

Povzetek

Clostridium difficile je sporogena, po Gramu pozitivna, striktno anaerobna bakterija. V zadnjih letih je postala posebej pomembna kot povzročitelj črevesnih okužb, ki jih povzroča predvsem pri pacientih s porušeno mikrobioto. Spore, ki jih bakterija tvori, so zelo odporne na spremembe v okolju. Spore vstopajo v telo po oralni poti, prehod v vegetativno obliko celice pa se običajno zgodi v anaerobnem debelem črevesu. Na poti do debelega črevesa gre spora tudi skozi želodec, kjer je izpostavljena nizkemu pH. Razumevanje vpliva nizkega pH na germinacijo spor je torej pomembno za razumevanje poteka okužbe.

Uporabili smo suspenzije spor dveh različnih sevov *C. difficile* (T6 in 3845). Izpostavili smo jih dvema različnima pufroma, s pH 3 in pH 7, ter vodi. Preizkušali smo tudi različne čase izpostavitve. Za tem smo različno tretirane spore nacepili na plošče in z izračunom CFU določili uspešnost germinacije. Uporabili smo komercialno trdno krvno gojišče in komercialno gojišče z dodanimi germinanti.

Spore izpostavljene nizkemu pH so kazale slabšo germinacijo kot tiste izpostavljene vodi in pH 7. Čas izpostavitve je imel različne vplive pri različnih sevih in na različnih gojiščih.

Iz rezultatov lahko sklepamo, da nas nizek pH v želodcu lahko delno zaščiti pred okužbo s *C. difficile*, saj inhibira kasnejšo germinacijo v debelem črevesu. Vsekakor pa je potrebno upoštevati dejstvo, da kljub izpostavitvi nizkemu pH spore še vedno germinirajo, uspešnost germinacije pa je odvisna tudi od količine germinantov in časa izpostavitve.

Kazalo

Povzetek	2
1. Problem	4
1. Uvod	5
2. Raziskovalna vprašanja in hipoteze	8
2.1. Raziskovalna vprašanja	8
2.2. Hipoteze	8
3. Metode dela	9
3.1. Organizmi	9
3.2. Kemikalije	9
3.3. Gojišča	9
3.4. Laboratorijski pribor	9
3.5. Priprava založne raztopine suspenzije spor	10
3.6. Protokol eksperimenta	10
3.7. Računanje CFU	11
3.8. Shema protokola	12
4. Rezultati	13
5. Diskusija	15
6. Sklep	18
7. Viri in literatura	19

1. Problem

Clostridium difficile je v zadnjih letih postala velik problem pri okužbah bolnišničnih pacientov. Zaradi problemov in črevesnih okužb, ki jih povzroča predvsem pri bolnikih z porušeno mikrobioto, je zelo pomembno razumeti mehanizme njenega delovanja, saj bi ti lahko pomagali pri razumevanju in reševanju nekaterih problemov pri okužbi s to bakterijo. Nobena bakterija ne povzroči več primerov diareje pri bolnišničnih pacientih v razvitem svetu, toksini, ki jih proizvajajo, pa lahko vodijo tudi do smrtno nevarnih bolezni, kot je pseudomembranski kolitis (po Greenwood, 2006).

C. difficile je po gramu pozitivna, sporogena, obligativno anaerobna bakterija. Bakterijske spore so odporne na temperaturo, razkužila in druge neugodne dejavnike v okolju. Za *C. difficile* so spore tudi pomemben način prenosa oz. okužbe. Pomembno je tudi razumeti, da bakterija potrebuje določene signale iz okolja, da lahko določa, ali so pogoji za germinacijo, oz. prehod iz spore v vegetativno obliko spet primerni (po Talaro). Germinacija spor bakterije *C. difficile* poteka v gastrointestinalnem traktu in mnoge žolčne soli so znane kot dobri germinanti zanjo (po Hegg er al., 2012).

Znano je, da lahko spremembe v pH v večini bakterij vplivajo na preživetje in razmnoževanje vegetativnih celic. Vrste in sevi pa se med seboj pomembno razlikujejo tudi po toleranci in optimumu pH vrednosti. Spore so na te spremembe dosti manj občutljive (po Greenwood, 2006).

Ker je *Clostridium difficile* bakterija, ki v telo običajno vstopa oralno, je izpostavljena nizkemu pH-ju v želodcu. Pri bolnikih, ki so zdravljeni z zdravili, ki znižujejo kislost želodca, se okužba s *C. difficile* pogosteje razvije, kar kaže na možno pomembno zaščitno funkcijo kislega pH v želodcu.

Zaradi teh dejstev nas je v raziskovalni nalogi zanimalo, kako lahko nizek pH, podoben želodčnemu, vpliva na germinacijo spor dveh različnih sevov bakterije *C. difficile* na različnih gojiščih; takšnih z dodanimi germinanti in takšnih brez.

1. Uvod

Clostridium difficile je gibljiv, po gramu pozitiven bacil, ki lahko tvori endospore in brez njih ne more preživeti ob kisiku. Je strikten anaerob.

Bakterija proizvaja tri toksine, ki so glavni dejavniki virulence, ko govorimo o bolezenskih znakih. Toksin A je enterotoksin, toksin B pa je citotoksin. Nekateri sevi proizvajajo tudi tretji, binarni toksin (po Greenwood). Za toksin A je značilno enterotoksično in citotoksično delovanje, pri katerem se poveča prepustnost žil v črevesni steni, kar vodi do nabiranja krvave tekočine polne levkocitov, eritrocitov, serumskih proteinov in sluzi, kar vodi do diareje.

Toksin B deluje citotoksično in sicer tako, da povzroča okvare v steni debelega črevesa in propad njegovih celic, kar posledično vodi do razjed z značilnimi rumeno belimi oblogami, kar je značilen znak pseudomembranskega kolitisa (po Hurley, Nguyen, 2002 v Janežič, 2008).

Kljub temu, da je omenjena bakterija lahko zelo nevaren patogen in je načeloma ne najdemo med naravno mikrobioto odraslih ljudi, pa se le-ta pojavlja v gastrointestinalnem traktu dojenčkov (po Greenwood, 2006). Omenjene bolezni se najbolj pogosto pojavljajo pri bolnikih s porušeno naravno črevesno mikrobioto, kar je običajno posledica zdravljenja z antibiotiki. Prav tako je možnost za ponovno okužbo, po prvi, veliko večja kadar so pacienti v kratkem po prvi okužbi dobivali antibiotike (Society for Healthcare Epidemiology of America, 2013)

Razširjenost *C.difficile* v bolnišničnem okolju pa je verjetno velika tudi zaradi dejstva, da tvori endospore in je zaradi tega dosti manj dovzetna za konvencionalne metode s katerimi se lahko zaščitimo pred bakterijami v obliki vegetativnih celic (Wellcome Trust Sanger Institute, 2012)

Ocene narekujejo, da za okužbo s *C. difficile* vsako leto trpi več kot 500. 000 ljudi samo v ZDA, njene okužbe pa so vodile tudi do zapiranja ne le oddelkov ampak celotnih bolnišnic (po Heeg et al., 2012). V Sloveniji javljanje okužbe s *Clostridium difficile* ni obvezno, zaradi tega ne moremo z gotovostjo govoriti o številu letnih primerov, ocenjujemo pa jih na nekaj sto (po Janežič, 2008).

Zdravljenje okužb s *C. difficile* vključuje oralno prejetje metronidazola ali vankomicina. Zdravljenje je pomembno predvsem zaradi hitre potrebe po intervenciji v primeru

pseudomembranskega kolitisa, ki je lahko smrten, v kolikor se ga ne zdravi (po Greenwood, 2008). V skrajnih primerih lahko pri tem stanju pride tudi do odstranitve dela debelega črevesa (Radsel et al. 2007 v Janežič 2008).

Za okužbo v debelem delu črevesja pa more bakterija potovati čez želodec in tanko črevo, saj spore vstopijo v telo po oralni poti. Na tej poti so izpostavljene tako nizkemu želodčnemu pH-ju kot mnogim žolčnim solem. Da pa lahko preživi v aerobnem mediju, običajno vstopa v telo v obliki spore.

V primeru sporogenih bakterij govorimo o bakterijah, ki so zmožne tvorbe bakterijskih endospor. To zmožnost imajo vsi predstavniki rodu *Clostridium* in nekaterih drugih rodov (npr. *Bacillus*). V tem primeru življenjski cikel kroži med obliko endospore in obliko vegetativne celice. Endospore so izjemno trpežna oblika bakterijske celice, za formacijo katere bakterije običajno porabijo od 6 do 12 ur. Ta proces se imenuje sporulacija. Nastala spora je struktura z učinkovito nično metabolno aktivnostjo in z svojo specifično strukturo deluje kot pufer pri visokih temperaturah in tlakih, prav zaradi tega pa so spore tako uspešne pri upiranju zunanjim faktorjem. Zaradi njihove velike trpežnosti se običajno za dezinfekcijo opreme ali materialov uporablja sterilizacija pri 121°C in pod visokim tlakom. Sporulacija se običajno pojavi kot odziv na skrajno neugodne ali celo toksične življenjske pogoje.

Cikel se nadaljuje s pretvorbo iz endospore nazaj v vegetativno celico, s procesom, ki se imenuje germinacija. Germinacija običajno ne traja več kot uro in pol, kar kaže na silovito odzivnost bakterij na ugodne življenjske pogoje. Kadar je torej bakterijska endospora v bližnjem stiku z ugodnimi življenjskimi pogoji, začne germinacijo in za njo zavzame spet obliko vegetativne celice. Velikokrat so v ta proces vključene tudi posebne kemijske snovi, imenovane germinanti. Germinanti so snovi, ki vzpodbudijo germinacijo s tem, da so za endosporo znak dobrega okolja (po Talaro, 2008).

Za pojav okužbe je torej potrebna germinacija spor *C. difficile* saj spore same ne povzročajo obolenja. Čeprav mehanizmi germinacije niso popolnoma znani za *C. difficile*, pa raziskave kažejo, da bakterija germinira ob stiku s sekundarnimi žolčnimi solmi. Med njimi je vredno omeniti tavroholat, ki deluje kot ko-germinant z aminokislinami, v glavnem z glicinom. Kot inhibitor germinacije spor *C. difficile* deluje henodeoksiholat. Znano je, da imajo spore *C. difficile* večjo afiniteto do henodeoksiholata, kot do tavroholata, zaradi česar je ob istih koncentracijah obeh rast upočasnjena. Verjetno obe molekuli delujeta kompetitivno za mesto na receptorjih za germinacijo na sporah bakterije. Čeprav spore kažejo večjo afiniteto za

henodeoksiholat, pa moramo vedeti, da je absorbcija le-tega v debelem črevesju okoli desetkrat večja kot absorbcija tavraholata. Zaradi tega je zelo možno, da bakterije ostanejo v obliki spor vse dokler ne dosežejo debelega črevesja, kjer dobijo kemijske signale za germinacijo v obliki tauroholata. Okolje debelega črevesja je anaerobno, kar pomeni, da omogoča rast vegetativnih celic *C. difficile*, ki je obligativni anaerob, za katerega so aerobni pogoji toksični in jih lahko preživi le v sporulirani obliki (po Heeg et al., 2012).

Inhibicija rasti oz. germinacije pa se lahko pojavi tudi zaradi sprememb v okolju v obliki temperature ali kislosti. Čeprav se običajno za boj proti bakterijami uporabljajo farmakološko sredstva ali metabolni produkti drugih organizmov, pa so včasih za dezinfekcijo dovolj tudi sredstva na osnovi joda ali klora. V vsakdanjem življenju, v gospodinjstvih, pa se pojavljajo tudi oblike zaščite pred bakterijami po mehanizmu zniževanja pH. Konzerviranje v raztopinah na osnovi kisa (ocetna kislina) lahko pomaga pri preprečevanju z okužbo *Clostridium botulinum*, ki je prav tako sporogena pripadnica rodu *Clostridium*. Zaradi nevarnosti za druge celice, ne samo bakterijske, pa se močne kisline ali baze običajno v namene preprečevanja ali zdravljenja okužb ne uporabljajo (po Talaro, 2008).

Spore pa so vendarle izpostavljene izjemno nizkemu pH-ju v človeškem želodcu. Ker vstopajo po oralni poti, morajo potovati čezenj, preden vstopajo v tanko črevo oz. dvanajsternik. Glavna naloga želodca je prebavna. Celice želodčne sluznice izločajo tri glavne produkte; pepsinogen, kloridne in vodikove ione ter sluz. Ker celice črpajo kloridne in vodikove ione v lumen, lahko govorimo o prisotnosti klorovodikove kisline v želodcu. Koncentracija vodikovih ionov je približno 0.01 mol/L, kar pomeni, da se pH giblje okoli 2. HCl pomaga pretvarjati pepsinogen, ki je neaktivna oblika proteaze, v pepsin, ki je pripadajoča aktivna oblika. Ta encim ima svoj optimum delovanja na pH prav okoli 2. Ob nizkem pH-ju imamo torej v želodcu tudi encime za razgradnjo proteinov. Sluznica se običajno ne poškoduje zaradi izločanja sluzi, ki varuje želodčno steno pred lastnim delovanjem. Veliko drugih organizmov, pa takšnih pogojev ne preživi. Nizek želodčni pH sodi pri človeku med naravne zaščitne bariere. Z redkimi izjemami, ne poznamo vegetativnih oblik bakterijskih celic, ki bi lahko živele v želodcu. Ena izmed bakterij, ki se lahko uspešno upira ekstremnim pogojem želodca je *Helicobacter pylori*, ki je znan povzročitelj razjed na želodcu. (po Reece, 2010).

Očitno je, da mora *Clostridium difficile* preživeti ekstremne pogoje želodca. Običajno se germinacija začne v anaerobnem debelem črevesju, saj je oblika spore verjetno eden glavnih

faktorjev, zakaj bakterija ne umre ob izpostavitvi želodčnemu pH-ju. Kot smo že omenili, pa lahko kasneje v prebavnem traktu (ob stiku z žolčnimi solmi z dvanajsterniku in ob njihovi absorpciji v debelem črevesju) pride do pogojev, ki so za germinacijo dosti primernejši (po Heeg et al., 2012).

2. Raziskovalna vprašanja in hipoteze

2.1. Raziskovalna vprašanja

- Ali so vzorci germinacije dveh izbranih sevov *C. difficile* podobni?
- Ali je germinacija boljša ali slabša ob izpostavitvi nižjemu pH-ju?
- Kako čas izpostavitve določenemu pH-ju vpliva na germinacijo?
- Je germinacija boljša na katerem izmed izbranih gojišč?

2.2. Hipoteze

H1: Seva se enako odzivata na spremembe pH-ja.

H2: Germinacija ob izpostavitvi nizkemu pH-ju bo slabša.

H3: Ob daljši izpostavitvi določenemu pH-ju bodo razlike med njihovimi vplivi bolj poudarjene.

H4: Germinacija se bo razlikovala na različnih gojiščih.

3. Metode dela

3.1. Organizmi

Za eksperiment smo uporabili dva seva *Clostridium difficile*:

-T6

-3845

3.2. Kemikalije

- Pufer, pH=7

- Pufer, pH=3

- destilirana voda

3.3. Gojišča

Uporabili smo komercialno trdno krvno gojišče (COH) in komercialno kromogeno gojišče, z dodanimi germinanti (CHROM). Pri obeh je proizvajalec bioMerieux

3.4. Laboratorijski pribor

- 1.5mL mikrocentrifugirke

- Avtomatske pipete (200 μ L in 1000 μ L)

- Hokejke (steklene palčke za razmazovanje kulture)

- Namizni mešalnik (vorteks)

- Namizna centrifuga

- Inokulacijska zanka

- Bunsenov gorilnik

3.5.Priprava založne raztopine suspenzije spor

Za pripravo založne raztopine smo najprej sev, ki je bil shranjen na -80°C cepili na gojišče COH. Po dvodnevni inkubaciji pri 37°C v loncu pri anaerobnih pogojih smo preverili čistost kulture in sev precepili na štiri nove plošče gojišča COH.

Gojišča smo inkubirali v anaerobnih razmerah na 37°C šest dni (pod temi pogoji običajno v laboratorijskih razmerah vegetativne celice *C. difficile* preidejo v obliko spore). Za tem smo bakterije z vateno paličico prenesli iz gojišča. Palčko smo prej omočili, da ne bi vsrkala vode v novem mediju. Pripravili smo dve 1.5 mL mikrocentrifugirki in ju napolnili z 1mL destilirane vode. V vsako smo prenesli bakterije iz dveh plošč. Za tem smo mikrocentrifugirki centrifugirali 10 minut pri 12000 obratov na minuto in za tem odpipetirali supernatant, saj se spore nahajajo v peletu. Spet smo dodali 1mL destilirane vode in postopek spiranja ponovili še dvakrat. Na koncu nam je torej po trikratnem spiranju ostal pelet, kjer so bile večinoma samo bakterijske spore. V vsako mikrocentrifugirko smo za tem dodali $400\ \mu\text{L}$ destilirane vode, pelet razbili s konico pipete in za tem celo raztopino dobro premešali na vorteksu. Založne raztopine so bile shranjene na 4°C v aerobnih pogojih. Postopek je bil enak za oba seva.

3.6.Protokol eksperimenta

Odpipetirali smo $40\ \mu\text{L}$ založne suspenzije spor in jo prenesli v 1,5mL mikrocentrifugirko. Dodali smo $960\ \mu\text{L}$ izbrane tekočine. To so bile: pufer s pH 3, pufer s pH 7 in destilirana voda. Za vsako pH vrednost smo pripravili šest mikrocentrifugirk. Označili smo jih glede na vsebino, paralelo (I ali II) in čas, ki bo potekel pred centrifugiranjem (0min, 30min ali 60min). Za vsak čas in tekočino smo naredili dve vzporedni ponovitvi (paralelki). Mikrocentrifugirke smo po preteku pripadajočega časa centrifugirali na 12000 rpm za 10 minut. Za tem smo odpipetirali supernatant. Pelet smo razredčili v $50\ \mu\text{L}$ destilirane vode in za tem vsebino odpipetirali v novo mikrocentrifugirko z $40\ \mu\text{L}$ destilirane vode. Za tem smo naredili redčitevno vrsto tako, da smo prenašali $50\ \mu\text{L}$ suspenzije z bakterijami v mikrocentrifugirke z $450\ \mu\text{L}$ destilirane vode, novo nastalo suspenzijo dobro premešali in potem postopek na novo ponovili. Tako smo dobili vrsto mikrocentrifugirk z desetkratnimi redčenji. Redčitve, ki smo jih naredili za specifičen sev so bile izbrane glede na število kolonij v kontrolni skupini.

Za tem smo iz redčitvene vrste iz pripadajočih mikrocentrifugirk z pravo koncentracijo prenesli 100 μL suspenzije na gojišče, bodisi COH ali CHROM. Naredili smo razmaz s hokejko in gojišča primerno označili. Za tem smo gojišča zložili v anaerobno posodo in jih inkubirali dva dni pri 37°C, da je prišlo do germinacije. Za tem smo prešteli število kolonij in določili CFU (colony forming unit: enota, ki tvori kolonije).

Hkrati smo 40 μL založne raztopine prenesli v 960 μL destilirane vode, zmešali na vorteksu ter po istem načelu naredili redčitveno vrsto tako da smo 50 μL suspenzije prenašali v 450 μL destilirane vode. S tem smo redčili za faktor 10. Brez centrifugiranja in čakanja smo 100 μL iz določenih redčitev prenesli na COH in CHROM gojišče, ter kasneje določili CFU, kot kontrolno skupino.

V obeh primerih smo delali v dveh paralelkah, za večjo natančnost rezultatov.

3.7. Računanje CFU

CFU (colony-forming-unit) se v mikrobiologiji uporablja za izražanje števila bakterijskih celic (celice zmožne formacije kolonij).. Šteli smo kolonije, v kolikor se jih je na plošči pojavilo manj kot 300. Računali smo ga po enačbi:

$$CFU = \frac{C}{((n_1 + 0.1n_2 + 0.01n_3) \cdot d)} \cdot 10$$

kjer je;

C- število vseh kolonij na vseh števnihih ploščah

n_1 -število števnihih petrijevki pri največji razredčitvi

n_2 - število števnihih petrijevki pri drugi največji razredčitvi

n_3 -število števnihih petrijevki pri tretji največji razredčitvi

d- faktor najmanjše števene razredčitve

3.8. Shema protokola

Založna raztopina je shranjena v hladilniku na 4°C v mikrocentrifugirkah z volumnom 1.5 mL. Vzamemo jo iz hladilnika in premešamo ter čakamo, da postane popolnoma tekoča.

Določimo CFU v vodi, kot kontrolno skupino.

Odpipetiramo 40µL založne raztopine v 1.5mL mikrocentrifugirko in dodamo 960µL izbranega medija. To je bodisi destilirana voda, ali pufer z pH vrednostjo 3 ali 7.

Mikrocentrifugirko premešamo na vorteksu in damo centrifugirati bodisi po 0, 30 ali 60 minutah.

Centrifugiramo 10 minut pri 12000 obratih na minuto.

Odpipetiramo supernatant in pelet razbijemo ter razredčimo v 50µL vode ter premešamo na vorteksu.

V Vnaprej pripravljene mikrocentrifugirke z 450µL vode zaporedno prenašamo 50µL suspenzije iz predhodne mikrocentrifugirke. Začnemo z prenosom razredčenega peleta v prvo. Ustvarimo jih toliko, kolikor razredčeno raztopino potrebujemo, kar se razlikuje glede na sev in gojišče.

Iz ustreznih mikrocentrifugirk prenesemo 100µL suspenzije na gojišče. Gojišče je bodisi COH ali CHROM. Inkubiramo za dva dni na 37°C, 1atm in v anaerobnih pogojih.

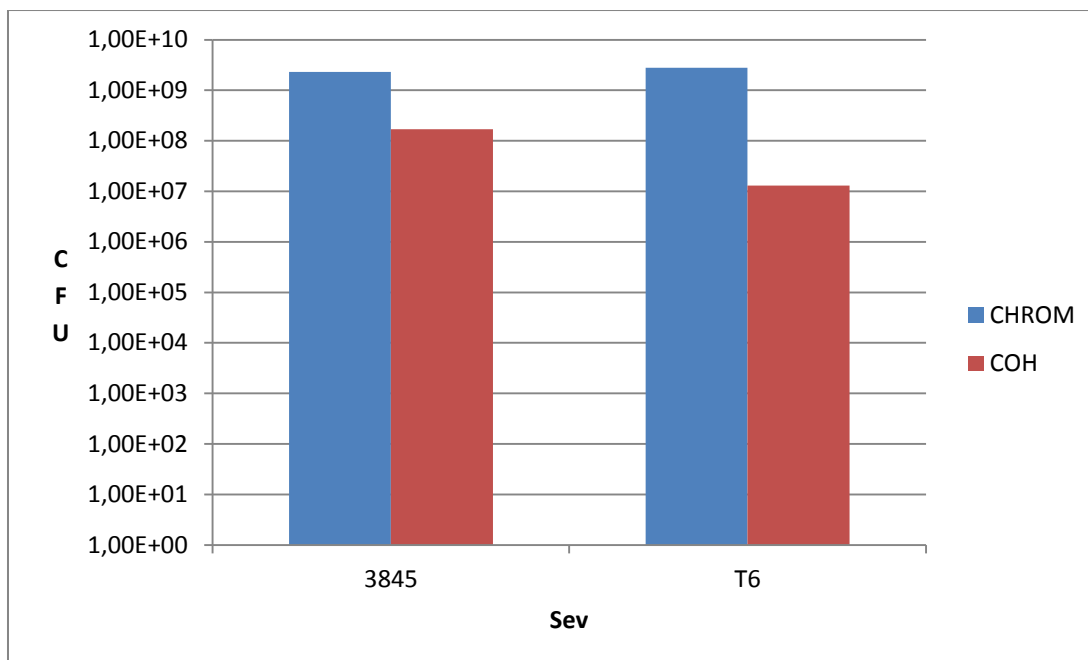
Preštejemo nastale kolonije in določimo CFU.

4. Rezultati

Namen naloge je bil ugotoviti vpliv izpostavitve določenemu pH na germinacijo, ugotavljali pa smo tudi pomembnost časa izpostavitve.

Tabela1: CFU vrednosti založnih raztopin, brez centrifugiranja. Gre za kontrolno skupino.

Medij/Sev	3845	T6
CHROM	2,30E+09	2,80E+09
COH	1,70E+08	1,30E+07



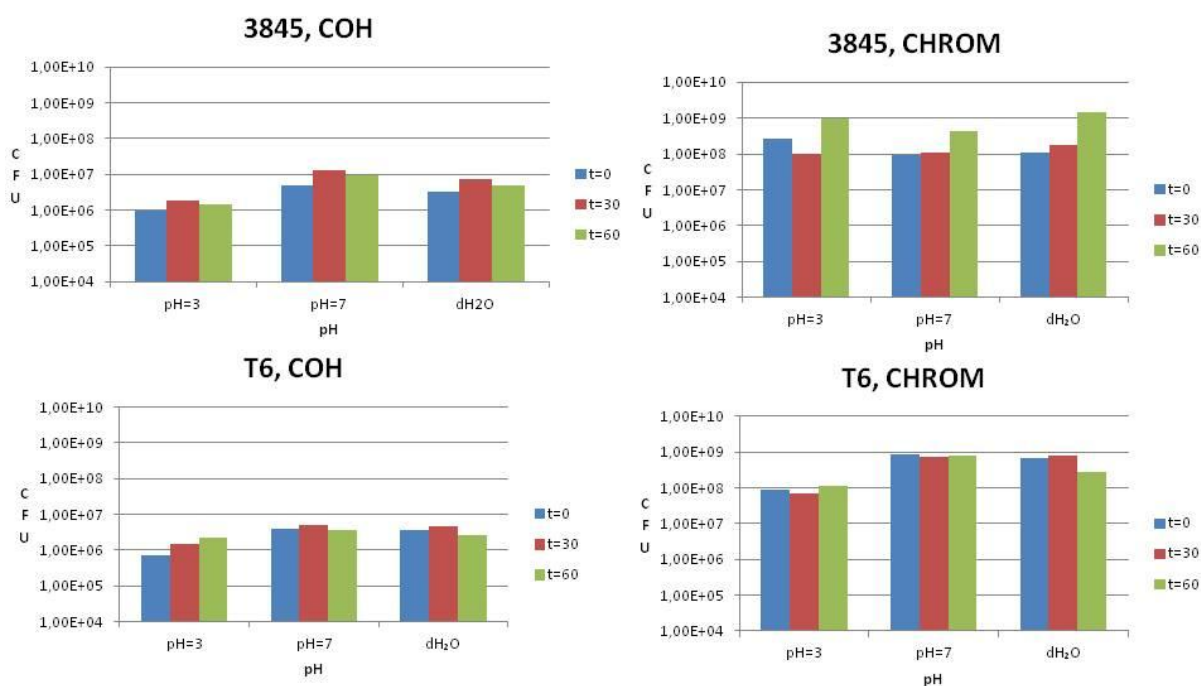
Slika1: CFU vrednosti na logaritmični skali, v odvisnosti od seva in medija na katerem so bili gojeni. Graf prikazuje rezultate iz tabele1 za kontrolno skupino. Rezultati so na logaritmski skali, ki je poenotena.

Opazimo lahko, da je germinacija obeh sevov boljša na CHROM gojišču. Na njem so razlike v uspešnosti rasti relativno majhne. CFU, ki je pokazatelj uspešnosti germinacije je odraz števila spor, ki so sposobne tvoriti kolonije. Rast na COH je manjša v obeh primerih in tudi razlika med germinacijama obeh sevov je večja, kar lahko opazujemo na sliki1.

Tabela1: Prikaz germinacije merjene v CFU za oba seva na CHROM in COH gojiščih. Prikazane so tudi razlike glede na čas in pH izpostavitve.

3845, COH				3845, CHROM			
pH/Čas(min)	t=0	t=30	t=60	pH/Čas(min)	t=0	t=30	t=60
pH=3	9,41E+05	1,91E+06	1,46E+06	pH=3	2,57E+08	1,02E+08	9,41E+08
pH=7	5,02E+06	1,27E+07	9,55E+06	pH=7	9,64E+07	1,12E+08	4,32E+08
dH ₂ O	3,18E+06	7,43E+06	4,72E+06	dH ₂ O	1,07E+08	1,84E+08	1,41E+09

T6, COH				T6, CHROM			
pH/Čas(min)	t=0	t=30	t=60	pH/Čas(min)	t=0	t=30	t=60
pH=3	7,00E+05	1,47E+06	2,30E+06	pH=3	8,75E+07	6,94E+07	1,14E+08
pH=7	3,94E+06	5,14E+06	3,65E+06	pH=7	8,68E+08	7,10E+08	7,77E+08
dH ₂ O	3,67E+06	4,45E+06	2,55E+06	dH ₂ O	7,01E+08	7,77E+08	2,70E+08



Slika2: Grafični prikaz rasti kolonij (CFU) pri dveh različnih sevih (3845 in T6) na dveh različnih gojiščih (COH in CHROM) po različno dolgi izpostavitvi spor pufrom s pH vrednostjo 3 ali 7 ter destilirani vodi (kontrola).

Rezultati kažejo, da je germinacija v vseh primerih slabša, kot v kontrolni skupini, saj pod nobenim pogojem izpostavitve spore niso germinirale tako dobro kot v kontrolni skupini (založna raztopina spor, rezultati prikazani na sliki 1). Tudi pri poskusu, kjer so bile spore izpostavljene različnim pH vrednostim, opazimo, da je germinacija pri obeh sevih boljša na CHROM gojišču, saj dosega CFU vrednosti med $9,64E+07$ in $1,41E+09$, medtem ko se CFU na COH ploščah giblje med $7,00E+05$ in $9,55E+06$. Vidimo lahko, da je germinacija pri pH 3 opazno slabša pri obeh sevih na COH ploščah in na CHROM za T6, med tem kot ta razlika ni jasna na CHROM za 3485. V vseh primerih ni pomembnejših razlik med germinacijo po izpostavitvi pufru s pH 7 ali destilirani vodi. Zdi se, da ima čas podoben vpliv na vse pH vrednosti pri 3485 na COH, saj germinacija po izpostavitvi za pol ure rahlo poraste in nato spet pade, vendar je vrednost CFU po eni uri vseeno višja kot na začetku. Pri 3485 na CHROM vrednost CFU zraste zanemarljivo po pol ure, vendar nato pomembno zraste po eni uri. Ta trend se ne kaže za pH 3. T6 na COH kaže rahel sorazmeren porast CFU s časom za pH 3, medtem ko se zdi, da za pH 7 in vodo vrednost po pol ure rahlo zraste in nato spet pade. Te razlike so zelo majhne. T6 na CHROM gojišču ne kaže jasnih trendov kar se tiče časa izpostavitve in CFU.

5. Diskusija

V primerjavi obeh sevov med seboj lahko opazimo nekaj razlik med vzorci germinacije. Kar jima je skupno, je, da sta oba seva v eksperimentu germinirala nekoliko slabše kot v kontrolni skupini. Noben CFU, ki je bil rezultat protokola eksperimenta, ni dosegel tako visoke vrednosti kot tisti v kontrolni skupini. Če upoštevamo, da je skupina v eksperimentu, ki je bila izpostavljena vodi za 0min, bila obravnavana skoraj enako kot kontrolna skupina z izjemo centrifugiranja, ki se v kontrolni skupini ni dogajalo, lahko iščemo vzroke prav v tem postopku. Možno bi bilo, da ob tvorbi peleta pri centrifugiranju čisto vse spore ne potonejo na dno in jih nekaj ostane v supernatantu, ki je kasneje odpipetiran. To bi posledično pomenilo, da je nekaj spor, ki so zmožne tvorbe kolonij, odstranjenih. Kot posledico dobimo v eksperimentalni skupini nižji CFU kot pa v kontrolni. Vsekakor je ta opazka pomembna za

nadaljnjo interpretacijo rezultatov, vendar v smislu primerjave rezultatov med seboj ne vpliva na interpretacijo, saj je bila centrifugiranje vedno opravljeno za deset minut na 12000 obratov na minuto, torej lahko sklepamo, da je morebiten ostanek spor v supernatantu vedno zelo podoben in ne bi smel varirati preveč.

Kar se tiče časa izpostavitve, lahko opazimo, da vzorec germinacije varira tudi znotraj istega seva glede na vrsto gojišča. Razlike se, seveda, pojavijo tudi med sevoma. Slika2 kaže, da se germinacija, ne glede na tekočino v kateri so spore, izboljša po uri izpostavitve. Isti sev po uri izpostavitve germinira slabše, če je gojen na COH in ne CHROM ploščah. Sev T6 ne kaže uniformnega vzorca germinacije glede na čas izpostavitve, saj je trend za krivulje različnih tekočin popolnoma drugačen. Isti sev na COH ploščah kaže podoben vzorec za vodo in pufer z pH 7. Vidimo lahko, da za te dve tekočini krivulja rahlo naraste po kratki izpostavitvi (30 minut) in za tem spet pade (60 minut). Spore T6 izpostavljene pH 3 pa na ploščah COH germinirajo bolje, če so izpostavljene dalj časa, zveza pa je (vsaj za prvo uro) skoraj linearna.

Na skiki2 lahko tudi jasno vidimo, da je ob kakršnikoli izpostavitvi pH 3, germinacija slabša, kot če so spore izpostavljene zgolj nevtralnemu pH-ju. Pri sevu 3845 na CHROM prihaja do manjših odstopanj od tega pravila, vendar so spremembe zelo majhne in težko nakazujejo splošno pravilo.

Navedeni podatki ne podpirajo H1, zaradi česar je ta hipoteza zavrnjena.

Slika2 kaže podobnosti kar se tiče germinacije T6 na CHROM in 3485 na COH po izpostavitvi pH 3. Ne glede na čas izpostavitve je germinacija v obeh primerih skoraj konstantna in nižja od obeh ostalih pogojev, ki sta bila merjena. Res pa je, da je razlika v CFU pri vseh treh časih približno 100kratna, saj gre pri grafu6 za germinacijo T6 na CHROM ploščah, ki imajo dodane germinante. Podoben vzorec se pojavi tudi za T6 na COH in 3845 na CHROM, kjer se zdi, da germinacija raste z dolžino izpostavitve nizkemu pH-ju, čeprav je CFU še vedno nižji kot za vodo in nevtralni pufer. H2 je zavrnjena zaradi dejstva, da je pH 3 slab pogoj za germinacijo in je z izjemo časa 0min za 3845 na CHROM ploščah vedno zmanjšal CFU v relaciji do drugih dveh tekočin.

Dejstvo, da CFU v dveh primerih raste z časom izpostavitve pH 3 bi lahko razlagali z ozirom na sorodne študije narejene na rodu *Bacillus*. Paidhungat in Setlow (v Heeg et al., 2012) navajata, da se receptorji za germinacijo nahajajo na notranji membrani spore, se pravi, da morajo germinanti preiti zunanje plasti spore; eksosporij. Zdi se možno, da je sterična ali

kemijska dostopnost samih receptorjev lahko lažja, če bi prišlo do manjših poškodb zunanjih plasti spore. Omenjeni proces bi lahko bil razlog za naraščanje germinacije s časom izpostavitve nizkemu pH-ju. Omeniti pa je potrebno, da je to dosti bolj verjetna razlaga v primeru, ko gre za gojišče z visoko prisotnostjo germinantov, CHROM, torej za 3845.

Kot smo navajali že v uvodu, pa je nizek pH velikokrat zelo škodljiv za vegetativne celice in deloma za spore, zaradi česar so naši rezultati v skladu s teoretičnim ozadjem. Verjetno pomembno vlogo igra tudi denaturacija samih receptorjev za germinacijo, ki so, kot proteini, zelo občutljivi na spremembe v pH-ju.

H3 se je izkazala pravilna samo izjemoma v primeru za graf5 3845 na COH ploščah.

Generalni problem, ki se pojavi v vrednotenju te hipoteze je, da načeloma germinacije po izpostavitvi različnim tekočinam nimajo enakih vzorcev, saj lahko včasih nekatere krivulje padajo s časom, ko se druge višajo in s tem manjšajo razlike, ki so vidne pri času 0min. Na grafu2 bi lahko govorili o poudarku razlik, če predpostavimo, da je CFU pri času 0min enak in so razlike nastale zgolj zaradi merskih napak, na koncu pa so se krivulje ločile zaradi dejanskih razlik v vplivu tekočin na spore. Vsekakor se zdi, da je takšna predpostavka premočna in da hipoteza3 ne podpira nikakršnega splošnega pravila. Zaradi tega je H3 zavrnjena.

Že rezultati iz kontrolnih skupin pa namigujejo, da je germinacija na CHROM ploščah boljša od tiste na COH, kar je konsistentno z samim namenom kromogenih plošč, ki zaradi dodanih germinantov vplivajo na hitrejšo in boljšo rast vegetativnih celic, pa tudi na boljšo germinacijo spor.

Če pogledamo rezultate v tabeli2 lahko opazimo, da je največji CFU, ki je bil dosežen na COH ploščah manjši kot najmanjši CFU, ki se je pojavil na CHROM ploščah. Tudi slika1 prikazuje podobne rezultate, ki potrjujejo razlike v kontrolni skupini.

S podporo teh podatkov je H4 potrjena.

Zaradi naraščajoče pomembnosti razumevanja *Clostridium difficile* se zdi pomembno poznati vpliv želodčnega pH-ja na germinacijo spor bakterije. Posebno ob dejstvu, da nekatere terapije spreminjajo želodčni pH, takoj za katerim so spore izpostavljene germinantom v žolču, je ugotovitev o slabši germinaciji ob nizkem pH pomembna. Zdi se, da bi lahko zaključili, da so terapije, ki neutralizirajo želodčni pH ob grožnji okužbe z *C. difficile* lahko

dodatni dejavnik tveganja. Prejemanje terapij, ki vključujejo inhibitorje protonskih črpalk, bi torej lahko povečalo možnost okužbe s *C. difficile* (po Rupnik et al. 2009)

6. Sklep

Z načrtovano metodo smo uspeli odgovoriti na vsa zastavljena raziskovalna vprašanja in ovrednotiti hipoteze.

Pri nekaterih skupinah, ki smo jih raziskovali, npr. T6 na CHROM nismo dobili jasnih trendov, ki bi jih lahko analizirali in iz njih zaključili jasne rezultate. Obstajata dva možna vzroka. Prvi je v delu, kar pomeni, da je morebiti prišlo do kakšne sistemske napake pri pipetiranju ali morebiti celo označevanju, čeprav je to zelo malo verjetno. Predvsem dejstvo, da smo delali v dveh paralelah zagotavlja kar nekaj trdnost rezultatov samih. Delo v še večih paralelah bi bilo še bolj priporočljivo, vendar tudi dosti bolj dolgotrajno in potrebovali bi več opreme, predvsem plošč. Drugi možen razlog je, da se trend ne kaže, ker smo naredili poskus zgolj za tri različne čase izpostavitve. Morebiti bi se ob podaljšani izpostavitvi izoblikovala neka zveza, ki bi jo bilo dosti lažje analizirati. Za bodoče poskuse predlagamo torej tudi daljše izpostavitve.

Razen tega se je metoda izkazala za primerno pri preučevanju vplivov pH na germinacijo bakterijskih spor na različnih gojiščih.

Za bodoče raziskave bi predlagal več paralel in dalj časa izpostavitve predvsem kar se tiče pH 3, saj je ta tisti, ki je dejansko fiziološko pomemben dejavnik. To bi lahko dalo jasnejšo sliko o vplivu in morebitnih mehanizmih zaradi katerih je germinacija slabša, a, v nekaterih primerih, vseeno rase s časom.

7. Viri in literatura

-Greenwood, D. (2006) *Medical Microbiology: A Guide to Microbial Infections*. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier

-Heeg, D., Burns, D. A., Cartman, S. T., Minton, N. P. (2012) Spores of *Clostridium difficile* Clinical Isolates Display a Diverse Germination Response to Bile Salts. PLoS ONE 7(2): e32381. doi:10.1371/journal.pone.0032381

-Janežič, S. (2008) Molekularne metode za tipizacijo črevesnih patogenih bakterij *Clostridium difficile*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

-Talaro Park, K. (2008) *Foundations in Microbiology*. New York: McGraw-Hill

-Reece, J.B., Urry, L.A., Cain, M.L, Wasserman, S.A., Minorsky, P.V., Jackson, R.B. (2011) San Francisco: Pearson

-Rupnik, M., Wilcox, M.H., Gerding, N.D., (2009) *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. Nature Review, July 2009

-(Society for Healthcare Epidemiology of America (2013, January 9). Unnecessary antimicrobial use increases risk of recurrent infectious diarrhea. *ScienceDaily*. Retrieved January 23, 2013, from <http://www.sciencedaily.com/releases/2013/01/130109151200.htm>).

-(Wellcome Trust Sanger Institute (2012, December 9). Bugs without borders: Researchers track the emergence and global spread of healthcare associated *Clostridium difficile*. *ScienceDaily*. Retrieved January 23, 2013, from <http://www.sciencedaily.com/releases/2012/12/121209152539.htm>).