

Tinja Kanerva

Sulfaatinpelkistäjäbakteerien DNA:n eristys ja pitoisuuden määrittäminen kvantitatiivisella PCR:llä

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Laboratorioanalyttikko
Laboratorioalan koulutusohjelma
Opinnäytetyö
4.9.2012

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Tinja Kanerva Sulfaatinpelkistäjäbakteerien DNA:n eristys ja pitoisuuden määrittäminen kvantitatiivisella PCR:llä 40 sivua + 3 liitettä 4.9.2012
Tutkinto	Laboratorioanalytikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioalan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaajat	Lehtori Jarmo Palm Erikoistutkija Hannu Fritze Vanhempi tutkija Tero Tuomivirta
<p>Suomen maaperässä esiintyy paljon elohopeaa, mikä on myrkyllistä monille mikrobeille. Maaperästä löytyy mikrobeja, jotka ovat kehittäneet elohopeatoleranssin. Saastuneessa maaperässä esiintyy sulfaatinpelkistäjäbakteereita (SRB), joiden solut sisältävät elohopeaa. Sulfaatinpelkistäjäbakteerit kykenevät käyttämään elohopeaa metaboliassaan muodostaen elohopeasulfidia. Tämä taas hapettuu metyylielohopeaksi, joka on elohopeaa myrkyllisempää ja kerääntyy elohopean tavoin ruokaketjussa ylöspäin.</p> <p>Metsäntutkimuslaitoksessa tutkitaan, miten avo- ja kokopuuhakkuut vaikuttavat elohopean liikkuvuuteen ja pitoisuuteen maaperässä. Tutkimukseen on valittu 8 suota, joista puolet on ravintorikkaalla mustaliuskemaaperällä ja puolet kallioperän päällä. Molempien maaperien 4 suota koostuivat yhdestä kontrollista, yhdestä avohakkuusuosta ja kahdesta kokopuuhakkuusuosta. Opinnäytetyössä keskityttiin maaperän, näytesyvyyden ja suon käsittelyn vaikutuksiin sulfaatinpelkistäjäbakteerien pitoisuuksiin.</p> <p>Sulfaatinpelkistäjäbakteeripitoisuudet määritettiin ensin eristämällä turvenäytteistä totaali-DNA, joka inhibition takia lisäpuhdistettiin PEG-saostuksella. PCR:ssä käytettiin 16S rRNA-alukkeita, joiden avulla todettiin DNA:n eristyksen onnistuminen. Sulfaatinpelkistäjäbakteerien määrä mitattiin spesifeillä <i>dsrA</i>-alukkeilla käyttäen kvantitatiivista PCR-tekniikkaa.</p> <p>Tuloksen mukaan soissa esiintyi vaihtelevia määriä sulfaatinpelkistäjäbakteereita läpi syvyysgradientin. Suurimmat pitoisuudet olivat 25 senttimetrin syvyydessä, mikä on loogista anaerobisuuden ja hapen rajapinnassa elämisen takia. Maaperien välillä oli eroja, sillä ravinnerikkaassa esiintyi huomattavasti enemmän sulfaatinpelkistäjäbakteereita. Suokäsittely vaikuttaa sulfaatinpelkistäjäbakteeripitoisuuksiin. Kokopuuhakkuusoilla pitoisuudet olivat korkeampia kuin kontrolli- tai avohakkuusoissa. Avopuuhakkuusoiden ja kontrollien välillä ei ollut suurta eroa. Tämä on loogista, koska kokohakkuusuoista maaperä on sekoittunut enemmän kuin avohakkuusuoista.</p> <p>Seuraava tutkimusvaihe on tunnistaa sulfaatinpelkistäjäbakteerit eri syvyyksistä ja eri soista. Sulfaatinpelkistäjäbakteerien kyky käsitellä happea ja elohopeaa vaihtelee sukujen ja lajien välillä.</p>	
Avainsanat	Maaperä, sulfaatin pelkistys, SRB, PCR, qPCR, elohopea, MeHg.

Author(s) Title Number of Pages Date	Tinja Kanerva Isolation of DNA of sulfate-reducing bacteria and detection with qPCR 40 pages + 3 appendices 4 September 2012
Degree	Bachelor of Laboratory Sciences
Degree Programme	Laboratory Science
Specialisation option	
Instructor(s)	Jarmo Palm, Senior Lecturer Hannu Fritze, Researcher Tero Tuomivirta, Researcher
<p>Mercury can be found in Finland's soil, and it is toxic for most microbes. There are microbes, which have resistances for mercury. Sulfate-reducing bacteria occur in polluted soil and even cells contain mercury. Sulfate-reducing bacteria can modify mercury to methyl mercury, which is more toxic than elemental mercury. Methyl mercury like mercury can accumulate to upwards in the food chain.</p> <p>Finnish Forest Research Institute studies how whole-tree harvesting and stem-only harvesting impacts on the mobilization of mercury and methyl mercury from drained peatland forests. For research eight peatlands from two different soils were chosen, half located on black schistsoil and other half on rock. Both four series of peatlands included one control site, one stem-only harvesting and two whole-tree harvesting peatlands.</p> <p>The thesis focuses on sulfate-reducing bacteria contained in swamps that were known to include mercury. Impacts of sample depth, soil and harvesting to sulfate-reducing bacteria's concentration were studied. First total-DNA was isolated, and then DNA was purified with PEG-precipitation because of high inhibition. With 16S rRNA primers sample's DNA was confirmed in PCR. Next PCR was performed with specific <i>dsrA</i> primers to study sulfate-reducing bacteria. Final concentration of sulfate-reducing bacteria was detected with qPCR.</p> <p>Sulfate-reducing bacteria were found on most of the samples in different depths, but the highest occurrence was in deeper layers of soil. The result was logical, because most sulfate-reducing bacteria are anaerobic and like to live in the interface of anaerobic and aerobic. Rich soil contained clearly higher concentration of sulfate-reducing bacteria than poor one. Stem-only harvesting had lower concentration of sulfate-reducing bacteria than whole-tree harvesting due to alteration of soil's composition.</p> <p>The ability on sulfate-reducing bacteria to process and resist oxygen and mercury vary between genus and even between species. Also the variety of sulfate-reducing bacteria changes in different depth of soil. That's why identification of sulfate-reducing bacteria is important.</p>	
Keywords	Soil, sulfate reduce, sulfate-reducing bacteria (SRB), PCR, qPCR, mercury (Hg) and methyl mercury (MeHg).

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Teoria	2
2.1	Sulfaatinpelkistäjäbakteerit	2
2.1.1	Sulfaatinpelkistäjäbakteerien ympäristösuhteet	3
2.1.2	Energiantuotanto	4
2.1.3	Vaihtoehtoisia elektroninluovuttajia vedylle	7
2.1.4	Sulfaatinpelkistäjäbakteerit ja happi	9
2.1.5	Rikin kierto	11
2.1.6	Ruostuminen	13
2.2	Elohopea ja metyylielohopea	14
2.3	Kvantitatiivinen PCR	16
2.3.1	DNA:n detektointi	18
2.3.2	Sulamiskäyräanalyysi	19
3	Työn suoritus ja materiaalit	20
3.1	DNA:n eristys	20
3.2	Polymeraasiketjureaktio yleisalukkeilla	20
3.3	Polyetyleeniglykoli-saostus	22
3.4	Polymeraasiketjureaktio sulfaatinpelkistäjäbakteerialukkeilla	23
3.5	Kvantitatiivinen PCR	24
4	Tulokset	29
5	Tulosten tulkinta	34
6	Yhteenveto	37
	Lähteet	39
	Liitteet	
	Liite 1. Alukkeiden tiedot ja sekvenssit	
	Liite 2. Näytekohtaiset sulfaatinpelkistäjäbakteeripitoisuudet	
	Liite 3. Suokohtaiset pitoisuudet	

Lyhenteet

APS	Adenosiini 5'-fosfosulfaatti, joka on adenosiinitrifosfaatilla aktivoitu sulfaatti.
ATP	Adenosiinitrifosfaatti, jota solut käyttävät ja tuottavat energianlähteeksi.
c_3	Sytokromi 3, joka on sulfaatinpelkistäjäbakteerin elektronin siirtoreaktioon osallistuva proteiini.
DSR	Dissimilatiivinen sulfiittireduktaasi (DSR), entsyymi, joka katasyloi sulfiitin pelkistystä sulfidiksi sulfaatin respirationissa.
<i>dsrA</i>	DSR:ää koodaava geeni.
Hmc	Sytokromikompleksi, joka on sulfaatinpelkistäjäbakteerin elektronin siirtoreaktioon osallistuva proteiini. Nimi on lyhenne englannin kielen sanoista the cytochrome of highest molecular weight.
LDH	Laktaattidehydrogenaasi, joka on sulfaatinpelkistäjäbakteerin elektronin siirtoreaktioon osallistuva proteiini.
NADH	Nikotinamidiadeniinidinukleotidi, joka on metaboliaan osallistuva molekyyli.
PAPS	Fosfoadenosiini 5'-fosfosulfaatti, joka on adenosiinitrifosfaatilla aktivoitu adenosiini 5'-fosfosulfaatti.
SRB	Sulfaatinpelkistäjäbakteeri, joka käyttää sulfaattia viimeisenä elektronin vastaanottajana. Lyhenne tulee englannin kielen sanoista sulfate-reducing bacteria.
SRM	Sulfaatinpelkistäjämikrobit, joihin kuuluu arkkeja ja bakteereita. Lyhenne tulee englannin kielen sanoista sulfate-reducing microbes.

1 Johdanto

Kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio on PCR-reaktio, jossa reaktion kulkua seurataan reaaliajassa. Kvantitatiivisella PCR:llä (qPCR) voidaan mitata DNA-pitoisuudet tarkasti, kun mitattava signaali kuvastaa PCR-tuotteen määrää. Yleisin määrittystapa on käyttää fluoresoivaa väriainetta kuten SYBR Green I:stä. Fluoresenssin aikana valon absorptio siirtää elektroneja ylemmälle tasolle, ja palatessaan takaisin alemmalle tasolle elektronit emittoivat fotonien energiaa. Fluoresenssi mitataan joka kierroksen ekstensio-vaiheessa, kun SYBR Green sitoutuu kaksijuosteiseen DNA:han aiemmin.

SYBR Green I sitoutuu epäspesifisesti kaksijuosteiseen DNA:han. Mitä spesifimmät alukkeet, sitä spesifimmin mitattu fluoresenssi kuvaa haluttua PCR-tuotetta. Opinnäytetyössä tuli rakentaa kvantitatiivinen PCR sulfaatinpelkistäjäbakteerien määrän määrittämiseksi turvenäytteistä, ja siihen käytettiin spesifejä *dsrA*-alukkeita. Sulfaatinpelkistäjäbakteerien sulfiittiredustaasi (DSR) on entsyymi, joka katalysoi sulfiitin pelkistystä sulfidiksi. DSR:n on välttämätön sulfaatinpelkistäjäbakteereille ja sitä koodaa geeni *dsr*. Dissimilatiivisia sulfiittiredustaaseja esiintyy monenlaisia ja ne vaihtelevat SRB-lajien välillä, esimerkiksi DsrA on entsyymi ja sitä koodaava geeni on *dsrA*. [1.]

Opinnäytetyö aloitettiin eristämällä turvenäytteistä totaali-DNA ja eristyksen onnistuminen todettiin 16S ribosomaalinen DNA (rDNA) -alukkeilla PCR-reaktiossa. Määrittäessä kokonaismikrobipitoisuuksia voidaan käyttää hyväksi 16S rDNA -geeniä, joka koodaa ribosomaalista RNA:ta (rRNA). rRNA osallistuu bakteerien proteiinisynteesiin ja se löytyy kaikista bakteereista. [2.]

Metsäntutkimuslaitoksessa tutkitaan eri hakkuiden vaikutusta sekä elohopean että metyylielohopean liikkuvuuteen ja pitoisuuksiin maaperässä. Sulfaatinpelkistäjäbakteerien epäillään osallistuvan metyylielohopean muodostumiseen, ja tämän opinnäytetyön tuloksia käytetään tämän tutkimiseen. Työn tavoitteena oli todeta, onko maaperällä tai suon käsittelytavalla vaikutusta sulfaatinpelkistäjäbakteerien määrään.

2 Teoria

2.1 Sulfaatinpelkistäjäbakteerit

Sulfaatinpelkistäjäbakteerit kuuluvat sulfaatinpelkistäjämikrobeihin (SRM), jotka käyttävät sulfaattia viimeisenä elektronin vastaanottajana. Sulfaatinpelkistyskyvyn takia sulfaatinpelkistäjäbakteereilla (SRB) on tärkeä merkitys rikin luonnollisessa kierrossa. Nykyään sulfaatinpelkistäjämikrobeja on tunnistettu 120 lajia, 35 eri suvusta ja 4 eri pääjaksosta. SRB:stä kaikki lukeutuvat yhteen seuraavista viidestä pääjaksosta: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Nitrospirae*, *Thermodesulfobacteria* tai *Thermodesulfobiaceae*. [3.]

Sulfaatinpelkistys on evolutionäärisesti vanha reaktio, sillä molekyylinen ja geologinen tutkimus viittaavat jo alkukantaisten elämänmuotojen käyttäneen sitä. Varhaisessa vaiheessa sulfaattia muodostui fotokemiallisesti vulkaanisesti vapautuneesta sulfidista ja ilmakehän rikkivedystä. Alkukantaisia SRB:tä lienee kehittynyt ennen syanobakteereita. Sen seurauksena dissimilatiivinen sulfaatinpelkistys kehittyi ennen happea vapauttavaa fotosynteesiä. Tutkimuksissa on selvinnyt, että bakteerien ja arkkien esi-isien sulfaatinpelkistyskyky on hävinnyt evoluution myötä monista suvuista. [3; 6, s. 21 - 27.]

Kaikkein eniten sulfaatinpelkistäjäbakteereita esiintyy sulfaattirikkaassa ympäristössä, mutta sopeutumiskykyisiä SRB-lajeja esiintyy myös köyhemmissä sulfaattipitoisuuksissa. Sulfaatinpelkistäjäbakteerit ovat välttämättömiä rikin kierrolle ja ympäristölle, mutta haittavaikutuksia esiintyy kuten sulfidin myrkyllisen sulfidin muodostuminen metaboliassa. SRB:t ovat laajalle levinneet anaerobisissa meri- ja maaympäristöissä. Niitä löytyy myös vesistöjen pohjamateriaalista, kosteikoista ja soista. Parhaiten tutkittu sulfaatinpelkistäjäbakteerisuku on *Desulfovibrio*, jota esiintyy meriympäristöissä ja vettyneessä maaperässä. [4, s.438 - 441; 3.]

2.1.1 Sulfaatinpelkistäjäbakteerien ympäristösuhteet

Sulfaatinpelkistäjäbakteerien levinneisyyteen vaikuttavat lämpötila, pH, redox- potentiaali, elektronin- ja hiilenlähteet sekä ravinteet. Lisäksi bakteerien kasvuun vaikuttavat bakteerien väliset vuorovaikutukset kuten kilpailu ja yhteistyö. Lämpötilan noustessa kemialliset ja entsyymaattiset reaktiot nopeutuvat, minkä seurauksena kasvunopeus kiihtyy. Lämpötilan laskiessa bakteerien kasvu pysähtyy tai hidastuu. Optimilämpötilassa mikrobit kasvavat runsaslukuisempina kuin kasvualueen ääripäissä. Lämpötilan optimi riippuu SRB-bakteerilajista: mesofiileille se on 28 - 45 °C, ja termofiilit suosivat korkeampia lämpötiloja 54 - 70 °C. [7, s.11 - 14; 4, s.157 - 160.]

pH riippuu maaperän tyypistä, kasvillisuudesta, kalkin määrästä ja mineraaliravinteista. Maaperän pH vaihtelee yleensä välillä 3 - 8,4. Ympäristön pH vaikuttaa vahvasti mikrobiaktiivisuuteen. Solun sisäisen pH:n tulee pysyä mahdollisimman lähellä neutraalia, etteivät solun makromolekyylit hajoaisi. Valtaosa SRB:stä kuuluu neutrofiileihin, jotka suosivat neutraalia pH:ta. Niiden optimi pH on väliltä 7 - 7,8, mutta ne sietävät myös pH:ta 5 - 9. [4, s.165 - 166; 5, s.14 - 20.]

Redox- potentiaali tarkoittaa mikrobin kykyä pelkistää ja hapettaa yhdisteitä. Mahdollisemman alhainen redox- potentiaali on edellytys SRB:n metabolisen toiminnan kannalta. Alhainen redox- potentiaali saadaan hapettomissa ja sulfidipitoisissa olosuhteissa. [5, s.14 - 20.]

Mikrobeja voidaan luokitella hiililähteen ja valon suhteen. Autotrofi on energiantuotannossa omavarainen, ja tuottaa orgaanista ainesta hiilidioksidista, vedestä ja epäorgaanisista yhdisteistä yhteyttämällä. Heterotrofi käyttää autotrofien tuottamia orgaanisia yhdisteitä metaboliassaan. Pinnalla olevat fotoautotrofit tuottavat happea alemman kerroksen heterotrofien käyttöön, jotka palauttavat sen hiilidioksidina takaisin. Fototrofit käyttävät valoenergiaa, kun kemotrofit käyttävät kemiallista energiaa. Orgaaninen materiaali tarjoaa energianlähteen heterotrofeille. Sulfaatinpelkistäjäbakteereista suurin osa kuuluu kemiallista energiaa käyttäviin kemoheterotrofeihin. [7, s.9 - 15.]

Sulfaatinpelkistäjäbakteerit elävät erilaisten anaerobisten bakteerien kanssa, jotka joko käyttävät eri elektroninluovuttajia ja -vastaanottajia tai kilpailevat samoista. Kommensalismissa bakteerit muodostavat katabolian lopputuotteita, jotka toimivat sulfaatinpelkityksessä elektroninluovuttajina. Kommensalismi tarkoittaa kahden lajin yhteiseloa sa-

masta ravinnosta molempien eduksi. SRB hapettaa kumppanin katabolian lopputuotteena syntynyttä vetyä, jolloin vedyn osapaine pysyy alhaisena ympäristössä. Kommensalismissa osapuolet muodostavat vakaan ympäristön, jossa ne edesauttavat toistensa kasvua. Ne jakavat tuottamansa energian ja kontrolloivat metaboliaa pelkistyskvivalenteilla lajienvälisiä reittejä pitkin. Avoimessa ja sekoittamattomassa ekosysteemissä kommensalismibakteerien elektroninluovuttajista ja -vastaanottajista tulee dominoivia. [6, s.17 - 20.]

Sulfaatinpelkistäjäbakteereita inhiboivia tekijöitä on esimerkiksi korkea metallien ja rikkivedyn pitoisuus. Myös korkeat sulfidipitoisuudet inhiboivat kasvua. Ehdottomat anaerobiset SRB:t kärsivät hapen läsnäolosta. Sulfaatin läsnä ollessa SRB:t kilpailevat metaania tuottavien bakteerien kanssa asetaatista ja vedystä. Elinympäristön pH on ratkaiseva tekijä kilpailussa: pH:n noustessa emäksisen puolelle on SRB:t hallitseva ryhmä. Lievästi happamissa ja neutraaleissa oloissa metonogeenit vallitsevat. [5, s.14 - 20.]

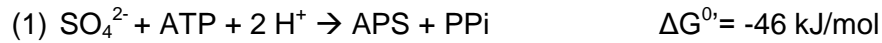
Sulfaatinpelkistäjäbakteerien metabolian välituotteena syntyvä sulfidi on myrkyllistä kaikille mikrobeille, myös SRB:lle. Siitä johtuen sulfidi on hajotettava tai neutralisoitava ja se kierrätetään hapelliseen rajapintaan hapetus- ja pelkistysreaktioilla. SRB:n elektroninluovuttajista valtaosa on fakultatiivisten mikrobien fermentointituotteita. SRB hävittää happea ympäristöstä välttääkseen kilpailua aerobisten mikrobien kanssa ja stimuloidakseen niiden fermentointireaktioita. [6, s.17 - 20.]

2.1.2 Energiantuotanto

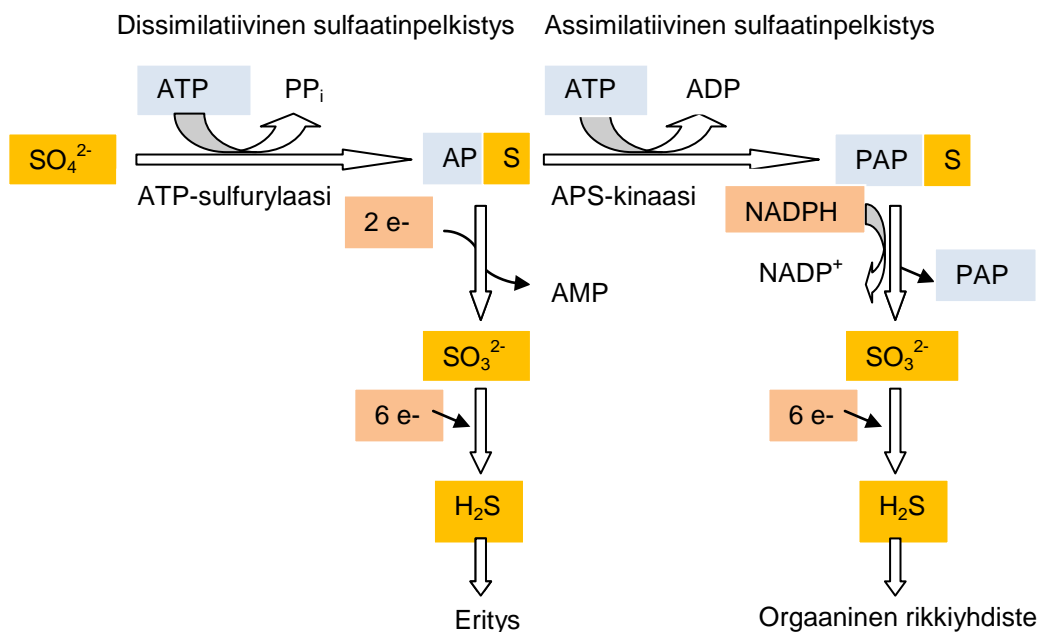
SRB:t nimensä mukaisesti pelkistävät sulfaattia ja rikkiä energiantuotannossaan. Sulfaatti toimii viimeisenä elektronin vastaanottajana elektroninsiirtoreaktiossa, jossa syntyy ATP:tä. Sulfaattia (SO_4^{2-}) ja rikkiä (S^0) elektronin vastaanottajana käyttää muun muassa iso anaerobinen ryhmä *Deltaproteobacteria*. Sekä sulfaatin että rikin pelkistysreaktion lopputuotteena muodostuu rikkivetyä (H_2S). [6, s. 5 - 11; 4, s. 438 - 441, 627 - 629.]

Sulfaatinpelkistystä on sekä assimilatiivista että dissimilatiivista, joiden merkittävin ero on lopputuotteena syntyneen rikkivedyn hävittäminen. Assimilatiivisessa sulfaatinpelkistyksessä rikkivety muutetaan orgaaniseksi rikiksi, jota käytetään rakennusmateriaalina aminohapoissa ja muissa orgaanisissa rikkihydrideissä. Dissimilatiivisessa sulfaa-

tinpelkistyksessä rikkivety ohjataan ulos solusta. Assimilatiivista sulfaatinpelkistystä käyttävät muun muassa kasvit, kun taas SRB:t käyttävät pääasiassa dissimilatiivista sulfaatinpelkistystä. Kuvassa 1 on esitetty vierekkäin sekä assimilatiivinen että dissimilatiivinen sulfaatinpelkistys. [6, s. 5 - 11; 4, s. 438 - 441, 627 - 629.]



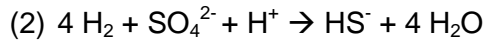
Sulfaatti on kemiallisesti vakaa, joten se on aktivoitava ennen pelkistystä. Sekä dissimilatiivisessa että assimilatiivisessa sulfaatinpelkistyksessä sulfaatti aktivoidaan yhdellä adenosiinitrifosfaatilla (ATP). ATP-sulfurylaasin katalysoimana sulfaatti-ioni kiinnittyy ATP:n ensimmäiseen fosfaattiin (1). ATP:n ja sulfaatin yhdiste on nimeltään adenosini-5'-fosfosulfaatti (APS). APS:n muodostuttua dissimilatiivinen sulfaatinpelkistys käynnistyy, kuten kuvasta 1 huomataan. Assimilatiivista sulfaatinpelkistystä varten APS on käsiteltävä vielä yhdellä ATP:llä. [4, s. 438 - 441, 627 - 629.]



Kuva 1. Sulfaatin aktivointi ja sulfaatinpelkistysreaktion kulku. Vasemmalla puolella on esitetty dissimilatiivinen sulfaatinpelkistys ja oikealla puolella assimilatiivinen sulfaatinpelkistys. Muokattu [4 s.628].

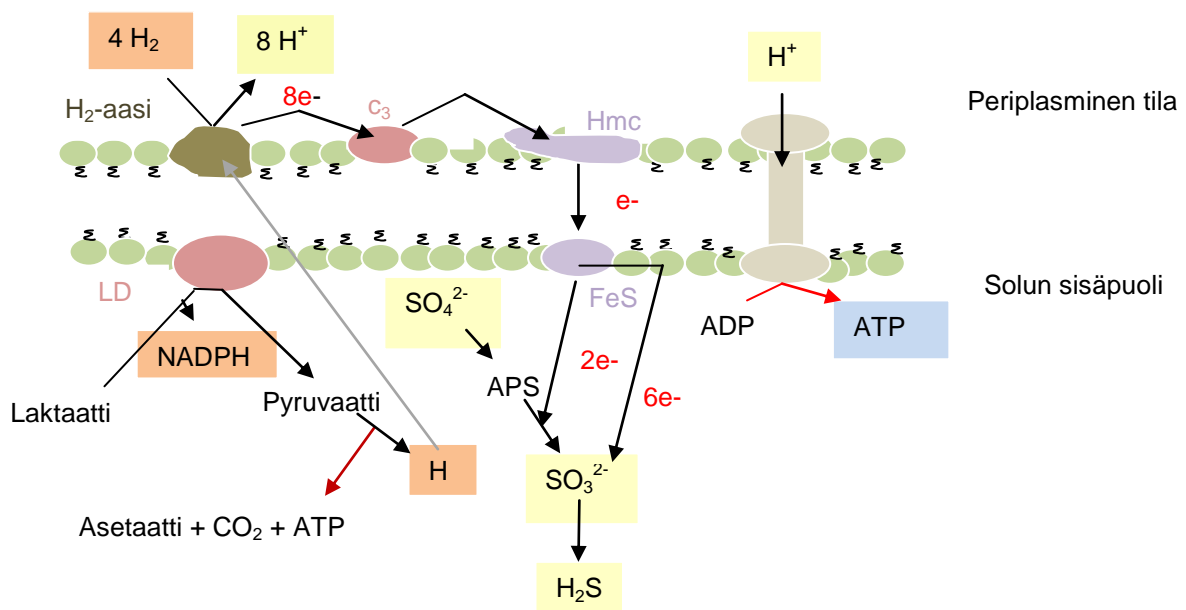
Assimilatiivisessa sulfaatinpelkistyksessä APS käsitellään edelleen APS-kinaasin katalysoimassa reaktiossa fosfoadenosiini-5'-fosfosulfaatiksi (PAPS). Assimilatiivisessa sulfaatinpelkistyksessä PAPS pelkistetään nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaattioksidaasilla (NADPH) sulfiitiksi. Dissimilatiivisessa sulfaatinpelkistyksessä APS pelkiste-

tään vedystä saaduista elektroneilla sulfiitiksi. Sekä dissimilatiivisessa että assimilatiivisessa sulfaatinpelkistyksessä syntyneestä sulfiitista muodostetaan rikkivetyä. [6, s. 6 - 11; 4, s. 438 - 441, 627 - 629.]



$$\Delta G^0 = -152 \text{ kJ/mol}$$

Sulfaatinpelkistäjäbakteerien yleisin elektroninluovuttaja on vety (2). Dissimilatiivisen sulfaatinpelkistyksen elektronin siirtoreaktiot johtavat protonigradientin muodostumiseen solun sisäkalvon ja periplasmisen tilan välille, jota purkamalla ATP-syntaasi katalysoi uusien ATP-molekyylien synteesiä. Kuvassa 2 on esitetty sulfaatinpelkistys kokonaisuudessaan. Elektronin siirtoreaktiot tapahtuvat solulimakalvolla, jossa 3 periplasmista proteiinia kuljettaa elektroneja ja reaktioketjua eteenpäin. Vety kuljetetaan periplasmisessa tilassa solulimakalvolle ja hydrogenaasi hapettaa sen muodostaen protonigradientin. [4, s. 627 - 629.]



Kuva 2. Sulfaatinpelkistäjäbakteerin ATP:n muodostus ja elektroninsiirto energiantuotannossa. Reaktio tapahtuu solulimakalvolla ja elektronin siirtoreaktiot periplasmisessa tilassa. Muokattu [4 s. 628].

Hydrogenaasi toimii sekä solun ulkopuolelta saadulla vedyllä että orgaanisten yhdisteiden kuten laktaatin tai pyruvaatin kataboliasta saatavalla vedyllä. Yhden sulfaatin pelkistäminen vaatii 8 elektronia, jotka saadaan hapettamalla 4 vetyä. Vety hapetetaan periplasmisessa tilassa, kuten kuvasta 2 huomaa. Kuvassa hydrogenaasille on piirretty

vaaleampi nuoli pyruvaatin kataboliasta vapautuneesta vedystä kuvastamaan hajotustuotteena saatua vetyä. Sulfaatinpelkistäjäbakteereilla hydrogenaaseja on useampia, esimerkiksi *Desulfovibrio vulgaris* on periplasmisia hydrogenaaseja 4. [6, s. 5 - 11.]

Hydrogenaasit voivat hapettaa erilaisia yhdisteitä. Vedyn lisäksi vain formiaatti hapetetaan periplasmisessa tilassa, muut hapetetaan eri hydrogenaaseilla solukalvon sisäpuolella tai solun sisällä. Inhibition ilmentyessä hydrogenaasit voivat korvata toisensa tarvittaessa. Hydrogenaasilta vapautuneet elektronit kuljetetaan sytokromi - c_3 -entsyymille. Sytokromi c_3 on periplasman matalapotentiaalinen sytokromi, joka siirtää vastaanottamansa elektronit edelleen korkeamman molekyylipainon sytokromille (Hmc). [4, s. 627 - 629; 6, s. 5 - 11.]

Hmc (cytochrome of highest molecular weight) on transmembraaninen kompleksi, jonka periplasmisella puolella on sytokromi ja soluliman puolella on rautarikkiproteiini (FeS). Hmc:n sytokromi katalysoi elektronien kuljetuksen solukalvon läpi FeS:lle. Rautarikkiproteiinilla elektronit ovat soluliman entsyymien, APS-pelkistäjän ja sulfiittipelkistäjän, saatavilla. APS -pelkistäjäentsyymien vastaanottaessa elektronit FeS:ltä APS pelkistetään sulfiittiksi, ja reaktio käyttää 2 elektronia sulfaatinpelkistykseen käytettävistä 8 elektronista kuten kuvasta 2 huomaa. Rautarikkiproteiinin luovuttaessa elektronit sulfiittipelkistäjäentsyymille syntyy rikkivetyä, ja reaktio käyttää loput kuusi elektronia yhden sulfaatin pelkistykseen tarvittavasta 8 elektronista. [4, s. 627 - 629; 6, s. 5 - 11.]

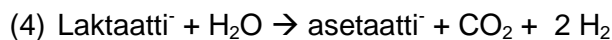
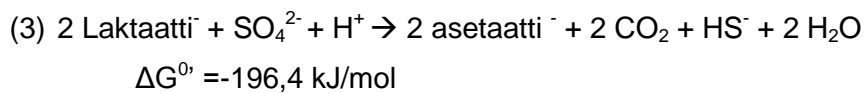
Yhtä ATP:tä kohti jokainen sulfaatti pelkistetään rikkivedyksi. Pelkistyspotentiaaliltaan sulfaatti (SO_4^{2-}) on huonompi kuin happi tai nitraatti (NO_3^-). Sulfaatinpelkistyksestä vapautuu riittävästi energiaa ATP:n syntesointiin, kun elektroninluovuttajan hapetus tuottaa pelkistyneitä koentsyymejä NADH:ta tai FADH:ta. [6, s. 12 - 16.]

2.1.3 Vaihtoehtoisia elektroninluovuttajia vedylle

Elektroninluovuttajista vety on yleisin, ja sitä saadaan ulkopuolisen vedyn lisäksi hajotustuotteena orgaanisista yhdisteistä. Sulfaatinpelkistäjäbakteerien välillä elektroninluovuttajat vaihtelevat lajikohtaisesti, mutta vety, laktaatti ja palorypälehappo esiintyvät suurimmalla osalla niistä. Kaikista elektroninluovuttajista vedyn lisäksi vain formiaatti hapetetaan periplasmisessa tilassa, kun muut elektroninluovuttajat hapetetaan solun sisäpuolella tai solulimakalvon sisällä. SRB kykenee käyttämään vaihtoehtoisesti

elektronin vastaanottajana rikkiyhdisteitä, jolloin se säästää sulfaatin aktivoimiseen tarvittavan ATP:n. [6, s. 12 - 16, 438 - 441 ja 627 - 629.]

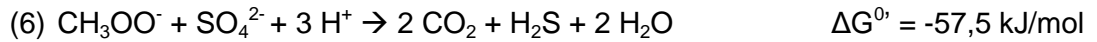
Proteobakteereihin kuuluvat SRB:t voidaan jakaa hapetuskyvyn mukaan epätäydellisiin ja täydellisiin hapettajiin. Epätäydelliset hapettajat hapettavat orgaanisia alkoholeja ja happoja asetaatiksi, kun täydelliset hapettajat hapettavat orgaanisen aineen hiilidioksidiksi. Ryhmään I, epätäydellisiin hapettajiin, kuuluvat suvut *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfotomaculum* sekä *Desulfobulbus*. Ensimmäisen ryhmän SRB:t käyttävät elektroninluovuttajina laktaattia, palorypälehappoa, etanolia ja tiettyjä rasvahappoja pelkistääkseen sulfaattia rikkivedyksi (H₂S). Ryhmä I ei kykene katabolisoimaan asetaattia toisin kuin ryhmä II. Ryhmään II, täydellisiin hapettajiin, kuuluvat suvut *Desulfobacter*, *Desulfonema*, *Desulfococcus* ja *Desulfosarcina*. Ryhmä II on erikoistunut hapettamaan rasvahappoja, kuten asetaattia, pelkistääkseen sulfaattia rikiksi. [4, s.438 - 441; 5, s.14 - 20.]



Laktaatin tai palorypälehapon ollessa elektroninluovuttajana syntyy ATP:tä sekä hajoitusreaktiossa vapautuneista elektroneista että hajoamistuotteena syntyneen vedyn hapettamisesta. Laktaatti hapetetaan ensiksi palorypälepoksi ja asetyyli-koentsyymi A:ksi ja lopulta asetaatiksi ja hiilidioksidiksi (3). Laktaatin hapetuksessa palorypälehapon muodostuminen kuluttaa energiaa. Kun sulfaattia ei ole saatavana, laktaatti hapetetaan asetaatiksi ja hiilidioksidiksi (4). Laktaatin hapetusreaktiota inhiboi arsenaatti, mutta se ei inhiboi palorypälehapon hapetusta. [6, s.12 - 16.]



Palorypälehaposta voidaan muodostaa formiaattia, joka on vedyn lisäksi ainut periplasmisesti hapetettava elektroninluovuttaja. Formiaattia syntyy koentsyymi A:sta (KoA) ja palorypälehaposta aktiivisen palorypälehapo-formiaattilyaasin katalysoimana (6). Palorypälehapo-formiaattilyaasi on syttoplasmisen, joten formiaatti on kuljetettava periplasmiseen tilaan formiaattidehydrogenaasin luokse. [4, s. 627 - 629; 6, s.12 - 16.]



Moni SRB kykenee hapettamaan orgaanisia yhdisteitä kokonaan hiilidioksidiksi kuten asetaattia, laktaattia ja pitkäketjuisia rasvahappoja ja alkaaneja. Asetaatin hapetus hiilidioksidiksi vapauttaa elektroneja sulfaatinpelkistysreaktioon (5), ja sen välituotteena syntyy asetyyli-koentsyymi A:ta (asetyyli-KoA). Asetaatin hajotusreaktiossa syntyneen asetyyli-KoA:n hapetusta katalysoi hiilimonoksidihydrogenaasi. Asetyyli-KoA hapetetaan hiilimonoksidilla, ja elektronit siirtyvät c_1 -sytokromille aloittaen elektronin siirtoreaktion. Asetaatin hapetuksen reaktiot ovat redox -potentiaaliltaan negatiivisia eivätkä siksi käytä energiaa. [4, s. 627 - 629; 6, s.12 - 16.]

2.1.4 Sulfaatinpelkistäjäbakteerit ja happi

Hapentarve ja toleranssikyky vaihtelevat lajikohtaisesti, ja mikrobit voidaan luokitella sen perusteella. Happi on heikosti liukeneva vedessä, ja jatkuvan respiraation takia happi kulutetaan nopeasti loppuun kosteissa ympäristöissä. Maaperän hapellisissa ja hapettomissa kerroksissa vallitsee eri sulfaatinpelkistäjäbakteereita. Hapellisissa kerroksissa vallitsevina sukuina ovat *Desulfococcus*, *Desulfonema* ja *Desulfovibrio*. Hapettomassa ympäristössä hallitsevina sukuina ovat *Desulfobulbus*, *Desulfobacter* ja *Desulfomaculum*. Sukujen sisällä esiintyy lajikohtaisia eroja hapentarpeen ja happitoleranssin suhteen. [6, s. 167 - 176; 4, s. 438 - 441.]

Eräät SRB:t elävät happea tuottavien syanobakteerien kanssa. Nämä SRB:t ovat happitolerantteja ja kykenevät hyödyntämään happea elektronin vastaanottajana syntetisoimien ATP:tä esimerkiksi *Desulfovibrio gigas*. *Desulfovibrio gigas*ilta löytyy sytoplasmisen nikotinamidiadeniinidinukleotidi (NADH)-oksidiaasi, joka pelkistää hapesta vetyperoksidia tai vettä. Eräiden aerobisten sulfaatinpelkistäjäbakteereissa happimolekyyli toimii solunjakautumisen inhibiittorina, koska ribonukleotidipelkistäjä -entsyymi inaktivoituu ja DNA:n replikointi vaikeutuu. [6, s. 167 - 176.]

Valtaosa SRB:stä on anaerobisia, vaikka aerobisia lajeja esiintyykin. Anaerobinen ekosysteemi saa alkunsa hapen poissulkemisesta tai poistamisesta. Aerobiset ja fakultatiiviset lajit käyttävät happea enemmän kuin mitä sitä saadaan. Happea saadaan maaperään lisää diffuusiosta ja maaperän sekoittuessa. Tästä syntyy hapettoman ja hapellisen ympäristön rajapinta, jossa happi vaihdetaan vähemmän hapettavaan elektronin vastaanottajaan syvyyden kasvaessa. [6, s. 17 - 20.]

Suurimmat SRB-pitoisuudet löytyvät läheltä hapellista rajapintaa. Tämä johtuu siitä, että aerobiset ja fakultatiiviset lajit tuottavat SRB:n käyttämiä hiililähteitä ja elektroninluovuttajia. SRB poistaa happea ympäristöstä edistääkseen fakultatiivisten mikrobien fermentointireaktioita, kun suurimmat sulfaattipitoisuudet ovat hapellisissa oloissa. Hapen rajapinnassa elävät liikkuvat SRB:t etenevät kemotaksisesti. Vetyperoksidin ja radikaalien poistokyky on edellytys sille, että pystyy menestymään hapen rajapinnassa. Pienikin happipitoisuuden kasvu nostaa respiraatiota ja NADH-hapetusta. [6, s. 167 - 176.]

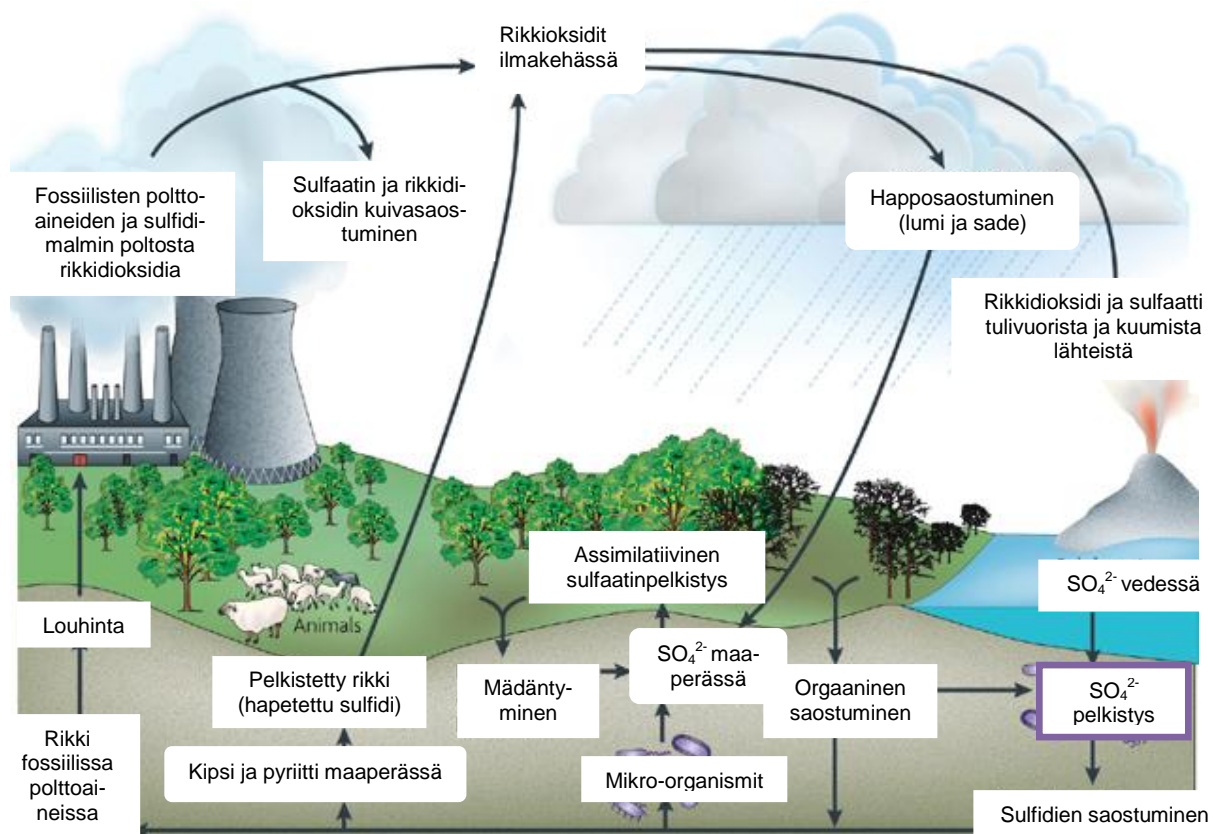
Happi itsessään ei ole myrkyllistä ehdottomille anaeroobeille, vaan sen johdannaiset. Happijohdannaiset kykenevät vahingoittamaan solun rakenteita ja jopa tuhoamaan niitä. Superoksidi (O_2^-) ja vetyperoksidi (H_2O_2) sekä hydroksyyli-radikaali (OH^\cdot) syntyvät kaikki hapen pelkistuksen sivutuotteina. Superoksidi ja hydroksyyli-radikaali ovat vahvoja hapettajia, jotka hapettavat orgaanisia yhdisteitä solussa. Vetyperoksidi ei ole niin myrkyllinen solulle kuin 2 aikaisemmin mainittua, mutta kykenee vahingoittamaan sitä. Pelkistetty vapaa rauta ja sulfidiryhmä muodostavat superoksidiradikaaleja ja peroksidia hapen kanssa, jolloin hapen myrkyllisyys kasvaa. [4, s. 168 - 172; 6, s. 167 - 176.]

Mikrobit ovat kehittäneet entsyymejä myrkyllisten happijohdannaisten tuhoamiseen. Superoksidi ja vetyperoksidi ovat yleisimpiä happijohdannaista, joten niiden tuhoamista varten on useita entsyymejä. Katalaasi hajottaa vetyperoksidia vedeksi ja hapeksi. Peroksidaasi ja NADH -pelkistäjä katalysoivat vetyperoksidin hajotusta, josta syntyy vain vettä. Superoksidin hajotusta katalysoi superoksididismutaasi, josta syntynyt vetyperoksidia katalaasi hajottaa edelleen. Aerobisilla ja fakultatiivisesti aerobisilla mikrobeilla löytyy kaikkia mainittuja entsyymejä. [4, s. 168 - 172.]

Ehdottomilla anaerobisilla SRB:illä on superoksidia vetyperoksidiksi hajottava superoksidiredustaasi. Superoksidiredustaasin katalysoimassa reaktiossa ei synny ehdottomille anaeroobeille myrkyllistä happea. Hapen pitoisuuden kasvaessa anaerobisten mikrobien respiratio lisääntyy, jolloin superoksididismutaasin ja NADH-oksidaasin aktiivisuus kasvaa. Katalaasiaktiivisuus on tehokkaampaa lähellä rajapintaa ja pinnassa kuin syvemmissä maaperässä. [4, s. 168 - 172.]

2.1.5 Rikin kierto

Rikki on 10. runsain elementti maaperässä. Suurimmat rikkipitoisuudet ovat maankuoressa liikkumattomia rikkiesiintymiä ja rikkimetallisaostumia, kuten rautadisulfidi (FeS_2) ja kipsi (CaSO_4). Rikkiä louhitaan maaperästä teollisuuden käyttöön. Rikkiä vapautuu ilmakehään teollisuuden ja fossiilisten polttoaineiden poltosta rikkioksidina. Rikkioksidit hapettuvat ilmakehässä vesiliukoiseksi sulfaatiksi, mikä sataa haposateena. Myös vulkaaninen aktiivisuus vapauttaa rikkiä ilmakehään, pääsääntöisesti rikkidioksidina ja rikkivetyä. Tulivuorista vapautunut rikkivety liukenee meriveteen ja pohjavesivaras-
toon. Veteen liuenneena rikkivety muodostaa metallisulfideja ja metallisulfaatteja baariumin, kalsiumin ja strontiuminin kanssa. Murto-osa ilmakehän rikistä on biologisesti syntyntä rikkivetyä, mikä syntyy mikrobisesta sulfaatinpelkistyksestä. Koko rikin kierto on esitetty kuvassa 3. [9, s. 309 - 314; 8, s. 132 - 135.]



Kuva 3. Rikin kiertokulku ja sulfaatinpelkistäjäbakteerien rooli osana rikin kiertoa. Suurin osa rikistä on maaperässä ja toiseksi suurin esiintymä on valtamerissä. Vain murto-osa rikistä esiintyy orgaanisessa materiaalissa, mutta kiertää siellä nopeammin. Muokattu [10].

Aerobisissa oloissa kasvit ja mikro-organismit hapettavat sulfaattia saadakseen rikkiä. Kasvit ja mikro-organismit tarvitsevat pelkistettyä rikkiä rakennusmateriaaliksi aminohappoihin ja muihin molekyyliin. Kasvit käyttävät maaperän sulfaattia ja pelkistävät sen solun sisällä rikiksi. Tätä kutsutaan assimilatiiviseksi sulfaatinpelkistykseksi, kuten kuvasta 3 ilmenee. [9, s. 309 - 314; 8, s. 132 - 135.]

Sulfaatinpelkistyksessä syntyvä sulfidi on myrkyllistä, minkä takia kasvit käyttävät maaperästä sulfaattia eivätkä suoraan sulfidia. Sulfidin myrkyllisyys vaihtelee, esimerkiksi solun sisällä se voi muodostaa metallisakkaa reagoimalla sytokromin kanssa ja tuhoamalla sen toiminnan. Otollisissa olosuhteissa sulfaatinpelkistyksessä syntynyt sulfidi voidaan poistaa solusta heti tai liittää se orgaaniseksi yhdisteeksi. Ympäristössä sulfidi neutralisoituu normaalisti raudalla, jolloin syntyy rautasulfidia (FeS) ja rautadisulfidia (FeS₂). [9, s. 309 - 314; 8, s. 132 - 135.]

Rikki on tärkeää mikrobeille, ja sitä on noin prosentti bakteerin kuivapainosta. Mikrobit mahdollistavat rikin kierron vaihtamalla sen hapetusastetta erinäisissä hapetuspelkistysreaktioissa. Mikrobit kykenevät rikin mineraalisaatioon anaerobisesti tai aerobisesti, mikä tarkoittaa rikin irrottamista orgaanisista yhdisteistä. Aerobisissa olosuhteissa syntyy sulfaatteja, kun anaerobisissa olosuhteissa syntyy rikkivetyä rikin mineraalisaatiosta. Rikin mineraalisaatioon tarvitaan entsyymejä. Kuvasta 3 näkee kuinka mikrobit hajottavat kuollutta orgaanista ainesta sulfaatiksi takaisin kasvien käyttöön. [9, s. 309 - 314; 8, s. 132 - 135.]

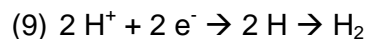
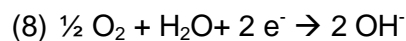
Rikin hapetus on tärkeä osa rikin kiertoa. Hapen läsnä ollessa pelkistetyt rikkinyhdisteet tukevat kemoautotrofien kasvua ja anaerobisissa oloissa ne tukevat fotoautotrofeja. Kemoautotrofit ovat hallitsevia rikin hapettajia monissa ympäristöissä. Eräät bakteerit ja sienet hapettavat rikkiä tiosulfaatiksi tai sulfaatiksi. Fotoautotrofiset vihreä- ja purppurabakteerit hapettavat sulfidia rikiksi. Ne ovat kehittyneet, kun ilmakehässä ei ollut happea. [8, s. 132 - 135.]

Rikin pelkistystä tapahtuu kolmea eri reittiä: Ennäkin assimilatiivinen sulfaatin otto soluun aerobisesti tai anaerobisesti. Muut tavat ovat rikkirespiraatio tai dissimilatiivinen sulfaatinpelkistys, joista molemmat tapahtuvat anaerobisesti. Rikkirespiraatiossa alkuaikainen rikki toimii viimeisenä elektronin vastaanottajana, kun sulfaatinpelkistyksessä se on sulfaatti. Dissimilatiivisessa sulfaatinpelkistyksessä syntynyt sulfidi saostetaan maa-

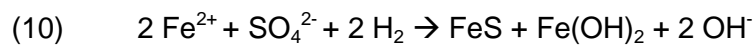
perään ja se kiertää sieltä takaisin rikin hapettajien käyttöön, kuten kuvasta 3 näkyy. [8, s. 132 - 135.]

2.1.6 Ruostuminen

Mikrobien aiheuttama korroosio vahingoittaa metallin rakennetta sen jouduttua kosketuksiin veden kanssa. Tämä on suurin syy putkistojen ongelmiin vedenkäsittelyssä ja kemikaaliteollisuudessa. Sulfaatinpelkistäjäbakteerit ovat osallisia metallin korroosioon. SRB:n aiheuttama korroosio vaatii anaerobiset olosuhteet. Vaikka happea on läsnä metallin ympärillä olevassa vedessä, syntyy anaerobinen ympäristö biofilmin sisälle. Anaerobiset olot syntyvät nopeasti, kun biofilmin uloimpien kerrosten bakteerit käyttävät kaiken hapen. [8, s. 144 - 146.]



Metallin ruostuminen johtuu kahdesta spontaanista elektrokemiallisesta reaktiosta. Ensimmäisessä reaktiossa erilaiset aerobiset solut virittyvät, jolloin metallin pinta toimii anodina tuottaen metalli-ioneja (7). Vastaavasti katodin reaktiossa happi vastaanottaa elektroneja hapetetulta raudalta (8). Toisessa korroosion reaktiossa anaerobisessa oloissa anodinen reaktio pysyy samana, mutta syntyneet elektronit reagoivat hapen sijasta vedyn kanssa (9). [9, s. 320 - 321.]



Mikrobien aiheuttamassa korroosiossa biofilmi edesauttaa näitä elektrokemiallisia reaktioita. SRB hyväksikäyttää vetyä elektroninluovuttajana, poistaen sitä ympäristöstä ja siten ajaen reaktion anodiseen suuntaan. Lopputuotteena sulfaatinpelkistyksestä muodostunut sulfidi reagoi raudan kanssa muodostaen metallisulfideja. Metallisulfidi muodostuu spontaanisti. Kaikki 3 reaktiota on esitetty reaktioyhtälössä (10). [8, s. 144 -146; 9, s. 320 - 321.]

2.2 Elohopea ja metyylielohopea

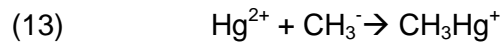
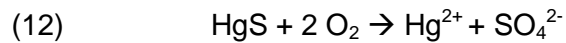
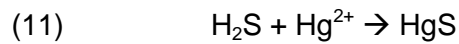
Elohopeaa (Hg^0 tai Hg^{2+}) esiintyy alhaisina pitoisuuksina luonnollisessa ympäristössä, ja sitä käytetään rajoitetusti metabolisissa reaktioissa. Suomen maaperässä elohopeaa esiintyi vuosina 2005 - 2006 vaihtelevasti 0,05 - 0,10 mg/kg väliltä. Elohopeaa käytetään paljon teollisuudessa ja fossiilisten polttoaineiden polttaminen vapauttaa elohopeaa ilmakehään. [11; 4, s. 708 - 709.]

Metyylielohopea (MeHg) on eniten tutkittu metyyliyhdistelmämetalli. Metyylielohopea ja sen yhdisteet ovat erittäin lipofiilisiä ja mahdollisia neurotoksiineja. Elohopea pystyy absorboitumaan soluihin. Metyylielohopean pitoisuuden lisääntyminen maaperässä kertoo bakteerien elohopean käytöstä metaboliassa. Metyylielohopea kykenee konsentroitumaan ruokaketjussa huippua kohti pääsääntöisesti kalassa. Se on sata kertaa myrkyllisempää kuin elohopea. Ympäristökijät vaikuttavat elohopean kemialliseen kehittymiseen ja biologiseen hyötysuhteeseen. [7, s. 423 -428; 12; 13; 4, s. 708 - 709.]

Kenttä- ja laboratoriokokeet osoittivat epäorgaanisen elohopean hapetusasteen kontrolloivan elohopean saatavuutta, metylointia ja käyttökykyä. Metyylielohopeaa muodostuu eniten lievästi sulfaattisessa ympäristössä. Oletettavasti mikro-organismit saavat elohopeaa kahta reittiä: passiivisen diffuusion tai aktiivinen kuljetuksen kautta. Aktiivisessa kuljetuksessa elohopeasta muodostetaan pieni neutraalinen Hg -ligandi kompleksiksi (HgCl tai HgS) tai spesifinen Hg -ligandi (Hg -aminohappo). [13; 14.]

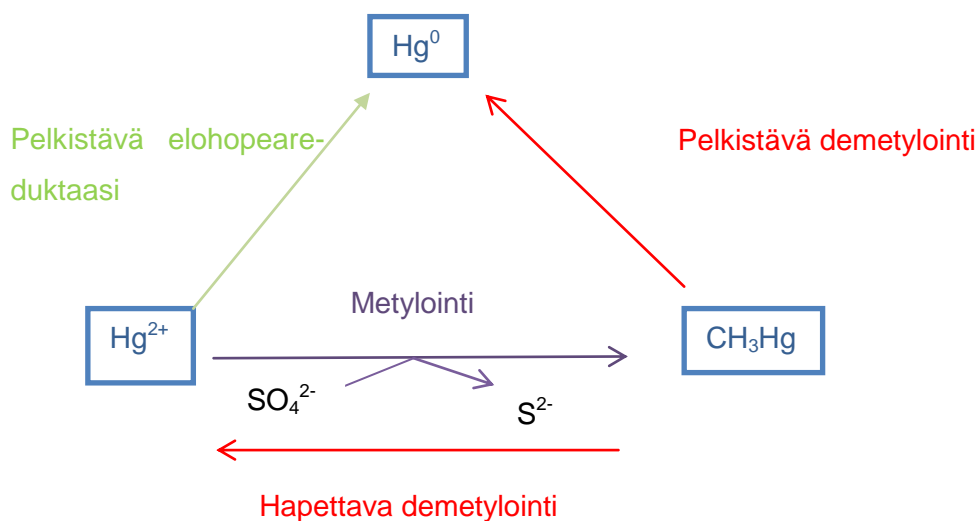
Monista tutkimuksista voidaan päätellä yhteenvedona, että maaperän kärsiessä ravinnonpuutteesta metyylielohopean muodostuminen lisääntyy. Metyylielohopean muodostumista on tutkittu monta vuosikymmentä, mutta vähän tiedetään metyylielohopeaan vaikuttavista tekijöistä esimerkiksi suotyypin vaikutuksesta. Metyylielohopea voi muuttua myös haihtuvaksi dimetyylielohopeaksi ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$). Myös $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ kykenee kerääntymään eläimiin, varsinkin lihaskudokseen. [12.]

SRB:tä esiintyy saastuneessa maaperässä ja solut sisältävät myrkyllisiä metalleja. SRB kykenee poistamaan metalleja ja muuttamaan resistentiksi. Elohopealla saastuneessa maaperässä esiintyy todennäköisesti enemmän sulfaatinpelkistäjäbakteereita tai vaihtoehtoisesti raudanpelkistäjäbakteereita. MeHg:tä muodostuu pääsääntöisesti emäksisessä maaperässä ja soissa, samoin kuin SRB:tä tai raudanpelkistäjäbakteereita (FRB). [14; 13; 6, s. 167 - 176.]



SRB muodostaa elohopeasta ja rikkivedystä elohopeasulfidia (HgS) (11). Elohopeasulfidin liukoisuus on erittäin alhainen, joten hapettomissa ympäristöissä suurin osa elohopeasta on HgS -muodossa. Hapellisissa olosuhteissa voidaan elohopeasulfidi hapettaa edelleen (12). Elohopeasulfidin hapetuksesta vapautunut elohopea hapettuu edelleen metyylielohopeaksi (13). Metyylielohopean muodostuminen on riippuvainen olosuhteista ja se ei ole välttämätön mikrobeille. SRB vain luo otolliset olosuhteet metyylielohopean muodostumiselle. [12; 4, s.708 - 709.]

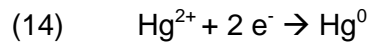
Kuvassa 4 on esitetty elohopean kierron ja SRB:n yhteys. Sulfaatinpelkistyksessä syntynyt rikkivety hajoo vedyksi ja sulfidiksi. Vapautunut sulfidi reagoi solussa olevan elohopean kanssa muodostaen elohopeasulfidia, joka hapettuu edelleen metyylielohopeaksi. Metyylielohopeaa muodostuu vain Hg²⁺:sta ei Hg⁰:sta, joka on stabiilimpi. [12; 4, s.708 - 709.]



Kuva 4. Sulfaatinpelkistäjäbakteerien osuus elohopean kierrossa maaperässä. Sulfaatin pelkistyksessä syntyvä sulfidi (S²⁻) reagoi elohopean Hg²⁺ kanssa muodostaen elohopeasulfidia (HgS). Muodostunut HgS hapettuu edelleen metyylielohopeaksi. Muokattu [13].

Korkea myrkyllisen metallin konsentraatio aktivoi aggressiivisia resistenssimekanismeja, jolloin mikrobin toleranssi paranee. Metallin myrkyllisyys voi ilmentyä monella eri

tavalla muun muassa syrjäyttämällä välttämättömän metallin sitoutumispaikalta tai inhi-
boimalla entsyymitoimintaa. Elohopean ja metyylielohopean myrkyllisyyden takia moni
mikrobi pyrkii muuttamaan elohopean myrkyttömäksi. [4, s.708 - 709; 7, s.423 - 428.]



Elohopearesistensseillä gram-negatiivisilla bakteerilla on NADPH:ta käyttävä eloho-
peareduktaasi -entsyymi (kuva 4), joka pelkistää elohopeaioneja (14). Jotkut bakteerit
ovat resistenttejä arsenikille ja elohopealle. Elohopearesistenssi on bakteereilla
plasmidivälitteistä, jolloin se leviää transformaation myötä nopeasti. Tästä johtuen ent-
syymikirjo on laaja. Elohopeareduktaasin puuttuessa bakteeri ei kykene pelkistämään
elohopeaa (14), mutta se ei häiritse metyylielohopeatoleransseja bakteereita. [4, s.708
- 709; 7, s.423 - 428.]

2.3 Kvantitatiivinen PCR

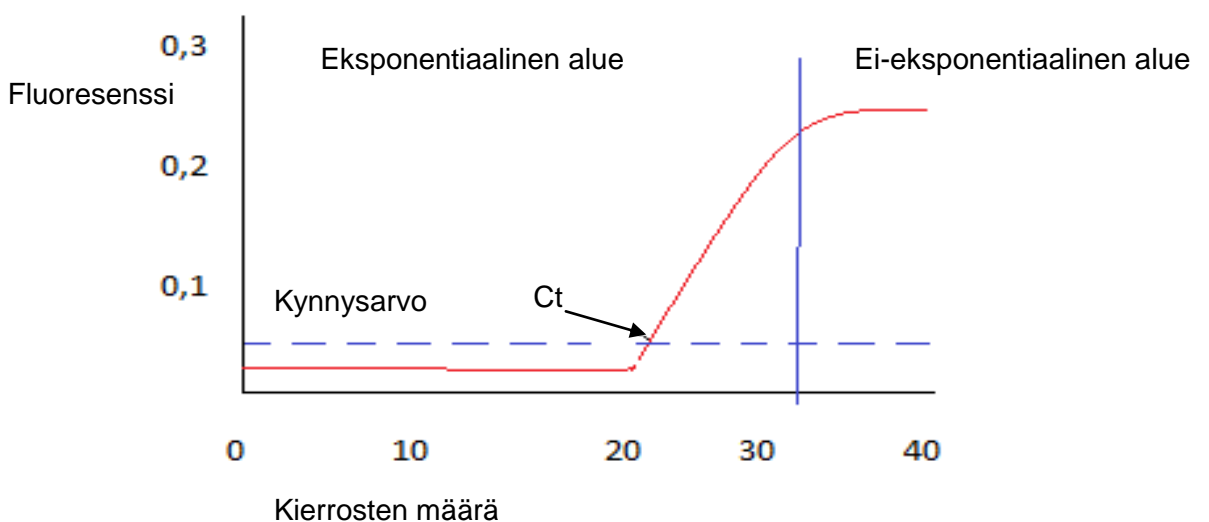
PCR:n avulla on mahdollista kopioida DNA-fragmenttia miljoonakertaiseksi muutamasa
tunnissa yksinkertaisilla reagensseilla. DNA:n tai RNA:n kvantitatiivinen tutkimus oli
vaikeata vuoteen 1993 asti, jolloin Russell Higuchi esitti reaaliaikaisen DNA:n monis-
tumisen seurantamenetelmän. Higuchi huomasi tutkimuksissaan, että PCR-tuotteen
määrä kasvaa lineaarisesti kierrosten myötä. Tämä synnytti reaali-aikaisen kvantitaii-
visen PCR:n (qPCR). Kvantitatiivinen PCR (qPCR) on toimintaperiaatteeltaan saman-
lainen kuin normaali PCR. [15, s. 1.]

qPCR:ssä reaktion kulkua seurataan reaaliajassa monin eri menetelmin. Valtaosa pe-
rustuu samaan ideaan käyttää DNA:n sitoutuvaa fluoresoivaa leimaa. Fluoresenssi
kasvaa PCR-tuotemäärän mukana. Reaktion kulkua ja tehokkuutta seurataan ja reak-
tiotuotetta ei ole välttämätöntä jälkikäteen analysoida geelielektroforeesilla. Yleisimpiä
kvantitatiivisen PCR:n analyysejä ovat geeniekspressiotutkimukset ja patogeenin to-
teaminen potilasnäytteestä. [16; 17.]

PCR-tuotteen ja fluoresenssin intensiteetin välistä lineaarista korrelaatiota käytetään
laskettaessa tuotteen määrää reaktion alkutilanteessa. Kynnysarvo (threshold) on
määritettävä, jotta näytepitoisuudet voidaan laskea. Kynnysarvo on käänteisesti
verrannollinen kopiolukemien logaritmiin. Kynnysarvo tulisi asettaa kohtaan, jossa laite

havaitsee eksponentiaalisen fluoresenssin lisääntymisen. Ct-arvo (cycle threshold) tarkoittaa pistettä, jossa fluoresenssi erottuu taust fluoresenssista. Mitä enemmän PCR-tuotetta näytteessä on, sitä pienempi Ct-arvo on. Vastaavasti mitä vähemmän PCR-tuotetta näytteessä on, sitä suurempi Ct-arvo on. [15, s. 2 - 3; 18, s. 2 - 4.]

On 2 tapaa kuvata qPCR-fluoresenssitulos: X-Y-standardisuora, jossa fluoresenssi on esitetty kierroksien määrän funktiona ja fluoresenssin logaritmi suhteessa kierroksien määrään. Ensimmäisenä mainitun suoran tulisi olla eksponentiaalisesti kasvava. Onnistunut logaritmistandardisuora on lineaarinen kuvan 5 eksponentiaalisessa alueessa ja sen kaarevuudesta voidaan laskea reaktion tehokkuus (efficiency). Kuvassa 5 on esitetty tyypillinen qPCR-käyrä. Kierroksien määrä on x-akselilla ja y-akselilla on mitattu fluoresenssiarvo. Eksponentiaalisessa osassa DNA-kopioiden määrä kasvaa eksponentiaalisesti. Reaktiossa väriaine kuluu loppuun, jolloin reaktio siirtyy ei-eksponentiaaliselle alueelle. [15, s. 2 - 3; 18, s. 2 - 4.]



Kuva 5. Tyypillinen qPCR-käyrä. Kuvassa punaisella näkyy PCR-tuotteen monistuminen reaktiossa. Kynnysarvo on merkitty katkoviivalla ja Ct-arvo osoitettu nuolella. Muokattu [18 s.2].

Standardisuoran tulee kattaa koko detektioalue. Standardisuoran on sisällettävä vähintään 5 pistettä. Standardit voivat olla esimerkiksi plasmideita tai PCR-tuotteita. qPCR-reaktion tehokkuus lasketaan standardisuoran kaltevuudesta. Tehokkuuden tulee olla välillä 90 - 110 %:a. Tehokkuuteen vaikuttavat PCR-tuotteen pituus ja GC-pitoisuus. Myös reagenssien pitoisuus ja alukkeiden sekundaarirakenne vaikuttavat tehokkuuteen. [17, s. 46 - 48.]

Korrelaatiokerroin (R^2) on suoralta laskettu parametri, ja se ilmaisee kuinka suorassa linjassa standardisuoran pisteet ovat. Hyväksyttävä korrelaatiokerroin on yli 0,985. Mitä pienemmät Ct-arvot, sitä herkempi reaktio. Herkkyyttä voidaan verrata samojen näytteiden välillä samassa analyysissä. Identtisten rinnakkaisten standardien välillä tulisi olla eroa enintään 0,5 Ct. Standardisuora tehdään laimentamalla 1:10 aina vahvemmassa seuraava. Näytteet ajetaan samassa analyysissä standardien kanssa. Y-akselilla on Ct-arvot ja x-akselilla on kopiomäärien logaritmit. Näytteen pitoisuus lasketaan seuraavalla kaavalla, kun suoran kaava on muotoa $y=mx+b$ tai $C_t=m(\log \text{ määrä})+b$: [18, s.35 - 36, 46 - 48.]

$$N_{Ct} = 10^{\frac{(Ct-b)}{m}}$$

$$\text{määrä} = 10^{\frac{(Ct-b)}{m}}$$

2.3.1 DNA:n detektointi

Mitattavan signaalin tulee kuvastaa PCR-tuotteen määrää. Yleisimmät tavat mitata näytteen pitoisuus ovat fluoresenssia käyttävät väriaine- ja spesifimpi koetinmenetelmä. Jokaisen fluorokromin aiheuttama aallonpituus ja emissio ovat yksilöllisiä. Fluoresenssin aikana valon absorptio siirtää elektroneja ylemmälle tasolle, ja palatessaan takaisin alemmalle tasolle elektronit emittoivat fotonien energiaa. Emission intensiteetti kuvastaa fotonien emittoitumista sekunnissa. Suurin osa fluorokromeista on joko heterolyttisiä tai polyaromaattisia hiilivetyjä. [15, s. 3 - 4; 17, s. 10 - 12.]

Väriaineet sitoutuvat palautuvasti ja tiukasti. Useimmat qPCR-liuokset käyttävät sitoutumisaineena SYBR Green I:stä, mutta markkinoilla on myös toisen sukupolven väriaineita kuten Evagreen ja Syto 9. SYBR Green I tuottaa fluoresenssia jatkuvasti, mutta fluoresenssi kasvaa tuhatkertaiseksi sen sitoutuessa DNA:han. Kasvava määrä väriainetta sitoutuu DNA:n reaktion edetessä. SYBR Green I virittyy huippuunsa 497 nm, ja fluoresenssin emission huippu on 520 nm. Fluoresenssi yleensä mitataan jokaisen kierroksen ekstensiovaiheen lopussa. [15, s. 3 - 4; 18, s. 10 - 11.]

Väriaineet sitoutuvat epäspesifisti kaikkeen kaksijuosteiseen DNA:n. Huonoihin puoliin luokitellaan se, ettei näyttemääriä voi verrata toisiinsa. Epäspesifinen sitoutuminen näkyy templaattivapaan näytteen monistusmäärissä tai useamman kuin yhden

tuotetyypin monistumisena. Jos templaattivapaasta näytteestä ei havaita fluoresenssia, ei näytteissä esiinny merkittävästi epäspesifistä alukepohjaista monistumista. Lisäksi tulee ottaa huomioon, että usea värimolekyylillä voi sitoutua samaan näytemolekyylisiin. Signaalin intensiteetti riippuu kaksijuosteisen DNA:n massasta reaktioissa. SYBR Green ei sovellu multiplex-PCR:ään, koska fluoresenssi signaalit eivät erotu toistaan ja siten eri tuotteiden määrittäminen on mahdotonta. [15, s. 3 - 4; 18, s.10 - 11.]

Toisin kuin koetinpohjaisessa qPCR:ssä SYBR Green -menetelmien spesifisyys perustuu ainoastaan käytettyihin alukkeihin. Alukkeiden tärkeä piirre on sulamislämpötila (T_m), jossa puolet oligonukleotideista on hybridisoitunut. Eräs tapa laskea T_m on käyttää laskukaavaa $2(A+T)+4(G+C)$. T_m :n tulisi olla 55 - 60 °C välillä, ja alukkeiden välinen lämpötilaero alle 4 °C. Alukkeiden pituuden tulisi olla 18 - 30 emäsparia ja GC-pitoisuus 30 - 80 %. Alukkeet eivät saa sitoutua itseensä tai toisiinsa, eivätkä muodosta vahvoja sekundäärirakenteita. Yleisesti lyhyempi PCR-tuote antaa suurempia PCR-tehokkuuslukuja. SYBR Greenin hyviin puoliin kuuluu se, ettei koettimia tarvitse suunnitella ja se on edullisempi. Kunnollisella alukesuunnittelulla saadaan monistumaan vain haluttu spesifinen tuote, johon SYBR Green sitoutuu. SYBR Greenin irtoamista voidaan seurata tekemällä sulamispisteanalyysi PCR-analyysin jälkeen. [17, s. 28 - 29; 18, s. 10 - 11.]

2.3.2 Sulamiskäyräanalyysi

Sulamispisteanalyysi tehdään qPCR-analyysin jälkeen nostamalla lämpötilaa asteittain, jolloin DNA denaturoituu ja fluoresenssi vähenee. Lämpötilagradientissa lämpötila nostetaan 50:stä 95 °C asteittain fluoresenssinlukemia seuraten. Jokaisella DNA-molekyylillä on sille tyypillinen sulamislämpötila, jossa se on puolittain denaturoitunut. Tämä sulamislämpötila voidaan erottaa itse tuotteen alukedimeeristä sulamispisteanalyysissä. Erilaiset kaksijuosteiset DNA:t sulavat eri lämpötiloissa, johtuen muun muassa GC -pitoisuudesta, tuotteen pituudesta ja sekundääri- ja tertiäärirakenteista. Kaikki kaksijuosteinen DNA denaturoituu lämpötilagradientin aikana. Sulamiskäyrässä kohta, jossa kaikki kaksijuosteinen DNA on denaturoitunut, näkyy fluoresenssin lukeman putoamisena. Erimittaiset tuotteet ja sekvenssit sulavat eri lämpötiloissa, ja siksi näkyvät erillisinä piikkeinä kuvattaessa fluoresenssin derivaattaa lämpötilan funktiona. [15, s.3 - 4; 18, s.10 - 11.]

3 Työn suoritus ja materiaalit

Tutkimuskohteena oli 8 suota Kajaanin ja Sotkamon välistä, joita on seurattu vuodesta 2007 lähtien. Soiden kalibrointi suoritettiin vuonna 2008 ja käsittelyhakkuut seuraavana vuonna. Kaikki 8 suota oli ojitettu ja pinta-alaltaan pienimuotoisia. Pinta-alat vaihtelivat väliltä 0,5 - 5 ha. Puuston tilavuus oli 70 - 170 m³, ja vallitsevia puulajeja olivat kuusi ja mänty. Turpeen paksuus vaihteli väliltä 1 - 2 m.

Kahdeksasta suosta puolet oli mustaliuskepohjalla ja puolet kallioperällä. Molemmilla suomaaperällä oli oma kontrollinsa, jotka olivat mustaliuskesuolla ML09 ja kallioperällä KV13. Kontrolleista haettiin vain näytteitä. Maaperän lisäksi suot oli jaettu käsittelyn mukaan avohakkuu- ja kokopuuhakkuuihin. Kokopuuhakkuusoilta noin 70 % hakkuiden jäännöksistä ja kannoista oli poistettu. Avohakkuusuot olivat S24 kallioperäsuolla ja M10 mustaliuskesuolla. Kokopuuhakkuu suoritettiin mustaliuskesoille ML10 ja ML07 ja kallioperäsoille KV14 ja KV22.

Jokaiselta suolla suoritettiin 4 rinnakkaiskairausta neljästä näytesyvyydestä. Näytteet oli merkitty numeroin 1-4 rinnakkaisen mukaan ja numeroin 5 - 35 näytesyvyyden mukaan, esimerkiksi näyte ML10 1-5 oli kokopuuhakkuusuon ensimmäisestä kairauksesta näytesyvyydeltä 5 cm. Näytteitä kerättiin syvyyksistä 0 - 5 cm, 5 -15 cm, 15 - 25 cm sekä 25 - 35 cm. Näytteitä oli 8 suolta 16 ja kaiken kaikkiaan 128 kappaletta. Työssä käytetyt turvenäytteet oli kerätty 7.9.2010 ja säilytetty pakkaseen 9.9.2010.

3.1 DNA:n eristys

Näytteitä sulatettiin huoneenlämmössä 30 minuuttia ennen eristystä. DNA eristettiin PowerSoil -pakkauksella (PowerSoil DNA Isolation kit, MO BIO, 12888-100). Näytteitä punnittiin 0,25 ±0,02 g pakkauksen PowerBead-putkiin ja eristettiin ohjeen mukaisesti. Punnitut määrät kirjattiin ylös vihkoon, sillä niitä tarvittiin tulosten laskentaan. Sekä turvenäytteitä että eristetyt DNA:t säilytettiin -20 °C:ssa.

3.2 Polymeerasiketjureaktio yleisalukkeilla

Alustavissa PCR-kokeissa käytettiin Biotools-ohjetta, jota varten reagenssit pipetoitiin yhteen eppendorf -putkeen reaktioseokseksi. Steriiliin 200 µl:n PCR-putkeen pipetoitiin reaktioseosta 49 µl ja templaatti-DNA:ta 1 µl. Taulukkoon 1 on listattu PCR:n reak-

tioseoksen reagenssien pitoisuudet yhdessä reaktiossa. Reaktioseokseen pipetoitiin viimeisenä entsyymi. Entsyyminä käytettiin 5 U/μl DreamTaqia (Fermentas, EP0702), jolla oli oma 10x puskuri (Fermentas, Buffer 10x DreamTaq, 20mM MgCl₂).

Taulukko 1. Reaktioseoksen reagenssit ja yhden reaktion pitoisuudet Biotools-ohjeen mukaisesti, kun reaktiutilavuus oli 50 μl.

Reagenssi	Lopullinen konsentraatio reaktiossa
Aluke 1	0,5 μM
Aluke 2	0,5 μM
dNTP	0,2 μM
DreamTaq 10x puskuri	1x
Ultrapuhdas H ₂ O	
DreamTaq	0,02 U/μl

Näytteille tehtiin ensin PCR 16S rRNA-yleisalukkeilla, millä todettiin, oliko näytteessä DNA:ta. Yleisalukkeet olivat nimeltään 533f ja R1378, ja niiden kopioima tuote oli kooltaan 394 bp. Käytettyjen alukkeiden sekvenssit ja tiedot on esitetty liitteessä 1. Alukkeita säilytettiin -80 °C:ssa 500 μM kantaliuosta, josta alukkeita laimennettiin 25 μM:ksi käyttöliuokseksi kaavalla

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2,$$

josta c_1 on alkuperäinen pitoisuus (mol/l) ja V_1 tarvittava tilavuus (l). c_2 on haluttu pitoisuus (mol/l) ja V_2 haluttu tilavuus (l). Yleisalukkeet laimennettiin steriiliin ultrapuhdastaan veteen.

Pipetoidessa oli huomioitava, että näytteet ja reagenssit oli pidettävä jäällä koko ajan. PCR:ssä positiivisena kontrollina toimi toisesta tutkimuksesta saatu näyte, jonka tiedettiin sisältävän SRB-bakteereita. Positiivisella näytteellä todettiin, että PCR toimi kuten pitikin. Lisäksi joka reaktiossa oli mukana myös templaattivapaa näyte, jossa oli ainoastaan reaktioseosta 49 μl.

Yleisaluke-PCR tehtiin Bio-Radin S1000 ThermalCyclerillä, jonka 30-kierroksinen ohjelma on esitetty taulukossa 2. Ohjelman sitoutumislämpötila ja -aika oli suunniteltu alukkeiden pituuden ja optimilämpötilojen mukaan. Ohjelman ekstensiolämpötila ja -

aika ovat yleisesti käyviä. Ohjelman loppuksi oli säädetty säilytys +4 °C, mikä mahdollisti PCR:n analyysin myöhään illalla, kun se säilyi laitteessa yön yli.

Taulukko 2. 16S rRNA-alukkeiden 30-kierroksinen PCR-ohjelma.

Ohjelmavaihe	Lämpötila (°C)	Aika (min)
Alkudenaturaatio	95	5
Denaturaatio	95	1
Sitoutuminen	56	1
Ekstensio	72	1
Loppuekstensio	72	10

Analysoimalla PCR-tuotteet agarosigeelielektroforeesilla jälkikäteen todettiin, oliko syntynyt PCR-tuotetta. Näytteiden lisäksi geelille pipetoitiin pituusstandardia (Generuler 100 bp Plus, DNA 0,5 µg/µl, Fermentas, SM0321). 42-kaivoiseen geeliin näytteitä pipetoitiin 8 µl ja pituusstandardia 4 µl. Agarosigeelielektroforeesin analyysiaika oli 60–75 minuuttia 120V:lla. Analyysipuskurina käytettiin 1xTAE:ta. Analyysin jälkeen geeli kuvattiin UV-valopöydällä ja kamerana käytettiin PowerShot A640 AIAE (Canon).

PCR-reaktio oli tehtävä uudelleen negatiivisen kontrolliin muodostuessa tuote. PCR-reaktio tehtiin kertaalleen myös silloin, jos näytettä tai positiivista kontrollia ei muodostunut. Tämän jälkeen vaihdettiin reagenssit. Jos reaktio ei toiminut edelleenkään, siirryttiin DNA-laimennoksiin. Käytetyt laimennokset olivat 1:10, 1:25, 1:50 ja 1:100. Näytteissä oli paljon inhibiitota, jonka takia yksikään näyte ei kopioitunut suoraan PCR:ssä. Laimennokset valmistettiin steriileihin 200 µl PCR-putkiin ultrapuhdaasta vedestä. Niitä säilytettiin – 20 °C:ssa kuten näytteitäkin. Laimennosten jälkeen 24 hajanaista näytettä eivät näkyneet, joten kaikki 128 näytettä lisäpuhdistettiin polyetyleeniglykoli-saostuksella.

3.3 Polyetyleeniglykoli-saostus

PCR:ää häytti näytteissä todettu inhibiitio, joten näytteet lisäpuhdistettiin tekemällä polyetyleeniglykoli (PEG)-saostus. PEG-liuos valmistettiin punnitsemalla 6 grammaa polyetyyliyglykolia ja lisäämällä 15 ml 25 M NaCl ja 15 ml ultrapuhdasta vettä. Seos sekoitettiin hyvin ja steriilisuodatettiin 0,2 µM kalvon läpi.

PEG -saostusta varten näytteet sulatettiin jäällä puoli tuntia ennen saostusta. Näytettä pipetoitiin steriiliin eppendorf -putkeen 50 µl ja päälle pipetoitiin PEG:iä 30 µl. Seosta vorteksoitiin huolella ja inbukoitiin jäällä 20 minuuttia. Inbukoinnin jälkeen näytteitä sentrifugoitiin 20 minuuttia 14 000 rpm:ssa. Supernatantti pipetoitiin pois varovasti, ja pellettin päälle pipetoitiin 70 % etanolia 50 µl. Nopean vorteksoinnin jälkeen näytteitä sentrifugoitiin 5 minuuttia 14 000 rpm:ssa. Supernatantti poistettiin ja pelletti kuivattiin vaakuumisentrifugilla tai vaihtoehtoisesti jätettiin yön yli huoneenlämpöön kansi auki. Kuivatettu pelletti liuotettiin samaan näytetilavuuteen, 50 µl:n 1:10 TE -puskuria (1 mM Tris-HCl ja 0,1 mM EDTA, pH 8). Näytteitä vorteksoitiin huolella ja inbukoitiin tunti + 50 °C:ssa.

Näytteiden tuli olla verrannollisia keskenään qPCR:ssä, joten kaikki näytteet lisäpuhdistettiin. PEG -saostuksen jälkeen tehtiin yleisaluke-PCR uudelleen aiemmin monistumattomille 24 näytteelle. Todettiin olevan 10 hajanaista näytettä, joiden PEG -saostuksista tehtiin laimennokset 1:25 ja 1:100. Laimennokset valmistettiin steriileihin 200 µl PCR-putkiin ultrapuhtaasta vedestä ja laimennoksia säilytettiin – 20 °C:ssa kuten näytteitäkin. Koska laimennosten jälkeen saatiin tulokset kaikista näytteistä yleisalukkeilla, todettiin näytteiden sisältävän DNA:ta ja siirryttiin SRB-PCR:n.

3.4 Polymeraasiketjureaktio sulfaatinpelkistäjäbakteerialukkeilla

Myös SRB-PCR tehtiin Biotools-ohjeen mukaisesti ja samalla entsyymillä. Monistusreaktion sisältö on esitetty taulukossa 1. SRB-PCR tehtiin alkuperäisillä näytteillä. SRB-PCR tehtiin Finnzymerin Arktik thermocycler -laitteella ja 40-kierroksinen PCR-ohjelma on esitetty taulukossa 3. Käytetyt spesifit alukkeet olivat Dsr-R ja Dsr1F+, ja niiden koproima tuote oli kooltaan 221 bp. Käytettyjen alukkeiden sekvenssit ja tiedot on esitetty liitteessä 1. Alukkeet laimennettiin samalla kaavalla kuin yleisalukkeet, mutta laimennos tehtiin qPCR-pakkauksen mukana tulleeseen nukleaasivapaaseen veteen.

Taulukko 3. Sulfaatinpelkistäjäbakteerien PCR-ohjelma, jossa oli 30 kierrosta.

Ohjelmavaihe	Lämpötila (°C)	Aika (min)
Alkudenaturaatio	95	5
Denaturaatio	95	15 s
Sitoutuminen	59	30 s
Ekstensio	72	30 s
Loppuekstensio	72	10

PCR:ssä positiivisena kontrollina toimi toisesta tutkimuksesta saatu näyte, jonka tiedettiin sisältävän SRB -bakteereita. Positiivisella kontrollilla todettiin, että PCR toimi kuten pitikin. Positiivisen kontrollin lisäksi oli templaattivapaa näyte, jossa oli reaktioseosta 49 µl.

Jokaisen PCR:n jälkeen näytteet analysoitiin agarosigeelielektroforeesilla, jotta nähtiin oliko reaktio onnistunut. Myös SRB-PCR:ssä esiintyi inhibitiota ja yksikään näyte ei näkynyt suoraan. Ratkaisuna käytettiin laimennoksia 1:25 ja 1:100, koska niillä saatiin eniten tuotetta yleisaluke -PCR:ssä. Näytesyvyyksissä 25 ja 35 cm PCR-tuotteet näkyivät himmeinä agarosigeelielektroforeesissa, minkä vuoksi kierrosten määrää lisättiin viidellä ja templaattia laitettiin kaksinkertainen määrä.

3.5 Kvantitatiivinen PCR

PCR-tuotemääriä verrattiin standardeihin, minä käytettiin *dsrA* (klooni 5c51)-plasmidia. Soluja kasvatettiin yön yli 5 ml 1x LB-liemessä. Soluliuksesta siirrettiin 500 µl eppendorf -putkeen ja pipetoitiin 500 µl 30 % steriiliä glyserolia, jonka jälkeen seos säilöttiin -80 °C:een. Loppu liuksesta sentrifugoitiin 15 minuutin ajan 32,15 g:ssä Eppendorf Centrifuge 5417C:llä. Supernatantti kaadettiin pois ja puhdistettiin GeneJET Plasmid Miniprep -pakkauksella (Fermentas, K0503) valmistajan ohjeen mukaisesti.

Puhdistetun plasmidin pitoisuudeksi mitattiin 118 ng/µl käyttäen Qubit-fluorometriä (Qubit dsDNA HS Assay, Invitrogen, Q32854). Plasmidin moolimassa laskettiin käyttämällä hyödyksi tietoa, että nukleotidimäsparin molekyylipaino on 660 g/mol. Plasmidin kokonaispituus saatiin, kun Topo-plasmidin pituuteen 3931 bp lisättiin *dsrA* – inseritin pituus 221 bp. Plasmidin kokonaispituus oli 4152 bp, jolloin plasmidin moolimassa oli

$$4152 \text{ bp} \times 660 \frac{\left(\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right)}{\text{base}} = 2740320 \text{ g/mol}$$

Kun otettiin huomioon mitattu plasmidin pitoisuus, voitiin laskea konsentraatio (mol/l) seuraavasti:

$$\frac{118 \text{ ng}/\mu\text{l}}{2740320 \text{ g/mol}} = 4,30607 \times 10^{-5} \text{ nmol}/\mu\text{l}$$

Kun saatu konsentraatio kerrottiin Avagadron vakiolla ($6,02 \times 10^{+23}$), saatiin fragmenttien määrä. Laskussa on otettu huomioon koko plasmidin koko, mutta se ei haittaa tulosten laskua. Tämä johtuu siitä, että kaikki plasmidit sisältävät halutun geenin samoin kuin näytteistä monistuu totaali-DNA:sta haluttua tuotetta.

$$(6,02 \times 10^{+23} \text{ pcs/mol}) \times (4,30607 \times 10^{-5} \text{ nmol/}\mu\text{l}) = 25931742688 = 2,59 \times 10^{10}$$

Tästä tehtiin laimennokset 10^7 - 10^2 , joista saatiin kuuden pisteen standardisuora. Standardi valmistettiin tekemällä 1:10 laimennos vahvemmassa aina laimeampi, esimerkiksi 10^6 laimennos saatiin pipetoimalla 100 μl 10^7 laimennosta ja lisäämällä eppendorf -putkeen 900 μl 1:10 TE – puskuria (1 mM Tris-HCl ja 0,1 mM EDTA, pH 8). Standardisuoran korrelaatiokertoimen tuli olla yli 0,985 ja tehokkuuden yli 0,84, jotta standardisuoraa voidaan käyttää tulosten laskemiseen. Sisäisen standardin lisäksi jokaiseen analyysiin lisättiin templaattivapaa näyte.

qPCR suoritettiin Corbett Researchin Rotor-Gene 6000 -laitteella. qPCR-reaktion tilavuus oli 20 μl , ja yhden reaktion reagenssien pitoisuudet on esitetty taulukossa 4. qPCR:n reaktioseoksena käytettiin 2x Maxima SYRB Green qPCR Master Mixiä (Fermentas, K0251). Templaattina käytettiin PEG-lisäpuhdistettuja näytteitä.

Taulukko 4. Yhteen qPCR-reaktioon tarvittavat reagenssit ja pitoisuudet yhdessä reaktiossa, kun näytetilavuus on 20 μl . Reaktiossa käytettiin SRB -spesifejä alukkeita Dsr-R ja Dsr1F+.

Reagenssi	Lopullinen konsentraatio reaktiossa
Dsr-R -aluke	0,375 μM
Dsr1F+ -aluke	0,375 μM
Nukleaasivapaa H ₂ O	
2x green mastermix	1x

Pipetoidessa tulee reagenssien ja näytteiden olla jäillä. Lisäksi reaktioseos tulee suojata valolta esimerkiksi peittämällä se foliolla. Alukkeina käytettiin SRB -alukkeita Dsr-R ja Dsr1F+. Taulukossa 5 on esitetty qPCR-ohjelma, jossa kierroksia oli 40 ja sulamispisteanalyysi.

Taulukko 5. Sulfaatinpelkistäjäbakteerien qPCR-ohjelma, jossa kierroksia oli 40.

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika (s)
Alkudenaturaatio	95	600
Denaturaatio	95	15
Sitoutuminen	59	30
Ekstensio	72	30
Loppuekstensio	72	420

Jokaisesta näytteestä analysoitiin 2 identtistä rinnakkaisnäytettä, ja niiden pitoisuuksista laskettiin keskiarvo. Standardisuoralta saatu tulos (kopiota/μl) muutettiin kopiota/gramma -muotoon. Tämä saatiin siten, että saatu tulos kerrottiin alkuperäisellä näytetilavuudella, 100 μl. DNA-eristyksessä punnittu määrä näytettä kerrottiin kuivapainoprosentilla, jotta saatiin tulokset kuivapainoina, ei tuorepainoina. Sitten jaettiin saatu kopiomäärä näytteen punnitulla määrällä. Kaava on muotoa:

$$\frac{(x * 100 \mu\text{l})}{(g * \frac{k\%}{100})} = y,$$

jossa x on qPCR:n tulos kopiota/μl, g on punnittu paino grammoina ja y on saatu tulos kopiota/gramma. K % on kuivapainoprosentti. Kuivapainot oli määritetty aiemmin, ja tulosten laskentaan käytettiin valmiita prosentteja.

Näytteet jaettiin maaperän mukaan kahtia. Jokaisen 4 rinnakkaisnäytteen pitoisuudet laskettiin yhteen keskiarvoon ja esitettiin diagrammissa omana pylväänään. Jokaiselle tulokselle esitettiin keskihajonta, ja se piirrettiin kuvan pylväiden päälle.

Kaikki näytteet analysoitiin PEG -lisäpuhdistettuina, mutta silti esiintyi inhibitiota. Tämän takia tehtiin 12 huonosti monistuvasta näytteestä 1:10 laimennos qPCR-pakkauksen nukleaasivapaaseen veteen. Laimennos ja alkuperäinen näyte analysoitiin samaan aikaan. Laimennoksen Ct-arvosta vähennettiin 3,3, koska laimennoksen tuli

olla 3,3 kierrosta alkuperäistä näytettä suurempi. Laimennos otettiin huomioon tuloksissa kertomalla qPCR:n antamien rinnakkaisten tuloksien (kopiota/ μ l) keskiarvo 10.

Näytteet analysoitiin agarosigeelielektroforeesilla joka analyysin jälkeen. Agarosigeelielektroforeesissa pintanäytteistä puolet, 16 näytettä, muodosti epäspesifin tuotteen. Epäspesifi tuote oli oikeaa tuotetta suurempi, ja oikean kokoista tuotetta ei syntynyt ollenkaan. Epäspesifin tuotteen muodostuminen pyrittiin estämään optimoimalla qPCR. Ensiksi analysoitiin qPCR:llä vierekkäin alkuperäiset ja PEG-lisäpuhdistetut suon ML10 näytteet 1-5, 1-15, 1-25, 1-35 ja 2-5, joista 1-5 ja 2-5 muodostivat epäspesifin tuotteen. Kyseisen analyysin tarkoituksena oli katsoa onko näytteiden käsittelyllä eroja epäspesifien tuotteiden välillä. Eroja ei ollut muuten kuin, että alkuperäiset eivät kopioituneet niin hyvin kuin PEG -saostetut.

Tämän jälkeen tehtiin gradientti-PCR Bio-Radin laitteella, jossa blokin jokaisella rivillä oli eri lämpötila väliltä 57 - 65 °C: 65 °C; 64,5 °C; 63,5 °C; 62 °C; 60,2 °C; 58,9 °C; 58,8 °C ja 57 °C. Gradientti-PCR:ssä käytettiin muutamaa epäspesifiä näytettä (ML101-5 ja ML102-5) ja yhtä oikean kokoisen tuotteen antavaa näytettä (ML101-35). Viimeiseksi mainittu toimi positiivisena kontrollina, lisäksi analyysissä oli templaattivapaa näyte. Epäspesifin tuotteen hävitessä väheni haluttu tuote huomattavasti. 63,5 °C:ssa positiivisen näytteen määrä oli riittävä, joten päädyttiin kokeilemaan qPCR:ää kyseisellä sitoutumislämpötilalla. qPCR:ssä analysoitiin sekä standardit ja edellä mainitut näytteet ML101-5, ML102-5 ja ML101-35 sekä PEG-lisäpuhdistettuina ja alkuperäisinä. Standardeista laimeimmasta ei saatu tulosta ja suoran tehokkuus ei ollut riittävä, joten sitoutumislämpötilaa ei muutettu.

Koska sitoutumislämpötilaa ei kannattanut muuttaa, kokeiltiin ekstensioajan muutosta. Bio-Radin vierekkäisillä blokeilla analysoitiin ekstensioajat 20 s ja 30 s reaktion muuten pysyessä samana. Näytteinä olivat samaiset ML101-5, ML102-5 ja ML101-35 sekä templaattivapaa näyte. Ekstensioajan lyhentyessä tuotemäärä väheni, mutta epäspesifi tuote ei hävinnyt. Ekstensioaikaa ei kannattanut muuttaa.

qPCR-pakkauksen valmistaja suosittelee ohjeessa alukepitoisuudeksi 0,3 μ M. Alukelaimennoksia tehtiin 0,3 μ M, 0,27 μ M ja 0,15 μ M. Samaisilla testinäytteillä analysoitiin alukelaimennokset qPCR:ssä. Alukelaimennoksia varten tuli valmistaa eri reaktioseokset. Laimennostuloksia verrattiin normaalianalyysiin, jonka näytteet

analysoitiin laimennosten kanssa samalla geelillä. Alukekonsentraation muuttaminen ei parantanut tulosta, siten että epäspesifi tuote olisi hävinnyt.

Koska mikään edellä mainituista ei parantanut qPCR:ää, lopetettiin optimointi. Epäspesifin tuotteen määrittämiseksi päätettiin joka qPCR-analyysin näytteet analysoida agarosigeelielektroforeesilla. Epäspesifit tuotteet merkittiin tuloksiin nolliksi, ja ne otettiin huomioon laskettaessa rinnakkaisten keskiarvoja. Reagensseja ei pyritty optimoimaan, sillä ne todettiin toimiviksi templaattivapaan näytteen pysyessä fluoresoimattomana. Standardisuoran tehokkuus ja korrelaatiokerroin olivat loistavia, jolloin qPCR-reagenssit toimivat halutusti.

Inhibition vaikutus tuloksiin tarkastettiin valitsemalla sattumanvaraisesti joka suolta näyte kaikista syvyyksistä ja lisäämällä niihin sisäinen standardi. Käytännössä lisättiin reaktioseokseen 4 µl standardia $2,59 \cdot 10^8$ ja vettä vain 332 µl, jolloin reaktioseoksessa standardi laimeni $2,59 \cdot 10^7$:ksi. Tästä johtuen jokaiseen näytteeseen saatiin saman verran standardia $2,59 \cdot 10^7$. Analyysin jälkeen laskettiin inhibitiokaavalla:

$$\frac{1 - (Ct_{\text{näyte}} - Ct_{\text{stand.}})}{Ct_{\text{stand.}}} \times 100 \% = x$$

jossa $Ct_{\text{näyte}}$ on näytteen Ct-arvo, johon on lisätty sisäinen standardi ja $Ct_{\text{stand.}}$ on standardin Ct – arvo analyysissä. Arvon tulee olla positiivinen, jolloin se on hyväksyttävä. Negatiivinen luku merkitsi inhibition olevan merkittävän suuri haitatakseen näytteen monistumista. Inhibitioprosentti sai olla 1-2 %.

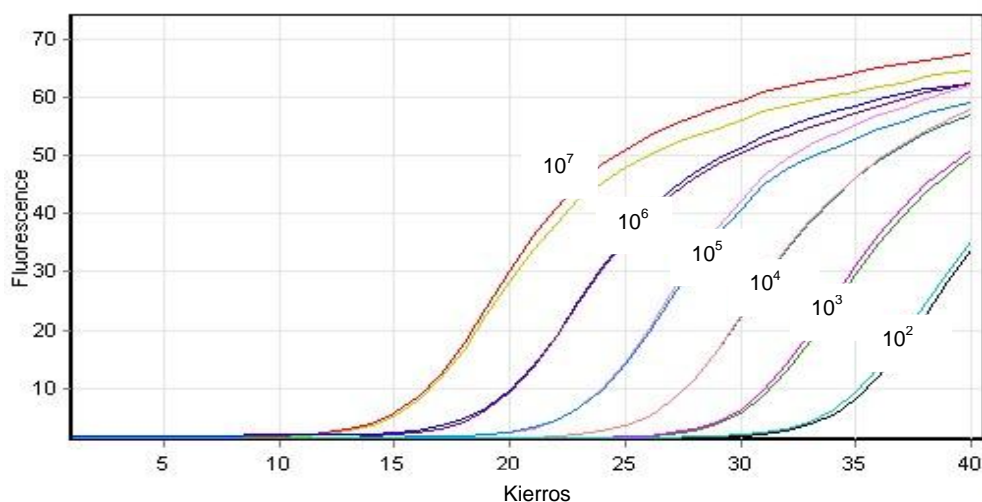
Jos näytteessä esiintyi inhibitiota, analysoitiin kaikki sen rinnakkaisnäytteet samasta syvyydestä uudelleen. Kyseisiä näytteitä oli yhteensä 4 kappaletta, ja niiden kaikki rinnakkaiset analysoitiin sisäisellä standardilla. Tämän jälkeen negatiivisen arvon antaneet näytteet laimennettiin 1:10 ja analysoitiin uudelleen. Jos laimennoksessa ei esiintynyt inhibitiota, käytettiin sitä määrittäessä näytteet pitoisuus. Laimennos huomioitiin tuloksissa kertomalla arvot 10.

4 Tulokset

Jokaisesta näytteestä saatiin tulos 16S rRNA -yleisalukkeilla, jolloin DNA:n eristys oli onnistunut. Eräistä näytteistä saatiin yleisaluketulos vasta laimennosten tai lisäpuhdistuksen jälkeen. SRB – alukkeilla saatiin parhaiten tuloksia ML-näytesarjoista ja KV22:sta, joilla oletettiin olevan sulfaatinpelkistäjäbakteereita. SRB-PCR:ssä tulosta ei saatu soista M10 ja KV13, kun KV14 suolta havaittiin heikkoja tuotteita. SRB-PCR:t tehtiin ennen PEG – lisäpuhdistusta, jolloin inhibitio vielä häiritsi merkittävästi kopioitumista.

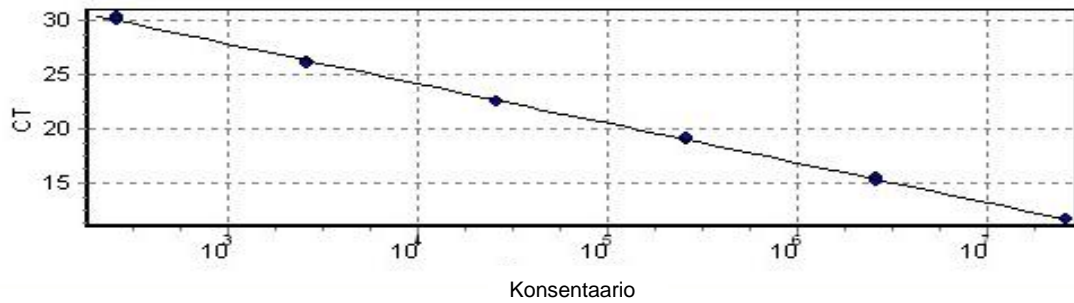
Inhibitiomittauksissa otettiin soilta joka syvyydestä satunnainen näyte. Jos näytteessä havaittiin inhibitiota, analysoitiin myös sen rinnakkaisnäytteet. Inhiboivat näytteet laimennettiin 1:10 ja analysoitiin uudelleen. Laimennoksissa ei havaittu inhibitiota, joten niillä määritettiin kyseisten näytteiden pitoisuudet. Eräistä näytteistä laimennoksen Ct-arvosta vähennettäessä alkuperäisen näytteen Ct-arvo oli erotus pienempi kuin 3,3, jolloin alkuperäisessä näytteessä esiintyi inhibitiota merkittävästi. Inhibition todettiin olevan suurimmillaan 3 % ja inhibitio on otettu huomioon tuloksissa niin hyvin kuin mahdollista.

Kuvassa 6 on esitetty qPCR:n standardien monistuskäyrät. Standardeina käytettiin laimennoksia *dsrA* (klooni 5c51) plasmidista, jonka pitoisuus oli $2,59 \cdot 10^{10}$. Standardeina olivat laimennokset 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 ja 10^2 laimennokset. Kuvassa standardien rinnakkaiset monistuvat päällekkäin ja niiden ero seuraavaan on noin 3,3 kierrosta. Ensimmäinen vasemmalta on 10^7 , ja oikeassa reunassa on viimeisenä monistunut 10^2 .



Kuva 6. Standardien qPCR-monistuskäyrät. Näiden suorien muodostamalta standardisuoralta on laskettu näytteiden pitoisuudet.

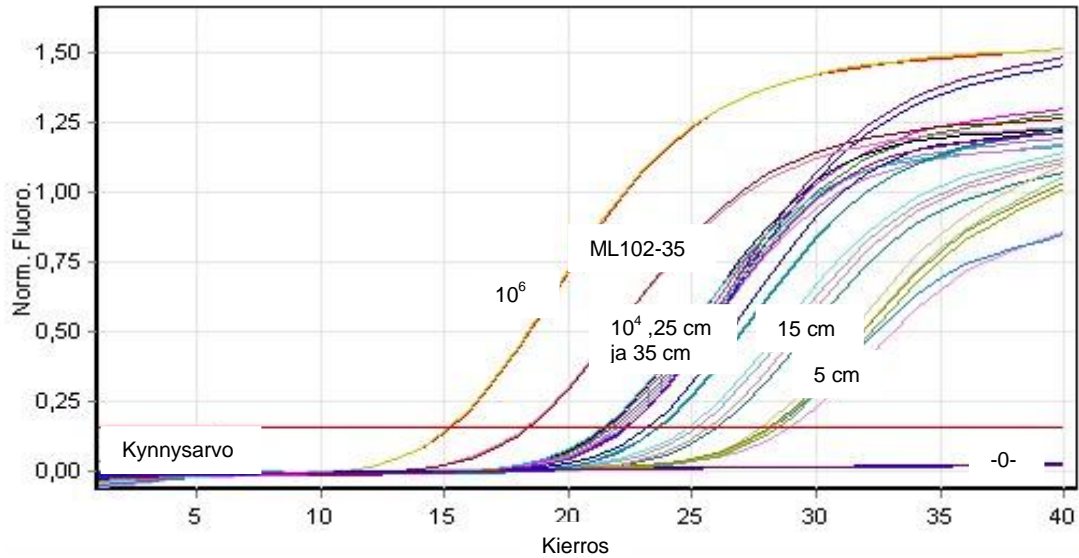
Tulosten laskemiseen käytetty standardisuora on esitetty kuvassa 7, johon käytettiin standardin laimennoksia 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 ja 10^2 . Joka näyteanalyysiin laitettiin standardi sisäiseksi standardiksi, jonka avulla näyteanalyysi liitettiin standardisuoraan. Standardisuoran yhtälö on muotoa $CT=3,658*\log(\text{conc})+38,869$. Reaktiotehokkuus (efficiency) on 0,880 ja korrelaatiokerroin on 0,999. Pienin hyväksyttävä arvo korrelaatiokertoimelle on 0,985 ja reaktiotehokkuudelle 0,840. [17, s. 46 – 48]



Kuva 7. Näytteiden monistumääriin käytetty standardisuora. Reaktiotehokkuus oli 0,880 ja korrelaatiokerroin 0,999.

Liitteen 2 taulukossa on näytteiden sekä saadut tulokset qPCR-analyysistä (kopio/ μ l) että lopullinen laskettu tulos. Lisäksi on esitetty analyysissä saadut Ct-arvot. Eräistä näytteistä ei muodostunut haluttua tuotetta, vaan isompi epäspesifi tuote. Kaikki epäspesifit tuotteet muodostuivat pintakerrosten näytteisiin ja ne on esitetty liitteenä 2 olevassa taulukossa x:llä. Epäspesifistä tuotteesta pyrittiin pääsemään eroon optimoimalla qPCR, mutta se onnistunut. Näin ollen jokaisen qPCR-analyysin jälkeen näytteet laitettiin agarosigeelielektroforeesiin.

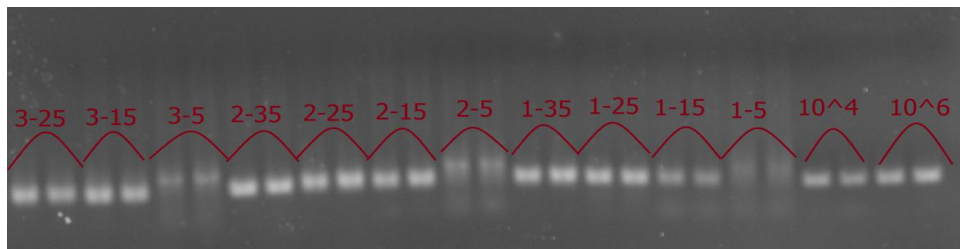
Tulokset käsiteltiin esimerkin kautta, joksi valittiin näytteet ML101-3, joiden pitoisuudet on esitetty liitteessä 2 ensimmäisenä. Esimerkinäytteidien monistumiskäyrät on esitetty kuvassa 8. X-akselilla on kierrokset ja y-akselilla on fluoresenssit. Kynnysarvo näkyy kuvassa punaisella. Analyysissä oli mukana 2 sisäistä standardia $2,59 * 10^4$ ja $2,59 * 10^6$, joilla analyysi liitettiin aiemmin ajettuun standardisuoraan.



Kuva 8. ML101-3 näytteiden qPCR:n tulokset. Kynnysarvon alapuolella jäävät templaattivapaat näytteet (-0-). Vasemmanpuoleisin a suora on suurin standardi pitoisuudeltaan $2,59 \times 10^6$. Seuraava suora on ML02-35, jota seuraa sisäinen standardi $2,59 \times 10^4$ ja loput 25 - 35 cm:n syvyydessä olleet näytteet. Seuraavaksi 3 päällekkäistä suoraa ovat 15 cm syvyyden näytteet ja viimeinen suoraryhmä on 5 cm:n syvyydessä olleet näytteet.

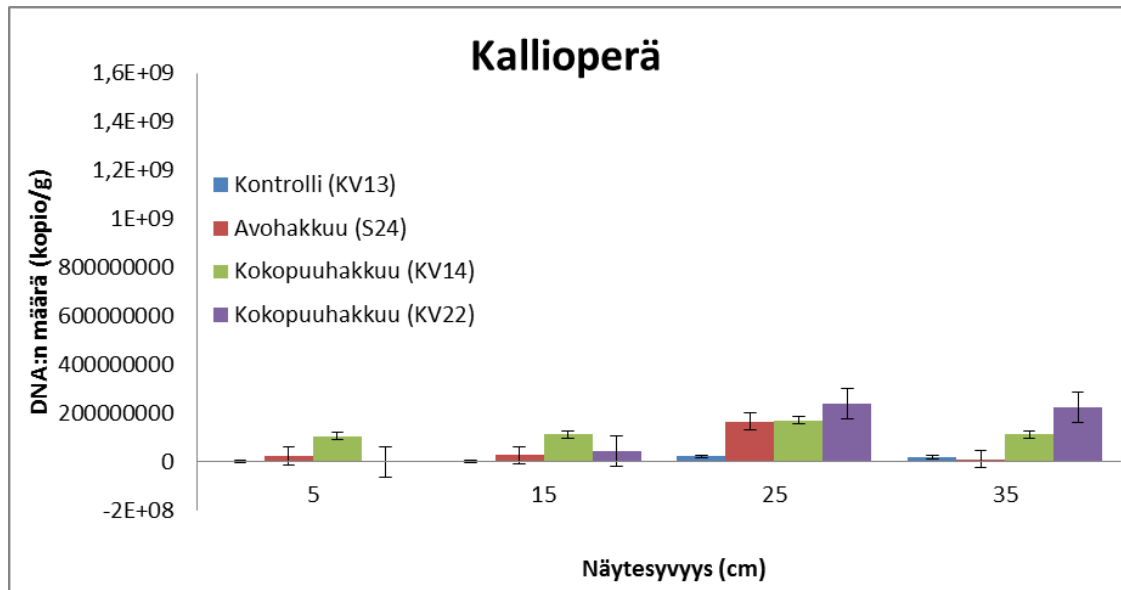
Kuvassa 8 kynnysarvon alapuolella jäävät templaattivapaat näytteet (-0-). Vasemmanpuoleisin a suora on suurin standardi pitoisuudeltaan $2,59 \times 10^6$. Seuraava suora on ML02-35, jota seuraa sisäinen standardi $2,59 \times 10^4$ ja loput 25 - 35 cm:n syvyydessä olleet näytteet. Seuraavaksi 3 päällekkäistä suoraa ovat 15 cm syvyyden näytteet ja viimeinen suoraryhmä on 5 cm:n syvyydessä olleet näytteet.

Kuvassa 9 on esitetty qPCR-analyysin jälkeen analysoitu agaroosigeelielektroforeesikuva. Parhaiten epäspesifin tuotteen erottaa näytteistä 2-5 ja 3-5. Mitä enemmän PCR-tuotetta on muodostunut, sitä vahvemmin tuote erottuu geeliltä. Geelin rakenne oli epätasainen, joten näytteet eivät muodosta suoraa linjaa.



Kuva 9. Agaroosigeelielektroforeesi qPCR-monistetuista ML10-näytteistä, jotka on merkitty punaisella tarkemmin. Oikealta katsottuna ensimmäisenä ovat sisäiset standardit 10^6 ja 10^4 . Epäspesifin tuotteen syntyessä ei synny varsinaista tuotetta laisinkaan.

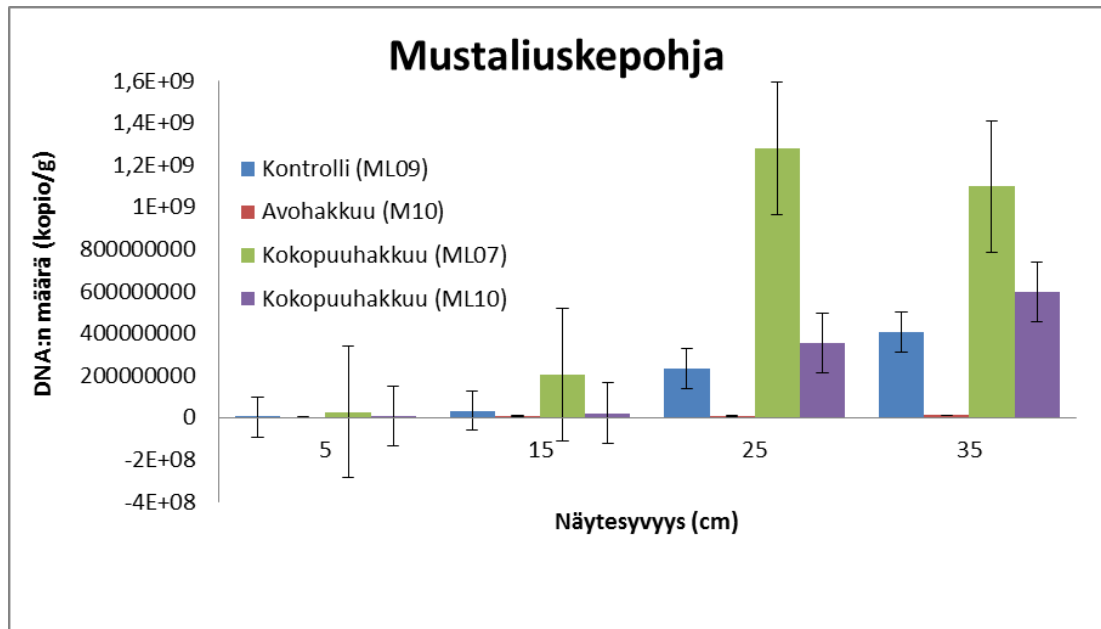
Liitteessä 3 on esitetty lopulliset tulokset 4 rinnakkaisen keskiarvoina. Epäspesifit tuotteet on huomioitu laskemalla ne nolliina keskiarvoon. Näistä keskiarvoista on tehty 2 erillistä kuvaa, jossa toisessa on kallioperäsuot ja toisessa mustaliuskesuot. Kuvassa 10 on esitetty kallioperäsuot seuraavassa järjestyksessä: kontrolli (KV13), avohakkuusuo (S24) ja kokopuuhakkuusuo (KV14 ja KV22). Kokohakkuusuo on esitetty erillään, koska KV22:n alle lienee siirtynyt mustaliusketta jääkauden aikana. Y-akselilla on rinnakkaisten keskiarvot ja x-akselilla testisyvyydet.



Kuva 10. Kallioperäsoiden SRB-pitoisuudet ja keskihajonnat. Suot ovat seuraavassa järjestyksessä kontrolli (KV13), avohakkuusuo (S24) ja kokopuuhakkuusuo (KV14 ja KV22). KV22:n alle lienee siirtynyt mustaliusketta jääkauden aikana, joten kokopuuhakkuusuo on esitetty erillään. Mustat viivat pylväiden päällä kuvaavat keskihajontaa.

Kallioperäsoilla suurimmat sulfaatinpelkistäjäpitoisuudet on syvemmissä näytesyvyyksissä, kun pintakerroksissa pitoisuudet ovat pieniä. Hakkuuden vaikutuksen pitoisuuteen huomaa, sillä kokopuuhakkuuden SRB-pitoisuudet ovat suurimmat. Kokopuuhakkuusuoista KV22:lla oli suuremmat pitoisuudet verrattuna KV14, koska sen alla on mahdollisesti mustaliusketta. Pienimmät pitoisuudet olivat kontrollissa, josta haettiin vain näytteet. Kontrolliin verrattuna avopuuhakkuusuoissa oli enemmän SRB:tä.

Kuvassa 11 on mustaliuskesuot seuraavassa järjestyksessä: kontrolli (ML09), avohakkuusuo (M10) kokopuuhakkuusuo (ML10 ja ML07). Kokopuuhakkuusoiden välillä on eroja maaperässä muun muassa elohopean määrän suhteen, joten pylväät pidetään erillään. Y-akselilla on rinnakkaisten keskiarvot ja x-akselilla testisyvydet.



Kuva 11. Mustaliuskesuot SRB-pitoisuudet ja keskihajonnat. Suot ovat seuraavassa järjestyksessä: kontrolli (ML09), avohakkuusuo (M10) kokopuuhakkuusuo (ML10 ja ML07). Kokopuuhakkuusoiden välillä on eroja maaperässä muun muassa elohopean määrän suhteen, joten pylväät on esitetty erillään.

SRB-pitoisuudet ovat olemattoman pieniä pintakerroksissa. Suurimmat pitoisuudet olivat syvemmissä näytesyvyyksissä. Kokopuuhakkuusuo ML07 suurin pitoisuus oli 25 cm:n syvyydessä, kun muilla mustaliuskesuilla suurimmat pitoisuudet olivat 35 cm:n syvyydessä. Kokopuuhakkuusuoilla oli suurimmat pitoisuudet.

Molemmat kuvat (10 ja 11) seuraavat samaa trendiä: Pintakerroksissa SRB-pitoisuudet olivat pieniä, mutta syvemmissä kerroksissa ne ovat suurempia. Mustaliuskepoijasuo pintakerroksissa on vähemmän SRB:tä kuin kallioperäsuilla, mutta KV22 on poikkeus. KV22:n lähellä on mustaliuske-esiintymä, josta epäillään jääkauden aikana siirtyneen mustaliusketta KV22:n alle. Molemmista kuvista huomasi hakkuuden vaikutuksen, sillä suurimmat pitoisuudet olivat kokopuuhakkuusuoilla. Kaikista näytesuoista suurimmat SRB-pitoisuudet olivat ML07 suolla. Mustaliuskeinen avohakkuusuo M10 on kaikista näytesuoista pienipitoisin.

5 Tulosten tulkinta

Taulukossa 6 on esitetty pohjaveden pinnankorkeudet, jotka kuvastavat hapellisen ja hapettoman kerroksen sijainnin. Pohjaveden pinnan alla on anaerobinen kerros ja yläpuolella aerobinen. Näiden kahden välillä on vaihettumisvyöhyke, jossa aerobiset ja anaerobiset olosuhteet vaihtelevat veden liikkeen myötä. Vedenpinta vaihtelee, joten tarkka määrittely on mahdotonta.

Vedenpinta on mitattu turpeen pinnasta alaspäin senttimetreinä (cm). Jokaisesta suosta veden pinta mitattiin 4 kaivosta, lukuun ottamatta näytesoitteita KV13 ja KV14. Mittaukset suoritettiin 30.8.2010 ja 21.9.2010, mutta ei näytteenottopäivänä. Ei siis ole tarkkaa tietoa, mikä pohjaveden pinnankorkeus oli näytteenottopäivänä. Taulukossa 6 on esitetty molempien mittauspäivien tulokset keskiarvona ja niille on esitetty vaihteluväli. Lisäksi taulukkoon on laitettu näytesyvyys, jossa oli suurimmat SRB-pitoisuudet.

Taulukko 6. Soiden pohjaveden korkeudet. Pohjaveden pinnankorkeus kuvastaa hapellisen ja hapettoman kerroksen sijaintia maaperässä.

Maaperä	Suo ja sen käsittely	Pohjaveden pinnankorkeus (cm)	Vaihteluväli (cm)	Suurin SRB-pitoisuus (cm)
Kallioperä	Kontrolli (KV13)	26,3	20-37	25
Kallioperä	Avohakkuu (S24)	28,4	24-32	25
Kallioperä	Kokopuuhakkuu (KV14)	30,2	15-40	25
Kallioperä	Kokopuuhakkuu (KV22)	19,6	10-26	25
Mustaliuske	Kontrolli (ML09)	23,1	14-40	35
Mustaliuske	Avohakkuu (M10)	21,4	13-29	35
Mustaliuske	Kokopuuhakkuu (ML07)	19,3	20-39	25
Mustaliuske	Kokopuuhakkuu (ML10)	28,0	14-40	35

Pohjaveden pinnankorkeuden ollessa ylempänä kuin suurin SRB-pitoisuus, ovat SRB:t anaerobisessa ympäristössä. Anaerobiset SRB:t on valtalajina mustaliuskesoilla ja potentiaalisesti mustaliuskesuolla KV22. Koska kaikissa mustaliuskesoissa pintakerrosten SRB-pitoisuudet olivat pieniä, syvemmissä kerroksissa voi olla ehdottomia anaerobisia sulfaatinpelkistäjäbakteereita. Mustaliuske on ravintorikas, jolloin ravintoa riittää alempiin näytesyvyyskerroksiin paremmin fakultatiivisille mikrobeille. SRB:t suosivat fakultatiivisia mikrobeja, koska fakultatiiviset mikrobit tuottavat metaboliensa lopputuotteena SRB:n käyttämiä elektroninluovuttajia. Kaikissa muissa mustaliuskesoissa paitsi ML07:ssä suurin SRB-pitoisuus on 35 cm:n kohdalla. Muiden mustaliuskesoiden SRB-pitoisuuden huippu ei välttämättä ole 35 cm:n kohdalla, joten

olisi viisasta seuraavalla näytteenottokerralla kerätä mustaliuskesoista näytteet vielä 45 cm:n kohdalta. Tällöin varmistettaisiin kaikkien mustaliuskesoiden SRB-pitoisuuksien huippujen sijainti.

Mustaliuskesoiden ML07:n ja ML10:n välillä on suuria eroja, joista merkittävin on ML07 suuret SRB-pitoisuudet. ML10:n suurin SRB-pitoisuus on syvemmällä kuin ML07. ML10:n suurin SRB-pitoisuus ei välttämättä ole 35 cm:n syvyydessä vaan vielä syvemmällä, joka selittäisi kokopuuhakkuusoiden väliset pitoisuserot. Lisäksi ML10:lla voi esiintyä SRB:tä inhiboivia tekijöitä kuten korkea metallipitoisuus.

Pohjaveden pinnankorkeuden ollessa alempana kuin suurin SRB-pitoisuus, ovat sulfaatinpelkistäjäbakteerit aerobisessa ympäristössä. Aerobisia ja happitolerantteja lajeja näyttäisi esiintyvän kallioperäsoilla KV13, S24 ja KV14. Pohjaveden pinnankorkeuden alhaisuuden voi selittää myös suuret vaihteluvälit, sillä ei ole tarkkaa tietoa pohjaveden korkeudesta juuri näytteidenottopäivänä. Happitoleranttien tai aerobisten SRB-lajien puolesta puhuu myös kallioperäsoiden suuremmat SRB-pitoisuudet pintakerroksissa verrattuna mustaliuskesoihin.

Kallioperän kontrollissa ja avohakkuusuon 35 cm:n näytesyvyudessa SRB-pitoisuus on olemattoman pieni, mikä voisi johtua vähäisestä anaerobisesta SRB-kannasta. Kallioperä on niukkaravintainen ympäristö, joten oletettavasti ympäristö suosii happitolerantteja SRB:tä. Happitolerantit SRB:t voivat nousta maaperässä lähemmäksi hapellisia oloja, jolloin ne ovat fakultatiivisten mikrobien lähettyvillä. Kallioperän kontrollissa oli pienimmät pitoisuudet, koska sen maaperä ei ole sekoittunut. Maaperän sekoituessa fakultatiivisia mikrobeja sekoittuu alempiin näytekerroksiin.

Kallioperän kokopuuhakkuusuot eroavat toisistaan. Potentiaalisesti mustaliuskesuo KV22:n SRB-pitoisuudet ovat korkeampia, mutta pintakerrosten pitoisuudet ovat pieniä. Mahdollisesti ravintorikkaalla suolla menestyy ehdoton anaerobinen SRB paremmin kuin happitolerantti, sillä ylemmissä maakerroksissa on kovempi kilpailu. KV14 suon SRB-pitoisuus on tasainen läpi syvyysgradientin, mikä lienee johtuvan maaperän sekoittumisesta. Maaperän sekoituessa fakultatiiviset mikrobit siirtyvät myös alempiin kerroksiin. KV14 suolla pinnassa SRB-pitoisuus on suurempi kuin 15 cm:n syvyydessä, mikä lienee johtuvan aerobisista SRB-lajeista pinnalla.

Pintakerroksien eräistä näytteistä muodostui epäspesifinen pidempi tuote kuin haluttu 221 bp tuote. Epäspesifin tuotteen syntyessä ei syntynyt oikean kokoista PCR-tuotetta. SYBR Green kiinnittyy mihin tahansa kaksijuosteiseen DNA:han, mikä selittäisi epäspesifin tuotteen qPCR:ssä. Jokaisessa näytteessä oli DNA:ta, mikä todettiin PCR:ssä 16 S rRNA -alukkeilla. SRB - alukkeet eivät olleet niin spesifejä kuin koettimet. Myös qPCR:n onnistunut optimointi olisi vähentänyt esiintynyttä epäspesifiyttä.

Inhibitiomittauksissa negatiiviset arvot vaihtelivat 0,5 - 3 % välillä. Näiden kaikki rinnakkaiset mitattiin uudelleen ja huomattiin, ettei rinnakkaisten inhibitioluvuissa ollut merkittävästi poikkeavuutta rinnakkaisten välillä. Inhibitiota esiintyi näytteissä ML102-35, ML07 pintanäytteissä ja M101-15 näytteessä, joista kaikki kuuluvat mustaliuskesoihin. Inhibitiio saattaa olla syvyysidonnainen, vaikka sitä esiintyi eri syvyyksissä. Pintakerroksien rinnakkaisista useammassa oli inhibitiota, kun 35 cm:n syvyudessa oli vain yksi inhibitionäyte.

Mustaliuskesoista kontrollissa ei esiintynyt inhibitiota, jolloin inhibitiio voi olla käsittelysidonnainen. Tätä tulkintaa tukisi myös se, että samassa syvyudessa avohakkuusuon (M10) inhibitiota mitattiin vain yhdestä neljästä rinnakkaisesta, kun kokopuuhakkuusuolta (ML07) sitä todettiin jokaisesta näytteestä samasta syvyydestä. Kallioperäsoilla ei tavattu inhibitiota. Mustaliuskesuolla saattaa olla enemmän häiriötekijöitä kuten erilaisia suoloja ja rikkiä. Inhibitionäytteet eivät olleet samoja kuin näytteet, joista tehtiin laimennokset. Tämä voi olla merkki siitä, ettei laimennosten tekeminen ollut välttämätöntä muista näytteistä kuin inhibitionäytteistä.

Inhibitiosta huolimatta tulokset saatiin ja ne koetaan luotettaviksi, sillä inhibitiio saatiin riittävän pieneksi. Vaikka inhibition todettiin haittaavan eräitä näytteitä, prosentuaalisesti kyseessä oli kaikista näytteistä noin 7,8 %. Lisäksi inhibitionäytteiden laimennoksista ei havaittu inhibitiota. Hyväksyttävä raja inhibitiolle oli 2 %, ja valtaosa oli alle 3 %. Tulosten luotettavuutta olisi voitu lisätä ajamalla kaikki 128 näytettä 1:10 laimennoksina.

6 Yhteenveto

Metsäntutkimuslaitoksessa tutkitaan eri hakkuiden vaikutusta sekä elohopean että metyylielohopean liikkuvuuteen ja pitoisuuksiin maaperässä. Sulfaatinpelkistäjäbakteerien epäillään osallistuvan metyylielohopean muodostumiseen, ja opinnäytetyön tuloksia käytetään tämän tutkimiseen. Opinnäytetyössä keskityttiin tutkimaan onko maaperällä, suon käsittelytavalla ja näytesyvyydellä merkitystä soiden SRB-pitoisuuksiin. Tutkimuksessa oli 2 eri maaperällä olevaa suota toiset kallion päällä ja toiset mustaliuskepohjalla. Molemmilla suotyypeillä suoritettiin sekä koko- että avohakkuuta, ja näitä käsittelytapoja verrattiin keskenään maaperä huomioiden.

Opinnäytetyö oli onnistunut, koska tavoite saavutettiin. Kaikilla tutkituilla muuttujilla oli vaikutusta SRB-pitoisuuksiin. Näytesyvyys vaikutti siten, että valtaosassa soista pinnasta 25 cm:n syvyyteen asti SRB-pitoisuus kasvoi. Kallioperällä esiintyi niukemmin sulfaatinpelkistäjäbakteereita kuin ravintorikkaalla mustaliuskepohjalla. Molemmissa maaperissä kokopuuhakkuusoilla SRB-pitoisuudet olivat suuremmat kuin kontrolleissa tai avohakkuusoissa. Avohakkuiden ja kontrollien välillä ei ollut suurta eroa.

Jatkotutkimuksissa olisi hyvä pyrkiä selvittämään, mitä sulfaatinpelkistäjäbakteereita esiintyy soissa. qPCR:ssä saatiin samankokoisia PCR-tuotteita, joten denaturoiva gradienttigelielektroforeesi (DGGE) olisi mahdollinen tapa erotella eri lajit. DGGE on menetelmä mikrobiyhteisöjen tunnistamiseen, jossa samanpituiset DNA:t erotellaan gradienttigelillä sekvenssinsä mukaisesti. Jokainen sekvenssi eroaa omaksi bändiksi niiden eroavan sulamisprofiilin takia. DGGE:n hyvä puoli on sen kyky erotella lajit nukleotidin erolla erillisiksi bändeiksi geelille, kun sen gradientti on optimoitu. DGGE:n jälkeen bändit voi leikata irti ja puhdistetut näytteet lähettää sekvensoitaviksi. [4, s. 663 - 664.]

Terminaali restriktiofragmentti pituus polymorfismi (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism; T-RFLP) -analyysiä käytetään tutkittaessa mikrobiyhteisön yhtenäisyyksiä ja eroavaisuuksia, esimerkiksi sulfaatinpelkistäjäbakteerien kohdalla *dsrA*-geenin. T-RFLP-analyysiä voidaan käyttää selvittäessä mikrobiyhteisön rakennetta ja sen dynamiikkaa ympäristömuutosten aikana, sekä tutkia bakteeripopulaatioita niiden luonnollisessa ympäristössä. Tulokseksi saatu piikkisarja kuvastaa mikrobiston vaihtelevuutta. T-RF:t eivät aina ole laji- tai sukuspesifejä. [19.]

Hieman erikoisempi tapa havainnoida eri sukuja tai lajeja on vaihtaa qPCR:n alukkeet spesifimpiin alukkeisiin. [6 s.42-57] Työmäärän vähentämiseksi voisi olla järkevämpää valita muutama suku esimerkiksi metabolian tai elohopean käytön perusteella. qPCR:n rakentaminen voisi olla halvempaa kuin T-RFLP:n tai DGGE:n tekeminen, muttei sen nopeampi optimoinnin takia. Kun sulfaatinpelkistäjäbakteerit on tunnistettu joko suku- tai lajikohtaisesti, tulee tutustua niiden ominaisuuksiin. Tutkimisen arvoinen olisi SRB:n elohopean käyttö metaboliassa. SRB:tä on tutkittu vuosikymmenien ajan, joten tutkimustuloksia löytyy.

Jos SRB ei selitä metyylielohopeapitoisuuksia, niin voidaan tutkia raudanpelkistäjäbakteereita (FRB). Myös FRB:t pystyvät luomaan otolliset olot metyylielohopean muodostumiseen. FRB-pitoisuudet voidaan periaatteessa määrittää samalla tavalla kuin SRB-pitoisuudet samoista näytteistä vaihtamalla vain alukkeet ja optimoimalla uusi qPCR. Teoriassa alukkeiden tulisi olla samalla lailla spesifejä kuin sulfaatinpelkistäjäbakteerien *dsrA* -alukkeet. Käytännössä FRB:tä ei ole tutkittu niin paljon kuin SRB:tä. Otollisissa olosuhteissa raudanpelkistäjäbakteerit voivat olla valtalajina.

Lähteet

1. C.Spence, T.R.Whitehead ja M.A.Cotta. 2008. Decelopment and comparison of STBR Green quantitative real - time PCR assays for detection and enumeration of sulfate-reducing bacteria in stored swine manure. Journal of Applied microbiology.
2. Greengenes. 2011. 16S rRNA gene. Verkkodokumentti. <http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/JD_Tutorial/nph-16S.cgi>. Luettu 2.6.2012.
3. Alexander Loy, Michael Pester, Bela Hausmann ja Martina Putz. Diversity, eco-physiology, and evolution of sulfate-reducing microbes. Department of Microbial Ecology, University of Vienna. Verkkodokumentti. <<http://www.microbial-ecology.net/srp.asp>>. Luettu 3.6.2012.
4. Michael T.Madigan, John M.Martinko, Paul V.Dunlap ja David P.Clark. 2009, 12.painos. Brock Biology of Microorganism. San Francisco: Pearson International Edition.
5. Elina Vestola & Ulla-Maija Mroueh. 2008. Sulfaatinpelkistyksen hyödyntäminen happamien kaivosvesien käsittelyssä. VTT tiedotteet 2422. Verkkodokumentti. <<http://www.vtt.fi/inf/pdf/tiedotteet/2008/T2422.pdf>>. Luettu 10.6.2012>.
6. Larry L.Barton ja W.Allan Hamilton. 2009. Sulphate-reducing Bacteria, Environmental and Engineered Systems. New York: Cambridge University Press.
7. Jan Dirk Van Elsas, Janet K. Jansson ja Jack T.Trevors. 2007. Modern Soil Microbiology second edition. Boca Raton: CRC Press LLC.
8. P D Sharma. 2005. Environmental Microbiology. Harrow, U.K: Alpha Science International Ltd.
9. Raina M.Maier, Ian L.Pepper ja Charles P.Gerba. 2009. Environmental Microbiology, second edition. USA: Academic Press, Elsevier.

10. Gerard Muyzer & Alfons J. M. Stams. 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. Artikkel. <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v6/n6/fig_tab/nrmicro1892_F1.html>. Luettu 12.6.2012.
11. Metsäntutkimuslaitos. 6.8.2010. Raskasmetallikartoitus. Verkkodokumentti. <<http://www.metla.fi/metinfo/metsienterveys/raskasmetalli/kartta-elohopea.htm>>. Luettu 14.7.2012.
12. I. Tjerngren, T. Karlsson, E. Björn ja U. Skyllberg. 30.4.2011. Potential Hg methylation and MeHg demethylation rates related to the nutrient status of different boreal wetlands. *Biogeochemistry*, Springer Science+Business Media.
13. Ri-Qing Yu, J. R. Flanders, E. Erin Mack, Ralph Turner, M. Bilal Mirza ja Tamar Barkay. 2011. Contribution of coexisting sulfate and iron reducing bacteria to methylmercury production in freshwater river sediments. *Environmental Science & Technology*, ACS Publications.
14. Andrew M. Graham, George R. Aiken ja Cynthia C. Gilmour. 2012. Dissolved organic matter enhances microbial mercury methylation under sulfidic conditions. *Environmental Science & Technology*, ACS Publications
15. Sigma. 2004. qPCR Technical Guide.
16. Primerdesign Ltd. Beginners guide to Real-Time PCR.
17. Eurogentec. 2009. qPCR guide.
18. 2006. Real-Time PCR Applications Guide. Bio-Rad Laboratories, Inc
19. Applied Biosystems. 2006. Terminal Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) Analysis on Applied Biosystems Capillary Electrophoresis Systems.

Alukkeiden toedot ja sekvenssit

Taulukossa on esitetty alukkeiden sekvenssit ja tuotetiedot. Yleisalukkeen R1378 lähde on Heuer et al. (1997). SRB-alukkeiden lähde on Kondo et al. (2004).

Aluke	Nimi	Kopioitava geeni	Tuotteen koko (bp)	Sekvenssi	Päivämäärä	Tuotetiedot
Yleis	533f	16S rRNA	394	5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3'	15.3.2011	Eurofins MWG Operon 12889244 B10
Yleis	R1378	16S rRNA	394	5'-CCC CCC CCC CCC CGC CCC CCG CCC CCC GCC CCC GCC GCC CGT GCC - 3'	18.9.2009	Eurofins MWG Operon 10962081 F5
SRB	Dsr-R	<i>dsrA</i>	221	5'-GTG GMR CCG TGC AKR TTG G- 3'	21.4.2011	Eurofins MWG Operon 13045548 F4
SRB	DsrIF+	<i>dsrA</i>	221	5'-ACS CAC TGG CAC GGC GG-3'	21.4.2011	Eurofins MWG Operon 13045547 H6

Näytekohtaiset sulfaatinpelkistäjäbakteeripitoisuudet

Näytesarja	Näytenumero	Ct (ka)	Kopioiden määrä (kpl/μl)	Tulos, kuivapaino (kopio/g)
ML10	1-5	28,54	501,8893	x
	1-15	25,83	6743,299	13730255,11
	1-25	21,68	36863,8901	110922552,3
	1-35	21,185	55258,2301	125841429,5
	2-5	27,99	701,6113	x
	2-15	25,345	17117,2295	33200463,76
	2-25	22,005	29229,8159	70480844,67
	2-35	18,29	830949,111	1920106458
	3-5	28,23	599,8647	x
	3-15	23,62	10854,66635	24910307,17
	3-25	22,855	19308,72695	34742423,01
	3-35	19,905	123903,2682	284372258,9
	4-5	26,605	19091,806	33898321,76
	4-15	24,49	6874,5539	15783978,28
	4-25	18,01	412040,9822	1208193146
	4-35	22,455	27314,823	68347716,1
ML09	1-5	28,085	867,8557	3069404,479
	1-15	24,34	8576,0004	37786062,87
	1-25	21,31	54605,30725	122462255,1
	1-35	17,96	422150,528	1036588160
	2-5	28,36	735,33415	2931019,412
	2-15	22,58	25207,61805	68961453,58
	2-25	19,84	117361,576	237973875
	2-35	19,71	127447,8793	253790248,2
	3-5	28,435	526,13935	x
	3-15	23,955	8819,5545	25978298,78
	3-25	25,29	10764,4904	22905120,44
	3-35	25,54	9180,3285	18838398,79
	4-5	29,135	957,3863	x
	4-15	27,94	1432,8233	3042998,647
	4-25	18,55	290258,9608	551037419,6
	4-35	20,915	168265,3033	314368272,1
ML07	1-5	29,95	573,34525	x
	1-15	21,99	191138,668	592972228,1
	1-25	16,925	809127,3264	2157977865
	1-35	18,705	264791,4205	818335956,6
	2-5	27,965	9933,227	24979447,06
	2-15	23,585	41371,4695	105171363,2
	2-25	19,345	310974,6265	900749120,8
	2-35	19,46	289837,3297	880044360
3-5	24,18	14812,7227	56792894,33	

Näytesarja	Näytenumero	Ct (ka)	Kopioiden määrä (kpl/ul)	Tulos, kuivapaino (kopio/g)
	3-25	18,275	611040,0985	1506531405
	3-35	17,545	954168,3232	2313056825
	4-5	26,54	7412,2565	29311475,05
	4-15	26,85	6438,151	20618578,06
	4-25	20,355	203960,962	556139874,1
	4-35	20,83	120526,103	379923284,6
S24	1-5	27,96	1404,74675	3790005,936
	1-15	23,635	21297,88345	52537553,16
	1-25	22,665	37971,60795	102419191,4
	1-35	26,435	3536,8833	10938588,79
	2-5	27,455	1780,6894	x
	2-15	24,075	10469,3254	27524780,21
	2-25	25,53	5287,275	16077586,21
	2-35	27,025	1726,136	5238652,504
	3-5	28,265	1068,1202	x
	3-15	25,13	7667,09845	23492044,15
	3-25	21,255	88123,8046	255089719,3
	3-35	26,25	3331,0925	8611145,579
	4-5	22,34	39512,97725	94229284,12
	4-15	28,34	714,43315	1750032,211
	4-25	20,87	112506,8594	291819335,7
	4-35	24,925	6101,88085	18532667,73
KV13	1-5	33,99	29,3164	x
	1-15	31,25	114,21325	x
	1-25	25,415	6440,08115	24664056,61
	1-35	25,765	5535,98135	21537431,33
	2-5	30,455	407,8119	810759,2445
	2-15	30,695	350,42065	1348746,979
	2-25	24,995	8793,07925	35573443,14
	2-35	25,85	7390,5519	28507432,59
	3-5	34	44,8916	x
	3-15	30,215	473,8531	1739038,095
	3-25	26,295	5618,0244	27955794,41
	3-35	27,535	2556,8312	10913663,25
	4-5	34,37	35,9416	x
	4-15	28,885	948,157	3057129,847
	4-25	26,645	4491,78725	1815127,554
	4-35	26,465	3733,1365	12741297,63
M10	1-5	29,07	980,7101	x
	1-15	27,86	5700,512	20745429,14
	1-25	24,58	9653,5543	21682612,23
	1-35	25,755	5794,5915	11867232,25
	2-5	28,1	1103,88685	x
	2-15	27,5	1606,63145	7227149,412

Näytesarja	Näytenumero	Ct (ka)	Kopioiden määrä (kpl/ul)	Tulos, kuivapaino (kopio/g)
	2-25	1321,07	3750,90615	7611787,404
	2-25	1321,07	3750,90615	7611787,404
	2-35	25,545	5274,11655	10828029,38
	3-5	26,6	2833,36845	x
	3-15	29,98	336,9489	x
	3-25	27,615	1491,76585	3983055,606
	3-35	26,04	4010,10915	13037020,07
	4-5	29,39	487,4648	x
	4-15	28,71	749,0206	x
	4-25	27,6	1135,9757	3655734,735
	4-35	26,585	2848,64435	8659546,297
KV14	1-5	29,055	602,2174	x
	1-15	26,715	4384,8761	23295061,94
	1-25	25,245	11033,37835	64060024,68
	1-35	25,095	6998,82325	18880427,01
	2-5	31,055	284,9506	762438,1917
	2-15	26,085	3438,30295	16374274,7
	2-25	23,99	12831,8923	56229425,61
	2-35	24,855	8140,36645	19069895,87
	3-5	24,39	9961,09595	45577484,41
	3-15	22,17	44099,566	162232152,4
	3-25	20,69	140237,474	417023432,7
	3-35	20,87	100104,0102	307184358,9
	4-5	20,355	126347,5324	373614722,5
	4-15	21,865	53496,0724	247398986,3
	4-25	23,235	22613,7612	145811509,5
	4-35	22,555	31740,0597	104643539,1
KV22	1-5	29,765	338,7103	x
	1-15	23,39	37071,9285	105478893,9
	1-25	23,215	27963,1786	91112279,54
	1-35	22,13	45592,4872	179921576
	2-5	29,555	517,44115	x
	2-15	29,74	479,5089	x
	2-25	21,58	78248,57195	233476073
	2-35	23,71	20983,3905	78488353,96
	3-5	29,555	519,25815	x
	3-15	24,885	9733,42425	26680658,12
	3-25	20,765	130679,9671	349712766,3
	3-35	20,975	114700,1634	374525031,1
	4-5	29,165	659,45765	x
	4-15	24,57	11903,03095	38370633,47
	4-25	21,21	98648,7944	285556137,6
	4-35	21,74	71186,4969	259501665,6

Suokohtaiset pitoisuudet

Näytesarja	Syvyys (cm)	Keskiarvo (kopio/g)
ML10	5	8474580,4
	15	21906251,1
	25	3560251,1
	35	599666965,6
ML09	5	1500106,0
	15	33942203,5
	25	233594667,5
	35	405896269,7
ML07	5	27770954,1
	15	204688962,9
	25	1280349566,0
	35	1097840107,0
S24	5	24504822,5
	15	26326102,4
	25	166351458,1
	35	10830263,7
KV13	5	202689,8
	15	1536228,7
	25	22502105,4
	35	18424956,2
M10	5	0
	15	6993144,6
	25	9233297,5
	35	11097957,0
KV14	5	104988661,3
	15	112325118,8
	25	170781098,1
	35	112444555,2
KV22	5	0
	15	42632546,4
	25	239964314,1
	35	223109156,7