

Pro gradu -tutkielma

Faagikoktailien vaikutus *Flavobacterium columnare*
-bakteeriin ja faagien evoluutio

Joanda Sorsa



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solu- ja molekyylibiologia

24.05.2020

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Solu- ja molekyylibiologia

Joanda Sorsa: Faagikoktailien vaikutus *Flavobacterium columnare* -bakteeriin ja faagien evoluutio
Pro gradu -tutkielma: 49 s., 4 liitettä (4 s.)
Työn ohjaajat: FM Anniina Runtuvuori-Salmela, FT Heidi Kunttu ja FT, apulaisprofessori Lotta-Riina Sundberg
Tarkastajat: FT, dosentti Matti Jalasvuori ja professori Jari Yläne
Toukokuu 2020

Hakusanat: bakteriofagi, columnaris-tauti, evolvoitunut faagi, faagiresistentti

Flavobacterium columnare on Gram-negatiivinen bakteeri, joka aiheuttaa columnaris-tautia. Columnaris-tauti aiheuttaa taloudellista menetystä kalanviljelylaitoksilla, ja tauti on vuosikymmenten aikana yleistynyt. Taudin hoitokeinona on pääasiallisesti käytetty antibiootteja, mutta taudin ehkäisyssä ja hoidossa voidaan mahdollisesti hyödyntää myös bakteriofageja. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää (1) miten faagit vaikuttavat bakteerin taudinaiheuttamiskykyyn liittyvään pesäkemorfologiaan ja faagiresistenssin kehittymiseen, (2) voidaanko bakteeria infektoida yhtä faagia tehokkaammin faagikoktaililla, joka sisältää yhtä tai kahta faagityyppiä ja (3) voidaanko faageja evolvoida infektoimaan faagiresistenttejä bakteeri-isolaatteja. Tässä työssä eri puolilta Suomea sijaitsevilta kalanviljelylaitoksilta eristettyjä *F. columnare* -bakteerikantoja altistettiin joko yhdelle tai kahdelle niitä infektoivalle faagille. Käsittelyistä määritettiin bakteeritiheys, pesäkkeiden morfologiajakauma ja faagitiitteri. Kokeen lopussa seulottiin evolvoituneita faageja. Tuloksiksi saatiin, että lähes kaikissa käsittelyissä pesäkkeiden morfologia muuttui, mikä saattaa viitata taudinaiheuttamiskykyisempien bakteerien määrän vähenemiseen. Faagiresistenttiys saattoi usein vaikuttaa bakteerin pintareseptoriin. Kahden faagin käyttäminen yhden sijasta ei voimistanut bakteerin infektointia. Kahta faagityyppiä sisältävässä käsittelyssä havaittiin evolvoituneita faageja. Tulokset tukevat faagien mahdollista hyödyntämistä columnaris-tautia vastaan.

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

Joanda Sorsa: Effect of phage cocktails to bacterium *Flavobacterium columnare*
and evolution of phages
MSc thesis: 49 p., 4 appendices (4 p.)
Supervisors: MSc Anniina Runtuvuori-Salmela, PhD Heidi Kunttu and
PhD, Associate professor Lotta-Riina Sundberg
Inspectors: PhD, Adjunct professor Matti Jalasvuori and
Professor Jari Ylänne
May 2020

Keywords: bacteriophage, columnaris disease, evolved phage, phage-resistant

Flavobacterium columnare is a Gram-negative bacterium causing columnaris disease. This disease causes economical losses at fish farms and during the last decades the number of outbreaks has increased. The main cure has been antibiotics, but also bacteriophages could be used. The research questions of the study were (1) how presence of phages change bacteria's colony morphology related to virulence, and development of phage resistance, (2) does phage cocktail of one or two phage types infect bacterium more effectively than one phage, and (3) is it possible to evolve phages to infect phage-resistant bacterial isolates. Bacteria and their phages used in this study were previously isolated from Finnish fish farms. *F. columnare* bacterium strain was exposed to either one or two phages. From the treatments, bacterium concentration, distribution of bacterium colony morphotype and phage titre were determined. At the end of the experiment, phages which could infect phage resistant bacterium were screened. As a result, almost in all treatments bacterium morphology changed. This might suggest that the number of more virulent bacterium decreased. Phage resistance might often affect the surface receptor of bacterium. Use of two phages was not more effective than one for infecting bacterium. Evolved phages from two phage type treatment were isolated. Results support the scenario of utilizing phages against columnaris disease.

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO	1
1.1 Columnaris-tauti	2
1.2 <i>Flavobacterium columnare</i>	3
1.3 <i>Flavobacterium columnare</i> -bakteerin taudinaiheuttamiskyky	5
1.4 Bakteriofagit eli faagit	6
1.5 Bakteerien puolustautuminen faagi-infektiolta.....	8
1.6 Faagiterapia	10
1.7 Tutkielman tavoitteet	13
2 AINEISTO JA MENETELMÄT.....	14
2.1 Bakteerikannat ja bakteriofagit	14
2.2 Bakteerien kasvatus Shieh-elatusaineessa ja bakteeritiheyden määrittäminen	15
2.3 Faagilysaattien tuottaminen	16
2.4 Faagilysaattien tiittereiden määrittäminen	17
2.5 Käsittelyt ja koeasetelma.....	17
2.6 Bakteeritiheyden ja bakteerien pesäkemorfologioiden määrittäminen.....	20
2.7 Bakteeripesäkkeiden puhdistus, nestekasvatus ja pakastus	20
2.8 Faagitiittereiden määrittäminen ja evolvoituneiden faagien seulonta	21
2.9 Evolvoituneiden faagien puhdistaminen ja infektiivisyyden testaaminen....	22
3 TULOKSET	23
3.2 Bakteeritiheydet	23
3.3 Bakteeripesäkkeiden morfologiajakauma ja faagiresistenttiys	24
3.4 Käsittelyistä puhdistetut bakteeripesäkkeet ja niiden faagiresistenttiys	26
3.5 Faagitiitterit käsittelyissä	28

3.6 Evolvoituneiden faagien eristäminen	29
4 TULOSTEN TARKASTELU	31
4.1 Faagien vaikutus bakteeritiheyksiin	32
4.2 Faagien vaikutus pesäkemorfologiajakaumaan ja faagiresistenssin kehittymiseen	33
4.3 Bakteerin infektointi kahdella faagilla	36
4.4 Faagien evolvointi bakteeria vastaan.....	38
4.5 Johtopäätökset	40
KIITOKSET.....	42
KIRJALLISUUS.....	43
LIITE 1. Shieh-elatusaine	50
LIITE 2. Optisen tiheyden ja <i>F. columnare</i> -bakteeritiheyden suhde.....	51
LIITE 3. Kokeen C2-bakteeritiheydet ja käsittelyjen faagitiitterit.	52
LIITE 4. Kokeen C9-bakteeritiheydet ja käsittelyjen faagitiitterit.	53

SANASTO JA LYHENTEET

CFU/ml	pesäkkeitä muodostavien yksiköiden (engl. colony-forming unit) määrä / ml
C2	<i>F. columnare</i> -bakteerikanta FCO-F2
C2ef	faaginäyte, joka sisälsi evolvoituneita faageja ja infektoi <i>F. columnare</i> -bakteerikannan C2 faagiresistenttiä C2zp-muotoa
C2zp	<i>F. columnare</i> -bakteerikannan C2 faagiresistentti muoto
C9	<i>F. columnare</i> -bakteerikanta FCO-F9
faagi	bakteriofagi, bakteeria infektoiva virus
<i>F. columnare</i>	<i>Flavobacterium columnare</i>
F13	<i>F. columnare</i> -bakteerin faagi FCOV-F13
F37	<i>F. columnare</i> -bakteerin faagi FCOV-F37
MOI	infektion monikerta (engl. multiplicity of infection)
MT	metyylitransferaasi
PFU/ml	plakkeja muodostavien yksiköiden (engl. plaque-forming unit) määrä / ml
RE	restriktioendonukleasi
rpm	kierrosta minuutissa (engl. rounds per minute)

1 JOHDANTO

Kalatalous on maailmanlaajuisesti kasvava ja merkittävä ravinnontuotannonala. Tuotannon tehostaminen ja samalla eri vaiheissa syntyvän taloudellisen menetyksen vähentäminen ovat tärkeitä tutkimus- ja kehityskohteita. Ruokakalan kasvatusta on lisääntynyt maailmanlaajuisesti vuosittain noin kahdella miljardilla kilogrammalla (Ruokakalankasvatusta 2020). Esimerkiksi vuonna 2016 ruokakalaa kasvatettiin noin 54 miljardia kilogrammaa (FAO 2018). Suomessa vuonna 2018 ruokakalaa kasvatettiin noin 14 miljoonaa kilogrammaa (Vesiviljely 2018).

Kaloja kasvatetaan muun muassa meressä verkkokasseissa, kiertovesilaitoksissa, luonnonravintolammikoissa ja uoma-altaissa (Yritykset 2020). Kalanviljelyympäristö saattaa muuttaa kalojen ja niiden taudinaiheuttajien dynamiikkaa lisäämällä infektioiden ilmenemistä. Esimerkiksi suuri kalatiheys, huono vedenlaatu ja stressitekijät altistavat kaloja bakteri-infektioille (Decostere ym. 1999, Pulkkinen ym. 2010). Flavobakteerit *Flavobacterium psychrophilum* ja *Flavobacterium columnare* ovat esimerkiksi merkittäviä bakteri-infektioiden aiheuttajia makean veden kaloille, kuten pilkkupiikkimonnille (*Ictalurus punctatus*), taimenelle (*Salmo trutta*) ja kirjolohelle (*Oncorhynchus mykiss*) (Wagner ym. 2002, Nematollahi ym. 2003, Pulkkinen ym. 2010, Peterman ja Posadas 2019). *F. psychrophilum* -bakteerin aiheuttamaa infektiota kutsutaan kylmän veden taudiksi, sillä infektiot ilmenevät viileämmissä olosuhteissa veden lämpötilan ollessa alle 15 °C (Nematollahi ym. 2003). *F. columnare* -bakteerin aiheuttamaa columnaris-tautia esiintyy puolestaan veden lämpötilan ollessa yli 18 °C (Pulkkinen ym. 2010). Columnaris-tautia havaitaan Suomessa kalanviljelylaitoksilla varsinkin loppukesällä, jolloin viljelylaitoksien vesien lämpötilat kohoavat usein 26 °C:een (Suomalainen ym. 2006a).

F. columnare -bakteerin aiheuttama columnaris-tauti on yleistynyt Suomessa kalanviljelylaitoksilla vuosikymmenten aikana (Pulkkinen ym. 2010). Tästä syystä *F. columnare* -bakteerin tutkiminen on tärkeää. Tutkimus on tärkeää myös siksi, että *F. columnare* -bakteerin isäntälajeista kirjolohi on Suomessa selkeästi eniten kasvatettu kalalaji: esimerkiksi vuonna 2018 kasvatetuista ruokakaloista kirjolohen osuus oli yli 90 % (Vesiviljely 2018).

1.1 Columnaris-tauti

Columnaris-tautia esiintyy maailmanlaajuisesti ja se aiheuttaa merkittäviä taloudellisia menetyksiä (Wagner ym. 2002, Pulkkinen ym. 2010, Peterman ja Posadas 2019). Ensimmäisen kerran *F. columnare* -bakteerista kirjattiin havaintoja Mississippijoesta vuonna 1922 (Davis 1922). Vastaavasti ensimmäinen havainto columnaris-taudista tehtiin Suomessa vuonna 1984 (Pulkkinen ym. 2010). Havainnot yleistyivät Suomessa 1990-luvulla, ja columnaris-taudista tuli yksi keskeisistä makean veden kalojen taudeista (Pulkkinen ym. 2010).

Columnaris-tauti on akuutti tai krooninen (Declercq ym. 2013). Taudin akuuttia muotoa esiintyy erityisesti nuorilla kalayksilöillä ja kudosaauriot kohdistuvat pääosin kiduksiin. Kroonista muotoa esiintyy aikuisilla kalayksilöillä. Siinä oireina ovat kidusaaurioiden lisäksi myös eroosiot evissä ja haavaumat ihossa. Lisäksi oireet ilmenevät akuuttia muotoa hitaammin (Declercq ym. 2013). Hoitamattomana columnaris-tauti johtaa jopa 100 % kuolleisuuteen viljely-yksiköissä (Suomalainen ym. 2005a). Kalanviljely-ympäristön on arveltu suosivan erityisesti taudin akuuttia muotoa eli taudinaiheuttamiskyvyltään vahvempia ja isäntänsä nopeammin tappavia bakteerikantoja (Pulkkinen ym. 2010).

Kuparisulfaatti ja kaliumpermanganaatti vähentävät *F. columnare* -bakteerin aiheuttamia kalakuolemia (Darwish ym. 2009, Darwish ym. 2012). Suolapitoiset ja happamat kylvyt auttavat myös *F. columnare* -bakteerin kasvun ehkäisyssä

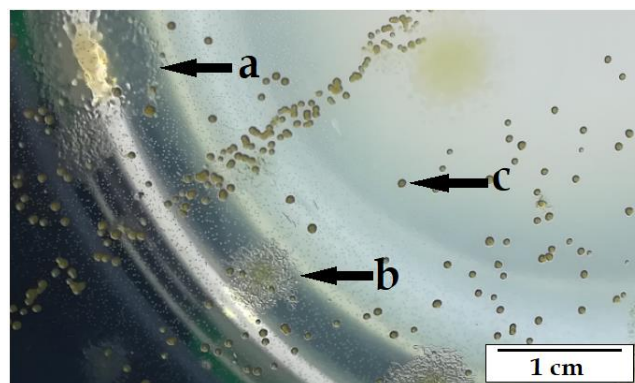
(Suomalainen ym. 2005b, Suomalainen ym. 2006b). Taudin hoitoon käytetään kuitenkin yleisimmin antibiootteja, ja esimerkiksi Suomessa oksitetrazykliiniä käytetään taudin pääasiallisena hoitokeinona (Pulkkinen ym. 2010). Antibioottien käyttöön liittyy riski bakteerien antibioottiresistenttiyden kehittymisestä ja yleistymisestä. Suomessa *F. columnare* -bakteerin oksitetrazykliinille resistentteistä kannoista ei ole raportoitu (Pulkkinen ym. 2010). Bakteerista esiintyy kuitenkin tietyille antibiooteille vastustuskykyisiä kantoja (Suomalainen ym. 2006b). Suomesta eristetyistä kannoista Suomalainen ym. (2006a) havaitsivat, että ne eivät olleet herkkiä neomysiinille eikä polymyxin B:lle. Yhdysvalloissa on puolestaan löydetty oksitetrazykliinille ja kanamysiinille resistenttejä kantoja (Mohammed ja Arias 2014).

1.2 *Flavobacterium columnare*

F. columnare on Gram-negatiivinen sauvabakteeri, joka kuuluu *Flavobacteriaceae*-heimoon (Declercq ym. 2013). Genomin koko vaihtelee bakteerikannan mukaan. Esimerkiksi B185-kannalla genomi on noin 3 261 kiloemäsparin mittainen ja ATCC 49512 -kannalla noin 3 162 kiloemäsparin mittainen (Tekedar ym. 2012, Ravantti ym. 2019). *F. columnare* -bakteeri jaetaan genomovareihin I, I/II, II, II-A, II-B ja III tarkastelemalla eroja niiden 16S rDNA:n katkoskirjossa (engl. restriction fragment length polymorphism, RFLP) ja DNA:n hybridisaatiossa (Triyanto ja Wakabayashi 1999, Olivares-Fuster ym. 2007, LaFrentz ym. 2014, García ym. 2018). Kantojen monimuotoisuutta voidaan tarkastella lisäksi ribosomaalisen RNA:n geenien välisten alueiden eroilla (engl. ribosomal intergenic spacer analysis, RISA). Tällöin genomovariin I kuuluvat Suomessa eristetyt kannat jakautuvat geneettisiin ryhmiin A-H (Suomalainen ym. 2006b).

Bakteerit kykenevät muodostamaan yhdessä solunulkoisten polymeeristen aineiden (engl. extracellular polymeric substance, EPS) kanssa järjestäytyneen

bakteeriyhdyskunnan eli biofilmin. Biofilmien fenotyypit vaihtelevat (Martino 2018). Erilaisten pesäkemorfologioiden ilmeneminen johtuu ympäristöolojen muutoksen aiheuttamasta valintapaineesta, minkä seurauksena bakteerin ulkokalvon rakenne muuttuu (Declercq ym. 2013). Pesäkemorfologian muutos on seurausta mutaatiosta tai ilman mutaatiota tapahtuvasta geenien toiminnan spontaanista säätelystä (Henderson ym. 1999). Näiden seurauksena esimerkiksi bakteerin pinnan proteiinien tai lipopolysakkaridien ilmeneminen muuttuu (Henderson ym. 1999). *F. columnare* -bakteerin kykyä muodostaa eri pesäkemorfologioita voidaan tarkastella kasvattamalla riittävän laimeaa bakteerikasvatusta maljalla Shieh-agar -elatusaineessa (Kunttu ym. 2009). *F. columnare* -bakteeri esiintyy kolmena eri pesäkemuotona, joita ovat ritsoidi (z), karkea (r) ja pehmeä (s). Ominaispiirteiltään z-pesäketyyppi muistuttaa rihmastoja ja r-pesäketyyppi on ympyränmuotoinen sekä selkeärajainen. S-pesäketyyppi on puolestaan pehmeän näköinen, epäsäännöllisen muotoinen ja se mukautuu enemmän alustansa (Kuva 1). Laboratorio-olosuhteissa pesäkemorfologian muodostumiseen vaikuttaa ympäristöolojen muuttuminen, kuten ravinteiden vähäisyys (Kunttu ym. 2009, Sundberg ym. 2014).



Kuva 1. *Flavobacterium columnare* -bakteerin muodostamat kolme eri pesäkemorfologiaa. Shieh-agar -elatusaineessa muodostuvat pesäkemorfologiat a) pehmeä (s), b) ritsoidi (z) ja c) karkea (r).

1.3 *Flavobacterium columnare* -bakteerin taudinaiheuttamiskyky

F. columnare -kantojen taudinaiheuttamiskyvyissä on eroja (Kunttu ym. 2009, Laanto ym. 2012). Esimerkiksi tässä työssä käytettävien FCO-F2- ja FCO-F9-kantojen taudinaiheuttamiskyvyt ovat vahvoja, joskin FCO-F2-kanta aiheuttaa kuolleisuutta nopeammin (A. Runtuvuori-Salmela ym. julkaisematon). *F. columnare* -bakteerin kalalle aiheuttamiin vaurioihin vaikuttaa bakteerin erittämä sidekudosta vaurioittava kondroitiini AC lyaasi-entsyymi (Suomalainen ym. 2006a, Kunttu ym. 2011). AC lyaasi-aktiivisuus vaikuttaa eri *F. columnare* -kantojen taudinaiheuttamiskykyyn. Kyseinen aktiivisuus on myös lämpötilasta riippuvainen ja on voimakkaampaa 25 °C:ssa kuin 20 °C:ssa (Suomalainen ym. 2006a). Bakterikannan muodostamien eri pesäketyyppien taudinaiheuttamiskyvyissä on myös eroja (Kunttu ym. 2009, Laanto ym. 2014). Taudinaiheuttamiskyvyiltään z-pesäketyyppiä muodostava bakteeri on vahvin, kun taas r- ja s-pesäketyyppiä muodostavat bakteerit ovat selkeästi heikompia (Laanto ym. 2012, Laanto ym. 2014, Sundberg ym. 2014). Saman kannan z-pesäketyyppiä muodostavien bakteerien AC lyaasi-aktiivisuus on myös voimakkainta (Kunttu ym. 2011). Myös Zhangin ym. (2014) mukaan z-pesäketyyppi on elinkelpoisin, sillä taudinaiheuttamiskykynsä lisäksi sen kasvunopeus on suurinta ja populaatiokoko kasvaa suurimmaksi.

F. columnare -bakteerin taudinaiheuttamiskykyyn vaikuttaa Laannon ym. (2014) tutkimuksen mukaan pesäkkeiden järjestäytynyt solurakenne. Z-pesäkkeessä solut ovat sijoittuneet järjestäytyneesti, kun taas r-pesäkkeessä samanlainen järjestäytynyt rakenne puuttuu. Solujen järjestäytynyt sijoittuminen saattaa liittyä bakteerin liikkumiskykyyn, jonka on puolestaan arvioitu liittyvän taudinaiheuttamiskykyyn (Laanto ym. 2014). Z-pesäketyyppiä muodostavien bakteerien kiinnittyminen on osittaista ja ne kykenevät liikkumaan alustassaan. R-pesäketyyppiä muodostavat bakteerit kiinnittyvät alustaansa tiukemmin ja niiden

liikkumiskyky on hyvin pientä. S-pesäketyyppiä muodostavat bakteerit kiinnittyvät alustaan puolestaan heikosti (Kunttu ym. 2009, Laanto ym. 2014). Bakterin kiinnittymiskykyyn vaikuttaa myös lämpötila: 20 °C:een asti z-pesäketyyppiä muodostavien bakteerien kiinnittyminen voimistuu (Kunttu ym. 2011). Columnaris-tautia havaitaan Suomessa viljelylaitoksilla erityisesti silloin, kun veden lämpötila on yli 20 °C (Suomalainen ym. 2006a). Taudinaiheuttamiskykyyn on arvioitu liittyvän lisäksi ulkokalvon vesikkelit ja bakterin erittämät proteiinit OmpA ja SprF sekä 13 kilodaltonin kokoinen proteiini, jota vain z-pesäketyyppiä muodostavan bakterin on havaittu tuottavan (Laanto ym. 2014).

F. columnare -bakteeri kykenee säilymään vähäravinteisissa olosuhteissa pitkiäkin aikoja, mutta bakterin taudinaiheuttamiskyky tämän seurauksena heikentyy (Arias ym. 2012). Sundberg ym. (2014) havaitsivat, että isäntäeliön poissaolo ja ravinteiden vähäisyys aiheuttivat bakteripopulaatiossa r- ja s-pesäketyyppiä muodostavien bakteerien osuuden kasvua. Lisäksi z-pesäketyyppiä muodostavien bakteerien taudinaiheuttamiskyky voimistui (Sundberg ym. 2014).

1.4 Bakteriofagit eli faagit

Faagit ovat bakteereja infektoivia viruksia ja ne hyödyntävät bakterin rakenteita replikoituakseen. Frederick Twort raportoi havaintoja faageista vuonna 1915. Myöhemmin, vuonna 1917, Felix d'Herelle onnistui ensimmäisenä eristämään faageja. (Salmond ja Fineran 2015). Faagit ovat biosfäärin runsaslukuisin ja monimuotoisin ryhmä. Ravinteiden kierrossa faagit ovat todennäköisesti tärkeässä asemassa, sillä ne vaikuttavat faagin ja bakterin rinnakkaisevoluution kautta ympäristön muihin mikrobeihin (Gómez ja Buckling 2011). Faagien määrä vaihtelee ekosysteemittäin ja kausittain (Bergh ym. 1989, Dion ym. 2020). On arvioitu, että luonnonvesissä faageja on 10^8 viruspartikkelia millilitrassa, ja biosfäärissä

puolestaan 10^{31} (Bergh ym. 1989, Dion ym. 2020). Faageja on monenlaisia: proteiinirakenne eli kapsidi on hännätön filamenttinen, polyhedraalinen, pleomorfinen tai hännällinen sekä genomi on joko yksi- tai kaksijuosteista RNA:ta tai DNA:ta (Dion ym. 2020). Faageilla voi olla myös lipidikalvo joko kapsidin sisällä tai ulkopuolella, tai lipidikalvo ilman kapsidia (Kivelä ym. 2002, Dion ym. 2020). Useimpien tähän asti löydettyjen faagien genomi on kaksijuosteista DNA:ta, jota ympäröivä kapsidi voi olla hännällinen (Dion ym. 2020). Tämän kaltaiset faagit kuuluvat *Caudovirales*-lahkoon (Dion ym. 2020). *F. columnare* -bakteerin monet eristetyt ja karakterisoidut faagit kuuluvat *Caudovirales*-lahkon *Myoviridae* ja *Podoviridae*-heimoihin, ja kapsidin koot ovat useimmiten 50–70 nm (Laanto ym. 2011). *F. columnare* -bakteerin faageista esimerkiksi tässä työssä käytettävät FCOV-F13, FCOV-F37 ja FCL-2 kuuluvat *Myoviridae*-heimoon (Laanto ym. 2011, A. Runtuvuori-Salmela ym. julkaisematon). Kyseisten flavofaagien genomit ovat 47–49 kiloemäsparin mittaisia (Laanto ym. 2015, A. Runtuvuori-Salmela ym. julkaisematon).

Faagit jaetaan lyyttisiin ja lysogeenisiin eli temperaatteihin niiden elinkierron perusteella. Lyyttiset faagit tuhoavat isäntänsä välittömästi infektion seurauksena, kun uusien viruspartikkelien tuoton seurauksena isäntäbakteeri hajoaa. Tuotetut virionit vapautuvat ympäristöön infektoimaan uusia isäntäbakteerisoluja. Näitä uusia vapaita faagipartikkeleita kutsutaan progeny-faageiksi (Howard-Varona ym. 2017). Lyyttinen elinkierto nähdään agaroosimaljalla plakkeina eli bakteerikasvustosta kirkkaina ns. syötyinä alueina. Plakit ovat kooltaan ja ulkonäöltään erilaisia faagista riippuen (Jurczak-Kurek ym. 2016). Lyyttisen elinkierron lisäksi temperaatit faagit hyödyntävät lysogeenistä elinkiertoa integroitumalla osaksi isäntänsä genomia. Tällöin uusia viruspartikkeleja ei tuoteta (Howard-Varona ym. 2017). Faagi voi päätyä lysogeeniseen elinkiertoon esimerkiksi silloin, kun faagi-infektion seurauksena bakteerista vapautuneiden peptidien konsentraatio on ympäristössä tarpeeksi suuri (Erez ym. 2017). Bakteerin

genomiin integroitunutta faagigenomia kutsutaan profaagiksi. Profaagi lisääntyy bakteerin genomien mukana tuhoamatta isäntäänsä, kunnes esimerkiksi DNA-vaurion seurauksena faagin lyytinen elinkierto aktivoituu (Howard-Varona ym. 2017). Epäedullisissa ympäristöolosuhteissa profaagi voi jäädä isäntäänsä odottamaan parempia replikaatio-olosuhteita. Profaagit ovat bakteerien genomissa yleisiä ja voivat vaikuttaa isäntäbakteerinsa fenotyyppiin sekä lisätä sen elinkelpoisuutta (Fortier ja Sekulovic 2013). Profaagi voi myös lisätä bakteerin taudinaiheuttamiskykyä (Freeman 1951, Yamaguchi ym. 2000).

1.5 Bakteerien puolustautuminen faagi-infektioilta

Bakteerit ja niiden faagit aiheuttavat jatkuvan kilpavarustelun seurauksena toisilleen rinnakkaisevoluutiota, jossa ne mutaatioiden kautta vuorotellen peittoavat toistensa ominaisuuksia: bakteeri kehittyy resistentiksi ja faagi kyseistä bakteeria infektoivaksi (Buckling ja Rainey 2002). Bakteerin ja faagin rinnakkaisevoluutio suosii laboratorio-olosuhteissa usein bakteerin resistenssi voimistumista ajan saatossa, kun taas luonnossa valinta saattaa suosia bakteerin voimakkaampaa resistenssiä sen hetkistä faagia vastaan (Gómez ja Buckling 2011). Bakteeri voi estää faagi-infektion etenemisen useassa eri vaiheessa erilaisilla synnynnäisillä ja hankituilla puolustuskeinoilla (van Houte ym. 2016).

Faagin täytyy kyetä kiinnittymään isäntäbakteerinsa reseptoriin, jotta se pystyy infektoimaan bakteerin. Hännälliset faagit käyttävät reseptoreinaan esimerkiksi lipopolysakkarideja, flagellan proteiineja ja B12-vitamiinin ottamiseen tarvittavaa reseptoria (Stone ym. 2019). Bakteeri estää faagin kiinnittymisen peittämällä, muokkaamalla tai poistamalla faagin tarvitsemää reseptoria (Tanji ym. 2003, Stone ym. 2019). Reseptorin peittämisen faagi estää puolestaan hajottamalla reseptoria peittävän hiilihydraatin polysakkaridi depolymeraasi -entsyymillä (Stone ym. 2019). Jos faagi kiinnittyy reseptoriin, voi bakteerissa mahdollisesti jo entuudestaan

oleva profaagi estää faagin genomien injektioonin ja replikaation eli superinfektion (engl. superinfection exclusion). Mikäli faagi injektioi genominsa bakteeriin, voi bakteeri tuhota vieraan metyloimattoman faagigenomin restriktiomuokkaus-systeemin (engl. restriction-modification) avulla. Tämä puolustusmekanismi perustuu erilaisiin restriktioendonukleaaseihin (RE), jotka hajottavat metyloimattoman tai liian eri tavalla metyloidun DNA:n ja metyyli transferaaseihin (MT), jotka suojaavat bakteerin omaa genomia metyloimalla sen DNA:ta (van Houte ym. 2016). Faagi voi estää sen genomiin kohdistuvaa RE:n toimintaa useilla eri tavoilla. Faagigenomi voidaan suojata metyloimalla se joko bakteerin tai faagin tuottamalla MT:lla (Samson ym. 2013). Genomi voidaan myös glykosyloidia (Bickle ja Krüger 1993). Faagi voi peittää RE:n kohteena olevaa genomien restriktiokohtaa, vähentää niiden määrää tai pidentää niiden etäisyyttä toisistaan. Faagi voi lisäksi tuottaa proteiinia, joka kiinnittymällä RE:iin ja MT:iin estää niiden toimintaa, tai vastaavasti tuottaa proteiineja, jotka joko aktivoivat MT:a tai inaktivoivat RE:a (Samson ym. 2013). Bakteeri tunnistaa vieraan genomien myös erilaisia argonaute-proteiineja käyttämällä. Bakteeri voi faagi-infektion seurauksena lisäksi käynnistää solukuoleman ympärillä olevien bakteerisolujen suojelemiseksi (van Houte ym. 2016).

Bakteereilla on kyky kehittää spesifinen puolustus aikaisemmin kohtaamiaan faageja vastaan. Tämän mahdollistavat bakteerin genomissa tasaisin välimatkoin esiintyvät lyhyet toistosekvenssit eli CRISPR-lokus (engl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Tähän mekanismiin tarvitaan myös erilaisia Cas-proteiineja (engl. CRISPR associated proteins). CRISPR-Cas-systeemissä osa faagin DNA-genomista liitetään CRISPR-lokukseen. Bakteeri tunnistaa aikaisemmin kohtamansa faagigenomien CRISPR-lokuksesta myöhemmin ilmennetyn RNA-sekvenssin ja Cas-proteiinin kompleksilla, jolla faagigenomi katkaistaan (Amitai ja Sorek 2016).

1.6 Faagiterapia

Antibioottien käyttöön liittyvien ongelmien vuoksi vaihtoehtoiset bakteeri-infektioiden hoitomuodot ja niiden tutkimukset ovat saaneet yhä enemmän huomiota. Yksi näistä on faagiterapia. Faagiterapialla tarkoitetaan erilaisten bakteeri-infektioiden hoitoa ja ehkäisyä faageja hyödyntämällä (Romero-Calle ym. 2019). Faagiterapian etu antibiootteihin verrattuna perustuu muun muassa lyyttisten faagien kykyyn monistua isäntäbakteerin läsnä ollessa, antibiootteja suurempaan spesifisyyteen vain tiettyyn bakteerilajiin ja kykyyn kehittyä infektoimaan faagiresistenttiä bakteeria (Carlton 1999).

Faagien terapeuttiseen ominaisuuteen vaikuttaa niiden tehokkuus infektoida bakteeria tai tehokkuus heikentää bakteerin taudinaiheuttamiskykyä faagiresistenttiyden seurauksena (Laanto ym. 2012, Merikanto ym. 2018). Faagin infektiivisyyden ja taudinaiheuttamiskyvyn heikentämisen tulee olla tarpeeksi tehokasta sekä kyvyn infektoida lajin eri bakteerikantoja on hyvä olla suhteellisen laaja (Merikanto ym. 2018, Hyman 2019). Faagiterapiaan sopivan faagin tärkeitä ominaisuuksia ovat faagin lyyttisyyden lisäksi se, että faagi ei sisällä lysogeeniseen elinkiertoon viittaavia tai bakteerin toksisia ominaisuuksia lisääviä geenejä (Hyman 2019). Faagiterapiassa yhtenä menetelmä on faagin mutatoiminen eli evolvoiminen. Faagin evolvoiminen perustuu siihen, että bakteeria infektoimattomasta faagista kehitetään laboratoriossa rinnakkaisevoluution periaatteella bakteeria infektoiva (Pirnay ym. 2012). Faagin ominaisuuksiin voidaan vaikuttaa myös tekemällä rekombinantti-faagi (Lin ym. 2012). Lin ym. (2012) osoittivat, että yhdistämällä kahden faagin ominaisuuksia voidaan laajentaa faagin isäntäkirjoa. Faagi-bakteerisuhteen tulee myös olla sopiva bakteerin mahdollisimman tehokkaaseen infektointiin ja sitä voidaan kuvata infektion monikerralla (engl. multiplicity of infection, MOI). Sopiva MOI-arvo on bakteerista ja faagista riippuvainen. Esimerkiksi Rajnovic ym. (2019) totesivat tutkimuksessaan, ettei T4-faagi

heikentänyt *Escherichia coli* -bakteerin kasvua, kun MOI-arvo oli 0,0001 tai alle. Faagi puolestaan esti bakteerin kasvun kokonaan MOI-arvon ollessa 1 tai suurempi (Rajnovic ym. 2019). *Aeromonas salmonicida* -bakteeria käyttämällä Chen ym. (2018) havaitsivat puolestaan bakteeria vähäisemmän faagien määrän olevan hieman tehokkaampaa bakteerin infektoimiseksi perustuen MOI-arvojen 10; 1; 0,1 ja 0,01 vertailuun.

Faagiterapiaan liittyy ongelmia ja haasteita. Faagi lisää bakteerin mutaationopeutta, ja faagiterapian toimivuuden yhtenä haasteena onkin bakteerien kehittyminen faagiresistenteiksi (Pal ym. 2007, Pirnay ym. 2012). Toisaalta faagiresistenttien bakteerien taudinaiheuttamiskyky saattaa olla heikentynyt (Flyg ym. 1980, Smith ja Huggins 1983, Laanto ym. 2012). Esimerkiksi *F. columnare* -bakteerin faagiresistentin r-pesäketyyppiä muodostavan bakteerin taudinaiheuttamiskyky on z-pesäketyyppiä muodostavaa bakteeria heikompi (Laanto ym. 2012, Zhang ym. 2014). Faagiresistenttien bakteerien kehittymistä voidaan mahdollisesti hidastaa useampaa eri faagia eli faagikoktailia käyttämällä (Chen ym. 2018). Faagikoktailin kyky hidastaa resistenssin kehittymistä perustuu siihen, että faagit infektoivat bakteeria eri reseptorien kautta. Näiden molempien reseptorien muuttaminen mutaatioiden kautta on hitaampaa kuin yhden reseptorin muuttaminen (Tanji ym. 2003). Faagikoktaili ei kuitenkaan estä faagiresistenttien bakteerien kehittymistä (Smith ja Huggins 1983, Tanji ym. 2003, Costa ym. 2019).

Monesti usea eri bakteerikanta aiheuttaa puhjetun taudin (Carlton 1999), kun taas faagit ovat isäntäspesifisiä jopa tiettyä geneettistä ryhmää kohtaan. Esimerkiksi *F. columnare* -bakteerin faageille on ominaista spesifisyys tiettyyn geneettiseen ryhmään (A-H) kuuluviin kantoihin (Laanto ym. 2011). Bakteeri-infektioiden hoitamisessa useampaa kuin yhtä faagia käyttämällä tavoitteena on myös se, että faagikoktaili kykenisi infektoimaan kohdebakteerin eri kantoja. Toisin sanoen faagikoktailin käyttö perustuu yksittäistä faagia laajempaan kykyyn infektoida eri

genotyypin bakteereja eli laajempaan isäntäkirjoon (Chan ym. 2013). Faagikoktailissa usean faagin ja laajan isäntäkirjon hyödyntäminen ei aina kuitenkaan ole paras keino. Usean faagin koktaili nimittäin antaa bakteerille mahdollisuuden kehittyä faagiresistentiksi kyseisille faageille (Krylov ym. 2013). Resistenttiyden kehittymisen takia isäntäkirjoltaan laajoja faageja tulisi Krylovin ym. (2013) mukaan erityisesti käyttää vain hankalimmissa tapauksissa. Tiettyjen bakteerikantojen aiheuttamien infektioiden hoidossa olisi järkevämpää käyttää vain näitä kantoja infektoivia, yhtä tai mahdollisimman vähän eri faageja, joiden isäntäkirjo olisi mahdollisimman kapea (Krylov ym. 2013).

Bakteerilajin infektoimiseksi useamman faagin käyttäminen samanaikaisesti voi olla tehokkaampaa, kuin yhden faagin käyttäminen (Chen ym. 2018, Costa ym. 2019). Kuitenkin faagiterapia yhdellä faagilla voi toimia bakteeri-infektion hoitona. Debarbieuxin ym. (2010) tutkimuksessa faagi ehkäisi keuhkoinfektiota ja siitä johtuvaa kuolleisuutta sekä Jeon ym. (2019) havaitsivat faagin vähentävän karbapeneemeille resistentin *A. baumannii* -bakteerin aiheuttamaa kuolleisuutta. Myös *F. columnare* -bakteerin aiheuttamat kalakuolemat vähenevät faagin vaikutuksesta laboratorio-olosuhteissa (Prasad ym. 2011, Laanto ym. 2015). *F. columnare* -bakteerin aiheuttamien kalakuolemien vähentämiseksi voidaan hyödyntää faagikylpyjä, rokottaa faagia kalaan, lisätä faagia veteen tai kalarehuun (Prasad ym. 2011, Laanto ym. 2015). Faagin vaikutuksesta *F. columnare* -bakteeriin Laanto ym. (2012) havaitsivat, että bakteerin muodostama pesäkemorfologia vaihtuu z-pesäketyypistä r-pesäketyypiin. Ilmentyneiden r-pesäketyypien faagiresistenttiys heikensi bakteerin taudinaiheuttamiskykyä, joka oli z-pesäketyypistä selkeästi heikompi. Faagiresistentille r-pesäketyypille altistettujen kalojen kuolleisuus on siis vähäisempää (Laanto ym. 2012).

Faagiterapian ja antibioottien käyttö yhdessä on mahdollisesti tehokkaampaa, kuin vain toisen hoitokeinon käyttäminen (Sousa ja Rocha 2019). Esimerkiksi monille

lääkkeille vastustuskykyisellä *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerilla Chan ym. (2016) osoittivat, että kun antibiootille resistenttiä bakteeripopulaatiota altistettiin OMKO1-faagille, pystyttiin faagiresistenttejä bakteereja jälleen tuhoamaan antibiootilla. Tämä perustuu siihen, että faagin aiheuttama valintapaine toimii bakteerille geneettisenä poiskytkentänä karsimalla osan antibioottiresistenttiyteen liittyvistä ominaisuuksista. Faagin avulla voidaan siis vaikuttaa bakteerin antibioottiresistenttiyteen (Chan ym. 2016). Bakteerien kykyyn kehittyä sekä faagietä antibioottiresistenteiksi vaikuttaa lisäksi se, kuinka hyvin faagi tai antibiootti levittäytyy ympäristöön (Sousa ja Rocha 2019).

1.7 Tutkielman tavoitteet

Tämä työ tehtiin, koska *F. columnare* -bakteerin kaloille aiheuttamalle columnaristaudille tarvitaan tehokkaampia hoito- ja ennaltaehkäisykeinoja. Siihen faagit ovat lupaava vaihtoehto. Työ on osa BONUS FLAVOPHAGE -projektia, jossa tavoitteena on kehittää taloudellinen ja kestävä kehitystä suosiva menetelmä *F. columnare* ja *F. psychrophilum* -bakteerien kirjolohelle aiheuttamien infektioiden ehkäisemiseksi ja hoitamiseksi faageja hyödyntämällä.

Tutkimuskysymyksinä olivat (1) miten faagit vaikuttavat bakteerien taudinaiheuttamiskykyyn liittyvään pesäkemorfologiaan ja faagiresistenssin kehittymiseen, (2) voidaanko bakteeria infektoida yhtä faagia tehokkaammin faagikoktaililla, joka sisältää yhtä tai kahta faagityyppiä ja (3) voidaanko faageja evolvoida infektoimaan faagiresistenttejä bakteereja. Vuorovaikutuksien selvittämiseksi työhön valittiin kaksi *F. columnare* -bakteerikantaa ja molemmille kaksi lyyttistä faagia. Yhden bakteerikannan nestekasvatukseen lisättiin joko yhtä faagia tai kahden faagin faagikoktailia, joka sisälsi joko yhtä tai kahta faagityyppiä. Luonnonmukaisia olosuhteita jäljiteltiin käyttämällä autoklavoitua Jyväsjärven

vettä. Tätä työtä vastaavaa tutkimusta *F. columnare* -bakteerin ja sen faagien vuorovaikutuksesta järvisedessä ei ole aikaisemmin raportoitu.

Hypoteeseina olivat, että (1) faagille altistumisen seurauksena faagiresistenttien bakteerien määrä kasvaa ja taudinaiheuttamiskykyisimpien z-pesäketyyppiä muodostavien bakteerien määrä vähenee, ja (2) kaksi faagia infektoivat bakteeria tehokkaammin kuin yksi faagi. Tutkielman tavoitteena oli tuoda uutta tietoa *F. columnare* -bakteerin ja sen faagien vuorovaikutuksista. Työn tulokset auttavat faagiterapian kehittämisessä.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Bakteerikannat ja bakteriofagit

Työssä käytetyt *F. columnare* -bakteerikannat FCO-F2 (C2) ja FCO-F9 (C9) sekä lyyttiset faagit FCOV-F13 (F13), FCOV-F37 (F37) ja FCL-2 on aikaisemmin eristetty eri puolilta Suomea sijaitsevien kalanviljelylaitoksien kala-altaiden vesistä (Taulukko 1). Faagien eristysäntinä olleita *F. columnare* -kantoja B185 ja B537 käytettiin työn alkuvaiheessa faagilysaattien tuottamiseen ja tiitterien määrittämiseen.

Taulukko 1. Työn *Flavobacterium columnare* -bakteerit ja niiden faagit, jotka on aikaisemmin eristetty eri puolilta Suomea sijaitsevilta kalanviljelylaitoksilta.

Bakteeri-kanta	Faagi	Eristys-laitos	Eristys-vuosi	Julkaisu
C2		1	2017	A. Runtuvuori-Salmela ym. julkaisematon
C9		2	2017	A. Runtuvuori-Salmela ym. julkaisematon
B185		2	2008	Laanto ym. 2011
B537		1	2013	Laanto ym. 2017
	F13	1	2017	A. Runtuvuori-Salmela ym. julkaisematon
	F37	3	2017	A. Runtuvuori-Salmela ym. julkaisematon
	FCL-2	2	2009	Laanto ym. 2011

Ennen kokeen alkua tarkistettiin työssä käytettävien faagien F13, F37 ja FCL-2 infektiivisyys bakteereja C2 ja C9 vastaan (Taulukko 2).

Taulukko 2. Työssä käytettyjen faagien F13, F37 ja FCL-2 infektiivisyys *Flavobacterium columnare* -bakteerikantoja C2 ja C9 vastaan.

Bakteerikanta (geneettinen ryhmä)	Faagi (eristysisäntä ja sen geneettinen ryhmä)		
	F13 (B185, G)	F37 (B537, C)	FCL-2 (B185, G)
C2 (C)	infektio	infektio	ei vaikutusta
C9 (G)	infektio	ei vaikutusta, välillä bakteerikasvun inhibitio	infektio

2.2 Bakteerien kasvatus Shieh-elatusaineessa ja bakteeritiheyden määrittäminen

Bakteerien kasvattamiseen käytettiin Shieh-elatusaineita (Song ym. 1988), joiden (Shieh-liemi, Shieh-pehmytagar ja Shieh-agar) valmistusohjeet ovat liitteessä (Liite 1). Bakteerien kasvatus aloitettiin ottamalla näytettä -80 °C:sta kasvamaan 4 ml:aan Shieh-lientä ja inkuboimalla 25 °C:ssa tasoravistelijassa 120 kierrosta minuutissa (engl. rounds per minute, rpm) 24–48 tuntia bakteerin kasvunopeudesta riippuen.

Kaikki nestekasvatukset inkuboitiin aina 25 °C:ssa tasoravistelijassa 120 rpm. Bakteerit tuoreistettiin Shieh-liemeen 1:10 ja inkuboitiin noin 24 tuntia. Tämän jälkeen bakteerikonsentraatio oli tarpeeksi suuri käytettäväksi koekäsittelyihin ja Shieh-agarmaljalle maljaamiseen. Shieh-agar -maljauksissa tuoreistettua bakteerikasvatusta sekoitettiin 47 °C:n Shieh-pehmytagariin 1:10.

Bakteerikonsentraatiot määritettiin C2:n ja C9:n -kasvatuksista kokeen alkamispäivänä pesäkkeitä muodostavien yksiköiden perusteella millilitraa kohden (engl. colony-forming units per millilitre, CFU/ml). Tätä varten näytteiden optinen tiheys mitattiin aallonpituudella 595 nm 96-kuoppalevyllä ja 200 µl:n näytetilavuudessa mittauslaiteella Multiskan FC 357 (Thermo Fisher Scientific, Shanghai, Kiina). Optisen tiheyden perusteella bakteeritiheydet arvioitiin aikaisemmin määritetyn taulukon mukaisesti (Liite 2). Määrityksen ajaksi kasvatukset laitettiin 7 °C:een noin 30 minuutiksi bakteerien kasvun estämiseksi. Mittaustulosten perusteella bakteerit laimennettiin Shieh-liemeen. Bakteerilaimennoksien lopulliset pitoisuudet olivat 5×10^5 CFU/ml.

2.3 Faagilysaattien tuottaminen

Aikaisemmin valmistetuista faagilysaateista FCL-2 ja F37 tuotettiin tässä työssä käytettävät lysaatit. Tuoreistettua eristysisäntäbakteeria (Taulukko 2) sekoitettiin 47 °C:n Shieh-pehmytagariin 1:10. Seokseen lisättiin laimentamatonta tai 10-kertaisesti laimennettua faagilysaattia 1:33 ja siirrostettiin Shieh-agarmaljalle. Maljoja inkuboitiin 25 °C:ssa 2 vrk, minkä jälkeen lähes konfluenteille maljoille lisättiin 5 ml Shieh-lientä ja inkuboitiin yön yli 7 °C:ssa tasoravistelijassa 90 rpm. Lysaatti kerättiin ja suodatettiin 0,45 µm kalvallisilla ruiskusuodattimilla (Supor®, Pall Life Sciences, Sàrl Fribourg, Sveitsi). Faagilysaatit säilytettiin 7 °C:ssa.

2.4 Faagilysaattien tiittereiden määrittäminen

Aikaisemmin valmistetun faagilysaatin F13 tiitteri tarkistettiin, ja koetta varten tuotettujen F37- ja FCL-2-faagilysaattien tiitterit määritettiin faagien eristysisännillä (Taulukko 2). Tiittereiden määrittämiseksi kasvatusmaljalle valettua bakteeria inkuboitiin huoneenlämmössä noin tunti. Kasvatusmaljat olivat halkaisijaltaan joko 5 cm, 9 cm tai 14 cm, joissa bakteeri-pehmytagar (1:10) seoksen lopputilavuus oli joko 2,2 ml, 3,3 ml tai 5,5 ml. Tippatitrauksessa faagilysaatin 10-kertaisia laimennoksia lisättiin maljalle 10 µl:n tippoina, minkä jälkeen maljoja inkuboitiin 25 °C:ssa kaksi vrk. Tiitterit määritettiin laskemalla plakkeja muodostavien yksiköiden määrä millilitraa kohden (engl. plaque-forming units per millilitre, PFU/ml). Tiittereiden perusteella faagilysaateista tehtiin koetta edeltävänä päivänä 5×10^5 PFU/ml laimennokset Shieh-liemeen. Laimennokset säilytettiin 7 °C:ssa.

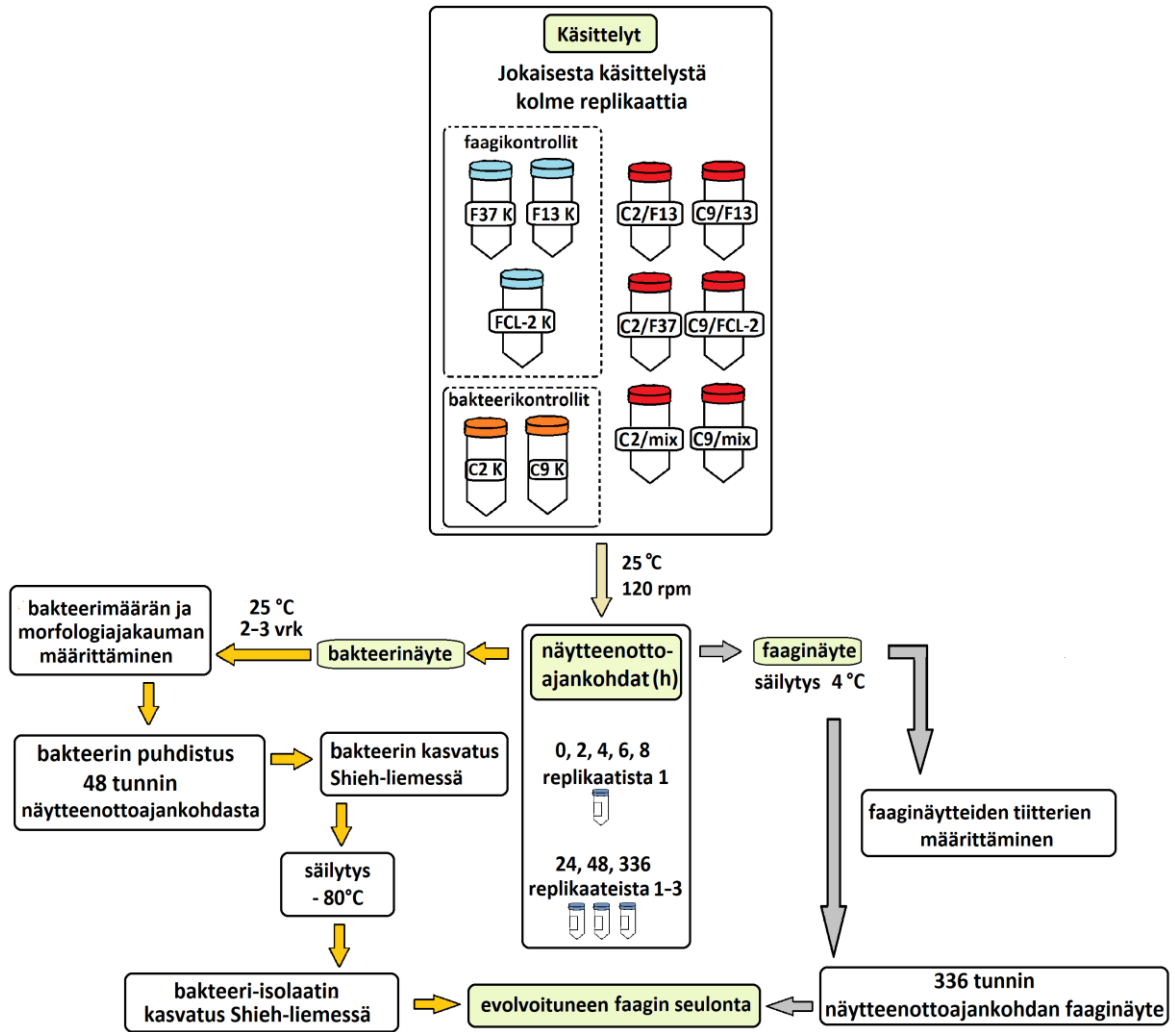
2.5 Käsittelyt ja koeasetelma

Käsittelyissä (Taulukko 3) käytettiin vettä Jyväskylän Jyväsjärvestä (62,23071°N 25,73894°E). Vesi oli kerätty yhden metrin syvyydestä (13.2.2018) ja autoklavoitu. Jyväsjärven vettä oli käsittelyissä 19,2 ml. Bakteritiheys oli 10^4 CFU/ml ja faagitiitteri oli 10^4 PFU/ml. Kahta faagia sisältävissä käsittelyissä yhden faagin pitoisuus oli puolet tästä eli 5×10^3 PFU/ml. MOI-arvo oli käsittelyissä siis 1. Bakterikontrolleissa faagin ja vastaavasti faagikontrolleissa bakteerin tilavuus korvattiin Shieh-liemellä. Käsittelyiden tilavuudet olivat 20 ml ja ne tehtiin 50 ml:n putkiin. Jokaisesta käsittelystä tehtiin kolme replikaattia. Käsittelyt pidettiin 25 °C:ssa tasoravistelijassa 120 rpm.

Taulukko 3. Käsittelyt sekä niissä oleva *F. columnare* -bakteerikanta ja faagit. K = kontrolli ja mix = käsittely, joka sisälsi kahta eri faagia.

Käsittely	Bakteerikanta	Faagi
C2 K	C2	
C2/F13	C2	F13
C2/F37	C2	F37
C2/mix	C2	F13 ja F37
C9 K	C9	
C9/F13	C9	F13
C9/FCL-2	C9	FCL-2
C9/mix	C9	F13 ja FCL-2
F13 K		F13
F37 K		F37
FCL-2 K		FCL-2

Käsittelyistä otettiin faagi- ja bakteerinäytteet 0, 2, 4, 6, 8, 24, 48 ja 336 tunnin kohdalla (Kuva 2). Faagi- ja bakteerinäytteet otettiin 0–8 tunnin kohdalla vain yhdestä replikaatista ja muina ajankohtina kaikista kolmesta replikaatista. Bakteerinäytteistä määritettiin bakteeritiheydet ja bakteeripesäkkeiden morfologiajakaumat (kohta 2.5). Myöhempiä analyyseja varten otettiin 48 tunnin kohdalla jokaisesta replikaatista kolme pesäkettä talteen eli yhteensä 72 pesäkettä (kohta 2.6). Faaginäytteistä määritettiin tiitterit (kohta 2.7), ja 336 tunnin kohdalla faaginäytteistä seulottiin evolvoituneita faageja testaamalla niiden infektointikyky 48 tunnin kohdalla eristettyjä faagiresistenttejä bakteereja vastaan (kohta 2.8.).



Kuva 2. Kaaviokuva koeasetelmasta. *F. columnare* -bakteerikannat olivat C2 ja C9. Faagit olivat F13, F37 ja FCL-2. C2-bakteerin käsittelyt sisälsivät joko faagia F13 (C2/F13), F37 (C2/F37) tai molempia (C2/mix). C9-bakteerin käsittelyt sisälsivät joko faagia F13 (C9/F13), FCL-2 (C9/FCL-2) tai molempia (C9/mix). Bakteerikontrollit C2 K ja C9 K sisälsivät vain bakteeria. Faagikontrollit F13 K, F37 K ja FCL-2 K sisälsivät vain faagia. Bakteeri- ja faaginäytteet otettiin kunkin käsittelyn yhdestä replikaatista näytteenottoajankohdissa 0, 2, 4, 6 ja 8 tuntia. Myöhemmin näytteet otettiin kaikista kolmesta replikaatista. Käsittelyistä määritettiin bakteeri- ja faagikonsentraatiot, morfologiajakaumat ja seulottiin evolvoituneita faageja. Samalla tarkasteltiin faagiresistenttien kehittymistä.

2.6 Bakteritiheyden ja bakteerien pesäkemorfologioiden määrittäminen

Bakteerinäytteeksi eli bakteritiheyden ja pesäkemorfologioiden (z-, r- ja s-pesäketyyppi) määrittämiseksi käsittelyistä otettiin ensimmäisessä näytteenottoajankohdassa 100 µl näytettä, jonka 10-kertaisia laimennoksia (Jyväsjärven veteen) levitettiin kasvatusmaljalle 100 µl. Laimentamattomaksi näytteeksi käsittelystä otettiin uudestaan 100 µl nestettä, joka levitettiin kasvatusmaljalle. Kontrolliksi maljattiin laimentamatonta Jyväsjärven vettä. Seuraavasta näytteenotosta (2 tuntia) alkaen käsittelystä otettiin 220 µl näytettä, josta tehtiin laimennossarja ja maljattiin laimentamaton näyte. Maljauksia inkuboitiin 25 °C:ssa 2–3 vrk. Poikkeuksena 0–8 tunnin kohtien maljaukset, joita pidettiin ensimmäiset 19–27 tuntia huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen pesäkkeiden määrät laskettiin maljoilta ja pesäkkeiden morfologiat määritettiin. Näytteenottoajankohdista 24, 48 ja 336 tuntia bakterikonsentraatiot määritettiin kolmen replikaatin keskiarvona.

2.7 Bakteeripesäkkeiden puhdistus, nestekasvatus ja pakastus

Bakteeripesäkkeitä kerättiin 48 tunnin näytteenottoajankohdasta jokaista käsittelyn replikaattia kohden kolme ja mahdollisuuksien mukaan kaikkia pesäketyyppejä. Faagikontaminaation poistamiseksi bakteerit puhdistettiin. Pesäkkeet siirrostettiin kasvatusmaljalle harventamalla ja inkuboitiin 25 °C:ssa 2 vrk. Pesäke siirrostettiin uudelle kasvatusmaljalle yhteensä kolme kertaa, jonka jälkeen pesäke siirrostettiin 700 µl:aan Shieh-lientä ja inkuboitiin 24–48 tuntia sekä tuoreistettiin kuten kohdassa 2.2. Myöhempiä analysointeja varten puhdistettua bakteeria säilytettiin 10-prosenttisessä vasikan sikiön seerumissa (engl. fetal calf serum, FCS) ja 10-prosenttisessä glyserolissa -80 °C:ssa.

2.8 Faagitiittereiden määrittäminen ja evolvoituneiden faagien seulonta

Käsittelystä otettiin faaginäytteeksi 900 µl nestettä, johon lisättiin kloroformia (VWR BDH Prolabo® Chemicals, Fontenay-sous-Bois, Ranska) siten, että sen lopullinen pitoisuus oli 10 %. Näytteet säilytettiin 7 °C:ssa faagitiittereiden ja evolvoituneiden faagien seulontaan asti.

Viimeisessä näytteenotossa (366 tuntia) kerättyjen faagien läsnäolo tarkistettiin. Tätä varten käsittelyn alkuperäinen bakteeri (C2 tai C9) kasvatettiin Shieh-liemessä ja Shieh-pehmytagarissa kuten kohdassa 2.2. Testeissä käytettiin halkaisijaltaan 14 cm kasvatusmaljoja ja maljattavan bakteeri-pehmytagar -seoksen lopputilavuutta 6,6 ml. Bakteeria kasvavalle pehmytagarille lisättiin 10 µl:n tippa laimentamatonta faaginäytettä. Faaginäytteiden kontrolliksi testattiin alkuperäiset faagilysaatit F13, F37 ja FCL-2. Samalla bakteerikontrollin faaginäytteistä tarkastettiin 0, 24, 48 ja 336 tunnin kohdalta, että faageja ei ole. Maljoja inkuboitiin 2 vrk huoneenlämmössä, minkä jälkeen faagien infektiivisyys tarkastettiin. Käsittelyiden faagitiitterit määritettiin faagien läsnäolon varmistuttua. Tiitterit määritettiin eri ajankohtina otetuista näytteistä käsittelyn alkuperäisellä bakteerilla kuten kohdassa 2.4.

Viimeisen näytteenottoajankohdan faaginäytteistä seulottiin evolvoituneita faageja. Eli faageja, jotka kykenivät infektoimaan alkuperäiselle faagille resistenttiä bakteeria. Alkuperäisten faagilysaattien ja 336 tunnin kohdan faagien infektiivisyys testattiin saman käsittelyn 48 tunnin kohdalla eristettyihin bakteereihin (kolmeen pesäkkeeseen). Pakastettu bakteeri-isolaatti (ks. kohta 2.7) kasvatettiin kuten kohdassa 2.2. Bakteeri-pehmytagar -seoksen lopputilavuus oli 2,2 ml ja kasvatusalustojen halkaisija 5 cm. Maljalla kasvavaan bakteeriin laitettiin laimentamatonta faaginäytettä 10 µl:n tippa. Ensimmäisen infektiotestausosan jälkeen siirryttiin käyttämään 0,1 % musiniä (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) sisältävää Shieh-pehmytagaria.

2.9 Evolvoituneiden faagien puhdistaminen ja infektiivisyyden testaaminen

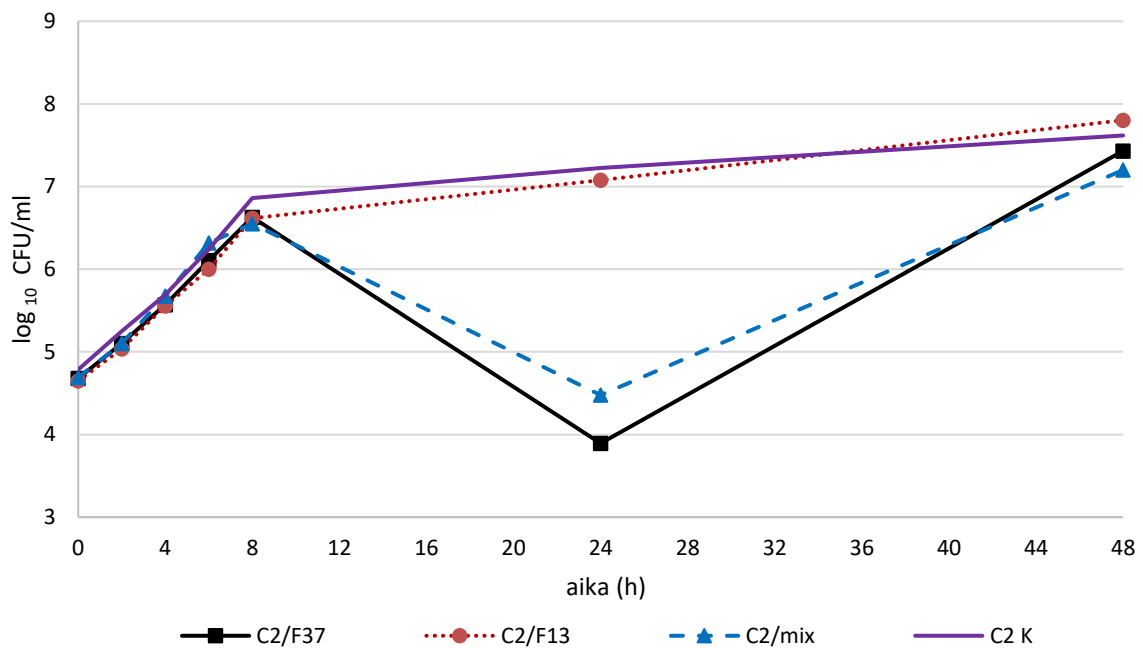
Mahdollisesti evolvoitunut faagi havaittiin ensimmäisessä infektiotestauserässä C2/mix-käsittelyn toisesta replikaatista 336 tunnin kohdalla otetusta faaginäytteestä (C2ef). Tästä evolvoitunut faagi puhdistettiin. Puhdistus ja tuotto tehtiin 48 tunnin kohdalla eristetyllä z-pesäketyyppiä ilmentäneellä bakteerilla (C2zp), jolla havainto kyseisestä faagista saatiin. Puhdistus tehtiin samanaikaisesti näytteen kahdelle plakille. Puhdistus (1. puhdistus) aloitettiin ottamalla plakki 500 µl:aan Shieh-lientä. Näytettä vorteksoitiin noin 45–60 sekuntia ja siirrettiin 7 °C:een. Neljän vuorokauden kuluttua 100 µl näytteen 10-kertaisia laimennoksia (Shieh-liemessä) ja 300 µl C2zp-bakteeria sekoitettiin 3 ml:aan 47 °C:ista Shieh-pehmytagaria ja maljattiin. Kontrolliksi maljattiin seos ilman faaginäytettä. Maljat inkuboitiiin 25 °C:ssa kaksi vrk. Maljalta valittiin yksi mahdollisimman kirkas plakki, joka siirrostettiin 500 µl:aan Shieh-lientä (2. puhdistus). Kahden tunnin 7 °C:ssa inkuboinnin jälkeen näytteistä tehtiin 10-kertaiset laimennokset ja maljattiin uudestaan bakteerin kanssa kuten edellä. Kahden vrk 25 °C:ssa inkuboinnin jälkeen puhdistusta jatkettiin toistamalla yhden plakin siirto Shieh-liemeen (3. puhdistus) ja maljaus bakteerin kanssa. Kolmannet puhdistusmaljat siirrettiin 2 vrk inkuboinnin (25 °C) jälkeen 7 °C:een. Vuorokauden kuluttua kaksi maljaa valittiin faagin tuottomaljoiksi, joihin lisättiin 5 ml Shieh-lientä. Työtä jatkettiin kuten kohdassa 2.3. Tuotetut faagilysaatit FCOV-JS1 ja FCOV-JS2 säilytettiin 7 °C:ssa.

C2ef-faaginäytteen infektiivisyys tarkistettiin C2zp-bakteeri-isolaattiin evolvoituneen faagin varmentamiseksi. Infektiivisyys tarkastettiin myös C2ef-faaginäytteestä puhdistuksen jälkeen tuotetuilla lysaateilla (FCOV-JS1 ja FCOV-JS2) sekä alkuperäisillä faagilysaateilla (F13 ja F37). Faagilysaateista FCOV-JS1 ja FCOV-JS2 määritettiin tiitterit sekä C2-bakteerille että C2zp-bakteeri-isolaatille kuten kohdassa 2.4.

3 TULOKSET

3.2 Bakteritiheydet

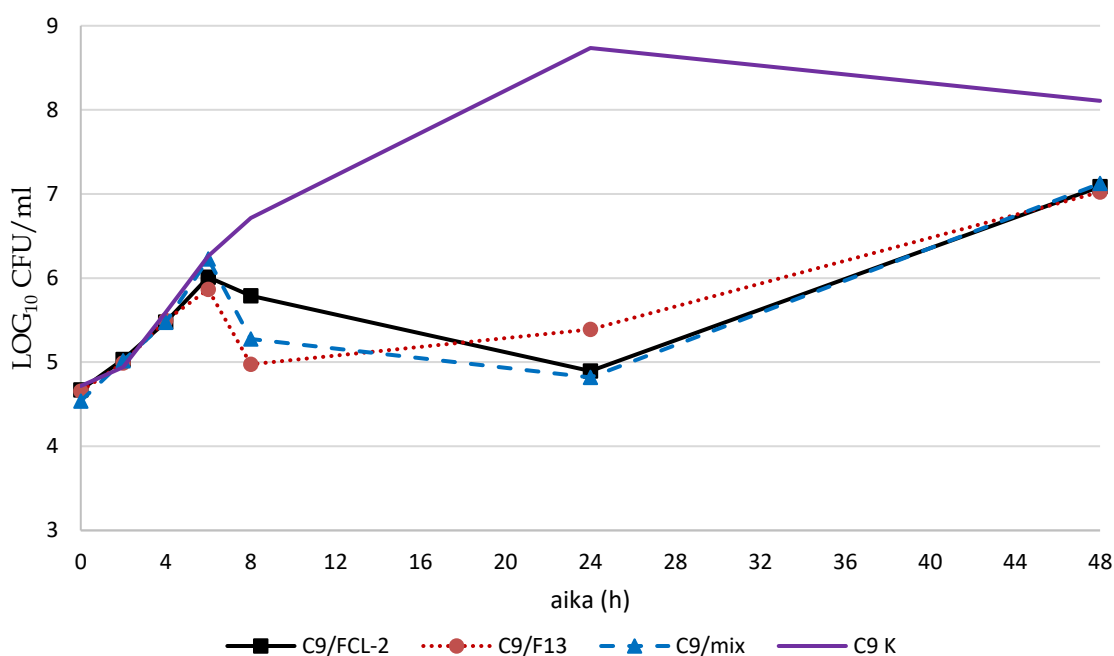
C2-bakteritiheydessä käsittelyjen välillä oli selkeitä eroja 24 tunnin kohdalla (Kuva 3). Kaikissa käsittelyissä bakterikonsentraatio kasvoi kahdeksan ensimmäisen tunnin aikana. Tämän jälkeen ainoastaan käsittelyissä C2/F37 ja C2/mix bakterikonsentraatiot laskivat hetkellisesti faagi-infektion seurauksena. Kaikissa käsittelyissä bakterikonsentraatio laski näytteenottoajankohtien 48 ja 336 tuntia välillä (Liite 3). Faagikontrolleissa (F13 ja F37) ja Jyväsjärven vedessä ei havaittu bakteereja.



Kuva 3. Faagikäsittelyjen vaikutus *Flavobacterium columnare* -kannan C2 kasvutiheyteen (CFU/ml). Käsittelyt sisälsivät joko faagia F37 (käsittely C2/F37), F13 (käsittely C2/F13) tai molempia (käsittely C2/mix). Bakterikontrolleina faagia sisältämätön käsittely (C2 K).

Faagikäsittely vaikutti selkeästi C9-bakteritiheyteen (Kuva 4). Kaikissa käsittelyissä bakterikonsentraatio kasvoi kuuden ensimmäisen tunnin aikana.

Kontrollikäsitellyssä ilman faagilisäystä (C9 K) bakteeritiheys kasvoi 24 tuntiin asti lähtien tämän jälkeen laskuun. Muissa käsittelyissä faagin aiheuttama bakteerikonsentraation lasku tapahtui jo 6–8 tunnin kohdalla. Bakteerikonsentraatio kasvoi käsittelyssä C9/F13 kahdeksan tunnin jälkeen ja vasta 24 tunnin jälkeen käsittelyissä C9/FLC-2 ja C9/mix. Kontrollin ja muiden käsittelyjen välinen ero oli suurimmillaan 24 tunnin kohdalla. Kaikissa käsittelyissä bakteerikonsentraatio laski näytteenottoajankohtien 48 ja 336 tuntia välillä (Liite 4). Faagikontrolleissa (F13 ja FCL-2) ja Jyväsjärven vedessä ei havaittu bakteereja.

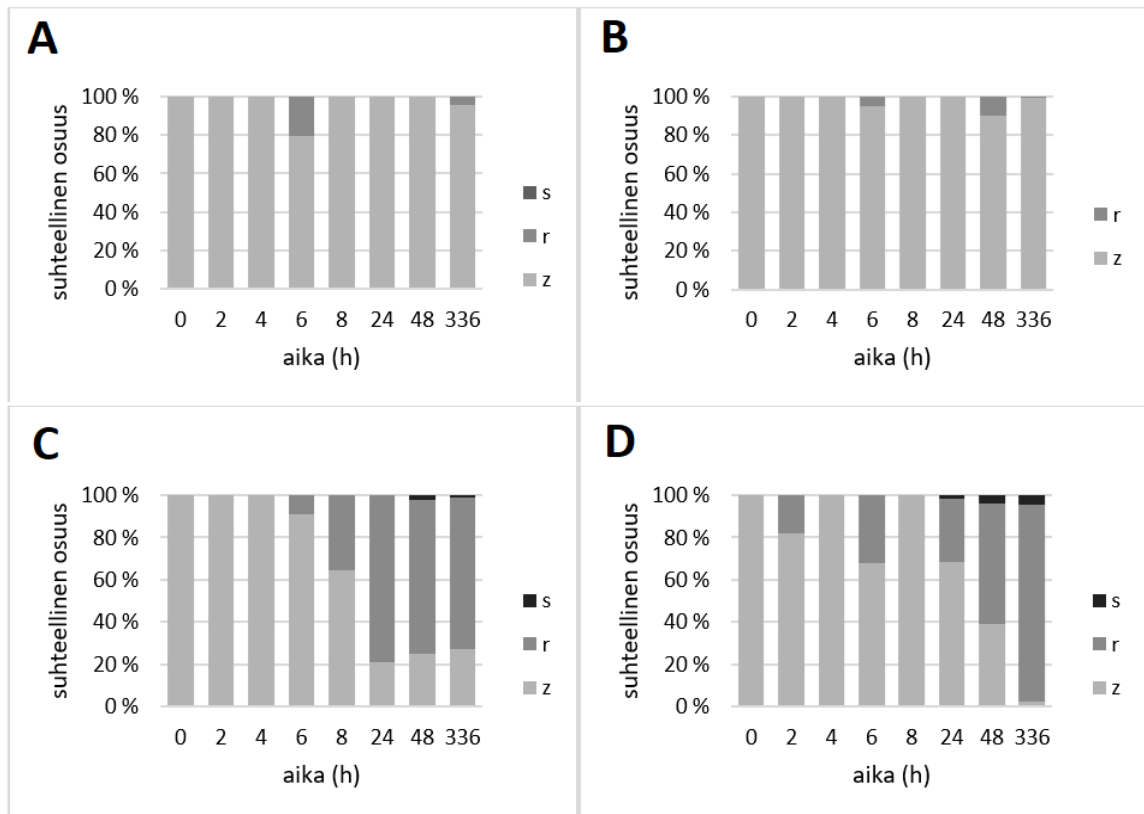


Kuva 4. Faagikäsitelyjen vaikutus *Flavobacterium columnare* -kannan C9 kasvutiheyteen (CFU/ml). Käsitelyt sisälsivät joko faagia F13 (käsitely C9/F13), FCL-2 (käsitely C9/FCL-2) tai molempia (C9/mix). Bakteerikontrolleina faagia sisältämätön käsitely (C9 K).

3.3 Bakteeripesäkkeiden morfologiajakauma ja faagiresistenttiys

Bakteeritiheyden määrittämisen yhteydessä määritettiin bakteerien pesäkemorfologiat (z-, r- ja s-pesäketypit). C2-bakteerin käsittelyjen morfologiajakaumat muuttuivat z-pesäketypistä r-pesäketypiksi.

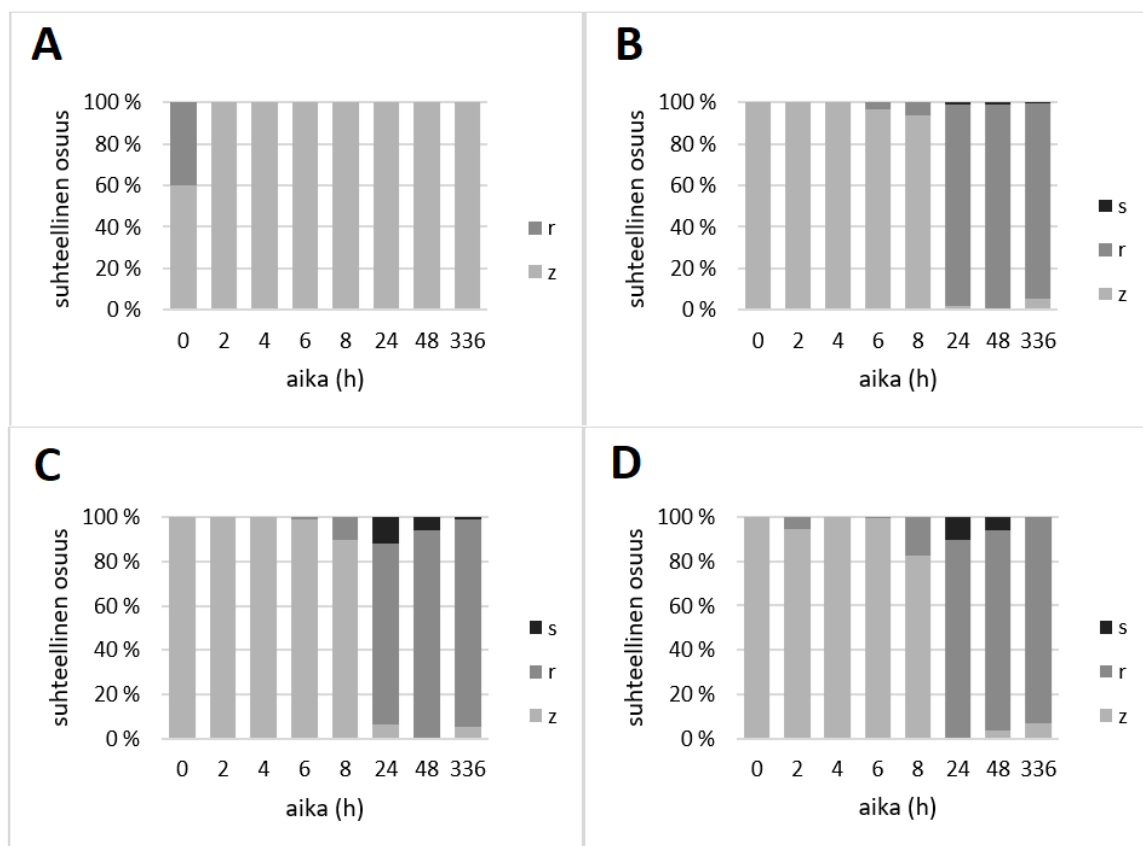
painotteisemmiksi (Kuva 5). F13-faagia sisältäneessä käsittelyssä bakteerin morfologiajakauma oli samankaltainen kuin vain bakteeria sisältäneessä käsittelyssä. Molemmissa käsittelyissä z-pesäketyyppi oli kaikissa kohdissa selkeästi eniten edustettuna.



Kuva 5. Faagikäsittelyjen vaikutus *Flavobacterium columnare* -kannan C2 pesäkemorfologiajakaumiin. Kontrollina faagia sisältämätön käsittely a) C2 K. Yhtä faagia (F13 tai F37) sisältäneet käsittelyt b) C2/F13 ja c) C2/F37 sekä näitä kahta faagia sisältänyt käsittely d) C2/mix. Pesäkemorfologiat: z = ritsoidi, r = karkea ja s = pehmeä pesäketyyppi.

Faagit vaikuttivat C9-bakteerin morfologiajakaumaan (Kuva 6). Faagia sisältämättömässä käsittelyssä ensimmäisen näytteenottoajankohdan r-pesäkkeitä lukuun ottamatta havaittiin vain z-pesäkkeitä. Muissa käsittelyissä z-pesäkkeiden määrä väheni kokeen edetessä, ja 24 tunnista jälkeen r-pesäkkeiden osuus oli suurin

kokeen loppuun asti. Faagia sisältävissä käsittelyissä oli myös s-pesäketyyppejä kolmessa viimeisessä eli 24, 48 ja 336 tunnin näytteenottoajankohdissa.



Kuva 6. Faagikäsittelyjen vaikutus *Flavobacterium columnare* -kannan C9 pesäkemorfologiajakaumiin. Kontrollina faagia sisältämätön käsittely a) C9 K. Yhtä faagia (F13 tai FCL-2) sisältäneet käsittelyt b) C9/F13 ja c) C9/FCL-2 sekä näitä kahta faagia sisältänyt käsittely d) C9/mix. Pesäkemorfologiat: z = ritsoidi, r = karkea ja s = pehmeä pesäketyyppi.

3.4 Käsittelyistä puhdistetut bakteeripesäkkeet ja niiden faagiresistenttiys

Evolvoituneiden faagien seulontaa varten puhdistettiin bakteeripesäkkeitä 48 tunnin kohdalla otetuista näytteistä. Jokaista replikaattia kohden puhdistettiin kolme eli yhteensä 72 pesäkettä (Taulukko 4). Seitsemän pesäkkeen puhdistaminen ei onnistunut bakteerin heikon kasvun takia. Puhdistettujen pesäkkeiden

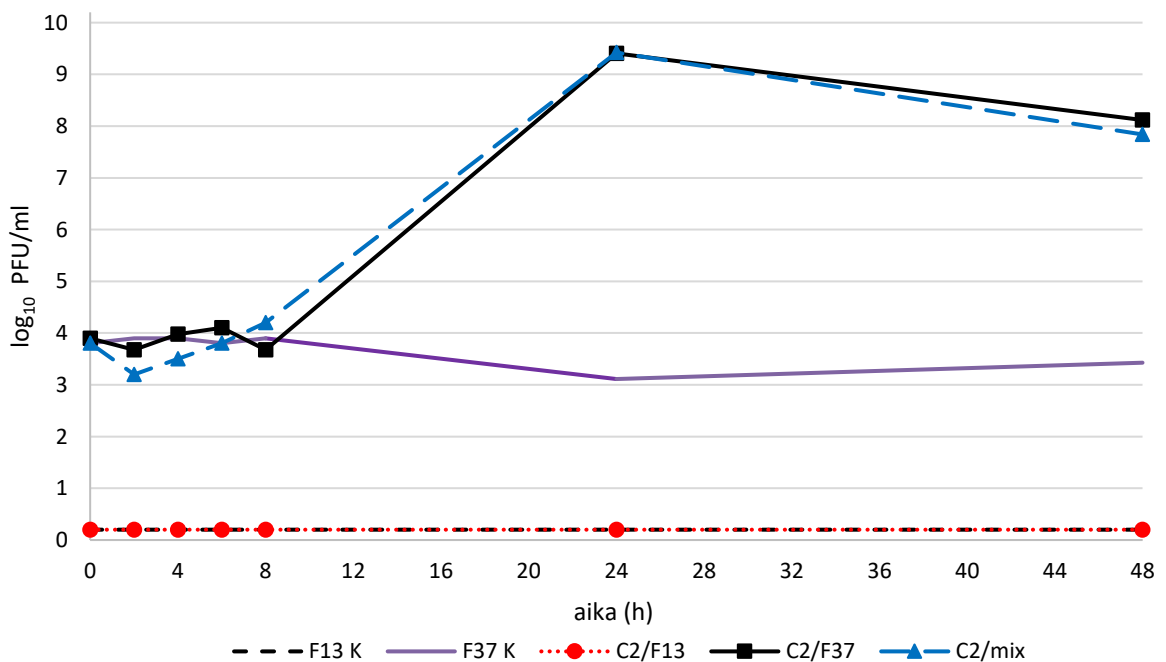
resistenttiys testattiin alkuperäistä faagia tai faageja ja 336 tunnin faaginäytettä vastaan. Määritykset tehtiin Shieh-elatusaineella, mutta heikosti kasvavien bakteeri-isolaattien kohdalla käytettiin musiinia sisältävää Shieh-elatusainetta. Tämä paransi bakteerimaton tasaisuutta, mutta osa bakteereista kasvoi tästä huolimatta liian heikosti bakteerin ja faagien vuorovaikutuksen määrittämiseksi. Alkuperäiselle faagille resistenttejä bakteereja oli 30.

Taulukko 4. Käsittelyistä 48 tunnin kohdalla puhdistettujen *Flavobacterium columnare* -kantojen C2 ja C9 pesäkemorfologiat ja faagiresistenttiys. Faagit olivat F13, F37 ja FCL-2. Kahta faagia sisältävä käsittely = mix, josta C2/mix sisälsi faageja F13 ja F37 sekä C9/mix faageja F13 ja FCL-2. Faageja sisältämätön kontrolli = K. Pesäkemorfologiat olivat z = ritsoidi, r = karkea ja s = pehmeä. Isoilla lihavoiduilla kirjaimilla merkittyjen pesäkkeiden puhdistaminen ei onnistunut ja pesäke menetettiin. Faagiresistenttiys testattiin alkuperäisiä faageja ja käsittelyn 336 tunnin faaginäytettä vastaan. Harmaa = bakteeri kasvoi liian heikosti eikä faagin vaikutusta voitu määrittää. Keltainen = bakteeri oli alkuperäiselle faagille resistentti, mutta alkuperäinen faagi tai faagit inhiboivat bakteerin kasvua. Myöskään 336 tunnin faaginäyte ei infektoinut. Vihreä = alkuperäiselle ja 336 tunnin faagille resistentti bakteeri (ei inhibitiota). Turkoosi = alkuperäiselle faagille resistentti, mutta ei 336 tunnin faagille. Sininen = alkuperäinen faagi infektoi bakteeria eli bakteeri ei ollut resistentti.

Käsittely	Bakteeripesäkkeen morfologia ja faagiresistenttiys								
	1. replikaatti			2. replikaatti			3. replikaatti		
C2 K	z	z	z	z	z	z	z	z	z
C2/F13	R	z	z	z	r	r	z	r	r
C2/F37	z	r	s	z	r	s	z	R	s
C2/mix	Z	r	s	z	r	s	Z	r	s
C9 K	z	z	z	z	z	Z	Z	z	z
C9/F13	z	r	s	r	r	r	r	r	s
C9/FCL-2	z	r	s	r	r	s	r	R	s
C9/mix	r	z	s	r	r	s	r	r	s

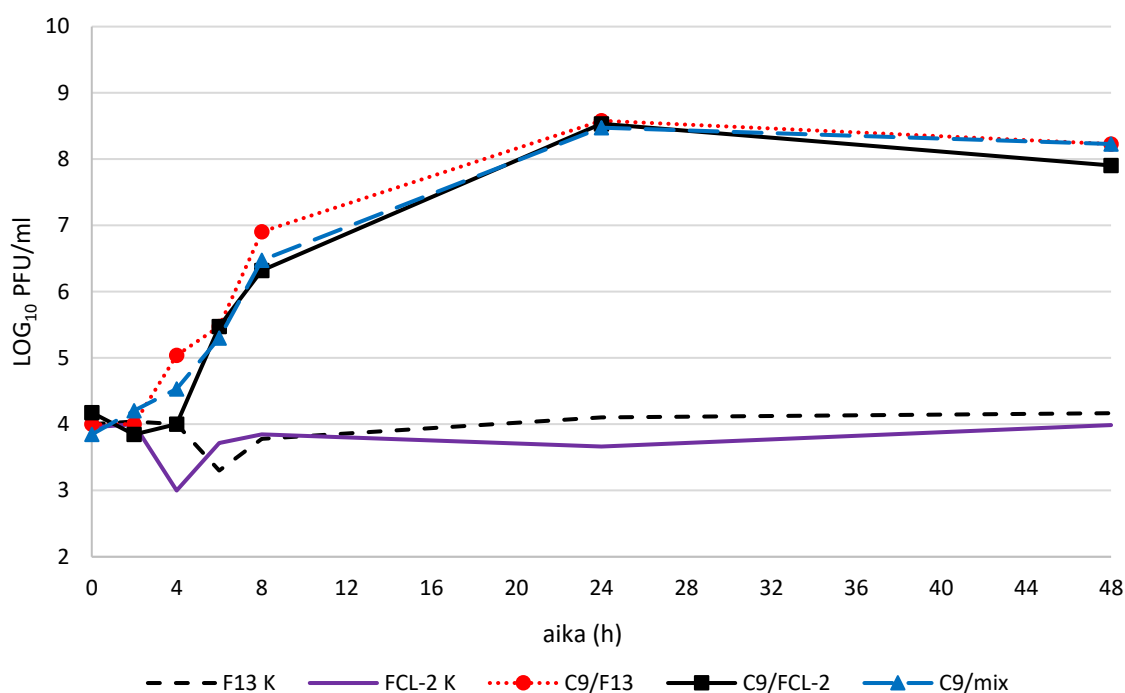
3.5 Faagitiitterit käsittelyissä

Faagien läsnäolon tarkistuksessa 336 tunnin laimentamattomat faaginäytteet sisälsivät faageja. Kaikissa bakteeria ja faagia sisältävissä käsittelyissä, lukuun ottamatta C2/F13-käsittelyä, oli faageja. Kokeen aikana C2-bakteerin faagikäsittelyissä tiitteri kasvoi lähtötilanteesta vain käsittelyissä C2/F37 ja C2/mix (Kuva 7). Käsittelyissä C2/F13 ja F13 K ei havaittu missään vaiheessa faageja. Kokeen edetessä faagikontrollin F37 K tiitteri pysyi suhteellisen tasaisena. Kahdeksan tunnin jälkeen käsittelyjen C2/F37 ja C2/mix tiitterit kasvoivat ja saavuttivat korkeimman arvonsa 24 tunnin kohdalla. Tämän jälkeen konsentraatiot laskivat aina kokeen loppuun asti (Liite 3). Faageja ei ollut faagia sisältämättömässä bakteerikontrollissa (C2 K) eikä Jyväsjärven vedessä.



Kuva 7. *Flavobacterium columnare* -kanta C2 sisältävien käsittelyjen faagitiitterit (PFU/ml). Käsittelyt sisälsivät joko F37-faagia (C2/F37), F13-faagia (C2/F13) tai molempia (C2/mix). Faagikontrollit eli bakteeria sisältämättömät käsittelyt: F37 K ja F13 K.

C9-bakteeria sisältävien käsittelyjen faagitiitterit kasvoivat selkeästi (Kuva 8). Tiitterit kasvoivat bakteeria ja faagia sisältävissä käsittelyissä kuuden tunnin kohdalla ja saavuttivat suurimman arvonsa 24 tunnin kohdalla. Tämän jälkeen tiitterit laskivat kokeen loppuun asti (Liite 4). Kontrolleissa faagikonsentraatiot pysyivät suhteellisen tasaisina koko kokeen ajan. Faageja ei ollut faagia sisältämättömässä bakteerikontrolissa (C9 K) eikä Jyväsjärven vedessä.



Kuva 8. *Flavobacterium columnare* -kanta C9 sisältävien käsittelyjen faagitiitterit (PFU/ml). Käsittelyt sisältävät joko F13-faagia (C9/F13), FCL-2-faagia (C9/FCL2) tai molempia (C9/mix). Faagikontrollit eli bakteeria sisältämättömät käsittelyt: F13 K ja FCL-2 K.

3.6 Evolvoituneiden faagien eristäminen

Alkuperäisille faageille resistenttejä bakteereja infektoivia eli evolvoituneita faageja seulottiin 336 tunnin kohdan faaginäytteistä 48 tunnin kohdalla puhdistetuilla bakteereilla (ks. kohta 3.4). Näistä käsittelyn C2/mix toisen replikaatin z-pesäketyyppiä muodostava bakteeri (C2zp) oli resistentti alkuperäisille faageille.

F13-lysaatti ei vaikuttanut bakteerin kasvuun, ja F37-lysaatti inhiboi bakteerin kasvua. Maljalla inhibitio havaittiin bakteerin heikompana kasvuna ilman plakkeja. C2zp ei ollut resistentti 336 tunnin faaginäytteelle (C2ef). F37-faagilysaatin vuorovaikutus ei ollut kaikilla testauskerroilla kuitenkaan selkeää ja muistutti välillä infektiota. Kyseiset infektiotestaukset toistettiin seitsemän kertaa (Taulukko 5). Tuloksien perusteella käsittelyssä oli evolvoituneita faageja.

Taulukko 5. Käsittelyn alkuperäisten ja evolvoituneiden faagien infektiivisyys *Flavobacterium columnare* -bakteerikannan C2 48 tunnin isolaattiin C2zp. Käsittelyn alkuperäisinä faageina olivat F37 ja F13. Evolvoituneina faageina olivat käsittelystä 336 tunnin kohdalla otettu C2ef-faaginäyte sekä siitä tuotetut lyaatit FCOV-JS1 ja FCOV-JS2. Vuorovaikutuksia tarkasteltiin Shieh-pehmytagar -elatusaineessa. Toisella infektiotestaukserällä käytettiin muista kerroista poiketen 0,1 % musiinia sisältävää Shieh-pehmytagaria. Musta = infektio, harmaa = inhibitio, valkoinen = ei vaikutusta ja ? = epäselvä tulos.

Testauskerta	Bakteeri	Alkuperäinen faagi		336 tunnin faaginäyte	Evolvoitunut faagilysaatti	
		F37	F13	C2ef	FCOV-JS1	FCOV-JS2
1	C2zp				ei testissä	ei testissä
2 (musiinia)	C2zp	?			ei testissä	ei testissä
3	C2zp	?				
4	C2zp	?				
5	C2zp	?			ei testissä	ei testissä
6	C2zp					
7	C2zp					

Evolvoituneiden faagien puhdistus aloitettiin ensimmäisen infektiotestaukserran havainnosta. Kahden viikon (336 tunnin) faaginäytteen C2ef tuottamat plakit bakteerille C2zp olivat suhteellisen pieniä. Evolvoituneen faagin puhdistuksessa plakkeja tuottui myös suhteellisen vähän. Toisaalta puhdistuksessa käytetty bakteeri (C2zp) myös kasvoi maljalla suhteellisen heikosti, mikä vaikeutti plakkien havaitsemista. Evolvoituneiden faagien eristys tehtiin samanaikaisesti näytteen

kahdelle plakille, joista tuotettiin faagilysaatit FCOV-JS1 ja FCOV-JS2. Evolvoituneiden faagilysaattien tiitterit määritettiin alkuperäiselle (ei-resistentille) C2-bakteerille ja resistentille C2zp-bakteerille. FCOV-JS1 ja FCOV-JS2 -faagilysaattien tiitterit olivat C2-bakteerille $3,0 \times 10^7$ PFU/ml ja $4,2 \times 10^6$ PFU/ml sekä C2zp-bakteerille $1,7 \times 10^6$ PFU/ml ja $1,3 \times 10^6$ PFU/ml. Evolvoituneet faagit tekivät alkuperäiselle bakteerille suurempia plakkeja kuin resistentille bakteerille. Evolvoituneiden faagien tekemät plakit alkuperäiselle bakteerille olivat kuitenkin lähes samankokoisia, kuin mitä alkuperäiset faagit (F13 ja F37) tuottivat.

4 TULOSTEN TARKASTELU

Faagiterapia on lupaava menetelmä bakteeri-infektioiden hoitomuotona. Faagiterapian etu antibiootteihin verrattuna perustuu esimerkiksi siihen, että faagi-infektio kohdistuu spesifisesti tiettyyn bakteerilajiin (Romero-Calle ym. 2019). Faagien isäntäspesifisyys jopa tietyn bakteerilajin alatyyppeihin on kuitenkin yksi faagiterapian haasteista, sillä bakteeritaudin aiheuttaa usein saman bakteerilajin eri kannat (Carlton 1999). Myös bakteerien kyky kehittyä faagiresistentiksi on faagiterapiassa ongelma. Näiden ongelmien vähentämiseksi bakteeria vastaan voidaan käyttää useampaa kuin yhtä faagia samanaikaisesti. Erilaisia faageja sisältävien faagikoktailien vaikutukset bakteeria vastaan vaihtelevat (Chen ym. 2018). Näin ollen tiettyä bakteeria vastaan sopivat faagit ja faagikoktailit tulee kartoittaa.

F. columnare -bakteerin aiheuttamaa columnaris-tautia hoidetaan Suomessa kalanviljelylaitoksilla pääasiassa oksitetrazykliinillä (Pulkkinen ym. 2010). Taudin mahdollista faagiterapiahoitoa varten tässä työssä tarkasteltiin yhden faagin, kahden saman faagityypin ja kahden eri faagityypin koktailin vaikutusta

bakteeriin. Tuloksista oli odotettavissa bakteeritiheyksien lasku, faagiresistenttien bakteerien kehittyminen sekä r- ja s-pesäketyyppien yleistymisen faageille altistumisen seurauksena. Työssä saatiin uutena tuloksena, että yhtä tai kahta faagia käyttämällä tehokkuus infektoida bakteeria ei eronnut selkeästi. Faagikoktailissa kahden saman tai eri faagityypin käyttäminen ei ollut myöskään tehokkaampaa. Lisäksi faagi kykeni evolvoitumaan kahden viikon aikana käsittelyssä, jossa oli kahta faagityyppiä.

4.1 Faagien vaikutus bakteeritiheksiin

Faagi-infektiot näkyivät selkeästi käsittelyjen bakteeritiheyksissä, mutta faagit kykenivät vain hetkellisesti vähentämään bakteerimääriä (Liitteet 3 ja 4). Kahden viimeisen näytteenottoajankohdan välissä oli kuitenkin 288 tuntia, joten tältä ajalta ei tiedetä, kuinka rinnakkaisevoluutio vaikutti bakteerikonsentraatioihin ja faagitiittereihin. Voi siis olla myös mahdollista, että tällä ajalla konsentraatiot vaihtelivat havaittua enemmän.

Faagit säilyvät elinkelpoisena kokeen loppuun asti (Liite 3 ja 4). F13-faagi ei kuitenkaan infektoinut C2-bakteeria tarpeeksi tehokkaasti ainakaan lyyttisesti, sillä faagin vaikutusta ei havaittu missään näytteenottoajankohdassa. C2/F13-käsittelyistä kaikki havainnot olivat kontrollin kaltaisia ja bakteerin morfologia pääsääntöisesti z-pesäketyyppiä (Kuva 5). Faagi-infektion aiheuttamaa bakteerikonsentraation laskua ei myöskään havaittu (Kuva 3), kuten ei vapaita faagejakaan (Kuva 7). Heikkoon infektointikykyyn on todennäköisesti syynä se, että C2-bakteeri kuuluu geneettiseen ryhmään C, kun taas F13-faagin eristysisäntä on ryhmään G kuuluva bakteeri (Taulukko 2). *F. columnare* -bakteerin faagit ovat spesifisiä ja infektoivat jopa vain yhteen geneettiseen ryhmään kuuluvia bakteerikantoja (Laanto ym. 2011). Näin ollen kokeen alussa havaittu F13-faagin kyky infektoida C9-bakteerin lisäksi C2-bakteeria oli yllättävää. On mahdollista,

että F13-faagilysaatin tuoton yhteydessä olisi indusoitunut temperaatti faagi, joka infektoi C2-bakteeria. Mahdollinen indusoitunut faagi ja F13-faagi saattoivat siis erota bakteerin infektointitavasta. Tätä tukee se, että profaagilla on kyky estää infektointiominaisuuksiltaan tarpeeksi samankaltaisten faagien aiheuttamat infektiot (Fortier ja Sekulovic 2013.).

4.2 Faagien vaikutus pesäkemorfologiajakaumaan ja faagiresistenssin kehittymiseen

Faagi-infektioiden aiheuttama valintapaine näkyi selkeästi bakteerien morfologiajakaumissa, joista ainoa poikkeus oli C2/F13-käsittely (ks. edellä). Mielenkiintoinen havainto oli myös C9-bakteerikontrollin r-pesäkkeiden suhteellisen suuri osuus ensimmäisessä näytteenottoajankohdassa. C9-bakteerikontrollissa ei ollut faageja, eivätkä 48 tunnin kohdalla puhdistetut bakteerit olleet faagiresistenttejä (Taulukko 4). Täten r-pesäkkeiden määrä saattaa selittyä geenien toiminnan spontaanilla vaihtelulla (Henderson ym. 1999). Kasvatusolosuhteiden muutos työn alussa saattoi aiheuttaa valintapaineen, kun Shieh-elatusaineessa kasvatettua bakteerikasvatusta siirrettiin Jyväsjärven veteen.

Eri faagi-bakteeri-vuorovaikutukset erosivat hieman: C2-bakteerin käsittelyjen välisissä pesäkkeiden osuuksissa oli eri ajankohdissa enemmän vaihtelua (Kuva 5), kun taas kaikissa C9-bakteerin käsittelyissä selkeä r-pesäketyyppien osuuden kasvu tapahtui 24 tuntia faagialtistuksen jälkeen (Kuva 6). Erityisesti r-pesäketyyppien yleistymisen faagialtistuksen seurauksena oli odotettua aikaisempien tutkimuksien perusteella (Laanto ym. 2012, Laanto ym. 2015). Laanto ym. (2012) havaintojen perusteella tämä viittaa siihen, että tässä työssä bakteerien taudinaiheuttamiskyky mahdollisesti heikkeni faagialtistuksen seurauksena. Bakteerien taudinaiheuttamiskykyä ei kuitenkaan testattu. Tämän työn tulokset tukevat sitä, että faagien avulla voidaan mahdollisesti vähentää taudinaiheuttamiskykyisimpien

bakteerimuotojen osuutta ja näin ollen columnaris-taudin ilmenemistä, kalakuolleisuutta ja taloudellista menetystä.

Työssä havaittiin myös s-pesäketyyppien määrän kasvua faagialtistuksen aikana, vaikka ei niin runsaslukuisena kuin r-pesäkkeiden. S-pesäkkeiden ilmentyminen oli selkeää, mikä viittaa siihen, että s-pesäketyyppejä muodostavilla bakteereilla on myös jokin hyöty faagien aiheuttamassa valintapaineessa. S-pesäketyyppejä muodostavilla bakteereilla on yhtenä ominaisuutena se, että ne eivät tuota bakteerin pinnalle samanlaisia vesikkeleitä kuin mitä r- ja z-pesäketyyppejä muodostavat bakteerit tuottavat (Laanto ym. 2014). Näiden vesikkeliön on arvioitu liittyvän pintaan kiinnittymiseen ja taudinaiheuttamiskykyyn. Lisäksi s-pesäketyypin pinnalta puuttuu filamenttinen rakenne, joka havaitaan muissa pesäketyypeissä (Laanto ym. 2014). Nämä eroavaisuudet saattavat siis liittyä bakteerin elinkelpoisuuden paremmuuteen, kun ympäristössä on faagi. Faagialtistuksen seurauksena eri pesäketyyppien ilmentyminen saattaa olla bakteeripopulaation kannalta hyödyllistä. Pesäkkeiden monimuotoisuuden avulla bakteeri saattaa mahdollisesti turvata geneettisen monimuotoisuuden säilyttämisen ja näin turvata bakteerin säilymisen ympäristössä. *F. columnare* -bakteerin pesäketyypeistä tarvitaan lisää tutkimusta niiden merkityksen ja tärkeyden selvittämiseksi bakteeripopulaatiossa.

Yksi faagiterapian ongelmista on faagiresistenttien bakteerien kehittyminen (Pirnay ym. 2012). Faagiresistenttien bakteerien yleistyminen populaatiossa käy ilmi myös tässä työssä, kun bakteerimäärät kasvoivat faagi-infektion jälkeen. Faagiresistenttien kehittyminen käy ilmi myös 48 tunnin kohdalla puhdistetuista pesäkkeistä (Taulukko 4). Yhdessä morfologiajakaumien kanssa tämä viittaa siihen, että r-pesäketyyppejä ilmentävillä bakteerisolulla on muiden pesäketyyppien bakteereihin verrattuna faagiresistenttien kannalta suotuisampi ominaisuus. Toisin sanoen eri pesäketyyppejä muodostavilla bakteereilla saattaa olla erilaiset

resistenssimekanismit. Bakteerien erilaisten puolustusmekanismien mukaisesti voi olla, että eri pesäketyyppejä muodostavilla bakteereilla olisi jokin ero esimerkiksi pinnan reseptorien ilmentämisessä, niiden peittämisessä tai muussa bakteerin sisäisessä puolustuksessa (Stone ym. 2019). Faagiresistenttiys kehittyy usein faagireseptorin muuttuessa spontaanien pistemutaatioiden seurauksena (Tanji ym. 2003, Castillo ym. 2015). Faagiresistenttiyden aiheuttamat muutokset esimerkiksi ravinteiden saantiin tarvittavissa reseptoreissa tai bakteerin aineenvaihdunnassa voivat vaikuttaa bakteerin elinkelpoisuuteen heikentävästi (Lenski 1988). *F. columnare* -bakteerin faagit saattavat hyödyntää pintareseptoria, joka vaikuttaa bakteerin liikkumiskykyyn (Laanto ym. 2012). R-pesäketyyppejä muodostavan bakteerin liikkumiskyky on vähäisempää kuin z-pesäketyyppejä muodostavan bakteerin (Laanto ym. 2014). R-pesäketyypin taudinaiheuttamiskyky on myös heikompi (Laanto ym. 2012, Laanto ym. 2014). Täten saattaisi olla, että r-pesäketyypin resistenssimekanismi faagia vastaan perustuu pintareseptorin peittämiseen, muuttamiseen tai poistamiseen, mikä vaikuttaa liikkumiskykyyn ja samalla taudinaiheuttamiskykyyn. Faagiresistenttiys muuttaa liikkumiskykyyn vaikuttavaa reseptoria esimerkiksi myös *F. psychrophilum* -bakteerilla (Castillo ym. 2015). Z-pesäketyypin puolustusmekanismi saattaisi pintarakenteen ja reseptorien muokkaamisen sijasta perustua bakteerin sisäiseen puolustukseen. Bakteerin sisäiseen puolustukseen kuuluvat esimerkiksi restriktiomuokkaus-systeemi ja CRISPR-Cas-systeemi, jotka voivat myös yhdessä vahvistaa bakteerin faagiresistenttiyttä (Dupuis ym. 2013, van Houte ym. 2016). Esimerkiksi Laanto ym. (2017) ovat havainneet kaksi CRISPR-lokusta *F. columnare* -bakteerilla. Näitä resistenssimekanismeja ei tässä työssä kuitenkaan tutkittu.

Bakteerin mekanismeista kehittyä resistentiksi useampaa faagia vastaan ei tarkasti tunneta. Wright ym. (2019) osoittivat, että kahdella faagilla infektoidessa faagialistuksien järjestys ja ajoitus vaikuttavat faagiresistenssin kehittymiseen ja siitä koituviin kustannuksiin bakteerin elinkelpoisuudessa. Altistuminen kahdelle

faagille samanaikaisesti heikensi bakteerin kykyä kehittyä faagiresistentiksi. Bakteri kykeni kehittämään resistenssin tehokkaammin silloin kun faagialtistus oli peräkkäistä, jolloin bakteri kehitti molempia faageja vastaan useita resistenssimutaatioita (Wright ym. 2019). Tanji ym. (2003) puolestaan osoittivat, että kahden faagin koktaili, jossa faagit infektoivat bakteeria eri reseptoreiden kautta hidastaa tehokkaammin bakteerin faagiresistenttiyden kehittymistä, kuin faagien käyttäminen yksittäin. Tässä työssä kahden faagityypin vaikutuksesta bakteerin morfologiajakauma muuttuikin hitaammin (Kuva 5D), joten resistentiyden kehittyminen saattoi olla hitaampaa. Työn faageista ei kuitenkaan tiedetä mitä reseptoreja ne käyttivät. Tulokset viittaavat siihen, että faagit F13 ja F37 mahdollisesti infektoivat C2-bakteerin eri reseptoreja. Vastaavasti C9-bakteerin infektointi kahdella samalla faagityypillä ei ollut yhtä faagia tehokkaampaa. Tämä saattaa johtua esimerkiksi siitä, että faagit mahdollisesti hyödynsivät samaa faagireseptoria (Tanji ym. 2003).

Faagiresistenssin kehittyminen on riippuvaista vallitsevasta ympäristöstä. Faagiresistenttiys kehittyy nopeammin runsasravinteisessa elatusaineessa kuin luonnossa (Hernandez ja Koskella 2019). Faagin ja bakteerin rinnakkaisevoluution tutkiminen luonnonmukaisia olosuhteita jäljitellen on siis tärkeää, jotta saadaan mahdollisimman todenmukaisia tuloksia. Tässä työssä käytettiin autoklavoitua Jyväsjärven vettä luonnonmukaisten olosuhteiden jäljittelemiseksi. Voi siis olla, että tulokset kuvastavat, kuinka bakteerin ja faagin rinnakkaisevoluutio vaikuttaa faagiresistenssin kehittymiseen järvisedessä. Erilaisessa ympäristössä, kuten isäntäeliön läsnä ollessa, vuorovaikutus saattaa olla erilaista.

4.3 Bakteerin infektointi kahdella faagilla

Tutkimukset ovat antaneet lupaavia tuloksia yhden faagin hyödyntämisessä yhtä *F. columnare* -kantaan vastaan (Prasad ym. 2011, Laanto ym. 2015). Tätä työtä

vastaavaa koetta kahden eri faagin vaikutuksesta *F. columnare* -bakteeriin järvivedessä ei ole aikaisemmin raportoitu. Kahden faagin käyttämisen tarkoituksena oli bakteerin infektointi mahdollisesti kahdella eri tavalla perustuen siihen, että käytetyt faagit infektoisivat bakteeria eri reseptorien välityksellä. Työn yhtenä odotuksena oli, että kahden saman tai eri faagityypin käyttäminen olisi ollut tehokkaampi tapa infektoida ja heikentää bakteerin kasvua, kuin yhden faagin käyttäminen. Selkeää eroa ei kuitenkaan havaittu.

Kahden faagin käsittelyissä yhden tai kahden faagityypin käyttämisellä oli jonkin verran eroa bakteerien pesäkemorfologiajakaumiin: kahden faagityypin käsittelyssä (Kuva 5D) muutos r-pesäketyyppi -painotteisemmaksi tapahtui hitaammin. Samassa käsittelyssä r-pesäketyyppien osuus oli lopulta myös suurempi kuin yhden faagin käsittelyissä. Tämä pesäkemorfologiaosuuksien hitaampi muutos saattaa viitata siihen, että kaksi faagityyppiä heikensi faagiresistenssin kehittymistä (ks. kohta 4.2). Bakteritiheyksien ja faagitiittereiden muutoksissa oli myös hieman eroja, mutta ei selkeää. Molempien bakteerien käsittelyissä yhtä faagia sisältävien käsittelyjen muutokset bakteritiheydessä ja faagitiitterissä olivat lähes samansuuruisia kuin kahta faagia sisältävien. Kuitenkin kahden faagityypin C2/mix-käsittelyn bakteritiheyden muutokset olivat hieman vähäisempiä kuin yhden faagin C2/F37-käsittelyn (Kuva 3). Tämä mahdollisesti selittyy osittain F13-faagin heikommalla kyvyllä infektoida C2-bakteeria (ks. kohta 4.1). C2/mix-käsittelyssä infektiot tapahtuivat mahdollisesti suurimmaksi osaksi faagin F37 vaikutuksesta, jolloin C2-bakteeria infektoivien faagien kokonaismäärä oli alhaisempi. Infektiokykyisten faagien määrän ero on siis mahdollisesti osasyynä eroihin käsittelyjen C2/mix ja C2/F37 bakteritiheyksissä, tiittereissä ja morfologiajakaumissa. Lyyttisten faagien määrä vaikuttaakin olennaisesti bakteerifaagi-dynamiikkaan. Eri faagi-bakteeri-suhteita käyttämällä esimerkiksi Chen ym. (2018) havaitsivat *A. salmonicida* -bakteerin infektoinnin olevan tehokkaampaa matalammalla MOI-arvolla. Samassa tutkimuksessa havaittiin myös, että kahden

faagin käyttäminen on tehokkaampaa, kuin yhden, kolmen, neljän tai viiden faagin. Lisäksi kahden faagin yhteisvaikutus oli todennäköisesti tehokkaampaa silloin, kun ne infektoivat bakteeria eri mekanismeilla (Chen ym. 2018). Näiden perusteella kahden faagityypin eli C2/mix-käsittelyssä bakteerin infektointi saattoi olla tehokkaampaa, mutta havaittu ero ei ollut suuri. Toisaalta esimerkiksi *Escherichia coli* -bakteerille tehdyssä tutkimuksessa faagit estivät bakteerin kasvun kokonaan MOI-arvon ollessa 1 tai yli, ja MOI-arvon laskiessa infektointitehokkuus heikkeni (Rajnovic ym. 2019).

Vaikka tämä työ ei antanut selkeitä viitteitä siitä, että kahden faagityypin käyttäminen yhden sijasta parantaisi bakteerin infektointia, voi kuitenkin olla, että eri faagien yhdistelmät olisivat infektoineet bakteeria tehokkaammin. Toiset kahden faagin yhdistelmät voivatkin infektoida bakteeria paremmin kuin toiset (Chen ym. 2018). Täten tässä työssä saatu tulos kertoo lähinnä siitä, että miten nämä kyseiset kahden faagin ja faagityypin yhdistelmät vaikuttivat käytettyihin *F. columnare* -bakteerikantoihin. Käyttämällä kohdebakteeria vastaan evolvoituneita eli infektiivisyydeltään vahvempia faageja, voi faagi-bakteeri-dynamiikka olla erilaista, ja bakteerin infektointi tehokkaampaa.

4.4 Faagien evolvointi bakteeria vastaan

Faagin evolvointi mahdollistaa bakteerikannan tehokkaamman infektoinnin. Faagiterapian kannalta faagin evolvointi onkin yksi keskeinen tavoite. Siten voidaan paremmin varmistaa, ettei bakteeripopulaatiossa kehity faagille resistenttejä yksilöitä, jotka voisivat tehdä faagiterapian hyödyttömäksi (Merikanto ym. 2018). Työssä evolvoitunut faagi havaittiin z-pesäketyyppejä muodostavalla bakteerilla C2zp. Toisin sanoen z-pesäketyyppejä muodostava bakteeri oli faagi-infektiolle altis. Evolvoitunut faagi havaittiin yhdestä kahta faagityyppeä sisältävästä käsittelystä (C2/mix). Vaikka alkuperäisen F37-faagin vuorovaikutus

C2zp-bakteeriin muistutti välillä infektiota (Taulukko 5), C2zp-bakteeri määritettiin resistentiksi, sillä testaukset toistettiin seitsemän kertaa ja kyseinen vuorovaikutus oli useimmin inhibitiota.

Saman käsittelyn kahdesta muusta puhdistetusta pesäkkeestä r-pesäketyyppiä muodostava bakteeri oli faagiresistentti, eli kahden viikon aikana ei ollut kehittynyt kyseistä r-pesäketyyppiä ilmentänyttä bakteeria infektoivia faageja. S-pesäketyyppiä muodostava bakteeri kasvoi maljalla puolestaan liian heikosti vuorovaikutusten määrittämiseksi. Evolvoituneen faagin havaitseminen z-pesäketyyppiä muodostavalla bakteerilla voisi mahdollisesti johtua kyseistä morfologiaa tuottavan bakteerin suuremmasta herkkyydestä faagi-infektiolle. Saattaa olla, että faagi käytti bakteerin liikkumiskykyyn vaikuttavaa reseptoria (Laanto ym. 2012). Bakteeri oli kuitenkin resistentti alkuperäisille faageille. Reseptoriin kohdistuneen muutoksen lisäksi bakteereilla on useita puolustuskeinoja, joten alkuperäisiä faageja vastaan resistenssin tuoma ominaisuus on voinut tapahtua monessa eri resistenssimekanismissa (Stone ym. 2019). Mahdollinen reseptorin muutos tarkoittaisi sitä, että alkuperäinen faagi mutatoitui esimerkiksi muokkaamalla reseptoriin kiinnittyvää proteiiniaan, poistamalla reseptorin peiton tai oppimalla infektoimaan uutta kohdereseptoria (Samson ym. 2013). Alkuperäisiä faageja vastaan resistenssimekanismi saattoi perustua pintarakenteen sijasta myös esimerkiksi restriktiomuokkaus- tai CRISPR-Cas-systeemiin (ks. kohta 4.2.). Näitä puolustusmekanismeja vastaan evolvoitunut faagi saattoi siis kehittyä esimerkiksi metyloimalla tai mutatoimalla genomiaan (Samson ym. 2013, Laanto ym. 2017).

Evolvoituneiden faagien havaitsemiseen kahta eri geneettistä ryhmää infektoivien faagien käsittelystä saattoi vaikuttaa se, että faagit käyttivät mahdollisesti eri reseptoreja. Eri reseptoreja infektoivat faagityypit voivat hidastaa faagiresistenssin kehittymistä (Tanji ym. 2003). Saattaisi siis olla, ettei C2zp-bakteeri kyennyt

hankkimaan resistenssimekanismeja yhtä nopeasti, kuin mitä se olisi kyennyt yhden faagityypin läsnä ollessa.

Ilman genomin sekvensointia ei voida sanoa, kumpi faageista (F13 vai F37) oli evolvoitunut. Alkuperäisiin faageihin verrattuna evolvoituneen faagin plakin koko oli kuitenkin lähes samankokoinen. Tämä viittaa siihen, että plakin kokoon vaikuttavissa ominaisuuksissa ei tapahtunut tarpeeksi suurta muutosta, jotta se olisi selkeästi havaittu. Esimerkiksi faagin suurempi häntä tai kapsidin koko voisivat aiheuttaa plakin koon pienenemisen (Jurczak-Kurek ym. 2016).

4.5 Johtopäätökset

Työn tavoitteena oli saada uutta tietoa faagien vaikutuksesta *F. columnare* -bakteeriin. Faageille altistumisen seurauksena faagiresistenttiys yleistyi ja r-pesäkkeiden osuus kasvoi selkeästi. Samalla tämä saattaa viitata siihen, että bakteeripopulaatiossa taudinaiheuttamiskykyisimpien bakteerien osuus väheni. Voi olla, että r-pesäketyypeillä on jokin tietty resistenssimekanismi, joka suojaa faagi-infektiolta z-pesäketyyppiä paremmin, mutta aiheuttaa samalla taudinaiheuttamiskyvyn heikentymisen. Näin ollen työn tulokset tukevat faagiterapian hyödyntämistä columnaris-taudin hoidossa. Sillä, käytettiinkö yhtä faagia vai faagikoktailia, ei ollut selkeää vaikutusta bakteerin infektoinnin tehokkuuteen. Faagikoktailissa kahden eri faagityypin käyttäminen kuitenkin vaikutti hieman hidastavan faagiresistenttiyden yleistymistä. Tämä saattaa viitata siihen, että kahta faagityyppiä käyttämällä bakteerin infektointi olisi tehokkaampaa. Faagi kykeni myös evolvoitumaan käsittelyssä, jossa oli läsnä toinen faagityyppi. Täten faagikoktaili kahdella eri faagityypillä voisi olla tehokkaampi keino infektoida bakteeria, kuin yhdellä faagilla tai yhden faagityypin koktaililla. Tulokset kertovat kuitenkin vain, miten kyseiset faagit ja niiden yhdistelmät vaikuttivat kyseiseen *F. columnare* -kantaan. Toisenlaiset faagit ja

faagikoktailit voisivat toimia tehokkaammin, joten tutkimusta erilaisten faagikoktailien vaikutuksista *F. columnare* -bakteeriin tarvitaan. Mahdollisimman tehokasta infektointia varten myös sopiva MOI-arvo tulisi määrittää.

Tämä työ antoi uutta tietoa *F. columnare* -bakteerin ja sen faagien vuorovaikutuksesta. Näin ollen työ toi uutta tietoa *F. columnare* -bakteerin aiheuttaman columnaris-taudin ehkäisyyn ja hoitoon faageja hyödyntäen. Työn tuloksiin ja niiden tulkintaan vaikuttavat näytteiden määrä ja myöhempiin testauksiin valikoidut bakteeripesäkkeet. On mahdollista, että käsittelyissä oli havaittua enemmän faagiresistenttejä bakteereja ja evolvoituneita faageja. Ei myöskään tiedetä, kuinka työn bakteerit ja faagit olisivat käyttäytyneet, jos bakteerin isäntälaji olisi ollut läsnä.

KIITOKSET

Tämä työ tehtiin osana BONUS FLAVOPHAGE -projektia. Haluan kiittää kaikkia, jotka auttoivat pro gradu -tutkielman tekemisessä. Elina Savilahta haluan kiittää akateemisten taitojen ohjauksesta. Erityisesti haluan kiittää ohjaajiani Anniina Runtuvuori-Salmelaa, Heidi Kunttua ja Lotta-Riina Sundbergia kärsivällisestä ja hyvästä ohjauksesta.

KIRJALLISUUS

- Amitai G. & Sorek R. 2016. CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nature Reviews Microbiology* 14(2): 67–76. doi:10.1038/nrmicro.2015.14.
- Arias C.R., LaFrentz S., Cai W. & Olivares-Fuster O. 2012. Adaptive response to starvation in the fish pathogen *Flavobacterium columnare*: cell viability and ultrastructural changes. *BMC Microbiology* 12: 266. doi:10.1186/1471-2180-12-266.
- Bergh Ø., Børsheim y., Bratbak G. & Heldal M. 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* 340(6233): 467–468. doi:10.1038/340467a0.
- Bickle T.A. & Krüger D.H. 1993. Biology of DNA Restriction. *Microbiological Reviews* 57(2): 434-450. doi:0146-0749/93/020434-17\$02.00/0.
- Buckling A. & Rainey P.B. 2002. Antagonistic coevolution between a bacterium and a bacteriophage. *Proceedings of the Royal Society of London* 269(1494): 931–936. doi:10.1098/rspb.2001.1945.
- Carlton R.M. 1999. Phage Therapy: Past History and Future Prospects. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 47(5): 267–274.
- Castillo D., Christiansen R.H., Dalsgaard I., Madsen L. & Middelboe M. 2015. Bacteriophage Resistance Mechanisms in the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*: Linking Genomic Mutations to Changes in Bacterial Virulence Factors. *Applied and Environmental Microbiology* 81(3): 1157–1167. doi:10.1128/AEM.03699-14.
- Chan B. K., Abedon S. T. & Loc-Carrillo C. 2013. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiology* 8:6. doi:10.2217/fmb.13.47.
- Chan B.K., Siström M., Wertz J.E., Kortright K.E., Narayan D. & Turner P.E. 2016. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports* 6: 26717. doi:10.1038/srep26717.
- Chen L., Yuan S., Liu Q., Mai G., Yang J., Deng D., Zhang B., Liu C. & Ma Y. 2018. In Vitro Design and Evaluation of Phage Cocktails Against *Aeromonas salmonicida*. *Frontiers in Microbiology* 9: 1476. doi:10.3389/fmicb.2018.01476.
- Costa P., Pereira C., Gomes A.T.P.C. & Almeida A. 2019. Efficiency of Single Phage Suspensions and Phage Cocktail in the Inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: An In Vitro Preliminary Study. *Microorganisms* 7(4): 94. doi:10.3390/microorganisms7040094.
- Darwish A.M., Mitchell A. & Straus D.L. 2012. Evaluation of a 4-h static copper sulphate treatment against experimental infection of *Flavobacterium columnare*

- in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture Research* 43(5): 688–695. doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02876.x.
- Darwish A.M., Mitchell A.J. & Straus D.L. 2009. Evaluation of potassium permanganate against an experimental subacute infection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Diseases* 32(2): 193–199. doi:10.1111/j.1365-2761.2008.01015.x.
- Davis. H.S. 1922. A new bacterial disease of fresh-water fishes.
- Debarbieux L., Leduc D., Maura D., Morello E., Criscuolo A., Grossi O., Balloy V. & Touqui L. 2010. Bacteriophages Can Treat and Prevent *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infections. *The Journal of Infectious Diseases* 201(7): 1096–1104. doi:10.1086/651135.
- Declercq A.M., Haesebrouck F., Van den Broeck W., Bossier P. & Decostere A. 2013. Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. *Veterinary Research* 44(1):27. doi:10.1186/1297-9716-44-27.
- Decostere A., Haesebrouck F., Turnbull J.F. & Charlier G. 1999. Influence of water quality and temperature on adhesion of high and low virulence *Flavobacterium columnare* strains to isolated gill arches. *Journal of Fish Diseases* 22(1): 1–11. doi:10.1046/j.1365-2761.1999.00132.x.
- Dion M.B., Oechslin F. & Moineau S. 2020. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology* 18(3): 125–138. doi:10.1038/s41579-019-0311-5.
- Dupuis M-E, Villion M., Magadán A.H. & Moineau S. 2013. CRISPR-Cas and restriction–modification systems are compatible and increase phage resistance. *Nature Communications* 4(1): 2087. doi:10.1038/ncomms3087.
- Erez Z., Steinberger-Levy I., Shamir M., Doron S., Stokar-Avihail A., Peleg Y., Melamed S., Leavitt A., Savidor A., Albeck S., Amitai G. & Sorek R. 2017. Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. *Nature* 541(7638): 488–493. doi:10.1038/nature21049.
- FAO 2018: *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals*. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>.
- Flyg C., Kenne K. & Boman H.G. 1980. Insect Pathogenic Properties of *Serratia marcescens*: Phage-resistant Mutants with a Decreased Resistance to *Cecropia* Immunity and a Decreased Virulence to *Drosophila*. *Journal of General Microbiology* 120(1): 173–181. doi:10.1099/00221287-120-1-173.
- Fortier L.-C. & Sekulovic O. 2013. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence* 4(5): 354–365. doi:10.4161/viru.24498.

- Freeman V.J. 1951. Studies on the Virulence of Bacteriophage-Infected Strains of *Corynebacterium Diphtheriae*. *Journal of bacteriology* 61(6): 675–688.
- García J.C., LaFrentz B.R., Waldbieser G.C., Wong F.S. & Chang S.F. 2018. Characterization of atypical *Flavobacterium columnare* and identification of a new genomovar. *Journal of Fish Diseases* 41(7): 1159–1164. doi:10.1111/jfd.12778.
- Gómez P. & Buckling A. 2011. Bacteria-Phage Antagonistic Coevolution in Soil. *Science* 332: 106–109. doi:10.1126/science.1198767.
- Henderson I.R., Owen P. & Nataro J.P. 1999. Molecular switches – the ON and OFF of bacterial phase variation. *Molecular Microbiology* 33(5): 919–932. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01555.x.
- Hernandez C.A. & Koskella B. 2019. Phage resistance evolution in vitro is not reflective of in vivo outcome in a plant-bacteria-phage system*. *Evolution* 73(12): 2461–2475. doi:10.1111/evo.13833.
- Howard-Varona C., Hargreaves K.R., Abedon S.T. & Sullivan M.B. 2017. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *The ISME Journal* 11(7): 1511–1520. doi:10.1038/ismej.2017.16.
- Hyman P. 2019. Phages for phage therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. *Pharmaceuticals* 12(1): 35. doi:10.3390/ph12010035.
- Jeon J., Park J.-H. & Yong D. 2019. Efficacy of bacteriophage treatment against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in *Galleria mellonella* larvae and a mouse model of acute pneumonia. *BMC Microbiology* 19:70. doi:10.1186/s12866-019-1443-5.
- Jurczak-Kurek A., Gašior T., Nejman-Faleńczyk B., Bloch S., Dydecka A., Topka G., Necel A., Jakubowska-Deredas M., Narajczyk M., Richert M., Mieszkowska A., Wróbel B., Węgrzyn G. & Węgrzyn A. 2016. Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. *Scientific Reports* 6: 34338. doi:10.1038/srep34338.
- Kivelä H.M., Kalkkinen N. & Bamford D.H. 2002. Bacteriophage PM2 Has a Protein Capsid Surrounding a Spherical Proteinaceous Lipid Core. *Journal of Virology* 76(16): 8169–8178. doi:10.1128/JVI.76.16.8169-8178.2002.
- Krylov V., Shaburova O., Krylov S. & Pleteneva E. 2013. A Genetic Approach to the Development of New Therapeutic Phages to Fight *Pseudomonas Aeruginosa* in Wound Infections. *Viruses* 5(1): 15–53. doi:10.3390/v5010015.
- Kunttu H.M.T., Jokinen E.I., Valtonen E.T. & Sundberg L.-R. 2011. Virulent and nonvirulent *Flavobacterium columnare* colony morphologies: characterization of chondroitin AC lyase activity and adhesion to polystyrene. *Journal of Applied Microbiology* 111(6): 1319–1326. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05149.x.

- Kunttu H.M.T., Suomalainen L.-R., Jokinen E.I. & Valtonen E.T. 2009. *Flavobacterium columnare* colony types: Connection to adhesion and virulence? *Microbial Pathogenesis* 46(1): 21–27. doi:10.1016/j.micpath.2008.10.001.
- Laanto E., Bamford J.K.H., Laakso J. & Sundberg L.-R. 2012. Phage-Driven Loss of Virulence in a Fish Pathogenic Bacterium. *PLoS One* 7(12): e53157. doi:10.1371/journal.pone.0053157.
- Laanto E., Bamford J.K.H., Ravantti J.J. & Sundberg L.-R. 2015. The use of phage FCL-2 as an alternative to chemotherapy against columnaris disease in aquaculture. *Frontiers in Microbiology* 6: 829. doi:10.3389/fmicb.2015.00829.
- Laanto E., Hoikkala V., Ravantti J. & Sundberg L.-R. 2017. Long-term genomic coevolution of host-parasite interaction in the natural environment. *Nature Communications* 8:111. doi:10.1038/s41467-017-00158-7.
- Laanto E., Penttinen R.K., Bamford J.K.H. & Sundberg L.-R. 2014. Comparing the different morphotypes of a fish pathogen - implications for key virulence factors in *Flavobacterium columnare*. *BMC Microbiology* 14: 170. doi:10.1186/1471-2180-14-170.
- Laanto E., Sundberg L.-R. & Bamford J.K.H. 2011. Phage Specificity of the Freshwater Fish Pathogen *Flavobacterium columnare*. *Applied and Environmental Microbiology* 77(21): 7868–7872. doi:10.1128/AEM.05574-11.
- LaFrentz B.R., Waldbieser G.C., Welch T.J. & Shoemaker C.A. 2014. Intragenomic heterogeneity in the 16S rRNA genes of *Flavobacterium columnare* and standard protocol for genomovar assignment. *Journal of Fish Diseases* 37(7): 657–669. doi:10.1111/jfd.12166.
- Lenski R.E. 1988. Experimental Studies of Pleiotropy and Epistasis in *Escherichia coli*. I. Variation in Competitive Fitness Among Mutants Resistant to Virus T4. *Evolution* 42(3): 425–432. doi:10.1111/j.1558-5646.1988.tb04149.x.
- Lin T.-Y., Lo Y.-H., Tseng P.-W., Chang S.-F., Lin Y.-T. & Chen T.-S. 2012. A T3 and T7 Recombinant Phage Acquires Efficient Adsorption and a Broader Host Range. *PLoS ONE* 7(2): e30954. doi:10.1371/journal.pone.0030954.
- Martino P.D. 2018. Extracellular polymeric substances, a key element in understanding biofilm phenotype. *AIMS Microbiology* 4(2): 274–288. doi:10.3934/microbiol.2018.2.274.
- Merikanto I., Laakso J.T. & Kaitala V. 2018. Outside-host phage therapy as a biological control against environmental infectious diseases. *Theoretical Biology and Medical Modelling* 15(1): 7. doi:10.1186/s12976-018-0079-8.
- Mohammed H.H. & Arias C.R. 2014. Epidemiology of columnaris disease affecting fishes within the same watershed. *Diseases of aquatic organisms* 109(3): 201–211. doi:10.3354/dao02739.

- Nematollahi A., Decostere A., Pasmans F. & Haesebrouck F. 2003. *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *Journal of fish diseases* 26(10): 563–574. doi:10.1046/j.1365-2761.2003.00488.x.
- Olivares-Fuster O., Shoemaker C.A, Klesius P.H. & Arias C.R. 2007. Molecular typing of isolates of the fish pathogen, *Flavobacterium columnare*, by single-strand conformation polymorphism analysis. *FEMS Microbiology Letters*. 269(1): 63–69. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00605.x.
- Pal C., Maciá M., Oliver A., Schachar I. & Buckling A. 2007. Coevolution with viruses drives the evolution of bacterial mutation rates. *Nature* 450(7172): 1079–1081. doi:10.1038/nature06350.
- Peterman M.A. & Posadas B.C. 2019. Direct Economic Impact of Fish Diseases on the East Mississippi Catfish Industry. *North American Journal of Aquaculture* 81(3): 222–229. doi:10.1002/naaq.10090.
- Pirnay J.-P., Verbeken G., Rose T., Jennes S., Zizi M., Huys I., Lavigne R., Merabishvili M., Vaneechoutte M., Buckling A. & De Vos D. 2012. Introducing yesterday's phage therapy in today's medicine. *Future Virology* 7(4): 379–390. doi:10.2217/fvl.12.24.
- Prasad Y., Arpana, Kumar D. & Sharma A.K. 2011. Lytic bacteriophages specific to *Flavobacterium columnare* rescue catfish, *Clarias batrachus* (Linn.) from columnaris disease. *Journal of Environmental Biology* 32(2): 161–168.
- Pulkkinen K., Suomalainen L.-R., Read A.F. Ebert D., Rintamäki P. & Valtonen E.T. 2010. Intensive fish farming and the evolution of pathogen virulence: the case of columnaris disease in Finland. *Proceedings Biological Sciences* 277(1681): 593–600. doi:10.1098/rspb.2009.1659.
- Rajnovic D., Muñoz Berbel X. & Mas J. 2019 Fast phage detection and quantification: An optical density-based approach. *PLoS One* 14(5): e0216292. doi:10.1371/journal.pone.0216292.
- Ravanti J.J., Laanto E., Papponen P. & Sundberg L.-R. 2019. Complete genome sequence of fish pathogen *Flavobacterium columnare* strain B185, originating from Finland. *Microbiology Resource Announcements* 8(49): e01285-19. doi:10.1128/MRA.01285-19.
- Romero-Calle D., Benevides R.G., Góes-Neto A. & Billington C. 2019. Bacteriophages as Alternatives to Antibiotics in Clinical Care. *Antibiotics (Basel)* 8(3): 138. doi:10.3390/antibiotics8030138.
- Ruokakalankasvatus 2020. Luonnonvarakeskus (Luke)
<https://www.luke.fi/tietoa-luonnonvaroista/kalat-jakalatalous/kalanviljely/ruokakalankasvatus/> (luettu 4.3.2020)

- Salmond G.P.C. & Fineran P.C. 2015. A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews Microbiology* 13(12): 777-786. doi:10.1038/nrmicro3564.
- Samson J.E., Magadán A.H., Sabri M. & Moineau S. 2013. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nature Reviews*. 11(10): 675-687. doi:10.1038/nrmicro3096.
- Smith H.W. & Huggins M.B. 1983. Effectiveness of Phages in Treating Experimental *Escherichia coli* Diarrhoea in Calves, Piglets and Lambs. *Journal of General Microbiology* 129(8): 2659-2675. doi:10.1099/00221287-129-8-2659.
- Song Y.L., Fryer J.L. & Rohovec J.S. 1988. Comparison of six Media for the Cultivation of *Flexibacter columnaris*. *Fish Pathology* 23(2): 91-94. doi:10.3147/jsfp.23.91.
- Sousa J.A.M.d & Rocha E.P.C. 2019. Environmental structure drives resistance to phages and antibiotics during phage therapy and to invading lysogens during colonisation. *Scientific Reports* 9: 3149. doi:10.1038/s41598-019-39773-3.
- Stone E., Campbell K., Grant I. & McAuliffe O. 2019. Understanding and Exploiting Phage-Host Interactions. *Viruses* 11(6): 567. doi:10.3390/v11060567.
- Sundberg L.-R., Kunttu H.M.T. & Valtonen E.T. 2014. Starvation can diversify the population structure and virulence strategies of an environmentally transmitting fish pathogen. *BMC Microbiology* 14: 64. doi:10.1186/1471-2180-14-67.
- Suomalainen L.-R., Kunttu H., Valtonen E.T., Hirvelä-Koski V. & Tiirola M. 2006b. Molecular diversity and growth features of *Flavobacterium columnare* strains isolated in Finland. *Diseases of Aquatic Organisms* 70(1-2): 55-61. doi:10.3354/dao070055.
- Suomalainen L.-R., Tiirola M. & Valtonen E.T. 2005a. Effect of *Pseudomonas* sp. MT5 baths on *Flavobacterium columnare* infection of rainbow trout and on microbial diversity on fish skin and gills. *Diseases of Aquatic Organisms* 63(1): 61-68. doi:10.3354/dao063061.
- Suomalainen L.-R., Tiirola M. & Valtonen E.T. 2005b. Treatment of columnaris disease of rainbow trout: low pH and salt as possible tools? *Diseases of Aquatic Organisms* 65: 115-120. doi:10.3354/dao065115.
- Suomalainen L.-R., Tiirola M. & Valtonen E.T. 2006a. Chondroitin AC lyase activity is related to virulence of fish pathogenic *Flavobacterium columnare*. *Journal of Fish Diseases* 29(12): 757-763. doi:10.1111/j.1365-2761.2006.00771.x.
- Tanji Y., Shimada T., Yoichi M., Miyanaga K., Hori K. & Unno H. 2003. Toward rational control of *Escherichia coli* 0157:H7 by a phage cocktail. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 270-274. doi:10.1007/s00253-003-1438-9.

- Tekedar H.C., Karsi A., Gillaspay A.F., Dyer D.W., Benton N.R., Zaitshik J., Vamenta S., Banes M.M., Gülsoy N., Aboko-Cole M., Waldbieser G.C. & Lawrence M.L. 2012. Genome Sequence of the Fish Pathogen *Flavobacterium columnare* ATCC 49512. *Journal of Bacteriology* 194(10): 2763–2764. doi:10.1128/JB.00281-12.
- Triyanto & Wakabayashi H. 1999. Genotypic Diversity of Strains of *Flavobacterium columnare* from Diseased Fishes. *Fish Pathology* 34(2): 65–71. doi:10.3147/jsfp.34.65.
- Wagner B.A., Wise D.J., Khoo L.H. & Terhune J.S. 2002. The Epidemiology of Bacterial Diseases in Food-Size Channel Catfish. *Journal of Aquatic Animal Health* 14(4): 263–272. doi:10.1577/1548-8667(2002)014<0263:TEOBDI>2.0.CO;2.
- van Houte S., Buckling A. & Westra E.R. 2016. Evolutionary Ecology of Prokaryotic Immune Mechanisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80(3): 745–765. doi:10.1128/MMBR.00011-16.
- Vesiviljely 2018. Suomen virallinen tilasto (SVT). https://stat.luke.fi/vesiviljely-2018_fi (luettu: 4.3.2020)
- Wright R.C.T., Friman V.-P., Smith M.C.M. & Brockhurst M.A. 2019. Resistance Evolution against Phage Combinations Depends on the Timing and Order of Exposure. *mBio*. 10:e01652-19. doi:10.1128/mBio.01652-19.
- Yamaguchi T., Hayashi T., Takami H., Nakasone K., Ohnishi M., Nakayama K., Yamada S., Komatsuzawa H. & Sugai M. 2000. Phage conversion of exfoliative toxin A production in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* 38(4): 694–705. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.02169.x.
- Yritykset 2020. Suomen Kalankasvattajaliitto Ry. <https://www.kalankasvatus.fi/kalankasvattajaliitto/yritykset/> (luettu: 4.3.2020)
- Zhang J., Laakso J., Mappes J., Laanto E., Ketola T., Bamford J. K.H., Kunttu H. & Sundberg L.-R. 2014. Association of colony morphotypes with virulence, growth and resistance against protozoan predation in the fish pathogen *Flavobacterium columnare*. *FEMS Microbiology Ecology* 89(3): 553–562. doi:10.1111/1574-6941.12356.

LIITE 1. Shieh-elatusaine

Shieh-liemi (Song ym. 1988).

Reagenssi	Pitoisuus	Valmistaja
peptoni	5,0 g/l	Sigma-Aldrich
hiivauute	0,5 g/l	Fluka-Analytical/Sigma-Aldrich
FeSO ₄	2,0 µM	EMD Millipore/Merck KGaA
CH ₃ OONa	120 µM	SigmaUltra/Sigma-Aldrich
MgO ₄ S	590 µM	Merck KGaA
BaCl ₂	35 µM	Sigma-Aldrich
CaCl ₂	35 µM	Sigma
NaHCO ₃	600 µM	Sigma
K ₂ HO ₄ P	440 µM	EMD Millipore/Merck KGaA
KH ₂ PO ₄	370 µM	EMD Millipore/Merck KGaA
1 M NaOH	niin, että pH 7,2	
ionivaihdettu vesi		

Shieh-pehmytagar ja Shieh-pehmytagar, joka sisälsi musiinia.

Reagenssi	Pitoisuus	Valmistaja
Shieh-liemi		
agar	5 g/l	Biokar Diagnostic
tarvittaessa musiini	0,1 %	Sigma-Aldrich

Shieh-agar.

Reagenssi	Pitoisuus	Valmistaja
Shieh-liemi		
agar	10 g/l	Biokar Diagnostic

LIITE 2. Optisen tiheyden ja *F. columnare* -bakteeritiheyden suhde.

Aikaisemmin määritettyjä optisen tiheyden (engl. optical density, OD) ja *F. columnare* -bakteerin CFU/ml-arvon suhteita mitattuna aallonpituudella 595 nm ja 200 µl näytetilavuudella.

OD-arvo (200 µl)	CFU/ml x 10 ⁶ -arvo	OD-arvo (200 µl)	CFU/ml x 10 ⁶ -arvo
0,035	-2	0,180	198
0,040	8	0,185	204
0,045	17	0,190	210
0,050	27	0,195	216
0,055	36	0,200	222
0,060	44	0,205	228
0,065	52	0,210	234
0,070	61	0,215	241
0,075	68	0,220	248
0,080	76	0,225	254
0,085	83	0,230	261
0,090	90	0,235	269
0,095	97	0,240	276
0,100	104	0,245	284
0,105	110	0,250	292
0,110	117	0,255	300
0,115	123	0,260	309
0,120	129	0,265	318
0,125	135	0,270	327
0,130	141	0,275	337
0,135	147	0,280	347
0,140	153	0,285	357
0,145	158	0,290	368
0,150	164	0,295	379
0,155	170	0,300	390
0,160	175	0,305	402
0,165	181	0,310	415
0,170	187	0,315	427
0,175	192		

LIITE 3. Kokeen C2-bakteeritiheydet ja käsittelyjen faagitiitterit.

Bakteeritiheydet (CFU/ml) sekä faagitiitterit (PFU/ml) ovat 0–8 tunnin kohdissa käsittelyn yhdestä replikaatista, ja loput ovat kolmen replikaatin keskiarvosta. Käsittelyjen replikaattien pienin ja suurin arvo merkitty viereiselle sarakkeelle. Tiitterit määritettiin C2-bakteerilla.

Käsittely	Aika (h)	CFU/ml -arvo	Pienin ja suurin CFU/ml -arvo	PFU/ml -arvo	Pienin ja suurin PFU/ml -arvo
C2 K	0	$6,1 \times 10^4$		0	
	2	$1,8 \times 10^5$		0	
	4	$4,9 \times 10^5$		0	
	6	$1,7 \times 10^6$		0	
	8	$7,3 \times 10^6$		0	
	24	$1,7 \times 10^7$	$4,9 \times 10^6$ ja $3,8 \times 10^7$	0	0
	48	$4,2 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$ ja $6,8 \times 10^7$	0	0
	336	$6,1 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$ ja $9,0 \times 10^6$	0	0
C2/F13	0	$4,5 \times 10^4$		0	
	2	$1,1 \times 10^5$		0	
	4	$3,6 \times 10^5$		0	
	6	$1,0 \times 10^6$		0	
	8	$4,1 \times 10^6$		0	
	24	$1,2 \times 10^7$	$8,6 \times 10^6$ ja $1,6 \times 10^7$	0	0
	48	$6,4 \times 10^7$	$4,1 \times 10^7$ ja $1,0 \times 10^8$	0	0
	336	$3,7 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$ ja $7,4 \times 10^6$	0	0
C2/F37	0	$4,8 \times 10^4$		$5,0 \times 10^3$	
	2	$1,3 \times 10^5$		$3,0 \times 10^3$	
	4	$3,7 \times 10^5$		$6,0 \times 10^3$	
	6	$1,3 \times 10^6$		$8,0 \times 10^3$	
	8	$4,3 \times 10^4$		$3,0 \times 10^3$	
	24	$7,8 \times 10^3$	$3,7 \times 10^3$ ja $1,1 \times 10^4$	$1,6 \times 10^9$	$9,2 \times 10^9$ ja $2,5 \times 10^9$
	48	$2,7 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$ ja $3,7 \times 10^7$	$8,2 \times 10^7$	$4,7 \times 10^7$ ja $1,2 \times 10^8$
	336	$3,7 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$ ja $4,4 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$4,0 \times 10^6$ ja $2,0 \times 10^7$
C2/mix	0	$4,9 \times 10^4$		$4,0 \times 10^3$	
	2	$1,3 \times 10^5$		$1,0 \times 10^3$	
	4	$4,7 \times 10^5$		$2,0 \times 10^3$	
	6	$2,1 \times 10^6$		$4,0 \times 10^3$	
	8	$3,5 \times 10^6$		$1,0 \times 10^4$	
	24	$3,0 \times 10^4$	$2,5 \times 10^3$ ja $8,1 \times 10^4$	$1,7 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$ ja $2,1 \times 10^9$
	48	$1,7 \times 10^7$	$8,7 \times 10^6$ ja $2,5 \times 10^7$	$4,4 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$ ja $9,5 \times 10^7$
	336	$5,1 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$ ja $6,1 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$	$5,0 \times 10^5$ ja $9,0 \times 10^6$
F13 K	0	0		0	
	2	0		0	
	4	0		0	
	6	0		0	
	8	0		0	
	24	0	0	0	0
	48	0	0	0	0
	336	0	0	0	0
F37 K	0	0		$4,0 \times 10^3$	
	2	0		$5,0 \times 10^3$	
	4	0		$5,0 \times 10^3$	
	6	0		$4,0 \times 10^3$	
	8	0		$5,0 \times 10^3$	
	24	0	0	$8,2 \times 10^2$	$8,0 \times 10^2$ ja $8,5 \times 10^2$
	48	0	0	$1,7 \times 10^3$	0 ja $3,3 \times 10^3$
	336	0	$2,1 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$ ja $2,5 \times 10^3$	

LIITE 4. Kokeen C9-bakteeritiheydet ja käsittelyjen faagitiitterit.

Bakteeritiheydet (CFU/ml) sekä faagitiitterit (PFU/ml) ovat 0–8 tunnin kohdissa käsittelyn yhdestä replikaatista, ja loput ovat kolmen replikaatin keskiarvosta. Käsittelyjen replikaattien pienin ja suurin arvo merkitty viereiselle sarakkeelle. Tiitterit määritettiin C9-bakteerilla.

Käsittely	Aika (h)	CFU/ml -arvo	Pienin ja suurin CFU/ml -arvo	PFU/ml -arvo	Pienin ja suurin PFU/ml -arvo
C9 K	0	$5,2 \times 10^4$		0	
	2	$8,8 \times 10^4$		0	
	4	$3,9 \times 10^5$		0	
	6	$1,8 \times 10^6$		0	
	8	$5,2 \times 10^6$		0	
	24	$5,4 \times 10^8$	$3,9 \times 10^8$ ja $6,7 \times 10^8$	0	0
	48	$1,3 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$ ja $1,6 \times 10^8$	0	0
	336	$2,8 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$ ja $4,2 \times 10^6$	0	0
C9/F13	0	$4,5 \times 10^4$		$1,0 \times 10^4$	
	2	$9,8 \times 10^4$		$1,0 \times 10^4$	
	4	$3,1 \times 10^5$		$1,1 \times 10^5$	
	6	$7,3 \times 10^5$		$3,0 \times 10^5$	
	8	$9,4 \times 10^4$		$8,0 \times 10^6$	
	24	$2,4 \times 10^5$	$3,8 \times 10^4$ ja $5,2 \times 10^5$	$3,8 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$ ja $6,1 \times 10^8$
	48	$1,1 \times 10^7$	$4,6 \times 10^6$ ja $2,1 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$ ja $1,9 \times 10^8$
	336	$2,2 \times 10^6$	$6,2 \times 10^5$ ja $5,0 \times 10^6$	$6,7 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$ ja $1,1 \times 10^8$
C9/FCL-2	0	$4,7 \times 10^4$		$1,5 \times 10^4$	
	2	$1,1 \times 10^5$		$7,0 \times 10^3$	
	4	$3,0 \times 10^5$		$1,0 \times 10^4$	
	6	$1,0 \times 10^6$		$3,0 \times 10^5$	
	8	$6,2 \times 10^5$		$2,1 \times 10^6$	
	24	$7,9 \times 10^4$	$7,0 \times 10^4$ ja $8,5 \times 10^4$	$3,4 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$ ja $3,4 \times 10^8$
	48	$1,2 \times 10^7$	$6,9 \times 10^6$ ja $2,1 \times 10^7$	$8,0 \times 10^7$	$6,0 \times 10^7$ ja $9,0 \times 10^7$
	336	$2,1 \times 10^6$	$8,7 \times 10^5$ ja $3,3 \times 10^6$	$3,6 \times 10^7$	$7,0 \times 10^6$ ja $9,0 \times 10^7$
C9/mix	0	$3,5 \times 10^4$		$7,0 \times 10^3$	
	2	$1,0 \times 10^5$		$1,6 \times 10^4$	
	4	$3,0 \times 10^5$		$3,4 \times 10^4$	
	6	$1,7 \times 10^6$		$2,0 \times 10^5$	
	8	$1,9 \times 10^5$		$3,0 \times 10^6$	
	24	$6,6 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$ ja $8,6 \times 10^4$	$3,0 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$ ja $3,6 \times 10^8$
	48	$1,3 \times 10^7$	$6,0 \times 10^6$ ja $1,9 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$ ja $2,0 \times 10^8$
	336	$1,8 \times 10^6$	$9,6 \times 10^5$ ja $2,6 \times 10^6$	$5,4 \times 10^7$	$8,0 \times 10^6$ ja $1,3 \times 10^8$
F13 K	0	0		$1,0 \times 10^4$	
	2	0		$1,1 \times 10^4$	
	4	0		$1,0 \times 10^4$	
	6	0		$2,0 \times 10^3$	
	8	0		$6,0 \times 10^3$	
	24	0	0	$1,3 \times 10^4$	$9,5 \times 10^3$ ja $1,7 \times 10^4$
	48	0	0	$1,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$ ja $2,0 \times 10^4$
	336	0	0	$4,3 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$ ja $5,0 \times 10^3$
FCL-2 K	0	0		$9,0 \times 10^3$	
	2	0		$1,0 \times 10^4$	
	4	0		$1,0 \times 10^3$	
	6	0		$5,2 \times 10^3$	
	8	0		$7,0 \times 10^3$	
	24	0	0	$4,6 \times 10^3$	$3,4 \times 10^3$ ja $5,6 \times 10^3$
	48	0	0	$9,7 \times 10^3$	$6,0 \times 10^3$ ja $1,2 \times 10^4$
	336	0	0	$4,7 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$ ja $1,0 \times 10^4$