

Opinnäytetyö (AMK)

Laboratorioalan koulutusohjelma

2011

Veera Nevala

HEMOLYTTINEN
AKTIIVISUUS
FLAVOBACTERIUM
PSYCHROPHILUM-
BAKTEERILLA



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Laboratorioalan koulutusohjelma

Huhtikuu 2011 | Sivumäärä: 28

Tom Wiklund, Kai Rosenberg

Veera Nevala

HEMOLYYTTINEN AKTIVITEETTI *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM*- BAKTEERILLA

Kirjolohi on suomessa eniten viljelty kalalaji. *Flavobacterium psychrophilum*-bakteeri aiheuttaa suurta kuolleisuutta kirjolohen kasvatuslaitoksissa. Ensimmäiset kuvaukset bakteerin aiheuttamasta kylmän veden taudista tehtiin jo vuonna 1946.

F. psychrophilum-bakteeri aiheuttaa infektoituneessa kalassa anemiaa ja näyttää siltä, että se aiheuttaa hemolyysiä punasoluissa. Aiemmissa tutkimuksissa on myös eristetty kanta, joka ei ole virulentti. Koska hemolyyttinen aktiviteetti yhdistetään usein virulenssiin bakteerissa, haluttiin asiaa tutkia tarkemmin.

Työssä tutkittiin aiheuttaako *F. psychrophilum*-bakteerin neljä eri kantaa hemolyysiä punasoluissa. Yhden näistä kannoista oli todettu aiemmissa tutkimuksissa olevan epävirulentti. Tutkimuksessa perehdyttiin kantojen aiheuttamaan hemolyysiin eri lämpötiloissa ja erittävätkö kannat eksotoksiineja. Kannat myös inaktivoitiin lämmöllä, proteaasi-K:lla, sonikoinnilla ja formaliinilla, jolloin pyrittiin saada selville, aiheuttaako hemolyysin esim. endotoksiinit.

Tutkimuksen perusteella voitiin todeta, että *F. psychrophilum*-bakteerin sileät kannat aiheuttavat hemolyysiä, kun taas marmoroidut kannat eivät aiheuta lähes ollenkaan. Vaikka tautia kutsutaan kylmän veden taudiksi, hemolysoi bakteerin sileät kannat yhtä hyvin sekä 5 että 15 °C:ssa. *F. psychrophilum*-bakteeri ei eritä eksotoksiineja, joka aiheuttaisi punasolujen hajoamista. Inaktivoitujen kantojen tuloksista voitiin tehdä johtopäätös, ettei sileiden kantojen bakteerien tarvitse olla elossa tai ehjiä voidakseen hajottaa punasoluja.

ASIASANAT:

Flavobacterium psychrophilum, bakteeri, hemolyysi

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Laboratory Technology

April 2011 | Total number of pages: 28

Tom Wiklund, Kai Rosenberg

Veera Nevala

THE HEMOLYTIC ACTIVITY OF THE BACTERIUM *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM*

The rainbow trout is the most farmed fish species in Finland. The *Flavobacterium psychrophilum* bacterium causes wide mortality rates in rainbow trout hatcheries. The first descriptions of the bacterial cold water disease date back to 1946.

F. psychrophilum causes anemia in an infected fish and it seems that it creates hemolysis of red blood cells. In previous research a strain has been isolated that is nonvirulent. Because hemolytic activity is often linked with the virulence of the bacterium, further research was wanted.

The objective of this study was to examine whether or not the four different strains of *F. psychrophilum* cause hemolysis in red blood cells. In the earlier studies, one of these strains was discovered to be nonvirulent. In this project, hemolysis caused by different strains was monitored in different temperatures, and it was determined if the strains would secrete exotoxins. The strains were also inactivated by heating, protease-K, sonication, and formaline. To find out if for example endotoxins was the cause of the hemolysis.

The study shows us that the smooth strains of *F. psychrophilum* cause hemolysis, whereas the rough strains hardly cause any at all. Although the disease is called a bacterial cold water disease, the smooth strains cause hemolysis in 5 °C as well as in 15 °C. *F. psychrophilum* does not secrete exotoxins, which would cause breaking of red blood cells. On the basis of the results from the inactivated strains, the conclusion can be drawn that the bacteria of the smooth strains do not need to be alive or intact to be able to break red blood cells.

KEYWORDS:

Flavobacterium psychrophilum, bacterium, hemolysis

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	5
2 FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM	6
2.1 Historiaa	6
2.2 Taudin kuvaus	6
2.3 Rakenne ja kannat	7
3 LÄMPÖTILAN VAIKUTUS BAKTEERIN AIHEUTTAMAAN HEMOLYYSIIN	9
4 SOLUN ULKOPUOLELLE ERITTYVÄN AINEEN (ECP) AIHEUTTAMA HEMOLYYSI	9
4.1 Eksotoksiinit	9
4.2 Pierce Protein Assay Kit	10
5 F. PSYCHROPHILUM-BAKTEERIN INAKTIVOINTITEKNIIKAT	10
5.1 Lämpö	10
5.2 Sonikointi	11
5.3 Proteaasi-K	11
5.4 Formaliini	11
6 KOKEELLINEN OSA	12
6.1 Veren käsittely	12
6.2 Bakteerien käsittely	12
6.3 Bakteerisolujen hemolyyttinen aktiivisuus 5 ja 15 °C:ssa	12
6.4 Solun ulkopuolelle erittyvien aineiden hemolyyttinen aktiviteetti	13
6.4.1 Solun ulkopuolisen aineen (ECP) eristys	13
6.4.2 Proteiinikonsentraation mittaaminen Pierce Protein Assay Kit:llä	14
6.4.3 ECP:n aiheuttaman hemolyysin mittaaminen	17
6.5 Inaktivoidut bakteerit	17
6.5.1 Lämmöllä inaktivoidut bakteerit	17
6.5.2 Formaliinilla inaktivoidut bakteerit	18
6.5.3 Sonikoidut näytteet	18
6.5.4 Proteaasi-K:lla käsitellyt bakteerit	19
7 TULOKSET	19
7.1 Lämpötilan vaikutus hemolyyttiseen aktiivisuuteen	19
7.1.1 Hemolyyttinen aktiviteetti 5 °C:ssa	19
7.1.2 <i>F. psychrophilum</i> -bakteerin aiheuttama hemolyysi 15 °C	22
7.1.3 Lämpötilojen vertailu kuvaajan avulla	24
7.2 ECP:n hemolyyttinen aktiviteetti	25

7.3 Inaktivoitujen bakteerien hemolyyttinen aktiivisuus	25
7.4 Tulosten yhteenveto	26

8 POHDINTA **27**

LÄHTEET **28**

KUVAT

Kuva 1. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> -bakteerin aiheuttama kraaterimainen haavauma.	7
Kuva 2. <i>F. psychrophilum</i> - bakteerin marmoroitu (vasemmalla) ja sileä kanta (oikealla).	8

KUVIOT

Kuvio 1. Proteiinistandardien kuvaaja.	15
Kuvio 2. Bakteerisolujen hemolyyttinen aktiivisuus (Absorbanssi) 5 °C:ssa eri aikoina (2 – 48 h).	20
Kuvio 3. Bakteerikasvun seuranta (5 °C)	21
Kuvio 4. Bakteerisolujen hemolyyttinen aktiivisuus 15 °C:ssa.	23
Kuvio 5. Bakteerikasvun seuranta (15 °C).	24
Kuvio 6. Kantojen P6-3R/07 ja P6-3S/07 absorbanssit 5 ja 15 °C:ssa.	25

TAULUKOT

Taulukko 1. Hemolyysi-, kontrolli- ja bakteeriputkien pipetointi.	13
Taulukko 2. Standardien valmistus proteiinikonsentraation mittauksessa	14
Taulukko 3. Proteiinistandardien (Absorbanssi) keskiarvot ja keskihajonnat (s).	15
Taulukko 4. Eri bakteerikantojen proteiinipitoisuudet	16
Taulukko 5. Näyteputkien valmistus	18
Taulukko 6. Mittaustulosten keskiarvot (A) ja keskihajonnat (s).	19
Taulukko 7. Bakteerien aiheuttama todellinen hemolyysi (5 °C)	20
Taulukko 8. Bakteerikasvun seuranta (5 °C).	21
Taulukko 9. Mittaustulosten keskiarvot (A, ka) ja keskihajonnat (s)	22
Taulukko 10. Bakteerien aiheuttama todellinen hemolyysi (15 °C)	22
Taulukko 11. Bakteerikasvun seuranta (15 °C)	23
Taulukko 12. Kantojen P6-3R/07 ja P6-3S/07 absorbanssit lämpötiloissa 5 °C ja 15 °C.	24

LIITTEET

LIITE 1 Proteiinistandardien mittaustulokset
LIITE 2 Bakteerien hemolyyttinen aktiivisuus 5 °C, mittaustulokset
LIITE 3 <i>F. psychrophilum</i> -bakteerin hemolyyttinen aktiviteetti 15 °C:ssa (A), mittaustulokset
LIITE 4 Ecp:n aiheuttama hemolyysi (1 h, 560 nm), mittaustulokset (A)
LIITE 5 ECP:n aiheuttama hemolyysi (4 h, 560nm), mittaustulokset (A)
LIITE 6 ECP:n aiheuttama hemolyysi (24 h, 560nm), mittaustulokset (A)
LIITE 7 Inaktivoitujen <i>F. psychrophilum</i> -bakteerien hemolyyttinen aktiviteetti, mittaustulokset (A)

1 Johdanto

Kirjolohti on Suomessa eniten viljelty kalalaji. Vuonna 2009 viljeltiin n. 13,6 miljoonaa kiloa ruokakalaa, joista n. 12,7 miljoonaa kiloa oli kirjolohta. Eri-ikäisiä kalanpoikasia tuotettiin n. 65 miljoonaa yksilöä istutuksiin ja kalanviljelyyn ja näistä oli kirjolohta n. 21 miljoonaa yksilöä (Savolainen R. (2010), [viitattu 19.9.2010]).

Flavobacterium psychrophilum- bakteerin aiheuttamaa tautia on havaittu ympäri maailmaa mm. Australiassa, Belgiassa, Chilessä, Englannissa, Espanjassa, Italiassa, Japanissa, Kanadassa, Koreassa, Ranskassa, Saksassa, Suomessa, ja Yhdysvalloissa (Hesami S. *et al* (2008), [viitattu 19.9.2010]).

F. psychrophilum-bakteeri on ongelma erityisesti makean veden kirjolohen kasvatustiluksissa. Se voi aiheuttaa suurta kuolleisuutta vastakuoriutuneilla poikasilla ja aikuisille haavaumia ihoon (Åbo Akademi (2006), [viitattu 16.4.2010]).

Bakteeri aiheuttaa infektoituneessa kalassa anemiaa ja hemolyysiä. On myös eristetty kanta, joka on ei-virulentti. Tutkimuksen kohteena ovat bakteerin hemolyyttiset ominaisuudet, koska hemolyyttinen aktiviteetti yhdistetään usein myös virulenssiin bakteerissa.

Kokeessa tutkitaan hemolyyttistä aktiviteettia eri lämpötiloissa, bakteerin ulkopuolelle erittyvän aineen aiheuttamaa hemolyysiä ja eri tekniikoin inaktivoitujen bakteerien aiheuttamaa hemolyysiä.

2 *Flavobacterium psychrophilum*

2.1 Historiaa

Ensimmäiset kuvaukset kylmän veden taudista (BCWD, bacterial cold-water disease) lohikaloilla teki Davis vuonna 1946 Länsi-Virginiassa U.S.A:ssa. Vuonna 1941 ja 1945 tehtiin löydökset pieniltä kirjolohilta, mutta Davis ei kuitenkaan eristänyt bakteeria kasvualustalle tarkempia tutkimuksia varten (Holt, R. A. (1987)).

Vuonna 1948 Borg raportoi kylmän veden taudista Washingtonissa U.S.A:ssa. Hän eristi *F. psychrophilum*- bakteeria nuorilta hopealohilta munuaisista ja ulkoisista haavaumista useista eri kalahautomosta Washingtonissa. Samassa kohteessa saatettiin menettää yli 30 % kaloista taudin vuoksi. Vuonna 1960 Borg tartutti onnistuneesti terveen hopealohen eristetyllä bakteerilla (Holt, R. A. (1987)).

Borg kuvaili vuonna 1960 *F. psychrophilum*- bakteerin olevan gram-negatiivinen bakteeri, joka liikkuu liukuvasti ja ei muodosta rakkuloita tai itiöitä. Tästä syystä bakteeri sijoitettiin *Cytophaga*- sukuun. Bakteerille Borg antoi nimeksi *Cytophaga psychrophila*, koska se lopetti kasvamisen kasvualustalla n. 25 °C:ssa (Holt, R. A. (1987)). Sittemmin bakteeria kutsuttiin nimellä *Flexibacter psychrophilus* ja nykyään bakteeria kutsutaan nimellä *Flavobacterium psychrophilum* (Madetoja J. et al. (2000)).

2.2 Taudin kuvaus

Flavobacterium psychrophilum aiheuttaa suomessa kirjolohen kasvatuslaitoksissa suuria ongelmia. Eniten bakteeri aiheuttaa tappioita alle 1 vuotiaalle poikasille, mutta sairastuttaa myös aikuisia kaloja. Poikasilla tautia kutsutaan pikkupoikaissyndroomaksi (RTFS, Rainbow Trout Fry Syndrome) ja aikuisilla kaloilla kylmän veden taudiksi (BCWD, bacterial cold water disease) (Åbo Akademi (2006), [viitattu 19.9.2010]).

Poikasilla sairautta on vaikeampi todeta ja ne voivatkin kuolla oireettomina. Kalojen kasvaessa oireetkin tulevat näkyviin. Värierot voivat olla parvissa suuria, aivan tummasta vaalean aneemiseen. Myös perna voi olla laajentunut ja vatsaontelo nesteen täyttämä. Kaloilla jotka ovat selvinneet tartunnasta, on havaittu selkärankamuutoksia ja kiduskannen lyhentymää (Åbo Akademi (2006), [viitattu 19.9.2010]).

Suuremmilla kaloilla *F. psychrophilum* aiheuttaa ensin ihonalaisia nesterakkuloita ja puhjetessaan ne muuttuvat kraaterimaisiksi haavaumiksi (Kuva 1). Haavaumien reunoilla näkyy usein selvästi keltaista bakteeria. Ärsytyksen seurauksena kala hankaa haavaumaa ja sen johdosta vaurioitunut alue laajenee (Åbo Akademi (2006), [viitattu 19.9.2010]).



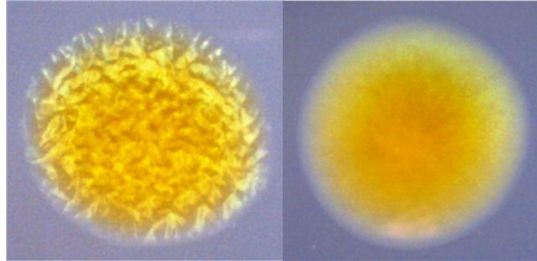
Kuva 1. *Flavobacterium psychrophilum*-bakteerin aiheuttama kraaterimainen haavauma.

Mäti, joka on *F. psychrophilum*- bakteerin infektoima, on yleisin tartunnanlähde. Poikaset ovat siis taudinkantajia alusta alkaen. Hoitona tautiin käytetään antibioottikäsittelyä. Turhia käsittelyitä on kuitenkin vältettävä, jottei bakteeri tulisi resistentiksi, kuten ulkomailla on käynyt joillekin antibiooteille (Åbo Akademi (2006), [viitattu 19.9.2010]).

2.3 Rakenne ja kannat

Flavobacterium psychrophilum on pitkä ja ohut (halkaisija 0,2-0,75 µm ja pituus 1,5- 7,5 µm) gram- negatiivinen sauva, tosin muoto on ympäristön vaikutuksille altis. Bakteeri tuottaa siihen erikoistuneella agarilla (0,4 % tryptonia, 0,04 % hiivauutetta, 0,05 % MgSO₄·7 H₂O, 0,05 % CaCl₂· 2 H₂O, 1,1 % agaria (Holt R. A., 1987)) kirkaankeltaisia pesäkkeitä ja niiden ympärillä on ohuesti

levittäytyneet reunat (Cipriano, R. C., Holt R. A. (2005)). Mikroskoopilla tarkasteltaessa pesäkkeestä voidaan havaita sekä marmoroitua että sileää kantaa (Kuva 2.)



Kuva 2. *F. psychrophilum*- bakteerin marmoroitu (vasemmalla) ja sileä kanta (oikealla).

F. psychrophilum on aerobinen bakteeri, joka kasvaa nopeasti 4 - 23 °C:ssa. Muutamat kannat kasvavat vähäisesti myös 25 °C:ssa.

Bakteeri ei hajota yksinkertaisia tai monimutkaisia hiilihydraatteja, mutta sillä on aktiivinen proteiineja hajottava kapasiteetti hajottaa kelatiinia, kaseiinia ja albumiinia. Kannat hajottavat myös tyrosiinia, mutta eivät tuota katalaasia, rikkivetyä, indolia eikä pelkistä nitraatteja (Holt R. A. (1987)).

Työssä tutkitaan neljää eri kantaa ja niiden ominaisuuksia hemolysoida punasoluja. Kaksi kannoista on marmoroituja ja kaksi sileitä. Toinen marmoroiduista kannoista on todettu aiemmissa tutkimuksissa olevan ei-virulentti.

Työssä käytetyt kannat:

- P6-3S/07, sileä kanta
- P6-3R/07, marmoroitu ei-virulentti kanta
- P13-4S/06, sileä kanta
- P13-4R/06, marmoroitu kanta

3 Lämpötilan vaikutus bakteerin aiheuttamaan hemolyysiin

Kylmänvedentautia esiintyy usein 4 - 10 °C:ssa mutta kuolleisuus vähenee vasta 15 - 18 °C:ssa. Nuorilla lohilla on havaittu tautia 15 - 18 °C:ssa aiheuttaen myös kuolleisuutta. Vaikka yleisesti ottaen tautia ei yhdistetä lämpimien vesien tauteihin, on havaintoja taudista tehty yli 18 °C:ssa vedessä (Cipriano, R. C., Holt R. A. (2005)).

Tässä osiossa tutkittiin, vaikuttaako lämpötilan muutos *F. psychrophilum*-bakteerin aiheuttamaan hemolyysiin. Testilämpötiloina olivat 5 ja 15 °C. Oleellisempänä tutkimuksen kannalta voidaan pitää eri kantojen käyttäytymistä eri lämpötiloissa.

4 Solun ulkopuolelle erittyvän aineen (ECP) aiheuttama hemolyysi

4.1 Eksotoksiinit

Eksotoksiinit voidaan jakaa neljään ryhmään niiden rakenteen ja fysiologisen aktiivisuuden mukaan. Ensimmäinen ryhmä on AB-toksiini, joka koostuu kahdesta osasta. B-osa sitoutuu isäntäsolun reseptoriin vapauttaen osan A solun sisäpuolelle. A-osa aiheuttaa entsyymiaktiivisuutensa vuoksi toksisuutta. Toinen tyyppi, joka voi myös olla AB-toksiini koostuu toksineista, jotka vaikuttavat tietyssä kohtaa isäntäsolun sisä- tai ulkopuolella. Kolmannella tyyppillä ei ole erillisiä A ja B osaa, vaan se toimii sekoittamalla isäntäsolun kalvoa. Neljäs tyyppi on superantigeeni joka stimuloi T-soluja vapauttamaan sytokiineja (Prescott L. M. *et al.*, (2005)).

Tarkastellaan lähemmin kolmatta tyyppiä, koska työssä keskitytään tutkimaan aiheuttaako eksotoksiini lyysiä punasoluissa. Patogeenisistä bakteereista voi erittyä myös punasoluja hajottavia toksineja. Proteiini sitoutuu kolesteroli osaan

punasolun solukalvolla ja muodostaa siihen aukon, mistä hemoglobiini ja/tai ionit vapautuvat. Koska solulimassa ja solun ulkopuolella olevassa nesteessä on erilaiset osmoottiset paineet, soluun aiheutuu nopea sisäänvirtaus ja aiheuttaa näin solun hajoamisen (Prescott L. M. *et al.* (2005)).

Kokeessa tutkittiin, erittääkö *F. psychrophilum* solun ulkopuolelle toksiinia, joka hajottaa punasoluja.

4.2 Pierce Protein Assay Kit

Pierce Protein Assay Kit:llä voidaan määrittää proteiinkonsentraatiota. *F. psychrophilum*- bakteerista eristettiin solun ulkopuolelle erittyvät aineet ja proteiinkonsentraatio mitattiin Pierce Protein Assay Kit:n avulla.

Pierce Protein Assay Kit- analyysissä yhdistyy Cu^{2+} - ionien pelkistäminen Cu^{1+} -ioneiksi emäksisissä olosuhteissa ja selektiivinen kuparikationien kolorimetrinen havaitseminen bisinkoniinihapon (biconchonic acid, BCA) avulla. Ensimmäinen vaihe on kuparin kelaatio proteiinien kanssa emäksisessä ympäristössä, jolloin muodostuu vaaleansininen kompleksi. Toisessa värinmuodostusreaktiossa bisinkoniinihappo reagoi ensimmäisessä vaiheessa pelkistetyn kuparikationin kanssa. Voimakas purppuran värinen reaktiotuote tulee kahden molekyylin kelatoitumisesta kupari- ionin kanssa. Bisinkoniinihappo/kupari- kompleksi on vesiliukoinen ja muodostaa voimakkaan absorbanssin proteiinien kanssa aallonpituudella 562 nm (Thermo Fisher Scientific (2011), [viitattu 19.2.2011]).

5 *F. psychrophilum*-bakteerin inaktivoititekniikat

5.1 Lämpö

Mikro-organismit ovat erityisen herkkiä, koska ne ovat yleensä yksisoluisia ja ovat alttiita ympäristön lämpötilanmuutokselle. Liian korkea lämpötila vahingoittaa niitä denaturoimalla entsyymeitä, kuljettajaproteiineja ja muita proteiineja. Kun lämpötilaa nostetaan tarpeeksi optimilämpötilasta, entsyymin rakenne muuttuu ja menettää toimintakykynsä (Prescott L. M. *et al.* (2005)).

Inaktivointi lämpötilana käytettiin 45 °C.

5.2 Sonikointi

Sonikaattoria käytettiin *F. psychrophilum*- bakteerin hajotukseen. Sonikaattorin toiminta perustuu ultraääneen, joka hajottaa bakteerisolut. Käytettäessä se muodostaa lämpöä ja koska ei haluta bakteerin proteiinien denaturoituvan, niin kaikki vaiheet tehtiin jäähauteessa ja sonikointiajat pidettiin lyhyinä 30 s ja 30 s tauko.

Sonikoinnin jälkeen suspensio sentrifugoitiin, jottei näytteeseen tullut lainkaan kokonaisia bakteereita, vaan ainoastaan soluseiniä.

5.3 Proteaasi-K

Proteaasi-K on eristetty sienestä (*Engyodontium album*), joka kasvaa keratiinissa. Sitä voidaan uuttaa luonnon keratiinista esimerkiksi hiuksista. Proteaasi-K:ta on käytetty poistamaan endotoksiinisia sidoksia kationisista proteiineista kuten lysosomeista ja ribonukleaasi- A:sta (Sigma-Aldrich (2010), [viitattu 22.4.2010]).

Proteaasi-K käsittely tehdään bakteerille siksi, ettei tiedetä onko sen pinnalla endotoksiinia esim. proteiineja, jotka aiheuttavat hemolyysiä.

5.4 Formaliini

Formaldehydistä voidaan valmistaa 100 %:sta formaliinia, joka on 40 % formaldehydin vesiliuos. 0,5 %:nen formaliinin vesiliuos tappaa bakteerit 6-12 tunnissa ja itiöt n. kolmessa vuorokaudessa (Raasmaja, A., Männistö, P.T. (2007), [viitattu 24.10.2010]). Formaliinikäsittelyssä bakteerit eivät hajoa.

6 Kokeellinen osa

6.1 Veren käsittely

Veri otettiin terveeltä kirjolohelta sen ollessa nukutettuna. Nukutusaineena käytettiin 0,5 % bentsokaiinia etanolissa. Veri otettiin ruiskuun johon laitettiin valmiiksi Alsever-liuosta (1:1) hyytymisen estämiseksi. Punasolut pestiin kolme kertaa 1 x PBS-liuoksella (1000 g, 5 min, 10 °C). Sentrifugointien välissä poistettiin supernatantti ja valkosolukerros, jolloin putken pohjalle jäi punasolut. 1 x PBS-liuosta lisättiin putkeen alkutilavuuden saamiseksi. Pesujen jälkeen punasoluista tehtiin 5 % liuos (0,75 ml punasoluja/ 14,25 ml 1x PBS).

6.2 Bakteerien käsittely

Bakteerikantoja kasvatettiin TYA-maljoilla ja kasvatusalusta uusittiin seitsemän päivän välein. Maljoilta kaavittiin bakteeria TYB- liuokseen (6 ml) ja säädettiin $OD^{520}=0,45$, joka vastaa 1×10^9 CFU/ml. Työvaiheet suoritettiin jäähauhteella, koska *F. psychrophilum* ei kestä korkeita lämpötiloja. Käytetyt bakteerikannat:

- P6-3S/07, sileä kanta
- P6-3R/07, marmoroitu ei-virulentti kanta
- P13-4S/06, sileä kanta
- P13-4R/06, marmoroitu kanta

6.3 Bakteerisolujen hemolyyttinen aktiivisuus 5 ja 15 °C:ssa

Työ aloitettiin valmistamalla 5 % punasoluliuos. Hemolyysiputkien rinnalla seurattiin bakteerikantojen kasvua, joten myös niistä tehtiin omat putket. Todellisen hemolyysin saamiseksi otettiin kontrolliksi putki, johon tuli ainoastaan punasoluja. Näytteitä valmistettiin kolme rinnakkaista tulosten luotettavuuden varmistamiseksi. Jokaista kantaa pipetoitiin seuraavasti (Taulukko 1.):

Taulukko 1. Hemolyysi-, kontrolli- ja bakteeriputkien pipetointi.

	Putki		
	1	2	3
0,5 % NaCl (ml)	6,4	6,4	6,4
Punasolut (ml)	0,8	0,8	-
1 x PBS (ml)	-	-	0,8
Bakteerit, TYB:ssä (ml)	0,8	-	0,8
TYB (ml)	-	0,8	-
Yht. (ml)	8,0	8,0	8,0

Putki 1: Bakteerien aiheuttama hemolyysi

Putki 2: Punasolujen luonnollinen hemolyysi (kontrolli)

Putki 3: Bakteerien kasvun seuranta

Spektrofotometrin nollausta varten valmistettiin liuos johon tuli 6,4 ml 0,5 % NaCl:a, 0,8 ml 1x PBS-liuosta ja 0,8 ml TYB:ä. Näyteputkia inkuboitiin 5 °C ja 15 °C:ssa sekoittajassa 200 rpm.

Aikapisteinä olivat 0 h, 4 h, 24 h ja 48 h. Aikapisteessä putkista pipetoitiin 1 ml näytettä ja niitä sentrifugoitiin 1000 g, 10 min, 10 °C ehjien punasolujen poistamiseksi. Supernatantit (900 µl) pipetoitiin uusiin putkiin ja toistettiin sentrifugointi nopeudella 10 000 g, 10 min, 10 °C. Toisella sentrifugoinnilla saatiin bakteerit pois näytteistä. Putkista pipetoitiin jälleen supernatantit uusiin putkiin, jolloin näytteet olivat valmiita mitattaviksi. Hemolyysiputkien absorbanssit mitattiin aallonpituudella 542 nm ja bakteeriputkien absorbanssit aallonpituudella 520 nm.

6.4 Solun ulkopuolelle erittyvien aineiden hemolyyttinen aktiviteetti

6.4.1 Solun ulkopuolisen aineen (ECP) eristys

Eristykseen käytettiin suuria TYA-maljoja joiden päälle laitettiin steriloitu sellofaani. Sellofaanin tarkoituksena oli estää ECP:n valuminen agarin pohjalle.

TYA-maljoilla kasvatettuja bakteereita siirrostettiin 0,5 %:seen NaCl-liuokseen ja suspensiota pipetoitiin sellofaanille 0,8 ml. Jokaiselle kannalle varattiin kuusi maljaa jotta ECP:a saataisiin tarpeeksi määrittystä varten. Maljoja inkuboitiin 6 vrk 15 °C.

Sekä bakteerit että ECP kaavittiin maljoilta pipetoimalla niihin 0,75 ml 1 x PBS-liuosta. Bakteerit poistettiin sentrifugoimalla suspensiota 15 000 g, 20 min, 4 °C. Lopuksi ECP-liuos suodatettiin (Millex-GV, 0,22 µm, LOT R8MN25931), jotta loputkin bakteerien osat saatiin pois.

6.4.2 Proteiinikonsentraation mittaus Pierce Protein Assay Kit:llä

Tarvittavat liuokset ja ohjeet saatiin pakkauksen mukana. Proteiinistandardina oli albumiini (BSA) 2 mg/ml. Standardit laimennettiin 1 x PBS-liuoksella lopputilavuuteen (Taulukko 2):

Taulukko 2. Standardien valmistus proteiinikonsentraation mittauksessa

	Std:n pitoisuus (µg/ml)		Kantaliuos, BSA (2 mg/ml)		Puskuri, 1 x PBS
A.	2000	→	100 µl Kantaliuosta	+	-
B.	1500	→	150 µl Kantaliuosta	+	50 µl
C.	1000	→	100 µl Kantaliuosta	+	100 µl
D.	750	→	50 µl B	+	50 µl
E.	500	→	100 µl C	+	100 µl
F.	250	→	100 µl E	+	100 µl
G.	125	→	100 µl F	+	100 µl
H.	25	→	20 µl G	+	80 µl
I.	0	→	-	+	100 µl

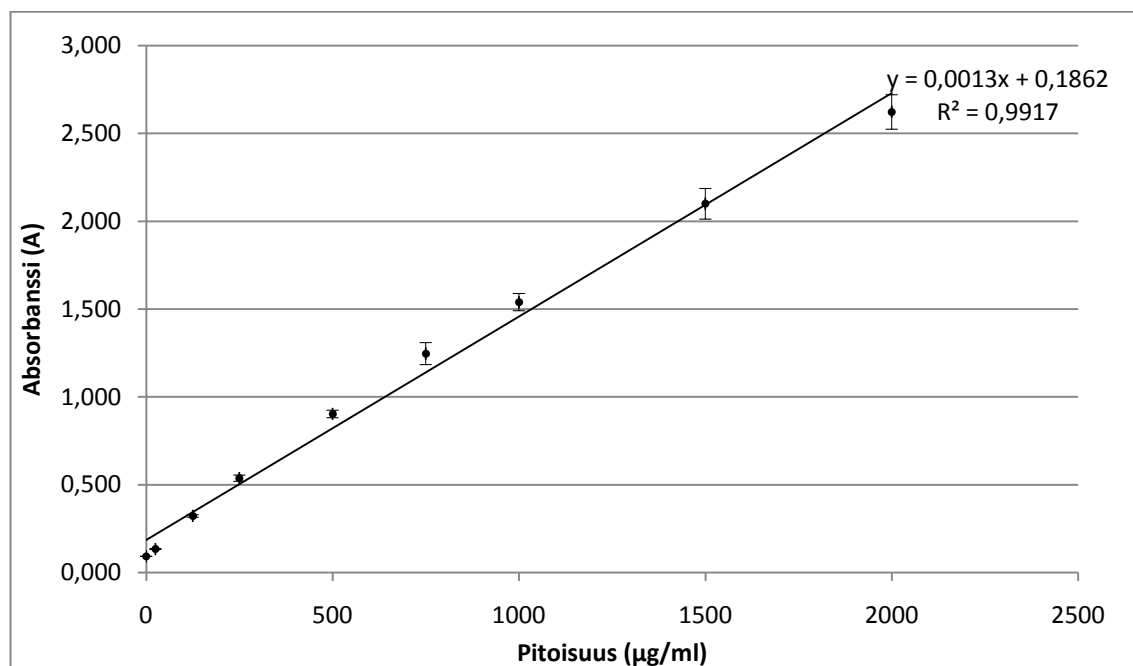
Työliuos valmistettiin pipetoimalla reagenssia A ja B 50:1 (10 ml: 0,2 ml).

Standardeja ja näytteitä (x3) pipetoitiin mikrolevyille (Nunc) 25 µl ja tämän jälkeen työliuosta 200 µl. Liuokset sekoitettiin 200 rpm 30 s. Levyä inkuboitiin 30 min 37 °C reaktion käynnistämiseksi. Liuosten absorbanssit mitattiin mikrolevyiltä aallonpituudella 560 nm (Victor²).

Mittaustuloksista (LIITE 1) laskettiin keskiarvot ja keskihajonnat (Taulukko 3). Taulukosta saaduista tuloksista tehtiin kuvaaja (Kuvio 1) jonka avulla laskettiin eri kantojen ECP- pitoisuudet (proteiinit). Kuvaajaan merkittiin myös variaatiot eri pitoisuuksissa.

Taulukko 3. Proteiinistandardien (Absorbanssi) keskiarvot ja keskihajonnat (s).

Pitoisuus $\mu\text{g/ml}$	Absorbanssi	s
2000	2,622	0,098
1500	2,100	0,087
1000	1,540	0,049
750	1,246	0,063
500	0,903	0,022
250	0,537	0,018
125	0,322	0,007
25	0,134	0,003
0	0,092	0,001



Kuvio 1. Proteiinistandardien kuvaaja.

ECP- näytteiden absorbanssien perusteella laskettiin bakteerikantojen proteiinipitoisuudet (Taulukko 4.).

Taulukko 4. Eri bakteerikantojen proteiinipitoisuudet

Näyte	Absorbanssi	keskiarvo	keskihajonta	Proteiinipitoisuus, µg/ml
P6-3S/07	1,113 1,068 1,107	1,10	0,024	700
P6-3R/07	0,741 0,761 0,739	0,75	0,012	431
P13-4S/96	1,227 1,219 1,258	1,23	0,021	807
P13-4R/96	1,614 1,603 1,613	1,61	0,006	1095

Lasku esimerkki (P6-3S/07- kanta):

$$y = 0,0013x + 0,1862 \rightarrow$$

$$x = \frac{y - 0,1862}{0,0013}$$

$$y = 1,10$$

$$x = \frac{1,10 - 0,1862}{0,0013} = 700$$

Kaikkien kantojen konsentraatiot säädettiin samaksi laimeimman eli P6-3R-kannan mukaan pitoisuuteen 431 µg/ml. Tarpeeksi määriteltiin 2 ml.

Laskuesimerkki, P6-3S/07- kannan laimennos:

$$700 \mu\text{g} / \text{ml} \cdot x = 2 \text{ml} \cdot 431 \mu\text{g} / \text{ml}$$

$$x = 1,23 \text{ml}$$

ECP:a pipetoitiin 1,23 ml ja laimennettiin 1 x PBS:lla 2 ml:ksi.

6.4.3 ECP:n aiheuttaman hemolyysin mittaaminen

Aikapisteiksi valittiin 1 h, 4 h ja 24 h, joten tarvittiin kolme mikrolevyä. ECP:sta tehtiin laimennokset 1:1–1:64 pipetoimalla ensin 1:2–1:64 kaivoihin 100 µl:aa 1 x PBS-liuosta. Tämän jälkeen ylimpiin kaivoihin pipetoitiin jokaisen kannan ECP:a 200 µl (x3) ja aloitettiin laimennos ylimmistä kaivoista alkaen, pipetoimalla 100 µl. Viimeisenä kaivoihin pipetoitiin 100 µl punasoluja (5 % -liuos). Kontrollina oli veri+PBS (100 µl+100 µl), jolla seurattiin luonnollista hemolyysiä, ja punasolut+tislattu vesi (100 µl+100 µl), jotta saatiin selville koko hemolyysi. Myös kontrolleista tehtiin kolme rinnakkaista. Levyjä inkuboitiin 15 °C:ssa 200 rpm.

Aikapisteessä levyä sentrifugoitiin 1000 g, 10 min, 10 °C ja pipetoitiin supernatantit (150 µl) uudelle levyille. Absorbanssit mitattiin aallonpituudella 560 nm (Victor²).

6.5 Inaktivoidut bakteerit

Inaktivoitaviksi kannoiksi valittiin P13-4S/96 ja P13-4R/96, poikkeuksena sonikoidut näytteet johon otettiin kaikki kannat. Inaktivointitekniikoita oli neljä erilaista: lämpö, sonikointi, proteaasi-K ja formaliini.

6.5.1 Lämmöllä inaktivoidut bakteerit

Kahteen putkeen pipetoitiin 5 ml TYB:ä ja näihin siirrostettiin bakteereita mahdollisimman paljon kuitenkin niin, että $OD_{520}=1,5$. Putkia inkuboitiin lämpöhauteessa 45 °C 1 h. Näytteet valmistettiin taulukon 5 mukaisesti.

Taulukko 5. Näyteputkien valmistus

Reagenssi	Putki			
	1	2	3	nolla
0,5 % NaCl, ml	3,2	3,2	3,2	3,2
punasolut, ml	0,4	0,4	0,4	-
1 x PBS, ml	-	-	-	0,4
Bakteerit, ml	0,4	-	0,4	-
TYB, ml	-	0,4	-	0,4

Putki 1: Inaktivoitu bakteeri

Putki 2: Luonnollinen hemolyysi

Putki 3: Elävät bakteerit

Aikapisteiksi valittiin 24 h ja 48 h ja inkubointi lämpötilaksi 15 °C. Aikapisteessä näytettä pipetoitiin 1 ml uuteen putkeen ja sentrifugoitiin 1000 g, 10 min, 10 °C. Supernatantit sentrifugoitiin uudelleen (10 000 g, 10 min, 10 °C). Näytteet mitattiin spektrofotometrillä aallonpituudella 542 nm.

6.5.2 Formaliinilla inaktivoitujen bakteerit

Kahteen putkeen pipetoitiin 4 ml 1 x PBS-liuosta jossa oli 0,5 % formaliinia. Putkiin siirrostettiin bakteerit (P13-4R/96, P13-4S/96) ja mittaamalla varmistettiin, että saatiin voimakkaat suspensiot ($A > 1,5$). Putkia inkuboitiin 4 °C:ssa o/n. Inkuboinnin jälkeen bakteerit pestiin kaksi kertaa TYB:llä (5000 g, 10 min, 10 °C). Näytteet valmistettiin ja analysoitiin samoin kuin kohdassa 6.5.1.

6.5.3 Sonikoidut näytteet

Neljään falkonputkeen pipetoitiin 8 ml TYB:ä ja niihin siirrostettiin bakteereita (P6-3R/07, P6-3S/07, P13-4R/96, P13-4S/96) niin että $A = 1,5 \pm 0,1$. Putkia sonikoitiin 50 W 4 x 60 s ja väleissä pidettiin 60 s tauko suspension ylikuumenemisen estämiseksi. Työvaihe suoritettiin jäähauteella. Sonikoinnin jälkeen putkia sentrifugoitiin 5000 g, 30 min, 10 °C. Putkista pipetoitiin supernatantit ja niistä valmistettiin ja analysoitiin näytteet samoin kuin kohdassa 6.5.1.

6.5.4 Proteaasi-K:lla käsitellyt bakteerit

4 mg/ml Proteaasi-K liuos valmistettiin punnitsemalla Proteaasi-K:ta 3,6 mg joka laimennettiin steriilillä 50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂ -lioksella (pH 8,0) 0,9 ml:ksi.

P13-4R/96 ja P13-4S/96 kantoja siirrostettiin TYB:iin ja säädettiin OD₅₂₀=0,45. Putkiin pipetoitiin 1,5 ml bakteereita ja proteaasi-K liuosta 15 µl jolloin proteaasi-K:n pitoisuudeksi saatiin 40 µg/ml. Putkia inkuboitiin 1 h 40 °C:ssa ja tämän jälkeen bakteerit pestiin TYB:llä 2 x 10 000 g, 10 min, 10 °C.

Näytteet valmistettiin ja analysoitiin kuten kohdassa 6.5.1.

7 Tulokset

Tuloksissa seurattiin näytteiden aiheuttamaa absorbanssia. Mitä suurempi absorbanssi, sitä suurempi hemolysoituminen oli tapahtunut. Jokaisessa kokeessa pidettiin kontrolliputkea (luonnollinen hemolyysi), jotta tuloksia laskiessa saatiin vähennettyä sen aiheuttama hemolyysi näytteistä.

7.1 Lämpötilan vaikutus hemolyyttiseen aktiivisuuteen

7.1.1 Hemolyyttinen aktiviteetti 5 °C: ssa

Mittaustuloksista (LIITE 2) laskettiin keskiarvot ja keskihajonnat (Taulukko 6.).

Taulukko 6. Mittaustulosten keskiarvot (A) ja keskihajonnat (s).

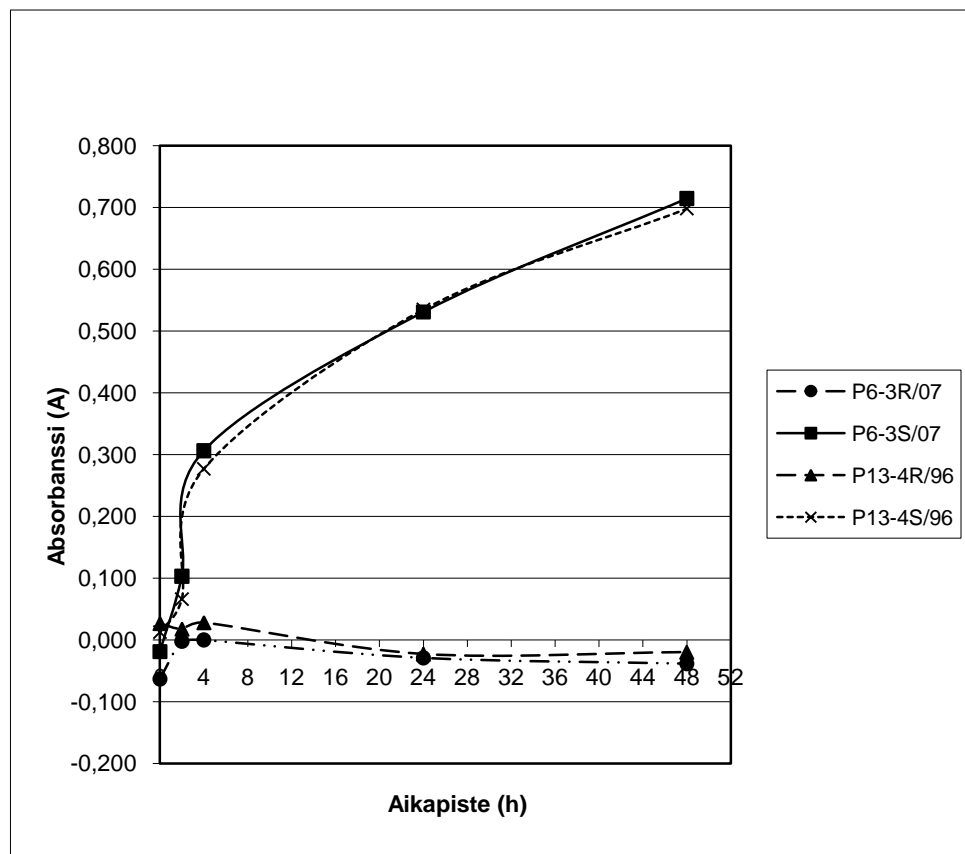
Kanta	0 h (A, ka)	0 h (s)	2 h (A, ka)	2 h (s)	4 h (A, ka)	4 h (s)	24 h (A, ka)	24 h (s)	48 h (A, ka)	48 h (s)
P6-3R/07	0,067	0,01	0,073	0,01	0,082	0,00	0,058	0,00	0,050	0,02
P6-3S/07	0,112	0,03	0,179	0,00	0,388	0,07	0,618	0,00	0,803	0,01
P13-4R/96	0,157	0,06	0,093	0,02	0,110	0,01	0,064	0,01	0,068	0,00
P13-4S/96	0,143	0,03	0,142	0,01	0,359	0,06	0,622	0,03	0,786	0,09
b, P6-3R/07	0,064	0,01	0,073	0,01	0,066	0,01	0,059	0,01	0,101	0,00
b, P6-3S/07	0,075	0,01	0,051	0,01	0,023	0,01	0,009	0,00	0,064	0,01
b, P13-4R/96	0,061	0,00	0,075	0,00	0,058	0,00	0,057	0,01	0,104	0,01
b, P13-4S/96	0,069	0,01	0,059	0,01	0,029	0,01	0,017	0,01	0,058	0,00
Kontrolli	0,131	0,02	0,076	0,02	0,082	0,01	0,087	0,01	0,088	0,01

Jotta saatiin todellinen *F. psychrophilum*-bakteerin aiheuttama hemolyysi, vähennettiin hemolyysiputkista kontrolliputken (luonnollinen hemolyysi) arvo (Taulukko 7.).

Taulukko 7. Bakteerien aiheuttama todellinen hemolyysi (5 °C)

Aikapiste (h)	Absorbanssi, A			
	P6-3R/07	P6-3S/07	P13-4R/96	P13-4S/96
0	-0,063	-0,019	0,027	0,013
2	-0,002	0,103	0,018	0,066
4	0,000	0,306	0,028	0,277
24	-0,029	0,531	-0,023	0,535
48	-0,038	0,715	-0,020	0,698

Taulukon 7 perusteella tehtiin kuvaaja, jotta tuloksia voitiin analysoida tarkemmin (Kuvio 2.).



Kuvio 2. Bakteerisolujen hemolyyttinen aktiivisuus (Absorbanssi)

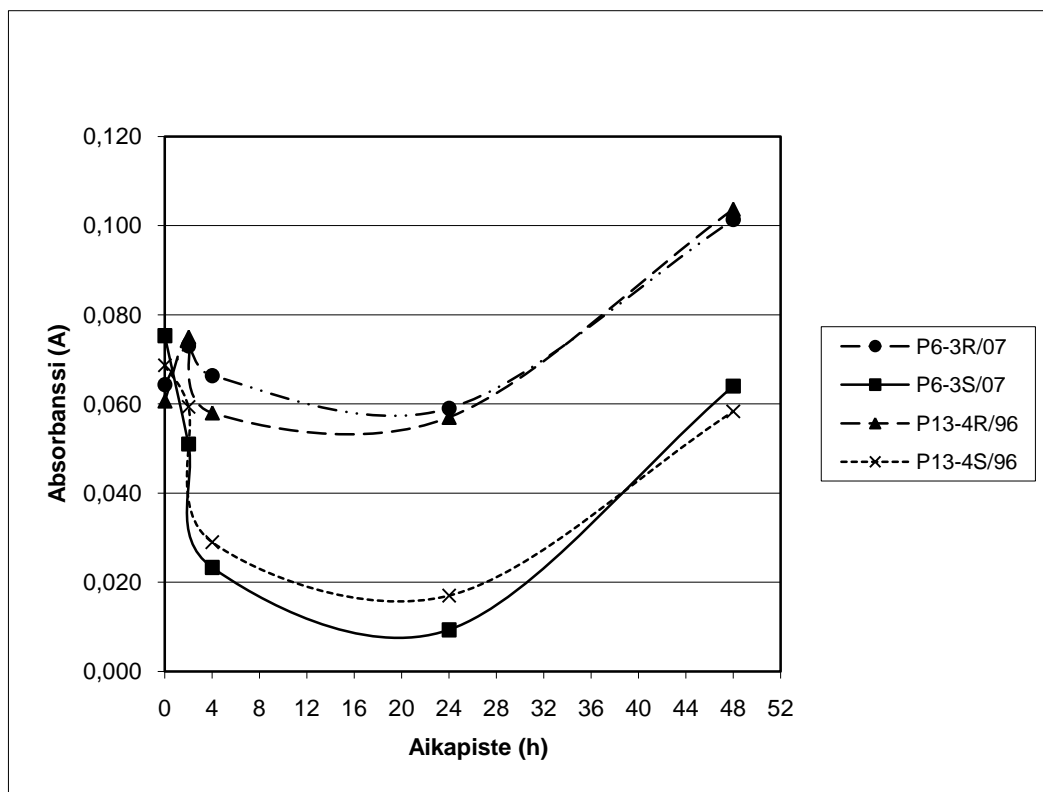
5 °C:ssa eri aikoina (2 – 48 h).

Kuviosta 2 voidaan huomata, että sileät kannat aiheuttavat todella paljon hemolyysiä, kun taas marmoroidut kannat eivät ollenkaan.

Bakteerikasvunseurannasta (5 °C) tehtiin oma kuvaaja (Kuvio 3.), laskemalla mittaustuloksista (LIITE 2) keskiarvot (Taulukko 8.).

Taulukko 8. Bakteerikasvunseuranta (5 °C).

Aikapiste (h)	Absorbanssi, A			
	P6-3R/07	P6-3S/07	P13-4R/96	P13-4S/96
0	0,064	0,075	0,061	0,069
2	0,073	0,051	0,075	0,059
4	0,066	0,023	0,058	0,029
24	0,059	0,009	0,057	0,017
48	0,101	0,064	0,104	0,058



Kuvio 3. Bakteerikasvunseuranta (5 °C)

Bakteerien kasvu 5 °C:ssa on aikapisteeseen 24 h asti väheneeseen päin, mutta tämän jälkeen ne lähtevät taas kasvuun. Tuloksista tekee mielenkiintoisen se,

että marmoroidut kannat lisääntyvät aktiivisemmin kuin sileät. Kuitenkin sileiden kantojen hemolysointiaktiivisuus on voimakkaampaa kuin marmoroiduilla.

7.1.2 *F. psychrophilum*-bakteerin aiheuttama hemolyysi 15 °C

Mittaustuloksista (LIITE 3) laskettiin keskiarvot ja keskihajonnat (Taulukko 9.).

Taulukko 9. Mittaustulosten keskiarvot (A, ka) ja keskihajonnat (s)

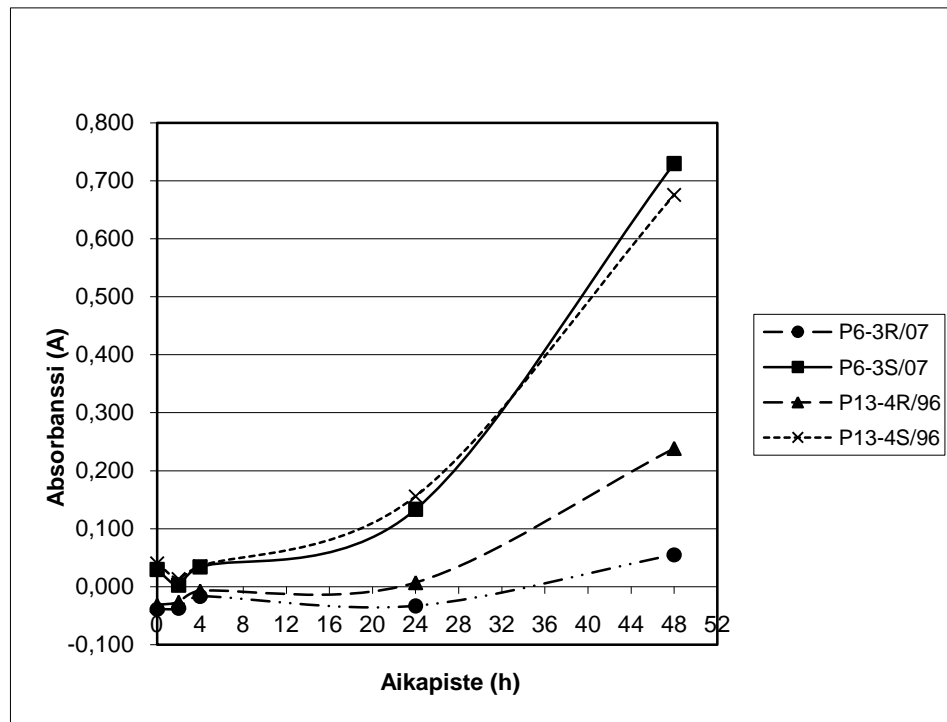
Kanta	0 h (A, ka)	0 h (s)	2 h (A, ka)	2 h (s)	4 h (A, ka)	4 h (s)	24 h (A, ka)	24 h (s)	48 h (A, ka)	48 h (s)
P6-3R/07	0,025	0,00	0,037	0,01	0,053	0,01	0,029	0,00	0,115	0,07
P6-3S/07	0,094	0,04	0,077	0,01	0,104	0,01	0,195	0,04	0,790	0,00
P13-4R/96	0,033	0,03	0,048	0,00	0,063	0,01	0,069	0,01	0,298	0,02
P13-4S/96	0,105	0,01	0,088	0,01	0,106	0,01	0,218	0,00	0,735	0,05
b, P6-3R/07	0,033	0,00	0,029	0,01	0,029	0,01	0,137	0,00	0,211	0,00
b, P6-3S/07	0,012	0,00	0,009	0,01	0,017	0,01	0,080	0,01	0,106	0,01
b, P13-4R/96	0,021	0,00	0,045	0,01	0,040	0,00	0,103	0,01	0,181	0,00
b, P13-4S/96	0,019	0,01	0,019	0,00	0,028	0,01	0,074	0,02	0,149	0,01
Kontrolli	0,064	0,01	0,074	0,01	0,070	0,01	0,062	0,01	0,060	0,01

Jotta saatiin todellinen *F. psychrophilum*-bakteerin aiheuttama hemolyysi, vähennettiin hemolysiputkista kontrolliputken (luonnollinen hemolyysi) arvo (Taulukko 10.).

Taulukko 10. Bakteerien aiheuttama todellinen hemolyysi (15 °C)

Aikapiste (h)	Absorbanssi			
	P6-3R/07	P6-3S/07	P13-4R/96	P13-4S/96
0	-0,039	0,030	-0,031	0,040
2	-0,037	0,003	-0,026	0,013
4	-0,017	0,034	-0,007	0,036
24	-0,033	0,134	0,007	0,156
48	0,055	0,730	0,239	0,676

Taulukon 10. perusteella tehtiin kuvaaja, jotta tuloksia voitiin analysoida tarkemmin (Kuvio 4.).



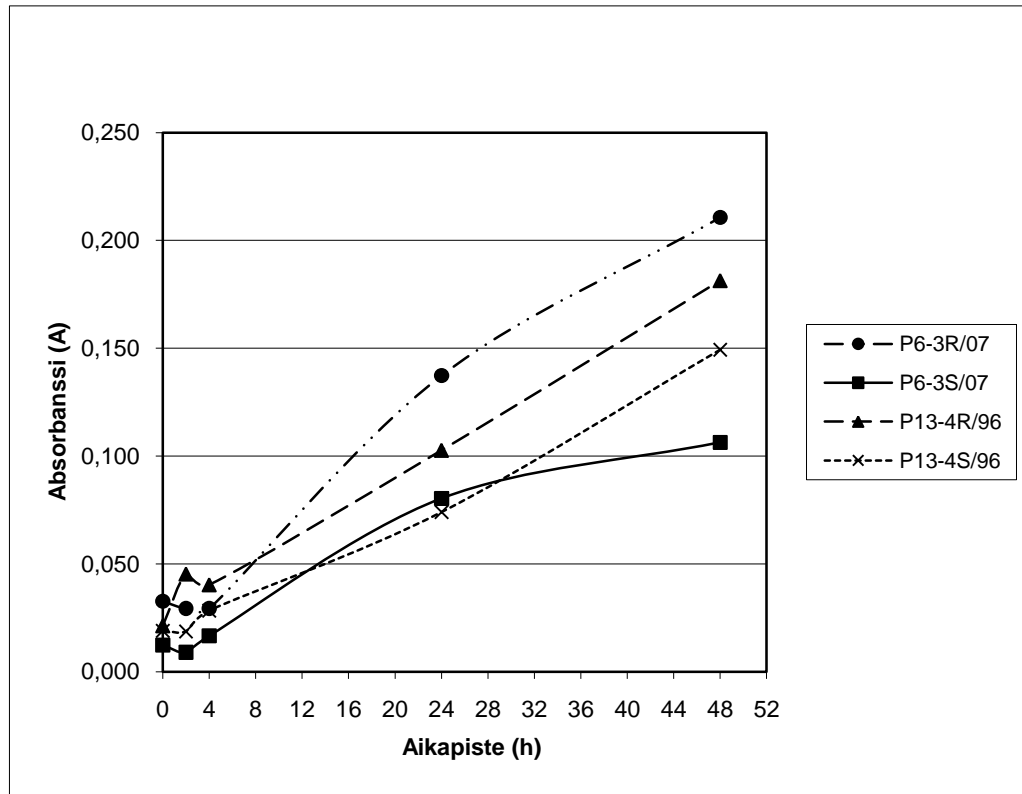
Kuvio 4. Bakterisolujen hemolyttinen aktiivisuus 15 °C:ssa.

Kuten 5 °C:ssa, sileät kannat hemolysoivat punasoluja huomattavasti enemmän kuin marmoroidut kannat. 15 °C:ssa hemolyysi tapahtuu kuitenkin maltillisemmin kuin 5 °C:ssa. Aikapisteessä 48 h sileiden kantojen absorbanssilukemat ovat suhteellisen samat, mikä lisää luotettavuutta tuloksille.

Bakteerikasvunseurannasta (15 °C) tehtiin oma kuvaaja (Kuvio 5.) laskemalla mittaustuloksista (LIITE 3) keskiarvot (Taulukko 11.).

Taulukko 11. Bakteerikasvunseuranta (15 °C)

Aikapiste (h)	Absorbanssi			
	P6-3R/07	P6-3S/07	P13-4R/96	P13-4S/96
0	0,033	0,012	0,021	0,019
2	0,029	0,009	0,045	0,019
4	0,029	0,017	0,040	0,028
24	0,137	0,080	0,103	0,074
48	0,211	0,106	0,181	0,149



Kuvio 5. Bakteerikasvunseuranta (15 °C).

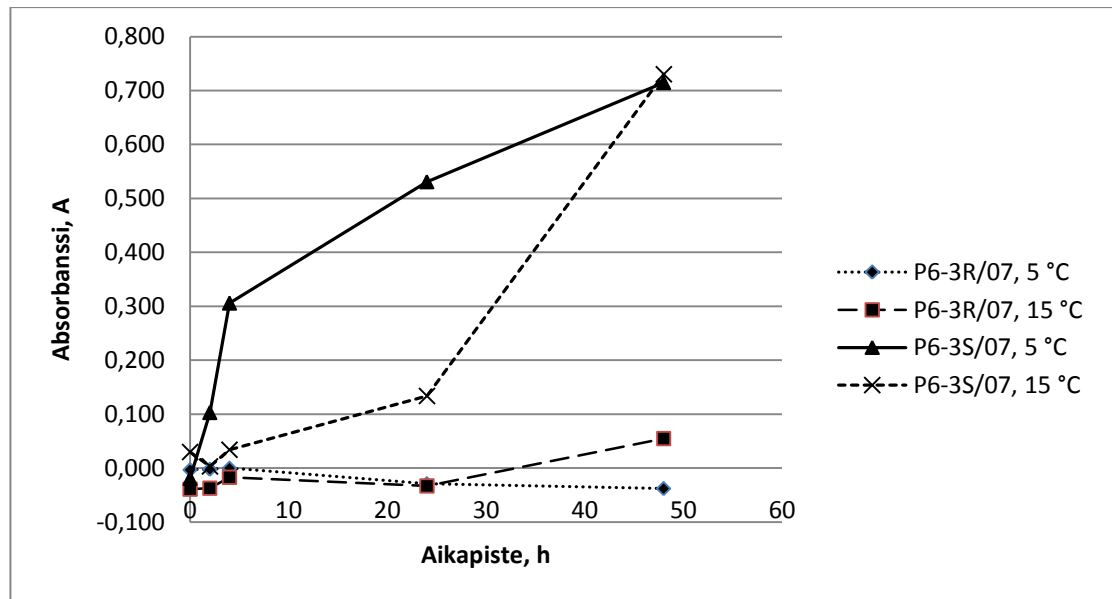
15 °C:ssa *F. psychrophilum*-bakteerikantojen kasvu on tasaisempaa kuin 5 °C:ssa. Marmoroitujen kantojen määrä on 15 °C:ssa lähes kaksinkertainen verrattuna 5 °C:een.

7.1.3 Lämpötilojen vertailu kuvaajan avulla

Jotta saataisiin kuva siitä, miten kannat käyttäytyvät eri lämpötiloissa otettiin tarkasteluun kannat P6-3R/07 ja P6-3S/07 lämpötiloissa 5 °C ja 15 °C. Mittaustulosten keskiarvoista (Taulukko 12.) tehtiin kuvaaja (Kuvio 6.).

Taulukko 12. Kantojen P6-3R/07 ja P6-3S/07 absorbanssit lämpötiloissa 5 °C ja 15 °C.

Aikapiste (h)	P6-3R/07, 5 °C	P6-3R/07, 15 °C	P6-3S/07, 5 °C	P6-3S/07, 15 °C
0	-0,003	-0,039	-0,019	0,030
2	-0,002	-0,037	0,103	0,003
4	0,000	-0,017	0,306	0,034
24	-0,029	-0,033	0,531	0,134
48	-0,038	0,055	0,715	0,730



Kuvio 6. Kantojen P6-3R/07 ja P6-3S/07 absorbanssit 5 ja 15 °C:ssa.

Kuviosta 6 nähdään, kuinka sileä kanta hemolysoi punasoluja huomattavasti enemmän kuin marmoroitu kanta. Marmoroitu P6-3R/07- kanta ei aiheuta hemolyysiä juuri lainkaan. Myöskään lämpötilalla ei ole vaikutusta hemolyyttiseen aktiivisuuteen näillä kannoilla.

7.2 ECP:n hemolyyttinen aktiviteetti

Mittaustuloksista voitiin nähdä (LIITE 4-6), että kontrolliputkien 1 (luonnollinen hemolyysi) absorbanssit ovat samaa luokkaa hemolyysinäytteiden kanssa. Kaikissa aikapisteissä tilanne oli sama eli voitiin tehdä johtopäätös, että *F. psychrophilum* ei eritä eksotoksiineja jotka aiheuttaisivat hemolyysiä.

7.3 Inaktivoitujen bakteerien hemolyyttinen aktiivisuus

Vaikka bakteerit olivat inaktivoituja, niin mittaustuloksista (LIITE 7) voidaan huomata samanlaista käyttäytymistä kuin esimerkiksi hemolyyttinen aktiviteetti 5 °C:ssa, jossa käytettiin eläviä bakteereita punasolujen hajotukseen. Tämä kuvastaa sitä, että joko inaktivointi on epäonnistunut tai *F. psychrophilum*-bakteerilla on jokin mekanismi millä se pystyy myös kuolleena hajottamaan

punasoluja. Sileät kannat ovat hemolysoineet punasoluja kun taas marmoroidut eivät. *F. psychrophilum*- bakteerin sileät kannat ovat kestävämpiä tai inkativointitekniikoiden pitoisuuksia tms. tulisi suurentaa. Jatkotutkimuksilla saataisiin selville tarvitsevatko bakteerin sileät kannat voimakkaamman käsittelyn, kun niitä halutaan inaktivoida.

Sonikointituloksista (LIITE 7) huomataan, että myös siinä sileillä kannoilla on huomattavasti suuremmat absorbanssilukemat kuin marmoroiduilla. Saattaa siis olla, että sileät kannat tuottavat endotoksiineja, jotka aiheuttavat hemolyysin.

Proteinaasi-K käsittelyllä punasolujen hemolyysi oli todella voimakasta. Toisaalta rinnakkaisten mittaustuloksissa oli heittoa, joten koe tulisi uusia.

7.4 Tulosten yhteenveto

Koska *F. psychrophilum*- bakteerin aiheuttamaa hemolyysiä ei ollut tutkittu aikaisemmin, olivat tulokset erittäin mielenkiintoisia. Näyttääkin siltä, että bakteerin sileät kannat aiheuttavat huomattavasti enemmän hemolyysiä kuin marmoroidut kannat.

Vaikka sileät kannat aiheuttivat hemolyysiä sekä 5 °C:ssa että 15 °C:ssa huomattavasti enemmän kuin marmoroidut kannat, oli marmoroitujen kantojen bakteerikasvu runsaampaa.

Yksiselitteisesti voitiin todeta, ettei *F. psychrophilum* eritä eksotoksiineja jotka hajoittaisivat punasoluja. Sonikointitulokset antavat osviittaa sille, että bakteerilla on endotoksiineja jotka aiheuttaa hemolyysin.

F. psychrophilum- bakteerin sileät kannat hemolysoivat punasoluja vaikka ne oltiin inaktivoitu lämmöllä ja formaliinilla. Joko sileät kannat kestävät paremmin ääriolosuhteita, tai inaktivointi lämpötila oli liian alhainen tai inkubointiaika liian lyhyt. Formaliinilla inaktivoitujen bakteerien hemolyysi voidaan ehkä selittää sillä, että bakteerien inkubointiaika on ollut liian lyhyt eivätkä kaikki bakteerit ole kuolleet. Toisaalta, marmoroidut kannat eivät olleet aiheuttaneet hemolyysiä lainkaan, joten tulokset tukevat sileän kannan kestävyyttä. On myös

mahdollista, että *F. psychrophilum*- bakteerilla on jokin mekanismi jolla se voi hajottaa punasoluja vaikka se oltaisiin inaktivoitu jollain yllä mainituista tekniikoista.

8 Pohdinta

F. psychrophilum- bakteerille ei ollut aikaisemmin tehty hemolyysitestejä, joten tulokset otettiin mielenkiinnolla vastaan. Yllätyksenä tuli bakteerin sileiden kantojen P6-3S/07 ja P13-4S/96 hemolyyttinen aktiviteetti.

Tutkimustyössä yksittäisen projektin tekniikoita (mm. lämpötiloja ja pitoisuuksia) voidaan joutua hiomaan useaan kertaan, ennen kuin tuloksista voidaan olla varmoja. Koska laboratorio-osuus oli niin lyhyt, ei voitu perehtyä projektin eri osiin syvemmin. Voidaankin sanoa, että tämän opinnäytetyön tulokset on hyvä raakadata, jonka pohjalta voidaan alkaa kehittämään *F. psychrophilum*-bakteerin aiheuttaman hemolyysin tutkimustekniikoita.

Tutkimustyö on erittäin kiinnostavaa, koska tilanteet muuttuvat kokoajan ja tutkimussuunnitelmaan voidaan joutua tekemään lennosta muutoksia. Valmiita työhöjeita ei ole, vaan tietoa etsitään kirjallisuudesta ja artikkeleista. Esimerkiksi jonkun toisen bakteerin tutkimuksissa käytetyt tekniikat ja materiaalit eivät välttämättä sovellu lainkaan siihen bakteerin jota itse tutkii. Työssä tulee olla erittäin luova ja teorianäytämys laaja.

LÄHTEET

Cipriano, R. C., Holt R. A. (2005), *Flavobacterium psychrophilum*, cause of Bacterial Cold-Water Disease and Rainbow Trout Fry Syndrome, Fish Disease Leaflet, No. 86.

Hesami S., Allen K. J., Metcalf D., Ostland V. E., MacInnes J. I., Lumsden J. S. (2008). Internet lähteisiin viittaaminen [online, viitattu 19.9.2010]. saatavilla www- muodossa: <http://web.ebscohost.com.ezproxy.turkuamk.fi/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=2&hid=109&sid=cbb0ec52-d210-47a7-9492-81673f41ce86%40sessionmgr110>.

Holt, R. A. (1987), *Cytophaga Psychrophila*, the Causative Agent of Bacterial Cold- Water Disease in Salmonid Fish. A thesis in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy. Oregon State University

Madetoja J., Nyman P., Wiklund T. (2000), *Flavobacterium psychrophilum*, invasion into and shedding by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Diseases of Aquatic Organisms, Vol. 43.

Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A. (2005), Microbiology, 6. painos, McGraw-Hill, New York, U.S.A.

Raasmaja, A., Männistö, P.T. (2007). internet lähteisiin viittaaminen [online. viitattu 24.10.2010]. saatavilla www- muodossa: <http://www.medicina.fi/fato/59.pdf>.

Savolainen R. (2010), Internet lähteisiin viittaaminen [online, viitattu 19.9.2010]. saatavilla www- muodossa: <http://www.rktl.fi/julkaisut/j/508.html>.

Sigma-Aldrich (2010). Internet lähteisiin viittaaminen [online, viitattu 22.4.2010]. saatavilla www- muodossa: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/proteinase-k.html>.

Thermo Fisher Scientific (2011). Internet lähteisiin viittaaminen [online, viitattu 19.2.2011]. saatavilla www-muodossa: <http://www.piercenet.com/products/browse.cfm?fldID=02020101>.

Åbo Akademi (2006). Internet lähteisiin viittaaminen [online, viitattu 16.4.2010]. Saatavilla www- muodossa: <http://web.abo.fi/institut/fisk/Fin/Bakterier/fpsy.htm>.

Proteiinistandardien mittaustulokset:

Pitoisuus ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbanssi
2000	2,519
2000	2,714
2000	2,634
1500	1,999
1500	2,153
1500	2,147
1000	1,483
1000	1,572
1000	1,564
750	1,174
750	1,284
750	1,281
500	0,878
500	0,918
500	0,912
250	0,517
250	0,545
250	0,55
125	0,315
125	0,323
125	0,329
25	0,132
25	0,132
25	0,137
0	0,093
0	0,092
0	0,092

Bakteerien hemolyyttinen aktiivisuus 5 °C, mittaustulokset:

Kanta	Absorbanssi, A				
	0 h	2 h	4 h	24 h	48 h
P6-3R/07	0,069	0,075	0,087	0,06	0,059
P6-3R/07	0,059	0,082	0,078	0,053	0,03
P6-3R/07	0,074	0,063	0,08	0,061	0,06
P6-3S/07	0,112	0,179	0,31	0,615	0,809
P6-3S/07	0,082	0,183	0,429	0,62	0,805
P6-3S/07	0,141	0,174	0,425	0,619	0,794
P13-4R/96	0,19	0,107	0,106	0,07	0,068
P13-4R/96	0,093	0,097	0,126	0,056	0,072
P13-4R/96	0,189	0,076	0,097	0,067	0,065
P13-4S/96	0,163	0,132	0,299	0,59	0,68
P13-4S/96	0,115	0,139	0,424	0,631	0,837
P13-4S/96	0,152	0,154	0,353	0,645	0,842
b, P6-3R/07	0,072	0,077	0,052	0,056	0,097
b, P6-3R/07	0,055	0,067	0,073	0,071	0,104
b, P6-3R/07	0,066	0,075	0,074	0,05	0,103
b, P6-3S/07	0,076	0,062	0,03	0,005	0,049
b, P6-3S/07	0,081	0,053	0,025	0,013	0,078
b, P6-3S/07	0,069	0,038	0,015	0,01	0,065
b, P13-4R/96	0,063	0,072	0,055	0,066	0,098
b, P13-4R/96	0,06	0,08	0,061	0,045	0,11
b, P13-4R/96	0,059	0,073	0,058	0,06	0,103
b, P13-4S/96	0,076	0,048	0,04	0,012	0,061
b, P13-4S/96	0,065	0,07	0,026	0,013	0,056
b, P13-4S/96	0,065	0,06	0,021	0,026	0,058
Kontrolli	0,111	0,1	0,086	0,081	0,09
Kontrolli	0,14	0,072	0,074	0,093	0,096
Kontrolli	0,141	0,055	0,085	0,087	0,078

F. psychrophilum-bakteerin hemolyyttinen aktiviteetti 15 °C:ssa (A), mittaustulokset.

Kanta	Asorbanssi				
	0 h	2 h	4 h	24 h	48 h
P6-3R/07	0,028	0,029	0,041	0,028	0,195
P6-3R/07	0,023	0,051	0,062	0,029	0,074
P6-3R/07	0,025	0,032	0,057	0,029	0,075
P6-3S/07	0,055	0,075	0,093	0,166	0,786
P6-3S/07	0,135	0,085	0,102	0,180	-
P6-3S/07	0,092	0,071	0,118	0,240	0,793
P13-4R/96	0,021	0,046	0,062	0,060	0,302
P13-4R/96	0,015	0,053	0,057	0,073	0,313
P13-4R/96	0,063	0,045	0,070	0,074	0,280
P13-4S/96	0,102	0,093	0,115	0,218	0,777
P13-4S/96	0,112	0,075	0,092	0,221	0,684
P13-4S/96	0,100	0,095	0,110	0,214	0,745
b, P6-3R/07	0,029	0,035	0,038	0,133	0,216
b, P6-3R/07	0,034	0,021	0,030	0,140	0,207
b, P6-3R/07	0,035	0,032	0,020	0,139	0,209
b, P6-3S/07	0,014	0,015	0,010	0,089	0,110
b, P6-3S/07	0,012	0,007	0,022	0,080	0,099
b, P6-3S/07	0,011	0,005	0,018	0,072	0,110
b, P13-4R/96	0,018	0,041	0,042	0,103	0,185
b, P13-4R/96	0,024	0,038	0,042	0,097	0,181
b, P13-4R/96	0,022	0,057	0,037	0,108	0,178
b, P13-4S/96	0,012	0,022	0,032	0,086	0,159
b, P13-4S/96	0,025	0,013	0,033	0,081	0,146
b, P13-4S/96	0,020	0,021	0,020	0,055	0,143
Kontrolli	0,059	0,070	0,064	0,066	0,065
Kontrolli	0,069	0,070	0,086	0,049	0,055
Kontrolli	0,065	0,083	0,060	0,070	0,059

Ecp:n aiheuttama hemolyysi (1 h, 560 nm), mittaustulokset (A)

	P6-3S/07, A	P6-3R/07, A	P13-4S/96, A	P13-4R/96, A
1:1	0,057	0,059	0,056	0,067
	0,058	0,062	0,060	0,063
	0,058	0,060	0,058	0,062
1:2	0,053	0,056	0,050	0,058
	0,053	0,057	0,050	0,057
	0,054	0,055	0,053	0,054
1:4	0,051	0,053	0,052	0,054
	0,052	0,052	0,052	0,054
	0,053	0,052	0,053	0,051
1:8	0,051	0,053	0,049	0,051
	0,052	0,050	0,051	0,051
	0,051	0,050	0,052	0,052
1:16	0,050	0,051	0,050	0,049
	0,049	0,050	0,050	0,051
	0,050	0,049	0,052	0,049
1:32	0,051	0,052	0,064	0,052
	0,052	0,051	0,060	0,050
	0,051	0,049	0,057	0,049
1:64	0,050	0,051	0,049	0,050
	0,051	0,052	0,048	0,048
	0,050	0,051	0,051	0,050

Kontrolli 1 (Luonnillinen hemolyysi)	Kontrolli 2 (koko hemolyysi)
0,053	0,311
0,053	0,302
0,052	0,333

ECP:n aiheuttama hemolyysi (4 h, 560nm), mittaustulokset (A)

	P6-3S/07, A	P6-3R/07, A	P13-4S/96, A	P13-4R/96, A
1:1	0,057	0,061	0,054	0,062
	0,057	0,060	0,054	0,059
	0,059	0,060	0,055	0,620
1:2	0,052	0,053	0,051	0,054
	0,052	0,052	0,050	0,054
	0,052	0,530	0,050	0,055
1:4	0,049	0,048	0,048	0,052
	0,048	0,049	0,049	0,053
	0,050	0,049	0,050	0,052
1:8	0,049	0,049	0,050	0,051
	0,048	0,048	0,047	0,048
	0,048	0,049	0,050	0,050
1:16	0,048	0,048	0,048	0,048
	0,049	0,047	0,049	0,050
	0,049	0,047	0,052	0,050
1:32	0,053	0,052	0,053	0,050
	0,050	0,049	0,050	0,052
	0,053	0,050	0,051	0,050
1:64	0,050	0,051	0,050	0,049
	0,049	0,050	0,050	0,050
	0,050	0,050	0,049	0,049

Kontrolli 1 (Luonnillinen hemolyysi)	Kontrolli 2 (koko hemolyysi)
0,050	0,341
0,050	0,306
0,051	0,338

ECP:n aiheuttama hemolyysi (24 h, 560nm), mittaustulokset (A)

	P6-3S/07, A	P6-3R/07, A	P13-4S/96, A	P13-4R/96, A
1:1	0,074	0,069	0,059	0,062
	0,059	0,062	0,059	0,061
	0,069	0,066	0,060	0,059
1:2	0,053	0,054	0,049	0,055
	0,054	0,056	0,051	0,053
	0,053	0,055	0,051	0,054
1:4	0,051	0,054	0,052	0,053
	0,050	0,051	0,049	0,052
	0,052	0,051	0,050	0,051
1:8	0,049	0,050	0,049	0,051
	0,050	0,050	0,049	0,050
	0,050	0,051	0,050	0,050
1:16	0,050	0,050	0,051	0,052
	0,051	0,049	0,052	0,052
	0,051	0,050	0,050	0,051
1:32	0,051	0,051	0,050	0,050
	0,051	0,049	0,049	0,051
	0,051	0,049	0,052	0,051
1:64	0,052	0,052	0,048	0,049
	0,050	0,052	0,051	0,050
	0,051	0,052	0,050	0,052

Kontrolli 1 (Luonnillinen hemolyysi)	Kontrolli 2 (koko hemolyysi)
0,053	0,326
0,052	0,349
0,054	0,407

Inaktivoitujen *F. psychrophilum*-bakteerien hemolyyttinen aktiviteetti, mittaustulokset (A).

Lämmöllä ja formaliinilla käsitellyt bakteerit

Näyte	24 h	48 h
4S L	0,112	0,481
4S L	0,126	0,599
4S L	0,185	0,572
4R L	0,056	0,032
4R L	0,058	0,048
4R L	0,039	0,038
4S F	0,089	0,694
4S F	0,072	0,734
4S F	0,087	0,761
4R F	0,031	0,021
4R F	0,026	0,022
4R F	0,031	0,038
4S B	0,530	0,700
4S B	0,506	0,679
4S B	0,508	0,667
4R B	0,057	0,359
4R B	0,054	0,342
4R B	0,056	0,373
4S K	0,053	0,050
4S K	0,042	0,051
4S K	0,048	0,042
4R K	0,044	0,046
4R K	0,048	0,077
4R K	0,047	0,051

Proteaasi-K

Näyte	24 h	48 h
4S P-K	0,389	0,473
4S P-K	0,342	0,498
4S P-K	0,336	0,420
4R P-K	0,78	0,197
4R P-K	0,61	0,179
4R P-K	0,09	0,157
K	0,054	0,069
K	0,069	0,037
K	0,072	0,054

Sonikoidut bakteerit

Näyte	24 h	48 h
3R S	0,060	0,048
3R S	0,070	0,080
3R S	0,062	0,086
3S S	0,072	0,292
3S S	0,07	0,291
3S S	0,0126	0,246
4R S	0,032	0,067
4R S	0,032	0,054
4R S	0,028	0,055
4S S	0,059	0,185
4S S	0,065	0,172
4S S	0,098	0,248
3R B	0,029	0,057
3R B	0,042	0,060
3R B	0,053	0,052
3S B	0,584	0,744
3S B	0,591	0,758
3S B	0,588	0,721
4R B	0,041	0,167
4R B	0,030	0,190
4R B	0,040	0,173
4S B	0,486	0,619
4S B	0,502	0,625
4S B	0,471	0,614
K	0,042	0,069
K	0,05	0,037
K	0,031	0,054

L=lämpö
F=formaliini
B=elävät bakteerit
K=kontrolli
S=sonikoidut
P-K=Proteaasi-K