

Aimo Saano

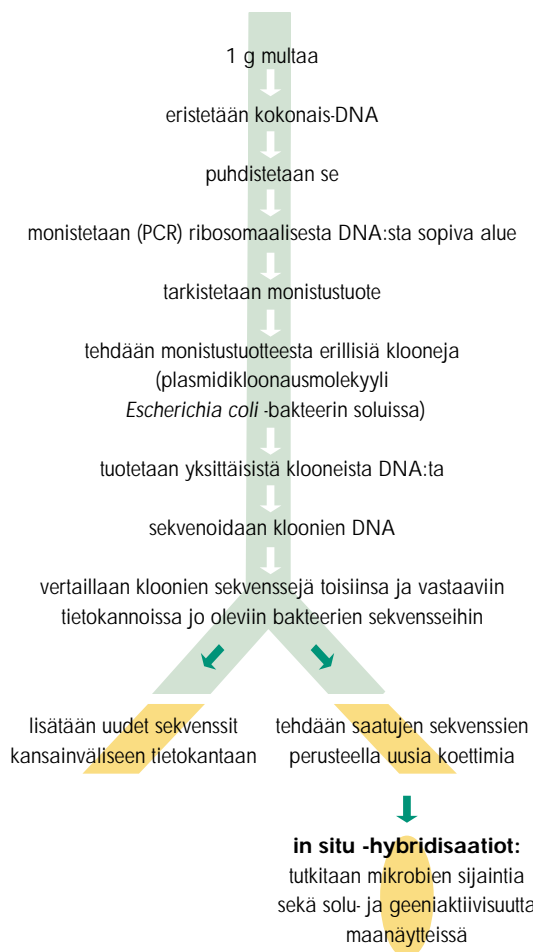
Metsämaamikrobien monimuotoisuuden tutkimus DNA-tekniikalla

DNA-tekniikantarjoamatiedut

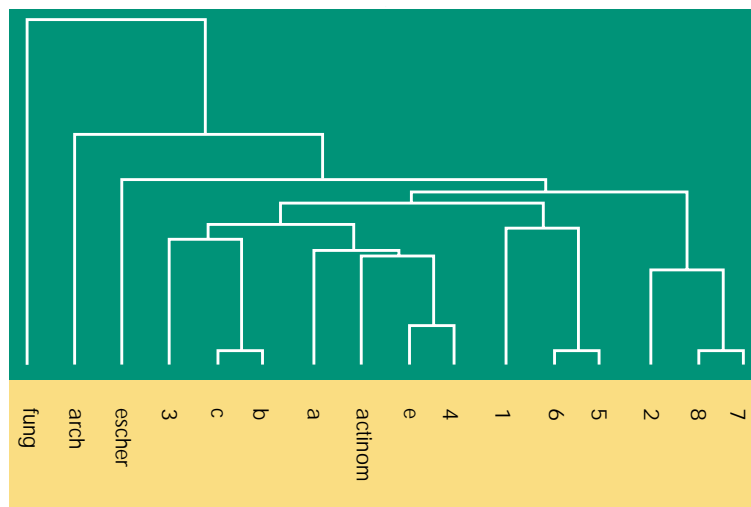
Orgaanisen maan mikrobien perinnöllinen monimuotoisuus on DNA-tekniikalla tehtyjen tutkimusten perusteella todettu paljon laajemmaksi kuin mikrobiologisilla tai muilla menetelmillä pystyttiin aiemmin osoittamaan. Ensimmäisiä, jotka osoittivat monimuotoisuuden uudet kertaluokat, oli norjalainen Vigdis Torsvik, joka eristi maasta kokonais-DNA:ta, denaturoi sen seoksessa yksijuosteiseksi ja mittasi komplementaaristen juosteiden uudelleenyhdistymis- eli reassosiaationopeutta ja vertasi sitä homogeenisempien DNA-liuosten vastaaviin nopeuksiin. Mitä heterogeenisempää DNA-juosteiden joukko on, sitä hitaammin komplementaariset juosteet löytävät toisensa ja sitä hitaammin muuttuu mitattava valon absorbanssi (Torsvik ym. 1990 a ja b). Orgaanisesti rikkaassa maassa on vähintään sata miljoonaa mikrobisolua yhtä multagrammaa kohti (Tsuji ym. 1995). On osoitettu, että niistä vähintään kymmenet tuhannet, mutta arvelujen mukaan jopa kymmenet miljoonat mikrobisolot ovat perimältään erilaisia (International Symposium on Exploration of Microbial Diversity, 12–15.6.1995, Goslar, Saksa).

DNA-tekniikat perustuvat eliöiden perimän tunnistukseen. Mikrobien monimuotoisuuden tutkimisessa ne ovat ylivertaisia siinä mielessä, että yksittäisten mikrobien elävänä tai kuolleena eristämi-

Ph.D. **Aimo Saano** toimii Helsingin yliopiston soveltavan kemian ja mikrobiologian laitoksella.



Kuva 1. Esimerkinomainen DNA-tekniinen metsämaan mikrobiston analyysi.



Kuva 2. Fylogeneettinen dendrogrammi tuntemattomista suomalaisista metsäamikoibeista.

nen ei ole tarpeen, jos ei haluta tutkia mikrobin ulkonäköä. Tunnistamista varten mikrobin geneettinen materiaali, joko DNA tai sen RNA-kopio-molekyylit, saatetaan sellaiseen tilaan, että siinä olevat kullekin suvulle, lajille tai kannalle ominaiset nukleotidijaksot voidaan tunnistaa sopivasti leimatujen DNA- tai RNA-molekyylien avulla.

DNA-tekniikat antavat mahdollisuuden, yhtäältä, kartoittaa metsämaan mikrobiston geneettistä monimuotoisuutta keräämällä tietoa mikrobin geneettisistä ominaisuuksista, jolloin päästään selville ennestään täysin tuntemattomien mikrobin olemassaolosta (DNA:n eristykseen ja spesifisten genomialueiden monistukseen perustuvat menetelmät), ja toisaalta, paikantaa kiinnostavia mikrobeja suoraan metsämaanäytteissä ja mitata niiden aineenvaihdunnallista aktiivisuutta (in situ -hybridisaatiot) (kuva 1).

Edellä kuvattu menetelmäketju on jo melko yleisessä tutkimuskäytössä erilaisten ympäristönäytteiden analyysissä monissa maissa, lukuunottamatta viimeistä vaihetta, in situ -hybridisaatiota. Sitä on käytetty toistaiseksi pääasiassa vesistöjen sedimenttitutkimuksissa, heterogeenisempi ja karkeampi metsämaa on vaikeampi materiaali tekniikan soveltamiseen. Kehittelytyötä tehdään kuitenkin jatkuvasti.

Esimerkkinä tuntemattomista suomalaisista met-

säamikoibeista, joiden ribosomaalisia DNA-fragmenteja (siis rDNA:ta, joka on perimän osa ja vastaa ribosomaalisen RNA:n koodauksesta) olemme monistaneet suoraan maasta eristetystä DNA:sta, on kuvan 2 fylogeneettinen dendrogrammi. Siinä mukana olevien 12 mikrobikloonin rDNA:n vastaavia alueita on verrattu toisiinsa sekä neljään tietokannasta mukaan otettuun esimerkkisekvenssiin. Vertailu on tehty Wisconsin Sequence Analysis Package, Genetics Computer Group (USA) -ohjelmistopakettin avulla käyttäen laskutoimituksiin Tieteellisen Laskennan Keskuksen (Espoo) Cypress-tietokonetta.

Dendrogrammista voi nähdä mm. sen, että kaikki 12 maassa olevaa tuntematonta bakteerikantaa (1–8, a, b, c, e) ovat läheisempää sukua toisilleen, kuin *Archaea*- (arch), sieni- (fung) tai *Escherichia coli* (escher) -referenssikannoille. Sen sijaan sädesieni-referenssikansio (actinom) näyttää olevan lähempänä maabakteeriklooneja 4, e ja a, kuin muut maabakteerikloonit. Lisäksi voidaan nähdä, että kloonit 7 ja 8 keskenään, 5 ja 6 keskenään, sekä b ja c keskenään ovat käytännöllisesti katsoen samanlaisia. Kaikki 12 maabakteerisekvenssiä ovat uusia, Euroopan molekyylibiologisen laboratorion EMBL:n ja USA:n GenBankin sekä japanilaisen DDBJ:n tietokannoille ennestään tuntemattomia.

Vertailut antoivat lähimmiksi 'sukulaisiksi' mm. seuraavia bakteereita: *Heliobacterium chlorum*, *Rhodospirillum salinarium*, *Oligotrophic bacterium* ja joukon tarkemmin määrittelemättömiä Actinomycetes-kantoja. Halutessamme voimme nyt hakea tietokonelaskentojen avulla omille maabakteerikannoillemme spesifisiä sekvenssejä sekvenoituista fragmenteista, valmistaa synteettisesti niitä vastaavia koettimia, leimata niitä, ja käyttää in situ -hybridisaatioissa paikantaaksemme 'tuntemattomat' bakteerimme alkuperäisissä metsämaanäytteisissä.

Näkymät

DNA-tekniikat (mukaanlukien RNA-kopioiden käyttö) tarjoavat uusia näkymiä mikrobiyhdykskuntiin metsämaassa, mutta myös muissa ympäristöissä. Niiden avulla voidaan löytää vastauksia mm. seuraaviin kysymyksiin:

1. Mitkä taksonomiset ja/tai aineenvaihdunnallisesti erikoistuneet mikrobiryhmät ovat vallitsevia? (Esim. metsässä: aarnio>>talous; metsä>>avohakattu alue;

laiduntamaton>>laidunnettu; ”puhdas”>>kuormitetu)

2. Esiintyyko joissain elinympäristöissä tiettyjä geenejä ja kuinka laajassa suku/laji-spektrissä, kuinka aktiivisia ne ovat? (Raskasmetalliresistenssit, sulfaatin pelkistys, ammoniumin hapetus, aromaattisten hiilivetyjen hajotus)
3. Onko joissain elinympäristöissä pitkälle erikoistuneita (ehkä vähälukuisia) mikrobeja? (*Archaea*)
4. Mitkä ovat joka paikan mikrobilajit?

Kirjallisuus

- Torsvik, V., Salte, K., Sorheim, R. & Goksoyr J. 1990. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 776–781.
- Torsvik, V., Goksoyr, J. & Daae, F.L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 782–787.
- Tsuji, T., Kawasaki, Y., Takeshima, S., Sekiya, T. & Tanaka, S. 1995. A new fluorescence staining assay for visualizing living microorganisms in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3415–3421.