

# **Kimalaisen (*Bombus terrestris*) suolistobakteerien herkkyys glyfosaatille ja glyfosaattipohjaisille herbisideille**

Essi Marjamäki

Biologia (aineenopettajan linja)

Pro gradu -tutkielma

Laajuus: 20 op

25.1.2026

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu  
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Pro gradu -tutkielma

**Pääaine:** Biologia

**Tekijä(t):** Essi Marjamäki

**Otsikko:** Kimalaisen (*Bombus terrestris*) suolistobakteerien herkkyys glyfosaatille ja glyfosaattipohjaisille herbisideille

**Ohjaaja(t):** Marjo Helander, Suni Mathew

**Sivumäärä:** 37 sivua + liitteet 19 sivua

**Päivämäärä:** 25.1.2026

---

Torjunta-aineiden lisääntynyt käyttö on yhdistetty osatekijäksi pölyttäjien määrän maailmanlaajuiselle vähenemiselle. Glyfosaatti on maailman käytetyin rikkakasvintorjunta-aineiden eli herbisidien aktiivinen aine, joka estää kasveilla shikimaattireitin 5-enolipuryvyylishikimaatti-3-fosfaattisyntaasin (EPSPS) toimintaa. Glyfosaatti voi muuttua myös mikrobiyhteisöjä, sillä suurimmalla osalla mikrobeista on aineenvaihdunnassaan EPSPS-entsyymi. Kauppavalmisteina myytävät glyfosaattipohjaiset herbisidit sisältävät glyfosaatin lisäksi erilaisia apuaineita, joiden on havaittu olevan haitallisempia kuin puhdas glyfosaatti. Glyfosaattiohjaisen herbisidialtistuksen on aiemmin todettu esimerkiksi vähentävän kimalaisten suolistomikrobiomin lajimonimuotoisuutta.

Pro gradu -tutkielmassani tutkin ovatko kimalaisista eristetyt suolistobakteerit herkkiä vai resistenttejä glyfosaatille ja/tai glyfosaattipohjaiselle herbisidille. Koska kimalaisen suolistobakteerien herkkyyttä glyfosaatille ja glyfosaatin kauppavalmisteille ei ole aiemmin tutkittu *in vitro* -olosuhteissa, selvitin tässä tutkielmassa, miten glyfosaatti ja glyfosaattipohjainen herbisidi (Roundup Flex) vaikuttavat kimalaisesta eristettyjen suolistobakteerikantojen, *Gilliamellan*, *Snodgrassellan* ja *Bacilluksen* kasvuun. Bakteereja kasvatettiin maljalla, jossa oli joko puhdasta glyfosaattia tai glyfosaattipohjaista herbisidiä kahdessa eri pitoisuudessa. Ennustin bakteerikantojen EPSPS-proteiinin herkkyuden glyfosaatille EPSPSClass-nimisen bioinformatiikan työkalun avulla.

Vaikka *Gilliamella* ja *Snodgrassella* olivat EPSPS-proteiiniltaan potentiaalisesti herkkiä ja *Bacillus* resistentti glyfosaatille, ei glyfosaatti estänyt minkään tutkimani bakteerikannan määrällistä kasvua. Tämä voi olla seurausta esimerkiksi bakteerien vaihtoehtoisista resistenttimekanismeista, jolloin EPSPS-proteiiniltaan glyfosaattiherkkä bakteeri voi vastustaa tai jopa hyötyä glyfosaatista. *Gilliamella*-kannat näyttivät pääosin hyötyvän pienestä pitoisuudesta glyfosaattia, mikä voi johtua bakteerien kyvystä hajottaa glyfosaattia ja käyttää hajoamistuotteita ravinteiden lähteenä. Erityisesti *Bacillus* kasvoi heikommin Roundup-käsittelyssä korkeassa pitoisuudessa, mikä viittaa kauppavalmisteiden sisältämien apuaineiden haitallisuuteen. Koska tutkimuksia glyfosaatin ja sen kauppavalmisteiden vaikutuksista kimalaisten suolistobakteereihin on vain vähän, on aihetta jatkossa tutkittava lisää.

**Avainsanat:** glyfosaatti, kimalainen, suolistobakteerit, EPSPS, resistenssi

# Sisällysluettelo

<b>1</b>	<b>Johdanto</b>	<b>1</b>
1.1	Pölyttäjien väheneminen	1
1.2	Glyfosaatti	2
1.3	Glyfosaattipohjaiset rikkakasvintorjunta-aineet ja niiden sisältämät apuaineet	4
1.4	Mikrobien herkkyys glyfosaatille	5
1.5	Kimalaisten suolistomikrobiomi	6
1.6	Tutkielman tavoite ja hypoteesi	8
<b>2</b>	<b>Aineisto ja menetelmät</b>	<b>9</b>
2.1	Kimalaisten suolistobakteerien eristäminen	9
2.2	Bakteerikasvatusten valmistus	9
2.3	Bakteerikantojen taksonomisen tunnistuksen varmistus	10
2.4	Bakteerien glyfosaattiherkkyden ennustaminen	12
2.5	Bakteerikasvuston määrän optimointi sarjalaimennoksella	13
2.6	Glyfosaattia ja glyfosaattipohjaista rikkakasvintorjunta-ainetta sisältävien runsaiden ja niukkojen ravinnealustojen valmistus	14
2.7	Bakteerien glyfosaatti- ja GBH-herkkyden <i>in vitro</i> -testaus runsaalla ravinnealustalla	14
2.8	Bakteerikantojen herkkyystestaus glyfosaatille ja GBH:lle niukalla ravinnealustalla	15
2.9	Tilastolliset analyysit	15
<b>3</b>	<b>Tulokset</b>	<b>16</b>
3.1	Bakteerikantojen taksonominen tunnistus	16
3.2	Bakteerien ennustetut glyfosaattiherkkydet EPSPS-sekvenssin mukaan	17
3.3	Sarjalaimennoksella optimoitu bakteerikasvuston määrä	17
3.4	Bakteerien glyfosaattiherkkyys runsaalla ravinnealustalla	18
3.5	Bakteerien glyfosaattiherkkyys niukalla ravinnealustalla	24
<b>4</b>	<b>Tulosten tarkastelu</b>	<b>28</b>

<b>5 Kiitokset.....</b>	<b>32</b>
<b>Lähteet.....</b>	<b>33</b>
<b>Liitteet.....</b>	<b>38</b>

# 1 Johdanto

## 1.1 Pölyttäjien väheneminen

Pölyttäjät tarjoavat tärkeitä ekosysteemipalveluja, joista pölytyksellä on suurin merkitys globaalin biodiversiteetin eli luonnon monimuotoisuuden sekä ekosysteemien toiminnan ja maatalouden tuottavuuden kannalta (Potts ym. 2010). Hyönteispölytys on tärkeää kasvien lisääntymiselle, se lisää siementuottoa ja ympäristön kasvilajien monimuotoisuutta (Katumo ym. 2022). Hyönteispölytys on välttämätöntä tai hyödyllistä 78 %:lle lauhkean vyöhykkeen ja 94 %:lle tropiikin kukkivista luonnonkasveista (Ollerton ym. 2011). Lisäksi ainakin 75 % viljelykasvilajeista ovat riippuvaisia tai hyötyvät pölytyksestä (Ritchie 2021). Pölyttäjät ovat vastuussa monien tärkeiden mikroravinteita sisältävien tuotantokasvien pölytyksestä (Eilers ym. 2011). Esimerkiksi arviolta 74 % maailmanlaajuisesti tuotetuista lipideistä, jotka ovat peräisin kasviöljyistä sisältäen myös rasvaliukoisia vitamiineja sekä 98 % ravinnon C-vitamiinista on peräisin eläinpölytteisistä kasveista. Eläinpölytteisten viljelykasvien mahdollisista vähenemisestä johtuvat mikroravinnepuutokset tulevat todennäköisesti olemaan vakavampia kehittyvissä maissa. Pölyttäjiä pidetään myös tärkeinä bioindikaattoreina, sillä monet pölyttäjryhmät, kuten mesipistiäiset ja perhoset ovat herkkiä erilaisille ympäristösaasteille (Katumo ym. 2022).

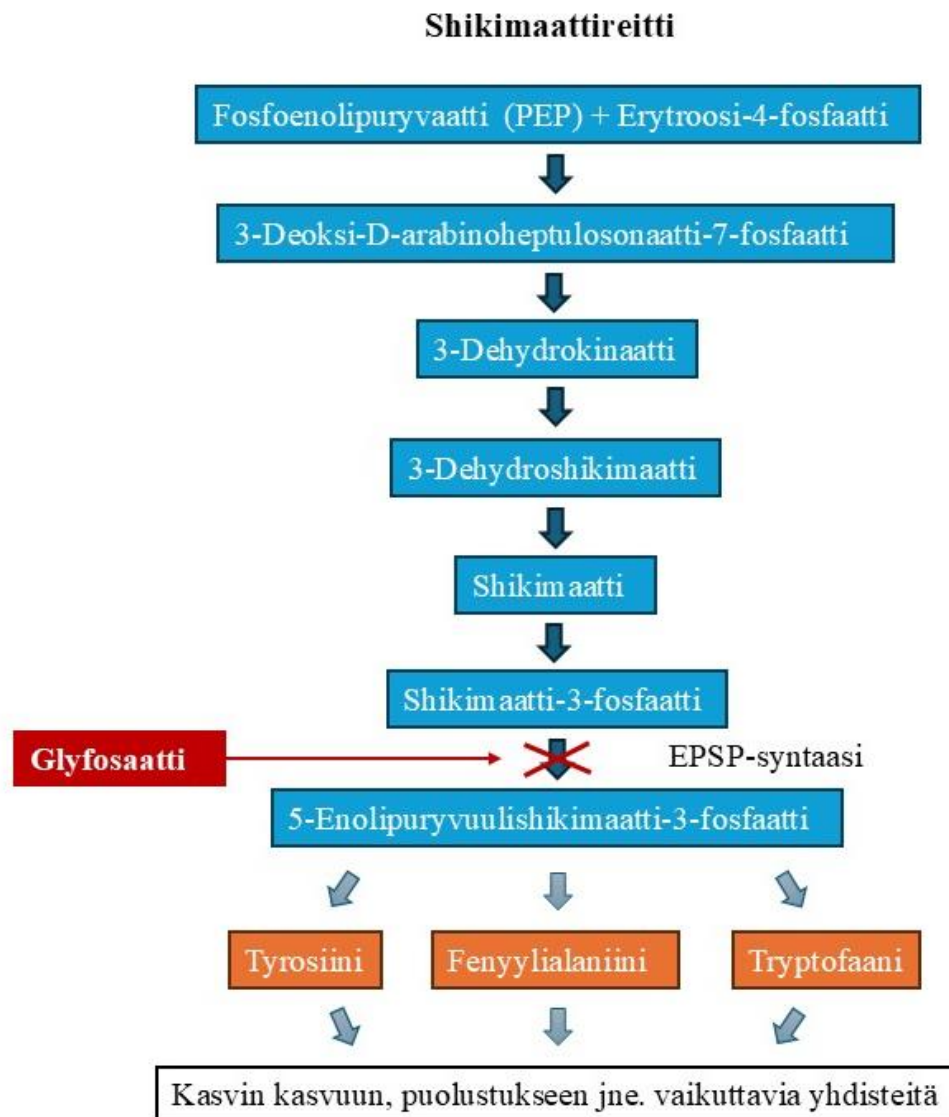
Pölyttäjiin kuuluu useita eliöryhmiä, kuten kärpäset, perhoset, koit sekä 20 000 mesipistiäislajia (IPBES 2016). Suomessa tärkeimpiä pölyttäjiä ovat mesipistiäisiin kuuluvat tarhamehiläinen, kimalaiset ja erakkomehiläiset (Peltotalo 2010). Pölyttäjien määrä ja monimuotoisuus on vähentynyt erityisesti Euroopassa ja Pohjois-Amerikassa (IPBES 2016, Potts ym. 2010). Pölyttäjien häviäminen on kuitenkin maailmanlaajuinen ongelma, jonka syitä ovat esimerkiksi maankäytön muutokset, elinympäristöjen pirstaloituminen, vieraslajit, ilmastonmuutos ja torjunta-aineiden lisääntynyt käyttö (Dicks ym. 2021, Potts ym. 2010). Esimerkiksi rikkakasvintorjunta-aineiden käyttö on lisääntynyt merkittävästi, sillä vuonna 1990 maataloudessa käytettiin arviolta 700 000 tonnia aktiivisia aineita, kun taas vuonna 2022 määrä oli noussut lähes 1 950 000 tonniin (Kaakinen 2025).

## 1.2 Glyfosaatti

Glyfosaatti eli N-(fosfonometyyli)-glysiini on maailman käytetyin rikkakasvintorjunta-aine eli herbisidi (Maggi ym. 2020). Se on pääasiassa rikkakasvien torjuntaan käytetty laajakirjoinen vaikuttava aine (Helander ym. 2012). Glyfosaatin toi markkinoille Monsanto-yhtymä vuonna 1974 kauppanimellä Roundup (Dill ym. 2010, Duke & Powles 2008). Vuoteen 2001 saakka Roundup oli markkinoiden ainoa glyfosaattipohjainen rikkakasvintorjunta-aine (Benbrook & Benbrook 2021). Vuonna 1996 glyfosaattiresistenttien, niin kutsuttujen ”Roundup Ready” -viljelykasvien, kuten soijapavun ja rapsin käyttöönotto johti lopulta siihen, että glyfosaatista tuli maailmanlaajuisesti käytetyin rikkakasvintorjunta-aine (Duke & Powles 2008, Benbrook, 2016). Glyfosaattiresistentit geenimuunnellut viljelykasvit on tuotettu siirtämällä viljelykasviin glyfosaattiresistenssin aiheuttava geeni, mikä mahdollistaa glyfosaatin käytön läpi satokauden (Duke & Powles 2008). Glyfosaatin käyttö lisääntyi maailmanlaajuisesti 12-kertaisesti vuodesta 1995 (67 milj. kg) vuoteen 2014 (826 milj. kg) (Benbrook 2016). Euroopan unionissa (EU) glyfosaattiresistentit viljelykasvit ovat kuitenkin kiellettyjä (Andert ym., 2019). Sen sijaan EU:ssa glyfosaattia käytetään esimerkiksi monivuotisten rikkakasvien torjuntaan juuri puiduilla sänkipelloilla tai esikylvökäsittelyssä. Riippuen maakohtaisista säädöksistä glyfosaattia käytetään maanviljelyssä rikkakasvien torjunnan lisäksi kuivatusaineena ennen sadonkorjuuta puinnin helpottamiseksi sekä viljelykasvien kypsyttämiseksi, jotta vältetään sadonmenetyksiltä kosteissa olosuhteissa (Maggi ym. 2020). Glyfosaatilla pakkotuleennuttaminen ei ole kuitenkaan sallittua EU:ssa (Turvallisuus- ja kemikaalivirasto [Tukes], 2023). Vuonna 2023 EU:n komissio hyväksyi glyfosaatin käytön edelleen kymmeneksi vuodeksi. Lisäksi glyfosaattia käytetään myös puutarhoissa, metsänviljelyssä ja viljelemättömillä alueilla (Tukes 2025).

Rikkakasvintorjunta-aineen vaikuttavana aineena glyfosaatti voi esiintyä eri muodoissa, kuten isopropyliamiinin, ammoniakkin tai natriumin suoloina (Dill ym. 2010). Systemisenä herbisidinä glyfosaatti tunkeutuu kohdekasvien lehdille suihkutettuna kasvin solukoihin ja eri osiin, kuten kärkikasvusolukkoon ja juuriin (Mesnage ym. 2021, Helander ym. 2012). Glyfosaatin vaikutus perustuu shikimaattireitin kuudennen entsyymien, 5-enolipuryvyylishikimaatti-3-fosfaattisyntaasin (EPSPS) inhibitioon eli estämiseen (Kuva 1) (Schönbrunn ym. 2001). Shikimaattireitti, ja näin ollen EPSPS-entsyymiä esiintyy kasveilla, sienillä ja prokaryooteilla, mutta ei eläimillä. Shikimaattireitin lopputuotteena muodostuu aromaattisia aminohappoja, fenyylialaniinia, tyrosiinia ja tryptofaania, jotka toimivat esimerkiksi kasveilla kasvuun ja puolustukseen vaikuttavien yhdisteiden prekursoreina

eli esiasteina (Kuva 1) (Helander ym. 2012). Glyfosaatti kilpailee sitoutumisesta EPSPS-entsyymin aktiiviseen kohtaan fosfoenolipuryvaatin kanssa (Schönbrunn ym. 2001). Glyfosaatti hajoaa kasveissa ja maaperässä hitaasti pääasiassa aminometyylifosfonihapoksi (AMPA), jonka jäämiä löydetään glyfosaatin ohella niin ympäristöstä, ruuasta kuin rehusta (Székács 2021). Korkean vesiliukoisuuden vuoksi glyfosaattia ja AMPA:a esiintyy yleisesti myös pohjavedessä ja vesistöissä. Glyfosaatille altistuvat myös ihmiset ja muut eläimet (Gillezeau ym. 2019, Winters ym., 2023, van Bruggen ym. 2021).



Kuva 1. Glyfosaatti estää shikimaattireitin 5-enolipuryvyulishikimaatti-3-fosfaattisyntaasin (EPSPS) toimintaa ehkäisten tyrosiinin, fenyylialaniinin ja tryptofaanin muodostumista, joita tarvitaan esimerkiksi kasvin kasvuun ja puolustukseen vaikuttavien yhdisteiden synteesissä.

Glyfosaatin on esitetty olevan sytotoksinen useilla solulinjoilla, inhiboivan aromataasientsyymejä jo alhaisissa pitoisuuksissa, omaavan hormoni-toimintaa häiritseviä vaikutuksia sekä mahdollisesti

vaikuttavan ei-alkoholiperäisen rasvamaksan syntyyn. (Székács 2021). Vaikka glyfosaatin on todettu aiheuttavan koe-eläimillä syöpää suurilla annoksilla, on sen karsinogeenisuus eli syöpävaarallisuus ihmiselle ollut kiistelty aihe (Balkhi ym. 2021). Esimerkiksi EU:ssa glyfosaatin käyttöluva perustuu Euroopan elintarviketurvallisuusviranomaisen EFSA:n riskinarviointiin, jonka mukaan glyfosaattia ei luokitella karsinogeeniseksi (Tukes 2023). Glyfosaatti voi vaikuttaa lisääntymisterveyteen lyhentämällä raskauden kestoa sekä pienentämällä syntymäpainoa (Reynier & Rubin 2025). Glyfosaatti voi vaikuttaa myös muihin metaboliareitteihin shikimaattireitin lisäksi, sillä mitokondrioiden elektroninsiirtoketjun on havaittu olevan herkkä glyfosaatille, jolloin glyfosaatille altistuminen voi aiheuttaa oksidatiivista stressiä ja johtaa toksisiin vaikutuksiin (Burchfield ym. 2019, Leino ym. 2021).

### **1.3 Glyfosaattipohjaiset rikkakasvintorjunta-aineet ja niiden sisältämät apuaineet**

Rikkakasvintorjunta-aineen teho riippuu aktiivisen aineen lisäksi esimerkiksi aineen kyvystä tunkeutua kasviin, sen liukoisuudesta ja sateenkestävyydestä (Mesnage 2021). Tämän vuoksi glyfosaatti myydään kaupallisesti aina glyfosaattipohjaisina rikkakasvintorjunta-aineina (eng. glyphosate-based herbicide), jossa on aktiivisen aineen eli glyfosaatin lisäksi myös erilaisia apuaineita parantamassa torjunta-aineen ominaisuuksia. Yleisiä apuaineita ovat surfaktantit eli pintajännitystä alentavat aineet, emulgointiaineet sekä väriaineet. Vaikka valmistajalla on velvollisuus suorittaa toksisuutta mittaavat testit kullekin markkinoille tuotavalle rikkakasvintorjunta-aineelle, voidaan niiden tulokset kuitenkin pitää salaisena. Torjunta-aineen aktiivisen aineen osalta vaaditaan mitattavan esimerkiksi pitkäaikaista myrkyllisyyttä, karsinogeenisuutta sekä genotoksisuutta eli perimämyrkyllisyyttä. Koska apuaineiden terveysriskiä pidetään kuitenkin mitättömänä, on valmistajien suoritettava markkinoille tuotavalle uudelle rikkakasvintorjuntavalmisteelle vain muutama testi, jotka mittaavat lyhytaikaista toksisuutta, kuten silmä- ja ihoärsytystä. Kuitenkin glyfosaattipohjaisten torjunta-aineiden sisältämät apuaineet voivat olla ei-kohde-eliöille myrkyllisempiä kuin glyfosaatti (Mesnage ym. 2019). Valmistajilla ei ole laillista velvollisuutta julkaista glyfosaattipohjaisten rikkakasvintorjunta-aineiden koostumusta, sillä tietoa pidetään liikesalaisuutena.

## 1.4 Mikrobin herkkyys glyfosaatille

Suurimmalla osalla mikrobeista on aineenvaihdunnassaan EPSPS-entsyymi, jolloin glyfosaatti voi vaikuttaa mikrobeihin suoraan estämällä entsyymien toimintaa (Ruuskanen ym. 2023). Tämä voi muokata mikrobiyhteisöjä ja näin ollen vaikuttaa myös isäntäeliöihin sekä maaperään. Joillekin mikrobeille on kuitenkin muodostunut erilaisia resistenssimekanismeja glyfosaattia vastaan (Walsh ym. 2023). EPSPS-entsyymien sitoutumiskohdan resistenssimekanismi perustuu entsyymien aktiivisen kohdan aminohappomarkkereihin (Leino ym. 2021). Vaikka EPSPS:n aktiivinen kohta on prokaryooteilla korkeasti konservoitunut, voi joillakin lajeilla jo pienet muutokset aktiivisen kohdan sekvenssissä vaikuttaa glyfosaattiherkkyyteen (Rainio ym. 2021). Bioinformatiikan EPSPSClass-työkalu luokittelee EPSPS-entsyymit neljään luokkaan sen mukaan, onko aktiivisen kohdan aminohappomarkkereiden perusteella kyseessä glyfosaatille potentiaalisesti herkkä vai resistentti entsyymi (Leino ym. 2021). Avoin tietokanta on löydettävissä osoitteessa <https://ppuigbo.me/programs/EPSPSClass>. Luokkaan I kuuluu glyfosaatille potentiaalisesti herkät ja luokkaan II, III ja IV potentiaalisesti resistentit EPSPS-entsyymit. Mikrobin EPSPS-sekvenssin mukaan voidaan arvioida sen herkkyys glyfosaatille. Prokaryooteista suurin osa, esimerkiksi 57 % bakteereista, kuuluu EPSPS-sekvenssinsä mukaan luokkaan I, eli ovat potentiaalisesti herkkiä glyfosaatille. On olemassa kuitenkin vielä suuri joukko erityisesti prokaryoottien EPSPS-proteiineja, jotka ovat vielä herkkydeltään luokittelemattomia.

Rainio ym. (2021) havaitsivat bakteerien EPSPS-entsyymien perusteella glyfosaattiherkkyyden selittyvän fylogeniikalla. Firmikuutit ovat todennäköisimmin herkempiä verrattuna proteobakteereihin. Aktinobakteerit taas ovat herkin ryhmä. Lisäksi bakteerin elintavan havaittiin olevan yhteydessä sen herkkyteen. Fakultatiivisesti isäntäeliössä elävät bakteerit ovat herkempiä kuin vapaasti elävät bakteerit. Fakultatiivisella tarkoitetaan sitä, että bakteeri kykenee kasvamaan ympäristötekijän, eli isäntäeliön, suhteen erilaisissa olosuhteissa (Tieteen termipankki 2025). Solunsisäiset parasiitit taas ovat todennäköisesti herkin ryhmä (Rainio ym. 2021). Rainio ym. arvioi, että bakteeriryhmien herkkyden erot ovat selitettävissä niihin kohdistuvalla valintapaineella, sillä vapaasti elävät bakteerit altistuvat todennäköisesti suuremmille glyfosaattipitoisuuksille kuin isäntäeliössä elävät bakteerit. Lisäksi solunsisäisiä parasiitteja taas suojaa solukalvo, jolloin altistuminen glyfosaatille on vähäisempää ja valintapaine lienee heikompi.

Pitkäaikainen altistuminen glyfosaatille voi johtaa resistenttien mikrobien runsastumiseen ja toisaalta herkkien kantojen resistenssin syntyyn (Leino ym. 2021). EPSPS:n aktiivisen kohdan resistenssi voi syntyä siinä tapahtuvien mutaatioiden kertymisen tai resistenssigeenin horisontaalisen geenisiirron myötä. EPSPS:n aktiivisen kohdan glyfosaattiresistenssin syntyminen on havaittu olevan analoginen antibioottiresistenssin kanssa (Bote ym. 2019). Näin ollen glyfosaattipohjaisten rikkakasvitorjunta-aineiden runsas käyttö voi hävittää herkkiä bakteereja, edistää herkkien bakteerien nopeaa sopeutumista glyfosaattiresistenssin ansiosta tai vaikuttaa bakteerien monikemikaaliresistenssin kehittymiseen (Rainio ym. 2021). Nämä kaikki voivat muuttaa mikrobiomin monimuotoisuutta ja koostumusta.

Mikrobeilla voi olla kehittynyt EPSPS:n aktiivisen kohdan lisäksi muita resistenssimekanismia glyfosaattia vastaan. Mikrobi voi olla resistentti glyfosaatille EPSPS:ää koodaavan *AroA*-geenin yliekspression tai geenin amplifikoitumisen eli monistumisen ansiosta (Hertel ym. 2021). Lisääntynyt EPSPS:n määrä voi vähentää glyfosaatin aiheuttamaa EPSPS:n inhibitiota titraamalla glyfosaatin määrää, jolloin bakteeri kykenee edelleen tuottamaan aromaattisia aminohappoja. Vastaavasti geenin selektiivinen monistuminen voi lisätä glyfosaattiresistenssiä. Lisäksi joillakin bakteereilla solukalvon effluksipumput voivat estää glyfosaatin kertymistä bakteerisoluihin, mikä lisää glyfosaattiresistenssiä (Staub ym. 2012).

Jotkin mikrobit kykenevät hajottamaan glyfosaattia ja käyttämään muodostuvia hajoamistuotteita, kuten fosforia, ravinteiden lähteenä (Huang ym. 2017, Jacob ym. 1988, Hove-Jensen ym. 2014). Glyfosaatin hajoaminen voi tapahtua kahdella tavalla: hiilen ja typen väliset sidokset voivat katketa, jolloin muodostuu sarkosiinia tai hiili-fosfori-sidokset voivat katketa, jolloin muodostuu AMPA:a (Huang ym. 2017). Näin ollen glyfosaatille altistuminen voi runsastuttaa glyfosaattia hajottavien bakteerien määrää.

## **1.5 Kimalaisten suolistomikrobiomi**

Eläinten suolistossa elää monia mikro-organismeja, jotka osallistuvat esimerkiksi immuunijärjestelmän kehittymiseen ja säätelyyn, terveydelle hyödyllisten bioaktiivisten yhdisteiden tuottamiseen sekä aivojen ja hermoston normaalin toiminnan ylläpitämiseen (Walsh ym. 2023, Belkaid & Harrison 2017, Patterson ym. 2014). Suolistomikrobiomin koostumus voi vaikuttaa myös kimalaisen muistiin ja näin ollen sen kelpoisuuteen (Li ym. 2021). Kimalaisten suolistomikrobiomia

hallitsee vain muutama bakteeriryhmä, joihin kuuluvat muun muassa *Snodgrassella*, *Gilliamella*, *Bombilactobacillus*, *Lactobacillus* ja *Bifidobacterium* (Hammer ym. 2021). Esimerkiksi *Snodgrassella alvi* ja *Gilliamella apicola* ovat kimalaisen suoliston yleisimpiä bakteereita, jotka lisäävät resistenssiä patogeeneja eli taudinaiheuttajia vastaan (Powell ym. 2016, Kaakinen 2025). Kimalaispesästä vain syksyllä hedelmöittynyt kuningatar talvehtii ja perustaa uuden pesän seuraavana keväänä, jolloin suolistomikrobiston koostumus on samankaltainen pesän sisällä (Peltotalo 2010, Kaakinen 2025).

Kimalaiset voivat altistua glyfosaattipohjaisille rikkakasvintorjunta-aineille joutuessaan ruiskutuksen kohteeksi, koskettaessaan käsiteltyä kasvia tai suun kautta kerätessään mettä ja siitepölyä (Böhme ym. 2018). Kimalaiset voivat vierailta jopa 4000 kukassa vuorokauden aikana (Peltotalo 2010). Väitöskirjatutkimuksessaan Kaakinen (2025) havaitsi, että kimalaiset eivät välttele glyfosaatilla ruiskutettuja kasveja, vaikka käsittelemättömiä kasveja olisi tarjolla. Suurin osa torjunta-aineiden vaikutuksia koskevista tutkimuksista on kuitenkin toteutettu mehiläisillä (Klein ym. 2022). Glyfosaatin on todettu häiritsevän mehiläisen suoliston bakteerikantaa lisäämällä patogeenisten ja vähentävän hyödyllisten suolistobakteerien määrää, mikä voi altistaa infektioille (Motta ym. 2018, Motta & Moran 2020).

Glyfosaatin ja glyfosaattipohjaisten torjunta-aineiden on havaittu muokkaavan kimalaisen suolistomikrobiomia *in vivo*, kun kimalaisia altistettiin glyfosaatille ja glyfosaattipohjaiselle torjunta-aineelle kenttäolosuhteita vastaavilla pitoisuuksilla (Helander ym. 2023). Glyfosaattipohjainen torjunta-aine vähensi mikrobiomin lajimonimuotoisuutta. Lisäksi glyfosaatti ja glyfosaattipohjainen torjunta-aine vähensivät merkitsevästi potentiaalisesti glyfosaattiherkän *Snodgrassella alvi* -bakteerin runsautta. Toisaalta pelkän glyfosaatin todettiin lisäävän lajimonimuotoisuutta. Tutkimuksessa havaittiin, että vaikutus mikrobiomin monimuotoisuuteen riippuu glyfosaattipohjaisen torjunta-aineen pitoisuudesta. Helander ym. tuovatkin esille glyfosaattipohjaisten torjunta-aineiden sisältämien apuaineiden mahdolliset suuremmat haittavaikutukset sekä lisätutkimuksen tarpeen glyfosaatin ja glyfosaattipohjaisten torjunta-aineiden käytön vaikutuksista suolistobakteereihin sekä edelleen kimalaisten terveyteen, kognitioon ja käyttäytymiseen.

## 1.6 Tutkielman tavoite ja hypoteesi

Pro gradu -tutkielmani tavoitteena on selvittää ovatko kimalaisen suolistobakteerit herkkiä glyfosaatille ja/tai glyfosaattipohjaisille rikkakasvitorjunta-aineille. Tutkimuskysymykseni ovat seuraavat: 1) Mitkä kimalaisen suolistobakteerit ovat potentiaalisesti herkkiä tai resistenttejä glyfosaatille, ja 2) miten glyfosaatti ja glyfosaattipohjainen rikkakasvitorjunta-aine vaikuttavat kimalaisen suolistobakteerien kasvuun in vitro? Ennustan kimalaisten suolistobakteerien herkkyyden glyfosaatille bakteerin EPSPS-sekvenssin mukaan EPSPSClass-tietokannan avulla. Hypoteesinani on, että glyfosaatti ja glyfosaattipohjainen torjunta-aine heikentää tai estää glyfosaatille herkkien bakteerien kasvua. Testaan tätä oletusta kasvattamalla kimalaisen suolistosta eristettyjä bakteereja runsasravinteisella ja niukkaravinteisella ravinnealustalla erivahvaisissa glyfosaatti- ja glyfosaattipohjaisen torjunta-aineen käsittelyissä. Torjunta-aineen pitoisuudet on valittu kenttärealistisiksi, eli sellaisiksi, joille kimalaiset voisivat juuri ruiskutetulla pellolla altistua.

## 2 Aineisto ja menetelmät

### 2.1 Kimalaisten suolistobakteerien eristäminen

Kahdesta kaupallisesta kimalaispesästä (Koppert, Alankomaat) kerättiin kustakin viisi kontukimalaista (*Bombus terrestris*). Kimalaiset pestiin 70 % etanolilla ja niiden suolistosta preparoitiin steriilisti suolen sisältö, joka liuotettiin fosfaattipuskuriin. Tästä liuoksesta tehtyjä laimennoksia levitettiin BHI (brain heart infusion agar) -ravinnealustalle (Liite 1). Sekaviljelmäkasvatuksista kerättiin eri bakteerikannat, joita kasvatettiin edelleen BHI-ravinnealustoilla. Bakteerikantoja säilöttiin -80 °C:ssa BHI-liemessä (brain heart infusion broth, 30 % glyseroli) (Liite 1). Bakteerien DNA eristettiin käyttäen ZymoBionics DNA Miniprep -kittiä (Zymo Research) valmistajan ohjeen mukaisesti ja bakteerikannat tunnistettiin 16S rRNA-sekvenssin perusteella Sanger-menetelmällä *Gilliamella*, *Snodgrassella* ja *Bacillus*-kannoiksi. Lisäksi yksi kannoista oli tunnistamaton.

### 2.2 Bakteerikasvatusten valmistus

Valitsin tutkimukseeni kymmenen *Gilliamella*-, kymmenen *Snodgrassella*- ja kolme *Bacillus*-kanta sekä kolme tunnistamatonta kantaa (Taulukko 1). Otin bakteerien varastoliuokset -80 °C:sta ja siirsin ne -20 °C kylmäsäilytysastiaan. Viljelin jokaisen bakteerikannan 10 µl viljelysilmukan avulla BHI-maljalle 75 % etanolilla puhdistetussa laminaarivirtauskaapissa. Kasvatin bakteereja 2–5 päivää (37 °C, 95 % N<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) lämpökaapissa (Sanyo O<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> Incubator MCO-19M). Varastoin maljat jääkaapissa (+4 °C) ennen herkkyystestausta. Koska useamman viikon kylmäsäilytyksen jälkeen osa bakteerikannoista oli kuollut, viljelin bakteereja uudelleen varastoliuoksista. Tällöin jätin maljat lämpökaappiin siihen asti, kunnes aloitin herkkyystestaukset.

Taulukko 1. Glyfosaatti- ja GBH (= glyfosaattipohjainen torjunta-aine)-herkkyystestaukseen valitut *Gilliamella*-, *Snodgrassella*-, *Bacillus*- sekä tunnistamattomat bakteerikannat. Koodauksessa numerointi tehty seuraavasti: kimalaispesän numero\_kimalaisen numero\_bakteerikannan numero.

<i>Gilliamella</i>	<i>Snodgrassella</i>	<i>Bacillus</i>	tunnistamaton
G1_1_2	S1_1_1	B1_4_6	t1_1_3
G1_1_6	S1_4_11	B1_4_7	t1_1_5
G1_2_6	S1_5_3	B1_4_8	t1_5_1
G1_3_1	S2_2_2		
G1_3_4	S2_2_4		
G1_4_9	S2_3_6		
G1_5_6	S2_3_8		
G2_2_1	S2_4_6		
G2_5_4	S2_4_8		
G2_1_6	S2_5_5		

### 2.3 Bakteerikantojen taksonomisen tunnistuksen varmistus

Valitsin sattumanvaraisesti kuusi bakteerikantaa (t1\_1\_3, G2\_5\_4, G1\_5\_6, S1\_4\_11, S1\_1\_1 ja B1\_4\_7) taksonomisen tunnistuksen varmistamiseen. Otin bakteerikasvustoa BHI agar -maljoilta ja eristin bakteerien DNA:n käyttäen ZymoBiomics DNA Miniprep -kittiä (Zymo Research) valmistajan ohjeen mukaisesti.

Monistin bakteerien 16S rRNA-geenit PCR:llä (Taulukot 2 ja 3). PCR:ssä käytin etualuketta 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') ja taka-aluketta 1492R (5'GGYTACCTTGTTACGACTT3'). Master mix -reagenssiseoksen seitsemää reaktiota varten valmistin ensin jäällä. Negatiivisena kontrollina oli reaktioseos ilman DNA-templaattia. PCR:n ajoin Biorad S1000 Thermal Cycler -laitteella (Taulukko 3).

Taulukko 2. Yhden PCR:n reaktioseos.

Reagenssi	Määrä (µl)	Loppukonsentraatio
Vesi (MilliQ)	12,2	
PCR-puskuri	4,0	1x
dNTP	0,4	0,20 mM
Etualuke 27F	0,6	0,30 µM
Taka-aluke 1492R	0,6	0,30 µM
GoTaq	0,2	1000 U/ml
DNA-templaatti	2,0	noin 25 ng/µl

Taulukko 3. PCR-ajo-ohjelma.

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika	Sykli
Alkudenaturaatio	95	3 min	1x
Denaturaatio	95	1 min	32x
Alukkeiden kiinnittyminen	55	30 s	
Elongaatio	72	1,5 min	
	72	5 min	1x

Varmistin 16S rRNA -geenin monistumisen ajamalla PCR-tuotteet elektroforeesilaitteessa 1,5 % agarosigeelillä. Geelin väriaineena oli 2 µl Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics). Latasin geelille 2 µl kokostandardina Generuler 1 Kb DNA ladder (Thermo Fisher), näytteet sekä negatiivisen kontrollin. Ajoin geelin Bio-Radin PowerPac 300 -laitteella (90 V, 400 mA).

Puhdistin DNA-näytteet ExoSAP-IT-kitillä (Avantor) valmistajan ohjeen mukaisesti. Puhdistetut näytteet lähetettiin sekvensoitavaksi (Macrogen Europe) Sanger-menetelmällä. Ennen tätä optimoin näytteiden DNA-konsentraation yrityksen ohjeiden mukaisesti Nano Drop ND-1000 spektrofotometrillä (Thermo Fisher Scientific, US). Sekvensointitulosten valmistuttua käytin SILVA:n rRNA-tietokantaa bakteerien tunnistamiseksi (<https://www.arb-silva.de/aligner/>). Hakukenttään syötin kunkin bakteerikannan osittaisen S16 rRNA-sekvenssin FASTA-muodossa (Kuva 2, Liite 2).

## ACT: Alignment, Classification and Tree Service

**SINA 1.2.12**

Input data

```
>seq4
CGATTACTAGCGATTCCGACTTC
ATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTTAGACGTAACCTTTGTGAGG
TCCGCTTACTCTCGCGAGGTCGCCTCCCTTTGTATACGCCATTGTAGCAC
GTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTGTCGCCACCC
TTCTCCGCTTATCAACGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGACCTAATCGA
TGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT
```

or

upload an FASTA file

**Cart: 0**

**Basic alignment parameters**

Tip: hovering over the options shows enhanced descriptions.

Gene:

Bases remaining unaligned at the ends should be:

attached to the last aligned base.

moved to the edge of the alignment.

removed.

Search and classify

Min. identity with query sequence:

Number of neighbours per query sequence:

Compute tree

Workflow:

Program to use:

Model to use:

Rate model for likelihoods:

**Output settings**

Format:  FASTA  FASTA w. meta-data  ARB

Compression:  none  zip  tgz

Reject sequences below identity (%):

Job Name:

Kuva 2. Bakteerien 16S rRNA-geenin osittaiset FASTA-sekvenssit syötettiin SILVA-tietokantaan (<https://www.arb-silva.de/aligner/>) bakteerien tunnistamiseksi taksonisesti.

## 2.4 Bakteerien glyfosaattiherkkyiden ennustaminen

Kunkin tutkimuksessa käytettävän bakteerisuvun (*Gilliamella*, *Snodgrassella*, *Bacillus*) kaikki EPSPS-proteiinisekvenssit haettiin NCBI-tietokannasta (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein?cmd=retrieve>). EPSPS-proteiinit luokiteltiin EPSPSClass-työkalun (<https://ppuigbo.me/programs/EPSPSClass/>) avulla perustuen niiden

glyfosaattiherkkyyteen (Kuva 3). Tietokanta vertaa sekvenssin vastaavuutta suhteessa kunkin EPSPS-luokan proteiinien konservoituneisiin aminohappotähteisiin niiden proteiinisekvenssissä.

The screenshot displays the EPSPS Class database interface. On the left, there are input fields for 'INSERT A SEQUENCE (in fasta format)', 'INSERT A REFERENCE SEQUENCE (optional)', and 'INSERT AA MARKERS (optional)', along with a 'SEND' button. The main area shows the 'EPSP Synthase Class' with 'Query sequence ID: 412824'. A table lists the classes and their identities:

CLASS	IDENTITY	MOTIFS (n_posite (i_tot))
Class I (alpha)	1.000	-
Class I (beta)	1.000	-
Class II	0.579	-
Class III	0.454	0 / 16
Class IV	0.233	-

Below the table, there is an 'Identity' section with a list of sequences and their identities. At the bottom, there is a 'Pairwise alignments' section showing sequence alignments for Class I and Class II.

Kuva 3. EPSPSClass-tietokanta (<https://ppuigbo.me/programs/EPSPSClass/>), jonka avulla luokiteltiin bakteerikantojen EPSPS-proteiinit niiden glyfosaattiherkkyyden perusteella. Tietokantaan syötettiin bakteerien EPSPS-proteiinisekvenssit NCBI-tietokannasta (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein?cmd=retrieve>).

## 2.5 Bakteerikasvuston määrän optimointi sarjalaimennoksella

Optimoin bakteerikasvuston määrän sarjalaimennoksella BHI-maljoilla. Optimointiin valitsin sattumanvaraisesti kaksi eri bakteerikantaa, joista tein seitsemän laimennoksen sarjan Eppendorf-putkiin. Pipetoin ensimmäiseen putkeen 1 ml ja putkiin 2–7 900 µl BHI-lientä. Keräsin maljalta bakteerikasvustoa 10 µl viljelysilmukalla ja sekoitin sen BHI-liemeen putkessa 1. Putkesta 1 alkaen pipetoitiin aina 100 µl edellisestä seuraavaan laimennokseen. Sarjan laimennuskertoimet olivat 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> ja 10<sup>-7</sup>. Pipetoin 100 µl kutakin laimennosta puhtaalle BHI-maljalle ja levitin sen kulmasauvan avulla. Pidin kasvatuksia lämpökaapissa (Sanyo O2/O2 Incubator MCO-19M) kaksi päivää (37 °C, 95 % N<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>), jonka jälkeen laskin ja vertasin eri laimennoksilla kasvavien pesäkkeiden muodostavien yksiköiden (CFU, eng. colony forming unit) määriä.

## **2.6 Glyfosaattia ja glyfosaattipohjaista rikkakasvintorjunta-ainetta sisältävien runsaiden ja niukkojen ravinnealustojen valmistus**

Glyfosaattiherkkyystestauksia varten valmistettiin runsaita (BHI-ravinnealusta) ja niukkoja ravinnealustoja ilman aminohappoja. Alustoihin lisättiin joko puhdasta glyfosaattia (G) (Sigma Aldrich, Pestanal,  $(\text{HO})_2\text{P}(\text{O})\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ , molekyylipaino 169,07 g mol<sup>-1</sup>; glyfosaattipitoisuus 470 g/l) 60 % sakkaroosiliuoksessa tai kaupallista glyfosaattipohjaista rikkakasvintorjunta-ainetta Roundup Flex, josta käytän jatkossa lyhennettä GBH (glyphosate based herbicide) (rekisterinumero 3072; glyfosaattipitoisuus 480 g/l, glyfosaatin natriumsuoloina CAS: 6229-014-3, Bayer Agriculture BVBA, Belgia). Runsaasta ja niukasta ravinnealustasta valmistettiin matalaa ja korkeaa G- ja GBH-pitoisuutta sisältävät kasvatusalustat: G-matala ja G-korkea sekä GBH-matala ja GBH-korkea.

Runsaat ravinnealustat valmistettiin lisäämällä glyfosaattia (G) tai GBH:ta autoklaavattuun BHI agar-liuokseen (noin 60 °C) (Liite 1). Niukkoja ravinnealustoja varten valmistettiin elatusaine, joka ei sisältänyt aminohappoja (Liite 1). Elatusaineisiin lisättiin ruiskusuodattimella (0,22 µm) suodatettu G tai GBH: G-matala 0,5 ml/l; G-korkea 1,0 ml/l; GBH-matala 0,5 ml/l ja GBH-korkea 1,0 ml/l. Lisäksi valmistettiin kontrollimaljat ilman glyfosaattia tai GBH:ta. Maljat valmistettiin laminaarivirtauskaapissa.

## **2.7 Bakteerien glyfosaatti- ja GBH-herkkyiden *in vitro* -testaus runsaalla ravinnealustalla**

Testasin suolistobakteerikantojen (Taulukko 1) herkkyiden glyfosaatille ja GBH:lle runsaalla ravinnealustalla matalassa ja korkeassa G- ja GBH-pitoisuuksissa sekä kontrollimaljalla ilman toistoja. Pipetoin jokaisen bakteerikannan sarjalaimennoksen 6. laimennosta ( $10^{-6}$ ) maljalle 100 µl. Laimennussarjan ja kasvatusten valmistus sekä inkubointi tapahtui kuten edellä (katso 2.5). Kolonioiden (CFU) muodostuttua laskin niiden määrät.

## 2.8 Bakterikantojen herkkyydestä glyfosaatille ja GBH:lle niukalla ravinnealustalla

Bakteerien herkkyyden testaukseen niukalla ravinnealustalla valitsin yhteensä yhdeksän bakterikantaa: kolme *Gilliamella*- (G1\_3\_1, G1\_5\_6 ja G2\_2\_1), kolme *Snodgrassella*- (S1\_4\_11, S1\_5\_3 ja S2\_3\_6) ja kolme *Bacillus*-kantaa (B1\_4\_6, B1\_4\_7 ja B1\_4\_8). Testasin valittujen bakterikantojen herkkyyden matalassa ja korkeassa G- ja GBH-pitoisuudessa sekä kontrollimaljoilla (niukka ravinnealusta ja runsas ravinnealusta). BHI agar -alustoista poiketen niukan ravinnealustan elatusaine ei sisältänyt aminohappoja. Sarjalaimennos tehtiin autoklaavattuun 1x M9 Minimal Salts -liuokseen (Sigma-Aldrich). Bakteereja kasvatettiin maljalla lämpökaapissa 2–7 päivää, kunnes maljalle oli muodostunut kolonioita. Laimennussarjan ja kasvatusten valmistus sekä inkubointi tapahtui kuten edellä (katso 2.5). Maljoilta laskettiin muodostuneet koloniat (CFU).

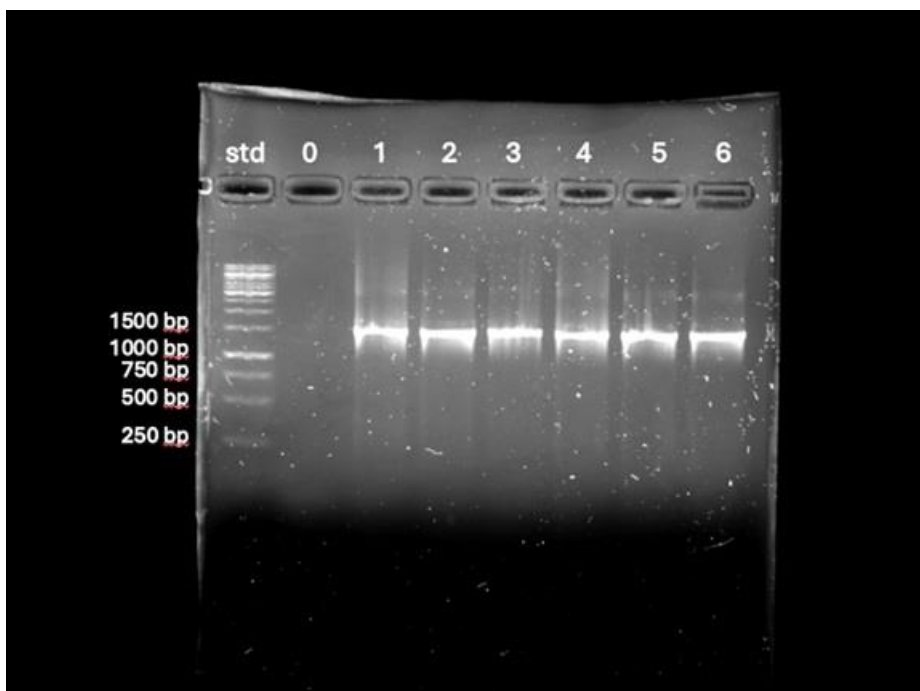
## 2.9 Tilastolliset analyysit

Tilastolliset analyysit suoritettiin R-ohjelmistolla (versio 4.5.0; R Core Team, 2025). Eri G- ja GBH-käsittelyiden vaikutuksia verrattiin toisiinsa ja kontrolliin käyttämällä t-testejä (Welchin t-testi) tilastollisesti merkitsevien erojen havaitsemiseksi bakteerien kasvussa eri käsittelyolosuhteissa. Kunkin käsittelyn ja kontrollin tuloksista laskin keskiarvot ja keskivirheet (standard error of the mean, SEM), ja nämä esitettiin graafisesti pylväsdiagrammina. R-koodit on esitetty liitteessä 3.

## 3 Tulokset

### 3.1 Bakterikantojen taksonominen tunnistus

Kimjalaisten suolistosta oli alkujaan tunnistettu Sanger-sekvensoinnilla bakterisuvut *Gilliamella*, *Snodgrassella*, *Bacillus* ja yksi tunnistamaton kanta. Ennen kuin suoritin valittujen bakterikantojen tunnistuksen varmistuksen, tutkin bakteerien 16S rRNA-geenin monistumisen onnistumista agarosigeelielektroforeesilla. Geelillä (Kuva 4) näkyvät näytteiden 1-6 vahvat bändit, noin 1500 emäsparin pituiset tuotteet. Geelillä ei ole havaittavissa kontaminantteja. Negatiivisessa kontrollinäytteessä ei ole havaittavissa amplikonit, joten PCR-reaktioseoksessa ei ollut kontaminantteja.



Kuva 4. Agarosigeelielektroforeesi bakteerien 16S rRNA-geenin monistumisen todentamiseksi. Geelillä kokostandardi (std), negatiivinen kontrolli (0) sekä DNA-näytteet (1-6).

Vertasin näytteiden 16S rRNA-geenisekvenssien vastaavuutta SILVA-tietokannan sekvensseihin. Tulosten mukaan tunnistus tapahtui yli 97 % tarkkuudella. Koska 16S rRNA-geenin sekvensointi ei riitä lajin määrittämiseksi, tunnistettiin bakteerit sukutasolla (Taulukko 4). Bakterikanta G1\_4\_11 oli alkujaan määritetty *Snodgrassella*-suvuksi, mutta tunnistettiin uudessa analyysissä *Gilliamellaksi*, joten jätin sen tulosten tarkastelun ulkopuolelle. Maljalla G1\_4\_11 muodosti erinäköisiä kolonioita,

joten kyseessä oli todennäköisesti sekaviljelmä. Lisäksi jätin bakteerikannan G2\_5\_4 glyfosaatti- ja GBH-herkkyystestauksen tulokset pois tarkastelusta liian alhaisen kolonioiden määrän vuoksi (katso 3.4), joten sen sekvensointitulos jätettiin myös tarkastelun ulkopuolelle. Alun perin tunnistamattoman bakteerikannan (t1\_1\_3) sekvensointitulokset suljettiin pois tarkastelusta tulosten huonon laadun vuoksi.

Taulukko 4. Näytteestä alkujaan tunnistettu bakteerisuku ja valittujen bakteerikantojen taksonomisen tunnistuksen varmistuksen tulokset.

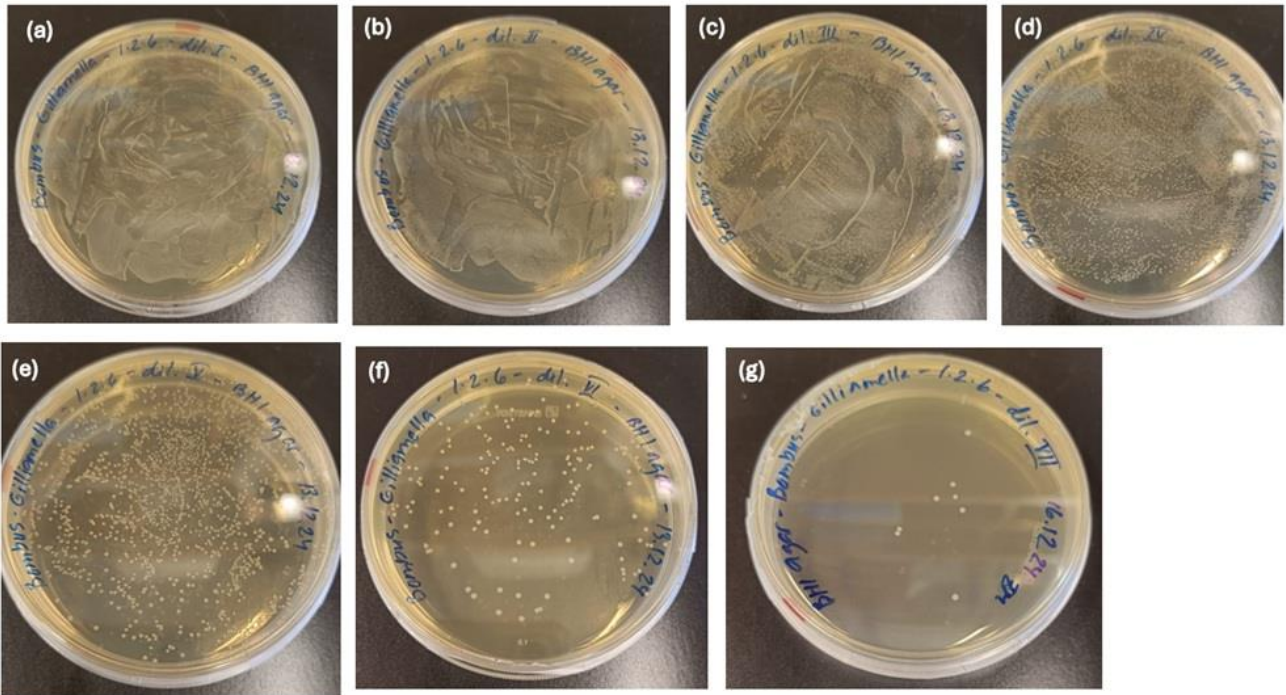
Bakteerikannan koodi	Alkujaan tunnistettu bakteerisuku	Bakteerikantojen tunnistuksen varmistus
G2_5_4	<i>Gilliamella</i>	<i>Gilliamella</i>
G1_5_6	<i>Gilliamella</i>	<i>Gilliamella</i>
S1_4_11	<i>Snodgrassella</i>	<i>Gilliamella</i>
S1_1_1	<i>Snodgrassella</i>	<i>Snodgrassella</i>
B1_4_7	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>

### 3.2 Bakteerien ennustetut glyfosaattiherkkydet EPSPS-sekvenssin mukaan

Liitteessä 4 on esitetty esimerkkejä mahdollisista bakteerikantojen EPSPS:n proteiinisekvenssien viitteistä sekä sekvenssien samankaltaisuusasteet verrattuna kunkin EPSPS-luokan konservoituneisiin EPSPS:n aktiivisen kohdan aminohapposekvensseihin. Tulosten perusteella *Gilliamella* ja *Snodgrassella* kuuluvat luokkaan I, eli ennustettiin sensitiiviseksi, sillä vastaavuus luokan I ( $\alpha$  ja  $\beta$ ) EPSPS-proteiinin konservoituneen aminohapposekvenssin kanssa on 100 %. *Bacillus* kuuluu luokkaan II, eli ennustettiin resistentiksi, sillä bakteerikantojen EPSPS-sekvenssit vastaavat parhaiten kyseisen luokan EPSPS:n konservoitunutta aminohapposekvenssiä.

### 3.3 Sarjalaimennoksella optimoitu bakteerikasvuston määrä

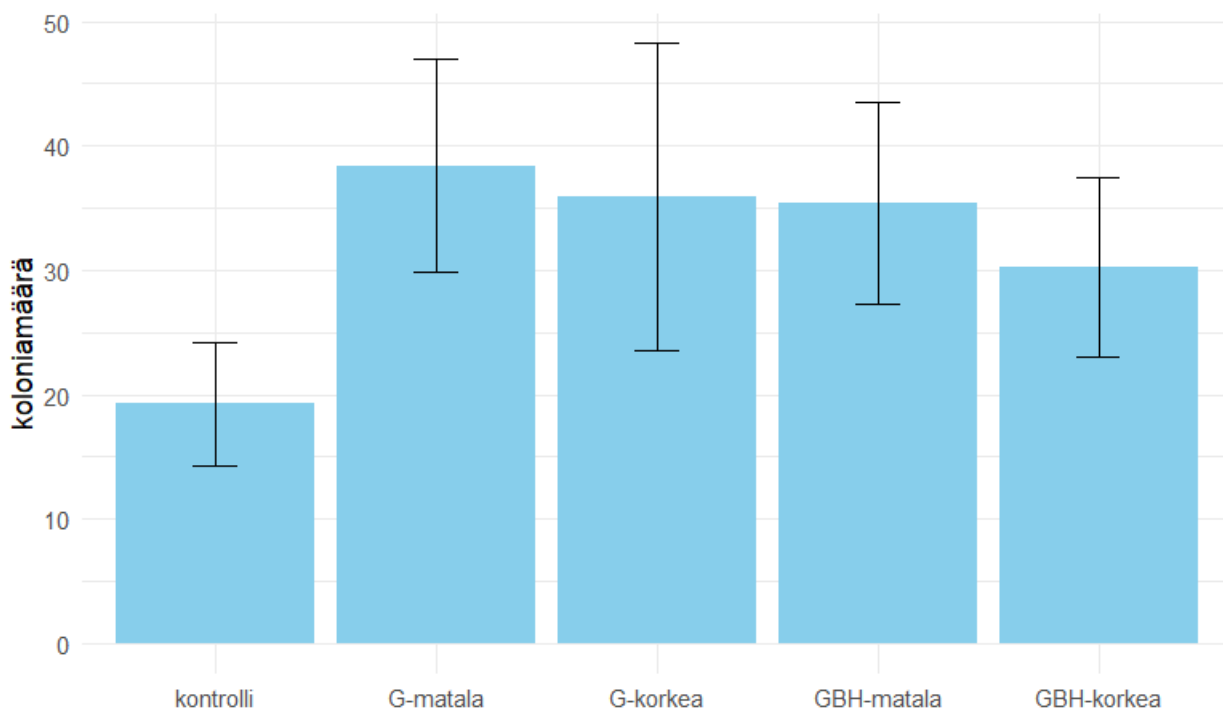
Optimoin bakteerikasvuston määrän sarjalaimennoksella (Kuva 5). Vertasin kolonioiden määriä maljoilla ja valitsin herkkyystestauksia varten kuudennen laimennoksen, jossa kolonioiden määrä maljalla oli optimaalinen.



Kuva 5. Bakteerikasvuston optimointi sarjalaimennoksella *Gilliamella*-bakteerikannalle. Kuvasarjassa esitetyt kasvatukset väkevimmästä (a) laimeimpaan (g) kolmen vuorokauden kuluttua kasvatuksen aloittamisesta. Kuudes laimennos (f) oli optimaalinen ja se valittiin testaukseen.

### 3.4 Bakteerien glyfosaattiherkkyys runsaalla ravinnealustalla

*Gilliamella*-bakteerikantojen sensitiivisyystestauksessa runsaalla (BHI) ravinnealustalla kolonioiden määrä oli keskimäärin alhaisin kontrollikäsittelyssä ja toiseksi alhaisin GBH-korkea-käsittelyssä (Kuva 6). Kontrolli ja G-matala erosivat toisistaan suuntaa antavasti (Taulukko 5). Kolonioiden määrä oli keskimäärin suurempi G-käsittelyissä verrattuna GBH-käsittelyihin (Kuva 6), mutta suuresta keskiarvon keskivirheestä johtuen (otoskoko n=7) en havainnut tilastollisesti merkitsevää eroa kontrollin ja eri käsittelyiden välillä (Taulukko 5, Liite 5). Kolmen bakteerikannan osalta tulokset hylättiin liian alhaisen (G2\_5\_4) tai korkean (G1\_2\_6, G1\_4\_9) kolonioiden määrän vuoksi, jotta tulokset olisivat verrattavissa keskenään.

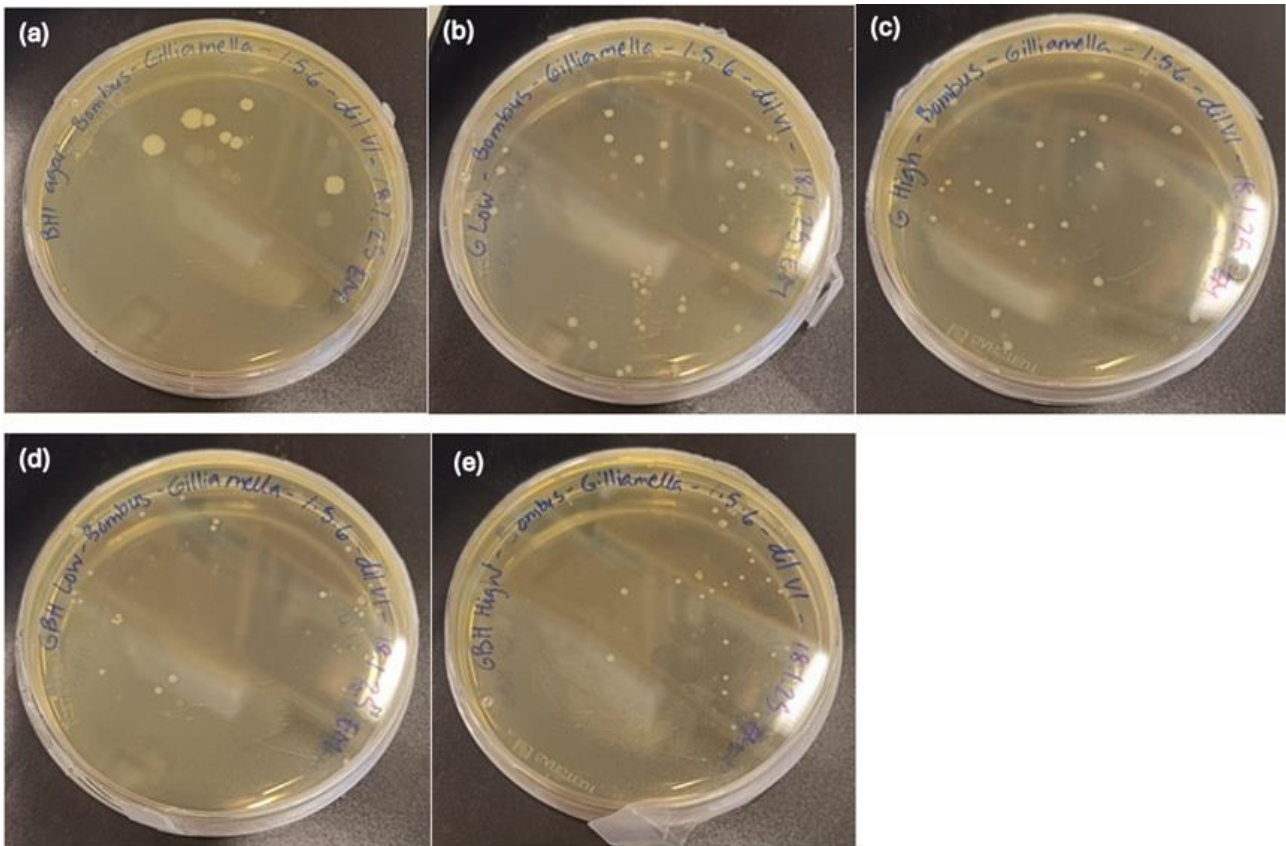


Kuva 6. *Gilliamella*-kantojen herkkyystestauksen (n = 7) koloniamäärien keskiarvot ja keskiarvon keskivirhe eri käsittelyissä runsaalla (BHI) ravinnealustalla. Lyhenteet G = glyfosaatti, GBH = glyfosaattipohjainen torjunta-aine (Roundup).

Taulukko 5. *Gilliamella*-bakteerikantojen T-testin tulokset koloniamäärien vertailussa eri käsittelyiden välillä runsaalla (BHI) ravinnealustalla.

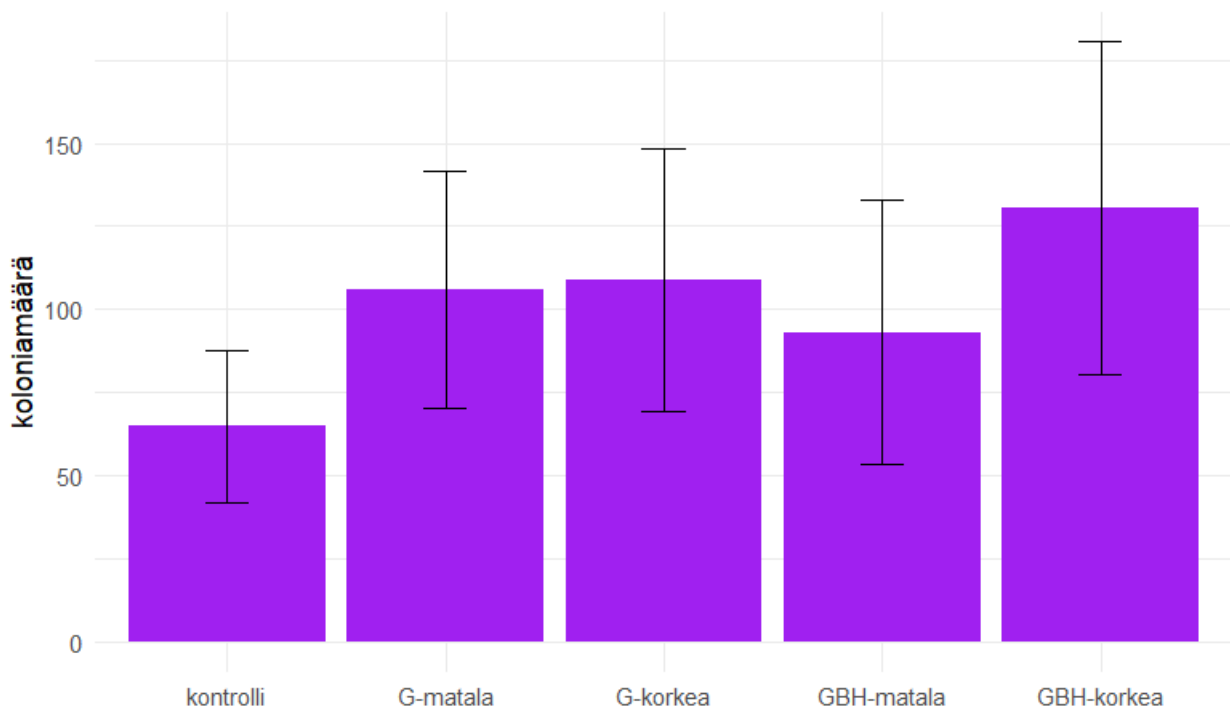
Verratut käsittelyt		<i>t</i>	<i>df</i>	<i>p</i>
kontrolli	G-matala	1,9251	9,582	0,0844
kontrolli	G-korkea	1,2441	7,8832	0,2492
kontrolli	GBH-matala	1,6978	9,9367	0,1206
kontrolli	GBH-korkea	1,2542	10,621	0,2367
G-matala	G-korkea	-0,1706	10,718	0,8677
GBH-matala	GBH-korkea	-0,4732	11,846	0,6447
G-matala	GBH-matala	0,2535	11,956	0,8042
G-korkea	GBH-korkea	0,38898	9,6771	0,7057

Vaikka kolonioiden määrä oli G- ja GBH-käsittelyissä keskimäärin suurempi kuin kontrollissa, viiden bakteerikannan osalta kontrollimaljoilla koloniat olivat kooltaan suurempia kuin G- ja GBH-käsittelyissä (Kuva 7).



Kuva 7. *Gilliamella*-kannan G1\_5\_6 bakteerikasvatukset runsaalla (BHI) ravinnealustalla. (a) kontrolli, (b) G-matala, (c) G-korkea, (d) GBH-matala ja (e) GBH-korkea.

*Snodgrassella*-kantojen kolonioiden muodostuminen kesti 5–7 vuorokautta, mutta bakteerit kasvoivat nopeammin G- ja GBH-käsittelyissä kuin kontrollimaljalla. Lisäksi kolonioiden määrä oli keskimäärin suurempi G- ja GBH-käsittelyissä verrattuna kontrolliin (Kuva 8, Liite 6). Kolonioita esiintyi keskimäärin eniten GBH-korkea-käsittelyssä, mutta hajonta oli suurta otoskoolla  $n=5$  (Liite 5). Tilastollisesti merkitsevää eroa kontrollin ja eri käsittelyjen tai G- ja GBH-käsittelyiden välillä tai pitoisuusriippuvaista tilastollisesti merkitsevää eroa en havainnut (Taulukko 6).



Kuva 8. *Snodgrassella*-kantojen herkkyytestauksen (n = 5) koloniamäärien keskiarvo ja keskiarvon keskivirhe eri käsittelyissä runsaalla (BHI) ravinnealustalla.

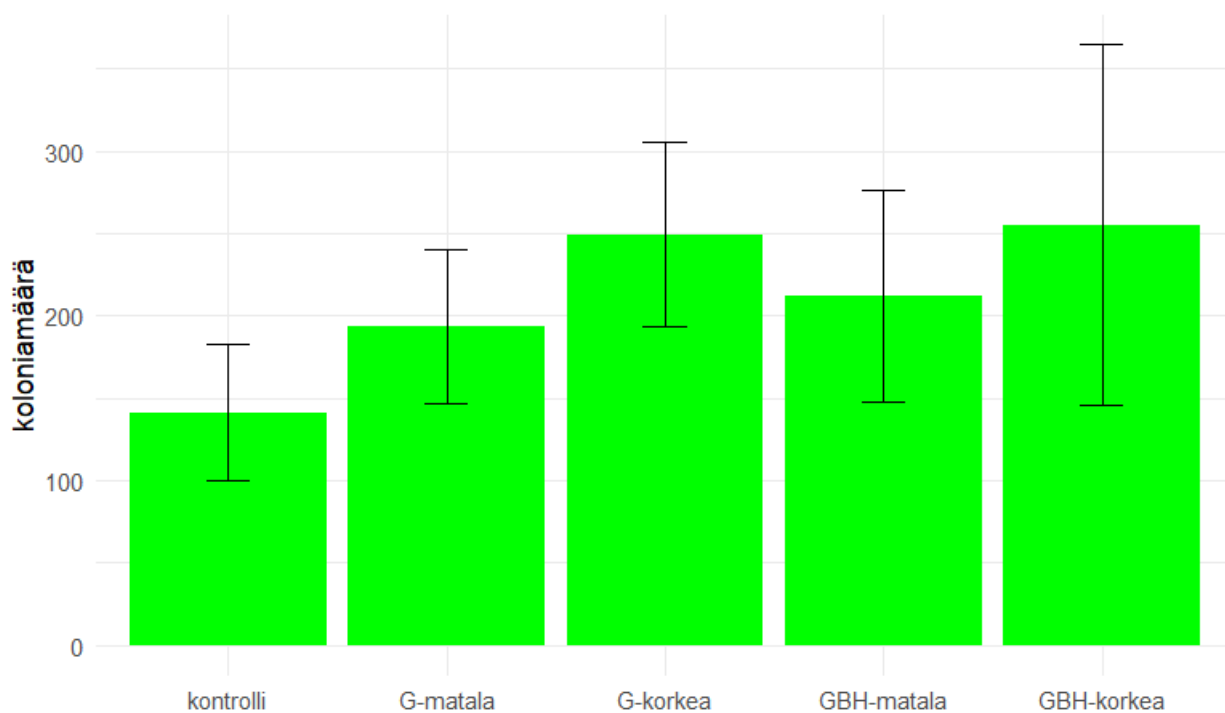
Taulukko 6. *Snodgrassella*-bakteerikantojen T-testin tulokset koloniamäärien vertailussa eri käsittelyiden välillä runsaalla (BHI) ravinnealustalla.

Verratut käsittelyt		<i>t</i>	<i>df</i>	<i>p</i>
kontrolli	G-matala	0,9702	6,8235	0,3651
kontrolli	G-korkea	0,9604	6,4119	0,3717
kontrolli	GBH-matala	0,6147	6,4053	0,5599
kontrolli	GBH-korkea	1,192	5,6144	0,2812
G-matala	G-korkea	0,0527	7,9145	0,9595
GBH-matala	GBH-korkea	0,5856	7,6094	0,5751
G-matala	GBH-matala	0,2434	7,9117	0,8139
G-korkea	GBH-korkea	-0,3384	7,604	0,7442

S2\_5\_5- ja S2\_4\_8-kannoilla kolonioiden koko oli suurempi G- ja GBH-käsittelyssä, mutta kannat suljettiin kuitenkin pois tulosten tarkastelusta kolonioiden alhaisen määrän vuoksi. Muilla bakteerikannoilla ei kolonioiden koossa ollut havaittavissa eroa eri käsittelyiden ja kontrollin välillä. S1\_1\_1-kannalla havaitsin ainakin neljä ulkonäöltään epäsäännöllistä koloniaa GBH-korkeamaljalla, mutta muut koloniat olivat säännöllisen pyöreitä. S1\_1\_1 oli tunnistettu kuitenkin uudelleen

olevan *Snodgrassella* (Taulukko 4). Bakteerikanta S1\_4\_11 oli tunnistettu alkujaan olevan *Snodgrassella* ja myöhemmässä analyysissä *Gilliamella*, joten se suljettiin tulosten tarkastelusta pois, sillä kyseessä oli todennäköisesti sekaviiljelmä. Bakteerikannat S2\_2\_2 ja S2\_2\_4 eivät muodostaneet bakteerikasvustoja käsittely- tai kontrollimaljoilla.

*Bacillus*-bakteerikannat kasvoivat jo yhdessä päivässä kaikissa käsittelyissä runsaalla ravinnealustalla. Kolonioiden määrä oli jälleen keskimäärin alhaisempi kontrollimaljoilla (n = 3) (Kuva 9). Korkeassa G- ja GBH-pitoisuudessa kolonioita oli keskimäärin eniten, mutta GBH-korkea käsittelyssä keskivirhe oli myös suurin. Toisaalta kolonioiden absoluuttisten määrien perusteella ei voida tällä otoskoolla sanoa glyfosaattipitoisuuden vaikutuksesta bakteerien kasvuun (Liite 5). Myöskään tilastollisesti merkitsevää eroa kontrollin ja eri käsittelyjen sekä glyfosaatti- ja GBH-käsittelyiden välillä tai pitoisuusriippuvaista tilastollisesti merkitsevää eroa ei havaittu (Taulukko 7).

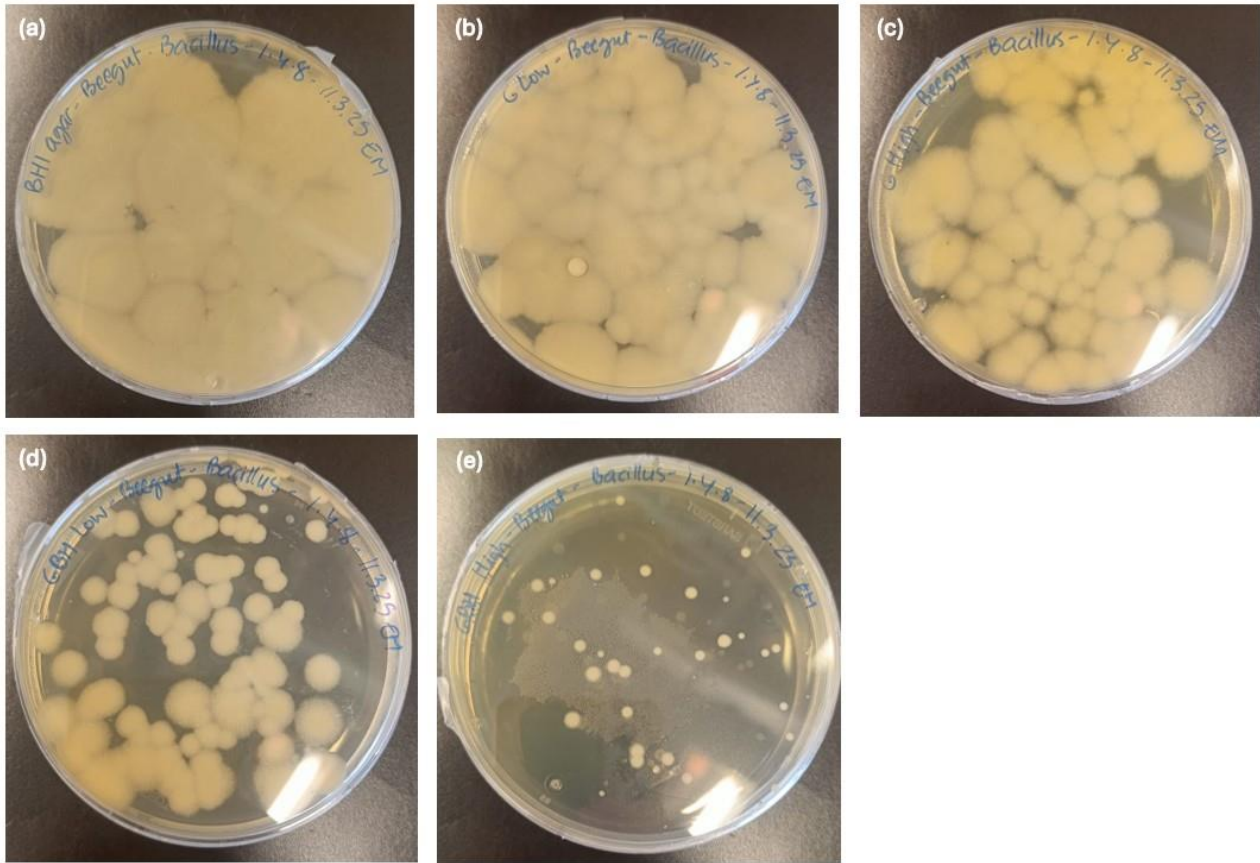


Kuva 9. *Bacillus*-bakteerikantojen herkkyytestauksen (n = 3) koloniamäärien keskiarvo ja keskiarvon keskivirhe eri käsittelyissä runsaalla (BHI) ravinnealustalla.

Taulukko 7. *Bacillus*-bakteerikantojen T-testin tulokset koloniamäärien vertailussa eri käsittelyiden välillä runsaalla (BHI) ravinnealustalla.

Verratut käsittelyt		<i>t</i>	<i>df</i>	<i>p</i>
kontrolli	G-matala	0,8302	3,9473	0,4537
kontrolli	G-korkea	1,5497	3,6985	0,2018
kontrolli	GBH-matala	0,925	3,4353	0,4152
kontrolli	GBH-korkea	0,9765	2,5714	0,4115
G-matala	G-korkea	0,7685	3,8801	0,4863
GBH-matala	GBH-korkea	0,3426	3,2327	0,753
G-matala	GBH-matala	-0,2354	3,6614	0,8265
G-korkea	GBH-korkea	-0,04896	2,9822	0,964

*Bacillus*-kannan kolonioiden koko oli suurin kontrollissa (Kuva 10). Kolonioiden koko oli myös pienempi GBH-käsittelyissä verrattuna kontrolliin ja glyfosaattikäsittelyihin. Koloniat olivat kontrollissa 10–100 kertaa suurempia kuin GBH-korkea-käsittelyssä. Havaittiin maljoilla jauhemaista rakennetta kolonioiden pinnalla. GBH-korkea-käsittelyn koloniat olivat kooltaan ja muodoltaan erilaisia, sillä maljoilla oli vain yksittäisiä pieniä kolonioita, joiden muoto oli säännöllisempi, eikä jauhemaista rakennetta kolonioiden pinnalla ollut silminnähden havaittavissa.



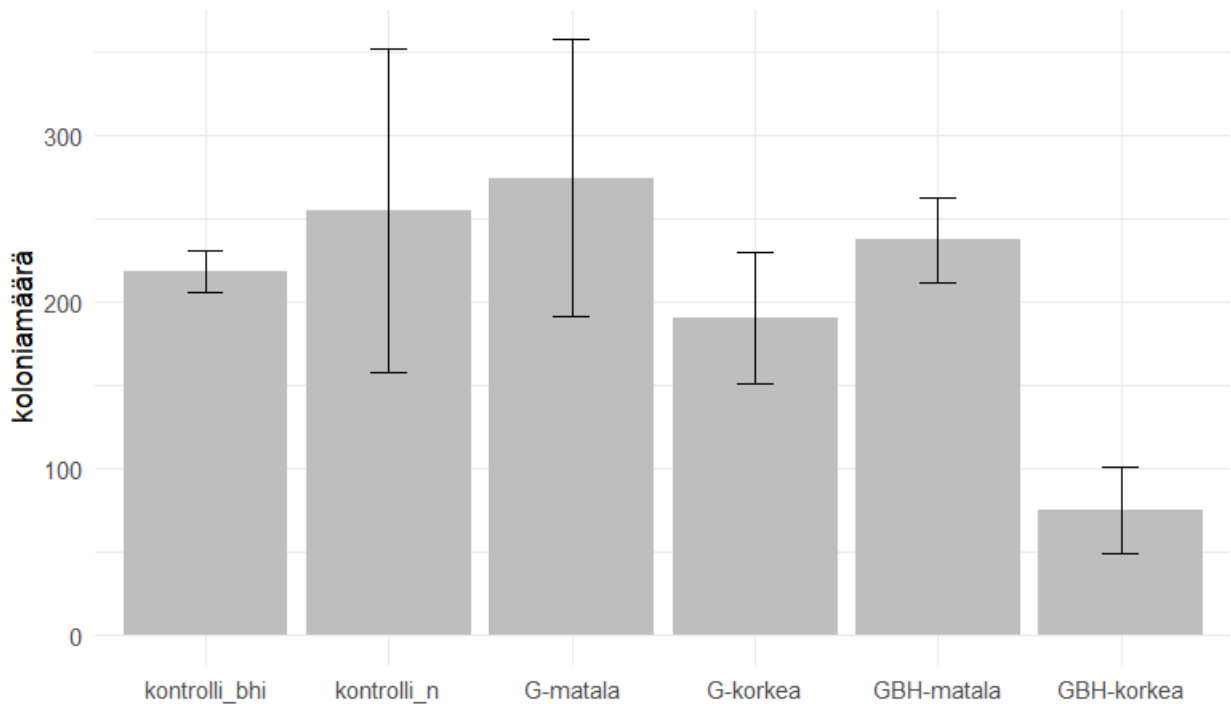
Kuva 10. *Bacillus*-kannan B1\_4\_8 kasvatustulos runsaalla (BHI) ravinnealustalla. (a) kontrolli, (b) G-matala, (c) G-korkea, (d) GBH-matala ja (e) GBH-korkea.

### 3.5 Bakteerien glyfosaattiherkkyys niukalla ravinnealustalla

*Snodgrassella* ja *Gilliamella*-kolonioita ei muodostunut lainkaan niukoilla ravinnealustoilla 7 vuorokauden kasvatuksen aikana (Liite 6).

Vain *Bacillus*-kannat kasvoivat niukalla ravinnealustalla. Kolonioita muodostui sekä kontrollialustoilla (niukka ja runsas) että G- ja GBH-käsittelyissä jo 1–2 vuorokauden kasvatuksen jälkeen. Poikkeuksena oli GBH-korkea-käsittely, jossa kolonioita muodostui vasta 4–5 vuorokaudessa. Kolonioiden määrä oli keskimäärin pienin GBH-korkea-käsittelyssä (Kuva 11). Havaittiin tilastollisesti merkitsevän eron kolonioiden määrässä kontrollin (runsaat ravinnealusta) ja GBH-korkean välillä sekä GBH-matalan ja -korkean välillä (Taulukko 8). G-korkean ja GBH-korkean välillä ero oli suuntaa antava. Kolonioiden määrä oli keskimäärin suurin G-matala-käsittelyssä sekä kontrollissa (niukka ravinnealusta), mutta keskivirhe oli myös suuri (Liite 5). Kontrollissa (runsaat ravinnealusta) koloniat olivat kooltaan suurimpia verrattuna kontrolliin ja G- ja GBH-käsittelyihin niukalla alustalla (Kuva 12). Poikkeuksena oli bakteerikantojen B1\_4\_6 G-

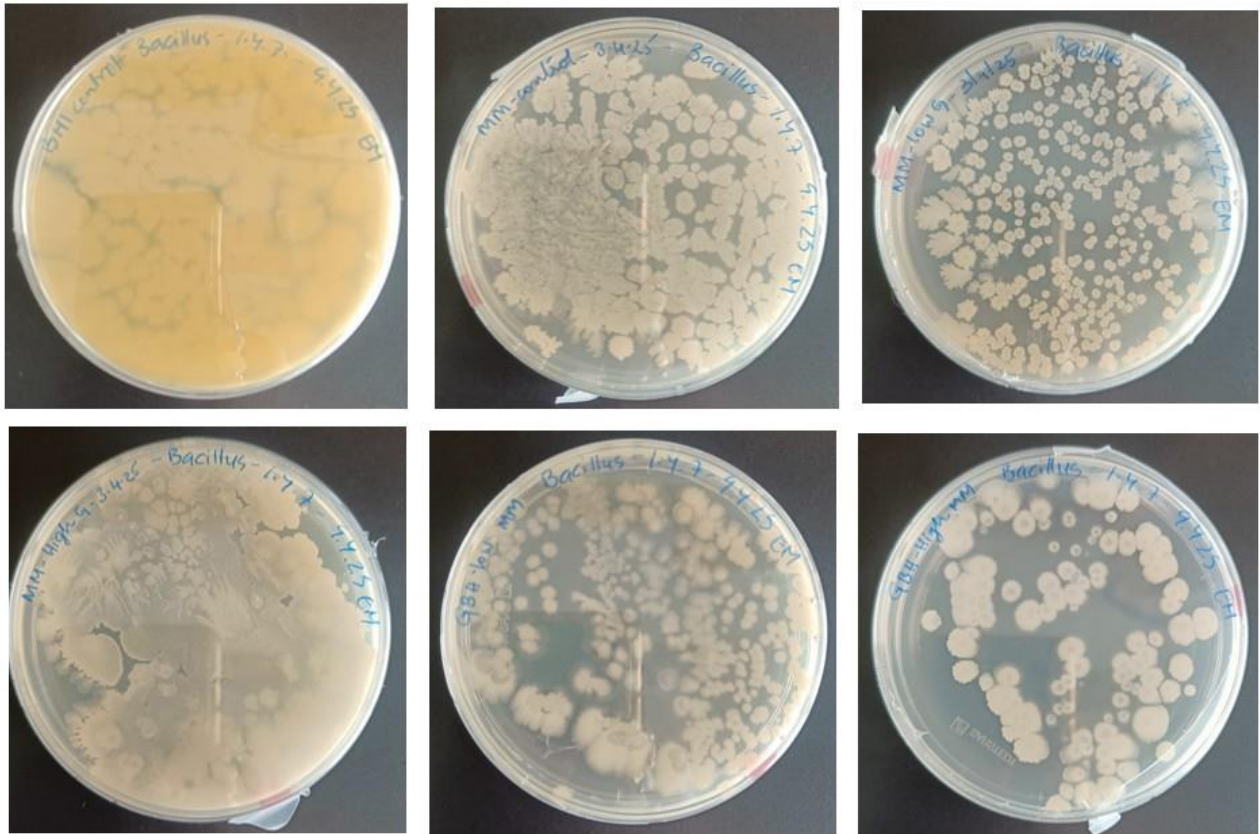
matala- ja B1\_4\_7 G-korkea-käsittelyt, joissa koloniat olivat samanlaisia. Kolonioiden muoto ja koko oli erilainen eri käsittelyissä. Kontrollissa runsaalla alustalla havaitsin kolonioiden pinnalla jauhemaista rakennetta, mutta vastaavaa rakennetta en havainnut silminnähdessä käsittelyissä niukalla ravinnealustalla.



Kuva 11. *Bacillus*-bakteerikantojen herkkyystestauksen (n = 3) koloniamäärien keskiarvo ja keskiarvon keskivirhe glyfosaatti- ja GBH-käsittelyissä sekä kontrollissa (kontrolli\_n) niukalla ravinnealustalla. Lisäksi koejärjestelyyn kuului kontrolli runsaalla BHI-ravinnealustalla (kontrolli\_bhi).

Taulukko 8. *Bacillus*-bakteerikantojen T-testin tulokset koloniamäärien vertailussa eri käsittelyiden välillä niukalla ravinnealustalla sekä kontrollissa runsaalla (BHI) ravinnealustalla. (kontrolli (runsaas) = kontrolli runsaalla ravinnealustalla, kontrolli (niukka) = kontrolli niukalla ravinnealustalla)

Verratut käsittelyt		<i>t</i>	<i>df</i>	<i>p</i>
kontrolli (runsaas)	kontrolli (niukka)	-0,3672	2,0684	0,7477
kontrolli (niukka)	G-matala	0,1565	3,9033	0,8834
kontrolli (niukka)	G-korkea	-0,6102	2,6381	0,5902
kontrolli (niukka)	GBH-matala	-0,1723	2,2792	0,8773
kontrolli (niukka)	GBH-korkea	-1,7866	2,2784	0,2003
kontrolli (runsaas)	G-matala	0,6673	2,094	0,5706
kontrolli (runsaas)	G-korkea	-0,6771	2,4134	0,5575
kontrolli (runsaas)	GBH-matala	0,6499	2,9211	0,5632
kontrolli (runsaas)	GBH-korkea	-5,009	2,9237	<b>0,0163</b>
G-matala	G-korkea	-0,9149	2,8567	0,4308
GBH-matala	GBH-korkea	-4,4611	4	<b>0,0112</b>
G-matala	GBH-matala	0,4298	2,3819	0,7032
G-korkea	GBH-korkea	2,4607	3,4443	0,0799



Kuva 12. *Bacillus*-kannan B1\_4\_7 kasvatukset kontrollissa runsaalla (BHI) ravinnealustalla (a) sekä niukoilla ravinnealustoilla (b) kontrolli (c) G-matala, (d) G-korkea, (e) GBH-matala ja (f) GBH-korkea.

## 4 Tulosten tarkastelu

Perustuen kimalaisten suolistobakteerien EPSPS-sekvenssiin bakteerien glyfosaattiherkkyys tutkittiin käyttäen EPSPSClass-työkalua. *Gilliamella* ja *Snodgrassella* olivat potentiaalisesti herkkiä kantoja, kun taas *Bacillus* potentiaalisesti resistentti. *Gilliamella*- ja *Snodgrassella*-bakteerikannat kasvoivat G (glyfosaatti)- ja GBH (glyfosaattipohjainen herbisidi)-käsittelyissä runsaalla ravinnealustalla vastoin hypoteesiani. Sen sijaan niukalla ravinnealustalla *Gilliamella* ja *Snodgrassella* eivät kasvaneet kontrolli-, G- tai GBH-käsittelyissä. *Bacillus*-kannat kasvoivat sekä niukalla että runsaalla ravinnealustalla.

Runsaalla ravinnealustalla kasvaneilla *Gilliamella*- ja *Snodgrassella*-bakteerisuvuilla ei havaittu tilastollisesti merkitsevää eroa kolonioiden määrässä eri käsittelyissä, vaikka G- ja GBH-käsittelyissä kolonioiden määrä oli keskimäärin suurempi verrattuna kontrolliin. *Gilliamella*-kannalla oli kolonioita kontrollimaljoilla vähemmän verrattuna G- ja GBH-käsittelyihin, mutta yksittäisten kolonioiden koko oli kontrollimaljalla suurempi, joten on mahdollista, että glyfosaatti rajoittaa EPSPS-proteiiniltaan herkkien bakteerien koon kasvua. Sen sijaan bakteerit voivat kasvaa runsaammin, jos niillä on jokin muu resistenssimekanismi glyfosaattia vastaan, kuten kyky hajottaa glyfosaattia. Näin ollen suuntaa antava ero *Gilliamella*-bakteerikantojen G-matala-käsittelyn ja kontrollin välillä voi kertoa siitä, että bakteerit hyötyvät pienestä pitoisuudesta glyfosaattia. Useilla mikrobeilla on havaittu olevan kyky hajottaa glyfosaattia ja käyttää muodostunutta fosfaattia ravinteiden lähteenä (Hove-Jensen ym. 2014).

*Snodgrassella* on myös EPSPS-sekvenssinsä mukaan potentiaalisesti glyfosaattiherkkä, mutta bakteerit kasvoivat nopeammin G- ja GBH-käsittelyissä ja lisäksi kolonioita oli niissä enemmän kuin kontrollissa. Voikin olla mahdollista, että myös *Snodgrassella*-kannalla on jokin muu resistenssimekanismi glyfosaatille, kuten bakteerien kyky hajottaa glyfosaattia. Toisaalta glyfosaatin ja GBH:n on aiemmin havaittu vähentävän yhden kimalaisen yleisimmän suolistobakteerin, *Snodgrassella alvin* määrää, kun kimalaisia on altistettu glyfosaatille tai GBH:lle (Helander ym. 2023). Tutkielmassani jää kuitenkin epäselväksi, mitä pidemmän ajan *in vitro* -altistus glyfosaatille ja GBH:lle tekee bakteerien runsaudelle. Lisäksi on tutkielmani tulosten osalta otettava huomioon, että bakteerien uudelleentunnistus tehtiin vain osalle bakteerikannoista, joista yksi tunnistettiin taksonomisesti eri ryhmään kuin alun perin, joten on mahdollista, että bakteerikannoissa oli myös muita sekaviljelmii. Bakteerikantojen koko genomia ei tutkittu EPSPS:n glyfosaattiherkkyyden

selvittämiseksi, vaan herkkyys ennustettiin yleisen tietokannan avulla. On siis mahdollista, että tässä tutkimuksessa käytettyjen bakteerikantojen EPSPS:t ovat herkkyydeltään erilaisia. Jos esimerkiksi kaupalliset kimalaiskannat ovat joskus altistuneet glyfosaatille, voi niille olla kehittynyt resistenssi glyfosaattia vastaan.

Yksikään *Gilliamella* ja *Snodgrassella*-bakteerikannoista ei kasvanut niukalla ravinnealustalla, mutta ne kasvoivat kontrollissa runsaalla ravinnealustalla, joten näyttää siltä, että bakteerit käyttävät hyväkseen runsaan ravinnealustan aminohappoja. Koska bakteerit eivät kasvaneet edes kontrollissa niukalla ravinnealustalla, jonka elatusaineessa ei ollut aminohappoja, ei tämän tutkimuksen perusteella voi tehdä johtopäätöksiä glyfosaatin vaikutuksista bakteerien shikimaattireittiin. Tulosten perusteella näyttää siltä, että glyfosaatti vaikutti bakteerien kasvuun runsaalla ravinnealustalla, mutta mekanismi jää vielä avoimeksi.

Osalla *Gilliamella*-kannoista oli GBH-käsittelyissä vähemmän kolonioita kuin glyfosaattikäsittelyissä. Tämä voi johtua GBH:n sisältämistä apuaineista, jotka voivat olla haitallisempia kuin puhdas glyfosaatti (Defarge ym. 2018, Mesnage ym. 2019). *Snodgrassella* kasvoi nopeammin ja voimakkaammin G- ja GBH-käsittelyissä. Lisäksi kolonioita oli keskimäärin eniten GBH-korkea-käsittelyssä. Yleisimpiä torjunta-aineiden sisältämiä apuaineita ovat surfaktantit, jotka auttavat aktiivista ainetta tunkeutumaan kasvin lehteen (Mesnage 2021, Straw ym. 2022). Surfaktantit alentavat pintajännitystä ja auttavat glyfosaattia tunkeutumaan kasvisolun solukalvon läpi (Mesnage, 2021). Koska surfaktantit voivat häiritä myös bakteerien solukalvoja (Silva ym. 2022, Brown & Jaffé 2001), on mahdollista, että GBH:n sisältämät surfaktantit voivat toimia samalla tavalla ja auttaa glyfosaattia tunkeutumaan bakteerisolun sisään. Mikäli bakteeri kykenee hajottamaan glyfosaattia, voi GBH-korkea-käsittelyssä suurempi pitoisuus glyfosaattia ja apuaineita tukea bakteerien kasvua. Apuaineiden vaikutusta bakteereihin olisi siis tutkittava lisää, mutta tutkimuksen kannalta haasteena on se, että GBH:n sisältämät apuaineet ovat vain valmistajien tiedossa olevia liikesalaisuuksia (Mesnage et al., 2019). Lisäksi eri apuaineiden yhteisvaikutukset pölyttäjiin ovat käytännössä tutkimaton alue, eikä torjunta-aineen valmistajalta vaadita apuaineiden pitkäaikaisia haittavaikutuksia mittaavia testejä (Helander ym. 2023, Mesnage ym. 2019). GBH:n on myös havaittu lisäävän kimalaisten kuolleisuutta korkeissa pitoisuuksissa (Kaakinen 2025).

*Bacillus* on potentiaalisesti glyfosaatille resistentti kanta ja hypoteesini mukaisesti glyfosaatti ei näyttänyt estävän sen kasvua, sillä kolonioita oli keskimäärin enemmän runsaalla ravinnealustalla G-matala- ja G-korkea-käsittelyissä verrattuna kontrolliin. Matalalla glyfosaattipitoisuudella G- ja

GBH-käsittelyissä ei ollut juuri vaikutusta bakteerien määrään niukalla ravinnealustalla. Sen sijaan suurempi vaikutus bakteerien kasvuun oli G- ja GBH-korkea-käsittelyissä. Tilastollisesti merkitsevä ero kolonioiden määrissä kontrollin (runsas) ja GBH-korkean (niukka) sekä GBH-matalan (niukka) ja GBH-korkean (niukka) välillä viittaa etenkin apunaineiden vaikutukseen. Näin ollen suurempi pitoisuus glyfosaattia ja apunaineita voi vaikuttaa bakteerien kasvuun heikentävästi. Vaikka runsaalla ravinnealustalla G ja GBH ei näyttäneet rajoittavan kolonioiden määrää, vaikuttivat ne heikentävästi bakteerien kokoon, sillä runsaalla ravinnealustalla kolonioiden koko oli suurin kontrollissa ja kymmeniä kertoja pienempi GBH-korkea-käsittelyssä. Lisäksi bakteerit kasvoivat hitaimmin GBH-korkea-käsittelyssä niukalla ravinnealustalla. Toisaalta vastaavaa eroa kolonioiden koossa ei ollut havaittavissa vertailtaessa eri käsittelyjä runsaalla ja niukalla ravinnealustalla, mutta edellä mainitut tulokset yhdessä viittaavat GBH:n haitallisiin vaikutuksiin bakteerien kasvuun.

*Bacillus*-kannan kolonioiden koko ja muoto vaihtelivat niukalla ravinnealustalla eri käsittelyissä. Havaitsin jauhemaista rakennetta kolonioiden pinnalla, paitsi GBH-korkea-käsittelyssä. *Bacillus*-suvun bakteerit voivat muodostaa endosporeja, jotka ovat bakteereja ulkoisilta stressitekijöiltä suojaavia rakenteita (McKenney ym. 2013). Vaikka tutkielmassani ei kerätty kvantitatiivista tietoa glyfosaatin ja GBH:n vaikutuksista bakteerien morfologiaan tai itiöiden muodostukseen, tarjoaa tutkielmani kysymyksen mielenkiintoiselle jatkotutkimukselle liittyen glyfosaatin ja GBH:n vaikutukseen näihin ominaisuuksiin.

Vaikka tutkimukseni aineiston otoskoot ovat pienet ja tilastollista merkitsevyyttä kolonioiden määrää verrattaessa eri käsittelyitä ei juurikaan havaittu, antavat tulokset kuitenkin aiheutta lisätutkimuksille erityisesti apuaineiden vaikutuksista bakteereihin sekä glyfosaatin ja GBH:n vaikutuksista bakteerien kasvuun, morfologiaan ja aineenvaihduntaan. On otettava myös huomioon, että shikimaattireitin lisäksi glyfosaatti voi vaikuttaa myös muihin aineenvaihduntareitteihin, esimerkiksi mitokondrioiden elektroninsiirtoketjuun (Gomes & Juneau, 2016). Jotta nähdään, tuleeko pidemmän ajan glyfosaatti- ja GBH-käsittelyjen tuloksena bakteereista herkkiä tai resistenttejä, tarvitaan pidemmän ajan altistus glyfosaatille ja GBH:lle toistettava käsitelyjen bakteerien viljely uusilla maljoilla glyfosaatti- ja GBH-käsittelyissä. Vaikka EPSPS:n aktiivinen kohta on korkeasti konservoitunut, voi glyfosaattiherkkyys muuttua esimerkiksi mutaatioiden aikaansaamien aktiivisen kohdan muutosten myötä (Rainio ym. 2021, Leino ym., 2021). Koska bakteerien glyfosaattiresistenssin syntymisen on havaittu olevan analoginen antibioottiresistenssin kanssa, voi glyfosaatin runsas käyttö johtaa myös monikemikaaliresistenssin syntymiseen (Rainio et al., 2021). Jotkin suolistobakteerit voivat

esimerkiksi auttaa kimalaista suojautumaan parasiiteilta (Koch & Schmid-Hempel 2011), mutta kimalaisilla toteutettuja tutkimuksia glyfosaatin ja GBH:n vaikutuksista on toistaiseksi vain vähän.

## **5 Kiitokset**

Kiitos erinomaisesta ohjauksesta ja tuesta ohjaajilleni Marjo Helanderille gradun kirjoittamisessa sekä Suni Mathewille laboratoriotöissä. Kiitos myös Jorma Nurmelle sekä Nina Arolle tärkeästä avusta lämpökaapin kanssa.

## Lähteet

- Balkhi, S. El, Dulaurent, S., & Saint-Marcoux, F. (2021). Analytical strategies to measure herbicide active ingredients and their metabolites. *Herbicides: Chemistry, Efficacy, Toxicology, and Environmental Impacts*, 113–141. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823674-1.00001-8>
- Belkaid, Y., & Harrison, O. J. (2017). Homeostatic Immunity and the Microbiota. In *Immunity* (Vol. 46, Issue 4, pp. 562–576). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.04.008>
- Böhme, F., Bischoff, G., Zebitz, C. P. W., Rosenkranz, P., & Wallner, K. (2018). Pesticide residue survey of pollen loads collected by honeybees (*Apis mellifera*) in daily intervals at three agricultural sites in South Germany. *PLOS ONE*, 13(7), e0199995. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0199995>
- Bote, K., Pöppe, J., Merle, R., Makarova, O., & Roesler, U. (2019). Minimum inhibitory concentration of glyphosate and of a glyphosate-containing herbicide formulation for *Escherichia coli* isolates - differences between pathogenic and non-pathogenic isolates and between host species. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY), 453181. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00932/BIBTEX>
- Brown, D. G., & Jaffé, P. R. (2001). Effects of nonionic surfactants on the UV/visible absorption of bacterial cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 74(6), 476–482. <https://doi.org/10.1002/BIT.1138>,
- Burchfield, S. L., Bailey, D. C., Todt, C. E., Denney, R. D., Negga, R., & Fitsanakis, V. A. (2019). Acute exposure to a glyphosate-containing herbicide formulation inhibits Complex II and increases hydrogen peroxide in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 66, 36–42. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2018.12.019>
- Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., & Séralini, G. E. (2018). Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. *Toxicology Reports*, 5, 156–163. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2017.12.025>
- Dicks, L. V., Breeze, T. D., Ngo, H. T., Senapathi, D., An, J., Aizen, M. A., Basu, P., Buchori, D., Galetto, L., Garibaldi, L. A., Gemmill-Herren, B., Howlett, B. G., Imperatriz-Fonseca, V. L., Johnson, S. D., Kovács-Hostyánszki, A., Kwon, Y. J., Lattorff, H. M. G., Lungharwo, T., Seymour, C. L., ... Potts, S. G. (2021). A global-scale expert assessment of drivers and risks associated with pollinator decline. *Nature Ecology and Evolution*, 5(10), 1453–1461. <https://doi.org/10.1038/S41559-021-01534-9>;SUBJMETA=158,2456,2458,631,670,672,704;KWRD=AGROECOLOGY,BIODIVERSITY,CONSERVATION+BIOLOGY,ECOSYSTEM+SERVICES
- Dill, G. M., Sammons, R. D., Feng, P. C. C., Kohn, F., Kretzmer, K., Mehrsheikh, A., Bleeke, M., Honegger, J. L., Farmer, D., Wright, D., & Hauptfear, E. A. (2010). GLYPHOSATE: DISCOVERY, DEVELOPMENT, APPLICATIONS, AND PROPERTIES [Bookitem]. In V. K. Nandula (Ed.), *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds* (pp. 1–33). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470634394.ch1>

- Eilers, E. J., Kremen, C., Greenleaf, S. S., Garber, A. K., & Klein, A. M. (2011). Contribution of Pollinator-Mediated Crops to Nutrients in the Human Food Supply. *PLOS ONE*, 6(6), e21363. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0021363>
- Gillezeau, C., Van Gerwen, M., Shaffer, R. M., Rana, I., Zhang, L., Sheppard, L., & Taioli, E. (2019). The evidence of human exposure to glyphosate: A review. In *Environmental Health: A Global Access Science Source* (Vol. 18, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12940-018-0435-5>
- Gomes, M. P., & Juneau, P. (2016). Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) induced by glyphosate: Is the mitochondrial electron transport chain a target of this herbicide? *Environmental Pollution*, 218, 402–409. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2016.07.019>
- Hammer, T. J., Le, E., Martin, A. N., & Moran, N. A. (2021). The gut microbiota of bumblebees [Article]. *Insectes Sociaux*, 68(4), 287–301. <https://doi.org/10.1007/s00040-021-00837-1>
- Helander, M., Jeevannavar, A., Kaakinen, K., Mathew, S. A., Saikkonen, K., Fuchs, B., Puigbò, P., Loukola, O. J., & Tamminen, M. (2023). Glyphosate and a glyphosate-based herbicide affect bumblebee gut microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*, 99(7). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiad065>
- Helander, M., Saloniemi, I., & Saikkonen, K. (2012). Glyphosate in northern ecosystems. In *Trends in Plant Science* (Vol. 17, Issue 10, pp. 569–574). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.008>
- Hertel, R., Gibhardt, J., Martienssen, M., Kuhn, R., & Commichau, F. M. (2021). Molecular mechanisms underlying glyphosate resistance in bacteria. In *Environmental Microbiology* (Vol. 23, Issue 6, pp. 2891–2905). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15534>
- Hove-Jensen, B., Zechel, D. L., & Jochimsen, B. (2014). Utilization of Glyphosate as Phosphate Source: Biochemistry and Genetics of Bacterial Carbon-Phosphorus Lyase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 78(1), 176. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-13>
- Huang, X., He, J., Yan, X., Hong, Q., Chen, K., He, Q., Zhang, L., Liu, X., Chuang, S., Li, S., & Jiang, J. (2017). Microbial catabolism of chemical herbicides: Microbial resources, metabolic pathways and catabolic genes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 143, 272–297. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2016.11.010>
- IPBES. (2016). Summary for policymakers of the thematic assessment on pollinators, pollination and food production Key messages Values of pollinators and pollination. *Biota Neotropica*, 16(1). <https://doi.org/10.1590/1676-0611201600010001>
- Jacob, G. S., Garbow, J. R., Hallas, L. E., Kimack, N. M., Kishore, G. M., & Schaefer, J. (1988). Metabolism of Glyphosate in *Pseudomonas* sp. Strain LBr. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 54, Issue 12). <https://journals.asm.org/journal/aem>
- Kaakinen, K. (2025). *THE IMPACTS OF GLYPHOSATE AND GLYPHOSATE-BASED HERBICIDES ON BUMBLEBEES*.
- Katumo, D. M., Liang, H., Ochola, A. C., Lv, M., Wang, Q. F., & Yang, C. F. (2022). Pollinator diversity benefits natural and agricultural ecosystems, environmental health, and human welfare. *Plant Diversity*, 44(5), 429. <https://doi.org/10.1016/J.PLD.2022.01.005>

- Klein, O., Roessink, I., Elston, C., Franke, L., Jütte, T., Knäbe, S., Lückmann, J., van der Steen, J., Allan, M. J., Alscher, A., Amsel, K., Cornement, M., Exeler, N., Guerola, J. S., Hodapp, B., Jenkins, C., Kimmel, S., & Tänzler, V. (2022). Results of Ring-Testing of a Semifield Study Design to Investigate Potential Impacts of Crop Protection Products on Bumblebees (Hymenoptera, Apidae) and a Proposal of a Potential Test Design. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *41*(10), 2548–2564.  
<https://doi.org/10.1002/ETC.5430>
- Koch, H., & Schmid-Hempel, P. (2011). Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(48), 19288–19292.  
[https://doi.org/10.1073/PNAS.1110474108/SUPPL\\_FILE/PNAS.201110474SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.1110474108/SUPPL_FILE/PNAS.201110474SI.PDF)
- Leino, L., Tall, T., Helander, M., Saloniemä, I., Saikkonen, K., Ruuskanen, S., & Puigbò, P. (2021). Classification of the glyphosate target enzyme (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) for assessing sensitivity of organisms to the herbicide. *Journal of Hazardous Materials*, *408*.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124556>
- Li, L., Solvi, C., Zhang, F., Qi, Z., Chittka, L., & Zhao, W. (2021). Gut microbiome drives individual memory variation in bumblebees. *Nature Communications* *2021 12:1*, *12*(1), 1–10.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-26833-4>
- Maggi, F., la Cecilia, D., Tang, F. H. M., & McBratney, A. (2020). The global environmental hazard of glyphosate use. *Science of The Total Environment*, *717*, 137167.  
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.137167>
- McKenney, P. T., Driks, A., & Eichenberger, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat [Article]. *Nature Reviews. Microbiology*, *11*(1), 33–44.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>
- Mesnager, R. (2021). Coformulants in commercial herbicides. In *Herbicides: Chemistry, Efficacy, Toxicology, and Environmental Impacts* (pp. 87–111). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823674-1.00010-9>
- Mesnager, R., Benbrook, C., & Antoniou, M. N. (2019). Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. *Food and Chemical Toxicology*, *128*, 137–145.  
<https://doi.org/10.1016/J.FCT.2019.03.053>
- Motta, E. V. S., & Moran, N. A. (2020). Impact of glyphosate on the honey bee gut microbiota: Effects of intensity, duration, and timing of exposure. *MSystems*, *5*(4), 20.  
<https://doi.org/10.1128/mSystems.00268-20>
- Motta, E. V. S., Raymann, K., & Moran, N. A. (2018). Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(41), 10305–10310.  
[https://doi.org/10.1073/PNAS.1803880115/SUPPL\\_FILE/PNAS.1803880115.SAPP.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.1803880115/SUPPL_FILE/PNAS.1803880115.SAPP.PDF)

- Ollerton, J., Winfree, R., & Tarrant, S. (2011). How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, *120*(3), 321–326. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0706.2010.18644.X>
- Patterson, E., Cryan, J. F., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., Dinan, T. G., & Stanton, C. (2014). Gut microbiota, the pharmabiotics they produce and host health. *Proceedings of the Nutrition Society*, *760*. <https://doi.org/10.1017/S0029665114001426>
- Peltotalo, P. (2010). Pölytysopas. *Suomen Mehiläishoitajain Liitto SML Ry*.
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., & Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, *25*(6), 345–353. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2010.01.007/ASSET/515F49CC-7BD6-44DD-B534-6F4C6C0F63EC/MAIN.ASSETS/GR1B3.JPG>
- Powell, E., Ratnayeke, N., & Moran, N. A. (2016). Strain diversity and host specificity in a specialized gut symbiont of honeybees and bumblebees [Article]. *Molecular Ecology*, *25*(18), 4461–4471. <https://doi.org/10.1111/mec.13787>
- Rainio, M. J., Ruuskanen, S., Helander, M., Saikkonen, K., Saloniemi, I., & Puigbò, P. (2021). Adaptation of bacteria to glyphosate: a microevolutionary perspective of the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Environmental Microbiology Reports*, *13*(3), 309–316. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12931>
- Reynier, E., & Rubin, E. (2025). *Glyphosate exposure and GM seed rollout unequally reduced perinatal health*. *121*. <https://doi.org/10.1073/pnas>
- Ritchie, H. (2021). How much of the world’s food production is dependent on pollinators? *Our World in Data*. <https://ourworldindata.org/pollinator-dependence>
- Ruuskanen, S., Fuchs, B., Nissinen, R., Puigbò, P., Rainio, M., Saikkonen, K., & Helander, M. (2023). Ecosystem consequences of herbicides: the role of microbiome. In *Trends in Ecology and Evolution* (Vol. 38, Issue 1, pp. 35–43). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2022.09.009>
- Schö, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W. A., Schloss, J. V., Amrhein, N., Evans, J. N. S., & Kabsch, W. (2001). *Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail*. [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)
- Silva, S. G., Pinheiro, M., Pereira, R., Dias, A. R., Ferraz, R., Prudêncio, C., Eaton, P. J., Reis, S., & do Vale, M. L. C. (2022). Serine-based surfactants as effective antimicrobial agents against multiresistant bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1864*(9), 183969. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2022.183969>
- Staub, J. M., Brand, L., Tran, M., Kong, Y., & Rogers, S. G. (2012). Bacterial glyphosate resistance conferred by overexpression of an E. coli membrane eZux transporter. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *39*(4), 641–647. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1057-x>
- Straw, E. A., Thompson, L. J., Leadbeater, E., & Brown, M. J. F. (2022). Inert ingredients are understudied, potentially dangerous to bees and deserve more research attention. *Proceedings of the Royal Society B:*

*Biological Sciences*, 289(1970).

<https://doi.org/10.1098/RSPB.2021.2353;WGROU:STRING:PUBLICATION>

Székács, A. (2021). Herbicide mode of action. In *Herbicides: Chemistry, Efficacy, Toxicology, and Environmental Impacts* (pp. 41–86). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823674-1.00008-0>

Tieteen termipankki. (2025). *Biologia:fakultatiivinen – Tieteen termipankki*.

<https://tieteentermipankki.fi/wiki/Biologia:fakultatiivinen>

Turvallisuus- ja kemikaalivirasto [Tukes]. (2023). *Glyfosaatti hyväksytään uudelleen kymmeneksi vuodeksi | Turvallisuus- ja kemikaalivirasto (Tukes)*. <https://tukes.fi/-/glyfosaatti-hyvakysytaan-uudelleen-kymmeneksi-vuodeksi>

van Bruggen, A. H. C., Finckh, M. R., He, M., Ritsema, C. J., Harkes, P., Knuth, D., & Geissen, V. (2021). Indirect Effects of the Herbicide Glyphosate on Plant, Animal and Human Health Through its Effects on Microbial Communities. *Frontiers in Environmental Science*, 9, 763917.

<https://doi.org/10.3389/FENVS.2021.763917/PDF>

Walsh, L., Hill, C., & Ross, R. P. (2023). Impact of glyphosate (Roundup™) on the composition and functionality of the gut microbiome. In *Gut Microbes* (Vol. 15, Issue 2). Taylor and Francis Ltd.

<https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2263935>

Winters, J. F. M., Foldager, L., Krogh, U., Nørskov, N. P., & Sørensen, M. T. (2023). Impact of glyphosate residues in sow diets on neonatal piglets: tail kinks, stillborn and diarrhoea. *Livestock Science*, 269, 105172. <https://doi.org/10.1016/J.LIVSCI.2023.105172>

## **Liitteet**

### **Liite 1. Liuosten ja elatusaineiden valmistus**

#### **BHI-kasvatusalustojen (runsas ravinnealusta) valmistus**

Kasvatuslustoiksi valmistin BHI (brain heart infusion agar) -maljoja. Litraa ultrapuhdasta vettä (MilliQ) kohden sekoitettiin 52 g BHI agar -jauhetta. Liuoksen pH säädettiin laimealla 1 M suolahapolla lukemaan 7,0–7,4 samalla sekoittaen. Liuos autoklaavattiin ja säilöttiin lämpökaapissa (55 °C), kunnes liuos kaadettiin petrimaljoille. BHI agar -maljat valmistettiin laminaarivirtauskaapissa, joka oli puhdistettu 70 % etanolilla. Jäähdytymisen jälkeen maljat varastoitiin aluksi huoneenlämmössä, jotta varmistuttiin, ettei maljat olleet kontaminoituneet. Viikon jälkeen maljat varastoitiin jääkappiin (+4 °C).

#### **BHI (Brain-Heart Infusion Broth) -liemen valmistus**

BHI-liuosta varten liuotettiin 37 g BHI-jauhetta litraan ultrapuhdasta vettä. Liuoksen pH säädettiin lukemaan 7,0–7,4 laimealla 1 M suolahapolla samalla sekoittaen, liuos autoklaavattiin ja säilöttiin jääkaapissa +4 °C.

#### **Niukkojen ravinnealustojen valmistus**

Niukkoja ravinnealustoja varten valmistettiin 1 M MgSO<sub>4</sub>-liuos, 40 % (w/v) glukoosiliuos sekä 1 M CaCl<sub>2</sub>-liuos steriiliin MilliQ-veteen, jonka jälkeen liuokset steriloitiin suodattamalla. Litraa elatusainetta kohden sekoitettiin 200 ml 5x M9 Minimal Salts (Sigma-Aldrich; Liquid microbial growth medium; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl, NH<sub>4</sub>Cl), 800 ml steriiliä MilliQ-vettä, 2 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>-liuosta, 0,1 ml 1 M CaCl<sub>2</sub>-liuosta sekä 10 ml 40 % (w/v) glukoosiliuosta ja liuos autoklaavattiin. Maljat valmistettiin laminaarivirtauskaapissa.

## Liite 2. Taksonomiseen tunnistuksen varmistukseen valittujen bakteerikantojen 16S rRNA-geenin osittaiset FASTA-sekvenssit

>1\_1\_3

```
CCCCACCTTCCTCCGCTTTATCAACGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGACC  
TAATCGATGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC  
CAACATTTTACAACACGAGCTGACAACGGCCATGCAGCACCTGTCTACA  
GTTCCCGAAGGCACTCTCGTATCTCTACAAGATTCTGTGGATGTCAAGAC  
CAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCT  
GGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTA  
CTC  
CCCAGGCGGTTCGATTTATCGCGTTAGCTTCGGAGCCCATCACTCTAGGCA
```

>2\_5\_4

```
TTCACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCC  
GAAGGCACTCTCGTATCTCTACAAGATTCTGTGGATGTCAAGACCAGGTA  
AGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCG  
GGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTA  
CTC  
CGGTTCGATTTATCGCGTTAGCTTCGGAGCCCATCACTCTAGGCAACAAAC  
TCCAAATCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGT  
TTGCTCCCCACGCTTTCGCATCTCAGCGTCAGTATCTGTCCAGAAGGCCG  
CCTTCGCCACCGGTATTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACG  
TGGAATTCTACCTTCCTCTACAATACTCTAGTTAACAGTTTTAAGTGCA
```

>1\_5\_6

```
TTCACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCC  
GAAGGCACTCTCGTATCTCTACAAGATTCTGTGGATGTCAAGACCAGGTA  
AGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCG  
GGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTA  
CTC  
CGGTTCGATTTATCGCGTTAGCTTCGGAGCCCATCACTCTAGGCAACAAAC  
TCCAAATCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGT  
TTGCTCCCCACGCTTTCGCATCTCAGCGTCAGTATCTGTCCAGAAGGCCG  
CCTTCGCCACCGGTATTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACG
```

>1\_4\_11

```
TGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATT  
TCACAACACGAGCTGACAACGGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTCCCG  
AAGGCACTCTCGTATCTCTACAAGATTCTGTGGATGTCAAAACCAGGTAA
```

GGTTCTTCGCGTTGCATCAAATTAACCACATGCTCCACCGCTGGTGCGG  
GCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGC  
GGTCGATTTATCGCGTTAGCTTCGGAGCCCATCACTCTAGGCAACAACT  
CCAAATCGACATCGTTTACAGCGTGA ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT  
TGCTCCCCACGCTTTCGCATCTCAGCGTCAGTATCTGTCCAGAAGGCCG

>1\_1\_1

CCTTCCTCCGTTTTGTCACCGGCAGTCTCATTAGAGTGCCCAACTTAATG  
ATGGCAACTAATGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT  
CTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTACGGTTCCC  
GAAGGCACTTTCCTATCTCTAAGAAATTCCGTACATGTCAAGACCAGGTA  
AGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCACATCATCCACCGCTTGTGCG  
GGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGG  
CGGACAATTTACGCGTTAGCTTCGCTACTAAGGTA ACTAGTACCCCAAC  
AGCTAATTGTCATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGT

>1\_4\_7

GCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACA  
TCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCC  
CGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGT  
AAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGC  
GGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAG  
GCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTA  
ACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT  
GTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGT  
CGCCTTCGCCACTGGTGTTCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACA

### Liite 3. R-koodi

```
#####Input data#####
#Gilliamella#
kontrolli <- c(17,27,42,11,25,3,10)
G_matala <- c(42,26,84,46,34,17,20)
G_korkea <- c(42, 38, 104, 25, 20,3, 19)
GBH_matala <- c(41,25,80,33,13,25,31)
GBH_korkea <- c(48,26,61,22,8,35,12)

group <- c(rep("kontrolli", 7), rep("G-matala", 7), rep("G-korkea", 7), rep("GBH-matala", 7), rep("GBH-
korkea", 7))
value <- c(kontrolli, G_matala, G_korkea, GBH_matala, GBH_korkea)
data <- data.frame(group, value)

#####T-test#####
t.test(value ~ group, data = subset(data, group %in% c("kontrolli", "G-matala")))
t.test(value ~ group, data = subset(data, group %in% c("kontrolli", "G-korkea")))
t.test(value ~ group, data = subset(data, group %in% c("kontrolli", "GBH-matala")))
t.test(value ~ group, data = subset(data, group %in% c("kontrolli", "GBH-korkea")))
t.test(value ~ group, data = subset(data, group %in% c("G-matala", "G-korkea")))
t.test(value ~ group, data = subset(data, group %in% c("GBH-matala", "GBH-korkea")))
t.test(value ~ group, data = subset(data, group %in% c("G-matala", "GBH-matala")))
t.test(value ~ group, data = subset(data, group %in% c("G-korkea", "GBH-korkea")))

install.packages("dplyr")
install.packages("ggplot2")

library(dplyr)
library(ggplot2)

# Keskiarvo, keskihajonta ja keskivirhe Gilliamella
summary_stats <- data %>%
  group_by(group) %>%
  summarise(mean = mean(value),
            sd = sd(value),
            se = sd / sqrt(n()))
```

```

# Muuta arvojen järjestys
summary_stats$group <- factor(summary_stats$group, levels = c("kontrolli", "G-matala", "G-korkea",
"GBH-matala", "GBH-korkea"))

# Pylväskaavio Gilliamella
ggplot(summary_stats, aes(x = group, y = mean)) +
  geom_bar(stat = "identity", fill = "skyblue") +
  geom_errorbar(aes(ymin = mean - se, ymax = mean + se), width = 0.2) +
  labs(title = "Mean ± SE by Group", y = "Mean Value") +
  theme_minimal()

#Snodgrassella#
kontrolli_s <- c(65,33,139,83,4)
G_matala_s <- c(76,74,220,148,12)
G_korkea_s <- c(106,56,245,127,10)
GBH_matala_s <- c(66,41,236,114,8)
GBH_korkea_s <- c(79,63,260,239,11)

group_s <- c(rep("kontrolli", 5), rep("G-matala", 5), rep("G-korkea", 5), rep("GBH-matala", 5), rep("GBH-
korkea", 5))
value_s <- c(kontrolli_s, G_matala_s, G_korkea_s, GBH_matala_s, GBH_korkea_s)

data_s <- data.frame(group_s, value_s)

#####T-test#####
t.test(value_s ~ group_s, data = subset(data_s, group_s %in% c("kontrolli", "G-matala")))
t.test(value_s ~ group_s, data = subset(data_s, group_s %in% c("kontrolli", "G-korkea")))
t.test(value_s ~ group_s, data = subset(data_s, group_s %in% c("kontrolli", "GBH-matala")))
t.test(value_s ~ group_s, data = subset(data_s, group_s %in% c("kontrolli", "GBH-korkea")))
t.test(value_s ~ group_s, data = subset(data_s, group_s %in% c("G-matala", "G-korkea")))
t.test(value_s ~ group_s, data = subset(data_s, group_s %in% c("GBH-matala", "GBH-korkea")))
t.test(value_s ~ group_s, data = subset(data_s, group_s %in% c("G-matala", "GBH-matala")))
t.test(value_s ~ group_s, data = subset(data_s, group_s %in% c("G-korkea", "GBH-korkea")))

# Keskiarvo, keskihajonta ja keskivirhe Snodgrassella

```

```

summary_stats_s <- data_s %>%
  group_by(group_s) %>%
  summarise(mean = mean(value_s),
            sd = sd(value_s),
            se = sd / sqrt(n()))

# Muuta arvojen järjestys
summary_stats_s$group_s <- factor(summary_stats_s$group_s, levels = c("kontrolli", "G-matala", "G-
korkea", "GBH-matala", "GBH-korkea"))

# Pylväskuvaaja Snodgrassella
ggplot(summary_stats_s, aes(x = group_s, y = mean)) +
  geom_bar(stat = "identity", fill = "purple") +
  geom_errorbar(aes(ymin = mean - se, ymax = mean + se), width = 0.2) +
  labs(title = "Mean ± SE by Group", y = "Mean Value") +
  theme_minimal()

#Bacillus#
kontrolli_b <- c(216,136,72)
G_matala_b <- c(284,168,128)
G_korkea_b <- c(324,284,140)
GBH_matala_b <- c(280,272,84)
GBH_korkea_b <- c(348,380,38)

group_b <- c(rep("kontrolli", 3), rep("G-matala", 3), rep("G-korkea", 3), rep("GBH-matala", 3), rep("GBH-
korkea", 3))
value_b <- c(kontrolli_b, G_matala_b, G_korkea_b, GBH_matala_b, GBH_korkea_b)

data_b <- data.frame(group_b, value_b)

#####T-test#####
t.test(value_b ~ group_b, data = subset(data_b, group_b %in% c("kontrolli", "G-matala")))
t.test(value_b ~ group_b, data = subset(data_b, group_b %in% c("kontrolli", "G-korkea")))
t.test(value_b ~ group_b, data = subset(data_b, group_b %in% c("kontrolli", "GBH-matala")))
t.test(value_b ~ group_b, data = subset(data_b, group_b %in% c("kontrolli", "GBH-korkea")))

```

```

t.test(value_b ~ group_b, data = subset(data_b, group_b %in% c("G-matala", "G-korkea")))
t.test(value_b ~ group_b, data = subset(data_b, group_b %in% c("GBH-matala", "GBH-korkea")))
t.test(value_b ~ group_b, data = subset(data_b, group_b %in% c("G-matala", "GBH-matala")))
t.test(value_b ~ group_b, data = subset(data_b, group_b %in% c("G-korkea", "GBH-korkea")))

# Keskiarvo, keskihajonta ja keskivirhe Bacillus
summary_stats_b <- data_b %>%
  group_by(group_b) %>%
  summarise(mean = mean(value_b),
            sd = sd(value_b),
            se = sd / sqrt(n()))

# Muuta järjestystä
summary_stats_b$group_b <- factor(summary_stats_b$group_b, levels = c("kontrolli", "G-matala", "G-
korkea", "GBH-matala", "GBH-korkea"))

# Pylväskuvaaja Bacillus
ggplot(summary_stats_b, aes(x = group_b, y = mean)) +
  geom_bar(stat = "identity", fill = "green") +
  geom_errorbar(aes(ymin = mean - se, ymax = mean + se), width = 0.2) +
  labs(title = "Mean ± SE by Group", y = "Mean Value") +
  theme_minimal()

#Bacillus niukka ravinnealusta#
kontrolli_bhi_b <- c(196,240,220)
kontrolli_n_b <- c(140,176,448)
G_matala_n_b <- c(120,404,300)
G_korkea_n_b <- c(232,112,228)
GBH_matala_n_b <- c(220,204,288)
GBH_korkea_n_b <- c(37,124,64)

group_b_n <- c(rep("kontrolli_bhi", 3), rep("kontrolli_n", 3), rep("G-matala", 3), rep("G-korkea", 3),
rep("GBH-matala", 3), rep("GBH-korkea", 3))
value_b_n <- c(kontrolli_bhi_b, kontrolli_n_b, G_matala_n_b, G_korkea_n_b, GBH_matala_n_b,
GBH_korkea_n_b)

data_b_n <- data.frame(group_b_n, value_b_n)

```

```
#####T-test#####
```

```
t.test(value_b_n ~ group_b_n, data = subset(data_b_n, group_b_n %in% c("kontrolli_bhi", "kontrolli_n")))
t.test(value_b_n ~ group_b_n, data = subset(data_b_n, group_b_n %in% c("kontrolli_n", "G-matala")))
t.test(value_b_n ~ group_b_n, data = subset(data_b_n, group_b_n %in% c("kontrolli_n", "G-korkea")))
t.test(value_b_n ~ group_b_n, data = subset(data_b_n, group_b_n %in% c("kontrolli_n", "GBH-matala")))
t.test(value_b_n ~ group_b_n, data = subset(data_b_n, group_b_n %in% c("kontrolli_n", "GBH-korkea")))
t.test(value_b_n ~ group_b_n, data = subset(data_b_n, group_b_n %in% c("kontrolli_bhi", "G-matala")))
t.test(value_b_n ~ group_b_n, data = subset(data_b_n, group_b_n %in% c("kontrolli_bhi", "G-korkea")))
t.test(value_b_n ~ group_b_n, data = subset(data_b_n, group_b_n %in% c("kontrolli_bhi", "GBH-matala")))
t.test(value_b_n ~ group_b_n, data = subset(data_b_n, group_b_n %in% c("kontrolli_bhi", "GBH-korkea")))
t.test(value_b_n ~ group_b_n, data = subset(data_b_n, group_b_n %in% c("G-matala", "G-korkea")))
t.test(value_b_n ~ group_b_n, data = subset(data_b_n, group_b_n %in% c("GBH-matala", "GBH-korkea")))
t.test(value_b_n ~ group_b_n, data = subset(data_b_n, group_b_n %in% c("G-matala", "GBH-matala")))
t.test(value_b_n ~ group_b_n, data = subset(data_b_n, group_b_n %in% c("G-korkea", "GBH-korkea")))
```

```
# Keskiarvo, keskihajonta ja keskivirhe Bacillus
```

```
summary_stats_b_n <- data_b_n %>%
  group_by(group_b_n) %>%
  summarise(mean = mean(value_b_n),
            sd = sd(value_b_n),
            se = sd / sqrt(n()))
```

```
# Muuta järjestystä
```

```
summary_stats_b_n$group_b_n <- factor(summary_stats_b_n$group_b_n, levels = c("kontrolli_bhi",
"kontrolli_n", "G-matala", "G-korkea", "GBH-matala", "GBH-korkea"))
```

```
# Pylväskuvaaja Bacillus
```

```
ggplot(summary_stats_b_n, aes(x = group_b_n, y = mean)) +
  geom_bar(stat = "identity", fill = "grey") +
  geom_errorbar(aes(ymin = mean - se, ymax = mean + se), width = 0.2) +
  labs(title = "Mean ± SE by Group", y = "koloniamäärä") +
  theme_minimal()
```

**Liite 4. Esimerkkejä bakteerikantojen EPSPS:n proteiinisekvenssien viitteistä sekä sekvenssien samankaltaisuusasteet verrattuna EPSPS-luokkien konservoituneisiin EPSPS:n aktiivisen kohdan aminohapposekvensseihin.**

NCBI-sekvenssin referenssi EPSPS:lle	Luokka I $\alpha$	Luokka II $\beta$	Luokka II	Luokka III	Luokka IV
<i>Gilliamella</i>					
WP_034901977.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella apis]	1	1	0.579	0.459(0/18)	0.233
WP_065634935.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. wkB292]	1	1	0.579	0.454(0/18)	0.233
WP_086363777.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. A7]	1	1	0.579	0.459(0/18)	0.233
WP_143421817.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella mensalis]	1	1	0.579	0.454(0/18)	0.233
WP_160401187.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. Pras54]	1	1	0.579	0.443(0/18)	0.233
WP_160402549.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. Pass95]	1	1	0.579	0.454(0/18)	0.233
WP_160431022.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. Pass25]	1	1	0.579	0.459(0/18)	0.233
WP_167349184.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella intestini]	1	1	0.579	0.449(0/18)	0.233
WP_174796018.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. ESL0250]	1	1	0.579	0.454(0/18)	0.233
WP_174799370.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. ESL0232]	1	1	0.605	0.438(0/18)	0.233
WP_176700809.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. Fer4-1]	1	1	0.579	0.438(0/18)	0.233

WP_202112857.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. Lep-s21]	1	1	0.605	0.443(0/18)	0.233
WP_218837099.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. wkB171]	1	1	0.579	0.454(0/18)	0.233
WP_218837384.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. wkB308]	1	1	0.579	0.454(0/18)	0.233
WP_220216882.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. ESL0441]	1	1	0.579	0.454(0/18)	0.233
WP_220219283.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. ESL0405]	1	1	0.579	0.449(0/18)	0.233
WP_220224909.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. ESL0443]	1	1	0.579	0.454(0/18)	0.233
WP_222102528.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella apicola]	1	1	0.579	0.454(0/18)	0.233
WP_267335875.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. B2923]	1	1	0.579	0.443(0/18)	0.233
WP_267352669.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. B3482]	1	1	0.579	0.454(0/18)	0.233
WP_267355121.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. B2840]	1	1	0.579	0.459(0/18)	0.233
WP_267356975.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. B2889]	1	1	0.579	0.454(0/18)	0.233
WP_267360210.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. B2717]	1	1	0.579	0.432(0/18)	0.233
WP_267361881.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. B2772]	1	1	0.579	0.454(0/18)	0.233
WP_267373398.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. B3172]	1	1	0.579	0.443(0/18)	0.233

WP_367274770.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. W8145]	1	1	0.579	0.459(0/18)	0.267
WP_370516491.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. Pras60]	1	1	0.579	0.443(0/18)	0.233
WP_370519410.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. Pass27]	1	1	0.579	0.449(0/18)	0.233
WP_370528042.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. M0320]	1	1	0.579	0.459(0/18)	0.233
WP_370545667.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. W8128]	1	1	0.579	0.459(0/18)	0.233
WP_370547583.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. W8126]	1	1	0.579	0.459(0/18)	0.267
QYN42356.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. ESL0443]	1	1	0.579	0.454(0/18)	0.233
QYN44072.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. ESL0441]	1	1	0.579	0.454(0/18)	0.233
QYN46496.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. ESL0405]	1	1	0.579	0.449(0/18)	0.233
WDM18256.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. B3022]	1	1	0.579	0.459(0/18)	0.233
WP_034912942.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. Imp1-1]	1	1	0.605	0.454(0/18)	0.233
WP_034943165.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. wkB18]	1	1	0.605	0.449(0/18)	0.233

WP_065556844.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. wkB178]	1	1	0.579	0.449(0/18)	0.233
WP_065561943.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. wkB195]	1	1	0.579	0.454(0/18)	0.233
WP_065565161.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. wkB112]	1	1	0.579	0.443(0/18)	0.233
WP_065575233.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. GillExp13]	1	1	0.605	0.454(0/18)	0.233
WP_065585618.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. Choc6-1]	1	1	0.579	0.443(0/18)	0.2
WP_065607479.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. Occ3-1]	1	1	0.605	0.443(0/18)	0.233
WP_065608805.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. Occ4-3]	1	1	0.605	0.443(0/18)	0.233
WP_065626050.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. Bif1-4]	1	1	0.605	0.454(0/18)	0.233
WP_065636614.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. Choc5-1]	1	1	0.579	0.443(0/18)	0.233
WP_065638910.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. App6-5]	1	1	0.579	0.449(0/18)	0.233
WP_065653191.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. Nev6-6]	1	1	0.579	0.438(0/18)	0.233
WP_065734568.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. wkB72]	1	1	0.579	0.449(0/18)	0.233

WP_065737368.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. wkB7]	1	1	0.579	0.459(0/18)	0.233
WP_075508619.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. App2-1]	1	1	0.605	0.449(0/18)	0.233
WP_141674400.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. wkB108]	1	1	0.579	0.454(0/18)	0.233
WP_141674885.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Gilliamella sp. App4-10]	1	1	0.605	0.449(0/18)	0.233
<b><i>Snodgrassella</i></b>					
PCL21450.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Snodgrassella alvi]	1	1	0.579	0.459(0/18)	0.267
WMY92834.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Snodgrassella communis]	1	1	0.579	0.432(0/18)	0.233
WP_066568349.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Snodgrassella sp. CFCC 13594]	1	1	0.526	0.459(0/18)	0.267
WP_174828688.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Snodgrassella sp. ESL0253]	1	1	0.605	0.443(0/18)	0.233
WP_174830186.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Snodgrassella sp. ESL0304]	1	1	0.579	0.459(0/18)	0.267
WP_174831275.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Snodgrassella sp. ESL0324]	1	1	0.579	0.459(0/18)	0.267
WP_174833474.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Snodgrassella sp. ESL0323]	1	1	0.579	0.422(0/18)	0.233
WP_198186103.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Snodgrassella sp. M0351]	1	1	0.579	0.459(0/18)	0.267

WP_198190048.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Snodgrassella sp. W8124]	1	1	0.579	0.465(0/18)	0.267
WP_198209172.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Snodgrassella sp. W8132]	1	1	0.579	0.459(0/18)	0.267
WP_198224402.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Snodgrassella sp. W8158]	1	1	0.579	0.459(0/18)	0.267
WP_239323712.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Snodgrassella gandavensis]	1	1	0.605	0.454(0/18)	0.233
WP_267375547.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Snodgrassella sp. B3882]	1	1	0.5	0.443(0/18)	0.267
WP_267390455.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Snodgrassella sp. B3088]	1	1	0.605	0.443(0/18)	0.233
WP_267403413.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Snodgrassella sp. B3837]	1	1	0.605	0.443(0/18)	0.233
WP_267407890.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Snodgrassella sp. B3800]	1	1	0.605	0.443(0/18)	0.233
<b>Bacillus</b>					
AOC91498.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Bacillus amyloliquefaciens]	0.08	0.111	0.053	0.059(0/18)	0
ABS74438.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Bacillus velezensis FZB42]	0.8	0.833	1	0.341(0/18)	0.167
QYM81124.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Bacillus sp. 7D3]	0.8	0.833	1	0.341(0/18)	0.167
QJW63319.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [Bacillus amyloliquefaciens]	0.8	0.833	1	0.341(0/18)	0.167

ARZ58488.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [ <i>Bacillus velezensis</i> ]	0.8	0.833	1	0.341(0/18)	0.167
QBQ48866.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [ <i>Brevundimonas naejangsanensis</i> ]	0.8	0.889	1	0.373(0/18)	0.333
AWG38086.1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase [ <i>Bacillus velezensis</i> ]	0.8	0.833	1	0.341(0/18)	0.167

**Liite 5. Lasketut kolonioiden (CFU) määrät runsailla ja niukoilla ravinnealustoilla.**

*Gilliamella*-bakteerikantojen muodostamien kolonioiden määrät runsaalla ravinnelustalla.

Bakteerikanta	kontrolli	G-matala	G-korkea	GBH-matala	GBH-korkea
G1_3_1	17	42	42	41	48
G2_2_1	27	26	38	25	26
G1_3_4	42	84	104	80	61
G1_5_6	11	46	25	33	22
G1_1_6	25	34	20	13	8
G1_1_2	3	17	3	25	35
G2_1_6	10	20	19	31	12

*Snodgrassella*-bakteerikantojen muodostamien kolonioiden määrät runsaalla ravinnelustalla.

Bakteerikanta	kontrolli	G-matala	G-korkea	GBH-matala	GBH-korkea
S1_5_3	65	76	106	66	79
S2_3_8	33	74	56	41	63
S2_3_6	139	220	245	236	260
S1_1_1	83	148	127	114	239
S2_4_6	4	12	10	8	11

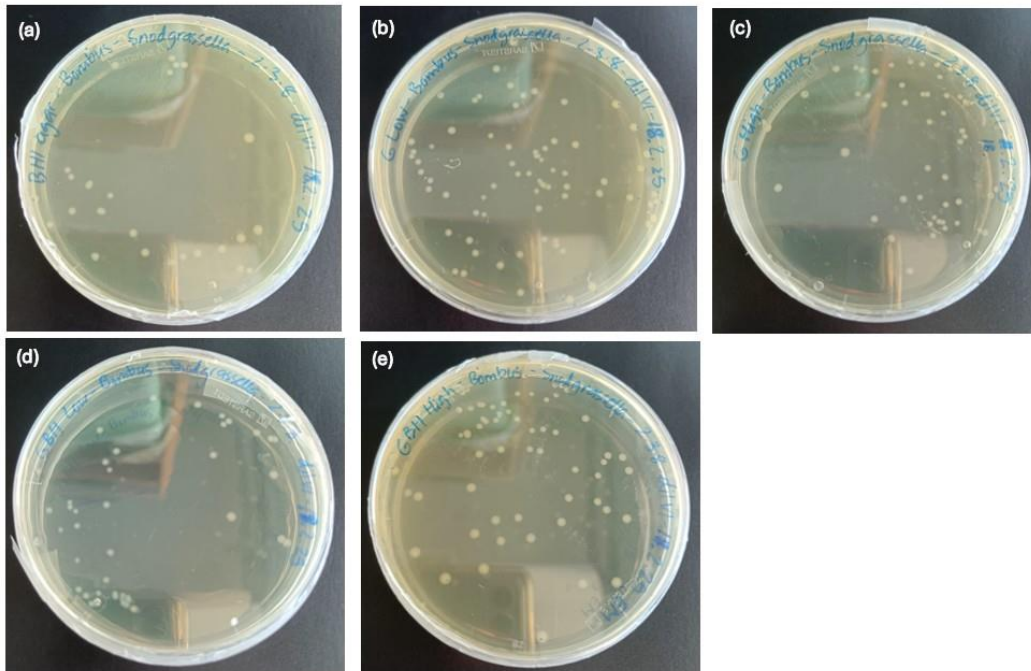
*Bacillus*-bakteerikantojen muodostamien kolonioiden määrät runsaalla ravinnelustalla.

Bakteerikanta	kontrolli	G-matala	G-korkea	GBH-matala	GBH-korkea
B1_4_6	216	284	324	280	348
B1_4_7	136	168	284	272	380
B1_4_8	72	128	140	84	38

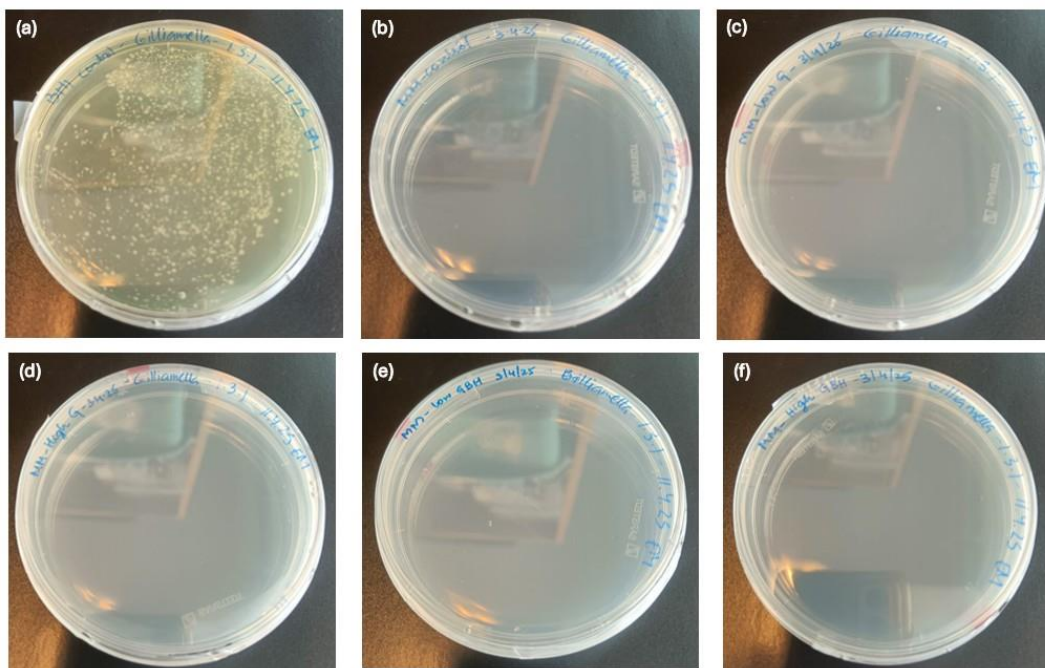
*Bacillus*-bakteerikantojen muodostamien kolonioiden määrät niukalla ravinnelustalla eri G- ja GBH-käsittelyissä sekä kontrollissa niukalla ja runsaalla ravinnealustalla.

Bakteerikanta	kontrolli (runsas)	kontrolli (niukka)	G-matala	G-korkea	GBH-matala	GBH-korkea
B1_4_6	196	140	120	232	220	37
B1_4_7	240	176	404	112	204	124
B1_4_8	220	448	300	228	288	64

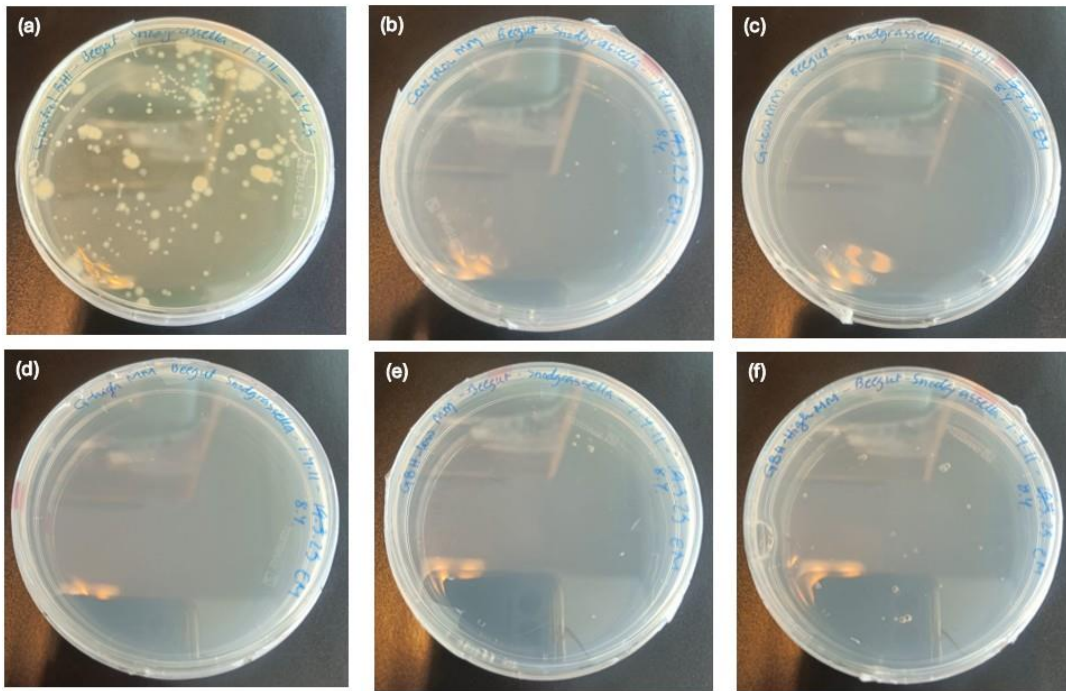
**Liite 6. Bakteerikannan S2\_3\_8 kasvatukset runsaalla ravinnealustalla sekä bakteerikantojen G1\_3\_1 ja S1\_4\_11 kasvatukset niukalla ravinnealustalla.**



*Snodgrassella*-kannan S2\_3\_8 kasvatukset runsaalla (BHI) ravinnealustalla. (a) kontrolli, (b) G-matala, (c) G-korkea, (d) GBH-matala ja (e) GBH-korkea.



*Gilliamella*-kannan G1\_3\_1 kasvatukset kontrollissa runsaalla (BHI) ravinnealustalla (a) sekä niukoilla ravinnealustalla (b) kontrolli (c) G-matala, (d) G-korkea, (e) GBH-matala ja (f) GBH-korkea.



*Snodgrassella*-kannan S1\_4\_11 kasvatukset kontrollissa runsaalla (BHI) ravinnealustalla (a) sekä niukoilla ravinnealustalla (b) kontrolli (c) G-matala, (d) G-korkea, (e) GBH-matala ja (f) GBH-korkea.