

2,4,6-TRIKLOORIFENOLILLA  
KONTAMINOITUJEN MAIDEN  
MIKROBISTON ANALYSOINTI  
PCR-DGGE-MENETELMÄLLÄ

LAHDEN AMMATTIKORKEAKOULU  
Tekniikan ala  
Ympäristötekniikan koulutusohjelma  
Ympäristöbiotekniikka  
Opinnäytetyö  
Kevät 2010  
Maiju Selin

Lahden ammattikorkeakoulu  
Ympäristötekniikan koulutusohjelma

SELIN, MAIJU: 2,4,6-trikloorifenolilla kontaminoitujen  
maiden mikrobiston analysointi  
PCR-DGGE-menetelmällä

Ympäristöbiotekniikan opinnäytetyö 54 sivua, 20 liitesivua

Kevät 2010

## TIIVISTELMÄ

---

Suomessa vanhojen sahojen maaperät ovat pääsääntöisesti kloorifenoleiden ja niiden epäpuhtauksien saastuttamia. Kloorifenolit päätyivät maaperään 1930–1980-luvuilla käytetyn KY-5-nimisen sahatavarassa home- ja sinistäjäsiementen aiheuttamia värivikoja estävän puunsuoja-aineen käytön seurauksena. Pilaantuneen maaperän kunnostuksessa on tavallisesti käytetty massanvaihtoa, mutta kloorifenolit hajoavat myös biologisesti useiden eri mekanismien kautta.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli vertailla kolmen eri maatyypin, humus-, turve- ja kivennäismaiden, bakteeridiversiteettiä sekä 2,4,6-trikloorifenolin (2,4,6-TCP) lisäyksen vaikutuksia siihen PCR-DGGE-menetelmän avulla. Kaksois-PCR:n (nestedPCR) ensimmäisessä vaiheessa käytettiin *Pseudomonas*-kantoja valikoivia alukkeita ja toisessa vaiheessa universaaleita alukkeita. Bakteeridiversiteettiä arvioitiin vertailemalla sekä DGGE-geeliltä leikattuja ja sekvensoituja DNA-fragmentteja että DGGE-geelikuvia.

Tulosten perusteella viljelemättömät alfaproteobakteerit olivat selvä enemmistö kaikissa maatyypeissä ja niitä löytyi kaikista käsittelyistä koko koejärjestelyn ajan. Tutkimuksen kohteena olleita *Pseudomonas*-lajeja identifioitiin eniten 2,4,6-TCP:llä käsitellyistä kivennäismaasta ja toiseksi eniten kivennäismaan kontrollista. Bakteeridiversiteetiltään kivennäismaa poikkesi selvästi humus- ja turvemaista, jotka taas keskenään olivat hyvin samanlaisia. Kaikissa maissa diversiteetti oli suurimmillaan viikkojen nolla ja neljä aikapisteissä ja väheni selvästi viikkoon kaksitoista mennessä.

2,4,6-TCP:n lisäyksellä ei ollut selvää vaikutusta maiden bakteeridiversiteettiin, sillä kontrollikokeet eivät poikenneet 2,4,6-TCP:llä käsitellyistä kokeista. Osa bakteerilajeista kuitenkin selvästi lisääntyi koejärjestelyn aikana, joten ne pystyivät sietämään ja mahdollisesti myös hyötymään kloorifenoliyhdisteen läsnäolosta.

Avainsanat: kloorifenoli, 2,4,6-TCP, biohajoaminen, kaksois-PCR, nestedPCR, *Pseudomonas*

Lahti University of Applied Sciences  
Degree Programme in Environmental Technology

SELIN, MAIJU:

The microbial analysis of 2,4,6-  
trichlorophenol contaminated soils using  
PCR-DGGE method

Bachelor's Thesis in Environmental Biotechnology 54 pages, 20 appendices

Spring 2010

ABSTRACT

---

In Finland, old saw mill sites are mainly contaminated by chlorophenols and their impurities. During the 1930s-1980s, KY-5, which contained chlorophenols, was used as a preservative to provide long-term protection of wood and timber against fungal decay and insects, with the result that chlorophenols spread to the ground. The most common remediation method for contaminated sites is mass exchange, but for soils contaminated by chlorophenols, bioremediation is also an option, because microbes can degrade chlorophenols through several degradation pathways.

The aim of this bachelor's thesis was to analyse the bacterial diversity of three different soil types, peat, humus and mineral soils, which were artificially contaminated with 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP), using the PCR-DGGE method. The first phase of nestedPCR was done using specific *Pseudomonas* primers, and the second phase using universal primers. The analysis of bacterial diversity was done by comparing both DNA-fragments that were cut from DGGE and sequenced and DGGE pictures.

The results showed that the uncultured alpha proteobacters were the majority in all the three soil types, and they were found in all treatments through the whole experiment. Most of the *Pseudomonas* species were found in 2,4,6-TCP contaminated mineral soil and its control. Mineral soil was also clearly different by its bacterial diversity when compared to humus soil and peat, which both were very similar with each other. In all the soil types, diversity was biggest at the start point and after four weeks and clearly smaller by the end of the experiment (week 12).

Because the controls and 2,4,6-TCP contaminated soils were similar with each other, there were no clear signs of 2,4,6-TCP affecting to bacterial diversity. However, some of the bacterial species had clearly multiplied during the experiment, so some of the species were able to gain benefit from the presence of 2,4,6-TCP.

Key words: chlorophenol, 2,4,6-TCP, biodegradation, nestedPCR, *Pseudomonas*

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
2	MAAPERÄN PILAANTUNEISUUS JA KLOORIFENOLIT	3
2.1	Maaperän pilaantuneisuus Suomessa	3
2.2	Haitallisten aineiden kertyminen ja vaikutukset eliöihin	5
2.3	Kloorifenolit maaperässä	6
3	KLOORIFENOLIEN BIOHAJOAMINEN	9
3.1	Biologinen hajoaminen	9
3.2	Kloorifenolien biohajoaminen	11
3.3	Kloorifenoleita hajottavia bakteereita	13
4	TUTKIMUKSEN TOTEUTUS	15
4.1	Hajoamiskoejärjestely	17
4.2	Molekyylibiologiset tutkimukset	18
4.2.1	Kokonais-DNA-eristys	21
4.2.2	Kaksois-PCR (nestedPCR)	22
4.2.3	DGGE	24
4.2.4	DNA-sekvenssien editointi ja linjaus	26
4.2.5	Kimeerisyystarkistus	27
5	TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	30
5.1	Kokonais-DNA-eristys, PCR- ja DGGE-ajot	30
5.2	Sekvenssien editointi ja kimeerisyystarkistus	31
5.3	Sekvenssien identifiointi	34
5.4	DGGE-gealien tarkastelu	38
5.5	Identifioitujen bakteerien ja DGGE-gealien yhteistarkastelu	42
6	JOHTOPÄÄTÖKSET	46
	LÄHTEET	49
	LIITTEET	55

# 1 JOHDANTO

Vuonna 2008 maaperän puhdistamista koskevista hallintopäätöksistä noin 2,2 % koski kloorifenoleilla ja/tai dioksiineilla (PCDD) ja furaaneilla (PCDF) pilaantuneita maa-alueita. Kyseiset aineet olivat päätyneet maaperään lähinnä sahateollisuudessa 1930–1980-luvuilla käytetyn KY-5-nimisen puutavaran sinistymisenestoaineen käytön seurauksena. KY-5:tä käytettiin laajalti ympäri Suomea ja Suomen valtion ympäristöhallinnon ylläpitämän maaperän tilan tietojärjestelmän mukaan noin 4 % pilaantuneista maa-alueista on pilaantunut saha- tai kyllästämötoiminnan seurauksena. (Suomen ympäristökeskus 2010e.)

Pilaantuneiden maa-alueiden yleisin kunnostusmenetelmä on massanvaihto, jossa pilaantunut maa-aines kaivetaan pois ja kuljetetaan muualle käsiteltäväksi. Yleensä käsittelymenetelmänä on käytetty kompostointia, kiinteytystä tai stabilointia. Joissain tapauksissa maamassoille on tehty huokoskaasu- tai alipainekäsittely tai ne on käsitelty termisesti tai pesemällä. Massanvaihdon sijasta yksittäisissä kohteissa on käytetty myös pilaantuneen aineksen eristämistä, kemiallista hapetusta, haihtuvien yhdisteiden huokosilmapuhdistusta tai luontaista puhdistusta, jolloin maa-alueen puhdistumista on vain monitoroitu. (Suomen ympäristökeskus 2010f.)

Maaperän luontaista puhdistumista on tutkittu muun muassa Helsingin yliopiston Tehostettu luonnonvalinta ja mikrobit -hankekokonaisuudessa. Hankekokonaisuuden Marjatta ja Eino Kollin säätiön tukeman Puunsuoja-aineilla pilaantuneen maan puhdistaminen maaperän bakteerien avulla -hankkeen tavoitteena on puunsuoja-aineiden, eli kreosootin ja KY-5:n ainesosien, riittävään hajottamiseen kykenevien luontaisten mikrobikantojen löytäminen tai jalostaminen. Lisäksi hankkeessa tutkitaan, voidaanko pilaantuneen maan puhdistustulosta parantaa bioaugmentaation avulla. (Sinkkonen & Kauppi 2010.)

Tämä opinnäytetyö tehtiin edellä mainitun tutkimushankkeen alaisuudessa. Opinnäytetyön tarkoituksena oli vertailla kolmen eri maatyypin, humus-, turve- ja kivennäismaiden, bakteeridiversiteettiä sekä 2,4,6-trikloorifenolin (2,4,6-TCP) lisäyksen vaikutuksia siihen. Bakteerien 16S rRNA-geeniä monistettiin polyme-

raasiketjureaktiolla (PCR) ja saadut DNA-jaksot analysoitiin denaturoivan gradienttigelielektroforeesin (DGGE) avulla. Kaksois-PCR:n (nestedPCR) ensimmäisessä vaiheessa käytettiin *Pseudomonas*-kantoja valikoivia alukkeita ja toisessa vaiheessa universaaleita alukkeita. Bakteridiversiteettiä arvioitiin vertailemalla sekä DGGE-geeliltä leikattuja ja sekvensoituja DNA-fragmentteja että DGGE-geelikuvia.

Opinnäytetyö oli jatkoa Kirsi Kalojärven saman hankekokonaisuuden alaisuudessa aiemmin tehdyille 2,4,6-trikloorifenolin hajoaminen eri maatyypeissä -opinnäytetyölle, jonka mukaan 2,4,6-TCP oli hajonnut nopeimmin humusmaassa, jossa oli neljässä viikossa hajonnut noin 96 % ja 12 viikossa 99 % alkuperäisestä 2,4,6-TCP-määrästä. Toiseksi nopeinta hajoaminen oli ollut kivennäismaassa, jossa neljässä viikossa oli hajonnut noin 70 % ja 12 viikossa 99 % alkuperäisestä määrästä. Hitainta hajoaminen oli ollut turvemaassa, jossa koejärjestelyn aikana oli hajonnut vain 34 % alkuperäisestä 2,4,6-TCP-määrästä. (Kalojärvi 2009, 24.)

2,4,6-TCP oli valittu tutkittavaksi aineeksi, koska se oli yksi KY-5:n ainesosista ja hajoamisnopeudeltaan koejärjestelyyn sopiva. Mikrobin analysoinnissa monistamisen kohteena olleet *Pseudomonas*-kannat taas olivat tunnettuja kloorifenoliyhdisteitä hajottavia bakteereita. Opinnäytetyön ohjaajina toimivat Aki Sinkkonen ja Sari Kauppi tutkimushankkeen puolesta ja Silja Kostia Lahden ammattikorkeakoulusta.

## 2 MAAPERÄN PILAANTUNEISUUS JA KLOORIFENOLIT

### 2.1 Maaperän pilaantuneisuus Suomessa

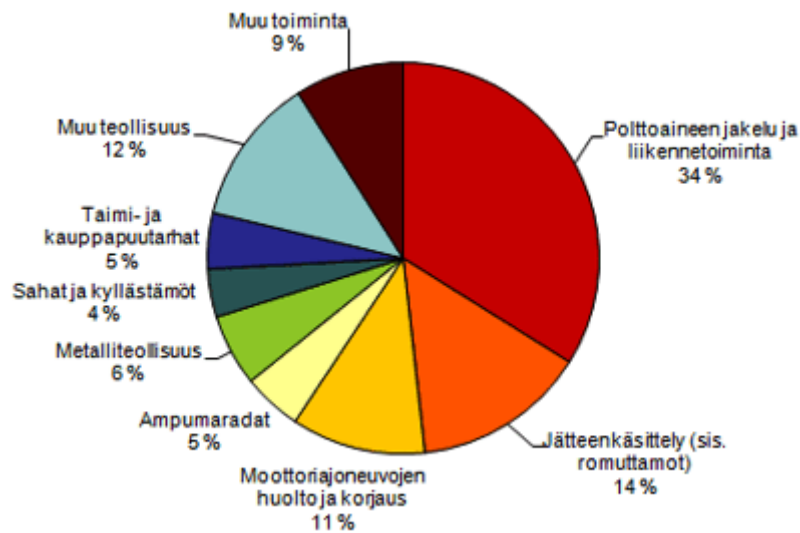
Verrattuna muuhun Eurooppaan Suomessa maaperä on keskimäärin puhdasta. Tästä huolimatta Suomessa on tuhansia saastuneita maa-alueita, ja vaikka alueet ovat yleensä pieniä, voivat niiden kemikaalipitoisuudet olla suuria. Monet maaperää saastuttavista myrkyistä ovat sitoutuneet maaperään melko pysyvästi ja lähtevät liikkeelle vasta ympäristöolojen muuttuessa, kuten happamoitumisen tai maansiirtotöiden seurauksena. Kuitenkin normaalioloissakin saastuneilta alueilta saattaa tihkua haitallisia määriä myrkyllisiä aineita, jotka voivat ajan kuluessa päätyä pohjavesiin. (Suomen ympäristökeskus 2010a.)

Maaperä luokitellaan pilaantuneeksi, kun siihen ihmisen toiminnan seurauksena päässeet aineet voivat aiheuttaa haittaa ihmisen terveydelle tai luonnolle, vähentää ympäristön viihtyisyyttä tai käyttöarvoa tai muuten loukata yleistä tai yksityistä etua. Pilaantumisen vakavuuteen vaikuttavat ensisijaisesti maaperässä olevien aineiden määrät ja pitoisuudet, mutta siihen vaikuttavat myös pilaantuneen alueen ja sen lähiympäristön käyttötarkoitus ja luonnonolot. Valtion ympäristöhallinnon ylläpitämässä maaperän tilan tietojärjestelmässä on tällä hetkellä tietoja runsaasta 21 000 maa-alueesta, joilla maaperä saattaa olla pilaantunut tai sen tiedetään olevan pilaantunut tai kunnostettu. (Reinikainen 2007, 7; Suomen ympäristökeskus 2010e.)

Tavallisesti maaperän paikallinen pilaantuminen on seurausta onnettomuudesta tai vahinkotapauksesta tai vähitellen kertyneistä normaalin toiminnan ympäristöpäästöistä. Suurin osa, yli kolmannes, pilaantuneista maa-alueista on pilaantunut polttoaineen jakelun ja liiketoiminnan seurauksena (kuvio 1). Myös jätteenkäsittely sekä moottoriajoneuvojen huolto ja korjaus ovat lukumääräisesti aiheuttaneet runsaasti pilaantuneita maa-alueita kattaen yhteensä noin neljänneksen kaikista pilaantuneista maa-alueista. Teollisen toiminnan lisäksi muita maaperän pilaantu-

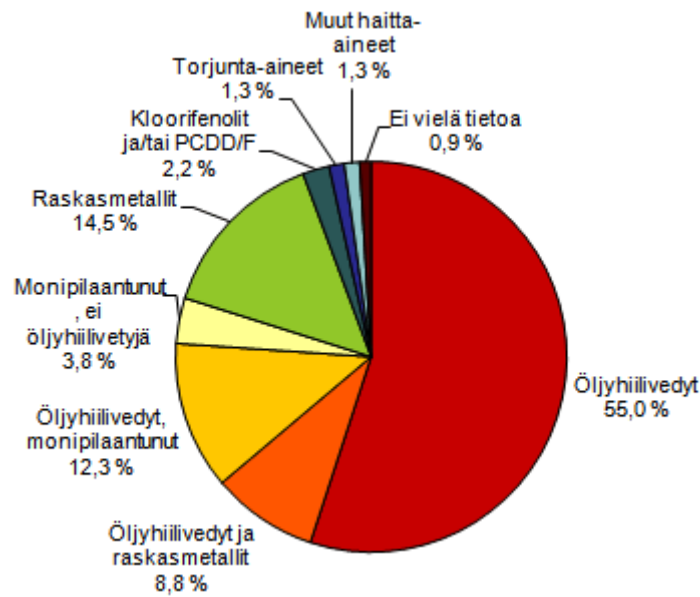
mista aiheuttaneita toimintoja ovat olleet ampumaradat, sahat, kyllästämöt sekä taimi- ja kauppapuutarhat. (Suomen ympäristökeskus 2010e.)

Yleisimmät maaperää pilanneet aineet ovat maaperän puhdistamista koskevien hallintopäätösten mukaan öljyhiilivedyt ja raskasmetallit (kuvio 2), jotka yhteensä kattavat noin 90 % maaperän puhdistamista koskevista hallintopäätöksistä. Muita maaperää pilanneita aineita ovat muun muassa kloorifenolit, furaanit ja dioksiinit, liuottimet ja torjunta-aineet. (Suomen ympäristökeskus 2010e.)



KUVIO 1. Pilaantuneiden maa-alueiden jakautuminen alueella harjoitetun toiminnan mukaan (Suomen ympäristökeskus 2010e)





KUVIO 2. Maaperää pilanneiden aineiden jakauma (Suomen ympäristökeskus 2010e)

## 2.2 Haitallisten aineiden kertyminen ja vaikutukset eliöihin

Maaperän pilaantumisen seuraukset voivat ilmetä välittömästi pilaantumisen jälkeen tai vasta myöhemmin vuosien saatossa. Välittömät vaikutukset ovat nähtävissä esimerkiksi näkyvinä ainekertyminä ympäristössä sekä akuutteina myrkyvaikutuksina eliöissä ja kasvillisuudessa.

Yleensä haitallisten yhdisteiden vaikutukset alkavat näkyä eliöissä kuitenkin vasta pitkän altistuksen ja kertymisen jälkeen. Monet yhdisteet ovat biokertyviä, eli ne voivat sitoutua solukalvolle tai solun sisään ja siten rikastua ravintoketjuissa. Eliöissä myrkyt voivat vaikuttaa suoraan biokemiallisesti entsyymeihin ja hormoneihin sekä estämällä että muuttamalla niiden toimintaa. Ne voivat aiheuttaa myös rakenteellisia muutoksia syövyttämällä, ärsyttämällä tai liuottamalla. Myrkyt voivat vaikuttaa eliöihin myös epäsuorasti kertymällä eri elimiin, kuten luustoon, maksaan tai munuaisiin, jolloin ne voivat aiheuttaa hermostollisia sekä munuais- ja sydän-verisuoni-vaikutuksia. Myös lisääntymisessä voi ilmetä ongelmia. (Suomen ympäristökeskus 2010b.)

Ihminen altistuu ympäristömyrkyille tyypillisesti hengityksen, ihon tai ravinnon välityksellä. Useimmiten altistuminen on niin vähäistä, ettei suoria terveysvaikutuksia voida osoittaa, vaan mahdolliset haitat ilmenevät vasta useiden vuosien tai vuosikymmenten altistuksen jälkeen. Elimistössä yhdisteet voivat vaikuttaa entsyymien sekä hormoni- ja immuunijärjestelmien toimintaan. Lisäksi karsinogeeniset yhdisteet voivat lisätä syöpäriskiä. (Reinikainen 2007, 37; Suomen ympäristökeskus 2010c.)

### 2.3 Kloorifenolit maaperässä

Kloorifenoleita syntyy luonnostaan esimerkiksi tulivuorenpurkausten ja metsäpalojen yhteydessä ja niitä esiintyykin sekä merissä että turve- ja metsämaissa. Orgaanisia kloorifenoliyhdisteitä voidaan valmistaa myös synteettisesti antamalla kloorin reagoida fenolin kanssa, jolloin fenolin aromaattisen renkaan vetyatomeja korvautuu klooriatomeilla. Yhteen renkaaseen voi kiinnittyä yhdestä viiteen klooriatomia. Koska kloorifenolit ovat myrkyllisiä ja niillä on laaja-alaisesti mikroorganismien tuhoava vaikutus, suurin osa luonnossa esiintyvistä kloorifenoliyhdisteistä onkin peräisin ihmisen toiminnasta, sillä niitä on käytetty liimoissa, maaleissa, nahan käsittelyssä, rakennusmateriaaleissa, valokuvausliuoksissa, tekstiileissä ja teollisuuden kiertovesijärjestelmissä torjumaan sienten, bakteerien, levien, tuhohyönteisten ja -kasvien sekä nilviäisten kasvua. (Gribble 2003, 289; Lindroos 2005, 271; Philp, Bamforth, Singleton & Atlas 2005, 26.)

Suomessa kloorifenoleita on käytetty erityisesti puunsuojauksessa estämässä home- ja sinistäjäsiementen aiheuttamia väriavioja sahatavarassa, ja vanhojen sahojen maaperät ovatkin pääsääntöisesti kloorifenoleiden ja niiden epäpuhtauksien saastuttamia. Sahoilla käytettiin 1930-luvulta lähtien natriumpentakloorifenolaattia puutavaran sinistymisenestoaineena. Aluksi suoja-aine tuotiin ulkomailta, mutta vuonna 1938 Kymiyhtiö kehitti vastaavanlaisen kotimaisen tuotteen, joka syrjäytti 1940-luvulla ulkomaiset valmisteet. (Lindroos 2005, 271; Suomen ympäristökeskus 2010d; Ahola 1999, 6.)

Suomessa sinistymisenestoainetta valmistettiin KY-5-tuotenimellä. Kuusankoskella sijainnut Kymiyhtiön tuotantotehdas valmisti vuosien 1938–1984 aikana noin 24 000 tonnia KY-5:tä ja tuotanto oli suurimmillaan 1970-luvulla. Ainetta käytettiin arvioilta 300 suurella ja 10 000 pienellä sahalla ympäri Suomea. Aineen valmistus kiellettiin 1980-luvun puolivälissä ja käyttö vuonna 1989, kun havaittiin aineen haitallisuus ihmiselle ja ympäristölle. (Lindroos 2005, 271; Suomen ympäristökeskus 2010d; Opetushallitus 2010; Ahola 1999, 6.)

KY-5-valmisteessa kloorifenolit olivat jauhemaisina natriumsuoloina ja sitä käytettiin 1–5 % vahvana vesiliuoksena. Valmiste sisälsi 70–80 % 2,3,4,6-tetrakloorifenolia, 5–15 % 2,4,6-trikloorifenolia sekä 5–15 % pentakloorifenolia. Lisäksi valmisteessa esiintyi epäpuhtauksina polykloorattuja dibentso-*p*dioksiineja ja -furaaneja sekä difenyyliettereitä. (Reinikainen 2007, 126.)

Sahatavaran sinistymisenestosuojauksessa käytettiin pääasiassa kolmea eri kastelumenetelmää. Puutavara kasteltiin joko niputtain tai yksittäin kastelualtaassa tai sumuttamalla. Suojausainetta pääsi valumaan ympäristöön puutavaran kastelun yhteydessä sekä kuljettaessa märkiä nippuja kastelupaikalta varastoon. Myös varastoinnin ja kuivauksen aikana ainetta pääsi valumaan maaperään. Maaperän saastuminen aiheutui usein myös jätehuollon puutteellisuuden takia. Sinistymänsojauksessa kastelualtaiden pohjalle kertynyt purua ja tikkuja sisältänyt sakka nostettiin usein suoja-altaan viereen ja jätettiin siihen, ellei sitä poltettu sahan voimalaitoksella tai viety kaatopaikalle. Myös onnettomuuksien, kuten tulipalojen yhteydessä, haitta-aineita joutui usein ympäristöön. (Ahola 1999, 6.)

Merkittävimmät kloorifenoleiden altistusreitit ihmiselle olivat iho ja hengitystiet. Kloorifenoleiden aiheuttamat tärkeimmät terveyshaitat ihmiselle olivat ihon, limakalvojen ja hengitysteiden ärsytys sekä ärsytyskosketushottuma. Voimakas altistuminen saattoi aiheuttaa hengitysvaikeuksia, hikoilua, kuumetta ja vatsavaivoja. Pitkäaikainen tai voimakas altistus saattoi johtaa myrkytykseen. Nykyisin pentakloorifenoli, sen suolat ja 2,4,6-trikloorifenoli on luokiteltu syöpää aiheuttaviksi. (Lindroos 2005, 271–272; Lehtola 2005, 283.)

Edellä mainituista syistä on tänä päivänä huomioitava työturvallisuus erityisesti vanhojen sahojen maaperän kunnostus- ja korvaustöissä. Työterveyslaitos on asettanut virtsan kloorifenolipitoisuudelle altistumattomille henkilöille viiteraja-arvoksi  $<0,5$  mol/l ja työssä kloorifenoleille altistuneille henkilöille toimenpideraja-arvoksi 2,0 mol/l. Maaperän kunnostuksessa kynnsarvoksi trikloorifenoleille on asetettu 0,5 mg/kg, alemmaksi ohjearvoksi 10 mg/kg (terveysperustein) ja ylemmäksi ohjearvoksi 40 mg/kg (ekologisin perustein). (Lindroos 2005, 272; Reinikainen 2007, 127.)

Nykyisin kloorifenolivalmisteiden käyttö sahoilla sinistymisenestoaineissa on kielletty. Kloorifenoleita hyödynnetään kuitenkin edelleen kaupallisesti kemiallisten synteisien lähtöaineina tai välituotteina. Suomessa valtioneuvoston päätös (143/2000) kieltää pentakloorifenolin markkinoille luovuttamisen ja käytön. (Lindroos 2005, 271.)

### 3 KLOORIFENOLIEN BIOHAJOAMINEN

#### 3.1 Biologinen hajoaminen

Mikro-organismit hyödyntävät orgaanisia yhdisteitä hiilen ja energian lähteinä. Ne hajottavat entsyymitoimintansa avulla yhdisteet pienemmiksi osiksi ja siirtävät molekyylit solukalvon läpi solun sisään. Sopivissa olosuhteissa kaikki ympäristössä luontaisesti esiintyvät orgaaniset yhdisteet voivat toimia mikro-organismien ravinnon lähteinä. (Smith 2009, 112.)

Mikro-organismien hajotustoimintaan vaikuttavat sekä ympäristön abioottiset että bioottiset tekijät. Maaperän fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien sekä biohajoavan materiaalin, typen ja fosforin saatavuuden, happipitoisuuden, lämpötilan, pH:n sekä kosteuden lisäksi hajotustoimintaan vaikuttavat myös alueen mikro-organismien määrät ja kannat, sillä hajotustoiminta on usein monen organismin yhteistyön tulos. Lisäksi raskasmetallien ja suolojen esiintyminen maaperässä saattavat vaikeuttaa hajotusprosessia. (Scragg 2005, 189; Smith 2009, 112.)

Ihmisen toimesta tai toiminnan seurauksena ympäristöön on joutunut suuri määrä kemiallisesti valmistettuja yhdisteitä, joita ei luontaisesti esiinny ympäristössä. Monet näistä kemikaaleista aiheuttavat haittaa tai ovat myrkyllisiä mikro-organismeille. Pitkäaikaisen altistuksen seurauksena monille mikro-organismeille on kuitenkin kehittynyt resistanssi haitallisia yhdisteitä vastaan ja sen seurauksena monet mikro-organismit ovat kehittyneet hyödyntämään kyseisiä yhdisteitä ravinnonlähteenään.

Haitallisten yhdisteiden käyttö mikro-organismien energian ja hiilen lähteenä riippuu suuresti yhdisteen kemiallisesta rakenteesta ja ominaisuuksista. Yhdisteen molekyylikoko, halogeenien määrä ja sijainti sekä yhdisteen vesi- tai rasvaliukoisuus ovat merkittäviä tekijöitä biologisen hajoamisen kannalta. Yleensä suurikokoiset ja monimutkaiset sekä useita halogeeneja sisältävät yhdisteet hajoavat hitaasti ja ovat usein toksisempia mikro-organismeille kuin yksinkertaisemmat yh-

disteet. Rasvaliukoiset yhdisteet sitoutuvat herkemmin organismien solukalvolle ja yhdisteen pitoisuudet rikastuvat soluissa, kun taas vesiliukoiset yhdisteet liukenevat maapartikkelien väleissä oleviin vesikerrokseen ja ovat helpommin saatavilla mikro-organismeille. Vesiliukoiset yhdisteet voivat kuitenkin kulkeutua veden mukana maaperässä ja päätyä pohjaveteen. (Scragg 2005, 75, 175, 178.)

Mikrobitoiminnan aktiivista hyödyntämistä yhdisteiden käsittelyssä ja pilaantuneen alueen puhdistamisessa kutsutaan bioremediaatioksi. Bioremediaation hyödyntämistavat pilaantuneen alueen puhdistamisessa voidaan jakaa karkeasti kahteen ryhmään, biostimulointiin ja bioaugmentaatioon. Biostimuloinnissa maaperän luontaisten mikro-organismien hajotustoimintaa edistetään parantamalla kasvuolosuhteita esimerkiksi lisäämällä ravinteita tai happea maaperään tai nostamalla maaperän lämpötilaa. Bioaugmentaatiossa luontaisten mikro-organismien sekaan lisätään laboratoriossa rikastettuja mikrobikantoja, jotka tutkitusti pystyvät hajotamaan hajotuksen kohteena olevia yhdisteitä. (Smith 2009, 124.)

Suomessa maaperän jäätyminen talvikaudeksi ja suhteellisen lyhyt kesä hidastavat maaperän luontaista puhdistumista, sillä tehokas mikrobitoiminta edellyttää usein pitkäaikaista lämmintä jaksoa. Luontaista puhdistumista voidaan kuitenkin tehostaa myös Suomen olosuhteissa. Esimerkiksi Suni, Malinen, Kosonen, Silvennoinen ja Romantschuk (2007, 277–287) tutkivat biostimuloinnin ja -augmentaation vaikutuksia kreosootilla pilaantuneen maan puhdistuksessa. Tutkimuksessa kreosootilla pilaantuneen maan luontaisten mikrobikantojen hajotustoimintaa tehostettiin lisäämällä maahan ravinteita, happea ja rikastettuja mikrobikantoja elektrokineettiä hyödyntäen.

Tutkimuksessa havaittiin, että maaperän lämpötilan nousu elektrokineettikan käytön seurauksena sekä ravinteiden ja hapen lisääminen maaperään tehostivat luontaisten mikrobikantojen hajotustoimintaa. Bioaugmentaatiosta ei kuitenkaan havaittu olevan merkittävää hyötyä ja laboratorioskokeiden perusteella rikastettujen mikrobikantojen syöttö maaperään lopetettiin kesken kenttäkokeen. Suni ym. toteavatkin, että biostimuloinnilla voidaan parantaa pilaantuneiden maa-alueiden luontaista puhdistustulosta, mutta bioaugmentaatiota ei välttämättä tarvita, ellei

maaperän luontaisten mikrobikantojen määrä ole poikkeuksellisen alhainen. (Suni ym. 2007, 284–287.)

### 3.2 Kloorifenolien biohajoaminen

Kloorifenolit ovat heikkoja orgaanisia happoja, jotka hajoavat suhteellisen hitaasti maaperässä ja pohjavedessä ja joiden myrkyllisyys mikro-organismeille yleisesti ottaen lisääntyy klooriatomien määrän kasvaessa yhdisteessä. Kloorifenolien myrkyllisyyteen ja biohajoamiseen vaikuttavat kuitenkin suuresti ympäristöolosuhteet, ja biohajoamisen tehokkuus ja kloorifenoleita hajottavien mikro-organismien käyttämät hajoamisreitit vaihtelevatkin eri olosuhteissa. (Ahola 1999, 6; Reinikainen 2007, 124–129; Leung, Errampalli, Cassidy, Lee, Hall, Trevors, Okamura & Bach 1997, 579.)

Kloorifenolit hajoavat biologisesti useiden eri mekanismien kautta. Esimerkiksi aerobiset mikrobit aloittavat kloorifenolien mineralisoinnin korvaamalla aromaattisen renkaan kloorisubstituentit hydroksyyli-ryhmillä, jonka seurauksena aromaattinen rengas lopulta aukeaa ja syntynyt alifaattinen rakenne voidaan mineralisoida. Anaerobiset mikrobit taas hajottavat kloorifenoleita korvaamalla kloorisubstituentit vedyllä, minkä seurauksena syntyy fenoli, joka muutetaan bentosoaatin kautta hiilidioksidiksi ja metaaniksi. (Puhakka & Melin 1996, Järvisen 2001, 8 mukaan; Leung ym. 1997, 579.)

Jotkut mikrobiryhmät voivat myös metyloidata kloorifenoleita, jolloin hajoamistuotteina syntyy kloorianisoleja. Kloorianisolit ovat yleensä vähemmän myrkyllisiä mikrobeille kuin kloorifenolit, mutta ne ovat rasvaliukoisempia ja voivat siten akkumuloitua soluihin helpommin. Muita kloorifenolien hajoamisen välituotteita ovat klooratut bentsokinonit sekä vähemmän klooratut fenolit, kuten dikloorifenolit. Ympäristön kannalta kuitenkin parhaita olisi, jos kloorifenolit mineralisoituisivat haitattomiksi orgaanisiksi lopputuotteiksi, vedeksi, kloridiksi ja hiilidioksidiksi. (Järvinen 2001, 8; Ahola 1999, 6; Leung ym. 1997, 579.)

Maaperässä mikro-organismien kasvuun, selviytymiseen ja aktiivisuuteen vaikuttavat monet biottiset ja abioottiset tekijät. Samalla tavalla ympäristötekijät, kuten maaperän lämpötila, pH, kosteus, maan rakenne, orgaanisen aineen koostumus, ravinteiden saatavuus ja maaperän redox-potentiaali, sekä luontaiset mikrobikannat, kloorifenolien biosaatavuus ja sopivien elektronien vastaanottajien esiintyminen, vaikuttavat myös kloorifenoleita hajottavien mikro-organismien selviytymiseen ja aktiivisuuteen kontaminoituneilla maa-alueilla. Epäedulliset olosuhteet voivat vähentää tai estää niiden mikro-organismien ja geenien ilmenemistä, jotka tuottavat kontaminoivaa yhdistettä hajottavia entsyymejä. (Leung ym. 1997, 588–590.)

Yksi tärkeimmistä kloorifenolien liukenevuuteen, liikkuvuuteen ja imeytymiseen vaikuttavista tekijöistä on maaperän happamuus. Esimerkiksi maaperässä, jonka pH on noin 6, valtaosa trikloorifenoleista esiintyy vielä ionisoitumattomassa muodossa, mutta pH muuttuessa neutraaliksi keskimäärin yli puolet trikloorifenoleista ionisoituu. Ionisoivien -OH-ryhmien esiintyminen yhdisteessä taas määrittää sen, onko kloorifenoliyhdiste kiinnittyneenä orgaaniseen ainekseen vai vesifaasiin. Maaperän alhaisissa pH-olosuhteissa kloorifenolit ovat ionisoitumattomassa muodossa ja sitoutuneena orgaaniseen ainekseen, kun taas korkeammissa pH-pitoisuuksissa kloorifenolit ionisoituvat ja muuttuvat vesiliukoisemmiksi ja siirtyvät vesifaasiin. Yksistään pH:n perusteella ei kuitenkaan voi päätellä, missä faasissa kloorifenolit maaperässä ovat, sillä esimerkiksi trikloorifenolit ovat luonnostaan kohtalaisen vesiliukoisia ja jonkin verran kulkeutuvia myös ionisoitumattomina, joten ne voivat kulkeutua pohjaveteen myös happamassa maaperässä. (Reinikainen 2007, 126; Leung ym. 1997, 591–592.)

Kloorifenolien biosaatavuuteen vaikuttavat myös maaperän maalajit. Kloorifenolit pystyvät sitoutumaan tiukasti maan orgaaniseen ainekseen, jolloin ne eivät ole helposti saatavilla mikro-organismeille. Lisäksi savipartikkelit sitovat itseensä yhdisteitä korkean pinta-aktiivisuutensa takia, sillä savipartikkeleiden negatiivisesti varautunut pinta sitoo itseensä positiivisesti varautuneita ioneita. Savipartikkeleiden lisäksi myös rauta- ja alumiinioksidit sitovat kloorifenoliyhdisteitä kiinni itseensä, erityisesti silloin, kun oksideihin on kiinnittyneenä myös orgaanista ai-



nesta. (Frankki, Persson, Öberg, Skyllberg & Tysklind 2007, 452–453; Stipicevic, Fingler & Drevenkar 2009, 43–44; Leung ym. 1997, 588–591.)

PH:n ja maalajien lisäksi myös lämpötila vaikuttaa sekä kloorifenolien liukenevuuteen ja haihtuvuuteen että liikkuvuuteen ja imeytymiseen maa-aineksessa. Lämpötila vaikuttaa olennaisesti myös maaperän mikrobikantojen toimintaan. Useimmat kloorifenoleita hajottavista mikro-organismeista hajottavat kloorifenoleita parhaiten 24–35 °C:n lämpötilassa, mutta hajoamista tapahtuu myös alhaisemmissa lämpötiloissa. (Leung ym. 1997, 590.)

### 3.3 Kloorifenoleita hajottavia bakteereita

*Pseudomonas*-suvun bakteerit ovat yksi tunnetuista aromaattisia hiilivetyjä ja orgaanisia klooriyhdisteitä hajottamaan pystyvistä bakteereista. Suvun bakteereita esiintyy yleisesti, myös vaatimattomissa kasvuolosuhteissa, sekä maaperässä että vesiekosysteemeissä. *Pseudomonakset* ovat gram-negatiivisia, sauvanmuotoisia mikro-organismeja, ja ne kuuluvat gammaproteobakteerien luokkaan. Monet suvun lajeista tuottavat fluoresoivia yhdisteitä. Lisäksi useat *Pseudomonas*-lajit luokitellaan patogeenisiksi. (Clark, Dunlap, Madigan & Martinko 2009, 400, 413–415, 642; Widmer, Seidler, Gillevet, Watrud & Di Giovanni 1998, 2545–2546.)

*Pseudomonasten* lisäksi muita kloorifenoleita hajottavia bakteereita ovat muun muassa *Ralstonia*-, *Rhodococcus*-, *Acinetobakteeri*-, *Sphingomonas*-, *Burkholderia*- ja *Streptomyces*-sukuihin kuuluvat bakteerit. Myös esimerkiksi *Trichoderma*- ja *Fusarium*-sukuihin kuuluvat sienet pystyvät hajottamaan kloorifenoleita. (Sanchez, Vasquez & Gonzalez 2004, 5769; Alvarez-Rodriguez, Lopez-Ocana, Lopez-Coronado, Rodriguez, Martinez, Larriba & Coque 2002, 5860.)

Mikrobien selviytyminen kasvua estävillä tai rajoittavilla yhdisteillä kontaminoidussa maaperässä riippuu suuresti niiden kyvystä sietää ja hyödyntää kyseisiä yhdisteitä hiilen ja energian lähteenä. Mikrobit reagoivat solun ulkopuolisiin signaaleihin ja säätelevät signaalien perusteella entsyymi- ja proteiinituotantoaan.

Philpin ym. (2005, 28–29) mukaan mikrobien aromaattisten klooriyhdisteiden hajottamiseen tuottamat entsyymit poikkeavat tavallisesti orgaanisen aineksen hajottamiseen tuotetuista entsyymeistä, sillä aromaattisia klooriyhdisteitä hajottavat entsyymit pystyvät hyödyntämään laajempaa substraattivalikoimaa.

Lisäksi Philpin ym. (2005, 28–29) mukaan hajottamisprosessiin liittyvät geenit sijaitsevat usein plasmideissa, kun taas tavalliseen hajotustoimintaan liittyvät geenit ovat kromosomaalista DNA:ta. Useita kloorifenolien hajotustoimintaan liittyviä geenejä on myös pystytty tutkimaan ja identifioimaan. Muun muassa Park, Park, Lim ja Shin (2003, 227–236) raportoivat tutkimuksessaan *Pseudomonas putida*-lajin fenolisten yhdisteiden hajotustoimintaan liittyvistä geeneistä ja Matus, Sanchez, Matrinez ja Gonzales (2003, 7108–7115) *Ralstonia eutropha*-lajin 2,4,6-TCP:n hajotustoimintaan liittyvistä geeneistä. Molemmissa tutkimuksissa havaittiin, että kloorifenolien hajottamiseen liittyvien geenien tuotanto lisääntyi altistuskokeissa. Tutkimuksissa kuitenkin havaittiin myös, että samojen geenien aktivoituminen ei välttämättä tuottanut yhtä hyvää hajoamistulosta eri kloorifenoliyhdisteillä, mikä viittaa siihen, että parhaimman hajoamistuloksen saaminen edellyttää juuri tietynlaisten geenien ilmenemistä ja aktivoitumista mikro-organismissa.



















Muuttuneissa olosuhteissa soluissa tapahtuu myös muita geneettisen tason muutoksia. Esimerkiksi Muller, Stevens, Craig ja Love (2007, 4550, 4553) havaitsivat altistaessaan *Pseudomonas aeruginosa* -lajin mikrobeja polykloorifenolille (PCP), että erityisesti solun sisältä kasvuympäristöön tapahtuvan aineen siirtoon liittyvien geenien transkriptio vilkastui huomattavasti, minkä seurauksena haitallisten yhdisteiden pitoisuudet solun sisällä pienenevät ja solun muu toiminta pystyi pysymään vakaana. Myös sopeutumista ja ulkoisilta stressitekijöiltä suojautumista koodaavien geenien transkriptio lisääntyi.

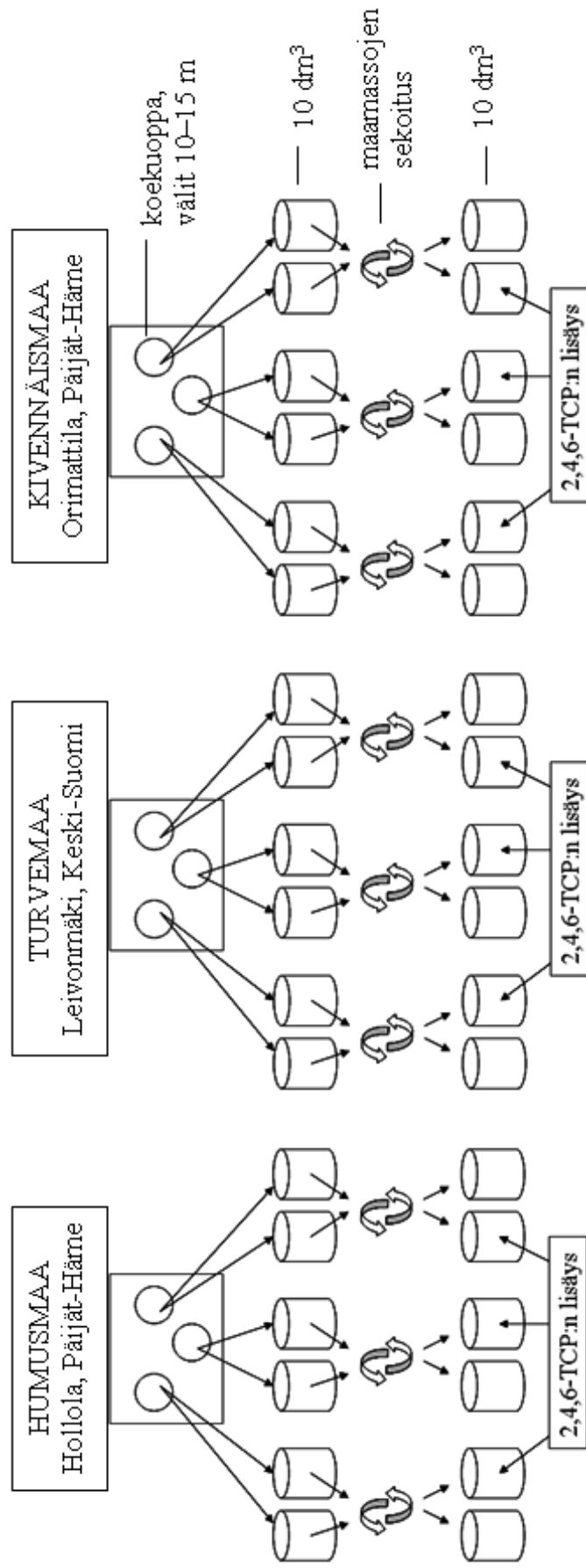
#### 4 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS

Tehostettu luonnonvalinta ja mikrobit -hankekokonaisuuden 2,4,6-trikloorifenolin (2,4,6-TCP) hajoamista tutkivassa koejärjestelyssä tutkittiin kolmea eri maatyyp-  
piä: humus-, kivennäis- ja turvemaata. Maat eivät olleet altistuneet ennestään ih-  
misen toimesta orgaanisille klooriyhdisteille. Maatyypeistä humusmaa oli mänty-  
metsämaata ja peräisin Hollolasta, Päijät-Hämeestä, Hälvälän ampumaradan kont-  
rollialueelta. Kivennäismaa taas oli kesannolla ollutta pelto- ja laidunmaata, joka  
oli pääasiassa savea ja hiesua. Kivennäismaa oli peräisin Orimattilasta, Päijät-  
Hämeestä. Turvemaata oli suon pohjamaasta otettua rahkaturvetta, jossa ei ollut  
juurikaan kivennäisaineita. Turvemaata oli peräisin Haapasuon turvetuotantoalueel-  
ta Leivonmäestä, Keski-Suomesta. (Sinkkonen & Kauppi 2010.)

Kunkin maatyypin maamassat oli otettu syksyllä 2007, ja ne oli muodostettu raja-  
tuilta alueilta kolmesta rinnakkaisesta koekuopasta otetuista maamassoista. Maa-  
massojen otto on havainnollistettu kuviossa 3. 10–15 metrin välimatkoin olleista  
koekuopista oli jokaisesta otettu kaksi 10 litran astiallista maata, jotka oli sen jäl-  
keen sekoitettu keskenään maassa. Sekoitetusta maamassasta oli otettu näytteen  
kahteen 10 litran kannelliseen muovikämpäriin, joista toiseen oli myöhemmin lisät-  
ty 2,4,6-TCP:tä laboratorio-olosuhteissa. Ennen 2,4,6-TCP:n lisäystä kussakin  
kämpäriin olleet maamassat oli sekoitettu ja homogenisoitu poistamalla maan se-  
asta suurimmat oksat ja kivet. Yhteensä kokeita oli kuusi kappaletta kustakin maa-  
tyypistä, kolme rinnakkaista ei-kontaminoitunutta kontrollimaata ja kolme rinnak-  
kaista kontaminoitua maata. Maatyypien kokeet on havainnollistettu taulukossa  
1. (Sinkkonen & Kauppi 2010.)

TAULUKKO 1. Maatyypien kokeet, joista allekkain olevat kokeet on otettu sa-  
masta koekuopasta

KÄSITTELY	HUMUSMAA			TURVEMAA			KIVENNÄISMAA		
Kontrolli	 H7	 H15	 H23	 V7	 V15	 V23	 J15	 J19	 J23
2,4,6-TCP:n lisäys	 H8	 H16	 H24	 V8	 V16	 V24	 J16	 J20	 J24



KUVIO 3. Maamassojen otto

#### 4.1 Hajoamiskoejärjestely

Koejärjestely oli aloitettu keväällä 2008. Koejärjestelyssä lisättävä 2,4,6-TCP oli liuotettu 10 ml:aan metanolia ja seos oli sekoitettu hiekkaan, minkä jälkeen metanolihiikkaseos oli sekoitettu 10 litran kannellisessa muoviämpärissä olleeseen maamassaan. Metanolihiikkaseoksen avulla oli pyritty varmistamaan 2,4,6-TCP:n tasainen jakautuminen tutkittavaan maamassaan. 2,4,6-TCP:n pitoisuus kokeissa oli ollut 100 µg/g kp. Kontrollikokeisiin, jotka olivat myös 10 litran kannellisessa muoviämpärissä, oli lisätty sama määrä metanolihiikkaseosta, jossa ei ollut 2,4,6-TCP:a. Koejärjestelyssä ei-kontaminoidut kokeet olivat toimineet kontrollikokeina, ja lisäksi niiden tarkoituksena oli ollut selvittää, oliko koejärjestelyn aikana tapahtunut kontaminaatiota ilmateitse. Koeastioita oli pidetty koejärjestelyn ajan 10–15 °C:n lämpötilassa. (Sinkkonen & Kauppi 2010; Kalojärvi 2009, 8.)

Koejärjestely oli kestänyt yhteensä 15 viikkoa. Koejärjestelyn aikana kokeista oli otettu analyysejä varten maata viikoilla 0, 4, 6, 12 ja 15. Maamassat oli otettu muovilusikalla noin yhden, seitsemän ja 15 cm:n syvyydeltä satunnaisista kohdista eri puolilta koeastiaa. Maamassoista oli punnittu noin 30 grammaa maata muovipussiin. Muovipusseissa olleet maanäytteet oli säilytetty pakastimessa myöhemmin tehtyjä kemiallisia sekä mikrobianalyysejä varten. (Sinkkonen & Kauppi 2010; Kalojärvi 2009, 8–9.)

Alustavien analyysien perusteella Kalojärven opinnäytetyöhön oli valittu analysoitavaksi näytteet koejärjestelyn viikoilta 0, 4 ja 12. Maanäytteet oli esikäsitelty uutamalla ja asetyloimalla, ja ne oli analysoitu kaasukromatografimassaspektrometrillä (GC-MS). Näytteistä oli analysoitu 2,4,6-trikloorifenolin lisäksi 4-monokloorifenolin, 2,4- ja 2,6-dikloorifenolien, 2,4,5-trikloorifenolin, 2,3,4,6-tetrakloorifenolin ja pentakloorifenolin pitoisuudet. (Kalojärvi 2009, 5, 9.)

## 4.2 Molekyylibiologiset tutkimukset

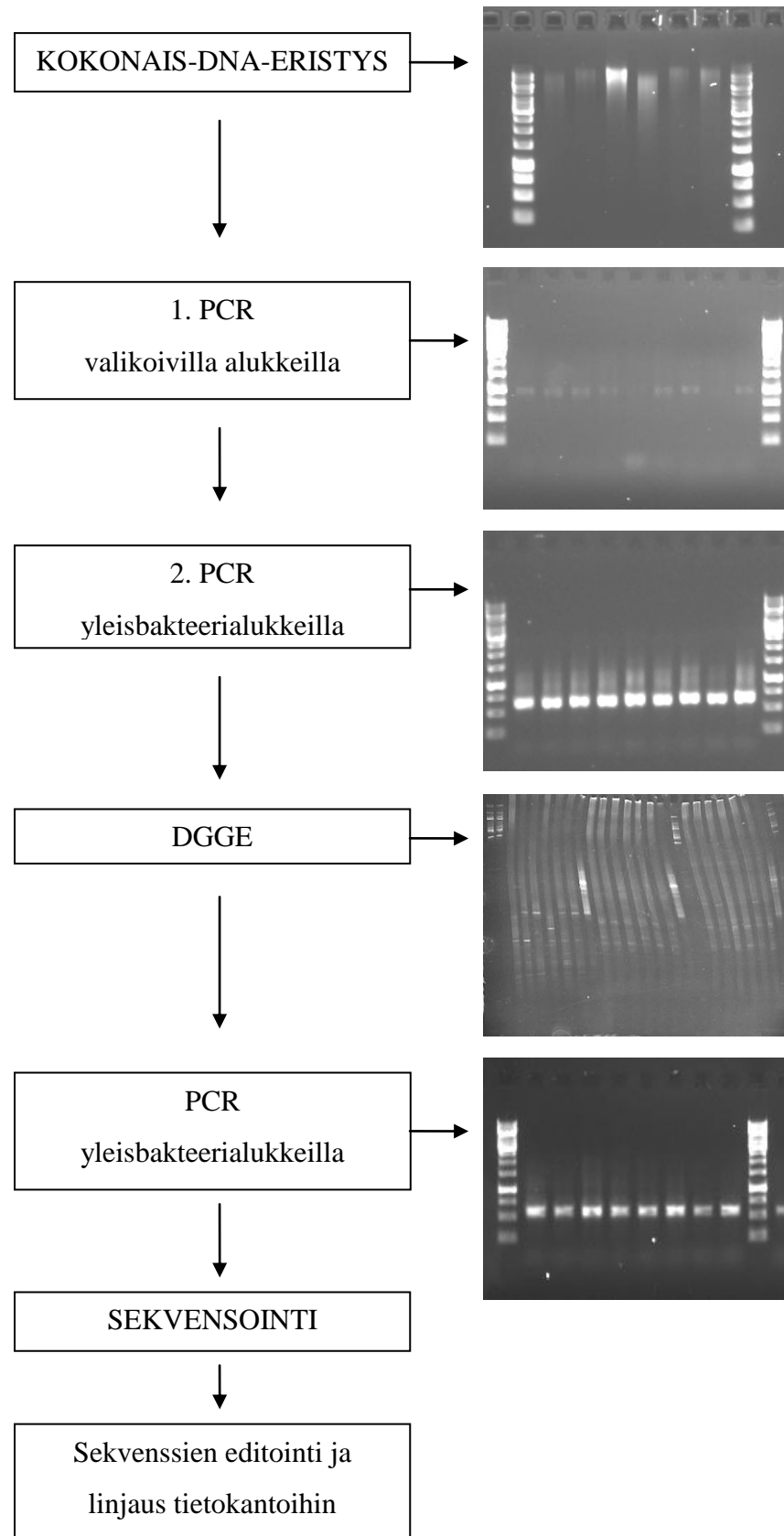
Tämän opinnäytetyön aiheena olleen 2,4,6-TCP:llä kontaminoitujen maiden mikrobiston analysointiin liittyneet molekyylibiologiset tutkimukset ja tulosten analysointi tehtiin kesän 2009 ja kevään 2010 aikana. Tutkittavat kokeet ja niiden maanäytteet olivat samat kuin Kalojärven opinnäytetyössä, eli näytteet olivat koejärjestelyn viikoilta 0, 4 ja 12. Viikoilta 0 ja 4 tutkittiin sekä kontrollikokeiden että 2,4,6-TCP-kontaminoitujen kokeiden näytteet, mutta viikolta 12 tutkittiin vain 2,4,6-TCP-kontaminoitujen kokeiden näytteet. Tutkittavien maanäytteiden määrät on esitetty taulukossa 2.

TAULUKKO 2. Molekyylibiologisissa tutkimuksissa tutkittujen maanäytteiden määrät

TUTKITTAVIEN MAANÄYTTEIDEN MÄÄRÄT (kpl)						
Aikapiste	Humusmaa		Turvemaa		Kivennäismaa	
	kontrolli	2,4,6-TCP	kontrolli	2,4,6-TCP	kontrolli	2,4,6-TCP
viikko 0	3	3	3	3	3	3
viikko 4	3	3	3	3	3	3
viikko 12	-	3	-	3	-	3

Molekyylibiologisten tutkimusten vaiheet on kuvattu kuviossa 4. Maanäytteistä tehtiin ensin kokonais-DNA-eristys, jonka jälkeen kokonais-DNA:sta monistettiin valikoivilla alukkeilla polymeerasireaktiolla (PCR) noin 1000 emäsparin pituisia jaksoja bakteerien 16S rRNA-geeneistä. Monistettuja DNA-jaksoja käytettiin PCR:n jälkeen templaattina toisessa PCR:ssä, jossa ensimmäisessä PCR:ssä monistettujen DNA-jaksojen sisältä monistettiin noin 560 emäsparin pituisia jaksoja. Samalla monistettuihin DNA-jaksoihin kiinnittyi GC-rikas yleisaluke.

Kaksois-PCR:ssä (nestedPCR) monistuneet DNA-jaksot eroteltiin toisistaan emäsjärjestyksen perusteella denaturoivan gradienttigelielektroforeesin (DGGE) avulla. DGGE:lta leikatut DNA-jaksot uutettiin irti geelistä ja monistettiin PCR:n avulla yleisalukkeilla. Noin 560 emäsparin pituiset PCR-tuotteet sekvensoitiin ja saadut sekvenssit editoitiin erillisillä ohjelmilla. Lopuksi sekvenssit linjattiin tietokantoihin.



KUVIO 4. Molekyylibiologisten tutkimusten vaiheet



#### 4.2.1 Kokonais-DNA-eristys

Maanäytteen mikrobiston kokonais-DNA:n eristys tehtiin MO BIO Laboratories Inc:n PowerSoil® DNA Isolation Kit -tuotteen avulla. Menetelmän periaatteena oli rikkoa maanäytteen mikrobien solut ja liuosten avulla saostaa epäpuhtaudet pois kokonais-DNA:n seasta. Puhdistuksen jälkeen kokonais-DNA sidottiin filttiin ja uutettiin siitä puhtaaseen koeputkeen. (MO BIO 2007.)

Kokonais-DNA-eristys tehtiin pääosin menetelmän työohjeen mukaan. Muutokset koskivat käytettyjen reaktioaineiden tilavuuksia ja käsitellyn maanäytteen massaa. Käytetyt reaktioaineiden tilavuudet sekä maanäytteen massat ovat taulukossa 3. Lisäksi ennen kokonais-DNA:n uuttoa filteristä puhtaaseen koeputkeen filteri-putkea sentrifugoitiin ohjeen yhdestä minuutista poiketen 2 minuuttia, jonka jälkeen filteri siirrettiin puhtaaseen koeputkeen ja annettiin kuivua 2 minuuttia ennen viimeisen reaktioaineen lisäystä. Tehdyt muutokset perustuivat hankkeessa aiemmin tehtyihin menetelmän optimointikokeisiin. Kokonais-DNA-eristys tehtiin pelkästään viikon 12 näytteille, koska muiden näytteiden kokonais-DNA-eristys oli tehty jo aiemmin hankkeen toimesta. Kokonais-DNA-näytteet olivat säilytyksessä -70 °C:n syväjässä.

Kokonais-DNA-eristyksen onnistuminen varmistettiin 1 % agarosigeelielektroforeesiajon avulla. Kokonais-DNA-näytettä ladattiin geelille 5 µl:aa ja GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder -molekyylikomarkkeria (Fermentas) 1 µl. 6X Loading Dye -latausväriä (Fermentas) käytettiin 0,5–0,7 µl:aa. Elektroforeesiajo tehtiin 1xTAE-puskuriliuoksessa Thermo Electron Corporation EC340 Minicell® Primo™ Electrophoretic gel system- ja Amersham pharmacia biotech Electrophoresis Power Supply EPS301 -ajolaitteilla. Ajoparametrit olivat 100 V ja 400 mA, ajoaika 45 minuuttia. Ajon päätyttyä geeli kuvattiin Alpha Innotech Corporation MultiImage™ Light Cabinet -kuvantamislaitteella ChemiImager 5500 -ohjelmalla.

TAULUKKO 3. Kokonais-DNA-eristyksen reaktioaineiden tilavuudet ja maanäyt-  
teiden massat

työohje / maatyyppi	maanäyte (g)	Reaktioaineet					
		C1 (µl)	C2 (µl)	C3 (µl)	C4 (µl)	C5 (µl)	C6 (µl)
työohje	0,250	60	250	200	1200	500	100
Humusmaa	0,050	40	350	300	1100	500	100
Turvemaa	0,100	40	350	300	1100	500	100
Kivennäismaa	0,250	60	150	100	1200	500	100

#### 4.2.2 Kaksois-PCR (nestedPCR)

Kokonais-DNA-eristyksen jälkeen DNA-eristyksistä monistettiin kaksois-PCR-menetelmällä osaa bakteerien 16S rRNA-geenistä. Monistuksessa käytettiin ensin valikoivia alukkeita, joilla monistaminen voitiin kohdentaa *Pseudomonas*-kantoihin. Käytetyt alukkeet olivat Ps-for 5'-GGT CTG AGA GGA TGA TCA GT-3' ja Ps-rev 5'-TTA GCT CCA CCT CGC GGC-3' (Widmer ym. 1998, 2546).

Tämän jälkeen tehtiin toinen PCR, jossa monistettiin lyhyempää DNA-jaksoa ensimmäisessä PCR:ssä monistettujen DNA-jaksojen sisältä. Alukkeina käytettiin 16S rRNA-yleisbakteerialukkeita MF341GC 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3' ja MR907 5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3'. Alukkeen MR907 sekvenssissä oleva lyhenne M vastasi adenosiniä tai sytosiiniä (Cortec 2010). MF341GC oli GC-rikas alue.

Kaksois-PCR:istä tehtiin rinnakkaiset PCR-ajot, joiden avulla varmistettiin monistettavien DNA-jaksojen diversiteetti. Ajot tehtiin VWR Doppio -laitteella. PCR-ajojen onnistuminen varmistettiin 1 % agarosigeelielektroforeesiajon avulla. PCR-reaktiossa käytetyn DNA-templaatin määrä optimoitiin agarosigeeliajon tulosten perusteella. PCR-reaktion sisältämät reagenssit ovat taulukossa 4 ja käytetyt PCR-ohjelmat taulukossa 5.

TAULUKKO 4. PCR-reaktion sisältämät reagenssit ja pitoisuudet

Kantaliuos	Pitoisuus reaktio-seoksessa	Tilavuus yhdessä reaktiossa
10x Buffer for Dynazyme DNA Polymerase -puskuriliuos (Finnzymes)	1 x	5 µl
10 mM dNTP -seos (Finnzymes)	0,2 mM	1 µl
10 µM forward-aluke (Oligomer Oy): Ps-for, MF341GC, MF341	0,2 µM	1 µl
10 µM reverse-aluke (Oligomer Oy): Ps-rev, MR907	0,2 µM	1 µl
Dynazyme™ II DNA Polymerase Recombinant enzyme (20 U/µl) - polymeraasientsyymi (Finnzymes)	0,2 U	0,5 µl
Bovine Serum Albumin (BSA) (20 mg/ml) (Fermentas)	0,2 mg/ml	0,5 µl
DNA-templaatti		1–3 µl
Steriloitu vesi		38–40 µl
Reaktioseoksen yhteistilavuus		50 µl

TAULUKKO 5. PCR-ohjelmat

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika (min)
1 Alkudenaturaatio	94	5
2 Denaturaatio	94	0:20
3 Alukkeiden kiinnittyminen	55	0:20
4 Pidennysreaktio	72	0:30
5 Sykli 2-4	Ps-for & Ps-rev	26 x
	MF341GC & MR907	35 x
	MF341 & MR907	28 x
6 Loppusynteesi	72	5
7 Alkujäähdytys	11	0:10
8 Jäähdytys	4	∞

### 4.2.3 DGGE

Kaksois-PCR:ssä monistetut DNA-jaksot eroteltiin toisistaan denaturoivan gradienttigelielektroforeesin (DGGE) avulla. DGGE:ssä DNA-jaksojen erottuminen toisistaan perustui DNA-jaksojen erilaiseen emäsjärjestyksen. DNA-jaksoissa adeniinin ja tymiinin välinen vetysidos on heikompi kuin guaniinin ja sytosiinin välinen vetysidos, jolloin jokainen emäsjärjestykseltään erilainen DNA-jakso jakautuu kahtia erilaisella nopeudella geelin gradientin kasvaessa. GC-rikkaan alukkeiden avulla DNA-jaksot eivät jakaudu kokonaan kahdeksi erilliseksi juosteeksi, vaan pysyvät kiinni toisissaan ja pysähtyvät geelille.

DGGE:tä varten oli tehty *Pseudomonas aeruginosa* -puhdaskannan kokonais-DNA-näytteestä PCR-ajot samoilla alukepareilla kuin tutkittaville näytteille. Kaksois-PCR:n jälkeen rinnakkaisista PCR-näytteistä pipetoitiin osa steriiliin PCR-putkeen ja sekoitettiin keskenään kevyesti vorteksoimalla ja sentrifugoimalla. Sekoituksen jälkeen tutkittavista näytteistä pipetoitiin 10–30 µl:aa ja *P. aeruginosa* -puhdaskannasta 5 µl:aa PCR-tuotetta steriileihin PCR-putkiin ja putkiin lisättiin 5 µl:aa 2X Loading Dye -latausväriä. Otettu PCR-näytemäärä riippui DNA-jaksojen vahvuudesta agarosielektroforeesiajon tuloksissa. Lisäksi 1,5 ml:n eppendorf-putkeen pipetoitiin 120 µl:aa steriiliä vettä, 40 µl:aa 2X Loading Dye -latausväriä ja 1 µl GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder -molekyylikomarkkeria (Fermentas), jonka jälkeen putkea vorteksoitiin ja sentrifugoitiin kevyesti. Sekoituksen jälkeen seosta pipetoitiin steriileihin PCR-putkiin 20 µl:aa.

DGGE:ssä käytettiin 6-%:isia polyakryyliamidi-geelejä, joiden ureaformamidipitoisuus kasvoi tasaisesti 35 %:sta 60 %:iin (100 %:n gradientti vastaisi 7 M ureaa ja 40 % formamidia). PCR-näytteet ladattiin geelille ja *P. aeruginosa* -puhdaskantaa ja GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder -molekyylikomarkkeria käytettiin markkereina. DGGE-ajo tehtiin BIO-RAD DCode™ Universal Mutation Detection System- ja Amersham pharmacia biotech Electrophoresis Power Supply EPS301 -ajolaitteilla 1xTAE-puskuriliuoksessa. Ajoparametrit olivat 80 V, 400 mA ja 60 °C, ajo kesti 16 tuntia.

Ajon jälkeen geeli otettiin pois laitteesta, siirrettiin muovikelkalle ja suoristettiin ultrapuhdasta vettä. Tämän jälkeen geelin kaksijuosteiset DNA-jaksot värjättiin pipetoimalla geelin päälle 4 µl:a Syber Green -kantaliuosta, joka oli laimennettu 30 ml:an ultrapuhdasta vettä. Geelin annettiin värjäytyä pimeässä 30–60 minuuttia. Värjäyksen jälkeen geeli kuvattiin Alpha Innotech Corporation MultiImage™ Light Cabinet -kuvantamislaitteella ChemiImager 5500 -ohjelmalla. Kuvauksen jälkeen geeli asetettiin Hoefer MacroVuo UV-20 -pöydän päälle ja geelistä leikattiin UV-valossa steriilin kirurginveitsen avulla DNA-jaksoja steriileihin PCR-putkiin. Veitsen steriloinnissa käytettiin 70 %:sta etanolia. Leikatut DNA-jaksot pakastettiin.

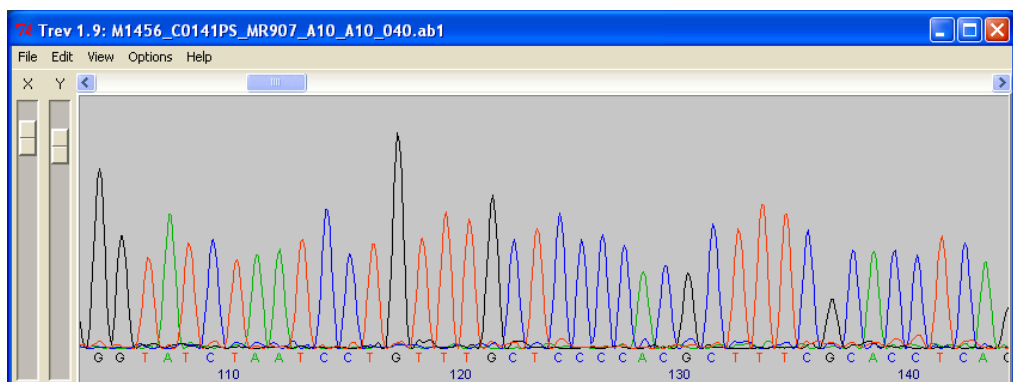
Myöhemmin DNA-jaksot uutettiin geelipaloista steriiliin veteen. PCR-putkiin lisättiin steriiliä vettä 20 µl:a, jonka jälkeen putkia vorteksoitiin 20 minuuttia ja sentrifugoitiin 15 minuuttia. Uutettuja DNA-jaksoja käytettiin templaattina sekvensointia varten tehdyssä PCR-ajossa. Ajossa käytettiin 16S rRNA-yleisbakteriaalukkeita MF341 5'-CTA CGG GAG GCA GCA-3' ja MR907 5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3'. Alukkeen MR907 sekvenssissä oleva lyhenne M vastasi adenosiinia tai sytosiinia (Cortec 2010). PCR-ajon onnistumisen varmistettiin 1 % agarosielektroforeesiajon avulla.

DGGE-ajoja tehtiin 10 ja niistä leikattiin yhteensä 283 DNA-jaksoa, joista 11 oli *P. aeruginosa* -puhdaskannan DNA-jaksoja. Taulukko DGGE-ajojen näytteistä on liitteessä 3 ja leikattujen DNA-jaksojen koe- ja viikkokohtainen jakautuminen on liitteessä 1.

#### 4.2.4 DNA-sekvensien editointi ja linjaus

DGGE:ltä leikatuista DNA-jaksoista sekvensoitavaksi lähetettiin 264 PCR-näytettä. *P. aeruginosa* -puhdaskannan näytteitä niistä oli 7. Koska sekvensoitavien näytteiden määrä oli rajattu, karsittiin näytteiden joukosta pois sellaiset, joiden PCR ei ollut onnistunut tai joiden epäiltiin sisältävän päällekkäisiä DNA-jaksoja. Lisäksi osa *P. aeruginosa* -puhdaskannan näytteistä jätettiin pois. Sekvensoitujen näytteiden jakautuminen koe- ja viikkokohtaisesti on liitteessä 1. Sekvensointi tehtiin Helsingin yliopiston Biotekniikan instituutin sekvensointipalvelussa. Näytteet sekvensoitiin yhteen suuntaan MR907-alukkeella.

DNA-sekvenssit käsiteltiin Staden Package-ohjelmistolla, jonka ohjelmien avulla voitiin editoida sekvenssien fasta-muotoa sekvenssien kromatogrammikuvaajien perusteella. Staden Packagen Trev 1.9 -ohjelmalla leikattiin sekvenssien alku- ja loppupäästä huonot osat pois. Kuviossa 5 on esitetty osa yhden näytteen kromatogrammista Trev 1.9 -ohjelmassa. Gap v4.10 -ohjelmalla korjattiin sekvensoinnin aikana tapahtuneet virheet ja tulostettiin erilliseen tiedostoon sekvenssien fasta-muoto linjausta varten. Kuviossa 6 on esitetty näkymä yhden näytteen editoinnista Gap v.4.10 -ohjelmalla.



KUVIO 5. Näkymä Staden Packagen Trev 1.9 -ohjelmasta



KUVIO 6. Näkymä Staden Packagen Gap v4.10 -ohjelmasta

Editoinnin jälkeen sekvenssejä vertailtiin sekvenssitietokantoihin NCBI:n BLAST-palvelimella. Tietokannaksi valittiin nukleotiditietokanta ja linjausvastauksien määräksi rajattiin 50. Blast-haku tehtiin megablastina, jolloin haku keskittyi suuresti samankaltaisiin sekvensseihin. Muiden hakuparametrien annettiin olla oletusarvoissa. Sekvenssien keskinäinen vertailu tehtiin EMBL-EBI -palvelimen ClustalW2-sekvenssianalyysiohjelmalla. Rinnastuksessa alignment-parametriksi valittiin fast ja output format-parametriksi align without numbers. Muita hakuparametreja ei muutettu oletusarvoista.

#### 4.2.5 Kimeerisyystarkistus

PCR-reaktiossa voi monistumisen aikana tapahtua virheitä, joiden seurauksena syntyy kimeerisiä DNA-jaksoja. Kimeerisessä DNA-jaksossa kaksi tai useampi vajaamittaista juostetta on kiinnittynyt toisiinsa ja muodostanut yhden uuden kopitkän DNA-jakson. PCR-ajon aikana kimeerinen DNA-jakso monistuu samalla tavalla kuin muut DNA-jaksot ja niiden määrä lisääntyy. Tuloksien tarkastelussa kimeeriset sekvenssit voivat vääristää tuloksia ja johtaa harhaan tietokantahauissa. (Huber, Faulkner & Hugenholtz 2004, 2317.)

Opinnäytetyön sekvenssien kimeerisyys tarkistettiin kahden eri palvelimen ohjelmilla:

- Huberin, Faulknerin ja Hugenholtzin kehittämällä Bellerophon-ohjelmalla (saatavilla: <http://foo.maths.uq.edu.au/~huber/bellerophon.pl> [viitattu 23.2.2010].)
- Michigan State University'n Ribosomal Database Project II -palvelimen Chimera Check-ohjelmalla (saatavissa: <http://35.8.164.52/cgis/chimera.cgi?su=SSU> [viitattu 23.2.2010].)

Bellerophonissa kimeerisyystarkistus perustui Huberin, Faulknerin ja Hugenholtzin kehittämään todennäköisyyslaskelmia hyödyntävään menetelmään. Menetelmässä tutkittava sekvenssijakso jaettiin osafragmentteihin ja niille laskettiin fylogeniaa hyödyntäen etäisyys- ja samanlaisuusarvot. Saatujen arvojen perusteella menetelmä arvioi, kuinka hyvin osafragmenttien antamat arvot sopivat yhteen saman sekvenssijakson muiden osafragmenttien arvoihin. Mikäli jonkin osafragmentin arvo poikkesi suuresti kokonaisuudesta, luokitteli menetelmä sekvenssijakson kimeeriseksi. Menetelmä hyödynsi etäisyys- ja samanlaisuusarvolaskelmissa sekä syötettyä sekvenssidataa että tietokannoissa olevia sekvenssitietoja. Kimeeristen sekvenssien lisäksi ohjelma ilmoitti myös ne sekvenssijaksot, joista kimeerinen sekvenssi oli todennäköisesti syntynyt. (Huber ym. 2004, 2317–2319.)

Bellerophon-ohjelmassa Correction to use -parametriksi valittiin Huber-Hugenholtz. Window size-parametriksi valittiin 200, jolloin käsiteltävien sekvenssien minimipituus oli 400 emäsparia. Ohjelmalla tarkastettiin sekvenssit sekä linjaamalla että ilman. Ensimmäisten tarkastusten jälkeen sekvenssien joukosta poistettiin liian lyhyet sekä kimeeriset ja jäljelle jääneet sekvenssit tarkistettiin ohjelmalla uudelleen.

Myös Michigan State University'n Ribosomal Database Project II -palvelimen Chimera Check -ohjelmassa tutkittava sekvenssijakso jaettiin osiin ja osia verrattiin sekä syötettyyn sekvenssidataan että tietokannoissa oleviin sekvenssitietoihin. Vertailumenetelmä oli kuitenkin erilainen. Kun Bellerophon-ohjelmassa vertailu



perustui todennäköisyyslaskelmiin, laski Chimera Check -ohjelma yhteisten emäksien määrät tutkittavan ja sitä parhaiten vastaavan tausta-aineiston sekvenssijakson kesken. Vertailua varten ohjelma jakoi tutkittavan sekvenssijakson kahtia ja laski erikseen yhteisten emästen määrät sekä kahdelle fragmentille että koko sekvenssille. Mikäli kahden fragmentin yhteenlaskettu emäsmäärä oli suurempi kuin koko sekvenssijakson emäsmäärä, olivat kaksi fragmenttia todennäköisemmin peräisin eri organismeista. (Larsen 2010.)

Chimera Check -ohjelmassa sekvenssien käyttötavaksi valittiin ”complemented”, jolloin ohjelma muokkasi syötetyt sekvenssit vertailua helpottavaan muotoon. Muita hakuparametrejä ei muutettu oletusarvoista. Ohjelma antoi sekvenssien vertailutuloksista histogrammikuvaajat sekä listat parhaiten vastaavista tietokannoissa olevista mikrobeista.

## 5 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELO

### 5.1 Kokonais-DNA-eristys, PCR- ja DGGE-ajot

Molekyylibiologiset tutkimukset onnistuivat kokonaisuudessaan hyvin. Koejärjestyksen viikon 12 kaikista 2,4,6-TCP:llä käsitellyistä maanäytteistä saatiin eristettyä mikrobien kokonais-DNA-näytteet. Agarosigeelijaajojen kuvien perusteella humusmaan näytteiden kokonais-DNA-pitoisuus oli suurin. Kivennäis- ja turvemaiden kokonais-DNA-näytteet näkyivät kuvissa yhtä vahvoina. Myös syväjäässä säilytyksessä olleet viikkojen nolla ja neljä kokonais-DNA-näytteet olivat käyttökelpoisia.

Myös kaksois-PCR:t onnistuivat. Valikoivilla alukkeilla tehdyissä PCR:issä monistetut jaksot näkyivät heikosti agarosigeelillä, mutta niiden katsottiin kuitenkin sisältävän riittävästi monistettuja DNA-jaksoja seuraavia tutkimusvaiheita varten. Valikoivien alukkeiden PCR-reaktiossa käytettiin samaa reaktioseosta kuin muidenkin vaiheiden PCR:issä. Valikoivilla alukkeilla monistettu DNA-fragmentti oli kuitenkin kaksi kertaa pidempi kuin muilla alukepareilla monistetut DNA-fragmentit, joten PCR-reaktioseoksen ja -ohjelman optimointi valikoiville alukkeille sopivaksi olisi voinut parantaa saantoa. Saannon vähyys selittyy kuitenkin myös sillä, että valikoivilla alukkeilla monistaminen kohdennettiin vain tiettyyn pieneen ryhmään koko bakteerimäärästä.

Kaksois-PCR:n toisen PCR:ien agarosigeelikuvissa monistetut DNA-jaksot näkyivät vahvempina, ja siten myös monistettujen DNA-jaksojen määrä oli lisääntynyt. Reaktioissa käytetyn DNA-templaatin määrää myös optimoitiin, mikä osaltaan paransi saantoa. Molekyylibiologisten tutkimuksen eri vaiheiden aikana PCR-tuotteita jouduttiin käsittelemään useaan otteeseen. Vaikka työt tehtiin huolella ja tarkasti, muutamat PCR-tuotteet kontaminoituivat laboratoriotöiden aikana, minkä takia ne korvattiin uusilla.

Kymmenestä DGGE:stä kahdesta ei saatu tulosta ollenkaan, koska ajon aikana puskuriliuoksen nestepinta oli pudonnut liian alhaiseksi ja ajolaite oli pysähtynyt ja jäähtynyt. Näiden geelien näytteet ajettiin myöhemmin uudelleen. Lisäksi yksi geeli repesi, kun se siirrettiin lasilevyjen välistä muovialustalle, ja yhden geelin, joka sisälsi humusmaan koantinäytteet, DNA-jaksot eivät erottuneet geelistä kunnonleikkausta varten yli 30 minuutin värjäysajasta huolimatta. Geeleiltä leikattiin yhteensä 283 DNA-jaksoa, joista 11 oli *P. aeruginosa* -puhdaskannan näytteitä. Leikattujen DNA-jaksojen PCR:t sekvensointia varten onnistuivat, vain neljäs-tä ei saatu PCR-tuotetta.

## 5.2 Sekvenssien editointi ja kimeerisyystarkistus

Sekvensoitavaksi lähetettiin yhteensä 264 DNA-jaksoa, joista seitsemän oli *P. aeruginosa* -puhdaskannan näytteitä. Sekvenssien editoinnin jälkeen tutkittavia sekvenssejä oli 175 kappaletta, joista *P. aeruginosa* -puhdaskannan näytteitä oli 7. Sekvensseistä reilu 3 % oli pituudeltaan alle 400 emästä ja noin 4 % oli pituudeltaan 400–449 emästä. Suurin osa eli 65 % sekvensseistä oli 450–499 emäksen pituisia jaksoja ja loput 29 % oli pituudeltaan 500–529 emästä. Kaikki linjatut sekvenssit eivät olleet täysin puhtaita, vaan noin 20 %:ssa oli päällekkäisyyttä. Jos sekvenssien kromatogrammikuvaajista sai editointivaiheessa muodostettua eheän sekvenssin, hyväksyttiin DNA-jakso linjattavien joukkoon.

Kimeerisyystarkistuksessa Bellerophon-ohjelma ilmoitti kimeerisiksi kaksi sekvenssiä ja viisi sekvenssiä liian lyhyiksi tarkastelua varten. Chimera Check -ohjelmalla kimeerisyden tarkistaminen ei ollut yhtä selkeää. Ohjelmassa kimeerisyys piti tulkita histogrammikuvioiden ja tutkittavaa sekvenssiä vastaavien tietokannoissa olevien bakteeritietojen perusteella. Chimera Checkin antamat histogrammikuvaajat ovat kuviossa 7. Kuvaajien mukaan tutkituista sekvensseistä 134 olisi ollut kimeerisiä, mikä oli selvästi ristiriitainen tulos Bellerophon-ohjelman tulosten kanssa.

Chimera Checkin ohjeiden mukaan ohjelma ei kuitenkaan anna täysin luotettavaa tulosta, ja jos esimerkiksi tutkittava sekvenssi sisältää sekä konservatiivisen että varioivan alueen, voi histogrammikuvaaja antaa vääränlaisen kuvan. (Larsen 2010.) Tästä syystä histogrammeja ei käytetty kimeerisyystarkistuksen perusteena, vaan tarkistus tehtiin linjaustulosten mukaan. Jos ohjelma antoi linjaustulokseksi saman tuloksen kuin sekvenssin linjaus tietokantoihin blast-haulla, sekvenssi tulkittiin puhtaaksi. Kolmen sekvenssin kohdalla tulokset eivät vastanneet toisiaan, joten ne tulkittiin kimeerisiksi. Yhteensä kimeerisyystarkistusten perusteella tulkittiin 5 sekvenssiä kimeerisiksi ja ne poistettiin sekvenssien joukosta. Kimeeristen sekvenssien määrät koekohtaisesti on merkitty liitteeseen 1.

<p>Kimeerisen sekvenssin histogrammi-kuvaaja Chimera Check -ohjelman mukaan (Larsen 2010).</p>	<p>Sekvensseistä 115 antoi kuvaajaksi tämän kaltaisen 1-huippuisen histogrammin.</p>
<p>Sekvensseistä 19 antoi kuvaajaksi tämän kaltaisen 2-huippuisen histogrammin.</p>	<p>Sekvensseistä 41 antoi kuvaajaksi tämän kaltaisen histogrammin.</p>

KUVIO 7. Chimera Check -ohjelman antamat tulokset kimeerisyystarkistuksessa

### 5.3 Sekvenssien identifiointi

Sekvenssit identifioitiin vertailemalla niitä sekvenssitietokantoihin NCBI:n BLAST-palvelimella. Identifioitujen sekvenssien määrät koe- ja viikkokohtaisesti ovat liitteessä 1. Tämän lisäksi sekvenssit rinnastettiin keskenään EMBL-EBI - palvelimen ClustalW2-sekvenssianalyysiohjelmalla. Rinnastuksen ja linjauksen tulosten perusteella sekvenssit ryhmiteltiin neljään eri luokkaan:

1. 100 %:sti sekvenssiltään samanlaiset ja erilaiset
2.  $\geq 99$  %:sti sekvenssiltään samanlaiset ja erilaiset
3.  $\geq 98$  %:sti sekvenssiltään samanlaiset ja erilaiset
4.  $\geq 97$  %:sti sekvenssiltään samanlaiset ja erilaiset.

Ryhmittelyn jälkeen erilaisia sekvenssejä luokassa 1 oli 77, luokassa 3 19 ja luokassa 4 14. Näiden lisäksi oli vielä *P. aeruginosa* -puhdaskannan sekvenssit. Sekvensseistä yli 99 %:sti samanlaisten ja erilaisten ryhmittely jätettiin kesken, koska suurin osa ryhmien sekvensseistä vastasi ryhmäläisiään 99–98 %:sti, joten rajanveto 99 % kohdalle osoittautui hankalaksi.

Koejärjestelyn kokeiden bakteerien analysointi tehtiin yli 97 %:sti toisiaan vastanneiden ja erilaisten sekvenssien perusteella. Tällöin tarkastelu tehtiin lajitasolla, sillä 97 %:sti tai enemmän toisiaan sekvenssiltään vastaavat bakteerit luokitellaan kuuluviksi samaan lajiin. (Clark ym. 2009, 390.) Lajien vastaavuus toisiinsa on esitetty liitteessä 2. Lajien keskinäinen rinnastustulos vaihteli 59 %:sta 91 %:iin.

Kun sekvenssien kokonaisuudesta, 175:stä, vähennettiin *P. aeruginosa* -puhdaskannan ja kimeeriset sekvenssit, jäi tarkasteltavaksi 163 sekvenssiä. Näistä sekvensseistä 64 % kuului alfaproteobakteereihin, 17 % gammaproteobakteereihin, 13 % actinobakteereihin ja 6 % viljelemättömiin bakteereihin.

Rinnastustulosten perusteella alfaproteobakteerit jakautuivat viiteen eri ryhmään, kolmeen viljelemättömän alfaproteobakteeriryhmä 1–3 -nimetyksi ryhmäksi sekä viljelemätön *Afipia sp./Bradyrhizobium sp.*- ja *Bradyrhizobium sp.*-lajeiksi. Pelkästään *Bradyrhizobium sp.*-lajeja vastanneita sekvenssejä oli kuusi kappaletta,

kun taas sekä viljelemättömiä *Afipia sp.*- että *Bradyrhizobium sp.*-lajeja yhtä suurella samanlaisuusarvolla vastanneita sekvenssejä oli yksi kappale. Nämä kahdeksi eri ryhmäksi luokitellut sekvenssit vastasivat toisiaan 90 %:sti. Loput 97 alfaproteobakteerien sekvenssiä, jotka oli ryhmitelty viljelemättömiksi alfaproteobakteeriryhmiksi 1–3, vastasivat linjauksessa 92 %:n samanlaisuusarvolla *Rhodospirillaceae* -sukuun kuuluvia bakteerilajeja. Lisäksi sekvenssit vastasivat samoja maaperäbakteereita, joita oli löydetty polyklooratulla bifenyylillä kontaminoitujen maiden mikrobiston analysointiin keskittyneestä tutkimuksesta (Nogales, Moore, Llobet-Brossa, Rosello-Mora, Amann & Timmis, 2001).

Gammaproteobakteereista 85 % kuului *Pseudomonas*-lajeihin. Tarkempaa lajijakoa sekvensseille ei tehty, sillä sekvenssit vastasivat samalla samanlaisuusarvolla sekä *P. fluorescens*-, *P. frederiksbergensis*-, *P. lini*-, *P. mediterranea*-, *P. migulae*- että *P. veronii*-lajeja. Huomion arvoista kuitenkin oli, että kyseisiä lajeja oli löytynyt fenolin (Merimaa, Heinaru, Liivak, Vedler, & Heinaru 2006), polyklooratun bifenyylin (PCB) (Leigh, Prouzova, Mackova, Macek, Nagle & Fletcher 2006), 4-n-butyylifenolin (Hai, Inoue, Momotani, Toyama, Sei & Ike 2009) ja 1,3-diklooripropeenin (Katsivela, Bonse, Krüger, Strömpl, Livingston & Wittich 1999) hajoamista tutkivista tutkimuksista. *Pseudomonas aeruginosa* -puhdaskannan sekvenssejä *Pseudomonas*-lajeiksi identifioidut DNA-jaksot vastasivat alle 95 %:sti.

Loput gammaproteobakteerit vastasivat viljelemättömiä *Xanthomonadaceae*-heimon lajeja, viljelemättömiä *Fulvimonas sp.*-lajeja tai viljelemättömiä gammaproteobakteerilajeja. Actinobakteereista 91 % kuului viljelemättömiin *Solirubrobacter sp.*-lajeihin ja loput viljelemättömiin *Actinomycetales*-lahkon lajeihin. Loput viljelemättömät bakteerit vastasivat maaperästä löytyneitä bakteereja.

Linjattujen sekvenssimäärien tarkastelua varten identifioidut bakteeriryhmät on ryhmitelty kuvioihin 8–10. Osassa bakteeriryhmistä oli vain yksi sekvenssi identifioitu kyseiseksi lajiksi, mutta tästä huolimatta eri ryhmiä ei yhdistetty yhteen. Kuviossa 8 saman viikon rinnakkaiset kokeet on yhdistetty ja tarkastelu on aikapisteiden mukaan, kun taas kuviossa 9 eri viikkojen rinnakkaiset kokeet on yhdis-

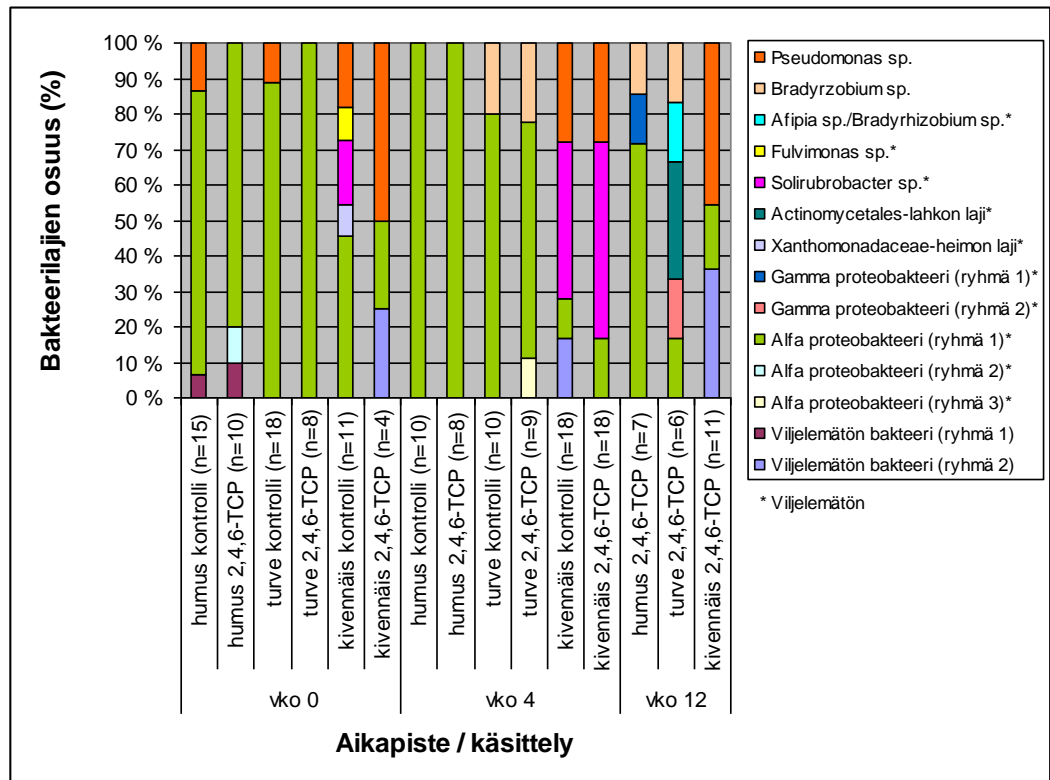
tetty ja tarkastelu on käsittelyn mukaan. Kuviossa 10 saman maatyypin kaikkien kokeiden ja aikapisteiden tulokset on yhdistetty.

Kuviossa 8 prosenttipylväät antavat vääristyneen kuvan kunkin käsittelyn viikko-kohtaisista identifioitujen bakteerien määristä, sillä sekvenssimäärät vaihtelivat neljästä 18:aan. Kuvioista on kuitenkin havaittavissa identifioitujen lajien diversiteetti ja aikapisteet, joista kunkin ryhmän DNA-jaksot on identifioitu. Alfaproteobakteereihin kuuluvat lajit olivat selvästi enemmistö, ja niitä löytyi kaikista käsittelyistä koko koejärjestelyn ajalta.

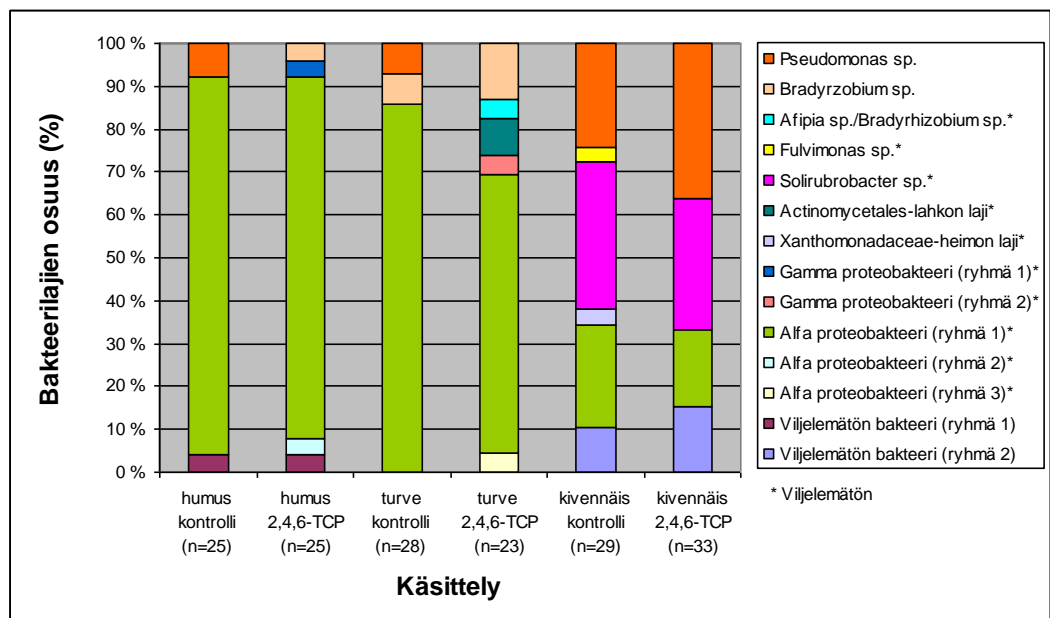
Kuvioista 9 ja 10 havainnollistuu selvemmin käsittelyjen ja maatyypien erot ja yhteneväisyydet. Identifioitujen bakteerimäärien perusteella humus- ja turvemaat eivät poikenneet suuresti toisistaan. Molemmissa alfaproteobakteerilaji 1 oli selvä enemmistö, niin kontrollissa kuin 2,4,6-TCP-käsittelyssä. Kivennäismaa poikkesi suuresti kahdesta muusta maatyypistä. Kivennäismaasta löytyi myös runsaasti alfaproteobakteeriryhmä 1:tä, mutta enemmistö oli kuitenkin *Pseudomonas sp.* - ja *Solirubrobacter sp.* -lajeja. Tutkimuksen kohteena olleita *Pseudomonas sp.* -lajeja identifioitiinkin eniten 2,4,6-TCP:llä kontaminoidusta kivennäismaasta ja toiseksi eniten kivennäismaan kontrollista. *Pseudomonas sp.* -lajeja identifioitiin kuitenkin myös humus- ja turvemaista, mutta ei yhtään 2,4,6-TCP:llä kontaminoiduista kokeista.

Linjattujen sekvenssimäärien ja identifioitujen bakteerien perusteella ei voida suoraan sanoa, lisääntyikö tai vähenikö *Pseudomonas sp.* -lajien tai muiden bakteerilajien määrä koejärjestelyn aikana, sillä identifioitujen bakteerien määrään vaikuttivat useat eri tekijät. Yksi suurimmista vaikuttajista oli leikattavien DNA-jaksojen valinta DGGE:ltä. DNA-jaksoja ei leikattu systemaattisesti kaikista kokeista ja aikapisteistä, vaan valinta kiinnitettiin ensisijaisesti eroavuuksiin ja eniten esiintyviin jaksoihin. Samaan kohtaan liikkuneita DNA-jaksoja myös leikattiin rinnakkaisista kokeista, mikä osaltaan myös lisäsi tietyn lajin näkyvyyttä käsittelykohtaisessa tarkastelussa. Toinen identifioitujen bakteerien määrään vaikuttanut tekijä oli sekvensoinnin onnistuminen.

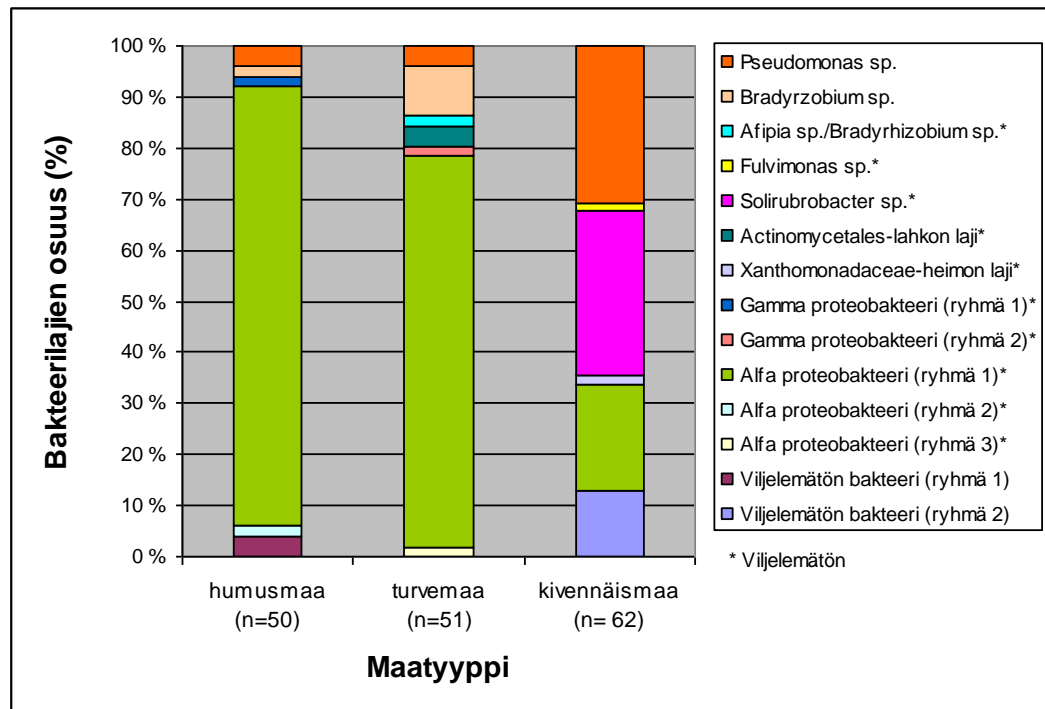




KUVIO 8. Linjattujen sekvenssien ja identifioitujen bakteeriryhmien jakautumisen aikapiste- ja käsittelykohtaisesti



KUVIO 9. Linjattujen sekvenssien ja identifioitujen bakteeriryhmien jakautumisen käsittelykohtaisesti



KUVIO 10. Linjattujen sekvenssien ja identifioitujen bakteriryhmien jakautuminen maatyypeittäin

#### 5.4 DGGE-geelien tarkastelu

DGGE-ajoja tehtiin kymmenen, joista seitsemän ajon kuvia voitiin käyttää vertailussa. Vertailussa kiinnitettiin huomiota maatyypien ja käsittelyjen eroihin ja yhteneväisyyksiin. DGGE-kuvista tehtiin myös yksinkertaistetut viivakaaviot DNA-jaksojen havainnollistamiseksi. Ennen viivakaavioiden tekoa Autocad mechanical 2007 -ohjelmalla DGGE-kuvat käsiteltiin Olympus Master 2 -kuvankäsittelyohjelmalla. Kaaviot sekä näytteiden jakautuminen geeleittäin ovat liitteinä 4–12. DNA-jaksojen diversiteettiluvut ovat taulukossa 6 ja tarkemmin liitteessä 20. Taulukossa 6 käsittelykohtaisten keskiarvojen perässä suluissa oleva luku kuvaa, kuinka monesta diversiteettiluvusta keskiarvo on laskettu. Luvut eivät kuitenkaan ole tarkkoja, sillä ne on laskettu DGGE-kuvien perusteella, ja kuvat eivät vastanneet tarkkuudessaan todellisuutta. Kokeiden ja maatyypien diversiteetin erojen vertailussa on käytetty lisäksi laboratoriotöiden aikana tehtyjä muisiinpanoja.

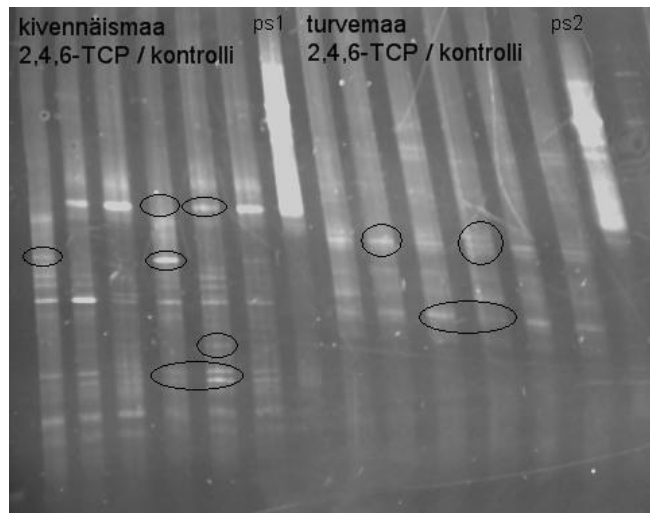
TAULUKKO 6. DNA-jaksojen diversiteettiluvut

Viikko	Maatyyppi	Käsittely	Käsittelykohtainen keskiarvo
VIIKKO 0	humusmaa	kontrolli	13 (7)
		2,4,6-TCP	18 (5)
	turvemaa	kontrolli	17 (10)
		2,4,6-TCP	16 (9)
	kivennäismaa	kontrolli	13 (9)
		2,4,6-TCP	10 (9)
VIIKKO 4	humusmaa	kontrolli	10 (5)
		2,4,6-TCP	13 (3)
	turvemaa	kontrolli	12 (8)
		2,4,6-TCP	16 (6)
	kivennäismaa	kontrolli	14 (8)
		2,4,6-TCP	15 (6)
VIIKKO 12	humusmaa	2,4,6-TCP	9 (3)
	turvemaa	2,4,6-TCP	16 (6)
	kivennäismaa	2,4,6-TCP	10 (6)

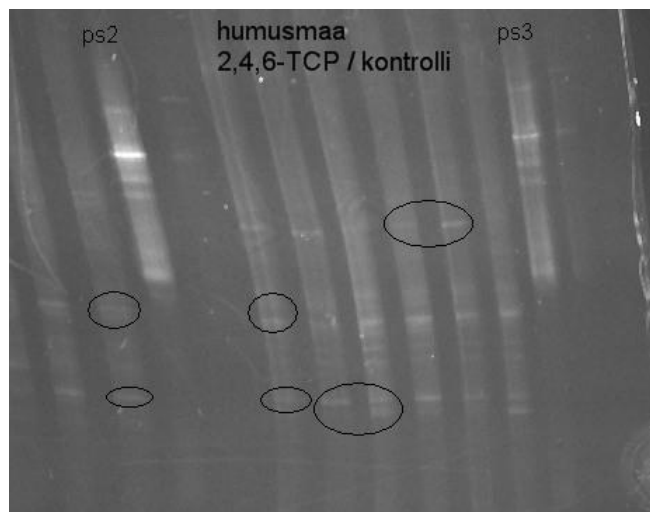
Viikolla nolla kaikkien kokeiden DNA-jaksojen diversiteetti oli suuri. Rinnakkaiset kokeet olivat pääosin yhteneviä, mutta joitakin eroja kuitenkin oli. Tämä kuitenkin johtui tutkittujen maa-alueiden heterogeenisuudesta. 2,4,6-TCP:llä käsitellyt kokeet eivät poikenneet kontrollikokeista. Humus- ja turvemaiden kokeissa oli paljon yhteneväisyyksiä, mutta ne erosivat toisistaan kuitenkin sen verran, että maatyypit pystyi erottamaan toisistaan. Kivennäismaan kokeet poikkesivat selvästi humus- ja turvemaiden kokeista, mutta joitakin yhteisiä DNA-jaksoja oli vahvimmissa DNA-jaksoissa.

Viikolla neljä DNA-jaksojen näkyvyys geelillä sekä paksuus olivat vahvistuneet. Myös maatyyppien erot olivat nyt selvemmat. Luontaisen lisääntymisen lisäksi DNA-jaksojen vahvistuminen saattoi johtua myös PCR-reaktioiden optimoinnista. Kuvioissa 11–12 on kuvat viikon neljä aikapisteen DGGE-ajosta, ja niissä on korostettuna muutamia eroja kokeiden välillä. Kivennäismaa oli selvästi erilainen verrattuna humus- ja turvemaihin. Kivennäismaalla ei geelien perusteella näyttänyt olevat monia yhteisiä DNA-jaksoja turve- ja humusmaiden kanssa, kun taas turve- ja humusmailla vahvimmat DNA-jaksot olivat osittain samoja. Kontrolli-

kokeiden ja 2,4,6-TCP:llä käsiteltujen kokeiden välillä ei DNA-jaksojen sijainnin perusteella ollut eroja, mutta samasta koekuopasta otettujen kontrolli- ja 2,4,6-TCP:llä käsiteltujen kokeiden välillä oli samojen DNA-jaksojen vahvuuksissa eroja.



KUVIO 11. Kivennäis- ja turvemaiden kokeiden viikon 4 aikapisteen DGGE-kuva



KUVIO 12. Humusmaan kokeiden viikon 4 aikapisteen DGGE-kuva

Viikkoon 12 mennessä kaikkien 2,4,6-TCP:llä käsiteltyjen maatyypin kokeiden diversiteetti oli vähentynyt. Myöskään maatyypin välinen ero ei ollut enää yhtä selvästi nähtävissä. Rinnakkaiset kokeet olivat yhä yhteneviä, mutta selvimmät yksittäiset erot olivat kuitenkin säilyneet. Monet vahvimmat DNA-jaksot esiintyivät kaikissa maatyypeissä.

Maatyypin aikavertailussa kaikkien maatyypin kontrollikokeiden diversiteetti pysyi tasaisena ja runsaana lähtötilanteesta viikon neljä aikapisteeseen asti. Viikon 12 kontrollikokeiden kokonais-DNA-näytteitä ei eristetty, joten mahdollista muutoksista viikkoon 12 mennessä ei ole tuloksia. 2,4,6-TCP:llä käsitellyissä kokeissa diversiteetti oli suurimmillaan viikolla nolla ja heikkeni viikkoon 12 mennessä. Erityisesti humusmaassa diversiteetin heikkeneminen oli selvä. Geelien tarkastelun perusteella kontrollikokeet eivät olleet kontaminoituneet ilman kautta koejärjestelyn aikana, eikä 2,4,6-TCP:llä käsitellyissä kokeissa ollut selvästi havaittavissa uusien DNA-jaksojen esiintuloa koejärjestelyn aikana, ainoastaan kivennäismaasta yhdessä geelissä viikon neljä aikapisteestä erottui selvästi muista yksi uusi DNA-jakso, joka identifioitiin *Pseudomonas*-lajiksi.

Geelien tarkastelua kuitenkin vaikeutti se, että suuri osa DNA-jaksoista näkyi geeleillä UV-valossa aivan ohuina viivoina ja usein viivat olivat ryhmittyneet allekkain ja hyvin lähelle toisiaan. Tällaiset erot eivät kuitenkaan näkyneet selvästi enää kuvissa, joissa lähekkäin olleet DNA-jaksot näkyivät yhtenä vahvempana DNA-jaksoalueena. Lisäksi samojen kokeiden ja aikapisteiden DNA-näytteet eivät näkyneet kaikilla geeleillä yhtä selvästi, vaan joissain ajoissa DNA-jaksot näkyivät heikommin ja joissain vahvemmin. Tämä merkitsi sitä, että ajoihin tehdyt geelit eivät olleet tasalaatuisia keskenään.

Kokeiden DNA-jaksojen eroja ja diversiteettiä tarkasteltaessa oli huomioitava myös se, että hajotustoiminnasta huolimatta bakteerien DNA ei häviä maaperästä välittömästi solun kuoleman jälkeen, vaan myös kuolleiden solujen DNA sisältyi maanäytteistä eristettyyn bakteerien kokonais-DNA:han, ja sitä kautta monistui myös PCR-reaktioissa. Tämän takia DGGE:llä ei välttämättä näkynyt selviä eroja eri käsittelyjen välillä.

Myös muut tekijät saattoivat vaikuttaa DNA-jaksojen diversiteettiin. 2,4,6-TCP:llä käsiteltyjen kokeiden DNA-jaksojen diversiteetin väheneminen viikkoon 12 mennessä ei välttämättä johtunut yksin 2,4,6-TCP:n lisäyksestä ja sen vaikutuksista hajottajabakteerikantojen suhteisiin, vaan myös erot kokonais-DNA-eristyksissä ja kasvuolosuhteet saattoivat vaikuttaa diversiteettiin. Viikkojen nolla ja neljä kokonais-DNA-eristys oli tehty aiemmin projektin toimesta ja niihin käytetyt maanäytteet olivat olleet pakastimessa säilytyksessä 7-8 kuukautta ennen kokonais-DNA-eristystä, kun taas viikon 12 kokonais-DNA-eristys tehtiin vasta vuoden päästä kokeiden maanäytteiden pakastamisesta. Eroja oli siis voinut syntyä jo säilytysjakson aikana, kuin myös kokonais-DNA-eristyksessä. Lisäksi koejärjestelyn ajan kokeita oli ylläpidetty keinotekoisien kasvuolosuhteiden avulla, mitkä eivät välttämättä olleet olleet suotuisia kaikille DNA-jaksoja edustaneille bakteerilajeille.

### 5.5 Identifioitujen bakteerien ja DGGE-geelien yhteistarkastelu

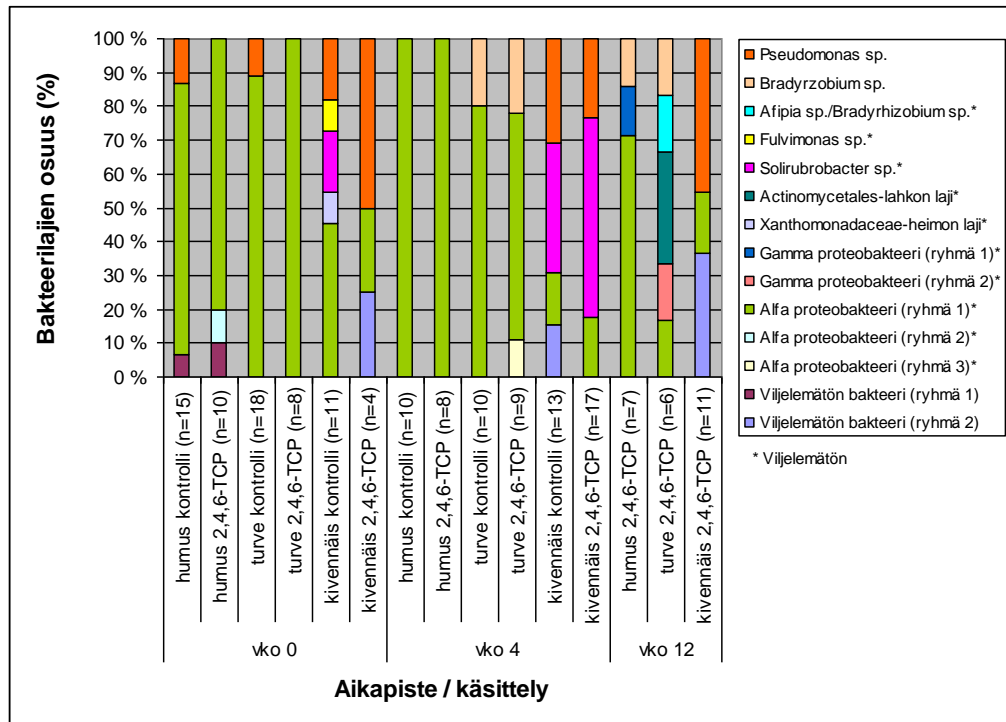
Identifioitujen bakteerien laajempaa tarkastelua varten identifioidut sekvenssit yhdistettiin DGGE-kuviin. DNA-jaksojen sijainnin perusteella laskettiin uudet määrät kullekin bakteerilajiryhmälle ja ryhmien jakautuminen DGGE-kuvien perusteella aikapiste- ja käsittelykohtaisesti on kuvioissa 14. Kuviossa 13 on kuvios- ta 8 muokattu versio, jossa bakteeriryhmien joukosta on poistettu päällekkäiset sekvenssit. Päällekkäisiä sekvenssejä ei ollut montaa, joten kuvio 13 ei poikkea paljoa kuviosta 8.

Yhdistämisessä havaittiin, että sekvenssit, jotka rinnastuksen mukaan olivat 100 %:sti samanlaisia keskenään, eivät sijainneet samassa kohdassa DGGE-geeliä. DGGE-menetelmässä perusoletus kuitenkin on, että 100 %:sti samanlaiset sekvenssit jakautuvat samassa kohdin gradienttia, ja että erottelu tapahtuu jopa yhden emäksen perusteella. Selityksenä 100 %:sti samanlaisten sekvenssien eri kohtiin jakautumiselle olikin sekvenssien kromatogrammikuvien tarkastelun perusteella erot emäksissä. Kromatogrammeissa yksittäisissä kohdissa päällekkäin olleet pii-

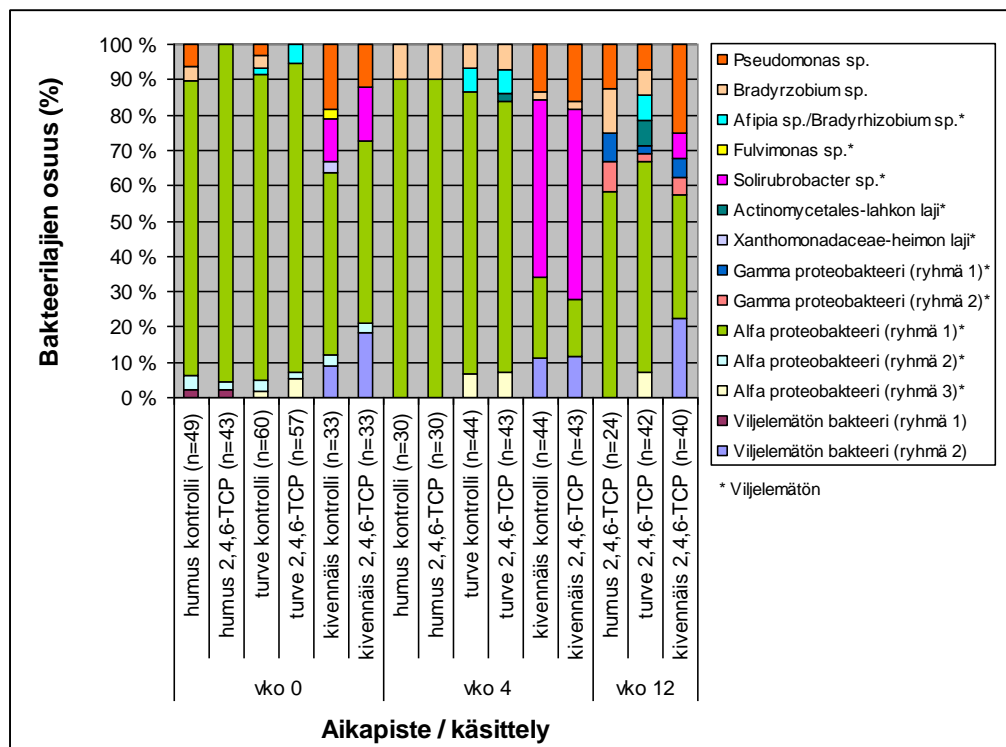
kit oli tulkittu eri tavoin eri sekvenssien kohdalla. Tästä johtuen identifioitujen bakteerien yhdistämisessä geeleihin ja ryhmittelyssä käytettiin samoja 97 %:sti samanlaisten ja erilaisten sekvenssien ryhmittelyä kuin luvun 5.3 tarkastelussa. Lisäksi identifioidut bakteerit yhdistettiin vain sen geelin DNA-jaksoihin, joista kyseisen lajin sekvenssiä oli löytynyt. DNA-jaksoja ei pyritty yhdistämään muihin geeleihin.

DGGE:n perusteella tehtyjen identifioitujen bakteerien jakauma selvensi bakteerien diversiteettiä niin aikapiste- kuin käsittelykohtaisesti. Alfaproteobakteeriryhmä 1 oli edelleen hallitsevin bakteeriryhmä, mutta nyt muidenkin ryhmien esiintyminen korostui. Turve- ja humusmaat eivät poikenneet suuresti toisistaan, kun taas kivennäismaa oli lajijakaumaltaan selvästi erilainen, kuten on nähtävissä myös pelkästään identifioitujen bakteerimäärien perusteella tehdystä kuvioista 13.

Huomion arvoista DGGE:n perusteella tehdyissä identifioitujen bakteerien jakauman tarkastelussa oli se, että *Pseudomonas*-lajien esiintyminen eri käsittelyissä korostui. Kun pelkästään identifioitujen DNA-sekvenssien perusteella tehdyissä analyyseissa *Pseudomonas*-lajeja ei esiintynyt lainkaan humus- ja turvemaiden 2,4,6-TCP-käsittelyissä, niin DGGE:n perusteella *Pseudomonas*-lajeja esiintyi kaikissa käsittelyissä ja niiden suhteelliset määrät olivat kasvaneet viikkoon 12 mennessä verrattuna muihin aikapisteisiin. Eniten *Pseudomonas*-lajeja oli edelleen kivennäismaassa, vaikka niiden osuus kyseisessä maatyypissä oli tasoittunut verrattuna muihin kivennäismaasta identifioituihin bakteerilajeihin.



KUVIO 13. Identifioitujen bakteerilajien jakautuminen aikapiste- ja käsittelykohtaisesti



KUVIO 14. Identifioitujen bakteerien määrät DGGE:ltä laskettuna, aikapiste- ja käsittelykohtainen tarkastelu



Identifioitujen bakteerien ja DGGE:n perusteella viikolla nolla sekä humusmaassa että turvemaassa alfaproteobakteeriryhmä 1:n DNA-jaksot olivat vahvimpia ja *Pseudomonas*- ja muut lajit näkyivät vain ohuina viivoina. Kivennäismaassa alfa-proteobakteeriryhmä 1:n DNA-jaksot olivat myös vahvoja, mutta niiden lisäksi myös *Pseudomonas*-lajit erottuivat selkeästi muista DNA-jaksoista.

Viikon neljä näytteiden DGGE:issä kivennäismaassa *Pseudomonas*-lajien DNA-jaksot olivat vahvistuneet selvästi, ja myös 2,4,6-TCP:llä kontaminoituun kivennäismaahan ilmestynyt uusi DNA-jakso identifioitiin *Pseudomonas*-lajiksi. Lisäksi viljelemättömien *Solirubrobacter*-lajien DNA-jaksot erottuivat muista. Turvemaassa alfaproteobakteeriryhmä 1:n lisäksi *Bradyrhizobium*-lajien DNA-jaksot erottuivat vahvoina, mutta *Pseudomonas*-lajien näkyvyys pysyivät edelleen heikkona. Humusmaassa ei ollut tapahtunut selvää muiden lajien DNA-jaksojen vahvistumista.

Viikolla kaksitoista 2,4,6-TCP:llä käsitellyissä kivennäismaissa *Pseudomonas*-lajien DNA-jaksot olivat selvästi vahvempia verrattuna muihin identifioituihin bakteerilajeihin. Myös turve- ja humusmaissa *Pseudomonas*-lajien DNA-jaksot erottuivat selkeästi. Lisäksi turvemaan ohella myös humusmaassa *Bradyrhizobium*-lajin DNA-jaksot olivat vahvistuneet.

## 6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Opinnäytetyön tarkoituksena oli analysoida 2,4,6-TCP:llä kontaminoitujen maiden bakteeridiversiteettiä ja 2,4,6-TCP:n lisäyksen vaikutuksia siihen. Tulosten perusteella viljelemättömät alfaproteobakteerit olivat selvä enemmistö kaikissa maatyypeissä ja niitä löytyi kaikista käsittelyistä koko koejärjestelyn ajan. Tutkimuksen kohteena olleita *Pseudomonas*-lajeja identifioitiin DNA-sekvensseistä eniten kivennäismaasta. Kivennäismaasta identifioitiin, muista poiketen, myös viljelemättömään *Solirubrobacter*-lajiin kuuluvia bakteereita.

Identifioitujen bakteerien lisäksi kivennäismaa poikkesi myös DGGE-kuvien perusteella humus- ja turvemaista, jotka taas olivat keskenään hyvin samanlaisia. Kaikissa maissa diversiteetti oli suurimmillaan viikkojen nolla ja neljä aikapisteissä ja väheni selvästi viikkoon kaksitoista mennessä. Kontrollikokeet eivät poikenneet 2,4,6-TCP:llä käsitellyistä kokeista viikoilla nolla ja neljä. Koska kontrollikokeiden bakteerikantoja ei analysoitu viikolta kaksitoista, ei varmuudella kuitenkaan voida sanoa, vaikuttiko 2,4,6-TCP:n lisäys diversiteetin pienenemiseen pitkällä aikavälillä vai johtuiko muutos esimerkiksi käytetyistä menetelmistä tai kasvuolosuhteista.

Diversiteetin vähenemisestä huolimatta tutkimuksen kohteena olleiden *Pseudomonas*-lajien DNA-jaksojen vahvuus DGGE:llä oli selvästi vahvistunut kaikissa tutkituissa maissa viikolle kaksitoista mennessä, mikä viittaa siihen, että kyseiset bakteerit olivat lisääntyneet. *Pseudomonas*-lajien määrä ei kuitenkaan ollut lisääntynyt DNA-jaksojen sijainnin perusteella katsottuna. Identifioitujen bakteerien perusteella tutkituissa maissa oli jo valmiiksi kloorifenoleita hajottavia tai sietäviä bakteerikantoja, ja 2,4,6-TCP:n hajoamisnopeudesta päätellen humus- ja kivennäismaiden bakteerit sopeutuivat nopeasti muutokseen ja pystyivät hyödyntämään kloorifenolia ravinnon lähteenä.

Vaikka *Pseudomonas*-lajit ovat tunnettuja kloorifenolien hajottajabakteereita, eivät niiden esiintyminen tai määrät ole aina suoraan verrattavissa kloorifenolien hajoamiseen maassa, kuten ilmenee myös tässä ja Kalojärven (2009) opinnäytetyössä. Humusmaassa 2,4,6-TCP:n hajoaminen oli ollut nopeinta, mutta kyseisestä maasta ei identifioitu montaa DNA-jaksoa *Pseudomonas*-lajiksi. Toisaalta taas turvemaan kohdalla 2,4,6-TCP:n hajoaminen oli ollut hyvin vähäistä, mutta kyseisestä maatyypistä kuitenkin löytyi *Pseudomonas*-lajeja sekä identifioituista DNA-sekvensseistä että DGGE-kuvien perusteella.

Maista löydetyillä bakteerilajeilla ei siis välttämättä ollut osaa 2,4,6-TCP:n hajottamisessa, vaan hajottamisen päävastuussa saattoivat olla jotkin muut bakteerilajit. Osa maista identifioituista bakteerilajeista oli kuitenkin lisääntynyt koejärjestelyn aikana, joten vaikka ne eivät olisikaan olleet päävastuussa 2,4,6-TCP:n hajottamisesta, pystyivät ne silti sietämään ja mahdollisesti muuten hyötymään kloorifenoliyhdisteen läsnäolosta.

2,4,6-TCP:n erilaiseen hajoamisnopeuteen eri maatyypeissä ovat voineet vaikuttaa myös muut tekijät. Tutkituista maamassoista aiemmin tehtyjen pH-määritysten mukaan turvemaan pH oli keskimäärin 3,48, kun se humusmaassa oli 3,61 ja kivennäismaassa 4,77 (Kauppi 2010). Koska maaperän alhaisissa pH-olosuhteissa kloorifenolit ovat ionisoitumattomassa muodossa ja sitoutuneena orgaaniseen ainekseen (Leung ym. 1997, 591–592), on mahdollista, että turvemaassa alhaisen pH:n takia kloorifenolit olivat tiukasti sitoutuneina rahkaturpeeseen, etteivät hajottajabakteerit voineet hyödyntää niitä samalla tavoin kuin humus- ja kivennäismaissa.

Kloorifenoliyhdisteiden, kuten muidenkin orgaanisten yhdisteiden, hajottamiseen vaikuttavat myös hajottamisesta vastaavissa bakteereissa ilmenevät geenit. Joten turvemaassa kloorifenolin hajoamistulokseen on voinut vaikuttaa myös se, että turvemaassa esiintyneet bakteerilajit eivät tuottaneet sellaisia entsyymejä, joita olisi tarvittu 2,4,6-TCP:n tehokkaaseen hajottamiseen. Hajottamisessa aktiivisesti toimivien bakteerien ja geenien identifioiminen olisi kuitenkin edellyttänyt RNA:n analysoimista DNA:n sijasta.

Bakteerien analysointiin käytetyillä menetelmillä saatiin lisätietoa tutkittujen maiden bakteeridiversiteetistä ja 2,4,6-TCP:n lisäyksen vaikutuksista siihen. Valituilla menetelmillä oli kuitenkin vaikutusta tuloksiin sekä niiden tulkintaan. *Pseudomonas*-kantoja valikoivat alukkeet eivät toimineet hyvin spesifisti, vaan niiden avulla monistui myös muita bakteerikantoja. PCR-reaktion ja käytetyn ohjelman optimoinnilla olisi mahdollisesti voitu tarkentaa monistumista. DGGE-menetelmällä saatiin yleiskuva DNA-jaksojen diversiteetistä koekohtaisesti, mutta koska geelit eivät olleet keskenään tasalaatuisia ja kuvat olivat epätarkempia kuin kuvattu geeli, oli geelien vertailu tulkinnanvaraista. Myös leikattavien DNA-jaksojen valinta ja sekvensoinnin onnistuminen vaikuttivat tuloksiin.

Muita vaihtoehtoja analysoida maaperän bakteereita DGGE:n sijasta on esimerkiksi kloonata tutkittavat PCR-tuotteet kloonausvektorin avulla tai sekvensoida DNA-jaksot pyrosekvensoinnin avulla. Jatkossa näitä menetelmiä voisi käyttää esimerkiksi DGGE-ajojen rinnalla, varsinkin jos halutaan tutkia tarkemmin jonkin tietyn kokeen *Pseudomonas*-bakteerikantoja. Myös muiden alukkeiden käyttäminen toisi lisää tietoa maatyypin bakteerikannoista.

Turvemaan kohdalla voisi myös tehdä pienimuotoisen erillisen koejärjestelyn, jossa 2,4,6-TCP:llä käsitellyn turvemaan sekaan sekoittaisi esimerkiksi 2,4,6-TCP:llä käsiteltyä humusmaata, jolloin voisi testata, vaikuttaako kloorifenoliyhdisteen hajoamiseen turvemaassa sen sitoutuminen orgaaniseen ainekseen vai oikeanlaisen geneettisen perimän omaavien hajottajabakteerien esiintyminen. Jatkossa voisi myös tarkastella, aiheuttavatko suuremmat 2,4,6-TCP-pitoisuudet selvempiä muutoksia bakteerikantoihin, tai rajoittavatko tai hidastavatko jonkin rajan ylittävät 2,4,6-TCP-pitoisuudet hajotustoimintaa.

Opinnäytetyön molekyylibiologisille tutkimuksille asetetut tavoitteet onnistuivat, ja menetelmien avulla saatiin lisätietoa tutkittujen maiden bakteeridiversiteetistä. Turvemaassa tapahtuvaan 2,4,6-TCP:n hajoamiseen vaikuttavien tekijöiden ja kloorifenolin hajottamisesta päävastuussa olevien bakteerilajien analysointi vaativat kuitenkin vielä jatkotutkimuksia.

## LÄHTEET

Ahola, S. 1999. Alustavat sahojen PCDD/F-tutkimukset Pohjois-Savossa. Pohjois-Savon ympäristökeskuksen moniste nro 23. Kuopio: Pohjois-Savon ympäristökeskus [viitattu 8.2.2010]. Saatavissa:

<http://www.ymparisto.fi/download.asp?contentid=25464>

Alvarez-Rodriguez, M. L., Lopez-Ocana, L., Lopez-Coronado, J. M., Rodriguez, E., Martinez, M. J., Larriba, G. & Coque, J. R. 2002. Cork tain of wines: Role of the filamentous fungi isolated from cork in the formation of 2,4,6-trichloroanisole by O methylation of 2,4,6-trichlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 12, 12/2002, 5860–5869.

Clark, D. P., Dunlap, P. V., Madigan, M. T. & Martinko, M. T. 2009. *Brock. Biology of Microorganisms*. 12. painos. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.

Cortec. 2010. IUB Codes. Cortec [viitattu 10.4.2010]. Saatavissa:

<http://www.cortec.ca/iubcodes.htm>

Frankki, S., Persson, Y., Öberg, L., Skyllberg, U. & Tysklind, M. 2007. Mobility of chloroaromatic compounds in soil: Case studies of Swedish chlorophenol-contaminated sawmill sites. *Ambio: A Journal of the Human Environment*, Vol. 36, No. 6, 7/2007, 452–457.

Gribble, G. W. 2003. The diversity of naturally produced organohalogenes. *Chemosphere* 52/2003, 289–297.

Hai, H., Inoue, D., Momotani, N., Toyama, T., Sei, K. & Ike, M. 2009. Characterization of novel 4-n-butylphenol-degrading *Pseudomonas veronii* strains isolated from rhizosphere of giant duckweed, *Spirodela polyrrhiza*. *Japanese Journal of Water Treatment Biology*, Vol. 45, 06/2009, 83–92.

Huber, T., Faulkner, G. & Hugenholtz, P. 2004. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, Vol. 20, No. 14. Oxford University Press, 2317–2319 [viitattu 23.2.2010]. Saatavissa:

<http://foo.maths.uq.edu.au/~huber/doc/bellerophon.pdf>

Järvinen, K. 2001. Bioreaktoriprosessi kloorifenoleilla pilaantuneen pohjaveden puhdistuksessa – Kärkölä –. Suomen ympäristö 506. Helsinki: Edita Oy.

Kalojärvi, K. 2009. 2,4,6-trikloorifenolin hajoaminen eri maatyypeissä. Lahden ammattikorkeakoulu, tekniikan ala. Ympäristötekniikan opinnäytetyö.

Katsivela, E., Bonse, D., Krüger, A., Strömpl, C., Livingston, A. & Wittich, R.-M. 1999. An extractive membrane biofilm reactor for degradation of 1,3-dichloropropene in industrial waste water. *Appl Microbial Biotechnol*, 52/1999, 853–862.

Kauppi, S. 2010. Kloorifenolimaat, pH [sähköpostiviesti]. Vastaanottaja Selin, M. Lähetetty 17.3.2010 [viitattu 10.4.2010].

Larsen, N. 2010. How to interpret Chimera Detection results. Ribosomal Database Project II. Michigan State University [viitattu 27.2.2010]. Saatavissa:

[http://35.8.164.52/docs/chimera\\_doc.html](http://35.8.164.52/docs/chimera_doc.html)

Lehtola, M. (toim.) 2005. Yhteenveto käytöstä poistetuista kemikaaleista (taulukko III A ja III B). Teoksessa Pietiläinen, R. (toim.) *Kemikaalit ja työ. Selvitys työympäristön kemikaaliriskeistä*. Helsinki: Työterveyslaitos, 283–285.

Leigh, B., Prouzova, P., Mackova, M., Macek, T., Nagle, D.P. & Fletcher, J.S. 2006. Polychlorinated biphenyl (PCB)-degrading bacteria associated with trees in a PCB-contaminated sites. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 4, 4/2006, 2331–2342.

Leung, K. T., Errampalli, D., Cassidy, M., Lee, H., Hall, B., Trevors, J. T., Okamura, H. & Bach, H. J. 1997. A case study of bioremediation of polluted soil: Biodegradation and toxicity of chlorophenols in soil. Teoksessa Van Elsas, J. D., Trevors, J. T. & Wellington, E. M. H. (toim.) Modern soil microbiology. New York: Marcel Dekker Inc. 577–605.

Lindroos, L. 2005. Kloorifenolit. Teoksessa Pietiläinen, R. (toim.) Kemikaalit ja työ. Selvitys työympäristön kemikaaliriskeistä. Helsinki: Työterveyslaitos, 271–273.

Matus, V., Sanchez, M.A., Martinez, M. & Gonzalez, B. 2003. Efficient degradation of 2,4,6-trichlorophenol requires a set of catabolic genes related to *tcp* genes from *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4). Applied and Environmental Microbiology, Vol. 69, No.12, 12/2003, 7108–7115.

Merimaa, M., Heinaru, E., Liivak, M., Vedler, E. & Heinaru, A. 2006. Grouping of phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase genes among phenol- and p-cresol-degrading *Pseudomonas* species and biotypes. Arch. Microbiol, 186 (4), 2006, 287–296.

MO BIO. 2007. PowerSoil™ DNA Isolation Kit. Instruction Manual. Version 05182007. Mo BIO Laboratories, Inc.

Muller, J. F., Stevens, A. M., Craig, J. & Love, N. G. 2007. Transcriptome analysis reveals that multidrug efflux genes are upregulated to protect *Pseudomonas aeruginosa* from pentachlorophenol stress. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 73, No.14, 7/2007, 4550–4558.

Nogales, B., Moore, E. R. B., Llobet-Brossa, E., Rossello-Mora, R., Amann, R. & Timmis, K. N. 2001. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 67, No. 4, 2001, 1874–1884.

Opetushallitus. 2010. Ympäristökemian verkkokurssi, ympäristömyrkyt. Klooratut hiilivedyt. Opetushallitus, Opettajan verkkopalvelu [viitattu 8.2.2010]. Saatavissa: <http://www.edu.fi/oppimateriaalit/ymparistokemia/hiilivety2.html>

Park, S. M., Park, H. H., Lim, W. K. & Shin, H. J. 2003. A new variant activator involved in the degradation of phenolic compounds from a strain of *Pseudomonas putida*. *Journal of Biotechnology* 103/2003, 227–236.

Philp, J. C., Bamforth, S. M., Singleton, I. & Atlas, R. M. 2005. Environmental pollution and restoration: A role for bioremediation. Teoksessa Atlas, R. M & Philp, J. (toim.) *Bioremediation. Applied Microbial Solutions for Real-World Environmental Cleanup*. Washington, DC: ASM Press, 1–48.

Reinikainen, J. 2007. Maaperän kynnys- ja ohjearvojen määrittämisperusteet. Suomen ympäristö 23/2007. Helsinki: Edita Prima Oy.

Sanchez, M. A., Vasquez, M. & Gonzalez, B. 2004. A previously unexposed forest soil microbial community degrades high levels of the pollutant 2,4,6-trichlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70, No. 12, 12/2004, 7567–7570.

Scragg, A. 2005. *Environmental Biotechnology*. 2. painos. Oxford: Oxford University Press.

Sinkkonen, A. (tutkijatohtori) & Kauppi, S. (FM). 2010. Helsingin yliopisto, ympäristötieteiden laitos, Tehostettu luonnonvalinta ja mikrobit -hankekokonaisuus. Haastattelu 10.4.2010.

Smith, J.E. 2009. *Biotechnology*. 5. painos. Cambridge: Cambridge University Press.



Stipicevic, S., Fingler, S. & Drevenkar, V. 2009. Effect of organic and mineral soil fractions on sorption behaviour of chlorophenol and triazine micropollutants. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology, Vol. 60, No. 1, 3/2009, 43–52.

Suni, S., Malinen, E., Kosonen, J., Silvennoinen, H. & Romantschuk, M. 2007. Electrokinetically enhanced bioremediation of creosote-contaminated soil: Laboratory and field studies. Journal of Environmental Science and Health Part A, 42/2007, 277–287.

Suomen ympäristökeskus. 2010a. Ympäristön tila. Haitalliset aineet maaympäristössä. Valtion ympäristöhallinto, Suomen ympäristökeskus [viitattu 8.2.2010]. Saatavissa: <http://www.ymparisto.fi/default.asp?node=1193&lan=fi>

Suomen ympäristökeskus. 2010b. Ympäristön tila. Haitallisten aineiden kertyminen ja vaikutukset eliöihin. Valtion ympäristöhallinto, Suomen ympäristökeskus [viitattu 8.2.2010]. Saatavissa: <http://www.ymparisto.fi/default.asp?node=1197&lan=fi>

Suomen ympäristökeskus. 2010c. Ympäristön tila. Ihmisen altistuminen haitallisille aineille. Valtion ympäristöhallinto, Suomen ympäristökeskus [viitattu 8.2.2010]. Saatavissa: <http://www.ymparisto.fi/default.asp?node=10100&lan=fi>

Suomen ympäristökeskus. 2010d. Ympäristön tila. Kymijoen saastuneet sedimentit. Valtion ympäristöhallinto, Suomen ympäristökeskus, Kaakkois-Suomen ELY. [viitattu 8.2.2010]. Saatavissa: <http://www.environment.fi/default.asp?contentid=172999&lan=fi&clan=fi>

Suomen ympäristökeskus. 2010e. Ympäristön tila. Maaperän pilaantumisen syyt ja esiintyminen Suomessa. Valtion ympäristöhallinto, Suomen ympäristökeskus [viitattu 8.2.2010]. Saatavissa: <http://www.ymparisto.fi/default.asp?node=11121&lan=fi>

Suomen ympäristökeskus. 2010f. Ympäristön tila. Pilaantuneilla alueilla tehdyt kunnostukset. Valtion ympäristöhallinto, Suomen ympäristökeskus [viitattu 8.2.2010]. Saatavissa:

<http://www.ymparisto.fi/default.asp?contentid=307138&lan=fi&clan=fi>

Widmer, F., Seidler, R. J., Gillevet, P. M., Watrud, L. S. & Di Giovanni, G. D. 1998. Highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (Sensu Stricto) in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 64, No. 7, 1998, 2545–2553.

## LIITTEET

- Liite 1 DNA-jaksojen jakautuminen koe- ja viikkokohtaisesti
- Liite 2 Bakteriryhmien keskinäinen rinnastus
- Liite 3 DGGE-ajojen näytteet
- Liite 4 Bakteriryhmien sekvenssien jakautuminen aikapiste- ja koekohtaisesti
- Liite 5 DGGE-ajojen näytetietojen merkkien selitykset
- Liite 6 DGGE-ajojen DNA-jaksojen viivakaaviot ja näytetiedot: DGGE 1
- Liite 7 DGGE-ajojen DNA-jaksojen viivakaaviot ja näytetiedot: DGGE 2
- Liite 8 DGGE-ajojen DNA-jaksojen viivakaaviot ja näytetiedot: DGGE 3
- Liite 9 DGGE-ajojen DNA-jaksojen viivakaaviot ja näytetiedot: DGGE 4
- Liite 10 DGGE-ajojen DNA-jaksojen viivakaaviot ja näytetiedot: DGGE 5
- Liite 11 DGGE-ajojen DNA-jaksojen viivakaaviot ja näytetiedot: DGGE 6
- Liite 12 DGGE-ajojen DNA-jaksojen viivakaaviot ja näytetiedot: DGGE 8
- Liite 13 DNA-sekvenssien vastaavuudet: DGGE 1
- Liite 14 DNA-sekvenssien vastaavuudet: DGGE 2
- Liite 15 DNA-sekvenssien vastaavuudet: DGGE 3
- Liite 16 DNA-sekvenssien vastaavuudet: DGGE 4
- Liite 17 DNA-sekvenssien vastaavuudet: DGGE 5
- Liite 18 DNA-sekvenssien vastaavuudet: DGGE 6
- Liite 19 DNA-sekvenssien vastaavuudet: DGGE 8
- Liite 20 DNA-jaksojen diversiteettiluvut

## LIITE 1

## DNA-JAKSOJEN JAKAUTUMINEN KOE- JA VIIKKOKOHTAISESTI

Viikko	Maatyyppe	Käsittely	Koe	leikattu DGGE:ltä	Sekvensoitu	Linjau- tulos	Kimee- rinen
VIIKKO 0	humusmaa	kontrolli	H7	3	3	3	
			H15	14	11	9	
			H23	5	5	3	
		2,4,6-TCP	H8	3	3	3	
			H16	8	6	5	
			H24	3	3	2	
	turvemaa	kontrolli	V7	12	12	5	
			V15	13	13	10	1
			V23	7	7	4	
		2,4,6-TCP	V8	9	9	3	
			V16	3	3	2	
			V24	7	7	3	
	kivennäismaa	kontrolli	J15	6	6	3	
			J19	3	3	2	1
			J23	17	17	7	
		2,4,6-TCP	J16	4	4	0	
			J20	6	6	0	
			J24	10	10	4	
VIIKKO 4	humusmaa	kontrolli	H7	4	3	3	1
			H15	4	4	4	1
			H23	7	5	5	
		2,4,6-TCP	H8	3	3	3	
			H16	4	2	2	
			H24	3	3	3	
	turvemaa	kontrolli	V7	3	3	1	
			V15	8	8	7	
			V23	6	6	2	
		2,4,6-TCP	V8	4	4	2	
			V16	7	7	5	1
			V24	5	4	3	
	kivennäismaa	kontrolli	J15	6	6	5	
			J19	13	13	10	
			J23	4	4	3	
		2,4,6-TCP	J16	4	4	4	
			J20	7	7	7	
			J24	9	9	7	
VIIKKO 12	humusmaa	2,4,6-TCP	H8	5	2	2	
			H16	2	2	1	
			H24	5	4	4	
	turvemaa	2,4,6-TCP	V8	6	6	4	
			V16	2	2	0	
			V24	5	5	2	
	kivennäismaa	2,4,6-TCP	J16	2	2	2	
			J20	7	7	7	
			J24	4	4	2	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - markkeri			PS	11	7	7	
YHTEENSÄ				283	264	175	5

## LIITE 2

## BAKTEERIRYHMIEN KESKINÄINEN RINNASTUS

Yhteneväisyys ilmaistu prosenttilukuina.

	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Afipia sp./Bradyrhizobium sp.</i>	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>Fulvimonas sp.</i>	<i>Solirubrobacter sp.</i>	<i>Actinomycetales</i> -lahkon laji	<i>Xanthomonadaceae</i> -heimon laji	Gamma proteobakteeri (ryhmä 1)	Gamma proteobakteeri (ryhmä 2)	Alfa proteobakteeri (ryhmä 1)	Alfa proteobakteeri (ryhmä 2)	Alfa proteobakteeri (ryhmä 3)	Viljelemätön bakteeri (ryhmä 1)	Viljelemätön bakteeri (ryhmä 2)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Pseudomonas sp.</i>		74	74	77	71	71	82	80	83	80	83	71	75	78	94
<i>Afipia sp./Bradyrhizobium sp.</i>	74		90	70	72	67	73	74	65	82	79	78	71	72	75
<i>Bradyrhizobium sp.</i>	74	90		69	69	64	73	70	68	80	77	77	69	73	74
<i>Fulvimonas sp.</i>	77	70	69		72	75	90	75	79	73	84	64	75	96	78
<i>Solirubrobacter sp.</i>	71	72	69	72		85	74	68	73	74	77	66	76	73	72
<i>Actinomycetales</i> -lahkon laji	71	67	64	75	85		79	72	73	69	79	62	78	74	72
<i>Xanthomonadaceae</i> -heimon laji	82	73	73	90	74	79		79	81	77	83	70	71	91	81
Gamma proteobakteeri (ryhmä 1)	80	74	70	75	68	72	79		80	74	84	66	73	73	79
Gamma proteobakteeri (ryhmä 2)	83	65	68	79	73	73	81	80		72	81	67	75	77	82
Alfa proteobakteeri (ryhmä 1)	80	82	80	73	74	69	77	74	72		91	85	76	76	80
Alfa proteobakteeri (ryhmä 2)	83	79	77	84	77	79	83	84	81	91		81	79	83	83
Alfa proteobakteeri (ryhmä 3)	71	78	77	64	66	62	70	66	67	85	81		66	69	71
Viljelemätön bakteeri (ryhmä 1)	75	71	69	75	76	78	71	73	75	76	79	66		73	76
Viljelemätön bakteeri (ryhmä 2)	78	72	73	96	73	74	91	73	77	76	83	69	73		79
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	94	75	74	78	72	72	81	79	82	80	83	71	76	79	



## LIITE 4

## BAKTEERIRYHMIEN SEKVENSSSIEN JAKAUTUMINEN AIKAPISTE- JA KÄSITTELYKOHTAISESTI

	Sekvenssien rinnastuskoodit	ps	br	ab	fu	so	ac	xa	gp1	gp2	ap1	ap2	ap3	vb1	vb2	
VIIKKO	BAKTEERIRYHMÄ / KÄSITTELY	Pseudomonas sp.	Bradyrhizobium sp.	Astipia sp. / Bradyrhizobium sp. *	Fulvimonas sp. *	Solirubrobacter sp. *	Actinomycetales-lahkon laji*	Xanthomonadaceae- heimon laji*	Gamma proteobakteeri (ryhmä 1)*	Gamma proteobakteeri (ryhmä 2)*	Alfa proteobakteeri (ryhmä 1)*	Alfa proteobakteeri (ryhmä 2)*	Alfa proteobakteeri (ryhmä 3)*	Viljelmätön bakteeri (ryhmä 1)	Viljelmätön bakteeri (ryhmä 2)	
		humus kontrolli (n=15)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	1	0
		humus 2,4,6-TCP (n=10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	1	0	1	0
		tuurve kontrolli (n=18)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	0
		tuurve 2,4,6-TCP (n=8)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0
		kiivennäis kontrolli (n=11)	2	0	0	1	2	0	0	1	0	5	0	0	0	0
		kiivennäis 2,4,6-TCP (n=4)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
		humus kontrolli (n=10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0
		humus 2,4,6-TCP (n=8)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0
		tuurve kontrolli (n=10)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0
		tuurve 2,4,6-TCP (n=9)	0	2	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	1	0
		kiivennäis kontrolli (n=18)	5	0	0	0	8	0	0	0	0	2	0	0	0	0
		kiivennäis 2,4,6-TCP (n=18)	5	0	0	0	10	0	0	0	0	3	0	0	0	0
		humus 2,4,6-TCP (n=7)	0	1	0	0	0	0	0	0	1	5	0	0	0	0
tuurve 2,4,6-TCP (n=6)	0	1	1	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0		
kiivennäis 2,4,6-TCP (n=11)	5	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0		
	* Viljelmätön															
	YHTEENSÄ	23	6	1	1	20	2	1	1	1	95	1	1	2	8	

## LIITE 5

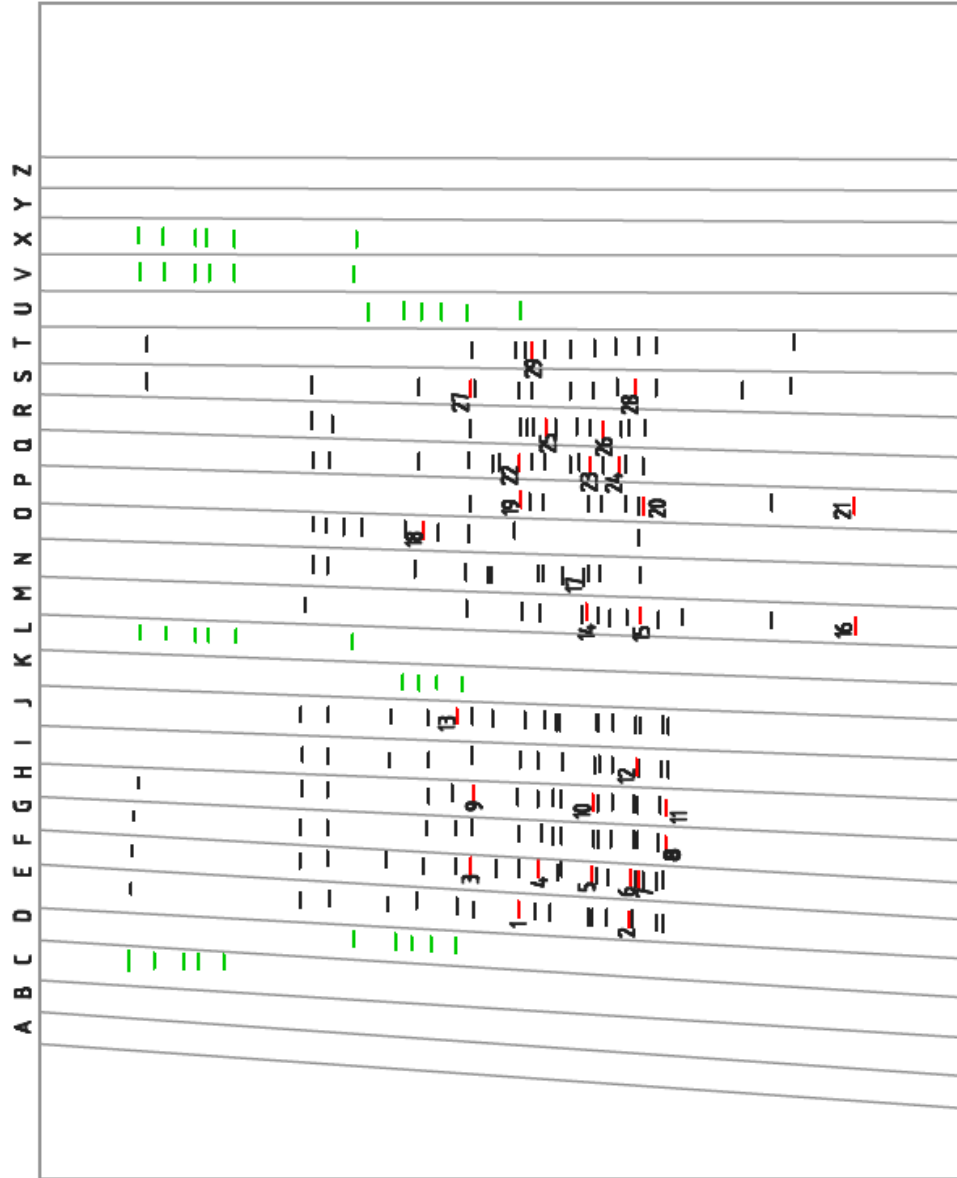
## DGGE-AJOJEN NÄYTETIETOJEN MERKKIEN SELITYKSET

<b>Merkki</b>	<b>Selitys</b>
T	tyhjä kaivo
M	GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder - molekyylirikkomarkkeri (Fermentas)
PS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -puhdaskanta
V (7-23)	turvemaa, kontrolli
V (8-24)	turvemaa, 2,4,6-TCP
H (7-23)	humusmaa, kontrolli
H (8-24)	humusmaa, 2,4,6-TCP
J (15-23)	kivennäismaa, kontrolli
J (16-24)	kivennäismaa, 2,4,6-TCP
—	<i>P. aeruginosa</i> -puhdaskannan / molekyylirikkomarkkerin DNA-jakso
—	DNA-jakso
—	identifioitu DNA-jakso



LIITE 6

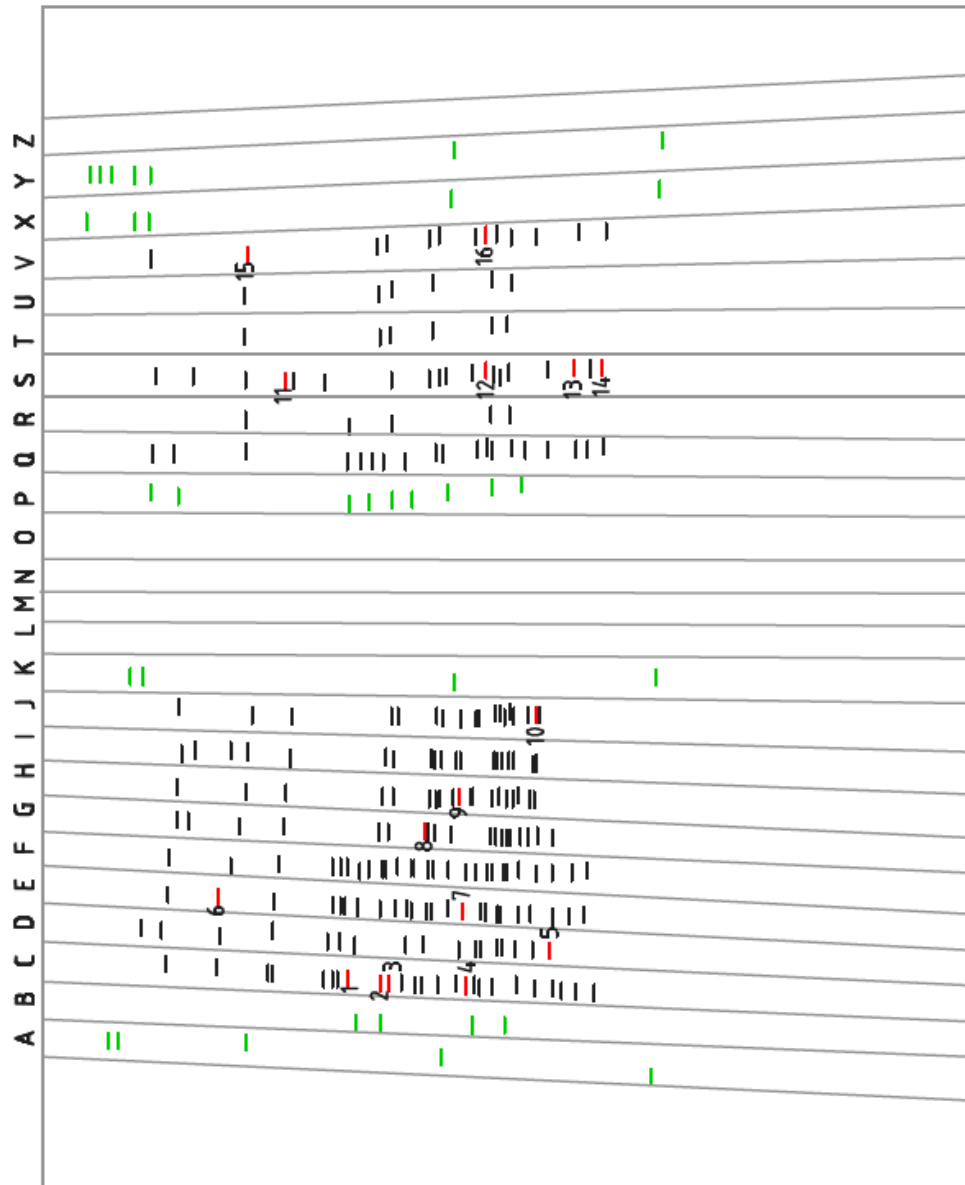
DGGE-AJOJEN DNA-JAKSOJEN VIIVAKAAVIOT JA NÄYTETIEDOT  
DGGE 1



DGGE 1 (11.6.2009)			
kaivo	näyte	viikko	PCR
A	T		nete dPCR
B	T		
C	M		
D	PS		
E	V7	0	9.6.09
F	V15	0	9.6.09
G	V23	0	9.6.09
H	V8	0	9.6.09
I	V16	0	9.6.09
J	V24	0	9.6.09
K	PS		
L	M		
M	H7	0	9.6.09
N	H15	0	9.6.09
O	H23	0	9.6.09
P	H8	0	9.6.09
Q	H16	0	9.6.09
R	H24	0	9.6.09
S	J23	0	9.6.09
T	J24	0	9.6.09
U	PS		
V	M		
X	M		
Y	T		
Z	T		

## LIITE 7

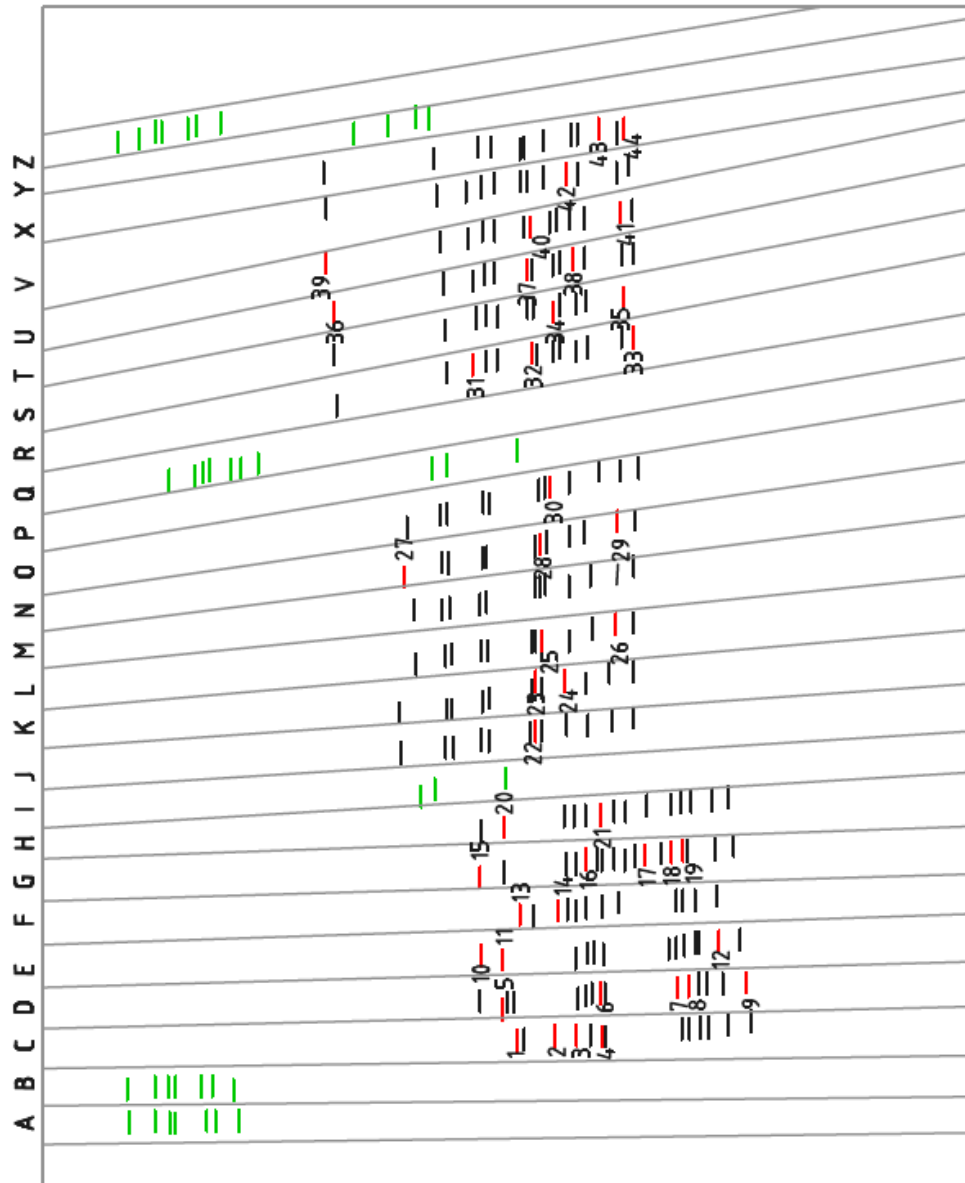
DGGE-AJOJEN DNA-JAKSOJEN VIIVAKAAVIOT JA NÄYTETIEDOT  
 DGGE 2



kairo	DGGE 2 (17.6.2009)		
	näyte	viikko	PCR
A	M		nestedPCR
B	PS		
C	H15	0	9.6.09
D	H23	0	9.6.09
E	H16	0	9.6.09
F	H24	0	9.6.09
G	V7	0	9.6.09
H	V23	0	9.6.09
I	V8	0	9.6.09
J	V24	0	9.6.09
K	M		
L	T		
M	T		
N	T		
O	T		
P	PS		
Q	J15	0	9.6.09
R	J19	0	9.6.09
S	J23	0	9.6.09
T	J16	0	9.6.09
U	J20	0	9.6.09
V	J24	0	9.6.09
X	M		
Y	M		
Z	T		

## LIITE 8

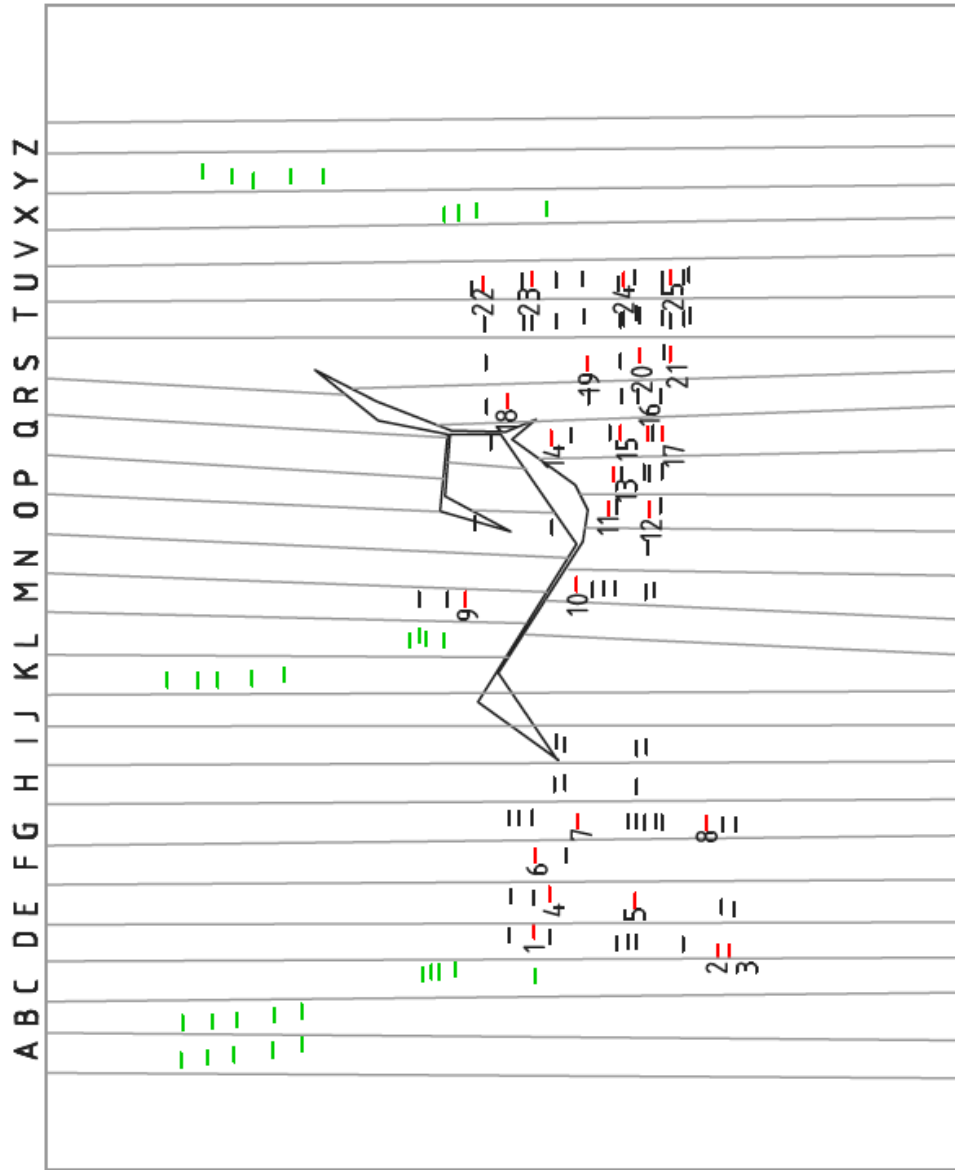
DGGE-AJOJEN DNA-JAKSOJEN VIIVAKAAVIOT JA NÄYTETIEDOT  
 DGGE 3



kaivo	näyte	DGGE 3 (3.8.2009)		
		viikko	PCR	nestedPCR
A	M			
B	M			
C	J24	4	13.7.09	14.7.09
D	J20	4	13.7.09	14.7.09
E	J16	4	13.7.09	14.7.09
F	J23	4	13.7.09	14.7.09
G	J19	4	13.7.09	14.7.09
H	J15	4	13.7.09	14.7.09
I	PS			
J	V24	4	13.7.09	14.7.09
K	V16	4	13.7.09	14.7.09
L	V8	4	13.7.09	14.7.09
M	V23	4	13.7.09	14.7.09
N	V15	4	13.7.09	14.7.09
O	V7	4	13.7.09	14.7.09
P	PS			
Q	M			
R	H24	4	13.7.09	14.7.09
S	H16	4	13.7.09	14.7.09
T	H8	4	13.7.09	14.7.09
U	H23	4	13.7.09	14.7.09
V	H15	4	13.7.09	14.7.09
X	H7	4	13.7.09	14.7.09
Y	PS			
Z	M			

LIITE 9

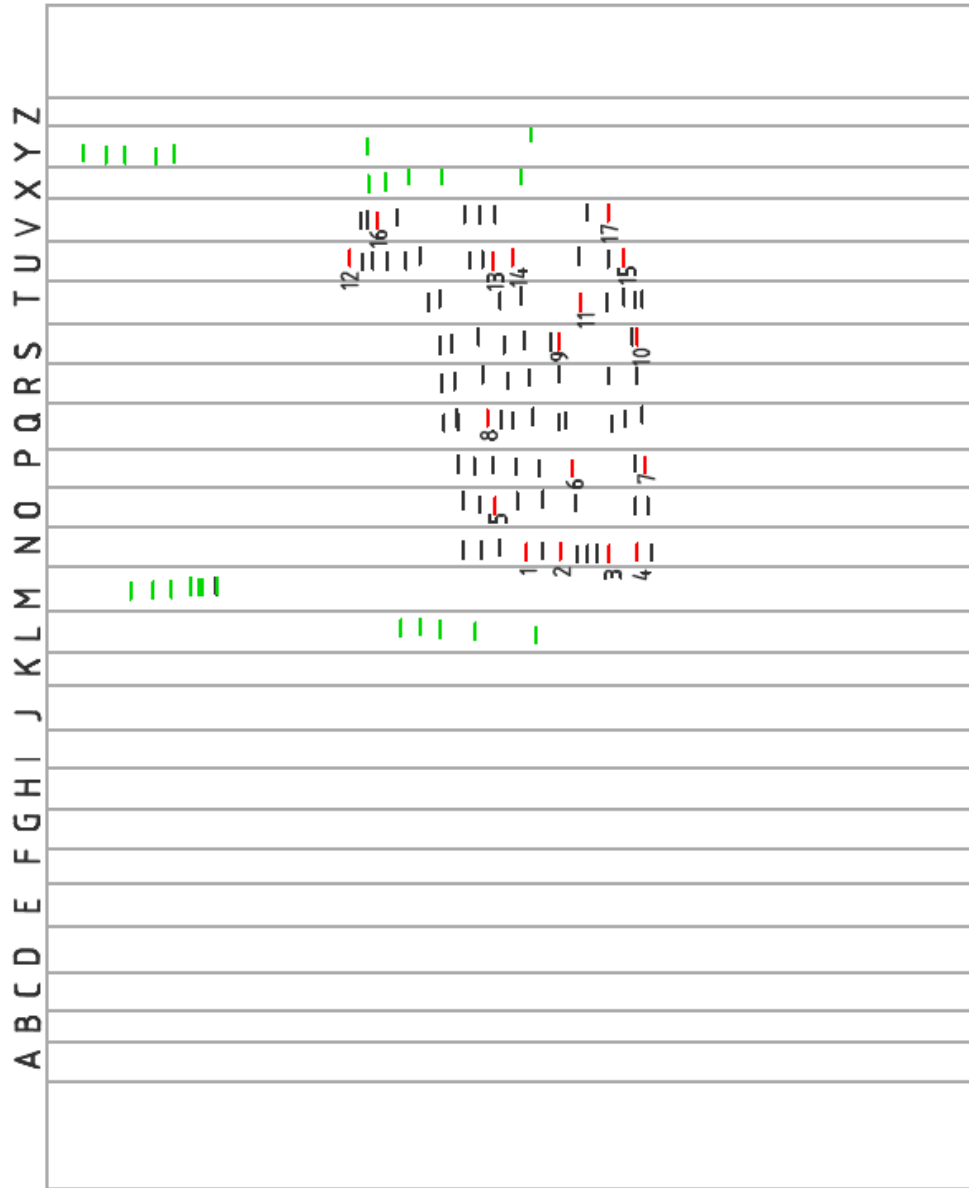
DGGE-AJOJEN DNA-JAKSOJEN VIIVAKAAVIOT JA NÄYTETIEDOT  
 DGGE 4



DGGE 4(4.8.2009)				
kaivo	näyte	viikko	PCR	nestedPCR
A	M			
B	M			
C	PS			
D	J19	4	13.7.09	14.7.09
E	J15	4	13.7.09	14.7.09
F	J19	0	9.6.09	9.6.09
G	J15	0	9.6.09	9.6.09
H	J20	0	9.6.09	9.6.09
I	J16	0	9.6.09	9.6.09
J	T			
K	M			
L	PS			
M	H23	4	13.7.09	14.7.09
N	T			
O	H15	4	13.7.09	14.7.09
P	H23	0	9.6.09	9.6.09
Q	H15	0	9.6.09	9.6.09
R	V23	4	13.7.09	14.7.09
S	V15	4	13.7.09	14.7.09
T	V23	0	9.6.09	9.6.09
U	V15	0	9.6.09	9.6.09
V	T			
X	PS			
Y	M			
Z	T			

LIITE 10

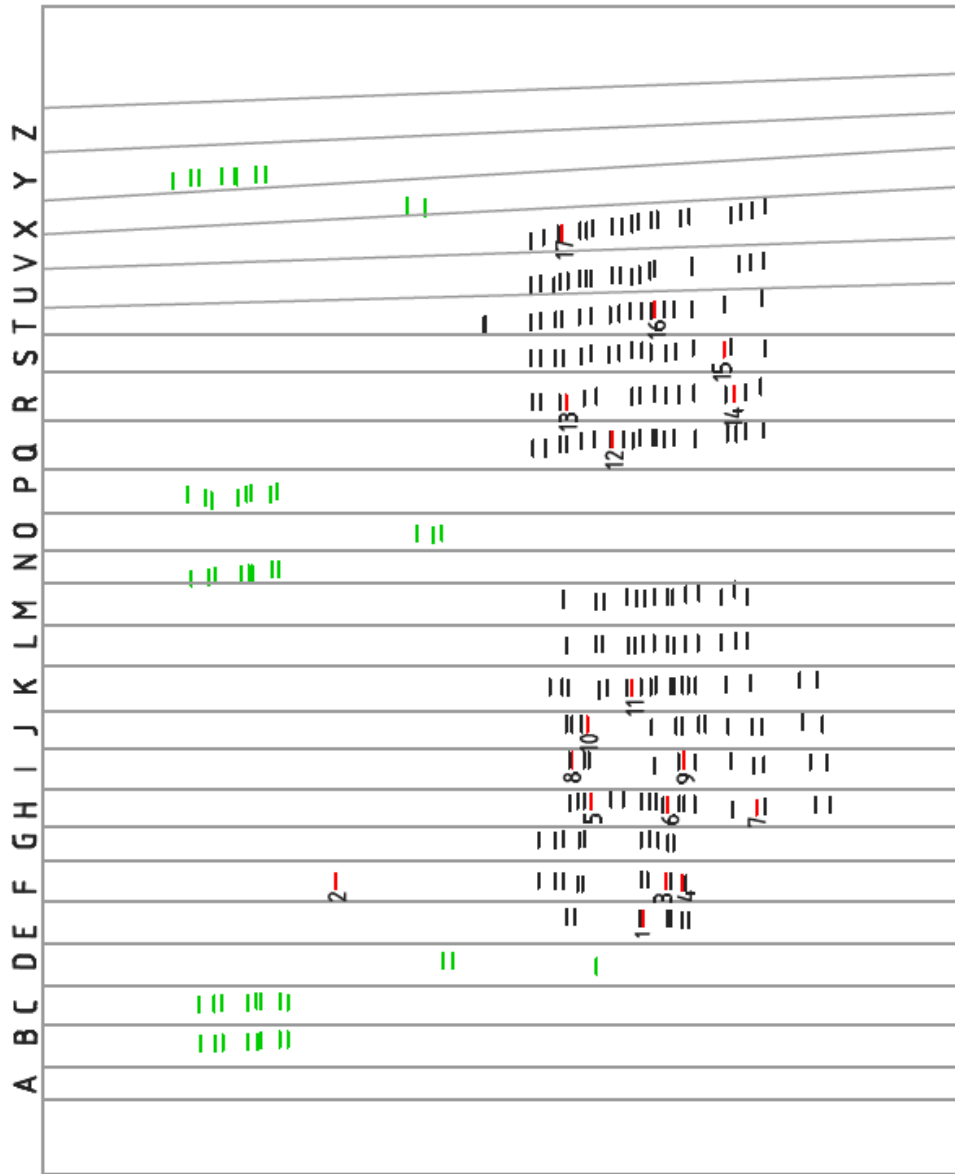
DGGE-AJOJEN DNA-JAKSOJEN VIVAKAAVIOT JA NÄYTETIEDOT  
 DGGE 5



kaivo	näyte	DGGE 5 (6.8.2009)		
		viikko	PCR	nestedPCR
A	T			
B	T			
C	T			
D	T			
E	T			
F	T			
G	T			
H	T			
I	T			
J	T			
K	T			
L	PS			
M	M			
N	H24	12	30.7.09	31.7.09
O	H16	12	30.7.09	31.7.09
P	H8	12	30.7.09	31.7.09
Q	V24	12	30.7.09	31.7.09
R	V16	12	30.7.09	31.7.09
S	V8	12	30.7.09	31.7.09
T	J24	12	30.7.09	31.7.09
U	J20	12	30.7.09	4.8.09
V	J16	12	30.7.09	31.7.09
X	PS			
Y	M			
Z	T			

LIITE 11

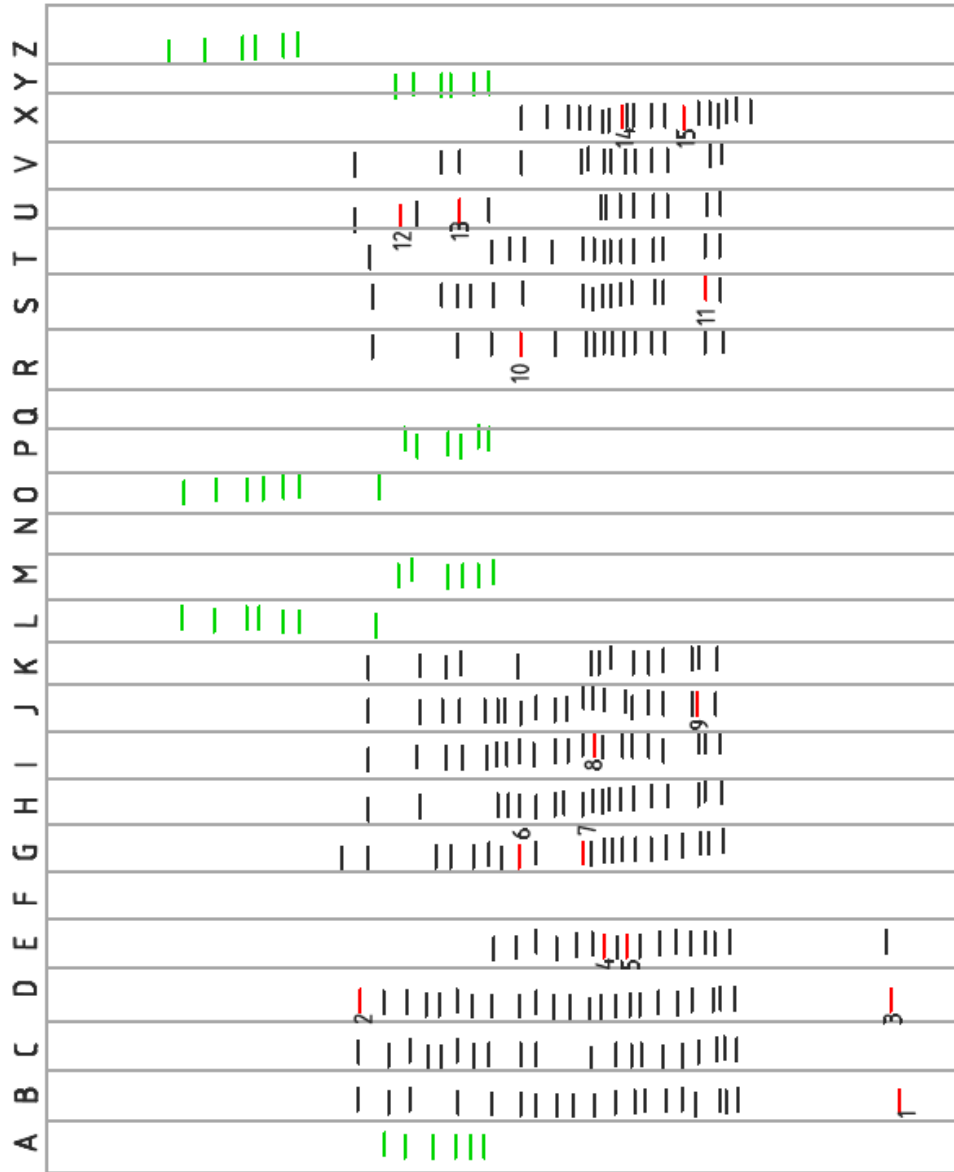
DGGE-AJOJEN DNA-JAKSOJEN VIIVAKAAVIOT JA NÄYTETIEDOT  
DGGE 6



DGGE 6 (24.8.2009)				
kaivo	näyte	viikko	PCR	nestedPCR
A	T			
B	M			
C	M			
D	PS			
E	J24	12	30.7.09	31.7.09
F	J20	12	30.7.09	21.8.09/24.8.09
G	J16	12	30.7.09	31.7.09/21.8.09
H	J24	4	13.7.09	14.7.09
I	J20	4	13.7.09	14.7.09
J	J16	4	13.7.09	14.7.09
K	J24	0	9.6.09	9.6.09
L	J20	0	9.6.09	21.8.09
M	J16	0	9.6.09	21.8.09
N	M			
O	PS			
P	M			
Q	J23	4	13.7.09	14.7.09
R	J19	4	13.7.09	14.7.09
S	J15	4	13.7.09	14.7.09
T	J23	0	9.6.09	9.6.09
U	J19	0	9.6.09	21.8.09
V	J15	0	9.6.09	9.6.09
X	PS			
Y	M			
Z	T			

LIITE 12

DGGE-AJOJEN DNA-JAKSOJEN VIIVAKAAVIOT JA NÄYTETIEDOT  
 DGGE 8



kaivo	näyte	DGGE 8 (26.8.2009)		nestedPCR
		viikko	PCR	
A	FS			
B	V24	12	30.7.09	31.7.09 21.8.09
C	V16	12	30.7.09	31.7.09 21.8.09
D	V8	12	30.7.09	31.7.09 21.8.09
E	V24	4	13.7.09	14.7.09
F	T			
G	V16	4	13.7.09	14.7.09
H	V8	4	13.7.09	14.7.09
I	V24	0	9.6.09	9.6.09
J	V16	0	9.6.09	9.6.09
K	V8	0	9.6.09	9.6.09
L	M			
M	FS			
N	T			
O	M			
P	FS			
Q	T			
R	V23	4	13.7.09 14.7.09	14.7.09
S	V15	4	13.7.09 14.7.09	14.7.09
T	V7	4	13.7.09 14.7.09	14.7.09
U	V23	0	9.6.09	9.6.09
V	V15	0	9.6.09	9.6.09
X	V7	0	9.6.09	9.6.09
Y	FS			
Z	M			

## DNA-SEKVENSSIEN VASTAAVUUDET

## LIITE 13

## DGGE 1

DNA-SEKVENSSIEN VASTAAVUUDET, DGGE 1						
DNA-jakson numero	Koe	Viikko	Accesssion	Kuvaus	Vastaavuus	Rinnastuskoodi
1	V7	0	EU298285.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
2	V7	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
3	V15	0	EU298285.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
4	V15	0	EU298285.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
5	V15	0	FJ569815.1	Uncultured alpha proteobacterium	98 %	ap1
6	V15	0	EF664825.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
7	V15	0	EF664825.1	Uncultured alpha proteobacterium	98 %	ap1
8	V23	0	EU298285.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
9	V8	0	EU298285.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
10	V8	0	EU298285.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
11	V8	0	EU298285.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
12	V16	0	EU298285.1	Uncultured alpha proteobacterium	98 %	ap1
13	V24	0	EF665463.1	Uncultured alpha proteobacterium	100 %	ap1
14	H7	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
15	H7	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
16	H7	0	AY309180.1	Uncultured bacterium	96 %	vb1
17	H15	0	EF664825.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
18	H23	0	AB494445.1	<i>Pseudomonas veronii</i>	100 %	vb1
19	H8	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
20	H8	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
21	H8	0	AY309180.1	Uncultured bacterium	96 %	vb1
22	H16	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
23	H16	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
24	H16	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
25	H24	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
26	H24	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
27	J23	0	EF665463.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
28	J23	0	EF665463.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
29	J24	0	AY785733.1	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	99 %	ps



## LIITE 14

## DNA-SEKVENSSIEN VASTAAVUUDET

## DGGE 2

DNA-SEKVENSSIEN VASTAAVUUDET, DGGE 2						
DNA-jakson numero	Koe	Viikko	Accesssion	Kuvaus	Vastaavuus	Rinnastuskoodi
1	H15	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
2	H15	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
3	H15	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
4	H15	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
5	H23	0	GU227427.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100 %	ps
6	H16	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	92 %	ap2
7	H16	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
8	V7	0	EU298285.1	Uncultured alpha proteobacterium	98 %	ap1
9	V23	0	EU298285.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
10	V24	0	EU298285.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
11	J23	0	EF665463.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
12	J23	0	FJ569815.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
13	J23	0	GQ329606.1	Uncultured <i>Solirubrobacter sp.</i>	99 %	so
14	J23	0	GQ329606.1	Uncultured <i>Solirubrobacter sp.</i>	99 %	so
15	J24	0	FJ889630.1	<i>Pseudomonas sp.</i>	99 %	ps
16	J24	0	EF665463.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1

## LIITE 15

## DNA-SEKVENSSIEN VASTAAVUUDET

## DGGE 3

DNA-SEKVENSSIEN VASTAAVUUDET, DGGE 3						
DNA-jakson numero	Koe	Viikko	Accession	Kuvaus	Vastaavuus	Rinnastuskoodi
1	J24	4	GQ329606.1	Uncultured <i>Solirubrobacter sp.</i>	99 %	so
2	J24	4	GQ329606.1	Uncultured <i>Solirubrobacter sp.</i>	98 %	so
3	J24	4	GQ329606.1	Uncultured <i>Solirubrobacter sp.</i>	99 %	so
4	J24	4	FJ569815.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
5	J20	4	EU647702.1	<i>Pseudomonas mediterranea</i>	99 %	ps
6	J20	4	EF665463.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
7	J20	4	GQ329606.1	Uncultured <i>Solirubrobacter sp.</i>	99 %	so
8	J20	4	GQ329606.1	Uncultured <i>Solirubrobacter sp.</i>	99 %	so
9	J20	4	GQ329606.1	Uncultured <i>Solirubrobacter sp.</i>	99 %	so
10	J16	4	FJ422406.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99 %	ps
11	J16	4	FJ422406.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99 %	ps
12	J16	4	GQ329606.1	Uncultured <i>Solirubrobacter sp.</i>	99 %	so
13	J23	4	EF693732.1	Uncultured bacterium	98 %	vb2
14	J23	4	EF693732.1	Uncultured bacterium	98 %	vb2
15	J19	4	DQ377758.1	<i>Pseudomonas migulae</i>	99 %	ps
16	J19	4	GQ329606.1	Uncultured <i>Solirubrobacter sp.</i>	98 %	so
17	J19	4	GQ329606.1	Uncultured <i>Solirubrobacter sp.</i>	99 %	so
18	J19	4	GQ329606.1	Uncultured <i>Solirubrobacter sp.</i>	99 %	so
19	J19	4	GQ329606.1	Uncultured <i>Solirubrobacter sp.</i>	99 %	so
20	J15	4	AY035996.2	<i>Pseudomonas lini</i>	99 %	ps
21	J15	4	EU298285.1	Uncultured alpha proteobacterium	98 %	ap1
22	V24	4	FJ390904.1	<i>Bradyrhizobium canariense</i>	99 %	br
23	V16	4	GQ863570.1	<i>Bradyrhizobium canariense</i>	97 %	br
24	V16	4	FJ569815.1	Uncultured alpha proteobacterium	98 %	ap1
25	V8	4	FJ475520.1	Uncultured alpha proteobacterium	98 %	ap1
26	V8	4	EF664825.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
27	V15	4	FJ569815.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
28	V15	4	FJ687966.1	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	100 %	br
29	V15	4	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
30	V7	4	FJ569815.1	Uncultured alpha proteobacterium	98 %	ap1
31	H24	4	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	98 %	ap1
32	H24	4	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
33	H24	4	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
34	H16	4	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	100 %	ap1
35	H16	4	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
36	H8	4	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	98 %	ap1
37	H8	4	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
38	H8	4	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
39	H23	4	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	98 %	ap1
40	H23	4	EF664825.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
41	H23	4	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	100 %	ap1
42	H15	4	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
43	H7	4	FJ475520.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
44	H7	4	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1

## LIITE 16

## DNA-SEKVENSSIEN VASTAAVUUDET

## DGGE 4

DNA-SEKVENSSIEN VASTAAVUUDET, DGGE 4						
DNA-jakson numero	Koe	Viikko	Accession	Kuvaus	Vastaavuus	Rinnastuskoodi
1	J19	4	GU198105.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99 %	ps
2	J19	4	GQ329606.1	Uncultured <i>Solirubrobacter</i> sp.	99 %	so
3	J19	4	GQ329606.1	Uncultured <i>Solirubrobacter</i> sp.	99 %	so
4	J15	4	GQ334365.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	96 %	ps
5	J15	4	EF665463.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
6	J19	0	GQ334365.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	98 %	ps
7	J15	0	EF074445.1	Uncultured <i>Fulvimonas</i> sp.	97 %	fu
8	J15	0	EF665399.1	Uncultured <i>Xanthomonadaceae</i> bacterium	99 %	xa
9	H23	4	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
10	H23	4	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
11	H15	4	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
12	H15	4	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	100 %	ap1
13	H23	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
14	H15	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
15	H15	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
16	H15	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
17	H15	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
18	V23	4	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	97 %	ap1
19	V15	4	EU298285.1	Uncultured alpha proteobacterium	98 %	ap1
20	V15	4	EU561082.2	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99 %	br
21	V15	4	EU298285.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
22	V15	0	EU298285.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
23	V15	0	EU298285.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
24	V15	0	EU298285.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
25	V15	0	EU298285.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1

## LIITE 17

## DNA-SEKVENSSIEN VASTAAVUUDET

## DGGE 5

DNA-SEKVENSSIEN VASTAAVUUDET, DGGE 5						
DNA-jakson numero	Koe	Viikko	Accession	Kuvaus	Vastaavuus	Rinnastuskoodi
1	H24	12	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
2	H24	12	EF664825.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
3	H24	12	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
4	H24	12	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	100 %	ap1
5	H16	12	EF665354.1	Uncultured gamma proteobacterium	97 %	gp1
6	H8	12	FJ719319.1	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	98 %	br
7	H8	12	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
8	V24	12	EF664646.1	Uncultured gamma proteobacterium	95 %	gp2
9	V8	12	FJ687966.1	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	99 %	br
10	V8	12	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
11	J24	12	EF693732.1	Uncultured bacterium	98 %	vb2
12	J20	12	FJ889630.1	<i>Pseudomonas sp.</i>	99 %	ps
13	J20	12	FJ889630.1	<i>Pseudomonas sp.</i>	99 %	ps
14	J20	12	FJ664279.1	<i>Pseudomonas sp.</i>	100 %	ps
15	J20	12	EF665463.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
16	J16	12	FJ889630.1	<i>Pseudomonas sp.</i>	100 %	ps
17	J16	12	EU818793.1	<i>Rhodanobacter sp.</i>	99 %	vb2

## LIITE 18

## DNA-SEKVENSSIEN VASTAAVUUDET

## DGGE 6

DNA-SEKVENSSIEN VASTAAVUUDET, DGGE 6						
DNA-jakson numero	Koe	Viikko	Accession	Kuvaus	Vastavuus	Rinnastuskoodi
1	J24	12	EF693732.1	Uncultured bacterium	98 %	vb2
2	J20	12	FJ889630.1	<i>Pseudomonas sp.</i>	99 %	ps
3	J20	12	FJ605268.1	<i>Rhodanobacter sp.</i>	99 %	vb2
4	J20	12	EF665463.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
5	J24	4	GQ329606.1	Uncultured <i>Solirubrobacter sp.</i>	99 %	so
6	J24	4	GQ329606.1	Uncultured <i>Solirubrobacter sp.</i>	99 %	so
7	J24	4	GQ329606.1	Uncultured <i>Solirubrobacter sp.</i>	99 %	so
8	J20	4	GU198105.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99 %	ps
9	J20	4	EF665463.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
10	J16	4	GU198105.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99 %	ps
11	J24	0	AF280945.1	Uncultured bacterium	99 %	vb2
12	J23	4	EF693732.1	Uncultured bacterium	98 %	vb2
13	J19	4	GQ334365.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99 %	ps
14	J19	4	GQ329606.1	Uncultured <i>Solirubrobacter sp.</i>	99 %	so
15	J15	4	GQ329606.1	Uncultured <i>Solirubrobacter sp.</i>	99 %	so
16	J23	0	EF665463.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
17	J15	0	FJ547380.1	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	99 %	ps

## LIITE 19

## DNA-SEKVENSSIEN VASTAAVUUDET

## DGGE 8

DNA-SEKVENSSIEN VASTAAVUUDET, DGGE 8						
DNA-jakson numero	Koe	Viikko	Accesssion	Kuvaus	Vastaavuus	Rinnastuskoodi
1	V24	12	X92699.1	Uncultured <i>Actinomycetales bacterium</i>	97 %	ac
2	V8	12	GQ287433.1	Uncultured <i>Afipia sp.</i>	95 %	ab
3	V8	12	X92699.1	Uncultured <i>Actinomycetales bacterium</i>	97 %	ac
4	V24	4	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
5	V24	4	EU298285.1	Uncultured alpha proteobacterium	91 %	ap3
7	V16	4	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
7	V16	4	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	98 %	ap1
8	V24	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
9	V16	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
10	V23	4	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
11	V15	4	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	100 %	ap1
12	V23	0	AB494445.1	<i>Pseudomonas veronii</i>	100 %	ps
13	V23	0	AB494445.1	<i>Pseudomonas veronii</i>	100 %	ps
14	V7	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1
15	V7	0	EF664862.1	Uncultured alpha proteobacterium	99 %	ap1

## LIITE 20

## DNA-JAKSOJEN DIVERSITEETTILUVUT

Suluissa oleva luku osoittaa, kuinka monen DGGE-ajon perusteella kyseisen ko-  
keen keskimääräinen DNA-jaksojen diversiteetti on laskettu.

Viikko	Maatyyppe	Käsittely	Koe	Koekohtainen keskiarvo	Käsittelykohtainen keskiarvo
VIIKKO 0	humusmaa	kontrolli	H7	14 (1)	13 (7)
			H15	15 (3)	
			H23	11 (3)	
		2,4,6-TCP	H8	11 (1)	18 (5)
			H16	20 (2)	
			H24	21 (2)	
	turvemaa	kontrolli	V7	19 (3)	17 (10)
			V15	16 (3)	
			V23	16 (4)	
		2,4,6-TCP	V8	13 (4)	16 (9)
			V16	18 (2)	
			V24	19 (3)	
kivennäismaa	kontrolli	J15	13 (3)	13 (9)	
		J19	8 (3)		
		J23	17 (3)		
	2,4,6-TCP	J16	8 (3)	10 (9)	
		J20	8 (3)		
		J24	15 (3)		
VIIKKO 4	humusmaa	kontrolli	H7	12 (1)	10 (5)
			H15	9 (2)	
			H23	11 (2)	
		2,4,6-TCP	H8	13 (1)	13 (3)
			H16	12 (1)	
			H24	13 (1)	
	turvemaa	kontrolli	V7	14 (2)	12 (8)
			V15	11 (3)	
			V23	11 (3)	
		2,4,6-TCP	V8	16 (2)	16 (6)
			V16	17 (2)	
			V24	15 (2)	
kivennäismaa	kontrolli	J15	12 (3)	14 (8)	
		J19	14 (3)		
		J23	16 (2)		
	2,4,6-TCP	J16	14 (2)	15 (6)	
		J20	14 (2)		
		J24	16 (2)		
VIIKKO 12	humusmaa	2,4,6-TCP	H8	8 (1)	9 (3)
			H16	8 (1)	
			H24	12 (1)	
	turvemaa	2,4,6-TCP	V8	17 (2)	16 (6)
			V16	14 (2)	
			V24	16 (2)	
	kivennäismaa	2,4,6-TCP	J16	10 (2)	10 (6)
			J20	13 (2)	
			J24	9 (2)	