



Osaamista
ja oivallusta
tulevaisuuden
tekemiseen

Saila Orasmaa

Acidithiobacillus-, *Leptospirillum-* ja *Sulfobacillus*-bakteerisuvuille spesifiseksi suunniteltujen alukkeiden testaaminen qPCR-menetelmällä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

26.2.2019

Tekijä	Saila Orasmaa
Otsikko	<i>Acidithiobacillus</i> -, <i>Leptospirillum</i> - ja <i>Sulfobacillus</i> -bakteerisuvuille spesifiseksi suunniteltujen alukkeiden testaaminen qPCR-menetelmällä
Sivumäärä Aika	27 sivua 26.2.2019
Tutkinto	laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	laboratorioala
Ohjaajat	vanhempi tutkija Malin Bomberg, Teknologian Tutkimuskeskus VTT Oy lehtori Jarmo Palm, Metropolia Ammattikorkeakoulu
<p>Metallien talteenotossa kaivoksilla hyödynnetään usein bioliuotusta, jossa mikrobit helpottavat metallien erottamista kiviaineksesta. Bioliuotusmikrobit elävät usein ilman orgaanisia hiilenlähteitä ja saavat energiansa hapettamalla rautaa ja/tai rikkiyhdisteitä. Yleisiä kaivosympäristössä esiintyviä ja bioliuotuksessa hyödynnettäviä raudanhapettajabakteerisukuja ovat <i>Acidithiobacillus</i>-, <i>Leptospirillum</i>- ja <i>Sulfobacillus</i>-suvut. Edellä mainittujen raudanhapettajasukujen määrittämistä kaivosnäytteistä helpottaisi, mikäli käytettävissä olisi bakteerisuvuille spesifisiin alukepareihin perustuva qPCR-menetelmä.</p> <p>Tämä opinnäyte tehtiin osana tieteellistä tutkimusprojektia Teknologian Tutkimuskeskus VTT Oy:ssä. Opinnäytteen tavoitteena oli qPCR-tekniikkaa käyttäen testata kolmen <i>Acidithiobacillus</i>-, <i>Leptospirillum</i>- tai <i>Sulfobacillus</i>-suvulle spesifiseksi suunnitellun alukeparin toimivuutta, käyttäen templaattina bakteeripuhdasviljelmiä sekä kaivosnäytteistä tehtyjä mikrobirikastusviljelmiä. Alukeparien toimivuutta testattiin qPCR-menetelmällä tehtyjen kvantitointien sekä sulamiskäyräanalyyysien avulla.</p> <p><i>Acidithiobacillus</i>-suvulle suunniteltu alukepari ei toiminut riittävän luotettavasti, mutta <i>Leptospirillum</i>- ja <i>Sulfobacillus</i>-suvuille suunnitellut alukeparit osoittautuivat käyttökelpoisiksi kyseisten bakteerisukujen määrittämiseen kaivosnäytteistä.</p> <p>Oppimisen kannalta tämän työn oleellisin tavoite oli perehtyä qPCR-tekniikan perusteisiin, laitteiston käyttöön ja tulosten käsittelytapoihin, jotta menetelmän käyttö olisi mielekkäämpää myös tulevissa työtehtävissä. Oppimistavoite täyttyi hyvin, sillä qPCR-laitteiston käyttö tuli tutuksi, ja työn aikana opitut tulostenkäsittelytaidot helpottavat tulevaisuudessa qPCR-määritysten arviointia itsenäisesti.</p>	
Avainsanat	<i>Acidithiobacillus</i> , <i>Leptospirillum</i> , <i>Sulfobacillus</i> , aluke, qPCR, kvantitatiivinen PCR

Author	Saila Orasmaa
Title	qPCR Performance Testing for the Newly Designed Primers Specific for the Bacterial Genera <i>Acidithiobacillus</i> , <i>Leptospirillum</i> and <i>Sulfobacillus</i>
Number of Pages	27 pages
Date	26th February 2019
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Malin Bomberg, Senior Scientist, VTT Technical Research Centre of Finland Ltd Jarmo Palm, Senior Lecturer, Metropolia University of Applied Sciences
<p>In mining, metal recovery from the ore is often facilitated by bioleaching with microorganisms. Bioleaching microbes usually live without organic carbon sources, and get their energy by oxidizing iron and/or sulphur compounds. Bacteria belonging to the genera <i>Acidithiobacillus</i>, <i>Leptospirillum</i> and <i>Sulfobacillus</i> are common inhabitants and bioleaching microorganisms in mines. A quantitative PCR (qPCR) method with genus specific primers would be of great value in detecting specific iron-oxidizing bacteria in mine samples.</p> <p>This study was part of a scientific research project at VTT Technical Research Centre of Finland Ltd. The aim of the study was to test the performance and specificity of newly developed primer pairs specific to the genera <i>Acidithiobacillus</i>, <i>Leptospirillum</i> and <i>Sulfobacillus</i>, respectively, using DNA from bacterial pure cultures or enrichment cultures from mine samples as templates. The qPCR features Absolute Quantification and Melting Curve Analysis were used to test the performance of the primer pairs.</p> <p>The primer pair designed to target the genus <i>Acidithiobacillus</i> did not prove to be specific enough for future use. The primer pairs targeting the genera <i>Leptospirillum</i> and <i>Sulfobacillus</i>, respectively, worked well to separate their specific genera from the reference microbes.</p> <p>The learning objectives of the thesis were to become familiar with the qPCR basics, and the device functions, as well as to learn how to analyse the results. The learning objectives were well achieved, and now it's easier to use the qPCR device and analyse the results independently in future work tasks.</p>	
Keywords	<i>Acidithiobacillus</i> , <i>Leptospirillum</i> , <i>Sulfobacillus</i> , primer, qPCR, quantitative PCR

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Kvantitatiivinen PCR (qPCR)	2
2.1	qPCR-tekniikan perusteet	2
2.2	qPCR-ajon vaiheet	3
2.3	Sulamiskäyräanalyysi	3
2.4	Absoluuttinen kvantitointi	4
3	Mikrobien käyttö arvokkaiden metallien talteenotossa	6
4	Työssä käytetyt laitteet ja reagenssit	7
4.1	Alukkeet	7
4.2	Aluketestauksessa käytetyt puhtasviljelmä-DNA:t	8
4.3	Aluketestauksen qPCR-ajot	9
4.4	Kaivosnäytteet	10
4.5	DNA:n eristäminen A-kaivoksen mikrobirikastusnäytteistä	10
4.6	Kaivosnäytteiden qPCR-määritykset	11
5	Tulokset ja niiden tarkastelu	12
5.1	Alukkeiden testaus	12
5.2	qPCR-määritykset A-kaivoksen mikrobirikastusnäytteistä	16
5.3	qPCR-määritykset B-kaivoksen mikrobirikastusnäytteistä	19
6	Päätelmät	25
	Lähteet	27

1 Johdanto

Metallien talteenotossa kaivoksilla hyödynnetään usein rautaa ja/tai rikkiyhdisteitä hapettavia mikrobeja, jotka helpottavat metallien erottamista kiviaineksesta. Tässä työssä keskityttiin *Acidithiobacillus*-, *Leptospirillum*- ja *Sulfobacillus*-raudanhapettajabakteerisukuihin, joita esiintyy yleisesti kaivosympäristöissä. Tämän opinnäytteen tutkimuksellisenä tavoitteena oli qPCR-tekniikkaa käyttäen testata kolmen edellä mainituille bakteerisuvulle spesifiseksi suunnitellun alukeparin toimivuutta. Alukkeiden spesifisyyttä ja luotettavuutta oli tarkoitus testata ensin bakteeripuhdasviljelmillä ja myöhemmin kaivosnäytteistä tehdyillä mikrobirikastusviljelmillä. Oppimisen kannalta työn oleellisin tavoite oli perehtyä qPCR-tekniikan perusteisiin, laitteiston käyttöön ja tulosten käsittelytapoihin, jotta menetelmän käyttö olisi mielekkäämpää myös tulevaisuudessa. Opinnäyte tehtiin osana tieteellistä tutkimusprojektia Teknologian Tutkimuskeskus VTT Oy:ssä.

2 Kvantitatiivinen PCR (qPCR)

2.1 qPCR-tekniikan perusteet

Kvantitatiiviseen polymeerasiketjureaktioon (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) perustuvat tekniikat mahdollistavat yhden tai useamman valitun nukleinihapposekvenssin osoittamisen sekä pitoisuuden määrittämisen erilaisista näytteistä nopeasti ja suurella herkkyydellä. qPCR-tekniikkaa voidaan käyttää esimerkiksi indikaattorimikrobien osoittamiseen ympäristönäytteistä, ruokamyrkytysmikrobien osoittamiseen elintarvikkeista, taudinaiheuttajien määrittämiseen potilasnäytteistä tai käänteistranskriptioon yhdistettynä myös geeniekspression havainnointiin erilaisista näytteistä. qPCR-analyysin tulokset valmistuvat yleensä jo muutamassa tunnissa. qPCR-tekniikan etu tavanomaiseen PCR-tekniikkaan verrattuna on se, ettei tuotteita tarvitse jälkikäteen tarkistaa agarosigeelielektroforeesilla, vaan niiden kehittymistä voidaan havainnoida reaaliaikaisesti ajon edetessä. Tavanomaisesta PCR-tekniikasta poiketen qPCR-tekniikalla voidaan standardilaimennossarjaa käyttämällä arvioida geenikopioiden määrät alkuperäisessä näytteessä. Perinteisistä viljelymenetelmistä poiketen PCR-tekniikoilla pystytään havaitsemaan myös kuolleita mikrobeja sekä sellaisia lajeja, joita ei viljelemällä saada kasvatettua.

qPCR-tekniikassa yhdistyvät DNA:n monistaminen polymeerasiketjureaktiolla sekä monistuneen tuotteen reaaliaikainen kvantitatiivinen seuranta reaktiossa käytettävien fluoresoivien väriaineiden avulla. Kuten tavanomaisessakin PCR:ssä, kaksijuosteiselle kohdesekvenssille suunnitellaan ensin alukepari eli kaksi lyhyttä DNA-jaksoa, jotka sitoutuvat kukin omaan puoliskoonsa spesifisesti emäsjärjestyksensä perusteella. Tämän jälkeen DNA-polymeerasi rakentaa uutta DNA-juostetta kiinnittämällä nukleotideja (dNTP) alukkeen perään. qPCR-reaktiot tapahtuvat kuoppalevyllä, jonka lämpötilaa säädellään qPCR-laitteen lämpöblokkissa.

Syntyneen DNA:n reaaliaikainen seuranta perustuu qPCR-reaktiossa käytettäviin fluoresoiviin väriaineisiin, jotka fluoresoivat tietyllä aallonpituudella ollessaan sitoutuneena kaksijuosteiseen DNA:han, mutta eivät fluoresoi ollessaan irtonaisina tai sitoutuneena yksijuosteiseen DNA:han. Yleisesti qPCR-tekniikassa käytetty SYBR Green I -väriaine kykenee sitoutumaan kaksijuosteisen DNA-kierteen väliin, jolloin värimolekyylin konfor-

maatio muuttuu ja se alkaa fluoresoida 530 nm aallonpituudella (LightCycler® 480 Instrument, Operator's Manual, Software Version 1.5, 2008, s. 65). Värimolekyylin eksitaatio tapahtuu qPCR-laitteessa olevan xenon-lampun ja eksitaatiofiltterin avulla, kun taas värimolekyylin emittoima valo voidaan havaita laitteen emissiofiltterin ja CCD-kameran avulla (LightCycler® 480 Instrument, Operator's Manual, Software Version 1.5, 2008, s. 54–55). Kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuvien väriaineiden vaihtoehtona qPCR-tekniikassa voidaan käyttää myös sekvenssispesifisiä väriaineita, jotka sitoutuvat koettimen avulla vain kohdesekvenssiin, jossa on koetinta vastaava emäsjärjestys.

2.2 qPCR-ajon vaiheet

qPCR-ohjelma alkaa muutaman minuutin pituisella kuumennuksella 95 °C:n lämpötilassa, jolloin hot start -polymeraasi aktivoituu toimintavalmiiksi ja kaikki DNA sulaa yksijuosteiseksi. Tämän jälkeen toistetaan useita kymmeniä kertoja DNA:n monistussyklejä, joissa uusia DNA-juosteita rakentuu kohdesekvenssin mallin mukaisesti. Kunkin monistussyklin alussa DNA-juosteet erotetaan toisistaan kuumentamalla 95 °C:n lämpötilaan, ja sitten lämpötila lasketaan sellaiselle tasolle (yleensä noin 50–65 °C), jossa alukkeet pääsevät sitoutumaan kohdesekvenssiin, mutta epäspesifinen sitoutuminen on mahdollisimman vähäistä. Varsinainen DNA:n monistusvaihe tehdään yleensä 72 °C:n lämpötilassa, jossa useimmat DNA-polymeraasit toimivat optimaalisesti. qPCR-tekniikassa käytettävän väriaineen aikaansaama fluoresenssi mitataan jokaisen monistussyklin aikana, mikä mahdollistaa syntyneen DNA:n kvantitoinnin reaaliajassa. Kun haluttu määrä monistussyklejä on tullut täyteen, reaktioseokset jätetään vielä useaksi minuutiksi synteesi-lämpötilaan, jotta myös kesken jääneet juosteet ehtivät monistua loppuun ennen sulamiskäyräanalyysiä.

2.3 Sulamiskäyräanalyysi

Kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuvia väriaineita käytettäessä qPCR-ajon lopussa suoritetaan sulamiskäyräanalyysi, jonka avulla voidaan arvioida monistuneiden tuotteiden luonnetta ja spesifisyyttä. Sulamiskäyräanalyysissä qPCR-reaktioseokset kuumentaan ensin 95 °C:n lämpötilaan tuotteiden denaturoimiseksi, ja jäädytetään sitten 65 °C:n lämpötilaan, jotta DNA palautuu kaksijuosteiseksi. Tämän jälkeen reaktioseoksia aletaan hitaasti kuumentaa 95 °C:n lämpötilaan, mitaten koko ajan fluoresenssia.

Mitä korkeammaksi lämpötila nousee, sitä enemmän DNA:n vastinjuosteet alkavat irrota toisistaan, ja sitä pienemmäksi fluoresenssi muuttuu, kun väriaine irtoaa DNA:sta. qPCR-tuotteen sulamispiste (T_m) eli lämpötila, jossa puolet kaksijuosteisesta DNA-molekyylistä on erottunut yksijuosteiseksi, riippuu tuotteen pituudesta, emäsjärjestyksestä sekä guaniini- ja sytosiiniemästen pitoisuudesta (GC-pitoisuus). Mitä pidempi tuote on kyseessä ja mitä suurempi sen GC-pitoisuus on, sitä korkeampi sulamispiste tuotteella on.

qPCR-laite piirtää sulamiskäyräanalyysistä sulamishuippukuvaajan, jossa fluoresenssin negatiivinen derivaatta esitetään lämpötilan funktiona. Sulamishuippukuvaajan huiput edustavat tuotteiden sulamispisteitä, ja spesifisellä tuotteella on yleensä vain yksi sulamispiste. Mikäli sulamishuippukuvaajassa näkyy useampi sulamispiste, syynä ei kuitenkaan aina ole epäspesifisen tuotteen muodostuminen. Mikäli qPCR-reaktiossa käytetty templaatti-DNA on ollut peräisin useita eri mikrobilajeja sisältäneestä populaationäytteestä, tavoitellusta tuotteesta on saattanut syntyä sekvenssiltään toisistaan poikkeavia muotoja, joilla on täten myös erilaiset sulamispisteet. Usealle sulamispisteelle voi olla selityksenä myös se, että reaktioseoksessa olevat alukkeet ovat muodostaneet dimeereitä, tai se, että spesifisen qPCR-tuotteen sulamisessa on muodostunut tuotteen rakenteesta johtuva välituote. Nämä alukedimeerien tai sulamisvälituotteiden aiheuttamat sulamispisteet poikkeavat tavoitellun monistustuotteen sulamispisteestä ja erottuvat sulamishuippukuvaajassa ylimääräisinä huippuina. On kuitenkin myös mahdollista, että useampi sulamispiste johtuu epäspesifisen monistustuotteen muodostumisesta, jolloin qPCR-menetelmä ei toimi optimaalisesti. (LightCycler® 480 Instrument, Operator's Manual, Software Version 1.5, 2008, s. 206–207.)

2.4 Absoluuttinen kvantitointi

Absoluuttisen kvantitoinnin menetelmässä qPCR-ajon tarkoituksena on ulkoisen kalibroitisuoran avulla määrittää näytteiden alkuperäiset kohdesekvenssipitoisuudet. Kalibroitinäytteinä käytetään sellaisen näytteen laimennossarjaa, josta on etukäteen määritetty kohdesekvenssin kopioiden pitoisuus. Kun kalibroitinäytteiden fluoresenssit piirretään kuvaajaan monistussykliä määrän funktiona, voidaan määrittää crossing point (C_p) -arvo eli syklimäärä, jossa näytteen aikaansaama fluoresenssi ylittää taust-

tafluoresenssin. Näytteen C_p -arvo on sitä pienempi, mitä enemmän se sisältää kohdesekvenssiä. Kalibrintinäytteiden C_p -arvoista määritetään kalibrintisuora, jonka avulla voidaan laskea varsinaisten näytteiden kohdesekvenssipitoisuudet. Jos kalibrintisuora määritetään Fit Points -menetelmällä, tuloksena on lineaarinen regressiosuora. Second Derivative Maximum -menetelmällä puolestaan kalibrintikäyrä muodostetaan epälineaarisesti. Standardisuoran E-arvo (Efficiency) kuvaa PCR-reaktion tehokkuutta, ja ihanteellisissa olosuhteissa se saavuttaa arvon 2. Standardinäytteiden ja varsinaisten näytteiden E-arvojen tulisi olla mahdollisimman lähellä toisiaan. Standardisuoran keskineliövirhe (Error value) puolestaan kuvaa yksittäisten standardinäytteiden asettumista standardisuoralle, ja arvon tulisi olla alle 0,2. (LightCycler® 480 Instrument, Operator's Manual, Software Version 1.5, 2008, s. 161–163.)

3 Mikrobien käyttö arvokkaiden metallien talteenotossa

Kupari, nikkeli ja sinkki esiintyvät luonnossa yleensä metallisulfideina, joita on vaikea liuottaa ilman voimakkaita happoja ja korkeita lämpötiloja. Runsaasti energiaa ja vahvoja kemikaaleja vaativan metallinrikastusprosessin vaihtoehtona voidaan käyttää niin sanottua bioliuotusta, jossa metallisulfidissa oleva metalli muutetaan mikrobien avulla liukoiseen muotoon. Bioliuotuksessa metallisulfidit hajoavat metalli-ioneiksi, sulfaatiksi sekä rikkiptoisiksi välituotteiksi, minkä jälkeen metallipitoinen liuos voidaan jatkokäsitellä kiinteäksi metalliksi. Kulta esiintyy usein metallisulfideihin kiinnittyneinä partikkeleina, jolloin ympäröivää metallisulfidainesta voidaan poistaa bioliuotuksella. Verrattuna kemiallis-fysikaaliseen liuotusprosessiin bioliuotus tehostaa mm. epäpuhtaiden, vaikeasti hajotettavien tai metallipitoisuudeltaan vähäisempien metalliesiintymien hyödynnettävyyttä. Menetelmää voidaan käyttää myös jäämämetsallin talteenottoon kaivosten jätkeviaineesta, josta ei enää kannattavasti saada irrotettua metalleja kemiallis-fysikaalisin keinoin. Helposti hyödynnettävien metalliesiintymien huetessa bioliuotuksen kysyntä luultavasti kasvaa. (Schippers ym. 2013, s. 1–4.)

Bioliuotuksessa käytettävät mikrobit ovat yleensä aerobisia ferroraudan Fe(II) ja/tai rikkiyhdisteiden hapettajia. Ne vaativat menestyäkseen hyvin happamat olosuhteet (ihanteellinen pH-arvo on välillä 0,35–4), mikä yleensä saadaan aikaan rikkihapolla. Useimmat bioliuotuksessa käytettävistä mikrobeista ovat 25–55 °C:n lämpötilassa viihtyviä bakteereita tai 35–90 °C:n lämpötilassa eläviä arkeoneja. Korkeampi lämpötila yleensä nopeuttaa bioliuotusprosessia. Bioliuotuksessa käytettäviä bakteerisukuja ovat mm. *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum* ja *Sulfobacillus* ja arkeonisukuja puolestaan mm. *Metallosphaera* ja *Sulfolobus*. (Schippers ym. 2013, s. 14–17.)

Bioliuotuksessa mikrobit kiinnittyvät metallisulfidien pinnalle lima-aineiden avulla muodostaen biofilmejä. Mikrobit elävät biofilmissä yleensä autotrofisesti eli saavat energiansa ja hiilensä epäorgaanisista yhdisteistä. Bioliuotuksessa käytettävät mikrobit hapettavat ferroraudan Fe(II) ferriraudaksi Fe(III), joka puolestaan hapettaa kiviaineksessa olevan metallisulfidin metalli-ioneiksi ja rikkiyhdisteiksi. Mikrobit muuttavat rikkiyhdisteet rikkihapoksi, joka auttaa ylläpitämään tarvittavaa ympäristön happamuutta. Hiilenlähteenä bioliuotusmikrobien autotrofisessa kasvussa toimii hiilidioksidi, ja ravinteikseen ne tarvitsevat lisäksi ainakin tyypä, fosforia, kaliumia ja magnesiumia. (Schippers ym. 2013, s. 14–17.)

4 Työssä käytetyt laitteet ja reagenssit

4.1 Alukkeet

Työssä testattiin qPCR-menetelmällä kolmelle eri raudanhapettajabakteerisuvulle (*Acidithiobacillus*, *Leptospirillum* ja *Sulfobacillus*) suunniteltujen alukeparien toimivuutta ja spesifisyyttä. Kukin työssä käytetty alukepari oli suunniteltu mahdollisimman spesifiseksi edellä mainittujen bakteerisukujen 16S rRNA -geenin muunteleville alueille. Lisäksi näytteidien kokonaisbakteeripitoisuutta sekä qPCR-menetelmän toimivuutta testattiin käyttämällä yhtä useimmille bakteereille toimivaa yleisalukeparia. Työssä käytettyjen alukkeiden tiedot löytyvät taulukosta 1.

Taulukko 1. Työssä käytetyt alukkeet

Alukkeen nimi	Kohdegeeni tai -bakteerisuku	Alukkeen sekvenssi	Viite
p1	Bakteerien 16S rRNA -geenin V3-alue	5'-CCTACGG-GAGGCAGCAG-3'	Muyzer ym. 1993, s. 696
p2		5'-ATTACCGCG GCTGCTGG-3'	
Acthb_F	<i>Acidithiobacillus</i>	5'-CCACACTGGGACT-GAGACAC-3'	Bomberg ym. 2019, s. 11
Acthb_R		5'-CCTGGAATTCCAY-CACCCTC-3'	
Lfp392F_mod	<i>Leptospirillum</i>	5'-GAAGGCYTTTCGGGTGTAACCAC-3'	Bomberg ym. 2018, s. 239; Hedrich ym. 2016, s. 3
Lfp601R_mod		5'-TTAAGCYACGGCCTTTCACCAA-3'	
Sbac F	<i>Sulfobacillus</i>	5'-CCACACTGGGACT-GAGACAC-3'	Bomberg ym. 2018, s. 239
Sbac_R		5'-CAGGAATTCCAY-GCACCTCT-3'	

4.2 Aluketestauksessa käytetyt puhdasviljelmä-DNA:t

Alukkeiden spesifisyyden testaamisessa käytettiin templaattina VTT:n mikrobikokoelmasta (<http://culturecollection.vtt.fi/>) saaduista bakteeripuhdasviljelmistä jo ennen tätä tutkimusta eristettyjä DNA-näytteitä. Bakteerikannat olivat seuraavat:

- *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 11477 (VTT E-991375)
- *Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis* DSM 30030 (VTT E-97056)
- *Alcanivorax borkumensis* DSM 11573 (VTT E-163489)
- *Clostridium ljungdahlii* VTT E-153486
- *Desulfovibrio desulfuricans* subsp. *desulfuricans* DSM 642 (VTT E-95573)
- *Escherichia coli* ATCC 31608 (VTT E-90418)
- *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705 (VTT E-991377)
- *Leptothrix discophora* ATCC 43182 (VTT E-99911)
- *Methylosinus trichosporium* VKM B-2117 (VTT E-143397)
- *Pseudomonas putida* DSM 291 (VTT E-92005)
- *Sulfobacillus benefaciens* DSM 19468 (VTT E-173525).

Aluketestauksen ensimmäisessä vaiheessa testattiin kvalitatiivisesti, sitoutuvatko tietyille bakteerisuvulle spesifiseksi suunnitellut alukkeet muiden bakteerisukujen DNA:han ja miten eri sitoutumislämpötilat vaikuttavat asiaan. Kunkin bakteerilajin DNA:ta testattiin neljänä erivahvuisena laimennoksena. Ensimmäisessä vaiheessa eri alukkeilla tehdyissä qPCR-reaktioissa käytettiin samoja laimennoksia kustakin bakteerilajista, mutta bakteerilajien välillä DNA-pitoisuuksia ei ollut yhdenmukaistettu. Aluketestauksen toisessa vaiheessa haluttiin kaikille puhdasviljelmä-DNA-templaateille sama vahvuus, joten DNA-pitoisuudet määritettiin Qubit 2.0 -fuorometrillä (Invitrogen). Määritykset tehtiin 5 µl:sta kutakin DNA-näytettä, käyttäen Qubit dsDNA HS -reagensseja (Invitrogen / ThermoFisher Scientific, tuotenumero Q32854) käyttöohjeen mukaisesti. Aluketestauksen toista vaihetta varten kaikki puhdasviljelmä-DNA-templaattit laimennettiin vedellä pitoisuuteen 0,2 ng/µl.

4.3 Aluketestauksen qPCR-ajot

Aluketestauksen qPCR-reaktiot tehtiin FrameStar 480/96 -kuoppalevyillä (4titude), LightCycler480 II -laitteella (Roche Diagnostics), käyttäen ensimmäisessä vaiheessa reagenssia KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x) for LightCycler 480 (KAPA BIOSYSTEMS, tuotenumero KK4610), ja toisessa vaiheessa reagenssia SensiFAST SYBR No-ROX Mix, 2x (Bioline, tuotenumero BIO-98020). Kustakin DNA-laimennoksesta tehtiin kaksi tai kolme rinnakkaista qPCR-reaktiota, joissa kokonaistilavuus oli 10 µl, alukkeiden pitoisuudet 0,5 µM ja templaatti-DNA-laimennoksen tilavuus 1-2,5 µl. Negatiiviset qPCR-kontrollit valmistettiin käyttämällä templaatti-DNA:n tilalla qPCR-reaktioissakin käytettyä Molecular Biology Reagent Water -vettä (Sigma-Aldrich, tuotenumero W4502-1L). Aluketestauksen ensimmäisen vaiheen määrytykset olivat kvalitatiivisia, joten pitoisuusstandardeja ei käytetty. Aluketestauksen toisessa vaiheessa käytettiin pitoisuusstandardeina kymmenkantaisia laimennossarjoja plasmideista, joihin oli liitetty 16S rRNA -geenin osa bakteerikannasta *Escherichia coli* ATCC 31608 (VTT E-90418), *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSM 11477 (VTT E-991375), *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705 (VTT E-991377) tai *Sulfobacillus benefaciens* DSM 19468 (VTT E-173525). Standardien pitoisuudet olivat luokkaa 10¹–10⁸ kopiota reaktiossa.

Aluketestauksessa käytetyn qPCR-ohjelman vaiheet olivat seuraavat:

- 1) Alkudenaturaatio, 95 °C, 15 minuuttia
- 2) 35 monistussykliä seuraavin vaihein:
 - a. Denaturaatio, 95 °C, 10 sekuntia
 - b. Alukkeiden sitoutuminen, 58 °C, 60 °C, 62 °C tai 64 °C, 35 sekuntia
 - c. DNA:n monistus, 72 °C, 30 sekuntia ja fluoresenssin mittaaminen jokaisen syklin lopussa
- 3) Loppumonistus, 72 °C, 3 minuuttia
- 4) Sulamiskäyräanalyysi seuraavin vaihein:
 - a. Denaturaatio, 95 °C, 10 sekuntia
 - b. DNA kaksijuosteiseksi, 65 °C, 1 minuutti
 - c. Kuumennus 95 °C:n lämpötilaan 0,2 °C sekunnissa ja jatkuva fluoresenssimittaus
- 5) Jäähdytys, 40 °C, 15 minuuttia.

Alukepareille kokeiltiin eri sitoutumislämpötiloja, jotta löydettäisiin lämpötila, jossa epäspesifisten tuotteiden syntyminen olisi mahdollisimman vähäistä ja spesifisen tuotteen monistuminen kuitenkin tehokasta. Acthb-alukkeille testattiin sitoutumislämpötiloja 60 °C, 62 °C ja 64 °C. Lfp-alukkeille testattiin sitoutumislämpötiloja 58 °C, 60 °C ja 62 °C. Sbac-alukkeille testattiin sitoutumislämpötiloja 60 °C ja 62 °C. Bakteeryleisalukkeille (p1 ja p2) testattiin sitoutumislämpötiloja 60 °C ja 64 °C.

4.4 Kaivosnäytteet

Työssä tutkittavat näytteet oli otettu kuparia ja nikkeliä tuottavilta kaivoksilta A ja B. A-kaivokselta otetut näytteet olivat rikastamossa kiertävää prosessivettä, nikkeli-prosessin saostusaltaassa kirkastettua vettä sekä lietettä jätekiviaineskasasta. A-kaivoksen näytteistä oli tehty ennen DNA:n eristämistä kertaluontoiset mikrobirikastusviljelmät R2A-liemessä (R2A-näytteet), tryptoni-soija-hiivauute-liemessä (TSB+YE-näytteet) ja ammoniumvetykarbonaattiliemessä (CARB-näytteet) sellaisenaan sekä ferroraudalla Fe(II) tai ferriraudalla Fe(III) lisättyinä. Lisäksi A-kaivoksen näytteistä oli tehty rikastusviljelmät kolmesti nuorentaan TK-m-liemessä (486. THIOBACILLUS THIOPARUS (TK-m) MEDIUM, 2015), joka sisälsi rikinhapettajabakteereille tiosulfaattia $S_2O_3^{2-}$, mutta ei orgaanista hiiltä. A-kaivoksen näytteille oli tehty rikastusviljelyt jo ennen tämän tutkimuksen alkua.

B-kaivoksen näytteet oli otettu vesiesiintymistä 240, 500 ja 600 metrin syvyydestä maanpinnan alapuolelta. Ennen DNA-eristystä raudan- ja rikinhapettajabakteereita oli rikastettu erittäin happamissa, ferrorautaa ja rikkiä sisältävissä kasvualustoissa, joihin ei ollut lisätty hiilenlähteitä. B-kaivoksen näytteille oli tehty rikastusviljelyt ja DNA-eristys jo ennen tämän tutkimuksen alkua.

4.5 DNA:n eristäminen A-kaivoksen mikrobirikastusnäytteistä

A-kaivoksen mikrobirikastusnäytteistä eristettiin DNA käyttäen kaupallista NucleoSpin Soil -menetelmää (Macherey-Nagel, tuotenumero 740780.50). Kutakin näytettä siirrettiin 1 ml NucleoSpin Soil -helmiputkeen, ja putkia sentrifugoitiin $20\ 800 \times g$, 10 minuuttia. Helmien yläpuolelle jäävä neste poistettiin, minkä jälkeen putkeen lisättiin valmistajan ohjeen mukaan Buffer SL-1 ja Enhancer SX -liuokset. Solut hajotettiin ravistelemalla helmiputkia huoneenlämmössä, 5 minuuttia, täydellä teholla Vortex-Genie 2 -laitteella

(Scientific Industries, malli G-560E), johon oli kiinnitetty adapteri helmiputkia varten (Macherey-Nagel, tuotenumero 740469). Tästä eteenpäin DNA-eristys tehtiin loppuun käyttöohjeen mukaisesti, ja lopussa DNA eluoitiin 60 µl:aan Buffer SE -liuosta. Kontaminaatiotason selvittämiseksi kustakin DNA-eristyserästä tehtiin myös negatiivinen kontrollinäyte suorittamalla eristysvaiheet reagensseilla ilman lisättyä näytettä.

4.6 Kaivosnäytteiden qPCR-määritykset

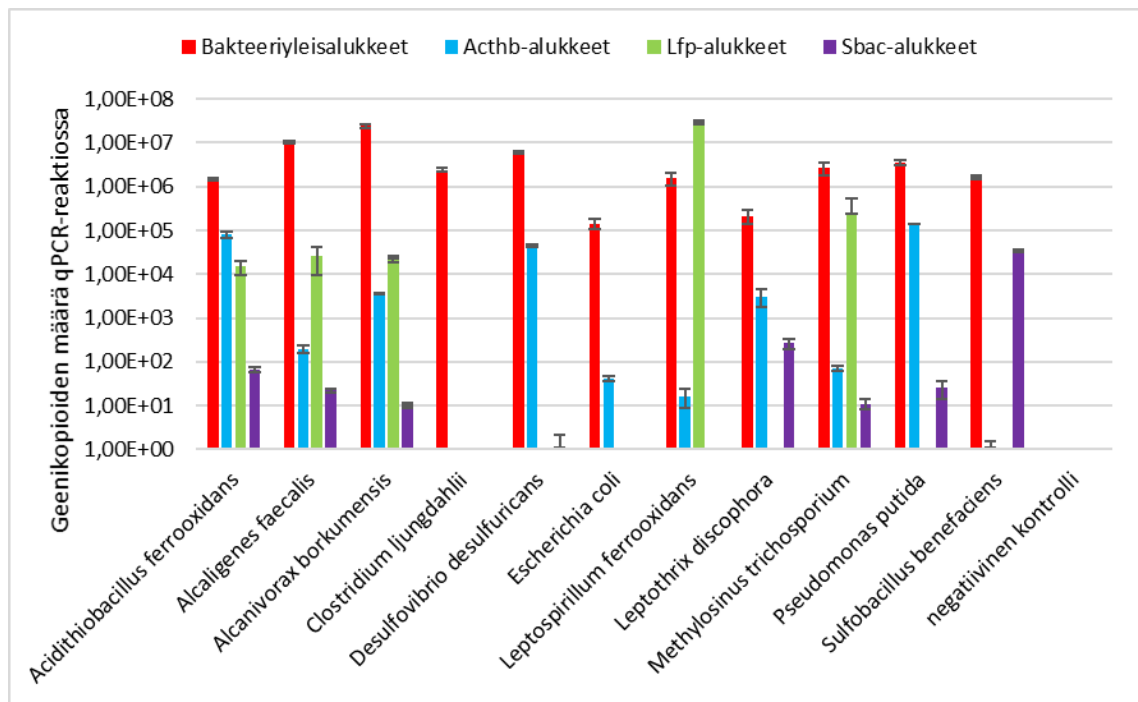
A-kaivoksen ja B-kaivoksen näytteistä eristetystä DNA:sta tehtiin qPCR-määrityksiä bakteerileisälukkeilla (p1 ja p2) sekä *Acidithiobacillus*- (Acthb-alukkeet), *Leptospirillum*- (Lfp-alukkeet) ja *Sulfobacillus*- (Sbac-alukkeet) bakteerisuvuille spesifiseksi suunnitelluilla alukkeilla, käyttäen aluketestausvaiheessa parhaiksi havaittuja säätöjä. qPCR-reagenssina käytettiin seosta SensiFAST SYBR No-ROX Mix, 2× (Bioline, tuotenumero BIO-98020). Kustakin näytetyypistä tehtiin kahdesta neljään rinnakkaista qPCR-reaktiota, joissa kokonaistilavuus oli 10 µl, alukkeiden pitoisuudet 0,5 µM ja templaatti-DNA:n tilavuus 1 µl. Muilta osin qPCR-ajot tehtiin samoin kuin aluketestausvaiheessa.

5 Tulokset ja niiden tarkastelu

5.1 Alukkeiden testaus

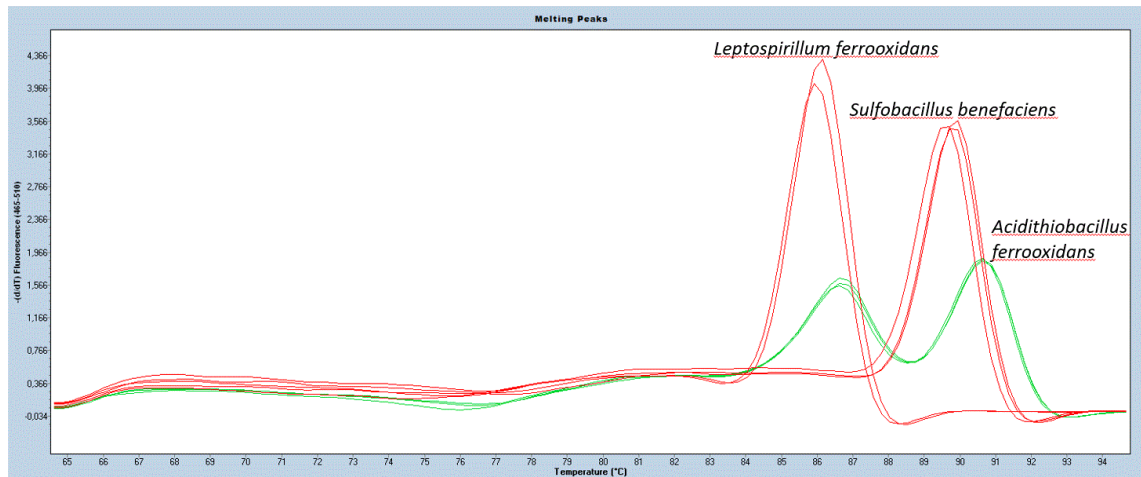
Aluketestausvaiheessa testattiin qPCR-tekniikalla *Acidithiobacillus*- (Acthb-alukkeet), *Leptospirillum*- (Lfp-alukkeet) ja *Sulfobacillus*- (Sbac-alukkeet) bakteerisuvuille spesifiseksi suunniteltujen alukeparien toimivuutta ja optimaalista alukkeiden sitoutumislämpötilaa, käyttäen templaattina 11 eri bakteerilajista eristettyä puhdasviljelmä-DNA:ta. Tavoitteena oli löytää alukkeille sitoutumislämpötila, jossa spesifisen tuotteen monistuminen olisi mahdollisimman tehokasta, ja epäspesifisten tuotteiden syntyminen mahdollisimman vähäistä. Vertailukohtana käytettiin useimmille bakteereille toimivaa yleisalukeparia (p1 ja p2), jotta voitiin varmistua qPCR-koeasetelman toimivuudesta. Tässä työssä tehtyjen aluketestausten kohdalla qPCR-tuotteiden kvantitointia voidaan pitää vain suuntaantavana, koska isossa osassa puhdasviljelmänäytteistä tulokset sijoittuivat standardisuoran ulkopuolelle.

Bakteeriyleisalukkeet (p1 ja p2) monistivat molemmissa testatuissa sitoutumislämpötiloissa (60 °C ja 64 °C) onnistuneesti qPCR-tuotteen kaikista testatuista puhdasviljelmänäytteistä (Kuva 1). Koeasetelma varmistui siis toimivaksi. Sulamiskäyräanalyysin avulla voitiin helposti havainnoida, miten erilaisia eri bakteeripuhdasviljelmistä saadut qPCR-tuotteet olivat toisiinsa nähden. Bakteeriyleisalukkeilla tehdyssä kokeessa *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* ja *Sulfobacillus benefaciens* -tuotteiden sulamishuippukuvaajat erottuivat selvästi toisistaan (Kuva 2). Tosin jostain syystä *A. ferrooxidans* -lajin sulamishuippukuvaajassa näkyi kaksi sulamispistettä. Samoin aluketestauksen kvalitatiivisessa ensimmäisessä vaiheessa väkevimmän *A. ferrooxidans* -näytteen monistustuotteessa esiintyi bakteeriyleisalukkeilla niin ikään kaksi sulamispistettä, kun taas laimeammassa *A. ferrooxidans* -näytteissä monistustuotteella oli vain yksi sulamispiste. Aluketestauksissa käytetyssä *A. ferrooxidans* -DNA-näytteessä on siis saattanut olla kontaminaatio tai jotain muuta vikaa.



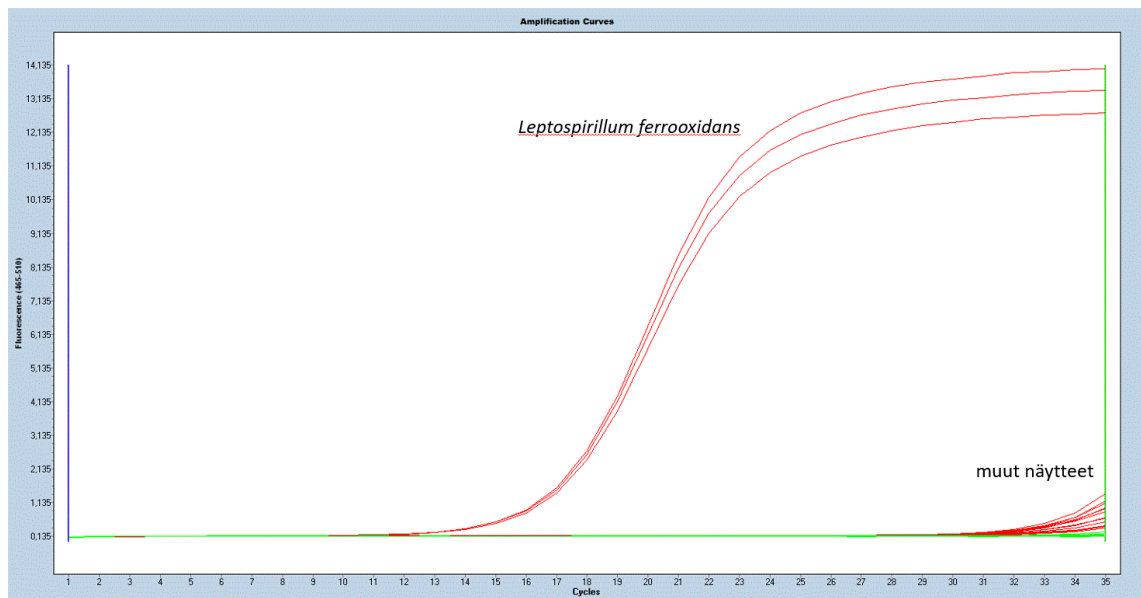
Kuva 1. Aluketestauksessa eri alukkeilla monistuneet geenikopiomäärät, kun kussakin reaktiossa käytettiin templaattina 0,5 ng bakteeripuhdasviljelmistä eristettyä DNA:ta. Määrittelyt tehtiin käyttäen kolmea rinnakkaista reaktiota eli $n = 3$. Virhepalkit kuvaavat keskihajontaa.

Acthb-alukkeilla saatiin kaikilla aluketestauksessa kokeilluilla sitoutumislämpötiloilla epäspesifistä qPCR-tuotetta useista muista bakteerilajeista *Acidithiobacillus ferrooxidans* -lajin lisäksi (Kuva 1). Yhtä tehokkaasti *A. ferrooxidans* -lajin kanssa monistuivat lajit *Desulfovibrio desulfuricans* ja *Pseudomonas putida*, joista jälkimmäinen voitiin kuitenkin erottaa ensin mainituista qPCR-tuotteen sulamislämpötilan perusteella. *D. desulfuricans* ei puolestaan anaerobisena lajina todennäköisesti esiintyisi samoissa elinympäristöissä aerobisen *A. ferrooxidans* -lajin kanssa. *A. ferrooxidans* -lajin elinympäristöille tyypillinen voimakas happamuus rajoittaisi sekä *D. desulfuricans* että *P. putida* -lajin selviytymistä, joten kyseisten lajien esiintyminen yhdessä olisi melko epätodennäköistä. Edellä mainituista syistä Acthb-alukkeita pidettiin tässä tutkimuksessa riittävän toimivina määrittysten jatkamiseksi varsinaisilla kaivosnäytteillä.



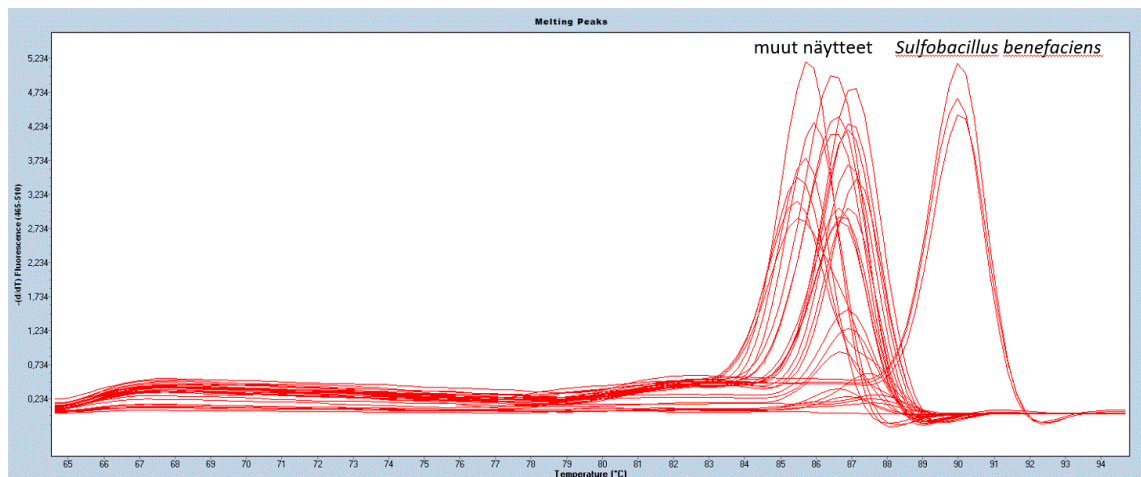
Kuva 2. Sulamishuippukuvaajat aluketestauksessa bakteeriyleisalukkeilla (p1 ja p2) tehdyistä qPCR-reaktioista, joissa templaattina käytettiin 0,5 ng DNA:ta *Leptospirillum ferrooxidans*, *Sulfobacillus benefaciens* tai *Acidithiobacillus ferrooxidans* -puhdasviljelmästä.

Lfp-alukkeiden testauksessa 62 °C:n sitoutumislämpötilassa *Leptospirillum ferrooxidans* -lajista syntyi qPCR-tuotetta huomattavasti verrokkilajeja voimakkaammin (Kuva1). qPCR-monistuskäyristä voidaan havaita, että *L. ferrooxidans* -tuotetta alkoi syntyä hyvin aikaisessa vaiheessa, eli sen C_p -arvo oli huomattavasti matalampi kuin millään muulla puhdasviljelmänäytteellä (Kuva 3). Aluketestauksessa Lfp-alukkeet vaikuttivat siis käytökelpoisilta *Leptospirillum*-bakteerisuvun tunnistamiseen.



Kuva 3. Kaikkien aluketestauksessa käytettyjen puhdasviljelmänäytteiden qPCR-monistuskäyrät Lfp-alukkeilla sitoutumislämpötilassa 62 °C. Kussakin reaktiossa käytettiin temp-laattina 0,5 ng DNA:ta.

Aluketestauksessa Sbac-alukkeilla spesifinen *Sulfobacillus benefaciens* -tuote monistui sitoutumislämpötilassa 62 °C selvästi muita lajeja voimakkaammin (Kuva 1). Sbac-alukkeilla tehtyjen qPCR-määritysten sulamiskäyräanalyysissä *S. benefaciens* -tuotteen sulamispiste oli selvästi korkeampi kuin millään verrokinäytteellä (Kuva 4). Spesifinen *Sulfobacillus benefaciens* -tuote poikkesi siis emäskoostumukseltaan kaikista epäspesifisistä tuotteista. Sbac-alukkeet vaikuttivat aluketestauksen perusteella toimivilta *Sulfobacillus*-bakteerisuvun tunnistamiseen.



Kuva 4. Kaikkien aluketestauksessa käytettyjen puhtasviljelmänäytteiden sulamishuippukuvajat Sbac-alukkeilla sitoutumislämpötilassa 62 °C. Kussakin reaktiossa käytettiin temp-laattina 0,5 ng DNA:ta.

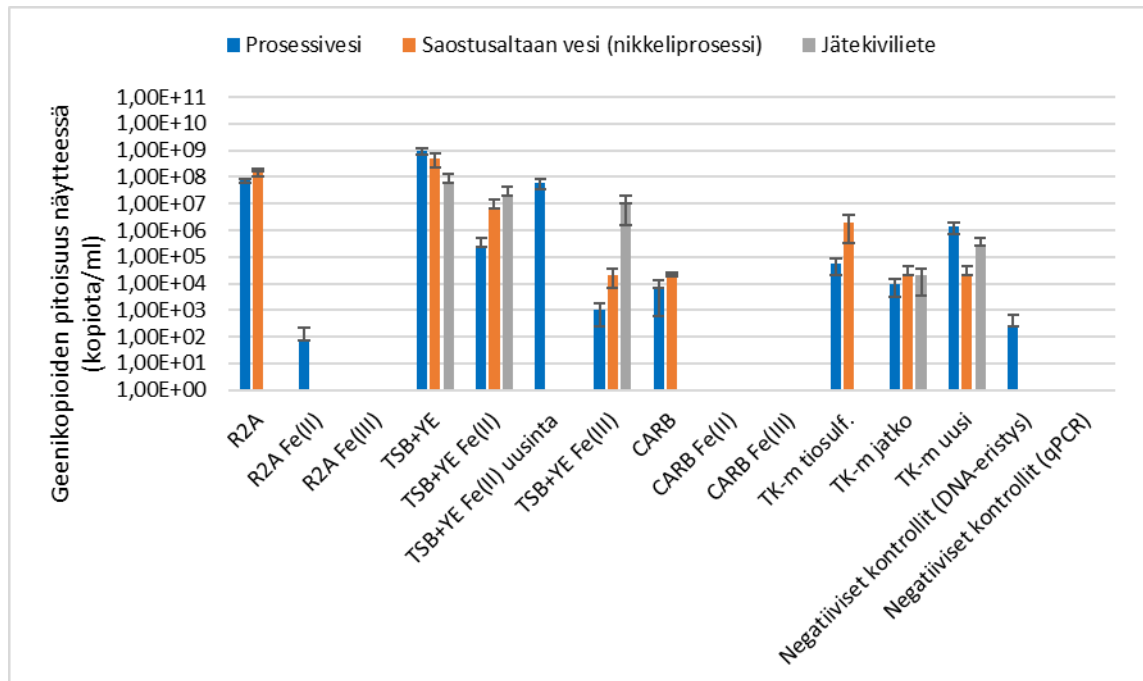
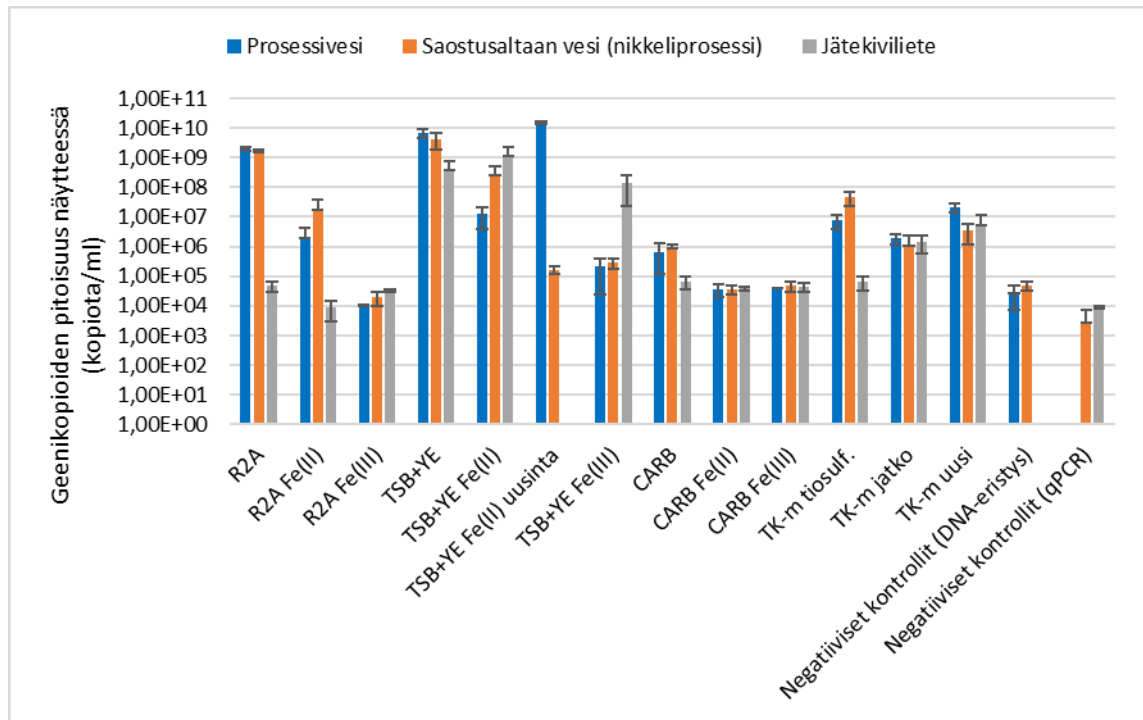
5.2 qPCR-määritykset A-kaivoksen mikrobirikastusnäytteistä

A-kaivoksen näytteistä oli tehty mikrobirikastusviljelyitä runsasravinteisessa tryptoni-soija-hiivauute-liemessä (TSB+YE-näytteet), ravinnepitoisuudeltaan laimeammassa R2A-liemessä (R2A-näytteet) ja vain epäorgaanista hiiltä sisältävässä ammoniumvetykarbonaattiliemessä (CARB-näytteet) sellaisenaan sekä ferroraudalla Fe(II) tai ferriraudalla Fe(III) lisätynä. Lisäksi A-kaivoksen näytteistä oli tehty rikastusviljelmät TK-m-liemessä, johon oli lisätty mahdollisille rikinhapettajille rikinlähteeksi tiosulfaattia. Ennen tätä tutkimusta suoraan A-kaivoksen näytteistä ilman rikastusviljelyä tehdyistä mikrobipopulaatioanalyseistä tiedettiin, ettei näytteissä todennäköisesti olisi *Acidithiobacillus*-, *Leptospirillum*- tai *Sulfobacillus*-suvun edustajia tai niiden määrä olisi hyvin vähäinen. Rikastusviljelyiden vaikutus tilanteeseen haluttiin kuitenkin testata tekemällä näytteistä qPCR-määritykset.

Bakteeriyeisalukkeilla A-kaivoksen mikrobirikastusnäytteistä tehdyissä määrityksissä negatiivisista kontrollinäytteistä voitiin havaita, että kaupallista DNA-eristysmenetelmää käytettäessä näytteisiin oli päätyntä melko runsaasti bakteerikontaminaatiota. Samoin qPCR-vaiheessa käytetyt reagenssit tai tarvikkeet olivat olleet kontaminoituneita. Liu ym. (2006, s. 335) havaitsivat tutkimuksessaan vastaavaa kontaminaatiota qPCR-

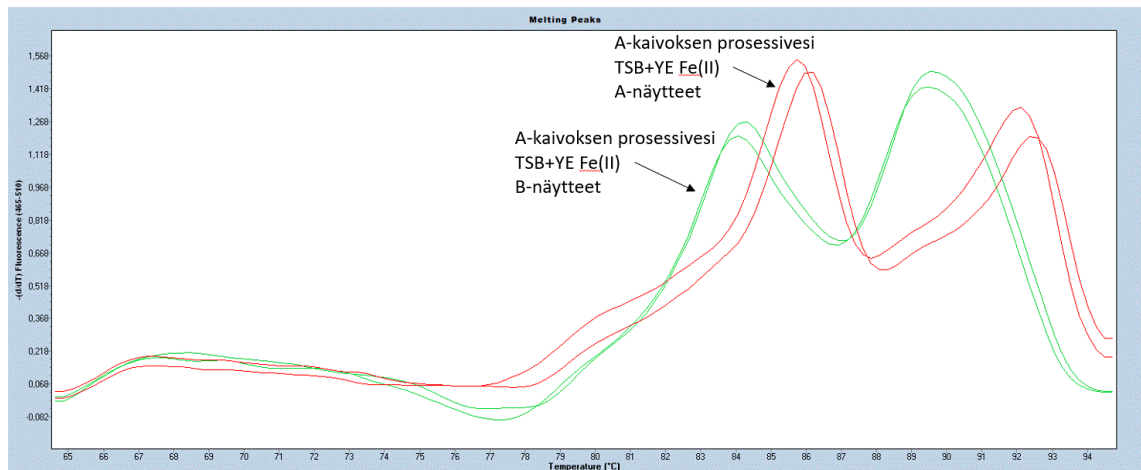
polymeraasissa, minkä he totesivat johtuvan jo valmistusvaiheessa tuotteeseen jääneistä *Escherichia coli* -bakteerin jäämistä. Raudanhapettajaspesifisiä alukkeita käytettäessä lievä yleisbakteerikontaminaatio ei kuitenkaan aiheuta ongelmaa, koska kyseisillä alukkeilla se ei tule näkyviin tuloksissa.

Bakteeriyleisalukkeilla ja *Acidithiobacillus*-suvulle suunnitelluilla Acthb-alukkeilla tehdyissä qPCR-ajoissa useimmista A-kaivoksen mikrobirikastusnäytteistä monistui negatiivisten kontrollinäytteiden tason ylittäviä geenikopiopitoisuuksia (Kuva 5). Sekä yleisalukkeilla että Acthb-alukkeilla tehdyissä qPCR-määryksissä geenikopiopitoisuudet olivat suurimpia runsasravinteisessa TSB+YE-liemessä ja toiseksi suurimpia ravinnepitoisuudeltaan laimeammassa R2A-liemessä. Karbonaattia hiilenlähteenä sisältäneessä liemessä (CARB-liemi) geenikopiopitoisuudet ylittivät molemmilla alukepareilla negatiivisten kontrollinäytteiden tason, mutta karbonaattia ja ferrorautaa sisältäneessä liemessä (CARB Fe[II] -liemi) tulokset jäivät negatiivisten kontrollien tasolle tai alle. Raudanhapettajabakteerien oletettiin nimenomaan menestyvän CARB Fe[II] -liemessä, koska ne eivät pidä orgaanisista hiilenlähteistä, vaan käyttävät kasvuunsa epäorgaanista hiiltä, ja saavat energiansa hapettamalla ferrorautaa. Koska bakteereita oli rikastunut juuri runsasravinteisissa alustoissa, mutta ei CARB Fe[II] -liemessä, tulokset viittaavat siihen, että kyse ei ollut raudanhapettajabakteereista. Se, että Acthb-alukkeilla saatiin qPCR-tuotetta niin monesta näytteestä, herättää epäilyksen, ettei monistustuote ollut peräisin *Acidithiobacillus*-suvun edustajista. Tämä ei ollut kovin yllättävää, koska jo aluketestausvaiheessa vaikutti siltä, etteivät Acthb-alukkeet ehkä toimisi kovin sukuspesifisesti. Koska oli hyvin epätodennäköistä, että A-kaivoksen rikastusviljelmistä löytyisi muitakaan raudanhapettajabakteereita, analysointia ei jatkettu näille näytteille Lfp- ja Sbac-alukkeilla.



Kuva 5. A-kaivoksen mikrobirikastusnäytteiden geenikopiopitoisuudet bakteeriyleisaluksilla (p1 ja p2) (ylempi kuva) ja Acthb-alueilla (alempi kuva) tehdyissä qPCR-ajoissa. Määritykset tehtiin kahtena rinnakkaisena reaktiona kustakin rinnakkaisen näyteparin näytteestä eli n = 4. Virhepalkit kuvaavat keskihajontaa.

A-kaivoksen mikrobirikastusnäytteistä bakteeriyleisalukkeilla monistettujen tuotteiden sulamiskäyräanalyseistä voitiin havaita, että näennäisesti samalla tavoin valmistettujen rinnakkaisten näyteparien käsittelyssä oli mahdollisesti syntynyt eroja näytteiden bakteeripopulaatioihin. Joidenkin näytteiden kohdalla kahdessa eri erässä käsiteltyjen rinnakkaisnäyteparien sulamishuippukuvaajissa oli selvä ero (Kuva 6), mikä viittaa siihen, että rinnakkaisnäytepareissa oli rikastunut erilaiset bakteeriyhteisöt. Kyseisissä sulamishuippukuvaajissa näkyi kaksi sulamispistettä, mikä luultavasti liittyy bakteeriyleisalukkeiden kykyyn monistaa hyvin monen tyyppisiä bakteereita.

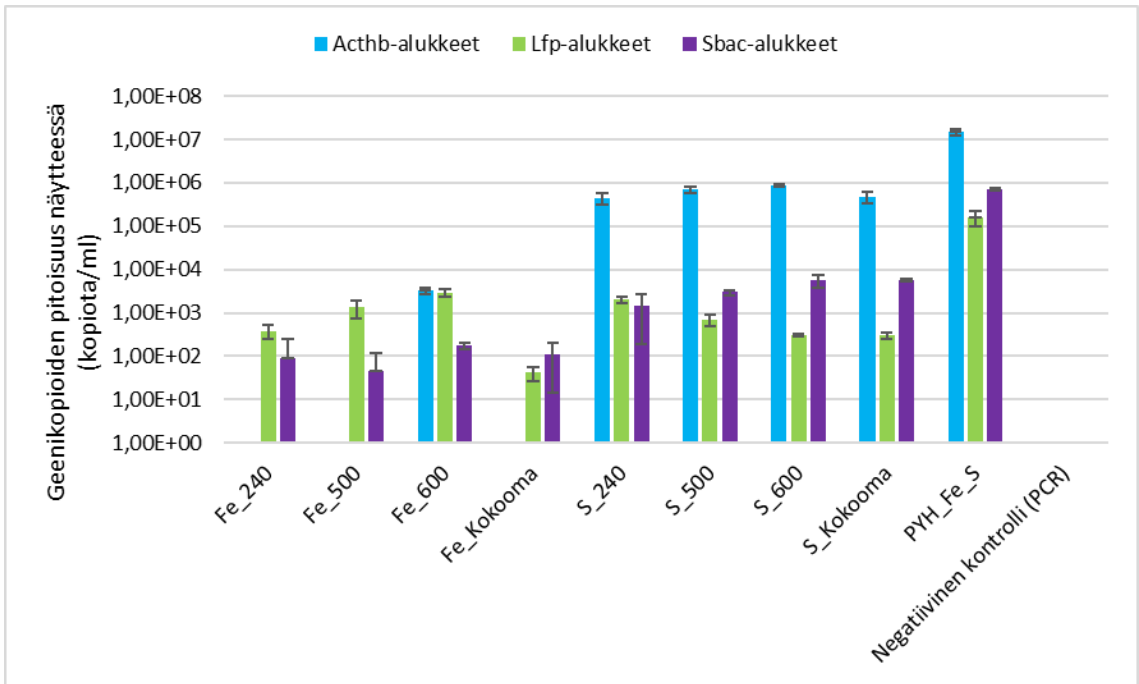
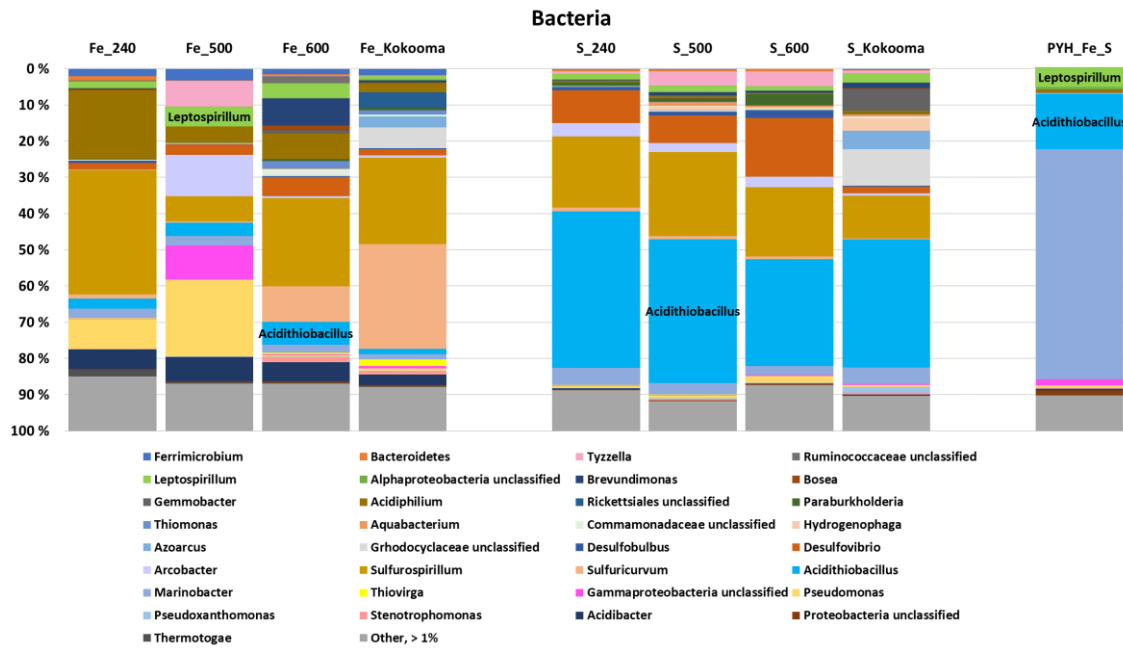


Kuva 6. Kahdessa eri erässä käsiteltyjen A-kaivoksen prosessivedestä valmistettujen rinnakkaisten näyteparien sulamishuippukuvaajat bakteeriyleisalukkeilla (p1 ja p2) monistettuna.

5.3 qPCR-määritykset B-kaivoksen mikrobirikastusnäytteistä

Aiemmassa tutkimuksessa B-kaivoksen mikrobirikastusnäytteistä oli tehty Lontorrent PGM -tehosekvensointimenetelmällä bakteeriyhteisöanalyysi, jonka perusteella tiedettiin, että kaikista näytteistä löytyisi ainakin pieniä määriä *Acidithiobacillus*-suvun lajeja (Julkaisematon VTT:n tulosraportti 2018). Tässä tutkimuksessa Acthb-alukkeilla tehdyssä määrittelyssä qPCR-tuotetta monistui tehokkaimmin PYH_Fe_S-yhdistelmänäytteestä sekä kaikista S-näytteistä eli juuri niistä näytteistä, joissa *Acidithiobacillus*-suvun edustajia oli bakteeriyhteisöanalyysinkin perusteella ollut runsaimmin (Kuva 7). Acthb-alukkeet eivät kuitenkaan onnistuneet monistamaan tuotetta sellaisista näytteistä, joissa

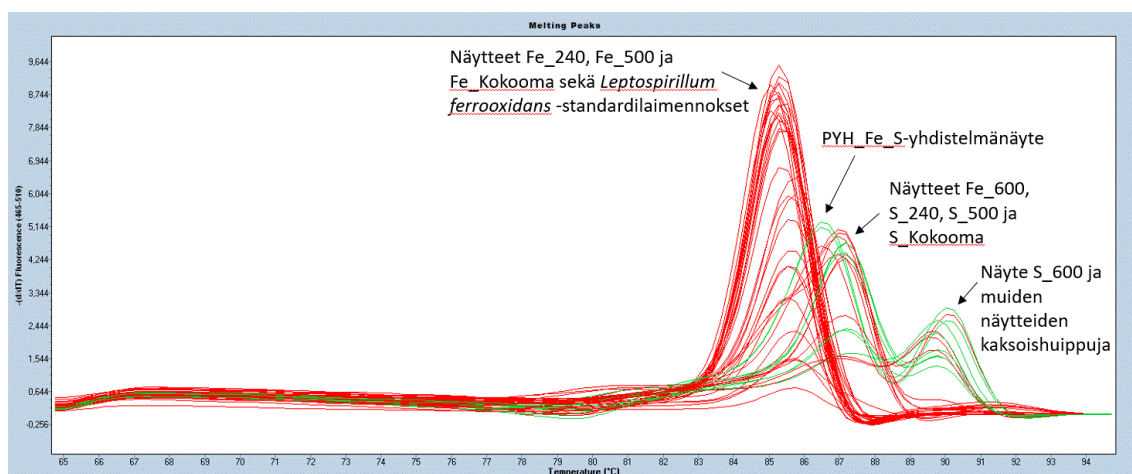
Acidithiobacillus-sukua oli bakteeriyhteisöanalyysin perusteella ollut vain vähän. Sulamiskäyräanalyyysien perusteella näytteistä saadut qPCR-tuotteet olivat identtisiä sekä keskenään että *A. ferrooxidans* -standardilaimennosten kanssa, joten Acthb-alukkeilla oli syntynyt vain yhdenlaista monistustuotetta.



Kuva 7. Ylempi kuva: Ennen tätä tutkimusta B-kaivoksen mikrobirikastusnäytteistä Iontorrent PGM -tehosekvensointimenetelmällä määritetty bakteeriyhteisöjen rakenne 16S rRNA -geenisekvenssien perusteella (Julkaisematon VTT:n tuloraportti 2018). Pylväät kuvaavat eri bakteerisukujen suhteellisiä määriä. Alempi kuva: B-kaivoksen mikrobirikastusnäytteiden geenikopioipitoisuudet Acthb-alukkeilla, Lfp-alukkeilla ja Sbac-alukkeilla tehdyissä qPCR-ajoissa. Määrytykset tehtiin käyttäen kolmea rinnakaista reaktiota eli n = 3. Virhepalkit kuvaavat keskihajontaa.

Ennen tätä tutkimusta B-kaivoksen mikrobirikastusnäytteille tehdystä bakteeriyhteisöanalyysistä tiedettiin, että *Leptospirillum*-suvun lajeja löytyisi pieniä määriä kaikista näytteistä (Julkaisematon VTT:n tulosraportti 2018). Tässä tutkimuksessa Lfp-alukkeilla tehdyissä määrytyksissä kaikista näytteistä saatiin monistumaan qPCR-tuotetta, joten tulos oli yhdenmukainen bakteeriyhteisöanalyysin kanssa (Kuva 7). Voimakkainta monistuminen oli PYH_Fe_S-yhdistelmänäytteessä.

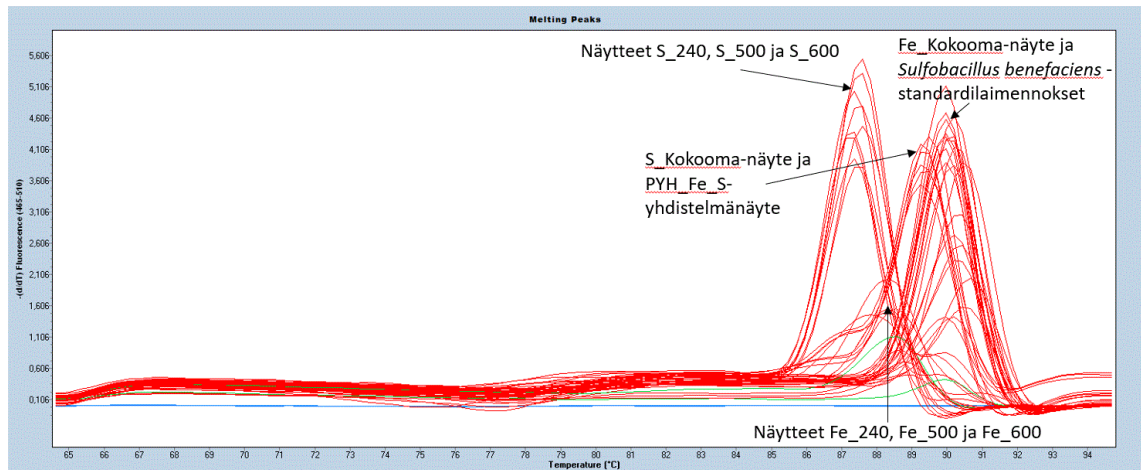
Lfp-alukkeilla B-kaivoksen näytteistä tehdyissä määrytyksissä eri näytteiden sulamishuippukuvaajat poikkesivat toisistaan, joten näytteistä oli syntynyt useampaa erilaista qPCR-tuotetta (Kuva 8). Näytteet Fe_240, Fe_500 ja Fe_Kokooma sekä *L. ferrooxidans*-standardilaimennokset muodostivat sulamispisteeltään yhtenäisen ryhmän, kun taas näytteellä Fe_600 oli hieman korkeampi sulamispiste. Kaikilla S-näytteillä puolestaan sulamispisteet olivat edellä mainittuja näytteitä korkeammat, ja useimmissa näytteissä erottui kaksi sulamispistettä. Kahdesta sulamispisteestä matalampi dominoi näytteissä S_240, S_500 ja S_Kokooma, kun taas korkeampi sulamispiste dominoi S_600-näytteessä. PYH_Fe_S-yhdistelmänäytteen sulamishuippukuvaajat muistuttivat profiililtaan enemmän S-näytteiden kuvaajia kuin Fe-näytteiden kuvaajia. PYH_Fe_S-yhdistelmänäytteen sulamislämpötila sijoittui kuitenkin Fe-näytteiden ja S-näytteiden välille.



Kuva 8. Lfp-alukkeilla monistettujen B-kaivoksen mikrobirikastusnäytteiden sulamishuippukuvaajat.

Lfp-alukkeilla saatujen tulosten perusteella voidaan todeta, että Fe- ja S-näytteiden bakteeriyhteisöt poikkesivat toisistaan. Lisäksi vaikuttaa siltä, että syvimmältä otetuissa Fe_600- ja S_600-näytteessä oli rikastunut muista näytteistä poikkeavat bakteeripopulaatiot. Eri näytteenottoisyvyyksien väliset erot bakteeriyhteisöjen rakenteessa näkyivät myös aiemmassa tutkimuksessa tehdyn bakteeriyhteisöanalyysin tuloksissa (Julkaismaton VTT:n tulosraportti 2018). Tässä tutkimuksessa tarkasteltujen bakteerilajien osalta PYH_Fe_S-yhdistelmänäytteen bakteeriyhteisö vaikutti siis jossain määrin heijastelevan osanäytteidensä piirteitä, mutta tarkempia päätelmiä oli vaikea tehdä. Ennen tätä tutkimusta tehdyn bakteeriyhteisöanalyysin tuloksista voidaan huomata, että vaikka PYH_Fe_S-yhdistelmänäytteessä *Acidithiobacillus*- ja *Leptospirillum*-sukujen osuudet karkeasti vastasivat osanäytteiden koostumusta, PYH_Fe_S-yhdistelmänäytteen bakteeriyhteisö kokonaisuudessaan poikkesi aika paljon muiden näytteiden yhteisöistä (Kuva 7, ylempi kuva).

Sulfobacillus-suvun edustajia oli Sbac-alukkeilla tehdyn qPCR-määrittelyn perusteella rikastunut kaikissa B-kaivoksen näytteissä, vaikka ennen tätä tutkimusta tehdyssä bakteeriyhteisöanalyysissä kyseistä sukua ei ollut havaittu. Sbac-alukkeilla tehdyssä määrittelyssä qPCR-tuotetta oli monistunut eniten PYH_Fe_S-yhdistelmänäytteessä. Sulamiskäyräanalyysin perusteella näytti siltä, että eri näytetyypeistä oli syntynyt useaa erilaista monistustuotetta (Kuva 9). Näytteiden S_240, S_500 ja S_600 monistustuotteilla oli matalin sulamispiste, ja näytteiden Fe_240, Fe_500 ja Fe_600 monistustuotteiden sulamispiste oli hieman tätä korkeampi. Korkein sulamispiste oli Fe_Kokooma-näytteen monistustuotteella, jonka sulamishuippukuvaaja osui samalle alueelle *Sulfobacillus benefaciens* -standardilaimennosten monistustuotteen kanssa. S_Kokooma-näyte muodosti yhtenäisen ryhmän PYH-Fe_S-yhdistelmänäytteen kanssa, ja kyseisillä näytteillä sulamispisteet olivat vain hieman Fe_Kokooma-näytettä ja standardilaimennoksia matalammat. Sulamiskäyräanalyysin tulokset voisivat selittyä sillä, että eri näytteissä oli rikastunut osittain eri *Sulfobacillus*-lajeja.



Kuva 9. Sbac-alukkeilla monistettujen B-kaivoksen mikrobirikastusnäytteiden sulamishuippuvaajat.

6 Päätelmät

Tässä tutkimuksessa Acthb-aluepari ei toiminut toivotusti *Acidithiobacillus*-suvun spesifiseen osoittamiseen ja kvantitointiin. Acthb-aluekkeet monistivat epäspesifistä qPCR-tuotetta *Acidithiobacillus*-sukuun kuulumattomista lajeista useassa aluketestaukseen käytetyssä bakteeripuhdasviljelmänäytteessä sekä ilmeisimmin myös A-kaivoksen näytteissä. B-kaivoksen näytteistä Acthb-aluekkeet monistivat onnistuneesti qPCR-tuotteen niistä näytteistä, joissa *Acidithiobacillus*-suvun osuus oli suuri, kun taas *Acidithiobacillus*-osuuden ollessa matalampi tuotetta ei syntynyt. Teoriassa voisi olla mahdollista, että Acthb-aluekkeet ovat monistaneet qPCR-tuotteen vain joistakin näytteen sisältämistä *Acidithiobacillus*-lajeista, jolloin osa lajeista olisi jäänyt osoittamatta. Asian varmistamiseksi syntyneiden qPCR-tuotteiden luonnetta olisi pitänyt selvittää tarkemmin.

Lfp-aluekkeet vaikuttivat tämän tutkimuksen tulosten perusteella käyttökelpoisilta *Leptospirillum*-bakteerisuvun osoittamiseen ja Sbac-aluekkeet *Sulfobacillus*-bakteerisuvun osoittamiseen. Lfp- ja Sbac-aluekkeilla spesifisen qPCR-tuotteen C_p -arvo oli huomattavasti matalampi ja monistuminen voimakkaampaa kuin verrokkilajeilla. B-kaivoksen näytteistä Lfp-aluekkeilla saadut tulokset vastasivat hyvin ennen tätä tutkimusta lontorrent PGM -tehosykvensointimenetelmällä tehdyn bakteeriyhteisöanalyysin tulosta (Kuva 7). Sbac-aluekkeilla puolestaan määritysherkyys osoittautui erityisen hyväksi, koska B-kaivoksen näytteistä monistui spesifistä *Sulfobacillus*-tuotetta, vaikka sukua ei ollut havaittu näytteille aiemmin tehdyssä bakteeriyhteisöanalyysissä. Tässä tutkimuksessa testattujen sukutasolla spesifisten alueparien lisäksi vain yhdessä aiemmassa tutkimuksessa (Aytar ym. 2015, s. 5998) oli kuvattu *Acidithiobacillus*- ja *Leptospirillum*-suvuille spesifiseksi suunnitellut aluekkeet, eikä niidenkään luotettavuutta ollut testattu järjestelmällisesti verrokkilajeilla. Tässä tutkimuksessa toimiviksi havaituille Lfp- ja Sbac-aluekkeille voisi hyvinkin olla kysyntää *Leptospirillum*- ja *Sulfobacillus*-sukujen määrittämiseksi tulevissa tutkimuksissa.

A-kaivoksen näytteiden analysointi jäi tässä työssä melko vaillinaiseksi, koska Acthb-aluekkeilla saadut tulokset viittasivat raudanhapettajien puuttumiseen näytteistä, eikä määrityksiä siksi jatkettu Lfp- tai Sbac-aluekkeilla. B-kaivoksen näytteistä kaikkia tässä tutkimuksessa etsittyjä raudanhapettajabakteerisukuja löytyi eniten PYH_Fe_S-yhdistelmänäytteestä. Sulamiskäyräanalyysien perusteella B-kaivoksen Fe- ja S-näytteiden bakteeriyhteisöt poikkesivat tutkittujen raudanhapettajasukujen osalta toisistaan Lfp- tai

Sbac-alukkeilla tehdyissä määrityksissä. Lfp-alukkeilla lisäksi kaikkein syvimmältä otetut näytteet poikkesivat lähempää maanpintaa otetuista näytteistä.

Tässä tutkimuksessa päästiin asetettuihin tavoitteisiin, koska alukeparit saatiin testattua sekä bakteeripuhdasviljelmillä että kaivosnäytteillä. Opinnäytteelle asetetut oppimistavoitteet täyttyivät hyvin, sillä qPCR-tekniikka tuli tutuksi pintaa syvemältä. qPCR-laitteiston käyttö tuntuu nyt tutummalta, ja työn aikana opitut tulostenkäsittelytaidot antavat mahdollisuuden arvioida tehtyjen määritysten onnistumista itsenäisesti.

Lähteet

Aytar P., Kay C. M., Mutlu M. B., Çabuk A. & Johnson D. B., 2015. Diversity of Acidophilic Prokaryotes at Two Acid Mine Drainage Sites in Turkey. *Environmental Science & Pollution Research*, Vol 22(8), s. 5995–6003.

Bomberg M., Miettinen H., Wahlström M., Kaartinen T., Ahoranta S., Lakaniemi A.-M. & Kinnunen P., 2018. Post Operation Inactivation of Acidophilic Bioleaching Microorganisms Using Natural Chloride-Rich Mine Water. *Hydrometallurgy*, Vol. 180, s. 236–245.

Bomberg M., Mäkinen J., Salo M. & Kinnunen P., 2019. High Diversity in the Iron Cycling Microbial Communities in the Acidic, Iron-Rich Water of the Pyhäsalmi Mine, Finland. *Geofluids*, julkaistavana.

Hedrich S., Guézennec A.-G., Charron M., Schippers A. & Joulian C., 2016. Quantitative Monitoring of Microbial Species during Bioleaching of a Copper Concentrate. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 7, artikkeli 2044.

Julkaisematon VTT:n tuloksetraportti, 2018. Opinnäytteen ohjaaja Malin Bombergin hallussa.

LightCycler® 480 Instrument, Operator's Manual, Software Version 1.5, 2008. Verkkoaineisto. Roche Diagnostics GmbH. <http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/biochem/Core%20Facilities/Data/R401-core/LightCycler480%20II_Manual_V1.5.pdf> . Luettu 16.1.2019.

Liu C.-Q., Plumb J. & Hendry P., 2006. Rapid Specific Detection and Quantification of Bacteria and Archaea Involved in Mineral Sulfide Bioleaching Using Real-Time PCR. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol 94(2), s. 330–336.

Muyzer G., de Waal E.C. & Uitterlinden A.G., 1993. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, Vol 59(3), s. 695–700.

Schippers A., Hedrich S., Vasters J., Drobe M., Sand W. & Willscher S., 2013. Biomining: Metal Recovery from Ores with Microorganisms. Teoksessa Schippers A., Glombitza F. & Sand W. (toim.) *Geobiotechnology I. Sarjassa Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 141, s.1–47. E-kirja. Berlin, Heidelberg: Springer.

486. THIOBACILLUS THIOPARUS (TK-m) MEDIUM, 2015. Verkkoaineisto. DSMZ. <https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium486.pdf> . Luettu 18.1.2019.