

KOBALAMIININ JA TIAMIININ VAIKUTUS *EUGLENA*
GRACILIS -MIKROLEVÄN BIOMASSAN TUOTTOON
JA VILJELMÄN BAKTEERIEN LUKUMÄÄRÄÄN JA
YHTEISÖN KOOSTUMUKSEEN

KATARIINA LAHTI-LEIKAS

BIO- JA
YMPÄRISTÖTIETEELLINEN
TIEDEKUNTA
EKOSYSTEEMIT JA YMPÄRISTÖ
HELSINGIN YLIOPISTO
PRO GRADU -TUTKIELMA
11.11.2018



Tiedekunta –Fakultet – Faculty Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution– Department	
Tekijä – Författare – Author Katriina Tuulikki Lahti			
Työn nimi – Arbetstitel – Title KOBALAMIININ JA TIAMIININ VAIKUTUS EUGLENA GRACILIS -MIKROLEVÄN BIOMASSAN TUOTTOON JA VILJELMÄN BAKTEERIEN LUKUMÄÄRÄÄN JA YHTEISÖN KOOSTUMUKSEEN			
Oppiaine– Läroämne – Subject Ympäristöekologia			
Työn laji – Arbetetsart – Level Pro gradu -tutkielma		Aika – Datum – Month and year 11.11.2018	
		Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 78	
<p>Tiivistelmä – Referat – Abstract <i>Euglena gracilis</i> Klebs (CCAP 1224/5Z) on toisenvarainen kobalamiinin ja tiamiinin suhteen. Tämän vuoksi se tarvitsee ulkoisen kobalamiinin ja tiamiinin lähteen kasvualustansa. Luonnonvesissä mikrolevien kobalamiinin ja tiamiinin lähteitä ovat bakteerit ja arkit. Mikrolevä ja bakteeri voivat muodostaa kobalamiinin ja tiamiinin vaihtoon perustuvan symbioosiin, ja vitamiinien synteisiin kykenevä bakteeri pystyy useissa tapauksissa ylläpitämään mikrolevän kasvua jopa yhtä tehokkaasti kuin mikrolevän kasvualustaan lisätyt vitamiinit. Kobalamiinia ja tiamiinia syntetisoivat bakteerit voivat elää mikroleväviljelmässä joko vapaina tai mikrolevään kiinnittyneinä soluina. Kobalamiinin ja tiamiinin lisäys mikrolevän kasvualustaan saattaa johtaa kyseistä vitamiinia syntetisoivien bakteerien määrän laskuun ja siten myös bakteeriyhteisön koostumuksen muuttumiseen mikroleväviljelmässä. Tässä pro gradu -tutkielmassa selvitettiin vaikuttaako kasvatusalustaan lisätty kobalamiini ja tiamiini <i>E. gracilis</i> -mikrolevän biomassan kuivapainoon sekä mikrolevään kiinnittyneiden, että vapaiden bakteerien lukumäärään ja yhteisön koostumukseen. Mikrolevä- ja bakteerisolujen suhteellinen lukumäärä vakioituu kasvatuksen kuluessa, minkä vuoksi tässä tutkielmassa keskityttiin yllä mainittuihin muuttujiin mikrolevän kasvun stationaarivaiheessa. Tutkielma toteutettiin yhteistyössä Helsingin yliopiston elintarvike- ja ravitsemustieteiden osaston kanssa, missä analysoitiin tutkielmassa kasvatetusta <i>E. gracilis</i> -mikrolevästä ja sen kasvatusalustasta kobalamiini toisen pro gradu -työn yhteydessä.</p> <p>Koe toteutettiin kasvattamalla <i>E. gracilis</i> -mikrolevää neljässä rinnakkaisessa lisätyä kobalamiinia ja tiamiinia sisältävässä ja sisältämättömässä kasvatusalustassa. Mikroleväviljelmien mikroleväsiirroksista ja stationaarista kasvunvaiheesta otettiin näytteitä mikrolevän kuivapainon ja kobalamiinipitoisuuden ja kasvatusalustan kobalamiinipitoisuuden ja ravinteiden sekä viljelmien bakteerimäärän ja -yhteisökoostumuksen selvittämiseksi. Mikrolevän kuivapaino määritettiin gravimetrisesti, bakteerien määrä qPCR-menetelmällä ja yhteisökoostumus Illumina MiSeq -sekvensointimenetelmällä. Kasvatusalustan, näytteenottohetken, ravinteiden, mikrolevän kobalamiinipitoisuuden ja kasvatusalustan kobalamiinipitoisuuden vaikutusta mikrolevän kuivapainoon ja vapaiden ja mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrään, luokkiin ja sukuihin testattiin tilastollisesti Imer-testillä. Vapaiden ja mikroleviin kiinnittyneiden bakteerien sekvenssiaineiston 10 yleisintä bakteeriluokkaa ja -sukua vertailtiin kasvatusalustojen sisällä ja niiden välillä. Sekvenssiaineistolle laskettiin myös Shannon-Wienerin -diversiteetti-indeksi, ja kasvatusalustan, näytteenottohetken, ravinteiden, mikrolevän kobalamiinipitoisuuden ja kasvatusalustan kobalamiinipitoisuuden vaikutusta vapaiden ja mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien diversiteettiin vertailtiin tilastollisesti.</p> <p>Tässä pro gradu -tutkielmassa kasvatusalusta vaikutti sekä <i>E. gracilis</i> -mikrolevän kuivapainoon, että mikrolevään kiinnittyneiden ja vapaiden bakteerien määrään ja yhteisön koostumukseen. <i>E. gracilis</i> -mikrolevän biomassan tuotto oli tehokkaampaa lisätyä kobalamiinia ja tiamiinia sisältämättömällä kasvatusalustalla. Samaisella kasvatusalustalla sekä mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrä oli korkeampi. Lisätyä kobalamiinia ja tiamiinia sisältämättömällä kasvatusalustalla kasvaneessa mikroleväviljelmässä yleistyivät enemmän sellaiset bakteerisuvut, joihin kuuluu monia luonnonvesissä eläviä kobalamiinia ja/tai tiamiinia syntetisoivia bakteerilajeja. Gammaproteobakteerien luokkaan kuuluvat <i>Gammaproteobacteria</i> sp., <i>Pseudomonas</i>-, <i>Pseudomonaceae</i> sp., <i>Halomonas</i>- ja <i>Alteromonadales</i> -suvut sekä alphaproteobakteerien luokkaan kuuluva <i>Rhodobactereaceae</i> -bakteerisuku yleistyivät sekä lisätyä kobalamiinia ja tiamiinia sisältämättömällä kasvatusalustalla kasvaneen mikroleväviljelmän vapaissa, että mikrolevään kiinnittyneissä bakteereissa enemmän kuin lisätyä kobalamiinia ja tiamiinia sisältävällä kasvatusalustalla kasvaneen mikroleväviljelmän bakteereissa. Koska lisätyä kobalamiinia ja tiamiinia sisältämättömällä kasvatusalustalla mikroleväbiomassan ja kasvatusalustan kobalamiinipitoisuus laski kasvatuksen aikana, ja koska kaikkia mikroleväviljelmän yleisimpiä kobalamiinia ja tiamiinia syntetisoivia bakteerisukuja löytyi sekä vapaista että mikrolevään kiinnittyneistä bakteereista, tämän pro gradu -tutkielman pohjalta ei kuitenkaan voida sanoa syntetisoivatko yleistyneet bakteerit todella mikrolevälle kasvatuksen aikana kobalamiinia ja tiamiinia, tai elivätkö vitamiineja syntetisoivat bakteerit <i>E. gracilis</i> -mikroleväviljelmässä mikrolevään kiinnittyneinä vai vapaina bakteereina.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Bakteeriyhteisö, <i>Euglena gracilis</i> -mikrolevä, kobalamiini, tiamiini			
Ohjaaja tai ohjaajat – Handledare – Supervisor or supervisors Martin Romantschuk, Anne Ojala, Marika Tossavainen			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information Tämä pro gradu -tutkielma toteutettiin osana LEVARBIO (Levien arvokkaiden biomolekyylien ja biomassan hyödyntäminen ravinnossa, rehuna ja energiana) -hanketta, joka vastaa tarpeeseen kehittää hajautettua uusiutuvan energian kannattavaa tuotantoa, edistää ravinnekierrätystä, rehuuotannon omavaraisuutta ja biomassan jalostamista arvotuotteiksi.			

Sisällys

1. Johdanto	3
1.1. Tutkimusaihe ja tutkimuksen tarkoitus	3
1.2. Kobalamiini ja tiamiini	5
1.3. Kobalamiinia ja tiamiinia syntetisoivat bakteerit.....	6
1.4. Kobalamiini ja tiamiini mikrolevissä.....	7
1.5. Kobalamiini ja tiamiini mikrolevä-bakteeri -symbioosissa	9
1.6. Bakteerien ja mikrolevän välinen kobalamiinin ja tiamiinin vaihto mikrolevien luonnonpopulaatioissa ja laboratorioviljelmissä.....	10
1.7. <i>Euglena gracilis</i>	12
1.8. Tutkimushypoteesit	14
2. Aineisto ja menetelmät	15
2.1. Kasvatusalustat ja mikroleväsiirros	15
2.2. Koeasetelma	16
2.3. Kokeen aloitus ja näytteenotto	17
2.4. <i>E. gracilis</i> -mikroleväviljelmän biomassan kuivapainon määrittäminen.....	19
2.5. Näytteenotto DNA -analyysiin.....	19
2.6. DNA:n eristys	20
2.7. qPCR -analyysi	21
2.8. PCR -analyysi	24
2.9. Sekvensointi	26
2.10. Sekvensointiaineiston käsittely ja Shannon-Wiener -diversiteetti-indeksi..	26
2.11. Ravinteiden määrittäminen.....	27
2.12. Mikrolevän kuivapaino- ja 16S rRNA geenin pitoisuus -tulosten tilastollinen testaus.....	27
2.13. Mikroleväviljelmien bakteerien sekvenssiaineiston ja diversiteetin vertailu ja tilastollinen testaus	28
3. Tulokset	30
3.1. pH.....	30
3.2. Mikroleväbiomassan kuivapaino	30
3.3. Bakteerien määrä.....	32
3.4. Bakteeriyhteisöt.....	35

3.4.1. Kasvatusalustan ja näytteenottohetken vaikutus bakteeriyhteisön koostumukseen.....	35
3.4.2. Bakteeriluokat	38
3.4.3. Bakteerisuvut.....	39
3.4.4. Shannon-Wiener -diversiteetti-indeksi.....	41
3.5. Kokonaistypen ja kokonaisfosforin pitoisuus	42
3.6. Kasvatusalustan ja mikroleväbiomassan kobalamiinipitoisuuden vaikutus mikroleväbiomassan kuivapainoon ja bakteerien määrään	46
4. Tulosten tarkastelu	49
4.1. Kasvatusalustaan lisätyn kobalamiinin ja tiamiinin vaikutus <i>E. gracilis</i> - mikroleväbiomassan kuivapainoon	49
4.2. Kasvatusalustaan lisätyn kobalamiinin ja tiamiinin vaikutus <i>E. gracilis</i> - mikroleväviljelmän bakteerien määrään	55
4.3. Kasvatusalustan vaikutus <i>E. gracilis</i> -mikroleväviljelmän bakteeriyhteisöön	61
5. Menetelmien soveltuvuus ja tutkimuksen virhelähteet	65
6. Johtopäätökset	66
7. Kiitokset	67
Lähdeluettelo.....	68
Liitteet	78

1. Johdanto

1.1. Tutkimusaihe ja tutkimuksen tarkoitus

Euglena gracilis Klebs (CCAP 1224/5Z) kuuluu B₁₂- (kobalamiini) ja B₁- (tiamiini) vitamiinin suhteen toisenvaraisiin eli auksotrofisiin mikrolevälajeihin. Kasvaakseen tehokkaasti se tarvitsee ulkoisen kobalamiinin ja tiamiinin lähteen kasvualustansa (Sekhara Varma ym. 1961, Isegawa ym. 1984, Shigeru ym. 1987, Buetow 2001). Luonnossa mikrolevien kobalamiinin ja tiamiinin lähteitä ovat pääasiassa moniin eri bakteerisukuihin kuuluvat bakteerit ja arkit (Sañudo-Wilhelmy ym. 2014, Gómez-Consarnau ym. 2018). Mikrolevä ja bakteeri voivat muodostaa vitamiinien vaihtoon perustuvan symbioosiin, jossa bakteeri syntetisoi mikrolevälle vitamiineja saaden mikrolevältä vaihdossa muun muassa orgaanista hiiltä. Useissa tapauksissa kobalamiinia ja tiamiinia syntetisoiva bakteeri pystyy ylläpitämään mikrolevän kasvua yhtä tehokkaasti kuin mikrolevän kasvatusalustaan lisätyt vitamiinit. (Watanabe ym. 2005, Croft ym. 2006, Sapp ym. 2007, Park ym. 2008, Guo ym. 2014, Cruz-López ym. 2016).

Kobalamiinia ja tiamiinia syntetisoivat bakteerit elävät mikroleväviljelmissä vapaina tai mikrolevään kiinnittyneinä soluina (Croft ym. 2005, Kazamia ym. 2012, Cruz-López ym. 2016). Mikrolevän siihen kasvun vaiheeseen mennessä, missä soluja syntyy ja kuolee yhtä paljon (stationaarivaihe), mikrolevä- ja bakteerisolujen suhdeluku asettuu yleensä samaan suhdelukuun riippumatta solujen suhdeluvusta kasvatuksen alussa (Han ym. 2016). Kobalamiinin ja tiamiinin lisäys mikrolevän kasvatusalustaan johtaa kobalamiinia ja tiamiinia syntetisoivien bakteerien määrän laskuun, mikä puolestaan vaikuttaa mikrolevä- ja bakteerisolujen suhdelukuun ja bakteeriyhteisön sukukoostumukseen (Kazamia ym. 2012, Cruz-López ym. 2016).

Toistaiseksi *E. gracilis* -mikroleväviljelmässä elävien luontaisten bakteerien roolia mikrolevän vitamiinien lähteenä on tutkittu vain vähän. Muilla mikrolevillä on

kuitenkin voitu osoittaa, että mikrolevän kasvatusalustaan lisätty hinnakas synteettinen kobalamiini ja tiamiini, on mahdollista korvata kyseisiä vitamiineja syntetisoivien bakteerien avulla (Croft ym. 2005, Kazamia ym. 2012, Cruz-López ym. 2016). Kasvatusalustaan lisättyjen vitamiinien korvaaminen vitamiineja syntetisoivilla bakteereilla voisi tehostaa *E. gracilis* -mikrolevästä eristettyjen arvokkaiden biomolekyylien, kuten esimerkiksi E-vitamiinin (Fujita ym. 2008, Mokrosnop ym. 2016), tuotannon taloudellisuutta, ettenkin jos *E. gracilis* -mikrolevästä saataisiin talteen muiden arvokkaiden biomolekyylien lisäksi myös mikrolevän varastoima, alun perin bakteerien tuottama kobalamiini ja tiamiini.

Tässä pro gradu -tutkielmassa kasvatettiin *E. gracilis* -mikrolevää lisättyä kobalamiinia ja tiamiinia sisältävällä ja sisältämättömällä kasvatusalustalla. Tarkoituksena oli selvittää, miten *E. gracilis* -mikrolevän kasvatusalustaan lisätty kobalamiini ja tiamiini vaikuttavat mikrolevän kuivapainoon ja mikrolevään kiinnittyneiden ja vapaiden bakteerien lukumäärään, yhteisökoostumukseen ja diversiteettiin. Lisättyjä vitamiineja sisältämättömällä kasvatusalustalla *E. gracilis* -mikrolevän oletettiin saavan tiamiinia ja kobalamiinia mikroleväviljelmässä esiintyviltä luontaisilta bakteereilta. Lisättyjä vitamiineja sisältävällä kasvatusalustalla mikrolevän kobalamiinin ja tiamiinin saanti taattiin lisäämällä kasvatusalustaan kyseisiä vitamiineja. Koska mikrolevä- ja bakteerisolujen suhdeluku vakioituu kasvatuksen kuluessa (Han ym. 2016, Kazamia ym. 2012), tässä tutkielmassa pyrittiin välttämään vitamiinien osalta erilaisilla kasvatusalustoilla kasvatetun mikroleväviljelmän kasvuvaiheesta johtuvat vaihtelut bakteerien määrissä ja yhteisössä tutkimalla yllämainittuja muuttujia mikrolevän kasvun stationaarivaiheessa.

Tässä pro gradu -tutkielmassa kasvatetusta mikroleväbiomassasta ja sen kasvatusalustasta analysoitiin kobalamiini (Liite 1.) osana Helsingin yliopiston LEVARBIO (Levien arvokkaiden biomolekyylien ja biomassan hyödyntäminen ravinnossa, rehuna ja energiana) -projektia toisen pro gradu -työn yhteydessä Helsingin yliopiston elintarvike- ja ravitsemustieteiden osastolla Viikissä (Aalto, 2017). Ainoastaan kobalamiini analysoitiin, koska toisin kuin tiamiinia, sitä

saadaan vain eläinperäisistä lähteistä (Camiener ym. 1960, Mitsuda ym. 1971, Begley ym. 1999, Croft ym. 2007, Watanabe 2007). Tämä tekee mikroleväbiomassasta kiinnostavan vaihtoehtoisen kobalamiinin lähteen. Kobalamiinituloksia hyödynnettiin tämän pro gradu -tutkielman tilastollisissa testeissä.

1.2. Kobalamiini ja tiamiini

Vesiliukoisiin B-vitamiineihin kuuluva kobalamiini on kobolttia sisältävä tetrapyrroli (Croft ym. 2006). Kobalamiini-termillä viitataan yleisesti kobolttia sisältäviin yhdisteisiin, korrinoideihin, joilla on koboltin kanssa yhteensopivan nukleotidin, DMB:n (5,6-dimetyylibentsimidatsoli) sisältävä alempi aksiaalinen ligandi (Watanabe 2007). Luonnossa kobalamiinia esiintyy sekä ihmiselle käyttökelpoisessa (bioaktiivinen muoto), että käyttökelvottomassa muodossa (pseudomuoto) (Taga ym. 2008). Kobalamiinin pseudomuoto eroaa bioaktiivisesta muodosta sen alemman α -aksiaalisen ligandin sisältämien yhdisteiden osalta. Bioaktiivisen kobalamiinin ligandissa on CH_3 - ja CN -ryhmiä, kun taas pseudokobalamiinin ligandi saattaa sisältää myös NH_2 -ryhmän (Taga ym. 2008). Bioaktiivisiin kobalamiinin muotoihin luetaan AdoB_{12} -, MeB_{12} -, syano- ja hydroksikobalamiini (Watanabe ym. 2002, Taga ym. 2008). Bioaktiiviset kobalamiinin muodot toimivat kaikilla eliöillä koentsyymeinä muun muassa metioniinin ja metyyliinalonyyni-KoA-mutaasin synteesissä (Watanabe ym. 2002). Metioniinilla ja metyyliinalonyyni-KoA-mutaasilla on merkittävä rooli eliöiden DNA:n synteesissä ja monissa keskeisissä metaboliareaktioissa, kuten aminohappojen synteesissä ja hiilen palauttamisessa sitruunahappokiertoon (Shimizu 1996).

Myös tiamiini kuuluu vesiliukoisiin B-vitamiineihin. Tiamiini muodostuu tiatsolirenkaasta ja pyrimidiiniryhmästä, jotka yhdessä muodostavat metyleeniryhmän yhdistämän rikkiä sisältävän kaksirenkaisen rakenteen (Ledesma-Amaro ym. 2013). Tiamiinin hydroksiryhmän fosforyloituminen solussa

johtaa tiamiinimonofosfaatin (ThMP) muodostumiseen, joka edelleen fosforyloituu tiamiinidi- (ThDP), tiamiinitri- (ThTP) ja adensiinitiamiinitrifosfaattiksi (Jurgenson ym. 2009, Ledesma-Amaro ym. 2013). ThDP on tiamiinin bioaktiivinen muoto, joka muodostuu difosfaattiin päättyvästä sivuketjusta, viisijäsenisestä tiatsolirenkaasta ja kuusijäsenisestä aminopyrimidiinirenkaasta. Se toimii kofaktorina monelle erilaiselle entsyymille, jotka osallistuvat hyvin monien eliöiden tärkeisiin aineenvaihduntareaktioihin. ThDP avustaa etenkin sitruunahappokierrossa ja hiili-hiili sidosten sekä hiilen ja rikin, hapen, typen ja vedyn välisten sidosten tekemisessä ja purkamisessa. (Frank ym. 2007, Jurgenson ym. 2009)

1.3. Kobalamiinia ja tiamiinia syntetisoivat bakteerit

Tiamiinia syntetisoivat bakteerit, arkit, kasvit, sienet ja osa mikrolevistä, mutta kobalamiinia syntetisoivat ainoastaan bakteerit ja arkit (Camiener ym. 1960, Mitsuda ym. 1971, Roth ym. 1993, Begley ym. 1999, Watanabe 2007). Yli 400 tutkitusta meressä elävästä bakteerilajista, 37 % on löydetty kobalamiinin ja 76 % tiamiinin synteetireitti (Sañudo-Wilhelmy ym. 2014). Samassa bakteerisuvussa voi olla lajeja, jotka pystyvät syntetisoimaan vain toista tai molempia kyseisistä vitamiineista (Sañudo-Wilhelmy ym. 2014, Gómez-Consarnau ym. 2018). Etenkin aktinobakteerien, syanobakteerien ja alpha-, beta, gammaproteobakteerien sekä bacteroidetes-, verrucomicrobia-, aquificae-, firmicutes-, plantomycetes- ja deinococcus-thermus- bakteeriluokkien bakteereissa on sekä tiamiinia että kobalamiinia syntetisoivia bakteereja (Sañudo-Wilhelmy ym. 2014, Gómez-Consarnau ym. 2018). Tämän pro gradu -tutkielman kannalta kiinnostavia bakteereja ovat myös roseobakteereihin kuuluvat *Marivita* sp. ja *Marinobacter flavimaris*, jotka kykenevät ylläpitämään kobalamiinin ja tiamiinin suhteen auksotrofisten mikrolevien kasvua, sekä gammaproteobakteereihin kuuluva *Halomonas*, joka on kyennyt ylläpitämään kobalamiinin suhteen auksotrofisten mikrolevien kasvua laboratorio-olosuhteissa (Croft ym. 2005, Cruz-López ym. 2016).

1.4. Kobalamiini ja tiamiini mikrolevissä

Yli puolet 306 tutkitusta mikrolevälajista on auksotrofisia kobalamiinin ja 22 % tiamiinin suhteen (Maruyama ym. 1989, Croft ym. 2006, Droop 2007). Mikrolevien kobalamiini- ja tiamiiniauksotrofia ei kuitenkaan periydy järjestelmällisesti mikrolevien evoluutiopuun sisällä, vaan sitä esiintyy mikrolevien eri kantamuodoista polveutuvissa mikroleväsuvuissa. Samassa suvussa voi siis olla lajeja, jotka ovat kobalamiinin ja tiamiinin suhteen auksotrofisia, ja lajeja, jotka eivät tarvitse kobalamiinia aineenvaihdunnassaan lainkaan, sekä lajeja, jotka syntetisoivat itse tarvitsemansa tiamiinin. Tämä viittaa siihen, että mikrolevien kobalamiini- ja tiamiiniauksotrofia on syntynyt useaan kertaan mikrolevien evoluution aikana. (Croft ym. 2005)

Kobalamiinin suhteen auksotrofiset mikrolevät, tarvitsevat muiden eliöiden tavoin kobalamiinia metioniinin ja metyyylimalonyyli-CoA-mutaasin synteesiin (Miyamoto ym. 2002, Pawlak ym. 2013). Mikrolevät syntetisoivat metioniinia joko MetE- tai MetH -entsyymien avulla (Croft ym. 2005). Mikrolevät, joilla on MetH-entsyymien synteessireitti, ovat kobalamiinin suhteen auksotrofisia, kun taas MetE-entsyymiä syntetisoivilla mikrolevillä ei ole tarvetta kobalamiinille. Tavallisesti mikrolevillä onkin käytössään vain joko MetE- tai MetH -entsyymi, mutta joiltakin mikrolevälajeilta löytyy molempien entsyymien synteessireitti. Tällaiset mikrolevät käyttävät MetH-entsyymiä silloin, kun kobalamiinia on niiden kasvualustassa. MetE-entsyymien ne ottavat käyttöönsä silloin, kun kobalamiinia ei ole saatavilla, mikä tekee niistä kobalamiinin suhteen riippumattomia. (Croft ym. 2006)

Tiamiinin suhteen mikrolevillä esiintyy kolmenlaista auksotrofiaa (Droop 1958, Shigeru ym. 1987). Tiamiinin suhteen auksotrofisilta mikroleviltä puuttuvat joko kaikki tiamiinin synteesiin tarvittavat geenit, tai tiamiinin pyrimidini- tai tiatsoliosan synteesiin tarvittavat geenit. Mikrolevät, joilta puuttuvat kaikki tiamiinin synteesiin tarvittavat geenit tarvitsevat tiamiinia kasvualustaansa

sellaisenaan. Ne mikrolevät, joilta puuttuvat tiamiinin pyrimidini- tai tiatsoliosan synteisiin tarvittavat geenit pystyvät syntetisoimaan tiamiinia itse, jos ne saavat kyseiset yhdisteet niiden elinympäristössä (Droop 1958, Shigeru ym. 1987, Paerl ym. 2015). Tiamiinin suhteen aukstrofisten mikrolevälajien lisäksi, mikrolevistä löytyy myös lajeja, jotka kykenevät syntetisoimaan itse tarvitsemansa tiamiinin alusta loppuun (Croft ym. 2006). Esimerkiksi *Chlamydomonas reinhardtii*-, *Cyanidioschyzon merolae*- ja *Thalassiosira pseudonana* -mikrolevien kasvatusalustaan ei tarvitse lisätä tiamiinia tai mitään sen esiastetta, mikä viittaa siihen, että kyseisiltä mikroleviltä löytyvät kaikki tiamiiniin synteisiin tarvittavat geenit (Croft ym. 2006). Tiamiinin synteessin kykenevät mikrolevät säätelevät tiamiinin synteesiä sen mukaan, mikä on sen pitoisuus ympäristössä. Mikrolevät käynnistävät tiamiinin synteisiin, kun tiamiinin pitoisuus laskee ympäristössä niiden elintoimintojen kannalta liian alhaiseksi. (Croft ym. 2007, McRose ym. 2014)

Mikrolevät myös varastoivat tehokkaasti useita erilaisia tiamiinin ja kobalamiinin muotoja (Miyamoto ym. 2002, Pinto ym. 2002, Watanabe ym. 2002, Kumudha ym. 2016). Esimerkiksi *Dunaliella salina* ja *E. gracilis* sisältävät kolmea erilaista kobalamiinin bioaktiivista muotoa MeB₁₂-, AdoB₁₂- sekä syanokobalamiinia (Miyamoto ym. 2002, Kumudha ym. 2016). Ihmiselle käyttökelpoisen bioaktiivisen kobalamiinin lisäksi mikrolevät sisältävät kuitenkin myös ihmisille käyttökeltvotonta pseudokobalamiinia (Miyamoto ym. 2002, Kumudha ym. 2016). Mikrolevät itse pystyvät hyödyntämään pseudokobalamiinia aineenvaihdunnassaan, mutta saavuttaakseen sillä yhtä hyvän biomassan kasvun kuin bioaktiivisella kobalamiinilla mikrolevät tarvitsevat pseudokobalamiinia bioaktiiviseen kobalamiiniin nähden moninkertaisia määriä (Helliwell ym. 2016).

Tiamiini voi olla mikrolevissä tiamiinina tai jonain sen fosfaattijohdannaisena, kuten esimerkiksi tiamiinidi- tai tiamiinitrifosfaattina. Esimerkiksi *E. gracilis* sisältää tiamiinin kolmea eri fosfaattijohdannaista (Shigeru ym. 1987). Tiamiini ja sen fosfaattijohdannaiset ovat käyttökelpoisia tiamiinin muotoja myös ihmisen aineenvaihdunnassa (Pinto ym. 2002, Gangolf ym. 2010).

1.5. Kobalamiini ja tiamiini mikrolevä-bakteeri -symbioosissa

Kaikilla kobalamiinin ja tiamiinin suhteen auksotrofisilla mikrolevillä uskotaan joskus olleen molempien kyseisten vitamiinien synteesireitti. Jotta joidenkin mikrolevien on kannattanut luopua kobalamiinin ja tiamiinin synteesireitistä, niiden on täytynyt saada riittävästi kobalamiinia ja tiamiinia niiden elinympäristöstä. Sille, mistä kobalamiinin ja tiamiinin suhteen auksotrofiset mikrolevät saavat tarvitsemansa vitamiinit, on olemassa kaksi teoriaa. (Karl 2002, Croft ym. 2006)

Merivirtausten, vuodenaikojen ja rannikon läheisyyden vaikutuksesta meriveden kobalamiini- ja tiamiinipitoisuus vaihtelee hyvin paljon eri merialueilla (Sañudo-Wilhelmy ym. 2012). Rannikkoalueilla meriveden kobalamiini- ja tiamiinipitoisuus voi olla <1-118 ng/l ja <1-350 ng/l, kun taas kauempana rannikosta pitoisuudet saattavat olla vain <1-9 ng/l ja <1-160 ng/l. (Vishniac ym. 1961, Natarajan 1970, Ohwada 1973, Bruno ym. 1978, Okbamichael ym. 2004, Bertrand ym. 2007, Panzeca ym. 2009, Koch ym. 2012, Sañudo-Wilhelmy ym. 2014). Alueellisten vaihteluiden lisäksi vitamiinien pitoisuuksissa on havaittu eroja myös eri vesikerrosten välillä (Sañudo-Wilhelmy ym. 2012). Etenkin kobalamiinin pitoisuuden tiedetään kasvavan meren pinnasta kohti pohjaa mentäessä ja tiamiinin pitoisuudetkin ovat usein korkeampia useita metrejä tuottavan vesikerrosten alapuolella (Sañudo-Wilhelmy ym. 2012). Tämän vuoksi toisen mikrolevien kobalamiini- ja tiamiiniauksotrofian syntymistä selittävän teorian mukaan mikrolevien käyttämä kobalamiini ja tiamiini on peräisin hajoavista soluista ja vesistöjen pohjassa eläviltä vitamiineja syntetisoivilta bakteereilta. Pohjasta vitamiinien uskotaan kulkeutuvan mikrolevien käyttöön ravintoverkon välityksellä ja veden liikkeen vaikutuksesta. (Karl 2002, Sañudo-Wilhelmy ym. 2014).

Toinen mikrolevien kobalamiini- ja tiamiiniauksotrofian syntymistä selittävä teoria pohjautuu laboratoriomikroleväkannoilla tehtyihin tutkimuksiin. Laboratoriokasvatuksissa mikrolevien on havaittu tarvitsevan tiamiinia ja

kobalamiinia suurempia pitoisuuksia kuin mitä luonnonvesistä on keskimäärin analysoitavissa (Croft ym. 2005). Tämän teorian mukaan luonnonvesien kobalamiini- ja tiamiinipitoisuudet ovat liian alhaisia ylläpitämään kobalamiinin ja tiamiinin suhteen auksotrofisten mikrolevien kasvua. Vesistöjen syvemmistä vesikerroksista kohti pintaa kulkeutuvien vitamiinien sijaan, mikrolevien uskotaan saavan kobalamiinia ja tiamiinia käyttöönsä suoraan niiden välittömässä läheisyydessä eläviltä bakteereilta ja muilta mikro-organismeilta (Croft ym. 2005, Grant ym. 2014). Kobalamiinin ja tiamiinin määrän uskotaan olevan bakteerien ja muiden mikro-organismien ansiosta mikroleväkasvustossa niin riittävä, että joillekin mikroleville on tullut edullisemmaksi elää sen varassa kuin syntetisoida itse kobalamiinia ja tiamiinia (Croft ym. 2005).

1.6. Bakteerien ja mikrolevän välinen kobalamiinin ja tiamiinin vaihto mikrolevien luonnonpopulaatioissa ja laboratorioviljelmissä

Laboratorio-olosuhteissa kobalamiinin ja tiamiini suhteen auksotrofisten mikrolevien on osoitettu kasvavan yhtä tehokkaasti kobalamiinia ja tiamiinia syntetisoivien bakteerien kanssa lisättyjä vitamiineja sisältämättömällä kasvatusalustalla kuin ilman bakteereja lisättyjä vitamiineja sisältävällä kasvatusalustalla (Croft ym. 2005, Kazamia ym. 2012, Cruz-López ym. 2016, Cruz-López ym. 2018). Bakteerien uskotaan syntetisoivan mikroleville niiden tarvitsemia vitamiineja tehostaakseen mikrolevien kasvua. Tehostunut mikrolevien kasvu lisää mikrolevien erittämän bakteereille käyttökelpoisen orgaanisen hiilen määrää mikroleväviljelmässä, mikä puolestaan tehostaa bakteerien kasvua. (Grant ym. 2014, Croft ym. 2005, Kazamia ym. 2012, Cruz-López ym. 2016)

Yleensä kobalamiinia ja tiamiinia syntetisoivat bakteerit esiintyvät luontaisesti kyseisten vitamiinien suhteen auksotrofisten mikrolevien rinnalla (Croft ym. 2005, Kazamia ym. 2012). Muun muassa tiamiinin ja kobalamiinin suhteen auksotrofisen *Lingulodinium polyedrum* -panssarilevän viljelmästä on löydetty sekä tiamiinia että kobalamiinia syntetisoivia bakteereja (Cruz-Lopez ym. 2016). Kobalamiinia ja

tiamiinia syntetisoiva bakteeri saattaa kuitenkin kyetä ylläpitämään kyseisten vitamiinien suhteen auksotrofisen mikrolevän kasvua, vaikka se ei olisikaan mikrolevän luontainen seuralainen (Kazamia ym. 2012). Esimerkiksi kobalamiinin suhteen auksotrofinen *Chlamydomonas nivalis* -mikrolevä kasvoi maaperässä elävän kobalamiinia syntetisoivan *Mesorhizobium loti* -bakteerin kanssa lisättyä kobalamiinia sisältämättömällä kasvatusalustalla yhtä hyvin kuin lisättyä kobalamiinia sisältävällä kasvatusalustalla ilman bakteeria (Kazamia ym. 2012).

Kobalamiinia ja tiamiinia syntetisoiva bakteeri ja vitamiineja vastaanottava mikrolevä, voivat toteuttaa vitamiinien ja orgaanisen hiilen vaihtoa joko toisiinsa kiinnittyneinä tai ilman fyysistä kontaktia (Kazamia ym. 2012, Cruz-López ym. 2016). Tiamiinin ja kobalamiinin suhteen aksotrofisen *L. polyedrum* -panssarilevän viljelmästä on löydetty sekä vapaita että mikrolevään kiinnittyneitä kobalamiinin ja tiamiinin synteisiin kykeneviä bakteereja (Cruz-López ym. 2016). Myös *M. loti* -bakteerin syntetisoiman kobalamiinin on havaittu riittävän ylläpitämään *Lobomonas rostrata* -mikrolevän kasvua ilman solujen välistä fyysistä kontaktia (Kazamia ym. 2012). Joissakin tapauksissa bakteerit syntetisoivat kobalamiinia, vaikka sitä tarvitsevia mikroleväsoluja ei ole läsnä. Esimerkiksi *Porphyridium purpureum* -mikrolevän ulkomembraanin pintaan tiukasti kiinnittynyt kobalamiinia syntetisoiva *Halomonas* sp. -bakteeri tehostaa kasvuaan ja kobalamiinin synteesiä myös silloin, kun sitä kasvatetaan pelkkää kaupallista mikroleväuutetta sisältävällä kasvatusalustalla ilman mikrolevää. (Croft ym. 2005)

Mikroleväviljelmissä bakteeri- ja mikroleväsolujen suhteellinen lukumäärä asettuu lähes samaan suhdelukuun kasvun stationaarivaiheeseen mennessä riippumatta solujen suhdeluvusta kasvatuksen alussa (Kazamia ym. 2012, Han ym. 2016). Symbionttisissa mikrolevä- ja bakteerisuhteissa, sen yhdisteen, jonka tuotannosta normaalisti toinen symbioosin osapuoli on vastuussa, lisääminen kasvatusalustaan vaikuttaa solujen väliseen suhdelukuun. Esimerkiksi kobalamiinin, tiamiinin ja B7-vitamiinin lisäys kyseisten vitamiinien suhteen auksotrofisen mikrolevän kasvatusalustaan johtaa kyseisiä vitamiineja syntetisoivien bakteerien määrän laskuun ja bakteeriyhteisön koostumuksen muutokseen. Samojen bakteerien

kasvattaminen mikrolevän kanssa kasvatusalustalla, johon vitamiineja ei ole lisätty johtaa puolestaan vitamiineja syntetisoivien bakteerien ja niiden sukujen suhteellisen määrän lisääntymiseen. (Kazamia ym. 2012, Cruz-López ym. 2016)

1.7. *Euglena gracilis*

Euglena-suvun mikrolevät ovat suuria, flagellan avulla liikkuvia yksisoluisia organismeja, joilla on sekä kasvien että eläinten kaltaisia piirteitä. Eläintieteilijöiden mukaan kyseessä onkin yhteyttävä alkueläin, kun taas kasvitieteilijät luokittelevat *Euglena*-mikrolevät silmäleviin. Tutkituin laji *Euglena*-mikrolevistä on *E. gracilis* ja sen eri kannat, joista ollaan kiinnostuneita etenkin proteiinien ja tokoferolin (E-vitamiini) lähteenä ja erilaisten jätejakeiden puhdistajana (Waygood ym. 1980, Barsanti ym. 2000, Ishii ym. 2006, Fujita ym. 2008, Rodríguez-Zavala ym. 2010, Schwarzhans ym. 2015, Mokrosnop ym. 2016).

Euglena-mikrolevät ovat pääasiassa makean veden mikroleviä, mutta ne sietävät hyvin suuriakin pH:n (2,3–11) ja lämpötilan (1–38 °C) vaihteluita, minkä vuoksi soluja voi löytyä olosuhteiltaan myös hyvin äärimmäisistä ympäristöistä. Miksotrofisina eliöinä *Euglena*-mikrolevät hankkivat energiansa yhteyttämällä ja hyödyntämällä orgaanisia hiiliyhdisteitä, mutta kasvaakseen tehokkaasti, ne tarvitsevat myös epäorgaanisia suoloja rikin, fosforin, typen ja mineraalien lähteeksi (Buetow 2001). Kobalmiinin ja tiamiinin suhteen auksotrofiset *Euglena*-mikrolevät kuten esimerkiksi *E. gracilis* var. *Bacillaris* ja *E. gracilis* Z tarvitsevat myös tiamiinia ja kobalamiinia kasvualustaansa (Hutner ym. 1956, Shigeru ym. 1987, Watanabe ym. 1992). *E. gracilis* var. *Bacillaris* ja *E. gracilis* Z reagoivat jo hyvin pieniin kobalamiinin pitoisuuksiin, minkä vuoksi niitä on perinteisesti käytetty kobalamiinipitoisuuden määrittämiseen ihmiskehon nesteistä ja ruoasta. Jo 0,25 ng/l kobalamiinia niiden kasvatusalustassa tehostaa niiden kasvua. (Hutner ym. 1956, Shigeru ym. 1987, Watanabe ym. 1992).

Kobalamiinia on yritetty korvata kobalamiinin suhteen auksotrofisen *E. gracilis* Z -mikrolevän kasvatuksessa muilla yhdisteillä, mutta yksikään niistä ei tehosta mikrolevän kasvua yhtä tehokkaasti kuin kobalamiini (Robbins ym. 1953, Hutner ym. 1956, Anderson 1964). Tiamiinin kohdalla tilanne on toinen, sillä se pystytään korvaamaan *E. gracilis* Z -mikrolevän kasvatusalustassa tiamiinin pyrimidiiniosalla 4-amino-5-hydroksimetyyli-2-metyylipyrimidinilla. Tämä viittaa siihen, että *E. gracilis* Z kuuluu niihin tiamiinin suhteen auksotrofisiin mikroleviin, joilta puuttuu vain pyrimidiinin synteesiin tarvittavat geenit tiamiinin synteesireitistä. (Shigeru ym. 1987)

Tiamiinin suhteen aksotrofisten *Euglena*-mikrolevien on havaittu tarvitsevan tiamiinia muun muassa viherhiukkasten synteesiin sekä sitruunahappokiertoon (Dubash ym. 1967, Shigeru ym. 1987). Kobalamiinia mikrolevä käyttää pääasiassa metioniinin ja metyyylimalonyyli-CoA-mutaasin synteesin. *E. gracilis* -mikrolevän deoksiribonukleotidien muodostumista ribonukleotideista katalysoivan ribonukleotidireduktaasi-entsyymin aktiivisuuden on havaittu myös lisääntyvän silloin, kun kobalamiinia on saatavilla. Kaikilla tumallisilla eliöillä on kobalamiinista riippumaton ribonukleotidireduktaasin synteesireitti, mutta *E. gracilis* -mikrolevältä on esitumallisten eliöiden tavoin löydetty myös kobalamiinista riippuvainen versio kyseisen entsyymin synteesistä. (Gleason ym. 1970, Hamilton 1974, Carell ym. 1980, Torrents ym. 2006)

E. gracilis myös varastoi tiamiinia ja kobalamiinia itseensä tehokkaasti (Sekhara Varma ym. 1961, Shigeru ym. 1987). Tiamiinia *E. gracilis* varastoi erilaisina fosfaattijohdannaisina solulimaan, mitokondrioihin ja viherhiukkasiin (Shigeoka ym. 1987). Kobalamiinin *E. gracilis* muuntaa metyyli, adeno- ja hydroksikobalamiiniksi ja jakaa sen eri soluelimille, joissa se varastoituu proteiineihin (Sekhara Varma ym. 1961, Isegawa ym. 1984).

Vitamiinien vaihtoon perustuvasta symbioosista bakteerien ja *Euglena*-mikrolevien välillä on olemassa vain hyvin vähän tutkimuksia, mutta *Euglena*-mikrolevien on havaittu olevan vuorovaikutuksessa useiden eri bakteerilajien kanssa (Leedale

1969, Leander ym. 2000). *Euglena helicoideus* -mikrolevän ulkomembraanin pinnan urista on löydetty sauvamaisia bakteereja. Bakteerien ja mikrolevän välinen suhde vaikuttaa hyvin tiiviiltä, mutta siitä, onko bakteereista hyötyä mikrolevälle, ei ole todisteita (Leander ym. 2000). *Euglena* -mikroleviin kuuluvan *Eutreptiella* sp. -mikrolevän symbionttisten bakteerien on kuitenkin osoitettu syntetisoivan *Eutreptiella* sp. -mikrolevälle kobalamiinia (Kuo ym. 2013).

1.8. Tutkimushypoteesit

Tämän pro gradu -tutkielman tutkimushypoteesit olivat:

1. Lisättyä kobalamiinia ja tiamiinia sisältävällä ja sisältämättömällä kasvatusalustalla kasvatetun *E. gracilis* -mikrolevän biomassan tuoton välillä ei ole havaittavissa merkittäviä eroja mikrolevän kasvun stationaarivaiheessa.
2. Lisättyä kobalamiinia ja tiamiinia sisältävässä kasvatusalustassa kasvaneessa *E. gracilis* -mikroleväviljelmässä on määrällisesti vähemmän bakteereja kuin lisättyä kobalamiinia ja tiamiinia sisältämättömällä kasvatusalustalla kasvaneessa *E. gracilis* -mikroleväviljelmässä mikrolevän kasvun stationaarivaiheessa.
3. Lisättyä kobalamiini ja tiamiinia sisältämättömällä kasvatusalustalla kasvatetun *E. gracilis* -mikroleväviljelmän kobalamiinin ja tiamiinin synteesiin kykenevät bakteerisuvut runsastuvat enemmän kuin lisättyä kobalamiinia ja tiamiinia sisältävällä kasvatusalustalla kasvatetussa *E. gracilis* -mikroleväviljelmässä mikrolevän kasvun stationaarivaiheessa.

2. Aineisto ja menetelmät

2.1. Kasvatusalustat ja mikroleväsiirros

Tässä kokeessa kasvatettiin kantakokoelmasta tilattua ja Helsingin yliopiston ympäristöekologian osastolla EG-kasvatusalustassa (*Euglena gracilis* medium, Culturecollection of Algae and Protozoa) ylläpidettyä *E. gracilis* Klebs CCAP 1224/5Z -kanta mikсотrofisesti (mikrolevän energianlähteenä olivat valo, hiilidioksidi ja orgaaninen hiiliyhdiste) kahdessa erilaisessa Hutner-kasvatusalustassa (Hutner ym. 1956), HB12 ja H (Taulukko 1.). Kasvatusalustat valmistettiin ionivaihdettuun veteen (Elga Purelab Ultra ULXXGEM2, Elga Labwater) ja *E. gracilis* -mikrolevän biomassan tuoton tehostamiseksi kasvatusalustojen glukoosipitoisuus nostettiin pitoisuuteen 5 g/l ja pääasiallinen typenlähde ((NH₄)₂SO₄) pitoisuuteen 2 g/l.

Kokeessa käytettyjen HB12- ja H- kasvatusalustojen ero oli vitamiineissa. HB12-kasvatusalustaan lisättiin tiamiinihydrokloridia ja syanokobalamiinia, kun taas H-kasvatusalustasta vitamiinit jätettiin kokonaan pois. Ennen kokeen aloitusta *E. gracilis* -mikrolevää esikasvatettiin HB12-alustassa kahdessa 200 ml:n kasvatuspulloissa kasvatuskaapissa (Sanyo MLR-350), jossa valo-pimeä-sykli oli 16:8, lämpötila 24 °C ja valointensiteetti 150 μmol m⁻² s⁻¹. Esikasvatuksessa kasvatuspulloihin ei syötetty ilmaa eikä hiilidioksidia.

Taulukko 1. H- ja HB12-kasvatusalustan valmistukseen käytetyt yhdisteet ja niiden pitoisuudet kasvatusalustoissa.

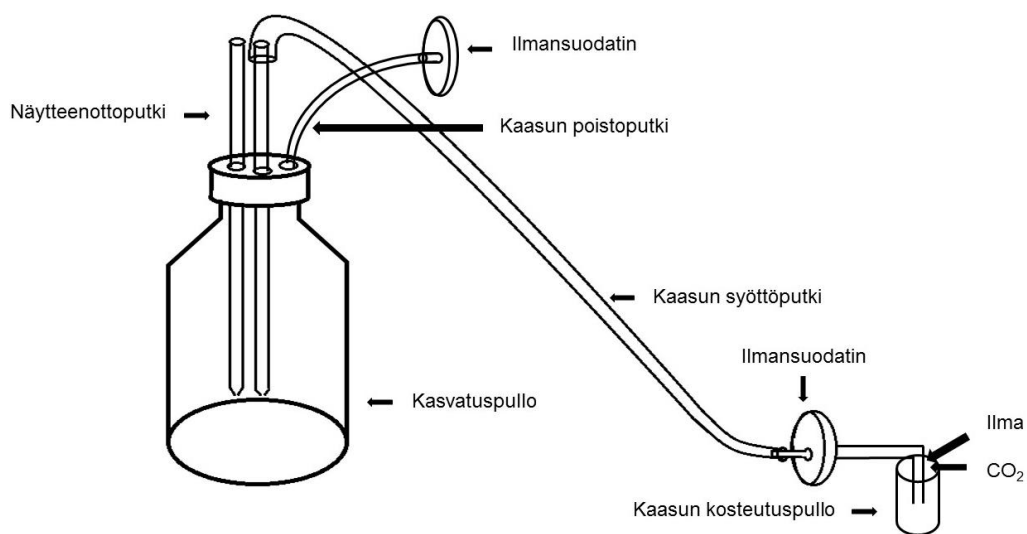
Reagenssi	H-kasvatusalusta	HB12-kasvatusalusta
Glukoosi (g/l)	5	5
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/l)	2	2
KH ₂ PO ₄ (g/l)	0,4	0,4
(NH ₄) ₂ HPO ₄ (g/l)	0,2	0,2
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/l)	0,5	0,5
CaCl ₂ (g/l)	0,2	0,2
H ₃ BO ₃ (mg/l)	14,4	14,4
Tiamiinihydrokloridi (mg/l)	0	2,5
Syanokobalamiini (mg/l)	0	0,020
Hivenaine-liuos:		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (μg/l)	44,0	44,0
MnSO ₄ ·H ₂ O (μg/l)	11,6	11,6
NaMoO ₄ ·2H ₂ O (μg/l)	3,0	3,0
CuSO ₄ ·5H ₂ O (μg/l)	3,2	3,2
CoCl ₂ ·6H ₂ O (μg/l)	2,8	2,8
Fe-liuos		
(NH ₄) ₂ SO ₄ ·Fe(SO ₄) ₂ ·6H ₂ O (μg/l)	11,4	11,4
EDTA (μg/l)	10,0	10,0

2.2. Koeasetelma

Koe toteutettiin kahden litran borosilikaattipulloissa (Kuva 1.). Molemmissa käsittelyissä rinnakkaisten toistojen määrä oli neljä. Pullot oli suljettu korkeilla, joissa oli reiät ilmastusputkelle, poistoilmaputkelle sekä näytteenottoletkulle. Ilmastus- ja ilmanvaihtoputkiin kiinnitettiin ilmansuodatin (Hepa-Vent™ pinta-ala 16 cm², Whatman GE Healthcare). Kaikissa käsittelyissä pH:ta mitattiin jatkuvatoimisesti yhteen kasvatuspulloon upotetulla pH -anturilla (Schott instruments electrode SL 81–425 pHT, SI Analytics). pH-aineisto tallentui automaattisesti KM-3000-laitteelle (KM-3000 Mehrparameter-Messgerät Multi-Parameter Controller, Sensortechnik Meinsberg).

Esikasvatuksen tavoin varsinainen kasvatus tehtiin kasvatuskaapissa (Sanyo MLR-350), jossa valo-pimeä -sykli oli 16:8 tuntia, lämpötila 24 °C ja valointensiteetti 150 μmol m⁻² s⁻¹. Valointensiteetti mitattiin (Datalogger LI-1400, LI-Cor Quantum Q

47166, LI-COR Biosciences) kasvatuskaapin keskimmäisen hyllyn kohdalta ennen kokeen aloittamista. Kasvatukseen syötettiin kosteutettua, hiilidioksidipitoisuudeltaan 2 %:sta ilma-hiilidioksidiseosta virtausnopeudella 0,5 l/min koko kasvatuksen ajan. Pullot sijoitettiin kasvatuskaapin keskimmäiselle hyllylle, yksi jokaiseen nurkkaan. Aina näytteenoton yhteydessä pullojen paikkaa vaihdettiin, jotta voitiin sulkea pois mahdollisesta valaistuksen vaihtelusta johtuvat erot rinnakkaisissa kasvatuksissa.



Kuva 1. *E. gracilis* -mikrolevän kasvatukseen käytetty kasvatuspullo ja sen osat.

2.3. Kokeen aloitus ja näytteenotto

Kasvatusalustaa lisätiin kasvatuspulloihin 1525 ml. Jokaisesta kasvatuspullosta mitattiin alustan pH (WTW Series Inolab pH720) ja kasvatuspullot autoklavoitiin alustoineen (2 h 121 °C 1 bar ylipaine, P Selecta Presoclave 30, J.P Selecta). Koska kokeessa käytetyt vitamiinit ovat herkkiä autoklavoinnille, tiamiinihydrokloridi ja syanokobalamiin lisätiin HB12-kasvatukseen steriilisuodatuksella laminaarikaapissa autoklavoinnin jälkeen. Ennen kokeen aloittamista kaikista kasvatusalustoista otettiin näyte kobalamiinipitoisuuksien lähtötason

määrittämiseksi, minkä jälkeen alustoihin lisättiin 175 ml mikroleväsiirrosta laminaarikaapissa etanolilla desinfioidulla ja autoklavoidulla (30 min 121 °C 1 bar ylipaine, P Selecta Presoclave 30, J.P Selecta) mittalasilla. Ennen mikrolevän siirrostusta kasvatusalustoihin, mikroleväsiirroksista otettiin näyte kuivapainon, kobalamiinipitoisuuden ja bakteerien määrän ja lajiston määrittämiseksi.

Mikrolevän kuivapainoa seurattiin kasvatuksen alusta (T0) alkaen joka toinen päivä (Taulukko 2.). Bakteerien määrä ja yhteisönkoostumus sekä mikroleväbiomassan kobalamiinipitoisuus ja kasvatusalustan kobalamiinipitoisuus ja kokonaistyyppi ja -fosforipitoisuus määritettiin kuitenkin vain mikroleväsiirroksista ja mikrolevän kasvun stationaarivaiheen kolmena näytteenotokertana (T1, T2 ja T3) (Taulukko 2.).

Taulukko 2. H- ja HB12-kasvatusalustalla kasvatetusta *E. gracilis* -biomassasta otetut näytteet ja näytteenottoajankohdat vuorokausina kasvatuksen alusta.

Näyte	Näytteenottoajankohta vuorokausina (vrk)
T0	0
T1	10
T2	15
T3	17

Kasvatuksen alun jälkeen näytteenotto aloitettiin heti kun mikrolevän kuivapainon perusteella mikrolevän kasvun havaittiin olevan stationaarivaiheessa. Kasvatuspulloja sekoitettiin ennen näytteenottoa, minkä jälkeen niistä otettiin 15 ml näytettä mikrolevän kuivapainon ja ravinteiden määrittämiseen, 3 ml bakteerien määrän ja lajiston selvittämiseksi ja 45 ml kobalamiinin määrittämiseen steriilillä 50 ml ruiskulla (Soft-Ject 50 ml (60 ml), DIN/EN/ISO 7886-1, Henke-Sass, Wolf GmbH). Näytteet siirrettiin steriileihin 50 ml sentrifugiputkiin (VWR collection, VWR). Kobalamiinianalyysia varten mikroleväbiomassanäytteet sentrifugoitiin (2700 rpm, 20 min, +20 °C, Heraeus multifuge 1 s-r). Sentrifugoinnissa erottunut kasvatusalusta pakastettiin -70 °C asteessa ja mikroleväbiomassa kylmäkuivattiin (0,250 mbar:n alipaine, Christ Alpha 1-4, B. Braun Biotech International) ja pakastettiin -70 °C asteessa.

2.4. *E. gracilis* -mikroleväviljelmän biomassan kuivapainon määrittäminen

E. gracilis -mikroleväviljelmän biomassan kasvunseuranta tehtiin gravimetrisesti määrittämällä mikroleväbiomassan kuivapaino. Mikroleväviljelmää suodatettiin 1-5 ml kuivatulle (105 °C, 4 h), ja esipunnitulle 0,2 µm lasikuitusuodattimelle (GF/C, halkaisija 47 mm, Whatman™). Suodatinta kuivattiin 105 °C asteessa yön yli, minkä jälkeen suodatin punnittiin uudelleen. Punnituseron ja pipetoidun mikroleväviljelmän määrän perusteella laskettiin kuivapaino kaavan 1 mukaan (Tredici ym. 1998).

$$dw = \frac{(m_{n+s} - m_s) * 1000}{V} \quad (1)$$

dw = näytteen kuivapaino (g/l)

m_{n+s} = näytteen ja suodattimen yhteispaino (g)

m_s = suodattimen paino (g)

V = näytemäärä (ml)

2.5. Näytteenotto DNA -analyysiin

Näytteet bakteerien määrän ja lajiston selvittämiseksi otettiin suodattamalla. Näytteiden suodatus tehtiin aseptisesti laminaarikaapissa vakuumisuodatuksella. Mikrolevään kiinnittyneet bakteerit kerättiin 5 µm suodattimelle (Membraanisuo datin Cyclopore™ Track Etched, Whatman™ 5µm) ja suodatuksen suodosvesi kerättiin talteen 50 ml steriiliin sentrifugiputkeen (VWR collection, VWR). Suodosvesi suodatettiin saman 5 µm suodattimen läpi uudestaan kolmeen kertaan, jotta voitiin varmistua siitä, että kaikki viljelmässä vapaana elävät bakteerit tulevat suodattimesta läpi. Vapaat bakteerit kerättiin suodattamalla suodosvesi

kerran 0,2 µm suodattimen (Membraanisuodatin Cyclopore™ Track Etched, Whatman™ 0,2 µm) läpi.

Eri suodatuksille oli suodatinlaitteistossa omat metalliosansa, jotka desin fioitiin 70% etanolilla ja kuivattiin aina näytteiden välissä. Suodattimien steriiliys ennen suodatusta varmistettiin autoklavoimalla suodattimia (40 minuuttia 121 °C ja 1 bar:n ylipaine, Sanyo Lab Autoclave MLS-3780). Jokaisen suodatuskerralla tehtiin myös nollasuodatus 0,2 µm suodattimille. Nollasuodatuksen näytteenä toimi autoklavoitu (40 minuuttia 121 °C ja 1 bar:n ylipaine, Sanyo Lab Autoclave MLS-3780) ionivaihdettu vesi (Elga Purelab Ultra ULXXGEM2, Elga Labwater). Suodattimet säilöttiin steriileihin 15 ml sentrifuugiputkiin (VWR collection, VWR) ja pakastettiin -20 °C asteessa.

2.6. DNA:n eristys

DNA eristettiin suodattimista Mobion Biofilm DNA extraction kit -menetelmän ohjeiden mukaisesti (Mobio laboratories, Inc. 2017). Kittiä ei ole suunniteltu suodattimilta eristämiseen, joten eristysmenetelmä testattiin testisuodattimilla ennen kokeen aloittamista. DNA:n eristäminen suodattimista aloitettiin leikkaamalla suodattimet 70 % etanolilla desin fioitujen saksien ja pinsettien avulla neljään osaan. Poikkeuksena eristyskitin ohjeisiin, DNA:n eristys suodattimista aloitettiin kohdasta 2, koska bakteerit eivät olleet nestemäisessä liuoksessa. DNA:n saanto varmistettiin agarosigeelielektroforeesiajolla (1h, 200 V ja 400 mA). Elektroforeesigeelin (1,5 % agarosia, 1 X tris-asetatti-EDTA -puskuria, EtBr (0,5 µg/ml)) kaivoihin pipetoitiin 1 µl latausväriä (6 X Loading Dye Solution) ja 5 µl näytettä. Geelin toimivuuden ja ajon onnistumisen osoittamiseksi näyterivin ensimmäiseen ja viimeiseen kaivoon pipetoitiin 1 µl latausväriä ja 5 µl DNA-merkkiainetta (GeneRuler 1 kb DNA ladder, 0,5 mg DNA/ml). Agarosigeelielektroforeesiajon jälkeen näytteet pakastettiin -20 °C asteessa sentrifuugiputkissa (Thin-walled, frosted lid, RNase-free PCR tubes 0,2 m, Invitrogen™). Nollanäytteenä toimivat suodatuksen nollanäytteet.

2.7. qPCR -analyysi

Mikroleväviljelmien bakteerien määrä analysoitiin qPCR-menetelmällä. qPCR -analyysi tehtiin 16S rRNA geenin yleisalukkeilla LightCycler 96 -laitteistolla (LightCycler 96 Instrument, Roche Life Science) Helsingin yliopiston AlmaLabin alukkeille optimoimalla monistusohjelmalla (Taulukko 3.) (Öqvist ym. 2008).

Taulukko 3. qPCR -ajossa käytetty monistusohjelma.

Vaihe	Toiminto	Lämpötila (°C)	Kesto (s)
1	Denaturaatio	95	900
2	Denaturaatio	94	10
3	Alukkeiden kiinnittyminen	60	20
4	Kopioituminen	72	30
5	Syklit 2-5 toistettiin 35 kertaa	35	
6	Sulamiskäyrä	95	10
		65	60
		95	1
		37	30

Jokaisesta näytteestä ja negatiivisesta kontrollista tehtiin kolme rinnakkaista ajoa. Negatiivisena kontrollina käytettiin autoklavoitua (20 min. 121 °C, 1 bar, Sanyo Lab Autoclave MLS-3780) ionivaihdettua vettä (Elga Purelab Ultra ULXXGEM2, Elga Labwater). Standardisuora valmistettiin Helsingin yliopiston AlmaLabin uuttamasta DSM 4058 -kannasta (*Cupriavidus necator* JMP134) laimentamalla kantaa autoklavoidulla (20 min. 121 °C, 1 bar, Sanyo Lab Autoclave MLS-3780) ionivaihdetulla vedellä (Elga Purelab Ultra ULXXGEM2, Elga Labwater). Standardien pitoisuudet olivat $9,030 \cdot 10^1$; $9,030 \cdot 10^2$; $9,030 \cdot 10^3$; $9,030 \cdot 10^4$; $9,030 \cdot 10^5$ ja $9,030 \cdot 10^6$ kopiota/ μ l. Laimein standardi toimi myös ajon positiivisena kontrollina.

qPCR-reaktioseos sisälsi 10 μ l (2x) PowerUp SYBR Green Master premix -liuosta (Thermo Scientific, MA, USA), 1 μ l pE-aluketta: 5'-

AAACTCAAAGGAATTGACGG-3' (Immuno Diagnostic Oy, Suomi), 1 µl pF'-aluketta: 5'-ACGAGCTGACGACAGCCATG-3' (Immuno Diagnostic Oy, Suomi), 0,5 µl BSA:ta (20 mg/ml bovine serum albumin, Fermentas), 6 µl autoklavoitua (20 min, 121 °C, 1 bar, Sanyo Lab Autoclave MLS-3780) ionivaihdettua vettä (Elga Purelab Ultra ULXXGEM2, Elga Labwater) ja 2 µl näytettä. Näytteet ja reaktioseos valmisteltiin ajoon aseptisesti laminaarikaapissa. Työskentelyssä käytettiin autoklavoituja (20 min. 121 °C, 1 bar, Sanyo Lab Autoclave MLS-3780) pipetinkärkiä, Eppendorf-putkia, PCR putkia ja niiden kansia. Laminaarikaappi ja siellä käytetyt välineet sterilisoitiin 70 % etanolilla ja UV-säteilytyksellä ennen ja jälkeen työskentelyn.

Ajon optimoinnissa havaittiin, että näytteet, joista analysoitiin mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrä, täytyi laimentaa qPCR -ajoa varten, jotta näytteiden pitoisuus saatiin osumaan laimeimman ja vahvimman standardin väliin. Kokeilemalla päädyttiin laimentamaan mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien näytteitä 1:10-suhteessa ionivaihdetulla (Elga Purelab Ultra ULXXGEM2, Elga Labwater) ja autoklavoidulla vedellä (20 min. 121 °C, 1 bar, Sanyo Lab Autoclave MLS-3780). Vapaiden bakteerien näytteitä ei laimennettu. qPCR -ajo katsottiin onnistuneeksi, jos ajon R^2 -arvo oli vähintään 0,985, kohde-DNA:n kopioitumisen tehokkuus 80–110% ja rinnakkaisten näytteiden välisestä pitoisuuden samankaltaisuudesta kertova Cq-arvo jäi alle 0,5. Negatiivisten kontrollien tuli pysyä negatiivisina, mutta jos kontrolleissa oli kontaminaatiota, ajo voitiin kuitenkin hyväksyä, kunhan näyte alkoi monistua 7 sykliä ennen negatiivista kontrollia. Tämä varmistettiin vähentämällä rinnakkaisten näytteiden Cq-arvon keskiarvo negatiivisten kontrollien välisestä Cq-arvon keskiarvosta. Keskiarvoja voitiin käyttää laskemiseen niin kauan, kun näytteiden Cq-arvot eivät eronneet toisistaan 0,5 enempää. 16S rRNA geenin kopioiden eli bakteerien määrä näytteessä laskettiin litraa näytettä kohti kaavalla 2.

$$x = \frac{a * b * c}{d} \quad (2)$$

x= 16S rRNA geenin kopioiden määrä litraa näytettä kohti laskettuna (kopio/l näytettä)

a= näytteen 16S rRNA geenin kopioiden määrä qPCR ajon mukaan (kopio/l)

b= laimennoskerroin 100

c= eristetyn DNA:n tilavuus 0,0001(l)

d= suodatetun näytteen määrä 0,003 (l)

Ajanhetken T0 16S rRNA geenin kopioiden määrät ovat laskennallisia tuloksia, jotka on laskettu kummankin kasvatusalustan mikroleväsiirrosteen 16S rRNA geenin kopioiden määrän, ja mikroleväsiirrosteen tilavuuden ja kasvatustilavuuden avulla kaavalla 3.

$$y = \frac{e * f * g * h}{i * j} \quad (3)$$

y= 16S rRNA geenin määrä litraa näytettä kohti laskettuna (16S rRNA geenin kopio/ l näytettä) kasvatuksen alussa ajan hetkellä T0

e= mikroleväsiirrosteen 16S rRNA geenin kopioiden määrä qPCR ajon mukaan (16S rRNA geenin kopio/ml näytettä)

f= laimennoskerroin 100

g= eristetyn DNA:n tilavuus 0,0001(l)

h= kasvatusalustaan lisätyn mikroleväsiirrosteen tilavuus 0,175 (l)

i= suodatetun näytteen määrä 0,003 (l)

j= kasvatustilavuus 1,7 (l)

2.8. PCR -analyysi

Mikroleväviljelmien bakteerien 16S rRNA geeniä monistettiin bakteeriyhteisön koostumuksen selvittämistä varten PCR -menetelmällä. Sekvensointia varten näytteiden DNA -pitoisuus ei saa olla näytteissä liian korkea, ja vertailun helpottamiseksi sen tulisi olla jokaisessa näytteessä lähes sama. Tämä edellyttää DNA:n määrän määrittämistä ennen PCR -ajoa. Tässä työssä näytteiden DNA -pitoisuutta ei kuitenkaan voitu määrittää siihen tavallisesti käytetyillä menetelmillä, sillä mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien näytteissä oleva mikrolevän DNA olisi vääristänyt tulosta. Niinpä näytteet laimennettiin PCR -ajoa varten qPCR -tulosten pohjalta.

Laimennoksen sopiva pitoisuus päätettiin ajamalla eri pitoisuuksiin laimennettuja näytteitä PCR:llä, ja tarkistamalla saanto agarosigeelielektroforeesilla. Vapaiden bakteerien näytteet laimennettiin autoklavoidulla (20 min, 121 °C, 1 bar, Sanyo Lab Autoclave MLS-3780) ionivaihdetulla vedellä (Elga Purelab Ultra ULXXGEM2, Elga Labwater), niin että niissä oli 1×10^4 16S rRNA geenin kopiota/ μl ($\pm 10 \%$). Kyseinen laimennos oli kuitenkin tuntemattomasta syystä liian laimea mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien näytteille, joten ne laimennettiin autoklavoidulla (20 min, 121 °C, 1 bar, Sanyo Lab Autoclave MLS-3780) ionivaihdetulla vedellä (Elga Purelab Ultra ULXXGEM2, Elga Labwater) niin, että niissä oli 1×10^6 16S rRNA geenin kopiota/ μl ($\pm 10 \%$). Mikroleväsiirroksien mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien, vapaiden bakteerien ja nollasuodatusten näytteet laimennettiin vapaiden bakteerien näytteille tehdyn laimennoksen mukaisesti autoklavoidulla (20 min, 121 °C, 1 bar, Sanyo Lab Autoclave MLS-3780) ionivaihdetulla vedellä (Elga Purelab Ultra ULXXGEM2, Elga Labwater).

Jokaisesta näytteestä tehtiin kolme rinnakkaista PCR -ajoa. PCR -reaktioseoksen kokonaismäärä oli 50 μl /näyte, jossa oli 10 μl 5 x Green Phusion HF -puskuria (F-537, Thermo Fisher scientific, MA, USA), 1 μl dNTP (Thermo Fisher scientific,

MA, USA), 2,5 µl 515F-aluketta: 5'- GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3', (Metabion international AG), 2,5 µl 806R-aluketta: 5'- GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' (Metabion international AG), 0,5 µl Phusion Hot Start II DNA polymeraasia (Thermo Fisher scientific, MA, USA), 33,5 µl autoklavoitua (20 min, 121 °C, 1 bar, Sanyo Lab Autoclave MLS-3780) ionivaihdettua vettä (Elga Purelab Ultra ULXXGEM2, Elga Labwater) ja 5 µl templaattia. Positiivisena kontrollina toimi DSM 4058:n (*Cupriavidus negator* JMP134) uutettu DNA. Negatiivisena kontrollina käytettiin autoklavoitua (20 min, 121 °C, 1 bar, Sanyo Lab Autoclave MLS-3780) ionivaihdettua vettä (Elga Purelab Ultra ULXXGEM2, Elga Labwater).

PCR -ajo tehtiin Thermocycler (MJ Research, MA, USA) PCR laiteella. PCR -ohjelmalla käytettiin Helsingin yliopiston Almalabin tässä kokeessa käytetyille alukkeille optimoimaan monistusohjelmaa (Taulukko 4.). PCR -ajon onnistuminen varmistettiin ajamalla monistetut näytteet agarosielektroforeesigeelillä samalla tavoin kuin DNA:n eristysvaiheessa. Näytteet ja reaktioseos valmistettiin ajoin aseptisesti laminarikaapissa. Työskentelyssä käytettiin autoklavoituja (20 min, 121 °C, 1 bar, Sanyo Lab Autoclave MLS-3780) pipetinkärkiä, Eppendorf-putkia, PCR -putkia ja niiden kansia. Laminaarikaappi ja siellä käytettävät välineet sterilisoitiin

Taulukko 4. PCR -ajossa käytetty monistusohjelma.

Vaihe	Toiminto	Lämpötila (°C)	Kesto (min)
1	Denaturaatio	98	5
2	Denaturaatio	94	1
3	Alukkeiden kiinnittyminen	50	0,17
4	Kopioituminen	74	1
5	Lopullinen kopioituminen		10
6	Syklit 2-5 toistettiin 25 kertaa		

2.9. Sekvensointi

Mikroleväviljelmien bakteeriyhteisön koostumuksen selvittämiseksi PCR-menetelmällä monistetut näytteet sekvensoitiin. Kaikki agarosielektroforeesijossa geelillä näkyneet rinnakkaiset PCR -näytteet yhdistettiin varsinaista sekvensointia varten samaan Eppendorf-putkeen aseptisesti laminaarikaapissa. Näytteiden sekvensointi tehtiin Illumina-MiSeq -menetelmällä ostopalveluna Helsingin yliopiston Biotekniikan instituutissa, jonne näytteet toimitettiin pakastettuina -20 °C asteessa.

2.10. Sekvensointiaineiston käsittely ja Shannon-Wiener -diversiteetti-indeksi

Sekvensointiaineiston analysoimiseen käytettiin Mothur-ohjelmistoa (versio 1.39.5) (Schloss ym. 2009). Analyysi aloitettiin yhdistämällä käänteis- ja etusekvenssien FASTQ-tiedostot samaan tiedostoon. Tämän jälkeen sekvenssit järjestettiin alkamaan ja päättymään samasta emäskohdasta kuin alukepari. Sekvensseistä poistettiin monitulkintaiset emäkset ja yli kahdeksaa emästä pidemmät homopolymeerit. Ajoa jatkettiin tiedostoista löydettyillä uniikeilla sekvensseillä, eli saman sekvenssin kopiot rajattiin tiedostoista pois. Sekvenssit ajettiin 16S rRNA reference (RDP) -bakteeritietokantaa vasten, sekvensoinnista aiheutuneet virheelliset sekvenssit poistettiin, ja emäsjärjestykseltään < 1 % eroavat sekvenssit yhdistettiin. Kimeeriset sekvenssit, eli vajaamittaisista DNA -jaksoista muodostuneet uudet DNA-jaksot tunnistettiin UCHIME-ohjelman avulla, minkä jälkeen kyseiset sekvenssit poistettiin (Edgar ym. 2011). Etäisyysmatriisiltaan enintään 3 % toisistaan eroavat sekvenssit jaettiin samaan OTU (operational taxonomical unit) -ryhmään käyttäen lähimmän naapurin ryhmittelymenetelmää. Molempien kasvatusalustojen mikroleväviljelmien kasvun stationaarivaiheessa otettujen näytteiden sekvenssit ja mikroleväsiirroksien sekvenssit erotettiin toisistaan ja jaettiin vapaiden ja mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien näytteiden

mukaan kahteen osaan. Rinnakkaisten näytteiden OTUista vähennettiin suodatuskontrolleista ja PCR -ajon negatiivisista kontrolleista löytyneiden OTU:jen määrä. Sekvenssiaineiston pohjalta jokaiselle näytteelle, myös mikroleväsiirroksille laskettiin R-ohjelmalla (versio 3.2.3) Shannon-Wiener -diversiteetti-indeksi käyttäen näytteiden kaikkia, myös luokittelemattomia OTU:ja.

2.11. Ravinteiden määrittäminen

Näytteenottohetken T0 kokonaistypen ja kokonaisfosforin pitoisuudet laskettiin kasvatusalustan ravinneliuosten pitoisuuksien pohjalta. Näytteenottohetkinä T1-T3, H- ja HB12-kasvatusalustoista määritettiin erikseen kokonaistyyppi ja kokonaisfosfori. Näytteenä käytettiin mikrolevän kuivapainon määrittämisen yhteydessä suodatetusta mikroleväviljelmästä ylijäänyttä suodosvettä. Kokonaistypen ja kokonaisfosforin pitoisuuksien analysointi tehtiin pikatesteillä (LatoN Total nitrogen 20–100 mg/l, LCK 338, Hach Lange GMBH ja Phosphate 5-60 mg/l, LCK 350, Hach Lange GMBH) Hach Lange -laitteistolla (DR3900 Laboratory VIS Spectrophotometer, Hach) testien ohjeiden mukaisesti. Ennen analysointia näytteet laimennettiin 1:5 osaan ionivaihdetulla vedellä (Elga Purelab Ultra ULXXGEM2, Elga Labwater).

2.12. Mikrolevän kuivapaino- ja 16S rRNA geenin pitoisuus -tulosten tilastollinen testaus

Kasvatusalustan, kokonaistypen ja -fosforin, näytteenottohetken ja kasvatusalustan ja mikroleväbiomassan kobalamiinipitoisuuden (Aalto, 2017, Liite 1.) vaikutusta *E. gracilis* -mikroleväviljelmän biomassan kuivapainoon ja vapaiden ja mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrään näytteenottohetkinä T1-T3 testattiin tilastollisesti käyttäen näytteenotossa käytetyn toistomittauksen huomioivaa lineaarista sekamallia lmer (linear mixed effect model, lmer4-paketti, R-ohjelma versio 3.2.3). Testeissä testattiin myös bakteerien määrän vaikutusta

mikroleväbiomassan kuivapainoon, ja vastaavasti mikroleväbiomassan kuivapainon vaikutusta bakteerimääriin. Mikrolevään kiinnittyneiden ja vapaiden bakteerien 16S rRNA geenin pitoisuuksille tehtiin 10-kantainen logaritmuunnos. Testin tulos tulkittiin merkitseväksi, jos sen p-arvo oli $<0,05$. Malli edellyttää aineiston residuaalien normaalijakaumaa, minkä testaamiseen käytettiin Shapiro-Wilkin testiä. Mikrolevän kuivapainolle ja mikrolevään kiinnittyneiden ja vapaiden bakteerien määrille tehtiin omat testinsä. Samassa testissä testattiin kaikkien yllä mainittujen muuttujien vaikutusta, mutta jäsentelyn helpottamiseksi eri muuttujien merkitys mikrolevän kuivapainoon ja mikrolevään kiinnittyneiden ja vapaiden bakteerien määriin on esitetty tuloksissa omissa osioissaan.

Rinnakkaisten näytteiden puutteen vuoksi mikroleväsiirroksien 16S rRNA geenin pitoisuudelle ei testattu kasvatusalustan, ravinteiden tai kasvatusalustan ja mikroleväbiomassan kobalamiinipitoisuuden (Liite 1., Aalto, 2017) vaikutusta eikä näytteenottohetkeä otettu mukaan samaan testiin näytteenottohetkien T1-T3 kanssa. Tämän vuoksi näytteenottohetken T0 mikroleväbiomassa- ja ravinnetuloksia ei myöskään testattu. pH-tuloksia ei myöskään huomioitu missään testeissä rinnakkaisten näytteiden puutteen vuoksi.

2.13. Mikroleväviljelmien bakteerien sekvenssiaineiston ja diversiteetin vertailu ja tilastollinen testaus

Kasvatusalustan vaikutusta mikroleväviljelmien välisten vapaiden ja mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien yhteisöjen samankaltaisuuteen testattiin ei-metrisellä moniulotteisella skaalaus (Non-metric Multidimensional Scaling, NMDS) -koordinaatioanalyysillä (R-ohjelma, versio 3.2.3). Vegan enfit -toiminnolla hahmotettiin kasvatusalustan ja biomassan kobalamiinipitoisuuden (Liite 1., Aalto, 2017) ja kokonaistypen ja kokonaisfosforin pitoisuuden vaikutusta vapaiden ja mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien yhteisöjen eroihin. Testiä käytettiin näytteenottohetkien T1-T3 sekvenssinäytteille, joissa oli yhä tallella myös

pääjaksolleen luokittelemattomat OTU:t. Merkitsevyyden rajaksi asetettiin 0,05 p-arvo, ja testi hyväksyttiin, jos sen stressitaso jäi alle 0,2.

Toistojen puuttuessa, mikroleväsiirroksille testiä ei voitu tehdä ja samasta syystä myöskään pH-tuloksia ei huomioitu tilastotesteissä. Mikroleväsiirroksien välisiä yhtäläisyyksiä pystyttiin kuitenkin vertailemaan bakteerien luokkien ja sukujen avulla. Mikroleväsiirroksien ja näytteenottohetkien T1-T3 bakteeriluokkia ja -sukuja vertailtiin vapaiden ja mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien välillä kasvatusalustojen sisällä sekä kasvatusalustojen välillä. Näytteenottohetkien T1-T3 näytteitä ei jaettu omiin aikapisteisiinsä, vaan niitä käsiteltiin yhtenä näytteenä ja jokaiselle OTUlle laskettiin keskiarvo rinnakkaisista näytteistä ja aikapisteistä. Näytteenottohetkien T1-T3 näytteitä verrattiin myös mikroleväsiirrosteiden bakteeriluokkiin ja -sukuihin.

Kasvatusalustan, ravinteiden, näytteenottohetken ja kasvatusalustan ja mikroleväbiomassan kobalamiinipitoisuuden sekä bakteerien 16 S rRNA geenipitoisuuksien ja mikrolevän kuivapainon vaikutusta vapaiden ja mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien Shannon-Wiener -diversiteetti-indeksituloksiin testattiin tilastollisesti Imer-testillä (R-ohjelma, versio 3.2.3). Testin tulos tulkittiin merkitseväksi, jos sen p-arvo oli <0,05.

Mikrolevään kiinnittyneiden ja vapaiden bakteerien yhteisöille ja niiden diversiteetille tehtiin omat testinsä. Samassa testissä testattiin kaikkien yllä mainittujen muuttujien vaikutusta, mutta jäsentelyn helpottamiseksi eri muuttujien merkitys mikrolevään kiinnittyneiden ja vapaiden bakteerien yhteisöille ja niiden diversiteetille on esitetty tuloksissa omissa osioissaan.

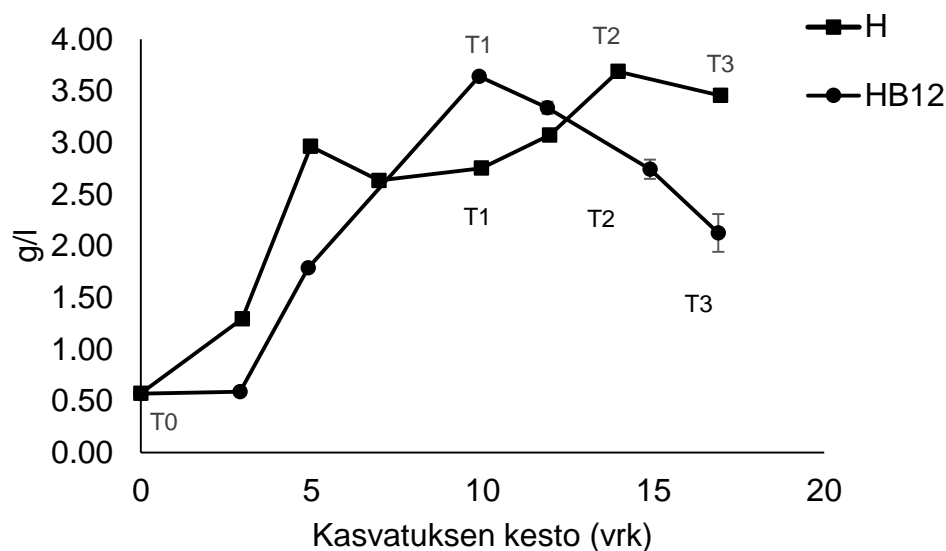
3. Tulokset

3.1. pH

Kasvatusten alkaessa molempien mikroleväviljelmien pH oli 6,45. Molemmissa kasvatusalustoissa pH laski arvoon 2,5 neljän päivän kuluessa kasvatuksen alusta ja pysyi yhtä happamana kasvatuksen loppuun asti.

3.2. Mikroleväbiomassan kuivapaino

H- ja HB12-kasvatuslaustalle siirrostetun *E. gracilis* -mikroleväsiirroksen kuivapaino oli 5,5 g/l. Kasvatuksen alussa näytteenottohetkellä T0 molempien käsittelyiden rinnakkaisten kasvatusten mikroleväbiomassan kuivapainon keskiarvo oli 0,57 g/l. *E. gracilis* -mikrolevä saavutti kasvun stationaarivaiheen noin 4 vuorokauden kuluttua kasvatuksen alusta molemmilla kasvatusalustoilla (Kuva 2.). Mikroleväbiomassan kuivapaino oli korkeimmillaan HB12-kasvatusalustalla näytteenottohetkellä T1 (3,6 g/l) ja H-kasvatusalustalla näytteenottohetkellä T2 (3,7 g/l). Kasvatuksen lopussa mikroleväbiomassan kuivapaino H-kasvatusalustalla oli 3,5 g/l ja HB12-kasvatusalustalla 2,1 g/l.



Kuva 2. H- ja HB12 -kasvatusalustalla kasvatetun *E. gracilis* -mikrolevän kuivapaino (g/l, ka ± keskivirhe) kasvatuksen eri ajanhetkinä (vrk). Kuvaan on merkattu tilastotesteissä käytettyjen näytteiden näytteenottohetket T0-T3.

E. gracilis kasvoi paremmin H- kuin HB12-kasvatusalustalla ($p=2,67 \cdot 10^{-6}$, Erotus=1,946, Taulukko 5.). H-kasvatusalustalla mikrolevän kuivapaino oli hiukan korkeampi ja kasvun stationaarivaihe kesti pidempää kuin HB12-kasvatusalustalla (Kuva 2.). HB12-kasvatusalustalla myös rinnakkaisten kasvatusten mikrolevän kuivapainon välinen vaihtelu oli suurempaa kuin H-kasvatusalustalla, ja vaihtelu oli sitä suurempaa mitä pidemmälle stationaarivaiheessa edettiin (Kuva 2.).

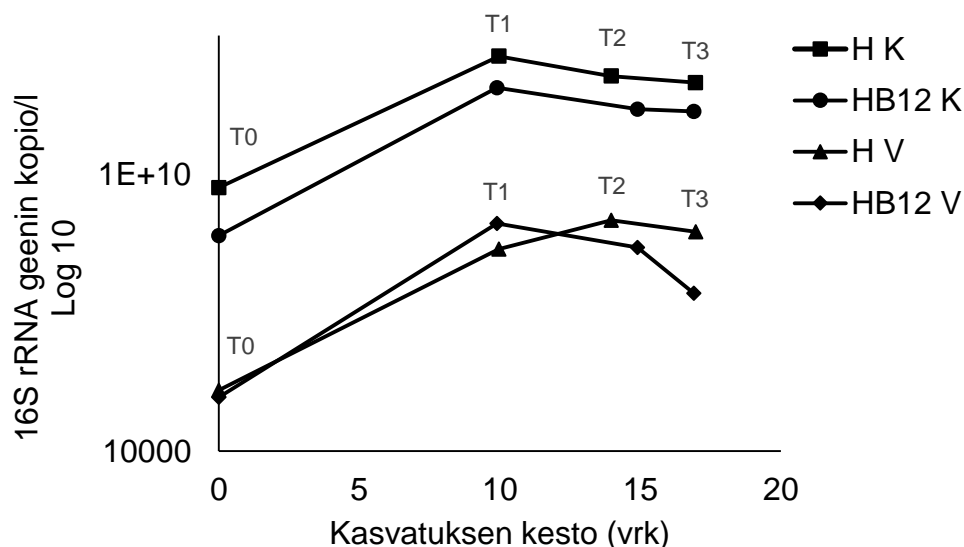
Mikrolevän kuivapaino vaihteli kasvatusalustojen välillä merkitsevästi myös eri näytteenottohetkinä. Näytteenottohetkestä T1 näytteenottohetkeen T2 H-kasvatusalustalla kasvaneen mikrolevän kuivapaino nousi ja HB12-kasvatusalustalla kasvatetun mikrolevän kuivapaino laski (T1 vs. T2 $p=0,023$, Erotus=-0,590, Taulukko 5.). Mikrolevien kuivapainojen kehitys korreloi ainoastaan näytteenottohetkestä T2 eteenpäin, jolloin molempien kasvatusalustojen mikrolevien kuivapaino laski (T2 vs. T3 $p=0,023$, Erotus=0,590, Taulukko 5.). Suurin ero oli näytteenottohetken T1 ja T3 välisessä kuivapainon kehityksessä, sillä H-kasvatusalustalla mikrolevän kuivapaino oli matalampi näytteenottohetkellä T1 kuin näytteenottohetkellä T3, kun HB12-kasvatusalustalla mikrolevän kuivapainon kehitys oli päinvastainen (T1 vs. T3 $p=0,002$, Erotus=-1,116, Taulukko 5.).

Taulukko 5. Kasvatusalustan (H vs. HB12), näytteenottohetken (T1-T3) vaikutus H- ja HB12-alustalla kasvatetun *E. gracilis* -biomassan kuivapainoon (g/l) näytteenottohetkinä T1-T3 Imer-testillä analysoituna. Merkitsevyydet ($p < 0,05$) on merkitty taulukkoon symbolilla *.

	Erotus	Keskivirhe	t	p	p<0,05
Kasvatusalusta H	1,946	0,533	3,649	$2,638 \cdot 10^{-4}$	*
T1 vs. T2	-0,590	0,259	-2,274	0,023	*
T2 vs. T3	0,590	0,259	2,274	0,023	*
T1 vs. T3	-1,116	0,369	-3,025	0,002	*

3.3. Bakteerien määrä

H- ja HB12 -kasvatusalustan mikroleväviljelmissä oli kaikkina näytteenottohetkinä enemmän mikrolevään kiinnittyneitä kuin vapaita bakteereja (Kuva 3.).



Kuva 3. H- ja HB12 -kasvatusalustalla kasvatetun *E. gracilis* -mikroleväviljelmän vapaiden bakteereiden (H V ja HB12V) ja mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrä (H K ja HB12 K) 16S rRNA geenin kopioiden mitattuna (Log 10 -asteikko) kasvatuksen alussa T0, ja näytteenottohetkinä T1, T2 ja T3 (keskiarvo ± keskiarvo: H $5 \pm 19\%$, HB12 $5 \pm 21\%$, H $0,2 \pm 18\%$, HB12 $0,2 \pm 21\%$). Kuvaan on merkattu kasvatuksen alun näytteenottohetki T0 ja stationaarivaiheen näytteenottohetket T1, T2 ja T3.

Mikrolevään kiinnittyneitä bakteereja oli enemmän H- kuin HB12-kasvatusalustan mikroleväviljelmässä ($p=2,6 \cdot 10^{-4}$, Erotus=2,188, Taulukko 6.), mutta mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrissä ei ollut merkitsevää eroa kasvatusalustojen välillä eri näytteenottohetkinä (Taulukko 6.). Vapaiden bakteerien määrässä ei puolestaan ollut eroa kasvatusalustojen välillä ($p=0,829$, Taulukko 6.).

Mikroleväbiomassan kuivapaino selitti mikrolevään kiinnittyneiden ja vapaiden bakteerien eroja kasvatusalustojen välillä. Mikrolevän kuivapainon kehitys korreloi mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrien kanssa negatiivisesti molemmilla kasvatusalustoilla ($p=0,034$, Erotus=-0,385, Taulukko 6.). Mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrä pysyy tasaisena molemmilla kasvatusalustoilla, mutta H-kasvatusalustalla mikroleväbiomassan kuivapaino nousee näytteenottohetkestä T1 näytteenottohetkeen T3, ja HB12-kasvatusalustalla laskee. Vapaiden bakteerien määrän ja mikroleväbiomassan kuivapainon kehitys korreloivat keskenään positiivisesti molemmilla kasvatusalustoilla ($p=0,002$, Erotus=0,722, Taulukko 6.). H-kasvatusalustalla mikrolevän kuivapaino ja vapaiden bakteerien määrä on korkeampi näytteenottohetkellä T1 kuin näytteenottohetkellä T3, kun taas HB12-kasvatusalustalla molempien määrä on alhaisempi näytteenottohetkellä T3 kuin näytteenottohetkellä T1.

Taulukko 6. Kasvatusalustan (H vs. HB12), näytteenottohetken (T1-T3) ja mikroleväbiomassan kuivapainon (g/l) vaikutus H- ja HB12-alustalla kasvatetusta *E. gracilis* -mikroleväviljelmän mikrolevään kiinnittyneiden ja vapaiden bakteerien määrään (16S rRNA kopio/l näytettä Log 10 -asteikko) näytteenottohetkinä T1-T3 Imer-testillä analysoituna. Merkitsevyydet ($p < 0,05$) on merkitty taulukkoon symbolilla *.

	Erotus	Keskivirhe	t	p	p<0,05
Mikrolevään kiinnittyneet bakteerit					
Kasvatusalusta H	2,188	0,451	4,851	$1,228 \cdot 10^{-6}$	*
Mikrolevän kuivapaino	-0,385	0,182	-2,122	0,034	*
T1 vs. T2	-0,359	0,266	-1,350	0,177	
T1 vs. T3	-0,549	0,414	-1,327	0,185	
T2 vs. T3	0,359	0,266	1,350	0,177	
Vapaat bakteerit					
Kasvatusalusta H	0,126	0,583	-0,216	0,829	
Mikrolevän kuivapaino	0,722	0,235	3,076	0,002	*
T1 vs. T2	0,409	0,344	1,190	0,234	
T1 vs. T3	0,687	0,534	1,286	0,198	
T2 vs. T3	-0,409	0,344	-1,190	0,234	

Vapaiden ($p=0,004$, Erotus=0,473, Taulukko 7.) ja mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien ($p=0,048$, Erotus=-0,466, Taulukko 7.). määrä selitti myös mikroleväbiomassan kuivapainon eroja kasvatusalustojen välillä. Mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrä korreloi negatiivisesti mikrolevän kuivapainon kanssa ja vapaiden bakteerien määrä positiivisesti.

Taulukko 7. Mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien (MK) ja vapaiden bakteerien (V) määrän (16S rRNA kopio/l Log 10 -asteikko) vaikutus mikroleväbiomassan (g/l) kuivapainoon näytteenottohetkinä T1-T3 Imer-testillä analysoituna. Merkitsevyydet ($p < 0,05$) on merkitty taulukkoon symbolilla *.

	Erotus	Keskivirhe	t	p	p<0,05
MK bakteerien määrä	-0,466	0,235	-1,982	0,048	*
V bakteerien määrä	0,473	0,162	2,914	0,004	*

3.4. Bakteriyhteisöt

3.4.1. Kasvatusalustan ja näytteenottohetken vaikutus bakteriyhteisön koostumukseen

H- ja HB12 -kasvatusalustan mikroleväsiirroksien ja näytteenottohetkien T1-T3 *E. gracilis* -mikroleväviljelmien vapaiden ja mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien OTU:jen, bakteeriluokkien ja -sukujen lukumäärissä ei ollut suurta näytteenottohetkestä tai kasvatusalustasta riippuvaista vaihtelua, lukuun ottamatta bakteerisukuja, joita oli HB12-kasvatusalustan vapaissa ja mikrolevään kiinnittyneissä bakteereissa näytteenottohetkinä T1-T3 kaksinkertainen määrä verrattuna H-kasvatusalustan vastaaviin näytteisiin (Taulukko 8.).

Taulukko 8. H- ja HB12-kasvatusalustan mikroleväsiirroksen (S) ja *E. gracilis* -mikroleväviljelmän näytteenottohetkien T1-T3 vapaiden (V) ja mikrolevään kiinnittyneiden (MK) bakteerien OTU:jen, bakteeriluokkien ja -sukujen määrät.

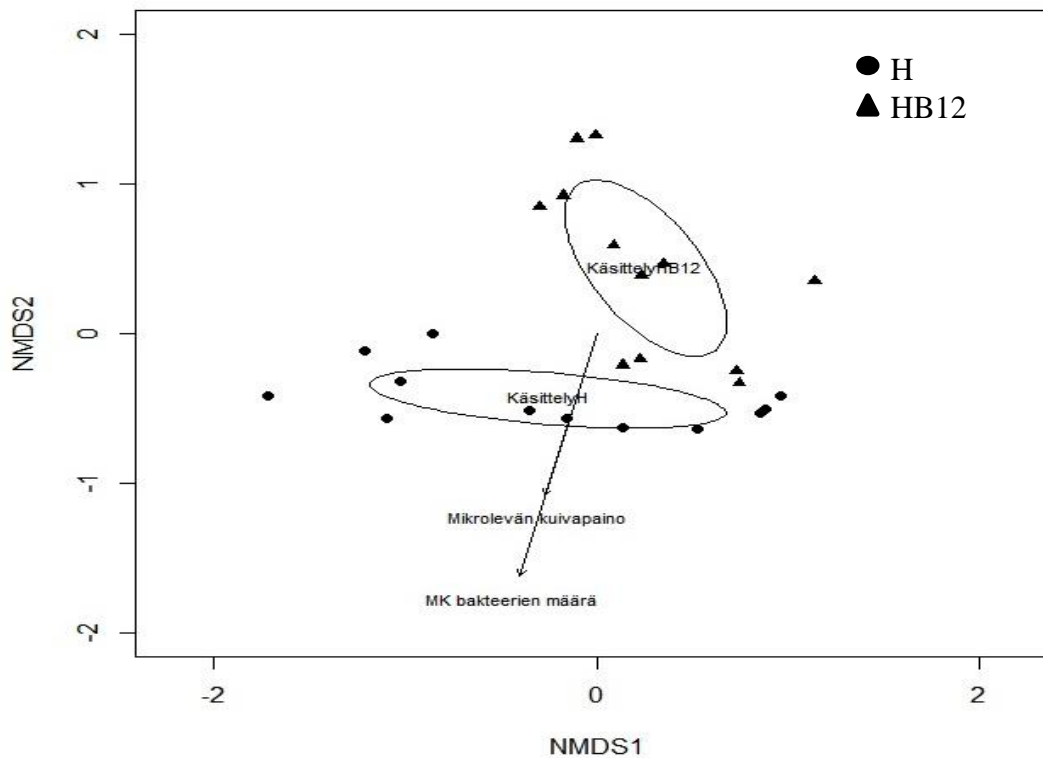
Näyte	OTU määrä	Vähintään pääjaksolleen tunnistetut OTUt	Bakteeriluokkien määrä	Bakteerisukujen määrä
H MK S	9620	1208	30	200
H V S	9530	880	28	201
HB12 MK S	11910	1643	31	259
HB12 V S	9295	1419	27	200
H MK T1-T3	76815	3760	18	173
H V T1-T3	84856	20870	30	332
HB12 MK T1-T3	92208	6730	30	416
HB12 V T1-T3	94034	14324	37	523

Mikroleväviljelmien mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien yhteisöt olivat erilaisia H- ja HB12 -kasvatusalustalla ($p=6,0 \cdot 10^{-4}$, Taulukko 9.). Yhteisöt eivät muuttuneet stationaarivaiheen aikana eri näytteenottohetkien välillä ($p=0,083$, Taulukko 9.). H-kasvatusalustalla kasvatetun mikroleväviljelmän mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien yhteisöt eivät eronneet toisistaan rinnakkaisten

kasvatusten ja eri näytteenottohetkien välillä yhtä paljon kuin HB12-kasvatualustalla (Kuva 4.).

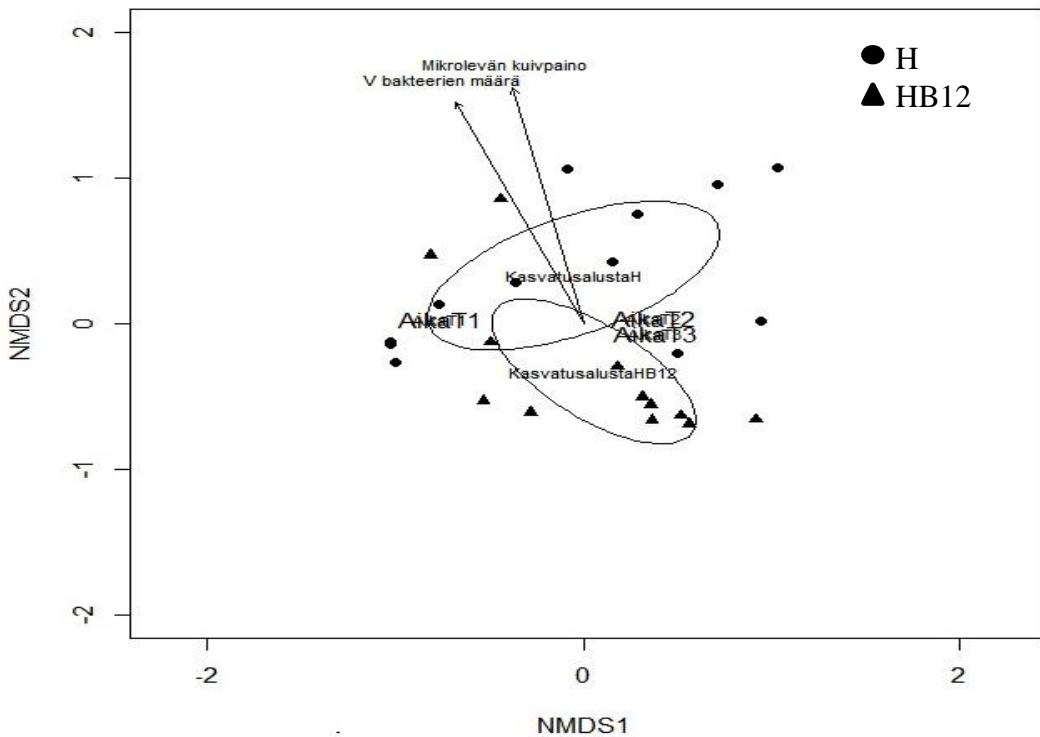
Taulukko 9. Näytteenottohetken ja kasvatusalustan vaikutus H- ja HB12-kasvatusalustan mikroleväviljelmien vapaiden bakteerien ja mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien yhteisöön NMDS-testillä analysoituna. Merkitsevyydet ($p < 0,05$) on merkitty taulukkoon symbolilla *.

	r^2	p	$p < 0,05$
MK bakteerien yhteisö			
Näytteenottohetki	0,173	0,083	
Kasvatusalusta	0,279	$6,0 \cdot 10^{-4}$	*
V bakteerien yhteisö			
Näytteenottohetki	0,388	$2,5 \cdot 10^{-4}$	*
Kasvatusalusta	0,148	0,028	*



Kuva 4. Kasvatusalustan, mikrolevän kuivapainon ja mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrän vaikutus H- ja HB12 -kasvatusalustalla (Käsittely H ja HB12) kasvatetun *E. gracilis* -mikroleväviljelmän mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien yhteisön samankaltaisuuteen.

Erot kasvatusalustassa selittivät myös mikroleväviljelmien vapaiden bakteerien yhteisökoostumuksen välisiä eroja ($p=0,028$, Taulukko 9.). Bakteriyhteisöt muuttuivat kuitenkin paljon stationaarivaiheen kuluessa, minkä vuoksi näytteenottohetki selitti eri kasvatusalustojen mikroleväviljelmien vapaiden bakteerien yhteisöjen välisiä eroja paremmin kuin kasvatusalusta ($p=2,5 \cdot 10^{-4}$, $r^2=0,388$, Taulukko 9.). H-kasvatusalustan näytteiden bakteriyhteisöissä oli enemmän vaihtelua kasvatusalustan rinnakkaisten kasvatusten ja eri näytteenottohetkinä otettujen näytteiden välillä, kun taas HB12-kasvatusalustan näytteiden bakteriyhteisöjen väliset erot olivat pienempiä (Kuva 5.).



Kuva 5. Kasvatusalustan, näytteenottohetken (Aika T1-T3), mikrolevän kuivapainon ja vapaiden bakteerien määrän vaikutus H- ja HB12-kasvatusalustalla (Käsittely H ja HB12) kasvatetun *E. gracilis* -mikroleväviljelmän vapaiden bakteerien yhteisön samankaltaisuuteen.

Sekä vapaiden että mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien yhteisöjen eroja selittivät bakteerien määrä ja mikrolevän kuivapainon pitoisuus (Taulukko 10.). H-kasvatusalustan mikrolevään kiinnittyneiden ja vapaiden bakteerien yhteisöt erosivat HB12-kasvatusalustan bakteerien yhteisöistä osaksi siksi, että sekä

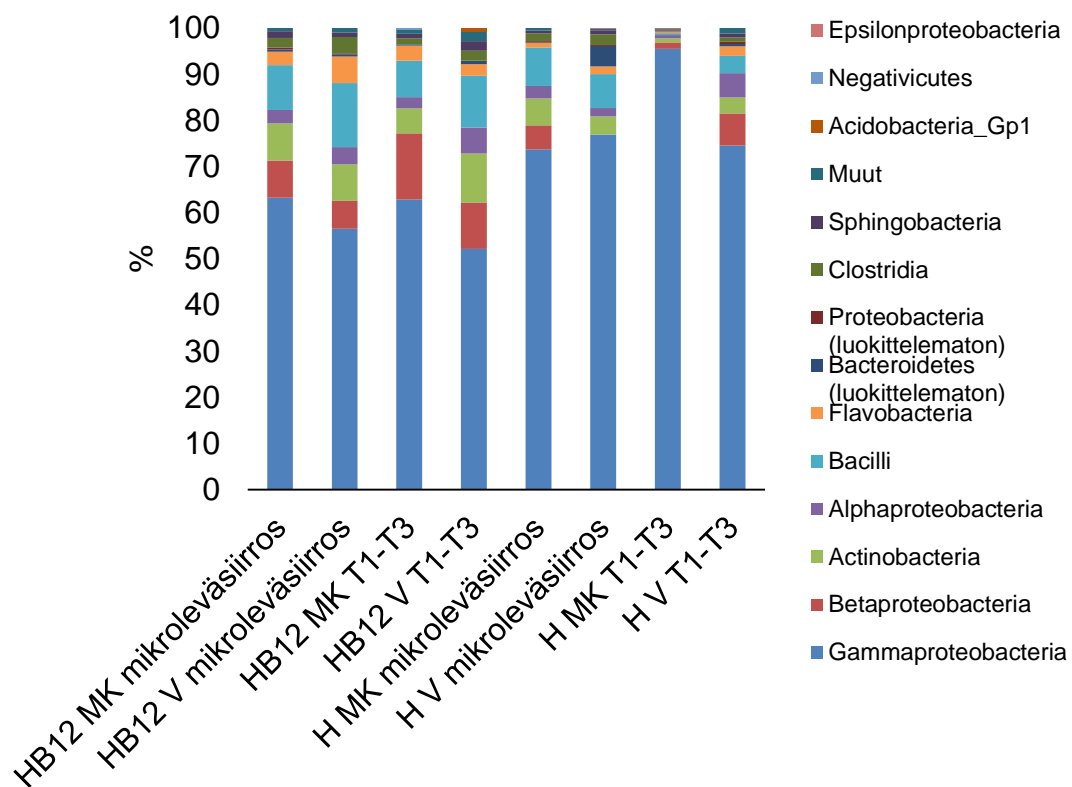
mikrolevää että bakteereja oli enemmän H-kasvatusalustalla kasvatetussa mikroleväviljelmässä.

Taulukko 10. Mikrolevän kuivapainon (g/l) ja bakteerimäärän (16S rRNA kopio/l) selittävyys mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien (MK bakteerien yhteisö) ja vapaiden bakteerien (V bakteerien yhteisö) yhteisöeroihin. Merkitsevyydet ($p < 0,05$) on merkitty taulukkoon symbolilla *.

	NMDS1	NMDS2	r ²	p-arvo	p<0,5
Mk bakteerien yhteisö					
Mikrolevän kuivapaino	-0,243	-0,967	0,307	0,020	*
MK bakteerien määrä	-0,241	0,970	0,685	$3 \cdot 10^{-5}$	*
V bakteerien yhteisö					
Mikrolevän kuivapaino	-0,0225	0,974	0,414	0,003	*
V bakteerien määrä	-0,407	0,913	0,416	0,004	*

3.4.2. Bakteeriluokat

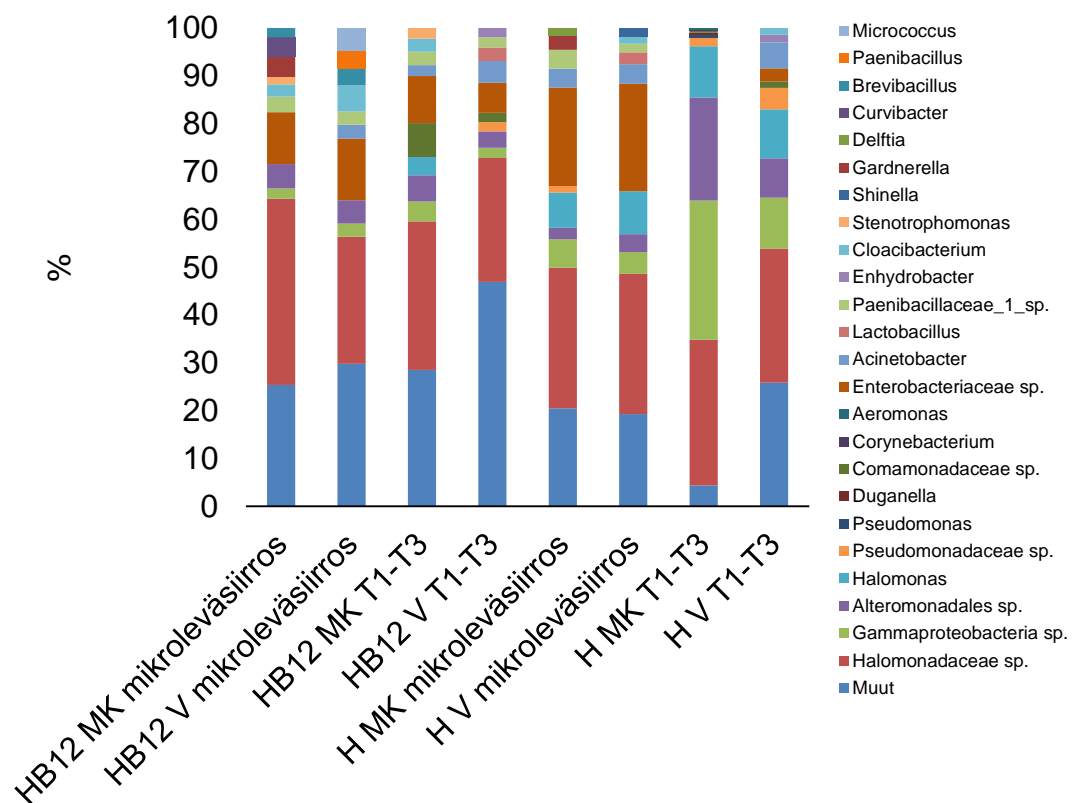
H- ja HB12-kasvatusalustoilla kasvatettujen mikroleväviljelmien neljä yleisintä bakteeriluokkaa olivat samoja bakteeriluokkia (gammaproteobacteria, bacilli, actinobacteria ja betaproteobacteria). H-kasvatusalustan mikroleväsiirroksen vapaissa bakteereissa oli kaksi bakteeriluokkaa bacteroidetes (luokittelematon) ja epsilonproteobacteria, joita ei ollut HB12-kasvatusalustan mikroleväsiirroksen vapaiden bakteerien kymmenen yleisimmän bakteeriluokan joukossa (Kuva 6). Bacteroidetes-luokka oli edustettuna myös H-kasvatusalustan mikroleväviljelmässä näytteenottohetkinä T1-T3. Negativicutes- ja acidobacteria Gp1 -luokat puolestaan olivat edustettuina HB12-kasvatusalustan mikroleväviljelmässä, mutta puuttuivat H-kasvatusalustan mikroleväviljelmien kymmenen yleisimmän bakteeriluokan joukosta. Kobalamiinin ja tiamiinin kannalta mielenkiintoista on gammaproteobacteria- ja alphaproteobacteria -luokkien suhteessa suurempi kasvu H-kasvatusalustan mikroleväviljelmässä näytteenottohetkinä T1-T3 verrattuna HB12-kasvatusalustan mikroleväviljelmään.



Kuva 6. H- ja HB12-kasvatusalustan mikroleväsiirroksien ja näytteenottohetkinä T1-T3 otettujen näytteiden vapaiden (V) ja mikrolevään kiinnittyneiden (MK) bakteerien kymmenen yleisintä bakteeriluokkaa, ja niiden prosentuaaliset osuudet suhteessa kaikkien bakteeriluokkien yhteenlaskettuun kokoon/kasvatusalusta.

3.4.3. Bakteerisuvut

Molempien käsittelyiden mikroleväsiirroksen vapaiden ja mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien kymmenestä yleisimmästä bakteerisuvusta kahdeksan olivat samoja bakteerisukuja (Kuva 7.). *Halomonadaceae* sp. oli yleisin bakteerisuku molempien kasvatusalustojen mikroleväsiirroksissa. Molempien kasvatusalustojen mikroleväsiirroksien vapaiden tai mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien kymmenen yleisimmän bakteerisuvun joukossa oli myös muutama pienempi bakteerisuku, jota ei löytynyt toisen kasvatusalustan kymmenen yleisimmän bakteerisuvun joukosta.



Kuva 7. H- ja HB12-kasvatusalustan mikroleväsiirroksien ja näytteenottohetkinä T1-T3 otettujen näytteiden vapaiden (V) ja mikrolevään kiinnittyneiden (MK) bakteerien kymmenen yleisintä bakteerisukua ja niiden prosentuaaliset osuudet suhteessa kaikkien bakteerisukujen yhteenlaskettuun kokoon/kasvatusalusta.

Halomonadaceae sp. oli yleisin bakteerisuku molempien kasvatusalustojen mikroleväviljelmissä myös näytteenottohetkinä T1-T3 (Kuva 7.). Lukuun ottamatta *Halomonadaceae* sp. -sukua bakteerisukujen vaihtelu oli suurempaa eri kasvatusalustojen mikroleväviljelmien välillä näytteenottohetkinä T1-T3 kuin mikroleväsiirroksissa. Tämän pro gradu -tutkielman kannalta mielenkiintoisia ovat etenkin kobalamiinin ja tiamiinin synteesiin kykenevät gammaproteobakteerien luokkaan kuuluvat bakteerisuvut *Halomonadaceae* sp., *Halomonas*, *Gammaproteobacteria* sp., *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas*, *Pseudomonaceae* sp. ja *Alteromonadales* sp. Suvut olivat runsaammin edustettuna etenkin H-kasvatusalustan mikroleväviljelmän vapaissa ja mikrolevään kiinnittyneissä bakteereissa kuin HB12-kasvatusalustan mikroleväviljelmän bakteereissa näytteenottohetkinä T1-T3 ja H-kasvatusalustan mikroleväsiirroksen bakteereissa.

Eniten kyseisistä suvuista runsastuivat *Gammaproteobacteria* sp. ja *Alteromonadales* sp. sekä H-kasvatusalustan mikroleväviljelmän vapaissa että mikrolevään kiinnittyneissä bakteereissa.

Kobalamiinin ja tiamiinin kannalta kuudes tärkeä suku on alphaproteobakteerien luokkaan kuuluva *Rhodobactereacea* sp. Vaikka kyseinen suku ei ollut missään näytteessä kymmenen yleisimmän bakteerisuvun joukossa, runsastui se etenkin H-kasvatusalustan mikroleväviljelmän vapaissa bakteereissa (483 OTUa) verrattuna HB12-kasvatusalustan mikroleväviljelmän vapaisiin bakteereihin (157 OTUa), tai H-kasvatusalustan mikroleväsiirroksen vapaisiin bakteereihin (29 OTUa).

3.4.4. Shannon-Wiener -diversiteetti-indeksi

H- ja HB12-kasvatualustojen mikroleväviljelmien vapaiden ja mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien bakteeriyhteisöjen monimuotoisuudessa ei ollut merkittäviä eroja (Taulukko 10.), tosin monimuotoisuudessa tapahtui muutosta mikrolevän kasvun stationaarivaiheen aikana. Mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien kohdalla mikrolevän kasvun stationaarivaiheen lopussa näytteenottohetkenä T3 yhteisöjen monimuotoisuus oli suurempi kuin näytteenottohetkenä T1 ($p=2,25 \cdot 10^{-4}$, Erotus=0,574, Taulukko10.). Mikrolevään kiinnittyneiden ja vapaiden bakteerien monimuotoisuuteen vaikutti myös mikroleväbiomassan kuivapaino. Mikrolevään kiinnittyneiden ja vapaiden bakteerien diversiteetti korreloivat negatiivisesti mikrolevän kuivapainon kanssa. Kun mikrolevän kuivapaino laskee mikrolevään kiinnittyneiden ($p=0,006$, Erotus=-1,217, Taulukko 10.) ja vapaiden bakteerien ($p=0,021$, Erotus=-0,401, Taulukko 10.) monimuotoisuus lisääntyy. Mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien diversiteetti ja mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrä korreloivat myös keskenään negatiivisesti. Mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrän laskiessa mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien diversiteetti kasvaa ($p=0,005$, Erotus=-0,139, Taulukko 10.).

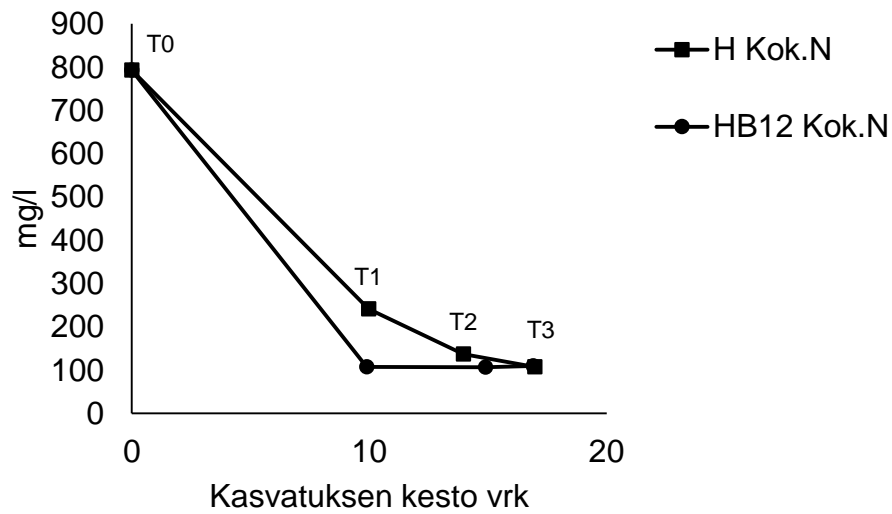
Taulukko 10. Kasvatusalustan (H vs. HB12), mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrän (16S rRNA geenin kopio/l, MK bakteerien määrä), vapaiden bakteerien määrä (16S rRNA geenin kopio/l, V bakteerien määrä), mikrolevän kuivapainon (g/l) ja näytteenottohetken (T1-T3) vaikutus vapaiden ja mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien diversiteettiin. Indeksinä käytettiin Shannon-Wiener indeksiä, ja muuttujien vaikutusa indeksiin testattiin Imer-testillä. Merkitsevyydet ($p < 0,05$) on merkitty taulukkoon symbolilla *.

	Erotus	Keskivirhe	t	p	p<0,05
Mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien diversiteetti					
Kasvatusalusta H	0,051	0,167	0,305	0,760	
MK bakteerien määrä	-0,139	0,050	-2,785	0,005	*
Mikrolevän kuivapaino	-1,217	0,442	-2,755	0,006	*
T1 vs. T2	0,181	0,202	0,894	0,371	
T1 vs. T3	-0,122	0,330	-0,367	0,711	
T2 vs. T3	0,574	0,156	3,689	$2,25 \cdot 10^{-4}$	*
Vapaiden bakteerien diversiteetti					
Kasvatusalusta H	0,059	0,119	0,495	0,620	
V bakteerien määrä	-0,024	0,036	-0,661	0,508	
Mikrolevän kuivapaino	-0,401	0,174	-2,310	0,021	*
T1 vs. T2	0,003	0,163	-0,020	0,984	
T1 vs. T3	-0,236	0,239	-0,989	0,323	
T2 vs. T3	0,061	0,230	0,265	0,791	

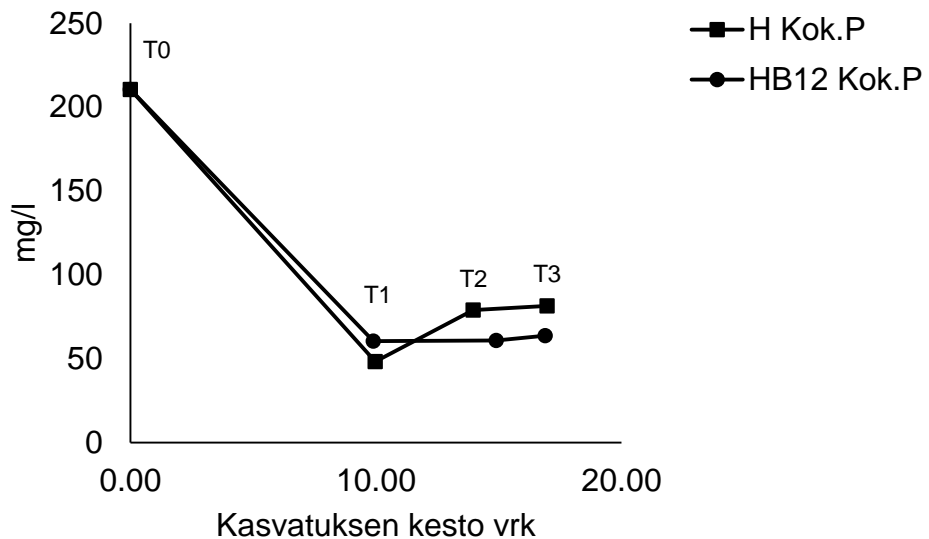
3.5. Kokonaistypen ja kokonaisfosforin pitoisuus

Molemmilla kasvatusalustoilla kokonaistypen ja -fosforin laskennallinen pitoisuus oli kasvatuksen alussa 711 mg/l ja 210 mg/l. H-kasvatusalustalla kokonaistypen ja -fosforin pitoisuus oli kasvatuksen päätyttyä 107 mg/l ja 81 mg/l ja HB12-kasvatusalustalla 106 mg/l ja 64 mg/l. *E. gracilis* -mikrolevä kulutti kokonaistyppeä hiukan tehokkaammin HB12- kuin H-kasvatusalustalla, mutta kokonaisfosforin kulutus oli aluksi vähän tehokkaampaa H-kasvatusalustalla (Kuva 8. ja 9.). HB12-kasvatusalustalla kokonaistypen pitoisuus pysyi melko tasaisena koko stationaarivaiheen, mutta H-kasvatusalustalla kokonaistypen pitoisuus oli stationaarivaiheen alussa näytteenottohetkenä T1 vielä 240 mg/l ja se laski pitoisuuteen 107 mg/l vasta näytteenottohetken T3 mennessä. H-kasvatusalustalla kokonaisfosforin pitoisuus stationaarivaiheen alussa näytteenottohetkenä T1 oli noin 30 mg/l vähemmän kuin stationaarivaiheen lopussa näytteenottohetkenä T3.

HB12-kasvatusalustalla kokonaisfosforin pitoisuus pysyi noin pitoisuudessa 64 mg/l koko stationaarivaiheen.



Kuva 8. Kokonaistypen (Kok.N) kulutus (mg/l, ka ± keskivirhe, keskivirheet niin pieniä, että eivät erotu kuvassa.) H- ja HB12-kasvatusalustoilla kasvatuksen alusta (T0) kasvatuksen stationaarivaiheen viimeiseen näytteenottohetkeen (T3). Kuvaan on merkattu kasvatuksen alun näytteenottohetki T0 ja stationaarivaiheen näytteenottohetket T1, T2 ja T3.



Kuva 9. Kokonaisfosforin (Kok.P) kulutus (mg/l, ka ± keskivirhe, keskivirheet niin pieniä, etteivät erotu kuvassa.) H- ja HB12-kasvatusalustoilla kasvatuksen alusta (T0) kasvatuksen stationaarivaiheen viimeiseen näytteenottohetkeen (T3). Kuvaan on merkattu kasvatuksen alun näytteenottohetki T0 ja stationaarivaiheen näytteenottohetket T1, T2 ja T3.

Typen määrä korreloi mikrolevän kuivapainon ($p=0,002$, Erotus=-9,568, Taulukko 11.) ja mikroleviin kiinnittyneiden bakteerien diversiteetin ($p=0,012$, Erotus=-10,084, Taulukko 11.) kanssa negatiivisesti. H-kasvatusalustalla typen määrä laskee näytteenottohetkestä T1 näytteenottohetkeen T3 samalla kun mikrolevän kuivapaino nousee. HB12-kasvatusalustalla typen pitoisuus pysyy melko tasaisena koko stationaarivaiheen, mutta mikrolevän kuivapaino laskee. Ravinteilla ei kuitenkaan ollut vaikutusta mikroleväviljelmien mikrolevään kiinnittyneiden ja vapaiden bakteerien määriin eikä vapaiden bakteerien diversiteettiin (Taulukko 11.).

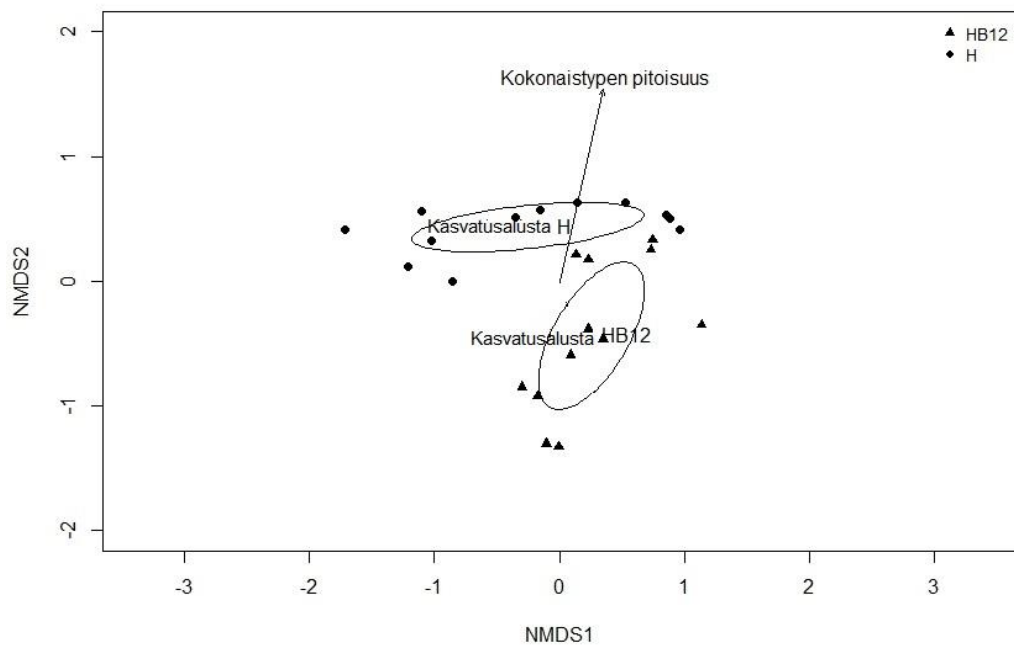
Taulukko 11. Kasvatusalustan kokonaistypen (Kok.N) ja kokonaisfosforin (Kok.P) pitoisuuden vaikutus mikroleväbiomassan kuivapainoon (g/l) ja mikrolevään kiinnittyneiden ja vapaiden bakteerien määrään (16S rRNA geenin kopio/l) sekä diversiteettiin (Shannon-Wiener indeksi) näytteenottohetkinä T1-T3 Imer-testillä mitattuna. Merkitsevyydet ($p<0,05$) on merkitty taulukkoon symbolilla *.

	Erotus	Keskivirhe	t	p	p<0,05
Mikroleväbiomassan kuivapaino					
Kok.N	-9,568	3,130	-3,057	0,002	*
Kok.P	2,719	10,90	0,249	0,804	
Mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrä					
Kok.N	-2,518	3,58	-0,704	0,482	
Kok.P	1,126	10,70	0,105	0,916	
Mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien diversiteetti					
Kok.N	-10,084	4,030	-2,504	0,012	*
Kok.P	8,56	15,800	0,543	0,587	
Vapaiden bakteerien määrä					
Kok.N	7,358	4,620	1,592	0,111	
Kok.P	3,717	13,9	0,268	0,789	
Vapaiden bakteerien diversiteetti					
Kok.N	-5,810	12,80	-0,455	0,649	
Kok.P	6,590	26,60	0,248	0,805	

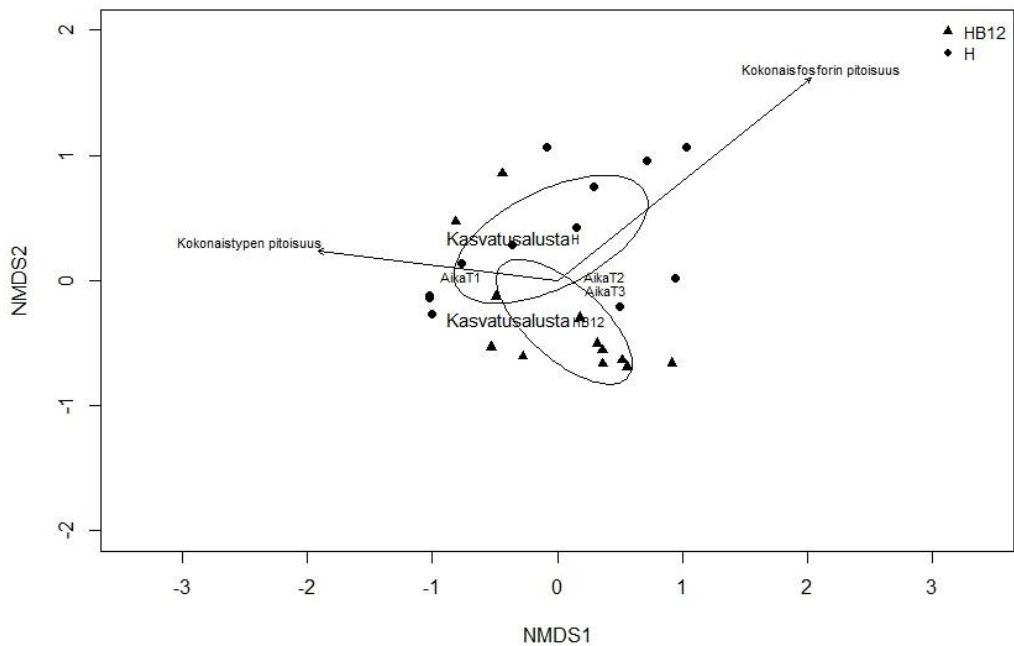
Kokonaistypen erilainen kulutus selitti myös mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien ($p=0,047$) yhteisöllisiä eroja (Taulukko 12, Kuva 10). Vapaiden bakteerien yhteisöjen eroja selitti sekä kokonaistyyppi, että -fosfori (Kok.P $p=1,0 \cdot 10^{-5}$, Kok.N $p=0,003$, Taulukko 12., Kuva 11.).

Taulukko 12. Kokonaistypen (Kok.N) ja kokonaisfosforin (Kok.P) pitoisuuden selittävyys H- ja HB12-kasvatusalustan mikroleväviljelmien välisten mikrolevään kiinnittyneiden ja vapaiden bakteerien eroihin NMDS-testillä analysoituna. Merkitsevyydet ($p < 0,05$) on merkitty taulukkoon symbolilla *.

	NMDS1	NMDS2	r^2	p	$p < 0,05$
Mikrolevään kiinnittyneet bakteerit					
Kok.N	0,220	0,975	0,248	0,047	*
Kok.P	-0,972	0,234	0,136	0,215	
Vapaat bakteerit					
Kok.N	-0,993	0,122	0,428	0,003	*
Kok.P	0,781	0,624	0,773	$1,0 \cdot 10^{-5}$	*



Kuva 10. Kokonaistypen pitoisuuden selittävyys mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien yhteisöeroihin.



Kuva 11. Kasvatusalustan kokonaisfosforin ja kokonaistypen pitoisuuden selittävyys vapaiden bakteerien yhteisöeroihin

3.6. Kasvatusalustan ja mikroleväbiomassan kobalamiinipitoisuuden vaikutus mikroleväbiomassan kuivapainoon ja bakteerien määrään

Mikroleväbiomassan kobalamiinipitoisuus ei vaikuttanut merkitsevästi mikroleväbiomassan kuivapainoon, mikrolevään kiinnittyneiden ja vapaiden bakteerien määrään eikä mikrolevään kiinnittyneiden tai vapaiden bakteerien diversiteettiin (Taulukko 13.).

Taulukko 13. Kasvatusalustan ja mikroleväbiomassan kobalamiinipitoisuuden (B_{12} biomassassa ja B_{12} kasvatusalustassa) vaikutus mikroleväbiomassan kuivapainoon (g/l) ja mikrolevään kiinnittyneiden ja vapaiden bakteerien määrään (16S rRNA geenin kopio/l) sekä diversiteettiin (Shannon-Wiener indeksi) näytteenottohetkinä T1-T3 Imer-testillä mitattuna. Merkitsevyydet ($p < 0,05$) on merkitty taulukkoon symbolilla *.

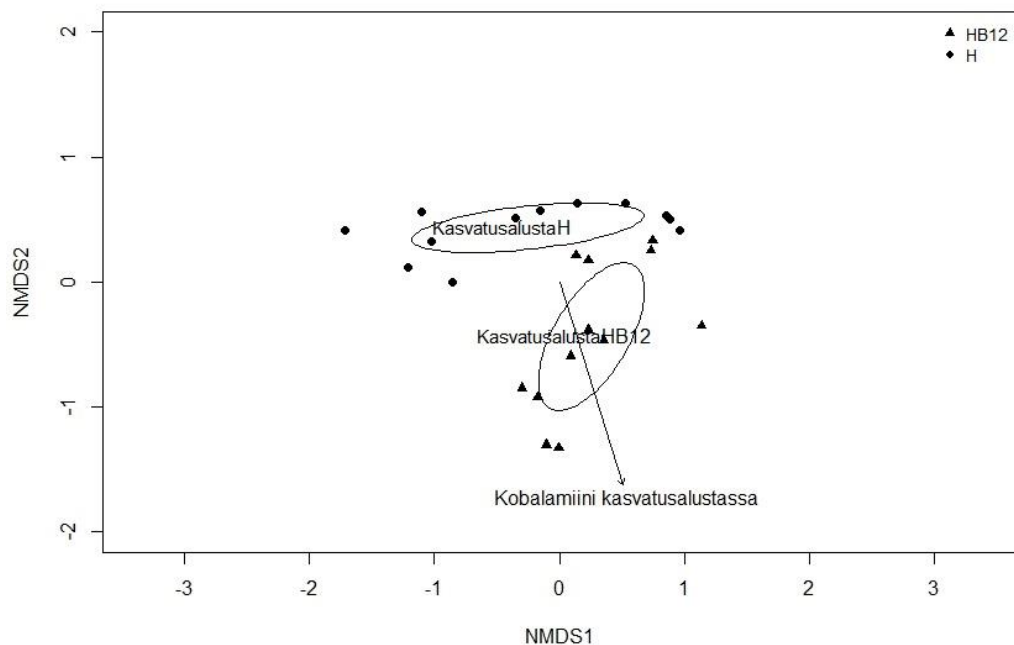
	Erotus	Keskivirhe	t	p	p<0,05
Mikroleväbiomassa					
B_{12} biomassassa	$1,953 \cdot 10^{-4}$	0,000	1,551	0,121	
B_{12} kasvatusalustassa	0,044	0,011	3,914	$9,064 \cdot 10^{-5}$	*
Mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrä					
B_{12} biomassassa	0,001	$1,58 \cdot 10^{-4}$	3,476	0,581	
B_{12} kasvatusalustassa	0,026	0,0123	2,111	0,035	*
Mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien diversiteetti					
B_{12} biomassassa	0,001	$2,30 \cdot 10^{-3}$	0,551	0,581	
B_{12} kasvatusalustassa	0,074	0,0382	1,932	0,053	
Vapaiden bakteerien määrä					
B_{12} biomassassa	$4,840 \cdot 10^{-4}$	$2,04 \cdot 10^{-4}$	1,146	0,252	
B_{12} kasvatusalustassa	-0,034	0,016	-2,171	0,030	*
Vapaiden bakteerien diversiteetti					
B_{12} biomassassa	$6,35 \cdot 10^{-5}$	$1,32 \cdot 10^{-4}$	0,480	0,631	
B_{12} kasvatusalustassa	$5,74 \cdot 10^{-3}$	$7,73 \cdot 10^{-3}$	0,743	0,457	

Kasvatusalustan kobalamiinipitoisuus korreloi positiivisesti mikroleviin kiinnittyneiden bakteerien määrään ($p=0,035$, Erotus=0,026, Taulukko 13.) ja mikrolevän kuivapainon kanssa ($p=9,06 \cdot 10^{-5}$, Erotus=0,044, Taulukko 13.), ja negatiivisesti vapaiden bakteerien määrän kanssa ($p=0,030$, Erotus=-0,034, Taulukko 13.). H-kasvatusalustalla ei ole kobalamiinia koko stationaarivaiheen aikana, paitsi yhdessä rinnakkaisessa kasvatuksessa (Liite 1.). Vapaiden bakteerien määrä kuitenkin kasvaa H-kasvatusalustalla näytteenottohetkestä T1 näytteenottohetkeen T2 ja pysyy tasaisena näytteenottohetkeen T3. HB12-kasvatusalustalla kobalamiinipitoisuus pysyy tasaisena näytteenottohetkestä T1 näytteenottohetkeen T2, minkä jälkeen se nousee rajusti näytteenottohetkeen T3 (Liite 1.). Samaisella kasvatusalustalla vapaiden bakteerien määrä laskee näytteenottohetkestä T1 näytteenottohetkeen T3.

Kasvatusalustan kobalamiinipitoisuus selittää myös kasvatusalustojen mikroleväviljelmien mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien yhteisöjen välisiä eroja ($p=0,021$, Taulukko 14., Kuva 12.). Mikroleväbiomassan kobalamiinipitoisuudella ei kuitenkaan ollut vaikutusta kasvatusalustojen mikroleväviljelmien välisiin vapaiden ($p=0,397$) ja mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien ($p=0,146$) yhteisöeroihin (Taulukko 14.).

Taulukko 14. Kasvatusalustan ja mikroleväbiomassan kobalamiinipitoisuuden (B_{12} biomassassa ja B_{12} kasvatusalustassa) vaikutus mikrolevään kiinnittyneiden ja vapaiden bakteerien yhteisöön näytteenottohetkinä T1-T3 NMDS-testillä analysoituna. Merkitsevyydet ($p<0,05$) on merkitty taulukkoon symbolilla *.

	NMDS1	NMDS2	r^2	p	$p<0,05$
Mikrolevään kiinnittyneet bakteerit					
B_{12} biomassassa	0,602	-0,798	0,167	0,146	
B_{12} kasvatusalustassa	0,298	-0,954	0,287	0,021	*
Vapaat bakteerit					
B_{12} biomassassa	-0,626	-0,780	0,085	0,397	
B_{12} kasvatusalustassa	0,442	-0,897	0,146	0,183	



Kuva 12. Kasvatusalustan kobalamiinin selittävyys mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien yhteisökoostumukselle NMDS-analyysillä mitattuna.

4. Tulosten tarkastelu

4.1. Kasvatusalustaan lisätyn kobalamiinin ja tiamiinin vaikutus *E. gracilis* -mikroleväbiomassan kuivapainoon

Tämän tutkimuksen ensimmäisen hypoteesin vastaisesti kasvatusalustalla oli merkitsevä vaikutus *E. gracilis* -mikroleväbiomassan kuivapainoon. Mikrolevä kasvoi paremmin H- kuin HB12-kasvatusalustalla, mutta ero ei ollut niinkään mikrolevän kuivapainossa, vaan kasvun stationaarivaiheen kestossa. Kasvatusalustan kobalamiini- ja kokonaistyyppipitoisuus sekä vapaiden että mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrä selittivät mikrolevän kuivapainon määrällisiä eroja kasvatusalustojen välillä. Parhaiten mikrolevän kuivapainon eroja selitti kasvatusalustan kobalamiini- ja tyyppipitoisuus.

Tiamiinin ja kobalamiinin suhteen auksotrofiset mikrolevät kasvavat yleensä tehokkaimmin silloin, kun sekä kobalamiinia, tiamiinia että tyypeä on runsaasti saatavilla (Gobler ym. 2007, Chen ym. 2011). Tämän pro gradu -tutkielman tulokset tukevat tätä teoriaa, sillä runsaasti lisättyjä vitamiineja sisältävällä HB12-kasvatusalustalla mikrolevä saavutti kuivapainon huipun jo kasvun stationaarivaiheen alussa, kun taas H-kasvatusalustalla korkein kuivapaino saavutettiin vasta stationaarivaiheen lopussa. HB12-kasvatusalustan kobalamiinipitoisuus oli vielä melko korkea mikrolevän kasvun stationaarivaiheen alussa, mutta tyypin pitoisuus oli jo niin alhainen, että se todennäköisesti rajoitti mikrolevän kasvua. HB12-kasvatusalustalla lisättyjen vitamiinien määrä on luultavasti ollut niin suuri, että se on mahdollistanut mikrolevän nopean tyypin kulutuksen ja biomassan kasvun. Jos HB12-kasvatusalustalla olisi ollut tyypeä runsaammin, mikrolevän kasvun stationaarivaihe olisi saattanut kestää pidempään ja myös sen kuivapaino olisi saattanut olla korkeampi.

Myös bakteereilla on saattanut olla osuutensa mikrolevän erilaiseen kasvuun ja ravinteiden kulutuksen nopeuteen eri kasvatusalustoilla. Ravinteiltaan erilaisilla kasvatusalustoilla mikrolevän kasvun nopeus ja sen kesto voivat olla hyvinkin erilaisia riippuen siitä kasvatetaanko mikrolevää ilman bakteereja vai niiden kanssa (Grossart ym. 2007). Kasvatusalustalla, jossa on kaikki mikrolevän ja bakteerien tarvitsemat ravinteet, tarve ravinteiden vaihtoon perustuville symbiooseille vähenee, ja mikroleväviljelmässä saattavat yleistyä enemmän mikrolevän kanssa ravinteista kilpailevat bakteerit (Danger ym. 2007, Sapp ym. 2007, Grant ym. 2014). Bakteerit myös kasvavat ja kuluttavat ravinteita mikrolevää nopeammin, mikä heikentää mikrolevän kilpailukykyä ja siten myös sen kasvua (Danger ym. 2007, Sapp ym. 2007, Grant ym. 2014). Kun kasvatusalustasta puuttuvat esimerkiksi lisätyt vitamiinit, mikroleväviljelmässä yleistyvät mikrolevän tarvitsemia vitamiineja syntetisoivat bakteerit ja mikrolevän kasvu tehostuu (Sapp ym. 2007, Grant ym. 2014, Cruz-López ym. 2016). Joissakin tapauksissa kumuloituvan yhteisvaikutuksen ansiosta mikrolevän kasvu saattaa olla jopa parempaa silloin kun kasvatusalustaan lisätään kobalamiinin lisäksi myös sitä syntetisoivia bakteereja (Kuo ym. 2013). Lisättyjä vitamiineja sisältävällä kasvatusalustalla saattaa kuitenkin esiintyä myös kilpailua vitamiineista vitamiineja tarvitsevien bakteerien ja mikrolevän välillä (Cruz-López ym. 2016).

Vitamiinien vaihtoon perustuvissa mikrolevä-bakteeri -symbiooseissa tärkeä tekijä on myös mikrolevien bakteereille erittämä orgaaninen hiili (Kazamia ym. 2012, Grant ym. 2014). Lisättyä orgaanista hiiltä sisältämättömällä kasvatusalustalla bakteerit ovat riippuvaisia mikrolevän erittämästä orgaanisesta hiilestä. Bakteriyhteisö voi jopa kiihdyttää mikrolevän orgaanisen hiilen eritystä syntetisoimalla mikrolevälle sen tarvitsemia vitamiineja (Kazamia ym. 2012, Grant ym. 2014). Kun kasvatusalustaan lisätään orgaanista hiiltä, bakteerit eivät enää ole riippuvaisia mikrolevän erittämästä orgaanisesta hiilestä ja tuloksena voi olla mikrolevän kanssa kilpailevien bakteerien yleistymisen mikroleväviljelmässä (Grant ym. 2014). Tämä ei kuitenkaan aina päde kobalamiinin ja orgaanisen hiilen vaihtoon perustuvissa symbiooseissa, sillä kobalamiinia syntetisoivien bakteerien

on havaittu jatkavan kobalamiinin syntetisointia mikrolevälle myös lisättyä orgaanista hiiltä sisältävällä kasvatusalustalla (Kazamia ym. 2012).

On todennäköistä, että tässä pro gradu -tutkielmassa lisättyä kobalamiinia ja tiamiinia sisältämättömällä H-kasvatusalustalla kasvatetussa mikroleväviljelmässä ovat yleistyneet enemmän kobalamiinia ja tiamiinia syntetisoivat kuin mikrolevän kanssa ravinteista kilpailevat bakteerit. Vitamiinien puuttumisen lisäksi myös kasvatusalustaan lisätty orgaaninen hiili on voinut edelleen tehostaa vitamiineja syntetisoivien bakteerien kasvua. HB12-kasvatusalustalla vitamiinien vaihdolle ei ollut tarvetta kasvatusalustan sisältämien vitamiinien vuoksi, mikä on voinut johtaa ravinteista ja vitamiineista kilpailevien bakteerien yleistymiseen mikroleväviljelmässä. Tällöin typen nopeampi kulutus HB12-kasvatusalustalla ei ole ollut yksin mikrolevän kasvun aiheuttamaa, vaan myös mikrolevän ja bakteerien välisen ravinnepilailun tulosta. Koska kasvatusalustoista ei analysoitu muita yhdisteitä kuin kobalamiini, kokonaistyyppi ja kokonaisfosfori, emme tiedä, onko jokin muukin yhdiste mahdollisesti rajoittanut mikrolevän kasvua HB12-kasvatusalustalla mikrolevän kasvun stationaarivaiheessa. Bakteerien ja mikrolevän välisen kilpailun seurauksena myös esimerkiksi orgaaninen hiili tai tiamiini on voitu kuluttaa loppuun jo mikrolevän kasvun stationaarivaiheen alkuun mennessä.

Mikrolevän ja bakteerien välinen kobalamiinin ja orgaanisen hiilen vaihto näkyy yleensä myös mikroleväbiomassan ja sen kasvatusalustan kobalamiinipitoisuudessa (Grant ym. 2014, Cruz-López ym. 2016). Kun mikrolevän kasvatusalustaan lisätään kobalamiinia mikrolevän tehokkaaseen kasvuun tarvittava määrä, kasvatusalustasta on analysoitavissa korkeita kobalamiinipitoisuuksia vielä mikrolevän kasvun stationaarivaiheessa (Kazamia ym. 2012). Mielenkiintoista on, että kun kobalamiinin suhteen auksotrofista mikrolevää kasvatetaan kobalamiinia syntetisoivan bakteerin kanssa lisättyä kobalamiinia sisältämättömällä kasvatusalustalla, kasvatusalustassa ei juuri ole kobalamiinia mikrolevän kasvun stationaarivaiheessa (Kazamia ym. 2012). Tämä siitä huolimatta, vaikka mikrolevän kasvu on kyseisellä kasvatusalustalla yhtä hyvää kuin kasvatusalustalla,

johon on lisätty kobalamiinia mikrolevän tehokkaaseen kasvuun tarvittava määrä (Kazamia ym. 2012, Cruz-López ym. 2016).

Kasvatusalustalla, jossa mikrolevän kobalamiinin saanti on bakteerien varassa, myös mikroleväbiomassan kobalamiinipitoisuus pysyy alhaisena (Kazamia ym. 2012, Cruz-López ym. 2016). Vitamiineja syntetisoivien bakteerien kanssa lisättyjä vitamiineja sisältämättömällä kasvatusalustalla kasvatetun mikroleväbiomassan ja sen kasvatusalustan alhainen kobalamiinipitoisuus viittaavat siihen, että bakteerit syntetisoivat kobalamiinia tasaisesti koko kasvatuksen ajan, ja vain sen verran kuin mikrolevä tarvitsee sitä kasvuunsa (Kazamia ym. 2012, Cruz-López ym. 2016). Kobalamiinia ei näytä jäävän yli mikrolevän kasvusta niin, että sitä olisi analysoitavissa ylimäärin kasvatusalustasta tai mikrolevästä (Kazamia ym. 2012, Cruz-López ym. 2016).

Tämän pro gradu -tutkielman tulokset tukevat näitä tuloksia. H-kasvatusalustassa ei juurikaan ollut kobalamiinia mikrolevän kasvun stationaarivaiheessa ja mikroleväbiomassankin kobalamiinipitoisuus oli enää noin 7 % mikroleväsiirroksen sisältämästä pitoisuudesta (Liite 1.). Tästä huolimatta mikrolevän kuivapaino lähti H-kasvatusalustalla nousuun vielä kasvatuksen stationaarivaiheen lopussa. HB12-kasvatusalustan kobalamiinipitoisuus oli puolestaan hyvin korkea kasvun koko stationaarivaiheen ajan (Liite 1.), mutta tästä huolimatta mikrolevän kuivapaino lähti laskuun jo näytteenottohetken T1 jälkeen.

Täytyy kuitenkin muistaa, että silloin kun *E. gracilis* -mikrolevällä on saatavillaan kobalamiinia ja tiamiinia yli sen kasvuun tarvittava määrä, se myös varastoi niitä itseensä tehokkaasti (Sekhara Varma ym. 1961, Shigeru ym. 1987). Ravinnerajoitteisissa olosuhteissa, mikrolevät turvautuvat usein aikaisemmin varastoimiinsa yhdisteisiin ja pystyvät hyödyntämään niitä kasvussaan silloin kun yhdisteitä ei ole saatavilla lisää kasvualustasta (Lemesle ym. 2008). Myös tässä pro gradu -tutkielmassa H- kasvatusalustan mikroleväsiirroksen *E. gracilis* -solut varastoivat kobalamiinia esikasvatusvaiheessa runsaasti (Liite 1.). Mikrolevän sisältämän tiamiinin määrästä emme tiedä, mutta todennäköisesti mikrolevä on

varastoinut myös sitä soluunsa runsaasti esikasvatusvaiheessa. Vaikka bakteerit eivät olisi syntetisoineet lisää kobalamiinia ja tiamiinia H-kasvatusalustalla kasvatuksen aikana, mikrolevän varastoimien vitamiinien määrät ovat voineet olla niin suuria, että mikroleväsolut ovat voineet jakautua ja kasvaa pelkästään niiden turvin. On siis mahdollista, että H-kasvatusalustan mikroleväviljelmässä bakteerit eivät todellisuudessa ole syntetisoineet mikrolevälle lainkaan kobalamiinia ja tiamiinia. Toisaalta kyse voi olla myös synergiaista, jossa mikrolevä on hyödyntänyt sekä varastoimaansa että bakteerien syntetisoimaa uutta kobalamiinia ja tiamiinia kasvuunsa (Kuo ym. 2013).

On kuitenkin hyvä huomioida myös se, että pelkästään kobalamiinin puuttuminen ja mikroleväsolujen erittämien yhdisteiden läsnäolo kasvatusalustassa voi käynnistää kobalamiinin synteessin bakteereissa. Esimerkiksi *Halomonas* sp. -bakteeri tehostaa kasvuaan ja kobalamiinin synteesiä pelkästään kaupallista leväuutetta sisältävällä mikrolevättömällä ja kobalamiinia sisältämättömällä kasvatusalustalla (Croft ym. 2005). Tämän perusteella voi olla myös mahdollista että *E. gracilis* kulutti soluun varastoidun kobalamiinin loppuun jo kasvatuksen aikaisemmissa vaiheissa, ja kasvun stationaarivaiheessa mikrolevästä analysoitu kobalamiini oli jo kasvatusalustan bakteerien syntetisoimaa kobalamiinia.

Tässä pro gradu -tutkielmassa *E. gracilis* -mikrolevän biomassan tuotto oli jopa hieman tehokkaampaa kasvatusalustalla, jossa mikrolevän vitamiinien saanti oli bakteerien vitamiinisynteesin varassa. Lisättyjä vitamiineja sisältävällä kasvatusalustalla bakteerien ja mikrolevän välinen kilpailu ravinteista hankaloitti mikrolevän kasvua, kun taas lisättyjä vitamiineja sisältämättömällä kasvatusalustalla mikrolevä ja bakteeri edesauttoivat toistensa kasvua. Mikrolevän kasvun ero eri kasvatusalustoilla ei kuitenkaan ollut mikrolevän korkeimmassa kuivapainossa, vaan mikrolevän kasvun kestossa. Kasvatusalustaan lisättyjen vitamiinien korvaaminen niitä syntetisoivilla bakteereilla vaikuttaa pidentävän mikrolevän kasvusaikaa ja hidastavan sen ravinteiden kulutusta lisäämättä kuitenkaan mikrolevän kuivapainon tuottoa merkittävästi. Mikrolevien bioteknologisen tuotannon kannalta olisikin syytä pohtia tuleeko edullisemmaksi

korvata mikrolevän kasvatusalustan vitamiinit niitä syntetisoivilla bakteereilla, ja siten pidentää myös mikrolevän harvestointisykliä, vai kasvattaa mikrolevää lisättyjä vitamiineja sisältävällä kasvatusalustalla, jolloin mikrolevän kasvatusaika lyhenee. Lisätutkimukset ovat tarpeen, sillä lisättyjä vitamiineja sisältämättömällä kasvatusalustalla *E. gracilis* -mikrolevän biomassan tuottoa voi olla mahdollista tehostaa myös erilaisilla ravinnemääräyhdistelmillä. Toisaalta myös lisättyä vitamiineja sisältävällä kasvatusalustalla mikrolevän typen ja vitamiinien suhteen optimointi saattaisi johtaa korkeampaan mikrolevän biomassan tuottoon.

Mikrolevään varastoituva kobalamiinin määrä on myös selkeästi korkeampi silloin kun kobalamiinia lisätään runsaasti mikrolevän kasvatusalustaan (Kuo ym. 2013). Lisättyjä vitamiineja sisältämättömällä kasvatusalustalla bakteerien tuottama kobalamiinin määrä on niin mikrolevän tarpeeseen sovitettua, että mikrolevään ei juuri varastoidu ylimääräistä, sen kasvussa käyttämätöntä kobalamiinia (Kuo ym. 2013). Vaikuttaa siltä, että *E. gracilis* -mikrolevästä ei ole otettavissa talteen suuria määriä kobalamiinia silloin kun mikrolevän kobalamiinin saanti on bakteerien varassa. Kasvatusalustaan lisättyjen vitamiinien korvaaminen bakteereilla voi kuitenkin vaikuttaa positiivisesti *E. gracilis* -mikrolevän muiden arvokkaiden biomolekyylien synteesiin (Kuo ym. 2013). Muun muassa *Euglena*-mikroleviin kuuluva kobalamiinin suhteen auksotorofinen *Eutreptiella* sp. syntetisoi rasvahappoja tehokkaammin silloin kun sitä kasvatetaan kobalamiinia syntetisoivien bakteerien kanssa (Kuo ym. 2013). Jatkossa tulisikin tutkia, kuinka *E. gracilis* -mikroleväviljelmässä elävä kobalamiinia ja tiamiinia syntetisoiva bakteeriyhteisö vaikuttaa mikrolevän syntetisoimiin yhdisteisiin. Näin myös olisi helpompi tehdä laskemia siitä, onko taloudellisempaa turvata mikrolevän vitamiinien saanti vitamiineja syntetisoivilla bakteereilla vai kaupallisilla vitamiineilla.

4.2. Kasvatusalustaan lisätyn kobalamiinin ja tiamiinin vaikutus *E. gracilis* -mikroleväviljelmän bakteerien määrään

Kasvatettaessa kobalamiinin ja tiamiinin suhteen auksotrofista mikrolevää lisättyjä vitamiineja sisältämättömällä kasvatusalustalla kobalamiinia ja tiamiinia syntetisoivien bakteerien määrä kasvaa enemmän kuin lisättyjä vitamiineja sisältävällä kasvatusalustalla kasvatetussa mikroleväviljelmässä (Wagner-Döbler ym. 2010, Kazamia ym. 2012, Cruz-López ym. 2016). Myös tässä pro gradu -tutkielmassa kobalamiinia ja tiamiinia sisältämättömällä H-kasvatusalustalla kasvatetussa *E. gracilis* -mikroleväviljelmässä oli hypoteesin 2 mukaisesti määrällisesti enemmän mikrolevään kiinnittyneitä bakteereja kuin lisättyjä vitamiineja sisältävällä HB12-kasvatusalustalla kasvatetussa mikroleväviljelmässä. Eri kasvatusalustoilla kasvatettujen mikroleväviljelmien vapaiden bakteerien määrissä ei kuitenkaan ollut eroa.

Kasvatusalustaan lisätyllä kobalamiinilla ja tiamiinilla, sekä mikrolevän kuivapainolla että mikroleväbiomassan ja kasvatusalustan kobalamiinipitoisuudella oli selkeä vaikutus mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrään. Mikroleviin kiinnittyneiden bakteerien määrä korreloi negatiivisesti mikrolevän kuivapainon kanssa. Mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrä pysyy tasaisena molemmilla kasvatusalustoilla koko stationaarisen kasvun vaiheen, mutta mikrolevän kuivapaino nousee H-kasvatusalustalla ja laskee HB12-kasvatusalustalla. Vapaiden bakteerien määrä korreloi puolestaan positiivisesti mikrolevän kuivapainon kanssa. H-kasvatusalustalla mikrolevän kuivapaino ja vapaiden bakteerien määrä nousee vielä näytteenottohetken T1 jälkeen, kun HB12-kasvatusalustalla molempien määrä lähtee laskuun.

Kobalamiinin suhteen auksotrofisille mikroleville kobalamiinia syntetisoivat bakteerit elävät mikroleväviljelmässä joko vapaina tai mikrolevään kiinnittyneinä soluina (Sapp ym. 2007, Kuo ym. 2013, Cruz-López ym. 2016). Muutamissa

tutkimuksissa kobalamiinia ja/tai tiamiinia lainkaan tai niitä hyvin vähän sisältävillä kasvatusalustoilla kasvatetuissa mikroleväviljelmissä ovat yleistyneet enemmän vapaat kuin mikrolevään kiinnittyneet bakteerit (Sapp ym. 2007, Cruz-López ym. 2016). Esimerkiksi *T. rotula* -piilevälle ja *L. polyedrum* -panssarilevälle vitamiineja syntetisoivat bakteerit vaikuttavat elävän mikroleväviljelmissä ennemmin vapaina kuin mikrolevään kiinnittyneinä soluina (Sapp ym. 2007, Cruz-López ym. 2016). Mikrolevän välittömässä läheisyydessä elävän bakteeriyhteisön lajikoostumus vaikuttaa kuitenkin olevan paljon mikrolevälajista riippuvainen, sillä muun muassa *Euglena*-mikroleviin kuuluvalla *Eutreptiella* sp. -mikrolevälle kobalamiinia syntetisoivat puolestaan sen solun ulkopintaan kiinnittyneet bakteerit (Grossart ym. 2007, Sapp ym. 2007, Kuo ym. 2013).

Mikrolevä ja bakteerit saattavat myös saavuttaa kasvunsa stationaarivaiheen eri aikaan kasvatuksen kuluessa (Grossart ym. 2007, Sapp ym. 2007, Kazamia ym. 2012, Cruz-López ym. 2016). Tämä ilmiö on riippuvainen sekä mikrolevälajista että kasvatusalustan koostumuksesta ja kasvatusolosuhteista (Grossart ym. 2007, Sapp ym. 2007, Kazamia ym. 2012, Cruz-López ym. 2016). Mikrolevään kiinnittyneet ja vapaat bakteerit saavuttavat stationaarisen kasvun vaiheen kuitenkin yleensä samaan aikaan, mutta bakteerien kasvu saattaa kulkea mikrolevän kasvuun nähden eri tahtia (Grossart ym. 2007, Sapp ym. 2007, Kazamia ym. 2012, Cruz-López ym. 2016). Tässä pro gradu -tutkielmassa ei seurattu bakteerien määrää kuin vasta mikrolevän kasvun stationaarivaiheessa, joten emme tiedä ovatko bakteerit ja mikrolevä saavuttaneet stationaarisen kasvun vaiheen eri aikaan.

Kakkien tarvittavien ravinteiden läsnäolo kasvatusalustassa saattaa symbioosien muodostumisen sijaan kannustaa mikrolevä- ja bakteerisolujen väliseen kilpailuun (Danger ym. 2007, Grossart ym. 2007, Sapp ym. 2007, Grant ym. 2014). HB12-kasvatusalustalla kasvatetun mikrolevän kasvun stationaarivaiheessa tapahtuva kuivapainon lasku ja mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien pitoisuuden pysyminen lähes vakiona, voi viitata siihen, että mikrolevään kiinnittyneet bakteerit ovat kilpailleet mikrolevää tehokkaammin ravinteista. Typen ja fosforin määrä ei kuitenkaan selittänyt mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrällisiä eroja,

joten voi olla, että kilpailua mikrolevän ja bakteerien välillä on ollut muista ravinteista, kuten esimerkiksi orgaanisesta hiilestä ja kobalamiinista. Toisaalta bakteerit ovat voineet olla niin tehokkaita kilpailijoita, että pienentyvä typen ja fosforin määrä ei ole rajoittanut niiden kasvua yhtä paljon kuin mikrolevän kasvua.

Bakteerit pystyvät yleensä hyödyntämään paremmin orgaanisen aineksen erilaisia typen muotoja kuin mikrolevät (Løvdal ym. 2007). Mikrolevät tuntuvat kasvavan paremmin epäorgaanisilla typen muodoilla kuten esimerkiksi tässäkin pro gradu -tutkielmassa mikrolevän typenlähteenä käytetyllä ammoniumtypellä (NH_4^+) (Løvdal ym. 2007). Koska tässä pro gradu -tutkielmassa analysoitiin ainoastaan kasvatusalustan kokonaistyyppi, emme tiedä millaisia typen eri muotoja kasvatusalusta todellisuudessa sisälsi mikrolevän kasvun stationaarivaiheessa. Kasvatuksen aikana kasvatusalustaan on päätynyt myös erilaisia orgaanisen typen muotoja solujen hajoamisen yhteydessä. Jos niiden määrä on ollut mikrolevän kasvun stationaarivaiheessa korkeampi kuin mikrolevän mieluummin käyttämän ammoniumtypen määrä, bakteerit ovat todennäköisesti pystyneet kilpailemaan tuestä mikrolevää paremmin.

Mikrolevien ja bakteerien välistä kanssakäymistä tutkittaessa tulisikin huomioida entistä vahvemmin kaikki fysikaaliskemialliset tekijät, sillä mikrolevälajin lisäksi erilaiset kasvuolosuhteet voivat vaikuttaa muun muassa siihen, esiintyykö bakteeri mikroleväviljelmässä mikrolevään kiinnittyneenä vai vapaana bakteerina (Grossart 2010). Pelkkä ravinteiden ja ympäristöolosuhteiden tarkastelu ei riitä, sillä mikrolevä ja bakteeri eivät eritä toisilleen ainoastaan vitamiineja tai ravinteita, vaan myös muita erilaisia kasvua edistäviä estäviä yhdisteitä, kuten esimerkiksi kasvuhormoneita (De-Bashan ym. 2005, Hare ym. 2005). Mikrolevän ja bakteerin kanssakäymisen luonne voi myös muuttua kasvatuksen kuluessa, kun kasvatusalustan ravinteet ja valo vähenevät solujen lisääntymisen seurauksena (Gurung ym. 1999). Bakteerit voivat ottaa loismaisemman selviytymisstrategian käyttöönsä ja alkaa hajottamaan mikroleväsoluja. Kyseessä on niin kutsuttu ”Jekyll & Hyde” -ilmiö, missä mikrolevän rinnalla elävä bakteeri ensin edesauttaa mikrolevän kasvua saadakseen siltä tarvitsemiaan yhdisteitä, mutta kun tavoiteltuja

yhdisteitä on tarpeeksi bakteeri muuttaa selviytymisstrategiaansa loismaisemmaksi ja alkaa tuhota mikroleväsoluja (Wang ym. 2006).

Mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrä on muutenkin riippuvainen mikrolevän kasvuvaiheesta. Ravinnerajoitteisissa olosuhteissa vanhojen ja kuolevien mikrolevien pinnalla on enemmän bakteereja kuin ravinteiltaan runsaissa olosuhteissa (Mayali ym. 2011). Ravinteiden loputtua mikroleväviljelmästä bakteerit tarttuvat mikrolevään saadakseen siitä irti enemmän ravinteita (Mayali ym. 2011). Tämän lisäksi bakteerit voivat muodostaa myös lepomuotoisia itiöitä (Kolter ym. 1993). Itiöt eivät kuluta ravinteita, eivätkä kuole, mutta koska ne sisältävät yhtä DNA:ta ne näkyvät qPCR-menetelmällä määritetyissä bakteerimäärissä (Kolter ym. 1993, Head ym. 1998). Myös tässä pro gradu -tutkielmassa HB12-kasvatusalustalla mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien tasaisena pysyvää määrää mikrolevän kuivapainon ja vapaiden bakteerien määrän vähetessä voivat selittää lisääntyvä mikroleväviljelmän vapaiden bakteerien kiinnittyminen mikrolevän ulkopintaan tai mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien itiöiden muodostus.

Euglena-mikrolevillä on havaittu olevan paljon myös solun sisäisiä bakteereja (Leedale 1969, Shin ym. 2003, Kuo ym. 2013). Joissakin tapauksissa bakteerit ovat osoittautuneet patogeenisiksi, mutta osassa tapauksista niiden merkitystä mikrolevälle ei ole saatu selville (Leedale 1969, Shin ym. 2003, Kuo ym. 2013). Tämän vuoksi tässä pro gradu -tutkielmassa mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien korkeampi määrä vapaiden bakteerien määrään verrattuna molemmissa mikroleväviljelmissä voisi osittain selittyä *Euglena* -mikroleville tyypillisillä mikrolevän solun sisäisillä bakteereilla. Sekä mikrolevään kiinnittyneet bakteerit, että mikrolevä suodatettiin samalle suodattimelle. Bakteerien DNA:n eristysvaiheessa todennäköisesti myös suodattimella olleet mikroleväsolut tuhoutuivat, jolloin myös mahdollisten mikrolevän sisällä olleiden bakteerien DNA eristyi näytteeseen. Joka tapauksessa mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien korkeampi määrä verrattuna vapaiden bakteerien määrään myös HB12-kasvatusalustan mikroleväviljelmässä viittaisi siihen, että kasvuolosuhteista

riippumatta *E. gracilis* -mikroleväviljelmässä elää enemmän bakteereja mikroleväsolun pinnalla ja/tai sisällä kuin vapaana solujen ympärillä. Tähän taustaan peilaten tässä pro gradu -tutkielmassa mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien korkeampi määrä vapaiden bakteerien määrään verrattuna voi selittää myös näytteenottomenetelmän haasteet. Mikroleväkasvuston tiheys tukki 5 µm suodattimen hyvin tehokkaasti, joten voi olla mahdollista, että osa vapaista bakteereista ei päässyt suodattimesta läpi ja mikrolevään kiinnittyneissä bakteereissa ovat edustettuna sekä mikrolevään kiinnittyneitä, että vapaita bakteereja. Toisaalta molemmilla kasvatusalustoilla vapaiden bakteerien määrä korreloi todella hyvin mikrolevän kuivapainon kanssa, mikä antaa olettaa, että suodatus toimi hyvin näytteenottomenetelmänä.

Täytyy kuitenkin huomioida, että myös kasvatusalustan vapaiden bakteerien määrä korreloi tässä pro gradu -tutkielmassa hyvin kasvatusalustan kobalamiinipitoisuuden ja mikrolevän kuivapainon kanssa. Vapaiden bakteerien määrä, mikrolevän kuivapaino sekä kasvatusalustan kobalamiinipitoisuus (Liite 1.) lisääntyivät H-kasvatusalustalla ja laskivat HB12-kasvatusalustalla näytteenottohetken T1 jälkeen. Vapaiden bakteerien määrässä ei kuitenkaan ollut kasvatusalustasta riippuvaista eroa, joten jos vapaat bakteerit syntetisoivat H-kasvatusalustan mikroleväviljelmässä kobalamiinia ja tiamiinia niiden määrä ei lisääntynyt mitenkään merkittävästi HB12-kasvatusalustan vapaisiin bakteereihin nähden. Toisaalta vapaiden bakteerien vahvempi korrelaatio mikrolevän kuivapainon kanssa viittaa siihen, että mikrolevä ja vapaat bakteerit ovat olleet vahvasti riippuvaisia toisistaan.

Joissakin tutkimuksissa lisättyjä vitamiineja sisältämättömällä kasvatusalustalla mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrä ei lisääntynyt tai vähene kasvatusolosuhteissa tapahtuvien muutosten seurauksena (Cruz-López ym. 2016). Vapaiden bakteerien määrä sen sijaan lisääntyy rinnan mikrolevän biomassan kanssa etenkin jos mikrolevällä on vitamiinien puutostila kasvatuksen alussa (Cruz-López ym. 2016). Tämän pohjalta vapaiden bakteerien on ajateltu olevan ensisijaisesti vastuussa mikrolevän vitamiinien saannista (Cruz-López ym. 2016).

Toisaalta joidenkin mikrolevälajien kohdalla on tultu siihen tulokseen, että juuri mikrolevään kiinnittyneet bakteerit syntetisoivat mikroleville vitamiineja (Leedale 1969, Shin ym. 2003, Kuo ym. 2013). Tässä pro gradu -tutkielmassa mikrolevä sisälsi runsaasti kobalamiinia ja todennäköisesti myös tiamiinia kasvatuksen alussa (Liite 1.). H-kasvatusalustalla kasvatettu mikrolevä ei siis välttämättä tarvinnut lisää vitamiineja, minkä vuoksi on mahdollista, että vitamiineja syntetisoivat bakteerit eivät ole runsastuneet niin paljon kuin ne olisivat siinä tapauksessa, jos mikrolevä olisi ollut vitamiinien suhteen puutostilassa kasvatuksen alussa. Tämä voisi selittää, miksi vapaat bakteerit eivät yleistyneet niin paljon tämän pro gradu -tutkielman H-kasvatusalustalla kuin muissa kokeissa.

On hyvä muistaa, että myös eri kasvatusalustojen mikroleväsiirroksissa oli eroja bakteerien lukumäärässä. H-kasvatusalustan mikroleväsiirros sisälsi enemmän sekä vapaita että mikrolevään kiinnittyneitä bakteereja kuin HB12-kasvatusalustan mikroleväsiirros. Aiempien tutkimusten perusteella kasvatusalustojen mikrolevä- ja bakteerisolujen suhdelukuluerolla ei kuitenkaan pitäisi olla vaikutusta solujen määriin kasvatuksen lopussa (Kazamia ym. 2012, Han ym. 2016), joten on todennäköisempää, että erot bakteerien määrissä H- ja HB12-kasvatusalustan välillä ovat todella seurausta HB12-kasvatusalustaan lisäystä tiamiinista ja kobalamiinista.

Tässä pro gradu -tutkielmassa mikrolevään kiinnittyneet bakteerit yleistyivät runsaammin lisättyä kobalamiinia ja tiamiinia sisältämättömällä kuin niitä sisältävällä kasvatusalustalla. Mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrä oli vapaiden bakteerien määrää korkeampi ja se myös korreloi paremmin mikrolevän kobalamiinipitoisuuden sekä kasvatusalustan ja sen kobalamiinipitoisuuden kanssa. Vapaiden bakteerien korkeimmat määrät olivat puolestaan lähes samat molemmilla kasvatusalustoilla, mutta niiden määrä noudatti paremmin mikrolevän kuivapainon kehitystä. Todennäköistä on, että vitamiineja syntetisoivia bakteereja oli molemmissa ryhmissä, kuten aikaisemmissakin tutkimuksissa (Cruz-López ym. 2016)., mutta bakteereja saattoi olla enemmän mikrolevään kiinnittyneissä kuin vapaissa bakteereissa.

4.3. Kasvatusalustan vaikutus *E. gracilis* -mikroleväviljelmän bakteeriyhteisöön

Kasvatusalustaan lisätyllä kobalamiinilla ja tiamiinilla oli selkeä vaikutus myös *E. gracilis* -mikroleväviljelmän vapaiden ja mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien yhteisökoostumukseen. Kobalamiinin ja tiamiinin synteesiin kykenevät bakteerisuvut yleistyivät runsaammin lisättyä kobalamiinia ja tiamiinia sisältämättömällä kuin sisältävällä kasvatusalustalla tämän tutkielman 3. hypoteesin mukaisesti.

Tässä pro gradu -tutkielmassa kasvatusalusta ja sen kobalamiinipitoisuus vaikuttivat enemmän mikrolevään kiinnittyneiden kuin vapaiden bakteerien yhteisöön. Mikroleviin kiinnittyneiden bakteerien määrän kannalta merkitystä oli myös mikrolevän kuivapainolla ja sen kobalamiinipitoisuudella sekä mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrällä ja kokonaistypen pitoisuudella. Parhaiten yhteisöeroja selittivät kasvatusalusta ja mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrä. Vapaiden bakteerien yhteisöön kasvatusalustan vaikutus ei ollut yhtä selkeä, vaan vapaiden bakteerien yhteisöeroja selitti enemmän näytteenottohetki. Kokonaistypen määrä selitti kuitenkin paremmin kuin mikään muu muuttuja eroja vapaiden bakteerien yhteisössä kasvatusalustojen välillä. HB12-kasvatusalustalla mikrolevän kasvun stationaarivaiheen alkuun mennessä lähes loppuun käytetty tyyppi on voinut rajoittaa joidenkin bakteerilajien kasvua enemmän kuin toisten. Muun muassa ammoniumtypen pitoisuuden muutoksen tiedetään vaikuttavan bakteeriyhteisön koostumukseen (Kirchman 1994). Myös muilla ravinteilla, joita tässä pro gradu -tutkielmassa ei analysoitu on voinut olla vaikutuksensa vapaiden bakteerien ja mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien yhteisöeroihin. Esimerkiksi erot tiamiinin ja orgaanisen hiilen kulutuksessa ovat voineet vaikuttaa bakteerien yhteisöeroihin kasvatusalustojen välillä.

Tässä pro gradu -tutkielmassa HB12-kasvatusalustan mikroleväviljelmässä oli edustettuna kaikki samat bakteerisuvut kuin H-kasvatusalustan mikroleväviljelmässä, mutta niiden koko oli merkitsevästi pienempi. Moni merissä elävä kobalamiinia ja tiamiinia syntetisoiva bakteeri kuuluu gammaproteobakteerien luokkaan (Sañudo-Wilhelmy ym. 2014). Kyseinen bakteeriluokka runsastui paljon myös tämän kokeen lisättyä kobalamiinia ja tiamiinia sisältämättömällä H-kasvatusalustalla kasvatetun mikroleväviljelmän vapaissa ja mikrolevään kiinnittyneissä bakteereissa. H-kasvatusalustan mikroleväviljelmän runsaslukuisimpiin bakteerisukuihin kuuluivat etenkin *Halomonadaceae* sp., *Halomonas*, *Gammaproteobacteria* sp., *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas*, *Pseudomonaceae* sp. ja *Alteromonadales* sp. *Halomonadaceae* sp. bakteerien määrä oli tosin lähes yhtä korkea sekä H- että HB12-kasvatusalustan mikroleväsiirroksissa kuin näytteenottohetkinä T1-T3. Verrattuna H-kasvatusalustan mikroleväsiirroksen ja HB12-kasvatusalustan mikroleväviljelmän mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien sukuihin, H-kasvatusalustan mikrolevään kiinnittyneissä bakteereissa runsastuivat eniten *Gammaproteobacteria* sp., *Alteromonadales* sp. ja *Halomonas*. H-kasvatusalustan vapaissa bakteereissa runsastuivat eniten *Gammaproteobacteria* sp., *Alteromonadales* sp., *Halomonas*, *Acinetobacter* sp. ja *Pseudomonaceae* sp.

Myös alphaproteobakteerien luokkaan kuuluvat *Rhodobactereacea* sp. -suvun bakteerit syntetisoivat kobalamiinia ja tiamiinia (Cruz-López ym. 2016). H-kasvatusalustan vapaissa bakteereissa *Rhodobactereacea* sp. -suku oli suurempi kuin HB12-kasvatusalustan vapaissa bakteereissa tai H-kasvatusalustan mikroleväsiirroksen vapaissa bakteereissa. Tämä tukee muiden tutkimusten tuloksia. Rhodobactereacea -yläluokan bakteerit yleistyneet paljon muissa lisättyjä vitamiineja sisältämättömillä kasvatusalustoissa kasvatetuissa mikroleväviljelmissä (Kuo ym. 2013, Cruz-López ym. 2016).

H-kasvatusalustan mikroleväviljelmässä runsastuneista bakteerisuvuista *Acinetobacter* sp. ja *Alteromonadales* sp. syntetisoivat molemmat sekä tiamiinia että kobalamiinia (Gómez-Consarnau ym. 2014, Sañudo-Wilhelmy ym. 2014). H-

kasvatusalustalla kasvatetussa mikroleväviljelmässä ovat voineet yleistyä myös monet muuta gammaproteobakteerien luokkaan kuuluvat kobalamiinia ja/tai tiamiinia syntetisoivat bakteerit, sillä H-kasvatusalustan mikroleväviljelmässä eniten runsastunut *Gammaproteobacteria* sp. sisältää kaikki gammaproteobakteerien luokkaan kuuluvat bakteerit, joita ei voitu tunnistaa kuin luokalleen (Gómez-Consarnau ym. 2014, Sañudo-Wilhelmy ym. 2014). Myös *Pseudomonaceae* sp. voi sisältää useita molempien vitamiinein synteisiin kykeneviä bakteereja, sillä se sisältää kaikki pseudomonaceae-yläluokkaan kuuluvat bakteerit, jotka voitiin tunnistaa vain yläluokalleen. Pseudomonaceae-yläluokkaan kuuluu muun muassa H-kasvatusalustan mikroleväviljelmässä yleistyneen tiamiinin synteisiin kykenevien *Pseudomonas*-suvun bakteerien lisäksi myös esimerkiksi *Acinetobacter*-suvun bakteerit, jotka syntetisoivat luonnonvesissä sekä kobaamiinia että tiamiinia. (Gómez-Consarnau ym. 2014, Sañudo-Wilhelmy ym. 2014)

Kaikkia yllämainittuja bakteerisukuja on löydetty paljon myös luonnonvesistä eristettyjen mikrolevien yhteydestä (Sapp ym. 2007, Kuo ym. 2013, Guo ym. 2014, Cruz-López ym. 2016). Kyseisiä bakteereja on löydetty mikroleväviljelmistä sekä mikrolevään kiinnittyneinä, että vapaina soluina. Muun muassa *Roseabacter* sp. RED-1 -bakteeria on löydetty vapaana *Akashiwo sanguinea* -panssarileväviljelmästä, mutta *Pseudo-nitzschia pungens* -piileväviljelmässä se on pääosin ollut kiinnittyneenä mikrolevän ulkopintaan (Sapp ym. 2007). Saman suvun bakteerit saattavat olla edustettuina mikroleväviljelmässä sekä vapaissa että mikrolevään kiinnittyneissä bakteereissa, mutta yleensä niiden määrä on kuitenkin korkeampi jommassakummassa (Cruz-López ym. 2016). Myös tässä pro gradu -tutkielmassa kaikki yllämainitut runsaasti H-kasvatusalustan mikroleväviljelmässä yleistyneet bakteerisuvut yleistyivät sekä vapaissa että mikrolevään kiinnittyneissä bakteereissa, mutta bakteerisukujen määrällinen kasvu oli kuitenkin suurempaa mikrolevään kiinnittyneissä kuin vapaissa bakteereissa. Ainoa poikkeus oli *Rhodobactereacea* sp. -bakteerit, jotka yleistyivät selkeästi enemmän H-kasvatusalustan mikroleväviljelmän vapaissa kuin mikrolevään kiinnittyneissä bakteereissa.

Tässä pro gradu -tutkielmassa H-kasvatusalustan mikroleväviljelmässä oli näytteenottohetkinä T1-T3 vähemmän bakteerisukuja edustettuna kuin HB12-kasvatusalustan vastaavana näytteenottohetkenä otetuissa näytteissä, vaikka molempien kasvatusalustojen mikroleväsiirroksissa sukuja oli lähes yhtä paljon. Mikrolevään kiinnittyneiden ja vapaiden bakteerien Shannon-Wiener -diversiteettiindeksissä ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevää eroa kasvatusalustojen mikroleväviljelmien välillä näytteenottohetkinä T1-T3. Mikrolevään kiinnittyneiden ja vapaiden bakteerien monimuotoisuuteen vaikutti kuitenkin mikroleväbiomassan kuivapaino ja bakteerien määrä. Molemmat niistä korreloivat mikrolevään kiinnittyneiden ja vapaiden bakteerien monimuotoisuuden kanssa negatiivisesti. H-kasvatusalustalla, missä mikrolevän kuivapaino nousee ja mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien määrä pysyy tasaisena mikrolevän kasvun stationaarivaiheessa, mikrolevään kiinnittyneiden ja vapaiden bakteerien monimuotoisuus pienenee. Myös muissa tutkimuksissa, joissa bakteerit ovat edesauttaneet mikrolevän kasvua, bakteeriyhteisö on ollut monimuotoisin kasvatuksen alussa (Gorden ym. 1969). Osasyynä tälle on pidetty muutosta kasvatusolosuhteissa. Kun kaikki tarvittavat ravinteet sisältävältä kasvatusalustalta siirrostetaan mikrolevä ja sen rinnalla elävät bakteerit kasvatusalustalle, jossa on tarjolla vain osa ravinteista, osa bakteereista ei sopeudu uusiin oloihin ja häviää viljelmästä kasvatuksen aikana (Gorden ym. 1969).

Kun huomioidaan bakteeriyhteisöön vaikuttaneet muuttujat sekä kobalamiinia ja tiamiinia syntetisoivien bakteerisukujen runsaampi yleistymisen H-kasvatusalustalla kasvatetun mikroleväviljelmän mikrolevään kiinnittyneissä ja vapaissa bakteereissa, sekä tulokset bakteerien määriin ja mikrolevän kuivapainoon vaikuttavista tekijöistä, niin näyttää siltä, että lisättyä kobalamiinia ja tiamiinia sisältämättömällä kasvatusalustalla *E. gracilis* -mikrolevälle kobalamiinia ja tiamiinia syntetisoivat sekä mikrolevään kiinnittyneet että vapaat bakteerit. H-kasvatusalustan mikrolevään kiinnittyneissä bakteereissa yleistyi moni sellainen bakteerisuku, johon kuuluu monia kobalamiinia ja tiamiinia syntetisoivia bakteereja. Samat suvut yleistyivät kuitenkin myös vapaissa bakteereissa, mutta

niiden yleistyminen ei ollut niin tehokasta kuin mikrolevään kiinnittyneissä bakteereissa, lukuun ottamatta bakteerisukua *Rhodobactereacea* sp.

Tämän pro gradu -tutkielman perusteella voidaan todeta, että *E. gracilis* -mikrolevän kasvatusalustaan lisätyllä kobalamiinilla ja tiamiinilla on vaikutusta mikroleväviljelmässä yleistyviin bakteerisukuihin. Lisätyä kobalamiinia ja tiamiinia sisältämättömällä kasvatusalustalla kasvatetussa mikroleväiljelmässä yleistyivät paljon sellaiset bakteerisuvut, joihin kuuluu monia kobalamiinin ja tiamiinin synteesiin kykeneviä bakteerilajeja. Mikrolevään kiinnittyneiden bakteerien yhteisö reagoi herkemmin kasvatusalustaan ja mikrolevän kuivapainoon, mutta vapaiden bakteerien yhteisö reagoi herkemmin kasvatusalustan kobalamiinipitoisuuteen. Kun vielä lisäksi huomioimme, että kobalamiinia ja tiamiinia syntetisoivat bakteerisuvut yleistyivät sekä mikrolevään kiinnittyneissä, että vapaissa bakteereissa, emme voi sanoa varmaksi syntetisoivatko *E. gracilis* -mikrolevälle kobalamiinia ja tiamiinia vapaat vai mikrolevään kiinnittyneet bakteerit. Täytyy kuitenkin muistaa, että vain osa kobalamiinin ja tiamiinin synteesireitin omaavan bakteerisuvun bakteerilajeista saattaa olla kykeneviä kobalamiinin ja/tai tiamiinin synteesiin (Gómez-Consarnau ym. 2018). Tämän vuoksi pelkän suku tason tarkastelun perusteella emme voi sanoa, ovatko juuri todella kobalamiinia ja tiamiinia syntetisoivat bakteerilajit yleistyneet H-kasvatusalustan mikroleväviljelmässä. Jatkossa bakteereja pitäisi tarkastella myös laji tasolla.

5. Menetelmien soveltuvuus ja tutkimuksen virhelähteet

Eristettäessä bakteereja mikroleväviljelmistä yleinen menetelmä on tässäkin kokeessa käytettyä suodatus, jossa mikrolevä ja siihen kiinnittyneet bakteerit suodatetaan huokoskooltaan suuremmalle suodattimelle ja vapaana viljelmässä elävät bakteerit huokoskooltaan pienemällä suodattimelle (Sapp ym. 2007, Yang ym. 2015, Cruz-López ym. 2016). Tässä kokeessa haasteita aiheutti kuitenkin mikroleväviljelmän tiheys, minkä vuoksi näytteiden suodattaminen kesti hyvin

kauan, ja altisti näytteet pidemmäksi aikaa suodatusympäristöstä peräisin oleville kontaminaatioille. Sama haaste tuli eteen DNA:ta eristettäessä. Kontaminaatioista aiheutuvat virhelähteet pyrittiin minimoimaan tekemällä nollasuodatuksia, jotka toimivat myös DNA-eristyksen nollanäyteinä.

Nollanäytteiden kontaminaatiot aiheuttivat haittaa etenkin sekvensoinnissa. Kontaminaatiot pyrittiin huomioimaan vähentämällä ne varsinaisesta aineistosta, mutta tämä tuo aina lisää virhelähteitä (Salter ym. 2014). Ongelmia tuotti myös sekvensointiaineiston runsaat pääjaksolleen luokittelemattomat OTUt. Kyseisten OTUjen määrä oli hyvin suuri kaikissa näytteissä. Toisaalta, tämä on hyvin yleistä planktoniyhteisön bakteerisekvensseissä (Yang ym. 2015, Yu ym. 2015). Luokittelemattomien OTUjen vuoksi osa kobalamiinin synteesin kannalta tärkeistä bakteereista saattoi kuitenkin jäädä tässä tutkimuksessa huomaamatta ja tunnistamatta.

Mikrolevän kasvunseuranta qPCR-menetelmällä tai solulaskennalla olisi todennäköisesti kertonut paremmin mikrolevä- ja bakteerisolujen lukumäärällisestä suhteesta. Tässä kokeessa käytetyn biomassan kuivapainon pohjalta ei voida sanoa, kuinka paljon viljelmät sisälsivät mikroleväsoluja. Ja täytyy myös muistaa, että kuivapaino sisälsi myös viljelmän bakteerien painon, vaikkakin niiden osuus painosta on hyvin pieni.

6. Johtopäätökset

Tämän kokeen tulosten perusteella voidaan sanoa, että kasvatusalustaan lisätyllä kobalamiinilla ja tiamiinilla on vaikutusta sekä *E. gracilis* -mikrolevän biomassan kuivapainoon, että mikroleväviljelmän bakteerien lukumäärään ja bakteryhteisön koostumukseen. Lisättyä kobalamiinia ja tiamiinia sisältämättömällä kasvatusalustalla mikrolevän kuivapaino ja bakteerein määrä oli korkeampi ja kobalamiinin ja tiamiinin synteesiin kykenevät bakteerisuvut runsastuivat enemmän kuin lisättyä kobalamiinia ja tiamiinia sisältävällä kasvatusalustalla.

Tämän tutkimuksen pohjalta ei kuitenkaan voida sanoa syntetisoivatko bakteerit todella mikrolevälle kobalamiinia ja tiamiinia tai elivätkö ne mikroleväviljelmässä mikrolevään kiinnittyneinä vai vapaina bakteereina. Tämä siksi, että kobalamiinin määrä laski kobalamiinia ja tiamiinia sisältämättömällä kasvatusalustalla kasvatetussa mikrolevässä ja sen kasvatusalustassa kasvatuksen aikana, ja vaikka mikrolevään kiinnittyneet bakteerit yleistyivät enemmän lisättyä kobalamiinia ja tiamiinia sisältämättömällä kasvatusalustalla, kobalamiinin ja tiamiinin synteesiin kykeneviä bakteerisukuja löytyi kuitenkin sekä mikrolevään kiinnittyneistä, että vapaista bakteereista. Bakteerien lajillinen tarkastelu, sekä bakteerien tuottaman kobalamiinin ja tiamiinin leimaaminen merkkiaineilla voisivat olla jatkossa tarpeen, jotta saadaan selville, mitkä kobalamiinia ja tiamiinia syntetisoivat bakteerit todella yleistyvät lisättyä kobalamiinia ja tiamiinia sisältämättömällä kasvatusalustalla kasvatetussa *E. gracilis* -mikroleväviljelmässä sekä syntetisoivatko bakteerit vitamiineja ja käyttäkö mikrolevä kyseisiä vitamiineja kasvuunsa.

7. Kiitokset

Haluan kiittää tämän opinnäytetyön mahdollistamisesta ja erinomaisesta ohjauksesta Martin Romantschukia, Anne Ojalaa ja Marika Tossavaista. Avusta kokeen käytännön toteutuksessa ja kokeeseen liittyvissä analyyseissa kiitos kuuluu Marika Tossavaiselle, Tuukka Ryytänselle ja Kaisa Soikkelle. Sekvensointiaineiston sekä tilastotestien suorittamisessa suureksi avuksi olivat Lijuan Yan, Nan Hui sekä Paula Kajankari, kiitos siitä. Paulalle kiitos myös henkisestä tuesta, tsemppauksesta ja muusta avusta.

Lähdeluettelo

- Aalto, Sanni 2017: Folaatin, niasiinin, B2- ja B12-vitamiinin pitoisuus kaupallisissa mikrolevävalmisteissa ja laboratorio-olosuhteissa kasvatetuissa mikrolevissä (pro gradu -tutkielma, Helsingin yliopisto). <http://urn.fi/URN:NBN:fi:hulib-201704263967>
- Anderson B.B. 1964: Investigations into the Euglena method for the assay of the vitamin B12 in serum. *Journal of Clinical Pathology* 17: 14-26.
- Barsanti L., Bastianini A., Passarelli V., Tredici M.R. & Gualtieri P. 2000: Fatty acid content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. *Journal of Applied Phycology* 12: 515-520.
- Begley T.P., Downs D.M., Ealick S.E., McLafferty F.W., Van Loon A.P.G.M., Taylor S., Campobasso N., Chiu H.-J., Kinsland C. & Reddick J.J. 1999: Thiamin biosynthesis in prokaryotes. *Archives of microbiology* 171: 293-300.
- Bertrand E.M., Saito M.A., Rose J.M., Riesselman C.R., Lohan M.C., Noble A.E., Lee P.A. & DiTullio G.R. 2007: Vitamin B12 and iron colimitation of phytoplankton growth in the Ross Sea. *Limnology and Oceanography* 52: 1079-1093.
- Bruno S.F. & Staker R.D. 1978: Seasonal vitamin B12 and phytoplankton distribution near Napeague Bay, New York (Block Island Sound). *Limnology and Oceanography* 23: 1045-1051.
- Buetow D.E. 2001: Euglena. --- In: *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd,
- Camiener G.W. & Brown G.M. 1960: The biosynthesis of thiamine. 2. Fractionation of enzyme system and identification of thiazole monophosphate and thiamine monophosphate as intermediates. *Journal of Biological Chemistry* 235: 2411-2417.
- Carell E.F. & Seeger J.W. 1980: Ribonucleotide reductase activity in vitamin B12-deficient *Euglena gracilis*. *Biochemical Journal* 188: 573-576.

- Chen M., Tang H., Ma H., Holland T.C., Ng K.Y.S. & Salley S.O. 2011: Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource technology* 102: 1649-1655.
- Croft M.T., Warren M.J. & Smith A.G. 2006: Algae need their vitamins. *Eukaryotic cell* 5: 1175-1183.
- Croft M.T., Moulin M., Webb M.E. & Smith A.G. 2007: Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 20770-20775.
- Croft M.T., Lawrence A.D., Raux-Deery E., Warren M.J. & Smith A.G. 2005: Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* 438: 90.
- Cruz-López R. & Maske H. 2016: The Vitamin B1 and B12 Required by the Marine Dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* Can be Provided by its Associated Bacterial Community in Culture. *Frontiers in Microbiology* 7:
- Cruz-López R., Maske H., Yarimizu K. & Holland N.A. 2018: The B-Vitamin Mutualism Between the Dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* and the Bacterium *Dinoroseobacter shibae*. *Front. Mar. Sci* 5: 274.
- Danger M., Oumarou C., Benest D. & Lacroix G. 2007: Bacteria can control stoichiometry and nutrient limitation of phytoplankton. *Functional Ecology* 21: 202-210.
- De-Bashan L.E., Antoun H. & Bashan Y. 2005: Cultivation factors and population size control the uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Ecology* 54: 197-203.
- Droop M. 2007: Vitamins, phytoplankton and bacteria: symbiosis or scavenging? *Journal of plankton research* 29: 107-113.
- Droop M.R. 1958: Requirement for thiamine among some marine and supra-littoral protista. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 37: 323-329.

- Dubash P.J. & Rege D.V. 1967: Chlorophyll formation in *Euglena gracilis* var. *bacillaris*: Interference by analogues of purines, pyrimidines and amino acids. *Microbiology* 48: 283-292.
- Edgar R.C., Haas B.J., Clemente J.C., Quince C. & Knight R. 2011: UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27: 2194-2200.
- Frank R.A.W., Leeper F.J. & Luisi B.F. 2007: Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 892.
- Fujita T., Aoyagi H., Ogonna J.C. & Tanaka H. 2008: Effect of mixed organic substrate on α -tocopherol production by *Euglena gracilis* in photoheterotrophic culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79: 371-378.
- Gangolf M., Czerniecki J., Radermecker M., Detry O., Nisolle M., Jouan C., Martin D., Chantraine F., Lakaye B. & Wins P. 2010: Thiamine status in humans and content of phosphorylated thiamine derivatives in biopsies and cultured cells. *PLOS ONE* 5: e13616.
- Gleason F. & Hogenkamp H. 1970: Ribonucleotide reductase from *Euglena gracilis*, a deoxyadenosylcobalamin-dependent enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 245: 4894-4899.
- Gobler C.J., Norman C., Panzeca C., Taylor G.T. & Sañudo-Wilhelmy S.A. 2007: Effect of B-vitamins (B1, B12) and inorganic nutrients on algal bloom dynamics in a coastal ecosystem. *Aquatic Microbial Ecology* 49: 181-194.
- Gómez-Consarnau L., Sachdeva R., Gifford S.M., Cutter L.S., Fuhrman J.A., Sañudo-Wilhelmy S.A. & Moran M.A. Mosaic patterns of B-vitamin synthesis and utilization in a natural marine microbial community. *Environmental Microbiology* 0:
- Gómez-Consarnau L., Sachdeva R., Gifford S.M., Cutter L.S., Fuhrman J.A., Sañudo-Wilhelmy S.A. & Moran M.A. 2018: Mosaic patterns of B-vitamin synthesis and utilization in a natural marine microbial community. *Environmental Microbiology* 0:

- Gorden R.W., Beyers R.J., Odum E.P. & Eagon R.G. 1969: Studies of a simple laboratory microecosystem: bacterial activities in a heterotrophic succession. *Ecology* 50: 86-100.
- Grant M.A., Kazamia E., Cicuta P. & Smith A.G. 2014: Direct exchange of vitamin B12 is demonstrated by modelling the growth dynamics of algal–bacterial cocultures. *The ISME journal* 8: 1418.
- Grossart H.-P. & Simon M. 2007: Interactions of planktonic algae and bacteria: effects on algal growth and organic matter dynamics. *Aquatic Microbial Ecology* 47: 163-176.
- Grossart H.P. 2010: Ecological consequences of bacterioplankton lifestyles: changes in concepts are needed. *Environmental Microbiology Reports* 2: 706-714.
- Guo Z. & Tong Y.W. 2014: The interactions between *Chlorella vulgaris* and algal symbiotic bacteria under photoautotrophic and photoheterotrophic conditions. *Journal of Applied Phycology* 26: 1483-1492.
- Gurung T.B., Urabe J. & Nakanishi M. 1999: Regulation of the relationship between phytoplankton *Scenedesmus acutus* and heterotrophic bacteria by the balance of light and nutrients. *Aquatic Microbial Ecology* 17: 27-35.
- Hamilton F.D. 1974: Ribonucleotide Reductase from *Euglena gracilis* A 5'-DEOXYADENOSYLCOBALAMIN-DEPENDENT ENZYME. *Journal of Biological Chemistry* 249: 4428-4434.
- Han J., Zhang L., Wang S., Yang G., Zhao L. & Pan K. 2016: Co-culturing bacteria and microalgae in organic carbon containing medium. *Journal of Biological Research-Thessaloniki* 23: 8.
- Hare C.E., Demir E., Coyne K.J., Cary S.C., Kirchman D.L. & Hutchins D.A. 2005: A bacterium that inhibits the growth of *Pfiesteria piscicida* and other dinoflagellates. *Harmful Algae* 4: 221-234.
- Head I.M., Saunders J.R. & Pickup R.W. 1998: Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology* 35: 1-21.

- Helliwell K.E., Lawrence A.D., Holzer A., Kudahl U.J., Sasso S., Kräutler B., Scanlan D.J., Warren M.J. & Smith A.G. 2016: Cyanobacteria and eukaryotic algae use different chemical variants of vitamin B 12. *Current Biology* 26: 999-1008.
- Hutner S., Bach M.K. & Ross G. 1956: A Sugar - Containing Basal Medium for Vitamin B12 - Assay with Euglena; Application to Body Fluids. *The Journal of Protozoology* 3: 101-112.
- Isegawa Y., Nakano Y. & Kitaoka S. 1984: Conversion and distribution of cobalamin in *Euglena gracilis* Z, with special reference to its location and probable function within chloroplasts. *Plant physiology* 76: 814-818.
- Ishii N. & Uchida S. 2006: Removal of Technetium from Solution by Algal Flagellate *Euglena gracilis*. *Journal of Environmental Quality* 35: 2017-2020.
- Jurgenson C.T., Begley T.P. & Ealick S.E. 2009: The structural and biochemical foundations of thiamin biosynthesis. *Annual review of biochemistry* 78: 569-603.
- Karl D.M. 2002: Nutrient dynamics in the deep blue sea. *TRENDS in Microbiology* 10: 410-418.
- Kazamia E., Czesnick H., Nguyen T.T.V., Croft M.T., Sherwood E., Sasso S., Hodson S.J., Warren M.J. & Smith A.G. 2012: Mutualistic interactions between vitamin B12 - dependent algae and heterotrophic bacteria exhibit regulation. *Environmental Microbiology* 14: 1466-1476.
- Kirchman D.L. 1994: The uptake of inorganic nutrients by heterotrophic bacteria. *Microbial Ecology* 28: 255-271.
- Koch F., Hattenrath-Lehmann T.K., Goleski J.A., Sañudo-Wilhelmy S., Fisher N.S. & Gobler C.J. 2012: Vitamin B and B 12 uptake and cycling by plankton communities in coastal ecosystems.
- Kolter R., Siegele D.A. & Tormo A. 1993: The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annual reviews in Microbiology* 47: 855-874.

- Kumudha A. & Sarada R. 2016: Characterization of vitamin B12 in *Dunaliella salina*. *Journal of food science and technology* 53: 888-894.
- Kuo R.C. & Lin S. 2013: Ectobiotic and endobiotic bacteria associated with *Eutreptiella* sp. isolated from Long Island Sound. *Protist* 164: 60-74.
- Leander B.S. & Farmer M.A. 2000: Epibiotic bacteria and a novel pattern of strip reduction on the pellicle of *Euglena helicoideus* (bernard) lemmermann. *European Journal of Protistology* 36: 405-413.
- Ledesma-Amaro R., Santos M.A., Jimenez A. & Revuelta J.L. 2013: Microbial production of vitamins. --- In: *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals*, 571-594. Elsevier,
- Leedale G.F. 1969: Observations on endonuclear bacteria in euglenoid flagellates. *Österreichische botanische Zeitschrift* 116: 279-294.
- Lemesle V. & Mailleret L. 2008: A Mechanistic Investigation of the Algae Growth “Droop” Model. *Acta Biotheoretica* 56: 87.
- Løvvdal T., Eichner C., Grossart H.P., Carbonnel V., Chou L. & Thingstad T.F. 2007: Competition for inorganic and organic forms of nitrogen and phosphorous between phytoplankton and bacteria during an *Emiliana huxleyi* spring bloom (PeECE II). *Biogeosciences Discussions* 4: 3343-3375.
- Maruyama I., Ando Y., Maeda T. & Hirayama K. 1989: Uptake of Vitamin B₁₂ by Various Strains of Unicellular Algae *Chlorella*. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI* 55: 1785-1790.
- Mayali X., Franks P.J.S. & Burton R.S. 2011: Temporal attachment dynamics by distinct bacterial taxa during a dinoflagellate bloom. *Aquatic Microbial Ecology* 63: 111-122.
- McRose D., Guo J., Monier A., Sudek S., Wilken S., Yan S., Mock T., Archibald J.M., Begley T.P. & Reyes-Prieto A. 2014: Alternatives to vitamin B 1 uptake revealed with discovery of riboswitches in multiple marine eukaryotic lineages. *The ISME journal* 8: 2517.
- Mitsuda H., Tanaka T., Takii Y. & Kawai F. 1971: Biosynthesis of thiamine in plants. *The Journal of vitaminology* 17: 89-95.

- Miyamoto E., Watanabe F., Takenaka H. & NAKANO Y. 2002: Uptake and physiological function of vitamin B12 in a photosynthetic unicellular coccolithophorid alga, *Pleurochrysis carterae*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 66: 195-198.
- Mokrosnop V.M., Polishchuk A.V. & Zolotareva E.K. 2016: Accumulation of α -tocopherol and β -carotene in *Euglena gracilis* Cells Under Autotrophic and Mixotrophic Culture Conditions. *Applied Biochemistry and Microbiology* 52: 216-221.
- Natarajan K.V. 1970: Distribution and significance of vitamin B12 and thiamine in the subarctic Pacific Ocean. *Limnology and Oceanography* 15: 655-659.
- Ohwada K. 1973: Seasonal cycles of vitamin B12, thiamine and biotin in Lake Sagami. Patterns of their distribution and ecological significance. *International Review of Hydrobiology* 58: 851-871.
- Okbamichael M. & Sañudo-Wilhelmy S.A. 2004: A new method for the determination of Vitamin B 12 in seawater. *Analytica chimica acta* 517: 33-38.
- Paerl R.W., Bertrand E.M., Allen A.E., Palenik B. & Azam F. 2015: Vitamin B12 ecophysiology of marine picoeukaryotic algae: strain - specific differences and a new role for bacteria in vitamin cycling. *Limnology and Oceanography* 60: 215-228.
- Panzeca C., Beck A.J., Tovar-Sanchez A., Segovia-Zavala J., Taylor G.T., Gobler C.J. & Sañudo-Wilhelmy S.A. 2009: Distributions of dissolved vitamin B 12 and Co in coastal and open-ocean environments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 85: 223-230.
- Park Y., Je K.-W., Lee K., Jung S.-E. & Choi T.-J. 2008: Growth promotion of *Chlorella ellipsoidea* by co-inoculation with *Brevundimonas* sp. isolated from the microalga. *Hydrobiologia* 598: 219-228.
- Pawlak R., James P.S., Raj S., Cullum-Dugan D. & Lucas D. 2013: Understanding vitamin B12. *American Journal of Lifestyle Medicine* 7: 60-65.

- Pinto E., Pedersén M., Snoeijs P., Van Nieuwerburgh L. & Colepicolo P. 2002: Simultaneous detection of thiamine and its phosphate esters from microalgae by HPLC. *Biochemical and biophysical research communications* 291: 344-348.
- Robbins W.J., Hervey A. & Stebbins M.E. 1953: Euglena and vitamin B12. *Annals of the New York Academy of Sciences* 56: 818-830.
- Rodríguez-Zavala J.S., Ortiz-Cruz M.A., Mendoza-Hernández G. & Moreno-Sánchez R. 2010: Increased synthesis of α -tocopherol, paramylon and tyrosine by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production. *Journal of Applied Microbiology* 109: 2160-2172.
- Roth J.R., Lawrence J.G., Rubenfield M., Kieffer-Higgins S. & Church G.M. 1993: Characterization of the cobalamin (vitamin B12) biosynthetic genes of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* 175: 3303-3316.
- Salter S.J., Cox M.J., Turek E.M., Calus S.T., Cookson W.O., Moffatt M.F., Turner P., Parkhill J., Loman N.J. & Walker A.W. 2014: Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biology* 12: 87.
- Sañudo-Wilhelmy S.A., Gómez-Consarnau L., Suffridge C. & Webb E.A. 2014: The Role of B Vitamins in Marine Biogeochemistry. *Annual Review of Marine Science* 6: 339-367.
- Sapp M., Schwaderer A.S., Wiltshire K.H., Hoppe H.-G., Gerdts G. & Wichels A. 2007: Species-specific bacterial communities in the phycosphere of microalgae? *Microbial Ecology* 53: 683-699.
- Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewski R.A., Oakley B.B., Parks D.H., Robinson C.J., Sahl J.W., Stres B., Thallinger G.G., Van Horn D.J. & Weber C.F. 2009: Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 7537-7541.
- Schwarzthans J.-P., Cholewa D., Grimm P., Beshay U., Risse J.-M., Friehs K. & Flaschel E. 2015: Dependency of the fatty acid composition of *Euglena gracilis* on growth phase and culture conditions. *Journal of Applied Phycology* 27: 1389-1399.

- Sekhara Varma T.N., Abraham A. & Hansen I.A. 1961: Accumulation of Co58-Vitamin B12 by *Euglena gracilis**. *The Journal of Protozoology* 8: 212-216.
- Shigeru S., Onishi T., Nakano Y. & Kitaoka S. 1987: Requirement for Vitamin B1 for Growth of *Euglena gracilis*. *Microbiology* 133: 25-30.
- Shimizu Y. 1996: MICROALGAL METABOLITES: A New Perspective. *Annual Review of Microbiology* 50: 431-465.
- Shin W., Boo S.M. & Fritz L. 2003: Endonuclear bacteria in *Euglena hemichromata* (Euglenophyceae): a proposed pathway to endonucleobiosis. *Phycologia* 42: 198-203.
- Taga M.E. & Walker G.C. 2008: Pseudo-B12 joins the cofactor family. *Journal of Bacteriology* 190: 1157-1159.
- Torrents E., Trevisiol C., Rotte C., Hellman U., Martin W. & Reichard P. 2006: *Euglena gracilis* Ribonucleotide Reductase the eukaryote class II enzyme and the possible antiquity of eukaryote B12 dependence. *Journal of Biological Chemistry* 281: 5604-5611.
- Tredici M.R. & Zittelli G.C. 1998: Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* 57: 187-197.
- Wagner-Döbler I., Ballhausen B., Berger M., Brinkhoff T., Buchholz I., Bunk B., Cypionka H., Daniel R., Drepper T. & Gerdt G. 2010: The complete genome sequence of the algal symbiont *Dinoroseobacter shibae*: a hitchhiker's guide to life in the sea. *The ISME journal* 4: 61.
- Wang H., Dey S.K. & Maccarrone M. 2006: Jekyll and hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility. *Endocrine reviews* 27: 427-448.
- Watanabe F. 2007: Vitamin B12 sources and bioavailability. *Experimental Biology and Medicine* 232: 1266-1274.
- Watanabe F., Nakano Y. & Stupperich E. 1992: Different corrinoid specificities for cell growth and the cobalamin uptake system in *Euglena gracilis* Z. *Microbiology* 138: 1807-1813.

- Watanabe F., Takenaka S., Kittaka-Katsura H., Ebara S. & Miyamoto E. 2002: Characterization and bioavailability of vitamin B12-compounds from edible algae. *Journal of nutritional science and vitaminology* 48: 325-331.
- Watanabe K., Takihana N., Aoyagi H., Hanada S., Watanabe Y., Ohmura N., Saiki H. & Tanaka H. 2005: Symbiotic association in Chlorella culture. *FEMS Microbiology Ecology* 51: 187-196.
- Waygood E.R., Hussain A., Godavari H.R., Tai Y.C. & Badour S.S. 1980: Purification and reclamation of farm and urban wastes by Euglena Gracilis: Photosynthetic capacity, effect of pH, temperature, acetate and whey. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological* 23: 179-215.
- Vishniac H.S. & Riley G.A. 1961: Cobalamin and thiamine in Long island sound: Patterns of distribution and ecological significance. *Limnology and Oceanography* 6: 36-41.
- Yang C., Li Y., Zhou B., Zhou Y., Zheng W., Tian Y., Van Nostrand J.D., Wu L., He Z., Zhou J. & Zheng T. 2015: Illumina sequencing-based analysis of free-living bacterial community dynamics during an Akashiwo sanguine bloom in Xiamen sea, China. *Scientific Reports* 5: 8476.
- Yu L., Zhang W., Liu L. & Yang J. 2015: Determining Microeukaryotic Plankton Community around Xiamen Island, Southeast China, Using Illumina MiSeq and PCR-DGGE Techniques. *PLOS ONE* 10: e0127721.
- Öqvist C.K., Kurola J., Pakarinen J., Ekman J., Ikävalko S., Simell J. & Salkinoja-Salonen M. 2008: Prokaryotic microbiota of recycled paper mills with low or zero effluent. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 35: 1165-1173.

Liitteet

Liite 1. H- ja HB12 -kasvatusalustojen kobalamiinipitoisuus (ng/g ka \pm keskivirhe) ja niillä kasvaneen *E. gracilis* -mikrolevän kobalamiinipitoisuus (ng/g kuiva mikrolevä ka \pm keskivirhe) kasvatuksen alussa T0 ja stationaarivaiheessa näytteenottohetkinä T1-T3 (Aalto, 2017).

	T0	T1	T2	T3
H-kasvatusalusta				
Mikroleväbiomassa	1010,04	159,19 \pm 17,32	65,38 \pm 3,11	82,19 \pm 13,53
Kasvatusalusta	0,00	0,21 \pm 0,10	1,94 \pm 0,97	2,04 \pm 1,02
HB12-kasvatusalusta				
Mikroleväbiomassa	584,59	2918,62 \pm 48,59	1893,29 \pm 205,41	849,38 \pm 119,14
Kasvatusalusta	21,98 \pm 0,53	4,06 \pm 0,09	3,66 \pm 0,61	17,80 \pm 2,78