

Prokaryoottien PCR-perustaisten
havaintomenetelmien kehittäminen ja
eliöiden tunnistaminen syvän kaivoksen
kivi- ja vesinäytteistä

Hanna Sanmark
Pro gradu –tutkielma
Jyväskylän yliopisto
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Molekyylibiologia
Kesäkuu 2008

Alkusanat

Tämän pro gradu –työn kokeellinen osa tehtiin pääasiassa Turun yliopiston biologian laitoksella, kasvifysiologian ja molekyylibiologian osastolla. Osa DNA-eristyksistä tehtiin Kööpenhaminan yliopistolla muinaisen DNA:n ja evoluution tutkimuskeskuksen puhdaslaboratoriossa. Tutkitut näytteet saatiin Pyhäsalmen kaivoksesta, Pyhäjärveltä.

Haluan kiittää ohjaajaani Kirsi Lehtoa mielenkiintoisen tutkimusaiheen tarjoamisesta ja innostavasta ohjauksesta. Kiitokset Mika Keräselle, Kurt Ståhlelle, Tapani Yli-Mattilalle, Suvi Valkoselle, Arto Peltolalle, Seppo Nokkalalle ja Jonas Binladenille käytännön avusta ja neuvoista. Kiitos myös Petri Saarelalle ja Katja Sahalalle, jotka avustivat näytteenotossa ja antoivat tiedot kaivoksesta ja vesianalyysistä.

Tekijä:	Hanna Sanmark	
Tutkielman nimi:	Prokaryoottien PCR-perustaisten havaintomenetelmien kehittäminen ja eliöiden tunnistaminen syvän kaivoksen kivi- ja vesinäytteistä	
English title:	Development of PCR-based detection methods for prokaryotes, and identification of microbes from deep mine rock and water samples	
Päivämäärä:	13.6.2008	Sivumäärä: 64
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos	
Oppiaine:	Molekyylibiologia	
Tutkielman ohjaaja(t):	Kirsi Lehto	

Tiivistelmä:

Mikrobeja elää kaikkialla maan pinnalla, jopa hyvin äärimmäisissä olosuhteissa kuten kuumissa lähteissä ja suolajärvisissä. Pitkään uskottiin, ettei syvällä maan alla ole elämää. Viime vuosina on löydetty mikrobeja syvältä maaperästä, jopa useiden kilometrien syvyydestä. Näiden mikrobien metabolia on hyvin hidasta. Ne muodostavat kemolitotrofeihin perustuvia ekosysteemejä, jotka käyttävät energian ja hiilen lähteinään maapallon sisällä syntyviä vety-, metaani- ja hiilidioksidikaasuja sekä kiven sisältämiä rauta- ja rikkiyhdisteitä. Ravinteiden ja tilan puute rajoittavat solujen määrää niin, että niitä on hyvin harvassa. Syvä kallioperä ja merenpohjan sedimentit muodostavat kuitenkin niin valtavan kokonaisuuden, että niiden sisällä elävien mikrobien biomassasta muodostaa merkittävän osan maapallon biomassasta.

Vaikka syvän kallioperän mikrobeilla voi olla tärkeä osa monien aineiden kierrossa, niistä tiedetään vielä vain vähän. Syvällä maan alla odottaa löytymistään lukuisia vielä tuntemattomia lajeja, jotka voivat avartaa käsitystämme elämän monimuotoisuudesta, antaa arvokasta tietoa elämän synnystä ja rajoista sekä tarjota uusia välineitä niin teollisuuden, luonnonsuojelun kuin lääketieteenkin tarpeisiin.

Tässä tutkimuksessa pyrittiin kehittämään molekyylibiologisia ja mikrobiologisia menetelmiä mikrobien tunnistamiseksi syvän kaivoksen kivi- ja vesinäytteistä. Tutkittavat näytteet saatiin Pyhäsalmen kaivoksesta, noin 1300 metrin syvyydestä. Näytteissä mahdollisesti elävät mikrobit pyrittiin tunnistamaan eristämällä niistä DNA, monistamalla 16S-rRNA –geeni ja vertaamalla sen sekvenssiä tunnettuihin DNA-sekvensseihin. Kasvatuskelpoisia mikrobeja pyrittiin löytämään viljelemällä näytteitä useilla eri tyyppisillä kasvualustoilla.

Valitettavasti näytteistä ei onnistuttu eristämään tunnistettavissa olevia määriä DNA:ta. Mikrobikasvatuksissa ei löydetty näytteille spesifisiä mikrobeja. Ainoa kasvatusmaljoille kasvanut bakteeri löytyi myös kontrollimaljoilta, mikä osoittaa kontaminaatioiden olevan todellinen ongelma kun tutkitaan näytteitä jotka sisältävät erittäin vähän biologista materiaalia. On siis todettava, että käyttämillämme menetelmillä ei onnistuttu löytämään mikrobeja näistä näytteistä. Opin kuitenkin tutkimuksen aikana paljon paitsi syvän kallioperän mikrobeista, myös tutkimusmenetelmistä sekä tarkkuuden ja kriittisen ajattelun tärkeydestä tieteellisessä tutkimuksessa.

Avainsanat: syvä biosfääri, mikrobi, DNA-eristys, PCR

Author: Hanna Sanmark
Title of thesis: Development of PCR-based detection methods for prokaryotes, and identification of microbes from deep mine rock and water samples
Finnish title: Prokaryoottien PCR-perustaisten havaintomenetelmien kehittäminen ja eliöiden tunnistaminen syvän kaivoksen kivi- ja vesinäytteistä
Date: 13.6.2008 **Pages:** 64
Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Molecular Biology
Supervisor(s): Kirsi Lehto

Abstract:

Microbes live everywhere on Earth, even in very extreme environments, such as hot springs and salt lakes. For a long time it was thought that there is no life in the deep subsurface. Recently microbes have been found in depths of several kilometers within the Earth's crust. These microbes have very slow metabolism. They form ecosystems based on chemolithoautotrophy, using hydrogen, methane and carbon dioxide gases generated in the Earth's crust and iron and sulphur compounds, as their carbon and energy sources. Because nutrients and space are limited, the cell counts in these environments are low. However, the enormous volume of the bedrock and sediments means, that the biomass of this deep biosphere accounts for a significant part of the total biomass on Earth.

Even though the deep biosphere may have an important role in recycling of many materials, very little is known about it. Numerous novel species are waiting to be found in the deep underground. They can broaden our understanding of microbial diversity, provide valuable information on the origin and limits of life, and provide new tools for the needs of industries, environmental protection, and medical sciences.

The aim of this study was to develop molecular and microbiological methods for the detection of microbes in deep mine rock and water samples. The samples were taken in Pyhäsalmi mine, in the depth of 1300 meters. The detection of microbes was done by extracting DNA from the samples, amplifying the 16S rRNA gene, and comparing the gene sequence with known 16S rRNA sequences. Several different growth media were used in cell culture experiments.

Unfortunately no DNA was discovered in the samples. In cell cultures no indigenous microbes were found. The only bacterial species that grew in the cell cultures grew also on the control plates. This shows that contamination is a substantial risk when studying environmental samples with very low biomass. In conclusion, no indigenous microbes were found in the samples with the available methods. During the research I still learned much about the deep biosphere, and also about the methods used, and of the importance of precision and critical thinking in scientific research.

Keywords: deep biosphere, microbe, DNA extraction, PCR

Sisällysluettelo

Alkusanat

Tiivistelmä

Sisällysluettelo

Lyhenteet

1. Johdanto	9
1.1. Syvän biosfäärin tutkimuksen historiaa	9
1.2. Miksi syvän kallioperän mikrobeja tutkitaan?	10
1.2.1. Mikrobien vaikutus öljynporaukseen	10
1.2.2. Saastuneiden maa-alueiden puhdistus	11
1.2.3. Radioaktiivisten jätteiden loppusijoitus	12
1.2.4. Elämän synty ja varhainen kehitys	12
1.2.5. Elämä muilla planeetoilla	12
1.3. Elämä syvällä maan alla	13
1.3.1. Elämän rajat	13
1.3.2. Mikrobien määrä	14
1.3.3. Diversiteetti	15
1.3.4. Metabolinen aktiivisuus	16
1.4. Kallioperän mikrobien aineenvaihdunta	17
1.4.1. Heterotrofit	17
1.4.2. Litoautotrofit	18
1.4.2.1. Sulfaattia pelkistävät bakteerit	19
1.4.2.2. Metalleja pelkistävät bakteerit	19
1.4.2.3. Nitraattia pelkistävät bakteerit	20
1.4.2.4. Metanogeenit	21
1.4.2.5. Homoasetogeenit	21
1.5. Syvän biosfäärin tutkimusmenetelmät	22
1.5.1. Näytteenotto	22
1.5.2. Kontaminaatio-ongelma	22
1.5.3. Mikrobien määrän, aktiivisuuden ja diversiteetin arviointi	24
1.5.3.1. Isotooppianalyysit	24
1.5.3.2. Solukasvatukset	24
1.5.3.3. Aineenvaihdunnan kemialliset analyysit	24
1.5.3.4. Mikroskooppiset menetelmät	25
1.5.3.5. Molekyylibiologiset menetelmät	26
1.5.3.6. Lipidianalyysit	26
1.6. Pyhäsalmen kaivos	27

2. Tutkimuksen tarkoitus	28
3. Materiaalit ja menetelmät	29
3.1. Kontrollilajien kasvatus	29
3.2. Kivi- ja vesinäytteet	30
3.2.1. Kivinäytteet ja niiden käsittely	30
3.2.2. Vesinäytteet ja niiden käsittely	30
3.3. DNA-eristykset	31
3.3.1. DNA-eristys proteinaasi K:n ja lysotsyymiin avulla	31
3.3.2. DNA-eristys Bio-Rad AquaPure Genomic DNA Isolation Kit:llä ...	32
3.3.3. DNA-eristys maaperänäytteille kehitetyllä SDS-pohjaisella menetelmällä	32
3.3.4. DNA-eristys muinaisen DNA:n eristykseen ikiroudasta muokatulla menetelmällä	33
3.3.5. DNA-eristys silikamenetelmällä	34
3.3.6. Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit	34
3.3.7. Eristetyn DNA:n puhdistus	35
3.3.8. DNA-saannon arviointi	35
3.4. PCR	36
3.5. Solukasvatukset vesi- ja kivinäytteistä	37
3.5.1. Kasvatusliuosten ja -maljojen valmistus	37
3.5.2. Solukasvatukset kivinäytteistä	38
3.5.3. Solukasvatukset vesinäytteistä	39
3.5.4. Solukasvatuskontrollit	39
3.6. PCR-tuotteiden sekvensointi ja analysointi	39
3.6.1. PCR-tuotteiden puhdistus	39
3.6.2. Sekvensointi	39
3.6.3. Sekvensointitulosten analysointi	40
3.7. Fluoresenssimikroskopia	40
3.7.1. Kivinäytteiden käsittely	40
3.7.2. DAPI-värjäys	40
3.7.3. Fluoresenssimikroskopia	41
4. Tulokset	42
4.1. DNA-eristysmenetelmien vertailu	42
4.1.1. Uuttomenetelmien vertailu	42
4.1.2. Soluhajotusmenetelmien vertailu	43
4.1.3. DNA-eristys kaupallisella genomisen DNA:n eristyskitillä	43
4.2. PCR-reaktion testaus ja optimointi	44
4.2.1. Annealing-lämpötilan valinta	44
4.2.2. Alukkeiden testaus	45
4.3. PCR kivi- ja vesinäytteistä eristetylle DNA:lle	46
4.3.1. PCR proteinaasi K:n ja lysotsyymiin avulla vesinäytteistä eristetylle DNA:lle	46

4.3.2. PCR-inhibitiotesti kiviäytteistä proteinaasi K:n ja lysosyymin avulla eristetyille DNA:lle	47
4.3.3. PCR puhdistetuille DNA-eristystuotteille	48
4.3.4. PCR kiviäytteistä muinaisen DNA:n eristysmenetelmällä saaduille tuotteille	49
4.3.5. PCR kiviäytteistä silikamenetelmällä saaduille DNA-eristystuotteille	50
4.4. Solukasvatukset kivi- ja vesinäytteistä	51
4.4.1. Sulfolobus solfataricus –kasvatusalustalle kasvaneiden pesäkkeiden analysointi	51
4.4.2. Thiobacillus thioparus –kasvatusalustalle muodostuneiden kiteiden analysointi	54
4.5. Fluoresenssimikroskopia	56
4.5.1. Kiviäytteet	56
4.5.2. Vesinäytteet	56
4.5.3. Thiobacillus thioparus –kasvatusalustalle muodostuneet kiteet	56
5. Tulosten tarkastelu	57
Lähdeluettelo	61

Lyhenteet

16S rRNA	arkkien ja bakteerien ribosomien pienen alayksikön RNA
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	deoksiribonukleiinihappo (deoxyribonucleic acid)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
OD ₆₀₀	optinen tiheys 600 nanometrillä aallonpituudella (optical density)
PCR	polymeraasiketjureaktio (polymerase chain reaction)
PLFA	fosfolipidirasvahappo (phospholipid fatty acid)
rpm	kierrosta minuutissa (revolutions per minute)
rRNA	ribosomaalinen RNA
SDS	natriumdodekyylisulfaatti (sodium dodecyl sulphate)
<i>S. solfataricus</i>	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
T _m	alukkeiden sulamislämpötila
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
UV-valo	ultraviolettivalo

1. Johdanto

Syvällä maan sisällä on runsaasti elämää. Eläviä mikrobeja on löydetty jopa useiden kilometrien syvyydestä maan alta. Löytöjä on tehty merenpohjan sedimenteistä ja niiden alla olevasta peruskalliosta, mantereiden peruskallioista ja niissä olevista ikivanhoista vesiesiintymistä sekä suolakaivoksista. Maan alla odottaa löytymistään suuri määrä vielä tuntemattomia mikrobilajeja joiden fysikaaliset ja biokemialliset ominaisuudet ovat ainutlaatuisia (ks. yleiskatsaus Pedersen, 2000; Cockell 2003).

1.1. Syvän biosfäärin tutkimuksen historiaa

Viitteitä syvällä maan alla elävistä mikrobeista on saatu jo kauan sitten. Öljyesiintymistä ensimmäiset mikrobit löydettiin jo 1920-luvulla (Bastin, 1926). Sisler ja Zobell (1950) tutkivat mikrobien aktiivisuutta meren pohjan sedimenteissä ja löysivät sulfaateja pelkistäviä bakteereja myös syvimmistä näytteistä, noin 55 metrin syvyydestä meren pohjan alta. Useimmat tutkijat eivät kuitenkaan uskoneet, että elämä syvällä maan alla olisi mahdollista. Varhaisia löytöjä pidettiin yleisesti porauksen yhteydessä tulleina kontaminaatioina.

Pitkäaikainen uskomus jonka mukaan kaikki elämä maapallolla on riippuvaista auringon valosta kumoutui, kun vuonna 1977 löydettiin monipuolisia ekosysteemejä syvältä meren pohjasta. Meren syvänteissä, missä ei ole lainkaan valoa, maan kuoren sisältä purkautuu kuumia kaasuja. Näissä syvän meren kuumissa lähteissä on kukoistavia ekosysteemejä, joiden perustana ovat kemosynteettiset bakteerit. Nämä bakteerit käyttävät energianlähteenään maan sisältä purkautuvaa vetysulfidia (Corliss ym., 1979).

Vielä 1980-luvun lopulle asti uskottiin, että maaperän mikro-organismit elävät vain sen päällimmäisissä kerroksissa. Viime aikoina useat tutkimukset ovat kuitenkin osoittaneet, että mikrobeja elää yleisesti myös syvällä maan sisällä. Tämä maanalainen elämä on

riippumatonta auringon energiasta. Vuonna 1987 U.S. Department of Energy (DOE) otti ensimmäiset maaperänäytteet joissa otettiin huomioon kontaminaation estäminen. Tarkoituksena oli tutkia mikrobien vaikutusta saastuneisiin pohjavesiin. Näistä näytteistä löydettiin monenlaisia mikrobeja syvimpään 500 metrin näytteeseen asti. Saman tutkimusohjelman puitteissa on löydetty mikrobeja useista eri paikoista, jopa 2800 metrin syvyydestä ja 75 °C:n lämpötilasta (Fredrickson ja Onstott, 1996).

Sedimenttikivilajit sisältävät orgaanista hiiltä, jota mikrobit voivat käyttää ravintonaan. Mikrobeja elää kuitenkin myös vulkaanisissa kivissä, joissa ne elävät litoautotrofisesti, riippumattomina auringon valosta ja fotosynteesistä. Stevens ja McKinley (1995) löysivät ensimmäisinä tällaisen maanalaisen litoautotrofisen ekosysteemin.

1.2. Miksi syvän kallioperän mikrobeja tutkitaan?

Erikoisissa elinympäristöissä eläviä mikrobeja tutkimalla saadaan arvokasta tietoa maapallon mikrobien diversiteetistä ja elämää rajoittavista tekijöistä. Syvän kallioperän mikrobeilla on kuitenkin myös taloudellista merkitystä useilla erikoisaloilla. Nämä taloudelliset tekijät ovat usein syynä tutkimusprojektien käynnistämiseen.

1.2.1. Mikrobien vaikutus öljynporaukseen

Jo pitkään on tiedetty, että öljyesiintymissä elää mikrobeja, jotka vaikuttavat öljyn koostumukseen ja talteenottoon (Bastin, 1926). Aihetta on tutkittu paljon johtuen sen taloudellisesta merkityksestä öljyteollisuudelle. Öljykentiltä otetuista vesinäytteistä on löydetty ainakin fermentoivia heterotrofisia bakteereja, hypertermofiilisiä arkkeja, sulfaatteja pelkistäviä bakteereja, rautaa pelkistäviä bakteereja ja metanogeenisiä arkkeja (ks. yleiskatsaus Magot ym., 2000; Li ym., 2007).

Mikrobit voivat vaikuttaa öljyn koostumukseen ja öljynporaukseen monin tavoin. Yksi merkittävä ilmiö on biodegradaatio eli orgaanisten aineiden hajoitus. Öljyn ja veden rajapinnoilla elävät mikrobit pilkkovat öljyn sisältämiä hiilivetyjä ja muita aineita, jättäen jäljelle kaikkein suurimmat hiilivedyt. Tällöin öljy muuttuu vähitellen raskaammaksi ja sen taloudellinen arvo laskee. Samalla öljyn happamuus, rikkipitoisuus ja metallipitoisuus kasvavat. Nämä ovat ominaisuuksia jotka myös laskevat öljyn arvoa. Monien rikkiä, happea ja typpeä sisältävien aineiden hajoamistuotteet aiheuttavat korroosio-ongelmia öljynporauksessa (ks. yleiskatsaus Head ym., 2003).

Öljyesiintymien alkuperäisten mikrobiekosysteemien tutkiminen on erityisen vaikeaa, koska kaupallisissa porauksissa käytetty laitteisto ei ole steriiliä. Lisäksi öljykammioon pumpataan usein vettä sen sisäisen paineen säilyttämiseksi, joten kammioon pääsee runsaasti ulkopuolisia mikrobeja. Myös kammion olosuhteiden muuttuminen voi aiheuttaa muutoksia sen luonnolliseen mikrobikoostumukseen (ks. yleiskatsaus Magot ym., 2000).

1.2.2. Saastuneiden maa-alueiden puhdistus

Saastuneiden pohjavesien puhdistus on vaikeaa ja kallista. Usein kuitenkin luonnolliset prosessit hajottavat ja laimentavat maaperään joutuneita myrkyllisiä yhdisteitä. Mikrobit ovat merkittävä osa näitä prosesseja, sillä ne pystyvät muuntamaan orgaanisia yhdisteitä, metalleja ja typpiyhdisteitä vähemmän myrkylliseen muotoon. Lisääntynyt tieto maanalaisista mikrobiekosysteemeistä auttaa meitä arvioimaan ympäristön kykyä toipua saasteista. Se myös parantaa mahdollisuuksiamme puhdistaa saastuneita pohjavesiä keinoitekoisesti lisättyjen bakteerien avulla (ks. yleiskatsaukset Röling ja van Verseveld, 2002; Holliger ym., 1997).

1.2.3. Radioaktiivisten jätteiden loppusijoitus

Useissa maissa suunnitellaan käytetyn ydinpolttoaineen loppusijoitusta syvälle kallioperään. Loppusijoitusjärjestelmiä suunniteltaessa on tärkeää ottaa huomioon myös kallioperän mikrobien vaikutus radioaktiivisen säteilyn leviämiseen sekä säteilyn vaikutus mikrobiekosysteemiin. Jos jätesäiliöiden tuottama säteily ja kuumuus tuhoaisivat lähiympäristönsä mikrobit, kuten pitkään uskottiin, niillä ei olisi vaikutusta jätesäiliöihin. On kuitenkin olemassa ekstreemofiileja, jotka voivat elää myös tällaisissa ääriolosuhteissa. Siksi on tärkeää selvittää voivatko mikrobit aiheuttaa säiliöissä käytettävien materiaalien haurastumista tai kulkeutua säiliöiden pintakerrosten läpi. Mikrobien tuottamat kaasut voivat heikentää säiliöiden kestoa nostamalla painetta. Mikrobit voivat myös vaikuttaa radioaktiivisten aineiden leviämiseen maaperässä monella tavoin, joko lisäten tai vähentäen sitä (ks. yleiskatsakset McKinley ym., 1997; Stroes-Gascoyne ja West, 1997).

1.2.4. Elämän synty ja varhainen kehitys

Elämän synnystä on useita erilaisia teorioita. Joidenkin tutkijoiden mukaan elämä saattoi syntyä syvällä maan alla. Siellä varhaiset eliöt olisivat olleet suojassa säteilyltä ja maan pinnan rajuilta ilmastonmuutoksilta (ks. yleiskatsaus Trevors, 2002).

Maanalaiset litoautotrofiset mikrobiekosysteemit voivat toimia mallina ekosysteemien toiminnasta ennen fotosynteesin kehittymistä. Ne voivat myös selittää elämän jatkumisen maapallolla useista maan pinnan sterilioivista katastrofeista huolimatta. Näitä tapahtumia uskotaan olleen useita maapallon historiassa (Sleep ym., 1989; Cockell, 2003).

1.2.5. Elämä muilla planeetoilla

Organismit jotka elävät maan alla riippumattomina fotosynteesistä osoittavat, että elämälle riittävät ne kemialliset aineet ja energia, jotka ovat osa kaikkien planeettojen kehitystä.

Elämä voi siis olla luonnollinen jatkumo univrsuimissa tapahtuville fysikaalisille ilmiöille (Gold, 1992).

Yleisimmin elämää etsitään naapuriplaneetaltamme Marsista. Marsin pinnalla lämpötila ja paine ovat liian pieniä jotta vesi voisi esiintyä siellä nestemäisessä muodossa. Olosuhteet planeetan alkuaikoina olivat hyvin erilaiset ja saattoivat mahdollistaa nestemäisen veden esiintymisen (Squyres ja Kasting, 1994; Guldbaek Schmidt, 2007). Maan alla vettä saattaa olla vielä nykyisinkin nestemäisenä (Clifford, 1993). Jos näin on, Marsissa voisi syvällä pinnan alla esiintyä litoautotrofista elämää.

Syvällä maan sisällä elävät mikrobit ovat esimerkkejä elämästä joka voisi selvitä Marsin olosuhteissa. Aurinkokunnan alkuaikoina olosuhteet maassa ja Marsissa olivat samantyyppiset, joten elämää saattoi syntyä molemmissa. Marsin pinnalla olosuhteet muuttuivat elinkelvottomiksi, joten jos siellä oli joskus elämää, se joko kuoli tai vetäytyi syvälle maan sisään. Siksi tietoa, jota saadaan maan alla elävistä mikrobeista ja niiden vaikutuksesta ympäristöönsä, voidaan käyttää hyväksi myös etsittäessä mahdollisia elämän merkkejä Marsista (ks. yleiskatsaus Mancinelli, 2000).

Aurinkokunnassamme on useita paikkoja joissa elämä voisi olla teoreettisesti mahdollista. Marsin lisäksi eniten kiinnostusta ovat herättäneet Jupiterin kuu Europa ja Saturnuksen kuut Titan ja Enceladus.

1.3. Elämä syvällä maan alla

1.3.1. Elämän rajat

Syvän biosfäärin elämää rajoittavat paine ja lämpötila sekä ravintoaineiden ja nestemäisen veden saatavuus. Näistä tärkein on luultavasti lämpötila, joka kasvaa syvemmillä mentäessä. Syvyys, jossa lämpötila nousee liian korkeaksi, vaihtelee suuresti eri paikkojen

välillä. Lämpötila nousee meren pohjassa keskimäärin 15 °C / kilometri ja maalla 25 °C / kilometri (ks. yleiskatsaukset Gold, 1992; Fredrickson ja Onstott, 1996; Guerrero, 1998). Tähän mennessä korkein lämpötila, jossa on onnistuttu kasvattamaan mikrobeita, on ollut 121 °C (Kashefi ja Lovley 2003). Näin laskien elämä voisi yltää meren pohjassa noin 8 km:n ja maalla 5 km:n syvyyteen, paikoitellen syvemmällekin.

Ruotsissa, Gravenbergissa, eristettiin termofiilisiä bakteereja 5278 metrin syvyydestä, jossa lämpötila oli 65-75 °C (Szewzyk ym., 1994).

1.3.2. Mikrobien määrä

Maan sisällä elävien mikrobien määrä vaihtelee suuresti paikasta riippuen. Tutkimuksissa ilmoitetut lukemat ovat yleensä välillä 10^3 – 10^7 millilitrassa pohjavettä tai grammassa kiveä. Vaikka nämä määrät ovat pieniä, mikrobien yhteismäärä useiden neliökilometrien alueella on suuri. Kaikkien maan alla elävien mikrobien yhteismäärä on vielä epäselvä, mutta laskelmien mukaan ne muodostavat merkittävän osan maapallon biomassasta (ks. yleiskatsaus Whitman ym., 1998; Cockell, 2003).

Solumäärien arviointi on vaikeaa, koska mikroskoopilla lasketuista soluista vain osa on eläviä ja aktiivisia. Solukasvatuksista saadut lukemat puolestaan ovat todellista pienempiä, koska monet syvän kallioperän mikro-organismeista eivät kasva laboratorio-olosuhteissa, jotka ovat kovin erilaiset kuin niiden luonnollinen elinympäristö.

Tutkimuksissa on löydetty mikrobeja pääasiassa syvästä pohjavedestä. Suurin osa kallioperän mikrobeista elää kuitenkin kiinnittyneinä kiven halkeamien ja huokosten pintaan, mistä niitä on vaikeampi eristää tutkimuksia varten (Pedersen ja Ekendahl, 1990).

1.3.3. Diversiteetti

Maan alla, kiven sisällä, on vain vähän tilaa vedelle ja eläville organismeille. Mikrobit elävät kiven huokosissa, halkeamissa ja vesitaskuissa. Lähes kaikki syvällä kallioperässä elävät mikrobit ovat anaerobisia.

Eri puolilta maailmaa on löydettyjen maanalaisten mikrobiyhteisöjen koostumus vaihtelee suuresti riippuen muun muassa kivityypistä ja veden koostumuksesta. Useimmat maan alta tähän mennessä löydetty mikrobit ovat olleet sukua maan pinnalta tunnetuille ryhmille. Aiemmin tuntemattomia lajeja on kuitenkin löydetty monissa tutkimuksissa.

Esimerkiksi Columbia-joen basalttiryhmästä, läheltä Richlandia, otetuista näytteistä löytyi selvästi eniten sulfaatteja pelkistäviä bakteereja ja metanogeeniä. Näiden määrät näytteissä vaihtelivat välillä 10 – 10000 solua millilitrassa pohjavettä. Lähes kaikissa näytteissä autotrofeja oli moninkertainen määrä heterotrofeihin verrattuna. Näytteiden mikrobikoostumuksissa oli selviä eroja silloinkin, kun näytteenottoaikat olivat vain muutaman metrin päässä toisistaan (Sahl ym., 2008).

Kiinan rannikolla sijaitsevasta öljyesiintymästä löydettiin pääasiassa metanogeenisia arkkeja, fermentoivia bakteereja ja arkkeja, sekä sulfaatteja pelkistäviä bakteereja (Li ym., 2007).

Chinese Continental Scientific Drilling (CCSD) –projektissa tutkittiin kiviläytettä useista eri syvyyksistä 529 - 2,026 metrin välillä. Metalleja pelkistävien *P. agglomerans* – bakteerien sukulaislajit, jotka olivat yleisiä 529 ja 730 metrin näytteissä, puuttuivat kokonaan syvemmistä näytteistä. Syvimmissä näytteissä, jotka sisälsivät runsaasti metaania, yleisimpiä olivat termofiilisen metanotrofin, *M. tepidumin* sukulaislajit (Zhang ym., 2005)

1.3.4. Maanalaisten eliöiden energialähteet ja metabolinen aktiivisuus

Maan alla elävien mikrobien metabolinen aktiivisuus on hyvin hidasta. Niiden sukupolvet ovat luultavasti kuukausien tai vuosien pituisia (Chapelle ja Lovley, 1990; Phelps ym., 1994). Kuitenkin niillä voi olla suuri merkitys maapallon ekosysteemeille.

Pohjavesi voi kuljettaa hitaasti orgaanisia hiiliyhdisteitä maan pinnalta. Sedimenttikivissä voi lisäksi olla yhä jäljellä orgaanisia hiiliyhdisteitä kiven muodostumisen ajoilta. Ne tarjoavat heterotrofisille mikrobeille ravintoa. Tiiviissä vulkaanisissa kivilajeissa veden liike on hitaampaa kuin sedimenteissä, joten ne eivät sisällä orgaanista hiiltä tai happea. Niissä elävien mikrobien on saatava energiaa ja ravintoaineita kiven sisältämistä epäorgaanisista yhdisteistä. Nämä mikrobit ovat siis kemolitoautotrofeja ja riippumattomia auringon energiasta (Stevens ja McKinley, 1995).

Kemolitoautotrofit muodostavat useiden ravintoketjujen metabolin perustan. Planeetan sisäosissa muodostuvat vety-, metaani- ja hiilidioksidikaasut tarjoavat ravintoa syvällä maan sisällä eläville mikrobeille. Kemolitotrofiset eliöt voivat olla esimerkiksi sulfaatteja pelkistäviä, rautaa pelkistäviä tai metaania tuottavia bakteereja. Syvällä maan alla elävien bakteerien metabolinen aktiivisuus voidaan päätellä maanalaisten kaasujen hiilen, rikin ja vedyn eri isotooppien suhteista, jotka viittaavat niiden biologiseen alkuperään. Esimerkiksi Kanadan ja Fennoskandian kilpien alueelta on löydetty mahdollisesti eloperäisiä kaasuja (Sherwood Lollar ym., 1993).

Stevensin ja McKinleyn (1995) teorian mukaan bakteerit käyttävät energianlähteenään vetyä, joka syntyy basaltin sisältämien rautapitoisten mineraalien reagoidessa veden kanssa tuottaen vetyä ja magnetiittia: $3\text{FeO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2 + \text{Fe}_3\text{O}_4$. Suomen, Kanadan ja Etelä-Afrikan prekambriksen kilven halkeamissa veden H_2 -pitoisuudet ovat yksiä suurimmista mitatuista. Tämä mahdollistaa maanalaisille mikrobeille energiarikkaan elinympäristön (Sherwood Lollar ym., 2007).

1.4. Kallioperän mikrobien aineenvaihdunta

Maanalaisten ekosysteemien rakenne riippuu suuresti kiven ja pohjaveden ominaisuuksista. Tutkimuksissa on löydetty sekä heterotrofeja, jotka saavat tarvitsemansa energian ja ravintoaineet muiden eliöiden tuottamista orgaanisista yhdisteistä, että litoautotrofeja, jotka selviävät pelkillä ympäristöstä löytyvillä epäorgaanisilla yhdisteillä.

1.4.1. Heterotrofit

Sedimenttikivissä on usein runsaasti orgaanista ainetta ja niiden huokoinen koostumus päästää pohjaveden levittämään ravinteita. Maanalainen ekosysteemi voi perustua fotosynteesin avulla tuotetun orgaanisen aineen kulkeutumiseen maan alle sedimentaation ja muiden kiven kiertoon liittyvien ilmiöiden kautta. Tällaiset heterotrofiseen metaboliaan perustuvat systeemit ovat kuitenkin rajallisia. Orgaaninen aine vähenee jatkuvasti kulutuksen takia ja muuttuu myös tiivistyessään ja kivityyessään vaikeammin tavoitettavaksi (Stevens ja McKinley, 1995).

Vulkaaniset kivilajit puolestaan eivät sisällä orgaanisia yhdisteitä, ja niissä pohjavesi kulkeutuu maan alle hitaasti vain halkeamia pitkin. Paikoissa, joissa auringon valoa ja orgaanista ainetta ei ole saatavilla, kemolitoautotrofiset primaarituottajat muuntavat epäorgaanisia yhdisteitä orgaaniseen muotoon. Tämä voi ylläpitää monimutkaisen ekosysteemin joka voi siis sisältää myös heterotrofeja. Aineenvaihdunta on kuitenkin tällaisessa ympäristössä erittäin hidasta ja energia kuluu pääasiassa elämän ylläpitämiseen eikä kasvuun.

Heterotrofisia mikrobeja on löydetty syvältä maan alta monissa eri tutkimuksissa. Esimerkiksi Biddle ym. (2006) analysoivat Perun rannikon sedimenttejä, joista löytyi pääasiassa heterotrofisia arkkeja. Graniitin halkeamien sisältämästä pohjavedestä on löydetty muun muassa heterotrofisia metanogeneenejä, jotka käyttävät ravinnokseen asetaattia, metanolia and trimetyyliaminia (Kotelnikova ja Pedersen, 1997). Stevensin ja

McKinleyn (1995) tutkima syvän kallioperän ekosysteemi perustui ilmeisesti vetyä energianlähteenään käyttäviin litoautotrofeihin, jotka tuottavat ravintoa myös heterotrofeille.

1.4.2. Litoautotrofit

Sedimenteistä löytyy usein runsaasti myös litoautotrofeja. Litoautotrofien osuus ekosysteemin energiantuotannossa on epäselvä, kuten myös niiden käyttämien energianlähteiden alkuperä – ovatko niiden käyttämät kaasut peräisin maan sisältä, vai kulkeutuvatko ne huokoisessa kivessä maan pinnalta.

Todennäköinen perusta maanalaiselle ekosysteemille on paikan päällä tapahtuva primäärituotanto joka perustuu geokemiallista alkuperää oleviin energianlähteisiin. Tällaisen tuotannon on oltava kemolitoautotrofista, eli kaikki siinä käytettävä materiaali, elektronin luovuttajat ja vastaanottajat sekä vety, on epäorgaanista ja prosessin tuloksena epäorgaaninen hiili muutetaan orgaaniseksi.

Vulkaanisissa kivissä kiven ja veden vuorovaikutus sekä veden radiolyysi tuottavat elämää ylläpitäviä pelkistys- ja hapettumistuotteita, kuten vetyä ja sulfaatteja (Stevens ja McKinley, 1995; Lin ym., 2005). Paljon pelkistyneitä metalleja, esimerkiksi magnesiumia ja rautaa, sisältävät kivet pystyvät tuottamaan eniten energiaa. Energiaa syntyy hapetus-pelkistysreaktioissa, joita kivissä tapahtuu veden kanssa hapettomissa olosuhteissa. Kivien hidasta hapettumista kutsutaan serpentinisatioksi. Graniitit sisältävät melko vähän rautaa, mutta niissäkin voi olla tarpeeksi rautasilikaatteja vetyä tuottaviin reaktioihin veden kanssa (Stevens ja McKinley, 1995).

Kemolitoautotrofeja on useita erilaisia. Metabolisten ryhmien välinen ero on niiden käyttämä elektroniakseptori. Elektronin luovuttajina voi toimia valtava joukko eri aineita, mutta syvällä maan alla laajimmin saatavissa on vety. Sitä onkin ehdotettu yleiseksi energian lähteeksi maanalaisissa litoautotrofisissa ekosysteemeissä (Stevens ja McKinley,

1995). Esittelen tässä muutamia esimerkkejä maanalaisissa ekosysteemeissä yleisistä metabolisista ryhmistä. Prokaryoottien monia erilaisia metaboliareittejä on esitelty esimerkiksi artikkelissa Martin ja Russell, 2003.

1.4.2.1. Sulfaattia pelkistävät bakteerit

Sulfaatteja pelkistävät bakteerit ovat yleisiä monissa hapettomissa ympäristöissä, kuten soissa ja eläinten ruuansulatuskanavissa. Ne käyttävät hapen sijasta elektronien vastaanottajana sulfaattia, joka pelkistyy sulfidiksi. Elektronin luovuttajina ne voivat käyttää useita eri aineita, joista vety on yleisin syvässä maanalaisissa elinympäristöissä. Energiaa saadaan reaktiosta $4\text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4\text{H}_2\text{O}$.

Useissa eri tutkimuksissa sulfaattia pelkistäviä bakteereja on löydetty myös syvältä maan alta. Esimerkiksi Sass ja Cypionka (2004) löysivät *Desulfovibrio*- ja *Desulfotomaculum* -sukuihin kuuluvia bakteereja hiekkakivistä Saksassa. Baker ym. (2003) löysivät basaltin sisältämistä pohjavesistä runsaasti gram-positiivisia sulfaattia pelkistäviä bakteereja.

Suomessa Haveman ym. (1999) löysivät sulfaattia pelkistäviä bakteereja kaikista neljästä tutkimastaan porausreiästä. Eniten niitä oli paikoissa, joissa on runsaasti pyriittiä. Sen sijaan sulfaatin tai sulfidin määrä pohjavedessä ei ollut yhteydessä näiden bakteerien määrään.

1.4.2.2. Metalleja pelkistävät bakteerit

Monet metalli-ionit voivat toimia elektronin vastaanottajina mikrobien aineenvaihdunnassa. Yleisimpiä näistä ovat rautaioni Fe^{3+} , jonka mikrobit pelkistävät Fe^{2+} -ioniksi, sekä mangaani Mn^{4+} , joka pelkistyy Mn^{2+} :ksi. Kivet sisältävät usein runsaasti metallioksiedeja, joten näitä ioneja on monin paikoin saatavilla (ks. yleiskatsaus Nealson ym., 2002).

Kiinalaisessa tutkimuksessa onnistuttiin kasvattamaan syvän kallioperän vesinäytteistä termofiilisiä ja alkalifiilisiä bakteereja, joista osa pelkisti rautaa Fe(III) –muodosta magnetiitiksi. 529 ja 739 metrin syvyyksissä yleisimmät mikrobit olivat läheistä sukua metalleja pelkistävälle bakteerille *Pantoea agglomeransille* (Zhang ym., 2005). Coloradossa tehdyssä tutkimuksessa osa löydetyistä mikrobeista oli sukua rautaa pelkistävälle litoautotrofile, *Sideooxidans lithoautotrophicukselle* (Sahl ym., 2008).

Myös Suomen kallioperässä rautaa pelkistävät bakteerit ovat yleisiä, erityisesti paikoissa joissa pojavesi sisältää runsaasti rautaa (Haveman ym., 1999).

1.4.2.3. Nitraattia pelkistävät bakteerit

Monet fakultatiiviset anaerobit käyttävät nitraattia (NO_3^-) elektronin vastaanottajana. Tätä yleistä aineenvaihduntareittiä käyttävät monet proteobakteerit. Lopputuotteena on nitriitti (NO_2^-), typpioksidi (NO tai N_2O) tai typpikaasu (N_2). Reaktio tapahtuu asteittain ja lopputuote riippuu siitä, onko mikrobilla kaikki tähän metaboliaketjuun tarvittavat entsyymit.

Zhangin ym. (2005) tutkimuksessa kiviinäytteistä tutkitut DNA-sekvenssit viittasivat siihen, että yleisin mikrobiryhmä näytteissä oli *Proteobacteria*. Suurin osa mikrobeista oli sukua nitraattia pelkistäville suolaisen, emäksisen ja kylmän ympäristön mikrobeille. Yksi yleinen ryhmä oli läheistä sukua *Pseudomonas pseudoalcaligenes*-bakteerille, joka pelkistää nitraattia typpikaasuksi.

Runsaasti metalleja sisältävistä graniittinäytteistä Coloradossa löydettiin muun muassa bakteereja, jotka ovat läheistä sukua *Ralstonia metalliduransille*. Tämä vetyä hapettava litoautotrofi pystyy ottamaan energiansa vedystä ja hiilidioksidista käyttäen esimerkiksi nitraattia elektronin vastaanottajana (Sahl ym., 2008).

1.4.2.4. Metanogeenit

Metanogeenit ovat arkkeja, joiden aineenvaihdunta tuottaa metaania hapettomissa olosuhteissa. Ne ovat yleisiä eläinten suolistoissa ja soilla, missä ne tuottavat suokaasuja. Sedimenteissä niitä on pääasiassa syvemmissä kerroksissa, joissa on vähän sulfaattia. Hydrogenotrofiset metanogeenit käyttävät hiilidioksidia hiilen lähteenä ja vetyä elektronin luovuttajana: $4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$.

Kotelnikova ja Pedersen (1997) löysivät Ruotsissa graniitin halkeamista useita erilaisia metanogeenia, joiden todettiin myös olevan metabolisesti aktiivisia. Näihin kuului myös aikaisemmin tuntematon *Methanobacterium*-suvun jäsen.

Metanogeenia oli paljon Stevensin ja McKinleyn (1995) tutkimissa näytteissä. Runsaasti sulfaattia sisältävissä näytteissä metanogeenia oli selvästi vähemmän kuin muissa näytteissä.

1.4.2.5. Homoasetogeenit

Kuten metanogeenit, myös asetogeenit käyttävät aineenvaihdunnassaan vetyä ja hiilidioksidia. Niillä lopputuotteena on kuitenkin asetaatti: $4\text{H}_2 + 2\text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2\text{O}$.

Stevensin ja McKinleyn (1995) tutkimuksessa asetogeenisiä bakteereja havaittiin runsaasti kaikissa basaltista otetuissa pohjavesinäytteissä. Myös Ruotsissa tutkituista pohjavesinäytteistä löydettiin aktiivisia homoasetogeenia (Kotelnikova ja Pedersen, 1997).

1.5. Syvän biosfäärin tutkimusmenetelmät

1.5.1. Näytteenotto

Syvältä maan alta ei ole helppoa saada näytteitä mikrobiologisia tutkimuksia varten. Jotta näihin ympäristöihin päästään käsiksi, vaaditaan laajoja poraus- ja kaivuuprojekteja. Todella syviä porauksia on tehty vain vähän, eikä niitä yleensä ole tehty erityisesti mikrobiologista tutkimusta varten. Porausten lisäksi kaivokset ja luolat mahdollistavat näytteiden oton syvältä maan alta.

Näytteitä otettaessa on pyrittävä estämään niiden kontaminoituminen ja kemiallinen muuttuminen. Olosuhteiden on oltava mahdollisimman steriilit eivätkä näytteiden kemiallinen koostumus, pH ja happipitoisuus saisi muuttua. Näytteet pyritään aina tutkimaan mahdollisimman nopeasti, mutta usein niitä joudutaan ensin kuljettamaan pitkiäkin matkoja. Kivinäytteiden kohdalla suurin riski on näytteiden pintakerroksissa, joten juuri ennen tutkimista otetaan pienempi näyte kiven sisältä.

1.5.2. Kontaminaatio-ongelma

Näytteenotossa on aina mikrobikontaminaation riski joka on huomioitava menetelmissä ja tuloksia tarkastellessa. Usein näytteitä otetaan paikoista, joissa maan sisään on kaivauduttu kaupallisista syistä, kuten kaivoksista ja öljyesiintymistä. Tällöin on selvää, että ympäristöstä on saattanut päästä näytteeseen mikrobeja. Kuitenkin myös biologista tutkimusta varten järjetetyissä projekteissa on vaikea kontrolloida mikrobikontaminaatioita.

Graniitti ja basaltti ovat yleisimmät ja myös kovimmat kivilajit. Niissä vettä löytyy erilaisista murtumista. Näytteiden ottaminen syvältä tällaisista kivistä on vaikeaa ja vaatii voimakasta porausta (ks. yleiskatsaus Guerrero, 1998). Otettaessa näytteitä poraamalla on

vaarana että porausnesteen mukana pääsee mikrobeja näytteeseen. Tätä voidaan estää käyttämällä steriiliä porausnestettä ja lisäämällä siihen merkkiaineita, jotka paljastavat onko näyte ollut kosketuksissa porausnesteen kanssa. Myös porauslaitteiston tulisi olla steriili, eivätkä polttoaine, öljy tai muut porauksessa tarvittavat aineet saisi päästä kosketuksiin näytteen kanssa. Täysin steriiliä näytteenottotilannetta on kuitenkin hyvin vaikea järjestää. Mitä kovempaa kiveä porataan, sitä enemmän tarvitaan voimaa ja samalla kontaminaatioiden riski kasvaa. Syvissä porauksissa tarvitaan aivan uudenlaisia poraustekniikoita steriilien olosuhteiden varmistamiseksi (Pedersen ja Ekendahl, 1990).

Jotta porausneste ei muuttaisi näytteiden mikrobikoostumusta tai kemiallisia ominaisuuksia, sen on oltava steriiliä ja mahdollisimman reagoimatonta. Colwell ym. (1992) käyttivät tähän tarkoitukseen porausnesteen sijasta argonkaasua.

Mahdollisten biologisten ja kemiallisten kontaminaatioiden havaitsemiseksi voidaan käyttää monia erilaisia merkkiaineita. Nämä aineet kulkeutuvat näytteessä mikrobien, nesteiden tai kaasujen tavoin. Jos näytteestä ei löydetä merkkiainetta, voidaan olettaa että samoin käyttäytyvät kontaminaatiot eivät myöskään ole päässeet näytteeseen. Onnistuneesti on käytetty esimerkiksi fluoresoivia mikroskooppisia helmiä, litiumbromidia ja perfluorihilivetyjä (Colwell ym., 1992).

Tehokas tapa erottaa kontaminaatiot näytteille ominaisista mikrobeista on fosfolipidirasvahappo (PLFA) –analyysi. Vertaamalla näytteiden rasvahappokoostumusta ympäristön ja näytteenottovälineiden rasvahappokoostumukseen voidaan nähdä niiden välillä selvä ero (Lehman ym., 1995).

Myös löydettyjen mikrobien ominaisuuksista voidaan usein päätellä paljon niiden alkuperästä. Esimerkiksi kuumasta ympäristöstä otetuista näytteistä löydetyt termofiiliset bakteerit ovat todennäköisesti tutkittavalle paikalle ominaisia. Kuumasta ympäristöstä löydetyt mikrobit, jotka eivät kestä korkeita lämpötiloja, ovat luultavasti joko epäaktiivisia tai tutkittavan ympäristön ulkopuolelta näytteeseen tulleita (Zhang ym., 2005; Li ym., 2007).

1.5.3. Mikrobin määrän, aktiivisuuden ja diversiteetin arviointi

1.5.3.1. Isotooppianalyysit

Bakteerit suosivat aineenvaihdunnassaan aineiden kevyempiä isotooppeja. Niiden aktiivisuudesta ja diversiteetistä saadaan siksi tietoa vertaamalla isotooppien määriä energianlähteinä käytetyissä aineissa ja metaboliatuotteissa (ks. yleiskatsaus Lichtfouse, 2000). Esimerkiksi metanogeenien tuottama metaani sisältää enemmän hiilen C^{12} -muotoa suhteessa C^{13} -muotoon kuin epäorgaaninen metaani (Belyaev ym., 1983; Sherwood Lollar ym., 1993).

1.5.3.2. Solukasvatukset

Perinteinen tapa elinkykyisten mikrobin laskemiseen on niiden kasvattaminen sopivalla kasvualustalla (Pedersen ja Ekendahl, 1990; Haveman ym. 1999). Suurta osaa näistä vaikeisiin olosuhteisiin erikoistuneista mikrobeista ei kuitenkaan ole onnistuttu kasvattamaan laboratorio-olosuhteissa, joten tällä menetelmällä ei saada luotettavia tuloksia mikrobin ja eri lajien määristä. Käyttämällä useita erilaisille metabolisille ryhmille tarkoitettuja kasvualustoja voidaan kuitenkin onnistua kasvattamaan joitakin näytteen sisältämistä mikrobeista, joista osa voi olla ennestään tuntemattomia lajeja. Vain niistä lajeista, joita onnistutaan kasvattamaan laboratorio-olosuhteissa, päästään tutkimaan perusteellisesti lajin morfologiaa, aineenvaihduntaa ja muita ominaisuuksia (Kotelnikova ja Pedersen, 1997).

1.5.3.3. Aineenvaihdunnan kemialliset analyysit

Bakteerien aktiivisuutta voidaan yrittää arvioida niiden käyttämien ja tuottamien aineiden määristä. Tiettyyn metaboliseen ryhmään kuuluvien mikrobin todennäköistä määrää

tutkitaan kasvattamalla näytteitä sopivassa kasvatusliuoksessa ja mittaamalla mikrobien aineenvaihdunnan lopputuotteiden määrä. Esimerkiksi sulfaatteja pelkistävien bakteerien metabolisen aktiivisuuden arvioimiseksi mitataan niiden aineenvaihdunnassa syntyvän sulfidin määrä (Pedersen ja Ekendahl, 1990). Metanogeenien tutkimiseksi mitataan metaanin määrä ja asetogeenien kohdalla asetogeenin määrä (Kotelnikova ja Pedersen, 1997; Haveman ym. 1999).

Kun kasvatukseen lisätään ^{14}C - ja ^3H -leimattuja ravintoaineita, niiden vähentymisestä nähdään eri tyyppisten mikrobien aktiivisuus näytteessä (Pedersen ja Ekendahl, 1990).

Syvien maanalaisten näytteiden kohdalla on yleensä mahdotonta tehdä näitä kokeita näytteenotto paikalla, joten näytteet on kuljetettava laboratorioon ja tutkittava siellä. Tällöin olosuhteet muuttuvat ja tulokset eivät vastaa tilannetta bakteerien omassa elinympäristössä (Chapelle ja Lovley, 1990).

1.5.3.4. Mikroskooppiset menetelmät

Näytteiden sisältämät mikrobit saadaan esiin värjäämällä ne spesifisesti fluoresoivilla väriaineilla ja tutkimalla niitä fluoresenssimikroskoopilla (ks. yleiskatsaus Kepner ja Pratt, 1994). Yleisiä DNA:han sitoutuvia väriaineita ovat akridiinioranssi (Pedersen ja Ekendahl, 1990) ja 4',6-diamidino-2-phenylindole eli DAPI (Haveman ym. 1999).

Autofluoresoivia mikrobeja voidaan tutkia mikroskoopilla myös ilman värjäystä. Esimerkiksi metanogeenit sisältävät runsaasti F_{420} -elektroninsiirtäjää, joka sinisellä valolla aktivoituna tuottaa sinivihreää valoa (Kotelnikova ja Pedersen, 1997).

Mikroskooppisilla menetelmillä voidaan laskea mikrobien kokonaismäärä näytteissä. Ne eivät kuitenkaan anna tietoa metabolisesta aktiivisuudesta ja elävien solujen määrästä. Lajikoostumuksesta voidaan mikroskooppikuvien perusteella sanoa vain vähän.

1.5.3.5. Molekyylibiologiset menetelmät

Molekyylibiologisilla menetelmillä voidaan eristää ja tutkia mikrobien DNA:ta. Vertaamalla löydettyjä DNA-sekvenssejä ennestään tunnettuihin sekvensseihin voidaan tehdä päätelmiä siitä, minkä tyyppisiä mikrobeja näyte sisältää. Yleisin tapa tällaisissa analyyseissä on monistaa näytteestä ribosomien sisältämän 16S-rRNA:n koodaava geeni (Weisburg ym., 1991; Sahl ym., 2008). Tämä vaatii tehokkaita DNA-eristysmenetelmiä jotta syvän maaperän näytteiden sisältämät hyvin pienet DNA-määrät saadaan talteen ja päästään eroon näytteiden usein sisältämistä PCR-reaktiota estävistä aineista (Webster ym., 2003).

DNA-analyysi on tehokas työkalu mikrobien kokonaisdiversiteetin määrittämisessä, mutta se ei anna tietoa elävien solujen määrästä. Lisäksi DNA:n eristys ja PCR-monistus suosivat tiettyjä lajeja, erityisesti kun biologisen materiaalin määrä näytteissä on pieni. Siksi näiden menetelmien avulla saatu mikrobidiversiteetti ei aina täysin vastaa todellista tilannetta (Webster ym., 2003).

1.5.3.6. Lipidianalyysit

Lipidianalyysien avulla voidaan arvioida näytteiden sisältämien elävien solujen biomassaa, mikrobikoostumusta ja mikrobiyhteisön fysiologista ja ravitsemuksellista tilannetta. Näytteistä eristetään lipidit ja eri tyyppiset lipidit erotetaan toisistaan. Erilaisten rasvahappojen suhteelliset määrät määritetään kromatografisilla menetelmillä (White ym., 1996; Sahl ym., 2008).

Fosfolipidirasvahapot eli PLFA:t hajoavat nopeasti solun kuoleman jälkeen, joten niitä tutkimalla saadaan tietoa juuri elävistä mikrobeista. Fosfolipidien määrän perusteella voidaan arvioida elävien solujen määrää. Fosfolipidit hajoavat solun kuoleman jälkeen ympäristön entsyymien vaikutuksesta diglyserideiksi. Vertaamalla fosfolipidien ja diglyseridien määriä saadaan arvio siitä, kuinka suuri osa näytteen sisältämistä soluista on eläviä (White ym., 1996).

Kullakin solutyypillä on ainutlaatuinen PLFA-koostumus. Rasvahappokoostumusta analysoimalla voidaan päätellä, minkä tyyppisiä mikrobeja näyte sisältää, ja jopa arvioida niiden fylogeneettisiä suhteita samaan tapaan kuin DNA-analyyseilla. Analyyseja voidaan tarkentaa tukimalla myös muita näytteen sisältämiä lipidejä (White ym., 1996).

Myös ympäristö vaikuttaa solujen lipidikoostumukseen säätelemällä niiden aineenvaihduntareittejä. Siksi lipidit kertovat myös solujen reaktioista ympäristöönsä. Kun tunnetaan bakteerien lipidiaineenvaihduntaan liittyviä mekanismeja, voidaan lipidikoostumuksesta päätellä paljon solun ravintotilanteesta, energiansaannista, stressireaktioista ja aineenvaihdunnasta (White ym., 1996).

1.6. Pyhäsalmen kaivos

Pyhäsalmen kaivos Pyhäjärvellä Keski-Suomessa on Euroopan syvin metallikaivos. Sen syvin kohta on 1416 metrin syvyydessä. Kaivos tuottaa kuparia, sinkkiä ja pyriittiä. Malmi on massiivista pyriittiä, josta 70 % on sulfideja (Saltikoff ym. 2006). Malmilöytö tehtiin vuonna 1958 ja vuonna 2002 kaivos siirtyi Outokumpu Oyj:ltä kanadalaisen Inmet Mining Corporation:n omistukseen.

Fennoskandian kilpi on todella vanhan kallioperän alue, johon kuuluvat Suomi, Ruotsi, Norja ja Venäjän luoteisosa. Fennoskandian kilven vanhimpien kivien ikä on 3,5 miljardia vuotta. Pyhäsalmen on vulkaanisen massiivisen sulfidimalmin (VMS) esiintymä, joka sijaitsee paleoproterotsooisien svekofennisen alueen laidalla. Alue on svekofennisen alueen vanhinta. Kiven ikä on 1,92 miljardia vuotta. (ks. yleiskatsaus Weihed ym., 2005).

2. Tutkimuksen tarkoitus

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli kehittää menetelmiä syvän kallioperän ja pohjaveden mikrobien havaitsemiseksi. Pääasiallisia menetelmiä olivat DNA- eristykset suoraan näytteistä, PCR, PCR-tuotteiden sekvensointi ja DNA-sekvenssien fylogeneettinen analyysi. Näiden molekyylibiologisten menetelmien rinnalla käytettiin mikrobikasvatuksia ja fluoresenssimikroskopiaa. Kehitettyjen menetelmien avulla etsittiin mikrobeja Pyhäsalmen kaivoksesta otetuista syvän kallioperän ja pohjaveden näytteistä.

3. Materiaalit ja menetelmät

3.1. Kontrollilajien kasvatus

Eri soluhajotusmenetelmien ja DNA-eristysmenetelmien testaamista varten kasvatettiin kolmea eri tyyppistä mikrobia.

Gram-negatiivisena malliorganismina käytettiin *Escherichia colia*. Kasvatus aloitettiin -70°C:n lämpötilassa glyserolissa säilytyistä soluista, joita siirrettiin steriilillä tikulla pieni määrä koeputkeen joka sisälsi noin 3 ml Luria-Bertani-kasvatusliuosta (LB). Tämä kasvatusliuos sisältää 10 g tryptonia, 5 g hiivauutetta ja 10 g natriumkloridia litrassa liuosta. Soluja kasvatettiin 37°C:ssa ravistelussa yli yön.

Gram-positiivinen bakteeri *Bacillus subtilis* tilattiin Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH:lta (DSMZ). Kuivatut solut liuotettiin LB-kasvatusliuokseen ohjeen mukaisesti. Soluja kasvatettiin 37°C:ssa ravistelussa yli yön. Solulinjan ylläpitämiseksi tehtiin myös maljakasvatus.

Arkki *Sulfolobus solfataricus* tilattiin myös DSMZ:lta. Aktiivisena liuoskasvatuksena saapuneet solut siirrettiin 250ml:n korkillisiin säilöpulloihin, jotka sisälsivät noin 10ml *Sulfolobus solfataricus* -kasvatusliuosta (DSMZ medium 182). Tämä kasvatusliuos sisältää 2 g hiivauutetta, 3,1 g KH_2PO_4 , 2,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ja 0,25 g CaCl_2 litrassa liuosta ja sen pH on 3,5. Soluja kasvatettiin suljetussa pullossa 80 °C lämpötilassa.

DNA-eristystä varten kustakin solukasvatuksesta mitattiin spektrofotometrillä OD_{600} -arvo solumäärän arvioimiseksi. Nämä arvot otettiin huomioon DNA-saantoja laskettaessa. Solut kerättiin sentrifugoimalla (14000 rpm, 1 min).

3.2. Kivi- ja vesinäytteet

3.2.1. Kivinäytteet ja niiden käsittely

Kivinäytteet saatiin Pyhäsalmen kaivoksesta, 1300 metrin syvyydestä. Seinämästä juuri räjäytetyt lohkat kerättiin steriiliin muovipussiin ja kuljetettiin laboratorioon. Lohkareiden pinta steriloitiin UV-valolla mahdollisten kontaminaatioiden poistamiseksi. Lohkareiden sisältä porattiin näytteet steriileillä välineillä ja näytteet jauhettiin kivimyllyssä. Kivijauhe säilytettiin -70 °C :ssa.

3.2.2. Vesinäytteet ja niiden käsittely

Pyhäsalmen kaivoksesta, 1300 metrin syvyydestä, kairareikästä valuvasta vedestä otettiin näytteet steriileihin 50 ml:n putkiin. Aikaisemman analyysin mukaan vesi oli hiukan emäksistä ja melko suolaista, ja sen lämpötila oli 18 °C (Taulukko1). Näytteet säilytettiin -20 °C :ssa. DNA-eristyksiä ja kasvatusmaljojen valmistusta varten vesinäytteitä konsentroidiin sentrifugoimalla (30 min, noin 1000 g).

Taulukko 1. Keväällä 2004 tehdyn vesianalyysin tulokset. Analyysi on tehty atomispektroskopiolla (AAS). Tiedot antoi Petri Saarela.

pH	8.0
johtavuus	1899*1.06=2013
Zn	0.12 mg/l (ppm)
Cu	0.08 mg/l
Fe	0.36 mg/l
Mn	0.11 mg/l
suolat (ei eritelty)	19900 mg/l
sulfaatti SO ₄	171 mg/l
lämpötila	18 °C

3.3. DNA-eristykset

Useita eri solunhajotus- ja DNA-eristysmenetelmiä kokeiltiin gram-negatiiviselle bakteerille *E. colille*, gram-positiiviselle bakteerille *B. subtilikselle* sekä arkki *S. solfataricukselle*. Tarkoituksena oli löytää menetelmä, joka olisi mahdollisimman tehokas eri tyyppisille mikrobeille. Tehokkaimmiksi havaitut menetelmät valittiin DNA:n eristämiseksi kivi- ja vesinäytteistä. Näytteille käytettiin myös maanäytteille kehitettyä SDS-pohjaista menetelmää (Zhou ym., 1996). Lisäksi kokeiltiin muinaisen DNA:n eristykseen ikiroudasta tarkoitettua menetelmää joka oli muokattu maanäytteille tarkoitettusta menetelmästä (Bulat ym., 2000), sekä silikamenetelmää.

3.3.1. DNA-eristys proteinaasi K:n ja lysotsyymien avulla

Solujen hajotukseen kokeiltiin lysotsyymiä, proteinaasi K:ta sekä näiden yhdistelmää.

Lysotsyymimenetelmässä solut suspensoitiin 250 µl:aan eristyspuskuria (50 mM Tris-HCl [pH 8,5], 5 mM Na-EDTA [pH 8,0], 50 mM NaCl) ja suspensioon lisättiin 37,5 µl lysotsyymiliuosta (50 mg/ml) sekä 5 µl Rnaasia (100 µg/ml). Entsyymien annettiin vaikuttaa 15 min 37 °C:ssa. Suspensioihin lisättiin 8,5 µl 30 % N-lauryylisarkosiinia ja inkubaatiota jatkettiin 15 min.

Proteinaasi K –menetelmässä solut suspensoitiin 300 µl:aan hajotuspuskuria. Tämä puskuuri sisältää 50 mM Tris-Hcl [pH 7,8], 50 mM Na-EDTA, 150 mM NaCl, 2 % N-lauryylisarkosiinia, 500 mM 2-merkapttoetanolina ja 600 µg/ml Proteinaasi K:ta. Näytteitä inkuboitiiin 65 °C:ssa 3-4 tuntia välillä ravistellen.

Näiden menetelmien yhdistelmässä tehtiin ensin proteinaasi K-käsittely kuten yllä on kerrottu. Tämän jälkeen näytteisiin lisättiin lysotsyymi ja Rnaasi kuten lysotsyymimenetelmässä. Entsyymien annettiin vaikuttaa 30 min 37 °C:ssa.

Solujen hajotuksen jälkeen DNA erotettiin suspension muista komponenteista vesifaasiin uuttamalla joko fenoli-kloroformi-isoamyylialkoholilla (25:24:1) tai kloroformi-oktanolilla (24:1). Uutto toistettiin kunnes proteiineja ei enää saostunut faasien väliin. Viimeinen uutto tehtiin kloroformilla.

DNA saostettiin joko nopeasti lisäämällä 0,6 osaa isopropanolia tai antamalla saostuksen tapahtua 2,5-kertaisessa tilavuudessa kylmää absoluuttista etanolia yön yli $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. DNA kerättiin sentrifugoimalla ($18000 \times g$, 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), pestiin kerran 70 % etanolilla ja liuotettiin 50 μl :aan steriiliä vettä.

3.3.2. DNA-eristys Bio-Rad AquaPure Genomic DNA Isolation Kit:llä

Eristys suoritettiin valmistajan ohjeen (3.6 Protocol for Extraction of DNA from Gram-Negative Bacteria) mukaisesti.

3.3.3. DNA-eristys maaperänäytteille kehitetyllä SDS-pohjaisella menetelmällä (Zhou ym., 1996)

Noin 2,5 g kivinäytettä sekoitettiin 6,75 ml:aan eristyspuskuriä (100 mM Tris-HCl [pH 8,0], 100 mM Na-EDTA [pH 8,0], 100 mM natriumfosfaatti [pH 8,0], 1,5 M NaCl) ja lisättiin 25 μl Proteinaasi K:ta (20 mg/ml). Näytteitä inkuboitiiin $37\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa ravistelussa (225 r.p.m.) 30 minuuttia. Näytteisiin lisättiin 1,5 ml 10 % SDS:a ja niitä inkuboitiiin $65\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa 2 tuntia käännellen putkia varovasti 20 minuutin välein. Sentrifugoinnin (6000 g , 10 min, huoneenlämmössä) jälkeen supernatantti otettiin talteen. Pelletit käsiteltiin vielä kaksi kertaa lisäämällä 2,25 ml eristyspuskuriä ja 0,5 ml 10 % SDS:a, vorteksoimalla 10 s, inkuboimalla $65\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa 10 min ja sentrifugoimalla kuten edellä. Näiden kolmen eristyksen supernatantit yhdistettiin ja puhdistettiin fenoli-kloroformiuutolla. DNA saostettiin 0,6-kertaisella tilavuudella isopropanolia ja kerättiin sentrifugoimalla (16000 g , 20 min, huoneenlämmössä). Se pestiin 70 % etanolilla ja liuotettiin 500 μl :aan steriiliä vettä.

3.3.4. DNA-eristys muinaisen DNA:n eristykseen ikiroudasta muokatulla menetelmällä

DNA-eristys tehtiin Kööpenhaminan yliopistolla muinaisen DNA:n ja evoluution tutkimuskeskuksen puhtaslaboratoriossa. Tämä laboratorio on eristetty tila jossa on positiivinen ilmanpaine. Kaikki pinnat käsitellään UV-valolla joka yö ja puhdistetaan desinfioivalla aineella viikoittain. Työntekijät käyttävät puhtaslaboratoriossa aina suojahaalareita, kasv suojuksia ja kumihanskoja.

Eristyksessä käytettiin FastPrep®-laitetta (Qbiogene) solujen hajottamiseksi. Fast Prep –putkiin punnittiin noin 1 g kivijauhetta. Jauhe sekoitettiin 600 µl:aan hajotuspuskuria, joka sisälsi 20 mg/ml sarkosiinia, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA, 150 mM NaCl, 35 µl/ml 2-merkaptoetanolia, 800 µg/ml proteinaasi K:ta, 50 mM DTT ja 2 mM PTB. Putkia ravisteltiin Fast Prep –koneessa täydellä teholla 45 sekunnin jaksoissa 4 – 7 kertaa. Putkien annettiin olla ravistelussa 55 °C lämpötilassa yön yli. Putkiin lisättiin 300 µl 5 M NaCl ja 750 µl kloroformi-oktanoliseosta (24:1). Putkien sisältö sekoitettiin ravistelemalla niitä lyhyesti Fast Prep –koneessa, minkä jälkeen niiden annettiin olla huoneenlämpötilassa vähintään 20 minuuttia. Vesi- ja kloroformifaasit erotettiin toisistaan sentrifugoimalla (12000 g 2 min). Päällimmäisenä oleva vesifaasi siirrettiin uuteen putkeen ja sentrifugointi toistettiin. Supernatantti siirrettiin 15 ml:n putkeen johon lisättiin PB-puskuria (Qiagen, cat.no. 19066) viisi kertaa supernatantin tilavuuden verran, ja sekoitettiin ravistamalla käsin. Liuos siirrettiin 650 µl kerrallaan QIAquick-suodatinputkiin joita sentrifugoitii 1 minuutti 10000 g:ssä. Suodos poistettiin putkesta ja sentrifugointi toistettiin, kunnes koko liuos oli suodatettu. Putkiin lisättiin 500 µl Salton wash #1 –puskuria (GENECLEAN® for Ancient DNA Kit, Qbiogene, cat.no. 1002-200) ja niitä sentrifugoitii jälleen 1 min 10000 g:ssä. Sama toistettiin Salton wash #2 –puskurilla (GENECLEAN® for Ancient DNA Kit, Qbiogene, cat.no. 1002-200) ja AW #1 –puskurilla (DNeasy Tissue Kit, Qiagen, cat.no. 69504). AW #2 -puskuria (DNeasy Tissue Kit, Qiagen, cat.no. 69504) lisättiin 500 µl ja sentrifugoitii 3 min 15000 g:ssä kaksi kertaa, jotta kaikki etanoli saatiin poistettua näytteistä. QIAquick-putki asetettiin puhtaaseen 1,5 ml:n putkeen ja DNA eluoiitiin siihen lisäämällä suodattimen keskelle 100 µl EB-puskuria (Qiagen, cat.no.

19086), antamalla DNA:n liueta siihen 10 min huoneenlämpötilassa, ja sentrifugoimalla 1 min 10000 g:ssä. Eluointi toistettiin uuteen putkeen, jotta kaikki DNA saatiin varmasti talteen.

3.3.5. DNA-eristys silikamenetelmällä

Fast Prep –putkiin punnittiin n. 1 g kivijauhetta. Jauhe sekoitettiin 600 µl:aan hajotuspuskuria kuten kohdassa 3.3.4. Putkia ravisteltiin Fast Prep –koneessa täydellä teholla 45 sekunnin jaksoissa 4 – 7 kertaa. Putkien annettiin olla ravistelussa 55 °C:n lämpötilassa yön yli. Kivijauhe sentrifugoitiin putkien pohjalle 2 min täydellä teholla. Supernatantti siirrettiin 18 ml:aan L2-puskuria (26 g GuSCN, 16,5 ml 1 M Tris [pH 8,0], 180 µl 5 M NaCl, 20 µl 37 % HCl) ja lisättiin 100 µl silikaa. Silikan annettiin sitoutua DNA:han kolme tuntia ravistelussa huoneenlämmössä. Putkia sentrifugoitiin 1 minuutti täydellä teholla ja supernatantti poistettiin. Putkiin lisättiin 1 ml L2-puskuria ja suspensio siirrettiin uusiin 2 ml:n putkiin. Putkia sentrifugoitiin 5 sekuntia, supernatantti poistettiin ja silika suspensoitiin 1 ml:aan NewWash-puskuria (Bio 101 systems, cat.no. 1001-202). Putkia sentrifugoitiin 10 sekuntia, supernatantti poistettiin, putkia sentrifugoitiin uudestaan lyhyesti ja poistettiin jäljelle jäänyt neste. Silika kuivattiin 65 °C:ssa 5 minuuttia. Putkiin lisättiin 100 µl TE-puskuria (10 mM Tris [pH 8], 1 mM EDTA [pH 8]) ja DNA:n annettiin liueta siihen 8 minuuttia 56 °C:ssa. Silika sentrifugoitiin putkien pohjalle 1 minuutti täydellä teholla. DNA:n sisältävä TE-puskuri siirrettiin puhtaaseen putkeen ja säilytettiin – 20 °C:ssa.

3.3.6. Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit

Thiobacillus thioparus –kasvatusliuokseen ja maljoille muodostuneista kiteistä pyrittiin yllä esitettyjen DNA-eristysmenetelmien lisäksi eristämään DNA:ta Qiagenin DNeasy Blood & Tissue Kitillä käyttäen Kööpenhaminan yliopistolla muokattua menetelmää.

Kiteet ja mahdolliset solut kerättiin maljalta huuhtomalla 1 ml:lla vettä. Solut kerättiin sentrifugoimalla 10000 g, 3 min ja supernatantti poistettiin. Solut suspensoitiin 600 µl:aan ATL-puskuria ja siirrettiin Fast Prep –putkiin. Putkia ravisteltiin Fast Prep –koneessa nopeudella 6 neljä kertaa 45 sekunnin ajan. Putkiin lisättiin 650 µl AL-puskuria sekä 80 µl proteinaasi K:ta. Putkia inkuboitiin 70 °C:ssa yön yli. Fast prep-putkien helmet sentrifugoitiin kevyesti pohjaan ja neste siirrettiin tyhjään 1,5 ml putkeen. Neste puhdistettiin sentrifugoimalla vielä kerran ja supernatantti siirrettiin uuteen putkeen. DNA saostettiin lisäämällä 600 µl 96% etanolia. Neste siirrettiin DNeasy Mini Spin Columniin 650 µl kerrallaan ja sentrifugoitiin 7000 g:n nopeudella minuutin ajan. Kolumniin lisättiin 500 µl puskuria AW1 ja sentrifugoitiin 7000 g, 1 min. Lisättiin 500 µl puskuria AW2 ja sentrifugoitiin 10000 g 3 min. DNA eluoiitiin 100 µl:aan AE-puskuria.

3.3.7. Eristetyn DNA:n puhdistus

Osa DNA-eristystuotteista puhdistettiin ja konsentroidiin Milliporen Microcon YM-100 sentrifugisuodatinyksiköillä valmistajan ohjeen mukaisesti. Puhdistus tehtiin kolme kertaa lisäämällä 450 µl steriiliä vettä ja sentrifugoimalla putkia 12 min 500 g:n teholla. Konsentroitunut DNA kerättiin sentrifugoimalla 3 min 1000 g:n teholla.

3.3.8. DNA-saannon arviointi

Eristetyn DNA:n määrä arvioitiin mittaamalla laimennetun näytteen absorbanssi spektrofotometrillä aallonpituusalueella 200 – 320 nm. Saadusta kuvaajasta mitattiin A_{260} :n poikkeama perustasosta. Tämän poikkeaman perusteella laskettiin näytteen DNA-konsentraatio ja siitä laimennoskertoimet ja näytteen tilavuus huomioon ottaen DNA-saanto.

3.4. PCR

Eristetyistä DNA-näytteistä monistettiin jaksoja 16S rRNA-geenistä. Alukkeina käytettiin arkkispesifisiä Arch349F (5'-GYGCASCAGKCGMGAAW-3') ja Arch806R (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3'), bakteerispesifisiä Bac349F (5'-AGGCAGCAGTDRGGAAT-3') ja Bac806R (5'-GGACTACYVGGGTATCTAAT-3'), sekä prokaryoottien yleisalukkeita Uni340F (5'-CCTACGGGRBGCASCAG-3') ja Uni806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') (Takai ja Horikoshi, 2000). PCR-tuotteiden pituus oli noin 450 emäsparia. Arkeista saatava PCR-tuote oli hiukan lyhyempi kuin bakteereista saatu.

PCR-reaktioseoksen tilavuus oli 50 µl ja se sisälsi 1 µM kumpaakin aluketta, 200 µM kutakin deoksiribonukleotidia, ja 2 U DNA-polymeraasia (Dynazyme tai Taq). Templaatin määrä pyrittiin arvioimaan siten, että se olisi noin 10 µg/ml. Kun näytteen DNA-pitoisuutta ei tunnettu, kokeiltiin useita eri näytemääriä reaktioseoksessa.

PCR tehtiin MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cyclor -koneella. Annealing-lämpötilaksi kokeiltiin 52 °C ja 55 °C, ja tulosten perusteella näistä valittiin jatkokäyttöön 55 °C. Olosuhteet olivat seuraavat: denaturaatio 94 °C 1 min, annealing 55 °C 40 s, ekstensio 72 °C 1 min. Tämä kierto toistettiin vähintään 24 kertaa.

Tulosten oikean tulkinnan varmistamiseksi tehtiin rinnakkain varsinaisten näytteiden kanssa PCR myös useille kontrolleille. Negatiivinen PCR-kontrolli, joka paljasti tässä vaiheessa mahdollisesti tulleet kontaminaatiot, sisälsi näytteen sijasta steriiliä ionivaihdettua vettä. Negatiivinen DNA-eristyskontrolli oli käynyt läpi saman DNA-eristyksen kuin näytteet. Positiivinen kontrolli osoitti PCR-reaktion toimivuuden. Bac-alukkeita käytettäessä se oli *E.coli*-bakteerin DNA:ta, Arch-alukkeita käytettäessä *S.solfataricus*-arkin DNA:ta. Uni-alukkeille käytettiin toista tai molempia näistä. Lisäksi tehtiin PCR-inhibitiokontrolli, jossa oli sekä tutkittavaa näytettä että kyseisen reaktion positiivista kontrollia. Näin saatiin selville, sisältääkö DNA-eristystuote PCR-reaktiota estäviä tai haittaavia aineita.

3.5. Solukasvatukset vesi- ja kiviäytteistä

Näytteiden sisältämiä elinkykyisiä mikrobeja pyrittiin kasvattamaan siirtämällä pieniä määriä näytteistä erilaisten mikrobien kasvua tukeville kasvatusalustoille. Kasvatukset tehtiin hapellisissa olosuhteissa, 37 °C lämpötilassa, useiden kuukausien ajan. Kasvaneet solut tunnistettiin eristämällä niistä DNA lysosyyminmenetelmällä (3.3.1.), monistamalla DNA PCR:llä kullakin kolmella alukeparilla ja sekvensoimalla PCR-tuotteet.

3.5.1. Kasvatusliuosten ja -maljojen valmistus

Luria-Bertani-kasvatusliuos (LB) on peruskasvatusliuos joka tukee monien erilaisten mikrobien kasvua. Sitä varten 10 g tryptonia, 5 g hiivauutetta ja 10 g natriumkloridia liuotettiin litraan ionivaihdettua vettä. pH:ksi säädettiin 7,0 ja liuos steriloidtiin autoklaavissa. Kasvatusmaljoja varten liuokseen lisättiin 15 g agarua ennen autoklavointia.

Sulfolobus solfataricus –kasvatusliuos (DSMZ medium 182) tukee tiettyjen rikkiä hapettavien mikrobien kasvua (Brock ym., 1972). Se valmistettiin kuten kohdassa 3.1. pH:ta ei säädetty, mutta mitattaessa sen todettiin olevan 4,1. Kasvatusmaljat valmistettiin kuten Grogan, 1989, on kuvannut. 3-3,5 g gellaanikuria liuotettiin 250 ml:aan ionivaihdettua vettä keittämällä ja sekoittamalla. Valmistettiin pitoisuuksiltaan kaksinkertainen kasvatusliuos johon lisättiin 20 mM MgCl₂ ja 6 mM CaCl₂. Kasvatusliuos kuumennettiin 60 °C:een ja lisättiin varovasti gellaanikumiliuoksen sekaan. pH säädettiin tarvittaessa HCl:lla.

Thiobacillus thioparus –kasvatusliuos (DSMZ medium 36) tukee sellaisten mikrobien kasvua, jotka saavat energiansa epäorgaanisten rikkiyhdisteiden kuten tiosulfaatin hapetuksesta. Se sisälsi 0,1 g (NH₄)₂SO₄, 4 g K₂HPO₄, 4 g KH₂PO₄, 0,1 g MgSO₄ x 7 H₂O, 0,1 g CaCl₂, 0,02 g FeCl₃ x 6 H₂O, 0,02 g MnSO₄ x 4 H₂O ja 10 g Na₂S₂O₃ x 5 H₂O litrassa kasvatusliuosta. pH oli 6,6. Kasvatusmaljoja varten liuokseen lisättiin 12 g agarua ennen autoklavointia.

YPM-kasvatusliuos (DSMZ medium 360) on peruskasvatusliuos. Se sisältää 5 g hiivauutetta, 3 g peptonia, ja 25 g mannitolia litrassa liuosta. Käytin peptonin sijasta tryptonia, joka on vastaava aminohapposeos. Kasvatusliuoksen pH oli 6,6. Kasvatusmaljoja varten liuokseen lisättiin 12 g agarua ennen autoklavointia.

Acetic acid bacterium –kasvatusliuos (DSMZ medium 989) on yksinkertainen liuos joka on tarkoitettu etikkahappoa tuottaville bakteereille. Se sisälsi 5 g tryptonia, 5 g hiivauutetta, 5 g glukoosia ja 1 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ litrassa liuosta. pH oli noin 7. Kasvatusmaljoja varten liuokseen lisättiin 12 g agarua ennen autoklavointia.

Lisäksi tein vielä kasvatusliuoksen, joka pohjautui kaivoksesta otettuihin vesinäytteisiin. 100 ml tätä liuosta sisälsi 0,1 g hiivauutetta ja 0,1 g glukoosia jotka liuotettiin autoklavoituun vesinäytteeseen. Tästä kasvatusliuoksesta ei tehty lainkaan kasvatusmaljoja.

3.5.2. Solukasvatukset kivinäytteistä

Solut pyrittiin uuttamaan kivijauheesta ennen niiden kasvatusta. Noin 500 µl:aan kivijauhetta lisättiin 1 ml sitä kasvatusliuosta jossa kasvatusta aiottiin tehdä. Putkia inkuboitettiin 37 °C:ssa useita tunteja jotta mahdollisimman paljon soluja irtoaisi liuokseen. Kivijauheen annettiin painua putken pohjalle. Maljakasvatuksia varten 450 µl liuosta siirrettiin kullekin kasvatusmaljalle. Nestekasvatuksia varten 400 µl liuosta lisättiin 15 ml:n putkiin jotka täytettiin kasvatusliuoksella ja korkit suljettiin. Maljat ja putket siirrettiin 37 °C:een useaksi kuukaudeksi.

3.5.3. Solukasvatukset vesinäytteistä

Vesinäytteen mahdollisesti sisältämät solut kerättiin sentrifugoimalla ja suurin osa supernatantista poistettiin. 500 µl konsentroitua liuosta siirrettiin kasvatusmaljoille ja 900 µl nestekasvatukseen. Kasvatukset tehtiin samoin kuin kivinäytteille.

3.5.4. Solukasvatuskontrollit

Näytekasvatusten lisäksi tehtiin negatiiviset kontrollit, joista voitiin päätellä olivatko kasvaneet solut peräisin näytteistä vai jostain vaiheesta kasvatusliuosten tai maljojen valmistuksessa. Maljakasvatuksia varten kasvatuskaappiin lisättiin tyhjä, käsittelemätön malja sekä malja jolle oli lisätty kasvatusliuosta. Nestekasvatuksia varten tehtiin putkia joissa oli pelkkää kasvatusliuosta.

3.6. PCR-tuotteiden sekvensointi ja analysointi

3.6.1. PCR-tuotteiden puhdistus

PCR-tuotteet puhdistettiin ajamalla ne 1,5 %:lla agarosigeelillä ja eristämällä ne sitten geeliltä. Eristykseen käytettiin Fermentas DNA Extraction Kit #K0513 valmistajan ohjeen mukaisesti.

3.6.2. Sekvensointi

Puhdistetut PCR-tuotteet sekvensoitiin Turun yliopiston genetiikan laitoksen sekvensointipalvelussa ABI PRISM® 377 DNA –sekvensointilaitteella.

Leimausreaktiot tehtiin BigDyeJ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Ready Reaction

Kitillä valmistajan ohjeen mukaisesti. Alukkeina käytettiin samoja alukkeita kuin PCR-reaktiossa ja sekvensointivirheiden välttämiseksi reaktiot tehtiin molempiin (F ja R) suuntiin templaattia.

3.6.3. Sekvensointitulosten analysointi

Sekvenssit analysoitiin etsimällä niille vastaavuuksia tietokannoista käyttäen National Center for Biotechnology Information (NCBI) megablast –palvelua.

3.7 . Fluoresenssimikroskopia

Kivi- ja vesinäytteitä sekä thiobacillus thioparus –kasvatusliuokseen ja maljoille muodostuneita kiteitä tutkittiin fluoresenssimikroskopian avulla.

3.7.1. Kivinäytteiden käsittely

Ohuiden mikroskooppileikkeiden valmistus kivinäytteistä ei ollut mahdollista täysin steriilisti. Mikroskooppimenetelmän testausta varten kivinäytteestä leikattiin noin 0,5 cm paksu pala, jonka yksi sivu hiottiin tasaiseksi mikroskopointia varten. Kivinäytteiden leikkauksen teki Arto Peltola Turun yliopiston geologian laitoksella.

3.7.2. DAPI-värjäys

Näytteiden mahdollisesti sisältämien solujen havaitsemiseksi ne värjättiin DAPI:lla (4',6-diamidino-2-phenylindole). Tämä fluoresoiva väriaine sitoutuu DNA:han ja mahdollistaa sen havaitsemisen fluoresenssimikroskoopilla (Kepner ja Pratt 1994).

Näyte fiksoitiin EtOH-CH₃COOH (3:1) –liuoksessa 10 minuuttia. Näyte pestiin kolme kertaa PBS-puskurilla, viisi minuuttia kullakin kerralla. Näytettä värjättiin 5-10 minuutin ajan DAPI:lla, 0,5 µg/ml PBS-puskurissa. Ylimääräinen väri huuhdeltiin pois PBS-puskurilla. Näyte peitettiin pienellä määrällä PBS-puskuria ja peitinlasilla.

3.7.3. Fluoresenssimikroskopia

Näytteet tutkittiin Turun yliopiston genetiikan laboratoriossa Seppo Nokkalan ohjauksessa.

4. Tulokset

4.1. DNA-eristysmenetelmien vertailu

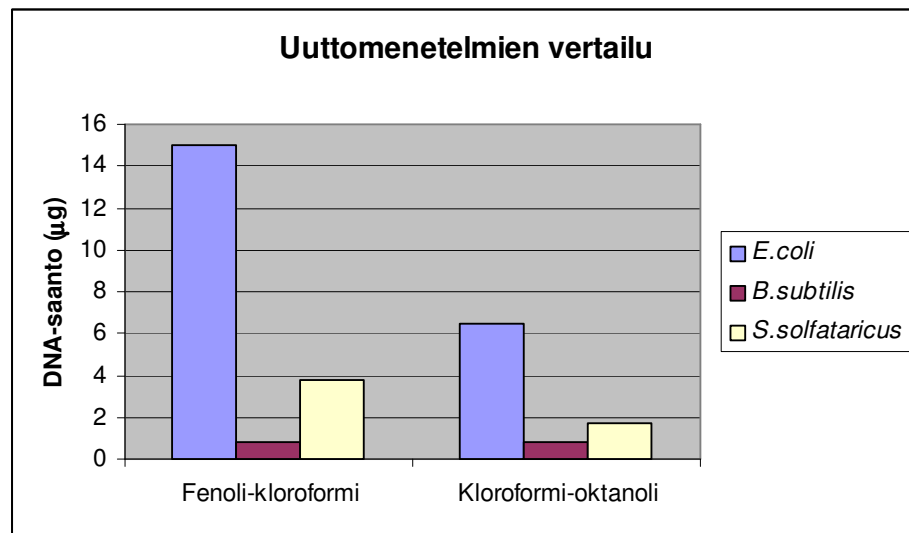
4.1.1. Uttomenetelmien vertailu

Fenoli-kloroformiuuton ja kloroformi-oktanoliuuton tehoa genomisen DNA:n eristämässä eri tyyppisistä mikrobeista vertailtiin eristämällä DNA *E. colista*, *B. subtiliksesta* ja *S. solfataricuksesta* ja mittaamalla DNA-saannot. Solujen hajotukseen käytettiin proteinaasi K:ta.

Taulukko 2. DNA-saannot eri uuttomenetelmillä.

DNA-saanto (µg) eri uutoista

	Fenoli-kloroformi	Kloroformi-oktanoli
<i>E.coli</i>	15	6,5
<i>B.subtilis</i>	0,8	0,83
<i>S.solfataricus</i>	3,8	1,7



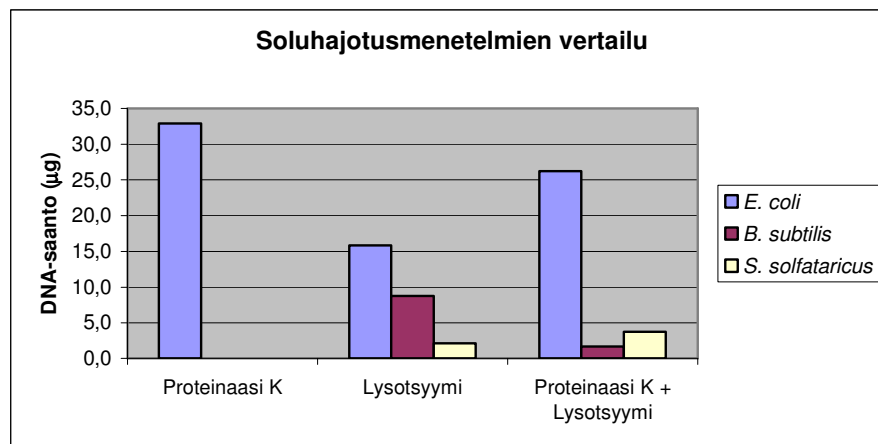
Fenoli-kloroformiuutolla saatiin selvästi paremmat DNA-saannot, joten se valittiin jatkossa käytettäväksi menetelmäksi.

4.1.2. Soluhajotusmenetelmien vertailu

Proteinaasi K:n, lysotsyymiin ja näiden yhdistelmän tehoa solujen hajotuksessa vertailtiin samoin kuin uuttoja, vertaamalla DNA-saantoja eri tyyppisille mikrobeille tehdyistä DNA-erityksistä.

Taulukko 3. Keskimääräinen DNA-saanto (µg) eri soluhajotusmenetelmillä.

	Proteinaasi K	Lysotsyymi	Proteinaasi K + Lysotsyymi
<i>E. coli</i>	32,9	15,9	26,3
<i>B. subtilis</i>	0,0	8,8	1,7
<i>S. solfataricus</i>	0,0	2,1	3,8



Proteinaasi K –menetelmä ei soveltunut gram-positiiviselle *B. subtilis*lle eikä arkkille *S. solfataricus*lle, joten se hylättiin. Lysotsyymimenetelmällä ja molempien menetelmien yhdistelmällä saatiin kaikista mikrobityypeistä eritettyä DNA:ta. Koska Lysotsyymimenetelmä on näistä kahdesta huomattavasti nopeampi ja vähemmän työläs, se valittiin jatkossa käytettäväksi menetelmäksi.

4.1.3. DNA-eristys kaupallisella genomisen DNA:n eristyskitillä

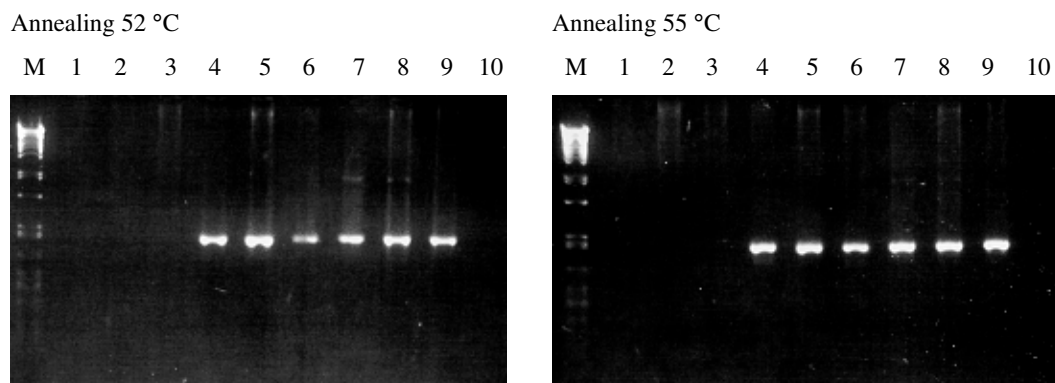
Bio-Rad AquaPure Genomic DNA Isolation Kit:illä *E. colille* tehtyjen DNA-eristysten DNA-saanto oli keskimäärin 6,3 µg. Tämä on selvästi alhaisempi saanto kuin muilla käytetyillä menetelmillä.

4.2. PCR-reaktion testaus ja optimointi

4.2.1. Annealing-lämpötilan valinta

Koska käytettyjen alukkeiden T_m -arvot vaihtelivat, kokeiltiin kahta eri annealing-lämpötilaa, 52 ja 55 °C. PCR-reaktiot tehtiin molemmilla lämpötiloilla käyttäen templaattina *E. coli* DNA:ta ja alukkeina kutakin kolmesta alukeparista. Kullakin alukeparilla tehtiin molemmissa lämpötiloissa kolme PCR-reaktiota käyttäen templaattina eri tavoin eristettyä *E. coli* DNA:ta. DNA-eristysmenetelminä olivat proteinaasi K-menetelmä kloroformi-oktanolii –uutolla, lysotsyymi-menetelmä fenoli-kloroformi –uutolla sekä Bio-Rad AquaPure Genomic DNA Isolation Kit, tässä järjestyksessä. PCR-reaktioiden tehokkuus arvioitiin 1,5 %:lla agarosigeelillä.

Kuten oli odotettavissa käytettäessä templaattina bakteerin DNA:ta, Arch-alukkeilla ei muodostunut PCR-tuotetta. Bac- ja Uni-alukkeilla tuotetta saatiin molemmilla lämpötiloilla eikä epäspesifistä sitoutumista ollut merkittävästi havaittavissa. 55 °C:n annealing-lämpötilalla reaktio oli hiukan tehokkaampi kuin 52 °C:n lämpötilaa käytettäessä, joten se valittiin käytettäväksi jatkossa.



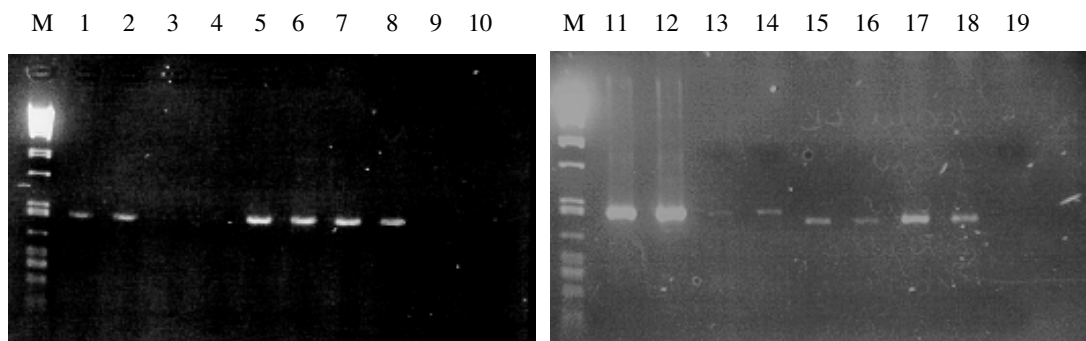
Kuva 1. Annealing-lämpötilan vaikutus PCR-reaktion tehokkuuteen. M: λ PstI molekyyli-massastandardi, 1-3: Alukepari Arch, 4-6: alukepari Bac, 7-9: alukepari Uni, 10: negatiivinen kontrolli: ei templaattia, alukepari Uni.

4.2.2. Alukkeiden testaus

Kaikkien käytettyjen alukeparien toimivuus ja spesifisyys tarkistettiin valmistamalla niillä jokaisella PCR-reaktio käyttäen templaatteina *E. coli*, *B. subtilisen* ja *S. solfataricuksen* DNA:ta.

Arch- ja Uni-alukkeet toimivat kuten oli odotettu. Arch-alukkeilla DNA:ta monistui ainoastaan arkki *S. solfataricuksen* DNA:sta. Uni-alukkeilla taas kaikista reaktioista saatiin tuotetta. Molemmissa tapauksissa *S. solfataricuksesta* monistunut DNA-jakso oli hiukan lyhyempi kuin bakteereista saatu.

Bac-alukkeet monistivat bakteerien *E. coli* ja *B. subtilis* DNA:ta kuten odotettiin. Ne tuottivat kuitenkin heikot juovat myös *S. solfataricuksen* DNA:sta, mikä voi tarkoittaa joko että alukkeet eivät ole niin spesifisiä kuin toivottiin, tai että kyseiset reaktiot olivat kontaminoituneet bakteerien DNA:lla. Koska muodostuneet DNA-molekyylit eivät ole samn pituisia kuin sekä Arch- ja Uni-alukepareilla tuotetut *S. solfataricuksen* DNA-jaksot, vaan ovat sen sijaan saman pituisia molempien bakteerien DNA-jaksojen kanssa, pääteltiin kyseessä olevan luultavasti kontaminaatio.



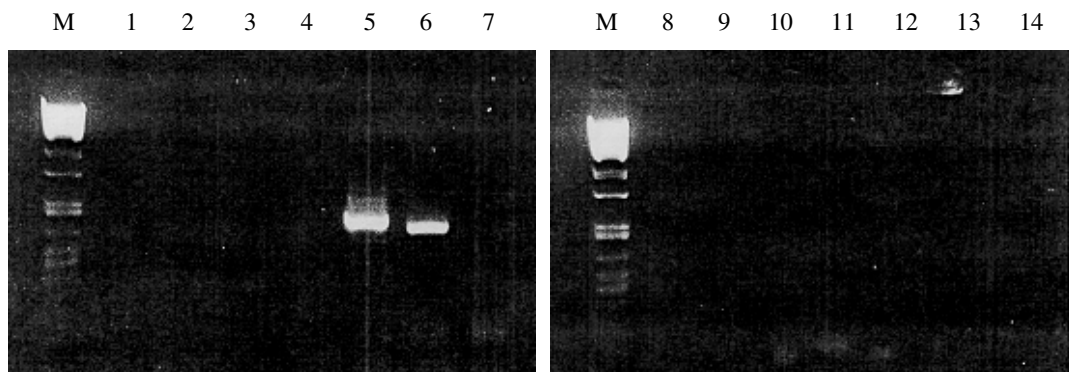
Kuva 2. Alukkeiden testaus. M: λ PstI molekyyli­massastandardi, 1-2: *E. coli* DNA, alukepari Bac, 3-4: *E. coli* DNA, alukepari Arch, 5-6: *E. coli* DNA, alukepari Uni, 7-8: *B. subtilis* DNA, alukepari Bac, 9-10: *B. subtilis* DNA, alukepari Arch, 11-12: *B. subtilis* DNA, alukepari Uni, 13-14: *S. solfataricus* DNA, alukepari Bac, 15-16: *S. solfataricus* DNA, alukepari Arch, 17-18: *S. solfataricus* DNA, alukepari Uni, 19: negatiivinen kontrolli: ei templaattia, alukepari Uni.

4.3. PCR kivi- ja vesinäytteistä eristetylle DNA:lle

Sovellettaessa PCR-menetelmää kivi- ja vesinäytteistä eristetylle DNA:lle näytteiden sisältämät PCR-reaktiota estävät aineet aiheuttivat ongelmia.

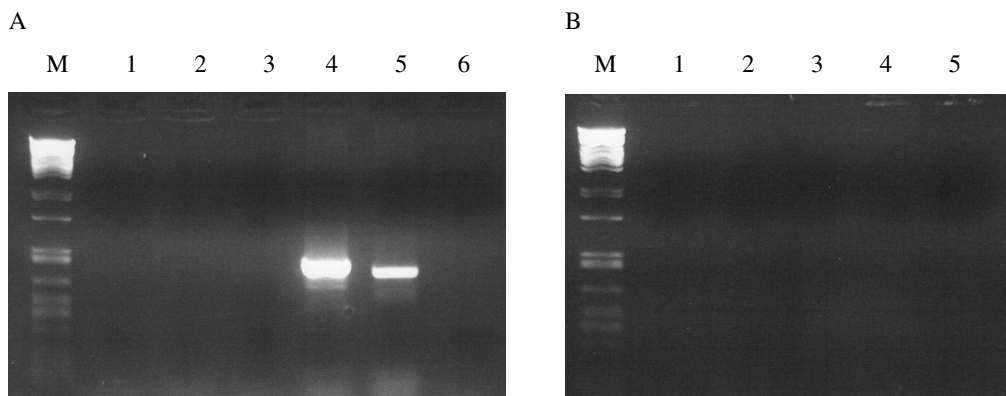
4.3.1. PCR proteinaasi K:n ja lysotsyymien avulla vesinäytteistä eristetylle DNA:lle

Vesinäytteistä proteinaasi K:n ja lysotsyymien avulla mahdollisesti talteen saatua DNA:ta pyrittiin monistamaan PCR-reaktiolla. Inhibitiokontrolli kuitenkin osoitti että näytteet estivät PCR-reaktion toiminnan.



Kuva 3. PCR vesinäytteistä eristetylle DNA:lle. M: λ PstI molekyyli­massastandardi, 1,3: DNA-eritystuote vesinäytteestä, alukepari Arch, 2,4: DNA-eritystuote vesinäytteestä, alukepari Bac, 5: positiivinen kontrolli: *E. coli* DNA, alukepari Bac, 6: positiivinen kontrolli: *S. solfataricus* DNA, alukepari Arch, 7: negatiivinen kontrolli: ei templaattia, alukepari Uni, 8-9: DNA-eritystuote vesinäytteestä, alukepari Uni, 10: negatiivinen DNA-eristyskontrolli, alukepari Arch, 11: negatiivinen DNA-eristyskontrolli, alukepari Bac, 12: negatiivinen DNA-eristyskontrolli, alukepari Uni, 13: inhibitiokontrolli: *E. coli* DNA + DNA-eritystuote vesinäytteestä, alukepari Bac, 14: : inhibitiokontrolli: *S. solfataricus* DNA + DNA-eritystuote vesinäytteestä, alukepari Arch.

PCR-inhibition epäiltiin johtuvan vesinäytteiden sisältämistä suoloista. DNA-eristys toistettiin siten, että suolainen vesi pyrittiin poistamaan näytteestä mahdollisimman hyvin kun solut oli kerätty sentrifugoimalla. Lisäksi erityspuskurin suolapitoisuutta laskettiin jättämällä natriumkloridi lisäämättä. Näytteet estivät silti edelleen PCR-reaktion.

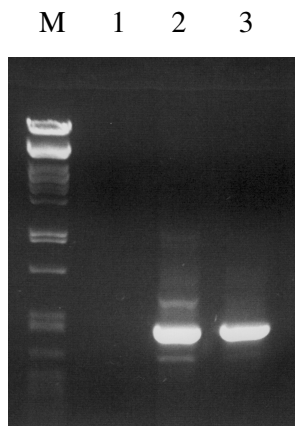


Kuva 4. Vesinäytteestä saatu DNA-eristystuote oli templaattiina PCR-reaktioissa, joiden tuotteet on ajettu 1,5 % agarosigeelille. M: λ PstI molekyyli­massastandardi, A1: vesinäyte, alukepari Arch, A2: vesinäyte, alukepari Bac, A3: vesinäyte, alukepari Uni, A4: positiivinen kontrolli *E. coli* DNA, alukepari Bac, A5: positiivinen kontrolli *S. solfataricus* DNA, alukepari Arch, A6: negatiivinen kontrolli, ei templaattia, alukepari Uni, B1: negatiivinen DNA-eristys­kontrolli, alukepari Arch, B2: negatiivinen eristys­kontrolli, alukepari Bac, B3: negatiivinen DNA-eristys­kontrolli, alukepari Uni, B4: PCR-inhibitiokontrolli: *E. coli* DNA ja vesinäyte, alukepari Bac, B5: PCR-inhibitiokontrolli: *S. solfataricus* DNA ja vesinäyte, alukepari Arch.

4.3.2. PCR-inhibitiotesti kivinäytteistä proteinaasi K:n ja lysotsyym­in avulla eristetylle DNA:lle

Kivinäytteen DNA-eristystuotteen vaikutusta PCR-reaktioon tutkittiin lisäämällä samaan reaktioon sekä sitä että *E. coli* DNA:ta. Kivinäyte esti PCR-reaktion toiminnan.

Negatiivinen eristys­kontrolli ei kuitenkaan vaikuttanut reaktioon, vaan *E. coli* DNA monistui normaalisti.

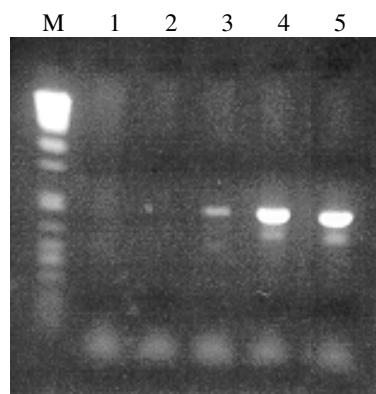


Kuva 5.
PCR- inhibitiotesti kivinäytteen DNA-eristystuotteelle.
M: λ PstI molekyyli­massastandardi,
1: inhibitiokontrolli: *E. coli* DNA ja DNA-eristystuote kivinäytteestä, alukepari Bac
2: inhibitiokontrolli: *E. coli* DNA ja negatiivinen DNA-eristys­kontrolli, alukepari Bac
3: positiivinen kontrolli: *E. coli* DNA, alukepari Bac.

4.3.3. PCR puhdistetuille DNA-eristystuotteille

Sekä vesi- että kivinäytteistä proteinaasi K ja lysotsyymi –menetelmällä saadut eristystuotteet puhdistettiin Milliporen Microcon YM-100 sentrifugisuodatinyksiköillä. Kivinäytteille tehtiin DNA-eristys SDS-pohjaisella menetelmällä ja myös nämä eristystuotteet puhdistettiin samoin. Positiivisena kontrollina tässä eristysmenetelmässä käytettiin Littoistenjärven pohjasedimenttiä.

SDS-menetelmällä saadut eristystuotteet sekä kivinäytteestä että pohjasedimentistä estivät PCR-reaktion täysin puhdistuksesta huolimatta. Sen sijaan kivinäytteen proteinaasi K ja lysotsyymi –menetelmällä saatu tuote vain heikensi PCR-reaktiota selvästi puhdistuksen jälkeen, mutta ei estänyt sitä kokonaan. Puhdistettu vesinäytteen eristystuote taas ei vaikuttanut reaktioon lainkaan.

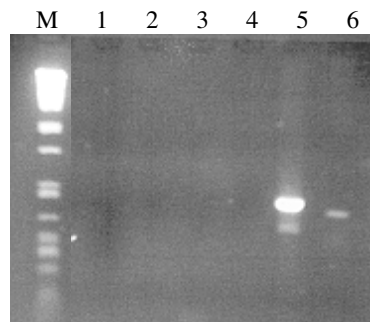


PCR-inhibitiokontrollit puhdistetuille DNA-eristystuotteille.

Kuva 6.

M: λ PstI molekyyli-massastandardi,
 1: pohjasedimentistä eristetty DNA ja *E. coli* DNA, alukepari Bac,
 2: kiviäytteestä SDS-menetelmällä eristetty DNA ja *E. coli* DNA, alukepari Bac,
 3: kiviäytteestä proteinaasi K ja lysotsyymi –menetelmällä eristetty DNA ja *E. coli* DNA, alukepari Bac,
 4: vesinäytteestä proteinaasi K ja lysotsyymi –menetelmällä eristetty DNA ja *E. coli* DNA, alukepari Bac,
 5: positiivinen kontrolli: *E. coli* DNA, alukepari Bac.

Proteinaasi K ja lysotsyymi –menetelmällä eritetyistä ja puhdistetuista kivi- ja vesinäytteistä ei kuitenkaan monistunut DNA:ta.

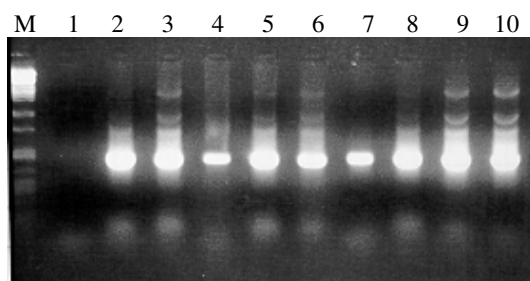


Kuva 7.

PCR puhdistetulle proteinaasi K ja lysotsyymi –menetelmällä eritetyille DNA:lle.
 M: λ PstI molekyyli-massastandardi,
 1: kiviäytteestä eristetty DNA, alukepari Bac,
 2: kiviäytteestä eristetty DNA, alukepari Arch,
 3: vesinäytteestä eristetty DNA, alukepari Bac,
 4: vesinäytteestä eristetty DNA, alukepari Arch,
 5: positiivinen kontrolli: *E. coli* DNA, alukepari Bac,
 6: positiivinen kontrolli: *S. solfataricus* DNA, alukepari Arch.

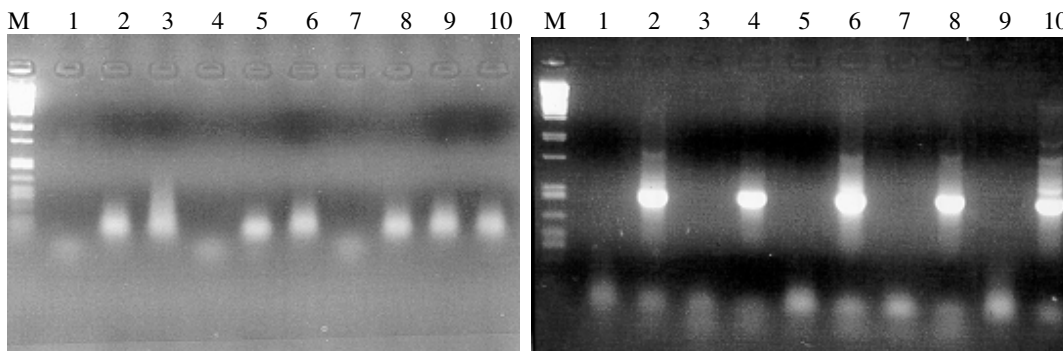
4.3.4. PCR kivinäytteistä muinaisen DNA:n eristysmenetelmällä saaduille tuotteille

Muinaisen DNA:n eristykseen kehitetyllä menetelmällä kivinäytteistä saatujen tuotteiden vaikutusta PCR-reaktioon tutkittiin inhibitiokontrolleilla, joissa käytettiin *E. coli* DNA:n lisäksi eri määriä eristystuotteita. Näin pyrittiin löytämään näytemäärä, jolla reaktio vielä toimii. Reaktioihin lisättiin 0,5 µl näytettä, sen 1/10 laimennosta tai 1/100 laimennosta. Suurimmat näytemäärät alensivat reaktion tehoa, mutta vain yksi näyte esti sen kokonaan. Pienemmällä näytemäärällä taas ei ollut juurikaan vaikutusta PCR-reaktioihin.



Kuva 8. Inhibitiokontrollit muinaisen DNA:n eristykseen kehitetyllä menetelmällä kivinäytteistä saaduille DNA-eristystuotteille. M: λ PstI molekyyli­massastandardi. Templaattina PCR-reaktiossa: 1,4,7: 0,5 µl DNA-eristystuotetta ja *E. coli* DNA, 2,5,8: 0,5 µl 1/10 DNA-eristystuotetta ja *E. coli* DNA, 3,6,9: 0,5 µl 1/100 DNA-eristystuotetta ja *E. coli* DNA, 10: positiivinen kontrolli: *E. coli* DNA.

Yksikään kahdeksasta testatusta näytteestä ei kuitenkaan sisältänyt monistuskelpoista DNA:ta.

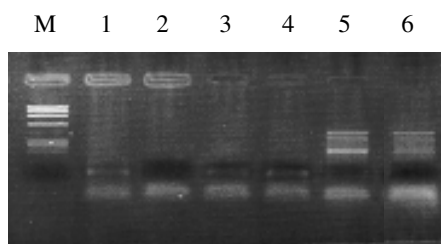


Kuva 9. PCR kivinäytteistä muinaisen DNA:n eristysmenetelmällä saaduille tuotteille. M: λ PstI molekyyli­massastandardi. Templaattina PCR-reaktiossa 1,4, 7: 0,5 µl DNA-eristystuotetta, 2,4,8: 0,5 µl 1/10 laimennettua DNA-eristystuotetta, 3,6,9: 0,5 µl 1/100 laimennettua DNA-eristystuotetta, 10: 0,5 µl negatiivista DNA-eristyskontrollia.

Kuva 10. PCR ja inhibitiokontrollit kivinäytteistä muinaisen DNA:n eristysmenetelmällä saaduille tuotteille. M: λ PstI molekyyli­massastandardi. Templaattina PCR-reaktiossa 1,3,5,7,9: 0,5 µl DNA-eristystuotetta, 2,4,6,8,10: inhibitiokontrollit, 0,5 µl DNA-eristystuotetta ja *E. coli* DNA

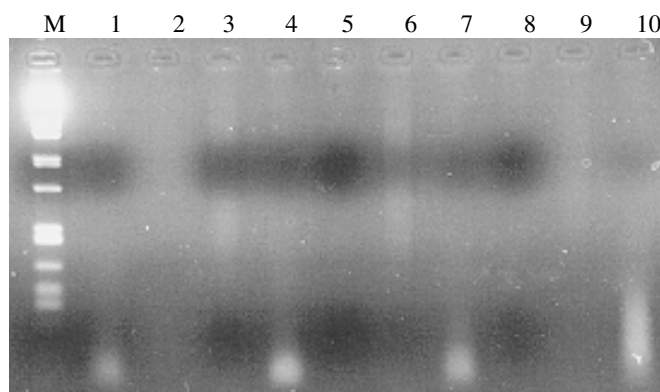
4.3.5. PCR kivinäytteistä silikamenetelmällä saaduille DNA-eristystuotteille

Ensimmäiset PCR-raktiot kivinäytteistä silikamenetelmällä saaduille DNA-eristystuotteille tehtiin Kääpenhaminan yliopistolla, kuten itse eristyksetkin. Tällöin PCR tehtiin Blackice-laitteella, ohjelmalla jossa oli denaturaatio 94 °C 1 min, annealing 45 °C 1 min ja ekstensio 68 °C 45 s. Näissä olosuhteissa 5 µl näytettä ei estänyt reaktiota, mutta näytteistä ei myöskään löytynyt monistuskelpoista DNA:ta.



Kuva 11. PCR kivinäytteistä silikamenetelmällä saaduille DNA-eristystuotteille. M: Molekyyli massasstandardi. Templaattina PCR-reaktiossa 1: negatiivinen kontrolli, ei templaattia, 2, 3: 5 µl DNA-eristystuotetta, 4: 5 µl negatiivista DNA-eristyskontrollia, 5: positiivinen kontrolli, *E. coli* DNA, 6: inhibiitokontrolli, 5 µl DNA-eristystuotetta ja *E. coli* DNA

PCR toistettiin Suomessa, samoissa olosuhteissa kuin muilla eristysmenetelmillä saadut tuotteet. Todettiin, että 10 µl näytettä riittää estämään PCR-reaktion. Näytteet eivät nytkään näyttäneet sisältävän monistuskelpoista DNA:ta, sillä 1 µl:n näytettä sisältävät reaktiot eivät myöskään tuottaneet DNA:ta.



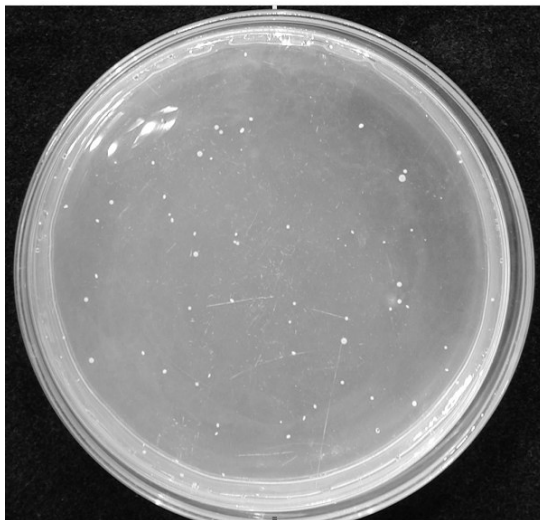
Kuva 12. PCR kivinäytteistä silikamenetelmällä saaduille DNA-eristystuotteille. M: λ PstI molekyyli massasstandardi. Templaattina PCR-reaktiossa 1,4: 1 µl DNA-eristystuotetta, 2,5: 10 µl DNA-eristystuotetta, 3,6: inhibiitokontrolli, 10 µl DNA-eristystuotetta ja *E. coli* DNA, 7: 1 µl negatiivista DNA-eristyskontrollia, 8: 10 µl negatiivista DNA-eristyskontrollia, 9: inhibiitokontrolli, 10 µl negatiivista DNA-eristyskontrollia ja *E. coli* DNA, 10: negatiivinen kontrolli, ei templaattia.

4.4. Solukasvatukset kivi- ja vesinäytteistä

Kivi- tai vesinäytteistä ei kasvanut mikrobeja Luria-Bertani-kasvatusliuoksessa, YPM-kasvatusliuoksessa, Acetic acid bacterium –kasvatusliuoksessa ja vesinäytteeseen pohjautuvassa kasvatusliuoksessa tai näistä tehdyillä maljoilla käytetyissä olosuhteissa.

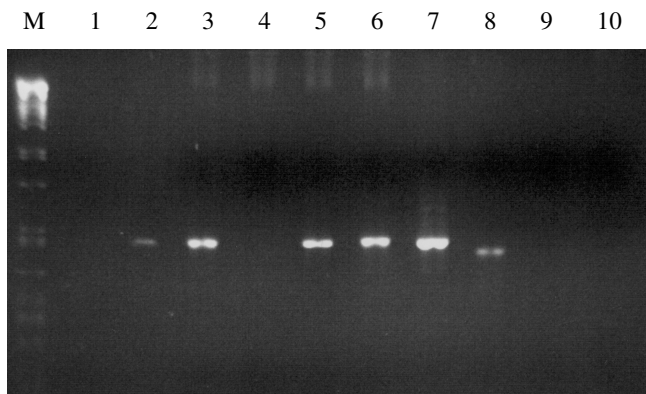
4.4.1. Sulfolobus solfataricus –kasvatusalustalle kasvaneiden pesäkkeiden analysointi

Sulfolobus solfataricus –kasvatusliuoksesta tehdyillä maljoilla kasvoi kahden viikon aikana +37 °C lämmössä pesäkkeitä sekä kivi- että vesinäytteistä. Samanlaisia pesäkkeitä löytyi kuitenkin myös kontrollimaljalta johon ei oltu lisätty näytettä, joten kyseessä oli kontaminaatio.



Kuva 13.
Pesäkkeet Sulfolobus solfataricus-kasvatusliuoksesta. Konsentroitunut vesinäyte levitettiin Sulfolobus solfataricus-kasvatusliuoksesta tehdyille maljoille, jotka inkuboitiin kaksi viikkoa +37 °C lämmössä.

Sulfolobus solfataricus –kasvatusalustalle kasvaneita pesäkkeitä siirrostettiin nestekasvatukseen Sulfolobus solfataricus-kasvatusliuokseen +37 °C:een kolmeksi vuorokaudeksi. Solususpensioista eristettiin DNA käyttäen lysosyyymia, fenoli-kloroformia ja etanolisaostusta. DNA monistettiin PCR:llä käyttäen kutakin kolmea alukeparia. PCR osoitti, että kaikki tutkitut pesäkkeet olivat bakteereita.



Kuva 14. PCR vesinäytteistä *Sulfolobus solfataricus* –kasvatusalustalle kasvaneille pesäkkeille. Pesäkkeistä tehtiin liemikasvatukset joista eristettiin DNA käytettäväksi templaattina PCR-reaktioissa. M: λ PstI molekyyli-massastandardi, 1: pesäke 1, alukepari Arch, 2: pesäke 1, alukepari Bac, 3: pesäke 1, alukepari Uni, 4: pesäke 2, alukepari Arch, 5: pesäke 2, alukepari Bac, 6: pesäke 2, alukepari Uni, 7: positiivinen bakteerikontrolli, templaattina *E. coli* DNA, alukepari Bac, 8: positiivinen arkkikontrolli, templaattina *S. solfataricus* DNA, alukepari Arch, 9: negatiivinen DNA-eristyskontrolli, alukepari Uni, 10: negatiivinen PCR-kontrolli, ei templaattia, alukepari Uni.

Pesäkkeistä eristetty DNA puhdistettiin agarosigeelielektroforeesilla ja sekvensoitiin.

Sekvensoitujen neljän pesäkkeen 16S rRNA-sekvenssit olivat keskenään täysin samanlaiset.

		1	70
Pesäke 7	(1)	GGGAATCTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT	
Pesäke 8	(1)	--GAATCTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT	
Pesäke 11	(1)	GGGAATCTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT	
Pesäke 12	(1)	GGGAATCTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT	
		71	140
Pesäke 7	(71)	AAAGCTCTGTTGCTCGGGGAGAGCGGCATGGGGAGTGGAAAGCCCCATGCGAGACGGTACCGAGTGAGGA	
Pesäke 8	(69)	AAAGCTCTGTTGCTCGGGGAGAGCGGCATGGGGAGTGGAAAGCCCCATGCGAGACGGTACCGAGTGAGGA	
Pesäke 11	(71)	AAAGCTCTGTTGCTCGGGGAGAGCGGCATGGGGAGTGGAAAGCCCCATGCGAGACGGTACCGAGTGAGGA	
Pesäke 12	(71)	AAAGCTCTGTTGCTCGGGGAGAGCGGCATGGGGAGTGGAAAGCCCCATGCGAGACGGTACCGAGTGAGGA	
		141	210
Pesäke 7	(141)	AGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAACGTTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATCACTGGG	
Pesäke 8	(139)	AGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAACGTTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATCACTGGG	
Pesäke 11	(141)	AGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAACGTTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATCACTGGG	
Pesäke 12	(141)	AGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAACGTTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATCACTGGG	
		211	280
Pesäke 7	(211)	CGTAAAGGGTGCGTAGGCCGTCGAGCAAGTCTGGAGTAAAAGTCCATGGCTCAACCATGGGATGGCTCTG	
Pesäke 8	(209)	CGTAAAGGGTGCGTAGGCCGTCGAGCAAGTCTGGAGTAAAAGTCCATGGCTCAACCATGGGATGGCTCTG	
Pesäke 11	(211)	CGTAAAGGGTGCGTAGGCCGTCGAGCAAGTCTGGAGTAAAAGTCCATGGCTCAACCATGGGATGGCTCTG	
Pesäke 12	(211)	CGTAAAGGGTGCGTAGGCCGTCGAGCAAGTCTGGAGTAAAAGTCCATGGCTCAACCATGGGATGGCTCTG	
		281	350
Pesäke 7	(281)	GAAACTGCTTGACTTGAGTGCTGGAGAGGCAAGGGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATG	
Pesäke 8	(279)	GAAACTGCTTGACTTGAGTGCTGGAGAGGCAAGGGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATG	
Pesäke 11	(281)	GAAACTGCTTGACTTGAGTGCTGGAGAGGCAAGGGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATG	
Pesäke 12	(281)	GAAACTGCTTGACTTGAGTGCTGGAGAGGCAAGGGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATG	
		351	420
Pesäke 7	(351)	TGGAGGAATACCAGTGGCGAAGCGCCCTTGCTGGACAGTGACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAG	
Pesäke 8	(349)	TGGAGGAATACCAGTGGCGAAGCGCCCTTGCTGGACAGTGACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAG	
Pesäke 11	(351)	TGGAGGAATACCAGTGGCGAAGCGCCCTTGCTGGACAGTGACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAG	
Pesäke 12	(351)	TGGAGGAATACCAGTGGCGAAGCGCCCTTGCTGGACAGTGACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAG	

Kuva 15. *Sulfolobus solfataricus* –kasvatusalustalle kasvaneiden pesäkkeiden sekvenssien vertailu.

Blast-haku osoitti että kyseessä on *Alicyclobacillus*-sukuun kuuluva bakteeri. Tämän suvun bakteerit ovat yleisiä maaperän bakteereja jotka tunnetaan parhaiten niiden aiheuttamista maku- ja hajuhaitoista pastöroiduissa tuoremehussa. Ne ovat gram-positiivisia, itiöitä muodostavia bakteereja jotka pystyvät kasvamaan 20-70 °C lämpötiloissa ja pH-alueella 2,5:stä kuuteen (Chang ja Kang 2004).

Taulukko 4. Blast-haun tulokset. Taulukossa mukana ensimmäiset viisitoista osumaa.

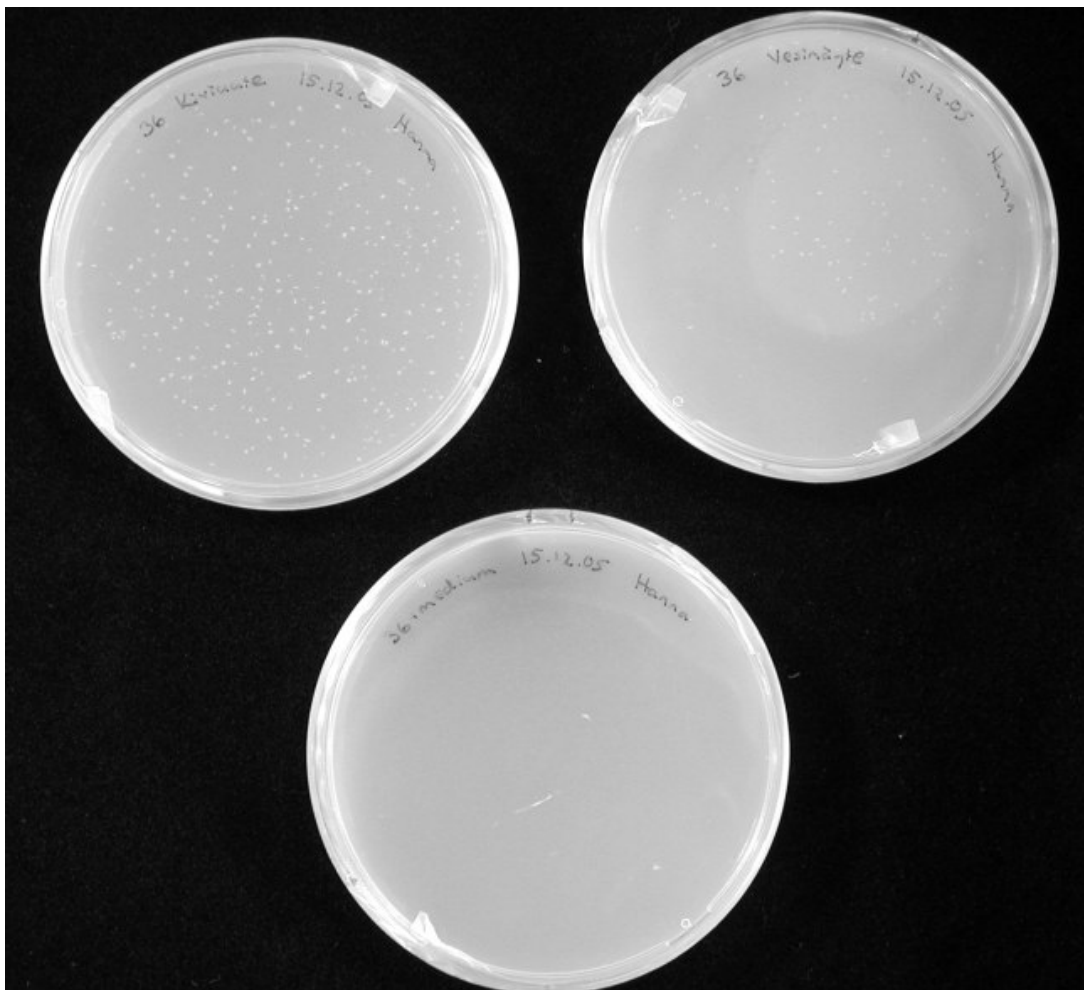
Sequences producing significant alignments:

(Click headers to sort columns)

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
AM749793.1	Alicyclobacillus sp. K2 partial 16S rRNA gene, isolate K2	811	811	99%	0.0	100%
AM749784.1	Alicyclobacillus sp. T131 partial 16S rRNA gene, isolate T131	811	811	99%	0.0	100%
DQ838045.1	Alicyclobacillus acidocaldarius isolate Tc-12-31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	811	811	99%	0.0	100%
AJ438297.2	Alicyclobacillus sp. R-10926 partial 16S rRNA gene	811	811	99%	0.0	100%
AJ493667.1	Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. rittmannii 16S rRNA gene	811	811	99%	0.0	100%
AY160968.1	Alicyclobacillus sp. PK-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	809	809	99%	0.0	100%
AB089859.1	Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. rittmannii gene for 16S rRNA	808	808	99%	0.0	99%
AB059674.1	Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. acidocaldarius gene for 16S rRNA, strain: DSM 11297	808	808	99%	0.0	99%
AB059673.1	Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. acidocaldarius gene for 16S rRNA, strain: DSM 452	808	808	99%	0.0	99%
AB059672.1	Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. acidocaldarius gene for 16S rRNA, strain: DSM 451	808	808	99%	0.0	99%
AB271754.1	Alicyclobacillus acidocaldarius gene for 16S rRNA, partial sequence	806	806	99%	0.0	99%
X60742.1	B.acidocaldarius 16S rRNA	806	806	99%	0.0	99%
AB060166.1	Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. acidocaldarius gene for 16S rRNA, strain: MIH 321	806	806	99%	0.0	99%
AB042056.1	Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. acidocaldarius gene for 16S rRNA, strain: ATCC 27009	806	806	99%	0.0	99%
AB059671.1	Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. acidocaldarius gene for 16S rRNA, strain: DSM 449	802	802	99%	0.0	99%

4.4.2. Thiobacillus thioparus –kasvatusalustalle muodostuneiden kiteiden analysointi

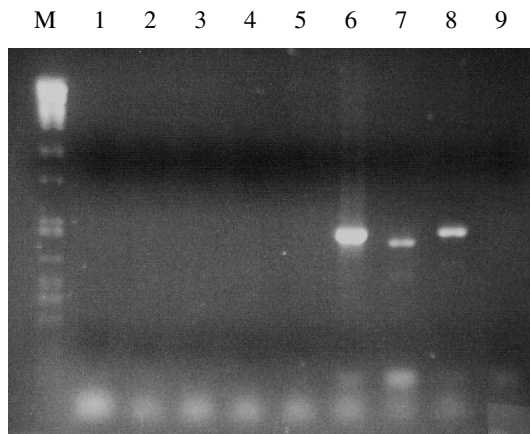
Thiobacillus thioparus –kasvatusalustalle muodostui kahden viikon aikana +37 °C lämmössä tähtimäisiä kiteitä sekä kivi- että vesinäytteistä. Negatiivisella kontrollimaljalla kiteitä oli huomattavasti vähemmän. Myös nestekasvatuksissa todettiin näytettä sisältävän kasvatusliuoksen saostuvan, mitä taas ei tapahtunut negatiivisessa kontrollissa.



Kuva 16. Thiobacillus thioparus –kasvatusalustalle muodostuneet kiteet. Ylärivissä kiviutteen ja konsentroidusta vesinäytteestä muodostuneet kiteet, alarivissä negatiivinen kontrollimalja jolle ei ole lisätty näytettä.

Kun maljoille muodostuneita kiteitä tai nestekasvatusta siirrettiin uusille maljoille, ne aiheuttivat uusien kiteiden muodostumisen. Näytti siis siltä, että kyseessä ovat mikrobit joita voi siirrostaa kasvatusmaljalta toiselle.

Kiteistä pyrittiin eristämään DNA:ta useilla eri menetelmillä. Niihin kokeiltiin lysosyymimenetelmää, Proteinaasi K + lysosyymi –menetelmää, SDS-menetelmää sekä Qiagen DNeasy Tissue Kitin reagensseihin perustuvaa menetelmää. Kiteistä ei kuitenkaan saatu eristettyä PCR-monistuksessa havaittavaa DNA:ta.



Kuva 17. PCR kiteistä eristetylle DNA:lle. Alukepari Uni. M: λ PstI molekyyli­massastandardi, 1: vesinäytteestä maljalle syntynyt kide, 2: kivi­näytteestä maljalle syntynyt kide, 3: nestekasvatus vesinäytteestä, 4: nestekasvatus kivi­näytteestä, 5: nestekasvatuksen negatiivinen kontrolli, 6: *E. coli* DNA, 7: *S. solfataricus* DNA, 8: PCR-inhibitiokontrolli, *E. coli* DNA ja nestekasvatuksen negatiivinen kontrolli, 9: negatiivinen PCR-kontrolli, ei templaatti.

4.5. Fluoresenssimikroskopia

4.5.1. Kivinäytteet

Kivinäytteiden mikroskooppianalyysia testattiin värjäämällä sileäksi hiottu näyte DAPI:lla. Väri sitoutui vahvasti kiven pintaan aiheuttaen vahvan taustafluoresenssin. Testinäytteestä ei ollut mahdollista erottaa soluja taustasta, joten todettiin että tämä menetelmä ei sovellu kivinäytteiden tutkimukseen.

4.5.2. Vesinäytteet

DAPI-värjätystä vesinäytteestä ei löytynyt soluja.

4.5.3. Thiobacillus thioparus –kasvatusalustalle muodostuneet kiteet

Thiobacillus thioparus –kasvatusalustalle muodostuneista DAPI:lla värjättyistä kiteistä tai niiden lähistöltä ei löytynyt DNA:ta. Näytteessä olevat roskat olivat värjäytyneet vahvasti, mistä nähtiin että värjäys oli onnistunut. Tästä pääteltiin että kiteet eivät sisältäneen soluja, vaan olivat epäorgaanisia.

5. Tulosten tarkastelu

Tässä tutkimuksessa pyrittiin kehittämään menetelmiä, jotka soveltuvat erittäin pienien mikrobimäärien tunnistamiseen kivi- ja vesinäytteistä. Näitä menetelmiä sovellettiin Pyhäsalmen kaivoksesta otettuihin kivi- ja vesinäytteisiin. Näytteistä ei löydetty varmasti niissä eläviä mikrobeja, mutta tutkimuksen aikana opimme paljon tällaisten näytteiden käsittelyyn liittyvistä ongelmista.

Eristettäessä DNA:ta syvältä maan alta otetuista näytteistä voidaan kohdata monia ongelmia (ks. yleiskatsaus Herrera ja Cockell, 2007). Kun näytteiden biomassa on erittäin pieni, DNA-eristysmenetelmän on oltava hyvin herkkä. Suorat DNA-eristysmenetelmät ovat yleisesti tehokkaampia kuin epäsuorat menetelmät, joissa solut otetaan erilleen näytteestä ennen DNA-eristystä (Tien ym., 1999). Tässä tutkimuksessa käytimme suoria DNA-eristysmenetelmiä. On tärkeää kokeilla useita erilaisia DNA-eristysmenetelmiä, koska näytteiden koostumus vaikuttaa suuresti DNA-eristyksen onnistumiseen (Henneberger ym., 2006).

Kallioperästä otetut näytteet sisältävät usein DNA:ta sitovia aineita. Esimerkiksi savimineraalit, metallit ja kvartsi voivat sitoutua DNA:han (Aardema ym., 1983) ja vaikeuttaa DNA-eristystä. Ne voivat myös saostua DNA:n mukana. Tällaiset epäpuhtaudet aiheuttavat ongelmia tutkimuksen seuraavissa vaiheissa, kuten DNA:n PCR-monistuksessa. Tämä ongelma oli selvä myös tässä tutkimuksessa, sillä näytteet estivät myös niihin lisätyn *E. coli* –DNA:n monistumisen. Näytteiden laimentaminen PCR-reaktiota varten auttoi tähän ongelmaan. Laimennus vähentää DNA:n määrää näytteissä, mikä saattoi vaikeuttaa sen havaitsemista. PCR-reaktiota estävistä aineista pyrittiin pääsemään eroon lisäämällä DNA-eristykseen puhdistusvaihe, jossa DNA kiinnitettiin selluloosasuodattimeen ja pestiin useita kertoja steriilillä vedellä. Vesinäytteiden kohdalla tämä riitti palauttamaan PCR-reaktion tehon normaalille tasolle. Kivinäytteet estivät PCR-reaktiota vielä puhdistuksen jälkeenkin. Toisin kuin SDS-pohjaisella menetelmällä, proteinaasi K ja lysosyyymi –menetelmällä saatu puhdistettu DNA-eristystuote ei estänyt reaktiota kokonaan. Sekä DNA-eristysmenetelmällä että puhdistusmenetelmällä on siis

suuri vaikutus DNA-eristystuotteiden puhtauteen ja samalla niiden jatkokäsittelyn onnistumiseen.

DNA-eristuksen ja PCR-reaktion valmistuksen aikana näytteeseen päätyvät kontaminaatiot voivat aiheuttaa vääriä tulkintoja näytteiden sisältämästä mikrobidiversiteetistä (Tanner ym., 1998). Steriileillä työskentelytavoilla voidaan vähentää kontaminaatoriskiä, mutta sitä ei voida koskaan sulkea täysin pois. Siksi on tärkeää käyttää kaikissa työvaiheissa negatiivisia kontroleja, joihin ei lisätä näytettä. Tulosten oikeellisuuden varmistamiseksi teimme DNA-eristuksen ilman näytettä samanaikaisesti näytteiden kanssa. Tästä negatiivisesta DNA-eristyskontrollista ei löytynyt DNA:ta, joten onnistuimme välttämään kontaminaatiot tässä työvaiheessa. PCR-reaktiossa käytetty negatiivinen kontrolli, johon ei lisätty templaattia, osoitti työn alkuvaiheessa kontaminaation PCR-monistuksessa. Tästä kontaminaatiosta päästiin eroon vaihtamalla PCR-reagenssit ja valmistamalla reaktiot laminaarikaapissa.

Tässä tutkimuksessa ei useista käytetyistä menetelmistä huolimatta löydetty DNA:ta tutkituista kivi- ja vesinäytteistä. Tähän voi olla useita syitä. Selvin mahdollinen syy on, että näytteet eivät sisältäneet soluja. Toinen mahdollisuus on se, että näytteissä oli soluja, mutta niiden määrä oli niin pieni, ettei käyttämämme menetelmien herkkyys riittänyt tunnistamaan niitä. Kolmantena on se mahdollisuus, että näytteet sisälsivät todellisuudessa merkittäviä määriä soluja, mutta emme löytäneet sopivaa menetelmää DNA:n eristämiseksi. Tämä viimeinen vaihtoehto on epätodennäköinen, sillä kokeilimme useita eri tyyppisiä DNA-eristysmenetelmiä. Solujen merkittävä määrä näytteissä olisi myös ristiriidassa solukasvatuksista ja mikroskooppianalyyseistä saatujen negatiivisten tulosten kanssa.

Syvän kallioperän näytteiden mikrobikoostumus vaihtelee suuresti eri paikkojen välillä. Siksi kasvatuskokeissa tarvitaan useita erilaisia kasvualustoja, jotka on suunnattu spesifisesti eri metaboliaryhmille (Pedersen ja Ekendahl, 1990; Haveman ym., 1999; Zhang ym., 2005). Monista eri kasvatusalustoista huolimatta emme onnistuneet kasvattamaan näytteistä soluja. Vaikka näytteet olisivat sisältäneet mikrobeja, ne tuskin olisivat kasvaneet käyttämässämme hapellisissa olosuhteissa. Lähes kaikki syvällä maan

alla elävät mikrobit ovat anaerobeja, joille happi on myrkyllinen aine. Vaikka jotkut anaerobisista bakteereista voivat kasvaa myös hapellisissa olosuhteissa, se on harvinaista maanalaisissa ympäristöissä joissa happea ei ole koskaan saatavilla. Siksi olisi tärkeää tehdä solukasvatukset hapetomissa olosuhteissa. Valitettavasti tämä ei onnistunut tämän projektin puitteissa.

Sulfolobus solfataricus –kasvatusalustalle kasvanut *Alicyclobacillus*-sukuun kuuluva bakteeri osoitti, kuinka altis tämän tyyppinen tutkimus on kontaminaatioille, vaikka kaikki työvaiheet pyrittiin tekemään mahdollisimman steriilisti.

Monissa tutkimuksissa mikrobien kokonaismäärä näytteistä on onnistuttu arvioimaan fluoresenssimikroskopian avulla (Pedersen ja Ekendahl, 1990; Kotelnikova ja Pedersen, 1997; Haveman ym., 1999; Zhang ym., 2005). Tämä voisi olla yksinkertaisin ja tehokkain tapa selvittää alustavasti, sisältävätkö näytteet soluja. Käyttämämme yksinkertainen DAPI-värjäys ei soveltunut kiviinäytteille, joten tarvittaisiin toisenlainen, kiviinäytteille optimoitu värjäysmenetelmä. Tämän tutkimuksen puitteissa ei ehditty sellaista tehdä, mutta jos aiheeseen liittyvää tutkimusta jatketaan kyseisille näytteille soveltuva värjäysmenetelmä kannattaa ehdottomasti kehittää. Vesinäytteille värjäysmenetelmä soveltuu hyvin. Ainoa tarvittava muutos olisi suuren vesimäärän suodattaminen ja solujen tutkiminen suodattimelta, jotta saataisiin pohjavesinäytteiden erittäin pienet solumäärät näkyviin.

Negatiivisesta tuloksesta huolimatta on huomioitava se mahdollisuus, että mikään käytetyistä menetelmistä ei ollut tarpeeksi tehokas mikrobien tunnistamiseen kyseisistä näytteistä. Näytteet otettiin ja säilytettiin hapellisissa olosuhteissa, mikä voi vaikuttaa merkittävästi niiden mikrobikoostumukseen (Rochelle ym., 1994). Tien ym. (1999) totesivat, että DNA hajoaa useiden viikkojen säilytyksen aikana. Siksi olisi hyvä eristää DNA näytteistä mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen. Tässä tutkimuksessa tämä ei valitettavasti ollut mahdollista. Näytteiden koostumuksella voi olla yllättäviä vaikutuksia DNA-eristysmenetelmien tehoon, eivätkä muissa tutkimuksissa hyviksi todetut DNA-eristysmenetelmät aina toimi erilaisille näytteille (Henneberger ym., 2006). DNA-eristysmenetelmät, joissa solut hajotetaan mekaanisesti ravistelemalla helmien kanssa, kuten käyttämissämme muinaisen DNA:n eristykseen ikiroudasta muokatussa

menetelmässä ja silikamenetelmässä, voivat hajottaa DNA:ta pienempiin osiin (Leff ym., 1995). Ehjän DNA:n saaminen on tärkeää, jotta PCR-reaktio toimisi oikein. Kivinäytteiden DNA-eristystuotteet heikensivät PCR-reaktion toimintaa. Heikentynyt PCR-reaktio ja näytteen laimantamisesta johtuva DNA-määrän pientyminen entisestään ovat voineet aiheuttaa sen, ettei reaktiossa syntynyt havaittavissa olevaa määrää tuotetta. Käyttämämme näytemäärät olivat pieniä, vain yksi tai muutama gramma kivijauhetta tai 45 ml vesinäytettä. Esimerkiksi Sahl ym. (2008) käyttivät DNA-eristyksissä 10 grammaa kiveä ja 2 litrasta vesinäytettä suodatettuja soluja. Mikrobit eivät ole jakaantuneet tasaisesti kallioperässä, vaan näytteiden mikrobikoostumus vaihtelee suuresti myös samalta alueelta otettujen näytteiden välillä (Sahl ym., 2008). Se, että pienestä kivinäytteestä ei löytynyt mikrobeja, ei siis sulje pois sitä mahdollisuutta että näytteenottoaikan syvässä kallioperässä olisi elämää.

Syvän kallioperän näytteiden biologisessa tutkimuksessa on välttämätöntä käyttää useita eri tutkimusmenetelmiä rinnakkain. Monissa eri tutkimuksissa on löydetty tällaisista ympäristöistä monipuolisia mikrobiekosysteemejä (Bastin, 1926; Sisler ja Zobell, 1950; Belyaev ym., 1983; Chapelle ja Lovley, 1990; Pedersen ja Ekendahl, 1990; Szewzyk ym., 1994; Stevens ja McKinley, 1995; Kotelnikova ja Pedersen, 1997; Haveman ym., 1999; Baker ym., 2003; Webster ym., 2003; Sass ja Cypionka, 2004; Zhang ym., 2005; Biddle ym., 2006; Li ym., 2007; Sahl ym., 2008). Silti tietoa syvästä biosfääristä on vielä kovin vähän ja tutkimuksessa kohdataan runsaasti erilaisia ongelmia. Nämä tutkimukset vaativat erityisen paljon tieteellistä tarkkuutta ja monipuolista osaamista niin molekyylibiologian, mikrobiologian ja biokemian, kuin myös geologian ja kemian aloilta.

Lähdeluettelo

- Aardema, B.W., M.G. Lorenz, and W.E. Krumbein. 1983. Protection of Sediment-Adsorbed Transforming DNA Against Enzymatic Inactivation. *Appl. Envir. Microbiol.* 46: 417-420.
- Baker, B.J., D.P. Moser, B.J. MacGregor, S. Fishbain, M. Wagner, N.K. Fry, B. Jackson, N. Speolstra, S. Loos, K. Takai, B. Sherwood Lollar, J. Fredrickson, D. Balkwill, T.C. Onstott, C.F. Wimpee, and D.A. Stahl. 2003. Related assemblages of sulphate-reducing bacteria associated with ultradeep gold mines of South Africa and deep basalt aquifers of Washington State *Environmental Microbiology* 5(4):267–277.
- Bastin, E. 1926. Microorganisms in oil fields. *Science.* 63:21-24.
- Belyaev, S.S., R. Wolkin, W.R. Kenealy, M.J. Deniro, S. Epstein, and J.G. Zeikus. 1983. Methanogenic Bacteria from the Bondyuzhskoe Oil Field: General Characterization and Analysis of Stable-Carbon Isotopic Fractionation. *Appl Environ Microbiol.* 45(2):691-697.
- Biddle, J.F., J.S. Lipp, M.A. Lever, K.G. Lloyd, K.B. Sørensen, R. Anderson, H.F. Fredricks, M. Elver, T.J. Kelly, D.P. Schrag, M.L. Sogin, J.E. Brenchley, A. Teske, C.H. House, and K.U. Hinrichs. 2006. Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(10):3846-51.
- Brock, T.D., K.M. Brock, R.T. Belly, R.L. Weiss. 1972. Sulfolobus: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch Mikrobiol.* 84(1):54-68.
- Bulat, S.A., M. Lübeck, I.A. Alekhina, D.F. Jensen, I.M.B. Knudsen ja P.S. Lübeck. 2000. Identification of a universally primed-PCR-derived sequence-characterized amplified region marker for an antagonistic strain of *Clonostachys rosea* and development of a strain-specific PCR detection assay. *Appl Environ Microbiol.* 66(11):4758-4763.
- Chang S.S., and D.H. Kang. 2004. Alicyclobacillus spp. in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Crit Rev Microbiol.* 30(2):55-74.
- Chapelle, F.H., and Lovley DR. 1990. Rates of Microbial Metabolism in Deep Coastal Plain Aquifers. *Appl Environ Microbiol.* 56(6):1865-1874.
- Clifford, S.M. 1993. A Model for the Hydrologic and Climatic Behavior of water on Mars. *J. Geophys. Res.* 98:10973–11016.
- Cockell, C.S. 2003. Impossible extention. Natural catastrophes and the supremacy of the microbial world. Cambridge university press. 181 pp.
- Colwell, F.S., G.J. Stormberg, T.J. Phelps, S.A. Birnbaum, J. McKinley, S.A. Rawson, C. Veverka, S. Goodwin, P.E. Long, B.F. Russell, T. Garland, D. Thompson, P. Skinner, and S. Grover. 1992. Innovative techniques for collection of saturated and unsaturated subsurface basalts and sediments for microbiological characterization. *J. Microbiol. Methods* 15:279–292.
- Corliss, J.B., J. Dymond, L.I. Gordon, J.M. Edmond, R.P. von Herzen, R.D. Ballard, K. Green, D. Williams, A. Bainbridge, K. Crane, and T.H. van Andel. 1979. Submarine Thermal Springs on the Galapagos Rift. *Science.* 203(4385):1073-1083.
- Fredrickson, J.K., and T.C. Onstott. 1996. Microbes deep inside the earth. *Sci Am.* 275(4):68-73.
- Gold, T. The deep, hot biosphere. 1992. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(13):6045-9.
- Guerrero R. 1998. Crucial crises in biology: life in the deep biosphere. *Int Microbiol.* 1(4):285-94.

- Guldbaek Schmidt, K. 2007. The Water Cycle on Mars. PhD Thesis, University of Copenhagen, Denmark. 106 pp.
- Haveman, S., K. Pedersen, and P. Ruotsalainen. 1999. Distribution and metabolic diversity of microorganisms in deep igneous rock aquifers of Finland. *Geomicrobiology Journal* 16: 277-294.
- Head, I.M., D.M. Jones, and S.R. Larter. 2003. Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature*. 426(6964):344-52.
- Henneberger, R.M., M.R. Walter, and R.P. Anitori. 2006. Extraction of DNA from acidic, hydrothermally modified volcanic soils, *Environ. Chem.* 3:100–104.
- Herrera, A., C.S. Cockell. 2007. Exploring microbial diversity in volcanic environments: a review of methods in DNA extraction. *J Microbiol Methods*. 70(1):1-12.
- Holliger, C., S. Gaspard, G. Glod, C. Heijman, W. Schumacher, R.P. Schwarzenbach, and F. Vazquez. 1997. Contaminated environments in the subsurface and bioremediation: organic contaminants. *FEMS Microbiol. Rev.* 20(3-4):517-23.
- Kashefi, K. and D.R. Lovley. 2003. Extending the upper temperature limit for life. *Science*. 301(5635):934.
- Kepner RL Jr, Pratt JR. 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiol Rev*. 58(4):603-15.
- Kotelnikova, S., and K. Pedersen. 1997. Evidence for methanogenic *Archaea* and homoacetogenic *Bacteria* in deep granitic rock aquifers. *FEMS Microbiol. Rev.* 20(3-4):339-349.
- Leff, L. G., J. R. Dana, J. V. McArthur, and L. J. Shimkets. 1995. Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1141-1143.
- Lehman, R.M., F.S. Colwell, D.B. Ringelberg, and D.C. White. 1995. Combined microbial community-level analyses for quality assurance of terrestrial subsurface cores. *J. Microbiol. Methods* 22, 263–281.
- Li, H., S.Z. Yang, B.Z. Mu, Z.F. Rong, and J. Zhang. 2007. Molecular phylogenetic diversity of the microbial community associated with a high-temperature petroleum reservoir at an offshore oilfield. *FEMS Microbiol Ecol.* 60(1):74-84.
- Lichtfouse, E. 2000. Compound-specific isotope analysis. Application to archaeology, biomedical sciences, biosynthesis, environment, extraterrestrial chemistry, food science, forensic science, humic substances, microbiology, organic geochemistry, soil science and sport, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14:1337–1344.
- Liesack, W., H. Weyland, and E. Stackebrandt. 1991. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Microb. Ecol.* 21:191–198.
- Lin, L-H., G.F. Slater, B. Sherwood Lollar, G. Lacrampe-Couloume, and T.C. Onstott. 2005. The yield and isotopic composition of radiolytic H₂, a potential energy source for the deep subsurface biosphere. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 69(4):893-903.
- Magot, M., B. Ollivier, and B.K. Patel. 2000. Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 77(2):103-16.
- Mancinelli, R.L. 2000. Accessing the Martian deep subsurface to search for life. *Planetary and Space Science.* 48(11):1035-1042.
- Martin, W., and M.J. Russell. 2003. On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358(1429):59-83

- McKinley, I.G., I. Hagenlocher, W.R. Alexander, and B. Schwyn. 1997. Microbiology in nuclear waste disposal: interfaces and reaction fronts. *FEMS Microbiol. Rev.* 20:545–556.
- Nealson, K.H., A. Belz, and B. McKee. 2002. Breathing metals as a way of life: geobiology in action. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 81(1-4):215-22.
- Pedersen, K. and S. Ekendahl. 1990. Distribution and activity of bacteria in deep granitic groundwaters of southeastern sweden. *Microb. Ecol.* 20:37-52.
- Phelps, T. J., E. M. Murphy, S. M. Pfiffner, and D. C. White. 1994. Comparison between geochemical and biological estimates of subsurface microbial activities. *Microb. Ecol.* 28:335-349.
- Rochelle, P.A., B.A. Cragg, J.C. Fry, R.J. Parkes, and A.J. Weightman. 1994. Effect of sample handling on estimation of bacterial diversity in marine sediments by 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 15:215–225.
- Röling, W.F., and H.W. Verseveld. 2002. Natural attenuation: what does the subsurface have in store? *Biodegradation.* 13(1):53-64.
- Sahl, J.W., R. Schmidt, E.D. Swanner, K.W. Mandernack, A.S. Templeton, T.L. Kieft, R.L. Smith, W.E. Sanford, R.L. Callaghan, J.B. Mitton, and J.R. Spear. 2008. Subsurface microbial diversity in deep-granitic-fracture water in Colorado. *Appl Environ Microbiol.* 74(1):143-52.
- Saltikoff, B., K. Puustinen, and M. Tontti. 2006. Metallogenic zones and metallic mineral deposits in Finland: explanation to the Metallogenic map of Finland. Geological Survey of Finland. Special Paper 35. Geological Survey of Finland, Espoo.
- Sass, H., and H. Cypionka. 2004. Isolation of sulfate-reducing bacteria from the terrestrial deep subsurface and description of *Desulfovibrio cavernae* sp. nov. *Syst Appl Microbiol.* 27(5):541-8.
- Sherwood Lollar, B., S.K. Frapre, P. Fritz, S.A. Macko, J.A. Welhan, R. Blomqvist, and P.W. Lahermo. 1993. Evidence for bacterially-generated hydrocarbon gas in Canadian and Fennoscandian Shield rocks. *Geochim. Cosmo. acta.* 57:5073-5085.
- Sherwood Lollar B., K. Voglesonger, L.H. Lin, G. Lacrampe-Couloume, J. Telling, T.A. Abrajano, T.C. Onstott, and L.M. Pratt. 2007. Hydrogeologic controls on episodic H₂ release from precambrian fractured rocks--energy for deep subsurface life on earth and mars. *Astrobiology.* 7(6):971-86.
- Sisler, F.D., and C.E. Zobell. 1950. Hydrogen-utilizing, sulfate-reducing bacteria in marine sediments. *J Bacteriol.* 60(6):747-56.
- Sleep, N.H., K.J. Zahnle, J.F. Kasting, and H.J. Morowitz. 1989. Annihilation of ecosystems by large asteroid impacts on the early Earth. *Nature.* 342(6246):139-42.
- Squyres, S.W., and J.F. Kasting. 1994. Early Mars: how warm and how wet? *Science.* 265:744-9.
- Stevens, T.O., and J.P. McKinley. 1995. Lithoautotrophic Microbial Ecosystems in Deep Basalt Aquifers. *Science.* 270:450-455.
- Stevens, T. 1997. Lithoautotrophy in the subsurface. *FEMS Microbiol. Rev.* 20(3-4):327-337.
- Stroes-Gascoyne, S., and J.M. West. 1997. Microbial studies in the Canadian nuclear fuel waste management program. *FEMS Microbiol. Rev.* 20(3-4):573-90.
- Szewzyk, U., R. Szewzyk, and T.A. Stenström. 1994. Thermophilic, anaerobic bacteria isolated from a deep borehole in granite in Sweden. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(5):1810-3.

- Takai, K. ja K. Horikoshi. 2000. Rapid Detection and Quantification of Members of the Archaeal Community by Quantitative PCR Using Fluorogenic Probes. *Appl Environ Microbiol.* 66(11):5066-5072.
- Tanner, M.A., B.M. Goebel, M.A. Dojka, and N.R. Pace. 1998. Specific ribosomal DNA sequences from diverse environmental settings correlate with experimental contaminants, *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3110–3113.
- Tien, C.C., C.C. Chao, and W.L. Chao. 1999. Methods for DNA extraction from various soils: a comparison. *J. Appl. Microbiol.* 86:937–943.
- Trevors, J.T. 2002. The subsurface origin of microbial life on the Earth. *Res Microbiol.* 153(8):487-91.
- Webster, G, C.J. Newberry, J.C. Fry, and A.J. Weightman. 2003. Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale. *J Microbiol Methods.* 55(1):155-64.
- Weihed, P., N. Arndt, K. Billström, J-C. Duchesne, P. Eilu, O. Martinsson, H. Papunen ja R. Lahtinen. 2005. Precambrian geodynamics and ore formation: The Fennoscandian Shield. *Ore Geology Reviews.* 27:273-322.
- Weisburg, W. G., S.M. Barns, D.A. Pelletier, and D.J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173, 697–703.
- White, D.C., J.O. Stair, and D.B. Ringelberg. 1996. Quantitative comparisons of in situ microbial biodiversity by signature biomarker analysis. *J. Ind. Microbiol.* 17:185–196.
- Whitman, W.B., D.C. Coleman, and W.J. Wiebe. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(12):6578-83.
- von Wintzingerode, F., U.B. Göbel, and E. Stackebrandt. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21(3):213–229.
- Zhang G., H. Dong, Z. Xu, D. Zhao, and C. Zhang. 2005. Microbial diversity in ultra-high-pressure rocks and fluids from the Chinese Continental Scientific Drilling Project in China. *Appl Environ Microbiol.* 71(6):3213-27.
- Zhou, J., M.A. Bruns ja J.M. Tiedje. 1996. DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. *Appl Environ Microbiol.* 62(2):316-322.