

Pro gradu -tutkielma

**ESBL-positiivisen suolistobakteeriyhteisön
karakterisointi ja koostaminen**

Petra Paananen



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solu- ja molekyylibiologia

29.04.2022

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

Petra Paananen: ESBL-positiivisen suolistobakteeriyhteisön karakterisointi ja koostaminen
Pro gradu -tutkielma: 48 sivua, 2 liitettä (3 sivua)
Työn ohjaajat: FT Reetta Penttinen (Turun yliopisto) ja dosentti Matti Jalasvuori (Jyväskylän yliopisto)
Tarkastajat: FT Satu Pekkala ja apluaisprofessori Suvi Ruuskanen

Huhtikuu 2022

Hakusanat: ESBL-kantajuus, antibioottiresistenssi, konjugaatio, laajakirjoiset beetalaktamaasit, suolistomikrobiomi, synteettinen bakteeriyhteisö

Bakteerien yleistynyt antibioottiresistenssi on vaarantanut antibioottien tehokkuuden bakteeri-infektioiden hoidossa. ESBL:t (Extended-Spectrum Beta-Lactamases) ovat entsyymejä, jotka antavat kantajabakteerilleen resistenssin useita terveydenhuollossa yleisesti käytettyjä beetalaktaamiantibiootteja vastaan. ESBL-geenit ovat useimmiten sijoittuneet liikkuviin plasmideihin, jolloin ne voivat levittää resistenssin yhteisön muihin bakteereihin. Vaikka osa ihmisistä kantaa ESBL-bakteereja suolistossaan oireettomasti, ne aiheuttavat lisääntyneen komplikaatoriskin tavanomaistenkin lääketieteellisten toimenpiteiden yhteydessä. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli koostaa ESBL-bakteeria suolistossaan kantavan potilaan suolistomikrobiomista synteettinen bakteeriyhteisö ESBL-plasmidien leviämisen tutkimista varten. Ulostenäytteistä eristettyjä bakteereja karakterisoitiin antibioottiresistenssi-profiiliin, 16S rRNA- ja genomisekvensoinnin avulla. Lopullinen synteettinen yhteisö koostui viidestä bakteerista, joita olivat *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella sp.* ja *Comamonas kerstersii* sekä ESBL-positiivinen *Escherichia coli*. Yhteisön stabiilisuutta tutkittiin seitsemän vuorokauden mittaisessa yhteiskasvatuksessa 16S rRNA sekvensoinnin avulla. *C. kerstersii* -bakteeria lukuun ottamatta kaikki bakteerilajit säilyivät yhteisössä. Konjugaatiokokeissa havaittiin, että ESBL-plasmidien siirtymistä tapahtui pienissä määrin *E. coli* (JM109(pSU19)) bakteerikantaan. Synteettistä yhteisöä voidaan tulevaisuudessa käyttää liikkuvien plasmidien tutkimiseen kontrolloiduissa olosuhteissa ja näin ollen paremmin ymmärtää suoliston ESBL-kantajuuden riskejä.

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

Petra Paananen: Characterization and assembly of an ESBL positive
intestinal bacterial community
MSc thesis: 48 pages, 2 appendices (3 pages)
Supervisors: PhD Reetta Penttinen (University of Turku) and PhD
Matti Jalasvuori (University of Jyväskylä)
Inspectors: PhD Satu Pekkala and PI Suvi Ruuskanen

April 2022

Keywords: ESBL-carrying, antibiotic resistance, conjugation, Extended-Spectrum
Beta-Lactamases, gut microbiome, synthetic bacterial community

Antibiotic resistance in bacteria has compromised the effectiveness of antibiotics in treating bacterial infections. Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) are enzymes that confer multidrug resistance to several beta-lactam antibiotics commonly used in healthcare. ESBL genes are most often located in mobile plasmids, allowing them to spread to other bacteria in a bacterial community. Although some people carry ESBL bacteria in their gut asymptotically, they may be in increased risk of complications during standard medical procedures. The aim of this study was to assemble a synthetic bacterial community from the intestinal microbiome of a patient carrying ESBL in their gut. This community can be used to study the spread of ESBL plasmids in a controlled system where interspecific bacterial interactions are present. Bacteria were isolated from fecal samples and characterized by their antibiotic resistance profile as well as their 16S rRNA and whole genome sequences. The final synthetic community consisted of five bacteria: *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella sp.*, *Comamonas kerstersii* and *Escherichia coli*, latter of which was ESBL positive. Community stability was studied in a seven-day co-culture by elucidating the community structure by 16S rRNA sequencing. All bacterial species survived in the community, except for *C. kerstersii*. Conjugation experiments showed that there was a small amount of transfer of ESBL plasmids into the *E. coli* (JM109 (pSU19)) bacterial strain. In the future, the synthetic community can be used to study mobile plasmids under controlled conditions and thus better understand the risks of intestinal ESBL carriage.

SISÄLLYSLUETTELO

1	JOHDANTO	1
1.1	Beetalaktamaasit ja ESBL	2
1.2	Konjugatiiviset plasmidit.....	4
1.3	Suoliston mikrobiyhteisö	5
1.4	Tutkielman tavoitteet	6
2	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	8
2.1	Tutkimuksessa käytetyt näytteet, bakteerikannat ja kasvuolosuhteet	8
2.2	Bakteerikantojen eristäminen ja karakterisointi.....	9
2.2.1	Bakteerikantojen eristys	9
2.2.2	Bakteerikantojen antibioottiresistenssi	9
2.2.3	16S rRNA sekvensointi	10
2.2.4	Bakteerien genomisekvensointi	13
2.4	Inhibitiotestit	14
2.5	Bakteeriyhteisön yhteiskasvatus	14
2.6	ESBL-konjugaatiokoe	20
2.7	16S rRNA kirjaston valmistus ulostenäytteistä	21
3	TULOKSET	22
3.1	Bakteerikantojen karakterisointi.....	22
3.2	Yhteiskasvatus.....	26
3.3	ESBL-konjugaatiokoe	29
3.4	Suolistomikrobiomin yhteisörakenne.....	31
4	TULOSTEN TARKASTELU	32
4.1	Bakteerikantojen karakterisointi.....	32
4.2	Yhteiskasvatus.....	34
4.3	ESBL-konjugaatiokoe	35

4.4	Suolistomikrobiomin yhteisörakenne.....	37
4.5	Johtopäätökset.....	38
	KIITOKSET	40
	KIRJALLISUUS	41
	LIITE 1. 25X PBS (500 ml)	49
	LIITE 2. Bakteerikantojen antibioottiresistenssiprofiili.....	50

SANASTO JA LYHENTEET

CFU	Pesäkkeen muodostava yksikkö (engl. colony-forming unit)
DNA	Deoksiribonukleiinihappo
ESBL	Laajakirjoinen beetalaktamaasi (engl. extended-spectrum beta-lactamases)
LB	Luria-Bertani kasvatusliuos
PCR	Polymeraasiketjureaktio
RNA	Ribonukleiinihappo
rRNA	Ribosomaalinen ribonukleiinihappo
rpm	Kierrosta minuutissa (engl. rounds per minute)

1 JOHDANTO

Antibiootit ovat mullistaneet lääketieteen monessa suhteessa, ja ne ovat olleet käännekohta ihmiskunnan historiassa, koska ne ovat pelastaneet miljoonia ihmisiä monien vuosikymmenien ajan bakteeri-infektioilta (Davies ja Davies 2010). Antibioottien liiallinen käyttö sekä väärinkäyttö ovat johtaneet antibioottiresistenttien kantojen nopeaan kasvuun, mikä vaarantaa niiden tehokkuuden. Uusien tehokkaiden antibioottien löytäminen ja kehittäminen on entistä hitaampaa (Davies ja Davies 2010, Ventola 2015), joka vaikeuttaa antibioottiresistenssikriisiä.

Jos antibiootit menettävät tehonsa bakteerien tuhoamiseen, ihmiskunta menettää kykynsä hoitaa infektioita ja hallita kansanterveyteen kohdistuvia uhkia (CDC 2020). Bakteerit aiheuttavat infektioita, kuten keuhkokuumetta, tuberkuloosia, verenmyrkytystä, tippuria sekä ruuan kautta leviäviä sairauksia (WHO 2020). Näitä sairauksia on entistä vaikeampi hoitaa ja joskus se on jopa mahdotonta, koska antibiootit ovat entistä tehottomampia. Kun ensisijaisilla antibiooteilla ei voida enää hoitaa infektioita, joudutaan käyttämään kalliimpia lääkkeitä. Antibioottiresistenssi pidentää sairauden ja hoidon kestoja sairaaloissa, mikä lisää terveydenhuollon kustannuksia ja yhteiskunnille aiheutuvaa taloudellista taakkaa (WHO 2018). Maailman terveysjärjestön (WHO) mukaan yksityisten investointien ja innovaatioiden puute uusien antibioottien kehittämisessä heikentää pyrkimyksiä torjua lääkkeille vastustuskykyisiä infektioita (WHO 2020). WHO on myös rohkaissut lääketieteellistä tutkimusyhteisöä kehittämään uusia hoitomenetelmiä antibioottiresistenteille bakteereille. WHO:n mukaan olisi tärkeää keskittää julkiset ja yksityiset investoinnit erittäin resistenttien bakteerien hoitomenetelmien kehittämiseen, koska vaihtoehdot ovat loppumassa (WHO 2020).

1.1 Beetalaktamaasit ja ESBL

Beetalaktaamiantibiootit ovat yleisimmin käytettyjä antibiootteja bakteeri-infektion hoidossa, koska ne ovat laajakirjoisia ja niillä on vain lieviä sivuvaikutuksia (Penders ym. 2013, Woerther ym. 2013). Beetalaktaamiantibiootit estävät bakteerien soluseinän biosynteesiä, mikä johtaa solujen hajoamiseen ja kuolemaan (Zeng ja Lin 2013). Beetalaktaamiantibiootit vaikuttavat bakteerien penisilliiniä sitoviin proteiineihin (PBP, engl. penicillin binding proteins) ja häiritsevät näin peptidoglykaanisynteesiä (Pandey ja Cascella 2022, Zeng ja Lin 2013). Tähän antibioottiryhmään kuuluvat penisilliinit, kefalosporiinit, karbapeneemit, monobaktaamit ja beetalaktamaasiestäjät (Pandey ja Cascella 2022). Kaikilla beetalaktaamiantibiooteilla on yhteinen ydin, beetalaktaamirengas (Pandey ja Cascella 2022, Zeng ja Lin 2013). Beetalaktaamien bakteereja tappavan vaikutuksen torjumiseksi bakteerit ovat kehittäneet puolustusjärjestelmiä, joista beetalaktamaasien tuotto on tärkein beetalaktaamiresistenssimekanismi (Zeng ja Lin 2013).

Beetalaktamaasit ovat bakteerien tuottamia entsyymejä, jotka hydrolysoivat beetalaktaamirenkaan ja inaktivoivat beetalaktaamiantibiootin (Bonnet 2004, Zeng ja Lin 2013). Beetalaktamaasit luokitellaan neljään eri luokkaan A-D niiden aminohapposekvenssien perusteella (Ambler ym. 1991). Luokat A ja C esiintyvät yleisimmin bakteereissa. Monilla gramnegatiivisten bakteerien suvuilla on luonnossa esiintyvä, kromosomissa sijaitseva beetalaktamaasi. Bakteereilla pieni määrä geenejä sijaitsee sirkulaarisessa DNA-molekyylissä, jota kutsutaan plasmidiksi. Plasmidit ovat erillään bakteerikromosomista ja replikoituvat siitä riippumatta. Tämän lisäksi plasmidit voivat kulkeutua eri bakteerisolujen välillä. Ensimmäinen plasmidivälitteinen beetalaktamaasi, TEM-1, löydettiin 1960-luvun alussa gramnegatiivisessa bakteerissa (Datta ja Kontomichalou 1965). Plasmidivälitteinen siirtyminen on helpottanut TEM-1:n leviämistä muihin bakteerilajeihin (Bradford 2001). TEM-1 beetalaktamaasi löydetään nykyään muun muassa *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* ja *Neisseria gonorrhoeae* -lajeista (Bradford 2001). Toinen yleinen plasmidivälitteinen beetalaktamaasi on SHV-1, joka löytyy *Klebsiella pneumoniae* ja *Escherichia coli*

(Bradford 2001). 1980-luvulla gramnegatiivisten bakteerien aiheuttamien infektioiden hoitoon otettiin käyttöön oksi-iminokefalosporiini beetalaktaamit, jotka olivat luonnostaan vähemmän herkkiä beetalaktamaaseille (Bonnet 2004). Näiden beetalaktaamien toistuva ja lisääntynyt käyttö aiheutti vastustuskykyisten kantojen ilmaantumisen, jotka tuottivat laajakirjoisia beetalaktamaaseja (ESBL, Extended-Spectrum Beta-Lactamases) (Bonnet 2004).

ESBL:t ovat enimmäkseen plasmidivälitteisiä bakteerientsyymejä, jotka pystyvät hydrolysoimaan monenlaisia penisilliinejä ja kefalosporiineja. Useimmat ESBL:t ovat kehittyneet geneettisen mutaation kautta alkuperäisestä beetalaktamaasista, erityisesti TEM-1:stä, TEM-2:sta ja SHV-1:stä (Bradford 2001, Fang ym. 2008). Viime vuosina on löydetty uusia plasmidivälitteisiä ESBL-perheitä, yleisimpinä CTX-M ja OXA-entsyymit (Bradford 2001). ESBL-entsyymit eivät hydrolysoi ainoastaan kolmannen polven kefalosporiineja, vaan myös penisilliinejä ja kapeakirjoisia kefalosporiineja (Fernandes ym. 2013). ESBL:ää kantavat organismit sisältävät usein muitakin resistenssigeenejä ja ovat näin resistenttejä monille antimikrobiaalisille lääkkeille, kuten aminoglykosideille, trimetopriimi/sulfametoksatsoli ja tetrasykliineille (Pfaller ja Segreti 2006). Koska ESBL:ää tuottavat kannat ovat vastustuskykyisiä useille yleisesti käytetyille mikrobilääkkeille, niiden lisääntyminen aiheuttaa vakavan maailmanlaajuisen terveysongelman, joka monimutkaistaa sairaalahoidon strategioita. Osa ihmisistä kantaa suolistossaan ESBL:ää tuottavia bakteereja. Resistentit bakteerit voivat pysyä kuukausia kantajansa suolistossa aiheuttamatta oireita tai ne voivat siirtyä suoliston epiteelin läpi elimistöön, aiheuttaen infektion (Carlet 2012, Karanika ym. 2016). ESBL-kantajudella tarkoitetaan henkilöä, joka kantaa suolistossa oireettomana kolonisaatiota bakteereita, jotka ovat resistenttejä monille erilaisille beetalaktaamiantibiooteille. Kehitysmaissa antibiootit ovat helposti saatavilla ja niitä käytetään ilman lääkärin ohjeistusta. Antibioottien liiallinen käyttö yhdistettynä matkailuun edistää antibiooteille vastustuskykyisten bakteerien leviämistä maailmanlaajuisesti (Karanika ym. 2016). Tämän vuoksi terveet yksilöt voivat toimia varastona ESBL:ää tuottaville bakteereille, ja tämä voi aiheuttaa riskin resistenssin leviämiseksi ympäri maailmaa (Sapkota ym. 2021). ESBL-kantajudeden haittana ihmiselle on esimerkiksi leikkauksiin liittyvät komplikaatoriskit. ESBL-

kantajuus voi leikkauksen jälkeen aiheuttaa infektion leikkauskohtaan (Dubinsky-Pertzov ym. 2019, Jolivet ym. 2017).

1.2 Konjugatiiviset plasmidit

Konjugatiiviset plasmidit ovat kromosomin ulkopuolisia DNA-elementtejä, jotka pystyvät siirtymään horisontaalisesti muihin bakteereihin ja joita löytyy monista luonnosta eristetyistä bakteereista (Norman ym. 2009). Bakterioplasmidien konjugatiivinen siirto on tehokkain tapa horisontaaliseen geenien leviämiseen, ja siksi sitä pidetään yhtenä tärkeimmistä syistä bakteerien voimakkaaseen antibioottiresistenssin kasvuun (Martínez ym. 2015). Konjugatiiviset plasmidit kykenevät replikoitumaan itsenäisesti sekä välittämään genejä horisontaalisesti konjugoimalla eli siirtämään plasmidin toiseen bakteeriin sen ympäristössä (Norman ym. 2009). Konjugatiiviset plasmidit pystyvät leviämään erilaisiin isäntälajeihin ja välttämään siten sukupuuton, jos ympäristöolosuhteet muuttuisivat epäsuotuisasti yhden solupopulaation kannalta (Norman ym. 2009). Konjugaatiota on kuvattu sekä gramnegatiivisissa että -positiivisissa bakteereissa ja jopa molempien bakteeriryhmien välillä (Samperio ym. 2021). Konjugatiiviset plasmidit sisältävät yleensä kaikki geenit, joita tarvitaan niiden ylläpitämiseen vertikaalisen siirron aikana emosta tytärsoluihin, sekä geenit, jotka ovat välttämättömiä horisontaaliseen siirtoon konjugaation aikana (Virolle ym. 2020). Yhä useampien konjugatiivisten plasmidien eristäminen ja sekvenssianalyysi on paljastanut huomattavan monimuotoisuuden geneettisten ominaisuuksien suhteen (Virolle ym. 2020). Tämä monimuotoisuus osoittaa, että eri plasmidit voivat käyttää erilaisia säätelyjä, molekyylireaktioita ja strategioita optimaalisen konjugaatiosiirron ja -ylläpidon saavuttamiseksi (Virolle ym. 2020). Bakteriyhteisöt koostuvat sadoista erilaisista plasmideista ja lajeista, jotka ovat vuorovaikutuksessa, kasvavat ja kilpailevat useilla aikaskaaloilla (Jorgensen ym. 2014). Plasmidin kohtalon ja yleisen konjugaatiodynamiikan ennustaminen näissä monimutkaisemmissa olosuhteissa on haasteellista (Dunn ym. 2019, Lopatkin ja Collins 2020).

1.3 Suoliston mikrobiyhteisö

Terve suolistofloora on osin vastuussa ihmisen yleisestä terveydestä. Normaali suoliston mikrobisto vaikuttaa isännän ravinteiden ja lääkeaineiden aineenvaihduntaan, suoliston limakalvon rakenteellisen eheyden ylläpitämiseen, immuunijärjestelmän muokkaukseen ja patogeenejä vastaan suojaamiseen (Jandhyala ym. 2015). On tutkittu, että ihmisen suoliston mikrofloora koostuu yli 35 000 bakteerilajista (Frank ym. 2007). Tavallisesti suoliston mikrobisto koostuu pääosin kahdesta suuresta suvusta, jotka ovat *Bacteroidetes* ja *Firmicutes* (Jandhyala ym. 2015). Ihmisen suolistossa on ruokatorven ja peräsuolen välillä paljon eroja bakteerien monimuotoisuuden ja lukumäärien välillä. Ruokatorvessa, pohjukais-suolella ja ohutsuolessa hallitsee *Streptococcus* suku (Jandhyala ym. 2015, Pei ym. 2004). *Helicobacter* on mahassa hallitseva suku, jossa *Helicobacter pylori* elää kommensaalina eli suoliston normaaliflooraan kuuluva mikrobi, josta ei koidu isännälle haittaa eikä hyötyä. Mahassa on runsas monimuotoisuus, joka koostuu myös muista hallitsevista suvuista, kuten *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella* ja *Rothia* (Blaser 1999, Andersson ym. 2008). Monimuotoisuus vähenee, jos *H. pylori* saa patogeenisen fenotyypin (Jandhyala ym. 2015). Paksusuolella hallitsevia sukuja ovat *Bacteroidetes* ja *Firmicutes* (Jandhyala ym. 2015). Paksusuolella on myös primaarisia taudinaiheuttajia, kuten *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholera*, *E. coli* (luetaan myös kommensaaliksi) ja *Bacteroides fragilis* (Gillespie ym. 2011, Human Microbiome Project Consortium 2012).

Vaikka luonnolliset mikrobiyhteisöt koostuvat yhdistelmästä mikrobeja, joilla on usein tuntemattomia toimintoja, synteettisten mikrobiyhteisöjen rakentaminen mahdollistaa määriteltyjen järjestelmien luomisen, jolloin niistä ei tule niin monimutkaisia (Grosskopf ja Soyer 2014). Yksinkertaisissa laboratorio-olosuhteissa on tutkittu ekologiaa ja evoluutiota yhdellä tai kahdella mikrobilajilla ja niiden vuorovaikutuksia on selvitetty (Buckling ym. 2009, Cairns ym. 2018, Fraser ja Keddy 1997). Ekologiset ja evolutiiviset prosessit voivat kuitenkin muuttua monimutkaisemmissa monilajisissa yhteisöissä useiden ominaisuuksien, kuten muuttuneiden kilpailuvuorovaikutuksien ja valintapaineiden, takia (Dunham 2007). Perusymmärrys mikrobielämän tietyistä ominaisuuksista, kuten

horisontaalisesta geeninsiirrosta, aineenvaihdunnallisesta vuorovaikutuksesta ja alueellisesta heterogeenisyydestä, vaatii monilajisten ympäristöjen tutkimista (Elias ja Banin 2012, van Gestel ym. 2014, Smillie ym. 2011). Monilajisten malliyhteisöjen suunnittelu kokeellisessa ekologiassa ja evoluutiossa on osa synteettisen ekologian uutta aluetta, jossa synteettisiä yhteisöjä käytetään lukuisiin soveltuviin tarkoituksiin (Cairns ym. 2018). Nämä yhteisöt kuvaavat tutkittavan luonnollisen järjestelmän olennaisia piirteitä ja niitä on käytetty monissa tutkimuksissa (Goodman ym. 2011, Lebeis ym. 2015, Wolfe ym. 2014, Yu ym. 2017). Näissä tutkimuksissa synteettiset yhteisöt on rakennettu bakteereista, jotka on eristetty luonnollisesta systeemistä, sekä yhteisöä pyritään kasvattamaan samankaltaisissa olosuhteissa kuin luonnollisessa systeemissä. Tällaisen lähestymistavan rajoituksiin kuuluvat harvalukuiset bakteerit, mikrobidiversiteetti ja bakteerien vuorovaikutukset muiden mikrobien kanssa ekologisissa toiminnoissa tai evolutiivisissa prosesseissa sekä luonnonolosuhteiden jäljitteleminen laboratoriossa (Chase ym. 2017, Liu ym. 2017, Wolfe 2018). Synteettisiä yhteisöjä voidaan käyttää tiettyjen luonnollisten systeemien ymmärtämiseksi ja saada enemmän yksityiskohtaista tietoa tiettyjen bakteerien ominaisuuksista ja toiminnasta luonnollisessa ympäristössä (Cairns ym. 2018). Tähän tarkoitukseen tarvitaan yksinkertaistettuja synteettisiä yhteisöjä, jotka ovat helposti käsiteltäviä ja selkeästi määriteltäviä systeemejä, joita on helppo tutkia käyttämällä viljelyä ja sekvensointia (Cairns ym. 2018). Sen lisäksi, että synteettiset yhteisöt ovat ilmeisiä mallijärjestelmiä helpottamaan mikrobiyhteisöjen rakenteen, toiminnan ja kehityksen ymmärtämistä monimutkaisina dynaamisina järjestelminä, synteettiset yhteisöt voivat myös avata uusia väyliä bioteknologisille sovelluksille, kuten biokaasun tuotannolle tai myrkyllisten orgaanisten yhdisteiden pelkistämiseksi (Grosskopf ja Soyer 2014).

1.4 Tutkielman tavoitteet

Tämän tutkimuksen tarkoitus oli koota ESBL-bakteeria suolistossaan kantavan ihmisen suolistomikrobiomista synteettinen bakteeriyhteisö, jota voitaisiin tulevaisuudessa käyttää suoliston plasmididynamiikan tutkimiseen. Tutkimuksen

tavoitteena oli (1) eristää ja karakterisoida suolistobakteerikantoja ulostenäytteistä synteettisen mikrobiyhteisön muodostamiseksi, (2) tutkia muodostetun yhteisön stabiilisuutta yhteiskasvatuskokeen avulla sekä (3) tutkia ESBL-plasmidien potentiaalista leviämiskykyä yhteisössä parittaisten konjugaatiokokeiden avulla.

Hypoteeseina tutkimuksessa olivat, että (1) ulostenäytteistä saadaan eristettyä useita erilaisia bakteerikantoja, (2) muodostetun bakteeriyhteisön rakenne pysyy vakaana pitkässä yhteiskasvatuksessa sekä (3) lähisukuiset bakteerikannat pystyvät vastaanottamaan ESBL-ominaisuuden *E. coli*-kannalta.

2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

2.1 Tutkimuksessa käytetyt näytteet, bakteerikannat ja kasvuolosuhteet

Tutkimuksessa käytetyt bakteerikannat eristettiin ihmisperäisistä ulostenäytteistä, jotka on saatu Turun yliopistollisen keskussairaalan yhteistyökumppanilta (VSSH:n tutkimuslupa T300/2020). Näytteet oli nimetty juoksevalla numerolla eikä tutkimuksessa käytetty henkilö- tai potilastietoja. Tutkimuksessa käytettiin ulostenäytteitä, jotka oli aiemmin todettu ESBL-positiivisiksi. Näistä näytteistä oli eristetty ESBL-bakteerikanta siirrostamalla ulostenäytettä ChromID ESBL (Biomerieux) -maljalla, joka sisälsi kefalosporiineihin kuuluvaa kefpodoksiimiantibioottia, ja sallii vain ESBL-tuottajabakteerien kasvun. Tutkimuksessa käytettiin ulostenäytteitä: 002, 004, 007, 011 ja 028 (Taulukko 1.).

Taulukko 1. Tutkimuksessa käytetyt ulostenäytteet sekä näytteistä eristetyt ESBL-bakteerikannat.

Näyte	Bakteerikanta	ESBL geeni	Laji
002	2B1	<i>blaCMY-48</i>	<i>Citrobacter sp.</i>
004	4B1	<i>blaCTX-M-15</i>	<i>Escherichia coli</i>
007	7B1	<i>blaCTX-M-15</i>	<i>Escherichia coli</i>
011	11B1	<i>blaCTX-M-14b</i> , <i>blaTEM-1B</i>	<i>Escherichia coli</i>
028	28B1	<i>blaCTX-M-15</i> , <i>blaTEM-1B</i> , <i>blaOXA-1</i> , <i>blaSHV-67/-11</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

Bakteereita kasvatettiin neste- ja maljakasvatuksissa kasvatusalustana Luria Bertani Lennox (LB) -media (Lennox 1955). Bakteerikasvatukset aloitettiin aina

siirrostamalla nestekasvatukseen yksittäinen bakteeripesäke. Nestekasvatuksia inkuboitiin ravistelussa (120 rpm) +37 °C:ssa 16–24 tuntia. Maljakasvatuksissa LB-kasvatusalustassa oli 1 % agaria ja niitä kasvatettiin aina +37 °C:ssa 16–24 tunnin ajan. Kasvatukseen lisättiin tarvittaessa antibiootteja seuraavissa konsentraatioissa: kefalotiini (50 µg/ml), ampisilliini (150 µg/ml), kloramfenikoli (25 µg/ml), tetrasykliini (20 µg/ml), kanamysiini (25 µg/ml), streptomysiini (25 µg/ml) ja rifampisiini (50 µg/ml).

2.2 Bakteerikantojen eristäminen ja karakterisointi

2.2.1 Bakteerikantojen eristys

Eristetyn ESBL-kannan lisäksi ulostenäytteistä eristettiin yhteisöjen muodostamista varten muita bakteerikantoja, jotka eivät kannata ESBL-geeniä. Tutkimuksessa käytettiin Taulukon 1 mukaisia ulostenäytteitä, jotka oli laimennettu 1x PBS-liuoksella (Liite 1) suhteessa 1:10. Jokaisesta laimennetusta ulostenäytteestä levitettiin näytettä steriilillä siirrostussilmukalla kahdelle L-maljalle, joita kasvatettiin yön yli. Tämän jälkeen maljoilta kerättiin yksittäisiä pesäkkeitä, joista tehtiin uusi puhdasviljelmä LB-maljalle. Seuraavana päivänä yksittäisistä pesäkkeistä tehtiin vielä toinen puhdasviljelmä LB-maljoille.

2.2.2 Bakteerikantojen antibioottiresistenssi

Antibioottiresistenssin testausta varten bakteerikantoja kasvatettiin yön yli 96-kuoppalevyllä (Nunc™ MicroWell™ 96-Well, Nunclon Delta-Treated, Flat-Bottom Microplate, Thermo Fisher Scientific) 200 µl LB-mediumissa, jossa yhdessä kaivossa kasvatettiin yhtä bakteerikantaa ilman ravistelua. Kontrolleina toimivat 2B1, 4B1, 7B1, 11B1 ja 28B1, koska nämä kannat olivat jo todettu ESBL positiivisiksi ja niiden resistenssi-profiili tiedettiin entuudestaan. Maljauksessa upotettiin Nunc™ Immuno TSP Lids (Thermo Fisher Scientific) tikullinen kansi kuoppalevyn kasvatusliuokseen, jonka jälkeen kansi painettiin LB-, kefalotiini-, ampisilliini-, kloramfenikoli-, tetrasykliini-, kanamysiini- ja streptomysiinimaljoille. Maljoja

kasvatettiin yön yli, jonka jälkeen maljoilta tarkistettiin, kasvoiko maljalla bakteeripesäkkeitä. LB-maljalla testattiin, oliko liuoksessa eläviä bakteereita.

Ulostenäytteistä eristettiin bakteerikantoja ja jatkoon valittiin bakteerikannat, joiden resistenssiprofiilit olivat mahdollisimman erilaiset. Tämän perusteella jatkoon valittiin 004 ja 007 ulostenäytteiden bakteerikantoja. Näiden ulostenäytteiden bakteerikannoista tehtiin kolmas puhdasviljelmä LB-, kefalotiini- tai ampisilliinimaljalle bakteerikannan antibioottiresistenssin mukaan ja käytettiin korkeinta antibioottia niin, että jos bakteeri kasvoi LB-, ampisilliini- ja kefalotiinimaljoilla se maljattiin kefalotiinimaljalle. Jos bakteeri kasvoi LB- ja ampisilliinimaljalla se maljattiin ampisilliinimaljalle. Jos bakteeri kasvoi vain LB-maljalle se maljattiin LB-maljalle. Näytteen 004 bakteerikannat, jotka kasvoivat LB-, kefalotiini-, ampisilliini ja tetrasykliinimaljoilla (samoin kuin kontrolli 4B1), maljattiin ChromID ESBL -maljalle ja tarkistettiin, löytyykö näistä kannoista muita bakteereja kuin *E. coli*. ChromID ESBL -maljalla kasvaneiden pesäkkeiden väri ja voimakkuus rekisteröitiin valmistajan ilmoittaman värikartan mukaan. ChromID ESBL -maljalla *E. coli* ilmenee punaruskean värisenä. Osassa kromogeenisissä viljelyalustoissa havaittiin punaruskean väristä kasvua, joten näitä bakteerikantoja ei valittu jatkoon. Bakteerikannat, jotka eivät kasvaneet punaruskean värisenä ChromID ESBL -maljalla valittiin jatkoon ja maljattiin kefalotiinimaljalle.

2.2.3 16S rRNA sekvensointi

Antibioottiresistenssiprofiilin perusteella jatkoon valituista bakteerikannoista tehtiin 5 ml nestekasvatukset, osaan kasvatuksista pipetoitiin antibioottia bakteerikannan korkeimman antibioottiresistenssin perusteella kuten yllä. Näistä kasvatuksista otettiin 1,5 ml nestekasvatusta, josta eristettiin DNA DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) käyttäen. Eristys tehtiin valmistajan ohjeiden mukaisesti, mutta DNA eluoiitiin 50 µl PCR-vettä (PCR grade water). Bakteerikannoista eristetyyn DNA:n konsentraatiot mitattiin tässä tutkimuksessa aina Qubit dsDNA HS Assay Kit:llä (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Bakteerikannat, joiden DNA-konsentraatio oli yli 1,0 ng/µl, valittiin 16S rRNA sekvensointiin.

Ennen sekvensointia eristetystä DNA:sta monistettiin 16S rRNA geeniä PCR-reaktion avulla. PCR-reaktion tilavuus oli 25 µl. Templaattina käytettiin 2 µl bakteerikannasta eristettyä DNA:ta. PCR-reaktio sisälsi 1x Phusion HS II High-Fidelity (Thermo Scientific) sekä 400 nM 27F (10 µM) aluketta ja 400 nM 1492R (10 µM) aluketta (Taulukko 6). Negatiivisena kontrollina PCR-reaktiossa käytettiin nukleaasivapaata PCR-vettä templaatin sijasta. PCR suoritettiin (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad) Taulukon 2 protokollaa noudattaen.

Taulukko 2. PCR ohjelma 16S rRNA:n monistamiseen.

Lämpötila (°C)	Aika (min)	Vaihe	
98	0:30	Alkudenaturaatio	
98	0:10	Denaturaatio	} x35
54	0:20	Alukkeiden liittyminen	
72	0:30	Pidentyminen	
72	5	Lopullinen pidentyminen	
4	∞		

PCR-reaktion jälkeen monistetusta tuotteesta tutkittiin PCR-tuotteen koko ja reaktion spesifisyys. Tämä suoritettiin agarosigeelielektroforeesilla (1,5 % AGE), jossa käytettiin asetuksina 120 V, 180 mA ja 30 min. Kun epäspesifisyyksiä ei löytynyt, PCR-tuotteet puhdistettiin QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN) valmistajan ohjeiden mukaisesti.

Sekvensointi-PCR:ssä alukkeina käytettiin 160 nM 27F (3,2 µM) (Taulukko 6) ja 160 nM 534R (3,2 µM) (Taulukko 6) 20 µl reaktio sisälsi alukkeiden lisäksi BigDye polymeraasi 0,5x BigDye puskuria (BigDye Terminator v3.1) ja 3 µl templaattia. Templaattina käytettiin puhdistettuja 16S rRNA PCR-tuotteita, joita oli laimennettu vedellä 1:3. Sekvensointi-PCR tehtiin BigDye Terminator v3.1 Sequencing Kit:lla (Applied biosystems by life technologies) ja sekvensointi-PCR-reaktio taulukon 3 protokollan mukaisesti.

Taulukko 3. Sekvensointi-PCR:n ohjelma 16S rRNA -geenin sekvensointiin.

Lämpötila (°C)	Aika (min)	Vaihe
96	1	Alkudenaturaatio
96	0:10	Denaturaatio
50	0:05	Alukkeiden liittyminen
60	4	Pidentyminen
4	∞	

PCR-tuotteet puhdistettiin sekvensointi-PCR:n jälkeen seuraavasti: jokaiseen näytteeseen pipetoitiin 2 μ l 125 mM EDTA:ta, 2 μ l 3M Na-asetaattia, sekä 50 μ l 99 % EtOH: a, joka jälkeen näytteet sekoitettiin pipetoimalla neljä kertaa edestakaisin ja levyn päälle laitettiin tarrakansi. Näytteitä inkuboitiin 15 minuuttia huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen levy sentrifugoitiin 1100 x g (2783 rpm) +4 °C asteessa 45 minuutin ajan. Levy käännettiin ylösalaisin käsipaperin päälle, jonka jälkeen levy kuivattiin sentrifugoimalla vielä ylösalaisin 100 x g noin 10 sekuntia. Jokaiseen kuoppaan pipetoitiin 70 μ l 75 % EtOH:a. Kuoppien kuivaamiseksi näytelevy sentrifugoitiin 1100 x g +4 °C asteessa 15 minuutin ajan, jonka jälkeen levy käännettiin ylösalaisin käsipaperin päälle. Näytelevy sentrifugoitiin vielä ylösalaisin 100 x g noin 30 sekuntia. Näytelevyn annettiin kuivua 10 minuutin ajan +37 °C asteessa. Kun kaikki kosteus oli haihtunut, pipetoitiin kuoppiin 10 μ l formamidia ja annettiin seistä 10 minuuttia huoneenlämmössä. Tämän jälkeen näytteet sekoitettiin pipetin avulla. Puhdistuksen jälkeen näytteet olivat valmiita sekvensointiin. Puhdistetut näytteet sekvensoitiin Sanger-sekvensointimenetelmällä käyttäen Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer -laitetta.

Sekvensoinnin raakadata saatiin elektroferogrammista, joka käsiteltiin Sequencing analysis v6 (Applied Biosystems) -ohjelmalla. Ohjelma tunnistaa elektroferogrammista fluoresoivat emäkset, jotka on merkattu neljällä eri värillä. Kun emäkset oli tunnistettu, data siirrettiin Geneious -ohjelmaan. Kunkin bakteeri-

isolaatin 16S rRNA -geenin 27F-534R alue koottiin Geneious v.2020.2-ohjelmalla (Biomatters). Alkuun sekvenssit trimmattiin Geneious -ohjelman Trim Ends toiminnolla niin, että saatiin sekvensseistä heikkolaatuiset osat pois. Trimmauksen jälkeen kaikkien sekvenssien alueet koottiin Geneious -ohjelman De Novo Assembly toiminnolla, jotta saatiin luotua yksi 16S rRNA konsensussekvenssi kullekin bakteeri-isolaatille. Kokoamisen jälkeen konsensussekvenssi vietiin BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) -ohjelmaan (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), jossa sekvenssejä etsittiin 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea) -tietokannasta.

2.2.4 Bakteerien genomisekvensointi

Genomisekvensointiin valittiin 004 ulostenäytteestä eristetyt bakteerikannat, koska tästä näytteestä löytyi eniten resistenssiprofiililtaan erilaisia kantoja (kappale 2.2.2).

Eristettyjen bakteerikantojen DNA sekvensoitiin sekvensointipalvelua käyttäen. Sekvensointikirjastot valmistettiin NEB Next® Ultra™ DNA Library Prep Kit:in avulla ja kirjastot sekvensoitiin Illumina NovaSeq 6000-sekvensointijärjestelmällä käyttäen S4 flowcell (PE150).

Paired end read data koottiin CLC Genomics Workbench (versioilla 12, 20 ja 21) avulla kontigeiksi. Tämä kokoaminen oli tehty etukäteen CLC-ohjelmiston De Novo Assembly -työkalulla ja kootut kontigien sekvenssit olivat käytettävissä. Kootut kontigit annotoitiin RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) -ohjelmalla (Aziz ym. 2008, Brettin ym. 2015, Overbeek ym. 2014), jonka jälkeen etsittiin genomisekvensseistä 16S rRNA-geenin sekvenssi ja se siirrettiin BLAST-ohjelmaan (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), jossa samankaltaisia sekvenssejä etsittiin 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea) -tietokannasta. Genomisekvensseistä etsittiin myös bakteerien resistenssigeenit ResFinder -ohjelmalla Center for Genomic Epidemiology -sivustolta (Bortolaia ym. 2020, Clausen ym. 2018, Zankari ym. 2020) sekä etsittiin bakteerien kantamat plasmidit PlasmidFinder -ohjelmalla Center for Genomic Epidemiology -sivustolta (Carattoli ym. 2014, Clausen ym. 2018).

Yhteisön bakteerikantojen koko 16S rRNA geenit linjattiin MUSCLE alignment -työkalulla (Geneious Prime 2021) ja linjauksen perusteella muodostettiin fylogeneettinen puu yhteisön sukulaisuussuhteiden selvittämiseksi. Asetuksina Geneious -ohjelmassa käytettiin Tree Build Method: Neighbor Joining, Genetic Distance Model: Jukes-Cantor.

2.4 Inhibiitotestit

Inhibiitotestaukseen valittiin bakteerikannat sekvensoinnin resistenssigeenien ja plasmidien perusteella (kappale 2.2.3). Sekvensoinnista jatkoon valittiin bakteerikannat 4B10, 4B11, 4B17, 4B24, 4B35, 4B41, 4B43 ja 4B44. Inhibiitotestaukseen otettiin mukaan myös 4B1 *E. coli* kanta.

Bakteerien välinen risti-inhibiitio testattiin seuraavasti: 100 µl yön yli kasvanutta bakteerikasvatusta ja 3 ml sulaa L-soft-agaria sekoitettiin ja seos kaadettiin L-maljoille. Jokaisesta yön yli kasvaneesta bakteerikasvatuksesta sentrifugoitiin 500 µl (10 000 x g, 5 min), ja tätä supernatanttia pipetoitiin 5 µl omalle sektorilleen kunkin bakteerimaton päälle.

Risti-inhibiitotestin tarkoituksena oli tarkistaa, etteivät valitut bakteerit inhiboi toistensa kasvua. Jos inhibiitiota ei löytynyt, voitiin bakteerikantaa käyttää tulevaisissa yhteiskasvatuksissa. Tulokset olivat luettavissa maljoilta, joille oli kasvanut selkeä bakteerimatto. Inhibiitiota näkyy maljoilla niin, että supernatantin kohdalta ja ympäriltä bakteerimaton kasvu on hidastunut ja havaittavissa maljalta kirikkaampana alueena.

2.5 Bakteeriyhteisön yhteiskasvatus

Bakteeriyhteisön yhteiskasvatuksessa kasvatettiin valittuja bakteerikantoja samassa nestekasvatuksessa seitsemän päivän ajan. Yhteiskasvatuksen avulla tarkistettiin, pystyvätkö valitut bakteerikannat elämään yhdessä. Yhteiskasvatuksessa käytettiin bakteerikantoja 4B1, 4B11, 4B24, 4B41 ja 4B43, jotka valittiin 16S rRNA -geenin sekvensoinnin perusteella. Bakteerikannoista tehtiin aluksi nestekasvatukset yön yli, joista pipetoitiin 5 µl kutakin bakteerikantaa 5 ml LB-mediumiin.

Yhteiskasvatuskoe tehtiin kolmella replikaatilla. Bakterikantojen nestekasvatuksista solutiheys (CFU, Colony Forming Unit) määritettiin 1:10 laimennossarjalla. Laimennossarja tehtiin steriiliin veteen, josta maljattiin 100 µl LB-maljalle. Maljoja kasvatettiin yön yli ja pesäkkeet laskettiin seuraavana päivänä. Bakterikantojen bakteritiheys laskettiin käyttämällä kaavaa 1.

$$CFU = \frac{\text{pesäkkeiden määrä} \times \text{laimennoskerroin}}{\text{maljaus tilavuus}} \quad (1)$$

Yhteiskasvatuksia kasvatettiin seitsemän vuorokautta tuoreistamalla kasvatuksia joka päivä pipetoimalla 5 µl edellisen päivän kasvatusta 5 ml tuoretta LB-mediumia. Yhteisökokeen neljäntenä päivänä tarkistettiin, onko ESBL-plasmidi siirtynyt muihin bakteereihin yhteiskasvatuksessa. Yhteiskasvatusta maljattiin ChromID ESBL-maljalle ja annettiin maljan inkuboitua yön yli. ChromID ESBL-maljoilta tarkistettiin inkuboinnin jälkeen kasvaneiden pesäkkeiden väri ja voimakkuus valmistajan ilmoittaman värikartan mukaan. ChromID ESBL -maljalla *E. coli* ilmenee punaruskeana.

Yhteiskasvatuksen ensimmäisenä ja seitsemäntenä päivänä bakterikasvatuksista eristettiin DNA. Bakterikasvatuksista pipetoitiin 200 µl näytettä DNA-eristykseen, joka suoritettiin QIamp Power Fecal Pro DNA Kit:ä (QIAGEN) käyttäen. Eristys suoritettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti, mutta DNA eluointiin 50 µl PCR-vettä (PCR grade water). DNA-eristyksen jälkeen näytteistä mitattiin konsentraatio. Yhteiskasvatuksien DNA-näytteistä tehtiin 16S rRNA kirjasto sekvensointia varten. 16S rRNA kirjaston valmistaminen aloitettiin monistamalla yhteisöstä eristetystä DNA:sta 16S rRNA geeniä PCR:ä käyttäen. Templaattina PCR-reaktiossa käytettiin 1 µl yhteiskasvatuksista eristettyä DNA:ta. 1. PCR-reaktio sisälsi 1x Phusion HS II High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific) sekä 0,4 µM 27F (10 µM) aluketta (Taulukko 6) ja 0,4 µM 338R (10 µM) aluketta (Taulukko 6). Negatiivisena kontrollina PCR-reaktiossa käytettiin vettä templaatin sijasta. 1. PCR ajettiin (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad) Taulukon 4 protokollaa noudattaen.

Taulukko 4. 1. PCR:n ohjelma, jota käytettiin 16S rRNA:n monistamisessa.

Lämpötila (°C)	Aika (min)	Vaihe	
98	0:30	Alkudenaturaatio	
98	0:10	Denaturaatio	} x 35
55	0:20	Alukkeiden liittyminen	
72	0:15	Pidentyminen	
72	5	Lopullinen pidentyminen	
12	∞		

1. PCR-reaktion jälkeen monistetusta tuotteesta varmistettiin PCR-tuotteen koko ja PCR-reaktion spesifisyys. Tämä suoritettiin agarosigeelielektroforeesilla (1,5 % AGE), jossa käytettiin asetuksina 120 V, 200 mA ja 30 minuuttia. PCR-tuotteen koko ja reaktion spesifisyys varmistettiin kaikissa tutkimuksen PCR-reaktioissa samalla tavalla. PCR tuotteet puhdistettiin ennen 2. PCR:ää QIAquick PCR purification Kit:llä (QIAGEN) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Puhdistuksen jälkeen tarkistettiin PCR-tuotteiden konsentraatio.

2. PCR:ssä lisättiin PCR-tuotteen 5' -päähän M13-adapteri ja tuotettiin lisää tuotteita. PCR:ssä mastermixinä käytettiin 1x Phusion HS II High-Fidelity (Thermo Scientific) ja alukkeina käytettiin 200 nM M13_27F (10 μ M) aluketta (Taulukko 6) ja 200 nM 338R (10 μ M) aluketta (Taulukko 6). Templaattina käytettiin 1. PCR-reaktiosta puhdistettua DNA:ta 1 μ l. Negatiivisena kontrollina PCR-reaktiossa käytettiin vettä templaatin sijasta. 2. PCR:n monistaminen sekä adapterin lisäys suoritettiin C1000 Thermal Cycler PCR-laitteella (Bio-Rad) taulukon 5 protokollaa noudattaen.

Taulukko 5. 2. PCR:n ohjelma 16S rRNA:n monistamiseen.

Lämpötila (°C)	Aika (min)	Vaihe
95	0:10	Alkudenaturaatio
95	0:15	Denaturaatio
55	0:05	Alukkeiden liittyminen
72	0:30	Pidentyminen

} x 16

2. PCR:n jälkeen tarkistettiin PCR-tuotteen koko ja PCR-reaktion spesifisyys, kuten aikaisemmin. 2. PCR:n reaktiotuotteet puhdistettiin 1,8x Agencourt AMPure XP PCR purification Kit:llä (Beckman) valmistajan ohjeiden mukaisesti, mutta ohjeista poiketen eluointiin käytettiin eluutiopuskurin sijasta PCR-vettä. Puhdistuksen jälkeen konsentraatio tarkistettiin vielä Qubit dsDNA HS Assay Kit:llä (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific).

3. PCR:ssä lisättiin PCR-tuotteen molempiin päihin barkoodit. 3. PCR:ssä käytettiin qPCR-laitetta, jotta pystyttiin seuraamaan tuotteen monistumista reaaliajassa. Templaattina käytettiin 2. PCR:n puhdistettuja PCR-tuotteita 2 µl. Reaktion kokonaistilavuus oli 25 µl. Supermixinä käytettiin 1x PCR Maxima SYBR green/Fluorescein qPCR Mastermix (Thermo Scientific). Alukkeina käytettiin barkoodausalukkeita 400 nM HTX_M13F ja 400 nM HTX_338R, jossa X korvataan aina barkoodin numerolla (Taulukko 6.). Jokainen näyte barkoodattiin eri barkoodeilla sekä 5' että 3' päistä, eikä samaa barkoodia käytetty kuin kerran. 3. PCR:n barkoodien lisäys suoritettiin C1000 Thermal Cycler with 96CFX(TM) Real-Time System qPCR-laitteella (Bio-Rad) taulukon 7 protokollaa noudattaen.

Taulukko 6. Tutkimuksessa käytetyt alukkeet ja niiden sekvenssit.

Aluke	Sekvenssi
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
1492R	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'
534R	5'-ATTACCGCGGCTGCTGGCA-3'
338R	5'-TGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'
M13_27F	5'-TGTA AAAACGACGGCCAGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
HT1_M13F	5'-AACGTGATTGTA AAAACGACGGCCAGT-3'
HT2_M13F	5'-AAACATCGTGTA AAAACGACGGCCAGT-3'
HT3_M13F	5'-ATGCCTAATGTA AAAACGACGGCCAGT-3'
HT4_M13F	5'-AGTGGTCATGTA AAAACGACGGCCAGT-3'
HT5_M13F	5'-ACCACTGTTGTA AAAACGACGGCCAGT-3'
HT8_M13F	5'-CATCAAGTTGTA AAAACGACGGCCAGT-3'
HT16_338R	5'-AAGACGGATGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'
HT18_338R	5'-ACACAGAATGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'
HT19_338R	5'-ACAGCAGATGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'
HT20_338R	5'-ACCTCCAATGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'
HT21_338R	5'-ACGCTCGATGTA AAAACGACGGCCAGT-3'
HT23_338R	5'-ACTATGCATGTA AAAACGACGGCCAGT-3'
HT11_M13F	5'-CTGTAGCCTGTA AAAACGACGGCCAGT-3'
HT12_M13F	5'-AGTACAAGTGTA AAAACGACGGCCAGT-3'
HT26_338R	5'-AGCAGGAATGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'
HT27_338R	5'-AGTCACTATGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

Taulukko 7. 3. PCR:n qPCR ohjelma barkoodien lisäämiseksi.

Lämpötila (°C)	Aika (min)	Vaihe
95	0:10	Alkudenaturaatio
95	0:15	Denaturaatio
55	0:30	Alukkeiden liittyminen
72	0:30	Pidentyminen
		Fluoresenssin mitta

} x 11

3. PCR:n reaktiotuotteet tarkistettiin agarosigeelielektroforeesilla (1,5 % AGE) sekä puhdistettiin 1,8x Agencourt AMPure XP PCR purification Kit:llä (Beckman) ennen lähetystä sekvensointiin. Puhdistuksen jälkeen konsentraatio tarkistettiin vielä Qubit dsDNA HS Assay Kit:llä (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific). Barkoodatut näytteet sekvensoitiin sekvensointipalvelua käyttäen. Sekvensointikirjastot tehtiin NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit:llä ja amplikonit sekvensoitiin Illumina NovaSeq 6000-sekvensointijärjestelmällä käyttäen SP flowcell (PE250).

Raaka sekvenssidata käsiteltiin CLC Genomics Workbench:n (versioilla 12, 20 ja 21) avulla. Illumina sekvensoinnista sekvenssidata saatiin parittaisina sekvensseinä. Tämän vuoksi CLC Genomic Workbench:lla suoritetaan alkuun Merge overlapping, jotta molempien juosteiden sekvenssit saadaan yhdistettyä yhdeksi sekvenssiksi. Yhdistetystä 16S-geenialueesta trimmattiin seuraavaksi barkoodit ja alukkeet pois. Ensin trimmattiin jokaisesta sekvenssistä yksitellen barkoodi pois, jonka jälkeen kaikista sekvensseistä trimmattiin ensin aluke 27F ja sitten aluke 338R-RC, sekä poistettiin readit, jotka olivat alle 250 bp. Trimmauksen jälkeen readit ryhmiteltiin toiminnallisiin taksonomisiin yksiköihin (OTU, Operational taxonomic unit) OTU clustering -työkalulla käyttäen De Novo OTU Clustering -asetusta ja samankaltaisuusprosenttia 99 %. OTU clustering -työkalun avulla saatiin selvitettyä, mistä bakteereista yhteisö koostui. OTU-työkalulla saaduista tuloksista poistettiin OTU:t, joita oli määrällisesti vähän (Remove OTUs with Low Abundance). Tässä tutkimuksessa suodatettiin algoritmillä OTU:t, joiden kokonaisesiintyvyyttä oli kaikissa näytteissä yhteensä alle 0,5 %. Erilaisia OTU:ja jäi jäljelle 10 kappaletta. OTU:jen konsensussekvenssit siirrettiin BLAST-ohjelmaan, jossa sekvenssejä etsittiin 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea) -tietokannasta. OTU:t, joiden havaittiin olevan kimeroja, poistettiin lopullisesta analyysistä.

2.6 ESBL-konjugaatiokoe

Konjugaatiokokeen avulla tutkittiin ESBL-*E. coli* -kannan 4B1 kykyä siirtää ja yhteisöön valittujen bakteerikantojen (4B11, 4B24, 4B41 ja 4B43) ominaisuuksia vastaanottaa ESBL-ominaisuuksia. Konjugaatiokokeessa käytettiin *E. coli* kontrollina JM109(pSU19) K-12 *E. coli* laboriokantaa. Yhteisön 4B11, 4B24, 4B41 ja 4B43 bakteerikannoista tehtiin rifampisiiniresistentit (Rif^R), jotta rifampisiiniä voitiin käyttää bakteerikannan selektioon konjugaatiokokeessa. Rifampisiiniresistenssi saatiin aikaan kasvattamalla bakteerikantoja ensin alhaisessa rifampisiinikonsentraatiossa (2,5 µg/ml) ja tuoreistamalla korkeampaan pitoisuuteen, kunnes rifampisiinin pitoisuus oli 50 µg/ml.

Konjugaatiokokeessa valmistettiin aluksi nestekasvatukset 4B1, 4B11, 4B24, 4B41, 4B43 ja JM109(pSU19) bakteerikannoista. 4B1 kasvatukseen lisättiin kefalotiinia ja JM109(pSU19) kasvatukseen kloramfenikolia, jotta 4B1 -bakteerikannassa saataisiin pidettyä ESBL-ominaisuus ja JM109:n pSU19-plasmidi.

20 tuntia kasvaneista nestekasvatuksista tehtiin solutiheyden määrittäminen (kuten kappaleessa 2.5) sekä valmistettiin konjugaatiokasvatukset, joissa testattiin ESBL-plasmidin siirtymistä yhteisön ESBL-*E. coli* -pareittain yhteisön muihin bakteereihin. Konjugaatiokasvatuksia varten 5 ml LB-mediaan lisättiin 5 µl 4B1 ja 5 µl yhteisön rifampisiiniresistenttiä kantaa tai JM109(pSU19) -bakteerikantaa.

Kun konjugaatiokasvatukset olivat kasvaneet noin 20 tuntia, valmistettiin kasvatuksista steriiliin veteen 1:10 laimennossarja, josta maljattiin 100 µl laimennosta kefalotiini-rifampisiinimaljalle (4B11, 4B24, 4B41 ja 4B43) tai kefalotiini-kloramfenikolimaljalle (JM109(pSU19)). Transkonjuganttien (4B11, 4B24, 4B41 ja 4B43) maljauksessa käytettiin kefalotiini-rifampisiinimaljaa, koska rifampisiinin avulla varmistettiin, että maljalla ei kasva 4B1 luovuttajakantaa. *E. coli*-kontrollikanta (JM109(pSU19)) maljattiin kefalotiini-kloramfenikolimaljalle, koska kloramfenikolin avulla varmistettiin, ettei 4B1 luovuttajakanta kasva maljalla. Molemmissa kasvatuksissa kefalotiinia käytettiin ESBL-ominaisuuden selektioon ja näillä antibioottiyhdistelmillä maljalla kasvoi vain ESBL-transkonjugantteja. Maljojen annettiin kasvaa 20 tuntia, jonka jälkeen maljoilta

laskettiin pesäkkeet mahdollisten transkonjuganttien bakteeritiheyden määrittämiseksi.

2.7 16S rRNA kirjaston valmistus ulostenäytteistä

Antibioottiresistenssi-profiilin perusteella jatkoon valittiin vain näytteiden 004 ja 007 kantoja, joten näistä kahdesta ulostenäytteestä valmistettiin 16S rRNA kirjasto, jossa selvitettiin alkuperäisen suolistomikrobiomin yhteisörakenne. Ulostenäytteitä 004 ja 007 pipetoitiin 200 µl DNA-eristykseen, joka tehtiin QIamp Power Fecal Pro DNA Kit:ä (QIAGEN) käyttäen valmistajan ohjeiden mukaisesti. DNA-eristyksen jälkeen mitattiin näytteiden konsentraatio. Ulostenäytteiden 16S rRNA:n monistaminen, M13-adapterin sekä barkoodien liittäminen tehtiin samalla tavalla kuin kappaleessa 2.5., mutta barkoodausalukkeina käytettiin 004 näytteelle HT11_M13F ja HT26_338R ja näytteelle 007 käytettiin HT12_M13F ja HT27_338R (Taulukko 6.). Näytteet sekvensoitiin sekvensointipalvelua käyttäen, kuten kappaleessa 2.5. Raaka sekvenssidata käsiteltiin CLC Genomics workbench:n (versioilla 12, 20 ja 21) avulla, samalla tavalla kuin kappaleessa 2.5, mutta OTU Clustering -asetuksena käytettiin SILVA 16S 99 % -asetusta, jossa sekvenssien samankaltaisuus oli 99 % tarkkuudella. OTU:t, joita oli määrällisesti vähän (Remove OTUs with Low Abundance) ja joiden kokonaisesiintyvyys oli kaikissa näytteissä alle 0,1 %, suodatettiin algoritmilla. Tämän sekvenssidatan avulla saatiin selville näytteiden 004 ja 007 suolistomikrobiomin rakenne.

3 TULOKSET

3.1 Bakterikantojen karakterisointi

Tutkimuksessa käytetyistä ESBL-positiivisista ulostenäytteistä viljeltiin bakteereja LB-maljoille. Ensimmäisen puhtasviljelmän jälkeen eristetyistä bakteereista muutama kanta ei kasvanut, joten näitä bakterikantoja ei valittu jatkoon (Taulukko 8). Näytteistä 002, 004, 007, 011 ja 028 eristettiin yhteensä 178 bakteeri-isolaattia.

Taulukko 8. ESBL-positiivisista ulostenäytteistä eristetyt bakterikannat sekä eristyksen, antibioottiresistenssitestauksen, sekvensoinnin ja yhteisökokeen jälkeen jatkoon valittujen kantojen lukumäärät.

Näyte	Eristetyt kannat	Kantojen lukumäärä	Erilaisia antibioottiresistenssi-profiileja	DNA-eristys	16S rRNA sekvensointi	Genomi sekvensointi	Yhteisökoee
002	2B10-2B37 (pl. 2B26)	27	4	-	-	-	-
004	4B10-4B57 (pl. 4B13, 4B39, 4B40, 4B53, 4B56)	43	11	18	14	12	5
007	7B10-7B33 (pl. 7B10, 7B12, 7B31, 7B32)	20	8	5	-	-	-

011	11B10- 11B65	56	6	-	-	-	-
028	28B3- 28B34	32	1	-	-	-	-

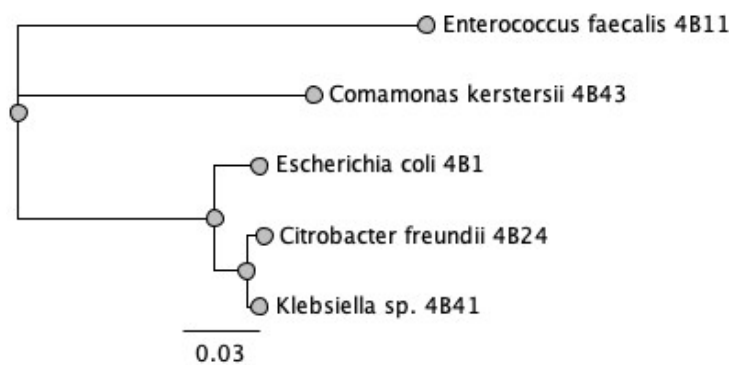
Eristettyjen bakteerikantojen antibioottiresistenssi testattiin kasvattamalla bakteereja LB-, kefalotiini-, ampisilliini-, kloramfenikoli-, tetrasykliini-, kanamysiini- ja streptomysiinimaljoilla. DNA-eristykseen valittiin bakteerikantoja, joiden resistenssiprofiilit olivat mahdollisimman erilaisia. Liitteessä 2 on esitetty bakteerikantojen resistenssiprofiilit. Antibioottiresistenssiprofiilin perusteella jatkoon valittiin 004 ulostenäytteen 18 bakteerikantaa sekä 007 ulostenäytteen 5 bakteerikantaa (Taulukko 8). Näytteistä 002, 011 ja 028 eristetyt kannat olivat resistenssiprofiililtaan hyvin samankaltaisia (Liite 2).

Antibioottiresistenssiprofiloinnin perusteella valittujen bakteerikantojen DNA eristettiin ja näytteiden DNA-konsentraatiot mitattiin. Konsentraatiot, jotka ylittivät 1 ng/ μ l, valittiin 16S rRNA sekvensointiin (bakteerikannat 4B10, 4B11, 4B17, 4B22, 4B24, 4B29, 4B30, 4B31, 4B35, 4B41, 4B43, 4B44, 4B49 ja 4B51; Taulukko 8). Näytteen 007 bakteerikannoista olisi konsentraation perusteella valittu jatkoon vain kanta 7B11, joten tämän vuoksi 007 näyte jätettiin kokonaan pois.

004-näytteen bakteerikantojen 16S rRNA sekvensointiin Sanger-sekvensointimenetelmällä. Sanger-sekvensoinnin tulosten perusteella genomien sekvensointiin valittiin samat bakteerikannat kuin 16S rRNA sekvensointiin, mutta 4B22 ja 4B30 kannat jätettiin pois (Taulukko 8). Bakteerikannat 4B22 ja 4B30 jätettiin pois, koska olivat 16S rRNA sekvensoinnin sekä antibioottiresistentin perusteella samankaltaisia kuin osa muista eristetyistä bakteereista. Bakteerien koko genomit sekvensoitiin Illumina-menetelmällä sekvensointipalvelua käyttäen. Sekvensointien jälkeen sekvenssit siirrettiin BLAST-ohjelmaan ja etsittiin samankaltaisia alueita 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea) -tietokannan sekvensseistä. BLAST-ohjelmalla selvitettiin, mitä bakteerikantoja eristetyt isolaatit olivat genomissa. 16S rRNA ja genomien sekvensoinnin perusteella

huomattiin, että osa eristetyistä isolaateista olivat todennäköisesti samaa kantaa ja siksi bakteerikantojen lukumäärä väheni myös tässä vaiheessa. Sekvenssitiedon perusteella eristetyt bakteerikannat olivat 4B1 *Escherichia coli*, 4B11 *Enterococcus faecalis*, 4B24 *Citrobacter freundii*, 4B41 *Klebsiella sp.* ja 4B43 *Comamonas kerstersii* (Taulukko 9). Sangerin sekvensoinnin perusteella bakteerikanta 4B41 oli *Klebsiella michiganensis*, *K. oxytoca* tai *K. aerogenes*, kun taas Illumina-sekvensoinnin perusteella bakteerikanta 4B41 oli *Klebsiella michiganensis*, tämän vuoksi käytetään bakteerikannasta 4B41 *Klebsiella sp.* nimeä (Taulukko 9).

Yhteisön bakteerikantojen koko 16S rRNA geenien perusteella muodostettiin fylogenetinen puu yhteisön sukulaisuussuhteiden selvittämiseksi. Fylogeneettisestä puusta nähdään, kuinka *E. faecalis*:n ja *C. kerstersii*:n sukuhaarat ovat omia sukuhaaroja, kun taas 4B1 *E. coli*, 4B24 *C. freundii* ja 4B41 *Klebsiella sp.* ovat läheisempää sukua toisilleen (Kuva 1). 4B24 *C. freundii* ja 4B41 *Klebsiella sp.* ovat hyvin läheistä sukua keskenään.



Kuva 1. Yhteisön bakteerikantojen 16S rRNA geenien perusteella muodostettu fylogeneettinen puu.

Genomisekvensseistä etsittiin bakteerien kantamat resistenssigeenit sekä plasmidit (Taulukko 9). Fenotyypin perusteella 4B1 *E. coli* kasvoi kefalotiini-, ampisilliini- ja tetrasykliinimaljoilla. Sitä vastaavat resistenssigeenit *blaCTX-M-15*, joka antaa resistenssin kefalotiinille ja ampisilliinille, sekä *tet(B)*, joka antaa resistenssin tetrasykliinille, löytyivät genomista. Genomista löytyi myös *qnrS1*, *sul2* ja *mdf(A)* -geenit. Bakteerikanta 4B35 oli lähestulkoon sama kuin 4B1, lukuun ottamatta *tet(B)* -resistenssigeeniä ja Col156 -plasmidia. Fenotyypin perusteella 4B11 *E. faecalis*

kasvoi vain kanamysiinimaljalla, mutta vastaavaa resistenssigeeniä ei löytynyt genomista. *C. freundii* bakteerikannoilla oli hajontaa fenotyypin suhteen niin, että bakteeri-isolaatit kasvoivat ampisilliinimaljalla tai kefalotiini-, ampisilliini- ja tetrasykliinimaljalla tai bakteerikanta ei kasvanut millään antibioottimaljalla (Liite 2). Kaikista *C. freundii* bakteeri-isolaateista löytyi kuitenkin sama *bla*CMY-152 resistenssigeeni. 4B41 *Klebsiella sp.* kasvoi ampisilliini- ja kanamysiinimaljalla ja genomista löytyi näitä vastaavasti resistenssigeeni *aph(3')-Ia*, joka antaa resistenssin kanamysiinille, sekä *bla*OXY-1-4, joka antaa resistenssin ampisilliinille. 4B43 *C. kerstersii* ei kasvanut millään antibioottimaljalla eikä sen genomista löytynyt resistenssigeenejä. Makrolidi, linkosamidi, streptogramin a, fluorokinoloni ja folaattiantagonisti resistenssigeenejä löytyi myös bakteerikannoista, mutta niiden fenotyyppejä ei testattu näille antibiooteille. PlasmidFinder etsii sekvenssidatasta replikonialueita, jotka ovat usein lyhyitä geenialueita. Tässä tutkimuksessa ei ole käytettävissä plasmidien kokonaisia sekvenssejä, joten löydettyjen replikonisekvenssien perusteella ennustetaan, minkä tyyppisiä (Inc-tyypit) plasmideja kukin bakteeri kantaa. *E. coli* bakteerista löytyi erilaisia IncF -tyypin plasmideja: IncFIB(AP001918), IncFII(29) ja IncFII(pCoo), sekä Col156 plasmidi. 4B11 *E. faecalis* bakteerista löytyi rep9a -plasmidi ja 4B24 *C. freundii* bakteerista pKPC-CAV1321-plasmidi. 4B41 *Klebsiella sp.* bakteerista löytyi IncFIB(K)(pCAV1099-114) -plasmidi ja Col440I -plasmidi.

Taulukko 9. Näytteestä 004 eristettyjen bakteerikantojen 16S rRNA:n ja genomi sekvensoinnin sekvenssidatat sekä genomista etsityt bakteerien resistenssigeenit ja bakteerien kantamat plasmidityypit. Sulkeissa olevat bakteerikannat ovat sekvensoinnin perusteella samankaltaisia bakteereja kuin yhteisöön valitut kannat.

Bakteerikanta	Laji (16S 27F-534R Sanger)	Laji (koko 16S Illumina)	Geeni	Plasmidi
4B1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> CTX-M-15, <i>qnr</i> S1, <i>sul</i> 2, <i>mdf</i> (A), <i>tet</i> (B)	Col156, IncFIB (AP001918), IncFII (29), IncFII(pCoo)
(4B35)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> CTX-M-15, <i>qnr</i> S1, <i>sul</i> 2, <i>mdf</i> (A)	IncFIB (AP001918), IncFII (29), IncFII(pCoo)
4B11	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>lsa</i> (A),	rep9a
4B24 (4B17, 4B29, 4B44, 4B49)	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>bla</i> CMY-152	pKPC-CAV1321
4B41 (4B10, 4B31, 4B51)	<i>Klebsiella sp.</i> (<i>K. michiganensis</i> / <i>oxytoca/aerogenes</i>)	<i>Klebsiella sp.</i> (<i>K. michiganensis</i>)	<i>aph</i> (3') -Ia, <i>bla</i> OXY- 1-4	Col440I, IncFIB(K)(pCAV1099-114)
4B43	<i>Comamonas kerstersii</i>	<i>Comamonas kerstersii</i>	-	-

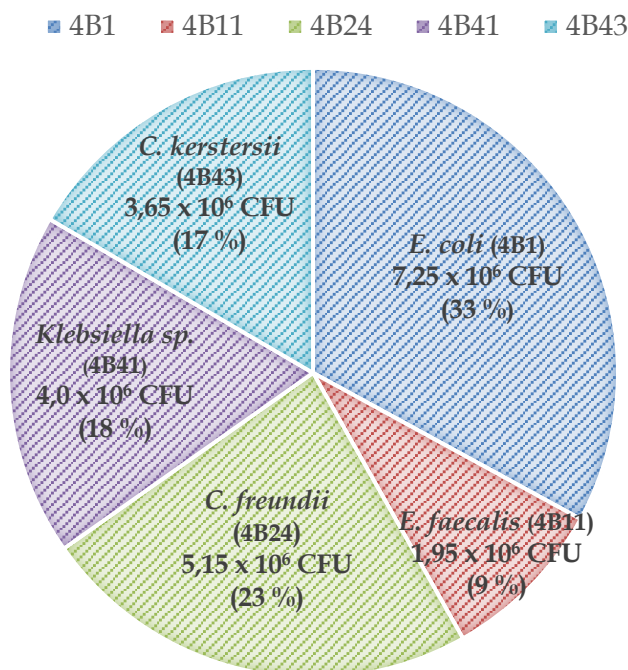
3.2 Yhteiskasvatus

Risti-inhibitiotestauksella testattiin valituilla bakteerikannoilla ristiin inhihoivatko ne toistensa kasvua. Tulokset olivat luettavissa maljoilta, joille oli kasvanut selkeä bakteerimatto. Inhibitiotestauksessa inhibitiomaljojen bakteerimattoihin ei syntynyt kirkkaampia kohtia bakteerin supernatantin kohdalle, joten inhibitiota ei

tapahtunut. 4B11 *E. faecalis* ei muodostanut bakteerimattoa LB-maljalle, minkä vuoksi ei pystytty sanomaan onko inhibitiota tapahtunut muiden bakteerikantojen kanssa.

Yhteiskasvatuksessa kaikkia yhteisöön valittuja kantoja kasvatettiin yhdessä seitsemän vuorokauden ajan. Yhteisön koostumus kokeen alkaessa määritettiin yksittäisten bakteerikasvatusten solutiheyksien perusteella. Bakteerikasvatuksissa suurin osuus oli 4B1:llä (33 %) eli suurin osa yhteiskasvatuksesta oli *E. coli* ja pienin osuus oli 4B11:sta (9 %) eli pienin osa yhteiskasvatuksista oli *E. faecalis* (Kuva 2).

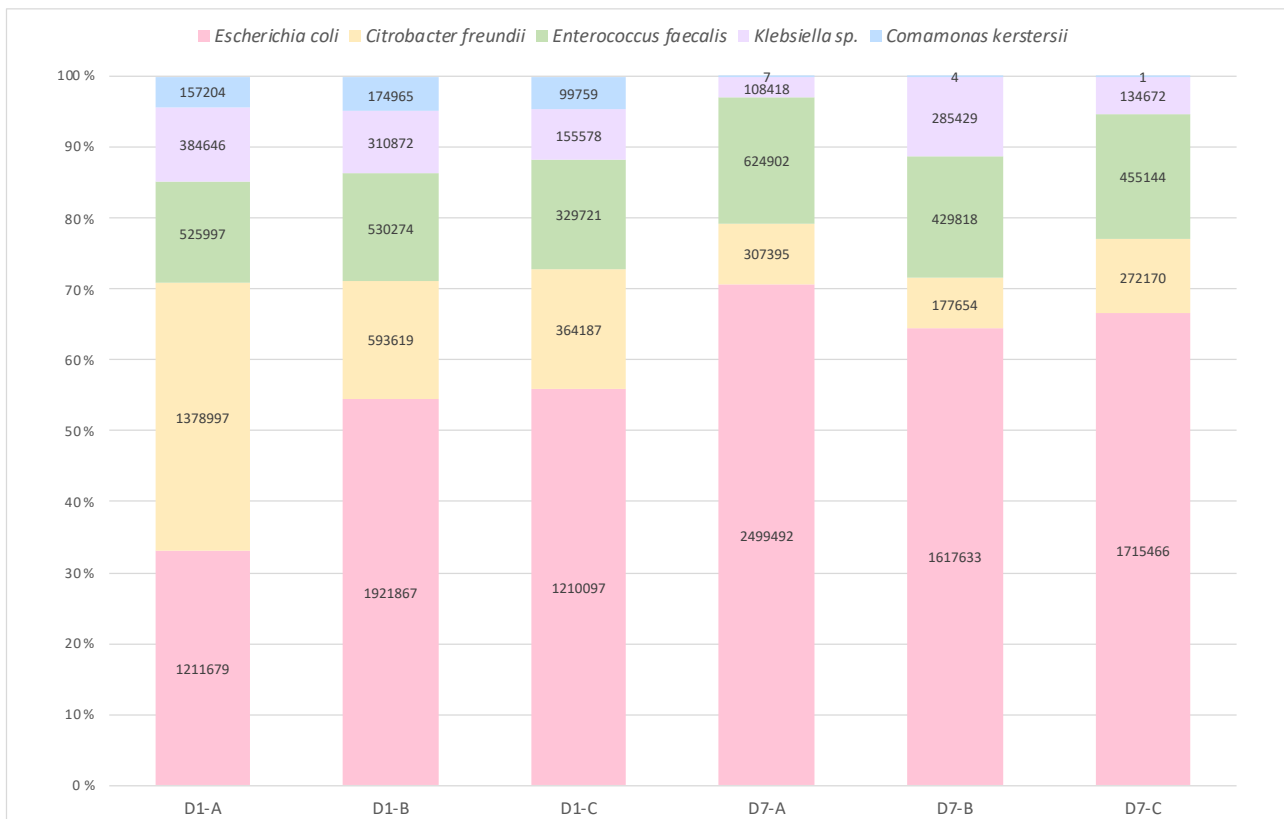
Yhteisökokeen neljäntenä päivänä kasvatukset maljattiin ChromID ESBL -maljalle, jotta saatiin selvitettyä, oliko ESBL-geeni siirtynyt muihin bakteereihin yhteiskasvatuksessa. Kaikissa kromogeenisissä viljelyalustoissa havaittiin punaruskean väristä kasvua, mikä tarkoittaa *E. colin* kasvua. Tämän perusteella todettiin, ettei ESBL-plasmidi ollut siirtynyt muihin bakteereihin.



Kuva 2. Yhteisön alkukoostumus kokeen alkaessa.

Yhteisökokeen ensimmäisenä ja seitsemäntenä päivänä yhteiskasvatusten yhteisörakenne määritettiin 16S rRNA -amplikonisekvensoinnin avulla. CLC Genomic Workbench:lla käsitellystä sekvenssidatasta löytyi kymmenen erilaista OTU:a, jotka siirrettiin BLAST-ohjelmaan ja etsittiin samankaltaisia alueita 16S ribosomal RNA tietokannan sekvensseistä. BLAST-ohjelman käyttö paljasti, että yhteisökokeen 16S rRNA kirjaston OTU:t olivat *E. coli*, *E. faecalis*, *Klebsiella sp.*, *C. freundii* ja *C. kerstersii*. Kimeroiksi havaitut OTU:t poistettiin lopullisesta data-analyysistä. Kaikki bakteerilajit, lukuun ottamatta 4B43 *C. kerstersii* -bakteeria, säilyivät yhteisössä koko kokeen ajan, mutta yhteisön rakenne oli muuttunut seitsemän vuorokauden aikana.

4B1 *E. coli*:n suhteellinen osuus ensimmäisenä päivänä oli 48 % (keskihajonta 13 %). Seitsemäntenä päivänä suhteellinen osuus oli 67 % (keskihajonta 3 %) eli sen osuus oli kasvanut 19 prosenttiyksikköä (Kuva 3). 4B11 *E. faecalis*:n suhteellinen osuus ensimmäisenä päivänä oli 15 % (keskihajonta 0,5 %) ja seitsemäntenä päivänä suhteellinen osuus oli 17,5 % (keskihajonta 0,3 %) eli sen osuus oli kasvanut 2,5 prosenttiyksikköä. 4B24 *C. freundii*:n suhteellinen osuus ensimmäisenä päivänä oli 24 % (keskihajonta 12 %). Seitsemäntenä päivänä suhteellinen osuus oli 9 % (keskihajonta 1,7 %) eli sen osuus oli laskenut 15 prosenttiyksikköä. 4B41 *Klebsiella sp.* suhteellinen osuus ensimmäisenä päivänä oli 9 % (keskihajonta 1,7 %) ja seitsemäntenä päivänä suhteellinen osuus oli 6,5 % (keskihajonta 4,3 %) eli sen osuus oli laskenut 2,5 prosenttiyksikköä. 4B43 *C. kerstersii* suhteellinen osuus ensimmäisenä päivänä oli 4,5 % (keskihajonta 0,3 %) ja seitsemäntenä päivänä suhteellinen osuus oli 0 % eli *C. kerstersii* oli hävinnyt kokonaan yhteisöstä.



Kuva 3. Synteettisen bakteeriyhteisön rakenne 16S rRNA amplikonisekvensoinnin perusteella. Bakteeriyhteisöä kasvatettiin seitsemän vuorokautta ja rakenne määritettiin päivien 1 (D1-A-C) ja 7 (D7-A-C) kohdalla. Kuvan luvut kertovat kyseisen bakteerin sekvensoitujen amplikonien lukumäärän yhteisössä.

3.3 ESBL-konjugaatiokoe

Konjugaatiokokeen avulla tutkittiin 4B1 bakterikannan ESBL-ominaisuuden siirtymistä muihin yhteisöön valittuihin bakterikantoihin (4B11, 4B24, 4B41 ja 4B43; Taulukko 10). Tulokset luettiin laimennos 10^{-1} maljalta, joka selektoi mahdollisia ESBL-transkonjugantteja. 4B11 *E. faecalis*, 4B41 *Klebsiella sp.* ja 4B43 *C. kerstersii* -transkonjuganttimaljoista vain yhdellä replikaatilla kasvoi 1–2 pesäkettä. 4B24 *C. freundii* replikaatti I maljalla kasvoi kuusi pesäkettä, replikaatti II maljalla kasvoi kaksi pesäkettä ja replikaatti III maljalla kasvoi neljä isoa pesäkettä ja 27 pientä pesäkettä. *E. coli* (JM109(pSU19)) replikaatti I maljalla kasvoi kolme

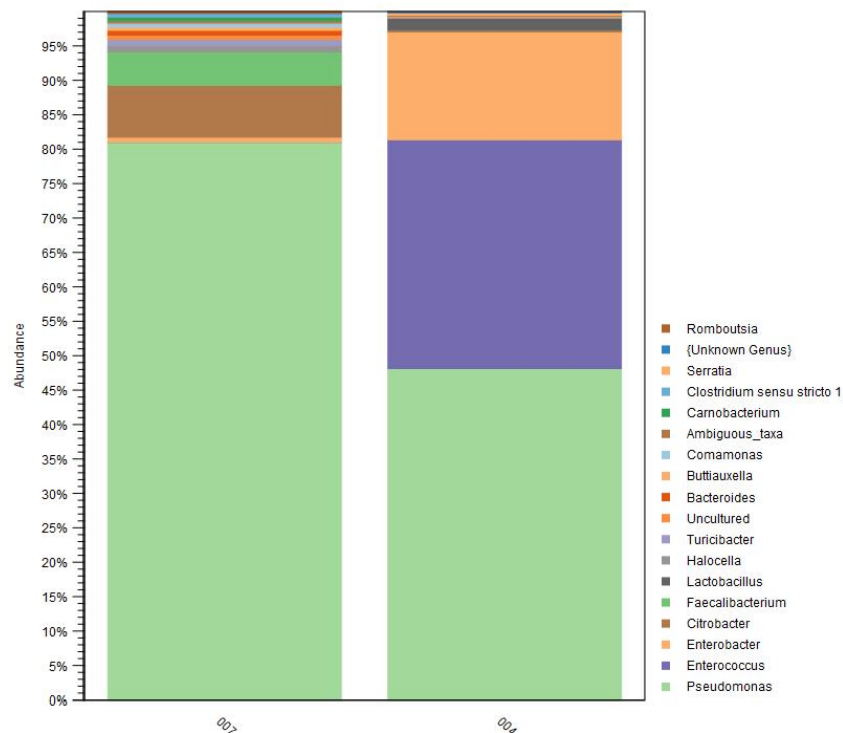
pesäkettä, replikaatti II maljalla kasvoi yksi pesäke ja replikaatti III maljalla kasvoi kaksi pesäkettä (Taulukko 10).

Taulukko 10. 4B1 *E. coli* bakteerikannan ESBL-ominaisuuden siirtyminen konjugaation avulla yhteisön bakteerikantoihin 4B11, 4B24, 4B41, 4B43 ja JM109(pSU19) parittaisilla konjugaatiokokeilla osoitettuna. Luovuttaja:vastaanottaja kohdassa kerrotaan luovuttajan ja vastaanottajan bakteeritiheyden suhde (CFU/ml) kokeen alkaessa. Transkonjuganttien pesäkemäärät 100 µl:ssa laimennettua konjugaatiokasvatusta.

Bakteeri-kanta	Laji	Luovuttaja: vastaanottaja	Transkonjuganttien määrä (Replikaatti I/II/III)	Transkonjuganttien keskiarvo (keskihajonta), CFU/ml
4B11	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,5	1/0/0	6,7 x 10 (5,8 x 10)
4B24	<i>Citrobacter freundii</i>	1,4	6/2/31	1,3 x 10 ³ (1,6 x 10 ³)
4B41	<i>Klebsiella sp.</i>	2	0/0/2	6,7 x 10 (11,5 x 10)
4B43	<i>Comamonas kerstersii</i>	8,1	0/0/1	3,3 x 10 (5,8 x 10)
JM109 (pSU19)	<i>Escherichia coli</i>	7,7	3/1/2	2,0 x 10 ² (1,0 x 10 ²)

3.4 Suolistomikrobiomin yhteisörakenne

Resistenssiprofiilin perusteella jatkoon valittiin vain näytteiden 004 ja 007 kantoja, joten näistä kahdesta ulostenäytteestä selvitettiin 16S rRNA-geeniin perustuva suolistomikrobiomin yhteisörakenne. Suolistoyhteisössä oli paljon erilaisia bakteereja, joista sukutasolla luokiteltuna näytteessä 004 oli 12 eri taksonomista ryhmää ja 007 näytteessä oli 15 eri taksonomista ryhmää. Näytteessä 004 vallitsevat bakteerisuvut olivat *Pseudomonas* (48 %), *Enterococcus* (28 %), *Enterobacter* (16 %) ja *Lactobacillus* (2 %) (Kuva 4.). *Citrobacter* löytyy yhteisöstä myös, mutta vähäisessä määrin (<1 %). Näytteessä 007 vallitsevat bakteerisuvut olivat *Pseudomonas* (81 %), *Citrobacter* (8 %), *Faecalibacterium* (5 %) sekä vähäisessä määrin (<1 %) *Halocella*, *Turicibacter*, *Bacteroides*, *Comamonas*, *Carnobacterium*, *Buttiauxella*, *Clostridium* ja *Enterobacter* (Kuva 4.).



Kuva 4. Ulostenäyte 007:n ja 004:n suolistomikrobiomin yhteisörakenne 16S rRNA:n perusteella.

4 TULOSTEN TARKASTELU

4.1 Bakteerikantojen karakterisointi

Vaikka ulostenäytteistä saatiin eristettyä paljon bakteerikantoja, niin bakteerien monimuotoisuus oli vähäistä sekä useat isolaatit osoittautuivat antibioottiresistenssiltään sekä sekvenssiltään samanlaisiksi. Monet tekijät voivat vaikuttaa erilaisten bakteerien löytämiseen ja karakterisoimiseen. Useimmat ihmisten suolistossa asuttavat bakteerit ovat anaerobisia ja niitä on 100–1000 kertaa enemmän kuin aerobisia bakteereja (Bartosch ym. 2004). Suolistomikrobiomissa on myös paljon fakultatiivisesti aerobisia bakteereja. Tässä tutkimuksessa bakteerit eristettiin hapellisissa eli aerobisissa olosuhteissa, mutta anaerobiset olosuhteet ovat yksi tekijä, mitkä olisivat voineet parantaa eristettyjen bakteerien monimuotoisuutta. On tutkittu, että ulostenäytteen altistaminen hapelle on vahingoittanut happiherkkiä soluja niin, että solut ovat kuolleet tai olleet ei-viljeltävässä tilassa (Bartosch ym. 2004). Viljeltävyys parantuisi myös, jos näytteenotto, keräys ja näytteen valmistelu suoritettaisiin hapettomassa tilassa. Näytteen olisi hyvä olla tuoretta, mutta ulosteen mikrobisto ei muutu merkittävästi, jos näyte saadaan heti -80 °C (Tang ym. 2020). Jos näyte on säilytetty muulla tavalla se vaikuttaa ulostenäytteen mikrobien DNA:n hajoamiseen, liikkakasvuun ja joidenkin lajien kuolemaan. On myös mahdollista, että erilaiset näytteenottotavat, kuten endoskopia, voivat parantaa ulostenäytteen mikrobiston spektriä. Mikrobisto vaihtelee ihmisen suoliston eri alueiden välillä, *Lactobacilaceae*- ja *Enterobacteriaceae*-perheet hallitsevat ohutsuolessa, kun taas paksusuolea hallitsevat perheet *Prevotellaceae*, *Bacteroidaceae*, *Rikenellaceae*, *Ruminococcaceae* ja *Lachnospiraceae* (Tang ym. 2020).

Tässä tutkimuksessa käytettiin kasvatusalustana LB-mediaa, joka on ravinnerikas, ei-selektiivinen sekä sen koostumus on huonosti määritelty median aineosien takia, koska ne sisältävät yleensä monimutkaisia ainesosia, kuten hiivauutetta (Medina ym. 2017). LB-media suosii nopeasti kasvavien ja kilpailukykyisten bakteerien kasvua, kuten esimerkiksi *E. coli*a (Medina ym. 2017). Tutkimukseen olisi voitu valita kasvatusalustaksi LB-median lisäksi toisen median, jossa olisi alhaisempi

ravinnepitoisuus ja jonka komponentit tiedetään. Alhainen ravinnepitoisuus voisi parantaa bakteerien monimuotoisuuden kasvua ja edistäisi hitaasti kasvavien bakteerien kasvua (Medina ym. 2017).

Bakteereja saadaan eristettyä viljelemällä näytteitä agarmaljoilla, mutta se ei ole niin tehokasta eikä anaerobisia bakteereja saada eristettyä. Agarviljelyn tilalle on kehitetty uusia menetelmiä, kuten maljapohjaisia kasvukokeita, joissa määritettiin bakteerikantojen ravitsemukselliset mieltymykset sekä biosynteettiset ominaisuudet. Uutena menetelmänä on kehitetty myös mikrofluidinen alusta (Watterson ym. 2019). Anaerobisia näytteitä voisi viljellä nesteviljelyputkissa, joissa bakteerien annettaisiin inkuboitua seitsemän vuorokautta ilman ravistelua (Raymond ym. 2019). Näin anaerobiset bakteerit kasvaisivat viljelyputken pohjalla. Anaerobisia näytteitä voitaisiin myös viljellä suojatulla elatusaineella tai anaerobisessa laatikossa. Laatikon sisäosa koostuu vedystä, hiilidioksidista ja typestä (Bellali ym. 2019). Watterson ym. (2019) tutkimuksessa on kehitelty uusi pisarapohjainen mikrofluidinen alusta (droplet-based microfluidic platform), joka eristää ja viljelee anaerobisesti mikrobisoluja miljoonissa pisaroissa ja lajittelee pisarat automaattisesti pesäketiheyden perusteella. Koska jokainen pesäke on eristetty suljetun pisaran sisällä, harvinaiset ja hitaasti kasvavat lajit välttävät nopeasti kasvavien lajien kilpailevan liikakasvun, mitä usein tapahtuu perinteisessä neste- tai Petri-agar-viljelyssä (Watterson ym. 2019).

Nestekasvatuksia ravistellaan, jotta bakteerit saisivat aerobiset oltavat kasvatukseen. Aerobista bakteerikasvua rajoittaa nopeus, jolla mikrobit voivat replikoitua, ja nopeus, jolla happikaasu voi liueta nestemäiseen viljelyalustaan (Bates ym. 2011). Ellei happea voida pumpata suoraan nesteviljelmään, siihen voidaan lisätä ilmaa sekoittamalla tai ravistamalla viljelypulloa voimakkaasti. Mitä nopeampi kierrosnopeus on, sitä enemmän bakteerit saavat happea. Kierrosnopeutta ei voi kuitenkaan lisätä liikaa, koska liiallinen sekoitus vahingoittaa bakteerisoluja (Bates ym. 2011).

4.2 Yhteiskasvatus

Synteettiset suoliston bakteeriekosysteemit ovat tehokas työkalu luonnollisten järjestelmien peruseriaatteiden tutkimiseen (De Roy ym. 2014, Vrancken ym. 2019). Ne rajoittavat vaikuttavia tekijöitä minimiin mahdollistaen niiden hallinnan sekä vuorovaikutusten seurannan (De Roy ym. 2014).

Yhteiskasvatuksessa kasvatettiin bakteerikantoja 4B1 *E. coli*, 4B11 *E. faecalis*, 4B24 *C. freundii*, 4B41 *Klebsiella sp.* ja 4B43 *C. kerstersii* samassa nestekasvatuksessa seitsemän päivän ajan. Yhteiskasvatuksen avulla tarkistettiin, pystyvätkö valitut bakteerikannat elämään yhdessä. Yhteiskasvatuksessa bakteerikannat säilyivät yhteisössä vakaasti pitkässä 7 vuorokauden pituisessa kasvatuksessa, lukuun ottamatta 4B43 *C. kerstersii* -bakteeria, joka oli bakteerilajeista ainut, joka oli hävinnyt kokonaan yhteiskasvatuksissa. Vertaamalla yhteisön alkukoostumusta (Kuva 2.) ensimmäisen päivän tuloksiin (Kuva 3.) on 4B43 *C. kerstersii*:n osuus laskenut huomattavasti jo päivässä. Voidaan olettaa, että 4B43 *C. kerstersii* on hitaampi kasvamaan LB-medialla eikä ole kilpailukykyinen muiden bakteerien kanssa. Bakteerien kasvunopeuksia olisi voinut tutkia tarkemmin kasvukäyrien avulla. 4B41 *Klebsiella sp.* suhteellinen osuus oli laskenut 8,8 %:sta 6,6 %:iin seitsemän päivän aikana. 4B41 *Klebsiella sp.* suhteellinen osuus oli laskenut myös alkukoostumuksesta ensimmäiseen päivään. 4B24 *C. freundii*:n suhteellinen osuus oli laskenut 15 prosenttiyksikköä seitsemän päivän aikana, mutta alkukoostumuksen ja ensimmäisen päivän aikana 4B24 *C. freundii* suhteellinen osuus oli pysynyt lähestulkoon samana. 4B1 *E. coli* suhteellinen osuus kasvoi 19,3 prosenttiyksikköä ja 4B11 *E. faecalis*:n suhteellinen osuus kasvoi 2,6 prosenttiyksikköä yhteiskasvatuksessa seitsemän päivän aikana. 4B11 *E. faecalis*:n ja 4B1 *E. coli* suhteelliset osuudet olivat kasvaneet myös alkukoostumuksesta ensimmäiseen päivään. 4B1 *E. coli* osuuden kasvu oli oletettavaa, koska LB-media on *E. colille* suotuisa kasvuympäristö (Medina ym. 2017). Voidaan olettaa, että 4B1 *E. coli* ja 4B11 *E. faecalis* ovat bakteeriyhteisön kilpailukykyisimmät bakteerit näissä olosuhteissa, koska ne olivat ainoat bakteerit, jotka rikastuivat seitsemän päivän aikana. Yhteiskasvatusta olisi voinut kasvattaa pidemmän aikaa ja käyttää jotain

toista kasvualustaa, jotta hitaampikasvuiset, esimerkiksi 4B43 *C. kerstersii*, olisi mahdollisesti ehtinyt kasvamaan yhteisössä (Cairns ym. 2018).

Synteettisten yhteisöjen tutkiminen avaa monia mahdollisuuksia ekosysteemien hallintaan. Yhtä parametria muuttamalla yhteisöä voidaan ohjata ja luoda haluttu vaikutus (De Roy ym. 2014). Synteettisten yhteisöjen käyttö lisää tietämystä mikrobisyhteisöjä muokkaavista ja vaikuttavista tekijöistä. Synteettisiä yhteisöjä voidaan käyttää jätetuotteiden kierrätykseen, teollisessa käymisessä kemiallisten yhdisteiden tuotannossa (De Roy ym. 2014). Synteettisiä bakteerisyhteisöjä voidaan myös käyttää plasmidien leviämisen tutkimiseen (Cairns ym. 2018). Tulevaisuudessa synteettisiä mikrobisyhteisöjä voitaisiin käyttää ennustamaan ekosysteemin käyttäytymistä, kuten vakautta, kestävyyttä ja toimivuutta.

4.3 ESBL-konjugaatiokoe

Konjugaatiokokeessa maljausten avulla tutkittiin syntyneiden ESBL-transkonjuganttien määrää. 4B24 *C. freundii* ja *E. coli* JM109(pSU19) maljoille oli muodostunut transkonjugantteja. 4B11 *E. faecalis*, 4B41 *Klebsiella sp.* ja 4B43 *C. kerstersii* -transkonjuganttimaljoilla kasvoi 1–2 pesäkettä vain yhdellä replikaatilla, joten konjugaatiosta ei ole varmuutta. *Klebsiella sp.* on *E. coli* kanssa läheistä sukua, joten on mahdollista, että yksittäiset pesäkkeet ovat transkonjugantteja. *E. faecalis* on *E. coli* kanssa kaukaista sukua ja on epätodennäköistä, että grampositiivinen bakteeri (*E. faecalis*) ottaisi vastaan gramnegatiivisen bakteerin (*E. coli*) plasmidin, vaikka konjugaatiota voi harvoin tapahtua grampositiivisen ja gramnegatiivisen bakteerien välillä (Neil ym. 2021). ESBL-geenin geneettistä sijaintia ei voida varmuudella määrittää, koska Illumina-sekvensoinnin tuloksena kootut kontigit ovat lyhyitä, eikä plasmidien täysimittaisia sekvenssejä ole mahdollista määrittää, koska ne olivat lyhyempinä paloina. Tämän voisi tulevaisuudessa määrittää esimerkiksi long-read-sekvensoinnilla, jolla on mahdollista määrittää pitkiä DNA-sekvenssejä (Amarasinghe ym. 2020). Koska ESBL-transkonjugantteja kuitenkin muodostui *E. coli* -bakteeriin konjugoituessa, voitiin olettaa, että 4B1 *E. coli* ESBL-geeni oli sijoittunut konjugatiiviseen plasmidiin. Vastaanottajasolut ovat voineet myös pitää konjugatiivista plasmidia vieraana DNA:na, jota vastaan isäntäbakteerit

ovat kehittäneet puolustusmekanismeja (Virolle ym. 2020). Myös ympäristöolosuhteet ja populaatiovuorovaikutukset ovat voineet vaikuttaa konjugaatioon. Plasmidin siirtyminen saattaa myös osaltaan hidastaa bakteerin kasvua, haitaten bakteerin kilpailukykyisyyttä.

4B24 *C. freundii* ja *E. coli* JM109(pSU19) transkonjugantteja ei tässä tutkimuksessa todennettu oikeiksi. Tämän todentamisen olisi voinut tehdä transkonjuganttien PCR:llä ja sekvensoinnilla tai tutkimalla niiden kykyä siirtää ESBL-ominaisuutta edelleen toiseen bakteeriin. Tämän tutkimuksen jälkeen kuitenkin onnistuttiin siirtämään ESBL-ominaisuudet konjugaatiokokeilla eri *E. coli* -kantoihin. Joten voidaan olettaa, että 4B1 *E. coli*in ESBL-geeni oli sijoittunut konjugatiiviseen plasmidiin. Tutkimuksen jälkeen tutkittiin myös 4B24 *C. freundii* genomia ja saatiin selville, että 4B24 *C. freundii* kantaa *bla*CMY-152-geeniä, joka on AmpR-säätelyalueen säätelemä. AmpR on promoottorialue, joka on *ampC* beetalaktamaasigeenin transkription säätelijä (Nakano ym. 2017, Vadlamani ym. 2015). AmpR-promoottorialue antaa korkean resistenssin useimmille kefalosporiineille (Nakano ym. 2017, Vadlamani ym. 2015). 4B24 *C. freundii* -bakteerilla on näin jo itsellään ESBL ominaisuus, joka on induoituva AmpR:n avulla. Näytteestä 004 eristettiin useampi *Citrobacter*, joista osa oli resistenttejä kefalotiinille ja osa ei ollut resistentti, mutta kaikilla *Citrobacter*:lla oli sama *bla*CMY-152-geeni. Vaikka geeni on ampisiliinillä induoituva, promoottorialue "vuotaa", jonka vuoksi syntyy geeniä ekspressoivia yksilöitä, jotka kasvavat tällöin myös kefalotiini-maljalla.

On tutkittu, että *E. coli* IncFIB-plasmidilla on potentiaalia kantaa antibioottiresistenssigeenejä ja näin siirtää konjugoimalla geenejä muihin bakteereihin (Khajanchi ym. 2017). *bla*CTX-M-15-geenien tiedetään myös olevan liikkuva geeni sekä CTX-M-geenejä koodaavat plasmidit siirtyvät usein konjugoitumalla (Bonnet 2004, Salinas ym. 2019).

4.4 Suolistomikrobiomin yhteisörakenne

Tutkimuksessa käytettävistä ulostenäytteistä oli aiemmin löytynyt jokin ESBL-bakteeri. Tutkimuksessa ei tiedetty potilaiden ikää, sairaalassaoloaikaa eikä sitä, olivatko he matkustaneet, mutta nämä tekijät ovat voineet antibioottien lisäksi aiheuttaa häiriötä suolistomikrobiomissa. Normaalin flooran puute voi johtua myös siitä, että suurin osa suolistomikrobiomeista ovat anaerobisia ja tässä tutkimuksessa käytettiin vain aerobisia menetelmiä.

Näytteestä 004 saatiin eristettyä viisi eri bakteerilajia *E. coli*, *E. faecalis*, *Klebsiella sp.*, *C. freundii* ja *C. kerstersii*. Näytteen 004 bakteeriyhteisöstä suurimmat taksonomiset ryhmät olivat *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Enterobacter* ja *Lactobacillus*. Bakteeriyhteisöstä löytyi samoja bakteerilajeja kuin näytteestä 004 saatiin eristettyä. *C. kerstersii* -bakteeria löytyi bakteeriyhteisöstä, mutta kun harvalukuisia bakteereja suodatettiin pois, jäi *C. kerstersii* pois lopullisesta analyysistä. *Enterococcus* ja *Enterobacter* edustivat bakteeriyhteisön suurimpia taksonomisia ryhmiä, mutta *Klebsiella* ja *Citrobacter* esiintyivät bakteeriyhteisössä vähäisissä määrin. Näytteessä 004 myös *Enterococcus:n* ja *Enterobacter:n* suhteelliset osuudet olivat suuremmat kuin *Klebsiella:n* ja *Citrobacter:n*. Tulosten perusteella ulostenäytteestä suurin taksonominen ryhmä oli *Pseudomonas*, vaikka sitä ei saatu eristettyä näytteistä ollenkaan. *Pseudomonas* on oksidaasipositiivinen ja se kasvaa monen tyyppisillä elatusaineilla 37 °C - 42 °C:ssa (Araos ja D'Agata 2019, LaBauve ja Wargo 2012). Ihmisiä infektoivia *Pseudomonaksia* ovat *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. cepacia*, *P. stutzeri*, *P. maltophilia* ja *P. putrefaciens*. *P. aeruginosa* ja *P. fluorescens* pystyvät elämään myös ihmisen suolistossa. *P. aeruginosa* on kaikkialla esiintyvä ympäristöbakteeri, joka on viiden suurimman bakteerilajin joukossa, joita tavallisimmin esiintyy sairaalainfektioissa (LaBauve ja Wargo 2012). On todettu, että *P. aeruginosa* ei yleensä löydy terveiden ihmisten mikrobistosta. *P. aeruginosa* löydös edellyttää mikrobiomin häiriötä. Häiriölähteitä ovat esimerkiksi antimikrobiset aineet, lääkkeet, maha-suolikanavan sairaus tai erityinen ruokavalio (Araos ja D'Agata 2019). Geneettisestä monimutkaisuudesta johtuen *P. aeruginosa:n* genomien koko vaihtelee välillä 5,5–7 Mbp ja se on yksi suurimmista sekvensoiduista bakteerigenomeista (LaBauve ja Wargo 2012). Tämän suuren koon ja

monimutkaisuuden ansiosta *P. aeruginosa* voi menestyä monissa erilaisissa ympäristöissä sekä aerobisissa että anaerobisissa olosuhteissa (Arai 2011). Tutkimuksessa näytteitä säilytettiin useampi kuukausi 4 °C:ssa, joten on mahdollista, että näyte oli mennyt huonoksi ja *Pseudomonas* -lajit eivät ole selvinneet. LaBauven tutkimuksessa suositellaan, että bakteeriviljelmässä käytettäisiin korkeintaan viikon vanhoja bakteereja (LaBauve ja Wargo 2012). On myös mahdollista, että näytteestä ei ole otettu tarpeeksi bakteereja. Toisaalta *Comamonas*:sta saatiin eristettyä ulostenäytteestä, vaikka sitä oli vain muutama sekvenssi miljoonista sekvensseistä 004 näytteessä.

4.5 Johtopäätökset

Tutkimuksen tavoitteena oli koota ESBL-bakteeria suolistossaan kantavan ihmisen suolistomikrobiomista eristetyistä bakteereista synteettinen bakteeriyhteisö. Bakteeriyhteisö muodostettiin viidestä eri bakteerilajista ja sen voidaan katsoa olevan stabiili, sillä sen bakteerit säilyivät, lukuun ottamatta 4B43 *C. kerstersii*:ä. Tutkimuksessa selvitettiin *E. colin* ESBL-ominaisuuden leviämispotentiaalia yhteisön muihin bakteereihin. ESBL-plasmidien konjugaatio onnistui *E. colien* välillä, muiden bakteerien konjugaatiosta ei ole varmuutta. Konjugaation onnistumiseen on voinut vaikuttaa myös se, että *E. coli* oli liian kaukaista sukua muiden bakteerien kanssa.

Bakteerien antibioottiresistenssi pidentää sairauden ja hoidon kestoja sairaaloissa sekä voivat aiheuttaa leikkauksiin liittyviä komplikaatioita. Tämän vuoksi oireetonta ESBL-kantajuutta olisi syytä tutkia lisää, jotta ESBL-bakteerit saataisiin hoidettua potilaalta ennen leikkauksia ja välttyttäisiin leikkauksen jälkeisiltä infektioilta. Synteettistä bakteeriyhteisöä voidaan tulevaisuudessa käyttää yksinkertaisena mallisysteeminä, kun halutaan lisätä tietoa bakteeriyhteisön käyttäytymisestä sekä siihen vaikuttavista tekijöistä. Sen avulla voidaan myös tutkia konjugatiivisten plasmidien leviämistä ja selvittää niiden siirtymiseen vaikuttavia tekijöitä olosuhteita muuttamalla. Tutkimuksessa rakennettua synteettistä yhteisöä voidaan tulevaisuudessa käyttää muun muassa bakteerien välisten suhteiden ja plasmididynamiikan tutkimiseen ja näin ollen paremmin

ymmärtää monimutkaisten bakteeriyhteisöjen, kuten luonnollisen suolistomikrobiomin, toimintaa.

KIITOKSET

Haluan kiittää ohjaajiani FT Reetta Penttistä ja dosentti Matti Jalasvuorta mahdollisuudesta, kärsivällisyydestä ja hyvästä ohjauksesta sekä tuesta tutkielman aikana.

KIRJALLISUUS

- Amarasinghe, S. L., Su, S., Dong, X., Zappia, L., Ritchie, M. E. & Gouil, Q. 2020. Opportunities and challenges in long-read sequencing data analysis. *Genome Biol*, 7;21(1):30. DOI: 10.1186/s13059-020-1935-5.
- Ambler, R. P., Coulson, A. F., Frère, J. M., Ghuysen, J. M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R. C., Tiraby, G., & Waley, S. G. 1991. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *The Biochemical journal*, 276 (Pt 1)(Pt 1), 269–270. DOI: <https://doi.org/10.1042/bj2760269>.
- Andersson, A. F., Lindberg, M., Jakobsson, H., Bäckhed, F., Nyrén, P., Engstrand, L. 2008. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS One*, 30;3(7):e2836. DOI: 10.1371/journal.pone.0002836.
- Arai, H. 2011. Regulation and Function of Versatile Aerobic and Anaerobic Respiratory Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology*, 2, 103. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00103>.
- Araos, R. & D'Agata, E. 2019. *Pseudomonas aeruginosa* and Other *Pseudomonas* Species. Teoksessa: Mandell, Douglas, and Bennett's (toim.), *Principles and Practice of Infectious Diseases*, Elsevier, pp. 2686-2687.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G. D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A. & Zagnitko O. 2008. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 8;9:75. DOI: 10.1186/1471-2164-9-75.
- Bartosch, S., Fite, A., Macfarlane, G. T., & McMurdo, M. E. 2004. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Applied and environmental microbiology*, 70(6), pp. 3575–3581. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3575-3581.2004>.
- Bates, M. K., Phillips, D. S. & O'Bryan, J. 2011. Shaker Agitation Rate and Orbit Affect Growth of Cultured Bacteria. *Thermo Fisher Scientific*. https://physiology.case.edu/media/eq_manuals/eq_manual_Shaker_Agitation_Rate_and_Orbit_Affect_of_Bacterial_Growth.pdf (luettu 01.02.2020).
- Bellali, S., Lagier, J. C., Raoult, D. & Bou Khalil, J. 2019. Among Live and Dead Bacteria, the Optimization of Sample Collection and Processing Remains Essential in Recovering Gut Microbiota Components. *Front Microbiol*, 10;10:1606. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01606.

- Blaser, M. J. 1999. Hypothesis: the changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: implications for health and disease. *J Infect Dis*, 179(6):1523-30. DOI: 10.1086/314785.
- Bradford, P. A. 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical microbiology reviews*, 14(4), 933-951. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001>
- Brettin, T., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Olsen, G. J., Olson, R., Overbeek, R., Parrello, B., Pusch, G. D., Shukla, M., Thomason, J. A. 3rd, Stevens, R., Vonstein, V., Wattam, A. R. & Xia, F. 2015. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci Rep*, 10;5:8365. DOI: 10.1038/srep08365.
- Bonnet, R. 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(1), 1-14. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.1-14.2004>.
- Bortolaia, V., Kaas, R. F., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. R., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., Malhotra-Kumar, S., Westh, H., Pinholt, M., Anjum, M. F., Duggett, N. A., Kempf, I., Nykäsenoja, S., Olkkola, S., Wiczorek, K., Amaro, A., Clemente, L., Mossong, J., Losch, S., Ragimbeau, C., Lund, O. & Aarestrup, F. M. 2020. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(12), pp. 3491-3500.
- Buckling, A., Craig Maclean, R. Brockhurst, M. A. & Colegrave, N. 2009. The Beagle in a bottle. *Nature*, 12;457(7231):824-9. DOI: 10.1038/nature07892.
- Cairns, J., Jokela, R., Hultman, J., Tamminen, M., Virta, M. & Hiltunen, T. 2018. Construction and Characterization of Synthetic Bacterial Community for Experimental Ecology and Evolution. *Frontiers in Genetics*, 9. DOI: 10.3389/fgene.2018.00312.
- Carattoli, A., Zankari, E., Garcia-Fernandez, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Aarestrup, F. M. & Hasman, H. 2014. PlasmidFinder and pMLST: in silico detection and typing of plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother* 58(7), pp. 3895-903.
- Carlet, J. 2012. The gut is the epicentre of antibiotic resistance. *Antimicrobial Resistance and Infectio Control*, 39. DOI: 10.1186/2047-2994-1-39.
- CDC. 2020. What Exactly is Antibiotic Resistance? <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html> (luettu 10.4.2020).
- Chase, A. B., Karaoz, U., Brodie, E. L., Gomez-Lunar, Z., Martiny, A. C. & Martiny, J. B. H. 2017. Microdiversity of an Abundant Terrestrial Bacterium

- Encompasses Extensive Variation in Ecologically Relevant Traits. *mBio*, 14;8(6):e01809-17. DOI: 10.1128/mBio.01809-17.
- Clausen, P. T. L. C., Aarestrup, F. M., Lund, O. 2018. Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinformatics* 19(1):307.
- Davies, J. & Davies, D. 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology reviews*. 74: 417–433. DOI: 10.1128/MMBR.00016-10.
- Datta, N. & Kontomichalou, P. 1965. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature*, 16;208(5007):239-41. DOI: 10.1038/208239a0. PMID: 5326330.
- De Roy, K., Marzorati, M., Van den Abbeele, P., Van de Wiele, T. & Boon, N. 2014. Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities. *Environ Microbiol*, 16(6):1472-81. doi: 10.1111/1462-2920.12343.
- Dubinsky-Pertsov, B., Temkin, E., Harbarth, S., Fankhauser-Rodriguez, C., Carevic, B., Radovanovic, I., Ris, F., Kariv, Y., Buchs, N. C., Schiffer, E., Cohen Percia, S., Nutman, A., Fallach, N., Klausner, J. & Carmeli, Y. 2019. Carriage of Extended-spectrum Beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae and the Risk of Surgical Site Infection After Colorectal Surgery: A Prospective Cohort Study. *Clin Infect Dis*, 2;68(10):1699-1704. DOI: 10.1093/cid/ciy768.
- Dunham, M. J. 2007. Synthetic ecology: a model system for cooperation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 6;104(6):1741-2. DOI: 10.1073/pnas.0611067104.
- Dunn, S. J., Connor, C. & McNally, A. 2019. The evolution and transmission of multi-drug resistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: the complexity of clones and plasmids. *Curr Opin Microbiol*, 51:51-56. DOI: 10.1016/j.mib.2019.06.004.
- Elias, S. & Banin, E. 2012. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev.*, 36(5):990-1004. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x.
- Fang, H., Ataker, F., Hedin, G., & Dornbusch, K. 2008. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases among Escherichia coli isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. *Journal of clinical microbiology*, 46(2), 707–712. DOI: https://doi.org/10.1128/JCM.01943-07.
- Fernandes, R., Amador, P. & Prudêncio, C. 2013. β -Lactams. *Reviews in Medical Microbiology*, 24;1, p.7-17. DOI: 10.1097/MRM.0b013e3283587727.
- Frank, D. N., St Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., & Pace, N. R. 2007. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America*, 104(34), 13780–13785. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0706625104>.
- Gillespie, J. J., Wattam, A. R., Cammer, S. A., Gabbard, J. L., Shukla, M. P., Dalay, O., Driscoll, T., Hix, D., Mane, S. P., Mao, C., Nordberg, E. K., Scott, M., Schulman, J. R., Snyder, E. E., Sullivan, D. E., Wang, C., Warren, A., Williams, K. P., Xue, T., Yoo, H. S., ... Sobral, B. W. 2011. PATRIC: the comprehensive bacterial bioinformatics resource with a focus on human pathogenic species. *Infection and immunity*, 79(11), 4286–4298. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00207-11>
- Goodman, A. L., Kallstrom, G., Faith, J. J., Reyes, A., Moore, A., Dantas, G. & Gordon, J. I. 2011. Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 12;108(15):6252-7. DOI: 10.1073/pnas.1102938108.
- Grosskopf, T. & Soyer, O. S. 2014. Synthetic microbial communities. *Current opinion in microbiology*, 18(100), 72–77. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.002>.
- Hanson, N. D. & Sanders, C. C. 1999. Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among Enterobacteriaceae. *Curr Pharm Des*, 5(11):881-94.
- Human Microbiome Project Consortium. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature11234>
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Nageshwar Reddy, D. 2015. Role of the normal gut microbiota. *World journal of gastroenterology*, 21(29), 8787–8803. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>.
- Jolivet, S., Lescure, F. X., Armand-Lefevre, L., Raffoul, R., Dilly, M. P., Ghodbane, W., Nataf, P. & Lucet, J. C. 2017. Surgical site infection with extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae after cardiac surgery: incidence and risk factors. *Clin Microbiol Infect*, 24(3):283-288. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.07.004.
- Jørgensen, T. S., Xu, Z., Hansen, M. A., Sørensen, S. J., & Hansen, L. H. 2014. Hundreds of circular novel plasmids and DNA elements identified in a rat cecum metamobilome. *PloS one*, 9(2), e87924. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087924>.
- Karanika, S., Karantanos, T., Arvanitis, M., Grigoras, C. & Mylonakis, E. 2016. Fecal Colonization with Extended-spectrum Beta-lactamase-Producing Enterobacteriaceae and Risk Factors Among Healthy Individuals: A Systematic Review and Metanalysis. *Clinical Infectious Diseases* 63: 310–318, DOI: 10.1093/cid/ciw283.

- Khajanchi, B. K., Hasan, N. A., Choi, S. Y., Han, J., Zhao, S., Colwell, R. R., Cerniglia, C. E. & Foley, S. L. 2017. Comparative genomic analysis and characterization of incompatibility group FIB plasmid encoded virulence factors of *Salmonella enterica* isolated from food sources. *BMC Genomics*, 2;18(1):570. DOI: 10.1186/s12864-017-3954-5.
- LaBauve, A. E., & Wargo, M. J. 2012. Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current protocols in microbiology, Chapter 6, Unit-6E.1*. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc06e01s25>.
- Lebeis, S. L., Paredes, S. H., Lundberg, D. S., Breakfield, N., Gehring, J., McDonald, M., Malfatti, S., Glavina del Rio, T., Jones, C. D., Tringe, S. G. & Dangl, J. L. 2015. Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa. *Science*, 21;349(6250):860-4. DOI: 10.1126/science.aaa8764.
- Lennox, E.S. 1955. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology*, 1, 190-206. DOI: 10.1016/0042-6822(55)90016-7.
- Lopatkin, A. J. & Collins, J. J. 2020. Predictive biology: modelling, understanding and harnessing microbial complexity. *Nat Rev Microbiol*, 18(9):507-520. DOI: 10.1038/s41579-020-0372-5.
- Liu, W., Russel, J., Røder, H. L., Madsen, J. S., Burmølle, M., Sørensen, S. J. 2017. Low-abundant species facilitates specific spatial organization that promotes multispecies biofilm formation. *Environ Microbiol*, 19(7):2893-2905. DOI: 10.1111/1462-2920.13816.
- Martínez, J. L., Coque, T. M. & Baquero, F. 2015. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nat Rev Microbiol*, 13(2):116-23. DOI: 10.1038/nrmicro3399.
- Medina, D., Walke, J. B., Gajewski, Z., Becker, M. H., Swartwout, M. C., & Belden, L. K. 2017. Culture Media and Individual Hosts Affect the Recovery of Culturable Bacterial Diversity from Amphibian Skin. *Frontiers in microbiology*, 8, 1574. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01574>.
- Nakano, R., Nakano, A., Yano, H. & Okamoto, R. 2017. Role of AmpR in the High Expression of the Plasmid-Encoded AmpC β -Lactamase CFE-1. *mSphere* 2 (4). DOI: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00192-17>.
- Norman, A., Hansen, L. H., & Sørensen, S. J. 2009. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364(1527), 2275-2289. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0037>.
- Neil, K., Allard, N., & Rodrigue, S. 2021. Molecular Mechanisms Influencing Bacterial Conjugation in the Intestinal Microbiota. *Frontiers in microbiology*, 12, 673260. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.673260>.
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., Edwards, R. A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A. R., Xia, F. &

- Stevens, R. 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res*, 42. (Database issue): D206-14. DOI: 10.1093/nar/gkt1226.
- Pandey, N. & Cascella, M. 2022. Beta Lactam Antibiotics. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Saatavilla: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545311/> (luettu 28.3.2022).
- Pei, Z., Bini, E. J., Yang, L., Zhou, M., Francois, F., & Blaser, M. J. 2004. Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(12), 4250-4255. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0306398101>.
- Penders, J., Stobberingh, E., Savelkoul, P. & Wolfs, P. 2013. The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. *Frontiers in microbiology*, 4, 87. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00087.
- Pfaller, M. A. & Segreti, J. 2006. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Infect Dis*, 15;42 Suppl 4:S153-63. DOI: 10.1086/500662.
- Philippon, A., Arlet, G., & Jacoby, G. A. 2002. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(1), 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.46.1.1-11.2002>.
- Raymond, F., Boissinot, M., Ouameur, A. A., Déraspe, M., Plante, P. L., Kpanou, S. R., Bérubé, È., Huletsky, A., Roy, P. H., Ouellette, M., Bergeron, M. G. & Corbeil, J. 2019. Culture-enriched human gut microbiomes reveal core and accessory resistance genes. *Microbiome*, 5;7(1):56. DOI: 10.1186/s40168-019-0669-7.
- Salinas, L., Cárdenas, P., Johnson, T. J., Vasco, K., Graham, J., & Trueba, G. 2019. Diverse Commensal Escherichia coli Clones and Plasmids Disseminate Antimicrobial Resistance Genes in Domestic Animals and Children in a Semirural Community in Ecuador. *mSphere*, 4(3), e00316-19. DOI: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00316-19>.
- Samperio, S., Guzmán-Herrador, D. L., May-Cuz, R., Martín, M. C., Álvarez, M. A., & Llosa, M. 2021. Conjugative DNA Transfer From E. coli to Transformation-Resistant Lactobacilli. *Frontiers in microbiology*, 12, 606629. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.606629>.
- Sapkota, B., Yadav, S. K., Dhungana, G., Ansari, S., & Mishra, S. K. 2021. Intestinal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamase- (ESBL-) Possessing Escherichia coli and Klebsiella Species among Nepalese Health Science and Non-Health Science Students. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale*, 2021, 4767429. DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/4767429>.

- Smillie, C. S., Smith, M. B., Friedman, J., Cordero, O. X., David, L. A., Alm, E. J. 2011. Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. *Nature*, 30;480(7376):241-4. DOI: 10.1038/nature10571.
- Tang, Q., Jin, G., Wang, G., Liu, T., Liu, X., Wang, B., & Cao, H. 2020. Current Sampling Methods for Gut Microbiota: A Call for More Precise Devices. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 151. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00151>.
- Vadlamani G., Thomas M. D., Patel T. R., Donald L. J., Reeve T. M., Stetefeld J., Standing K. G., Vocadlo D. J. & Mark B. L. The β -lactamase gene regulator AmpR is a tetramer that recognizes and binds the D-Ala-D-Ala motif of its repressor UDP-N-acetylmuramic acid (MurNAc)-pentapeptide. 2015. *J Biol Chem*. 30;290(5). 2630-43. DOI: 10.1074/jbc.M114.618199.
- van Gestel, J., Weissing, F. J., Kuipers, O. P. & Kovács, A. T. 2014. Density of founder cells affects spatial pattern formation and cooperation in *Bacillus subtilis* biofilms. *ISME J*, 8(10):2069-79. DOI: 10.1038/ismej.2014.52.
- Ventola C. L. 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T: a peer-reviewed journal for formulary management*, 40: 277-283.
- Virolle, C., Goldlust, K., Djermoun, S., Bigot, S., & Lesterlin, C. 2020. Plasmid Transfer by Conjugation in Gram-Negative Bacteria: From the Cellular to the Community Level. *Genes*, 11:11, 1239. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes11111239>.
- Vrancken, G., Gregory, A. C., Huys, G. R. B., Faust, K. & Raes, J. 2019. Synthetic ecology of the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol*, 17(12):754-763. DOI: 10.1038/s41579-019-0264-8.
- Watterson, W. J., Tanyeri, M., Watson, A. R., Cham, C. M., Shan, Y., Chang, E. B., Eren, A. M. & Tay, S. 2019. High-throughput isolation and sorting of gut microbes reduce biases of traditional cultivation strategies. *Cold Spring Harbor Laboratory*. DOI: <https://doi.org/10.1101/759969>.
- WHO. 2018. Antibiotic resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> (luettu 10.4.2020).
- WHO. 2020. Lack of new antibiotics threatens global efforts to contain drug-resistant infections. <https://www.who.int/news-room/detail/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections> (luettu 10.4.2020).
- Woerther P., Burdet C., Chachaty E. & Andremont A. 2013. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. *Clinical Microbiology Reviews*.; 26:744-758. DOI: 10.1128/CMR.00023-13.

- Wolfe, B. E., Button, J. E., Santarelli, M. & Dutton, R. J. 2014. Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. *Cell* 17;158(2):422-433. DOI: 10.1016/j.cell.2014.05.041.
- Wolfe, B. E. 2018. Using Cultivated Microbial Communities To Dissect Microbiome Assembly: Challenges, Limitations, and the Path Ahead. *mSystems*, 27;3(2):e00161-17. DOI: 10.1128/mSystems.00161-17.
- Yu, Z., Krause, S. M., Beck, D. A., Chistoserdova, L. 2016. A Synthetic Ecology Perspective: How Well Does Behavior of Model Organisms in the Laboratory Predict Microbial Activities in Natural Habitats? *Front Microbiol*, 15;7:946. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00946.
- Yu, Z., Beck, D. A. C., Chistoserdova, L. 2017. Natural Selection in Synthetic Communities Highlights the Roles of Methylococcaceae and Methylophilaceae and Suggests Differential Roles for Alternative Methanol Dehydrogenases in Methane Consumption. *Front Microbiol*, 5;8:2392. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02392.
- Zankari, E., Allesøe, R., Joensen, K. G., Cavaco, L. M., Lund, O. & Aarestrup, F. M. 2020. PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72(10), pp. 2764-2768.
- Zeng, X. & Lin, J. 2013. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. *Front Microbiol*, 22;4:128. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00128.

LIITE 1. 25X PBS (500 ML)

Suola	Pitoisuus (mol/l)	Pitoisuus (g/l)
NaCl	3,4	200
KCl	0,067	5
Na ₂ HPO ₄	0,24	28,8
KH ₂ PO ₄	0,034	6

LIITE 2. Bakteerikantojen antibioottiresistenssiprofiili

Ceph = Kefalotiini (50 µl/ml)

AMP = Ampisilliini (150 µl/ml)

TET = Tetrasykliini (20 µl/ml)

CAM = Kloramfenikoli (25 µl/ml)

KANA = Kanamysiini (25 µl/ml)

Strep = Streptomysiini (25 µl/ml)

+ = Resistentti

- = sensitiivinen

(+) = Resistentti, bakteeri kasvaa maljalla pieninä pesäkkeinä

X = Ei tutkittu

K = Kontaminaatio

Kanta	Ceph	AMP	TET	CAM	KANA	Strep	LB
2B1	+	+	-	-	-	X	+
2B10	+	+	-	-	-	-	+
2B11	+	+	-	-	-	-	+
2B14	+	+	-	-	-	-	+
2B15	+	+	-	-	-	-	+
2B16	+	+	-	-	-	-	+
2B17	+	+	-	-	-	-	+
2B18	+	+	-	-	-	-	+
2B19	+	+	-	-	-	-	+
2B21	+	+	-	-	-	-	+
2B24	+	+	-	-	-	-	+
2B28	+	+	-	-	-	-	+
2B29	+	+	-	-	-	-	+
2B30	+	+	-	-	-	-	+
2B31	+	+	-	-	-	-	+
2B33	+	+	-	-	-	-	+
2B12	+	+	-	-	-	(+)	+
2B20	+	+	-	-	-	(+)	+
2B23	+	+	-	-	-	(+)	+
2B35	+	+	-	-	-	(+)	+
2B34	+	+	-	-	-	+	+
2B36	+	+	-	-	-	+	+
2B13	(+)	(+)	-	-	(+)	(+)	(+)
2B22	(+)	(+)	-	-	(+)	(+)	(+)
2B27	(+)	(+)	-	-	(+)	(+)	(+)
2B25	+	+	-	1 pes.	-	-	+
2B32	+	+	-	1 pes.	-	-	+

Kanta	Ceph	AMP	TET	CAM	KANA	Strep	LB
4B1	+	+	+	-	-	-	+
4B19	+	+	+	-	-	-	+
4B21	+	+	+	-	-	-	+
4B22	+	+	+	-	-	-	+
4B26	+	+	+	-	-	-	+
4B29	+	+	+	-	-	-	+
4B32	+	+	+	-	-	-	+
4B44	+	+	+	-	-	-	+
4B50	+	+	+	-	-	-	+
4B20	-	-	-	-	(+)	-	(+)
4B33	-	-	-	-	(+)	-	(+)
4B34	-	-	-	-	(+)	-	(+)
4B55	-	-	-	-	(+)	-	(+)
4B15	-	-	-	-	-	-	(+)
4B24	-	-	-	-	-	-	+
4B25	-	-	-	-	-	-	+
4B30	-	-	-	-	-	-	+
4B42	-	-	-	-	-	-	+
4B43	-	-	-	-	-	-	+
4B47	-	-	-	-	-	-	+
4B49	-	-	-	-	-	-	+
4B57	-	-	-	-	-	-	+
4B16	-	+	-	-	-	-	+
4B17	-	+	-	-	-	-	+
4B48	-	+	-	-	-	-	+
4B36	-	1 pes.	-	-	-	-	+
4B54	-	1 pes.	-	-	-	-	+
4B28	-	3 pes.	-	-	-	-	+
4B12	-	+	-	-	+	-	+
4B14	-	+	-	-	+	-	+
4B31	-	+	-	-	+	-	+
4B38	-	+	-	-	+	-	+
4B41	-	+	-	-	+	-	+
4B46	-	+	-	-	+	-	+
4B51	-	+	-	-	+	-	+
4B10	-	+	+	-	+	-	+
4B23	-	1 pes.	+	-	-	-	+
4B27	+	-	-	-	-	-	+
4B18	2 pes.	-	-	-	-	-	+
4B35	+	+	-	-	-	-	+
4B37	+	+	-	-	-	-	+
4B45	+	+	-	-	-	-	+
4B52	+	+	-	-	-	-	+
4B11	(+)	-	-	-	(+)	(+)	(+)

Kanta	Ceph	AMP	TET	CAM	KANA	Strep	LB
7B1	+	+	-	-	-	-	+
7B20	+	(+)	-	-	-	-	+
7B24	+	(+)	-	-	-	-	+
7B26	+	(+)	-	-	-	-	+
7B33	+	(+)	-	-	-	-	+
7B19	+	+	-	-	-	-	+
7B14	-	+	-	-	-	-	+
7B16	-	+	-	-	-	-	+
7B27	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)
7B28	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)
7B15	-	-	(+)	-	-	-	(+)
7B17	-	-	-	-	-	-	+
7B21	-	-	-	-	-	-	(+)
7B11	-	+	-	-	(+)	-	+
7B13	-	-	-	-	(+)	-	(+)
7B18	-	-	-	-	(+)	-	(+)
7B22	-	-	-	-	(+)	-	(+)
7B23	-	-	-	-	(+)	-	(+)
7B25	-	-	-	-	(+)	-	(+)
7B29	-	-	-	-	(+)	-	(+)
7B30	+	+	-	-	+	-	+

Kanta	Ceph	AMP	TET	CAM	KANA	Strep	LB
28B1	+	+	+	-	+	+	+
28B10	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B11	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B12	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B13	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B14	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B15	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B16	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B17	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B18	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B19	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B20	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B21	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B22	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B23	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B24	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B25	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B26	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B27	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B28	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B29	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B30	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B31	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B32	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B33	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)
28B34	(+)	(+)	-	-	(+)	-	(+)

Kanta	Ceph	AMP	TET	CAM	KANA	Strep	LB
11B1	+	+	-	-	+	+	+
11B14	+	+	-	-	-	+	+
11B17	+	+	-	-	-	+	+
11B18	+	+	-	-	-	+	+
11B22	+	+	-	-	-	+	+
11B47	+	+	-	-	-	+	+
11B23	K	+	-	-	-	+	+
11B44	2 pes	+	-	-	-	-	+
11B41	+	1 pes.	-	-	-	-	+
11B51	+	1 pes.	-	-	-	-	+
11B57	+	1 pes.	-	-	-	-	+
11B35	+	2 pes.	-	-	-	-	+
11B42	+	2 pes.	-	-	-	-	+
11B30	+	3 pes.	-	-	-	-	K
11B43	+	4 pes.	-	-	-	-	+
11B10	+	+	-	-	-	-	+
11B11	+	+	-	-	-	-	+
11B12	+	+	-	-	-	-	+
11B13	+	+	-	-	-	-	+
11B15	+	+	-	-	-	-	+
11B19	+	+	-	-	-	-	+
11B20	+	+	-	-	-	-	+
11B21	+	+	-	-	-	-	+
11B24	+	+	-	-	-	-	+
11B25	+	+	-	-	-	-	+
11B26	+	+	-	-	-	-	+
11B31	+	+	-	-	-	-	+
11B32	+	+	-	-	-	-	+
11B33	+	+	-	-	-	-	+
11B34	+	+	-	-	-	-	+
11B37	+	+	-	-	-	-	+
11B38	+	+	-	-	-	-	+
11B40	+	+	-	-	-	-	+
11B46	+	+	-	-	-	-	+
11B48	+	+	-	-	-	-	+
11B49	+	+	-	-	-	-	+
11B50	+	+	-	-	-	-	+
11B52	+	+	-	-	-	-	+
11B53	+	+	-	-	-	-	+
11B54	+	+	-	-	-	-	+
11B55	+	+	-	-	-	-	+
11B58	+	+	-	-	-	-	+
11B60	+	+	-	-	-	-	+
11B61	+	+	-	-	-	-	+
11B62	+	+	-	-	-	-	+
11B63	+	+	-	-	-	-	+
11B64	+	+	-	-	-	-	+
11B65	+	+	-	-	-	-	+
11B16	K	+	-	-	-	-	+
11B28	K	+	-	-	-	-	+
11B39	K	+	-	-	-	-	+
11B56	K	+	-	-	-	-	K
11B36	-	+	-	-	-	-	+
11B27	+	-	-	-	-	-	+
11B29	+	-	-	-	-	-	+
11B45	4 pes	-	-	-	-	-	+
11B59	-	-	-	-	-	-	+