

Sini Manninen

# MIKROBIBIOSENSORIT MERINÄYTTEI- DEN ANALYSOINNISSA

Kandidaatintyö  
Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta  
Tarkastaja: Ville Santala  
toukokuu 2024

# TIIVISTELMÄ

Sini Manninen: Mikrobibiosensorit merinäytteiden analysoinnissa  
Microbial Whole Cell Biosensors in Marine Sample Analysis  
Kandidaatintyö  
Tampereen yliopisto  
Bioteknologian ja biolääketieteen tekniikan kandidaattiohjelma, tekniikan opintosuunta  
toukokuu 2024

---

Meret ovat suorasti tai epäsuorasti elintärkeitä kaikelle elämälle maapallolla. Ihmisen ja ilmastonmuutoksen vaikutukset näkyvät meriekosysteemien muuttumisena. Jotta vaikutuksia voidaan tarkastella, tarvitaan keinoja meriekosysteemien analysointiin. Maapallolla elää noin  $10^{12}$  mikro-organismilajia. Mikrobien luonnolliset metaboliareitit tarjoavat valtavasti mahdollisuuksia tunnistaa erilaisia yhdisteitä. Synteettisen biologian avulla metaboliareiteista voidaan tunnistaa oikeat osat ja valmistaa mikrobeihin perustuvia kokosolubiosensoreita eli mikrobibiosensoreita. Tämän kandidaatintyön tavoitteena on selvittää, miten mikrobibiosensoreita voidaan käyttää merinäytteiden analysoinnissa.

Työssä esitellään mikrobibiosensorin toimintaperiaatteet, neljä eri meriekosysteemeihin kohdistuvaa uhkaa sekä uhkien mittaamiseen soveltuvia mikrobibiosensorisovelluksia. Mikrobibiosensori koostuu tunnistuselementistä, promoottorista ja reportterista. Tunnistuselementti ja reportteri valitaan tunnistettavan analyytin ja käyttöympäristön perusteella. Työssä esitellyt meriekosysteemeihin kohdistuvat uhat ovat meritoksiinit, happamoituminen, kemiallinen saastuminen ja muovit. Sen lisäksi, että uhat vaikuttavat negatiivisesti meriekosysteemeihin, ne vaikuttavat myös esimerkiksi ihmisten terveyteen ja kalastuselinkeinoon. Meriekosysteemeihin kohdistuvia uhkia voidaan mitata niihin liittyvien merkkiyhdisteiden avulla. Työssä esitellyt mikrobibiosensorit tunnistavat kyseisiä merkkiyhdisteitä. Kaikki työssä esitellyt mikrobibiosensorit ovat edelleen tutkimusvaiheessa.

Kirjallisuuden perusteella mikrobibiosensorit ovat nopeita, spesifejä, helppokäyttöisiä ja kustannustehokkaita. Usein merinäytteiden analysointiolosuhteet ovat haastavia ja kuljetusmatkat pitkiä. Ominaisuuksiltaan mikrobibiosensorit soveltuvatkin hyvin merinäytteiden analysointiin. Mikrobibiosensorit tarvitsevat kuitenkin edelleen laajaa tutkimusta ennen kuin niitä voidaan alkaa käyttää kaupallisissa tarkoituksissa. Mikrobien metaboliareitit ja niistä löytyvät tunnistuselementit ovat tärkeä tutkimuskohde. Tutkimuksen avulla mikrobibiosensoreille voidaan löytää uusia mittauskohteita ja olemassa olevia sovelluksia saadaan kehitettyä tarkemmiksi. Myös sensorimatriisilajien tutkimusta on edistettävä, jotta niistä voidaan löytää meriympäristön vaihteleviin olosuhteisiin sopivia lajeja.

Avainsanat: mikrobibiosensori, meri, mikrobi, ympäristön mittaaminen, kokosolubiosensori

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check –ohjelmalla.

# SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO .....	1
2. MIKROBIBIOSENSORIT .....	3
2.1 Mikrobibiosensorin toiminta .....	3
2.2 Mikrobibiosensorien tunnistuselementit .....	5
2.3 Mikrobibiosensorien reportterit .....	6
2.4 Mikrobibiosensorien rakentaminen .....	9
3. MERIEKOSYSTEEMIIN KOHDISTUVAT UHAT .....	12
3.1 Meritoksiinit .....	12
3.2 Happamoituminen .....	13
3.3 Kemiallinen saastuminen .....	13
3.4 Muovi .....	14
4. MIKROBIBIOSENSORIEN SOVELLUKSET .....	15
4.1 Mikrobibiosensorien edut .....	15
4.2 Meritoksiinit .....	15
4.2 Happamoituminen .....	16
4.3 Kemiallinen saastuminen .....	17
4.4 Muovi .....	18
5. JOHTOPÄÄTÖKSET .....	20
LÄHTEET .....	23

# 1. JOHDANTO

Meret ovat elintärkeitä suorasti tai epäsuorasti kaikelle elämälle maapallolla. Rannikkoalueet ovat maapallon asutetuimpia alueita (Intergovernmental Panel On Climate Change, 2022), mikä saa ne myös hyvin alttiiksi ihmisen vaikutukselle. Meriympäristöjä uhkaavat esimerkiksi rakentaminen, laivaliikenne ja ravintona käytettyjen merenelävien saastuminen. Jotta merta voidaan suojella oikeilla keinoilla, tarvitaan työkaluja merinäytteiden analysointiin. Mikrobibiosensorit tarjoavat tähän liikuteltavan, kustannustehokkaan ja ekologisen vaihtoehdon (Regan et al., 2023).

Maapallolla elää ainakin  $10^{12}$  erilaista mikro-organismilajia (Rappuoli et al., 2023). Mikrobin erilaiset ominaisuudet ja metabolia tarjoavat siis valtavasti mahdollisia ominaisuuksia hyödynnettäväksi biosensoreina. Synteettisen biologian keinoin mikrobisoluja voidaan muokata ja niiden ominaisuuksia voidaan yhdistellä halutuksi sensoriksi. Tässä kandidaatintyössä keskitytään mikrobisoluihin biosensoreina eli mikrobibiosensoreihin (eng. microbial whole cell biosensor).

Mikrobibiosensorit ovat kokosolubiosensoreita, joiden matriisisoluna on mikrobi. Ne koostuvat tunnistuselementistä, joka reagoi tiettyyn kohdemolekyyliin, promoottorista, joka säätelee reportterin toimintaa sekä reportterista, jonka avulla tunnistus voidaan havaita. Tunnistuselementtejä ja reporttereita on erilaisia ja ne valitaan tunnistettavan analyysin ja käyttöympäristön perusteella. (Chiang ja Hasty, 2023)

Tämän kandidaatintyön tavoitteena on selvittää, miten mikrobibiosensoreita voidaan käyttää merinäytteiden analysoinnissa. Tavoitteena on myös tutustua mikrobibiosensorin rakenteeseen, toimintaan ja erilaisiin rakennusmenetelmiin. Lisäksi selvitetään miksi mikrobibiosensoreita tarvitaan merinäytteiden analysointiin, mitkä ovat lupaavia käyttökohteita ja kuinka laajasti mikrobibiosensoreita käytetään tällä hetkellä. Työ toteutetaan kirjallisuuskatsauksena eli kokoamalla tietoa ajankohtaisista artikkeleista, tuomalla esiin meriympäristön haasteita ja etsimällä niiden mittaamiseen soveltuvia mikrobibiosensoreita. Työssä tuodaan esiin lupaavampia sovelluksia ja pohditaan niiden käyttöä tulevaisuudessa.

Luvussa kaksi esitellään mikrobibiosensorien toimintaperiaate, erilaiset tunnistusmekanismit, erilaiset reportterit ja biosensorien rakentamiseen liittyviä vaiheita. Luvussa kolme

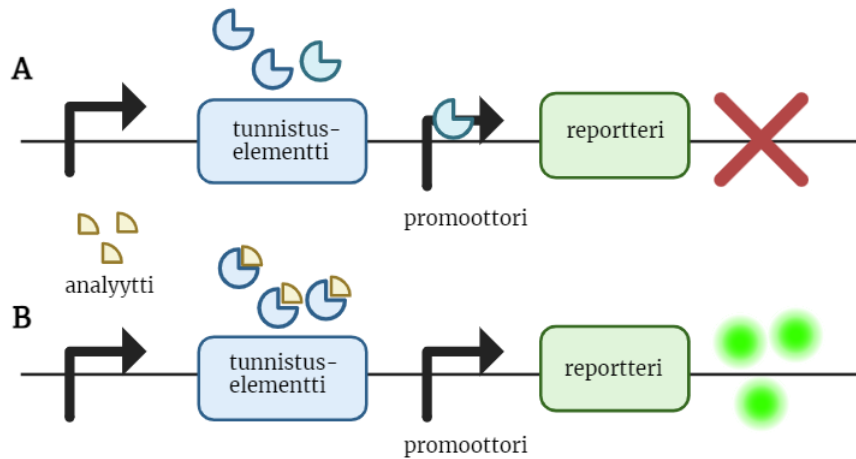
esitellään neljä meriympäristöön kohdistuvaa uhkaa, joiden seurannassa mikrobibiosensoreita voidaan käyttää. Luvussa neljä käydään läpi biosensorisovelluksia, joita on kehitetty uhkien seuraamiseksi ja pohditaan niiden hyötyjä.

## 2. MIKROBIBIOSENSORIT

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) määrittelee biosensorin laitteeksi, joka käyttää tiettyjä biokemiallisia reaktioita, entsyymejä, immunosysteemejä, kudoksia, soluelimiä tai kokosoluja kemiallisten yhdisteiden tunnistamiseen sähköisen, lämpö- tai optisen signaalin kautta (The International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2006). Ensimmäinen biosensori kehitettiin vuonna 1967. Kyseessä oli entsyymielektrodi, jonka toimintaperiaatteena oli tunnistaa entsyymien toiminta sähkökemiallisesti ja näin mitata glukoosin pitoisuutta. (Updike and Hicks, 1967) Biosensori koostuu tunnistuselementistä ja reportterista. Biosensoreita voidaan rakentaa esimerkiksi entsyymeistä, aptameereista tai vasta-aineista. (Regan et al., 2023) Tässä kandidaatintyössä keskitytään kuitenkin mikrobisoluista rakennettuihin mikrobibiosensoreihin. Pitkään entsyymibiosensorit olivat biosensoreista spesifisimpiä, mutta DNA-rekombinaatioteknologian kehittyttyä mikrobibiosensorien täyttää potentiaalia voitiin alkaa hyödyntää (Moraskie et al., 2021). Tässä luvussa keskitytään mikrobibiosensoreiden toimintaan ja rakenteeseen.

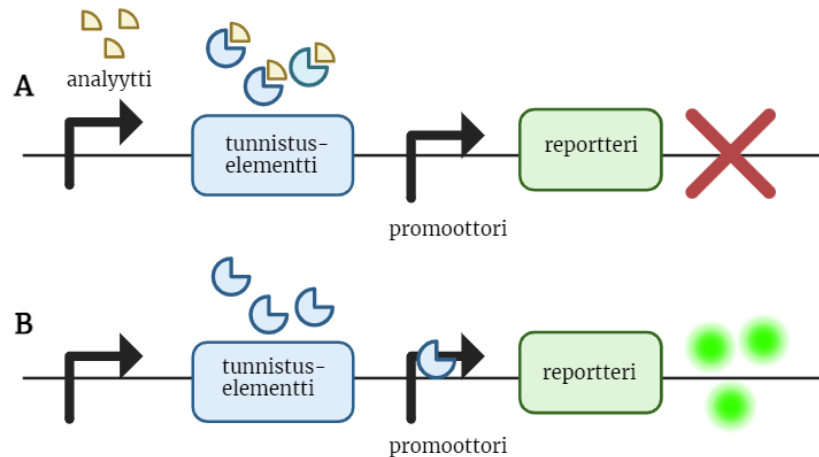
### 2.1 Mikrobibiosensorin toiminta

Mikrobibiosensorit ovat kehittyneet nopeasti 2020-luvulla. Ne koostuvat mikrobisoluista, jotka voivat tunnistaa halutun yhdisteen. Tunnistusmekanismi voi olla joko aktivoiva tai repressoiva. Sensorissa on kolme osaa: tunnistuselementti, promoottori sekä reportteri. Tunnistuselementti on esimerkiksi transkriptiofaktori tai ribokatkaisija (eng. riboswitch), joka reagoi tunnistettavan yhdisteen läsnä ollessa. Promoottori säätelee reportterin toimintaa tunnistuselementin viestin mukaisesti ja reportteri tuottaa signaalin. (Chiang ja Hasty, 2023) Tässä kandidaatintyössä keskitytään pääasiassa transkriptiofaktoreihin tunnistuselementtinä. Erilaiset tunnistuselementit esitellään luvussa 2.2 ja erilaiset reportterit luvussa 2.3. Repressoivan tunnistusmekanismin toimintaa on havainnollistettu kuvassa 1.



*Kuva 1. Repressoituvan mikrobibiosensorin toiminta. (A) Kun analyyttiä ei ole läsnä, tunnistuselementti estää promoottorin aktivaation ja vihreää fluoresenssiproteiinia ei tuoteta. (B) Kun analyytti on läsnä, se reagoi tunnistuselementin kanssa, promoottori aktivoituu ja reportteri tuottaa vihreää fluoresenssiproteiinia. Muokattu lähteestä (Chen et al., 2023). Kuvan luomiseen käytetty sovellusta BioRender.com.*

Kuvassa 1 esitellään repression kautta toimivan mikrobibiosensorin toimintamekanismi. Analyyttiä ei ole läsnä, joten tunnistuselementti estää promoottorin aktivaation ja reportteri ei tuota vihreää fluoresenssiproteiinia. Silloin, kun analyytti reagoi tunnistuselementin kanssa, promoottori aktivoituu ja reportteri tuottaa vihreää fluoresenssiproteiinia. (Chen et al., 2023) Sensorin toiminta perustuu siis promoottorin säätelyyn. Biosensori voidaan rakentaa myös promoottorin aktivaation avulla (Moraskie et al., 2021). Aktivaatiomekanismin avulla toimiva mikrobibiosensori esitetään kuvassa 2.



Kuva 2. Aktivoituvan mikrobibiosensorin toiminta. (A) Kun analyyttiä on läsnä, tunnistuselementti ei aktivoi promoottoria ja vihreää fluoresenssiproteiinia ei tuoteta. (B) Kun analyyttiä ei ole, tunnistuselementti aktivoi promoottorin ja reportteri tuottaa vihreää fluoresenssiproteiinia. Kuvan luomiseen käytetty sovellusta BioRender.com.

Kuvassa 2 esitellyssä aktivaation kautta toimivassa mikrobibiosensorissa analyytti estää tunnistuselementin toiminnan. Analyytin läsnä ollessa tunnistuselementti ei pääse sitoutumaan promoottoriin, jolloin reportteri ei aktivoidu eikä vihreää fluoresenssiproteiinia tuoteta. Kun analyyttiä ei ole, tunnistuselementti pääsee sitoutumaan promoottoriin. Näin reportteri aktivoituu ja tuottaa vihreää fluoresenssiproteiinia. Biosensori on kuitenkin yksinkertaisempi rakentaa repression kautta aktivaation sijaan, joten repressoituvan mikrobibiosensorit ovat suositumpia (Carpenter et al., 2018).

## 2.2 Mikrobibiosensorien tunnistuselementit

Mikrobibiosensorien tunnistuselementtinä voidaan käyttää transkriptiofaktoreita tai ribokatkaisijoita (Chen et al., 2023). Käytössä on myös muita tunnistuselementtejä, kuten kinaaseja tai aptameereja (Chiang ja Hasty, 2023). Tässä alaluvussa esitellään yleisimmät tunnistuselementit eli transkriptiofaktori ja ribokatkaisija.

Transkriptiofaktorit ovat proteiineja, jotka säätelevät niistä usein ylävirtaan olevia genejä. Transkriptiofaktoriin voi sitoutua tietty analyytti, joka joko estää tai aktivoi sen toimintaa. Transkriptiofaktori valitaan tunnistuselementiksi biosensoriin sen perusteella, mihin analyyttiin se reagoi. Analyytin sitoutuessa transkriptiofaktorissa tapahtuu konformaation muutos, joka muuttaa sen kykyä sitoutua promoottoriin. Transkriptiofaktori ja promoottori muodostavat kokonaisuuden, joka tunnistaa halutun yhdisteen ja siirtää signaalin eteenpäin reportterille. Prokaryoottisia transkriptiofaktoreita tunnetaan jo yli 300 joten niitä voidaan etsiä valmiista kirjastoista. Uusia transkriptiofaktoreita etsitään kuitenkin



kin jatkuvasti esimerkiksi uuden sukupolven sekvensoinnilla. Transkriptiofaktoreita voidaan myös muokata tai valmistaa kokonaan alusta eli *de novo* synteettisen geenitekniologian menetelmillä. Esimerkiksi mutaatioita apuna käyttämällä voidaan löytää uusiin analyytteihin reagoivia transkriptiofaktoreita. *De novo* transkriptiofaktoreita kehitetään esimerkiksi vasta-aineiden tai aptameerien avulla. (Chen et al., 2023)

Ribokatkaisijat ovat RNA:sta koostuvia geenien säätelyelementtejä, joilla on spesifi konformaatio. Ribokatkaisijat koostuvat aptameerista, joka sitoutuu analyttiin sekä vastealueesta, joka tuottaa signaalin analyttin sitouduttua. (Carpenter et al., 2018) Ne toimivat samaan tapaan kuin transkriptiofaktorit, mutta eivät ole proteiineja. Ribokatkaisija sitoutuu analyttiin, jolloin ribokatkaisijassa tapahtuu konformaation muutos, ja se voi säädellä promoottoria joko repressoivasti tai aktivoivasti. Ribokatkaisijaa koodaava geeni voidaan liittää tunnistuselementin paikalle kuten transkriptiofaktoria koodaava geeni. Ribokatkaisijoita voidaan käyttää erityisesti pienten analyttien tunnistamisessa. Ribokatkaisijat ovat myös nopeampia tunnistuselementtejä kuin transkriptiofaktorit, sillä ribokatkaisijat koostuvat RNA:sta eikä niitä tarvitse enää transkription jälkeen translaatiolla valmistaa proteiiniksi. (Dong et al., 2023) Viime vuosina on pyritty kehittämään synteettisiä ribokatkaisijoita, jotka voitaisiin rakentaa tunnistamaan mikä tahansa ligandi. (Wachsmuth et al., 2015)

Luonnosta löytyvät transkriptiofaktorit ovat helpoimpia käyttää, joten ne ovat suosituimpia. Transkriptiofaktorien käyttö heterologisesti eli lajista toiseen on kuitenkin haasteellista, sillä usein niihin liittyy useita säätelytekijöitä ja koaktivaattoreita. Transkriptiofaktorien kokoaminen synteettisesti on mahdollista, mutta oikein toimivien sitoutumiskohtien löytäminen ja luominen on haasteellista. Ribokatkaisijoiden rakentaminen synteettisesti on yksinkertaisempaa, sillä ne koostuvat RNA:sta, jonka rakenne on yksinkertaisempi kuin transkriptiofaktoreiden. Haasteena on kuitenkin oikeiden aptameerien ja vastealueiden yhdistäminen toimiviksi ribokatkaisijoiksi. Suuri osa ribokatkaisijoihin liittyvästä tutkimuksesta keskittyykin tällä hetkellä niiden synteettiseen kehittämiseen. (Carpenter et al., 2018)

### **2.3 Mikrobiosensorien reportterit**

Reportteri on tärkeä osa mikrobiosensoria, sillä sen avulla signaali voidaan tunnistaa. Reportterit ovat enimmäkseen proteiineja, mutta myös nukleiinihappoja voidaan käyttää reporttereina. Reportterin valinnassa on tärkeä huomioida käyttötarkoitus, käyttöympäristö ja biosensorin näytetyyppi. Reportteria säädellään tunnistuselementin avulla. Re-

portterit voidaan jakaa kahdeksaan ryhmään: lusiferaasit, fluoresenssiproteiinit, fluoresenssiaptameerit, mikrobipigmentit, kaasureportterit, magnetosomit ja jääkideproteiini. (Chen et al., 2023) Reportterien ominaisuuksia on vertailtu taulukossa 1.

Taulukko 1. Reportterien ominaisuudet. Muokattu lähteestä (Chen et al., 2023).

reportteri	havaittu signaali	näytteen olomuoto	signaalin käsittelyaika	signaali havaittavissa silmällä
Lusiferaasi	bioluminesenssi	valoa läpäisevä	reaaliaikainen	kyllä
Fluoresenssiproteiini	fluoresenssi	valoa läpäisevä	reaaliaikainen	ei
Fluoresenssiaptameeri	fluoresenssi	valoa läpäisevä	reaaliaikainen	ei
Mikrobipigmentti	absorbanssi	valoa läpäisevä	kumulatiivinen	kyllä
Kaasureportteri	kaasun määrä	ei kaasun adsorptiota	reaaliaikainen	ei
Magnetosomi	magneettiset muutokset	ei vaatimuksia	reaaliaikainen	ei
Jääkideproteiini	jäätyminen	ei vaatimuksia	kumulatiivinen	ei

Reportterit eroavat toisistaan ominaisuuksiltaan. Taulukon 1 mukaisesti näitä ominaisuuksia ovat esimerkiksi havaittava signaali, analysoitavan näytteen olomuoto, signaalin käsittelyyn kuuluva aika sekä signaalin havaittavuus silmällä. Vaihtelevien ominaisuuksien myötä reportterit soveltuvat erilaisiin käyttötarkoituksiin.

Bioluminesenssi on ilmiö, jota havaitaan luonnossa valona. Bioluminesenssin saa aikaan lusiferaasientsyymi, joka katalysoi lusiferiinin hapettumista. Lusiferaasireportteri tarvitsee siis toimiakseen happea. Lusiferaaseja on useita erilaisia, joista käytetyimpiä reporttereina ovat tulikärpäslusiferaasi ja bakteerilusiferaasi. Bakteerilusiferaasia koodaavat geenit *luxCDABE* löytyvät luonnossa yhdestä operonista, joten operoni soveltuu hyvin siirrettäväksi erityisesti mikrobeihin (Syed and Anderson, 2021) Tulikärpäslusiferaasia koodaa geeni *lucFF*. Tulikärpäslusiferaasi tarvitsee toimiakseen D-lusiferiini-substraatin, kun taas bakteerilusiferaasi ei tarvitse substraattia. (Hakkila et al., 2002) Se, että substraattia ei tarvita, voi helpottaa mikrobibiosensorin rakentamista. (Syed and Anderson, 2021) *LucFF* tarvitsee reaktiossaan ATP:ta, mikä kytkee valon tuotannon organismin metaboliaan. Tämä tekee tulikärpäslusiferaasista tasaisesti mitattavan. (Hakkila et al., 2002) Tulikärpäslusiferaasi tuottaa eniten fotoneita kaikista lusiferaaseista. Sen tuottaman valon aallonpituus kuitenkin läpäisee soluja huonommin kuin muut lusiferaasit. (Syed and Anderson, 2021)

Myös fungi-lusiferaasia voidaan käyttää reportterina mikrobibiosensoreissa. Fungi-bioluminesenssin biosynteesi tarvitsee happea, lusiferiinia, NAD(P)H-riippuvaista hydroksylaasia sekä lusiferaasia. Fungi-bioluminesenssin etuna on, että se soveltuu hyvin käytettäväksi eukaryoottimikrobeissa kuten sienisoluisissa. (Kotlobay et al., 2018)

Lusiferaasit tuottavat valoa eri aallonpituuksilla. (Syed and Anderson, 2021) Analysoitavan näytteen täytyy siis läpäistä valoa tietyllä aallonpituudella. Bioluminesenssin tunnistuksessa mitataan sensorin tuottamaa valon aallonpituutta. Lusiferaaseja ja lusiferiineja voidaan muokata synteettisesti, jotta valon aallonpituus saadaan viritettyä halutuksi. (Mofford et al., 2014).

Fluoresoivat proteiinit ovat eniten käytettyjä reporttereita mikrobibiosensoreissa. Fluoresenssiproteiinit voidaan jakaa niiden fluoresenssin värin perusteella. Yksi käytetyimmistä fluoresenssiproteiineista on esimerkiksi vihreä fluoresenssiproteiini gfp. Suuri käyttöaste johtuu fluoresenssiproteiinien yksinkertaisesta rakenteesta. Yleisesti fluoresenssiproteiinia koodaa vain yksi geeni, joka tuottaa tiettyä fluoresoivaa signaalia ilman erillistä substraattia. (Chen et al., 2023) Myöskään sensorialustana toimivan solun metabolia ei vaikuta fluoresenssiproteiinin toimintaan. Fluoresoivat proteiinit ovat siis erittäin stabiileja ja ne säilyvät fluoresoivina myös solun kuollessa. (Hakkila et al., 2002)

Fluoresenssi ei ole yhtä tarkka reportteri kuin bioluminesenssi, sillä taustahäiriötä on enemmän (Mofford et al., 2014). Taustahäiriö johtuu solun autofluoresenssista (Hakkila et al., 2002). Fluoresenssin etuna on kuitenkin laaja kirjasto erilaisia fluoresenssiproteiineja. (Mofford et al., 2014) Toisaalta bioluminesenssista saadaan signaali nopeammin kuin fluoresoivasta proteiinista. Tutkimuksessaan Hakkila et al. (2002) saivat bakteeeri- ja tulikärpäslusiferaasista signaalin 0,5 h inkubaatioajalla ja vihreästä fluoresenssiproteiinista kahden tunnin inkubaatiolla. (Hakkila et al., 2002)

Fluoresoivat aptameerit ovat RNA:sta koostuvia reporttereita, jotka tuottavat fluoresoivaa signaalia fluoresoivien proteiinien tavoin. (Chen et al., 2023) Reportteri koostuu RNA-rakenteesta sekä aptameerista, joka tuottaa fluoresenssia. Fluoresoivaa signaalia vahvistaa aptameeriin kiinnittyvä fluorogeenimolekyyli. RNA:n transkription ja laskostumisen jälkeen fluorogeeni sitoutuu aptameeriin ja tehostaa fluoresenssia. (Neubacher ja Hennig, 2019) Fluoresoivat RNA-aptameerit eivät siis tarvitse translaatiota fluoresenssin tuottamiseksi toisin kuin fluoresoivat proteiinit. Tämän vuoksi fluoresoivat RNA-aptameerit ovat useimmiten nopeampia, kuin fluoresoivat proteiinit. Nopeutensa lisäksi fluoresoivat RNA-aptameerit ovat hyviä vaihtoehtoja fluoresoiville proteiineille, sillä RNA-aptameereja vastaavat geenit ovat usein lyhyempiä ja sen myötä helpommin käsiteltäviä. (Chen et al., 2023)

Mikrobipigmentit ovat mikro-organismien, eläinten ja kasvien sekundäärisiä metabolian tuotteita. Niiden rakenteen, joka heijastaa tai hajottaa valoa eri tavoin, ansiosta pigmentit näkyvät eri värisinä. Mikrobipigmenttejä voidaan käyttää reporttereina säätelemällä pigmenttisynteesiä, jolloin värin muodostumista katalysoivaa entsyymiä koodaava geeni siirretään plasmidin avulla matriisisoluuun. (Chen et al., 2023)

Luminesenssia, fluoresenssia ja pigmenttiä tuottavia reporttereita voidaan käyttää vain valoa läpäisevissä näytteissä, jotta signaali voidaan tunnistaa puhtaasti. Viime vuosina on kehitetty uusia reporttereita, joita voidaan käyttää myös suoraan valoa läpäisemättömissä näytteissä kuten sedimentissä tai maassa. Myös samea merivesi saattaa vaatia reportteria, joka voidaan havaita muun kuin värin tai valon avulla. (Del Valle et al., 2021) Tällaisia reporttereita ovat esimerkiksi kaasureportterit, magnetosomit ja jääkideproteiini.

Tietyt mikrobit tuottavat metaboliensa tuotteena kaasuja kuten etyleeniä, rikkivetyä tai klorometaania. Kaasureportterin toimintamekanismina on tuottaa tiettyä kaasua, jonka lisääntyminen voidaan havaita analyytin läsnä ollessa. Näitä voitaisiin käyttää kaasureporttereina tutkittaessa esimerkiksi merenpohjan sedimenttiä. Jotkut syanobakteerit sisältävät kaasuvesikkeleitä, joita voitaisi hyödyntää myös kaasureporttereina. (Del Valle et al., 2021)

Magneettisia partikkeleita mikrobeissa kutsutaan magnetosomeiksi. Magnetosomit ovat järjestäytyneet pitkiksi ketjuiksi bakteerin akselin suuntaisesti ja ne säätelevät bakteerin liikettä ulkoisessa magneettikentässä. Magnetosomeja voidaan käyttää reporttereina siten, että analyytin läsnä ollessa solu alkaa tuottaa magneettista signaalia, jonka muutokset voidaan tunnistaa ja sen perusteella tunnistaa analyytin läsnäolo. (Chen et al., 2023)

Jääkideproteiini katalysoi jään syntymistä alijäähtyneestä vedestä. Se on löydetty bakteereista, jotka katalysoivat veden jäätymistä kasveissa ja aiheuttavat siten haittaa kasveille. (Chen et al., 2023) Jääkideproteiinia voidaan käyttää reportterina niin, että neste-mäinen näytepisara lisätään biosensoria sisältävälle alustalle ja tutkitaan alkaako pisaraan muodostua jäätä. Jääkideproteiinia voidaan käyttää sekä aerobisissa että anaerobisissa olosuhteissa. Jääkideproteiinin avulla on kuitenkin hankala arvioida signaalin vahvuutta. (Del Valle et al., 2021)

## 2.4 Mikrobibiosensorien rakentaminen

Mikrobibiosensorin rakentamiseen kuuluu sopivan tunniste- ja reportterielementin etsiminen, geneettisen piirin suunnittelu, matriisisolun valinta, solujen konkreettinen rakentaminen, testaus ja optimointi. Tässä alaluvussa keskitytään uusien mikrobibiosensorien etsimisen mahdollisuuksiin, rakentamisen perusteisiin sekä optimointiin.

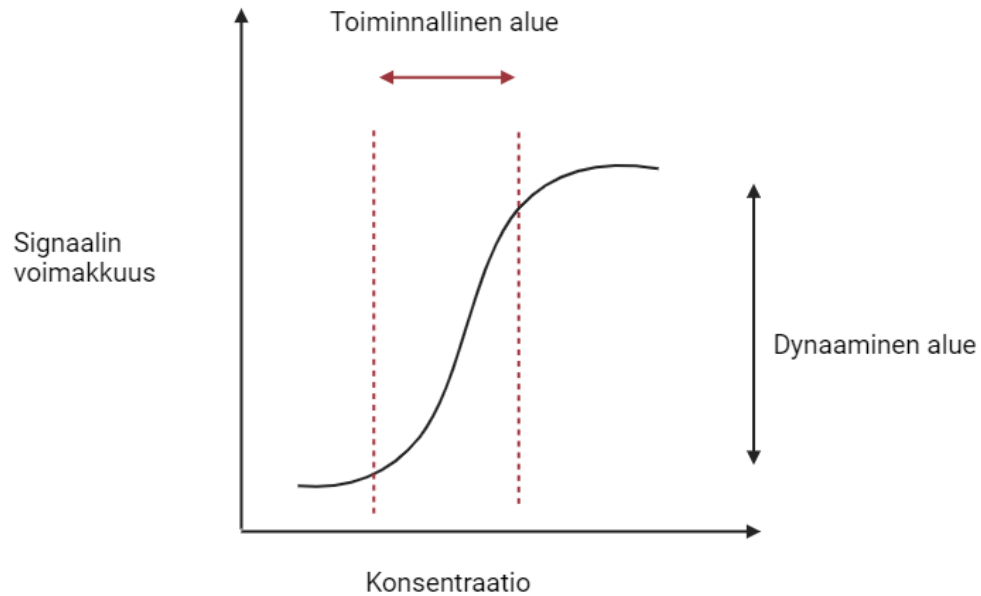
Luonnosta löytyvät mikrobit hyödyntävät erilaisia yhdisteitä metaboliassaan. Mikrobit selviävät parhaiten luonnollisessa ympäristössään, joten myös biosensorien toimintaa kannattaa kehittää luonnollisesti mikrobin toimintaan kuuluvan metabolian kautta. Kun halutut tunnistus- ja reportterielementit löydetään, voidaan niitä yhdistellä ja siirtää eri matriisisoluihin synteettisten geenitekniikoiden avulla. (Yu et al., 2023) Uusia tunnistuselementtejä etsitään esimerkiksi sekvensoimalla geenikirjastoja tai tutkimalla mutaatioita (Chiang ja Hasty, 2023). Uusia ideoita biosensorien rakentamiseen voidaan saada erilaisissa ympäristöissä eläviä mikrobeita tutkimalla. (Roy et al., 2021)

Mikrobibiosensorien valmistuksessa on tärkeää huomioida käyttöympäristö. Laboratorioolosuhteissa matriisisoluna käytetään usein *Escherichia coli* -bakteeria. *E. coli* sopii mikrobibiosensorien rakentamiseen, sillä sen rakenne on sopivan yksinkertainen ja tunnettu geenimuokkaukseen varten. Todellisiin mittausolosuhteisiin *E. coli* ei kuitenkaan välttämättä sovellu. (Chiang ja Hasty, 2023) Sen vuoksi mikrobibiosensorin rakentamisessa on myös huomioitava matriisisolun soveltuvuus käyttöympäristöön, kuten merinäytteiden tapauksessa suolaveteen. Abdulkarim et al. (2009) mittasivat tutkimuksessaan natriumkloridin ja kaliumkloridin vaikutusta *E. coli*in kasvuun. Kasvatuksessa lämpötila oli 37°C. Optimaalista *E. coli*in kasvu oli 0,5 m-% suoloja sisältävässä mediumissa. 1,5 m-% suoloja sisältävässä mediumissa kasvu heikentyi jo merkittävästi. (Abdulkarim et al., 2009) Valtamerien suolapitoisuus on noin 3,5 m-%. (National Oceanic and Atmospheric Administration, 2023) Tutkimuksen inkubaatiolämpötila ei vastaa todellista meriveden lämpötilaa, mutta voidaan arvioida, että *E. coli* ei luonnollisilta kasvuominaisuuksiltaan soveltuisi merivedessä käytettäväksi.

Mikrobibiosensorin geneettinen osa lisätään matriisisoluun usein plasmidin avulla. Jotta plasmidiin voidaan lisätä halutut tunnistuselementtiä ja reportteria koodaavat geenit, tarvitaan DNA:n muokkaustyökaluja. Perinteisesti DNA:ta on muokattu restriktioentsyymien ja DNA-ligaasin avulla. Restriktioentsyymejä on useita erilaisia ja ne tunnistavat tietyn sekvenssin DNA:sta, jonka kohdalta ne katkaisevat DNA:n. Restriktioentsyymiä käytettäessä täytyy siis olla tiedossa DNA:n sekvenssi kohdasta, josta se halutaan leikata. Kun halutut DNA:n palat on saatu leikattua, ne liitetään plasmidiin DNA-ligaasin avulla. (Nelson et al., 2017) DNA:n kasaamiseen on kuitenkin kehitetty myös tarkempia menetelmiä. Plasmidien rakentamisessa voidaan käyttää esimerkiksi Gibson kasaus -menetelmää (eng. Gibson assembly). Gibson-kasaus hyödyntää isotermistä entsyymireaktiota ja sen avulla voidaan koota suuriakin DNA-pätkiä. (Gibson et al., 2009)

Mikrobibiosensorin optimoinnissa tavoitteena on saada sensorin toiminnallinen alue mahdollisimman laajaksi ja dynaaminen alue mahdollisimman suureksi. Geeniekspres-

sio ei-halutulla alueella halutaan saada mahdollisimman pieneksi ja geeniekspressio halutun molekyylin läsnä ollessa mahdollisimman suureksi. (Berepiki et al., 2020) Toiminnallinen ja dynaaminen alue on esitelty kuvassa 2.



*Kuva 3. Mikrobibiosensorin optimointi. Toiminnallinen alue kuvaa kuinka suurella konsentraatioalueella analyytti voidaan havaita. Dynaaminen alue kuvaa millä alueella analyttistä saadaan tunnistettava signaali.*

Kuvasta 3 nähdään, mitä laajempi toiminnallinen alue on sitä paremmin sensori tunnistaa eri analyttien konsentraatioita. Mitä suurempi dynaaminen alue on, sitä voimakkaampi signaali analyttistä saadaan ja sitä paremmin signaali erotetaan taustasta (Berepiki et al., 2020). Sama pätee toiminnalliseen alueeseen, sillä sen laajentaminen vahvistaa signaalin luotettavuutta hyvin pienistä konsentraatioista hyvin suuriin (Roy et al., 2021). Optimoinnin avulla biosensorin spesifisyys paranee ja se parantaa tuloksen luotettavuutta. Esimerkiksi Berepiki et al. (2020) saivat tutkimuksessaan optimoinnilla suurennettua PCA-biosensorin toiminnallista aluetta niin, että 25 RFU/OD (x1000) havaittiin  $10^{-1,2} \text{ PCA } \mu\text{M}$  konsentraatiosta, kun ilman optimointia konsentraatio, josta sama määrä fluoresenssia havaittiin, oli  $10^{2,2} \text{ PCA } \mu\text{M}$ . Samassa tutkimuksessa optimoitiin myös feruilihappobiosensorin dynaamista aluetta. 1000  $\mu\text{M}$  feruilihappokonsentraatiolla vahvimman näytteen signaaliksi saatiin 85 RFU/OD (x1000) ja heikoimman näytteen signaaliksi 30 RFU/OD (x1000). (Berepiki et al., 2020)

### 3. MERIEKOSYSTEEMIIN KOHDISTUVAT UHAT

Merien sisältämä veden määrä on valtava, ja sen kautta meret ovat osa lukuisia ekosysteemien säätelytekijöitä kuten ilmastoa, hiilen kiertoa ja lämpötilaa. Jotta kaikkien tekijöiden vaikutuksia pystytään ymmärtämään, täytyy meriekosysteemejä pystyä tarkkailemaan mittauksilla. (Liu et al., 2023) Ihminen vaikuttaa meriekosysteemeihin esimerkiksi jätehuollon, teollisuuden ja rakentamisen kautta. (Regan et al., 2023) Ihmisen aiheuttamia uhkia pyritään ehkäisemään asettamalla yhteisesti sovittuja tavoitteita, projekteja, lakeja ja asetuksia. Esimerkiksi Yhdistyneiden kansakuntien United Nations Decade of Ocean Science for Sustainable Development -projekti tuo esiin 10 haastetta, joita varten merien tutkimusta täytyy edelleen kehittää. (Ocean Decade, 2023) Tässä luvussa esitellään meriekosysteemin uhkia, joiden seurantaan on kehitetty tai olisi hyödyllistä kehittää mikrobiosensoreita.

#### 3.1 Meritoksiinit

Meritoksiinit ovat merien mikrolevien tuottamia myrkyllisiä yhdisteitä. Meriveden lämpeneminen ja happamoituminen lisäävät haitallisten leväkukintojen kasvua. Leväkukinnot tuottavat muun muassa siguatoksiineja, brevetoksiineja, pektenotoksiineja ja jessotoksiineja. (Martin-Yken, 2020) Ciguatera-myrkytys on yleisin ei bakteerin aiheuttama ruokamyrkytys ihmisellä. (Martin-Yken et al., 2018) Tässä luvussa keskitytään siguatoksiinin aiheuttamaan ciguatera-myrkytykseen.

Siguatoksiinit ovat vaaraksi ihmisten terveydelle. Pääasiassa siguatoksiinit päätyvät ihmisiin ruoan välityksellä. Siguatoksiineja tuottavat levät ovat ravintoketjun alimmaisena. Kun kalat ja muut merenelävät syövät toksiineja sisältävää levää, toksiinit kertyvät hiljalleen suurempiin kaloihin ja päätyvät ihmisten ravinnoksi. Ketjussa siguatoksiinit hapetuvat, mikä lisää niiden myrkyllisyyttä. Haasteena siguatoksiineissa on, että ne säilyvät myrkyllisinä myös pakastuksen, suolauksen, keittämisen tai savustuksen jälkeen. (Martin-Yken et al., 2018)

Siguatoksiinit sitoutuvat neuroneiden jänniteriippuvaisiin natriumkanaviin ja aiheuttavat membraanin depolarisaatiota. Ciguatera-myrkytys aiheuttaa gastrointestinaalisia, kardiovaskulaarisia ja neurologisia oireita, jotka voivat jopa johtaa kuolemaan. Toksiinin konsentraatio vaikuttaa terveysvaikutusten haitallisuuteen. Siguatoksiinia esiintyy erityisesti tropiikin alueen kaloissa. Ciguatera-myrkytys on ongelma kuitenkin myös globaalisti

trooppisen kalan viennin myötä. Siguatoksiineja tuottavat leväkukinnot myös leviävät entistä laajemmalle meriveden lämpenemisen myötä. (Martin-Yken et al., 2018)

Siguatoksiinien leviämistä yritetään rajoittaa erilaisilla säädöksillä. Siguatoksiinin analysointi on haasteellista, joten maat rajoittavat toksiinin esiintymistä säätelemällä sallittua kalan kokoa markkinoilla. Leväkukintojen kontrolloinnilla voidaan säädellä toksiinin kausittaisia esiintymisiä. Kalapopulaatiot ovat usein paikallisia, joten kalastajat voivat välttää myrkyllisiä alueita. Sekä Yhdysvaltojen että Euroopan ruokavirastot ovat asettaneet siguatoksiinin maksimikonsentraatioksi 0,01 µg/kg. (World Health Organisation, 2020)

### 3.2 Happamoituminen

Merten happamoituminen tarkoittaa hiilidioksidin liukenemisen lisääntymistä meriveteen ja samalla meriveden pH:n laskua. On ennustettu, että meriveden pH voi laskea jopa 0,4 yksikköä 2000-luvun loppuun mennessä. Kun hiilidioksidin määrä ilmakehässä lisääntyy, sitä liukenee yhä enemmän myös meriveteen. Happamoitumista on tärkeä pystyä mitaamaan, sillä tiedon avulla voidaan ennustaa tulevia ilmastonmuutoksen vaikutuksia. (Shi ja Li, 2023)

Hiilidioksidin lisäksi myös metaani lisää happamoitumista. Anaerobiset mikrobit hajottavat orgaanista materiaalia meressä ja lopputuotteena syntyy metaania, joka liukenee ensin veteen ja sieltä ilmaan. Metaania on myös varastoituneena merenpohjan sedimenttiin. Kun ilmaston lämpötila nousee ja paine muuttuu vuorovesien myötä, varastoitunut metaani muuttuu epästabiiilimmaksi ja suuria määriä metaania vapautuu veteen ja ilmakehään. Osa metaanista muuttuu myös hiilidioksidiksi, kun mikro-organismit käyttävät metaania metaboliassaan. (Liu et al., 2023)

Happamoitumisella on merkittäviä vaikutuksia merten ekosysteemeihin. Erityisesti happamoituminen vaikuttaa negatiivisesti selkärangattomiin. Selkärangattomien metabolia, kasvu, lisääntyminen, immuniteetti ja kehitys häiriintyvät. Erityisen tuhoisa vaikutus on kalkkeutumisprosessiin. (Shi ja Li, 2023)

### 3.3 Kemiallinen saastuminen

Kemiallista saastumista aiheuttavat esimerkiksi raskasmetallit ja öljy. Lannoitteiden, riittämättömän jätevedenpuhdistuksen ja kaivosten päästöjen takia raskasmetalleja päätyy meriin. Raskasmetallit ovat merkittävä saaste, sillä ne ovat myrkyllisiä koko meriekosysteemille. (Zhang et al., 2020)

Raskasmetallikonsentraatiot meren eliöstössä ovat haitaksi myös ihmiselle. Raskasmetallit kertyvät pienimmistä eliöistä suurempiin mereneläviin ravintoverkossa ja lopulta



myös ihmisiin. Raskasmetallit muuttuvat myrkyllisiksi eliöiden tai ihmisen elimistössä, kun ne eivät hajoa metabolian mukana vaan alkavat kertyä pehmytkudokseen. Ne estävät tärkeiden funktionaalisten ryhmien toimintaa, korvaavat tärkeitä metalli-ioneita tai muuttavat molekyylien konformaatiota soluissa. Raskasmetalleille altistuminen voi tuhota DNA:ta tai solukalvoa. (Nakamura, 2018)

Teollisuuden ja maatalouden jatkuva kasvu viime vuosikymmeninä on lisännyt myös öljynjalostusta. Öljy koostuu alkaaneista ja aromaattisista hiilivedyistä. Ne ovat haitallisia eliöille ja ympäristölle. Erityisesti aromaattiset hiilivedyt eli PAH-yhdisteet ovat karsinogeenisiä ja aiheuttavat mutaatioita. (Jiang et al., 2021) Öljyn kuljetukseen ja käyttöön liittyy aina uhka öljyvudosta. Öljyonnettomuudet ovat suuri katastrofiuhka meriekosysteemeille. (Jiang et al., 2021) Vuosina 2010-2020 tapahtui keskimäärin 6,5 keskisuurta tai suurta öljyvudoa vuodessa (ITOPF, 2023). Kaikki öljy ei päädy meriin ihmisen vaikutuksesta, sillä meren pohjasta vapautuu myös luonnollisesti raakaöljyä. (Jiang et al., 2021)

### **3.4 Muovi**

Muovit koostuvat synteettisten orgaanisten polymeerien ketjuista. Muovia päätyy meriin kontrolloimattoman jätehuollon, jätevesien, laivaliikenteen, kalastamisen ja luonnonkatastrofien myötä. Muovi on merkittävä osa merissä olevaa jätettä, sillä se ei maadu ja kulkeutuu helposti tuulen ja veden mukana. Suuri osa makromuovista päätyy rannoille tai niiden läheisyyteen. Yleisimmin huomattavat muovin aiheuttavat ongelmat ovat eläinten sotkeutuminen muovin palasiin ja muovin nieleminen. (Law, 2017)

Merkittävänä ongelmana ovat kuitenkin huomaamattomammat mikro- ja nanomuovit, sillä ne jäävät meriekosysteemeihin ja ravintoverkkoihin pysyvästi. Mikro- ja nanomuovit kulkeutuvat eliöihin ruoansulatuksen kautta ja voivat edetä jopa kudosten läpi. Lopulta ne päätyvät myös ihmisiin ruoan kautta. Muovit aiheuttavat myrkytyksiä, kasvun vääristymistä, tulehduksia, hedelmällisyyden madaltumista ja ravitsemushäiriöitä merieliöissä. (Peng et al., 2020)

## 4. MIKROBIBIOSENSORIEN SOVELLUKSET

Mikrobibiosensorien sovellukset ovat erittäin lupaavia niiden ominaisuuksien ansiosta. (Moraskie et al., 2021) Suolaiseen veteen suunniteltujen standardisoitujen ja käytössä olevien mikrobibiosensorien määrä on kuitenkin vielä huomattavan pieni. (Regan et al., 2023) Tässä luvussa pohditaan mikrobibiosensorien etuja sekä esitellään muutamia biosensorisovelluksia, joita voisi kehittää luvussa 3 esiteltyjen uhkien seurantaan varten.

### 4.1 Mikrobibiosensorien edut

Mikrobibiosensoreita kehitetään, sillä niissä on ominaisuuksia, joita nykyisin käytettävissä sensoreissa ei ole. Merinäytteiden analysoinnissa on perinteisesti käytetty menetelmiä, joissa näyte ensin kerätään vedestä, eliöstä tai sedimentistä ja viedään laboratorioon analysoitavaksi. Näissä menetelmissä näytteiden kuljetusmatkat voivat venyä hyvin suuriksi, jolloin kustannukset nousevat ja näytteiden laatu huononee. Tulosten saamiseen kuluu aikaa, ja näytteiden säilöntä ja asiantuntijoiden tarve nostavat analysoinnin kustannuksia. (Liu et al., 2023)

Mikrobibiosensorit ovat ratkaisu analysoida näytteitä *in situ* eli kohteessa. Liikuteltavuutensa lisäksi perinteisiin menetelmiin verrattuna mikrobibiosensorit ovat nopeita, spesifejä, helppokäyttöisiä ja kustannustehokkaita. (Regan et al., 2023) Mikrobibiosensoreita on nopeaa ja halpaa valmistaa, sillä solut lisääntyvät luonnollisesti. Solun luonnollinen rakenne, erityisesti solukalvo, suojaa sensorin rakennetta, mikä tekee siitä kestävä. Sensori voidaan valmistaa synteettisesti tunnistamaan vain haluttu yhdiste, mikä parantaa sensorin tarkkuutta. Mikrobibiosensorilla analysoitava näyte ei myöskään tarvitse etukäteisvalmistelua. (Chen et al., 2023) Usein esimerkiksi toksiinia tuottavien levien tutkimiseksi täytyy analysoida niiden DNA:ta. DNA:n analysointi näytteistä PCR tai qPCR -menetelmien avulla on kallista. Mikrobibiosensorit ovat vaihtoehto halvempaan näytteiden analysointiin, sillä biosensori tunnistaa etsityn yhdisteen metaboliensa avulla eikä DNA:ta tarvitse analysoida kokonaan. (Dong et al., 2023)

### 4.2 Meritoksiinit

Meritoksiineja täytyy voida mitata, jotta saadaan selville millä alueilla niitä esiintyy. *In situ* -mittaus mahdollistaisi nopean tuloksen toksiinipitoisista tai toksiinittomista alueista. Jos toksiinien leviämistä halutaan rajoittaa, täytyy toksiineja sisältävät kalakannat voida tun-

nistaa. Myös jo kalastetun kalan analysointi on tärkeää. Mikrobibiosensorit ovat helppokäyttöisiä ja niitä voisivat käyttää jopa pienkalastajat saaliin turvallisuuden takaamiseksi. (Regan et al., 2023) Mittaamalla meritoksiinien määrää tietyillä alueilla voitaisi rajoittaa kalastusta, kun kalojen myrkyllisyyskonsentraatio kasvaa liian suureksi. Myös kalan viennistä aiheutuvaa toksiinien leviämistä alueille, joissa sitä ei vielä ole havaittu, voitaisi estää tunnistamalla toksiinia kantavat kannat.

Martin-Yken et al (2018) tutkivat voisiko hiivasoluja käyttää siguatoksiinien tunnistuksessa. Tutkimuksessa käytettiin *Saccharomyces cerevisiae* -hiivasoluja. Näytteet olivat puhdistettuja toksiininäytteitä sekä mikrolevänäytteitä. Reportterina oli fluoresenssiproteiini. Hiivasolujen soluseinä on luonnollisesti paksu, joten tutkimuksessa luotiin mutanttisolulinja *knr4 Δ* paremmin läpäisevällä soluseinällä. Tavoitteena oli tutkia lisäksi ohuempi soluseinä solun herkkyyttä. Tutkimuksessa havaittiin, että siguatoksiinit eivät vaikuta hiivasolujen kasvuun tai elinvoimaisuuteen. (Martin-Yken et al., 2018)

Tiedetään kuitenkin, että hiivasolut ovat hyviä sopeutumaan ympäristön vaikutuksiin soluseinän mekanismien avulla. Sen vuoksi tutkimusta jatkettiin etsimällä endogeenista kohdetta, johon siguatoksiinit vaikuttaisivat hiivan solukalvossa. Nisäkässoluissa siguatoksiinit vaikuttavat neuroneiden jänniteriippuvaisiin natriumkanaviin, joten hiivan genomista etsittiin proteiinia, joka olisi homologinen nisäkässolujen kanssa. Genomista löydettiin geeni CCH1, joka koodaa erityistä säätelyproteiinia. Proteiini säätelee kalsiumkanavaa ja kalsiumsignalointia, joten siguatoksiinin vaikutusta kyseiseen proteiiniin tutkittiin. Tutkimuksen tuloksena havaittiin, että siguatoksiini sitoutuu kalsiumkanavaan ja lisää solunsisäistä  $Ca^{2+}$ -ionikonsentraatiota. Soluseinän paksuudella huomattiin olevan vaikutus kalsiumionikonsentraation kasvuun, sillä mutanttisolulinjasta saatiin suurempi vaste. (Martin-Yken et al., 2018)

Havaittua kalsiumionikonsentraation kasvua voitaisiin hyödyntää siguatoksiinia mittaavassa mikrobibiosensorissa, mutta sensorin kehitys tarvitsee vielä lisää tutkimustyötä. Siguatoksiineja mittaavan biosensorin kehitys olisi kuitenkin erittäin aiheellista, sillä luotettavia menetelmiä meritoksiinien tunnistamiseen tarvitaan, jotta voidaan taata puhtaan ruoan saatavuus ja kalastuselinkeinon jatkuminen.

## 4.2 Happamoituminen

Happamoitumisen ympäristövaikutukset ovat niin laajat, että niiden mittaamisen avulla voidaan arvioida ja ennustaa myös monien muiden ympäristövaikutusten etenemistä. Happamoitumisen mittaamiseen ei ole kuitenkaan vielä kehitetty tehokasta mikrobibiosensoria. Ympäristön pH vaikuttaa mikrobien kasvuun. Kasvua ei kuitenkaan koodaa

vain yksi geeni, vaan siihen vaikuttavat monet tekijät. (Lund et al., 2020) Tunnistuselementti-reportteri-kompleksia on siis hankalampi rakentaa. Tämän vuoksi kasvun käyttäminen indikaattorina biosensorin kehittämisessä on haasteellista. Happamoitumista mittaavaa biosensoria voisi lähteä kehittämään esimerkiksi hiilidioksidin tai metaanin tunnistuksen avulla.

Toisaalta meristä löytyy jo valmiiksi kalkkikuorisia eliöitä, kuten koralleja, joita voidaan hyödyntää happamoitumisen edistymisen seurannassa. Tutkimalla korallien metaboliaa, voitaisiin löytää mekanismeja, joilla ne reagoivat pH:n vaihteluun. (Gastoldi ja Cinti, 2023) Tuntemalla korallien metaboliareittejä voitaisiin etsiä samankaltaisia mikrobeita, joita voisi soveltaa mikrobibiosensoreiksi. Toisaalta mikrobibiosensorit eivät välttämättä ole aina paras tavoiteltava ratkaisu. pH:n mittaamiseksi voisi kehittää esimerkiksi entsyymibiosensoria, jossa käytettäisiin koralleista löytyviä pH:n vaihteluun reagoivia yhdisteitä.

### 4.3 Kemiallinen saastuminen

Kemiallista saastumista täytyy voida mitata, jotta sitä on myös mahdollista torjua. Erityisesti alueilta, joilta kalastetaan ruuaksi tulevia mereneläviä tai otetaan vettä puhdistettavaksi, täytyy mitata kemiallisten saasteiden pitoisuuksia. Onnettomuuden sattuessa täytyy voida seurata miten hyvin alueen puhdistus onnistuu, ja kuinka pitkään saasteipitoisuudet ovat koholla alueella. Onnettomuuksia voidaan myös ehkäistä esimerkiksi asentamalla öljyputkien läheisyyteen öljyä tunnistavia sensoreita. Tehtaiden ja muiden päästölähteiden läheisyydessä täytyy valvoa, että kemiallisten saasteiden pitoisuudet pysyvät sallituissa rajoissa.

Zhang et al. (2020) kehittivät tutkimuksessaan mukana kuljetettavan mikrobibiosensorin kadmiumin ja lyijyn tunnistamiseen. Kyseessä on fluoresenssiin perustuva mikrobibiosensori, joka tuottaa vihreää fluoresenssiproteiinia  $Pb^{2+}$ - ja  $Cd^{2+}$ -ionien läsnä ollessa. Matriisisoluna käytetään *E. colia*. Kadmiumin ja lyijyn tunnistamiseen käytetään *znt*-operonia, jota löytyy useista bakteereista. Alkuperäisessä bakteerissa *znt*-operoni vastaa metalli-ionien ulosvirtauksesta solussa. (Zhang et al., 2020)

Biosensorisoluun siirrettiin *pzntA*- ja *gfp*-geenin yhdistelmä plasmidin avulla. Tunnistuselementtinä toimi *pzntA*, joka on sinkin ulosvirtausta säätelevä promoottori *znt*-operonissa eli se tunnistaa  $Zn^{2+}$ -ionit. *pzntA* saatiin tunnistamaan myös  $Pb^{2+}$ - ja  $Cd^{2+}$ -ionit. Reportterina toimi vihreää fluoresoivaa proteiinia koodaava geeni *gfp* ja se asettiin alavirtaan *pzntA*-geenistä. Kun  $Pb^{2+}$  tai  $Cd^{2+}$ -ioneita oli läsnä, ne sitoutuivat tunnistuselementtiin, joka laukaisi reportterissa vihreän fluoresenssiproteiinin tuotannon. Kyseinen

biosensori tunnistaa lyijyn 518 ppb asti ja kadmiumin 44,8 ppb asti. Biosensori on suunniteltu hana- tai uima-allasveden analysointiin. (Zhang et al., 2020) Esimerkiksi matriisisolua muokkaamalla samaa geenitekniikkaa voitaisi mahdollisesti käyttää myös merinäytteiden analysointiin sopivan mikrobibiosensorin kehittämiseen.

Roy et. al (2021) kehittivät tutkimuksessaan viritettävän mikrobibiosensorin aromaattisten hiilivetyjen kuten bentseenin, fenolien ja tolupeen tunnistukseen. Sensorin ensimmäisessä versiossa käytettiin tunniste-elementtinä MopR-proteiinia, joka reagoi fenoliin. Fenolin kataboliareitti on peräisin *Acinetobacter calcoaceticus* -bakteerista. MopR on aktivoiva proteiini eli fenolin sitoutuminen MopR proteiiniin aktivoi alavirtaan olevan geenin transkription. Kyseisen sensorin matriisisoluna käytettiin *E. colia*. MopR lisättiin promottorin kanssa plasmidiin ja siitä alavirtaan reportterigeeniksi valittiin tulikärpäslusiferaasi *LucFF*. Huomattiin, että sensori reagoi fenolin lisäksi myös 3-klorofenoliin ja *m*-kresoliin. Tulikärpäslusiferaasi ei reagoinut suuriin alkoholeihin kuten resorsioliin tai 2,3-dimetyylifenoliin. Tutkimuksissa kuitenkin havaittiin, että MopR-proteiinin sitoutumiskohdian mutaatioiden avulla saman proteiinin avulla voitiin tunnistaa myös 2,3-dimetyylifenolia tai muita ksylenelejä. Sensori tunnistaa fenolin korkealla tarkkuudella hyvin pienistäkin konsentraatioista. Etuna muihin menetelmiin verrattuna on se, että kehitetyn mikrobibiosensorin avulla vesinäytteen analysointiin ei tarvita ennakkovalmisteluja. (Roy et al., 2021)

*MopRLuc*-sensorin onnistuessa Roy et. al päättivät käyttää sitä mallina myös mikrobibiosensorin suunnitteluun muille ksenobioteille. Sensoreilla on hyvin suuri toiminnallinen alue 0,01 - >100  $\mu\text{M}$ , joka mahdollistaa analysoinnin sekä pieniä että suuria konsentraatioita analyyyttiä sisältävistä näytteistä. Dynaaminen alue on myös laaja, mikä parantaa signaalin tarkkuutta ja vähentää virheiden määrää. (Roy et al., 2021) Sensoria tutkittiin juomaveden analysointikäyttöön, mutta esimerkiksi matriisisolua muokkaamalla tai vaihtamalla, sitä voitaisiin käyttää myös meriveden analysointiin.

#### 4.4 Muovi

Muovia tunnistavia mikrobibiosensoreita täytyy kehittää, jotta mikro- ja nanomuovien leviämistä ja vaikutuksia ekosysteemiin voidaan tutkia. Muovia tunnistavia biosensoreita voitaisi hyödyntää mittaamaan vettä, joka virtaa laskujoista meriin. Jos sensoreista havaittaisiin, että mikro- ja nanomuovikonsentraatio ylittää sallitun rajan, voitaisiin joen suulle asettaa muovinkerääjiä. Sensorien avulla saataisiin myös tietoa, mitkä ovat kriittisimpiä jokia, joiden muovikonsentraatiota täytyisi kontrolloida. Sensoreita voitaisi hyödyntää jätevedenpuhdistamon veden analysoinnissa ennen kuin vesi laskettaisiin takaisin mereen. Sensoreita voitaisi myös hyödyntää laitoksissa, jossa merivedestä puhdistetaan

juomavettä. Myös ravintoverkoista ja lopulta syötävistä merenelävistä voitaisi mitata muovikonsentraatiota.

Puhakka ja Santala (2022) kehittivät tutkimuksessaan mikrobibiosensorin, jota voidaan käyttää muovin seurantaan vesiympäristöissä. Mikrobibiosensori tunnistaa akryylihapon, joka on muovin polyakryylihaposta löytyvä monomeeri. Biosensorissa käytettiin tunnistuselementtinä akryylihapon tunnistavaa transkriptiofaktoria ja reporterina tulikärpäslusiferaasia *LucFF*. Matriisisoluna käytettiin *E. coli*a. Tutkimuksessa testattiin sensorin toimivuutta makeassa vedessä. *E. coli* reagoi akryylihapon happamuuteen ja sen vuoksi kehitettyä sensoria voidaan käyttää vain matalan toksisissa ympäristöissä. (Puhakka ja Santala, 2022) *E. coli* ei sopisi alustasoluna myöskään suolaiseen meriveteen, kuten todetaan luvussa 2.3.

## 5. JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämän kandidaatintyön tavoitteena oli selvittää miksi mikrobibiosensoreita tarvitaan merinäytteiden analysointiin. Meriekosysteemissä tapahtuu jatkuvasti muutoksia, jotka ovat pohjimmitaan ihmisen aiheuttamia. Sen lisäksi, että muutokset aiheuttavat haittaa meriekosysteemille, niistä on myös haittaa ihmiselle. Meritoksiinit, happamoituminen, kemialliset saasteet ja muovi aiheuttavat vaikutuksia, joiden seurauksia tulevaisuudessa ei voida vielä täysin tietää. Vaikutusten seuraamisen vuoksi on tärkeää löytää keinoja, joilla saadaan seurattua meriekosysteemin tilaa. Tässä työssä onnistuttiin löytämään syitä miksi mikrobibiosensoreita tarvitaan merinäytteiden analysointiin. Myös lisää käyttökohteita on mahdollista löytää mikrobibiosensorien kehittämisen myötä.

Tavoitteena oli myös tutustua mikrobibiosensorien rakenteeseen, toimintaan ja rakennusmekanismeihin. Mikrobit ovat valtavan suuri ryhmä organismeja, joiden metaboliareitit tarjoavat mahdollisuuksia tunnistaa kemiallisia yhdisteitä. Synteettinen biologia mahdollistaa sen, että voidaan valita haluttu metaboliareitti ja muokata siitä mikrobisoluun sensorimekanismi. Oikealla tunnistuselementin ja reportterin valinnalla sekä sensorin optimoinnilla, voidaan valmistaa spesifisti merinäytteelle sopiva mikrobibiosensori. Tässä työssä onnistuttiin esittelemään laajasti varsinkin erilaisia reporttereita.

Tavoitteena oli selvittää myös, miten mikrobibiosensoreita voidaan käyttää merinäytteiden analysoinnissa ja kuinka laajasti niitä käytetään todellisuudessa. Mikrobibiosensoreista onnistuttiin antamaan sensoriesimerkkejä, mutta yksikään sensori ei vielä todellisuudessa soveltunut käytettäväksi merinäytteiden analysointiin. Johtopäätökseksi siis saatiin, että mikrobibiosensoreita voidaan käyttää merinäytteiden analysointiin vasta, kun ne saadaan optimoitua suolaista merinäytettä kestäviksi. Mikrobibiosensorien vähäisestä tutkimuksesta merinäytteiden analysoinnissa kertoi myös täsmällisten lähdeaineistojen löytämisen haasteellisuus.

Merkittävin johtopäätös tässä kandidaatintyössä oli se, että mikrobibiosensorit ovat edelleen laajalti tutkimusvaiheessa. Siitä huolimatta niistä onnistuttiin löytämään monia lupaavia ominaisuuksia. Mikrobibiosensorit ovat helppokäyttöisiä, nopeita, liikuteltavia, spesifejä ja kustannustehokkaita. Mikrobibiosensorit sopisivat kaupalliseen käyttöön esimerkiksi laiva- tai kalastusteollisuudessa niiden nopean rakentamisen ja halvan hinnan myötä. Mikrobibiosensorit voisivat tarjota kuluttajaystävällisen vaihtoehdon, jonka avulla muutkin kuin asiantuntijat voisivat kerätä tietoa meriympäristön tilasta. Tutkimusta tulisi lisätä erityisesti uusiin molekyyliin reagoivien tunnistuselementtien löytämisessä sekä

matriisisolujen kehittämisessä myös muihin kuin laboratorio-olosuhteisiin sopiviksi. Tässä kandidaatintyössä tutkitun lähdeaineiston perusteella voidaan todeta, että mikrobiosensorien tutkimusta täytyy lisätä ja kehittää, jotta mikrobiosensoreita voidaan tulevaisuudessa käyttää meriympäristöön kohdistuvien uhkien seurannassa.



Tässä kandidaatintyössä käytetyt tekoälytyökalut ja niiden käyttötarkoitukset on kuvailtu alla:

### **ChatGPT (GPT-4)**

Työkalua käytettiin aiheen hahmotteluun ja rajaamiseen.

### **Microsoft Copilot**

Työkalua käytettiin koko kandidaatintyössä haasteellisten käsitteiden selkeyttämiseksi itselle.

### **Scopus AI**

Työkalua käytettiin lähteiden löytämiseen erityisesti luvuissa 2 ja 4.

Olen tietoinen siitä, että olen täysin vastuussa koko opinnäytteeni sisällöstä, mukaan lukien tekoälyllä tuotetut osat, ja hyväksyn vastuun mahdollisista eettisten ohjeiden rikkomuksista.

# LÄHTEET

- Abdulkarim, S.M., Fatimah, A.B., Anderson, J.G., 2009. Effect of Salt Concentrations on the Growth of Heat-stressed and Unstressed *Escherichia coli*. *Journal of Food Agriculture and Environment* 7, 51–54.
- Berepiki, A., Kent, R., Machado, L.F.M., Dixon, N., 2020. Development of High-Performance Whole Cell Biosensors Aided by Statistical Modeling. *ACS Synth Biol* 9, 576–589. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00448>
- Carpenter, A.C., Paulsen, I.T., Williams, T.C., 2018. Blueprints for Biosensors: Design, Limitations, and Applications. *Genes* 9, 375. <https://doi.org/10.3390/genes9080375>
- Chen, S., Chen, X., Su, H., Guo, M., Liu, H., 2023. Advances in Synthetic-Biology-Based Whole-Cell Biosensors: Principles, Genetic Modules, and Applications in Food Safety. *IJMS* 24. <https://doi.org/10.3390/ijms24097989>
- Chiang, A.J., Hasty, J., 2023. Design of synthetic bacterial biosensors. *Current Opinion in Microbiology* 76. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102380>
- Del Valle, I., Fulk, E.M., Kalvapalle, P., Silberg, J.J., Masiello, C.A., Stadler, L.B., 2021. Translating New Synthetic Biology Advances for Biosensing into the Earth and Environmental Sciences. *Front. Microbiol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.618373>
- Dong, X., Qi, S., Khan, I.M., Sun, Y., Zhang, Y., Wang, Z., 2023. Advances in riboswitch-based biosensor as food samples detection tool. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 22, 451–472. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13077>
- Gastoldi, L., Cinti, S., 2023. (Bio)sensors applied to coral reefs' health monitoring: a critical overview. *Green Analytical Chemistry* 4, 100049. <https://doi.org/10.1016/j.greeac.2023.100049>
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., Smith, H.O., 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 6, 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Hakkila, K., Maksimow, M., Karp, M., Virta, M., 2002. Reporter Genes *lucFF*, *luxCDABE*, *gfp*, and *dsred* Have Different Characteristics in Whole-Cell Bacterial Sensors. *Analytical Biochemistry* 301, 235–242. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5517>
- Intergovernmental Panel On Climate Change, 2022. *The Ocean and Cryosphere in a Changing Climate: Special Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, 1st ed. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781009157964>
- ITOPF, 2023. *Oil Tanker Spill Statistics 2023* [WWW-dokumentti]. URL <https://www.itopf.org/knowledge-resources/data-statistics/statistics/> (luettu 20.3.2024).
- Jiang, B., Song, Y., Liu, Z., Huang, W.E., Li, G., Deng, S., Xing, Y., Zhang, D., 2021. Whole-cell bioreporters for evaluating petroleum hydrocarbon contamination. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 51, 272–322. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1717907>
- Kotlobay, A.A., Sarkisyan, K.S., Mokrushina, Y.A., Marcet-Houben, M., Serebrovskaya, E.O., Markina, N.M., Gonzalez Somermeyer, L., Gorokhovatsky, A.Y., Vvedensky, A., Purtov, K.V., Petushkov, V.N., Rodionova, N.S., Chepurnyh, T.V., Fakhranurova, L.I., Guglya, E.B., Ziganshin, R., Tsarkova, A.S., Kaskova, Z.M., Shender, V., Abakumov, M., Abakumova, T.O., Povolotskaya, I.S., Eroshkin, F.M., Zaraisky, A.G., Mishin, A.S., Dolgov, S.V., Mitiouchkina, T.Y., Kopantzev, E.P., Waldenmaier, H.E., Oliveira, A.G., Oba, Y., Barsova, E., Bogdanova, E.A.,

- Gabaldón, T., Stevani, C.V., Lukyanov, S., Smirnov, I.V., Gitelson, J.I., Kon-drashov, F.A., Yampolsky, I.V., 2018. Genetically encodable bioluminescent system from fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, 12728–12732. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803615115>
- Law, K.L., 2017. Plastics in the Marine Environment. *Annual Review of Marine Science* 9, 205–229. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010816-060409>
- Liu, Y., Lu, H., Cui, Y., 2023. A Review of Marine In Situ Sensors and Biosensors. *Journal of Marine Science and Engineering* 11, 1469. <https://doi.org/10.3390/jmse11071469>
- Lund, P.A., De Biase, D., Liran, O., Scheler, O., Mira, N.P., Cetecioglu, Z., Fernández, E.N., Bover-Cid, S., Hall, R., Sauer, M., O'Byrne, C., 2020. Understanding How Microorganisms Respond to Acid pH Is Central to Their Control and Successful Exploitation. *Front Microbiol* 11, 556140. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.556140>
- Martin-Yken, H., 2020. Yeast-Based Biosensors: Current Applications and New Developments. *Biosensors* 10, 51. <https://doi.org/10.3390/bios10050051>
- Martin-Yken, H., Gironde, C., Derick, S., Darius, H.T., Furger, C., Laurent, D., Chinain, M., 2018. Ciguatoxins activate the Calcineurin signalling pathway in Yeasts: Potential for development of an alternative detection tool? *Environmental Research* 162, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.12.022>
- Mofford, D.M., Reddy, G.R., Miller, S.C., 2014. Aminoluciferins Extend Firefly Luciferase Bioluminescence into the Near-Infrared and Can Be Preferred Substrates over d-Luciferin. *Journal of the American Chemical Society* 136, 13277–13282. <https://doi.org/10.1021/ja505795s>
- Moraskie, M., Roshid, M.H.O., O'Connor, G., Dikici, E., Zingg, J.-M., Deo, S., Daunert, S., 2021. Microbial whole-cell biosensors: Current applications, challenges, and future perspectives. *Biosensors and Bioelectronics* 191. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113359>
- Nakamura, H., 2018. Current status of water environment and their microbial biosensor techniques – Part II: Recent trends in microbial biosensor development. *Anal Bioanal Chem* 410, 3967–3989. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1080-0>
- National Oceanic and Atmospheric Administration, 2023. Sea Water [WWW-dokumentti]. URL <https://www.noaa.gov/jetstream/ocean/sea-water> (luettu 15.6.2024).
- Nelson, D.L., Cox, M.M., Lehninger, A.L., 2017. *Lehninger principles of biochemistry*, Seventh edition. ed. W.H. Freeman and Company ; Macmillan Higher Education, New York, NY : Houndmills, Basingstoke.
- Neubacher, S., Hennig, S., 2019. RNA Structure and Cellular Applications of Fluorescent Light-Up Aptamers. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 58, 1266–1279. <https://doi.org/10.1002/anie.201806482>
- Ocean Decade, 2023. 10 Challenges [WWW-dokumentti]. Ocean Decade. URL <https://oceandecade.org/challenges/> (luettu 21.2.2024).
- Peng, L., Fu, D., Qi, H., Lan, C.Q., Yu, H., Ge, C., 2020. Micro- and nano-plastics in marine environment: Source, distribution and threats — A review. *Science of The Total Environment* 698, 134254. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134254>
- Puhakka, E., Santala, V., 2022. Method for acrylic acid monomer detection with recombinant biosensor cells for enhanced plastic degradation monitoring from water environments. *Marine Pollution Bulletin* 178, 113568. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113568>
- Rappuoli, R., Young, P., Ron, E., Pecetta, S., Pizza, M., 2023. Save the microbes to save the planet. A call to action of the International Union of the Microbiological Societies (IUMS). *One Health Outlook* 5, 5. <https://doi.org/10.1186/s42522-023-00077-2>

- Regan, F., Hansen, P.-D., Barceló, D. (Eds.), 2023. Biosensors for the Marine Environment: Present and Future Challenges, *The Handbook of Environmental Chemistry*. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-32001-9>
- Roy, R., Ray, S., Chowdhury, A., Anand, R., 2021. Tunable Multiplexed Whole-Cell Biosensors as Environmental Diagnostics for ppb-Level Detection of Aromatic Pollutants. *ACS Sens.* 6, 1933–1939. <https://doi.org/10.1021/acssensors.1c00329>
- Shi, Y., Li, Y., 2023. Impacts of ocean acidification on physiology and ecology of marine invertebrates: a comprehensive review. *Aquatic Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s10452-023-10058-2>
- Syed, A.J., Anderson, J.C., 2021. Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond. *Chemical Society Reviews* 50, 5668–5705. <https://doi.org/10.1039/D0CS01492C>
- The International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2006. IUPAC - biosensor (B00663) [WWW-dokumentti]. <https://doi.org/10.1351/goldbook.B00663>
- Urdike, S.J., Hicks, G.P., 1967. The Enzyme Electrode. *Nature* 214. <https://doi.org/10.1038/214986a0>
- Wachsmuth, M., Domin, G., Lorenz, R., Serfling, R., Findeiß, S., Stadler, P.F., Mörl, M., 2015. Design criteria for synthetic riboswitches acting on transcription. *RNA Biology* 12, 221–231. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1017235>
- World Health Organisation, Department of Food Safety and Zoonoses., 2020. Ciguatera poisoning. [WWW-dokumentti] URL <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HEP-NFS-SSA-2022.1> (luettu 6.4.2024)
- Yu, W., Xu, X., Jin, K., Liu, Y., Li, J., Du, G., Lv, X., Liu, L., 2023. Genetically encoded biosensors for microbial synthetic biology: From conceptual frameworks to practical applications. *Biotechnology Advances* 62, 108077. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108077>
- Zhang, C., Siddiqui, S., Navarrete, P.M., Yuan, J., 2020. An Integrated Whole-Cell Detection Platform for Heavy Metal Ions. *IEEE Sensors J.* 20, 4959–4967. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2020.2964642>