



Heli Antikainen

Merijään bakteerien generaatioaika ja hiiliyhdisteiden käyttö optimikasvulämpötilassa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalytiikka (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

18.1.2024

Tiivistelmä

Tekijä:	Heli Antikainen
Otsikko:	Merijään bakteerien generaatioaika ja hiiliyhdisteiden käyttö optimikasvulämpötilassa
Sivumäärä:	63 sivua + 2 liitettä
Aika:	11.2.2024
Tutkinto:	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat:	Erikoistutkija Eeva Eronen-Rasimus Lehtori Jarmo Palm

Opinnäytetyö tehtiin Suomen ympäristökeskuksessa osana Suomen Akatemian rahoittamaa IMICROBE-tutkimushanketta, jossa on tarkoituksena mallintaa Eteläisen jäämeren merijään bakteeriyhteisöitä erilaisissa ravinneolosuhteissa. Opinnäytetyön tavoitteena oli määrittää neljäntoista merijäästä eristetyn bakteerikannan optimikasvulämpötilat modifioiduilla ZoBell-agarmaljoilla 4, 10, 16 ja 20 °C:ssa sekä bakteerien generaatioaika optimikasvulämpötilassa nesteviljelmässä. Lisäksi tutkittiin mitä hiilenlähteitä jääbakteerit kykenevät hyödyntämään EcoPlate-kuoppalevyillä ja kuvattiin bakteerit fluoresenssimikroskoopin avulla. Tavoitteena oli myös hyödyntää tuotettua tietoa genomipohjaisen gRodon-kasvunopeusohjelman parantamiseksi ääriolosuhteissa kasvavien bakteerikantojen osalta.

Neljästätoista jääbakteerikannasta kuuden bakteerikannan optimikasvulämpötilaksi määritettiin 20 °C. Neljän bakteerikannan optimikasvulämpötila oli 16 °C ja kahden kannan optimikasvulämpötila oli 10 °C. Kahden bakteerikannan optimikasvulämpötilaksi määritettiin 4 °C.

Jääbakteerien kasvunopeutta nesteviljelmässä seurattiin mittaamalla sameutta turbiditeettimittarilla ja viljelmästä otettujen näytteiden solulukumäärät analysoitiin virtaussytometrillä. Generaatioaika määritettiin kasvukäyrän eksponentiaalisen vaiheen suoran kulmakertoimesta. Virtaussytometrianalyysin perusteella kaikille bakteerikannoille muodostui kaksi solupopulaatiota: yksittäiset solut ja aggregoituneet solut eli bakteerikasaumat. Lopulliseen tarkasteluun valittiin vain ne kuusi bakteerikantaa, joilla oli enemmän yksittäisiä kuin aggregoituneita soluja. Kahdenkymmenen asteen optimilämpötilassa kasvaneiden bakteerien generaatioajat olivat 0,6–2,1 tuntia ja neljässä ja kymmenessä asteessa kasvaneiden bakteerikantojen generaatioajat olivat 7,4–21,7 tuntia. gRodon-ohjelma ennusti hyvin vain nopeimmin kasvaneen bakteerin eli *Pseudoalteromonas* sp. 121:n generaatioajan.

Jääbakteerit hyödynsivät yhteensä 20:tä erilaista hiiliyhdistettä eli 64,5 % EcoPlate-alustojen hiilenlähteistä, joista käytetyimpiä olivat Tween 40- ja Tween 80 -polymeerit sekä hiilihydraatit tukien aiempia havaintoja polaarialueiden bakteerien hiilenkäytöstä.

Avainsanat: jääbakteeri, optimikasvulämpötila, generaatioaika, EcoPlate

Tämän opinnäytetyön alkuperä on tarkastettu Turnitin Originality Check -ohjelmalla.

Abstract

Author: Heli Antikainen
Title: The Growth Rates and Carbon Utilization Patterns of Sea-Ice Bacteria in Optimal Growth Temperatures
Number of Pages: 63 pages + 2 appendices
Date: 18 January 2024

Degree: Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme: Laboratory Sciences
Supervisors: Eeva Eronen-Rasimus, Senior Research Scientist
Jarmo Palm, Senior Lecturer

This Bachelor's thesis study was carried out at the Finnish Environment Institute as part of the Research Council of Finland funded IMICROBE research project on bacterial communities in polar sea ice. The purpose of this thesis study was to determine the optimal growth temperatures of fourteen sea-ice bacterial strains on modified ZoBell agar plates at 4, 10, 16, and 20 °C, and the generation times of the bacteria at their optimal growth temperature in liquid culture. In addition, the carbon utilization patterns of the bacteria were investigated on EcoPlate well plates and the bacteria were photographed using a fluorescence microscope. The ultimate aim was to generate information to supplement the genome-based gRodon program to determine growth rates.

Of the fourteen sea-ice bacterial strains, six strains had an optimal growth temperature of 20 °C. The optimal growth temperature for four bacterial strains was determined to be 16 °C and for two strains it was 10 °C. The optimal growth temperature for two strains was determined to be 4 °C.

The growth rates of ice bacteria in liquid culture were monitored by measuring turbidity with a turbidity meter and the cell counts of samples taken from the cultures were analyzed with a flow cytometer. The generation times were determined using the slope of the exponential phase of the growth curve. Based on the flow cytometry analysis, all bacterial strains had two cell populations: single cells and aggregated cells, i.e., bacterial clusters. The generation times were calculated only for six bacterial strains, which had more single cells than aggregated cells. The generation times of bacteria grown at an optimal temperature of 20 °C varied between 0.6–2.1 hours, and the generation times of bacterial strains grown at 4 and 10 °C varied between 7.4–21.7 hours. The gRodon program predicted well only the generation time of the fastest-growing bacterial strain *Pseudoalteromonas* sp. 121.

Sea-ice bacteria utilized a total of 20 different carbon compounds, i.e., 64.5 % of the EcoPlate carbon sources, of which the most used were two polymers, Tween 40 & Tween 80, and carbohydrates supporting previous observations of the carbon utilization patterns of bacteria in polar regions.

Keywords: sea-ice bacteria, optimal growth temperature, generation time, EcoPlate

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Työn teoria	3
2.1	Jääbakteerit	3
2.1.1	Yleistä jääbakteereista	3
2.1.2	Psykrofiilisyys, optimikasvulämpötila ja kasvunopeus	4
2.1.3	Kylmään sopeutuminen	5
2.2	Kasvatusalustat ja optimikasvulämpötilan määrittäminen	6
2.3	Kasvukäyrän määrittäminen turbiditeettimittarilla	6
2.4	Solulukumäärien määrittäminen virtaussytometrillä	7
2.5	Bakteerien kasvuvaiheet ja kasvunopeus eli generaatioaika	9
2.6	Genomiperustaiset kasvunopeusmallit	11
2.7	Fluoresenssimikroskopia	12
2.8	EcoPlate-kuoppalevyt	13
3	Materiaalit ja menetelmät	16
3.1	Tutkitut bakteerikannat	16
3.2	Kasvualustat	17
3.3	Bakteerien esikasvatus ja optimikasvulämpötilan määrittäminen	17
3.4	Kasvukäyrän muodostaminen turbiditeettimittauksella	18
3.5	Bakteerien solulukumäärien mittaaminen virtaussytometrillä	19
3.6	EcoPlate-kuoppalevy menetelmä ja absorbanssimittaukset	20
3.7	Bakteerien käsittely fluoresenssimikroskooppitutkimuksia varten	20
4	Tulokset	22
4.1	Kasvu eri lämpötiloissa ja optimikasvulämpötilan määrittäminen	22
4.2	Bakteerikantojen pesäkkeiden ulkonäkö RC-maljoilla	24
4.3	Kasvukäyrän muodostaminen turbiditeettimittausten perusteella	27
4.4	Generaatioajan määrittäminen virtaussytometrianalyysin perusteella	34
4.5	Hiihiyhdisteiden hyödyntäminen EcoPlate-kuoppalevyillä	39
4.6	Bakteerien tarkastelu fluoresenssimikroskooppilla	41

5	Tulosten tarkastelu	44
5.1	Optimikasvulämpötila ja psykrofiilisyy	44
5.2	Jääbakteerien kasvattamisen haasteista laboratoriossa	44
5.3	Generaatioaika	46
5.3.1	Esikäsittelyn merkitys generaatioajan määrittämisessä	46
5.3.2	Määritetty generaatioaika vs. gRodon-generaatioaika	48
5.4	Hiiliyhdisteiden hyödyntäminen EcoPlate-kuoppalevyillä	50
5.4.1	Käytetyimmät hiilenlähteet	50
5.4.2	Lämpötilan vaikutus hiilenlähteiden käyttöön	51
5.4.3	Muiden tekijöiden vaikutus EcoPlate-kasvatukseen	52
6	Yhteenveto	54
	Lähteet	57

Liite 1. Generaatioajan tarkastelusta poisjätettyjen jääbakteerien kasvukäyrät

Liite 2. Jääbakteerien yksittäisten ja aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvot eksponentiaalisen kasvuvaiheen näytteissä virtaussytometrillä määritettynä

1 Johdanto

Opinnäytetyö tehtiin Suomen ympäristökeskuksen merentutkimuslaboratoriossa keväällä ja kesällä 2023 osana Suomen Akatemian rahoittamaa IMICROBE-tutkimushanketta, jossa on tarkoitus mallintaa Eteläisen jäämeren merijään bakteeriyhteisöjen kasvua erilaisissa ravinneolosuhteissa. Työn ohjaajina toimivat erikoistutkija Eeva Eronen-Rasmus ja johtava tutkija Hermanni Kaartokallio.

Opinnäytetyön tavoitteena oli määrittää neljäntoista napa-alueiden merijäästä eristetyn bakteerikannan optimikasvulämpötilat agaralustalla sekä bakteerien kasvunopeudet eli generaatioajat nesteviljelmässä. Bakteerien kasvua nesteviljelmässä seurattiin turbiditeettimittarilla ja solulukumäärät määritettiin virtaussytometrillä. Lisäksi tutkittiin, mitä hiilenlähteitä jääbakteerit kykenevät hyödyntämään Ecoplate-kuoppalevyillä, sekä tutkittiin bakteerien morfologiaa fluoresenssimikroskoopin avulla.

Jääbakteerit ovat runsaimpia merijään sisässä elävistä eliöistä yhdessä jäälevien kanssa (Arrigo 2014). Ne ovat kylmään sopeutuneita eli psykrotrofisia tai kylmää rakastavia eli psykrofiilisiä (Boetius ym. 2015). Jääbakteerit hajottavat partikulaarista orgaanista ainesta ja vapauttavat ravinteita veteen. Ne ovat osa ns. mikrobisilmukkaa, jossa liunneen orgaanisen aineksen hiili kierrätetään bakteeribiomassana takaisin ylemmille trofiatasoille laiduntajien käyttöön. (Steiner ym. 2021.) Jääbakteerit ovat sopeutuneet elämään hyvin vaihtelevissa ympäristöolosuhteissa jään suolataskuissa (Boetius ym. 2015), joten niiden viljeltävyys laboratoriossa voi vaihdella paljonkin käytetyn alustan ja lämpötilan mukaan (Junge ym. 2002).

Mikrobien kasvunopeus voi vaihdella lajin mukaan minuuteista useisiin päiviin. Tieto mikrobien kasvunopeudesta perustuu enimmäkseen laboratoriossa helposti ja nopeasti kasvaviin lajeihin. (Weissman ym. 2021.) Mikrobien todellisten kasvunopeuksien vaihtelua on vaikea arvioida (Weissman ym. 2021),

sillä yleisesti ottaen vain noin yksi prosentti ympäristössä elävistä mikrobilajeista on viljeltävissä (Staley & Konopka 1985).

Mikrobien genomien pohjalta on laadittu tietokoneohjelmia, joiden avulla voidaan päätellä kasvunopeuksia ilman, että bakteeria tarvitsee kasvattaa laboratoriossa. Nämä ohjelmat perustuvat enimmäkseen kuitenkin nopeasti kasvavien bakteerikantojen genomeihin ja kasvunopeuksiin. Ohjelmien kehittämisessä on käytetty vain vähän ääriolosuhteissa, kuten jäässä, eläviä lajeja. Näin ollen ohjelmien laskemat kasvunopeudet esim. psykrofiileille eivät ole luotettavia. (Weissman ym. 2021.)

Tässä jääbakteeritutkimuksessa mukana olleiden bakteerikantojen genomit oli sekvensoitu aiemmin (Eronen-Rasimus 2023), joten genomi- ja kasvunopeustietoja voitaisiin käyttää genomiperustaisen gRodon-ohjelman täydentämiseksi psykrotrofisten ja -fiilisten bakteerikantojen osalta (Jlw-ecoevo/gRodon2), mikäli kasvunopeudet saataisiin määritettyä.

2 Työn teoria

2.1 Jääbakteerit

2.1.1 Yleistä jääbakteereista

Merijää kattaa noin 10 % valtameren pinnasta ja on keskimäärin n. 2–3 m paksua. Jään lämpötila vaihtelee pintajäessä yli -30 °C :sta talvella sulamiskauden yli 0 °C :seen. Kun meri jäätyy kohti talvea, mikrobeja ja meriveden suoloja konsentroituu huokoisen jään suolataskuihin ja kanaviin. Suolataskujen suolapitoisuus vaihtelee lähes makeasta vedestä yli 24 %:iin vuodenaikojen mukaan. Merijään bakteerit joutuvat siten kestämään hyvin vaihtelevia lämpötiloja ja suolapitoisuuksia. Keväällä ja kesällä merijään bakteerit vapautuvat veteen jään sulaessa. Arktisen alueen merijään määrä vähenee n. 50 % kesäisin ja vastaavasti Antarktisen alueella n. 80 %. Jääbakteerilajiston on siitä huolimatta havaittu eroavan meriveden bakteeriplanktoniyhteisöjen koostumuksesta. (Boetius ym. 2015.)

Talvisin jääbakteerien aktiivisuus ja runsaus ovat minimissään (Steiner ym. 2021), mutta jäälevistä peräisin oleva orgaaninen aines voi silti ylläpitää bakteeriaktiivisuutta jopa kylminä talvikausina (Eronen-Rasimus ym. 2017). Jotkin jääbakteerit voivat olla aktiivisia jopa -20 °C :ssa (Junge ym. 2004). Keväällä lisääntyvä auringonvalo aiheuttaa jäälevien massakasvun, joka mahdollista myös bakteerien määrien lisääntymisen (Steiner ym. 2021).

Arktisen ja Antarktisen merialueen jääbakteerit kuuluvat erityisesti seuraaviin luokkiin: Flavobacteriia, Gammaproteobacteria ja Alphaproteobacteria. Yleisimpiä bakteerisukuja molemmilla napa-alueilla ovat Flavobacteriia-luokan suvut *Polaribacter*, *Psychrobacter*, *Psychroflexus* ja *Flavobacterium*, Gammaproteobacteria-luokan suvut *Glaciecola* ja *Colwellia* ja Alphaproteobacteria-luokan suku *Octadecabacter*. (Boetius ym. 2015; Steiner ym. 2021.) Jääbakteeriyhteisöjen koostumus ja runsaus vaihtelevat vuodenaikojen mukaan, sillä niitä säätelevät tekijät, kuten lämpötila, suolaisuus,

valo, käytettävissä olevat ravinteet, laidunnuspaine ja virusten vaikutus, vaihtelevat vuodenajoittain (Steiner ym. 2021).

Keväisin ja kesäisin kopiotrofiset bakteerit dominoivat jääbakteeriyhteisöjä (Eronen-Rasimus ym. 2017). Kopiotrofit ovat bakteereita, jotka ovat sopeutuneet kasvamaan parhaiten ravinnerikkaissa ympäristöissä ja muuttamaan kasvunopeuttaan vaihtuvien ravinnepitoisuuksien mukaan. Niiden vastakohta ovat oligotrofiset bakteerit, jotka ovat sopeutuneet elämään matalissa ravinnepitoisuuksissa. (Noell ym. 2023.) Jääbakteeriyhteisöjä dominoivia kopiotrofisia bakteerisukuja ovat mm. *Glaciacola*, *Colwellia*, *Polaribacter* ja *Flavobacterium* (Eronen-Rasimus ym. 2017; Steiner ym. 2021). Näistä *Polaribacter* ja *Glaciacola* olivat myös dominoivia talviaikaan yhdessä *Octadecabacter*-suvun kanssa (Eronen-Rasimus ym. 2017).

2.1.2 Psykrofiilisyyden, optimikasvulämpötila ja kasvunopeus

Käsite psykrofiilinen on peräisin kreikan sanoista psychros eli kylmä ja philos eli rakastava (Boetius ym. 2015). Moritan (1975) mukaan todelliset kylmää rakastavat bakteerit eli psykrofiilit ovat eliöitä, joiden optimikasvulämpötila on n. 15 °C tai alle, maksimikasvulämpötila on n. 20 °C ja minimikasvulämpötila on 0 °C tai alle. Optimikasvulämpötilalla tarkoitetaan lämpötilaa, jossa eliön kasvunopeus on suurin. Minimikasvulämpötila on alhaisin lämpötila, jossa eliö voi selviytyä ja lisääntyä, kun taas maksimikasvulämpötila on korkein lämpötila, jossa eliön kasvu voi tapahtua. (Temperature and Microbial Growth.)

Todellisten psykrofiilien ajatellaan olevan suhteellisen harvinaisia, sillä suurin osa kylmistä ympäristöistä eristetyistä bakteereista on enemmänkin kylmään sopeutuneita eli psykrotrofeja tai paremmin sanottuna psykrotolerantteja. Näiden bakteerien optimikasvulämpötila on n. 20 °C tai enemmän, mutta ne pystyvät kasvamaan myös nollan asteen tienoilla, koska ne ovat ravinnonkäytöltään ja ekofysiologialtaan mukautuvia. (Bowman 2001: 591.)

Psykrofiilliset bakteerit voivat kasvaa nopeastikin (Morita 1975), ainakin optimaalisissa olosuhteissa (Moyer ym. 2017). Esimerkiksi meressä elävän bakteerin, *Vibrio marinus*, generaatioaika eli solupopulaation kaksinkertaistumiseen kuluva aika oli 80,7 minuuttia 15 °C:n optimikasvulämpötilassa, mutta se nousi 226 minuuttiin 3 °C:ssä (Morita & Albright 1965). Alaskan merijäästä eristetyn jääbakteerin, *Psychromonas ingrahamii*, optimikasvulämpötila on 5 °C, jossa sen generaatioaika on 12 tuntia, mutta –12 °C:ssa generaatioaika kasvoi 240 tuntiin eli 10 päivään (Breezee ym. 2004).

2.1.3 Kylmään sopeutuminen

Kylmässä elävät eliöt ovat kehittäneet biokemiallisia ja ekofysiologisia sopeutumia optimoidakseen aktiivisuuttaan matalissa lämpötiloissa (Bowman 2001: 591). Psykrofiilien ensisijainen sopeutuma kylmiin lämpötiloihin on ylläpitää solukalvon juoksevuutta matalissa lämpötiloissa säilyttääkseen kyvyn ottaa ravinteita. Solukalvon homeostaasia ja biokemiallisia prosesseja pitävät yllä lipidit ja entsyymit, jotka poikkeavat lämpimässä viihtyvien bakteerien vastaavista aineista. (Moyer ym. 2017.) Liunneen orgaanisen aineen hajotus merijäässä vaatii matalissa lämpötiloissa toimivia ekstrasellulaarisia entsyymejä (Mock & Thomas 2005). Muita sopeumia ovat jäätymisenestoproteiinien ja ekstrasellulaaristen polymeerien eli EPS:n (=extracellular polymeric substances) tuotto. EPS koostuu enimmäkseen polysakkarideista, mutta siinä voi olla myös proteiineja, DNA:ta tai lipopolysakkarideja. (Boetius ym. 2015.) Bakteerien lisäksi erityisesti jäälevät tuottavat EPS:ää (Mock & Thomas 2005).

EPS:n tuoton on kokeellisesti havaittu kasvavan jopa 20-kertaiseksi *Pseudoalteromonas*-sukuun kuuluvalla bakteerilla, kun sitä kasvatettiin –2 ja 10 °C:ssa verrattuna 20 °C:seen (Nichols ym. 2005). Bakteerit erittävät EPS:ää ympäristöolosuhteiden muuttuessa, sillä se suojaa sekä jäätymiseltä että osmoottiselta stressiltä. EPS edistää myös solujen kasautumista ja mahdollistaa biofilmin muodostuksen jäässä ja jään alla. (Boetius ym. 2015.) Merijään suolataskut vaikuttavat olevan enemmän biofilmin kaltaisia systeemejä kuin

avovesimäisiä, koska niissä on korkeat eliöpitoisuudet ja suuria määriä EPS:ää, mikä aiheuttaa geelimäisen matriksin muodostumisen (Krembs & Deming 2008).

2.2 Kasvatusalustat ja optimikasvulämpötilan määrittäminen

Jäästä eristettyjen bakteerien viljeltävyys laboratoriossa voi vaihdella paljonkin käytetyn alustan ja lämpötilan mukaan (Junge ym. 2002). Psykrofiilisten bakteerien kasvatukseen ei ole olemassa spesifiä kasvatusalustaa, mutta parhaana yleisalustana merilajeille pidetään ZoBell Marine 2216 -alustaa (Bowman 2001: 593). Se jäljittelee meriveden suolapitoisuutta (n. 3,4 %) ja mineraalikoostumusta sekä sisältää peptonia ja hiivauutetta ravinteiden lähteenä (Zobell Marine Agar). Hankalammille lajeille suositellaan laimeampia alustoja, jotka on tehty suodatettuun meriveteen (Bowman 2001: 593).

Optimikasvulämpötilan määrittämiseen voidaan käyttää joko kasvatusliuosta tai kiinteää alustaa. Tarkempi optimikasvulämpötila saadaan käyttämällä kasvatusliuosta. Kiinteän ja nestemäisen kasvualustan välillä optimikasvulämpötiloissa on havaittu n. 5 asteen ero mahdollisesti siksi, että kiinteällä alustalla bakteerikasvustot voivat kuivua. Esim. useimmat *Polaribacter*-lajit kasvavat liuoksessa 15–20 °C:ssa, mutta agarmaljoilla kasvu tapahtuu maksimissaan 10–12 °C:ssa. Siten optimikasvulämpötila voidaan aliarvioida käyttämällä agarmaljoja. Optimilämpötilakasvatuksia tulisi tehdä 5 asteen välein alkaen 0–5 °C:sta. (Bowman 2001: 606.)

2.3 Kasvukäyrän määrittäminen turbiditeettimittarilla

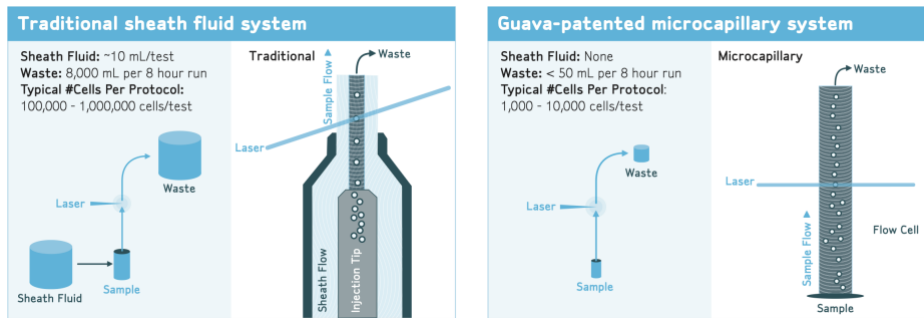
Bakteerien kasvukäyrä voidaan määrittää turbiditeettimittauksen avulla. Kasvatusliuoksen sameus eli turbiditeetti kasvaa, kun bakteerit lisääntyvät kasvatusliuoksessa. Turbiditeettiä voidaan seurata spektrofotometrillä, joka mittaa valon läpikäymistä bakteerikasvuston läpi detektorille aallonpituudella 600 nm (OD_{600}). Turbiditeettimittauksella voidaan seurata bakteerikasvuston kehittymistä, mutta tarkkoja bakteerimääriä sillä ei saada selville. (Tortora ym.

2021: 198–199; Pusterla 2018.) Bakterimäärät voidaan selvittää ottamalla kasvatusliuoksesta näyte ja tekemällä maljakasvatuksia (Tortora ym. 2021: 198) tai mittaamalla bakterimäärät virtaussytometrillä (Singh ym. 2019).

2.4 Solulukumäärien määrittäminen virtaussytometrillä

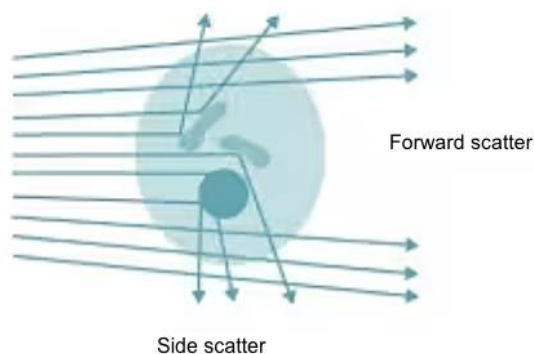
Virtaussytometrillä voidaan määrittää liuoksessa olevien solujen lukumääriä, analysoida solujen kokoa sekä erotella erilaisia solupopulaatiota toisistaan (Introduction to flow cytometry). Virtaussytometri koostuu valonlähteestä (yleensä laser), virtaussolusta, hydraulisesta nestejärjestelmästä, optisista suodattimista, detektoreista, kuten fotodiodeista tai valomonistinputkista ja datankäsittely-yksiköstä. Virtaussytometrissä solut kulkevat nestevirtauksen mukana yksitellen virtaussolussa valonlähteen ohi. Solujen aiheuttama valon taittuminen ja värjättyjen solujen emittoima fluoresenssi voidaan mitata detektoreilla. Optisilla suodattimilla valitaan sopiva valon aallonpituus mittausta varten. (Diaz ym. 2010.)

Perinteisissä virtaussytometreissä solut saadaan kulkemaan yksitellen nestevirtauksessa ns. hydrodynaamisen fokuoinnin avulla, jolloin solut ohjataan erillisen vaippanesteen virtauksen avulla yksitellen kapeaan suuttimeen valonlähteen läpi (Diaz ym. 2010). Uudemmissa virtaussytometreissä käytetään patentoitua tekniikkaa, jossa solut imetään mikropillaarisen virtaussolun läpi yksitellen laserin ohi (kuva 1). Täten ei tarvita erillistä vaippanestettä ja voidaan käyttää pieniä näytemääriä sekä tuotetaan vähemmän jätettä. (Guava® Flow Cytometry easyCyte™ Systems.)



Kuva 1. Virtaussytometrin nestejärjestelmät perinteisessä ja guava-patentoidussa mikrokapillaarisysteemissä (Guava® Flow Cytometry easyCyte™ Systems).

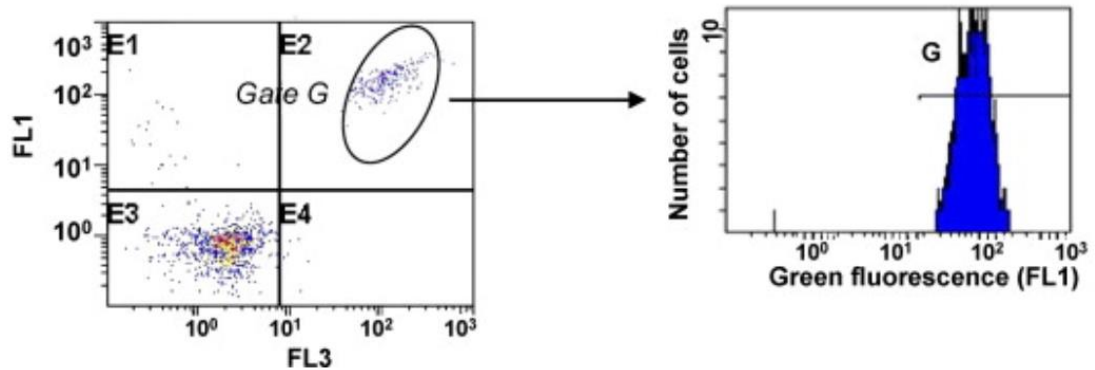
Virtaussytometrin valonlähteenä käytetään yleensä 1–3 laseria. Näistä käytetyin on sininen laser, joka tuottaa valoa aallonpituudella 488 nm. Laitteissa on usein myös punainen (630 nm) ja violetti laser (300–400 nm). (Adan ym. 2017.) Kun solut valaistaan laserilla, solujen aiheuttama valon hajonta kertoo solun rakenteellisista ja toiminnallisista ominaisuuksista. Valonlähteen edessä olevat detektorit mittaavat solusta eteenpäin siroavaa valoa eli FS:ää (=forward scatter) ja sivussa olevat detektorit mittaavat valon sivusuuntaista hajoamista eli SS:ää (=side scatter) (kuva 2). Eteenpäin siroava valo antaa tietoa solun koosta ja sivusuuntainen hajoaminen kertoo solujen kompleksisuudesta, joten näitä parametrejä voidaan käyttää solupopulaatioiden erottamiseen toisistaan. (Diaz ym. 2010; Introduction to flowcytometry.)



Kuva 2. Solun aiheuttama valon siroaminen virtaussytometrissä (Introduction to flow cytometry).

Useilla lasereilla mahdollistetaan erilaisten fluoresoivien väriaineiden eli fluorokromien käyttäminen solujen tai niiden eri osien havaitsemiseksi. Fluorokromilla värjätystä solusta mitataan sen emittoimaa fluoresenssia, kun solua eksitoidaan laserilla sopivalla aallonpituudella. (Aebisher ym. 2017.) Esimerkiksi bakteerisolumäärien laskemiseen voidaan käyttää DNA:han sitoutuvia väriaineita, kuten SYBR-greeniä (Singh ym. 2019).

Virtausmittaus mittaa solun aiheuttamia hajontasignaaleja ja useita fluoresenssiparametreja käytettävissä olevien lasereiden ja detektorien määrän mukaan, minkä jälkeen signaali analysoidaan ohjelmistolla. Erityisesti kiinnostavia alueita tai populaatioita voidaan valita asettamalla portteja (kuva 3). Solut pyritään myös erottamaan taustasta, roskista tai muista pienistä hiukkasista. (Diaz ym. 2010.)

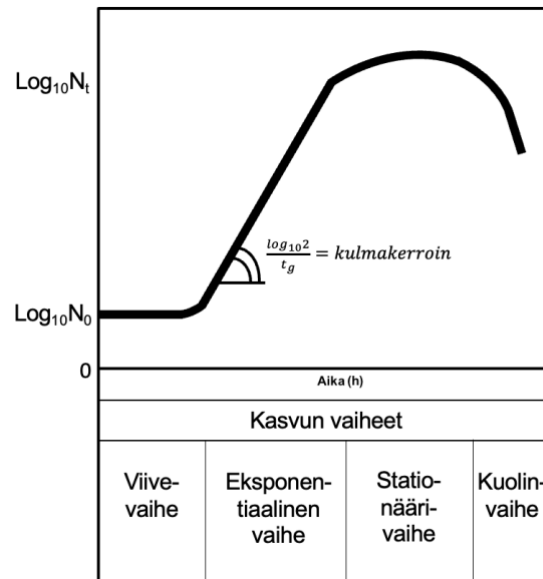


Kuva 3. Asettamalla portteja (vasemmassa kuvassa G) voidaan tutkia erilaisten solupopulaatioiden ominaisuuksia virtausmittausohjelmistolla (Diaz ym. 2010).

2.5 Bakteerien kasvuvaiheet ja kasvunopeus eli generaatioaika

Bakteerien kasvunopeus määritellään solulukumäärän lisääntymisenä (Solubiologia: Kasvu ja lisääntyminen). Yleensä bakteereilla on aluksi uudessa kasvatusliuoksessa ns. viivevaihe, jonka aikana solut eivät lisääny vaan sopeutuvat uusiin olosuhteisiin. Tämän jälkeen kasvu tapahtuu eksponentiaalisena eli bakteerien lukumäärän logaritmi kasvaa lineaarisesti ajan funktiona, mikäli olosuhteet ovat vakait. Tämä tapahtuu yleensä nopeasti.

Lopulta solujen kasvu estyy joko ravintoaineiden loppumisen tai aineenvaihduksen haitallisten lopputuotteiden kertymisen takia eli seuraa ns. stationäärivaihe. Solulukumäärä säilyy vakiona, koska soluja kuolee ja syntyy yhtä paljon. Tämän jälkeen solut alkavat kuolla. (Solubiologia: Mikrobipopulaation kasvuvaiheet.) Kuvassa 4 on esitelty bakteerien kasvun vaiheet.



Kuva 4. Bakteerien kasvun vaiheet (Bakteerien kasvun määrittäminen, muokattu lähteestä).

Generaatioaika (t_g) on aika (h), joka kuluu bakteeripopulaation kahdentumiseen eksponentiaalisen kasvun aikana. Kun populaation alkuperäinen solulukumäärä kahdentuu ajassa t_g , tällöin solulukumäärä (N) hetkellä t on $N_0 2^n$, jossa N_0 on alkuperäinen solulukumäärä ja n on jakautumisten määrä ajassa t . Saadaan kaava $N_t = N_0 2^n$. Tällöin generaatioaika t_g on $\frac{t}{n}$, josta voidaan johtaa, että n on $\frac{t}{t_g}$. (Bakteerien kasvun määrittäminen.)

Ratkaistaan n kaavasta $N_t = N_0 2^n$ ottamalla siitä logaritmi: $\log_{10} N_t = \log_{10} N_0 + n \log_{10} 2$. Sijoitetaan edelliseen kaavaan $n = \frac{t}{t_g}$, jolloin saadaan kaava:

$\log_{10}N_t = \log_{10}N_0 + \frac{\log_{10}2}{t_g} \cdot t$. Kun bakteerin kasvatusliuoksesta määritettyjen solulukumäärien logaritmi (\log_{10}) ilmoitetaan kasvatusajan funktiona, generaatioaika (t_g) voidaan laskea saadun suoran kulmakertoimesta ($\frac{\log_{10}2}{t_g}$) (kuva 4). Generaatioaika t_g on siten: (Bakteerien kasvun määrittäminen.)

$$t_g = \frac{\log_{10}2}{\text{kulmakerroin}} = \frac{0,301}{\text{kulmakerroin}}$$

2.6 Genomiperustaiset kasvunopeusmallit

Bakteerien generaatioajat vaihtelevat minuuteista muutamiin päiviin. Generaatioaikoja mitataan tyypillisesti laboratoriokasvatuksissa, joiden olosuhteet eivät välttämättä ole sopivia, koska aina ei ole tarpeeksi tietoa kyseisen lajin fysiologiasta. Lisäksi laboratoriokasvatuksissa on tutkittu enemmän helposti ja nopeasti kasvatettavia bakteereita. Kuitenkin luonnossa on monia elinympäristöjä, kuten meri ja maaperä, joissa on paljon hitaasti kasvavia mikrobeja. (Weissmann ym. 2021.)

Viime vuosina bakteerien kasvunopeuksien määrittämiseksi on kehitelty genomipohjaisia tietokoneohjelmia (Vieira-Silva & Rocha 2010; Weissmann ym. 2021). Genomisekvensseistä voidaan siten ennustaa kasvunopeuksia lajeille, joiden kasvattaminen laboratoriossa on vaikeaa. Lisäksi ohjelmat tarjoavat mahdollisuuden analysoida mikrobien metagenominäytteitä eli kokonaisen eliöyhteisön geenejä eri ympäristöistä. Siten voidaan saada selville kokonaiskuva kyseisen yhteisön bakteerien kasvunopeuksista verrattuna muihin elinympäristöihin. (Weissmann ym. 2021.)

Vieira-Silvan & Rochan (2010) mukaan kasvunopeutta pystytään parhaiten ennustamaan ribosomaalisia proteiineja koodaavien geenien tai muiden runsaasti ilmentyvien geenien kodonikäytön poikkeamalla. Geenin koodissa samaa aminohappoa voi koodata useampi kodoni, mutta on havaittu, että geenien koodeissa toistuu usein vain yksi kodoni monista vaihtoehdoista. Tätä

sanotaan kodonikäytön poikkeamaksi. Sen on havaittu olevan yleisempää nopeakasvuisilla bakteerilajeilla. (Vieira & Rocha 2010.)

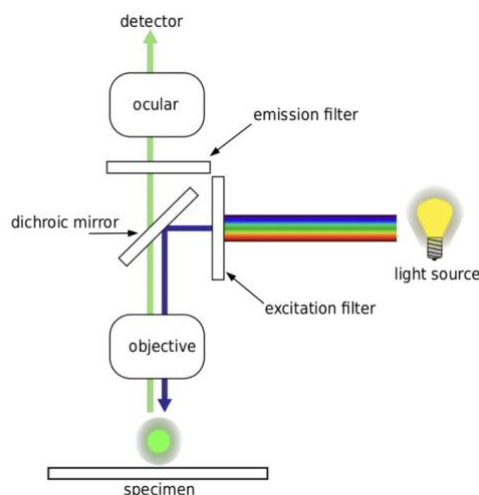
Weissmann ym. (2021) kehittivät gRodon-ohjelman kasvunopeuksien arvioimiseksi Vieira-Silvan & Rochan (2010) kodonikäytön poikkeamaan perustuvan growthpred-ohjelman pohjalta. Weissmannin ym. (2021) mukaan gRodon-ohjelman laskemat generaatioajat vaikuttavat olevan luotettavia jopa viiteen tuntiin asti. Toisaalta ohjelman laatimisessa on käytetty vain vähän ääriämpötiloissa kasvavia mikrobeja, joten niiden osalta ohjelman perusteella ei kannata tehdä kovin pitkälle meneviä johtopäätöksiä (Weissmann ym. 2021). Yli viiden tunnin generaatioajoilla ohjelma pystyy ennustamaan ainoastaan mikrobin hidaskasvuisuuden, mutta ei sitä, kuinka hitaasti mikrobi kasvaa. Mallin arviot ovat tässä tapauksessa yleensä aliarvioita. (Predicting maximal growth rates with gRodon.)

2.7 Fluoresenssimikroskopia

Fluoresenssimikroskopiassa hyödynnetään aineiden kykyä absorboida valon lyhyitä ultravioletin tai sinisen alueen aallonpituuksia ja emittoida valoa pidemmällä aallonpituuksilla, kuten vihreällä tai punaisella. Lamppujen valonlähteenä käytetään yleensä ksenonia tai elohopeaa, mutta käytössä on myös led- ja laserlamppuja. Jos näyte ei itse fluoresoi, se voidaan värjätä fluorokromeilla, jolloin näyte nähdään kirkkaana tummaa taustaa vasten. (Rijal 2022a; Tortora ym. 2021: 82–83.) Tyypillisiä fluoresoivia värejä ovat DAPI, akridiinioranssi ja auramiini-rodamiini (Rijal 2022a). Akridiinioranssia käytetään yleisesti fluoresenssimikroskopiassa mikrobien tutkimiseen. Se kulkeutuu solujen sisään ja sitoutuu nukleiinihappoihin. (Rijal 2022b.)

Kun fluoresoivaa näytettä tarkastellaan fluoresenssimikroskoopissa, elohopealampun tuottamat lyhyemmät aallonpituudet (UV tai sininen valo) menevät läpi eksitaatiosuodattimesta. Dikroidinen peili heijastaa valon näytteeseen, jolloin näytteen fluorokromit absorboivat lyhytaallonpituista valoa ja emittoivat dikroidisen peilin kautta pidemmän aallonpituista valoa

emissiosuodattimen läpi. Mikroskoopin okulaarissa nähdään silloin fluorokromeilla leimattuja mikrobeja tummaa taustaa vasten. (Rijal 2022a.) Fluoresenssimikroskoopin osat on esitelty kuvassa 5.



Kuva 5. Fluoresenssimikroskoopin osat (Rijal 2022a).

2.8 EcoPlate-kuoppalevyt

Bakteerien kykyä hyödyntää erilaisia hiiliyhdisteitä voidaan tutkia esimerkiksi Biolog EcoPlate -kuoppalevyjen avulla. EcoPlate-levyissä on 31 eri hiiliyhdistettä 96-kuoppaisella levyllä. Ne on suunniteltu mikrobien ekologian ja mikrobiyhteisöjen tutkimista varten ja niiden avulla on tutkittu mm. maaperän, veden ja jäteveden mikrobeja. (Biolog EcoPlate™.) Taulukossa 1 on esitelty EcoPlate-kuoppalevyjen sisältämät hiiliyhdisteet ja niiden luokittelu Weberin & Leggen (2009) mukaan.

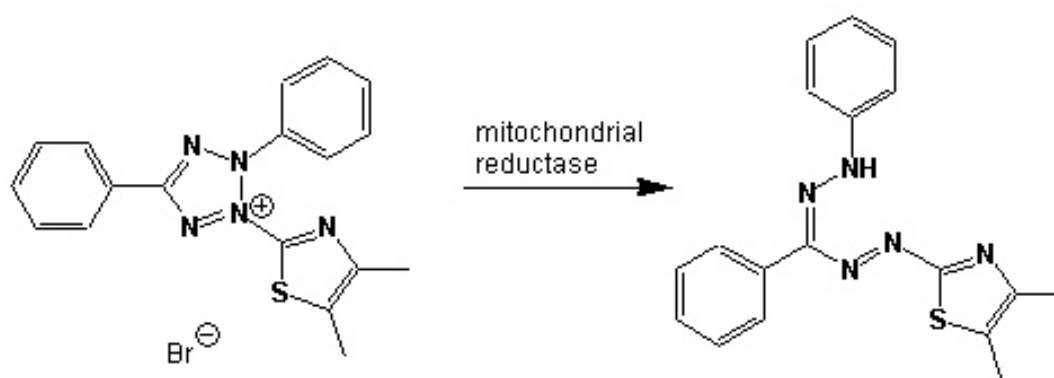
Taulukko 1. Ecoplate-kuoppalevyjen sisältämät hiiliyhdisteet ja niiden luokittelu (Weber & Legge 2009).

Hiiliyhdiste	Luokittelu
Metyylipyruvaatti	hiilihydraatti
Tween 40	kompleksinen hiilenlähde

Hiiliyhdiste	Luokittelu
Tween 80	kompleksinen hiilenlähde
Alfasyklodekstriini	kompleksinen hiilenlähde
Glykogeeni	kompleksinen hiilenlähde
D-sellobioosi	hiilihydraatti
Alfa-D-laktoosi	hiilihydraatti
Beta-metyyli-D-glukosidi	hiilihydraatti
D-ksyloosi	hiilihydraatti
I-erytrioli	hiilihydraatti
D-mannitoli	hiilihydraatti
N-asetyyli-D-glukosamiini	hiilihydraatti
D-glukosamiinihappo	karboksyylihappo
Glukoosi-1-fosfaatti	hiilihydraatti
D, L-alfa-glyserolifosfaatti	hiilihydraatti
D-galaktonihappo gamma-laktoni	karboksyylihappo
D-galakturonihappo	karboksyylihappo
2-hydroksibentsoehappo	karboksyylihappo
4-hydroksibentsoehappo	karboksyylihappo
Gamma-aminovoihappo	karboksyylihappo
Itakonihappo	karboksyylihappo
Alfaketovoihappo	karboksyylihappo
D-hydroksibutaanidihappo	karboksyylihappo
L-arginiini	aminohappo
L-asparagiini	aminohappo
L-fenyylialaniini	aminohappo
L-seriini	aminohappo
L-treoniini	aminohappo
Glysyili-L-glutamiinihappo	aminohappo

Hiiliyhdiste	Luokittelu
Fenyylityyliamiini	amiini
Putreskiini	amiini

EcoPlate-kuoppalevyissä jokainen hiiliyhdiste esiintyy kolmena replikaattina ja lisäksi kolme kuoppaa toimii kontrollikuoppina ilman hiilenlähdettä. Jokaisessa kuopassa on myös väritöntä tetrazolium-väriainetta. Kun bakteeri hajottaa kuopassa olevaa hiiliyhdistettä, muodostuu NADH:ta, joka pelkistää tetrazolium-väriaineen, jolloin se muuttuu värittömästä violetiksi formatsaaniksi (kuva 6). (Weber & Legge 2010.)



Kuva 6. Tetrazolium-väriaineen pelkistyminen formatsaaniksi (M465: Biolog Ecoplates).

Jos bakteerin genomissa ei ole kyseisen hiiliyhdisteen hajotukseen tarvittavan entsyymien geeniä, värinmuutosta ei tapahdu. Jos bakteerin respiraatio on hidasta tai pysähtynyt, värinmuutosta ei myöskään tapahdu. (Vehkala ym. 2015.) Tulos luetaan joko silmämääräisesti värin muodostuksen perusteella tai mittaamalla näytteen absorbanssia aallonpituudella 590 nm Microstation-laitteella (Biolog EcoPlate™).

3 Materiaalit ja menetelmät

3.1 Tutkitut bakteerikannat

Tutkittavista bakteerikannoista 12 kantaa oli kerätty Antarktikselta Weddellinmeren 1-vuotisesta ajojäästä vuonna 2013 sekä Terra Nova Bayn merijäästä vuonna 2015. Näiden lisäksi mukana oli kaksi bakteerikantaa arktisen alueen merijäästä Huippuvuorten pohjoispuolelta vuodelta 2015. Näytteet oli säilötty 15-prosenttiseen glyseroliin $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:seen. (Eronen-Rasimus 2023; N-ICE2015.) Bakteerikannat tunnuksineen ja alkuperäalueineen on esitelty taulukossa 2 (Eronen-Rasimus 2023).

Taulukko 2. Tutkitut bakteerikannat ja niiden alkuperä.

Bakteerikanta	Alkuperä
<i>Psychrobacter</i> sp. 118	Terra Nova Bay 2015
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 121	Terra Nova Bay 2015
<i>Pseudomonas</i> sp. 132	Terra Nova Bay 2015
<i>Leifsonia xyli/Rhodoglobus</i> sp. 140	Terra Nova Bay 2015
<i>Halomonas</i> sp. 363	Weddellinmeri 2013
<i>Paraglaciecola</i> sp. 372	Weddellinmeri 2013
<i>Paracoccus</i> sp. 392	Weddellinmeri 2013
<i>Colwellia</i> sp. 403	Weddellinmeri 2013
<i>Octadecabacter</i> sp. 405	Weddellinmeri 2013
<i>Polaribacter</i> sp. 408	Weddellinmeri 2013
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 415	Weddellinmeri 2013
<i>Octadecabacter</i> sp. 419	Weddellinmeri 2013
<i>Psychrobacter</i> sp. N1	Arktinen meri 2015
<i>Psychrobacter</i> sp. N73	Arktinen meri 2015

3.2 Kasvualustat

Jääbakteereita kasvatettiin modifioidulla ZoBell-agarmaljoilla sekä vastaavassa kasvatusliuoksessa. Maljat valmistettiin sekoittamalla 15 g agarua (Sigma-Aldrich), 33 g Reef Crystals -suolaa (Aquarium Systems), 5 g peptonia (Sigma-Aldrich), 1 g hiivauutetta (Sigma-Aldrich) ja 1 litra Milli Q -vettä. Kasvatusliuos valmistettiin samoista aineista ilman agarua. Kasvatusalustoja kutsutaan tästä eteenpäin RC-alustoiksi Reef Crystals -suolan mukaan. Seoksia keitettiin 1 minuutti, jonka jälkeen ne autoklavoitiin 121 °C:ssa 20 minuuttia. Agar kaadettiin maljoille laminaarissa ja agarin annettiin jähmettyä n. 2 tuntia. Valmiit maljat säilytettiin 4 °C:ssa.

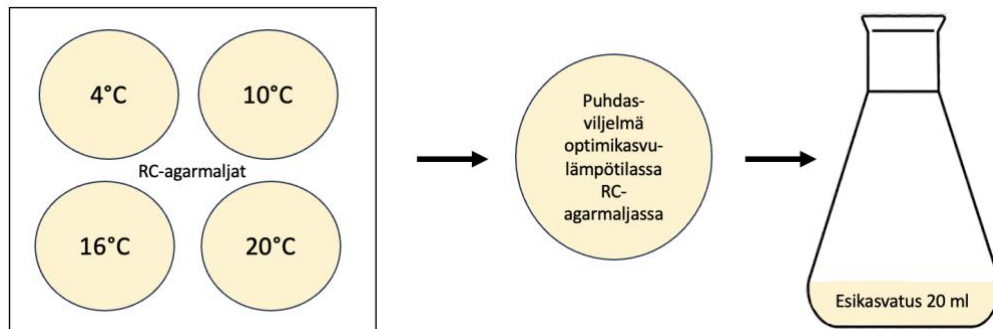
Esikasvatuspulloina käytettiin 50 ml:n erlenmayer-pulloja, joihin kaadettiin 20 ml RC-kasvatusliuosta. Varsinaisina kasvatuspulloina käytettiin 500 ml:n klett-pulloja, joihin kaadettiin 200 ml RC-kasvatusliuosta. Pullot suljettiin foliokorkilla ja ne autoklavoitiin 121 °C:ssa 20 minuuttia. Kasvatuspullot säilytettiin huoneenlämpötilassa foliokorkilla suljettuina.

3.3 Bakteerien esikasvatus ja optimikasvulämpötilan määrittäminen

Jääbakteerit siirrostettiin superpakastimesta glyseroliin säilötyistä näytteistä pipetoimalla riittävästi sulanutta liuosta RC-agarmaljoille (4 maljaa/bakteeri) laminaarissa. Liuos levitettiin maljoille lasisauvoilla hajotusviljelynä. Maljat inkuboitiin 4, 10, 16 ja 20 °C:ssa.

Bakteerien kasvua maljoilla seurattiin päivittäin ja optimikasvulämpötilaksi valittiin se lämpötila, jossa bakteeri muodosti pesäkkeitä nopeimmin. Tämän lämpötilan maljasta tehtiin puhdasviljelmä siirrostamalla yksi pesäke hajotusviljelynä uudelle maljalle. Optimikasvulämpötilassa inkuboidusta puhdasviljelmästä siirrostettiin yksi erillispesäke esikasvatuspulloon, jossa oli 20 ml RC-liuosta. Tästä poikettiin *Polaribacter* sp. 408 -kannan kohdalla, sillä se ei

lähtenyt kasvuun yhdestä pesäkkeestä vaan bakteerimassaa siirrostettiin suurempi määrä esikasvatuspulloon. Esikasvatuspulloja inkuboitiin optimilämpötilassa ravistelijalla (120 rpm), kunnes kasvatusliuos sameni. Kuvassa 7 on esitelty jääbakteerien esikasvatusmenetelmä.



Kuva 7. Jääbakteerien esikasvatusmenetelmä RC-alustoilla.

3.4 Kasvukäyrän muodostaminen turbiditeettimittauksella

Samentunutta esikasvatusliuosta siirrostettiin 1 ml klett-pulloihin, joissa oli 200 ml kasvatusliuosta. Kolmen bakteerikannan kohdalla tästä tehtiin poikkeus, sillä kannat *Colwellia* sp. 403, *Polaribacter* sp. 408 ja *Octadecabacter* sp. 419 eivät lähteneet kasvuun 1 ml:n siirrostuksella. Esikasvatusliuosta siirrostettiin 19 ml klett-pulloon, jotta kasvatus saatiin käynnistymään. Kuvassa 8 on esitelty RC-liuosta sisältäviä klett-pulloja, joiden kylkeen liitetystä koeputkesta pystytään mittaamaan kasvatusliuoksen absorbanssi suoraan.



Kuva 8. RC-kasvatusliuosta sisältäviä klett-pulloja.

Klett-pulloja inkuboitiin optimilämpötilassa ravistelijalla (120 rpm) ja samalla bakteerien kasvua seurattiin mittaamalla ajoittain klett-pullostsa absorbanssi (OD_{600}) turbiditeettimittarilla (Biochrom Ultrospec 10), kunnes bakteerin kasvu oli saavuttanut stationäärivaiheen tai turbiditeettimittarin asteikko oli käytetty loppuun. Absorbanssi mitattiin kahtena rinnakkaisena ja niistä laskettiin keskiarvo. Bakteerin kasvukäyrä muodostettiin ilmoittamalla absorbanssi ajan funktiona. Turbiditeettimittausten yhteydessä liuoksesta otettiin 930 μ l:n näyte, johon lisättiin 70 μ l 16-prosenttista paraformaldehydiä (Alfa Aesar) ja näyte pakastettiin superpakastimeen (-80 °C).

3.5 Bakteerien solulukumäärien mittaaminen virtaussytometrillä

Klett-kasvatuksista otettujen bakteerinäytteiden solulukumäärät selvitettiin virtaussytometrin (Guava easyCyte SL) avulla. Näytteistä valittiin mitattavaksi 5–6 eksponentiaalisen vaiheen näytettä. Superpakastimessa olleet näytteet sulatettiin huoneenlämmössä. Näytteistä tehtiin 10-kertainen laimennos 1-prosenttiseen Tris-EDTA-puskuriin (pH 8, VWR). Laimennoksiin lisättiin 1 tippa 0,5-prosenttista Triton X -liuosta (valmis liuos) ja niitä sonikoitiin kaksi minuuttia jäävesihauteessa ultraäänilaitteessa (Bandelin Sonorex Digitec).

Mitattavat näytteet tehtiin kahtena rinnakkaisena edellä mainitusta 10-kertaisesta laimennoksesta. Rinnakkaisnäytteitä laimennettiin 1-prosenttisella Tris-EDTA-puskurilla tarvittavissa määrin. Näytteisiin lisättiin 3 μ l SYBR R Green -väriainetta (valmis liuos), ne vorteksoitiin ja siirrettiin huoneenlämmössä pimeään 10 minuutiksi ennen analysointia virtaussytometrillä. Näytteiden laimentamistarve (50–2500 x) määritettiin seuraamalla virtaussytometrin laskemaa solulukumäärää, jonka tulisi olla 250–750 solua/ μ l luotettavan tuloksen saamiseksi. Mikäli tulos ei ollut annetulla välillä, näytteestä tehtiin uusi laimennos ja se määritettiin uudestaan.

Virtaussytometrissä käytettiin sinistä laseria (488 nm) vihreällä detektorilla (kynnysarvo 500) ja saantoasetuksina käytettiin oletusasetuksia. Analysointiin käytettiin InCyte 4.5.25.2 -ohjelmistoa. Suomen ympäristökeskuksen tutkija Lumi Haraguchi sääti tarvittavat portit ja alueet InCyte-ohjelmistossa.

Virtaussytometrin määrittämät solulukumäärät/ml kerrottiin laimennoskertomella ja laskettiin rinnakkaisten näytteiden keskiarvona. Solulukumäärien keskiarvo/ml kerrottiin näytemäärällä (0,93 ml). Solulukumäärät (\log_{10}) ilmoitettiin kasvatusajan (h) funktiona ja generaationopeus laskettiin saadun suoran kulmakertoimen avulla.

3.6 EcoPlate-kuoppalevymenetelmä ja absorbanssimittaukset

Bakteerien kykyä hyödyntää erilaisia hiiliyhdisteitä tutkittiin Biolog Ecoplate -kuoppalevyjen avulla. Bakteerinäytettä otettiin siirrostussilmukalla kasvatusmaljalta ja sekoitettiin 10 ml:aan steriloitua natriumkloridiliuosta (33 g NaCl / 1 litra MilliQ-vettä). Näytteen turbiditeetti (OD_{600}) mitattiin turbiditeettimittarilla (Biochrom Ultrospec 10). Turbiditeetiksi tavoiteltiin arvoa 0,3–0,4, mutta useiden bakteerien kohdalla tämä ei ollut mahdollista, sillä maljalla ei kasvanut tarpeeksi bakteerimassaa. Bakteeriliuosta pipetoitiin 100 μ l Ecoplate-kuoppalevyn kuhunkin 96 kaivoon ja levyt inkuboitiin kyseisen bakteerin optimikasvulämpötilassa. Kuoppalevyjen absorbanssi mitattiin Biolog Microstation -laitteella (590 nm) kerran vuorokaudessa viikon ajan, jonka jälkeen levyt mitattiin kerran viikossa kolmeen viikkoon asti. Levyjä tarkasteltiin tämän jälkeen vielä viikoittain hitaasti kasvavien bakteerikantojen osalta seitsemään viikkoon asti.

3.7 Bakteerien käsittely fluoresenssimikroskooppitutkimuksia varten

Kustakin bakteerista säilöttiin näyte glutaraldehydiin mikroskooppitutkimuksia varten. Pipetoitiin 1 ml samentunutta esikasvatusliuosta kryoputkeen, johon lisättiin 50 μ l glutaraldehydiä. Sekoittamisen jälkeen näytteet säilytettiin 4 °C:ssa jääkaapissa.

Mikroskooppitutkimuksia varten näytteet suodatettiin imusuodatuslaitteistolla. Laitteistoon asetettiin 0,2 µm:n selluloosa-asettaattifiltteri (Sartorius Stedim Biotech) ja sen päälle musta 0,2 µm:n polykarbonaattilevy (GVS Life Sciences). Laitteistoon lisättiin 2 ml MilliQ-vettä steriiliin 0,2 µm:n Minisart-ruiskusuodattimen läpi sekä pipetoitiin 10 µl bakteerinäytettä. Näyte suodatettiin kuiviin, minkä jälkeen se värjättiin akridiinioranssivärillä (valmis liuos). Väriä lisättiin 10 tippaa 0,2 µm:n Minisart-ruiskusuodattimen läpi ja annettiin vaikuttaa 5 minuuttia. Näyte suodatettiin kuiviin ja polykarbonaattilevy siirrettiin aluslasille immersioöljypisaroiden väliin ja peitettiin peitinlasilla. Näytteet mikroskoipoitiin fluoresenssimikroskoopilla (Leica Aristoplan) sinisellä valolla 1000 x suurennettuna samalla valokuvaamalla näytteet.

4 Tulokset

4.1 Kasvu eri lämpötiloissa ja optimikasvulämpötilan määrittäminen

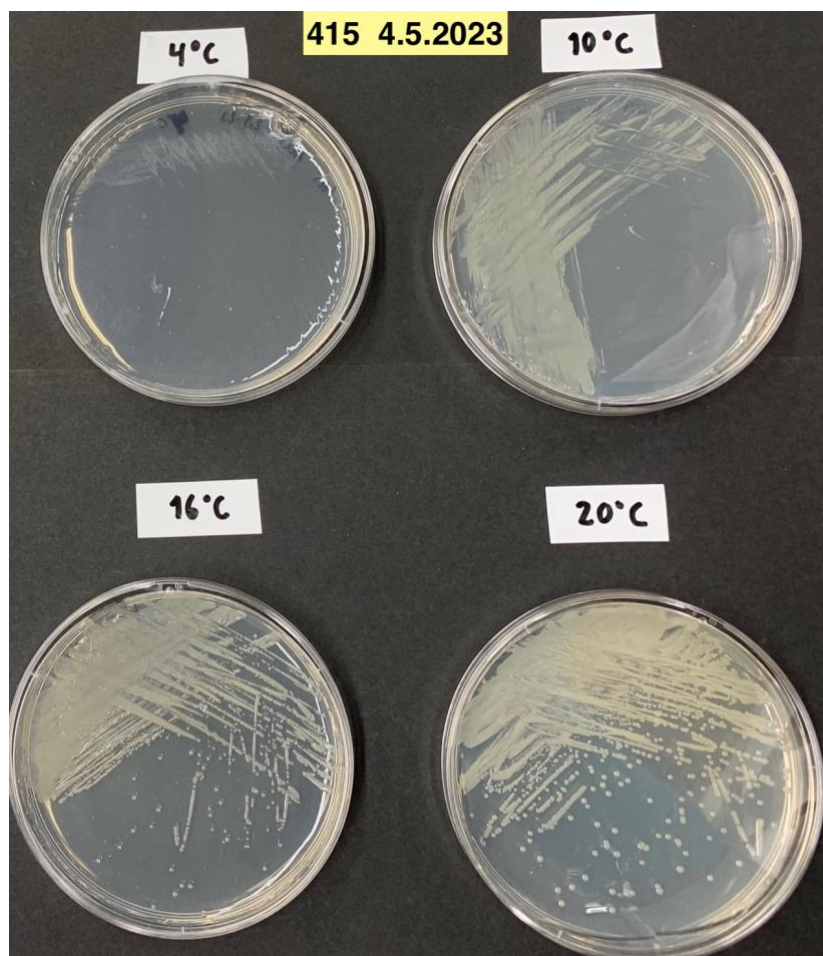
RC-agarmaljoilla kasvaneista bakteerikannoista hidaskasvuisimmat olivat *Octadecabacter* sp. 419 ja *Paraglaciecola* sp. 372, jotka muodostivat pesäkkeitä vain 4 ja 10 °C:n lämpötiloissa. Pesäkkeiden muodostus oli nopeinta 4 °C:n lämpötilassa molemmilla kannoilla. *Octadecabacter* sp. 419:llä tähän kului 32 vuorokautta ja *Paraglaciecola* sp. 372:lla viisitoista vuorokautta.

Colwellia sp. 403 ja *Polaribacter* sp. 408 muodostivat myös pesäkkeitä vain 4 ja 10 °C:n lämpötiloissa. Nopeimmin tämä tapahtui 10 °C:ssa, jossa *Colwellia* sp. 403 muodosti pesäkkeitä kuudessa päivässä ja *Polaribacter* sp. 408 kahdessatoista päivässä. *Octadecabacter* sp. 405 kasvoi 4 ja 10 °C:n lisäksi myös 16 °C:ssa, jossa se muodosti pesäkkeitä nopeimmin eli kymmenessä päivässä.

Muut tutkitut kannat muodostivat pesäkkeitä kaikissa kasvatuslämpötiloissa 2–19 päivän kuluessa. *Pseudoalteromonas* sp. 415 ja 121, *Halomonas* sp. 363, *Psychrobacter* sp. N1 ja *Paracoccus* sp. 392 kasvoivat nopeimmin 16 ja 20 °C:ssa, joissa ne muodostivat pesäkkeitä kahdessa vuorokaudessa. Lisäksi *Pseudoalteromonas* sp. 415 ja 121, *Halomonas* sp. 363 sekä *Psychrobacter* sp. 118, N1 ja N73 muodostivat pesäkkeitä kaikkiin lämpötiloihin viikon sisään.

Bakteerikannan optimikasvulämpötilaksi valittiin se lämpötila, jossa se muodosti pesäkkeitä nopeimmin. Mikäli pesäkkeitä muodostui samaan aikaan useammassa lämpötilassa, optimikasvulämpötilaksi valittiin se lämpötila, jossa pesäkkeet olivat isompia ja/tai niitä oli enemmän. Bakteerikantojen *Pseudoalteromonas* sp. 415 ja 121, *Halomonas* sp. 363, *Psychrobacter* sp. 118, *Leifsonia xyli/ Rhodoglobus* sp. 140 ja *Pseudomonas* sp. 132 optimikasvulämpötilaksi valittiin 20 °C. Kuvassa 9 on esitelty esimerkkinä *Pseudoalteromonas* sp. 415:n kasvu agarmaljoilla kahden vrk:n inkuboinnin jälkeen 4, 10, 16 ja 20 °C:n lämpötiloissa. Pesäkkeitä on muodostunut sekä 16

°C:seen että 20 °C:seen, mutta pesäkkeitä on enemmän ja ne ovat isompia 20 °C:ssa.



Kuva 9. *Pseudoalteromonas* sp. 415:n kasvu agarmaljoilla kahden vrk:n inkuboinnin jälkeen 4, 10, 16 ja 20 °C:ssa.

Bakteerikantojen *Psychrobacter* sp. N1 ja N73, *Paracoccus* sp. 392 ja *Octadecabacter* sp. 405 optimikasvulämpötilaksi valittiin 16 °C. *Colwellia* sp. 403:n ja *Polaribacter* sp. 408:n optimikasvulämpötilaksi määritettiin 10 °C ja *Paraglaciecola* sp. 372:n ja *Octadecabacter* sp. 419:n optimikasvulämpötilaksi määritettiin 4 °C.

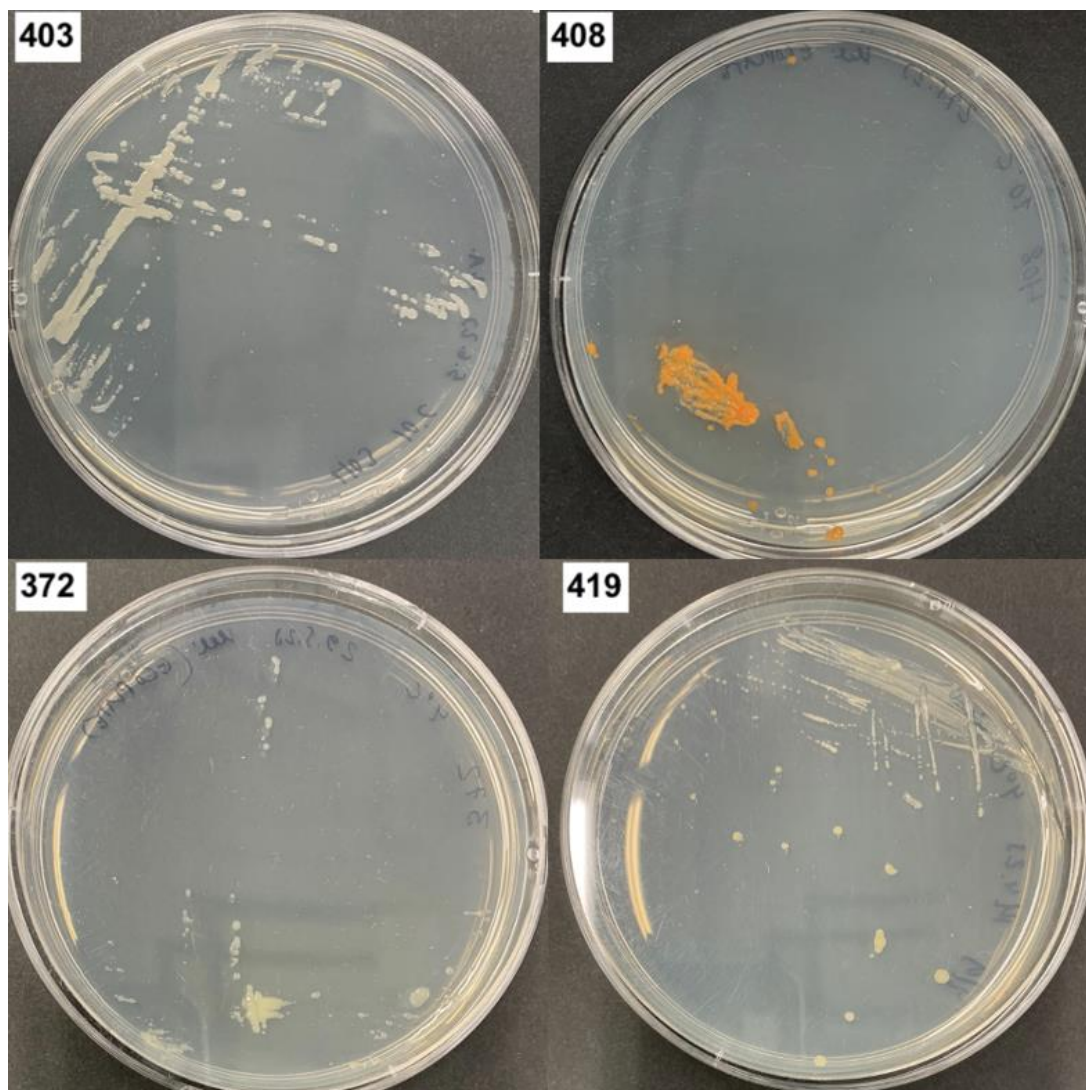
Taulukossa 3 on esitelty pesäkkeiden muodostumiseen kulunut aika päivissä (d) eri lämpötiloissa. Taulukkoon on myös merkitty tummennetulla värillä bakteerin optimikasvulämpötila.

Taulukko 3. Pesäkkeiden muodostumiseen kulunut aika päivissä (d) eri lämpötiloissa. Tummennetulla värillä merkitty tulos ilmoittaa bakteerin optimikasvulämpötilan.

Bakteerikanta	4 °C	10 °C	16 °C	20 °C
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 121	6	2	2	2
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 415	6	3	2	2
<i>Halomonas</i> sp. 363	7	6	2	2
<i>Psychrobacter</i> sp. 118	6	4	4	4
<i>Pseudomonas</i> sp. 132	11	6	4	4
<i>Leifsonia xyli/ Rhodoglobus</i> sp.140	19	9	5	5
<i>Psychrobacter</i> sp. N1	6	3	2	2
<i>Paracoccus</i> sp. 392	15	6	2	2
<i>Psychrobacter</i> sp. N73	7	4	4	4
<i>Octadecabacter</i> sp. 405	25	14	10	-
<i>Colwellia</i> sp. 403	8	6	-	-
<i>Polaribacter</i> sp. 408	18	12	-	-
<i>Paraglaciecola</i> sp. 372	15	21	-	-
<i>Octadecabacter</i> sp. 419	32	39	-	-

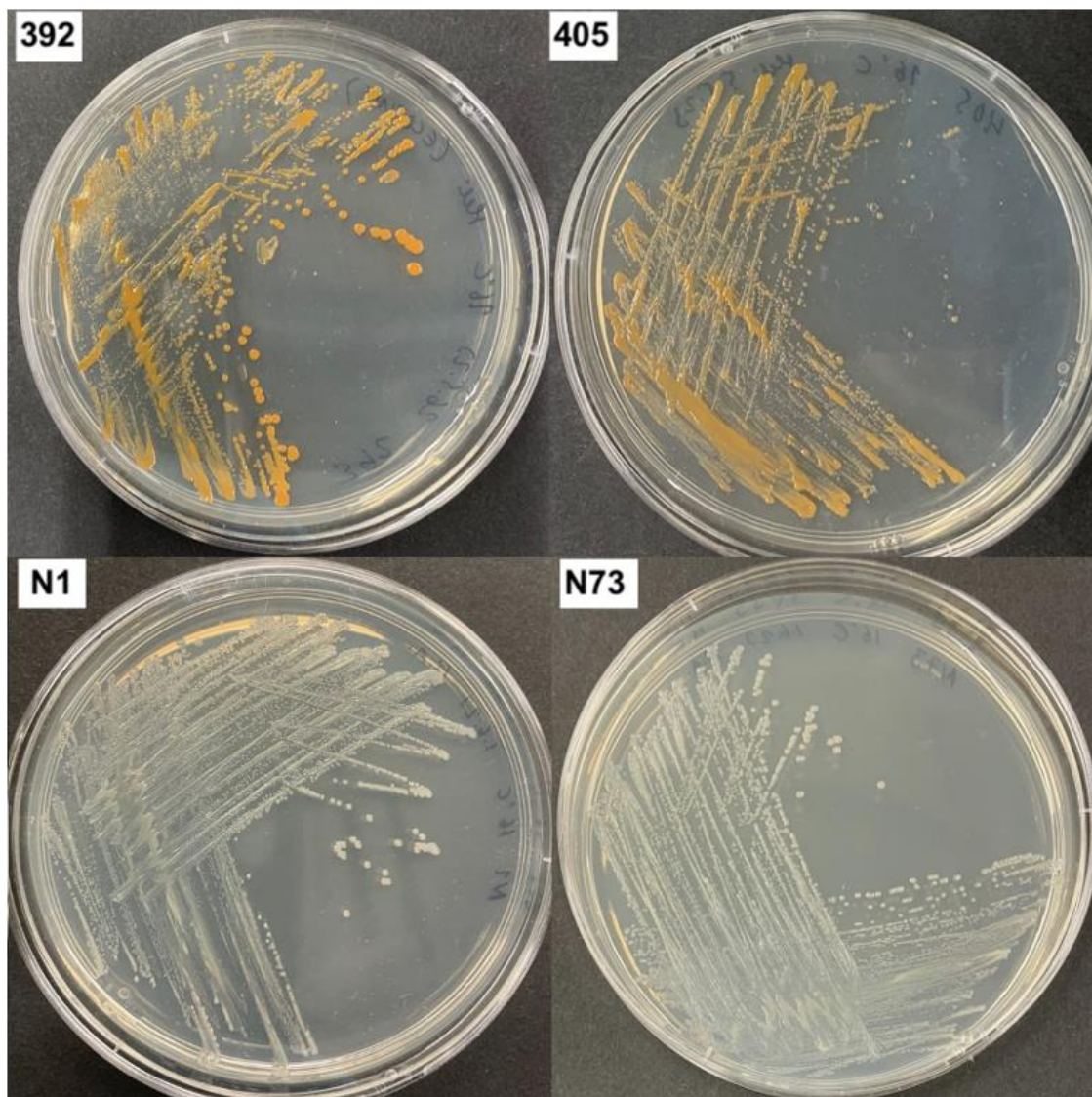
4.2 Bakteerikantojen pesäkkeiden ulkonäkö RC-maljoilla

Neljän ja kymmenen asteen lämpötiloissa kasvaneiden bakteerien pesäkkeiden muodostus ja kasvu RC-maljoilla oli heikkoa. Kymmenessä asteessa kasvanut *Colwellia* sp. 403 muodosti kermanvärisiä isohkoja pesäkkeitä ja *Polaribacter* sp. 408 kasvatti isohkoja oransseja pesäkkeitä. Neljässä asteessa kasvaneiden kantojen, *Paraglaciecola* sp. 372 ja *Octadecabacter* sp. 419, pesäkkeet olivat kermanvärisiä. Sekä *Paraglaciecola* sp. 372 että *Polaribacter* sp. 408 muodostivat hyvin vähän pesäkkeitä, ja ne kasvoivat enemmän yhtenäisenä massana kuin pesäkkeinä. Kuvassa 10 esitelty 4–10 °C:ssa kasvaneiden bakteerien pesäkkeet puhtasviljelmässä RC-maljoilla.



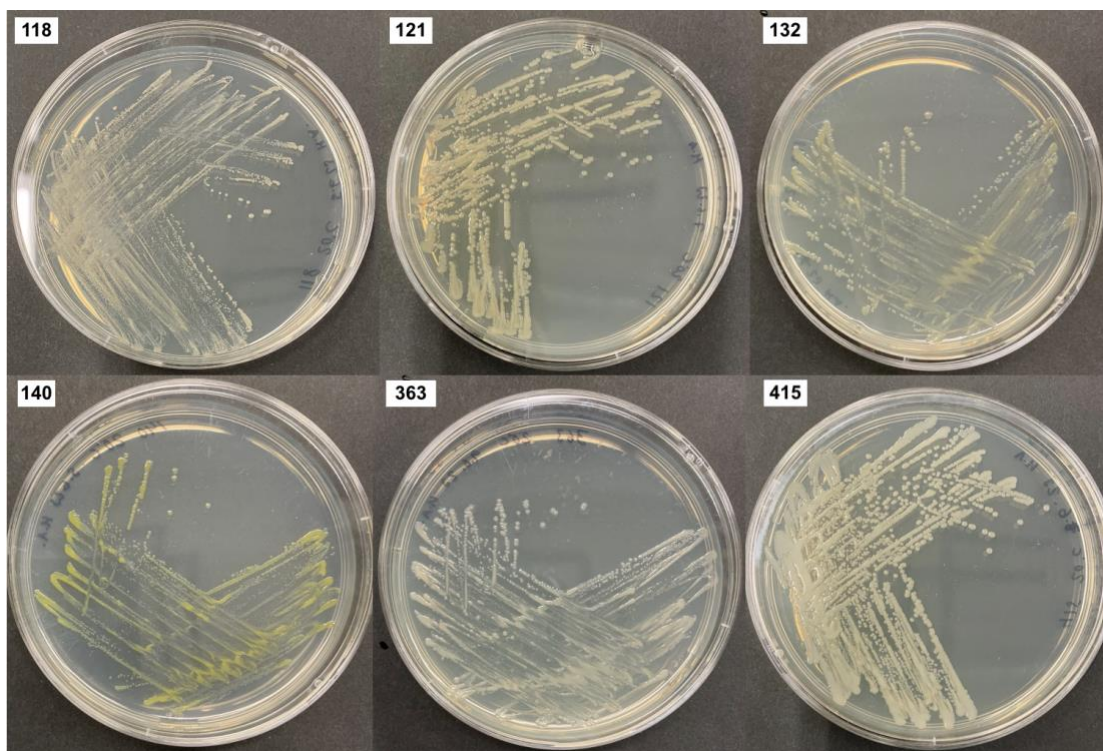
Kuva 10. Ylärivissä 10 °C:ssa kasvaneiden bakteerikantojen pesäkkeet ja alarivissä 4 °C:ssa kasvaneiden bakteerikantojen pesäkkeet puhtasviljelmässä RC-maljoilla.

Kuudessatoista asteessa kasvaneiden jääbakteerien pesäkkeet olivat pieniä ja pyöreitä. *Paracoccus* sp. 392:n ja *Octadecabacter* sp. 405:n pesäkkeet olivat oransseja ja *Psychrobacter* sp. N1:n ja N73:n pesäkkeet olivat kermanvärisiä. *Octadecabacter* sp. 405 muodosti alun perin heikosti pesäkkeitä 4–16 °C:ssa, mutta puhtasviljelmässä pesäkkeitä muodostui runsaasti. Kuvassa 11 on esitelty 16 °C:ssa kasvaneiden bakteerien pesäkkeet puhtasviljelmässä RC-maljoilla.



Kuva 11. Kuudessatoista asteessa kasvaneiden bakteerikantojen pesäkkeet puhtasviljelmässä RC-maljoilla.

20 asteessa kasvaneiden jääbakteerien pesäkkeet RC-maljoilla olivat pieniä ja pyöreitä. *Pseudomonas* sp. 132:n pesäkkeet olivat vaaleankeltaisia, mutta tämä ei näy kovin hyvin kuvassa 12. *Leifsonia xyli/Rhodoglobus* sp. 140:n pesäkkeet olivat keltaisia. Muiden samassa lämpötilassa kasvaneiden jääbakteerien pesäkkeet olivat kermanvärisiä, mutta kuvassa 12 puhtasviljelmien väri näyttää osalla kannoista tummemmalle kuin se oikeasti on.



Kuva 12. Kahdessakymmenessä asteessa kasvaneiden bakteerikantojen pesäkkeet puhtasviljelmässä RC-maljoilla.

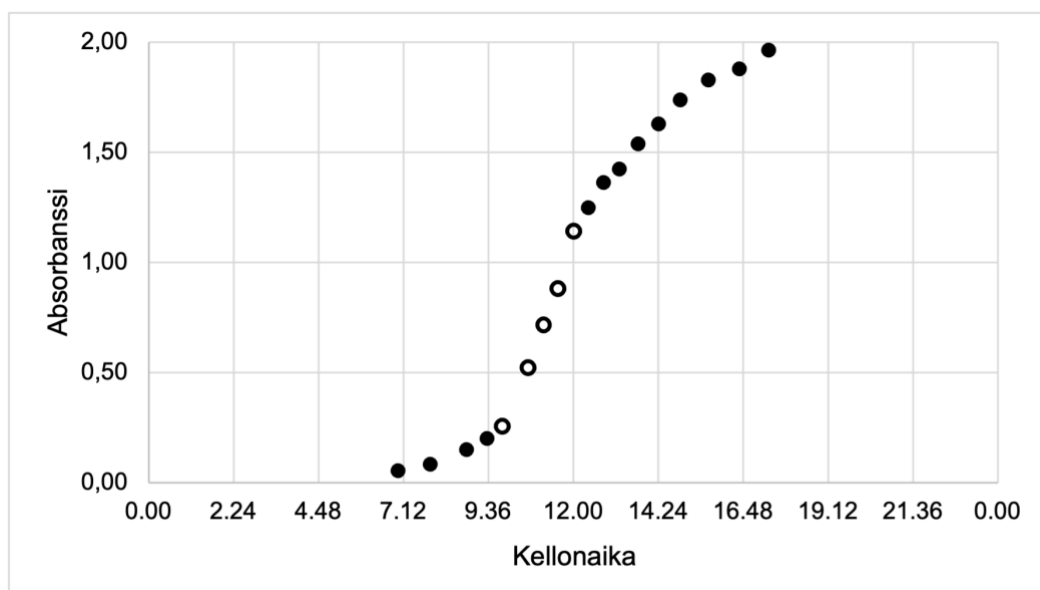
4.3 Kasvukäyrän muodostaminen turbiditeettimittausten perusteella

Bakteerin kasvukäyrä muodostettiin turbiditeettimittausten tulosten perusteella. Osa kannoista muodosti bakteerikasaumia kasvatusliuokseen, mikä vaikeutti turbiditeetin mittaamista. Bakteerikasaumia muodostaneita kantoja olivat *Psychrobacter* sp. 118, *Pseudomonas* sp. 132, *Colwellia* sp. 403, *Polaribacter* sp. 408, *Octadecabacter* sp. 419 & 405 ja *Paracoccus* sp. 392. Lisäksi kantojen *Psychrobacter* sp. 118, *Pseudomonas* sp. 132, *Colwellia* sp. 403, *Polaribacter* sp. 408 ja *Octadecabacter* sp. 419 kasvatukset jouduttiin uusimaan 2–3 kertaa tuloksen saamiseksi.

Kaikista bakteerikannoista saatiin määritettyä kasvukäyrät, mutta seuraavaksi on esitelty kasvukäyrät vain kuudelle bakteerikannalle, joiden tuloksia käytettiin jatkoanalyysissä. Syyt tähän on esitelty luvussa 4.4. Nämä kannat olivat

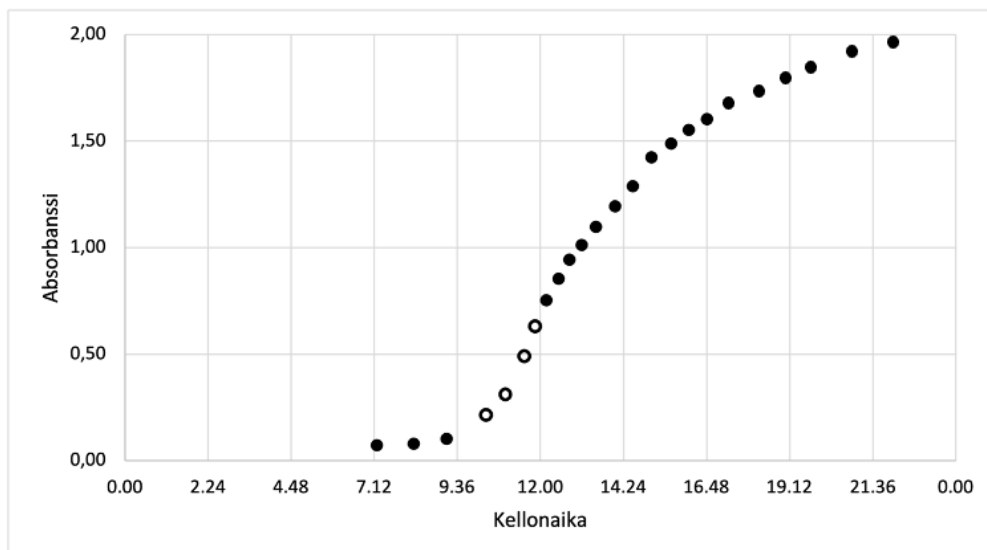
Pseudoalteromonas sp. 415 ja 121, *Leifsonia xyli/Rhodoglobus* sp. 140, *Colwellia* sp. 403, *Polaribacter* sp. 408 ja *Paraglaciecola* sp. 372.

Kahdessakymmenessä asteessa kasvaneen *Pseudoalteromonas* sp. 415:n kasvukäyrän määrittämiseen kului 10 tuntia. Viivevaihe vei n. 3 tuntia, ja eksponentiaaliseen vaiheeseen kului alle 6 tuntia. Kuvassa 13 on esitelty *Pseudoalteromonas* sp. 415:n kasvukäyrä. Avoimilla ympyröillä merkittyjen näytteiden solulukumäärät saatiin määritettyä virtausytometrillä.



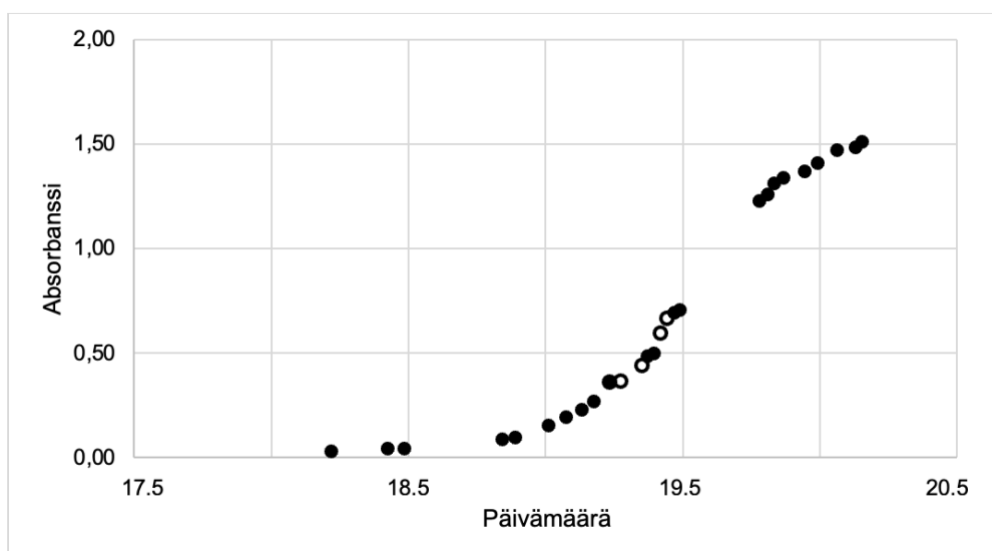
Kuva 13. *Pseudoalteromonas* sp. 415:n kasvukäyrä 20 °C:ssa turbiditeettimittauksen mukaan.

Kahdessakymmenessä asteessa kasvaneen *Pseudoalteromonas* sp. 121:n kasvukäyrän määrittämiseen kului 15 tuntia. Viivevaihe vei n. 3 tuntia, ja eksponentiaaliseen vaiheeseen kului alle 6 tuntia. Kuvassa 14 on esitelty *Pseudoalteromonas* sp. 121:n kasvukäyrä. Avoimilla ympyröillä merkittyjen näytteiden solulukumäärät saatiin määritettyä virtausytometrillä.



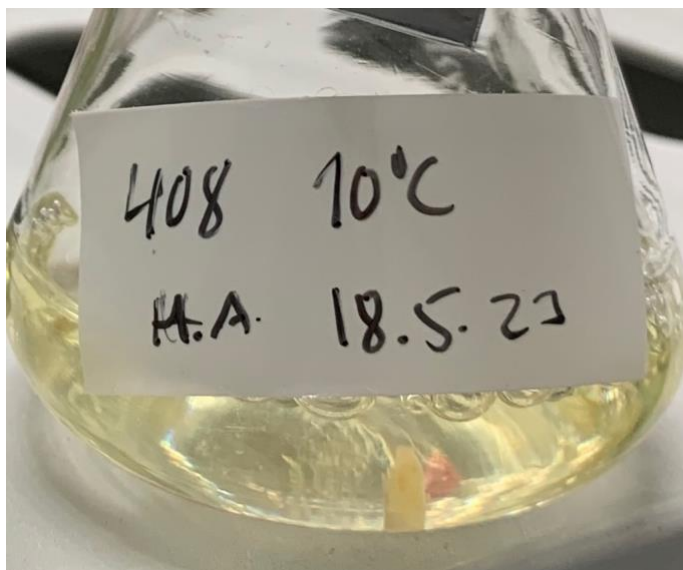
Kuva 14. *Pseudoalteromonas* sp. 121:n kasvukäyrä 20 °C:ssa turbiditeettimittauksen mukaan.

Kahdessakymmenessä asteessa kasvaneen *L. xyli/Rhodoglobus* sp. 140:n kasvukäyrän määrittämiseen kului kaksi vuorokautta. Viivevaihe vei alle vuorokauden, ja eksponentiaaliseen vaiheeseen kului alle 12 tuntia. Kuvassa 15 on esitelty *L. xyli/Rhodoglobus* sp. 140:n kasvukäyrä. Avoimilla ympyröillä merkittyjen näytteiden solulukumäärät saatiin määritettyä virtaussytometrillä.



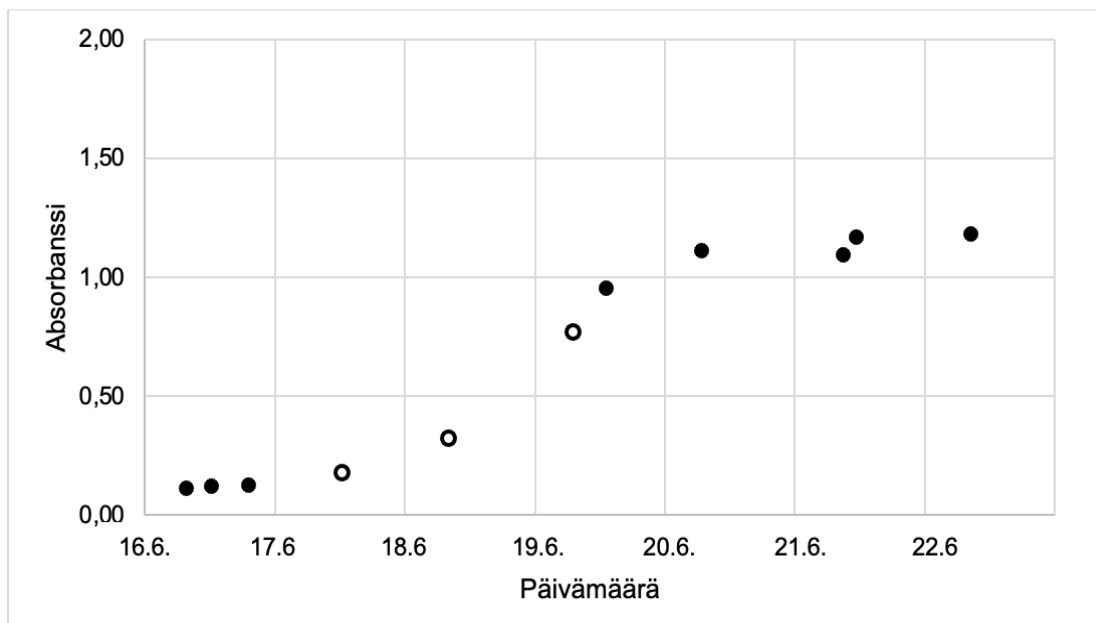
Kuva 15. *L. xyli/Rhodoglobus* sp. 140:n kasvukäyrä 20 °C:ssa turbiditeettimittauksen mukaan.

Kymmenessä asteessa kasvaneen *Polaribacter* sp. 408:n turbiditeettimittaukset tehtiin kolme kertaa, sillä se ei kasvanut kunnolla esikasvatusliuoksessa vaan muodosti bakteerikasaumia eikä liuos samentunut ollenkaan parin viikon kuluessa. Kuvassa 16 on näkyvissä *Polaribacter* sp. 408:n bakteerikasauma esikasvatuspullon alareunassa.



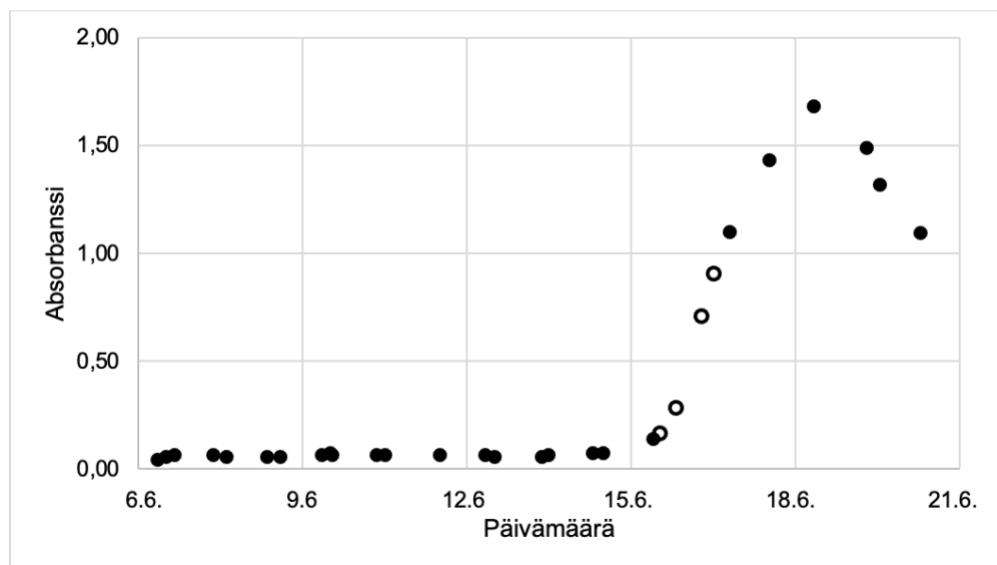
Kuva 16. *Polaribacter* sp. 408:n esikasvatuspullossa näkyvä bakteerikasauma.

Koska aikaa oli rajallisesti käytössä, näitä bakteerikasaumia kokeiltiin siirrostaa 1 ml:n esikasvatusliuoksen mukana klett-pulloon kasvukäyrän mittaamista varten, vaikka esikasvatusliuos ei ollut samentunut. Tämä ei tuottanut tulosta 25 vuorokauden, eikä samanaikaisesti tehty toinen kokeilu 19 ml:n siirrostuksella onnistunut myöskään. Lopulta kokeiltiin siirrostaa runsaasti bakteerimassaa RC-maljalta esikasvatusliuokseen. Liuos sameni kolmen vuorokauden kuluessa ja sitä siirrostettiin 19 ml klett-pulloon turbiditeettimittausta varten, minkä jälkeen kasvukäyrän määrittämiseen kului kuusi vuorokautta. Viivevaihe kesti yli vuorokauden, ja eksponentiaaliseen vaiheeseen kului kaksi vuorokautta. Kuvassa 17 on esitelty *Polaribacter* sp. 408:n kasvukäyrä. Avoimilla ympyröillä merkittyjen näytteiden solulukumäärät saatiin määritettyä virtaussytometrillä.



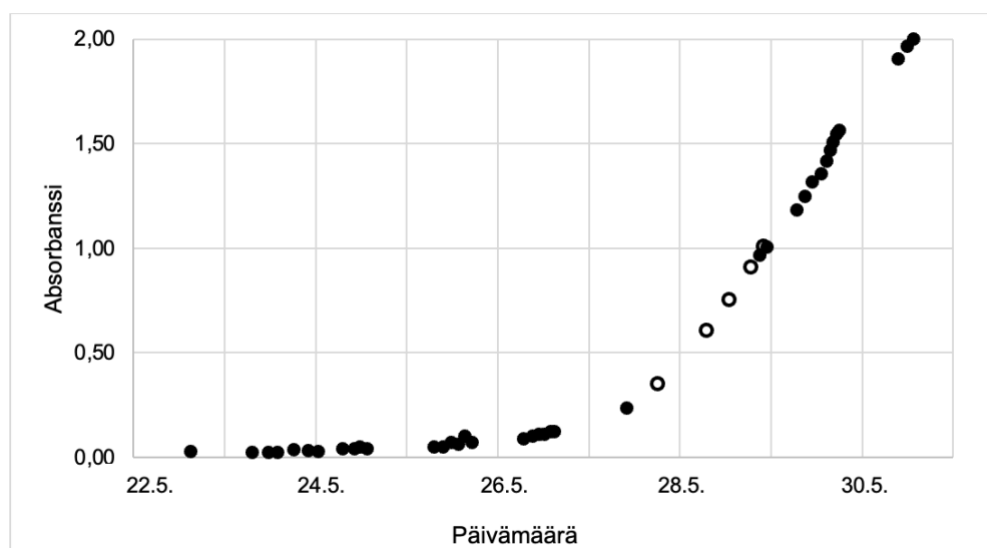
Kuva 17. *Polaribacter* sp. 408:n kasvukäyrä 10 °C:ssa turbiditeettimittauksen mukaan.

Kymmenessä asteessa kasvaneen *Colwellia* sp. 403:n turbiditeettimittaukset tehtiin myös kolme kertaa samoista syistä kuin edellä mainitulla *Polaribacter* sp. 408:lla. *Colwellia* sp. 403:n tapauksessa kolmannella kerralla yhden pesäkkeen siirrostuksesta tehty esikasvatusliemi sameni jonkin verran ja sitä siirrostettiin 19 ml klett-pulloon, minkä jälkeen kasvukäyrän määrittämiseen kului 14 vuorokautta. Viivevaihe kesti yhdeksän vuorokautta ja eksponentiaaliseen vaiheeseen kului noin vuorokausi. Kuvassa 18 on esitelty *Colwellia* sp. 403:n kasvukäyrä. Avoimilla ympyröillä merkittyjen näytteiden solulukumäärät saatiin määritettyä virtaussytometrillä.



Kuva 18. *Colwellia* sp. 403:n kasvukäyrä 10 °C:ssa turbiditeettimittauksen mukaan.

Neljässä asteessa kasvaneen *Paraglaciecola* sp. 372:n kasvukäyrän määrittämiseen kului kahdeksan vuorokautta. Viivevaihe kesti viisi vuorokautta, ja eksponentiaaliseen vaiheeseen kului 1,5 vuorokautta. Kuvassa 19 on esitelty *Paraglaciecola* sp. 372:n kasvukäyrä. Avoimilla ympyröillä merkittyjen näytteiden solulukumäärät saatiin määritettyä virtaussytometrillä.



Kuva 19. *Paraglaciecola* sp. 372:n kasvukäyrä 4 °C:ssa turbiditeettimittauksen mukaan.

Muilla bakteerikannoilla eksponentiaalivaihe vei nopeimmillaan alle 6 tuntia. Näitä olivat 20 °C:ssa kasvanut *Halomonas* sp. 363 ja 16 °C:ssa kasvaneet *Psychrobacter* sp. N1 ja N73. Alle 12 tunnin eksponentiaalivaiheen kävivät läpi 20 °C:ssa kasvaneet *Pseudomonas* sp. 132 ja *Psychrobacter* sp. 118 sekä 16 °C:ssa kasvaneet *Paracoccus* sp. 392 ja *Octadecabacter* sp. 405. Hitaimmillaan eksponentiaalivaihe kesti kaksi vuorokautta 4 °C:ssa kasvaneella *Octadecabacter* sp. 419 -kannalla. Muiden bakteerikantojen kasvukäyrät ovat nähtävissä liitteessä 1.

Liitteessä 1 esitellyistä kannoista 20 °C:ssa kasvaneet *Psychrobacter* sp. 118 ja *Pseudomonas* sp. 132 muodostivat runsaasti bakteerikasaumia ensimmäisellä kasvatuskerralla klett-pulloissa, mutta itse kasvatusliuos ei juurikaan samentunut. Turbiditeettimittaus ei onnistunut, koska bakteerikasaumat antoivat satunnaisesti vaihtelevia tuloksia eri kerroilla. Toisella kasvatuskerralla molemmat bakteerit muodostivat edelleen hieman kasaumia, mutta kasvatusliemi sameni ja turbiditeettimittaus onnistui. Kuvassa 20 on esitelty vasemmalla ja keskellä *Pseudomonas* sp. 132:n ensimmäinen kasvatuskokeilu ja oikealla toinen kasvatuskokeilu. Bakteerikasaumat ovat selkeästi nähtävissä vasemman puoleisessa ja keskimmaisessä kuvassa.



Kuva 20. Vasemmalla ja keskellä *Pseudomonas* sp. 132:n ensimmäinen kasvatuskokeilu ja oikealla toinen kasvatuskokeilu.

Liitteessä 1 esitellyistä kannoista myös *Octadecabacter* sp. 419:n turbiditeettimittaus tehtiin kahteen kertaan. Ensimmäisellä kerralla 1 ml:n siirrostus ei lähtenyt kasvuun viiteentoista vuorokauteen, joten kasvatus uusittiin siirrostamalla 19 ml esikasvatusliuosta, minkä jälkeen kasvu käynnistyi parissa vuorokaudessa.

4.4 Generaatioajan määrittäminen virtaussytometrianalyysin perusteella

Virtaussytometrianalyysin perusteella kaikille bakteerikannoille muodostui kaksi populaatiota: yksittäiset solut ja aggregoituneet solut eli bakteerikasaumat. Tämän lisäksi bakteerikannat jakoutuivat selkeästi kahteen ryhmään: 1) kannat, joilla oli enemmän yksittäisiä kuin aggregoituneita soluja ja 2) kannat, joilla oli enemmän aggregoituneita kuin yksittäisiä soluja.

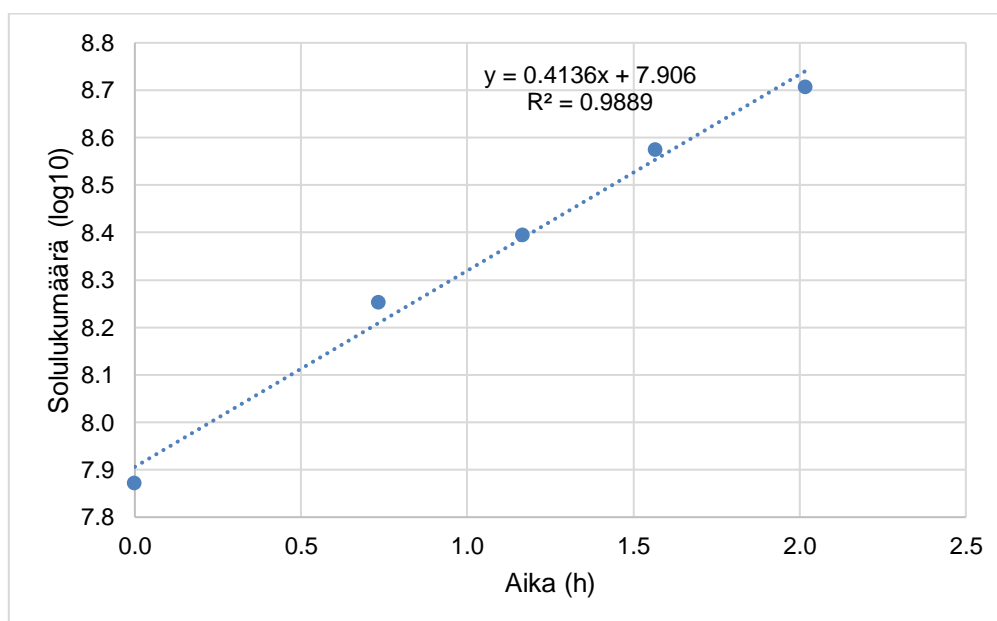
Ryhmän 2 bakteerikannat jätettiin pois lopullisesta tulosten tarkastelusta, koska ei voitu varmuudella todeta, onko virtaussytometri laskenut bakteerikasaumia vai yksittäisiä eri kokoisia soluja. Ryhmään 1 kuuluva *Octadecabacter* sp. 419 jäi myös pois tarkastelusta, koska sen yksittäisten solujen lukumäärät eivät kasvaneet lineaarisesti ajan funktiona. Lisäksi tuloksista jätettiin pois ne kannat, joiden solulukumääriä ei saatu luotettavasti määritettyä virtaussytometrillä. Nämä olivat *Psychrobacter* sp. 118 ja *Pseudomonas* sp. 132. Liitteessä 2 on esitelty kaikkien muiden bakteerikantojen paitsi kahden edellä mainitun kannan virtaussytometrillä määritetyt yksittäisten ja aggregoituneiden solujen lukumäärät.

Lopulliseen tarkasteluun otettiin edellisessä luvussa 4.3 mainitut kuusi bakteerikantaa, jotka kuuluivat ryhmään 1. Nämä kannat olivat *Pseudoalteromonas* sp. 415 ja 121, *Leifsonia xyli/Rhodoglobus* sp. 140, *Colwellia* sp. 403, *Polaribacter* sp. 408 ja *Paraglaciecola* sp. 372.

Generaatioajan laskemiseen käytettiin kunkin kannan eksponentiaalisen vaiheen näytteiden yksittäisten solujen lukumäärää. Solulukumäärät (\log_{10})

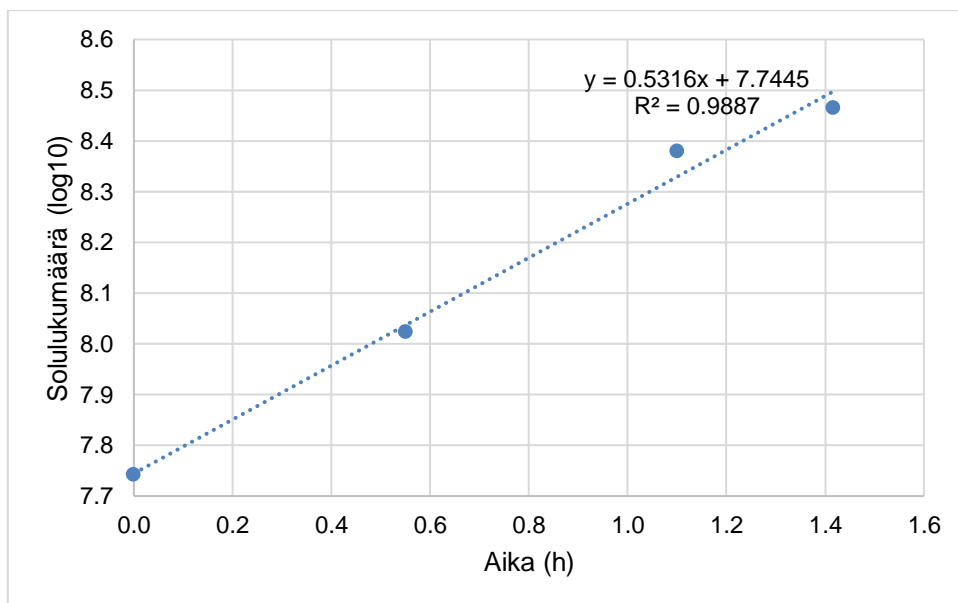
ilmoitettiin kasvatusajan (h) funktiona ja generaatioaika (t_g) tunteina laskettiin saadun suoran kulmakertoimesta kaavan $t_g = \frac{0,301}{\text{kulmakerroin}}$ avulla.

Kuvassa 21 on esitelty 20 °C:ssa kasvaneen *Pseudoalteromonas* sp. 415:n solulukumäärät (\log_{10}) ajan (h) funktiona eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa. Kulmakertoimesta laskettu generaatioaika oli $\frac{0,301}{0,4136} \approx 0,7$ tuntia. Suoran selitysaste (R^2) oli 0,9889.



Kuva 21. *Pseudoalteromonas* sp. 415:n solulukumäärät (\log_{10}) ajan (h) funktiona.

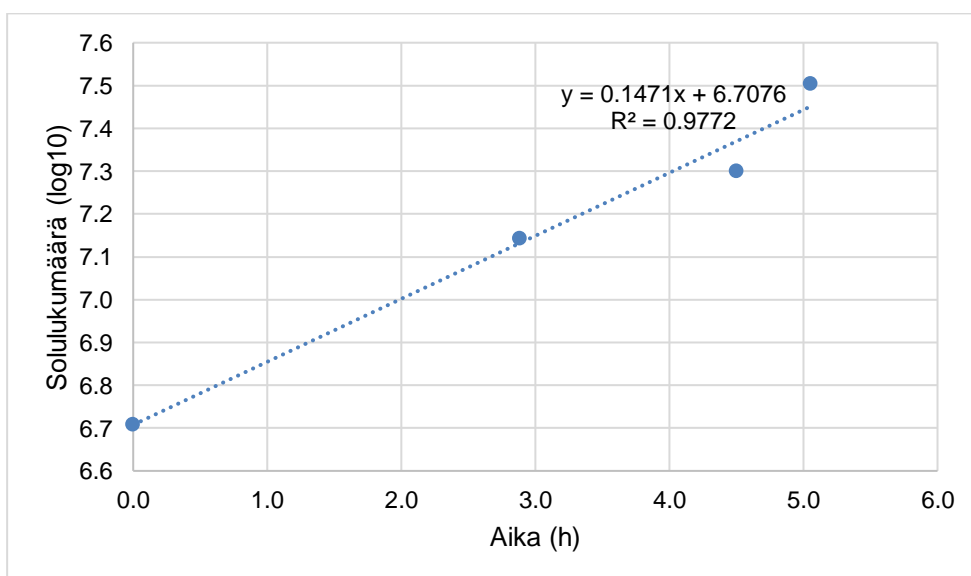
Kuvassa 22 on esitelty 20 °C:ssa kasvaneen *Pseudoalteromonas* sp. 121:n solulukumäärät (\log_{10}) ajan (h) funktiona eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa. Kulmakertoimesta laskettu generaatioaika oli $\frac{0,301}{0,5316} \approx 0,6$ tuntia. Suoran selitysaste (R^2) oli 0,9887.



Kuva 22. *Pseudoalteromonas* sp. 121:n soluluk määrät (log₁₀) ajan (h) funktiona.

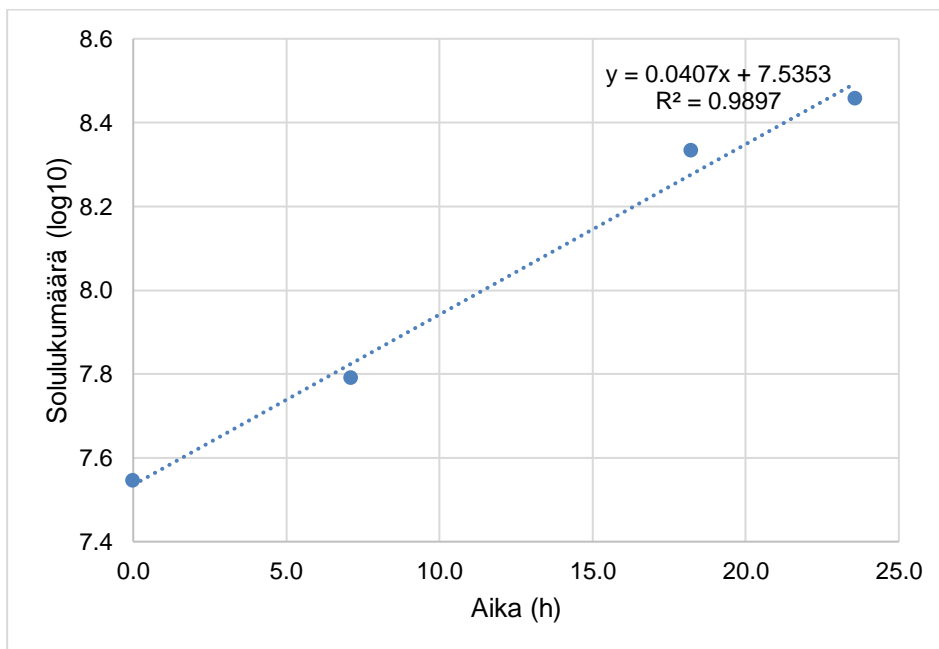
Kuvassa 23 on esitelty 20 °C:ssa kasvaneen *L. xyli/Rhodoglobus* sp. 140:n soluluk määrät (log₁₀) ajan (h) funktiona eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa.

Kulmakertoimesta laskettu generaatioaika oli $\frac{0,301}{0,1471} \approx 2,1$ tuntia. Suoran selitysaste (R²) oli 0,9772.



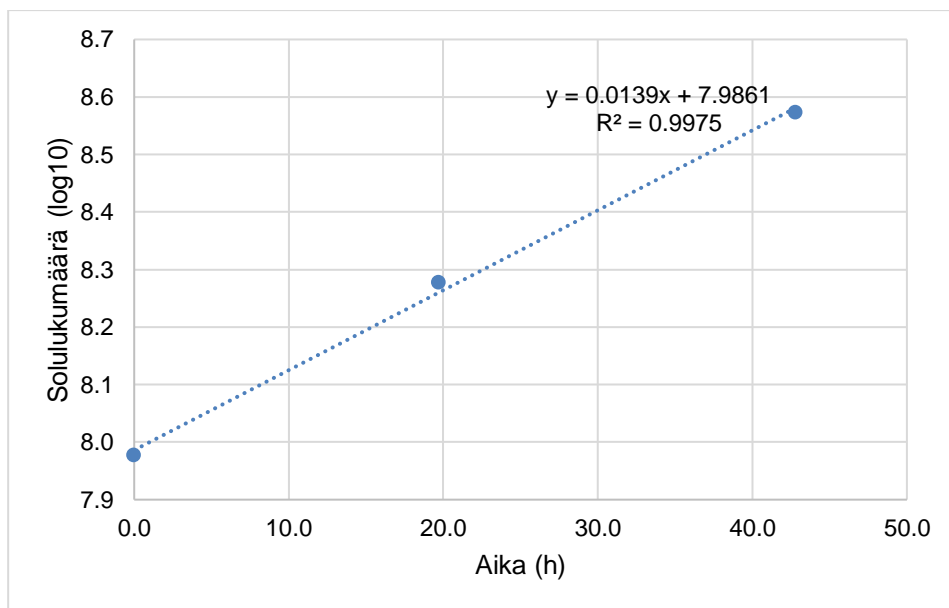
Kuva 23. *L. xyli/Rhodoglobus* sp. 140:n soluluk määrät (log₁₀) ajan (h) funktiona.

Kuvassa 24 on esitelty 10 °C:ssa kasvaneen *Colwellia* sp. 403:n solulukumäärät (\log_{10}) ajan (h) funktiona eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa. Kulmakertoimesta laskettu generaatioaika oli $\frac{0,301}{0,0407} \approx 7,4$ tuntia. Suoran selitysaste (R^2) oli 0,9897.



Kuva 24. *Colwellia* sp. 403:n solulukumäärät (\log_{10}) ajan (h) funktiona.

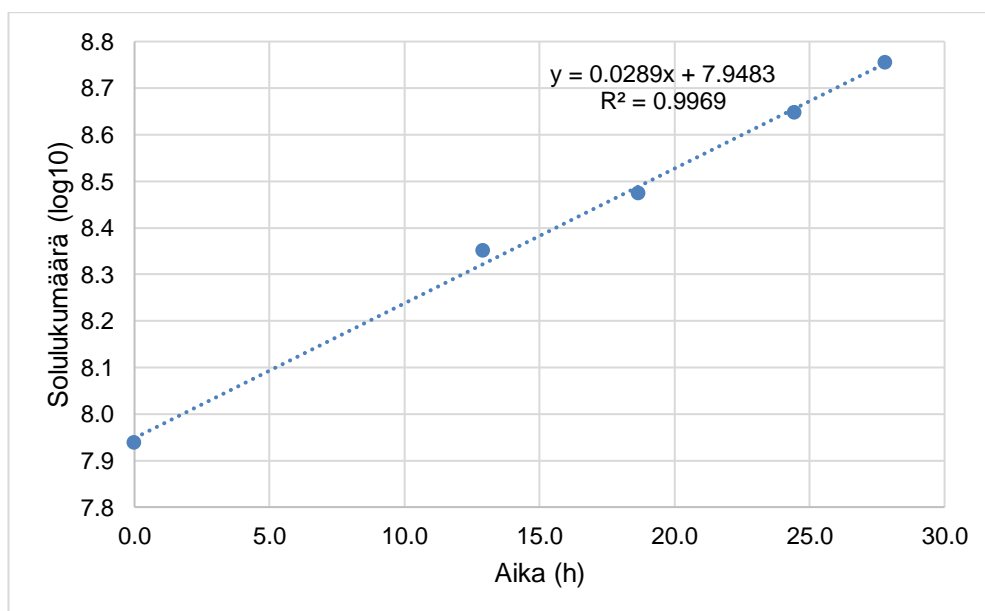
Kuvassa 25 on esitelty 10 °C:ssa kasvaneen *Polaribacter* sp. 408:n solulukumäärät (\log_{10}) ajan (h) funktiona eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa. Kulmakertoimesta laskettu generaatioaika oli $\frac{0,301}{0,0139} \approx 21,7$ tuntia. Suoran selitysaste (R^2) oli 0,9975.



Kuva 25. *Polaribacter* sp. 408:n solulukumäärät (log₁₀) ajan (h) funktiona.

Kuvassa 26 on esitelty 4 °C:ssa kasvaneen *Paraglaciecola* sp. 372:n solulukumäärät (log₁₀) ajan (h) funktiona eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa.

Kulmakertoimesta laskettu generaatioaika oli $\frac{0,301}{0,0289} \approx 10,4$ tuntia. Suoran selitysaste (R²) oli 0,9969.

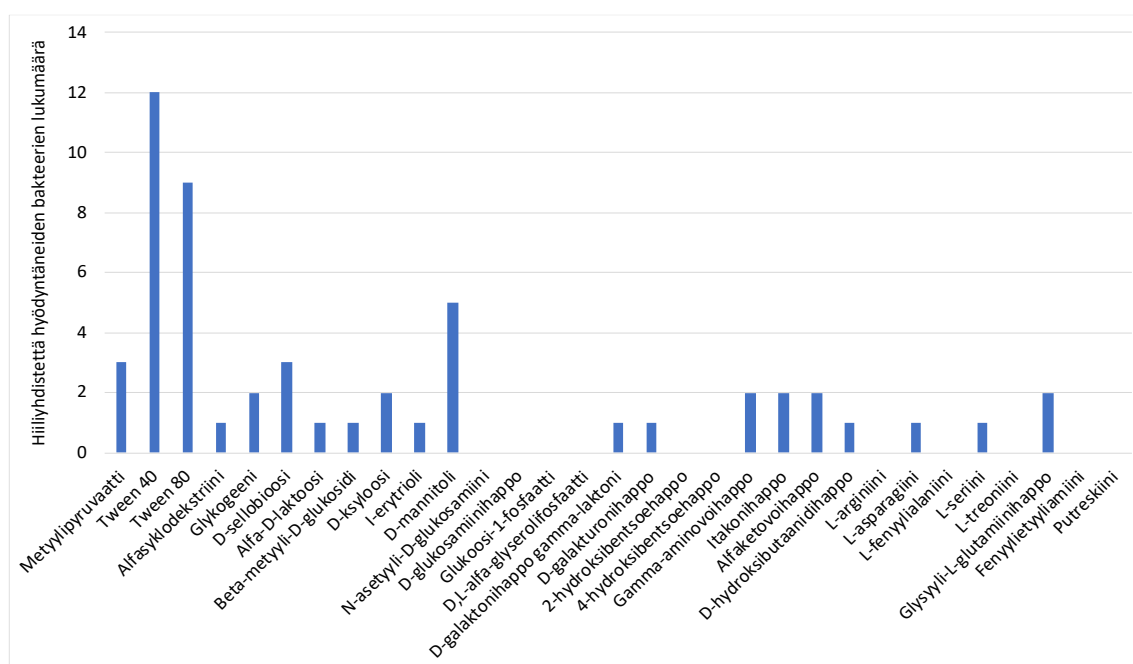


Kuva 26. *Paraglaciecola* sp. 372:n solulukumäärät (log₁₀) ajan (h) funktiona.

4.5 Hiiliyhdisteiden hyödyntäminen EcoPlate-kuoppalevyillä

EcoPlate-kuoppalevyjen tulokset analysoitiin kolmen viikon kuluttua inkuboinnin aloituksesta. Bakteerikannan tulkittiin hyödyntävän kaivossa olevaa hiiliyhdistettä, mikäli Biolog Microstation -laite tulkitsi kaksi kolmesta rinnakkaisesta kaivosta positiiviseksi. Lisäksi kaivojen värin muutosta tarkasteltiin paljain silmin. Hitaimmin kasvavat kannat tarkistettiin vielä 7 viikon kuluttua, jolloin tulos oli edelleen sama kuin kolmen viikon kohdalla.

Tutkimuksessa mukana olleet bakteerikannat käyttivät hiilenlähteinään yhteensä 20:tä hiiliyhdistettä 31:stä tarjolla olleesta hiilenlähteestä. Eniten käytetyt hiiliyhdisteet olivat Tween 40- ja Tween 80 -polymeerit. Seuraavaksi eniten käytettiin D-mannitolia, metyylipyruvaattia ja D-sellobioosia, jotka ovat hiilihydraatteja. Amino- ja karboksyylihapojen hyödyntäminen oli vähäistä, eikä amiineja käytetty ollenkaan. Kuvassa 27 on esitelty kutakin hiiliyhdistettä hyödyntäneiden bakteerikantojen lukumäärä.



Kuva 27. Kutakin hiiliyhdistettä hyödyntäneiden bakteerikantojen lukumäärä.

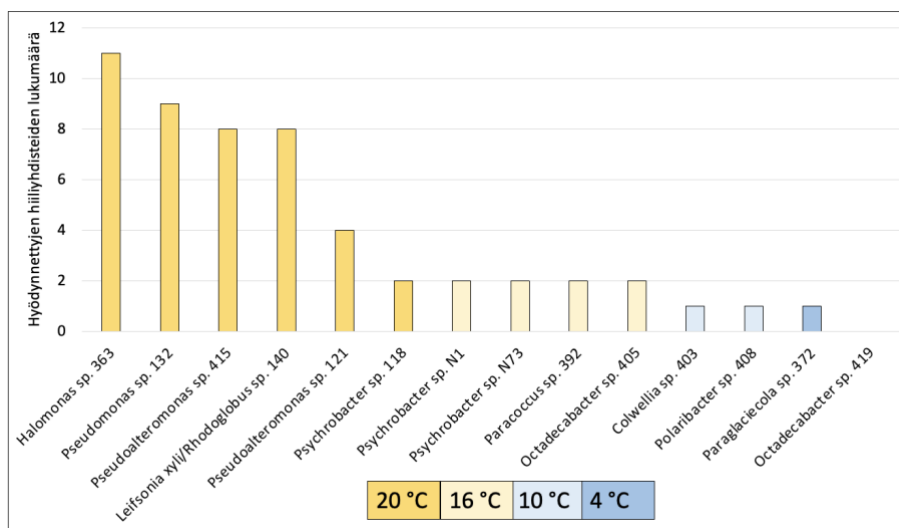
Yleisesti ottaen 20 °C:ssa kasvaneet bakteerikannat hyödynsivät enemmän erilaisia hiilenlähteitä kuin alhaisemmissa lämpötiloissa kasvaneet bakteerikannat. 20 °C:ssa kasvaneet bakteerit käyttivät yhteensä 20 erilaista hiilenlähdettä, kun 4–16 °C:ssa kasvaneet käyttivät yhteensä vain kahta erilaista hiilenlähdettä.

4 °C:ssa kasvaneista bakteerikannoista *Octadecabacter* sp. 419 ei hyödyntänyt mitään EcoPlate-kuoppalevyissä olevaa hiiliyhdistettä. *Paraglaciicola* sp. 372 hyödynsi vain Tween 40 -polymeeriä samoin kuin 10 °C:ssa kasvaneet *Polaribacter* sp. 408 ja *Colwellia* sp. 403. Näiden bakteerikantojen tulos perustui pelkästään laitteen antamaan positiiviseen tulokseen, sillä paljain silmin värin muutos ei ollut havaittavissa.

16 °C:ssa kasvaneet bakteerikannat, *Psychrobacter* sp. N1 ja N73, *Paracoccus* sp. 392 ja *Octadecabacter* sp. 405, hyödynsivät kukin vain kahta hiiliyhdistettä eli Tween 40- ja Tween 80 -polymeerejä. Näiden bakteerien useissa muissa kaivoissa oli havaittavissa värin muodostusta kaivojen pohjalla reunoissa, mutta Microstation-laite ei tulkinnut sitä positiiviseksi tulokseksi. Laite ei myöskään tulkinnut *Octadecabacter* sp. 405:n Tween 40- ja 80 -kaivoja positiivisiksi, mutta värinmuutos oli havaittavissa ko. kaivoissa paljain silmin, joten tulos tulkittiin positiiviseksi.

20 °C:ssa kasvaneet kannat hyödynsivät vaihtelevasti 2–11:tä eri hiiliyhdistettä. Suurin hiilenlähteiden määrä oli *Halomonas* sp. 363 -kannalla, joka ei kuitenkaan käyttänyt Tween 40- ja Tween 80 -polymeerejä, joita muut 20 °C:ssa kasvaneet kannat pystyivät hyödyntämään. *Halomonas* sp. 363 hyödynsi myös kuutta sellaista hiiliyhdistettä, joita muut kannat eivät käyttäneet. Näitä olivat hiilihydraatteihin kuuluvat alfa-D-laktoosi, beta-metyyli-D-glukosidi ja i-erytrioli, karboksyylihappoihin kuuluvat D-galaktonihappo gamma-laktoni ja D-hydroksibutaanidihappo sekä aminohappoihin kuuluva L-seriini. Kaikki muut 20 °C:ssa kasvaneet kannat, paitsi *Psychrobacter* sp. 118, käyttivät D-mannitolia. *Psychrobacter* sp. 118 hyödynsi vain Tween 40- ja Tween 80 -polymeerejä, kuten 16 °C:ssa kasvaneet saman suvun edustajat *Psychrobacter* sp. N1 ja

N73. Kuvassa 28 on esitelty eri bakteerikantojen hyödyntämien hiilenlähteiden lukumäärät kasvatuslämpötilan mukaan jaoteltuina.



Kuva 28. Bakteerikantojen hyödyntämien hiilenlähteiden lukumäärät kasvatuslämpötilan mukaan jaoteltuina.

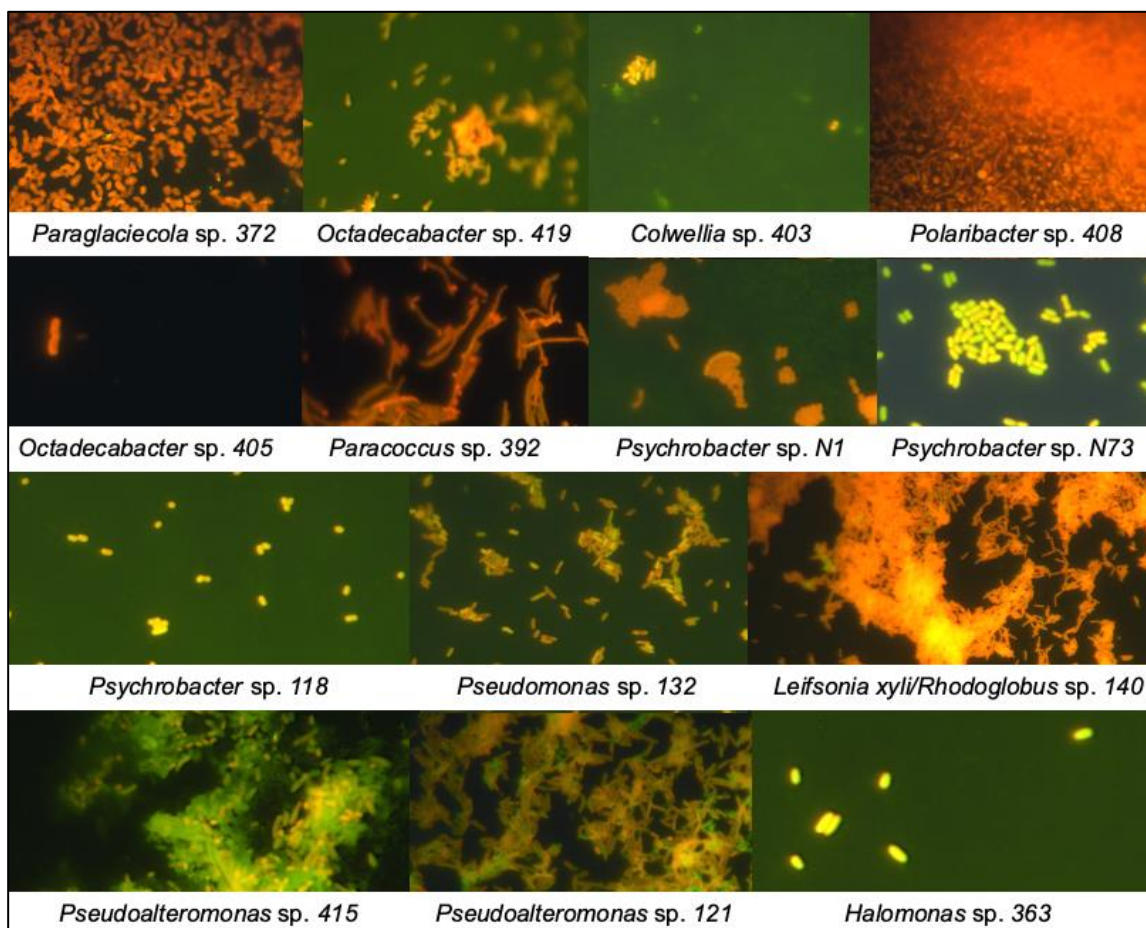
4.6 Bakteerien tarkastelu fluoresenssimikroskoopilla

Esikasvatusvaiheen samentuneesta kasvatusliuoksesta säilöttyjä bakteerinäytteitä tarkasteltiin fluoresenssimikroskoopissa akridiinioranssilla värjättyinä. Suurin osa bakteereista oli muodoiltaan basilleja eli sauvamaisia bakteereja, mutta joukossa on myös kolme kantaa, joiden muoto näyttää olevan enemmän kokkobasilli eli sauvamaisen ja pallomaisen bakteerin välimuoto. Nämä bakteerikannat ovat *Psychrobacter* sp. 118, *Paracoccus* sp. 392 ja *Paraglaciecola* sp. 372. Taulukkoon 4 on koottu eri bakteerikannat ja niiden muoto fluoresenssimikroskoopilla tarkasteltuna.

Taulukko 4. Bakterikantojen muoto fluoresenssimikroskoopilla tarkasteltuna.

Bakterikanta	Bakteerin muoto
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 121	basilli
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 415	basilli
<i>Halomonas</i> sp. 363	basilli
<i>Psychrobacter</i> sp. 118	kokkobasilli
<i>Leifsonia xyli/Rhodoglobus</i> sp. 140	basilli
<i>Pseudomonas</i> sp. 132	basilli
<i>Psychrobacter</i> sp. N1	basilli
<i>Psychrobacter</i> sp. N73	basilli
<i>Octadecabacter</i> sp. 405	basilli
<i>Paracoccus</i> sp. 392	kokkobasilli
<i>Colwellia</i> sp. 403	basilli
<i>Polaribacter</i> sp. 408	basilli
<i>Paraglaciecola</i> sp. 372	kokkobasilli
<i>Octadecabacter</i> sp. 419	basilli

Monet kannat, erityisesti *Pseudoalteromonas* sp. 121 ja 415, *Leifsonia xyli/Rhodoglobus* sp. 140 ja *Polaribacter* sp. 408, näyttivät muodostavan tiheitä kasauksia. Kuvaan 29 on koottu fluoresenssimikroskooppikuvat tutkituista bakterikannoista.



Kuva 29. Fluoresenssimikroskooppikuvat tutkituista bakteerikannoista.

5 Tulosten tarkastelu

5.1 Optimikasvulämpötila ja psykrofiilisyy

Tutkituista bakteerikannoista *Paraglaciecola* sp. 372, *Octadecabacter* sp. 419, *Colwellia* sp. 403 ja *Polaribacter* sp. 408 kasvoivat maljoilla vain 4 ja 10 °C:ssa. Nämä kannat ovat siten psykrofiilejä Moritan (1975) mukaan. *Octadecabacter* sp. 405 muodosti heikosti pesäkkeitä 4–16 °C:ssa, mutta se ei kasvanut 20 °C:ssa. *Octadecabacter* sp. 405 muodosti pesäkkeitä kuitenkin hyvin puhdasviljelmässä 16 C:ssa, joten alkuperäinen siirrostuksen määrä agarmaljoilla on saattanut olla liian pieni ja vaikuttanut siten kasvuun. *Octadecabacter* sp. 405 on myös psykrofiili. Muut tutkitut bakteerikannat ovat psykrotolerantteja, koska ne kasvoivat maljoilla 4–20 °C:ssa.

Optimikasvulämpötilan määrittämiseen käytettiin kiinteää alustaa, koska resurssien puolesta ei ollut mahdollista tutkia asiaa nestekasvatuksessa. Siten on mahdollista, että nyt määritetyt optimikasvulämpötilat ovat aliarvioita, koska kiinteän alustan ja nestekasvatuksen välillä optimikasvulämpötiloissa on havaittu olevan n. 5 asteen lämpötilaero (Bowman 2001: 606).

5.2 Jääbakteerien kasvattamisen haasteista laboratoriossa

Jääbakteerien kasvattaminen RC-alustoilla osoittautui haastavammaksi kuin oletettiin erityisesti turbiditeettimittausten osalta. Kaikkia kantoja oli kuitenkin aiemmin kasvatettu RC-alustoilla silloin, kun niistä oli jäänäyteestä eristyksen jälkeen tehty puhdasviljelmät (Eronen-Rasimus 2023). Lisäksi osaa bakteerikannoista oli kasvatettu RC-alustoilla muissa tutkimuksissa (Luhtanen ym. 2018). Jääbakteerien kasvua pyrittiin ennakoimaan esikasvatusten perusteella, mutta tämä onnistui harvoin. Useita kasvatuksia jouduttiin aloittamaan alusta, koska kasvukäyrän eksponentiaalinen vaihe oli osunut yöaikaan tai viikonloppuun. Näiden bakteerien sekä viivevaiheet että eksponentiaaliset vaiheet kestivät tyypillisimmillään muutamasta tunnista

useaan vuorokauteen RC-kasvatusliuoksessa, joten tästä seurasi muutenkin aikatauluhaasteita.

Monet kannat muodostivat RC-liuoksessa kasvaessaan ainakin jossain vaiheessa paljain silmin näkyviä bakteerikasaumia, joista osa vaikutti olevan biofilmimäisiä. Todennäköisesti näissä kasaumissa on ollut mukana myös EPS:ää, jota bakteerit erittävät olosuhteiden muuttuessa. EPS edistää myös solujen kasautumista (Boetius ym. 2015). Bakteerikasaumia muodostaneita kantoja olivat *Psychrobacter* sp. 118, *Pseudomonas* sp. 132, *Colwellia* sp. 403, *Polaribacter* sp. 408, *Octadecabacter* sp. 419 ja 405 ja *Paracoccus* sp. 392. Osalla näistä bakteereista kasaumien muodostuminen häiritsi sekä turbiditeetin mittaamista että virtausytometrämääryksiä. 20 °C:ssa kasvaneet kannat *Psychrobacter* sp. 118 ja *Pseudomonas* sp. 132 muodostivat bakteerikasaumia molemmilla kasvatuskerroilla samassa lämpötilassa, mutta kummankin kannan kasvatusliuos sameni vasta toisella yrityksellä, jolloin turbiditeetti saatiin mitattua. Syytä tällaiseen vaihteluun samassa kasvatuslämpötilassa ei löytynyt.

Eronen-Rasimuksen ym. tutkimuksessa (2021) *Paracoccus* sp. 392 -kanta kasvatettiin 4 °C:ssa RC-liuoksessa, jolloin se tuotti runsaasti bakteerikasaumia eikä turbiditeettimittauksista saatu luotettavia tuloksia. Tässä tutkimuksessa *Paracoccus* sp. 392 -kanta kasvatettiin 16 °C:ssa, jossa se muodosti jonkin verran kasaumia, mutta turbiditeettimittaus saatiin kuitenkin tehtyä. Lämpötila on voinut vaikuttaa näiden kahden tutkimuksen välillä havaittuun eroon. *Paracoccus* sp. 392:n bakteerikasaumat olivat mahdollisesti seurausta EPS:n tuottamisesta. EPS:n määrän on kokeellisesti havaittu kasvavan 20-kertaiseksi esimerkiksi *Pseudoalteromonas*-sukuun kuuluvalla bakteerilla, kun sitä kasvatettiin -2 ja 10 °C:ssa verrattuna 20 °C:seen (Nichols ym. 2005).

Kasvatuksissa käytetyt modifioidut ZoBell-alustat eli RC-alustat eivät välttämättä olleet optimaalisia kaikille kannoille, kuten *Octadecabacter* sp. 419:lle, *Colwellia* sp. 403:lle ja *Polaribacter* sp. 408:lle, jotka kaikki vaativat useamman kasvatusyrityksen ja selvästi suuremman siirrostusmäärän kasvaakseen klett-pullossa. Ne olisivat voineet kasvaa paremmin toisenlaisella

alustalla. *Colwellia*- ja *Polaribacter*-sukujen joukossa on aiemmin havaittu hankalia kantoja, joiden kasvattaminen on onnistunut ravinteiltaan laimeammalla alustalla (Bowman 2001: 593). Toisaalta *Colwellia* sp. 403 oli alun perin eristetty konsentroidulle ZoBell-alustalle, joka on muuten samanlainen kuin RC-alusta, mutta kasvatusalustan suolaliuos oli konsentroitua puoleen alkuperäisestä tilavuudesta (Luhtanen ym. 2018). Kasvatuksissa käytettyjen RC-alustojen suolapitoisuus oli 3,3 %, mutta jääbakteerien luonnollisen ympäristön suolapitoisuus vaihtelee lähes makeasta vedestä yli 24 %:iin (Boetius ym. 2015). Suolapitoisuudella on siten voinut olla vaikutusta joidenkin bakteerikantojen kasvuun.

5.3 Generaatioaika

5.3.1 Esikäsittelyn merkitys generaatioajan määrittämisessä

Generaatioajan luotettava määrittäminen osoittautui hankalaksi. Virtausmittauksen toiminta perustuu siihen, että solut kulkevat yksitellen laserin ohi (Diaz ym. 2010), mutta turbiditeettimittauksen pohjalta tiedettiin, että *Psychrobacter* sp. 118, *Pseudomonas* sp. 132, *Colwellia* sp. 403, *Polaribacter* sp. 408, *Octadecabacter* sp. 419 ja 405 ja *Paracoccus* sp. 392 muodostivat bakteerikasaumia kasvatusliuokseen. Sen lisäksi mikroskoopinäytteiden perusteella havaittiin, että monet muutkin kannat, kuten *Pseudoalteromonas* sp. 121 ja 415 ja *Leifsonia xyli/Rhodoglobus* sp. 140, näyttivät muodostavan tiheitä kasaumia.

Bakteerinäytteitä käsiteltiin kasaumien hajottamiseksi Triton X:llä sekä sonikoitiin ultraäänihauteessa. Ajan puutteen vuoksi käsittelyä testattiin etukäteen vain osalla bakteereista eri pituisilla sonikointiajoilla, jolloin huomattiin, että kaksi minuuttia pidemmät sonikointiajat eivät parantaneet tulosta. Haraguchin (2023) mukaan pidemmällä sonikointiajoilla riskinä on myös solujen hajoaminen. Kahden minuutin sonikointiaika ei kuitenkaan selvästi ollut riittävä käsittely kaikille kannoille.

Edellä mainitulla esikäsitteilymenetelmällä bakteerikantojen *Psychrobacter* sp. N1 ja N73, *Octadecabacter* sp. 405, *Halomonas* sp. 363 ja *Paracoccus* sp. 392 virtaussytometrituloksissa enemmistönä oli aggregoituneet solut -populaatio, eikä generaatioaikaa voitu siten määrittää luotettavasti. Toisaalta ei voida olla varmoja, sisälsikö aggregoituneet solut -populaatio todella vain bakteerikasaumia vai oliko joukossa kenties eri kokoisia soluja, joita bakteerien jakautumisen takia muodostuu paljon eksponentiaalisessa vaiheessa.

Pseudomonas sp. 132 ja *Psychrobacter* sp. 118 muodostivat jo kasvatusliuoksessa runsaasti bakteerikasaumia, eikä edellä kuvattu esikäsitteily riittänyt niiden hajottamiseen ollenkaan. Virtaussytometrimäärytyksiä yritettiin monilla eri laimennoksilla, mutta tulokset eivät olleet johdonmukaisia.

Bakteerikantojen *Pseudoalteromonas* sp. 121 & 415, *Leifsonia xyli/Rhodoglobus* sp. 140, *Paraglaciecola* sp. 372, *Colwellia* sp. 403 ja *Polaribacter* sp. 408 yksittäisten solujen populaatio oli suurempi kuin aggregoituneiden solujen populaatio. Niiden generaatioaika määritettiin yksittäisten solujen eksponentiaalisen vaiheen suoran kulmakertoimesta. Generaatioajat vaihtelivat 0,6 tunnista 21,7 tuntiin. Suorien selitysasteet (R^2) vaihtelivat välillä 0,9772–0,9975, mikä on riittävä bakteerien kasvunopeusmäärytyksiin (Breidt ym. 1994). Toisaalta *Polaribacter* sp. 408:n suoran määrittämiseksi virtaussytometrillä saatiin analysoitua vain 3 näytettä ja muiden kantojen osalta saatiin analysoitua 4–5 näytettä, vaikka tavoitteena oli 5–6 näytettä.

Hitaasti kasvaneilla bakteerikannoilla, erityisesti *Colwellia* sp. 403:lla ja *Polaribacter* sp. 408:lla, havaittiin myös paljon aggregoituneita soluja virtaussytometrianalyysissä, vaikka yksittäiset solut olivat enemmistönä. Molemmat bakteerikannat muodostivat kasaumia kasvatusliuokseen, joten esikäsitteily ei täysin riittänyt niiden hajottamiseen. Määritetyt generaatioajat voivat siten olla yliarvioita.

5.3.2 Määritetty generaatioaika vs. gRodon-generaatioaika

Tässä tutkimuksessa mukana olleiden jääbakteerikantojen genomit oli sekvensoitu aiempien tutkimusten yhteydessä ja niiden teoreettiset generaatioajat oli laskettu gRodon-ohjelmalla (Eronen-Rasimus 2023). Weissmann ym. (2021) mukaan gRodon-ohjelman laskemat generaatioajat vaikuttavat olevan luotettavia jopa viiteen tuntiin asti.

Jääbakteeritutkimuksessa kolmelle 20 °C:ssa kasvaneelle bakteerikannalle määritettiin alle viiden tunnin generaatioaika. Alle viiden tunnin generaatioaikoja määritettiin myös 16 °C:ssa kasvaneille bakteerikannoille, mutta tulokset eivät olleet luotettavia, koska ne perustuivat vain aggregoituneiden solujen populaatioon virtausytometrianalyysin mukaan. Näitä tuloksia ei otettu mukaan tarkasteluun.

Kahdessakymmenessä asteessa kasvaneista bakteerikannoista gRodon-ohjelma ennusti hyvin *Pseudoalteromonas* sp. 121:n generaatioajan, joka tutkimuksen mukaan oli 0,6 h ja ohjelman mukaan 0,7 h. *Pseudoalteromonas* sp. 415 -kannan generaatioaika gRodon-ohjelmassa oli kuitenkin lähes kaksinkertainen verrattuna tutkittuun generaatioaikaan, joka oli 0,7 h. gRodon-ohjelma aliarvioi *Leifsonia xyli/Rhodoglobus* sp. 140:n generaatioajan, joka tutkimuksen mukaan oli 2,1 tuntia ja ohjelman mukaan 1,6 h.

Yli viiden tunnin generaatioaikoja määritettiin 4 ja 10 °C:ssa kasvaneille bakteerikannoille. Näiden bakteerikantojen ennustetut generaatioajat gRodon-ohjelmassa poikkesivat hyvin paljon havaituista generaatioajoista. gRodon ennustaa neljässä asteessa kasvaneelle *Paraglaciicola* sp. 372:lle yli viiden tunnin generaatioaikaa, kun määritetty generaatioaika oli kaksinkertainen. Kymmenessä asteessa kasvaneiden *Colwellia* sp. 403:n ja *Polaribacter* sp. 408:n ennustetut generaatioajat poikkesivat vielä enemmän havaituista generaatioajoista, jotka olivat nelin- ja kuusinkertaisia ennustettuihin verrattuna. Toisaalta molempien kantojen määritetyt generaatioajat saattavat olla

yliarvioita. Taulukkoon 5 on koottu määritetyt jääbakteerien generaatioajat (h) ja gRodon-ohjelman avulla lasketut generaatioajat (h).

Taulukko 5. Jääbakteerien määritetyt generaatioajat (h) ja gRodon-ohjelman avulla lasketut generaatioajat (h).

Lämpötila (°C)	Bakteerikanta	Generaatio-aika (h) (määritetty)	Generaatio-aika (h) (gRodon)
20	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 415	0,7	1,3
20	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. 121	0,6	0,7
20	<i>Leifsonia xyli/Rhodoglobus</i> sp. 140	2,1	1,6
10	<i>Colwellia</i> sp. 403	7,4	1,8
10	<i>Polaribacter</i> sp. 408	21,7	3,8
4	<i>Paraglaciecola</i> sp. 372	10,4	>5

Weissmannin ym. (2021) kehittämä gRodon-ohjelma ennusti hyvin vain *Pseudoalteromonas* sp. 121:n generaatioajan. Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että ohjelman kehittämiseen on käytetty vain vähän ääriolosuhteissa kasvavia bakteerikantoja ja se on validoitu ensisijaisesti mesofiilisille bakteereille (Predicting maximal growth rates with gRodon), joiden kasvulämpötilat ovat 10–50 °C (Tortora ym. 2021: 178).

Tutkituista bakteereista *Paraglaciecola* sp. 372 oli ainoa, jolle gRodon-ohjelma ennusti yli viiden tunnin generaatioaikaa. Viiden tunnin jälkeen ohjelma pystyy ennustamaan ainoastaan mikrobien hidaskasvuisuuden, mutta ei sitä, kuinka hitaasti mikrobi kasvaa (Predicting maximal growth rates with gRodon). gRodon-ohjelma ennusti alle viiden tunnin generaatioaikoja *Colwellia* sp. 403:lle ja *Polaribacter* sp. 408:lle, mutta kannat osoittautuivat huomattavasti hidaskasvuisemmiksi. Niiden tulokset eivät kuitenkaan olleet täysin luotettavia.

5.4 Hiiliyhdisteiden hyödyntäminen EcoPlate-kuoppalevyillä

5.4.1 Käytetyimmät hiilenlähteet

Suurin osa Ecoplate-tutkimuksista on tehty esim. maaperästä, sedimenteistä, kosteikkoalueilta, jätevedestä ja pilaantuneilta maa-alueilta eristetyistä näytteistä (Biolog EcoPlate™; Biolog Publication Database). Polaarialueilla tutkimuksia on tehty lähinnä planktisten bakteerien hiilenkäytöstä EcoPlate-alustoilla (Sala ym. 2005; 2008; 2010; Krisnan ym. 2014; Caruso ym. 2023) ja muilla Biolog MicroPlate -alustoilla (Tan 1997; Fernández-Gómez ym. 2014).

Useimmat orgaaniset yhdisteet ovat monimutkaisempia luonnossa kuin kasvatusalustoissa käytetyt, tai kasvatusalustoissa käytettyjä yhdisteitä ei löydy ollenkaan luonnosta (Casals 2016). EcoPlate-yhdisteitä, erityisesti hiilihydraatteja ja aminohappoja, tiedetään kuitenkin esiintyvän Antarktisisissa vesissä (Sala ym. 2005). Aiempien tutkimusten mukaan bakteeriplankton käyttää metaboliassaan eniten hiilihydraatteja ja polymeerejä arktisella merialueella (Sala ym. 2008; 2010) sekä Antarktisen merialueella (Sala ym. 2005) tai hiilihydraatteja ja aminohappoja arktisella alueella (Fernández-Gómez ym. 2014) sekä Antarktisen merialueella (Caruso ym. 2023).

Suosituimmat polymeerit, Tween 40 ja Tween 80, ovat polyoleja, joita polaariset bakteerikannat voivat hydrolysoida. Polyoleja kertyy merijään leviin, ja ne auttavat leviä kestämään matalia lämpötiloja ja korkeita suolapitoisuuksia. D-sellobioosi ja n-asetyyli-glukosamiini ovat myös yleisiä meriympäristössä. Sellobioosia on kasviplanktonin soluseinissä ja n-asetyyli-glukosamiinia kitiinissä ja bakteerien soluseinien peptidoglykaanissa. (Sala ym. 2010.)

Salan ym. (2005) tutkimuksessa Antarktisen alueen bakteeriplanktoniyhteisöt hyödynsivät yhteensä 25/31 hiiliyhdistettä kasvaessaan 2 °C:ssa 10 vuorokautta ja Salan ym. (2008) tutkimuksessa vastaavat yhteisöt arktisella alueella käyttivät yhteensä 21/31 hiiliyhdistettä kasvaessaan 4 °C:ssa 2–4 viikkoa.

Tässä tutkimuksessa jääbakteerit hyödynsivät yhteensä 20:tä erilaista hiilenlähdettä eli 64,5 prosenttia EcoPlate-alustojen hiilenlähteistä. Käytetyimpiä olivat Tween 40 ja Tween 80 -polymeerit sekä D-mannitoli, metyyliipuryvaatti ja d-sellobioosi, jotka ovat hiilihydraatteja. Tutkituista bakteerikannoista 12 kantaa neljästätoista käytti Tween 40 -polymeeriä. Tulokset tukevat aiempia havaintoja polaaristen alueiden bakteerien hiilenkäytöstä, vaikka täysin vertailevia tutkimuksia jääbakteereista ei ollut saatavilla. Toisaalta inkubointilämpötilalla ja muilla tekijöillä on saattanut olla vaikutusta tuloksiin. Näitä tarkastellaan luvuissa 5.4.2 ja 5.4.3.

5.4.2 Lämpötilan vaikutus hiilenlähteiden käyttöön

Jääbakteerien EcoPlate-kasvatukset tehtiin kunkin bakteerikannan optimikasvulämpötilassa, joka on korkeampi kuin jääbakteerien normaalissa kasvuympäristössä. Aikaisemmissa tutkimuksissa alustoja on inkuboitu 2–4 °C:ssa, mikä on lähempänä polaaristen bakteerien luonnollisen ympäristön lämpötilaa (Sala ym. 2005; 2008). Jääbakteereista vain *Paraglaciecola* sp. 372 ja *Octadecabacter* sp. 419 inkuboitiin 4 °C:ssa. *Paraglaciecola* sp. 372:n havaittiin käyttävän vain yhtä hiiliyhdistettä, kun taas *Octadecabacter* sp. 419 ei hyödyntänyt mitään hiiliyhdistettä EcoPlate-alustalla.

Tan (1997) vertaili MicroPlate-alustoilla psykrotrofisten kopiotrofibakteerien hiilenkäyttöä 4 ja 20 °C:ssa ja havaitsi, että joitakin hiiliyhdisteitä käytettiin vain 20 °C:n lämpötilassa. Kuoppalevyillä alhaisessa lämpötilassa inkuboinnin haasteena on se, että mikrobien aktiivisuus todennäköisesti alenee ja kasvusaika pitenee, jolloin laboratorio-olosuhteet alkavat vaikuttaa bakteerien kasvuun enemmän. Bakteerisolut voivat hajota sekä tuottaa ekstrasellulaarisia varastopolymeerejä. (Casals 2016.) Inkubointilämpötila on siten voinut vaikuttaa tässä tutkimuksessa käytettyjen hiiliyhdisteiden määrään, sillä 20 °C:ssa kasvaneet jääbakteerit hyödynsivät 2–11:tä hiiliyhdistettä bakteerikantaa kohden, kun taas alhaisemmissa lämpötiloissa käytettiin vain 1–2:tä hiilenlähdettä.

5.4.3 Muiden tekijöiden vaikutus EcoPlate-kasvatukseen

Kuudessatoista asteessa kasvaneiden bakteerikantojen, *Psychrobacter* sp. N1 ja N73, *Paracoccus* sp 392 ja *Octadecabacter* sp. 405, useissa EcoPlate-kaivoissa oli havaittavissa värin muodostusta vain kaivojen pohjalla reunoissa, mutta tätä Microstation-laite ei tulkinnut positiiviseksi tulokseksi. EcoPlate-kasvatusta valmisteltaessa bakteerimassaa siirrostettiin suolaliuokseen varoen ottamasta mukaan agaralustaa, jonka hyödyntäminen olisi voinut näkyä värinmuutoksena kaivoissa ja tuottaa edellä mainitun ilmiön. On myös mahdollista, että osa kannoista pystyy hyödyntämään omia tuottamiaan ekstrasellulaarisia polysakkarideja ja tämä on voinut aiheuttaa kyseisen värinmuutoksen EcoPlate-kaivoissa (GP2™ MicroPlate).

Neljässä asteessa kasvaneista bakteerikannoista *Octadecabacter* sp. 419 ei hyödyntänyt mitään EcoPlate-kaivoissa olevaa hiiliyhdistettä. Kyseinen kanta kasvoi heikosti RC-agarmaljoilla ja on mahdollista, että siirrostus maljalta suolaliuokseen EcoPlate-kasvatusta varten ei ollut riittävän tuore ja bakteeri ei lähtenyt kasvuun. Osa bakteereista voi kuivua maljakasvatuksessa nopeammin kuin toiset (Bowman 2001: 606).

EcoPlate-tuloksiin vaikuttavat olosuhteiden lisäksi myös siirrostettujen bakteerien määrä ja siirrostetut bakteerilajit. On havaittu, että kaikki lajit eivät kasva EcoPlate-kaivoissa vaan ne suosivat nopeasti kasvavia bakteereita. Myös tetrazolium-väriaine voi olla myrkyllinen joillekin bakteerikannoille. (Casals 2016.)

EcoPlate-levyille siirrostettujen bakteerien määrään yritettiin vaikuttaa mittaamalla bakteeriliuoksen turbiditeetti. Se pyrittiin saamaan välille 0,3–0,4, mutta tämä ei onnistunut kaikkien kantojen osalta, sillä maljoilla ei ollut tarpeeksi bakteerimassaa. *Octadecabacter* sp. 419:n suhteen näin ei kuitenkaan ollut, joten on todennäköistä, että kasvatus ei ollut tarpeeksi tuore. Lisäksi kyseinen kanta oli hyvin hitaasti kasvava eikä EcoPlate-alustoilla ollut 7 viikon jälkeenkään havaittavissa värinmuodostusta.

Maljoilla heikosti kasvavia olivat myös kannat *Paraglaciecola* sp. 372 ja *Polaribacter* sp. 408, joten tämä on voinut vaikuttaa niiden EcoPlate-tuloksiin, jos siirrostus ei ollut riittävän tuore. Lisäksi tulokseen on todennäköisesti vaikuttanut se, että *Colwellia* sp. 403:n, *Paraglaciecola* sp. 372:n ja *Polaribacter* sp. 408:n EcoPlate-siirrostuksen turbiditeetti oli alhainen (0,1–0,2). Ne olivat kaikki myös hitaasti kasvatusliuoksessa kasvavia kantoja. Kaikki edellä mainitut bakteerikannat hyödynsivät vain Tween 40 -polymeeriä, mutta tulos perustui pelkästään laitteen antamaan positiiviseen tulokseen, sillä värin muutos ei ollut havaittavissa paljain silmin.

Tanin (1997) tutkimuksessa Antarktiksien merialueelta peräisin olevan psyktrotrofisen bakteeriplanktonin havaittiin hyödyntävän useampia hiiliyhdisteitä pH:ssa 7 kuin pH:ssa 5,82 MicroPlate-alustoilla. Toisaalta osa samassa tutkimuksessa mukana olleista bakteereista ei kyennyt hyödyntämään pH:ssa 7 yhtään hiiliyhdistettä tai hyödynsi vain muutamia yhdisteitä. Monet meressä elävät bakteerit suosivat todennäköisesti korkeampaa pH:ta, sillä meriveden pH on yleisesti 7,6–8. (Tan 1997.) Jääbakteerien luonnollisessa kasvuympäristössä eli jään suolataskuissa pH voi vaihdella välillä 8,41–8,82 (Papadimitriou ym. 2007). EcoPlate-alustojen pH:lla on siten voinut olla vaikutusta jääbakteerien kasvuun, sillä alustoissa käytetyn suolaliuoksen pH:ta ei tarkistettu.

6 Yhteenveto

Tämän työn tavoitteena oli selvittää neljäntoista polaarialueiden merijäästä eristetyn bakteerikannan optimikasvulämpötilat RC-agarmaljoilla, generaatioajat RC-kasvatusliuoksessa ja hiiliyhdisteiden käyttö EcoPlate-kuoppalevyillä. Tutkimuksessa pyrittiin tuottamaan tietoa bakteerien generaatioajoista myös genomipohjaisen gRodon-ohjelman kehittämistä varten, sillä ohjelma ei kykene ennustamaan äärioloissa elävien bakteerien generaatioaikoja kovin hyvin.

Tutkituista bakteerikannoista viiden kannan, *Colwellia* sp. 403, *Polaribacter* sp. 408, *Octadecabacter* sp. 419 ja 405 ja *Paraglaciecola* sp. 372, havaittiin olevan psykrofiilisiä ja muut yhdeksän kantaa olivat psykrotolerantteja. *Octadecabacter* sp. 405:n optimikasvulämpötilaksi määritettiin 16 °C ja *Colwellia* sp. 403:n ja *Polaribacter* sp. 408:n optimikasvulämpötila oli 10 °C. *Octadecabacter* sp. 419:n ja *Paraglaciecola* sp. 372:n optimikasvulämpötilaksi määritettiin 4 °C.

Psykrotoleranttien kantojen *Psychrobacter* sp. N1 ja N73 ja *Paracoccus* sp. 392 optimikasvulämpötilaksi määritettiin 16 °C. Muiden psykrotoleranttien bakteerikantojen eli *Pseudoalteromonas* sp. 415 ja 121, *Halomonas* sp. 363, *Psychrobacter* sp. 118, *Leifsonia xyli*/*Rhodoglobus* sp. 140 ja *Pseudomonas* sp. 132 optimikasvulämpötilaksi määritettiin 20 °C.

Optimikasvulämpötila selvitettiin kiinteällä alustalla, mutta voisi olla hyödyllistä kokeilla sen määrittämistä myös nesteviljelmässä, sillä optimikasvulämpötila voi olla korkeampi nestekasvatuksessa kuin kiinteällä alustalla kasvatettaessa (Bowman 2001: 606). Kasvatuksissa käytetyt modifioidut ZoBell-alustat eli RC-alustat eivät välttämättä olleet optimaalisia kaikille bakteerikannoille, joten jääbakteerien kasvattamista kannattaisi kokeilla myös laimeammilla alustoilla tai eri suolapitoisuuksissa, koska niiden luonnollisen elinympäristön olosuhteet vaihtelevat paljon.

Bakteerien kasvukäyrät optimikasvulämpötilassa muodostettiin turbiditeettimittausten avulla. Bakteerien kasvukäyrien viivevaiheet RC-liuoksessa kestivät kolmesta tunnista yhdeksään vuorokauteen.

Eksponentiaalinen vaihe vei alle kuudesta tunnista kahteen vuorokauteen bakteerikannan mukaan. Monet kannat muodostivat RC-liuoksessa kasvaessaan ainakin jossain vaiheessa paljain silmin näkyviä bakteerikasaumia, joista osa vaikutti olevan biofilmimäisiä. Bakteerikasaumia muodostaneita kantoja olivat *Psychrobacter* sp. 118, *Pseudomonas* sp. 132, *Colwellia* sp. 403, *Polaribacter* sp. 408, *Octadecabacter* sp. 419 ja 405 ja *Paracoccus* sp. 392. Osalla näistä bakteereista kasautumien muodostuminen haittasi sekä turbiditeetin mittaamista että virtaussytometrimääryksiä.

Virtaussytometrianalyysin perusteella kaikille bakteerikannoille muodostui kaksi populaatiota: yksittäiset solut ja aggregoituneet solut eli bakteerikasaumat. Tämän lisäksi bakteerikannat jakautuivat selkeästi kahteen ryhmään: 1) kannat, joilla oli enemmän yksittäisiä kuin aggregoituneita soluja ja 2) kannat, joilla oli enemmän aggregoituneita kuin yksittäisiä soluja. Generaatioajat määritettiin kuudelle ryhmään yksi kuuluvalla bakteerikannalla, jotka olivat *Pseudoalteromonas* sp. 415 ja 121, *Leifsonia xyli/Rhodoglobus* sp. 140, *Colwellia* sp. 403, *Polaribacter* sp. 408 ja *Paraglaciecola* sp. 372. Edellä mainittujen bakteerikantojen generaatioajat olivat 0,6–21,7 tuntia. Generaatioaikaa ei pystytty määrittämään luotettavasti ryhmän kaksi bakteerikannoille. Näiden bakteerikantojen osalta pitäisi löytää parempi näytteiden esikäsittelymenetelmä, jotta bakteerikasaumat saataisiin hajotettua ennen virtaussytometrianalyysiä.

Bakteerikantojen generaatioaikoja verrattiin gRodon-ohjelman laskemiin generaatioaikoihin, jotka oli määritetty aikaisemmassa tutkimuksessa. gRodon-ohjelma pystyi ennustamaan hyvin vain kaikkien nopeimmin kasvaneen *Pseudoalteromonas* sp. 121:n generaatioajan, joka tutkimuksen mukaan oli 0,6 h ja ohjelman mukaan 0,7 h. Yli viiden tunnin generaatioaikoja määritettiin 4 ja 10 °C:ssa kasvaneille bakteerikannoille. Näiden bakteerikantojen ennustetut generaatioajat gRodon-ohjelmassa poikkesivat 2–6-kertaisesti havaituista generaatioajoista. Toisaalta *Colwellia* sp. 403:n ja *Polaribacter* sp. 408:n määritetyt generaatioajat (7,4 h ja 21,7 h) saattavat olla yliarvioita. Kuitenkin

joitakin tämän tutkimuksen tuloksista voitaisiin hyödyntää gRodon-ohjelman kehittämisessä.

EcoPlate-tulokset tukivat aiempia havaintoja polaaristen alueiden bakteerien hiilenkäytöstä polymeerien ja hiilihydraattien osalta. Jääbakteerit käyttivät yhteensä 20:tä erilaista hiiliyhdistettä eli 64,5 % EcoPlate-alustojen hiilenlähteistä, joista käytetyimpiä olivat Tween 40- ja Tween 80 -polymeerit sekä hiilihydraatit. Tutkituista bakteereista 12 kantaa neljästätoista kannasta käytti Tween 40 -polymeeriä. Tutkimus tehtiin kunkin bakteerikannan optimikasvulämpötilassa, joten inkubointilämpötila on voinut vaikuttaa käytettyjen hiiliyhdisteiden määrään. 20 °C:ssa kasvaneet jääbakteerit hyödynsivät 2–11:tä hiiliyhdistettä bakteerikantaa kohden, kun taas alhaisemmissa lämpötiloissa käytettiin vain 1–2:ta hiilenlähdetä bakteeria kohden.

Olisi mielenkiintoista selvittää muuttuuko 10–20 °C:ssa kasvaneiden bakteerien hiilenkäyttö, jos ne inkuboitaisiin 4 °C:ssa eli lähempänä niiden luonnollisen ympäristön lämpötilaa. Lisäksi EcoPlate-alustoihin käytetyn suolaliuoksen pH tulisi määrittää sekä tehdä kokeiluja eri pH-arvoilla ja mahdollisesti myös eri suolapitoisuuksissa, sillä jääbakteerien luonnollisen kasvuympäristön suolapitoisuus voi vaihdella suuresti.

Jääbakteerien kasvattaminen osoittautui haastavammaksi kuin alun perin oletettiin, sillä ne tuottivat ekstrasellulaarisia polymeerejä ja muodostivat kasaumia samalla vaikeuttaen turbiditeetti- ja virtaussytometrimittauksia. Monet niistä kasvoivat hyvin hitaasti eikä niiden kasvua pystytty yrityksistä huolimatta ennakoimaan, mikä aiheutti myös aikatauluhaasteita. Tämä tutkimus tuotti kuitenkin perustietoa, jonka pohjalta voitaisiin tehdä uusia kasvatuskokeiluja erilaisissa kasvatusolosuhteissa. Genomipohjaisten ohjelmien parantamiseen tarvittaisiin runsaasti lisää tietoa psykrofiilisten bakteerien kasvusta erilaisilla alustoilla.

Lähteet

Adan, Aysun; Alizada, Gunel; Kiraz, Yagmur, Baran, Yusuf & Nalbant Ayten. 2017. Flow cytometry: basic principles and applications. Verkkoaineisto. Critical Reviews in Biotechnology. <<https://abis-files.agu.edu.tr/avesis/def2de30-7127-49dd-9316-2799206c0481?AWSAccessKeyId=CQPZAON576S8WWHLW4KJ&Expires=1702031043&Signature=YUyE%2B33ZuVMWqD8EQdTp25gkumE%3D>>. 11.10.2017. Luettu 1.8.2023.

Aebisher, David; Bartusik, Dorota & Tabarkiewicz, Jacek. 2017. Laser flow cytometry as a tool for the advancement of clinical medicine. Verkkoaineisto. Biomedicine & Pharmacotherapy. <<https://www.sciencedirect-com.ezproxy.metropolia.fi/science/article/pii/S0753332216315153#bib0030>>. 23.11.2016. Luettu 1.8.2023.

Arrigo, Kevin R. 2014. Sea Ice Ecosystems. Verkkoaineisto. Annual Review of Marine Science. <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-marine-010213-135103?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed>. Päivitetty 4.9.2013. Luettu 11.1.2024.

Bakteerien kasvun määrittäminen. Mikrobiologian opetusmoniste. Helsingin yliopisto.

Biolog EcoPlate™. Microbial community analysis. Verkkoaineisto. Biolog. <<https://www.biolog.com/wp-content/uploads/2023/06/00A-012-Rev-E-EcoPlate-IFU.pdf>>. Luettu 17.4.2023.

Biolog Publication Database. Verkkoaineisto. Biolog. <<https://www.biolog.com/publication-database/>>. Luettu 18.12.2023.

Boetius, A.; Anesio, A. M.; Deming, J. W.; Mikucki, J. A. & Rapp, J. Z. 2015. Microbial ecology of the cryosphere: sea ice and glacial habitats. Verkkoaineisto. Nature Reviews. Microbiology. <<https://www.proquest.com/docview/1767370306/fulltextPDF/2E02FB732F294FFEPQ/1?accountid=11363>>. Päivitetty 30.11.2023. Luettu 1.12.2023.

Bowman, J. P. 2001. Methods for Psychrophilic Bacteria. Teoksessa Paul, John H. (edit.). Marine Microbiology. Methods in Microbiology. Vol. 30. San Diego: Academic Press.

Breezee, J.; Cady, N. & Staley, J. T. 2004. Subfreezing Growth of the Sea Ice Bacterium "*Psychromonas ingrahamii*." Verkkoaineisto. Microbial Ecology. <<https://www.jstor.org/stable/25153059>>. 4.3.2004. Luettu 1.12.2023.

Breidt, F.; Romick, T. L. & Fleming, H. P. 1994. A rapid method for determination of bacterial growth kinetics. Verkkoaineisto. Agricultural Research Service.
<<https://www.ars.usda.gov/ARUserFiles/60701000/Pickle%20Pubs/p250.pdf>>. 17.3.1994. Luettu 17.12.2023.

Caruso, G.; Maimone, G.; Rappazzo, A. C.; Dell'Acqua, O.; Laganà, P. & Azzaro, M. 2023. Microbial Biofilm Colonizing Plastic Substrates in the Ross Sea (Antarctica): First Overview of Community-Level Physiological Profiles. Verkkoaineisto. Journal of Marine Science and Engineering.
<<https://www.mdpi.com/2077-1312/11/7/1317#app1-jmse-11-01317>>. 28.6.2023. Luettu 18.12.2023.

Casals, Anna Freixa. 2016. Function and structure of river sediment biofilms and their role in dissolved organic matter utilization. Doctoral thesis. Verkkoaineisto. Universitat de Girona. <<https://dugi-doc.udg.edu/bitstream/handle/10256/12265/tafc1de1.pdf?sequence=6>>. Luettu 18.4.2023.

Diaz, Mario; Herrero, Monica; Garcia, Luis A. & Quiros, Covadonga. 2010. Application of flow cytometry to industrial microbial processes. Verkkoaineisto. Biochemical Engineering Journal. <<https://www.sciencedirect-com.ezproxy.metropolia.fi/science/article/pii/S1369703X09002563?via%3Dihub>>. 26.7.2009. Luettu 1.8.2023.

Eronen-Rasimus, Eeva. 2023. Erikoistutkija, Suomen ympäristökeskus, Helsinki. Keskustelu 8.9.2023.

Eronen-Rasimus, Eeva; Luhtanen, Anne-Mari; Rintala, Janne-Markus; Delille, Bruno; Dieckmann, Gerhard; Karkman, Antti & Tison, Jean-Louis. 2017. An active bacterial community linked to high chl-a-concentrations in Antarctic winter-pack ice and evidence for the development of an anaerobic sea-ice bacterial community. Verkkoaineisto. The ISME Journal.
<<https://www.nature.com/articles/ismej201796>>. 14.7.2017. Luettu 1.12.2023.

Eronen-Rasimus, E.; Hultman, J.; Hai, T.; Pessi, I. S.; Collins, E.; Wright, S.; Laine, P.; Viitamäki, S.; Lyra, C.; Thomas, D. N.; Golyshin, P. N.; Luhtanen, A.-M.; Kuosa, H. & Kaartokallio, H. 2021. Sea-Ice Bacteria *Halomonas* sp. Strain 363 and *Paracoccus* sp. Strain 392 Produce Multiple Types of Poly-3-Hydroxyalkanoic Acid (PHA) Storage Polymers at Low Temperature. Verkkoaineisto. Applied and Environmental Microbiology.
<<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aem.00929-21>>. 11.8.2021. Luettu 15.12.2023.

Fernández-Gómez, Beatriz; Montserrat Sala, Maria & Pedrós-Alió, Carlos. 2014. Seasonal changes in substrate utilization patterns by bacterioplankton in the Amundsen Gulf (western Arctic). Verkkoaineisto. Polar Biology.

<https://www.researchgate.net/publication/264313743_Seasonal_changes_in_substrate_utilization_patterns_by_bacterioplankton_in_the_Amundsen_Gulf_western_Arctic>. 20.5.2014. Luettu 3.12.2023.

GP2™ MicroPlate. Instructions for use.1999. Biolog. Hayward, California.

Guava® Flow Cytometry easyCyte™ Systems. Data Sheet. 2010. Verkkoaineisto. Merck Millipore. <<https://lbb.wsu.edu/documents/2020/03/guava-easycyte-information.pdf/>>. Luettu 1.8.2023.

Haraguchi, Lumi. Tutkija, Suomen ympäristökeskus, Helsinki. Keskustelu 7.8.2023.

Introduction to flow cytometry. Verkkoaineisto. Abcam. <<https://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry/>>. Luettu 1.8.2023.

Jlw-ecoevo/gRodon2. Verkkoaineisto. Github. <<https://github.com/jlw-ecoevo/gRodon2>>. Päivitetty 2.12.2022. Luettu 30.8.2023.

Junge, K., Imhoff, F.; Staley, T. & Deming, J. W. 2002. Phylogenetic Diversity of Numerically Important Arctic Sea-Ice Bacteria Cultured at Subzero Temperature. Verkkoaineisto. Microbial Ecology. <https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/52320065/Phylogenetic_Diversity_of_Numerically_Important_Arctic_Sea-Ice_Bacteria_Cultured_at_Subzero_Temperature.pdf?1490594844=&response-content-disposition=inline%3Bfilename%3DPhylogenetic_diversity_of_numerically_important_arctic_sea-ice_bacteria_cultured_at_subzero_temperature.pdf&Expires=1701972955&Signature=P5MnaH4TGMDGuPvt8vFtnXQ1JRhV2BKfudW6x2G2IHOWR7gmr9JylkBgxX0JrkF26FjzVpf4QoH35iekiHc3XdEvcyox9myZQ9cJvv8DxroL7wiLsmcxN5X2qGHxYCsxsKPnwspDstzlhKDRwG2h4zl5BxLVXM67manswoZDnjNy7rKVOamfal81NS51VCrQgejozejud7uShDEb7a-LIOKqqv9ILwr5JMxD0K0FVL0~clhI8zK7v9HdaPdT67VF3R8y38Ly9er9bfqamJPKzaA~ygMCVVtZ89b9ijaWr4WClfHDXh1ywlcbKWmg-AtXQgbjJQFNEiWmOjFIHqfsw__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA>. 13.3.2002. Luettu 1.12.2023.

Junge, Karen; Eicken, Hajo & Deming, Jody W. 2004. Bacterial Activity at -2 to -20°C in Arctic Wintertime Sea Ice. Verkkoaineisto. Applied and Environmental Microbiology. <<https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/aem.70.1.550-557.2004?src=getftr>>. Tammikuu 2004. Luettu 1.12.2023.

Krembs, C. & Deming, J. W. 2008. Chapter 15. The Role of Exopolymers in Microbial Adaptation to Sea Ice. Verkkoaineisto. Teoksessa Margesin et al. (eds.). Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. <<http://ndl.ethernet.edu.et/bitstream/123456789/72215/1/126.pdf.pdf#page=251>>. Luettu 1.12.2023.

Krishnan, K. P.; Sinha, R. K.; Nair, S. ym. 2014. Carbon demand, utilization, and metabolic diversity of bacterioplankton in the frontal regimes of the Indian sector of the Southern Ocean. Verkkoaineisto. Annals of Microbiology. <<https://annalsmicrobiology.biomedcentral.com/articles/10.1007/s13213-014-0948-2>>. 7.8.2014. Luettu 3.12.2023.

Luhtanen, Anne-Mari; Eronen-Rasimus, Eeva; Oksanen, Hanna M.; Tison, Jean-Louis; Delille, Bruno; Dieckmann, Gerhard S.; Rintala, Janne-Markus & Bamford, Dennis H. 2018. The first known virus isolates from Antarctic sea ice have complex infection patterns. Verkkoaineisto. FEMS Microbiology Ecology. <<https://academic.oup.com/femsec/article/94/4/fiy028/4898008>>. 22.2.2018. Luettu 14.4.2023.

M465: Biolog Ecoplates. Verkkoaineisto. OpenWetWare. <https://openwetware.org/wiki/M465:Biolog_Ecoplates>. Päivitetty 28.1.2016. Luettu 17.4.2023.

Mock, T. & Thomas, D. N. 2005. Recent advances in sea-ice microbiology. Verkkoaineisto. Environmental Microbiology. <<https://ami-journals-onlinelibrary-wiley-com.ezproxy.metropolia.fi/doi/full/10.1111/j.1462-2920.2005.00781.x>>. 31.3.2005. Luettu 1.12.2023.

Morita, Richard Y. & Albright, Lawrence J. 1965. Cell yields of *Vibrio marinus*, an obligate psychrophile, at low temperature. Verkkoaineisto. Canadian Journal of Microbiology. <<https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.1139/m65-028>>. Luettu 1.12.2023.

Morita, Richard Y. 1975. Psychrophilic Bacteria. Verkkoaineisto. Bacteriological Reviews. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC413900/pdf/bactrev00049-0066.pdf>>. Luettu 1.12.2023.

Moyer, Graig L.; Collins, R. Eric & Morita, Richard Y. 2017. Psychrophiles and psychrotrophs. Verkkoaineisto. Elsevier Inc. <https://fire.biol.wvu.edu/cmoyer/research/Moyer%20etal%20psychrophiles_rmls17.pdf>. Luettu 1.12.2023.

N-ICE2015. Verkkoaineisto. Norsk Polarinstitut. <<https://www.npolar.no/en/projects/n-ice2015/>>. Luettu 17.4.2023.

Nichols, C. M.; Bowman, J. P. & Guezennec, J. 2005. Effects of incubation temperature on growth and production of exopolysaccharides by an antarctic sea ice bacterium grown in batch culture. Verkkoaineisto. Applied and Environmental Microbiology. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1169062/>>. 31.1.2005. Luettu 1.12.2023.

Noell, S. E.; Brennan, E.; Washburn, Q.; Davis, E. W.; Hellweger, F. L. & Giovannoni, S. J. 2023. Differences in the regulatory strategies of marine oligotrophs and copiotrophs reflect differences in motility. Verkkoaineisto. *Environmental Microbiology*. <<https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1462-2920.16357>>. 24.2.2023. Luettu 1.12.2023.

Papadimitriou S.; Thomas D. N.; Kennedy H.; Haas C.; Kuosa H.; Krell A. & Dieckmann G. S. 2007. Biogeochemical composition of natural sea ice brines from the Weddell Sea during early austral summer. Verkkoaineisto. *Limnology and Oceanography*. <<https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.4319/lo.2007.52.5.1809>>. 27.9.2007. Luettu 14.12.2023.

Predicting maximal growth rates with gRodon. Verkkoaineisto. gRodon. <<http://microbialgamut.com/gRodon-vignette>>. Luettu 30.8.2023.

Pusterla, Tobias. 2018. Turbidity measurements in life science. Verkkoaineisto. BMG Labtech. <<https://www.bmglabtech.com/en/blog/turbidity-measurements-in-life-science/>>. Päivitetty 15.5.2018. Luettu 14.4.2023.

Rijal, Nisha. 2022a. Fluorescence Microscope: Principle, Types, Applications. Verkkoaineisto. Microbe Online. <<https://microbeonline.com/fluorescence-microscope-principle-types-applications/>>. Päivitetty 17.9.2022. Luettu 1.8.2023.

Rijal, Nisha. 2022b. Acridine Orange Staining: Principle, Procedure, Results. Verkkoaineisto. Microbe Online. <<https://microbeonline.com/acridine-orange-staining-principle-procedure-results-applications/>>. Päivitetty 13.9.2022. Luettu 1.8.2023.

Sala, M. M., Arin, L.; Balangue, V.; Felipe, J.; Guadayol; O. & Vaqué, D. 2005. Functional diversity of bacterioplankton assemblages in western Antarctic seawaters during late spring. Verkkoaineisto. *Marine Ecology Progress Series*. <<https://www.int-res.com/articles/meps2005/292/m292p013.pdf>>. 12.5.2005. Luettu 3.12.2023.

Sala, M. M.; Terrado, R.; Lovejoy, C.; Unrein, F. & Pedros-Alio, C. 2008. Metabolic diversity of heterotrophic bacterioplankton over winter and spring in the coastal Arctic Ocean. Verkkoaineisto. *Environmental Microbiology*. <<https://people-new.ucsc.edu/~acr/migrated/BeringResources/Articles%20of%20interest/Central%20Artic/Sala%20et%20al%202008.pdf>>. Luettu 3.12.2023.

Sala, M. M.; Arrieta, J. M.; Boras, J. A.; Duarte, C. M. & Vaqué, D. 2010. The impact of ice melting on bacterioplankton in the Arctic Ocean. Verkkoaineisto. *Polar Biology*.

<<https://www.proquest.com/docview/843424409/fulltextPDF/7AE67EDE0F0E4A26PQ/1?accountid=11363>>. Päivitetty 12.3.2023. Luettu 3.12.2023.

Singh, A.; Yelverton, C. J. & Barnard, T. G. 2019. Rapid Quantification of the Total Viable Bacterial Population on Human Hands Using Flow Cytometry with SYBR® Green I. Verkkoaineisto. Cytometry Part B. Clinical Cytometry. <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cyto.b.21776>>. 9.3.2019. Luettu 1.8.2023.

Solubiologia. Kasvu ja lisääntyminen. 2006. Verkkoaineisto. Solunetti. <https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/kasvu_ja_lisaantyminen_1/2/>. Luettu 17.5.2023

Solubiologia. Mikrobipopulaation kasvuvaiheet. 2006. Verkkoaineisto. Solunetti. <https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/mikrobipopulation_kasvuvaiheet/3/>. Luettu 17.5.2023.

Staley, J. T. & Konopka, A. 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. Verkkoaineisto. Annual review of microbiology. <https://www.researchgate.net/profile/James-Staley-2/publication/275068856_Measurement_of_In_Situ_Activities_of_Nonphotosynthetic_Microorganisms_in_Aquatic_and_Terrestrial_Habitats/links/58921e85aca272f9a5584b26/Measurement-of-In-Situ-Activities-of-Nonphotosynthetic-Microorganisms-in-Aquatic-and-Terrestrial-Habitats.pdf>. Luettu 11.1.2024.

Steiner, Nadja S.; Bowman, Jeff; Campbell, Karley; Chierici, Melissa; Eronen-Rasimus, Eeva; Falardeau, Marianne; Flores, Hauke; Fransson, Agneta; Herr, Helena; Insley, Stephen J.; Kauko, Hanna M.; Lannuzel, Delphine; Loseto, Lisa; Lynnes, Amanda; Majewski, Andy; Meiners, Klaus M.; Miller, Lisa A.; Michel, Loïc N.; Moreau, Sebastien; Nacke, Melissa; Nomura, Daiki; Tedesco, Letizia; van Franeker, Jan Andries; van Leeuwe, Maria A. & Wongpan, Pat. 2021. Climate change impacts on sea-ice ecosystems and associated ecosystem services. Verkkoaineisto. Elementa: Science of the Anthropocene. <<https://online.ucpress.edu/elementa/article/9/1/00007/118760/Climate-change-impacts-on-sea-ice-ecosystems-and>>. 19.8.2021. Luettu 1.12.2023.

Tan, T. L. 1997. Biolog Metabolic Fingerprints for Clustering Marine Oligotrophic Bacteria from Polar Regions. Verkkoaineisto. Teoksessa Insam, H. & Ronger, A. (eds.). Microbial Communities. <https://www.researchgate.net/profile/Heribert-Insam/publication/265458548_A_New_Set_of_Substrates_Proposed_for_Community_Characterization_in_Environmental_Samples/links/540f10c60cf2df04e75a2115/A-New-Set-of-Substrates-Proposed-for-Community-Characterization-in-Environmental-Samples.pdf#page=168>. 9.9.2014. Luettu 3.12.2023.

Temperature and Microbial Growth. Verkkoaineisto. Libre Texts Biology. <[https://bio.libretexts.org/Courses/Mansfield_University_of_Pennsylvania/BSC_3271%3A_Microbiology_for_Health_Sciences_Sp21_\(Kagle\)/07%3A_Growth/7.01%3A_Microbial_Growth/7.1.03%3A_Temperature_and_Microbial_Growth](https://bio.libretexts.org/Courses/Mansfield_University_of_Pennsylvania/BSC_3271%3A_Microbiology_for_Health_Sciences_Sp21_(Kagle)/07%3A_Growth/7.01%3A_Microbial_Growth/7.1.03%3A_Temperature_and_Microbial_Growth)>. Luettu 1.12.2023.

Tortora, G. J.; Funke, B. R. & Case, C. L. 2021. Microbiology: An introduction. Thirteenth edition, global edition. Harlow: Pearson Education Ltd.

Vehkala, Minna; Shubin, Mikhail; Connor, Thomas R.; Thomson, Nicholas R. & Corander, Jukka. 2015. Novel R Pipeline for Analyzing Biolog Phenotypic Microarray Data. Verkkoaineisto. Plos One. <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0118392>>. 18.3.2015. Luettu 17.4.2023.

Vieira-Silva, Sara & Rocha, Eduardo P. C. 2010. The Systemic Imprint of Growth and Its Uses in Ecological (Meta)Genomics. Verkkoaineisto. Plos Genetics. <<https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1000808>>. 15.1.2020. Luettu 5.12.2023.

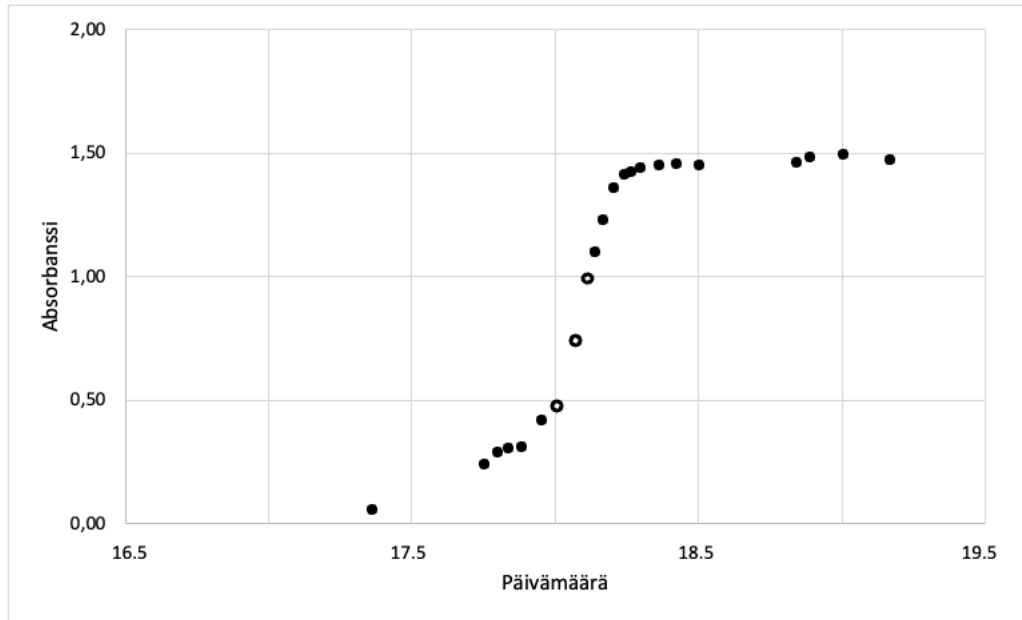
Weissmann, Jake L., Hou, Shengwei & Fuhrman, Jed A. 2021. Estimating maximal microbial growth rates from cultures, metagenomes, and single cells via codon usage patterns. Verkkoaineisto. PNAS. <<https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2016810118>>. 15.3. 2021. Luettu 30.8.2023.

Weber, Kela P. & Legge, Raymond L. 2009. One-dimensional metric for tracking bacterial community divergence using sole carbon source utilization patterns. Verkkoaineisto. Journal of Microbiological Methods. <<https://www-sciencedirect-com.ezproxy.metropolia.fi/science/article/pii/S0167701209002322>>. 6.8.2009. Luettu 1.6.2023.

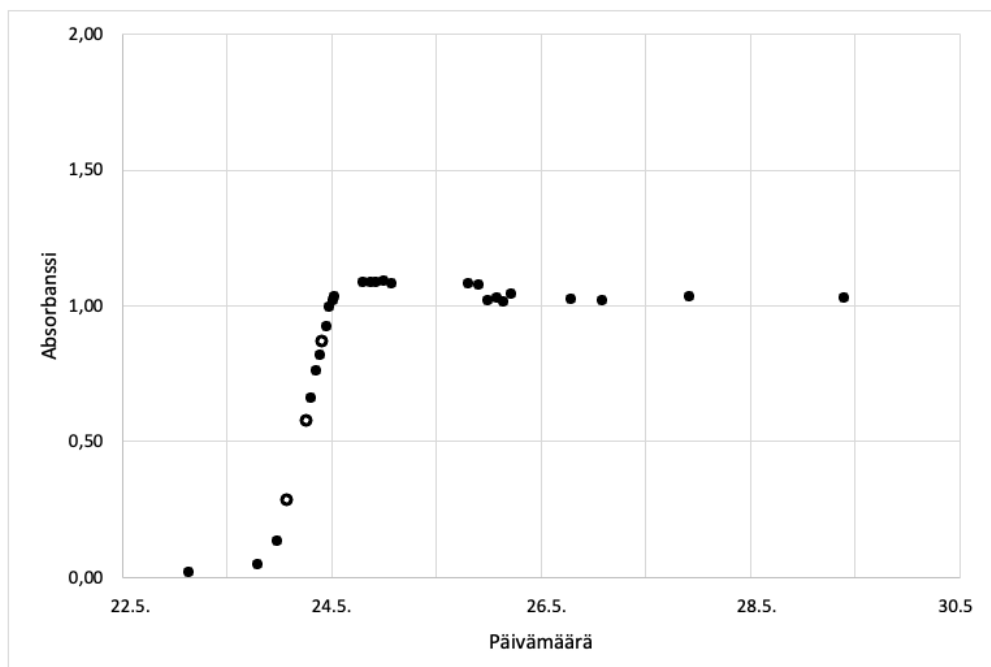
Weber, Kela P. & Legge, Raymond L. 2010. Community-Level Physiological Profiling. Verkkoaineisto. Teoksessa Clifton, N. J. Methods in molecular biology. <https://www.researchgate.net/publication/38060479_Community-Level_Physiological_Profiling>. Luettu 17.4.2023.

ZoBell Marine Agar 2216. Technical Data. Verkkoaineisto. HiMedia Laboratories. <https://exodocientifica.com.br/_technical-data/M384.pdf>. Helmikuu 2017. Luettu 14.4.2023.

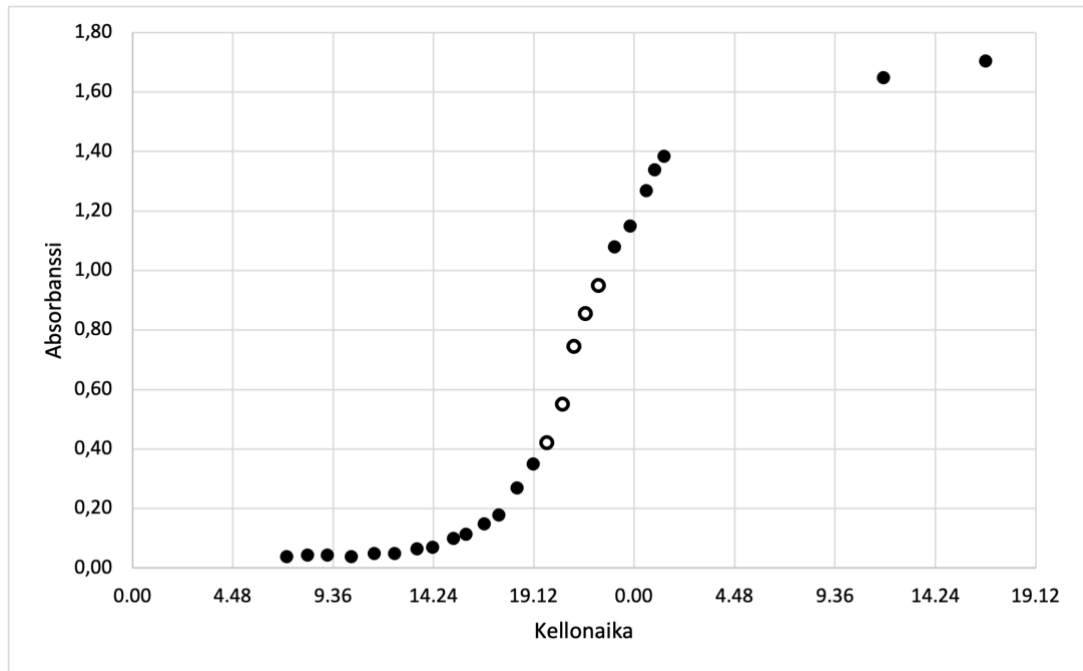
Generaatioajan tarkastelusta poisjätettyjen jääbakteerien kasvukäyrät



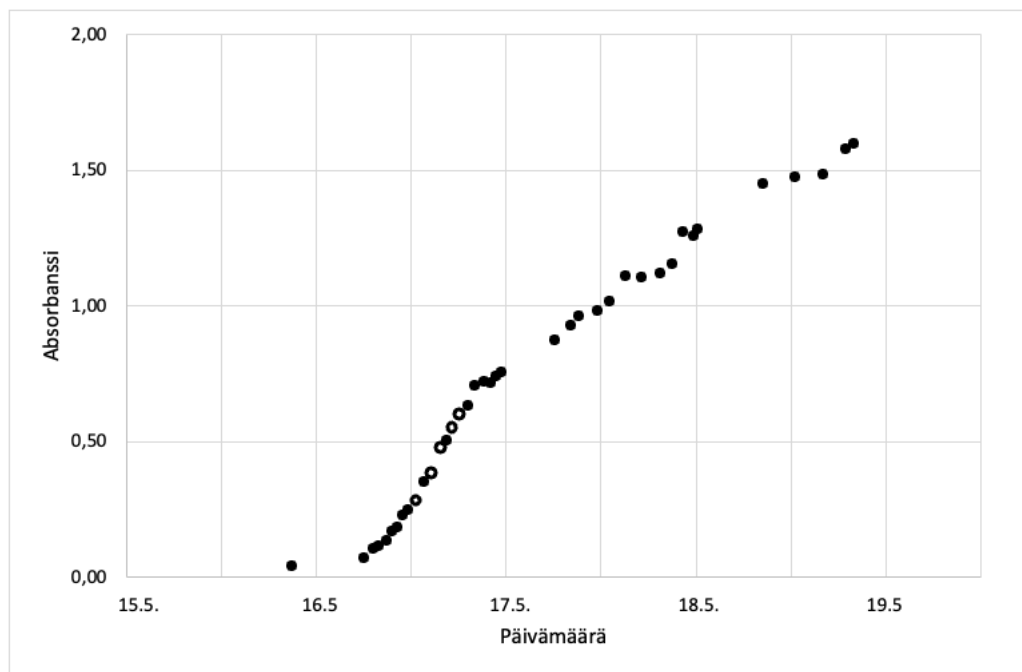
Kuva 1. *Psychrobacter* sp. 118 -kannan kasvukäyrä 20 °C:ssa.



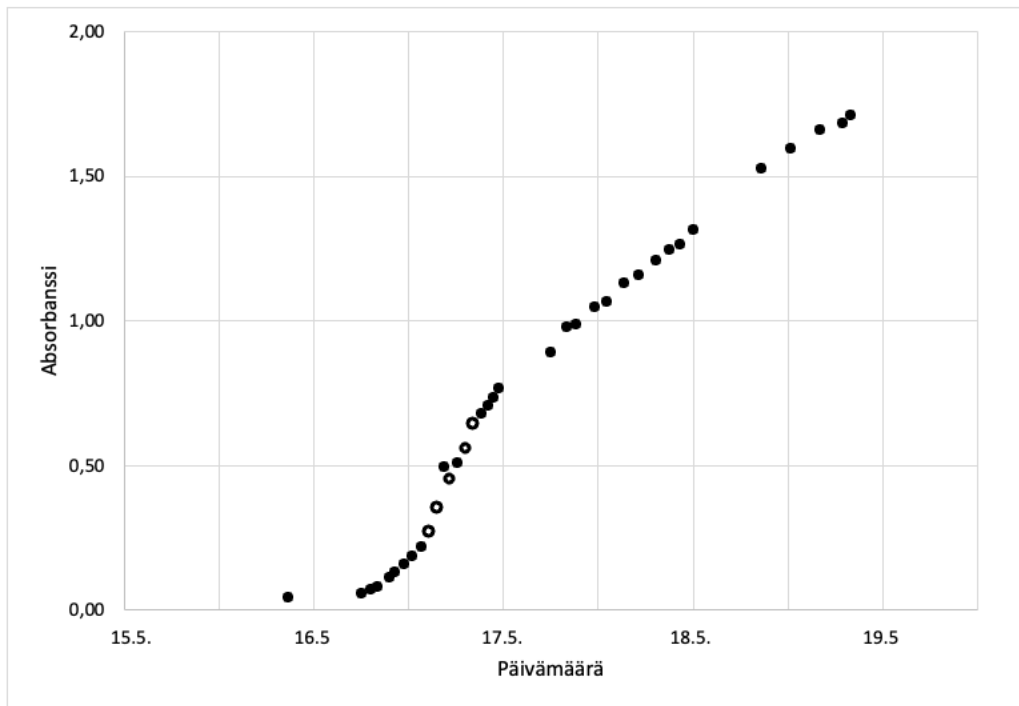
Kuva 2. *Pseudomonas* sp. 132 -kannan kasvukäyrä 20 °C:ssa.



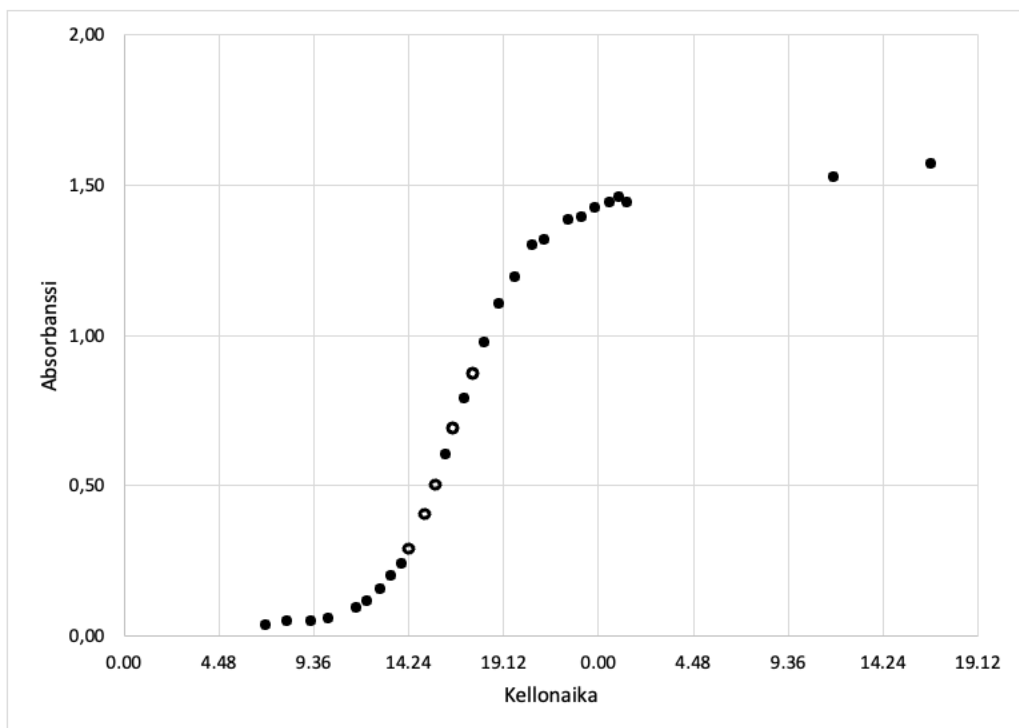
Kuva 3. *Halomonas* sp. 363 -kannan kasvukäyrä 20 °C:ssa.



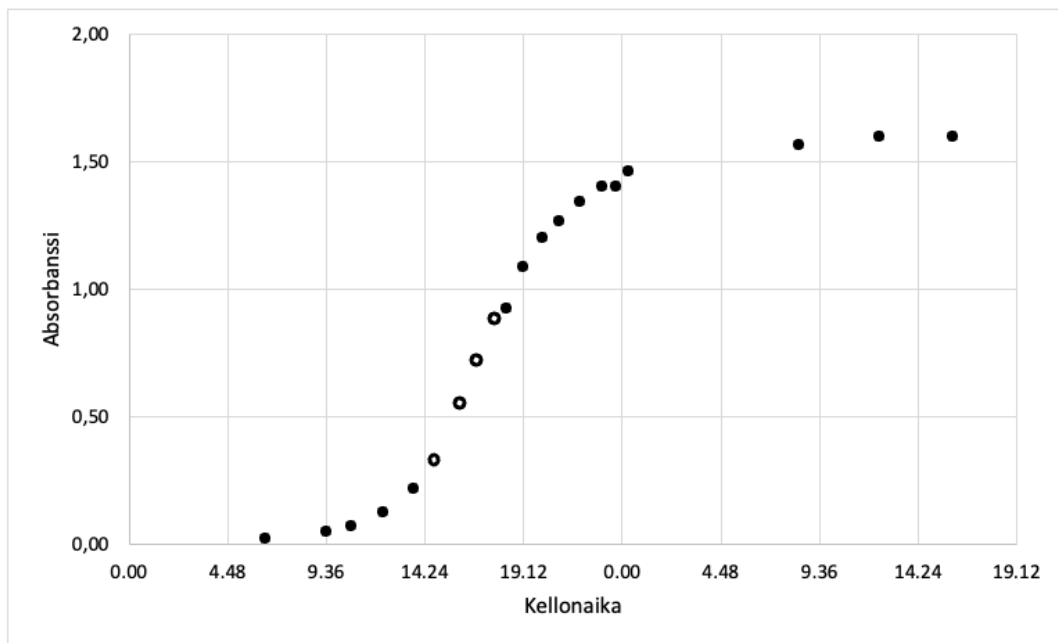
Kuva 4. *Paracoccus* sp. 392 -kannan kasvukäyrä 16 °C:ssa.



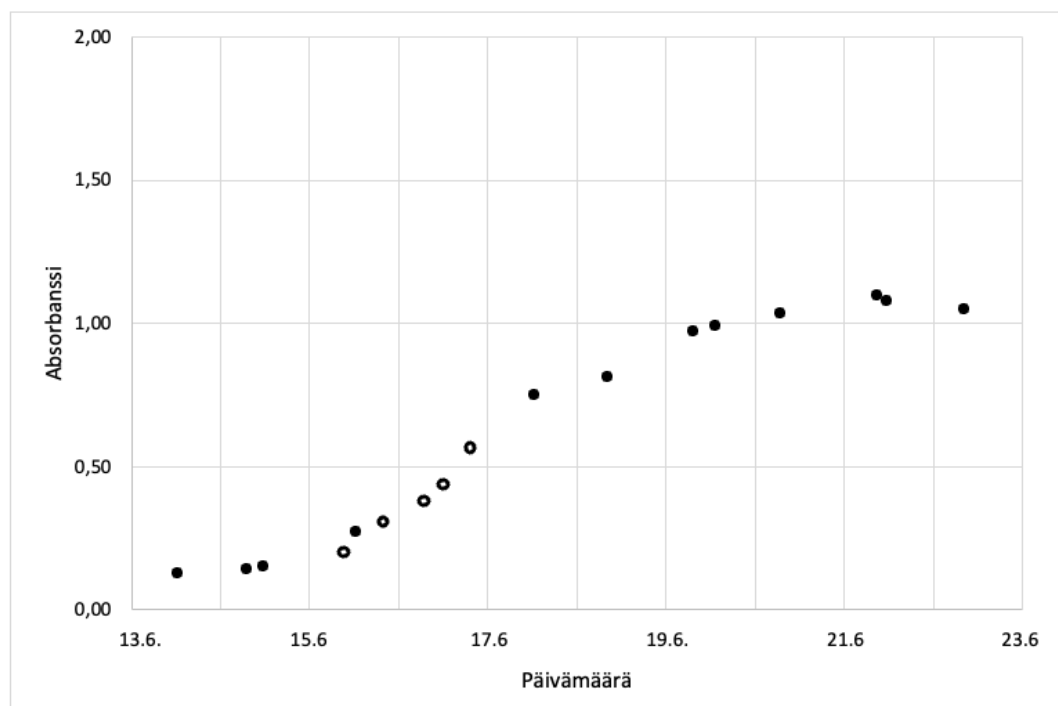
Kuva 5. *Octadecabacter* sp. 405 -kannan kasvukäyrä 16 °C:ssa.



Kuva 6. *Psychrobacter* sp. N1 -kannan kasvukäyrä 16 °C:ssa.



Kuva 7. *Psychrobacter* sp. N73 -kannan kasvukäyrä 16 °C:ssa.



Kuva 8. *Octadecabacter* sp. 419 -kannan kasvukäyrä 4 °C:ssa.

Jäähakteenien yksittäisten ja aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvot eksponentiaalisen kasvuvaiheen näytteissä virtaussytometrillä määritettynä

Ryhmä 1

Taulukko 1. *Pseudoalteromonas* sp. 415 -kannan yksittäisten ja aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvot.

Näytteen numero	Yksittäisten solujen lukumäärien keskiarvo	Aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvo
1	74 452 862	2 336 021
2	178 809 846	4 417 875
3	247 718 316	2 717 747
4	374 951 260	2 270 777
5	508 078 259	812 945

Taulukko 2. *Pseudoalteromonas* sp. 121 -kannan yksittäisten ja aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvot.

Näytteen numero	Yksittäisten solujen lukumäärien keskiarvo	Aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvo
1	55 184 728	9 387 806
2	105 452 607	3 338 191
3	239 342 165	1 307 648
4	291 244 067	666 534

Taulukko 3. *Leifsonia xyli/Rhodoglobus* sp. 140 -kannan yksittäisten ja aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvot.

Näytteen numero	Yksittäisten solujen lukumäärien keskiarvo	Aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvo
1	5 127 049	276 249
2	13 931 123	852 933
3	20 003 466	267 606
4	31 978 613	277 877

Taulukko 4. *Polaribacter* sp. 408 -kannan yksittäisten ja aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvot.

Näytteen numero	Yksittäisten solujen lukumäärien keskiarvo	Aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvo
1	94 812 590	34 938 782
2	189 194 365	119 211 922
3	373 975 492	224 065 930

Taulukko 5. *Colwellia* sp. 403 -kannan yksittäisten ja aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvot.

Näytteen numero	Yksittäisten solujen lukumäärien keskiarvo	Aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvo
1	35 142 464	5 516 013
2	61 779 365	50 855 047
3	215 881 136	143 005 643
4	287 685 777	167 505 331

Taulukko 6. *Paraglaciicola* sp. 372 -kannan yksittäisten ja aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvot.

Näytteen numero	Yksittäisten solujen lukumäärien keskiarvo	Aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvo
1	86 717 072	14 551 615
2	224 487 995	44 842 171
3	298 187 129	36 519 126
4	444 765 650	35 136 563
5	569 312 986	21 505 805

Taulukko 7. *Octadecabacter* sp. 419 -kannan yksittäisten ja aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvot.

Näytteen numero	Yksittäisten solujen lukumäärien keskiarvo	Aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvo
1	4 932 143	842 044
2	5 124 428	1 303 028
3	4 767 508	1 680 142
4	11 577 529	2 011 381
5	11 012 443	2 477 445

Ryhmä 2

Taulukko 8. *Halomonas* sp. 363 -kannan yksittäisten ja aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvot.

Näytteen numero	Yksittäisten solujen lukumäärien keskiarvo	Aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvo
1	3 901 225	85 952 956
2	4 047 090	110 585 085
3	3 872 975	229 580 212
4	9 833 395	345 422 360

Taulukko 9. *Octadecabacter* sp. 405 -kannan yksittäisten ja aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvot.

Näytteen numero	Yksittäisten solujen lukumäärien keskiarvo	Aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvo
1	521 332	29 843 082
2	537 015	41 068 767
3	481 302	57 242 600
4	595 686	82 591 028
5	483 114	96 916 298

Taulukko 10. *Paracoccus* sp. 392 -kannan yksittäisten ja aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvot.

Näytteen numero	Yksittäisten solujen lukumäärien keskiarvo	Aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvo
1	432 861	35 774 156
2	502 317	54 613 044
3	454 870	65 817 019
4	629 534	80 087 127
5	466 238	85 458 861

Taulukko 11. *Psychrobacter* sp. N1 -kannan yksittäisten ja aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvot.

Näytteen numero	Yksittäisten solujen lukumäärien keskiarvo	Aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvo
1	267 756	4 290 893
2	8 552	60 311 776
3	44 863	42 028 418
4	56 899	121 733 945
5	436 516	124 278 775

Taulukko 12. *Psychrobacter* sp. N73 -kannan yksittäisten ja aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvot.

Näytteen numero	Yksittäisten solujen lukumäärien keskiarvo	Aggregoituneiden solujen lukumäärien keskiarvo
1	64 312	94 956 449
2	53 119	130 018 148
3	207 755	233 399 030
4	461 429	294 061 025