

HVITFELDTSKA GYMNASIET

Naturvetenskapliga programmet

Projektarbete 100 p

2013-03-15

Let there be light



En studie av *P. Phosphoreums* bioluminescens
med varierande zinkkoncentration

Författare: Malin Petersson N3IK, Frida Sandgren N3IK

Handledare: Emma Lundgren

ABSTRACT

The purpose of this study was to find out how the bioluminescence, that is the ability of a living organism to produce light, of the bacteria *Photobacterium Phosphoreum* varies depending on different concentrations of zinc ions. This was made with the intention of comparing the results with the amount of zinc present in the natural environment of the bacteria. Zinc was chosen because it is an essential metal as well as a metal common in anti-fouling paints and other sources of marine pollution. In this report it will also be discussed whether the method used is adequate as a toxicity analysis.

Bacteria was isolated from freshwater fish and cultivated in screw cap test tubes with a complex culture medium. The culture was then inoculated to additional test tubes and when bioluminescence could be observed they were subjected to a solution containing different concentrations of zinc ions. The bioluminescence of the test tubes was observed immediately after addition of zinc and also after 30 minutes, 60 minutes, 90 minutes, 8 hours and 24 hours. All experimental work, except for the preparation of culture medium, was conducted at the home of one of the authors.

Results were too few to draw any reliable conclusions. Further testing needs to be conducted in order to answer the questions asked. The results that were gathered suggest that the inhibition of bioluminescence does not necessarily increase with the concentration of zinc. Resistance mechanisms are discussed as well as sources of error. It is only possible to speculate regarding the ecological effects on the bacteria due to elevated zinc concentrations. It is not likely that the values in the areas where the fish used in this experiment were caught could affect the bioluminescence on bacteria present. Whether this is an appropriate method of analysis is also dependant on many variables which needs further investigation.

INNEHÅLL

ABSTRACT	2
INNEHÅLL.....	3
INTRODUKTION	4
SYFTE	4
BAKGRUND	4
<i>Zink</i>	4
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	4
<i>Försvarsmekanismer</i>	4
<i>Bioluminescens</i>	5
<i>Förroeningar</i>	6
<i>Biotillgänglighet</i>	7
<i>Toxicitetsanalyser</i>	7
FRÅGESTÄLLNINGAR	8
HYPOTES.....	8
MATERIAL OCH METODER.....	9
METODVAL	9
ODLINGSMEDIUM	9
RENODLING.....	9
ZINKTESTER	10
RESULTAT.....	11
ANALYS	12
DISKUSSION.....	14
SLUTSATS.....	18
REFERENSER	19
LITTERATUR.....	19
RAPPORTER OCH ARTIKLAR FRÅN INTERNET	19
WEBSIDOR FRÅN INTERNET	20
BILDER	20
ACKNOWLEDGEMENTS	21
BILAGA 1	22
BILAGA 2	23

INTRODUKTION

SYFTE

Metallutsläpp i vatten är ett av många miljöproblem i dagens samhälle. Vår rapport fokuserar på metallen zink och dess påverkan av bioluminescensen hos bakterien *P. Phosphoreum*. Syftet med arbetet är att studera hur bioluminescensen påverkas vid olika halter zinkjoner för att sedan jämföra med zinkkoncentrationer uppmätta i bakteriernas naturliga miljö som vi hittar i litteraturen. Detta för att kunna spekulera i om dagens metallhalter kan ha någon påverkan på bakterierna och dess bioluminescens.

BAKGRUND

ZINK

Zink är en essentiell metall som krävs för tillväxt, differentiering och utveckling hos alla slags organismer från bakterier till människor. Den form av zink som utnyttjas i biologiska sammanhang är den divalenta jonen Zn^{2+} . Zink är en komponent till över 200 kända enzymer hos olika organismer och nödvändig för katalytisk förmåga och för strukturstabilitet. Den medverkar även till att stabilisera membran och vid DNA-replikation, transkription m.m.¹

Toxiska nivåer inhiberar bland annat enzymet cytokrom c oxidas som är nödvändigt för elektrontransportkedjan.² Zinkjonerna binder till svavelatomer och kan därmed ändra formen på proteiner och enzymer.³

PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM

Photobacterium Phosphoreum är en bakterie som förekommer både frilevande i havsvatten och i symbios med fiskar, bläckfiskar eller räkor. Bakterierna kan uppvisa bioluminescens vid tillräckligt hög celltäthet vilket t.ex. kan ske i speciella lysorgan eller på huden hos symbionten. Organismen som bakterierna lever hos kan använda sig av ljuset som produceras till att attrahera partners, locka till sig bytesdjur eller varna rovdjur m.m. Vad bakterierna får i utbyte är oklart men man skulle kunna tänka sig att det är näring och skydd som väger upp för energiförlusten vid ljusproduktionen (se mer under Bioluminescens).⁴

FÖRSVARSMEKANISMER

¹ Choudhury, R., Srivastava, S. *Zinc resistance mechanisms*, 769.

² Kuznetsova, S. S., Azarkina, N. V., Vygodina, T. V., Siletsky, S. A., Konstantinov, A.A. *Zinc ions as cytochrome c oxidase inhibitors: two sites of action*.

³ Bauman, Robert W. *Microbiology*, 147.

⁴ Ibid.

Många bakterier har försvarsmekanismer som skyddar bakterien mot toxiska halter av metaller. Dessa är mer komplicerade för essentiella metaller, som zink, eftersom en viss halt av metallen krävs för funktionen av cellen samtidigt som överskottet måste omhändertas och toxiciteten elimineras så att inte cellen dör.⁵

BIOLUMINESCENS

Bioluminescens innebär att en levande organism kan producera ljus. Principen bakom bioluminescens är att ett protein, **luciferin**, reagerar med ett enzym, **luciferas**, och ljus bildas.⁶ För *P. Phosphoreum* heter luciferinet flavin mononukleotid (FMNH₂) och bildar ett komplex med luciferas. När detta reagerar med syre oxideras luciferinet till oxyluciferin (FMN) och luciferaset exciteras. När luciferaset återgår till sitt vilostadium emitteras ljus. Bioluminescens kan endast observeras hos kulturer som befinner sig i 'log fas' och fortfarande växer.⁷

*P. Phosphoreum*s bioluminescensgenererande mekanism är en alternativ sidokedja till dess elektrontransportkedja. Denna sidokedja är mycket mer energikrävande än den normala elektrontransportkedjan eftersom ingen protongradient etableras och därmed bildas inget ATP. Istället går elektronerna åt till att bilda luciferin-luciferaskomplexet.⁸

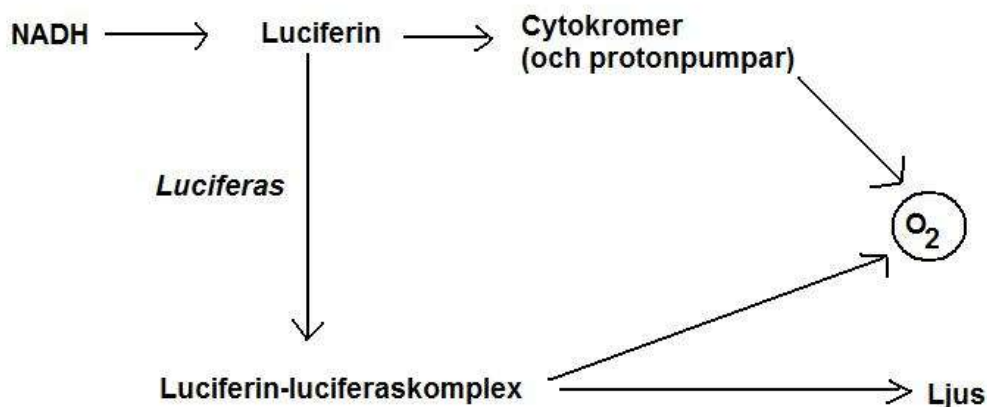


BILD 1 Photobacteriums båda alternativa elektrontransportkedjor. Källa: Malin Petersson utifrån BAUMAN, ROBERT W. *MICROBIOLOGY*, 147.

⁵ Choudhury, R., Srivastava, S. *Zinc resistance mechanisms*, 768.

⁶ Levinton, Jeffrey S. *Marine Biology*, 97.

⁷ Madden, Dean., Lidesten, Britt-Marie. *Bakteriell Illumination – att odla luminescenta bakterier*.

⁸ Bauman, Robert W. *Microbiology*, 147.

Bakterierna lyser inte då de är frilevande utan det är inte förrän de samlats i en koloni med en viss storlek som de börjar emittera ljus. Detta beror på att de inte tillverkar något luciferas förrän celltätheten blir så stor att en aktivator molekyl ackumulerats till en viss koncentration. Regleringar som orsakas av förändringar i populationstätheten kallas kvorumreglering⁹.

P. Phosphoreum bioluminescens påverkas av såväl pH som temperatur och salinitet. Den luminescerar ej på pH högre än 7, temperaturer lägre än 5 °C eller högre än 25 °C och inte vid salthalter lägre än 1,0 %.¹⁰

FÖRORENINGAR

Metaller i vatten					
Metall	Klass 1 Mycket låg halt (µg/l)	Klass 2 Låg halt (µg/l)	Klass 3 Måttligt hög halt (µg/l)	Klass 4 Hög halt (µg/l)	Klass 5 Mycket hög halt (µg/l)
As	< 0,4	0,4–5	5–15	15–75	> 75
Cd	< 0,01	0,01–0,1	0,1–0,3	0,3–1,5	> 1,5
Cr	< 0,3	0,3–5	5–15	15–75	> 75
Cu	< 0,5*	0,5–3*	3–9*	9–45	> 45
Ni	< 0,7	0,7–15	15–45	45–225	> 225
Pb	< 0,2	0,2–1	1–3	3–15	> 15
Zn	< 5	5–20	20–60	60–300	> 300
Risk för biologiska effekter					
	Ingen eller mycket liten risk	Liten risk	Risk föreligger främst i mjuka, närrings- och humusfattiga vatten samt i sura vatten	Ökad risk	Hög risk redan vid kort exponering

* Klassindelningen för koppar avser främst sjöar och mindre vattendrag. I större vattendrag kan kopparhalter upp till 3 µg/l förekomma även i opåverkade områden. Kopparhalter i klass 3 utgör normalt inte samma risk i större vattendrag som i sjöar och mindre vattendrag.

TABELL 1 Tillståndsklassning för metaller i vatten. Källa: Naturvårdsverket 2004 från: LARSSON, MARTIN. *TOXICITETSANALYS MED LUMINESCENTA BAKTERIER*.

Enligt en undersökning som gjordes runt Bullandö marina 2004¹¹ varierade bakgrundsvärdena för zink mellan 0,64 – 2,19 µg/l. När båtar målade med båtbottnfärger innehållande zink lades i på våren kunde halterna stiga till 20,0 µg/l i hamnbassängen vilket, enligt Tabell 1, motsvarar en låg till måttligt hög halt av zink.

⁹ Carlson, Karin., Linder, Claës. *Introduktion till mikrobiologi*, 67, 151.

¹⁰ Walters, Paul., Lloyd, David. *Salt, pH and Temperature Dependencies of Growth and Bioluminescence of Three Species of Luminous Bacteria Analysed on Gradient Plates*.

¹¹ Kylin, Henrik. *Kemiska ämnen I båtbottnfärger*, 9.

Båtbottenfärger med zink ska enligt Kemikalieinspektionen¹² ha slutats sälja under våren 2012. Det finns dock andra källor till zinkutsläpp som t.ex. industriavfall. Zink används oftast som korrosionsskydd.¹³

I Stilla havet, Sargassohavet och runt Arktis varierar halten zink mellan 0,004 – 0,225 µg/l.¹⁴ I Nordostatlanten ligger zinkhalten på runt 0,130 µg/l.¹⁵

BIOTILLGÄNGLIGHET

Eftersom metaller är grundämnen kan de inte brytas ned av naturen och de är svåra att avlägsna från naturen. Detta innebär dock inte att all metall är biotillgänglig. En biotillgänglig metall kan definieras som en metall som befinner sig som en fria joner eller som lätt kan övergå till det.¹⁶ Biotillgängligheten kan variera beroende på pH, redoxförmågan hos omgivningen och andelen organiskt material som kan binda till en metall. Dessa faktorer gör att det kan vara stora avvikelser mellan den totala halten och den biotillgängliga halten metall i ett område.¹⁷

TOXICITETSANALYSER

Kemiska analyser av ämnen används mycket för att bestämma halten av föroreningar. Dock finns det ett behov av andra slags tester eftersom halter för vilka miljöförstöring sker inte nödvändigtvis är densamma som den totala halten metall eftersom biotillgängligheten kan variera. Då kan man använda sig av organismer och utsätta dessa för olika halter av föroreningar och iaktta hur de reagerar.

Det är dock alltid inte helt lätt då det finns många variabler man måste ta hänsyn till. Bland annat försvarsmekanismer och om biotillgängligheten av ämnet i testmiljön skiljer sig från den naturliga miljön. Detta gäller särskilt toxicitetsanalys av metaller.¹⁸

¹² Kemikalieinspektionen. *Frågor och svar om båtbottenfärger*.

¹³ Naturvårdsverket. *Zink (Zn)*.

¹⁴ Clark, R.B. *Metal Pollution*, 21.

¹⁵ Danielsson, Lars-Göran., Magnusson, Bertil., Westerlund, Stig. *Cadmium, copper, iron, nickel and zinc in the north-east Atlantic Ocean*.

¹⁶ Sposito G i *Environmental microbiology*, 403.

¹⁷ Roane, Timberley M., Pepper, Ian L. *Environmental microbiology*, 414.

¹⁸ Clark, R.B. *Metal Pollution*, 17-20.

FRÅGESTÄLLNINGAR

- Kan dagens zinknivåer tänkas ge en påverkan på bioluminescensen hos P. Phosphoreum om man utifrån zinkvärden från tidigare litteratur och undersökningar?
- Är P. Phosphoreum en lämplig organism för toxicitetsanalyser av metall?

HYPOTES

Vår hypotes är att ju mer zink vi tillsätter desto mindre kommer P. Phosphoreum att luminescera och desto fortare kommer de att sluta luminescera. Vid en tillräckligt låg halt borde bioluminescensen inte påverkas alls utan bakterierna kommer lysa lika mycket som en referens utan zink. På samma sätt tror vi det finnas en övre gräns där bakterierna inte alls lyser eller snabbt slocknar. Om denna dödliga halt kan uppmätas ute i havet har vi svårt att ha någon hypotes om utan några bakgrundskunskaper, men vi antar att så inte är fallet.

Angående ifall P. Phosphoreum skulle gå att använda för toxicitetsanalyser så tror vi att så är fallet då vi läst att de använts till detta av andra.¹⁹

¹⁹ Larsson, Martin. *Toxicitetsanalys med luminescenta bakterier*.

MATERIAL OCH METODER

METODVAL

Valet av metod baserades på att så mycket som möjligt skulle kunna utföras utanför skolan. Experimenten skulle vara lätta att göra flera gånger och inte kräva avancerad eller dyr utrustning.

Alla experiment annat än förberedandet av odlingsmedium som skedde på Hvitfeldtskas gymnasium utfördes hemma hos en av författarna. Bakteriekulturerna förvarades i ett kylskåp med en temperatur på ca 15°C och allt praktiskt arbete utfördes på en diskbänk i ett badrum.

Fast medium i agarplattor användes i början men byttes senare ut mot flytande medium i skruvlocksrör eftersom det är mer likt bakteriernas naturliga miljö och resultaten av zinktesterna lättare går att jämföra.

ODLINGSMEDIUM

Odlingsmedium förbereddes enligt en befintlig manual²⁰. För det fasta mediumet användes ”Fiskberikat medium” och för det flytande mediumet användes ”Photobacterium medium”. pH justerades dock till 6,5 istället för 7,2–7,5 enligt recept då en rapport²¹ indikerade att *P. Phosphoreum* växte och luminescerade bättre vid pH lägre än 7.

Flytande medium hölls upp i skruvlocksrör som sedan autoklaverades. Allt odlingsmedium förvarades i kylskåp när det inte användes.

RENODLING

Bakterier ympades från fisk till ett skruvlocksrör som sedan förvarades i kylskåp. Fisken hade inkuberats i saltvatten och förvarats i kylskåp under ca ett dygn för att förhindra tillväxt av andra bakterier än *P. Phosphoreum*. Fisken (vitling eller sill) köptes från Mölndals Fiskhall och var fiskad i Nordostatlanten.

Bakterierna fick växa till sig under ett till två dygn och när luminescens kunde observeras så omympades bakterier till andra skruvlocksrör där de fick föröka sig i ytterligare ett till två

²⁰ Madden, Dean., Lidesten, Britt-Marie. *Bakteriell Illumination – att odla luminescenta bakterier*.

²¹ Walters, Paul., Lloyd, David. *Salt, pH and Temperature Dependencies of Growth and Bioluminescence of Three Species of Luminous Bacteria Analysed on Gradient Plates*.

dygn för att sedan kunna testa hur deras bioluminescens påverkades av zink i olika koncentrationer.

ZINKTESTER

Zn(NO₃)₂ vägdes upp och löstes i destillerat vatten. Lösningen späddes sedan ut till önskade koncentrationer, se Bilaga 1.

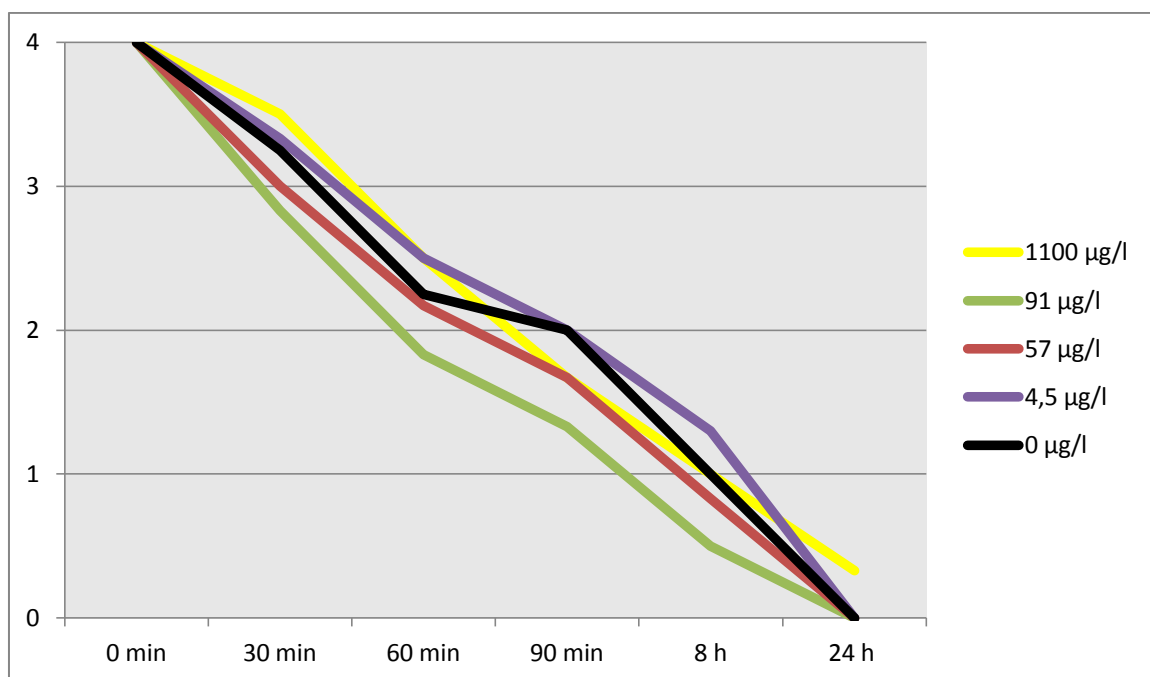
1 ml av lösningar med koncentrationerna 12,5 mg/l, 1,00 mg/l, 0,625 mg/l och 50,0 µg/l tillsattes till 4 olika skruvlocksrör. De totala koncentrationerna i provröret blev då ca 1,1 mg/l, 91 µg/l, 57 µg/l och 4,5 µg/l vilket enligt Tabell 1 motsvarade mycket hög halt, hög halt, måttligt hög halt och mycket låg halt. Ett rör med tillsats av 1 ml destillerat vatten, utan zink, användes också vid varje omgång som referens.

Bioluminescensen iaktogs direkt efter tillsats av zinklösning samt efter 30 min, 60 min, 90 min, 8 h och 24 h. Innan varje observationstillfälle skakades provrören. Luminescensen graderades på en skala från 0-4.

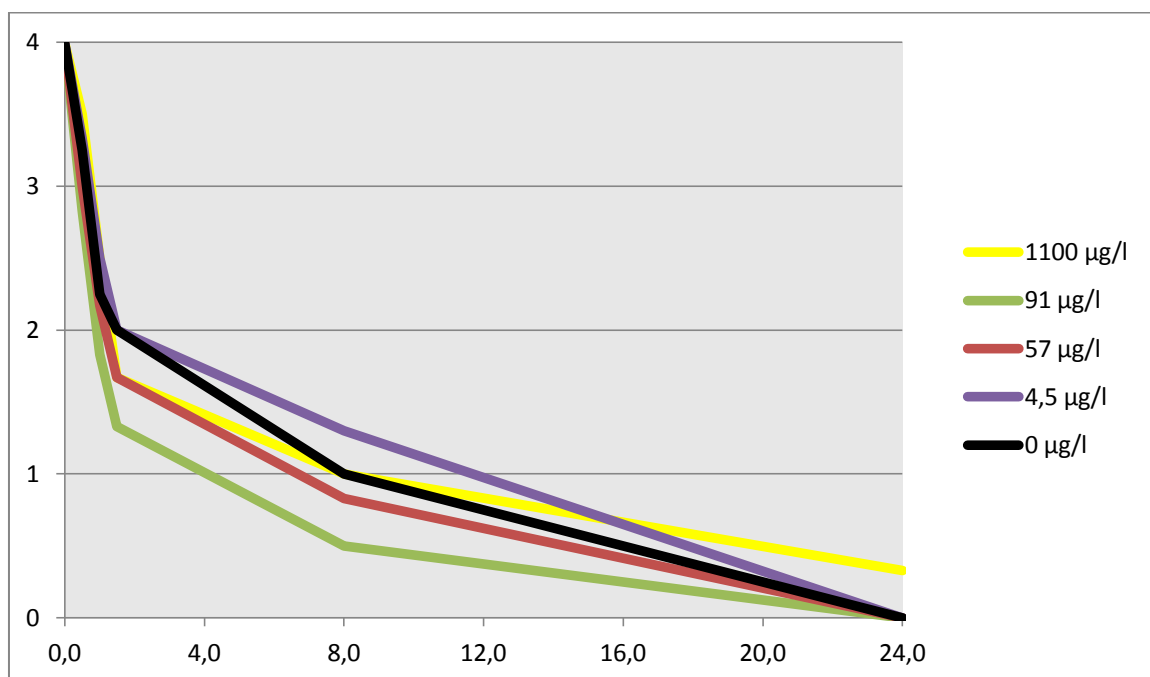
0	Ingen bioluminescens kan observeras
1	Svag bioluminescens kan observeras efter att mörkerseendet anpassats. Mörkt med någon enstaka koloni.
2	Bioluminescens kan observeras med anpassat mörkerseende. Flera små kolonier.
3	Bioluminescens kan observeras även utan fullt mörkerseende. Lyser upp direkt när provröret skakats.
4	Stark bioluminescens kan observeras utan mörkerseende. Lyser tydligt och mycket när provröret skakats.

TABELL 2 Tabell med bedömningskriterier för luminescensen.

RESULTAT



FIGUR 1 Figuren visar hur luminescensen avtog efter tillsats av zink. Luminescens på y-axeln och tiden på x-axeln.



FIGUR 2 Figuren visar tidsskalenligt hur luminescensen avtar efter tillsats av zink. Luminescens på y-axeln och tiden i timmar på x-axeln.

	1100 µg/l	91 µg/l	57 µg/l	4,5 µg/l	0 µg/l
0 min	4	4	4	4	4
30 min	3,5	2,8	3	3,3	3,3
60 min	2,5	1,8	2,2	2,5	2,3
90 min	1,7	1,3	1,7	2	2
8 h	1	0,5	0,8	1,3	1
24 h	0,3	0	0	0	0

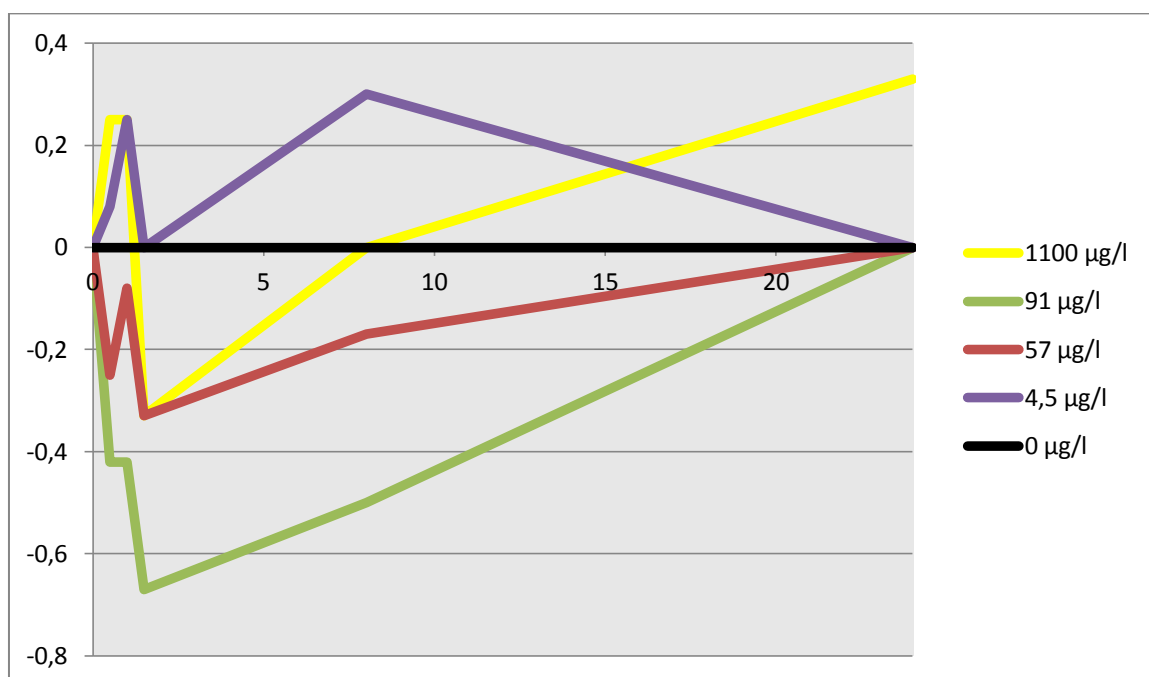
TABELL 3 Tabell med medelvärden av luminescensen från försöken.

Graferna och tabellen visar ett medelvärde på sex stycken försök som utförts. Referensen med 0 µg/l är dock endast baserad på medelvärdet av fyra försök. För alla data se Bilaga 2.

Koncentrationen 91 µg/l var genomgående den som gav mest påverkan på luminescensen. 4,5 µg/l var den koncentration för vilken luminescensen var minst påverkad. Referensen uppvisade också en påverkan på luminescensen.

ANALYS

Eftersom referensen också avtog i luminescens verkar det finnas någon slags process som maskerar påverkan från zinken. För att försöka urskilja mönster har vi dragit bort referensens medelvärde från de andra medelvärdena och gjort en graf över hur de skiljer sig från referensen.



FIGUR 3 Figuren visar skillnaden hos proverna med tillsatt zink mot referensens medelvärde. Tiden på x-axeln och skillnaden på y-axeln.

För att kunna dra slutsatser om hur statistiskt signifikant denna graf är behöver beräkningar av konfidensintervallet göras. Vi räknar med en konfidensgrad på 95 % och standardavvikelser enligt tabellen nedan. Standardavvikelser och konfidensintervall har beräknats i Microsoft Excel 2007. Sampelstorlek är för referensen 4 och för övriga mätvärden 6.

STDAV	1100 µg/l	91 µg/l	57 µg/l	4,5 µg/l	0 µg/l
0 min	0	0	0	0	0
30 min	0,55	0,75	0,63	0,52	0,50
60 min	0,87	0,75	0,75	0,55	0,96
90 min	0,52	0,52	0,52	0,63	1,2
8 h	0,63	0,55	0,41	0,82	0,82
24 h	0,52	0	0	0	0

TABELL 4 Tabell över standardavvikelser för mätvärdena.

KONFIDENS	1100 µg/l	91 µg/l	57 µg/l	4,5 µg/l	0 µg/l
0 min	-	-	-	-	-
30 min	0,44	0,60	0,50	0,42	0,49
60 min	0,70	0,60	0,60	0,44	0,94
90 min	0,42	0,42	0,42	0,50	1,2
8 h	0,50	0,44	0,33	0,66	0,80
24 h	0,42	-	-	-	-

TABELL 5 Tabell över konfidensintervallet hos mätvärdena baserat på standardavvikelse i Tabell 4 och konfidensgraden 95 %.

Eftersom avvikelserna från referensvärdet i Figur 3 bara är marginellt större än en del av konfidensintervallen i Tabell 5 så har de låg statistisk signifikans.

DISKUSSION

Vår hypotes var att ju högre zinkhalt, desto lägre bioluminescens kan observeras. Resultaten indikerar att en mycket hög halt av zink (1100 µg/l) inte nödvändigtvis påverkar luminescensen mer än höga och måttligt höga halter utan rentav påverkar luminescensen mindre. Även om resultaten har en låg statistisk signifikans skulle man kunna tänka sig att bakterierna har någon form av försvarsmekanismer mot toxiska nivåer av zink. Detta förklarar dock inte varför de lägre koncentrationerna påverkade luminescensen mer, om det inte är så att det skulle finnas något slags tröskelvärde för vilka försvarsmekanismerna initieras. Detta tror vi dock är ganska osannolikt. Sannolikheten är större att resultaten är osäkra.

Att referensen inte luminescerade opåverkat var också en överraskning. Det var samma destillerade vatten som använts till zinklösningarna. Eftersom ingen zink tillsats borde ju inte luminescensen påverkas. Tillsatsen ger en viss utspädning av pH och salinitet men de borde inte ha påverkats tillräckligt mycket för att ge utslag. Det skulle kunna vara något som kontaminerat det destillerade vattnet eller behållarna som zinklösningarna förvarats i. Det skulle också kunna ha något att göra med temperaturen. Även om provrören förvarades i kylskåp med en temperatur på ca 15 °C så utfördes alla experiment och iakttagelser i rumstemperatur (ca 20 °C) och ytterligare värme skulle kunna komma från hantering, om än kortvarig. Även lösningarna som tillsattes hade förvarats i rumstemperatur vilket också bidrar till att höja temperaturen. Provlösningarna borde ha förvarats i kylskåp. Frågan är om denna temperaturstress när de byter från kallare till varmare miljö kan ge en påverkan på bioluminescensen. Även om de emellan observationerna förvarades i kylskåp skulle temperaturen kunna ha blivit så hög att bioluminescensen påverkas.

Kan dagens zinknivåer tänkas ge en påverkan på bioluminescensen hos *P. Phosphoreum* om man utgår ifrån zinkvärdet från tidigare litteratur och undersökningar?

Utifrån de resultaten vi har fått är det svårt att dra någon slutsats om detta. Bakterierna verkar tolerera mycket höga halter zink bättre än vad de hanterat höga halter, måttligt höga halter och även destillerat vatten utan någon tillsats av zink. Låga halter hanterades bäst enligt resultaten men dessa har alldeles för låg statistisk signifikans för att man skall kunna använda sig av dessa.

Om man spekulerar skulle man kunna tänka sig att eftersom fiskarna vi använde hade luminescerande bakterier på sig så är zinknivåerna i områden där de fiskats inte tillräckligt

stora för att ge en påverkan. Dock så varierar zinkhalterna mycket beroende på vilket område som avses och därför kan inget generellt svar ges. Eftersom fiskarna kommit från Nordostatlanten skulle man kunna tänka sig att värden på 0,130 µg/l inte påverkar luminescensen. Dessa värden är dock från 1985 och man skulle kunna tänka sig att halterna är högre idag även om man inte kan veta hur mycket som är biotillgängligt. Eftersom referensen i våra försök också fick en påverkan på luminescensen kan man tänka sig att det inte enbart är zinken som påverkar luminescensen utan något annat vi har utsatt dem för. Detta bidrar ytterligare till att våra resultat inte kan användas för att diskutera denna fråga.

Utifrån våra tester kan vi inte besvara frågeställningen men åtminstone i Nordostatlanten antar vi att zinkhalten inte påverkar bioluminescens eller tillväxt av *P. Phosphoreum* eftersom vi kunde erhålla luminescerande kolonier från fisk fångad där. Vissa fiskar vi använde luminescerade inte, vi kan dock inte avgöra om detta beror på att bakterierna blivit utsatta för toxiska halter av zink, om de helt enkelt inte hade bakterier på sig eller om de blivit felaktigt hanterade efter fångst.

Är *P. Phosphoreum* en lämplig organism för toxicitetsanalyser av metall?

Huruvida *P. Phosphoreum* är en lämplig organism för toxicitetsanalyser av metall är en fråga som kan diskuteras. Med vårt tillvägagångssätt kan vi inte påstå att det är ett bra sätt för att analysera den toxiska effekten av metall eftersom de påverkades även utan tillsats av zink. Eftersom det verkar som att vi inte kunnat testa zinken så kan vi inte, utifrån våra resultat, uttala oss om det är en lämplig organism för just toxicitetsanalys av metall. Det vi kan göra är att diskutera om det verkar vara en lämplig organism för toxicitetsanalyser i allmänhet utifrån hur våra försök gick och spekulera kring metallaspekten utifrån bakgrundsfaktan.

Teoretiskt sett så borde det vara en lämplig testorganism eftersom luminescensen och metabolismen är så kopplade. Ämnen och variabler som påverkar metabolismen, i synnerhet elektrontransportkedjan, borde ge en tydlig påverkan av luminescensen. Våra resultat tyder inte direkt på att det skulle vara en olämplig organism, men mer kontrollerade förhållanden behövs för att kunna avgöra vad det är som påverkar bioluminescensen. Att förhållandena behöver kontrolleras så noggrant gör dock att det kanske inte är en så lämplig testorganism ändå. pH, salinitet, temperatur spelar roll både för bioluminescens och för metallers biotillgänglighet vilket gör det svårreglerat om man måste ändra någon variabel (pH etc.) precis innan man tillsätter provet. Det kan vara svårt att veta om det är variabeln man ändrat som orsakar förändringar i luminescens eller om det är provet man tillsatt som ger ett utslag.

Ett annat argument för att *P. Phosphoreum* inte skulle vara en lämplig testorganism, är att de skulle kunna ha försvarsmekanismer mot metaller. Detta skulle medföra att bioluminescensen är opåverkad vid metallnivåer som är toxiska för det ekosystem man vill testa.

Hur man bedömer luminescensen kan också skapa problem. Vi har använt oss av en väldigt subjektiv skala och hur man bedömer luminescens kan antagligen skilja sig mycket mellan individer. Man skulle kunna eliminera detta problem genom att använda sig av någon slags teknik som kan räkna antalet utsända fotoner och därmed få ett mer objektiva mätvärde av ljusstyrkan.

Sammanfattningsvis så är fördelarna med *P. Phosphoreum* att luminescensen är ett konkret sätt att mäta toxiciteten hos metall, man kan snabbt få resultat och den är relativt lätt att få tag på och odla. Nackdelarna är att de kan ha försvarsmekanismer som gör den egentliga toxiciteten svår att bedöma. Det krävs även noggrant kontrollerade förhållanden för att påverkan av rätt variabel (metallhalten) ska kunna analyseras samt utrustning som kan mäta luminescensen på ett objektiva sätt.

Diskussion av metodval och projektet i allmänhet

Våra ursprungliga krav på metoden var att så mycket som möjligt skulle kunna utföras utanför skolan, experimenten skulle vara lätta att göra flera gånger och inte kräva avancerad eller dyr utrustning. Dessa krav har uppfyllts, vi har kunnat göra allt hemma, kunnat upprepa försöket flera gånger och ingen avancerad eller dyr utrustning har krävts. Dock har det funnits många problem vi stött på under projektets gång några som vi kunnat lösa och några som upptäcktes för sent och kräver ytterligare undersökning.

I början användes fast medium men efterhand insåg vi att resultaten skulle vara svåra att relatera till bakteriernas naturliga miljö. Det var även stora variationer i hur mycket det växte, om det växte överhuvudtaget och hur mycket det luminescerade. Vi tog beslutet att gå över till flytande medium, som var en mer konkret metod när det gällde att bedöma koncentrationerna som bakterierna utsattes för. Dock borde detta beslut tagits mycket tidigare i processen vilket skulle kunna ha medfört att vi kommit fram till de andra problemen med referensen, temperaturen osv. tidigare och därmed haft mer tid att försöka förändra metoden så att resultaten hade kunnat bli mer exakta och statistisk signifikanta. Detta hade man kunnat göra genom att till exempel genomföra försöken i ett rum med en temperatur som är densamma som kylskåpets och därmed eliminera temperaturfaktorn som felkälla. Dock hade

denna ändring gjort att experimentet inte längre uppfyllde våra krav på att det skulle kunna utföras hemma hos någon av författarna.

Något som skulle kunna utvecklas är att ta reda på hur bioluminescensen förändras i helt opåverkade rör för att se om det är ett naturligt avtagande som rör med prover tillsatta uppvisar. Man skulle även kunna använda lösningar med högre koncentrationer att tillsätta för att minimera utspädningen

En annan aspekt av metoden som kan diskuteras är odlingsmediumet. Organiskt material som använts kan påverka biotillgängligheten av metall väsentligt och eftersom odlingsmediumet bl.a. innehåller jästextrakt kan man tänka sig att biotillgängligheten blir mycket lägre än i havet. pH och temperatur är också variabler som skiljer sig något från den naturliga miljön. pH på 6,5 är antagligen något lägre än i havet där det borde vara runt 7-8. Temperaturen är också högre även om den kan variera i havet. pH i odlingsmedium borde öka biotillgängligheten jämfört med i havet. Att pH i havet är högre än vad studierna indikerar bakterierna luminescerar i är också intressant men detta har vi inga förklaringar till. Eftersom vi fått fram bakterier så verkar de ju uppenbarligen klara ett högre pH än 7. Alla dessa faktorer som kan påverka resultatet gör att toxiciteten inte kan utvärderas på ett önskvärt sätt. Det hade varit intressant om man hade kunnat komma fram till någon faktor för hur metallens biotillgänglighet skiljer sig mellan odlingsmediumet och den naturliga miljön. Ett annat sätt att gå tillväga skulle kunna vara att försöka odla bakterierna i havsvatten men detta medför fler problem. För att bioluminescens ska uppnås måste en viss celltäthet uppnås vilket inte sker när bakterierna är frilevande i vatten utan endast när de har en tillräcklig näringskälla. Alltså hade antagligen bakterier odlade i provrör med havsvatten inte uppvisat någon bioluminescens och därmed hade inte en toxisk effekt kunnat påvisas med hjälp av bioluminescens.

Överlag hade projektet kunnat utvecklas om mycket av bakgrundsfaktan vi nu tagit reda på hade insamlats tidigare och vi hade kunnat ha de diskuterade aspekterna i åtanke när vi utformade experimentet. Dock så har många nya kunskaper och funderingar kommit från oväntade resultat som då har föranlett ett behov av att söka ny kunskap. Även om vi inte har kunnat besvara frågeställningarna i den utsträckning vi hoppats har vi ändå lärt oss otroligt mycket nytt under projektets gång som vi kan ha nytta av nästa gång vi genomför någon form av forskning.

SLUTSATS

- Resultaten har för låg statistisk signifikans för att använda när frågeställningarna skulle besvaras. Fler försök och förändrad utformning av experimentet behöver göras.
- Antagligen klarar *P. Phosphoreum* av zinkkoncentrationerna i de områden av Nordostatlanten där fisken vi har använt av oss har fångats.
- *P. Phosphoreum* är kanske inte en jättelämplig organism för toxicitetsanalys av metaller på grund av odlingsförhållanden som krävs för experimentet, variabler som är svåra att kontrollera och eventuella försvarsmekanismer hos bakterien.
- Projektet hade tjänat på att söka mer information innan metoden utformades men samtidigt har mycket kunskap baserats på oväntade resultat som hade varit svåra att förutse även med mer bakgrundsfakta.
 - Ett visst mått av trial-and-error kan generera många nya funderingar som leder till ny kunskap.

REFERENSER

LITTERATUR

Bauman, Robert W. 2003. *Microbiology*. Pearsons.

Carlson, Karin., Linder, Claës. 2012. *Introduktion till mikrobiologi*. Studentlitteratur.

Clark, R.B. 2001. *Marine Pollution*. Oxford University Press. Bath.

Levinton, Jeffrey S. 2001. *Marine Biology*. Oxford University Press. New York.

Roane, Timberley M., Pepper, Ian L. 2000. *Environmental Microbiology. 17: Microorganisms and Metal Pollutants*. Academic Press, Elsevier.

Sposito, Garrison. 1989. I Roane, Timberley M., Pepper, Ian L. 2000. *Environmental Microbiology. 17: Microorganisms and Metal Pollutants*. Academic Press, Elsevier.

RAPPORTER OCH ARTIKLAR FRÅN INTERNET

Choudhury, R., Srivastava, S. 2001. *Zinc resistance mechanisms in bacteria*. Current Science Vol. 81, No. 7. Tillgänglig på <http://www.iisc.ernet.in/currsci/oct102001/768.pdf> citerad 3/3-2013.

Danielsson, Lars-Göran., Magnusson, Bertil., Westerlund, Stig. 1985. *Cadmium, copper, iron, nickel and zinc in the north-east Atlantic Ocean*. Marine Chemistry Vol. 17 No. 1. Tillgänglig på <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304420385900349> citerad 14/3-2013.

Kuznetsova, S. S., Azarkina, N. V., Vygodina, T. V., Siletsky, S. A., Konstantinov, A.A. 2004. *Zinc Ions as Cytochrome c Inhibitors: Two Sides of Action*. Tillgänglig på <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/contents/v70/full/70020160.html> citerad 5/3-2013.

Kylin, Henrik. 2004. *Kemiska ämnen i båtbottnfärger*. Kemikalieinspektionen. Tillgänglig på http://www.kemi.se/Documents/Publikationer/Trycksaker/Rapporter/Rapport2_06.pdf?eps_language=sv citerad 13/3-2013

Larsson, Martin. 2004. *Toxicitetsanalys med luminescenta bakterier*. Examensarbete, LTH. Tillgänglig på <http://epubl.ltu.se/1402-1617/2004/304/LTU-EX-04304-SE.pdf> citerad 14/3-2013.

Madden, Dean., Lidesten, Britt-Marie. 2001. *Bakteriell Illumination – att odla luminescenta bakterier*. Bioscience explained Vol. 1, No 1. Tillgänglig på http://www.bioscience-explained.org/SEvol1_1/pdfvol1_1/PhotoSE.pdf citerad 10/3 -2013.

Walters, Paul., Lloyd, David. 1985. *Salt, pH and Temperature Dependencies of Growth and Bioluminescence of Three Species of Luminous Bacteria Analysed on Gradient Plates*. Tillgänglig på <http://mic.sgmjournals.org/content/131/11/2865.full.pdf> citerad 10/3-2013.

WEBSIDOR FRÅN INTERNET

Kemikalieinspektionen. *Frågor och svar om båtbottnfärger*. Tillgänglig på <http://www.kemi.se/sv/Innehall/Fragor-och-svar/Batbottenfarger/Fragor-och-svar-om-batbottenfarger/> citerad 12/3-2013.

Naturvårdsverket. *Zink (Zn)*. Tillgänglig på <http://utslappisiffror.naturvardsverket.se/Amnen/Tungmetaller/Zink/> citerad 12/3-2013.

BILDER

Bilden på framsidan är ett foto av en sill täckt av luminescerande kolonier av *P. Phosphoreum*. Fotograf: Malin Petersson.

ACKNOWLEDGEMENTS

Emma Lundgren - vår handledare som under arbetet uppmuntrat oss till att arbeta själva och ta egna initiativ och som även lärt oss vad en autoklav är.

Susanne Ottosson - som gett oss en grundläggande kunskap i ämnet bioteknik och mikrobiologi och svarat på frågor.

Ulf Larsson - för hans allmänna entusiasm och hans inspirerande frågor och kommentarer kring vårt arbete.

Robert Petersson – för hans insikter och hjälp med, särskilt, statistiken.

Fiskhallen Mölndals centrum - till deras allmänt sköna personal som intresserat följt vårt projekt från start och då och då bjudit på en gratis fisk.

Malins föräldrar - för att vi under nästan ett halvår har fått ockupera deras badrum och kyl med bakterier, desinfektionsmedel, agarplattor och provrör!

Malins bröder - för alla glada och uppmuntrande kommentarer vi fått under arbetets gång och den hänsyn som visats till vårt mörkerrum.

Fridas föräldrar - för att hon fått låna bilen för att åka till Malin så ofta.

Hvitfeldtska biologi/kemi institution - som låtit oss använda deras arbetsrum och material till förberedelse av medium trots att det ibland har lett till en allt annat än trevligt odör av fisk.

Chalmers bibliotek - för deras otroligt användbara litteratur.

Biomedicinska biblioteket - som varit himmelriket när vi sökt litteratur att använda till arbetet.

Axel Flinth - för att han fick oss att söka till Unga Forskare-tävlingen där vi fick synpunkter, tips och råd till utveckling av projektet.

Och till alla som inte nämnts här men som bidragit med inspiration, kunskap eller uppmuntran under projektets gång!

BILAGA 1

För att få en lösning med koncentrationen 0,500 g Zn²⁺/100 ml behövs det tillsättas hur mycket Zn(NO₃)₂ · 4H₂O?

	Zn(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	Zn ²⁺
M [g/mol]	261,494	65,41
m [g]	$\left(\frac{0,500}{65,41}\right) 261,494$	0,500
N [mol]	$\frac{0,500}{65,41}$	$\frac{0,500}{65,41}$

$$m = \left(\frac{0,500}{65,41}\right) 261,494 \approx 1,9999 \text{ g}$$

Späda lösningar till nya koncentrationer...

Använd 100 ml mätglas för att mäta volymer. Två olika vollpipetter. En till destillerat vatten och en till lösningarna. Den till lösningarna sköljs ur en gång med destillerat vatten mellan varje uppmätning.

$$\frac{m}{V_{taget}} = \frac{c_{taget}}{V_{nya}} \quad V_{taget} = \frac{m_{\text{önskat}}/100\text{ml}}{c_{taget}}$$

- 0) Lösning med koncentration 0,500 g Zn²⁺/100 ml = 5,00 g/l
Väg upp 1,9999 g Zn(NO₃)₂ · 4H₂O och späd till 100 ml.
- 1) Önskad **c₁=0,25 g/l**.
5,0 ml av c₀ späds till 100 ml.
- 2) Önskad **c₂=12,5 mg/l**
5,0 ml av c₁ späds till 100 ml.
- 3) Önskad **c₃=0,625 mg/l**
5,0 ml av c₂ späds till 100 ml.
- 4) Önskad **c₄=50 µg/l**
8,0 ml av c₃ späds till 100 ml.
- 5) Önskad **c₅=20 µg/l**
40 ml av c₄ späds till 100 ml.
- 6) Önskad **c₆=15 µg/l**
75 ml av c₅ späds till 100 ml.
- 7) Önskad **c₇=10 µg/l**
67 ml av c₆ späds till 100 ml.
- 8) Önskad **c₈=5,0 µg/l**
50 ml av c₇ späds till 100 ml.
- 9) Önskad **c₉=1,0 µg/l**
20 ml av c₈ späds till 100 ml.

Sedan späddes även lösningar med koncentrationerna 0,80 mg/l och 1,0 mg/l utifrån lösning c₂.

1,0 mg/l: 8,0 ml av 12,5 mg/l späddes till 100 ml.

0,8 mg/l: 8,0 ml av 1,0 mg/l späddes till 100 ml.

BILAGA 2

Försök 1 A	1100 µg/l	91 µg/l	57 µg/l	4,5 µg/l
0 min	4	4	4	4
30 min	4	2	3	3
60 min	3	1	2	2
90 min	2	1	2	2
8 h	1	0	1	2
24 h	1	0	0	0

TABELL 6 Tabell med värden från omgång A från första försöket.

Försök 1 B	1100 µg/l	91 µg/l	57 µg/l	4,5 µg/l
0 min	4	4	4	4
30 min	4	2	3	3
60 min	3	1	2	2
90 min	2	1	2	2
8 h	1	0	1	2
24 h	1	0	0	0

TABELL 7 Tabell med värden från omgång B från första försöket.

Försök 2	1100 µg/l	91 µg/l	57 µg/l	4,5 µg/l	referens
0 min	4	4	4	4	4
30 min	4	4	4	4	4
60 min	3	2	3	3	3
90 min	2	2	2	3	3
8 h	0	0	0	0	0
24 h	0	0	0	0	0

TABELL 8 Tabell med värden från andra försöket.

Försök 3A	1100 µg/l	91 µg/l	57 µg/l	4,5 µg/l	referens
0 min	4	4	4	4	4
30 min	3	3	3	3	3
60 min	3	3	3	3	2
90 min	1	1	1	2	1
8h	1	1	1	1	1
24 h	0	0	0	0	0

TABELL 9 Tabell med värden från omgång A från tredje försöket.

Försök 3B	1100 µg/l	91 µg/l	57 µg/l	4,5 µg/l	referens
0 min	4	4	4	4	4
30 min	3	3	2	3	3
60 min	1	2	1	2	1
90 min	1	2	1	1	1
8h	1	1	1	1	1
24 h	0	0	0	0	0

TABELL 10 Tabell med värden från omgång B från tredje försöket.

Försök 3C	1100 µg/l	91 µg/l	57 µg/l	4,5 µg/l	referens
0 min	4	4	4	4	4
30 min	3	3	3	4	3
60 min	2	2	2	3	3
90 min	2	1	2	2	3
8h	2	1	1	2	2
24 h	0	0	0	0	0

TABELL 11 Tabell med värden från omgång C från tredje försöket.