

# **Itämeren sedimentin ja rauta- mangaanisaostumien bakteerien kyky hajottaa raakaöljyä ja naftaleenia**

*Mikrokosmoskokeet 23.7.-18.12.2012*

Anna Reunamo, Pirjo Yli-Hemminki, Jari Nuutinen,  
Jouni Lehtoranta, Kirsten Jørgensen

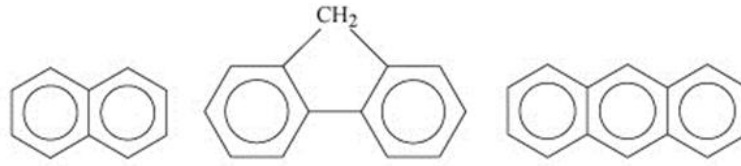
Suomen ympäristökeskus

MUTKU-päivät

20.-21.3.2013 Tampere

## PAH-yhdisteet (polysykliset aromaattiset hiilivedyt)

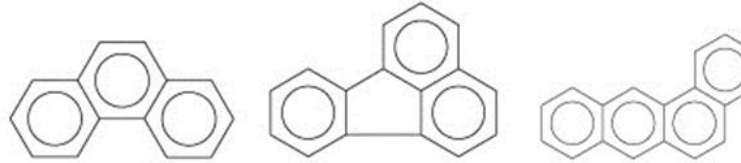
- PAH-yhdisteet ovat raakaöljyn myrkyllisimpiä komponentteja ja niitä syntyy myös epätäydellisen palamisen seurauksena
- PAH-yhdisteitä esiintyy laajalti ympäristössä, mm. tervassa, kivihiiliperäisissä öljyissä, diesel- ja moottoriöljyissä, noessa, asfaltissa, bitumissa jne.
- Monet mikrobit pystyvät käyttämään öljyhiilivetyjä hiilen- ja energianlähteenään, myös PAH-yhdisteitä.
- Bakteerien PAH-yhdisteiden hajotus alkaa solunsisäisten entsyymien avulla -> PAH otettava soluun ennen hajotusprosessia
- PAH-yhdisteiden tiedetään hajoavan biologisesti niin hapellisissa kuin hapetomissakin olosuhteissa



naftaleeni

fluoreeni

antraseeni



fenantreeni

fluoranteeni

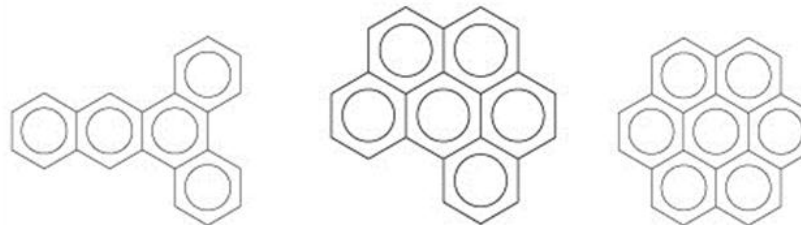
bentso(a)antraseeni



pyreeni

bentso(a)pyreeni

bentso(b)fluoranteeni



dibentso(a,c)antraseeni

bentso(g,h,i)peryleeni

koroneeni

# PAH-yhdisteiden hajotuspotentiaalin seuraaminen

- AEROBINEN HAJOAMINEN
  - **PAH-RHD $\alpha$** -geeni koodaa PAH-rengasta hydrolysoivien dioksigenaasientsyymien  $\alpha$ -alayksikköä; gram-positiivisille ja -negatiivisille bakteereille on kehitetty omat alukkeet (Cebren et al. 2008)
  - Alukkeiden avulla pystytään määrittämään useita tietokannoissa olevia PAH-hajotukseen liittyviä geenejä
- ANAEROBINEN HAJOAMINEN
  - **bssA**-geeni koodaa bentsyyilisukkinaattisyntaasin  $\alpha$ -alayksikköä, joka toimii anaerobisessa tolueenin ja ksyleenin hajotuksessa
  - Ensimmäinen anaerobista hajotusta määrittävä molekyylibiologinen menetelmä (Beller ym. 2002)

## Itämeren rauta-mangaanisaostumat

- Rauta-mangaanisaostumia eli konkreetioita löytyy useilta valtamerien alueilta
- Peittävät myös Itämeren merenpohjaa laajoilla alueilla
- Huokoisia, usein sisältä onttoja, muodostuvat rauta- ja mangaanikerroksista.
- Konkreetioiden mikrobeilla voi olla potentiaalia haitallisten aineiden hajotukseen



Kuva: Pirjo Yli-Hemminki, SYKE

# Mikrokosmoskokeet

Kokeessa käytettiin itäiseltä Suomenlahdelta kerättyä sedimenttiä ja rauta-mangaanisaostumia.

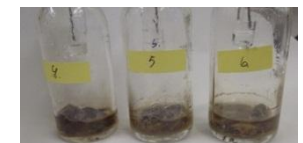
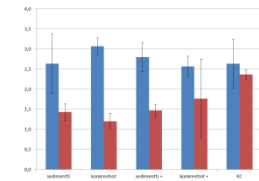
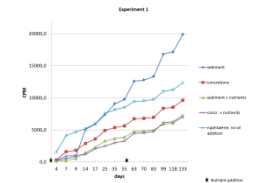
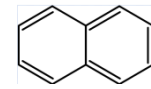
Koepulloihin lisättiin raakaöljyä ja/tai C14-leimattua naftaleenia.

C14-leimatun naftaleenin hajoamista seurattiin kokeen ajan (75 vrk).

Raakaöljyn määrää kokeen lopussa verrattiin alkupitoisuuteen.

Kokeen lopuksi pulloista eristettiin DNA: PAH-hajotusgeenien määrä, bakteeriyhteisöanalyysit.

Tavoitteena oli selvittää Itämeren bakteerien öljyn- ja naftaleenin hajotuskykyä niin hapellisissa kuin hapettomissa olosuhteissa 10°C:ssa. Myös ravinnelisäyksen vaikutusta hajotusnopeuteen testattiin.



# Koeasetelma



- A: sarja öljyanalyysiin kokeen 1. päivänä
- B: sarja öljyanalyysiin kokeen viimeisenä (75.) päivänä
- C: näytteet DNA-eristykseen
- Kaikissa pulloissa: 10 ml Helsinki-vettä, ~ 3 mg raakaöljyä, 1,6 µM ”kylmää” naftaleenia

Ravinnelisäys= 50 µl 1 M NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> ( 5 mM loppukons.), 50 µl 70 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ( 0,35 mM loppukons.)





# Koeasetelma, mineralisaatiopullot

10 g sedimenttiä



10 g konkreetioita



10 g sedimenttiä  
ravinnelisäys



10 g konkreetioita  
ravinnelisäys



10 g konkreetioita+sedimenttiä  
ravinnelisäys, autoklavointi



Kaikissa pulloissa: 10 ml Helsinki-vettä, ~ 3 mg raakaöljyä ja 'kuumaa' naftaleenia (~100 000 DPM)

Lisäksi kaksi kontrollipulloa:



- 10 ml Helsinki vettä, 10 g sedimenttiä, 'kuumaa' naftaleenia (~100 000 DPM)

**Ei öljylisäystä**



## Menetelmät

- Naftaleenin mineralisaationopeuden mittaaminen nestetuikelaskurilla
- Öljy- ja PAH-analyysit kaasukromatografilla
- Kvantitatiivinen PCR (qPCR) PAH-hajotusgeenien määrittämiseksi (PAH-RHD $\alpha$ , bssA)
- DGGE (denaturant gradient gel electrophoresis) bakteeriyhteisöjen rakenteen selvittämiseksi
- Kloonaukset, sekvensointi

# Menetelmät, C14-naftaleenin mineralisaation mittaaminen nestetuikelaskurilla



- Hiilellä on kaksi pysyvää isotooppia, C-12 (98,89%) ja C-13 (1,11%). Lisäksi luonnosta löytyy pieniä määriä epävakaa C-14:ta, joka on radioaktiivinen.
- Kokeen mineralisaatiopulloissa käytetyssä 'kuumassa' naftaleenissa on C14-leima
- Naftaleenin mineralisaation seurauksena syntynyt  $^{14}\text{CO}_2$  päätyy pulloissa olevaan pieneen lasiseen keräimeen, jossa on 1 M NaOH:ia -> mittauksia varten NaOH sekoitetaan nestetuikeluokseen

- Näytteiden mittaus nestetuikelaskurilla, joka mittaa näytteen tuottaman betasäteilyn



## Alustavia tuloksia

- Raakaöljystä hajosi hapellisessa kokeessa 54-81% ja hapettomassa 35-61%
- Molemmissa kokeissa naftaleeni hajosi biologisesti
- PAH-hajotusgeenien kopioluku kasvoi kokeen aikana selvästi kaikissa mikrokosmoksissa
- Työstä kirjoitetaan julkaisu vuoden 2013 aikana.



## **Kiitos kuuntelijoille ja MUTKU:lle apurahasta!**

**Muut työn rahoittajat:  
Suomen Kulttuurirahasto  
K.H. Renlundin säätiö**

