman tehokkaamana bakteereja vastaan, mutta tämä riippuu suuresti myös testattavasta bakteerista. Etanolin tavoin 2-

propanoli ei tehoa kaikkiin itiöihin. (Mcdonell ja Russel 1999)

Trikloorimetaani, tunnetaan myös kloroformina, ja sitä käytetään lähinnä laboratorioissa liuottimena ja kemian teollisuudessa reagenssina. Liuotinvaikutuksensa lisäksi trikloorimetaani hajoaa OH^- -ionin katalysoimana vesiliuoksessa, muodostaen myrkyllisiä ja helposti reagoivia hajoamistuotteita (March 1985). Trikloorimetaania syntyy myös pieniä määriä juomaveden kloorauksessa, jos orgaanista-ainetta on päässyt veteen (Rook 1974). Yleisin ihmisten altistuminen trikloorimetaanille syntyy kloorilla tai hypokloriitilla puhdistetuista uima-altaista (Chu ja Nieuwenhuijsen 2002)

1.5 Antibiootit

Termin antibiootti antoi Selman Waksman 1942 aineille, joita toiset mikrobit muodostavat ja jotka estävät toisten mikrobilajien kasvua tai tappavat niitä. Antibiootit ovat tämän määritelmän mukaisesti kemoterapia-aineiden alaryhmä. Ne kemoterapia-aineet, joita mikrobit valmistavat biologisissa prosesseissa toisia mikrobeja vastaan. Tässä työssä käytetyt antibiootit on esitetty kuvassa 9.(Elonen ja muut 2001)



Kuva 9. Antibioottien rakenteita. Vasemmalla ylhäällä ampicilliini (A). Oikealla ylhäällä kanamysiini (B). Vasemmalla alhaalla streptomysiini (C). Oikealla alhaalla polymyxin B (D). Sinisellä on merkitty typpi-, punaisella happi-, keltaisella rikki, harmaalla hiili-, ja valkoisella vetyatomit. (Elonen ja muut 2001)

Ampicilliini on peräisin *Penicillium chrysogenum*:sta. Se on penisiliinin kaltainen beetalaktaami (Brewer ja Johnson 1953). Ampicilliinin on noin 10 kertaa potentimpi gramnegatiivisia sauvoja vastaan kuin bentsyylipenisilliini. Ampicilliini tehoaa myös *proteukseen*, *salmonellaan*, *shigellaan*, *E. coli:n* ja *listeriaan*. Sen sijaan grampositiivisia bakteereita vastaan se on bentsyylipenisilliiniä heikompia. (Elonen

ja muut 2001) Ampisilliinia käytetään tässä työssä valintapaineen ylläpitämisessä. Ilman sitä *E. coli-lux* menettäisi kykynsä tuottaa bioluminesenssia ja fluoresenssia, koska niiden tuottaminen on rasite ja luonnonvalinta karsisi muuten nämä heikommat yksilöt pois.

Kanamysiini on *Streptomyces kanamyceticuksesta* vuonna 1957 eristetty bakterisidinen antibiootti. Rakenteellisesti kanamysiini luokitellaan Aminoglykosideidin. Kanamysiini sitoutuu bakteerien ribosomien 30S-alayksikköön, jossa se häiritsee tai estää kokonaan proteiinisynteesin. (Elonen ja muut 2001)

Polymyksiini B on *Bacillus polymyxa*:sta eristetty antibiootti. Se aiheuttaa 90 % *E.coli*:sta inhibitorisia vaikutuksia alle 1mg/l ja vain 0,5 % *E. coli*:sta sille luonnostaan resistenttejä. (Zavascki ja muut 2007) Polymyksiini B estää bakteerinseinämän synteesiä varhaisvaiheessa. Polymyksiini B lisää bakteerin solukalvon läpäisevyyttä myös muille yhdisteille. (Elonen ja muut 2001)

Streptotsotosiini on antibiootti, mutta sen antibioottikäytöstä ihmisillä on luovuttu siitä aiheutuvien sivuvaikutusten takia. Streptotsotosiini on eristetty *Streptomyces achromogenesista*. (Elonen ja muut 2001) Sitä käytetään sokeritaudin indusoimiseen hiirillä tai muilla koe-eläimillä (Junod ja muut 1969). Ihmisillä streptotsotosiiniä käytetään syöpälääkkeenä metastasoituneen saarekesolukarsinooman ja karsinoidikasvaimen hoidossa (Elonen ja muut 2001). Se valittiin testattavaksi lähinnä sen antibiootiksi pienen molekyyli­massansa takia.

1.6 halogeenit, pseudohalidit ja radikaalit

Moderni kirurgia lähti kehittymään yli sata vuotta sitten, kun leikattavaa ihoa opittiin desinfiomaan tehokkaasti. (Stretton 1909) Fluori, kloori ja otsoni (tai niistä valmistetut kemikaalit) ovat tärkeitä juomaveden puhdistuksessa ympäri maailman, mutta useimmissa sovellutuksissa fluori, kloori ja otsoni ovat liian reagoivia, että niitä voitaisiin turvallisesti käyttää. (Petrucci ja muut 2007). Näiden kaikkien

yhdistävänä tekijänä on niiden suuri reagoivuus erilaisten kemikaalien kanssa, jolloin mikrobien on hyvin vaikea kehittää resistanssia niitä vastaan.

Jodi (I) on ihmiselle välttämätön alkuaine (Nelson ja Cox 2008). Jodi tinktuura on käytetty jo yli sata vuotta haavojen desinfiointi aineena (Schutze 1915). Samoin jodia tai sen yhdisteitä ovat kirurgit käyttäneet leikkauksissa ihon antimikrobiaalisessa käsittelyssä. (Stretton 1909) Jodi tinktuuran vaikuttavana ionina pidetään polyhalidi-ioniä I_3^- . Polyhalidi ioni syntyy I⁻-ionin ja alkuainemuodossa olevan jodin I₂ reagoidessa stoikiometrisesti keskenään. (Petrucci ja muut 2007)

Natriumazidia (NaN₃) käytetään rakettipolttoaineena, räjähteiden valmistuksessa, turvavyöryissä ja liuennon hapen poistamiseen vesiliuoksesta. Azidit ovat pseudohalideja, jotka reagoivat vedessä myrkylliseksi hydrasiiniksi. (Petrucci ja muut 2007) Natriumazidi tunnetaan bakteerien kasvua inhiboivana yhdisteenä. (Snyder ja Lichstein 1940) NaN₃ tiedetään vaikuttavan *E. coli*:ssa aerobiseen soluhengitykseen (Anraku ja muut 1975).

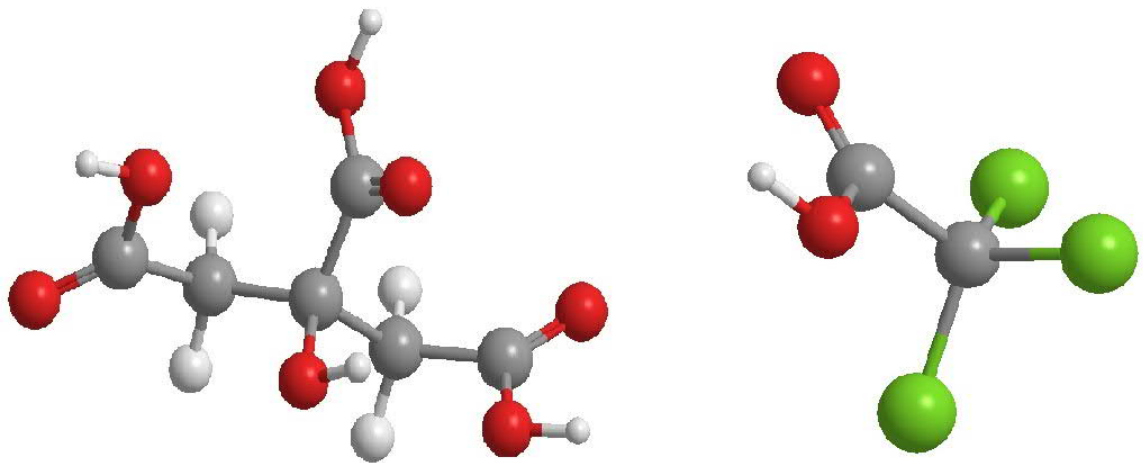
Natriumhypokloriittia (NaOCl) käytetään valkaisuaineena, juomaveden ja uima-altaiden puhdistukseen (Petrucci ja muut 2007). Natriumhypokloriittia on tutkittu jo 1900-luvun alkupuolella desinfiointiaineena ja haavojen puhdistukseen (Schutze 1915). Natriumhypokloriitin puoliintuminen liuoksessa on nopeampaa, jos siinä on helposti hapettuvia epäorgaanisia ioneja tai orgaanisia yhdisteitä, jotka sisältävät -NH₂ ja -CHO⁻ ryhmiä (Ishihara ja muut 2017).

Vetyperoksidia (H₂O₂) käytetään piilolinssien desinfiointissa (Petrucci ja muut 2007). Lisäksi sitä on käytetty antiseptinä haavoihin (M'Kenzie 1908). Vetyperoksidi reagoi muodostaen radikaaleja vapauttaen samalla hapetta Haberin ja Weissin reaktioiden mukaisesti (Haber ja Weiss 1932). Vetyperoksidin muodostuminen on myös osa ihmisen immuunijärjestelmän toimintaa (Roos ja Winterbourn 2002). Vetyperoksidin tehokkuuteen vaikuttaa bakteerien tuottamien katalaasien määrä ja liuoksessa olevien muiden reagoivien yhdisteiden määrä. Vetyperoksidin vaikutus

on tehokkaampi vähäisempien mikrobimäärien kanssa. (Martin ja muut 2015)

1.7 Happoja ja emäksiä

Happoja ja emäksiä on käytetty avuksi ruuan säilömisessä jo esihistoriallisella ajalla. Ne siirtävät ruuan pH:n sellaiselle tasolle, jossa vain harvat mikrobit menestyvät. Natriumin ja Kaliumin lipeät ovat hyvin käytettyjä, mutta litiumlipeä on huonommin tunnettu. Toisin kuin kaliumin ja natriumin lipeät litiumia ei käytetä ruuan säilönnässä (Petrucci ja muut 2007). Sitruunapon ja trikloorietikkahapon rakenteet on esitetty alla kuvassa 10.



Kuva 10. Sitruunapon (vasemmalla) ja trikloorietikkahapon (oikealla) rakenteet. Happiatomit on merkitty punaisella. Punaisella on merkitty happi-, harmaalla hiili-, vihreällä kloori- ja valkoisella vetyatomit.

Toisin kuin natrium-ionit tai kalium-ionit, litium-ionit eivät ole ihmiselle välttämättömiä (Nelson ja Cox 2008). Litium-suoloja käytetään mielialalääkityksessä. Litiumhydroksidia LiOH käytetään erikoisvahojen

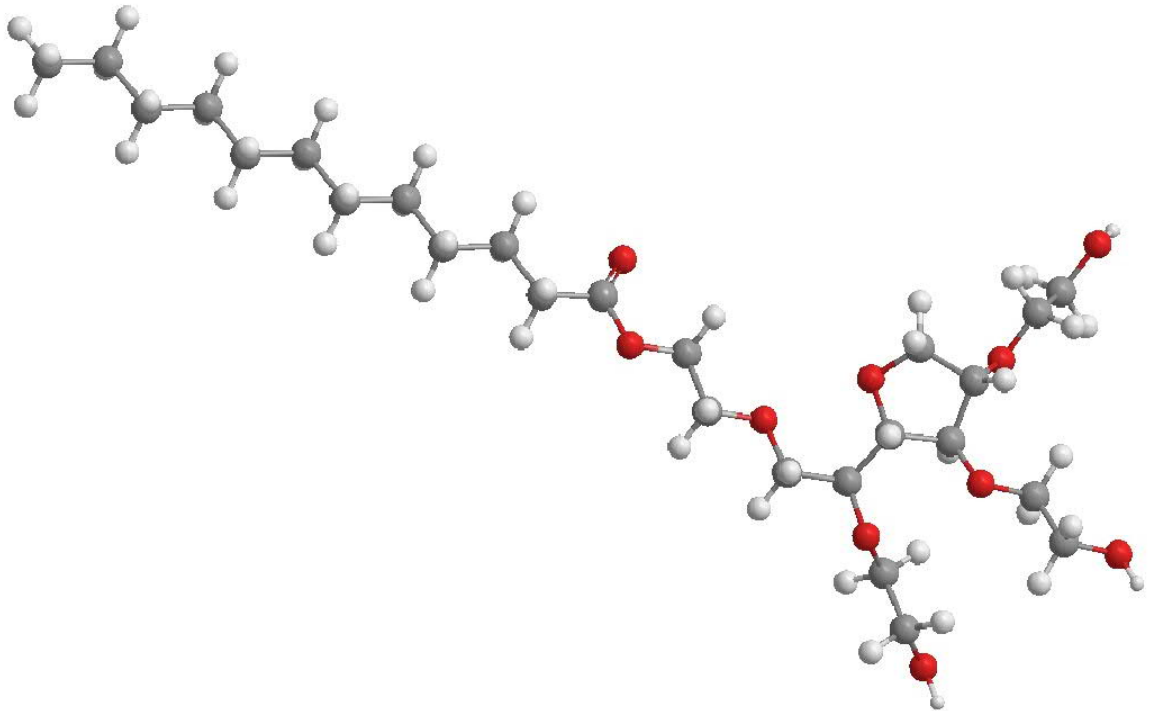
valmistukseen. (Petrucci ja muut 2007). Taloudellisesti tärkein litiumin käyttökohte on kuitenkin akut.

Sitruunahappoa (rakenne kuvassa 10) esiintyy sekä prokaryooteissa, että eukaryooteissa osana Krebsin sykliä (Nelson ja Cox 2008). Sitruunahapon antimikrobiaalinen vaikutus perustuu sekä pH:n laskuun, että sitruunahapon kykyyn kelatoida metalli-ioneja. Fermentoimalla tuotettua sitruunahappoa käytetään elintarvikkeissa säilöntä- ja happamuudensäätöaineena. Sen elintarvike koodi on E330. Sitruunahappoa käytetään yleisesti moniin elintarvikkeisiin. (Brul ja Coote 1999) On mahdollista, että fermentoimalla tuotettuun sitruunahappoon jää epäpuhtautena *Aspergillus niger*:n solukomponentteja (Salkinoja-Salonen 2016).

2,2,2-trikloorietikkahappoa (engl. Trichloroacetic acid, TCAA) pKa on 0,65, mikä on noin 10000 kertaa happamampaa, kuin etikan pKa 4,76. TCAA rakenne on esitetty kuvassa 10. Kenttävaikutuksen avulla negatiivisesti varautunut elektronipari delokalisoituu koko TCAA molekyyliin elektroniverhoon. Tämän ansiosta liuoksen molekyylit ovat vähemmässä vuorovaikutuksessa TCAA:n kuin etikkahapon kanssa ja varauksen jakautuminen myös lisää TCAA:n vakautta. (March 1985) TCAA:ta on käytetty proteiinien sakkaamiseen jo 40-luvulta lähtien (Hock ja Vallee 1949). TCAA on käytetty myös rikkaruohomyrkkynä, mutta sen käytöstä on luovuttu Euroopan unionin alueella (Lewis ja muut 2004) .

1.8 Tensidit

Useat kationiset ja anioniset tensidit tunnetaan bakterisidisinä, koska ne reagoivat bakteerin soluseinän kanssa hajottaen sitä. Varauksettomien tensidejä ei pidetä niin tehokkaina, mutta varsinaisia tutkimuksia on varsin vähän. Polyoksietyleenisorbitaanimonolauraatti, joka tunnetaan myös kauppanimellä Tween 20, rakenne on esitetty kuvassa. Polyoksietyleenisorbitaanimonolauraatin tiedetään haittaavan ainakin *Aspergillus parasiticus* kasvua ja sen tuottamien toksiinien määrää. (Tanuja ja muut 2010)



Kuva 11. Polyoksietyleenisorbitaanimonolauraatin rakenne. Polyoksietyleenisorbitaanimonolauraatti on varaukseton tensidi. Punaisella on merkitty happi-, harmaalla hiili- ja valkoisella vetyatomit.

1.9 Ilmavirran mukana kulkeutuvien myrkköjen spektrofotometrinen kokonaistoksisuus mittaaminen

Ilman mukana kulkee suuri joukko kemiallisesti erilaisia yhdisteitä kaasuina, nesteinä ja hiukkasina. Yksittäisen tunnetun yhdisteen etsiminen ja pitoisuuden määrittäminen onnistuu kemiallisin metodein, mutta eri olomuodoissa olevien yhdistelmäkemikaalien, määrittäminen ei nykyteknologialla ole käytännössä mahdollista. Hiukkasia syntyy luonnollisten prosessien seurauksena tai ihmisen toiminnasta, kuten liikenteessä tai teollisuudessa. Riippumatta hiukkasten laadusta 2,5 μm -0,3 μm kokoiset hiukkaset sisälsivät lipofiilisiä myrkköjä kaikkein eniten. (Billet ja muut 2018)

Homekasvustot tuottavat itiöitä, myös monet bakteerit kuten aktinomyketit tuottavat

itiöitä, jotka pienekokoisina hiukkasina voivat itsessään aiheuttaa terveysvaikutuksia. Maatiloilla, joissa oli kärsitty hengitystieongelmista, vaihtelut näytteiden välillä olivat suuria. 2 % -65 % itiöistä esiintyi yksittäisinä ja loput aggregoituneina hiukkasina. Lajeissa oli suurta vaihtelua, mutta 67 % -100 % näytteiden hiukkasista oli kooltaan alle 10 μ m. Hiukkasia oli osassa näytteitä yli 10¹⁰/m³. (Karlsson ja Malmberg 1989). Myrkyä tuottamattomien ja infektiota aiheuttamattomien sienten ja bakteerien itiöiden turvallisena ylärajana pidetään 10⁶/m³ (Eduard ja muut 2012)

Monet mikrobit itsessään voivat aiheuttaa haittaa ihmiselle. Sen lisäksi mikrobien palaset, entsyymit, toksiinit, $\beta(1 \rightarrow 3)$ -glukaanit ja mahdolliset allergeenit voivat aiheuttaa myös terveysvaikutuksia. (Eduard ja muut 2012) Ainakin *Aspergillus westerdijkiae* ja *Aspergillus versicolor* tuottavat myrkyllisiä ekstroliitti pisaroita, jotka voivat levitä rakenteista alipaineiseen sisätilaan kosteuden kuljettamana. Pisarat sisältävät sienien itiön ja lipofiilisiä mahdollisesti toksisia aineita. (Salkinoja-Salonen 2016) Aktinobakteerit, tunnetaan myös sädesieninä, itiöissä on aktiivisia entsyymejä itiön pinnalla. (Gazenko ja muut 1998) Myös immuunivastetta aiheuttavia arkkeja on löydetty aerosoleista, vaikka arkkeja on tähän asti pidetty täysin vaarattomina ihmiselle. (Lecours ja muut 2011)

Haihtuvia orgaanisia yhdisteitä kutsutaan VOC:ksi (engl. volatile organic compound). VOC:ja syntyy ihmisen tuottamista kemikaaleista, elävistä eliöistä ja kemiallisten reaktioiden seurauksena ilman elämää. Tarkkaa mikrobien tuottamien VOC:ien biologista funktiota ei tunneta, mutta ne voivat vahingoittaa suurissa määrissä kilpailevia eliöitä ja osaa VOC:sta esiintyy laajasti eri mikrobien välillä ja niillä arvellaan olevan merkitystä lajien välisessä viestimisessä. (Schulz ja muut 2010) *Aspergillus niger* 129B-kannan tuottamat VOC:t aiheuttivat 80 % kuolleisuuden *Drosophila melanogaster*:lle 12 päivässä. Verrattuna muihin tutkimuksessa mukana olleisiin vähemmän vaarallisiin kantoihin tuotti se enemmän: 1-okteeni-3-olia, 3-oktanonia, 3-oktanolia, 2-okteeni-1-olia ja 2-nonanoneniinia (Zhao ja muut 2017)

Mikrobien tuottamien VOC:n määrä ja laatu vaihtelevat kasvuympäristön, ilmankosteuden, ja mikrobilajien mukaan. Homeet selvisivät rakennusmateriaaleissa myös pitkän ajan itäisinä, vapauttaen VOC:ja, 32 % - 33 % suhteellisessa kosteudessa. Kunhan materiaali oli ensin kertaalleen kostunut itämisen ajaksi. 1-okten-3-olia, limoneenia, asetonia, butanonia, 2-pentanonia, 3-metyyli-2-pentanonia, 2-heksanonia ja 3-oktanonia on havaittu lisääntyvän eri rakennusmateriaalien homeutuessa tutkimuksessa käytetyillä homeilla. Tuottuneiden VOC:n perusteella ei kuitenkaan useimmissa tapauksissa voida päätellä niiden tuottaja mikrobia. (Korpi ja muut 1998)

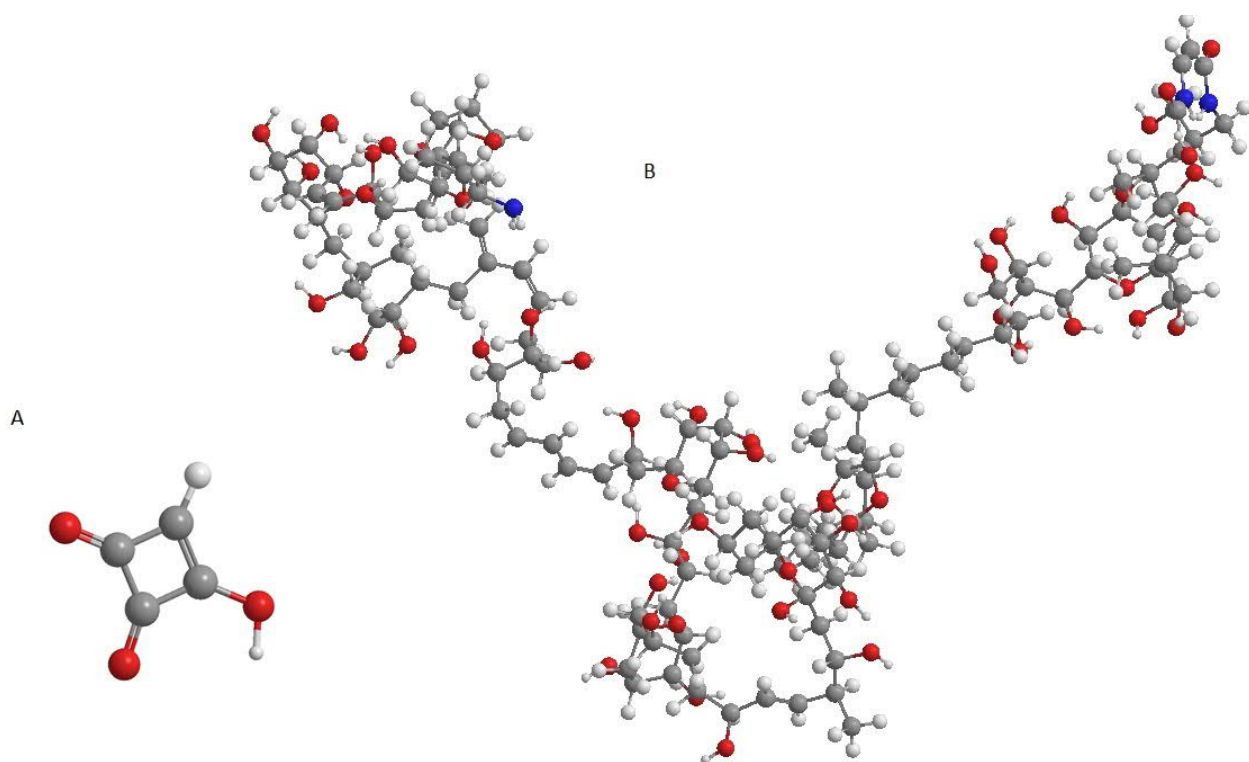
Aerosolien ja VOC:n molempien läsnä ollessa on ihmisten oireilu yleisempää (Norbäck ja muut 1990). Kaasufaasissa olevat myrkyt voivat, fyysisten ja termodynaamisten prosessien, avulla rikastua pienhiukkasiin ja tehdä pienhiukkaset myrkyllisemmiksi. Pienten hiukkasten kulkeuma keuhkoihin eroaa kaasuista, joten ne voivat kuljettaa mukanaan haitalliset aineet syvälle ihmisen keuhkoihin ja siirtää fyysisen kontaktin avulla hiukkasta ympäröivät myrkyt suoraan kudokseen. (Ebersviller ja muut 2012)

Kaikki mikrobien tai ihmisten tuottamat yhdisteet eivät haihdu tarpeeksi helposti ollakseen VOC:ja. Osaa huonommin haihtuvista yhdisteistä kutsutaan osittain haihtuviksi orgaanisiksi yhdisteiksi (engl. semi-volatile organic compounds, SVOC). SVOC:n etenemiselle ilmassa tärkeänä pidetään sitoutuuko se aerosoleihin vai pysyykö se kaasufaasissa ja laskeutuuko pinnoille pölyn mukana vai jääkö se kaasufaasiin tai aerosoleihin kiinni. (Wei ja muut 2016) Amerikkalaisissa kodeissa tehdyssä tutkimuksessa, jossa etsittiin 76 potentiaalisesti haitallista SVOC:a, löydettiin 60 SVOC:a.. Näistä ennalta valituista teollisista kemikaaleista löydettiin 11 eri Ftalaattia, 3 eri polybrominoitua difenyylietteriä, 3 eri polykloorattua bifenyyliä, 24 eri polysyklisiä aromaattista hiilivetyä ja 36 eri tuholaisten torjunta-ainetta. Tärkeänä SVOC:n kohtalon määrääjänä, päätyykö se pölyyn, ilmaan vai molempiin pidetään oktanoli/ilma suhdetta. Tosin tämä ei ota huomioon pölyn tai ilman

kemiallisen koostumuksen vaihtelua. (Dodson ja muut 2015)

Eräs tunnettu useiden eri toksiinien tuottaja suku on *Fusarium*. *Fusarium* -suvun yleisin Toksiini on moniliformiini kuva 12 (Fotso ja muut 2002). Moniliformiini löydettiin vuonna 1973 *Fusarium moniliforme* sienestä (Cole ja muut 1973). Sitä tuottavat ainakin *F. Verticillioides*, *F. pseudonygamai*, *F. ramigenum*, *F. tricinctum*, *F. acutatum*, *F. anthophilum*, *F. bulbicola*, *F. concentricum*, *F. begoniae*, *F. denticulatum*, *F. lactis*, *F. nisikadoi*, *F. phyllophilum*, *F. pseudocircinatum*, *F. diaminii*, *F. fujikuroi*, *F. napiforme*, *F. nygamai*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. thapsinum*, *F. beomiforme*, *F. redolens*, *F. chlamydosporum*, *F. arthrosporiodes*, *F. pseudoanthophilum*, *F. sacchari*, *F. avenaceum* *F. acuminatum* ja *F. oxysporum*. (Fraeyman ja muut 2017) Moniliformiini ei kuitenkaan ole vain *Fusariumin*-suvun tuottama Toksiini vaan myös *Penicillium melanoconidium* tiedetään tuottavan moniliformiinia (Hallas-Møller ja muut 2016). Lisäksi osasta on olemassa moniliformiinia tuottamattomia kantoja, joten pelkkä kasvustojen ulkonäköön perustuva tarkastelu ei kerro kasvustojen vaarallisuudesta. Se indikoi ainoastaan vallitsevista kasvuolosuhteista (Fotso ja muut 2002; Salkinoja-Salonen 2016).

Moniliformiinin haitallisten vaikutusten oletetaan johtuvan sen vaikutuksesta pyruvaatti dehydrogenaasille, joka on oleellinen entsyymi asetyyli-CoA:n muodostumiselle primäärisessä aineenvaihdunassa (Fraeyman ja muut 2017). Moniliformiini on pieni hyvin tunnettu Toksiini (moolimassa 98.057 g/mol), mutta jopa huomattavasti suurempi massaista palytoksiinia (moolimassa 2680.17 g/mol) on tavattu aerosoleista. Moniliformiinin ja palytoksiinin rakenteet on esitetty alla kuvassa 12. (Ciminiello ja muut 2014)



Kuva 12. Kuvassa on moniliformiinin ja palytoksiinin rakenteet. Vasemmalla on moniliformiinin rakenne, joka on merkitty symbolilla (A). Oikealla on palytoksiinin rakenne, joka on merkitty symbolilla (B). Punaisella on merkitty happi-, sinisellä typpi-, harmaalla hiili- ja valkoisella vetyatomit.

Rakennuksen mikrobivauriosta emittoituu sisäilmaan VOC:ja (Korpi ja muut 1998) ja Itiöitä toksiineineen (Salkinoja-Salonen 2016). Nämä molemmat vaikuttavat SVOC:n määrään (Wei ja muut 2016). Kosteusvauriomikrobeille altistumisen onkin havaittu lisäävän astman riskin 4-5 kertaiseksi kantaväestöön verrattuna (Karvala ja muut 2010; Pekkanen ja muut 2007) Hengitysteihin liittyvien ongelmien lisäksi pitkäaikaisessa altistumisessa reuman ja nivelrikon riski kasvaa (Luosujärvi ja muut 2003; Mendell ja muut 2011). Useiden eri alojen ammattilaisten tiedetään kärsivän sisäilmaongelmista, kuten hoitajien, maanviljelijöiden, ja opettajien (Hellgren ja Reijula 2011; Erkinjuntti-Pekkanen ja muut 1998; Mendell ja muut 2011).

1.10 Työn tavoitteet

Tämän työn tarkoituksena oli: testata *E.coli-lux*:n isomman mittakaavan kasvatusta LB-mediumissa, kokeilla tämän kasvatuksen soveltuvuutta antibioottien vaikutuksen mittaukseen ja kehittää tapa mitata liuottimien toksista vaikutusta *E. coli-lux*:lle, mikä on ollut aikaisemmin ongelmallista. Lisäksi tarkoituksena oli kokeilla syanidipitoisuuden mittausta tiosyanaatin mittausta hyväksi käyttäen ja kehittää mittausta ilmavirran mukana kulkevien yhdisteiden kokonaistoksikologista vaikutusta *E. coli-lux*:n avulla, mitä tämän työn laatimisen aikoihin ei tiedetä kenenkään muun testanneen.

2 Materiaalit ja menetelmät

LB-mediumin (engl. Liquid broth, LB) valmistus: lisätään tryptonia 10 g/l, hiivauutetta 5 g/l ja NaCl 5 g/l veteen (MQ) ja autoklavoidaan.

Pakastetun esikasvatuksen valmistus: *E. coli* -lux siirrostettiin 1 μ l silmukalla autoklavoituun LB-mediumiin + 100mM ampisilliinia. Kasvatetaan logaritmisen kasvuvaiheen alkuun saakka +37 °C, 80rpm ja valolta suojattuna (Shaker Bath SBS30, Stuart Scientific). Sentrifugoidaan 2000g ja otetaan pelletti talteen. Pelletti suspensoidaan liuokseen: tryptonia 5 g/l hiivauutetta 2,5 g/l NaCl 2,5 g/l glyserolia 25 % v/v. Näytettä pakastetaan -80°C, kunnes tarvitaan.

2.1 Spektrofotometrinen kokonaistoksisuusmääritys

E. coli -lux pakastettua esikasvatusta lisätään 0,1 % v/v autoklavoituun LB-mediumiin Kasvatetaan logaritmisen kasvuvaiheen alkuun saakka ja toinen stationääri o/n +37 °C, 80rpm ja valolta suojattuna (Shaker Bath SBS30, Stuart Scientific). Tämän jälkeen kasvatukset jaetaan 50ml eriin tappo testiä varten. Bioluminesenssia seurattiin nestetuikespektrometrilla (Liquid scintillation counter, Hidex) 1,5ml näytteestä kyvettissä. OD₆₂₀:tä mitataan 620 nm, \pm 2nm (ultrospec 7000, GE healthcare) samasta 1,5ml näytteestä kyvettissä, kuin bioluminesenssikin. Testattuja yhdisteitä olivat: polymyxin b 1 mg/l, etanoli 20 % v/v, NaOCl 0,3 % m/v, kanamysiini 1 μ mol/l, NaOCl 0,1 % m/v, NaOCl 0,05 % m/v, I-tinktuura 0,3 % m/v, I-tinktuura 0,1 % m/v, ampisilliini 3mmol/l, ampisilliini 30mmol/l, CuCl₂ 0,1 mol/l, CuSO₄ 0,1 mol/l, NaN₃ 3 mmol/l, As₂O₅ 0,1mmol/l, HCCl₃ 5 g/l, H₂O₂ 0,3 % m/v, CoCl₂ 0,1 mol/l, CoSO₄ 0,1 mol/l, ZnSO₄ 0,1mol/l, LiOH 1 mol/l, asetoni 10 % v/v, 1-butanoli 10 % v/v, CdCl₂ 0,1 mol/l, Pb(NO₃)₂ 0,1 mol/l, etanoli 5 % v/v, isopropanoli 10 % v/v, sitruunahappo 2,4 mol/l, AgNO₃ 1 mmol/l, B(OH)₄ 1 g/l, B(OH)₄ 2 g/l, Na₂B₄O₇ 1 g/l, Na₂B₄O₇ 2 g/l, 2-etyyli-1heksanoli 2% v/v+ 5,6 % v/v, etanoli 5,6%, polyoksietyleenisorbitaanimonolauraatti 0,05 % v/v, polyoksietyleenisorbitaanimonolauraatti 0,1 % v/v, Fe₂(SO₄)₃ 1/6 mol/l ja TCAA 5 %

m/m

3.1.1 Fluoresenssi

Tappokasvatusta laimennetaan 1ml 75 % v/v+ H₂O (MQ) 25 % v/v MQ sentrifugoitiiin 12128g 10min, jonka jälkeen supernatantti poistetaan. Supernatantin poiston jälkeen pelletti suspensoidaan 200µl H₂O (MQ) ja siitä pipetoidaan 200µl 96-kuoppalevylle. Mitataan fluoresenssi +37°C, eksitaatio 485nm, ±10nm ja emissio 595nm, ±10nm (Hidex Sense). Fluoresenssilla testattuja yhdisteitä olivat CoCl₂ 0,1 mol/l, CoSO₄ 0,1 mol/l, ZnSO₄ 0,1 mol/l, AgNO₃ 0,01 mol/l, LiOH 1 mol/l, asetoni 10 % v/v, 1-butanoli 10 % v/v, isopropanoli 10 % v/v, etanoli 5 % v/v, etanoli 5,6 % v/v, sitruunahappo 2,4 mol/l, B(OH)₄ 1 g/l, B(OH)₄ 2 g/l, Na₂B₄O₇ 1g/l, Na₂B₄O₇ 2g/l, 2-etyyli-1heksanoli 2 % v/v+ 5,6 % v/v, etanoli 5,6%, Polyoksietyleenisorbitaanimonolauraatti 0,05 % v/v ja Polyoksietyleenisorbitaanimonolauraatti 0,1 % v/v.

3.1.2 Tiosyanaatti

Otetaan 2ml näyte, siihen lisätään 0,033 % m/v natriumhypokloriitti. Vorteksoidaan hyvin ja lisätään 5 % m/m TCAA, annetaan reagoida 30min korkilla suljettuna. Sentrifugointi 12128g 10min. Otetaan supernatantti talteen. Lisätään vähintään 2h, RT liukenemassa ollutta 83,1/3 mM Fe₂(SO₄)₃. Mitataan absorpanssi 495nm (ultrospec 7000, GE healthcare)

3.1.3 Ilmavirran mukana kulkeutuvien myrkkujen spektrofotometrinen kokonaistoksisuus mitta

Syöttöpaine säädetään välillä 0,05bar-0,2bar. *E. coli* -luxin LB mediumissa + 100mM ampicilliinia o/n kasvanutta jaetaan 4 rinnakaiseen toksisuustestiin falcon-putkiin 40ml ja kontrolliin erlenmeyrissä samassa valo, ravistelu 50rpm ja lämpökontrolloidussa tilassa (Shaker Bath SBS30, Stuart Scientific). Haihdutettava myrky laimennettiin liuottimeen, jonka läpi syöttöilma kuplitetaan haihtumisen

edistämiseksi. Kuplituksesta ilmavirta johdettiin falconeihin (50ml) ruiskuneulojen tai pitkien pipetinkärkien läpi 40ml *E. coli*- lux kasvatusta. Annetaan haihtua o/n ja mitataan bioluminesenssi nestetuikespektrometrilla (Liquid scintillation counter, Hidex). Testattuja yhdisteitä olivat monilliformiini, streptotsosiini ja 2-etyyliheksanoli.

3.2 Maljat

Liuottimiin käytettiin lasisia petri-maljoja, jotka tiivistettiin haihtumisen hidastamiseksi. Tiivistämistä varten testattiin kylläiset liuokset ja niiden yhdistelmiä: Na_2SO_4 , CuCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, NaCl , KCl , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, NaOH , glukoosi ja D(+)-sakkaroosi. Tiiviys testattiin 3ml asetonia 72 tunnin ajan ja paras yhdistelmä valittiin.

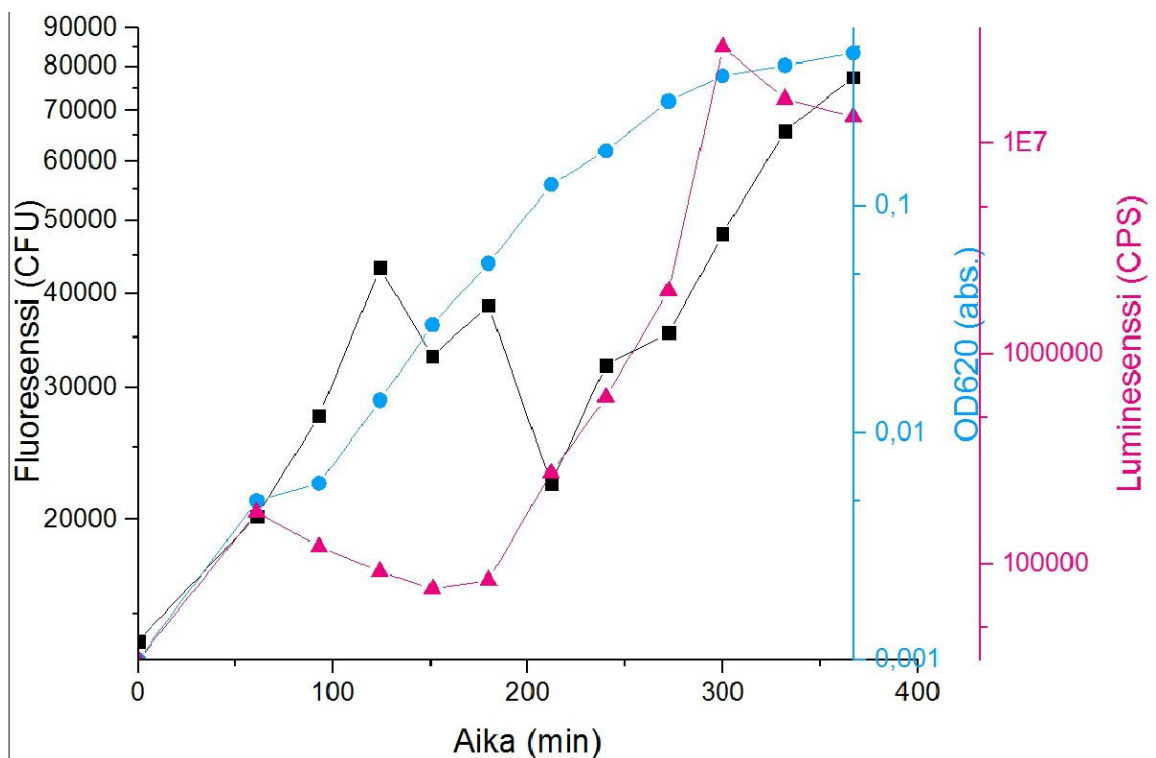
Ensiksi valettiin 5cm lasiset LA-maljat (engl. liquid broth agar, LA) tryptonia 10g/l, hiivauutetta 5g/l, NaCl 5g/l, Agar 16 g/l ja 100mM ampisilliinia. Tämä pieni lasimalja asetettiin oikeinpäin ylösalaisin olevan isomman lasimaljan sisälle. Siirrostettiin aseptisesti 100 μl *E. coli* -lux laimennusta LB-mediumissa. Tämän jälkeen lisättiin testattavaa liuotinta: 5 g/l trikloorimetaania, 10 % v/v asetonia, 10 % v/v 1-butanolia, 10 % v/v isopropanolia, etanolia 20 % v/v ja 2-etyyli-1-heksanolia + 2 % v/v +etanolia 5,6 % v/v. Liuottimen lisäämisen jälkeen lasisen petri-maljan pohjan päälle asetettiin välittömästi n. 1Kg punnus ja tiivistettiin kylläisellä $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + D(+)-sakkaroosi tiivistysliuoksella kannen ja pohjan välinen tila. Kiteytymisprosessin aloittamiseksi käytettiin D(+)-sakkaroosin kiteitä. Jokaisesta testattavasta liuottimesta tehtiin kaksi rinnakkaista lasista LA-maljaa ja kontrollista valmistettiin kolme rinnakkaista lasista LA-maljaa.

Epäorgaanisetsuolo-Maljat: valmistettiin La-maljoja tryptonia 10g/l, hiivauutetta 5g/l, NaCl 5g/l, 16 g/l ja 100mM ampisilliinia +0,1M tappoon käytettyä yhdistettä: CuSO_4 , CuCl_2 , $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, CoCl_2 , CoSO_4 , Sitruunahappo ja ZnSO_4 , joista tehtiin 3 rinnakkaista ja 3 kontrollia. Valmistettiin La-maljoja tryptonia 10g/l, hiivauutetta 5g/l, NaCl 5g/l, Agar 20 g/l ja 100mM ampisilliinia +0,01M tappoon käytettyä yhdistettä: AgNO_3 , CuSO_4 , CuCl_2 , $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, CoCl_2 , CoSO_4 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, Sitruunahappo ja

ZnSO₄. Valmistettiin 3 rinnakkaista ja 4 kontrollia. Lisäksi tehtiin La-maljoille tryptonia 10g/l, hiivauutetta 5g/l, NaCl 5g/l, Agar 16 g/l ja 100mM ampicilliinia, joilla testattiin + B(OH)₄ 1g/l ja Na₂B₄O₇ 1g/l .

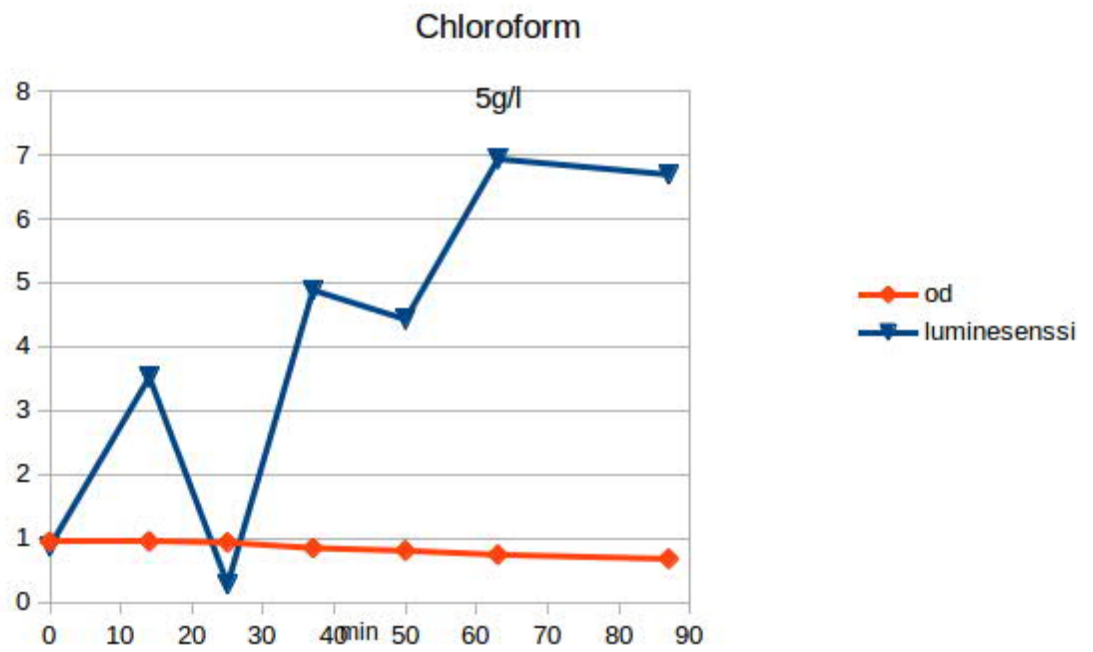
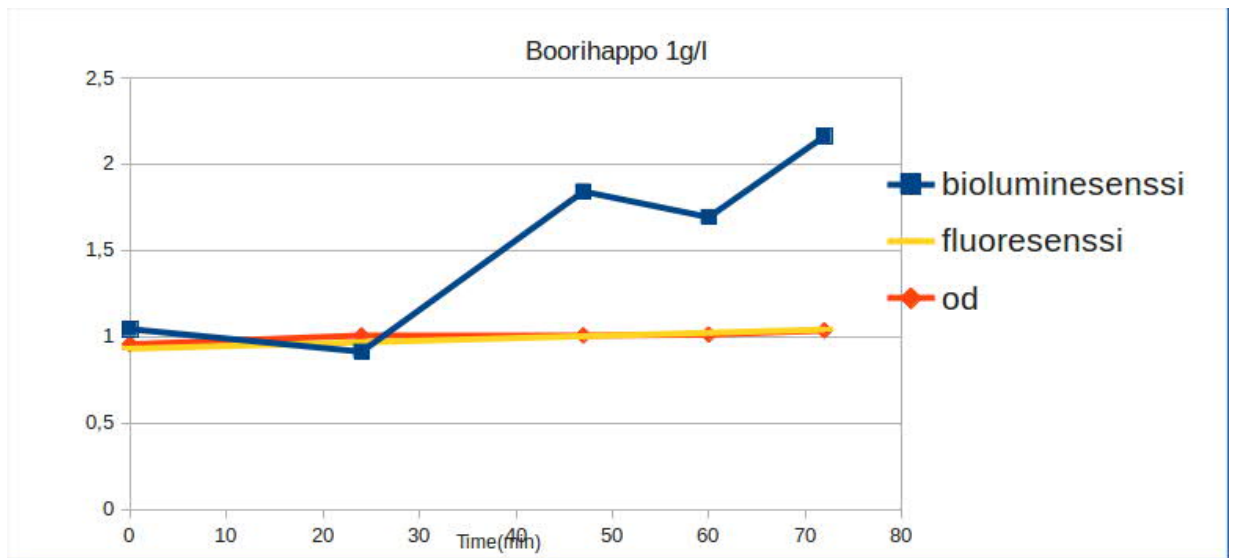
3 Tulokset

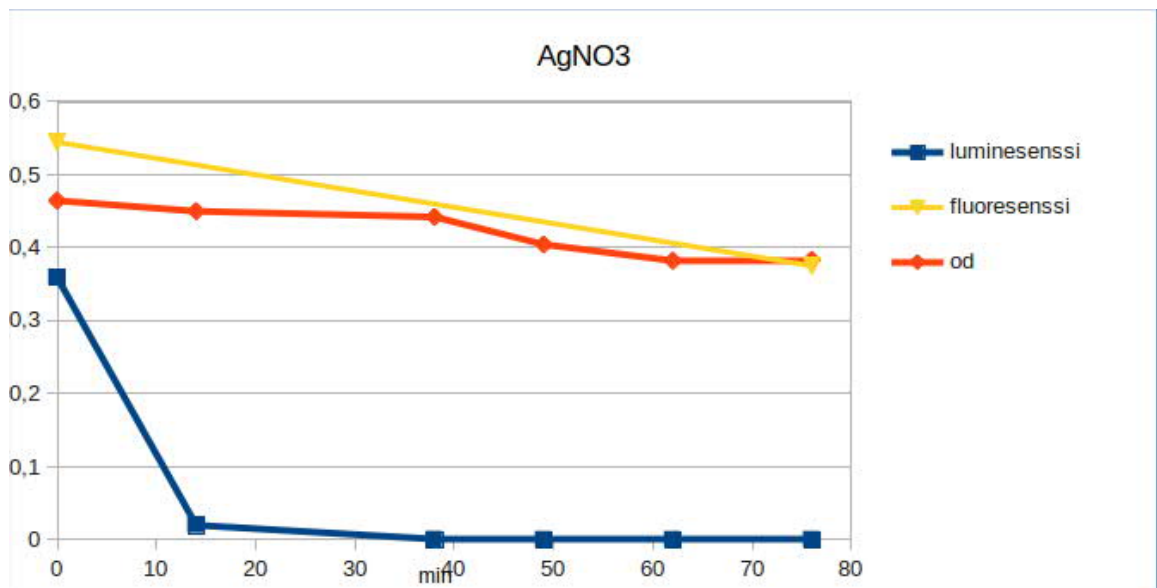
Mittauksissa tappokasvatusta verrataan aina samasta erästä otettuun vertailukasvatukseen, koska kasvatuksien välillä on niin paljon päivittäistä vaihtelua. Samasta kasvatuksesta jaettuna erot jäävät alle 0,1 %. Esimerkkikasvatus ilman jakoa tappokasvatukseen on kuvassa 13. Kuten siitä huomaa, fluoresenssi seuraa luminesenssin muotoa, mutta noin tunnin viiveellä.



Kuva 13. Esimerkkikasvatus *E. coli-luxilla*. Sinisellä ympyrällä on merkitty OD_{620} , punaisella kolmiolla bioluminesenssi ja mustalla neliöllä fluoresenssi. X-akselilla on aika ja logaritmisilla y-akseleilla tulokset.

Saadut tulokset voidaan jakaa 4 pääryhmään Stimulatoriseen, ei vaikutusta, bakteriostaattiseen ja bakterisidiseen. Esimerkit stimulatorisesta, bakteriostaattisesta ja bakterisidisestä normalisoitiin vertailukasvatukseen ja esitettiin kuvassa 14. Ei vaikutusta esittäminen kuvana ei ole järkevää, koska se olisi vain yksi viiva.





Kuva 14. Ylimmäisenä on stimulatorinen boorihappo($B(OH)_4$), keskimmäisenä bakteriostaattinen trikloorimetaani(kloroformi) ja alimmaisena bakterisidinen hopeanitraatti ($AgNO_3$). Sininen väri kuuluu bioluminesenssille, keltainen fluoresenssille ja punainen OD_{620} . Trikloorimetaanista ei ole tehty fluoresenssi mittausta.

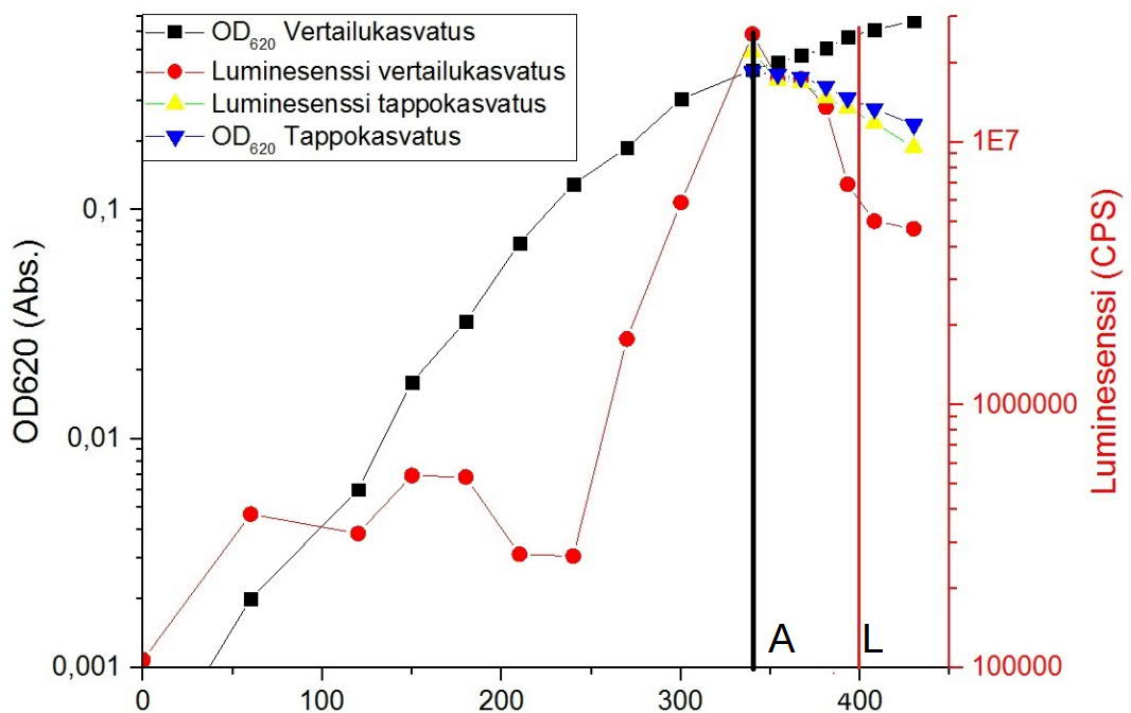
Stimulatorisessa kaikki OD_{620} , bioluminesenssi ja fluoresenssi ovat vähintään yhtä suuria, kuin vertailukasvatuksessa ja yksi tai enemmän niistä on suurempia kuin vertailukasvatus. Bakteriostaattisessa OD_{620} ei pienene alle OD_{620} lähtötason, mikä havaitaan kuvassa 14 kloroformissa OD_{620} hyvin hitaana erottimisena 1 tasosta, kun vertailu kasvatus jatkaa kasvuaan. Bakterisidisessa OD_{620} tippuu alle lähtötason.

3.1 Spektrofotometrinen kokonaistoksisuusmittaus

Monien epäorgaanisten suolojen kanssa esiintyy suolojen saostumista johtuen LB-mediumin runsaasta erilaisten ionien tarjonnasta. LB-mediumin ja reagenssin reagoidessa voi muodostua värillisiä yhdisteitä, jotka haittaavat spektrofotometrisiä mittauksia. Muutokset LB-mediumin absorptiossa testattiin erillisellä mittauksella. Tilanne mutkistuu kuitenkin lisää bakteerien ja/tai niiden metaboliittien muodostaessa värillisiä yhdisteitä reagenssien kanssa, koska näiden vaikutusta ei

pystytä kompensoimaan LB-mediumista tehtävän mittauksen avulla. Tällaisiksi absorptio mittausta häiritseviksi yhdisteiksi havaittiin Fe^{3+} -ioni, Cu^{2+} -ioni Ag^+ -ioni, sitruunahappo ja natriumhypokloriitti.

Taulukkoon 2 koottiin bioluminesenssin ja OD_{620} tulokset. Kaikissa kasvatuksissa normalisoitiin aina sen kertaisen vertailu kasvatuksen avulla. Mittauksen alkupisteen ja loppupisteen sijoittuminen kasvatukseen merkittiin kuvaan 15, joita käytetään taulukossa 2.



Kuva 15. Polymyxin b:n tappokasvatuksella ja vertailukasvatuksella. Bioluminesenssin ja OD_{620} alkupiste, on merkitty (A) ja loppupiste (L). X-akselilla on aika ja logaritmisilla y-akseleilla tulokset. Mustalla neliöllä on merkitty OD_{620} vertailukasvatukselle, punaisella ympyrällä vertailukasvatuksen bioluminesenssi, keltaisella kolmiolla tappokasvatuksen bioluminesenssi ja sinisellä kolmiolla tappokasvatuksen OD_{620} .

Taulukko 2. Eri tappokokeiden tulokset OD_{620} :lle ja bioluminesenssille kasvu- ja stationääri faasista. Bioluminesenssin ja OD_{620} :n arvot ovat laskennallisia, jos

mittauspiste ei ole osunut täsmälleen aikapisteen kohdalle. Alku- ja loppupiste on otettu kuvan 15 esimerkin tavoin. Alkupiste on vertailu vertailukasvatuksen ja tappokasvatuksen välillä prosentteina, heti tutkittavan yhdisteen lisäämisen jälkeen. Loppupiste on vertailu vertailukasvatuksen ja tappokasvatuksen välillä prosentteina, tunti tutkittavan yhdisteen lisäämisen jälkeen. Bioluminesenssin mennessä alle kymmenen kertaisen taustasignaalin -merkitään se. Kun OD₆₂₀ ei pystytty luotettavasti mittaamaan sakan, kuplien tai muiden vastaavien ilmiöiden vuoksi merkitään se --. Jokaisesta mittauspisteestä on 3 rinnakkaista.*

Kasvufaasi					
Aine	Pitoisuus	Bioluminesenssi alkupiste	Bioluminesenssi loppupiste	OD ₆₂₀ alkupiste	OD ₆₂₀ loppupiste
Polymyxin b	1 mg/l	85 %	213 %	98 %	50 %
Etanoli	20 % v/v	*	*	83 %	41 %
NaOCl	0,3 % m/v	0 %	0 %	--	--
Kanamysiini	1µmol/l	100 %	48 %	100 %	100 %
NaOCl	0,1 % m/v	117 %	176 %	95 %	93 %
NaOCl	0,05 % m/v	165 %	107 %	98 %	94 %
“Jodi-tinktuura”	0,3 % m/v	0 %	*	119 %	67 %
“Jodi-tinktuura”	0,1 % m/v	29 %	632 %	98 %	85 %
Ampisilliini	3mmol/l	106 %	69 %	96 %	98 %
Ampisilliini	30mmol/l	145 %	177 %	77 %	56 %
CuCl ₂	0,1 mol/l	6 %	*	86 %	68 %
CuSO ₄	0,1 mol/l	*	*	89 %	78 %
NaN ₃	3 mmol/l	7 %	164 %	100 %	80 %
As ₂ O ₅	0,1mmol/l	87 %	101 %	100 %	72 %
HCCl ₃	5 g/l	87 %	693 %	-	-
H ₂ O ₂	0,3 % m/v	45 %	63 %	95 %	67 %
CoCl ₂	0,1 mol/l	291 %	16 %	86 %	75 %
CoSO ₄	0,1 mol/l	301 %	164 %	90 %	76 %
ZnSO ₄	0,1mol/l	0 %	*	--	--
LiOH	1 mol/l	0 %	*	69 %	56 %
Asetoni	10 % v/v	0 %	*	75 %	56 %
1-Butanoli	10 % v/v	*	*	--	--

CdCl ₂	0,1 mol/l	0 %	*	--	--
Pb(NO ₃) ₂	0-1 mol/l	30 %	0 %	--	--
Etanoli	5 % v/v	66 %	832 %	85 %	77 %
Isopropanoli	10 % v/v	0 %	*	80 %	65 %
Sitruunahappo	2,4 mol/l	*	*	--	--
AgNO ₃	1 mmol/l	36 %	*	--	--
B(OH) ₄	1 g/l	104 %	170 %	96 %	101 %
B(OH) ₄	2 g/l	106 %	206 %	96 %	96 %
Na ₂ B ₄ O ₇	1 g/l	102 %	171 %	95 %	111 %
Na ₂ B ₄ O ₇	2 g/l	107 %	162 %	93 %	93 %
2-etyyliheksa-1-olia etanolissa	2%/5,6% v/v	6 %	*	--	--
Etanoli	5,6 %	96 %	131 %	96 %	103 %
Polyoksietyleenisorbitaanim onolauraatti	0,05	63 %	73 %	97 %	106 %
Polyoksietyleenisorbitaanim onolauraatti	0,5	79 %	53 %	72 %	60 %
Fe ₂ (SO ₄) ₃	1/6 mol/l	*	*	--	--
TCAA	5 % m/m	*	*	--	--
Stationäärifaasi					
Polymyxin b	1 µg/ml	100 %	73 %	96 %	98 %
Etanoli	20 % v/v	*	*	96 %	82 %
NaOCl	0,3 % m/v	7 %	0 %	--	--
Kanamysiini	1µmol/l	770 %	144 %	100 %	100 %
NaOCl	0,1 % m/v	12 %	2 %	84 %	85 %
NaOCl	0,05 % m/v	2 %	36 %	87 %	87 %
“Jodi-tinktuura”	0,3 % m/v	0 %	*	100 %	61 %
“Jodi-tinktuura”	0,1 % m/v	0 %	*	82 %	83 %
Ampisilliini	3mmol/l	145 %	121 %	85 %	83 %
Ampisilliini	30mmol/l	73 %	75 %	63 %	61 %
CuCl ₂	0,1 mol/l	9 %	*	79 %	84 %

CuSO ₄	0,1 mol/l	0 %	*	84 %	96 %
NaN ₃	3 mmol/l	137 %	4 %	100 %	87 %
As ₂ O ₅	0,1mmol/l	139 %	2 %	100 %	95 %
HCCl ₃	5 g/l	44 %	21 %	--	--
H ₂ O ₂	0,3 % m/v	2 %	35 %	86 %	86 %
ZnSO ₄	0,1mol/l	25 %	0 %	-	-
LiOH	1 mol/l	0 %	*	88 %	5 %
Asetoni	10 % v/v	*	*	91 %	84 %
1-Butanoli	10 % v/v	0 %	0 %	--	--
CdCl ₂	0,1 mol/l	44 %	*	--	--
Pb(NO ₃) ₂	0,1 mol/l	11 %	*	--	--
Etanoli	5 % v/v	334 %	109 %	89 %	77 %
isopropanoli	10 % v/v	0 %	*	89 %	78 %
Sitruunahappo	2,4 mol/l	*	*	--	--
AgNO ₃	1 mmol	20 %	*	--	--
B(OH) ₄	1 g/l	78 %	67 %	75 %	65 %
B(OH) ₄	2 g/l	75 %	61 %	77 %	67 %
Na ₂ B ₄ O ₇	1 g/l	115 %	121 %	85 %	77 %
Na ₂ B ₄ O ₇	2 g/l	119 %	157 %	88 %	77 %
2-etyyliheksa-1-olia etanolissa	2%/5,6% v/v	15 %	*	--	--
Etanoli	5,6 %	106 %	121 %	61 %	61 %
Polyoksietyleenisorbitaanim onolauraatti	0,05	90 %	73 %	78 %	69 %
Polyoksietyleenisorbitaanim onolauraatti	0,5	85 %	66 %	72 %	60 %
Fe ₂ (SO ₄) ₃	1/6 mol/l	*	*	--	--
TCAA	5 % m/m	*	*	--	--

Natriumhypokloriitilla (NaOCl) havaittiin myös kemiluminesenssia, kun sitä lisättiin LB-mediumiin. Kemiluminesenssi havaittiin konsentraatiosta ja ajasta

riippuvaiseksi. Kemiluminesenssi ensimmäisen 20 sekunnin jälkeen laski tasolle, jolla se pysyi konsentraatiosta riippuvaisesti. Testatuilla pitoisuuksilla pitkäkestoinen kemiluminesenssi signaali LB-mediumissa vaihteli 2-7 kertaa tausta signaalin verran.

Edellä mainitun lisäksi 0,3 % m/v natriumhypokloriitti tuotti kuplia, hajusta pääteltynä kloorikaasua, mikä teki OD₆₂₀:n mittaamisesta epäluotettavaa ja joka reagoi kasvatusta suojaavan alumiinifolion kanssa. Laimeammilla natriumhypokloriitti liuoksilla tummenemista tai kaasun muodostusta ei esiintynyt havaittavissa määrin.

Jodi-tinktuura värjäsi punaiseksi solut, jotka eivät tuottaneet bioluminesenssia. Jodi-tinktuuralle ei havaittu natriumhypokloritiin tapaan jodikaasun muodostusta tai kemiluminesenssia. Jodi-tinktuuran sisältämä etanoli pitoisuus jäi alle pienimmän kasvua haittaavan pitoisuuden (Mcdonell ja Russel 1999). I₃⁻-ionin oletetaan olevan Jodi-tinktuuran vaikuttava ioni, joskin se on jatkuvassa tasapainossa I⁻-ionin ja I₂ kanssa (Petrucci ja muut 2007).

As₂O₅ bioluminesenssi signaali voi osittain selittyä sillä, että se oli mittauksessa samanaikaisesti NaN₃ kanssa. NaN₃ muodostaa vesiliuoksessa hydrasiinia, joka haihtuu herkästi, kun kasvatukset olivat samassa lämpötila-, ravistus- ja valokontrolloidussa tilassa, voi hydrasiini mahdollisesti vaikuttaa myös vertailuna käytettyyn kasvatukseen.

Trikloorimetaani ja TCAA samensivat liuoksen, eikä niistä saatua OD₆₂₀ voida pitää luotettavana. 2-etyyli-1-heksanoli ja 1-butanoli irrottivat, oletettavasti rasvaa, eikä niistä saatua OD₆₂₀ tulosta voida pitää luotettavana. Bioluminesenssi tulokset saatiin näistä ilmiöistä huolimatta, tosin suurin osa bakteereista vaikuttaisi kuolevan, jos niiden lipidit muodostavat liuottimen kanssa oman kerroksen tappokasvatuksen pinnalle.

3.1.1 Fluoresenssi

Puhdas polyoksietyleenisorbitaanimonolauraatti fluoresoi yli 4-kertaisesti kasvu- ja stationäärifaasin vertailukasvatusten, joten polyoksietyleenisorbitaanimonolauraatti tuloksiin tulee suhtautua varauksella mahdollisten polyoksietyleenisorbitaanimonolauraatin jäänteiden fluoresoidessa EGFP:n lisäksi mittauksessa. Fluoresenssi mittauksen tulokset koottiin taulukkoon 3. Muiden yhdisteiden osalta fluoresenssi oli todennäköisesti EGFP:n aiheuttama.

Taulukko 3. Fluoresenssin tuloksia. Tulokset pyöristettiin lähimpään prosenttiin. Alkupiste on fluoresenssin erotus vertailukasvatuksen ja tappokasvauksen välillä prosentteina, heti tutkittavan yhdisteen lisäämisen jälkeen. Loppupiste on fluoresenssin erotus vertailukasvatuksen ja tappokasvauksen välillä prosentteina, tunti tutkittavan yhdisteen lisäämisen jälkeen.

Taulukko 3				
Aine	Pitoisuus	Faasi	Alkupiste	Loppupiste
CoCl ₂	0,1M	kasvu	68 %	53 %
CoSO ₄	0,1M	kasvu	66 %	49 %
ZnSO ₄	0,1M	kasvu	95 %	68 %
ZnSO ₄	0,1M	stationääri	178 %	105 %
LiOH	1M	kasvu	32 %	19 %
LiOH	1M	stationääri	27 %	25 %
Asetoni	10 % v/v	kasvu	107 %	72 %
Asetoni	10 % v/v	stationääri	84 %	69 %
1-Butanoli	10 % v/v	Kasvu	49 %	67 %
1-Butanoli	10 % v/v	stationääri	87 %	71 %
Isopropanoli	10 % v/v	Kasvu	73 %	62 %
Isopropanoli	10 % v/v	stationääri	94 %	77 %
Etanoli	5 % v/v	Kasvu	114 %	64 %
Etanoli	5 % v/v	stationääri	82 %	85 %
Etanoli	5,6 % v/v	kasvu	99 %	84 %

Etanoli	5,6 % v/v	stationääri	103 %	146 %
Sitruunahappo	2,4M	kasvu	116 %	75 %
Sitruunahappo	2,4M	stationääri	99 %	157 %
AgNO ₃	0,01M	kasvu	54 %	38 %
AgNO ₃	0,01M	Stationääri	84 %	49 %
B(OH) ₄	1g/l	kasvu	93 %	104 %
B(OH) ₄	1g/l	stationääri	117 %	117 %
B(OH) ₄	2g/l	kasvu	99 %	95 %
B(OH) ₄	2g/l	stationääri	114 %	100 %
Na ₂ B ₄ O ₇	1g/l	kasvu	84 %	92 %
Na ₂ B ₄ O ₇	1g/l	stationääri	122 %	94 %
Na ₂ B ₄ O ₇	2g/l	kasvu	116 %	97 %
Na ₂ B ₄ O ₇	2g/l	stationääri	99 %	104 %
Etyyliheksanoli	2 % v/v	kasvu	69 %	53 %
Etyyliheksanoli	2 % v/v	stationääri	136 %	89 %
Polyoksietyleenisorbitaanimonolauraatti	0,5 % v/v	kasvu	94 %	120 %
Polyoksietyleenisorbitaanimonolauraatti	0,5 % v/v	stationääri	164 %	122 %
Polyoksietyleenisorbitaanimonolauraatti	0,05 % v/v	kasvu	91 %	101 %
Polyoksietyleenisorbitaanimonolauraatti	0,05 % v/v	stationääri	127 %	86 %

Aloitus kasvatuksen faasi vaikutti myös fluoresenssin tuloksiin (data ei esitetty). Niissä kasvatuksissa, jotka aloitettiin pakastetusta esikasvatuksesta, olivat fluoresenssin taustat ja vaihtelut kasvatusten välillä pienempiä. Näistä syistä käytettiin aina pakastettua esikasvatusta, eikä edellisen päivän stationäärifaasia.

3.1.2 Tiosyanaatti

TCAA ja hypokloriitti molemmat denaturoivat proteiinia eri mekanismein. Pelkkä TCAA:n lisäys LB-mediumissa olevaan kasvatukseen, mutta ei seerumiin tai pelkkään LB-mediumiin, muodosti punaista yhdistettä. Punainen yhdiste muodostui myös hitaammin hypokloriitin läsnä ollessa. Oletettavasti hypokloriitti reagoi muodostuvan yhdisteen kanssa ja hypokloriitin reagoitua loppuun yhdiste muodostui.

TCAA:n ja hypokloriitin denaturoitua proteiinit. Näin saadaan osa tiosyanaatista irti proteiinista. Tiosyanaatti muodostaa värillisen kompleksin Fe^{3+} -ionien kanssa happamissa oloissa, mitä havainnoitiin spektrofotometrisesti. Tiosyanaatti pitoisuus erosi pelkän LB-mediumin ja logaritmiseen kasvuvaiheeseen saakka päässeän kasvatuksen välillä oli noin 10 kertainen ero absorpanssissa. Stationäärin ero oli samaa suuruus luokkaa, mutta paljon vakaampi, kuin kasvuvaiheella.

Mittaus ei kerro paljonko tiosyanaatista oli sitoutuneena proteiineihin tai paljonko hypokloriitti oli hajottanut tiosyanaattia, joten sitä voidaan pitää kvalitatiivisena. Happamissa olosuhteissa tiosyanaatti myös haihtuu, joten se estettiin pitämällä näytteitä koko ajan korkilla suljettuina.

Etanolin, isopropanolin ja asetonin vesiliuoksessa havaittiin haittavan kompleksin muodostusta. Asetonitriilin LB-mediumissa havaittiin myös heikentävän kompleksin muodostusta. Seerumin jäätyminen, sulaminen ja uudelleen jäätyminen havaittiin vaikuttavan voimakkaasti tiosyanaatti pitoisuutta laskevasti.

Tiosyanaatin määrän selvittämiseksi seerumista hankittiin vertailutulokset akkreditoidusta laboratorion. Vertailu metodi antoi seerumeille: $112\mu\text{mol/l}$ ja $241\mu\text{mol/l}$. Tämä antaisi näytteille absorptio yksikköä kohden $0,72\text{ mmol}$ ja $0,78\text{mmol}$. Jos tämä olisi suoraan sovellettavissa, olisi statiönäärikasvatuksen tiosyanaattipitoisuus välillä $100\mu\text{mol/l}$ - $125\mu\text{mol/l}$. Vertailussa onkin syytä käyttää spektrofotometrisen kokonaistoksuusmittauksen muissa mittauksissa käytettyä tapaa, jossa verrataan aina vertailu kasvatukseen. Tällä tavalla tarkkuudeksi

saadaan 3,2 $\mu\text{mol/l}$ (n.5).

3.1.3 Ilmavirran mukana kulkeutuvien myrkkujen spektrofotometrinen kokonaistoksisuus mitta

Haihdotusliuokseen lisätty myrkyä haihdutetaan tappokasvatukselle saakka, jotta sen vaikutusta *E. coli*-lux soluille voidaan havainnoida. Teoriassa haihdutusliuokseen tulisi potentiaalisesti haitallinen ilma ja sen sisältämät aerosolit jäisit haihdutusliuokseen. Tässä sitä on simuloitu lisäämällä haitallinen yhdiste suoraan haihdutusliuokseen ja syöttämällä ilmaa haihdutusliuoksen lävitse. Jos välissä ei olisi haihdutusliuosta, aerosolit kulkeutuisivat suoraan tappokasvatukseen ja ne haittaisivat mittausta. Esimerkiksi muut ampisilliini resistentit mikrobit saattaisivat kilpailla elintilasta *E. coli*-luxin kanssa ja hiukkaset todennäköisesti lisäävät OD₆₂₀.

Haihdotusliuoksesta haihtuu liuotinta ja mahdollisesti sen mukana kuljettamia yhdisteitä. Nämä kuplitetaan tappoliuoksen läpi ja yhdisteet tulevat kontaktiin LB-mediumin ja siinä elävien *E. coli*-luxien kanssa. Liuottimet sen lisäksi, että liuottavat toimivat tässä samalla kantokaasuna ja muuttavat kaasuseoksen lipofiilisemmäksi.

Kokeiden aikana havaittiin silmämääräisesti muovien pehmenemistä, värin irtoamista muovista ja tiivisteiden haurastumista. Näitä ilmiöitä ei esiintynyt vastaavilla tai suuremmilla määrillä pelkillä haihdutettavilla liuottimilla. Kokeissa testattiin myös streptotsotosiiniä, mutta sen tulosta ei voida pitää luotettava, materiaalien tuhouduttua liaksi. LB-medium samentui testien aikana, oletettavasti haihtuvista liuottimista, joten OD₆₂₀:ta mittausta ei voitu käyttää. Ilmavirran mukana kulkeutuvien myrkkujen bioluminesenssit koottiin Taulukkoon 4.

Taulukko 4. *Ilmavirran mukana kulkeutuvien myrkkujen bioluminesenssit. Pitoisuus ilmaistaan, jos testattava yhdiste olisi haihtunut kokonaan haihdutus-liuoksesta ja pysähtynyt täysin LB-mediumiin. Kontrollikasvatuksessa ei käytetty myrkyä, mutta laitettiin sama määrä liuottimia, kuin tappokokeissa haihdutusta varten. Jokaisesta*

bioluminesenssi mittauksesta otettiin 4 rinnakkaista.

Aine	BL keskiarvo (CPS)	Pitoisuus
Kontrolli kasvatus	3420000±80000	-
Mediumi	270±50	-
etyyliheksanoli	244±110	1,25 % v/v
monilliformiini	1774±1190	0,4mmol/l

3.2 Maljat

Lasissa liuotin-maljoissa kontrollien keskiarvo oli 4 2/3 pesäkettä/malja. Yhdessäkään testatussa liuottimessa ei esiintynyt kasvua 180 tunnin aikana. Parhaaksi tiivistys yhdistelmäksi todettiin kylläiset $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ja D(+)-sakkaroosi. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -liuos itsellään kovettui aivan liian hitaasti, mutta oli ainoa testatuista yhdisteistä, joka muodosti tarpeeksi tiiviin sauman. Testatut suololiuokset muodostivat nopeasti sauman, mutta liuottimet kykenivät kulkeutumaan sen ja lasin välistä. Glukoosin + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ havaittiin tuottavan keltaista yhdistettä, joka muodostui luultavasti alkalolyttisesti, eikä sitä voitu käyttää. Keltainen yhdiste olisi voinut olla jotain, mikä haihtuu ja vaikuttaa tutkimus tuloksiin.

Epäorgaaniset maljat, joissa metalli-ionit lisättiin autoklaavausta ennen, epäonnistuivat 0,1M pitoisuudella. Ne eivät hyytyneet ja metalli-ionit aiheuttivat termolyttisiä reaktioita. Boorihappo, booraksi ja 0,01 M AgNO_3 LA-maljat onnistuivat. 1g/l Booraksin keskiarvo 304 pesäkettä ja 1g/l $\text{B}(\text{OH})_4$ 283 pesäkettä kontrollissa oli keskimäärin 188 1/3 pesäkettä 96 tuntia kestäneen kasvatuksen aikana. Pesäkkeet olivat huomattavasti pienempiä kuin kontrollissa.

0,1M pitoisuus metalli-ioneja sekoitettuna maljojen valuvaiheessa esti agarin hyytymisen. Hyytymisen tehostamiseksi suolojen pitoisuutta laskettiin 0,01M ja samalla nostettiin agarin määrää ja kaikki hyytyivät. Epäorgaanisia suoloja sisältävissä LA-maljoissa, 0,01M pitoisuudessa havaittiin ampisilliini reagoivan silminnähtävästi Cu^{2+} -ionien, Zn^{2+} -ionien ja Fe^{3+} -ionien kanssa. Oli myös silmin nähden havaittavissa, etteivät epäorgaaniset suolat levinneet aivan tasaisesti

maljan koko tilavuuteen, vaan olisivat vaatineet pitkän varastoinnin viileässä, jotta metalli-ionit olisivat diffunoituneet tasaisesti koko maljaan.

Myös kuumennusta +90°C vesihauteessa kokeiltiin, mutta tämä johti termolyyttisten reaktioiden alkuun, jotka havaittiin LA-maljoilla sekä hajusta, että visuaalisena värin muutoksena. Ampisilliinin reagointi tarkoittaa, että LA-maljalla kasvava *E. coli*-lux ei enää olisi valintapaineen alla ja ampisillinin puuttuminen lisäisi kontaminaatio riskiä. Näistä syistä epäorgaanisia suoloja sisältäviä maljoja ei testattu onnistuneita AgNO₃, boorihappoa ja booraksia sisältäviä LA-maljoja lukuun ottamatta.

4 Tulosten tarkastelu

Kasvatuksien ollessa samassa lämpötila-, ravistus- ja valokontrolloidussa tilassa ongelmaksi muodostuvat helposti haihtuvat yhdisteet, jotka voivat vaikuttaa myös vertailuna käytettävän kasvatukseen. Tämä selittää osalla helposti haihtuvista yhdisteistä esiintyvän korkean bioluminesenssin. Itse tappokasvatuksen bioluminesenssi-arvo ei välttämättä ole korkea vaan vertailun kasvatuksen bioluminesenssi on laskenut, mikä saa tappokasvatuksen bioluminesenssin vaikuttamaan korkeammalta.

Alkoholien ja asetonin kanssa esiintyi samaa ilmiötä, että suurin pudotus bioluminesenssissa tapahtui hyvin nopeasti heti pipetoinnin jälkeen (Atosuo ja muut 2013). Oletettavasti tämä johtuu alkoholin ja rasva-aldehydin välisestä kilpailusta sitoutumisessa entsyymiin, koska ne ovat rakenteellisesti lähellä toisiaan. Toinen mahdollisesti selittävä teoria on, että jokin entsyymeistä denaturoituu inaktiiviseen muotoon alkoholipitoisuuden noustessa. Teoriassa molempien tapahtuminen samanaikaisesti on myös mahdollista.

Kuparin ja hopean tappoon tarvittava määrä on oletettavasti suurempi ravinnerikkaassa kasvatusliuoksessa, kuin pelkässä vedessä. Tämä johtuu kilpailevien, vähemmän vaarallisten, ionien pyrkivän myös soluihin ja liuoksessa olevat vastakkaiset varausten lisäävät affiniiteettia liuosta kohti. Myös mahdollisuus niukkaliukosten suolojen syntyyn on suurempi (Stoyanov ja muut 2003).

Lähtökohtaisesti vaikuttaisi siltä, että jos metallia tai puolimetallia ei tarvita elämiseen on se haitallisempi, kuin välttämättömät metallit. Tosin tutkimuksen resursseissa ei ollut mahdollista läpikäydä kaikkien alkuaineiden metalli-ioneja, joten on myös aivan mahdollista, että jotkin tutkimattomat metalli-ionit olisivat vain vähän haitallisia (Lemire ja muut 2013)

Kemiluminesenssia havaittiin vain natriumhypokloriitin ja LB-mediumin välisissä

reaktioissa. Kemiluminesenssia ei havaittu jodi-tinktuuraan tai vetyperoksidin muodostamana, vaikka molemmat radikaalimekanismein reagoivatkin. Vaikuttaisi siltä, että kloorin reaktiomekanismi on siis energeettisin, koska sen tuottama kemiluminesenssi pystyttiin havainnoimaan. Tämä täsmää kirjallisuuden kanssa (Petrucci ja muut 2007).

4.1.1 Fluoresenssi

Fluoresenssi LB-mediumin suuren taustasignaalin takia ei ole reaaliaikainen toisin kuin OD₆₂₀ ja bioluminesenssi. Pesuvaiheen työläyden takia sillä otetaan vain alku- ja loppupiste. Fluoresenssin hyödyllisyyteen vaikuttaa myös mittauslaiteistossa käytössä olleiden suodattimien laatu. Oletettavaa on, että fluoresenssille on olemassa optimaalisempi emissio aallonpituus, kuin mitä laitteistossa oli käytössä. Fluoresenssi on lämpötilariippuvainen mittausta, mutta myös kasvatuksen aikana EGFP saavuttaa lopullisen muotonsa lämpötilasta riippuen. (Tsien 1998)

Fluoresenssin tulokset on hyvin pitkälti linjassa OD₆₂₀ ja bioluminesenssin tulosten kanssa. Polyoksietyleenisorbitaanimonolauraatti aiheuttama poikkeama tulosten kanssa on selitettävissä polyoksietyleenisorbitaanimonolauraatin omalla fluoresenssilla, koska on hyvin mahdollista, että tensidinä polyoksietyleenisorbitaanimonolauraatti on kiinnittynyt bakteerin pintaan ja tulee osittain sen mukana pesuvaiheesta huolimatta.

Ionien varaukset voivat vaikuttaa EGFP:n fluoresenssiin. Sinkki-ionin (Zn²⁺) (taulukko 3) voimistama fluoresenssi voi johtua sen samankaltaisuudesta kalsium-ionin (Ca²⁺) kanssa. (Elsiger ja muut 1999) Pakastetusta esikasvatuksesta aloitettuun kasvatukseen ja stationäärifaasista aloitetun kasvatukseen välistä eroa voisi selittää EGFP:n kertyminen stationäärifaasin soluihin (Tsien 1998).

4.1.2 Tiosyanaatti

Punaisen yhdisteen muodostumisen voisi selittää eräs punainen yhdiste, joka on kemiallisesti vakaa syanokobalamiini. Tämä voisi selittyä sillä, että hypokloriitti hajottaa lukuisia yhdisteitä ja vapauttaa niihin sitoutunutta syanidia ainakin CNCl:nä. CNCl reagoi eteenpäin ja reagoiduttuaan vapauttaa CN⁻-ionin, joka voi reagoida kobalamiinin kanssa muodostaen syanokobalamiinia. Hypokloriitin reagoiduttu punainen yhdiste jää jäljelle (Abu-Soud ja muut 2012). Tai sitten kyseessä on jokin muu yhdiste, joka ei merkittävästi häiritse oikein ajoitettua mittausta.

Matriiseina LB- mediumissa oleva bakteerikasvatus ja seerumi ovat varsin erilaisia, joten tuloksien vertailtavuuteen matriisien väleillä tulee suhtautua varauksella. Seerumissa tiosyanaatti on assosiotunut albumiinin pinnalle, koska albumiinilla on positiivinen varaus sen pinnassa ja tiosyanaati-ionilla negatiivinen. (Jaszczak ja muut 2017). Mahdollisesti muutkin pseudohalidit, kuten hypokloriitti, kilpailevat sitoutumisesta albumiinin. Niissä voi olla virhelähde, jonka havaitseminen on vaikeaa.

4.1.3 Ilmavirran mukana kulkeutuvien myrkkujen spektrofotometrinen kokonaistoksisuus mitta

E.coli-lux voi olla resistentti Ilmavirran mukana kulkeutuvien myrkkujen -kokeissa käytetylle streptotsotosiinille. (Lengeler. 1980) Streptotsotosiinin aikana tapahtunut materiaalien haurastuminen saattaa johtua sen nitrourea ryhmän reaktioista, tai aikaisemmat kokeet olivat haurastuttaneet materiaaleja. Moniliformiinin ja kontrollikasvatuksen välillä on selkeä ero bioluminesenssissa. Moniliformiinin tai 2-etyyliheksanolin lisääminen haihdutus-liuokseen selkeästi vähensi bioluminesenssia. Oletettavasti kyseiset yhdisteet haihtuivat ja ovat myrkyllisiä. Toisin kuin aikaisemmissa spektrofotometrisissä kokeissa nyt ei samentumisesta johtuen ole OD₆₂₀ tulosta saatavilla ja kontrollit eivät kärsi haihtuvista yhdisteistä, koska ne johdetaan ilmavirran avulla putkistoa pitkin pois kasvatustilasta.

Merkittävä ongelma on myös, että ei ole tietoa siitä paljonko haihdutetusta myrkyistä

on haihtunut haihdutus-liuoksesta. Paljonko siitä on jäänyt LB-mediumiin ja paljonko LB-mediumista on haihtunut eteenpäin. Tämä voidaan kromatografisesti määrittää, mutta se ei ole tämän työn tarkoitus. Mittausmetodi on vasta kehitysasteella ja siinä on vielä optimoitavaa. Näiden seikkojen puitteissa on viisaampaa säästää tarkemmat mittaukset vasta optimoidummalle mittaukselle.

Toinen merkittävä ongelma, että *E. coli*-lux bakteerit eivät kestä suuria määriä kokeiltuja liuottimia. Ensimmäiset kokeet, jotka tehtiin asetonilla tai etanolilla, päättyivät aina bioluminesenssin sammumiseen. Näin tosin bioluminesenssille kävi muissakin mittauksissa. Trikloorimetaani-asetoni-haihdutusliuos osoittautui tehokkaammaksi, johtuen luultavasti trikloorimetaanin kantokaasu-ominaisuuksista, mutta myös valitettavasti samensi tappoliuoksen (Atkins ja de Paula 2014). Tarvittaisiin lisää optimointia, jotta myrkkujen haihduttaminen olisi tehokasta ja *E. coli*-lux:sta saataisiin luotettavaa mittausdataa reaaliajassa.

Kolmas ongelma on turvallisuuteen liittyvä. Monet testattavista myrkyistä on hyvin myrkyllisiä ja havaittu materiaalien haurastuminen jo muutaman kasvatuksen aikana, muodostavat oman riskinsä ja materiaalivalintoja sietäisi pohtia uudelleen, muillakin kriteereillä kuin vain liuottimen höyryjen kestävyys suhteen.

4.2 Maljat

$\text{Ca}(\text{OH})_2$ + D(+)-sakkarosi tiivistetyissä liuotin-maljoissa kontrollit kasvoivat hyvin, eikä tappaviksi oletetuissa pitoisuuksissa esiintynyt kasvua. Pienin inhiboiva pitoisuus etanolille ja isopropanolille *E. colia* vastaan on 6,56 % (Penna ja muut 2001). Koska kasvua ei esiintynyt, oletettavasti näiden liuottimien pitoisuus pysyi tarpeeksi korkeana tarpeeksi pitkään estämään kasvun. Itse tiivistyksessä $\text{Ca}(\text{OH})_2$:n affiniteetti lasia kohtaan teki siitä paremman kuin suolat, joiden kanssa liuotin tunkeutui lasin ja suolan väliin. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ei kuitenkaan kovetu kovin nopeasti, joten lisäämällä kylläistä D(+)-sakkarosia liuokseen saatiin kovettumista nopeutumaan.

Edellä mainituista ongelmista johtuen epäorgaanisista maljoista onnistui AgNO_3 ja booria sisältävät malja. Molemmat boori yhdisteet selvästi vaikuttivat *E. coli*-luxin kasvuun. Pesäkkeitä tuli enemmän, mutta ne kasvoivat selvästi kontrollia hitaammin. Luminesenssilla varmistettiin, että pesäkkeet olivat *E. coli*-luxia. AgNO_3 lähes varmasti ei olisi pitänyt kasvaa, koska kaikissa muissa testeissä AgNO_3 on osoittautunut tehokkaaksi bakterisidiksi.

Boori pitoisuuden 1000mg/l väitetään tappavan bakteerit ja sienten sen ansiosta valtaavan maljat. Kyseinen pitoisuus ei kuitenkaan tappanut bakteereja LA-maljalla. Edes 2000mg/l ei tappanut *E. coli*-luxia OD_{620} , bioluminesenssin tai fluoresenssin mukaan. Ainakaan *E.coli*-luxin tapauksessa kyse ei olisi bakteerien kuolemasta boorin lisäyksestä johtuen. Täytyy myös ottaa huomioon, että LA-malja eroaa kasvuympäristönä TSA-maljasta. (Salkinoja-Salonen 2016) Kyseessä on pikemminkin kilpailuedun siirtyminen bakteereilta sienille, minkä seurauksen seurauksena sienet valtaavat maljat. Eräs selittävä tekijä voi olla boorin haitalliset ominaisuudet biofilmin muodostukselle (Sayin ja muut 2016).

5 Päätelmät

E. coli-luxin ampisilliini resistenttien takia menetelmä ei sovellu ampisilliinia tai sitä rakenteellisesti muistuttavien beetalaktaamien kokonaistoksisuuden määrittämiseen. bioluminesenssin avulla pystyttiin havaitsemaan pienempiä bakteerimääriä, kuin mitä OD₆₂₀:n avulla on mahdollista. Tämä täsmäsi kirjallisuuden kanssa (Atosuo ja muut 2013). bioluminesenssin ja OD₆₂₀:n reaali-aikainen mittaus toimi hyvin ja EGFP:n fluoresenssin tulisi työläytensä vuoksi jättää varajärjestelmän rooliin.

Maljat ovat vakiintunut, mutta ongelmallinen, työläs, hidas ja informaation suhteen pahasti vajavainen mittaustapa. Niitä voidaan korkeintaan pitää indikaattoreina kasvu ympäristöstä. Maljoja tiivistämällä saadaan, ainakin osa, helposti haihtuvasta yhdisteestä saadaan pysymään maljalla useita päiviä pidempään. Luonnollisesti edelleen pikkuhiljaa haihtuu, mutta huomattavasti hitaammin, kuin ilman tiivistystä.

96-kuoppalevyyn verrattuna näytetilavuus voidaan ottaa kymmenkertaisena 200µl sijasta 2ml. Lisäksi OD₆₂₀ mittauksessa saatiin vaihteluväli laskettua 0,007:sta 0,004:n tosin otanta oli pienempi 20 sijasta vain viisi. Bioluminesenssissa herkkyyttä voi isommassa mittakaavassa parantaa, mutta jos otetaan vaihteluväliä per millilitra oli se tällä metodilla ±25 CPS/ml ja 96-kuoppalevyllä se oli ±40 CPS/ml. Lisäksi solumassa on kasvatuksessa niin suuri, että muutkin kokeet ovat mahdollisia, jos näille ilmenee tarvetta. (Atosuo ja muut 2013)

Fluoresenssi toimi, mutta ei ole erityisen tarkka, jos verrataan vaikka bioluminesenssiin. Se kuitenkin aikaisemmin ongelmallisten liuottimien kanssa osoittautui varsin toimivaksi ratkaisuksi. Iso ongelma on kuitenkin LB- mediumin taustafluoresenssi, mikä estää reaaliaikaisen fluoresenssin mittauksen. Tähän saattaisi löytyä ratkaisu, jos löydettäisiin fluoresenssia vaimentava yhdiste, mikä ei merkittävästi vaimenna bioluminesenssia, vaikuta OD₆₂₀ tai haittaa *E. coli* -lux:n kasvua. Tulevaisuutta ajatellen tulee myös huomioida, että monet homeet ja niiden

tuottamat yhdisteet fluoresoivat ja voivat haitata mittausta.

Tiosyanaatti mittausta on ainakin kvalitatiivinen, keskenään vertailukelpoisissa matriiseissa. Sen soveltuvuus haihtuviin syanidi-yhdisteisiin tarvitsee vielä testata, varsinkin millä vauhdilla *E. coli*-lux kykenee metabolisoimaan eri syanidiyhdisteitä. Optimoinnin varaa saattaa olla myös käytetyssä Fe³⁺-ionien lähteessä. Jos näiden yhdisteiden osalta ei tule ongelmaa, voidaan se yhdistää ilmapirran mukana kulkevien myrkkyjen mittaukseen. Tämän avulla saatetaan saada selville onko näytteen toksisuus syanidin tai siksi hajoavien yhdisteiden aiheuttama. Muussa tapauksessa metodi soveltuu myös halvaksi tavaksi mitata tiosyanaattipitoisuutta seerumista.

Ongelma on myös näytteiden ottamisessa, Ne myrkyistä, jotka haihtuvat tai reagoivat helposti häviävät osittain tai kokonaan jo näytteiden varastoinnin, kuljetuksen ja käsittelyn aikana. Kun niitä kerätään liuottimien tai hiukkasloukkujen avulla osa niistä voi reagoida liuottimen, astian, muiden epäpuhtauksien kanssa ja ne voivat reagoida myös keskenään. Näiltä ongelmilta voidaan vähentää reaaliaikaisella *in situ*-mittauksella, mutta tämä vaatisi tähän kykenevän mittauslaitteen rakentamista.

Vähemmän haihtuvien yhdisteiden kulkeutuminen ilmassa ei ole riippuvainen vain haihtumisesta, vaan myös ilman aerosolit vaikuttavat niihin, joten teoriassa *in situ*-mittauksessa tulisi myös aerosolien vaikutus huomioida. Tässä metodissa teoriassa kaikki aerosolit kertyisivät syöttöilman mukana haihdutus-liuokseen ja vain niiden mukanaan kuljettamat myrkylliset yhdisteet saattaisivat haihtua siitä eteenpäin.

Haihdutus kokeissa havaitut materiaalien heikkenemiset herättivät kysymyksiä, kuinka paljon homeita ja niiden myrkyjä analysoidaan muovilaaduilla, jotka niiden analysointiin eivät sovellu. Monet niistä kuitenkin ovat hyvinkin lipofiilisiä ja niiden taipumusta reagoida/imetyä muoviin ei juurikaan ole tutkimustietoa. Tällä tiedolla olisi mahdollisesti merkitystä kierrätetyn muovin turvallisuuden, homeiden

tuottamien myrkköydyksien yhdisteiden havainnoinnin ja korjausrakentamisen käytännön toteuttamisen kannalta.

Yhteenvetona tutkimuksen tavoitteiden saavuttamisesta. *E.coli-lux*:n isomman mittakaavan kasvatusta LB-mediumissa onnistui ja siitä saatiin mitattua OD₆₂₀ ja bioluminesenssi. *E.coli-lux*:lla pystyttiin testaamaan antibioottien vaikutuksia. Liuotimien toksisen vaikutuksen mittaamista varten kehitettiin tiivistetyt malja ja fluoresenssi mittaus. Tiosyanaattipitoisuus saatiin kvalitatiivisesti mitattua sekä bakteerikasvatuksesta, että seerumista. VOC:n ja toksiinin vaikutusta pystyttiin mittaamaan ilmavirran mukana kulkevien yhdisteiden kokonaistoksikologisella mittauksella, mitä tämän työn laatimisen aikoihin ei tiedetty kenenkään muun testanneen.

6 Lähteet

Abu-Soud, H., M., Maitra, D., Byun, J., Souza, C., E., A., Banerjee, J., Saed, G., M., Diamond, M., P., Andreana P., R., & Pennathur. S. (2012) The reaction of HOCl and cyanocobalamin: corrin destruction and the liberation of cyanogen chloride. *Free Radic Biol Med.* **52**: 616–625.

Anraku, Y., Kin, E. & Tanaka, Y. (1975) Transport of sugars and amino acids in bacteria. XV. Comparative studies on the effects of various energy poisons on the oxidative and phosphorylating activities and energy coupling reactions for the active transport systems for amino acids in *E. coli*. *J Biochem.* **78**:165-179.

Atkins, P. & de Paula, J. (2014) Atkins' Physical Chemistry 10. painos, s.476-862 Oxford university press, Oxford UK.

Atosuo, J., Lehtinen, J., Vojtek, L. & Lilius, E-M. (2013) *Escherichia coli* K-12 (pEGFP_{lux}ABCDEamp): a tool for analysis of bacterial killing by antibacterial agents and human complement activities on a real-time basis. *Luminescence.* **28**:771-779.

Azuma, K., Endo, G., Endo, Y., Hara, K., Harada, K., Hori, H., Horie, S., Horiguchi, H., Ichiba, M., Ichihara, G., Ikeda, M., Ishitake, T., Ito, A., Iwasawa, S., Kamijima, M., Karita, K. Kawai, T., Kawamoto, T., Koizumi, A., Kumagai, S., Kusaka, Y., Miyagawa, M., Morimoto, Y., Nagano, K., Nasu, T., Nomiyama, T., Omae, K., Sato, K., Okuda, H., Sakurai, H., Sobue, T., Suwazono, Y., Takebayashi, T., Takeshita, T., Takeuchi, A., Tanaka, M., Tanaka, S., Tsukahara, T., Tsunoda, M., Ueno, S., Yamano, Y., Yamauchi, T. & Yano, E. (2016) Occupational Exposure Limits of lead, dimethylamine, n-butyl-2,3-epoxypropyl ether, and 2-ethyl-1-hexanol and carcinogenicity and occupational sensitizer classification. *J Occup Health* **58**: 385-

387.

Bailar, J., C, Emeleus, H., J, sir Nyholm R. & Trotman-Dickenson, A., F. (1973) Comprehensive inorganic chemistry. 3, Groups IB, IIB, IIIA, IVA, VA, VIA, VIIA, VIII s. 880-927. Oxford ; New York: Pergamon.

Baldwin, T., O., Christopher, J., A., Raushel, F., M., Sinclair, J., F., Ziegler, M., M., Fisher A., J. & Rayment, I. (1995) Structure of bacterial luciferase. *Curr Opin Struct Biol.* **5**:798-809.

Beesch, S., C. (1953) Acetone-butanol fermentation of starches. *Appl Microbiol.* **1**:85-95.

Billet, S., Land, Y., Martin, P., J., Verdin, A., Ledoux, F., Lepers, C., André, V., Cazier, F., Sichel, F., Shirali, P., Gosset, P. & Courcot, D. (2018) Chemical characterization of fine and ultrafine PM, direct and indirect genotoxicity of PM and their organic extracts on pulmonary cells. *J Environ Sci* **71**:168-178.

Bogosian, G. & Bourneuf, E., V. (2001) A matter of bacterial life and death *EMBO* **2**:770–774.

Borkow, G. & Gabbay, J. (2009) Copper, an ancient remedy returning to fight microbial, fungal and viral infections, *Curr Opin Chem Biol.* **3**:272-278.

Brady, L., J., Judd, D., B., Fortune, W., B., Mose, M., L. Gibson, K., S., Müller, R., H., Holiday, E., R. & Stearmer, E., I. (1950) Analytical absorption spectroscopy absorptimetry and colorimetry. S. 80-420 Mellon, M., G.(toim.), New York John Wiley & Sons inc. London Chapman & Hall Limited.

Brewer G., A. & Johnson M., J. (1953) Activity and properties of para-aminobenzyl

penicillin. *Appl Microbiol.* **1**:163-166.

Brul, S., & Coote, P. (1999) Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int J Food Microbiol.* **50**:1-17.

Cheng, H., Donahue, J., L., Battle, S., E., Ray, W., K. & Larson, T., J. (2008) Biochemical and geneic characterization of PspE and GlpE, two single-domain sulfurtransferases of *Escherichia coli*. *Open Microbiol J.* **2**:18-28.

Chu, H. & Nieuwenhuijsen, M., J. (2002) Distribution and determinants of trihalomethane concentrations in indoor swimming pools. *Occup Environ Med* **59**:243–247.

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso. E., Forino, M., Tartaglione, L., Benedettini, G., Onorari, M., Serena, F., Battocchi, C. & Casabianca, S., Penna., A. (2014) First finding of *Ostreopsis cf. ovata* toxins in marine aerosols. *Environ Sci Technol.* **48**:3532-3540.

Cole, R., J., Kirksey, J., W., Cutler, H., G., Doupnik, B., L. & Peckham, J., C. (1973) Toxin from *Fusarium moniliforme*: Effects on Plants and Animals. *Science.* **179**:1324-1326.

Delfosse, V., Balaguer, P. & Bourguet W. (2016) L'association fait le poison Nouveau regard sur l'effet cocktail des xénobiotiques et les interactions médicamenteuses. *Med Sci (Paris).* **32**:326-328.

Dodson, R., E., Camann, D., E., Morello-Frosch, R., Brody, J., G. & Rudel, R., A. (2015) Semivolatile organic compounds in homes: strategies for efficient and systematic exposure measurement based on empirical and theoretical factors. *Environ. Sci. Technol.* **49**:113–122.

Ebersviller. S., Lichtveld, K., Sexton, K., G., Zavala, J., Lin, Y-H., Jaspers, I., & Jeffries H., E. (2012) Gaseous VOCs rapidly modify particulate matter and its biological effects – Part 1: Simple VOCs and model PM. *Atmos Chem Phys Discuss.* **12**: 5065–5105.

Eduard, W., Heederik, D., Duchaine C. & James B. (2012) Bioaerosol exposure assessment in the workplace: the past, present and recent advances. *Green J Environ Monit.* **14**:334–339.

Elonen, E., Männistö, P., T., Tuominen, R. K. Liesivuori, J. & Savolainen, H.(2001)*Farmakologia ja toksikologia*,Tuomisto K. (toim.) 6. painos. s.789-1120

Elsiger, M., Wachter ,R., M., Hanson, G., T., Kallio, K. & Remington, S., J. (1999) Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH. *Biochemistry* **38**:5296–5301.

Erkinjuntti-Pekkanen, R., Rytönen, H., Kokkarinen, J., I., Tukiainen, H., O., Partanen K. & Terho, E., O. (1998) Long-term risk of emphysema in patients with farmer's lung and matched control farmers. *Am J Respir Crit Care Med.* **158**:662-665.

Ernstgård, L., Norbäck, D., Nordquist, T., Wieslander, G., Wålinder, R. & Johanson G. (2010) Acute effects of exposure to 1 mg/m³ of vaporized 2-ethyl-1-hexanol in humans *Indoor Air* **20**: 168–175

Eyjólfsson, R. (1970) Recent Advances in the Chemistry of Cyanogenic Glycosides. *FORTCHEMIE* **28**:74-108.

Fotso, J., Leslie J., F. & Smith, J., S. (2002) Production of beauvericin, moniliformin, fusaproliferin, and fumonisins B1, B2, and B3 by fifteen ex-type strains of *Fusarium* Species. *AEM* **68**:5195–5197.

Fowler B., A., Chou, C-H., S., J., Jones, R., L., Sullivan, D., W. & Chen, J., R., C-J. (2015) Handbook on the Toxicology of Metals. Kirjassa: Nordberg, G., F., Fowler, B., A., Nordberg, m.(toim.) 4. painos. s. 581-616 Academic Press,

Fraeyman, S., Croubels, S., Devreese, M. & Antonissen, G. (2017) Emerging *Fusarium* and *Alternaria* Mycotoxins: Occurrence, toxicity and toxicokinetics. *Toxins* **9**:228-258.

Gazenko, S., V., Reponen, T., A., Grinshpun, S., A. & Willeke, K. (1998) Analysis of Airborne Actinomycete Spores with Fluorogenic Substrates. *Appl Environ Microbiol.* **64**:4410–4415.

Grant, A., K. (1897) Agar-Agar. *Ind Med Gaz* **1**:4-5.

Von Haber, F. & Weiss, J. (1932) Über die katalyse des hydroperoxydes. *Naturwissenschaften.* **12**:948-949.

Hallas-Møller, M., Nielsen, K., F. & Frisvad, J., C. (2016) Production of the *Fusarium*

mycotoxin moniliformin by *Penicillium melanoconidium*. *J Agric Food Chem.* **64**:4505-4510.

Heim, R., Prasher, D., C. & Tsien, R., Y. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **26**: 12501–12504.

Hellgren, U. & Reijula, K. (2011) Indoor air problems in hospitals: a challenge for occupational health. *AAOHN J.* **59**:111 – 117.

Hock, F., L., Vallee B., L. (1949) Precipitation by trichloroacetic acid as a simplification in the determination of zinc in blood and its components. *J Biol Chem.* **181**:295-306.

Ishihara, M., Murakami, K., Fukuda, K., Nakamura, S., Kuwabara, M., Hattori, H., Fujita, M., Kiyosawa, T. & Yokoe, H. (2017) Stability of weakly acidic hypochlorous acid solution microbicidal activity. *Biocontrol Sci.* **22**:223-227.

Jaszczak, E., Polkowska, Z., Narkowicz, S. & Namieśnik, J. (2017) Cyanides in the environment—analysis—problems and challenges. *Environ Sci Pollut Res* **24**:15929-15948.

Junod, A., Lambert A., E., Stauffacher, W. & Renold A., E. (1969) Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest.* **48**:2129–2139.

Karlsson, K. & Malmberg, P. (1989) Characterization of exposure to molds and actinomycetes in agricultural dusts by scanning electron microscopy, fluorescence microscopy and the culture method. *Scand J Work Environ Health* **15**:353-359.

Karvala, K., Toskala, E., Luukkonen, R., Lappalainen, S., Uitti, J. & Nordman, H. (2010) New-onset adult asthma in relation to damp and moldy workplaces. *Int Arch Occup Environ Health*. **83**:855–865.

Kim, J., Gherasim, C. & Banerjee, R. (2008) Decyanation of vitamin B12 by a trafficking chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **105**:14551-14554.

Korpi, A., Pasanen, A-L. & Pasanen, P. (1998) Volatile compounds originating from mixed microbial cultures on building materials under various humidity conditions. *Appl Environ Microbiol*. **64**:2914–2919.

Laville, J., Blumer, C., von Schroetter, C., Gaia, V., de Fago, V., Keel, C. & Haas, D. (1998) Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol*. **180**:3187–3196.

Lawrence J., G. & Roth J., R. (1995) Evolution of coenzyme B12 synthesis among enteric bacteria: Evidence for loss and reacquisition of a multigene complex. *Genetics*. **142**:11-24.

Lecours, P., B., Duchaine, C., Taillefer, M., Tremblay, C., Veillette, M., Cormier, Y. & Marsolais, D. (2011) Immunogenic Properties of Archaeal Species Found in

Bioaerosols. *PLoS* **6**: 1-8.

Lemire, J., A., Harrison, J., J. & Turner, R., J. (2013) Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol.* **11**:371-384.

Lengeler. J. (1980) Characterisation of mutants of *Escherichia coli* K12, selected by resistance to streptozotocin *Molec. gen Genet.* **179**:49-54.

Lewis, T., E., Wolfinger, T., F. & Barta, M., L. (2004) The ecological effects of trichloroacetic acid in the environment. *Environ Int.* **8**:1119-1150.

Lister, M., W. & Rivington, D., E. (1966) Ferric sulphate complexes, and ternary complexes with thiocyanate ions. *Can. J. Chem.* **33**:1591-1602.

Logue, B., A., Kirschten, N., P., Petrikovicsc, I., Moser, M., A., Rockwood, G., A. & Baskin, S., I. (2005) Determination of the cyanide metabolite 2-aminothiazoline-4-carboxylic acid in urine and plasma by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr.* **819**:237-244.

Luosujärvi, R. A., Husman, T. M., Seuri, M., Pietikäinen, M. A., Pollari, P., Pelkonen, J., Hujakka, H. T., Kaipiainen-Seppänen, O. A. & Aho, K. (2003) Joint symptoms and diseases associated with moisture damage in a health center. *Clin Rheumatol* **22**: 381–385.

March, J. (1985) Advanced organic chemistry reactions, mechanisms and structure. 3. painos, s. 230-328. New York: wiley inter-science publications USA.

Martin, N., L., Bass, P. & Liss, S., N. (2015) Antibacterial properties and mechanism of activity of a novel silver-stabilized hydrogen peroxide. *PLoS* **10**:1-7

Mathews, S., Hans, M., Mücklich, F. & Solioz, M. (2013) Contact killing of bacteria on copper is suppressed if bacterial-metal contact is prevented and is induced on iron by copper ions. *Appl Environ Microbiol.* **79**:2605–2611.

McDonnell, G. & Russell, A., D. (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev.* **12**: 147–179.

Mendell, M., J., Mirer, A., G., Cheung, K., Tong, M. & Douwes, J. (2011) Respiratory and allergic health effects of dampness, mold, and dampness-related agents: a review of the epidemiologic evidence. *Environ Health Perspect.* **119**:748-756.

M'Kenzie, D. (1908) The Uses of hydrogen peroxide. *The Hospital* **44**: 9–10.

Nalli, S., Cooper, D., G. & Nicell, J., A. (2006) Interaction of metabolites with *R. rhodochrous* during the biodegradation of di-ester plasticizers. *Chemosphere.* **65**:1510-1517.

46. Nelson, D., I. & Cox. M., M. (2008) Lehninger principles of biochemistry. 5th edition. s. 11 -621. W. H. Freeman Company, New York, U.S.A.

Nies, D., H. (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**:730-750.

Norbäck, D., Torgén, M. & Edling C. (1990) Volatile organic compounds, respirable dust, and personal factors related to prevalence and incidence of sick building syndrome in primary schools. *Br J Ind Med.* **47**:733-741.

Ormö, M., Cubitt, A., B., Kallio, K., Gross, L., A., Tsien, R., Y. & Remington S., J.(1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**:1392-1395.

Patel, R., N., Hou, C., T., Laskin, A., I., Felix, A. & Derelanko, P. (1980) Microbial oxidation of gaseous hydrocarbons: Production of secondary alcohols from correspondingn-alkanes by methane utilizing bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **39**:720-726.

Pekkanen, J., Hyvärinen, A., Haverinen-Shaughnessy, U., Korppi, M., Putus, T. & Nevalainen, A. (2007) Moisture damage and childhood asthma: a population-based incident case–control study. *Eur Respir J* **29**: 509–515.

Penna,T., C., V., Mazzola, P., G. & Martins A., M., S. (2001) The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection. *BMC Infectious Diseases* **16**:1-8.

Petrucci R., H., Harwood, W., S., Herring, F., G. & Madura, J., D. (2007) General Chemistry Principles and modern applications. 9. painos, s. 217-1093. Pearson Prentice Hall,Upper Saddle River, New Jersey.

Putus, T., Tuomainen, A. & Rautiala, S. (2004) Chemical and microbial exposures in a school building: adverse health effects in children. *Arch. Environ. Health*, **59**:194–201.

Rabbow, E., Rettberg, P., Baumstark-Khan, C. & Horneck, G. (2003) The SOS-LUX-LAC-FLUORO-Toxicity-test on the International Space Station (ISS). *Adv Space Res.* **31**:1513-1524.

Riedel, K., Hagedorn, H., W. & Scherer G. (2013) Thiocyanat in plasma und speichel. veröffentlicht in der reihe analytische methoden zur prüfung gesundheitsschädlicher arbeitsstoffe. *Analysen in biologischem Material* **20**: 1-11.

Rook, J.,J. (1974) Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *WaterTreat.Exam.***23**:234-243.

Roos, D. & Winterbourn, C., C. (2002) Lethal weapons. *Science* **26**:669-671.

Salkinoja-Salonen, M. (2016) Diagnostisia työkaluja rakkennusten patologiaan. s.25-29 Hansaprint, Vantaa.

Sande, J., Massart, C., Beauwens, R., Schoutens, A., Costagliola, S., Dumont, J., E. & Wolff, J. (2003) Anion selectivity by the sodium iodide symporter. *Endocrinology*. **144**:247-252.

Sasaki, S., Mochizuki, M. & Igarashi, M. (2013) Development of a bioluminescent bacteria sheet for the measurement of oxygen concentration. *Anal Sci* **29**:267-269.

Sayin, Z., Ucan, U., S. & Sakmanoglu, A. (2016) Antibacterial and antibiofilm effects of boron on different bacteria. *Biol Trace Elem Res*. **173**:241–246.

Schlorke, D., Atosuo, J., Flemmig, J., Lilius, E-M. & Arnhold, J. (2016) Impact of cyanogen iodide in killing of *Escherichia coli* by the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-(pseudo)halide system. *Free Radic Res*. **50**:1287-1295.

Schulz, S., Dickschat, J., S., Kunze, B., Wagner-Dobler, I., Diestel, R. & Sasse, F. (2010) Biological activity of volatiles from marine and terrestrial bacteria *Mar. Drugs* **8**: 2976-2987.

Schutze, H. (1915) Iodine and sodium hypochlorite as wound disinfectants. *Br Med J.* **2**:921-923.

Sinclair, G., M., Graeme, Y., Paton, I., Meharg, A., A. & Killham K. (1999) Lux-biosensor assessment of pH effects on microbial sorption and toxicity of chlorophenols. *FEMS Microbiol Lett* **174**:273-278.

Snyder, M., I. & Lichstein, H., C. (1940) Sodium azide as an inhibitive substance for gram-negative bacteria. *J.Infectious Disease* **67**: 113-115.

Stier, T., J., Arnold, W. & Stannard, J., N. (1934) A photoelectric densitometer for use with suspensions. *J Gen Physiol* **3**:383-392.

Stoyanov, J., V., Magnani, D., & Solioz, M. (2003) Measurement of cytoplasmic copper, silver, and gold with a lux biosensor shows copper and silver, but not gold, efflux by the CopA ATPase of Escherichia coli. *FEBS Letters* **546**:391-394.

Stretton, J., L. (1909) The Sterilization of the skin of operation areas. *Br Med J.* **2**:368-369.

Tanaka, T., Kawasaki, K., Daimon, S., Kitagawa, W., Yamamoto, K., Tamaki, H., Tanaka, M., Nakatsu, C., H. & Kamagata, Y. (2014) A hidden pitfall in the preparation of agar media undermines microorganism cultivability. *Appl Environ Microbiol.* **80**:7659 –7666.

Tanuja, K., Hemalatha, K., Rao, B., S. & Karuna, R. (2010) Effect of various surfactants (cationic, anionic and non-ionic) on the growth of *Aspergillus parasiticus*

(NRRL 2999) in relation to aflatoxin production. *Mycotoxin Res.* **26**:155–170.

Tauriainen, S., Karp, M., Chang, W., Virta, M. (1997) Recombinant luminescent bacteria for measuring bioavailable arsenite and antimonite. *Appl Environ Microbiol.* **63**:4456–4461.

Tsien, R., Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:509–544.

Ulitzur, S. & Hastings, J., W. (1979) Evidence for tetradecanal as the natural aldehyde in bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**:265-267.

Vlasova, I., I., Asrieli, T., V., Gavrilova, E., M. & Danilov, V., S (2003) New approach for specific determination of antibiotics by use of luminescent *Escherichia coli* and Immune Serum. *AEM.* **70**:1245–1248.

Wei, W., Mandin, C., Blanchard, O., Mercier, F., Pelletier, M., Le Bot, B., Glorennec, P. & Ramalho, O. (2016) Distributions of the particle/gas and dust/gas partition coefficients for seventy-two semi-volatile organic compounds in indoor environment. *Chemosphere* **153**: 212-219.

Weigold, P., Ruecker, A., Jochmann, M., Barajas X., L., O., Lege, S., Zwiener, C., Kappler, A. & Behrens, S. (2015) Formation of chloroform and tetrachloroethene by *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Lett Appl Microbiol* **61**:346-353.

Willardson B., M., Wilkins, J., F., Rand, T., A., Schupp, J., M., Hill, K., K., Keim, H.,

P., & Jackson, P., J. (1998) Development and testing of a bacterial biosensor for toluene-based environmental contaminants. *Appl Environ Microbiol.* **64**:1006–1012.

Woutersen, M., Belkin, S., Brouwer, B., van Wezel, A., P. & Heringa, M., B. (2011) Are luminescent bacteria suitable for online detection and monitoring of toxic compounds in drinking water and its sources? *Anal Bioanal Chem* **400**:915–929.

Wright, E., V. & Kersten, H. (1937) An apparatus for measuring turbidity of bacterial suspensions. *Bacteriol.* **34**:581–583.

Zavascki, A., P., Goldani, L., Z., Li, J. & Nation R., L. (2007) Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother.* **60**:1206 – 1215,

Zhao, G., Yin, G., Inamdar, A., A., Luo, J., Zhang, N., Yang, I., Buckley, B. & Bennett, J., W. (2017) Volatile organic compounds emitted by filamentous fungi isolated from flooded homes after hurricane Sandy show toxicity in a *Drosophila* bioassay. *Indoor Air* **27**: 518-528.

