



YMPÄRISTÖN-  
SUOJELU

Maarit Niemi, Milja Vepsäläinen, Suvi Simpanen,  
Kirsti Erkomaa ja Uwe Münster

# ZymProfilier® testisarjan kehittäminen ja soveltaminen ympäristönäytteiden entsyymiaktiivisuuksien mittaamiseen

MDIVE II loppuraportti





Maarit Niemi, Milja Vepsäläinen, Suvi Simpanen,  
Kirsti Erkomaa ja Uwe Münster

ZymProfil® testisarjan  
kehittäminen ja soveltaminen  
ympäristönäytteiden  
entsyymiaktiivisuuksien  
mittaamiseen

MDIVE II loppuraportti

HELSINKI 2004

Julkaisu on saatavana vain Internetistä:  
[www.ymparisto.fi/julkaisut](http://www.ymparisto.fi/julkaisut)

ISBN 952-11-1650-1 (PDF)  
ISSN 1238-7312

Kannen kuva: Maarit Niemi

Helsinki 2004

# Esipuhe

MDIVE-hanke kuului Suomen Akatemian biodiversiteettitutkimusohjelmaan, FIBRE, sen molemmissa vaiheissa ja sitä rahoitti 50 % TEKES ja 50 % Suomen ympäristökeskus. Tutkimuksen ensimmäinen vaihe käynnistyi keväällä 1997 ja päättyi vuoden 1999 lopussa, jolloin siitä laadittiin loppuraportti (Niemi ym. 2000). Työ toteutettiin pääosin Suomen ympäristökeskuksen tutkimuslaboratoriossa Hakuninmaalla ja organisaatiouudistuksen jälkeen vuonna 2002 osana luonnon monimuotoisuuden tutkimusohjelmaa. Laboratorion henkilökunnalle haluamme lausua kiitokset hyvästä yhteistyöstä.

Tutkimuksen toisen vaiheen vastuullisena johtajana on jatkanut dos. Maarit Niemi, päätoimisena tutkijana ja väitöskirjatyön tekijänä on toiminut MMM Milja Vepsäläinen, hänen äitiyslomittajanaan MMM Kaisa Wallenius, sekä päätoimisena laboranttina Lotta Sankkila. Tutkimuksen kenttä- ja laboratoriokokeiden toteutukseen ovat osallistuneet kemisti Kirsti Erkomaa, apulaistutkijat Tuula Ollinkangas ja Riitta Vehmaa, laborantit Tarja Bertula, Kaisa Heinonen, Hannele Leskinen, Sirpa Paattakainen ja Elina Tammi. Kesäharjoittelijoina ovat toimineet opiskelijat Leea Kuokkanen, Heikki Riisiö ja Kaisa Rantasärkkä. Suvi Simpanen viimeistelee hanketta koskevaa erikoistyötä osana mikrobiologian opintoja. DI Hannu Sirviö on vastannut ryhmittelyanalyysiä koskevan ohjelmiston ja fosfolipidirasvahapojen tarkastelussa käytetyn ohjelman laatimisesta. FM Timo Vänni on laatinut fluorometritulosten laskemisessa käytetyn Excel-pohjaisen dataprosessorin sekä ryhmittelytulosten visualisointia helpottavan Excel-makron yhteistyössä tutkijoiden kanssa.

Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksesta hankkeeseen ovat osallistuneet Laukaan tutkimus- ja valiotaimiasemalta MMT Mauritz Vestberg sekä hänen tutkimusryhmänsä sekä Mikkelistä ekologisen tuotannon Karilan asemalta tutkija Pirjo Kivijärvi viljelyjärjestelyjä vertailevissa hankkeissa. Helsingin yliopistosta prof. Hannu Ilvesniemen kanssa tehtiin yhteistyötä selvittäessä kasvukauden aikaisia muutoksia maaperän entsyymiaktiivisuuksissa. Peltomaan entsyymiaktiivisuuksien kesän aikaista vaihtelua tutkittiin yhteistyössä Helsingin yliopiston (dos. Liisa Pietola) ja Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksen (MMT Laura Alakukku) kanssa. Geneettisesti muunnetun mikrobin ja dieselöljyn vaikutusta entsyymiaktiivisuuksiin tutkittiin yhteistyössä dos. Kristina Lindströmin ja DI, MMM Jyrki Pitkälän kanssa Helsingin yliopistosta. Aktiivilietteen ja liete-kompostin entsyymiaktiivisuuksia mitattiin yhteistyössä Helsingin Veden kanssa. Metsäteollisuuden kompostoitujen aktiivilietteiden vaikutusta maaperään analysoitiin yhteistyössä Biopap Oy:n FM Kimmo Kuusisen kanssa. Näytteiden säilytystä tutkittiin yhteistyössä kemisti Pirkko Laakson kanssa Viljavuuspalvelu Oy:stä. Aboatox Oy toimitti mittalaitteen Viljavuuspalvelu Oy:ssä toteutettuihin entsyymiaktiivisuus mittauksiin, joissa selvitettiin näytteen säilyvyyttä. Dos. Uwe Münsterin järjestämällä laboratoriokursseilla käytettiin ZymProfilier®-testisarjoja sekä maa- että vesinäytteiden tutkimisessa.

Hanketta on ohjannut Tekesin asettama johtoryhmä, jonka puheenjohtajana on toiminut tutkimusjohtaja Väinö Mäntylähti Viljavuuspalvelu Oy:stä. Johtoryhmään ovat kuuluneet Tekesin edustajana aluksi teknologia-asiantuntija FT Riikka Heikinheimo ja myöhemmin teknologia-asiantuntija dos. Erja Heikkinen sekä Tampereen Teknillisestä korkeakoulusta dos. Uwe Münster, joka edusti myös ARBAC-

konsortiota, johon hanke FIBRE-tutkimusohjelman toisessa vaiheessa kuului. Teollisuuden edustajana ryhmässä toimi tuotepäällikkö Risto Juvonen edustaen ensin BioNobile ja myöhemmin Aboatox yrityksiä. Hänen seuraajanaan johtoryhmässä toimi Aboatox Oy:n toimitusjohtaja FM (väit.) Juha Lappalainen. Sihteerinä toimi tutkimuksen vastuullinen johtaja.

Aktiivisesti hanketta ohjanneelle ja tukeneelle johtoryhmälle sekä kaikille yhteistyökumppaneille tekijät haluavat esittää lämpimät kiitokset. Kiitämme myös dos. Kristina Lindströmiä hänen tähän raporttiin esittämistään korjauksista.

# Sisällys

<b>Esipuhe</b> .....	<b>3</b>
<b>1 Johdanto</b> .....	<b>7</b>
<b>2 Projektin tarkoitus</b> .....	<b>8</b>
<b>3 ZymProfilor® entsyymiaktiivisuus testisarjan kehittäminen</b> ....	<b>9</b>
3.1 Entsyymit ja substraatit .....	9
3.2 Materiaalin valmistus .....	10
3.3 Materiaalin käsittely ja säilytys .....	11
3.4 Maanäytteenotto ja käsittely .....	12
3.5 Maanäytteiden säilytys .....	13
3.6 Substraattitaso .....	15
3.7 Entsyymiaktiivisuuksien mittaaminen .....	17
3.8 Tulosten laskeminen .....	17
3.9 Havaintoaineistojen käsittely: ZymProfilor® ohjelmisto .....	19
<b>4 Biomarkkereiden analyysit maanäytteistä</b> .....	<b>20</b>
4.1 Fosfolipidirasvahappomääritykset .....	20
4.2 Ergosteroli ja $\beta$ -sitosteroli maanäytteistä .....	20
<b>5 PCR-DGGE analyysit maanäytteistä</b> .....	<b>21</b>
<b>6 Fysikaaliset ja kemialliset mittaukset maanäytteistä</b> .....	<b>22</b>
<b>7 Entsyymiaktiivisuusmittausten soveltaminen</b> .....	<b>23</b>
7.1 Kasvukauden aikainen vaihtelu metsämaassa .....	23
7.2 Kasvukauden aikainen vaihtelu peltomaassa .....	24
7.3 Raskasmetallikuormituksen vaikutus metsämaan entsyymiaktiivisuuksiin .....	25
7.4 Viljelymenetelmien vaikutus entsyymiaktiivisuuksiin .....	25
7.5 Viljelykasvin ja turpeen vaikutus entsyymiaktiivisuuksiin .....	26
7.6 Maaperän katteiden vertailu mansikanviljelyssä .....	26
7.7 Geneettisesti muunnetun mikrobin ja dieselöljyn vaikutus .....	27
7.8 Entsyymiaktiivisuudet aktiivilietteestä ja lietekompostissa .....	28
7.9 Metsäteollisuuden puhdistamolietekompostien lisäyksen vaikutus maassa .....	30
7.10 Entsyymiaktiivisuuden riippuvuus pH-arvosta eri näytteissä .....	30
7.11 Soveltuvuus vesinäytteille .....	30
7.12 Entsyymiaktiivisuuksien vaihtelu eri habitaateissa .....	32
<b>8 Luonnontieteellisen hyödyntämisen ja kaupallistamisen näköalat</b> .....	<b>35</b>
<b>9 Projektin tuottamat opinnäytteet ja julkaisut</b> .....	<b>36</b>
<b>10 Kirjallisuus</b> .....	<b>40</b>
<b>Kuvailulehdet</b> .....	<b>41</b>





# Johdanto



EU:n piirissä on valmisteltu vesipuitedirektiiviä vastaavaa maaperän suojeluun tähtäävää lainsäädäntöä ja tiedeyhteisö, erityisesti International Union of Soil Science Societies, on korostanut maaperän suojelun välttämättömyyttä ja kiireellisyyttä sekä elintarviketuotannon että biosfäärin turvaamiseksi. Maaperän biologiselle tilalle ei ole toistaiseksi asetettu laadullisia kriteereitä, koska ei ole ollut laaja-alaisesti käyttöön sopivia mittausmenetelmiä, jotka heijastelisivat mikrobidiversiteettiä tai mikrobien toimintaa monipuolisesti. Aivan viime vuosina on saatu myönteisiä kokemuksia maahengityksen, maaperän mikrobien fosfolipidien rasvahappokoostumuksen, joidenkin entsyymien aktiivisuuksien ja maaperän DNA:n joidenkin geenien monimuotoisuuden käytöstä ilmentämään ihmisen toiminnan aiheuttamia muutoksia maaperässä.

Mikrobien aineenvaihdunta maaperässä aikaan saa olennaisilta osin aineiden kiertokulun, mineralisaation ja alkuaineiden ja yhdisteiden saatavuuden kasveille käyttökelpoisessa muodossa. Ihminen vaikuttaa maaperään, sen mikrobilajistoon ja mikrobien aikaan saamiin prosesseihin tietoisesti maanviljelyssä ja metsien hoidossa eri käsittelyillä. Toisaalta ilmastomuutos, kaukokulkeutumat, pistemäiset ilman saastutuslähteet ja liikenteen sekä onnettomuuksien aiheuttama saastutus voivat vaikuttaa maaperän mikrobistoon haitallisesti.

Yksittäisten mikrobilajien merkitystä maaperän prosesseihin on vaikea arvioida, koska redundanssia esiintyy todennäköisesti melkoisesti ja vasta huomattavat vaikutukset heijastuvat mikrobien välittämien prosessien tasolla. Luonnollista vaihtelua aiheutuu esim. vuodenajan vuoksi ja maaperän fysikaalisen ja kemiallisen heterogeenisyyden vuoksi eikä hyväksyttävää vaihtelun tasoa voida toistaiseksi arvioida. Sen vuoksi käytännön ympäristönsuojelun ja maa- ja metsätalouden tarpeisiin tarvitaan maaperän prosessien häiriintymistä tai myönteistä muutosta mittaavia menetelmiä, joiden tulosten arviointiin tarvittava taustatieto on olemassa.

Maaperän entsyymien aktiivisuus kuvastaa aineiden kierron funktioita. Biotekniikan ja tietotekniikan nopea kehitys on luonut edellytyksiä kehittää useiden entsyymiaktiivisuuksien samanaikaiseen mittaukseen perustuva testisarja, jota MDIVE-hankkeen toisessa vaiheessa on edelleen kehitetty, testattu ja sovellettu erilaisissa ympäristöä koskevissa tutkimuksissa.

# 2

## Projektin tarkoitus

Hankkeen tarkoituksena oli kehittää ympäristö- ja erityisesti maanäytteille soveltuva testisarja entsyymiaktiivisuuksien mittaamiseen valitsemalla käyttökelpoiset entsyymiaktiivisuudet ja optimoimalla näytteenotto, esikäsitely, materiaalin käsittely sekä mittausolosuhteet. Mittaustulosten laskemista ja näytteiden analysointia päätettiin automatisoida.

Testisarjan käyttökelpoisuuden arvioimiseksi entsyymiaktiivisuuksia mitattiin tunnetuista saastegradienteista metsissä ja eri tavoin käsitellyistä viljelymaista sekä seurattiin entsyymiaktiivisuuksien muuttumista kasvukauden aikana. Lisäksi mitattiin aktiivisuuksia aktiivilieteprosessista ja lietteen komposteista. Alustavasti selvitettiin testisarjan soveltuvuutta vesiympäristössä.

Jotta voitaisiin tarkastella tutkittavien maiden tilaa ja arvioida entsyymiaktiivisuuksien herkkyyttä osoittamaan muutoksia maaperän biologisessa tilassa, näytteistä mitattiin taustatietoja.

# ZymProfiler® entsyymiaktiivisuus- testisarjan kehittäminen

# 3

## 3.1 Entsyymit ja substraatit

Seuraavia entsyymiaktiivisuuksia on hankkeen kuluessa käytetty (taulukko 1):

**Fosfomonoesteraasi** (PME) on hydrolaasi, joka ei vaadi koentsyymiä ja hydrolysoi fosfaattiestereitä. Fosfaattit yhdyvät laajaa kirjoa rakenteeltaan samankaltaisia substraatteja mutta hydrolysointinopeudet vaihtelevat. Triviaaliniimiä substraattien perusteella ovat mm. fytaasi, nukleotidaasi, sokerifosfaatti ja glyserofosfaatti. Fosfomonoesteraasit katalysoivat orgaanisen fosfomonoesterin hydrolyysiä epäorgaaniseksi fosforiksi, joka on kasveille käyttökelpoista. Hapanta ja neutraalia fosfaattia on löydetty eläin-, mikrobi- ja kasvisoluista. Sekä hapanta että alkalinen fosfaatti on aktiivisempi riittosfäärin ympäristössä kuin täsmälleen riittosfäärissä, joten ne molemmat ovat kasvinravitsemuksessa tärkeitä. (Alef & Nannipieri 1995). ZymProfiler® testisarjan PME mittaa aktiivisuutta valitussa pH-arvossa, joten voidaan mitata joko hapanta tai alkalista PME aktiivisuutta. Suurin osa mitatuista entsyymiaktiivisuuksista mitattiin pH-arvossa 5.5, joten tulokset edustavat hapanta fosfaattia ellei muuta mainita. **Alkalinen PME** aktiivisuus mitataan yleensä pH-arvossa 8.0. Alkalista PME entsyymiä on löydetty mikrobi- ja eläin-soluista. (Alef & Nannipieri 1995).

**Fosfodiesteri** (FDE) substraattimolekyylissä olevat orgaaniset molekyylit voivat olla mm. alkoholi-, fenoli- tai nukleotidiryhmiä. (Alef ja Nannipieri 1995).

**Arylsulfataasi** vapauttaa kasveille käyttökelpoista rikkiä orgaanisista molekyyleistä. Se on tärkeä entsyymi rikin mineralisaatiossa.

Proteasit katalysoivat oligopeptidien hydrolyysiä aminohapoiksi. **Leusiini-aminopeptidaasi**, **alaniini-aminopeptidaasi** ja **lysiini-alaniini-aminopeptidaasi** ovat proteaaseja, jotka liittyvät yleisesti ammoniumin vapautumiseen proteiineista. (Alef & Nannipieri 1995). Lysiini-alaniini-aminopeptidaasin aktiivisuudet olivat niin alhaisia, että siitä luovuttiin testisarjassa.

**α-Glukosidaasi** katkaisee tärkkelyksen ja glykokeenin suorien ketjujen sokeri-monomeerien välisiä sidoksia, joten se on tärkeä näiden yhdisteiden hajotuksessa.

**β-Glukosidaasi** pilkkoo selluloosan sokeri-monomeerien välisiä sidoksia ja katkaisee sellobioosin ja selluloosasta pilkottujen oligosakkaridien sidoksia, jolloin vapautuu glukoosia. **Sellobiosidaasi** hydrolysoi 1,4-β-D-glukosididoksia selluloosassa vapauttaen sellobioosia.

Ksylaanit ovat kasvien tuottamia heterogeenisiä polysakkarideja (sisältävät ksyloosia, joka on pentoosi). Ksylaani on hemiselluloosan tärkein komponentti. Hemiselluloosa on toiseksi yleisin kasvimateriaali luonnossa. Niiden hydrolyysissä tarvitaan ksylanaaseja ja ksylosidaaseja, joista **β-ksylosidaasi** on tärkeä. Se irrottaa D-ksyloosimonomeerejä 1,4-β-D-ksylaanin ei-pelkistävästä päistä. Tämä entsyymi hajottaa ksylobioosia. **Ksylanaasit** ovat entsyymikomplekseja, joissa on useita entsyymiaktiivisuuksia. Endo-1,4-β-ksylanaasi katalysoi 1,4-β-D-ksylosididoksia ksyylaanin sidoksia. Ksylanaasimääritykset antoivat lupaavia tuloksia manuaalisilla menetelmillä, mutta fluoresoivaa substraattijohdannaisista ei ollut käytettävissä ja värireaktioon perustuva menetelmä oli työturvallisuuden vuoksi hankala. ZymProfiler® testisarjaan sisältyy β-ksylosidaasi, mutta ei ksylanaasimääritystä.

**Invertaasi** katkaisee  $\alpha$ -1,4-glykosididoksen sakkaroosista vapauttaen glukosia ja fruktoosia. Manuaalisesti analysoituna invertaasi antoi mielenkiintoisia tuloksia sekä metsä- että viljelymaassa. Sopivaa fluorogeenistä substraattia ei ollut käytettävissä, joten tätä entsyymiä ei voitu sisällyttää ZymProfilin® testisarjaan.

**Kitinaasi** osallistuu kitiinin hajotukseen eli se katkaisee N-asetyyli-glukosamiinimonomeereistä  $\beta$ -1-4-glykosididoksen.

**Lipaasi** hydrolysoi esterisidoksia vapauttaen mm. rasvahappoja. Se ei vaadi koentsyymiä. Testattu fluorogeeninen substraatti ei ollut koeolosuhteissa täysin stabiili (kts. 3.3), joten muiden substraattien testaus on aiheellista.

**Esteraasi** katkaisee esterisidoksia. Substraattina MUF-asetaatti ei ollut riittävän stabiili (kts. 3.3).

**$\beta$ -Galaktosidaasi** hajottaa galaktoosioligosakkarideja, galaktomannaaneja ja galaktolipideitä.  **$\beta$ -Glukuronidaasi** hydrolysoi glukuronidia ja sitä käytetään mm. *Escherichia colin* osoittamiseen vesinäytteistä. Näiden entsyymien osalta saatiin alustavia tuloksia.

Taulukko 1. ZymProfilin® testisarjan entsyymit, käytetyt substraattit ja pääasiallisesti hajotettavat molekyylit tai sidokset. Entsyymit, joissa substraatin stabiilius ei ollut hyvä tai joissa aktiivisuustaso oli alhainen on merkitty *kursiivilla*.

Entsyymi	Substraatti	Hajotettava molekyyli
$\alpha$ -glukosidaasi	4-MU- $\alpha$ -D-glukopyranosidi	tärkkelys ja glykogeeni
$\beta$ -glukosidaasi	4-MU- $\beta$ -D-glukopyranosidi	selluloosa
$\beta$ -ksylosidaasi	4-MU- $\beta$ -D-ksylopyranosidi	ksylaani, ksylbioosi
Kitinaasi	4-MU-N-asetyyli- $\beta$ -D-glukosaminidi	$\beta$ -1-4-glykosididosten katkaisu N-asetyyli-glukosaminidista (kitiinistä) ja kitobioosista
Sellobiosidaasi	4-MU- $\beta$ -sellobiopyranosidi	selluloosa
Fosfomonoesteraasi (hapan/alkalinen)	4-MU-fosfaatti	fosfaattiestereiden hydrolyysi
Arylsulfataasi	4-MU-sulfaatti	orgaanisen rikin mineralisaatio
Fosfodiesteriaasi	bis-4-MU-fosfaatti	fosfaattidiesterien hydrolyysi
Leusiini-aminopeptidaasi	L-leusiini-7-AMC	oligopeptidit aminohapot
Alaniini-aminopeptidaasi	L-alanine-7-AMC	oligopeptidit aminohapot
<i>Lys-ala-aminopeptidaasi</i>	<i>lys-ala-7-AMC</i>	<i>oligopeptidit</i> → aminohapot
<i>Esteraasi</i>	<i>4-MU-asetaatti</i>	<i>esterisidosten hydrolyysi</i>
<i>Lipaasi</i>	<i>4-MU-heptanoaatti</i>	<i>lipidit, triasyyliglyserolin hydrolyysi</i>
$\alpha$ -galaktosidaasi	4-MU- $\alpha$ -D-galaktopyranosidi	galaktoosi oligosakkaridit, galaktomannaanit, galaktolipidit
$\beta$ -glukuronidaasi	4-MU- $\beta$ -D-glukuronidihydraatti	glukuronidin hydrolyysi

## 3.2 Materiaalin valmistus

Testisarjassa käytetään sekä Sigman (Sigma-Aldrich Co.,) että Glycosynthin (Glycosynth Co., Iso-Britannia) valmistamia substraattijohdannaisia ja standardiyhdisteitä. Substraattijohdannaisien detektoitava osa on joko 4-metyyliumbelliferoni (MUF) tai aminometyyliikumariini (AMC) (Taulukko 1).

Substraattijohdannaiset ja standardiyhdisteet liuotetaan orgaaniseen liuottimeen. Reagenssien punnituksessa ja liuotuksessa on kiinnitetty erityisesti huomiota siihen, että valonarat substraattijohdannaiset eivät joudu valolle alttiiksi fotolyysin minimoimiseksi.

Substraattiliuokset valmistetaan 2 mM vahvuiseksi ja niitä pipetoidaan kuoppalevyille siten, että näytettä lisättäessä lopulliseksi pitoisuudeksi saadaan 500  $\mu$ M. Kutakin näytettä varten jokaista substraattia pipetoidaan neljään rinnakkaiseen kuoppaan. Standardireagenssien 5 mM varastoliuoksia laimennetaan ja niitä lisä-

tään kuoppalevyille siten, että lopulliset pitoisuudet näytteitä lisättäessä ovat 0,5-100  $\mu\text{M}$  MUF-standardille ja 0,1-50  $\mu\text{M}$  AMC-standardille, kummallekin kahdeksan standardipistettä 0-piste mukaan luettuna. Standardit on lisätty kuoppalevyille kolmena rinnakkaisena. Kuoppalevyt peitetään foliopinnoitetulla teipillä yhdisteiden fotolyysin estämiseksi.

Hankkeessa on kokeiltu useita erilaisia kuoppalevyjä muovien ja pinnoitteiden erilaisten ominaisuuksien vuoksi ja päädyttiin MUF- ja AMC-yhdisteille eri kuoppalevyihin. Kokeessa kiinnitettiin huomiota erityisesti viereisten kuoppien vaikutukseen mittaustuloksiin, rinnakkaismittausten hajontaan, taustafluoresenssiin ja levyjen käyttökelpoisuuteen. Mustat kuoppalevyt antoivat lisää herkkyyttä mittaukseen alhaisen taustafluoresenssin vuoksi, mutta niiden käytöstä luovuttiin, sillä kuopista ei nähnyt sisäisivätkö ne manuaalisesti lisättyjä reagensseja vai eivät.

Kuoppalevyille pipetoidut yhdisteet kuivattiin kylmäkuivurissa, sillä liuoksesta yhdisteet eivät säily ja niiden kuljettaminen on vaikeaa. Ennen kuivausta reagenssit jäädytettiin ( $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , 30 min) ja folioituun teippiin pisteltiin neulalla reikä kunkin kuopan kohdalle jään haihtumista varten. Kylmäkuivaus kesti n. 16 h. Hankkeessa selvitettiin, että SpeedVac-laite, jossa haihtuminen tapahtuu alipaineessa sentrifugoitaessa ja levyjä on mahdollista lämmittää, mahdollistaisi kuivauksen noin kolmessa tunnissa. Tämä vaihtoehto saattaisi olla kylmäkuivausta parempi ratkaisu. Levyjen kuivausta laminaarivirtauskaapissa kokeiltiin kylmäkuivauksen välttämiseksi. Liuotin ei haihtunut levyiltä ja haihtuvat liuottimet eivät liuottaneet kaikkia substraatteja, joten tämä vaihtoehto on poissuljettu.

### 3.3 Materiaalin käsittely ja säilytys

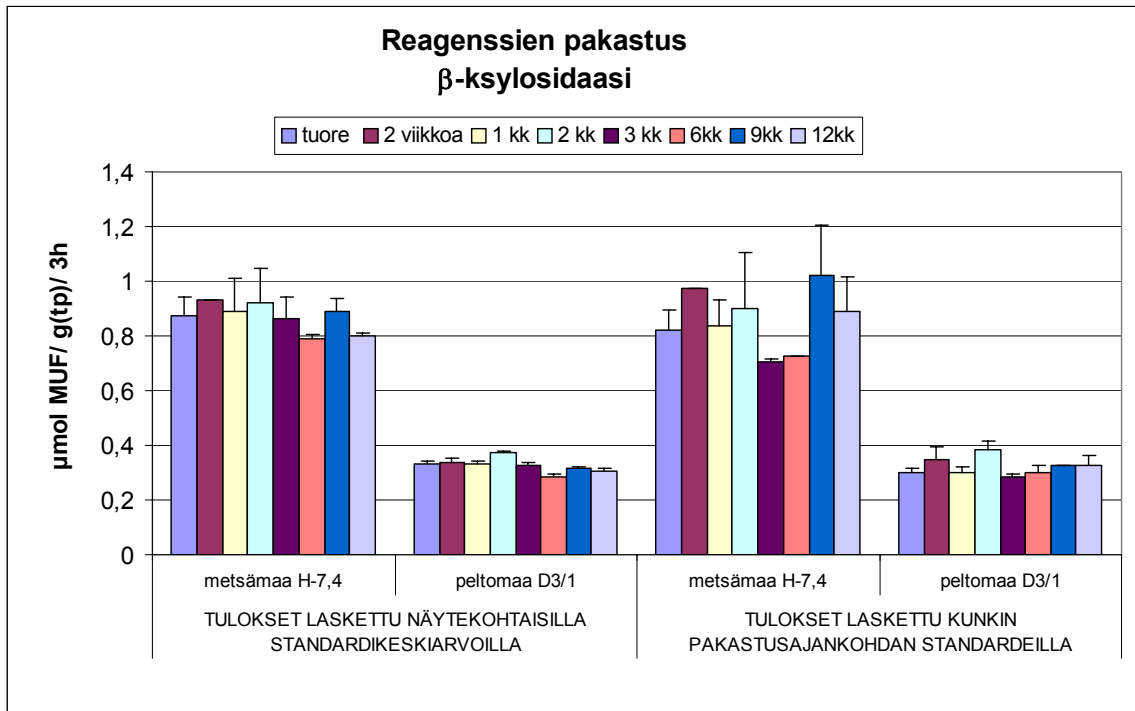
Suurin osa hankkeen entsyymiaktiivisuusmittauksista tehtiin tuoreilla reagenssilevyillä. Testisarjan käyttöä kuitenkin laajentaisi huomattavasti mahdollisuus tehdä reagenssimateriaalia valmiiksi varastoon. Materiaalin säilyvyys -kokeen avulla tutkittiin vaikuttaako valmiiksi tehtyjen testilevyjen varastointi pakkasessa merkittävästi mittaustuloksiin. Tästä sekä maanäytteiden säilytystä koskevasta kokeesta (kts. 3.5) on *Pro gradu* -työ tekeillä (Suvi Simpanen).

Reagenssilevyjä valmistettiin vuoden 2001 aikana useana eri ajankohtana ja ne säilytettiin pimeässä,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ :n pakkasessa mittaushetkeen asti. Levyjen säilytysajat olivat 12 kk, 9 kk, 6 kk, 3 kk, 2 kk, 1 kk ja 2 viikkoa. Kontrollilevyinä käytettiin juuri ennen levyjen testausta valmistettuja, tuoreita levyjä, joista saatuihin tuloksiin vertaamalla voitiin arvioida mahdollinen reagenssien säilytyksen aiheuttama vaikutus mittaustulokseen. Kaikki levyt testattiin kahdella erilaisella maa-tyypillä, joista kummastakin tehtiin kaksi rinnakkaisanalysointia.

Kokeesta saatujen tulosten perusteella lähes kaikki entsyymisubstraatit näyttivät kestävän pakastettuna säilyttämisen melko hyvin. Pakastuksen vaikutus näkyi tilastollisesti merkitsevänä ainoastaan  $\alpha$ -glukosidaasin,  $\beta$ -ksylosidaasin (kuva 1) ja fosfodiesteriäsin aktiivisuuksissa, mutta näissäkään ei havaittu selkeää aktiivisuuden heikkenemistä tai lisääntymistä säilytysajan etenemisen myötä. Eri mitauskertojen välinen vaihtelu saattoi osaksi vaikuttaa tilastolliseen merkitsevyyteen.

Arylsulfataasin aktiivisuustuloksissa ilmeni suurta vaihtelua tietyn ajanjakson aikana, mutta vaihtelun syytä ei kyetty tarkasti selvittämään. Sama ajankohta oli ongelmallinen arylsulfataasin osalta myös muissa analyyseissä, joten kyse saattoi olla substraatin puhtaudesta tai substraattiliuoksen laimentamisvirheestä. Esteraasin ja lipaasin substraatit todettiin epästabiileiksi (Vepsäläinen, Rapala, Nieminen 2002), minkä johdosta näiden entsyymien aktiivisuustuloksiin on suhtauduttava varauksella.

Lisäksi kokeessa havaittiin, että eräs mittausepävarmuutta aiheuttava tekijä oli standardisubstraattien pipetointi. Samasta näytteestä eri testilevyillä toistetuissa standardimittauksissa ilmeni suurta satunnaisvaihtelua, mikä vaikutti myös lopullisiin entsyymiaktiivisuustuloksiin (kuva 1). Tämän johdosta kaikissa tulosten laskemisissa päädyttiin käyttämään näyte- tai näytetyyppikohtaisia standardikeskiarvoja.



Kuva 1. β-Ksylosidaasin aktiivisuudet metsämaassa ja peltomaassa kun mittauksessa on käytetty tuoreita sekä 2 viikosta 12 kuukauteen pakastettuja reagenssilevyjä. Standardivaihtelun vaikutuksen aktiivisuustuloksiin näkee vertailemalla standardien keskiarvoilla ja kunkin pakastusajankohdan standardeilla laskettuja tuloksia keskenään.

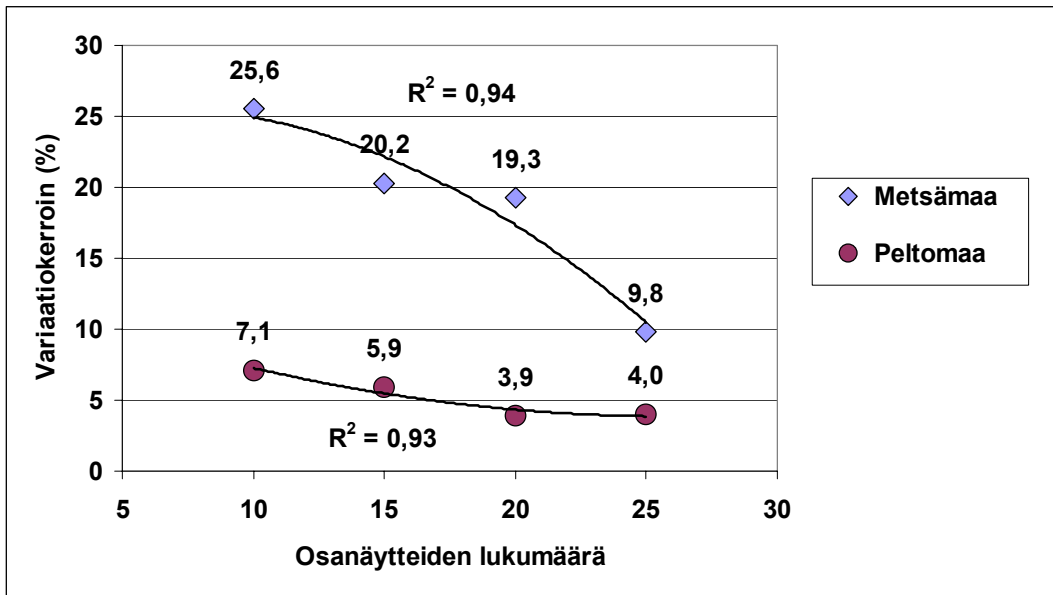
### 3.4 Maanäytteenotto ja käsittely

Hankkeessa käytettiin useasta rinnakkaisesta osanäytteestä koottua kokoomanäytettä edustamaan kunkin koejärjestelyn koejäseniä. Osanäytteet otettiin kulloinkin tarkoitukseen sopivalla pintamaakairalla (metsämaasta halkaisijaltaan 10 cm kairalla koko humuskerroksesta ja viljelymaasta halkaisijaltaan 2.5 cm kairalla yleensä kyntökerroksesta eli ylimmästä 20 cm, mutta kasvukauden aikaisessa peltomaan kokeessa erikseen 10 cm kerroksista 40 cm syvyyteen asti). Mahdollisuuksien mukaan myös koejäsenistä otettiin rinnakkaiskokoomanäytteet A ja B. Osanäytteet yhdistettiin pellolla PE-muovipusseihin ja ne kuljetettiin SYKEN laboratorioon kylmälaukuissa. Kokoomanäytteet seulottiin joko  $\varnothing$  4 mm tai  $\varnothing$  2 mm seulalla ja sekoitettiin huolellisesti viimeistään näytteenottoa seuranneena päivänä. Osassa koealoista näytteet saatiin valmiiksi käsiteltyinä SYKEN laboratorioon. Näytteet säilytettiin +4 °C lämpötilassa eri analyysejä varten. Pintamaan suuren heterogeenisuuden vuoksi näytteenoton edustavuus selvitettiin hankkeen kuluessa.

Näytteenoton edustavuus selvitettiin sekä kivennäispitoisilla peltomaa- että humuspitoisilla metsämaanäytteillä. Molempia näytetyyppejä otettiin useita kokoomanäytteitä siten, että ne koostuivat 10, 15, 20 tai 25 osanäytteestä. Peltomaasta näytteet otettiin  $\varnothing$  2 cm kairalla 0-15 cm syvyydestä ja metsämaasta  $\varnothing$  5 cm kairalla humuskerroksesta. Yksi osanäyte kustakin kokoomanäytteestä värjättiin ent-

syymiaktiivisuusmittauksissa käytetyllä standardiyhdisteellä 4-metyyliumbellife-ronilla (MUF) ja kaikki osanäytteet ilmakeivattiin. Osanäytteet kutakin kokooma- näytettä varten seulottiin yksitellen ja lopulta fluoresoivaa väriainetta sisältäneet ja muut osanäytteet yhdistettiin kokoomanäytteiksi huolellisesti sekoittaen. Kus- takin kokoomanäytteestä otettiin viisi rinnakkaisnäytettä tutkimukseen.

Viiden rinnakkaisnäytteen sisältämän MUF-yhdisteen määrän vaihtelu on esitetty kuvassa 2. Tarpeeksi suurella osanäytteiden määrällä vaihtelu rinnakkais- ten mittausten välillä saatiin hallittavaksi. Tavoitteena on päästä alle 10 % maama- teriaalista aiheutuvaan vaihteluun.



Kuva 2. Fluoresenssimittauksen vaihtelukerroin eri osanäyttemääristä koostuvissa kokooma- näytteissä.

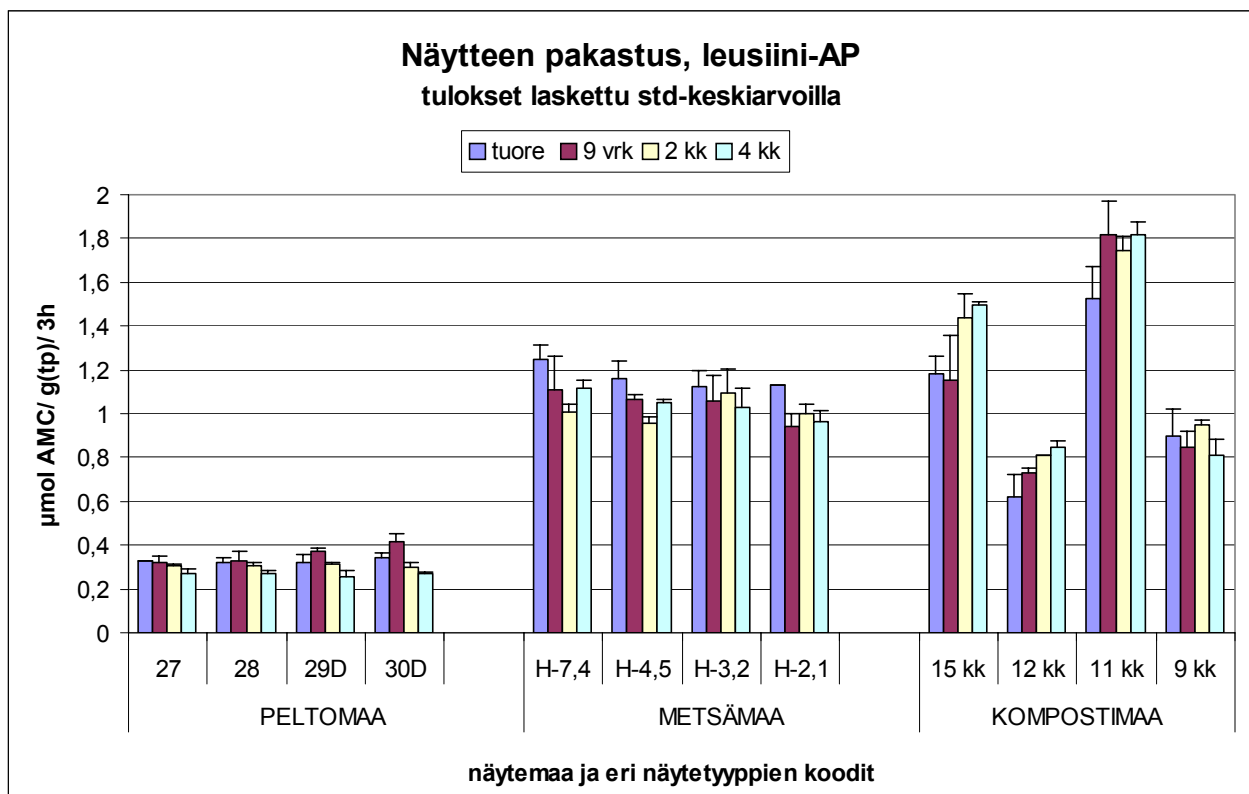
### 3.5 Maanäytteiden säilytys

Useimmissa hankkeen kokeissa näytteet pyrittiin testaamaan mahdollisimman tuo- reina, enintään noin vuorokausi näytteenoton jälkeen. Näytteenottojen kasautu- minen kesäksi aiheuttaa kuitenkin ruuhkia ja menetelmän soveltamista helpottai- si, jos näytteet voisi pakastaa. Tämän vuoksi haluttiin erillisen kokeen avulla sel- vittää vaikuttaako maanäytteen säilyttäminen pakastettuna näytteen entsyymi- aktiivisuuksiin.

Kokeen aineisto kerättiin syksyn 2001 aikana ja siihen valittiin kolme erilaista maatyypistä: metsämaa, peltomaa ja kompostimaa. Jokaisesta maatyypistä oli mu- kana neljä eri näytettä, jotka vaihtelivat näytteenottoaikan tai näytteenottopai- kalle tehtyjen käsittelyjen suhteen jonkin verran toisistaan. Metsämaanäytteet oli- vat Harjavallan kupari-nikkelisulaton läheisyydessä sijaitsevalta kangasmetsäalu- eelta, joiden keräyspisteet sijaitsivat 2,1–7,4 kilometrin etäisyydellä kuparisulatos- ta. Peltomaanäytteet haettiin Helsingin yliopiston Viikin koetilalla sijaitsevalta koe- kentältä josta näytteiksi saatiin puhdasta peltomaata ja dieselöljyllä saastutettua peltomaata. Kompostimaanäytteet olivat Helsingin Veden Sipoossa sijaitsevalta Metsäpirtin kompostointikentältä otettuja eri ikäisten kompostiaumojen aineista, joiden kompostoitumisaika vaihteli 9 kuukaudesta 15 kuukauteen.

Tuoreista näytteistä mitattiin entsyymiaktiivisuudet ja ne pakastettiin 4 g:n erissä vuorokausi näytteenoton jälkeen. Näytteet säilytettiin pakastettuina  $-20^{\circ}\text{C}$ :ssa kolme eripituista ajanjaksoa: noin viikon ajan, kahden kuukauden ajan ja neljän kuukauden ajan. Pakastusajan jälkeen näytteiden entsyymiaktiivisuudet mitattiin ja tuloksia verrattiin tuoreista näytteistä saatuihin entsyymiaktiivisuustuloksiin. (Näytteenoton ja tuoreen mittaushetken välisen, noin vuorokauden kestäneen ajan näytteet säilytettiin  $+4^{\circ}\text{C}$ :n kylmähuoneessa.) Kaikista näytteistä tehtiin kaksi rinnakkaisanalysointia jokaista säilytysaikaa kohti. Mittauksissa käytettiin aina tuoreita reagenssilevyjä.

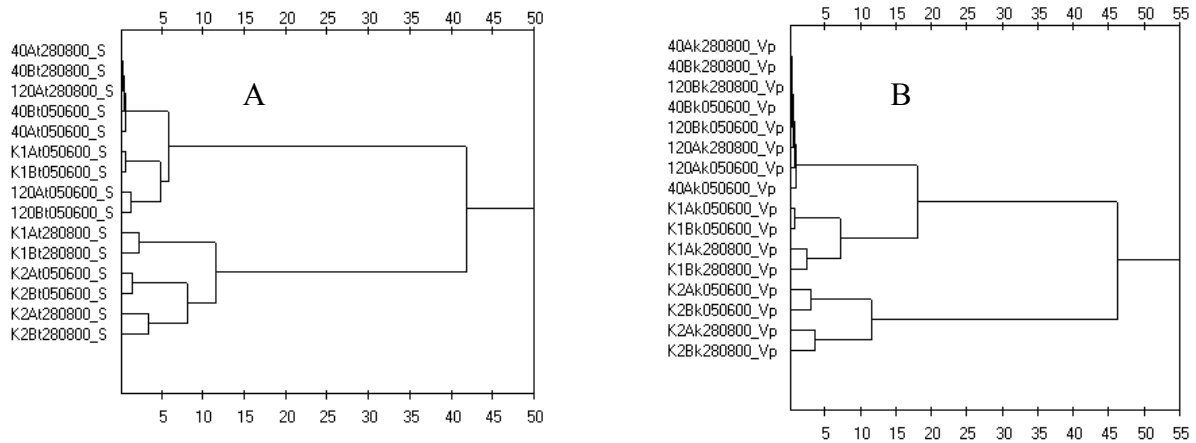
Erilaiset näytemaat näyttivät reagoivan pakastukseen hyvin vaihtelevasti. Kompostimaassa useimpien entsyymien aktiivisuudet kasvoivat säilytysajan myötä, mistä pääteltiin, ettei  $-20^{\circ}\text{C}$  ole riittävän alhainen säilytyslämpötila pysäyttämään kompostimaan mikrobitoimintoja. Kaikissa näytetyypeissä tilastollista merkitsevyyttä ajan suhteen ilmeni  $\beta$ -glukosidaasissa, leusiiniaminopeptidaasissa ja alaniiniaminopeptidaasissa.  $\beta$ -glukosidaasin aktiivisuus laski pakastuksen myötä kaikissa näytetyypeissä, leusiini-aminopeptidaasin aktiivisuus laski pelto- ja metsämaassa mutta nousi kompostimaassa (kuva 3) ja alaniiniaminopeptidaasin aktiivisuus laski hieman metsämaassa, mutta muissa näytetyypeissä ei havaittu selkeää nousu- tai laskutrendiä. Tilastollista merkitsevyyttä ajan suhteen ilmeni lisäksi pelto- ja metsämaassa fosfomonoesteraasin, arylsulfataasin ja sellulaasin kohdalla, mutta osa havainnoista johtuu todennäköisesti eri analyysikertojen välisistä vaihteluista.



Kuva 3. Leusiiniaminopeptidaasin aktiivisuudet pelto- ja metsämaassa ja kompostimaassa. Aktiivisuudet mitattu tuoreista näytteistä sekä 9 vrk, 2 kk ja 4 kk pakastettuina säilytetyistä näytteistä.



Näytteen ilmakeivauksen vaikutusta entsyymiaktiivisuuksiin tutkittiin aiemmin (Niemi, R. M., Vepsäläinen, M., Laakso, P. and V. Mäntylähti 2001). Kuivaus sekä laske nosti entsyymiaktiivisuuksia ja erot tuoreen ja kuivatun näytteen välillä olivat pakastuksen aiheuttamaa suuremmat. Ryhmittelyanalyysissä sekä kuivatuista näytteistä että tuoreista näytteistä analysoidut entsyymiaktiivisuudet kuitenkin ryhmittyivät omiksi ryhmikseen näytteenottoaikan mukaan (kuva 4).



Kuva 4. Klusterianalyysit tuoreista näytteistä mitatuista entsyymiaktiivisuuksista (A) ja ilmakeivatuista näytteistä mitatuista entsyymiaktiivisuuksista (B). (40 ja 120 = eri lannoitemäärät viljapellossa, K1 = maa 500 m päässä Koverharin sulatosta, K2 = verranne 11 km päässä Koverharin sulatosta, kaikissa ajankohta pppkvv, S = SYKE ja Viljavuuspalvelu mittaajina.)

### 3.6 Substraattitaso

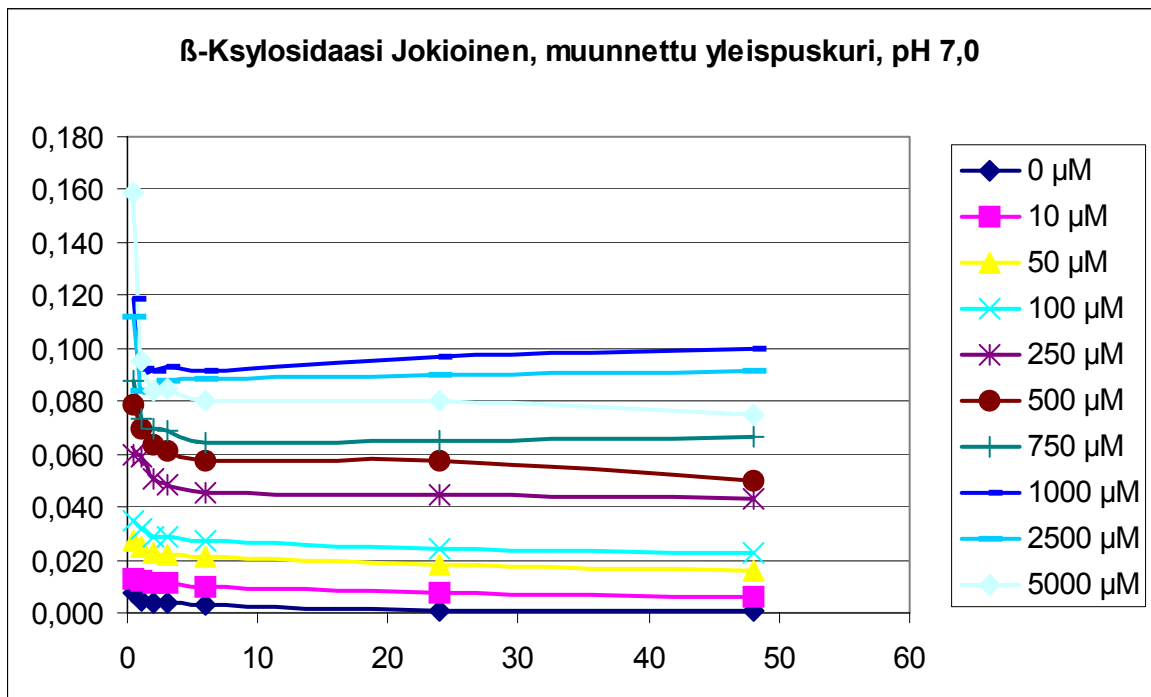
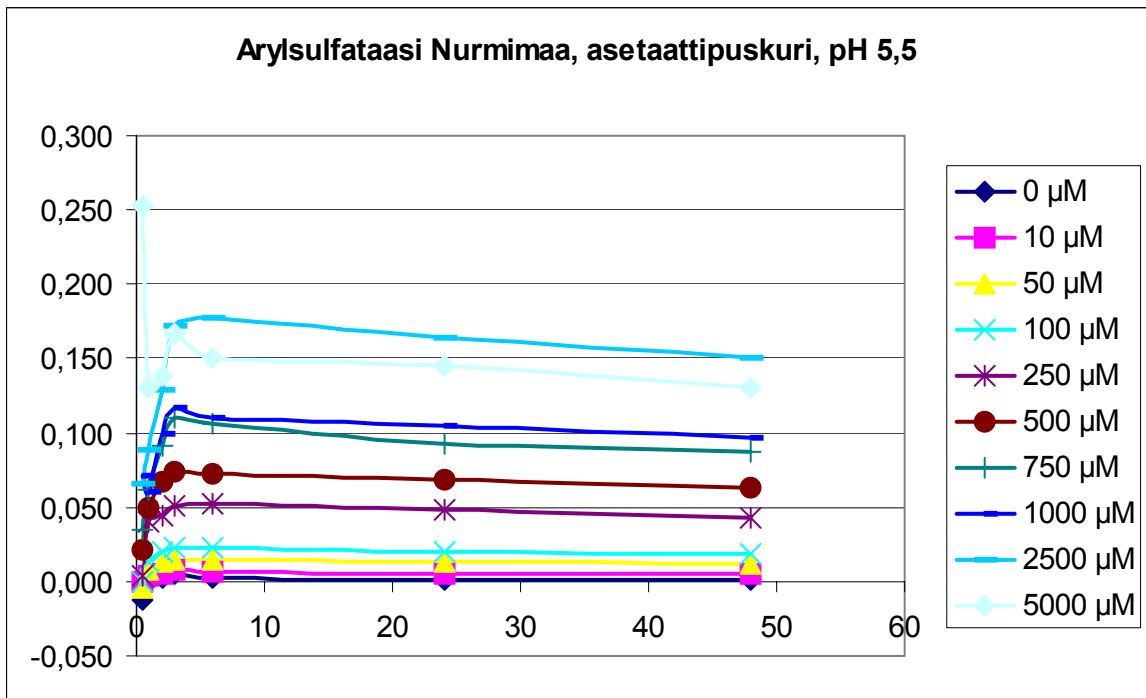
Entsyymitestisarjassa on käytetty substraattitasona 500  $\mu\text{M}$  pitoisuutta kaikissa mitauksissa osaa lipaasimäärityksiä lukuun ottamatta. Substraattitason riittävyys testattiin taulukossa 2 näkyvillä muuttujilla.

Taulukko 2. Substraattitason testauksessa käytetyt maanäytteet, puskurit, substraattikonsentraatiot sekä inkubointiajat.

Näyte	Puskuri	Inkubointiaika	Substraattikonsentraatio
Humusmaa, pakastettu	0,5 M Na-asettaatti, pH 5,5	30 min	0 $\mu\text{M}$
Kivennäismaa, pakastettu	muunnettu yleispuskuri, pH 7,0	1 h	10 $\mu\text{M}$
Nurmimaa, tuore		2 h	50 $\mu\text{M}$
Vesinäyte, tuore		3 h	100 $\mu\text{M}$
		6 h	250 $\mu\text{M}$
		24 h	500 $\mu\text{M}$
		48 h	750 $\mu\text{M}$
			1000 $\mu\text{M}$
			2500 $\mu\text{M}$
			5000 $\mu\text{M}$

Entsyymiaktiivisuudet riippuivat inkubointiajasta, substraattikonsentraatiosta ja näytteestä. Lipaasin ja esteraasin aktiivisuuksia ei saatu kaikilta osin laskettua standardipisteisiin verrattuna liian suurten aktiivisuuksien vuoksi. Useilla entsyymeillä aktiivisuudet vaihtelivat ensimmäisten tuntien inkuboinnin aikana, mutta tasoituivat tietyille (substraattikonsentraatiosta riippuvalle) tasolle kuuden tunnin in-

kuboinnin aikana (Kuva 5). Tällaisia entsyymejä olivat arylsulfataasi,  $\alpha$ -glukosiidaasi,  $\beta$ -kxylosidaasi, fosfodiesteraasi sekä osittain kitinaasi,  $\beta$ -glukuronidaasi,  $\alpha$ -galaktopyranosidaasi ja molemmat aminopeptidaasit.



Kuva 5. Esimerkkeinä substraattitasojen soveltuvuuden testaamisesta arylsulfataasin aktiivisuus nurmi-  
maanäytteessä ja  $\beta$ -kxylosidaasin aktiivisuus Jokioisten peltomaanäytteessä. Alun vaihtelun jälkeen aktiivi-  
suus asettui suurella osalla entsyymeistä inkubointiajasta (x-akselilla, h) riippumattomalle tasolle.

Kolmen tunnin inkuboinnin jälkeen mitatuille entsyymiaktiivisuustuloksille laskettiin  $K_m$  (substraattikonsentraatio, jolla puolet entsyymin aktiivisista kohdistusta on täyttynyt substraatilla) ja  $V_{max}$  (maksimaalinen reaktionopeus) arvot SigmaPlot -ohjelmistolla käyttäen Michaelis-Mentenin yhtälöä tai substraatti-inhibitio -yhtälöä.  $\beta$ -ksylosidaasilla, fosfodiesterasilla, kitinaasilla, esteraasilla  $K_m$ -arvo jäi yleensä alle kuoppalevyillä käytetyn  $500 \mu\text{M}$  pitoisuuden. Arylsulfataasilla ja lipaasilla  $K_m$  oli yleensä alle  $1000 \mu\text{M}$ , alaniini-aminopeptidaasilla yli  $1000 \mu\text{M}$ . Fosfomonoesteraasilla,  $\alpha$ -glukosidaasilla,  $\alpha$ -galaktopyranosidaasilla, leusiini-aminopeptidaasilla ja  $\beta$ -glukuronidaasilla arvot vaihtelivat huomattavasti näytteestä ja puskurista riippuen. Suuret substraattikonsentraatiot aiheuttivat entsyymin inhibitiota  $\beta$ -glukosidaasilla, fosfodiesterasilla, kitinaasilla, lipaasilla, esteraasilla, fosfomonoesteraasilla ja molemmilla aminopeptidaaseilla.

### 3.7 Entsyymiaktiivisuuksien mittaus

Entsyymiaktiivisuusmittauksia varten maanäytteet on huolellisesti laimennettava ja homogenoitava. Maanäytettä punnittiin  $4,00 \text{ g}$  ja siihen lisättiin  $200 \text{ ml}$   $0,5 \text{ M}$  natriumasetatipuskuria (pH  $5,5$ , näytteen laimennustaso  $1:50$ ). Mitattaessa alkalisen fosfataasin aktiivisuutta käytettiin  $0,5 \text{ M}$  TRIS-asetatti-puskuria (pH  $8,0$ ). Suspendoitu näyte homogenoitiin sekoittamalla sitä tarkoitukseen sopivalla sauvasekoittimella (Bamix, ESGE AG, Sveitsi)  $3$  minuutin ajan jäähähteessä. Maanäyte laimennettiin edelleen valittuun puskuriin siten, että lopullinen laimennos oli  $1:100$  tai  $1:1000$ . Jälkimmäisestä laimennoksesta mitattiin vain fosfomonoesteraasin, lipaasin ja esteraasin aktiivisuudet metsämaissa.

Jokaista entsyymianalyysiä varten pipetoitiin kuoppalevyille  $200 \mu\text{l}$  maanäytettä lopullisessa laimennoksessa neljänä rinnakkaisena. Välittömästi näytelaimennoksen jälkeen mitattiin  $0$ -hetken fluoresenssi taustan määrittämistä varten Wallacin 1420 Victor<sup>2</sup> -monileima-analysaattorilla (PerkinElmer Co., USA).

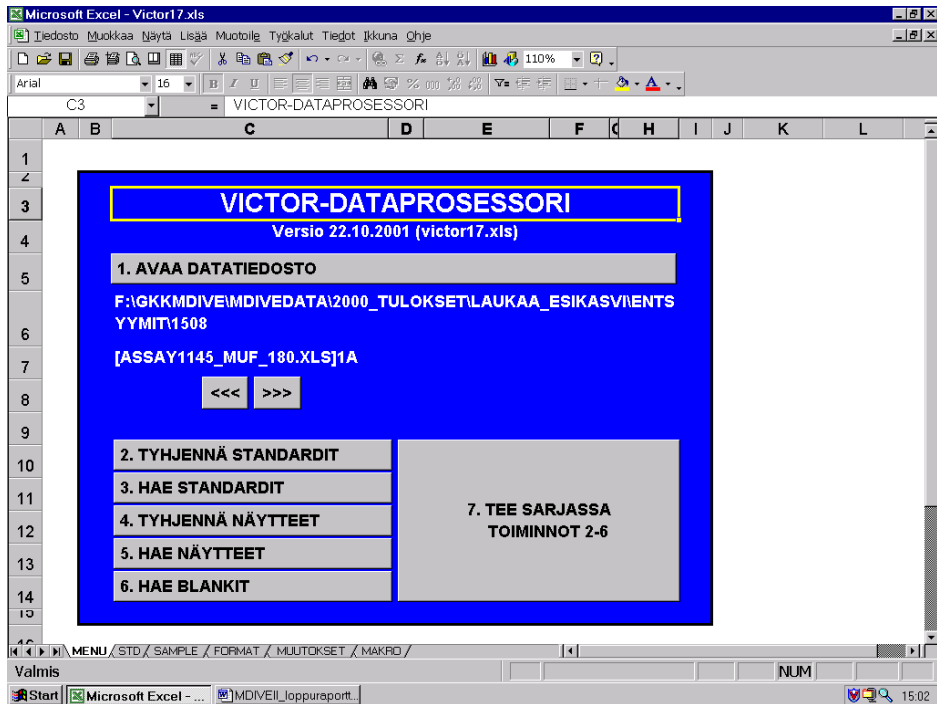
Kutakin standardipistettä varten maaliotetta pipetoitiin kolmeen rinnakkaiseen kuoppaan  $200 \mu\text{l}$  MUF- tai AMC- standardeja sisältäville kuoppalevyille.

Kuoppalevyt peitettiin välittömästi folioteipillä päällystetyillä kansilla ja niitä inkuboitiin  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  lämpötilassa kuoppalevyravistelijassa ( $n. 450 \text{ rpm}$ ). Reaktiota ei pysäytetty pH:ta nostamalla, koska menettely ei ollut luotettava. Siksi mittaus voitiin suorittaa useampaan kertaan. Hankkeessa kuoppalevyt on pääsääntöisesti mitattu  $1 \text{ h}$ ,  $2 \text{ h}$  ja  $3 \text{ h}$  inkuboinnin jälkeen vaikkakin tulosten tarkastelu perustuu  $3 \text{ h}$  mittaustulokseen.

### 3.8 Tulosten laskeminen

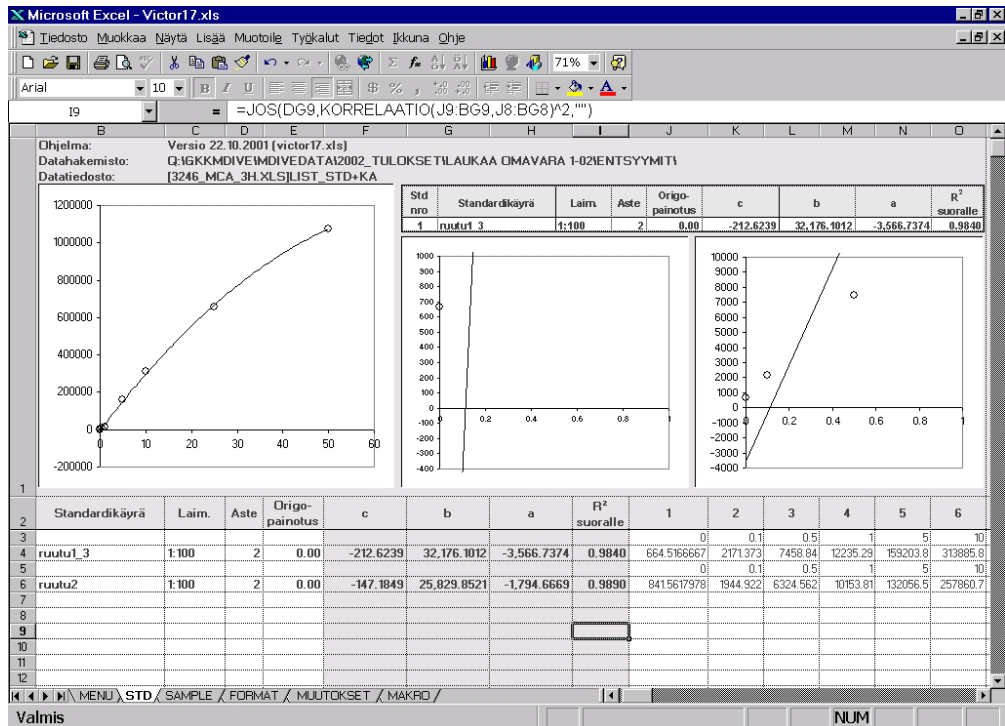
Victor<sup>2</sup>-mittalaite tallettaa kunkin mittauksen tulosaineiston Excel-yhteensopivassa muodossa tiedostoksi. Hankkeessa on kehitetty Excel-pohjainen ZymProfiler-dataprosessori tulosaineiston laskemiseen. Standardi-, tausta ja näytetuloksien tiedot yhdistetään dataprosessorille sopivaan muotoon yhdeksi tiedostoksi. Standarditulosten kohdalle lisätään tieto standardin konsentraatiosta ( $\mu\text{M}$ ), näytteen kuvaustieto ja näytteen kokonaislaimennuskerroin. Näytetulosten kohdalle edellisten lisäksi (standardikonsentraatiota lukuun ottamatta) lisätään näytemäärä ( $\text{g}$ ), puskuritulavuus ( $\text{l}$ ) kuivapaino- ja hehikutushäviöprosentit sekä inkubointiaika.

Dataprosessorissa avataan tiedosto ja suoritetaan toiminnot 2-6 datan hakemiseksi prosessorin käyttöön ja tulosten laskemiseksi (Kuva 6).



Kuva 6. ZymProfiler®-dataprosessorissa data voidaan hakea erissä tai yhdellä kertaa. Samalla prosessori laskee tulokset.

Dataprosessorilla standardikuvaajat lasketaan toisen asteen yhtälöä käyttäen. Kuvaaja on mahdollista painottaa siten, että se saadaan kulkemaan origon kautta. Mahdollisia virheellisiä mittauksia voidaan poistaa ja kuvaajan muotoa tarkastella graafisesti (Kuva 7).



Kuva 7. Dataprosessorissa standardeja voidaan tarkastella graafisesti.

Dataprosessori vertaa taustan ja näytteiden mittaustuloksia standardikuvaajaan ja laskee mittaustuloksia vastaavan lopputuotekonsentraation ( $\mu\text{M MUF}$  tai  $\mu\text{M AMC}$ ). Tausta vähennetään näytetuloksista ja tulos lasketaan maanäytteen tuorepainoa, kuivapainoa ja hehkutushäviötä kohden. Laskujen välivaiheet ovat näkyvissä tarkastelua varten ja dataprosessori ilmoittaa standardimittaukset ylittävistä arvoista sekä negatiivisista tuloksista.

Tulostaulukko voidaan siirtää jatkokäsittelyä varten uuteen Excel-tiedostoon, jossa on mahdollista poistaa tuloksia ja jossa lasketaan keskiarvotulokset ja keskihajonnat entsyymeittäin rinnakkaismittauksille.

### **3.9 Havaintoaineistojen käsittely: ZymProfiler® ohjelmisto**

Kun useasta näytteestä mitataan joukko ominaisuuksia, tulosten käsittelyyn soveltuvat näytteiden profiileita vertailevat matemaattiset menetelmät. Ryhmittelymenetelmät auttavat visualisoimaan näytteiden samankaltaisuutta tai erilaisuutta ja soveltuvat siten tulosaineiston hahmottamiseen. Tässä tutkimuksessa laadittiin ZymProfiler® tietokoneohjelmisto, jonka avulla voidaan ryhmitellä aineisto useita eri etäisyysmittoja ja ryhmittelymenetelmiä käyttämällä. Ohjelmat on suunniteltu käytettäväksi mitä erilaisimpien havainto- ja mittaustulosten (muidenkin kuin entyymiaktiivisuuksien) ryhmittelyssä silloin, kun suuresta joukosta tutkittavia kohteita on mitattu samat ominaisuudet.

Ohjelmisto on kuvattu edellisen vaiheen loppuraportissa (Niemi ym. 2000), jonka jälkeen siihen on laadittu on line –help.

# 4

## **Biomarkkereiden analyysit maanäytteistä**

---

### **4.1 Fosfolipidirasvahapot**

Analyysimenetelmä, joka perustuu Frostegårdin ym. (1993) kuvaamaan on aiemmin tarkemmin esitetty (Niemi ym. 2000). Fosfolipidirasvahappoja mitattiin Laukaan kokeessa, jossa verrattiin eri viljelykasveja ja turpeen vaikutusta sekä toisessa kokeessa, jossa verrattiin luomu- ja tavanomaista viljelyä. Myös dielselöljyn ja geneettisesti muunnetun bakteerin vaikutustutkimuksen lysimetreistä ja Harjavallan ja Koverharin laskeuma-alueen näytteistä mitattiin näitä mikrobiston rakenteesta tietoa antavia yhdisteitä. Tulosten tarkastelu on osin kesken.

### **4.2 Ergosteroli ja $\beta$ -sitosteroli**

Ergosterolia käytetään sienten määrän mittarina ja  $\beta$ -sitosterolia kuvaamaan kasvien vaikutusta. Analyysimenetelmät on kuvattu aiemmin (Niemi ym. 2000). Näitä yhdisteitä mitattiin toistuvasti Harjavallan ja Koverharin laskeuma-alueen näytteistä ja Laukaan kokeissa ja kerran Karilassa toteutetussa mansikan viljelyssä käytettävän maaperäkatteen vaikutusta selvittävässä kokeessa.

## **PCR-DGGE analyysit maanäytteistä**

---

# 5

Niemi ym. (2001) ovat kuvanneet menetelmät DNA:n eristämiseksi maanäyttees-  
tä, 16S ribosomaalista RNA:ta koodaavien geenien jaksojen monistamiseksi ja erot-  
tamiseksi denaturoivassa gradienttigelielektroforeesissa (PCR-DGGE).

Menetelmää käytettiin Harjavallan saastuneen maaperän ja kontrollialueen  
metsämaan bakteeriyhteisöjälkien vertaamiseen. Harvoja, mutta selviä eroja  
havaittiin näiden kohdealueiden välillä. Tarkemmat tulokset esitetään Suvi Sim-  
pasen erikoistyössä.

# 6

## **Fysikaaliset ja kemialliset mittaukset maanäytteistä**

---

Kaikista näytteistä mitattiin kuivapaino (yli yön 105 °C:ssa) kosteustason selvittämiseksi ja hehkutushäviö (800 °C:ssa 1 h) kivan saamiseksi orgaanisen aineksen osuudesta, jota kohti entsyymiaktiivisuudet eräissä kokeissa ilmoitettiin. Maan pH mitattiin sekä vedessä että KCl-liuoksessa. Kaikki mittaukset tehtiin kolmena rinnakkaisena analyysinä. ATP mitattiin Vanhalan ja Ahtiaisen mukaan (1994). Hyytiälän asemalla olevista jatkuvatoimisista mittalaitteista saatiin kosteus- ja lämpötilatietoja.



# Entsyymiaktiivisuusmittausten soveltaminen

# 7

## 7.1 Kasvukauden aikainen vaihtelu metsämaassa

Tutkimus toteutettiin seuraamalla entsyymiaktiivisuuksien kehittymistä Helsingin yliopiston Hyytiälän SMART-asemalla. Kokeesta on lähetetty käsikirjoitus.

Männyn ritsosfäärissä entyymiaktiivisuudet nousivat maan lämpötilan nousua heinäkuun alussa, mutta säilyivät korkeina syksyllä lämpötilan laskiessa. Kuivuus ehkä pienensi entsyymiaktiivisuuden potentiaalin heinäkuun alussa. Lepän ympärillä ei havaittu nousevaa ajallista trendiä, mutta aktiivisuudet olivat alhaisia kuivassa leppämaassa heinäkuun puolivälissä arylsulfataasia, lipaasia ja aminopeptidaaseja lukuunottamatta.

Vaikka entsyymiaktiivisuudet laskettiin orgaanista ainetta kohti, jota oli selvästi enemmän lepän läheisyydessä, aktiivisuudet olivat leppämaassa mäntymaata korkeampia lukuun ottamatta PDE:n, lipaasin ja aminopeptidaasien aktiivisuutta (taulukko 3). Orgaanista ainetta kohti laskettuna metsämaan ja viljelymaan entsyymiaktiivisuudet olivat samaa suuruusluokkaa, mutta metsämaan pintakerroksessa suuren orgaanisen aineen pitoisuuden vuoksi entsyymiaktiivisuus oli selvästi viljelymaata korkeammalla tasolla.

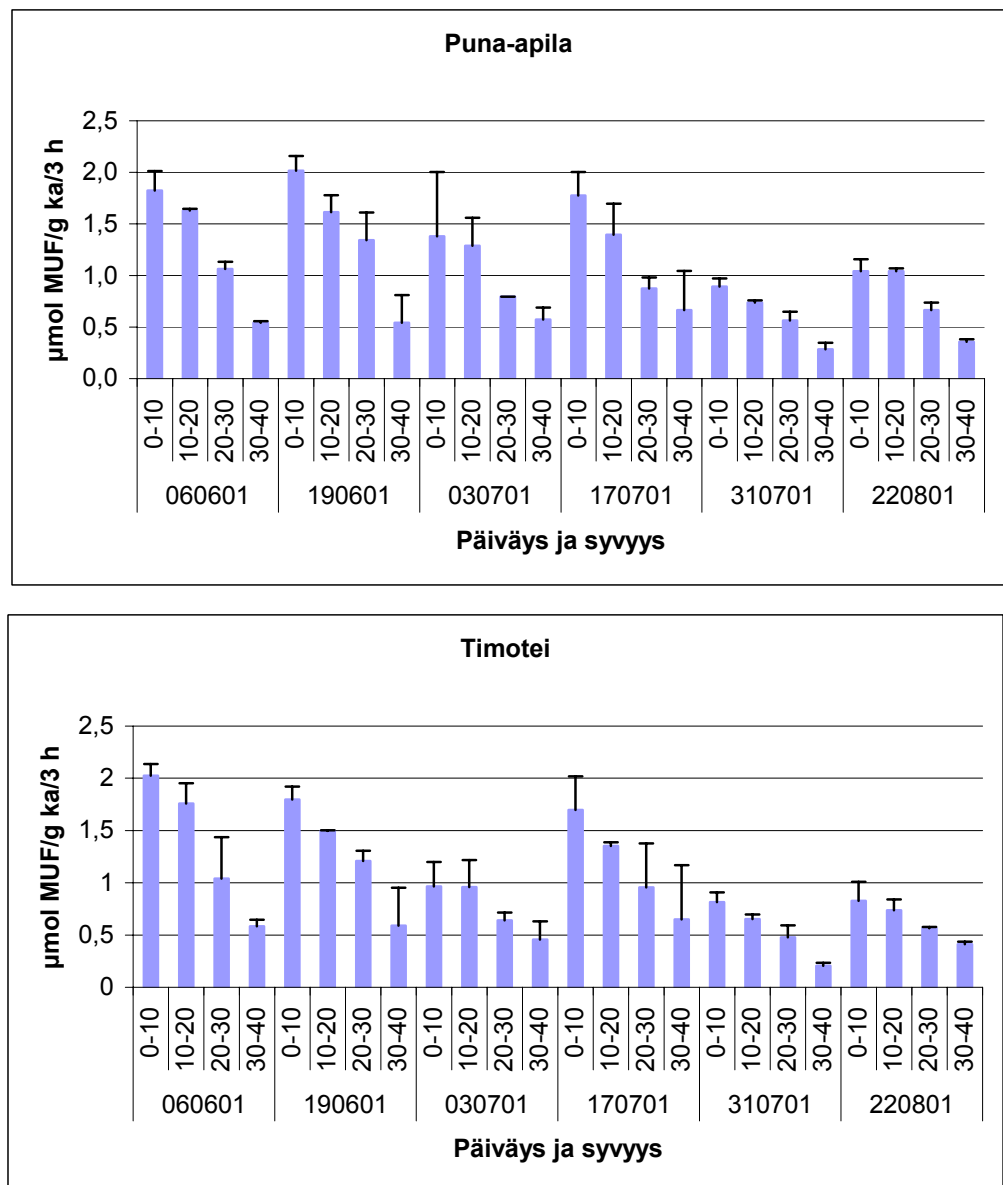
Lepän ympäristössä maa sisälsi selvästi enemmän fosfolipidirasvahappoja kuin maa mäntyjen ympärillä, mutta fosfolipirasvahahappojen määräsuhteet olivat jokseenkin samanlaisia kummassakin ympäristössä. Kuitenkin muutaman rasvahapon suhteellisten määrien erojen vuoksi klusterianalyysi erotteli leppä- ja mäntymaan näytteet fosfolipirasvahahappojen perusteella eri ryhmiin vaikka taaserot kokonaispitoisuudessa standardisaatiolla pyrittiin eliminoimaan.

Taulukko 3. Entsyymiaaktiivisuuksien mediaaniarvot ( $\mu\text{mol MUF(AMC)}/\text{g}$  orgaanista ainetta/3 h) lepän ja mäntyjen ympärillä Hyytiälän koealueella.

Entsyymi	Leppä	Mänty
arylsulfataasi	2,89	1,92
leusiini_AP	6,87	5,15
alaniini_AP	10,3	5,6
PDE	9,54	6,96
PME	182	109
kitinaasi	25,7	12,1
$\alpha$ -glukosidaasi	4,27	1,56
sellobiosidaasi	13,1	2,85
$\beta$ -ksylosidaasi	11,1	4,10
$\beta$ -glukosidaasi	24,2	9,89
lipaasi	275	150
esteraasi	459	177

## 7.2 Kasvukauden aikainen vaihtelu peltomaassa

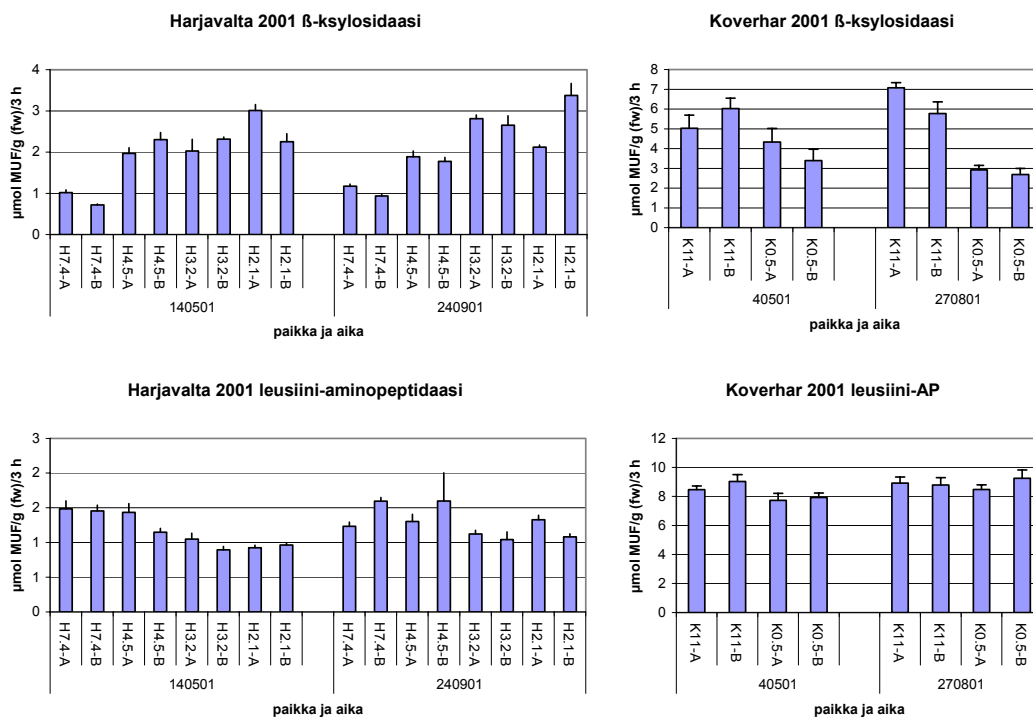
Maa- ja elintarviketalouden tutkimuslaitoksen koekentällä Jokioisissa seurattiin kesän aikana entsyymiaktiivisuuksien kehittymistä timotei- ja puna-apilanurmissa. Näytteet jaettiin kentällä 10 cm jakeisiin kooten eri syvyyttä edustavat kokoomanäytteet, joista mitattiin entsyymiaktiivisuudet. Erikseen otetuista näytteistä mitattiin Helsingin yliopistossa juurten biomassa. Kenttään asetetuista putkista kuvattiin videokameralla juurten kasvua jokaisen näytteenoton yhteydessä. Tuloksista on lahetetty tieteellinen artikkeli, jossa tarkastellaan koko havaintoaineistoa. Kuva 8 edustaa esimerkkiä entsyymiaktiivisuuksien riippuvuudesta syvyydestä ja ajankohdasta. Kaikkien entsyymien aktiivisuudet olivat suurimmillaan pintamaassa.



Kuva 8.  $\beta$ -glukosidaasiaktiivisuus kesän aikana eri syvyyksissä. Rinnakkaisten ruutujen pakastettujen kokoomanäytteiden keskiarvot ja keskihajonta.

### 7.3 Raskasmetallikuormituksen vaikutus metsämaan entsyymiaktiivisuuksiin

Harjavallan kupari-nikkelisulatto aiheuttaa ympäröivään kangasmetsään monen eri raskasmetallin laskeuman. Koverharin rauta-terässulatto aiheuttaa pääosin eri metalleista koostuvan alkalisen laskeuman. Molempien alueiden entsyymiaktiivisuuksia tutkittiin useana vuonna keväällä ja syksyllä otetuista maanäytteistä. Havaintoalueiden välillä havaittiin selviä eroja ja myös ajankohta vaikutti siihen, ero-siko puhtaan paikan entsyymiaktiivisuus saastuneesta alueesta. Kuvassa 9 on esitetty  $\beta$ -ksylosidaasin ja leusiini-aminopeptidaasin aktiivisuudet kevään ja syksyn 2001 näytteissä. Harjavallassa  $\beta$ -ksylosidaasiaktiivisuus kasvoi kuormituksen funktiona, mutta Koverharissa se laski. Leusiiniaminopeptidaasiaktiivisuus laski Harjavallan saastuneella alueella, mutta Koverharissa ei havaittu eroa saastuneen ja puhtaan alueen välillä.



Kuva 9.  $\beta$ -Ksylosidaasi- ja leusiiniaminopeptidaasiaktiivisuus Harjavallan ja Koverharin kangasmetsän maaperässä (H= Harjavalta, K= Koverhar, A ja B = rinnakkaiset, numerot koodin perässä ilmoittavat havaintopaikan etäisyyden päästölähteestä, ajankohta = ppkkvv).

### 7.4 Viljelymenetelmien vaikutus entsyymiaktiivisuuksiin

Entsyymiaktiivisuuksia mitattiin kolmena vuonna 10. - 12. kesäkuuta ja 3. - 21. syyskuuta MTT:n Laukaan aseman kenttäkokeessa. Näytteenottoajankohdan, sekä vuoden että vuodenajan välillä oli eroja monen entsyymin aktiivisuudessa.

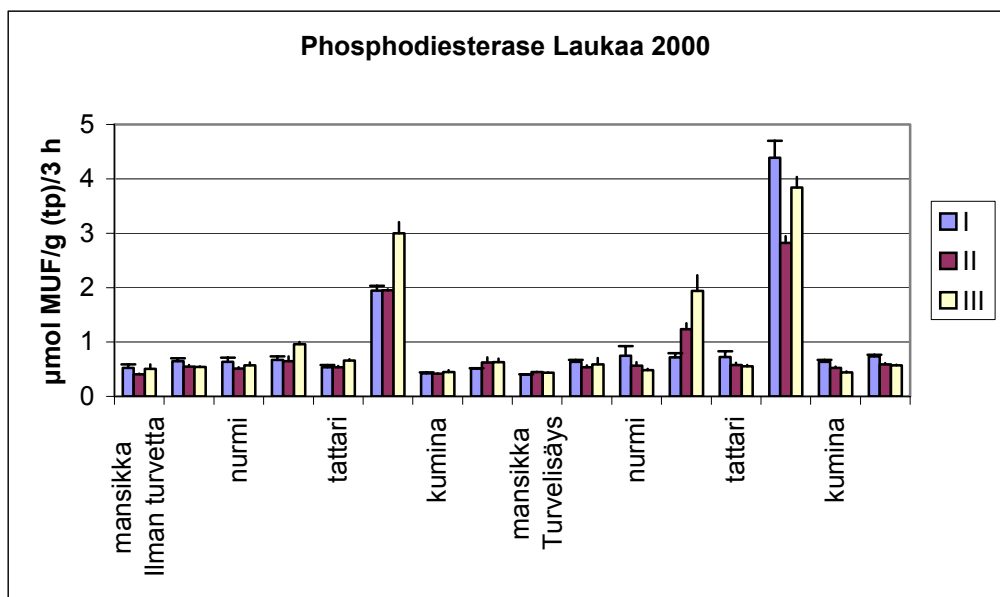
Viljelymenetelmän (tavanomainen = A ja kompostoitua kasvijätettä saaneen maan =D) vaikutusta testattiin t-parivertailutestillä Ig-transformoiduilla entsyymiaktiivisuuden arvoilla. Ainoat merkitsevät erot saatiin arylsulfataasin, happaman fosfomonoesteraasin, kitinaasin,  $\beta$ -glukosidaasin, esteraasin ja alaniini-aminopeptidaasin aktiivisuuksille, jotka olivat kaikki korkeampia kompostoitua kasvijätettä saaneessa maassa. Kokeesta on suunnitteilla tieteellinen artikkeli.

Yhteenvedona voi todeta, että sekä kompostoidun kasvimateriaalin että turpeen lisääminen maahan lisäsi useiden entsyymien aktiivisuutta. Sen sijaan voimakas kalkitus heikensi monien entsyymien aktiivisuutta 20-vuotta käsittelyn jälkeenkin.

## 7.5 Viljelykasvin ja turpeen vaikutus entsyymiaktiivisuuksiin

Kahdeksan eri viljelykasvin ja turvelisäyksen vaikutuksia entsyymiaktiivisuuksiin tutkittiin yhteistyössä MTT:n väen kanssa koekentällä joka sijaitsi MTT:n Laukaan valiotaimiasemalla. Entsyymiaktiivisuustuloksia, fosfolipidirasvahappoja, mikrobibiomassan mittareita sekä fysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia käsittelevä käsikirjoitus on painettavana tieteelliseen lehteen. Maahan lisätyssä turpeessa entsyymiaktiivisuudet olivat maanäytteitä korkeammalla tasolla. Turvekäsittely nosti kaikkien entsyymien aktiivisuuksia, osittain myös tilastollisesti merkittävällä tasolla. Vaikutusmekanismina ei kuitenkaan ollut suoraan entsyymien lisäys maahan vaan mikrobientsyymejä tuotettiin enemmän tai entsyymeillä oli paremmat toimintaedellytykset turvelisätyissä ruuduissa.

Viljelykasvit vaikuttivat eri entsyymien aktiivisuuksiin, mm. sipulilla fosfodiesteriaktiivisuudet olivat kohonneita (kuva 10). Samoin vuosien 2000 ja 2001 entsyymiaktiivisuuksissa havaittiin eroja. Turpeen lisäys nosti rasvahappojen kokonaismäärää maanäytteissä.

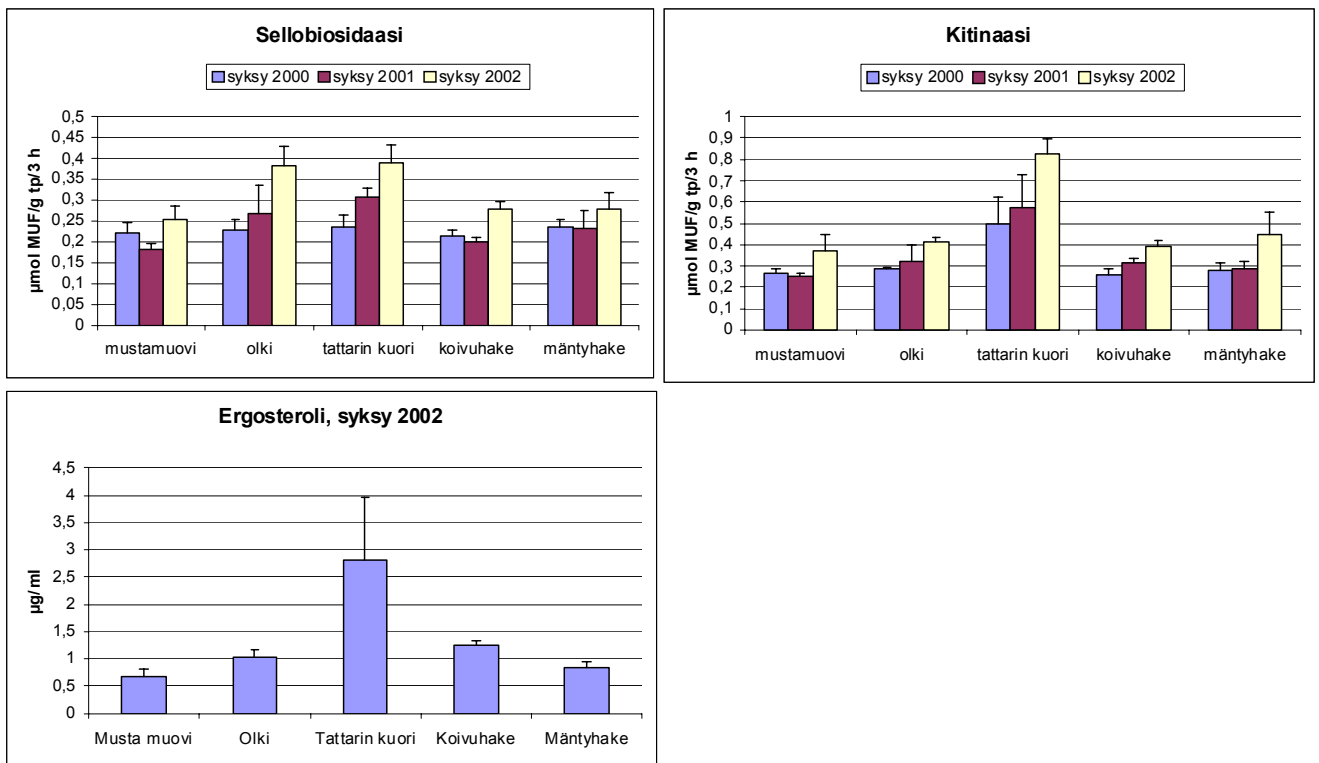


Kuva 10. Esimerkkinä esikasvien ja turvelisäyksen vaikutuksista maan fosfodiesteriaktiivisuuteen. (I, II ja III ovat kerranteet).

## 7.6 Maaperän katteiden vertailu mansikanviljelyssä

MTT:n Karilan asemalla toteutetussa hankkeessa selvitettiin mansikan viljelyssä käytettävien maaperän katteiden vaikutusta entsyymiaktiivisuuksiin kolmena eri syksynä (2000, 2001 ja 2002) otetuista näytteistä. Ergosteroli mitattiin kokeen lopussa syksyllä 2002.

Eri ajankohtina aktiivisuuksissa havaittiin eroja ja eri entsyymeihin katteet vaikuttivat eri tavoin. Kuvassa 11 on esimerkkinä esitetty sellobiosidaasin ja kitinaasin aktiivisuudet eri katteiden vaikutuksesta kolmena vuonna. Ergosterolipitoisuudet on esitetty samassa kuvassa syksyn 2002 osalta. Kitinaasiaktiivisuus nousi tattarin kuorirouheella katetussa maassa koko kokeen ajan. Rouhe homehtui, mikä selittäisi kitinaasiaktiivisuuden kasvun homeiden sisältämän kitiinin saatavuutena. Ergosterolipitoisuuden nousu näissä ruuduissa vahvistaa sienten biomassan kasvaneen. Kokeen kuluessa sekä tattarin kuorirouhe että olki lisäsivät sellobiosidaasiaktiivisuutta, mikä myös selittyy substraattisäyksellä oljen ja tattarin kuorirouheen sisältämänä selluloosana. Maan pH<sub>vesi</sub> oli syksyllä 2002 6,4 mustalla muovilla ja oljella katetuissa maissa, 6,2 koivu- ja mäntyhakeella katetussa maassa, mutta vain 5,4 tattarin kuorirouheella katetussa maassa.



Kuva 11. Sellobiosidaasi- ja kitinaasiaktiivisuudet sekä ergosterolin pitoisuus maassa eri materiaaleilla katetuissa mansikkaviljelmissä.

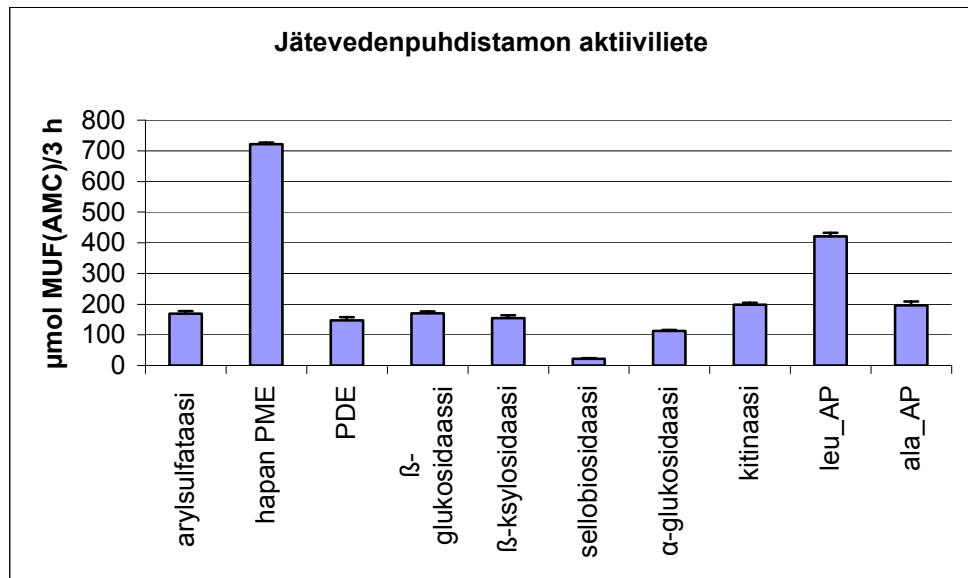
## 7.7 Geneettisesti muunnetun mikrobin ja dieselöljyn vaikutus

Helsingin yliopiston soveltavan kemian ja mikrobiologian laitoksen tutkijat pysyttivät Viikin kenttäkoealueelle lysimetrikokeen, jossa selvitettiin dieselöljyn ja merkkigeenejä lisäämällä muunnetun *Rhizobium*-bakteerin vaikutusta maassa ja vuohenherneen kasvussa. Lisäksi tutkittiin muunnetun mikrobin osoittamista. Tutkimuksesta on julkaistu artikkeli (Pitkäjärvi ym. 2003).

Kesän 2001 aikana otetuista näytteistä mitattiin entsyymiaktiivisuuksia. Eroja todettiin ajankohtien välillä siten, että aktiivisuudet olivat yleensä korkeampia syyskesällä kuin alkukesästä, etenkin vuohenherneitä kasvavassa maassa. Kuitenkin myös niissä ruuduissa, joihin ei oltu istutettu kasveja, aktiivisuudet olivat alhaisia myös syksyllä. Vähäinen dieselöljymäärä ei näyttänyt entsyymiaktiivisuuksiin vaikuttavan eikä myöskään muunnetulla ritsobilla ollut havaittavaa vaikutusta maan entsyymiaktiivisuuksiin.

## 7.8 Entsyymiaktiivisuudet aktiivilietteestä ja lietekompostissa

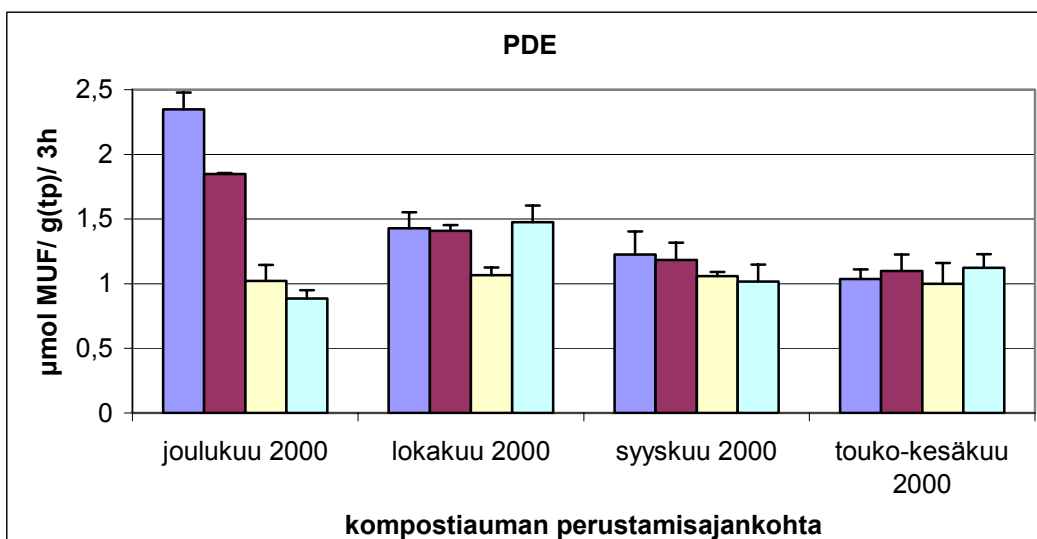
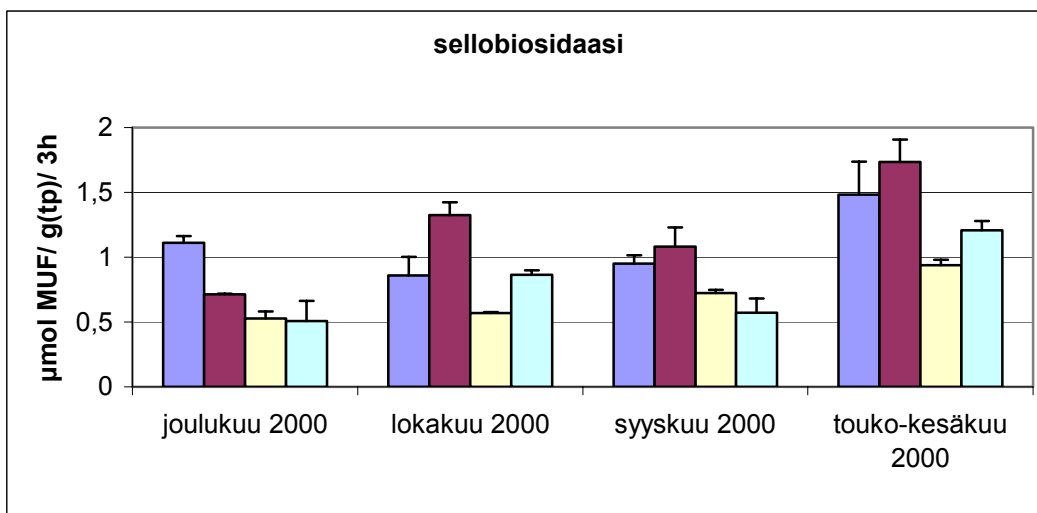
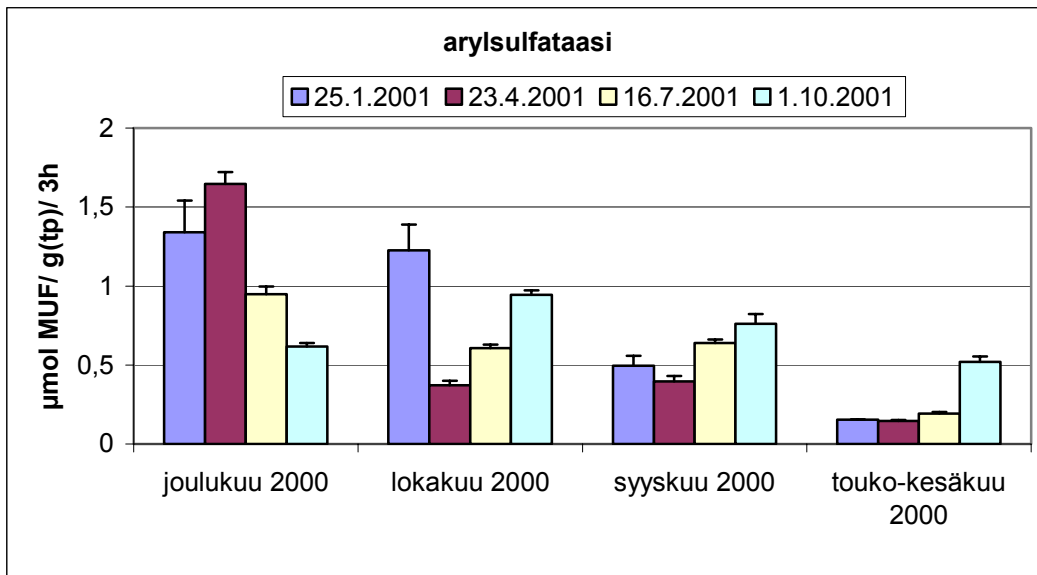
Aktiivilietteen entsyymiaktiivisuuksia mitattiin Viikinmäen jätevedenpuhdistamon aktiivilietteen tuoreista näytteistä. Suurin aktiivisuus oli happamalla PMElla ja alhaisin sellobiosidaasilla. Neljän havaintokerran ja sekä puhdistamolla että SYKEN laboratoriossa tehtyjen testien tulokset tarkastellaan myöhemmin. Kuvassa 12 esitetään tammikuussa mitatut tulokset.



Kuva 12. Jäteveden puhdistamon aktiivilietteen suhteelliset entsyymiaktiivisuudet 4.1.2001 (jana kuvaa rinnakkaismittausten keskihajontaa).

Helsingin Veden Metsäpirtin kompostikentällä seurattiin puhdistamolietettä sisältävien kompostiaumojen entsyymiaktiivisuuksia. Tarkasteltavana oli eri ikäisiä komposteja, joista tuorein oli perustettu kuukautta ennen näytteenoton käynnistymistä ja vanhin oli tällöin kahdeksan kuukauden ikäinen. Komposteja seurattiin noin yhdeksän kuukauden ajan.

Tuloksiin vaikutti sekä kompostin ikä että näytteenoton vuodenaika. Tuoreimassa kompostissa aktiivisuudet yleensä laskivat, mutta vanhemmissa saattoi myös tapahtua aktiivisuuksien nousua. Kuvassa 13 on esitetty esimerkkinä kolmen entsyymin aktiivisuuksien muutokset. Arylsulfataasiaktiivisuudet laskivat kompostoitumisen edetessä, mutta nousivat syksyllä. PDE-aktiivisuudet laskivat noin puoleen alkuperäisestä tasosta ja säilyivät sen jälkeen vakiotasolla. Sellobiosidaasiaktiivisuudet kasvoivat kompostoitumisen edetessä, mutta olivat suhteellisen korkeita kylmänä aikana.



Kuva 13. Arylsulfataasin, sellobiosidaasin ja fosfodiesteriaasin aktiivisuuden muutokset eri ikäisissä komposteissa.

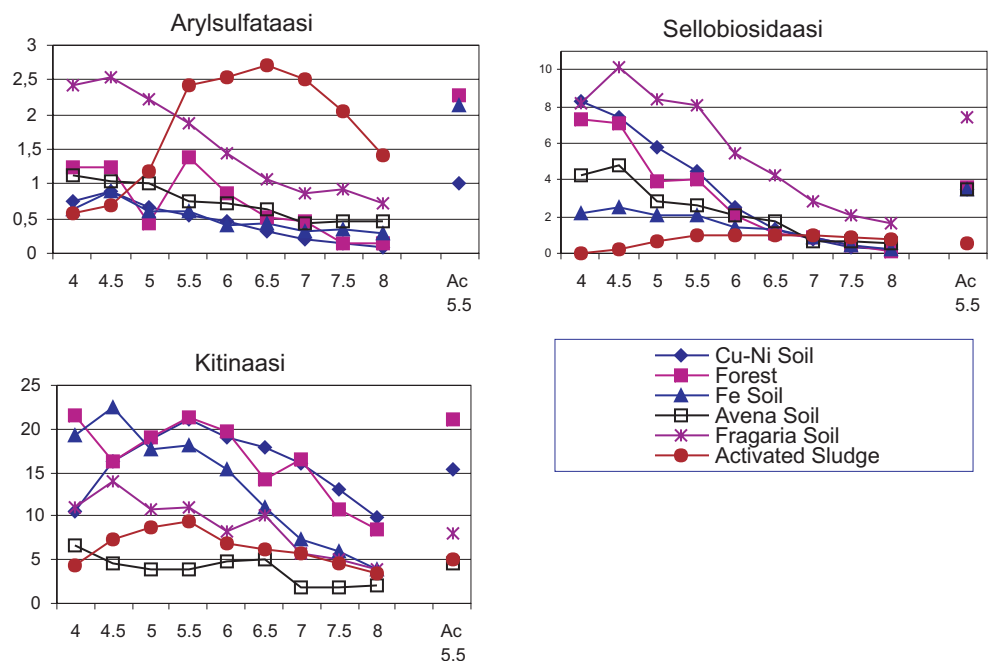
## 7.9 Metsäteollisuuden puhdistamolietekompostien lisäyksen vaikutus maassa

Metsäteollisuuslietteiden kompostointi- ja kompostin hyödyntäminen kasvituo-  
tannossa (KOMPO-projekti) –hanke oli MTT:n, Pirkanmaan Ympäristökeskuksen  
ja Biopap Oyn yhteistyö, jota Tekes rahoitti. Entsyymimäärytyksiä tehtiin MDIVE-  
hankkeessa kerran koekentältä, jonne oli lisätty eri määrät kompostoitua teolli-  
suuden puhdistamolietettä.

Aktiivisuudet olivat alhaisia suojaruudussa, kemiallisesti lannoitetussa ruu-  
dussa, mutta korkeampia kompostoitua puhdistamolietettä saaneissa ruuduissa.

## 7.10 Entsyymiaktiivisuuden riippuvuus pH-arvosta eri näytteissä

Entsyymiaktiivisuuksien riippuvuutta pH-arvosta mitattiin eri näytteillä käyttäen  
MUB-puskuria (Vepsäläinen ja Niemi 2002). Eri entsyymeillä oli erilainen pH-op-  
timi, joka riippui suuresti näytteestä (Kuva 14). Se, että aktiivilietteellä pH-optimi  
oli usein maanäytteitä korkeampi heijastellee bakteerien suurta merkitystä verrat-  
tuna etenkin metsämaiden sienivaltaiseen flooraan.



Kuva 14. Entsyymiaktiivisuuksien ( $\mu\text{mol MUF/g org. C/3 h}$ )riippuvuus pH-arvosta eri näyt-  
teissä. Cu-Ni Soil = Harjavallan sulaton kuormittama maa, Forest = puhdas kangasmaa,  
Fe Soil = Koverharin sulaton kuormittama maa, Avena Soil = vehnäpelto, Fragaria Soil =  
mansikkamaa, Activated sludge = puhdistamon aktiiviliete.

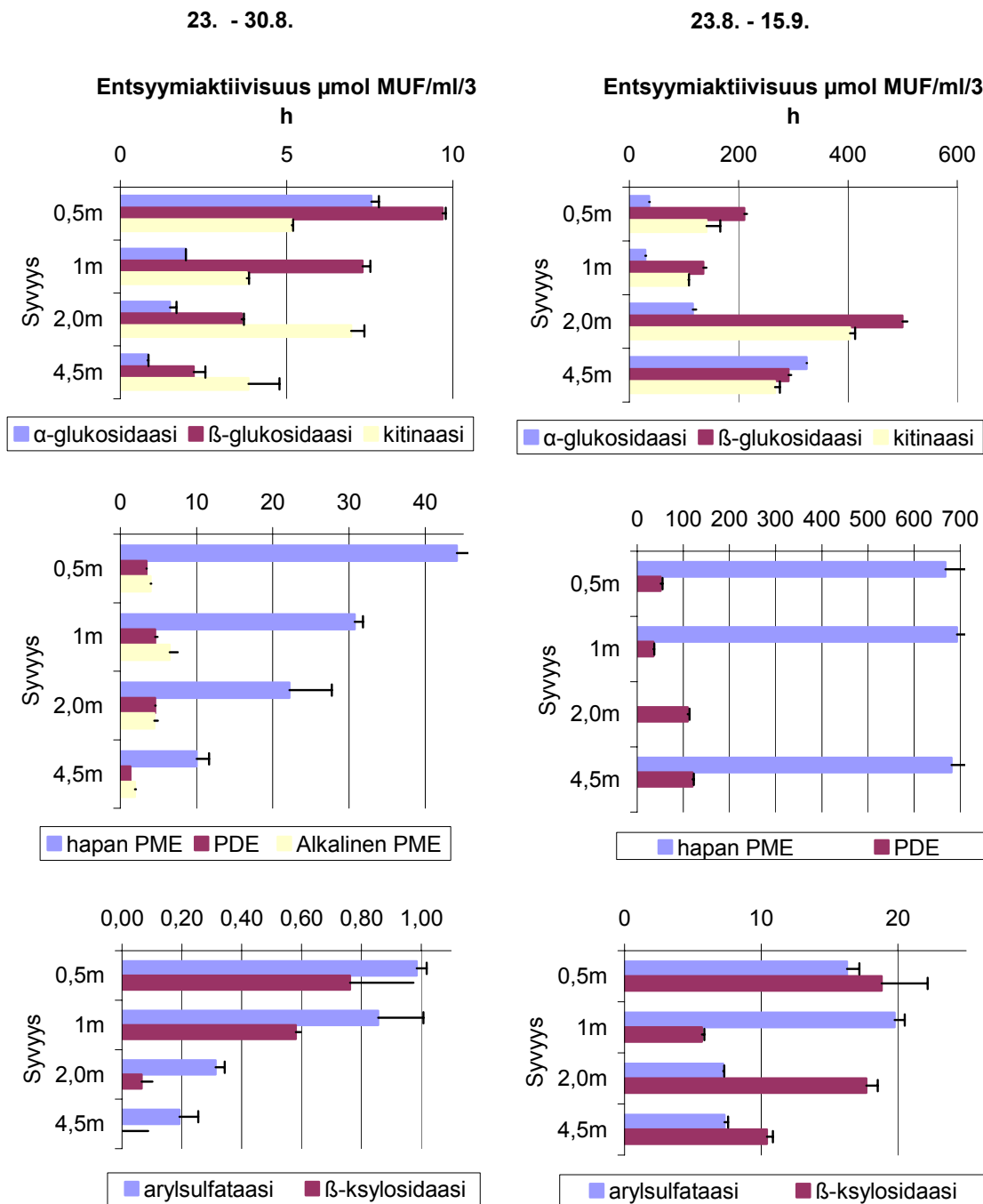
## 7.11 Soveltuvuus vesinäytteille

Tässä tutkimuksessa on painotettu maaperää koskevia tutkimuksia, mutta myös  
vesinäytteitä on alustavasti tarkasteltu. Niemi ym. (2000) totesivat, että menetelmä  
oli riittävän herkkä jokiveden hapan PME-, PDE-,  $\alpha$ -glukosidaasi-,  $\beta$ -glukosidaasi-,



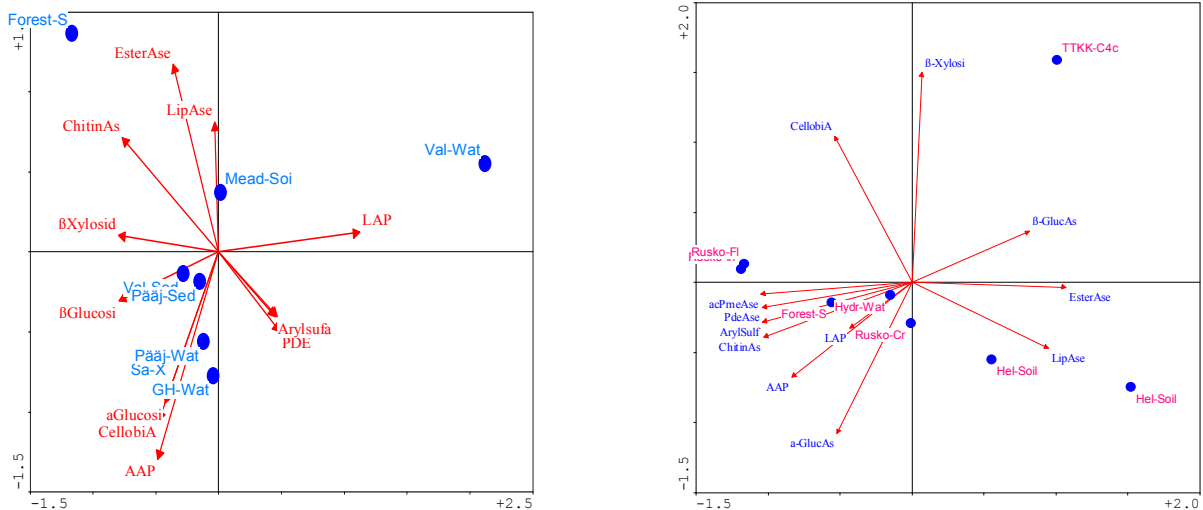
kitinaasi-, arylsulfataasi- ja osan vuotta  $\beta$ -ksylosidaasiaktiivisuuden mittaamiseen käytetyllä 3 h inkuboinnilla. Sen sijaan aminopeptidaasit olisivat vaatineet pidemmän inkubointiajan.

Meriveden biofilmien entsyymiaktiivuuksia mitattiin viikon ja kolmen viikon kuluttua keräimien laskemisesta meriveteen eri syvyyksille. Sekä biofilmin kehittyminen että syksyn tuulten pintavettä sekoittava vaikutus näkyy eroina viikon ja kolmen viikon vaikutusajan jälkeen (kuva 15). Entsyymiaktiivisuudet kasvoivat jakson aikana, mutta entsyymiaktiivuuksien vertikaalisessa jakautumisessa ilmeni selviä muutoksia.



Kuva 15. Pienvenesataman allasveden entsyymiaktiivisuudet biofilmikeräimissä viikon ja kolmen viikon säilytyksen jälkeen eri syvyyksissä.

Entsyymiaktiivisuuksia mitattiin Lammin biologisella asemalla ja Tampereen yliopistolla pidetyillä kursseilla sekä vedestä että maanäytteistä käyttäen 20 °C lämpötilaa ja 5 d inkubointia ZymProfiler® –testisarjoille. Monimuuttuja-analyysi CANOCO-ohjelmalla osoitti, että eri habitaateissa eri entsyymit olivat luonteenomaisia (kuva 16). Esimerkiksi leusiini-AP aktiivisuus oli suhteellisen suurta Valkea Kotisen vedessä, kun taas tämän järven ja Pääjärven sedimenteissä  $\beta$ -glukosidaasiaktiivisuus oli voimakasta. Pääjärven vedessä ja jätevedenpuhdistamolla  $\alpha$ -glukosidaasi, sellobiosidaasi ja alaniini-AP-aktiivisuus oli leimallista. Metsämaata luonnehti kitinaasin,  $\beta$ -ksylosidaasin, esteraasin ja lipaasin merkittävyys. Niityn maaperän entsyymiaktiivisuudet sijoittuivat metsämaan ja Valkea Kotisen veden välille.



Kuva 16. Habitaattien erot entsyymien suhteellisissa aktiivisuuksissa CANOCO-ohjelmalla laskettuina (Canoco for Windows, versio 4, Microcomputer Power, Ithaca, NY, USA). Vasemman puoleisessa kuvassa entsyymien nimet punaisella ja habitaattien sinisellä ja oikean puoleisessa kuvassa päin vastoin. (Forest-S = metsämaa, Mead-Soi = niityn maaperä; Val-Wat = Valkea Kotisen vesi, Val-Sed = Valkea Kotisen sedimentti, Pääj-Sed = Pääjärven sedimentti, Sa-X = puhdistettu jätevesi, GH-Wat = kasvihuoneen altaan vesi; TTKK-C4c = dieselöljyllä saastutettu apilamaa, Rusko-FI = saostusallas juomaveden puhdistamolla, Rusko-IN = Roineen vesi vesilaitoksella, Hydr-Wat = painona käytetty vesi, Rusko-Cr = Ruskon puro, Hel-Soil = maanäytteet bioremediaatiokokeesta).

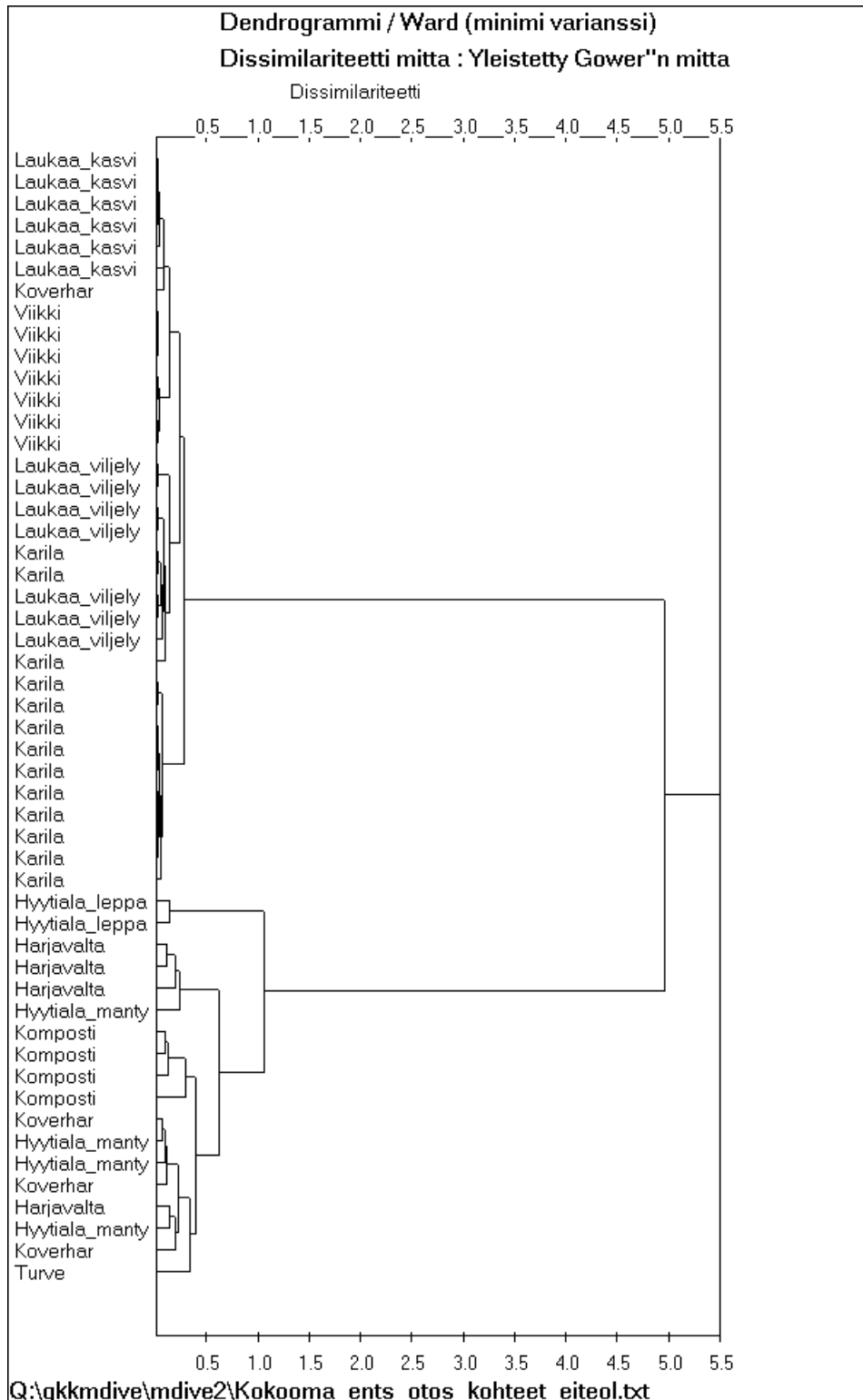
## 7.12 Entsyymiaktiivisuuden vaihtelu eri habitaateissa

Mikrobit ovat osa maan orgaanista ainesta ja niiden kasvu sekä toiminta ovat riippuvaisia siitä. Lisäksi monien entsyymien aktiivisuus on sidottu orgaanisiin substraatteihin. Siksi entsyymiaktiivisuudet ovat vahvasti riippuvaisia näytteen orgaanisen aineen määrästä. Jotta saataisiin käsitys entsyymiaktiivisuuden tason vaihtelusta erilaisissa maissa, on tässä verrattu aktiivisuutta näytteen tuorepainoa kohti vaikka tasoerot vähenevät laskettaessa tulokset orgaanista ainetta kohti. Metsämaasta näytteet on otettu humuskerroksesta (n. 5 cm) ja viljelymaista 20 cm pintakerroksesta. Ryhmittelyanalyysi selkeästi erottelee viljelymaan näytteet (alhaisten aktiivisuudet) metsämaan (korkeat aktiivisuudet) näytteistä (kuva 17). Kuitenkin viljelymaan näytteet ryhmittyvät pääosin kohdealueiden mukaisesti, vaikka kohdealueiden sisällä on eroja eri havaintopaikkojen välillä. Yksi Koverharin rautasulaton läheltä otetuista näytteistä poikkesi muista metsämaan näytteistä alhaisten aktiivisuuksien vuoksi. Kunnallisen puhdistamon lietekompostin näytteet muis-

tuttivat enemmän metsämaan kuin viljelymaan näytteitä osoittaen suuria entsyymiaktiivisuuksia. Taulukossa 4. on esitetty kunkin entsyymiaktiivisuuden vaihteluväli ja mediaani arvot 269 näytteestä. Havaintoalue ja -paikkakohtaisia entsyymiaktiivisuuden sormenjälkien eroja (suhteelliset erot entsyymien välillä) todettiin selkeästi, mutta esteraasi-, lipaasi- ja PME-aktiivisuudet olivat aina muita entsyymiaktiivisuuksia selvästi korkeampia ja  $\alpha$ -glukosidaasi- ja arylsulfataasiaktiivisuudet muita alhaisempia.

Taulukko 4. Entsyymiaktiivisuuksien vaihteluvälit ja mediaanit 269 eri maanäytteestä mitatuista entsyymiaktiivisuuksista tuorepainoa kohti  $\mu\text{mol MUF (AMC)}/\text{g (tp)}/3 \text{ h}$ .

Parametri	minimi	maksimi	mediaani
arylsulfataasi	0,13	1,65	0,31
$\alpha$ -glukosidaasi	0,08	1,30	0,16
sellobiosidaasi	0,14	7,66	0,27
$\beta$ -ksylosidaasi	0,19	4,33	0,35
$\beta$ -glukosidaasi	0,40	14,8	1,14
PDE	0,26	6,10	0,53
kitinaasi	0,23	21,4	0,42
lipaasi	2,12	78,5	7,51
esteraasi	3,73	141	7,12
hapan PME	1,29	81,4	3,63
leusiini-AP	0,20	6,41	0,47
alaniini-AP	0,46	3,83	0,8



Kuva 17. Entsyymiaktiivisuuksien perusteella Gowerin mitalla ja Wardin menetelmällä lasketut ryhmät otoksessa erilaisia näytteitä. Laukaa\_kasvi = Laukaan kenttäkokeen eri viljelykasvit, Koverhar = rautasulaton kuormittama metsämaa, Viikki = Viikin bioremediaatiokokeen lysi-metrinäytteet, Laukaa\_viljely = Laukaan kenttäkokeen eri viljelyjärjestelmät, Karila = mansi-kan viljelyn kate-aineiden vartailu, Hyytiala\_leppa = maa Hyytiälän asemalla lepän alla; Harjavalta = kupari-nikkelisulaton saastuttama metsämaa, Hyytiala\_manty = maa Hyytiälän asemalla mäntyjen alla, komposti = puhdistamolietekomposti, turve = kasvuturve.

# Luonnontieteellisen hyödyntämisen ja kaupallistamisen näköalat

# 8

FIBRE-tutkimusohjelman kuluessa MDIVE-hankkeessa sovellettiin ZymProfiler® testisarjaa hyvin monenlaisissa koejärjestelyissä laajana yhteistyönä. Pyrkimyksenä oli saada käsitys sen sovellettavuudesta ympäristötutkimukseen. Tulokset osoittivat, että testisarja tuo uutta tietoa keskeisten alkuaineiden kiertojen prosesseja säätelevistä tekijöistä. Vuodenajalla oli vaikutusta entsyymiaktiivisuuksiin ja maaperän ominaisuudet vaikuttivat niihin. Monet erilaiset kasvien tuotannossa käytetyt menetelmät (viljelykasvi, luomu- tai tavanomainen viljely, turpeen lisäys) vaikuttivat entsyymiaktiivisuuksiin potentiaalina mitattuna. Metsämaassa puulaji ja raskasmetallikuormitus heijastuivat entsyymiaktiivisuuksiin. Asutuksen puhdistamolietteen kompostoinnin kuluessa entsyymiaktiivisuudet muuttuivat ja maan entsyymiaktiivisuudet kasvoivat lisättäessä maahan metsäteollisuuden kompostoitua puhdistamolietettä. Menetelmän herkkyys osoittautui riittäväksi myös vesiympäristön entsyymiaktiivisuuksien mittaamiseen.

Maaperän suojeleminen on merkittävimpiä ympäristönsuojelun haasteita ja sen onnistuminen on ihmisen tulevaisuuden kannalta ratkaisevaa, koska ravinnon tuotto ja elinkeinoelämä ovat riippuvaisia maaperän toimivuudesta. Biologisia indikaattoreita maaperän tilan arviointiin tarvitaan kipeästi. ZymProfiler® testisarjaa voidaan käyttää arvioitaessa ympäristön, etenkin maaympäristön, biologista tilaa ja ihmisen toiminnan vaikutusta siihen. Koejärjestelyssä on kuitenkin otettava huomioon se, että tarvitaan koekohtaiset verrokot, koska entsyymiaktiivisuudet ovat riippuvaisia monista luontaisesti vaihtelevista tekijöistä.

ZymProfiler® testisarjalla hankittua havaintoaineistoa esiteltiin kansainvälisissä kokouksissa (Third International Symposium of the Working Group MO "Interactions of Soil Minerals with Organic Components and Microorganisms" of the International Union of Soil Sciences. Soil Mineral-Organic Matter-Microorganism Interactions and Ecosystem Health, 22-26.5.2000, Napoli-Capri, Italia; ISME 9, Ninth International Symposium on Microbial Ecology, Amsterdam, 26-31.8.2001 ja 17th World Congress of Soil Science 14.-21.8.2002, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thaimaa, International Symposium on Soil Microbial Structure and Function, 18- 20.9.2003 (Marburg, Saksa), joista jokaisessa menetelmä herätti kiinnostusta ja kyselyitä sen kaupallisesta saatavuudesta. Tiedusteluja on tullut myös sähköpostina. Pyyntöjä osallistua yhteistyöhankkeisiin mitaten entsyymiaktiivisuuksia on tullut runsaasti. Tieteellinen artikkeli, jossa menetelmä kuvattiin pääpiirteissään julkaistiin arvostetussa sarjassa (Vepsäläinen, M., S. Kukkonen, M. Vestberg, H. Sirviö and R. M. Niemi 2001) ja sen soveltamiseen perustuvia tieteellisiä artikkeleita on julkaistu.

EU-maat kattava tuotemerkki on hyväksytty vuonna 2003. Se kattaa testisarjan, sillä tuotetut mittaukset ja ATK-ohjelmat tulosten laskemiseksi ja analysoimiseksi. Joitakin keskusteluja kaupallisesta hyödyntämisestä on käyty.

# 9

## Projektin tuottamat opinnäytteet ja julkaisut

Luettelossa on hankkeen molempien vaiheiden opinnäytteet ja julkaisut.

### Opinnäytteet

- Mahmoud, S. 1999. Suhteellinen saanto fosfolipidien rasvahappojen analysoimisessa eri maanäytteissä. Erikoistyö. Helsingin yliopisto. Kemianlaitos. 29 s. ja 18 liitettä. Helsinki.
- Räsänen, M. 1999. Arylsulfataasin ja fosfodiesteriaasin mittaaminen maanäytteistä. Pro gradu. Helsingin yliopisto. Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos. Helsinki.
- Simpanen, S. Maanäytteiden säilyvyys ja reagenssien säilytys entsyymimäärityksiä varten. Käsitkirjoitus erikoistyöstä työn alla.
- Vepsäläinen, M. Väitöskirja maaperän entsyymiaktiivisuuksista ja niiden mittaamisesta valmis-  
teilla: Soil enzyme activities and soil biological quality.

### Suomenkieliset

- Räsänen, M. 1999. Entsyymiaktiivisuuksien mittaaminen maanäytteistä - esimerkkeinä arylsul-  
fataasi ja fosfodiesteriaasi. Suomen ympäristö 307, 72 s., Suomen ympäristökeskus. Hel-  
sinki. ISBN 952-11-0494-5.
- Niemi, M. 1998. [Mikrobien monimuotoisuuden tutkimus.] I. Lappalainen (toim.). Suomen  
luonnon monimuotoisuus, s. 118. Suomen ympäristökeskus. Helsinki
- Niemi, M. 1999. Entsyymiaktiivisuudet maan mikrobien monimuotoisuuden mittarina. P. 62 -  
63. Walls, M., M. Vieno and E. Peltola (toim.) Biodiversiteettitutkimusohjelma FIBRE.  
Monimuotoinen luonto - monitieteellinen näkökulma. Kooste tuloksista 1997 - 1999.  
Suomen Akatemian julkaisu 5/99. Helsinki.
- Kuokkanen, L., M. Vepsäläinen & M. Niemi 2000. Kokoomanäytteiden osanäytteiden määrä  
maaperätutkimuksessa. Posterit ja laajennettu abstrakti Maaperätieteen päivillä 21-  
22.11.2000. Maaperätieteet ihmiskunnan palveluksessa. Maaperätieteen päivien laajen-  
netut abstraktit. L. Pietola (toim.) Pro Terra 4/2000, s. 22-24.
- Vepsäläinen, M. & M. Niemi 2000. Entsyymiaktiivisuudet Harjavallan ja Koverharin maaperäs-  
sä. Laajennettu abstrakti Maaperätieteen päivillä 21-22.11.2000. Maaperätieteet ihmis-  
kunnan palveluksessa. Maaperätieteenpäivien laajennetut abstraktit. L. Pietola (toim.)  
Pro Terra 4/2000, s. 61-63.
- Niemi, M., M. Vepsäläinen, K. Erkomaa ja H. Sirviö 2000. Maan mikrobiodiversiteetin mittaus  
entsyymiaktiivisuuksina. MDIVE 1997-1999 loppuraportti. Suomen ympäristö 444, 34 s.  
Suomen ympäristökeskus. Helsinki. (Saatavana Internetissä: <http://www.vyh.fi/palvelut/julkaisu/elektro/sy444/sy444.htm>)
- Niemi, M, I. Heiskanen ja K. Wallenius 2000. DNA:n eristäminen ja puhdistaminen ritsosfääri-  
näytteitä - menetelmävertailu PCR-DGGE:llä. Raportti ympäristöministeriölle. 29 s.  
Moniste.
- Vepsäläinen, M., J. Rapala ja M. Niemi 2002. Fluorogeenisten entsyymisubstraattien stabiilius.  
Posterit ja laajennettu abstrakti maaperätieteen päivillä 19-20.11.2002.
- Münster, U., G. Jurgens, L. Montonen ja M. Niemi. Bakteerien monimuotoisuus pohjoisissa ve-  
sistöissä. Hyväksytty FIBRE vesikirjaan, painossa.

## **Kansainväliset arvioidut julkaisusarjat**

- Vepsäläinen, M. 2001. Poor enzyme recovery by extraction from soils. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1131-1135.
- Vepsäläinen, M., S. Kukkonen, M. Vestberg, H. Sirviö and R. M. Niemi 2001. Application of soil enzyme activity test kit in a field experiment. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1665-1672.
- Niemi, R. M., I. Heiskanen, K. Wallenius, K. Lindström 2001. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J. Microbiol. Methods* 45:155-165.
- Vepsäläinen, M., K. Erkomaa, K. Wallenius, S. Kukkonen, M. Vestberg and M. Niemi. The impact of cover crop and peat amendment on soil enzyme activity patterns. *Plant and Soil*, in print.

## **Kansainväliset arvioidut kongressijulkaisut**

- Vepsäläinen, M. and Niemi, R.M. 2002. pH optima of enzyme activities in different soils. In: 17th World Congress of Soil Science (WCSS 2002). 14-21 August 2002. Bangkok, Thailand. Transactions, pp. 2028-1–2028-9. (cd-rom).

## **Kansalliset arvioidut julkaisusarjat**

- Vestberg, M., S. Kukkonen, K. Saari, A. Palojärvi, T. Tuovinen, M. Vepsäläinen and M. Niemi 2002. The impact of cropping system on soil quality determinants. *Agricultural and Food Science in Finland* 4: 311-328.

## **Kongressiesitelmien ja postereiden abstraktit**

- Niemi, R. M. and T. Hyvärinen 1997. Microbial diversity in soil measured as enzyme activities: First results. A microbiologists view. *Natural Resources and Social Institutions: Cultural Management of Biodiversity*. Turku 20. - 22.11.1997. Poster.
- Niemi, R. M., J. Ahtiainen, T. Sarjakoski, E. Schultz and P. Vanhala 1998. Impact of airborne metal pollution on microbial community structure in coniferous soil. *ISME 8*, Halifax, Canada, 8 - 15 August 1998. Abstract of the oral presentation.
- Niemi, R.M., J. Ahtiainen, T. Sarjakoski, E. Schultz & P. Vanhala 1998. Impact of airborne metal pollution on microbial community structure in coniferous soil. *Biodiversity and Decision Making: Biological and Socio-Economic Perspectives*. International Symposium hosted by the University of Turku and the Finnish Biodiversity Research Programme (FIBRE 1997-2002), August 24-26, 1998. Poster.
- Niemi, M. 1999. Biotechnology and biodiversity: A microbiologist's view. In: M. Walls & M. Vieno (eds.) *Natural Resources and Social institutions*. Workshop Proceedings. Publication of Academy of Finland 6/98, p. 37-38. Helsinki. ISBN 951-37-2523-5.
- Niemi, R. M., T. Sarjakoski, M. Räsänen, P. Laitinen, S. Kurppa and J. Ahtiainen. Soil enzyme activities in strawberry (*Fragaria ananassa*) and sugar beet (*Beta vulgaris*) cultivation, p. 129. *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*. International Conference, Granada, Spain, 12-15 July 1999. Poster.
- Niemi, M. 1999. Microbial diversity measured by enzyme activities and functional groups. P. 62-63. Walls, M., M. Vieno and E. Peltola (eds.) *The Finnish Biodiversity Research Programme FIBRE. From Species to Society - The Many Faces of Biodiversity*. 1997 - 1999 Progress Report. Publications of the Academy of Finland 6/99. Helsinki.

- Räsänen, M., R. M. Niemi, M. Vestberg and S. Kukkonen 2000. Soil enzyme activity patterns in organic and conventional cultivation. Third International Symposium of the Working Group MO "Interactions of Soil Minerals with Organic Components and Microorganisms" of the International Union of Soil Sciences. A. Violante and L. Gianfreda (eds.) Soil Mineral-Organic Matter-Microorganism Interactions and Ecosystem Health, p. 200, Naples-Capri 22-26 May, 2000. (Poster abstract)
- Vepsäläinen, M., S. Kukkonen, M. Vestberg, H. Sirviö and R. M. Niemi 2000. Soil enzyme activity patterns in organic and conventional cultivation. Third International Symposium of the Working Group MO "Interactions of Soil Minerals with Organic Components and Microorganisms" of the International Union of Soil Sciences: Soil Mineral-Organic Matter-Microorganism Interactions and Ecosystem Health, Naples-Capri 22-26 May, 2000. Poster.
- Räsänen, M., R. M. Niemi, M. Vestberg and S. Kukkonen 2000. Soil enzyme activity patterns in organic and conventional cultivation. Third International Symposium of the Working Group MO 'Interactions of Soil Minerals with Organic Components and Microorganisms' of the International Union of Soil Sciences. A. Violante and L. Gianfreda (eds.) Soil Mineral-Organic Matter-Microorganism Interactions and Ecosystem Health, p. 200, Naples-Capri 22-26 May, 2000. Abstract.
- Vepsäläinen, M., S. Kukkonen, M. Vestberg, H. Sirviö and R. M. Niemi 2000. Soil enzyme activity patterns in organic and conventional cultivation. Third International Symposium of the Working Group MO 'Interactions of Soil Minerals with Organic Components and Microorganisms' of the International Union of Soil Sciences: Soil Mineral-Organic Matter-Microorganism Interactions and Ecosystem Health, Naples-Capri 22-26 May, 2000. (Poster)
- Niemi, R. M., Vepsäläinen, M., Laakso, P. and V. Mäntylähti 2001. Drying of soil samples alters enzyme activities depending on the enzyme. ISME 9, Ninth International Symposium on Microbial Ecology, Amsterdam, August 26-31, 2001. Poster.
- Vestberg, M., S. Kukkonen, M. Niemi, M. Vepsäläinen, A. Palojarvi, T. Tuovinen and P. Parikka 2001. Biological soil properties, including AFM, as indicators of soil quality for strawberry fields. COST838 kokous, Praha, Tsekin tasavalta, 26. 29.9.2001. Poster.
- Vepsäläinen, M. and R. M. Niemi 2002. pH optima for enzyme activities in different soils. 17th World Congress of Soil Science 14—21 August 2002, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, Abstracts Vol. 1, Symposium 12, paper no. 2028, p. 398. Poster.
- Niemi, M. 2002. Microbial diversity in soil as measured by enzyme activities and functional groups. Markkanen, S., M. Vieno and M. Walls (eds.) Finnish Biodiversity Research Programme FIBRE 1997-2002. Summary report, p. 69-70. ISBN 951-29-2329-7. Raisio.
- Münster, U. and M. Niemi 2002. Bacterial diversity in boreal aquatic interfaces (Bioface-I) (1997-1999) Archaeal and bacterial diversity in boreal environments: A multiphasic approach including anthropogenic impacts (ARBAC)(Consortium 2000-2002). Markkanen, S., M. Vieno and M. Walls (eds.) Finnish Biodiversity Research Programme FIBRE 1997-2002. Summary report, p. 63-64. ISBN 951-29-2329-7. Raisio.
- Münster, U. and Niemi, M. 2003. Microbial biocatalysis in Boreal environments. In: Dick, R. P. (ed.) Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications. Praha, Czech Republic, July 14-17, 2003. Program and Abstracts, p. 43.
- M. Vepsäläinen, K. Wallenius, S. Simpanen, L. Pietola, L. Alakukku and R. M. Niemi 2003. Temporal variation in enzyme activities and root growth of red clover (*Trifolium pratense*) and timothy (*Phleum pratense*) at different soil depths in arable field. International Symposium on Soil Microbial Structure and Function, 18th to 20th September 2003, Marburg, Germany. Poster and abstract.
- Simpanen, S., K. Wallenius, M. Vepsäläinen, R. M. Niemi 2004. Suitability of deep-freezing of soil samples for storage for enzyme activity measurements is soil type dependent. Conference on Arctic Microbiology, Rovaniemi, Finland, 22-25 March, 2004. Poster.



## **Muut englanninkieliset julkaisut**

Münster, U., G. Jurgens, L. Montonen, M. Vepsäläinen and M. Niemi 2000. Archaeal and bacterial diversity in Boreal environments - A multiphasic approach including antropogenic impacts (ARBAC). Lammi Notes 28: 5-7.

## **Käsikirjoitukset ja suunnitellut julkaisut**

- Niemi, R.M., M. Vepsäläinen, K. Erkomaa and H. Ilvesniemi. Temporal dynamics in enzyme activities in top soil in *Pinus silvestris* and *Alnus glutinosa* rhizosphere. Submitted.
- Niemi, R. M., M. Vepsäläinen, K. Wallenius, S. Simpanen, L. Alakukku and L. Pietola. Temporal and soil depth related variation in enzyme activities and root growth of red clover (*Trifolium pratense*) and timothy (*Phleum pratense*) in field. Submitted.
- Niemi, R. M., M. Vepsäläinen, K. Wallenius, A. Palojärvi and P. Kivijärvi. Different soil cover materials affect soil enzyme activities and strawberry yield. Manuscript during 2004.
- Niemi, R. M., Simpanen, S., M. Vepsäläinen, L. Kuokkanen, P. Laakso and V. Mäntylähti. Measurement aspects of fluorogenic enzyme activity measurements in multiwells. Manuscript during 2004.
- Vepsäläinen, M. , K. Wallenius, K. Erkomaa, S. Simpanen, R. M. Niemi ym. Enzyme activities, PLFA composition and PCR-DGGE patterns as affected by heavy metal pollution in coniferous forest top soil. Manuscript during 2005.
- Vepsäläinen, M, K. Erkomaa, K. Wallenius, M. Vestberg, S. Kukkonen, A. Palojärvi and R.M. Niemi. Impact of agricultural management practices on soil enzyme activities during three successive growing seasons. Manuscript during 2005.
- Vepsäläinen, M, K. Wallenius, K. Kuusinen, P-R. Rantala and R.M. Niemi. Enzyme activities in domestic activated sludge, its composting piles and in soil supplemented with industrial activated sludge. Manuscript during 2005.
- Niemi, R. M., M. Vepsäläinen, K. Erkomaa and H. Sirviö. Value of phospholipid fatty acid patterns, different individual enzyme activities and activity patterns as indicators of soil quality. Manuscript during 2006.

# Kirjallisuus

- Alef, K. ja P. Nannipieri. 1995. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, London. 576 p. ISBN 0-12-513840-7
- Frostegård Å., Tunlid A. and Bååth E. 1993. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.*,59: 3605-3617.
- Niemi, R. M., I. Heiskanen, K. Wallenius, K. Lindström 2001. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J. Microbiol. Methods* 45:155-165.
- Niemi, M., M. Vepsäläinen, K. Erkomaa ja H. Sirviö 2000. Maan mikrobiodiversiteetin mittaus entsyymiaktiivisuuksina. MDIVE 1997-1999 loppuraportti. Suomen ympäristö 444, 34 s. Suomen ympäristökeskus. Helsinki. (Saatavana Internetissä: <http://www.vyh.fi/palvelut/julkaisu/elektro/sy444/sy444.htm>)
- Niemi, R. M., Vepsäläinen, M., Laakso, P. and V. Mäntylähti 2001. Drying of soil samples alters enzyme activities depending on the enzyme. ISME 9, Ninth International Symposium on Microbial Ecology, Amsterdam, August 26-31, 2001. (Poster)
- Vepsäläinen, M., S. Kukkonen, M. Vestberg, H. Sirviö and R. M. Niemi 2001. Application of soil enzyme activity test kit in a field experiment. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 1665-1672.
- Pitkälampi, J., Räsänen, L.A., Langenskiöld, J., Wallenius, K., Niemi, M., Lindström, K. 2003. Persistence, population dynamics and competitiveness for nodulation of marker gene tagged *Rhizobium galegae* strains in field lysimeters in the boreal climatic zone. *FEMS Microbial Ecology* 46(1): 91-104. ISSN 0168-6496. <http://www.sciencedirect.com> [online]
- Vanhala, P. T. and J. H. Ahtiainen 1994. Soil respiration, ATP content, and *Photobacterium* toxicity test as indicators of metal pollution in soil. *Environmental Toxicology and Water Quality* 9: 115-121.
- Vepsäläinen, M. and R. M. Niemi 2002. pH optima for enzyme activities in different soils. 17th World Congress of Soil Science 14—21 August 2002, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, Abstracts Vol. 1, Symposium 12, paper no. 2028, p. 398. (Poster).
- Vepsäläinen, M., J. Rapala ja M. Niemi 2002. Fluorogeenisten entsyymisubstraattien stabiilius. Poster ja laajennettu abstrakti maaperätieteen päivillä 19-20.11.2002.

# Kuvailulehti

Julkaisija	Suomen ympäristökeskus	Julkaisu-aika Toukokuu 2004
Tekijä(t)	Maarit Niemi, Milja Vepsäläinen, Suvi Simpanen, Kirsti Erkomaa ja Uwe Münster	
Julkaisun nimi	ZymProfilier® testisarjan kehittäminen ja soveltaminen ympäristönäytteiden entsyymiaktiivisuuksien mittaamiseen. MDIVE II Loppuraportti	
Julkaisun osat/ muut saman projektin tuottamat julkaisut	<p>Julkaisu on saatavana internetistä: <a href="http://www.ymparisto.fi/julkaisut">http://www.ymparisto.fi/julkaisut</a></p> <p>Niemi, M., Vepsäläinen, M., Erkomaa, K. ja Sirviö H. 2000. Maan mikrobiodiversiteetin mittaus entsyymiaktiivisuuksina. MDIVE 1997-1999 loppuraportti. Suomen ympäristö 444, 34 s. Suomen ympäristökeskus. Helsinki.</p> <p>Niemi, M., Vepsäläinen, M., Simpanen, S., Erkomaa, K. ja Münster U. 2004. ZymProfilier® testisarjan kehittäminen ja soveltaminen ympäristönäytteiden entsyymiaktiivisuuksien mittaamiseen. MDIVE II Loppuraportti. Suomen ympäristö 684, 43 s. Suomen ympäristökeskus. Helsinki.</p>	
Tiivistelmä	<p>Tekes ja SYKE rahoittivat puoliksi Suomen Akatemian Biodiversiteettitutkimusohjelmaan kuuluvan hankkeen, jossa kehitettiin fluorogeenisiin substraatteihin, kuoppalevyihin ja fluorometriaan perustuva entsyymiaktiivisuuksien mittaamenetelmä ympäristönäytteille sekä ATK-ohjelmat tulosten laskemista ja analysointia varten. EU-maat kattava tuotemerkki ZymProfilier® on myönnetty sekä testisarjalle että ohjelmille. Testisarjan avulla on mahdollista mitata maanäytteistä ja muista ympäristönäytteistä 12 eri entsyymin aktiivisuudet samanaikaisesti. Menetelmää on sovellettu mm. tutkittaessa luomu- ja tavanomaisen viljelyn, viljelykasvin, turvelisäyksen, maaperäkatteiden, vuodenajan ja syvyyden vaikutusta viljelymaassa, vuodenajan, puulajin ja raskasmetallikuormituksen vaikutusta metsämaassa. Entsyymiaktiivisuuksia on seurattu kompostoinnin kuluessa puhdistamolietettä kompostoivalla laitoksella ja lisäksi on selvitetty teollisuuden aktiivilietteiden lisäämisen vaikutusta viljelymaassa. Menetelmä on todettu riittävän herkäksi myös vesinäytteille. Näytteenoton optimointia ja näytteen säilytyksen vaikutusta on tutkittu ja selvitetty se, että testisarjoja voidaan valmistaa isoja eriä ja säilyttää niitä pitkiä aikoja. Kehitettyjä ohjelmia on käytetty tulosten laskemisen virtaviivaistamisessa ja havaintoaineiston tarkasteluissa ne ovat osoittautuneet tehokkaiksi. Tässä raportissa esitetään esimerkkejä tuloksista etenkin kuvina ja taulukoina.</p>	
Asiasanat	entsyymiaktiivisuus, maaperä, mikrobien toiminta, mikrobirakenne, viljelymaa, metsämaa	
Julkaisusarjan nimi ja numero	Suomen ympäristö 684	
Julkaisun teema	Ympäristönsuojelu	
Projektihankkeen nimi ja projektinumero	Entsyymitestisarjan kehittäminen ja soveltaminen SA02025	
Rahoittaja/toimeksiantaja	Tekes, SYKE, Suomen Akademia/FIBRE	
Projektiryhmään kuuluvat organisaatiot	Fibre, Tekes, Viljavuuspalvelu, Aboatox, Tampereen teknillinen yliopisto, Biopap, SYKE	
	ISSN 1238-7312	ISBN 952-11-1650-1 (PDF)
	Sivuja 43	Kieli Suomi
	Luottamuksellisuus Julkinen	Hinta
Julkaisun myynti/ jakaja		
Julkaisun kustantaja	Suomen ympäristökeskus	
Painopaikka ja -aika		

# Presentationsblad

Utgivare	Finlands miljöcentral	Datum Maj 2004
Författare	Maarit Niemi, Milja Vepsäläinen, Suvi Simpanen, Kirsti Erkomaa och Uwe Münster	
Publikationens titel	Utveckling av ZymProfiler® test system och dess applikation för mätning av enzymaktiviteter i miljöprov	
Publikationens delar/ andra publikationer inom samma projekt	<p>Publikationen finns tillgänglig på internet: <a href="http://www.ymparisto.fi/julkaisut">http://www.ymparisto.fi/julkaisut</a></p> <p>Niemi, M., Vepsäläinen, M., Erkomaa, K. och Sirviö, H. 2000. Mätning av mikrobdiversitet i jord genom enzymaktivitet - MDIVE 1997 - 1999 slutrapport. Miljön i Finland 444, 34 s. Finlands miljöcentral. Helsinki.</p> <p>Niemi, M., Vepsäläinen, M., Simpanen, S., Erkomaa, K. och Münster U. 2004. Utveckling av ZymP-rofiler® test system och dess applikation för mätning av enzymaktiviteter i miljöprov. Miljön i Finland 684. 43 s. Helsinki.</p>	
Sammandrag	<p>I den här projekten, som utvecklade en testsystem för mätning av enzymaktiviteter i miljöprov med fluorogena substrater i mikrotiterplattor med fluorescence mätning och program för datamaskin för räkning och analysering av resultat, finansierades dels av Tekes och dels av Syke. Projekten hörde till Finlands Akademiens forskningsprogram för biodiversitet. Bode testsystem och programmen är registrerade under varumärke ZymProfiler® gällande i alla EU länderna. Med test system är det möjligt att mäta hos mark och hos andra miljöprov aktivitet av 12 olika enzym samtidigt. Metoden har applicerats till exempel för att jämföra biologisk och sedvanlig odling, påverkan av olika odlingsväxt, torv, olika marktäckan, årstid och mark djupet i odlingsmark, påverkan av årstid, trädart och förorening med tungmetaller i skogsmark. Man har följat utveckling av enzymaktiviteter under kompostering av avloppsslam och studerat hur industrins avloppsslam påverkar enzymaktiviteter i mark. Metoderna har visat sig vara tillräckligt känslig för vattenprov. Provtagnings strategi har optimerats och hållbarheten av prov har studerats. Man har försäkrat att man kan tillverka större mängder testmaterial på samma gång och hålla dem längre tider. Program för räkning och analysering av resultat har använts för rationalisering och de har visat sig vara effektiva. I den här rapporten framställs exempel av resultat närmast som figurer och tabeller.</p>	
Nyckelord	enzymaktivitet, mark, aktivitet av mikrober, mikrobstruktur, jordbruk mark, skog mark	
Publikationsserie och nummer	Miljön i Finland 684	
Publikationens tema	Miljövard	
Projektets namn och nummer	Utveckling av test system för mätning av enzymaktiviteter i miljöprov	
Finansiär/ uppdragsgivare	Tekes, SYKE, Suomen Akatemia/FIBRE	
Organisationer i projektgruppen	FIBRE, Tekes, Viljavuuspalvelu, Aboatox, Tampereen teknillinen yliopisto, Biopap, SYKE	
	ISSN 1238-7312	ISBN 952-11-1650-1 (PDF)
	Sidantal 43	Språk finska
	Offentlighet offentlig	Pris
Beställningar/ distribution		
Förläggare	Finlands miljöcentral	
Tryckeri/ tryckningsort och -år		

# Documentation page

Publisher	Finnish Environment Institute	Date May 2004
Author(s)	Maarit Niemi, Milja Vepsäläinen, Satu Simpanen, Kirsti Erkomaa and Uwe Münster	
Title of publication	Development of ZymProfiler® test kit and its application to the measurement of enzyme activities in environmental samples. MDIVE II Final Report	
Parts of publication/ other project publications	<p>The publication is available in the internet: <a href="http://www.ymparisto.fi/julkaisut">http://www.ymparisto.fi/julkaisut</a></p> <p>Niemi, M., Vepsäläinen, M., Erkomaa, K. and Sirviö, H. 2000. Microbial diversity in soil measured as enzyme activities - MDIVE 1997 - 1999 final report. The Finnish Environment 444, 34 p. Finnish Environment Institute. Helsinki.</p> <p>Niemi, M., Vepsäläinen, M., Simpanen, S., Erkomaa, K. and Münster, U. 2004. Development of ZymProfiler® test kit and its application to the measurement of enzyme activities in environmental samples. MDIVE II Final Report. The Finnish Environment 684, 43 p. Finnish Environment Institute. Helsinki.</p>	
Abstract	<p>This work was partly financed by the National Technology Agency of Finland, as a project of the Biodiversity Research Programme of the Finnish Academy of Sciences. A test kit for environmental samples was developed for the measurement of enzyme activity patterns in multiwells using fluorogenic substrates and fluorescence measurements. Computer programs were developed for calculation and analysis of the results. The trademark ZymProfiler® was registered in all the EU countries for both the test kit and computer programs. ZymProfiler® test kit is applicable for the measurement of 12 different enzyme activities simultaneously from different environmental samples. The methods has been applied for the comparison of enzyme activities in organic and in traditional cultivation, in cultivation of different crops, in peat treated soil, in soil covered with different materials, in different seasons and soil depths in arable land, and in forest soil in studies on impact of season, of tree species and of heavy metal pollution. The changes in enzyme activities during composting of municipal sludge have been monitored and influence of addition of industrial sludge to arable soil have been monitored. The method has been observed to be sensitive enough for the aquatic samples. Sampling strategy has been optimized and impacts of sample storage studied. It has been confirmed that test kits can be manufactured in large quantities and stored for long periods of time. The programs developed have been used for the streamlining of calculation of results and the programs for the analysis of the results have proved to be efficient. In this report examples of results are presented mainly as figures and tables.</p>	
Keywords	enzyme activity, soil, microbial functions, microbial structure, arable soil, forest soil	
Publication series and number	The Finnish Environment 684	
Theme of publication	Environmental protection	
Project name and number, if any	Development of a test kit for the measurement of enzyme activities in environmental samples	
Financier/ commissioner	National Technology Agency Tekes and Finnish Environment Institute	
Project organization	FIBRE, Tekes, Viljavuuspalvelu, Aboatox, Tampereen teknillinen yliopisto, BioPap, SYKE	
	ISSN 1238-7312	ISBN 952-11-1650-1 (PDF)
	No. of pages 43	Language finnish
	Restrictions Public	Price
For sale at/ distributor		
Financier of publication	Finnish Environment Institute	
Printing place and year		



## YMPÄRISTÖN- SUOJELU

### ZymProfilor® testisarjan kehittäminen ja soveltaminen ympäristönäytteiden entsyymiaktiivisuuksien mittaamiseen MDIVE II loppuraportti

MDIVE-hanke kuului Suomen Akatemian biodiversiteettitutkimusohjelmaan, FIBRE, sen molemmissa vaiheissa ja sitä rahoittivat TEKES ja Suomen ympäristökeskus. Tämä julkaisu on tutkimuksen toisen vaiheen loppuraportti.

EU:n piirissä on valmisteltu maaperän suojeluun tähtäävää lainsäädäntöä ja tutkijat ovat korostaneet maaperän suojelun välttämättömyyttä ja kiireellisyyttä sekä elintarviketuotannon että biosfäärin turvaamiseksi. Mikrobien aineenvaihdunta maaperässä aikaan saa olennaisilta osin aineiden kiertokulun. Ihminen vaikuttaa maaperään, sen mikrobilajistoon ja mikrobien aikaan saamiin prosesseihin tietoisesti maanviljelyssä ja metsien hoidossa eri käsittelyillä. Ilmastonmuutos, kaukokulkeutumat, pistemäiset ilman saastutuslähteet ja liikenteen sekä onnettomuuksien aiheuttama saastutus voivat vaikuttaa maaperän mikrobistoon haitallisesti. Käytännön ympäristönsuojelun ja maa- ja metsätalouden tarpeisiin tarvitaan maaperän prosessien häiriintymistä tai myönteistä muutosta mittaavia menetelmiä. Maaperän entsyymien aktiivisuus kuvastaa aineiden kierron funktioita. Tässä tutkimuksessa on kehitetty useiden entsyymiaktiivisuuksien samanaikaiseen mittaukseen perustuva testisarja ja sovellettu sitä erilaisissa ympäristötutkimuksissa.

ISBN 952-11-1650-1 (PDF)  
ISSN 1238-7312