

Lapin kaivoskeskittymän virtavesibakteerien DNA-analyysit

Tiina Laamanen¹ ja Kaisa Lehosmaa²

¹Suomen ympäristökeskus

²Oulun yliopisto



Sisällys

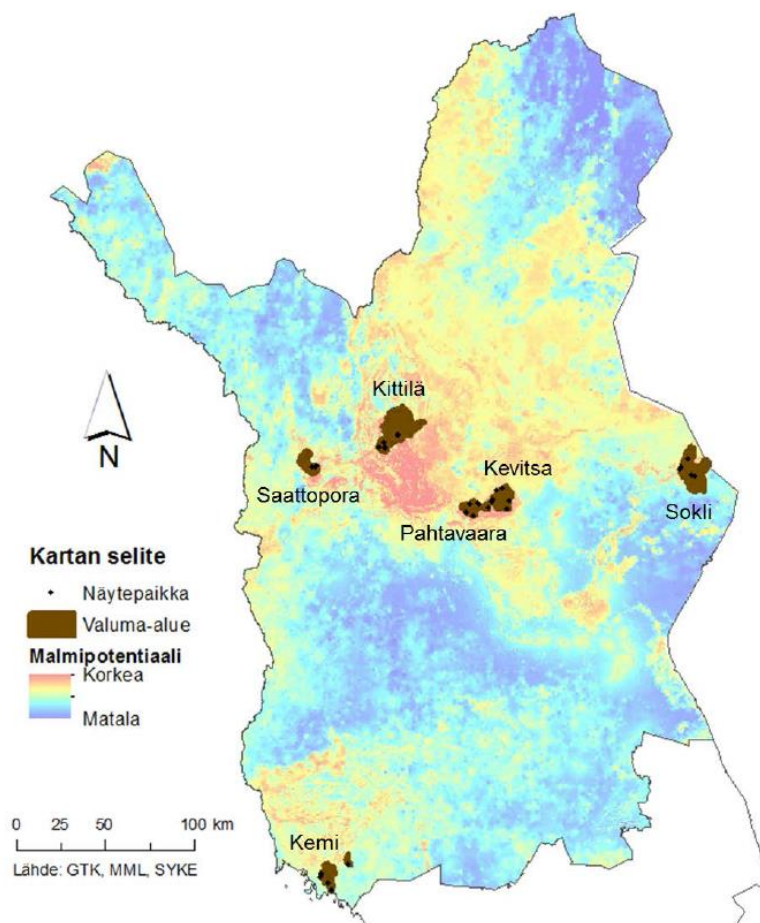
Johdanto	3
Tutkimuspaikat	3
Näytteenotto.....	4
Laboratoriomenetelmät.....	5
Bioinformatiikan menetelmät	5
Tulokset	6
Johtopäätökset.....	7
Lähteet	8

Johdanto

Biomonitorointi, eli eliöiden käyttö ympäristömuutosten seurantaan ja mittaamiseen, pyrkii tunnistamaan, seuraamaan ja arvioimaan ekosysteemien toimintaa uhkaavia ympäristön stressitekijöitä (Friberg ym. 2011; Bonada ym. 2006; Gerhardt 2000). Tulevaisuudessa yksi mahdollinen biomonitoroinnin työkalu ja ekologisen tilan mittari yhdessä muiden biologisten (esim. piilevät, pohjaeläimet, vesikasvit ja kalat) ja fysikaalis-kemiallisten mittarien kanssa voivat olla mikrobit (Friberg ym. 2011). Mikrobien DNA:n ja ribosomaalisen RNA:n sekvensointimenetelmät ja geenitietokannat ovat voimakkaasti kehittyneet viime vuosina ja sekvensointipohjaisia menetelmiä hyödynnetään kasvavissa määrin erilaisissa ympäristöseurannoissa. Mikrobiyhteisöjen koostumus indikoi ympäristön tilaa pidemmällä aikavälillä ja on siten vakaampi tilan indikaattori verrattuna yksittäisiin ympäristön fysikaalisen ja kemiallisen tilan mittauksiin. Viimeaikaiset tutkimukset ovat lisäksi osoittaneet, että mikro-organismeihin perustuvat ympäristön tilan mittarit ovat herkempiä verrattuina tavanomaisesti seurattaviin eliöryhmiin. (ks. esim. Schlötterer ym. 2014).

Tutkimuspaikat

Bakteerinäytteet otettiin Lapin kaivoskeskittymän tutkimusalueiden joista ja puroista (kuva 1). Näytepaikoista puolet sijaitsee Kemin, Kevitsan, Kittilän, Pahtavaaran, Saattoporan ja Soklin kaivosalueiden alapuolisissa virtavesissä (AP) ja puolet kunkin kaivosalueen lähetyvillä vertailualueilla (REF), kaivosvaikutuksen ulottumattomissa. Näytepaikat kuvastavat osin koko yläpuolisten valuma-alueiden tilannetta, sillä valuma-alueilta tulevat vedet virtaavat näytepaikkojen läpi alemmaksi vesistöissä. Tutkimuksessa oli mukana yhteensä 18 kaivosvaikutteista näytepaikkaa (AP) ja 18 vertailualueetta (REF). Maastotyöt toteutettiin elo-syyskuussa 2017.



Kuva 1. Lapin kaivoskeskittymän tutkimusalueet. Näytepaikoista puolet sijaitsee Kemin, Kevitsan, Kittilän, Pahtavaaran, Saattoporan ja Soklin kaivosalueiden alapuolisissa virtavesissä (AP) ja puolet kunkin kaivosalueen lähetyvillä vertailualueilla (REF), kaivosvaikutuksen ulottumattomissa. Näytepaikat kuvastavat osin koko yläpuolisten valuma-alueiden tilannetta, sillä valuma-alueilta tulevat vedet virtaavat näytepaikkojen läpi alemmaksi vesistöissä. Taustalla näkyy GTK:n määrittämä malmipotentiali koko Lapin alueelle.

Näytteenotto

Bakteerinäytteet otettiin jokaiselta tutkimuspaikalta 10 noin nyrkin kokoisen kiven yläpinnalta. Kivien keräyssyvyys oli noin 40 cm, ja ne kerättiin mahdollisimman keskeltä uoma mahdollisen varjostusvaikutuksen välttämiseksi. Jokaiseen näytteenottoon otettiin uudet, valmiiksi pakatut steriilit näytteenottovälineet, jotka sisälsivät pienen minigrip-pussin sisään pakatut kertakäyttökäsineet, keltakorkkisen näytteenottoastian (valmistaja: Mekalasi) ja steriilin, noin 4 cm x 4 cm x 4 cm kokoisen keittiösienen palan. Lisäksi käytettiin puhdasta pakastusrasiaa näytteenottoa varten.

Keltakorkkista astiaa avuksi käyttäen kerättiin aluksi kertakäyttöhansikkaat kädessä noin 1,5 x keltakorkkisen näyteastian tilavuuden verran paikan vettä pakasterasiaan. Seuraavaksi sientä kostutettiin ensin pakasterasiassa ja kiven pinnalta siirrettiin biofilmimateriaali pakasterasiaan niin, että kostea sientä hierottiin noin 6 cm x 6 cm kokoisella kiven yläpinnan alueella ja irronnut biofilmimateriaali puristettiin pakasterasiassa olevaan näytteenottopaikan veteen (Vilmi ym. 2016). Kiven pinnan sienellä harjaamista toistettiin niin kauan kunnes silmämääräisesti nähtiin kiven pinnalla olleen materiaalin siirtyneen näyteastiaan. Yllä kuvattu toistettiin kaikkien kymmenen kerätyn kiven kohdalla ja puristettiin kaikki biofilmimateriaali samaan näyteastiaan (puhdas pakastusrasia) kymmenen kiven

kokoomanäytteeksi. Lopuksi kaadettiin biofilmmateriaalin sisältävä näyte keltakorkkiseen näyteastiaan ja merkittiin siihen vedenkestävällä tussilla näytteenottoaika, paikka ja näytteenottajan nimikirjaimet. Näytteet pakastettiin välittömästi näytteenoton jälkeen autossa toimivaan kannettavaan Waeco Cool Freeze CFX35 -pakastimeen (valmistaja: Dometic WAECO).

Laboratoriomenetelmät

Laboratoriossa näytteet siirrettiin välittömästi näytteenottajien maastosta palattua kannettavasta pakastimesta laboratorion pakastimeen odottamaan jatkokäsittelyä. Näytteitä pakastekylmäkuivattiin ALPHA 1-4 LD plus-pakastekylmäkuivurilla (valmistaja: Martin Christ) vuorokauden ajan ja pakastekylmäkuivatusta näytemateriaalista eristettiin QIAGEN DNase -kitillä (valmistaja: QIAGEN) DNA. Eristyksen onnistuminen tarkistettiin määrittämällä DNA:n saanto SimpliNano-spektrofotometrillä (valmistaja: Biochrom Ltd.).

Näytteiden DNA monistettiin käyttäen universaaleja bakteerialukkeita 519F (5-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3) ja 926R (5-CCGTC AATTCCTTTRAGTTT-3) (Lane 1985; Lane 1991). Jokaiselle näytteelle käytettiin erilaista yksilöllisen ”viivakoodin” sisältävää 519F-aluketta (nk. a-aluke), jotta sekvensointia varten yhdistetyt näytteet voitiin aineiston jatkoanalyyseissa erottaa toisistaan. 519F alukkeet sisälsivät Ion Torrent pyrosekvensointi-adapterisekvenssin A (Lifescience Technologies, USA), yhdeksän emäsparin mittaisen yksilöllisen ”viivakoodisekvenssin” ja yhden nukleotidilinkkerin. 926R aluke (nk. b-aluke) puolestaan sisälsi Ion Torrentin adapterisekvenssin trP1 (Tejesvi ym. 2016). Testasimme alukkeet etukäteen SILVA-tietokannassa (Quast ym. 2013) ja saimme tulokseksi noin 94 % kattavuuden kaikille bakteeritaksoneille. Tarkempi kuvaus on luettavissa julkaisusta Heino ym. (2015).

Näytteet monistettiin Veriti Thermal Cycler -PCR-laitteella (Life technologies). Käytetyn PCR-ohjelman tarkempi kuvaus on luettavissa julkaisusta Laamanen (2019).

Näytteet puhdistettiin, yhdistettiin sekvensointia varten ja sekvensoitiin Oulun yliopiston molekyylibiologian (BioSer) -laboratoriossa Ion Torrent Semiconductor -sekvenssaattoria käyttäen. Aineisto sekvensoitiin Ion 316™ Chip -sirua käyttäen. Siru sisältää 6 miljoonaa kaivoa ja sen ulosanto on 100 Mb.

Ion Torrent sekvenssaattorin toiminta perustuu DNA:n polymerisaation yhteydessä vapautuvien vetyionien havaitsemiseen. Sekvensointiprosessi aloitetaan emulsio-PCR:lla, jossa DNA-kirjaston fragmentit kiinnittyvät pienien mikrohelmien pinnalle. Tämän jälkeen mikrohelmet pipetoidaan sekvensointisirulle, jossa sijaitsee miljoonia mikrokaivoja. Mikrokaivoihin puolestaan lisätään sekvensoinnin aikana vuorotellen neljää DNA -nukleotidia. Sopivien komplementaaristen emästen löytyminen aiheuttaa vetyionin vapautuessa pienen pH -muutoksen, jonka sekvenssaattori havaitsee. Jos DNA-juosteessa on peräkkäin kaksi identtistä emästä, on jännite kaksinkertainen ja sekvenssaattori tunnistaa ne kahdeksi peräkkäiseksi samaksi emäkseksi. Ion Torrentin teknologia siirtää kemiallisen informaation (A,C,G,T) suoraan digitaaliseen (0,1) muotoon. Yllä kuvattu reaktio tapahtuu yhtä aikaa miljoonissa mikrokokoisissa kaivoissa. Tästä johtuen Ion Torrent Semiconductor -sekvensointi on huomattavasti perinteisiä sekvensointimenetelmiä nopeampi ja sekvensointi kestää vain muutaman tunnin (Glenn 2011; Rothberg ym. 2011).

Bioinformatiikan menetelmät

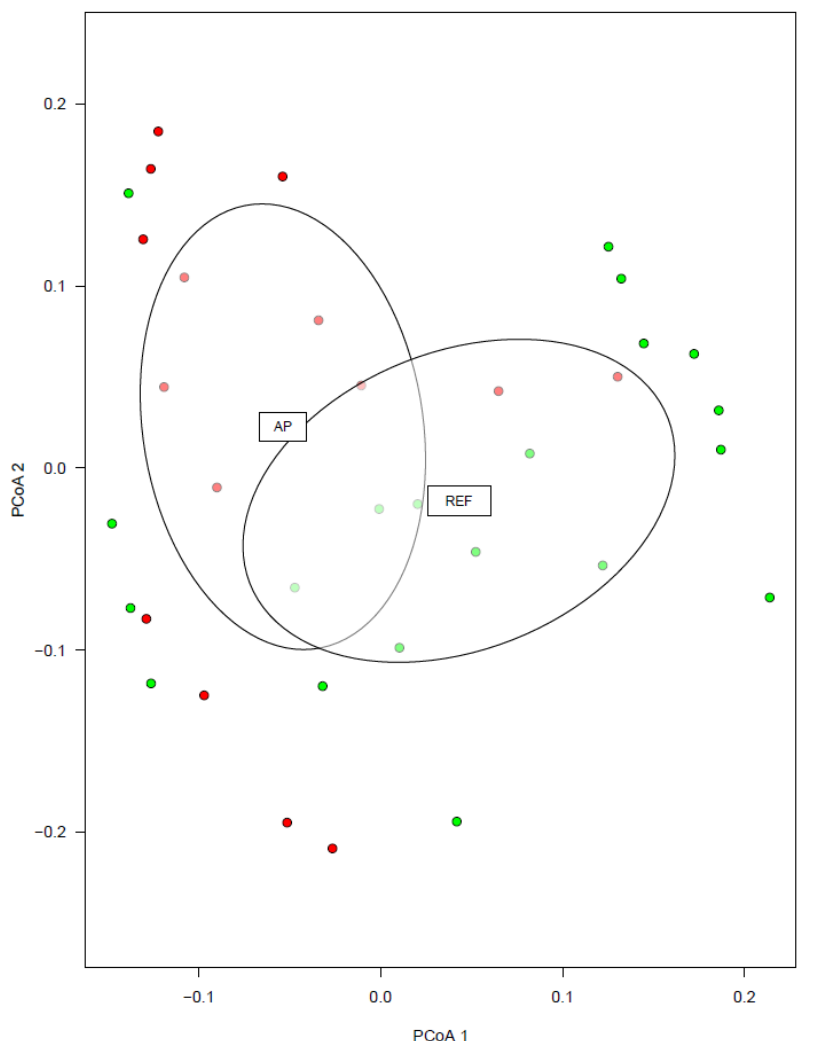
Sekvensointiaineistossa raakasekvenssien määrä oli 605 521. Sekvenssiaineisto analysoitiin QIIME2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) -ohjelman (Bolyen ym. 2018) versiolla 2019.4 käyttäen SILVA_132_QIIME_release tietokantaa 16S rRNA taksonomian määrittämiseen. Sekvenssien trimmauksen jälkeen näytekohdaisen sekvenssimäärän maksimi oli 49257, mediaani 9407 ja minimi 3372.

Näytteitä ei trimmattu tiettyyn pituuteen (esim. 200 bp) sillä silloin voidaan menettää uuden Qiime 2 -

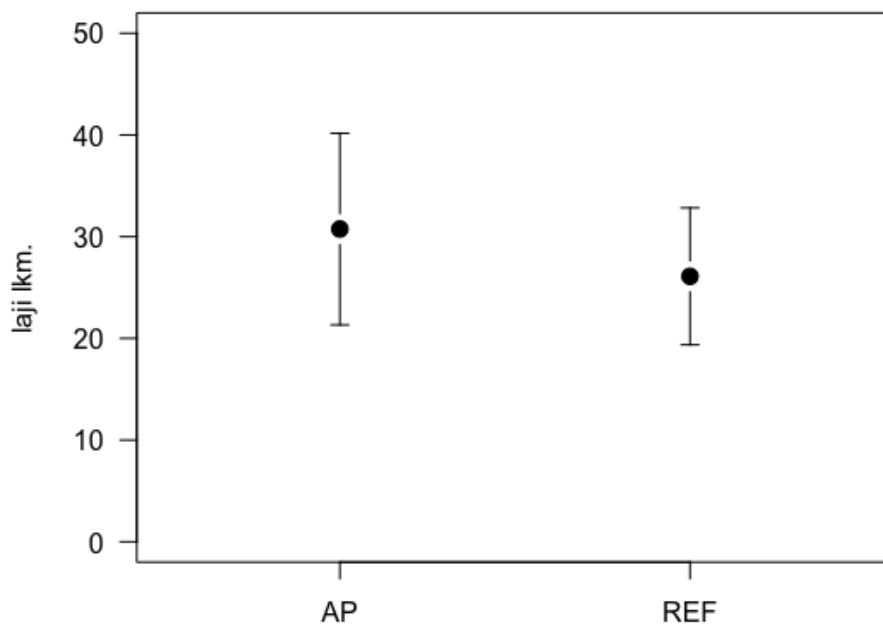
ohjelman dada2:n error rate- vaiheessa informaatiota (ohjelma itsessään trimmaa pois biologisesti ei merkitsevät sekvenssit). Raakasekvenssidataa analysoitiin Qiime 2:ssa käyttäen DADA2 (Callahan et al. 2016) ja bakteeritaksonit määritettiin asv (amplicon sequence variants) menetelmällä sekä datalle opti- moidulla luokittelulla.

Tulokset

Tuloksista havaitaan lajikoostumuksessa selkeä ja tilastollisesti merkitsevä ero REF ja AP ryhmien vä- lillä, PERMANOVA $P=0.009$ (kuva 2). Kuvan 2 PCoA-kuvaajassa on otettu huomioon lajien suhteelli- nen runsaus. Lajimäärä (kuva 3) AP vs. REF ei ollut tilastollisesti merkitsevä $P=0.383$. Beta- diversiteetissä (kohteiden välinen lajistollisen monimuotoisuuden vaihtelevuus) ei myöskään ollut tilas- tollista merkitsevyyttä $P=0.39$. Aineistolle tehtiin myös mikrobiökologian indikaattorilajianalyysi ANCOM, joka ottaa huomioon bakteerien suhteellisen runsauden. ANCOM-analyysi ei löytänyt merkit- seviä indikaattoreita AP vs. REF- luokittelulla.



Kuva 2. PCoA-kuvaaja vertailupaikoista (REF) ja kaivosten alapuolisista (AP) tutkimuspaikoista havaituista biofilmi- bakteereista. Kuvasta havaitaan, että jotkut vertailupaikat ovat hyvin samankaltaisia kuin kaivosten alapuoliset paikat ja päinvastoin. Tästä luultavasti johtuu se, ettei beta-diversiteetissä näy vasteita. Toisaalta tulokset viittaavat siihen, että lajikoostumuksessa tapahtuu vaihduntaa eli kaivosten valumavesien myötä tulee uusia lajeja, joilla saattaa olla merkittävä vaikutus bakteerien metaboliaan, tämä vaatii jatkotutkimuksia.



Kuva 3. Lajimäärä vertailupaikoilla (REF) ja kaivosten alapuolisilla (AP) tutkimuspaikoilla. Lajimäärä AP vs. REF ei ole tilastollisesti merkitsevä $P=0.383$

Johtopäätökset

Tuloksista havaitaan lajimäärän aineistossa jääneen alhaiseksi ollen keskiarvoltaan 27 lajia/per paikka. Tämä voi osittain johtua esimerkiksi käytetystä PCR-menetelmästä. PCR-menetelmän näytekohtaista optimointia on jatkotutkimuksissa syytä edelleen kehittää. Osittain alhainen lajimäärä voi selittyä myös aineiston käsittelyssä bioinformatiikan menetelmillä käytetystä dada2-vaiheesta. Qiime2 -ohjelma on vasta hiljattain korvannut Qiime 1-ohjelman käyttämän perinteisemmän klusterointimenetelmän. Dada2, kuten muutkin denoising-menetelmät, poistaa sekvenssijosta hälyä. Erityisesti algoritmi on kehitelty tunnistamaan biologisesti merkittävät sekvenssit ja näin ollen dada2 on herkempi menetelmä verrattuna perinteisempiin klusterointi-menetelmiin. Dada2 poistaa sekvenssidatasta esimerkiksi alukkeet, sekvenssiadapterit ja barkoodit.

Lajimäärän ero vertailupaikkojen ja kaivosten alapuolisten tutkimuspaikkojen välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevä, mutta lajimäärässä havaittiin kuitenkin selkeä nouseva trendi kaivosten alapuolisilla tutkimuspaikoilla. Tulos viittaa siihen että kaivosvesien laskiessa vesistöön tulee valumavesien mukana vierasta lajistoa, sillä lajikoostumus muuttuu ja lajimäärä näyttää hieman kasvavan kaivoksen jälkeen. Metalleihin assosioituneet mikrobit ovat spesialisteja, joten tulosta voidaan pitää odotettuna.

LÄHTEET

- Bolyen, Evan, Jai Ram Rideout, Matthew R. Dillon, Nicholas A. Bokulich, Christian Abnet, Gabriel A. Al-Ghalith, Harriet Alexander et al. QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. No. e27295v1. PeerJ Preprints, 2018
- Bonada, N., Prat, N., Resh, V. H., & Statzner, B. (2006). Developments in aquatic insect biomonitoring: a comparative analysis of recent approaches. *Annu. Rev. Entomol.*, 51, 495-523.
- Friberg, N., Bonada, N., Bradley, D. C., Dunbar, M. J., Edwards, F. K., Grey, J., Hayes, R.B, Hildrew, A.G., Lamouroux, N., Trimmer, M., Woodward, G. U. Y. (2011). Biomonitoring of human impacts in freshwater ecosystems: the good, the bad and the ugly. *Advances in Ecological Research*, 44, 1-68.
- Gerhardt, A. (2000). Biomonitoring of polluted water. Trans Tech Publications Ltd.
- Glenn, T. C. (2011). Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular ecology resources*, 11(5), 759-769
- Heino, J., Nokela, T., Soininen, J., Tolkkinen, M., Virtanen, L., & Virtanen, R. (2015). Elements of metacommunity structure and community-environment relationships in stream organisms. *Freshwater Biology*, 60(5), 973-988.
- Laamanen, T., 2019. Mikrobit virtavesien ympäristön tilan kuvaamisessa: Harvinaisten lajien poiston vaikutus yhteisö-ympäristösuhteisiin. Pro gradu-tutkielma. Helsingin yliopisto.
https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/302589/Laamanen_Tiina_Pro_gradu_2019.pdf?sequence=2
- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115–175. Teoksessa E. Stackebrandt ja M. Goodfellow (toim.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(20), 6955-6959.
- Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J. H., Johnson, K., Milgrew, M. J., Edwards, M., Hoon, J., Simons, J. F., Marran, D., Myers, J. W., Davidson, J. F., Branting, A., Nobile, J. R., Puc, B. P., Light, D., Clark, T. A., Huber, M., Branciforte, J. T., Stoner, I. B., Cawley, S. E., Lyons, M., Fu, Y., Homer, N., Sedova, M., Miao, X., Reed, B., Sabina, J., Feierstein, E., Schorn, M., Alanjary, M., Dimalanta, E., Dressman, D., Kasinskas, R., Sokolsky, T., Fidanza, J. A., Namsaraev, E., McKernan, K. J., Williams, A., Roth, G. T., & Bustillo J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 475(7356), 348.
- Schlötterer, C., Tobler, R., Kofler, R., & Nolte V. (2014) Sequencing pools of individuals -mining genome-wide polymorphism data without big funding. *Nature Reviews Genetics* 15, 749–763.
- Tejesvi, M. V., Uhari, M., Tapiainen, T., Pirttilä, A. M., Suokas, M., Lantto, U., Koivunen, P., & Renko, M. (2016). Tonsillar microbiota in children with PFAPA (periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenitis) syndrome. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(6), 963-970.
- Vilmi, A., Karjalainen, S.M, Nokela, T., Tolonen, K., & Heino J. 2016. Unravelling the drivers of aquatic communities using disparate organismal groups and different taxonomic levels. *Ecological Indicators* 2016; 60: 108-118