

Loviniskamuurahaisen immuunipuolustuksen käynnistyminen

Tuomas Aivelo

Pro gradu –tutkielma
Ekologia ja evoluutiobiologia
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Helsingin yliopisto
Huhtikuu 2009

Tiedekunta/Osasto Fakultet/Sektion – Faculty Biotieteellinen tiedekunta		Laitos Institution – Department Bio- ja ympäristötieteiden laitos	
Tekijä/Författare – Author Tuomas Aivelo			
Työn nimi Arbetets titel – Title Loviniskamuurahaisen immuunipuolustuksen käynnistyminen			
Oppiaine Läroämne – Subject Ekologia ja evoluutiobiologia			
Työn laji Arbetets art – Level Pro gradu – tutkielma		Aika Datum – Month and year Huhtikuu 2009	Sivumäärä Sidoantal – Number of pages 49 ss.
Tiivistelmä Referat – Abstract <p>Patogeenit ja loiset ovat merkittävä evolutiivinen tekijä, koska ne ovat yleisiä. Näiltä suojautuminen on evolutiivisesti merkittävä tekijä ja tärkeä trade-off: Immuunipuolustuksen ylläpito on kallista, mutta toisaalta edistää selviytyvyyttä. Selkärangattomilla ei ole yhtä hienostunutta immuunipuolustusta kuin selkärangkaisilla, mutta on esitetty arvailuja, että erityisesti yhteiskuntahyönteisillä voisi odottaa olevan sosiaalisia menetelmiä immuunipuolustuksen käynnistämiseksi. Vanhemmat työläiset voisivat ”rokottaa” vastakuoriutuneita työläisiä ja näin tehostaa näiden immuunipuolustusta. Tavoitteeni oli selvittää onko näin tarkastelemalla antimikrobiaalisten peptidien määrää muurahaisten hemolymfassa kuoriutumisen jälkeen.</p> <p>Tutkin bakteerimaljauksokokeiden avulla antimikrobiaalisten peptidien määrää loviniskamuurahaisten (<i>Formica exsecta</i>) vastakuoriutuneiden työläisten hemolymfassa. Pilottikokeissa selvitin sopivan bakteerilajin ja –annoksen varsinaisiin kokeisiin ja pidin luonnosta tuotuja muurahaisia karanteenissa, jotta saisin selville aleneeko immuunivaste pienemmässä patogeenipaineessa. Varsinaisissa kokeissa käytin viittä eri käsittelyä. Tartutin muurahaisia antamalla suun kautta (1) kuollutta bakteeria tai (2) elävää bakteeria. Annoin muurahaisten kasvaa (3) vanhojen työläisten kanssa tai (4) kuolleelle bakteerille altistettujen muurahaisten kanssa. (5) Kontrollina toimi käsittely, jossa muurahaisille ei tehty mitään. Antimikrobiaalisten peptidien määrän selvittämisen lisäksi tarkkailin työläisten kuolleisuutta eri käsittelyissä.</p> <p>Pilottikokeiden tulokset eivät antaneet bakteeriannostuksen tai –valinnan suhteen vahvoja tuloksia. Tarkastelin määrän ja bakteerin vaikutusta varianssianalyysillä ja lineaarisella regressiolla, mutta selkeitä riippuvuuksia ja merkitsevyyksiä ei löytynyt. Päädyin käyttämään <i>Micrococcus luteus</i> –bakteeria ja tartuttamaan muurahaiset juottamalla niille bakteerilientä. Karanteenikokeessa ei tapahtunut merkittävää immuunivasteen sammumista Varsinaisten kokeiden aineiston analysoin tilastollisesti varianssianalyysillä. Immuunivasteen käynnistymiseen vaikutti tilastollisesti merkitsevästi vain aika: Kahden päivän näytteissä ei ollut lähes lainkaan antimikrobiaalisia peptidejä, kun taas viikon ja kahden näytteistä hieman yli puolessa oli peptidejä. Käsittelyillä tai pesillä ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja immuunivasteen käynnistymisessä. Kuolleisuus oli suurinta käsittelyissä, joissa työläisiä tartutettiin kuolleella ja elävällä bakteereilla ja pienintä käsittelyissä, joissa työläisiä kasvatettiin yhdessä kuolleella bakteerilla tartutettujen ja tartuttamattomien vanhojen työläisten kanssa. Kontrollikäsittely erosi näistä molemmista merkittävästi ja kuolleisuus oli näiden kahden ryhmän välissä.</p> <p>Tutkimukseni puoltaa näkemystä, että vastakuoriutuneilla muurahaisilla ei ole vielä toimivaa immuunipuolustusta, mutta se käynnistyy ympäristöstä riippumatta muutaman päivän kuluessa. Omassa tutkimuksessani vanhemmat työläiset eivät auttaneet immuunivasteen käynnistymisessä, eikä ympäristön patogeenipaine nopeuttanut tai tehostanut immuunivasteen syntymistä. Täydellinen muodonmuutos on fysiologisesti rankka prosessi, jonka aikana muurahainen on hyvin suojattu kotelon sisällä – työläinen ei siis välttämättä tarvitse puolustusta vaan voi panostaa muihin kustannuksiin.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords antimikrobiaaliset peptidit, patogeeni, <i>Formica exsecta</i> , sosiaalisuus, kuoriutuminen			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Viikin tiedekirjasto, Helsingin yliopisto, Viikinkaari 11 A PL 62 00014 Helsingin yliopisto			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Sisällysluettelo

1. Johdanto.....	4
1.1. Immuunipuolustus	5
1.2. Immuunipuolustuksen voimakkuuden tutkiminen	6
1.3. Antimikrobiaaliset peptidit	8
1.4. Yhteiskuntahyönteiset.....	9
1.5. Tutkimuskysymykset.....	11
2. Aineisto ja menetelmät	12
2.1. Pilottikokeiden toteutus	13
2.2. Varsinaisten kokeiden toteutus.....	15
2.3. Hemolymfanäytteiden käsittely.....	17
2.4. Aineiston käsittely	18
3. Tulokset	20
3.1. Pilottikokeet	20
3.2. Pilottikokeen tulosten tarkastelu	23
3.3. Varsinaiset kokeet	24
4. Tulosten tarkastelu	27
4.1. Immuunivasteen sammuminen.....	28
4.2. Immuunivasteen käynnistyminen.....	28
4.3. Ongelmia ja ratkaisuja koeasetelmassa	30
4.4. Mitä antimikrobiaaliset peptidit kertovat immuunipuoluksesta?.....	33
4.5. Tulosten merkitys	34
4.6. Tutkimuksen herättämiä uusia kysymyksiä	35
5. Loppuyhteenveto.....	37
6. Kiitokset.....	37
7. Lähteet	38
Liitteet	
Liite 1: Tutkittavat pesät varsinaisessa kokeessa	44
Liite 2: Käytetyt reseptit liuoksiin.....	45
Liite 3: Bakteerikantojen alkuperä	46
Liite 4: Varsinaisen kokeen näytteet pesittäin ja käsittelyittäin.....	47

1. Johdanto

Patogeenien ja loisten merkitys on suunnaton: Tietävästi jokaisella eliölajilla on loisia, ja jokainen yksilö joutuu jatkuvasti patogeenien ja loisten hyökkäysten kohteeksi. Patogeenien hyökkäykset ovat eliöille haitta, koska tartunnat vähentävät eliöiden kelpoisuutta heikentämällä elin- tai lisääntymiskykyä. Haittoja vähentääkseen eliöillä onkin keinoja suojautua tartunnalta.

Suojautumisen voimakkuuteen vaikuttaa kolme tekijää: miten suuri vaikutus tartunnalla on, kuinka paljon suojautumiseen kuluu resursseja ja kuinka yleisiä tartunnat ovat (Schmid-Hempel 2005a). Jos patogeenit ja loiset ovat runsaita, tartunnat ovat yleisempiä ja suojautumisen merkitys kasvaa.

Suojautuminen ei kuitenkaan ole ilmaista, vaan immuunipuolustuksen ylläpitoon kuluu resursseja, jotka ovat pois muista kelpoisuutta parantavista toimista (trade-off) (Cotter ym. 2004). Patogeenit ja loiset ovat isäntälajeilleen ongelmallisia myös, koska ne sopeutuvat jatkuvasti hyväksikäyttämään paremmin isäntiään. Samalla isäntälajit pyrkivät sopeutumillaan vähentämään loisivien lajien vaikutusta ja tehostamaan puolustustaan (Schmid-Hempel 2005a). Tilanne voi johtaa evolutiiviseen kilpavarusteluun, jossa lajien pitää kehittyä säilyttääkseen kelpoisuutensa (ns. punaisen kuningattaren hypoteesi, Red Queen hypothesis, Van Valen 1973). Tämänkaltaisen mekanismin saattaa olla suvullisen lisääntymisen syy (Bell 1982, Lively & Jokela 2002).

Ryhmissä elävät eläimet saattavat olla alttiimpia patogeeneille kuin yksin elävät eläimet, koska tartunnan todennäköisyys on suurempi. Tämä on todettu myös empiirisesti, muun muassa yhdyskunnissa pesivillä linnuilla (Tella 2002). Tärkein yksittäinen tekijä, joka lisää alttiutta saada tartunta, on suuri yksilötiheys (Alexander 1974) - ryhmissä eläimet ovat jatkuvasti lähellä toisiaan. Erityisesti yhteiskunnissa sukulaisuus voi helpottaa patogeenien leviämistä, koska läheistä sukua toistensa kanssa olevien yksilöiden joukossa syntyy helposti epidemia, koska patogeenit leviävät helpommin geneettisesti samankaltaisten yksilöiden välillä (Schmid-Hempel 1994, Cremer ym. 2007, Reber ym. 2008). Näin ollen sosiaalisilla eläimillä tehokas immuunipuolustus on todennäköisesti merkittävä valintatekijä. Sosiaalisilla eläimillä onkin sosiaalisuuteen perustuvia adaptiivisia piirteitä, joilla ne välttävät tartuntoja (Cremer & Sixt 2009).

Minkälainen sitten on patogeenin ja isännän välinen dynamiikka? Koska mielenkiintomme kohdistuu patogeenien isännälleen aiheuttamiin kustannuksiin, keskeinen käsite on virulenssi. Virulenssi on laajan määritelmän mukaan infektion aiheuttama kustannus isännälle. Andersonin ja Mayn (1982) vaihtokauppaperiaatteeseen perustuvan hypoteesin mukaan virulenssi, patogeenin tarttuvuus ja infektiosta selviytymisen aika ovat keskenään riippuvaisia: Mitä kauemmin infektio kestää, sitä kalliimmaksi se tulee patogeenille, koska patogeeni joutuu panostamaan isännän

immuunipuolustuksen harhauttamiseen ja välttelyyn. Mitä virulentimpi patogeeni on, sitä tehokkaammin patogeenin on levittävä, koska isäntä saattaa kuolla nopeammin ja nopea leviäminen vaatii puolestaan kustannuksia. Infektion alkuvaiheessa suuri virulenssi saattaa olla erittäin haitallista patogeenille, jos isäntä kuolee ennen kuin patogeenilla on ollut mahdollisuuksia lisääntyä (Alizon ym. 2009). Frank ja Schmid-Hempel (2008) esittivätkin, että sellaiset patogeenit, jotka manipuloivat tai ohittavat kokonaan isännän immuunipuolustuksen, ovat merkittävimpiä virulenssin lähteitä.

1.1. Immuunipuolustus

Yksittäisten hyönteisten tärkein suoja on antimikrobiaalisten aineiden peittämä ulkokuori (Siva-Jothy ym. 2005). Hyönteiset pitävät kuorta puhtaana sukimisella, joka poistaa bakteereja kuorelta ja levittää antimikrobiaalisia aineita (Hart & Ratnieks 2001). Myös ruuansulatuskanava on patogeeneille vaikea elinympäristö, sillä ruuan joukkoon eritetyt antibiootit tappavat bakteereja ja vähentävät suolen seinämän läpi pyrkivien patogeenien määrää. Jos patogeeni kuitenkin pääsee sisälle hyönteisen ruumiiseen, monipuolinen puolustus käynnistyy. Immuunipuolustus rakentuu molekyyli- sekä solutason osista (Schmid-Hempel 2005a, Evans ym. 2006), joista edelliseen lukeutuvat muun muassa antimikrobiset peptidit, lysosomit ja joukko immuunitekiäjiä (Hancock ym. 2006). Solutason puolustukseen kuuluu muun muassa kotelointi, jossa hemosyytit tunnistavat tartunnanaiheuttajan vieraaksi ja kerääntyvät sen pinnalle. Näin pystytään puolustautumaan monisoluisia tunkeutujia vastaan. Biokemiallisen reaktion jälkeen kotelo kovettuu ja taudinaiheuttaja kuolee kotelon sisälle (Schmid-Hempel & Ebert 2003). Jaottelu molekyyli- ja solutason puolustukseen on ennemminkin kätevä kuin biologisesti merkityksellinen (Rolff & Siva-Jothy 2003, Schmid-Hempel & Ebert 2003), esimerkiksi koteloinnin jälkeen tapahtuva melanisaatio on sekä solu- että molekyyli- ja solutason puolustuksen aiheuttama. Edellä kuvailtuja mekanismeja kutsutaan synnynnäiseksi immuunipuolustukseksi. Sekä selkärangattomilla että selkärangattomilla on perustoiminnaltaan samanlaiset mekanismit puolustautua laaja-alaisesti patogeeneja vastaan.

Selkärangattomilla on synnynnäisen immuunipuolustuksen lisäksi hankittu immuunipuolustus (Klein 1989). Hankittu puolustuskyky tarkoittaa eräänlaista solutason oppimista: jos eliö on haastettu tietyllä patogeenillä, se pystyy seuraavalla kerralla käynnistämään tarkasti tätä patogeeniä vastaan suunnatun vasteen (Vilmos & Kurucz 1998). Lisäksi reaktioon liittyy immunologinen muisti, jolloin seuraavat reaktiot patogeeniä vastaan ovat nopeampia ja

tehokkaampia. Hankitusta puolustuskyvystä vastaavat selkärankaisten T- ja B-solut. Perinteisen käsityksen mukaan hyönteisillä, eikä muillakaan selkärangattomilla, ole hankittua puolustusta (Rolff & Siva-Jothy 2003).

Viime vuosina on kuitenkin havaittu, että selkärangattomilla saattaa olla hankittua immuunipuolustusta vastaava suunnattu puolustus (Kurtz & Armitage 2006). Tätä aihetta on tutkittu erityisesti *Drosophila* –kärpäksillä (Agaisse 2007). Kärpäsiä on altistettu bakteeriannoksella, joka ei ole tappava. Tämän jälkeen annettu toinen, normaalisti kuolettavan kokoinen annostus, ei aiheutakaan kuolemaa. Erityisen mielenkiintoista on, että ”rokotus” toimii spesifisti vain samalle patogeenille. Reaktion mekanismeja ei vielä tunneta tarkkaan. Samankaltaisia reaktioita on havaittu muun muassa kimalaisilla (Moret 2001) ja kovakuoriaisilla (Moret & Siva-Jothy 2003). Kovakuoriaisilla on huomattu, että reaktio saattaa jopa olla spesifi bakteerikannalle (Roth ym. 2009) ja kimalaisilla on havaittu, että immunologinen ”muisti” voi säilyä useita viikkoja (Sadd & Schmid-Hempel 2006). Lisäksi on havaittu, että vanhempien saama immuunihaaste saattaa johtaa jälkeläisten parempaan immuunipuolustukseen. *Daphnia magna* –vesikirpulla tämä on jopa havaittu yksilölliseksi patogeenikantojen suhteen (Little ym. 2003).

Selkärankaisten puolustusta vastaavan hankittujen immuunipuolustusmekanismien löytyminen myös selkärangattomilta ei ole sinänsä yllättävää (Kurtz 2004, Little & Kraaijeveld 2004). Evoluution kuluessa voi muodostua hyvinkin samankaltaisia järjestelmiä, ja patogeenien tunnistaminen ja muistaminen ovat molemmat erittäin hyödyllisiä ominaisuuksia (Loker ym. 2004). Toistaiseksi on kuitenkin vielä epäselvää, kuinka paljon selkärangattomien ja selkärankaisten immuunipuolustuksissa on eroja ja yhtäläisyyksiä – vai onko yhtäläisyyksiä rakenteellisella tasolla lainkaan (Little ym. 2005, Hauton & Smith 2007, Rowley & Powell 2007).

1.2. Immuunipuolustuksen voimakkuuden tutkiminen

Immuunipuolustuksen voimakkuutta voidaan tutkia monella eri menetelmällä. Usein käytetty mittari on melanisaatio, joka voidaan saada aikaan kokeellisesti abioottisilla esineillä, kuten nylonsäikeellä (König & Schmid-Hempel 1995). Muita käytettyjä menetelmiä ovat antimikrobiaalisten aineiden (Moret 2001), fenolioksidaasin ja hemosyyttien määrän mittaaminen (Wilson ym. 2001) Lisäksi RNA-transkriptien perusteella voidaan havaita mahdollinen immuuniproteiinien synteesin käynnistyminen (Hauton ym. 2005).

Immuunipuolustuksen tehosta puhuminen saattaa kuitenkin olla harhaanjohtavaa, sillä immuunipuolustukseen kuuluu hyvinkin erilaisia osia: melanisaatio, antimikrobiaaliset peptidit, lysosyymit ja syöjäsolut. Näiden toiminnan välillä ei ole välttämättä korrelaatiota ja tutkimukset ovat hyvinkin ristiriitaisia (Adamo 2004). Krysanteemiyökkösellä (*Spodoptera littoralis*) tehtyjen tutkimusten mukaan lysosyymien välittämä antibakteriaalinen toiminta korreloi negatiivisesti hemosyyttien määrän kanssa. Hemosyyttien määrä puolestaan korreloi positiivisesti soluvälitteisen puolustuksen, kuten melanisaation, kanssa (Cotter ym. 2004). Vastaava tutkimus on myös tehty sirkoilla, joilla dominoivilla koirailta oli voimakkaampi melanisaatioreaktio, mutta lysosyymien toiminta oli heikompaa (Väänänen ym. 2006). Selitykseksi tarjottiin, että dominoiva koiras on äänekkäämpi ja mahdolliset parasitoidit huomaavat sen helpommin, jolloin tehokas parasitoidin munien tuhoamiskyky on erityisen tärkeä. Sama toimisi myös käänteisesti: ääntely on luotettava mittari koiraan kelpoisuudesta, joka on sitä parempi, mitä tehokkaampi immuunipuolustus on.

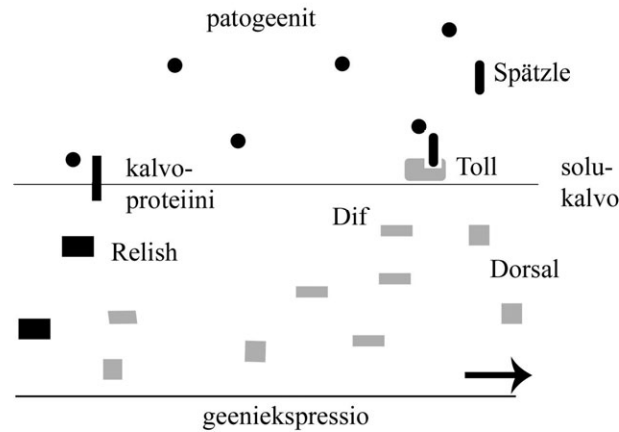
Immuunipuolustuksen tehoa rajoittavat useat tekijät kuten ravinnonpuute, reaktion käynnistämiseen kuluva aika, tartunnanaiheuttajien monimuotoisuus ja yksilön ikä (Cotter ym. 2004, Rantala & Roff 2006). Hyönteisten ikääntyessä niiden immuunipuolustuksen teho saattaa heiketä (Brown ym. 2003). Immuunipuolustuksen tehon vaihtelu johtunee siitä, että immuunipuolustuksen ylläpito on kustannus hyönteiselle (Sandland & Minchella 2003). Immuunipuolustuksen teho on siis optimoitava kuhunkin tilanteeseen (Rolff & Siva-Jothy 2003). Yleisen käsityksen mukaan vastakuoriutuneella hyönteisellä on merkittävästi aikuista hyönteistä heikempi immuunipuolustus. Täydellisen muodonvaihdoksen lajit käyvät läpi suojaavassa kotelossa rankan muodonmuutoksen, jolloin oletettavasti immuunipuolustukseen ei ole varaa kuluttaa paljon resursseja (Siva-Jothy 2005).

Hyönteisen immuunipuolustus saattaa olla rakenteellisesti suuntautunut juuri yksilön kohtaamaa patogeenipainetta kohden. Todisteena tästä ovat erot *Anopheles* ja *Drosophila*-sukujen edustajilla. Vaikka molemmat suvut kuuluvat kaksisiipisten (Diptera) luokkaan, Toll-reseptorijärjestelmän (kts. kappale Antimikrobiaaliset peptidit) tunnistusmolekyyleissä oli suuria eroja (Dimopoulos ym. 1997). Immuunipuolustusjärjestelmissä lienee suurta vaihtelua pelkästään hyönteisten kesken, jos näin läheisilläkin sukuilla erot ovat suuria. Monimuotoisuuden takia muilla lajeilla tehdyn tutkimuksen soveltaminen muurahaisiin on otettava varauksella. Tässä työssä keskityn antimikrobiaalisiin peptideihin, jotka ovat merkittävä immuunipuolustuksen osa. Antimikrobiaalisten peptidien määrää pystytään arvioimaan sen perusteella, kuinka voimakkaasti hyönteisten hemolymfa ehkäisee kasvua bakteeriviljelmässä (Moret 2001).

1.3. Antimikrobiaaliset peptidit

Antimikrobiaaliset peptidit ovat aineita, jotka tuhoavat mikrobeja. Antimikrobiaalisten peptidien pituus on noin 12-50 aminohappoa (Taguchi ym. 1998). Pienimmät, alle yhden kilodaltonin kokoiset peptidit ovat rakenteellisesti hyvin kestäviä molekyylejä, joten niitä voidaan elimistössä muodostaa ja varastoida. Antimikrobiaalisia peptidejä löytyy koko eläinkunnasta, sekä selkärangkaisilta että selkärangattomilta. Peptidejä on havaittu jokaisella tutkitulla selkärangattomalla lajilla ja niiden oletetaan olevan immuunipuolustuksen selkäranka. Peptidit ovat erityisen kiinnostava tutkimuskohde mahdollisten taloudellisten ja terveydellisten hyötyjen takia, sillä ne ovat uusien lääkeaineiden suunnittelussa lupaavia kohteita (Hancock ym. 2006).

Suurin osa hyönteisten peptideistä muodostuu rasvakudoksessa, mutta niitä syntetisoidaan myös hemosyyteissä ja suolenseinämän soluissa. Antimikrobiaalisten peptidien muodostuminen voi olla jatkuvaa, tai sitten niiden tuotanto laukeaa immuunihaasteen ansiosta (Meylaers ym. 2003). Vaikka niiden rakenteet eroavat toisistaan paljon, yhteisenä tekijänä laskostuneessa muodossa ovat hydrofobisia ja varautuneita osia, jotka reagoivat voimakkaasti kalvorakenteiden kanssa. Reaktiot voivat olla melko spesifisiä bakteereille, koska bakteerien solukalvoissa on paljon anionilipidejä (Tincu & Taylor 2004). Peptidien yhteistoiminnasta tai patogeeneja tuhoavista ominaisuuksista tiedetään vielä vähän, mutta tuotantoon liittyvät signaaliketjut ovat jo melko hyvin tunnettuja (Khush ym. 2002). Kun patogeeni tunkeutuu hyönteisen ruumiiseen, hemolymfassa kiertävät hemosyytit löytävät patogeenin kemotaksiksen perusteella. Hemosyytit vapauttavat antimikrobiaalisia peptidejä ja auttavat peptidisynteesin käynnistymisessä. *Drosophila*-kärpäksillä sieni-infektio aiheuttaa muodonmuutoksen Spätzle-proteiinissa, joka kiinnittyy Toll-reseptoriin (Tzou ym. 2002). Tästä syntyy signaaliketju, joka päättyy transaktivaattoreihin Dorsal ja Dif, jotka käynnistävät antimikrobiaalisia peptidejä koodaavien geenien ekspression. Toinen vastaava signaali-reitti on immuunipuutosreitti (Imd), joka tunnistaa Gram-negatiiviset bakteerit ja joka Relish-transaktivaattorin avulla käynnistää peptidituotannon. Erona näillä kahdella reitillä on se, että Toll-reitti käyttää apunaan hemolymfassa liikkuvia proteiineja, kun taas Imd-reitin käynnistävät kalvoproteiinit. Antimikrobiaalisia peptidejä muodostavat geenit aktivoituvat nopeimmillaan tunnin sisällä. Geeniekspression käynnistymistä on tutkittu sekä *Drosophila*-kärpäksillä (Lemaitre ym. 1997), *Tenebrio molitor*-kovakuoriaisella (Haine ym. 2008) että *Pseudoplusia includens*-yökkösellä (Lavine ym. 2005). Kaikilla geeniekspressio on vilkkaimmillaan 24 tuntia haasteen jälkeen ja sammuu viimeistään 48 tuntia



Kuva 1: Toll- ja Imd-signaalireittien toiminta. Gram-negatiiviset bakteerit käynnistävät yleensä Imd-reitin ja Gram-positiiviset Toll-reitin. Imd-reitin kalvoproteiinia ei vielä tunneta.

immuunihaasteen jälkeen. Antimikrobiaaliset peptidit säilyvät hemolymfassa 5 – 44 päivää lajista riippuen.

Antimikrobiaalisia peptidejä on löydetty yhteiskuntahyönteisiltä vähemmän kuin yksin eläviltä hyönteisiltä. Mehiläisillä (*Apis mellifera*) näitä yhdisteitä on löydetty kuusi, verrattuna *Drosophilan* 20 ja *Anophelexen* yhdeksään peptidiin (Evans ym. 2006). Syyksi tähän yksinkertaisempaan immuunipuolustusvalikoimaan on ehdotettu muun muassa tehokkaita sosiaalisia patogeenien hillitsemiskeinoja tai sitä, että yhteiskuntahyönteisten patogeenit ovat spesifimpiä kuin yksin elävillä hyönteisillä.

1.4. Yhteiskuntahyönteiset

Kuinka paljon hyönteisten aitososiaalisuus vaikuttaa patogeenien leviämiseen? Vastausta on vaikea antaa, koska sosiaalisten hyönteisten immuunipuolustuksen evoluutiosta tiedetään hyvin vähän. Mallinnusten perusteella työnjaon puute, yhteiskunnan epätasainen ikärakenne, työläisten väliset vuorovaikutukset (Naug ja Camazine 2002), suuri yksilötiheys ja työläisten aktiivisuus (Pie ym. 2004) ovat merkittäviä patogeenien levittäytymistä lisääviä tekijöitä. Patogeenien leviämistä voidaan estää pesän sopivalla rakenteella (Pie ym. 2004) ja yhteiskuntahyönteisten käyttäytymispiirteillä (Fefferman 2006).

Yhteiskuntahyönteisten taudinvälttämistästrategiat voidaan jakaa kolmeen joukkoon: elämänkaaren muutoksiin, sosiaalisen käyttäytymisen piirteisiin ja yksittäisten yksilöiden

immuunipuolustukseen. Elämänkaaren muutoksilla voidaan tarkoittaa esimerkiksi muutoksia lisääntymisajassa (Moret & Schmid-Hempel 2004) tai kuningatararten parittelua useampien koiraiden kanssa (Kraus & Page 1998). Yhteiskuntahyönteisten käyttäytymispiirteitä, jotka vähentävät taudinaiheuttajien määrää, on monia: pesätovereiden sukiminen, sairastuneiden ja ruumiiden poistaminen pesästä (Hart & Ratnieks 2001), pesien rakentaminen antimikrobisista aineista (Chapuisat ym. 2007), infektoituneiden siirtyminen riskialttiimpiin tehtäviin ja immuniteetin käynnistämisen avustaminen (Cremer ym. 2007).

Todisteita sosiaalisesti välittyvästä immuunipuolustuksesta on lukuisia.

Kimalaisyhteiskunnan kohtaama immuunihaaste johtaa jälkeläisten suurempaan immuunivasteeseen (Moret & Schmid-Hempel. 2001). Patogeenille altistetut termiittityöläiset auttavat aiemmin altistamattomia työläisiä selviytymään paremmin tartunnasta (Traniello ym. 2002). Ilmiön mekanismeja ei tunneta, mutta eräs mahdollisuus on, että vanhat työläiset edistävät immuunipuolustuksen käynnistymistä ruokkimisen kautta. Vastasyntyneet nisäkkäät saavat maidon mukana patogeneilta suojaavia aineita (Hanson 1998). Myös yhteiskuntahyönteistyöläiset ruokkivat toukkia, ja tässä yhteydessä ne voisivat luontevasti levittää antipatogeenisiä aineita (Rose & Briggs 1969). Sosiaalisuudella on oma merkityksensä myös yksittäisten yksilöiden immuunipuolustuksen voimakkuuteen: mehiläiset erittävät sitä voimakkaampia antimikrobiaalisia aineita kitiinikuorensa pinnalle, mitä suuremmassa ryhmässä ne elävät (Stow ym. 2007).

Muurahaisilla on myös morfologisia sopeutumia patogeenien vaikutuksen vähentämiseksi. Niillä on ainutlaatuinen rakenne, metapleuraalirauhanen, joka tuottaa antibioottisia yhdisteitä. Muurahaiset sukivat tämän rauhasen tuotoksia etujalkoihinsa ja siitä edelleen tarpeellisiin paikkoihin (Fernández-Marin ym. 2006). On myös havaittu, että erityisen haavoittuvaset lajit, kuten lehdenleikkaajamuurahaiset, käyttävät erityisen innokkaasti metapleuraalirauhasen sukimista. Onpa jopa ehdotettu, että metapleuraalirauhanen olisi ollut muurahaisille avainnovaatio, joka mahdollisti suuremman ryhmäkoon kasvun (Thorne & Traniello 2003). Lehdenleikkaajamuurahaisilla on myös muita rakenteita, kuten infrabukkaaliset taskut, jotka voivat toimia sterilaatiovälineinä (Little ym. 2006).

Immuunipuolustuksesta on selviä kustannuksia, joten puolustuksen tehon vaihtelevuus patogeenipaineen mukaan saattaa olla evolutiivinen sopeutuma. Suuremmissa patogeenipaineissa antimikrobiaalisten aineiden tuotanto on suurempaa ja vastaavasti ympäristössä, jossa patogeenipaine on vähäinen, aineiden tuotanto vähenee (Moret 2001). Pesän ulkopuolella olevilla vanhoilla työläisillä on paljon suurempi tartuntariski kuin pesän sisällä olevilla nuorilla työläisillä (Bocher ym. 2007). Pesän ulkopuolella olevilla työläisillä saattaakin olla voimakkaampi immuunipuolustus, koska työläiset kohtaavat suuremman patogeenipaineen. Kun kimalaisia on

pidetty vähäisessä patogeenipaineessa, immuunipuolustus alkaa hitaasti sammua, niin että kahdessa viikossa taso on jo selvästi alkutasoa alempi (Moret 2001). Sammumiseen vaikuttaa kuinka nopeasti peptidien tuotanto loppuu ja kuinka kauan ne säilyvät ruumiissa.

Jos työläisillä ei ole kuoriutuessaan toimivaa immuunivastetta, immuunipuolustuksen pitää käynnistyä ja olisi mahdollista, että muurahaïsilla on sosiaalisia keinoja käynnistää ja vahvistaa immuunipuolustusta. Immuunipuolustuksen aktivoituminen voi tapahtua vuorovaikutuksessa muiden työläisten kanssa (Ugelvig & Cremer 2007), esimerkiksi ruokinnan kautta. Jos yksilön immuunipuolustus käynnistyy ”rokotuksella”, taudinvälittämisstrategiat leikkaisivat mielenkiintoisesti: Kyseessä olisi yhteisön toiminto, joka vaikuttaa yksilön omaan immunitettiin.

1.5. Tutkimuskysymykset

Vastakuoriutuneiden muurahaistyöläisten immuunipuolustusta ei ole aiemmin tutkittu, eikä tiedetäkään, minkälaisilla mekanismeilla puolustus käynnistyy vai onko se jo kuoriutumisen aikaan käynnissä. Minua kiinnostaakin, vaikuttavatko vanhemmat pesätoverit immuunipuolustuksen käynnistämiseen. Tutkimuskohteenani on immuunipuolustuksen yksi osatekijä, antimikrobiaalisten aineiden tuotanto. Tutkimuskysymykset voi muotoilla seuraavasti: Onko vastakuoriutuneilla muurahaistyöläisillä antimikrobiaalisten aineiden tuotantoa ja miten vastakuoriutuneen muurahaistyöläisen ympäristö vaikuttaa aineiden tuotantoon?

Hypoteeseja on neljä: 1. Immuunipuolustus voi olla jo kuoriutumisen aikaan käynnissä. Tällöin työläinen olisi tuottanut antimikrobiaalisia peptidejä muodonmuutoksen aikana ja niitä löytyisi hemolymfasta. 2. Immuunipuolustus voi käynnistyä sisäsyntyisesti. Tässä tapauksessa ulkoinen patogeenipaine ei vaikuttaisi puolustuksen käynnistymiseen. Se saattaisi vaikuttaa antimikrobiaalisten bakteerien tuotantoon kasvattavasti, mutta ei itse tuotannon käynnistymiseen, joka alkaisi samanaikaisesti kaikissa käsittelyissä. 3. Immuunipuolustus voi käynnistyä sosiaalisesti (Ugelvig & Cremer 2007). Vanhemmat työläiset aiheuttaisivat jollain tavalla vastakuoriutuneiden työläisten immuunipuolustuksen käynnistymisen. Tällöin patogeeneille altistettujen vanhojen työläisten kanssa pidetyt nuoret työläiset käynnistäisivät antimikrobiaalisten peptidien tuotannon aiemmin kuin eristyksissä pidetyt sekä mahdollisesti voimakkaampana. 4. Immuunipuolustus voi käynnistyä ympäristön aiheuttamana. Suuremmassa patogeenipaineessa työläisten olisi käynnistettävä antimikrobiaalisten peptidien tuotanto nopeammin kuin matalassa

patogeenipaineessa. Tällöin patogeenivapaassa kontrollikäsittelyssä peptidien tuotanto alkaisi myöhemmin kuin käsittelyissä, joissa työläiset on altistettu bakteereille.

Tutkin puolustuksen käynnistymistä loviniskamuurahaisella (*Formica exsecta*). Tartutan keinotekoisesti työläisiin bakteereja ja selvitän antimikrobiaalisten aineiden määrän työläisten hemolymfassa mittamalla hemolymfanäytteen synnyttämään estorenkkaan koon. Ennen varsinaisiin kysymyksiin vastaamista on tehtävä muutamia pilottikokeita, joiden tärkein tehtävä on selvittää, kuinka nopeasti muurahaisten immuunipuolustus sammuu ympäristössä, jossa patogeenien määrä on mahdollisimman pieni. Jos vastakuoriutuneiden työläisten immuunipuolustus saadaan sammutettua, eri ympäristöjen aiheuttamat erot immuunireaktiossa näkyvät selvemmin.

2. Aineisto ja menetelmät

Loviniskamuurahaista on tutkittu Tvärminnen eläintieteellisellä asemalla Lotta Sundströmin tutkimusryhmässä vuodesta 1993 lähtien, joten käyttämästäni populaatiosta on tutkimustietoa pitkältä ajalta. Lajin populaatiot saattavat olla hyvinkin tiheitä ja yhteen yhteiskuntaan voi kuulua useampia kekoja. Keot ovat yleensä verrattain pieniä ja niissä voi olla yksi tai useampia kuningattaria ja työläisiä useita tuhansia, monikuningattarissa jopa satoja tuhansia. Lajia esiintyy koko Suomessa (Czechowski ym. 2002).



Kuva 2: Kartta tutkimusalueista Tvärminnen aseman lähellä

Keräsin muurahaiset kahdelta saarelta läheltä Tvärminnen eläintieteellistä asemaa, Furuskäriltä ja Joskäriltä sekä 15 kilometrin päästä asemalta Öbystä (Kuva 2, Liite 1). Pilottikokeita varten keräsin 11.6.2008 muurahaisia Furuskärin yhdestä monikuningattarisesta pesästä (pesä numero 120). Varsinaisia kokeita varten keräsin muurahaisia heinäkuussa kahdeksana eri päivänä (Liite 1). Pesästä F72 ei löytynyt tarpeeksi lisäkoteiloita, joten sillä ei pystytty tekemään kaikkia käsittelyitä. Tätä paikatakseni hain 31.7. monikuningattarisesta pesästä Öbystä koteiloita, jotta toistojen määrä pysyisi riittävän isona.

Pidin muurahaisia Tvärminnessä sisätiloissa laboratorioissa ja kliimahuoneissa sekä Viikissä kasvatuskaapeissa. Ruokin pesät hunajaa, kananmunaa ja ravinteita sisältävällä kiinteällä Bhatkar-Whitcomb -ravintosekoituksella (Bhatkar-Whitcomb 1970, liite 2). Muurahaisten kasvatusolosuhteet vaihtelivat eri kokeiden välillä: varsinaisen kokeen vastakuoriutuneita muurahaisia säilytettiin kliimahuoneissa tasaisessa lämmössä, muissa tapauksissa muurahaisia kasvatettiin laboratorio-oloissa. Pesien riittävästä kosteudesta huolehdin päivittäin tai tarpeen vaatiessa useamman kerran päivässä suihkuttamalla pesämateriaaliin vettä.

Immuunivastetesteissä käytin neljää eri bakteeria, jotka olivat *Serratia marcescens*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens* ja *Arthrobacter globiformis*. Kaikki ovat maaperässä eläviä bakteereja, jotka voivat olla muurahaisille patogeenisiä. *Serratia* ja *Pseudomonas* ovat gram-negatiivisia, *Micrococcus* ja *Arthrobacter* gram-positiivisia. Bakteerikannat ovat peräisin Amerikan tyyppikasvatuskokoelmasta (ATCC) ja Belgian mikro-organismikokoelman bakteeriosastolta (BCCM/LMG) Ghentin yliopistolta (Liite 3). Kasvatin käyttämäni bakteerit lihaliemessä (Liite 2) ravistelijassa noin 18-celsiusasteisessa kliimahuoneessa. Huoneen viileyden takia bakteerien kasvamiseen tasaiseen vaiheeseen meni bakteerista riippuen 2-5 päivää. Kasvatuksen jälkeen säilytin bakteereita jääkaapissa ja uusin kasvatuksat viikon välein. Kahteen käsittelyyn tarvitsin kuolleita bakteereja, joten tapoin osan bakteereista pitämällä niitä vähintään 20 minuuttia 121-celsiusasteisessa autoklaavissa.

2.1. Pilottikokeiden toteutus

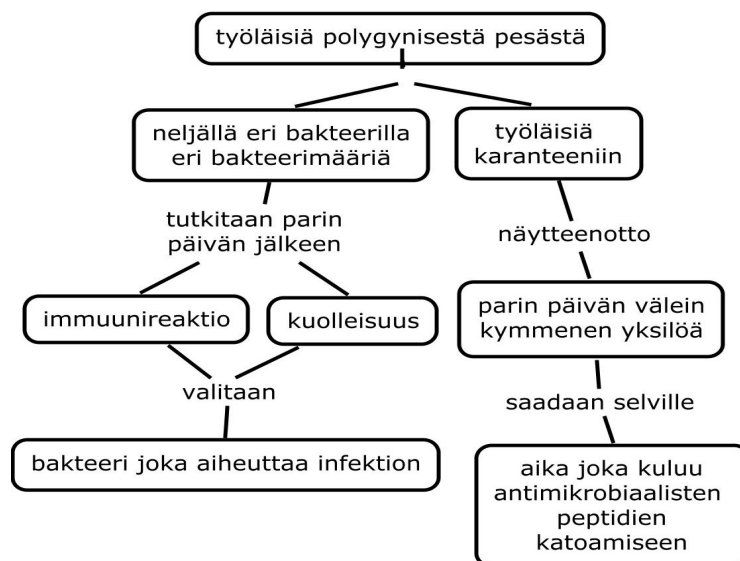
Pilottikokeiden tavoite oli selvittää, mikä bakteeri soveltuu parhaiten varsinaiseen kokeeseen, kuinka suuri annostus on riittävä, jotta muurahaiset saavat tartunnan mutta eivät kuole, ja kauanko työläisiä tarvitsee pitää karanteenissa ennen immuunireaktion sammumista. Sovelias bakteeri aiheuttaa

muurahaisille tartunnan ja selkeitä kustannuksia – käytännössä se siis aiheuttaa kuolleisuutta. Kuolleisuus ei kuitenkaan saa olla liian suurta, jotta osa työläisistä jää eloon näytteenottoa varten. Koska tutkimukseni perustuu estorenkaiden vertailulle, tutkimukseen soveltuvalla bakteerilla tartutetun työläisen hemolymfanäyte aiheuttaa mahdollisimman usein estorenkiaan.

Pilottikokeisiin käytin kesäkuussa kerättyjä työläisiä ja pesäainesta. Näin aikaisin vuodesta pesän kaikki työläiset ovat talvehtineita, joten ne ovat melkein vuoden ikäisiä. Toin työläiset laboratorio-oloihin noin 22 celsiusasteen lämpöön, jossa kasvatin niitä pesäaineksineen 15 cm x 20 cm x 40 cm muovilaatikossa. Laitoin pesäaineksen lisäksi laatikkoon turvemultaa kosteuden säilyttämiseksi.

Immuunireaktion sammumista testatakseni siirsin viitisensataa muurahaista mahdollisimman puhtaaseen tilaan. Muurahaiset olivat muovilaatikossa (mitat noin 35 cm x 20 cm x 10 cm), jonka pohjalla oli kostea Wettex-liina. Vaihdoin työläisten ruuan sekä poistin kuolleet työläiset päivittäin ja pesin laatikon sekä vaihdoin liinan parin päivän välein. Ruoka tarjoiltiin *ad libitum* eppendorf-putkissa, jotka kestivät autoklavoinnin. Kokeen alussa otin nollanäytteen suoraan pesäaineksessa olevista muurahaisista (20 kappaletta) ja seuraavat hemolymfanäytteet kahden päivän välein, kahden viikon ajan. Maljasin jokaisen näytteen neljän eri bakteerin kanssa.

Löytääkseni oikean bakteeriansostuksen otin kymmenen työläistä ja annoin niiden olla kaksi päivää kasvatuslaatikossa, jonka pohjalle olin laittanut kostean Wettex-liinan. Kokeilin neljällä bakteerilla neljää eri bakteerimääriä, jotka olin levittänyt mahdollisimman tasaisesti liinalle. Työläiset saivat tartunnan siis ollessaan kosketuksissa bakteerin kanssa. Viimeisenä, viidentenä tartutuksena, juotin työläisille kokonaan kasvanutta bakteerien



Kuva 3: Pilottikokeen koasetelma

kasvatuslientä, joten tässä tapauksessa bakteeri takuuvarmasti pääsi sisälle muurahaiseen. Asetin muovipurkin pohjalle puoli millilitraa bakteeriliuosta ja asetin muurahaiset muovipurkkiin. Otin muurahaiset pois purkista, kun ne olivat juoneet bakteeriliettä. Kokeiden jälkeen laskin kahden päivän aikana kuolleiden määrän ja otin hemolymfanäytteen elossa selvinneistä.

Aloitin tartutukset heti bakteerien kasvatuksen aloittamisen jälkeen, joten selvitin bakteerien määrät tartutukseen käytetyistä liuoksista vasta kokeen aloittamisen jälkeen. Tein kustakin tartutukseen käytetystä kasvatuksesta laimennossarjan, jossa laimensin bakteeritiheyden aina kymmenesosaan. Maljasin laimennokset agarmaljoille (Liite 2) ja kasvatin niitä 28 celsiusasteessa vuorokauden. Tämän jälkeen laskin bakteeripesäkkeet (colony forming unit, vastaa suurin piirtein solujen määrää) niiltä maljoilta, joista ne erottuivat hyvin toisistaan. Laimennos huomioiden saatiin näin laskettua alkuperäisen liuoksen bakteerikonsentraatio, josta sain laskettua käytetyt bakteerimäärät (Taulukko 1 sivulla 20).

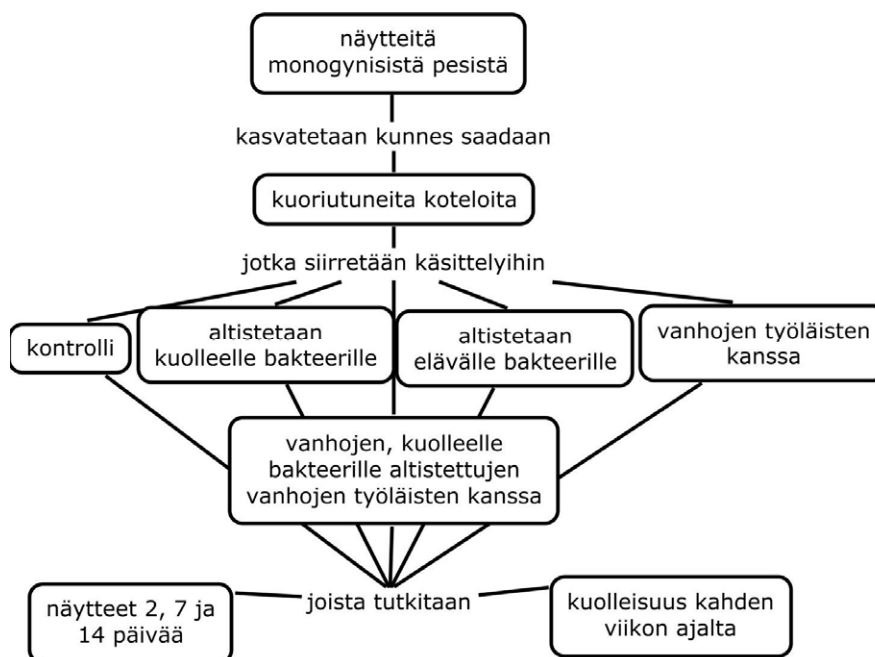
2.2. Varsinaisten kokeiden toteutus

Varsinaisissa kokeissa käytin heinäkuussa kerättyjä koteloiden ja työläisiä. Kerätyt työläiset laitoin kipsipohjaisiin noin 15 cm x 15 cm x 10 cm muovilaatikoihin ja otin niitä tarpeen mukaan käsittelyihin mukaan. Kotelot erottelin jo keräysvaiheessa ja puhdistin ne kaikesta ylimääräisestä aineksesta laboratoriossa. Tämän jälkeen asetin ne petrimaljoille, joita pidin muovilaatikossa, jonka pohjalla oli kostea talouspaperi. Petrimaljat säilytin kliimahuoneessa, jonka lämpötila oli 22 astetta ja valosykli 14 tuntia valoa ja 10 tuntia pimeää. Tarkastin kotelot päivittäin ja avasin ne, jotka vaikuttivat valmiilta kuoriutumaan. Jätin jokaisesta pesästä viisi ensimmäistä kuorimaani työläistä avaamaan koteloiden ja auttamaan uusia työläisiä kuoriutumisessa. Merkitsin nämä ”kättilöt” merkintätussilla, jotta erotin ne muista kuoriutuneista. Muurahaiskättilöt eivät kuitenkaan osoittautuneet tehokkaiksi kuoriijoiksi, joten jouduin itse avaamaan suurimman osan koteloiden. Avasin tummentuneet kotelot tekemällä pinseteillä aukon vatsapuolelle. Tämän jälkeen työläiset pystyivät itse rimpuilemaan jalkojen ja leukojensa avulla kotelosta ulos. Avasin muutaman kerran päivässä koteloiden ja laitoin ne takaisin muiden koteloiden sekaan. Samalla keräsin kokonaan kuoriutuneet työläiset erilliselle petrimaljalle käsittelyn aloittamista varten. Käynnistin uuden käsittelyn aina kun yhdestä pesästä oli kuoriutunut 20 työläistä ja siirsin ne pieniin muovipurkkeihin (koko noin 10 cm x 10 cm x 10 cm).

Varsinaisten kokeiden tehtävänä oli tutkia antimikrobiaalisten peptidien määrää vastakuoriutuneessa muurahaisessa erilaisissa patogeenisissa ja sosiaalisissa ympäristöissä.

Käytin kokeessa viittä eri käsittelyä (Kuva 4): 1. Kontrolli, jossa työläiset siirrettiin suoraan muovipurkkiinsa, ilman eri käsittelyjä. 2. Muurahaiset altistettiin kuolleelle bakteerille. 3. Muurahaiset altistettiin elävälle bakteerille. 4. Työläisten annettiin olla vanhojen työläisten kanssa, jotka oli altistettu kuolleelle bakteerille. 5. Työläisten kanssa oli vanhoja altistamattomia työläisiä. Tartutuksia varten juotin työläisille bakteerikasvustoa, kuten pilottikokeessa. Bakteerikasvatuksen juottaminen vastakuoriutuneille oli työlästä, koska muurahaiset eivät olleet janoisia. Ratkaisuna pidin muurahaisia muutaman tunnin ajan ilman juotavaa, jonka jälkeen tarjosin niille bakteerilientä. Annoin vanhojen työläisten olla vastakuoriutuneiden kanssa molemmissa käsittelyissä kahden päivän ajan. Vanhat työläiset olin merkinnyt tussilla, jotta pystyn erottamaan ne joukosta. Patogeenille altistamisen tein juottamalla kuollutta bakteeria noin kaksi päivää ennen käsittelyn aloittamista, jotta mahdolliset immuunireaktiot ehtivät alkaa. Eri käsittelyjen tavoitteena oli selvittää onko vanhoilla työläisillä merkitystä immuunivasteen käynnistämässä tai onko vasteen käynnistyminen selkeämpää tai nopeampaa tilanteissa, joissa patogeenien aiheuttama paine on suurempi. Koska muurahaiset eivät kuoriutuneet samanaikaisesti, pesästä riippuen työläisten ikä oli käsittelyn alussa muutamasta tunnista pariin päivään.

Kokeen alussa otin kymmenestä työläisestä näytteet kahden päivän jälkeen ja laskin lopuista kuolleisuuden kahden viikon ajalta. Ensimmäisten maljausten jälkeen selvisi, ettei yhdessäkään näytteessä ollut kahden päivän jälkeen immuunireaktiota. Jouduin muuttamaan koeasetelmaa niin, että tästä eteenpäin otin jokaisesta käsittelystä kahden päivän jälkeen vain viisi



Kuva 4: Varsinaisen kokeen koeasetelma

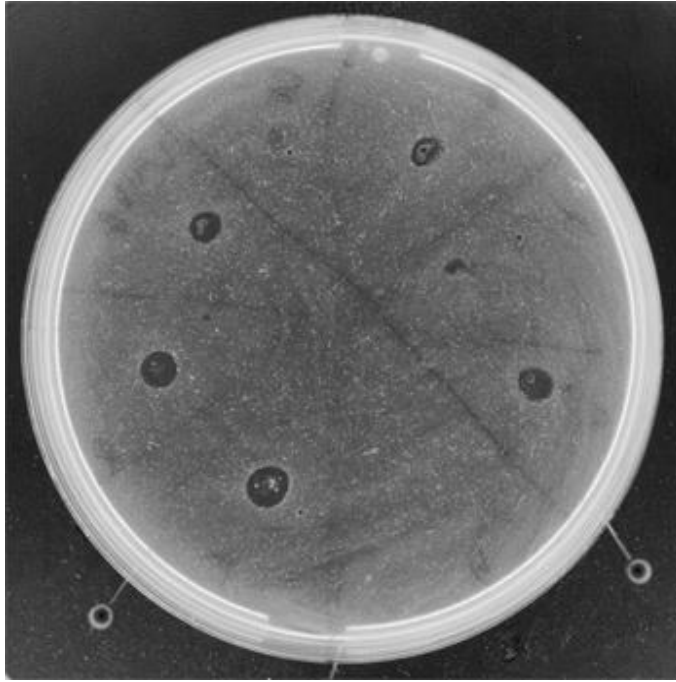
näytettä, viikon jälkeen puolet elossa olevista työläisistä ja kahden viikon jälkeen kaikista näytteet (Liite 4). Tämä johti luonnollisesti siihen, että kaikista käsittelyistä ei ole samanlaisia näytemääriä samoilta ajoilta. Otin myös vertailunäytteitä siten, että jokaisesta käyttämästäni pesästä otin kymmenestä vanhasta työläisestä näytteen ja tartutin kymmeneen vanhaan työläiseen bakteeria ja otin näytteen kahden päivän päästä tartutuksesta. Näitä näytteitä voin käyttää arvioidessani kuinka voimakas käyttämieni pesien taustaimmuunivaste on ja onko ikääntymisellä merkitystä immuunivasteen voimakkuuteen.

Poistin päivittäin pesistä kuolleet työläiset pois ja laskin kuolleiden määrän. Tämän tiedon perusteella pystyn arvioimaan onko jostain käsittelystä kustannuksia työläisille. Vaikkei immuunipuolustuksen voimakkuudella olisi eroja, immuunipuolustuksen toimivuudella työläisten välillä saattaa olla eroja, jotka näkyisivät eroina kuolleisuudessa.

2.3. Hemolymfanäytteiden käsittely

Kaikissa kokeissa ottamani näytteet ovat hemolymfanäytteitä muurahaisten takaruumiista. Näytteenotto tappaa muurahaisen, joten muurahaista kohden sai otettua vain yhden näytteen. Rikoin muurahaisen ihon hyönteisneulalla ja imin kapillaariputkella mahdollisimman paljon hemolymfaa; 0,1 – 1 mikrolitraa työläisen koosta riippuen. Muurahaisten koko vaikutti näytteen tilavuuteen – suuresta yksilöstä sai enemmän hemolymfaa kuin pienestä. Pyrin välttämään muurahaishapon joutumista näytteeseen puhdistamalla muurahaisen takaruumiin paperilla ennen näytteenottoa ja ottamalla näytteen riittävän edestä, toisen ja kolmannen tergiitin välistä. Suspensoin hemolymfan 20 mikrolitraan PBS-puskuria (Liite 2). Näytteitä säilytettiin pakastimessa -18 celsiusasteessa.

Tutkin vasta-aineiden määrää näytteen muodostaman estorengaan avulla (inhibition zone assay, Moret 2001). Hemolymfan antimikrobiaaliset peptidit tappavat bakteereja ja estävät näin ollen niiden kasvun kasvatusalustalla. Mitä enemmän muurahaisella on antimikrobiaalisia peptidejä, sitä suurempi estorengas muodostuu. Näytteiden analysointiin käytin petrimaljalla olevia bakteeriliuoksia, joiden agar-ravintoliuos -seokseen oli lisätty haluttua bakteeria (Liite 2). Maljoja valmistaessani sulatin agar-ravintoliuoksen mikroaaltouunissa, jäähdytin sen vesihautteessa noin 40-asteiseksi, lisäsin kullekin petrimaljalle noin 10 millilitraa liuosta sekä bakteereja niin, että pitoisuus oli noin 10^6 bakteeria millilitrassa. Koska kaikki bakteerit olivat aerobisia, ne kasvoivat vain maljan pinnalla. Maljalle pipetoidun näytteen tilavuus oli 2 mikrolitraa ja niitä sai yhdellä maljalla testattua



Kuva 5: Tyypillinen maljaus. Maljalla kahdeksan näytettä, joista viisi on muodostanut estoreenkaan.

kahdeksan kappaletta. Estin näytteen leviämisen maljalla tekemällä pipetinkärjellä kolon, johon laitoin näytteen.

Maljoja kasvatettiin yön yli 28 asteessa, jonka jälkeen mittasin hemolymfan aiheuttaman estoreenkaan halkaisijan viivoittimella millimetrin tarkkuudella. Lisäksi kaikki maljat kuvattiin mahdollista myöhempää tarvetta varten. Renkaan koko ei muutu ajan mittaan, joten jos bakteeri ei ollut kasvanut riittävästi, että rengas erottuu selkeänä, mittaukset tehtiin vasta seuraavana päivänä. Jos näytteisiin oli päätenyt ulkopuolista bakteeria, rengasta ei voitu ottaa huomioon ja tulos jätettiin huomioimatta.

Maljalle syntyneet estoreenkaat olivat pyöreitä, joten halkaisija kuvaa hyvin inhibition voimakkuutta (Kuva 2). Osalla maljoista agar tai bakteerikasvusto ei levittäytynyt tasaisesti, mutta maljoilta sai silti tulokset helposti luettua.

2.4. Aineiston käsittely

Näytteiden määrä on jakautunut ajoittain, käsittelyittäin ja pesittäin epätasaisesti (Liite 4). Arviolta noin puolet koteloista ja vastakuoriutuneista työläisistä kuoli, joten jouduin hankkimaan muutaman kerran uusia koteloita pesiin. Kontaminaatioita oli kaikkiaan 13 näytteessä ja nämä jakautuivat eri pesille ja käsittelyille. Jätin nuo näytteet pois tulosten käsittelystä, koska niiden estoreenkaita ei voi pitää vertailukelpoisina. Muiden näytteiden lisäksi otettiin 112 kontrollinäytettä.

Aineisto on analysoitu SPSS 16.0 for Windows -ohjelmalla. Aineiston vertailussa käytin pääasiassa varianssianalyysiä. Tartutuskokeen varianssianalyysissä käytin mallia, jossa kuolleiden ja renkaiden määrä oli riippuva muuttuja, bakteerilajit ja tartutuksen tapa kiinteitä muuttujia ja bakteerien määrä satunnaismuuttuja. Lisäksi tarkastelin Wettex-liina -tartutuksia regressioanalyysillä siten, että selitettävät muuttujat olivat kuolleiden määrä ja estorenkaita muodostaneiden osuus ja selittävä muuttuja bakteerien määrän logaritmi. Kuvaajista voi nähdä, että kuolleiden työläisten määrälle soveltuu lineaarinen regressio. Renkaita muodostaneiden osuudessa ei vaikuttaisi olevan minkäänlaista riippuvuutta, mutta tarkastelin sitäkin lineaarisen regressio mallilla. Regressioanalyysin luotettavuuden varmistin tarkastelemalla silmämääräisesti residuaalien normaalijakautumista ja kvantiilikuviota. Näin pienellä näytekoolla residuaalien normalisuuden testaaminen tilastollisesti ei ole järkevää, sillä tulokset voivat olla harhaanjohtavia. Residuaalien silmämääräinen tarkastelu sen sijaan paljastaa, jos regressiossa on jotain hälyttävästi pielessä (Zuur ym. 2007). Pilottikokeiden immuunivasteen sammumisen tuloksia tarkastelin varianssianalyysillä käyttämällä päiviä kiinteinä muuttujina, eri bakteereita toistoina ja estorenkaiden halkaisijaa riippuvana muuttujana. Tukeyn post-hoc -testin avulla sain selvitettyä, onko yksittäisten päivien välillä merkittäviä eroja.

Varsinaisen kokeen varianssianalyysijä varten rakentamissani malleissa pesä toimii satunnaismuuttujana, aika ja käsittelyt kiinteinä muuttujina. Ajan vaikutusta tarkastellessani käytin kovarianttina näytteen tilavuutta. Ensimmäisen ja toisen viikon näytteiden keskinäiseen vertailemiseen käytin Mannin-Whitneyn testiä, koska aineisto ei ollut normaalisti jakautunutta ja mahdollisti ei-parametrisen testin käytön. Vertailin eroavatko näytteet tilavuutensa tai estorenkaiden suhteen. Estorenkaita tuottaneiden osuuden vertailuun ajankohtien välillä käytin varianssianalyysiä, jossa aika huomioitiin toistona. Tämä oli tarpeen, koska työläiset oli otettu samasta joukosta. Koska analyysi vaatii täydellisen sarjan kolmena eri ajanjaksona, tähän analyysiin voitiin käyttää vain osaa pesistä ($N_{\text{kontrolli}} = 7$, $N_{\text{kuolleella altistettu}} = 7$, $N_{\text{elävällä altistettu}} = 7$, $N_{\text{työläiskontrolli}} = 6$, $N_{\text{altistetut työläiset}} = 7$). Pesien vähäinen määrä myös esti pesien välisen vertailun tekemisen ja mallissa vertaillaankin vain käsittelyn vaikutusta. Vertailun kaikkien näytteiden välillä tein varianssianalyysillä siten, että näytteen tilavuus oli satunnaismuuttujana ja tapaukset kiinteinä muuttujina. Parittaisiin post hoc -vertailuihin käytin Tukeyn testiä. Varsinaisen kokeen kuolleisuuden vertailuun käytin Kaplanin-Meierin -testiä, jolla voidaan vertailla onko eri käsittelyillä vaikutusta työläisten kuolleisuuteen. Testin ominaisuuksiin kuuluu muun muassa, että sillä voidaan tarkastella myös kokeesta jossain vaiheessa poistettuja havaintoja. Omassa aineistossani työläiset aloittivat kokeen samaan aikaan, mutta osa työläisistä poistettiin joukosta

näytteenoton takia. Parittaiset vertailut käsittelyjen välillä tein Breslowin-testillä, joka painottaa päiviä jäljellä olevien työläisten määrän mukaan

Aina käyttäessäni varianssianalyysiä testasin aineiston normaalin jakautumisen Wilkin-Shapiron testillä. Olen huomionnut tilaston käsittelyssä näytteet, jotka eivät aiheuttaneet immuunireaktiota ja antanut niille arvon 0. Koska näitä näytteitä on suhtellisen paljon, aineistoni ei ole normaalisti jakautunut, enkä saanut normalisoitua sitä logaritmisella tai neliöjuurimuunnoksella. Ongelmana tilastollisessa käsittelyssä on, että soveltuvia ei-parametrisiä testejä ei ole. Varianssianalyysit ovat melko tehokkaita työvälineitä, joten olen pääosin käyttänyt niitä tilastollisia analyysyjä tehtäessä. Nollanäytteiden suuri määrä aiheuttaa näytteiden suhteen ylidispersiota, joka entisestään vahvistaa tilastollisten testien tuloksia.

3. Tulokset

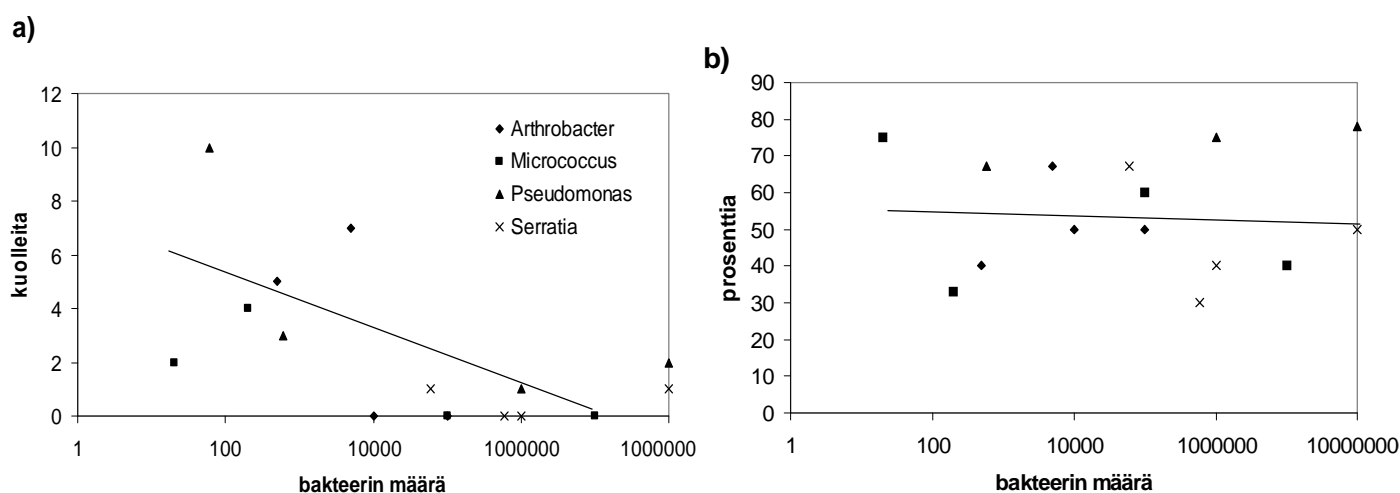
3.1. Pilottikokeet

Tartutuskokeissa työläisiä kuoli keskimäärin 17 ± 22 % (keskiarvo \pm keskihajonta, $n = 25$, Taulukko 1). Kuolleisuus vaihteli aina nolasta sataan prosenttiin ja 76 %:ssa käsittelyjä työläisiä kuoli. Kaikissa käsittelyissä, joissa jäi eloon työläisiä, oli myös estorenkaita tuottaneita työläisiä (estorenkaita muodostaneiden osuus 54 ± 14 %, estorenkaiden keskimääräinen koko $3,12 \pm 3,86$ mm). Tartutuskokeissa ei ollut merkitseviä eroja bakteerikantojen, tartutustapojen tai bakteerimäärien välillä kuolleisuudessa eikä renkaita muodostavien yksilöiden osuudessa (Taulukko 2).

Kun työläisiä tartutettiin bakteereilla Wettex-liinassa, kuolleiden määrä laski bakteerien määrän funktiona ($R^2 = 0,327$, $df = 14$, $t_{leikkauspiste} = 3,910$, $p_{leikkauspiste} = 0,002$; $t_{kulmakerroin} = -2,608$ ja $p_{kulmakerroin} = 0,021$; Kuva 6). Renkaiden määräkin laski bakteerien määrän funktiona, mutta ei merkitsevästi ($R^2 = 0,119$, $df = 13$, $t_{leikkauspiste} = 3,495$, $p_{leikkauspiste} = 0,004$, $t_{kulmakerroin} = 1,322$ ja $p_{kulmakerroin} = -0,209$; Kuva 6). Molempien regressioiden residuaalit olivat melko hyvin normaalisti jakautuneita.

Taulukko 1: Tartutuskokeen käsittelyt bakteereittain. Tartutustavan lisäksi on kerrottu käytetyn bakteerin määrä ja suun kautta tartutuksen tapauksessa käytetyn bakteeriliemen pitoisuus. Käsittelyittäin on laskettu kuolleiden työläisten määrä, estorenkaita muodostaneiden osuus eloonjääneistä työläisistä sekä estorenkaiden halkaisijoiden keskiarvo ja keskihajonta. Jokaisessa tartutuksessa näytekokoo oli 10 työläistä.

Bakteeri	Tartutustapa	Bakteerin määrä (kpl)	Kuolleita (kpl)	Elävistä renkaita muodosti (%)	Halkaisija ja keskihajonta (mm)
<i>Arthrobacter</i>	Wettex	5×10^2	5	40	$1,60 \pm 2,61$
	Wettex	5×10^3	7	67	$0,55 \pm 3,06$
	Wettex	1×10^4	0	50	$6,43 \pm 8,04$
	Wettex	1×10^5	0	50	$4,00 \pm 4,93$
	Suun kautta	1×10^8 / ml	1	67	$1,44 \pm 2,07$
<i>Micrococcus</i>	Wettex	2×10^1	2	75	$2,60 \pm 3,58$
	Wettex	2×10^2	4	33	$3,25 \pm 2,49$
	Wettex	1×10^5	0	60	$3,50 \pm 3,81$
	Wettex	1×10^7	0	40	$2,11 \pm 2,93$
	Suun kautta	1×10^8 / ml	4	83	$5,50 \pm 3,27$
<i>Pseudomonas</i>	Wettex	6×10^1	10		
	Wettex	6×10^2	3	67	$4,00 \pm 4,12$
	Wettex	1×10^6	1	75	$2,75 \pm 3,01$
	Wettex	1×10^8	2	78	$2,67 \pm 3,57$
	Suun kautta	1×10^8 / ml	1	44	$4,00 \pm 4,53$
<i>Serratia</i>	Wettex	6×10^4	1	67	$1,75 \pm 2,55$
	Wettex	6×10^5	0	30	$3,56 \pm 3,78$
	Wettex	1×10^6	0	40	$1,90 \pm 2,69$
	Wettex	1×10^8	1	50	$3,56 \pm 4,25$
	Suun kautta	1×10^8 / ml	1	44	$3,22 \pm 3,46$



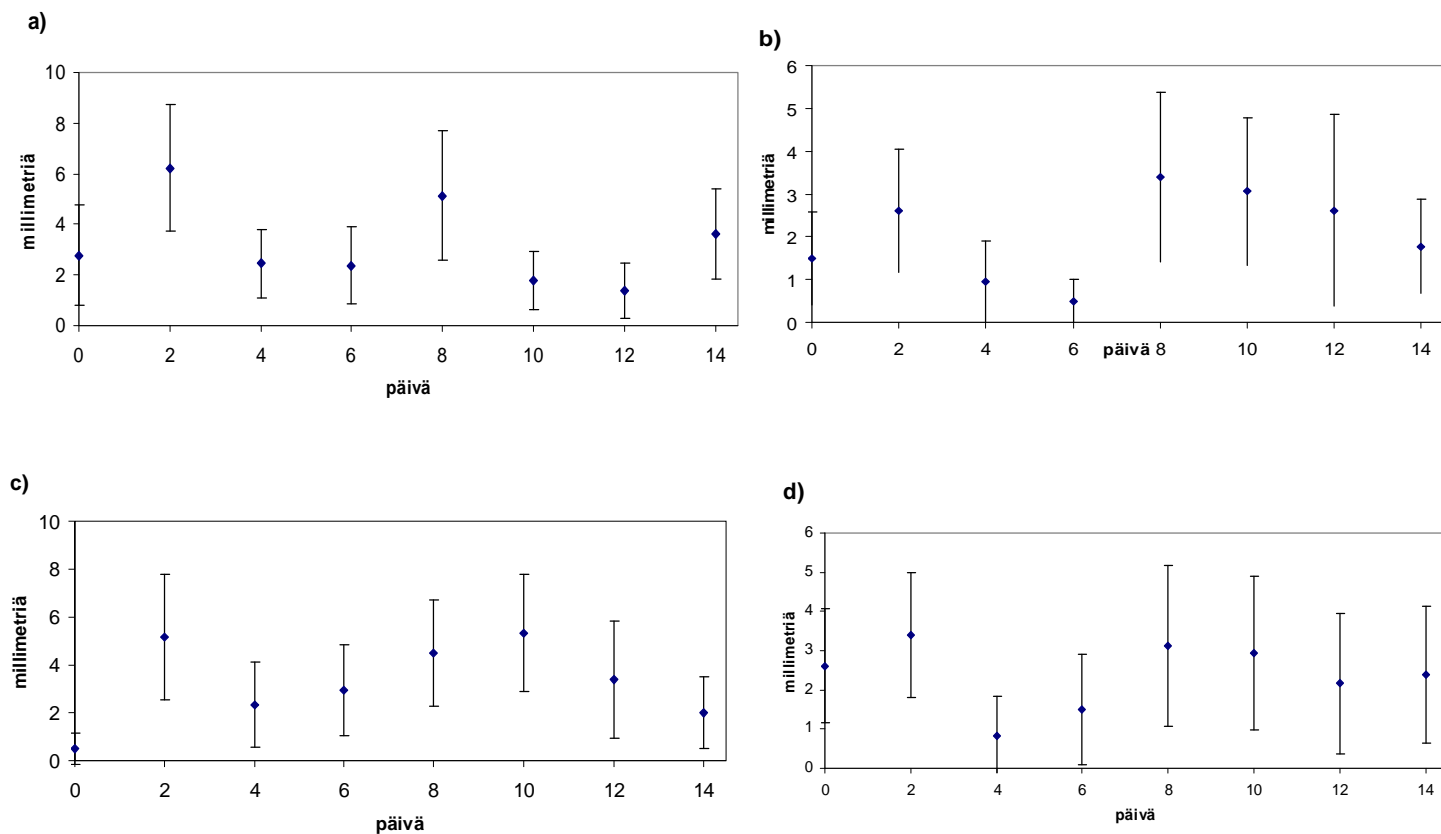
Kuva 6: Bakteerin määrän merkitys tartutuksessa Wettex-liinan avulla a) kuolleiden määrään ja b) estorenkaita muodostavien työläisten osuuteen. Jokaista bakteeria on neljä eri tartutusta. Kuvaajiin on piirretty kaikille bakteereille yhteiset regressiosuorat.

Karanteenikokeessa ei päivien välillä ollut tilastollisesti merkitseviä eroja estorenkään koossa. Koko vaihtelee huomattavasti päivien välillä (Kuva 7), mutta suuresta hajonnasta johtuen tilastollisesti merkitseviä eroja ei synny. Näytteistä 45 % muodosti renkaita ja keskimääräinen halkaisija oli $2,6 \text{ mm} \pm 3,6 \text{ mm}$. Suurin ero oli 2:n ja 4:n päivän välillä, mutta tämäkään ei ollut tilastollisesti merkitsevä ($p = 0,148$, keskimääräinen ero 2,5, keskivirhe 1,0).

Immuunireaktion voimakkuuteen vaikutti työläisestä saadun hemolymfan tilavuus. Kokeen alussa, 2 päivän ja 4 päivän kohdalla en mitannut näytteen tilavuutta, mutta myöhemmissä näytteissä lymfan määrä vaihteli merkittävästi päivien välillä ($F_{4,395} = 21,234$, $p < 0,001$). Kuudennen päivän näytteessä lymfan keskimääräinen tilavuus oli $0,40 \mu\text{l}$ ($n = 20$, $S^2 = 0,23 \mu\text{l}$), kahdeksannen päivän näytteessä $0,53 \mu\text{l}$ ($n = 20$, $S^2 = 0,29 \mu\text{l}$), kymmenen päivän näytteessä $0,63 \mu\text{l}$ ($n = 20$, $S^2 = 0,31 \mu\text{l}$), kahdennentoista päivän näytteessä $0,67 \mu\text{l}$ ($n = 20$, $S^2 = 0,33 \mu\text{l}$) ja neljänentoista päivän näytteessä $0,42 \mu\text{l}$ ($n = 20$, $S^2 = 0,25 \mu\text{l}$).

Taulukko 2: Tartutuskokeen eri muuttujien vaikutus kuolleisuuteen, estorenkaiden muodostamiseen tai estorenkaiden halkaisijoiden kokoon.

Riippuva muuttuja	Riippumattomat muuttujat											
	Bakteerin määrä				Bakteerilaji				Tartutustapa			
	Neliö-summa	F	df	p	Neliö-summa	F	df	p	Neliö-summa	F	df	p
Kuolleisuus	0,001	0,050	1	0,905	0,68	0,440	3	0,730	0,000	0,009	1	0,926
Renkaiden muodostus	0,003	0,140	1	0,716	0,83	1,231	3	0,349	$2,550 \times 10^{-5}$	0,001	1	0,974
Renkaiden halkaisija	0,067	0,026	1	0,875	6,251	0,805	3	0,519	0,192	0,074	1	0,791



Kuva 7: Immuunivasteen sammuminen ajan kuluessa a) *Arthrobacterin*, b) *Micrococcuksen*, c) *Pseudomonaksen* ja d) *Serratian* osalta. Kuvaajissa on esitetty keskimääräinen estorenkään halkaisija keskihajontoineen.

3.2. Pilottikokeen tulosten tarkastelu

Etsin sellaista bakteeriannostusta ja bakteeria, joka aiheuttaa infektion ja aiheuttaa työläisille selkeitä kustannuksia, eli tässä tapauksessa kuolleisuutta. Lisäksi kuolleisuus varmistaa, että työläiset saavat tartunnan. Se ei kuitenkaan saa olla liian suurta, koska näytteitä varten tarvitsen eläviä yksilöitä. Näytteiden pitäisi myös tuottaa tartuntatapauksissa mahdollisimman usein estorenkaita.

Pienemmillä bakteerimäärillä kuolleisuus on suurta ja suurilla bakteerimäärillä ei vaikuta olevan juuri lainkaan vaikutusta (Kuva 6). Tulos oli päinvastainen kuin odotin, enkä osaa ehdottaa muuta syytä kuin merkittäviä virhelähteitä. Koska käyttämäni näytekoot ovat niin pieniä, todennäköisesti kyse on sattuman vaikutuksesta ja tulokset eivät ole luotettavia. En tiedä, mitkä kuolleista muurahaisista ovat kuolleet juuri bakteerin vaikutuksesta. Tätä tietoa varten pitäisi ruumista vielä pystyä eristämään tartunnanaiheuttaja, mutten tämänkaltaista koetta tehnyt.

Merkittävää on, että bakteeriliuoksen juottaminen ei näytä tappavan kaikkia työläisiä, joten se lienee paras vaihtoehto.

Juottamistulosten perusteella *Pseudomonas* ja *Micrococcus* soveltuvat kokeeseen parhaiten: Lähes kaikki näillä bakteereilla altistetut eloonjääneet muurahaiset tuottivat estorenkaan. *Micrococuksen* etuna oli myös selkeä kuolleisuus. Merkittävää on, ettei pilottikokeiden perusteella yksikään bakteeri olisi mahdoton vaihtoehto. Estorenkaiden muodostuksen ja selkeän kuolleisuuden perusteella päätin käyttää varsinaisessa kokeessa bakteeria *Micrococcus luteus* ja tartuttaa bakteerin juottamalla maksimitiheyteen kasvanutta bakteeriliuosta.

Pilottikokeen tulokset osoittavat selkeästi, ettei työläisten immuunipuolustus sammunut karanteenissa. Tulokset olivat samanlaisia kaikilla bakteereilla, joten nämä tulokset eivät vaikuta bakteerin valintaan. Koska työläisten pitämisessä karanteenissa ei ollut selkeää hyötyä, käytin kokeissa vastakuoriutuneita työläisiä.

3.3. Varsinaiset kokeet

Kahden päivän jälkeen otetuissa näytteissä immuunivaste on heikompi kuin myöhemmissä näytteissä sekä estorenkaita tuottaneiden ($F_{1,30} = 58,513$, $p < 0,001$) että estorenkaiden halkaisijoiden ($F_{2,25,127} = 34,739$, $p < 0,001$) osalta. Kahden päivän ikäisistä muurahaisnäytteistä estorenkaita tuotti 1,7 % ($n = 459$), viikon näytteistä 55,7 % ($n = 126$) ja kahden viikon näytteistä 58,5 % ($n = 212$). Vastaavat estorenkaiden kokojen keskiarvot keskihajontoineen samoista näytteistä olivat $0,1 \text{ cm} \pm 0,8 \text{ cm}$, $2,1 \text{ cm} \pm 2,6 \text{ cm}$ ja $2,0 \text{ cm} \pm 2,1 \text{ cm}$.

Taulukko 3: Varianssianalyysi yksi ja kaksi viikkoa kokeen aloittamisen jälkeen otettujen lymfanäytteiden tilavuuksista ja estorenkaiden halkaisijasta.

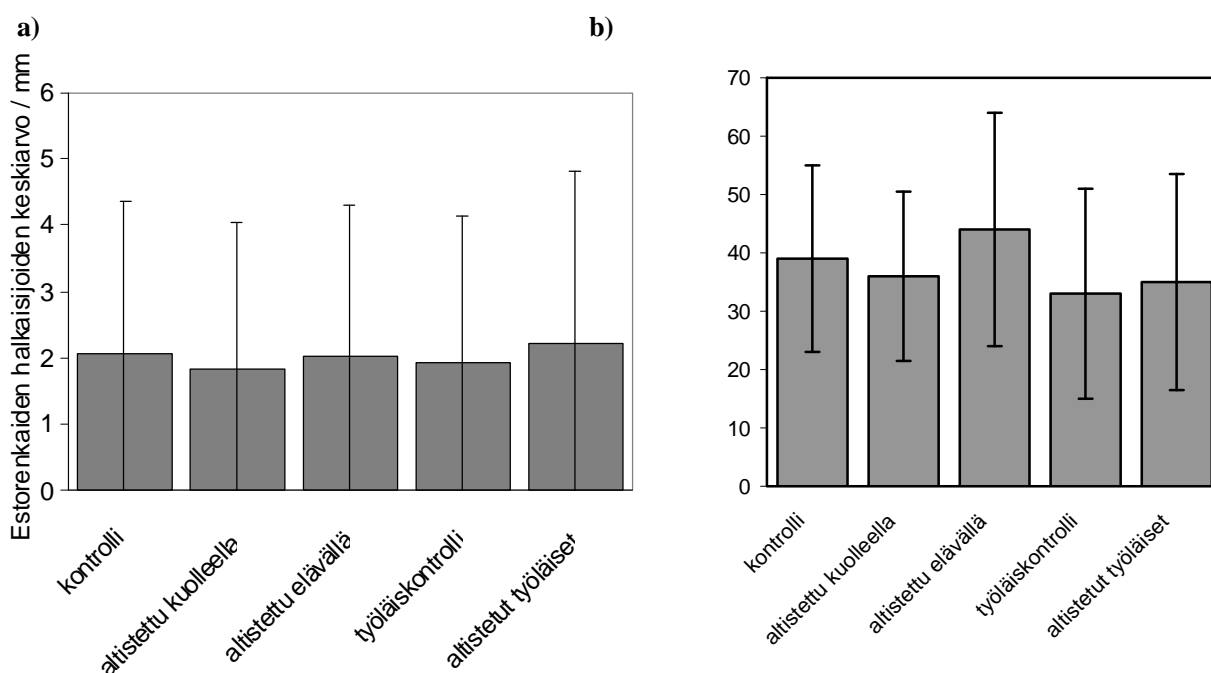
Suure	Aika	N	Keskiarvo	Z-arvo	Merkitsevyys
Lymfa	1 viikko	126	$12,4 \pm 7,4$	-0,395	0,693
	2 viikkoa	212	$12,7 \pm 7,2$		
Rengas	1 viikko	126	$2,1 \pm 2,6$	-0,229	0,819
	2 viikkoa	212	$2,0 \pm 2,1$		

Taulukko 4: Eri muuttujien näytemäärät, estorenkaiden halkaisijoiden keskiarvot ja keskihajonnat

Muuttuja	N	Renkaiden halkaisija (mm) ja keskihajonta
Viikko ja kaksi viikkoa	338	2,0 ± 2,3
Kaksi päivää	459	0,1 ± 0,75
Pilottikoe	400	2,6 ± 3,6
Kontrollit	112	2,4 ± 4,1

Yhden ja kahden viikon päästä otettujen näytteiden estorenkaiden halkaisijat tai lymfan tilavuudet eivät eroa toisistaan tilastollisesti merkitsevästi (Taulukko 3). Koska merkitseviä eroja ei ollut, tämän jälkeen tarkasteluissa yhden ja kahden viikon aineistot ovat liitetty yhteen.

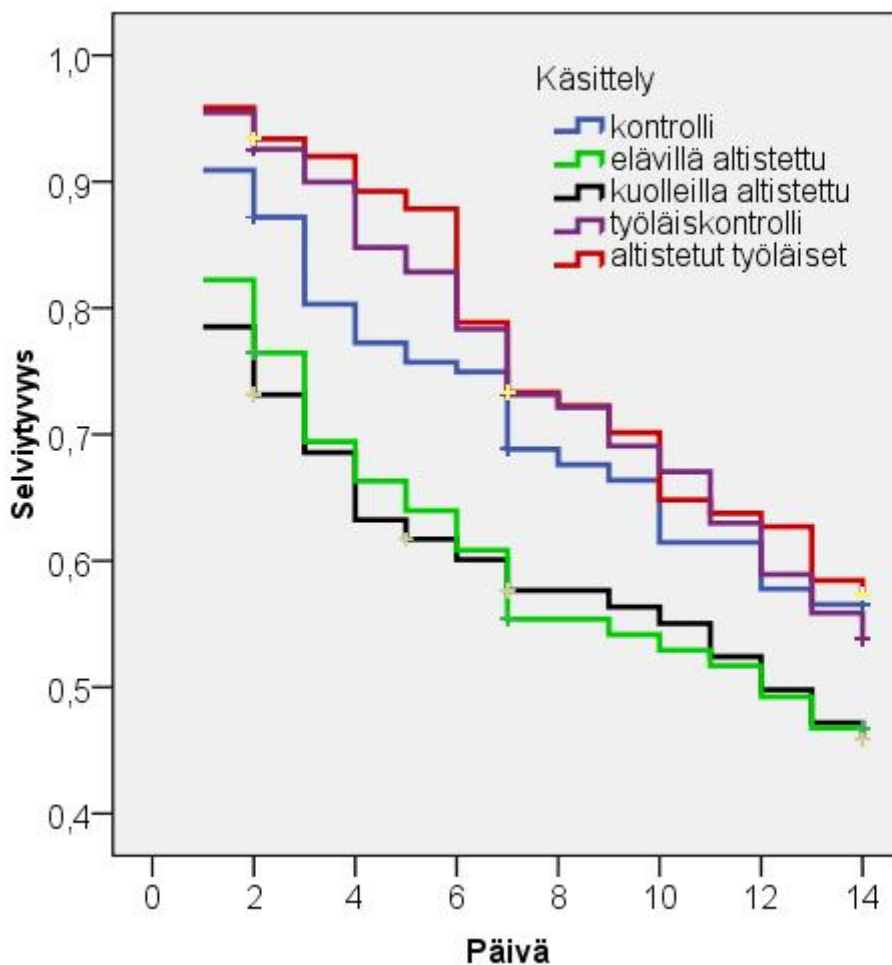
Kun kahden päivän näytteet jätettiin analyysistä pois, käsittelyiden välillä ei ole tilastollisesti merkitseviä eroja estorenkaiden halkaisijoissa ($F_{4;70,749} = 0,594$, $p = 0,668$, Kuva 8), eikä estorenkaita muodostaneiden osuuksissa. ($F_{6;65,694} = 0,343$, $p = 0,912$, Kuva 8).



Kuva 8: Yhdistetyt yhden ja kahden viikon näytteet käsittelyittäin. a) Estorenkaiden halkaisijoiden keskiarvot keskihajontoineen ja b) estorenkaita muodostaneiden työläisten osuuksien keskiarvot keskihajontoineen

Tutkin kuinka paljon vastakuoriutuneiden muurahaistyöläisten immuunivaste eroaa vanhoista työläisistä vertailemalla estorenkaiden kokoja. Jaoin kaikki näytteeni neljään eri tapaukseen: (1) Varsinaisen kokeen näytteet ensimmäisen ja toisen viikon jälkeen, (2) näytteet, jotka on otettu kaksi päivää kokeen alun jälkeen, (3) pilottikokeen kaikki näytteet ja (4) varsinaisen kokeen kontrollinäytteet (Taulukko 4). Vertailussa eri tapausten välillä oli tilastollisesti merkitsevä ero ($F_{3,1305} = 26,383$, $p < 0,001$). Kaksi päivää kuoriutumisen jälkeen estorenkaat olivat merkitsevästi pienempiä (Tukeyn post hoc –testi, $p < 0,001$) kuin muissa tapauksissa. Viikon ja kahden viikon näytteiden muodostamat estorenkaat eivät eroa merkitsevästi kontroleista ($p = 0,582$), mutta ovat merkitsevästi pilottikokeen estorenkaita pienempi ($p = 0,002$). Pilottikokeen ja kontrollien renkaiden koko eivät eroa toisistaan merkitsevästi ($p=0,683$).

Bakteereilla altistetuilla muurahaisilla oli suurin kuolleisuus (Taulukko 5, Kuva 9). Keskimääräinen selviytymisaika kuolleille bakteereille altistetuilla yksilöillä on 8,8 päivää (95 % luottamusväli 8,1 - 9,7 päivää) ja elävälle bakteereille altistetuilla yksilöillä 8,6 päivää (95 %



Kuva 9: Kaikista pesistä yhdistelty selviytymiskuvaaja. 0-päivän kohdalla kaikkien lähtötilanne on 1, eli kaikki ovat elossa. Ajankohdat, jolloin joukosta otettiin muurahaisia näytteiksi, on merkitty risteillä.

Taulukko 5: Breslow-testi parittaisista eroista selviytyvydessä eri käsittelyissä. Vapausasteiden määrä jokaisessa vertailussa on yksi.

Käsittely	Kuolleilla altistetut		Elävillä altistetut		Työläiskontrolli		Altistetut työläiset	
	X ²	p	X ²	p	X ²	p	X ²	p
Kontrolli	8,11	0,00	14,64	0,00	1,84	0,18	3,21	0,07
Kuolleilla altistetut			1,45	0,23	16,76	0,00	20,70	0,00
Elävillä altistetut					33,05	0,00	33,09	0,00
Työläiskontrolli							0,24	0,62

luottamusväli 7,8 – 9,4 päivää). Kontrollityöläisillä keskimääräinen selviytymisaika oli 10,4 päivää (95% luottamusväli 9,7-11,2 päivää), joka oli merkitsevästi edellisiä pidempi (Breslow, $p < 0,001$). Vanhojen altistamattomien työläisten kanssa olleilla työläisillä keskimääräinen selviytymisaika oli 10,8 päivää (95% luottamusväli 10,2 – 11,4 päivää) ja altistettujen työläisten kanssa olleilla 11,0 päivää (95% luottamusväli 10,4 – 11,7 päivää). Nämäkin molemmat erosivat merkitsevästi kuolleilla ja elävillä bakteereilla altistettujen muurahaisten selviytyvyydestä ($p < 0,001$).

4. Tulosten tarkastelu

Tutkimukseni selkein tulos on, ettei työläisillä vaikuta olevan heti kuoriutumisen jälkeen antimikrobiaalisiin peptideihin liittyvää immuunipuolustusta. Vain harvassa kahden päivän jälkeen otetussa näytteessä oli antimikrobiaalisia peptidejä ja viikon näytteistä jo yli puolessa havaittiin peptidejä. Yhden ja kahden viikon näytteissä eri käsittelyjen välillä ei ollut eroja, joten puolustuksen käynnistyminen vaikuttaa olevan ympäristöstä riippumatonta. Laboratoriossa kaksi viikkoa olleilla muurahaisilla immuunivaste vaikutti yhtä voimakkaalta kuin vasta laboratorioon tuoduilla. Immuunivaste ei siis katoa ajan mukana, vaan se pysyy suhteellisen tasaisena.

4.1. Immuunivasteen sammuminen

Muurahaisten immuunivasteessa ei tapahtunut voimakkuuden heikentymistä ajan funktiona. Sen sijaan immuunivasteen voimakkuudessa näyttäisi olevan aaltoliikettä ajan suhteen (Kuva 7). Erot päivämäärien välillä eivät kuitenkaan ole tilastollisesti merkitseviä, eikä selkeää syytä mahdolliselle säännölliselle vaihtelulle ole. Vaihtelua voisi tapahtua pienemmässä mittakaavassa, esimerkiksi vuorokauden mukaan tai laajemmassa mittakaavassa, kuten vuodenaikojen vaihtelun mukaan ja muurahaisten ikääntymisen myötä. Kaikki päivän näytteet on otettu eri päivinä eri vuorokauden aikoina aamukahdeksan ja iltapäivällä neljän välissä. Jos muurahaisilla on rytmi, jonka puitteissa immuunipuolustuksen voimakkuus vaihtelee vuorokauden aikana, tulokset saattaisivat olla saamani kaltaisia.

Koeasetelma ei ollut täysin steriili. Koska pyydystin muurahaiset luonnosta, niiden mukana kulkeutui varmasti joitain patogeenejä koeasetelmaan. Työläiset vaativat jatkuvaa kosteutta, joten asetelma oli oivallinen mikrobien kasvulle. Muurahaisia pitää ruokkia säännöllisesti ja ruokakin oli kokeessani mahdollinen uusien infektioiden lähde. Joka tapauksessa, patogeenipaine väheni huomattavasti luontoon verrattuna, mutta muurahaisten mitattu immuunivaste ei kuitenkaan pienentynyt. Muurahaisten luonnollisesti käynnissä oleva immuunivaste ainakaan käyttämiäni bakteereja vastaan ei siis vaikuta reagoivan herkästi muutoksiin ympäristön patogeenimäärissä.

Ensimmäisissä näytteissä hemolymfan tilavuus saattoi olla huomattavasti seuraavia pienempi, koska näytteenottotekniikkani ei varmasti tuolloin ollut vielä yhtä hyvin toimiva kuin myöhemmissä näytteissä. Tämän arviointi on kuitenkin vaikeaa, koska mittasin hemolymfan tilavuuden vasta 6 päivästä lähtien.

4.2. Immuunivasteen käynnistyminen

Kaksi päivää kuoriutumisen jälkeen, käsittelystä riippumatta, työläisistä otettu hemolymfanäyte – kahdeksaa poikkeusta lukuun ottamatta – ei estänyt bakteerien kasvua maljalla. Sen sijaan viikon päästä käsittelyjen jälkeen estorenkaita ilmaantui jo merkitsevästi enemmän. Viikon jälkeen ei kuitenkaan estorenkaiden koossa tai määrässä ole merkitsevää kasvua. Nämä tulokset osoittavat, että vastakuoriutuneilla työläisillä ei ole antimikrobiaalisten peptidien tuottoa, mutta se käynnistyy muutaman päivän kuluessa tämän jälkeen. Tämä kumoaa ensimmäisen hypoteesini, eli että

muurahaisilla olisi jo kuoriutuessaan toimiva immuunipuolustus. Tulos eroaa mehiläisillä tehdystä tutkimuksesta (Wilson-Rich ym. 2008), jossa toukilla, koteloilla ja päivän ikäisillä työläisillä oli selkeä immuunivaste. Tosin Wilson-Richin ym. tutkimuksessa käytettiin immuunipuolustuksen arvioimiseen eri menetelmiä kuin minulla: hemosyyttien määrää, enkapsulaatiota ja fenoloksidaasiaktiivisuutta.

Peptidien ilmaantuminen hemolymfaan on merkittävän samanaikaista, eikä siinä ole suurta vaihtelua käsittelyjen välillä. Tämä kumoaa kolmannen ja neljännen tutkimushypoteesini, joiden perusteella käynnistymisessä olisi pitänyt syntyä eroja käsittelyiden välille. Koska kuolleille bakteereille altistettujen työläisten immuunireaktio ei ollut voimakkaampi kuin kontrolleissa, sosiaalinen immuunipuolustuksen käynnistyminen ei ole todennäköistä. Eläville ja kuolleille bakteereilla altistettujen välillä ei ollut eroa, eikä kumpikaan eronnut merkitsevästi kontrollista, joten ympäristön aiheuttama immuunipuolustuksen käynnistyminen ei vaikuta todennäköiseltä. Toinen hypoteesini on lähinnä tuloksiani: muurahaisten immuunipuolustus käynnistyy automaattisesti ympäristöstä riippumatta. Kotelosta kuoriutumisen jälkeen muurahainen saattaa olla fysiologisessa shokkitilassa, josta tokenemiseen kuuluu myös immuunipuolustuksen käynnistyminen. Kotelossa muurahainen ei myöskään altistu patogeeneille, joten silloin ei ole tarvetta immuunipuolustukselle.

Muurahaiset, jotka varttuivat vanhojen työläisten kanssa, selviytyivät paremmin kuin työläiset, joilla ei ollut seuranaan vanhoja työläisiä. Tämä ei ole yllättävää, koska vastakuoriutuneet työläiset eivät ole vielä tarpeeksi voimakkaita selviytyäkseen omillaan. Kuolleisuus oli suurempaa elävillä ja kuolleilla tartutetuilla bakteereilla kuin kontrolleilla. Elävien bakteerien vaikutus on ymmärrettävää, koska tartunta aiheuttaa kustannuksia, mutta se, että kuolleet bakteerit vaikuttavat samalla tavalla on yllättävämpää. Bakteerien kasvatusliemessä, jota vastakuoriutuneille työläisille juotettiin, saattoi olla bakteerien tuottamia toksiineja, jotka myrkyttivät työläisiä. Kuolleet bakteerit ovat myös saattaneet käynnistää muurahaisissa samanlaisen reaktion kuin elävät bakteerit. Reaktio ei kuitenkaan näy antimikrobiaalisten peptidien tuotannossa. Kyseessä voivat olla immuunipuolustuksen muut osa-alueet, joita ei havainnoitu. Mahdollisia käynnistyneitä immuunipuolustuksen osia olisivat esimerkiksi lisääntynyt hemosyyttien määrä, kohonnut fenoloksidaasi-pitoisuus tai antimikrobiaaliset peptidit, jotka eivät toimi *Micrococcusta* vastaan.

Sekä immuunireaktion sammumisen ja käynnistymisen suhteen on mahdollista, että muurahaiselle paras vaihtoehto on pitää jatkuvasti yllä immuunipuolustusta. Vaikka puolustuksen ylläpito olisi hyvinkin kallista, se saattaa olla kannattavaa, jos puolustuksen käynnistymisen hitaus saattaisi aiheuttaa kustannuksia. Ylläpidon kustannuksissa merkittävää on lähinnä kuinka vakaita

molekyylejä antimikrobiaaliset peptidit ovat ja aiheuttavatko ne haittavaikutuksia elimistölle. Kumpaankaan ei tiedetä vastausta.

4.3. Ongelmia ja ratkaisuja koeasetelmassa

Näytteiden epätasainen jakauma on pienoinen ongelma (Liite 4). Yllättävä tulos kahden päivän näytteiden osalta ja nopea suunnitelmien muutos aiheuttivat sen, että kahden päivän näytteitä on paljon ja myöhempiä näytteitä huomattavasti vähemmän eikä yhtä systemaattisesti. Näytemäärä on kuitenkin riittävän suuri, jotta tulokset olivat merkitseviä. Suuri näytemäärä kahden päivän osalta ainakin kertoo vastaansanomattomasti, ettei työläisillä – muutamia poikkeuksia lukuun ottamatta – ole antimikrobiaalisia peptidejä hemolymfassaani heti kuoriutumisen jälkeen. Poikkeustapauksia oli kahdeksan yksilöä, ja ne jakautuivat eri pesille, niin että samasta pesästä ei ollut kahta yksilöä enempää. Poikkeukset saattavat olla omien käsittelyjensä ensimmäisiä kuoriutujia, jolloin niillä olisi ollut eniten aikaa käynnistää antimikrobiaalisten aineiden tuotanto.

Tilastollista analyysiä vaikeutti tulosten jakauman poikkeaminen normaalista. En voinut käyttää ei-parametrisiä testejä, koska tarpeisiini soveltuvia riittävän yksinkertaisia testejä ei ole olemassa. Varianssianalyysien tuloksiin voi kuitenkin suhtautua melko luottaen, koska menetelmät ovat voimakkaita, eikä epänormaalisuus välttämättä aiheuta vääriä tuloksia. Erityisesti on merkittävää, että epänormaalisuus aiheutuu suuresta nollanäytteiden määrästä. Tällöin syntyy näytteiden ylidispersio, eli kuvaajaan syntyy ylimääräinen häntä. Tässä tapauksessa varianssianalyysi vahvistaa eri tekijöiden merkitystä ja merkitsevät vaikutukset syntyvät helpommin. Pääosa vaikutuksista ei kuitenkaan ole merkitseviä, joten en usko analyysien olevan virheellisiä. Jos aineisto olisi normaalin, uskon, että tulokset olisivat samansuuntaisia.

Miksi nollanäytteitä sitten on niin paljon? Epäilemättä osassa näytteistä työläisillä ei ole antimikrobiaalisia peptidejä *Micrococcusta* vastaan. Kahden päivän näytteet olivat luultavasti näitä, koska nollanäytteiden määrä oli niin suuri. Estorenkaiden puute voi johtua myös koeasetelman aiheuttamista virheistä: Pienillä hemolymfamäärillä estorengasta ei välttämättä havaita, joten näytteen tilavuus on merkittävä asia. Muurahaisella saattaa olla jollain tasolla toimiva immuunipuolustus, mutta se ei toimi bakteereita vastaan. Näyte voi olla syystä tai toisesta tuhoutunut, jolloin maljatussa näytteessä ei enää ole bakteereista tuhoavia aineita. Antibakteeristen aineiden määrä saattaa olla liuoksessa niin pieni, että ne tappavat bakteereja, mutta eivät riittävästi,

jotta muodostuu rengas. Käsittelin kaikki näytteet samalla tavalla, joten estorenkaiden puutos ei todennäköisesti johdu eroista näytteiden käsittelyssä.

Nollanäytteitä ei voi jättää huomioimatta tulosten käsittelyssä, koska se saattaisi valikoida näytteitä epätasaisesti: Estorenkkaan puuttuminen saattaa johtua immuunivasteen puuttumisesta, joka on merkittävä asia. Emme kuitenkaan voi tietää mistä estorenkkaan puuttuminen johtuu. Myöskään näytteitä, joissa on liian pieni näytteen tilavuus, ei voi jättää pois, koska luontevaa leikkauskohtaa ei ole. Tästä saavutettava hyötykään ei olisi merkittävä, koska nollanäytteitä on runsaasti myös siinä joukossa, jossa saadun näytteen tilavuus on suuri.

Näytteet olivat terminaalinäytteitä – kaiken mahdollisen hemolymfan eristäminen muurahaisesta tappaa yksilön. Jos yhdestä muurahaisesta saisi useampia näytteitä, immuunivasteen kehittymisen seuraaminen olisi helpompaa, tai ainakin varmempaa, eikä vastaavia ongelmia näytteiden epätasaisen jakautumisen osalta välttämättä tulisi.

Hemolymfan määrä muurahaisissa vaihtelee rutkasti. Muurahaisten koon vaihtelu on suurta, joten osalla muurahaisista ei ollut riittävästi nestettä täyttämään kapillaariputkea. Hemolymfan määrään saattaa vaikuttaa myös mahdollinen tartunta: Jos tartunta aiheuttaa esimerkiksi ripulia tai muurahaist pyrkivät nostamaan itselleen kuumeen, on mahdollista, että työläiset dehydroituvat ja hemolymfan määrä vähenee. Arvelin pilottikokeiden aikana, että tästä saattaisi tulla merkittävä ongelma, mutta nuorilla työläisillä ongelma ei vaikuttanut olevan yhtä suuri. Mahdollisen virheen suuruuden arvioiminen vaatisi paljon tarkempaa tietoa muurahaisten patologiasta.

Pilottikokeissa käytin vanhoja ja varsinaisessa kokeessa nuoria työläisiä. Talvehtiminen ja pitkä ikä saattaa vaikuttaa niin hemolymfan määrään kuin immuunipuolustuksen voimakkuuteen. Lisäksi vanhojen työläisten stressinsietokyky saattaa olla heikompi kuin nuorilla työläisillä. Vanhoissa työläisissä on lisäksi mukana sekä ravintoa pesän ulkopuolelta kerääviä yksilöitä, jotka ovat palanneet pesään että pesän sisällä työskenteleviä yksilöitä. Näiden muurahaisten kokemassa patogeenisuudessa on isoja eroja. Luultavasti ulkona liikkuneet työläiset ovat kokeneet enemmän stressiä ja esimerkiksi menettäneet herkemmin nestettä. Näiden erojen ei kuitenkaan pitäisi vaikuttaa tuloksiini: Vertailin vanhoja ja nuoria työläisiä keskenään (Taulukko 4) ja erot eivät ole suuria. Oletettavasti pilottikokeissa oli suhteellisen tasaisesti pesän ulkopuolella liikkuneita että pesän sisällä oleskeleviä työläisiä. Oma ongelmansa tietenkin on, voisiko nuorilla työläisillä tapahtua immuunipuolustuksen sammumista. En usko siihen, koska on vaikea keksiä hyvää syytä, miksi sammuminen hyödyttäisi nuorta, mutta olisi vanhalle työläiselle selkeästi haitallinen.

Olosuhteet muurahaisten kasvatuksessa eivät olleet kohdallaan, koska muurahaisia kuoli paljon kokeiden aikana. Muurahaisten siirtäminen luonnosta laboratorio-olosuhteisiin johti luultavasti stressaantumiseen ja lisääntyneeseen kuolleisuuteen. Tämä saattoi vaikuttaa karanteenikokeen ensimmäisiin näytteisiin, jotka oli otettu suoraan luonnosta kerätyistä muurahaisista. Seuraavien päivien aikana heikommat yksilöt olivat kuitenkin kuolleet, eivätkä vaikuttaneet enää tuloksiin. Selviytymiskokeissa suurin yksittäinen kuolleisuutta aiheuttava tekijä on luultavasti vanhempien työläisten puute, koska vastakuoriutuneet työläiset olivat melko heikosti toimivia. En nähnyt niiden syövän kertaakaan parin päivän aikana kuoriutumisen jälkeen. Ymmärrettävästi kuoriutuminen on merkittävä tapahtuma muurahaisten elämässä ja siitä seuraava fysiologinen stressitila voi olla pitkäaikainen. Kuolleisuus voi myös johtua koteloiden kuorimisesta väärään aikaan: Liian aikaisin kuorittu yksilö ei ole vielä kypsä, mutta saavuttaa parissa päivässä tarvittavan toimintakyvyn. ”Kuoriutuminen” onkin melko venyvä käsite. Muurahaisten välillä kuorivat selvästi vielä epäkypsiä yksilöitä ja sitä tapahtuneen luonnossakin. Kotelosta ulos pääseminen ja täysi toimintakyky eivät välttämättä tapahdu samaan aikaan. Kuoriutumisen ongelmasta voisi päästä käyttämällä tutkimuksessa lajeja, jotka eivät lainkaan luo koteloa. Tällöin kokeen aloittamisajankohdan voisi päättää sen mukaan, koska työläiset alkavat liikkua. En ollut yhtä näppärä pinsettien kanssa kuin työläiset ovat leukojensa kanssa ja jouduin avaamaan työläisiä melko suuria määriä. Työläisiltä irtosi raajoja tai tuntosarvia operaation aikana. Sorminäppäryteni kuitenkin parani alkukankeuden jälkeen huomattavasti, joten tämänkaltaisten vahinkojen määrä väheni ajan kuluessa. Noin puolet avatuista koteloista ei kuitenkaan koskaan lähtenyt liikkeelle, vaan jäi kuolleen maljalle.

Muutamit kontaminaatiot näytteissä kertovat, että steriili työtapana ei onnistunut moitteettomasti. Noin prosentin verran kontaminaatioita on kuitenkin vähän, eikä häiritse tulosten tulkintaa. Ongelmallisempi näytteiden laatua heikentävä tekijä on mahdollinen näytteeseen joutuva muurahaishappo. Happo luultavasti tuhoaa antibakteriaaliset aineet, joten näyte, jossa on muurahaishappoa, ei saa aikaan estorengasta. On vaikea arvioida kuinka monessa näytteessä on ollut mukana muurahaishappoa. Osalla yksilöistä happosäiliö oli kuitenkin selkeästi nähtävissä ja se säilyi ehjänä. Monella yksilöllä happosäiliö oli jo tyhjentynyt käsittelyn aikana, ymmärrettävästi sisältöä oli käytetty puolustautumiseen, kun tartuin muurahaiseen. Pikkutarkassa työssä pienetkin erot näytteenotossa johtavat suurin eroihin tuloksissa. Etenkään, kun en ole kovin kokenut näytteenotossa ja paras näytteenottotapa muotoutui kokeiden edetessä. Joidenkin näytteiden tilavuus oli liian pieniä, mikrolitran kymmenyksiä. Työläisistä ei kuitenkaan saa helposti suurempaa näytetilavuutta – uskon, että sain kapillaariin tiristettyä sen, mitä muurahaisten ruumiista on saatavissakin.

Ongelmista huolimatta pidän käyttämiäni menetelmiä toimivina. Näytteenotto ja analysointi oli suoraviivaista ja helppoa. Ongelmia tuotti ensisijaisesti muurahaisen kasvattaminen mahdollisimman bakteerivapaassa ympäristössä, eivätkä niinkään näytteiden ottoon tai käsittelyyn liittyvät ongelmat. Muurahaisia käytettäessä voidaan helposti käyttää suuria näytekokoja, jolloin pienet menetykset eivät ole niin suuri ongelma.

4.4. Mitä antimikrobiaaliset peptidit kertovat immuunipuolustuksesta?

Antimikrobiaaliset peptidit ovat vain yksi osa immuunipuolustusta ja immuunipuolustuksen eri osien välillä saattaa olla trade-offeja. Siksi onkin oleellista pohtia tuloksieni suhteen, mitä antimikrobiaalisten peptidien määrä oikeasti kertoo.

Lemaitre ym. (1997) huomasivat, että *Serratia marcescens* ei aiheuta antimikrobiaalisten peptidien tuottoa *Drosophila*-kärpäsissä. He epäilivät, että bakteeri tappaa kärpäsen vaikuttamalla suolen toimintaan, eikä siirry lainkaan elimistön sisälle. *Serratia* oli yksi käyttämäni bakteereista, ja on mahdollista, että muutkin patogeenini toimivat samoin. Toisaalta, käyttämäni *Arthrobacter globiformis* tuottaa jauhopukilla (*Tenebrio molitor*) estorenkään (Haine ym. 2008) ja suolistotartunnatkin saattavat käynnistää immuunireaktion hemolymfassa (Brown ym. 2003). Työläiset saivat bakteerit suun kautta ruuansulatusjärjestelmään, joten on mahdollista, että bakteerit eivät muuttuneet patogeeniseksi tai päässeet sisälle hemolymfaan. Hemolymfaan pääsevän tartunnan varmistamiseksi muurahaiset olisi voinut infektoida tekemällä bakteeria sisältävällä neulalla reiän kutikulaan. Surullinen tosiasia on, että hyönteisten patologia on heikosti tunnettua ja patogeenien vaikutustavat ovat hämärän peitossa (Shirasu-Hiza & Schneider 2007). Käyttämiäni bakteerien vaikutuksesta muurahaisiin ei tiedetäkään juuri muuta kuin että ne voivat olla patogeenisiä.

Meylaers ym. (2003) havaitsivat, että monilla hyönteisillä on valmiina hemolymfassaan antimikrobiaalisia peptidejä ja Lambertyn ym. (2001) tulokset termeillä ovat samansuuntaisia: haastamattomillakin yksilöillä oli peptidejä, eikä immuunihaaste lisännyt niiden määrää. He esittivätkin, että on olemassa kaksi eri tapaa taistella mikrobeja vastaan: peptidituotannon käynnistäminen tai jatkuva peptidien tuottaminen ja säilöminen hemosyytteihin. Jälkimmäinen on yleistä muissa eliöryhmissä, muttei vielä todennettu niveljalkaisilla. Haine ym. (2008) huomasivat, että 99,5 % hyönteisen ruumiiseen injektoiduista bakteereista kuolee puolessa

tunnissa. He epäilivät, että käynnistymistä vaativan puolustuksen tehtävä on ainoastaan siivota pois jäljet, jotka jäävät valmiina olevan puolustuksen toiminnan jälkeen.

Mitä tämä kaikki sitten tarkoittaa tulosteni kannalta? Järkevä oletus olisi, että muodonmuutoksen aikana työläisen ruumiissa ei ole antimikrobiaalisia peptidejä, mutta niiden tuotanto alkaa heti, kun metamorfoosi on viety loppuun. Näin ollen muutaman päivän kuluessa olisi saavutettu yleinen taso, jonka havaitsin yhden ja kahden viikon näytteistäni. Luultavasti luonnollisissa olosuhteissa peptidejä olisi nopeammin muurahaisen ruumiissa, mutta nyt menetelmäni aiheuttivat muurahaisten kuoriutumisen hivenen aikaisemmin kuin ne olisivat luonnollisesti kuoriutuneet.

4.5. Tulosten merkitys

Tulosteni perusteella muurahaisen antimikrobiaalisilla peptideillä välittyvä immuunivaste käynnistyy ympäristöstä riippumatta muutaman päivän kuluttua kuoriutumisesta. Tämä on uutta tietoa, eikä tämänkaltaista tulosta ole aiemmin raportoitu.

Muurahainen on ensimmäiset kuoriutumisen jälkeiset hetkensä immunologisesti haavoittuvainen. Työläinen ei kuitenkaan heti joudu kohtaamaan maailmaa, vaan se voi myös valmistautua rauhallisesti pesän suojassa. Moniin muihin hyönteislajeihin verrattuna muurahaisen ensi hetket ovat hyvin suojattuja ja turvallisia. Tämä saattaa selittää myös erot mehiläistutkimukseen (Wilson-Rich ym. 2008), sillä mehiläisten kotelot ovat huomattavasti enemmän ympäristön armoilla kuin muurahaiskotelot. Muurahaisten kotelo on toukan itse rakentama, eikä pesäaineksesta tehty ja lisäksi muurahaistyöläiset voivat puhdistaa kotelon ulkopintaa sekä siirtää koteloa turvaan ulkoisilta uhilta. Tämä saattaisi selittää, miksi muurahaisten ja mehiläisten välillä on eroja immuunivasteessa yksilönkehityksen aikana.

Yhteiskuntahyönteisillä olisi ymmärrettävää, että yhteiskunnan muilla jäsenillä olisi roolinsa immuunipuolustuksen käynnistymisestä. Tämä ei kuitenkaan vaikuta tapahtuvan sosiaalisen rokotuksen kautta. Vanhempien työläisten antamat eväät vastakuoriutuneiden elämään tuntuvat enemmän liittyvän ravinnon ja nesteen antamiseen. Tähän voidaan ajatella kahta eri syytä. Immuunipuolustuksen kustannukset eivät ole välttämättä kovin suuria, jos ympäristöllä ei ole merkitystä. Tällöin työläinen ei säästä kustannuksissa, vaikka käynnistäisi immuunipuolustuksensa ”tarpeen mukaan”.

Koska immuunipuolustukseen kuitenkin kuuluu luultavasti paljon resursseja, todennäköisempää on, että jatkuvasti toimivan immuunipuolustuksen hyödyt ovat suuria. Yhteiskuntahyönteisillä ei ehkä ole varaa luottaa siihen, että ympäristöstä riippuva reagointi muodostaa tarpeeksi nopeasti suojan patogeeneja vastaan. Yhteiskunnissa taudit leviävät nopeasti ja liian hidas reagointi saattaisi olla kohtalokasta. Sosiaalisuuden tuoma tuki voi tapahtua jo toukkavaiheessa, kuten mehiläisillä on oletettu. Muurahaistoukat ovat täysin riippuvaisia työläisten antamasta ravinnosta ja tämä ravinto olisi oiva keino toimittaa toukille immuunipuolustusta tehostavia aineita.

Sosiaalisuudesta on eittämättä etua immuunipuolustuksen suhteen, aivan kuten se myös altistaa suuremmalle patogeeniriskille. Tulosteni ja tähän asti tehdyn tutkimuksen perusteella on kuitenkin vaikea muodostaa kokonaiskuvaa siitä, miten sosiaalisuuden ja immuunipuolustuksen yhteinen evoluutio on tapahtunut (Thorne & Traniello 2003). Ekologisen tai evolutionaarisen immunologian keskeinen käsite on immunokompetenssi (Köning & Schmid-Hempel 1995, Owens & Wilson 1999, Ryder 2003). Tämä käsite tarkoittaa, kuinka tehokas eläimen immuunipuolustus on tehtävässään, eli kuinka hyvin eläin pystyy välttämään patogeenien aiheuttama kustannukset. On huomattava, että immuunipuolustuksen voimakkuus ei vielä kerro mitään evolutiivisesti merkityksellistä. Väliä ei ole immuunipuolustuksen koolla, vaan sillä miten sitä käyttää.

4.6. Tutkimuksen herättämiä uusia kysymyksiä

Muurahaisten patogeenit ovat heikosti tunnettuja. Emme tiedä mille patogeeneille muurahaiset voivat luonnollisissa olosuhteissa altistua, saati sitten minkälainen näiden patologia on. Molemmat olisivat ensiarvoisen tärkeitä tietoja, jotta voimme arvioida immuunipuolustuksen tehokkuutta tai muodostaa kokonaiskuvaa siitä minkälaisessa ympäristössä muurahaisten immuunipuolustus on kehittynyt. Oma ongelmansa on selkärangattomien kirjava immuunipuolustus. Jotta voisimme arvioida paremmin, kuinka laajalle tulokset ovat yleistettävissä muurahaisiin, hyönteisiin tai selkärangattomiin, meidän pitäisi tietää enemmän loviniskamuurahaisen immuunivasteen molekyylibiologisesta perustasta. Tällä hetkellä tietomme siitä on olematonta. Yleisemmin myös monet spesifisyyteen liittyvät ongelmat selkärangattomien immuunipuolustuksessa ovat avoinna: Miten näennäisen laajavaikutteiset signaaliketjut voivat ylläpitää tiukan patogeenispesifiä immuunivastetta (Schmid-Hempel 2005b, Schulenburg ym. 2007)?

Kuoriutumishetken määrittäminen on vaikeaa. Tuntemme ylipäänsä kehnosti fysiologisia prosesseja, jotka määräilevät hyönteisen aikuisvaiheen käynnistymistä. Immuunipuolustuksen käynnistymisen tunteminen vaatisi seurakseen muita tutkimuksia, joissa selvitetään työläisten muiden elintoimintojen käynnistymistä ja muurahaisen valmistumista aikuisvaiheen elämään.. Olisi tarpeellista tietää, ovatko tulokset samansuuntaisia myös muiden immuunipuolustuksen osa-alueiden osalta. Laajemmalla työmäärällä samassa yhteydessä olisi voinut tutkia myös muita osa-alueita, kuten esimerkiksi melanisaatiota ja fenyloksidaasiaktiivisuutta. Jos antimikrobiaalisten peptidien tuotanto käynnistyy muodonmuutoksen jälkeen, vastakuoriutuneiden hyönteisten hemolymfasta pitäisi havaita aktiivinen peptidisynteesi. Se saattaa aluksi olla voimakkaampaa ja saavutetun tason jälkeen sen määrä vähenee, kunnes peptidien tuhoutuminen ja valmistaminen saavuttavat tasapainon.

Ongelma on myös se, että on vaikea arvioida immuunipuolustuksen todellisia kustannuksia muurahaisille. Jos haluamme arvioida eri sopeutumien merkitystä muurahaisten immuunipuolustukselle, olisi tarpeen myös osata mahdollisimman tarkkaan arvioida kustannukset, joita työläisille aiheutuu. Mahdollisia menetelmiä on käyttämämme selviytyvyys sekä kasvuun ja lisääntymiseen liittyvät tekijät. On myös mahdollista rajoittaa ravinnon määrää, jolloin kustannukset tulevat selkeämmin esille (Moret & Schmid-Hempel 2000). Kustannusten mittaamisessa on kuitenkin omat ongelmansa: ympäristövaikutukset voivat olla niin merkittäviä, että on vaikea erottaa mitkä kustannukset syntyvät immuunivasteesta ja mitkä puolestaan jostain muusta tartunnan saaneen biologiasta. Onkin tärkeää arvioida immuunivasteen kustannuksia useammalla menetelmällä (Sandland & Minchella 2003).

5. Loppuyhteenveto

Tutkimukseni osoitti selvästi, ettei muurahaistyöläisillä ole kuoriutuessaan antimikrobiaalisia peptidejä. Puolustus käynnistyy muutaman päivän kuluessa riippumatta ympäristöstä. Ulkoisella patogeenipaineella on vaikutusta työläisten selviytymiseen, mutta immuunivasteen käynnistymiseen sillä ei ole vaikutusta. Immuunireaktio ei vaikuta sammuvan parin viikon kuluessa, vaikka ulkoinen patogeenipaine olisi vähäinen.

6. Kiitokset

Lämpimät kiitokset tutkimukseni mahdollistamisesta kuuluvat rahoittajilleni, Helsingin yliopiston Matematiikan ja luonnontieteiden rahastolle, Suomen biologian seura Vanamo ry:lle sekä Societas pro Flora et Fauna Fennicalle. Sain työskennellä kannustavassa ja kansainvälisessä ympäristössä Tvärminnen eläintieteellisellä asemalla, jossa erityisesti laboriomestari Jaana Koistinen sekä amanuenssi Marko Reinikainen auttoivat käytännön järjestelyissä. Bakteerit sain Jouni Laakson tutkimusryhmältä, jonka lisäksi erityiskiitos kuuluu ko. ryhmän Minna Pekkoselle, joka opasti Viikin laboriotorilojen käytössä sekä antoi käyttöni hienon bakteerimaljojen kuvauslaitteistonsa. Monet kommentoivat yksittäisiä tai laajempia osia gradustani ja pohtivat kanssani määritelmiin ja päätelmiini liittyviä ongelmia ja he ansaitsevat syvimmit kiitokseni avustaan. Lisäksi haluan kiittää suurta laumaa ystäviä, jotka ovat pyytteettömästi tukeneet eri tavoin gradutyöskentelyni ylä- ja alamaissa. Mahtavaa että olette olemassa!

Suurimmat kiitokset kuuluvat Team::Antzz:ille, jonka jäsenet ovat tarjonneet oivaa apua ajatusteni peilaamiseen, käytännön vinkkejä muurahaisten kanssa työskentelyyn ja vastapainoksi rentoutumista ja huolien unohtamista. Erityishuomion ansaitsevat ohjaajani professori Lotta Sundström ja FM Emma Vitikainen sekä kanssagradulaiseni Hannele Luhtasela.

7. Läheteet

Adamo, S.A. 2004: How should behavioural ecologists interpret measurements of immunity? — *Animal Behaviour* 68: 1443-1449.

Agaisse, H. 2007: An Adaptive Immune Response in *Drosophila*? — *Cell Host & Microbe* 1: 91-93.

Alexander, R.D. 1974: The Evolution of social behaviour. — *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 5: 325-383.

Alizon, S., Hurford, A., Mideo, N. & van Baalen, M. 2009: Virulence evolution and the trade-off hypothesis: history, current state of affairs and the future. — *Journal of Evolutionary Biology* 22: 245-259.

Anderson, R.M. & May, R. M. 1982: Coevolution of hosts and parasites. — *Parasitology* 85:411-426.

Bell, G. 1982: *The Masterpiece Of Nature: The Evolution and Genetics of Sexuality*. University of California Press, Berkeley, 635 s.

Bhatkar, A. & Whitcombe, W.H. 1970. Artificial diet for rearing various ant species. — *The Florida Entomologist* 53:229-232.

Bocher, A., Tirard, C. & Doums, C. 2007: Phenotypic plasticity of immune defence linked with foraging activity in the ant *Cataglyphis velox*. — *Journal of Evolutionary Biology* 20: 2228-2234.

Brown, M.J.F., Moret, Y. & Schmid-Hempel, P. 2003: Activation of host constitutive immune defence by an intestinal trypanosome parasite of bumble bees. — *Parasitology* 126: 253-260.

Chapuisat, M., Oppliger, A., Magliano, P. & Christe, P. 2007: Wood ants use resin to protect themselves against pathogens. — *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274:2013-2017.

Czechowski, W., Radchenko, A. & Czechowska, W. 2002: *The ants (Hymenoptera, Formicidae) of Poland*. Museum and Institute of Zoology PAS, Varsova, 200 s.

Cotter, S.C., Kruuk, L.E.B. & Wilson, K. 2004: Costs of resistance: genetic correlations and potential trade-offs in an insect immune System. — *Journal of Evolutionary Biology* 17: 421-429.

Cremer, S., Armitage, S. A. O. & Schmid-Hempel, P. 2007: Social Immunity. — *Current Biology* 17: 693-702.

Cremer, S. & Sixt, M. 2009: Analogies in the evolution of individual and social immunity. — *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364: 129-142.

- Dimopoulos, G., Richman, A., Müller, H. & Kafatos, F.C. 1997: Molecular immune responses of the mosquito *Anopheles gambiae* to bacteria and malaria parasites. — *Proceedings of National Academy of Sciences of U.S.A.* 94: 11508-11513.
- Evans, J.D., Aronstein, K., Chen, Y.P., Hetru, C., Imler, J.-., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G.J., Zou, Z. & Hultmark, D. 2006: Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. — *Insect Molecular Biology* 15: 645-656.
- Fefferman, N.H., Traniello, J.F.A., Rosengaus, R.B. & Calleri, D.V.II 2006: Disease prevention and resistance in social insects: modeling the survival consequences of immunity, hygienic behavior, and colony organization. *Behavioral ecology and sociobiology* 61:565-577.
- Fernández-Marin, H., Zimmermann, J., K., Rehner, S., A. & Weislo, W., T. 2006: Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. — *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273:1689-1695.
- Frank, S.A. & Schmid-Hempel, P. 2008: Mechanisms of pathogenesis and the evolution of parasite virulence. — *Journal of Evolutionary Biology* 21: 396-404.
- Haine, E.R., Pollitt, L.C., Moret, Y., Siva-Jothy, M.T. & Rolff, J. 2008: Temporal patterns in immune responses to a range of microbial insults (*Tenebrio molitor*). — *Journal of Insect Physiology* 54: 1090-1097.
- Hancock, R.E.W., Brown, K.L. & Mookherjee, N. 2006: Host defence peptides from invertebrates – emerging antimicrobial strategies. — *Immunobiology*, 211: 315-322.
- Hanson, L. 1998: Breastfeeding provides passive and likely long-lasting active immunity. — *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 81: 523-537.
- Hart, A.G. & Ratnieks, F.L.W. 2001: Task partitioning, division of labour and nest compartmentalisation collectively isolate hazardous waste in the leafcutting ant *Atta cephalotes*. — *Behavioral ecology and sociobiology* 49: 387-392.
- Hauton, C., Hammond, J.A. & Smith, V.J. 2005: Real-time PCR quantification of the in vitro effects of crustacean immunostimulants on gene expression in lobster (*Homarus gammarus*) granular haemocytes. — *Developmental & Comparative Immunology* 29: 33-42.
- Hauton, C. & Smith, V.J. 2007: Adaptive immunity in invertebrates: a straw house without a mechanistic foundation.— *BioEssays* 29: 1138-1146 .
- Khush, R.S., Leulier, F. & Lemaitre, B. 2002: Pathogen Surveillance--the Flies Have It. — *Science* 296: 273-275.
- Klein, J. 1989: Are Invertebrates Capable of Anticipatory Immune Responses?— *Scandinavian Journal of Immunology* 29:499-505.
- Kraus, B. & Page, R.E., Jr. 1998: Parasites, Pathogens, and Polyandry in Social Insects. — *American Naturalist* 151: 383-391.

- Kurtz, J. 2004: Memory in the innate and adaptive immune systems. — *Microbes and Infection* 6: 1410-1417.
- Kurtz, J. & Armitage, S.A.O. 2006: Alternative adaptive immunity in invertebrates. — *Trends in Immunology* 27: 493-496.
- Köning, C. & Schmid-Hempel, P. 1995: Foraging activity and immunocompetence in workers of the bumble bee, *Bombus terrestris* L. — *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 260: 225-227.
- Lamberty, M., Zachary, D., Lanot, R., Bordereau, C., Robert, A.I., Hoffmann, J.A. & Bulet, P. 2001: Constitutive expression of a cystein-rich antifungal and a linear antibacterial peptide in a termite insect. *Journal of Biological Chemistry* 276:4085-4092.
- Lavine, M.D., Chen, G. & Strand, M.R. 2005: Immune challenge differentially affects transcript abundance of three antimicrobial peptides in hemocytes from the moth *Pseudoplusia includens*. — *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 1335-1346.
- Lemaitre, B., Reichhart, J. & Hoffmann, J.A. 1997: *Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. — *Proceedings of National Academy of Sciences of U.S.A.* 94: 14614-14619.
- Little, T.J., Hultmark, D. & Read, A., F. 2005: Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. — *Nature Immunology* 6: 651-654.
- Little, T.J. & Kraaijeveld, A.R. 2004: Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates. — *Trends in Ecology & Evolution* 19: 58-60.
- Little, A.E.F., Murakami, T., Mueller, U., G. & Currie, C.R. 2006: Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens — *Biology letters* 2:12-16.
- Little, T.J., O'Connor, B., Colegrave, N., Watt, K. & Read, A.F. 2003: Maternal Transfer of Strain-Specific Immunity in an Invertebrate. — *Current Biology* 13: 489-492.
- Lively, C. M. & Jokela, J. 2002: The temporal and spatial distributions of parasites and sex in a freshwater snail. — *Evolutionary Ecology Research* 4:219-226.
- Loker, E.S., Adema, C.M., Zhang, S. & Kepler, T.B. 2004: Invertebrate immune systems - not homogenous, not simple, not well understood. — *Immunological Reviews* 198: 10-24.
- Meylaers, K., Cerstiaens, A., Vierstraete, E., Baggerman, G., Michiels, C.W., De Loof, A. & Schoofs, L. 2003: Antimicrobial Compounds of Low Molecular Mass are Constitutively Present in Insects: Characterisation of β -Alanyl-Tyrosine. — *Current Pharmaceutical Design* 9: 159-174.
- Moret, Y. 2001: Evolutionary ecology and adaptiveness of immune defenses of the social insect *Bombus terrestris* (L.) – Vaitöskirja. ETH-Zürich. 91 s.
- Moret, Y. & Schmid-Hempel, P. 2000: Survival for Immunity: The Price of Immune System Activation for Bumblebee Workers. — *Science* 290: 1166-1168.

- Moret, Y. & Schmid-Hempel, P. 2001: Facultative increase of offspring innate immune response after paternal challenge in an insect. — *Nature* 414: 506.
- Moret, Y. & Schmid-Hempel, P. 2004: Social life-history response to individual immune challenge of workers of *Bombus terrestris* L.: a possible new cooperative phenomenon. — *Ecology Letters* 7: 146-152.
- Moret, Y. & Siva-Jothy, M., T. 2003: Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. — *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: 2475-2480.
- Naug, D. & Camazine, S. 2002: The Role of Colony Organization on Pathogen Transmission in Social Insects. *Journal of Theoretical Biology* 215:427-439.
- Owens, I.P.F. & Wilson, K. 1999: Immunocompetence: a neglected life history trait or conspicuous red herring?— *Trends in Ecology & Evolution* 14: 170-172.
- Pie, M.R., Rosengaus, R.B. & Traniello, J.F.A. 2004: Nest architecture, activity pattern, worker density and the dynamics of disease transmission in social insects. *Journal of Theoretical Biology* 226:45-51.
- Rantala, M.J. & Roff, D.A. 2006: Analysis of the importance of genotypic variation, metabolic rate, morphology, sex and development time on immune function in the cricket, *Gryllus firmus*. — *Journal of Evolutionary Biology* 19: 834-843..
- Reber, A., Castella, G., Christe, P. & Chapuisat, M. 2008: Experimentally increased group diversity improves disease resistance in an ant species. — *Ecology Letters* 11: 682-689.
- Rolff, J. & Siva-Jothy, M.T. 2003: Invertebrate Ecological Immunology. — *Science* 301: 472-475.
- Rose, R.I. & Briggs, J.D. 1969: Resistance to american foulbrood. IX. Effects of honey bee larval food on the growth and viability of *Bacillus* larvae — *Journal of Invertebrate Pathology* 13: 74-80.
- Roth, O., Sadd, B.M., Schmid-Hempel, P. & Kurtz, J. 2009: Strain-specific priming of resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. — *Proc. R. Soc. B* 276: 145-151.
- Rowley, A.F. & Powell, A. 2007: Invertebrate Immune Systems Specific, Quasi-Specific, or Nonspecific?— *Journal of Immunology* 179: 7209-7214.
- Ryder, J. 2003: Immunocompetence: an overstretched concept?— *Trends in Ecology & Evolution* 18: 319-320.
- Sadd, B.M. & Schmid-Hempel, P. 2006: Insect Immunity Shows Specificity in Protection upon Secondary Pathogen Exposure — *Current Biology* 16: 1206-1210.
- Sandland, G.J. & Minchella, D.J. 2003: Costs of immune defense: an enigma wrapped in an environmental cloak?— *Trends in Parasitology* 19: 571-574.

- Schmid-Hempel, P. 1994: Infection and colony variability in social insects. — *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 346: 313-321.
- Schmid-Hempel, P. 2005a: Evolutionary Ecology of Insect Immune Defenses. — *Annual Review of Entomology* 50: 529-551.
- Schmid-Hempel, P. 2005b: Natural insect host-parasite systems show immune priming and specificity: puzzles to be solved. — *BioEssays* 27: 1026-1034.
- Schmid-Hempel, P. & Ebert, D. 2003: On the evolutionary ecology of specific immune defence. — *Trends in Ecology & Evolution* 18: 27-32.
- Schulenburg, H., Boehnisch, C. & Michiels, N.K. 2007: How do invertebrates generate a highly specific innate immune response?— *Molecular Immunology* 44: 3338-3344.
- Shirasu-Hiza, M.M. & Schneider, D.S. 2007: Confronting physiology: how do infected flies die?— *Cellular Microbiology* 9: 2775-2783.
- Siva-Jothy, M.T., Moret, Y. & Rolff, J. 2005: Insect Immunity: An Evolutionary Ecology Perspective. *Advances in Insect Physiology* 32: 1-48.
- Stow, A., Briscoe, D., Gillings, M., Holley, M., Smith, S., Leys, R., Silberbauer, T., Turnbull, C. & Beattie, A. 2007: Antimicrobial defences increase with sociality in bees. — *Biology Letters* 3: 422-424.
- Taguchi, S., Bulet, P. & Hoffmann, J.A. 1998: A novel insect defensin from the ant *Formica rufa*. — *Biochimie* 80: 343-346.
- Tella, J.L. 2002: The evolutionary transition to coloniality promotes higher blood parasitism in birds. — *Journal of Evolutionary Biology* 15: 32-41.
- Thorne, B.L. & Traniello, J.F.A. 2003: Comparative social biology of basal taxa of ants and termites. — *Annual Review of Entomology* 48: 283-306.
- Tincu, J.A. & Taylor, S.W. 2004: Antimicrobial Peptides from Marine Invertebrates. — *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 3645-3654.
- Traniello, J.F.A., Rosengaus, R.B. & Savoie, K. 2002: The development of immunity in a social insect: Evidence for the group facilitation of disease resistance. — *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 6838-6842.
- Tzou, P., De Gregorio, E. & Lemaitre, B. 2002: How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host–pathogen interactions. — *Current Opinion in Microbiology* 5: 102-110.
- Ugelvig, L.V. & Cremer, S. 2007: Social Prophylaxis: Group Interaction Promotes Collective Immunity in Ant Colonies. — *Current Biology*, 17: 1967-1971.
- Van Valen, L. 1973: A new evolutionary law. — *Evololutionary Theory* 1: 1-30.

Vilmos, P. & Kurucz, É. 1998: Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. — *Immunology Letters* 62: 59-66.

Wilson, K., Cotter, S.C., Reeson, A.F. & Pell, J.K. 2001: Melanism and disease resistance in insects. — *Ecology Letters* 4: 637-649.

Wilson-Rich, N., Dres, S.T. & Starks, P.T. 2008: The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). — *Journal of Insect Physiology* 54: 1392-1399.

Väänänen, S., Kortet, R. & Rantala, M.J. 2006: Dominance and immune function in the F1 generation of wild caught field crickets. — *Behaviour* 143: 701-712.

Zuur, A.F., Ieno, E.N., & Smith, G.M. 2007: *Analysing Ecological Data*. Springer-Verlag, Berliini. 685 ss.

Liitteet

Liite 1: Tutkittavat pesät varsinaisessa kokeessa

Paikka	Pesä	Haettu
Joskär	J2	13.7., 24.7., 30.7.
	J31	13.7., 25.7.
Furuskär	F9	13.7., 30.7.
	F35	13.7., 24.7., 30.7.
	F72	13.7., 30.7.
	F73	12.7., 22.7.
	F76	13.7., 30.7.
	F103	12.7., 28.7.
	F110	13.7., 28.7.
Öby	F113	13.7., 28.7.
	Polygyninen pesä, josta kaksi rinnakkaista sarjaa käsittelyitä	31.7.

Liite 2: Käytetyt reseptit liuoksiin

Agar 1%

- 5 grammaa ravintosekoitetta Nutrient Broth (Merck KGaA, Damstadt, Saksa)
- 2,5 grammaa hiivatiivistettä (Scharlau Microbiology, Barcelona, Espanja)
- 10 grammaa agaria (Scharlau Microbiology, Barcelona, Espanja)
- 1 litra vettä

Steriloidaan autoklaavissa 25 minuuttia, 121 astetta.

PBS (pH 7,4)

- 2,314 grammaa kaliumdivetyfosfaattia (KH_2PO_4)
- 7,384 grammaa dinatriumvetyfosfaattia (Na_2HPO_4)
- 87,66 grammaa natriumkloridia (NaCl)
- 1 litra vettä

Steriloidaan autoklaavissa 25 minuuttia, 121 astetta.

NB

- 10 grammaa ravintosekoitetta Nutrient Broth
- 1,25 grammaa hiivatiivistettä
- 1 litra vettä

Steriloidaan autoklaavissa 25 minuuttia, 121 astetta.

Muurahaisten ruoka (Bhatker-Whitcomb)

- 0,5 litraa vettä
- 5 grammaa agaria
- 1 kananmuna
- 2-3 ruokalusikallista hunajaa

Sekoitetaan agar kiehuvaan veteen. Annetaan jäähtyä hieman ja sekoitetaan loput aineet mukaan.

Liite 3: Bakterikantojen alkuperä

Jouni Laakson tutkimusryhmän kautta hankittiin seuraavat Yhdysvalloista ostetut bakterikannat (American Type Culture Collection) sekä Belgiasta ostettiin suoraan yksi bakterikanta (Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms / Laboratorium voor Microbiologie, Gentin yliopisto):

Bakteeri	Alkuperä	Kannan tunniste
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC	13525
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC	4698
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC	13880
<i>Arthobacter globiformis</i>	BCCM/LMG	3813

Liite 4: Varsinaisen kokeen näytteet pesittäin ja käsittelyittäin

Pesä	Käsittely	2 päivää	1 viikko	2 viikkoa
J2	C	5	3	3
	D	10	0	6
	L	10	0	3
	WC	10	2	1
	WD	10	4	4
J31	C	6	5	6
	D	1	0	0
	L	10	1	0
	WC	5	6	5
	WD	5	5	5
F9	C	10	1	0
	D	10	0	1
	L	5	3	2
	WC	10	0	8
	WD	10	0	3
F35	C	10	0	0
	D	10	0	5
	L	10	0	2
	WC	10	2	2
	WD	10	1	0
F72	C	5	6	6
	D	10	0	2
	L	10	0	0
	WC	5	3	3
	WD	0	0	0
F73	C	10	3	0
	D	10	2	3
	L	10	0	7
	WC	10	0	6
	WD	10	0	5
F76	C	10	0	7
	D	10	2	3
	L	10	1	1
	WC	5	5	4
	WD	10	0	10
F103	C	10	1	1
	D	5	1	2
	L	5	4	4
	WC	10	0	6
	WD	10	0	5
F110	C	10	3	3
	D	5	2	3
	L	3	4	3
	WC	5	0	8
	WD	10	3	2

F113	C	10	1	2
	D	10	1	2
	L	10	2	2
	WC	10	3	3
	WD	5	4	5
POLY1	C	10	0	2
	D	5	4	3
	L	5	3	5
	WC	5	7	6
	WD	5	6	4
POLY2	C	5	6	8
	D	5	6	5
	L	5	3	2
	WC	5	5	3
	WD	5	7	5
Yhteensä		459	126	212

Luvuista on poistettu kontaminoituneet näytteet

käsittely N		pesä N	
C	166	F103	64
D	144	F110	64
L	140	F113	65
WC	180	F35	62
WD	167	F72	50
		F73	76
		F76	77
		F9	62
		J2	71
		J31	59
		POLY1	75
		POLY2	72