

Pro Gradu –tutkielma

**Ravintoresurssin ajallisen vaihtelun vaikutus saaliin
(*Serratia marcescens* -bakteeri) ja pedon (*Tetrahymena
thermophila* -alkueläin) evolutiiviseen ja ekologiseen
dynamiikkaan**

Maija Koivu



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Ekologia ja ympäristöhoito

23.3.2010

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Ekologia ja ympäristöhoito

KOIVU, MAIJA: Ravinto resurssin ajallisen vaihtelun vaikutus saaliin (*Serratia marcescens*) ja pedon (*Tetrahymena thermophila*) ekologiseen ja evolutiiviseen dynamiikkaan

Pro Gradu -tutkielma: 22 s.

Työn ohjaajat: Dos. Jouni Laakso, Tohtori Ville Friman

Tarkastajat: Prof. Janne Kotiaho, Prof. Mikko Mönkkönen

Maaliskuu 2010

Hakusanat: evoluutio, kilpailu, puolustautuminen, ravintoresurssin ajallinen vaihtelu, *Serratia marcescens*, *Tetrahymena thermophila*, trade-off

TIIVISTELMÄ

Resurssit ovat yksi tärkeimmistä eliöiden evoluutioon vaikuttavista ympäristötekijöistä. Esimerkiksi eliöiden kyky kilpailla ja puolustautua voivat kehittyä erilailla ravintoympäristöstä ja sen muutoksista riippuen: hyvä resurssisaatavuus voi mahdollistaa kalliisiin puolustusominaisuuksiin allokoimisen, kun taas resurssien puute voi estää saaliin puolustusominaisuuksien evoluution. Tutkin saalistuksen ja ympäristön vaihtelun vaikutusta faktoriaalisessa mikrokosmos kokeessa, jossa saalisbakteereita (*Serratia marcescens*) kasvatettiin joko yksin (kontrollit) tai yhdessä alkueläinpedon (*Tetrahymena thermophila*) kanssa vakaassa tai vaihtelevassa ravintoresurssiympäristössä 8 viikon ajan. Petojen suhteellinen osuus ja saalistuspaine vaihtelivat enemmän ajallisesti vaihtelevassa ravintoympäristössä. Saalistus lisäsi bakteerien puolustusta kontroleihin verrattuna, mutta eri ravintoympäristöillä ei ollut vaikutusta pedon kanssa eläneen saaliin puolustuksen voimakkuuteen. On mahdollista, että puolustuksesta aiheutuva allokaatiokustannus ei ollut tarpeeksi suuri rajoittaakseen saalisbakteerin kasvua. Vaihtoehtoisesti ravinnon ajallinen vaihtelu ei ollut tarpeeksi voimakasta aiheuttaakseen bakteereille vähäresurssisia olosuhteita, jolloin bakteerit olisivat joutuneet puolustautumaan kasvun kustannuksella. Yksinään kasvaneet saaliit saavuttivat suurimmat populaatiokoot vaihtelevassa ravintoympäristössä ja tämän johdosta myös petojen populaatiokoot olivat suuremmat ajallisesti vaihtelevassa resurssiympäristössä. Myös petojen suhteellinen osuus oli suurempi ajallisesti vaihtelevassa ravintoympäristössä. Ero petojen suhteellisessa osuudessa eri ympäristöjen välillä kuitenkin kapeni kokeen loppupuolella. Tämä saattoi johtua siitä, että pedot eivät pystyneet hyödyntämään ravintobakteereitaan enää yhtä tehokkaasti kokeen lopussa. Petojen suhteellisen osuuden kapenemisen eri ympäristöjen välillä voisi selittää sillä, että saaliit puolustautuivat tehokkaammin vaihtelevassa resurssiympäristössä tuottamalla saalistuksenkestävää biofilmiä. Tämä koe osoitti, että resurssisaatavuuden ajallinen vaihtelu voi siirtyä peto-saalissuhteen kannanvaihteluiden dynamiikkaan. Lisäksi eliöiden vuorovaikutuksissa saattaa tapahtua nopeita evolutiivisia muutoksia, joilla saattaa olla iso merkitys eliöiden väliselle ekologiselle dynamiikalle.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Science

Department of Ecological and Environmental Science

KOIVU, MAIJA: The effect of temporal resource fluctuations on the evolutionary and ecological dynamics between prey (*Serratia marcescens* bacterium) and predator (*Tetrahymena thermophila* protozoan)

Master of Science Thesis: 22 p

Supervisors: Docent Jouni Laakso, Dr Ville Friman

Inspectors: Prof. Janne Kotiaho, Prof. Mikko Mönkkönen

March 2010

Key Words: competition, defence, evolution, *Serratia marcescens*, temporal resource fluctuations, *Tetrahymena thermophila*, trade-off

ABSTRACT

Resources are one of the most important factors affecting the evolution of organisms. For example, organisms' ability to compete and defend can evolve differently depending on the concentration and variability of the resource environment: in a good resource environment organisms can allocate resources to costly defence but shortage of resources can prevent the evolution of defence traits. I studied the effect of predation and resource fluctuation in factorial microcosm experiment where prey bacteria (*Serratia marcescens*) evolved alone (controls) or with predatory protozoa (*Tetrahymena thermophila*) in a constant and temporally varying resource environments total of eight weeks. Predator-to-prey ratio and predation pressure varied more in a temporally varying prey resource environment. Predation increased variation in prey defensive ability. However, no difference in the strength of prey defence was observed between the environments when measured as prey growth in the presence of predator. It is possible that the cost of defence was not high enough to reduce the growth of defending prey bacteria. Alternatively, the temporal variation in resources might not have been strong enough to create resource-limited conditions where bacteria would have been able to defend only on the expense of the reduced growth ability. Temporal variation in prey resources increased the prey population densities in the absence of predators and consequently the predators reached higher biomasses in the temporally varying prey resource environment. Also predator-to-prey ratio was higher in a temporally varying prey resource environment. However this difference converged between resource environments towards the end of the experiment. It is possible that the predators were not able to use prey as effectively as their food resource in the end compared to beginning of the experiment. The converging of predator-to-prey ratio between the resource environments could be explained by the fact that prey defended better in temporally varying resource environment by forming predation resistant biofilm. This study showed that temporal variation in resource availability can transfer to population dynamics of predator-prey interaction. Moreover the rapid evolutionary changes on the species level can have a profound influence on the ecological dynamics between the organisms.

Sisältö

1. JOHDANTO.....	5
2. AINEISTO JA MENETELMÄT.....	8
2.1. Tutkimuslajit.....	8
2.1.1. Peto.....	8
2.1.2 Saalis.....	8
2.2 Kasvatusliuokset.....	8
2.3 Mikrokosmokset.....	9
2.4 Kokeenperustaminen.....	9
2.5 Koeasetelma.....	9
2.6 Viikoittaiset mittaukset.....	11
2.6.1 Bakteerien pakastus.....	11
2.6.2 Bakteerien populaatiokoon määrittäminen.....	11
2.6.3 Alkueläimen populaatiokoon määrittäminen.....	11
2.6.4 Bakteerien erottaminen alkueläimistä.....	12
2.6.5 Alkueläinten erottaminen bakteereista.....	12
2.6.6 Bakteerien elinkierto-ominaisuuksien mittaukset.....	12
2.6.7 Aineiston analysointi.....	13
3. TULOKSET.....	13
3.1 Populaatiodynamiikka.....	13
3.2 Evoluutiiviset muutokset saaliin puolustuksessa, kasvukyvyyssä ja biofilmin muodostuksessa.....	13
3.3 Saaliin elinkierto-ominaisuuksien vaihtelevuus.....	14
4. TULOSTEN TARKASTELU.....	14
Kiitokset.....	20
Kirjallisuus.....	20

1. JOHDANTO

Peto ja saalispopulaatioiden on tyypillisesti ajateltu koostuvan yksilöistä, jotka eivät muutu nopeasti ajassa evoluution seurauksena (Johnson & Agrawal 2003). Lajien evolutiivisten muutoksien on sittemmin havaittu tapahtuvan hyvinkin nopeasti ja vuorovaikuttavan populaatiokokojen vaihteluiden kanssa (E.B. Ford 1949; Bohannan & Lenski 1999; Yoshida ym. 2003; Hairston ym. 2005). Peto-saalissuhteen evolutiivisen ja ekologisen dynamiikan kokeellinen tutkimus onkin saanut viime vuosikymmenellä osakseen valtavaa kiinnostusta ja varsinkin mikrobeilla tehdyn kokeellisen työn tulokset ovat vieneet ekologian teoriaa eteenpäin (Buckling & Rainey 2002; Johnson & Agrawal 2003; Yoshida ym. 2003; Matz & Kjelleberg 2005; Yoshida ym. 2007; Friman ym. 2008). Siitä ei kuitenkaan ole vielä selvyyttä, miten evoluutio ja kannanvaihtelut vuorovaikuttavat vaihtelevissa ympäristöissä, joten tarve tämänkaltaiselle tutkimukselle on suuri.

Tutkimuksia siitä kumpi, saalis vai saalistaja, aiheuttaa suuremman evolutiivisen vasteen toiselle on lukuisia. Osa tutkijoista (Endler 1986a,b; Reznick ym. 1990) pitää petojen kehittymistä saaliille haitallisemmiksi todennäköisempänä. Todisteita saaliin kehittymisestä paremmin pedoilta suojautuvaksi löytyy kuitenkin huomattavasti enemmän (Bakker 1983; Abrams 1986; Vermeij 1987, 1994). Esimerkiksi useat akvaattisten bakteereiden fenotyyppiset piirteet on tulkittu sopeutumiksi, jotka ovat kehittyneet suojaksi protistien saalistukselta. Nopea liikkumiskyky (Matz & Jürgens 2005), solun pienentyminen (Boenigk ym. 2004), myrkkyjen tuottaminen (Matz ym. 2004) ja biofilmin muodostus (bakteeripopulaation kasvu tiiviinä muodostelmana pinnoille kiinnittyneenä), esim. Matz & Kjelleberg (2005), ovat esimerkkejä piirteistä, jotka ovat kehittyneet vastaamaan protistien saalistukselta selviytymiseen. Joissakin bakteerikannoissa esiintyy myös huomattavaa fenotyyppistä joustavuutta erilaisissa kasvuympäristöissä. Näyttäisikin ilmeiseltä, että tällaiset morfologiset muutokset voivat olla seurausta petojen lähettämistä ulkoisista, kemiallisista viesteistä (Pernthaler 2005). Koevoluution näkökulmasta peto ja saalis voivat myös kehittyä vastavuoroisesti keskinäisessä kilpajuoksussa: pedot valikoivat saalislajeissa ominaisuuksia, jotka parantavat sen mahdollisuuksia selvitä hengissä saalistukselta, ja peto taas kehittyi tehokkaammaksi saalistajaksi vasteena saaliin parantuneisiin suojamekanismeihin (Hanski ym. 1998; Bohannan & Lenski 1999; Buckling & Rainey 2002). Kaikki kolme edellä mainittua evolutiivista vaihtoehtoa ovat siis mahdollisia, mutta eniten kokeellista todistusaineistoa löytyy saaliin evoluutiosta (Abrams 2000).

Resurssit ovat yksi tärkeimmistä eliöiden evoluutioon vaikuttavista ympäristötekijöistä ja niillä voi olla huomattavia vaikutuksia peto-saalissuhteen ekologiseen ja evolutiiviseen dynamiikkaan (Bohannan & Lenski 1999; Abrams 2000). Hyvässä resurssiympäristössä saaliin ja pedon populaatiokoot voivat kasvaa, jolloin myös lajien mutaatiofrekvenssi sekä kohtaamistiheys ovat suuremmat (Hochberg & Holt 1995). Hyvässä ravintoympäristössä eliöillä on varaa allokoida resursseja useaan eri tarkoitukseen tai piirteeseen, mikä ei ehkä huonossa ravintoympäristössä ole mahdollista (Yoshida ym. 2004). Eliöiden piirteet saattavat näin ollen kehittyä erilailla ravintoympäristöstä ja sen muutoksista riippuen. Esimerkiksi Friman ym. (2008) havaitsivat kokeessaan, että matalassa ravintopitoisuudessa bakteerien puolustus kehittyi heikommaksi ja aiheutti bakteerien kantokyvyn pienentymisen eli puolustautumisesta oli saaliille evolutiivinen allokatiokustannus (Trade-off). Yoshida ym. (2004) kasvattivat leväpopulaatiota usean sukupolven ajan sekä pedon, *Brachionus calyciflorus* -rataseläimen kanssa tai ilman, ja arvioivat tämän jälkeen levien puolustus- ja kilpailukykyä. Saalistukselle alttiina olleet levät puolustautuivat paremmin, mikä näkyi pedon huonompana kasvuna niihin petoihin verrattuna, jotka olivat kasvaneet kokeen aikana kokemattomien levien kanssa.

Saalistukselle alttiina olleilla levillä oli kuitenkin pienentynyt kilpailukyky, mikä näkyi heikompana kasvuna ravintorajoitteisessa ympäristössä. Saalistukselle altistettujen levien solukoko oli myös pienempi (Yoshida ym. 2004). Teoria ja kokeet (Bohannan & Lenski 1999; Abrams 2000; Yoshida ym. 2004; Friman ym. 2008; Lopez-Pascua & Buckling 2008) puoltavat ajatusta, että alhaisessa ravintoympäristössä puolustukseen allokoiminen vähentäisi saaliin kilpailukykyä, mutta korkeassa ravintotasossa saalis pystyisi allokoimaan resursseja molempiin. Saaliin puolustuskyvyn evoluutio saattaa riippua ravinnon saatavuudesta ja sen vaihtelusta; hyvässä ravintoympäristössä on mahdollista puolustautua paremmin, kun taas ravintotilanteen ollessa huono, saaliit eivät pysty välttämättä allokoimaan energiaa yhtä tehokkaasti puolustukseen.

Lajien välisten vuorovaikutusten lisäksi myös luonnonolosuhteet vaihtelevat paljon jo lyhyenkin ajan sisällä, mikä vaikuttaa populaatioiden kokoihin ja vaihteluihin esimerkiksi syntyvyyden ja kuolevuuden kautta. Esimerkiksi saaliin ravintoresurssin ajallinen vaihtelu voi johtaa selektioympäristöjen ajalliseen vaihteluun, jossa puolustukseen allokoidaan silloin, kun ravintoa on runsaasti saatavilla ja kilpailuun silloin, kun ravintoa on niukasti. Valinta fluktuoivassa ympäristössä voi siksi johtaa kahden eri saalis genotyypin vuorotteluun, jotka eroavat kyvyssä puolustautua ja kilpailla (Yoshida ym. 2003; Yoshida ym. 2007) tai generalisti saalistyypin evoluutioon, joka pystyy puolustautumaan ja kilpailemaan tehokkaasti samaan aikaan (Fututyama & Moreno 1988; Reboud & Bell 1997; Kassen & Bell 1998; Kassen 2002). Toisaalta voi olla yleisempää, että tasaisessa ravintoympäristössä valinnan kohteena ovat ne piirteet, jotka takaavat parhaan mahdollisen kelpoisuuden kyseisessä ympäristössä (spesialistien evoluutio) (Fututyama & Moreno 1988; Kassen 2002). Ravintoresurssin ajallinen vaihtelu voi myös vaikuttaa peto-saalisuhteen evoluutioon lisäämällä vaihtelunmäärää populaatioitiheyksissä. Tämä voi edelleen johtaa vaihteluun valinnanvoimakkuudessa (Luckinbill & Fenton 1978; Drake & Lodge 2004; Becks ym. 2005). Esimerkiksi vaihtelu petotiheyksissä voi johtaa saaliin puolustukseen kohdistuvan valinnan ajalliseen vaihteluun (Levins 1968; Hairston & Dillon 1990; Yoshida ym. 2003; Yoshida ym. 2007). Tästä syystä on mahdollista, että saaliin puolustuksen evoluutio on todennäköisempää tasaisessa ravintoympäristössä, jossa petopaine vaihtelee vähemmän ja ravinnon tasainen saatavuus kattaa puolustuksen aiheuttamat allokaatiokustannukset (Holt ym. 1994; Leibold 1996; Bohannan & Lenski 2000; Bohannan ym. 2002; Lopez-Pascua & Buckling 2008; Friman ym. 2008; Hall ym. 2008).

Saaliin puolustuksen evoluutiolla ja muiden sen kelpoisuuteen vaikuttavien tekijöiden välisellä allokaatiokustannuksella voi olla huomattavia laadullisia ja määrällisiä vaikutuksia mikrobien ekologiseen dynamiikkaan. Ekologit ovat esimerkiksi jo pitkään kiistelleet siitä, kummat tekijät ovat tärkeämpiä saalispopulaatioiden säätelyssä; saaliin resurssien määrä (bottom up -säätely) vai petojen saalistus (top-down -säätely) (mm. Hairston ym. 1960; Murdoch 1966). Syötäväksi kelpaamattomien yksilöiden esiintyminen saalispopulaatioissa näyttäisi heikentävän top-down -säätelyn voimaa ja lisäävän bottom-up -säätelyn suhteellista tärkeyttä (Leibold 1989; Abrams 1993; Leibold; 1996). Joissakin tapauksissa on todettu, että esim. leväpopulaatiot ovat pääasiassa top-down -säädelyjä, kun ne ovat syötävyydeltään varsin homogeenisia. Silloin kuin leväpopulaation syötävyys on heterogeenisempää, ne ovat taas yleensä bottom-up -säädelyjä (McCauley ym. 1988). Top-down -säätelyn heikkeneminen näyttäisi johtuvan siitä, että heterogeenisemmässä saalispopulaatioissa syötäväksi kelpaamattomat saaliit voivat reagoida määrällisesti resurssien lisääntymiseen ja paeta puolustusominaisuuksissa tapahtuneen evoluution avulla saalistusta. Homogeenisemmässä saalispopulaatioissa populaation säätelystä vastaavat myös pedot, jotka pystyvät käyttämään koko saalispopulaatiota ravintonaan (Bohannan & Lenski 1999).

Eliöiden ja niiden abioottisen ympäristön väliset monimutkaiset vuorovaikutussuhteet ja epäsäännöllisesti vaihteleva ympäristö asettavat kokeellisen tutkimuksen tekemiselle luonnossa monia vaikeuksia. Mikrobeilla tehtävät kokeet kuitenkin mahdollistavat peto-saalisdynamiikan tutkimisen laboratorio-olosuhteissa. Laboratoriossa kokeet ovat helposti toistettavissa ja toivottuja sekä ei-toivottuja ympäristötekijöitä on helppo manipuloida. Mikrobit taas ovat käytännöllisiä tutkimuseliöitä, koska niitä on esimerkiksi helppo kasvattaa, ne lisääntyvät nopeasti aseksuaalisesti sekä niistä on runsaasti molekyyli- ja genomitason tietoa (Elena & Lenski 2003). Lisäksi mikrobien ekologian ja evoluution ymmärtäminen on tärkeää, koska ne ovat merkityksellinen osa eliöyhteisöä, tärkeitä taudinaiheuttajia ja niitä käytetään hyödyksi monissa ihmisen sovelluksissa (esimerkiksi lääketieteellisyys, elintarviketeollisuus ja jätevedenpuhdistus).

Pro Gradu -tutkielmassani tutkin saalistuksen ja ympäristön vaihtelun vaikutusta saaliin evolutiivisiin muutoksiin sen maksimaalisessa kasvunopeudessa, kantokyvyssä ja puolustautumisessa alkueläimiä vastaan. Tutkimuslajejana käytin *Serratia marcescens*-bakteeria ja *Tetrahymena thermophila* -alkueläintä, joita on aikaisemmin käytetty tutkimuseliöinä monissa samantyyppisissä tutkimuksissa (Nakajima & Kurihara 1994a; Meyer & Kassen 2007; Friman ym. 2008). Faktoriaalisessa mikrokosmos kokeessa saalisbakteereita (*Serratia marcescens*) kasvatettiin joko yksin tai yhdessä alkueläinpedon (*Tetrahymena thermophila*) kanssa vakaassa tai vaihtelevassa ravintoresurssiympäristössä (Kokeen kesto yhteensä 8 viikkoa). Resurssiympäristön vaihtelua manipuloitiin kokeessa tietokoneohjatusti (Kuva 1). Vakaassa ympäristössä resurssien virtaus oli tasaista koko kokeen ajan (1.4 ml h^{-1}), vaihtelevassa ympäristössä resurssien virtaus oli jaksoittaista (5 päivää 2.8 ml h^{-1} ja 5 päivää 0 ml h^{-1} virtauksella). Keskivirtaus ympäristöjen välillä oli samansuuruinen. Saaliiden ja petojen populaatiokokojen viikoittaisen mittaamisen lisäksi myös muutokset saaliiden elinkiertopiirteissä mitattiin erillisissä kokeissa joka viikko. Näihin ominaisuuksiin kuului saaliin kilpailukykyyn liittyvät kasvuominaisuudet (maksimaalinen kasvunopeus ja -populaatiokoko) ja puolustuskyky alkueläinten saalistusta vastaan (kasvu pedon läsnä ollessa ja biofilminmuodostuskyky saaliin puolustuskonaktina). Mahdollisten puolustuksen ja kasvun välisten trade-offien selvittämiseksi saaliiden elinkiertopiirteet mitattiin alhaisessa ja korkeassa ravintotasossa.

Tutkimuksessani tarkastelin seuraavia kysymyksiä:

- 1.) Muuttuvatko pedolle altistettujen bakteerien elinkiertopiirteet (maksimaalinen kasvunopeus, kantokyky tai puolustautuminen) yksin kasvaneisiin kontrollibakteereihin verrattuna? Muuttuuko pedon ja saaliin populaatiodynamiikka kokeen aikana?
- 2.) Eroavatko mahdolliset evolutiiviset muutokset vakaan ja vaihtelevan ympäristön kesken?
- 3.) Havaitaanko kokeessa trade-offeja saalisbakteerin eri elinkiertopiirteiden välillä?

2. AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Tutkimuslajit

2.1.1 Peto

Käyttämäni peto, *Tetrahymena thermophila* on yksisoluinen alkueläin (Protozoa, Ciliata) Sen pituus on normaaliolosuhteissa n. 50 µm ja leveys max. 20 µm (Elliot 1974; Frankel 2000). Kokeessa käytetty kanta on tilattu alunperin ATCC:sta (American Type Culture Collection, kantanumero 30008). Tämä alkueläinkanta on eristetty makeasta vedestä (Falmouth, MA) vuonna 1952 (Elliot 1974; Frankel 2000). Ennen kokeen aloittamista kantaa on kasvatettu kuukausia laboratorio-olosuhteissa akseenisesti 1 % PPY-mediumissa (10 g proteose peptonea ja 2,5 g hiiva uutetta yhdessä litrassa tislattua vettä; Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ). *T. thermophila* -alkueläimen biologiset ominaisuudet ovat hyvin tunnettu ja sen sukupolvenkierto laboratorio-olosuhteissa on nopeimmillaan n. 3 tuntia (Hill 1972; Elliot 1974). *T. thermophila* käyttää ravintonaan esim. bakteereja sekä makromolekyylejä ja se lisääntyy aseksuaalisesti kahtia jakautumalla (Elliot 1974). *T. thermophila* -alkueläintä on käytetty aikaisemmin saalistajana useissa mikrokosmoskokeissa (Nakajima & Kurihara 1994 ; Ammendola ym. 1998; Meyer & Kassen 2007; Friman ym. 2008).

2.1.2 Saalis

Gramnegatiivinen *Serratia marcescens* -bakteeri kuuluu enterobakteerien heimoon ja se on muodoltaan suora ja sauvamainen (Bailey & Scott 1974). Kokeessa käytetty kanta on hankittu ATCC:sta (American Type Culture Collection, kantanumero 13880) ja tämä kanta on eristetty alunperin lammesta. Eri kantojen kyky tuottaa punaista, veteen liukenematonta väriainetta, prodigiosiinia, vaihtelee suuresti (Bailey & Scott 1974). Väriaineen muodostuksen on myös osoitettu liittyvän moniin *S. marcescens* -bakteerin elinkiertoaiirteisiin (Grimont & Grimont 1978), kuten esimerkiksi liikkumiseen (Paruchuri & Harsey 1987; Friman ym. 2009). *Serratia marcescens* -bakteerit muodostavat myös biofilmiä. Biofilmit ovat vastustuskykyisempiä esim. ravinnosta aiheutuvalle stressille ja ne voivat antaa myös suojan alkueläinten saalistusta vastaan (Matz ym. 2005). ”Quorum sensing” (geenien ilmentymisen säätely, joka on riippuvaista bakteerisolupopulaatiotiheydestä) (Miller & Bassler 2001) ja ravintotaso vaikuttavat merkittävästi biofilmin rakenteeseen ja muodostukseen (Rice ym. 2005). Aikaisemmin vesissä ja maaperässä esiintyviä *S. marcescens* -bakteereita pidettiin harmittomina, mutta nykyään antibioottien ajatellaan olevan yksi syy niiden kehittymiseen ihmisille tauteja aiheuttaviksi patogeeneiksi (Bailey & Scott 1974; Rice ym. 2005).

2.2 Kasvatusliuokset

Kokeessa käytettiin neljää eri kasvatusliuosta. Varsinaisessa kokeessa bakteereita kasvatettiin yksin tai petojen kanssa fosfaattisuoloilla puskuroidussa heinäuutteessa 0,1 % pitoisuudessa (korkeapitoinen SPL-liuos). Kokeen aikana käytettiin myös 0,025 % pitoisuutta (matalapitoinen SPL-liuos) bakteerien elinkiertoaiirteiden mittauksissa. SPL-liuos valmistettiin uuttamalla 1g heinäuutetta 1 litraan ionivaihdettua, kiehuva vettä. Seosta kiehautettiin kuumalla keittolevyllä 10 minuuttia, jonka jälkeen uutis jähdytettiin ja suodatettiin filtlerin (GF/C, Whatman) läpi imupumpun avulla. Tislattua vettä lisäämällä saatiin haluttu pitoisuus (0,25g/l SPL tai 1g/l SPL). Valmis uutis steriloitiin autoklaavissa

heti valmistuksen jälkeen 121°C:ssa 25 minuutin ajan, jonka jälkeen siihen lisättiin steriilejä puskurisuoloja (47.172g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 12g KH_2PO_4 , 15 g $(NH_4)_2SO_4$, 3g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.3g NaCl and 0.684g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ / 490 ml H_2O), jolla lopulliseksi pH:ksi saatiin 7.5.

Kun *Tetrahymena thermophila* -alkueläimiä kasvatettiin yksin, käytettiin 0,5 % pitoista PPY-liuosta, joka valmistettiin sekoittamalla 5 g proteose peptonea ja 1,25 g hiivauutetta (Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ) 1 litraan ionivaihdettua vettä. Kokeen aikana alkueläimiä kasvatettiin myös ePP-liuoksessa, kun bakteerien eri ominaisuuksien muutoksia mitattiin erillisissä mittauksissa. ePP-liuos valmistettiin sekoittamalla 1g maksauutetta ja 10g proteose peptonea (Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ) 1 litraan ionivaihdettua vettä. ePP-liuoksessa alkueläimet kasvavat nopeammin ja populaatiokoot ovat jopa 20 kertaa suuremmat kuin PPY-liuoksessa (Elliot 1974). Valmiit liukset steriloidtiin autoklaavissa heti valmistuksen jälkeen (121°C, 25 min).

Ennen elinkiertopiirteiden mittausta bakteereita kasvatettiin yksinään Agar-maljoilla. Agar-liuos valmistettiin sekoittamalla 10g Nutrient Brothia, 2,5g hiivauutetta ja 15g agarjauhetta (Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ) 1 litraan ionivaihdettua vettä.

2.3 Mikrokosmokset ja näytteenotto

Mikrokosmoksina käytettiin muovisia Erlenmeyer soluviljelypulloja, joiden nestetilavuus oli 40 ml (kokonaistilavuus 250ml). Mikrokosmoksista lähti kaksi sisähalkaisijaltaan 1 mm silikoniletkaa, joista toinen oli kiinni steriiliä ravintoliuosta sisältävässä pullossa (2 litra/ 0,1 % SPL tai 2 litra/ 0,5 % PPY) ja toinen, poistoletku oli kontaminaationriskin pienentämiseksi 80 % etanolissa. Kontaminaation estämiseksi letkut (60 cm) pakattiin kulkemaan lämmityslaitteen (80°C) läpi.

2.4 Kokeenperustaminen

Agar-maljalla kasvaneista *Serratia marcescens* -bakteeripesäkkeistä (alkuperäinen ATCC kanta) valittiin yksi pesäke, joka sekoitettiin 400 ml 0,1 % SPL:ää ja annettiin kasvaa kolmen päivän ajan 25°C:ssa. Bakterisoitu SPL jaettiin tasan neljään pulloon, joihin lisättiin 300 ml puhdasta SPL:ää. Jokaiseen bakteereita sisältävään 20 koeastiaan mitattiin 40 ml bakterisoitua SPL:ää. Niihin mikrokosmoksiin, joihin tuli vain alkueläimiä mitattiin 40 ml PPY-liuosta.

Päivä ennen kokeen käynnistämistä, PPY-liuoksessa kasvaneet *Tetrahymena thermophila* -alkueläimet sentrifugoitiin (768 G, 8 min, +4 °C), supernatanti poistettiin ja tilalle laitettiin puskurisuoloja sisältävää liuosta. Tarkoituksena oli, että näytteeseen jäi vain alkueläimiä ja korkeaenerginen PPY-liuos saatiin poistettua. Kaikkiin alkueläimiä sisältäneisiin 20 mikrokosmokseen pipetoitiin 1 ml *Tetrahymena thermophila* -alkueläimiä.

2.5 Koeasetelma

Kokeessa käytettiin faktoriaalista koeasetelmaa, jossa manipuloitiin alkueläinten saalistusta (läsnä tai poissa) ja ravintoympäristön ajallista vaihtelua (tasainen tai vaihteleva). Osa *Serratia marcescens* -bakteereista altistettiin alkueläinten (*Tetrahymena thermophila*)

saalistukselle (ns. kokeneet bakteerit) ja osa kasvatettiin samanlaisissa oloissa ilman petoja (ns. naiivit bakteerit) sekä vakaassa että vaihtelevassa ympäristössä. Näin yksin kasvaneita saaliita ja petoja pystyttiin myöhemmin vertaamaan yhdessä kasvaneisiin saaliisiin ja petoihin. Kaikissa käsittelyissä, joissa oli bakteereja, käytettiin korkeapitoista SPL-kasvatusliuosta ja alkueläimet saivat ravintonsa bakteereista. Niissä käsittelyissä, joissa oli vain alkueläimiä, kasvatusliuksena käytettiin PPY:tä, koska alkueläimet eivät pysty käyttämään ravintonaan pelkkää SPL-liuosta.

Ravintoympäristöfaktorilla oli kaksi tasoa: vakaa tai vaihteleva (Taulukko 1). Ravintoliuoksen virtauksen säätely ja näytteenotto tapahtui tietokoneohjatulla kemostaattilaitteistolla (matlab-ohjelma) (Kuva 1). Vakaassa ympäristössä ravinnonvirtaus oli tasaista koko kokeen ajan (1,4ml/h). Vaihtelevassa ympäristössä ravinnonvirtaus oli säädelty siten, että 5 päivän ajan virtaama on 2,8 ml/h, jonka jälkeen ravinnonvirtaus pysäytettiin viiden päivän ajaksi. Kokonaisvirtaama vakaassa ja vaihtelevassa ympäristössä oli kokeen aikana yhtä suuri. Mikrokosmosten sisältö sekoitettiin kerran tunnissa magneettisekoittajalla ennen jokaista resurssiudistusta. Kokeessa oli kaikkiaan kuusi käsittelyä; saalis (*Serratia marcescens*) yksin, peto (*Tetrahymena thermophila*) yksin ja saalis ja peto yhdessä sekä vakaassa että vaihtelevassa ympäristössä. Jokaisesta käsittelystä oli viisi toistoa. Koe kesti yhteensä kahdeksan viikkoa (15.9-13.11.2005).

Taulukko 1. Koeasetelma

YHTEISÖ	YMPÄRISTÖ	
	Vakaa	Vaihteleva
<i>Serratia marcescens</i>	N=5	N=5
<i>Tetrahymena thermophila</i>	N=5	N=5
<i>S. marcescens</i> + <i>T. thermophila</i>	N=5	N=5



Kuva 1.

2.6 Viikoittaiset mittaukset

Jokaisesta mikrokosmoksesta (1-30) otettiin viikoittain 2 ml näytettä seuraavia käsittelyjä varten:

2.6.1 Bakteerien pakastus

Bakteereja sisältävistä näytteistä pipetoitiin 500 μm näytettä kryoputkiin, joissa oli valmiina pakastusneste (100 μl nutrient brothia ja 500 μl glyserolia). Näytteiden annettiin olla huoneenlämmössä puoli tuntia, jonka jälkeen ne vietiin $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ vuorokaudeksi. Seuraavana päivänä näytteet vietiin $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pakkaseen.

2.6.2 Bakteerien populaatiokoon määrittäminen

Bakteerien populaatiokoon mittaukset tehtiin aseptisesti Bioscreen C spektrofotometrillä (25°C , 420-580-nm aallonpituudella, 2 minuutin mittausväli, mittausaika 1 tunti), ottamalla jokaisesta bakteerillisesta näytteestä (N=2) 400 μl steriilille kuoppalevyille.

2.6.3 Alkueläimen populaatiokoon määrittäminen

Jokaisesta *tetrahymena thermophila* -alkueläintä sisältävästä näytteestä otettiin 0,5 ml nestettä, johon sekoitettiin 30 μl lugolia, jolla tapettiin ja värjättiin alkueläimet. 200 μl sekoitettua näytettä laitettiin 50 % kloriitilla ja ionivaihdetulla vedellä pestyihin lasikyvetteihin ja alkueläinten annettiin laskeutua n. 10 minuutin ajan kyvetin pohjalle. Jos alkueläimiä oli näytteessä paljon, näytettä laimennettiin ionivaihdetulla vedellä. Näytteiden kuvaamiseen käytettiin valomikroskooppia (Olympus SZX mikroskooppi, 40x suurennos), joka oli yhdistetty videokameraan (Panasonic WV-CL702). Kuvien tallentamiseen ja käsittelyyn käytettiin tietokoneohjelmistoa (Matrox meteor II videokortti ja Image Pro Plus™ (v.4.5, Medium Cybernetics Inc.). *Tetrahymena thermophila* -yksilöt laskettiin automaattisella kuvankäsittelyohjelmistolla, joka tunnisti alkueläimet koon ja muodon perusteella (tunnistus Image Pro Plus -ohjelmalle (J. Laakso, julkaisematon)).

2.6.4 Bakteerien erottaminen alkueläimistä

Bakteerien elinkiertopiirteiden (maksimaalinen kasvunopeus ja kantokyky) mittaukset tehtiin kasvattamalla sekä kokeneita että naiiveja bakteereita ensin yksin kaksi päivää agar-maljoilla, jonka jälkeen 20 kloonista eristettiin per toisto ja siirrettiin kasvamaan matala- ja korkeapitoiseen SPL-liuokseen vuorokaudeksi. Tänä aikana bakteerit kävivät läpi kymmeniä sukupolvia.

2.6.5 Alkueläinten erottaminen bakteereista

Bakteerien elinkiertopiirteiden mittausta varten alkueläimiä sisältäneille näytteille (20) tehtiin antibiootikäsittely, jonka tarkoituksena oli tappaa bakteerit. Antibioottina käytettiin penisilliiniin ja streptomysiiniin sekoitusta (SIGMA-Aldrich; Koodi P0781), pitoisuutta 0,9 %.

Kun antibiootikäsittelystä oli kulunut 24 tuntia, jokaista näytettä pipetoitiin 571 µl steriileihin, muovisiin koeputkiin, joihin oli mitattu 8 ml 1 %:sta ePP liuosta. Tämän jälkeen tarkistettiin, että alkueläimet olivat hengissä. Näytteistä levitettiin vielä 100 µl agar-maljoille, koska haluttiin varmistaa, että bakteerit olivat kuolleet antibiootikäsittelyssä.

Kaikki alkueläimiä sisältäneet putket fuugattiin (768G, 8 min, +4°C). Tämän jälkeen ePP-liuos pipetoitiin pois putkista ja tilalle lisättiin 5 ml puskurisuolaa. *Tetrahymena thermophila* -alkueläinten annettiin olla ilman ravintoa seuraavaan aamuun asti, jolloin jokaisesta toistosta otettiin 0,5 ml näyte kuvausta ja laskemista varten. Alkueläinten määrä oli tärkeä saada selville, koska tämän tiedon perusteella alkueläinten määrä saatiin laimennettua ionivaihdetulla vedellä eri käsittelyjen kesken mahdollisimman yhdenmukaiseksi, noin 100 yksilöä/käsittely. Näin alkueläinten määrä pidettiin vakiona viikoittain tehtävissä bakteerien elinkiertopiirteitä mittaavissa vastekokeissa.

2.6.6 Bakteerien elinkiertopiirteiden mittaukset

Bakteerien elinkiertopiirteet (kasvukyky, puolustuskyky ja biofilminmuodostuskyky) mitattiin viikoittain erillisissä faktoriaalisissa kokeissa.

Bakteerien kilpailukykyyn liittyvät kasvuominaisuudet (maksimaalinen kasvunopeus ja - populaatiokoko) mitattiin bakteerin kasvuna ilman petoa. Mittaukset tehtiin matalassa ja korkeassa resurssikonsentraatiossa seuraavasti. 400 µl steriiliä matala- ja korkeapitoista SPL-liuosta pipetoitiin mittauslevyn kuoppiin ja jokainen koebakteeripopulaation (N=2) kasvu mitattiin Bioscreen C spektrofotometrillä lisäämällä kasvuliuokseen 10 µl bakteerinäytettä. Mittauksissa käytettiin seuraavia asetuksia: 25 °C, 420-580-nm, 10 minuutin mittausväli, mittausaika 3 vuorokautta.

Bakteerien puolustustehokkuus mitattiin niiden kykyä ylläpitää populaatiokokoa petojen läsnä ollessa. Kaikki bakteeripopulaatiot kasvatettiin aluksi lähelle kantokykyä matalassa ja korkeassa resurssikonsentraatiossa. Tämän jälkeen 400 µl kantokykyyn kasvanutta bakteerinäytettä pipetoitiin mittauslevyn kuoppiin (N=2), jonka jälkeen jokaiseen kuoppaan lisättiin n. 100 *Tetrahymena thermophila* -alkueläin yksilöä vastaavasta bakteeri+alkueläin käsittelystä. Mittaukset tehtiin Bioscreen C spektrofotometrillä ja niissä käytettiin seuraavia asetuksia: 25 °C, 420-580-nm, 10 minuutin mittausväli, mittausaika 3 vuorokautta.

Bakteerien kasvu ja puolustusmittausten loputtua bakteerien biofilmin muodostuskykyä mitattiin seuraavasti. Mittauksen päätyttyä neljän päivän jälkeen

kuoppalevyihin pipetoitiin 100 µl 1 % kristallivioletta. 15 minuutin kuluttua kuopat tyhjennettiin pipetillä ja huuhdeltiin ionivaihdetulla vedellä 3 kertaa. Biofilmi saatiin irrotettua kuoppalevyn pohjasta ja reunoilta lisäämällä jokaiseen kuoppaan 95 % alkoholia (etax A), jonka jälkeen näytteiden absorbanssit mitattiin uudelleen spektrofotometrillä (asetukset: 25°C lämpötila, 420-580-nm, 10 minuutin mittausväli, mittausaika 1 vuorokausi).

2.6.7 Aineiston analysointi

Aineiston analysointiin käytettiin toistomittaus analyysiä (ANOVAR). Tilastolliset testit tehtiin SPSS-ohjelmalla (v.12.0.1, SPSS Inc., Chigaco, IL).

3. TULOKSET

3.1 Populaatiodynamiikka

Saalistus vähensi bakteerien populaatiokokoja kontrolleihin verrattuna ($F_{1, 16}=111.8$, $p<0.001$, Kuva 2a). Yksinään kasvaneet saaliit saavuttivat suurimmat populaatiokoot vaihtelevassa ravintoympäristössä ($F_{1, 16}=4.7$, $p=0.046$, Kuva 2a). Ympäristön vaihtelu ei kuitenkaan vaikuttanut kokeneiden bakteerien populaatiokokoihin (Bonferroni korjattu monivertailu: kokenut bakteeri vakaassa ympäristössä vs kokenut bakteeri vaihtelevassa ympäristössä, $p = 1.00$, Kuva 2a).

Pedon populaatiokoot olivat 2,5 kertaa suuremmat vaihtelevassa kuin vakaassa ympäristössä ($F_{1, 8}=110.0$, $p<0.001$, Kuva 2b). Ero vaihtelevan ja vakaan ympäristön välillä kuitenkin pieneni kokeen loppua kohti mentäessä (toistomittausanalyysin tulos muuttuu ei-merkittäväksi, kun 3 ensimmäistä mittausviikkoa poistetaan analyysistä, $F_{1, 8}=5.0$, $p=0.057$, Kuva 2b). Petojen suhteellinen osuus oli korkeampi vaihtelevassa ympäristössä ($F_{1, 8}=96.4$, $p<0.001$, Kuva 3a). Ero eri ympäristöjen välillä kapeni myös näissä mittauksissa kokeen loppua kohti mentäessä. (toistomittausanalyysi tulos muuttuu ei-merkittäväksi, kun 3 ensimmäistä mittausviikkoa poistetaan analyysistä, $F_{1, 8}=3.6$, $p=0.094$, Kuva 3a).

Ravintoympäristön ajallinen vaihtelu kasvatti yksin eläneen saaliin populaatiodynamiikan vaihtelua ($F_{1, 9}=14.1$, $p=0.006$, Taulukko 2), mutta sillä ei ollut vaikutusta saaliin populaatiodynamiikan vaihteluun pedon läsnä ollessa ($F_{1, 9}=0.4$, $p=0.556$, Taulukko 2). Ravintoympäristön ajallinen vaihtelu vaikutti saaliin kanssa eläneen pedon populaatiodynamiikan vaihteluun ($F_{1, 9}=23.7$, $p=0.001$, Taulukko 2), mutta ei yksin eläneen pedon populaatiodynamiikan vaihteluun ($F_{1, 9}=0.1$, $p=0.722$, Taulukko 2).

3.2 Evolutiiviset muutokset saaliin puolustuksessa, kasvukyvyyssä ja biofilmin muodostuksessa

Saalistus lisäsi bakteerien puolustusta kontrolleihin verrattuna ($F_{1, 63}=51.7$, $p<0.001$, Kuva 4a ja b) ja tämä ero oli selvempi, kun mittaukset tehtiin korkeapitoisessa-SPL-liuoksessa ($F_{1, 63}=19.4$, $p<0.001$, Kuva 4a ja b). Eri ravintoympäristöllä ei ollut vaikutusta pedon kanssa eläneen saaliin puolustuksen voimakkuuteen ($F_{1, 63}=2.4$, $p=0.122$).

Saaliin altistaminen pedoille vähensi saaliin kantokykyä (maksimaalinen populaatiokoko) mitattaessa matalapitoisessa-SPL-liuoksessa ilman petoa ($F_{1, 27}=19.2$, $p<0.001$, Kuva 5a). Sen sijaan saaliin altistaminen pedoille lisäsi kantokykyä mitattaessa korkeapitoisessa-SPL-liuoksessa ($F_{1, 27}=19.2$, $p<0.001$, Kuva 5b). Saaliin altistaminen pedoille tai ravintoresurssin ajallinen vaihtelu ei vaikuttanut maksimaaliseen kasvunopeuteen (kaikki p-arvot >0.05).

Kun bakteerien biofilmin muodostuskykyä mitattiin ilman petoa, aikaisempi petokokemus vähensi ($F_{1, 32}=27.1$, $p>0.001$, Kuva 6a) ja ravintoresurssin ajallinen vaihtelu lisäsi ($F_{1, 32}=8.3$, $p=0.007$, Kuva 6a) biofilmin muodostusta. Kun biofilmin muodostuskykyä mitattiin pedon läsnä ollessa, aiempi petokokemus lisäsi biofilmin muodostusta ($F_{1, 63}=104.4$, $p<0.001$, Kuva 6b). Aiempi petokokemus lisäsi eniten biofilmin muodostuskykyä ajallisesti vaihtelevassa ravintoympäristössä ($F_{1, 63}=9.2$, $p=0.004$, Kuva 6b).

3.3 Saaliin elinkiertopiirteiden vaihtelevuus

Ravintoympäristön ajallinen vaihtelu epävakautti ja saalistus vakautti saaliin puolustuskyvyn ajallista vaihtelua (saaliin ravintoympäristö: $F_{1, 39}=6.6$, $p=0.015$, saalistus: $F_{1, 39}=32.5$, $p<0.001$, Taulukko 2). Saaliin puolustuskyky vaihteli enemmän niillä bakteereilla, jotka olivat eläneet ajallisesti vaihtelevassa ravintoympäristössä (vrt. vakaa ravintoympäristö) yhdessä pedon kanssa (saaliin ravintoympäristön vaikutus ilman petoa eläneisiin bakteereihin: $F_{1, 19}=1.8$, $p=0.197$, ja pedon läsnä ollessa eläneisiin bakteereihin: $F_{1, 19}=8.1$, $p=0.011$).

Saaliin kantokyky vaihteli yleisesti enemmän mitattaessa matalapitoisessa-SPL-liuoksessa ($F_{1, 39}=144.6$, $p<0.001$). Saaliin kantokyky vaihteli kuitenkin enemmän pedon kanssa eläneillä bakteereilla mitattaessa korkeapitoisessa-SPL-liuoksessa ($F_{1, 39}=14.4$, $p=0.001$, CV keskivirhe ± 1 viisi toistoa ilman pedon läsnäoloa ja pedon läsnä ollessa: 0.1045 ± 0.0052 ja 0.1534 ± 0.0112).

4. TULOSTEN TARKASTELU

Resurssien ajallinen vaihtelu voi vaikuttaa merkittävästi bakteerien puolustus- ja kilpailukyvyn evoluutioon saalistuspaineen ja ravinnon saatavuuden vaihtelun kautta. Tässä Pro Gradussa selvitin miten saaliin resurssiympäristön ajallinen vaihtelu ja saalistus vaikuttavat peto-saalisuhteen ekologiseen ja evolutiiviseen dynamiikkaan. Kokeessa havaitsin, että ravintoympäristön ajallinen vaihtelu kasvatti yksin eläneen saaliin populaatiodynamiikan vaihtelua, mutta pedon läsnä ollessa ravintoympäristön ajallinen vaihtelu lisäsi vain pedon populaatiodynamiikan vaihtelua. (Kuva 2a ja Taulukko 2). Bakteerien ravintoympäristön ajallinen vaihtelu on ilmeisesti vaikuttanut petopopulaation koon vaihteluihin syötävien bakteeriyksilöiden määrän lisääntymisen kautta (Kuva 2a ja b). Nämä tulokset todistavat, että resurssisaatavuuden ajallinen vaihtelu voi siirtyä peto-saalisuhteen kannanvaihteluiden dynamiikkaan.

Petojen suhteellinen osuus ja siten ehkä myös saalistuspaine vaihtelivat eniten ajallisesti vaihtelevassa ravintoympäristössä. Onkin mahdollista, että saalistus voi johtaa kahden, kilpailu- ja puolustuskyvyltään erilaisen genotyypin vuorotteluun vaihtelevassa resurssiympäristössä (Yoshida ym. 2003).

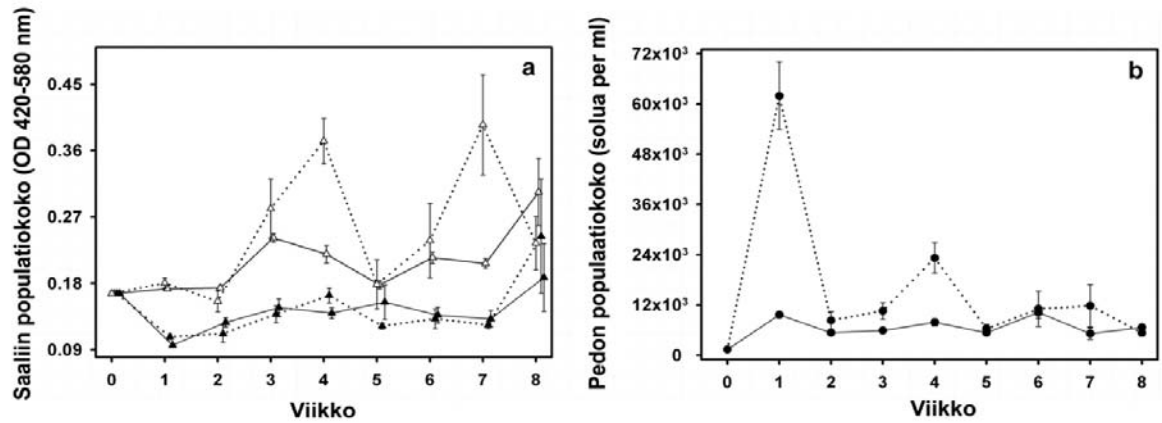
Saalistus lisäsi bakteerien puolustusta kontroleihin verrattuna, mutta eri ravintoympäristöillä ei ollut vaikutusta pedon kanssa eläneen saaliin puolustuksen voimakkuuteen (Kuva 4a ja b). Vaikka siis petopaine ja bakteerien alkueläin puolustukseen allokointi vaihtelivat enemmän ajallisesti vaihtelevassa ravintoympäristössä, bakteerien keskimääräiseen puolustuksen voimakkuuteen se ei kuitenkaan vaikuttanut. On mahdollista, että puolustuksesta aiheutuva allokaatiokustannus ei ollut tarpeeksi suuri rajoittaakseen myös kasvua tai ravinnon ajallinen vaihtelu ei ollut tarpeeksi merkittävää aiheuttaakseen bakteereille trade off -tilanteen, jossa ne olisivat joutuneet puolustautumaan kasvun kustannuksella. Saaliin altistaminen pedoille vähensi saaliin kantokykyä (maksimaalinen populaatiokoko), mutta vain mitattaessa matalapitoisessa-SPL-liuoksessa (Kuva 5a). Tämä tarkoittaa, että trade offin merkitys tässä kokeessa saattoi olla varsin pieni. Teoria ja kokeet (Bohannon & Lenski 1999; Abrams 2000; Yoshida ym. 2004) puoltavat ajatusta, että alhaisessa ravintoympäristössä puolustukseen satsaaminen vähentäisi saaliin kilpailukykyä, mutta korkeassa ravintotasossa saalis voi allokoida resursseja molempiin. Myös Friman ym. (2008) havaitsivat kokeessaan, että matalassa ravintopitoisuudessa bakteerien puolustus kehittyi heikommaksi ja aiheutti bakteerien kantokyvyn pientymisen. Tässä kokeessa saaliin resurssien ajallinen vaihtelu ei aiheuttanut vastaavanlaista divergenssiä petopuolustuksen evoluutiossa. Havaitsin kuitenkin, että saaliin puolustuskyky vaihteli enemmän niillä bakteereilla, jotka olivat eläneet ajallisesti vaihtelevassa ravintoympäristössä yhdessä pedon kanssa (Taulukko 2). Voikin olla, että resurssien ajallisella vaihtelulla ei ole niin suurta merkitystä saaliin puolustuksen evoluutiolle, jos resurssia on koko ajan riittävästi saatavilla, tai jos petopuolustuksesta aiheutuva allokaatiokustannus on pieni.

Useat akvaattisten bakteereiden fenotyypiset piirteet on tulkittu sopeutumiksi, jotka ovat kehittyneet suojaksi alkueläinten saalistukselta. Näistä tunnettuja esimerkkejä on nopea liikkumiskyky (Matz & Jürgens 2005), solukoon pientyminen (Boenigk ym. 2004), myrkkujen tuottaminen (Matz ym. 2004) ja biofilmin muodostus (Matz & Kjelleberg 2005). Kokeessa havaitsimme, että aiempi petokokemus ja ajallisesti vaihteleva resurssiympäristö lisäsivät eniten bakteerien biofilmin muodostusta (Kuva 6b). Tämä tulos todistaa, että saaliin puolustuksen evoluutio voi riippua ympäristöolosuhteiden vaihtelusta ja että saalistuksen kestävän biofilminmuodostus voi toimia bakteerien puolustusmekanismina alkueläimiä vastaan. Yksinään kasvaneet saaliit saavuttivat suurimmat populaatiokoot vaihtelevassa ravintoympäristössä. Bakteerit pystyivät siis muuntamaan ravintoresurssin tehokkaammin biomassakseen vaihtelevassa ravintoympäristössä, eivätkä näyttäneet kärsivän ravinnon puutteesta. Tämän johdosta myös petojen populaatiokoot olivat suuremmat ajallisesti vaihtelevassa resurssiympäristössä. Pedon populaatiokoko ja petojen suhteellinen osuus eri ympäristöissä oli korkeampi vaihtelevassa ympäristössä. Ero eri ympäristöjen välillä kapeni myös näissä mittauksissa kokeen loppua kohti mentäessä (Kuva 2a ja 3b), mikä voi johtua siitä, että pedot eivät pystyneet hyödyntämään yhtä tehokkaasti ravintobakteereitaan kokeen alusta loppuun. Petojen suhteellisen osuuden kapenemisen eri ympäristöjen välillä kokeen aikana voisi selittää sillä, että saaliit puolustautuivat tehokkaammin vaihtelevassa resurssiympäristössä tuottamalla saalistuksenkestävää biofilmiä.

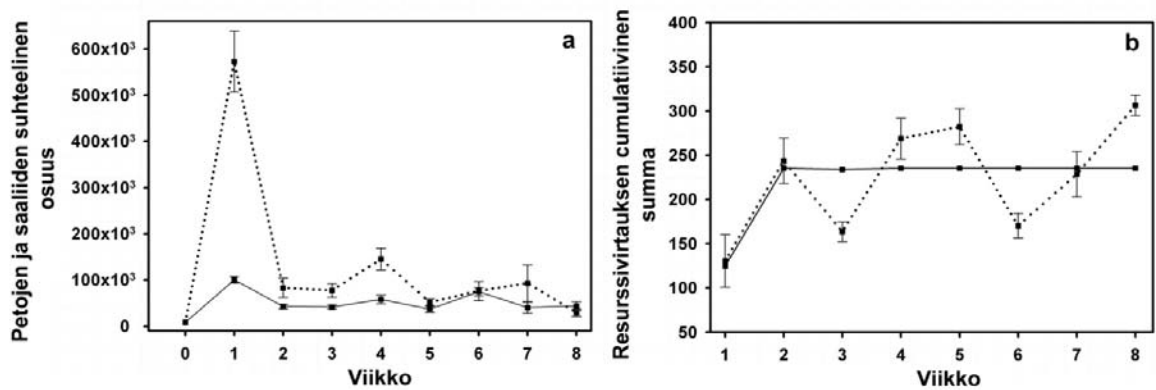
Saaliin erilainen kyky tuottaa biofilmiä eri ympäristöissä saattaa johtua siitä, että vaihtelevassa resurssiympäristössä saaliin ja pedon populaatiokoot kasvoivat suuremmiksi, jolloin myös mutaatiotaajuus sekä kohtaamistiheys (Hochberg & Holt 1995) ovat olleet mahdollisesti suuremmat vaikuttaen saaliin evoluutionopeuteen. Biofilmin tuottamisesta on havaittu myös olevan bakteereille energettistä kustannusta (Spiers ym. 2003). Vaihtelevassa ravintoympäristössä suurempi ravinnon saatavuus on ehkä mahdollistanut sen, että bakteereilla on ollut varaa allokoida resursseja biofilmin muodostukseen, mikä ei

ehkä tasaisessa ravintoympäristössä ole ollut mahdollista. Bakteereiden piirteet saattavat näin ollen kehittyä hyvinkin erilaiseksi ravintoympäristöstä ja sen muutoksista riippuen. Pintoihin kiinnittyneet bakteerit myös säilyvät mahdollisesti paremmin hengissä kuin vapaassa vedessä elävät bakteerit resurssivirtaaman aiheuttamalta kuolevuudelta. Tästä saattaa olla hyötyä näille bakteereille, koska se vähentää ravintokilpailua vapaassa vedessä elävien bakteerien kanssa.

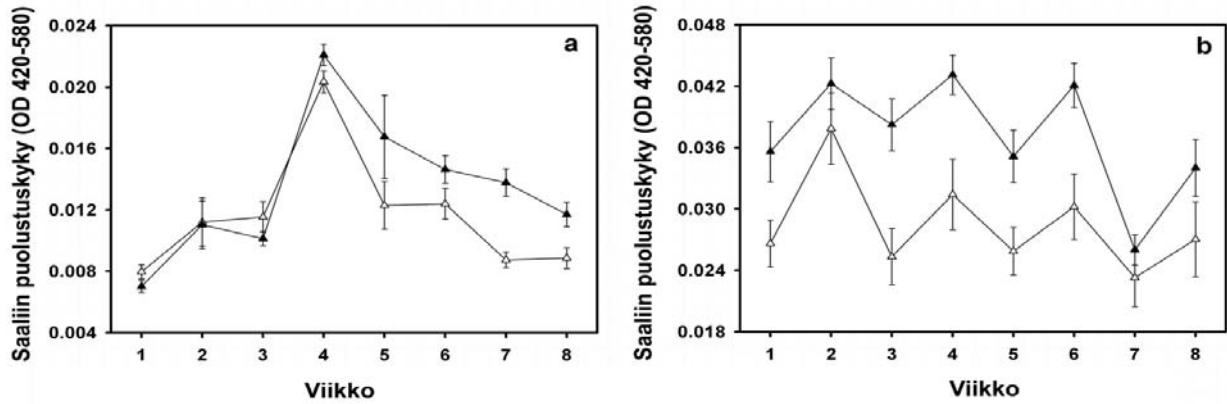
Tämä koe osoitti, että resurssisaatavuuden ajallinen vaihtelu voi siirtyä peto-saalissuhteen kannanvaihteluiden dynamiikkaan; eliöiden ekologisissa ominaisuuksissa saattaa tapahtua nopeitakin muutoksia. Kokeessa havaittiin muutoksia myös eliöiden evolutiivisissa ominaisuuksissa, jotka vaikuttivat edelleen peto-saalissuhteeseen. Saaliin puolustuskyky vaihteli enemmän niillä bakteereilla, jotka olivat eläneet ajallisesti vaihtelevassa ravintoympäristössä yhdessä pedon kanssa. Vaikka petopaine ja bakteerien alkueläinpuolustukseen allokoiminen vaihtelivat enemmän ajallisesti vaihtelevassa ravintoympäristössä, bakteerien keskimääräiseen puolustuksen voimakkuuteen se ei kuitenkaan vaikuttanut. Voikin olla, että resurssien ajallisella vaihtelulla ei ole niin suurta merkitystä saaliin puolustuksen evoluutiolle, jos resurssia on koko ajan riittävästi saatavilla tai jos petopuolustuksesta aiheutuva allokaatiokustannus on pieni. Aiempi petokokemus ja ajallisesti vaihteleva resurssiympäristö lisäsivät eniten bakteerien biofilmin muodostusta. Tämä tulos todistaa, että saaliin puolustuksen evoluutio voi riippua ympäristöolosuhteiden vaihtelusta ja että saalistuksen kestävä biofilminmuodostus voi toimia bakteerien puolustusmekanismina alkueläimiä vastaan. Ympäristöolojen ajallisella vaihtelulla, kuten esimerkiksi globaalilla ilmastonmuutoksella ja siitä aiheutuvilla muuttuvilla sääoloilla, voi siis olla huomattavaa vaikutusta eliöiden ekologisiin ja evolutiivisiin vuorovaikutussuhteisiin sekä niissä tapahtuviin muutoksiin.



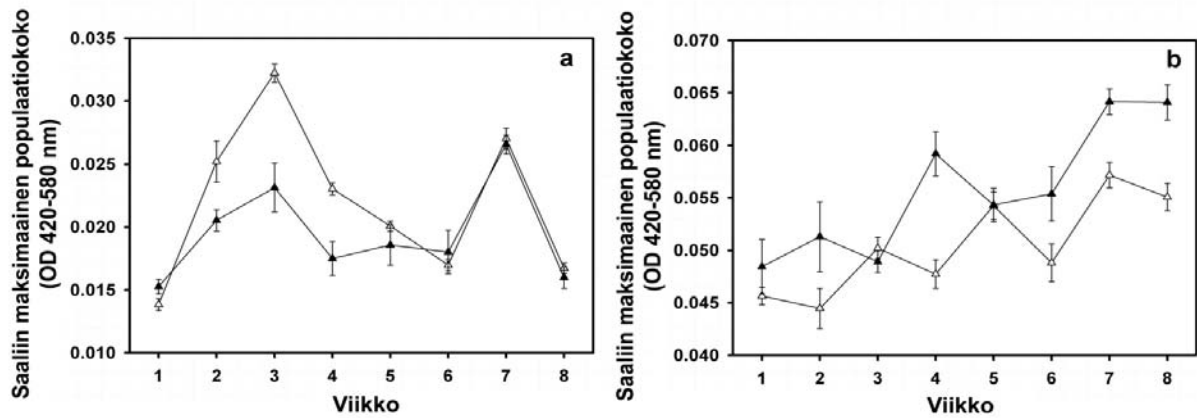
Kuva 2. Saaliin populaatiokokojen dynamiikka (a) vakaassa (tummat viivat) tai vaihtelevassa (katkoviivat) ravintoympäristössä ilman petoa (avoimet kuviot) tai pedon läsnä ollessa (täytetyt kuviot). Pedon populaatiokokojen dynamiikka (b) saaliin läsnä ollessa vakaassa (tumma viiva) ja vaihtelevassa ravintoympäristössä (katkoviiva). Pystysuorat viivat osoittavat keskiarvon ± 1 keskivirheen.



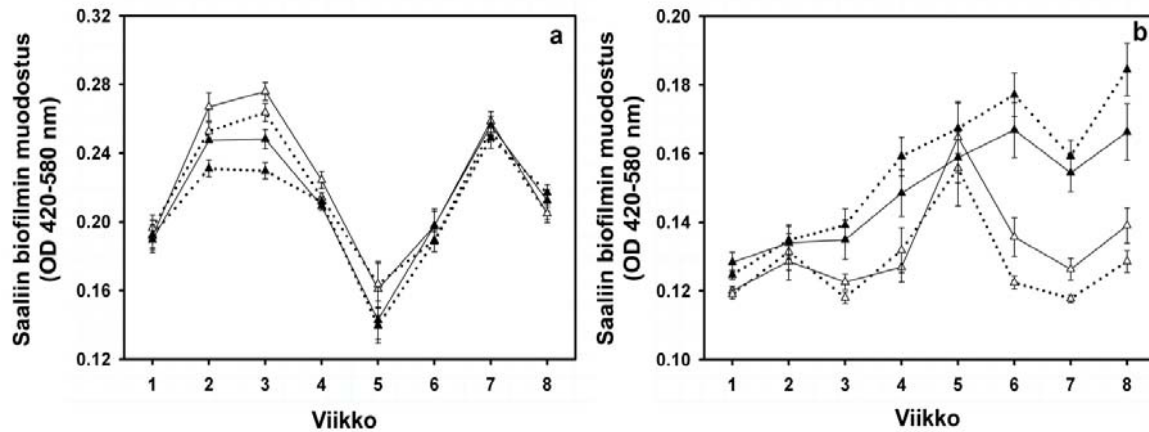
Kuva 3. Pedon (solut ml⁻¹) ja saaliin (optinen tiheys) suhteellinen osuus. Tummat viivat osoittavat vakaata ja katkoviivat vaihtelevaa ravintoympäristöä. Pystysuorat viivat osoittavat keskiarvon ± 1 keskivirheen.



Kuva 4. Saaliin puolustuskyvyn dynamiikka matalapitoisessa-SPL:ssä (a), ja korkeapitoisessa-SPL:ssä (b). Saaliit, jotka ovat kehittyneet ilman petoa (avoimet symbolit) ja pedon läsnä ollessa (täytetyt symbolit). Pystysuorat viivat osoittavat keskiarvon ± 1 keskivirheen.



Kuva 5. Saaliin kantokyvyn dynamiikka matalapitoisessa-SPL:ssä (a) ja korkeapitoisessa-SPL:ssä mitattuna (b) ilman petoa (avoimet symbolit) ja pedon läsnä ollessa (täytetyt symbolit). Pystysuorat viivat osoittavat keskiarvon ± 1 keskivirheen.



Kuva 6. Saaliin biofilmin muodostuskyvyn dynamiikka mitattuna ilman petoa (a) tai pedon läsnä ollessa (b) niillä saaliilla, jotka kasvoivat vakaassa (tummat viivat) tai vaihtelevassa ravintoympäristössä (katkoviivat) ilman pedon läsnäoloa (avoimet symbolit) tai pedon läsnä ollessa (täytetyt symbolit). Pystyviivat suorat osoittavat keskiarvon ± 1 keskivirheen.

Taulukko 2. Saaliin ja pedon populaatiokokojen vaihtelevuus ja puolustuskyky. Arvot ovat variaatiokertoimen keskiarvon vaihtelu (CV) viidestä mikrokosmos toistosta ± 1 keskivirhe. CV on laskettu 8 peräkkäisestä datapisteestä.

Pedon ja saaliin evoluutiivinen historia	Saaliin populaatiokoko	Pedon populaatiokoko	Saaliin puolustus
Yksinään vakaassa ympäristössä	0.229 \pm 0.048	0.558 \pm 0.069	0.414 \pm 0.026
Yksinään ajallisesti vaihtelevassa ympäristössä	0.460 \pm 0.037	0.588 \pm 0.044	0.476 \pm 0.037
Yhdessä vakaassa ympäristössä	0.286 \pm 0.074	0.372 \pm 0.037	0.238 \pm 0.015
Yhdessä ajallisesti vaihtelevassa ympäristössä	0.375 \pm 0.123	1.167 \pm 0.158	0.324 \pm 0.026

KIITOKSET

Haluan kiittää ohjaajiani, erityisesti Ville Frimania, joka on jaksanut kärsivällisesti ja pitkäjänteisesti neuvoa, kannustaa ja rakentaa mm. hajusuojuksia laboratorioon raskaana olevalle, välillä hyvinkin äkäiselle naiselle. Tämän välillä loputtomalta tuntuvan projektin aikana minulle on ehtinyt syntyä kaksi ihanaa poikaa, Noel ja Milo, joiden myötä olen tajunnut mikä elämässä on todella tärkeää.

KIRJALLISUUS

- Abrams, P.A. 1986. Adaptive responses of predators to prey and prey to predators: the failure of the arms race analogy. *Evolution* 40: 47- 1229. (Ref. Elena & Lenski 2003)
- Abrams, P.A. 1993. Effect of increased productivity on the abundances of trophic levels. *Am. Nat.* 141: 351-371. (Ref. Bohannan & Lenski 1999)
- Abrams, P.A. & Matsuda, H. 1997. Fitness minimization and dynamic instability as a consequence of predator- prey coevolution. *Evol. Ecol.* 11: 1-20.
- Abrams, P.A. 2000. The evolution of predator-prey interactions. Theory and evidence. *Annu. Rev Ecol. Syst.* 31: 79-105.
- Ammendola, A., Geisenberger, O., Andersen, J.B., Givskov, M., Sclifer, K-H. & Eberl, L. 1998. *Serratia liquefaciens* swarm cells exhibit enhance resistance to predation by *Tetrahymena* sp. *FEMS Microbiology letters* 164: 69-75.
- Bailey, W. R. & Scott, E.G. 1974. *Diagnostic Microbiology*, 4th edn. St Louis, MO: C. V. Mosby.
- Bakker, R.T. 1983. The deer flees, the wolf pursues: incongruencies in predator-prey coevolution. In *Coevolution* (D.J. Futuyma and M. Slatkin, eds), s. 350-82. Sinauer Associates, Sunderland, MA. (ref. Elena & Lenski 2003)
- Becks, L., Hilker, F. M., Malchow, H., Jürgens, K. & Arndt, H. 2005. Experimental demonstration of chaos in a microbial food web. *Nature* 435: 1226-1229.
- Boenigk, J., Stadler, P. & Hahn, M. W. 2004. Strain-specific differences in the grazing sensitivities of closely related ultramicrobacteria affiliated with the Polynuclearbacter cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5787-5793. (Ref. Pernthaler 2005)
- Bohannan, B.J.M. & Lenski R.E. 1999. Effect of prey heterogeneity on response of a model food chain to resource enrichment. *Am. Nat.* 153: 73-82
- Bohannan, B.J.M. & Lenski, R.E. 2000. The relative importance of competition and predation varies with productivity in a model community. *Am. Nat.* 156: 329-340.
- Bohannan, B.J.M., Kerr, B., Jessup, C.M., Hughes, J.B. & Sandvik, G. 2002. Trade-offs and coexistence in microbial microcosms. *Anton. Leeuw.* 81: 107-115.
- Buckling, A. & Rainey, P.B. 2002. Antagonistic coevolution between a bacterium and a bacteriophage. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* 269: 931-936.
- Drake, J.M. & Lodge, D.M. 2004. Effects of environmental variation on extinction and establishment. *Ecology Letters* 7: 26-30.
- Elena, S.F. & Lenski, R.E. 2003. Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nature rev. Genetics* 4: 457-469.
- Elliot A. M. 1974. *Biology of Tetrahymena*. Dowdwn, Hutchinson and Ross, Inc. Stroudsburg, PA, s. 508.
- Endler, J.A. 1986a. *Natural Selection in the Wild*. Princeton University Press, Princeton, NJ. (Ref. Elena & Lenski 2003)
- Endler, J.A. 1986b. Defense against predators. In *Predator-Prey Relationships* (M. Feder and G. Lauder,eds), s. 109-34, University of Chicago Press, Chicago, IL. (Ref. Elena & Lenski 2003)
- Frankel, J. 2000. Cell biology of *Tetrahymena thermophila*. *Methods Cell Biol.* 62: 27-125.
- Friman, V-P., Hiltunen, T., Laakso, J. & Kaitala, V. 2008. Prey resource availability drives evolution predator prey interaction. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 275: 1625-1633.

- Friman, V-P. 2009. The role of productivity in the ecological and evolutionary dynamics of predator-prey interaction, Doctoral dissertation (article-based), <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-10-5309-2>
- Fututyama, D.J. & Moreno, G. 1988. The evolution of ecological specialisation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 19: 207–233.
- Ford, E. B. 1949. Mendelism and evolution. Methuen and Co. (Ref. Johanson&Agrawal 2003).
- Grimont, P. A. D. & Grimont, F. 1978. The genus *Serratia*. *Annual Review of Microbiology* 32: 221–248.
- Hairston, N.G. Jr & Dillon, T.A. 1990. Fluctuating selection and response in a population of freshwater copepods. *Evolution* 44: 1796–1805.
- Hairston, N.G., Smith, F.E. & Slobodkin, L.B. 1960. Community structure, population control and competition. *Am. Nat.* 94: 421-425. (Ref. Bohannan & Lenski 1999)
- Hairston, N.G.Jr., Ellner, S.P., Geber, M.A., Yoshida, T. & Fox, J.A. 2005. Rapid evolution and convergence of ecological and evolutionary time. *Ecology letters* 8: 1114-1127.
- Hall, A.R., Meyer, J.R. & Kassen, R. 2008. Selection for predator resistance varies with resource supply in a model adaptive radiation. *Evolutionary ecology Research* 10: 735-746.
- Hanski, I., Linström, J., Niemelä, J., Pietiäinen, H. & Ranta, E. 1998. *Ekologia*. WSOY, Juva: 244-323.
- Hill D.L. 1972. The biochemistry and physiology of Tetrahymena. Academic Press, New York and London, s. 203.
- Hochberg, M.E. & Holt, R.D. 1995. Refuge evolution and the population-dynamics of coupled host–parasitoid associations. *Evol. Ecol.* 9: 633–661.
- Holt, R. D., J. Grover, & D. Tilman. 1994. Simple rules for interspecific dominance in systems with exploitative and apparent competition. *Am. Nat.* 144: 741–771.
- Jonhson, M.T.J. & Agrawal, A.A. 2003. The ecological play of predator-prey dynamics in an evolutionary theatre. *Trends Ecol. Evol.* 18: 549-551.
- Kassen, R. & Bell, G. 1998. Experimental evolution of *Chlamydomona*. IV. Selection in environments that vary through time at different scales. *Hereditary* 80: 732-741.
- Kassen, R. 2002. The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity. *J. Evol. Biol.* 15: 173–190.
- Leibold, M.A. 1989. Resource edibility and the effects of predators and productivity on the outcome of trophic interactions. *Am. Nat.* 134: 922-949. (Ref. Bohannan & Lenski 1999)
- Leibold, M.A. 1996. A graphical model of keystone predators in food webs: trophic regulation of abundance, incidence and diversity patterns in communities. *Am. Nat.* 147: 784-812. (Ref. Bohannan & Lenski 1999)
- Levins, R. 1968. *Evolution in Changing Environments*. Princeton, NJ, Princeton
- Lopez-Pascua, L.D.C. & Buckling, A. 2008. Increasing productivity accelerates host-parasite co-evolution. *J. Evol. Biol.* 21: 853-860.
- Luckinbill, L. S. & Fenton, M. M. 1978. Regulation and environmental variability in experimental populations of protozoa. *Ecology* 59: 1271-1276.
- Matz, C. & Jürgens, K. 2005. High motility reduces grazing mortality of planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 921-929. (Ref. Pernthaler 2005)
- Matz, C & Kjelleberg, S. 2005. Off the hook – how bacteria survive protozoan grazing. *Trends in Microbiology* 13: 302-307
- Matz, C., Deines, P., Poenigk, J., Ardnt, H., Eberl, L., Kjelleberg, S. & Jürgens, K. 2004. Impact of violacein-producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1593-1599. (Ref. Pernthaler 2005)
- McCauley, E., Murdoch, W.W. & Watson, S. 1988. Simple models and variation in plankton densities among lakes. *Am. Nat.* 132: 383-403. (Ref. Bohannan & Lenski 1999)
- Meyer, J.R. & Kassen, R. 2007. The effects of competition and predation on diversification in a model adaptive system. *Nature* 446: 432–435.
- Murdoch, W. 1966. Community structure, population control and competition – a critique. *Am. Nat.* 100: 219-226. (Ref. Bohannan & Lenski 1999)
- Miller, M. & Bassler, B. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 165-199.

- Nakajima, T. & Kurihara, Y. 1994a. Evolutionary changes of ecological traits of bacterial populations through predator mediate competition 1. Experimental analysis. *Oikos*. 71: 24-34.
- Paruchuri, D.K. & Harshey, R.M. 1987. Flagellar variation in *Serratia marcescens* is associated with colour variation. *J. Bacteriol.* 169: 61-65.
- Pernthaler, J. 2005. Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Microbiol.* 3: 537-546.
- Reboud, X. & Bell, G. 1997. Experimental evolution of *Chlamydomonas*. III. Evolution of specialists and generalists types in environments that vary in space and time. *Heredity* 78: 507-514.
- Reznick, D.N., Bryga, H. & Endler, J.A. 1990. Experimentally induced life-history evolution in a natural population. *Nature* 346: 9-357. (Ref. Elena & Lenski 2003)
- Rice, S.A., Koh, K.S., Queck, S.Y., Labbate, M., La, K.W. & Kjelleberg, S. 2005. Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *PNAS*, 187, 3477-3485.
- Spiers, A.J., Bohannon, J., Gehrig, S.M. & Rainey, P.B. 2003. Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol. Microbiol.* 50: 15-27.
- Yoshida, T., Jones, L.E., Ellner, S.P., Fussmann, G.F. & Hairston, Jr, N.G. 2003. Rapid evolution drives ecological dynamics in a predator-prey system. *Nature* 424: 303-306.
- Yoshida, T., Hairston, Jr. N.G & Ellner, S.P. 2004. Evolutionary trade-off between against grazing and competitive ability in a simple unicellular alga, *Chlorella vulgaris*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 271: 1947-1953.
- Yoshida, T., Ellner, S.P., Jones, L.E., Bohannon, B.J.M., Lenski, R.E. & Hairston Jr, N.G. 2007. Cryptic population dynamics: rapid evolution masks trophic interactions. *PLoS Biology* e235: 1868-1879.
- Vermeij, G. 1987. *Escalation and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, MA. (Ref. Elena & Lenski 2003)
- Vermeij, G. 1994. The evolutionary interaction among species: selection, escalation, and coevolution. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25: 36-219. (Ref. Elena & Lenski 2003)