

# TUNTURIMAAN BAKTEERIEN LIPIDIMARKKERIT

Johanna Eilola

Opinnäytetyö  
Kesäkuu 2011

Laboratorioalan koulutusohjelma  
Tekniikan ja liikenteen ala





Tekijä(t) EILOLA, Anne Johanna	Julkaisun laji Opinnäytetyö	Päivämäärä 07.06.2011
	Sivumäärä 39	Julkaisun kieli suomi
	Luottamuksellisuus ( ) saakka	Verkojulkaisulupa myönnetty ( X )
Työn nimi TUNTURIMAAN BAKTEERIEN LIPIDIMARKKERIT		
Koulutusohjelma Laboratorioalan koulutusohjelma		
Työn ohjaaja(t) VÄRTÖ-NIEMI, Merja		
Toimeksiantaja(t) Metsäntutkimuslaitos, Rovaniemen toimipaikka, MÄNNISTÖ, Minna		
<p>Tiivistelmä</p> <p>Fosfolipidirasvahappomenetelmää (PLFA) käytetään yleisesti analysoitaessa mm. maaperän mikrobiyhteisöjä. Sillä etsitään markkereita ilmaisemaan tiettyjä lajeja ja ryhmiä tai sitä voidaan käyttää sormenjälkenä vertailtaessa mikrobiyhteisöjen koostumusta. Tutkimuksessa analysoitiin tunturimaassa yleisesti esiintyvien bakteerilajien PLFA-koostumusta. Analyysit tehtiin ARMI-kantakokoelman (Arktisten mikrobien kantakokoelma) kannoista <i>Rhodanobacter</i> sp. A1T6, <i>Pseudomonas</i> sp. S3B2, <i>Pedobacter</i> sp. K2C9, <i>Mucilaginibacter frigiditolerans</i> FT22, <i>Janthinobacter</i> sp. K2Li3, <i>Burkholderia</i> sp. R5E1, <i>Sphingomonas</i> sp. R5TW3 ja <i>Terriglobus saanensi</i> SP1PR4. Tutkimuksen tulokset auttavat tulkitsemaan maanäytteiden PLFA-profiileja.</p> <p>Työn tavoitteena oli myös tutkia lämpötilan vaikutusta bakteerien lipidirakenteisiin. Fosfolipidien rasvahapot uutettiin + 4 °C:ssa ja + 20 °C:ssa kasvatetuista soluista. Tunturimaassa maaperän lämpötila on harvoin 20 °C tai yli ja mikrobien tiedetään muuttavan rasvahappokoostumusta lämpötilan vaikutuksesta. Näytteet metyloitiin ja analysoitiin kaasukromatografilla. Tuloksia verrattiin kokosolun rasvahappo (FAME) menetelmällä tehtyihin rasvahappoprofiileihin ja kolmesta kannasta tehtyyn seokseen.</p> <p>Vertailemalla kantojen PLFA ja FAME profiileja huomattiin, että osa kannoista (SP1PR4) voi uuttua hyvin samankaltaisesti molemmilla menetelmillä, kun taas joissakin voi olla suurempia eroja (FT22). FT22 kannan tulosten perusteella voitiin päätellä, että OH-ryhmät eivät sijaitse fosfolipideissä. Kolmen kannan seoksen perusteella voitiin todeta, että rasvahapot uuttuivat kustakin kannasta samassa suhteessa ja PLFA seos kuvasi hyvin seoksen bakteereja ja niiden suhteellista määrää. Eli rasvahapot uuttuvat samalla tavoin seoksena ja yksin. Lämpötilan nostaminen aiheutti muutoksia rasvahappojen tyydyttyneisyydessä, haaraketjuisten rasvahappojen osuudessa sekä bakteerien syklopropanirasvahappojen kasvussa, mikä voi ilmaista joissakin bakteereissa esimerkiksi stressioireita.</p>		
Avainsanat (asiasanat) PLFA, lipidiuutto, kaasukromatografia, FAME, fosfolipidi		
Muut tiedot		



Author(s) EILOLA, Johanna	Type of publication Bachelor's Thesis	Date 07062011
	Pages 39	Language Finnish
	Confidential ( ) Until	Permission for web publication ( X )
Title LIPID MARKERS OF THE ARCTIC TUNDRA SOIL BACTERIUM		
Degree Programme Laboratory		
Tutor(s) VÄRTÖ-NIEMI, Merja		
Assigned by Finnish Forest Research Institute, Rovaniemi Research Unit MÄNNISTÖ, Minna		
Abstract <p>Phospholipid fatty acid (PLFA) method is commonly used in studies of soil microbial communities. It is used for searching markers to indicate specific species and groups or it could be used as a fingerprint. The objective was to analyze the PLFA composition of selected bacteria that are commonly found from arctic tundra soils. The research was done from Arctic microbial culture collection (ARMI) strains A1T6, S3B2, K2C9, FT22, K2Li3, R5E1, R5TW3 and SP1PR4. The PLFA composition of these species was examined in the study. The results will help to link fatty acids of the soil PLFA profiles to bacterial species known to dominate in the soils.</p> <p>The effect of the temperature on the lipid composition of the different bacterial strains was studied. The PLFAs were extracted from strains cultured at + 4°C and + 20°C. In tundra soils the temperature is hardly ever up to 20 °C. Samples were methylated and analyzed by gas chromatography. The results were compared to the cellular fatty acid composition (FAME) and to a special mixture which was prepared from three analyzed strains.</p> <p>The comparison of the PLFA and FAME profiles indicated that both extraction methods gave similar profiles for <i>Terrigobus saanensis</i> SP1PR4 while the PLFA and FAME profiles of <i>Mucilaginibacter frigoritolerans</i> FT22 differed more. Hydroxy fatty acids of FT22 were not included in the phospholipid phase. The PLFA profiles of the mixture showed that it was comparable with the sum of the lipid fatty acids of the single strain extraction. In other words fatty acids were extracted in the same way if they were in a mixture or singly. Increasing the temperature increased the share of cyklopropane fatty acids values. This could mean that there are stress conditions like starvation.</p>		
Keywords PLFA, gas chromatography, FAME, phospholipid, lipid extraction		
Miscellaneous		

# SISÄLTÖ

1 JOHDANTO .....	3
2 LIPIDIT .....	4
2.1 Lipidit .....	4
2.2 Rasvahapot .....	5
2.3 Rasvahappojen rakenne. ....	6
2.4 Fosfolipidit. ....	9
2.5 Markkerit. ....	9
3 PLFA-ANALYYSI .....	10
3.1 PLFA-tutkimuksen tavoitteet .....	10
3.2 PLFA-menetelmän erinomaisuus .....	11
3.3 Bakteerien mukautuminen lämpötilan muutokseen. ....	13
4 KAASUKROMATOGRAFIA .....	14
5 MENETELMÄ .....	15
5.1 Tutkittavat kannat .....	15
5.2 Kantojen kasvatusta .....	16
5.3 Lipidiuutto. ....	17
5.4 Fraktiointi .....	18
5.5 Metylointi ja rasvahappometyyliestereiden uutto heksaaniin .....	19
5.6 Kaasukromatografia-ajon valmistelu .....	20
5.7 Piikkien tulkinta .....	20
6 TULOKSET .....	21
6.1 Tutkittujen kantojen PLFA-koostumus. ....	21
6.2 Markkerit .....	24
6.3 Lämpötilan vaikutus PLFA-koostumukseen. ....	25
7 POHDINTA. ....	27
LÄHTEET .....	28
LIITTEET .....	30
Liite 1. Kannat .....	30
Liite 2. Valmistusohjeita .....	31
Liite 3. Työohje .....	32
Liite 4. Kromatogrammeja .....	34
Liite 5. Kantojen lämpötilavertailu .....	36

## KUVIOT:

KUVIO 1. Glyseroli . . . . .	4
KUVIO 2. Lipidimolekyyl . . . . .	4
KUVIO 3. Fosfolipidin rakenne . . . . .	5
KUVIO 4. Steariinihappo . . . . .	5
KUVIO 5. Kaksoissidoksen paikan ilmaiseminen . . . . .	8
KUVIO 6. iso- ja anteisorakenteet sekä rengasrakenne . . . . .	8
KUVIO 7. Kaasukromatografialaitteisto . . . . .	14
KUVIO 8. Fraktiointilaitteisto . . . . .	18
KUVIO 9. Huoneenlämmössä kasvatetun kannan FT22 PLFA:jen ja koko solun rasvahappojen profiilien vertailu. . . . .	23
KUVIO 10. Huoneenlämmössä kasvatetun kannan SP1PR4 PLFA-profiilin ja koko solun rasvahappo profiilin vertailu . . . . .	23
KUVIO 11. Seoksen Mx3 profiili verrattuna erikseen ajettujen kantojen profiilien summaan. . . . .	24

## TAULUKOT:

TAULUKKO 1. Joitakin yleisimpiä rasvahappoja . . . . .	6
TAULUKKO 2. Taulukossa on kuvattu tyydyttyneen ja tyydyttymättömän rasvahapon rakenteet. . . . .	7
TAULUKKO 3. Markkerirasvahappoja fosfolipidi rasvahapoissa. . . . .	10
TAULUKKO 4 Työssä käytetyt bakteerikannat . . . . .	16
TAULUKKO 5. Taulukossa on kuvattu yleisimpiä rasvahappoja ja niiden PLFA-rasvahappojen suhteellista osuutta tutkituista kannoista. . . . .	22
TAULUKKO 6. Muutokset lämpötilan muuttuessa huoneen lämmöstä (20 °C) kylmempään (4 °C) . . . . .	26

# 1 JOHDANTO

Maaperän mikrobiyhteisöjä tutkitaan yleisesti fosfolipidirasvahappomenetelmällä (PLFA), jolla etsitään markkereita ilmaisemaan tiettyjä lajeja tai ryhmiä. PLFA-koostumusta voidaan käyttää myös sormenjälkenä, ilman että etsitään markkereita. Vain hyvin pieni osa maaperän mikrobeista tunnetaan, joten ei tunneta tarkkaan mikrobien rasvahappokoostumusta. PLFA (Bligh & Dyer, 1959) on melko vanha menetelmä ja monet käytetyt PLFA-markkerit on kehitetty 1980-90 luvulla tunnettujen bakteerilajien mukaan. Bakteritaksonomia on kuitenkin 2000-luvulla kehittynyt ja uusia ympäristöbakteereita on eristetty ja kuvattu satoja.

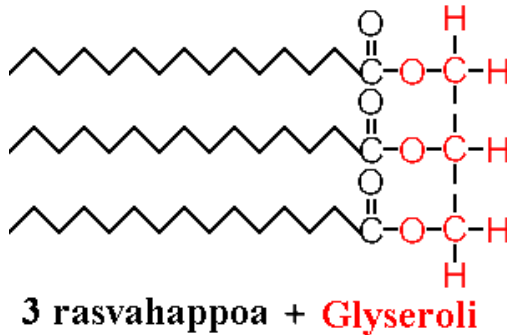
Työ tehtiin Metsäntutkimuslaitoksella (Metlalla) Rovaniemen yksikössä toimivalle tutkijalle, Minna Männistölle. Männistö tutkii arktisessa maaperässä olevien mikrobien toimintaa mikrobiyhteisössä ja roolia lajien välisessä kilpailussa. Yleensä kantoja kasvatetaan lämpötilavälillä 20 °C – 37 °C, mutta tunturimaassa lämpötila kohoaa harvoin yli 20 °C:n. Bakterikasvatukset tehtiin PLFA-analyysiä varten kahdessa eri lämpötilassa, + 4 °C ja + 20 °C, koska lämpötilan arvellaan vaikuttavan huomattavasti mikrobien PLFA-koostumukseen.

Tässä työssä tutkittiin kahdeksan uuden maaperäbakteerilajin PLFA-koostumusta tarkoituksena päivittää aikaisemmin julkaistujen PLFA-markkereiden spesifisyyttä erilaisiin bakteeriryhmiin. Tutkimuksen tavoitteena oli tutkia yleisesti tunturimaassa esiintyvien bakteerien PLFA-koostumuksia. Niitä verrattiin kolmen kannan seokseen ja toisella menetelmällä tehtyihin rasvahappoprofiileihin. Tavoitteena oli myös tutkia lämpötilan vaikutusta rasvahappoprofiileihin. Tulokset auttavat tulkitsemaan maanäytteiden PLFA-profiileja.

## 2 LIPIDIT

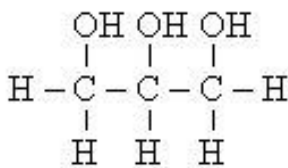
### 2.1 Lipidit

Lipidi on yleisnimitys erilaisille lipidiryhmille. Lipidit ovat veteen liukenemattomia rasvoja tai niiden kaltaisia aineita. Ne liukenevat hyvin orgaanisiin liuottimiin. Lipidit sisältävät runsaasti energiaa, ja ne ovatkin tärkeitä solujen energianlähteitä. Lipidimolekyylit (ks. kuvio 1) koostuvat glyserolista (ks. kuvio 2) ja rasvahapoista. (Tast, Tyrväinen, Nyberg & Leinonen 1999, 9 – 10.)



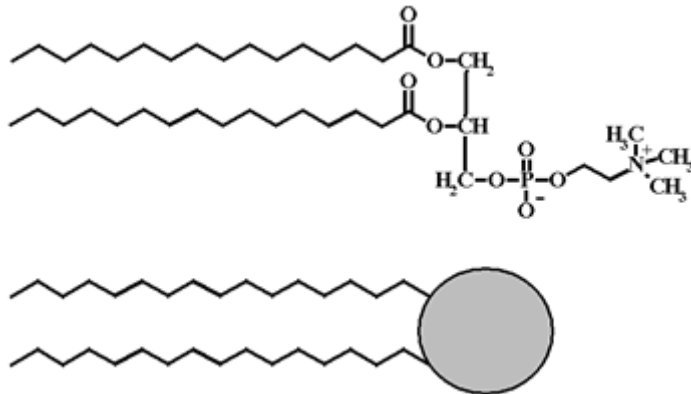
KUVIO 1. Lipidimolekyylit

Suurin osa lipideistä koostuu glyserolista, jonka 1 - 3 hydroksyyliinryhmään on sitoutunut rasvahappo (mono- triglyseridit). Fosfolipideissä yhteen OH -ryhmään on sitoutunut fosfaatti. Muita lipidiryhmiä ovat esim. glykolipidit ja sfingolipidit. (Ratledge & Wilkinson 1989, 33 – 38.) Tässä työssä keskitytään fosfolipideihin, joita tutkin PLFA-menetelmällä.



KUVIO 2. Glyseroli

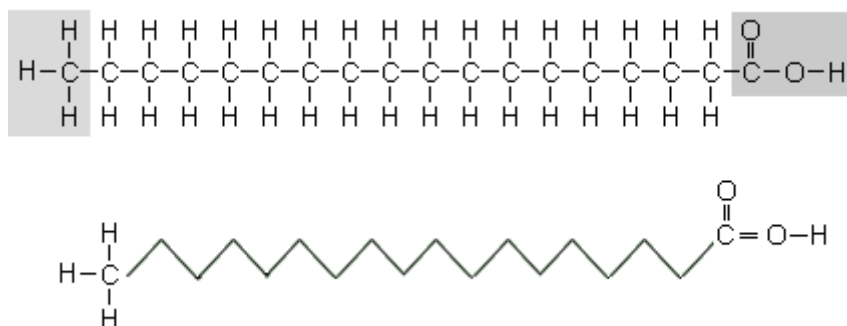
Lipidejä esiintyy mikrobien membraanissa ja varastointituotteina Membraanilipideillä on veteen liukeneva ja veteen liukenematon pää. Esimerkiksi fosfolipidi (ks. kuvio 3): fosfolipideissä on fosfaattia sisältävä rakenne joka on vesihakuinen. (Paul 2007, 60.)



KUVIO 3. Fosfolipidin rakenne, rasvahappo-osa on vesipakoinen ja fosfaattiosa vesihakuinen.

## 2.2 Rasvahapot

Rasvahapossa (ks. kuvio 4) on karboksyyliiryhmä (COOH), joka on liittynyt yleensä vajaa parikymmentä hiiliatomiä käsittävään hiilivetyketjuun. Rasvahapot ovat neutraaleja hiilivetyjä, ja niiden nimen happo-osa tulee karboksyylihapporyhmästä. Rasvahapon peruskaava on  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ , jossa  $n$  tarkoittaa hiiliatomien lukumäärää. (Tast ym. 1999, 9 - 10.)



KUVIO 4. Steariinihappo



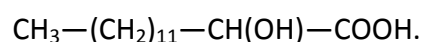
Kaikista elävistä soluista löytyy rasvahappoja (ks. taulukko 1). Useimmat rasvahapot ovat liittyneet isompiin molekyyliin, pääasiassa fosfolipideihin ja glykolipideihin tai lipoproteiineihin-, ja lipoteikkohappoihin. Joissakin bakteereissa rasvahapot esiintyvät vapaina (Zelles 1999, 112) vaikka niitä ei ole juurikaan löydetty luonnosta vapaassa muodossa (Ratledge & Wilkinson 1989, 23).

TAULUKKO 1. Joitakin yleisimpiä rasvahappoja. i = iso, a = anteiso ja c = syklo.

<u>Tyydyttyneet</u>	<u>Systemaattinen nimi</u>	<u>Triviaalinimi</u>
14:0	tetradekaanihappo	myristiinihappo
15:0	pentadekaanihappo	
16:0	heksadekaanihappo	palmitiinihappo
17:0	heptadekaanihappo	margariinihappo
18:0	oktadekaanihappo	steariinihappo
19:0	nonadekaanihappo	
<u>Tyydyttymättömät</u>		
15:1	pentadekeenihappo	
16:1	heksadekeenihappo	
17:1	heptadekeenihappo	
18:1	oktadekeenihappo	
<u>Rengasrakenne</u>		
c-17:0	metyleeniheksadekaanihappo	
c-19:0	metyleenioktadekaanihappo	
<u>Haaroittuneet</u>		
i-15:0	13-metyylitetradekaanihappo	isopentadekaanihappo
a-15:0	12-metyylitetradekaanihappo	anteisopentadekaanihappo

## 2.3 Rasvahappojen rakenne

Mikäli rasvahappojen hiiliatomien välissä ei ole lainkaan kaksoissidoksia, lipidi luokitellaan tyydyttyneeksi ja jos niitä on yksi tai useampi, tyydyttymättömäksi. Rasvahapot voivat olla myös suoria tai haaroittuneita tai sisältää alisyklisiä renkaita tai erilaisia substituentteja, kuten -OH, esim. 14:0 - 2OH



Kun hiilivetyketju on tyydyttynyt, se on suora, sillä kaksoissidos hiilivetyketjussa saa aikaan taitekohdan. Kasvien lipidit ovat yleensä huoneenlämmössä öljymäisiä ja niiden rasvahapot tyydyttymättömiä.

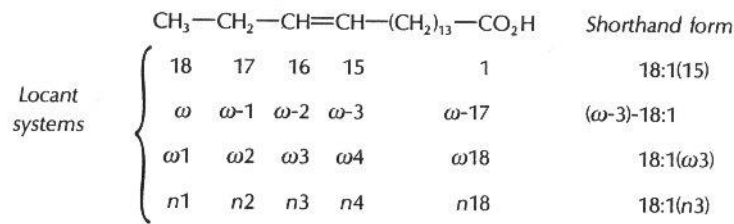
Monotyydyttymättömät ja rengasrakenteiset rasvahapot myötävaikuttavat joustavuuteen ja juoksevuuteen, mikä mahdollistaa membraanin muodonmuutoksen solun kasvaessa. (Moat & Foster 1995, 410.) Ne mahdollistavat myös ravinteiden kulkemisen solukalvon läpi. Lämpötilan laskiessa rasvat jäykistyvät, mutta rasvahappokoostumusta muuttamalla membraani saadaan pysymään juoksevana. (Sinensky 1974, 522 - 525.)

Tärkeimpiä tyydyttymättömiä rasvahappoja ovat sellaiset, joissa on vain yksi tyydyttymätön kohta. Di-, tri- tai monityydyttymättömiä rasvahappoja ei ole bakteereissa. Haaroittuneita-, hydroksyyli- tai metyyli-rasvahappoja ja syklopropanirasvahappoja, eli rengassisältöisiä rasvahappoja, esiintyy useissa mikro-organismeissa. (Moat & Foster 1995, 410.)

TAULUKKO 2. Taulukossa on kuvattu tyydyttyneen ja tyydyttymättömän rasvahapon rakenteet. (Männistö 2001, 18.)

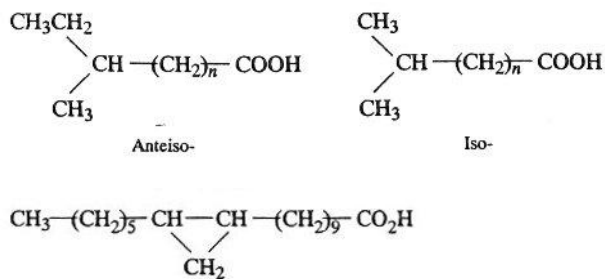
Tyydyttynyt:		rasvahapon rakenne
<b>18:0</b>	steariinihappo	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}-\text{COOH}$
Tyydyttymätön:		
<b>18:1 ω 7</b>	11-Oktadekeenihappo	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_9-\text{COOH}$

Rasvahapot on merkitty niiden hiiliatomien lukumäärän mukaan. Tyydyttymättömyysaste (ks. taulukko 2) on ilmaistu ketjun pituuden luvusta kaksoispisteellä erotulla luvulla, esim. pentadekeenihapolla on yksi kaksoissidos ja se ilmaistaan 15:1 ja pentadekaanihapolla ei ole kaksoissidoksia, jolloin se merkitään 15:0. (Zelles 1999, 112).



KUVIO 5. Kaksoissidoksen paikan ilmaiseminen (Ratledge & Wilkinson 1989, 27)

Kun kaksoissidoksen paikka (ks. kuvio 5) lasketaan metyyliryhmästä lukien, se ilmoitetaan hiililuvun perässä olevan kaksoissidoksen lukumäärän jälkeen  $\omega$  (omega) -merkillä. Toinen tapa ilmaista kaksoissidoksen paikka on laskea karboksyyliiryhmästä alkaen, jolloin omega ( $\omega$ ) jätetään pois tai paikka voidaan ilmaista cis-merkin perässä. (Ratledge & Wilkinson 1989, 27)



KUVIO 6. Iso- ja anteisorakenteet sekä rengasrakenne (Moat & Foster 1995, 414 - 415)

Yleisimmät haaroittuneet rasvahappomuodot ovat iso- ja anteisomuodot (ks. kuvio 6). Näitä muotoja löytyy monista eri organismeista, ja ne ilmaistaan hiililukumäärän edellä i- ja a-etumerkein. Rengasrakenne rasvahapossa ilmaistaan c-merkillä (c tulee sanasta syklo). Ensimmäinen löydetty rengasrakenteinen rasvahappo on lactobacillus happo c-19:0, cis-11,12-metyleenioktadekaanihappo (ks. kuvio 6). (Moat & Foster 1995, 414 - 415)

## 2.4 Fosfolipidit

Fosfolipidejä (ks. kuvio 3) on etenkin solun kalvorakenteessa, missä ne ovat välttämättömiä elävien solujen solukalvon osasia. Fosfolipidien fosfaattiryhmä on vesiliukoinen ja muodostaa lipidin vesihakuisen pään, rasvahappopää puolestaan on vesipakoinen. (Zelles 1999, 111.)

Fosfolipidit indigoivat elinkelpoista biomassaa (Vestal, Robby & White 1989, 537). Fosfolipidit hajoavat nopeasti solukuoleman jälkeen. Siksi ne ovat merkityksellisiä mikrobien ”sormenjälkiä” (Paul 2007, 60).

Membraanilipidit ja niihin liittyvät rasvahapot ovat erittäin hyödyllisiä biomarkkereita, koska ne ovat tärkeitä osasia jokaisessa elävässä solussa ja niillä on suuria rakenteellisia eroja. Lipidimarkkerit ovat käyttökelpoisia markkereita luonnon mikrobiyhteisöjen koostumusta tutkittaessa, koska näitä on käytetty laajasti bakteerien taksonomiassa ja tunnistuksessa ja laji-, suku-, tai ryhmäspesifisistä rasvahapoista on laajasti kirjallisuutta ja tietokantoja. (Zelles 1999, 114)

## 2.5 Markkerit

Tiettyjä PLFA-rasvahappoja käytetään markkereina erityisille eliöryhmille (ks. taulukko 3). Organismien PLFA koostumuksen tiedetään vaihtelevan asteittain ympäristöolojen ja solun aktiivisuuden mukaan. Esim. Rasvahapon 16:1 $\omega$ 7 muutoksen cis-isomeeristä trans-muotoon on oletettu ilmaisevan bakteerin stressi- ja nälkätiloja samoin kuin rasvahappojen c-19:0 ja c-17:0. Pieniä määriä rasvahappoa 16:1 $\omega$ 7trans voi kyllä löytyä myös stressittömistä yhteisöistä. Rasvahappo 18:2 $\omega$ 6 ilmaisee sienten läsnäolon. Rasvahappojen i-14:0, i-15:0, a-15:0 ja i-16:0 on raportoitu indikoivan gram-positiivisuutta, koska näitä rasvahappoja on löydetty gram-positiivisista bakteereista. Gram-negatiivisista bakteereista on löydetty mm. tyydyttymättömiä cis- ja trans-isomeereja. (Leckie 2005, 92 - 94)

TAULUKKO 3. Markkerirasvahappoja fosfolipidi rasvahapoissa. (Paul 2007, 62; Vestal & White 1989, 539; Zelles 1999, 113)

Rasvahappo	Organismi
Suuraketju	Eukariootit; yleinen
syklopropyyli	Gram-negatiiviset: <i>Rhodospirillum</i> , <i>Cromatium/Legionella</i> ; Gram-positiiviset: <i>Clostridium</i> , <i>Bifidobacterium</i>
16:1 $\omega$ 9, 15:0, i-15:0	Bakteerit yleisesti, syanobakteerit, aktinobakteerit
c-15:1	Clostridia
16:0	Sienet
i-16:1	Gram-positiiviset bakteerit
16:1 $\omega$ 5	Syanobakteerit, arbuskeli mykorritsasienet (e.g. <i>Glomus</i> )
16:1 $\omega$ 7, 16:1 $\omega$ 7t	Aerobibakteerit
c-17:0, c-19:0	Anaerobibakteerit, gram-negatiiviset bakteerit
17:1 $\omega$ 6, i-17:1 $\omega$ 7	Sulfaatin pelkistäjä bakteerit, aktinobakteerit
18:1 $\omega$ 7	Aerobibakteerit, gram-negatiiviset bakteerit
$\omega$ 9	Gram-positiiviset, laajallelevinnyt
18:1 $\omega$ 9	Sienet, vihreät levät, kasvit, gram-positiiviset bakteerit
18:1 $\omega$ 11	kasvit
18:2 $\omega$ 6	Eukariootit, syanobakteerit, sienet
10Me18:0	Aktinobakteerit

### 3 PLFA-analyysi

#### 3.1 PLFA-tutkimuksen tavoitteet

Fosfolipidirasvahappotekniikkaa on käytetty kuvaamaan mikrobiyhteisöjen koostumuksen eri tapoja reagoida muuttuviin ympäristöolosuhteisiin erilaisilla maatyypeillä, hoitotoimenpiteillä, ilmastollisella alkuperällä ja häiriöillä (Paul 2007, 60). Elinkelpoisilla mikrobeilla on membraaneja, jotka koostuvat yleensä fosfolipideistä, joihin sitoutunut rasvahappo-osa on diagnostinen eri mikrobiryhmille (Zelles 1999, 111 - 112). Luonnossa mikro-organismit esiintyvät harvoin monokulttuureina, useimmiten ne elävät yhteisöissä toisten mikrobien kanssa (Vestal & White 1989, 535).

Fosfolipidirasvahappoja käytetään kuvaamaan biomassaa ja yhteisön rakennetta. Eri näytteiden profiileja vertailemalla voidaan saada tietoa mikrobiyhteisöjen eroista tai samanlaisuudesta. Markkeri-rasvahappoja voidaan käyttää myös kuvaamaan tiet-

tyjen ryhmien muutoksia. Tämä on kuitenkin usein kyseenalaista, sillä useissa organismeissa on samoja rasvahappoja, ympäristön bakteereista tunnetaan vain häviävän pieni osa, jolloin käytetyt markkerit edustavat vain pientä osaa tunnetuista lajeista. On mahdollista antaa erehdyksessä markkerille liian suuri merkitys. Lisäksi bakteerien tunnistuksessa ja ekologisessa tutkimuksessa käytetyt menetelmät eroavat toisistaan eikä rasvahappoprofiileja voi aina suoraan verrata. (Zelles 1997, 275 - 276.) Olosuhteet vaikuttavat rasvahappokoostumukseen ja voivat haitata PLFA-profiilin tulkintaan. Aina ei voida olla varmoja johtuvatko PLFA-profiilissa olevat erot muutoksista yhteisön rakenteesta (lajikoostumuksessa) vai kasvuoloissa, jotka ovat aiheuttaneet fysiologisia muutoksia yhteisön lajeissa. (Leckie 2005. 92 – 94.)

Leckien (2005, 92) mukaan PLFA-tekniikassa lipidit uutetaan maasta orgaanisilla liuottimilla. Tämä perustuu yleensä Blightin ja Dyerin (1959) kehittelemään protokollaan. PLFA-menetelmässä lipidit uutetaan kloroformin, metanolin ja fosfaattipuskurin seoksella, johon ne liukenevat lähes saman tien. Sen seurauksena lipidimetabolia loppuu ja saadaan talteen uuttohetykellä olevat lipidit. Seos jaetaan kahteen faasiin: kloroformi- ja vesifaasiin. Koko lipidifraktio jää alempaan kloroformifaasiin. (Vestal & White 1989, 536.) Fosfolipidirasvahapot metyloidaan sitten rasvahappometyyliesteiksi (lyhennetään FAME, joka tulee sanoista fatty acid methyl ester). Sitten ne analysoidaan kaasukromatografilla. PLFA-profiilissa kaasukromatografian detektoimien rasvahappojen piikkien pinta-ala on verrannollinen rasvahapon määrään. (Leckie 2005, 92.)

PLFA-profilointitekniikka mahdollistaa fenotyyppisen sormenjäljen maamikrobiyhteisöistä. Tämä menetelmä perustuu siihen että mikrobin fosfolipidien rasvahappokoostumus on lajispesifinen. Tietyn lajin tai ryhmän organismit sisältävät siis enemmän tai vähemmän samanlaisen rasvahappokoostumuksen. (Leckie 2005, 92.)

### **3.2 PLFA-menetelmän erinomaisuus**

Perinteiset menetelmät ovat hankalia ja aikaa vieviä. Nämä menetelmät koostuvat mikrobien viljelemisestä ja satojen pesäkkeiden keräämisestä. Pesäkkeitä tutkitaan

värjäämällä ja niiden muodon tarkastelulla sekä biokemiallisilla testeillä. Yhden ainoan puhtaan viljelmän tutkiminen voi vaatia liki sata testiä, jotta saataisiin tarpeellinen määrä tietoa analysoitavaksi tietokoneella. Ja silti saataisiin vain todennäköinen taksonominen nimi viljelmälle. Viljelymenetelmillä ei pystytä tutkimaan kaikkia mikrobeja, koska vain osa pystytään kasvattamaan laboratorio-olosuhteissa. Suurin osa mikrobeista on riippuvia ympäristöstään. Mikrobeja ei voida siirtää kvantitatiivisesti, joten kaikkia ei pystytä tutkimaan. (Vestal & White 1989, 535 – 536.)

Päästäkseen näistä ongelmista tutkijat ovat kehittäneet keinoja mitata mikrobiyhteisöjen biomassaa, rakennetta, metabolista statusta ja aktiivisuutta suoraan näytteestä ilman että mikrobeja tarvitsee eristää siitä. DNA:n ja RNA:n eristys ja sekvensointi on lupaava tapa määrittää luonnollista yhteisön rakennetta. Tutkijan on päätettävä, mikä menetelmä vastaa parhaiten tutkimuksen lähtökohtiin. (Vestal & White 1989, 536.)

Yksi tapa tutkia koko mikrobiyhteisön rakennetta on analysoida maan PLFA-koostumus, sillä eri organismeilla on erilainen PLFA-koostumus. Tällä menetelmällä ei ole yleensä mahdollista havaita tiettyä mikro-organismien lajia tai sukua, mutta muutokset koko yhteisön rakenteessa sitä vastoin voidaan havaita (Frostegård, Tunlid & Bååth 1993, 3605). PLFA-menetelmä on herkkä, ja se huomioi enimmäkseen paikalla olevat luonnolliset mikrobit. Käyttäen tätä menetelmää tutkija voi tutkia mikrobiyhteisön muutoksia ympäristön rasituksesta suhteessa aikaan. Muutokset alkuperäisessä yhteisössä voi ilmaista ympäristötekijöiden muutosta. (Vestal & White 1989, 535 - 536).

Fosfolipidirasvahapot, solumembraanin osat, ovat osoittautuneet käyttökelpoisiksi ja tietoa antaviksi markkereiksi (Leckie 2005, 89). Yleisesti koko yhteisön rasvahappoprofiilit osoittavat mitkä yhteisöt ovat samankaltaisia tai erilaisia. Lipidien profiilit voivat antaa ymmärrystä mikrobiyhteisön rakenteesta esimerkiksi kun tietyn PLFA:n suhteellinen määrä poikkeaa huomattavasti erityisistä mikro-organismiryhmistä (Zelles 1999, 111 - 114).

### 3.3 Bakteerien mukautuminen lämpötilan muutoksiin

Fosfolipidit muodostavat merkittävän osan koko solumembraanista, ja fosfolipidien pitkäketjuiset rasvahapot nähdään mikrobiyhteisön sormenjälkenä. Kuitenkin puhdasviljelmätutkimuksissa on todettu, että ympäristötekijät vaikuttavat membraanilipideihin. Joten lajien koostumus ei ole ainoa muuttuja. Ympäristötekijä, joka eniten vaikuttaa PLFA-koostumukseen, on lämpötila. (Petersen & Klug 1994, 2421.)

Bakteerit muuttavat membraanien lipidirakennetta pitääkseen membraanien toiminnan optimaalisena. Lämpötilan lasku vaikuttaa juoksevuuteen siten, että rasvat jäykistyvät. (Sinensky 1974, 524.) Jos solu ei pysty vastaamaan voimakkaisiin lämpötilan muutoksiin, se voi saada stressioireita tai kuolla (Petersen & Klug 1994, 2421).

Lämpötilan muutoksen aiheuttama vaikutus vaihtelee lajin mukaan, koska eri lajeilla on eri rasvahappokoostumus. Useimmin havaittu muutos tapahtuu tyydyttymättömissä rasvahappoketjuissa. Koska bakteerit eivät tee monityydyttymättömiä rasvahappoja, tämä muutos on tyydyttyneestä monityydyttymättömään rasvahappoon, kun lämpötilaa lasketaan. On myös muita muutoksia, jotka tapahtuvat lämpötilan laskun jälkeen. Lämpötilan lasku voi vaikuttaa ketjun pituuden lyhentymiseen, haaroituneiden rasvahappojen lukumäärän kasvuun ja muutoksiin haaraketjuissa tai voi seurata syklisten rasvahappojen osuuden vähenemistä. (Russell 1984, 108 – 109.)

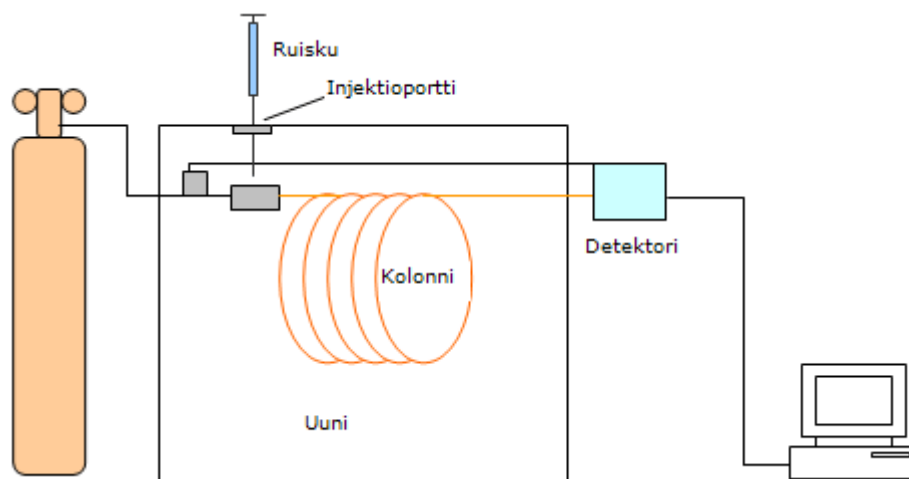
Petersenin ja Klugin tutkimuksessa (1994, 2424) suurimmat lämpötilan aiheuttamat muutokset näkyivät 16:0- ja 18:0-lähtöisissä rasvahapoissa. Erilaisia kaksoissidoksen paikassa havaittiin heksadekeenihapossa (16:1) ja oktadekeenihapossa (18:1); kuitenkin pääasiassa konsentraatiomuutokset havaittiin vain rasvahapoissa 16:1 $\omega$ 7c ja 18:1 $\omega$ 7c. Kun nämä kaksi rasvahappoa voidaan valmistaa rasvahapoista 16:0 ja 18:0, ne ovatkin itse asiassa myös prekursoreita syklopropyyliirasvahapoille c-17:0 ja c-19:0. Myös Männistön (2001, 42) tutkimuksessa on huomattu, että lämpötilan laskeminen kasvattaa heksadekeenihapon ja oktadekeenihapon määrää samalla, kun heksadekaanihapon määrä vähenee.



## 4 KAASUKROMATOGRAFIA

Kaasukromatografista ja kaasukromatografiasta käytetään lyhennettä GC, joka tulee englanninkielien sanoista gas chromatography. Kaasukromatografiassa analysoidaan yhdisteitä, jotka eivät hajoa höyrystettäessä eli eivät hajoa lämpötilan ollessa alle 400 °C. Jotkin yhdisteet eivät itsessään ole tarpeeksi haihtuvia, joten niistä voidaan tehdä haihtuva johdos, esim. rasvahapoista metyloidaan metyyliestereitä. Analysoitaessa näyte syötetään septumin läpi kuumaan injektoriin, jossa näyte höyrystyy ja kantaja-kaasu (liikkuva faasi) kuljettaa näytteen kolonniin ja detektorille. (Jaarinen & Niiranen 2005, 183 – 195.)

Kaasukromatografissa (ks. kuvio 8) käytetään liikkuvana faasina kolonnin läpi virtaavaa inerttiä kaasua. Stationäärifaasina eli paikallaanpysyvänä faasina on nestemäinen aine kolonnin pinnassa. Liikkuva faasi kuljettaa haihtuvia yhdisteitä näille tunnusomaisella nopeudella. Lopputuloksena GC-ajosta saadaan kromatogrammi, jossa yhdisteet näkyvät piikkeinä. Näytteessä voi olla jopa satoja tutkittavia yhdisteitä ja ne pystytään erottamaan kaasukromatogrammista. (Kaasukromatografia. n.d.)



KUVIO 7. Kaasukromatografialaitteisto. (Kaasukromatografia n.d.)

Näytteen erottumiseen vaikuttavat eri tekijät, kuten lämpötila (nopeus) ja kolonnin pituus (matka). Lämpötila vaikuttaa esimerkiksi yhdisteiden liikkumiseen kolonnissa

ja sitä myöten sen erottumiseen. Näytteen nopeus kolonnissa johtuu liikkuvan faasin ja stationäärifaasin välillä olevasta tasapainosta. Yhdisteen kemialliset ominaisuudet (esim. hiilten lukumäärä), konsentraatio, höyrynpaine ja kiehumispiste vaikuttavat näytteen retentioaikaan eli paikkaan kromatogrammissa. (Jaarinen & Niiranen 2005, 183.)

Liekki-ionisaatiodetektor (FID, flame ionization detector) on yleisimmin käytetty detektor. Molekyylien palaessa syntyneet elektronit ja ionit johdetaan sähkökentässä kollektorielektrodille ja sen aiheuttama sähkövirta mitataan. Tiedot lähetetään detektorilta eteenpäin ja piikit voidaan lukea kromatogrammista. Yhdisteiden tunnistukseen voidaan käyttää suhteellista retentioaikaa, absoluuttista retentioaikaa tai retentioindeksiä. (Jaarinen ja Niiranen 2005 193 - 196).

Näytteeseen lisättävän sisäisen standardin avulla voidaan laskea suhteellinen retentioaika (RRT). Sisäistä retentiostandardia käytetään, koska retentioajat saattavat vaihdella eri ajoissa. (Kaasukromatografia. n.d.)

## 5 MENETELMÄ

### 5.1 Tutkittavat kannat

Tutkittavat kannat (ks. liite 1) olivat Männistön kokoamasta ARMI-kantakokoelmasta. Kannoiksi valittiin erisukuisia mikrobeja. Tutkittavaksi otettiin seuraavat kannat (ks. liite 1) *Rhodanobacter* sp. A1T6, *Pseudomonas* sp. S3B2, *Pedobacter* sp. K2C9, *Mucilaginibacter frigoritolerans* FT22, *Janthinobacter* sp. K2Li3, *Burkholderia* sp. R5E1, *Sphingomonas* sp. R5TW3, *Bacillus* sp. S5R4, *Caulobacter* sp. MP5aCTX6 ja *Terriglobus saanensi* SP1PR4. Näistä kaksi kantaa (S5R4 ja MP5aCTX6) jätettiin pois tutkittavien kantojen joukosta.

Kannat valittiin aikaisempien tulosten perusteella. Kannat edustivat lajeja, joilla on erilaisia rasvahappotyyppejä, kuten suoraketjuisia, iso- ja anteisohaaroittuneita sekä

erilaisia OH-rasvahappoja. DNA-sekvensointi on osoittanut näiden kantojen edustavan tunturimaaperässä yleisiä bakteeriryhmiä: Acidobacteria, Bacteroidetes sekä Alfa-, Beta- ja Gammaproteobakteeriryhmiä. (Männistö ym. 2007; 2009.) Kantojen rasvahapot on aikaisemmin analysoitu koko solun rasvahappomenetelmällä, joka mittaa kaikki solussa olevat rasvahapot, ei pelkästään fosfolipidien rasvahappoja (Männistö & Häggblom, 2006; Männistö ym. 2010 ja 2011). Tässä työssä tutkittiin kantojen fosfolipidien rasvahappokoostumus, verrattiin tätä aikaisempiin koko solun rasvahappoprofiileihin sekä tutkittiin lämpötilan vaikutusta PLFA koostumukseen.

## 5.2 Kantojen kasvatus

Kanta MP5aCTX6 (A526) jouduttiin jättämään pois, koska se ei lähtenyt kasvamaan siirrostuksen jälkeen ja kanta S5R4 (A316) jätettiin pois tuloksia häiritsevän kontaminaation takia.

Kannat (ks. taulukko 4) siirrostettiin pakkasesta otetuista näytteistä R2A-maljoille (pH=6). R2A on kaupallinen tuote, josta valmistetaan kasvatusalustoja veteen sekoittamalla ja autoklavoimalla (koostumus on ilmoitettu liitteessä 2). Näytteet siirrostettiin maljalta ensimmäiseen kasvatusliemeen. Siirrostettaessa varottiin kontaminoimasta näytettä.

TAULUKKO 4 Työssä käytetyt bakteerikannat.

Fyyla	Kanta	Identifikaatio	ARMI nro
Acidobacteria	SP1PR4	Terriglobus saanensin	
Bacteroidetes	FT22	Mucilaginibacter frigiditolerans	414
	K2C9	Pedobacter sp.	64
Alfaproteobakteeri	R5TW3	Sphingomonas sp.	202
Betaproteobacteria	K2Li3	Janthinobacterium sp.	73
	R5E1	Burkholderia sp.	192
Gammaproteobacteria	A1T6	Rhodanobacter sp.	18
	S3B2	Pseudomonas sp.	274

Reilu silmukallinen näytettä siirrostettiin GY-liemeen (ks. liite 2) Sameus mitattiin spektrofotometrilla (aallonpituudella 600 nm) kolmena peräkkäisenä päivänä, minkä perusteella nähtiin, kuinka kannat olivat kasvaneet. Sameusmittausta varten näytettä laimennettiin suhteessa 1:5 (kasvatusliemi:vesi). Näytettä siirrostettiin liemestä edelleen uusiin GY-liemiin 6 - 10 ml steriileillä pipeteillä. Hyvin kasvaneesta näytteestä otettiin vähemmän ja huonommin kasvaneesta enemmän näytettä. Kustakin kannasta haluttiin saada suurin piirtein saman verran biomassaa. Kannoista siirrostettiin kasvamaan kaksi näytettä huoneenlämpöön (20 °C) ja kaksi + 4 °C:seen.

Kun huoneenlämmössä olleet kannat olivat kasvaneet 3 vrk, kasvatuksesta maljattiin R2A-maljalle kontrollinäyte, jolla seurattiin kannan puhtautta. Näytteestä pipetoitiin myös 0,4 ml näytettä sameuden mittausta varten kyvettiin. Loput näytteestä kaadettiin 2 - 3 punnittuun sentrifuugiputkeen (30 ml näytettä/putki) ja näytettä fuugattiin 15 minuuttia 25 °C:ssa 10 000 – 14 000 rpm. + 4 °C:ssa kasvatetut näytteet fuugattiin + 10 °C:ssa. Kylmässä kasvaneiden näytteiden kanssa toimittiin nopeasti, jotta kantojen rasvahappoihin ei ehdi tulla muutoksia. Fuugaus uusittiin tarvittaessa suuremmilla kierrosnopeuksilla.

Liemi dekantoiitiin varovasti pohjaan pakkaantuneen biomassan päältä pois, niin ettei biomassaa lähtenyt putkesta. Näytettä pestiin  $K_2HPO_4$ -puskurilla (20 ml, pH on 7,4, ks. liite 2) ja fuugattiin uudelleen. Pesuliemi dekantoiitiin pois ja näyte punnittiin. Fuugiputket punnittiin tyhjänä ja biomassan pesun jälkeen, kun pesuliuos oli kaadettu pois. Näin saatiin biomassan paino ja pystyttiin arvioimaan saatu biomassan määrä. Näyte pakastettiin odottamaan uuton aloitusta.

Näytteet olisi tullut kylmäkuivata ennen uuton aloittamista, mutta koska kylmäkuivuria ei ollut käytettävissä, päätettiin kokeilla uuttoa ilman kuivausta.

### 5.3 Lipidiuutto

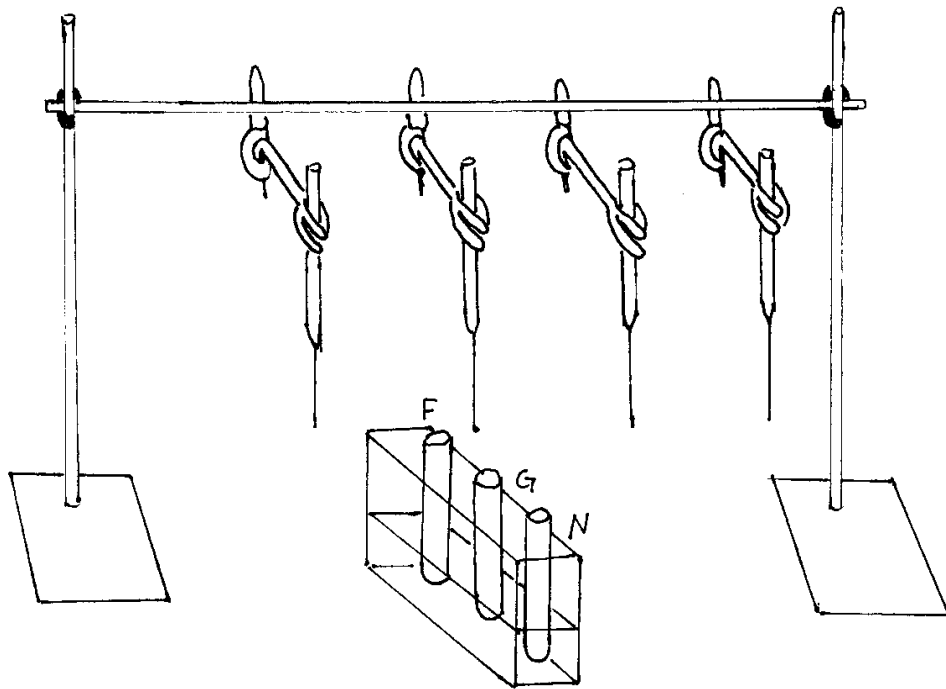
Uutto perustui tunnettuun Blighin & Dyerin (1959) menetelmään (ks. liite 3). Näytteet huuhdeltiin fuugiputkista 10 ml:llä Bligh & Dyer'in (ks. liite 2) liuosta 40 ml:n

uuttoputkiin. Putkia ravisteltiin 2 h tasoravistelijassa. Putket fuugattiin tarvittaessa ja dekantoidatiin liemi pois. Uutto toistettiin lisäämällä Bligh & Dyer liuosta (5 ml) ja ravistelemalla puoli tuntia. Uutto toistettiin jotta saatiin lipidit mahdollisimman tarkkaan talteen.

Dekantoitiin liemi samaan putkeen mihin aiemminkin ja lisättiin uutoksiin 4 ml kloroformia ja 4 ml vettä. Fuugattiin 5 min / 1500 rpm ja annettiin faasien erottua yön yli 4 asteessa jääkaapissa. Pipetoitiin alin faasi suodatinpaperin läpi foliokorkilliseen koeputkeen. Näytteet kuivattiin typpivirrassa.

## 5.4 Fraktiointi

Fraktioinnissa erotetaan fosfolipidit muista lipidiryhmistä. Näytteestä saadaan erotettua neutraalit lipidit, glykolipidit ja fosfolipidit. Koottiin fraktiointilaitteisto (ks. kuvio 8). Rautakouriin laitettiin valmistetut piihappo-kolonnit (ks. liite 2). Keräysastianä käytettiin kierrekorkillisia koeputkia.



Kuvio 8. Fraktiointilaitteisto. N = neutraalilipidi fraktio, G = glykolipidifraktio, F = fosfolipidifraktio.

Piihappo kasteltiin ensin kloroformilla ja kerättiin kloroformin ylimäärä jäteastiaan. Sitten liuotettiin näyte 200 µl:n kloroformia, joka pipetoitiin pasteurpipetillä piihappokolonneihin. Pestiin koeputki vielä 100 µl:lla kloroformia ja pipetoitiin se samalla pasteurpipetillä kolonneihin.

Pipetoitiin 5 ml kloroformia koeputkeen, josta se pipetoitiin kolonneihin ja otettiin fraktio talteen uuteen korkilliseen koeputkeen. Kloroformi eluoi neutraalit lipidit. Pipetoitiin 10 ml asetonia koeputkeen. Asetonilla eluoi glykolipidit piihappokolonnista. Asetonin raja näkyi ja kerättiin "väliin jäävä"-neste jäteastiaan, kunnes asetoni oli valunut kolonnin alas asti.

Eluoiitiin fosfolipidit uuteen koeputkeen 5 ml:lla metanolia. Haihdutettiin liuotin tyypivirrassa fosfolipidinäytteestä ja pakastettiin näyte. Tyytettiin myös muiden fraktioiden ilma pois ja säilöttiin ne pakkaseen mahdollista tulevaa käyttöä varten.

## **5.5 Metylointi ja rasvahappometyyliestereiden uutto heksaanin**

Näytteet metyloitiin rasvahappojen metyyliestereiksi, joka on rasvahapon helpommin haihtuva muoto, sillä ilman metylointia rasvahapot eivät ole itsestään tarpeeksi haihtuvia analysoitavaksi kaasukromatografisesti. Metyloituminen tapahtuu emäksisessä liuoksessa sitä lämmitettäessä.

Näyte liuotettiin 1 ml:lla tolueeni:metanoli-liuokseen (1:1) ja lisättiin 1 ml KOH-liuosta (0,2 M). Näytteitä vorteksoitiin hetki ja laitettiin vesihauteeseen (37 °C) 15 minuutin ajaksi. Niiden annettiin sitten jäähtyä pöydällä huoneenlämpöiseksi. Tämän jälkeen metyloidut rasvahapot uutettiin heksaanin ja kloroformin seokseen. Heksaanin:kloroformi-liuosta (4:1) lisättiin 2ml ja sekoitettiin 1 minuutti kevyesti. Näyte neutraloitiin 200 µl:lla etikkahappoa (1 M). Näyte erottui ja happamuus testattiin tiputtamalla pisara näytettä pH-paperille.

MQ-vettä lisättiin näytteeseen 2 ml kloroformi- ja heksaanifaasien erottamiseksi. Neste muuttui kirkkaasta sameaksi ja vaaleammaksi. Näytteet laitettiin jääkaappiin erottumaan. Näytteiden erottumista parannettiin fuugaamalla 5 minuuttia 3000 rpm. Ylempi faasi kerättiin uuteen putkeen ja alempi faasi uutettiin uudelleen. Näytteet fuugattiin uudestaan ja kerättiin mahdollisimman tarkasti ylempi kerros samaan putkeen kuin edellä kuitenkin ottamatta liian läheltä faasien rajaa. Kerätty faasi kuivattiin typpivirrassa.

## 5.6 Kaasukromatografia-ajon valmistelu

Sisäisenä standardina käytettiin 19:0 50 pmol/ml –kantaliuosta: 100x kantaliuos (156 mg/100 ml). Standardia valmistettiin 25 ml:n erä johon punnittiin 39 mg standardia.

Näyte liuotettiin 450 µl heksaania ja lisättiin 50 µl sisäistä standardia. Liuos pipetoi-  
ttiin GC-putkiin pieniin lasi-insertteihin, sitten näyte oli valmis ajettavaksi.

## 5.7 Piikkien tulkinta

Jokaisessa GC-ajossa ajettiin mukana standardiseos (Bacterial fatty acid methyl ester mix, Supelco), joka sisälsi 26 bakteerirasvahappoa ja vertailukanta (*Stenotrophomonas maltophilia*), jonka rasvahappokoostumus tunnetaan sekä nollanäyte, joka oli milli-Q vettä ja käsitelty kuten tavalliset näytteet. Näytteisiin oli lisätty sisäistä standardia 19:0, jonka avulla määritettiin kullekin piikille suhteellinen retentioaika. Näin saaduista retentioajoista saatiin vertailukelpoiset.

Jokaisesta kannasta ajettiin neljä näytettä, kaksi huoneenlämpötilassa kasvatetuista ja kaksi + 4 °C:ssa kasvatetuista soluista. Näiden näytteiden kromatogrammien (ks. liite 4) retentioaikoja vertailtiin ja poistettiin piikit, joita ei löytynyt kaikista kyseessä olevan kannan kasvatuksista. Näytteistä laskettiin myös piikkien pinta-ala -%. Vertai-

lusta poistettiin myös nollanäytteessä olleet piikit ja alle 0,5 prosenttia koko pinta-alasta olevat piikit.

Ajetun standardin ja vertailukannan piikkien retentioaikoja vertailtiin näytteiden piikkien retentioaikoihin. Näytteen piikit pystyttiin nimeämään standardin ja vertailukannan piikkien avulla.

## 6 Tulokset

### 6.1 Tutkittujen kantojen PLFA-koostumus

Tutkin rasvahappojen PLFA-koostumusta eri lajien kannoista. Useista kannoista löytyi suoraketjuisia tyydyttyneitä (14:0, 16:0), kaksoissidoksellisia (16:1 w7/cis9, 16:1 w7/cis 10, 18:1), haaroittuneita (i-15:0, i-17:0) ja rengasrakenteisia rasvahappoja (c-17:0 ja c-19:0) (ks. taulukko 5). Rengasrakenteita löytyy kannoista A1T6, K2Li3, R5E1, R5TW3 ja S3B2. Hydroksirasvahappoja ei todettu yhdessäkään kannassa, vaikka näitä on todettu usean kannan koko solun rasvahappokoostumuksessa (ks. liite 1). OH-rasvahapot sijaitsevat siis muissa solun osissa kuin fosfolipideissä.

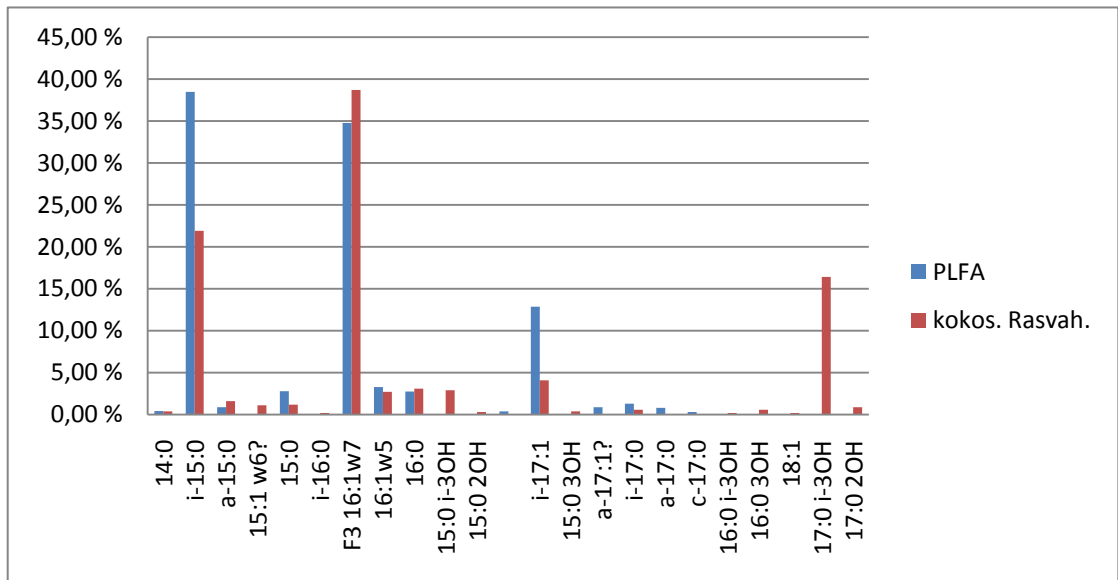
Kantojen *Terriglobus saanensis*, SP1PR4, ja *Mucilaginibacter frigitolerans*, FT22, kromatografiaprofiileja vertailtiin myös aiemmin toisella menetelmällä (koko solun rasvahappokoostumus - FAME) tehtyjen kantojen profiileihin (Männistö ym., 2010; 2011). Aiemmin analysoituja koko solun rasvahappotuloksia on käsitelty eri tavalla kuin nyt mitattuja PLFA-tuloksia. Koko solun rasvahappotuloksissa on poistettu piikit, joiden pinta-alaprosentti on alle 0,3 ja PLFA-tuloksia käsiteltäessä on jätetty pois piikit joiden pinta-alaprosentti on alle 0,5. Koko solun rasvahappo piikkejä näkyy FT22-vertailussa (ks. kuvio 9) ja SP1PR4-vertailussa (ks. kuvio 10) enemmän kuin vastaavia PLFA-piikkejä, mikä voi johtua siitä että PLFA-piikki on ollut niin pieni, että se on karstiutunut pois, tai että rasvahappo on fraktioitunut eri faasiin. Kannalla FT22 näkyy koko solun rasvahappo piikeissä hydroksyylipiikit, jotka PLFA-uuton fraktioinnissa menevät muihin faaseihin kuin fosfolipidifaasiin.



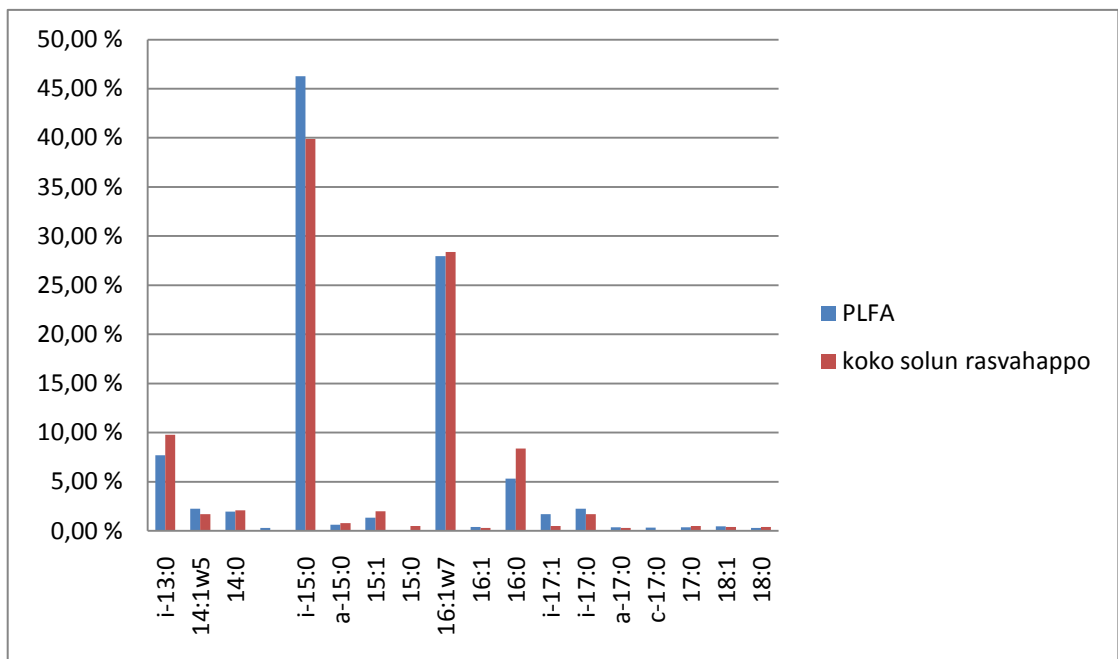
TAULUKKO 5. Taulukossa on kuvattu yleisimpiä rasvahappoja ja niiden PLFA-rasvahappojen suhteellista osuutta tutkituista kannoista.

rasvahappo	PLFA							
	A1T6	S3B2	K2C9	FT22	K2Li3	R5E1	R5TW3	SP1PR4
14:0		0,7 %	0,7 %				1,5 %	2,0 %
15:0				2,8 %				
16:0	0,7 %	29,1 %		2,8 %	35,1 %	15,9 %	20,3 %	5,3 %
17:0					0,7 %	1,8 %		
18:0						1,0 %	7,3 %	
14:1w5								2,3 %
15:1								1,3 %
F3 16:1 w7/cis9	1,9 %	4,0 %	62,3 %	34,9 %	23,7 %	4,1 %	27,9 %	28,0 %
16:1 w7/cis 10	0,9 %	2,8 %	6,8 %	3,3 %				
17:1w8		46,8 %					0,8 %	
18:1	1,9 %	13,3 %			5,6 %	13,9 %	39,5 %	0,5 %
i-13:0								7,7 %
i-15:0	5,8 %		22,4 %	38,6 %				46,3 %
i-16:0	16,9 %		1,7 %					
i-17:0	11,9 %			1,3 %				2,3 %
i-17:1	32,1 %		1,3 %	12,9 %				1,7 %
a-15:0	12,2 %		3,1 %	0,9 %				0,6 %
a-17:0	7,5 %			0,8 %				
c-17:0	0,5 %				32,9 %	34,7 %		
c-19:0		1,7 %				25,7 %	0,8 %	
15:0 2OH								
15:0 3OH								
16:0 3OH								
17:0 2OH								
i-15:0 3OH								
i-17:0 3OH								

Kuviosta 9 voidaan huomata selvästi erot hydroksyyllirasvahapoissa. PLFA-menetelmällä tehdyssä profiilissa ei ole OH-ryhmiä, joten nämä ryhmät sijaitsevat muissa solun lipideissä. Muutenkin FAME- ja PLFA-profiilit poikkeavat toisistaan: joidenkin rasvahappojen suhteellinen määrä vaihtelee huomattavasti (esim. i-15:0).



KUVIO 9. Huoneenlämmössä kasvatetun kannan FT22 PLFA:jen ja koko solun rasvahappojen (Männistö ym., 2010) profiilien vertailu.

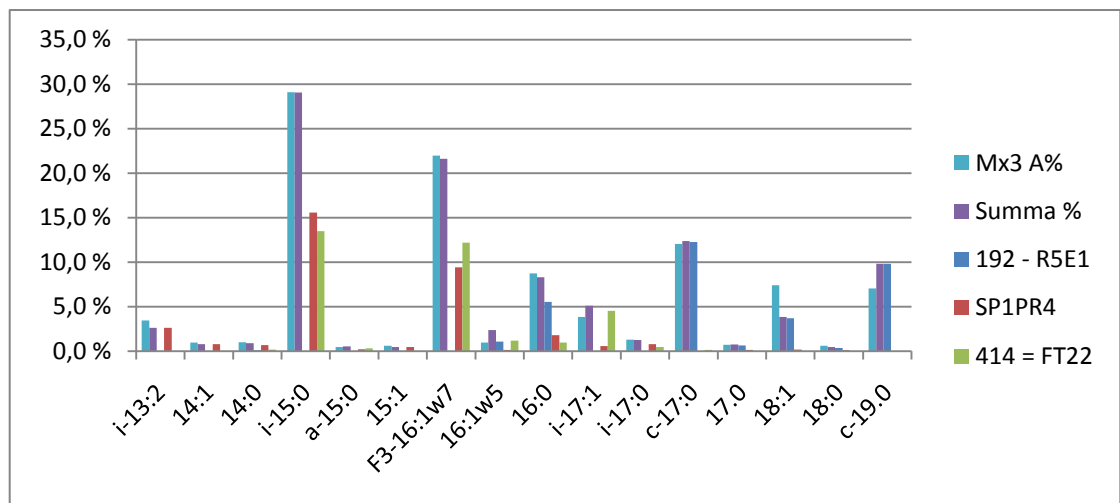


KUVIO 10. Huoneenlämmössä kasvatetun kannan SP1PR4 PLFA-profiilin ja koko solun rasvahappoprofiilin vertailu.

Acidobacteria ryhmän bakteereilla, kuten SP1PR4 koko solun rasvahappokoostumus on hyvin samankaltainen kuin PLFA-koostumus (ks. kuvio 10). Tämä on osoitus siitä, että eri menetelmillä, PLFA:n ja koko solun rasvahappouutto, voivat olla vertailukelpoisia. Toisaalta Bacterioidetes ryhmän bakteerit, kuten FT22, sisältävät runsaasti

OH-rasvahappoja, jotka sijaitsevat muualla kuin fosfolipideissä ja koko solun sekä PLFA rasvahapot poikkeavat merkittävästi toisistaan.

Seos Mx3 tehtiin kannoista R5E1, FT22 ja SP1PR4, jotka kasvatettiin liemessä seosta varten. Seosten konsentraatiot tarkistettiin DNA- ja proteiininimenetelmillä. Molemmat tulokset näyttivät, että kantoja oli suhteessa yhtä paljon. Joten näistä kannoista tehtiin seos pipetoimalla kutakin näytettä yhtä paljon.



KUVIO 11. Seoksen Mx3 profiili verrattuna erikseen ajettujen kantojen profiilien summaan.

Kuviosta 11 nähdään, että seoksen koostumus on likimäärin sama, kuin yksittäisten rasvahappojen summa. Nämä rasvahapot siis uuttuvat samalla tavalla, uutettiinpa ne erikseen tai samassa seoksessa. Voitaisiin siis olettaa, että tuntematonta maanäytettä analysoitaessa rasvahapot uuttuvat samalla tavoin kuin erikseen kasvatettuna ja näin ollen voivat ilmaista maaperän olosuhteita ja mahdollisia bakteerien sukuja. Rasvahappotulosten suhteelliset pitoisuudet näyttävät toimivan tässä hyvin.

## 6.2 Markkerit

Rengasrakenteita löytyy kannoista A1T6, K2Li3, R5E1, R5TW3 ja S3B2 (ks. taulukko 5). Rengasrakenteisia rasvahappoja pidetään markkerina solun stressitilalle.

Iso- ja anteisorasvahappoja pidetään markkereina Gram-positiivisille lajeille. Iso- ja anteisorasvahappoja löytyi kannoista A1T6, K2C9, FT22 ja SP1PR4, mutta nämä ovat gram-negatiivisia. Gram-positiivisuutta ei siis voida osoittaa iso- ja anteisorasvahappojen perusteella. Kannoista K2Li3, R5E1, R5TW3 ja S3B2 näitä iso- ja anteisorasvahappoja ei löytynyt. Nämä ovat myös gram-negatiivisia, eli kaikki tutkitut kannat ovat gram-negatiivisia.

### 6.3 Lämpötilan vaikutus PLFA-koostumukseen

Usean kannan (K2Li3, R5E1, S3B2) piikeistä nähdään esimerkiksi, että lämpötilan noustessa rasvahappopiikit 16:1 ja 18:1 pienenevät (ks. taulukko 6) ja piikit c-17:0 ja c-19:0 kasvavat (ks. liite 5). Tämä johtuu siitä, että rasvahapot 16:1 ja 18:1 ovat prekursoreita rasvahapoille c-17:0 ja c-19:0 rasvahapoille, eli syklopropanirasvahapot syntetisoidaan suoraketjuisista rasvahapoista.

Syklopropanirasvahappojen uskotaan ilmaisevat stressiä bakteerissa esimerkiksi olosuhteiden takia, joten kun huoneenlämmössä kasvaneilla kannolla havaittiin syklopropanirasvahappoja (kannat K2Li3, R5E1, S3B2), niiden voidaan olettaa kärsivän stressioireista.

Lämpötilan laskiessa solumembraanissa olevia tyydyttyneitä suoraketjuisia rasvahappoja muuttuu tyydyttymättömään muotoon. Muutosta tapahtuu esimerkiksi kannoilla K2Li3, R5E1, R5TW3, S3B2, FT22 ja SP1PR4. Samankaltaista muutosta näkyi myös iso-rasvahapolla. Kannan A1T6 rasvahapon i-17:0 määrä väheni alhaisessa lämpötilassa samalla kun rasvahapon i-17:1 määrä kasvoi.

Iso- ja anteisoisomeerien välisiä muutoksia näkyi esimerkiksi rasvahapoissa i-15:0 ja a-15:0. Alhaisessa lämpötilassa iso-rasvahappojen määrä oli pienempi ja anteisorasvahappojen määrä suurempi kuin huoneenlämmössä (kannat A1T6, K2C9).

TAULUKKO 6. Muutokset lämpötilan muuttuessa huoneen lämmöstä (20 °C) kylmempään (4 °C).

	A1T6	K2C9	K2Li3	R5E1	R5TW3	S3B2	FT22	SP1PR4
14:1w5								<
14:0								>
i-15:0	>	>>					>	>>
a-15:0	<	<						
i-16:0	>							
F3 16:1w7	<	<<	<<<	<<<<	<	<<<	<	<<
16:1w5								<
16:0			>>	>	>>	>>	>	>
i-17:1	<<<							
a-17:1	>							
i-17:0	>							>
a-17:0	>							
c-17:0			>>	>>>>		>>		
18:2/a-18:0	>							
18:1 trans9 + cis11	>		<	<<<	<<	<		
18:1	>							
18:0					>	>		
c-19:0				>>>		>		

Taulukossa 6 on ilmaistu rasvahappokonsentraation muutos huoneenlämmössä (20 °C) kylmähuoneessa (4 °C) kasvatettujen välillä. Nuolien lukumäärä ilmaisee muutoksen voimakkuutta ja suunta ilmaisee muutosta huoneenlämmöstä kylmempään, seuraavasti:

< = rasvahapon konsentraatio kasvaa kylmemmässä vähän paremmin

<< = kasvaa liki 10 yksikköä

<<< = kasvu yli 20 yksikköä

<<<< = kasvu yli 30 yksikköä

> = pienenee vähän (alle 5 yksikköä)

>> = pienenee n. 10 yksikköä

>>> = pienenee n. 20 yksikköä

>>>> = pienenee n. 30 yksikköä

## 7 POHDINTA

Tutkimuksessa selvitettiin muutamien kantojen (ks. liite 1) fosfolipidirasvahappoprofiili. Kantojen FT22 ja SP1PR4 PLFA-profiileja verrattiin koko solun rasvahappo - profiileihin. Profiileja vertailemalla todettiin, että kannan SP1PR4 FAME-profiili on likimain samanlainen kuin PLFA-profiili, eli nämä ovat vertailukelpoisia menetelmien eroista huolimatta. Kannan FT22 FAME- ja PLFA-profiileissa taas oli huomattavan paljon eroja. Kannan FT22 FAME-profiilissa oli hydroksyyliipukkejä, jotka menevät muihin kuin fosfolipidifaasiin, sillä näitä ei löytynyt PLFA-profiilista. Lisäksi piikkien suhteellisessa koossa oli poikkeavuuksia, eli tämä kanta ei uutuu samalla tavoin FAME- ja PLFA-menetelmillä. Jotkin kannat siis uuttuvat samalla lailla molemmilla menetelmillä. Toisilla kannoilla osa rasvahapoista ei näy PLFA-menetelmällä ollenkaan ja joidenkin suhteellinen määrä poikkeaa koko solun rasvahappo –menetelmällä tehdystä määrittämisestä.

Kantojen R5E1, FT22 ja SP1PR4 profiilien summaa verrattiin samoista kannoista tehtyyn seokseen. Seoksen profiili vastasi hyvin paljon erillisten kantojen summan profiilia. Tästä tuloksesta voitaisiin olettaa, että tuntemattoman seoksen PLFA-profiili kuvastaa hyvin seoksessa olevien näytteiden yhteenlaskettua suhteellista määrää.

Lämpötilan nostaminen näyttää tulosten valossa lisäävän syklopropanirasvahappoja c-17:0 ja c-19:0 ja vähentävän rasvahappoja 16:1 ja 18:1. Rasvahapot 16:1 ja 18:1 ovat esiaste rasvahapoille c-17:0 ja c-19:0, jolloin toisen pienentyessä toinen kasvaa. Syklopropanirasvahappojen voidaan olettaa ilmaisevan solun stressiä. Tästä voitaisiin päätellä, että solut ovat sopeutuneempia kylmempään lämpötilaan ja stressaavat lämpimämmässä. Myös rasvahappojen i-15:0 ja 16:0 huomattiin vähenevän lämpötilan laskiessa. Lämpötilan laskiessa solun entsyymitoiminta vähentää tyydyttyneiden rasvahappojen määrää pitääkseen yllä solumembraanin toimintaa. Pitämällä membraanin joustavana solu ylläpitää kykyä välittää ravinteita. Tyydyttymättömät rasvahapot säilyvät lämpötilaa laskettaessa pidempään juoksevana kuin tyydyttyneet.

## LÄHTEET:

Björk, R., Björkman, M., Anderson, M. ja Klemedtsson, L. 2008. Soil Biology & Biochemistry 40, 266 - 268.

Frostegård, Å., Tunlid, A., Bååth, E. 1993. Phospholipid Fatty Acid Composition, Biomass, and Activity of Microbial Communities from Two Soil Types Experimentally Exposed to Different Heavy Metals. Applied and Environmental Microbiology, 59, 11, 3605 - 3617

Jaarinen, S. Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 140 - 202

Kaasukromatografia. n.d. Opetushallitus

[http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat\\_2-5\\_kaasukromatografia.html](http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-5_kaasukromatografia.html). Viitattu 21.1.2010

Leckie, S. 2005. Methods of microbial community profiling and their application to forest soils. Forest Ecology and Management 220, 88 - 106

Moat, A., Foster, J. 1995. Microbial physiology, New York, NY: Wiley, 1995

Mortimer, C. 1997. Kemia. Gummerus Kirjapaino Oy. Opetushallitus. 333

Männistö, M. 2001. Microbiology and In Situ Bioremediation Potential of Boreal Chlorophenol Contaminated Groundwater. Tampereen teknillinen korkeakoulu. Julkaisu 318. 17 - 18

Männistö, M., Puhakka, J. 2001. Temperature- and growth-phase-regulated changes in lipid fatty acid structures of psychrotolerant groundwater Proteobacteria. Arch Microbiol 177, 41 - 46.

Männistö, M. ja Häggblom, M. 2006. Characterization of psychrotolerant heterotrophic bacteria from Finnish Lapland. Systematic and Applied Microbiology 29, 229 - 243.

Männistö, M., Tirola, M ja Häggblom M. 2007. Bacterial communities in Arctic fjelds of Finnish Lapland are stable but highly pH-dependent. FEMS Microbial Ecol 59, 452 - 465.

Männistö, M. Eskelinen, A. ja Stark, S. 2009. Links between plant community composition, soil organic matter quality and microbial communities in contrasting tundra habitats. 2009. Oecologia 161, 113 - 123.

Männistö, M., Tirola, M., McConnell, J. ja Häggblom M. 2010. *Mucilaginibacter frigitolerans* sp. nov., *Mucilaginibacter lappiensis* sp. nov and *Mucilaginibacter mallensis* sp. nov., isolated from soil and lichen samples. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60, 2849 - 2856.

- Männistö, M., Rawat, S., Starovoytov, V. ja Häggblom M. 2011 . *Terriglobus saanensis* sp. nov., a novel *Acidobacterium* isolated from tundra soil of Northern Finland. sgmjournals.
- Paul, E. 2007. Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry. Third edition. 62.
- Petersen, S. ja Klug, M. 1994. Effects of Sieving, Storage, and Incubation Temperature on the Phospholipid Fatty Acid Profile of a Soil Microbial Community. Applied and environmental microbiology. 2421 – 2430.
- Ratledge, C., Wilkinson S. 1989. Fatty acids, related and derived lipids. In Microbial Lipids 1, 23 - 53.
- Russell, N. 1984. Mechanisms of thermal adaptation on bacteria: blueprints for survival. TIBS 108 - 112
- Sinensky, Michael. 1974. Homeoviscous Adaptation – A Homeostatic Process that Regulates the Viscosity of Membrane Lipids in *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 71, 2, 522 - 525.
- Tast, J.; Tyrväinen, H.; Nyberg, T.; Leinonen, M. 1999. Koulun biologia, Lukio 4, Solubiologia ja biotekniikka.
- Vestal, J. ja White D. 1989. Lipid Analysis in Microbial Ecology. Quantitative approaches to the study of microbial communities. BioScience, 39, 535 - 541.
- Welch, D. 1991. Applications of Cellular Fatty Acid Analysis. Clinical Microbiology Reviews 4, 4, 422 - 438.
- Zelles L. 1997. Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. Chemosphere 35, 275 - 294.
- Zelles, L. 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil. Biol Fertil Soils 29, 111 – 129.



## LIITTEET

### Liite 1. Kannat

Fyyla	kanta	identifikaatio	rasvahappotyyppe	ARMI nro
Acidobacteria	SP1PR4	Terriglobus saanensin	iso/suoraketjuiset C14-C17	
Bacteroidetes	FT22	Mucilaginibacter frigitolerans	iso/anteiso, suoraketjuiset	414
	K2C9	Pedobacter sp.	iso/anteiso, suoraketjuiset	
Alfaproteobakteeri	R5TW3	Sphingomonas sp.	suoraketjuiset, 14:0-2OH	202
	MP5aCTX6	Caulobacter sp.		526
Betaproteobacteria	K2Li3	Janthinobacterium sp.	suoraketjuiset, OH	73
	R5E1	Burkholderia sp.	suoraketjuiset, OH	192
Gammaproteobacteria	A1T6	Rhodanobacter sp.	iso/anteiso, OH	18
	S3B2	Pseudomonas sp.	suoraketjuiset, OH	274
Firmicutes	S5R4	Bacillus sp.	iso/anteiso	316

Liite 2. Valmistusohjeita.

**R2A Agar, Composition (g/l) (Koostumus):**

Proteose peptone, 0.5  
 Casamino acids, 0.5  
 Yeast extract, 0.5  
 Dextrose, 0.5  
 Soluble starch, 0.5  
 Dipotassium phosphate, 0.3  
 Magnesium sulfate 7H<sub>2</sub>O, 0.05  
 Sodium pyruvate, 0.3  
 Agar, 15  
 Final pH 7.2 ± 0.2 (25 °C)

**GY-liemen valmistus:**

glukoosi 1g  
 hiivauute 0,2g  
 VL55x1 pH5,5 1000ml  
 jaettiin 60ml/erlenmeyer autoklavoitiin

**Fosfaattipuskuri (50 mM)**

8,7 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 1 l MQ-vettä

Säädettiin pH=7,4 6M HCL (kulutusta vaikea arvioida, ehkä 1-2ml, ohjeessa oli 3,5ml mutta se oli aivan liikaa) Ohjeessa neuvottiin uuttamaan kloroformilla puhtauden varmistamiseksi, mutta se jätettiin väliin.

**Blight & Dyer uuttoseos:**

Kloroformi	100ml
Metanoli	200ml
Fosfaattipuskuri	80ml

**Piihappokolonni**

Laitettiin lasi villaa poltetun lasisen pasteurpipetin pohjalle. Päälle kaadettiin n. 0,5 ml kuivattua piihappoa. Kolonnit peiteltiin foliolla odottamaan fraktiointia.

Piihappo-kolonni: Pitkään (230mm) lasiseen pasteur-pipettiin laitettiin lasivilla tuppoo ja punnittiin kuivattua(100 astetta vähintään tunti) piihappoa 0,5 g. Laitettiin folio suuaukon suojaksi.

### Liite 3. Työohje

#### Fosfaattipuskuri (50 mM)

8,7 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1 l MQ-vettä

Säädetään pH=7,4 6M HCL.

#### Blight & Dyer uutoseos:

Kloroformi	100ml	tai	150ml
Metanoli	200ml		300ml
Fosfaattipuskuri	80ml		120ml

#### Lipidiuutto

- Huuhdellaan (10 ml) Blight & Dyer uuttoliuoksella näyte 40 ml uuttoputkiin.  
/otetaan ympäri pois siirrostussilmukalla ja huuhdellaan 2,1 ml fosfaattipuskurilla fuugiputki. Laitetaan näyte uuteen 40 ml lasiseen uuttoputkeen ja lisätään 7,9 ml metanoli-kloroformi –seosta.
- Ravistellaan 2 h huoneenlämmössä
- Fuugataan tarvittaessa 1500 rpm/5 - 10 min ja dekantoidaan liemi pois uuteen 40 ml putkeen
- Lisätään (5 ml) uuttoliuosta ensimmäiseen putkeen ja ravistellaan näytettä ½h
- Fuugaa tarvittaessa ja siirrä liemi samaan putkeen kuin edellä
- Lisää uutoksiin 4 ml kloroformia ja 4 ml vettä
- Fuugataan ja annetaan erottua yön yli /4 astetta
- Pipetoi alin faasi ja suodata se kierrekorkilliseen koeputkeen.
- Haihduta liuotin pois typpivirrassa. Käytä lämpölevyä haihtumisen nopeuttamiseksi (n.25 astetta)
- Pakasta näyte seuraavaa vaihetta varten.

#### Fraktiointi

- Liuota näyte 200 µl kloroformiin, vorteksoidaan n.15s
  - pipetoidaan näyte huolellisesti pihappo-kolonneihin
  - Pestään koeputki 100µl kloroformia ja lisätään tämä kolonneihin. Pipetoidaan kolonnin näyte niin huolellisesti kuin mahdollista, käytetään esim. samaa pipetinkärkeä 1. ja 2. satsin pipetoimiseen.
  - Eluoi
 

1. Neutraalit lipidit	-kloroformilla	5 ml
2. Glykolipidit	-asetonilla	10 ml
3. Fosfolipidit	-metanolilla	5 ml
  - Kerää kaikki fraktiot puhtaisiin koeputkiin ja haihdutetaan liuotin fosfolipideistä typpivirrassa.
- Pakastetaan näyte tarvittaessa ja pakasta muut fraktiot talteen.

## Metanolyysi

Tarvitaan:

1. 0,2 M KOH metanolissa, valmistetaan juuri ennen käyttöä! Punnitaan 0,28 KOH ja liuotetaan 25 ml metanoliin.
2. 1 N etikkahappo: 5,72 ml väkevää etikkahappoa laimennettiin 100 ml:ksi MQ-vedellä
3. Tolueeni:metanoli 1:1 ;Sekoitettiin 100 ml kumpaakin
4. Heksaani:kloroformi 4:1 ;200 ml heksaania ja 50 ml kloroformia (mittalaseilla)
5. Sisäinen standardi 19:0 50 pmol/ml -kantaliuos: 100x kantaliuos (156 mg/100 ml), valmistettiin 25 ml erä johon punnittiin 39mg "standardia"
6. Vesihaude 37 astetta
7. MQ-vesi

- Liuota näytteet 1 ml tolueeni:metanoliin (1:1)
- Lisää 1 ml KOH liuosta, vorteksoi hetki ja laita vesihauteeseen 15 min
- jäähdytä putket huoneenlämpöiseksi
- Lisää 2 ml heksaani:kloroformi -liuosta, sekoita(vorteksoi kevyesti, tai sekoita ravistelijassa)
- Neutraloi näytteet 200 ul etikkahapolla (1N). Tarkista pH tiputtamalla pieni pisara pH paperille.
- Lisää 2 ml MQ ja sekoita 1 min
- Fuugaa 5 min/3000 rpm (pöytäfuugissa)
- Siirrä ylempi faasi puhtaaseen koeputkeen
- uuta alempi faasi uudelleen 2 ml heksaani:kloroformilla, sekoita 1 min ja fuugaa
- Siirrä ylempi faasi samaan putkeen kuin 1. uutoksen faasi
- Haihduta liuotin pois typpivirrassa
- Pakasta

## Kaasari analyysi:

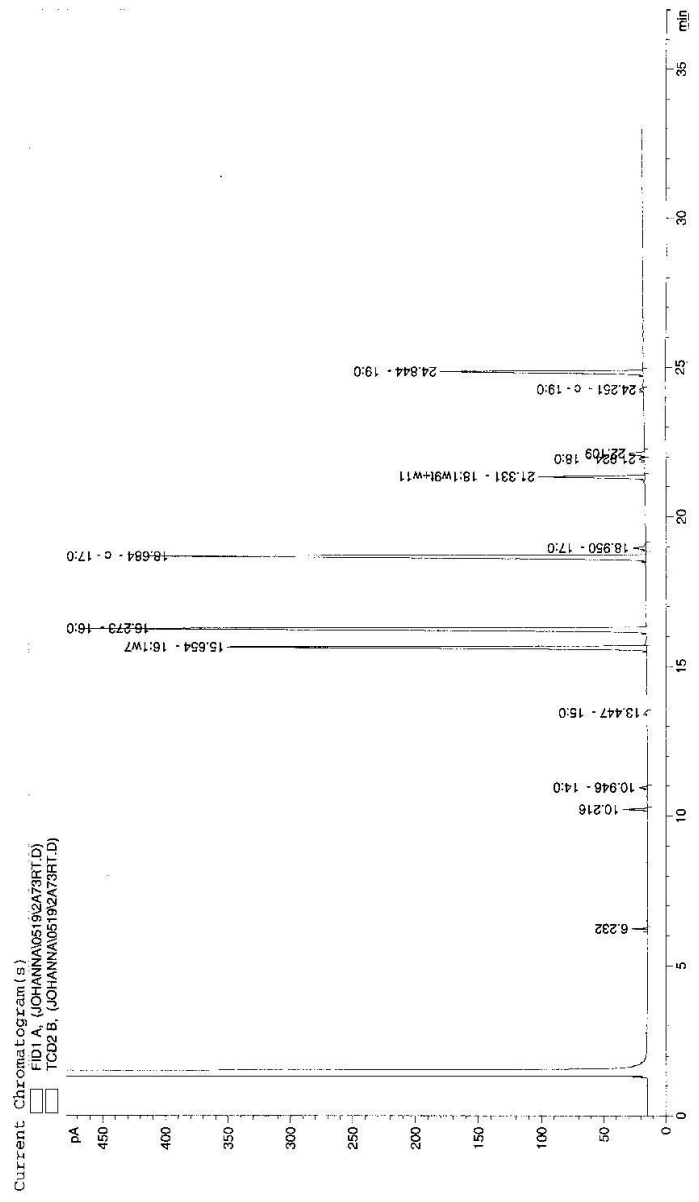
- Liuota näyte 450ul heksaania ja lisää 50 µl sisäistä standardia, vorteksoi 5 – 10 s.
- Pipetoi koko näyte GC-putkeen. (Lisää putkiin sisäputki-insertit tarvittaessa.)
- Sulje pullo alumiinikorkilla.

Liite 4. Kromatogrammeja.

Print of window 38: Current Chromatogram(s)  
=====

Injection Date	: 20.5.2010 2:48:14	Seq. Line	: 25
Sample Name	: 2A73 RT	Location	: Vial 23
Acq. Operator	: Johanna	Inj	: 1
		Inj Volume	: 1 µl

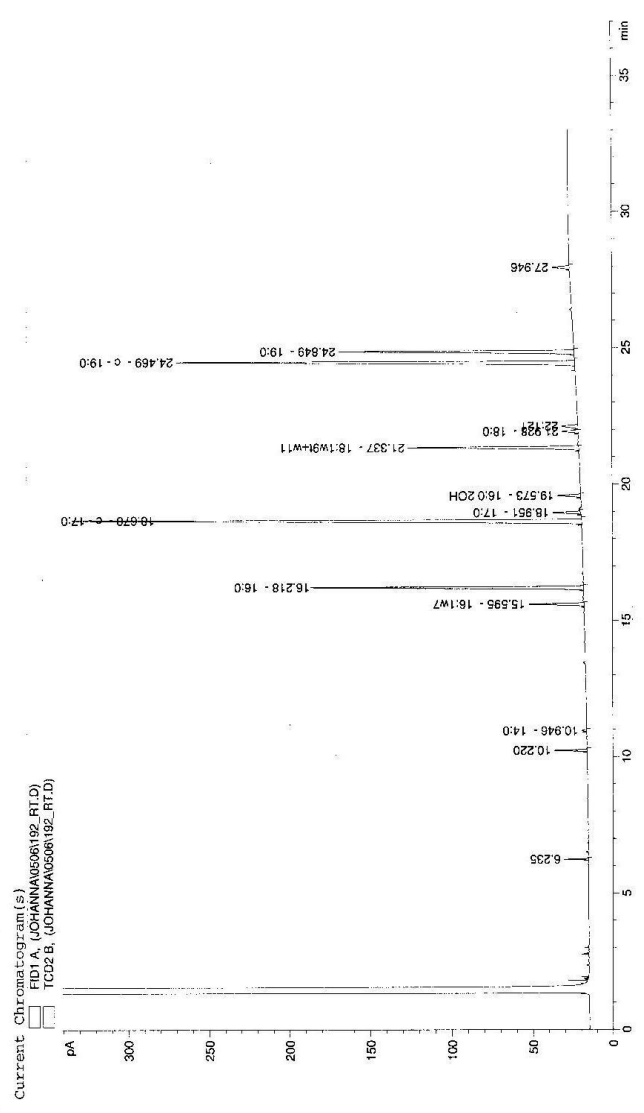
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\MINNA\FAME10\_2.M  
Last changed : 12.5.2010 11:42:26 by minna  
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\MINNA\FAME10\_4.M  
Last changed : 10.6.2010 13:35:52 by minna  
Phospholipid fatty acid methyl esters



Print of window 38: Current Chromatogram(s)  
=====

Injection Date	: 6.5.2010 21:05:17	Seq. Line	: 9
Sample Name	: 192_RT	Location	: Vial 9
Acq. Operator	: Johanna	INJ	: 1
		Inj Volume	: 1 µl

Acq. Method : C:\PROGRAMS\METHODS\MINNA\FAME10\_2.M  
Last changed : 4.2.2010 10:07:14 by Johanna  
Analysis Method : C:\PROGRAMS\METHODS\MINNA\FAME10\_4.M  
Last changed : 10.6.2010 13:35:52 by minna  
Phospholipid fatty acid methyl esters



Liite 5. Kantojen lämpötilavertailu. RT = + 20 °C ja 4C = + 4 °C.

