

Opinnäytetyö (AMK)

Prosessi- ja materiaalitekniikan koulutusohjelma

PPROMS15

2019

Pinja Helenius

SUOLISTOBAKTEERIKANTOJEN BIOKEMIAALLINEN KARAKTERISOINTI

OPINNÄYTETYÖ AMK | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Prosessi- ja materiaalitekniikan koulutusohjelma

Ohjaaja: Pärssinen Raimo

7.6.2019 | 32 sivua, 3 liitesivua (Liite 1 yrityksen sisäiseen käyttöön)

Pinja Helenius

SUOLISTOBAKTEERIKANTOJEN BIOKEMIAALLINEN KARAKTERISOINTI

Opinnäytetyön tarkoituksena oli karakterisoida suolistobakteerikantoja biokemiallisin menetelmin. Biokemiallisten reaktioiden selvittämisen myötä helpotettaisiin selektiivisten kasvualustojen valmistamista mahdollisissa jatkotutkimuksissa. Tutkimustyöllä oli tarkoitus selvittää kromogeenisten maljojen soveltuvuus anaerobisten suolistobakteerien kasvatukseen ja visuaaliseen tunnistukseen. Lisäksi haluttiin selvittää kasvaako anaerobiset suolistobakteerit Eosin Methylene Blue (EMB) elatusalustalla. Bakteerikannoista testattiin myös hapensietokyky niiden kasvuvaiheessa sekä mikroaerofiilisten olosuhteiden vaikutus kasvuun.

Biokemiallinen karakterisointi suoritettiin API 20 A ja Rapid ID 32 A –menetelmillä. Aineenvaihduntatesteillä selvitettiin bakteerien entsyymaattisia reaktioita ja kykyä hyödyntää spesifisiä ravinteita. Analytical Profile Index (API) ja Rapid -menetelmien tulokset vahvistettiin kromogeenisillä maljoilla. Kromogeenisillä maljoilla erotettiin bakteerien aineenvaihduntareaktioita perustuen Mannitolin fermentoitumiseen sekä β -galaktosidaasi- ja β -glukosidaasientsyymireaktioihin. Opinnäytetyön aikana kehitettiin uusi työvaihe, joka saattaa mahdollistaa kromogeenisten maljojen käyttöönoton anaerobisia bakteereja kasvattaessa. Työvaihe implementoitiin ohjeisiin noin puolessa välissä tutkimustyötä.

Aineenvaihduntatestien tulosten ja kromogeenisten maljojen viljelyiden perusteella saatiin viitteitä tuloksien yhtäläisyyksistä, ja näin ollen nopeaan diagnostiikkaan tarkoitetut menetelmät voivat toimia myös hitaasti kasvavilla anaerobisilla bakteereilla. Tuloksissa on kuitenkin havaittavissa myös eroavaisuuksia. Eri menetelmien tulosten lukeminen perustuu laajalti visuaaliseen tarkasteluun ja tulkintaan, josta osa tuloksien ristiriitaisuudesta voi johtua. Erojen ei voida kuitenkaan varmuudella sanoa johtuvan tästä. Ottaen huomioon testauksista saadut tulokset ja havaitut eroavaisuudet tulosten välillä, aihe vaatii jatkotutkimuksia.

ASIASANAT:

Anaerobinen, biokemiallinen, karakterisointi

BACHELOR'S / MASTER'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Chemical Engineering

7.6.2019 | 32 pages, 3 appendix pages (Appendix 1 is not public)

Pinja Helenius

BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF INTESTINAL BACTERIA

The intention of the thesis was to characterize intestinal bacteria strains with biochemical methods. By discovering the biochemical reactions, it was attempted to get more information about the bacteria, which would be of great help with producing selective culture mediums in the future. By means of characterizing the goal was to discover whether the chromogenic plates was suitable for anaerobic growing of intestinal bacteria and their visual identification. In addition, it was desired to determine whether anaerobic intestinal bacteria grow on Eosin Methylene Blue (EMB) medium or not. Bacterial strains were also tested for sensitivity towards oxygen during the growth period, and the effect of microaerophilic conditions on bacterial growth.

The biochemical characterizing was performed with API 20 A and Rapid ID 32 A –methods. Metabolic testing was used to find out more about the bacteria's enzymatic reactions and their ability to utilize specific nutrients. The results of API and Rapid methods were confirmed on chromogenic plates. Chromogenic plates were used to separate bacterial metabolic reactions based on Mannitol fermentation and galactosidase and glucosidase enzyme reactions. In the middle of the thesis, a new working phase was developed to possibly enable chromogenic plates to be used to grow anaerobic bacteria strains. The working phase was implemented into the instructions halfway through the research.

Looking at the results of the metabolic testing and chromogenic plates, there were indications that the results were similar, therefore the methods made for fast diagnostics might be functioning on slowly growing anaerobic bacteria as well. Although, the results also have many differences. The reading of the results from different methods is largely based on visual examination and interpretation, which may lead to inconsistency in results. However, it cannot be said for certain that this is the cause of the differences in the results. Considering the results from all the tests, and the inconsistency between the results, the subject requires further examination.

KEYWORDS:

Anaerobic, biochemical, characterization

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET	5
1 JOHDANTO	6
2 BAKTEERIT	8
2.1 Rakenne	8
2.2 Luokitus ja kasvuolosuhteet	9
2.3 Aineenvaihdunta	9
3 BAKTEERIEN KASVATUS LABORATORIO-OLOISSA	11
3.1 Elatusaineet	11
3.2 Näytteiden siirrostus ja kasvatus	12
4 MENETELMÄT	14
4.1 Aineenvaihduntareaktiokokeet	14
4.1.1 API 20 A	14
4.1.2 Rapid ID 32 A	14
4.2 Kromogeeniset elatusaineet	15
4.3 Eosin Methylene Blue (EMB)	16
4.4 Hapensieto ja mikroaerofiilisyyt	16
5 TYÖN SUORITUS	17
5.1 Bakteerikannat	17
5.2 Bakteerien kasvatus	17
5.3 Testaus	17
5.3.1 Hapensieto ja mikroaerofiilisyyt	17
5.3.2 Kasvatus EMB, UCM, BC ja BCP kasvualustoilla	18
5.3.3 API 20 A ja Rapid ID 32 A -testit	18
6 TULOKSET JA ARVIOINTI	21
6.1 Aineenvaihduntatestit ja kromogeeniset maljat	21
6.2 Hapensieto ja mikroaerofiilisyyt	26
6.3 Tuloksien arviointi	28
7 POHDINTA	31
LÄHTEET	33

KÄYTETYT LYHENTEET

API	Analytical Profile Index
BC	Bacillus ChromoSelect Agar
BCP	Bacillus ChromoSelect Agar supplemented with polymyxin B.
EMB	Eosin Methylene Blue agar
FAA	Fastidious Anaerobe Agar
FYLOGENETIIKKA	Määritelmä, mikrobien väliseen evolutiiviseen sukulaisuuteen perustuva (Tieteen termipankki 2.5.2019)
GENOMIIKKA	Yhden perimän organismin tutkiminen (Researchgate 2.5.2019)
KRYOGEENINEN	Erittäin alhaisissa lämpötiloissa tapahtuva säilytys (Aga.fi 6.5.2019)
METAGENOMIIKKA	Kokonaisen yhteisön geenien, esimerkiksi suoliston organismien tutkimista (Duodecim lehti 2.5.2019)
UCM	Universal differential ChromoSelect Medium

1 JOHDANTO

Viimeaikaiset suolistobakteerien tutkimukset perustuvat paljolti moderneihin sekvensointipohjaisiin menetelmiin, genomiikkaan ja metagenomiikan kehitykseen. Ryhmissä, jotka jäävät viljeltyjen kantojen joukossa aliedustetuiksi, esimerkiksi kapeiden kasvualueiden tai vaativien kasvuolosuhteiden myötä, on metagenomiikka usein ainoa keino todistaa niiden olemassaolo ja merkitys. Menetelmän avulla voidaan tunnistaa samanaikaisesti isompia määriä mikro-organismeja. Vaikka menetelmät ovat tehokkaita ja ennen kaikkea nopeita työkaluja, on niillä heikkoutensa. Merkittävä puute metagenomiikassa on se, että uusien sekvenssien tahdikkaan löytymisen myötä tietokannoista ei välttämättä löydy tuloksille vastaavuutta, ainakaan vielä. (Alan W. Walker, Sylvia H. Duncan, Petra Louis & Harry J. Flint 2014; Jean-Christophe Lager et al. 2014.)

Vanhaa perinteistä viljelyä sekä nykyaikaisia sekvensointipohjaisia menetelmiä ei tulisi asettaa vastakkain ja niin ikää vertailla, vaan niitä tulisi osata käyttää toisiaan täydentäen. Viljelyä ja fylogenetikkaa tarvitaan muun muassa ihmisen mikrobikantojen tutkimus- ja kehitystyössä. Näin ollen niiden tärkeyttä ei tulisi aliarvioida ja unohtaa. Artikkelin (Alan W. et al. 2014) mukaan metagenomisen seulonnan aikana tunnistetut oletetut tulokset voidaan kokeellisesti validoida viljelyillä kannoilla. Päinvastoin genomisia tietoja voidaan käyttää uusien kasvatusalustojen kehittämisessä, jotka tukevat viljelemättömien kantojen kasvua. Perinteisen viljelyn avulla voidaan saada tarkempia ja laajempia tuloksia tietyistä mikrobilajeista.

Opinnäytetyö tehtiin Orion Oyj:lle heidän laboratoriotiloissaan. Tutkimustyön tarkoituksena oli karakterisoida suoliston bakteerikantoja biokemiallisin menetelmin. Biokemiallinen karakterisointi suoritettiin manuaalisesti käyttäen API 20 A ja Rapid ID 32 A -menetelmiä. Karakterisoinnin tarkoituksena oli selvittää kromogeenisten maljojen soveltuvuus anaerobisten hitaasti kasvavien bakteerien tunnistuksessa ja löytää mahdollisesti keinoja vaikeasti

kasvatettavien bakteerien kasvatuksessa sekä anaerobisten suolistobakteerien tunnistamisessa visuaalisesti. Jotkin bakteerit ovat erittäin vaikeasti kasvatettavia, jopa mahdottomia, syitä tähän on monia. Kuten Eric J. Stewart (2012) selventää bakteriologian artikkelissaan, viljelemätön bakteeri ei tarkoita, että sitä ei voitaisi viljellä, vaan ettei meillä ole vielä tarvittavaa kriittistä tietoa niiden biologiasta ja tämä luo haasteita niiden viljelyssä.

Tutkimustyössä aineenvaihduntatesteillä selvitettiin ravintoaineet, joita kyseinen bakteerikanta käyttää energianlähteenä. Bakteereja kasvatettiin anaerobisesti erilaisilla kromogeenisilla kasvualustoilla, jotka ilmentävät valittuja entsyymejä ja sokereita. Kromogeenisilla kasvualustoilla voidaan sokereista varmistaa mannitolin fermentoituminen ja entsyymeistä β -glukosidaasin sekä β -galaktosidaasin muodostuminen.

Tuloksia vertaillen tarkoituksena oli löytää yhtäläisyys API 20 A ja RAPID ID 32 A -menetelmien sekä kromogeenisten maljojen välillä. Anaerobisten bakteerikantojen ollessa kyseessä, haluttiin myös selvittää niiden hapenherkkyys sekä miten mikroaerofiiliset olosuhteet vaikuttavat niiden kasvuun. Lisäksi haluttiin selvittää Eosin Methyle Blue (EMB) elatusalustan soveltuvuus anaerobisten suolistobakteerien kasvatukseen ja tunnistamiseen. Tehdyn opinnäytetyön myötä voitaisiin toivotusti parantaa bakteerien kasvattamista ja tunnistamista visuaalisesti mikrobiologisessa laboratoriossa. Lisäksi mahdollisesti voitaisiin helpottaa selektiivisen kasvualustan valmistamista jatkossa. Työssä käytettiin näytteinä jo entuudestaan identifioituja bakteerikantoja.

2 BAKTEERIT

2.1 Rakenne

Bakteerit ovat prokaryoottisia mikro-organismeja. Toisin sanoen ne ovat yksisoluisia mikroskooppisen pieniä eliöitä, joissa ei ole selvärajaista tumaa, kuten eukaryooteilla, vaan sen sijaan perintöaines sijaitsee kierteisenä rihmana solulimassa. Bakteerit lisääntyvät jakautumalla ihanteellisissa kasvuolosuhteissa. (Sivelä & Saarinen 1992, 19, 13.) Mirja Salkinoja-Salonen ja Jaakko Puhakka korostavat kirjoittamassaan kappaleessa *Bakteerit ja arkit* teoksessa *Mikrobiologian perusteita (2002)* bakteerien muodoilla olevan ekologiset perusteet, liittyen bakteerien selviytymiseen erilaisissa kasvuolosuhteissa. Esimerkiksi kun vertaillaan pyöreitä kokkeja ja sauvamaisia basilleja, selviää kokki paremmin kuivissa olosuhteissa pyöreän muotonsa ansiosta. Kun taas sauvamaisella basillilla on enemmän pintaa yksikkötilavuutta kohden ja täten se pystyy ottamaan nopeammin ravinteita laimeammaltakin kasvualustalta.

Bakteeri käyttää liikkumiseen usein flagellaa eli uintisiimaa. Flagellat ovat ohuita ja pitkiä rihmoja, ja niitä voi olla yksi tai useita. Bakteerin pinnalla voi flagellojen lisäksi havaita pienempiä rihmoja, joita kutsutaan fimbrioiksi sekä piluksiksi. Niiden avulla bakteeri kiinnittyy pintoihin, kuten limakalvoihin. Bakteerien liikkeessä on havaittu hakuisuutta, esimerkiksi valoa tai hapekkaampaa ja runsasravintoisempaa elatusainetta kohden. Hakuisuutta eli liikkumista herkästi jotakin tavoitetta kohti kutsutaan nimellä taxis. Kemotaksiassa ärsykkeenä toimii kemikaali. Valon vaikutusta kutsutaan fototaksiaksi. (Sivelä & Saarinen 1992, 16 - 17; Jaakko Puhakka & Mirja Salkinoja-Salonen 2002, 125.)

2.2 Luokitus ja kasvuolosuhteet

Bakteerien luokitus perustuu ulkomuodon lisäksi muun muassa niiden ominaisuuksiin, kuten gram-värjäytyvyyteen, elintapoihin ja biokemiallisiin ominaisuuksiin.

Gram-värjäyksessä soluseinän kemiallinen rakenne vaikuttaa bakteerin värjäytymiseen joko siniseksi tai punaiseksi. Gram-värjäys jakaa bakteerit violetteihin gram-positiivisiin ja punaisiin gram-negatiivisiin bakteereihin. (Jaakko Puhakka & Mirja Salkinoja-Salonen 2002, 99.) Carita Sivelä ja Tarja Saarinen (1992) jaottelevat bakteerit pallomaisiin kokkeihin, sauvamaisiin basilleihin, käyristyneisiin sauvamaisiin vibrioihin ja kierteisiin sprilleihin.

Yksi merkittävä bakteerien jaottelutapa on hapen tarve. Obligaatit ovat ehdottomia hapelle. Anaerobisille obligaateille happi on kasvulle vahingollista ja aerobisille välttämätöntä. Fakultatiiviset aerobit kasvavat hapen läsnä ollessa, mutta myös ilman happea. Hapen puuttuessa ne ottavat käymisestä energiaa. Happea jonkin verran sietävä anaerobi on puolestaan mikroaerofiili. Aerotolerantti anaerobi ei hengitä eli ei käytä happea energiantuottoon. Hapelle tolerantille anaerobille happi ei ole kuitenkaan myrkky. (Mirja Salkinoja-Salonen 2002, 196-198.)

2.3 Aineenvaihdunta

Bakteerien rakenne on hyvin yksinkertainen, mutta niiden aineenvaihdunta saattaa olla kehittynyt. Bakteerit tarvitsevat elääkseen ja lisääntyäkseen energiaa. Metaboliassa eli aineenvaihdunnalla tarkoitetaan solun biokemiallisia reaktioita ravinteista energiaksi sekä muodostuneen energian käyttämistä solumateriaalin synteesiin eli biosynteesiin. Metabolia jaetaan anaboliaksi ja kataboliaksi. Yksinkertaistettuna anaboliaksi kutsutaan rakentavaa aineenvaihduntaa, jolloin tuotetaan uusia yhdisteitä. Kataboliaksi puolestaan aineenvaihduntaa, joka tuottaa energiaa ja täten hajottaa yhdisteitä. Bakteerit jaetaan aineenvaihduntatyyppeihin sen mukaan, mitä energianlähteitä ne

käyttävät. Omavaraisia organismeja kutsutaan autotrofeiksi. Autotrofit käyttävät hiilenlähteenä hiilidioksidia ja energianlähteenä auringonvaloa tai epäorgaanista yhdistettä. Heterotrofeiksi kutsutaan organismeja, jotka ovat toisen varaisia eli eivät pysty itse tuottamaan tarvitsemaansa energiaa. Pääasialliset energiantuottotyypit ovat fermentaatio, fotosynteesi ja aerobinen ja anaerobinen respiraatio eli soluhengitys. (Sivelä & Saarinen 1992, 26 - 27.)

3 BAKTEERIEN KASVATUS LABORATORIO-OLOISSA

3.1 Elatusaineet

Kasvatusmenetelmän valinta riippuu kasvatettavasta mikrobista sekä sen käyttötarkoituksesta. Jotta mikrobit saadaan kasvamaan laboratoriossa, tarvitaan elatusaineita eli kasvualustoja. Kasvatustapa riippuu alustan koostumuksesta. Alustan ollessa nestemäinen liemi, puhutaan liemiviljelystä. Maljaviljely tehdään puolijähmeille ja jähmeille agaralustoille, joissa valtamerialueista eristetty polysakkaridiseos, agar, jähmettää vesiliuoksen 1–2 %:n pitoisena. (Mirja Salkinoja-Salonen 2002, 56-57.)

Kasvatusalustojen pääkomponenteiksi Sivelä ja Saarinen (1992, 54 - 56) nimeävät ravinteiden ja suolojen lisäksi agarin ja veden sekä tarvittaessa selektiiviset eli valikoivat reagenssit. Kuten Sivelä ja Saarinen niin myös Microbeonline (2019) jakavat kasvualustat esimerkiksi koostumuksen perusteella kompleksisiin ja selektiivisiin. Kompleksinen kasvualusta sisältää luonnontuotetta. Hiivauute on hyvin usein käytettävä luonnontuote kompleksisissa alustoissa. Kompleksisen kasvualustan kemiallista koostumusta ei tunneta tarkoin. Selektiivinen eli valikoiva kasvualusta pyrkii saamaan tietyn organismin tai organismiryhmän kasvamaan. Alustaan lisättäville reagensseille joko edistetään toivottujen mikrobien kasvua ja/tai estetään niitä kasvamasta. Sivelä ja Saarinen (1992, 55) käyttää selektiivisen kasvualustan yhtenä käyttöesimerkkinä rikastusviljelyä, jota käytetään, kun näytteessä on vain vähän mikrobeja, ja niitä on vaikea saada esille. Opinnäytetyössä käytettiin sekä valmiiksi sekoitettuja jauheita, joista kasvualustat valmistettiin että puolivalmiita sulatettavia alustoja.

Jotkin elatusaineen reagenssit eivät kestä sterilointia, ja ne tulee valaa maljoille heti valmistamisen jälkeen. Steriloinnin jälkeen elatusaine jäädytetään haluttuun lämpötilaan (yleensä noin +50 °C) ja elatusaineen ollessa nestemäinen, se valetaan petrialjoille. Maljojen valu suoritetaan

laminaarikaapissa, jotta vältetään ilmasta putoavilta kontaminaatioilta (Mirja Salkinoja-Salonen 2002, 62).

3.2 Näytteiden siirrostus ja kasvatus

Työssä käytettävät kryogeenisessä säilytyksessä olevat näytteet ovat puhtasviljelmiä. Näytteiden inokulointi hajotusviljelmäksi ilman kontaminaatteja perustuu steriileihin työvälineisiin, aseptiseen työskentelyyn sekä bakteerisuspension laimentamiseen. Laimentaminen ilmenee levitysvaiheessa, kun ensimmäisen siirrostusalueen lopusta aloitetaan uusi siirrostusalue ja niin edelleen. Laimennus suoritetaan yleensä kolmesti, jolloin saadaan neljä siirrostusaluetta. Viimeisessä hajotusalueessa on bakteereja jäljellä enää murto-osa verrattuna ensimmäiseen hajotusalueeseen. Hajotusviljelyssä hajotus koetaan onnistuneeksi, kun maljalle kasvaneista pesäkkeistä ainakin osa on yksittäisiä, ja näin ollen saadaan tarvittaessa jatkoviljeltyä vain yksi haluttu pesäke. (Mirja Salkinoja-Salonen 2002, 80 – 81.) Hajotusviljelyssä pesäkkeiden näyttäessä identtisiltä ja yksittäisen pesäkkeen ollessa erillään muista, on todennäköistä, että jatkoviljelystä saadaan puhtasviljely, eikä se näin ollen sisällä muuta kuin yhtä viljeltävää bakteeria. Näin ollen saadaan tutkittua tai säilöttyä tiettyä haluttua bakteeria. Kuvassa 1 on havainnollistettu hajotusviljelyn periaate.



Kuva 1 Hajotusviljely (mukaillen Sivelä & Saarinen 1992, 72)

Viljelyn jälkeen maljoja kasvatetaan bakteerin vaatimissa olosuhteissa. Yleensä kasvatus tapahtuu joko aerobisesti tai anaerobisesti. Anaerobisten bakteerien ollessa kyseessä viljely sekä kasvatus eli viljelymaljojen inkubointi tapahtuu anaerobisesti eli hapettomissa oloissa joko siihen tarkoitettussa astiassa tai anaerobikammiossa. Kammioon joko syötetään yksitellen tiettyjä kaasuja tai käytetään kaasuseosta poistamaan happi ja muodostamaan tarvittava olosuhde. Anaerobikammiossa on eteiskammio, joka on ilmatiivis sekä kammion suuntaan että ulospäin. Eteiskammion kautta viedään kaikki tarvittavat tavarat ja reagenssit kammioon. Eteiskammiossa käynnistetään kaasusykli, joka poistaa hapen, ennen kuin tavaraa siirretään itse kammioon, näin ollen varmistutaan siitä, ettei varsinaiseen kammioon pääse happea (Leone Montonen & Mirja Salkinoja-Salonen 2002, 66).

Useille bakteereille ideaalinen kasvatuslämpötila on huoneenlämpöä huomattavasti korkeampi (+37 °C). Tarvittava inkuboitumisaika riippuu kasvatettavasta bakteerista. Työtä tehdessä huomattiin, että hyvin nopeasti kasvavat pesäkkeet saattavat näkyä jo alle 24 tunnin kuluttua inkuboitumisen aloitusajankohdasta, mutta hidaskasvuisilla aika on yhdestä jopa seitsemään vuorokautta.

4 MENETELMÄT

4.1 Aineenvaihduntareaktiokokeet

4.1.1 API 20 A

Analytical Profile Index (API) 20 A (BioMérieux) on testimenetelmä, joka mahdollistaa 20 biokemiallista samanaikaista testiä anaerobisesta bakteerista. API -menetelmä on suhteellisen nopea testi, sillä testien tulokset ovat luettavissa vuorokauden kuluttua. Entsyymireaktiot, kemiallisten aineiden tuotto ja fermentaatio ovat testimenetelmän toimintaperiaatteena. (API ®.) Testissä käytettävien näytteiden tulee olla puhtasviljelmiä. Lisäksi tarvittavan bakteerisuspension tulee olla tarpeeksi sameaa, näin ollen tutkittavaa bakteeria on näytteessä tarpeeksi testien suorittamiseen. Testituloksien perusteella saadaan positiivisista reaktioista numerosarja, jota verrataan tietokantaan, ja tämän avulla organismi voidaan tunnistaa. Opinnäytetyössä ei ollut tarkoitus tunnistaa bakteereja, vaan tutustua niiden aineenvaihduntareaktioihin.

Tässä työssä käytettävät aineenvaihduntatestit perustuvat pääosin sokerien metaboliareaktioihin. Bakteerinäytteelle tarjottiin erilaisia sokereita. Yleisesti glukoosi, laktoosi ja mannitoli ovat tarjottavia sokereita. Sokerien avulla lopputuotteen fermentaation myötä pH:n lasku tai nousu ilmenee usein värimuutoksena. Tällä menetelmällä työssä tutkittiin D-mannitolin happamoitumista. Tulokset varmennettiin kromogeenisilla maljoilla. (API ®.)

4.1.2 Rapid ID 32 A

RAPID ID 32 A (BioMérieux) testissä on 32 kuoppaa, joissa substraatit ovat. Testi on nopeampi menettelytapa kuin API 20 A, sillä Rapid testitulokset saadaan jo 4 tunnin kuluttua testin aloituksesta. Tarkasteltavat reaktiot perustuvat sokerien metaboliareaktioihin, kuten API 20 A testimenetelmässä.

Tutkittavat reaktiot olivat tässä työssä β -glukosidaasi- ja β -galaktosidaasientsyymireaktion tapahtuminen.

4.2 Kromogeeniset elatusaineet

Elatusaine, jota kutsutaan kromogeeniseksi, sisältää perinteisestä pH:n muutos elatusaineesta poiketen substraattiin liitetyn kromogeenin eli väriyhdisteen. Kromogeeni koostuu kromoforista ja substraatista, joka on kohdistettu tiettyyn entsyymaattiseen aktiivisuuteen. Konjugaatti on väritön, kunnes kohdeorganismien entsyymi katkaisee sen. Tämän jälkeen erottuvan värinen kromofori pääsee vapautumaan. Vapautuminen ilmenee bakteeripesäkkeen värjäytymisenä. (Kärpänoja P., Laaduntarkkailupäivät 2007; Dr. Alain Rembach 2009.)

Työssä käytettävät elatusaineet valittiin ilmentämään tiettyjen entsyymien reaktioita bakteereissa. *Universal Differential ChromoSelect Medium* (UCM) agarkasvualustaan vaikuttavia entsyymejä ovat muun muassa β -glukosidaasi ja β -galaktosidaasi. β -glukosidaasientsyymien ilmentyessä bakteerissa kromogeeni vapautuu ja värjää pesäkkeet sinertävän vihreiksi. *Echerichia coli* vapauttaa β -galaktosidaasia ja näin ollen pesäkkeet värjäytyvät purppuran värisiksi. Koliformiset eli *E. colia* muistuttavat enterobakteerit pilkkovat molempia substraatteja, josta muodostuu sinisestä lilaan värjäytyneitä pesäkkeitä. (Sigma-Aldrich, *Universal Differential ChromoSelect Medium*, 2019)

Bacillus ChromoSelect Agar (BC) alustassa Mannitoli toimii fermentoitavana hiilihydraattina. Fermentointi voidaan havaita elatusalustan värimuutoksena. Jotta maljasta saadaan selektiivinen (BCP malja), lisätään siihen valmistusvaiheessa aseptisesti antibiootti, polymyksiini B. Mannitolia fermentoivat organismit ilmenevät maljan värimuutoksena keltaiseksi sekä keltaisina pesäkkeinä. Kasvualustassa β -glukosidaasientsyymien myötä vapautuva kromogeeni ilmenee puolestaan sinisinä pesäkkeinä. Toisin sanoen, mikäli malja on keltainen, on sokerin eli Mannitolin myötä malja keltainen,

siniset pesäkkeet maljoilla kuvaavat entsyymireaktiota. Maljan ollessa keltainen ja pesäkkeet vihreät, on vaikuttanut sekä sokeri että entsyymi. (Sigma-Aldrich, Bacillus ChromoSelect Agar, 2019)

4.3 Eosin Methylene Blue (EMB)

Eosiini-metyleenisininen on kasvatusalusta gram-negatiivisille bakteereille. Maljassa käytettävä kahden väriaineen eosinin ja metyleenisinisen yhdistelmä on myrkyllinen gram-positiivisille bakteereille, eikä ne siksi kasva siinä. Gram-negatiiviset bakteerit, jotka fermentoivat laktoosia tuottaen happoa, ilmenevät violetteina pesäkkeinä. Tietyt laktoosia fermentoivat bakteerit tuottavat lisäksi vihreän metallisen kiillon tummiin pesäkkeisiin. (Microbeonline, 2019.)

Työssä haluttiin tutkia, toimiiko alusta samalla tavoin anaerobisissa olosuhteissa, kuin aerobisissa. *E. coli*, joka yleisesti ottaen viihtyy EMB kasvualustalla, on fakultatiivinen anaerobi. Tämän vuoksi selvitettiin, kasvaisiko jokin tutkittavista bakteereista tällä maljalla tutkimustyön vaativissa anaerobisissa olosuhteissa.

4.4 Hapensieto ja mikroaerofiilisyyden

Kasvu ympäristön happi on toisille organismeille elintärkeää, siinä kun toisille se on myrkky. Työssä käytettävät bakteerit ovat anaerobeja, pois lukien 11 aerobista bakteerikantaa. Tutkitaan hapen saannin vaikutusta bakteeriin sen kasvuvaiheessa.

Mikroaerofiilisyyttä testataan CampyGenTM -pusseilla. Kehite tuottaa 5 % happea, 10 % hiilidioksidia ja 85 % typpeä. (CampyGenTM). Kehite suljetaan kasvatettavien maljojen kanssa ilmatiiviiseen pussiin, jolloin se aktivoituu saman tien.

5 TYÖN SUORITUS

5.1 Bakterikannat

Työssä käytettiin jo identifioituja bakterikantoja, joita oli 51 kappaletta. Tutkittavista bakterikannoista kuusi oli aerobisia bakteereja ja loput 45 anaerobisia suolistobakteereja. Aerobisista bakteereista ei tutkittu hapen sietoa eikä mikroaerofiilisyyttä.

5.2 Bakteerien kasvatus

Nestetypestä otettiin jokaisesta kannasta yksi kryogeenisesti säilötty näytepullo ja siirrettiin se aseptisesti anaerobikammioon. Näytepullosta inokuloitiin 10 µl:n siirrostussilmukalla Fastidious anaerobe agar (FAA) kasvatusalustalle. Inkubointia suoritettiin keskimäärin kahdesta viiteen päivään +37 asteessa. Heikosti kasvavista bakteereista tehtiin jatkoviljelyt, jotta kasvustoa saatiin kerättyä tarpeeksi ja aineenvaihduntatesteissä voitaisiin käyttää mahdollisimman nuoria pesäkkeitä.

5.3 Testaus

5.3.1 Hapensieto ja mikroaerofiilisuus

Anaerobikammiossa otettiin FAA kasvatusalustalta aseptisesti yksi hyvin kasvanut pesäke uudelle FAA maljalle sekä hapensietotestiin että mikroaerofiilisiin olosuhteisiin. Hapensieto testattiin ottamalla juuri viljelty FAA elatusmalja ulos kammioista, pitämällä kansia hapellisissa oloissa hetken auki ja inkuboimalla 45 minuuttia lämpökaapissa. Tämän jälkeen maljat siirrettiin aseptisesti takaisin anaerobikammioon kasvamaan viideksi päiväksi +37 asteeseen. Mikroaerofiiliset olosuhteet toteutettiin Campygen™ -kehitteellä ilmatiiviissä suljettavassa pussissa. Maljoja inkuboitii lämpökaapissa yhtä kauan samassa lämpötilassa kuin hapensietotesteissä.

5.3.2 Kasvatus EMB, UCM, BC ja BCP kasvualustoilla

Maljat tuli siirtää hyvissä ajoin ennen niille viljelyä anaerobikammioon. Näin voitiin minimoida happipitoisuus maljoista ja maksimoitiin hyvät kasvuolosuhteet anaerobisille bakteereille. Hyvin kasvanut yksittäinen pesäke siirrostettiin siirrostussilmukalla anaerobisissa olosuhteissa kolmelle kromogeeniselle maljalle sekä EMB kasvualustalle. Maljojen sekä pesäkkeiden värimuutokset kirjattiin 24, 48 tunnin sekä neljän päivän kasvatuksen jälkeen. Muutamien testien jälkeen huomattiin, että BC kasvatusalusta ilman antibioottia ei pysy tarpeeksi kauan puhtaana, joten sen käyttö testeissä lopetettiin.

Noin puolessa välissä testejä havaittiin, etteivät kromogeenisten maljojen värimuutokset tapahdu anaerobisissa olosuhteissa, vaan vaativat happea. Huomion jälkeen maljat kasvatettiin anaerobisesti, mutta siirrettiin aerobisiin olosuhteisiin, jonka jälkeen värimuutoksia tarkasteltiin. Tulokset kirjattiin 24 ja 48 tunnin jälkeen.

5.3.3 API 20 A ja Rapid ID 32 A -testit

FAA maljoille inokuloiduista näytteistä tehtiin jatkoviljelyt, jotta testit voitiin suorittaa mahdollisimman nuorista pesäkkeistä. Keskimääräinen pesäkkeiden ikä oli kolme vuorokautta. Joistakin bakteereista saatiin tehtyä 24 tunnin kasvatuksen jälkeen tarvittavan sameinen bakteerisuspensio, kun toisista bakteereista ei meinannut riittää edes 5 päivän jatkokasvatus. Bakteerimassa kerättiin maljalta steriilillä pumpulipuikolla, josta liuotettiin bakteerimassaa valmiiseen mediumiin. Rapid ID 32 A testeissä käytettiin API suspension mediuja ja API 20 A testeissä bakteerimassa liuotettiin API 20 A Analytical Profile Index mediumiin. Mediumin sameudesta varmistettiin silmämääräisesti suspension vahvuus McFarland Standardien avulla. Rapid menetelmässä bakteerisuspension tuli olla McFarland 4, eli hieman sakeampaa kuin API testeissä riitti McFarland 3:n mukainen vahvuus. Bakteerisuspensiot pipetoitiin työohjeen mukaisesti API ja Rapid testiliuskoille. Kuvilla 2 ja 3 on

havainnollistettu huomattavia värireaktioita juuri pipetoidun sekä inkuboidun testiliuskan välillä.

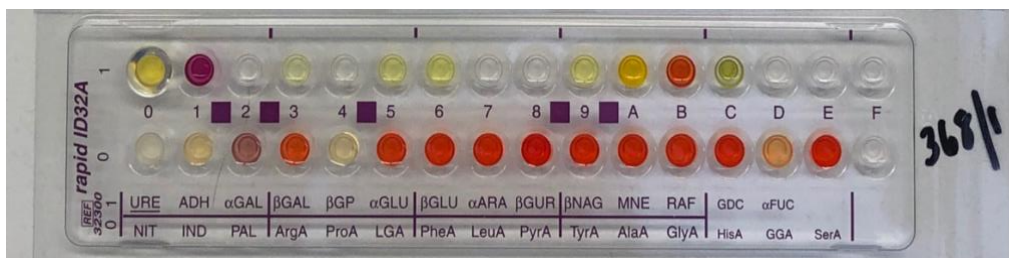


Kuva 2 API 20 A testiliuskalle pipetoitu bakterisuspensio ennen inkubointia.

Rapid ID 32 A testiliuskat inkuboitiin 4–4 ½ tuntia lämpökaapissa +37 °C:ssa. API testejä inkuboitiin yhden vuorokauden ajan anaerobisesti. Tulokset luettiin inkubointiaikojen jälkeen. Osa reaktioista tapahtui spontaanisti ja toiset vaativat tapahtuakseen lisäreagensseja. Tulokset kirjattiin ylös. Kuvissa 3 ja 4 on samasta bakterikannasta tehty API 20 A ja RAPID ID 32 A testit. Kuvat on otettu inkubointiaikojen jälkeen. Kuva 5 havainnollistaa eri bakterikantojen aineenvaihduntareaktioiden muutoksia.



Kuva 3 API 20 A testiliuska (368/1) inkubointiajan jälkeen.



Kuva 4 RAPID ID 32 A testiliuska (368/1) inkubointiajan jälkeen.



Kuva 5 RAPID ID 32 A testiliuska (B2) inkubointiajan jälkeen.

6 TULOKSET JA ARVIOINTI

6.1 Aineenvaihduntatestit ja kromogeeniset maljat

Tuloksissa (Taulukko 2) keskityttiin β -glukosidaasin ja β -galaktosidaasin entsyymireaktioiden ilmentymiseen sekä mannitolin fermentoitumiseen.

Taulukosta (Liite 1, yrityksen sisäiseen käyttöön) on luettavissa API ja Rapid -testeistä myös monia muita reaktioita, joiden myötä uusien selektiivisten maljojen valmistaminen helpottuu tulevaisuudessa sekä voidaan kehittää diagnostiikkaa bakteerikantojen jatkotutkimuksiin. Tarkasteltavat entsyymireaktiot selvisivät Rapid ID 32 A -menetelmällä. Mannitolin fermentoituminen kävi puolestaan ilmi API testien tuloksista. Vain yksi bakteerikanta kasvoi EMB maljalla.

β -glukosidaasin entsyymireaktio varmistettiin kahdella eri kromogeenisella maljalla; UCM ja BCP. Rapid -menetelmässä β -glukosidaasin entsyymireaktion tulos luettiin positiiviseksi suspension värjäytyessä keltaiseksi (Kuva 6). On huomioitava, että kaikille reaktioille on omat väri-indikaattorit, jotka löytyvät menetelmän manuaalista ja niitä lukiessa tulee olla tarkkaavainen. Kuva 7 havainnollistaa erilaisia värireaktioita kromogeenisilla maljoilla. UCM maljoilla, joilla bakteeri pystyi kasvamaan, ilmeni yhtä aerobisesti kasvavaa bakteeria lukuun ottamatta (Kuva 7, oikealla 368/1) kasvustoa sinivihreästä lilaan, kuten samassa kuvassa maljassa 303/25. Tämä tarkoittaa, että kromogeenisten maljojen mukaan UCM maljoilla tapahtuu molemmat tutkittavat entsyymireaktiot. Kuvassa 8, maljalla olevat pesäkkeet ovat värjäytyneet sinisiksi β -glukosidaasin entsyymireaktiosta. Mikäli BCP maljalle viljelty bakteeri käytti mannitolia aineenvaihdunnassaan ja tuotti entsyymiä, oli malja keltainen ja pesäkekasvusto vihreää (Kuva 7, ylin 368/16). Värireaktiot on listattu taulukkomuotoon alle (Taulukko 1).

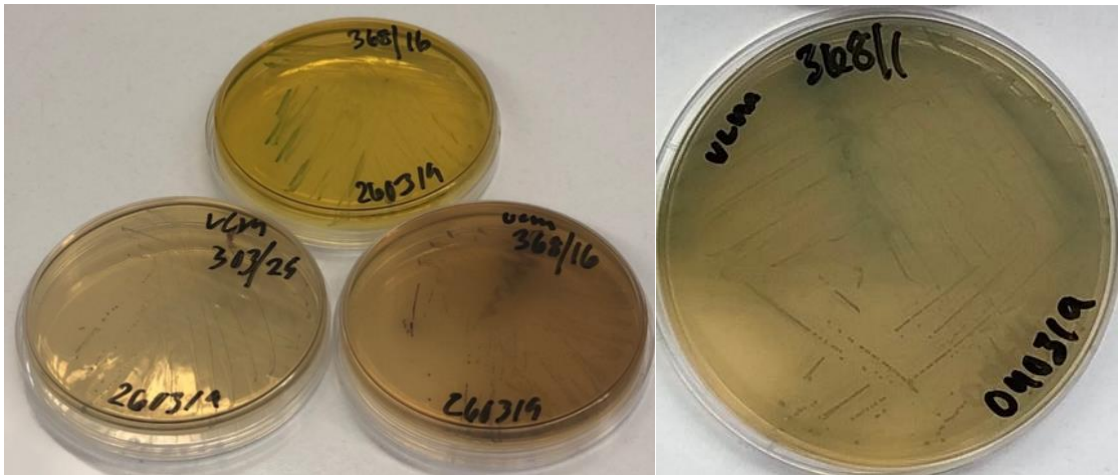
Taulukko 1 Maljoissa tapahtuvat värireaktiot.

Agar	Enzyme/Sugar	Color
UCM	B- glucosidase	blue green colonies
	B- galactosidase	purple colonies
	Both (coliforms)	blue green to purple colonies
BCP	Mannitol	yellow petri dish and colonies
	B-glucosidase	blue colonies
	Both	yellow petri dish and green colonies

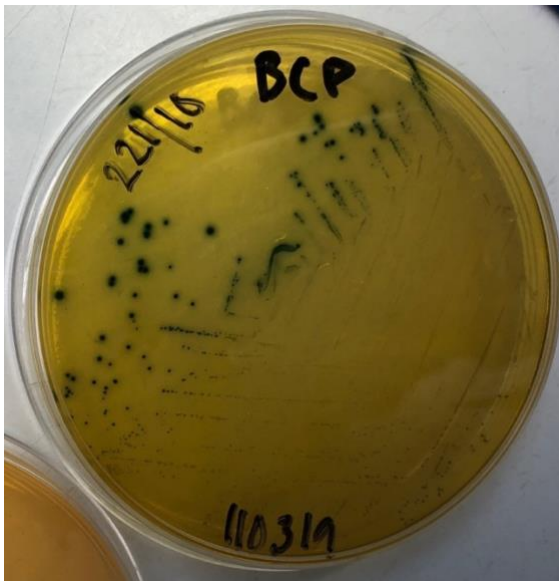
Jotkin UCM maljoista värjäytyivät melkein heti viljelyn ensivaiheessa ruskean eri sävyisiksi, kun taas toiset pysyivät maljalle ominaisen värisinä, eli vaaleina. Rapid tuloksista löytyi yksi yhtäläisyys: millään ruskeaksi värjäytyneillä maljoilla ei ollut α -galaktosidaasireaktio negatiivinen. Tämä saattaa vaikuttaa maljan värjäytymiseen. Maljassa näkyvä värimuutos oli yleisesti ottaen selkeä. Kahdessa tapauksessa reaktio oli ollut vaikeasti luettava, joten positiivista eikä negatiivista reaktiota näissä tapauksissa voida varmistaa. Jos jatkotutkimuksissa selvitetään mikä reaktio kyseisen muutoksen aiheuttaa, voi bakteerien tunnistaminen jatkossa olla helpompaa. Reaktiot on kirjattu taulukkoon (Liite 2), mutta muuten niitä ei ole tutkittu, vaan ne ovat huomioita jatkotutkimuksiin.



Kuva 6 RAPID ID 32 A testiliuska (274/14), positiivinen bGLU tulos merkitty.

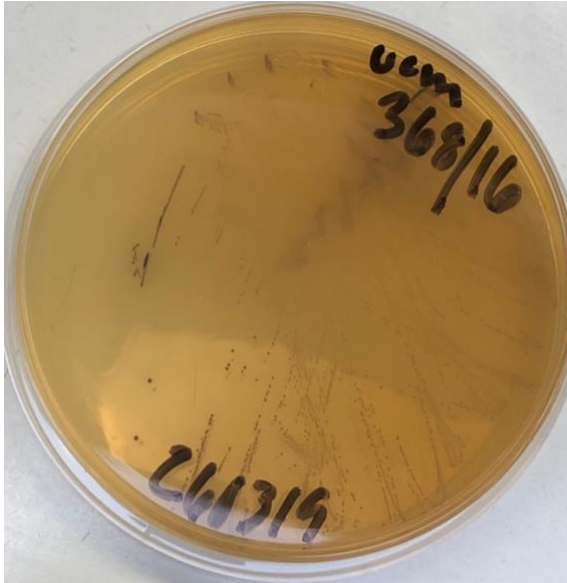


Kuva 7 Kromogeenisten maljojen värimuutoksia.



Kuva 8 β -glukosidaasin entsyymireaktion myötä BCP maljalla (221/10) siniseksi värjäytyneitä pesäkkeitä.

Toisen entsyymin, β -galaktosidaasin, entsyymireaktiot luettiin Rapid ID 32 A menetelmän tuloksista ja varmistettiin UCM maljoilla. Pesäkkeet värjäytyivät substraatti-entsyymireaktion myötä violeteiksi (Kuva 9).



Kuva 9 β -galaktosidaasientsyymi ilmenee violetteina pesäkkeinä UCM maljalla 368/16.

Liitteessä 2 olevat kromogeenisten maljojen tulokset on listattu ymmärrettävämmin alla olevaan taulukkoon (Taulukko 2). + -merkillä kuvastetaan bakteerikannan käyttävän kyseistä sokeria tai entsyymiä aineenvaihduntareaktiossaan. Puolestaan - -merkki tarkoittaa, että kyseinen reaktio ei ole ilmennyt tuloksissa. Tulokset on kirjattu kromogeenisten maljojen värimuutoksista ja aineenvaihduntatesteistä. Vihreä väri kuvaa yhtäläisyyttä näiden kahden menetelmän tuloksien välillä. Ristiriita tuloksissa on kuvattu punaisella. β -glukosidaasi ilmenee RAPID ID 32 A testissä sekä UCM maljalla ja BCP maljalla. Keltaisella kuvataan tuloksen olevan yhtäläinen RAPID ID 32 A testin tuloksen kanssa, mutta ristiriidassa toisen kromogeenisen maljan kanssa. Värjäämättömät tulokset johtuvat joko siitä ettei kaikkien bakteerien kromogeenisiä maljoja tarkasteltu aerobisesti tai tulos on ollut epäselvä. Ellei maljaa ole tutkittu aerobisissa olosuhteissa ollenkaan, on taulukossa merkintä *no aer*. Merkintä *no growth* kuvaa, ettei kasvua ole ollut. Merkki, jossa on allekkain + ja -, tarkoittaa kasvun olleen vähäistä, eikä yksittäisiä pesäkkeitä ole

muodostunut. Vähäisestä kasvusta johtuen tällöin ei ole saatu tuloksia tai ainakaan ne eivät ole luotettavia. Kolmesta bakteerikannasta ei saatu mitään tuloksia kasvamattomuuden tai sekakasvuston takia.

Taulukko 2 Tarkasteltavat tulokset taulukoituina ja värikoodattuina.

Strain	β -glucosidase			β -galactosidase		MAN Mannitol	
	Rapid ID 32A	UCM	BCP	Rapid ID 32A	UCM	API 20 A	BCP
B2	-	-	-	+	+	+	± (BC)
368 1	+	+	+	+	-	+	±
369 10	+	+	+	+	+	+	+
227 14	+	+	+	+	+	+	+
369 9	+	+	+	±	+	+	+
374 54	+	+	+	±	+	+	+
379 5	-	no aer.	no aer.	+	no aer.	+	+
379 8	-	no aer.	no aer.	+	no aer.	+	+
368 39	-	no aer.	no aer.	-	no aer.	-	+
379 4	-	no aer.	no aer.	-	no aer.	-	+
379 9	-	no aer.	no aer.	-	no aer.	-	+
221 20	+	no aer.	no aer.	+	no aer.	-	-
221 10	+	+	+	+	+	-	-
368 25	+	no aer.	no aer.	+	no aer.	-	-
303 20	-	no aer.	no aer.	+	no aer.	-	-
384 6	+	+	-	+	+	-	-
227 8	+	+	-	+	+	-	+
386 2a	+	no aer.	no aer.	+	no aer.	-	-
336 4	+	+	-	+	+	-	+
325 10	+	no aer.	no aer.	+	no aer.	-	-
227 17	-	no aer.	no aer.	-	no aer.	-	-
221 24	-	no aer.	no aer.	+	no aer.	-	-
368 9	±	no aer.	no aer.	+	no aer.	-	-
303 57	-	no aer.	no aer.	-	no aer.	-	-
303 13	-	no aer.	no aer.	-	no aer.	-	-
368 11	+	no aer.	no aer.	-	no aer.	+	-
338 13	±	no aer.	no aer.	-	no aer.	-	-
368 12	-	no aer.	no growth	-	no aer.	-	no growth
243 11	-	-	-	-	-	-	+
368 16	+	-	+	+	+	-	+
227 18	+	-	+	+	+	-	+
221 18	-	-	-	-	-	-	+
221 28 ₂	-	-	no growth	-	-	-	no growth
221 1	-	-	-	-	-	-	-
303 25	+	+	+	+	+	-	+
384 2	+	-	-	+	-	+	+
303 17	-	-	-	-	-	-	±
303 55	-	-	no growth	-	-	±	no growth
227 15	-	-	-	-	-	-	-
368 49	-	-	-	+	-	+	+

(jatkuu)

(Taulukko 2 jatkuu)

368 37	-	-	+	-	-	-	-
227 10	±	+	-	-	-	-	+
325 5	-	+	no growth	-	-	-	no growth
368 42	-	-	no growth	-	-	-	no growth
368 44	+	-	-	+	+	+	+
227 5	-	-	no growth	-	-	+	no growth
221 26	-	-	no growth	-	-	-	no growth
368 33	±	-	-	+	+	-	-

6.2 Hapensieto ja mikroaerofiilisyyys

Taulukossa 2 on listattu bakteerikannan kasvavuus mikroaerofiilisissä olosuhteissa sekä hapelle altistettuina. Taulukon yksitoista ensimmäistä bakteerikantaa ovat aerobisia, joten niille ei ole tehty kyseisiä testejä.

Taulukossa plus -merkki tarkoittaa, että bakteerikanta on kasvanut poikkeavista olosuhteista huolimatta. Minimal growth -merkinnällä tarkoitetaan todella vähäistä kasvua, kun taas ± kuvastaa kasvua maljalla, muttei yksittäisiä pesäkkeitä. Miinus -merkillä kuvastetaan kasvamattomuutta.

Mikroaerofiilisyystestit suoritettiin 37 bakteerikannalle, joista 26 bakteeria kasvoi kehitteen kanssa suljetussa pussissa. Hapensietotesteissä vain kolme bakteerikantaa eivät sietäneet happea kasvuvaiheessa. Muutamia kantoja lukuun ottamatta, bakteerit eivät olisi obligaatteja hapelle eivätkä mikroaerofiilisille olosuhteille.

Taulukko 3 Mikroaerofiilisyys- ja hapensietotestien tulokset.

Strain	Oxygen sensitivity	Microaerophilic
B2	aerobe	aerobe
368 1	aerobe	aerobe
369 10	aerobe	aerobe
227 14	aerobe	aerobe
369 9	aerobe	aerobe
374 54	aerobe	aerobe
379 5	aerobe	aerobe
379 8	aerobe	aerobe

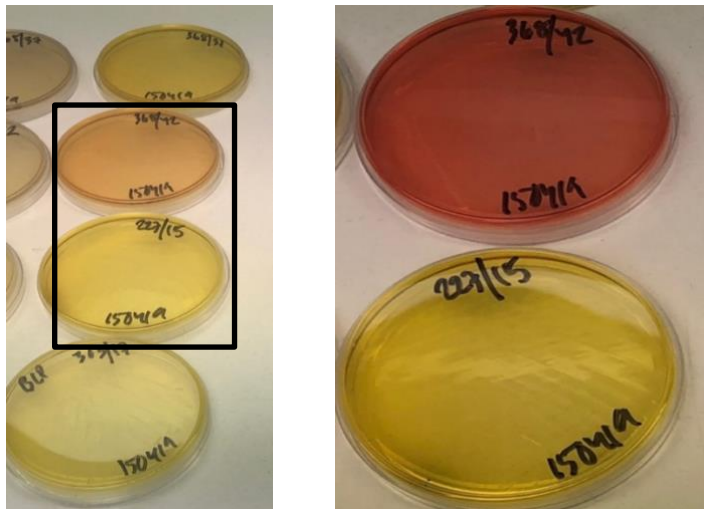
(jatkuu)

(Taulukko 3 jatkuu)

368 39	aerobe	aerobe
379 4	aerobe	aerobe
379 9	aerobe	aerobe
221 20	+	+
221 10	+	+
368 25	+	-
303 20	+	minimal growth
384 6	+	+
227 8	+	+
336 4	+	+
325 10	+	minimal growth
386 2a	+	+
227 17	+	+
221 24	+	-
368 9	+	-
303 57	+	+
303 13	+	+
368 11	+	+
338 13	+	+
368 12	-	-
243 11	-	-
368 16	-	+
221 18	+	+
221 28 2	+	-
221 1	+	minimal growth
303 25	+	minimal growth
384 2	+	+
303 17	+	±
303 55	+	+
227 15	+	+
368 49	+	+
368 37	+	+
227 10	+	+
325 5	+	+
368 44	+	+
227 5	+	+
221 26	+	+
368 42	+	+
227 18	+	+
368 33	+	+

6.3 Tuloksien arviointi

Aineenvaihduntareaktiokokeiden ja kromogeenisten maljojen tulosten välillä ei ole huomattavaa ristiriitaa. Suurin ristiriita on mannitolin fermentaation ilmentymisessä. BCP maljan ollessa keltainen, ei API testi ole näyttänyt mannitolin kuuluvan bakteerin aineenvaihduntareaktioon. Tämä voi selittyä yksinkertaisesti sillä, että BCP malja on viljelemättömänä punainen, anaerobikammiossa malja muuttuu pH:n muutoksen myötä oranssiksi ja mannitolireaktion myötä keltaiseksi. Oranssin ja keltaisen eri sävyjä on paljon ja raja keltaisen väristen maljojen välillä on häilyvä, kuten kuvassa 10 oikealla puolella on huomattavissa. Oikeanpuoleinen oranssi kasvamaton malja muuttuu takaisin punaiseksi (oikealla 368/42) ollessaan aerobisissa olosuhteissa. Maljojen värimuutosten näkymiseen vaaditaan muutama tunti. Pesäkkeissä värit ovat luettavissa vasta vuorokauden kuluttua.



Kuva 10 BCP maljojen värimuutoksia. Oikealla merkattujen maljojen värimuutokset vuorokauden kuluttua.

Joissain määrin ristiriitaisia tuloksia ilmenee myös UCM maljojen värireaktioissa. Elatusaineen valmistaja (Sigma-Aldrich) toteaa tuloksissa voivan olevan epävarmuutta ja epäselkeyttä värimuutoksissa sekä niiden tulkinnassa. Muutamissa tuloksissa, Rapid testien mukaan, molempien tutkittavien entsyymien pitäisi ilmetä maljalla, mutta vain toinen väri on

vahvemmassa asemassa, ja täten erotettavissa. Kasvuolosuhteet voivat olla yksi tekijä, joka ei saa jostain syystä toista väriä erottumaan. API ja Rapid testien värimuutoksien tuloksissa uskoisin, että positiiviset tulokset ovat herkemmin luotettavia kuin negatiiviset. Negatiivisten tulosten syynä saattaa olla liian laimea bakteerisuspensio, jolloin bakteeria ei ole ollut riittävästi ilmentämään reaktiota. Mikäli testien tuloksissa on suurin osa negatiivisia reaktioita, voi kyseessä joissain tapauksissa olla bakteeri, joka ei tarvitse ollenkaan sokereita kasvaakseen. Esimerkiksi Olof Schwanin (1979, 160.) suorittamassa kokeessa (Liite 3) on huomioitu API 20 A tuloksissa kahden tutkittavan bakteerikannan, jotka eivät käytä perinteisiä sokereita aineenvaihdunnassaan, tuottavan negatiiviset tulokset.

Noin puolessa välissä testejä huomattiin, että hitaasti kasvavat anaerobisesti kasvatettavat bakteerit eivät ilmentäneet mitään värireaktioita, ellei niitä siirretty hapellisiin oloihin vuorokaudeksi. Kromogeeni tarvitsee ilmeisesti happea, jotta väripigmentit muodostuvat tai pigmentti värjäytyy.

Tutkimuksessa käytetyt bakteerikannat olivat suurelta osin anaerobisia suolistobakteereja. Osan ennalta identifioitujen bakteerien tiedettiin olevan mikroaerofiilisiä, mutta mikroaerofiilissä olosuhteissa kasvavia bakteereja oli näiden lisäksi monia. Mikroaerofiiliset olosuhteet poikkeavat normaalista ilmakehästä merkittävästi ja vielä merkittävämmiin anaerobikammion hapettomista oloista. Euroopan ympäristökeskuksen (2013) mukaan ilmakehän merkittävät kaasut ovat typpi ja happi. Näitä on keskimäärin tilavuusprosentteina typpeä 78 ja happea 21. Anaerobikammiossa puolestaan ei ole ollenkaan happea vaan kaasuseos sisältää keskimäärin 95 % typpeä ja 5 % vetyä (BiteSizeBio, 2017). Mikroaerofiiliset olosuhteet luova kehite tuottaa typpeä 85 %, hiilidioksidia 10 % ja happea vain 5 %. Itzhak Brook ja Sarah S. Long (2018) mainitsevat artikkelissaan, että täysin anaerobiset mikrobit kuolevat hapellisissa oloissa muutamassa minuutissa, vaikka kasvuolosuhteissa olisi vain alle puoli prosenttia happea. Tällä perusteella bakteerit ovat mitä ilmeisemmin hieman arotolerantteja. Arotolerantteina ne

sietävät 2 – 8 % happea, ja kehite tuottaa happea vain 5 tilavuusprosenttia, joten tulos on yhdenmukainen. Lisäksi voidaan tarkastella hiilidioksidin määrää, jota kehite tuottaa ympäristöönsä 10 %. Tiukat anaerobit eivät kasva tällaisessa ympäristössä, mutta mikroaerofiiliset bakteerit puolestaan voivat kasvaa.

7 POHDINTA

Opinnäytetyössä perehdyttiin suolistobakteerikantojen karakterisointiin biokemiallisin menetelmin. Tutkimustyö on pääasiassa tehty Orion Oyj:lle, mutta koottu kirjallinen teos on yleishyödyllinen ja sitä voidaan hyödyntää myös opiskelijoiden tietoisuuden lisäämiseen kyseisestä aiheesta. Lisäksi tutkimustyöllä voidaan monipuolistaa ammatillista osaamista.

Biokemiallisia karakterisointimenetelmiä oli kaksi erilaista, ja tuloksien yhtäläisyyden myötä voidaan sanoa tutkimustyön tuottaneen tulosta. Täysin yksiselitteinen ei työn onnistuminen kuitenkaan ole. Kromogeenisillä maljoilla oli tarkoitus vahvistaa API ja Rapid testien tuloksia. Suurin osa tuloksista oli yhtäläisiä tai tuloksien ristiriitaisuudelle voitiin ajatella löytyvän jokin selvä syy. Kaikkien tulosten ei voida kuitenkaan sanoa olleen yhdenmukaisia ja näin ollen jatkotutkimukset ovat tarpeellisia.

Opinnäytetyö oli tutkimustyö, ja täten sen sisältö muokkautui hieman prosessin edetessä. Käytännöntyötä tehdessä huomattiin, että kromogeenisten maljojen värireaktiot ovat huomaamattomia tai niitä ei tapahdu ollenkaan anaerobissa oloissa. Väripigmentit tarvitsivat muodostuakseen happea. Tämän huomion myötä anaerobisesti kasvatetut bakteerimaljat otettiin kasvatuksen jälkeen aerobisiin olosuhteisiin. Vuorokauden jälkeen voitiin huomata värimuutokset maljoissa. Aerobisiin nopean diagnostiikan tarpeisiin kehitetyt kromogeeniset maljat voivat toimia myös anaerobisesti kasvatettavilla bakteereilla, kunhan tämä asia huomioidaan. Pääosassa sokeri- ja entsyymireaktiot voitiin huomata aineenvaihduntatestien lisäksi kromogeenisillä maljoilla. Eri menetelmien tulosten lukeminen perustui laajalti visuaaliseen tarkasteluun ja tulkintaan, josta osa tuloksien ristiriitaisuudesta voi johtua.

Kuten tarkoituksena oli, biokemiallisten reaktioiden myötä saatiin tietoa bakteerien aineenvaihduntareaktioista ja kyvystä hyödyntää spesifisesti valikoituja ravinteita. Saatujen tietojen pohjalta selektiivisten kasvualustojen

valmistamiseen saadaan toivotusti helpotusta tulevaisuudessa jatkotutkimustöitä tehdessä. EMB maljalla kasvoi vain yksi bakteeri. Malja ei siis sovellu suurimmalle osalle bakteerikannoista, mutta toisaalta kun haluttiin helpottaa bakteerien kasvatusta, niin tämän avulla löydettiin erittelevä tekijä tietyille bakteerille. Muutamia bakteerikantoja ei saatu kasvamaan, vaikka niitä yritettiin kasvattaa elatusalustalla, jota rikastettiin lisäravinteilla. Kasvamattomuus saattaa johtua siitä, että kannat ovat vanhoja, vaikeasti kasvatettavia tai kasvuolosuhteet eivät ole ideaaliset kyseiselle bakteerille. Jatkotutkimuksissa voitaisiin tutkia tätäkin lisää.

LÄHTEET

Advice for working with anaerobic chambers 2017. BiteSizeBio. Saatavilla: <https://bitesizebio.com/34766/advice-anaerobic-chambers/>. Viitattu 20.5.2019

Alan W. Walker, Sylvia H. Duncan, Petra Louis, and Harry J. Flint. 2014. Phylogeny, culturing and metagenomics of the human gut microbiota. Trends in microbiology, Cell Press, review. Saatavissa: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X14000511?via%3Dihub> Viitattu 3.5.2019

API 20 A. (2002). System for the identification of anaerobes. Saatavilla: http://people.ypei.ca/jlewis/API_20_A.pdf. Viitattu 6.5.2019

Dr. Alain Rambach. Chromogenic Technology. CHROMagar. Saatavilla: http://www.chromagar.com/p-Chromogenic_agar_Technology.html#.XOW56C8glQK. Viitattu 17.5.2019

Eosin Methylene Blue (EMB) Agar: Composition, uses and colony characteristics (2013) MH Magazine WordPress. Microbeonline. Saatavilla: <https://microbeonline.com/eosin-methylene-blue-emb-agar-composition-uses-colony-characteristics/>. Viitattu 6.5.2019

Eric J. Stewart 2012. Growing Uncurable Bacteria. American Society for Microbiology. Journal of Bacterology. Saatavilla: <https://microbeonline.com/eosin-methylene-blue-emb-agar-composition-uses-colony-characteristics/>. Viitattu 6.5.2019

Gregory Dubourg, Guillaume Durand, Gaël Mourembou, Elodie Guilhot, Amadou Togo, Jean-Christophe Lagier, Saber Khelaifia, Maryam Tidjani Alou, Sokhna Ndongo, Niokhor Dione, Perrine Hugon, Aurelia Caputo, Frédéric Cadoret, Sory Ibrahima Traore, El Hadji Seck, Sara Bellali, Dipankar Bachar, Nadim Cassir, Fadi Bittar, Jérémy Delerce, Morgane Mailhe, Davide Ricaboni, Melhem Bilen, Nicole Prisca Makaya Dangui Niekou, Ndeye Mery Dia Badiane, Camille Valles, Donia Mouelhi, Khoudia Diop, Matthieu Million, Didier Musso, Jônatas Abrahão, Esam Ibraheem Azhar, Fehmida Bibi, Muhammad Yasir, Aldiouma Diallo, Cheikh Sokhna, Felix Djossou, Véronique Vitton, Catherine Robert, Jean Marc Rolain, Bernard La Scola, Pierre-Edouard Fournier, Anthony Lévasseur and Didier Raoult. 2016. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics. Nature microbiology, letter. Saatavissa: <https://www.nature.com/articles/nmicrobiol2016203>. Viitattu 13.5.2019

Itzhak Brook, Sarah S. Long, in Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases (Fifth Edition), 2018. Anaerobic bacterium. Saatavilla: <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/anaerobic-bacterium>. Viitattu 24.5.2019

Ilma jota hengitämme 2013, muokattu 2016. Euroopan ympäristökeskus. Saatavilla: <https://www.eea.europa.eu/fi/ymparisto-signaalit/signaalit-2013/artikkelit/ilma-jota-hengitamme>. Viitattu 18.5.2019

Jenni Hultman & Petri Auvinen 2010. Metagenomiikka avaa uusia ovia mikrobiologiassa. Duodecim, lehtiartikkeli. Saatavissa: <https://www.duodecimlehti.fi/lehti/2010/11/duo98836>. Luettu 6.5.2019

Karpanoja Pauliina 2007. Kromogeeniset maljat, periaate, tausta. Esitelmä, laaduntarkkailupäivät. Saatavilla: <https://docplayer.fi/49325996-Kromogeeniset-maljat-periaate-tausta-pauliina-karpanoja-laaduntarkkailupaivat-2007.html>. Viitattu 5.5.2019

Mikrobiologia, fylogeneettinen. Tieteen termipankki. Saatavilla:
<https://tieteentermipankki.fi/wiki/Mikrobiologia:fylogeneettinen>. Viitattu 6.5.2019

RAPID ID 32 A. (2009). System for the identification of anaerobes. Saatavilla:
https://www.mediray.co.nz/media/15794/om_biomerieux_test-kits_ot-32600_package_insert-32600.pdf. Viitattu 6.5.2019

Salkinoja-Salonen, Mirja., Puhakka, Jaakko., Leone, Montonen. Teoksessa Mikrobiologian perusteet (2002). Toimittanut Salkinoja-Salonen, M. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy Sanimall. Sanigen. Saatavilla:
<http://sanigen.tium.co.kr/shop/mart5/mall.php3?query=view&no=258>. Viitattu 20.5.2019

Schwan O. 1979. Biochemical, Enzymatic, and Serological Differentiation of Peptococcus indolicus (Christiansen) Sørensen from Peptococcus asaccharolyticus (Distaso) Douglas. Journal of microbiology. Saatavilla:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC272981/?page=4>. Viitattu 23.5.2019.

Sigma-Aldrich. Bacillus ChromoSelect Agar. Product information. Saatavilla:
<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/1/92325dat.pdf>. Viitattu 6.5.2019

Sigma-Aldrich. Universal Differential ChromoSelect Medium. Product information. Saatavilla: . Viitattu 6.5.2019

Solunetti www-sivut (2006). Saatavissa: <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/bakteerit/2/>. Viitattu 6.5.2019

Tulostaulukko, mikroaerofiilisyytys, hapensieto, kromogeeniset maljat ja EMB

Strain	B2	368 1	369 10	227 14	369 9	379 5	379 8	368 39	379 4	379 9	221 20	221 10	368 25	303 20	384 6	227 8	336 4	325 10	386 2a	227 17	221 24	368 9	303 57	303 13	368 11	338 13	368 12	243 11	368 16	221 18	221 28 2	221 1	303 25	384 2	303 17	303 55	227 15	368 49	368 37	227 10	325 5	368 44	227 5	221 26	225 12	1 20	386 1a	368 42	227 18	374 54	225 14	368 33		
Notes	Aerobic conditions 4 h: -Violet colonies (UCM) -Red petri dish (BCP)	Aerobic conditions 4 h: -Bluegreen colonies (UCM) -Green colonies (BCP)	Aerobic conditions 4 h: -Bluegreen and violet colonies (UCM) -Green colonies (BCP)	Aerobic conditions 4 h: -Bluegreen and violet colonies (UCM) -Green colonies (BCP)	Aerobic conditions 4 h: -Bluegreen and violet colonies (UCM) -Green colonies (BCP)	Has not been in aerobic conditions	Has not been in aerobic conditions	Has not been in aerobic conditions	Has not been in aerobic conditions	Has not been in aerobic conditions	Has not been in aerobic conditions	Aerobic conditions - Blue to violet colonies (UCM) -Bluegreen colonies (BCP)	Has not been in aerobic conditions	Has not been in aerobic conditions	Aerobic conditions - Dark blue to violet / brown colonies (UCM)	Aerobic conditions - Dark blue to violet / brown colonies (UCM)	Aerobic conditions - Dark blue to violet / brown colonies (UCM)	Has not been in aerobic conditions	Has not been in aerobic conditions	Has not been in aerobic conditions	Has not been in aerobic conditions	Has not been in aerobic conditions	Has not been in aerobic conditions	Has not been in aerobic conditions	Has not been in aerobic conditions	Has not been in aerobic conditions	Has not been in aerobic conditions	Has not been in aerobic conditions	Has not been in aerobic conditions	No change in aerobic conditions 24 h	Aerobic conditions 24 h: -Violet colonies (UCM) -Bluegreen colonies (BCP)	No change in aerobic conditions 24 h	no change in aerobic conditions 24 h	no change in aerobic conditions 24 h	no change in aerobic conditions 24 h	no change in aerobic conditions 24 h	no change in aerobic conditions 24 h	Aerobic conditions 24 h: -Green colonies (BCP)	Aerobic conditions 24 h: -Violet colonies (UCM)	Aerobic conditions 24 h: -Light bluish colonies (UCM)	Aerobic conditions 24 h: -Brown/violet colonies (UCM) -Red petri dish (BCP)	Aerobic conditions 24 h: -Red petri dish (BCP)	Aerobic conditions 24 h: -Red petri dish (BCP)	Not grow on FAA	mixed culture on enriched FAA	Not grow on enriched FAA	Poor growth on enriched FAA	Aerobic conditions 24 h: -Green colonies (BCP) -Violet colonies (UCM)	AEROBIC STRAIN Aerobic conditions 24 h: -Light red/purple/brown colonies (UCM) -Violet colonies (BCP)	Retest	Aerobic conditions 24 h: -violet colonies (UCM)			
Oxygen sensitivity											+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Microaerophilic											+	+	-	minimal growth	+	+	+	minimal growth	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
EMB																																																						
EMB petri dish colour (violet)							violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet	violet
EMB colony colour							-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
UCM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	±	±	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
UCM petri dish colour (beige)	brown	brown, bluish first cultivation	brown, bluish first cultivation	brown, bluish first cultivation	brown, bluish first cultivation	brown	brown	beige	beige	beige	brown	brown	-	beige	brown	brown	brown	brown	brown	beige	brown	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige	beige
UCM colony colour	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light		
BC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	
BC petri dish colour	yellow	yellow/red	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	orange	orange	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used
BC colony colour	colourless/light	colourless/light, bluish first cultivation	colourless/light, bluish first cultivation	colourless/light, bluish first cultivation	colourless/light, bluish first cultivation	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used	not used
BCP	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	minimal growth	+	+	minimal growth	minimal growth	+	agar growth	-	+	+	+	-	+	+	+	+	minimal growth	-	minimal growth	+	+	+	-	minimal growth	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
BCP petri dish colour	red	yellow/red	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	orange	orange	orange	orange	orange	yellow	yellow	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange	orange
BCP colony colour	-	colourless/light, bluish first cultivation	colourless/light, bluish first cultivation	colourless/light, bluish first cultivation	colourless/light, bluish first cultivation	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	colourless/light	

TABLE 1. Biochemical test characteristics of *P. indolicus* and *P. asaccharolyticus* strains

System or test kit	Biochemical test or characteristic	<i>P. indolicus</i> (79) ^a	<i>P. asaccharolyticus</i> (10) ^a
API 20A	Indole production	+	+
	Gelatin hydrolysis	-	-
	Esculin hydrolysis	-	-
	Urease production	-	-
	Acid from various saccharides ^b	-	-
	H ₂ S production ^c	+	-
	Catalase	-	-
API-ZYM ^d	Alkaline phosphatase	++	-
	Acid phosphatase	++	++
	Leucine aminopeptidase	w	w(6) or -(4)
	Cystine aminopeptidase	w	-
	Glycosidases ^e	-	-
	Trypsin, chymotrypsin, lipase, valine aminopeptidase	-	-
	Phosphoamidase	w	w
	Esterase (butyrate)	+	+
	Esterase-lipase (caprylate)	w	+(9) or w(1)
Miscellaneous tests	Nitrate reduction	+	-
	Citrate utilization	-	-
	Gas production	+	+
Gas-liquid chromatography ^f	Metabolites in PYG medium	A, p, B ^g	A, b or A, p, B
	Lactate utilization	A, P, B ^h	A, b or A, p, B
Hemolysis	Horse or bovine blood agar	-	-
Peptocagulase	Cell bound	+	-
	Extracellular (free)	+(74)	-
Agar plate tests for extracellular enzymes	Ribonuclease	w (70) ⁱ	-(9) or +(1)
	Deoxyribonuclease	+(6)	-
	Amylase, elastase, protease, egg yolk factor	-	-
Serotyping ^j	A (R3)	6 [7]	0
	B (R8)	17 [21]	0
	C (R13)	16 [20]	0
	D (R14)	18 [22]	0
	E (R33)	21 [26]	0
	F (Gr31)	1 [1]	0
Metronidazole disk test	Sensitive (zone diameter >22 mm)	+	+

^a Number of strains.^b Glucose, mannitol, lactose, saccharose, maltose, salicin, *d*-(+)-xylose, *d*-(+)-arabinose, glycerol, cellobiose, mannose, melezitose, raffinose, sorbitol, rhamnose, trehalose.^c As detected by a smoky black color throughout the esculin cupule of the API 20A.^d ++, Strong reaction (grade 5 according to color chart); +, medium reaction (grade 2 or 3); w, weak reaction (grade 1); -, negative (grade 0).^e α -Galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, β -glucosaminidase, α -mannosidase, α -fucosidase.^f Ethyl ether extracts only.^g A, Large amount of acetic acid; B, large amount of butyric acid; P, large amount of propionic acid; p, small amount of propionic acid.^h 10 out of 10 strains tested representing different serotypes.ⁱ w, weak hydrolysis.^j According to Sørensen's serotype classification (24); serotype strains given in parentheses; numbers of strains of each serotype indicated in Table, with percentage of strains in brackets.