

Helsingin yliopisto, Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos

Aerobisissa ja anaerobisissa olosuhteissa öljyhiilivetyjä
hajottavien mikrobiyhteisöjen molekyylibiologinen tarkastelu

Pro gradu –työ
Lotta Purkamo
Heinäkuu 2004

Helsingin yliopisto - Helsingfors universitet - University of Helsinki

Tiedekunta - Fakultet - Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos - Institution – Department Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos, mikrobiologian osasto	
Tekijä - Författare – Author Lotta Purkamo			
Työn nimi - Arbetets titel - Title Aerobisissa ja anaerobisissa olosuhteissa öljyhiilivetyjä hajottavien mikrobiyhteisöjen molekyylibiologinen tarkastelu			
Oppiaine - Läroämne - Subject Mikrobiologia			
Työn laji - Arbetets art - Level Pro gradu-työ		Aika - Datum - Month and year Heinäkuu 2004	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 104
<p>Tiivistelmä - Referat - Abstract</p> <p>Ympäristön saastuminen on viimeisen vuosisadan ajan ollut kasvava ongelma. Yksi maaperän ja vesien pilaantumista aiheuttava aineryhmä ovat öljyhiilivedyt. Öljyhiilivedyillä saastuneita ympäristöjä voidaan puhdistaa fysikaalisin, kemiallisin ja biologisin keinoin. Biologisessa puhdistuksessa eli bioremediaatiossa käytetään ympäristön organismeja hyväksi puhdistamisprosesseissa. Ympäristön mikrobit pystyvät hajottamaan öljyhiilivetyjä monissa eri olosuhteissa. Koska pilaantuneissa ympäristöissä mikrobitoiminta on aluksi hyvin vilkasta, happi kulutetaan loppuun ja mikrobiyhteisö muuttuu muita elektroninvastaanottajia käyttäväksi. Haitta-aineiden anaerobisella hajotuksella saattaa olla suuri merkitys erityisesti luonnollisessa biohajoamisessa.</p> <p>Tässä työssä lähestyttiin saastuneen maaperän mikrobiyhteisöjä molekyylibiologisten menetelmien kautta, koska vain pieni osa mikrobeista pystytään havaitsemaan viljelemällä. Maanäytteet otettiin vanhalta kaatopaikalta, ja yhtä näytettä inkuboitiin 10 kuukautta laboratorioissa. Toisia näytteitä, jotka otettiin maaperän profiilista puolen metrin välein, ei inkuboitu. Maaperänäytteistä eristettiin DNA, josta arki- ja bakteerispesifisin alukkein monistettiin PCR:n avulla osa 16S rRNA-geeniä. PCR-tuotteet erotettiin toisistaan kloonamalla ja kloonit ryhmiteltiin RFLP:n avulla. Eri RFLP-ryhmittä valittiin sekvensointiin edustajat. Sekvensoituja 16S rRNA-geenin paloja verrattiin tietokantoihin ja tutkittiin kloonien sukulaisuussuhteita.</p> <p>Öljyllä saastuneesta maasta otetuista näytteistä löydettiin sekvenssejä, jotka olivat läheisiä muille viljelemättömille organismeille. Monet näistä organismeista oli löydetty eri tavoin saastuneista ympäristöistä. Metanogeenisissä olosuhteissa alkaaneja hajottaville <i>Syntrophus</i> -lajin bakteereille ja metanogeenisille arkeille, kuten <i>Methanosaeta</i> -lajin jäsenille läheisiä sekvenssejä löytyi myös. Inkuboidusta näytteestä löytyi organismeja, joita profiilinäytteissä ei havaittu, ja profiilinäytteistä löytyi vastaavasti sellaisia organismeja joita inkuboidusta näytteestä ei löydetty. Saatujen sekvenssien tietokantahakujen perusteella lähimpien sukulaisten metaboliat sopivat erinomaisesti kokonaiskuvaan eri hajotusprosesseista, joita maaperässä on todennäköisesti käynnissä. Työn tuloksia voidaan mahdollisesti soveltaa suunniteltaessa saastuneiden maiden monitorointia. Joitain löydettyjä organismeja voidaan ehkä pitää indikaattoriorganismeina öljyhiilivedyillä saastuneiden maiden kunnostuksen seuraamisessa.</p>			
Avainsanat – Nyckelord - Keywords Öljyhiilivedyt, bioremediaatio, anaerobinen hajotus, metanogeeniset olosuhteet, mikrobiyhteisöt			
Säilytyspaikka - Förvaringsställe - Where deposited Mikrobiologian osasto			
Muita tietoja - Övriga uppgifter - Additional information Pro gradu-työtä ohjasivat Suomen ympäristökeskuksessa dosentti Kirsten Jørgensen ja FT Katarina Björklöf			

Sisällysluettelo	
Tiivistelmä	2
Kuvaluettelo	5
Taulukkuuettelo	6
Lyhenneluettelo	7
Esipuhe	8
Johdanto	9
Kirjallisuuskatsaus tutkimusaiheen alaan	10
1. Maaperä mikro-organismien elinympäristönä	10
1.1 Maan mikrobistoon vaikuttavat fysikaaliset ja kemialliset tekijät	10
1.2 Maan mikrobistoon vaikuttavat biologiset tekijät	12
2. Öljyhiilivetyjen hajoaminen	14
2.1 Hiilivedyistä ja maaperän mikrobeista niiden hajottajina	14
2.2 Aerobinen hajoaminen	15
2.2.1 Aerobiset hajoamisreitit	15
2.2.2 Aerobiset hajottajat	20
2.3 Anaerobinen hajoaminen	21
2.3.1 Anaerobiset hajoamisreitit	22
2.3.2 Anaerobiset hajottajat	23
3. Bioremediaatio saastuneiden maa-alueiden puhdistuskeinona	26
3.1 Yleistä bioremediaatiosta	26
3.2 Bioremediaation eri muodot	27
3.2.1 <i>Ex situ</i> -bioremediaatio	27
3.2.2 <i>In situ</i> ja on site -bioremediaatio	28
3.2.2.1 <i>Exxon Valdez</i> in tapaus	29
3.2.3 Haitta-aineiden luontainen biohajoaminen	29
4. Maaperämikrobiologiassa sovellettavista molekyylibiologisista menetelmistä	30
4.1 Kokonais-DNA:n eristys mikrobiyhteisön tutkimisessa	31
4.2 Polymeraasiketjureaktio eli PCR	32
4.3 Kloonauksen apuvälineenä mikrobiyhteisön tutkimisessa	34
4.4 Restriktioanalyysit	35
4.5 Sekvensointi	36
4.6 Fylogeneettiset analyysit	36
4.7 Molekyylibiologiset menetelmät pilaantuneiden ympäristöjen tutkimuksessa	36
Kokeellisen työn selostus	37
5. Tutkimuksen tavoitteet	37

6. Materiaalit ja menetelmät	38
6.1 Näytteenotto	38
6.1.1 Näytteenotto 7.5.2001	40
6.1.2. Näytteenotto 14.4.2003	40
6.2 DNA:n eristäminen maanäytteestä	40
6.3 Geelielektroforeesit	41
6.3.1 Pitoisuuden määrittäminen geelielektroforeesissa	41
6.4 PCR maanäyte-DNA:sta	42
6.4.1 GC-pidike	43
6.5 PCR-tuotteiden puhdistus	43
6.6 Kloonaus	44
6.6.1 A-tailing	44
6.6.2 Ligaatio	44
6.6.3 Transformaatio	44
6.6.4 Puhdasviljelmät	45
6.7 Plasmidieristys	45
6.8 Kloonien PCR	46
6.9 Restriktiofragmenttien pituuspolymorfia eli RFLP	46
6.10 Sekvensointi	47
6.11 Sekvensoinnin tulosten käsittely	48
6.12 Metaanintuotannon mittaaminen	48
6.13 Hiilidioksidituotannon mittaaminen	48
6.14 Maan mikrobiston mikroskooppinen tarkastelu	49
7. Tulokset	49
7.1 Tulokset kloonaukseen-, RFLP- ja sekvensointitöistä	49
7.2. Metaanintuotanto- ja hiilidioksidin tuotantotulokset	80
7.3 Mikroskopointitulokset	81
8. Tulosten tarkastelu	82
8.1. Mikrobiyhteisöt öljyhiilivedyillä saastuneessa maassa	82
8.2. Käytettyjen menetelmien arviointi	88
8.3. Tulosten hyödyntäminen ja tutkimuksen jatkaminen	90
9. Loppupäätelmät	91
10. Kirjallisuus	93

Kuvaluettelo

1. Pilaantuneeseen maaperään muodostuvat elektroninvastaanottaja- vyöhykkeet.	11
2. Alkaanien aerobinen hajoaminen ja β -oksidaatio.	17
3. Aromaattisten hiilivetyjen hajoamisreitit prokaryooteissa aerobisissa olosuhteissa.	20
4. Mineraaliöljyn arvioitu levinneisyys ja havaintopisteiden sijainti Trollbergetin tutkimuskohteessa.	39
5. Arvio huokoskaasujen koostumuksesta ja havaintopisteiden sijainti Trollbergetin tutkimuskohteessa.	39
6. <i>HaeIII</i> ja <i>MspI</i> –restriktioentsyymien tetrameeriset leikkauskohdat.	47
7. Esimerkki RFLP-kuvioiden ryhmittelystä.	50
8. Anaerobisesti 10 kk inkuboidun, 1,8-2,3 metrin syvyydestä otetun näytteen bakteerikloonien jakautuminen ryhmiin RFLP-kuvioiden perusteella.	52
9. Anaerobisesti 10 kk inkuboidun, 1,8-2,3 metrin syvyydestä otetun näytteen arkkikloonien jakautuminen ryhmiin RFLP-kuvioiden perusteella.	53
10. Anaerobisesti 10 kk inkuboidun, 1,8-2,3 metrin syvyydestä otetun näytteen bakteeriklooneista rakennettu fylogeneettinen puu.	63
11. Anaerobisesti 10 kk inkuboidun, 1,8-2,3 metrin syvyydestä otetun näytteen arkkiklooneista rakennettu fylogeneettinen puu.	64
12. Inkuboimattomien maan profiilinäytteiden bakteerikloonien jakautuminen RFLP-ryhmiin syvyyksittäin.	66
13. Inkuboimattomien maan profiilinäytteiden arkkikloonien jakautuminen RFLP-ryhmiin syvyyksittäin.	69
14. Maaperän profiilinäytteiden bakteerikloonien linjautuneista sekvensseistä rakennettu fylogeneettinen puu.	79
15. Maaperän profiilinäytteiden arkkikloonien linjautuneista sekvensseistä rakennettu fylogeneettinen puu.	80
16. Trollbergetin näytteenottoaikan maaperän profiili: kuvaajat öljypitoisuuden, aerobisen sekä anaerobisen hiilidioksidintuoton sekä metaanintuoton osalta.	81
17. Mikroskooppikuva DAPI-värjätystä 1,8-2,3 metrin syvyydestä otetusta, inkuboidusta näytteestä.	82

18. Trollbergetin saastuneimmasta kohdasta, 3 metrin syvyydestä otetun näytteen autofluoresenssista otettu mikroskooppikuva.	82
--	----

Taulukkuuettelo

1. Esimerkkejä mikrobeista, joiden on todettu hajottavan hiilivetyjä hapellisissa olosuhteissa ja niiden luokittelu nykytaksonomian mukaan.	21
2. Esimerkkejä mikrobeista, joiden on todettu hajottavan erilaisia hiilivetyjä hapettomissa olosuhteissa.	24-25
3. Kokeellisessa työssä käytetyt PCR-alukkeet.	42
4. Anaerobisesti 10 kuukautta 8 °C inkuboidun 1,8-2,3 metrin syvyydestä otetun maanäytteen bakteerikloonien jakautuminen restriktiokuviryhmiin, kloonien määrä ryhmissä ja ryhmistä valittujen sekvensoitujen kloonien numero.	51
5. Anaerobisesti 10 kuukautta 8 °C inkuboidun 1,8-2,3 metrin syvyydestä otetun maanäytteen arkkikloonien jakautuminen restriktiokuviryhmiin, kloonien määrä ryhmissä ja ryhmistä valittujen sekvensoitujen kloonien numero.	52-53
6. Anaerobisesti 10 kuukautta inkuboidun 1,8-2,3 metrin syvyydestä otetun maanäytteen sekvensoitujen bakteerikloonien lähimmät osumat sekvenssitietokannasta.	55-58
7. Anaerobisesti 10 kuukautta inkuboidun 1,8-2,3 metrin syvyydestä otetun maanäytteen sekvensoitujen arkkikloonien lähimmät osumat sekvenssitietokannasta.	60-61
8. Inkuboimattomien maaperän profiilinäytteiden bakteerikloonien jakautuminen restriktiokuviryhmiin, kloonien määrä ryhmissä ja ryhmistä valittujen sekvensoitujen kloonien numero.	65
9. Inkuboimattomien maaperän profiilinäytteiden arkkikloonien jakautuminen restriktiokuviryhmiin, kloonien määrä ryhmissä ja ryhmistä valittujen sekvensoitujen kloonien numero.	67-68
10. Inkuboimattomien maaperän profiilinäytteiden sekvensoitujen bakteerikloonien lähimmät osumat tietokannasta.	71-74
11. Inkuboimattomien maaperän profiilinäytteiden sekvensoitujen arkkikloonien lähimmät osumat tietokannasta.	76-78

Lyhenneluettelo

DAPI	4',6-diamido-2-fenylyli-indoli
DGGE	Denaturoiva gradienttigelielektroforeesi
DNA	deoksiribonukleiinihappo
HSCoA	Koentsyymi A
IPTG	Isopropyyli- β -D-galaktopyranosidi
LB	Luria-liuos
NADH - NAD ⁺	Nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi (pelkistynyt - hapettunut muoto)
NADPH - NADP ⁺	Nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatti (pelkistynyt - hapettunut muoto)
PCR	Polymeraasiketjureaktio
RFLP	Restriktiofragmenttien pituuspolymorfismi
SDS	Natriumdodekyylisulfaatti
SSU	Pieni alayksikkö
STET	Suola-Tris-Cl-EDTA-Triton X
SYKE	Suomen ympäristökeskus
X-Gal	5-bromo-4-kloro-3-indolylyli- β -D-galaktopyranosidi
16S rRNA	16S ribosomaalinen RNA
16S rRNA-geeni	16S ribosomaalisen RNA:n geeni

Esipuhe

Pro gradu-työ tehtiin Suomen ympäristökeskuksessa, ympäristötekniikan tutkimusohjelmassa, Hakuninmaan laboratoriossa maaliskuun 2003 ja toukokuun 2004 välisenä aikana.

Suuret kiitokset päävastuulliselle ohjaajalleni Kirsten Jørgensenille ja myös vähemmän vastuullisille Jani Salmiselle ja Lotta Björklöfille innostamisesta, ansiokkaista kommentteista ja kiinnostuksesta työtäni kohtaan. Kiitokset kuuluvat myös Hakuninmaan laboratorion väelle, jotka auttoivat ongelmien ilmetessä ja olivat mukavaa kahviseuraa: Sinikka Pahkalalle, Ilse Heiskaselle, Tuula Ollinkankaalle, Kaisa Heinoselle, Minna Madsenille, Ritva Väisäselle, Sirpa Kuvajalle ja muillekin kenet tässä unohdan. Mechelininkadun TTO-laisia tahdon kiittää joukkoon kuulumisen tunteen välittämisestä ja mukavasta seurasta erinäisissä riennöissä. Kiitos myös Viikkiin German Jürgensille, joka auttoi minua muuten niin hankalissa fylogenia-asioissa ja Tanja Horkolle Biotekniikan insituuttiin sekvensointien suorittamisesta ja kaikesta huolimatta mallikelpoisten sekvenssien toimittamisesta ja kaikesta muustakin avusta. Kiitokset myös Maa- ja vesitekniikan tuki ry.:lle, jonka rahallinen tuki mahdollisti leivän hankinnan pöytään tätä työtä tehdessä. Oppiainevastaavalle professorille Mirja Salkinoja-Saloselle ja FT Minna Laineelle kiitokset pro gradu -työni arvostelusta ja viimeisistä kommentteista.

Viimeisimpinä muttei vähäisimpinä kiitän tyttöjä vertaistukiryhmänä olosta ja Samia ja Tumppua tietokoneen vapaudesta, riittävästä hiljaisuudesta ja kaikesta tuesta mitä tämän työn aikana on tarvittu.

6.7.2004

Lotta Purkamo

Johdanto

Öljy on syntynyt orgaanisesta aineesta kovassa paineessa ja kuumuudessa vuosituhansien aikana. Öljyä on aina päässyt luontaisesti karkaamaan ympäristöön, mutta nykyinen öljyn ja öljyhiilivetyjen laaja-alainen käyttö ja tapahtuneet öljypäästöt ovat johtaneet ajoittain suuriin ympäristökatastrofeihin (Atlas ja Bartha 1998). Suomessa pilaantuneita alueita on arvioitu olevan noin 20 000, joista kolmasosa on saastunut öljytuotteilla. Monet maaperässä luontaisesti elävät mikrobit pystyvät hajottamaan ja käyttämään energiakseen haitta-aineita. Tällaisten mikrobien avulla saastuneita alueita voidaan kunnostaa biologisesti ilman hankalia ja usein kalliita teknisiä menetelmiä. Usein pahoin saastunut maaperä muuttuu hapettomaksi ympäristöksi, jolloin anaerobisten mikrobien merkitys öljyhiilivetyjen hajotuksessa korostuu. Öljyhiilivetyjen hajotuksessa anaerobisissa olosuhteissa muodostuu metaania, joka on 25-30 kertaa tehokkaampi kasvihuonekaasu kuin hiilidioksidi (Alexander 1999). Biologista metaania kaikesta ilmakehään joutuvasta metaanista on n. 30 %, mutta eräät mikrobit pystyvät hapettamaan myös metaania hiilidioksidiksi. Ihanteellisessa bioremediaatiotilanteessa maaperä puhdistuu öljyhiilivedyistä ja muodostuva metaani muunnetaan kasvihuoneilmiötä vähemmän vahvistavaan muotoon hiilidioksidiksi.

Maaperän mikrobeista vain pieni osa havaitaan viljelemällä, ja anaerobiseen elämään erikoistuneiden mikrobien kasvatus on erityisen vaikeaa. Viimeisen kahdenkymmenen vuoden aikana tapahtunut molekyylibiologisten menetelmien kehitys on kuitenkin osittain helpottanut mikrobien tunnistamista ilman viljelyä, ja nykyisin arvellaan mikrobiryhmien, jotka tunnetaan vain sekvenssien perusteella, olevan määrällisesti vallitsevia monissa ympäristöissä (Head ym. 1998).

Työssä tutkittiin mineraaliöljyllä saastuneen maan mikrobiyhteisöjä ja selvitettiin laboratoriossa inkuboidun maanäytteen ja autenttisten maaperän profiilinäytteiden mikrobiyhteisöjen eroja ja samankaltaisuuksia. Tutkimuksessa pyrittiin myös selvittämään löytyykö maaperästä bioremediaatioon ja öljyn hajotukseen kykeneviä eliöitä.

Kirjallisuuskatsaus

1. Maaperä mikro-organismien elinympäristönä

Suomen maaperä on saanut muotonsa viime jääkauden aikana 10 000 vuotta sitten. Yleisimmäksi maannokseksi on muodostunut viileälle havumetsävyöhykkeelle tyypillinen podsolimaannos, jossa maaperä on jakautunut eri kerroksiin (Hartikainen 1992). Tämä tutkimuksen kohdealue sijaitsee kuitenkin jääkauden aikana syntyneen reunamuodostuman, Salpauselkä 1:n kohdalla, jossa vallitsevina maalajeina ovat hieno sekä karkea hiekka ja sora (Salminen ym. 2004). Maaperässä vallitsevat olot vaikuttavat suuresti maan mikrobistoon. Maaperän fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet kuten veden saatavuus, maan ilman ominaisuudet, lämpötila, paine, ionikoostumus, pH, hapetus-pelkistyspotentiaali sekä elektromagneettinen säteily ja biologiset ominaisuudet kuten mikrobien hiilen ja energianlähteiden saatavuus, mineraaliravinteet, kasvutekijät, mikrobien väliset vuorovaikutukset, mikrobien geneettiset ominaisuudet ja käytettävissä oleva tila vaikuttavat kaikki omalta osaltaan mikro-organismien elämään maaperässä (Stotzky 1997).

Maaperän monista muuttuvista tekijöistä huolimatta siellä vallitsee runsaslukuinen mikrobisto. Toisaalta juuri maaperän monipuoliset elinmahdollisuudet mahdollistavat monimuotoisen eliöyhteisön. Maaperän sisältämästä bakteerimäärästä on esitetty erilaisia arvioita: miljoonasta 10^9 bakteeriin yhtä grammaa maata kohti (Atlas ja Bartha 1998) jopa todella suuriin määriin, $1,5 \times 10^{10}$ bakteeria/g maata (Torsvik ym. 1996).

1.1 Maan mikrobistoon vaikuttavat fysikaaliset ja kemialliset tekijät

Veden saatavuus vaihtelee kausittain, syksyllä ja keväällä maaperä saa vettä enemmän kuin haihduttaa, kesällä ja talvella on kuivempaa. Vesi sitoutuu maahiukkasten pinnoille vetysidosten avulla. Mikrobimetabolian maassa rajoittuu alueille, joissa vettä on jatkuvasti saatavilla. Tästä johtuen mikrobit muodostavat kolonioita maahiukkasten pinnoille (Stotzky 1997). Pohjavesi muodostuu sadeveden ja sulamisvesien suodattuessa maakerrosten läpi. Maaperässä tapahtuvat kemialliset ja biokemialliset reaktiot vaikuttavat pohjaveden koostumukseen (Männistö 2001). Vesi kuljettaa happea maamikrobien käyttöön (Alexander ja Lovley 1997). Puhtailla hiekka- ja sorapitoisilla pohjavesialueilla maaperän happipitoisuus on korkein ja savisilla alueilla

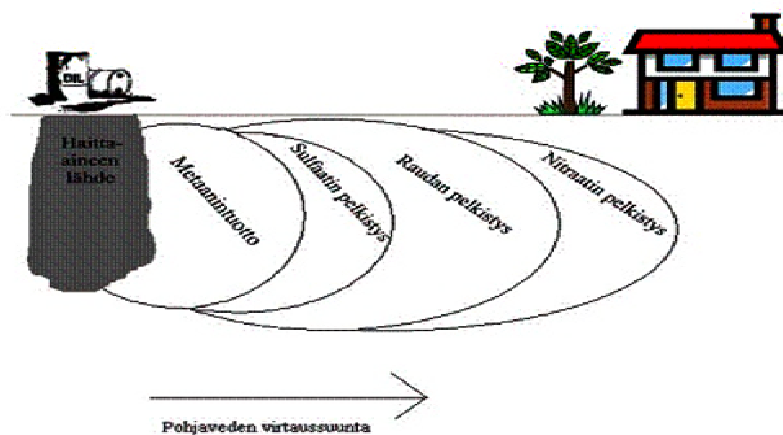
alhaisin (Lahermo ym. 1990). Koska happi liukenee heikosti veteen ja hapen kulutus on saastuneissa maissa nopeaa, maaperään voi muodostua täysin hapettomia alueita, jos hapen kulutus on jatkuvasti suurempaa kuin hapen diffuusio ympäristöstä (Alexander ja Lovley 1997).

Yksittäisenkin maapartikkelin ulko- ja sisäosien välillä on eroja: maapartikkelin ulkopinnalla on saatavilla happea ja vettä sekä orgaanista ainesta hiilenlähteeksi, kun taas maapartikkelin sisäosissa happea ei ole, vaan sinne on muodostunut hapeton eli anaerobinen tila (Atlas ja Bartha 1998, Madigan ym. 2003).

Hapen loputtua maaperästä mikrobit alkavat käyttää vaihtoehtoisia elektronien vastaanottajia, esimerkiksi nitraattia, mangaania, rautaa, sulfaattia tai hiilidioksidia. Elektronivastaanottajavyöhykkeet, jotka voivat muodostua pilaantuneisiin maihin on esitetty kuvassa 1. Eri elektronivastaanottajien käyttö riippuu niiden saatavuudesta maaperässä, eri reaktioiden termodynaamisista tuotoista ja elektroninluovuttajista kilpailevista mikrobeista (Bouwer 1992).

Maaperän lämpötila vaihtelee ylimmissä kerroksissa vuodenaikojen mukaan. Yli 10 metrin syvyydessä lämpötila on melko muuttumaton ja vastaa ilman keskimääräistä lämpötilaa (Männistö 2001). Etelä-Suomessa ilman vuosilämpötila on keskimäärin neljän ja kuuden asteen välillä (Ilmatieteenlaitos, internetsivu http://www.ilmatieteenlaitos.fi/saa/tilastot_99.html#1).

Osmoottinen paine vaikuttaa kaikkien solujen toimintaan. Vesi kulkeutuu puoliläpäisevän kalvon (kuten solukalvon) läpi pienemmästä aineiden pitoisuudesta suurempaan. Usein liuenneiden aineiden pitoisuus on solun sisällä korkeampi kuin solun ulkopuolella. Tällöin vesi kulkeutuu solukalvon läpi ympäristöstä soluun



Kuva 1. Pilaantuneeseen maaperään muodostuvat elektronivastaanottajavyöhykkeet (mukailten Anderson ja Lovley 1997).

pyrkien tasapainottamaan kalvon eri puolet (Madigan ym. 2003). Yleensä liuenneiden aineiden pitoisuus normaalissa maaperän vesifaasissa ei ole niin suuri, että osmoottinen paine estäisi maan mikrobien kasvua (Stotzky 1997).

Suomalainen maaperä on luontaisesti hapan. Happamuus johtuu happamia kivilajeja sisältävästä kallioperästä ja karkeista maalajeista, joiden läpi hapan sadevesi suodattuu (Soveri 1990, Männistö 2001). Myös maassa tapahtuvissa hapetusreaktioissa syntyvillä vetyioneilla on jonkin verran merkitystä maan happamuuteen. Suomen maaperässä on luontaisesti vähän puskurivaikutuksen aikaansaavaa kalkkia. Maan happamuudesta johtuen kaikki ravinteet ja mineraalit eivät välttämättä ole mikro-organismeille sopivassa muodossa eli ne eivät ole liukoisia. Toisaalta jos happamuus lisääntyy, jotkin mikrobien kasvua haittaavat mineraalit, kuten alumiini, voivat muuttua liukoiseen, haitalliseen muotoon (Hartikainen 1992). Monet maamikrobit voivat muuttua lepomuodoiksi epäsuotuisissa olosuhteissa (Madigan ym. 2003).

1.2 Maan mikrobistoon vaikuttavat biologiset tekijät

Hiili kiertää maapallolla ilmakehän, veden, maan ja biomassan kautta. Hiilen kierto tapahtuu hapellisissa ja hapettomissa osuhteissa ja siihen osallistuvat sekä autotrofiset että heterotrofiset eliöt. Hiiliyhdisteet toimivat eliöiden energianlähteenä ja solumassan rakennusaineena. Fotosynteettiset eliöt muodostavat hiilidioksidista ja vedestä orgaanisia yhdisteitä. Heterotrofit hajottavat orgaaniset yhdisteet pääosin kahteen hiilen muotoon, hiilidioksidiksi ja metaaniksi. Orgaanisista yhdisteistä muodostuu hiilidioksidia hapellisen ja hapettoman hengityksen sekä fermentaatioiden kautta. Metaania tuottavat metanogeenit hapettomissa olosuhteissa. Metanogeenit käyttävät lisäksi vetyä ja asetaattia, joita syntyy orgaanisten yhdisteiden käymisprosesseissa. Metaani kulkeutuu maaperässä metanotrofien ulottuville, jotka hapettavat metaanin jälleen hiilidioksidiksi (Madigan ym. 2000).

Öllyhiilivedyillä saastuneissa maissa orgaanisesta hiilestä ei ole pulaa, mutta epäorgaanisten ravinteiden saatavuus saattaa rajoittaa biohajotusnopeutta (Chapelle 1999). Useat biohajotukseen kykenevät sienet ja bakteerit tarvitsevat perusravinteiden lisäksi kasvutekijöitä, joita ovat esimerkiksi aminohapot, puriini- ja pyrimidiiniemäkset ja B-vitamiinit. Ympäristössä näitä kasvutekijöitä tuottavat ja erittävät heterotrofiset mikrobit. Kasvutekijöillä on merkitystä erityisesti synergistisissä vuorovaikutussuhteissa mikrobien välillä (Alexander 1999).

Mikrobien vuorovaikutukset toistensa, kasvien ja maan muun eliöstön välillä voivat olla nille hyödyllisiä, haitallisia tai eivät kumpaakaan. Hyödyllinen suhde on esimerkiksi synergismi, jossa eliöt elävät löyhässä suhteessa, josta molemmat osapuolet hyötyvät. Tällainen suhde on esimerkiksi syntrofisilla mikrobeilla. Syntrofiassa ensimmäinen mikrobipopulaatio muuntaa yhdisteen A tuotteeksi B, mutta tässä reaktiossa ei synny energiaa, ellei syntyvää tuotetta B muunneta jossain toisessa reaktiossa. Toinen populaatio ei pysty käyttämään A-yhdistettä, mutta voi muuntaa ensimmäisessä reaktiossa syntyneen tuotteen B joksikin kolmanneksi yhdisteeksi, jolloin reaktioiden kokonaissaanto on termodynaamisesti suotuisa eli energiaa vapauttava. Haitallinen vuorovaikutussuhde on esimerkiksi kilpailu joko elintilasta tai ravinnosta (Atlas ja Bartha 1998). Kilpailutilanteessa jotkin mikrobit pystyvät tuottamaan yhdisteitä, jotka haittaavat toisten mikrobien kasvua. Näitä ovat esimerkiksi bakteriosiinit ja antibiootit (Torsvik ym. 1996). Tällaisessa tilanteessa, jossa toisella osapuolella on jokin toista haittaava ominaisuus, puhutaan antagonismista tai amensalismista.

Mikrobit ovat hyvin sopeutuvaisia kulloiseenkin ympäristöön sekä fysiologisilta ominaisuuksiltaan että perimänsä puolesta (Stotzky 1997). Mikrobipopulaatioiden sopeutuminen esimerkiksi vierasaineisiin tapahtuu biohajoamiseen tarvittavien entsyymien induktiolla ja populaation sisällä biohajotukseen kykenevien organismien lukumäärän runsastumisella. Jos hajotettava aine tai sen analogit eivät esiinny luonnossa normaalisti eivätkä mikrobit ole altistuneet niille, tarvitaan mutaatioita tai geeninsiirtoja, jotta mikrobien perimä mahdollistaa kyvyn hajottaa vierasaineita (Maier ym. 2000).

Mikrobien geneettinen potentiaali kasvaa niiden vaihtaessa perimänsä hyödyllisiä geenejä toisten mikrobien kanssa (Stotzky 1997). Mikrobien välillä geenienvaihtoa voi tapahtua transformaation, konjugaation tai transduktion kautta. Plasmidit ja transposonit voivat kasvattaa mikrobiyksilön geneettistä potentiaalia lisäämällä DNA:n määrää solussa. Transposonit ovat nk. hyppiviä elementtejä, joiden geneettinen materiaali voi kopioitua ja kopiot voivat siirtyä eri paikkaan joko kromosomissa tai plasmidissa. Kopioluvun lisääntyminen tarkoittaa yksilön kannalta suurempaa geneettistä potentiaalia esimerkiksi hajottaa joitain vierasaineita, mutta se ei vielä merkitse, että mikrobiyksilö kykenisi hajottamaan näitä yhdisteitä. Hajotukseen tarvittavien entsyymien tuotto riippuu geenien ekspressiosta (Olson ja Tsai 1992). Jos geeni ei ekspressoitu, ei synny myöskään hajotukseen tarvittavia entsyymejä.

Saastuneista maista eristetyistä gram-negatiivisista bakteereista on löydetty nk. TOL-plasmideja (Fritsche ja Hofrichter 2000). TOL-plasmidit ovat katabolisia plasmideja, joihin on koodattu aromaattisten yhdisteiden hajotusreitteihin tarvittavien entsyymien rakennusohjeet. Katabolisilla plasmideilla on usein laaja isäntävalikoima, joten mikrobipopulaation kyky käyttää erilaisia substraatteja lisääntyy katabolisten plasmidien välityksellä. Siksi tällaisten plasmidien esiintymistiheys on korkea erityisesti saastuneissa ympäristöissä (Sarand 2000).

2. Öljyhiilivetyjen hajoaminen

2.1 Hiilivedyistä ja maaperän mikrobeista niiden hajottajina

Raakaöljy on luonnontuote, joka muodostuu geokemiallisesti biomassasta korkeassa paineessa ja lämpötilassa. Öljy on sekoitus alifaattisia, alisyklisiä ja aromaattisia hiilivetyjä. Aromaattiset hiilivedyt voivat olla polymerisoituneita, eli bentseenirenkaita voi olla liittyneenä toisiinsa useampia. Näitä rakenteita kutsutaan polyaromaattisiksi hiilivedyiksi eli PAH-yhdisteiksi. Hiilivedyt voivat lisäksi olla tyydyttyneitä tai tyydyttymättömiä. Tyydyttyneissä hiilivedyissä ei ole kaksois- tai kolmoissidoksia kuten tyydyttymättömissä hiilivedyissä. Raakaöljyssä on lisäksi pienempiä määriä muita yhdisteitä, kuten nafteenihappoja, fenoleja, tioleja, heterosyklisiä typpiyhdisteitä ja rikkiyhdisteitä (Atlas ja Bartha 1998).

Hiilivetyjä muodostuu myös biologisissa toiminnoissa. Esimerkiksi metanogeenit muodostavat metabolian lopputuotteenaan yksinkertaisinta alkaania, metaania. Merilevät pystyvät muokkaamaan aldehydeistä alkaaneja. Etyleeni eli eteeni, yksinkertaisin alkeeni, on kasvien syntetisoima hormoni. Hyönteisten ja kasvien vahakerroksissa on myös alkeeneja, jossa ne toimivat feromoneina ja estävät veden haihtumista soluista. Hyvin tunnettu ryhmä luontaisia hiilivetyjä ovat isoprenoidit, kuten karotenoidit ja terpeenit. Myös joitain aromaattisia hiilivetyjä on havaittu muodostuvan biologisesti, näistä esimerkkinä tolueni ja naftaleeni (Heider ym. 1999). Hiilivetyjä on todennäköisesti esiintynyt luonnossa jo elämän alusta asti, mikä selittäisi monien mikrobien metabolisten kykyjen kehityksen hiilivetyjen hyödyntämisessä elektroninluovuttajina hengitysreaktioissa ja hiilenlähteinä solusynteesissä (Spormann ja Widdel 2000).

Hiilivetyjen hajoamisnopeudet vaihtelevat hiilivety molekyylin tyypin ja koon mukaan. Mikrobit hajottavat nopeimmin keskipituisia alkaaneita, joissa hiiliatomien

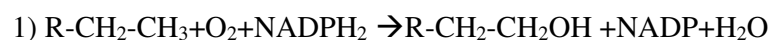
lukumäärä vaihtelee 10 ja 24 välillä (Atlas ja Bartha 1998). Mieluiten mikrobit käyttävät energianlähteinään *n*-alkaaneja, joissa hiiliatomien lukumäärä vaihtelee 10 ja 18 välillä. Lyhytketjuiset alkaanit ovat mikrobeille haitallisia niiden erittäin suuren rasvaliukoisuuden takia. Ne liukenevat solukalvoon, jolloin sen juoksevuus ja läpäisevyys lisääntyy (Maier ym. 2000). Mitä pidempi tai haaroittuneempi hiilivety molekyyli on, sitä vaikeampi se on hajottaa (Atlas ja Bartha 1998). Pitkäketjuisten hiilivetyjen hajotusta vaikeuttaa niiden erittäin alhainen liukoisuus veteen (Maier ym. 2000). Erittäin hydrofobisesta luonteestaan johtuen pitkäketjuiset hiilivedyt imeytyvät luonnossa maan pienimpiin huokosiin kauas vedestä, jolloin ne ovat mikrobien ulottumattomissa. Jotkin bakteerit ovat ratkaisseet ongelman tuottamalla pinta-aktiivisia aineita, joiden avulla hiilivedyt voidaan tuoda vesifaasin muiden organismien hajotettaviksi. Solun ulkopuolelle eritettävien pinta-aktiivisten aineiden avulla hiilivedyt voidaan myös kuljettaa hydrofiilisen soluseinän läpi, jolloin solukalvossa kiinni olevat entsyymit pystyvät hajottamaan ne. Esimerkiksi *Pseudomonas aeruginosa* -kannat tuottavat rhamnolipidejä, kasvaessaan hydrofobisilla substraateilla. Bioaktiivisten aineiden tuotolla saattaa olla merkitystä myös bioremediaatiossa (Chayabutra ja Ju 2000).

2.2 Aerobinen hajoaminen

Mikrobien on tiedetty hajottavan hiilivetyjä aerobisissa olosuhteissa jo lähes vuosisadan ajan (Spormann ja Widdel 2000). Aerobisessa hajoamisessa terminaalinen elektroniakseptori on happi (Maier ym. 2000).

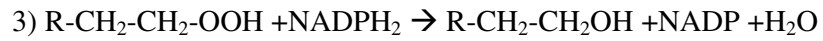
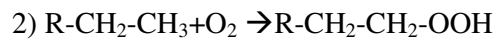
2.2.1 Aerobiset hajoamisreitit

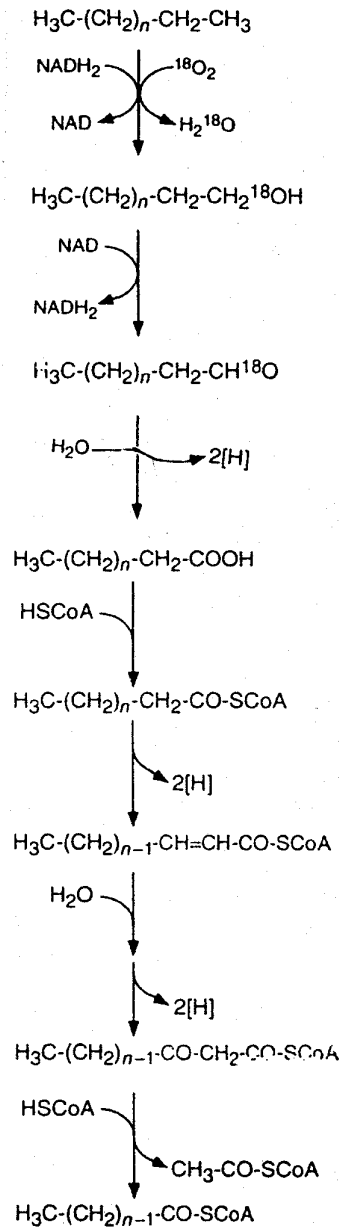
Alkaanien aerobinen hajoaminen alkaa mono-oksygenaasientsyymien lisätessä yhden happiatomin, joka on lähtöisin molekulaarisesta hapesta, alkaanimolekyyliin. Toinen happiatomi liittyy nikotiiniamididinukleotidifosfaatin (NADPH₂) luovuttamaan vetymolekyyliin (kaava 1). Useimmiten happiatomi lisätään alkaanin päähän metyyliryhmään muodostaen alkoholin, joka hapettuu edelleen aldehydiksi ja lopulta rasvahapoksi (Atlas ja Bartha 1998).



Alkaanit voivat hajota myös dioksygenaasientsyymien avulla. Dioksygenaasi liittyy happimolekyyliin molemmat atomit alkaaniin, jolloin muodostuu hydroksiperoksidi

(kaava 2). Hydroksiperoksidi pelkistyy NADPH₂:n luovuttaessa vetyatominsa, jolloin muodostuu vettä ja alkoholi (kaava 3). Alkoholi hapettuu edelleen aldehydiksi ja rasvahapoksi kuten toisessakin reaktiomekanismissa. Rasvahappo muuntuu energiaksi β-oksidaatiossa (Atlas ja Bartha 1998, Maier ym. 2000). Kuvassa 2 on esitetty alkaanien aerobinen hajoaminen rasvahapoksi ja β-oksidaatio, joka alkaa koentsyymi-A:n liittämällä rasvahappoon.

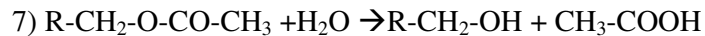
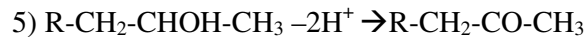
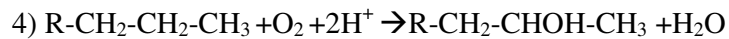




Kuva 2. Alkaanien aerobinen hajoaminen ja β -oksidatio (mukaillen Bouwer ja Zehnder 1993).

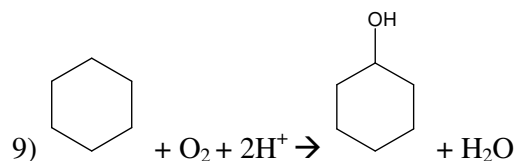
Hiilivetyjen mineralisaation lopputuotteet ovat siis vesi ja hiilidioksidi. β -oksidatio ei vaadi happea, joten rasvahapon hajotus voi tapahtua ensimmäisen hapetusreaktion jälkeen myös anaerobisissa olosuhteissa. Jotkut mikrobit hajottavat alkaaneja lisäämällä happiatomin muualle kuin hiilivetyketjun päähän. Näin muodostuu ensin sekundäärialkoholi (kaava 4), joka hapettuu ketoniksi (kaava 5) ja lopulta esteriksi

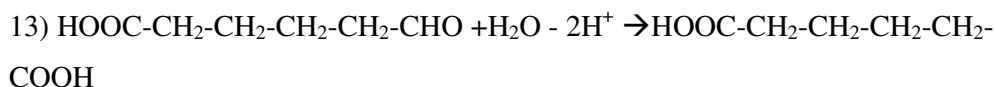
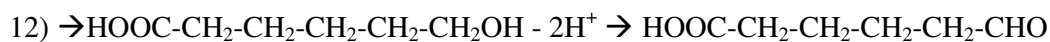
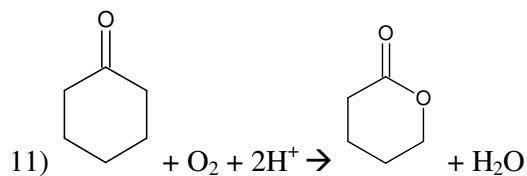
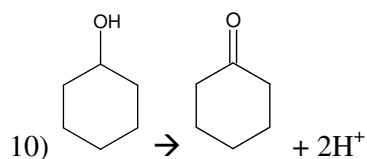
(kaava 6). Esterisidos purkautuu, jolloin muodostuu primäärialkoholi ja rasvahappo, joiden hiiliatomien yhteenlaskettu määrä on sama kuin alkaanin (kaava 7). Alkoholit muuntuvat rasvahappoanalogueiksi (kaava 8) ja molemmat tuotteet käyvät läpi β -oksidointia (Atlas ja Bartha 1998).



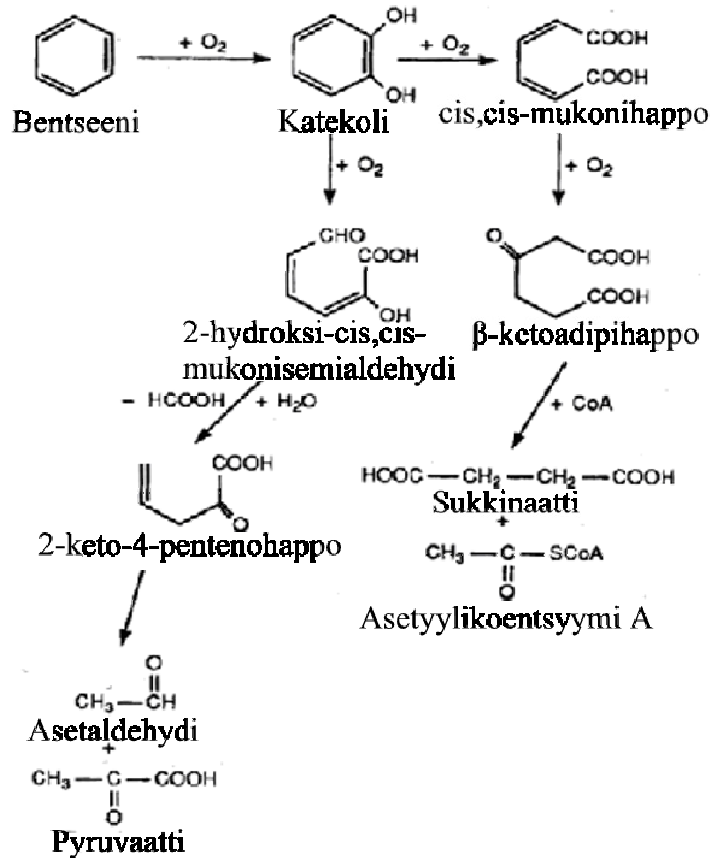
Alkeenit ja alkyynit hajoavat myös sekundäärialkoholin muodostumisen kautta edellä kuvatuilla tavalla, mutta kaksois- ja kolmoissidokset tekevät niistä reaktiivisempia ja siten ne voivat muuntua myös vaihtoehtoisilla tavoilla, kuten epoksidointia ja hydraation kautta (Atlas ja Bartha 1998, Maier ym. 2000).

Alisyklisissä hiilivedyissä on 5-8 hiilestä muodostunut rengasrakenne ja siksi niiden hajotus saattaa olla hitaampaa kuin alifaattisten hiilivetyjen. Hiiliketjujen haaroittuminen ja funktionaaliset ryhmät saattavat muuttaa hajotettavaa molekyyliä niin, että hajotusentsyymit eivät pääse molekyylin reaktiokohdan läheisyyteen, ja näin hajottaminen vaikeutuu (Maier ym. 2000). Alisyklisen hiilivedyn, esimerkiksi sykloheksaanin, hydroksylaatio mono-oksygenaasin avulla tuottaa alisyklisen alkoholin, sykloheksanolin (kaava 9), jonka dehydrogenaatio synnyttää sykloheksanoni-ketonin (kaava 10). Ketonin hapettuessa muodostuu kaprolaktoni (kaava 11). Laktonin hydroksyyli-ryhmä hapettuu ja laktonista muodostuu dikarboksyylihappo (kaavat 12 ja 13), joka edelleen hapettuu β -oksidointiossa. Usein mikrobit, jotka pystyvät muokkaamaan sykloheksaanista alkoholin ja edelleen ketonin, eivät pysty muodostamaan laktonia eivätkä avaamaan rengasrakennetta, ja toiset mikrobit eivät kykene muuntamaan sykloheksaania alkoholiksi. Näin ollen sykloheksaanin kuten muidenkin alisyklisen hiilivetyjen biohajotamisessa kometaabolialla on tärkeä rooli (Atlas ja Bartha 1998).





Dioksygenaasientsyymi hapettaa aromaattisen renkaan hapellisissa olosuhteissa epästabiiliksi *cis,cis*-dihydrodioliksi, joka muuntuu spontaanisti katekoliksi. Katekoli hapetetaan edelleen *cis,cis*-mukonihapoksi (*orto*-asema) tai 2-hydroksi-*cis,cis*-mukonisemialdehydiksi (*meta*-asema). Muodostuva rakenne riippuu siitä, liittyvätkö happiatomit meta- vai orto-asemaan molekyylin rengasrakenteessa. Mukonihapon rengasrakenteeseen liitetään happiatomi, jolloin muodostuu β-ketoadipihappo, joka hajoaa asetyylikoentsyymi A:ksi ja sukinaatiksi, jotka voidaan sitruunahapposyklissä muuntaa energiaksi. Mukonisemialdehydiin lisätään vettä, jolloin muodostuu rasvahappo, joka edelleen muuntuu asetaldehydiksi ja pyruvaatiksi. Yksinkertaistettu metaboliareitti on esitetty kuvassa 3. Eukaryootit hapettavat aromaattiset hiilivedyt *trans*-dioleiksi toisin kuin prokaryootit (Atlas ja Bartha 1998).



Kuva 3. Aromaattisten hiilivetyjen hajoamisreitit prokaryooteissa aerobisissa olosuhteissa (mukailien Atlas ja Bartha 1998).

2.2.2 Aerobiset hajottajat

Hiilivetyjen hajotuskyky hapellisissa olosuhteissa on laajalle levinnyt ominaisuus mikrobien keskuudessa. Yli sadan eri mikrobilajin on todettu kykenevän hiilivetyjen hajotukseen (Atlas 1992) ja ainakin 28 bakteerisuvun jäsenen on havaittu hajottavan hiilivetyjä (Rosenberg 1992). Hajottajasukuihin kuuluu sekä gram-positiivisia että -negatiivisia bakteereita. Gram-negatiivisista bakteereista öljyhiilivetyjen hajottajina toimivat pääasiallisesti β - ja γ -proteobakteerit, sphingobakteerit ja flavobakteerit. Gram-positiiviset öljyhiilivetyjen hajottajat kuuluvat useimmiten basilluksiin ja laktobasilluksiin sekä aktinobakteereihin.

Taulukko 1. Esimerkkejä mikrobeista, joiden on todettu hajottavan hiilivetyjä hapellisissa olosuhteissa ja niiden luokittelu nykytaksonomian mukaan (mukaillen Rosenberg 1992).

Hiilivetyjen hajottajasukuja	Ryhmä
<i>Achromobacter</i> ->nyk. <i>Alcaligenes</i>	β -proteobakteerit
<i>Acinetobacter</i>	γ -proteobakteerit
<i>Actinomyces</i>	aktinobakteerit
<i>Aeromonas</i>	γ -proteobakteerit
<i>Alcaligenes</i>	β -proteobakteerit
<i>Arthrobacter</i>	aktinobakteerit
<i>Bacillus</i>	basillukset ja laktobasillukset
<i>Beneckeia</i> ->nyk. <i>Vibrio</i> tai <i>Listonella</i>	γ -proteobakteerit
<i>Brevibacterium</i>	aktinobakteerit
<i>Corynebacterium</i>	aktinobakteerit
<i>Cytophaga</i>	sphingobakteerit
<i>Erwinia</i>	γ -proteobakteerit
<i>Flavobacterium</i>	flavobakteerit
<i>Klebsiella</i>	γ -proteobakteerit
<i>Lactobacillus</i>	basillukset ja laktobasillukset
<i>Leucothrix</i>	γ -proteobakteerit
<i>Micrococcus</i>	aktinobakteerit
<i>Moraxella</i>	γ -proteobakteerit
<i>Mycobacterium</i>	aktinobakteerit
<i>Nocardia</i>	aktinobakteerit
<i>Peptococcus</i>	klostridit ja sukulaiset
<i>Pseudomonas</i>	γ -proteobakteerit
<i>Rhodococcus</i>	aktinobakteerit
<i>Sarcina</i>	klostridit ja sukulaiset
<i>Serratia</i>	γ -proteobakteerit
<i>Sphaerotilus</i>	β -proteobakteerit
<i>Spirillum</i>	β -proteobakteerit
<i>Vibrio</i>	γ -proteobakteerit
<i>Xanthomonas</i>	γ -proteobakteerit

2.3 Anaerobinen hajoaminen

Mikrobien hapettomissa olosuhteissa hyödyntämiä hiilivetyjä on tutkittu huomattavasti vähemmän aikaa kun hiilivetyjen aerobista hyödyntämistä (Spormann ja Widdel 2000).

Maaperä muuttuu vähitellen anaerobiseksi, kun hapen kulutus on jatkuvasti suurempaa kuin hapen diffuusio ympäristöön. Anaerobisessa hajoamisessa terminaalisenä elektroninvastaanottajana toimii jokin muu yhdiste kuin happi (Maier ym. 2000). Hiilivetyjen on todettu hajoavan mikrobiologisesti nitraatin (Chayabutra ja Ju 2000, Wilkes ym. 2000), sulfaatin (Coates ym. 2002, Kropp ym. 2000) ja hiilidioksidin (Anderson ja Lovley 2000, Zengler ym. 1999) ollessa lopullinen elektroniakseptori. Hapella on suuri hapetuskyky kun taas nitraatti, mangaani, rauta,

sulfaatti ja hiilidioksidi ovat toinen toistaan heikompia hapettajia. Näin ollen niistä saadaan elektroninsiirtoketjussa vähemmän energiaa (Bouwer 1992).

2.3.1 Anaerobiset hajoamisreitit

Alifaattiset ja aromaattiset hiilivedyt voivat hajota myös hapettomassa ympäristössä. Hiilivetyjen anaerobisista hajoamismekanismeista on vielä melko vähän tietoa, mutta jatkuvasti saadaan eristettyä lisää uusia hiilivetyjen hajottajakantoja. Näiden avulla hapettomissa olosuhteissa tapahtuvaan hiilivetymetaboliaan voidaan tutustua ja saada tietoa hiilivetyjen hajoamisen biokemiasta.

Alkaanien on todettu hajoavan denitrifioivan bakteerin toimesta anaerobisissa olosuhteissa. Wilkes ym. (2003) esittivät *n*-alkaanien anaerobiseksi hajoamisreitiksi radikaalireaktiolla käynnistyvän reaktiosarjan, jossa fumaraatti, yksi sitruunahappokierron yleinen välituote, liitetään hiiliketjun 2-hiileen. Muodostunut molekyyli, (1-metyylialkyyli)sukkinaatti aktivoidaan koentsyymi A:n avulla. Hiiliketjun rungossa tapahtuu uudelleenjärjestäytymistä, jonka jälkeen hiiliketju päättyy hajotettavaksi β -oksidaatiossa. Kropp ym. (2000) havaitsivat fumaraatin lisäyksen toimivan alkaanien hajotuksessa sulfaatinpelkistysolosuhteissa. Kropp ym. (2000) arvelivat jo tällöin mekanismin toimivan laajasti myös muiden hiilivetyjen anaerobisessa hajoamisessa.

Hiilivetyjen hajoaminen metaaniksi tapahtuu vasta kun hiilidioksidia energeettisesti paremmat elektroniakseptorit on käytetty ympäristöstä. Zengler ym. (1999) todistivat alkaanien hajoavan bakteerien ja arkkien yhteistoiminnan ansioista. Asetogeeniset bakteerit hapettivat heksadekaanin ($C_{16}H_{34}$) vedestä saatavan hapen avulla asetaatiksi ja vedyksi. Eräs arkkiryhmä hajotti asetaatin metaaniksi ja hiilidioksidiksi ja toinen arkkiryhmä muunsi vedystä ja hiilidioksidista metaania ja vettä. Nettoreaktiossa heksadekaanista ja vedestä saatiin metaania ja hiilidioksidia.

Alkeenien ja alkyynien anaerobisen hajoamisen mekanismiksi on ehdotettu kaksoissidoksen hydraatiota, jolloin muodostuu ensin alkoholi, sitten aldehydi ja lopulta rasvahappo (Maier ym. 2000).

Rios-Hernandes ym. (2003) tutkivat alisyklisten hiilivetyjen hajoamista sulfaatinpelkistysolosuhteissa etyyliisyklopentaani mallimolekyylinään. Tutkimuksessa havaittiin etyyliisyklopentaanin hajoavan fumaraatin lisäyksen avulla. Fumaraatti liittyy etyyliisyklopentaaniin, molekyylistä lohkeaa asetaattia ja hiilidioksidia ja siihen muodostuu kaksoissidos. Näin se voidaan hapettaa alkoholiksi ja edelleen ketoniksi.

Ketonimuotoinen rengasrakenne hajoaa ja muodostuu β -etyyliapidihappo, joka voidaan hajottaa edelleen β -oksidaatiossa.

Aromaattisten hiilivetyjen hajoaminen anaerobisissa olosuhteissa tapahtuu hydroksyloimalla bentseenirengas. Reaktioon tarvittava happi saadaan vesimolekyylistä (Atlas ja Bartha 1998). Bentseenin on todettu hajoavan raudan, sulfaatin ja nitraatin ollessa elektroninvastaanottajana sekä metanogeenisissä olosuhteissa, kuten Lovley (2000) selvittää. Coates ym. (2002) esittelivät viisi mahdollista mekanismia bentseenin hajotukseen anaerobisissa olosuhteissa. (I) Bentseenin hydroksylaatioissa lisätään rengasrakenteeseen happea, jolloin muodostuu fenoli. Fenolista muotoutuu lopulta bentsoaatti, kuten muissakin Coatesin ym. (2002) esittelemissä reiteissä. (II) Bentseenin karboksylaatioissa hiilidioksidin lisäys tuottaa bentsoaatin. (III) Myös fumaraatin lisäys voi olla yksi bentseenin aktivointitapa. (IV) Bentseeni voidaan pelkistää kemiallisesti, mutta biologista elektroninluovuttajaa ei tälle reaktiolle tiedetä. (V) Bentseeni voi substituutioreaktion kautta metyloitua tolueeniksi metyyliryhmän liittyessä rengasrakenteeseen. Metyyliryhmän voi reaktioon luovuttaa esimerkiksi metyylitetrahydrofolaatti.

Denitrifioivien bakteerien on todettu hajottavan tolueenia aiemmin kuvatun mekanismin, fumaraatin lisäyksen, avulla (Heider ym. 1999).

2.3.2 Anaerobiset hajottajat

Anaerobiset hiilivetyjen hajottajat ovat usein β -proteobakteereita kuten nitraatinpelkistäjäbakteerit (Wilkes ym. 2002), tai δ -proteobakteereita kuten sulfaatin ja raudan pelkistyksestä energiansa saavat bakteerit (Aeckersberg ym. 1998, Coates 2002). Metanogeenisissä olosuhteissa hiilivetyjen on todettu hajoavan syntrofiametabolian avulla δ -proteobakteereihin kuuluvan *Syntrophus*-bakteerisuvun jäsenten ja metanogeenisten arkkien vuorovaikutuksen tuloksena (Zengler ym. 1999). Anaerobiseen hajotukseen pystyviä mikrobeja on esitelty taulukossa 2.

Taulukko 2. Esimerkkejä mikrobeista, joiden on todettu hajottavan erilaisia hiilivetyjä hapettomissa olosuhteissa.

Hiilivetymuoto	Hajotusolosuhteet, elektroniakseptori	Esimerkkejä hajottajaorganismeista	Viitteet	Luokka
<u>Alifaattiset hiilivedyt</u>				
Alkaanit	denitrifikaatio, NO ₃ ⁻	<i>Azoarcus</i> -tyyppinen kanta	Wilkes ym. 2002	β-proteobakteerit
	sulfaatin pelkistys, SO ₄ ²⁻	Sulfaatinpelkistäjäbakteeri Hxd3-kanta	Aeckersberg ym. 1991, 1998	δ-proteobakteerit
	metanogeneesi, CO ₂	<i>Syntrophus sp.</i> , <i>Methanosaeta sp.</i> , <i>Methanospirillum sp.</i>	Zengler ym. 1999	δ-proteobakteerit ja arkit
Alkeenit	sulfaatin pelkistys, SO ₄ ²⁻	Sulfaatinpelkistäjäbakteerikannat Hxd3 ja Pnd3	Aeckersberg ym. 1998	δ-proteobakteerit
Alkyynit	asetyleenin fermentaatio	<i>Pelobacter acetylenicus</i>	Spormann ja Widdel 2000	δ-proteobakteerit
Alisykliset hiilivedyt	sulfaatin pelkistys, SO ₄ ²⁻	<i>Desulfotomaculum sp.</i> , <i>Syntrophobacter sp.</i>	Rios-Hernandes ym. 2003	Firmikuutit, δ-proteobakteerit
<u>Aromaattiset ja polyaromaattiset hiilivedyt</u>				
Bentseeni	raudan pelkistys, Fe(III)	<i>Geobacter sp.</i>	Coates ym. 2002	δ-proteobakteerit
	sulfaatin pelkistys, SO ₄ ²⁻	<i>Desulfobacula toluicia</i> , <i>Dechloromonas sp.</i>	Coates ym. 2002	δ-proteobakteerit
Tolueeni	denitrifikaatio, NO ₃ ⁻	<i>Thauera aromatica</i> , <i>Azoarcus sp.</i>	Heider ym. 1999	β-proteobakteerit
	raudan pelkistys, Fe(III)	<i>Geobacter metallireductans</i>	Heider ym. 1999	δ-proteobakteerit
	sulfaatin pelkistys, SO ₄ ²⁻	<i>Desulfobacula toluolica</i>	Heider ym. 1999	δ-proteobakteerit
	metanogeneesi, CO ₂	Anaerobiset bakteerit ja metanogeeniset arkit	Heider ym. 1999	δ-proteobakteerit ja arkit

Naftaleeni	valo energianlähteenä denitrifikaatio, NO_3^-	<i>Blastochloris sulfovirdis</i> <i>Vibrio sp.</i> NAP-4 <i>Pseudomonas sp.</i> NAP-3	Spormann ja Widdel 2000 Rockne ym. 2000	α -proteobakteerit γ -proteobakteerit
------------	---	---	--	--

3. Bioremediaatio saastuneiden alueiden puhdistuskeinona

3.1 Yleistä bioremediaatiosta

Saastuneen ympäristön biologista kunnostusta kutsutaan bioremediaatioksi. Watanabe (2001) määrittelee bioremediaation teknologiaksi, joka hyödyntää mikrobien metaboliaa saastuneiden ympäristöjen puhdistamisessa. Bioremediaation tavoitteena on mikrobien kasvun lisääminen ja suoran kontaktin tarjoaminen mikrobien ja haitta-aineiden välille biotransformaatioiden aikaansaamiseksi. Mikrobien kannalta kemiallisten yhdisteiden biotransformaation tarkoituksena on lisätä mikrobipopulaatioiden kokoa ja biomassaa (Bouwer 1992). Bioremediaation avulla voidaan muuntaa haitta-aineet epäorgaanisiksi molekyyleiksi, jotka ovat haitattomia ympäristölle ja ihmiselle. Bioremediaatiossa käytetään elävien organismien metabolisia ominaisuuksia vierasaineiden hajottamiseen ympäristössä. Mikrobien lisäksi bioremediaatiossa voidaan hyödyntää kasveja. Kasvit voivat ottaa sisään vierasaineita tai elättää hajottajamikrobeja ritsosfäärissään. Maaperän kunnostusta kasvien avulla kutsutaan fytoimediaatioksi. Bioremediaation tuloksena on biohajoaminen, jossa kemialliset yhdisteet joko muuntuvat toisiksi tai mineralisoituvat täydellisesti epäorgaanisiksi molekyyleiksi ja elävien organismien biomassaksi (Jørgensen 2002).

Mikrobitoimintaa, joka sopivissa olosuhteissa, ilman ihmisen tekemiä aktiivisia toimenpiteitä, vähentää saasteiden haitallisuutta tai myrkyllisyyttä, massaa ja liikkuvuutta ilman ihmisen toimintaa kutsutaan luonnolliseksi biohajoamiseksi (Röling ja van Verseveld, 2002).

Bioremediaatio on huokea puhdistuskeino, mutta sen tuloksia on vaikea ennustaa, koska mikrobipopulaatioiden käyttäytymisestä luonnollisessa ympäristössään on suhteellisen vähän tietoa (Head 1998). Molekyylibiologiset menetelmät ovat kuitenkin paljastaneet mikrobipopulaatioiden moninaisuuden, jotka saastuneissa ympäristöissä voivat toimia bioremediaatioprosesseissa (Watanabe 2001).

Bioremediaatiossa lähestytään ongelmaa biologisesta näkökulmasta. Toinen tapa on hyödyntää maaperän tai muun ympäristön kunnostamiseen fysikaalis-kemiallisia menetelmiä. Maaperän kunnostuksessa käytettyjä fysikaalisia ja kemiallisia kunnostusmenetelmiä ovat kemikaalien leviämisen estäminen maan eristämisen avulla, terminen käsittely eli maaperän poltto korkeassa lämpötilassa ja maaperän pesu korkean paineen ja pinta-aktiivisten aineiden avulla. Lisäksi erityisesti raskasmetalleilla saastuneiden maiden kunnostamisessa käytetään kiinteytystä eli

sitomista (Jørgensen 2002). Fysikaalisissa kunnostusmenetelmissä saastunut maa siirretään usein täyttömaaksi, jolloin haitta-aineet eivät hajoa vaan siirtyvät vain toiseen paikkaan. Maan peseminen tai haitallisten aineiden uuttaminen maasta johtaa samaan tulokseen, saasteiden väkevöitymiseen toiseen paikkaan. Fysikaalisilla kunnostusmenetelmillä saastunut ympäristö saadaan kuitenkin nopeasti puhdistettua.

3.2 Bioremediaation eri muodot

Maaperän kunnostuksessa voidaan käyttää monia erilaisia tapoja. Usein puhdistusmenetelmät jaetaan *ex situ*-, *in situ*- ja on site-menetelmiin. *In situ* -kunnostusmenetelmää käytettäessä puhdistettavaa maamassaa ei siirretä vaan veden ja ilman liikkumista ohjailaan maaperässä. Paikan päällä tapahtuvassa (on site-) bioremediaatiossa puhdistettavaa ainesta ei kuljeteta pilaantuneelta alueelta muualle kunnostettavaksi, vaan esimerkiksi pilaantunut pohjavesi, pumpataan maanpinnalla olevaan bioreaktoriin, jossa puhdistuminen tapahtuu. Tällaista toimintaa kutsutaan pump-and-treat -menetelmäksi. *Ex situ* -kunnostusmenetelmissä saastunut maa-aines siirretään kunnostusta varten esimerkiksi aumoihin, kompostoreihin tai bioreaktoreihin (Jørgensen 2002). Kustannukset ovat usein korkeammat *ex situ* -menetelmissä, johtuen saastuneen maan kuljetuksesta, puhdistusvälineiden hankinnasta ja tarvittavasta energiasta ja työvoimasta (Alexander 1999).

3.2.1 *Ex situ* -bioremediaatio

Ex situ -menetelmässä kunnostettava maa siirretään saastuneelta paikalta käsiteltäväksi muualle. Saastunutta maa-ainesta voidaan käsitellä esimerkiksi aumoissa, joita voidaan ilmastaa ja joihin voidaan lisätä ravinteita. Aumoihin siirrettyyn maa-ainekseen lisätään yleensä tukiainetta kuten olkia tai kuoriketta ravinteiden lisäksi, ja aumoja voidaan myös ilmastaa esimerkiksi kääntelemällä maata mekaanisesti. Maa-aines voidaan *ex situ* -menetelmässä käsitellä myös bioreaktorissa, johon lisätään vettä lietteen aikaansaamiseksi. (Jørgensen 2002). Bioreaktoreissa ja kompostoreissa hapen ja ravinteiden määrää ja pH:ta voidaan monitoroida ja säädellä tarkasti (Alexander 1999).

Kaikissa *ex situ* -menetelmissä voidaan lisätä mikrobiymppi puhdistettavaan maa-ainekseen. Ympin lisäystä kunnostettavaan maa-ainekseen kutsutaan bioaugmentaatioksi. Mikrobiymppi voi olla puhdas- tai sekaviljelmä. Ymppi lisätään usein, kun halutaan haitta-aineen hajoavan nopeasti. Maan ymppeä voi nopeuttaa haitta-aineen hajotukseen tarvittavaa mukautumisaikaa. Ymppejä voidaan tarvita

myös tilanteissa, joissa ympäristön kotoperäinen mikrobiyhteisö ei toimi kunnolla esimerkiksi jonkun stressitilanteen takia. Inokuloinnilla ei aina päästä toivottuun tulokseen, koska ympin mikrobit eivät ole tottuneet ympäristön vaihtelevuuteen esimerkiksi pH:n, lämpötilan, ravinteiden saannin ja mikrobien välisten vuorovaikutusten osalta. Lisäksi ympin tasainen sekoitus maahan on ongelmallista. Ymppejä käytetään usein bioreaktoreissa tai muissa järjestelmissä, joissa eri olosuhteita voidaan säädellä helpommin kuin kentällä (Alexander 1999).

Ensimmäisiä suuressa mittakaavassa tehtyjä saastuneiden maiden puhdistuksia Suomessa oli kloorifenoleilla saastuneen maan bioremediaatio. Tässä tutkimuksessa havaittiin kloorifenoleiden hajoavan jopa 80-prosenttisesti neljässä kuukaudessa, kun kentälle pystyttiin luomaan kloorifenoleja hajottavan mikrobiston kasvulle suotuisat olosuhteet (Valo ja Salkinoja-Salonen 1986). Öljyhiilivedyillä saastunutta maata on Suomessa onnistuneesti kunnostettu kompostiaumoissa (Jørgensen ym. 2000).

3.2.2 *In situ*- ja on site-bioremediaatio

In situ -bioremediaatiossa kunnostettavaa maa-ainesta ei siirretä pois paikaltaan vaan maan ilman ja veden kiertoa säädellään. Lisäksi maahan voidaan lisätä ravinteita tai mikrobiymppeä. Tarkoituksena on luoda maaperään vyöhyke, jossa haitta-aineita hajottavat eliöt menestyvät. Pohjaveden yläpuolella olevaan maaperään voidaan injektoida ilmaa, jolloin aerobiset mikrobit voivat menestyä maaperässä. Menetelmää käytetään usein hiilivedyillä saastuneiden maiden kunnostamiseen (Alexander 1999). Myös pohjavettä ja sen alapuolista maata voidaan ilmastaa (Alexander 1999).

Pohjaveden kunnostamiseen käytetään myös on site -tapahtuvaa bioremediaatiota. Pohjavettä pumpataan maan pinnalle, jossa toimii bioreaktori. Veteen lisätään ravinteita ja paineistettua ilmaa tai esimerkiksi vetyperoksidia, josta vapautuu happea pumpattaessa vesi takaisin maaperään. Vesi joko injektoidaan tai imeytetään takaisin maaperään, ja sen mukana ravinteet ja happi kulkeutuvat haitta-aineita hajottavien eliöiden käyttöön (Alexander 1999). Suomessa on puhdistettu kloorifenoleilla pilaantunutta pohjavettä suuressa mittakaavassa kenttäolosuhteissa. Onnistuneiden laboratoriokokeiden kannustamana on Kärkölään rakennettu maanpäällinen puhdistin, joka on ollut toiminnassa useita vuosia. Järjestelmässä kloorifenoleja hajottaa kylmää sietävä, monimuotoinen mikrobiyhteisö (Järvinen ym. 1994, Puhakka ym. 2000).

3.2.2.1 Exxon Valdezin tapaus

Maaliskuussa vuonna 1989 ajoi karille Alaskan rannikolla suuri öljytankkeri *Exxon Valdez*. Tankkerista pääsi ympäristöön 37 000 tonnia raakaöljyä, joka saastutti noin 2000 kilometriä Alaskan rantaviivaa. Öljyn mekaaninen poisto keräämällä olisi ollut työlästä ja pesumenetelmät kalliita ja aikaa vieviä (Bragg ym. 1994, Mattila 2002, suullinen tiedonanto). Öljyn poistoon käytettiinkin laajasti on site-bioremediaatiota. Tarkoituksena oli kiihdyttää öljyn luontaista hajoamista ravinteiden lisäämisellä ja lieventää näin öljyn ekologisia vaikutuksia alueen eliöyhteisöihin. USEPA:n (United States Environmental Protection Agency) kenttäkokeissa lannoitetut alueet olivat silmin nähden puhtaampia öljyjäämistä kuin käsittelemättömät alueet. *Exxon Valdezin* öljy sisälsi hopaania, monirenkaista tyydyttynyttä hiilivetyä (Bragg ym. 1994). Tutkimuksessa havaittiin, että *Exxon Valdezin* öljyn hopaani ei hajonnut biologisesti, joten sitä käytettiin verrokkina tutkittaessa muiden hiilivetyjen hajoamista. Bragg ym. (1994) tutkivat lannoitteiden vaikutusta bioremediaatioon ja öljyn hajoamiseen erilaisilla näytealoilla. Bioremediaatiota tehostettiin lisäämällä kahta erilaista lannoitetta, joissa oli typpeä ja fosforia. Toinen lannoite oli nestemäistä, öljyfilmiin tarttuvaa ja toinen rakeista, hitaasti vapautuvaa (Bragg ym 1994). Yhteensä yli 110 km rantaviivaa käsiteltiin lannoitteilla luontaisen mikrobipopulaation stimuloimiseksi (Leber 2003). Biohajoavuuteen vaikutti enimmäkseen typen pitoisuus rantaviivassa ja öljyn määrä. Hiilivetyjen hajoamista mitattiin kaasukromatografian avulla ja näytealoilta viljeltiin heterotrofiset mikrobit, joiden joukosta löytyi useita hiilivetyjen hajottajiksi tiedettyjä organismeja. Tutkimuksessa todettiin ravinteiden lisäyksen kiihdyttävän öljyn hajoamista jopa yli viisinkertaisesti. Huomattiin myös, että öljyn biohajoamisen nopeus riippuu typen pitoisuuksista rannan sedimentin huokosvedessä. Tutkimuksessa tultiin siihen tulokseen, että öljyvahingon sattuessa Alaskan kaltaisilla alueilla, bioremediaatio on tärkeä menetelmä rantojen kunnostamisessa (Bragg ym. 1994).

3.2.3 Haitta-aineiden luontainen biohajoaminen

Maaperään joutuneet tietyt synteettiset yhdisteet häviävät ajan kuluessa mikrobitoiminnan ansiosta. Luontaisessa hajoamisessa maan mikro-organismit käyttävät maaperään joutuneita haitta-aineita hiilen- ja energianlähteinä. Ihmisen kannalta tavoitteena on haitta-aineiden muuntuminen haitattomampaan muotoon, mutta joskus mikrobit muuntavat haitta-aineen itselleen sopivampaan muotoon, jolloin se muuttuu ihmiselle vielä haitallisemmaksi. Erilaisten raskasmetallien metylointi

tekee niistä mikrobeille haitattomia, mutta ihmiselle ne muuttuvat erittäin myrkyllisiksi. Esimerkiksi metyylielohopea on voimakas hermomyrky (Atlas ja Bartha 1998).

Luontaisen biohajoamisen esiintymisen ja haitta-aineiden hajoamisnopeuden lisäksi olisi tärkeää tietää, pystytäänkö saasteiden leviäminen estämään tai haitta-ainepitoisuutta alentamaan pelkän luontaisen biohajoamisen avulla tietyn ajan kuluessa (Röling ja van Verseveld 2002). Tärkeää on myös havaita anaerobisten vyöhykkeiden muodostuminen maahan sekä tutkia hapettomissa olosuhteissa öljyhiilivetyjen hajotukseen kykeneviä mikro-organismeja ja niiden yhteisöjä. Luontaisessa biohajoamisessa anaerobiseen elämään sopeutuneilla mikrobeilla on mahdollisesti suuri merkitys.

Luontaista hajoamista monitoroidaan esimerkiksi seuraamalla maan kaasukoostumusta ja happitilannetta, määrittämällä maaperässä olevien haittayhdisteiden pitoisuuksia ja tutkimalla mikrobistoa, joka on saastuneelle alueelle muodostunut.

4. Maaperämikrobiologiassa sovellettavista molekyylibiologisista menetelmistä

Maan mikrobipopulaatiot koostuvat yksilöistä, jotka kuuluvat elämän kolmeen päähaaraan eli domeeniin: bakteereihin, arkkeihin ja eukaryooteihin. Mikrobiyhteisöihin vaikuttavat monet jo edellä mainitut fysikaaliset, kemialliset ja biologiset tekijät. Siksi tutkittavasta kohteesta otetut maanäytteet ovat aina erilaisia mikrobikoostumukseltaan. Tutkittaessa maan mikrobiyhteisöjä voidaan tutkia joko mikrobien monimuotoisuutta tai yhteisön rakennetta. Monimuotoisuudella tässä tarkoitetaan tietyn eliön tai DNA-sekvenssityypin lukumäärää ympäristössä. Yhteisörakenteen määrittelyyn käytetään laskennallista (kvantitatiivista) tietoa tiettyyn taksoniin tai fysiologiseen ryhmään kuuluvista yksilöistä (Liesack ym. 1997). Molekyylibiologian menetelmät ovat olleet ekologian ja diversiteetin tutkimuksessa käytössä 1980-luvun puolesta välistä asti (Head ym. 1998). Myös mikrobiökologian tutkimus on nykyään painottunut molekyylibiologisiin analyysiin luontaisten yhteisöjen kuvailemisen yksinomaan viljelyn kautta osoittaututtua ongelmalliseksi. Yhteisöistä ei viljelymenetelmillä voida saada oikeaa kokonaiskuvaa, koska kaikkia mikrobeja ei pystytä viljelemään (Amann ym. 1995, Pace 1997). Erityisesti

anaerobisten mikrobien edustus yhteisöissä saadaan esille paremmin molekyylibiologisin menetelmin.

Useimmiten yhteisöjä tutkittaessa molekyylibiologisten analyysien työkaluna toimii ribosomien pienen alayksikön rRNA:n geeni eli SSU 16S rDNA (small subunit 16S ribosomal RNA gene). Ribosomien pienen alayksikön rRNA-geeni on olemassa kaikissa tunnetuissa solullisissa organismeissa ja sen evoluutio on melko hidasta sekä konservoituneilla että vaihtelevilla alueilla sekvenssiä (Engebretson ja Moyer 2003). Vaihtelevia alueita on siellä täällä konservoituneiden sekvenssialueiden keskellä. Ribosomaalisen RNA:n geenistä voidaan tunnistaa universaaleja sekvenssialueita sekä domeeni-, kaari-, alakaari-, laji- ja jopa alalajispesifisiä sekvenssialueita, joita voidaan käyttää eliöiden sukulaisuussuhteiden tunnistamiseen ja sukupuiden muodostamiseen (Head ym. 1998).

4.1 Kokonais-DNA:n eristys mikrobiyhteisön tutkimisessa

Maaperän kokonais-DNA:n eristämiseen voidaan soveltaa kahta eri lähestymistapaa. DNA voidaan eristää joko erottamalla eliöstö maahiukkasista esimerkiksi sentrifugoimalla ja niiden hajotuksella tai hajottamalla solut niiden ollessa vielä kiinnittyneenä maapartikkeleihin ja eristämällä DNA suoraan maanäytteestä (Liesack ym. 1997, Maier ym. 2000).

Solujen erottelu maamassasta voidaan tehdä mekaanisesti tai kemiallisesti. Mekaanisiin menetelmiin kuuluvat sekoitus eli homogenisointi, ravistelu ja ultraäänikäsittely. Mekaanisten menetelmien huonona puolena pidetään sitä, että herkät solut voivat liian voimakkaassa käsittelyssä hajota. Kemialliset menetelmät ovat sen sijaan hellävaraisempia soluja kohtaan. Kelatoivien aineiden lisääminen maainekseen saa aikaan savipartikkeleiden pinnalla polyvalenttien kationien vaihdon monovalentteihin kationeihin, jolloin mikrobisolujen ja maapartikkeleiden välinen vetovoima vähenee. Myös erilaisia ioninvaihtohartseja voidaan käyttää samaan tarkoitukseen. Hartsien rinnalla käytetään usein pinta-aktiivisia aineita, jotta erilaisilla polymeereillä ja lima-aineilla maapartikkeleihin kiinnittyneet mikrobit saadaan irrotettua (Wellington ym. 1997). Solujen eristys on työläs ja aikaa vievä menetelmä, mutta sen avulla saadaan erotettua esimerkiksi elävät (tai ehjät) bakteerisolut muusta biomassasta. Mikrobit kuitenkin eroavat toisistaan esimerkiksi savipartikkeleihin kiinnittymisessä, jolloin tiukemmin kiinni olevia mikrobeja ei saada yhtä paljon kerättyä kuin helposti irti lähteviä mikrobeja (Maier ym. 2000). Soluerottelumenetelmä soveltuu bakteerien ja muiden yksisoluisien eliöiden DNA:n

eristykseen, mutta rihmamaisten sienien ja aktinobakteerien erottaminen on vaikeampaa (Wellington ym. 1997).

DNA voidaan irrottaa mikrobeista vielä niiden ollessa kiinni maahiukkasissa. Bakteerisolut hajotetaan esimerkiksi kemikaaleilla tai fysikaalisilla menetelmillä, kuten jäädytys-sulatus-sykleillä, ultraäänikäsittelyllä tai lasihelmihomogenisoinnilla (bead beating). Solujen hajotuksessa käytetään usein pinta-aktiivisia aineita kuten natriumdodekyylisulfaattia (SDS) tai entsyymejä kuten lysotsyymiä tai proteinaasia (Liesack ym. 1997, Maier ym. 2000). Sentrifugoinnilla erotellaan maa-aines ja solujen hajoamisjätteet DNA:sta, joka saostetaan esimerkiksi etanolilla supernatantista (Maier ym. 2000). Solujen hajotus tulisi olla tarpeeksi voimakasta, jotta soluseinältään vahvat mikrobit hajoaisivat. Solujen liian voimakas hajotus voi pilkkoa DNA:ta. Gram-positiivisten solujen seinät ovat yleisesti ottaen vahvempia kuin gram-negatiivisten, joten vaarana on, että gram-negatiivisten solujen DNA pilkkoutuu (von Winzingerode ym 1997). Nykyään on saatavilla erilaisia kaupallisia DNA:n eristyspaketteja, joiden toiminta perustuu yleensä edellä mainittuihin menetelmiin tai niiden yhdistelmiin.

4.2 Polymeraasiketjureaktio eli PCR

PCR:n keksiminen vuonna 1985 on tuonut molekyylibiologiset menetelmät uudelle tasolle. Polymeraasiketjureaktion avulla voidaan monistaa DNA:ta miljoonakertaisesti. PCR on hyvin herkkä menetelmä, jonka avulla voidaan hyvin pienikin määrä DNA:ta havaita (Maier ym. 2000). PCR-menetelmät ovat herkkiä saastumiselle, koska monistamisteho on korkea. PCR-reaktioseos voi kontaminoitua ulkopuolelta tulevasta DNA:sta, jolloin alkuperäinen DNA-näyttemateriaali sekoittuu kontaminoivaan DNA:han ja monistetussa tuotteessa on sekaisin DNA-pätkiä, jotka ovat alkuperäisestä näytteestä ja pätkiä, jotka ovat monistuneet kontaminoivasta DNA:sta. Lisäksi PCR-pohjaisissa menetelmissä voi reaktioissa syntyä artefakteja, kuten kimeerisiä DNA-molekyylejä, deleetiomutantteja tai pistemutantteja (von Winzingerode ym. 1997).

Polymeraasiketjureaktioon tarvitaan kohdesekvenssi, aluke, polymeraasientsyymi ja vapaita nukleotidejä. Kohdesekvenssinä on yleensä eristetty DNA, josta halutaan lisätietoa. Alukkeita on normaalissa PCR-reaktiossa kaksi. Toinen aluke kiinnittyy kohde-DNA:han yksittäisjuosteen alkuun ja toinen toisen juosteen loppuun. Alukkeiden perään muodostuu uusi DNA-juoste vanhan juosteen rinnalle. Alukkeiden suunnittelussa otetaan huomioon kohdesekvenssi, jonka pohjalta PCR-alukkeet suunnitellaan. Haluttu alue voi olla myös konservoitunut, jolloin se löytyy monen eri

bakteerin perimästä samanlaisena. Jotkin konservoituneet sekvenssit ovat universaaleja, jotka löytyvät lähes samanlaisena kaikkien samaan pääkaareen kuuluvien organismien perimästä. Tällainen alue on esimerkiksi bakteerien 16S ribosomaalista RNA:ta koodaava geeni. Alukkeet ovat yleisesti 17-30 emäsparin pituisia ja niiden väliin jäävä alue voi vaihdella sadasta emäsparista jopa useisiin tuhansiin emäspareihin (Maier ym. 2003).

Ensimmäisissä PCR-kokeiluissa käytettiin polymeraasientsyyminä *Escherichia coli*n DNA-polymeraasia, jota jouduttiin kuitenkin lisäämään jokaisessa syklissä, koska se denaturoitui korkeassa lämpötilassa. Ongelma ratkesi, kun termofiilisen *Thermus aquaticus* -bakteerin korkeissa lämpötiloissa stabiili polymeraasi eristettiin. Tällä *Taq*-polymeraasilla ei kuitenkaan ole oikolukukykyä, ts. se ei tarkista polymeroimaansa sekvenssiä. Nykyisin on saatavilla kuumuutta kestäviä, oikolukevia polymeraasientsyymeitä, kuten *Pyrococcus furiosus* -arkista eristetty *Pfu*-polymeraasi (Madigan ym. 2003).

Lisäksi PCR-reaktioon tarvitaan vapaita nukleotidejä, joista polymeraasi rakentaa uusia juosteita. PCR-reaktiot tapahtuvat puskuriliuoksessa, jotta reaktion pH voidaan optimoida. Jotkin entsyymit vaativat toimiakseen tietyn magnesiumionipitoisuuden, jolloin reaktioon on lisättävä Mg^{2+} . PCR-reaktion tehokkuutta ja spesifisyyttä voidaan parantaa lisäämällä reaktioseokseen esimerkiksi asetamidia (Amann ym. 1995) tai formamidia. Naudan seerumin albumiinin, BSA:n (bovine serum albumin) lisäys vähentää reaktioseoksessa olevien mahdollisten inhiboivien aineiden vaikutusta (von Winzingerode ym. 1997). Eräs tyypillinen maanäytteistä peräisin oleva inhiboiva aineryhmä on humusyhdisteet.

Tyypillinen PCR on kolmiosainen. Ensimmäiseksi kohde-DNA:n kaksoisjuoste denaturoituu kahdeksi yksittäiseksi DNA-juosteeksi. Denaturaatio tapahtuu yleisesti 94 °C minuutista kahteen. Seuraavaksi lämpötila lasketaan 50–70 °C välille riippuen alukkeiden koostumuksesta. Tässä lämpötilassa alukkeet kiinnittyvät (engl. annealing) kohdesekvenssiin. Alukkeen perään DNA-polymeraasi muodostaa 72 °C lämpötilassa uuden juosteen kohdesekvenssin rinnalle. Näin alun perin kahdesta kohdesekvenssistä, yhdestä kaksijuosteisesta DNA:sta muodostuu kaksi kaksoisjuostetta, yhteensä siis neljä juostetta. Molemmissa uusissa kaksijuosteisissa DNA-rihmoissa on toinen juoste alkuperäistä DNA:ta ja toinen juoste on uusi, polymeraasientsyymillä kokoama sekvenssi. Tästä sykli voi alkaa uudelleen.

4.3 Kloonauksen apuvälineenä mikrobiyhteisön tutkimisessa

Kloonauksen periaatteena on siirtää tietty, haluttu osa jonkun organismin suuresta ja kompleksisesta perimästä toiseen, pienempään kokonaisuuteen. Tarkoituksena voi olla esimerkiksi erotella PCR-tuotteet toisistaan tai tutkia organismin koko perimää. Kloonauksessa DNA-materiaalin siirtämiseen käytetään vektoria. Kloonauksen jaetaan viiteen pääkohtaan: lähtö-DNA:n eristys ja pilkkominen, DNA-palan liittäminen kloonauksvektoriin, vektorin siirtäminen isäntäorganismiin ja sen ylläpito, kloonien tunnistus ja puhdistus ja halutun kloonin sisältävien solujen kasvatus kloonatun DNA:n eristystä ja tutkimista varten. Lähtö-DNA:na voi toimia esimerkiksi restriktioentsyymeillä pilkottu kokonaisgenomi, monistettu DNA PCR-tuotteena tai käänteistranskription avulla tuotettu DNA. DNA-fragmentit liitetään ligaasientsyymien avulla kloonauksvektoriin, joka voi olla plasmidi, bakteriofaagi tai jopa keinotekoinen kromosomi. Vektoriin liitetty tutkittava DNA-pala eli insertti, esimerkiksi geeni tai osa siitä, vietään isäntäeliön sisään (Madigan ym. 2003).

Jokaisessa plasmidissa on alue, joka säätelee replikaatiota. Tätä kutsutaan replikaatio-origoksi. Plasmidit, joissa on sama replikaatio-origo, ovat inkompatibeileita, eli ne eivät voi olla samassa solussa yhtä aikaa. Kompatibeileissa plasmideissa on eri replikaatio-origot, jolloin ne molemmat voivat toimia solun sisällä (Olson ja Tsai 1992). Plasmidivektoreissa on sama replikaatio-origo, eli ne ovat keskenään inkompatibeileitä. Tähän perustuu PCR-tuotteiden erottaminen kloonauksen avulla. Insertillinen vektori siirtyy kompetentin solun sisään, jolloin solu ei enää ota vastaan toisia saman replikaatio-origon omaavia plasmideita eli toisia inserttejä. Näin ollen jos kloonattu sekvenssi on PCR:llä monistettu 16S rDNA, jokaisesta solusta kehittyy maljalle oma pesäke, joka edustaa maanäytteessä ollutta yhtä eliötä.

Oikean kloonin tunnistamiseen on keksitty useita erilaisia sovellutuksia. Jos kloonauksvektorina on plasmidi, siinä on yksi tai useampi antibioottiresistenssigeeni. Isäntäsolu pystyy kasvamaan alustalla, jossa on antibioottia, jolle se on saanut vastustuskyvyn plasmidivektorissa. Solut, joihin vektori ei ole siirtynyt, eivät periaatteessa kasva antibioottialustalla. Kun isäntäsoluja kasvatetaan koko ajan antibioottia sisältävissä alustoissa, ne eivät voi luopua plasmidista eivätkä näin ollen myöskään niihin siirretystä DNA:sta. Insertin liittyminen vektoriin voidaan todeta yksinkertaisella mekanismilla, jossa kloonauksvektorissa on *lac*-promootorialue sekä *lacZ*-geeni, joka koodaa β -galaktosidaasigeenin funktionaalista osaa. Insertti liitetään vektoriin *lacZ*-geenin väliin, jolloin se ei pysty toimimaan ja solu ei tuota β -galaktosidaasia. Isäntäsolut viljellään maljalle, johon on lisätty β -galaktosidaasin

substraattia, joka hajotessaan muodostaa sinisen värin koko bakteeripesäkkeeseen. Jos *lacZ*-geeni ei toimi, ei sinistä väriä synny eli insertti on siirtynyt vektorissa vaaleita pesäkkeitä muodostaviin soluihin (Madigan ym. 2003). Tämä mekanismi on käytössä erilaisissa kaupallisissa kloonauksiteissä (esimerkiksi Promegan pGEM[®]-T - ja pGEM[®]-T Easy Vector System, Invitrogen Corp.:in TOPO-TA Cloning Kit).

4.4 Restriktioanalyysit

Yhdessä maanäytteestä yleisalukkeilla monistetussa PCR-tuotteessa voi olla monta saman organismin DNA-palaa. Saatu kloonikirjasto kannattaa siis seuloa. Seulomiseen voidaan käyttää esimerkiksi pesäkehybridisaatiota tai restriktioanalyysijä. Pesäkehybridisaatiossa käytetään koetinta, jonka avulla pyritään tunnistamaan pesäkkeet, joiden soluissa on tutkimuksen kohteena olevat sekvenssit. Restriktioanalyysissä peruslähtökohtana on pilkkoa kloonatut DNA-sekvenssit paloihin, jolloin erilaiset kloonit erotetaan toisistaan palojen koon perusteella (Head ym. 1998). Restriktioentsyymit, joita pilkkomiseen käytetään, tunnistavat tietyn kohdan DNA-sekvenssistä. Usein tunnistuskohta on 4-6 emäsparin pituinen. Erilaisilla organismeilla on erilaiset DNA-sekvenssit, ja restriktioentsyymien pilkkoessa DNA:ta muodostuu eri lajeista eri määriä erikokoisia palasia. Tästä johtuen jokaisella lajilla on tyypillinen restriktiokuvio eli sormenjälki. DNA-palat ajetaan geelielektroforeesissa ja visualisoidaan etidumbromidivärjäyksen ja UV-valon avulla, jonka jälkeen kuvioita, joita erilaisista DNA-paloista on muodostunut, tarkastellaan. Kuvioista voidaan päätellä samanlaisten kloonien lukumäärät näytteissä. Lyhyesti tällaisesta restriktioanalyysistä käytetään nimitystä RFLP (restriction fragment length polymorphism) (Maier ym. 2000). Tässä työssä RFLP:n restriktioentsyymeiksi valittiin *HaeIII* ja *MspI*. *HaeIII*-entsyymiä ovat käyttäneet samankaltaisten näytteiden kloonikirjastojen restriktioanalyysissä Bakermans ja Madsen (2002) ja Röling ym. (2002), *MspI*-entsyymiä käyttivät metanogeenisen yhteisön tutkimisessa Sizova ym. (2003) ja saastuneen pohjavesialueen mikrobidiversiteetin tutkimisessa Dojka ym. (1998). Engebretson ja Moyer (2003) testasivat T-RFLP:llä 18 eri restriktioentsyymiä, joiden joukossa olivat myös valitut entsyymit. Molemmilla entsyymeillä havaittiin erilaiset taksonit hyvin. *MspI* sijoittui ensimmäiseksi taksonien määrässä ja molemmat tuottivat melko monta erilaista restriktiokuvioita (sijoitukset *MspI* 5. ja *HaeIII* 7.).

4.5 Sekvensointi

Sekvensoinnissa selvitetään DNA-palan nukleotidijärjestys. Nykyään sekvensointi on automatisoitua ja se tapahtuu Sangerin dideoksimenetelmään pohjautuen. Sekvenssi määritellään valmistamalla kopio yksijuosteisesta DNA:sta polymeerasientsyymien avulla. Juosteen monistaminen tehdään kuten PCR:ssä, alukkeeseen liitetään deoksinukleotidejä jolloin malli-DNA-juosteen viereen muodostuu uusi juoste. Reaktioseoksessa on kuitenkin pieni määrä dideoksinukleotidejä (yhtä tyyppiä yhdessä reaktioseoksessa), joihin reaktio pysähtyy. Tuotteina saadaan eripituisia DNA-palasia. Dideoksinukleotidit ovat leimattu esimerkiksi radioaktiivisesti, jolloin ne pystytään visualisoimaan elektroforeettisesti. Sekvenssi pystytään lukemaan suoraan elektroforeesigeelistä, kun neljän reaktioseoksen tuotteet ajetaan vierekkäin. Nykyään automatisoidussa sekvensoinnissa käytetään fluoresoivia leimoja, jotka detektoidaan kapillaarielektroforeesissa fluoresenssispektroskopian avulla. Fluoresoivat leimat voivat olla erilaiset joka nukleotidille, jolloin kaikki reaktiot voidaan ajaa samassa kapillaarissa. Tulokset analysoidaan tietokoneella erilaisten käsittelyohjelmien avulla (Madigan ym. 2003).

4.6 Fylogeneettiset analyysit

Fylogeneettisillä analyyseillä pyritään arvioimaan eri eliöiden sukulaisuutta ja niiden erkaantumista yhteisestä kantamuodosta. Mutaatiot perimässä aiheuttavat yhteisestä kantamuodosta erkaantumisen. Usein tarkastelun kohteina ovat siis DNA-sekvenssit, mutta myös aminohapposekvenssejä, joista proteiinit muodostuvat, voidaan käyttää. Molekyylitason tieto on evolutiivisten sukulaisuussuhteiden määrittelyssä luotettavampaa kuin morfologisiin tai fysiologisiin ominaisuuksiin perustuva tieto. Koska DNA on periytyvä yksikkö, mittausten tekeminen on yksiselitteistä, aineiston käsittely helpompaa ja molekyylitason tietoa on runsaasti saatavilla (Tuimala 2003).

4.7 Molekyylibiologiset menetelmät pilaantuneiden ympäristöjen tutkimuksessa

Molekyylibiologisia menetelmiä on käytetty myös luontaiseen biohajoamiseen liittyvien mikrobiyhteisöjen tutkimiseen. Dojka ym. (1998) tutkivat ensimmäisten joukossa mikrobidiversiteettiä hiilivedyillä ja klooratuilla liuottimilla saastuneella pohjavesialueella. Sedimenttinäytteistä eristettiin yhteisö-DNA, josta monistettiin bakteri-, arkki- ja universaaleilla alukkeilla DNA-fragmenttejä. DNA-palat eroteltiin toisistaan kloonauksella, jonka jälkeen plasmidi-DNA:sta monistettiin vektorispesifisin alukkein insertit. PCR-tuotteet pilkottiin restriktioentsyymeillä ja

saadut palaset eroteltiin geelielektroforeettisesti. Kloonit ryhmiteltiin ja ryhmistä valittiin edustajat sekvensointiin. Sekvenssoinnissa käytettiin vektorispesifisiä alukkeita. Sekvenssoinnin tuloksia verrattiin tietokantaan ja tutkittiin näytteiden fylogeniaa erilaisin bioinformatiikan keinoin.

Dojkan ym. (1998) sedimenttinäytteistä löytämä mikrobiyhteisö oli hyvin monimuotoinen. Suuri osa löydetyistä mikrobeista kuului tunnettuihin bakteeri- ja arkkitaksoneihin, mutta eivät olleet läheisiä sukulaisia viljellyille organismeille. Tärkeimmät löydöt liittyivät uuden alakaaren muodostumiseen löydetyitä näytteistä *Verrucomicrobia*-pääluokkaan, merkittävään termiittiryhmä I:sen fylogenetiseen laajenemiseen, suureen näytteiden diversiteettiin green nonsulfur bacteria -pääluokassa ja aiemmin vain merestä eristettyjen arkkien läheisen sukulaisten löytymiseen maa-aineksesta. Kaksi yleisintä sekvenssityyppiä olivat läheistä sukua syntrofimetaboliasta tunnetuille eliöille. Yleisin arkkiryhmän sekvenssityyppi oli 97 %:sti identtinen *Methanosaeta* -sukuun kuuluvan arkin kanssa ja yleisin bakteerikloonien sekvenssityyppi oli 96 %:sti identtinen *Syntrophus* -sukuun kuuluvan *Syntrophus gentianaen* kanssa. Dojka ym. (1998) päättelivät öljyhiilivetyjen hajoavan hapettomissa olosuhteissa tutkimallaan pohjavesialueella *Syntrophus*-sukuisten bakteerien sekä *Methanosaeta*-sukuisten arkkien syntrofiametabolian johdosta.

von Winzingerode ym. (1999) havaitsivat tutkiessaan hapettomissa olosuhteissa triklooribentseenejä muuntavaa mikrobiyhteisöä sen hyvin monimuotoiseksi. Mikään sekvensseistä ei ollut täysin identtinen minkään viljellyn mikrobin kanssa, mutta joitakin läheisiä sukulaisia hyvin tunnetuista bakteerisuvuista sekvensseille löytyi. Monet sekvenssit olivat läheisiä Dojkan ym. (1998) löytämille sekvensseille ja ryhmittivät Dojkan ym. (1998) artikkelissa esiintyviin ryhmiin.

Kokeellisen tutkimuksen selostus:

5. Tutkimuksen tavoitteet

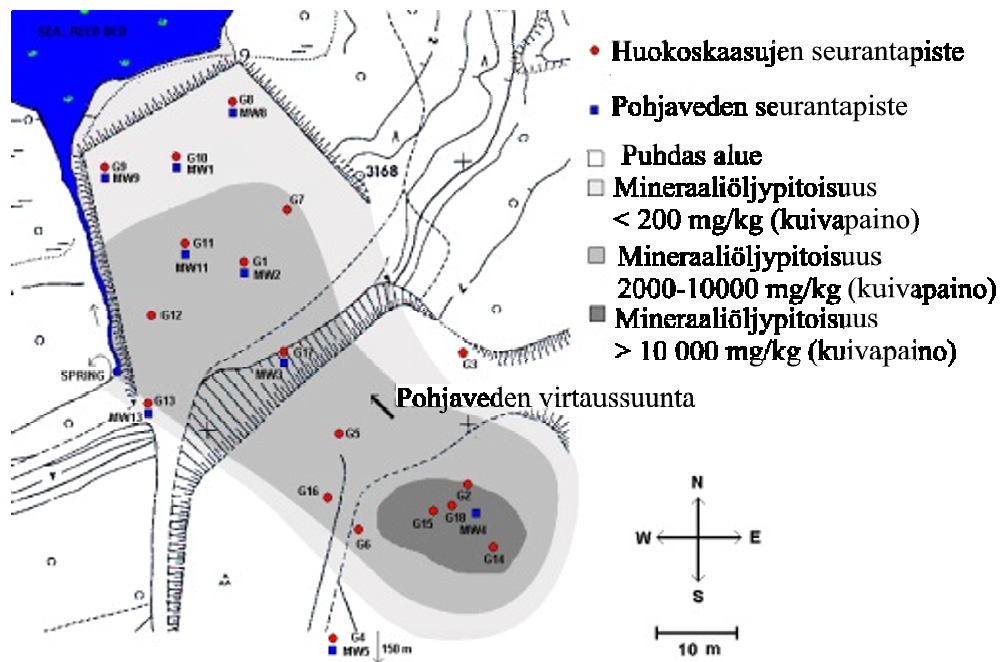
Tutkimuksessa tavoitteet kohdistuivat mikrobiyhteisöihin, jotka vallitsevat öljyllä pilaantuneessa maaperässä, josta tutkitaan luontaista puhdistumista. Tällaiset ympäristöt ovat usein hapettomia ja anaerobisten mikrobien kyvystä hajottaa öljyhiilivetyjä luonnon olosuhteissa tiedetään vielä vähän. Anaerobisten eliöiden viljely on työlästä ja maamikrobeja viljeltäessä koko mikrobiyhteisö ei ole

edustettuna, joten työ painottui molekyylibiologiin tutkimusmenetelmiin. Työn tavoitteena oli vertailla laboratoriossa inkuboidun näytteen eli anaerobisen rikastusviljelmän ja samalta alueelta otettujen, inkuboimattomien näytteiden mikrobiyhteisöjen lajikoostumuksia. Tavoitteena oli löytää maaperästä sekvenssejä, jotka viittaisivat hapettomissa olosuhteissa öljyhiilivetyjä hajottaviin mikrobeihin. Inkuboimattoman näytteen eri syvyyksistä otetuista näytteistä oli mahdollista saada tietoa myös maaperän profiilin mukaisesta mikrobiyhteisöjen muuntumisesta öljypitoisuuden ja lopullisten elektronivastaanottajien vaihdellessa. Tutkimuksen tavoitteena oli luoda kloonikirjastoja erilaisista maanäytteistä, eristää ja sekvensoida kloonit ja vertailla sekvenssejä tietokantoihin mikrobien taksonomian selvittämiseksi. Työ oli osa suurempaa tutkimusta öljyhiilivetyjen luontaisesta biohajoamisesta Suomen olosuhteissa, jota Suomen ympäristökeskuksessa on tehty vuodesta 1999. Tuloksia voidaan mahdollisesti soveltaa pilaantuneiden maiden ja pohjavesien biologisessa kunnostamisessa ja erityisesti sen seurannassa.

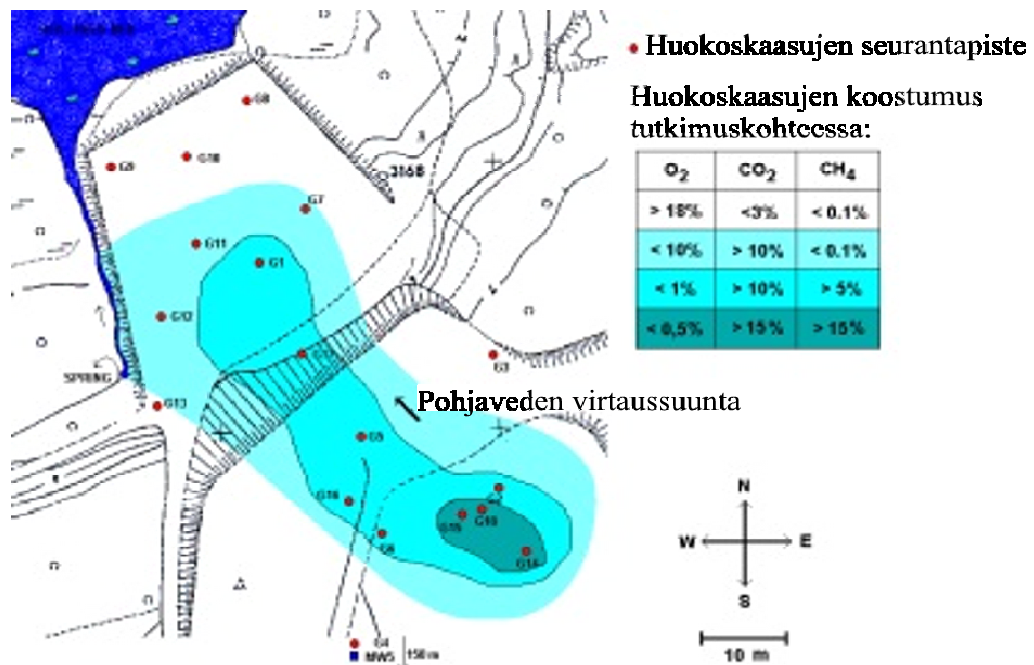
6. Materiaalit ja menetelmät

6.1 Näytteenotto

Näytteenottopaikkana oli käytöstä poistettu kaatopaikka Trollberget Hangossa. Toiminnan loputtua Trollbergetissä vuonna 1984 maaperä ja pohjavesi olivat saastuneet kevytpolttoöljyllä, voiteluöljyllä ja osittain myös raskasmetalleilla. Öljyhiilivedyt ovat levinneet alueelle vajo- ja pohjaveden mukana kuopasta, johon öljyjätteitä on kaadettu. Kaatopaikan sulkemisen jälkeen kuoppa täytettiin hiekka- ja sorapitoisella, roskaisella maalla. Huokoskaasujen koostumuksen perusteella saastunein alue on anaerobinen. Nykyisin alueella on runsaasti aluskasvillisuutta ja puulajeista mänty ja koivu viihtyvät paikalla.



Kuva 4. Mineraaliöljyn arvioitu levinneisyys ja havaintopisteiden sijainti Trollbergetin tutkimuskohteessa (mukaiillen Salminen ym. 2004).



Kuva 5. Arvio huokoskaasujen koostumuksesta ja havaintopisteiden sijainti Trollbergetin tutkimuskohteessa (mukaiillen Salminen ym. 2004).

6.1.1 Näytteenotto 7.5.2001

Maanäyte, josta kloonikirjasto tehtiin, otettiin 1,8–2,3 metrin syvyydestä pisteestä G19 (ei näkyvillä, kuvissa 4 ja 5 pisteen G18 vieressä). Näyte seulottiin kentällä 8 mm seulan läpi ja jaettiin osanäytteisiin tehtäviä määrittäviä varten. Noin 30 g maanäytettä säilöttiin 100 ml:n seerumipulloon, jossa oli butyylikumikorkki. Seerumipullo tyytettiin välittömästi anaerobisen ympäristön säilyttämiseksi ja kuljetettiin laboratorioon kylmälaukussa, jotta lämpötila pysyisi alle 10 °C. Laboratoriossa pullo siirrettiin inkubointihuoneeseen 8 °C. Inkubointi kesti 10 kuukautta. Samasta pullosta määritettiin myös inkuboinnin aikainen metaanintuotanto. Lisäksi otettiin näytteet maahengityksen ja öljypitoisuuden määrittämiseksi. Hengitysmäärittystä varten 100 ml:n seerumipulloon otettiin n. 10 g maanäytettä ja pullo suljettiin kumikorkilla. Öljypitoisuuden määrittämistä varten 100 ml:n kierrekorkkipullo täytettiin kokonaan maanäytteellä ja suljettiin tiiviisti. Myös hengitys- ja öljymäärittämissä pullo kuljetettiin laboratorioon kylmälaukuissa. Laboratoriossa öljymäärittämissä näytteet pakastettiin ja hengitysmäärittämissä näytteet laitettiin inkuboitumaan 8 °C. Kaikkia määrittäviä varten otettiin rinnakkaiset näytteet.

Suomen ympäristökeskuksessa tehdyissä tutkimuksissa alkaanien on todettu hajoavan tässä näytteessä. Näytteen alkuperäinen öljypitoisuus oli 4100 +/- 10 mg mineraaliöljyä/kuivapainokilo, josta se oli muuttunut 10 kuukauden inkuboinnin aikana 3800 +/-380 mg:ksi kuivapainokiloa kohti. Mineraaliöljyä saattoi olla hävinnyt näytteestä ehkä 7 % verran. Näytteen hehikutushäviö oli n. 7 % kuivapainosta (Salminen ja Jørgensen, julkaisematon tulos).

6.1.2 Näytteenotto 14.4.2003

Näytteet otettiin pisteestä G20 (ei näkyvillä), pisteen G18 vierestä (kts. kuvat 4 ja 5) puolen metrin välein 4,1 m syvyyteen asti. DNA:n eristämistä varten jokaisesta korkeudesta otettiin maanäytteet neljään rinnakkaiseen eppendorf-putkeen, jotka laitettiin nestetyypeen. Maanäytteet, joista DNA oli tarkoitus eristää, siirrettiin laboratorioon -20 °C pakastimeen. Myös metaanintuotannon, maahengityksen ja öljypitoisuuden määrittäviä varten otettiin näytteet. Näytteet otettiin, käsiteltiin ja säilytettiin laboratorioon samalla tavoin kuten aiemmin otetut samanlaiset näytteet.

6.2 DNA:n eristäminen maanäytteestä

DNA eristettiin maanäytteistä FastDNA[®] SPIN Kit for Soil -kitillä (BIO 101), joka perustuu suoraan DNA:n uuttoon maanäytteistä lasihelmihajotuksen avulla. Eristys

tehtiin kitin ohjeen mukaan muutamia poikkeuksia lukuun ottamatta. Kutakin maanäytettä punnittiin n. 600 mg putkiin, joissa oli helmiä. Tarkka punnittu määrä kirjattiin ylös. Putkia ravisteltiin FastPrep[®]-laitteessa (Bio 101 Savant) 30 sekuntia 5.5 nopeudella. Putket pidettiin jäissä punnituksen, solujen hajotuksen ja proteiinien saostuksen ajan. Sentrifugointi tapahtui mikrosentrifuugissa (Biofuge pico, Heraeus Instruments) aina 13 000 rpm:n nopeudella. Ravistelun jälkeen putket sentrifugoitiin ja supernatantti siirrettiin puhtaaseen putkeen. Proteiinit saostettiin PPS-liuoksella. Proteiinit erotettiin supernatantista sentrifugoimalla. Supernatantti pipetoitiin proteiinien saostamisen jälkeen 15 ml:n Falcon-putkeen, johon oli lisätty 1 ml kiinnitysmatriisisuspensiota. Supernatanttia pipetoitiin varoen pois 700 µl Falcon-putkista niin, ettei kiinnitysmatriisia tullut yhtään mukaan. Kiinnitysmatriisi resuspendoitiin ja siitä siirrettiin 700 µl kitin SPIN[™]-suodatinputkeen, joka oli asetettu eppendorf-putkeen. Kiinnitysmatriisi pestiin kitin etanolipesuliuoksella, jonka jälkeen matriisi kuivattiin sentrifugoimalla. DNA eluoiitiin matriisista 100 µl DNAasittomalla vedellä ja säilytettiin -20 °C.

6.3 Geelielektroforeesit

Kaikki geelielektroforeesit tehtiin agarosigeelissä (SeaKem[®] LE Agarose, Cambrex) 1x TBE-puskurissa (Tris-borate-EDTA, DNA electrophoresis, Biocell Products Oy). Ajoaika vaihteli tarkastelun kohteesta riippuen 30-45 minuutin välillä ja jännite oli 100-150 V. Virtalähteenä oli PowerPac 300 ja ajokammiona Sub-Cell GT, molemmat Bio-Radin. Latausvärinä käytettiin MBI Fermentasin 6x Loading Dye:ta ja kokostandardeina olivat ΦX174 DNA- *Hae* III Digest (Finnzymes), 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs) ja 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs), joista kahdesta edellisestä oli tehty 1:10 laimennokset steriiliin veteen. Geelit jälkivärjättiin EtBr-vesiliuoksessa (0,5 µg/ml, Bio-Rad) ja kuvattiin UV-valossa Gel Doc 2000-laitteistolla ja Quantity One-tietokoneohjelmalla (versio 4.2.2) (Bio-Rad). Geelikuvien tulostus tapahtui Mitsubishi P91-tulostimella.

6.3.1 Pitoisuuden määrittäminen geelielektroforeesissa

DNA-pitoisuuden määrittämisessä käytettiin Bio-Radin EZ Load Precision Molecular Mass Ruler -pitoisuusstandardia. DNA-näytteet ajettiin 1,2 % agarosigeelissä 35 minuuttia 150 V jännitteellä pitoisuusstandardin kanssa. Pitoisuusstandardia pipetoitiin geelille eri määriä ja ajon jälkeen geeli kuvattiin Gel Doc -laitteella. Geelikuvasta määritettiin Quantity One -tietokoneohjelman avulla standardisuora

pitoisuusstandardin avulla ja standardisuoran avulla saatiin tietää näytteiden DNA-pitoisuudet.

6.4 PCR maanäyte-DNA:sta

Maanäytteistä eristetty DNA monistettiin PCR-reaktiolla. PCR:ssä monistettiin sekä bakteeri- että arkkidna:ta. Arkki-PCR tehtiin *nested*-menetelmällä, jossa ensin monistettiin pidempää aluetta DNA-sekvenssistä (outer-reaktio) ja saatua tuotetta käytettiin templaattina, kun monistettiin lyhyempää aluetta monistetun alueen sisältä (inner-reaktio). PCR:ssä käytettiin alukkeina bakteerien 16S rDNA-yleisalukkeita PRBA341f (Øvreås ym. 1997) ja DS907r (Teske ym. 1996) sekä arkkien 16S rDNA-yleisalukkeita PRA46f ja PREA1100r (Øvreås ym. 1997) ja PARCH 340f (Øvreås ym. 1997) sekä ARC915 (Grosskopf ym. 1998). Kaikki kokeellisessa työssä käytetyt alukkeet on esitelty taulukossa 3.

PCR-reaktiot tehtiin 50 µl tilavuudessa. Reaktioseoksessa oli (lopullisina pitoisuuksina) 1x NH₄(SO₄)₂-puskuria (MBI Fermentas), 2,5 mM MgCl₂ (MBI Fermentas), 200 µM kutakin deoksinukleotidia (MBI Fermentas), 0,2 µM sekä forward että reverse -aluketta, 0,5 mg/ml BSA:ta (New England Biolabs), formamidia 1:100 (BDH Biochemical, molekyylibiologinen laatu), ja 0,04 U *Taq*-polymeraasia (MBI Fermentas). Templaattia lisättiin reaktioon aina yksi µl. PCR-ajo suoritettiin MJ

Taulukko 3. Kokeellisessa työssä käytetyt PCR-alukkeet.

Aluke	Alukkeen sekvenssi 5'-3'	Monistettava alue	Spesifisyys	Viite
PRBA341f	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	16S, 338-357*	Bakteerit	Øvreås 1997
	+gc-pidike: CGCCCGCCGCGCGGCG GGCGGGGCGGGGACGGGGG			
DS907r	CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT	16S, 907-928*	Bakteerit	Teske 1996
PRA46f	YTAAGCCATGCRA GT	16S, 46-60*	Arkit, outer-reaktio	Øvreås 1997
PREA1100r	YGGGTCTCGCTCGTTRCC	16S, 1100-1117*	Arkit, outer-reaktio	Øvreås 1997
PARCH340f	CCCTACGGGGYGCASCAG	16S, 340-357*	Arkit, inner-reaktio	Øvreås 1997
	+gc-pidike : CGCCCGCCGCGCGGCG GGGCGGGGCGGGGACGGGGG			
ARC915	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	16S, 915-935*	Arkit, inner-reaktio	Großkopf 1998
PGEMmM13f	CGTTGTAAACGACGGCCAGTG	vektori, 2972-2993	pGEM [®] -T-vektori	Tämä työ
PGEMRPr	TTTCACACAGGAAACAGCTATGA C	vektori, 176-199	pGEM [®] -T-vektori	Tämä työ

**E. coli* -numerointi

Researchin PTC-100 ja PTC-200 -laitteissa. Bakteerialukkeilla monistettaessa ensimmäisessä vaiheessa lämpötila oli 94 °C 60 sekuntia, jonka jälkeen tuli 30 kierroksen ajan ensin 94 °C 45 sekuntia (DNA-juosteiden denaturoituminen), toiseksi 46 °C 45 sekuntia (alukkeiden kiinnittyminen kohdesekvenssiin), kolmanneksi 72 °C 60 sekunnin ajan (DNA-ketjujen pidentyminen polymeerasientsyymien toimesta). Lopuksi lämpö nostettiin vielä 72 °C 6 minuutin ajaksi, jonka jälkeen reaktiot säilytettiin 15 °C, kunnes ne otettiin pois laitteesta. Arkkien PCR-reaktio alkoi 92 °C 120 sekunnin ajan, jonka jälkeen tuli 30 kierroksen ajan ensin 92 °C 60 sekunnin ajan, 65 °C 30 sekunnin ajan ja 72 °C 60 sekunnin ajan. Lopuksi lämpö oli vielä 6 minuuttia 72 °C, jonka jälkeen reaktiot olivat 15 °C, kunnes ne otettiin pois laitteesta. PCR-reaktiotuotteet säilytettiin 8 °C.

6.4.1 GC-pidike

Maanäytteestä saadut DNA:t monistettiin erehdyksessä forward-alukkeilla, joiden päässä oli GC-rikas alue DGGE-ajoja varten. GC-alueesta ei ollut haittaa muussa yhteydessä, mutta joidenkin inkuboitujen näytteiden sekvensointi ei onnistunut lainkaan ja inkuboitujen arkinäytteiden sekvensointi onnistui vain toisesta suunnasta, koska samaa GC-pidikkeellistä aluketta käytettiin sekvensoinnissakin.

6.5 PCR-tuotteiden puhdistus

PCR-tuotteiden puhdistuksessa käytettiin kahta menetelmää. Inkuboidusta näytteestä saadut PCR-tuotteet puhdistettiin Wizard[®] DNA Clean-Up System -menetelmällä (Promega) käyttämällä imulaitteistoa ja inkuboimattomien näytteiden PCR-tuotteet puhdistettiin Qiaquick PCR Purification Kit -kitillä (Qiagen) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Promegan Wizard[®]-kitissä koottiin ensin suodatuslaitteisto, jossa PCR-tuote pipetoitiin ensin puhdistushartsisuspensioon. PCR-tuotteet oli laimennettu steriiliin veteen (2 osaa PCR-tuotetta ja 3 osaa vettä), jottei pylväs tukkeutuisi. Seos imettiin puhdistuspylvään läpi, jolloin DNA kiinnittyi pylvään puhdistusmatriisiin ja hartsisuspension mukana pylvään läpi tulivat mahdolliset epäpuhtaudet. Pylväs pestiin isopropanolilla (JT Baker, analyttinen laatu) ja DNA eluoiitiin pylväästä 70 °C steriilillä vedellä.

Qiagenin kitissä käytettiin apuna mikrosentrifuugia (Biofuge pico, Heraeus Instruments) DNA:n puhdistamisessa. Viisi tilavuusosaa puskuria ja yksi tilavuusosa PCR-tuotetta sekoitettiin ja näin saatu liuos pipetoitiin pylvääseen, johon DNA

kiinnittyi. Pylväs pestiin pesupuskurilla ja DNA eluoiitiin pylväästä steriilillä vedellä. Puhdistettuja PCR-tuotteita säilytettiin -20 °C.

6.6 Kloonaus

Kloonauksessa käytettiin Promegan pGEM[®]-T Easy Vector System -kloonauksettia. Kloonauksella eroteltiin yhteisö-DNA:sta monistetut sekvenssit toisistaan. Insertin siirtyminen vektoriin ja siten siis oikeat kloonit havaittiin valkoisina pesäkkeinä, koska vektorissa oleva *lacZ*-geeni ei transkriptoidu eikä entsyymiä, joka pystyisi pilkkomaan maljoilla olevan kromogeenisen substraatin, synny.

6.6.1 A-tailing

Valmistajan ohjeissa suositeltiin, että kloonauksessa käytettäisiin PCR-tuotteita, joiden 3'-päähän polymeraasientsyymi olisi lisännyt ylimääräisen adeniiniemäksen. PCR:ssä oli käytössä MBI Fermentasin *Taq*-polymeraasi, jolla oli alhainen 5'-3' eksonukleasiaktiivisuus ja siksi päätettiin koettaa kloonausta sekä käsittelemättömille PCR-tuotteille että tehdä PCR-tuotteille A-tailing. A-tailingissa lisättiin PCR-tuotteiden 3'-päähän yksi adeniiniemäs. A-tailing tehtiin kitin ohjeiden mukaisesti 2 µl:lle PCR-tuotteita käyttäen *Taq* DNA-polymeraasia (Promega), *Taq* DNA polymerase 10x reaction buffer -puskuria (Promega) ja dATP-nukleotidiliuosta (Promega). Reaktioon lisättiin lisäksi 1 µl MgCl₂:a (MBI Fermentas).

6.6.2 Ligaatio

Ligaatiota varten määritettiin geelielektroforeesin avulla PCR-tuotteiden pitoisuus. Insertin ja vektorin suhteeksi valittiin 3:1 ja laskettiin ligaatioon tarvittava puhdistetun PCR-tuotteen määrä. Ligaatio tehtiin valmistajan ohjeen mukaan. Lisäksi molemmilla kloonaukskerroilla (inkuboitu näyte ja inkuboimattomat näytteet) tehtiin positiivinen vertailunäyte, jossa inserttinä käytettiin paketin verrokki-inserttiä. Nollanäyte tehtiin vain ensimmäisellä kloonaukskerralla inkuboimattoman näytteen rinnalla. Nollanäytettä varten vektoriin ei lisätty inserttiä. Ligaatioreaktiot tapahtuivat 4 °C yön yli.

6.6.3 Transformaatio

Transformaatioissa siirrettiin insertti vektorissa kompetentteihin *Escherichia coli* -soluihin (JM109 competent cells). Transformaatio tapahtui lämpöshokin avulla. Ligaatiotuotteet ja solususpensiot sekoitettiin ja pidettiin 20 minuuttia jäissä. Sen

jälkeen ne siirrettiin 45 sekunnin ajaksi 42 °C ja pipetoitiin kloonauskitin ohjeen mukaan valmistettuun huoneenlämpöiseen SOC-liemeen (0,2 g tryptonia/l, 0,05 g hiivauutetta/l, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM Mg²⁺, 20 mM glukoosia). SOC-liemi valmistettiin punnitsemalla 2 g tryptonia ja 0,5 g hiivauutetta ja liuottamalla nämä 97 ml:aan vettä, lisäämällä liuokseen 1 ml 1M NaCl ja 0,25 ml 1M KCl. Liemi autoklavoitiin 121 °C 15 minuutin ajan ja jäähdytettiin huoneenlämpöiseksi. Liemeen lisättiin vielä 1 ml steriilisuodatettua 2M Mg²⁺-liuosta ja 1 ml steriilisuodatettua 2M glukoosiliuosta ja säädettiin pH:ksi 7,0 NaOH:lla ja HCl:lla. Valmis liemi suodatettiin vielä 0,2 µm suodattimella. Ekspressioinkubointi tapahtui SOC-liemessä n. 200 rpm 37 °C, 90 minuutin ajan. Inkuboinnin jälkeen solususpensiosta maljattiin 100 µl kahdelle rinnakkaiselle LB-ampisilliini-X-Gal-IPTG-maljalle. Kyseinen alusta valmistettiin seuraavasti: 10 g tryptonia, 5 g hiivauutetta, 5 g NaCl ja 15 g agaria punnittiin ja sekoitettiin litraan vettä ja alustan pH:ksi säädettiin 7,0 NaOH:lla. Alusta autoklavoitiin 121 °C 15 minuutin ajan, jäähdytettiin alusta n. 50-asteiseksi ja lisättiin ampisilliiniä 100 mg/l. Alusta valettiin halkaisijaltaan 9 cm:n maljoille, joille lisättiin X-gal:ia (20 µl/malja, 50mg/ml, Promega) ja IPTG:tä (100 µl/malja, 100 mM, Promega). Inkubointi tapahtui 37 °C 20-23 h.

6.6.4 Puhdasviljelmät

Yön yli inkuboiduilta maljoilta laskettiin siniset ja valkoiset pesäkkeet ja valkoisista pesäkkeistä valittiin jatkoviljeltävät kloonit. Inkuboimattomille näytteille tehtiin pintahajotus, jotta saataisiin vielä erillispesäkkeitä plasmidieristystä varten puhtauden varmistamiseksi. Pesäkkeet viljeltiin LB-maljoille, joissa oli ampisilliiniä (100 µg/ml, Sigma) ja inkuboitiin 18-20 h. Inkuboinnin jälkeen maljat siirrettiin jääkaappiin 4 °C.

6.7 Plasmidieristys

Plasmidit eristettiin Sambrookin ja Russellin (2001) mukaan STET-lysosyyminkeitton menetelmällä. Menetelmässä detergenttien ja lysosyymin vaikutuksesta bakteerien soluseinät heikkenevät ja lämmityksen johdosta solut hajoavat ja proteiinit ja kromosomaalinen DNA denaturoituvat. Plasmidi-DNA voidaan tämän jälkeen eristää supernatantista. Kahteen ml:aan LB-ampisilliinilientä (10g/l tryptonia, 5 g/l hiivauutetta 5 g/l NaCl, 1000 ml vettä, autoklavoinnin 121 °C, 15 minuuttia, jälkeen lisätty ampisilliini 100 mg/l, Sigma) ympättiin puhdasviljelmistä bakteerimassaa ja kasvatettiin liemiviljelminä 18-23 tuntia 37 °C, 225 rpm ravistelussa. Solut erotettiin sentrifugoinnilla kasvatusliemestä ja hajotettiin lisäämällä STET (Sambrook ja Russell

2001)- ja lysotsyymiliuoksia (10mg/ml, Boehringer Mannheim GmbH) pitämällä putkia kiehuvaassa vedessä 40 sekuntia. Eroteltiin muodostuneet faasit sentrifugoimalla (Biofuge pico ja Biofuge fresco, Heraeus Instruments). Nukleiinihapot saostettiin supernatantista 3M natriumasetaatin (pH 5,2) ja isopropanolin (JT Baker, analyttinen laatu) avulla. DNA pelletoitettiin sentrifugoimalla ja pestiin etanolilla. DNA-pelletti liuotettiin steriiliin veteen ja säilytettiin -20 °C.

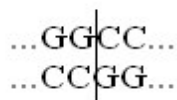
6.8 Kloonien PCR

Eristetyistä plasmideista monistettiin inserttialue sekvensointia varten. Inkuboitujen näytteiden bakteri- ja arkkisekvenssit sisältävien kloonien plasmidien PCR:ssä käytettiin alukkeina samoja alukkeita, joilla ensimmäiset PCR:t tehtiin: bakteerien 16S rDNA-yleisalukkeita PRBA341f (Øvreås ym. 1997) ja DS907r (Teske ym. 1996) sekä arkkien 16S rDNA-yleisalukkeita PARCH 340f (Øvreås ym. 1997) sekä ARC915 (Grosskopf ym. 1998). PCR tehtiin samoilla reagensseilla ja samalla lämpötilaohjelmalla kuin maanäytteistä eristetyn DNA:n PCR. Inkuboimattomista näytteistä saatujen kloonien monistamisessa käytettiin vektorispesifisiä, itse suunniteltuja alukkeita pGEMmM13f ja pGEMRPr, ja reagenssit olivat samat kuin maanäytteestä eristetyn DNA:n PCR:ssä. PCR-ohjelma optimoitiin uusille alukkeille gradienttiPCR:n avulla. PCR-reaktiot valmistettiin kuten maanäyte-DNA:n monistuksessa (loppupitoisuudet samat), mutta alukkeina käytettiin vektorispesifisiä alukkeita pGEMmM13f ja pGEMRPr. Templaattina käytettiin 12 putkessa yhtä tutkittavan bakterikloonin plasmidiDNA:ta ja 12 yhtä tutkittavan arkkikloonin plasmidiDNA:ta. PCR-ajo suoritettiin MJ Resesarchin PTC-200- laitteessa. Lämpötilagradientti asetettiin laitteeseen 40 °C–60 °C välille. Muut lämpötilat kuten maanäytteistä eristetyn DNA:n monistamisessa bakterialukkeilla, mutta alukkeiden kiinnittyminen kohdesekvenssiin tapahtui eri lämpötiloissa eri putkissa. GradienttiPCR:n perusteella päädyttiin seuraavanlaiseen ohjelmaan: 94 °C 60 sekunnin ajan, jonka jälkeen 30 kertaa ensin 45 sekuntia 94 °C, 60 °C 45 sekuntia ja 72 °C 60 sekuntia. Kierrosten jälkeen 72 °C 6 minuutin ajan, jonka jälkeen ohjelma jäähdytti PCR-reaktiot 15 °C, kunnes ne otettiin pois koneesta. PCR-tuotteet säilytettiin 8 °C.

6.9 Restriktiofragmenttien pituuspolymorfia eli RFLP

PCR-tuotteet pilkottiin paloihin restriktioentsyymeillä, joiden leikkauskohdat on esitetty kuvassa 6. Inkuboiduille näytteille käytettiin *HaeIII*-entsyymiä (New England

HaeIII



MspI



Kuva 6. *HaeIII* ja *MspI* -restriktioentsyymien tetrameeriset DNA:n leikkauskohdat.

Biolabs). Inkuboimattomien näytteiden bakteerikloonien PCR-tuotteet digestoitettiin *HaeIII* - ja *MspI* (New England Biolabs)- restriktioentsyymeillä samassa putkessa. Arkkikloonien PCR-tuotteiden restriktiot tehtiin vain *HaeIII*-entsyymillä.

PCR-tuotteita restriktioitiin puskuriliuoksessa (10x NEB2 buffer, New England Biolabs) 37 °C vesihauteessa kolmen tunnin ajan, jonka jälkeen digestiotuotteet ajettiin geelielektroforeesissa. Elektroforeesissa käytettiin 2,5 % agarosigeeliä TBE-puskurissa, ja kokostandardina oli 100 bp DNA ladder (New England Biolabs), jonka avulla pystyttiin myös arvioimaan DNA:n määrä tuotteissa. Geeliä ajettiin 110 V jännitteellä n. 45 minuuttia. Restriktiokuvia vertailtiin toisiinsa silmämääräisesti (inkuboitujen näytteiden kloonit) sekä lisäksi tietokoneohjelman (Diversity database, versio 2.2.0, Bio-Rad) avulla (inkuboimattomien näytteiden kloonit). Kloonit ryhmiteltiin kuvioiden perusteella.

6.10 Sekvensointi

Sekvensoitavat kloonit valittiin RFLP-kuvioiden perusteella. Erilaisista kuviorystistä valittiin sekvensoitavaksi yleensä yksi edustaja yhtä ryhmää kohti. Sekvensointi suoritettiin ostopalveluna Biotekniikan instituutissa. Inkuboidusta maanäytteestä saatujen kloonien PCR-tuotteet lähetettiin sellaisenaan PCR-putkissa ja mukaan laitettiin sekä bakteerialukkeet PRBA341f (Øvreås ym. 1997) ja DS907r (Teske ym. 1996) että arkkialukkeet PARCH 340f (Øvreås ym. 1997) sekä ARC915 (Grosskopf ym.1998). Inkuboimattomien profiilinäytteiden kloonien PCR-tuotteet lähetettiin sellaisenaan PCR-putkissa, ja niiden sekvensointi tehtiin Biotekniikan instituutin yleisalukkeilla T7 ja RP. Sekvensoitavat PCR-tuotteet puhdistettiin Biotekniikan instituutissa Milliporen Montage™ PCR_{μ96} -levyillä. Sekvensointiin käytettiin Applied Biosystems'in BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit -kittiä ja sekvensointireaktiot ajettiin Applied Biosystems'in 16-kapillaarisella ABI3100-kapillaarielektroforeesilaitteella. Terminaattorien poistoon sekvensointireaktioista käytettiin Montage™ SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup Kit -tuotetta (Millipore).

Saadut sekvenssit koottiin ja käsiteltiin Staden Package -tietokoneohjelmiston ohjelmilla.

6.11 Sekvensoinnin tulosten käsittely

Sekvenssejä vertailtiin GenBank-tietokantaan BLAST-haun (nucleotide-nucleotide BLAST eli BLASTn) avulla (internetsivu <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, käyttöpäivät 13.-14.8.2003, 20.11.-11.12.2003). BLAST-haussa käytettiin ohjelman perusasetuksia. Fylogeneettiset puut rakennettiin Phylip-paketin avulla Ribosomal Database Project II:n eli RDP:n internetsivulla (internetsivu <http://rdp.cme.msu.edu/html/analyses.html> käyttöpäivät 17.-28.3.2004). RDP:n tietokannasta valittiin puihin omien linjautuneiden sekvenssien lisäksi puhdasviljelmää sekä yksi omien sekvenssien naapuri. Sekvenssien väliset fylogeneettiset etäisyyden määriteltiin maximum likelihood eli suurimman uskottavuuden menetelmällä. Sekvenssit, joita RDP:n Phylip ei pystynyt linjaamaan, tarkistettiin kimeeristen sekvenssien löytämiseksi RDP:n internetsivulla olevan Chimera check-ohjelman avulla (internetsivu <http://rdp.cme.msu.edu/html/analyses.html> käyttöpäivä 1.4.2004). Lisäksi valituille sekvensseille tehtiin linjaus ClustalW-ohjelmalla (internetsivu <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> käyttöpäivä 5.5.2004) RDP:n Phylip-ohjelmassa tapahtuneen epäonnistuneen linjautumisen syyn selvittämiseksi.

6.12 Metaanintuotannon mittaaminen

Maanäytteistä mitattiin metaanintuotanto HP5890 series II -kaasukromatografilla, jossa oli Hayesep Q -kolonni ja liekki-ionisaatiodektori (FID). Kantokaasuna käytettiin typpeä. Injektiotilavuus oli 0,5 ml. Metaanintuotantoa mitattiin näytteenoton jälkeen kahden viikon ajan kaksi kertaa viikossa, jonka jälkeen mittaus tapahtui noin kerran kuussa 8 kuukauden ajan.

6.13 Hiilidioksidituotannon mittaaminen

Aerobinen hengitys sekä hiilidioksidituotanto anaerobisissa näytteissä mitattiin joka toinen päivä viikon ajan hiilianalysointorilla (Easy Quant) infrapunailmaisinta käyttäen. Hiilianalysointoriin injektointiin 0,5 ml näytettä näytepullojen kaasutilasta. Hapellisissa olosuhteissa inkuboituihin näytteisiin lisättiin injektoitu määrä ilmaa hapellisten olosuhteiden ylläpitämiseksi. Anaerobisesti inkuboituihin näytteisiin lisättiin typpeä, jottei pullossa kehittyisi alipainetta ja hapettomat olosuhteet säilyisivät muuttumattomina.

6.14 Maan mikrobiston mikroskooppinen tarkastelu

Trollbergetin saastuneimmasta kohdasta otettua saastunutta maata tarkasteltiin eri tavoin mikroskooppisesti. Maanäytteiden mikroskopointi tehtiin 100X-objektiivien kautta, jolloin lopullinen suurennos oli 1000-kertainen. Tavallisia vesipreparaatteja suoraan maanäytteestä tarkasteltiin faasikontrastin avulla Leican DM RXA2 – epifluoresenssimikroskoopilla. Näytteistä tehtiin myös DAPI-värjäykset (mukaillen Suomen ympäristökeskuksen menetelmäohje B101). DAPI-värjäyksessä bakteerien DNA:han kiinnittyy fluoresoiva väriaine, joka epifluoresenssimikroskoopilla tarkasteltuna näkyy sinisenä värinä viritettäessä 340-380 nanometrin aallonpituudella. Inkuboimatonta 1,8-2,3 metrin syvyydestä otettua näyteaata punnittiin n. 0,2 g eppendorf-putkeen, johon lisättiin 1,8 ml seosta, jossa oli 50 ml 0,9 % NaCl, 50 µl 10,4 % Na₅P₃O₁₀ ja 5 ml 2 % Tween 80:tä. Näytettä homogenisoitiin 15 minuutin ajan ravistelijassa. Homogenisoinnin jälkeen suurempien maa-ainesten annettiin laskeutua putken pohjalle ja nestefaasia siirrettiin uuteen eppendorf-putkeen 1 ml. Tähän lisättiin 70 µl 37 % formaldehydiä. Seosta suodatettiin 1 ml 0,5 µm suodattimen (Millipore) läpi, lisättiin suodatettuun liuokseen 1 ml 1 M KCl:ia suodattamalla kaliumkloridiliuos suodattimen läpi. Solut suodatetusta näytteestä kerättiin polykarbonaattisuodattimelle (0,2 µm huokoskoko, Whatman) ja värjättiin DAPI-värillä (Sigma) (loppupitoisuus 3,3 µg/ml). Värjättyä näytettä tarkasteltiin epifluoresenssimikroskoopilla.

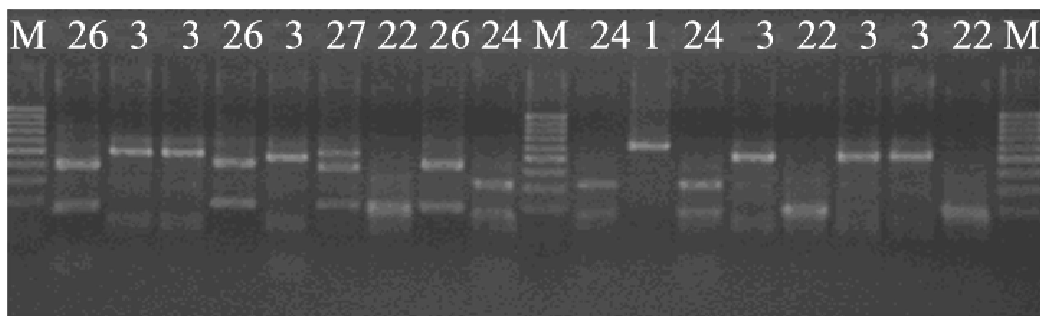
Trollbergetin saastuneimmasta kohdasta, 3 metrin syvyydestä aikaisemmin otettua maanäytettä tarkasteltiin lisäksi ilman värjäystä 340-380 nm:n aallonpituudella, jotta havaittaisiin metanogeneille tyypillinen autofluoresenssi. Metanogeenisillä arkeilla on erityinen koentsyymi F₄₂₀, joka näkyy soluissa vihreänä värinä sinisellä valolla indusoituna. Maanäyte käsiteltiin kuten DAPI-värjäyksessä, mutta niitä ei värjätty DAPI-väriaineella. Lisäksi tarkasteltiin nestepreparaattia maanäytteestä suoraan faasikontrastilla. Erilaisista mikroskooppinäytteistä otettiin kuvia digitaalikameran avulla (Leica DC 500).

7. Tulokset

7.1. Tulokset kloonaus-, RFLP- ja sekvensointitöistä

Työn tavoitteena oli tutkia maaperän mikrobiyhteisöjä kloonaamalla maanäytteistä eristetystä yhteisö-DNA:sta saadut PCR-tuotteet. Kloonauksen kohteena oli PCR:stä saatu 16S rRNA-geenin osa. Kloonauksen avulla erilaiset PCR-tuotteet pystyttiin

erottelemaan toisistaan. Kloonaukseen tehtiin kaupallisella paketilla ja insertin siirtyminen plasmidivektorissa *E. coli* -soluihin todettiin sini-valkoselektiolla. Anaerobisesti 10 kk inkuboidun maanäytteen PCR-tuotteille tehtiin A-tailing, mutta koska kloonauksessa tuli enemmän pesäkkeitä näytteille, joille A-tailingia ei ollut tehty, sitä ei tehty enää inkuboimattomille näytteille. Positiivisessa vertailunäytteessä, jossa vektoriin oli liitetty kaupallisen paketin kontrolli-insertti, valkoisia pesäkkeitä havaittiin 573 kpl ja sinisiä 85. Taustanäytteessä, jossa kloonattiin vektori ilman inserttiä, valkoisia pesäkkeitä ei havaittu ja sinisiä oli 18 kpl. Inkuboidusta maanäytteestä saatuja DNA-klooneja valittiin jatkoon 194 kpl, joista bakteeri-insertin sisältäviä klooneja 93 kpl (100 % kaikista valkoisista pesäkkeistä) ja arkki-insertin sisältäviä klooneja 101 kpl (30 %). Inkuboimattomista maanäytteistä eristetyille DNA:lle saaduista pesäkkeistä poimittiin jatkoon valkoisia pesäkkeitä jokaisesta syvyydestä 30 kpl, eli yhteensä 120 bakteerikloonina (9 % kaikista valkoisista pesäkkeistä) ja 120 arkkikloonina (7 %). Kaikki lukumäärät ovat yhteenlaskettuja lukuja kahdelta rinnakkaiselta maljalta. Klooneille annettiin juokseva numero ja kirjain A (arkkiklooni) tai E (bakteeriklooni). Lisäksi perään laitettiin projektin juokseva näytenumero, jotta ne pystyttäisiin jäljittämään maanäytteeseen asti. 10 kuukautta anaerobisesti 8 °C lämpötilassa inkuboitu maanäyte oli 1,8-2,3 (SYKE:n projektin A06002 1238) metrin syvyydestä ja inkuboimattomat maanäytteet vaihteittain nollasta (SYKE:n projektin A06057 1564, 1568, 1572, 1576) 3,6 metrin syvyyteen. Klooneista eristettiin plasmidi-DNA ja siitä monistettiin insertti. Monistettu PCR-tuote pilkottiin RFLP:ssä restriktioentsyymein, ryhmiteltiin kloonit ja valittiin ryhmistä erilaisten kloonien edustajat sekvensoitaviksi Biotekniikan instituutissa. Restriktiokuvioille annettiin juokseva numero. Esimerkki kloonien ryhmittelystä on esitetty kuvassa 7. Inkuboidun maanäytteiden ja inkuboimattomien



Kuva 7. Esimerkki RFLP-kuvioiden ryhmittelystä. Näytteet 72E-1238-80E-1238 (2.-10. pystyrivi), 82E-1238-89E-1239 (12.-19. pystyrivi). Kokomarkkeri on merkitty kuvaan M-kirjaimella (kaivot 1, 11 ja 20), numerot ovat RFLP-ryhmien numerot.

maanäytteiden 16S rRNA-geenin DNA:sta saadut RFLP-kuvioryhmät eivät olleet samat, vaikka samat numerot toistuvat.

Inkuboidun näytteen erilaisten bakteerikloonien jaottelu RFLP-kuvioryhmiin on esitetty taulukossa 4. Bakteeriklooneista löydettiin silmämääräisesti arvioiden 28 erilaista RFLP-kuviota. Arviointi oli joidenkin kloonien kohdalla vaikeaa esimerkiksi huonojen geelikuvien takia. Useimpiin ryhmiin kuului yhdestä muutamaan kloonia, suurimmat RFLP-kuvioryhmät olivat 1, 2, 3, 22 ja 24. Näitä vastasivat sekvensoidut bakteerikloonit nro:t 13E-1238, 27E-1238, 6E-1238, 44E-1238 ja 80E-1238. Yleisin RFLP-kuvio inkuboitujen näytteiden bakteeriklooneilla oli numero 1 (kuva 7). Neljän kloonin kohdalla sekvensointi ei onnistunut.

Taulukko 4. Anaerobisesti 10 kuukautta 8 °C inkuboidun 1,8-2,3 metrin syvyydestä otetun maanäytteen bakteerikloonien jakautuminen restriktiokuvioryhmiin, kloonien määrä ryhmissä ja ryhmistä valittujen sekvensoitujen kloonien numero.

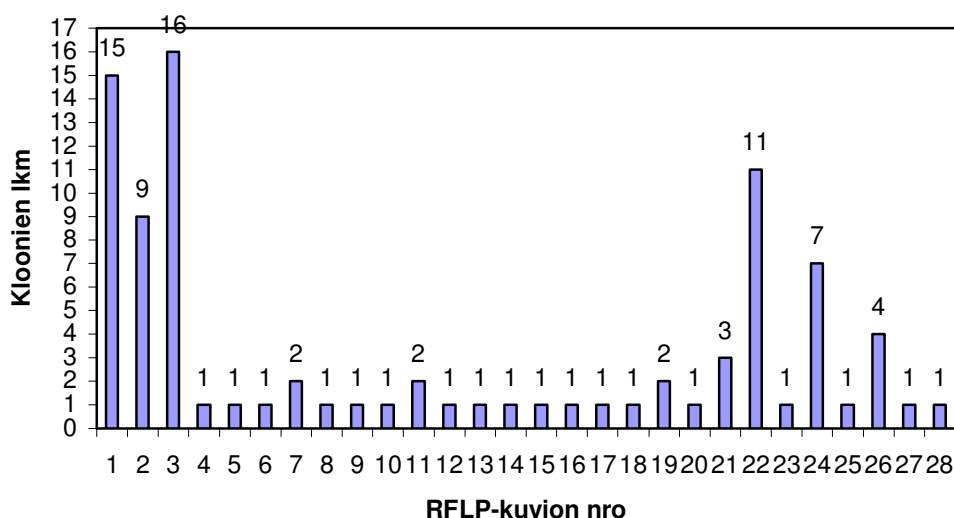
RFLP-kuvion nro	Kloonien lkm	Kloonien nro:t ¹ xE-1238	Sekvensoidut kloonit ²
1	15	1,13, 18, 24, 39, 50, 52, 66, 83, 16, 8, 12, 68, (10, 20)	13E-1238
2	9	2, 11, 27, 33, 71, 62, 64, (30, 41)	27E-1238
3	16	3, 6, 7, 25, 40, 74, 85, 87, 88, 49, (14, 73, 74, 76, 90, 91)	6E-1238
4	1	4	4E-1238*
5	1	5	5E-1238
6	1	9	9E-1238
7	2	10, 28	10E-1238
8	1	14	14E-1238
9	1	15	15E-1238
10	1	17	17E-1238
11	2	19, 63	63E-1238
12	1	21	21E-1238
13	1	22	22E-1238
14	1	23	23E-1238
15	1	26	26E-1238
16	1	29	29E-1238*
17	1	31	31E-1238
18	1	32	32E-1238
19	2	34, 35	35E-1238
20	1	36	36E-1238
21	3	37, 38, 61	38E-1238
22	11	42, 47, 78, 43, 44, 51, 65, 69, 70, 86, 89	44E-1238
23	1	45	45E-1238
24	7	53, 67, 80, 93, 82, 84, (46)	80E-1238

25	1	48	48E-1238*
26	4	54, 72, 75, 79	79E-1238
27	1	77	77E-1238*
28	1	92	92E-1238
Yht. 28	89		28

¹Suluissa olevien näytteiden ryhmittely epäselvää

²Tähdellä merkittyjen kloonien sekvensointi epäonnistui

Kuvassa 8 on esitetty graafisesti kloonien jakautuminen RFLP-kuvioryhmiin. Monissa RFLP-kuvioryhmissä oli vain yksi edustaja ja suurimmassa ryhmässä edustajia oli 16.



Kuva 8. Anaerobisesti 10 kuukautta inkuboidun, 1,8-2,3 metrin syvyydestä otetun näytteen bakteerikloonien jakautuminen ryhmiin RFLP-kuvioiden perusteella.

Arkkikloonien ryhmittymisen on esitetty taulukossa 5. Inkuboidun maanäytteen arkkiklooneista erilaisia RFLP-kuvioita muodostui 11. Kaksi kuvioryhmää oli ylivoimaisesti suurimmat, RFLP-kuviot 1 ja 6. Näistä ryhmistä sekvensoitaviksi valittiin arkkikloonit 19 ja 36. Arkkikloonit saatiin sekvensoitua vain yhdestä suunnasta. Kokonaan epäonnistuneita sekvensointeja oli kolme.

Taulukko 5. Anaerobisesti 10 kuukautta 8 °C inkuboidun, 1,8-2,3 metrin syvyydestä otetun maanäytteen arkkikloonien jakautuminen restriktiokuvioryhmiin, kloonien määrä ryhmässä ja ryhmistä valittujen sekvensoitujen kloonien numero.

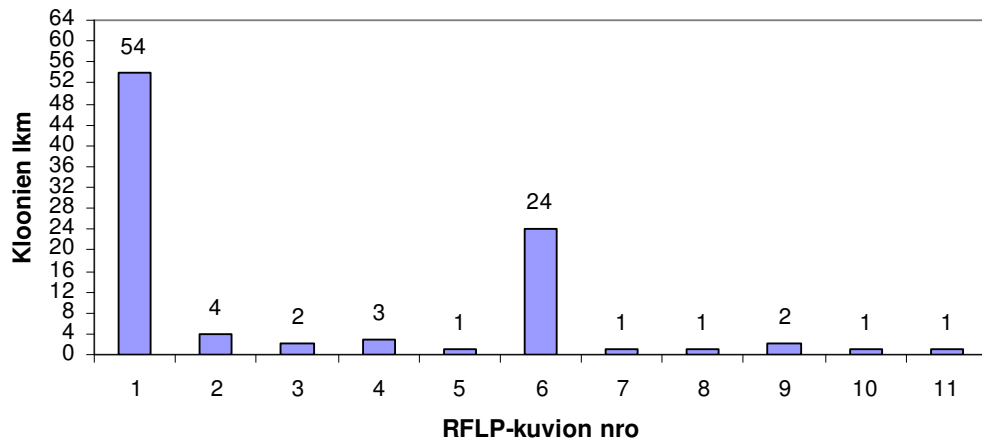
RFLP-kuvion nro	Kloonien lkm	Kloonien nro:t ¹ xA-1238	Sekvensoidut kloonit ²
1	54	1, 7, 9, 11, 12, 18-20, 23, 25, 26, 29-31, 34, 35, 37, 39-41, 45, 47, 49, 51, 52, 54, 55, 59-64, 66, 67, 69, 70, 72, 74-78, 80-83, 87-90, 96, 99, 100, (8, 10)	19A-1238
2	4	4, 8, 10, 71	10A-1238
3	2	5, 56	5A-1238

4	3	6, 13, 16	13A-1238
5	1	15	15A-1238
6	24	2, 21, 22, 24, 27, 28, 32, 36, 38, 42-44, 48, 50, 57, 65, 68, 73, 79, 85, 94, 95, 98	36A-1238
7	1	46	46A-1238*
8	1	53	53A-1238*
9	2	58, 92	92A-1238
10	1	86	86A-1238*
11	1	93	93A-1238
Yht. 11	94		11

¹Suluissa olevien näytteiden ryhmittely epäselvää

²Tähdellä merkittyjen kloonien sekvensointi epäonnistui

Kuvassa 9 on esitetty arkkikloonien jakautuminen erilaisiin RFLP-kuvioryhmiin. Arkkikloonit eivät jakautuneet yhtä moneen ryhmään kuin bakteerit ja vaihtelua oli vähemmän, koska yli puolet arkkiklooneista kuului samaan RFLP-ryhmään. Lisäksi noin neljäsosa lopuista kuului toiseen suureen ryhmään. Saatuja sekvenssejä verrattiin GenBank-tietokantaan, jotta saataisiin tietoa sekvenssien lähisukulaisista. Vertailussa käytettiin Blastn-hakua.



Kuva 9. Anaerobisesti 10 kuukautta inkuboidun, 1,8-2,3 metrin syvyydestä otetun maanäytteen arkkikloonien jakautuminen ryhmiin RFLP-kuvioiden perusteella.

Tulokseksi saatiin samanlaisuusprosentti näytteen sekvenssin ja tietokannasta löytyneen lähimmän sekvenssin välille. Taulukossa 6 on esitelty sekvenssoinnin tulokset bakteerien kohdalta. Lähes kaikki bakteerisekvenssit, joille inkuboidun näytteen sekvenssit olivat läheisiä, olivat viljelemättömistä bakteereista saatuja sekvenssejä. Tietokannasta löydetty lähin osuma oli ≥ 99 %:sti samanlainen 54 %:lla vertailluista sekvensseistä, 98 %:sti samanlainen 70 %:lla sekvensseistä ja ≤ 96 %:sti samanlainen 16 %:lla sekvensseistä. Kahden sekvenssin lähin tietokantavastaavuus oli

vain 87- tai 89-prosenttisesti samanlainen. Monet tietokannasta löydettyt läheiset sekvenssit kuuluivat eri proteobakteeriryhmiin, joista β -proteobakteereihin kuuluvia kloonveja oli eniten. Myös *Bacteroides*-luokkaan ja spirokeettoihin kuuluvien bakteerien sekvenssit olivat joillekin näytteille lähimpiä sukulaisia. Suurimpiin RFLP-kuviorhyymiin kuuluvien kloonien sekvenssit olivat läheisiä saastuneesta pohjavedestä ja aktiivilietteestä aiemmin löydetyille bakteereille. Suurimman RFLP-kuvionryhmän läheisin tietokannasta löydetty sekvenssi oli 99-prosenttisesti samanlainen aiemmin hiilivedyillä ja klooratuilla liuottimilla saastuneesta maaperästä saadun sekvenssin kanssa. Sekvensoidun kloonin 80E-1238, joka kuului viiden muun kloonin kanssa RFLP-ryhmään E24, lähin osuma tietokannasta oli *Photorhabdus luminescens*in 16S rRNA-geenin osittainen sekvenssi, mutta useat muut yhtä läheiset sekvenssit olivat *Escherichia coli*n genomisia sekvenssejä.

Taulukko 6. Anaerobisesti 10 kuukautta inkuboidun, 1,8-2,3 metrin syvyydestä otetun maanäytteen sekvensoitujen bakteerikloonien lähimmät osumat sekvenssitietokannasta.

RFLP-kuvion nro	Sekvensoidun kloonin tunnus	Kloonien lkm	Lähin osuma 16S rRNA-geenin osittaiselle sekvenssille GenBank-tietokannasta	Samanlaisuus-% n. 600 bp:n sekvenssille	Luokittelu	Viite	Näyteympäristö
E1	13E-1238	14	Viljelemätön eubakteeriklooni WCHB1-29, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	<i>Bacteroides</i> -ryhmä	Dojka, M. A. ym. 1998. Appl. Environ. Microbiol. 64 (10), 3869-3877	Saastunut pohjavesi
E2	27E-1238	7	Viljelemätön β -proteobakteeriklooni 36-9, ositt. 16S rRNA-geeni	99 %	β -proteobakteerit	Bakermans, C. ja Madsen, E. L. 2002. Microb. Ecol. 44 (2), 95-106	Saastunut pohjavesi
E3	6E-1238	10	<i>Nordella oligomobilis</i> osittainen 16S rRNA-geeni	97 %	α -proteobakteerit	La Scola ym. Julkaisematon	Tuntematon
E3 ¹	6E-1238	10	Viljelemätön lietebakteeri H34, osittainen 16S rRNA-geeni	96 %	α -proteobakteerit	Juretschko, S. ym. 2002. Syst. Appl. Microbiol. 25(1), 84-99	Aktiiviliete
E5	5E-1238	1	Viljelemätön bakteeriklooni ASG1, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	β -proteobakteerit	Marchesi, J. R. ja Weightman, A. J. 2003. Appl. Environ. Microbiol. 69 (8), 4375-4382	Rikastus-viljelmä
E6	9E-1238	1	Viljelemätön eubakteeriklooni WCHB1-30, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	spirokeetat	Dojka, M. A. ym. 1998. Appl. Environ. Microbiol. 64 (10), 3869-3877	Saastunut pohjavesi
E7	10E-1238	2	Viljelemätön eubakteeriklooni WCHB1-12, osittainen 16S rRNA-geeni	98 %	δ -proteobakteerit	Dojka, M. A. ym. 1998. Appl. Environ. Microbiol. 64 (10), 3869-3877	Saastunut pohjavesi
E8	14E-1238	1	Viljelemätön bakteeriklooni KD2-16, osittainen 16S rRNA-geeni	97 %	<i>Bacteroides</i> -ryhmä	Zhang, R. ym. Julkaisematon	Uloste

E8 ¹	14E-1238	1	Viljelemätön eubakteeriklooni WCHB1-32, osittainen 16S rRNA-geeni	97 %	<i>Bacteroides</i> -ryhmä	Dojka, M. A. ym. 1998. Appl. Environ. Microbiol. 64 (10), 3869-3877	Saastunut pohjavesi
E9	15E-1238	1	Viljelemätön β -proteobakteeriklooni 36-9, ositt. 16S rRNA-geeni	97 %	β -proteobakteerit	Bakermans, C. ja Madsen, E. L. 2002. Microb. Ecol. 44 (2), 95-106	Saastunut pohjavesi
E10	17E-1238	1	Viljelemätön bakteeriklooni KD3-5, osittainen 16S rRNA-geeni	98 %	<i>Bacteroides</i> -ryhmä	Zhang, R. ym. Julkaisematon	Uloste
E11	63E-1238	2	<i>Syntrophus</i> sp. klooni B2, osittainen 16S rRNA-geeni	98 %	δ -proteobakteerit	Zengler, K. ym. 1999. Nature 401(6750), 266-269	Rikastus-viljelmä
E12	21E-1238	1	Viljelemätön eubakteeriklooni WCHB1-30, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	spirokeetat	Dojka, M. A. ym. 1998. Appl. Environ. Microbiol. 64 (10), 3869-3877	Saastunut pohjavesi
E13	22E-1238	1	<i>Burkholderia cepacia</i> -kanta B9, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	β -proteobakteerit	Lee, Y. A. ym. 2003 Plant Dis. 87(5), 601	Kasvi-materiaali
E14	23E-1238	1	Viljelemätön bakteeriklooni ASG1, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	β -proteobakteerit	Marchesi, J. R. ja Weightman, A. J. 2003. Appl. Environ. Microbiol. 69 (8), 4375-4382	Rikastus-viljelmä
E15	26E-1238	1	Viljelemätön bakteeriklooni LKC2.127-11, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	nitrospinat	Engel, A. S. ym. Julkaisematon	Tuntematon
E15 ¹	26E-1238	1	Viljelemätön bakteeriklooni SJA-36, osittainen 16S rRNA-geeni	97 %	fibrobakteerit	von Wintzingerode, F. ym. 1999. Appl. Environ. Microbiol. 65 (1), 283-286	Saastunut maaperä
E17	31E-1238	1	Viljelemätön maabakteeri PBS-37, osittainen 16S rRNA-geeni	89 %	planktonmykeetit, OP3 kand. divisioona	Derakshani, M. ym. 2001. Appl. Environ. Microbiol. 67 (2), 623-631	Hapeton maaperä

E18	32E-1238	1	Viljelemätön bakteeriklooni ZZ15C1, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	β -proteobakteerit	Alfreider, A. ja Vogt, C. Julkaisematon	Saastunut pohjavesi
E18 ¹	32E-1238	1	<i>Acidovorax defluvii</i> 16S rRNA-geeni	99 %	β -proteobakteerit	Schulze, R. ym. 1999. Syst. Appl. Microbiol. 22(2), 205-214	Aktiiviliete
E19	35E-1238	2	Viljelemätön eubakteeriklooni WCHB1-30, osittainen 16S rRNA-geeni	95 %	spirokeetat	Dojka, M. A. ym. 1998. Appl. Environ. Microbiol. 64 (10), 3869-3877	Saastunut pohjavesi
E20	36E-1238	1	Viljelemätön α -proteobakteeri, osittainen 16S rRNA-geeni	96 %	α -proteobakteerit	Loy, A. ym. Julkaisematon	Pullotettu vesi
E20 ¹	36E-1238	1	Tuntematon α -proteobakteeri JP57, osittainen 16S rRNA-geeni	95 %	α -proteobakteerit	Eilers, H. ym. 2001. Appl. Environ. Microbiol. 67 (11), 5134-5142	Meren pintavesi
E21	38E-1238	3	Viljelemätön bakteeriklooni ASG1, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	β -proteobakteerit	Marchesi, J. R. ja Weightman, A. J. 2003. Appl. Environ. Microbiol. 96 (8), 4375-4382	Rikastus-viljelmä
E22	44E-1238	11	Viljelmätön eubakteeriklooni WCHB1-30, osittainen 16S rRNA-geeni	100 %	spirokeetat	Dojka, M. A. ym. 1998. Appl. Environ. Microbiol. 64 (10), 3869-3877	Saastunut pohjavesi
E23	45E-1238	1	Viljelemätön eubakteeri OCG6, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	sphingobakteerit	Watanabe, K. ym. 2001. J. Microbiol. Methods 44 (3), 253-262	Saastunut pohjavesi
E24	80E-1238	6	<i>Photorhabdus luminescens</i> , osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	γ -proteobakteerit	Wang, X. ym. Julkaisematon	
E26	79E-1238	4	Viljelemätön eubakteeriklooni WCHB1-12, osittainen 16S rRNA-geeni	98 %	δ -proteobakteerit	Dojka, M. A. ym. 1998. Appl. Environ. Microbiol. 64 (10), 3869-3877	Saastunut pohjavesi

E28	92E-1238	1	Viljelemätön bakteeri ACE-38, osittainen 16S rRNA-geeni	87 %	plankto- mykeetit, OP11 kand. divisioona	Bowman, J. P. ym. 2000. Environ. Microbiol. 2 (2), 227-237	Sedimentti
-----	----------	---	--	------	---	---	------------

¹Taulukkoon laitettu allekkain toinen yhtiä lähellä ollut osuma GenBank-tietokannasta, jos lähin osuma on julkaisematon tulos.

Taulukossa 7 on esitelty inkuboidun näytteen arkkikloonien sekvensoinnin tulokset. Suurimpaan RFLP-kuvioryhmään kuulunut arkkiklooni, joka sekvensoitiin, oli läheistä sukua aiemmin riisipellon maaperästä eristetyille arkkikloonille. Myös muihin suurempiin ryhmiin kuuluvat arkkikloonit olivat läheisiä toisille maaperästä eristetyille arkeille. Muutama sekvenssi oli läheistä sukua endosymbionttisille metanogeneille. Vertailtaessa inkuboidun näytteen arkkikloonien sekvenssejä tietokantaan, lähes kaikille löytyi ≥ 97 -prosenttisesti läheinen sekvenssi. Ainoastaan RFLP-ryhmään A9 kuuluneille kahdelle kloonille tietokannan sekvenssi oli vain 93-%:sti samanlainen. Kaikki sekvenssien lähimmät osumat kuuluivat eurarkkeihin.

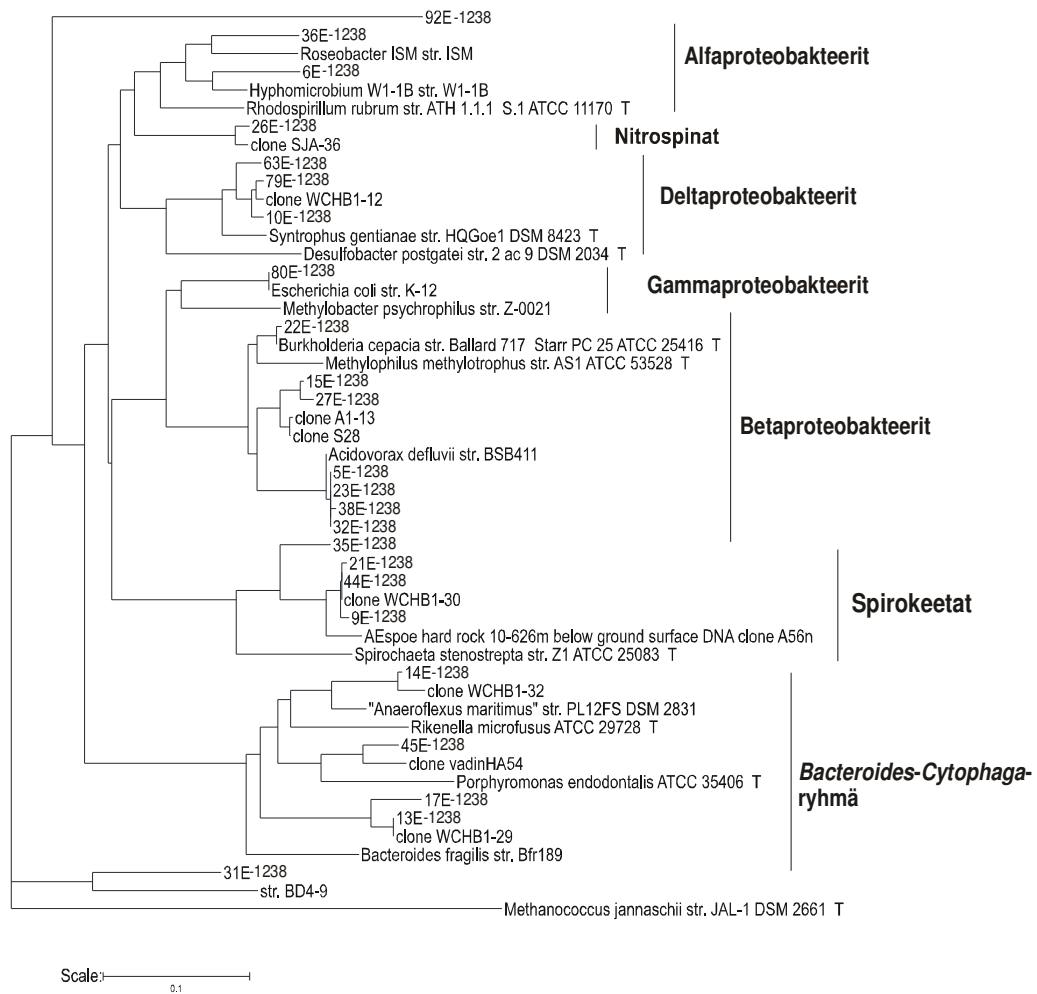
Taulukko 7. Anaerobisesti 10 kuukautta inkuboidun, 1,8-2,3 metrin syvyydestä otetun maanäytteen sekvensoitujen arkkikloonien lähimmät osumat sekvenssitietokannasta.

RFLP- kuvion nro	Sekvensoidun kloonin numero	Kloonien lkm	Lähin osuma 16S rRNA-geenin osittaiselle sekvenssille GenBank-tietokannasta	Samanlaisuus- % n. 600 bp:n sekvenssille	Luokittelu	Viite	Näyteympäristö
A1	19A-1238	54	Viljelemätön arkkiklooni AS08-03, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	eurarkit	Lueders, T. ja Friedrich, M. 2000. Appl. Environ. Microbiol. 66(7) 2732-2742	Maaperä
A2	10A-1238	4	Viljelemätön arkkimetanogeeniklooni R9, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	eurarkit	Bolliger, C. Julkaisematon	Saastunut maaperä
A3	5A-1238	2	Viljelemätön arkkiklooni SJC-125a, osittainen 16S rRNA-geeni	98 %	eurarkit	von Wintzingerode, F. ym. 1999. Appl. Environ. Microbiol. 65 (1), 283-286	Saastunut maaperä
A4	13A-1238	3	Viljelemätön arkkiklooni MB-19, 16S rRNA-geeni	97 %	eurarkit	Basiliko, N. ym. 2003. Geomicrobiol. J. 20, 563-577	Suomaaperä
A5	15A-1238	1	<i>Caenomorpha</i> sp.2:n metanogeeninen endosymbiontti, ositt. 16S rRNA-geeni	99 %	eurarkit	van Hoek, A. H. ym. 2000. Mol. Biol. Evol. 17(2), 251-258	Ripsieläimen symbionttina
A6	36A-1238	24	Viljelemätön arkkiklooni GW70-10-49, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	eurarkit	Uz, I. ym. Julkaisematon	Maaperä
A6 ¹	36A-1238	24	Viljelemätön arkkiklooni SJD-114, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	eurarkit	von Wintzingerode, F. ym. 1999. Appl. Environ. Microbiol. 65 (1), 283-286	Saastunut maaperä
A9	92A-1238	2	Tunnistamaton arkkiklooni Rot10, osittainen 16S rRNA-geeni	93 %	eurarkit	Zepp Falz, K. ym. 1999. Appl. Env. Microbiol. 68(8). 3899-3907	Järvisedimentti

A11	A93-1238	1	<i>Caenomorpha</i> sp.2:n metanogeeninen endosymbiontti, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	eurakit	van Hoek, A. H. ym. 2000. Mol. Biol. Evol. 17(2), 251-258	Ripsieläimen symbionttina
-----	----------	---	--	------	---------	--	------------------------------

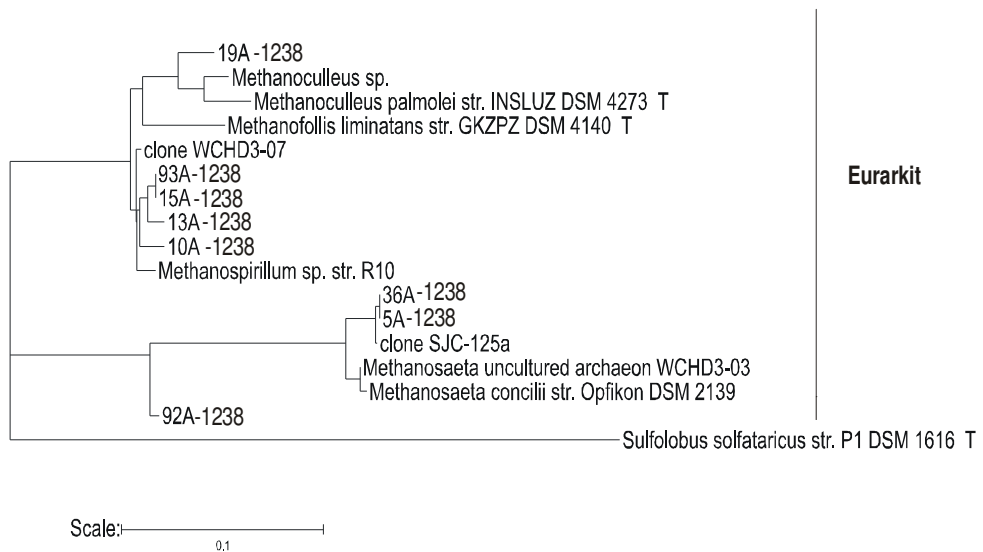
¹Taulukkoon laitettu allekkain toinen yhtälähellä ollut osuma GenBank-tietokannasta, jos lähin osuma on julkaisematon tulos.

Sekvenssit linjattiin ja fylogeneettiset puut rakennettiin Ribosomal Database Project II:n Phylip-paketin avulla. Sekvenssien fylogeneettisten etäisyyksien määrittelyssä käytettiin maximum likelihood-algoritmiä. Kymmenen kuukauden ajan laboratoriossa inkuboidun näytteen bakteerikloonien sekvensseistä, sekvenssien lähinaapureista sekä puhdasviljelmistä rakennettu puu on esitetty kuvassa 10. Puussa käytettiin ulkoryhmänä *Methylococcus jannashii* -arkkityyppikantaa. Näytteestä saadut sekvenssit jakautuvat neljään proteobakteeriryhmään α , β , γ ja δ . Kloonin 26E-1238 on läheistä sukua triklooribentseeniä hajottavan mikrobisynteesin kloonille SJA-36, jonka fylogeneettinen sijoitus on epävarmaa. RDP:n mukaan se on sukua joko nitrospinoille tai δ -proteobakteereille. Oman haaransa puussa muodostavat δ -proteobakteerin *Syntrophus* sukulaiset, joita löytyi sekä omista sekvensseistä että niiden läheisistä naapureista, kuten saastuneesta maasta eristetty kloonin WCHB1-12. Lisäksi useampi sekvenssi oli läheistä sukua viljellylle spirokeettabakteerille sekä kloonille WCHB1-30. Kloonin 80E-1238 sekvenssi on läheinen *E. coli* sekvenssin kanssa. Inkuboidun näytteen bakteerikloonien sekvensseistä ei löytynyt kovin läheisiä vastaavuuksia metylotrofien sekvensseille. Suurimmaksi ryhmäksi muodostui β -proteobakteerit, johon kuului yhteensä 6 eri sekvenssiä. Näistä neljä oli läheistä sukua toisilleen sekä *Acidovorax*-bakteerille. Monimuotoisin ryhmä oli *Bacteroides-Cytophaga* -ryhmä, johon omien sekvenssien lisäksi kuului kaksi saastuneelta pohjavesialueelta eritettyä kloonin (WCHB1-32 ja WCHB1-29). Puussa kauimpina muista ovat sekvenssit 92E-1238 ja 31E-1238, joille sekvenssitietokannasta löytyneiden lähimpien sekvenssien samanlaisuusprosentit olivat suhteessa alhaisemmat kuin muiden kloonien sekvenssien. Bakteerikloonit 15E-1238 ja 27E-1238 olivat läheisiä sukulaisia RDP-tietokannan klooneille S28 ja A1-13. Nämä molemmat kloonit ovat läheisiä *Nitrosomonas*-suvun bakteereille.



Kuva 10. Anaerobisesti 10 kuukautta inkuboidun, 1,8-2,3 metrin syvyydestä otetun maanäytteen bakteeriklooneista rakennettu fylogeneettinen puu. Mittakaava: 10 nukleotidin muutosta toiseksi/100 nukleotidia.

Inkuboidun näytteen arkkisekvenssit linjattiin ja niistä rakennettiin fylogeneettiset puut kuten bakteerikloonien sekvensseistä. Kuvassa 11 esitetystä fylogeneettisessä puussa ulkoryhmänä käytettiin krenarkkeihin kuuluvaa *Sulfolobus* -arkkityyppikantaa, koska kaikki maanäytteestä saadut sekvenssit kuuluivat eurarkkeihin. Puussa voidaan erottaa kaksi selvää haaraa. Seitsemän arkkisekvenssiä kuului selkeästi metanogeenisiin arkkeihin, *Methanomicrobia*-lahkoon. Myös 92A-1238 -kloonin voi olettaa kuuluvan samaan lahkoon, vaikka se on puussa muista jonkin verran erillään. Neljä kloonia on samassa haarassa *Methanospirillum*-kannan sekvenssin kanssa, joka kuuluu eri sukuun kuin *Methanofollis*- ja *Methanoculleus*-lajit. Kaksi arkkikloonia, jotka olivat myös läheistä sukua triklooribentseeniä hajottavan mikrobiyhteisön kloonille SJC-125a, olivat läheisiä *Methanosarcinales*-heimon *Methanosaeta*-arkkisuvun kantakokoelmassa olevalle kannalle ja viljelemättömälle saastuneelta



Kuva 11. Anaerobisesti 10 kuukautta inkuboidun, 1,8-2,3 metrin syvyydestä otetun näytteen arkkiklooneista rakennettu fylogeneettinen puu. Mittakaava: 10 nukleotidin muutosta toiseksi/100 nukleotidia.

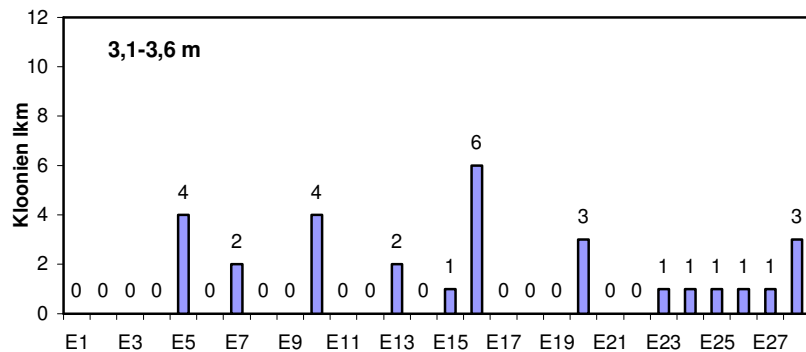
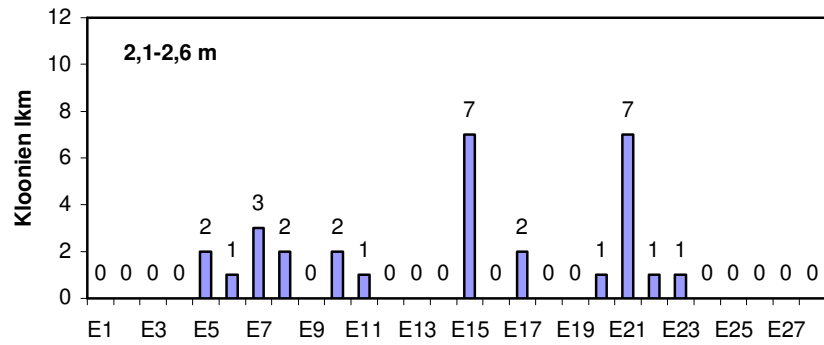
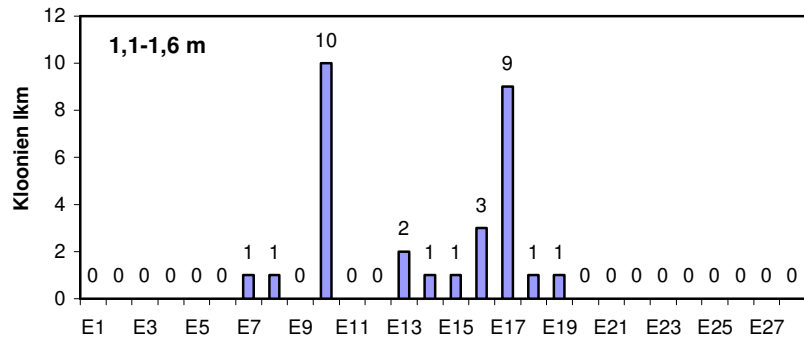
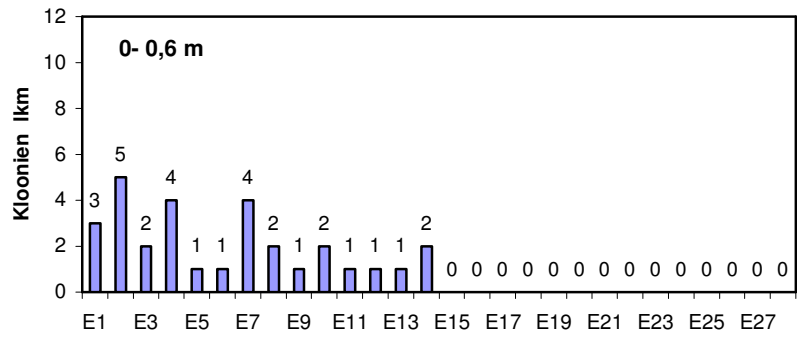
pohjavesialueelta eristetyille kloonille WCHD3-03. Samaan haaraan kuului myös yksi klooni, tosin *Methanosaeta*-lajille kaukaisempi kuin toiset sekvenssit. Sekä arkki- että bakteerinäytteiden sekvenssit linjautuivat kaikki toistensa kanssa, joten ne ovat kaikki sisällytetty puihin. Kaikista inkuboidusta maanäytteestä saaduista sekvensseistä 80 % oli läheisiä aiemmin hiilivedyillä saastuneista maista saaduille sekvensseille.

Myös inkuboimattomien näytteiden kloonien PCR-tuotteet jaoteltiin ryhmiin RFLP:n avulla. Ryhmittely, kloonien määrä ryhmissä sekä sekvensointiin valitut kloonit on esitelty taulukossa 8. Inkuboimattomien maan eri syvyyksistä otettujen näytteiden bakteerikloonit jakautuivat yhteensä 28 erilaiseen RFLP-ryhmään. Suurimpaan ryhmään kuului 18 kloonia, joista kaksi valittiin sekvensoitavaksi; kloonit 85E-1572 ja 100E-1576. Muita suurempia ryhmiä olivat RFLP-kuviot E17, E7, E15, E16, E5 ja E21. Näistä sekvensointiin valittiin kloonit 65E-1572, 75E-1572, 108E-1576, 86E-1572, 36E-1568, 97E-1576 ja 83E-1572. Inkuboimattomista maanäytteistä sekvensointiin valittiin ensisijaisesti sellaisia klooneja, jotka olivat anaerobisesta näytesyvyydestä (2,1-2,6 m).

Taulukko 8. Inkuboimattomien maaperän profiilinäytteiden bakteerikloonien jakautuminen restriktiokuvioryhmiin, kloonien määrä ryhmissä ja ryhmistä valittujen sekvensoitujen kloonien numero.

RFLP- kuvion nro	Kloonien lkm	Kloonien nro:t (näytteenottoisyvyys m)	Sekvensoidut kloonit
E1	3	1, 17, 9 (0-0,6)	1E-1564
E2	5	2, 7, 10, 13, 15 (0-0,6)	7E-1564
E3	2	3, 4 (0-0,6)	3E-1564
E4	4	5, 18, 19, 22 (0-0,6)	19E-1564
E5	7	6 (0-0,6), 64, 68 (2,1-2,6), 97, 112, 116, 117 (3,1-3,6)	97E-1576
E6	2	8 (0-0,6), 72 (2,1-2,6)	8E-1564
E7	10	11, 16, 23, 25 (0-0,6), 50 (1,1-1,6), 70, 73, 75 (2,1-2,6), 104, 108 (3,1-3,6)	75E-1572, 108E-1576
E8	5	2, 30 (0-0,6), 54 (1,1-1,6), 82, 84 (2,1-2,6)	82E-1572
E9	1	14 (0-0,6)	14E-1564
E10	18	40, 43, 45, 46, 49, 51, 52, 53, 55 (1,1-1,6), 85, 90 (2,1-2,6), 91, 95, 99, 100 (3,1-3,6)	85E-1572, 100E-1576
E11	2	21 (0-0,6), 88 (2,1-2,6)	88E-1572
E12	1	24 (0-0,6)	24E-1564
E13	5	26(0-0,6), 31, 32 (1,1-1,6), 92, 93 (3,1-3,6)	93E-1576
E14	3	28, 29(0-0,6), 33 (1,1-1,6)	29E-1564
E15	9	35(1,1-1,6), 69, 74, 78, 79, 86, 87, 89 (2,1-2,6), 96 (3,1-3,6)	86E-1572
E16	9	36, 38, 39(1,1-1,6), 94, 102, 107, 114, 119, 120 (3,1-3,6)	36E-1568
E17	11	37, 41, 47, 48, 56, 57, 58, 59, 60 (1,1-1,6), 65, 67 (2,1-2,6)	65E-1572
E18	1	42 (1,1-1,6)	42E-1568
E19	1	44 (1,1-1,6)	44E-1568
E20	4	61(2,1-2,6), 98, 109, 118 (3,1-3,6)	61E-1572
E21	7	62, 63, 66, 76, 77, 80, 83 (2,1-2,6)	83E-1572
E22	1	71 (2,1-2,6)	71E-1572
E23	1	81 (2,1-2,6)	81E-1572
E24	1	103 (3,1-3,6)	103E-1576
E25	1	105 (3,1-3,6)	105E-1576
E26	1	106 (3,1-3,6)	106E-1576
E27	1	110 (3,1-3,6)	110E-1576
E28	3	111, 113, 115 (3,1-3,6)	111E-1576
Yht. 28	119		30

Eri syvyyksistä otettujen näytteiden välillä oli RFLP-kuvioryhmiin jaoteltaessa eroavaisuuksia, kuten kuvasta 12 voi havaita.



RFLP-kuvion nro

Kuva 12. Inkuboimattomien maan profiilinäytteiden bakteerikloonien jakautuminen RFLP-ryhmiin syvyyksittäin.

Pintamaasta saadut bakteerikloonit jakautuivat 14 eri ryhmään. Ainostaan pintamaan klooneja sisältäviä RFLP-kuvioryhmiä oli kuusi. Yleisimmät pintamaan kloonien kuviot olivat E2, E4 ja E7. 1,1-1,6 metrin syvyydestä otetuissa näytteissä oli edelleen useita eri RFLP-kuvioryhmiä, joihin kloonit jakautuivat. Tässä syvyydessä oli kuitenkin vähiten erilaisia RFLP-ryhmiä, 10 kappaletta. Vallitsevat RFLP-kuvioryhmät olivat E10 ja E17, joissa molemmissa tämän syvyyden kloonit olivat suurin ryhmä. RFLP-ryhmät, joihin kuului vain tämän syvyyden klooneja, olivat kuvioryhmät E18 ja E19. Hapettomasta maasta, 2,1-2,6 metrin syvyydestä eristetyt bakteerikloonit jakautuivat 12 eri RFLP-kuvioryhmään. E15 ja E21 olivat vallitsevia ryhmiä, ja E21-ryhmän kaikki kloonit olivat tästä syvyydestä. Tästä syvyydestä ei löytynyt RFLP-ryhmää E13, johon muista syvyyksistä saadut yhteensä viisi kloonia kuului. Syvimmältä saadut kloonit olivat myös erilaisia, sillä ne jakaantuivat yhteensä 13 RFLP-kuvioryhmään. Vain tästä syvyydestä saatuja klooneja oli viidessä kuvioryhmässä, E24-E28. Suurin kuvioryhmä tässä syvyydessä oli E16, johon kuului 6 kloonia tästä syvyydestä.

Maaperän profiilia kuvaavien inkuboimattomien maanäytteiden arkkikloonien jaottelu restriktiokuvioryhmiin on esitetty taulukossa 9. Arkkikloonit jakautuivat 15 erilaiseen RFLP-kuvioryhmään. RFLP-kuvio A1 oli suurin ryhmä, johon kuului lähes kolmasosa kaikista arkkiklooneista. Kolmesta suurimmasta ryhmästä valittiin kustakin kaksi kloonia sekvensoitavaksi, muista ryhmistä yksi kloon. Valinta painottui jälleen syvyyden 2,1-2,6 m klooneihin anaerobisten mikrobien löytämiseksi.

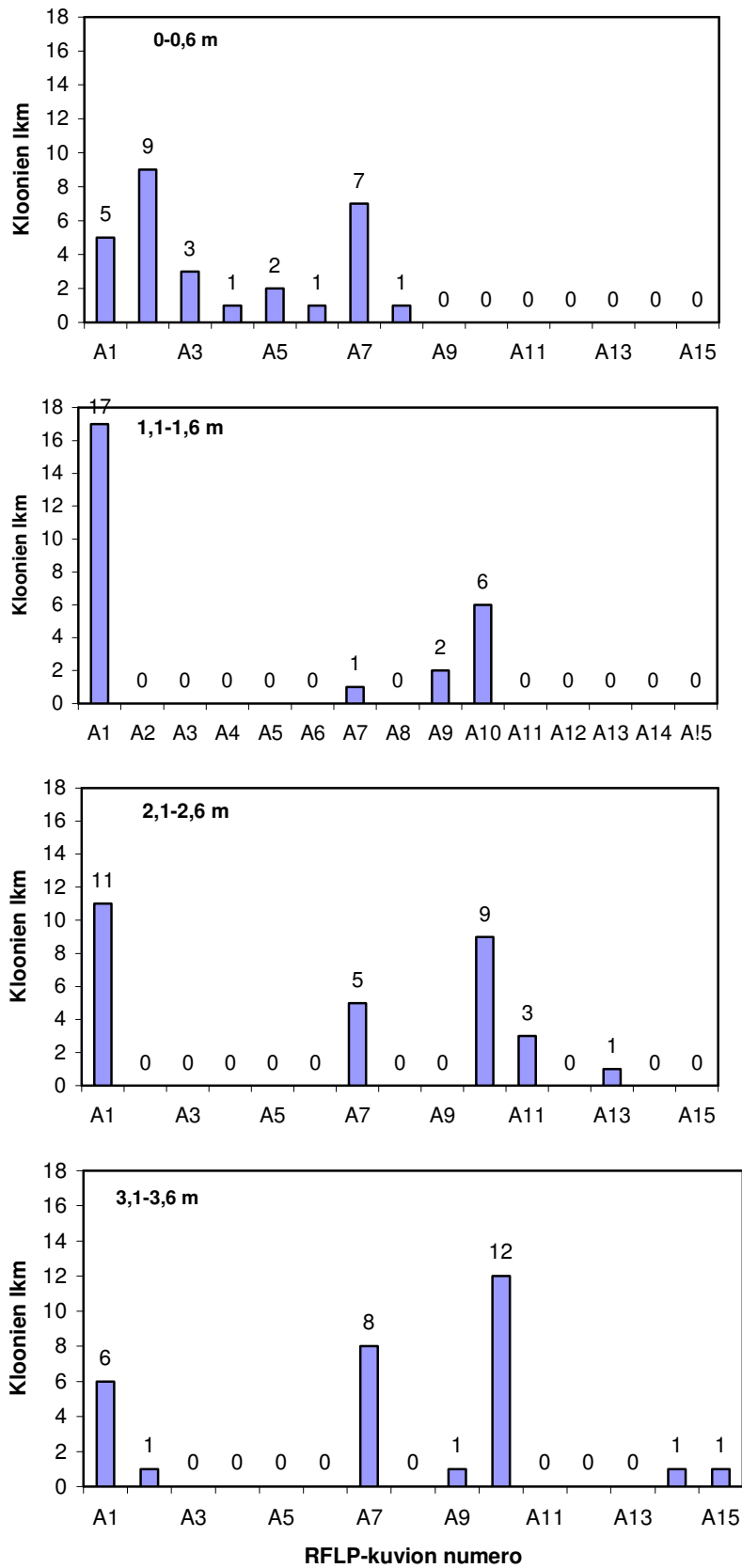
Taulukko 9. Inkuboimattomien maaperän profiilinäytteiden arkkikloonien jakautuminen restriktiokuvioryhmiin, kloonien määrä ryhmissä ja ryhmistä valittujen sekvensoitujen kloonien numero.

RFLP-kuvion nro	Kloonien lkm	Kloonien nro:t (näytteenottosyvyys m)	Sekvensoidut kloonit
A1	42	13, 15, 19, 23, 24 (0-0,6), 32, 33, 35, 38, 41, 42, 43, 44, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 59 (1,1-1,6), 65, 68, 72, 73, 76, 79, 82, 83, 88, 89, 90(2,1-2,6), 95, 102, 106, 109, 110, 119 (3,1-3,6)	79A-1572, 106A-1576
A2	10	2, 3, 7, 10, 11, 14, 20, 25, 30 (0-0,6), 101 (3,1-3,6)	93A-1576
A3	3	4, 12, 27 (0-0,6)	12A-1564
A4	1	5 (0-0,6)	5A-1564
A5	2	6, 18 (0-0,6)	6A-1564
A6	1	9 (0-0,6)	9A-1564
A7	22	1, 8, 16, 21, 22, 26, 29 (0-0,6), 46 (1,1-1,6), 61, 75, 78, 80, 87 (2,1-2,6), 94, 99, 100, 107, 114, 115, 116, 118 (3,1-3,6)	80A-1572, 115A-1576
A8	1	28 (0-0,6)	28A-1564

A9	3	31, 58 (1,1-1,6), 93(3,1-3,6)	58A-1568
A10	28	34, 36, 37, 39, 40, 55 (1,1-1,6), 64, 67, 70, 71, 74, 77, 81, 84, 85 (2,1-2,6), 91, 92, 96, 97, 98, 103, 104, 108, 111, 112, 117, 120(3,1-3,6)	77A-1572, 103A-1576
A11	3	60, 63, 86 (2,1-2,6)	63A-1572
A13	1	69 (2,1-2,6)	69A-1572
A14	1	105 (3,1-3,6)	105A-1576
A15	1	113 (3,1-3,6)	113A-1576
Yht. 15	119		17

Jälleen arkkikloonien ryhmittelyssä yksi ryhmä muodostui ylivoimaisesti suurimmaksi. Kloonit jakautuvat kuitenkin kaikkiin neljään eri syvyyteen (kuva 13). Suurimpaan ryhmään kuuluvien kloonien määrässä pääpaino oli silti kahdella keskimmaisella syvyydellä, 1-1,6 metriin ja 2,1-2,6 metriin.

Pintamaan arkkikloonit jakautuivat useimpaan erilaiseen RFLP-kuvioryhmään. Erilaiset kloonit jakautuivat yhteensä kahdeksaan ryhmään. Suurin kuvioryhmä tässä syvyydessä on A2, johon kuului yhdeksän kloonia. Tähän kuvioryhmään kuuluvia klooneja ei löydy muista ryhmistä kuin yksi, syvyydestä 3,1-3,6 metriä. Useita muissa syvyyksissä esiintyviä ryhmiä ei pintamaasta odotetusti löytynyt. Syvyydestä 1,1-1,6 m eristetyistä klooneista löytyi vain neljää erilaista RFLP-kuviota. Suurin ryhmä oli A1, johon noin kaksi kolmasosaa syvyyden klooneista kuului. Toinen suurempi ryhmä tässä syvyydessä oli A10. Anaerobisesta vyöhykkeestä otetun näytteen arkkikloonit jakautuivat viiteen eri RFLP-ryhmään. Suurimmat ryhmät olivat kuten ylemmässä syvyydessäkin A1 ja A10. A1-ryhmä ei ollut enää dominoiva kuten ylemmässä näytteessä, vaan muihinkin ryhmiin kuului useampia klooneja. Lisäksi tässä syvyydessä oli ainoa A13-ryhmään kuuluva klooni. Syvimmältä otetusta maanäytteestä eristetyt arkkikloonit jakautuivat seitsemään erilaiseen kuvioryhmään. Yllättäen tässä syvyydessä oli siis toiseksi eniten erilaisia klooneja. Suurimman ryhmän muodosti RFLP-kuvio A10, johon kuului 12 kloonia. Tässä syvyydessä oli myös kaksi kloonia, jotka muodostivat omat RFLP-kuvioryhmänsä, joita ei muista syvyyksistä löytynyt.



Kuva 13. Inkuboimattomien maan profiilinäytteiden arkkikloonien jakautuminen RFLP-ryhmiin syvyyksittäin.

Taulukossa 10 on esitelty eri syvyyksistä eristettyjen sekvensoitujen bakteerikloonien tietokantavertailun tulokset. Kuten inkuboidun näytteen sekvensoinnin tuloksissakin, monet lähimmistä osumista on viljelemättömistä bakteereista molekyylibiologisin menetelmin saatuja sekvenssejä. Pintamaassa 64 % saadusta bakteerisekvensseistä oli läheisiä sukulaisia maaperästä eristetyille bakteereille. Maan syvemmistä osista saatujen sekvenssien lähimmistä osumista 42 % oli öljyllä tai klooratuilla liuottimilla saastuneesta maaperästä tai pohjavedestä saatuja viljelemättömiä klooneja. Suurin yksittäinen luokka, johon lähimmät osumat kuuluivat, oli γ -proteobakteerit. Muut luokat, joihin sekvenssien lähimmät osumat jakautuivat, olivat β -, δ - ja α -proteobakteerit, aktinobakteerit, sphingo- ja fibrobakteerit. Yhden sekvenssin lähin osuma kuului OP3-kandidaattikategoriaan, ja sillä oli myös alhaisin samanlaisuusprosentti, 95 %. OP3-kandidaattikategoria on yksi kahdestatoista Yellowstonen kansallispuistosta löydetystä bakteeriryhmästä, jonka edustajia ei ole pystytty sijoittamaan mihinkään olemassa olevaan bakteeritaksoniin (Hugenholz ym. 1998). Tietokannasta löydetty lähin osuma oli ≥ 99 %:sti samanlainen 47 %:lla vertailuista sekvensseistä. ≤ 96 %:sti samanlaisen osuman tietokannasta sai 17 % näytteistä.

Pintamaata hallitsivat mm. aktinobakteereihin kuuluva *Streptomyces*-sukuun kuuluva laji ja jäästä saatu *Pseudomonas*-klooni ARK9971. Syvyydestä 1,1-1,6 saatujen kloonien sekvenssien lähimmät osumat kuuluivat β - ja γ -proteobakteereihin. Yleisimmät kloonit olivat läheisiä β -proteobakteereille sekä γ -proteobakteereihin kuuluvalle metylotrofille. Anaerobista syvyyttä, 2,1-2,6 metriä, hallitsivat β - ja δ -proteobakteerit. Tässä syvyydessä suurimmat RFLP-ryhmät olivat E17 ja E21, joista valittujen kloonien sekvenssit olivat läheisiä β -proteobakteerikloonille, joka oli löytynyt saastuneesta maaperästä (*Azoarcus* sp.:n sukulainen) ja *Syntrophus*-bakteerilajille (δ -proteobakteeri), jonka tiedetään osallistuvan öljyhiilivetyjen hajotukseen metanogeenisten arkkien kanssa. Syvimmältä otetun näytteen kloonit jakautuivat moneen eri luokkaan. Metylotrofeja löytyi myös tästä syvyydestä ja eräs erikoinen osuma oli *Cellulomonadaceae*-heimon kanta. RFLP-kuvion sekvensoitua kloonia, jonka lähin osuma tämä oli, esiintyi kaikissa muissa syvyyksissä paitsi 2,1-2,6 metrissä.

Taulukko 10. Inkuboimattomien maaperän profiilinäytteiden sekvensoitujen bakteerikloonien lähimmät osumat tietokannasta.

RFLP-kuvion nro	Sekvensoidun kloonin nro	Kloonien lkm	Sekvensoidun kloonin näytesyvyys m	Lähin osuma 16S rRNA-geenin osittaiselle sekvenssille GenBank-tietokannasta	Samanlaisuus-% n. 600 bp:n sekvenssille	Luokka	Viite	Näyteympäristö
E3	3E-1564	2	0-0,6	Ellin325-bakteeri, osittainen 16S rRNA-geeni	98 %	aktino-bakteerit	Sait, M. ym. 2002. Environ. Microbiol. 4 (11), 654-666	Maaperä
E6	8E-1564	2	0-0,6	<i>Bradyrhizobium</i> sp. Pp2.4, osittainen 16S rRNA-geeni	100 %	α -proteo-bakteerit	Parker, M. A. Julkaisematon	Ritsosfääri
E4	19E-1564	4	0-0,6	Jääbakteeri ARK9971, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	γ -proteo-bakteerit	Brinkmeyer, R. ym. 2003. Appl.Environ. Microbiol 69 (11),6610-6619	Napajää
E2	7E-1564	5	0-0,6	<i>Streptomyces</i> sp.11709, osittainen 16S rRNA-geeni	100 %	aktino-bakteerit	Li, W. ym. 2000	Maaperä
E12	24E-1564	1	0-0,6	Viljelemätön bakteeriklooni SL6, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	γ -proteo-bakteerit	Kielemoes, J. ym. 2002. FEMS Microbiol. Ecol.39(1), 41-55	Pintavesi
E9	14E-1564	1	0-0,6	Bakteeriklooni LB-P rikastusviljelmästä, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	tuntematon	LaPara, T. M. Julkaisematon	Jätevesi
E9 ¹	14E-1564	1	0-0,6	Viljelemätön bakteeriklooni PeM51	98 %	γ -proteo-bakteerit	Egert, M. ym. 2003. Appl. Environ. Microbiol. 69(11), 6659-6668	Toukan suolisto
E1	1E-1564*	3	0-0,6	Viljelemätön <i>Acidobacteria</i> -klooni 46h5 genomien sekvenssi	97 %	fibro-bakteerit	Quaiser, A. ym 2003. Mol. Microbiol. 50 (2), 563-575	Maanäyte

E14	29E-1564	3	0-0,6	Tunnistamaton bakteeriklooni W4-B20, osittainen 16S rRNA-geeni	93 %	tuntematon	Donachie, S. P ym. Julkaisematon	Maanäyte
E18	42E-1568	1	1,1-1,6	Ritsosfääristä eristetty maabakteeri RSI-24, osittainen 16S rRNA-geeni	96 %	flavo- bakteerit	Lukow, T. 1999. Väitös	Ritsosfääri
E19	44E-1568	1	1,1-1,6	Viljelemätön <i>Methylobacter</i> sp. klooni 17E-T1P9, osittainen 16S rRNA-geeni	98 %	γ -proteo- bakteerit	Newby, D. T. ym. Julkaisematon	Pohjavesi
E19 ¹	44E-1568	1	1,1-1,6	Viljelemätön γ -proteobakteeriklooni 8-65, osittainen 16S rRNA-geeni	98 %	γ -proteo- bakteerit	Bakermans, C. ja Madsen, E. L. 2002. Microb. Ecol. 44(2), 95-106	Saastunut maaperä
E16	36E-1568	9	1,1-1,6	Viljelemätön β -proteobakteeriklooni FTLM27, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	β -proteo- bakteerit	Carroll, A. B. ja Zinder, S. H. Julkaisematon	Saastunut maaperä
E22	71E-1572	1	2,1-2,6	Viljelemätön <i>Methylobacter</i> sp. klooni 17E-T1P9, osittainen 16s rRNA-geeni	98 %	γ -proteo- bakteerit	Newby, D. T. ym. Julkaisematon	Saastunut maaperä
E23	81E-1572	1	2,1-2,6	Viljelemätön β -proteobakteeriklooni 36-9, osittainen 16S rRNA-geeni	98 %	β -proteo- bakteerit	Bakermans, C. ja Madsen, E. L. 2002. Microb. Ecol. 44 (2), 95-106	Saastunut maaperä
E11	88E-1572	2	2,1-2,6	Viljelemätön bakteeriklooni p-4936-6Wb2 osittainen 16S rRNA-geeni	100 %	tuntematon	Leser, T. D. ym. 2002. Appl. Environ. Microbiol. 68 (2), 673-690	Suolisto
E20	61E-1572	4	2,1-2,6	<i>Methylophilus</i> sp. 040703/8067S	98 %	β -proteo- bakteerit	Xu, J. ym. Julkaisematon	Puhdasviljelmä

E21	83E-1572	7	2,1-2,6	<i>Syntrophus</i> sp. kloonin B2, osittainen 16S rRNA-geeni	97 %	δ-proteobakteerit	Zengler, K. ym. 1999. Nature, 401(6750), 266-269	Rikastusviljelmä
E15	86E-1572	9	2,1-2,6	<i>Syntrophus</i> sp. kloonin B2, osittainen 16S rRNA-geeni	98 %	δ-proteobakteerit	Zengler, K. ym. 1999. Nature, 401(6750), 266-269	Rikastusviljelmä
E7 ²	75E-1572	10	2,1-2,6	δ-proteobakteerikloonin JG37-AG-113, osittainen 16S rRNA-geeni	94 %	δ-proteobakteerit	Geissler, A. Julkaisematon	Jättemateriaali
E17	65E-1572*	11	2,1-2,6	Viljelemätön bakteerikloonin 178up, osittainen 16S rRNA-geeni	97 %	β-proteobakteerit	Simpson, J. M. ym. 2004. FEMS Microbiol. Ecol. 47, 65-75	Lanta
E17	65E-1572*	11	2,1-2,6	Viljelemätön β-proteobakteerikloonin 36-9, osittainen 16S rRNA-geeni	97 %	β-proteobakteerit	Bakermans, C. ja Madsen, E. L. 2002. Microb. Ecol. 44 (2), 95-106	Saastunut maaperä
E10 ²	85E-1572	18	2,1-2,6	Viljelemätön <i>Methylobacter</i> sp. kloonin 17E-T1P9, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	γ-proteobakteerit	Newby, D. T. ym. Julkaisematon	Pohjavesi
E24	103E-1576	1	3,1-3,6	Viljelemätön bakteerikloonin GIF10, osittainen 16S rRNA-geeni	95 %	planktonmykkeet, OP3 kand. divisioona	Alfreider, A. ym. 2002. Syst. Appl. Microbiol. 25 (2), 232-240	Saastunut pohjavesi
E25	105E-1576	1	3,1-3,6	Viljelemätön eubakteerikloonin WCHB1-29, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	<i>Bacteroides</i> -ryhmä	Dojka, M. A. ym. 1998. Appl. Environ. Microbiol. 64 (10), 3869-3877	Saastunut pohjavesi

E26	106E-1576	1	3,1-3,6	Viljelemätön <i>Methylobacter</i> sp. kloonin 17E-T1P9, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	γ -proteobakteerit	Newby, D. T. ym. Julkaisematon	Pohjavesi
E27	110E-1576	1	3,1-3,6	Tuntematon meri- α -proteobakteeri JP57, osittainen 16S rRNA-geeni	96 %	α -proteobakteerit	Eilers, H. ym. 2001. Appl. Environ. Microbiol. 67 (11), 5134-5142	Meren pintavesi
E28	111E-1576	3	3,1-3,6	Jääbakteeri ARK9971, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	γ -proteobakteerit	Brinkmeyer, R. ym. 2003. Appl. Environ. Microbiol. 69 (11), 6610-6619	Napajää
E13	93E-1576	5	3,1-3,6	<i>Cellulomonadaceae</i> str. KB8, osittainen 16S rRNA-geeni	98 %	aktinobakteerit	Akasaka, H. ym. 2003. FEMS Microbiol. Ecol. 43, 149-161	Maaperä
E8	82E-1572	5	3,1-3,6	Jääbakteeri ARK9971, osittainen 16S rRNA-geeni	97 %	γ -proteobakteerit	Brinkmeyer, R. ym. 2003. Appl. Environ. Microbiol. 69 (11), 6610-6619	Napajää
E7 ²	108E-1576	10	3,1-3,6	Jääbakteeri ARK9971, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	γ -proteobakteerit	Brinkmeyer, R. ym. 2003. Appl. Environ. Microbiol. 69 (11), 6610-6619	Napajää
E5	97E-1576	7	3,1-3,6	Viljelemätön bakteerikloni p-2330-s962-2 osittainen 16S rRNA-geeni	100 %	basillukset ja lakto-basillukset	Leser, T. D. ym. 2002. Appl. Environ. Microbiol. 68 (2), 673-690	Suolisto
E10 ²	100E-1576	18	3,1-3,6	Viljelemätön bakteerikloni p-248-o5, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	tuntematon	Leser, T. D. ym. 2002. Appl. Environ. Microbiol. 68 (2), 673-690	Suolisto

¹Taulukkoon laitettu allekkain toinen yhtä lähellä ollut osuma GenBank-tietokannasta, jos lähin osuma on julkaisematon tulos.

²Taulukossa kaksi saman RFLP-kuvion omaavaa näytettä eri näytteenottosyvyyksistä.

*Sekvenssi tulkittu kimeeriseksi.

Taulukossa 11 on inkuboimattoman maanäytteen sekvensoitujen arkkikloonien tietokantahakujen tulokset lähimmän osuman ja samanlaisuuden osalta ja lähimmän osuman luokittelu joko eurarkkeihin tai krenarkkeihin. Arkkien lähimmistä osumista suurin osa oli viljelemättömistä, tunnistamattomista klooneista. Lähin tietokannasta löydetty osuma arkkikloonien sekvensseille oli ≥ 99 %:sti samanlainen 18 %:lla sekvensseistä. ≥ 97 %:sti samanlainen sekvenssivastaavuus löytyi tietokannasta 82 %:lle arkkisekvensseistä. Erityisesti pintamaasta löytyi lähimpinä osumina viljeltyjen arkkien sekvenssejä. Pintamaan yleisimmän RFLP-kuvioryhmän sekvensoitu edustaja oli 94 %:sti samanlainen saastuneesta pohjavedestä löydetylle *Methanosarcinales* -kloonille. Toiset pintamaan yleisimpiin RFLP-kuvioihin kuuluvat kloonit olivat läheisiä aiemmin suomaasta eristetyille eurarkeille. Pintamaasta löytyi myös ainoat krenarkit lähimpinä osumina. 2,1-2,6 metrin syvyydestä saaduille klooneille lähimmät sekvenssit olivat jätevesilietteestä, suomaaperästä ja triklooribentseenillä saastuneesta maaperästä löydetyistä arkeista. Samoista ympäristöstä olivat myös syvimmältä saatujen kloonien lähimmät osumat.

Taulukko 11. Inkuboimattomien maaperän profiilinäytteiden sekvensoitujen arkkikloonien lähimmät osumat tietokannasta.

RFLP-kuvion nro	Sekvensoidun kloonin nro	Kloonien lkm	Sekvensoidun kloonin näytesyvyys m	Lähin osuma 16S rRNA-geenin osittaiselle sekvenssille GenBank-tietokannasta	Samanlaisuus-% n. 600 bp:n sekvenssille	Luokittelu	Viite	Näyteympäristö
A4	5A-1564	1	0,0-0,6	<i>Methanobacterium bryantii</i> -kanta MOHG	98 %	eurarkit	Wright, A-D., G. ja Pimm, C. 2003. J. Microbiol. Methods 55 (2), 337-349	Puhdasviljelmä
A6	9A-1564	1	0,0-0,6	<i>Methanoculleus</i> sp. kloni KuA9	98 %	eurarkit	Watanabe, K. ym. 2002. Appl. Environ. Microbiol. 68 (8), 3899-3907	Saastunut pohjavesi
A8	28A-1564	1	0,0-0,6	<i>Methanosarcina barkeri</i> -kanta Sar	98 %	eurarkit	Joulian, C. ym. 1998. FEMS Microbiol. Ecol. 25 (2), 135-145	Maaperä
A5	6A-1564	2	0,0-0,6	Arkkikloni SAGMA-8, osittainen 16S rRNA-geeni	96 %	krenarkit	Takai, K. ym. 2001. Appl. Environ. Microbiol. 67 (12), 5750-5760	Pintavesi
A3	12A-1564	3	0,0-0,6	Viljelemätön arkkikloni HTA-E7, osittainen 16S rRNA-geeni	98 %	krenarkit	Stein, L., Y. ym. 2002. FEMS Microbiol. Ecol. 42 (3), 431-440	Järvivesi
A9	58A-1568	3	1,1-1,6	Viljelemätön arkkikloni GW70-10-49, osittainen 16S rRNA-geeni	97 %	eurarkit	Uz, I. ym. Julkaisematon	Maaperä
A13	69A-1572	1	2,1-2,6	Viljelemätön arkkikloni 61-2, osittainen 16S rRNA-geeni	98 %	eurarkit	Williams, D. ym. Julkaisematon	Jätevesiliete

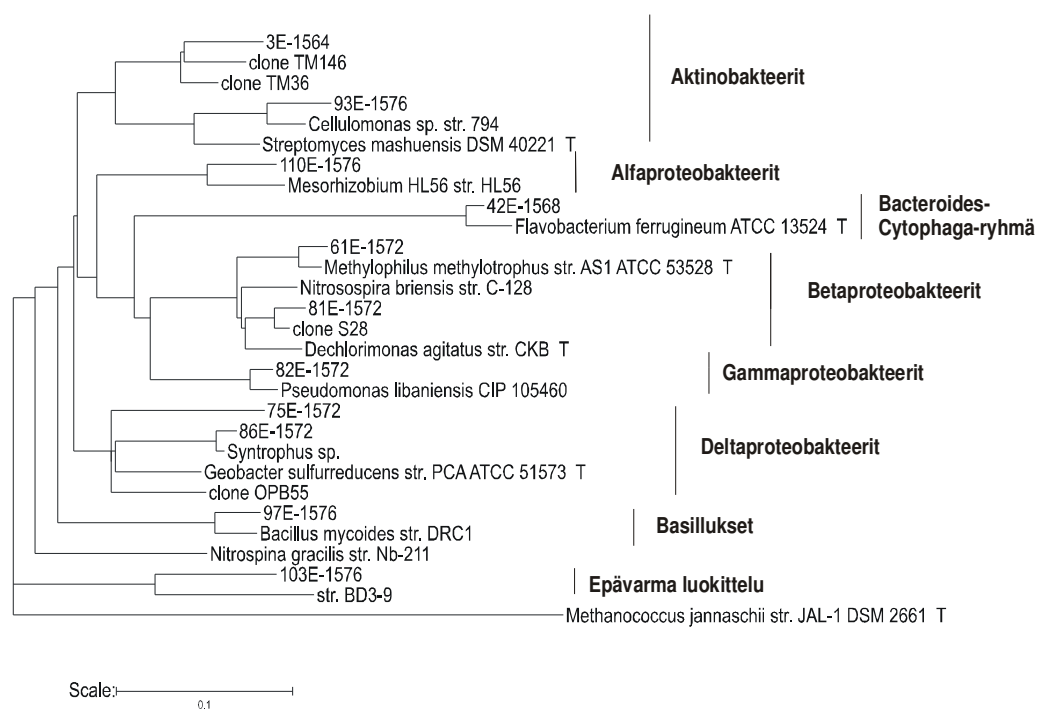
A7 ¹	80A-1572	22	2,1-2,6	Viljelemätön arkkiklooni MB-01, osittainen 16S rRNA-geeni	96 %	eurarkit	Basiliko, N. ym. 2003. Geomicrobiology Journal 20, 563-577	Suomaaperä
A10 ¹	77A-1572	28	2,1-2,6	Viljelemätön arkkiklooni 61-2, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	eurarkit	Williams, D. ym. Julkaisematon	Jätevesiliete
A1 ¹	79A-1572	42	2,1-2,6	Viljelemätön arkkiklooni MB-19, osittainen 16S rRNA-geeni	98 %	eurarkit	Basiliko, N. ym. 2003. Geomicrobiology Journal 20, 563-577	Suomaaperä
A11	63A-1572	3	2,1-2,6	Viljelemätön arkkiklooni MB-06, osittainen 16S rRNA-geeni	97 %	eurarkit	Basiliko, N. ym. 2003. Geomicrobiology Journal 20, 563-577	Suomaaperä
A10 ¹	103A-1576	28	3,1-3,6	Viljelemätön arkkiklooni SJC-125a, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	eurarkit	von Wintzingerode, F. ym. 1999. Appl. Environ. Microbiol. 65 (1), 283-286	Saastunut maaperä
A14	105A-1576	1	3,1-3,6	Viljelemätön arkkiklooni GW70-10-49, osittainen 16S rRNA-geeni	98 %	eurarkit	Uz, I. ym. Julkaisematon	Maaperä
A15	113A-1564	1	3,1-3,6	<i>Methanocorpusculum bavaricum</i> , osittainen 16S rRNA-geeni	98 %	eurarkit	Wright, A., D., G. ja Pimm, C. 2003. J. Microbiol. Methods 55 (2), 337-349	Puhdas- viljelmä
A2	93A-1576	10	3,1-3,6	<i>Methanosarcinales</i> - arkkiklooni KuA3, osittainen 16S rRNA- geeni	94 %	eurarkit	Watanabe, K. ym. 2002. Appl. Environ. Microbiol. 68 (8), 3899-3907	Saastunut pohjavesi

A7 ¹	115A-1576	22	3,1-3,6	Arkkiklooni K-4a2 osittainen 16S rRNA-geeni	98 %	eurarkit	Sizova, M., V. ym. 2003. FEMS Microbiol. Ecol. 45 (3), 301-315	Suomaaperä
A1 ¹	106A-1576	42	3,1-3,6	Viljelemätön arkkiklooni 57-1, osittainen 16S rRNA-geeni	99 %	eurarkit	Williams, D. ym. Julkaisematon	Jätevesiliete

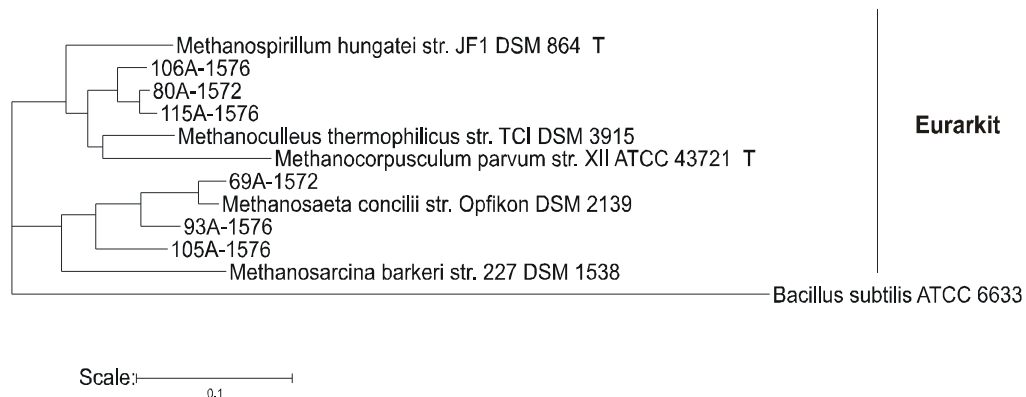
¹ Taulukossa kaksi saman RFLP-kuvion omaavaa näytettä eri näytteenottosyvyyksistä

Kuvassa 14 on esitetty maaperän profiilinäytteiden linjautuneiden sekvenssien fylogeneettiset sukulaisuussuhteet. Kaikki sekvenssit eivät linjautuneet keskenään. Profiilinäytteiden bakteerikloonien sekvensseistä kaksi tulkittiin kimeerisiksi (1E-1564 ja 65E-1572). Syytä toisten sekvenssien ongelmiin linjaamisessa ei saatu selville.

Aktinobakteereihin kuului kaksi kloonia, joista toinen oli pintamaasta (3E-1564) ja toinen suurimmasta (93E-1576) syvyydestä otetusta näytteestä. Proteobakteeriryhmät α - δ olivat edustettuina sekvensseissä. Yksi sekvenssi kuului planktomykeettiryhmään, josta löytyi myös inkuboidun näytteen klooneja. *Syntrophus*-proteobakteerille läheistä sukua oli kaksi linjautunutta sekvenssiä. Ulkoryhmänä puussa käytettiin *Methanococcus jannashii* -eurarkkia. Kloonit 3E-1564 sekä sen lähisukulaiset TM146 sekä TM36 (Rheims ym. 1996) ovat aktinobakteereita, mutta eri ryhmää kuin *Cellulomonas* sp. ja kloonit 93E. 81E-1572-kloonin lähisukulainen on puussa kloonit S28, joka on jätevedestä eristetty, *Nitrosomonas*-bakteerin kaltainen organismi. δ -proteobakteereihin kuuluva kloonit OPB55 (Hugenholz ym. 1998) on profiilinäyteklonin 75E-1572 lähisukulainen RDP-tietokannan mukaan. Se kuuluu δ -proteobakteeriluokassa *Desulfobulbaceae*-sukuun. 103E-1576-kloonille ei löytynyt läheistä viljeltyä sukulaista, ja kloonin BD3-9 luokittelu on epävarmaa.



Kuva 14. Maaperän profiilinäytteiden bakteerikloonien linjautuneista sekvensseistä rakennettu fylogeneettinen puu. Mittakaava: 10 nukleotidin muutosta toiseksi/100 nukleotidia.

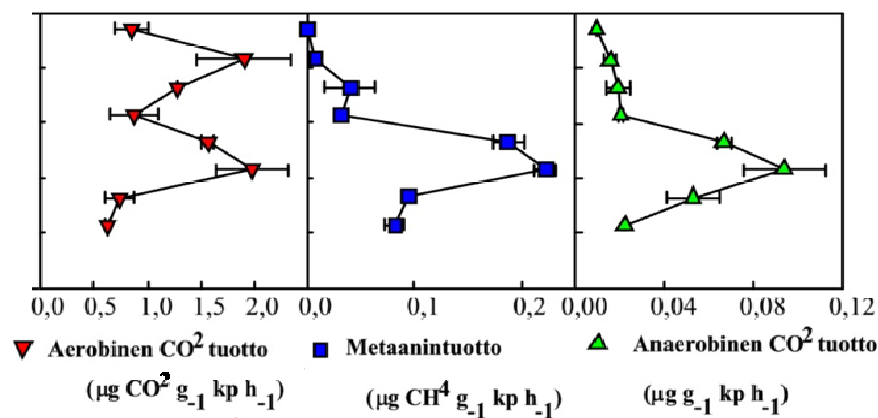


Kuva 15. Maaperän profiilinäytteiden arkkikloonien linjautuneista sekvensseistä rakennettu fylogeneettinen puu. Mittakaava: 10 nukleotidin muutosta toiseksi/100 nukleotidia.

Profiilinäytteiden arkkikloonien sekvenssit jakautuivat inkuboidun näytteen tapaan kahteen ryhmään, kuten kuvasta 15 voidaan havaita. Kaikki linjautuneet arkkisekvenssit kuuluivat metanogeenisiin arkkeihin, *Methanomicrobia*-lahkoon. Kolmen linjautuneen arkkikloonin sekvenssin lähimmät sukulaiset puussa ovat *Methanomicrobiales*-heimon eri sukuja edustavat *Methanoculleus thermophilicus*, *Methanocorpusculum parvum* ja *Methanospirillum hungatei* -arkkityypikannat. Kolme muuta kuuluu *Methanosarcinanales*-heimoon, joista yksi on erityisen lähellä *Methanosaeta*-arkkikantaa. Profiilinäytteiden arkkikloonien sekvensseistä myöskin kaksi tulkittiin kimeerisiksi (5A-1564 ja 113A-1576). Syytä toisten sekvenssien linjautumisongelmiin ei saatu selville. Fylogeneettisessä puussa ulkoryhmänä käytettiin *Bacillus subtilis*-bakteerityypikantaa.

7.2 Metaanintuotanto- ja hiilidioksidin tuotantotulokset

Mikrobiaktiivisuutta tutkittiin mittaamalla maanäytteistä metaanin- ja hiilidioksidintuotanto. Maan eri syvyyksistä otetuista näytteistä mitattiin metaanintuotanto kaasukromatografilla ja hiilidioksidintuotanto sekä anaerobisissa että aerobisissa olosuhteissa hiilianalyssaattorilla infrapunailmaisinta käyttäen. Analyysien tulokset on esitetty kuvassa 16. Metaanintuotto oli melko vähäistä pintamaassa, mutta syvemmällä metaanintuotantoa oli enemmän, ja eniten samassa syvyudessa kuin mineraaliöljyn suurimmat pitoisuudet (tulokset eivät esillä). Aerobinen hiilidioksidin tuotanto oli huomattavasti suurempaa verrattuna

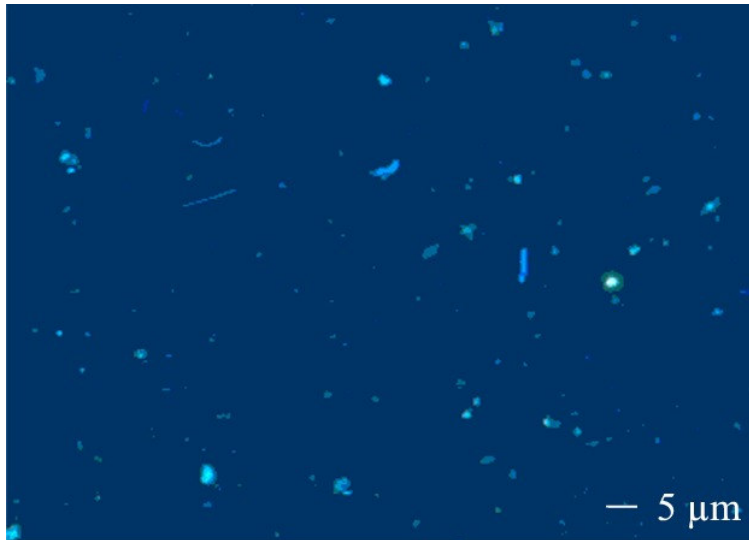


Kuva 16. Trollbergetin näytteenottoaikan maaperän profiili: kuvaajat aerobisen sekä anaerobisen hiilidioksidintuoton (huomaa mittakaavaerot) sekä metaanintuoton osalta. Keskihajonta on kuvattu virhejanalla.

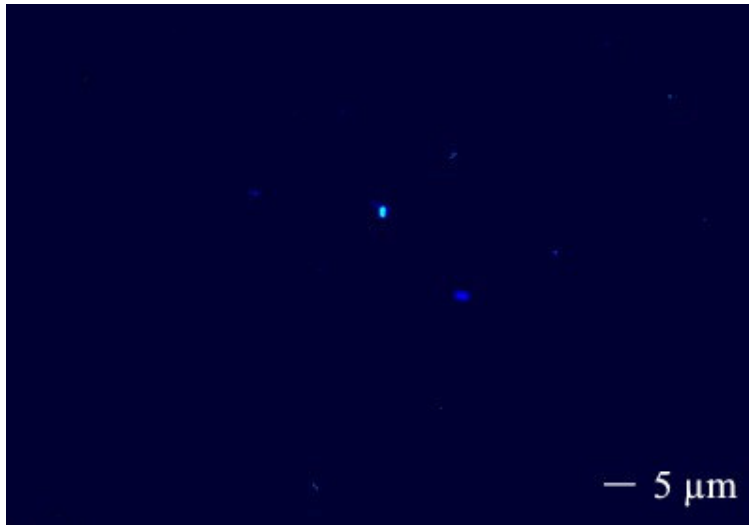
hapettomissa olosuhteissa tuotetun hiilidioksidin määrään (huomaa mittakaavat kuvassa 15). Anaerobinen hiilidioksidin tuotanto oli myös suurimmillaan kahdesta neljän metrin syvyyteen.

7.3 Mikroskopointitulokset

Maan mikrobiston tarkastelu mikroskooppisesti tehtiin epifluoresenssimikroskoopilla. Näytteitä faasikontrastilla katsottaessa soluja ei nähty. Kuva 17 esittää DAPI-värjättyjä soluja. DAPI-värjättyissä näytteissä näkyi sinisinä sekä kellertävän vihreinä fluoresoivia soluja. Solut olivat pieniä, mutta selviä morfologisia ominaisuuksia pystyi erottamaan. Näytteissä näkyi sinisinä sauva- ja nauhamaisia soluja sekä vihreinä kokkoideja soluja. Tarkasteltaessa värjäämätöntä näytettä 470 nm aallonpituudella metanogeenien tunnistamiseksi voitiin erottaa vihreänsinisiä, pieniä sauvamaisia ja kokkoideja soluja (kuva 18).



Kuva 17. Mikroskooppikuva DAPI-värjätystä 1,8-2,3 metrin syvyydestä otetusta, inkuboidusta näytteestä.



Kuva 18. Trollbergetin saastuneimmasta kohdasta, 3 metrin syvyydestä otetun näytteen autofluoresenssista otettu mikroskooppikuva.

8. Tulosten tarkastelu

8.1. Mikrobiyhteisöt öljyhiilivedyillä saastuneessa maassa

Tutkimuksen hypoteeseina oli, että tutkittavan maan mikrobiyhteisö on monimuotoinen ja että mikrobiyhteisössä saattaisi olla jäseniä, jotka hajottavat öljyhiilivetyjä vallitsevissa olosuhteissa. Mikrobiyhteisön monimuotoisuuden havaitsemiseksi käytettiin työssä pääosin molekyylibiologisia menetelmiä. Maanäyteistä eristettiin yhteisö-DNA, josta arkki- ja bakteerispesifisin alukkein monistettiin osa 16S rRNA-geenistä. 16S rDNA-palat erotettiin toisistaan

kloonaamalla ja osa klooneista sekvenssoitiin niiden edustamien mikrobiryhmien tunnistamiseksi.

Laboratoriossa anaerobisesti viileissä olosuhteissa inkuboidussa näytteessä ja inkuboimattomassa, anaerobisesta ja korkean öljypitoisuuden omaavasta syvyydestä otetussa näytteessä mikrobiyhteisöt olivat samantyyppisiä. Kloonatut sekvenssit edustivat aiemmin saastuneista ympäristöistä löydettyjen, viljelemättömien organismien sekvenssien sukulaisia. Näytteistä löytyi sekvenssejä, jotka olivat läheisiä mikrobien, joiden tiedetään pystyvän alkaanien anaerobiseen hajotukseen, sekvensseille. Molemmista näytekokonaisuuksista löytyi myös sellaisia sekvenssejä, jotka kuvastivat bakteeriryhmiä, joita ei toisessa havaittu lainkaan.

Zengler ym. (1999) sekä Anderson ja Lovley (2000) todistivat mikrobien hajottavan alkaaneja metanogeenisissä olosuhteissa. Tässä työssä laboratoriossa 10 kuukautta inkuboidussa näytteessä pidettiin yllä hapettomia olosuhteita ja profiilinäytteet otettiin alueelta, joka huokoskaasujen koostumuksen perusteella oli päätelty anoksiseksi. Laboratoriossa inkuboidussa näytteessä oli jo aiemmin havaittu öljyn hajoamista (mineraaliöljyä hävinnyt 7 %, Salminen ja Jørgensen, julkaisematon tulos) ja myös inkuboimattomissa, muissa paitsi pintamaasta otetuissa näytteissä havaittiin öljyn hajoamista. Syvyydessä 1,1-1,6 metriä öljyhiilivedyistä oli hajonnut 44 %. Anaerobisessa 2,1-2,6 metrin syvyydessä öljyhiilivedyistä oli hajonnut 25 %. Alimmassa syvyydessä 3,1-3,6 metriin öljyhiilivetyjen hajoamisprosentti oli 16 % (Salminen ja Jørgensen, julkaisematon tulos).

Alkaanien anaerobiseen hajotukseen kykenevien organismien sekvenssien läheisiä sekvenssejä löytyi profiilinäytteistä erityisesti suurimman öljypitoisuuden kohdalta (2,1-2,6 m) sekä myös inkuboidusta näytteestä. Näytteistä löytyi sekvenssivastaavuuksia *Syntrophus*-bakteereille sekä metanogeenisille arkeille, joita Dojka ym. (1998) olivat löytäneet saastuneelta pohjavesialueelta. Lähes kaikkien arkkikloonien sekvenssit edustivat metanogeenisiä. Inkuboidun ja inkuboimattomien maanäytteiden sekvensoiduilla bakteeriklooneilla oli neljä samaa sekvenssivastaavuutta. Kaksi molemmissa näyteryhmissä esiintyvää sekvenssivastaavuutta olivat *Syntrophus*-suvun sekvenssejä. Sekvensoiduilla arkkiklooneilla oli kolme samaa sekvenssivastaavuutta. Kaksi sekvenssivastaavuutta, jotka esiintyivät molemmissa näyteryhmissä, olivat *Methanosaeta*-suvun sekvenssejä. Kolmas sekvenssivastaavuus, joka saatiin sekä inkuboidun näytteen kloonille että

maan profiilinäytteestä, 2,1-2,6 metrin syvyydestä saadulle kloonille oli *Methanospirillum*-arkkisuvulle läheinen. Bakteri- ja arkkilöydökset sekä inkuboidun näytteen että profiilinäytteiden osalta nojaavat Zenglerin ym. (1999) esittelemään yhteistyöhön *Syntrophus*-lajin bakteerien ja metanogeenisten arkkien välillä alkaanien hajoamisessa metanogeenisissä olosuhteissa. *Syntrophus*-bakteerit hapettavat alkaanin asetaatiksi ja vedyksi. Metanogeenit tuottavat metaania joko asetaatti tai hiilidioksidi hiilenlähteenään. Hiilidioksidia käyttävillä metanogeeeneilla vety toimii elektroninluovuttajana. Asetaattia käyttävät metanogeeniset arkit hajottavat asetaatin metaaniksi ja hiilidioksidiksi. Toiset metanogeeniset arkit muuntavat hiilidioksidista ja vedystä metaania ja vettä. Kaikki kolme eri eliöryhmää ovat siis merkityksellisiä alkaanien anaerobisessa hajotuksessa (Zengler ym. 1999). Kloonisekvenssien, jotka olivat läheisiä *Methanospirillum*-, *Methanoculleus*- ja *Methanocorpusculum* -sukujen arkeille, voidaan olettaa kuuluvan eliölle, joiden metabolia on hydrogenotrofista eli vetyä ja hiilidioksidia käyttävää. Sen sijaan *Methanosarcina*- ja erityisesti *Methanosaeta*-suvuille läheisten sekvenssien kuvaamat eliöt ovat luultavasti metabolialtaan asetoklastisia eli käyttävät pääasiassa asetaattia hiilenlähteenään. Watanabe ym. (2002) havaitsivat, että erilaisilla PCR-alukkeilla tuotetut sekvenssit kloonautuivat eri tehokkuudella, joka saattoi aiheuttaa vääriä tulkintoja mikrobiyhteisöistä. Esimerkiksi juuri *Methanosaeta*-suvun jäsenet rikastuivat kloonausprosessissa. *Methanosaeta*-sukulaiset vallitsivat myös tässä työssä, joten PCR-monistuksessa tai kloonauksessa on saattanut tapahtua suosimista näitä sekvenssejä kohtaan.

Tulokset viittaavat siihen, että öljyhiilivedyt saattavat hajota Trollbergetin näytealueella anaerobisesti mahdollisesti samankaltaisten eliöiden toimesta kuin muissa saastuneissa ympäristöissä. Salmisen ym. (2004) tulokset viittaavat anaerobisen hajotuksen olleen tärkeässä roolissa hiilivetyjen luontaisessa hajoamisessa boreaalisissa olosuhteissa, 8 °C lämpötilassa.

Monille tässä työssä saaduille sekvensseille ei löytynyt kuvattuja lajeja läheisiksi sekvenssivastaavuuksiksi, vaan useat sekvensseille saadut lähimmät osumat sekvenssitietokannasta olivat viljelemättömien mikrobien sekvenssejä. Monet näistä sekvensseistä oli saatu eri tavoin saastuneista ympäristöistä. Usein ajatellaan, että eliöt, jotka ovat läheistä sukua toisilleen, omaavat samanlaisen fysiologian. Zeiglerin (2003) tutkimuksessa havaittiin, että eräiden proteiineja koodaavien geenien sekvenssit voivat antaa vahvoja todisteita genomien samanlaisuudesta ja näin ollen saman suvun tai lajin edustajista. Toisaalta on todettu myös, että 16S rDNA:n

perusteella läheiset sukulaiset voivat olla energiametabolialtaan hyvinkin erilaisia (Pace 1997). Klooneille saadut samanlaisuusprosentit olivat kuitenkin hyvin korkeita, useat kloonien sekvenssit olivat 99-prosenttisesti samanlaisia tietokannasta löydettyjen sekvenssien kanssa. Näin korkea samanlaisuusarvo viittaa siihen, että löydetyt kloonit olivat samaa sukua. Rosselló-Mora ja Amann (2001) totesivat katsauksessaan, että yli 97 %:sti samanlaisen 16S rRNA-geenin sekvenssin omaavat eliöt voidaan luokitella kuuluvaksi samaan lajiin. Salkinoja-Salosen (2002) mukaan samaan lajiin kuuluviksi voidaan luokitella > 97 % samanlaisuuden omaavat sekvenssit vertailtaessa n. 1500 nukleotidin aluetta. Sekvenssin pituus siis vaikuttaa samanlaisuusarvoon. Koska työssä sekvensoitiin vain vähän yli kolmasosa koko 16S rDNA-alueesta, tulosten luotettavuus ei ole samaa luokkaa kuin jos koko tai lähes koko 16S-alue genomista olisi monistettu ja kloonattu (Amann ym. 1995).

Muutamit sekvenssit, joita näytteistä saatiin, olivat melko kaukaisia sukulaisia muille tietokantojen sekvensseille. Esimerkiksi inkuboidun näytteen kloonit 31E-1238, 92E-1238 ja 92A-1238 olivat kaikki 93 % tai vähemmän samanlaisia tietokantojen sekvenssien kanssa. Inkuboimattomien profiilinäytteiden kloonit 29E-1564, 75E-1572, 103E-1576 ja 92A-1576 olivat kaikki 95 % tai vähemmän samanlaisia tietokantojen sekvenssien kanssa. Kloonien 31E-1238 ja 92E-1238 lähimpien tietokantaosumien sekvenssit luokiteltiin kuuluviksi uusiin kandidaattiryhmiin OP11 ja OP3. RDP:n tietokannasta löytynyt lähisukulainen 31E-1238:lle oli kanta BD4-9 (Li ym. 1999), ja näiden läheiset sekvenssit luokiteltiin kuuluvaksi planktomykkeetteihin. Myös kloonin 92E-1238 lähimmät sukulaiset olivat planktomykkeetteihin kuuluvien vielä viljelemättömien bakteerien sekvenssejä. Kloonin 92A-1238 sekvenssi oli Blast-haun perusteella 93-prosenttisesti samanlainen läheisimmän tietokantasekvenssin kanssa ja fylogeneettisessä puussa se oli kaukana muista näytesekvensseistä sekä viljellyistä organismeista. Inkuboimattomien profiilinäytteiden klooneista matalin samanlaisuusprosentti (93 %) oli kloonilla 29E-1564. Tämä sekvenssi oli yksi linjautumattomista sekvensseistä puita rakennettaessa, ja ClustalW-linjausohjelmalla havaittiin, että sekvenssi oli linjautuneisiin sekvensseihin verrattuna erilainen (tuloksia ei esitetty). Kloonin 103E-1576 lähin tietokannasta saatu sekvenssi oli 95-prosenttisesti samanlainen. Lähin tietokantaosuma luokiteltiin OP3-kandidaattidivisioonan ja planktomykkeetteihin, kuten kaksi inkuboidun näytteen kloonien lähintä osumaa. Se, että monille maaperästä saaduille sekvensseille ei löytynyt yli 97 % samanlaisuuden saavaa, kuvatus lajin sekvenssivastaavuutta ja nämä kohtalaisen matalat samanlaisuusprosentit kertovat

siitä, että maaperä on edelleen kovin tuntematon alue. Jopa kokonaan uusien bakteeriluokkien löytyminen ei välttämättä ole epätodennäköistä havaittujen alhaisempien samanlaisuuksien johdosta.

Työssä havaittiin myös anaerobisten olojen vaikutus mikrobiyhteisön koostumukseen. Maaperä, josta inkuboimattomat näytteet otettiin, oli huokoskaasumittausten ja metaanintuotannon perusteella lähes hapeton ja metanogeeninen. Myös inkuboidun näytteen atmosfääri pidettiin hapettomana. Inkuboidussa näytteessä havaittiin eniten β -proteobakteereja, jotka ovat δ -proteobakteerien kanssa yleisimpiä öljyhiilivedyillä saastuneissa, hapettomissa ympäristöissä. Eri syvyyksistä otetuista inkuboimattomista näytteissä voitiin havaita, että 2,1-2,6 metrin syvyydestä saaduissa klooneissa vallitsivat β - ja δ -proteobakteerit. Toiset proteobakteeriryhmät, α - ja γ -proteobakteerit, vallitsivat joko pintakerroksessa tai syvimmissä kerroksessa. Inkuboidun anaerobisen näytteen ja inkuboimattoman, 2,1-2,6 metrin syvyydestä otetun näytteen mikrobiyhteisöjen samankaltaisuus on todennäköisesti seuraus siitä, että näytteissä menestyvät mikrobit ovat mukautuneet viileisiin, hapettomiin olosuhteisiin ja käyttämään energianlähteenään samanlaisia yhdisteitä.

Profiilinäytteiden osalta voitiin havaita myös syvyyden vaikutukset mikrobiyhteisöihin. Bakteerikloonit jakautuivat eri RFLP-ryhmiin, ja eri ryhmät olivat vallitsevia pintamaassa kuin syvemmillä. Mikrobiyhteisö muuntui syvemmälle mentäessä, mutta säilyi monimuotoisena. Arkkikloonien osalta muuntuminen ei ollut yhtä selvästi havaittava johtuen muutamasta suuresta RFLP-ryhmästä, joiden kloonit jakautuivat kaikkiin syvyyksiin.

Profiilinäytteistä löydettiin kaikista muista syvyyksistä paitsi pintamaakerroksesta γ -proteobakteereihin kuuluvia metanotrofeja. Metanotrofit käyttävät hiilen- ja energianlähteenään metaania, jota metanogeenit tuottavat. Metanotrofit ovat usein lähellä metaanin tuotantokohdetta hapellisen ja hapettoman ympäristön siirtymäkohdassa (Conrad 1996). Metanotrofien entsyymi metaanimono-oksygenaasi, jolla metaanin hapetus tapahtuu, tarvitsee kuitenkin happea, jolloin energiantuotanto täysin anaerobisissa olosuhteissa on mahdotonta. Siksi onkin mielenkiintoista, että metanotrofeja löytyi maaperän profiilista myös anaerobisiksi tulkituista syvyyksistä. Näytteistä löytyneet metanotrofit saattavat olla peräisin mahdollisesti näytteenotossa tapahtuneen kontaminaation kautta ylemmistä maakerroksista. Näytteenotto tapahtui keväällä, jolloin lumien sulamisvedet ovat saattaneet huuhtoa metanotrofeja alempiin

maakerroksiin. Täysin poissuljettua ei ole myöskään se, että maaperässä olisi kuitenkin riittävästi happea metanotrofien käyttöön.

Laboratoriossa inkuboidusta näytteestä löydettiin useita sekvenssejä, jotka oli samanlaisia kuin *Acidovorax*-sukuun kuuluvien bakteerien sekvenssit. *Acidovorax*-sukuun kuuluvat lajit ovat aerobisia tai denitrifioivissa olosuhteissa eläviä β -proteobakteereita. Niiden on todettu hapellisissa olosuhteissa hajottavan PAH-yhdisteitä (Eriksson ym. 2003), mutta hapettomissa olosuhteissa tapahtuvasta hajotuksesta ei ole todisteita. Toisaalta aerobisten denitrifioivien bakteerien on havaittu selviävän hapettomissa olosuhteissa joidenkin vaihtoehtoisten metabolioiden, kuten fermentaatioiden, avulla (Jørgensen ja Tiedje, 1993). Tässä työssä löydetty kloonit, joiden sekvenssit olivat läheisiä *Acidovorax*-sukuisille bakteereille, saattavat selviytyä näyteympäristössä tällaisin keinoin. Lisäksi on huomattava, että työssä monistetut 16S rRNA-geenipalat kuvaavat vain mikrobien DNA:n läsnäoloa näytteessä, eivät eliöiden aktiivisuutta.

Anaerobisesti inkuboidusta näytteestä havaittiin myös spirokeetoille läheisiä sekvenssejä. Usein spirokeetat ovat anaerobisia tai fakultatiivisesti aerobisia bakteereita, kuten *Spirochaeta stenostrepta*. *Spirochaeta*-suvun bakteereita on löytynyt esimerkiksi termiitin suolistosta, jossa on metanogeeniset olosuhteet. Termiitin suolistosta löytynyt spirokeetta on homoasetogeeni, joka muuntaa vedystä ja hiilidioksidista asetaattia (Madigan ym. 2000). Kaikki löydetty spirokeettasekvenssit olivat läheistä sukua Dojkan ym. (1998) öljyhiilivedyillä saastuneesta ympäristöstä löytymille sekvensseille. Sitä, että näillä spirokeetoilla olisi jotain tekemistä öljyhiilivetyjen hajoamisen kanssa, on mahdotonta sanoa tämän tutkimuksen perusteella. Mikroskoopilla DAPI-värjättyä näytettä tarkasteltaessa havaittiin muutamia spirokeetoille tyypillisen morfologian omaavia soluja. Samankaltaisen solumuodon mahdollisesti omaavia, *Methanospirillum*-suvulle läheisiä metanogeenijä ei havaittu mikroskopitaessa näytteitä metanogeenien havaitsemiseksi.

Profiilinäytteistä sekä inkuboidusta näytteestä löytyi myös *Bacteroides*-ryhmän jäseniä. *Bacteroides*-ryhmään kuuluu anaerobisia bakteereita, jotka fermentoivat sokereita tuottaen asetaattia ja sukkiniaattia. Näiden bakteerien pääasiallinen esiintymisalue on eläinten ruuansulatuskanava (Madigan ym. 2003).

Nämä kaikki edellä esitetyt eliöryhmät sopivat kokonaisuvaan toimimalla maaperässä hiilidioksidin, vedyn, orgaanisten happojen ja metaanin kieroissa.

Näytteenotto paikalla on havaittu myös muuta orgaanista materiaalia kuin öljyhiilivetyjä, josta hiilidioksidi tai metaani voi olla peräisin (Salminen ym. 2004). Muu orgaaninen aines mahdollistaa metabolioiltaan erilaisten, ei hiilivetyjä hyödyntävien mikrobien menestymisen maaperässä. Mikrobiyhteisön monimuotoisuus saattaa olla seurausta juuri muun orgaanisen aineen läsnäolosta.

Maanäytteistä ei löytynyt *Geobacter*- tai *Desulfobacula*- bakteerisukujen sekvenssejä. Näiden sukujen tiedetään kirjallisuuden perusteella hajottavan öljyhiilivetyjä anaerobisissa olosuhteissa. Tämä varmistaa osaltaan alueen metanogeeniset olosuhteet, sillä *Geobacter*-bakteerisuvun jäsenet hajottavat aromaattisia öljy-yhdisteitä raudanpelkistysolosuhteissa (Coates ym. 2002) ja *Desulfobacula*-suvun jäsenet sulfaatinpelkistysolosuhteissa (Coates ym. 2002, Heider ym. 1999).

8.2 Käytettyjen menetelmien arviointi

Työssä käytettiin kaupallista DNA:n eristyspakettia, jonka on todettu tuottavan hyvin puhdasta ja vähän pilkkoutunutta DNA:ta (Borneman ym. 1996). Kaupallisen kitin käytöllä nopeutettiin DNA:n eristystä ja vältettiin erilaiset jatkossa mahdollisesti ilmenevät ongelmat, kuten PCR-reaktioita inhiboivat yhdisteet ja pahoin pilkkoutunut DNA.

PCR:n tuotteisiin vaikuttavat reaktioon valitut alukkeet. Tässä työssä maanäytteistä eristetyn DNA:n monistamiseen käytettiin yleisalukkeita, jotka monistivat DNA:ta 16S-geenin konservoituneelta alueelta. Vaikka alukkeiden kohdealue on vähän muuntelevasta osasta geeniä, yleisalukkeet eivät todennäköisesti tunnista kaikkia bakteerisekvenssejä yhteisö-DNA:sta. Erityisesti tuntemattomat organismit saattavat jäädä monistumatta, jos niiden 16S-geenin monistettava alue on muuntunut hyvin erilaiseksi. Esimerkiksi bakteeri-DNA:n monistamiseen käytetty PRBA338f-alue ei sitoudu edes kaikkiin tunnettuihin bakteerisekvensseihin (Øvreås ym 1997). Jos PCR-alukkeiksi valittaisiin spesifisemmät alukkeet, pystyttäisiin todennäköisesti monistamaan ja kloonamaan sellaisia sekvenssejä, joita tässä työssä ei havaittu.

PCR-reaktioissa voi syntyä artefakteja, jotka vääristävät tuloksia. Tässä tutkimuksessa yhteensä neljä sekvensoitua kloonaa osoittautui kimeerisiksi (kloonit 5A-1564, 113A-1576, 1E-1564 ja 65E-1572) ja nämä kaikki olivat maaperän profiilinäytteistä.

Mikrobien määrää alkuperäisessä näytteessä on mahdoton arvioida kloonauksen keinoin, koska työ perustui normaaleihin PCR-menetelmiin, joissa ei pystytty kvantifioimaan mikrobiyhteisöjen geenejä. On myös epätodennäköistä, että erilaiset

16S rRNA-geenit kloonautuivat samalla tehokkuudella, joten erilaiset kloonausmenetelmät tuottavat erilaisia kloonikirjastoja samasta PCR-tuotemateriaalista. Näistä seikoista johtuen tämän työn perusteella ei pystytä sanomaan millaiset runsaussuhteet vallitsevat eri organismien ja eri ryhmien välillä maaperässä.

Inkuboimattomien profiilinäytteiden bakteerikloonien restriktionnissa käytettiin *MspI*- ja *HaeIII* -entsyymejä. Arkkikloonit sen sijaan pilkottiin vain *HaeIII*:lla, koska tällöin saatiin enemmän ja selvempiä raitoja kuin molemmilla entsyymeillä pilkottaessa (tulokset eivät näkyvillä).

Tässä työssä RFLP-kuviot tulkittiin ja jaoteltiin ryhmiin pääasiassa silmämääräisesti, joten on todennäköistä, että eri kloonien eroja ei ole pystytty havaitsemaan niin hyvin kuin esimerkiksi T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism)-analyysissä. Tämä saattaa olla syynä siihen, että inkuboidusta näytteestä löydettiin lähes saman verran erilaisia RFLP-kuvioita sekä arkki- että bakteerisekvenssien osalta kuin inkuboimattomista näytteistä yhteensä.

Suurien ryhmien kloonien osalta on mahdollista, että pieniä eroja ei havaittu ja ryhmät muodostuivat suuriksi. Jotkin yksittäiset kloonit, jotka omasivat silmämääräisesti arvioiden ainutlaatuisen RFLP-kuvion, saattoivat olla samoja jonkun toisen kloonin kanssa. Lisäksi restriktioentsyymit pilkkovat kahden saman eliön DNA:n erilaisiksi RFLP-kuvioiksi jos toisen eliön genomissa on tapahtunut pienikin muutos. Kloonien 5E-1238, 23E-1238 ja 38E-1238 kohdalla havaittiin, että vaikka restriktiokuviot näyttivät erilaisilta, sekvenssit antoivat saman lähimmän osuman BLAST-hausta. Tämä viittaa siihen, että inkuboidun maanäytteen samanlaisia RFLP-kuvioita on tulkittu erilaisiksi, mistä voi johtua inkuboidun maanäytteen RFLP-kuvioiden yhtä suuri määrä inkuboimattomien maanäytteiden kanssa. Toisaalta eri eliöt voivat tuottaa samanlaiset RFLP-kuviot sattumalta. Inkuboimattomien maanäytteiden sekvensoitujen kloonien joukossa oli samoiksi tulkittuja RFLP-kuvioita, joiden lähimmät vastaavuudet tietokannasta erosivat. Kloonien 85E-1572 ja 100E-1576 sekä 75E-1572 ja 108E-1576 kohdalla tilanne oli tällainen. Inkuboimattomien profiilinäytteiden kloonit on siis saatettu jaotella harvempaan RFLP-ryhmään kuin ne todellisuudessa kuuluisivat. On kuitenkin muistettava, että inkuboimattomista profiilinäytteistä valittiin jokaisesta syvyydestä vain 30 bakteerikloonia ja 30 arkkikloonia jatsoon, kun taas inkuboidusta maanäytteestä valittiin noin kolminkertainen määrä bakteri- ja arkkiklooneja puhdasviljelmiksi. Näin ollen inkuboimattomien näytteiden jatsoon

valitut kloonit edustavat huomattavasti pienempää osaa kunkin kloonikirjaston kokonaisdiversiteetistä.

Sekvensointi epäonnistui neljän bakteerikloonin (4E-1238, 29E-1238, 48E-1238, 77E-1238) ja kolmen arkkikloonin osalta (46A-1238, 86A-1238, 53A-1238), mutta näiden edustamat ryhmät eivät välttämättä olleet merkittäviä, sillä niihin kuului yksi tai kaksi kloonia. Kaikki epäonnistuneet sekvensoinnit olivat inkuboidun maanäytteen klooneja. Sekvensoinnissa mahdollisena häiriötekijänä on voinut olla näytteisiin vahingossa monistettu GC-rikas alue, joka on saattanut johtaa epäonnistuneeseen sekvensointiin näiden näytteiden kohdalla.

Fylogeneettisten analyysejä ei voida pitää kovin luotettavina, sillä PCR:ssä tuotettu 16S rDNA-pala on vain n. kolmasosa koko 16S-geenistä. Amann ym. (1995) suosittelevat koko geenin tai vähintään yli 1000 emäsparin kokoisen palan monistamista, jotta saatu DNA-molekyyli sisältäisi riittävän määrän informaatiota luotettavia fylogeneettisiä analyysejä varten.

Työssä käytetyt menetelmät ovat yleisessä käytössä mikrobiologisissa tutkimuksissa menetelmien tunnetuista heikkouksista huolimatta.

8.3. Tulosten hyödyntäminen ja tutkimuksen jatkaminen

Tutkimuksessa löydettiin useita saastuneista maista aiemminkin havattuja sekvenssejä, jotka edustivat organismeja, joita ei ainakaan vielä ole viljelty. von Wenzingerode ym. (1999) ehdottavat, että tällaisilla eliöillä saattaa olla suurta merkitystä hapettomissa olosuhteissa tapahtuvissa hajotusprosesseissa. Tämän työn tuloksia voidaan tulevaisuudessa mahdollisesti soveltaa suunniteltaessa saastuneiden maiden monitorointia. Jotain löydettyjen sekvenssien edustamia mikrobeja voidaan ehkä pitää indikaattorieliöinä öljyhiilivedyillä saastuneiden maiden kunnostuksen seuraamisessa. Tutkimusta voisi jatkaa määrittämällä näytteissä vallitsevien lajien lukumääräiset suhteet. Suhteiden määrittämiseksi ja tiettyjen ryhmien tunnistamiseksi maasta voitaisiin käyttää FISH-tekniikkaa; fluoresoivien leimojen avulla pystyttäisiin suoraan maaperästä tunnistamaan ja kvantifioimaan tietyn sekvenssin omaavat mikrobit. DGGE-profiilien avulla voitaisiin tutkia, kuinka hyvin saatu kloonikirjasto vastaa näytteiden kokonaisuhteisöä. DGGE-profiileista voisi laskea kaikki eri organismeja kuvaavat raidat ja verrata, kuinka monta eri RFLP-kuviota saadaan klooneista ja kuinka hyvin nämä kaksi menetelmää kohtaavat. Mielenkiintoista olisi myös yrittää viljellä öljynhajottajaorganismeja ja tutkia niiden fysiologiaa ja metaboliareittejä, joiden kautta öljyhiilivetyjen hajotus tapahtuu. Hajotusreiteista voitaisiin etsiä

avainensyymit, jotka hajotukseen tarvitaan. Maaperän mikrobiyhteisöä voitaisiin tutkia näitä entsyymejä koodaavien, ns. toiminnallisten geenien esiintymisen kannalta.

9. Loppupäätelmät

Tässä tutkimuksessa pyrittiin havainnoimaan mikrobiyhteisöjä, jotka ovat muodostuneet öljyhiilivedyillä saastuneeseen maaperään. Mikrobiyhteisöjä erityisesti saastuneilla, hapettomilla alueilla on tutkittu vielä vähän. Muita borealisella vyöhykkeellä tehtyjä vastaavia tutkimuksia, joissa tutkimuskohteessa olisi havaittu öljyhiilivetyjen hajoamista, ei ole tehty. Tutkimuksessa käytettiin mikrobiyhteisöjen jäsenten tunnistamisessa molekyylibiologisia menetelmiä. Työssä pyrittiin pohjustamaan kloonausmenetelmän käyttöönottoa SYKE:ssä ja luomaan kloonikirjastot erilaisten maanäytteiden mikrobiyhteisöistä.

Molemmissa näytekokonaisuuksissa öljyhiilivetyjen hajoamista tapahtui anaerobisissa olosuhteissa. Näytteistä löydettiin öljyhiilivetyjen hajotukseen kykenevien eliöiden, kuten *Syntrophus*-bakteerisuvun ja metanogeenisten arkkien 16S rRNA-geenille läheisiä sekvenssejä.

Monet saadut sekvenssit olivat läheisiä tietokannan viljelemättömien organismien sekvensseille. Monet näiden viljelemättömien organismien sekvenssit oli saatu eri tavoin saastuneista, sekä hapellisista että hapettomista ympäristöistä.

Profiilinäytteiden anaerobisen syvyyden (2,1-2,6 metriä) ja inkuboidun näytteen mikrobiyhteisöissä havaittiin selviä yhtäläisyyksiä. Molemmissa näytteissä vallitsivat hapettomissa olosuhteissa yleisesti esiintyvät β - ja δ -proteobakteeriryhmät. Myös samoja sekvenssivastaavuuksia löytyi.

Näyteryhmissä havaittiin myös eroavaisuuksia. Inkuboidusta näytteestä löytyi *Acidovorax*-bakteerisuvulle läheisiä sekvenssejä, ja inkuboimattomista profiilinäytteistä löytyi metylotrifeja. Inkuboidusta näytteestä ei metylotrifeja havaittu eikä inkuboimattomista profiilinäytteistä löydetty *Acidovorax*-sukulaisia.

Työssä käytetyt molekyylibiologiset menetelmät toimivat hyvin mikrobiyhteisöjen laadullisessa tarkastelussa. Mikrobiryhmien määrälliset erot sen sijaan jäivät tämän työn puitteissa epäselviksi, mutta kvantitatiivista tutkimusta voidaan tulevaisuudessa

tehdä esimerkiksi maaperän hallitsevien lajien selvittämiseksi ja öljyhiilivetyjä hajottavien organismien osuuden arvioimiseksi.

Tässäkin työssä löydettyjä sekvenssejä, jotka ovat läheisiä aiemmin öljyhiilivedyillä saastuneista ympäristöistä löydetyille sekvensseille, voidaan tulevaisuudessa mahdollisesti käyttää indikaattoreina öljyhiilivedyillä saastuneiden maiden seuraamisessa.

10. Kirjallisuus

Aeckersberg, F., Bak, F. ja Widdel, F. 1991. Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. Archives of Microbiology 156, 5-14

Aeckersberg, F., Rainey, F., A. ja Widdel, F. 1998. Growth, natural relationships, cellular fatty acids and metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions. Archives of Microbiology 170, 361-369

Akasaka, H., Izawa, T., Ueki, K. ja Ueki A. 2003. Phylogeny of numerically abundant culturable anaerobic bacteria associated with degradation of rice plant residue in Japanese paddy field soil. FEMS Microbiology Ecology 43, 149-161

Alexander, M. 1999. Biodegradation and Bioremediation. 2. painos. Academic Press, San Diego, Kalifornia, Yhdysvallat. Sivut 1-7, 269-298, 325-376

Alfreider, A. Vogt, C. ja Babel, W. 2002. Microbial diversity in an *in situ* reactor system treating monochlorobenzene contaminated groundwater as revealed by 16S ribosomal DNA analysis. Systematic and Applied Microbiology 25 (2), 232-240

Amann, R., I., Ludwig, W. ja Schleifer, K-H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological reviews 59, 143-169

Anderson, R., T. ja Lovley, D., R. 1997. Ecology and biochemistry of *in situ* groundwater bioremediation. Teoksessa: J. G. Jones (toim.) Advances in microbial ecology, vol. 15, Plenum Press, New York, Yhdysvallat. Sivut 289-350

Anderson, R., T. Ja Lovley, D., R. 2000. Hexadecane decay by methanogenesis. Nature 404, 722-723

Atlas, R., M. 1992. Petroleum microbiology. Teoksessa: J. Lederberg (toim.) Encyclopedia of Microbiology, vol 3. Academic Press Inc., San Diego, Kalifornia, Yhdysvallat. Sivut 363-369

Atlas, R., M. ja Bartha, R. 1998. Microbial ecology: Fundamentals and applications. 4. painos. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Kalifornia, Yhdysvallat. Sivut 60-98, 332-384, 511-555

Bakermans, C. ja Madsen, E. L. 2002. Diversity of 16S rDNA and naphtalene dioxygenase genes from coal-tar-waste-contaminated aquifer waters. *Microbial Ecology* 44(2), 95-106

Basiliko, N., Yavitt, J., B., Dees, P., M. ja Merkel, S., M. 2003. Methane biogeochemistry and methanogen communities in two northern peatland ecosystems, New York State. *Geomicrobiology Journal* 20, 563-577

Borneman, J., Skroch, P., W., O'Sullivan, K., M., Palus, J., A., Rumjanek, N., G., Jansen, J., L., Nienhuis, J., ja Triplett, E., W. 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (6), 1935-1943

Bouwer, E., J. 1992. Bioremediation of organic contaminants in the subsurface. Teoksessa: R. Mitchell (toim.) *Environmental Microbiology*, Wiley-Liss, Inc. New York, New York, Yhdysvallat. Sivut 287- 318

Bouwer, E., J. ja Zehnder, A., J., B. 1993. Bioremediation of organic compounds-putting microbial metabolism to work. *Trends in Biotechnology* 11, 360-367

Bowman, J., P., Rea, S., M., McCammon, S., A. ja McMeekin, T., A. 2000. Diversity and community structure within anoxic sediment from marine salinity meromictic lakes and a coastal meromictic marine basin, Vestfold Hills, Antarctica. *Environmental Microbiology* 2 (2), 227-237

Bragg, J., R., Prince, R., C., Harner, E., J., ja Atlas, R., M. 1994. Effectiveness of bioremediation for the *Exxon Valdez* oil spill. *Nature* 368, 413-418

Brinkmeyer, R., Knittel, K., Jürgens, J., Weyland, H., Amann, R. ja Helmke, E. 2003. Diversity and structure of bacterial communities in Arctic versus Antarctic pack ice. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (11), 6610-6619

Chapelle, F., H. 1999. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated ground water: the perspectives of history and hydrology. *Ground Water* 37 (1), 122-132

Chayabutra, C. ja Ju, L-K. 2000. Degradation of *n*-hexadecane and its metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under microaerobic and anaerobic denitrifying conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 493-498

Coates, J., D., Chakraborty, R. ja McInerney, M., J. 2002. Anaerobic benzene biodegradation - a new era. *Research in Microbiology* 153, 621-628

Conrad, R. 1996. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiological reviews* 60 (4), 609-640

Derakshani, M., Lukow, T. ja Liesack, W. 2001. Novel bacterial lineages at the (sub)division level detected by signature nucleotide-targeted recovery of 16S rRNA genes from bulk soil and rice roots of flooded microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (2), 623-631

Dojka, M., A., Hugenholtz, P., Haack, S., K. ja Pace, N., R. 1998. Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3869-3877

Egert, M., Wagner, B., Lemke, T., Brune, A. ja Friedrich, M., W. 2003. Microbial community structure in midgut and hindgut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Applied and Environmental Microbiology* 69(11), 6659-6668

Eilers, H., Pernthaler, J., Peplies, J., Glöckner, F., O., Gerdtts, G. ja Amann, R. 2001. Isolation of novel pelagic bacteria from German bight and their seasonal

contributions to surface picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (11), 5134-5142

Engebretson, J., J. ja Moyer, C., L. 2003. Fidelity of select restriction endonucleases in determining microbial diversity by terminal-restriction fragment length polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 4823-4829

Eriksson, M., Sodersten, E., Yu, Z., Dalhammar, G. ja Mohn, W., W. 2003. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from northern soils. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (1), 275-284

Fritche, F. ja Hofrichter, M. 2000. Aerobic degradation by microorganisms. Teoksessa: H.-J. Rehm, G. Reed, A. Pühler ja P. J. W. Stadler (toim.) *Biotechnology*, Vol 11b. Environmental processes II - soil decontamination. http://www.wiley-vch.de/books/biotech/pdf/v11b_aero.pdf, katsottu 9.2.2004

Grosskopf, R., Janssen, P., R. ja Liesack, W. 1998. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy field soil microcosm as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (3), 960-969

Hartikainen, H. 1992. Maaperä. Teoksessa: E. Aura, H. Hartikainen, R. Heinonen (toim.), A. Jaakkola, E. Kempainen: *Maa, viljely ja ympäristö*, Werner Söderström Oy, Porvoo. Sivut 9-17, 72-88

Head, I., M. 1998. Bioremediation: towards a credible technology. *Microbiology* 144, 599-608

Head, I., M., Saunders, J., R. ja Pickup, R., W. 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology* 35, 1-21

Heider, J., Spormann, A., M., Beller, H., R. ja Widder, F. 1999. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews* 22, 459-473

van Hoek, A., H., A., M., van Alen, T., A., Sprakel, V., S., I., Leunissen, J., A., M., Brigg, T., Vogels, G., D. Ja Hackstein, H., P. 2000. Multiple acquisition of methanogenic archaeal symbiots by anaerobic ciliates. *Molecular Biology and Evolution* 17(2), 251-258

<http://rdp.cme.msu.edu/html/> Ribosomal Database Project II -tietokanta

<http://rdp.cme.msu.edu/html/analyses.html> Ribosomal Database Project II - tietokannan analyysit

<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) ClustalW-sekvenssilinjausohjelma

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> BLAST-tietokantahaku

Hugenholtz, P., Pitulle, C., Herschberger, K., L. ja Pace, N., R. 1998. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *Journal of Bacteriology* 180 (2), 366-376

Ilmatieteenlaitos, http://www.ilmatieteenlaitos.fi/saa/tilastot_99.html#1, katsottu 20.4.2004

ISO(2001) ISO/DIS 16703:2001, 2001. Soil quality – Determination of mineral oil content by gas chromatography.

Joulian, C., Ollivier, B., Patel, P., K., C. ja Roger, P., A. 1998. Phenotypic and phylogenetic characterization of dominant culturable methanogens isolated from ricefield soils. *FEMS Microbiology Ecology* 25 (2), 135-145

Juretschko, S., Lou, a., Lehner, A. ja Wagner, M. 2002. The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Systematic and Applied Microbiology* 25(1), 84-99

Järvinen, K., T., Melin, E., S. ja Puhakka, J., A. 1994 High-rate bioremediation of chlorophenol-contaminated groundwater at low temperatures. *Environmental Science and Technology* 28 (13), 2387-2392

Jørgensen K., S. ja Tiedje, J., M. 1993. Survival of denitrifiers in nitrate-free, anaerobic environments. *Applied and Environmental Microbiology* 59 (10), 3297-3305

Jørgensen, K., S, Puustinen, J., ja Suortti, A-M. 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution* 107, 245-254

Jørgensen, K., S. 2002. Saastuneiden maiden biologinen puhdistus -luentomuistiinpanot Ympäristömikrobiologia (YBIOT371)-kurssilla. Soveltavan kemian ja mikrobiologian osasto, mikrobiologian laitos 2002.

Kielemoes, J., Bultinck, i., Storms, H., Boon, N. ja Verstaete, W. 2002. Occurrence of manganese-oxidizing microorganisms and manganese deposition during biofilm formation on stainless steel in a brackish surface water. *FEMS Microbiology Ecology* 39(1), 41-55

Kropp, K., G., Davidova, I., A. ja Suflita, J., M. 2000. Anaerobic oxidation of n-dodecane by an addition reaction in a sulfate-reducing bacterial enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 5393-5398

Lahermo, P., Ilmasti, M., Juntunen, R. ja Taka, M. 1990. Suomen geokemian atlas, osa 1. Suomen pohjaveden hydrogeokemiallinen kartoitus. PunaMusta, Helsinki. Sivut 14-20

Leber, P., A. 2003. Environmental Chemistry: A case study of the Exxon Valdez oil spill of 1989. <http://wulfenite.fandm.edu/exxon-valdez.htm> Päivitetty 10.2.2003, ylläpitäjät Ginion, K., ja Yoder, C. Katsottu 5.2.2004

Lee, Y., A., Shiao, Y., Y. ja Chao, C., P. 2003. First report of *Burkholderia cepacia* as a pathogen of banana finger-tip rot in Taiwan. *Plant Disease* 87 (5), 601

Leser, T., D., Amenuvor, J., Z., Jensen, T., K., Lindecrona, R., H., Boye, M. ja Møller, K. 2002. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (2), 673-690

Li, L., Kato, C. ja Horikoshi, K. 1999. Bacterial diversity in deep-sea sediments from different depths. *Biodiversity and Conservation* 8, 659-677

Liesack, W., Janssen, P., H., Rainey, F., A., Ward-Rainey, N., L. ja Stackebrandt, E. 1997. Microbial diversity in soil: The need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. *Teoksessa Modern soil microbiology, toim. J. D. van Elsas, J. T. Trevors ja E. M. Wellington, Marcel Dekker, New York.* Sivut 375-437

Lovley, D., R. 2000. Anaerobic benzene degradation. *Biodegradation* 11, 107-116

Lueders, T. ja Friedrich, M. 2000. Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (7), 2732-2742

Madigan, M., T., Martinko, J., M. ja Parker, J. 2003. *Brock Biology of Microorganisms*. 10. painos. Pearson Education, Inc., New Jersey, Yhdysvallat. Sivut 55-101, 351-456, 614-679

Maier, R., M., Pepper, I., L. ja Gerba, C., P. 2000. *Environmental Microbiology*. Academic Press, San Diego, Kalifornia, Yhdysvallat. Sivut 177-194, 287-318, 363-402

Marchesi, J. R. ja Weightman, A. J. 2003. Comparing the dehalogenase gene pool in cultivated α -halocarboxylic acid-degrading bacteria with the environmental metagenome pool. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (8), 4375-4382

Mattila, K. 2002. Kylmän mikrobiologiaa -luentomuistiinpanot Ympäristömikrobiologia (YBIOT371)-kurssilla. Soveltavan kemian ja mikrobiologian osasto, mikrobiologian laitos 2002.

Männistö, M. 2001. Microbiology and *in situ* bioremediation potential of boreal chlorophenol contaminated groundwater. Väitöskirja Tampereen teknillinen korkeakoulu, julkaisuja 318. Domus-Offset Oy, Tampere. Sivut 1-24

Olson, B. H., ja Tsai, Y-L. 1992. Molecular approaches to environmental management. Teoksessa: R. Mitchell (toim.) Environmental Microbiology, Wiley-Liss, Inc. New York, New York, Yhdysvallat. Sivut 239-263

Pace, N., R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science 276, 734-740

Puhakka, J., A., Järvinen, K., T., Langwaldt, J., H., Melin, E., S., Männistö, M., K., Salminen, J., M. ja Sjölund, M., T. 2000. On-site and *in situ* bioremediation of wood-preserved contaminated groundwater. Water Science and Technology 42 (5), 371-376

Quaiser, A., Ochsenreiter, T., Lanz, C., Schuster, S., C., Treusch, A., H., Eck, J. ja Schleper, C. 2003. Acidobacteria from a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. Molecular Microbiology 50 (2), 563-575

Rheims, H., Spröer, C., Rainey, F., A. ja Stackebrandt, E. 1996. Molecular biological evidence for the occurrence of uncultured members of the actinomycete line of descent in different environments and geographical locations. Microbiology 142, 2863-2870

Rios-Hernandez, L., A., Gieg, L., M. ja Suflita, J., M. 2003. Biodegradation of an alicyclic hydrocarbon by a sulfate-reducing enrichment from gas condensate-contaminated aquifer. Applied and Environmental Microbiology 69 (1), 434-443

Rockne, K., J., Chee-Sanford, J., C., Sanford, R., A., Hedlund, B., P., Staley, J., T. ja Strand, E., S. 2000. Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. Applied and Environmental Microbiology 66, 1595-1601

Rosenberg, E. 1992. Hydrocarbon-oxidizing bacteria. Teoksessa: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, ja K-H. Schleifer (toim.), *The Prokaryotes*, Vol 1., 2. painos, Springer-Verlag New York Inc, New York, Yhdysvallat. Sivut 446-459

Rosselló-Mora, R. ja Amann, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 39-67

Röling, W., F., M. ja van Verseveld, H., W. 2002. Natural attenuation: What does the subsurface have in store? *Biodegradation* 13, 53-64

Sait, M., Hugenholtz, P. ja Janssen, P., H. 2002. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation independent surveys. *Environmental Microbiology* 4 (11), 654-666

Salkinoja-Salonen, M. 2002. Mikrobien geneettiset ominaisuudet, Fylogenia ja taksonomia-kappale. Teoksessa: M. Salkinoja-Salonen (toim.) *Mikrobiologian perusteita*, Gummerus Kirjapaino Oy, Jyväskylä. Sivut 358-384.

Salminen, J., M., Tuomi, P., M., Suortti, A-M ja Jørgensen, K., S. 2004. Potential for aerobic and anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in boreal subsurface. *Biodegradation* 15, 29-39

Sambrook, J. ja Russell, D., W. 2001. Protocol 4: Preparation of plasmid DNA by small-scale boiling lysis. *Molecular cloning a laboratory manual* Vol. 1. 3. painos. Cold Spring Harbor laboratory press, New York, Yhdysvallat. Sivut 1.43-1.46

Sarand, I. 2000. TOL Plasmid: Stability, transfer and activity in bacteria from soil and mycorrhizosphere. Väitöskirja Dissertationes Biocentri Viikki Universitatis Helsingiensis-sarjassa. Gummerus Kirjapaino Oy, Saarijärvi. Sivut 1-23

Schulze, R., Spring, S., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W., Schleifer, K., H. ja Kampfer, P. 1999. Genotypic diversity of *Acidovorax* strains isolated from activated sludge and description of *Acidovorax defluvii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 22(2), 205-214

Simpson, J., M., Santo Domingo, J., W. ja Reasoner, D., J. 2004. Assessment of equine fecal contamination: the search for alternative bacterial source-tracking targets. *FEMS Microbiology Ecology* 47, 65-75

Sizova, M., V., Panikov, N., S., Tourova, T., P. ja Flanagan, P., W. 2003. Isolation and characterization of oligotrophic acido-tolerant methanogenic consortia from *Sphagnum* peat bog. *FEMS Microbiology Ecology* 45 (3), 301-315

Soveri, J. 1990 Pohjaveden happamoituminen ja sen torjunta. *Kemia-Kemi* 17 (10), 805-808

Spormann, A., M. ja Widdel, F. 2000. Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* 11, 85-105

Stein, L., Y., Jones, G., Alexander, B., Elmund, K., Wright, Jones, C. ja Nealson, K., H. 2002. Intriguing microbial diversity associated with metal-rich particles from a freshwater reservoir. *FEMS Microbiology Ecology* 42 (3), 431-440

Stotzky, G. 1997. Soil as an environment for microbial life. Teoksessa: J. D. van Elsas, J. T. Trevors ja E. M. Wellington (toim.), *Modern soil microbiology*, Marcel Dekker, New York. Sivut 1-20

Suomen ympäristökeskuksen menetelmäohje B101. 2000. Bakteerien solutiheyden määrittäminen DAPI-värjäyksellä maa- ja sedimenttinäytteistä.

Takai, K., Moser, D., P., DeFlaun, M., Onstott, T., C. ja Fredrickson, J., K. 2001. Archaeal diversity in waters from deep South African gold mines. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (12), 5750-5760

Teske, A., Wawer, C., Muyzer, G. ja Ramsing, N., B. 1996. Distribution of sulfate-reducing bacteria in stratified fjord (Mariager fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (4), 1405-1415

Torsvik, V., Sørheim, R. ja Göksoyr, J. 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. *Journal of Industrial Microbiology* 17, 170-178

Tuimala, J. 2003. Geneettinen bioinformatiikka –luentomoniste. Sivut 62-87. Geneettinen bioinformatiikka -kurssi, Biotieteiden laitos, perinnöllisyystieteen osasto, 2003.

Valo, R. ja Salkinoja-Salonen, M. 1986. Bioreclamation of chlorophenol-contaminated soil by composting. *Applied Microbiology and Biotechnology* 25, 68-75

Watanabe, K. 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 12, 237-241

Watanabe, K., Kodama, Y. ja Harayama, S. 2001. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *Journal of Microbiological Methods* 44, 253-262

Watanabe, K., Kodama, Y., Hamamura, N., ja Kaku, N. 2002. Diversity, abundance, and activity of archaeal populations in oil-contaminated groundwater accumulated at the bottom of an underground crude oil storage cavity. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (8), 3899-3907

Wellington, E., H., Marsh, P., Watts, J., E., M. ja Burden, J. 1997. Indirect approaches for studying soil microorganisms based on cell extraction and culturing. Teoksessa: J. D. van Elsas, J. T. Trevors ja E. M. Wellington (toim.), *Modern soil microbiology*, Marcel Dekker, New York, Yhdysvallat. Sivut 311-329

Wilkes, H., Rabus, R., Fischer, T., Armstroff, A., Behrends, A. ja Widdel, F. 2002. Anaerobic degradation of *n*-hexane in a denitrifying bacterium: Further degradation of the initial intermediate (1-methylpentyl)succinate via C-skeleton rearrangement. *Archives of Microbiology* 177, 235-243

Wilkes, H., Kühner, S., Bolm, C., Fischler, T., Classen, A., Widdel, F. ja Rabus, R. 2003. Formation of *n*-alkane- and cycloalkane-derived organic acids during

anaerobic growth of a denitrifying bacterium in crude oil. *Organic Geochemistry* 34, 1313-1323

von Wintzingerode, F., V., Göbel, U., B. ja Stackebrandt, E. 1997. Determination of microbial diversity in environment samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 21, 213-229

von Wintzingerode, F., V., Selent, B., Hegemann, W. ja Göbel, U., B. 1999. Phylogenetic analysis of an anaerobic, trichlorobenzene-transforming microbial consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 283-286

Wright, A-D., G. ja Pimm, C. 2003. Improved strategy for presumptive identification of methanogens using 16S riboprinting. *Journal of Microbiological Methods* 55 (2), 337-349

Zengler, K., Richnow, H., H., Rosselló-Mora, R., Michaelis, W. ja Widdel, F. 1999. Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature* 401, 266- 269

Zepp Falz, K., Holliger, C., Großkopf, R., Liesack, W., Nozhevnikova, A., N., Müller, B., Wehrli, B. ja Hahn, D. 1999. Vertical distribution of methanogens in anoxic sediment of Rotsee (Switzerland). *Applied and Environmental Microbiology* 68(8) 3899-3907

Øvreås, L., Forney, L., Daae, F., L. ja Torsvik, V. 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Sælenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3367-3372