

# MIKROBITOKSIINIT SISÄILMAN LASKEUMAPÖLYSSÄ

Riikka Paananen  
2011  
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

# MIKROBITOKSIINIT SISÄILMAN LASKEUMAPÖLYSSÄ

Riikka Paananen  
Opinnäytetyö  
28.3.2011  
Laboratorioalan koulutusohjelma  
Oulun seudun ammattikorkeakoulu

Koulutusohjelma	Opinnäytetyö	Sivuja	+	Liitteitä
Laboratorioalan koulutusohjelma	Opinnäytetyö	61	+	6
Suuntautumisvaihtoehto	Aika			
Laiteanalytiikka	Kevät 2011			
Työn tilaaja	Työn tekijä			
Kemian laitos, Inspector Sec	Riikka Paananen			
Työn nimi				
Mikrobitoksiinit sisäilman laskeumapölyssä				
Avainsanat				
LC-ESI/MS, mikrobitoksiini, sian siittiötesti				

Kosteusvauriorakennusten mikrobisto voi sisältää myrkyntuottajamikrobeja. Esiintyvät mikrobit voivat tuottaa hyvin myrkyllisiä aineita, kuten valinomysiinia, kereulidia ja amyloosiinia. Tutkittavat aineet ovat biomolekyyliä, hyvin usein peptidejä. Aineille ei ole olemassa standardien mukaista määrittämenetelmää.

Työn tavoitteena oli määrittää kosteusvauriorakennuksesta kerätystä pölystä ja siitä kasvatetuista mikrobeista mahdollisia myrkyllisiä kemiallisia rakenteita ja luoda määrittämenetelmä, jolla voitaisiin tutkia myrkyjä. Mikrobiuutosten myrkyllisyys määritettiin ensin sian siittiötestillä, ja tämän jälkeen myrkyllisten uutosten rakennetta tutkittiin LC-MS-laitteistoilla.

Työssä ei päästy menetelmänkehitysvaiheeseen, mutta yhden mikrobiuutoksen kolmesta fraktiosta saatiin aminohapporakennetta sen verran selville, että kaksi niistä voisi olla pumilacidinia ja yksi mahdollisesti jotain vielä tunnistamatonta ainetta. Tulokset jäivät kuitenkin varmistamatta.

## ALKULAUSE

Tein opinnäytetyön Oulun yliopiston kemian laitokselle ja Inspector Secille, joka toimi yhteistyössä kemian laitoksen kanssa. Opinnäytetyön kokeellinen osuus on tehty kemian laitoksen ja Oulun seudun ammattikorkeakoulun laboratorioissa.

Kiitän kemian laitoksella työskentelevää Marena Kajulaa hyvästä ohjauksesta analyysilaitteistojen kanssa. Kiitän myös Oulun seudun ammattikorkeakoulun Pirkko Kekaraista opinnäytetyön ohjauksesta sekä hyvästä opetuksesta kuluneina opiskeluvuosina.

Riikka Paananen

# SISÄLLYS

TIIVISTELMÄ

ALKULAUSE

SISÄLLYS

1 JOHDANTO .....	7
2 KOSTEUSVAURIOSTA AIHEUTUVAT SISÄILMAN ONGELMAT .....	8
3 KOSTEUSVAURIORAKENNUKSEN SISÄILMAN MIKROBIT.....	10
3.1 Bakteerit .....	10
3.1.1 Bakteerien muoto.....	11
3.1.2 Prokaryoottien soluseinä.....	12
3.1.3 Gram-negatiivisen ja -positiivisen bakteerin soluseinä .....	13
3.1.4 Bakteerien itiöt .....	15
3.1.5 Aktinobakteerit .....	15
3.2 Sienet .....	16
4 MIKROBIEN TUOTTAMIA MYRKYLLISIÄ YHDISTEITÄ.....	19
4.1 Valinomysiini .....	20
4.2 Kereulidi .....	21
4.3 Amylosiini .....	22
4.4 <i>Bacillus</i> -toksiinit.....	23
4.5 Mykotoksiinit ja peptaibolit.....	24
5 MIKROBINÄYTTEEN KÄSITTELY- JA TUTKIMUSMENETELMIÄ.....	26
5.1 Puhdasviljelmän teko.....	26
5.2 Elatusaineet.....	27
5.3 Mikrobin värjäys .....	30
5.3.1 Gram-värjäys .....	30
5.3.2 Muita värjäysmenetelmiä .....	31
5.4 Valomikroskopointi .....	31
5.5 PCR-tekniikka.....	32
6 MIKROBIMYRKKYJEN TUTKIMUSMENETELMIÄ .....	34
6.1 Solutestit.....	34
6.1.1 Siittiötesti .....	34

6.1.2	Lymfosyyttitestaus .....	35
6.1.3	Indikaattoribakteerilajit .....	35
6.2	Toksiinien analysointimenetelmiä .....	36
6.2.1	Nestekromatografia .....	36
6.2.2	Massaspektrometria .....	39
6.2.3	Tandem-massaspektrometria .....	43
7	LASKEUMAPÖLYNÄYTTEIDEN TUTKIMINEN .....	45
7.1	Näytteenkäsittely ja -testaus siittiötestillä .....	45
7.2	LC-ESI/MS –analyysi.....	46
7.3	LC-ESI/MS –analyysin tulokset .....	47
7.4	Näyte 11 .....	48
7.4.1	Näytteen 11 fraktioiminen ja fraktionkäsittely .....	50
7.4.2	Näytteen 11 fraktioiden testaus siittiötestillä .....	51
7.5	Rakenteen määrittäminen LC-ESI/TOF-MS/MS:lla .....	51
7.6	LC-ESI/TOF-MS/MS -analyysin tulokset .....	52
8	POHDINTA .....	53
	LÄHTEET .....	55
	LIITTEET .....	61

# 1 JOHDANTO

Rakennusten epäterveellisen sisäilman ajatellaan aiheutuvan kosteusvauriosta, jossa on saanut rauhassa kehittyä mikrobikasvusto. Tällaisessa vauriossa alkavat haitalliset mikrobit pikkuhiljaa vallata tilaa harmittomilta mikrobeilta tuottaen myrkyllisiä aineita. (1.) Aineita voivat olla entsyymi, peptidi, antibiootti tai joku muu proteiini. (2, s. 533.)

Päästessään elimistöön mikrobien tuottamat haitalliset aineet ohjaavat elimistön reaktioita ja voivat aiheuttaa ärsytysoireita, allergiaa ja myrkytysoireita. On tärkeää tunnistaa kosteus- ja mikrobivaurioista aiheutuva sairastumisriski, ennen kuin terveydelliset ongelmat ilmenevät. Tämän vuoksi menetelmien kehittäminen haitallisten mikrobien ja niiden tuottamien yhdisteiden nopeaan havaitsemiseen on tärkeää. (3, s. 3.)

Taloista, joissa epäiltiin olevan kosteusvaurion aiheuttama haitallinen mikrobikasvusto, kerättiin laskeumapölyä. Pölystä viljeltiin TSA-agarille mikrobikasvusto, josta testattiin myrkyllisyys sian siittiötestillä. Myrkylliseksi todetut näytteet tutkittiin tarkemmin nestekromatografia-massaspektrometria –sovellutuksia apuna käyttäen. Tarkoituksena oli löytää uutoksen myrkyllisyyden aiheuttaja selvittämällä sen kemiallista rakennetta ja luoda pohjaa menetelmälle, jolla voitaisiin helposti ja nopeasti löytää myrkyllisyyden aiheuttaja.

## 2 KOSTEUSVAURIOSTA AIHEUTUVAT SISÄILMAN ONGELMAT

Ihminen käyttää vuorokaudessa vähintään 15 000 litraa ilmaa, josta suurin osa on sisäilmaa (16, s. 4). Sisäilma koostuu ilman perusosista. Lisäksi se voi sisältää hiukkasmaisia ja kaasumaisia epäpuhtauksia, jotka ovat peräisin eri lähteistä. (18.) Monet tekijät vaikuttavat sisäilman hyvään laatuun. Tärkeimmät niistä ovat kunnossa olevat rakenteet sekä toimivat ilmanvaihtoja ja lämmityslaitteet. (16, s. 4.) Ilman suhteellinen kosteus, lämpötila, materiaalin kosteus ja aika puolestaan ovat merkittävimmät tekijät, jotka johtavat rakenteiden homehtumisriskiin. Mitä lämpimämpää ja kosteampaa on, sitä nopeammin mikrobit alkavat kasvaa. (14, s. 17.)

Sisäilman mikrobit eli homeet, bakteerit ja hiivat ovat peräisin niin ulkoilmasta kuin sisäilman mikrobilähteistä, joita ovat muun muassa polttopuut, elintarvikkeet, huonekasvit, huonepöly, kotieläimet, ilmankostuttimet ja ihminen itse. Mikrobikasvuston edellytyksenä on, että materiaali on kostea ja siinä on mikrobeja, itiöitä tai vanhaa kasvustoa. Mikrobit ovat vaatimattomia ravinteiden suhteen. Ne voivat käyttää lähes kaikkea eloperäistä materiaalia ravintonaan, ja osa mikrobeista kykenee pysymään hengissä ainoastaan huonepölyllä. Haitallisten mikrobien kasvun voi parhaiten estää pitämällä rakennus kuivana. (19.)

Kosteusvauriossa pesivän mikrobikasvuston mikrobit ja niiden ainevaihduustuotteet voivat levitä sisäilmaan ilmavirtausten mukana ja näin aiheuttaa sisäilman heikkenemistä ja asukkaiden oirehtimista. (17, s. 75.) Oireet voivat olla erilaisia ärsytysoireita, kuten ihon, silmien ja hengitysteiden oirehtiminen. Myös yleisoireita ilmenee, kuten lämpöilyä, väsymystä ja päänsärkyä. Pitkäaikaissairauksia voi myös syntyä, kuten astma. (16, s. 14;17 s. 75.) Sosiaali- ja terveysministeriö on luokitellut indikaattorimikrobeita, joiden läsnäolo kosteusvaurioissa viittaa vakavampaan mikrobiongelmaan. Näitä mikrobeja on esitelty taulukossa 1. (20, s. 39.)



TAULUKKO 1. Kosteusvaurioon viittaavia mikrobeja (20, s. 39)

Kosteusvaurioon viittaavia mikrobeja	
<i>Acremonium*</i>	<i>Geomyces</i>
<i>Aspergillus fumigatus*</i>	<i>Paecilomyces*</i>
<i>Aspergillus ochraceus*</i>	<i>Phialophora</i>
<i>Aspergillus penicillioides/A.restrictus</i>	<i>Scopulariopsis</i>
<i>Aspergillus sydowii*</i>	<i>Sporobolomyces</i>
<i>Aspergillus terreus*</i>	<i>Sphaeropsidales (Phoma)</i>
<i>Aspergillus versicolor*</i>	<i>Stachybotrys*/Memnoniella*</i>
<i>Chaetomium*</i>	<i>Trichoderma*</i>
<i>Eurotium</i>	<i>Tritirachium/Engyodontium</i>
<i>Exophiala</i>	<i>Ulocladium</i>
<i>Fusarium*</i>	<i>Wallemia</i>
<i>Oidiodendron</i>	<i>Aktinomykeetit eli sädesienet*</i>

\* merkatut ovat mahdollisesti toksiineja tuottavia mikrobeja.

Julkisuudessa on paljon keskusteltu myös siitä, että mikrobimyrkyt (home- ja bakteeritoksiinit) voivat olla oireilun osatekijä tai jopa pääsyyllinen. Kosteusvaurioissa kasvaa usein mikrobeja, jotka voivat todistetusti tuottaa erittäin myrkyllisiä yhdisteitä. Käytännössä on huomattu, että sellaisissa taloissa, joissa kasvaa näitä toksiinintuottajamikrobeja, terveyshaitat ovat vakavampia. (20, s. 37.)

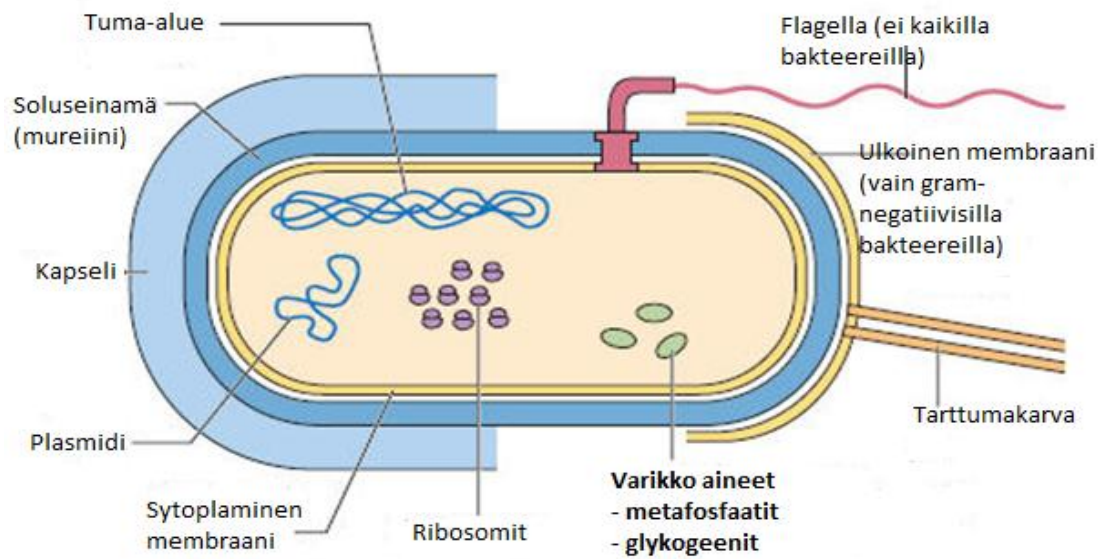
Nykyisin käytetyillä menetelmillä mitataan mikrobien määrää, ja sen mukaan tehdään päätelmät siitä, onko talossa terveydelle haitallista asua. On tapauksia, joissa asukkaat oireilevat, mutta silti mikrobimäärien riskiarvot eivät ylitä, ja toisin päin, mikrobeita löytyy arvot ylittäviä määriä, mutta asukkaat eivät siltikään oirehdi. Tällaisissa tapauksissa sairastumisen syynä voivat olla mikrobetoksiinit yhdessä bakteerien soluseinän osien kanssa. Erilaisissa solukokeissa on todettu, että näiden yhteisvaikutus aiheuttaa massiivisen tulehdusreaktion. Oireiden epäilläänkin olevan monen tekijän yhteisvaikutus. (21.)

## **3 KOSTEUSVAURIORAKENNUKSEN SISÄILMAN MIKROBIT**

Mikrobit ovat mikroskooppisen pieniä eliöitä, joita tavataan kaikkialla maapallolla. Mikrobeita ovat muun muassa bakteerit, sienet, levät, virukset ja alkueläimet. Mikrobien lisääntymiskyky on erinomainen, ja niillä on hyvin voimakas kyky sopeutua erilaisiin oloihin. Mikrobiryhmät ovat erilaisia. Virukset eivät kykene elämään ilman elävää isäntäsolua, toisin kuin bakteerit ja sienet. Sienillä on kalvon erottama tuma, jossa perimäaine sijaitsee, ja näin ollen ne ovat kehittyneempiä kuin bakteerit, joilla kalvon erottamaa tumaa ei ole. Kosteusvauriorakennuksen sisäilman mikrobeista puhuttaessa tarkoitetaan yleensä bakteereita ja sieniä. (36, s. 39.)

### **3.1 Bakteerit**

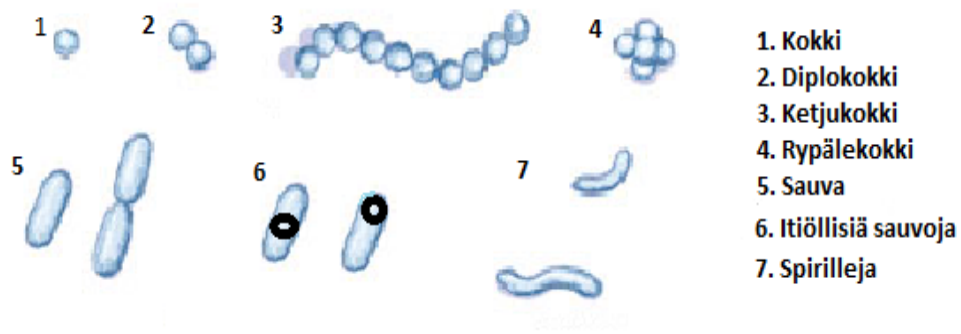
Bakteerit ovat rakenteeltaan yksisoluisia esitumallisia eliöitä eli prokarioteja (kuva 1). Niiden koko vaihtelee 0.1–50 µm:iin ja niillä ei ole kalvon ympäröimää tumaa, vaan DNA on sytoplasmassa. Bakteerit lisääntyvät jakautumalla, joten kasvuvauhti voi olla eksponentiaalinen. Bakteerit sopeutuvat muuttuviin oloihin nopean jakautumiskykynsä vuoksi. Bakteerien aineenvaihdunta voi olla hyvinkin kehittynyttä, vaikka ne ovat rakenteellisesti yksinkertaisia. Tämän vuoksi ne voivat käyttää ravinnokseen melkein mitä tahansa orgaanista ainesta. (4.) Sieniin, kasveihin ja eläimiin verrattuna bakteerit ovat muodoltaan hyvin vaatimattomia, joten niiden luokittelu heimoihin, sukuihin ja lajeihin tehdään muidenkin ominaisuuksien kuin muodon perusteella. Bakteerien tärkeimpiä luokittelutapoja ovat gram-värijäytyvyys, elintavat, biokemialliset ominaisuudet ja DNA:n emäsjärjestys eli sekvenssi. (2, s. 92.)



KUVA 1. Prokaryoottisolun rakenne (31.)

### 3.1.1 Bakteerien muoto

Yleisimmät bakteerien esiintymismuodot ovat pallomainen kokki (*coccus*) ja sylinterimäinen sauva (*bacillus*) (kuva 2). Näiden kahden välimuotoja kutsutaan kokkobasilleiksi. Vibriot ovat käyristyneitä, pilkunmuotoisia sauvoja. Pitkät, kapeat ja korkkiruuvinmuotoiset bakteerit ovat spirokeettoja. Näistä pienempi muoto on spirilli. Mikroskoopilla katsottaessa voidaan huomata bakteerien ryhmittyneen tietyllä tavalla. Kokkeja, jotka esiintyvät kaksittain, kutsutaan diplokokkeiksi. Kokit voivat myös muodostaa rykelmiä, jolloin niitä kutsutaan rypälekokeiksi. Ketjuja muodostavat kokit ovat ketjukokkeja. (32, s. 20–21.)



*KUVA 2. Bakteerin erilaisia muotoja (37.)*

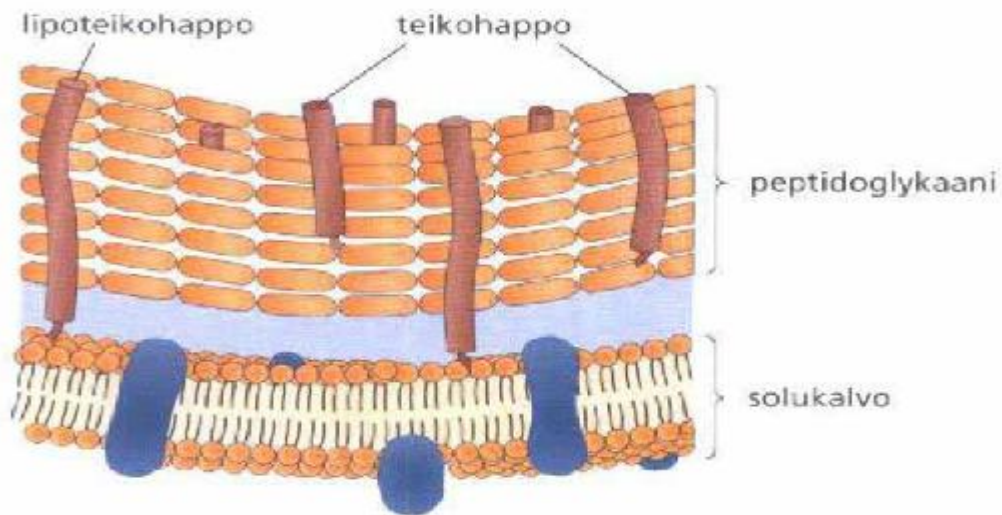
Joillakin bakteereilla on ulokkeita, joiden tehtävänä voi esimerkiksi olla tarttuminen elottomiin pintoihin tai toisiin eliöihin. Bakteerisolujen erilainen muoto ei ole sattumanvaraista, vaan niillä on ekologinen peruste. Kokit ovat pallomaisen muotoisia ja sietävät paremmin kuivuutta kuin sauvat. Sauvoilla puolestaan on enemmän pintaa yksikkötilavuutta kohden, ja näin ollen kykenevät nopeammin ottamaan ravinteita laimeista liuoksista. (2, s. 97–98)

### **3.1.2 Prokaryoottien soluseinä**

Prokaryoottisolulla on solukalvon ulkopuolella kerroksia, joita kutsutaan solukuoreksi tai -seinäksi. Soluseinän tarkoituksena on antaa solulle muoto ja mekaanista lujuuutta. (2, s. 98) Peptidoglykaanipolymeeri eli mureiini on bakteerien soluseinän keskeisin materiaali. Vuorottelevien N-asetyyli-glukosamiin (NAG)- ja N-asetyyli-muramiinihappoyksiköiden (NAM) muodostama ketju toimii peptidoglykaanin perusrunkona. Ketjujen välillä on ristisidoksina peptidiosia. Tavanomaisesta poikkeavat aminohapot tekevät sillat resistenteiksi proteaaseille, kuten diaminopimeeli-happo. Gram-positiivisilla bakteereilla on peptidisilloissaan usein viidestä glysiinistä koostuva jakso. Tämä jakso yleensä puuttuu gram-negatiivisilta bakteereilta. (6, s. 11–12.)

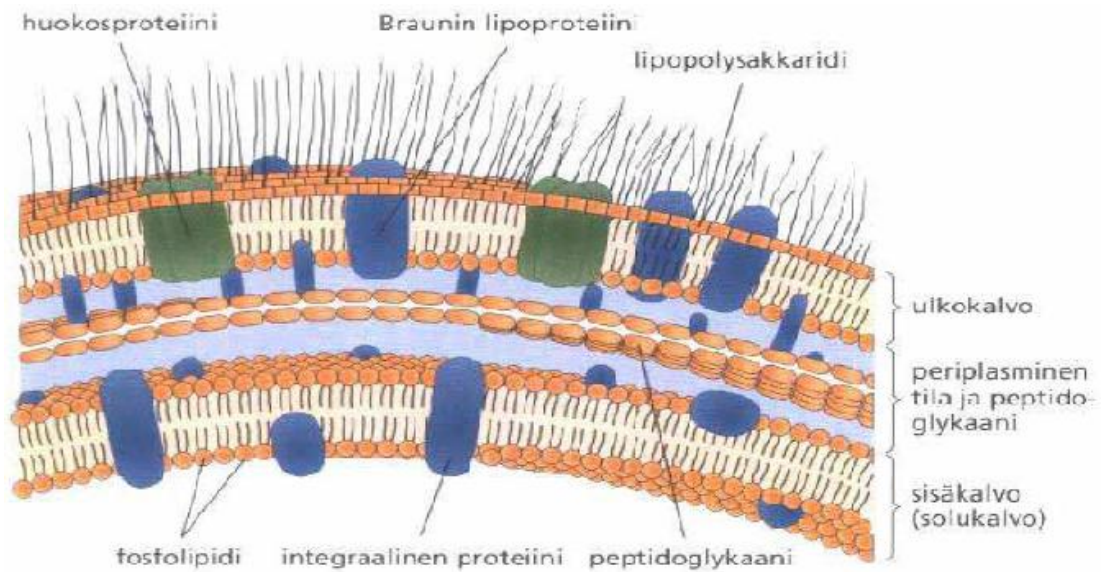
### 3.1.3 Gram-negatiivisen ja -positiivisen bakteerin soluseinä

Gram-positiivisten bakteerien soluseinä koostuu paksusta peptidoglykaani kerroksesta. Sen lisäksi soluseinäessä on teikohappoa ja lipoteikohappoa. (Kuva 3.)



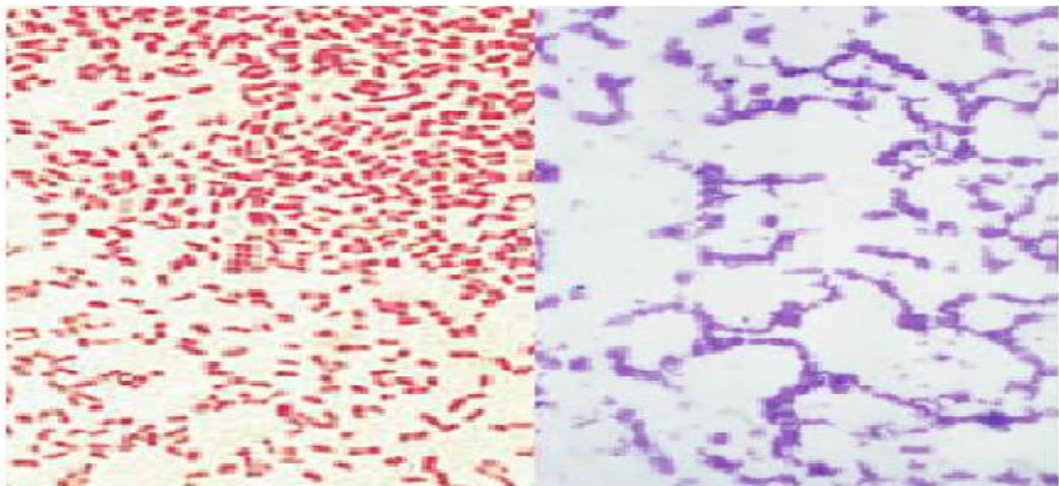
*KUVA 3. Gram-positiivisen bakteerin soluseinä (38.)*

Gram-negatiivisten bakteerien soluseinä on monimutkaisempi rakenteeltaan ja kemialtaan. Gram-negatiivisilla bakteereilla peptidoglykaanikerros on ohut. Kerros sisältää runsaasti Braunin lipoproteiinia, joka kiinnittää peptidoglykaanikerroksen ulkokalvoon. Kalvojen väliin jää suhteellisen paljon tilaa. Tätä tilaa kutsutaan periplasmiseksi tilaksi. (Kuva 4.) (6, s.11–12)



*KUVA 4. Gram-negatiivisen bakteerin soluseinä (38.)*

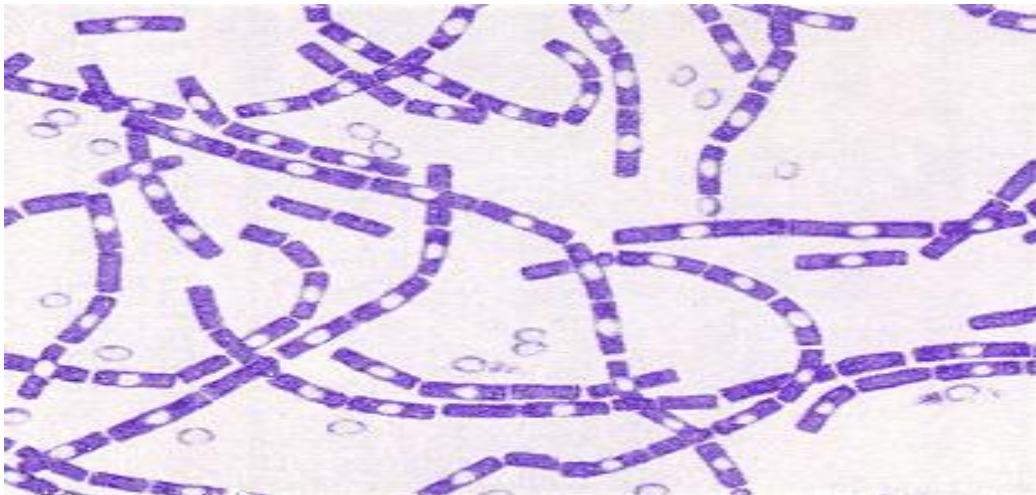
Gramvärjäyksessä kristalliviolettijodikompleksi ei pysty vuotamaan ulos gram-positiivisesta bakteerista, kun alkoholi- tai asetonikäsittelyllä kutistetaan peptidoglykaanisoluseinät. Gram-negatiivisten bakteerien soluseinät sen sijaan sisältävät enemmän lipidiä kuin peptidoglykaania. Tästä johtuen liuotinpesun aikana lipidi irtoaa soluseinästä ja solusta tulee vuotava. Lopuksi solut jälkivärjätään punaisella väriaineella, jolloin punainen väri tarttuu gram-negatiivisiin bakteereihin. Mikroskopoinnilla voidaan havaita värjäytyvyserot. (Kuva 5.) (2, s. 101.)



*KUVA 5. Gram-negatiivisen (vasen) ja gram-positiivisen bakteerin värjäytyvyserot (39.)*

### 3.1.4 Bakteerien itiöt

Muutammat bakteerit pystyvät muodostamaan solunsisäisiä itiöitä eli endosporeja. Itiöt vapautuvat ympäristöön emosolun hajottua, ja niistä kehittyy sopivissa oloissa uusi bakteeri. Itiöllä on useita kuorikerroksia, mikä selittää niiden kyvyn sietää kemikaaleja, kuumuutta, säteilytystä ja happamuutta. Itiöt kykenevät selviämään hengissä hyvinkin pitkiä aikoja, ja niitä on vaikea tuhota. Useimmiten itiönmuodostajabakteereja tavataan maaperässä. Gram-värjäyksellä värjätessä itiöt näkyvät valkoisina, koska ne eivät värjydy normaaleilla värjäystavoilla (kuva 6). Itiönmuodostajabakteereita ovat muun muassa *bacillus*-suvun bakteerit. (2, s. 147 - 148, 152)



KUVA 6. Itiöllinen bakteeri gram-värjätynä (40.)

### 3.1.5 Aktinobakteerit

Aktinobakteerit eli sädesienet ovat laaja maaperäbakteerien ryhmä. Ne ovat gram-positiivisia bakteereita (kuva 7), jotka kykenevät muodostamaan itiöitä ja rihmastoja. (25.) Näin ollen aktinobakteerit luokiteltiin aiemmin kuuluvaksi sieniin, josta sädesieni nimitys on peräisin. Nykyään ne luokitellaan kuuluvaksi maaperäbakteereihin, joilla on yhteneväisiä ominaisuuksia homeiden kanssa. (26.)



KUVA 7. *Streptomyceetti gram-värjätynä (41.)*

Aktinobakteerit voivat aiheuttaa allergiaa ja alveoliittia eli homepölykeuhkoa, mikä johtuu niiden hyvin pienestä itiökoosta. Aktinobakteerit viihtyvät märässä ja tuottavat bakteeritoksiineja. Niitä pidetään kosteusvaurioindikaattoreina. (42.) Yleisimpiä kosteusvaurioon viittaavia aktinobakteereja ovat *Streptomyces*-suvun lajit, joita kutsutaan streptomykeeteiksi (26). *Streptomyces*-bakteereiden on havaittu olevan tiettyjen homeiden kanssa yhteisvaikutukseltaan haitallisempia kuin kumpikaan mikrobi yksinään (42).

### 3.2 Sienet

Sieniä jaotellaan monella eri tavalla. Sienien jaottelu voidaan tehdä kehitymisasteen ja lisääntymiselinten mukaan levä-, lima-, kanta- ja kotelosieniin sekä epätäydellisiin sieniin. Rihmaston värin perusteella sienet voidaan jakaa tummiin ja vaaleisiin sekä rihmaston muodostuksen perusteella rihmasieniin, hiivoihin ja dimorfisiin sieniin eli ne esiintyvät sekä rihma- että hiivamuodossa. Sienet muodostavat rihmastoja ja rihmastot muodostavat pesäkkeitä, joissa itiöt kehittyvät. Sienet lisääntyvät suvullisesti tai suvuttomasti itiöiden avulla. (36, s. 39–40)

Home on yleiskielinen nimitys sienelle, joka muodostaa rihmastoja ja kasvaa nukkamaisena pesäkkeenä kasvualustalla (kuva 8). Suurin osa homeista on

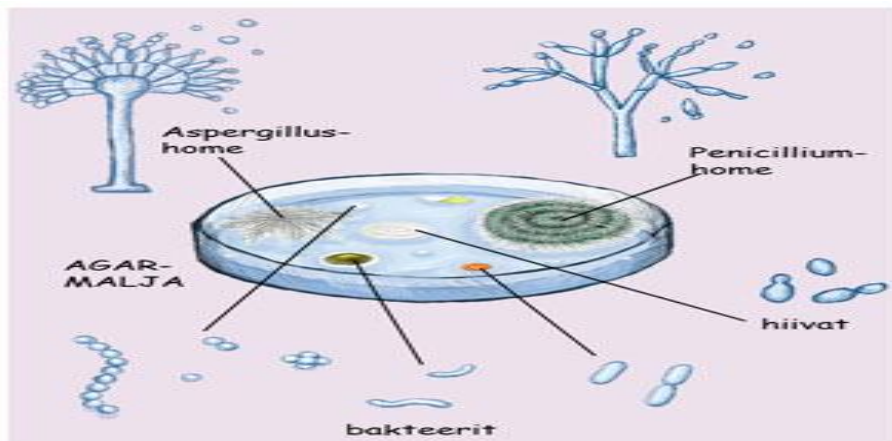


epätäydellisiä sieniä, ja ne lisääntyvät suvuttomasti kuroumaitiöiden avulla (kuva 9). Homeiden itiöt ovat kirkkaan värisiä, esimerkiksi vihreitä, sinisiä tai punaisia, mistä johtuu homeiden huomattava värin muutos itiöinnin alkaessa.



*KUVA 8. Homepesäkkeitä elatusalustalla (43.)*

Homeiden pääasiallinen tehtävä luonnossa on toimia materiaalin kierrättäjinä. Sen vuoksi ne omaavat vertaansa vailla olevan entsyymijärjestelmän, joka kykenee hajottamaan pysyviksi luonnehdittuja yhdisteitä. (36, s. 39–40)



*KUVA 9. Homeiden muoto ja kuroumaitiöt (37.)*

Kasvaakseen homeet vaativat ehdottomasti happea, mutta vettä ne tarvitsevat vain vähän. Homeita tavataan hyvinkin kuivissa olosuhteissa, ja sen vuoksi ne ovat laajalle levinneitä luonnossa. (37.)

## 4 MIKROBIEN TUOTTAMIA MYRKYLLISIÄ YHDISTEITÄ

Mikrobien on havaittu tuottavan toksiineja yhdessä kasvaessaan. Tällöin mikrobit taistelevat ravinteista ja vedestä toistensa kanssa ja tuottavat myrkkyjä eliminoidakseen kilpailijansa. (21.) Mikrobit, jotka valtaavat tilaa muilta mikrobeilta, kutsutaan antagonisteiksi. Antagonismi perustuu aineisiin, joita toinen mikrobi ei kestä ja joita valtaajamikrobi tuottaa. (2, s. 533.) Bakteriosiineiksi kutsutaan bakteerien tuottamia aineita, jotka ovat antimikrobisia peptidejä. Tällöin aineen tuottaja on bakteeri ja uhri bakteeri. Suurin osa bakteriosiineista on amfifiilisiä eli niillä on hydrofiilinen ja lipofiilinen pää. Antibiootit ovat mikrobien tuottamia aineita, jotka estävät toisten mikrobien kasvua tai tappavat niitä. Antibiootteja tuottavat bakteerit ja tumalliset mikrobit. Antibiootit ovat laajakirjoisia, kun taas bakteriosiinit kapeakirjoisia. (2, s. 518, 537.) Mykotoksiinit ovat sienten tuottamia myrkyllisiä aineita. (26.)

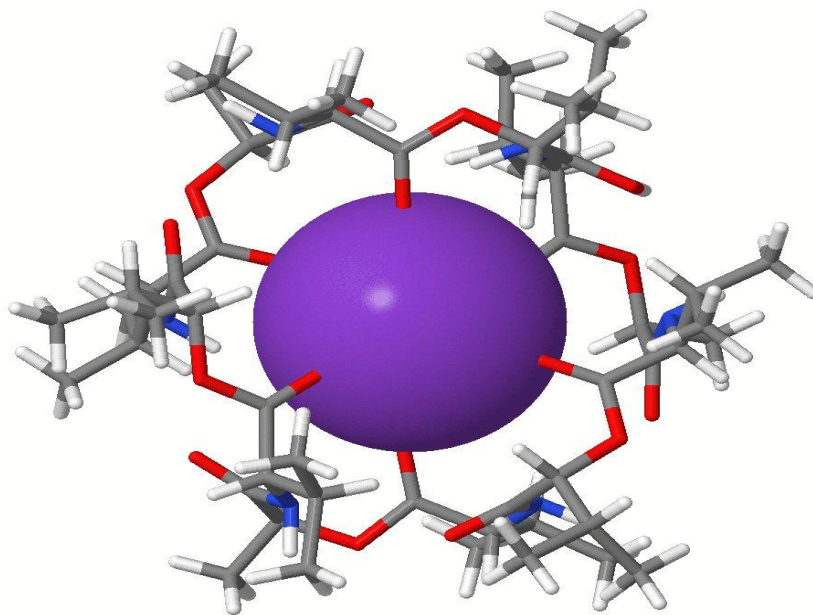
Tutkittaessa myrkyllisyyden aiheuttajaa on hyvä tietää, mitä mikrobimyrkkyjä on jo löydetty. Ne antavat suuntaa siitä, mitä näytteessä mahdollisesti voisi olla. Taulukossa 2 on esitelty olemassa olevia mikrobien tuottamia toksisia aineita ja niiden molekyylimassoja.

TAULUKKO 2. Mikrobien tuottamia myrkyllisiä aineita (7, s. 17–18)

Myrkky	Molekyyli massa	Myrkky	Molekyyli massa
Akreboli A, B	1726, 1740	Kereulidi	1152
Amoebiens, fungicin M4	770-3400	Kurstakins	878-906
Amyloosiini	1197	Likenysiini A	992-1034
Antimysiini A	548,6	LI-F	947
Azoxybacilin	161	Longibraktiinit	1937-1965, 1197
Bacilysocin	470	Microcystins	994,5
Bacitracin A (B,C)	1423	Monensiini	670,4
Butirosin A	555	Mycobacillin	1528
Cispentacin	129	Mycocerein	1000
Cytochalasin J	451,2	Mycosubtilin	1030, 1044
Fengycins	1449-1505	Narasiini	764,5
Fusaricidin A-D	886-960	Nigerisiini	724,4
Macrolactin A	402	Oligomysiini A-D	790,5/804,5/774,5/776,5
Gramicidin (dubois)	1930	Peptaiboli ES 39	1719-1775
Gramicidin (A,B,C,D)	1882,3	Polymyxin B	1203
Gramicidin S	1141	Polymyxin M (Mattacin)	1157
Tyrocidine	1309, 1271	Pumilacidin	1035-1077
Halobacillin	1035	Roridiini A, D	532, 530
Homocereulide	1166	Rhizocticin A	351,13
Ionomysiini	709	Salinomysiini	751
Isohalobacillin B	1035	Satratoksiini H,G	529, 545
Iturin A	1030, 1044	Surfaktiini	993-1035
Kalsimysiini	523,2	Valinomysiini	1111
Kanosamine	179	Zwittermicin A	396

#### 4.1 Valinomysiini

Valinomysiinin tuottajia ovat aktinobakteerit *Streptomyces griseus* ja *Streptomyces anulatus*. Valinomysiini on rengasmaisen peptidi ja kaliumkuljetin (kuva 10). Peptidit ovat alle viidestäkymmenestä aminohaposta koostuvia aminohappoketjuja.

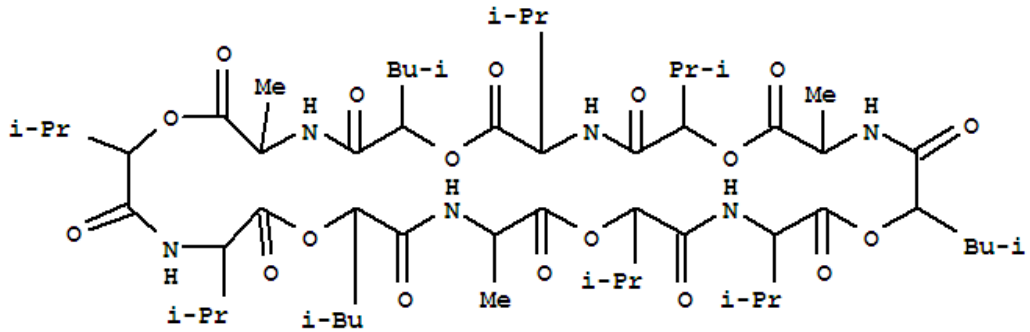


KUVA 10. Valinomysiinin rakenne (34.)

Valinomysiini hakeutuu mitokondrioihin ja käynnistää apoptoosin eli solun itsetuhon. Se aiheuttaa myös luontaisten tappajasolujen itsetuhon käynnistymisen. Lisäksi valinomysiinille altistuminen aiheuttaa nisäkässolujen värekarvojen liikkeen pysähtymisen, mistä muun muassa keuhkot ja haima kärsivät. (1, s. 8.)

## 4.2 Kereulidi

Kereulidi on *Bacillus cereuksen* tuottama rengasmaisen pieni peptidi. (kuva 11) Se on samankaltainen aine kuin valinomysiini. *Bacillus cereus* on yleisesti luonnossa esiintyvä bakteeri, ja vain jotkut sen kannoista tuottavat kereulidia. *Bacillus cereus* -bakteerissa kereulidin tuotto on suurikokoisen plasmidin koodittamaa, ja tätä plasmidia tavataan vain harvoissa kannoissa. Näitä myrkyllisiä kantoja esiintyy yleisesti hometaloissa, vaikka ne ovat harvinaisempia muualla. (1, s. 8 ; 8.)



KUVA 11. Kereulidin rakenne (35.)

Tunnetuista stabiileista mikrobimyrkyistä kereulidi on myrkyllisin. Se on tunnettuja mykotoksiineja, kuten okratoksiini, aflatoksiini tai patuliini, 10–100 kertaa myrkyllisempi. Se kestää kuumennusta, desinfiointiaineita, autoklavointia ja entsyymejä. (8.) Kereulidi on rasvaliukoinen ja tekee nisäkässolun kaliumioneja läpäiseväksi. Se aiheuttaa ensin mitokondriotuhoon tuhotessaan solun kaliumionigradientit. Tästä seuraa energiakriisi, ja sen jälkeen solu käynnistää apoptoosin. Kereulidi kykenee pysäyttämään immunitetista huolehtivien tappajasolujen toiminnan. (1, s. 8.)

### 4.3 Amylosiini

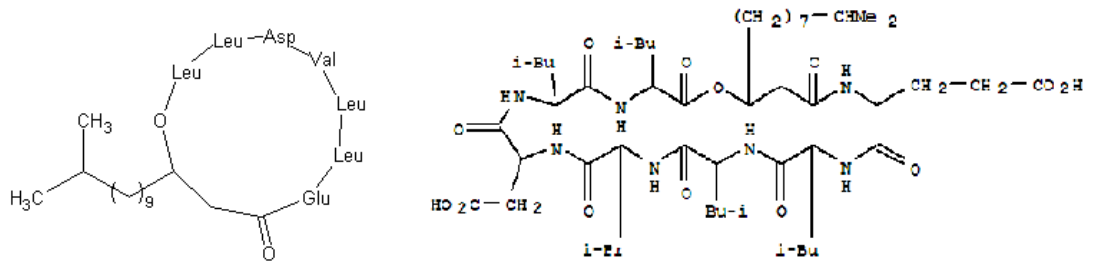
*Bacillus amyloliquefaciens* -bakteeri tuottaa amylosiinia. Se on osoittautunut yleiseksi myrkyksi kosteusvauriorakennuksissa. Amylosiini muodostaa biologisiin kalvoihin kalsium-, natrium- ja kaliumioneja läpäisevän kanavan peptidin toisessa päässä olevalla polyeenihännällä. Luontaisen järjestelmän ohittava ylinmääräinen kanava sekoittaa kalium- ja natriumpitoisuuksien erot. Ionigradienttien tuho saa aikaiseksi solujen sisäisen ja ulkoisen viestiliikenteen tuhon. Amylosiinin oletetaan vaikuttuvan hermoimpulssien kulkuun ja sydämen toimintaan, mutta vaikutuksia elimistöön ei vielä paremmin tunneta. (1, s. 8.)

#### 4.4 *Bacillus*-toksiinit

*Bacilluksien* itiöt leviävät ilmaitse samaan tapaan kuin toksisten sienten itiöt. Itiöt toimivat toksiinien levittäjinä (7, s. 77). Monet *Bacillus*-lajit tuottavat yhdessä kasvaessaan myrkyllisempiä yhdisteitä kuin yksin kasvaessaan. Myös yksi *basillus*-laji voi tuottaa yhtä aikaa erilaisia myrkyllisiä yhdisteitä. Esimerkiksi ituriinin, surfaktiinin ja fengysinin yhtäaikainen tuotto samalla *basillus*-lajilla on yleistä. (7, s. 38.)

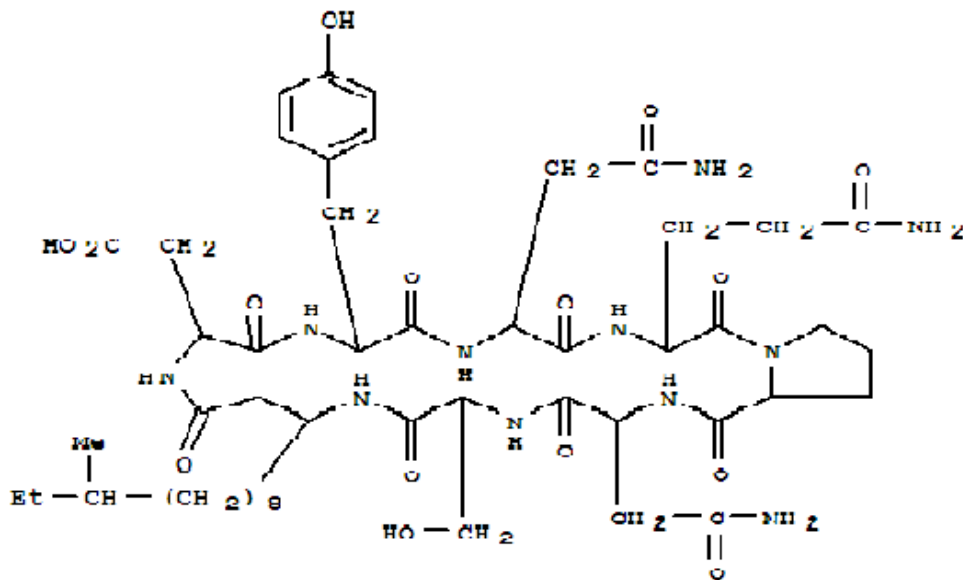
Monet *Bacillus*-lajit tuottavat erilaisia lipopeptidejä. *Bacillusten* lipopeptidit koostuvat 7–11 aminohapon peptidiosasta, joka on syklinen tai lineaarinen tai näiden yhdistelmä.  $\beta$ -hydroksi- tai  $\beta$ -aminorasvahapot muodostavat lipidiosan, joka on liittynyt peptidin selkärankaan. Lipopeptidit ovat sekä hydrofobisia että hydrofiilisiä yhdisteitä ja voimakkaita biosurfankteja eli pinta-aktiivisia aineita. Aminohapon ja rasvahapon hiilivetyketjun pituus sekä se, miten lipopeptidi vaikuttaa kohteeseen, vaihtelee riippuen bakteerin ravinteista. Peptidin syklinen muoto suojelee lipopeptidiä entsyymaattiselta hajoamiselta ja ylläpitää yleistä tasapainoa. Monilla lipopeptideillä on antimikrobisia tai antiviraalisia ominaisuuksia. Ne vaikuttavat nisäkässolun toimintoihin. Lipopeptidit pystyvät tunkeutumaan soluihin lipofiilisellä hiilivetyketjulla vaikuttaen plasmamembraanin lipidien komponenttina samalla, kun peptidiosan polaarinen aminohappo vaikuttaa komponenttina polaarisisessa fosfatidyylifosfaattiosassa. Lipopeptidit kykenevät vahingoittamaan plasmamembraanin eheyttä tai luomaan ioniselektiivisiä huokosia riippuen lipopeptidin luonteesta ja membraanin fosfatidyylifosfaateista. (7, s. 26.)

*Bacillus*-lipopeptideihin kuuluvat esimerkiksi surfaktiiniperheen ja iturinperheen lipopeptidit. Surfaktiiniperheeseen kuuluvat lipopeptidit surfaktiini (kuva 12), lichenysin ja pumilacidin.



KUVA 12. Surfaktiinin rakenteet (49;50.)

Iturin perheeseen kuuluvat muun muassa ituriinit (kuva 13), basillomysiinit ja mycosubtilin. Osa edellä mainituista yhdisteistä ovat sen verran uusia, että niille ei ole olemassa vakiintunutta suomenkielistä nimeä. (7, s. 26, 28)



KUVA 13. Ituriinin rakenne (51.)

#### 4.5 Mykotoksiinit ja peptaibolit

Mykotoksiinit ovat ihmisille ja eläimille myrkyllisiä sienten tuottamia aineita. Myrkyä tuottavia sieniä voi syntyä kosteusvauriosta kärsiviin rakennuksiin. (2, s. 550.) *Stachybotrys chartarum* on eniten tutkittu kosteusvauriohome ja se tuottaa monia eri mykotoksiineja. *Stachybotrys chartarum* voi olla myrkyllinen sekakasvustona *Streptomyces*-kantojen kanssa ja tuottaa



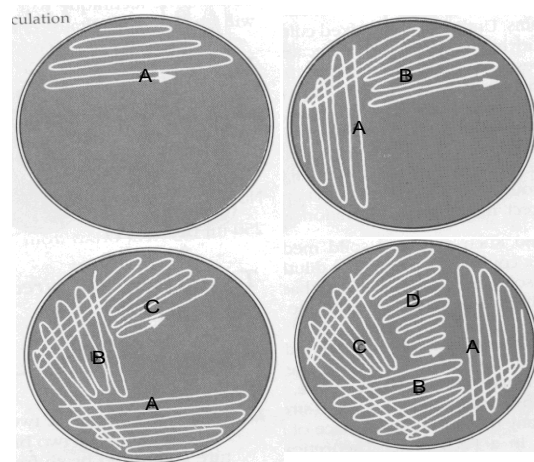
valinomysiiniä. Molekyyli­tas­on hait­ta­mekan­is­me­ja ei kuiten­kaan vielä tun­neta. (1, s. 9.)

*Hypocreales*-lah­kon sienet tuot­ta­vat peptaiboleja. Ne ovat 5–20 ami­no­hap­on pituisia lyhyitä ja hydrofobisia peptidejä. Home­ta­lois­sa esiintyvistä peptaiboleista parhaiten tun­netaan *Trichoderma harzianum* -sien­en tuot­ta­ma ES 39:n peptaiboli. Kyseessä oleva peptaiboli tekee ihmisen keu­kosoluihin kaliumioneja läpäiseviä kanavia ja pystyy näin tappamaan ne. Toinen vasta löydetty peptaiboli on akreboli, jota tuot­taa *Acremonium exuviarum* -sienilaji. Se estää mitokondriossa tapahtuvan hapen­kulutuksen. Eniten akrebolista ennustetaan olevan hait­taa niille elimistön osille, jotka tarvitsevat mitokondriossa tapahtuvaa hapetusta, esimerkiksi sydämelle. (1, s. 9.)

# 5 MIKROBINÄYTTEEN KÄSITTELY- JA TUTKIMUSMENETELMIÄ

## 5.1 Puhdasviljelmän teko

Mikrobiviljelynäytteissä on yleensä toisiinsa sekoittuneina eri mikrobilajeja ja -kantoja. Mikrobin, yleensä bakteerien, erottelemiseksi toisistaan tarvitaan puhdasviljelytekniikkaa. Sen periaatteena on laimentaa bakteerinäyte niin laimeaksi, että kiinteän elatusaineen pinnalle saadaan yksittäisiä pesäkkeitä, joissa on vain yhden bakteerin edustajia. Puhdasviljelmän laimentaminen tehdään niin kutsutulla hajotusmenetelmällä. Alkuperäistä näytettä levitetään vain pienelle osalle elatusmaljaa ja viljelysauvaa apuna käyttäen asteittain koko maljalle. Viimeisessä hajotusalueessa on vain murto-osa näytteen bakteereista. (Kuva 14.) (32, s.23)



KUVA 14. Hajotustekniikka. (10, s. 6.)

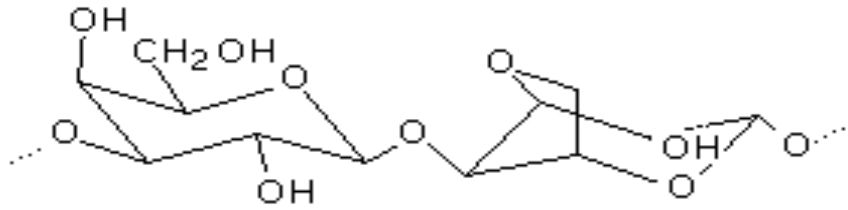
## 5.2 Elatusaineet

Mikrobien kasvatus tapahtuu elatusaineissa, jotka voivat olla kiinteitä maljoja tai nestemäisiä liemialustoja. Elatusmaljojen koostumus vaihtelee paljon riippuen viljeltävästä mikrobista ja siitä, mitä ylipäänsä tutkitaan. Elatusmaljojen tulee sisältää kaikki tarvittavat ravinteet, joita mikrobi tarvitsee lisääntyäkseen (taulukko 3). (44.)

TAULUKKO 3. Mikrobien ravinteet (44.)

Hiilen lähde	tavallisimmin glukoosi tai jokin muu sokeri, toimii myös energia lähteenä
Typen lähde	joko orgaaninen tai epäorgaaninen lähde esimerkiksi nitraatti tai aminohapot
Fosforin lähde	$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ säätää samalla pH kasvatuksen aikana
Alkuaineet	tarvitsevat jonkin verran muitakin alkuaineita rikki, kalium, magnesium, kalsium
Hivenaineet	Fe, Mn, Co, Zn ja Mo

Elatusmaljat valmistetaan agarista ja erilaisista elatusaineista. Agar on polysakkaridiseos (kuva 15), joka on eristetty valtamerileivistä. Koostumus on 70 % agarosia ja 30 % agaropektiiniä. Hyvin harvat bakteerilajit kykenevät hajottamaan agaria, joten se soveltuu hyvin maljojen jäähmettämiseen. (2, s. 57.) Agar sulaa 100 celsiusasteessa ja hyytyy jälleen noin 50 celsiusasteessa. (44.)



KUVA 15. Agaroosin rakenne (45.)

Elatusalustat voidaan jaotella kolmeen eri ryhmään. Ne voidaan jaotellaan koostumuksen perusteella synteettisiin ja ei-synteettisiin alustoihin. Toiseksi ne voidaan jaotella käyttötarkoituksen perusteella, jolloin alustan valintaan vaikuttaa se, mitä halutaan tietää bakteerista; on esimerkiksi olemassa yleisalustoja, jotka sopivat lähes kaikille bakteereille, ja toisaalta selektiivisiä alustoja, joilla kykenevät lisääntymään vain tietyt bakteerilajit. Kolmanneksi jaottelu voi tapahtua sen mukaan, onko alusta kiinteä, puolikiinteä vai nestemäinen. (44.)

### Jaottelu koostumuksen mukaan

Synteettiset elatusalustat koostuvat kemiallisesti puhtaista aineista, ja niiden koostumus tiedetään tarkalleen. Ei-synteettiset elatusalustat puolestaan koostuvat biologisesta materiaalista valmistetuista uutteista, joiden tarkkaa koostumusta ei tunneta. Käytettyjä uutteita ovat esimerkiksi lihauute, hiivauute ja mallasuute. Lihauute sisältää sellaisenaan kaikki mikrobin tarvitsemat ravinteet. Hiivauute sisältää paljon B-ryhmän vitamiineja ja aminohappoja. Mallasuute sisältää runsaasti hiilihydraatteja, ja sitä käytetään hiivojen ja homeiden elatusalustoissa. (44.)

### Jaottelu käyttötarkoituksen mukaan

Kun halutaan tietää, sisältääkö näyte mikrobeja ollenkaan, käytetään yleisalustoja. Näillä alustoilla pystyy kasvamaan mahdollisimman monet mikrobilajit, ja kasvusto on yleensä eri mikrobilajistoilla hyvin samannäköistä.

Yleisalustojen ravintosisältö vastaa mikrobien luonnollista ympäristöä. Esimerkiksi taulukossa 4 on yhden yleisalustan koostumus. (44.)

*TAULUKKO 4. TSA-agarin koostumus*

<b>TSA (Tryptic Soy Agar) / l</b>	<b>g</b>
Kaseiini	15
Soijaproteiini	5
Natriumkloridi	5
Agar	15

Selektiiviset eli valikoivat alustat suosivat tiettyjä mikrobiryhmiä tai -lajeja. Elatusmaljojen selektiivisyys saadaan aikaiseksi esimerkiksi valitsemalla sellainen energianlähde tai typenlähde, jota vain tietty mikrobi voi käyttää hyväkseen. Elatusalustan pH voidaan myös säätää sellaiseksi, että vain tietyt mikrobit menestyvät siinä. Kasvunestoaineilla saadaan myös vain tietyt mikrobiryhmät kasvamaan. Kasvunestoaineita ovat esimerkiksi natriumatsidi, sappisuolat ja natriumseleniitti. (44.)

Indikaattorialustoilla pystytään erottamaan mikrobilajit toisistaan. Tunnistaminen tapahtuu esimerkiksi alustaan lisätyn happo-emäsindikaattorin avulla. Tällä havaitaan ne mikrobit, jotka muuttavat alustan pH:n. Alustaan voidaan myös lisätä sellaisia yhdisteitä, jotka saostuvat mikrobitoiminnan vaikutuksesta, esimerkiksi munankeltuissaissuspensio. (44.)

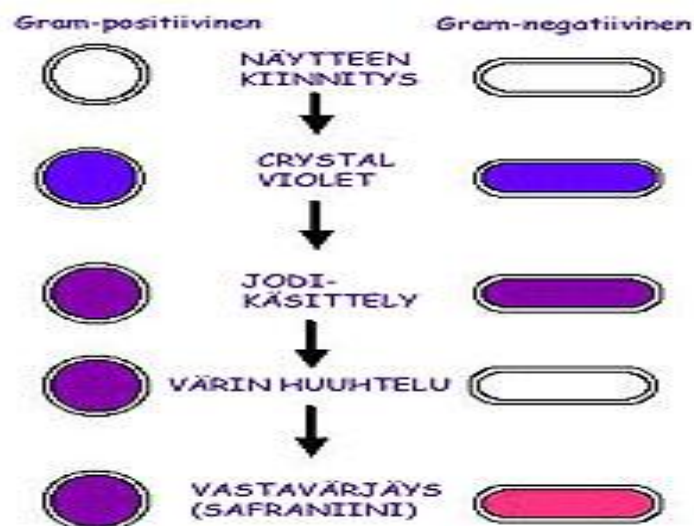
### **Jaottelu olomuodon mukaan**

On olemassa nestemäisiä, kiinteitä ja puolikiinteitä alustoja. Nestemäisissä alustoissa mikrobien kasvu havaitaan liemen samentumisena. Sameus mitataan spektrofotometrillä aallonpituudella  $A_{600}$ . Kiinteät elatusmaljat kiinteitetään agarilla, jota tulee olla 15 g/l vesipohjaisessa seoksessa. Näin kiinteisiin alustoihin saadaan hyvä koostumus. Tätä elatusalustamuotoa käytetään yleisimmin, kun halutaan tunnistaa mikrobeja. Puolikiinteät alustat valmistetaan lisäämällä agarina vain 0,3 %. Näitä alustoja käytetään esimerkiksi tutkittaessa mikrobien liikkuvuutta. (44.)

## 5.3 Mikrobin värjäys

### 5.3.1 Gram-värjäys

Tunnistettaessa tuntemattomia bakteereita ja viljelmän puhtautta gramvärjäys on välttämätön esitesti. Sen perusteella bakteerit voidaan luokitella kahteen pääryhmään: gram-positiivisiin ja gram-negatiivisiin. Gramnegatiiviset bakteerit värjäytyvät punaisiksi ja gram-positiiviset violetinsinisensävyyisiksi. (2, s. 99.) Gramvärjäyksen suoritus tapahtuu seuraavasti: Aluksi bakteerit kiinnitetään objektilasille esimerkiksi kuumentamalla. Tämän jälkeen bakteerit käsitellään emäksisellä kristalliviolettiliuoksella, joka värjää solut violetiksi. Värin kiinnitys tapahtuu jodi-kaliumjodidiliuoksella, minkä jälkeen preparaatti huuhdellaan asetonialkoholiseoksella. Tässä vaiheessa gram-positiiviset bakteerit säilyttävät violetin värinsä paksumman peptidoglykaanikerroksen vuoksi. Gram-negatiivisista bakteereista violetti väri huuhtoutuu pois. (Ks. s. 11–13.) Lopuksi näyte värjätään safraniinilla, joka on punaista. Näin saadaan näkyviin myös gram-negatiiviset bakterit. (32, s. 22.) (Kuva 16.)



KUVA 16. Gram-negatiivisen ja gram-positiivisen bakteerin värjäytyminen (9.)

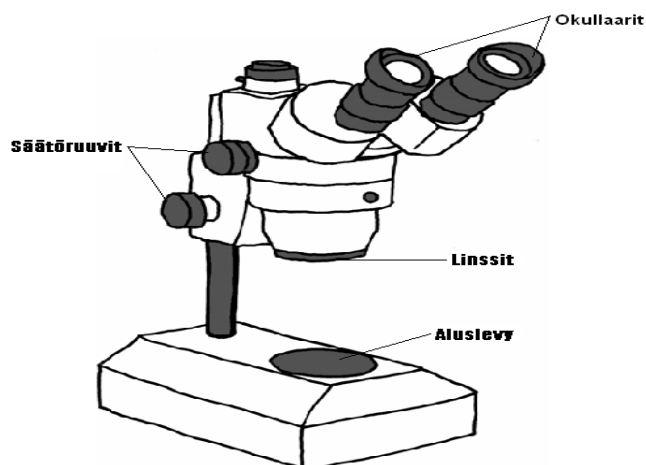
### 5.3.2 Muita värjäysmenetelmiä

Aivan kaikki bakteerit eivät värjydy gram-värjäyksellä, esimerkiksi hyvin lipidipitoiset mykobakteerit. Tällöin käytetään aggressiivisempaa happovärjäysmenetelmää. Ennen liuotin-happokäsittelyä mykobakteerit käsitellään detergentteillä tai kuumennuksella, jolloin väri ei huuhtoudu pois käsittelyssä. Perinteisesti käytetyt menetelmät happovärjäyksessä ovat Ziehl-Neelsenin ja Kinyounin menetelmät. (32, s. 23.)

Itiöt värjäytyvät huonosti tavallisilla menetelmillä paksun kuorensa vuoksi. Itiötä värjättäessä menetelmän täytyy myöskin olla aggressiivisempi, jotta väri saataisiin menemään solun sisään. Yhtenä tapana on objektilasiin kiinnitettyjen bakteerisolujen kuumentaminen vesihauteella. Tällöin solukon päälle tiputetaan malakiittivihreäliuosta ja haudutetaan preparaattia niin, ettei se pääse kuivamaan. Jälkivärjäys suoritetaan safraniinilla, jolloin itiöt havaitaan vihreinä mikroskoopissa ja kasvullinen solu punaisena. (44.)

### 5.4 Valomikroskopointi

Bakteerien havaitseminen paljain silmin on mahdotonta niiden pienen koon vuoksi. Valomikroskooppi (kuva 17) on tärkein apuväline bakteerien tarkastelussa. Valomikroskoopilla saavutetaan noin 1000–1200-kertainen suurennos. (32, s. 20.)



KUVA 17. Valomikroskooppi (46, hakusana: valomikroskooppi)

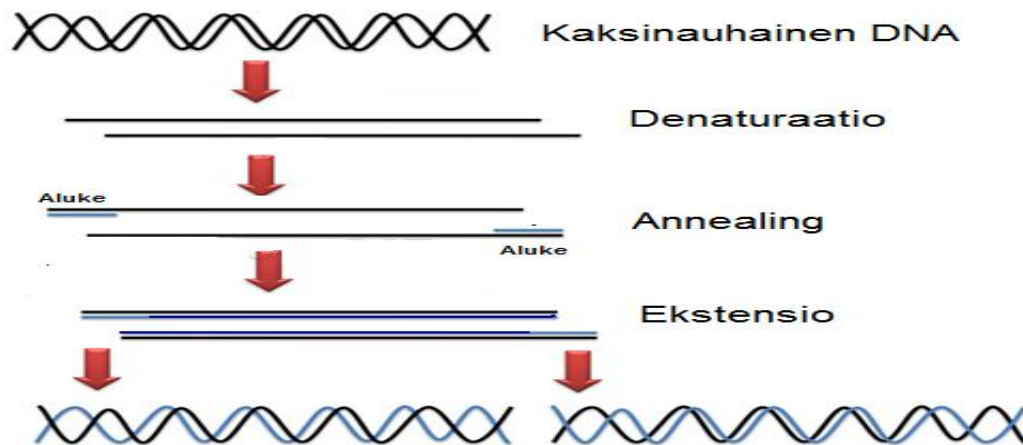
Valomikroskooppi eli kirkaskenttämikroskooppi on monimutkainen optinen instrumentti. Se sisältää lukuisia linsskejä. Ennen näytettä olevien linssien tehtävä on kohdistaa valo yhdensuuntaisiksi säteiksi. Säteet kulkevat näytteen läpi. Näytteen jälkeen tulevat linssit puolestaan muodostavat vahvasti suurennettun kuvan näytteestä. Objektiivi luo kuvan, ja sitä tarkastellaan okulaarin läpi. Kokonaissuurennus on mikroskoopissa objektiivin ja okulaarin suurennuskertoimien tulo. Esimerkiksi kun mikroskoopissa on 40X-objektiivi ja käytetään 10X-okulaaria, on kokonaissuurennus 400X. (6, s. 4.)

## **5.5 PCR-tekniikka**

Polymeraasiketjureaktio (PCR) on menetelmä, jossa voidaan monistaa mikrobin genomista geeni tai geenin osa. Monistaminen tapahtuu polymeraasientsyymien avulla DNA-ketjun ollessa kahden emäsjärjestykseltään tunnetun DNA-jakson välissä. Polymeraasientsyymillä on kyky rakentaa uutta DNA-ketjua malliketjun eli templaatin mukaisesti. PCR:llä saadaan monistettua miljoonia molekyyliä lyhyessä ajassa. Reaktio tapahtuu tietyssä lämpötilassa tarvittavien aineiden läsnä ollessa. Emäsjärjestyksestä eli sekvenssistä voidaan päätellä mikrobin laji, mikrobilääkeresistenssi ja virulenssi. (47, s.17)

PCR-reaktio tapahtuu toistuvissa kolmivaiheisissa sykleissä. Sykli sisältää vaiheet denaturaatio, annealing ja ekstensio, jotka saadaan aikaiseksi reaktiolämpötilan muutoksella (kuva 18).





KUVA 18. PCR-reaktio (47, s. 20)

Yksi sykli kestää yleensä alle viisi minuuttia. Denaturaatio on aloitusvaihe, jossa DNA denaturoidaan nostamalla lämpötilaa yli 90 °C:seen. Tällöin vastinjuosteet irtoavat toisistaan. Denaturaatiovaihetta seuraa annealing-vaihe, jossa alukkeet sitoutuvat yksijuosteisen templaatti-DNA:n 3'-päihin. Tämä saadaan aikaiseksi laskemalla hetkellisesti lämpötilaa 40–60 °C:seen. Ekstensio- eli pidennysvaiheessa lämpötila nostetaan 72 °C:seen, jolloin DNA-polymeraasi alkaa templaatin mallin mukaan liittää 3'-päähen reaktioseoksessa olevia nukleotideja. Tämän seurauksena molemmille templaatin nauhoille syntyy vastinnauha. PCR:n monistustuotteita tutkitaan agarosigeelielektroforeesilla. (47, s. 17.)

# 6 MIKROBIMYRKKYJEN TUTKIMUSMENETELMIÄ

## 6.1 Solutestit

Solutesteillä altistetaan erilaisia soluja mikrobitoksiineille. Näin voidaan tutkia kuinka erilaiset aineet vaikuttavat soluihin, ja päätellä mahdollisia vaikutuksia ihmiseen. Käytetyt solut voivat esimerkiksi olla siittiösoluja, lymfosyyttejä, NK-soluja tai bakteerisoluja. Mitä enemmän testaukseen otetaan mukaan eri solufunktioihin vaikuttavia testejä, sitä varmemmat tulokset saadaan.

### 6.1.1 Siittiötesti

Liikkuvuus on sian siittiöillä sidoksissa energiaan, jota mitokondriot tuottavat, joten mitokondriossa tapahtuvat häiriöt näkyvät nopeasti liikkuvuuden alenemisena. Siittiösolussa puolestaan ei tapahdu proteiinisynteesiä tai DNA- ja RNA-synteesiä, joten ensisijaisesti makromolekyyli synteesiin vaikuttaviin myrkkyihin siittiö ei reagoi. Siittiötestiä käytetäänkin mitokondriofunktion mittaamiseen. Siittiöiden reaktioita voidaan tutkia mikroskoopilla. (23, s. 53.)

Sian siittiötesti on kehitetty Helsingin yliopiston soveltavan kemian ja mikrobiologian laitoksella. Karjun siittiöiden liikkuvuuden inhibitiotestin eli siittiötoksisuustestin avulla voidaan todeta mitokondrioille ja solukalvolle haitalliset myrkyt. Kuitenkaan yhdellä toksisuutta mittaavalla testillä ei voida kattavasti arvioida mikrobin myrkyllisyyttä, joten testin rinnalla on usein hyvä olla muitakin vaikutustapoja mittaavia testejä. Näin tieto näytteiden myrkyllisyydestä ja biologisista vaikutuksista on monipuolisempaa. (3, s. 4.)

### Siittiötestin suoritus

Siittiötestiin voidaan tehdä uutosto pölystä, erilaisista materiaaleista tai mikrobimassasta. Haluttu materiaali uutetaan metanoliin, minkä jälkeen uutosto suodatetaan tai sentrifugoidaan riippuen uutetusta materiaalista. Tämän jälkeen metanoli haihdutetaan pois uutoksesta esimerkiksi

evaporoimalla. Haihdutuksesta jäljelle jäänyt aines punnitaan ja liuotetaan haluttuun pitoisuuteen, esimerkiksi 100 mg/ml. Tästä perusliuoksesta tehdään halutun vahvuinen laimennossarja, jolla altistetaan siittiöitä 3 päivää huoneenlämmössä. Siittiöiden liikkuvuus arvioidaan ennen altistusta, jotta testi olisi totuuden mukainen. Yli 50 % siittiöistä tulisi uida vilkkaasti, jotta siittiöliuosta voidaan käyttää testissä. Altistuksen jälkeen siittiöiden liikkuvuutta seurataan mikroskopoimalla joka päivä tai ensimmäisenä ja kolmantena päivänä. (3, s. 5)

Kuoppalevyllä kontrollinäytteinä käytetään pelkkää siittiöliuosta, siittiöliuosta johon on lisätty metanolia, varmasti myrkyllistä uutosta ja ei-myrkyllistä uutosta. Myrkyllisiä ovat ne uutokset, jotka pysäyttävät siittiöiden uinnin pienissä pitoisuuksissa.  $EC_{50}$  (effective concentration eli tehoava pitoisuus) on se pitoisuus, joka pysäyttää siittiöiden liikkeen 50 %:sta siittiöitä verrattuna pelkällä metanolilla altistettuihin siittiöihin. Tulos ilmoitetaan  $EC_{50}$ -arvona. Esimerkiksi  $EC_{50}$  5–50  $\mu\text{g/ml}$  merkintä tarkoittaa, että myrkyllisyys on pitoisuusvälillä 5–50  $\mu\text{g/ml}$ . Siittiötestillä voidaan myös tehdä nopeampi, yhden vuorokauden testaus. Näissä tapauksissa uutokselle ei määritetä ollenkaan kuivapainoa ja pitoisuutta. (3, s. 5.)

### **6.1.2 Lymfosyyttitestaus**

Lymfosyytit ovat ihmisen perifeerisen veren imusoluja, ja niillä voidaan tutkia ihmisen immunologisten puolustusreaktioiden toimintakykyä. Testissä määritetään sytotoksista aktiivisuutta eli tappamistarmoa, kun kohteena on leukemiasolut. Lymfosyytit altistetaan myrkyille, ja tutkitaan aleneeko niiden kyky tappaa vierassoluja. Testinäytteeseen lisätään myrkkyä ja nollanäytteeseen ei. Tämän jälkeen mitataan nollanäytettä verrokkina käyttäen kuinka, paljon lymfosyytit ovat altistetussa näytteessä tappaneet syöpäsoluja. (23 s. 52, 65.)

### **6.1.3 Indikaattoribakteerilajit**

Tiettyjä indikaattoribakteerilajeja voidaan käyttää toksisuustestauksissa. Tällöin tutkitaan indikaattoribakteerien kasvun inhiboitumista, kun ne

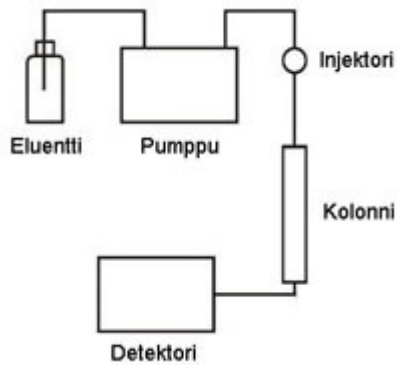
altistetaan tutkittavalle toksiinille. Bakteerien kasvun estymistä käytetään yleisesti esimerkiksi antibioottien analysoinnissa. Bakteeri voi olla *Corynebacterium renale*, jota yleensä käytetään indikaattorina stafylokokkien tuottamalle myrkylle stafylokokkiini BacR1:lle. *Micrococcus luteus* toimii indikaattoribakteerina monelle peptidiantibiootille esimerkiksi streptomyykeettien tuottamille depsi-peptidiantibiooteille. (23, s. 54.)

## 6.2 Toksiinien analysointimenetelmiä

Mikrobitoksiinit ovat biomolekyylejä ja yleensä peptidejä, joten niiden puhdistamiseen, fraktiointiin ja näytteissä olevien yhdisteiden erottamiseen solveltuvat hyvin nestekromatografiset menetelmät. (12, s. 182.) Massaspektrometri, joka on varustettu ESI-ionisaatiotekniikalla, soveltuu detektointiin, koska se on liitettävissä helposti nestekromatografiin ja sillä voi määrittää kaikenlaisia molekyylejä. (27, s. 1.) Sähkösumutus toimii samalla LC:n ja MS:n liitososana ja ionisointitekniikkana. Kun halutaan enemmän tietoa rakenteesta, voidaan käyttää esimerkiksi tandem-massaspektrometriaa. (27, s. 19.)

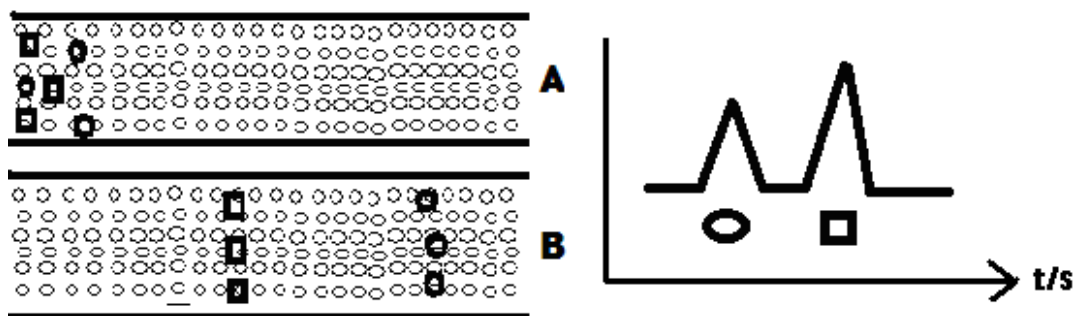
### 6.2.1 Nestekromatografia

Nestekromatografia perustuu liikkuvan faasin eli mobiilifaasin, paikallaan pysyvän faasin eli stationäärifaasin ja näytekomponenttien välisiin vuorovaikutuksiin. Korkean erotuskyvyn nestekromatografia (high performance liquid chromatography, HPLC) (kuva 19) on nestekromatografian alalaji jossa mobiilifaasi pakotetaan kulkemaan painetta vastaan tiukasti stationäärifaasilla pakattuun kolonniin. Näyteseos injektoidaan näytteensyöttösilmukkaan, minkä jälkeen mobiilifaasi syötetään silmukan läpi ja näyte kulkeutuu mobiilifaasin mukana kolonniin ja detektoitavaksi. (11. s. 22, 29.)



KUVA 19. HPLC-laitteisto (11. s. 22.)

Näyteseos hajoaa komponenteikseen stationäärifaasin ja mobiilifaasin vuorovaikutuksessa siten, että polaariset osat jäävät mieluummin polaariseen faasiin ja polaarittomat polaarittomaan faasiin, ja näin ne saapuvat eri aikaan detektorille. Mitä enemmän yhdisteiden tasapaino on stationäärifaasin puolella, sitä hitaammin ne tulevat detektorille, ja sitä pitempi on retentioaika. Vuorollaan jokainen komponentti saapuu ominaisuuksiensa määrittämän ajan kuluttua detektorille, ja tämä signaali mitataan. (13, s. 154.) Kohdassa A analyytit ovat samassa lähtötilanteessa stationäärifaasin alkupäässä, ja kohdassa B on tilanne ajanhetkellä  $t$ ; jälkimmäinen yhdiste sitoutuu stationäärifaasiin tiukemmin ja näin ollen liikkuu hitaammin. Erottuminen tulostetaan kromatogrammina ajan suhteen. (Kuva 20.)



KUVA 20. Analyyttien erottuminen ja kromatogrammi

Mobiilifaasina toimii erilaiset nesteet, joita kutsutaan yleisemmin eluenteiksi, ja stationäärifaasina kolonnin pintaan sidotut partikkelit. Partikkelien koko ja

materiaali määrää pitkälti, kuinka tehokasta erottuminen on. Mitä pienempiä partikkelit ovat, sitä enemmän niitä mahtuu kolonniin ja sitä suurempi on aktiivinen pinta-ala. (13. s. 154.)

Kummankin faasin ominaisuudet määrää se, mitä tekniikkaa käytetään ja minkälainen on analysoitava näyte. Tekniikoita ovat esimerkiksi normaalifaasinestekromatografia, käänteisfaasinestekromatografia, ioninvaihtokromatografia ja ekskluusiokromatografia. Näistä käänteisfaasinestekromatografia eli RPLC on yleisimmin käytetty.

## **RPLC**

Käänteisfaasinestekromatografiassa stationäärifaasi on polaariton ja eluentti vahvasti polaarinen. Eluentti koostuu yleensä vedestä ja polaarittomammasta orgaanisesta liuottimesta, esimerkiksi asetonitrilistä tai metanolista. (11, s. 35.) Stationäärifaasina on yleisimmin käytetty silikaan sidottua oktadekyyliä eli C18 tai ODS. Erottuminen perustuu hydrofobiseen retentioon eli liikkuvan faasin hylkimiseen poolittomia analyyttejä kohtaan. Poolittomat analyytit suorastaan työnnetään liikkuvasta faasista stationäärifaasin pinnalle. Tätä hylkimistä voidaan vähentää lisäämällä orgaanisen liuottimen määrää. (12, s. 168 – 170.)

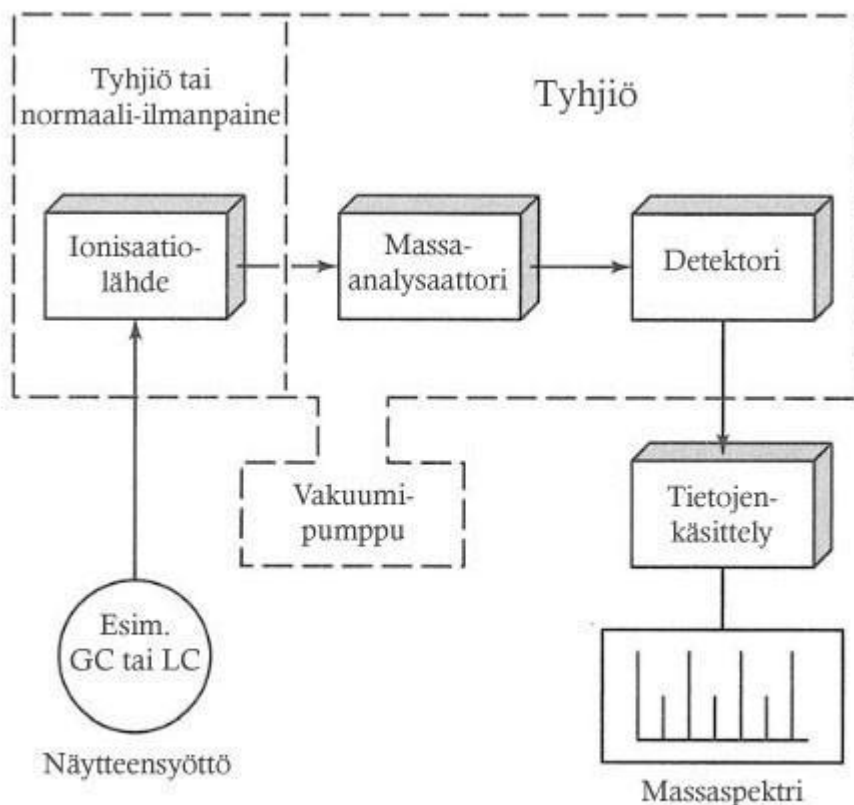
Analyysi voidaan tehdä, joko isokraattisesti tai gradienttisysteeminä. Isokraattisessa analyysissä ajo-olosuhteet eli virtausnopeus, eluenttikoostumus ja lämpötila pysyvät muuttumattomina koko ajon ajan. Gradienttisysteemissä puolestaan parametreja voidaan muuttaa ajon aikana. (11, s. 29.)

Gradienttisysteemissä ajon aikana muutetaan jotain parametria portaittain tai jatkuvasti. Tämä mahdollistaa monikomponenttisten näytteiden analyysin, koska muuttamalla parametreja saadaan lähellä toisiaan eluoituvat komponentit erottumaan ja kromatogrammin piikit ovat terävämpiä. Ajot ovat myös nopeampia verrattaessa isokraattiseen ajoon, koska gradienttiajossa

eluutiovoimakkuutta kasvatettaessa retentioaika lyhenee. Liutonseos voi koostua kahdesta, kolmesta tai neljästäkin eri liuottimesta. (12, s. 143)

## 6.2.2 Massaspektrometria

Massaspektrometriassa analysoitavat molekyylit saatetaan kaasufaasiin, minkä jälkeen ne ionisoidaan positiivisiksi tai negatiivisiksi molekyyli-ioneiksi. Ionit sisältävät ylimääräistä energiaa, jonka johdosta sidokset katkeavat ja molekyylit pilkkoutuvat pienemmiksi osiksi, massafragmenteiksi. Ionit erotellaan tyhjiössä ja detektoidaan massa/varaus-suhteen ( $m/z$ ) mukaan. Saatu massaspektri ilmoittaa varautuneet ionit. Spektristä saadaan tärkeää informaatiota tunnistettaessa yhdistettä. (13, s. 122 ; 11, s. 4.) Massaspektrometrin komponentit ovat näytteensyöttösystemi, vakuumpumppu, ionisaatiolähde, massa-analysaattori, detektori ja tietojenkäsittelylaitteisto (kuva 21).



KUVA 21. MS-laitteisto (11, s. 4.)

## **Ionisaatiolähde**

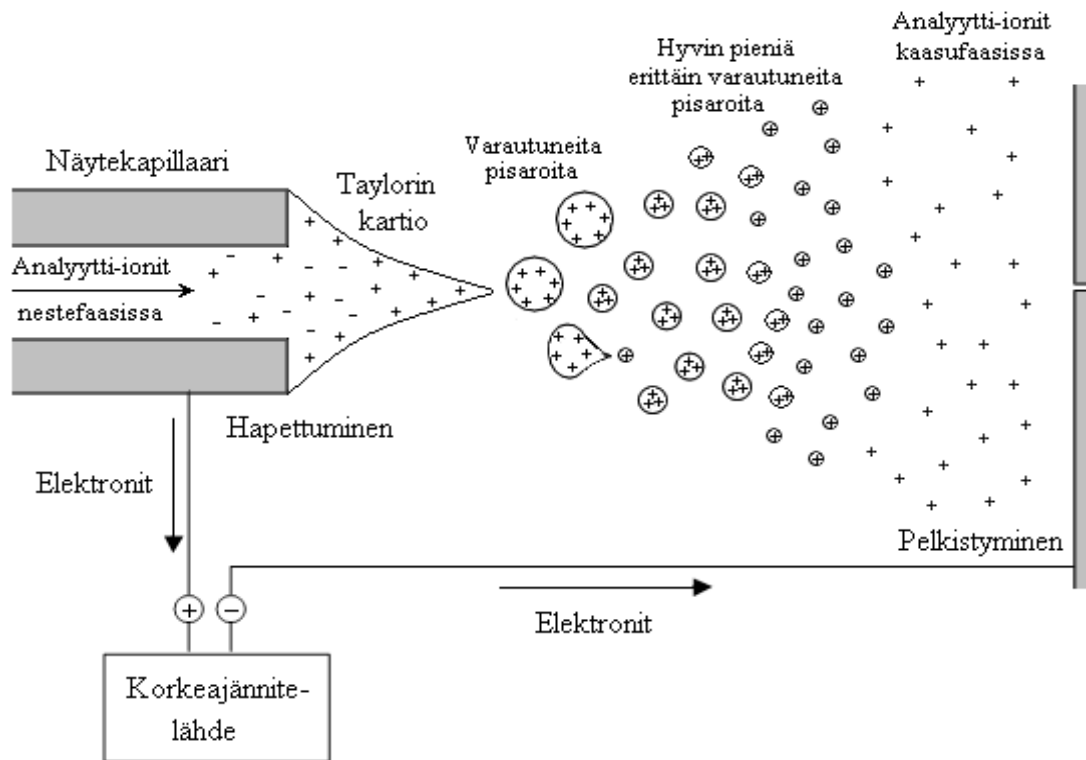
Ionisaatiolähde muuttaa näytemolekyylit kaasumaisiksi ioneiksi, jotta massaspektrometri kykenee mittaamaan ne. Näin ollen ionisaatiolähde on merkittävä osa massaspektrometriä. Yleisimpiä käytettyjä tekniikoita ovat esimerkiksi kaasukromatografian yhteydessä käytetyt elektronipommitus-ionisaatio ja kemiallinen ionisaatio. (11, s. 5.)

LC-MS-liitännöiden yhteydessä käytetään pehmeitä ilmanpaineessa tapahtuvia ionisointitapoja, API (Atmospheric Pressure Ion Source), jotka ovat yleistyneet vasta viime vuosikymmenien aikana ja soveltuvat hyvin kyseessä olevaan tekniikkaan. Näitä ovat muun muassa sähkösumutus-ionisaatio, ESI ja normaali-ilmanpaine-kemiallinen-ionisaatio, APCI. (11, s. 5, 6.)

ESI-tekniikka eli sähkösumuionisaatio sopii sellaisille analyyteille, jotka voidaan saattaa liuoksessa ionimuotoon. Sähkösumuionisaatio siis siirtää valmiiksi varautuneet ionit nestefaasista kaasufaasiin ja samalla ilmanpaineesta tyhjiöön. (11, s. 6.) Ionisoituminen tapahtuu suhteellisen pienille 3000 Da (molekyyli­massan yksikkö) polaarille molekyyleille. Isommat peptidit ja proteiinit näkyvät, koska ne voivat varautua useamman kerran. (28.)

Aerosolisumu syntyy, kun varautuneet analyytit sisältävä neste ajetaan korkeajännitteisen kapillaarin läpi. Kapillaarin kanssa vastakkain varautuneet ionit jäävät kapillaariin ja saman varauksen omaavat työnnetään ulos, jolloin muodostuu kartio, ja lopulta ionit purkautuvat ulos hienona sumuna, joka sisältää pieniä varauksellisia pisaroita. Pisarat pienenevät koko ajan liuottimen haihtuessa ja ionien purkautumisen vuorotellussa. Lopulta jäljellä on vain kaasufaasissa olevat ionit, jotka ohjataan vastaelektrodin kautta tyhjiöön ja massa-analysointiin. (Kuva 22.) (11, s. 7 ; 13, s. 211 ; 12, s. 43.)





KUVA 22. ESI-tekniikka (11, s. 7.)

### LC-ESI/MS-spektri

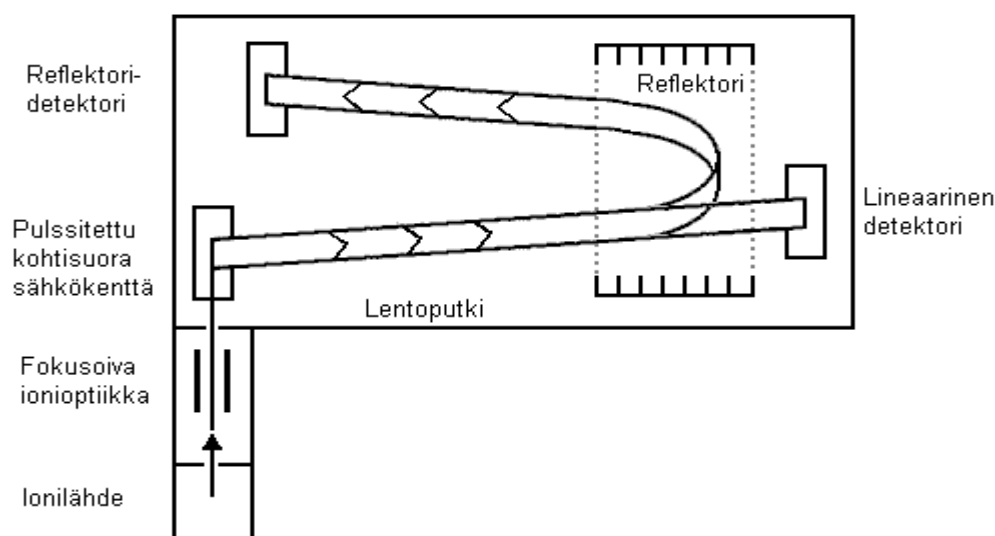
ESI:n ionisaatiotekniikka on pehmeä ionisointitapa. Molekyyli pysyy todennäköisimmin ehjänä ionilähteessä. Massaspektrometri mittaa ionien määrää eli "ion countia". Siihen vaikuttavat analyysiolosuhteet. Ion count on erilainen eri massaspektrometreillä. Tämän vuoksi ion count ei ole toistettava, ja sitä ei voi käyttää kvantitointiin. (28.) Massaspektrometri mittaa koko halutun massa-alueen esimerkiksi sekunnin välein. Tällöin saadaan kokonaisionikromatogrammi, joka voidaan hajottaa tietokoneen avulla useiksi ionikromatogrammeiksi. Tämä tarkoittaa sitä, että kromatogrammissa näkyy tällöin vain yhden ionin esiintyminen. (27, s. 5.)

Molekyylit näkyvät protonoituneina eli  $[M+H]^+$ , tai esimerkiksi natrium-, kalium- ja ammoniumaddukteina. Liuottimen valinnalla voidaan vaikuttaa siihen, millaisena addukti ilmenee. Massaspektrissä näkyy atomien isotooppijakauma. Tätä voidaan käyttää hyväksi molekyylin tunnistuksessa ja tarkan massan eli monoisotooppisen massan määrittämisessä. (28.)

## Massa-analysaattorit

Massa-analysaattori erottelee ionisaatiolähteestä tulevat ionit  $m/z$ -suhteiden perusteella, mikä tapahtuu tyhjiössä. Ionit voidaan erotella liikemäärän, nopeuden tai energian perusteella. Massa-analysaattoreita on olemassa muun muassa kvadrupoli-, lentoaika- ja ioniloukkuanalysaattorit. Näistä yleisimmin käytetty on kvadrupolimassa-analysaattori. Kvadrupolimassaspektrometrit ovat edullisia, helppokäyttöisiä ja paineen sietokyky on hyvä, joten niillä voi ajaa suurilla analyttivirtauksilla. Resoluution sijaan on matala. (11, s. 12.)

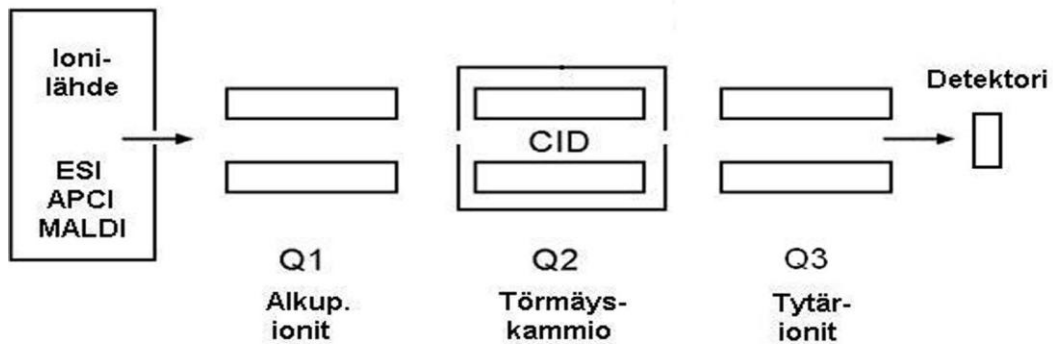
Lentoaika-analysaattorilla eli TOF (time of flight) -analysaattorilla (kuva 23) puolestaan on korkea erotuskyky ja melkein rajaton massa-alue. Mittauksen alussa ionien on oltava täysin samalla energiatasolla ja paikalla, jotta saavutettaisiin korkea erotuskyky. Lentoaikamassaspektrometrian idea on mitata erimassaisten ionien nopeuseroja. Ionit saavat saman kineettisen energia, kun niitä kiihdytetään yhtäaikaaisesti vakiojännitteellä. Tällöin samanaikaisesti lähtevät raskaammat ionit lentävät kevyitä hitaammin, ja näin ollen ionit saapuvat detektorille eri aikaan. Toisin sanoen eri massaiset ionit saapuvat detektoitavaksi eri aikaan ja tästä voidaan laskea  $m/z$ -suhde lentoajan perusteella. (11, s. 14–15)



KUVA 23. TOF-laitteisto (11, s. 15.)

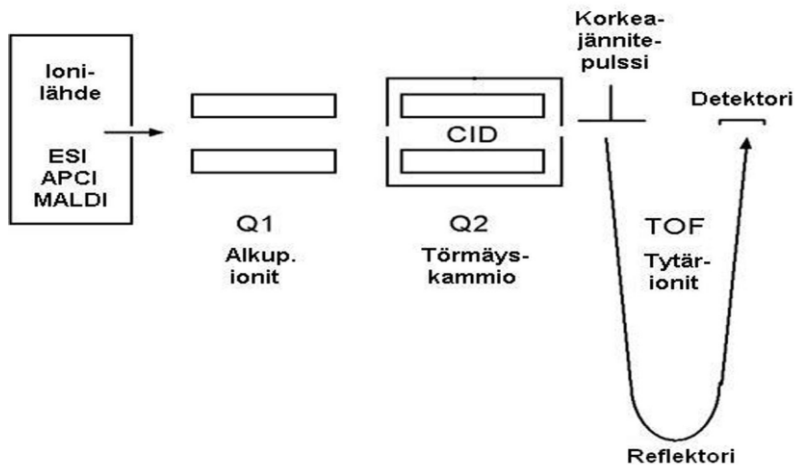
### 6.2.3 Tandem-massaspektrometria

Tandem-massaspektrometrialla tarkoitetaan kahta tai useampaa massaspektrometria yhdistettynä toisiinsa. (12, s. 54). Kolmoiskvadrupoli on yleisin tandem-laitteisto. Siinä on kolme kvadrupolia peräkkäin. Kolmoiskvadrupolin ensimmäisessä kvadrupolissa tapahtuu massa-analyysi, jonka perusteella valitaan törmäytettävä äiti-ioni. Toisessa kvadrupolissa tapahtuu törmäytys, eli valitut ionit frakmentoidaan törmäyttämällä ne inerttiin kaasuun. Kolmannessa kvadrupolissa analysoidaan syntyneet ionit. (Kuva 24.) (11, s. 19 ; 13, s. 214.)



KUVA 24. Kolmoiskvadrupoli (11, s. 20)

Toinen viime aikoina yleistynyt laitteisto on kvadrupoli-lentoaika-analysaattori, jossa yksi kvadrupoli on korvattu TOF-analysaattorilla. TOF-MS/MS -menetelmä on yleisesti käytetty tuntemattomien proteiinien tutkimuksessa. Sen herkkyys on hyvä, ja sillä saa tytärioneista korkearesoluutioisen massaspektrin ja tarkan massan. (Kuva 25.) (11, s. 20.)



KUVA 25. TOF-MS/MS laitteisto (11, s. 21.)

## 7 LASKEUMAPÖLYNÄYTTEIDEN TUTKIMINEN

Laskeumapölynäytteet on kerätty kohteissa, joissa arvellaan olevan kosteusvauriosta johtuva mikrobiongelma. Eri näytteitä viljeltiin ja testattiin siittiötestillä paljon, mutta lopulta tutkimukseen otettiin mukaan kaksitoista (12.) siittiötestillä myrkylliseksi todettua näytettä. Kaikki nämä näytteet analysoitiin ESI/LC-MS:llä, mutta lopulta rakennetutkimukseen otettiin mukaan vain näyte 11.

### 7.1 Näytteenkäsittely ja -testaus siittiötestillä

Laskeumapölynäytteestä tehtiin sekaviljelelmä TSA-elatusalustalle. Viljely suoritettiin laminaarikaapissa pinseteillä, jotka on steriloitu etanolilla ja kuumentamalla. Pinseteillä otettiin pieni määrä steriilisti säilytettyä pölynäytettä, ja siveltiin TSA-maljan pintaan. Viljelmän annettiin kasvaa huoneenlämmössä kolme vuorokautta. Elatusmaljoilla kasvatetut sekakasvustot ovat yleensä täynnä eri mikrobipesäkkeitä, joten niistä tehtiin laimentaminen hajotustekniikalla (ks. s. 25) Kun pesäkkeet oli saatu laimentamalla erilleen, niistä tehtiin uutos. Uutos valmistettiin keräämällä kaikki elatusalustalta irtilähtevä mikrobimassa.

Mikrobimassaa uutettiin metanolissa 50 celsiusasteessa 10 minuutista 15 minuuttiin. Tämän jälkeen uutosta käsiteltiin ultraäänihauteessa 30 minuuttia, jotta solukko hajoaisi ja kaikki aines saataisiin liukenemaan uutokseen. Lopuksi sentrifugoitiin uutos ja siirrettiin kirkasliuos säilytyspulloon. Uutosnäytteet testattiin vuorokauden kestäväällä siittiötestillä, jolla määritettiin myrkyllisyys vain kvalitatiivisesti (ks. s. 33–34). Testaus suoritettiin siten, että kuoppalevyille pipetoitiin 1 ml siittiöliuosta. Siihen lisättiin haluttu määrä mikrobiuutosta ja annettiin vaikuttaa vuorokauden. Tulokset tutkittiin mikroskoopilla. Testillä myrkyllisiksi todetut pesäkkeet viljeltiin puhtasviljelmiksi. Puhtasviljelmien annettiin kasvaa 14 vuorokautta. Puhtasviljelmästä tehtiin uutos ja se testattiin vielä siittiötestillä myrkyllisyyden varmentamiseksi. Lopulta kaikista testatuista uutosnäytteistä

valittiin kaksitoista myrkylliseksi todettua näytettä jatkoanalyysiin. Mikrobiuutokset nimettiin 1–12.

## 7.2 LC-ESI/MS –analyysi

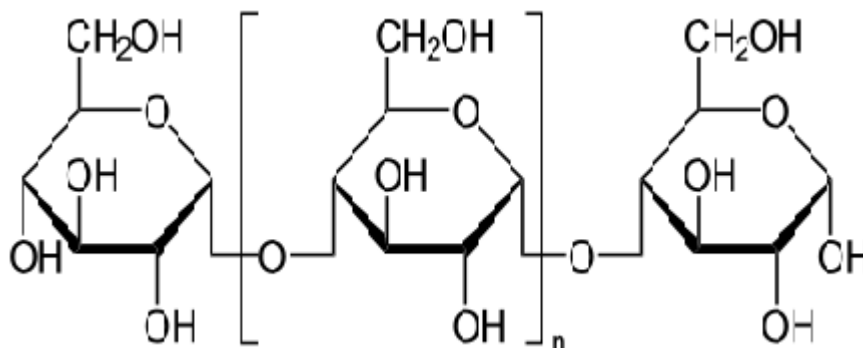
Mikrobimyrkkyjen ensimmäiseen analyysiin käytettiin LC-ESI/MS-yhdistelmätekniikkaa. Nestekromatografi (Waters 626) on gradientti-HPLC-laitteisto, joka on varustettu UV- ja diodirividetektoreilla sekä näytteensyöttäjällä. Kolonnina toimi silikapohjainen käänteisfaasikolonne. Laitteistoon voidaan liittää näytteenkeräysyksikkö, jolloin nestekromatografi erottelee näytteen komponenteikseen ja keräyslaitteisto kerää komponentit näyteputkiin määrätyillä poiminta-ajoilla. Massaspektrometri (Micromass LCT) on TOF-MS-laite eli lentoaika-analysointitekniikkaan perustuva korkea erotuskyvyn massaspektrometri. Ionisaatiotekniikkana käytettiin sähkösumutusta (ESI). Sisäänsyöttö nestekromatografista massaspektrometriin tapahtuu kapillaarin välityksellä. Kyseessä olevalla massaspektrometrillä voidaan myös määrittää molekyyllille tarkka massa jotain referenssiainetta verrokkina käyttäen.

Analyysit suoritettiin gradienttiohjelmalla, joka on esitetty taulukossa 5. Ajoliuokset olivat 0,1-prosenttinen muurahaishappo (HCOOH) ja asetonitrili (ACN). Näytteen injektioilavuus vaihteli 20–50 µl:aan. Virtausnopeus oli 1 ml/min. Kolonnia tasapainotettiin ennen ajo-ohjelman alkua huuhtelemalla sitä ajoliuoksella niin kauan, että vastapaineen vaihtelu tasaantui.

TAULUKKO 5. Gradienttianalyysin olosuhteet

Aika (min)	Asetonitrili (%)	0,1 % HCOOH (%)
0	5	95
5	50	50
15	100	0
25	100	0
25,10	5	95
31	5	95

Massoille 1036,6903 - 1050,7034 - 1078,7394 määritettiin tarkkamassa  $\alpha$ -syklodekstriiniä verrokkina käyttäen.  $\alpha$ -syklodekstriini (kuva 17) valittiin sen vuoksi, että sen molekyylipaino oli lähellä määritettäviä massoja.



KUVA 26.  $\alpha$ -syklodekstriinin rakenne (48.)

### 7.3 LC-ESI/MS –analyysin tulokset

Suurimmaksi osaksi näytteiden kromatogrammien piikit olivat epäselviä ja massapiikkejä esiintyi lukuisia määriä yhdellä kromatogrammin piikillä. Näytteistä 2–5 ja 7 löydettiin yhtäläisiä ominaisuuksia. Ne sisälsivät yhteneviä massapiikkejä. Näytteiden yhteneväiset massapiikit on esitelty taulukossa 6.

TAULUKKO 6. Näytteiden 2–5 ja 7 yhteneviä massoja

Näyte								
	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z
2	699,4	1036,6	1050,4	1058,5	1064,6	1072,4	1078,6	1100,5
3	699,4	1036,4	1050,4	1058,4	1064,6	1072,4	1078,6	1100,4
4		1036,6	1050,6	1058,6		1072,5		1100,5
5		1036,3		1058,2		1072,9		1100,1
7	699,4	1036,6	1050,4	1058,5	1064,6	1072,4	1078,6	1100,6

Näitä tuloksia pystyttiin arvioimaan vain käytössä olleiden artikkeleiden perusteella. Yhteneväisyyttä löytyi surfaktiiniin kanssa seuraavilla massoilla 1058,9  $[M+Na]^+$ , 1072  $[M+Na]^+$ , 1036  $[M+H]^+$  ja 1050  $[M+H]^+$ . Tarkat massat

määritettiin osalle taulukossa 6 esiintyvistä massapiikeistä. Talukukossa 7 esiintyvä määritetyt tarkat massat.

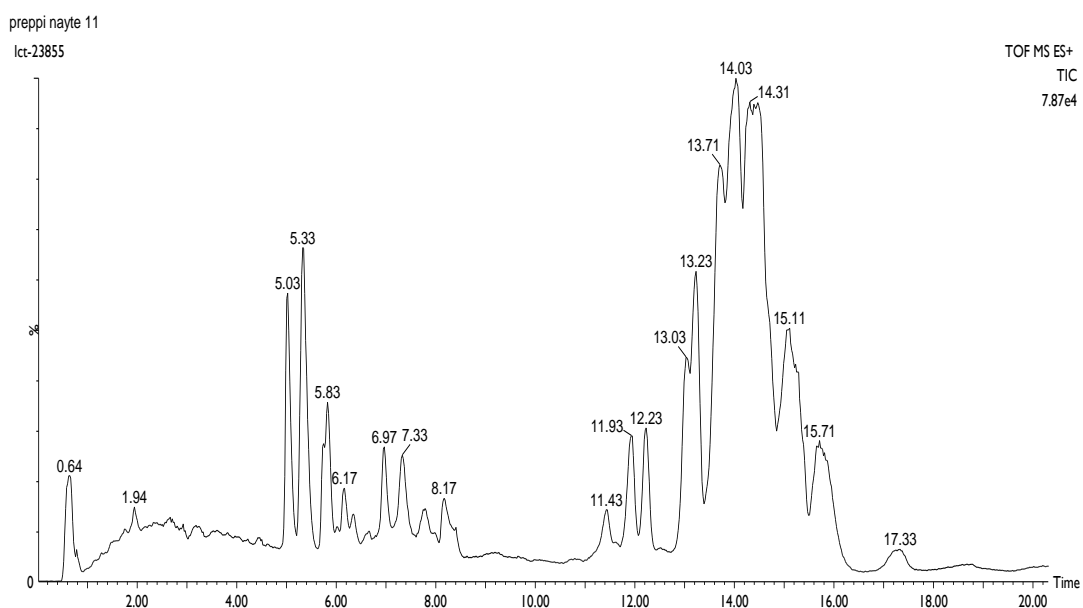
TAULUKKO 7. Tarkat massat

Tarkka massa	Kaava	Epätty aine
1036,6903 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>53</sub> H <sub>94</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	C15 Surfaktiini
1050,7034 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>54</sub> H <sub>96</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	C16 Surfaktiini
1078,7394 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>56</sub> H <sub>100</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub>	ei vastaavuutta

Tarkan massamäärityksen perusteella voitiin melko varmasti sanoa, että näytteissä esiintyvä surfaktiinin C15- ja C16- muotoa. C15- ja C16- nimitykset tulevat hiilivetyketjujen pituudesta, mitkä ovat liittyneet surfaktiinin rengasrakenteiseen peptidiin. (Ks. s. 24)

## 7.4 Näyte 11

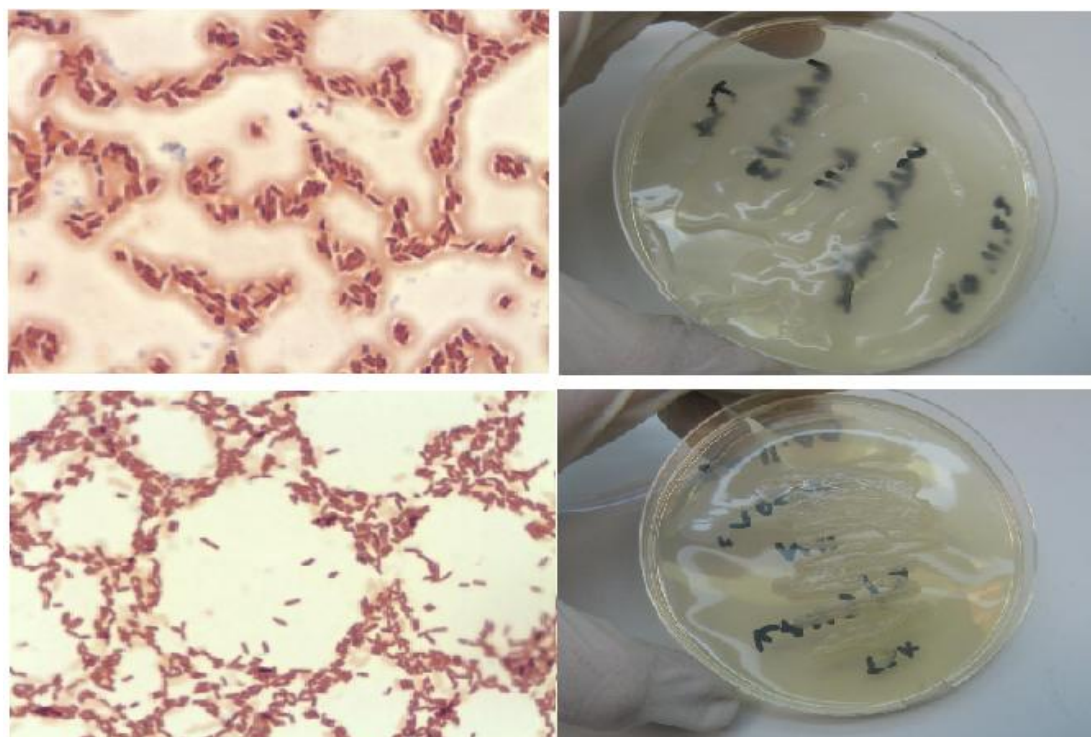
Näytteen 11 kromatogrammi oli selkeä muihin näytteisiin verrattuna (kuva 27). Fraktioiden kerääminen selkeästä kromatogrammista on keräyslaitteistolla helpompaa, joten päädyttiin jatkamaan tutkimista ainoastaan näytteestä 11.



KUVA 27. Näytteen 11 kromatogrammi



Näytteen 11 bakteerit olivat gram-negatiivisia sauvoja. Kuvassa 28 on esitelty näytteen 11 kaksi eri pesäkettä, jotka on viljelty puhtaaksi. Puhdasviljelmien bakteerimassat yhdistettiin, ja tehtiin vain yksi uutos näytteen vähyden vuoksi.



KUVA 28. Näytteen 11 pesäkkeet ja gram-värjäykset

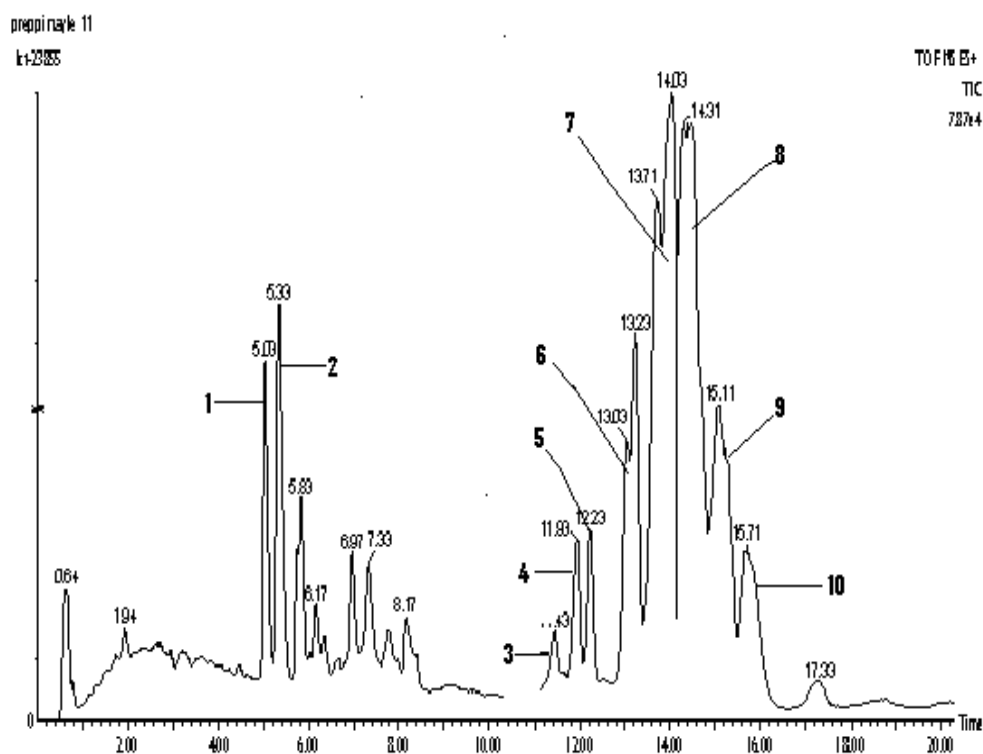
Näytteellä 11 ja näytteillä 2–5 ja 7 ilmeni kolmea yhtenevää massaa (vrt. taulukko 5). Massat on esitelty taulukossa 8. Kromatogrammit ja massat löytyvät liitteistä 5–6.

TAULUKKO 8. Näytteessä 11 ilmeneviä massoja

Näyte 11	
m/z	m/z
1008,517	1057,365
1008,89	1058,292
1018,451	1072,145
1022,471	1076,6
1032,473	1086,42
1043,283	1090,461
1044,421	1100,4

## 7.4.1 Näytteen 11 fraktioiminen ja fraktionkäsittely

Näyte 11 fraktioitiin luvussa 7.2 esitellyllä nestekromatografilla (Waters 626), johon on liitetty näytteenkeräysyksikkö. Kolonni, olosuhteet ja näytemäärä pysyvät samoina kuin kappaleessa 7.2, koska näytteen täytyy retentoitua mahdollisimman samalla tavalla, jotta halutut piikit saadaan talteen. Näytteenkeräysyksikkö ohjelmoidaan keräämään tietyllä retentioajalla eluoituvat piikit näyteputkiin. Detektorina toimii UV-detektor. Keräysyksikköä käytettäessä virtausnopeus on huomattavasti suurempi noin 20 ml/min. Tästä johtuen suurin osa kerätystä näytteestä on liuotinta. Ylimääräinen liuotin ja vesi poistetaan kylmäkuivauksella ja pyöröhaihduuttimella. Kuvassa 29 on esitelty kromatogrammista kerätyt kymmenen (10) piikkiä.



KUVA 29. Fraktiointiin valitut 10 piikkiä

**Kylmäkuivauksen** periaate on poistaa liuoksen liuotin, yleensä vesi, niin että liuotin saatetaan kiinteään muotoon ja poistetaan sublimaation avulla. Kylmäkuivausprosessi tapahtuu kolmessa vaiheessa: jäädytys, primääri- ja sekundäärikuivaus. Kylmäkuivauslaitteisto koostuu kuivauskammioista, höyryn tiivistyskammioista, vakuumpumpusta ja jäädytyslaitteistosta. (29, s. 2.)

**Pyöröhaihdutusta** käytetään orgaanisten liuottimien pois tislauksessa. Se vastaa nopeutettua alipainetislausta mutta, on hellävaraisempi tapa poistaa liuotin reaktiotuotteesta. (30.)

#### 7.4.2 Näytteen 11 fraktioiden testaus siittiötestillä

Kuivatut fraktiot liuotettiin metanoliin niin, että lopullinen tilavuus oli kullakin fraktiolla noin 50 µl. Fraktiot testattiin yhden vuorokauden kestäväällä kvalitatiivisella siittiötestillä. Myrkylliset fraktiot on esitelty taulukossa 9.

TAULUKKO 9. Fraktioiden toksisuus

Näyte	Toksisuus
4	Vähiten toksinen, tappoi siittiöitä vuorokauden testissä
6	Toksinen
7	Toksinen, tappoi siittiöt 10 minuutissa
10	Toksinen

#### 7.5 Rakenteen määrittäminen LC-ESI/TOF-MS/MS:lla

TOF-MS/MS (Micromass QToF I) on lentoaika-analysointilaitteisto ja kolmoiskvadrupolin yhdistelmälaiteisto. Laitteistolla saadaan tarkka massa yhdisteen pilkkoutumistuotteille sekä alkuainekoostumus. Laitteistoa voi käyttää erityisesti peptidien tunnistamiseen ja aminohapposekvenssien määrittämiseen. Näytteensyöttö suoritettiin nestekromatografilla (Waters 626), joka oli liitetty kapillaarilla tandem-massaspektrometriin.



## 8 POHDINTA

Tutkimuksen tarkoituksena oli luoda menetelmää mikrobitoroksiinien määrittämiseksi ja määrittää mikrobiuutoksesta mahdollinen myrkyllisyyden aiheuttaja, tutkimalla uutoksen kemiallista rakennetta. Menetelmän kehitys jäi alkeelliselle tasolle. Kehitykseen tarvittaisiin enemmän aikaa, tutkimusta ja erikoisosaamista. Kahdesta mikrobiuutoksen fraktiosta löydettiin aminohapporakenne, joka mahdollisesti voisi kuulua pumilacidinille sekä yhdestä fraktiosta aminohapporakenne, jota ei ollut nykyisten tietojen mukaan määritetty tiedossa oleville aineille. Nämäkin tulokset jäivät alkeellisiksi, ja mikäli haluttaisiin varmempia tuloksia, tutkimukseen tarvittaisiin jälleen enemmän aikaa ja erikoisosaamista.

Tutkimuksessa käytettiin myrkyllisyyden testaamiseen vain sian siittiöttestiä, joten alkuvaiheista lähtien joitain myrkyllisiä pesäkkeitä on saattanut jäädä huomaamatta. Tämän vuoksi olisi hyvä ottaa mukaan myös muita testejä, jotka kertovat mahdollisesta myrkyllisyydestä. Nestekromatografian ja massaspektrometrian lisäksi rakenneanalysointi voitaisiin suorittaa myös NMR:llä.

Bakteeriviljelyksistä olisi voitu tehdä erilaisia bakteerin tunnistustestejä. Esimerkiksi olisi voitu käyttää selektiivisiä kasvatusalustoja ja biokemiallisia testejä. Näin olisi saatu enemmän tietoa bakteerista, ja se olisi rajannut paljon sitä, minkälaisia myrkyllisiä yhdisteitä lajilta olisi mahdollisesti odotettavissa. PCR-menetelmä olisi hyvin varma tapa tunnistaa bakteeri. Tällöin olisi voitu keskittyä yhteen tiettyyn bakteeri sukuun tai lajiin, esimerkiksi *Bacilluksiin*.

Ensimmäisissä analyyseissä toistui samanlaisia molekyyliainemääriä ja molekyyliainemääriä monilla eri näytteillä. Näitä toistuvia molekyyliainemääriä olisi kannattanut mielestäni tutkia enemmän. Näytteiden loppuminen osoittautui tutkimusta haittaavaksi tekijäksi liian usein, joten viljelmiä samasta näytteestä pitäisi valmistaa huomattavasti enemmän.

Tutkimus oli irrallisesti toteutettu, jotta siitä olisi saanut edes mainittavan arvoisia tuloksia. Mikäli mikrobitoksiineille halutaan joskus saada aikaiseksi kunnollinen standardien mukainen määritysmenetelmä, tulisi sen työstämisessä olla mukana eri alan osajia, jotka työskentelisivät tiiviisti yhdessä ja loisivat toimivan kokonaisuuden. Tällä hetkellä menetelmät tarvitsevat vielä paljon kehitystä.

# LÄHTEET

1. Hometaloissa hengitetään myrkyllistä ilmaa. 2008. Saatavissa:  
[http://www.kemia-lehti.fi/pdf/kem608\\_home.pdf](http://www.kemia-lehti.fi/pdf/kem608_home.pdf) Hakupäivä: 21.4.2010
2. Salkinoja-Salonen, Mirja 2002. Mikrobiologian perusteita. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.
3. Laakso, Tuula. – Peltola, Joanna. – Kalso, Seija. – Vartiala, Timo. – Ahonen, Seppo. Asuntojen rakennusmateriaalien sekä niiden ja sisäilman mikrobien myrkyllisyys karjun siirtötestissä. Saatavissa:  
[http://www.hel.fi/wps/wcm/connect/04a618004a172340a48eec3d8d1d4668/julkaisu15\\_01.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=04a618004a172340a48eec3](http://www.hel.fi/wps/wcm/connect/04a618004a172340a48eec3d8d1d4668/julkaisu15_01.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=04a618004a172340a48eec3) Hakupäivä: 16.4.2010.
4. Solunetti 2006. Bakteerit. Saatavissa:  
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/bakteerit/2/> Hakupäivä: 5.5.2010.
5. Solunetti 2006. Sienet. Homeet. Saatavissa:  
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/homeet/2/> Hakupäivä: 5.5.2010.
6. Niemi, Jarmo 2003-2006. Luentorunko. Mikrobiologian perusteet.
7. Mikkola, Raimo 2006. Food an Indoor Air Isolated *Bacillus* Non-Protein Toxins: Structures, Physico-Chemical Properties an Mechanisms of effects on Eukaryotic Cells. Helsinki: University of Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Applied Chemistry and Microbiology, Division of Microbiology. Väitöskirja. Saatavissa:  
<http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/mikkola/foodandi.pdf>  
Hakupäivä: 10.1.2010.
8. Salkinoja-Salonen, Mirja 2009. Mikrobitoksiinit sisätiloissa. Saatavissa:  
[http://www.sisailmayhdistys.fi/attachments/sem2009/mikrobitoksiinit\\_sisailoissa.pdf](http://www.sisailmayhdistys.fi/attachments/sem2009/mikrobitoksiinit_sisailoissa.pdf) Hakupäivä: 13.3.2010.
9. Solnetti 2006. Gram-värjäys. Saatavissa:  
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/gram-varjays/2/> Hakupäivä: 24.5.2010.
10. Ouwehand, Arthur - Nuutila, Jari - Niemi, Jarmo 2003-2010. Mikrobiologian harjoitustyöt. Puhdasviljelmä.

11. Laine, Aleksi 2009. Polaaristen yhdisteiden analytiikkaan soveltuvat nestekromatografia-massaspektrometria-menetelmät. Pro gradu. Saatavissa:  
[https://jyx.jyu.fi/dspace/bitstream/handle/123456789/19967/URN\\_NBN\\_fi\\_jyu-200904201471.pdf?sequence=1](https://jyx.jyu.fi/dspace/bitstream/handle/123456789/19967/URN_NBN_fi_jyu-200904201471.pdf?sequence=1) Hakupäivä: 18.2.2010.
12. Riekkola, Marja-Liisa – Hyötyläinen, Tuulia 2002. Kolonnikromatografia ja kapillaarielektromigraatiotekniikat. Helsinki: Yliopistopaino.
13. Jaarinen, Soili – Niiranen, Jukka 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5., uudistettu painos. Helsinki: Edita.
14. Kettunen, Ari-Veikko 1998. Rakennusten kosteus- ja homevaurioituminen. Ympäristö ja terveys-lehti 1/1998.
15. Meklin, Teija - Hyvärinen, Anne - Torkko, Pirjo- Nevalainen, Aino 1999. Rakennusten mikrobiologisten tutkimusten laatu - investointi työhön ja tekijöihin. Ympäristö ja terveys-lehti 7-8/1999.
16. Allergia- ja astmaliitto. Sisäilmaopas. Saatavissa:  
[http://www.allergia.com/files/988/AA\\_sis\\_ilma\\_net.pdf](http://www.allergia.com/files/988/AA_sis_ilma_net.pdf) Hakupäivä: 24.1.2011.
17. Sosiaali- ja terveysministeriön oppaita 2003. Asumisterveysohje. Saatavissa: [http://www.finlex.fi/pdf/normit/14951-asumisterveysohje\\_pdf.pdf](http://www.finlex.fi/pdf/normit/14951-asumisterveysohje_pdf.pdf) Hakupäivä: 18.1.2011.
18. Sisäilmayhdistys 2008. Sisäilmasto. Saatavissa:  
[http://www.sisailmayhdistys.fi/portal/terveelliset\\_tilat/sisailmasto/](http://www.sisailmayhdistys.fi/portal/terveelliset_tilat/sisailmasto/) Hakupäivä: 18.1.2011.
19. Sisäilmayhdistys 2008. Mikrobikasvun edellytykset. Saatavissa:  
[http://www.sisailmayhdistys.fi/portal/terveelliset\\_tilat/kosteusvauriot/mikrobit/mikrobikasvun\\_edellytykset/](http://www.sisailmayhdistys.fi/portal/terveelliset_tilat/kosteusvauriot/mikrobit/mikrobikasvun_edellytykset/) Hakupäivä: 18.1.2011.
20. Sosiaali- ja terveysministeriön selvityksiä 2009. Kosteusvauriot työpaikoilla. Saatavissa:  
[http://www.stm.fi/c/document\\_library/get\\_file?folderId=39503&name=DLFE-8606.pdf](http://www.stm.fi/c/document_library/get_file?folderId=39503&name=DLFE-8606.pdf) Hakupäivä: 19.1.2011.
21. Heikkilä, Mari 2009. Homeista viis, ongelmatalossa sairastuttaa toksiini. Tiede 6/2009. Saatavissa:



- [http://www.tiede.fi/artikkeli/1067/homeista\\_viis\\_ongelmatalossa\\_sairas\\_tuttaa\\_toksiini](http://www.tiede.fi/artikkeli/1067/homeista_viis_ongelmatalossa_sairas_tuttaa_toksiini) Hakupäivä: 26.1.2011.
22. Solunetti 2006. Bakterien rakenne. Saatavissa:  
[http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/bakterien\\_ulkoiset\\_rakenteet/](http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/bakterien_ulkoiset_rakenteet/)  
Hakupäivä: 14.1.2011.
23. Salkinoja-Salonen, Mirja 1999. Myrkylliset mikrobit sisätiloissa.  
Helsinki: Mikrobiologian julkaisuja.
24. Solunetti 2006. Hiivat. Saatavissa:  
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/hiivat/2/> Hakupäivä: 2.2.2011.
25. Sisäilmayhdistys 2008. Katsaus mikrobeihin. Saatavissa:  
[http://www.sisailmayhdistys.fi/portal/terveelliset\\_tilat/kosteusvauriot/mikrobit/katsaus\\_mikrobeihin/](http://www.sisailmayhdistys.fi/portal/terveelliset_tilat/kosteusvauriot/mikrobit/katsaus_mikrobeihin/) Hakupäivä: 2.2.2011.
26. Hengityслиitto. Sisäilmassa esiintyvistä mikrobeista. Saatavissa:  
[http://www.hengityслиitto.fi/content/Liitteet/Tietoa\\_sisailman\\_mikrobeista.pdf?from=18299991562874257](http://www.hengityслиitto.fi/content/Liitteet/Tietoa_sisailman_mikrobeista.pdf?from=18299991562874257) Hakupäivä: 3.2.2011.
27. Kotiaho 2009. Analytiikan perusteet. Saatavissa:  
[http://www.helsinki.fi/farmasia/pharmchemistry/opetus/analytiikanperusteet/Luento7\\_8.pdf](http://www.helsinki.fi/farmasia/pharmchemistry/opetus/analytiikanperusteet/Luento7_8.pdf) Hakupäivä: 3.2.2011.
28. Kajula, Marena 2010. ESI-ionisaatiotekniikka. Oulu: Oulun yliopisto, kemian laitos.
29. Seppänen, Timo 2008. Kylmäkuivaus ja siinä suoja-aineina käytettävät sokerit. Saatavissa  
[http://www.pharmtech.helsinki.fi/seminaarit/seminaarit/timo\\_seppanen.pdf](http://www.pharmtech.helsinki.fi/seminaarit/seminaarit/timo_seppanen.pdf) Hakupäivä: 3.2.2011.
30. Orgaanisen kemian laboratorio-opas 2005. Pyöröhaihdutus.  
Saatavissa:  
<http://virtuaali.tkk.fi/orgaaninenkemian/labraopas/metodit/erottelu/pyorohaihdutin/pyorohaihdutin.htm> Hakupäivä: 3.2.2011.
31. Arabslab 2006. Basic Bacterial Cell Structure. Saatavissa:  
[http://www.google.fi/imgres?imgurl=http://www.arabslab.com/myimages/bacteria/bacteria\\_cell\\_wall\\_structure.jpg&imgrefurl=http://www.arabslab.com/vb/showthread.php%3Ft%3D577&usq=K\\_UyyM6y-EqBXfCGJXgOifzsdWE=&h=402&w=520&sz=51&hl=fi&start=0&zoom=1&tbnid=3a0gy0bGmpogOM:&tbnh=135&tbnw=175&ei=7uF0TZDqO](http://www.google.fi/imgres?imgurl=http://www.arabslab.com/myimages/bacteria/bacteria_cell_wall_structure.jpg&imgrefurl=http://www.arabslab.com/vb/showthread.php%3Ft%3D577&usq=K_UyyM6y-EqBXfCGJXgOifzsdWE=&h=402&w=520&sz=51&hl=fi&start=0&zoom=1&tbnid=3a0gy0bGmpogOM:&tbnh=135&tbnw=175&ei=7uF0TZDqO)

S-

[Oswbstp2IDg&prev=/images%3Fq%3Dbacteria%2Bstructure%26um%3D1%26hl%3Dfi%26client%3Dfirefox-a%26rls%3Dorg.mozilla:fi:official%26biw%3D1680%26bih%3D858%26tbs%3Disch:1&um=1&itbs=1&iact=rc&dur=473&oei=7uF0TZDqOs-Oswbstp2IDg&page=1&ndsp=42&ved=1t:429,r:2,s:0&tx=104&ty=51](http://www.oswbstp2idg.com/prev=/images%3Fq%3Dbacteria%2Bstructure%26um%3D1%26hl%3Dfi%26client%3Dfirefox-a%26rls%3Dorg.mozilla:fi:official%26biw%3D1680%26bih%3D858%26tbs%3Disch:1&um=1&itbs=1&iact=rc&dur=473&oei=7uF0TZDqOs-Oswbstp2IDg&page=1&ndsp=42&ved=1t:429,r:2,s:0&tx=104&ty=51)

Hakupäivä: 3.3.2011.

32. Huovien, Pentti - Meri, Seppo - Peltola, Heikki - Vaara, Matti - Vaheri, Antti - Valtonen, Ville 2003. Mikrobiologia ja infektiosairaudet. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.
33. Wapedia 2010. Bakteerit. Saatavissa: <http://wapedia.mobi/fi/Bakteeri>  
Hakupäivä: 3.3.2011.
34. Chemgapedia 2011. Valinomycin. Saatavissa:  
[http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/transport/membranentransport.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/transport/pep\\_antibiot.vscml.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/transport/membranentransport.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/transport/pep_antibiot.vscml.html) Hakupäivä: 14.3.2011.
35. Lookchem 2011. Cereulide. Saatavissa:  
[http://www.lookchem.com/chemical-dictionary/en/product\\_c/157232-64-9/](http://www.lookchem.com/chemical-dictionary/en/product_c/157232-64-9/) Hakupäivä: 14.3.2011.
36. Leivo, Virpi 1998. Tampereen teknillinen korkeakoulu. Opas kosteusongelmiin. Saatavissa:  
<http://www.tut.fi/units/rak/rtek/tutkimusraportit/Raportti95.pdf>  
Hakupäivä: 7.3.2011.
37. Solunetti 2006. Bakteerin muoto.  
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/bakteerit/2/> Hakupäivä: 7.3.2011.
38. Solu tuotantolaitoksena 2006. Saatavissa:  
<http://www.tkk.fi/Units/BioprocessEngineering/BPr%20%20organismit.pdf> Hakupäivä: 7.3.2011.
39. National Microbial Pathogen Data Resource 2011. Gram-Positive and Gram-Negative. Saatavissa:  
<http://www.nmpdr.org/FIG/wiki/view.cgi/FIG/GramStain> Hakupäivä: 8.3.2011.

40. Lindroos, Anna 2003. Pernarutto. Saatavissa:  
[http://www.mm.helsinki.fi/users/lindstro/Opetus/Opetus\\_2003/Seminaarityot2003K/Anna\\_Lindroos/index.htm](http://www.mm.helsinki.fi/users/lindstro/Opetus/Opetus_2003/Seminaarityot2003K/Anna_Lindroos/index.htm) Hakupäivä: 8.3.2011.
41. American Society for Microbiology 2005. Gram Stain. Saatavissa:  
<http://archive.microbelibrary.org/microbelibrary/files/cclimages/Articleimages/Atlas-Gram/Streptomyces%20species%20fig13.jpg> Hakupäivä: 9.3.2011.
42. IndoorAid 2011. Aktinobakteeri. Saatavissa:  
[http://indooraid.com/?page\\_id=14](http://indooraid.com/?page_id=14) Hakupäivä: 9.3.2011.
43. Mold Inspection services 2011. Mold. Saatavissa:  
<http://www.moldinspectionnow.com/> Hakupäivä: 9.3.2011.
44. Kumpulainen, Elsa 2008. Mikrobiologia 1 luentomoniste, 3 op. Opintojakson oppimateriaali syksyllä 2008. Oulu: Oulun seudun ammattikorkeakoulu, tekniikan yksikkö.
45. CyberColloids 2011. Agar structure. Saatavissa:  
<http://www.cybercolloids.net/library/agar/introduction-agar> Hakupäivä: 9.3.2011.
46. Oulun yliopisto, Biologian laitos 2005. Ohjeita laboratoriotyöskentelyyn. Saatavissa:  
<http://www.oulu.fi/biologia/koululaisvierailut/opetusmateriaali/laboratorio-ohjeita.pdf> Hakupäivä: 14.3.2011.
47. Kempainen, Noora - Keränen, Pekka - Kojo, Hanna-Liisa 2009. PCR-menettelyn optimointi kihomadon DNA:n osoittamiseksi ulosteesta. Pirkanmaa: Pirkanmaan ammattikorkeakoulu, bioanalytiikan koulutusohjelma. Opinnäytetyö. Saatavissa:  
[https://publications.theseus.fi/bitstream/handle/10024/6604/Pekka\\_Keränen.pdf?sequence=1](https://publications.theseus.fi/bitstream/handle/10024/6604/Pekka_Keränen.pdf?sequence=1) Hakupäivä: 8.3.2011.
48. Wikipedia 2007. Poly-(1-4)-alpha-D-Glucose. Saatavissa:  
<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2f/Poly-%281-4%29-alpha-D-Glucose.svg> Hakupäivä: 14.3.2011.
49. Look Chem. Surfaktiinin rakenne. Saatavissa:  
<http://www.lookchem.com/cas-150/150949-31-8.html> Hakupäivä: 28.3.2011.

50. Biosurf. Surfaktiinin rakenne. Saatavissa:

<http://www.biosurf.ugent.be/Biosurfactantia.htm> Hakupäivä: 28.3.2011.

51. Look Chem. Ituriinin rakenne. Saatavissa:

<http://www.lookchem.com/cas-164/164740-74-3.html> Hakupäivä:

28.3.2011.

## LIITTEET

- Liite 1. Näyte 11: fraktion 6 analyysitulokset.
- Liite 2. Näyte 11: fraktion 8 analyysitulokset.
- Liite 3. Näyte 11: fraktion 9 analyysitulokset.
- Liite 4. Artikkel: Antifungal compound produced by the cassava endophyte  
*Basillus pumilus* MAIIM4A
- Liite 5. Näyte 11: kromatogrammit ja massat.
- Liite 6. Näyte 11: kromatogrammit ja massat.

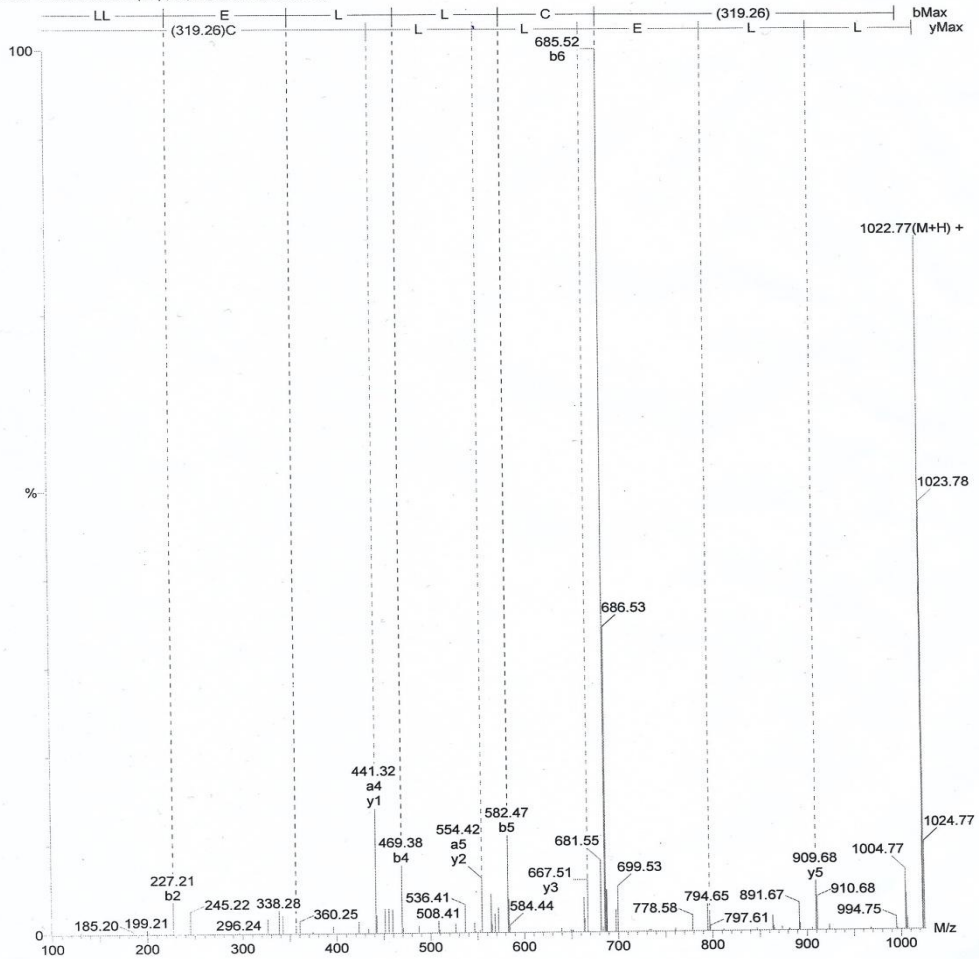
**BioLynx - Peptide Sequencing Report**

PepSeq file: C:\MassLynx\gf03.psq  
 Printed: Tue Apr 20 13:45:37 2010

Observed MW: 1021.9922 Precursor ion charge state: 1  
 M/z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 1 (0.750%)

a	86.10	199.18	328.22	441.31	554.39	657.40	976.99
	---	---	---	-0.02	-0.02	---	---
b	114.09	227.18	356.22	469.30	582.39	685.40	1004.99
	---	-0.03	-0.05	-0.08	-0.09	-0.13	---
	Leu	Leu	Glu	Leu	Leu	Cys	319.26
y	1023.00	909.92	796.83	667.79	554.71	441.62	338.61
	---	0.24	0.26	0.28	0.29	0.30	---
z	1005.97	892.89	779.80	650.76	537.68	424.59	321.58
	---	---	---	---	---	---	---

n 11-fr 6 1023  
 QT0050 AccMass 463 (Top,10, Ht,9000.0,0.00,0.70) 1: TOF MSMS 1023.00ES+



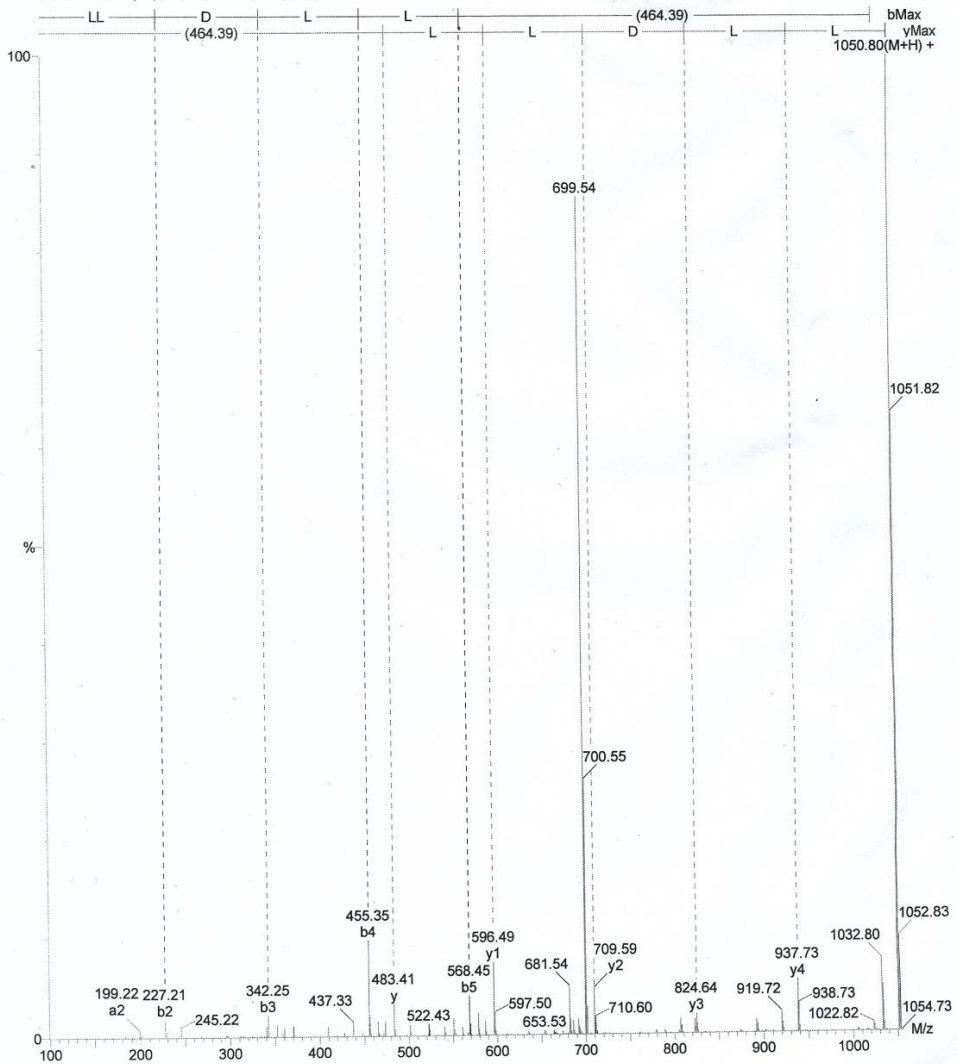
BioLynx - Peptide Sequencing Report

PepSeq file: C:\MassLynx\gf03.psq  
 Printed: Tue Apr 20 13:56:22 2010

Observed MW: 1049.9922 Precursor ion charge state: 1  
 M/z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 10 (0.550%)

a	86.10	199.18	314.21	427.29	540.38	1004.99
	---	-0.04	---	---	-0.06	---
b	114.09	227.18	342.20	455.29	568.37	1032.99
	---	-0.03	-0.05	-0.06	-0.07	---
	Leu	Leu	Asp	Leu	Leu	464.39
y	1051.00	937.92	824.83	709.80	596.72	483.64
	---	0.19	0.19	0.21	0.23	0.23
z	1033.97	920.89	807.80	692.77	579.69	466.61
	---	---	---	---	---	---

n 11-fr 8 1051  
 QT0051 AccMass 547 (Top,10, Ht,9000.0,0.00,0.70) 1: TOF MSMS 1051.00E5+



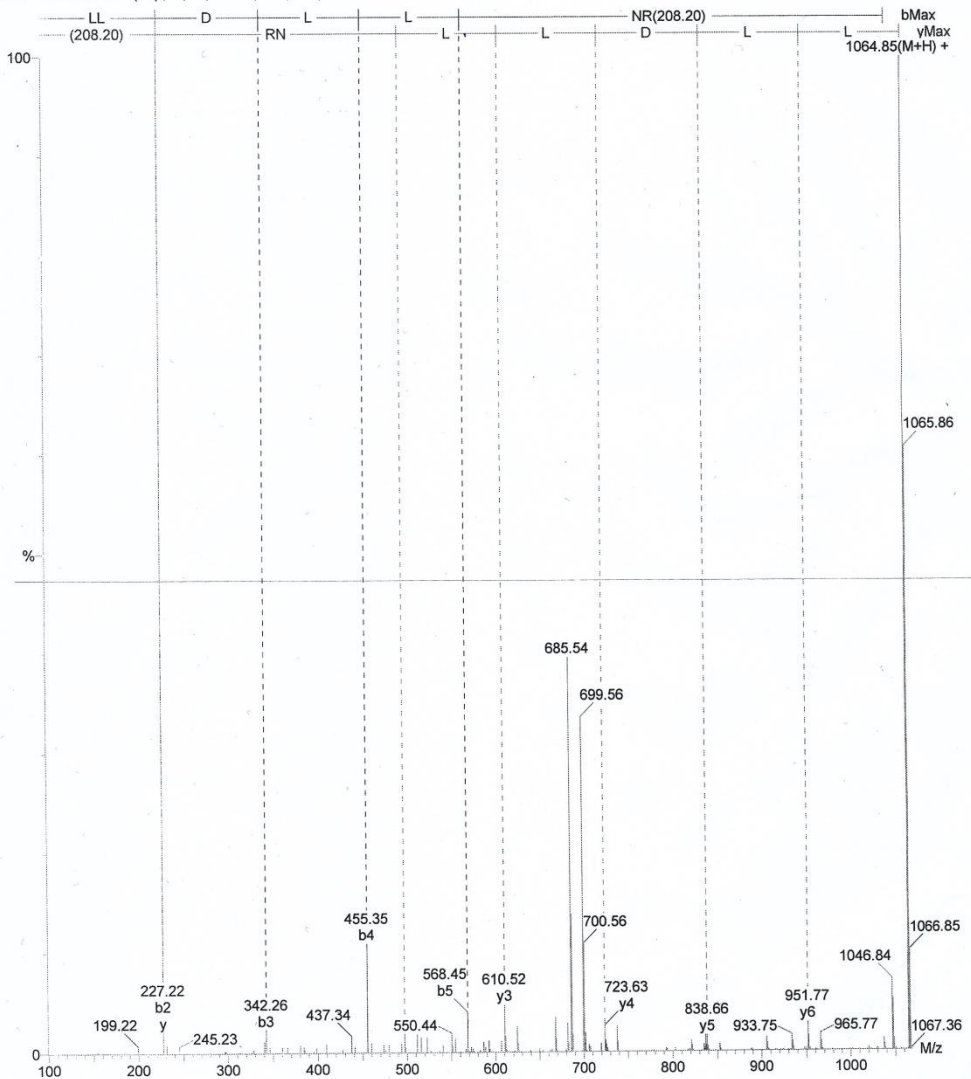
BioLynx - Peptide Sequencing Report

PepSeq file: C:\Masstlyn\gf03.psq  
 Printed: Tue Apr 20 13:32:25 2010

Observed MW: 1063.9922 Precursor ion charge state: 1  
 M/z tolerance: 0.30 Intensity threshold: 5 (0.750%)

a	86.10	199.18	314.21	427.29	540.38	654.42	810.52	1018.99
b	114.09	227.18	342.20	455.29	568.37	682.41	838.52	1046.99
		-0.04	-0.06	-0.07	-0.07			
	Leu	Leu	Asp	Leu	Leu	Asn	Arg	208.20
y	1065.00	951.92	838.83	723.80	610.72	497.64	383.59	227.49
		0.15	0.17	0.18	0.20	0.20		0.28
z	1047.97	934.89	821.80	706.77	593.69	480.61	366.56	210.46

n 11-fr 9 1065  
 QT0055 AccMass 584 (Top,10, Ht,9000,0,0.00,0.70) 1: TOF MSMS 1065.00ES+





## ANTIFUNGAL COMPOUND PRODUCED BY THE CASSAVA ENDOPHYTE *Bacillus pumilus* MAIIM4A

Flávia Mandolesi Pereira de Melo<sup>1,2\*</sup>; Marli Fátima Fiore<sup>1</sup>; Luiz Alberto Beraldo de Moraes<sup>3</sup>; Maria Estela Silva-Stenico<sup>1</sup>; Shirlei Scramin<sup>2</sup>; Manoel de Araújo Teixeira<sup>2,4</sup>; Itamar Soares de Melo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>USP/CENA - Lab. de Biologia Celular e Molecular, Av. Centenário, 303, C.P. 96 - 13400-970 - Piracicaba, SP - Brasil.

<sup>2</sup>Embrapa Meio Ambiente - Lab. de Microbiologia Ambiental, Rod. SP 340, km 127,5, C.P. 69 - 13820-000 - Jaguariúna, SP - Brasil.

<sup>3</sup>USP/FFCLRP - Depto. de Química, Av. Bandeirantes, 3900 - 14040-901 - Ribeirão Preto, SP - Brasil.

<sup>4</sup>UNIVÁS/MG - Lab. de Microbiologia, Av. Prefeito Tuany Toledo, 470 - 37550-000 - Pouso Alegre, MG - Brasil.

\*Corresponding author <flamelo@cpmpa.embrapa.br>

**ABSTRACT:** In the search for new organisms and new secondary metabolites, a study was conducted to evaluate the diversity of endophytic bacteria from ethnovarieties of cassava cultivated by Brazilian Amazon Indian tribes and also to study the secondary metabolites produced by a *Bacillus pumilus* strain. Sixty seven cassava endophytic bacteria were subjected to 16S rRNA sequencing and FAME analysis. The bacterial profile revealed that 25% of all endophytic isolates belonged to the genus *Bacillus*. The isolate *B. pumilus* MAIIM4a showed a strong inhibitory activity against the fungi *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum* and *Sclerotium rolfsii*. Secondary metabolites of this strain were extracted using hexane, dichloromethane and ethyl acetate. Extracts were subjected to bioautography and LC/MS analysis, which allowed the identification of pumilacidin, an antifungal compound produced by *B. pumilus* MAIIM4a. The bacterial endophytic localization was confirmed by cassava cell tissue examination using scanning electron microscopy.

**Key words:** ESI-MS/MS, pumilacidin, endophytic bacteria, bioautography

## COMPOSTO ANTIFÚNGICO PRODUZIDO PELO ENDÓFITO DE MANDIOCA *Bacillus pumilus* MAIIM4A

**RESUMO:** Na busca de novos organismos e novos metabólitos secundários, um estudo foi conduzido visando avaliar a diversidade de bactérias endofíticas de etnovarietades de mandioca cultivadas por tribos indígenas da Amazônia brasileira e também para estudar metabólitos secundários produzidos por *Bacillus pumilus*. Sessenta e sete bactérias endofíticas de mandioca foram identificadas através do sequenciamento do gene 16S rRNA e por meio da análise de ácidos graxos (FAME). Essas análises revelaram que 25% de todos os endofíticos pertenciam ao gênero *Bacillus*. O isolado *Bacillus pumilus* MAIIM4a apresentou forte ação inibitória contra os fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum* e *Sclerotium rolfsii*. Os metabólitos secundários deste isolado foram extraídos do sobrenadante usando-se hexano, diclorometano e acetato de etila. Esses extratos foram utilizados nas análises de bioautografia e LC-MS, as quais permitiram a identificação do composto pumilacidina, um antifúngico produzido por *B. pumilus* MAIIM4a. A localização das bactérias endofíticas foi confirmada examinando-se o tecido celular da mandioca através de microscopia eletrônica.

**Palavras-chave:** ESI-MS/MS, pumilacidina, bactéria endofítica, bioautografia

### INTRODUCTION

Endophytes are microorganisms (bacterial and fungal) that inhabit a wide variety of plant tissue types without causing any apparent harm to the host (Hallmann et al., 1997). In order to colonize the plant and compete with other microorganisms, they produce many enzymes and toxins (Lima et al., 2005). Also, a variety of secondary metabolites, including enzymes,

antibiotics (Pleban et al., 1997), anticancer (Stierle et al., 1993), anti-inflammatory (Trischman et al., 1994), antifungal (Korzybski et al., 1978), and biological control agents (Hallmann et al., 1997) have been isolated from endophytic microorganisms. To date, many promising endophytic bacteria have been reported as biocontrol candidates against plant pathogens. Most of them produce enzymes and antibiotics as the main action mechanisms. However, their frequent occurrence

in agricultural crops and subsequent relevance to crop production systems is yet to be explored widely (Loeffler et al., 1986; Krebs et al., 1998). Cassava (*Manihot esculenta* Crantz ssp. *esculenta*) is one of the main species cultivated by farmers of tropical areas and it is thought to be originated from Brazilian Amazon basin, whereas many ethnovarieties have been cultivated by Indian tribes.

The cassava roots are the major carbohydrate source throughout the humid tropics for over 500 million people (FAO, 2000). Despite its global importance as a subsistence crop, cassava has not received major attention in crop research programs. In this context, studies about cassava endophytic bacteria may bring important contribution to the knowledge of the crop disease control mechanisms and the beneficial relationships between plants and bacterial endophytes communities (Teixeira et al., 2007). The aim of the present study was to provide a survey of bacterial endophytic population in cassava plants from an Indian tribe plantation of Brazilian Amazon, characterize the isolated strains and identify the antifungal metabolites produced by the isolates.

#### MATERIAL AND METHODS

##### Isolation and identification of endophytic bacteria

Six healthy cassava plants were collected from different Indian tribes plantation located in the Autazes region (03°18'003" S - 60°37'15.5" W), Amazonas State, Brazil. Freshly collected plants were placed in plastic bag, maintained in low temperature ( $\pm 10^{\circ}\text{C}$ ) and transported to the laboratory where they were separated into stems, root and leaf and cut into sections about 1 cm<sup>2</sup>. A vigorous rinsing with sterilized distilled water and neutral detergent was used to remove adhering microorganisms. All the material (10 roots pieces, 20 stem pieces and 15 leaves pieces) were then surface disinfected using 70% ethanol for 1 min, 2% sodium hypochlorite for 6 min, again 70% ethanol for 30 s to remove sodium hypochlorite and finally rinsed with sterilized distilled water (Araújo et al., 2001). To confirm the surface disinfection process the tissue segments of the final rinse were plated out onto tryptic soy agar (TSA) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Seven segments of each cassava tissue were inoculated in Petri dish containing TSA medium supplemented with 1  $\mu\text{L mL}^{-1}$  of the fungicide benomyl, to inhibit fungal growth. The Petri dishes (replicated three times) were incubated at 27°C for 10 d. After this period, endophytic bacterial colonies were transferred to plates containing fresh TSA. Individual colonies without contaminants were kept in mineral oil at 4°C.

##### Identification of bacteria by fatty acid methyl ester (FAME) analysis

Pure bacterial cultures were grown on TSA medium for 2 d at 28°C. Triplicate of 40 ng wet mass of cells were harvested and placed into reaction tubes. One milliliter of methanolic sodium hydroxide solution (15% NaOH [m/v] in 50% methanol [v/v]) was added to the cells and the mixture was heated (100°C) in water bath for 30 min to saponify the cells. The fatty acids were methylated in 2.0 mL methanolic hydrochlorid acid solution (6N HCL in 46% methanol [v/v]) in a water bath at 80°C for 10 min. The FAMES were extracted from aqueous phase with 1.25 mL of methyl-tert-butyl ether: hexane (1:1, v/v). The FAME extracts were analyzed on gas chromatography (Hewlett Packard, Rolling Meadows, IL, USA). The FAME compounds were identified using the microbial identification software (Sherlock aerobic method and TSA library version 4.0) developed by MIDI Inc. (Newark, NJ, USA).

##### Identification of bacteria by sequencing the 16S rRNA gene fragment

Pure cultures of bacteria were cultivated in 10 mL of TSA liquid medium and incubated for 48 h at 28°C at 120 rpm. Aliquots of 1.5 mL of culture were rinsed twice with 500  $\mu\text{L}$  of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0). The cell pellets were resuspended in 500  $\mu\text{L}$  of TE buffer plus 30  $\mu\text{L}$  of 10% sodium dodecyl sulfate [m/v] and 0.5 g of 0.1-mm-diameter glass beads (BioSpect Products, Inc., Bartlesville, OK, USA). Each sample was shaken vigorously for 3 sec in a mini-bead beater (BioSpect Products, Inc). One milliliter of phenol was added; the solution was mixed well, and centrifuged at 12,000  $\times g$  for 10 min. The aqueous phase containing the DNA was extracted once with 1 mL of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) and once with chloroform-isoamyl alcohol (24:1). The DNA was precipitated with a 0.6 volume of isopropanol and a 0.1 volume of 5 M NaCl and washed with 70% ethanol. The pellet was washed with 70% ethanol, air dried and resuspended in 50  $\mu\text{L}$  sterilized ultrapure water containing RNase (10 mg mL<sup>-1</sup>). The DNA from each sample was finally analyzed by agarose gel electrophoresis to estimate the yield.

The 16S rRNA partial sequence was amplified from the *B. pumilus* MAIIM4a genomic DNA using the primers F968 (5'-AACGCGAAGAACCTT AC-3') (Nübel et al., 1996) and R1387 (5'-CGGTGTGACAAGCCCGGGAACG-3') (Heuer et al., 1997). Amplification was performed in a Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using 50  $\mu\text{L}$  PCR mixture containing 10 ng of genomic DNA, 0.2  $\mu\text{M}$  of each oligonucle-

otide primer, 200  $\mu$ M dNTPs, 3.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\times$  PCR buffer and 5.0 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Thermal cycling was performed using a touchdown series as described by Araújo et al. (2002). PCR amplifications were then analyzed by electrophoresis using 1% agarose gel stained with ethidium bromide. Gel was viewed on an Alpha DigiDoc System Gel Documentation System (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA) and recorded.

The PCR fragments were purified using the Ultra Clean PCR clean-up kit (MO BIO Laboratories, Inc., Solana Beach, CA, USA) according to the manufacturer's instruction. Direct PCR sequencing reaction was performed using the purified PCR product, R1387 primer and BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). After the completion of the sequencing reaction, a 100% isopropanol wash followed by a 70% ethanol wash was performed to remove residual dye terminators. The purified reaction was then resuspended in HiDi formamide (Applied Biosystems) and the samples were placed in an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

The nucleotide fragment sequences of 16S rRNA obtained in this study were compared with sequence information available in the National Center for Biotechnology Information database using BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)). Phylogenetic tree was constructed by multiple pair-wise alignments using the CLUSTAL W computer program, version 1.8 (Thompson et al., 1994). The neighbour-joining tree (Saitou & Nei, 1987) was built with BioEdit version 5.0.6 (Hall, 2001). The tree reliability was evaluated by bootstrap analysis with 1,000 replicates. The nucleotide sequence determined in this study has been deposited in GeneBank under accession number DQ011675.

#### Scanning electron microscopy of endophytic bacteria in cassava tissues

Microorganisms-free axenic seedlings of cassava were obtained by tissue culture procedures. Three flasks containing 400 mL of Murashige & Skoog medium (Murashige & Skoog, 1962) and three with sterilized distilled water were prepared. Cassava seedlings were transferred to the flasks and 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup> of *B. pumilus* MAIIM4a was inoculated. Non-inoculated media containing cassava seedlings was routinely used as control. After 5 d the cassava plants were separated into stems, roots and leaves and each tissue was cut into sections of approximately 2 cm<sup>2</sup>. Each cassava tissue section was fixed in a modified Karnovsky solution (Kitajima & Leite, 1999) and the samples were

kept at 8°C overnight. The samples were washed 3 times with cacodylate buffer (0.05 M) for 10 min and immersed in 1% OsO<sub>4</sub> (in 0.05 M cacodylate buffer, pH 7.2) for 1 h. The fragments were washed five times, 15 min changes in distilled water. Samples were dehydrated in an ethanol series (30, 50, 70, 90 and 100%) for 15 min per change. The latter phase was repeated three times. Ultimately, the cassava material were critically point dried, gold sputter coated with gold and examined using a field emission scanning electron microscope (SEM) (LEO Co-operation Zeiss/Leica, Oberkochen, Germany). All experiments were performed in triplicate.

#### Screening of bacteria for antagonism

All bacterial isolates were screened for their activity against the pathogenic fungi *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. A plug of the fungus was placed on one side of the potato dextrose agar (PDA) plate, and a loop of bacteria was streaked down the opposite side of the plate. Control plates consisted of the fungus placed on PDA plates alone. Plates were incubated at 28°C for 48 h. Antifungal activity from each bacterial isolate was recorded as the size of the zone of inhibition.

#### Extraction of secondary metabolites

According to the antifungal screening, one bacterium *Bacillus pumilus* MAIIM4a that showed strong antifungal activity was chosen for further studies, including the characterization of its metabolites. Thus this strain was cultivated in liquid PD (potato-dextrose) medium and incubated in a shaker (150 rpm) at 28°C for 72 h. At the end of this period, the cultures were centrifuged at 10,000  $\times$  g for 5 min. and 500 mL of the supernatant were used for successive extractions with hexane (200 mL), dichloromethane (200 mL) and ethyl acetate (200 mL). The respective organic phases were collected and dried with anhydrous sodium sulfate and evaporated and then the crude extracts were obtained: 7 mg from hexane extraction, 8 mg from dichloromethane extraction and 8 mg from ethyl acetate extraction.

#### Antimicrobial activity

The test-fungi described previously were grown in PDA medium at 25°C for 24 h and then 20  $\mu$ L of the hexane, dichloromethane and ethyl acetate extracts were applied in sterile disks of 7.0-mm-diameter (Sensibiodisc, Cecon, São Paulo, SP, Brazil), previously inserted in Petri dishes inoculated with fungal strains. The controls consisted of 20  $\mu$ L of solvent or the medium extracted in the same solvent. Zones of inhibition were recorded after two days. This experiment was performed in triplicate.

### Thin layer chromatography and bioautography

Silica gel G60 F<sub>254</sub> alumina backed plates (10 × 10 cm) were used for separation and identification of inhibitory fractions. Aliquots (10 µL) of each extract obtained as described above were applied and the layers developed with dichloromethane/ethyl acetate (9:1). The UV active absorbing spots were visualized at 254 and 366 nm. For bioautography experiments, chromatograms were placed in 9 × 9 cm sterile Petri dishes with covers. Overlay media (PDA, 20 mL) containing a suspension of 10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup> cells of the fungal tests was sprayed over the developed TLC plates. After solidification of the media, the TLC plates were incubated at 25°C. The fungal growth was observed daily and the formation of inhibition zones was recorded.

### GC-MS

Extracts were derivatized with diazomethane and subjected to gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis. GC-MS analysis was performed on a Shimadzu equipped with a 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm capillary column. The following oven program was applied: the temperature was 40°C programmed up to 280°C at 8°C/min. The carrier gas He (research grade 99.95% purity) was used at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>. A sample volume of 1 µL (10 mg mL<sup>-1</sup>) was injected. The injector and the transfer lines were maintained at 240°C. The Mass Selective Detector (QP-5000) was operated in the Electron Ionization mode at 70 eV in the full scan range of *m/z* 100 to 2000. Nist 12 and Wiley library were used to identify metabolites in the extracts.

### Mass spectrometry

MS was performed using a hybrid quadrupole time-of-flight (TOF) high resolution (7,000) and high accuracy (5 ppm) Q-TOF mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) equipped with an electrospray ion source (ESI). The working conditions for positive and negative ESI were as follows: desolvation gas (nitrogen) was heated at 250°C; capillary was held at a potential of 3.2 kV, and the cone voltage was set at 25 kV. MS/MS tandem mass spectra were acquired by mass-selecting the target ion using the quadrupole mass analyzer followed by 25eV, collision induced dissociation using argon in the quadrupole collision cell and mass analysis by TOF. The crude extracts were dissolved in a mixture of methanol and water 2:1 (v/v) and 10 mM ammonium acetate for analysis in both positive and negative ion mode. The sample was introduced into the source at 10 µL min<sup>-1</sup> with a syringe pump.

## RESULTS

### Isolation and identification of endophytic bacteria

Sixty-seven strains of endophytic bacteria were isolated from six cassava plants. The taxonomic results revealed that out of 67 isolates subjected to 16S rRNA gene and FAME profile analysis, only 44 showed similarities comparing the two techniques. It was possible to identify 19 genera of endophytic bacteria in cassava plants (Table 1). More than 25% of the isolates were classified as *Bacillus* species. The bacteria identified in cassava were isolated from all colonizing parts of the plant. The percentage of colonization in roots was 41% of the total isolated bacteria, followed by the stem with 34% and leaves with 25%. Some of the strains were present in all tissues of the plant, while others colonized specific parts. The resulting profiles were identified with microbial identification software (MIDI) using the TSBA database, version 4.0 (MIDI, Newark, Del.) and a dendrogram can be visualized in Figure 1 (Teixeira, 2004). The 16S rRNA sequence of the *B. pumilus* MAIIM4a compared favourably (98% identity) with several sequences of *B. pumilus* (AF526907, AY289549, AY496869, AY167886) from public database by BLAST analysis. Phylogenetic relationships were investigated with other bacteria from Genebank using the joining method (Figure 2). All the *B. pumilus* strains formed a monophyletic cluster in the tree. The bootstrap analysis based on 1,000 resamplings of the neighbour-joining data, used to test the robustness and stability of the branching, showed that the *B. pumilus* strains sequences clustered with high bootstrap value (98%) separated from the other species of *Bacillus*.

### Scanning electron microscopy of cassava tissues

Scanning electron microscopy analysis demonstrated that *B. pumilus* MAIIM4a beneficially infected

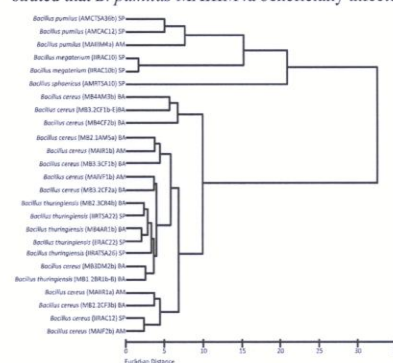


Figure 1 - Dendrogram obtained by FAME profile analysis of *Bacillus* strains (Teixeira, 2004).

Table 1 - Identification of endophytic bacteria using FAME and 16S rRNA gene. The fat acids profiles were obtained comparing the data from the TSBA4.0 library (reference strains). Isolates with similarity index (SI) of 0.6 or higher were considered positively identified.

Strain	Plant tissue	Identification	MIDIa (SI)	16S rRNA (% identity)
MAIIR2b	Root	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	0.699	99
MAIVR1b	Root	<i>Bacillus cereus</i>	0.782	99
MAIVR2a	Root	<i>Streptomyces olivaceus</i>	0.606	96
MAIIR1b	Root	<i>Bacillus thuringiensis</i>	0.855	100
MAIIR3b	Root	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.565	99
MAIR1b	Root	<i>Bacillus cereus</i>	0.789	99
MAIIR1a	Root	<i>Bacillus cereus</i>	0.854	98
MAIVR3b	Root	<i>Burkholderia cepacia</i>	0.785	99
MAIIR4a	Root	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.791	99
MAIR2f	Root	<i>Burkholderia cepacia</i>	0.754	90
MAIIR4a-B	Root	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.762	99
MAIR2b	Root	<i>Bacillus cereus</i>	0.756	100
MAIIR4b	Root	<i>Acidovorax avenae</i>	0.584	99
MAIIR2a	Root	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.621	96
MAIIR2b	Root	<i>Burkholderia cepacia</i>	0.733	94
MAIR2a	Root	<i>Bacillus cereus</i>	0.650	100
MAIIR3a	Root	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	0.721	99
MAIVR2b	Root	<i>Microbacterium hominis</i>	0.628	98
MAIIM2b	Stem	<i>Bacillus anthracis</i>	0.689	100
MAIM1b	Stem	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	0.601	99
MAIIM2a	Stem	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.621	100
MAIVM3a	Stem	<i>Bacillus anthracis</i>	0.632	99
MAIIM1a	Stem	<i>Salmonella enteritidis</i>	0.800	99
MAIM3a	Stem	<i>Brevibacillus brevis</i>	0.600	99
MAIVM2a	Stem	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	0.751	100
MAIIM2b	Stem	<i>Salmonella bongori</i>	0.802	97
<b>*MAIIM4a</b>	<b>Stem</b>	<b><i>Bacillus pumilus</i></b>	<b>0.938</b>	<b>100</b>
MAIVM2b	Stem	<i>Salmonella choleraesuis</i>	0.931	100
MAIM1b	Stem	<i>Escherichia coli</i>	0.871	99
MAIIM3a-B	Stem	<i>Salmonella bongori</i>	0.623	96
MAIIM1b-A	Stem	<i>Serratia rubidae</i>	0.654	97
MAIIM1b	Stem	<i>Escherichia coli</i>	0.878	98
MAIM1a	Stem	<i>Escherichia coli</i>	0.539	99
MAIF2b	Leave	<i>Bacillus cereus</i>	0.806	100
MAIIF1a	Leave	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.654	99
MAIF6b	Leave	<i>Clavibacter michiganensis</i>	0.848	99
MAIIF2b	Leave	<i>Curtobacterium luteum</i>	0.659	100
MAIF1b	Leave	<i>Bacillus pumilus</i>	0.748	100
MAIF1a	Leave	<i>Microbacterium aerobrescens</i>	0.610	99
MAIVR1f	Leave	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	0.784	98
MAIIR1f	Leave	<i>Enterobacter cloacae</i>	0.655	99
MAIIF1a	Leave	<i>Microbacterium imperiale</i>	0.784	99
MAIF4b	Leave	<i>Ochrobactrum antropi</i>	0.890	98
MAIIF2a	Leave	<i>Microbacterium imperiale</i>	0.747	94

\*FAME (Fatty acid methyl ester). \*Source: Teixeira, 2004. \*Strain selected for antimicrobial analysis

the tissues, established and colonized leaves, stems and roots of cassava plants. However, the distribution of this species was variable according to the colonization microhabitats. Populations of *B. pumilus* MAIIM4a in the stem and root of cassava are shown in Figure 3. The majority of cells of *B. pumilus* MAIIM4a invaded and colonized intracellular and intercellular sites

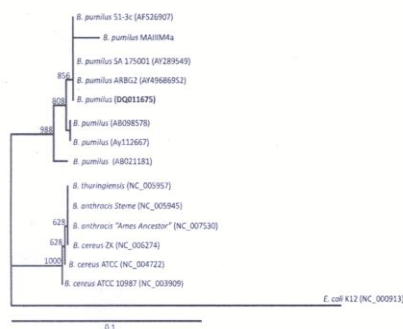


Figure 2 - A phylogenetic tree of the *B. pumilus* MAIIM4a 16S rRNA gene sequence. The 16S rRNA gene sequence from *Escherichia coli* strain K12 was treated as the outgroup. Numbers at the nodes represent percentage bootstrap values of 1000 resamplings. Sequence shown in bold was generated during this study. The scale is the expected number of substitutions per position. Nucleotide sequence obtained in this study has been deposited in GeneBank under accession number DQ011675.

of cassava tissues. It was not detected presence of any bacteria in tissues of the axenic plants.

**Screening of bacteria for antagonism against *P. aphanidermatum***

A total of 67 bacterial isolates were screened for their antagonistic ability to suppress the mycelial growth of *P. aphanidermatum* in an *in vitro* assay. Ten isolates showed strong antagonistic activity against the phytopathogen. These antagonists were isolated from all parts of the plants, that is, 30% from roots, 20% from leaves and 50% from stem. The percentage of inhibition against *P. aphanidermatum* found is presented as follow: *Enterobacter cancerogenus* MAIVM2a (33%), *Bacillus anthracis* MAIVM3a (26%), *B. anthracis* MAIIM2b (48%), *Kluyvera cryocrescens* MAIIR2b (29%), *Bradyrhizobium japonicum* MAIIR3a (35%), *B. pumilus* MAIIM4a (54%), *B. cereus* MAIF4b (33%), *Clavibacter michiganensis isidiosum* MAIF6b (34%), *B. cereus* MAIVM1b (51%), *Burkholderia cepacia* MAIVR3b (35%). Due to the highest antifungal activity of *B. pumilus* MAIIM4a, this strain was chosen for further analysis.

**Antimicrobial activity**

Dichloromethane and ethyl acetate extracts showed high bioactivity against the phytopathogens *R. solani*, *P. aphanidermatum* and *S. rolfsii*, while the hexane extract presented low bioactivity only against *P. aphanidermatum* (Table 2).

Table 2 - Bioactivity of different *B. pumilus* extracts against phytopathogenic fungi.

Extracts	<i>R. solani</i>	<i>P. aphanidermatum</i>	<i>S. rolfsii</i>
Hexane	-	+	-
Dichloromethane	+++	++	++
Ethyl acetate	+++	++	++

(-) Inactive (+) Active (++) or (+++) Highly active.

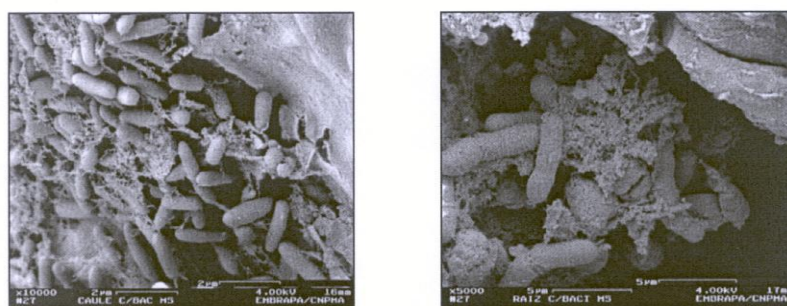


Figure 3 - Scanning electron micrographs of *B. pumilus* MAIIM4a colonizing cassava tissues. a) Stem colonization; b) Root colonization.

### TLC and bioautography

The choice of extraction conditions was very important, since different solvents showed different fractions of compounds. Preliminary TLC analysis of *B. pumilus* MAIIM4a supernatant extracted into ethyl acetate indicated that 10 fractions were obtained, while hexane extraction presented only two fractions (Table 3). The bioautography was performed only for the ethyl acetate extract. Clear inhibition zones at  $R_f$  of 0.62, 0.56 and 0.42 for *B. pumilus* MAIIM4a extracts were observed against *P. aphanidermatum*, showing that the compounds responsible for the antifungal activity are strongly apolar.

### GC-MS

The results obtained by GC-MS are presented in Table 4. Mass spectra data were compared with Nist 12, Nist 62 and Wiley 139 libraries. These data suggested that hexane extracts were constituted of long chain hydrocarbons. Dichloromethane extract presented phthalate derivative, composed of aromatic and different classes of oxygenated compositions (esters, alcohols, diols, ketones and others), while ethyl acetate extract had phthalate, fatty ester, long chains of unsaturated hydrocarbons and diols.

### Mass Spectrometry

Mass peaks were assigned to lipopeptide species by comparison with reference data and by mass spectrometric *in situ* sequence analysis of selected compounds by ESI-MS/MS. These mass data correspond well to those determined by other authors indicating the presence of pumilacidin A-E series (Kalinovskaya et al., 2002; Pabel et al., 2003) (Figure 4).

The predominant ions in ESI mass spectrum in the positive ion mode were that of  $m/z$  1036.7, 1050.7, 1064.7 and 1078.7 (Figure 5a) and the more abundant one was that of  $m/z$  1050.7, which corresponds to the protonated pumilacidin A with a  $C_{12}$  lipid carbon chain and Ile7. In a similar manner, ESI mass spectrum in the negative ion mode showed the pumilacidin A-E series  $[M-H]^-$  (Figure 5b). Different isoforms exist for each lipopeptide, which vary in

the chain length of their fatty acid components and amino acid residues in their peptide rings, respectively.

### DISCUSSION

A total of 67 endophytic bacteria were isolated from cassava plants collected in the Brazilian Amazon region. The isolation methodology used probably underestimates the real bacterial population, since it has been isolated only bacteria that could grow in culture conditions. Several isolates were identified by FAME profile analysis or 16S ribosomal RNA gene sequencing. The selected isolate MAIIM4a was confirmed to belong to *B. pumilus* species and showed similarity with *B. pumilus* strains AMCTSA36b and AMCAC12. *Bacillus* species are found as the main endophytic bacteria in several plants, including *Zea mays* L. (Lalande et al., 1989), *Gossypium hirsutum* L. (Misaghi & Donndelinger, 1990), *Beta vulgaris* (Jacobs et al.,

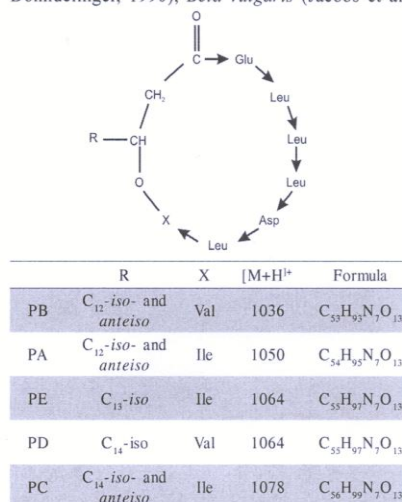


Figure 4 - Structure and mass data of lipopeptides pumilacidins. (PA-PE indicates pumilacidins series A-E).

Table 3 -  $R_f$  values for different solvent extracts using UV light to visualize spots (254 and 366 nm).

Extracts of <i>B. pumilus</i>	*R <sub>f</sub>									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Control	0.89	0.62	0.53	0.23	-	-	-	-	-	-
Hexane	0.33	0.24	-	-	-	-	-	-	-	-
Dichloromethane	0.89	0.80	0.65	0.60	0.53	0.23	-	-	-	-
Ethyl acetate	0.89	0.78	0.71	0.67	0.62	0.56	0.49	0.42	0.29	0.25

\*R<sub>f</sub> is defined as the distance traveled by the compound divided by the distance traveled by the solvent

Table 4 - Compounds identified in the hexane extract using GC/MS.

Solvent	Peak number	Retention Time	Relative Abundance	Compound
		min.	%	
Hexane	1	3.663	1.16	a
	2	4.147	4.51	a
	3	4.183	1.85	<i>n</i> -propyl acetate
	4	5.680	26.79	a
	5	13.556	2.18	<i>n</i> -dodecane
	6	15.480	5.10	<i>n</i> -tridecane
	7	17.298	24.15	<i>n</i> -tetradecane
	8	18.372	2.96	b
	9	18.997	12.35	<i>n</i> -pentadecane
	10	20.603	12.94	<i>n</i> -hexadecane
	11	22.105	3.19	<i>n</i> -heptadecane
	12	22.201	2.83	2,6-dimethyl octadecane
Dichloromethane	1	3.699	1.11	a
	2	4.250	41.64	3-hydroxy 2-butanone
	3	4.360	0.57	b
	4	5.284	25.64	2,3-butanediol
	5	5.383	1.03	b
	6	5.475	0.80	b
	7	5.602	5.76	methylpropenylcarbinol
	8	5.707	6.50	a
	9	5.796	2.13	isopropyl acetate
	10	9.089	1.78	2,3-butanedione monooxime
	11	10.197	4.27	benzyl alcohol
	12	12.065	1.20	2,6-dimethyl morfoline
	13	13.155	1.13	mMethylphenylacetate
	14	20.623	3.36	diethyl phthalate
	15	25.855	3.08	butyl phthalate
Ethyl acetate	1	3.824	0.28	a
	2	4.263	1.44	a
	3	5.547	46.77	b
	4	5.620	2.78	2,3-butanediol
	5	5.767	5.80	a
	6	17.163	8.32	1-pentadecene
	7	20.506	10.41	1-hexadecene
	8	23.450	5.64	1-octodecene
	9	23.789	0.81	b
	10	25.238	0.82	14 methyl-pentadecanoate
	11	25.896	6.19	a
	12	26.111	3.86	a
	13	26.402	4.23	b
	14	28.546	1.02	a
	15	33.053	1.36	dioctyl phthalate

a = Compounds present in the culture medium. b = Not identified.



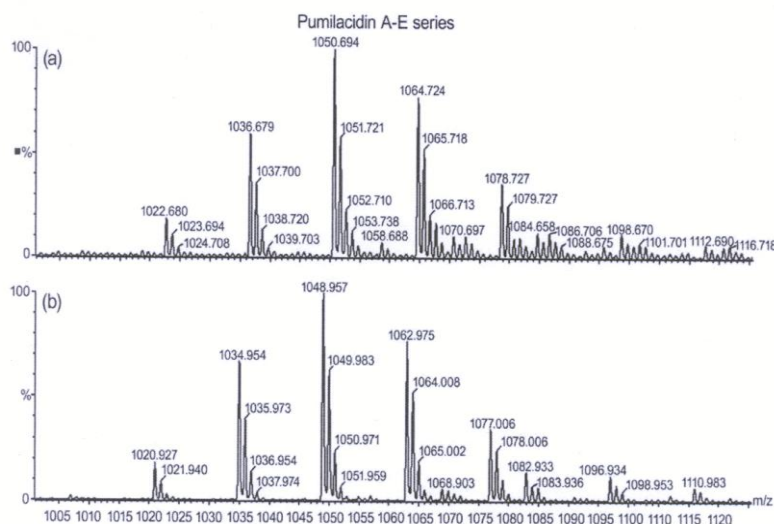


Figure 5 - ESI mass spectrum in the positive (a) and negative (b) ion mode of the pumilicidin A-E series.

1985), and *Solanum tuberosum* L. (Hollis, 1951), and the species that are often cited as endophytic are: *B. cereus* and *B. lentus* (Araújo et al., 2001), *B. subtilis* (Bai et al., 2002), *B. megaterium* (Elvira-Recueno & Vuurde, 2000; Araújo et al., 2001), *B. insolitus* and *B. brevis* (Sturz et al., 1997) and *B. pumilus* (Araújo et al., 2002). This genera has been reported as a potent biological control agent (Cook, 1986), demonstrating a great potential in agriculture.

Scanning electron microscopy was able to detect this strain in inner tissues in all parts of the plant. *Bacillus pumilus* MAIIM4a colonized roots and stem, indicating that this isolate is efficient and a good candidate as biological control agent.

With the increased occurrence of phytopathogens causing plant disease, the search for new antifungal bioagent has gained urgency. The production of bioactive compounds by *Bacillus* species is well established (Korzybski et al., 1978; Naruse et al., 1990; Munimbazi & Bullerman, 1998). These classes of bioactive compounds act as antifungal peptides, antifungal lipopeptides and antimicrobial polypeptides (Pabel et al., 2003). To characterize antimicrobial activity of *B. pumilus* MAIIM4a, the isolate was tested against three phytopathogenic fungi: *R. solani*, *P. aphanidermatum* and *S. rolfii*. The antifungal screening revealed that *B. pumilus* MAIIM4a produced a compound with high bioactivity against *P. aphanidermatum*. The bioautography was considered an efficient test to determine antimicrobial activity, since less than 2.5 µg of extract was enough to form

inhibition halo around the active fractions. LC-MS/MS was able to identify a compound assigned as pumilicidin by comparison with reference data. Pumilicidin is produced by *B. pumilus* and are cyclic acylheptapeptide composed of a beta-hydroxy fatty acid (Naruse et al., 1990). This lipopeptide has antimicrobial (Pabel et al., 2003), antiviral and antiulcer activity (Naruse et al., 1990).

Mass spectrometric data corroborate the identification of one bioactive compound as a lipopeptide, pumilicidin, a characteristic of *B. pumilus*. This is the first time that an endophytic *B. pumilus* was characterized as pumilicidin producer.

#### ACKNOWLEDGEMENT

Financial support was provide by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 99/09177-1). F.M.P.M. was supported by a graduate scholarship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

#### REFERENCES

- ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JR, W.; AGUILLAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology*, v.47, p.229-236, 2001.
- ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JR, W.; ELSAS, J.D.van; VUURDE, J.W.L.van; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, p.4906-4914, 2002.

- BAI, Y.; D'ARISTO, F.; SMITH, D.L.; DRISCOLL, B.T. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. *Canadian Journal of Microbiology*, v.48, p.230-238, 2002.
- COOK, R.J. Plant health and the sustainability of agriculture, with special reference to disease control by beneficial microorganisms. *Biological Agriculture and Horticulture*, v.3, p.211-232, 1986.
- ELVIRA-RECUENCO, M.; VUURDE, J.W.L.van. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, v.46, p.1036-1041, 2000.
- FAO. Championing the cause of cassava. 2000. Available in [www.fao.org/NEWS/2000/000405-e.htm](http://www.fao.org/NEWS/2000/000405-e.htm). Accessed 28 Sept. 2000.
- HALL, T. *BioEdit*: version 5.0.6. Raleigh: North Carolina State University, Department of Microbiology, 2001. 192p.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, v.43, p.895-914, 1997.
- HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, p.3233-3234, 1997.
- HOLLIS, J.P. Bacteria in healthy potato tissue. *Phytopathology*, v.41, p.350-366, 1951.
- JACOBS, M.J.; BUGDEE, W.M.; GABRIELSON, D.A. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. *Canadian Journal of Botany*, v.63, p.1262-1265, 1985.
- KALINOVSKAYA, N.I.; KUZNETSOVA, T.A.; IVANOVA, E.P.; ROMANENKO, L.A.; VOINOV, V.G.; HUTH, F.; LAATSCH, H. Characterization of Surfactin-like Cyclic Depsipeptides Synthesized by *Bacillus pumilus* from Ascidian *Halocynthia aurantium*. *Marine Biotechnology*, v.4, p.179-188, 2002.
- KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. *Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura*. 2. ed. Piracicaba: NAP/MEPA-USP/ESALQ, 1999. 46p.
- KORZYBSKI, T.; KOWSZYK-GIFINDER, Z.; KURYTOWICZ, W. *Antibiotics: origin, nature, and properties*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1978. p.501-534.
- KREBS, B.; HÖDING, B.; KÜBART, S.; ALEMAYEHU-WORKIE, M.; JUNGE, H.; SCHMIEDEKNECHT, G.; GROSCH, R.; BOCHOW, H.; HEVESI, M. Use of *Bacillus subtilis* as biological control agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains. *Journal of Plant Diseases and Protection*, v.105, p.181-197, 1998.
- LALANDE, R.; BISSONNETTE, N.; COUTLEE, D.; ANTOUN, H. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. *Plant and Soil*, v.115, p.7-11, 1989.
- LIMA, A.O.S.; QUECINE, M.C.; FUNGARO, M.H.P.; ANDREOTE, F.D.; MACCHERONI JR, W.; ARAÚJO, W.L.; SILVA FILHO, M.C.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Molecular characterization of a  $\beta$ -1,4-endoglucanase from an endophytic *Bacillus pumilus* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.68, p.57-65, 2005.
- LOEFFLER, W.; TSCHEN, S.-M.; VANITTANAKOM, N.; KUGLER, M.; KNORPP, E.; HSIEH, T.-F.; WU, T.-G. Antifungal effects of bacilysin and fengycin from *Bacillus subtilis* F29-3: a comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *Journal of Phytopathology*, v.115, p.204-213, 1986.
- MISAGHI, I.J.; DONDELINGER, C.R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology*, v.80, p.808-811, 1990.
- MUNIMBAZI, C.; BULLERMAN, L.B. Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *Journal of Applied Microbiology*, v.84, p.959-968, 1998.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.
- NARUSE, N.; TENMYO, O.; KOBARU, S.; KAMEI, H.; MIYAKI, T.; KONISHI, M.; OKI, T. Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. *Journal of Antibiotics*, v.43, p.267-280, 1990.
- NÜBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKA, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R.L.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, v.178, p.5636-5643, 1996.
- PABEL, C.T.; VATER, J.; WILDE, C.; FRANKE, P.; HOFEMEISTER, J.; ADLER, B.; BRINGMANN, G.; HACKER, J.; HENTSCHEL, U. Antimicrobial activities and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of *Bacillus* isolates from the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Marine Biotechnology*, v.5, p.424-434, 2003.
- PLEBAN, S.; CHERNIN, L.; CHET, I. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology*, v.25, p.284-288, 1997.
- SAITOU, N.; NEI, N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, v.4, p.406-25, 1987.
- STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, v.260, p.214-216, 1993.
- STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; MATHESON, B.G.; NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biology and Fertility of Soils*, v.25, p.13-19, 1997.
- TEIXEIRA, M.A. Diversidade de Bactérias endofíticas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) coletada de diferentes regiões do Brasil. São Paulo: USP/ICB, 2004. 102p. Tese (Doutorado).
- TEIXEIRA, M.A.; MELO, I.S.; VIEIRA, R.F.; COSTA, F.E.C.; HARAKAVA, R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três Estados brasileiros. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, p.42-49, 2007. Available in <http://www.scielo.br/pdf/pab/v42n1/06.pdf>. Accessed 1 Jul. 2008.
- THOMPSON, J.D.; HIGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Clustal-W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v.22, p.4673-4680, 1994.
- TRISCHMAN, J.A.; TAPIOLAS, D.M.; JENSEN, P.R.; DWIGHT, R.; FENICAL, W.; MCKEE, T.C.; IRELAND, C.M.; STOUT, T.J.; CLARDY, J.C. Salinamide-A and salinamide-B: anti-inflammatory depsipeptides from a marine streptomycete. *American Chemical Society*, v.116, p.757-758, 1994.

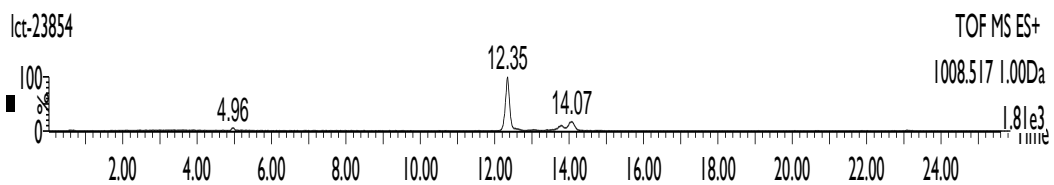
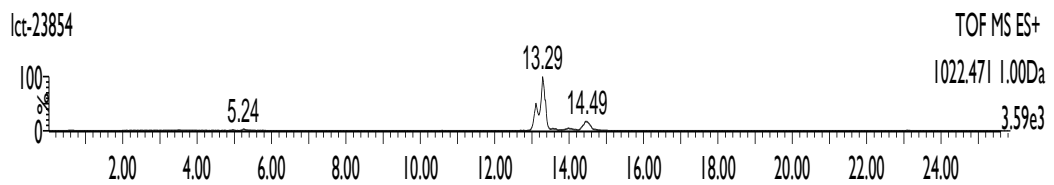
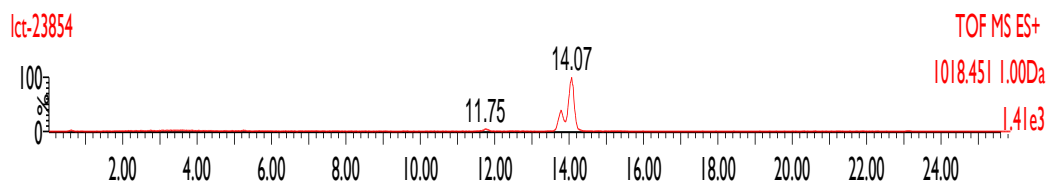
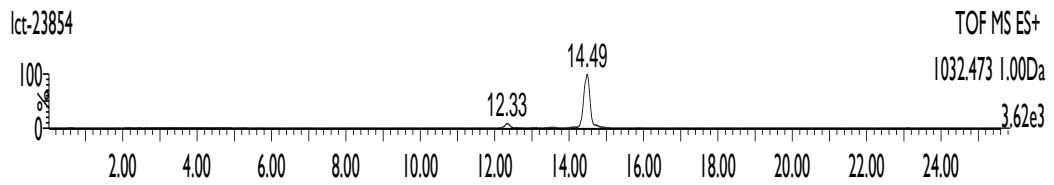
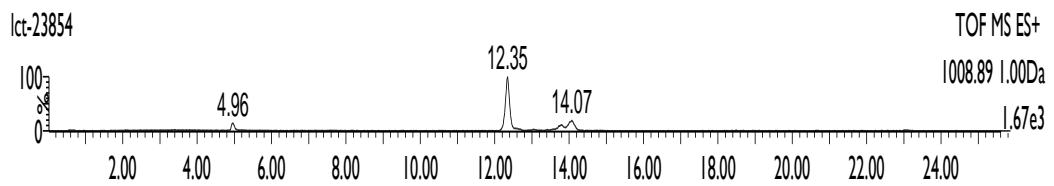
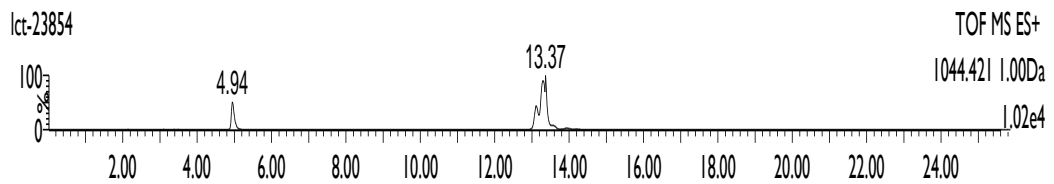
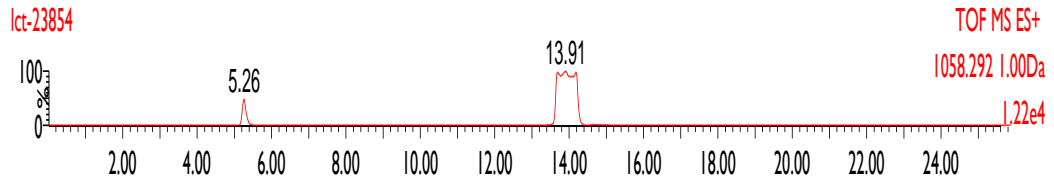
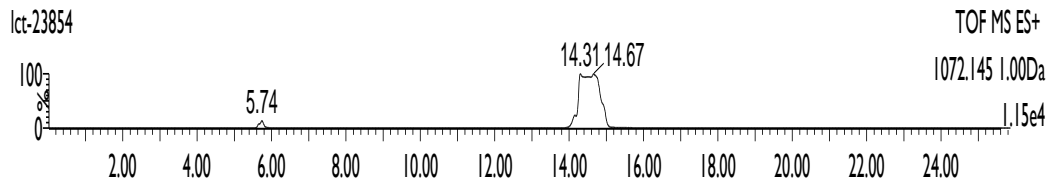
Received December 06, 2007

Accepted April 16, 2009

NÄYTE 11: KROMATOGRAMMIT JA MASSAT

LIITE 5

preppi nayte 11



NÄYTE 11: KROMATOGRAMMIT JA MASSAT

LIITE 6

preppi nayte 11

