

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

***Clostridium perfringens* identificēšana un
uzskaitīšana dzeramajā ūdenī ar fluorescentās *in situ*
hibridizācijas metodi**

Maģistra darbs

Autors: Jeļena Dzjubenko
Stud. apl. Nr. jz12035
Darba vadītājs: Dr.sc.ing. Asoc.prof. Linda Mežule

RĪGA 2017

SATURS

Ievads.....	6
1. Literatūras apskats	7
1.1. <i>Clostridium</i> spp. dzēramajā ūdenī.....	7
1.2. Bioplēve.....	8
1.3. <i>C. perfringens</i> sporulēšana un enterotoksīna producēšana	9
1.4. Sporu ģerminācija.....	11
1.5. Metodes <i>Clostridium</i> identificēšanai.....	12
1.5.1. Pavairošana mikrobioloģiskajā barotnē	12
1.5.2. Molekulārās bioloģiskās metodes	13
1.5.2.1. Polimerāzes ķēdes reakcija (PCR).....	13
1.5.2.2. Imunoloģiskās metodes	14
1.5.2.3. Fluorescentā <i>in situ</i> hibridizācija.....	15
2. Materiāli un metodes	20
2.1. Iekārtas	20
2.2. Materiāli un trauki	20
2.3. Reaģenti.....	21
2.4. Reaktīvi	22
2.5. Mikroorganismu kultūras	22
2.6. Zondes	22
2.7. Šķidrās klostrīdiju barotnes pagatavošana	23
2.7.1. Agarizētas barotnes pagatavošana un kultūras iegūšana.....	23
2.8. Sporulācijas barotņu pagatavošana	23
2.9. Sporu krāsošana ar malahīta zaļo	25
2.10. Fluorescentā <i>in situ</i> hibridizācija.....	25
2.10.1. Kultūru iegūšana	25
2.10.2. Fiksācija	26
2.10.3. Permeabilizācija.....	26
2.10.4. Hibridizācija.....	26
2.10.5. Mazgāšana.....	26
2.10.6. Krāsošana ar DAPI	27
2.11. <i>Clostridium perfringens</i> šūnu/ sporu skaita noteikšana un mikroskopēšana	27
2.12. <i>Clostridium</i> kopējā skaita noteikšana.....	28
2.13. <i>Clostridium</i> fluorescences intensitātes noteikšana	28
2.14. Bioplēves audzēšana.....	28
2.15. <i>Clostridium perfringens</i> šūnu/ sporu skaita noteikšana un mikroskopēšana bioplēvē	30
2.16. Kupona virsmas apstrāde ar ultraskaņu.....	31
2.17. DNS izdalīšana un PĶR veikšana	31
2.18. Datu statistiskā analīze	32
3. Rezultāti un diskusija.....	33
3.1. Sporu iegūšana	33

3.2. Fluorescentā <i>in situ</i> hibridizācija.....	40
3.3. Permeabilizācijas protokola izstrāde <i>Clostridium perfringens</i> sporu identificēšanai ar FISH.....	44
3.4. <i>Clostridium perfringens</i> sporu un šūnu identificēšana bioplēvē.....	54
4. Secinājumi	59
5. Pateicības	60
6. Literatūras saraksts	61
Pielikumi	69

KOPSAVILKUMS

Sporu-veidojošā *C. perfringens* ir nozīmīgs organisms ūdens vidē, ko izmanto kā indikatororganismu dzeramā ūdens kvalitātes noteikšanai. Turklāt šī baktērija un tās sporas ir noderīgas, lai brīdinātu par citu stresa rezistentu patogēnu iespējamo klātbūtni dzeramajā ūdenī. Atbilstoši Ministru kabineta noteikumiem Nr. 235, *Clostridium perfringens* noteikšanai un uzskaitē jāizmanto membrānfiltrācija un tālāka mikroorganismu kultivēšana. Tomēr izpētīts, ka kultivēšanas metodes nespēj identificēt ūdenī esošus nekultivējamus bet dzīvotspējīgus mikroorganismus (VBNC). Fluorescentā *in situ* hibridizācija (FISH), nodrošina baktēriju identificēšanu to dabiskā vidē, un var būt izmantojama, ka alternatīvā metode. Taču standarta FISH protokols nav piemērots baktēriju sporu identificēšanai. Tas ir skaidrojams ar to, ka *C. perfringens* sporas ir ļoti izturīgas pret dažādiem nelabvēlīgiem apstākļiem, to starp dezinfekciju, UV apstarošanu, ķīmisko vielu apstrādi, kā arī pret dažādām caurlaidību pastiprinošām procedūrām. Līdz ar to *C. perfringens* sporas var ilgstoši saglabāties ūdens apgādes sistēmā neidentificētas.

Šajā pētījumā izstrādātais permeabilizācijas protokols, kur sporas jāinkubē 30 minūtes (70°C) 5% nātrija dodecilsulfāta un 50 mM detiotreitola maisījumā, ar tālāko 15 minūtes (37°C) 10 mg/ml vai 20 mg/ml lizocīma apstrādi, palielināja *C. perfringens* sporu fluorescences intensitāti deviņas reizes, kur sporu fluorescences sasniedza 1800 RLU. Apvienojot izstrādāto permeabilizācijas protokolu ar Fluorescento *in situ* hibridizāciju, arī dabiskajos paraugos bija iespējams identificēt *Clostridium perfringens* veģetatīvas šūnas un sporas ar fluorescences intensitāti virs 1000 RLU.

Atslēgvārdi: Fluorescentā *in situ* hibridizācija, *Clostridium perfringens*, sporas, dzeramais ūdens.

SUMMARY

Spore-forming *Clostridium perfringens* has an important ecological role in aquatic environments and is used as an indicator of drinking water quality. According to ISO 14189:2013, the enumeration of vegetative cells and spores of *C. perfringens* is performed by the membrane filtration method, which is based on cultivation. This method is time consuming and can not enumerate nonculturable cells. An alternative method is fluorescence *in situ* hybridization (FISH) which allows *in situ* detection of target cells in their native environments without cultivation. Nevertheless, typical FISH protocol needs to be improved and modified if bacterial spores are to be detected. All *Clostridia* spores are extremely resistant to harsh conditions, including disinfection, chemicals and UV light, which means they can persist through the disinfection process and last for long periods in water supplies. At the same time fluorescent probe binding is limited due to reduced accessibility.

Since no universal or standard spore permeabilization procedure was available in the literature, the aim of this study was to develop an effective protocol to permeabilize *C. perfringens* spores in order to apply the FISH method. The most effective combination, 5% Sodium dodecyl sulfate and 50 mM Dithiothreitol mixture, with combination of 10 mg/ml Lysozyme treatment, allowed to obtain increased spore fluorescence signals and demonstrated a technology for the detection of *Clostridium* cells and spores in less than 6 hours. However, in comparison with alternative method (qPCR), FISH method demonstrated insufficient sensitivity, that prevented exact quantities determination of *C. perfringens* in biofilm.

Keywords: Fluorescent *in situ* hybridization, *Clostridium perfringens*, spores, drinking water.

IEVADS

Krāna ūdens tā sagatavošanas procesā tiek attīrīts no mikroorganismiem, tai skaitā patogēniem, tomēr tajā joprojām paliek noteikts baktēriju daudzums, kas ilgstoši uzturoties sadales sistēmā, var vairoties un izraisīt draudus patērētāju veselībai. Viens no bioloģiskā piesārņojuma avotiem var būt atsevišķas *Clostridium* ģints sugas, piemēram, *Clostridium perfringens* šūnas un sporas. Šī baktērija un tās sporas ir svarīgs, ūdens piesārņojuma rādītājs, kas ir noderīgs, lai brīdinātu par citu stresa rezistentu patogēnu iespējamo klātbūtni dzeramajā ūdenī. Atbilstoši Ministru kabineta noteikumiem Nr. 235 *Clostridium perfringens* noteikšanai un uzskaitē jāizmanto uz baktēriju kultivēšanu balstīta membrānfiltrācijas metode, kas var būt ļoti laukietilpīga.

Lai efektīvi aizsargātu patērētājus un uzlabotu izpratni par attīrīšanas un sadales sistēmām, ir nepieciešama ātra un precīza metode, kura varētu nodrošināt plašu dzeramā ūdens parametru monitoringu, tajā skaitā mikroorganismu koncentrāciju. Fluorescentā *in situ* hibridizācija (FISH) ļauj izcelt un vēlāk arī identificēt tikai interesējošos mikroorganismus, kā arī sniedz informāciju par to morfoloģiju un skaitu. Līdz ar to šī krāsošanas tehnika ļauj identificēt baktērijas bez iepriekšējas kultivēšanas un tādējādi, samazina noteikšanas laiku līdz dažām stundām. Tomēr FISH metode nav piemērota baktēriju sporu identificēšanai. Galvenokārt tas ir saistīts ar īpašu sporu izturību pret parastajām permeabilizācijas metodēm. Tāpēc ir nepieciešama jauna metodika, kas ļautu *C. perfringens* gan šūnu, gan tas sporu efektīvu identificēšanu dzeramā ūdenī un bioplēvē paraugos.

Maģistra darba mērķis:

Clostridium perfringens sporu un veģetatīvo šūnu identificēšana ūdenī un bioplēvē ar FISH metodi.

Darba uzdevumi:

1. Pielāgot fluorescento *in situ* hibridizācijas metodi *Clostridium perfringens* veģetatīvo šūnu un sporu identificēšanai.
2. Izstrādāt permeabilizācijas protokolu *Clostridium perfringens* sporu sagatavošanai fluorescentai *in situ* hibridizācijai.
3. Identificēt *Clostridium perfringens* sporas dzeramajā ūdenī un bioplēvē ar izstrādāto metodi.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. *Clostridium* spp. dzeramajā ūdenī

No cilvēka veselībai bīstamiem mikroorganismiem dzeramajā ūdenī var būt sastopami *Legionella*, *Salmonella*, *Yersinia* ģints pārstāvji (Kahlisch et al. 2010), ka arī *Cryptosporidium*, *Campylobacter* (Girones et al. 2010), vai *Variovorax*, *Staphylococcus*, *Bosea*, *Ralstonia* ģintis (Lee et al. 2010). Starp tiem samērā bieži ir novērojamas arī *Clostridium* ģints baktērijas (Долгоносков 2006).

Viens no *Clostridium* ģints pārstāvjiem, kas var būt sastopams dzeramajā ūdenī, ir *Clostridium perfringens*. Tā ir sulfitreducējoša, sporu veidojoša, anaeroba, Gram-pozitīva baktērija (Rozwadowska et al. 2013). *C. perfringens* un tās sporas ir sastopamas notekūdeņos, bet paši organismi ūdens vidē nevairojas. Šo pazīmi var izmantot kā fekālā piesārņojuma rādītāju (Yang et al. 2009), gan pirms, gan pēc dezinfekcijas (Maheux et al. 2013). Neapstrādātā ūdenī, šo baktēriju līmenis parasti tiek noteikts, lai izvērtētu mikrobioloģiskā piesārņojuma pieauguma risku (Kay et al. 2012, Ryzinska-Paier et al. 2011). Sporu klātbūtne dzeramajā ūdenī var norādīt uz attālinātu vai neregulāru piesārņojuma avotu. Tā kā klostrīdiju sporas ir ļoti izturīgas pret dažādiem nelabvēlīgiem apstākļiem, tostarp dezinfekciju, ķīmisko vielu apstrādi un UV gaismas apstarošanu, tās var saglabāties ilgu laiku ūdens apgādes sistēmā (Smeets et al. 2006, Figueras et al. 2010). Tādējādi tas ir svarīgs ūdens piesārņojuma rādītājs, kas ir noderīgs, lai brīdinātu par citu stresa rezistentu patogēnu iespējamo klātbūtni (Savichtcheva et al. 2006). Atšķirībā no mazāk izturīgajām koliformām (*E. coli*, enterokoki), kuras izmanto kā fekālā piesārņojuma rādītājus (Deshmukh et al. 2016), *C. perfringens* piemīt cita priekšrocība- spēja izdzīvot ilgāk pēc termiskās un ķīmiskās apstrādes (Ryzinska-Paier et al. 2011). *C. perfringens* sporas ir piemērots rādītājs cilvēka zarnu vīrusu, *Giardia* oocistu un *Cryptosporidium* oocistu, izsekošanai ūdens apgādes sistēmās (Muller-Spitz et al. 2010). Klostrīdiju sporām un oocistām ir līdzīgi izmēri, kā arī tām ir līdzīga izturība pret hloru (Adcock et al. 2001), tāpēc klostrīdijas var būt noderīgs indikators dezinfekcijas efektivitātes novērtēšanai. Ja tās atklāj tūlīt pēc dzeramā ūdens apstrādes, ir jāizvērtē filtrēšanas efektivitāte. Pati *C. perfringens* ūdens vidē cilvēkam nav bīstama, tomēr, ja baktēriju saturošais ūdens nonāks saskarsmē ar pārtiku, ir iespēja saindēties (Enan et al. 2006). Sporulācijas laikā, cilvēka zarnu traktā, baktērija veido olbaltumvielu enterotoksīnu, kā rezultātā var rasties zarnu trakta iekaisums, stipras vēdersāpes, caureja un citi simptomi (Rhodehamel et al. 2001). Tomēr, *C. perfringens* izmantošanai par indikatororganismu, ir savi trūkumi, ņemot vērā to

ilgtermiņa dzīvotspēju, un plašu izplatību ūdenī, ir iespējami viltus trauksmes signāli (Figueras et al. 2010). *C. perfringens* sporas var atklāt pat lielā attālumā no piesārņojuma vietām, kas norāda, uz attālinātu vai veco fekālo piesārņojumu. Turklāt to koncentrācija atšķiras starp dažādām dzīvnieku sugām, piemēram, liellopu, zirgu un aitu ekskrementos šī baktērijas daudzums ir mazāks, salīdzinot ar cilvēka ekskrementiem (Savichtcheva et al. 2006).

Latvijā dzeramā ūdens obligātās nekaitīguma un kvalitātes prasības tiek noteiktas atbilstoši Ministru kabineta noteikumiem Nr. 235. Dzeramais ūdens nedrīkst saturēt mikroorganismus, parazītus un vielas tādā daudzumā (skaitā vai koncentrācijā), kas rada draudus patērētāju veselībai. Sekojot tiem, maksimāli pieļaujamā *Clostridium perfringens* norma dzeramā ūdenī (ieskaitot sporas) ir 0/ 100 ml. Kopumā, *C. perfringens* izmantošana par piesārņojuma radītāju, galvenokārt, balstās uz augsto šī mikroorganisma sporu izturību pret dezinfekciju, salīdzinot ar koliformām vai citiem ūdenī esošiem, cilvēkiem bīstamiem mikroorganismiem. Tādejādi, klostrīdiju sporas ļauj konstatēt ne tikai attālo vai punktveida fekālo piesārņojumu, bet arī novērtēt dezinfekcijas procesa kvalitāti, ka arī norādīt uz vīrusu un/ vai cistu inaktivāciju gatavā dzeramā ūdens.

1.2. Bioplēve

Lai ilgstoši saglabātos nestabilā vidē, *C. perfringens*, un dažām citām baktērijām, jābūt kādam mehānismam, lai pārvarētu vides stresa apstākļus, tādus kā: skābeklis, izžūšana vai baktericīdie savienojumi. Ilgtermiņa rezistence pret nelabvēlīgiem apstākļiem parasti noved pie endosporu veidošanas. Kaut endosporas ir ļoti izturīgas pret dažādām stresa apstākļiem, piemēram, skābekli, bada, UV apstarošanu, un izžāvēšanu, sporulācijas process patērē diezgan daudz enerģijas (Obana et al. 2014). Endosporas pastāv neaktīvā stāvoklī, un baktērijas nevar ātri pielāgoties vides izmaiņām. Mikroorganismu bioplēve ir dominējošais brīvu baktēriju stāvoklis dabā (Varga et al. 2008). Bioplēve ir baktēriju populācija, kas ir iekapsulēta ārpus šūnu matricā (EPS), kas savukārt sastāv no polisaharīdiem, nukleīnskābēm un proteīniem (Flemming et al. 2010). Mikroorganismu bioplēves nodrošina lielāku baktēriju noturību pret oksidatīvo stresu, pret antibiotikām vai citiem baktericīdiem aģentiem (Momba et al. 2000).

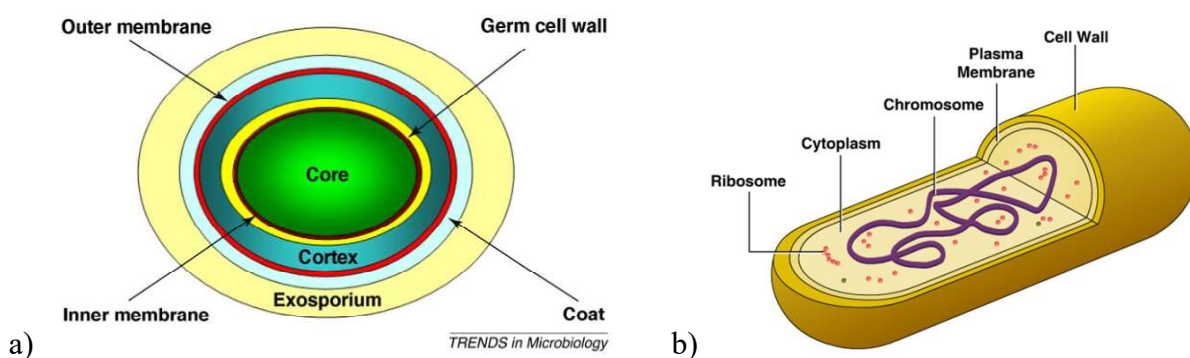
Pētījumi parādījuši, ka *Clostridium perfringens* ir attīstījusies spēja veidot bioplēvi, kas sniedz līdzīgu aizsardzību pret stresu, kā endosporas, bet papildus tam, baktērijas var ātrāk pielāgoties vides izmaiņām (Varga et al. 2008, Charlebois et al. 2014). Tika konstatēts, ka *C. perfringens* ir spējīga izveidot 30 līdz 40 mikrometriem biezu bioplēvi uz

stikla un plastmasas virsmām, vai arī uz gaļas gabaliņa, pateicoties IV tipa piliem (TFP) un CcpA proteīnam, kas pirms tam bija novērots Gramnegatīvām baktērijām, bet agrāk netika konstatēts Grampozitīviem pārstāvjiem. Savukārt cits pētījums liecina, ka *C. perfringens* bioplēves veidošanā, ir galvenokārt iesaistīti IV tipa pili un glikozes koncentrācija (Charlebois et al. 2014). Tikpat veiksmīgi, šī baktērija spēj piesaistīties jau esošām bioplēvēm, apvienojoties kopā ar citiem oportunistiskiem patogēniem un fekāliem indikatororganismiem, sastopamiem dzeramā ūdens bioplēvē (Farkas et al. 2012). Obana et al. pētījumā tika novērots, ka *C. perfringens* spēj veidot dažādu struktūru bioplēves, atkarībā no temperatūras. Proti, pie 37° C, šūnas piesaistās blīvi uz substrāta virsmas, kas veido plakanu, plānu bioplēvi. Taču 25° C temperatūrā, adhēzija nav novērojama, un tiek veidota viskoza, bieza plēvīte, kas tikai nedaudz atgādina bioplēvi. Turklāt sporulācijas transkripcijas faktori Spo0A un AbrB, līdz ar toksīnu regulatoru CtrAB ir nepieciešami, IV tipa pili regulēšanai un ārpus šūnu matricas veidošanai. Tie savukārt veicina atšķirīgo bioplēves morfoloģijas veidošanu, atkarībā no temperatūras. Tādejādi, *C. perfringens* bioplēves strukturālās izmaiņas ir iesaistītas gan sporulācijas procesā, gan arī toksīnu ražošanā, un, visticamāk, ir arī saistītas ar šī organisma patogēnēzi (Obana et al. 2014).

1.3. *C. perfringens* sporulēšana un enterotoksīna veidošana

Nelabvēlīgos apstākļos, piemēram, barības vielu trūkuma gadījumā, daudzie *Bacillales* un *Clostridiales* klases pārstāvji sāk sporulēt, radot neaktīvas un izturīgas sporas, kas var gadiem pastāvēt bez barības vielām (Mohapatra et al. 2012). Šī ekstrēmā stabilitāte ir izskaidrojama ar zemo ūdens saturu kodolā (ko nodrošina augsts kalcija jonu un dipikolīnskābes (DPA) saturs kodolā), īpašo DNS komplekciju, ļoti izturīgā, saspiestā veida (Abdelmassih et al. 2011), kā arī vairākiem, sporu aizsargājošiem slāņiem. Sporu struktūra ievērojami atšķiras no veģetatīvās šūnas (1. attēls). Visdziļākā slānī atrodas kodols, kas satur DNS, RNS un vairumu fermentu. Kodola zemais ūdens daudzums, proti ap 25-50% mitrumā, nosaka sporu pretestības īpašības (Parades-Sabja et al. 2011, Abel-Santos 2012). Apkārt kodolam ir ļoti blīva iekšējā membrāna, kurā lipīdi lielā mērā atrodas nekustīgā stāvoklī. Šai membrānai ir zema caurlaidība, kas nelaiž iekšā molekulas, pat ūdeni, tādejādi sporu kodolā esoša DNS tiek pasargāta no iespējamās kaitīgo ķīmikāliju iedarbības (Laflamme et al. 2009). Dīgļa šūnas sienas pamatā ir peptidoglikāna slānis – šī sienas struktūra kļūst par veģetatīvās šūnas sienu, sporai atsākot dzīvības procesu. Ārējā membrāna aptver sporas garozu, un, lai gan ārējai membrānai nav īpašas nozīmes caurlaidības barjeras veidošanā, tai ir svarīga nozīme sporas veidošanās procesā (Setlow

et.al 2006). Savukārt ārējo membrānu aptver olbaltumvielu apvalks, kas satur >50 sporu specifiskām olbaltumvielām, kas aizsargā sporu no ķīmiski aktīvām vielām un lītiskiem fermentiem (Setlow et al. 2006, Parades-Sabja et al. 2011). Dažām sugām, olbaltumvielu apvalks ir ārējais slānis un pēdējais aizsardzības slānis, tomēr ir sugas, kurām ir raksturīgs papildus – eksosporijs, kas ir virskārta, kurai ir loma sporu patoģenēzē (Abel-Santos 2012), starp šīm baktērijām ir *Clostridium sporogenes*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum 78A*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, (Filion et al. 2009, Stevenson et al. 1972).



1. attēls. a) Baktēriju sporu (Adaptēts no Trends in Microbiology, -19(2):85-94.) un b) šūnu uzbūve.

Figure 1. Structure of a bacterial a) spore and b) cell.

Turklāt sporu pretestības līmenis var atšķirties atkarībā no celma. Neskatoties uz to, ka sporu veidošanas process ir līdzīgs *Bacillales* un *Clostridiales* klasēm, nesen veiktie pētījumi apstiprinājuši, ka pastāv būtiskas atšķirības, gan starp sporulāciju izraisošām olbaltumvielām, gan starp signālu transdukcijas ceļiem (Parades-Sabja 2011). Tomēr, skābē šķīstošā sporu olbaltumviela (SASPs), kas var aizsargāt *Bacillus subtilis* sporas no karstuma bojājumiem un citiem vides faktoriem, spēlē līdzīgu lomu arī *C. perfringens* šūnās (Raju et al. 2006). Arī *C. perfringens* toksiskums ir saistīts ar enterotoksīna (CPE) veidošanu tieši sporulācijas laikā. Veģetatīvo šūnu sporulāciju, cilvēka organismā, veicina kuņģa skāba vide, kā arī žults sāļi. Attiecīgi nonākot līdz tievajai zarnai, veģetatīvas šūnas sāk sporulēt un izdalīt enterotoksīnu (CPE) (Juneja et al. 2010, Li et al. 2010). CPEgēns, kas sekmē saindēšanos ar pārtiku, parasti lokalizējas hromosomā (C-cpe), bet zarnu trakta slimību (GI disease) neizraisošs CPEgēns, parasti atrodas plazmīdā (P-cpe). *C. perfringens* celmi, kuri nes šo CPEgēnu uz hromosomām, ir aptuveni 60 reizes vairāk siltumaizturīgi, nekā plazmīdas gēni (Xiao et al. 2012, Byrne et al. 2006). Līdz ar to ir arī konstatētas

atšķirības starp sporu dīgšanas procesiem. Tajā laikā, kad KCl un, mazākā mērā, L-asparagīns aktivizē C-cpe dīgtspēju, L-alanīns un L-valīns, ir P-cpe sporu aktivatori. Neskatoties uz dažādiem dīgtspējas aktivatoriem, optimālā dīgšanās temperatūra, gan C-cpe, gan P-cpe sporām ir $\sim 40^{\circ}$ C, kas ir nedaudz augstāka par optimālo augšanas temperatūru (37° C) (Paredes-Sabja et al. 2008).

1.4. Sporu ģerminācija

Iestājoties labvēlīgiem apstākļiem, sporas dīgšanas (ģerminācijas) rezultātā atgriežas veģetatīvas šūnas stadijā. Endosporu ģerminācijas laikā, tās tiek pakļautas vairākām biofizikālām un strukturālajām izmaiņām, kas noved pie kodola rehidratācijas, metabolisma atjaunošanās (Mongkoltharuk et al. 2009). Sporu dīgšana ir būtisks process, lai neaktīvās sporas spētu ieņemt atpakaļ veģetatīvo šūnu stāvokli. Šī procesa mehānisms tiek stingri regulēts ar specifiskām olbaltumvielām, kas sintezējas sporu veidošanas laikā. Sporu dīgtspēju var stimulēt vairākas barības vielas, enzīmi un enerģijas avoti, visbiežāk tie ir aminoskābes, cukuri un purīna nukleozīdi (Hornstra et al. 2005, Laflamme et al. 2007). Tomēr, katrai baktēriju sugai ir atšķirīgas prasības pēc ģerminantiem, dažreiz atšķirības ir novērotas pat starp vienas sugas dažādiem celmiem (Abee et al. 2011).

Ģerminantus spēj uztvert specifiski receptori (GR). Ģerminācijas process sākas tūlīt pēc ģerminanta saistīšanās ar GR, kur tiek palaista neatgriezeniskā biofizisko un bioķīmisko reakciju virkne, kas noved pie sporas peptidoglikāna gārozās degradācijas, tādējādi tiek panākta kodola rehidratācija un metabolisma sākums (Olguin-Araneda et al. 2015). Ģerminantu molekulas piesaistās pie sporas iekšējās membrānas receptoriem, kas savukārt atbrīvo kodolā esošo dipikolīnskābi un katjonus, kuri tiek aizvietoti ar ūdens molekulām (Setlow 2003). Tālākais dīgšanas posms ir *crack-opening*, kas ļauj sasniegt attālākajos sporu slāņus. Neskatoties uz to, ka *Clostridium* sporas dīgšana parasti notiek aerobos apstākļos, skābekļa klātbūtne kavē topošo veģetatīvu šūnu attīstību.

Kaut arī sporu rRNS daudzums ir tādā pašā daudzumā, kā log fāzes šūnām (Filion et al. 2009), tomēr, lai tas būtu identificējamas, sporas vispirms ir jāsaprot. Viens no variantiem ir sporu permeabilizācija, kur sporu caurlaidība tiek panākta izmantojot īpašu permeabilizācijas buferi, vai arī ir jāierosina dīgšana (t.i. atjaunot veģetatīvu fāzi, kad sporas ir caurlaidīgas) (Laflamme et al. 2007, Filion et al. 2009). Ģerminācijas laikā, sporas zaudē tām raksturīgas pretestības īpašības, un var būt tikpat viegli nogalināmas stresa apstākļos, kā veģetatīvās šūnas (Olguin-Araneda et al. 2015, Laflamme et al. 2007).

1.5. Metodes *Clostridium* identificēšanai

1.5.1. Pavairošana mikrobioloģiskajā barotnē

Atbilstoši Ministru kabineta noteikumiem Nr. 235, *C. perfringens* šūnu un sporu noteikšanai un uzskaitēi jāizmanto membrānfiltrācijas metode, atbilstoši ISO 14189:2013 standart metodei. Šī metode sevī ietver trīs galvenos posmus: noteiktu ūdens daudzuma filtrēšanu (šajā gadījumā 100 ml ūdens paraugs), baktēriju koncentrēšanu uz filtra un baktēriju tālāku audzēšanu uz agara plates.

Speciālais TSC (tryptose-sulfite-cycloserine) agars var būt sagatavots kombinējot atsevišķus reaģentus, vai to arī var iegādāties gatavā veidā. Plates inkubē anaerobos apstākļos, pie $44 \pm 1^\circ \text{C}$, 21 ± 3 stundas. TSC agars papildus satur diferenciālus un selektīvus aģentus, starp tiem ir antibiotikas D-cikloserīns, kanamicīna sulfāts un polimiksīna B sulfāts, kas kavē citu organismu augšanu, bromkrezolsarkanais un fenoltaleīna difosfāts, kas palīdz identificēt klostrīdiju kolonijas. Izaugušās kolonijas uzskaita, pieņemamais koloniju daudzums skaitīšanai ir 30 līdz 300 kolonijas uz standarta 90 mm diametra agara plates (Maier et al. 2008). Neskatoties uz to, ka membrānu filtrācijas metode joprojām ir visplašāk pielietotā metode, dzeramā ūdens mikrobioloģiskās kvalitātes novērtēšanai, tai ir daudzi trūkumi, kuri traucē objektīvai ūdens kvalitātes novērtēšanai. Viens no pamatotiem iemesliem ir tas, ka tikai neliela daļa, no kopējā, ūdenī sastopamo, mikroorganismu skaita ir kultivējamas (Kay et al. 2012, Deshmukh et al 2016). Turklāt mikroorganismiem ir atšķirīgi, tiem optimālie, augšanas apstākļi, attiecībā uz barības vielām, temperatūru, inkubācijas laiku un citiem specifiskiem apstākļiem (Allen et al. 2004), kas būtiski ietekmē to efektīvu uzskaitīšanu.

ISO 14189:2013 metode ir paredzēta veģetatīvo šūnu uzskaitīšanai, tomēr ISO 6461-2:1986 standarta otrā daļa, ir piemērota tieši klostrīdiju sporu noteikšanai un uzskaitēi. Šo metodi ir iespējams izmantot visu veidu ūdeņu testēšanā, izņemot gadījumus, kad membrāna var aizturēt lielu daudzumu daļiņu, ko satur testējamais materiāls. Atšķirībā no minētas metodes, šīs metodes ietvaros pirmkārt ir jāveic sporu atlasīšana, izmantojot karstumu tādu laika periodu, ar kādu pietiek, lai iznīcinātu veģetatīvās šūnas. Ūdens parauga filtrācijai jāizmanto filtrs ar piemērotu poru izmēru, proti $0,2 \mu\text{m}$, lai aizturētu sporas uz tā. Pēc filtrācijas, filtrs jāievieto Petri traukā tālākai kultivēšanai. Sporu audzēšanai tiek izmantota speciāla vide (sulfīts-dzelzs-agars), turklāt tiek mainīti arī inkubēšanas temperatūra un laiks, sporas jākulturē anaerobi 44 ± 4 stundas, pie $37 \pm 1^\circ \text{C}$, kam seko visu melno koloniju saskaitīšana. Lai uzlabotu rezultātu atveidojamību, ir ieteicams

šķīdinātāju un kultūras vides sagatavošanā izmantot dehidratētas sastāvdaļas, vai pilnībā dehidrētu vidi (ISO 2013).

Klasiski sporu identificēšanai tiek izmantota kultivēšanas metode, bet koloniju veidojošo vienību uzskaitījums uz agara plates, ir piemērots tikai viegli kultivējamiem mikroorganismiem. Kultivēšanas metode nespēj pienācīgi novērtēt dzīvotspējīgo endosporu daļu, ka arī dzīvotspējīgas, bet nekultivējamas šūnas un/ vai sporas (Mohapatra et al. 2012).

1.5.2. Molekulārās bioloģiskās metodes

Ir zināmas daudzas dzeramā ūdens sagatavošanas metodes, bet neviena no tām negarantē pilnīgu ūdens atbrīvošanu no mikroorganismiem. Tradicionālās ūdens dezinfekcijas metodes, tādas kā hlorēšana, var neitralizēt dažādus patogēnus, un nepatogēnus mikroorganismus dzeramā ūdenī, ieskaitot koliformas, kā arī dzelzs, mangāna un sēra baktērijas (Skipton et al.2007). Tomēr, ir zināms, ka atsevišķi hlora rezistenti mikroorganismi, piemēram, *Giardia* spp. un *Cryptosporidium* spp., kā arī klostrīdiju sporas, var saglabāt savu dzīvotspēju (Kahlisch et.al 2010). Līdz ar to, ūdenī, stresa apstākļos, daļa no patogēniem vai fakultatīvi patogēniem mikroorganismiem, piemēram, *Pseudomonas* spp., *Mycobacter* spp., *Campylobacter* spp., *Legionella* spp., *Helicobacter* vai *Salmonella* spp. var nonākt nekultivējamā, bet dzīvotspējīgā stāvoklī (viable but non-culturable state, VBNC) (Ramirez-Castillo et al. 2015, Deshmukh et al 2016). Atrodoties VBNC stāvoklī, mikroorganismi nav kultivējami mikrobioloģiskajās barotnēs, tomēr saglabā savu metabolisko aktivitāti (Mežule L. 2011). Tieši tāpēc ir diezgan svarīgi ātri un precīzi identificēt ūdenī esošos organismus, lai kontrolētu tā kvalitāti.

1.5.2.1. Polimerāzes ķēdes reakcija (PCR)

Lielākā daļa pašreiz izmantojamo testu, ūdens patogēnu identificēšanai, balstās uz nukleīnskābes noteikšanu, viena no šīm metodēm ir PCR (Ramirez-Castillo et al. 2015), ko var izmantot gan vides, gan klīnisko, gan arī pārtikas paraugu analizēšanai (Baeumner et al. 2004). Tās galvenā priekšrocība ir specifiskums un augsta jutība (Lemmon et al. 2008). Chankhamhaengdech et al. pētījumā, ar PCR pārbaudi izdevās konstatēt gan atšķirīgus *Clostridium difficile* ribotipus, gan arī citus *Clostridium* spp. pārstāvjus (ieskaitot *C. septicum*, *C. glycolicum*, *C. perfringens*, *C. tetani*, *C. sordellii*, *C. sporogenes*, un *C. botulinum*), ar 100% specifiskumu, ar spēju atklāt ~ 22 genomu kopiju skaitu, uz vienu

PCR reakciju (Chankhamhaengdech et al. 2013). Turklāt kvantitatīvā PCR (qPCR) metode, ko raksturo augsts jutīgums, specifiskums, efektivitāte un salīdzinoši ātra rezultātu iegūšana (Ramirez-Castillo et al. 2015, Ahmed et al. 2008), var būt izmantojama tādu ūdens patogēnu identificēšanai, kā *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, kuru starpā ir arī *Clostridium perfringens* (Rozwadowska et al. 2013, Ahmed et al. 2008). Reālā laika PCR metode ļauj noteikt mikroorganismu ģenētisko materiālu tieši no vides parauga, tomēr nespēj izšķirt starp dzīvām vai mirušām šūnām (Deshmukh et al. 2016, Rozwadowska et al. 2013). Citi PCR paņēmieni pamatojas uz CPA gēnu sekvenēšanas analīzi, kas kodē *C. perfringens*- alfa-toksīnu (cpa rtPCR- Reversās transkripcijas polimerāzes ķēdes reakcija). Kombinējot CPA rtPCR un CRENAME (mikroorganismu koncentrēšana un atgūšana, izmantojot nukleinskābes ekstrahēšanu un molekulāro bagātināšanu) metodes, ir iespējams identificēt *C. perfringens* sporas dzeramajā ūdenī. CRENAME+ CPA rtPCR metožu kombinācija ir spējīga konstatēt vienu *C. perfringens* šūnu, 100 ml dzeramā ūdens paraugā, mazāk nekā 5 stundu laikā, kamēr m-CP agara metodei, rezultātu sasniegšanai, bija nepieciešamas ~ 25 stundas (Maheux et al. 2013). Taču galvenais šīs metodes trūkums ir tīra sākotnējā parauga nepieciešamība, līdz ar to parasti tiek izmantotas sarežģītas un dārgas iekārtas (Morel et al. 2012). Multiplexa PCR (mPCR) ļauj vienlaikus atklāt vairākus mērķa organismus paraugā vienas reakcijas laikā, kodējot dažādu patogēnu specifiskus gēnus. Tomēr tas prasa precīzu prameru izmantošanu, kā arī optimālu reakcijas maisījumu, lai izvairītos no riska iegūt viltus pozitīvu un/ vai negatīvu rezultātu (Ramirez-Castillo et al. 2015).

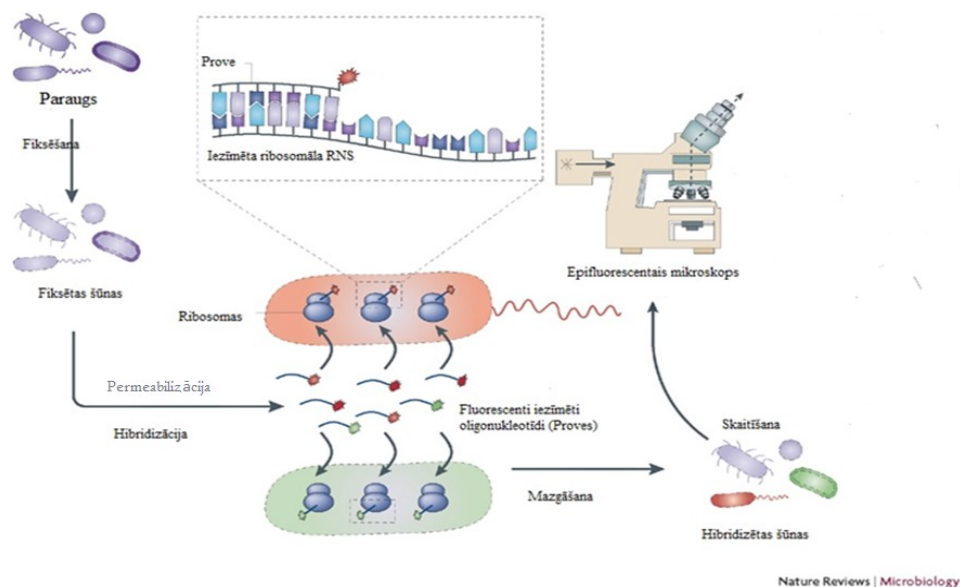
1.5.2.2. Imunoloģiskās metodes

Imunoloģiskās metodes, piemēram, enzīmu imūnsorbcijas tests (ELISA), imunofluorescences analīze (IFA), ka arī seruma neitralizācijas tests (SNTs) var būt izmantojams ūdenī esošo patogēnu atklāšanai (Deshmukh et al. 2016). Imunoloģiskais tests ir diezgan ātra un viegli pielietojama metode, sporu identificēšanai, kas izmanto antivielas, kas ir vērstas pret sporu virsmas antigēniem, bet tam bieži trūkst specifiskuma, attiecībā uz radniecīgām sugu sporām (Morel et al. 2012). Uzlabotie imūnhromatografijas testi, piemēram, sānu plūsmas imūnanalīze (LFIA), arī tiek izmantoti sporu identificēšanai (Wang et al. 2015).

1.5.2.3. Fluorescentā *in situ* hibridizācija

Fluorescentā *in situ* hibridizācija (FISH), ir krāsošanas tehnika, kas ļauj ātri un precīzi identificēt baktērijas to dabiskā vidē. FISH ne tikai ļauj konstatēt kultivējamus mikroorganismus, bet arī nekultivējamus (Girones et al. 2010), un tādējādi var palīdzēt izprast sarežģītas mikroorganismu populācijas veidošanos (Ramirez-Castillo et al. 2015). Atšķirībā no citām metodēm, FISH ļauj izcelt un vēlāk arī atrast tikai interesējošās kultūras, kā arī sniedz informāciju par baktēriju morfoloģiju, skaitu, un to sadalījumu telpā (Domanska et al. 2014, Nistico et al. 2009). FISH sniedz detalizētu priekšstatu par mikrovidi un neprasa selektīvās attīrīšanas vai amplifikācijas soļus. To plaši izmanto vides daudzveidības izpētes jomā, piemēram, bioplēves (Almeida et al. 2011), aktīvo dūņu vai notekūdeņu paraugu analīzei (Deshmukh et al. 2016, McIlroy et al. 2015). Hibridizācijas tehnikā, par mērķa molekulu, bieži izmanto 16S RNS molekulu (Ichijo et al. 2010). Tai piemīt augsta ģenētiskā stabilitāte, kā arī 16S RNS ir atrodama visos prokariotiskajos organismos, tai ir raksturīgs liels kopiju skaits. Šī ribonukleīnskābe nodrošina ļoti vieglu un precīzu identifikāciju vairumam mikroorganismu, kas ir īpaši svarīgi strādājot ar jauktām baktēriju populācijām, vai ar vēl neapraštiem organismiem (Moter et al. 2000). FISH procedūra notiek sekojoši (2. attēls): vispirms mikroorganismus apstrādā ar piemērotu ķīmisko fiksācijas līdzekli, Gramnegatīvām baktērijām visbiežāk tiek izmantots 3-4% paraformaldehīda vai formaldehīda šķīdums, un 50% etanols Grampozitīvām baktērijām (Domanska et al. 2014). Hibridizācija notiek saskaņā ar stingriem nosacījumiem šķīdumā, kur ir pievienotas oligonukleotīdu zondes. Stingrība tiek panākta ar hibridizācijas temperatūras un bufera sastāva izmaiņām, it īpaši sāls koncentrācijas izmaiņām (Nistico et al. 2009). Formamīdu bieži lieto, lai palielinātu bufera stingrību (Remacle 2004). Oligonukleotīdu zondes parasti ir 15-25 nukleotīdu garas, un tiek kovalenti marķētas ar fluorescējošu krāsu, 5' vai 3' galā. Pēc mazgāšanas, iekrāsotās šūnas tiek vizualizētas ar epifluorescences mikroskopu (Wagner et al. 2003). Fluorescentā mikroskopa darbības princips pamatojas uz fotoluminiscences parādību. Izmeklēšanas objekts tiek apstarots ar monohromatisku gaismu no lāzera, kas iet caur objekta virsmu, atstarotā gaisma iet atpakaļ caur objektīvu okulārā. Mikroskopā var redzēt tikai tas parauga daļas, kas rada fotoluminiscenci izvēlētajā viļņa garuma diapazonā (Drummen et al. 2012). Ja objektam nepiemīt dabiska luminiscence, tad laboratorijas pētījumos jāizmanto speciālas fluorescējošas krāsvielas. Klasiski tiek izmantots fluoresceīna izotiocianāts (FITC), 4'-diamidino-2-fenilindol-dihidrochlorīds (DAPI), cianīni Cy3 un Cy5 (Moter et al. 2000). Ja mikroskops ir aprīkots ar daudzkrāsainu filtru komplektu, CCD kameru un piemērotu

programmatūru, var veikt manipulācijas ar attēlu un tā detalizētu analīzi. Taču paraugu analizēšana ar fluorescēto mikroskopu ir diezgan darbietilpīga. Šo trūkumu var novērst kombinējot FISH ar plūsmas citometriju, kas ļautu panākt ātru, automatizētu un kvantitatīvu analīzes veikšanu, jauktās baktēriju populācijās (Berney et al. 2008).



2. attēls. FISH metodes soļu secība. (Adaptēts no Nature Reviews Microbiology – 6: 339-348)

Figure 2. Stepsequence of FISHmethod.

FISH metodei var būt daži ierobežojumi, piemēram, paaugstināta fona fluorescence, mērķa šūnu nepieejamība un zema signāla intensitāte (Rastogi et al. 2012, Kubota 2013). Fluorescenti iezīmēto šūnu intensitāte bieži vien atrodas zem noteikšanas robežas vai zaudē to, augstas fona fluorescence līmeņa dēļ (Pernthaler et al. 2001, Almeida et al. 2011). Līdz ar to ir veikti uzlabojumi minēto problēmu risināšanai, tie ietver, spilgtāko fluorohromu izmantošanu, hloramfenikola apstrādi, kas palielina rRNS saturu baktēriju šūnās, hibridizāciju ar zondēm, kas pārvadā vairākus fluorohromus, un signāla pastiprināšanu ar reportieru enzīmu (Rastogi et al. 2012). Pēdējos gados veiktie pētījumi ieviesuši jaunas marķēšanas un noteikšanas metodes, kā arī parādījusies tendence apvienojot FISH ar citām metodēm, kas būtiski uzlabo tās jutīgumu un paplašina FISH potenciālu detektēt mikroorganismus (1. tabula) (Domanska et al. 2014). Dažos rakstos tika atzīts, ka klīniskajā diagnostikā, pārtikas drošības un mikrobiālas ekoloģijas nišās, FISH ierobežojumus iespējams pārvarēt izmantojot peptīdu nukleīnskābes (PNA) zondes, kas ir īsākas, parasti sastāv no 15 bp., kā arī uzrāda augstāku specifiskumu un jutību nekā parastās zondes (Almeida et al. 2011). Alexa fluorescējošas krāsvielas, kuras izmanto

signāla amplifikācijai, vai CARD-FISH kur mārrutku peroksidāzes izmantošana atvieglo baktēriju šūnu identificēšanu (Pavlekovic et al. 2009). Šī metode tika veiksmīgi piemērota jūras baktēriju, kā arī uz aļģem veidotas baktēriju bioplēves izpētei. Turklāt šī metode tiek izmantota kā alternatīva, rRNS bagātināšanai, izmantojot īslaicīgu kultivēšanu (Ferrari et al. 2006).

1. tabula

FISH metodes apvienošana ar citām metodēm, konkrētas problēmas risināšanai. (Adaptēts no –Environment Protection Engineering, 40(3): 151-161).

Table 1

Specific FISH problem solving by combining it with other methods.

Task	Problem	Solution
Probe design and evaluation	limited accessibility of probe target site	check in probeBase
		helper probes
		PNA probes
no pure culture available	determination of optimal hybridization conditions	clone-FISH
		digital image analysis
Detection in complex samples	low abundance	enrichment by filtration, flow cytometry, substrate addition
	target cells not detectable (low ribosome content)	CARD-FISH
		polyribonucleotide probes
	target cells not detectable (insufficient permeabilization)	PNA probes
		enzymatic pretreatment modification of fixation
bad signal/noise ratio		self-ligation probes
		polyribonucleotide probes
		CARD-FISH
Quantification in complex samples	biofilms/cell aggregates hamper manual counting	Spike-FISH
		digital image analysis
Analysis of general metabolic activity	ribosome content does not always correlate with activity	FISH/MAR
		FISH/BrdU
		rRNA open spacer probes
Analysis of specific function	phylogeny rarely reflects physiology	FISH/MAR
		FISH/BrdU + inhibitors of substrates
Phylogenetic assignment/sorting of rDNA clones		Clone-FISH + flow cytometry

Izmantojot FISH kombinācijā ar īslaicīgu filtru kultivēšanu (FISHFC), metode ir pielietojama dzīvotspējīgo mikroorganismu uzskaitīšanai. Tā ļauj ātri un precīzi uzskaitīt tikai interesējošās dzīvotspējīgās baktērijas no pārtikas un vides paraugiem (Shimizu et al. 2009). Pētījumā, kas tika veikts izmantojot FISHFC metodi, tika pārbaudīta oligonukleotīdu zondes CLP-180 (50-AAT GAT GAT GCC ATC TTT CAA CA-30)

piesaistīšanas spēja pie 16S rRNS mērķa molekulas, tiešai *C. perfringens* noteikšanai. Pētījuma rezultāti apstiprināja zondes specifiskuma atbilstību, pozitīvais rezultāts tika iegūts tikai *C. perfringens* gadījumā, pārējiem *Clostridium* spp. pārstāvjiem, pat tādiem, kā *Clostridium sardiniense* un *Clostridium baratii*, kas fenotipiski cieši saistīti ar *C. perfringens* un veido līdzīgas kolonijas, fluorescējošā krāsviela netika atrasta (Shimizu et al. 2009).

Chis 150 un ClostI&II zondes, nav tik specifiskas, un var būt izmantojamas plaša spektra *Clostridium* ģints pārstāvju identificēšanai. Chis150 ir piemērota *Clostridium histolyticum* grupas sugu noteikšanai (Franks et al. 1998), bet ClostI&II tiek izmantota *Clostridium* I un II grupu identificēšanai (Kusel et al. 1999) (sk. 2. pielikums).

Kaut ribosomālas RNS daudzums gan sporās, gan veģetatīvās šūnās ir līdzīgs (Laflamme et al. 2009, Filion et al. 2009), tomēr FISH metode, tās oriģinālajā veidā, nav piemērota baktēriju sporu identificēšanai (Weerasekara et al. 2013). Galvenokārt tas ir saistīts ar īpašu sporu izturību pret parastajām permeabilizācijas metodēm. Ja sporas apvalks būtu caurlaidīgs zondēm, būtu arī iespējams veiksmīgi veikt *in situ* marķēšanu ar fluorescētām zondēm (Filion et al. 2009). Viens no sporu necaurlaidības iemesliem ir saistīts ar vairākiem sporu apvalku slāņiem, kuri ietver eksosporiju, olbaltumvielu apvalku, garozu, un iekšējo membrānu (Paredes-Sabjaet al. 2011).

Joprojām nav pieejama atbilstoša literatūra, kā arī nav zinātnisko publikāciju klostrīdiju sporu identificēšanai, izmantojot FISH metodi. Tomēr, ir aprakstīti vairāki darbi, *Bacillus* sporu permeabilizācijas panākšanai. Starp tiem ir dubultā (double-color) FISH specifiskai *B. anthracis* sporu identificēšanai, kas pamatojas uz to, ka *B. cereus* un *B. thuringiensis*, kas pieder tai pašai sugu grupai, saistīsies ar abām zondēm, tajā laikā, kad *B. anthracis* saistīsies tikai ar FITC zondi (Fluoresceinisothiocyanate) un būs redzama tikai zem zaļās gaismas (Weerasekara et al. 2013); Filion *et al.* pētījumā tiek piedāvāti trīs atšķirīgi sporu permeabilizācijas protokoli priekš dažādiem *Bacillus* celmiem (*B. megaterium*, *B. atropheus*, *B. cereus*) (Filion et al. 2009); PMA-FISH, kur propidiumamonoazīds (PMA) ir nukleīnskābes specifiskā krāsviela, ar ko var diskriminēt dzīvotspējīgās un dzīvotnespējīgās baktēriju šūnās, pamatojoties uz membrānas integritāti (Mohapatra et al. 2012); Vai arī Alexa-FISH – fluorescentā *in situ* hibridizācija izmantojot AlexaFluor®488 oligonukleotīdu zondes (Mohapatra et al. 2012). *Paenibacillus polymyxa* sporu identificēšanai tika izmantota plūsmas citometrija. Tā ir alternatīvā metode, kas sniedz ātru un precīzu endosporu identificēšanu, papildus tam ļauj atšķirt sporas no veģetatīvām šūnām, bez mikroskopēšanas, ka arī novērtēt dzīvo un mirušo šūnu proporciju tajā pašā paraugā (Comas-Riu et al. 2002).

Kaut autori piedāvā dažādus sporu permeabilizācijas risinājumus, joprojām nav izveidots standarta protokols. Tādējādi ir nepieciešama jauna FISH metodika, kas ļautu *C. perfringens* gan šūnu, gan tas sporu efektīvu identificēšanu dzeramā ūdens un bioplēves paraugos.

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Iekārtas

1. Autoklāvs (Table Top Pressure Steam Sterelizer HS9041; Hanshin Medical Co. Ltd, Ķīna)
2. Centrifūga (Mini Spin plus; Eppendorf, Vācija)
3. Svari (Kern AES 220-4; Kern & Sohn GmbH, Vācija)
4. Inkubators (Binder, Vācija)
5. Automātiskās pipetes 0,1-1, 10-100, 100-1000 µl (Thermo Scientific Finnpipette Focus; Thermo Electron Corporation, Vācija)
6. Ledusskapis (Samsung, Dienvid Koreja)
7. Iekārta ultratīra destilēta H₂O iegūšanai (Adrona Crystal CR- E; Adrona, Latvija)
8. Saldētava (Eletrolux; Zviedrija)
9. Vortex (Bio Vortex V1; Biosan, Latvija)
10. Filtrēšanas iekārta (Millipore)
11. Fluorescentais mikroskops DM 6000B (Leica, Vācija)
12. Peristaltiskais sūknis DBT600 – 2J (LSM Pumps, Dānija)
13. Zondes tipa ultraskaņas sonifikātors (Cole-Parmer, ASV)
14. PĶR iekārta (7300 Real Time PCR System, Applied Biosystem, ASV)

2.2. Materiāli un trauki

1. Pipešu uzgaļi 0,1-1, 10-100, 100-1000 µl (Thermo Scientific Finntip; Thermo Electron Corporation, Vācija)
2. Pudeles 1l (Simax, Čehija)
3. Ūdens filtrs, poru izmērs 0.22 µm, diametrs 47mm (Whatman, Lielbritānija)
4. Petri trauki, diametrs 90mm (Nuova aptaca SRL, Itālija)
5. Mikrobioloģiskās cilpas 1 µl (COPAN, Itālija)
6. Plastmasas trauki 50, 150 ml (Deltalab, Spānija)
7. Mikromēģenes 1.5ml (Sarstedt, Vācija)
9. Segstikliņi 24×24mm (LLG Labware, Vācija)
10. Priekšmetstikliņi 25×75mm, (Santaks, Ķīna)
11. Pincete
12. Membrānas – poru izmērs 0.2 µm, diameters 25mm (Whatman, ASV)

2.3. Reāģenti

1. Sterils, destilēts ūdens (ddH₂O)
2. Nātrija hlorīds NaCl, analītiski tīrs, Sigma-aldrich, Vācija
3. Tris/ HCl H₂NC(CH₂OH)₃, mol.biol.tīrība, AppliChem, Vācija
4. Formamīds (FA), analītiski tīrs, AppliChem, Vācija
5. Nātrija dodecilsulfāts (SDS), analītiski tīrs, Enola SIA, Rīga
6. Etilēndiamīntetraacetāts(EDTA), mol.biol.tīrība, AppliChem, Vācija
7. Sālsskābe HCl, analītiski tīra, Chempur, Polija
8. 96% etanols, tehniskais
9. Nātrija dihidrogēnfosfāts NaH₂PO₄, analītiski tīrs, AppliChem, Vācija
10. Nātrija-2 dihidrogēnfosfāts Na₂HPO₄, analītiski tīrs, NORMAPUR PROLAB, Beļģija
11. Nātrija hidroksīds NaOH, analītiski tīrs, Enola SIA, Rīga
12. 4'6-diamidino-2fenilindol-dihidrochlorīds (DAPI) C₁₆H₁₇C₁₂N₅, Merck KGaA, Vācija
13. Triton X-100, analītiski tīrs, Enola SIA, Rīga
14. Kālija dihidrogēnfosfāts KH₂PO₄, AppliChem, Vācija
15. Kālija fosfāts K₂HPO₄, Anala R, Lielbritānija
16. Magnija sulfāts MgSO₄*H₂O, AppliChem, Vācija
17. Dzelzs sulfāts FeSO₄*7H₂O, AppliChem, Vācija
18. Biotīns, Sigma-aldrich, Vācija
19. P-aminobenzoskābe, Sigma-aldrich, Vācija
20. Glikoze, Biolife, Itālija
21. Rauga ekstrakts, Oxoid, Lielbritānija
22. Lab – Lemco pulveris, Oxoid, Lielbritānija
23. Peptons, Oxoid, Lielbritānija
24. Clostridium Reinforced barotne, Oxoid, Lielbritānija
25. Tioglikolāta barotne, Oxoid, Lielbritānija
26. SYBR Green Thermo Scientific, Lietuva
27. PCR ūdens Thermo Scientific, Lietuva
28. DNS izdalīšanai izmanto GeneJET Genomic Purification Kit, Thermo Scientific, Lietuva

2.4. Reaktīvi

1. 4% paraformaldehīds (PFA)
2. 3× Fosfāta bufera sāls (PBS)
3. 1× Fosfāta bufera sāls (PBS)
4. 0% hibridizācijas buferis
5. 0% mazgāšanas buferis
6. 0.5 Metilēndiamīntetraacetāts(EDTA)
7. 1M Tris/ HCl
8. 5M Nātrija hlorīds
9. 10% Nātrija dodecilsulfāts (SDS)

(sk.1. pielikumu)

2.5. Mikroorganismu kultūras

1. *Clostridium beijernickii* DSM 6422
2. *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824
3. *Clostridium tetanomorphum* ATCC 49273
4. *Clostridium perfringens* ATCC 13124
5. *Bacillus subtilis* ATCC 11774

2.6. Zondes

2. tabula

Darbā izmantotas zondes.

Table 2

Probes used.

Nosaukums	Sekvence 5' - 3'	Fluorescentais marķeris	Tips	Atsauce
ClostI&II	TTCTTCCTAATCTCTACGCA	Cy3	Oligonukleotīds	Kusel K. et al. 1999
Chis 150	TTATGCGGTATTAATCTYCCTTT	Cy3	Oligonukleotīds	Franks A. H. et al. 1998

2.7. Šķidrās klostrīdiju barotnes pagatavošana

<u>Barotnes sastāvs</u>	<u>g/l :</u>
Glikoze	30g/l
Biotīns	0,0001g/l
p-aminobenzoskābe	0,01g/l
Peptons	5g/l
Lab-Lemco pulveris	5g/l
Rauga ekstrakts	10g/l
<u>Sāļu šķīdums:</u>	
KH ₂ PO ₄	25g/l
K ₂ HPO ₄	25g/l
MgSO ₄ *H ₂ O	40g/l
FeSO ₄ *7H ₂ O	2g/l
NaCl	2g/l

100ml *Clostridium* šķidrai barotnes pagatavošanai:

Nosvērt attiecīgo komponentu daudzumu, pievienojot 2ml gatava sāļu šķīduma. 100ml barotnes jāpievieno 10µl biofīna un 100µl p-aminobenzoskābes. Mikroorganismus kultivē anaerobos apstākļos, 37° C, 24 stundas. Pēc barotnes atdzesēšanas, jāpievieno glikoze.

2.7.1. Agarizētas barotnes pagatavošana un kultūras iegūšana

Agarizētas barotnes pagatavošanai tika izmantota gatava (*Clostridium* reinforced medium, Oxoid, Lielbritānija) barotne. Nosvērt burciņā norādīto barotnes daudzumu (5,26g. uz 100ml ūdens), autoklāvēt 15 min, 121° C. Mikroorganismi jākultivē anaerobos apstākļos, 37° C, 24 stundas.

2.8. Sporulācijas barotņu pagatavošana

Sporu iegūšanai tika sagatavotas speciālas sporulācijas barotnes: TM1423 (Titan Biotech LTD, Indija), M1868 (HiMedia, Indija), Ellnera barotne (Ellner 1956), Duncan un Strong (Duncan et.al 1964), Tortora (Tortora 1984).

TM 1423 barotnes sastāvs g/l

Triptons 15g

(aizvietots ar Proteose Petone)

Nātrija-2 dihidrogēnfosfāts 11g

Rauga ekstrakts 3g

Šķīstošā ciete 3g

Nātrija tioglikolāts 1g

Magnija sulfāts 0,1g

pH \approx 7,8 \pm 0,2

M 1868 barotnes sastāvs g/l

Biopeptons 10g

(aizvietots ar Proteose Petone)

Rauga ekstrakts 10g

Nātrija-2 dihidrogēnfosfāts 4,36g

Kālija dihidrogēnfosfāts 0,25g

Amonija acetāts 1,50g

Magnija sulfāts 0,20g

pH \approx 7,5 \pm 0,1

Tortora barotnes sastāvs g/l

Tioton peptons 5g

(aizvietots ar Proteose Peptone)

Šķīstošā ciete 3g

Magnija sulfāts 0,2g

Nātrija-2 dihidrogēnfosfāts 9g

pH \approx 8,2

Ellnera barotnes sastāvs g/l

Proteozes peptons 10g

Rauga ekstrakts 3g

Šķīstošā ciete 3g

Magnija sulfāts 0,1g

Kālija dihidrogēnfosfāts 1,5g

Nātrija-2 dihidrogēnfosfāts 50g

pH \approx 7,8 \pm 0,2

Duncan un Strong barotnes satāvs g/l

Proteozes peptons	15g
Rauga ekstrakts	4g
Nātrija tioglikolāts	1g
Nātrija-2 dihidrogēnfosfāts	10g
Rafinoze (aizvietota ar cieti)	4g

pH \approx 7,8 \pm 0,2

Sagatavojot nepieciešamo barotnes daudzumu, tā jāsterilizē (autoklāvēt 15min, 121° C). Atdzesētajā barotnē pievienot inokulātu (ap 10% no kopēja tilpuma), inkubēt anaerobos apstākļos, 35-37° C, 24 stundas.

2.9. Sporu krāsošana ar malahīta zaļo

Sagatavot sporas suspensijas uztriepi. Safiksēt baktērijas virs liesmas. Uztriepei uzpilināt 0,5% malahīta zaļās krāsvielas un karsēt virs liesmas, līdz krāsa iztvaiko. Pēc 5 minūtēm paraugs jānoskalo. Tālāk, uzpilina 0,25% safranīna, krāso 30 sekundes. Noskalo un nožāvē, tad skata gaismas mikroskopā. Sporas būs redzamas zaļā, bet veģetatīvās šūnas sarkanā krāsā.

2.10. Fluorescentā *in situ* hibridizācija

2.10.1. Kultūru iegūšana

Inokulēt nepieciešamo kultūru no agara plates, ievietot šķidrā barotnē. Ielikt inkubatorā uz 16-24 stundām, 30-37° C temperatūrā. Iepildīt mikromēģenē 1ml kultūras. Mikroorganismus no barotnes attīra centrifūgējot 2 minūtes, 6000 apgr/min. Ar pipeti nosūc supernatantu, saglabājot nogulsnes. Pēc tam pievieno sterilu 1×PBS (pH 7,2 – 7,4). Savorteksējot PBS ar baktēriju šūnām, suspensiju centrifugē (2 minūtes, 6000 apgr/ min). Tāpat kā iepriekš, noliet šķidro daļu un uzpildīt sterilu PBS. Šīs darbības jāatkārto trīs reizes, aizvietojo ar supernatantu ar PBS.

2.10.2. Fiksācija

Šūnu suspensijai pievieno PBS un 4% PFA (1:3 attiecīgi), vorteksēt. Inkubēt suspensiju ledusskapī 4° C, 2-3 stundas. Pēc fiksēšanas centrifugēt paraugu (2 minūtes, 6000 apgr/ min). Maksimāli nosūkt šķidro daļu, un uzpildīt stobriņu ar PBS, kas noņems paraformaldehīdu no parauga, vorteksēt. Darbības atkārtot vismaz divas reizes, vienmēr precīzi nolejot un pielejot vienādu PBS tilpumu. Pēc trešās centrifugēšanas, jau atmazgātam paraugam, pievienot 96% etanola un PBS tā, lai etanola daudzums sastādītu pusi no kopējā šķidrums daudzuma stobriņā. Tādejādi paraugu var uzglābāt saldētavā – 18 ° C.

2.10.3. Permeabilizācija

Pirms permeabilizācijas šūnas tiek imobilizētas uz membrānas. Tad to uzliek uz priekšmetstikliņa un izžāvē. Pagatavot 0,5mM DTT (svaigi pagatavots), un 5% SDS šķīdumus. Tieši pirms permeabilizācijas procedūras veikšanas tos sajaukt, un uzlikt uz membrānas, inkubēt 30 minūtes pie 70° C. Pirms lizocīma apstrādes, membrāna jāskalo un jāizžāvē. Tad uzlikt 10 mg/ ml lizocīma šķīdumu, inkubēt 15 minūtes, 37° C. Beigās lizocīmu jāizskalo, un jāizžāvē membrāna.

2.10.4. Hibridizācija

Hibridizācijai vispirms ir nepieciešams pagatavot 0% hibridizācijas buferi un zondes maisījumu (0.5µl ClostI&II; 0.5µl Chist 150 un 200µl 0% hibridizācijas buferi) (1. pielikums). Uz membrānas uzliek ~26µl maisījuma. Priekšmetstikliņu ar membrānu ievieto Petri traukā (papildus jāievieto ar hibridizācijas buferi samitrinātu salveti). Membrānu pārklāj ar segstikliņu un ievieto inkubatorā uz 3 stundām, 46° C temperatūrā (vienlaikus ievietot 0% mazgāšanas buferi) (1. pielikums).

2.10.5. Mazgāšana

Pēc inkubēšanas noņemt segstikliņu un salvetes. Uz membrānas uzlej nedaudz mazgāšanas bufera. Turpināt inkubēt vēl 20 minūtes, 48° C temperatūrā. Pēc tam membrānu skalo ar aukstu (4° C) destilēto ūdeni. Nožāvē.

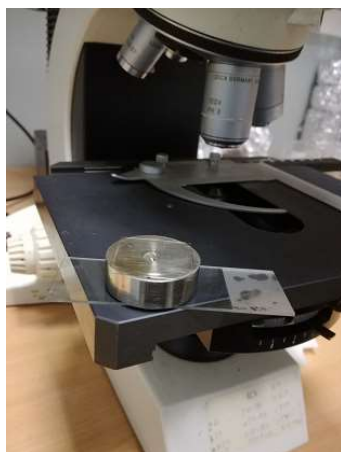
2.10.6. Krāsošana ar DAPI

Uz filtrēšanas iekārtas ievietot membrānu. Uzpilināt pāris pilienus Triton X-100 un DAPI – krāsot 5 minūtes. Atkārtot skalošanu ar sterilu destilēto ūdeni 2-3 reizes. Membrāna jāizžāvē. Tad paraugam virsū uzliek segstikliņu un imersijas eļļas pilienu un aplūko ar epifluorescento mikroskopu.

2.11. *Clostridium perfringens* šūnu/ sporu skaita noteikšana un mikroskopēšana

Caur filtru, ar poru diametru 0,2µm, nofiltrēt 3µl sporu/ šūnu suspensijas. Tālāk, veic fluorescento *in situ* hibridizāciju, atbilstoši 2.10 sadaļai. Membrānu, ar koncentrētām sporām/ šūnām, papildus jākrāso ar DAPI, lai salīdzinātu fluorescējošo šūnu/ sporu skaitu, ar reālo šūnu/ sporu koncentrāciju. Kupona virsmas analīzei (3. attēls), procedūra tiek veikta atbilstoši 2.10.3, 2.10.4 un 2.10.5 punktiem. Krāsošana ar DAPI notiek tieši uz kupona, iepilnot krāsvielu virsū; pēc 5 minūtēm tā jānoskalo ar ūdeni.

Paraugu vizualizēšanai tika izmantota A2 filtru sistēma (Leica, Vācija) ar 340/ 380 nm ierosmes viļņu garumu un >425nm emisijas viļņu garumu (DAPI), un 535 ± 25nm ierosmes viļņu garumu un 610 ± 37nm emisijas viļņu garumu (CY3).



3. attēls. Mikroorganismu analizēšana uz kupona virsmas

Figure 3. Microbial analysis of the coupon surface

2.12. *Clostridium* kopējā skaita noteikšana

No fiksēta parauga (punkts 2.10.2) paņemt konkrēto suspensijas daudzumu. Zinot iepriekš, ka sagatavota paraugā ir augsta šūnu koncentrācija, tika nofiltrēts un nokrāsots (2.11. nodaļa) 1 μl suspensijas. Lai iegūtu šūnu skaitu uz membrānas virsmas laukuma, tika noteikts kopējais šūnu skaits 20 brīvi izvēlētiem mikroskopa redzes laukiem. Aprēķini tika veikti izmantojot formulu:

Šūnas uz membrānas = $(S1 / S2 * N)$, kur S1 – membrānas laukums, S2 – redzes lauka (režģa) laukums, N – vidējais šūnu skaits 20 redzes laukos.

2.13. *Clostridium* fluorescences intensitātes noteikšana

Sākumā, no iepriekš sagatavotiem fiksētiem paraugiem (punkts 2.10.2), no katras *Clostridium* kultūras, jāņem attiecīgo daudzumu, atkārtībā no koncentrācijas. *Clostridium* un negatīvās kontroles – *B. subtilis* fluorescences intensitāti nosaka ar Image Pro Plus programmatūru kā relatīvās gaismas vienības (RLU). Vidējās RLU vērtības, iegūtas analizējot ne mazāk kā 300 atsevišķas šūnas, vismaz 20 mikroskopa redzes laukos. Iegūtās RLU vērtības ir specifiskas izvēlētajai mikroskopa sistēmai, tādējādi augstāka RLU vērtība nenorāda, ka sistēma ir jutīgāka. Tā kā katrs ražotājs izmanto atšķirīgu skalu, jābūt uzmanīgiem, izmantojot vai salīdzinot RLU vērtības, jeb fluorescences intensitātes, iegūtas no dažādām novērošanas sistēmām (Mulvey et al. 2011).

2.14. Bioplēves audzēšana

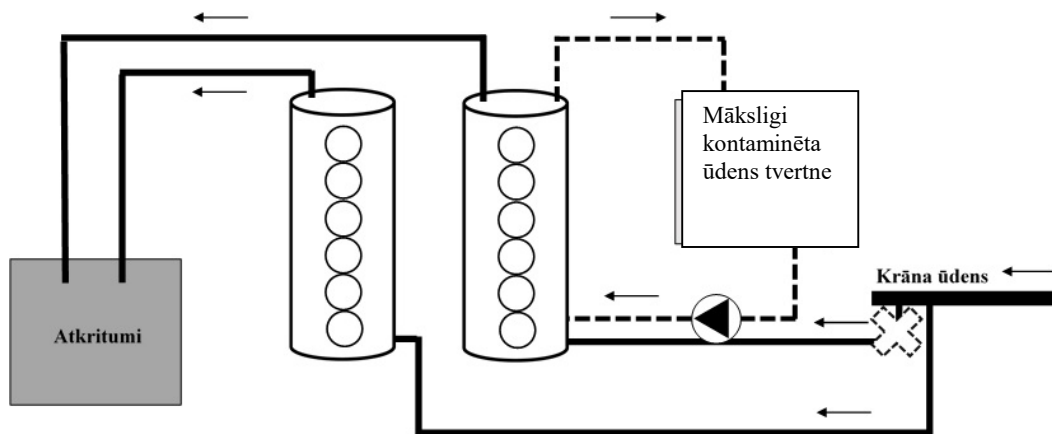
Bioplēves audzēšanai tika izmantoti divi cilindri, sūknis un nerūsējošā tērauda plāksnes ar sešiem izņemamiem kuponiem iekšā (4., 5. attēls). 4. attēlā var redzēt, ka viena caurule ir pieslēgta pie ūdens apgādes sistēmas, kurai, no apakšās, tiek sūknēts krāna ūdens, kas nonāk ārā caur otru cauruli. Bioplēves audzēšana notika istabas temperatūrā, viena mēneša garumā.



4. attēls. Bioplēves audzēšanas iekārta. Sarkanās bultiņas norāda ūdens plūsmas ieeju, dzeltenās - izeju.

Figure 4. Biofilm growing facility. The red arrows show water input, yellow - output.

Pēc šī laika, krāna ūdens plūsma, vienā no cilindriem, tika pārtraukta, bet otrajā turpināja plūst. Tam cilindram tika pieslēgta, ar *C. perfringens* sporām piesārņota, ūdens tvertne, ar kopējo tilpumu – 10 litri (5. attēls). Mākslīgais piesārņojums sastādīja $1,6 \cdot 10^6$ šūnas, kas atbilst vidēji smagam piesārņojuma līmenim. Pieslēgtais sūknis nodrošina, ūdenī esošo sporu cirkulāciju, ar plūsmas ātrumu 50 ml/ min. Katru nākamo dienu (piecu dienu laikā), tvertne tika pildīta ar svaigu krāna ūdeni, kā arī atkārtoti papildināta ar to pašu sporu koncentrāciju.



5. attēls. Bioplēves audzēšanas sistēma, ar tālāko mākslīgo kontamināciju ar *C. perfringens*.

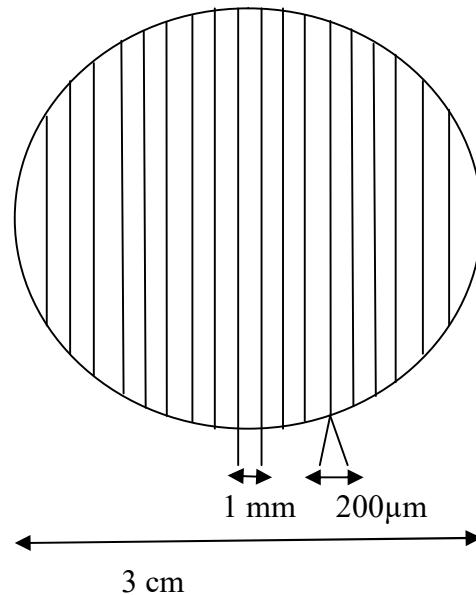
Figure 5. Biofilm growth system and subsequent contamination with *C. perfringens*.

2.15. *Clostridium perfringens* šūnu/ sporu skaita noteikšana un mikroskopēšana bioplēvē

Iepriekš aprakstītā mikroskopēšanas metode (2.11. nodaļa), nav piemērota zemas koncentrācijas mikroorganismu noteikšanai. Ja, piemēram, brīvi izvēlētos 20 redzes laukos konstatē vienu potenciālu šūnu, tad uz kupona, teorētiski, jābūt vairāk par 1500 šūnu (2.12. punktā minēta formula). Šis skaitlis neatbilst realitātei. Līdz ar to parādījās nepieciešamība samazināt metodes noteikšanas robežas. Tika veikti aprēķini, izmantojot mikroskopa un kupona parametrus, kas ļauj samazināt noteikšanas robežu līdz 5 šūnām vienā paraugā. Darbā izmantotā kupona diametrs (f) ir 3 cm, mikroskopa kopējais redzes lauka diametrs (d) ir vienāds ar 200 μm , jeb 0.2 mm. Mikroskops ir aprīkots ar lineālu, ar kura palīdzību iespējams pārvietot sistēmu par 1mm. Tādējādi katra nākamā atstarpe starp redzes laukiem (a) sastāda 1 mm, jeb 0.1 cm. Līdz ar to :

$$N = f / a = 3\text{cm} / 0.1\text{cm} = 30$$

N - ir membrānas sektori, kuri tiks apskatīti pārbīdot objektīvu pa 1mm. 6. attēlā tie ir apzīmēti ar melnām līnijām.



6. attēls. Aprēķiniem izmantotie parametri: Filtra diametrs 2 cm, sektora diametrs 200 μm, atstarpe starp sektoriem 1mm.

Figure 6. The parameters used in the calculations: Filter diameter 2 cm, sector width 200 μm, the gap between sectors of 1mm.

Tādējādi, membrāna ir sadalīta 30 sektoros ar platumu (p) 0.2 mm, no tā izriet:

$$K = N * p = 30 * 0.2 = 6 \text{ mm}$$

K- ir kopējais kupona platums, kas tiek apskatīts.

Pamatojoties uz to, var secināt, ka ar šo metodi tiek izanalizēta kupona 1/ 5 daļa, un noteikšanas robeža tiks samazināta līdz piecām šūnām paraugā. Tomēr, pirms šīs tehnikas izmantošanas ir ieteicams veikt kritisko parauga novērtējumu.

2.16. Kupona virsmas apstrāde ar ultraskaņu

Kuponu ievieto glāzē un piepilda ar 16 ml sterilā destilēta ūdens un sonificē 2 minūtes (20 μA un 822 kHz) no abām pusēm.

2.17. DNS izdalīšana un PĶR veikšana

DNS izdalīšanai izmanto GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, Lietuva), kas sastāv no gataviem buferiem (mazgāšanas I un II, atgūšanas, šķelšanas, kā arī Rnāzes un proteināzes K šķīdumiem. Izdalīšanu 1ml sonificētai suspensijai (2.16 nodaļa), veic atbilstoši ražotāja norādījumiem. Izdalīšanas laikā tiek

veikta parauga lizēšana ar proteināzi K, RNS un inhibitoru aizvākšana, mazgāšana un DNS atgūšana.

Lai veiktu PĶR, sagatavo maisījums, kas sastāv no 12,5µl SYBR Green, 6,5µl PCR ūdens un 0,5µl praimeriem: S-_-Chis-0150-a-S-23 (AAAGGRAGATTAATACCGCATAA), un S-_-Cbot-0983-a-A-21 (CARGRGATGTCAAGYCYAGGT). PCR plati, kur katrā bedrītē ir 20µl sagatavota maisījuma un 5µl izdalītās DNS (negatīvai kontrolei DNS vietā izmanto sterilu destilētu ūdeni). Izvēlētie amplifikācijas parametri ietvēr denaturācijas soli pie 90° C, 10 minūšu laikā, kam seko 40 denaturācijas cikli pie 95° C, pa 15 sekundēm. Atlaidināšanas temperatūra un ciklu ilgums ir atkarīgi no izvēlētiem praimeru pāriem. Kad rūdīšana ir notikusi, sākas pagarināšana pie 72° C, 30 sekundes. Pēdējā cikla laikā, reakcija tika uzturēta 72° C, 10 minūtes. Amplifikācijas efektivitāte (E) tika novērtēta, izmantojot standarta līknes slīpumu (slope) un formulu $E = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$.

2.18. Datu statistiskā analīze

Datu statistiskai apstrādei tika izmantota MS Excel dispersijas analīze un ANOVA (*Analysis of Variance*) statistiskā metode.

3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

3.1. Sporu iegūšana

Lai uzsāktu darbu, vispirms bija nepieciešams iegūt sporu suspensiju. Izanalizējot literatūras avotos pieejamus *C. perfringens* sporulācijas protokolus, tika izvēlētas un izmēģinātas piecas dažādas sporulācijas barotnes, proti, TM1423 (Titan Biotech LTD, Indija), M1868 (HiMedia, Indija), Ellnera barotne (Ellner 1956), Duncan un Strong (Duncan et al. 1964), Tortora (Tortora 1984). Barotņu pamatā ir līdzīgi komponenti, taču atšķirīga jonu un barības vielu koncentrācija. Peptons, rauga ekstrakts, triptons ir aminoskābju un augšanas faktoru avoti, kas ir nepieciešami mikroorganismu augšanai, savukārt ciete ir ogļhidrātu un enerģijas avots. Katras barotnes sastāvā ir iekļauts nātrijs-2 dihidrogēnfosfāts, kas kontrolē pH līmeni. Magnija sulfāts, amonija acetāts, nātrijs karbonāts – ir sporulācijai nepieciešamo jonu avots (Abel-Santos 2012), turklāt Ellner *et al.* pētījumā tika atzīmēts, ka $MgSO_4$ pievienošana sporulācijas barotnei, gandrīz divreiz palielināja sporu skaitu atsevišķiem *C. perfringens* celmiem (Ellner 1956). Dabiski, kuņģa skābā vide un žults sāļi izraisa *C. perfringens* sporulāciju, kas parasti notiek cilvēka tievajā zarnā (Byrne et al. 2006, Juneja et al. 2010). Tāpēc, sporulācijas stimulēšanai, atsevišķās barotnēs tiek izmantots lielāks dažādu jonu daudzums. Sporulācijas procesam jānotiek anaerobos apstākļos, temperatūras robežās starp 35-37° C, kultivējot 24-72 stundas. Tomēr sākotnējie pētījumi, kuru laikā sporu veidošanās netika novērota, lika mainīt ieteikto temperatūru un laiku, ka arī pārbaudīt dažādus sporulēšanas apstākļus.

Sākumā tika pārbaudītas piecas dažādas sporulācijas vides, proti, M1868, TM1423, Ellner, Tortora un PBS (phosphate-buffered saline) (sk. 5. Pielikums), kas ir sāļu šķīdums, kurā jonu koncentrācija līdzinās cilvēka ķermeņa esošām (izotoniskā). Pētījums ilga piecas nedēļas, kuru laikā neizdevās iegūt sporas. Šajās barotnēs tika novērota šūnu vairošanās, kur šūnu skaita samazināšanās sākās tikai ceturtajā nedēļā. Tika novērots, ka M1868 un TM1423 barotnēs, esošas šūnas nedaudz izmainīja morfoloģiju. Iegareno nūjiņu vietā, tika novērotas ovālas šūnas. Jau otrajā nedēļā, arī Tortora barotnē tika novērotas dažāda izmēra šūnas. Ellnera barotnē tika konstatētas šūnas, kas līdzinās kontroles paraugā esošām. Šūnu inkubēšana PBS nedeļa rezultātu.

Pēc tam tika veikta inkubēšana arī aerobos apstākļos. Novērojumiem tika izvēlēta Ellnera barotne. Aeroba kultivēšana notika divos temperatūras režīmos, 37° C un istabas temperatūrā, novērojumi ilgst trīs nedēļas, pozitīvs rezultāts netika iegūts (sk. 5. pielikums). Lielākais izaicinājums darba laikā bija tīras *Clostridium* sporu suspensijas

iegūšanas, jo tipiski klostrīdiju augšana nav sinhrona. Vairums *Clostridium* kultūru iekļauj visus iespējamus šūnu veidus: jaunas veģetatīvās šūnas, šūnas dažādos sporulācijas posmos, brīvas sporas un izdīgušas sporas (Yang et al. 2009).

Tālāk, tika izmēģināta Duncan Strong barotne, aerobajā un anaerobajā vidē, pie dažādām temperatūrām – 37, 30, 25° C. Arī šajā gadījumā, sporas netika konstatētas.

Analizējot iespējamās pieļautās kļūdas, tika konstatēts, ka barotņu autori, pirms sporulācijas vides testēšanas, kultivēja *C. perfringens* kultūru tioglikolāta barotnē (Tortora 1984, Duncan et al. 1968, Sacks et al. 1977, Kim et al. 1967). Turklāt liela nozīme ir ne tikai kultūras daudzumam, kur inokulātam jā sastāda 10% no kopēja tilpuma (Yang et al. 2008, Duncan et al. 1968), bet arī kultūras augšanas fāzei. Lielāko sporu procentu ir iespējams iegūt, ja šūnas atrodas log fāzē. Tāpēc nepieciešams izmantot svaigu kultūru, kuras maksimālais inkubēšanas laiks nepārsniedz 24 stundas.

Nākamajā mēģinājumā tika pārbaudīts, vai tie paši sporulācijas nosacījumi veicina arī citu *Clostridium* ģints pārstāvju sporulāciju. *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetanomorphum*, *Clostridium acetobutylicum* un *Clostridium beijernickii* kultūras inokulāti, no agarizētas *Clostridium* reinforced barotnes, tika ievietoti divās sporulācijās barotnēs – Duncan un Strong, un Ellnera, inkubācijas laiks – 24 stundas (3. tabula). Papildus tam, tioglikolāta barotnes vietā, tika izmēģināta šķidrā klostrīdiju barotne (sk. punktu 2.7.), kur tika audzēta *C. perfringens* kultūra. Ņemot vērā inokulēšanas specifiku, no šķidrās *Clostridium* barotnes tika ņemts 1ml inokulāta, kuru suspendēja 10ml attiecīgajā sporulācijas barotnē. Savukārt, agarizētās barotnes gadījumā, tika pagatavota suspensija 10ml H₂O, no kuras sporulācijas barotnei tika pievienots 1ml. Atsevišķos gadījumos enerģijas avota koncentrācijas palielināšana sekmēja labāku sporulācijas procesu (Duncan et al. 1968, Yang et al. 2009), tāpēc papildus regulārai Duncan un Strong barotnei, bija sagatavota barotne ar divreiz palielinātu cietes daudzumu. Tāpat, kā iepriekš, tika novērota atšķirīga šūnu morfoloģija, atkarībā no temperatūras un izmantotās barotnes (sk 4. pielikums).

3. tabula

Iegūtais *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetanomorphum*, *Clostridium acetobutylicum* un *Clostridium beijernickii* sporu daudzums, 5 dienas kultivējot Duncan Strong un Ellner sporulācijas barotnēs.

Table 3

Obtained spore percentage, from *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetanomorphum*, *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijernickii* strains, after 5 days cultivating in Duncan Strong and Ellner sporulation broth.

-Iegūtie rezultāti kultivējot Ellner barotnē

Inkubēšanas laiks	Barotnes nosaukums	Kultūra	Inkubācijas apstākļi	Šūnu skaits	Sporu skaits	Nobriedušo šūnu (endosporas) skaits	Sporu %
2 dienas	Ellner	<i>C. acetobutylicum</i>	Anaerobi, 37°C	5	0	0	0
		<i>C. beijernickii</i>		21	0	0	0
		<i>C. tetanomorphum</i>		12	0	0	0
		<i>C. perfringens</i> no šķidrās barotnes		25	0	0	0
		<i>C. perfringens</i>		68	0	0	0
		<i>C. acetobutylicum</i>	Anaerobi, 25°C	9	0	0	0
		<i>C. beijernickii</i>		19	0	0	0
		<i>C. tetanomorphum</i>		27	0	0	0
		<i>C. perfringens</i> no šķidrās barotnes		37	0	0	0
		<i>C. perfringens</i>		68	0	0	0
5 dienas	Ellner	<i>C. acetobutylicum</i>	Anaerobi, 37°C	8	0	0	0
		<i>C. beijernickii</i>		15	0	0	0
		<i>C. tetanomorphum</i>		10	0	0	0
		<i>C. perfringens</i> no šķidrās barotnes		9	0	0	0
		<i>C. perfringens</i>		4	0	0	0
		<i>C. acetobutylicum</i>	Anaerobi, 25°C	2	0	0	0
		<i>C. beijernickii</i>		6	0	0	0
		<i>C. tetanomorphum</i>		17	0	0	0
		<i>C. perfringens</i> no šķidrās barotnes		13	0	0	0
		<i>C. perfringens</i>		6	0	0	0

-Iegūtie rezultāti kultivējot Duncan un Strong barotnē

Inkubēšanas laiks	Barotnes nosaukums	Kultūra	Inkubācijas apstākļi	Šūnu skaits	Sporu skaits	Nobriedušo šūnu(endo sporas) skaits	Sporu %
2 dienas	Duncan un Strong	<i>C. acetobutylicum</i>	Anaerobi, 37°C	51	0	2	0
		<i>C. beijernickii</i>		112	0	1	0
		<i>C. tetanomorphum</i>		144	9	10	6
		<i>C. perfringens</i> no šķidrās barotnes		168	1	0	0,6
		<i>C. perfringens</i>		159	0	0	0
		<i>C. acetobutylicum</i>	Anaerobi, 25°C	26	0	0	0
		<i>C. beijernickii</i>		19	0	0	0
		<i>C. tetanomorphum</i>		88	0	0	0
		<i>C. perfringens</i> no šķidrās barotnes		>250	0	0	0
		<i>C. perfringens</i>		200	0	0	0
5 dienas	Duncan un Strong	<i>C. acetobutylicum</i>	Anaerobi, 37°C	49	15	1	30
		<i>C. beijernickii</i>		174	73	0	42
		<i>C. tetanomorphum</i>		250	14	0	6
		<i>C. perfringens</i> no šķidrās barotnes		9	0	0	0
		<i>C. perfringens</i>		154	0	0	0
		<i>C. acetobutylicum</i>	Anaerobi, 25°C	208	0	116	0
		<i>C. beijernickii</i>		>250	0	0	0
		<i>C. tetanomorphum</i>		96	0	0	0
		<i>C. perfringens</i> no šķidrās barotnes		>250	0	0	0
		<i>C. perfringens</i>		194	0	0	0

-Iegūtie rezultāti kultivējot Duncan un Strong barotnē ar divreiz paaugstināto cietes daudzumu

Inkubēšanas laiks	Barotnes nosaukums	Kultūra	Inkubācijas apstākļi	Šūnu skaits	Sporu skaits	Nobriedušo šūnu(endo sporas) skaits	Sporu %
2 dienas	Duncan un Strong, ciete 6g	<i>C. acetobutylicum</i>	Anaerobi, 37°C	22	4	2	14
		<i>C. beijernickii</i>		43	7	15	11
		<i>C. tetanomorphum</i>		32	9	10	18
		<i>C. perfringens</i> no šķidrās barotnes		111	0	0	0
		<i>C. perfringens</i>		>250	0	0	0
		<i>C. acetobutylicum</i>	Anaerobi, 25°C	14	0	0	0
		<i>C. beijernickii</i>		23	0	0	0
		<i>C. tetanomorphum</i>		34	0	0	0
		<i>C. perfringens</i> no šķidrās barotnes		128	0	0	0
		<i>C. perfringens</i>		106	0	0	0
5 dienas	Duncan un Strong, ciete 6g	<i>C. acetobutylicum</i>	Anaerobi, 37°C	8	51	0	86
		<i>C. beijernickii</i>		14	36	16	55
		<i>C. tetanomorphum</i>		20	22	3	49
		<i>C. perfringens</i> no šķidrās barotnes		37	0	0	0
		<i>C. perfringens</i>		>250	0	0	0
		<i>C. acetobutylicum</i>	Anaerobi, 25°C	108	0	74	0
		<i>C. beijernickii</i>		86	0	13	0
		<i>C. tetanomorphum</i>		94	0	26	0
		<i>C. perfringens</i> no šķidrās barotnes		80	0	0	0
		<i>C. perfringens</i>		84	0	0	0

Neviena no pārbaudītām kultūrām nesporulēja Ellnera barotnē, neatkarīgi no temperatūras. Atšķirībā no Ellnera barotnes, Duncan un Strong barotnē sporulācijas process, sākas jau pēc 48 stundām. Iegūtais sporu procents palielinājās piektajā dienā. Vēl augstāka sporu koncentrācija tika novērota Duncan un Strong barotnē ar divreiz paaugstinātu cietes daudzumu. Turklāt tika noskaidrots, ka optimāla klostrīdiju sporulācijas temperatūra (Duncan un Strong barotnē) ir 37° C, jo sporulācija tika novērota trim no četrām pārbaudītajām kultūrām. Divreiz paaugstinātais cietes daudzums, tāpat kā šķidrās/ cietas barotnes variācijas neietekmēja *C. perfringens* sporu veidošanos. Pie tam, novērtējot iegūtus rezultātus, var secināt, ka *C. perfringens* ir prasīgāka kultūra, salīdzinot ar citām analizētajām sugām. Tāpēc tālāk darbā tika izmantota tikai *C. perfringens*.

Kā jau minēts, barotņu autori, pirms sporulācijas vides testēšanas, kultivēja *C. perfringens* kultūru tioglikolāta barotnē, kura izmēģināta arī šī pētījuma ietvaros. Rezultāti ir apkopoti 4. tabulā (4. tabula).

4. tabula

Iegūtais *C. perfringens* sporu daudzums, pēc kultivēšanas tioglikolāta barotnē.

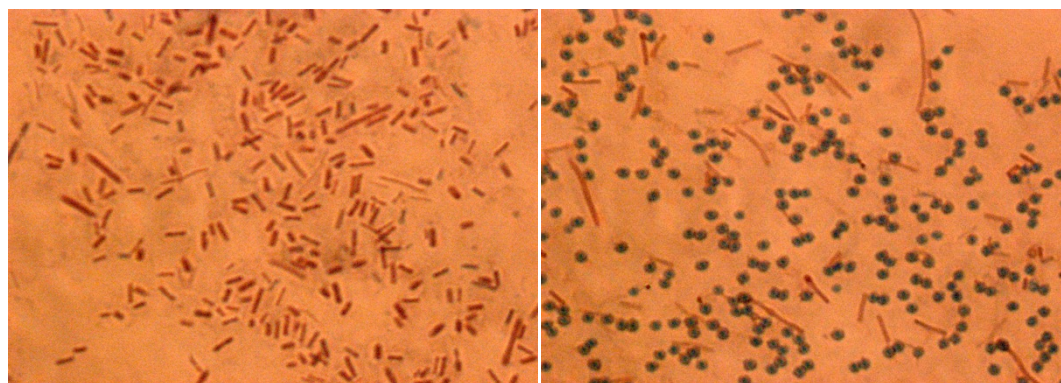
Table 4

Obtained *C. perfringens* spore percentage, after cultivating in thioglycolate medium.

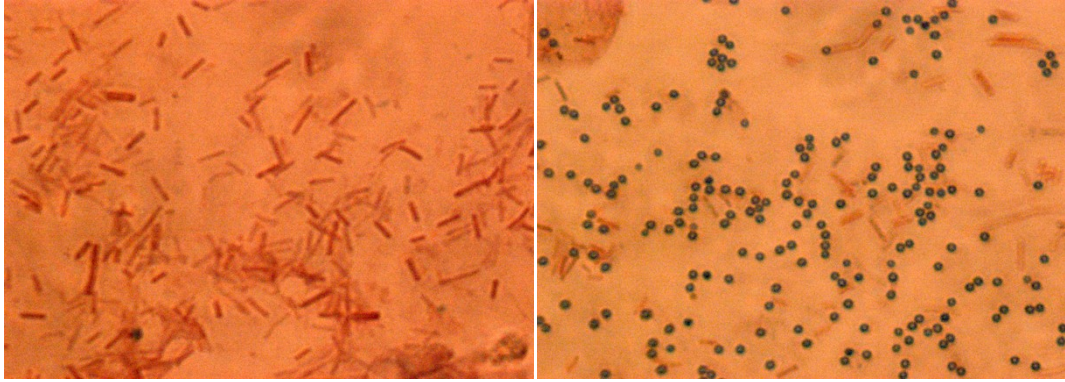
Kultivēšanas laiks	Sporulācijas barotne	Izmantojamais mikroorganisms	Kultivēšanas apstākļi	Vidējais šūnu skaits	Vidējais sporu skaits	Sporu %
5. dienas	TM1423	<i>Clostridium perfringens</i>	Aerobi, 37°C	78	205	72
	M1868			45	162	81
	Duncan Strong			82	87	51
	Tortora			59	-	-

Neskatoties uz to, ka *C. perfringens* ir vieni no visgrūtāk sporulējošiem mikroorganismiem *in vitro* (Yang et al. 2009, Meyer et al. 1999, Duncan et al. 1968, Sacks et al. 1977), tika konstatēti daži nosacījumi, kuri veicina sporulēšanu (7. attēls): 1) šūnām jāatrodas eksponenciālajā augšanas fāzē, kur maksimālais inkubēšanas laiks nepārsniedz 24 stundas 2) inokulātam jā sastāda 10% no kopējā tilpuma 3) pirms ievietošanas sporulācijas barotnē, mikroorganismus kultivē tioglikolāta barotnē; Sporulācijas barotnē ievietoti mikroorganismi jā kultivē anaerobi pie 37° C. Sporulācijas laiks ir aptuveni 5 dienas, jo pēc 24 un 48 stundām brīvas sporas netika konstatētas.

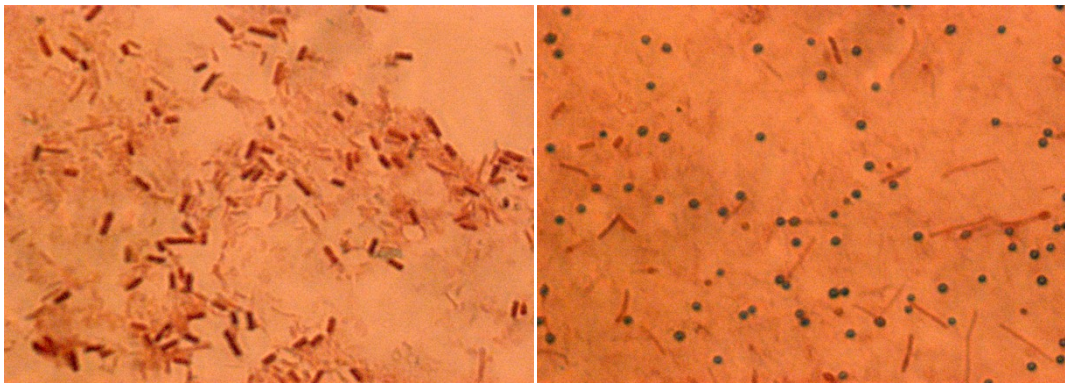
a)



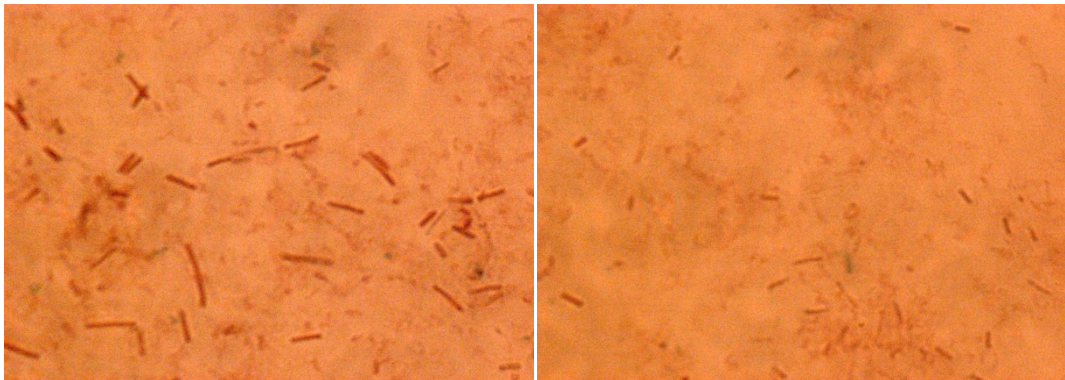
b)



c)



d)



7. attēls. *Clostridium perfringens* sporulācija atkarībā no izmantotas sporulācijas barotnēs. a) sporulācijas barotne M1868 b) sporulācijas barotne TM1423 c) sporulācijas barotne Duncan un Strong d) sporulācijas barotne Tortora. Pa kreisi, divu dienu *C. perfringens* inkubēšana sporulācijas barotnē. Pa labi, piecu dienu *C. perfringens* inkubēšana sporulācijas barotnē.

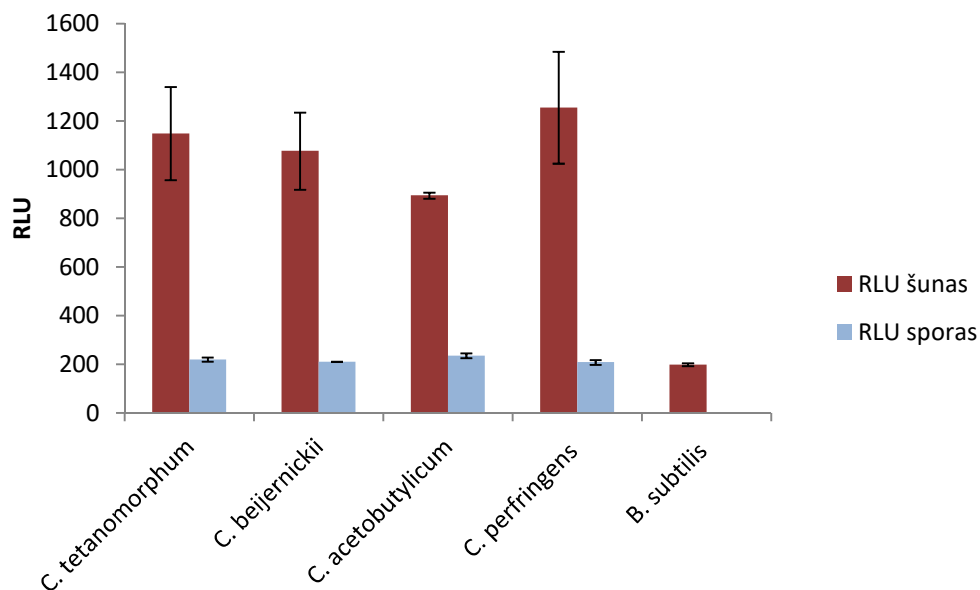
Figure 7. Sporulation of *Clostridium perfringens*, depending upon the sporulation medium. a) M1868 sporulation medium b) TM1423 sporulation medium c) Duncan Strong sporulation medium d) Tortora sporulation medium. On the left, a two-day incubation of *C. perfringens* in sporulation medium. On the right, five-day incubation of *C. perfringens* in sporulation medium.

3.2. Fluorescentā in situ hibridizācija

Lai pārlicinātos, ka metode var būt pielietojama *Clostridium perfringens* noteikšanai dzeramajā ūdenī, vispirms, tika noteikta *Clostridium* ģints pārstāvjiem raksturīgā fluorescences intensitāte. Darbā tika izvēlēti četri šīs grupas pārstāvji: *Clostridium beijernickii*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium tetanomorphum* un *Clostridium perfringens*. Vienlaikus tika analizētas arī šo mikroorganismu sporas. Kā negatīvā kontrole tika izmantota, sporu veidojošā, *Bacillus subtilis*. Fluorescentai *in situ* hibridizācijai tika izmantots piemērots hibridizācijas buferis, ar 0% formaldehīda koncentrāciju un divas zondes ClostI&II un Chis 150. Chis 150 ir piemērota *Clostridium histolyticum* grupas sugu noteikšanai (Franks et al. 1998), bet ClostI&II tiek izmantota *Clostridium* I un II grupas identificēšanai (Kusel et.al 1999) (2. pielikums). Sporu klātbūtne paraugos tika kontrolēta izmantojot krāsošanu ar DAPI, kas saistās ar DNS A-T reģioniem. Fluorescences intensitāte tika noteikta kā RLU, jeb relatīvās gaismas vienības, kas nav standartizēta mērvienība, bet specifiska katrai izmantotajai vizualizācijas iekārtai, piemēram, fluorescences mikroskopam. Attiecīgi izmantojot vai salīdzinot RLU vērtības, jeb fluorescences intensitātes, kas iegūtas no dažādām novērošanas sistēmām jāņem vērā tehniskās īpatnības (Mulvey et al. 2011).

Viens no FISH metodes ierobežojumiem ir augsta fona intensitāte. Tā fluorescenti iezīmētā šūna, augstas fona fluorescences līmeņa dēļ var to zaudēt (Pernthaler et al. 2001). Tāpēc, lai objektīvi novērtētu gan šūnu, gan sporu fluorescenci tās tika sajauktas vienā paraugā, kas nodrošina vienādu fona intensitātes līmeni. Katram paraugam tika izvēlētas 300 nejauši atlasītas šūnas un noteikts to RLU, mērījumi tika atkārtoti trīs reizes.

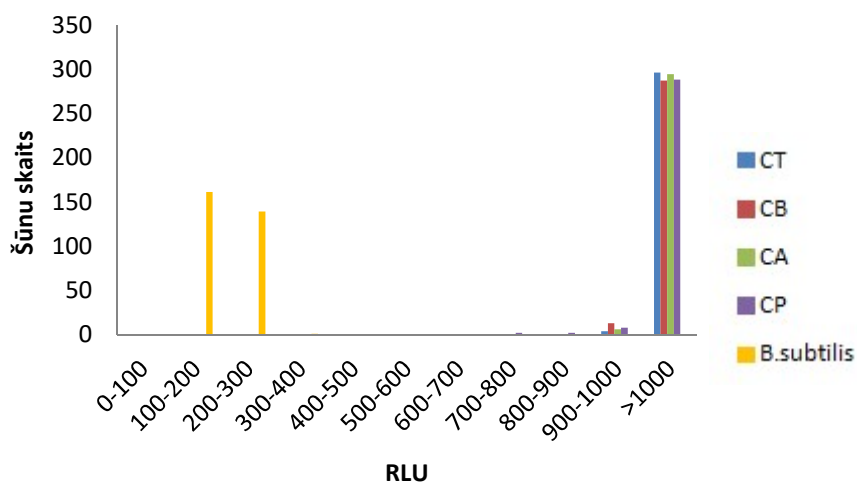
Kopumā, visas analizētās *Clostridium* sugu šūnas bija labi saskatāmas, un uzrādīja augstu fluorescences intensitāti, kas liecināja par labu zondes saistīšanos ar baktēriju rRNS. Savukārt sporu un negatīvās kontroles fluorescences intensitāte ievērojami atšķīrās no *Clostridium* ģints pārstāvju fluorescenci (8a, 8b. attēls). Vienlaikus, tika novērots, ka fona fluorescences intensitāte pozitīvām un negatīvām kontrolēm atrodas vienā līmenī.



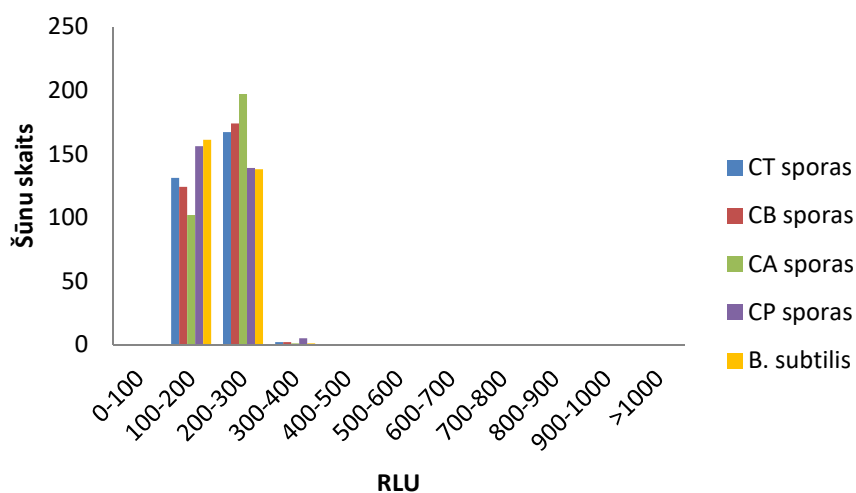
9. attēls. Fluorescences intensitātes salīdzinājums starp *Clostridium* sugām un to sporām un *Bacillus subtilis* celmu; vidējās vērtības no trim mērījumiem.

Figure 9. The comparison of fluorescence intensity between *Clostridium* species, their spores and *Bacillus subtilis* strain; average value of three measurements.

It sevišķi rezultātos (10. attēls) ir krasi redzama rezultātu atšķirība, kur 96% no *C. perfringens*, 98% no *C. tetanomorphum*, 96% no *C. beijernickii*, un 99% no *C. acetobutylicum* izmērītam šūnām fluorescences intensitāte pārsniedza 1000 RLU, tajā laikā, kad tikai 46% *C. perfringens* sporu pārsniedza 200 RLU robežu. Turklāt visi trīs sporu mērījumu grafiki (3. pielikums) liecina, ka sporu un negatīvas kontroles, proti, *B. subtilis* fluorescences intensitāte atrodas vienā līmenī. Tas savukārt norāda uz to, ka saistīšanas nenotika, un zonde nerasniedza savu mērķi, proti, sporās esošo rRNS. Kas liecina par paraugu priekšapstrādes nepieciešamību, pirms FISH procedūras.



a)



b)

10. attēls. Fluorescences intensitātes salīdzinājums starp *Clostridium* sugām, tas sporām un *Bacillus subtilis* celmu. a) *Clostridium* sugu šūnu fluorescences intensitātes salīdzinājums ar *B. subtilis*. b) *Clostridium* sugu sporu fluorescences intensitātes salīdzinājums ar *B. subtilis*.

Figure 10. The comparison of fluorescence intensity between *Clostridium* species, their spores and *Bacillus subtilis* strain. a) The comparison of fluorescence intensity between *Clostridium* species cells vs. *B. subtilis*. b) The comparison of fluorescence intensity between *Clostridium* species spores vs. *B. subtilis*.

3.3. Permeabilizācijas protokola izstrāde *Clostridium perfringens* sporu identificēšanai ar FISH

Galvenais sporu permeabilizācijas ierobežojums ir dažādi sporu aizsargslāņi – sporu apvalki, proti, eksosporijs, olbaltumvielu apvalks, ārējā membrāna, peptidoglikāna slānis, un iekšējā membrāna (Paredes-Sabja et al. 2008). Šāda ekstrēma stabilitāte ir izskaidrojama ar zemu ūdens saturu kodolā un īpašu DNS olbaltumvielu sastāvu, ļoti izturīgā, saspiestā veidā (Abdelmassih et al. 2011). Eksosporijs jeb ārējais slānis, nav raksturīgs *C. perfringens* sugai, taču ir atrodams citu baktēriju sugu sporām, tādām kā *Clostridium sporogenes*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum 78A*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* (Filion et al. 2009, Stevenson et al. 1972). Ārējā membrāna nav viendabīga, tās sastāvā ir iekļauti gan glikoproteīni, gan olbaltumvielas, gan arī lipīdi. Ārējo membrānu aptver olbaltumvielu apvalks, kuram ir izšķiroša nozīme, sporu pretestībā (Driks et al. 2007, Parades-Sabja et al. 2011). Šo slāni galvenokārt veido proteīni. Tās sastāvā ir iekļautas, vairāk nekā 50, sporām specifiskas olbaltumvielas (Setlow et al. 2006). Nākamais slānis, kas atrodas dziļāk, ir peptidoglikāna slānis. Tas ir galvenais komponents garozā (Mohapatra et al. 2012). Iekšējai membrānai, kas aptver kodolu, ir ārkārtīgi zema caurlaidība, kas pasargā kodolā esošo DNS un citu ģenētisko materiālu (Parades-Sabja 2011). Lai novājinātu, katru no minētiem slāņiem nepietiek ar vienu vielu. Tāpēc ir nepieciešama secīga, katram slānim attiecīga viela, kas pamatojas uz sporu apvalka uzbūves īpatnībām.

Sākotnēji, tika izvēlētas un izmēģinātas sekojošas vielas: proteīnāze K, DTT, SDS, Urīnviela, lizocīms, etanols un Tritons X-100 (5. tabula).

5. tabula

Sporu permeabilizācijai izmantojamas vielas un to iedarbība

Table 5

Spore permeabilization agents and their activity

N.p.k.	Reāģenta nosaukums	Visparīgā iedarbība	Iedarbība uz sporas slāni
1.	DTT (Dithiothreitol)	Pārrauj proteīnu disulfīdu saites, denaturē proteīnus, bojā bioloģiskās membrānas.	Iedarbojas uz olbaltumvielu apvalku (ārējo slāni), denaturē proteīnus pārraujot disulfīdu saites (Filion et al. 2009, Weerasekara et al. 2013)

2.	SDS (nātrija dodecilsulfāts)	Deterģents, denaturē proteīnus, sagrauj šūnas membrānas, un nukleīnskābes/proteīnu kompleksus.	Degradē olbaltumvielu apvalka esošos proteīnus (ārējais slānis) (Filion et al. 2009, Weerasekara et al. 2013)
3.	Lizocīms	Enzīms, šķeļ baktēriju šūnu sienu, iedarbojas uz peptidoglikāna slāni (ir īpaši efektīvs pret Grampozitīvām baktērijām), uzlabo proteīnu/ nukleīnskābes izdalīšanas efektivitāti.	Tā saucamās „germ cell wall”, pamatā ir peptidoglikāna slānis – šī sienas struktūra kļūst par veģetatīvas šūnas sienu, sporai atsākot dzīvības procesu. Lizocīms iedarbojas uz glikozīdu saitēm peptidoglikānu slānī. (Weerasekara et al. 2013)
4.	Proteināze K	Stabila serīna proteāze, kas specifiska plašām substrātu spektram. Noderīga vispārējai olbaltumvielu destrukcijai bioloģiskajos paraugos.	Olbaltumvielu apvalks (ārējais slānis). Izmanto arī eksosporija permeabilizācijai (Filion et al. 2009). Nav efektīvs, jo <i>C. perfringens</i> eksosporijs nav raksturīgs.
6.	Urīnviela	Izmanto olbaltumvielu denaturēšanai, arī kā izšķīdināšanas aģentu nešķīstošiem vai jau denaturētiem proteīniem.	Olbaltumvielu apvalks (ārējais slānis)(Weerasekara et al. 2013, Filion et al. 2009)
7.	Tritons X-100	Triton X-100 ir viens no visplašāk izmantojamajām virsmas aktīvajām vielām . Tika pierādīta tas spēja permeabilizēt prokariotiskās un eikariotiskās šūnu membrānas (Mohapatra et al. 2012, Cimino et al. 2006, Koley et al. 2010).	

Šo vielu kombinācijas un koncentrācijas tika veidotas pamatojoties uz Filion *et al.*, Weerasekara *et al.*, Mohapatra *et al.*, Deere *et al.* un NASA sporu preabilizācijas protokoliem (Filion et al. 2009, Weerasekara et al. 2013, Mohapatra et al. 2012, Deere et al. 1998, NASA 2014), jo joprojām nav izveidots standarta protokols. Katrs autors sniedz savu sporu permeabilizācijas risinājumu. Filion *et al.* pētījumā tiek piedāvāti trīs atšķirīgi permeabilizācijas protokoli dažādiem *Bacillus* celmiem (*B. megaterium*, *B. atrophaeus*, *B. cereus*) (Filion et al. 2009). Tādējādi, *C. perfringens* sporu permeabilizēšanai tika izveidotas 6. tabulā redzamas kombinācijas.

6. tabula

Pirmā meģinājuma izveidotas vielu kombinācijas. Eksperiments tika taisīts divos temperatūras režīmos a) 65°C, b) 37°C.

Table 6

The table represents the course of first experiment. The experiment was carried out in two temperature conditions a) 65°C, b) 37°C.

N.p. k.	1.solis	Inkub ēšanas laiks	t°, C	2.solis	Uztur ēšanas laiks	t°, C	3.solis	Uztur ēšanas laiks	t°, C	Efektivitāte
1a	0,5% SDS + 0,5M TT	15min	65	7 mg/ml lizocīms	15min	37				++
1b	0,5% SDS + 0,5M DTT	15min	37	7 mg/ml lizocīms	15min	37				-
2a	5% SDS + 0,5M DTT	15min	65	7 mg/ml lizocīms	15min	37				++
2b	5% SDS + 0,5M DTT	15min	37	7 mg/ml lizocīms	15min	37				-
3a	0,5% SDS + 25mM DTT	15min	65	7 mg/ml lizocīms	15min	37				-
3b	0,5% SDS + 25mM DTT	15min	37	7 mg/ml lizocīms	15min	37				-
4a	5% SDS + 25mM DTT + 4M UREA	15min	65	7 mg/ml lizocīms	15min	37				-
4b	5% SDS + 25mM DTT + 4M UREA	15min	37	7 mg/ml lizocīms	15min	37				-
5a	5M UREA + 25mM DTT	15min	65	7 mg/ml lizocīms	15min	37				-
5b	5M UREA + 25mM DTT	15min	37	7 mg/ml lizocīms	15min	37				-
6a	5% SDS + 5M UREA	15min	65	7 mg/ml lizocīms	15min	37				n
6b	5% SDS + 5M UREA	15min	37	7 mg/ml lizocīms	15min	37				-
7a	5% SDS + 25mM DTT	15min	65	20 mg/ml lizocīms + 50mM Tris-HCl + 0,5 M EDTA	15min	37				+
7b	5% SDS + 25mM DTT	15min	37	20 mg/ml lizocīms + 50mM	15min	37				-

				Tris-HCl + 0,5 M EDTA						
8a	5% SDS + 0,5M DTT	15min	65	2 mg/ml lizocīms	15min	37				+
8b	5% SDS + 0,5M DTT	15min	37		15min	37				-
9a	5% SDS + 20 mg/ml proteināze-K	15min	37	7 mg/ml lizocīms	15min	37				n
9b	5% SDS + 20 mg/ml proteināze-K	15min	65	7 mg/ml lizocīms	15min	37				-
10a	5% SDS + 25mM DTT	15min	37	2 mg/ml lizocīms + 50mM Tris-HCl	15min	37				+
10b	5% SDS + 25mM DTT	15min	65	2 mg/ml lizocīms + 50mM Tris-HCl	15min	37				-
11a	5% SDS + 70mM DTT	15min	37	7mg/ml lizocīms	15min	37				++
11b	5% SDS + 70mM DTT	15min	65	7 mg/ml lizocīms	15min	37				-
12	20 mg/ml proteināze K	30min	65							n
13a	5% SDS + 10 mg/ml proteināze K	15min	65	5M Urea + 50mM Tris HCl	15min	65	7 mg/ml lizocīma	15min	37	n
13b	5% SDS + 10 mg/ml proteināze K	15min	37	5M Urea + 50mM Tris HCl	15min	65	7 mg/ml lizocīma	15min	37	-
14	5M UREA + 70mM DTT + 1% SDS + Triton X-100	15min	65							-
15	4M UREA + 5% SDS	15min	65	1% Triton X-100	15min	37				n

Katra kombinācija, paralēli, tika testēta divos temperatūras režīmos, proti, 37° C un 65° C. Pētījumu rezultātā tika novērots, ka 37° C nav pietiekama temperatūra sporu olbaltumvielu apvalku noārdīšanai, pozitīva tendence tika novērota tikai atsevišķām kombinācijām 65° C. Tālākai izpētei, attiecīgi, tiks izmantota 65° C temperatūra. Lai denaturētu olbaltumvielu apvalku, tika izmantotas urīnviela, DTT un SDS. Kombinējot SDS un DTT var uzlabot efektivitāti— šo vielu maisījums denaturē olbaltumvielas,

pārraujot proteīnu iekšmolekulāras disulfīdu saites (Weerasekara et al. 2013). Atšķirībā no SDS un DTT, urīnvielas klātbūtne paraugos ievērojami apgrūtināja rezultātu novērtēšanu. Uz filtra virsmas veidojās grūti noskalojami kristāli. Izvēloties šo vielu, netika ņemts vērā, ka citi autori permeabilizāciju veica mikromēģenēs, bet šajā pētījumā tika izmantoti uz filtra sakoncentrēti mikroorganismi. Tāpēc, tālākos pētījumos urīnviela netika izmantota. Vislielākā efektivitāte tika panākta izmantojot kombinācijas ar DTT, jo 6a, 9a, 12, 13a un 15 (6. tabula) kombinācijas varianti bija vienīgie, kur pozitīva ietekmē nebija novērojama. Pretēji, 1a, 2a, 7a, 8a, 10a, 11a tika uzskatīti par visveiksmīgākiem, no tiem var atzīmēt 1a 2a un 11a kombinācijas, kur sporu fluorescence tuvinājās 600 RLU, tomēr, tā bija ļoti nevienmērīgā, tikai ~60% sporām.

Neskatoties uz to, ka proteināze K parasti tiek izmantota vispārējai olbaltumvielu noārdīšanai bioloģiskajos paraugos, šī pētījuma novērojumi liecina, ka tās ietekme uz *C. perfringens* sporām ir zema. Fillion *et al.* publikācijā, proteināze K tika izmantota eksosporija permeabilizācijai *B. subtilis* sugai. Var pieņemt, ka proteināzes K zema efektivitāte ir saistīta ar eksosporija trūkumu *C. perfringens* sugai. Triton X-100 ir viens no visplašāk izmantojamajām virsmas aktīvajām vielām, kas šķeļ vai permeabilizē prokariotiskās un eikariotiskās šūnu membrānas (Mohapatra et al. 2012, Koley et al. 2010). Tas tika izmantots gan sinerģiskā iedarbībā ar olbaltumvielas apvalka denaturējošām vielām, gan patstāvīgi, pēc minētā apvalka noārdīšanās. Tomēr, tā darbība netika kārtīgi novērtēta, jau minētās kristālu veidošanās dēļ. Būtībā, permeabilizācijas vielu secība ir izvēlēta tā, lai sākumā sagrautu olbaltumvielu apvalku, un tikai tad iedarboties uz atlikušo garozas slāni. Garozā esošā peptidoglikāna slāņa noārdīšanai tiek izmantots lizocīms.

Viena no grūtībām, ar kuru nācās saskarties, bija saistīta ar to, ka permeabilizācijas procedūras laikā ir jāļauj zondei sasniegt rRNS, bet tajā pašā laikā saglabāt sporu strukturālo integritāti, lai novērstu to intracelulārā satura zudumu. Kaut 1a un 2a kombinācijas tiek uzskatītas par veiksmīgām, tomēr, ir jāatzīmē, ka 0,5M DTT koncentrācijas ietekmē, sporas pilnīgi zaudē savu formu, turklāt ir novērojama paraugā esošo šūnu noārdīšanās.

Līdz ar to, otrs mēģinājums tika veikts saskaņā ar šādiem nosacījumiem: 1) Temperatūrai jābūt 65° C 2) Jāizveido SDS + DTT kombinācijas 3) Jāizmanto DTT ar samazinātu (zemāku par 0,5M) koncentrāciju (7. Tabula).

The table represents the course of second experiment

N.p. k.	1.solis	Uzturēšanas laiks	t°, C	2.solis	Uzturēšanas laiks	t°, C	Efektivitāte
1.	0,5% SDS + 70mM DTT	15min	65	2 mg/ml lizocīms	15min	37	-
2.	0,5% SDS + 25mM DTT	15min	65	2 mg/ml lizocīms	15min	37	-
3.	5% SDS + 25mM DTT	15min	65	2 mg/ml lizocīms	15min	37	-
4.	0,5% SDS + 70mM DTT	15min	65				-
5.	5% SDS + 25mM DTT	15min	65				-
6.	5% SDS + 70mM DTT	15min	65				-
7.	0,5% SDS + 70mM DTT	15min	65	7 mg/ml lizocīms	15min	37	-
8.	5% SDS + 25mM DTT	15min	65	7 mg/ml lizocīms	15min	37	+
9.	5% SDS + 70mM DTT	15min	65	7 mg/ml lizocīms	15min	37	+

Otrajā mēģinājumā savstarpēji tika salīdzinātas divas SDS un DTT koncentrācijas; Kur kļuva skaidrs, ka pat paaugstinātā DTT koncentrācijā, nav iespējams panākt sporu permeabilizāciju, bez nātrija dodecilsulfāta klātbūtnes. Turklāt tika noskaidrots, ka 0,5% SDS nav efektīvs, atšķirībā no 5% SDS, kas ar abām DTT koncentrācijām uzrādīja pozitīvu permeabilizācijas tendenci. Daudzie atkārtojumi liecina, ka SDS un DTT kombinācija ir bezspēcīga, un nespēj sagraut visas barjeras, bez lizocīma klātbūtnes.

Lizocīms ir efektīvs grampozitīvo baktēriju šūnas sienas noārdošs ferments, kas palielina šūnas sienas caurlaidību (Weerasekara et al. 2013). Kā jau bija minēts, aiz olbaltumvielas apvalka, seko garoza, kuras sastāvā galvenais komponents ir peptidoglikāns, uz kuru arī iedarbojas lizocīms. Šajā gadījumā 7 mg/ml lizocīma tika uzskatīta par piemērotāko. Tomēr, novērojumi liecina, ka labāka rezultāta sasniegšanai ir nepieciešams, vēl, papildus koriģēt vielu koncentrācijas. DTT koncentrācijai jābūt zemākai par 70mM, bet augstākai par 25mM, bez tam ir jāizmēģina augstākas lizocīma koncentrācijas.

Deere *et al.* tika ziņots, ka termiskā apstrāde ar 50% etanolu var palielināt cietu *Cryptosporidium* sienas caurlaidību (Deere et al. 2008), kas savukārt atvieglo fluorescentās zondes nokļūšanu līdz rRNS. Turklāt Weerasekara *et al.* pētījumā karsta etonola zmantošana būtiski ietekmēja *B. anthracis* sporu permeabilizāciju. Taču šajā pētījumā, sporu apstrādei ar karstu etanolu nebija manāmas ietekmes uz *C. perfringens* sporām. Pamatojoties uz Weerasekara *et al.* publikācijā izmantoto metodi, tika izmantota gan secīgā apstrāde ar etanolu, proti 50%, 80% un 96% etanola koncentrācijas, pa 1 minūtes katrā koncentrācijā, gan sporu uzturēšana 50% etanolā pirms permeabilizācijas procedūras (Weerasekara et al. 2013) (6. pielikums). Permeabilizēto sporu skaits palika nemainīgs, salīdzinot ar paralēli novērojamām, ar etanolu neapstrādātām sporām.

Trešajā mēģinājumā izdevās identificēt vielu koncentrāciju, kas uzrādīja uzlabotu FISH signāla intensitāti (8. tabula, Nr. 3).

8. tabula

Trešajā mēģinājuma izveidotas vielu kombinācijas

Table 8

The table represents the course of third experiment

N.p. k.	1.solis	Uzturēšanas laiks	t°, C	2.solis	Uzturēšanas laiks	t°, C	Efektivitāte
1.	Lizocīms 10 mg/ml	30min	37				-
2.	5% SDS + 50mM DTT	15min	65				-
3.	5% SDS + 50mM DTT	30min	65	10 mg/ml lizocīms	15min	37	++
4.	5% SDS + 50mM DTT	15min	65	10 mg/ml lizocīms	15min	37	+
5.	5% SDS + 50mM DTT	15min	65	7 mg/ml lizocīms	15min	37	+
6.	5% SDS + 50mM DTT	15min	65	2 mg/ml lizocīms	15min	37	+
7.	5% SDS + 50mM DTT	15min	65	20 mg/ml izocīms	15min	37	++
8.	10% SDS + 50mM DTT	15min	65	7 mg/ml lizocīms	15min	37	-
9.	10% SDS + 50mM DTT	15min	65	10 mg/ml lizocīms	15min	37	-
10.	10% SDS + 50mM DTT	15min	65	2 mg/ml lizocīms	15min	37	-
11.	10% SDS + 50mM DTT	15min	65	20 mg/ml izocīms	15min	37	-

Pirmo reizi tika izmēģināta 50mM DTT koncentrācija, kombinācijā ar 5% SDS (30 min.), kam sekoja 10 mg/ ml lizocīma apstrāde. Šāds maisījums sniedza efektīvu permeabilizāciju, kur vairāk par 90% parauga esošo sporu uzradīja pietiekoši augstu fluorescenci, vienlaikus saglabājot šūnu integritāti. Tomēr jāatzīmē, ka 7 mg/ ml un 20 mg/ ml lizocīma koncentrācijas uzradīja tikpat veiksmīgo rezultātu. Arī ar 2 mg/ ml lizocīma apstrādātas sporas uzradīja pietiekošu fluorescenci, taču permeabilizēto sporu skaits bija krietni zemāks (9. tabula). Divreiz paaugstināta SDS koncentrācija bojāja gan šūnu, gan sporu struktūru.

9. tabula

Kopējais permeabilizēto sporu skaits salīdzinot ar FISH iezīmētajām sporām.

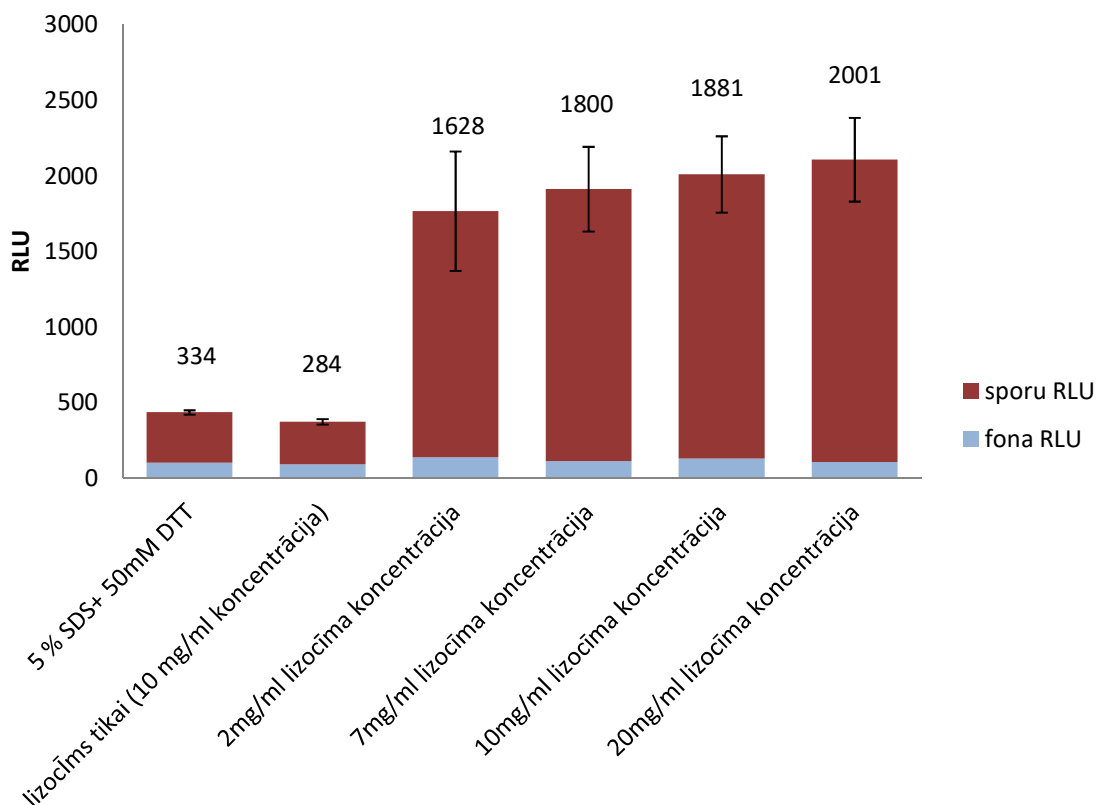
Table 9

Total spore count comparison with FISH labelled spores.

Ar FISH metodi identificētais sporas, %				
Lizocīma koncentrācija	1. mērījums	2. mērījums	3. mērījums	Vidējais identificēto sporu procents
2 mg/ ml	81%	49%	37%	63%
7 mg/ ml	85%	79%	83%	88%
10 mg/ ml	99%	98%	99%	99%
20 mg/ ml	99%	98%	99%	99%

Divpakāpju sporu apstrāde, ar nātrija dodecilsulfātu un ditiotreitolu, un tālāko apstrādi ar dažādām lizocīma koncentrācijām (2, 7, 10 un 20 mg/ ml), ir efektīvāka nekā bez lizocīma (tikai SDS + DTT), un viena paša lizocīma apstrāde (8. tabula, Nr 1, 2). Pēc sākotnējās DTT un SDS apstrādes (50mM DTT, 5% SDS– 30 min, 65° C), tika izmēģinātas 2, 7, 10 un 20 mg/ ml lizocīma koncentrācijas, kur visaugstāko fluorescences intensitāti, proti 2001 RLU, uzradīja ar 20 mg/ ml apstrādātas sporas, 1881 RLU intensitāti sporas sasniedza 10 mg/ ml lizocīma ietekmē, 1800 RLU un 1628 RLU fluorescenci sporas sasniedza pēc apstrādes ar 7 un 2 mg/ ml lizocīma attiecīgi. Kaut vidējās sporu fluorescences intensitātes vērtības bija līdzīgas, uzskaitītais permeabilizēto sporu daudzums krietni atšķīrās (12. attēls). Turklāt veiktā ANOVA testa rezultāti liecina, ka sporu fluorescences intensitāte, pēc divpakāpju apstrādes (SDS + DTT, kam seko lizoīma apstrāde), būtiski atšķīrās no vienpakāpju apstrādāto sporu fluorescences (Tikai DTT + SDS, vai lizocīma apstrāde), kur ($p < 0.05$). Apstrādājot sporas ar SDS un DTT 30 minūtes pie 65° C, maksimāli iegūtā fluorescences vērtība sasniedza 343 RLU. Vēl zemāko

rezultātu uzradīja vienīgi apstrāde ar lizocīmu, kur vidējā vērtība no trim mērījumiem sastādīja 284 RLU (11. attēls).



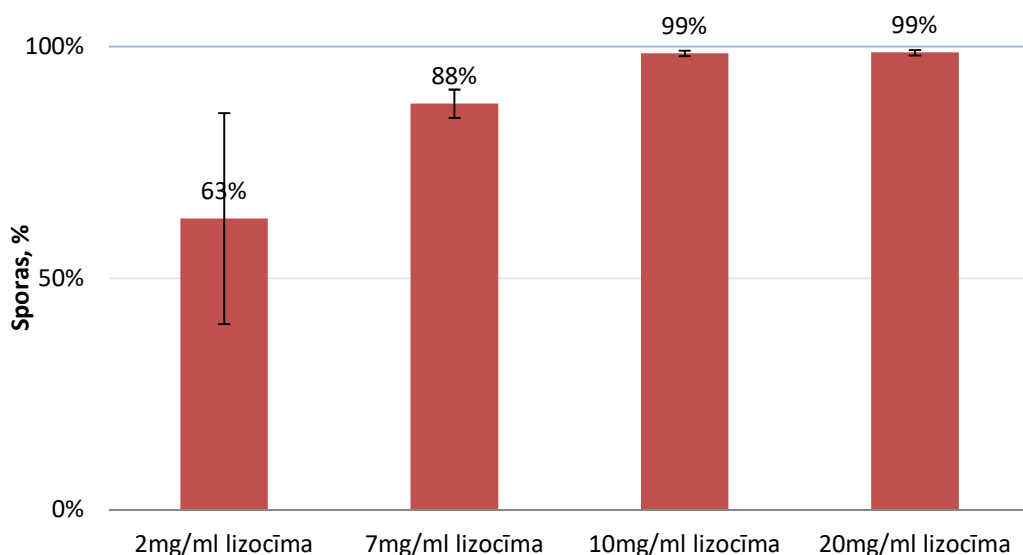
11. attēls. Atšķirīgu *C. perfringens* sporu permeabilizācijas paņēmieni izmantošana pirms FISH procedūras. Standartnovirze atspoguļo vidējo vērtību no trīs atkārtojumiem.

Figure 11. Effect of different permeabilization treatments on *C. perfringens* spore FISH. Error bars indicate the standard deviation of triplicate determinations.

Darba gaitā, veicot metodes tālākus uzlabojumus, tika novērots, ka, atšķirībā no SDS ditiotreitola šķīdums ir jā sagatavo tieši pirms permeabilizācijas procedūras veikšanas. DTT ir stiprs reducētājs, bet viegli oksidējošs un gaisā vai SDS klātbūtnē diezgan ātri zaudē savas īpašības. Turklāt tika pagarināts inkubēšanas laiks no 15 min., līdz 30 min., kas arī ievērojami paaugstināja permeabilizēto sporu daudzumu. Stingri ir jāievēro ne tikai buferu koncentrācijas, bet arī temperatūra. Tai jābūt virs 65° C. Vairāki atkārtojumi liecina, ka 65° C nav iespējams panākt kārtīgu sporu permeabilizāciju. Turklāt apstrāde 65° C neiedeva stabilu permeabilizēto sporu koncentrāciju— to procents variē katrā no veiktajiem atkārtojumiem. Taču apstrādājot sporas 70° C, tika panākts apmierinošs rezultāts.

Izveidotā permeabilizācijas stratēģija balstās uz secīgu sporu apvalku noārdīšanu. Tā 5% SDS un 50mM DTT, paaugstinātā temperatūrā, noārda olbaltumvielu apvalku (ārējo slāni), denaturējot tajā esošos proteīnus, pārraujot disulfīdu saites. Uz atlikušo peptidoglikāna slāni iedarbojas lizocīms, kur optimālai rezultāta iegūšanai var izmantot 10 vai 20 mg/ ml lizocīma koncentrācijas.

Tālāka pētījuma gaitā, lai noteiktu permeabilizēto sporu daudzumu, tika ņemti 20 brīvi izvēlētie redzes lauki, kuros tika saskaitīts un salīdzināts, fluorescējošo un kopējo (ar DAPI krāsotu) sporu skaits. Trīs atkārtojumu rezultāti liecina, ka 7 mg/ ml lizocīma klātbūtnē permeabilizēto sporu skaits sasniedza 88%, bet 2 mg/ ml lizocīma iedarbības rezultātā, tika permeabilizētas vairāk par pusi, no visām paraugā esošām sporām. Savukārt, lielākas lizocīma koncentrācijas, proti 10 mg/ ml un 20 mg/ ml, tika sasniegta 99% sporu permeabilizācija (12. attēls).

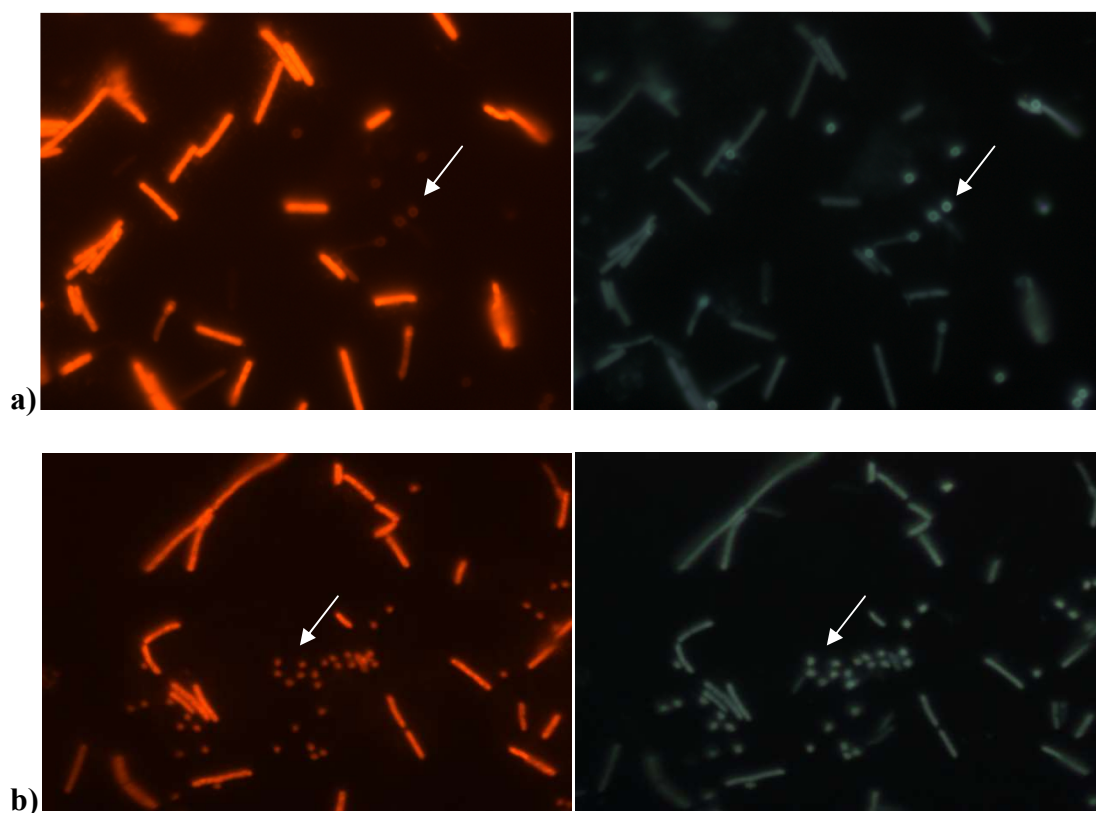


12. attēls. Permeabilizēto sporu procents, atkarībā no izmantotas lizocīma koncentrācijas.

Figure 12. Treated spores percentage, depending on the lysozyme concentration used.

Sporu permeabilizācija, pirms hibridizācijas, būtiski ietekmēja *C. perfringens* sporu fluorescences intensitāti ($p < 0.05$), ja nepermeabilizēto sporu fluorescences intensitāte sasniedza ~200 RLU (208 RLU, vidējā vērtība no trim atkārtojumiem), tad ar 5% SDS + 50mM DTT un tālāko 10 mg/ ml lizocīma apstrādāto sporu fluorescences intensitāte paaugstinājās deviņas reizes, sasniedzot 1800 RLU vērtību (13. attēls). Taču jāpiemin, ka, izmantojot šādu

permeabilizācijas, pieeju, sporas neizbēgami samazinās diametrā. Vienīgi izmantojot 2 mg/ml lizocīma koncentrāciju, tās vairāk vai mazāk saglabā sākotnējo izmēru, taču šī koncentrācijas izmantošana nenodrošina augsto permeabilizēto sporu procentu.



13. attēls. *C. perfringens* sporu (atzīmetas ar bultiņu) un šūnu FISH procedūras salīdzinājums a) bez iepriekšējas permeabilizācijas b) ar veikto permeabilizāciju, pirms hibridizācijas procedūras. Pa labi FISH, pa kreisi krāsots ar DAPI.

Figure 13. The comparison of *C. perfringens* spores (indicated by arrow) and cells FISH a) without prior permeabilization b) carried out permeabilization, before hybridization procedures. FISH on the right, stained by DAPI on the left side.

3.4. *Clostridium perfringens* sporu un šūnu identificēšana bioplēvē

Izstrādātā metode nodrošina gan veiksmīgu sporu permeabilizāciju, vienlaikus saglabājot veģetatīvas šūnas integritāti, gan arī augstu šūnu un sporu fluorescenci. Tomēr nepieciešams pārbaudīt, vai dabiskos apstākļos sasniedzams tikpat veiksmīgs rezultāts. Šim nolūkam, tika audzēta dzeramā ūdens bioplēve (1.14. nodaļa), kura pēc tam tika kontaminēta ar *Clostridium perfringens* sporu un šūnu suspensiju. Vienlaikus tika uzturēta otra sistēma, kurai netika veikta kontaminācija. Pēc tam kuponi tika pakļauti FISH

procedūrai (ar iepriekšējo permeabilizācijas procedūru), mikroskopēšanai tika izmantota 2.15. nodaļā aprakstītā metode, kur tika izanalizēta 1/5 kupona daļa, un noteikšanas robeža tika samazināta līdz piecām šūnām uz kupona virsmas, jeb 1 šūnai uz cm².

Vislielākais *C. perfringens* sporu un šūnu skaits, ko izdevās identificēt ar FISH metodi, bija 16 šūnas uz vienu kupona kvadrātcentimetru (10. tabula). Kaut potenciālo *C. perfringens* šūnu skaits bija pietiekošs, tomēr kuponiem Nr. 2 un Nr. 3, tika konstatēts ievērojami zemāks šūnu skaits, jāmin, ka sporas šajos paraugos netika konstatētas. Pārsteidzoši arī nekontaminētos paraugos tika konstatētas *C. perfringens* šūnas ar fluorescenci virs 1000 RLU. Tas var būt izskaidrojams ar dabisko *Clostridium* pārstāvju esamību krāna ūdenī, un to identificēšanu ar izmantoto metodi. Analizējot kuponus, potenciālas (fluorescējošas) šūnas un/ vai sporas ar fluorescences intensitāti zem 1000 RLU netika ņemtas vērā.

Kā tika novērots, dabiskos paraugos var būt sastopami dažāda veida piesārņojumi, kuri var ietekmēt mikroskopa attēla kvalitāti. Paraugu analīzi un identificēšanu apgrūtināja arī liels citu baktēriju blīvums. Vietām nebija iespējams iegūt viendabīgi asu attēlu. Tādējādi, var secināt, ka izstrādātā permeabilizācijas metode nav destruktīva baktēriju šūnām.

10. tabula

Identificētais *C. perfringens* sporu un/ vai šūnu skaits ar FISH metodi

Table 10

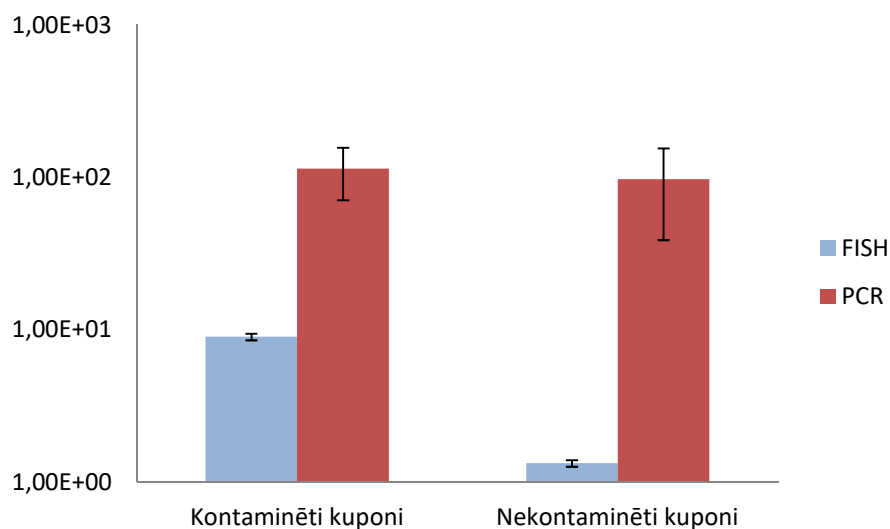
Identified *C. perfringens* spores and/ or cells by FISH method

Kuponi	<i>C. perfringens</i> sporu un/ vai šūnu skaits uz 1 cm ² kupona virsmas
1. Kontaminēts kupons	16
2. Kontaminēts kupons	4
3. Kontaminēts kupons	7
1. Nekontaminēts kupons	1
2. Nekontaminēts kupons	1
3. Nekontaminēts kupons	2

Paralēli FISH, *C. perfringens* klātbūtne tika apstiprināta ar alternatīvu metodi – polimerāzes ķēdes reakciju. Pozitīvs signāls tika konstatēts visiem atšķaidījumiem, izņemot negatīvo kontroli, kurā DNS vietā tika pievienots ūdens. qPCR reakcija tika veikta ar 105% efektivitāti, kas tika izrēķināta atbilstoši 2.17. nodaļā minētai formulai, un korelācijas koeficientu (R2) vienādu ar 0,965.

Salīdzinot *C. perfringens* skaitu, abas metodes demonstrēja zemas *Clostridium* koncentrācijas, uz kupona kvadrātcimetru (14. attēls). Pozitīvās kontroles gadījumā tika konstatēts līdzīgs šūnu skaits, kur ar qPCR metodi tika konstatēts $1 \cdot 10^2$ šūnu, tajā laikā kad ar FISH tika identificēts $1 \cdot 10^1$ šūnu. Kā vienu no iemesliem kāpēc FISH uzrādīja zemāku skaitu nekā qPCR var minēt baktēriju zudumu, kas ir neizbēgama, jo gan permeabilizācijas, gan hibridizācijas procedūras iekļauj paraugu mazgāšanu. qPCR rezultāti parādīja ka, gan kontaminētos, gan nekontaminētos paraugos klostrīdiu skaits bija vienāds. Pretēji, ar FISH metodi kontaminētos paraugos noteiktais šūnu skaits, pārsniedz nekontaminētos paraugos atklāto baktēriju skaitu. Šādas atšķirības skaidrojamas ar to, ka dabiski bioplēvē sastopamām klostrīdijām ir zemāka fluorescences intensitāte, kas analizējot netika ņemtas vērā. Savukārt, to identificēšana ir iespējama, jo izmantotas zondes (un praimeri) ir paredzēti plašai *Clostridium* grupas pārstāvju identificēšanai.

Ūdenī esošo baktēriju vairākums ir novājināts un cieš badu, tādēļ tām bieži novērojams samazināts fluorescences signāls, kurš identificējams vēl grūtāk dabiski augstās fona fluorescences dēļ (Pernthaler et al. 2001). Vairākkārt zinātniskajā literatūrā tika minēts, ka FISH ir limitēts it sevišķi analizējot dabiskus paraugus, galvenokārt tas var būt saistīts ar nepietiekamu jutību, nepietiekošu mērķa molekulu skaitu šūnās, zemo zondes caurlaidību, vai arī zemo signāla intensitāti (Kubota 2013, Deshmukh et al. 2016, Rastogi et al. 2012, Ferrari et al. 2006, Filion et al. 2009, Almeida et al. 2011). Turklāt ribosomu skaits ir cieši saistīts ar šūnu metabolisko aktivitāti (Nettmann et al. 2013). Attiecīgi jo zemāka ir baktēriju metaboliskā aktivitāte, jo zemāks ir zondes mērķu skaits, jo zemāka ir sagaidāma fluorescence.



14. attēls. *C. perfringens* sporu un/ vai šūnu skaita noteikšana ar divām metodēm. Identificēto šūnu skaits uz kupona 1cm², vidējais no trim atkārtojumiem

Figure 14. *C. perfringens* spores and/ or cells determination using two methods. The identified cells count per 1cm² of coupon, the average of the three measurements.

Pēdējos gados veiktie uzlabojumi, kas vērsti minēto problēmu risināšanai ietver: spilgtāku fluorohromu izmantošanu, piemēram, PNA zondes, kas ir īsākas, parasti sastāv no 15 bp., uzrāda augstāku specifiskumu un jutību nekā parastās zondes (Almeida et al. 2011). Alexa fluorescējošas krāsvielas ir fotostabilākas, labi šķīst ūdenī, tādējādi saistīšanās notiks bez papildus šķīdinātājiem. Vienlaikus Alexa zondes nav jutīgas pret pH izmaiņām. Tāpat, novājināto baktēriju efektīvai identificēšanai, var būt izmantojams CARD FISH, kur mārrutku peroksidāze sekmē fluorescentā signāla amplifikāciju (Kubota 2013, Ferrari et al. 2006). Fona fluorescences līmeņa reducēšanai ir jāsamazina izmantotās zondes koncentrācija, kas samazina nepecifiskās saistīšanās riskus (Kubota 2013).

Analizējot darba rezultātus var redzēt, ka, izmantojot izstrādāto metodi, pat bez papildus uzlabojumiem bioplēves paraugos tika konstatētas gan *C. perfringens* šūnas, gan sporas, ar fluorescences intensitāti virs 1000 RLU. Kā arī šūnu koncentrācija bija salīdzināma ar qPCR rezultātiem. Kaut arī bija skaitliskas atšķirības, *Clostridium* klātbūtne tika konstatēta visos pārbaudītajos paraugos ar abām metodēm. Tālākos pētījumos, specifiskai *C. perfringens* identificēšanai būtu vērts izmantot atbilstošas zondes.

Šajā pētījumā izstrādātais permeabilizācijas protokols, mijiedarbībā ar Fluorescentas *in situ* hibridizācijas metodi ļauj panākt augstu *C. perfringens* sporu fluorescenci mazāk nekā 6 stundu laikā, ieskaitot permeabilizācijas un hibridizācijas posmus. Tomēr, tā var nebūt pietiekoši jutīga, lai identificētu ūdeni esošas novājinātas baktērijas ar zemu rRNS

daudzumu. Dabisko paraugu analizēšanai ir nepieciešams optimizēt protokolu fluorescentā signāla pastiprināšanai un fona līmeņa samazināšanai, kā arī veikt uzlabojumus, lai novērstu lielus šūnu zudumus veicot paraugu apstrādi.

4. SECINĀJUMI

1. Izmantotais 5% SDS un 50 mM DTT maisījums, ar tālāko 10 mg/ ml vai 20 mg/ ml lizocīma apstrādi, palielināja *C. perfringens* sporu fluorescences intensitāti deviņas reizes, sasniedzot 1800 RLU.
2. Izstrādātais permeabilizācijas protokols ļauj panākt ne tikai *C. perfringens* sporu permeabilizāciju, bet vienlaikus saglabāt veģetatīvo šūnu integritāti.
3. Apvienojot izstrādāto permeabilizācijas protokolu ar Fluorescento *in situ* hibridizāciju, dabiskajos paraugos ir iespējams identificēt *Clostridium perfringens* veģetatīvas šūnas un sporas, ar fluorescences intensitāti virs 1000 RLU.
4. Precīzā *C. perfringens* skaita noteikšanai dzeramās ūdens paraugos, ir nepieciešams optimizēt protokolu fluorescenta signāla pastiprināšanai un fona līmeņa samazināšanai, jāizmanto tikai tai specifiskās fluorescentās zondes, ka arī jānovērš lielus šūnu zudumus veicot mazgāšanas etapus.

5. PATEICĪBAS

Pateicos darba vadītājai Dr.sc.ing. Asoc.prof Lindai Mežulei par iespēju izstrādāt maģistra darbu RTU Ūdens pētniecības laboratorijā, par sniegtajiem vērtīgiem norādījumiem. Liels paldies arī ūdens pētniecības laboratorijas komandai, par atsaucību un palīdzību eksperimentu realizēšanā un izveidē.

Darbs izstrādāts Valsts pētījumu programmas (VPP) "Energoefektīvi un oglekļa mazietilpīgi risinājumi drošai, ilgtspējīgai un klimata mainību mazinošai energoapgādei" (LATENERGI) projekta Ūdeņraža un biodegvielu ieguves inovatīvās tehnoloģijas, to uzglabāšana, kvalitātes kontrole, kvalitātes nodrošināšana un izmantošana Latvijā (4.2. apakšprojekts) ietvaros. Vienošanās Nr. 2014.10-4/VPP-1/27.

6. LITERATŪRAS SARAKSTS

Abdelmassih M., Planchon V., Anceau C., Mahillon J. 2011. Development and validation of stable reference materials for food microbiology using *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* spores. –Journal of Applied Microbiology, 110(6): 1524-1530.

Abee T., Groot M.N., Tempelarrs M., Zwietering M., Moezelaar R., Van de Abel-Santos E. 2012. Bacterial spores: current research and applications. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 143-165 lpp.

Adcock P.W., Saint C.P. 2001. Rapid confirmation of *Clostridium perfringens* by using chromogenic and fluorogenic substrates. –Applied and Environmental Microbiology, 67: 4382–4384.

Ahmed W., Huygens F., Goonetilleke A., Gardner T. 2008. Real-Time PCR Detection of Pathogenic Microorganisms in Roof-Harvested Rainwater in Southeast Queensland, Australia. –Applied and Environmental Microbiology, 74(17): 5490- 5496.

Allen J.M., Edberg S.C., Reasoner J.D. 2004. Heterotrophic plate count bacteria—what is their significance in drinking water? –Elsevier, 92: 265-274.

Almeida C., Azevedo N.F., Santos S., Keevil C.W., Vieira M.J. 2011. Discriminating Multi-Species Populations in Biofilms with Peptide Nucleic Acid Fluorescence *in situ* Hybridization (PNA FISH). –Plos One, 6(3): 147-157.

Amann R., Fuchs B.M., Behrens S. 2001. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization. –Current Opinion in Biotechnology, 12(3): 231-236.

Armisen T.G. 2004. Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent *in situ* hybridization. –Elsevier, 58(2): 269-279.

Baeumner A.J., Leonard B., McElwee J., Montagna R.A. 2004. A rapid biosensor for viable *B. anthracis* spores. –Analytical and Bioanalytical Chemistry, 1: 15-23.

Bartholomew J.W., Mittwer T. 1950. A Simplified Bacterial Spore Stain. –Stain Technology, 25(3):153-6.

Byrne B., Dunne G., Bolton D.J. 2006. Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. –Elsevier, 23: 803–808.

Chankhamhaengdecha S., Hadpanus P., Aroonual A., Ngamwongsatit P., Chotiprasitsakul D., Chongtrakool P., Janvilisri T. 2013. Evaluation of Multiplex PCR with Enhanced Spore Germination for Detection of *Clostridium difficile* from Stool Samples of the Hospitalized Patients. –BioMed Research International, 1-6 lpp.

Charlebois A., Jacques M., Archambault M. 2014. Biofilm formation of *Clostridium perfringens* and its exposure to low-dose antimicrobials. –Frontiers in Microbiology, 5: 183-192.

Cimino M., Alamo L., Salazar L. 2006. Permeabilization of the mycobacterial envelope for protein cytolocalization studies by immunofluorescence microscopy. –BMC Microbiology, 6(1): 35-39.

Comas-Riu J., Vives-Rego J. 2002. Cytometric monitoring of growth, sporogenesis and spore cell sorting in *Paenibacillus polymyxa* (formerly *Bacillus polymyxa*). –Journal of Applied Microbiology, 92(3): 475-481.

Deere D., Vesey G., Ashbolt N., Davies K.A., Williams K.L., Veal D. 1998. Rapid method for fluorescent *in situ* ribosomal RNA 62 nteric 62 of *Cryptosporidium parvum*. – Journal of applied microbiology, 85(5): 807-818.

Deshmukh R.A., Joshi K., Bhand S., Roycorresponding U. 2016. Recent developments in detection and enumeration of waterborne bacteria: a retrospective minireview. –Microbiology Open, 5(6): 901-922.

Domanska M., Kuhn R., Lomotowski J., Stanczyk E. 2014. Fish method for identification of microbes in wastewater distribution systems. –Environment Protection Engineering, 40(3): 151-161.

Driks A. 2007. Surface appendages of bacterial spores. –Journal of Molecular Biology, 63(3): 623-625.

Drummen G.P.C. 2012. Fluorescent Probes and Fluorescence (Microscopy) Techniques – Illuminating Biological and Biomedical. –Journal Molecules, 17(12): 14067-14090.

Duncan C.L., Strong D.H. 1968. Improved Medium for Sporulation of *Clostridium perfringens*. –Applied Microbiology, 16(1): 82-89.

Ellner P.D. 1956. A medium promoting rapid quantitative sporulation in *Clostridium perfringens*. –Journal of Bacteriology, 71(4): 495-496.

Enan G. 2006. Inhibition of *Clostridium perfringens* LMG 11264 in Meat Samples of Chicke, Turkey and Beef by the Bacteriocin Plantaricin UG1. –International Journal of Poultry Science 5(2): 195-200.

Farkas A., Dragan-Bularda M., Ciataras D., Bocos B., Tigan S. 2012. Opportunistic pathogens and faecal indicators in drinking water associated biofilms in Cluj, Romania. – Journal of Water and Health, 10(3): 471-483.

Ferrari B. C., Tujula N., Stoner K., Kjelleberg S. 2006. Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescence *In Situ* Hybridization Allows for Enrichment-Independent

Detection of Microcolony-Forming Soil Bacteria. –Applied and Environmental Microbiology, 72(1): 918–922.

Figueras M.J., Borrego J.J. 2010. New Perspectives in Monitoring Drinking Water Microbial Quality. –International Journal of Environmental Research and Public Health, 7(12): 4179-4202.

Filion G., Laflamme C., Turgeon N., Ho J., Duchaine C. 2009. Permeabilization and hybridization protocols for rapid detection of *Bacillus* spores using fluorescence *in situ* hybridization. –Journal of Microbiological Methods, 77(1): 29-36.

Flemming H.C., Wingender J. 2010. The biofilm matrix. –Nature Reviews Microbiology, 8(1): 623-633.

Franks A.H., Harmsen H.J.M., Raangs G.C., Jansen G.C., Schut F., Welling G.W. 1998. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. –Applied and Environmental Microbiology, 64(9): 3336-3345.

Girones R., Ferru M.A., Alonso J.L., Manzano J.R., Calgua B., Corre A.A., Hundesa A., Carratala A., Mas S.B. 2010. Molecular detection of pathogens in water the pros and cons of molecular techniques. –Elsevier, 44: 4325-4339.

Harmsen H.J.M., Gibson G.R., Elfferich P., Raangs G.C., Wildeboer-Veloo A.C.M., Argaiz A., Roberfroid M.B., Welling G.W. 2000. Comparison of viable cell counts and fluorescence *in situ* hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria. –FEMS Microbiology Letters, 183(1): 125-129.

Hornstra L.M., Vries Y.P., Vos W.M., Abee T., Wells-Bennik M.H.J. 2005. gerR, a novel ger operon involved in L-alanine- and inosine-initiated germination of *Bacillus cereus* ATCC 14579. –Applied Environmental Microbiology, 71: 774–781.

Huang I.H., Raju D., Paredes-Sabja D., Sarker M. 2007. *Clostridium perfringens*: Sporulation, spore resistance and germination. –Bangladesh Journal Microbiology, 24(1): 1-8.

Ichijo T., Yamaguchi N., Tani K., Nasu M. 2010. Oligonucleotide Probes for Phylogenetic Detection of Waterborne Bacteria. –Journal of Health Science, 56(3): 321-325.

Yang W.W., Crow-Willard E.N., Ponce A. 2009. Production and characterization of pure *Clostridium* spore suspensions. –Journal of Applied Microbiology, 106: 27-33.

Juneja V.K., Novak J.S., Labbe R.J. *Clostridium perfringens*. In: Juneja VK, Sofos JN, editors. Pathogens and Toxins in Foods: Challenges and Interventions. Washington, DC: ASM Press; 2010. 53–70 lpp.

Kahlisch L., Henne K., Groebe L., Draheim J., Höfle M. G., Brettar I. 2010. Molecular analysis of the bacterial drinking water community with respect to live/dead status. –Water Science & Technology, 61(1): 9-14.

Kay D., Fricker C. 2012. The significance of faecal indicators in water : A Global Perspective, 107-108 lpp.

Kim C.H., Cheney R., Woodburn M. 1967. Sporulation of *Clostridium perfringens* in a Modified Medium and Selected Foods. – Applied Microbiology, 15(4): 871-876.

Klotz M.G., Stein L.Y. 2011. Methods on Enzymology. Research on Nitrification and Related Processes, Part B. Volume 496. 277 lpp.

Koley D., Bard A.J. 2010. Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(39): 16783–16787.

Kubota K. 2013. CARD-FISH for Environmental Microorganisms: Technical Advancement and Future Applications. –Microbes and Environments, 28(1): 3–12.

Kusel K., Pinkart H. C., Drake H. L., Devereux R. 1999. Acetogenic and sulfate-reducing bacteria inhabiting the rhizoplane and deep cortex cells of the sea grass *Halodule wrightii*. –Applied and Environmental Microbiology, 65(11): 5117-5123.

Laflamme C., Gendron L., Turgeon N., Filion G., Ho J., Duchaine C. 2009. Rapid detection of germinating *Bacillus cereus* cells using Fluorescent *in situ* hybridization. – Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology 17: 80–102.

Lee J., Lee C.S., Hungunin K.M., Maute C.J., Dysko R.C. 2010. Bacteria from drinking water supply and their fate in gastrointestinal tracts of germ-free mice: A phylogenetic comparison study. –Elsevier, 44(17): 5050-5058.

Lemmon G.H., Gardner S.N. 2008. Predicting the sensitivity and specificity of published real-time PCR assays. –Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 7(1): 18-28.

Li J., Mc Clane B.A. 2010. Evaluating the Involvement of Alternative Sigma Factors SigF and SigG in *Clostridium perfringens* Sporulation and Enterotoxin Synthesis. – Infection and Immunity, 78(10): 4286-4293.

Maheux A.F., Berube E., Boudreau D.K., Villeger R., Cantin P., Boissinot M., Bissonnette L., Bergeron M.G. 2013. Abilities of the mCP Agar Method and CRENAME Alpha Toxin-Specific Real-Time PCR Assay To Detect *Clostridium perfringens* Spores in Drinking Water. –Applied and Environmental Microbiology, 79(24): 7654-7661.

Maier R.M., Pepper I.L., Gerba C.P. Environmental Microbiology. Second Edition. 2009, 173-175 lpp.

McIlroy S.J., Nittami T., Kanai E., Fukuda J., Saunders A.M., Nielsen P.H. 2015. Re-appraisal of the phylogeny and fluorescence *in situ* hybridization probes for the analysis of the Competibacteraceae in wastewater treatment systems. –Environmental microbiology reports, 7(2): 166-174.

Mežule L. 2011. Nekultivējamo *E. coli* nozīme dzeramā ūdens apgādes sistēmās. – Promocijas darbs, Rīgas Tehniskā universitāte.

Mohapatra B.R., Duc M. T. 2012. Evaluation of fluorescence *in situ* hybridization to detect encapsulated *Bacillus pumilus* SAFR-032 spores released from poly (methylmethacrylate). –Microbiology and Immunology, 56(1): 40-47.

Mohapatra B.R., Duc M.T. 2012. Evaluation of fluorescence *in situ* hybridization to detect encapsulated *Bacillus pumilus* SAFR-032 spores released from poly (methylmethacrylate). –Microbiology and Immunology, 56(1): 40-47.

Mohapatra B.R., Duc M.T. 2012. Rapid detection of viable *Bacillus pumilus* SAFR-032 encapsulated spores using novel propidium monoazide-linked fluorescence *in situ* hybridization. –Journal of Microbiological Methods, 90(1): 15-19.

Momba M.N.B., Kfir R., Venter S.N., Cloete T.E. 2000. An overview of biofilm formation in distribution systems and its impact on the deterioration of water quality. – Water SA, 26(1): 59-66.

Mongkolthanaruk W., Robinson C., Moir A. 2009. Localization of the GerD spore germination protein in the *Bacillus subtilis* spore. –Microbiology Society Journal, 155(4): 1146-1151.

Morel N., Volland H., Dano J., Lamourette P., Sylvestre P., Mock M., Creminon C. 2012. Fast and Sensitive Detection of *Bacillus anthracis* Spores by Immunoassay. – Applied and Environmental Microbiology, 78(18): 6491-6498.

Moter A., Gobel U.B. 2000. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. –Journal of Microbiological Methods, 41(2): 85-112.

Mueller-Spitz S.R., Stewart L.B., McLellan S.L. 2010. Reliability of mCP method for identification of *Clostridium perfringens* from faecal polluted aquatic environments. – Journal of Applied Microbiology, 108(6): 1994-2002.

Mulvey D., Redding P., Robertson C., Woodal C., Kingsmore P., Bedwell D., Dancer S.J. 2011. Finding a benchmark for monitoring hospital cleanliness. –Journal of Hospital Infections, 77: 25-30.

NASA. 2014. A novel protocol for decoating and permeabilizing bacterial spores for epifluorescent microscopy. NASA's Jet Propulsion Laboratory, Pasadena, California.

Nettmann E., Frohling A., Heeg K., Klocke M., Schluter O., Mumme J. 2013. Development of a flow-fluorescence *in situ* hybridization protocol for the analysis of microbial communities in anaerobic fermentation liquor. –BMC Microbiology, 13(1): 278-283.

Nistico L., Gieseke A., Stoodley P., Hall-Stoodley L., Kerschner J.E., Ehrlich G.D. 2009. Fluorescence *in situ* hybridization for the detection of biofilm in the middle ear and upper respiratory tract mycose. –Auditory and Vestibular research: Methods and Protocols, 493: 191-213.

Obana N., Nakamura K., Nomura N. 2014. A Sporulation Factor Is Involved in the Morphological Change of *Clostridium perfringens* Biofilms in Response to Temperature. –Journal of Bacteriology, 196(8): 1540-1550.

Olguin-Araneda V, Banawas S, Sarker M.R, Paredes-Sabja D. 2015. Recent advances in germination of *Clostridium* spores. –Research in Microbiology, 166: 236–243.

Paredes-Sabja D., Setlow P., Sarker M.R. 2011. Germination of spores of *Bacillales* and *Clostridiales* species: mechanisms and proteins involved. –Trends in Microbiology 19 (2): 85-94.

Paredes-Sabja D., Torres A., Setlow P., Sarker M.F. 2008. *Clostridium perfringens* Spore Germination: Characterization of Germinants and Their Receptors. –Journal of Bacteriology, 190(4): 1190-1201.

Pavlekovic M., Schmid M.C., Schmider-Poignee N., Spring S., Pilhofer M., Gaul T., Fiandaca M., Lof F.E., Jetten M., Schleifer K.H., Lee N.M. 2009. Optimization of three FISH procedures for *in situ* detection of anaerobic ammonium oxidizing bacteria in biological wastewater treatment. –Journal of Microbiological Methods, 78: 119-126.

Pernthaler J., Glockner F.O., Schonhuber W., Amann R. 2001. Fluorescence *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. –Methods in Microbiology: Marine Microbiology, 30. Academic Press Ltd, London.

Raju D., Waters M., Setlow P., Sarker M. R. 2006. Investigating the role of small, acid-soluble spore proteins (SASPs) in the resistance of *Clostridium perfringens* spores to heat. –BMC Microbiology, 6: 1471-2180.

Ramírez-Castillo F.Y., Loera-Muro A., Jacques M., Garneau P., Avelar-Gonzalez F.J., Harel J., Guerrero-Barrera A.L. 2015. Waterborne Pathogens: Detection Methods and Challenges. –Pathogens, 4(2): 307-334.

Rastogi G., Sani R.K. 2011. Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function, and Dynamics in the Environment. –Microbes And Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications, Springer, 29-57 lpp.

Remacle C., Reusens B. 2004. Functional foods, ageing and degenerative disease. Woodhead Publishing Limited. 336 lpp.

Rhodehamel E., Harmon S. 2001. Bacteriological Analytical Manual: *Clostridium perfringens*. US FDA, Rockville.

Ryzinska-Paier G., Sommer R., Haider J.M., Knetsch S., Frick C., Kirschner A.K.T., Farnleitner A.H. 2011. Acid phosphatase test proves superior to standard phenotypic identification procedure for *Clostridium perfringens* strains isolated from water. –Journal of Microbiological Methods, 87(2): 189-194.

Rozwadowska B., Albertynska M., Hudzik G., Okla H., Jasik K.P., Slodki J. 2013. Application of a real-time PCR method for *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Clostridium perfringens* detection in water samples. –The Polish Society of Microbiologists, 62(4): 439-43.

Sacks L.E., Thompson P.A. 1977. Clear, Defined Medium for the Sporulation of *Clostridium perfringens*. –Applied and Environmental Microbiology, 35(2): 405-410.

Sarosdy M.F., Schellhammer P., Bokinsky G., Kahn P., Chao R., Yore L., Zadra J., Burzen D., Osher G., Bridge J.A., Anderson S., Johanson S., Lieber M., Soloway M., Flom K. 2002. Clinical evaluation of a multi-target Fluorescent *in situ* hybridization assay for detection of bladder cancer. –Elsevier, 168(5): 1950-1954.

Savitcheva O., Okabe S. 2006. Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. –ScienceDirect-Water Research, 40(13): 2463-2476.

Setlow P. 2003. Spore germination. -Current Opinion in Microbiology, 6: 550–556.

Setlow P. 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. –Journal of Applied Microbiology, 101(3): 514-525.

Shimizu S., Ootsubo M., Kubosawa Y., Fuchizawa I., Kawai Y., Yamazaki K. 2009. Fluorescent *in situ* hybridization in combination with filter cultivation (FISHFC) method for specific detection and enumeration of viable *Clostridium perfringens*. –Elsevier, 26: 425-431.

Skipton S.O., Dvorak B.I., Woldt W.E., Kranz W.L. 2007. Drinking water treatment: Shock chlorination. –University of Nebraska, Lincoln Extension Publications, G1761.

Smeets, Rietveld, Hijnen, Medema, Stenstrom. 2006. *Clostridium perfringens* Guidance for Local Authorities. –Private Water Supplies.

Stevenson K.E., Vaughn R.H. 1972. Exosporium Formation in Sporulating Cells of *Clostridium botulinum* 78A. –Journal of Bacteriology, 112(1): 618-621.

Stoecker K., Dorninger C., Daims H., Wagner M. 2010. Double Labeling of Oligonucleotide Probes for Fluorescence *In Situ* Hybridization (DOPE-FISH) Improves Signal Intensity and Increases rRNA Accessibility. –Applied Environmental Microbiology, 76(3): 922-926.

Tortora .C.O. 1984. Alternative Medium for *Clostridium perfringens* Sporulation. – Applied and Environmental Microbiology, 47(5): 1172-1174.

Varga J., Therit B., Melville S.B. 2008. Type IV Pili and the CcpA Protein Are Needed for Maximal Biofilm Formation by the Gram-Positive Anaerobic Pathogen *Clostridium perfringens*. –Infection and Immunity, 76(11): 4944-4951.

Voort M. 2011. Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: Diversity and role of germinant receptors. –Food Microbiology, 28: 199-208.

Wagner M., Horny M., Daims H. 2003. Fluorescence *in situ* hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. –Current Opinion in Microbiology, 6(3): 302–309.

Wang D. B. , Tianb B., Zhang Z.P., Wang X.J., Fleming J., Bi L.J., Yang R.F., Zhang X.E. 2015. Detection of *Bacillus anthracis* spores by super-paramagnetic lateral-flow immunoassays based on “Road Closure”. –Elsevier, 67: 608-614.

Weerasekara M.L., Ryuda N., Miyamoto H., Okumura T., Ueno D., Inoue K., Someya T. 2013. Double-color fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for the detection of *Bacillus anthracis* spores in environmental samples with a novel permeabilization protocol. –Elsevier, 93(3): 177-184.

Xiao Y., Wagendorp A., Moezelaar R., Abee T., Wells-Bennik M. 2012. A Wide Variety of *Clostridium perfringens* Type A Food-Borne Isolates That Carry a Chromosomal *cpe* Gene Belong to One Multilocus Sequence Typing Cluster. –Applied and Environmental Microbiology, 78(19): 7060-7068.

Долгоносков Б.М., Корчагин К.А., Мессинева Е.М. 2006. Модель Флуктуаций бактериологических показателей качества речной воды. –Водные ресурсы, 33(6): 686-700.

PIELIKUMI

1. pielikums

Šķīdumu pagatavošanas receptes

N.p.k	Šķīduma nosaukums	Sastāvdaļas	Nepieciešamais daudzums uz 100ml
1.	Fosfāta buferis	200mM NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O 200mM Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O Sajaukt attiecība 20:80 pH= 7,2-7,4	3,12g 7,16g
2.	3× Fosfāta bufera sāls (PBS)	390 mM NaCl 15% Fosfāta buferis pH= 7,2-7,4	2,27g 15ml
3.	1× Fosfāta bufera sāls (PBS)	130 mM NaCl 5% Fosfāta buferis pH= 7,2-7,4	0.76g 5ml
4.	4% paraformaldehīds (PFA)	Uzsildīt H ₂ O līdz 65°C Pievienot PFA NaOH 3×PBS Noturēt istabas temperatūra Filtrēt ar 0.22µm filtru pH= 7,2-7,4	66ml 4g Līdz PFA izšķīšanai 33,20ml
5.	5M NaCl	NaCl	29.22g
6.	1M Tris/ HCl	Tris/HCl	15.8g
7.	0.5M etilēndiamīntetraacetāts (EDTA)	EDTA pH=8	14,60g
8.	10% Nātrija dodecilsulfāts (SDS)	SDS	10g

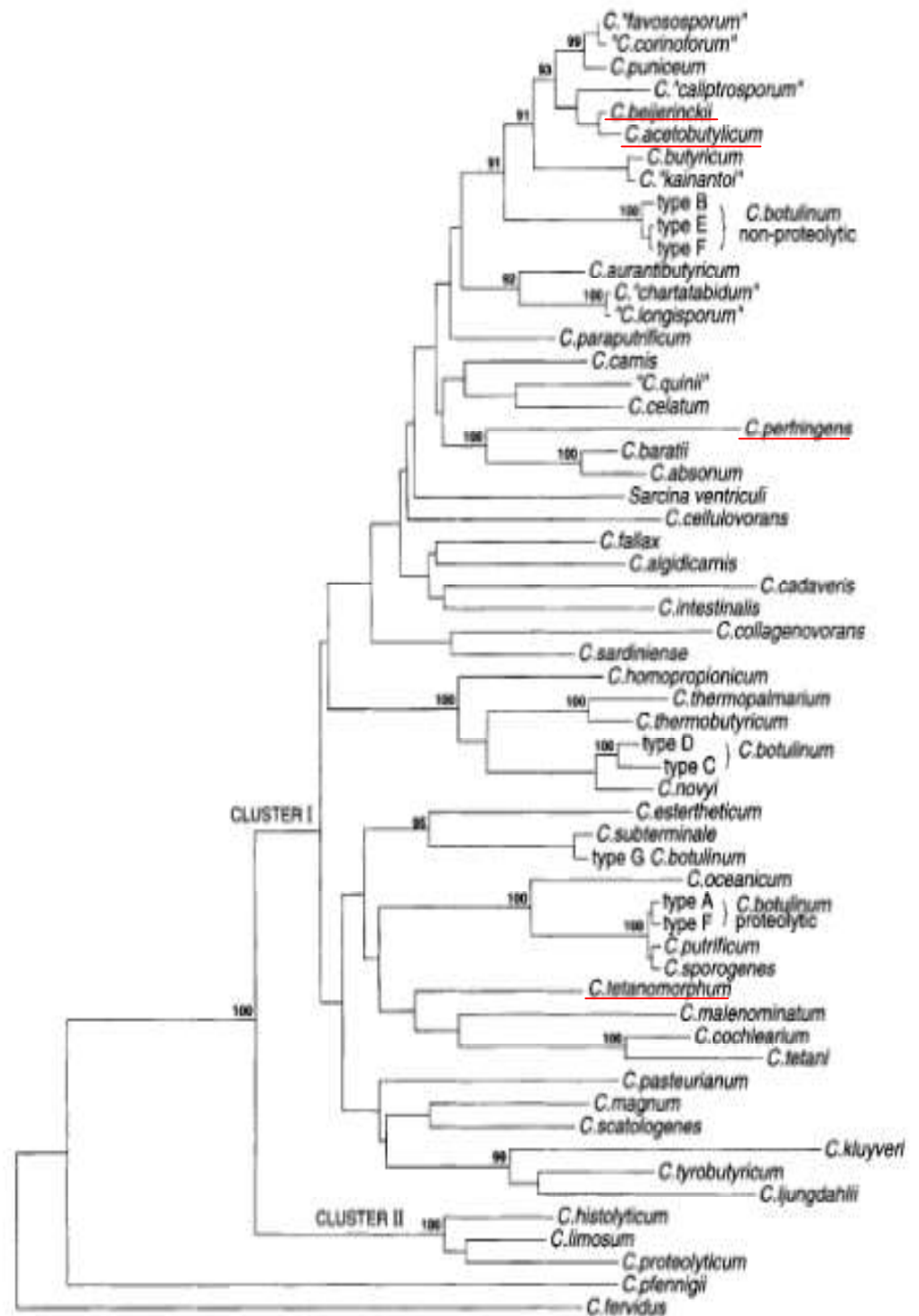
Hibridizācijas bufera pagatavošana:

Reaģenti	0% hibridizācijas buferis
5M NaCl	180 µl
1M Tris/HCl	20 µl
ddH ₂ O	799 µl
Formamīds	0 µl
10% SDS	1 µl

Mazgāšanas bufera pagatavošana:

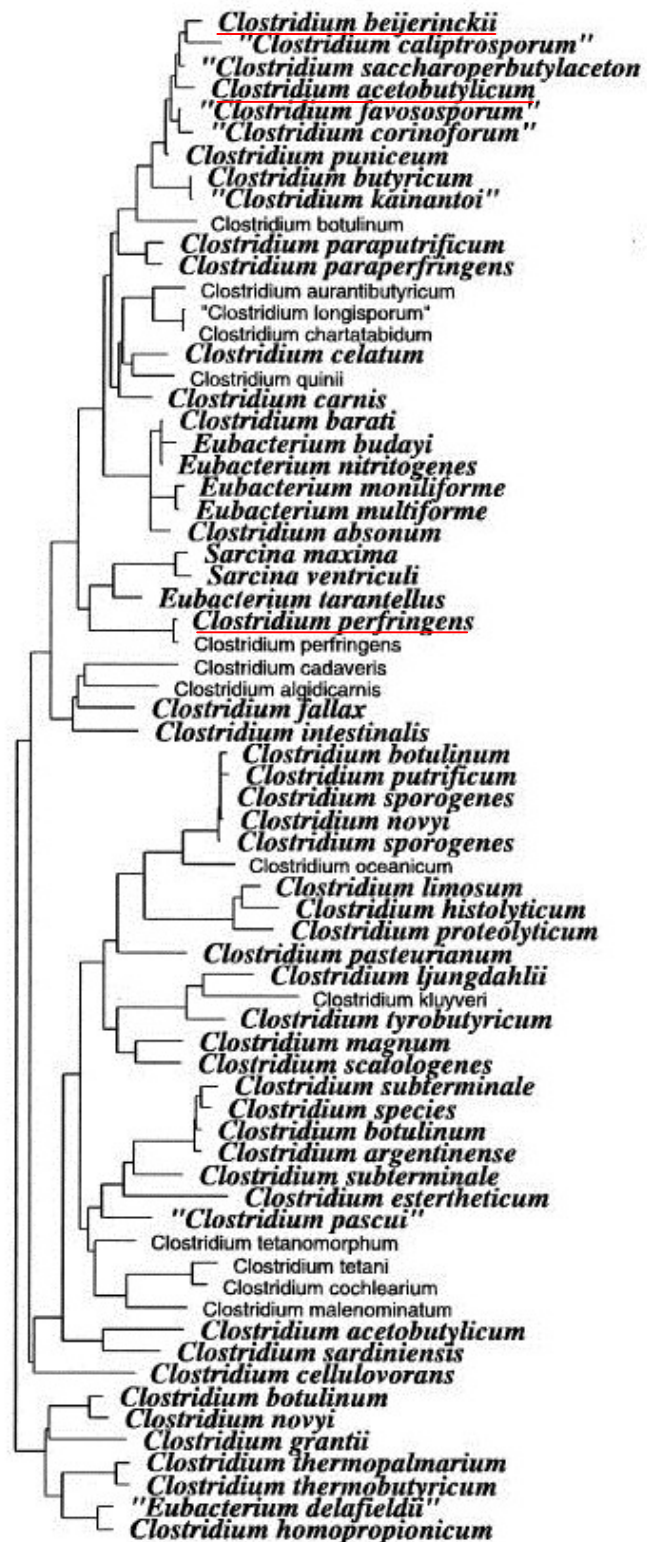
Reaģenti	0% mazgāšanas buferis
5M NaCl	900 µl
1M Tris/HCl	1000 µl
ddH ₂ O	48100 µl
0.5M EDTA	0 µl

Clostridium I un II grupa. (Adaptēts no International Journal of Systematic Bacteriology 44, 812-826 lpp).

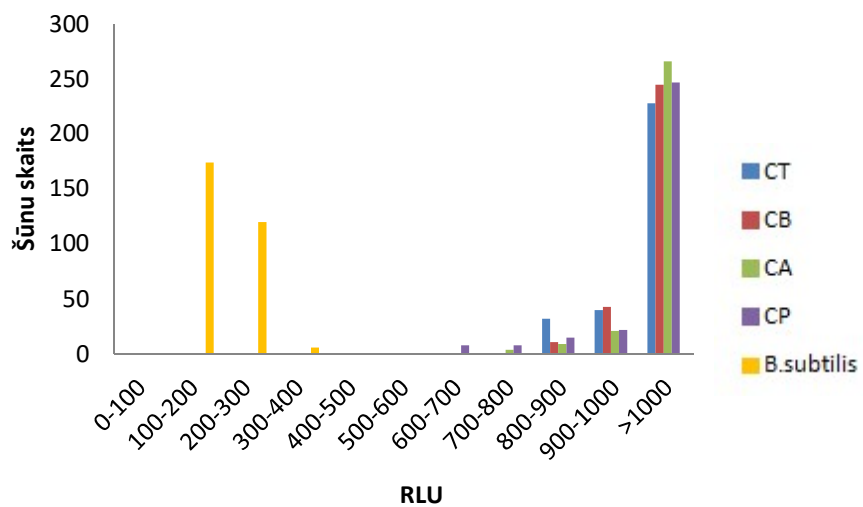
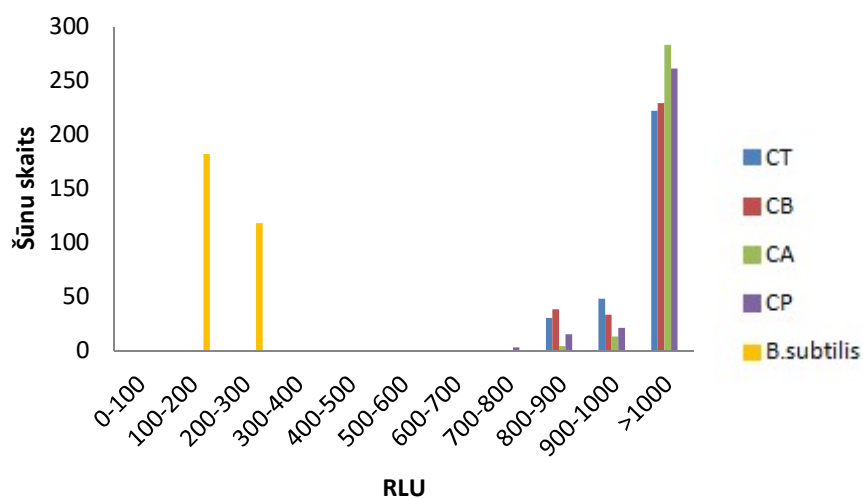
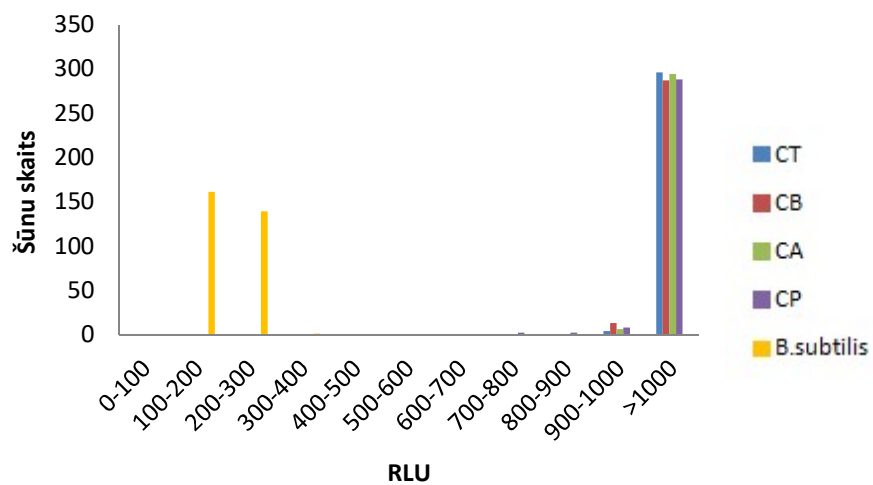


Clostridium histolyticum grupa (iekļaujot *Clostridium* I un II grupas pārstāvjus), kas mijiedarbojas ar Chis150 zondi. (Adaptēts no Applied Environmental Microbiology 64 3336–3345 lpp).

Chis150

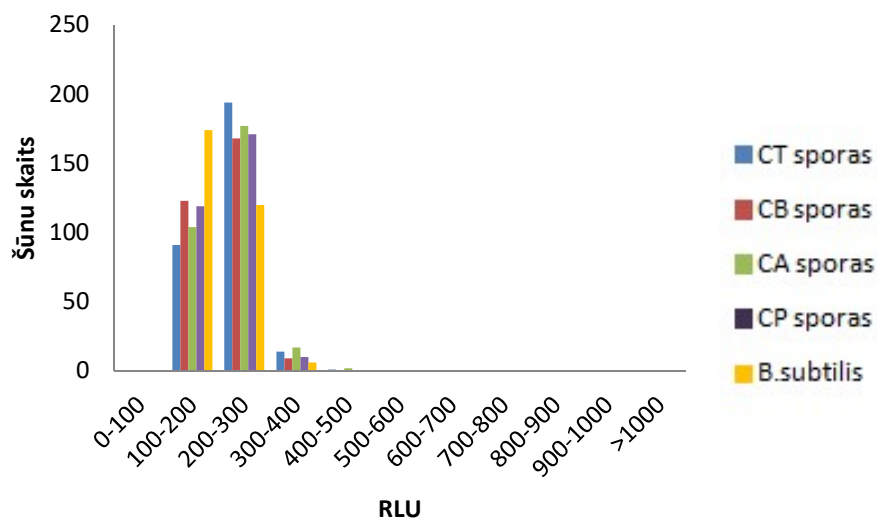
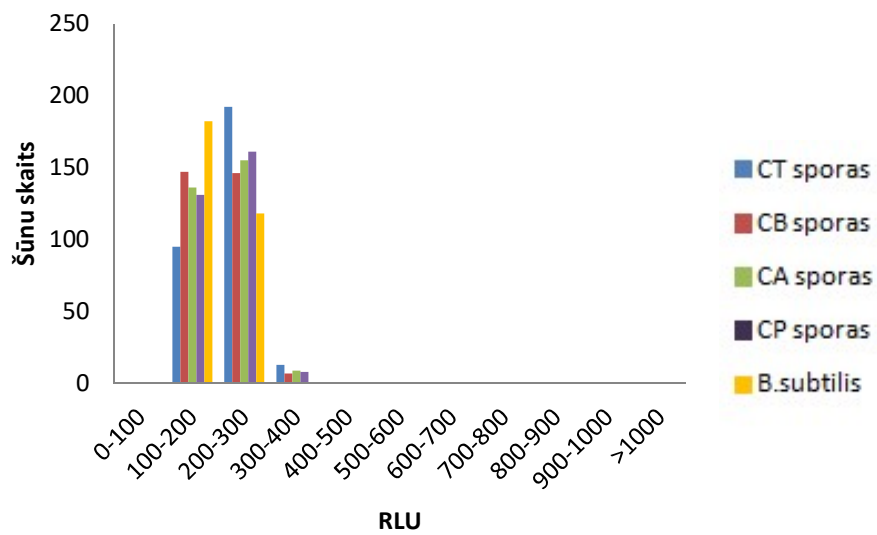
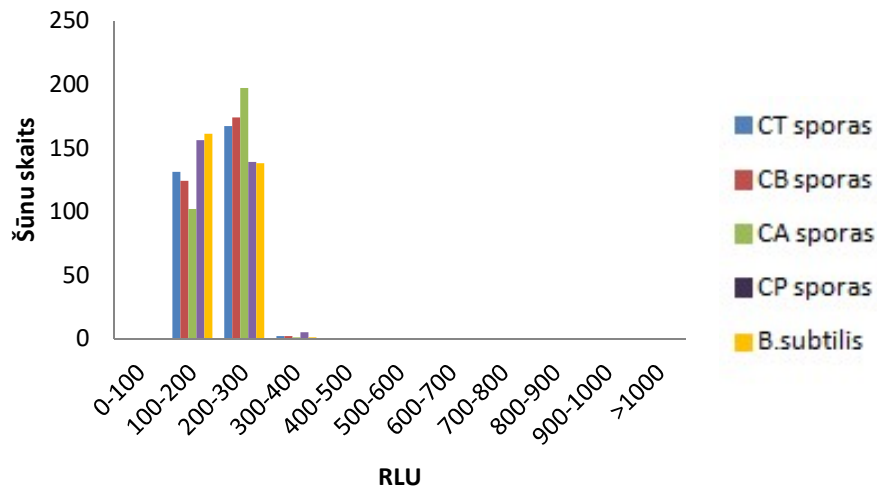


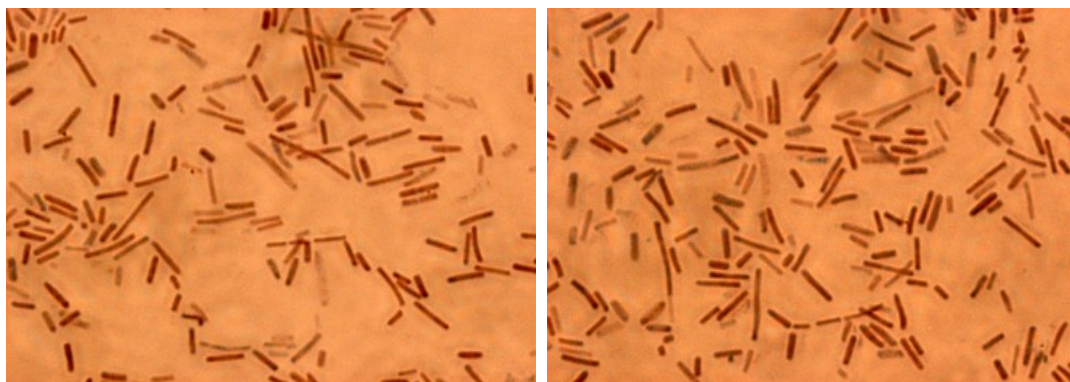
Clostridium un *B.subtilis* šūnu mērījumu atkārtojumu rezultātu grafiki.



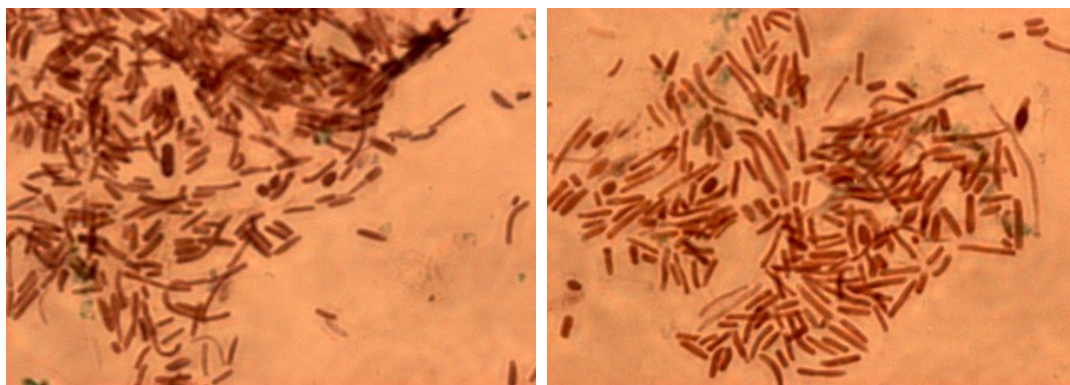
3-2. pielikums

Clostridium sporu un *B.subtilis* šūnu mērījumu atkārtojumu rezultātu grafiki.

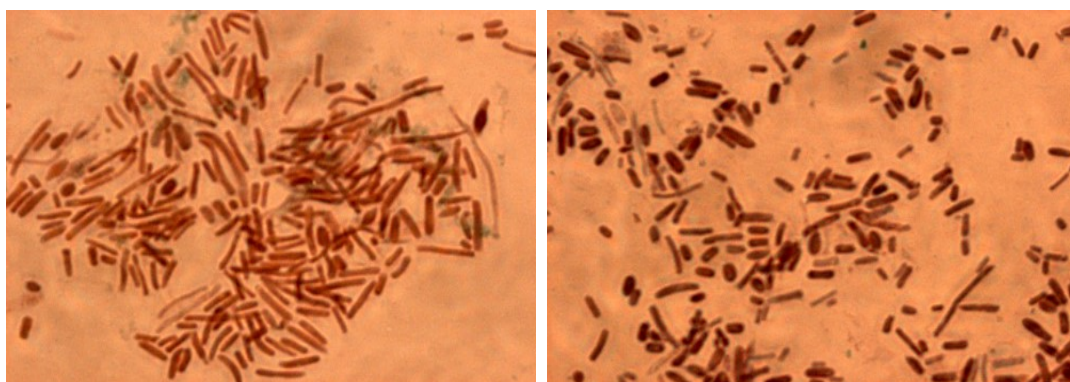




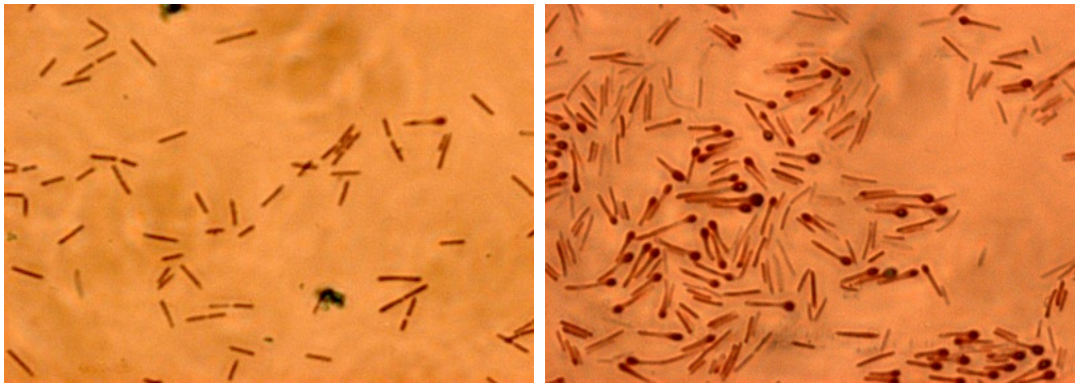
Duncan un Strong barotne, ciete 6g, CP, Anaerobi, 37°C, inokulāts no plates



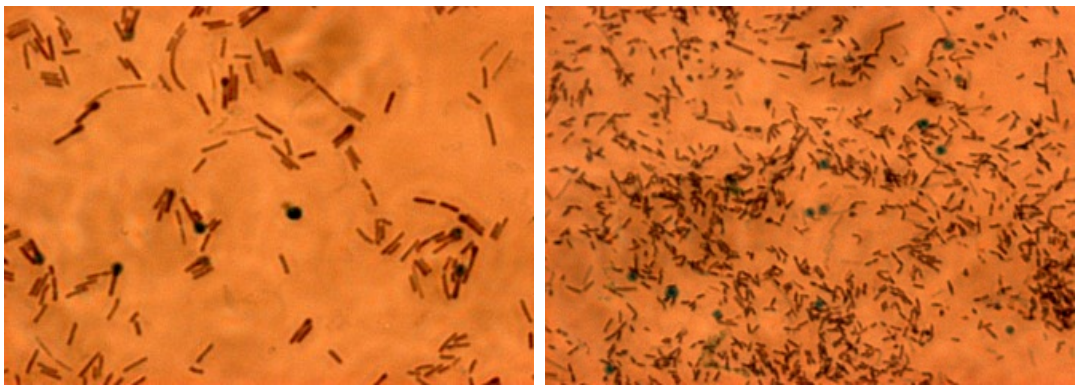
Duncan un Strong barotne, ciete 6g, CP, Anaerobi, 37°C, inokulāts no šķidrās barotnes



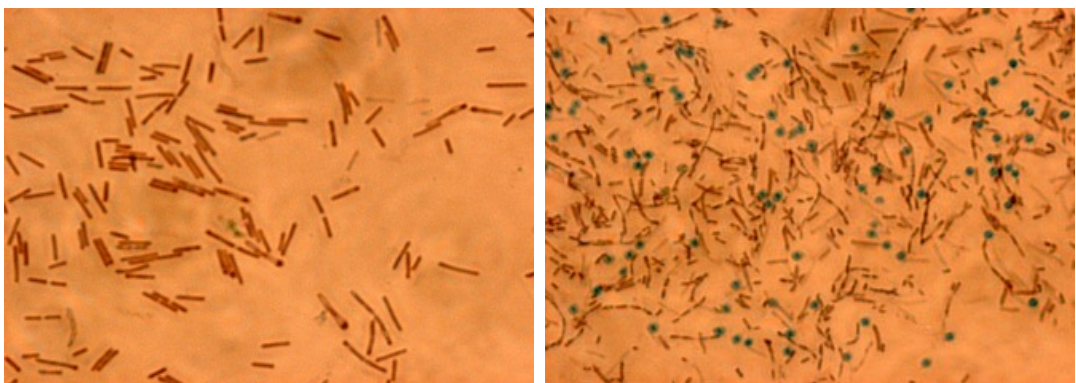
Duncan un Strong barotne, ciete 6g, CP, Anaerobi, 25°C, inokulāts no šķidrās barotnes



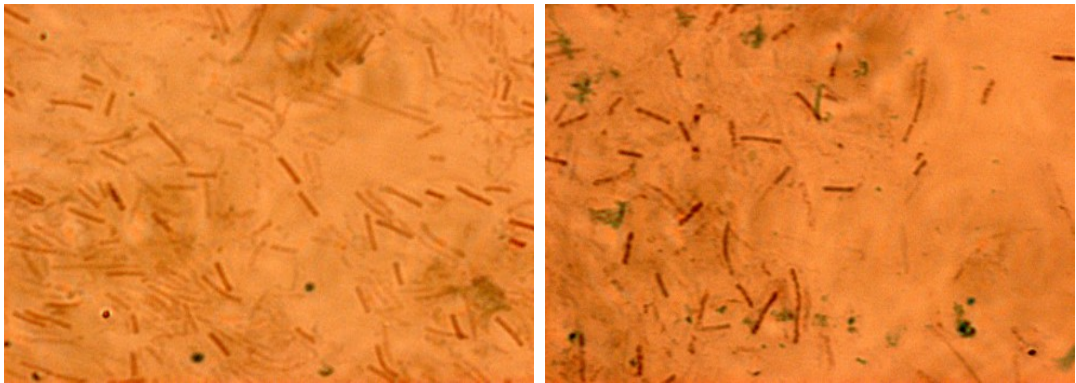
Duncan Strong barotne, Anaerobi, 25°C, CA, inokulāts no plates



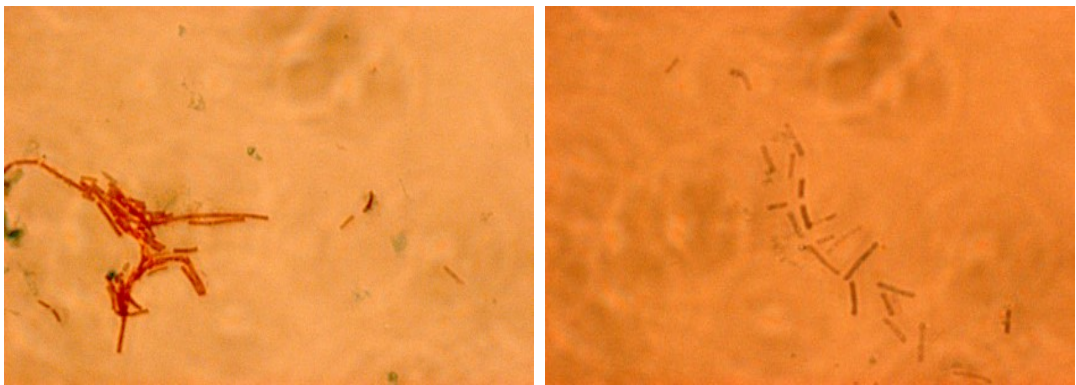
Duncan Strong barotne, Anaerobi, CT, 37°C, inokulāts no plates



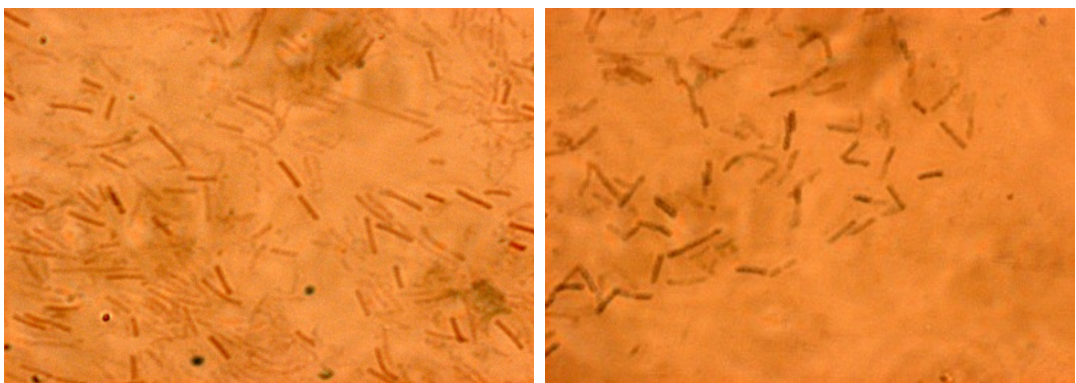
Duncan Strong barotne, Anaerobi, CB, 37°C, inokulāts no plates



Ellnera barotne, Anaerobi, CP, 37°C, inokulāts no šķidrās barotnes



Ellnera barotne, Anaerobi, CB, 25°C, inokulāts no plates



Ellnera barotne, Anaerobi, CP, 37°C, inokulāts no plates

5. pielikums

M1868, TM1423, Ellner, Tortora un PBS sporulācijas vides pārbaudes rezultāti.

Inkubēšanas laiks	Barotne	Sporas/Šūnas	Inkubēšanas apstākļi
1.nedēļa	M1868	0/123	Anaerobi, 37°C
	PBS	0/12	
	Ellners	0/141	
	Torrora	0/192	
	TM1423	0/156	
2.nedēļa	M1868	>200/0	Anaerobi, 37°C
	PBS	0/0	
	Ellners	>150/0	
	Torrora	0/76	
	TM1423	>200/0	
3.nedēļa	M1868	>200/0	Anaerobi, 37°C
	PBS	-	
	Ellners	0/110	
	Torrora	0/46	
	TM1423	>200/0	
1.nedēļa	Ellners O2	0/136	Aerobi, 37°C
4.nedēļa	M1868	0/174	Anaerobi, 37°C
	PBS	-	
	Ellners	0/186	
	Torrora	0/74	
	TM1423	≈200/0	
2.nedēļa	Ellners O2	0/87	Aerobi, 37°C
1.nedēļa	Ellners O2	0/94	Aerobi, Istabas temp.
5.nedēļa	M1868	0/192	Anaerobi, 37°C
	PBS	-	
	Ellners	0/173	
	Torrora	0/74	
	TM1423	≈200/0	
3.nedēļa	Ellners O2	0/112	Aerobi, 37°C
2.nedēļa	Ellners O2	0/94	Aerobi, Istabas temp.

Trešā mēģinājuma izveidotas vielu kombinācijas ar etanolu

1.solis	2solis	3solis	4solis
0,5% SDS + 70mM DTT, 15 min	etanola gradients pirms hibridizācijas		
5% SDS + 25mM DTT, 15 min	etanola gradients pirms hibridizācijas		
0,5% SDS + 70mM DTT, 15 min	etanola gradients pirms un pēc hibridizācijas		
5% SDS + 25mM DTT, 15 min	etanola gradients pirms un pēc hibridizācijas		
0,5% SDS + 70mM DTT, 15 min	etanola gradients pirms permeabilizācijas		
5%SDS+25mM DTT, 15 min	etanola gradients pirms permeabilizācijas		
Uzturēšana 50% etanolā pirms permeabilizācijas 15 min, 65C	0,5% SDS+70mM DTT	7 mg/ml lizocīms	
Uzturēšana 50% etanolā pirms permeabilizācijas 15 min, 65C	5% SDS + 25mM DTT	7 mg/ml lizocīms	
Uzturēšana 50% etanolā pirms permeabilizācijas 15 min, 65C	0,5% SDS + 70mM DTT	2 mg/ml lizocīms	etanola grādients
Uzturēšana 50% etanolā pirms permeabilizācijas 15 min, 65C	5% SDS + 25mM DTT	2 mg/ml lizocīms	etanola grādients
Uzturēšana 50% etanolā pirms permeabilizācijas 15min, 65C	0,5% SDS + 70mM DTT		
Uzturēšana 50% etanolā pirms permeabilizācijas 15min, 65C	5% SDS + 25mM DTT		
Etanola gradients pirms un pēc hibridizācijas	5% SDS+ 50 mM DTT, 65°C, 15 min	10 mg/ml lizocīms, 37°C, 15min.	
Uzturēšana 50% etanolā pirms permeabilizācijas, 30	5% SDS+50 mM DTT, 65°C, 15 min	10 mg/ml lizocīms, 37°C, 15 min	etanola grādients, pa 1 min. 50/ 80/ 96 %

min, 65°C			
Uzturēšana 50% etanolā pirms permeabilizācijas 30 min, 65C	5% SDS + 50 mM DTT, 65°C, 15 min	10 mg/ml lizocīms, 37°C, 15 min.	
Uzturēšana 50% etanolā pirms permeabilizācijas 15 min, 65°C	5% SDS + 50 mM DTT, 65°C, 15 min	10 mg/ml lizocīms, 37°C, 15 min.	etanola grādients, pa 1 min. 50/ 80/ 96 %

Maģistra darbs „*Costridium perfringens* identificēšana un uzskaitīšana dzeramajā ūdenī ar fluorescentās *in situ* hibridizācijas metodi” izstrādāts RTU, būvniecības inženierzinātņu fakultātē, Ūdens pētniecības laboratorijā.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Jelena Dzjubenko

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr.sc.ing., Asoc.prof. Linda Mežule

Recenzents: Dr.biol., vad. pētn., doc. Vizma Nikolajeva

Darbs iesniegts Bioloģijas fakultātē

Metodiķe: Diāna Marcinkēviča

Darbs aizstāvēts bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

09. 06. 2017 prot. Nr. Vērtējums

Komisijas sekretāre: Dr. biol., asoc. prof. Līga Plakane