

Pro gradu -tutkielma

**Elintarvikepakkauskartongin sisältämien bakteerien
alkuperän kartoitus**

Minttu Miettinen



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Ympäristötiede

24.5.2021

Minttu Miettinen: Elintarvikepakkauskartongin sisältämien bakteerien alkuperän kartoitus
Pro gradu -tutkielma: 75 s., 4 liitettä (4 s.)
Työn ohjaajat: Specialist, Product Safety Tuula Kerkkänen, Metsä Board, FT Riitta Nissinen ja FM Emmi Räsänen, Jyväskylän yliopisto
Tarkastajat: Professori Tuula Tuhkanen ja dosentti Eeva-Riikka Vehniäinen

Toukokuu 2021

Hakusanat: *Bacillus*, itiö, mikrobiyhteisö, sekvensointi, taivekartonki, 16S rRNA

Väestönkasvu ja lukuisat ympäristöongelmat kasvattavat laadukkaiden pakkausmateriaalien kuten kartongin kysyntää. Kartonginvalmistusprosessi tarjoaa suotuisan elinympäristön lukuisille bakteereille. Vaikka suurin osa näistä eliöistä ei selviä prosessin loppupään kuumissa oloissa, bakteerien (mm. *Bacillus*) itiöt kestävät korkeita lämpötiloja ja voivat päätyä lopputuotteeseen. Nämä itiöt ovat ongelmallisia elintarvikepakkauskartongissa, koska ne voivat edesauttaa ruuan pilaantumista. Kartoittamalla lopputuotteessa esiintyvien bakteerien lähteitä, voidaan mahdollisesti löytää keinoja tuotantoprosessin puhtauden parantamiseksi. Tässä tutkimuksessa selvitettiin taivekartongin sisältämien bakteerien alkuperä. Jotta saatiin selville, mistä kontaminaatiot päätyvät lopputuotteeseen, raaka-aineiden, eri prosessivaiheiden ja kartongin sisältämät bakteerit analysoitiin. Näytteiden bakteeritiheys määritettiin viljelymenetelmällä ja runsaimmat bakteerisuvut tunnistettiin suorasekvensoimalla 16S rRNA-geeni. Kartonkinäytteiden bakteeriviljelmistä määritettiin elävät bakteerit Sanger sekvensoinnilla. Lopuksi näytteiden bakteeriyhteisöjen rakenteita verrattiin keskenään. Lopputuotteen viljeltyjen bakteerien määräksi saatiin $3,9 \times 10^2$ – $1,5 \times 10^3$ CFU/g. Tulosten perusteella prosessin märkää on todennäköisin lähde lopputuotteen bakteerisuvuille *Tepidimonas*, *Paenibacillus*, *Cloacibacterium* ja *Schlegelella*. *Pseudomonas*-suku puolestaan on oletettavasti peräisin näytteistä 8 ja 10. Näytepisteet 9 ja 11 toimivat bakteerien *Enterobacter* ja *Citrobacter* lähteinä, kun taas näytteessä 16 dominoi *Geobacillus*. Kaikille kartongin sisältämille bakteereille ei kuitenkaan löytynyt selkeää lähdeä. Lopputuotteen bakteeriviljelmistä tunnistettiin neljä elävää, itiöitä muodostavaa sukua *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* ja *Lysinibacillus*. Näistä bakteereista *Bacillus* on todennäköisesti peräisin pisteistä 10 ja 13. Sen sijaan *Brevibacillus*-suvulle ei löytynyt prosessista mitään selkeää lähdeä. Lisäksi suorasekvensoinnin perusteella kartonkinäytteet eivät sisältäneet *Lysinibacillus*-suvun DNA:ta. Tutkimuksessa saatujen havaintojen perusteella bakteereja päätyy lopputuotteeseen sekä prosessista että raaka-aineista. Vaikka kartonkikoneessa esiintyvät tietyn tyyppiset mikrobit, jokainen tehdas on mikrobistoltaan uniikki. Elintarvikkeen hygienian kannalta tulee kiinnittää erityisesti huomiota kartongin eläviin, itiöitä muodostaviin bakteereihin.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science
Department of Biological and Environmental Science
Environmental Science

Minttu Miettinen: Origin of the bacteria appearing in paperboard used for food packaging
MSc thesis: 75 p., 4 appendices (4 p.)
Supervisors: Specialist, Product Safety Tuula Kerkkänen, Metsä Board, FT Riitta Nissinen and FM Emmi Räsänen, University of Jyväskylä
Inspectors: Professor Tuula Tuhkanen and Docent Eeva-Riikka Vehniäinen

May 2021

Keywords: *Bacillus*, folding box board, microbiome, sequencing, spore, 16S rRNA

There is an increasing demand for quality packing materials like board because of the population growth and environmental issues. A board making process provides an optimal environment for numerous bacteria. Despite the majority of these organisms dies in the heat of a drying section of the process, the spores of bacteria (like *Bacillus*) may survive in these high temperatures and end up on the product. These spores may contribute a spoiling of food and due to that are problematic. The investigation of the source of the bacteria in the board producing process may help to find ways to improve the hygiene of the process. The aim of this study was to investigate the origin of the bacteria found in paperboard used for food packaging. In order to find out the source of these contaminants, the bacteria of raw materials, different process steps and the end product itself were examined. The number of living bacteria was determined by using a culturing method. The dominating genera were identified by sequencing the target gene 16S rRNA with NGS-technique. The genera of living bacteria from the board cultures were analysed with the Sanger method. Finally, the structures of bacteria communities between samples were compared. The amount of bacteria cultured of board was $3,9 \times 10^2$ – $1,5 \times 10^3$ CFU/g. The results indicate that wet end is the most probable origin for genera *Tepidimonas*, *Paenibacillus*, *Cloacibacterium* and *Schlegelella*. Instead, genus *Pseudomonas* may end up on the board from samples 8 and 10. Samples 9 and 11 are possible sources of genera *Enterobacter* and *Citrobacter* while genus *Geobacillus* dominates in sample 16. However, not all the resources of bacteria appearing in the board were identified. Four living, spore forming strains *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* and *Lysinibacillus* were identified from the board cultures. Based on NGS, sources of *Bacillus* were samples 10 and 13 whereas the origin of *Brevibacillus* was not found. However, the board did not contain any DNA of *Lysinibacillus*. According to this study, bacteria may end up on the product both from the process and raw materials. Despite, there are certain types of bacteria appearing in the board industry, each factory represents a unique microbiome. In terms of hygiene of the food stuff, the board industry should particularly pay attention to living, spore forming bacteria found on board.

SISÄLLYSLUETTELO

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | JOHDANTO | 1 |
| 2 | TUTKIMUKSEN TAUSTA..... | 4 |
| 2.1 | Kartonginvalmistusprosessi | 4 |
| 2.1.1 | Vesikierrot..... | 5 |
| 2.1.2 | Lisäaineet..... | 6 |
| 2.2 | Prosessissa esiintyviä mikrobeja | 7 |
| 2.3 | Mikrobien aiheuttamia ongelmia | 8 |
| 2.3.1 | Lopputuotteen laatu ja hygienia..... | 8 |
| 2.3.2 | Prosessi | 9 |
| 2.4 | Lopputuotteen sisältämät bakteerit ja niiden alkuperä | 9 |
| 2.4.1 | Lopputuote | 9 |
| 2.4.2 | Raaka-aineet..... | 10 |
| 2.4.3 | Märkäpää | 11 |
| 2.4.4 | Prosessivesi | 12 |
| 2.4.5 | Lisäaineet..... | 12 |
| 2.4.6 | Biofilmit | 13 |
| 2.5 | Mikrobien tunnistus sekvensoinnin avulla | 16 |
| 2.5.1 | Yleistä..... | 16 |
| 2.5.2 | Sanger sekvensointi | 17 |
| 2.5.3 | Suorasekvensointi | 17 |
| 3 | AINEISTO JA MENETELMÄT | 19 |
| 3.1 | Näytteiden otto | 19 |
| 3.1.1 | Lopputuote | 19 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.1.2 | Prosessivaiheet | 19 |
| 3.2 | Bakteerien viljely | 21 |
| 3.2.1 | Kartonkinäytteet | 21 |
| 3.2.2 | Prosessinäytteet..... | 22 |
| 3.3 | Pesäkkeiden laskenta ja bakteeritiheyden määrittäminen..... | 23 |
| 3.4 | Kartonkinäytteistä viljeltyjen bakteeripesäkkeiden talteenotto..... | 23 |
| 3.5 | DNA-pohjainen tutkimus | 24 |
| 3.5.1 | DNA:n eristys | 24 |
| 3.5.2 | PCR-I..... | 27 |
| 3.5.3 | PCR-II | 30 |
| 3.5.4 | Mikrobisyhteisöjen kartoitus suorasekvensoinnilla (Ion Torrent) | 32 |
| 3.5.5 | Mikrobisyhteisörakenteiden vertailu | 33 |
| 4 | TULOKSET | 34 |
| 4.1 | Bakteerien viljely | 34 |
| 4.1.1 | Kartonkinäytteet | 34 |
| 4.1.2 | Prosessinäytteet..... | 35 |
| 4.2 | Viljeltyjen mikrobien bakteeritiheys | 36 |
| 4.3 | Lopputuotteen sisältämät bakteerit suorasekvensoinnin perusteella.... | 39 |
| 4.4 | Lopputuotteen sisältämien bakteerien alkuperä..... | 41 |
| 4.5 | Lopputuotteen sisältämät elävät bakteerit..... | 43 |
| 4.6 | Näytteiden sisältämien bakteerien yhteisörakenne..... | 44 |
| 5 | TULOSTEN TARKASTELU | 46 |
| 5.1 | Viljeltyjen mikrobien bakteeritiheys | 46 |
| 5.1.1 | Lopputuote | 46 |
| 5.1.2 | Prosessivaiheet | 46 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 5.2 | Lopputuotteen sisältämät bakteerit suorasekvensoinnin perusteella | 49 |
| 5.2.1 | <i>Bacilli</i> -luokan itiöitä muodostavat bakteerit | 50 |
| 5.2.2 | Itiöitä muodostamattomat bakteerit | 51 |
| 5.2.3 | Koliformiset <i>Enterobacteriaceae</i> -heimon bakteerit..... | 54 |
| 5.3 | Lopputuotteen sisältämien bakteerien alkuperä..... | 54 |
| 5.3.1 | <i>Bacilli</i> -luokan itiöitä muodostavat bakteerit | 54 |
| 5.3.2 | Itiöitä muodostamattomat bakteerit | 56 |
| 5.3.3 | Koliformiset <i>Enterobacteriaceae</i> -heimon bakteerit..... | 58 |
| 5.3.4 | Muut bakteerit..... | 59 |
| 5.4 | Lopputuotteen sisältämät elävät bakteerit..... | 59 |
| 5.5 | Näytteiden sisältämien bakteerien yhteisö rakenne..... | 61 |
| 6 | JOHTOPÄÄTÖKSET..... | 63 |
| | KIITOKSET..... | 64 |
| | KIRJALLISUUS..... | 65 |
| | Liite 1: Ringer's solution -puskuriliuoksen valmistusresepti..... | 72 |
| | Liite 2: AGE-ajon geelikuvat (PCR-I)..... | 73 |
| | Liite 3: Kartonki- ja prosessinäytteiden viljeltyjen mikrobien bakteeritiheys ... | 74 |
| | Liite 4: Prosessinäytteiden sisältämät runsaimmat bakteerisuvut..... | 75 |

SANASTO JA LYHENTEET

SANASTO

| | |
|-----------------------------------|---|
| Aluke | Geenin monistumisen aloituskohtana toimiva DNA- tai RNA-juoste. |
| 16S rRNA | Bakteerin ribosomin ison alayksikön (30S) rakenneosana, joka toimii fylogeneettisenä markkerigeeninä. |
| Gram-negatiivinen bakteeri | Gram-värjäyksessä punaiseksi värjäytyvä bakteeri, jonka soluseinä koostuu sisä- ja ulkokalvosta sekä näiden väliin jäävästä tilasta. Violetiksi värjäytyvien gram-positiivisten bakteerien soluseinässä kalvoja on vain yksi. |

LYHENTEET

| | |
|--------------|-------------------------------------|
| AGE | Agaroosigeelielektroforeesi |
| BSA | Bovine serum albumin |
| CFU | Colony forming unit |
| NGS | Next generation sequencing |
| OTU | Operational taxonomic unit |
| PCR | Polymeraasiketjureaktio |
| BCTMP | Valkaistu kemitermomekaaninen massa |

1 JOHDANTO

Paperi- ja selluteollisuus on yksi merkittävimmistä teollisuuden osa-alueista, jota harjoitetaan joka puolella maailmaa. Kartonki ja paperi valmistetaan kuiduista, joita saadaan muun muassa puusta, maatalouden sivutuotteista sekä kierrätysmateriaaleista. Monien ympäristönäkökulmien vuoksi paperiteollisuudessa kiinnitetään erityistä huomiota raaka-aineiden ja veden käyttöön sekä muodostuviin päästöihin (Suhr *ym.* 2015). Tällä hetkellä tyypillisiä paperiteollisuuden trendejä ovat neutraalit tai emäksiset prosessiolosuhteet, kierrätysmateriaalien ja kemikaalien lisääntyvä hyödyntäminen sekä suljetut vesikierrrot (Blanco *ym.* 1996, Hubbe 2004, Bajpai 2015).

Globaalisti kasvava väestömäärä ja elintason paraneminen lisäävät elintarvikkeiden kysyntää. Samalla kasvaa tarve pakkausmateriaaleille, joiden on kestettävä haastavia olosuhteita kuten lämpötilan muutoksia, kuljetusta, kosteutta ja rasvaa (Weber *ym.* 2002). Lainsäädäntö, yritystenvälinen kilpailu sekä vaativat asiakkaat edellyttävät entistä parempia ja ekologisempia pakkauksia (Raheem 2012).

Maailmanlaajuisesti pakkauskäyttöön valmistetaan vuosittain 246 milj. tonnia kartonkia ja paperia (Garside 2019). Tämän materiaalin hyödyntämiseen pakkauksissa tullaan kiinnittämään enemmän huomiota tulevaisuudessa muun muassa muoviin liittyvien ympäristöongelmien vuoksi (Davis & Song 2006, Kočí 2019). Kartongin keveys, muokattavuus ja kierrätettävyyt tekevät siitä hyvän pakkausmateriaalin. Lisäksi sen etuja ovat biohajoavuus ja pääraaka-aineen uusiutuvuus (Vishtal & Retulainen 2012).

Elintarvikeketjun toimijat kuten pakkausmateriaalien valmistajat ovat vastuussa tuotteidensa hygieniasta ja turvallisuudesta ((EY) N:o 852/2004). Euroopan Unioni on asettanut vaatimukset elintarvikkeiden kanssa kosketuksiin joutuville pakkausmateriaaleille mukaan lukien kartongille ((EY) N:o 1935/2004). Asetuksen

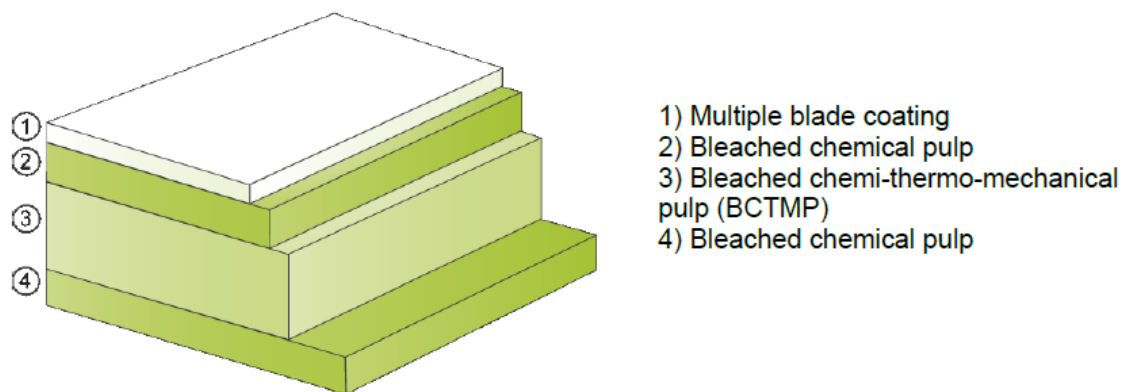
mukaan kyseinen pakkaus ei saa aiheuttaa vaaraa kuluttajan terveydelle, muuttaa sopimattomasti elintarvikkeen koostumusta tai heikentää sen ominaisuuksia.

Kartonginvalmistusprosessi on avoin systeemi, joka tarjoaa monilla fysikaaliskemiallisilla ominaisuuksillaan sopivan elinympäristön erilaisille mikrobeille. Nämä eliöt voivat päästä prosessiin veden, raaka-aineiden, kemikaalien, ilman tai työntekijöiden mukana. Bakteereja voi päätyä prosessiin myös kierrätettävistä materiaaleista. Kartongin pääraaka-aine, kemiallinen ja mekaaninen selluloosamassa sekä lukuisat lisäaineet kuten tärkkelys, pinnoitteet ja liimat toimivat ravintona bakteereille, joille prosessin lämpötila (20–78 °C) ja pH (5–8) mahdollistavat otolliset kasvuolot (Flemming *ym.* 2013, Bajpai 2015). Prosessin lopussa, kuivausvaiheessa lämpötila nousee korkeaksi (~140 °C), minkä seurauksena suurin osa bakteereista kuolee. Kuitenkin bakteerien muodostamat itiöt pystyvät selviämään tällaisista vaativista olosuhteista ja voivat päätyä lopputuotteeseen (Salkinoja-Salonen & Puhakka 2002). Nämä itiöt saattavat olla ongelmallisia elintarvikepakkauksiin käytettävissä kartongeissa, sillä ne voivat edesauttaa ruuan pilaantumista (Väisänen *ym.* 1991).

Tässä työssä tutkittava tehdas valmistaa taivekartonkia (folding boxboard, FBB), jonka raaka-aineena käytetään lehti- ja havupuusellua sekä valkaistua kemihierrettä (bleached chemi-thermo mechanical pulp, BCTMP; Itä-Suomen ympäristölupavirasto 2006, Metsä Board 2020). Tällä elintarvikepakkauksiin soveltuvalla kevyellä ja jäykällä kartongilla on kolmikerroksinen rakenne (Kuva 1). Valmistusprosessissa tarvitaan lukuisia lisäaineita kartongin ominaisuuksien parantamiseen ja päällystyksen. Tutkittavan tehtaan vuosittainen tuotantokapasiteetti on 260 000 tonnia kartonkia (Metsä Board 2020). Kartongin tyypillisiä elintarvikekäyttökohteita ovat makeis-, ruoka- ja juomapakkaukset.

Tutkittavan tehtaan lopputuotteen mikrobialaalyysit on tehty maljaviljelynä ISO-standardin (8784-1: 2014) mukaan. Prosessimassan mikrobit on puolestaan tutkittu pikatesteillä. Elintarvikepakkaukskartongin bakteeritiheys yhdessä grammassa

vaihtelee tyypillisesti 100–1000 pesäkkeen välillä (Tanner *ym.* 1940). Tehtaan lopputuotteen bakteeritiheys jää kyseiselle välille, eikä kartongista ole koskaan löytynyt koliformisia - tai *Salmonella*-suvun bakteereja. Kuitenkaan laajamittaisempaa mikrobianalyysiä ei ole tehty, eikä bakteerien alkuperää ole selvitetty.



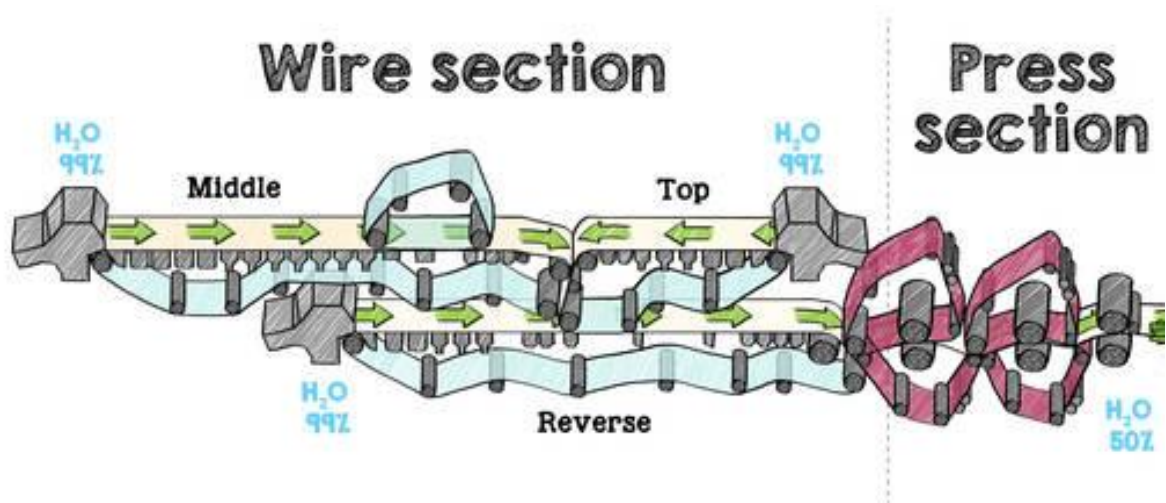
Kuva 1. Taivekartonki koostuu kolmesta kerroksesta sekä päällystekerroksista (Metsä Board 2020).

Tämän työn tavoitteena oli kartoittaa tutkittavan tehtaan lopputuotteen bakteerien alkuperä. Tutkimuskysymys oli: "Mistä prosessivaiheesta bakteerit päätyvät lopputuotteeseen? Ensimmäinen hypoteesi oli, että bakteerit ovat peräisin raaka-aineista, jolloin niistä löytyy samoja lajeja kuin lopputuotteesta. Toisena hypoteesina oli oletus, että bakteerit päätyvät lopputuotteeseen prosessiolosuhteissa lisääntyneistä ja sinne sopeutuneista mikrobiyhteisöistä. Bakteerien analysoimiseksi näytteitä kerättiin tehtaalta lopputuotteesta, prosessin eri vaiheista sekä raaka-aineista. Näytteiden bakteeriyhteisöt analysoitiin viljelymenetelmää ja DNA-pohjaista tutkimusta (suorasekvensointi) hyödyntäen. Lisäksi lopputuotteen viljelmistä tunnistettiin elävät bakteerit Sanger sekvensoinnin avulla.

2 TUTKIMUKSEN TAUSTA

2.1 Kartonginvalmistusprosessi

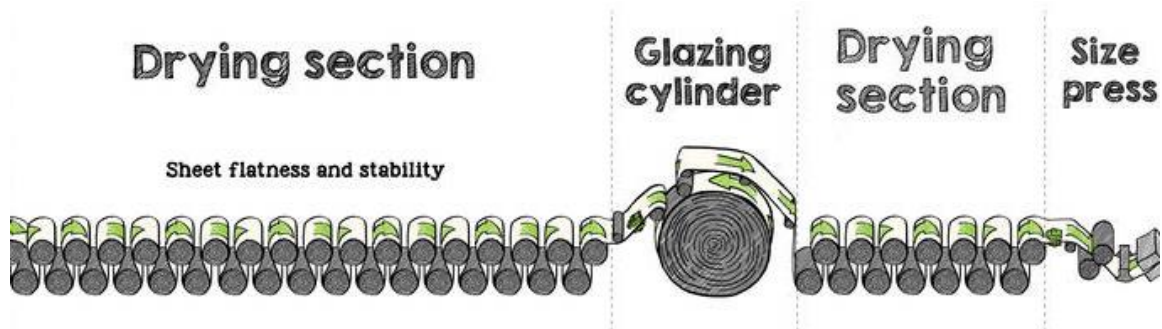
Kartonkikone voidaan jakaa karkeasti kahteen pääosaan; märkään- ja kuivaanpäähän. Prosessin alussa kemikaaleja ja yli 99 % vettä sisältävä selluloosamassa saapuu koneen märkäänpäähän (Kuva 2). Kartonkikoneen perälaatikoilla sellumassa syötetään viiralle, jossa osa vedestä poistuu ja kuidut alkavat tarttua toisiinsa koneensuuntaisesti muodostaen märän kartonkirainan. Viiralla olevia rainoja voidaan kaventaa suihkuvedellä, jolla puhdistetaan myös koneen osia. Seuraavaksi massa kulkeutuu koneen puristinosaan, jossa telat puristavat pinta-, sisä- ja taustarainat yhteen, jolloin vesipitoisuus laskee noin 50 %:iin (Bajpai 2015, Metsä Board 2020).



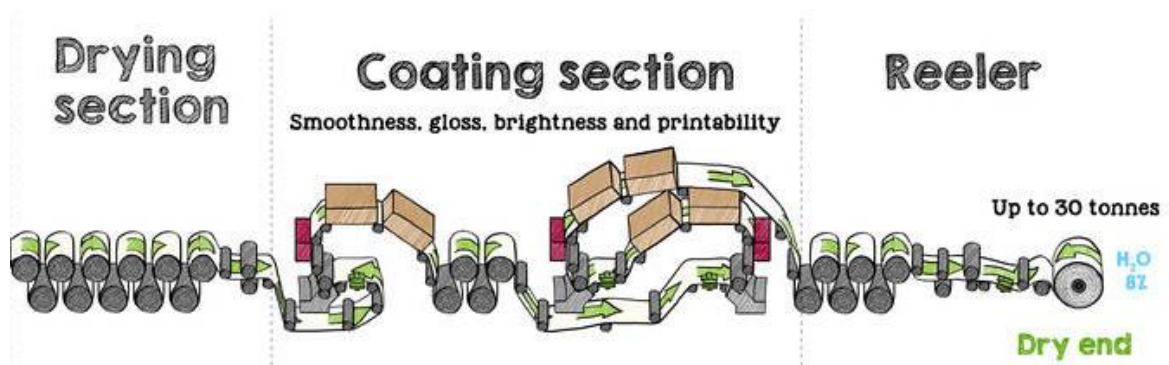
Kuva 2. Kartonkikoneen märkääpää koostuu kolmesta perälaatikosta (pinta, sisä ja tausta) sekä viira- ja puristinosasta (Metsä Board 2020).

Kartonkimassa kuivataan koneen kuivassapäässä eri lämpötiloissa höyryn tai lämmitettyjen telojen avulla. Kartongin pintaa käsitellään kiillotussylinterissä, minkä jälkeen se jatkaa prosessin liimausosaan (Kuva 3). Liimauksen jälkeen kartongin pinta viimeistellään ja päällystetään (Kuva 4). Lopuksi valmis kartonki

suuntaa kalanteriin, minkä jälkeen se pakataan suuriin rulliin (Bajpai 2015, Metsä Board 2020).



Kuva 3. Kuivauksen jälkeen kartonki käsitellään kiillotussyylinterissä. Koneen liimausosassa kartongin pinta suljetaan pintaliimauksella, jolla parannetaan myös kartongin lujuutta (Metsä Board 2020).



Kuva 4. Lopuksi kartonki päällystetään ja pakataan suuriin rulliin (Metsä Board 2020).

2.1.1 Vesikierrat

Kartonginvalmistusprosessin vesikierrat voidaan jakaa kolmeen tyyppiin; primääriseen-, sekundääriseen- ja tertiääriseen kiertoon (Bajpai 2015). Primäärinen vesikierto kiertää sellaisenaan prosessissa, kun taas sekundääriselle ja tertiääriselle kierrolle tehdään käsittelyjä. Käytännössä primäärinen kiertovesi on viiraosan vettä, joka ohjataan takaisin kartonkikoneeseen. Primääristä kiertoa kutsutaan myös lyhyeksi kierroksi (Suhr *ym.* 2015). Viira- ja puristinosissa muodostuva

ylimääräinen vesi kuuluu sekundääriseen vesikiertoon. Tyypillisesti tämä pitkään kiertoon kuuluva vesi puhdistetaan sedimentaation, flotaation tai suodatuksen avulla, minkä jälkeen se kierrätetään takaisin sellumassasäiliöön. Sekundäärisen kierron ylimääräinen vesi sekä muualta prosessista tuleva likainen vesi muodostavat tertiäärisen vesikierron. Kyseinen vesi puhdistetaan kemiallisia- ja biologisia menetelmiä hyödyntäen jätevedenpuhdistuslaitoksella. Vaikka tertiäärinen kiertovesi käsitellään puhdistamalla, se ei välttämättä ole tarpeeksi puhdasta käytettäväksi uudelleen prosessin raakavetenä (Suhr *ym.* 2015).

Osittain tai täysin suljetulla vesikierrolla pystytään vähentämään veden lisäksi kuitujen ja lisäaineiden hävikkiä. Toisaalta suljettu vesikierto lisää kemiallista hapen kulutusta (COD), mikä vaikuttaa paperikoneen ajettavuuteen ja lopputuotteen laatuun (Bajpai 2015, Suhr *ym.* 2015). Tehtaat, jotka valmistavat elintarvikepakkauskäyttöön soveltuvaa kartonkia, suljettujen vesikiertojen hyödyntäminen on rajallista, jottei lopputuotteen hygienia kärsi (Suhr *ym.* 2015).

2.1.2 Lisäaineet

Kartonginvalmistuksessa tarvitaan lukuisia lisäaineita ja kemikaaleja, jotka helpottavat sellumassan työstämistä ja mahdollistavat lopputuotteen haluttujen ominaisuuksien saavuttamisen. Lisäaineilla pystytään säätelemään muun muassa veden imeytymistä kartonkiin ja vahvistamaan kuitujen välisiä sidoksia. Kemikaalit mahdollistavat sen, että lopputuotteesta saadaan valkaistua ja läpikuultamatonta (Bajpai 2015). Lisäksi kartongin valmistuksessa käytetään täyteaineita (esim. CaCO_3), sillä ne ovat kuituja halvempia (Hubbe 2004). Täyteaineilla pystytään parantamaan myös lopputuotteen ominaisuuksia. Tyypillisiä prosessissa käytettäviä aineita ovat muun muassa dispersio-, retentio-, vaahdonesto- ja korroosionestoaineet, vedenpoistokemikaalit ja sekä erilaiset biosidit (Bajpai 2015, Suhr *ym.* 2015).

2.2 Prosessissa esiintyviä mikrobeja

Paperiteollisuudessa esiintyy aerobisia ja anaerobisia mikrobeja. Lisäksi aerobisista mikrobeista esiintyy sekä itiöitä muodostavia että - muodostamattomia bakteereja (Bajpai 2015). Paperin- ja kartonginvalmistusprosessien tyypillisimmät mikrobit kuuluvat *Bacillus*-sukuun, joka edustaa aerobisia, itiöitä muodostavia bakteereja (Väisänen *ym.* 1991, Väisänen *ym.* 1998, Mohammadzadeh-Vezifeh *ym.* 2015). Muita tavallisia prosessissa esiintyviä bakteerisukuja on esitelty Taulukossa 1. Anaerobisista bakteereista puolestaan voi esiintyä esimerkiksi *Desulfovibrio*-sukua, joka kuuluu sulfaattipelkistäjiin (Maukonen *ym.* 2006). Lisäksi prosessikoneista voi löytyä ennen tunnistamattomia bakteereja (Lahtinen *ym.* 2006). Muita kartonginvalmistusprosessissa mahdollisesti tavattavia organismeja ovat hiivat, homeet ja jopa levät (Bajpai 2015).

Taulukko 1. Paperiteollisuudessa tyypillisesti esiintyvät bakteerisuvut Blanco *ym.* 1996 ja Bajpai 2015 mukaan.

| | Itiöitä muodostavat | Itiöitä muodostamattomat |
|-------------|---------------------|---|
| Aerobiset | <i>Bacillus</i> | <i>Acinetobacter</i> <i>Citrobacter</i> <i>Enterobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Klebsiella</i> <i>Leptothrix</i> <i>Micrococcus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Staphylococcus</i> |
| Anaerobiset | <i>Clostridium</i> | <i>Desulfovibrio</i> |

2.3 Mikrobin aiheuttamia ongelmia

2.3.1 Lopputuotteen laatu ja hygienia

Osa prosessin bakteereista päätyy valmiiseen kartonkiin, mikä voi ilmetä tuotteen haurautena tai esteettisinä haittoina. Lopputuotteen bakteerit voivat myös kontaminoida niiden kanssa kosketuksiin joutuvia elintarvikkeita. (Flemming *ym.* 2013, Bajpai 2015). Jotta kartonkipakkauksessa olevat mikrobit voisivat aiheuttaa ruuan pilaantumista, niiden on ensiksi päästävä kosketuksiin elintarvikkeen kanssa. Elintarvikkeeseen koskeva kartongin pinta on pakkauskartongissa todennäköisin alue, josta bakteerit voivat päästä käsiksi ruokaan (Suominen *ym.* 1997). Erityisen haitallisia elintarvikkeen hygienian kannalta ovat koliformiset bakteerit, jotka ovat yleisnimitys *Enterobacteriaceae*-heimon laktoosia fermentoiville, sauvamaisille, itiöitä muodostamattomille gram-negatiivisille mikrobeille. Näitä bakteereja esiintyy runsaasti esimerkiksi ulosteissa, minkä vuoksi niiden esiintyminen viittaa yleensä myös muiden patogeenien läsnäoloon. Koliformisten bakteerien lisäksi muita ruokaa pilaavia bakteereja on esitelty Taulukossa 2. Bakteerien lisäksi kierrätysmateriaalien käyttö raaka-aineena voi lisätä muiden epäpuhtauksien kuten metallien (Arvanitoyannis & Bosnea 2004) ja bentsofenonijohdannaisien (Castle *ym.* 1997) päätymistä lopputuotteeseen.

Taulukko 2. Ruokaa pilaavia bakteerisukuja Siitonen *ym.* 2002* ja Zahra *ym.* 2016 mukaan.

| Koliformiset* | Muut |
|---------------------|-----------------------|
| <i>Citrobacter</i> | <i>Bacillus</i> |
| <i>Enterobacter</i> | <i>Campylobacter</i> |
| <i>Escherichia</i> | <i>Clostridium</i> |
| <i>Klebsiella</i> | <i>Listeria</i> |
| | <i>Salmonella</i> |
| | <i>Shigella</i> |
| | <i>Staphylococcus</i> |

2.3.2 Prosessi

Sen lisäksi, että edellä mainitut mikrobit ovat ongelmallisia lopputuotteessa, ne aiheuttavat haittoja myös itse kartonginvalmistusprosessissa. Mikrobit käyttävät selluloosaa sekä muita prosessin orgaanisia lisäaineita ravintonaan ja hajottavat niitä entsyymien avulla. Nämä mikrobien metaboliset prosessit tuhoavat raaka-aineita, aiheuttavat hajuhaittoja ja edesauttavat korroosion muodostumista paperikoneeseen (Blanco *ym.* 1996). Bakteerit voivat myös vaikuttaa sellumassan viskositeettiin ja näin ollen aiheuttaa koneeseen tukoksia. Lisäksi kartonkikoneessa olevat bakteerit ja sienet voivat muodostaa biofilmejä eli johonkin pintaan tarttuneita, limakerroksen ympäröimiä mikrobiyhteisöjä (Chandki *ym.* 2011). Nämä voivat aiheuttaa terveysriskejä työntekijöille ja lisätä kartonkikoneen puhdistustarvetta ja -kustannuksia (Flemming *ym.* 2013, Bajpai 2015).

2.4 Lopputuotteen sisältämät bakteerit ja niiden alkuperä

2.4.1 Lopputuote

Useissa tutkimuksissa on todettu, että kartongissa esiintyy tyypillisesti *Bacillus*-suvun bakteereja (Väisänen *ym.* 1989, Pirttijärvi *ym.* 1996, Väisänen *ym.* 1991, Suominen *ym.* 1997, Väisänen *ym.* 1998, Suihko *ym.* 2004, Mohammadzadeh-Vezifeh *ym.* 2015). Kyseiset bakteerit ovat hyvin yleisiä monissa ympäristöissä, sillä niiden muodostamat itiöt kestävät äärimmäisiä olosuhteita kuten kuumuutta ja kuivuutta (Nicholson *ym.* 2000).

Yksi runsaimmista kartongista tavatuista *Bacillus*-suvun bakteereista on *B. polymyxa*, jonka haitallisuudesta elintarvikkeille ei tiedetä kovin paljon (Väisänen *ym.* 1991). Sen sijaan *B. cereus* ja *B. licheniformis* tuottavat toksineja, jotka voivat olla haitallisia elintarvikkeiden hygienialle (Pirttijärvi *ym.* 1996, Suihko *ym.* 2004). Lisäksi *B. cereus* kasvaa matalissa lämpötiloissa (6–10 °C), minkä vuoksi se saattaa olla mahdollinen uhka lopputuotteen hygienialle (Pirttijärvi *ym.* 1999). Kyseinen

bakteeri onkin yleisin maitotuotteita pilaava tekijä, vaikka sen merkitys pakkauskartongissa on vähäisempi (Väisänen *ym.* 1991).

Kartongin bakteereja tutkineet Suominen *ym.* 1997 eivät havainneet mikrobiologista kasvua elintarvikepakkauksessa, johon lisättiin ruokaa tai nestettä. Heidän mukaansa on epätodennäköistä, että mikrobit pääsisivät kestävän kartongin pinnan läpi kosketuksiin elintarvikkeen kanssa. Elintarvikepakkauuskartongissa esiintyviä bakteereja on esitelty Taulukossa 3.

Taulukko 3. Kartongista yleisimmin tavattuja bakteerisukuja ja -lajeja.

| Bakteerisuku/(-laji) | Lähde |
|-----------------------------|--|
| <i>Bacillus</i> | Väisänen <i>ym.</i> 1989, Suominen <i>ym.</i> 1997 |
| (<i>B. brevis</i>) | Väisänen <i>ym.</i> 1991 |
| (<i>B. cereus</i>) | Väisänen <i>ym.</i> 1991, Pirttijärvi <i>ym.</i> 1996, Pirttijärvi <i>ym.</i> 1999, Suihko <i>ym.</i> 2004 |
| (<i>B. coagulans</i>) | Väisänen <i>ym.</i> 1998 |
| (<i>B. licheniformis</i>) | Väisänen <i>ym.</i> 1991, Pirttijärvi <i>ym.</i> 1996, Väisänen <i>ym.</i> 1998, Mohammadzadeh-Vezifeh <i>ym.</i> 2015 |
| (<i>B. megaterium</i>) | Pirttijärvi <i>ym.</i> 1996 |
| (<i>B. pumilus</i>) | |
| (<i>B. polymyxa</i>) | Väisänen <i>ym.</i> 1991 |
| (<i>B. subtilis</i>) | Mohammadzadeh-Vezifeh <i>ym.</i> 2015 |
| <i>Brevibacillus</i> | Väisänen <i>ym.</i> 1998, Suihko <i>ym.</i> 2004 |
| <i>Bulkholderia</i> | Väisänen <i>ym.</i> 1998 |
| <i>Corynebacterium</i> | Väisänen <i>ym.</i> 1991 |
| <i>Enterobacter</i> | Väisänen <i>ym.</i> 1991, Raaska <i>ym.</i> 2002 |
| <i>Paenibacillus</i> | Pirttijärvi <i>ym.</i> 1996, Suominen <i>ym.</i> 1997, Suihko <i>ym.</i> 2004 |
| <i>Staphylococcus</i> | Väisänen <i>ym.</i> 1991 |

2.4.2 Raaka-aineet

Selluloosamassa on kartonginvalmistusprosessin tärkein raaka-aine. Bakteerien kannalta tuorekuitu eli neitseellinen selluloosamassa on hyvin puhdasta (Tanner

ym. 1940, Väisänen ym. 1991, Suihko & Skyttä 1997). Tuorekuidun lisäksi selluloosamassan valmistuksessa voidaan hyödyntää tehtaan ulkopuolisia kierrätyspaperikuituja kuten sanomalehtiä ja nestepakkauksia. Tällaisista kierrätysmateriaaleista on löydetty laaja kirjo itiöitä muodostamattomia bakteereja, joista runsaimpia ovat *Enterobacter*, *Klebsiella*, ja *Microbacterium* (Suihko & Skyttä 2009). Lisäksi kierrätyskuitujen on todettu olevan *Paenibacillus*-suvun bakteerien oletetuin lähde lopputuotteessa (Raaska ym. 2002). Kyseistä bakteerisukua on löydetty myös muun muassa ihmisestä, vedestä sekä erilaisista maaperänäytteistä (Sáez-Nieto ym. 2017).

Kartonginvalmistusprosessissa hylyllä viitataan valmiiseen tai lähes viimeistelyyn kartonkiin, joka ei päädy lopputuotteeksi vaan kierrätetään uudelleen prosessiin raaka-aineeksi. Kyseisen massan on todettu toimivan varastona itiöitä muodostaville bakteereille *Bacillus* (*B. cereus*), *Brevibacillus* ja *Paenibacillus* (Suihko ym. 2004). Vastaavasti Väisänen ym. 1991 ovat todenneet hylyn olevan todennäköisin lähde kartongin *Bacillus*-suvun bakteereille. Lisäksi hylystä on löydetty kellertäviä pesäkkeitä muodostavia *Pseudoxanthomonas taiwanensis*-bakteereja (Suihko ym. 2004) sekä *Bulkholderia*-sukua (Väisänen ym. 1998). Päälylystyistä hylystä on puolestaan tunnistettu bakteerisukuja *Klebsiella*, *Pseudomonas* ja *Acinetobacter* (Väätänen & Niemelä 1983).

2.4.3 Märkäpää

Bakteerien kannalta yksi kriittinen prosessivaihe on kartonkikoneen märkäpää (Bajpai 2015). Noin 80 % märänpään tunnistetuista bakteerilajeista kuuluu *Bacillus*-tai *Brevibacillus*-sukuihin (Väisänen ym. 1998). Kyseisessä tutkimuksessa märänpään yleisimpiin bakteereihin kuuluivat *Bacillus* (*B. coagulans* ja *B. cereus*), *Bulkholderia*, *Ralstonia*, *Pantoea* sekä *Microbulbifer*-suvun lajit. Näistä bakteereista *B. coagulans*, *Bulkholderia* ja *Ralstonia* esiintyivät kartonkikoneen perälaatikossa. Sitä vastoin Prince ym. 2009 totesivat tutkimuksessaan, että perälaatikon yleisimmät bakteerit kuuluvat *Meiothermus*- ja *Schlegelella*-sukuihin. Perälaatikosta on myös

tavattu *Alcaligenes*- (Väisänen *ym.* 1998), *Klebsiella*- (Väätänen & Niemelä 1983, Väisänen *ym.* 1998), *Pseudomonas*- ja *Acinetobacter*-sukujen edustajia (Väätänen & Niemelä 1983) sekä biofilmejä muodostavaa *Tepidimonas*-bakteeria (Zumsteg *ym.* 2017). Desjardis & Beaulieu 2003 löysivät perälaatikosta *Pseudomonas*-suvun lisäksi ensimmäistä kertaa bakteeria *Pseudoxanthomonas*.

Kartonkikoneen viira- ja puristinosan biofilmeistä on puolestaan tunnistettu *Deinococcus*- ja *Brevibacterium*-sukuja (Väisänen *ym.* 1998). Lisäksi Pirttijärvi *ym.* 1999 löysivät *Bacillus cereus* -lajia kartonkikoneesta, mutta heidän mukaansa se ei todennäköisesti ole prosessissa ainoa kyseisen bakteerin lähde.

2.4.4 Prosessivesi

Kartonginvalmistusprosessissa käytettävän prosessiveden on todettu sisältävän runsaasti gram-negatiivisia bakteereja, joista monet ovat potentiaalisia patogeeneja (Väisänen *ym.* 1991). Esimerkiksi Väätänen & Niemelä 1983 tunnistivat kiertovedestä bakteerisukuja *Klebsiella*, *Pseudomonas* ja *Acinetobacter*. Lisäksi prosessin suihkuvedestä on löydetty biofilmejä muodostavaa *Sphingomonas*-sukua (Väisänen *ym.* 1998). Kuitenkaan kyseisen bakteerisuvun alkuperää prosessiin ei tiedetä. Muita suihkuvedessä esiintyviä bakteereja ovat edellä mainitun tutkimuksen mukaan *Alcaligenes*, *Bulkholderia*, *Klebsiella* ja *Ralstonia*. Näistä *Bulkholderia*-sukua tavattiin myös kiertovedessä ja viiraosan vedessä. Sen sijaan *B. cereus*-lajia on tavattu prosessin kiertoveden lisäksi kalanterointivedestä (Pirttijärvi *ym.* 1999, Suihko *ym.* 2004).

2.4.5 Lisäaineet

Yksi merkittävä kartonkihygieniää vaarantava tekijä on pastöroidun tärkkelyspohjaisen liiman käyttö prosessissa. Raaska *ym.* 2002 ovat todenneet, että lopputuotteesta löytyy samoja bakteereja (*Enterobacter*) kuin kyseisestä liimasta. Lisäksi elintarvikkeen hygienia vaarantuu helpommin, jos pakkausten valmistuksessa käytetään kontaminoitunutta tärkkelystä (Suominen *ym.* 1997).

Väisänen *ym.* 1998 ovat löytäneet tärkistä myös bakteerisukuja *Bacillus* (*B. licheniformis*, *B. circulans* (Väisänen *ym.* 1989)), *Bulkholderia*, *Cellulomonas* ja *Pantoea*.

Lisäaineista myös epäorgaanisten pintaväriaineiden on todettu sisältävän mikrobeja (Suominen *ym.* 1997). Tutkimuksessa todettiin, että epäorgaaniset pigmentit sisältävät enemmän bakteereja kuin polyetylenei (PE) -pinnoite. Pirttijärvi *ym.* 1999 mukaan mineraalipigmentit voivat olla yksi *Bacillus cereus*-lajin lähde lopputuotteessa.

Päällystyspigmenttinä käytettävästä kaoliinista on löydetty bakteerisukuja *Bordetella*, *Aureobacterium*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas* ja *Microbulbifer* (Väisänen *ym.* 1998). Muista prosessissa käytettävistä pigmenteistä on puolestaan tavattu *Micrococcus*-, *Bacillus*-, *Microbulbifer*-, *Arthrobacter*- sekä *Staphylococcus*-sukuja (Väisänen *ym.* 1998). Kyseisessä tutkimuksessa bakteereja (*Bordetella*, *Hydrogenophaga*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Staphylococcus*) löytyi eritoten pigmenttilietteistä, mutta ei kuivista kemikaaleista tai vedestä. Tämä viittaa siihen, että edellä mainitut bakteerit ovat peräisin kemikaalisäiliöistä. Lisäksi erilaisista kemikaaleista on löydetty gram-negatiivisia bakteereja (Väisänen *ym.* 1991) sekä lajia *B. cereus* (Suihko *ym.* 2004).

2.4.6 Biofilmit

Biofilmejä muodostavia bakteereja esiintyy lukuisissa kartonkikoneen osissa (Taulukko 4) ja ne ilmenevät vaihtelevan värisinä kasvustoina (Taulukko 5). Prosessin biofilmeissä esiintyvät bakteerit voidaan jakaa primäärisiin- ja sekundäärisiin lajeihin (Blanco *ym.* 1996). Primääriset biofilmin muodostajat kasaantuvat ensimmäisinä paperikoneen pinnoille ja mahdollistavat sekundääristen lajien kiinnittymisen jo muodostuneeseen mikrobiyhteisöön. Biofilmiin muodostuminen on biologisesti ja kemiallisesti monimutkainen prosessi (Väisänen *ym.* 1994), minkä vuoksi primääristen ja sekundääristen lajien absoluuttinen erottaminen toisistaan voi olla haastavaa (Bajpai 2015).

Taulukko 4. Prosessin eri osista löydettyjä, biofilmejä muodostavia bakteerisukuja.

| Sijainti prosessissa | Bakteerisuku/laji | Lähde |
|-----------------------|-----------------------------|---|
| Perälaatikko | <i>Bacillus</i> | Chaudhary <i>ym.</i> 1997, Desjardis & Beaulieu 2003 |
| | <i>Enterobacter</i> | Chaudhary <i>ym.</i> 1997 |
| | <i>Tepidimonas</i> | Zumsteg <i>ym.</i> 2017 |
| Päällystetty hylky | <i>Pseudomonas</i> | Chaudhary <i>ym.</i> 1997, Desjardis & Beaulieu 2003 |
| | <i>Bacillus</i> | Chaudhary <i>ym.</i> 1997 |
| | <i>Citrobacter</i> | |
| Suihkuvesi | <i>Sphingomonas</i> | Väisänen <i>ym.</i> 1998 |
| Kiertovesi | <i>Aerobacter</i> | Chaudhary <i>ym.</i> 1997 |
| | <i>Klebsiella</i> | Caplenas <i>ym.</i> 1981, Chaudhary <i>ym.</i> 1997 |
| Kiertovesi/kaoliini | <i>Methylobacterium</i> | Oppong <i>ym.</i> 2000 |
| Viiraosa | <i>Bacillus (B. brevis)</i> | Väisänen <i>ym.</i> 1989 |
| | <i>B. licheniformis</i> | |
| Viira- ja puristinosa | <i>Brevibacterium</i> | Väisänen <i>ym.</i> 1998 |
| | <i>Deinococcus</i> | |

Bacillus-suvun bakteereja on löydetty runsaasti biofilmeistä (Chaudhary *ym.* 1997, Wirtanen *ym.* 2000, Suihko *ym.* 2004). Kolari *ym.* 2001 mukaan *Bacillus*-suvun bakteerit eivät varsinaisesti ole itsessään tehokkaita biofilminmuodostajia, mutta tarttuvat herkästi pintoihin, joissa on jo kiinni muita lajeja (esim. *Deinococcus geothermalis*, Taulukko 6). Yleisimmät biofilmeistä löytyvät bakteerit ovat *Pseudomonas*, *Flavobacterium* (Wirtanen *ym.* 2000) ja *Clavibacter* (Väisänen *ym.* 1994). Lisäksi biofilmeistä on tavattu bakteereja *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *B. licheniformis*, *B. cereus* (Suihko *ym.* 2004), *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* (Wirtanen *ym.* 2000) sekä *Klebsiella* (Caplenas *ym.* 1981).

Taulukko 5. Tietyinvärisiä biofilmikasvustoja muodostavat bakteerisuvut.

| Väri | Bakteerisuku/laji | Lähde |
|------------|--------------------------------------|--|
| Punertava | <i>Acinetobacter</i> | Väisänen <i>ym.</i> 1998 |
| | <i>Deinococcus</i> | Väisänen <i>ym.</i> 1998, Oppong <i>ym.</i> 2000 |
| | <i>Methylobacterium</i> | Väisänen <i>ym.</i> 1998, Oppong <i>ym.</i> 2000 |
| | <i>Micrococcus</i> | Oppong <i>ym.</i> 2000, Wirtanen <i>ym.</i> 2000 |
| | <i>Roseomonas</i> | Oppong <i>ym.</i> 2000 |
| Kellertävä | <i>Aureobacterium</i> | Väisänen <i>ym.</i> 1998 |
| | <i>Pantoea</i> | Väisänen <i>ym.</i> 1998 |
| | <i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i> | Suihko <i>ym.</i> 2004 |
| | <i>Ralstonia</i> | Väisänen <i>ym.</i> 1998 |
| Rusehtava | <i>Microbulbifer</i> | Väisänen <i>ym.</i> 1998 |

Taulukko 6. Prosessissa esiintyviä primäärisiä biofilminmuodostajia.

| Bakteerisuku/laji | Lähde |
|---------------------------------|--|
| <i>Bacillus coagulans</i> | Väisänen <i>ym.</i> 1998 |
| <i>Burkholderia</i> | Väisänen <i>ym.</i> 1998 |
| <i>Cloacibacterium</i> | Tiirola <i>ym.</i> 2009 |
| <i>Deinococcus geothermalis</i> | Väisänen <i>ym.</i> 1998, Kolari <i>ym.</i> 2001, Kolari <i>ym.</i> 2003 |
| <i>Meiothermus silvanus</i> | Kolari <i>ym.</i> 2003 |
| <i>Rhodobacter</i> | Tiirola <i>ym.</i> 2009 |
| <i>Tepidimonas</i> | Tiirola <i>ym.</i> 2009 |

2.5 Mikrobien tunnistus sekvensoinnin avulla

2.5.1 Yleistä

Geenin sekvensointiin eli DNA:n emäsjärjestyksen selvittämiseen perustuvat tutkimusmenetelmät ovat mullistaneet mikrobien tutkimisen. Sekvensointimenetelmät voidaan jakaa ensimmäisen -, toisen - ja kolmannen sukupolven tekniikoihin. Sanger sekvensointi (Sanger *ym.* 1977) on yleisesti käytetty ensimmäisen sukupolven menetelmä, jonka etuna on pitkien geenien sekvensointi (400–900 emästä; Liu *ym.* 2012). Toisen sukupolven menetelmiin verrattuna Sangerin menetelmä on kuitenkin todella hidas, koska sillä pystytään sekvensoimaan vain yksi geeni kerrallaan. Nopeuden lisäksi toisen sukupolven sekvensointimenetelmille on tyypillistä suuri suorituskapasiteetti ja suhteellinen edullisuus (Mardis 2013). Kyseisillä menetelmillä pystytään sekvensoimaan genejä, joiden emäspituus on jopa 500. Kolmannen sukupolven sekvensointimenetelmillä viitataan tällä hetkellä kehitteillä oleviin tekniikoihin, joilla pystytään prosessoimaan pidempiä sekvenssejä aina kokonaiseen genomiin asti (Mardis 2013, Goodwin *ym.* 2016).

Esitumallisilla eliöillä kuten bakteereilla tyypillisin tutkittava geeni on 16S rRNA (Kirchman 2018). Kyseinen geeni on esitumallisten eliöiden ribosomin ison alayksikön (30S) rakenneosaa, jolla on keskeinen merkitys proteiinien tuotannossa. Geeni sopii hyvin fylogeniattutkimuksiin, sillä se löytyy kaikilta bakteereilta ja sen evoluutio on hidasta (Woese & Fox 1977). Lisäksi 16S rRNA-geenistä on saatavilla eri tietokannoista paljon dataa, johon tuloksia voi verrata bakteerien tunnistamiseksi.

2.5.2 Sanger sekvensointi

Perinteinen Sanger sekvensointi perustuu leimattujen nukleotidien käyttöön (Sanger *ym.* 1977). Menetelmässä analysoitavan näytteen DNA:n kaksoisjuoste aukaistaan ja tutkittava geenipätkä monistetaan polymeerasiketjureaktiolla (PCR). Monistettuihin DNA-pätkiin lisätään tietyt alukkeet, minkä jälkeen ne jaetaan neljään koeputkeen. Koeputket sisältävät DNA-polymeerasientsyymiä, kaikkia nukleotidejä (A, T, G, C) sekä kukin yhtä tiettyä leimattua nukleotidiä, joka pysäyttää DNA:n kahdentumisen. Toisen PCR-reaktion tuloksena saadaan eri mittaisia DNA-ketjuja, jotka erotellaan elektroforeesilla. Vertaamalla muodostunutta PCR-amplikonikuviota bakteerifylogeniaan erikoistuneisiin tietokantoihin, saadaan selville, mihin kantaan näyte kuuluu.

2.5.3 Suorasekvensointi

Suorasekvensoinnilla viitataan toisen sukupolven (next generation sequencing, NGS) menetelmiin, jotka perustuvat rinnakkaiseen sekvensointiin. Nämä menetelmät mahdollistavat tuhansien geenien emäsjärjestyksen selvittämisen samanaikaisesti (Goodwin *ym.* 2016). Mikrobitutkimuksessa NGS-menetelmillä pystytään siis määrittämään näytteen koko mikrobisyhteisö rinnakkaissekvensointeja analysoimalla. NGS-menetelmistä on kehitetty lukuisia eri sovellutuksia.

2.5.3.1 IonTorrent

Yksi tavallisista NGS-menetelmistä on IonTorrent, jossa sekvensointi tapahtuu DNA-synteesin avulla. Menetelmän toimintaperiaate perustuu nukleotidin lisäämisestä johtuvan H^+ -ionin vapautumiseen, mikä havaitaan detektorilla pH:n muutoksena (Rothberg *ym.* 2011). Tämän sovellutuksen etuja ovat hyvä prosessinopeus sekä alhaiset kustannukset. Halpuus perustuu esimerkiksi siihen, ettei menetelmä vaadi kalliita kameroita tai fluoresenssilaitteita.

Tässä menetelmässä tutkittava geeni monistetaan PCR:n avulla. DNA:n monistus tapahtuu mikroskooppisen pienissä pisaroissa (micelle), jotka koostuvat vesipohjaisesta puskuriliuoksesta (Goodwin *ym.* 2016). Kyseinen liuos sisältää tutkittavan DNA-juosteen lisäksi alukkeita, nukleotidejä (A, T, C, G), DNA-polymeraasientsyymiä sekä alukkeilla päällystettyjä hiukkasia, joiden pinnalla itse monistuminen tapahtuu. DNA-juoste yhdistyy hiukkasen pinnalla olevaan vastaavaan alukkeeseen, jolloin geenistä alkaa muodostua miljoonia kopioita. Jokaisessa pisarassa voidaan monistaa vain yksi geeni.

Monistuksen jälkeen DNA-kopiot asetetaan sekvensointisirulle omiin kuoppiinsa. Tämän jälkeen tapahtuu sekvensointireaktio, jossa toisiaan vastaavat nukleotidit liittyvät DNA-juosteeseen yksitellen. Jokaisen emäksen lisäyksestä vapautuu H^+ -ioni, jonka detektori havaitsee. Jos samaa nukleotidiä lisätään useampi peräkkäin, on detektorissa havaittava signaali voimakkaampi. Tämä ominaisuus voi tosin aiheuttaa ongelmia samojen, perättäisten emästen lukumäärän selvittämisessä, sillä happamuuden muutos ei välttämättä ole kovin suuri.

3 AINEISTO JA MENETELMÄT

Tutkittavan tehtaan lopputuotteen mikrobien alkuperä selvitettiin ottamalla näytteitä lopputuotteesta sekä prosessin eri vaiheista. Näytteiden sisältämät bakteerit viljeltiin ISO-standardin (8784-1: 2014) mukaisesti. Lisäksi kaikkien näytteiden mikrobiyhteisöt analysoitiin DNA-pohjaista tutkimusta (suorasekvensointi) hyödyntäen.

Tutkimuksen aineisto koostui 17 näytteenottopisteestä. Näytteitä kerättiin lopputuotteesta eli pakkauskartongista sekä 16:stä eri prosessivaiheesta. Prosessinäytteitä otettiin seitsemän eri kohdista kartonkikonetta, kahdeksan päällystysosasta ja yksi liimausosasta. Lopputuotteen otoskoko oli viisi ja prosessinäytteiden kolme. Näytepisteiden valinnoissa otettiin huomioon tehtaan aiemmat mikrobiraportit sekä kirjallisuuden perusteella mikrobialteimmat prosessivaiheet (Bajpai 2015). Valitut näytteenottopisteet on esitelty Taulukossa 7.

3.1 Näytteiden otto

3.1.1 Lopputuote

Näytteet oli kerätty lopputuotteesta valmiiksi viitenä eri ajankohtana. Noin A4-kokoiset kartonkinäytteet oli leikattu steriilisti ja kääritty alumiinifolioon, joka oli säilötty puhtaaseen muovipussiin. Näytteet oli pidetty noin 2 kk huoneenlämmössä, jossa ne säilyivät muuttumattomina.

3.1.2 Prosessivaiheet

Näytteet kerättiin eri prosessivaiheista kolmena eri ajankohtana. Kukin prosessinäyte otettiin ”hanasta” steriiliin 50 ml kartioputkeen. Ennen jokaista näytteenottoa hanan annettiin valuttaa massaa muutama litra. Päällystysasemien ja pintaliiman osalta biosidin annostelusta kulunut aika näytteenottohetkellä on ilmaistu Taulukossa 8. Kun kaikki 16 prosessinäytettä oli kerätty, näyteputket

laitettiin jäille kylmälaukkuun. Näytteet 1–7 käsiteltiin samana päivänä ja loput (8–16) seuraavana päivänä.

Taulukko 7. Näytepisteet ja näytteiden koostumus.

| Näytepisteen koodi | Näytepiste | Koostumus |
|--------------------|---------------|-----------|
| 0 | Lopputuote | kiinteä |
| 1 | Märkäpää | liete |
| 2 | | neeste |
| 3 | | neeste |
| 4 | | liete |
| 5 | | liete |
| 6 | | liete |
| 7 | | liuos |
| 8 | Päällystysosa | liete |
| 9 | | liete |
| 10 | | liete |
| 11 | | liete |
| 12 | | liete |
| 13 | | liete |
| 14 | | liete |
| 15 | | liete |
| 16 | Liimausosa | liete |

Taulukko 8. Biosidien edellisestä annostelusta kulunut aika näytteenottohetkellä.

| Näytepiste | Biosidi annosteltu (h) sitten | | |
|------------|-------------------------------|-----|-----|
| | A | B | C |
| 8 | 1,5 | 0,5 | 1,2 |
| 10* | 3 | 1,2 | 2,3 |
| 16 | 1,5 | 0,7 | 3,7 |

Biosidin annostelu 4 h (3 h*) välein.

3.2 Bakteerien viljely

Kaikki näytteet viljeltiin ISO-standardin (8784-1: 2014) protokollan mukaan. Kartonkinäytteistä analysoitiin erikseen totaalibakteerit sekä itiöitä muodostavat bakteerit. Totaalibakteereilla tarkoitetaan kaikkia mikrobeja, jotka kasvavat käytetyissä kasvatusolosuhteissa kokeen aikana, kun taas itiöitä muodostavilla bakteereilla viitataan kuumakäsittelyn (80 °C) kestäviin lajeihin. Prosessinäytteistä analysoitiin vain totaalibakteerit. Jokaisesta kartonkinäytteestä maljattiin viisi rinnakkaista toistoa. Prosessinäytteistä maljattiin kolme toistoa. Sopivat laimennokset arvioitiin tehtaan aiempien bakteerianalyysien perusteella. Lisäksi työskentelyolosuhteiden puhtautta seurattiin käyttäen kontrollimaljoja (3-5), jotka valettiin näytteiden käsittelyn lomassa työn alussa sekä keski- ja loppuvaiheilla. Työskentelyssä käytettiin steriilejä reagensseja ja välineitä. Jos tarvikkeet eivät olleet jo valmiiksi steriilejä, ne autoklavoitiin (Danfoss; 121 °C, 15 min).

3.2.1 Kartonkinäytteet

Maljausta varten kartonkinäytteistä valmistettiin 1:100 laimennos. Tätä varten kahdesta eri kartonkiarkista leikattiin paloja, joiden kokonaispaino vastasi suunnilleen 0,5 g. Leikatut palat laitettiin etukäteen punnitulle (Mettler Toledo AG 135) petrimaljalle. Punnitut kartongin palat hienonnettiin saksilla silpuksi (< 5 mm) huhmareeseen, johon lisättiin hieman lämmitettyä Ringer-puskuria (45 °C, Liite 1). Kartonkisilppu homogenisoitiin hienoksi puuroksi ja kaadettiin 50 ml kartioputkeen, joka täytettiin puskurilla merkkivilavuuteen. Laimennettu näyte sekoitettiin huolellisesti (vortex).

Bakteerien analysoimiseksi edellä mainitusta laimennoksesta (1:100) pipetoitiin 2 ml viidelle petrimaljalle. Välittömästi tämän jälkeen (< 5 min) maljoille lisättiin noin 45 °C PCA agar (Neogen, Culture Media, NCM0010A, Plate Count Agar (Standard Methods)). Maljaa pyöräytettiin kevyesti välttämällä voimakasta sekoitusta. Agarin annettiin jähmettyä huoneenlämmössä (25 °C). Jähmettymisen aikana petrimaljan kansi oli kevyesti raollaan, jotta muodostuneet huurut pääsivät

haihtumaan. Maljoja inkuboitiin 32 ± 2 °C (Lämpökaappi: Lab. Companion, Personal Incubator) 48 ± 3 h.

Itiöitä muodostavien bakteerien määrittämistä varten laimennetusta näytteestä (1:100) otettiin 15 ml toiseen kartioputkeen. Putkea lämmitettiin vesihauteessa 80 ± 2 °C 10 min, minkä jälkeen se jäähdytettiin ≤ 45 °C. Näytettä pipetoitiin 2 ml viidelle maljalle ja käsiteltiin samalla tavalla kuin edellä mainitussa bakteerien maljauksessa. Yli jääneet laimennetut näytteet (1:100) säilöttiin pakkaseen (-20 °C) DNA-analyysia varten.

3.2.2 Prosessinäytteet

Bakteeritiheyden määrittämiseksi prosessinäytteistä valmistettiin laimennossarja. Kartonkikoneen näytteistä (1–6) viljeltiin raakanäytteen lisäksi laimennokset 1:10, 1:100 ja 1:1000. Muissa prosessipisteissä oletettiin aiempien tutkimusten perusteella olevan vähemmän mikrobeja, minkä vuoksi niistä maljattiin raakanäytteen lisäksi vain laimennokset 1:10 ja 1:100. Laimennossarjat (10 ml) valmistettiin 15 ml kartioputkiin ja laimentimena käytettiin Ringer-puskuria (Taulukko 9).

Taulukko 9. Prosessinäytteistä valmistettu laimennossarja.

| Maljattava laimennos | Pitoisuus | Välilaimennos (ml) | Ringer (ml) | V (ml) |
|----------------------|-----------|--------------------|-------------|--------|
| R | 1 | - | - | 10 |
| VL1 | 1:10 | 1 (R) | 9 | 10 |
| VL2 | 1:100 | 1 (VL1) | 9 | 10 |
| VL3 | 1:1000 | 1 (VL2) | 9 | 10 |

R = raaka, VL = välilaimennos

Jokaisesta laimennoksesta maljattiin 2 ml näytettä kolmelle petrimaljalle, jolle lisättiin välittömästi (< 5 min) lämmin PCA agar (45 °C). Paksu prosessinäyte sekoitettiin agariin käyttäen apuna viljelysauvaa. Agarin annettiin jähmettyä huoneenlämmössä, minkä jälkeen maljoja inkuboitiin 32 ± 2 °C 48 ± 3 h. Jokaisesta

prosessinäytteestä laitettiin raakanäyte pakkaseen (-20 °C) DNA-pohjaista tutkimusta varten.

3.3 Pesäkkeiden laskenta ja bakteeritiheyden määrittäminen

Inkuboinnin jälkeen maljat otettiin huoneenlämpöön pesäkkeiden laskemista varten. Ensin tarkistettiin kontrollimaljat, ettei niissä esiintynyt kasvustoa. Maljoja tarkasteltiin paljain silmin valoa vasten ja lopuksi myös mikroskoopilla (Wild Heerbrugg 124450, VER VisiLight I-LED). Bakteeritiheyden määrittämistä varten laskettaviksi maljoiksi valittiin kustakin näytteestä vain yksi laimennos, jonka pesäkemäärä oli silmämääräisesti 10–100 välillä. Valitusta laimennoksesta (1, 1:10, 1:100 tai 1:1000) laskettiin erikseen kaikkien toistojen pesäkkeet. Yksittäiset pesäkkeet merkattiin maljalle ympyröimällä, minkä jälkeen niiden lukumäärä laskettiin. Voimakkaasti yhteen kasvaneet kasvustot otettiin lukuun yhtenä pesäkkeenä.

Kartonkinäytteen totaalibakteeritiheys (CFU/g) määritettiin seuraavan kaavan avulla:

$$N_{tot} = \frac{n \times V \times f}{v \times m}, \quad (1)$$

jossa N_{tot} = totaalibakteeritiheys (colony forming unit (CFU)/g), n = pesäkkeiden yhteislukumäärä 5 rinnakkaisella maljalla (CFU), V = kartonkikuspension kokonaistilavuus (ml), f = laimennoskerroin (laimentamattomilla näytteillä = 1), v = maljalle pipetoidun näytteen yhteismäärä 5 rinnakkaisella maljalla (ml) ja m = kartonkinäytteen massa (g).

3.4 Kartonkinäytteistä viljeltyjen bakteeripesäkkeiden talteenotto

Pesäkkeiden laskun jälkeen kartonkinäytteiden viljelymaljoilta kerättiin talteen morfologisesti erilaiset kasvustot, jotta saataisiin käsitys kartongin sisältämistä elävistä bakteereista. Talteen otettaviksi pesäkkeiksi valikoitui 26 selkeästi erillään

olevaa, silmämääräisesti erilaista kasvustoa. Pesäkkeet irrotettiin agarista steriilin viljelysilmukan avulla ja laitettiin Eppendorf-putkiin, jotka säilöttiin pakkaseen (- 20 °C). Pesäkkeitä vastaavat bakteerisuvut tunnistettiin Sanger sekvensoinnilla.

3.5 DNA-pohjainen tutkimus

Kaikista näytetyypeistä, joista mikrobit viljeltiin, oli otettu erilleen myös näytteet DNA-pohjaista tutkimusta varten. Näytteistä eristettiin yhteisöDNA NucleoSpin Soil-DNA eristyskitillä. Eristetyistä DNA-näytteistä monistettiin mikrobien 16S rRNA-geenistä alue käyttäen kirjallisuudessa hyväksi todettuja alukkeita 1062F (Ghyselinck *ym.* 2013) ja 1390R (Ikenaga *ym.* 2018). Näytteet sekvensoitiin IonTorrent PGM-laitteistolla (Liu *ym.* 2012), mikä mahdollistaa eri näytteiden koko mikrobiyhteisöjen yhtäaikaisen sekvensoinnin. Sekvenssidata prosessoitiin laitoksen CLC Genomic Workbench -ohjelmistolla ja sen Microbial Genomics -moduulilla. Bakteerisuvut tunnistettiin käyttäen SILVA-tietokantaa (Quast *ym.* 2013). Eri näytteiden mikrobiyhteisöjen rakennetta analysoitiin ja ympäristörakennetta verrattiin toisiinsa käyttäen Primer6.0+PERMANOVA-ohjelmistopakettia.

3.5.1 DNA:n eristys

Näytteiden DNA eristettiin käyttämällä NucleoSpin Soil-DNA eristyskittiä (Macherey-Nagel). Sulatettua kartonki- tai prosessinäytettä pipetoitiin 500 µl hajotushelmiä sisältävään näyteputkeen (NucleoSpin, Bead Tube Type A), johon lisättiin 700 µl hajotuspuskuria SL1 (Macherey-Nagel, Lysis Buffer SL1) tai SL2 (Macherey-Nagel, Lysis Buffer SL2). Pääasiassa orgaanista ainesta sisältäville näytteille käytettiin puskuria SL2 ja epäorgaanisia ainesosia sisältäville SL1 (Taulukko 10). Putkiin lisättiin 150 µl tehostinpuskuria (Macherey-Nagel, Enhancer SX), minkä jälkeen niitä sekoitettiin vaakatasossa (Scientific Industries, Vortex-Genie 2) täydellä teholla huoneenlämpötilassa 5 min solujen hajottamiseksi.

Näytteet sentrifugoitiin (Sigma Laborzentrifugen, 1-14; 11 000 x g/ 2 min), minkä jälkeen niihin lisättiin 150 µl hajotuspuskuri SL3 (Macherey-Nagel, Lysis Buffer SL3). Putkia sekoitettiin (Vortex, STARLAB) 5 s ja inkuboitiin jääkaapissa (3 °C) 10 min. Lopuksi näytteet fuugattiin (11 000 x g/ 1 min).

Muodostuneesta supernatantista pipetoitiin 700 µl uuteen näyteputkeen (Collection Tube, lid), jonne oli laitettu suodatin (NucleoSpin, Inhibitor Removal Column) epäpuhtauksien poistamista varten. Näytteen suodattumista tehostettiin sentrifugoimalla (11 000 x g/ 1 min). Fuugauksen jälkeen suodatin poistettiin ja näytteeseen lisättiin 250 µl puskuria SB (Macherey-Nagel, Binding Buffer SB, Guanidium thiocyanate 30–60 %).

Taulukko 10. DNA:n eristyksessä käytetty puskuri (SL1/SL2) näytetyypeittäin.

| Näyte | Käytetty puskuri (SL1/SL2) |
|-------|----------------------------|
| 0 | SL2 |
| 1 | SL2 |
| 2 | SL2 |
| 3 | SL2 |
| 4 | SL2 |
| 5 | SL2 |
| 6 | SL1 |
| 7 | SL2 |
| 8 | SL1 |
| 9 | SL1 |
| 10 | SL1 |
| 11 | SL1 |
| 12 | SL1 |
| 13 | SL1 |
| 14 | SL1 |
| 15 | SL1 |
| 16 | SL1 |

Puskurin lisäyksen jälkeen näytettä sekoitettiin 5 s ja pipetoitiin 550 µl suodattimella (NucleoSpin, Soil Column) varustettuun keräysputkeen (Collection Tube). Fuugauksen (11 000 x g/ 1 min) jälkeen DNA jäi suodattimelle ja läpi mennyt nestefaasi heitettiin pois. Vaihe toistettiin, kunnes koko näyte oli lisätty suodattimelle.

Seuraavaksi eristetylle DNA:lle suoritettiin pesu. Ensimmäisessä pesussa suodattimelle lisättiin 500 µl puskuria SB ja putki fuugattiin (11 000 x g/ 30 s). Putki tyhjennettiin pesuliuoksesta, minkä jälkeen toinen pesu suoritettiin lisäämällä 550 µl pesupuskuria SW1 (Macherey-Nagel, Wash Buffer SW1, Guanidine hydrochloride 36–50 %, 2-propanol 20–50 %). Fuugauksen jälkeen neste poistettiin ja DNA pestiin kolmannen kerran lisäämällä 700 µl pesupuskuria SW2 (Macherey-Nagel, Wash Buffer SW2). Putkea sekoitettiin 2 s, minkä jälkeen se fuugattiin. Neljäs pesu tehtiin samalla tavalla kuin kolmas pesu. Lopuksi pesuliuos heitettiin pois ja suodattimen silikakalvo kuivattiin sentrifuugissa (11 000 x g/ 2 min).

Kuivattu suodatin asetettiin uuteen eppendorf-putkeen, johon lisättiin 50 µl 80 °C eluointipuskuria SE (Macherey-Nagel, Elution Buffer SE, 5 mM Tris/HCl, pH 8,5). Näytettä inkuboitiin korkki auki huoneenlämmössä 1 min, minkä jälkeen putki fuugattiin (11 000 x g/ 30 s). Suodatin heitettiin pois ja eristetty DNA säilöttiin pakkaseen (-80 °C).

3.5.1.1 DNA-konsentraation määrittäminen Qubit fluorometrillä

DNA-konsentraation määrittämistä varten valmistettiin 11 ml working solution (WS)-liuosta, joka koostui HS-reagenssista (Molecular probes by life technologies, Qubit dsDNA HS Reagent) sekä HS-puskurista (Molecular probes by life technologies, Qubit dsDNA HS Buffer). Liuos valmistettiin suhteessa 1:200 pipetoimalla 15 ml kartioputkeen 55 µl HS-reagenssia ja 10 945 µl HS-puskuria. Pipetointi ja liuoksen käsittely suoritettiin valolta suojassa.

Standardit (2 kpl) valmistettiin 0,5 ml Qubit-putkiin pipetoimalla 190 μl WS-liuosta ja 10 μl standardiliuosta 1 (Molecular probes by life technologies, Qubit dsDNA HS Standard #1, 0 ng/ μl in TE buffer) tai 2 (Molecular probes by life technologies, Qubit dsDNA HS Standard #2, 10 ng/ μl in TE buffer). Vastaavasti näytteet valmistettiin pipetoimalla 195 μl WS-liuosta ja 5 μl eristettyä DNA:ta. Putkia sekoitettiin 2–3 s, minkä jälkeen niitä inkuboitiin huoneenlämpötilassa valolta suojassa 2 min.

DNA-konsentraatiot mitattiin Qubit fluorometrillä (Invitrogen by life technologies, Qubit 2.0 Fluorometer). Laite ilmoitti DNA-konsentraation yksikössä ng/ml, josta laimentamattoman näytteen DNA-pitoisuus määritettiin seuraavan kaavan avulla:

$$c_1V_1 = C_2V_2, \quad (2)$$

jossa c = DNA-konsentraatio (ng/ μl) ja V = tilavuus (μl). Numero 1 viittaa laimentamattomaan näytteeseen ja numero 2 laimennettuun.

3.5.2 PCR-I

Eristetystä DNA:sta monistettiin kohdegeeni (16S rRNA) PCR-reaktion avulla tunnettuja alukkeita 1062F (Ghyselinck *ym.* 2013) ja 1390R (Ikenaga *ym.* 2018) hyödyntäen. Tätä varten valmistettiin reaktioseos (Taulukko 11), joka sisälsi Master mix -seosta (DNA-polymeraasientsyymi, nukleotidit, puskuri), vettä sekä alukkeet M13–1062F ja P1–1390R. Edellä mainitut reagenssit pipetoitiin 1,5 ml eppendorf-putkeen siten, että vesi laitettiin ensin, minkä jälkeen lisättiin Master mix ja lopuksi alukkeet. Reaktioseoksen määrä laskettiin hieman yläkanttiin negatiivisten kontrollien ja pipettien mahdollisen epätarkkuuden vuoksi. Jokaista näytettä varten reaktioseosta pipetoitiin 20 μl qPCR-putkeen, jonne lisättiin 5 μl eristettyä DNA:ta. Lisäksi tehtiin kaksi negatiivista kontrollia, joissa DNA oli korvattu vedellä (nuclease free). Ensimmäinen PCR-reaktio ajettiin (C1000 Thermal Cycler) Taulukon 12 protokollaa noudattaen.

Taulukko 11. PCR-I-reaktion komponentit.

| Reagenssi | 1 reaktio (µl) | 60 reaktiota (µl) |
|---|----------------|-------------------|
| DreamTaq Green PCR Master mix (2x)* (Sis. DreamTaq DNA polymerase (5000 U/ml) & dNTP mix (25 mM)) | 12,5 | 750 |
| M13-1062F (10 µM) | 1 | 60 |
| P1-1390R (10 µM) | 1 | 60 |
| H ₂ O (nuclease-free)* | 5,5 | 330 |
| Eristetty DNA | 5 | |
| Yhteensä | 25 | 1200 |

* from Thermo Scientific

Taulukko 12. PCR-I-reaktion lämpötilaohjelma.

| Vaihe | Lämpötila (°C) | Aika (min) |
|---|----------------|------------|
| 1. Initial denaturation | 95 | 3:00 |
| 2. Denaturation | 95 | 0:45 |
| 3. Primer annealing | 54 | 0:45 |
| 4. Extension Vaiheet 2-4 toistetaan 35 | 72 | 1:00 |
| 5. Final extension | 72 | 5:00 |
| | 12 | ∞ |

3.5.2.1 Agarosigeelielektroforeesi (AGE)

Ensimmäisen PCR-reaktion onnistuminen tarkistettiin ajamalla näytteet agarosigeelielektroforeesilla (AGE). Geeli (0,8 %) valmistettiin punnitsemalla (A&D, GX-400) 0,8 g agarosijauhetta (Conda pronadisa, agarose D1 Low EEO) erlenmeyeriin ja lisäämällä 100 ml 1 × TA-puskuria. Liuosta lämmitettiin mikrossa kolme kertaa kiehuvaiksi välillä sekoittaen. Seoksen annettiin jäähtyä noin 65 °C, minkä jälkeen siihen lisättiin 2 µl SybrSafe-reagenssia (Invitrogen by Thermo Fisher

Scientific, SYBR Safe DNA gel stain, 10 000 x concentrate in DMSO). Geeli kaadettiin kammoilla varustellulle tarjottimelle ja annettiin jähmettyä 20 min.

Valmis geeli siirrettiin puskurilla (1 x TA) täytettyyn ajokammioon (OWL, Model B2), ja kammot poistettiin. Geeliin muodostuneiden rivien ensimmäisiin kammioihin pipetoitiin 5 µl Ladder-seosta (Thermo Scientific, GeneRuler, DNA Ladder Mix, 0,1 µg/µl). Seuraavaksi ensimmäisen PCR-reaktion tuotteet pipetoitiin (10 µl) kukin omaan kammioonsa. Geeliä ajettiin 120 V (VWR) 1 h. Ajettua geeliä tarkasteltiin UV-valon avulla (Axygen, Gel Documentation System). Osa geelillä ajetuista näytteistä ei ollut monistunut kunnolla (Liite 2; Kuva 13 A-B), joten kyseisille näytteille (Taulukko 13) PCR-I reaktio suoritettiin uudelleen.

Taulukko 13. PCR-I-reaktiossa huonosti monistuneet näytteet.

| Uusintaan menevän näytteen tunnus | Toisto |
|-----------------------------------|--------|
| 1 | A |
| 4 | A |
| 5 | A |
| 7 | A B C |
| 8 | A B |
| 11 | A B C |
| 13 | A B C |
| 14 | A B C |
| 15 | A B C |

3.5.2.2 PCR-I uusinta

Näytteille (Taulukko 13), joiden DNA ei ollut geelin (Liite 2; Kuva 13 A-B) perusteella monistunut, PCR-I-reaktio suoritettiin uudelleen. Reaktioseos valmistettiin muuten samalla tavalla kuin ensimmäisellä kerralla, mutta siihen lisättiin BSA:ta (Garland *ym.* 2010, Taulukko 14). Ensimmäisestä reaktiosta poiketen reaktioseosta pipetoitiin qPCR-putkiin 23 µl ja eristettyä DNA:ta 2 µl. Uusittu PCR-I-reaktio suoritettiin Taulukon 12 protokollan mukaan ja DNA:n monistuminen

tarkistettiin ajamalla näytteet AGE:lla. Vaikka BSA:n lisäämisestä oli pääosin apua (Liite 2; Kuva 13 C), osa näytteistä ei monistunut kunnolla toisellakaan kerralla (Taulukko 15).

Taulukko 14. Uusitun PCR-I-reaktion komponentit.

| Reagenssi | 1 reaktio (µl) | 25 reaktiota (µl) |
|--|----------------|-------------------|
| Dream Taq Green PCR Master mix (2x) (Sis. Dream Taq DNA polymerase (5000 U/ml) & dNTP mix (25 mM)) | 12,5 | 312,5 |
| BSA (20 mg/ml) | 1,3 | 32,5 |
| M13-1062F (10 µM) | 1 | 25 |
| P1-1390R (10 µM) | 1 | 25 |
| H ₂ O (nuclease free) | 7,2 | 180 |
| Eristetty DNA | 2 | |
| Yhteensä | 25 | 575 |

Taulukko 15. Huonosti monistuneet näytteet PCR-I:n uusinnassa, jossa käytettiin BSA:ta.

| Huonosti monistuneen näytteen tunnus | Toisto |
|--------------------------------------|--------|
| 4 | A |
| 7 | A B C |
| 11 | A |

3.5.3 PCR-II

Toista PCR-reaktiota varten valmistettiin reaktioseos (Taulukko 16), joka sisälsi Master mix -seosta, vettä sekä R-alukkeen. Seosta pipetoitiin 23 µl kylmällä telineellä pidettäviin qPCR-putkiin. Jokaiseen putkeen lisättiin yksilöllinen tunnettu DNA-pätkä eli barcode (1 µl) sekä ensimmäisen reaktion PCR-tuotetta (1 µl). Barcode-tunnisteet lisättiin näytteisiin, jotta sekvensointituloksista pystytään

tulkitsemaan, mikä DNA on peräisin mistäkin näytetyypistä. Yksilölliset DNA-pätkät alkoivat juoksevasta numerosta yksi, joka annettiin prosessinäytteen 1 ensimmäiselle toistolle. Viimeinen barcode puolestaan laitettiin kartonkinäytteiden viimeiselle toistolle.

Taulukko 16. PCR-II-reaktion komponentit.

| Reagenssi | 1 reaktio (µl) | 60 reaktiota (µl) |
|--|----------------|-------------------|
| Dream Taq Green PCR Master mix (2x) (Sis. Dream Taq DNA polymerase (5000 U/ml) & dNTP mix (25 mM)) | 12,5 | 750 |
| P1-1390R (10 µM) | 1 | 60 |
| H ₂ O (nuclease free) | 9,5 | 570 |
| Yksilöllinen barcode DNA (PCR-I) | 1 | 1 |
| Yhteensä | 25 | 575 |

PCR-II-reaktion ajossa noudatettiin PCR-I-reaktion protokollaa (Taulukko 12), josta poiketen syklit 2–4 toistettiin 10 kertaa. PCR-reaktion onnistuminen tarkistettiin suorittamalla AGE-ajo. Geelille pipetoitiin 5 µl Ladder-seosta sekä 7 µl PCR-II-tuotetta, minkä jälkeen se ajettiin 120 V 1 h.

3.5.3.1 DNA-konsentraation määrittäminen Qubit fluorometrillä

PCR-II-tuotteiden DNA-konsentraatiot määritettiin Qubit fluorometrillä. Mittausta varten PCR-II-tuotteita laimennettiin WS-liuokseen suhteessa 1:200. Laimentamattoman PCR-II-tuotteen DNA-konsentraatio (ng/ml) saatiin selville kaavan (2) avulla.

3.5.3.2 DNA:n laimennus ja sekvensointikirjaston luominen

PCR-II-tuotteista valmistettiin 50 µl vesilaimennos, jonka pitoisuus oli 10 ng/µl. Sekvensointia varten kunkin näytteen DNA:ta tarvittiin 20 ng. DNA-kirjasto luotiin

pipetoimalla 2 µl jokaista näytelaimennosta samaan 1,5 ml Eppendorf-putkeen. Tämän jälkeen putki sekoitettiin ja fuugattiin.

3.5.3.3 DNA:n puhdistus Quanta SparQ PureMag Beads -menetelmällä

Kootulle DNA-kirjastolle suoritettiin puhdistus Quanta SparQ PureMag Beads -menetelmällä. DNA-kirjastosta pipetoitiin 20 µl 1,5 ml Eppendorf-putkeen, jonne lisättiin 1,3-kertainen määrä eli 26 µl SparQ-helmiä. Seosta inkuboitiin huoneenlämmössä 15 min, minkä jälkeen se siirrettiin magneettitelineeseen. Inkubointia jatkettiin 5 min ja supernatantti pipetoitiin pois. Putkeen lisättiin 200 µl etanolia (80 %) ja 30 s inkuboinnin aikana putkea pyöräytettiin pari kertaa telineessä ympäri. Supernatantti poistettiin ja etanolihuuhtelu toistettiin. Kun supernatantti oli jälleen poistettu, putki jätettiin inkuboitumaan 15 min korkki auki, jotta kaikki etanoli varmasti haihtuisi. Tämän jälkeen korkki suljettiin ja putki poistettiin magneettitelineestä. Putkeen pipetoitiin 40 µl vettä ja inkuboitiin 5 min. Lopuksi putki siirrettiin vielä magneettitelineeseen ja inkuboitiin 5 min. Supernatantti pipetoitiin uuteen Eppendorf-putkeen ja säilöttiin pakkaseen (-20 °C). Lopuksi puhdistus toistettiin 1-kertaisella määrällä SparQ-helmiä.

3.5.4 Mikrobyhteisöjen kartoitus suorasekvensoinnilla (Ion Torrent)

Näytteiden sisältämä DNA sekvensoitiin Jyväskylän yliopistolla Ion Torrent PGM-sekvensointilaitteistolla (Thermo Fisher Scientific) käyttäen HiQ-sekvensointikittiiä ja 318v2-sirua. Sekvenssidata prosessoitiin Ion Torrent-serverillä, jossa sekvenssit yhdistettiin barcode-tunnisteiden perusteella oikeisiin näytteisiin, ja data muunnettiin analysoitavaan muotoon. Sekvensointidata tuotiin analysoitavaksi fastQ-tiedostomuodossa.

Sekvenssidata käsiteltiin QIAGEN CLC Genomics Workbench -ohjelmistolla ja sen Microbial Genomics -moduulilla (Qiagen, Aarhus, Denmark). CLC-ohjelmistossa sekvenssidatasta poistettiin kaikki sekvenssit, jotka eivät täyttäneet laatukriteerejä (laatutason raja = 0,05). Lisäksi analysoitavaksi valittiin vain ne sekvenssit, joiden

pituus oli 200–380 nukleotidia ja jotka sisälsivät 1062F-alukkeen. Seuraavaksi analysoitavaksi hyväksytyt sekvenssit jaettiin OTUihin eli operational taxonomic unit-yksiköihin. Mikrobin molykyyli-pohjaisissa tutkimuksissa OTUa käytetään bakteerilajia edustavana yksikkönä. Samaan OTUun kuuluvaksi määriteltiin sekvenssit, joiden identtisyys oli vähintään 97 %. OTUjen taksonomia määräytyi bakteerifylogeniaan erikoistuneen referenssitietokanta SILVAn (Quast *ym.* 2013) version v.136.1 mukaan. OTU-taulukkoon koottu data vietiin yhteisö-rakennepuhtausanalyysia varten Primer 6+ Permanova -ohjelmistoon. Tämä työvaihe tehtiin yhdessä ohjaaja Riitta Nissisen kanssa.

3.5.5 Mikrobiyhteisö-rakenteiden vertailu

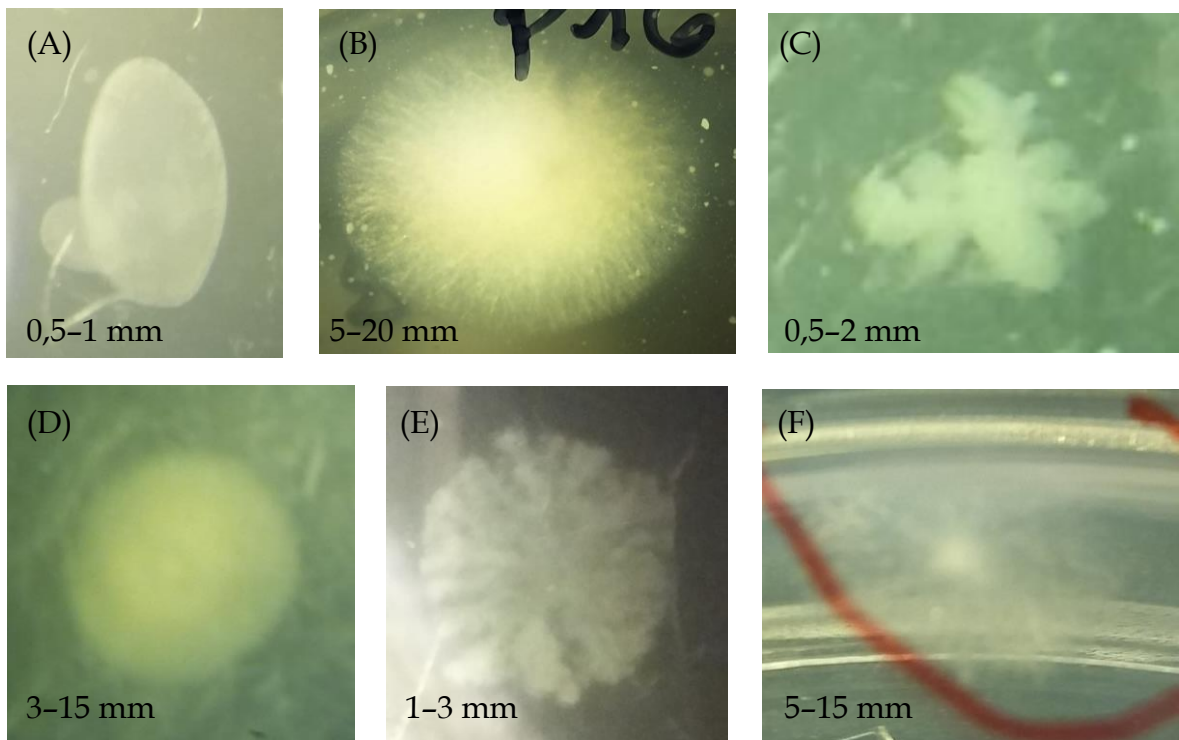
Näytteiden mikrobiyhteisöjen tutkimiseksi sekvenssidata analysoitiin Primer 6 + Permanova -ohjelmalla (primer-e.com). Sekvenssidatan OTU:t yksilöitiin juoksevilla numerolla lopputuotteessa esiintyvän runsauden mukaan. Analyysiin otettiin mukaan sekvenssidatasta niiden bakteerien OTU:t, joiden kokonaisrunsaus oli ≥ 100 . Kaiken kaikkiaan analysoitavia OTUja oli 447. Näytetyyppien sisältämien bakteerien yhteisö-rakenteiden samankaltaisuutta verrattiin PCO-analyysillä (Principal coordinates analysis) näytteiden OTUjen määrän perusteella.

4 TULOKSET

4.1 Bakteerien viljely

4.1.1 Kartonkinäytteet

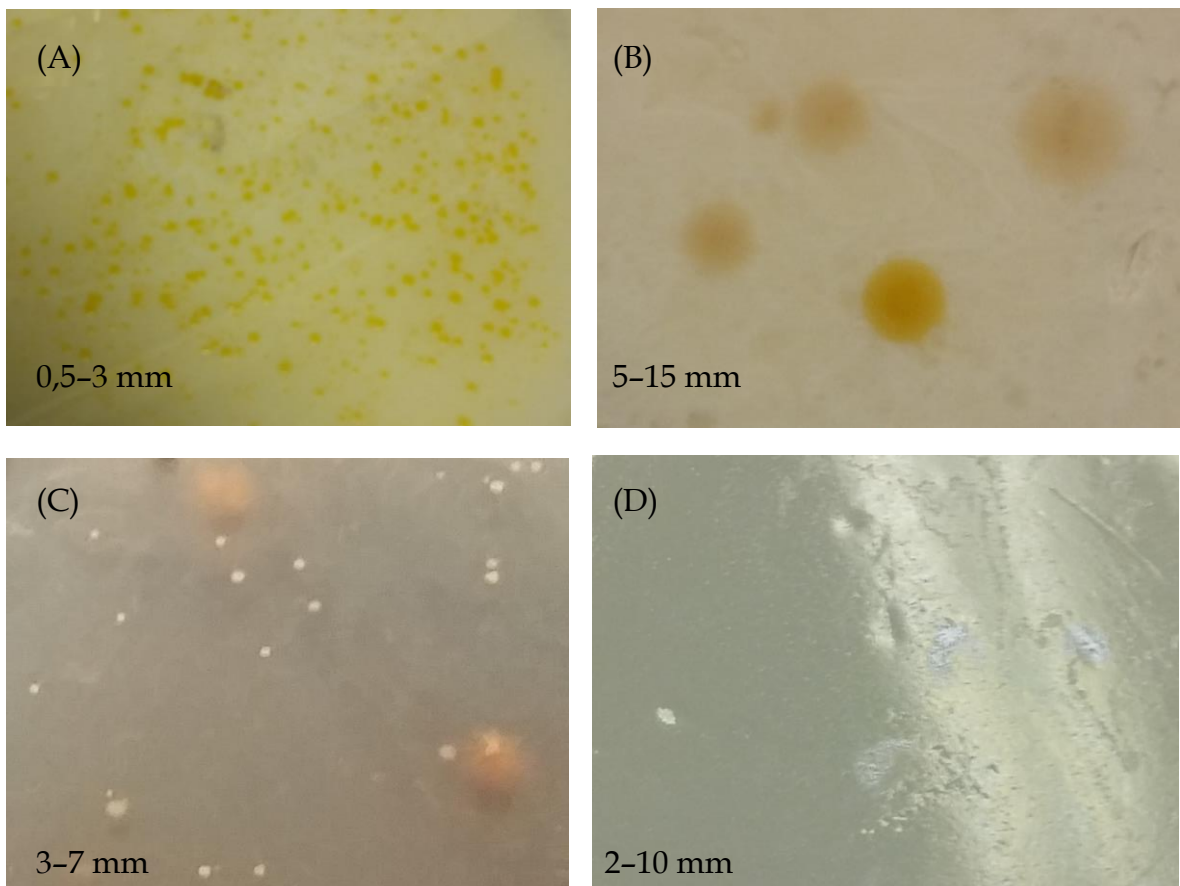
Kaikki kontrollimaljat olivat puhtaat. Kartonkinäytemaljoilla kasvoi erilaisia pesäkkeitä, joista suurin osa oli pieniä ja kiekkomaisia (Kuva 5 A). Lisäksi maljoilta löytyi läpikuultavia, epäsäännöllisiä, pyöreitä ja ruusukemaisia kasvustoja (Kuva 5 B–E). Joillakin pesäkkeillä erottui selvästi muuta kasvustoa tiheämpi keskusta (Kuva 5 F). Itiömaljoilla osa pesäkkeistä oli kasvanut voimakkaasti yhteen muodostaen suuria, kellertäviä kasvustoja.



Kuva 5. Kartonkinäytteistä viljellyiltä maljoilla löytyi kiekkomaisia (A), läpikuultavia (B), epäsäännöllisiä (C), pyöreitä (D), ruusukemaisia (E) ja keskustan sisältäviä pesäkkeitä (D). Pesäkkeiden kokoluokka on arvioitu mikroskojoinnin perusteella.

4.1.2 Prosessinäytteet

Prosessinäytteiden viljelymaljoilla esiintyvien pesäkkeiden morfologinen vaihtelu oli runsaampaa kuin kartonkinäytteissä (Kuva 5). Lisäksi maljoilta löydettiin lukuisia eri värisiä pesäkkeitä. Kellertäviä pesäkkeitä tavattiin näytteissä 12, 13, 15 sekä 8 ja 10 (Kuva 6 A). Näyte 6 oli ainoa näytetyyppi, jonka maljoilla esiintyi suurehkoja rusehtavia kasvustoja (Kuva 6 B). Lisäksi näytteiden 4 (Kuva 6 C), 5 ja 16 maljoilla kasvoi punertavia pesäkkeitä. Näytteen 11 maljojen pinnassa havaittiin tietyssä valokulmassa violettina hohtavia muodostumia (Kuva 6 D), joita ei varmuudella kuitenkaan tunnistettu bakteerikasvustoiksi.



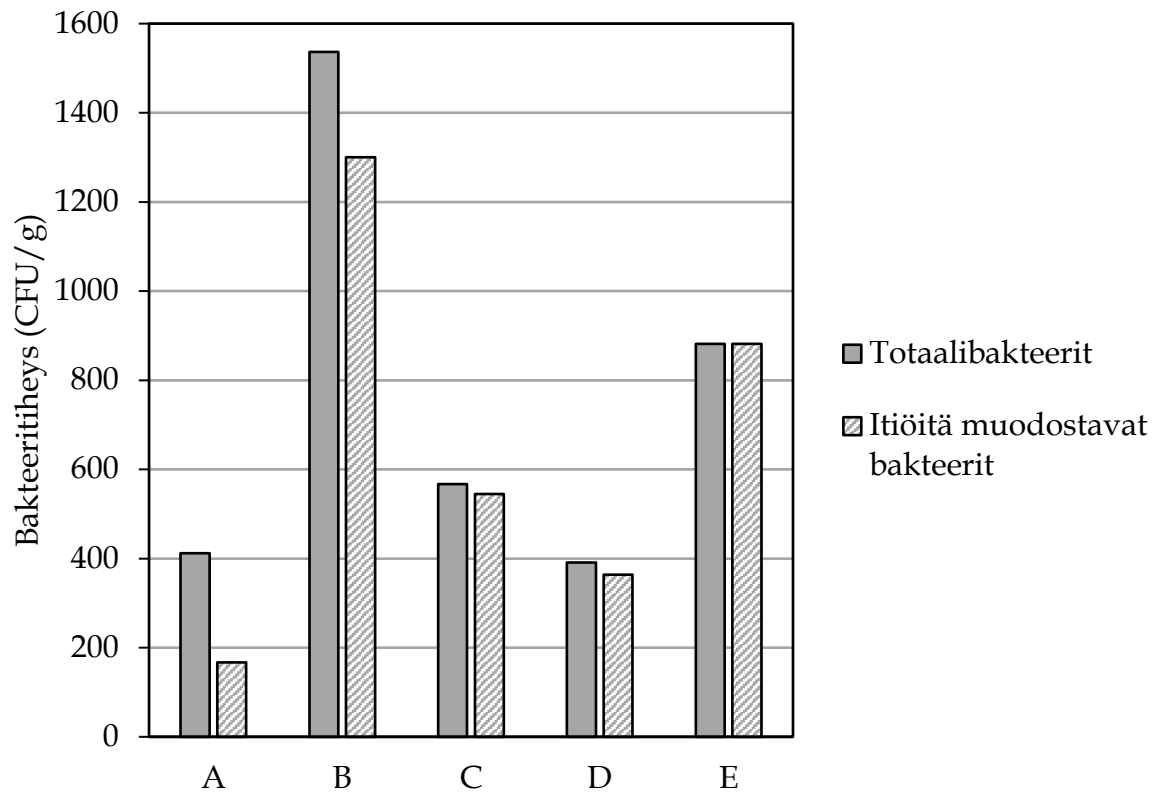
Kuva 6. Prosessinäytteistä viljeltyjä eri värisiä pesäkkeitä. Keltaiset pesäkkeet (A) ovat peräisin näytteestä 10, ruskehtavat pesäkkeet (B) näytepisteestä 6, punertavat pesäkkeet (C) näytteestä 4 ja violettina hohtavat muodostumat (D) näytteestä 11. Pesäkkeiden kokoluokka on arvioitu mikroskoppoinnin perusteella.

4.2 Viljeltyjen mikrobien bakteeritiheys

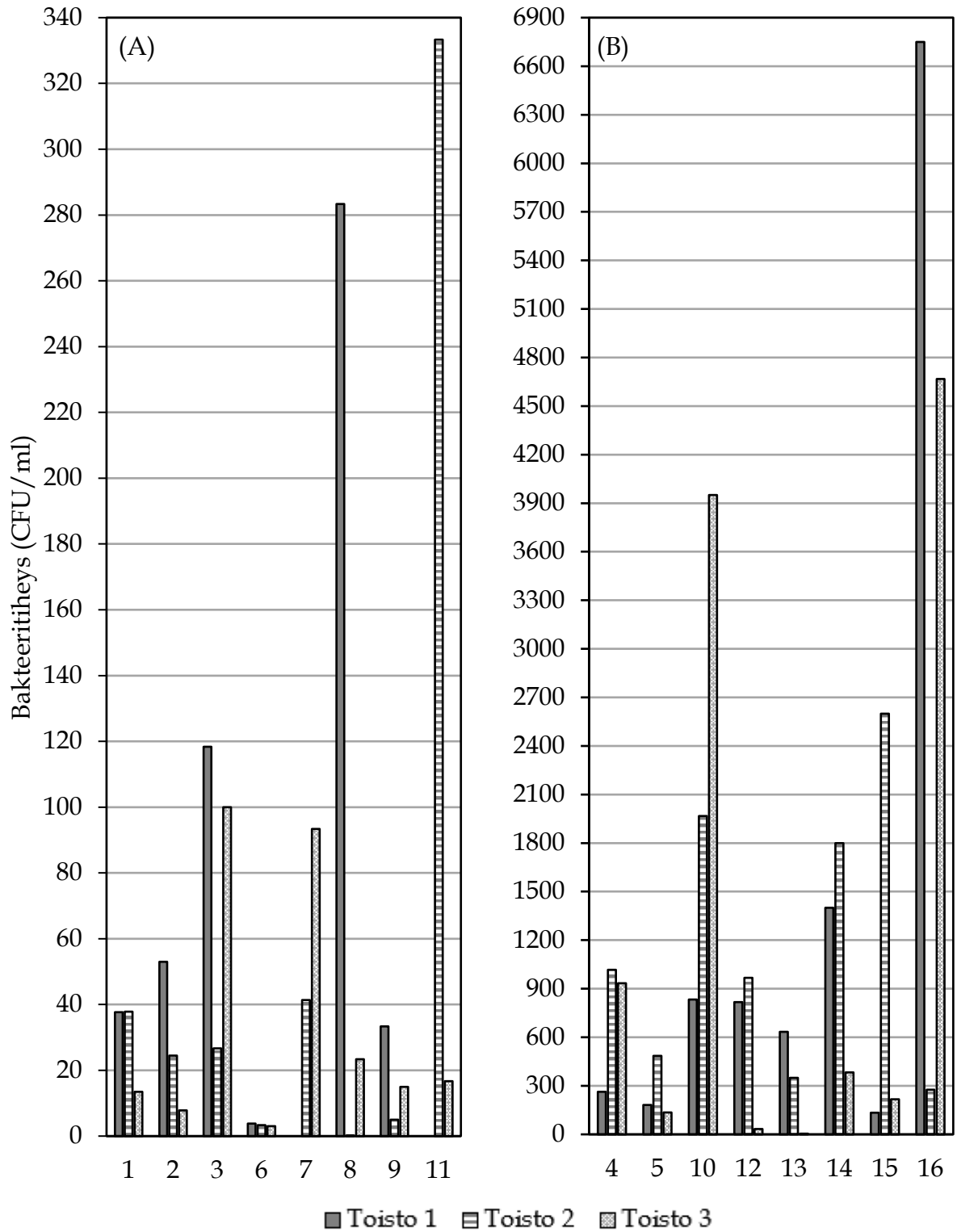
Viljeltyjen kartonki- ja prosessinäytteiden bakteeritiheydet vaihtelivat runsaasti näytteenottokertojen välillä (Kuvat 7-8, Liite 3; Taulukko 20). Lopputuotteen totaalibakteeritiheydeksi määritettiin kaavan (1) avulla $3,9 \times 10^2$ – $1,5 \times 10^3$ CFU/g. Kartongin sisältämien itiöiden tiheydeksi saatiin puolestaan $1,7 \times 10^2$ – $1,3 \times 10^3$ CFU/g.

Prosessinäytteistä eniten bakteereja sisälsivät näyte 16 ($2,8 \times 10^2$ – $6,8 \times 10^3$ CFU/ml) ja 10 ($8,3 \times 10^2$ – $4,0 \times 10^3$ CFU/ml, Kuva 8 B). Sen sijaan näytteen 8 bakteeritiheys oli noin kaksikymmentä kertaa pienempi kuin näytteellä 10. Raaka-aineista näyte 5 ja 4 sisälsivät satoja pesäkkeitä millilitrassa. Näistä näytepiste 4:n bakteeritiheys oli hieman suurempi kuin pisteen 5. Näytepisteiden 12–15 bakteeritiheydet vaihtelivat taas sadoista tuhansiin pesäkkeisiin millilitrassa. Näistä 12 ja 13 sisälsivät vähemmän bakteereja kuin 14 ja 15.

Näytepisteet 1, 2, 3, 6, 7, 9 ja 11 sisälsivät vähiten bakteereja (< 120 CFU/ml; Kuva 8 A). Näistä näytetyypeistä 6:n bakteeritiheys oli selvästi alhaisin. Näytteessä 3 esiintyi enemmän bakteereja kuin pisteessä 2. Näytepiste 11 puolestaan sisälsi huomattavasti enemmän bakteereja kuin näyte 9.



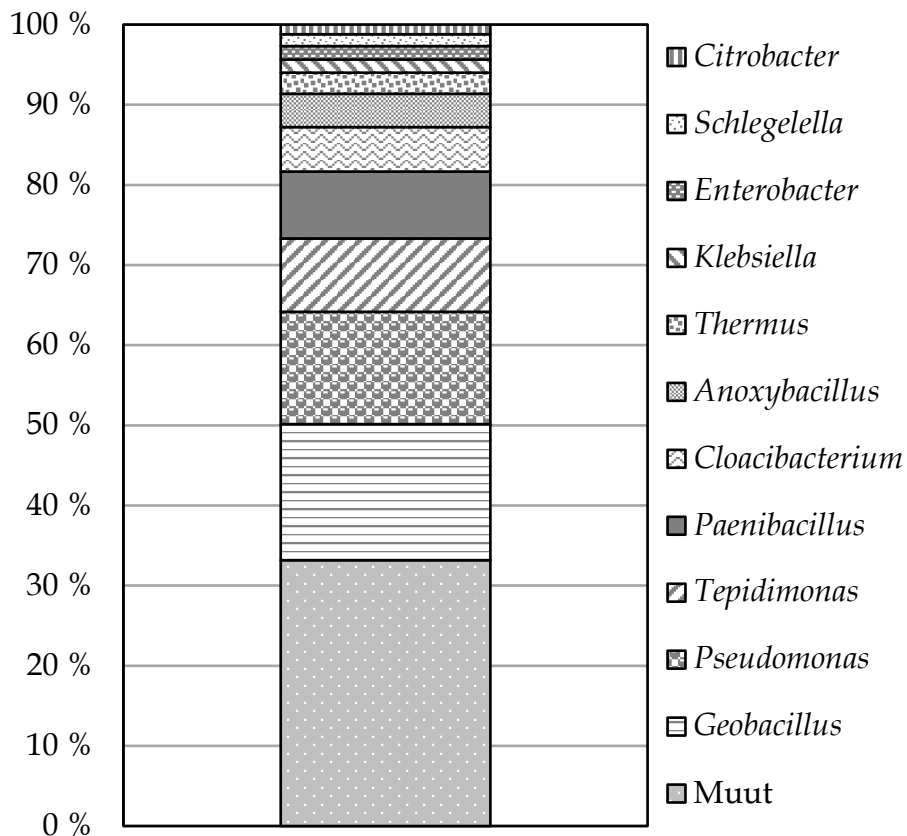
Kuva 7. Lopputuotteen viljeltyjen mikrobin totaalibakteeritiheys ja itiötä muodostavien bakteerien määrä toistoilla A-E.



Kuva 8. Eri näytepisteiden (1-16) viljeltyjen mikrobin bakteeritiheydet jaoteltuna alhaisiin (A) ja runsaisiin (B) määriin.

4.3 Lopputuotteen sisältämät bakteerit suorasekvensoinnin perusteella

Kartongin sisältämien bakteerien diversiteetti oli rikasta. Kaiken kaikkiaan lopputuotteesta löydettiin runsaat 500 eri OTUa, joihin lukeutui sekä itiöitä muodostavia että - muodostamattomia bakteerisukuja. Tarkastelussa keskityttiin niihin OTUihin, joiden suhteellinen osuus lopputuotteessa oli $>1\%$. Noin kolmannes (33,2 %) kartongin sisältämistä bakteereista kuului "muut"-ryhmään (Kuva 9). Tämä ryhmä sisälsi noin 500 eri bakteeria, joiden kokonaisrunsaus lopputuotteessa oli $\leq 1\%$.



Kuva 9. Lopputuotteen yleisimmät bakteerisuvut suorasekvensoinnin perusteella. Prosentuaalinen osuus on ilmoitettu kartonkinäytteiden toistojen keskiarvojen avulla.

Lopputuotteen yleisin bakteerisuku oli (itiöitä muodostava) *Geobacillus* (17,0 %; Kuva 9, Taulukko 17). Kyseisestä suvusta esiintyi kolmea eri sekvenssiä (OTU 1, 8, 13), jotka mahdollisesti edustivat eri lajeja. Näistä sekvensseistä löytyi muun

muassa tietokannasta RDP (Cole *ym.* 2014) lukuisia 100 % osumia, minkä vuoksi kyseisiä bakteereja ei pystytty tunnistamaan lajitasolle asti. Toiseksi yleisin bakteerisuku oli (itiöitä muodostamaton) *Pseudomonas* (14,1 %), jonka suhteellinen osuus puolestaan koostui kahdesta eri sekvenssistä (OTU 3, 5). Muita runsaasti esiintyviä bakteerisukuja olivat *Tepidimonas* (9,2 %), *Paenibacillus* (8,3 %) ja *Cloacibacterium* (5,5 %).

Yleisimmin esiintyvistä bakteereista *Geobacillus*, *Paenibacillus* ja *Anoxybacillus* kuuluivat itiöitä muodostaviin sukuihin. Näiden bakteerien suhteellinen osuus lopputuotteessa oli noin 30 %. DNA-pohjaisissa analyyseissa itiöitä muodostamattomien bakteerisukujen osuus oli puolestaan 37 %. Loput 33 % oli bakteereja, joiden kokonaisrunsaus oli ≤ 1 % (Kuva 9, Taulukko 17).

Taulukko 17. DNA-pohjaisen tutkimuksen perusteella määritetyt lopputuotteen yleisimmät bakteerisuvut ja niiden suhteellisten osuuksien keskiarvot sekä keskihajonta.

| Bakteerisuku | Itiöitä muodostava | OTU* | %-osuus |
|------------------------|--------------------|----------|-------------|
| Muut | | | 33,2 ± 6,0 |
| <i>Geobacillus</i> | x | 1, 8, 13 | 17,0 ± 11,4 |
| <i>Pseudomonas</i> | | 3, 5 | 14,1 ± 5,0 |
| <i>Tepidimonas</i> | | | 9,2 ± 4,6 |
| <i>Paenibacillus</i> | x | | 8,3 ± 3,8 |
| <i>Cloacibacterium</i> | | | 5,5 ± 0,8 |
| <i>Anoxybacillus</i> | x | | 4,2 ± 8,6 |
| <i>Thermus</i> | | | 2,61 ± 0,82 |
| <i>Klebsiella</i> | | | 1,66 ± 1,08 |
| <i>Enterobacter</i> | | | 1,66 ± 1,05 |
| <i>Schlegelella</i> | | | 1,47 ± 1,11 |
| <i>Citrobacter</i> | | | 1,22 ± 1,12 |

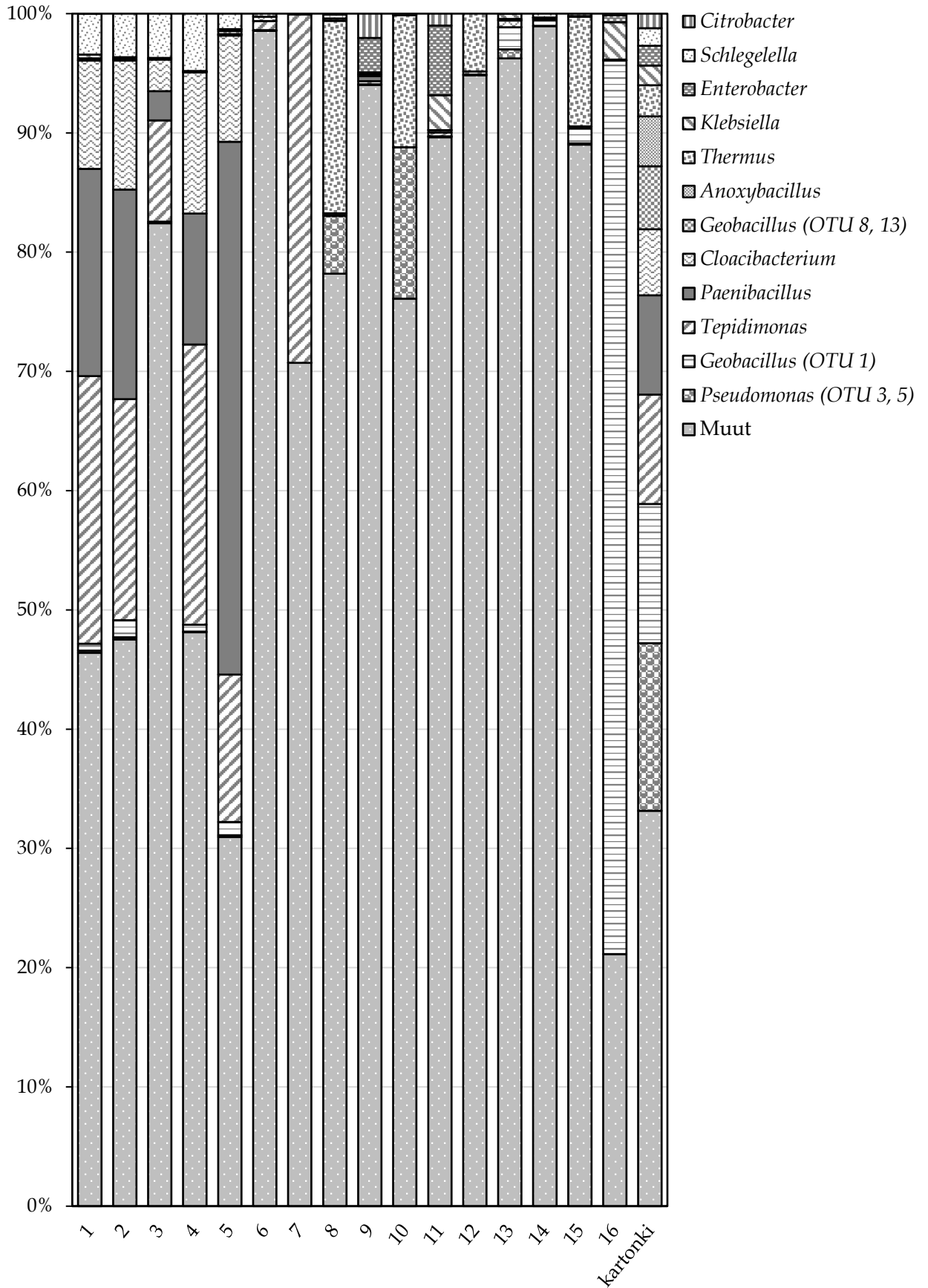
*Perustuen SILVA-tietokantaan (Quast *ym.* 2013): OTU 1 = CP002835, OTU 3 = AY221605, OTU 5 = KJ535394, OTU 8 = KY883609, OTU 13 = DQ100071.

4.4 Lopputuotteen sisältämien bakteerien alkuperä

Kartongin sisältämiä bakteerisukuja löytyi useista näytetyypeistä (Kuva 10). Osa kartongissa tavatuista suvuista esiintyi selkeästi märänpään näytetyypeissä, kun taas osa dominoi epäorgaanisissa lisäaineissa. Lopputuotteen runsainta bakteeria *Geobacillus* (OTU 1) löytyi eritoten näytteestä 16 (suhteellinen osuus ko. näytetyypissä 75 %) sekä pieniä määriä näytteistä 12 ja 15. Sen sijaan kartongissa esiintyville edellä mainittuun bakteerisukuun kuuluville OTUille (8 ja 13) prosessivaiheista ei löytynyt selkeää lähdettä. Toinen lopputuotteessa esiintynyt bakteerisuku, jonka alkuperää ei pystytty kunnolla määrittämään, oli *Anoxybacillus*. Kartongin toiseksi runsainta bakteerisukua *Pseudomonas* löytyi huomattavasti ainoastaan näytetyypeistä 8 ja 10 (Kuva 10).

Seuraavaksi yleisimmät kartongin bakteerisuvut *Tepidimonas*, *Paenibacillus* ja *Cloacibacterium* olivat selkeästi runsaimpia märänpään näytetyypeissä 1–5 (Kuva 10). Kyseisten lähteiden lisäksi *Tepidimonas*-sukua esiintyi muista poiketen runsaasti näytepisteessä 7. *Paenibacillus*-suvun suhteellinen osuus (45 %) oli näytteessä 5 kaikkein suurin. Näyte 3 sisälsi edellä mainittuja bakteerisukuja huomattavasti vähemmän kuin näyte 1, 2, 4 tai 5. Märänpään näytetyypit 1–5 ovat myös todennäköisin *Schlegelella*-suvun lähde kartongissa (Kuva 10).

Lopputuotteen bakteerisukua *Thermus* esiintyi sekä näytteissä 8 ja 10 että 12 ja 15 (Kuva 10). Sen sijaan näytepisteessä 14 ei juurikaan esiintynyt kartongissa yleisesti ilmeneviä bakteerisukuja. Toinen näytetyyppi, jonka sisältämät bakteerisuvut eivät korreloineet lopputuotteen runsaimpien lajien kanssa, oli piste 6. *Klebsiella*-sukua tavattiin lopputuotteen lisäksi pääasiassa näytteistä 11 ja 16. Näytteet 9 ja 11 toimivat myös bakteerisukujen *Enterobacter* ja *Citrobacter* todennäköisimpinä lähteinä (Kuva 10).



Kuva 10. Kartonin sisältämien bakteerien alkuperä näytesteiden (1-16) toistojen keskiarvon perusteella.

4.5 Lopputuotteen sisältämät elävät bakteerit

Talteen kerätyistä 26 pesäkkeestä ainoastaan 18 saatiin analysoitua onnistuneesti. Kaikki kartongista löydetyt elävät bakteerit olivat itiöitä muodostavia. Lopputuotteesta tunnistettiin kaiken kaikkiaan neljä eri bakteerisukua, jotka olivat *Bacillus* (9 pesäkettä), *Paenibacillus* (3 pesäkettä), *Brevibacillus* (3 pesäkettä) ja *Lysinibacillus* (1 pesäke; Taulukko 18). Lisäksi maljoilta analysoiduista pesäkkeistä kaksi (2) kuului *Bacilli*-luokkaan, mutta niitä ei saatu määritettyä sukutasolle asti. Saman bakteerisuvun edustamien pesäkkeiden morfologiassa ei ollut havaittavissa mitään yleispätevää muotoa. Proteobakteereja tai koliformisia bakteereja ei kasvanut maljoilla.

Taulukko 18. Lopputuotteen bakteeriviljelmien pesäkkeistä tunnistetut elävät bakteerisuvut perustuen SILVA-tietokantaan (Quast *ym.* 2013).

| Bakteerisuku | Pesäkkeen koodi* | Sekvenssin vastaavuus tietokantaan (%) | Pesäkkeen muoto |
|-----------------------|------------------|--|---------------------|
| <i>Bacillus</i> | B1, B6, E6 | 100 | epäsäännöllinen |
| | B7 | 100 | kiekko |
| | B8 | 100 | ympyrä |
| | B2 | 99 | ruusuke |
| | C5 | 99 | keskustan sisältävä |
| | C4 | 98 | epäsäännöllinen |
| | C2 | 89 | keskusta |
| <i>Paenibacillus</i> | C6 | 97 | epäsäännöllinen |
| | E2 | 94 | epäsäännöllinen |
| | E5 | 99 | läpikuultava |
| <i>Brevibacillus</i> | D1 | 99 | epäsäännöllinen |
| | D3 | 99 | ympyrä |
| | B9 | 99 | läpikuultava |
| <i>Lysinibacillus</i> | B4 | 100 | epäsäännöllinen |
| Luokittelematon | D2 | 85 | epäsäännöllinen |
| | E4 | 80 | kiekko |

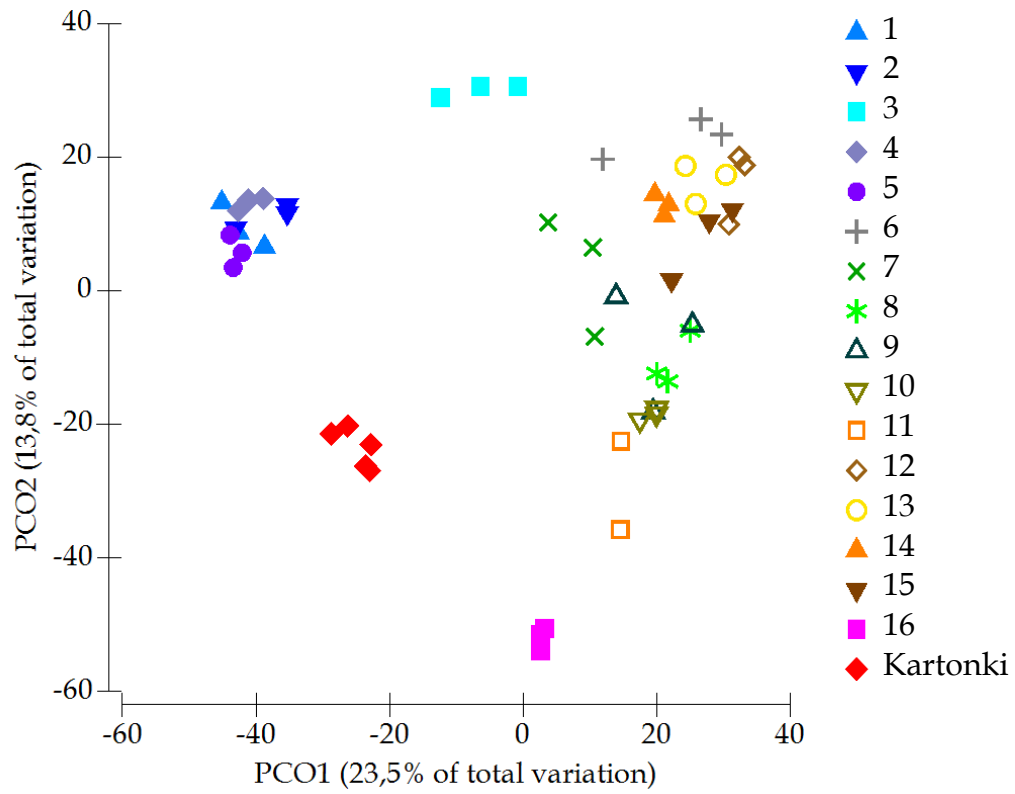
*Kirjaimet viittaavat kartonkinäytteiden toistoihin A–E.

Kun maljoilta analysoitujen bakteeripesäkkeiden DNA:ta verrattiin suorasekvensoinnilla saatuihin tuloksiin, huomattiin, että maljoilla kasvava *Bacillus*-suku on todennäköisesti peräisin näytetyypeistä 10 ja 13. Suorasekvensoinnin perusteella kyseisen bakteerin DNA:ta esiintyi vain yhdessä kartonkinäytteen toistossa. Kuitenkin tätä bakteeria kasvoi jopa kolmella eri kartonkitoiston maljalla.

Lopputuotteessa elävänä esiintyvää *Paenibacillus*-sukua esiintyi suorasekvensoinnin perusteella määränpään näytetyypeissä 1-5 (Kuva 10). Sen sijaan kartongissa elävälle *Brevibacillus*-suvulle ei analysoiduista prosessinäytetyypeistä löytynyt suorasekvensoinnin perusteella mitään selkeää lähdeä. Lisäksi maljoilla kasvavan *Lysinibacillus*-suvun DNA:ta ei löytynyt lainkaan suorasekvensointidatasta.

4.6 Näytteiden sisältämien bakteerien yhteisörakenne

PCO-analyysin tuloksena saatiin näytteiden bakteeriyhteisörakenteiden samankaltaisuudesta visuaalinen malli, jossa erottuu viisi toisistaan erillään olevaa ryhmittymää (Kuva 11). Mitä lähempänä näytetyypit ovat toisiaan, sitä samankaltaisempi niiden yhteisörakenne on OTUjen perusteella. Lopputuotteen toistot sijaitsevat kasassa muiden näytetyyppien keskellä. Kuvaajasta nähdään, että määränpään näytteet ovat samassa rykelmässä. Sen sijaan näytteen 3 bakteeriyhteisö on muista selvästi erillään. Lisäaineet sijoittuvat puolestaan omaan ryhmäänsä, mutta niissä on enemmän hajontaa jopa toistojen välillä. Näyte 16 on lisäaineista ainoa näytetyyppi, joka erottuu kuvaajassa selkeästi omana ryhmänään.



Kuva 11. Näytteiden sisältämien bakteerien yhteisöstruktureiden vertailu suorasekvensoinnista saatujen OTU:jen perusteella.

5 TULOSTEN TARKASTELU

5.1 Viljeltyjen mikrobien bakteeritiheys

5.1.1 Lopputuote

Lopputuotteen viljeltyjen mikrobien bakteeritiheydeksi määritetty $3,9 \times 10^2$ – $1,5 \times 10^3$ CFU/g on samaa suuruusluokkaa, kuin aiemmissa tutkimuksissa saadut määrät. Elintarvikepakkausikäyttöön tarkoitettun kartongin bakteeritiheys on tyypillisesti alle 1000 CFU/g (Suominen *ym.* 1997). Kuten omista tuloksista nähdään (Kuva 7), bakteerien määrä voi vaihdella huomattavastikin näytteenottokertojen välillä. Tämä on paperiteollisuudessa kuitenkin hyvin tavallista, sillä bakteerien esiintymiseen vaikuttavat lukuisat fysikaaliskemialliset tekijät (Wirtanen *ym.* 2000).

Kartongista viljellyistä totaalibakteereista löytyi paljon itiöitä muodostavia bakteereja (Kuva 7). Toistoissa D–E lähes kaikki viljeltyt bakteerit olivat itiöitä muodostavia, kun taas toistojen A–B kohdalla kyseisten bakteerien osuus suhteessa kokonaisbakteerimäärään oli pienempi. Itiöitä muodostavien bakteerien suuri osuus lopputuotteessa oli odotettavaa, sillä niiden itiöiden on todettu sietävän hyvin prosessin kuivausosan korkeita lämpötiloja (Salkinoja-Salonen & Puhakka 2002).

5.1.2 Prosessivaiheet

Huolimatta näytteenottokertojen välisestä suuresta hajonnasta, näytteen 16 bakteeritiheys oli selkeästi tämän tutkimuksen suurin $2,8 \times 10^2$ – $6,8 \times 10^3$ CFU/ml (Kuva 8 B). Raaska *ym.* 2002 raportoivat tutkimuksessaan vastaavansuuruisia tuloksia (10^3 CFU/ml). Näytteen 16 bakteerimäärä on kuitenkin hyvin alhainen verrattuna siihen, millaisia lukuja muista prosessivaiheista on löydetty aiemmissa tutkimuksissa. Esimerkiksi märänpään bakteeritiheys voi olla jopa miljoonia pesäkkeitä/ml (Väisänen *ym.* 1998).

Prosessivaiheista näyte 10 sisälsi toiseksi eniten bakteereja, kun taas näytteen 8 bakteeritiheys oli huomattavasti sitä alhaisempi (Kuva 8). Kyseisten näytetyyppien mikrobiitiheyserot voivat selittyä biosidien annosteluajankohtien vaihtelusta (Taulukko 8). Näytteet otettiin pisteestä 8 keskimäärin lähempänä myrkytysaikaa, mistä johtuen niiden bakteeritiheydet olivat oletetusti alhaisemmat kuin näytteessä 10. Mitä vähemmän aikaa myrkytyksestä oli kulunut, sitä alhaisempi oli myös bakteerien esiintyvyys pisteen 8 näytteissä. Toisaalta Taulukosta 8 nähdään myös, ettei biosidien annosteluajankohdat aina täysin korreloi bakteeritiheyden (Kuva 8) kanssa. Näytteen 10 kohdalla myrkytysajankohta ei korreloi lainkaan bakteerien määrän kanssa. Tämä voi selittyä sillä, että kyseisen näytteen viljely oli haastavaa. Näyte oli paksua lietettä, jonka valaminen agarille oli verrattain haastavaa. Esimerkiksi näytteen sekoittuminen maljalle ei aina ollut tasaista. Valetusta agarista pesäkkeet oli laskettava paljain silmin, koska mikroskoopin valo ei päässyt näytteen läpi. Lisäksi viljelyssä käytetyn standardimenetelmän inkubointilämpötilahaarukka (32 ± 2 °C 48 ± 3 h) oli hyvin kapea, eikä välttämättä optimoinut kaikkien näytteissä esiintyvien mikrobien kasvua. Tämä saattoi aiheuttaa bakteeritiheyden määrittämisessä vääristymää tuloksiin. Bakteeritiheyksien heitot annosteluajankohdan kanssa voivat johtua myös siitä, että näytteenottohetkellä biosidi ei ole ollut täysin homogeenisesti sekoittunut näytepisteessä. Myös prosessiympäristön fysikaaliskemiallisissa (lämpötila, pH) oloissa saattoi olla pieniä eroja näytteenottokertojen välillä, mikä voi vaikuttaa merkittävästi kartonkikoneen mikrobiyhteisön koostumukseen (Rosso *ym.* 1995, Wirtanen *ym.* 2000).

Väisänen *ym.* 1998 mukaan prosessin määränpään bakteeritiheys on runsas (10^5 – 10^8 CFU/ml). Myös kiertoveden bakteeritiheydeksi on määritetty jopa 10^8 CFU/ml (Suihko & Skyttä 1997). Nämä luvut eroavat saaduista tuloksista, joiden mukaan määränpään näytetyyppien 1–3 bakteeritiheydet olivat prosessin alhaisimpia (< 120 CFU/ml; Kuva 8 A). Tätä havaintoa voi selittää esimerkiksi eri tehtaissa hyödynnettävien raaka-aineiden laatu. Raaka-aineena käytettävät

kierrätysmateriaalit sisältävät tiettävästi runsaasti bakteereja (Raaska *ym.* 2002, Suihko & Skyttä 2009). Tutkittavalla tehtaalla ei hyödynnetä kierrätyskuituja, minkä vuoksi märänpään bakteeritiheydet ovat alhaisia. Lisäksi elintarvikepakkausikäyttöön valmistettavan kartongin valmistuksessa vaadittavat hygieniaolosuhteet voivat olla muita tehtaita tiukemmat. Tehtailla, joiden lopputuotteella on tarkat hygieniakriteerit, on myös rajoittuneet mahdollisuudet hyödyntää suljettuja vesikiertoja bakteerikontaminaatioriskin vuoksi (Suhr *ym.* 2015). Tämä selittää tutkimuksen märestäpäästä analysoitujen bakteerien alhaisia lukumääriä.

Tärkein on todettu olevan huomattava bakteerien lähde (10^3 – 10^5 CFU/g) kartonginvalmistusprosessissa (Väisänen *ym.* 1991). Tämän tutkimuksen mukaan näytepisteessä 7 ei juurikaan ollut bakteereja (ka < 120 CFU/ml; Liite 3; Taulukko 20). Tulos kuulostaa alhaiselta, sillä lukuisilla mikrobeilla on kyky käyttää tärkkelystä ravinnonlähteenä (Anand *ym.* 2010, Chen *ym.* 2013). Toisaalta näyte 7 tulee tehtaalle kuivina rakeina, jotka aiempien testien perusteella ovat olleet puhtaita. Sen sijaan valmiina liuksena näyte 7 on altis kontaminaatiolle seisoessaan pitkään säiliössä. Kyseisen näytteen prosessoinnissa oli lukuisia haasteita, jotka voivat myös osaltaan selittää alhaista bakteeritiheyttä. Näyte oli esimerkiksi koostumukseltaan hyvin tahmeaa, minkä vuoksi se tarttui tiukkaan pipetinkärjen sisä- ja ulkopinnoille. Näin ollen sitä ei myöskään saatu tarkasti siirrostettua kasvatusaljoille. Lisäksi tahmea koostumus esti näytteen tasaisen sekoittumisen agarissa.

Näyte 6 oli bakteeritiheydeltään tämän tutkimuksen alhaisin (Liite 3; Taulukko 20). Vaikka bakteerit voivat käyttää energianlähteenään orgaanisia- tai epäorgaanisia yhdisteitä (Jurtschuk 1996), kyseinen näyte ei välttämättä ollut tähän tarkoitukseen paras vaihtoehto. Myös näytteiden 9 ja 11 bakteeritiheydet olivat suhteellisen alhaisia (Kuva 8 A). Näistä näytteen 11 bakteeritiheys oli suurempi kuin pisteessä 9, mihin saattoi vaikuttaa erot kyseisten näytetyyppien kemiallisessa koostumuksessa. Tutkittavalla tehtaalla näyte 11 varastoidaan neljässä säiliössä,

kun taas näytteellä 9 varastosäiliöitä on vain yksi. Useampia säiliöitä on vaikeampi pitää puhtaana, mikä selittää näiden näytepisteiden erot bakteeritiheyksissä. Lisäksi näytteeseen 11 on voitu jo kyseisen raaka-aineen valmistuspaikalla lisätä vähemmän biosidia, minkä vuoksi sen bakteerimäärä oli näytettä 9 suurempi.

Märänpään näytetyypeistä näytteet 4 ja 5 sisälsivät eniten bakteereja (satoja pesäkkeitä/ml; Kuva 8 B). Havainto tukee olettamusta, jonka mukaan hylky toimii yhtenä merkittävänä bakteerien lähteenä prosessissa (Väisänen *ym.* 1991, Suihko *ym.* 2004). Kuitenkin näytteessä 5 esiintyi vähemmän bakteereja kuin näytteessä 4. Havainto selittyy biosidin annoskoolalla, joka oli näytteessä 5 suurempi. Kyseisen näytepisteen alhaisempaan bakteerimäärään saattoi vaikuttaa myös biosidin suora annostelutapa, kun taas näytteen 4 myrkytys tapahtui vesien kautta.

Näytteiden 12–15 bakteeritiheys vaihteli sadoista tuhansiin pesäkkeisiin millilitrassa (Kuva 8 B), mikä on hieman alhaisempi kuin aiemmissa tutkimuksissa määritelty väli 10^3 – 10^6 CFU/g (Väisänen *ym.* 1991, Suominen *ym.* 1997). Märänpään bakteeritiheys on useissa tutkimuksissa (Suihko & Skyttä 1997, Väisänen *ym.* 1998) suurempi kuin päällystepigmenteissä todetut määrät (Väisänen *ym.* 1991, Suominen *ym.* 1997). Tässä tutkimuksessa saatujen tulosten (Kuva 8) perusteella näytteet 12–15 sisältävät enemmän bakteereja kuin näytteet 1–7. Koska kaikki näytteet 12–15 otettiin lietemäisessä muodossa, on vaikea ottaa kantaa siihen, ovatko bakteerit peräisin itse raaka-aineesta vai säiliöön lisättävästä vedestä. On mahdollista, että mikrobiyhteisö kehittyy vasta itse säiliössä (Väisänen *ym.* 1998).

5.2 Lopputuotteen sisältämät bakteerit suorasekvensoinnin perusteella

Paperikoneessa runsaimmin esiintyvät bakteerit vaihtelevat jonkin verran tutkimusten välillä. Tähän vaikuttavat tutkimuskohteessa käytettävät raaka-aineet, vallitsevat prosessiolosuhteet (Wirtanen *ym.* 2000) sekä käytetyt tutkimusmenetelmät. Edellä mainitut tekijät puolestaan vaikuttavat tutkimustulosten vertailukelpoisuuteen. Seuraavissa kappaleissa kartongin

runsaimpia bakteerisukuja käsitellään suorasekvensointitulosten perusteella. Vaikka sekvensoinnin avulla tiedetään, minkä bakteerien DNA:ta kartonki sisältää eniten, se ei kuitenkaan kerro, onko kyseinen DNA peräisin elävästä vai kuolleesta eliöstä. Tällä voi olla merkitystä arvioitaessa lopputuotteessa esiintyvien bakteerien haitallisuutta elintarvikkeille, koska ruuan pilaantuminen johtuu usein patogeenisten bakteerien aineenvaihdunnasta ja kasvusta (Mostafa *ym.* 2018).

5.2.1 *Bacilli*-luokan itiöitä muodostavat bakteerit

Lukuisissa tutkimuksissa kartongin tyypillisimmiksi bakteereiksi on todettu *Bacillus*-suvun edustajat (Väisänen *ym.* 1989, Pirttijärvi *ym.* 1996, Väisänen *ym.* 1991, Suominen *ym.* 1997, Väisänen *ym.* 1998, Suihko *ym.* 2004, Mohammadzadeh-Vezifeh *ym.* 2015). Tässä tutkimuksessa lopputuotteen yleisimmäksi bakteerisuvuksi osoittautui itiöitä muodostava *Geobacillus* ($17,0 \pm 11,4$ %; Taulukko 17), jota myös Suihko *ym.* 2004 ovat löytäneet kartongista. *Geobacillus* on haarautunut *Bacillus*-suvusta omaksi ryhmäkseen ja se on alun perin eristetty öljykenttien kuumista vesistä, joissa lämpötila vaihtelee 50–80 °C (Nazina *ym.* 2001). Tämä selittää, miksi kyseinen termofiilinen eli kuumuutta kestävä bakteeri selviytyy myös kartonginvalmistusprosessin korkeissa lämpötiloissa. Lisäksi *Bacillus*-bakteerien itiöt kestävät polttavan kuivia olosuhteita (Nicholson *ym.* 2000), minkä vuoksi niiden päätyminen lopputuotteeseen on mahdollista.

Toinen tämän tutkimuksen kartongista tavattu itiöitä muodostava bakteeri oli *Paenibacillus* ($8,3 \pm 3,8$ %; Taulukko 17), joka *Geobacillus*-suvun tavoin on haarautunut *Bacillus*-suvusta erilleen (Ash *ym.* 1993). Tätä bakteeria on tavattu kartongissa myös aiemmin (Pirttijärvi *ym.* 1996, Suominen *ym.* 1997, Suihko *ym.* 2004). Lisäksi kartongista on löydetty bakteeria *Brevibacillus* (Väisänen *ym.* 1998, Suihko *ym.* 2004), joka kuuluu samaan heimoon (*Paenibacillaceae*) *Paenibacillus*-suvun kanssa (Kuva 12). *Paenibacillus*-sukua on eristetty lukuisissa ympäristöistä, esimerkiksi maaperästä, kasveista ja eläimistä (Grady *ym.* 2016, Sáez-Nieto *ym.* 2017). Vaikka kyseisen suvun tuottamia entsyymejä on hyödynnetty jopa

kaupallisesti, joidenkin *Paenibacillus*-lajien on todettu aiheuttavan ruuan pilaantumista sekä infektoita ihmisille (Grady *ym.* 2016). Kuten *Geobacillus*, myös *Paenibacillus* on fakultatiivisesti anaerobinen bakteeri (Taulukko 19) eli se pystyy kasvamaan sekä hapellisissa että hapettomissa ympäristöissä. Se ei kuitenkaan siedä *Geobacillus*-suvun tavoin kovia lämpötiloja.

Kolmas kartongista löydetty itiöitä muodostava bakteeri oli *Anoxybacillus* ($4,2 \pm 8,6$ %; Taulukko 17). Edellä mainituista suvuista poiketen *Anoxybacillus* elää vain hapettomissa oloissa (Pikuta *ym.* 2000) eli se on anaerobinen eliö (Taulukko 19). Luonnossa tällaisia elinympäristöjä löytyy esimerkiksi lannasta. Tässä tutkimuksessa tunnistettujen itiöitä muodostavien bakteerien sukulaisuussuhteita on havainnollistettu tarkemmin Kuvassa 12.

5.2.2 Itiöitä muodostamattomat bakteerit

Toiseksi yleisin kartongista löydetty bakteeri tässä tutkimuksessa oli aerobinen eli happea vaativa *Pseudomonas* ($14,1 \pm 5,0$ %; Taulukko 17), joka on yksi monimuotoisimmista bakteerisuvuista (Spiers *ym.* 2000). Diversiteetin runsaudesta johtuen suvun lajien taksonominen luokittelu on vaihtunut useaan kertaan proteobakteeriluokkien välillä (Peix *ym.* 2009). Suvun edustajia on tavattu niin terrestrisistä kuin myös akvaattisista ekosysteemeistä (Valenstein *ym.* 1983). Paperiteollisuudessa *Pseudomonas*-suvun on todettu muodostavan biofilmejä (Chaudhary *ym.* 1997). Kyseisestä suvusta on löydetty myös ihmiselle haitallisia lajeja, joista esimerkkinä *P. alcaligenes* (Valenstein *ym.* 1983).

Kartongista tavattiin myös bakteeria *Tepidimonas* ($9,2 \pm 4,6$ %; Taulukko 17), joka on löydetty ensimmäisen kerran kuumasta lähteestä (Moreira *ym.* 2000). Kyseistä sukua on tavattu aiemmin paperiteollisuudessa prosessin biofilmeissä (Tirola *ym.* 2009). Joillakin tämän termofiilisen, aerobisen bakteerisuvun (Taulukko 19) edustajilla (*T. taiwanensis*) on todettu olevan kyky hajottaa tärkkelystä (Chen *ym.* 2013). *Tepidimonas* kuuluu β -proteobakteereihin, johon kuuluu myös kartongista aikaisemmin tavattu *Burkholderia*-suku (Väisänen *ym.* 1998, Kuva 12). Kartongista

löydetty *Schlegelella* ($1,47 \pm 1,11$ %) lukeutuu myös β -proteobakteereihin. Tätä kuumuutta kestävä, happea vaativaa bakteeria on eristetty muun muassa aktiivilietteestä. Lisäksi *Schlegelella*-sukua esiintyy tyypillisesti paperiteollisuuden jätevesissä (Elbanna *ym.* 2003).

| Luokka (class) | Lahko (order) | Heimo (family) | Suku (genus) |
|---|--------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| <i>Bacilli</i> | <i>Bacillales</i> | <i>Bacillaceae</i> | <i>Bacillus</i> |
| | | | <i>Geobacillus</i> ¹ |
| | | | <i>Anoxybacillus</i> ² |
| | | | <i>Lysinibacillus</i> |
| | | <i>Paenibacillaceae</i> | <i>Paenibacillus</i> ³ |
| | | | <i>Brevibacillus</i> |
| | | <i>Staphylococcaceae</i> | <i>Staphylococcus</i> |
| <i>β-Proteobacteria</i> | <i>Burkholderiales</i> | <i>Burkholderiaceae</i> | <i>Burkholderia</i> |
| | | | <i>Ralstonia</i> |
| | | | <i>Tepidimonas</i> ⁴ |
| | | | <i>Schlegelella</i> ⁵ |
| <i>Deinococci</i> | <i>Thermales</i> | <i>Thermaceae</i> | <i>Thermus</i> ⁶ |
| | | | <i>Meiothermus</i> |
| | <i>Deinococcales</i> | <i>Deinococcaceae</i> | <i>Deinococcus</i> |
| <i>γ-Proteobacteria</i> | <i>Enterobacteriales</i> | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Enterobacter</i> ⁷ |
| | | | <i>Citrobacter</i> ⁷ |
| | | | <i>Klebsiella</i> ⁸ |
| | <i>Pseudomonadales</i> | <i>Pseudomonadaceae</i> | <i>Pseudomonas</i> ⁹ |
| <i>Flavobacteria</i> | <i>Flavobacteriales</i> | <i>Flavobacteriaceae</i> | <i>Cloacibacterium</i> ¹⁰ |

Kuva 12. Lopputuotteessa esiintyvien bakteerien sukulaisuussuhteet (perustuen: Nazina *ym.* 2001¹, Pikuta *ym.* 2000², Ash *ym.* 1993³, Moreira *ym.* 2000⁴, Elbanna *ym.* 2003⁵, Brock & Freeze 1969⁶, Kus & Burrows 2007⁷, Podschun & Ullmann 1998⁸, Peix *ym.* 2009⁹, Allen *ym.* 2006¹⁰ ja SILVA-tietokanta (Quast *ym.* 2013)).

Taulukko 19. Lopputuotteesta suorasekvensoinnin perusteella löydettyjen bakteerisukujen ominaisuuksia (Nazina *ym.* 2001¹, Peix *ym.* 2009², Moreira *ym.* 2000³, Ash *ym.* 1993⁴, Allen *ym.* 2006⁵, Pikuta *ym.* 2000⁶, Brock & Freeze 1969⁷, Podschun & Ullmann 1998⁸, Kus & Burrows 2007⁹, Elbanna *ym.* 2003¹⁰).

| Bakteerisuku | Kyky liikkua | Itiöitä muodostava | Hapen tarve | Termofiilinen |
|-------------------------------------|--------------|--------------------|-------------|---------------|
| <i>Geobacillus</i> ¹ | x | x | FAN | x |
| <i>Pseudomonas</i> ² | x | | AE | |
| <i>Tepidimonas</i> ³ | | | AE | x |
| <i>Paenibacillus</i> ⁴ | | x | FAN | |
| <i>Cloacibacterium</i> ⁵ | | | FAN | |
| <i>Anoxybacillus</i> ⁶ | | x | AN | x |
| <i>Thermus</i> ⁷ | | | AE | x |
| <i>Klebsiella</i> ⁸ | | | FAN | |
| <i>Enterobacter</i> ⁹ | x | | FAN | |
| <i>Schlegelella</i> ¹⁰ | | | AE | x |
| <i>Citrobacter</i> ⁹ | | | FAN | |

Aerobinen = AE, Fakultatiivisesti anaerobinen = FAN, Anaerobinen = AN

Toinen jätevesissä viihtyvä bakteeri on *Cloacibacterium* ($5,5 \pm 0,8$ %; Taulukko 17), joka esiintyi myös tämän tutkimuksen lopputuotteessa. Tämä fakultatiivisesti anaerobinen bakteeri (Taulukko 19) kuuluu flavobakteerien heimoon (Kuva 12), jonka edustajia tavataan kaikissa vesihabitaateissa (Allen *ym.* 2006). Kartonginvalmistusprosessissa *Cloacibacterium* toimii tehokkaana biofilminmuodostajana (Tirola *ym.* 2009).

Kuumista lähteistä alun perin eristettyä aerobista bakteerisukua *Thermus* esiintyi selvästi lopputuotteessa ($2,61 \pm 0,82$ %; Taulukko 17). Bakteerin optimikasvulämpötila (70 °C) on huomattavan korkea (Brock & Freeze 1969). *Thermus* kuuluu samaan luokkaan (*Deinococci*) kuin kartonginvalmistusprosessin biofilmeistä tavattu *Deinococcus* (Väisänen *ym.* 1998, Oppong *ym.* 2000, Kolari *ym.* 2001, Kolari *ym.* 2003, Kuva 12).

5.2.3 Koliformiset *Enterobacteriaceae*-heimon bakteerit

Koliformisista bakteereista kartongissa esiintyi sukuja *Klebsiella* ($1,66 \pm 1,08$ %), *Enterobacter* ($1,66 \pm 1,05$ %) ja *Citrobacter* ($1,22 \pm 1,12$ %; Taulukko 17), jotka kuuluvat γ -proteobakteereihin (Kuva 12). Kyseiset fakultatiivisesti anaerobiset bakteerit (Taulukko 19) voivat toimia patogeeneinä eli taudinaiheuttajina ihmisille (Podschun & Ullmann 1998, Kus & Burrows 2007). *Klebsiella* elää kaikenlaisissa ympäristöissä, muun muassa luonnossa ja eliöiden limakalvoilla (Podschun & Ullmann 1998). Tätä bakteeria on tavattu runsaasti myös paperinvalmistusprosessissa (Bagley 1985). Menestystä paperiteollisuudessa voi selittää *Klebsiella*-suvun kyky hajottaa selluloosaa sekä tärkkelystä (Anand *ym.* 2010). *Klebsiella*-suvun lisäksi *Citrobacter* pystyy hajottamaan selluloosaa. Edellä mainituista bakteereista *Enterobacter*-sukua on raportoitu esiintyvän kartongissa (Väisänen *ym.* 1991, Raaska *ym.* 2002). Lisäksi molempia bakteerisukuja *Citrobacter* ja *Enterobacter* on esiintynyt paperiteollisuuden biofilmeissä (Chaudhary *ym.* 1997) ja niiden luontaiset elinympäristöt ovat hyvin samankaltaisia kuin *Klebsiella*-suvulla (Kus & Burrows 2007).

5.3 Lopputuotteen sisältämien bakteerien alkuperä

5.3.1 *Bacilli*-luokan itiöitä muodostavat bakteerit

Tässä tutkimuksessa analysoidun näytteen 16 todettiin olevan kartongin runsaimman bakteerisuvun (*Geobacillus*, OTU 1) päälähde (Kuva 10). Havainto tukee olettamusta, että itiöitä muodostavat bakteerit selviävät prosessin loppupään kuumissa olosuhteissa. Tärkkelyspohjaisen liiman on todettu olevan *Enterobacter*-suvun kannalta yksi kartonkihygieniää vaarantava lisäaine (Raaska *ym.* 2002). Kyseistä bakteerisukua ei juurikaan esiintynyt tämän tutkimuksen näytteessä 16. *Geobacillus*-sukua esiintyi myös pieniä määriä päällystyspigmenteissä näytteissä 13 ja 15 (Kuva 10). Väisänen *ym.* 1998 ovat todenneet pigmenttien sisältävän bakteerisukua *Bacillus*.

Sen sijaan kartongissa esiintyville *Geobacillus*-sukuun kuuluville bakteereille (OTU 8 ja 13) ei löytynyt selkeää lähdettä prosessista, mikä viittaa niiden olevan peräisin näytetyypeistä, joita ei analysoitu tässä tutkimuksessa. Tämä korostaa sitä, että saman bakteerisuvun eri lajien ei voida olettaa olevan peräisin samoista lähteistä. Vaikka saman bakteerisuvun lajeilla on samoja piirteitä, ne voivat kuitenkin viihtyä hyvin erilaisissa ympäristöissä. Tämän vuoksi tulevissa tutkimuksissa olisi hyvä paneutua myös bakteerisukuja syvemmälle lajitasolle.

Toinen kartongista löydetty itiöitä muodostava bakteeri oli *Paenibacillus*, jonka lähteitä tämän tutkimuksen perusteella olivat näytetyypit 1–5 (Kuva 10). Bakteerin runsautta määräsäpäässä selittää se, että kyseistä sukua on eristetty lukuisista ympäristöistä kuten kasveista (Grady *ym.* 2016, Sáez-Nieto *ym.* 2017). Väisänen *ym.* 1998 ovat todenneet, että määränpään tunnistetuista bakteerilajeista noin 80 % kuuluu bakteereihin *Bacillus*- tai *Brevibacillus*, joka on läheistä sukua *Paenibacillus*-suvulle. Vaikka *Paenibacillus* muodostaa itiöitä, sitä ei esiintynyt prosessin loppupäässä, koska kyseinen bakteerisuku ei siedä kuumuutta toisin kuin *Geobacillus*. Määränpään näyte 5 sisälsi *Paenibacillus*-sukua selvästi eniten (45 %; Kuva 10). Vastaavanlaisia tuloksia raportoivat Suihko *ym.* 2004 tutkimuksessaan, jossa prosessissa kierrätettävän massan todettiin toimivan varastona bakteereille *Bacillus*, *Brevibacillus* ja *Paenibacillus*. Tutkimuksen mukaan *Paenibacillus*-bakteeria tavattiin myös prosessin biofilmeistä.

Anoxybacillus oli viimeinen lopputuotteesta löytynyt bakteeri, joka muodostaa itiöitä. Sille ei kuitenkaan löytynyt analysoiduista näytepisteistä mitään yleispätevää lähdettä. Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että kyseinen bakteeri on anaerobinen, kun taas analysoitujen näytteiden olosuhteet olivat hapelliset. Sitä, onko bakteeri peräisin prosessin jostakin hapettomasta ympäristöstä vai mahdollisesti jostain muusta kontaminaation lähteestä, on vaikea arvioida.

5.3.2 Itiöitä muodostamattomat bakteerit

Pseudomonas oli analysoidun kartongin toiseksi runsain bakteerisuku, jonka kahta lajia (OTU 3, 5) esiintyi vain näytepisteissä 8 ja 10 (Kuva 10). Sen sijaan aiemmissa tutkimuksissa kyseistä bakteeria on esiintynyt lukuisissa prosessin osissa kuten kierto- (Väätänen & Niemelä 1983) ja puristinosan vesissä (Zumsteg *ym.* 2017) sekä paperikoneen perälaatikolla (Väätänen & Niemelä 1983). Lisäksi bakteeria on tavattu hyllyn- (Chaudhary *ym.* 1997) ja perälaatikon (Desjardis & Beaulieu 2003) biofilmeistä sekä kaoliinista (Väisänen *ym.* 1998). Ottaen huomioon bakteerin laajat luontaiset elinympäristöt (Valenstein *ym.* 1983), aiemmat tutkimukset sekä suvunsisäisen monimuotoisuuden (Spiers *ym.* 2000, Peix *ym.* 2009), sitä olisi voinut odottaa löytyvän useammasta näytetyypistä. Toisaalta saadut tulokset viittaavat siihen, että kyseisen suvun osalta raaka-aineet ovat hyvin puhtaita. Näin ollen on todennäköistä, että *Pseudomonas*-populaatio kehittyy vasta kyseisissä näytepisteissä.

Lopputuotteen kolmanneksi runsainta bakteerisukua *Tepidimonas* löytyi eniten näytteestä 7 (suhteellinen osuus ko. näytetyypissä 29 %; Kuva 10). Jotkut tämän suvun edustajat pystyvät hajottamaan tärkkelystä (Chen *ym.* 2013), mikä selittää bakteerin runsaan esiintymisen kyseisessä näytetyypissä. Toisaalta *Tepidimonas* esiintyi runsaana (47 %) vain yhdessä näytteen 7 toistossa C (Liite 4), mikä kasvatti tämän suvun keskiarvoa kyseisessä näytetyypissä. Muut toistot A ja B eivät sisältäneet kyseistä sukua, mikä viittaisi siihen, että *Tepidimonas*-suvun esiintyminen näytteen 7 C toistossa olisi pistekontaminaation seurausta. Erot toistojen välillä voivat johtua myös tärkin analysoinnin haastavuudesta. Esimerkiksi DNA:n eristysvaiheessa koostumukseltaan liimamaisen tahmea näyte tukki suodattimia. Lisäksi DNA:n monistus ei kunnolla onnistunut toisellakaan kerralla (Liite 2; Kuva 13 C). Näillä tekijöillä on todennäköisesti jonkin verran vaikutuksia saatuihin tuloksiin.

Huolimatta *Tepidimonas*-suvun ominaisuudesta sietää korkeita lämpötiloja (Moreira *ym.* 2000), sitä ei kuitenkaan tavattu prosessin kuivassapäässä (Kuva 10).

Sen sijaan muita näytetyyppejä, joissa *Tepidimonas* esiintyi, olivat näytepisteet 1–5 sekä 7. Saadut tulokset tukevat havaintoja, joiden mukaan kyseistä sukua on tavattu aiemmin kierto- ja puristinosan vesissä (Zumsteg *ym.* 2017) sekä prosessin biofilmeissä (Tirola *ym.* 2009), eritoten perälaatikolla (Zumsteg *ym.* 2017). Märänpään eräiksi yleisiksi bakteereiksi on todettu myös *Burkholderia* ja *Ralstonia* (Väisänen *ym.* 1998). Nämä bakteerisuvut kuuluvat samaan luokkaan (β -proteobakteerit) kuin *Tepidimonas*. Edellä mainitun bakteerin on todettu olevan yhdessä *Chryseobacterium*-suvun kanssa yksi paperilaatua huonontava tekijä (Zumsteg *ym.* 2017).

Toinen lopputuotteessa esiintyvä β -proteobakteeri oli *Schlegelella*. Sen lähteitä prosessissa olivat *Tepidimonas*-suvun tavoin näytteet 1–5 (Kuva 10). *Schlegelella*-suvun on raportoitu olevan yksi perälaatikon yleisimmistä bakteereista (Prince *ym.* 2009). Sitä on tavattu myös runsaasti paperiteollisuuden jätevesistä (Elbanna *ym.* 2003), mikä tukee saatuja tuloksia. Vaikka tämäkin bakteeri kestää kuumuutta (Elbanna *ym.* 2003), sitä ei yllättävä kyllä esiintynyt prosessin loppupään näytetyypeissä.

Schlegelella-suvun ohella perälaatikon yhdeksi yleisimmäksi lajiksi on todettu *Meiothermus* (Prince *ym.* 2009), joka on tämän tutkimuksen kartongista analysoidun *Thermus*-bakteerin läheinen sukulainen. Huolimatta läheisestä sukulaisuussuhteesta, tässä tutkimuksessa *Thermus*-bakteerin lähteitä olivat päällystysasemat näytteet 8 ja 10 sekä 12 ja 15 (Kuva 10). Esiintyminen prosessin loppupään näytteissä oli odotettavaa tälle termofiiliselle bakteerille (Brock & Freeze 1969). Koska bakteeria esiintyi sekä monissa näytetyypeissä, on mahdotonta sanoa varmaksi, onko se peräisin pelkästään raaka-aineista vai myös itse prosessista.

Thermus-suvun on todettu muodostavan kellertäviä pesäkkeitä (Brock & Freeze 1969). Tässä tutkimuksessa keltaisia pesäkkeitä löytyi nimenomaan näytteistä, joissa *Thermus*-sukua tavattiin. On mahdollista, että viljelyvaiheessa havaitut kellertävät pesäkkeet (Kuva 6 A) ovat kyseisen bakteerisuvun muodostamia.

Poikkeuksena näytteessä 13 havaittiin myös kellertäviä kasvustoja, vaikka *Thermus*-sukua ei siinä juurikaan ollut. Toisaalta kyseisestä näytetyypistä määritetyistä lajeista 96 % oli sellaisia bakteereja, joiden kokonaisrunsaus oli vähemmän kuin 1 %. On siis mahdollista, että näyte 13 sisälsi *Thermus*-suvun eri lajeja, mutta niiden kokonaisrunsaus ei ollut kovin suuri.

Kartongista löydetyn *Cloacibacterium*-suvun edustajia on löydetty lukuisista vesiympäristöistä (Allen *ym.* 2006). Tämän tutkimuksen perusteella kyseinen bakteeri on todennäköisesti peräisin näytteistä 1-5 (Kuva 10). Lisäksi Tirola *ym.* 2009 ovat todenneet tämän bakteerin olevan yksi yleisimmistä kartonginvalmistusprosessissa esiintyvistä biofilmien muodostajista.

5.3.3 Koliformiset *Enterobacteriaceae*-heimon bakteerit

Tässä tutkimuksessa analysoidusta kartongista löydettiin kolmea koliformista bakteerisukua, joista runsain oli *Klebsiella* (Taulukko 17). Suvun lähteitä prosessissa olivat näytteet 11 sekä 16 (Kuva 10). Raaska *ym.* 2002 ovat todenneet tärkkelyspohjaisen liiman sisältävän koliformista bakteerisukua (*Enterobacter*). *Klebsiella*-suvun esiintyminen näytepisteessä 11 ei ole tavatonta, sillä kyseinen bakteeri on tyypillinen paperiteollisuudessa (Bagley 1985, Blanco *ym.* 1996 ja Bajpai 2015) ja sitä tavataan muutenkin kaikenlaisissa ympäristöissä (Podschun & Ullmann 1998). Lukuisissa tutkimuksissa *Klebsiella*-sukua on raportoitu esiintyvän pääasiassa prosessin määräsäpäässä, muun muassa perälaatikolla (Väätänen & Niemelä 1983, Väisänen *ym.* 1998). *Klebsiella* on yleinen myös prosessin kierto- (Caplenas *ym.* 1981, Väätänen & Niemelä 1983) ja suihkuvesissä (Väisänen *ym.* 1998) sekä biofilmeissä (Chaudhary *ym.* 1997, Wirtanen *ym.* 2000). Suvun esiintymistä määräsäpäässä selittää se, että *Klebsiella* pystyy hajottamaan selluloosaa ja tärkkelystä (Anand *ym.* 2010). Näihin tutkimuksiin vedoten on yllättävää, ettei kyseistä sukua tavattu tämän tutkimuksen määränpään näytteissä. Näytteen 7 analysoinnissa ilmenneillä haasteilla saattoi olla vaikutusta edellä mainittuun tulokseen.

Muita lopputuotteen sisältämiä koliformisia bakteerisukuja olivat *Enterobacter* ja *Citrobacter*, jotka molemmat ovat paperiteollisuudessa hyvin yleisiä (Blanco *ym.* 1996, Bajpai 2015). Nämä suvut ovat saatujen tulosten perusteella peräisin näytteistä 9 ja 11 (Kuva 10). Sen sijaan *Citrobacter* ei esiintynyt prosessin määräsäpäässä, vaikka kyseiselle suvulle selluloosanhajotuskyky on tyypillistä (Anand *ym.* 2010). Sitä on tavattu aikaisemmin esimerkiksi hyllyn biofilmeissä (Chaudhary *ym.* 1997). *Enterobacter*-sukua taas on löydetty tärkkelyspohjaisesta liimasta (Raaska *ym.* 2002). Vaikka lopputuotteesta löytyi koliformisten bakteerien DNA:ta, kyseiset bakteerit eivät olleet elossa. Tämän vuoksi niiden mahdollinen riski elintarvikkeen pilaantumiselle on hyvin pieni.

5.3.4 Muut bakteerit

Noin kolmannes lopputuotteen sisältämistä bakteereista edusti lajeja, joiden kokonaisrunsaus kartongissa oli ≤ 1 %. Näiden bakteerien alkuperän selvittäminen noin 500 sekvenssin perusteella olisi periaatteessa mahdollista. Kyseisiin bakteereihin ei kuitenkaan ole mielekästä perehtyä tässä tutkimuksessa sen enempää, koska niiden suhteellinen määrä on pieni ja suurin osa niistä ei esiinny elävänä lopputuotteessa.

Näytepisteet 6 ja 14 sisälsivät vain 1 % bakteereja, jotka korreloivat lopputuotteen runsaimpien lajien kanssa (Kuva 10). Tämän havainnon perusteella voidaan todeta, että osa kyseisten näytetyyppien runsaimmista bakteereista todennäköisesti kuolee prosessissa, eikä päädy merkittäväällä tavalla lopputuotteeseen.

5.4 Lopputuotteen sisältämät elävät bakteerit

Elintarvikkeen hygienian kannalta kartongissa esiintyvistä bakteereista haitallisimpia ovat ne, jotka ovat elossa (Mostafa *ym.* 2018). Tässä tutkimuksessa kaikki kartongista löydetyt elävät bakteerisuvut olivat itiöitä muodostavia *Bacillales*-lahkon edustajia (Taulukko 18, Kuva 12). Tulos korostaa, että itiöitä muodostamattomat bakteerit (mm. koliformiset- ja proteobakteerit) eivät selviä

prosessin kuumista oloista lopputuotteeseen hengissä, vaikka niiden DNA:ta löytyisikin kartongista.

Tämän tutkimuksen perusteella lopputuotteen elävät bakteerit edustavat fylogeneettisesti läheisiä bakteeriheimoja *Bacillaceae* ja *Paenibacillaceae*. Kartongin elävistä bakteerisuvuista yleisin oli *Bacillus* (Taulukko 18), mikä on todettu lukuisissa aiemmissa tutkimuksissa (Väisänen *ym.* 1989, Väisänen *ym.* 1991, Väisänen *ym.* 1994). Suorasekvensoinnin perusteella *Bacillus*-sukujen suhteelliset osuudet lopputuotteessa olivat kuitenkin hyvin pieniä (≤ 1 %). Vaikka suorasekvensoinnin mukaan *Bacillus* olisi peräisin näytetyypeistä 10 ja 13, tästä ei voida vetää yleispätevää johtopäätöstä, koska kyseinen havainto todettiin vain yhdessä kartonkinäytteen toistossa. DNA-pohjaisen menetelmän tarkkuuden kyseenalaistaa myös havainto siitä, että *Bacillus*-sukua kasvoi useissa kartonkinäytteiden viljelmissä (Toistot B, C ja E; Taulukko 18), vaikka sen DNA:ta löytyi vain yhdestä.

Edellä mainitun suvun lisäksi yleiseksi kartongissa esiintyviksi bakteereiksi on raportoitu *Paenibacillus* (Pirttijärvi *ym.* 1996, Suominen *ym.* 1997, Suihko *ym.* 2004) ja *Brevibacillus* (Väisänen *ym.* 1998, Suihko *ym.* 2004), joita kasvoi myös tämän tutkimuksen kartonkinäytteiden maljoilla (Taulukko 18). Suorasekvensointitulokset viittaavat vahvasti siihen, että *Paenibacillus* olisi peräisin näytteistä 1-5 (Kuva 10). Sen sijaan suorasekvenssidatasta ei löytynyt mitään selkeää viitettä *Brevibacillus*-suvun alkuperälle. Tämä tukee mahdollisuutta siitä, että *Brevibacillus* on peräisin pistekontaminaatiosta tai jostakin prosessivaiheesta, jota ei analysoitu tässä tutkimuksessa. Se, että *Brevibacillus*-suvun alkuperää ei saatu selville, voi johtua myös itse sekvensointimenetelmästä. Maljoilla kasvavat pesäkkeet tunnistettiin Sangerin menetelmällä, jossa analysoidaan sekvenssit ovat pidempiä, kuin suorasekvensoinnissa. Tämä voi osaltaan vaikuttaa siihen, että pesäkkeitä vastaavia bakteereja ei saatu täysin linjattua NGS-tulosten kanssa. Viimeinen lopputuotteen kasvatusmaljoilta löydetty elävä bakteerisuku oli *Lysinibacillus* (Taulukko 18), jonka DNA:ta ei kuitenkaan suorasekvensoinnin

perusteella löytynyt kartongista tai mistään analysoiduista näytetyypeistä. Havainto korostaa, miten menetelmän valinnalla voi olla huomattavaa merkitystä saataviin tuloksiin.

Vaikka kartongista löydettiin itiöitä muodostavien *Anoxy-* ja *Geobacillus*-sukujen DNA:ta (Taulukko 17), näitä bakteereja ei kasvanut maljoilla (Taulukko 18). *Anoxybacillus*-suvun pesäkkeiden puuttuminen oli odotettavaa, koska bakteeri elää vain hapettomissa oloissa (Pikuta *ym.* 2000). Sen sijaan on mahdollista, että jotkut *Geobacillus*-suvun bakteerit voisivat esiintyä elävinä lopputuotteessa. Se, että kyseisiä bakteereja ei kuitenkaan tavattu maljoilla, johtuu todennäköisesti suvun optimikasvulämpötilasta 45–70°C (Nazina *ym.* 2001), joka on huomattavasti enemmän kuin standardimenetelmän inkubointilämpötila (32 ± 2 °C). Tämän perusteella on hyvä pohtia, onko standardimenetelmä riittävän kattava kartongin elävien bakteerien kartoittamisessa.

Kun tarkastellaan kuvaajaa lopputuotteen sisältämistä totaalibakteereista ja itiöitä muodostavista bakteereista (Kuva 7), huomataan, että kartongin toistoissa A–B itiöitä muodostavien bakteerien määrä oli hieman alhaisempi kuin totaalibakteeritiheys. Havainto viittaa siihen, että kartongissa voisi esiintyä elävinä myös itiöitä muodostamattomia bakteereja, vaikka tässä tutkimuksessa ei niin todettu. On mahdollista, että toisella elatusaineella sekä inkubointilämpötilalla ja -ajalla olisi saatu hyvinkin erilaisia tuloksia. Lisäksi viljelymenetelmässä agar valettiin näytteiden päälle, mikä todennäköisesti antaa eri tuloksen verrattuna siihen, jos näyte olisi viljelty agarin pintaan.

5.5 Näytteiden sisältämien bakteerien yhteisörakenne

Näytteiden bakteerien yhteisörakennetta verratessa (Kuva 11) huomataan viisi toisistaan erottuvaa ryhmää. Kartonkinäytteet asettuvat muiden näytteiden keskelle, mikä kertoo, että niiden bakteeriyhteisössä on piirteitä ympäröivistä näytetyypeistä. Näytteen toistot ovat myös hyvin lähellä toisiaan, mikä vahvistaa,

että niiden bakteeriyhteisöt ovat samanlaiset. Kartonki on siis bakteerien suhteen tasalaatuista.

Toisen ryhmän muodostavat näytteet 1-2 ja 4-5 (Kuva 11). Näiden näytetyyppien bakteerien yhteisörakenne on samankaltainen. Tämä on oletettavaa, sillä näytteet ovat ominaisuuksiltaan lähellä toisiaan. Sen sijaan näyte 3 on tästä edellä mainitusta ryhmästä selvästi erillään. Kyseisen näytteen bakteeriyhteisön erilaisuus suhteessa muihin näytteisiin 1, 2, 4 ja 5 havaitaan myös Kuvasta 10. Kyseinen näyte sisältää samoja bakteereja kuin muut näytteet 1, 2, 4 ja 5, mutta sen lisäksi myös paljon muita lajeja. Näille näytteen 3 eroaville bakteerisuvuille ei ole kuitenkaan havaittavissa mitään selkeää luokkatrendiä. Kyseisen näytetyypin bakteeriyhteisön erilaisuus voi johtua yksinkertaisesti näytepisteen mahdollisista epäpuhtauksista, minkä vuoksi se erottuu omana ryhmänään.

Näytteet 6-15 muodostavat oman hajanaisen ryhmänsä (Kuva 11). Näistä näytteet 12-15 sijoittuvat toistensa lähelle viitaten niiden bakteeriyhteisöjen samankaltaisuuteen. Joidenkin näytetyyppien (6, 7, 9 ja 11) bakteeriyhteisöissä on runsaasti hajontaa toistojen välillä, mikä havaitaan myös Liitteestä 4. Eroja toistojen välillä voivat selittää esimerkiksi prosessiolosuhteiden vaihtelut näytteenottokertojen välillä. Sen sijaan biosidin annostelusta kuluneella ajalla (Taulukko 8) ei näyttäisi olevan vaikutusta bakteeriyhteisön rakenteeseen. Näyte 16 erottuu selkeästi muista näytetyypeistä, mikä viittaa sen bakteeriyhteisön erilaisuuteen.

6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tulosten perusteella lopputuotteeseen päätyy bakteereja sekä raaka-aineista että itse prosessista. Ensimmäistä hypoteesia tuki havainto, jonka mukaan näyte 16 on *Geobacillus*-suvun todennäköisin lähde lopputuotteessa. Vastaavasti *Enterobacter* ja *Citrobacter* päätyvät kartonkiin oletettavasti näytteistä 9 ja 11. Prosessin määssäpäässä puolestaan dominoivat lopputuotteesta analysoidut bakteerisuvut *Tepidimonas*, *Paenibacillus*, *Cloacibacterium* ja *Schlegelella* tukien toista hypoteesia prosessiin sopeutuneesta mikrobiyhteisöstä. Lopputuotteen sisältämä *Pseudomonas*-suku taas on mahdollisesti peräisin näytepisteistä 8 ja 10.

Elintarvikkeen hygienian kannalta kartongin eläviin, itiöitä muodostaviin bakteereihin *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* ja *Lycinibacillus* tulee kiinnittää huomiota. Näistä bakteereista *Bacillus* on todennäköisesti peräisin näytepisteistä 10 ja 13, kun taas *Paenibacillus* määssäpäästä. Sen sijaan *Brevibacillus*-suvulle ei löytynyt prosessista mitään selkeää lähdettä. Lisäksi suorasekvensoinnin perusteella kartonkinäytteet eivät sisältäneet *Lycinibacillus*-suvun DNA:ta, vaikka kyseistä sukua löydettiin kasvatusmaljoilta.

Kaiken kaikkiaan kartonginvalmistusprosesseissa vallitsevat tiettytyyppiset bakteerit, mutta jokainen tehdas on mikrobistoltaan ainutlaatuinen. Prosessiolosuhteet ja käytettävät raaka-aineet vaikuttavat huomattavasti siihen, millainen mikrobiyhteisö kartonkikoneeseen ja itse lopputuotteeseen muodostuu. Vain harvat prosessissa ja raaka-aineissa esiintyvistä bakteereista päätyvät lopputuotteeseen, sillä valtaosa kuolee prosessin ankarissa kuivausolosuhteissa. Vaikka kartongissa esiintyy vääjäämättä joitakin eläviä bakteereja, niiden elintarvikkeille aiheuttama todellinen hygieniariski ei ole merkittävä. Tämä johtuu siitä, että kyseiset bakteerit kuolevat ennemmin kuivuuteen, kuin pääsevät kartongin rakenteista käsiksi elintarvikkeeseen.

KIITOKSET

Haluan kiittää kaikkia tahoja gradun tekemiseen liittyvästä ohjauksesta ja tuesta. Erityiskiitos ohjaajilleni Tuula Kerkkäselle, Riitta Nissiselle sekä Emmi Räsäselle. Kiitokset myös Terhi Saarelle opastuksesta tehtaalla. Poikkeusoloista huolimatta pääsin itse suorittamaan näytteidenoton, jonka avustamisesta kiitokset biosiditoimittajien Mika Aholle ja Jukka Elorannalle. Kiitos vielä Elina Virtaselle IonTorrent -ajon suorittamisesta sekä Marja Tirolalle projektin alun koordinoimisesta. Lopuksi haluan osoittaa kiitokseni kaikille projektissa mukana olleille yrityksen asiantuntijoille.

KIRJALLISUUS

- Allen T.D., Lawson P.A., Collins M.D., Falsen E. & Tanner R.S. 2006. *Cloacibacterium normanense* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium in the family *Flavobacteriaceae* isolated from municipal wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 1311–1316.
- Anand A.A.P., Vennison S.J, Sankar S.G., Prabhu D.I.G., Vasani P.T., Raghuraman T, Geoffrey C.J. & Vendan S.E. 2010. Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *Journal of Insect Science* 10: 107. saatavilla verkossa: insectscience.org/10.107.
- Arvanitoyannis I.S. & Bosnea L. 2004. Migration of Substances from Food Packaging Materials to Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44: 63–76.
- Ash C., Priest F.G. & Collins M.D. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek* 64: 253–260.
- Bagley S.T. 1985. Habitat Association of *Klebsiella* Species. *Infection Control* 6: 52–58.
- Bajpai P. 2015. *Pulp and Paper Industry: Microbiological Issues in Papermaking*, Elsevier, USA, ss. 1–73.
- Blanco M.A., Negro C., Gaspar I. & Tijero J. 1996. Slime problems in the paper and board industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 46: 203–208.
- Brock T. & Freeze H. 1969. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a Non-sporulating Extreme Thermophile. *Journal of Bacteriology* 98: 289–297.
- Caplenas N.R., Kanarek M.S. & Dufour A.P. 1981. Source and Extent of *Klebsiella pneumoniae* in the Paper Industry. *Applied Environmental Microbiology* 42: 779–785.
- Castle L., Damant A.P., Honeybone C.A., Johns S.M., Jickells S.M., Sharman M. & Gilbert J. 1997. Migration studies from paper and board food packaging materials. Part 2. Survey for residues of dialkylamino benzophenone UV-cure ink photoinitiators. *Food Additives and Contaminants* 14: 45–52.
- Chandki R., Banthia P. & Banthia R. 2011. Biofilms: A microbial home. *J Indian Soc Periodontol* 15: 111–114.
- Chaudhary A., Gupta L.K., Gupta J.K. & Banerjee U.C. 1997. Studies on slime-forming organisms of a paper mill – slime production and its control. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18: 348–352.
- Chen W.-M., Huang H.-W., Chang J.-S., Han Y.-L., Guo T.-R. & Sheu S.-Y. 2013. *Tepidimonas fonticaldi* sp. nov., a slightly thermophilic betaproteobacterium

- isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 1810–1816.
- Cole J.R., Wang Q., Fish J.A., Chai B., McGarrell D.M., Sun Y., Brown C.T., Porras-Alfaro A., Kuske C.R. & Tiedje J.M. 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucl. Acids Res.* 42: D633–D642.
- Davis G. & Song J.H. 2006. Biodegradable packaging based on raw materials from crops and their impact on waste management. *Ind. Crops Prod.* 23: 147–161.
- Desjardins E. & Beaulieu C. 2003. Identification of bacteria contaminating pulp and a paper machine in a Canadian paper mill. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30: 141–145.
- Elbanna K., Lütke-Eversloh T., Van Trappen S., Mergaert J., Swings J. & Steinbüchel A. 2003. *Schlegelella thermodepolymerans* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic bacterium that degrades poly(3-hydroxybutyrate-co-3-mercaptopropionate). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1165–1168.
- (EY) N:o 852/2004. Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 852/2004 elintarvikehygieniasta. EUVL L139/1, 30.4.2004. Saatavissa: <https://eurlex.europa.eu/legal-content/FI/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004R0852&qid=1587634432012&from=EN>.
- (EY) N:o 1935/2004. Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1935/2004 elintarvikkeen kanssa kosketukseen joutuvista materiaaleista ja tarvikkeista ja direktiivien 80/509/ETY ja 89/109/ETY kumoamisesta. EUVL L338/4, 13.11.2004. Saatavissa: <https://eurlex.europa.eu/legalcontent/FI/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004R1935&qid=1587634803286&from=EN>.
- Flemming H.-C., Meier M. & Schild T. 2013. Mini-review: Microbial problems in paper production. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, doi: 10.1080/08927014.2013.798865.
- Garland S., Baker A., Phillott A.D. & Skerratt L.F. 2010. BSA reduces inhibition in a TaqMan® assay for the detection of *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis Aquat Org* 92: 113–116.
- Garside M. 2019. Global paper production volume from 2007 to 2017 by type. <https://www.statista.com/statistics/270317/production-volume-of-paper-by-type/#statisticContainer> (luettu 6.4.2020).
- Ghyselinck J., Pfeiffer S., Heylen K., Sessitsch A., De Vos P. 2013. The Effect of Primer Choice and Short Read Sequences on the Outcome of 16S rRNA Gene Based Diversity Studies. *PLOS ONE* 8: 8. e71360. doi: 10.1371/journal.pone.0071360.

- Goodwin S., McPherson J.D. & McCombie W.R. 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics* 17: 333–351.
- Grady E.N., MacDonald J., Liu L., Richman A. & Yuan Z.-C. 2016. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb Cell Fact* 15: 203. doi: 10.1186/s12934-016-0603-7.
- Hubbe M.A. 2004. Acidic and Alkaline Sizings for Printing, Writing, and Drawing Papers. *The Book and Paper Group Annual* 23: 139–151.
- Ikenaga M., Katsuragi S, Handa Y., Katsumata H., Chishaki N., Kawauchi T. & Sakai M. 2018. Improvements in Bacterial Primers to Enhance Selective SSU rRNA Gene Amplification of Plant-associated Bacteria by Applying the LNA Oligonucleotide- PCR Clamping Technique. *Microbes Environ.* 33: 340–344.
- ISO 8784-1: 2014. Pulp, paper and board – Microbiological examination – Enumeration of bacteria and bacterial spores based on disintegration.
- Itä-Suomen ympäristölupavirasto. 2006. M-real Oyj:n Äänekosken kartonkitehtaan ympäristölupa, Äänekoski. Nro 112/06/1.
- Jurtshuk P. Jr. 1996. Bacterial Metabolism. Teoksessa: Baron S., (toim.). *Medical Microbiology*. 4. painos. Galveston (TX), University of Texas Medical Branch at Galveston, kpl 4. saatavilla verkossa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7919/>.
- Kirchman D.L. 2018. *Processes in microbial ecology*, Oxford University Press, 2nd edition, ss. 53–72.
- Kočí V. 2019. Comparisons of environmental impacts between wood and plastic transport pallets. *Science of the Total Environment* 686: 514–528.
- Kolari M., Nuutinen J. & Salkinoja-Salonen M.S. 2001. Mechanisms of biofilm formation in paper machine by *Bacillus* species: the role of *Deinococcus geothermalis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 27: 343–351.
- Kolari M., Nuutinen J., Rainey F.A. & Salkinoja-Salonen M.S. 2003. Colored moderately thermophilic bacteria in paper-machine biofilms. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30: 225–238.
- Kus J.V. & Burrows L.L. 2007. xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference: Infections due to Citrobacter and Enterobacter, Elsevier BV. doi: 10.1016/b978-008055232-3.60868-2.
- Lahtinen T., Kosonen M., Tirola M., Vuento M. & Oker-Blom C. 2006. Diversity of bacteria contaminating paper machines. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33: 734–740.
- Liu L., Li Y., Hu N., He Y., Pong R., Lin D., Lu L. & Law M. 2012. Review Article: Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J. Biomed. Biotechnol.*, doi: 10.1155/2012/251364.

- Mardis E.R. 2013. Next-Generation Sequencing Platforms. *Annu. Rew. Anal. Chem.* 6: 287–303.
- Maukonen J., Saarela M. & Raaska L. 2006. Desulfovibrionales-related bacteria in a paper mill environment as detected with molecular techniques and culture. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33: 45–54.
- Metsä Board. 2020. Äänekoski board mill. <https://www.metsaboard.com/AboutUs/Aanekoski-board-mill/Pages/default.aspx> (luettu 17.3.2020).
- Mohammadzadeh-Vezifeh M.M., Hosseini S.M., Khajeh-Nasiri S., Hashemi S. & Fakhari J. 2015. Isolation and identification of bacteria from paperboard food packaging. *Iran J. Microbiol.* 7 (5): 287–293.
- Moreira C., Rainey F.A., Nobre M.F., da Silva M.T. & da Costa M.S. 2000. *Tepidimonas ignava* gen. nov., sp. nov., a new chemolithoheterotrophic and slightly thermophilic member of the β -Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 735–742.
- Mostafa A.A., Al-Askar A.A., Almaary K.S., Dawoud T.M., Sholkamy E.N. & Bakri M.M. 2018. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences* 25: 361–366.
- Nazina T.N., Tourova T.P., Poltarau A.B., Novikova E.V., Grigoryan A.A., Ivanova A.E., Lysenko A.M., Petrunyaka V.V., Osipov G.A., Belyaev S.S. & Ivanov M.V. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermo catenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 433–446.
- Nicholson W.L., Munakata N., Horneck G., Melosh H.J. & Setlow P. 2000. Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64: 548–572.
- Oppong D., King V.M., Zhou X. & Bowen J.A. 2000. Cultural and biochemical diversity of pink-pigmented bacteria isolated from paper mill slimes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 25: 74–80.
- Peix A., Ramírez-Bahena M.-H. & Velázquez E. 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution* 9: 1132–1147.
- Pikuta E., Lysenko A., Chuvilskaya N., Mendrock U., Hippe H., Suzina N., Nikitin D., Osipov G. & Laurinavichius K. 2000. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium

- from manure, and description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 2109–2117.
- Pirttijärvi T.S.M. Graeffe T.H. & Salkinoja-Salonen M.S. 1996. Bacterial contaminants in liquid packaging boards: assessment of potential for food spoilage. *Journal of Applied Bacteriology* 81: 445–458.
- Pirttijärvi T.S.M., Andersson M.A., Scoging A.S. & Salkinoja-Salonen M.S. 1999. Evaluation of Methods for Recognising Strains of the *Bacillus cereus* Group with Food Poisoning Potential Among Industrial and Environmental Contaminants. *System. Appl. Microbiol.* 22: 133–144.
- Podschun R. & Ullmann U. 1998. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 589–603.
- Prince V., Simao-Beaunoir A.-M. & Beaulieu C. 2009. Amplified ribosomal DNA restriction analysis of free-living bacteria present in the headbox of a Canadian paper machine. *Can. J. Microbiol.* 55: 810–817.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J. & Glöckner F.O. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl. Acids Res.* 41: D590-D596.
- Raaska L., Sillanpää J., Sjöberg A.-M. & Suihko M.-L. 2002. Potential microbiological hazards in the production of refined paper products for food applications. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 28: 225–231.
- Raheem D. 2012. Application of plastics and paper as food packaging materials – An overview. *Emir. J. Food Agric.* 25 (3): 177–188.
- Rosso L., Lobry J.R., Bajard S. & Flandrois J.P. 1995. Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 610–616.
- Rothberg J.M., Hinz W., Rearick T.M., Schultz1 J., Mileski W., Davey M., Leamon J.H., Johnson K., Milgrew M.J., Edwards M., Hoon J., Simons J.F., Marran D., Myers J.W., Davidson J.F., Branting A., Nobile J.R., Puc B.P., Light D., Clark T.A., Huber M., Branciforte J.T., Stoner I.B., Cawley S.E., Lyons M., Fu Y., Homer N., Sedova M., Miao X., Reed B., Sabina J., Feierstein E., Schorn M., Alanjary M., Dimalanta E., Dressman D., Kasinskas R., Sokolsky T., Fidanza J.A., Namsaraev E., McKernan K.J., Williams A., Roth G.T. & Bustillo J. 2011. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475: 348–352.
- Sáez-Nieto J.A., Medina-Pascual M.J., Carrasco G., Garrido N., Fernandez-Torres M.A., Villalón P. & Valdezate S. 2017. *Paenibacillus* spp. isolated from human and environmental samples in Spain: detection of 11 new species. *New Microbes New Infect* 19: 19–27.

- Salkinoja-Salonen M. & Puhakka J. 2002. Bakteerien itiöt. Teoksessa: Salkinoja-Salonen M. (toim.), *Mikrobiologian perusteita*, Gummerus Kirjapaino Oy, Jyväskylä, ss. 147–153.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminal inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (12): 5463–5467.
- Siitonen A., Johansson T., Pirttijärvi T. & Hielm S. 2002. Elintarvikkeiden haittamikrobit. Teoksessa: Salkinoja-Salonen M. (toim.), *Mikrobiologian perusteita*, Gummerus Kirjapaino Oy, Jyväskylä, ss. 611–655.
- Spiers A.J., Buckling A. & Rainey P.B. 2000. The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* 146: 2345–2350.
- Suhr M., Klein G., Kourti I., Gonzalo M.R., Santonja G.G., Roudier S. & Sancho L.D. 2015. Best Available Techniques (BAT) Reference Document for the Production of Pulp, Paper and Board. JRC Science And Policy Reports. European Commission. ss. 105, 193, 663–665, 677, 720.
- Suihko M.-L., Sinkko H., Partanen L., Mattila-Sandholm T., Salkinoja-Salonen M. & Raaska L. 2004. Description of heterotrophic bacteria occurring in paper mills and paper products. *Journal of Applied Microbiology* 97: 1228–1235.
- Suihko M.-L. & Skyttä E. 1997. A study of the microflora of some recycled fibre pulps, boards and kitchen rolls. *Journal of Applied Microbiology* 83: 199–207.
- Suihko M.-L. & Skyttä E. 2009. Characterisation of aerobically grown non-spore-forming bacteria from paper mill pulps containing recycled fibres. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36: 53–64.
- Suominen I., Suihko M.-L. & Salkinoja-Salonen M. 1997. Microscopic study of migration of microbes in food-packaging paper and board. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 19: 104–113.
- Tanner F.W., Wheaton E. & Ball C.O. 1940. Microbiology of Paper and Paper-board for Use in the Food Industry. *Am. J. Public Health* 30: 256–266.
- Tirola M., Lahtinen T., Vuento M. & Oker-Blom C. 2009. Early succession of bacterial biofilms in paper machines. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36: 929–937.
- Valenstein P., Bardy G.H., Cox C.C. & Zwadyk P. 1983. *Pseudomonas Alcaligenes Endocarditis*. *Am J Clin Pathol* 79: 245–247.
- Vishtal A. & Retulainen E. 2012. Deep-drawing of paper and paperboard: the role of material properties. *BioResources* 7 (3): 4424–4450.
- Väisänen O., Elo S., Marmo S. & Salkinoja-Salonen M. 1989. Enzymatic characterization of *Bacilli* from food packaging paper and board machines. *Journal of Industrial Microbiology* 4: 419–428.
- Väisänen O.M., Mentu J. & Salkinoja-Salonen M.S. 1991. Bacteria in food packaging paper and board. *J. Appl. Bacteriol.* 71: 130–133.

- Väisänen O.M., Nurmiaho-Lassila E.-L., Marmo S.A. & Salkinoja-Salonen M.S. 1994. Structure and Composition of Biological Slimes on Paper and Board Machines. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 641–653.
- Väisänen O.M., Weber A., Bennasar A., Rainey F.A., Busse H.-J. & Salkinoja-Salonen M.S. 1998. Microbial communities of printing paper machines. *J. Appl. Microbiol.* 84: 1069–1084.
- Väätänen P. & Niemelä S.I. 1983. Factors regulating the density of bacteria in process waters of a paper mill. *Journal of Applied Bacteriology* 54: 367–371.
- Weber C.J., Haugaard V., Festersen R. & Bertelsen G. 2002. Production and applications of biobased packaging materials for the food industry. *Food Addit. Contam.* 19: 172–177.
- Wirtanen G., Saarela M. & Mattila-Sandholm T. 2000. Biofilms – Impact on hygiene in food industries. Teoksessa: Bryers J.D., *Biofilms II: Process Analysis and Applications*, Wiley-Liss, ss. 327–372.
- Woese C.R. & Fox G.E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5088–5090.
- Zahra S.A., Butt Y.N., Nasar S., Akram S., Fatima Q. & Ikram J. 2016. Food Packaging in Perspective of Microbial Activity: a review. *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.* 6: 752–757.
- Zumsteg A., Urwyler S.K. & Glaubitz J. 2017. Characterizing bacterial communities in paper production – troublemakers revealed. *MicrobiologyOpen* 6: e487. doi: 10.1002/mbo3.487.

Liite 1: Ringer's solution -puskuriliuoksen valmistusresepti

Ringer's solution ¼ strength

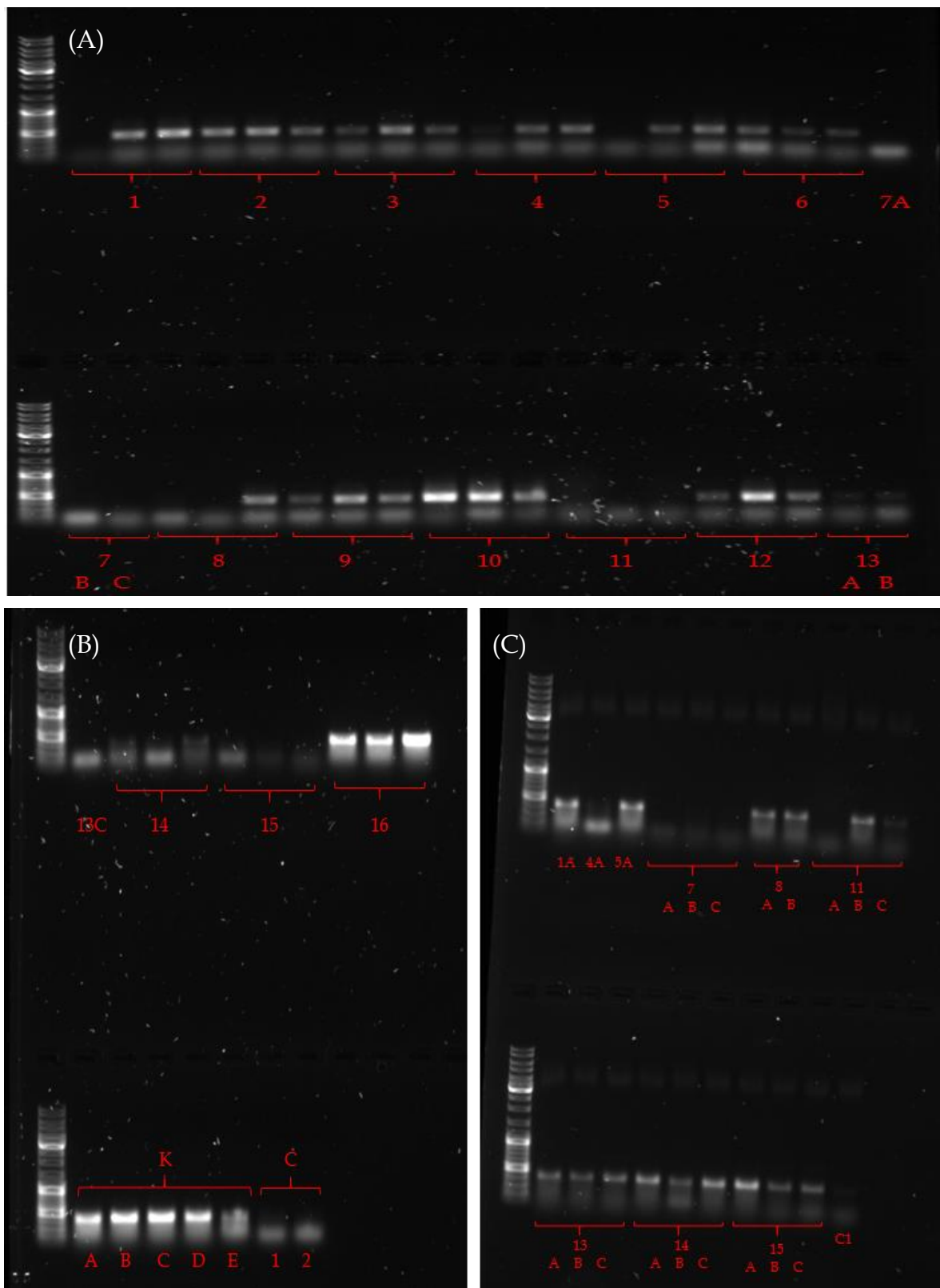
Composition per litre

| | |
|--|----------|
| Sodium chloride (NaCl) | 2,250 g |
| Potassium chloride (KCl) | 0,105 g |
| Calcium chloride (CaCl ₂) 6 H ₂ O | 0,120 g |
| Sodium hydrogen carbonate (NaHCO ₃) | 0,050 g |
| Water | 1 000 ml |

Preparation

Dissolve the salts in water and dispense into appropriate containers. Sterilize the solution in the autoclave for 15 min at 121 °C.

Liite 2: AGE-ajon geelikuvat (PCR-I)



Kuva 13. PCR-I tuotteiden (prosessinäytteet 1-16, K=kartonki, C=kontrolli) AGE-geelikuvat (A ja B) sekä uusitun PCR-I:n geelikuva (C).

Liite 3: Kartonki- ja prosessinäytteiden viljeltyjen mikrobien bakteeritiheys

Taulukko 20. Lopputuotteen ja eri prosessivaiheiden viljeltyjen mikrobien bakteeritiheydet.

| Lopputuote | Bakteeritiheys (pesäkettä/g) | | | | | |
|--------------------|------------------------------|------|-----|-----|-----|--------------|
| | A | B | C | D | E | ka ± hajonta |
| Kartonki (totaali) | 412 | 1536 | 567 | 391 | 882 | 758 ± 478 |
| Kartonki (itiöt) | 167 | 1300 | 544 | 364 | 882 | 651 ± 448 |

| Näytepiste | Bakteeritiheys (pesäkettä/ml) | | | | ka ± hajonta |
|------------|-------------------------------|------|------|--|--------------|
| | A | B | C | | |
| 1 | 38 | 38 | 14 | | 30 ± 14 |
| 2 | 53 | 25 | 8 | | 28 ± 23 |
| 3 | 118 | 27 | 100 | | 82 ± 49 |
| 4 | 263 | 1017 | 933 | | 738 ± 413 |
| 5 | 182 | 485 | 135 | | 267 ± 190 |
| 6 | 4 | 3 | 3 | | 3 ± 0,42 |
| 7 | 0 | 41 | 93 | | 45 ± 47 |
| 8 | 283 | 0,2 | 23 | | 102 ± 157 |
| 9 | 33 | 5 | 15 | | 18 ± 14 |
| 10 | 833 | 1967 | 3950 | | 2250 ± 1578 |
| 11 | 0 | 333 | 17 | | 117 ± 188 |
| 12 | 817 | 967 | 33 | | 606 ± 501 |
| 13 | 633 | 350 | 5 | | 329 ± 315 |
| 14 | 1400 | 1800 | 383 | | 1194 ± 730 |
| 15 | 133 | 2600 | 217 | | 983 ± 1401 |
| 16 | 6750 | 277 | 4667 | | 3898 ± 3304 |

