



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2019 60 stp

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Karakterisering av clostridiesporer i avføringsprøver fra mødre og deres barn

Characterization of clostridial spores in stool
samples from mothers and their infants

Marte Gro Laeskogen Larsen

Master i bioteknologi, studieretning mikrobiologi

Forord

Denne masteroppgaven ble skrevet ved fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap med professor Knut Rudi som hovedveileder og postdoktor Ekaterina Avershina som tilleggsveileder.

Jeg vil først av alt takke professor Knut Rudi og postdoktor Ekaterina Avershina for deres gode veiledning underveis i arbeidet. Dere har alltid vært positive og det har vært enkelt å få hjelp til store og små spørsmål underveis. En ekstra takk til postdoktor Ekaterina Avershina for arbeidet du gjorde med å analysere resultater.

Tusen takk til hele gjengen på MiDiv som gjorde studiehverdagen enda bedre, ikke minst tusen takk til avdelingsingeniør Inga Leena Angell for at du alltid var behjelpelig med det jeg lurte på underveis på laboratoriet.

Tusen takk til alle som har bidratt med bakteriekulturer, protokoller og lignende underveis.

Jeg er takknemlig for all støtte og motivasjon familien og svigerfamilien min har gitt meg underveis. Spesielt takk til mannen min og barna våre for tålmodigheten dere hadde da jeg satt time etter time foran dataskjermen.

Til slutt vil jeg gi en stor takk til Ragnhild som har tatt seg tid til å korrekturlese for meg.

Dette har vært en utfordrende, spennende og lærerik prosess.

Mai, 2019

Marte Gro Laeskogen Larsen

Sammendrag

Etableringen av tarmmikrobiotaen er en dynamisk og ikke-tilfeldig prosess. Proteobacteria og Actinobacteria dominerer hos nyfødte, før Bacteroides og Firmicutes øker dominansen en tid etter fødselen. Voksnes tarmmikrobiota domineres av bakterier innen klassen Clostridia, som omfatter obligat anaerobe, sporedannende bakterier. Det er antatt at disse bakteriene koloniserer tarmen via sporer, men det er fortsatt uklart når og hvordan dette skjer.

I denne masteroppgaven ble det utviklet en protokoll for å isolere DNA fra clostridiesporer i avføringsprøver. De vegetative cellene ble drept ved å behandle prøvene med likt volum av 70% etanol i fire timer, før vegetativt DNA ble fjernet med ethidium monoazide (EMA) som binder seg kovalent til DNA under lyseksponering. Antall 16S rRNA-kopier ble kvantifisert med qPCR og avføringsprøvene ble sekvensert med Illumina-sekvensering.

Klassen Clostridia hadde en signifikant økning i relativ mengde av 16S rRNA-kopier etter etanol- og EMA-behandling ved 3-10 dager og 4 måneders alder, men ikke for barn 1 år, 2 år og mødrene. Tre OTUer tilhørende klassen Clostridia og én OTU tilhørende klassen Bacilli ble funnet med signifikant høyere relativ mengde 16S rRNA-kopier etter etanol- og EMA-behandling i forhold til ved kun etanolbehandling både hos barna og hos mødrene og ble karakterisert som sporer. De tre Clostridia-OTUene tilhørte Peptostreptococcaceae, *Romboutsia* og *Clostridium sensu stricto*. Bacilli-OTUen ble karakterisert som *Turicibacter* og det ble antatt at denne var sporedannende. OTUene har senere blitt bekreftet som etanolresistente ved dyrkning. Det ble ikke funnet indikasjoner på at disse OTUene var overført fra mor til barn ved fødsel og det ble antatt at de hadde opprinnelse fra omgivelsene. De tre Clostridia-OTUene viste økt antall DNA-kopier ved ett års alder i forhold til tidligere prøvetidspunkter, både i kun etanolbehandlede og i etanol- og EMA-behandlede prøver. Det er mulig bakteriene kommer inn i tarmen som sporer og ligger latent til betingelsene er gunstige rundt ett års alder.

Det ble funnet indikasjoner på at EMA til en viss grad trengte inn i sporene, men nedgangen i antall DNA-kopier var høyere for vegetativt DNA og det var derfor mulig å skille DNA fra sporer og vegetative celler fra hverandre. Det er allikevel nødvendig å optimalisere metoden ytterligere for å kunne karakterisere flere sporer.

Abstract

The establishment of the gut microbiota is a dynamic and non-random process. Phylum Proteobacteria and Actinobacteria dominates the gut of infants, before Bacteroides and Firmicutes becomes the dominating phylums. The adult gut microbiota is dominated by Clostridia, which include obligate anaerobe, spore forming bacteria. It is assumed that these bacteria colonize the gut as spores, but it is still unclear when and how this happens. In this master thesis a protocol has been developed to isolate DNA from clostridial spores in stool samples. The vegetative cells were killed by treatment with 70% ethanol for four hours before DNA was removed by ethidium monoazide (EMA), that covalently binds to DNA when exposed to light. The number of 16S rRNA copies was quantified by qPCR and the stool samples was sequenced by Illumina sequencing.

The Clostridia class had a significant enrichment after EMA treatment for children 3-10 days and 4 months of age, but not for children at 1 and 2 year of age and the mothers. Three Clostridia OTUs and one Bacilli OTU had a significant higher relative amount of 16S rRNA gene copies after ethanol- and EMA treatment compared to only ethanol treated samples in both the children and the mothers. These OTUs were characterized as spores. The three Clostridia OTUs belonged to Peptostreptococcaceae, *Romboutsia* and *Clostridium sensu stricto*. The Bacilli OTU was characterized as *Turcibacter* and it was assumed to be spore forming bacteria. The four OTUs have later been confirmed as ethanol resistant bacteria in a culturing experiment. There were no indications that these OTUs were transferred from mother to child at birth and were believed to originate from the environment. The three Clostridia OTUs showed an increased number of DNA copies at 1 year of age in both ethanol treated and ethanol- and EMA-treated samples, and the bacteria may have an early colonization as spores but stay dormant until around 1 year of age.

There were indications that EMA penetrated the spores to some extent, but the decrease in DNA copies was higher for vegetative DNA and it was therefore possible to distinguish between the spores and vegetative DNA. It is nevertheless necessary to further optimize the method in order to characterize more spores.

Forkortelser

bp	Basepar
ddPCR	Dråpebasert digital polymerasekjedereaksjon
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dsDNA	Dobbeltrådet DNA
EMA	Ethidium monoazide bromide
IMPACT	Immunology and Microbiology in Prevention of Allergy among Children in Trondheim
kb	Kilobase
NaCl	Natriumklorid
NaOH	Natriumhydroksid
OTU	Operasjonell taksonomisk enhet
PCR	Polymerasekjedereaksjon
PMA	Propidium monoazide
qPCR	Kvantitativ polymerasekjedereaksjon
rRNA	Ribosomal ribonukleinsyre

Innhold

1. Introduksjon	1
1.1 Menneskets tarmmikrobiota	1
1.2 Endosporer	2
1.2.1 Sporedannende bakterier i tarmen	3
1.2.2 Clostridia	4
1.3 DNA-ekstraksjon av fekalt materiale	5
1.4 Polymerasekjedereaksjon	5
1.4.1 Kvantitativ polymerasekjedereaksjon	6
1.4.2 Dråpebasert digital polymerasekjedereaksjon	6
1.5 Sekvensering	7
1.6 Membranintegritet	8
1.6.1 Ethidium monoazide og propidium monoazide	9
1.7 IMPACT-studiet	9
1.8 Målsetting	10
2. Materialer og metoder	11
2.1 Forsøksoppsett	11
2.1.1 Modellbakterier for protokollutvikling	12
2.1.2 Forsøksmateriale	13
2.2 Dyrkningsbetingelser	14
2.2.1 Kulturer av vegetative celler	14
2.2.2 Sporesuspensjon	14
2.3 Drap av vegetative celler	14
2.4 Inaktivering av DNA fra vegetative celler	15
2.5 DNA-ekstraksjon	15
2.6 Evaluering av DNA-mengden i prøvene	16
2.6.1 Kvalitativ polymerasekjedereaksjon	16
2.6.2 Kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR)	17
2.7 LIVE/DEAD® BacLight™-farging	17
2.8 Illumina-sekvensering (MiSeq)	18
2.8.1 Preparering av bibliotek	18
2.8.2 Dråpebasert digital PCR	20
2.8.3 Biblioteksdenaturering	20
2.9 Dataanalyse	21
2.9.1 Normalisering av OTU-tabellen	21

2.9.2	Statistikk	22
3.	Resultater	23
3.1	Optimalisering av metode for å inaktivere DNA fra vegetative celler	23
3.2	Visualisering av etanoleffekten på sporer og vegetative celler	26
3.3	Validering av protokollen med sporer fra <i>Clostridium perfringens</i>	28
3.4	Kvantifisering av DNA i avføringsprøver.....	29
3.5	Generelt om avføringsprøvene	30
3.6	OTUer med signifikant anrikning etter EMA-behandling	32
4.	Diskusjon.....	35
4.1	Effekten av EMA-behandling for anrikning av spore-DNA	35
4.2	Karakterisering av Clostridia anriket etter EMA-behandling	36
5.	Konklusjon og framtidig arbeid.....	39
	Referanser	40
	Vedlegg A: Oppskrifter	45
	Vedlegg B: Primere.....	47
	Vedlegg C: Tabeller.....	49

1. Introduksjon

1.1 Menneskets tarmmikrobiota

Menneskets tarmmikrobiota består av både bakterier, arker, eukaryoter og virus (Milani et al., 2017). Dette er et komplekst samfunn med stor diversitet, men relativt like funksjonelle genprofiler mellom individer (Lozupone et al., 2012). 98% av tarmmikrobiotaen består av bakterier fra phylum Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroides og Firmicutes (Lopetuso et al., 2013), og etableringen av tarmmikrobiotaen er en dynamisk og ikke-tilfeldig prosess (Milani et al., 2017). Svangerskapslengde, fødemåte, genetikk, diett, hygiene, helse og antibiotikabehandling er alle faktorer som spiller en rolle i utviklingen av tarmmikrobiotaen (Rodriguez et al., 2015). Mikrobiotaen er nært knyttet til immunsystemet (Ivanov & Honda, 2012), og koloniseringen og etableringen av mikrobiotaen ser ut til å være en viktig faktor for menneskets helse (Milani et al., 2017). De tre første leveårene er derfor spesielt viktige for barnets vekst og utvikling, da mikrobiotaens sammensetning og diversitet når nivået til en voksen rundt denne alderen (Lozupone et al., 2012; Rodriguez et al., 2015).

Først koloniseres tarmen av fakultativt anaerobe bakterier, som *Enterococcus*, *Escherichia*, og *Streptococcus* (Bäckhed et al., 2015), før strikt anaerobe bakterier, som *Bifidobacterium*, *Bacteroides* og Clostridiales overtar dominansen. Proteobakterier og Actinobakterier dominerer hos nyfødte, mens Firmicutes og Bacteroidetes øker dominansen en tid etter fødselen. Dette dominansskiftet ser ut til å ha sammenheng med overgangen fra morsmelk til fast føde (Milani et al., 2017), hvor opphør av morsmelkinntak ser ut til å være den drivende faktoren (Bäckhed et al., 2015). Bacteroidia og Clostridia er de dominerende bakterieklassene i voksnes tarmmikrobiota og det er funnet indikasjoner på at klassen Bacteroidia i stor grad overføres direkte fra mor til barn (Avershina et al., 2016; Jakobsson et al., 2014). Den samme tendensen har ikke blitt funnet for klassen Clostridia og det er derfor sannsynlig at disse rekrutteres på et senere tidspunkt (Avershina et al., 2016).

Tidligere var det en vanlig oppfatning at fostrene lever sterilt og at den mikrobielle koloniseringen startet under og etter fødselen. I de senere årene har flere studier utfordret denne hypotesen med indikasjoner om at den mikrobielle koloniseringen starter allerede under fosterstadiet i livmoren (Perez-Munoz et al., 2017). Det har blitt isolert bakterier både fra morkaken, navlestrengen, fostervannet og mekonium, men kontaminasjonsfaren ved slike prøver er stor og må tas med i betraktningen. Fødselen er uansett en viktig faktor for

koloniseringen av mage-tarmkanalen, når barnet eksponeres for morens mikrobiota og miljøet rundt. Barnet eksponeres både for morens tarm- og vaginalmikrobiota på veien gjennom fødselskanalen, og nyfødte barn født vaginalt har vist seg å ha større andel sekvenslikhet med mor enn nyfødte barn født med keisersnitt (Bäckhed et al., 2015; Jakobsson et al., 2014). Generelt er mikrobiotaen til nyfødte barn født vaginalt i stor grad dominert av bakterier fra morens vaginale flora, som *Lactobacillus* og *Prevotella*, mens mikrobiotaen til nyfødte barn født med keisersnitt domineres av hudbakterier, som *Staphylococcus* (Dominguez-Bello et al., 2010). Spedbarn har større variasjon og lavere diversitet i mikrobiotaen enn voksne (Lozupone et al., 2012).

1.2 Endosporer

Evnen til å danne endosporer (heretter omtalt som sporer) er en egenskap som gjør bakteriene i stand til å overleve under ugunstige vilkår. I motsetning til de vegetative cellene er hvilende sporer relativt hardføre og motstandsdyktige mot blant annet varme, uttørking, ulike typer stråling og kjemikaler (Nicholson et al., 2000). Sporer kan overleve i mange år, de kan overleve store endringer i miljøet og flyttes over store avstander, noe som gjør dem til viktige faktorer for genflyt og horisontal genoverføring (Tetz & Tetz, 2017).

Sporuleringsprosessen, hvor vegetative celler danner sporer, innebærer en asymmetrisk celledeling med en liten presporedel og en større morcelledel (Talukdar et al., 2015). DNAet frigjøres og pumpes inn i presporen, som omslutes av morcellen. Dette resulterer i en forspore med inner- og yttermembran inni morcellen. Mellom inner- og yttermembranen syntetiseres en germcellevegg og en tykk bark av peptidoglykan, som er viktig for å opprettholde integriteten av innermembranen med lav permeabilitet for små molekyler (Setlow, 2007). Dette er med på å sørge for resistens mot blant annet kjemikaler som kan ødelegge DNAet. I forsporens protoplast reduseres pH, volum- og vanninnholdet. På utsiden av forsporen dannes en sporekappe bestående av en kompleks proteinstruktur med mer enn 40 ulike proteiner. Denne beskytter mot reaktive kjemikaler og predasjon fra eukaryote mikrober. Noen arter har i tillegg et eksosporium av proteiner og karbohydrater på utsiden. Sporen frigjøres til slutt fra morcellen ved cellelysis.

Innerst i sporen finner vi sporekjernen, som inneholder DNA, RNA og enzymer. Sporekjernen har lavt vanninnhold, og høye nivåer av pyridin-2,6-dikarboksylsyre (DPA) og assosierte divalente kationer. Dette er viktige faktorer i sporerresistens (Setlow et al., 2006). DNAet

beskyttes av sporuleringsspesifikke proteiner, kalt α/β -type små syreløselige proteiner (SASPs), som binder til DNAet og forandrer den kjemiske og fotokjemiske reaktiviteten. Dette er viktig for å beskytte DNAet mot varme, mange genotoksiske kjemikaler og UV-stråling (Nicholson et al., 2000).

Når sporene kommer under gunstige vilkår kan de germinere for å vokse som vegetative celler igjen. Sporegermineringen starter når germinantreseptorer trigges av spesifikke små molekyler kalt germinanter (Paredes-Sabja et al., 2011). Germinantene er art- og stammespesifikke og kan blant annet være nukleosider, sukker, aminosyrer, ioner eller gallesyre.

1.2.1 Sporedannende bakterier i tarmen

Det er anslått at minst 50-60% av tarmmikrobiotaen hos friske voksne er i stand til å danne sporer (Browne et al., 2016). De sporedannende bakteriene i tarmen kan omtales som tarmsporobiotaen (Tetz & Tetz, 2017) og er fenotypisk forskjellige fra de ikke-sporiddannende bakteriene av mikrobiotaen (Browne et al., 2016), med større diversitet og høyere artsutskifting. I motsetning til vegetative celler er kommensale, sporedannende bakterier resistente mot etanol og kan derfor brukes for å isolere sporedannende bakterier fra tarminnhold (Koransky et al., 1978). Browne et al. (2016) testet overlevelse av kommensale sporedannende og ikke-sporiddannende bakterier, i tillegg til *Clostridium difficile*, under aerobe forhold og ved etanoleksponering. Det viste seg at kun de sporedannende bakteriene, inkludert *C. difficile*, og den fakultativt anaerobe bakterien *E. coli* overlevde mer enn 144 timer under aerobe forhold, mens kun de sporedannende bakteriene overlevde eksponering for etanol i fire timer.

Bakterier som er i stand til å danne sporer finnes hovedsakelig innen klassene Clostridia, Bacilli og Erysipelotrichi i phylum Firmicutes (Galperin, 2013; Yutin & Galperin, 2013), som utgjør over 50-80% av den gastrointestinale mikrobiotaen med Clostridia som den mest tallrike gruppen (Rajilic-Stojanovic & de Vos, 2014). Klassen Bacilli har mange representanter i tarmen som tilhører familier uten sporedannende bakterier, som familiene Staphylococcaceae, Lactobacillaceae, Enterococcaceae og Streptococcaceae (Rajilic-Stojanovic & de Vos, 2014), mens de fakultativt anaerobe, sporedannende tarmbakteriene i hovedsak finnes innen slekten *Bacillus* som tilhører familien Bacillaceae (Fakhry et al., 2008; Tam et al., 2006). Klassen Erysipelotrichi består også i hovedsak av ikke-sporiddannende

arter, men de sporedannende artene *C. ramosum*, *C. innocuum* og *C. spiroforme* har blitt reklassifisert til denne klassen (Galperin, 2013).

1.2.2 Clostridia

Slekten *Clostridium* er en svært heterogen gruppe som Collins et al. (1994) delte inn i 19 cluster, hvor de fleste representantene i tarmen er kommensale, stavformede bakterier tilhørende *Clostridium* cluster IV og *Clostridium* cluster XIVa (Lopetuso et al., 2013). Bakterier fra disse gruppene spiller en viktig rolle i opprettholdelsen av tarmhomeostase. Atarashi et al. (2011) fant ut at det var en anrikelse av arter som induserte T_{reg}-celler i den kloroformresistente delen av tarmmikrobiotaen til mus. Det ble senere funnet tilsvarende i human avføring (Atarashi et al., 2013), hvor 17 stammer tilhørende Clostridia cluster XIVa, IV og XVIII ble isolert fra kloroformbehandlet human avføring, og inokulering av disse i sterile mus viste en akkumulering av T_{reg}-celler i tykktarmen. Det ble også vist at T_{reg}-celleinduksjonen var både horisontalt og vertikalt overførbar, og tilstedeværelse av disse bakteriene viste svekket sykdomsforløp ved eksperimentell kolitt og allergirelatert diaré.

Clostridium var i hovedsak sett på som en gruppe obligat anaerobe, Gram-positive sporedannende bakterier, men har vist seg å omfatte både anaerobe, aerobe, Gram-positive, Gram-negative, sporedannende og ikke-sparedannende bakterier (Finegold et al., 2002). Gruppen har derfor blitt reklassifisert en rekke ganger de senere årene, både på slekt-, familie- og klassenivå, og *Clostridium sensu stricto* tilhørende cluster I er i dag regnet som den riktige *Clostridium*-slekten med *C. butyricum* som typeart (Lawson & Rainey, 2016; Liu et al., 2008; Stackebrandt et al., 1999). Dette er Gram-positive, obligat anaerobe, sporedannende arter.

Tarmbakterier innen klassen Clostridia omfattes av familiene *Clostridiaceae*, *Chrisentsenellaceae*, *Eubacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Ruminococcaceae* og bakterier med uklar taksonomisk status klassifisert i *Clostridiales Incertae Sedis* familie XI og XIII (Rajilic-Stojanovic & de Vos, 2014). I tillegg kommer *Veillonellaceae* inn i denne klassen, men som i motsetning til de fleste Clostridia farger Gram-negativt og er omkranset av to tynne membraner med et tynt lag av peptidoglykan imellom (Rajilic-Stojanovic & de Vos, 2014; Yutin & Galperin, 2013). *Ruminococcus* og *Lachnospiraceae* er de mest dominante tarmmikrobene (Tap et al., 2009).

1.3 DNA-ekstraksjon av fekal materiale

For at DNA skal kunne brukes i videre analyser må alt som kan inhibere disse videre prosessene fjernes slik at DNAet er rent. En mye brukt metode for å ekstrahere DNA er silikakuler som i kombinasjon med kaotropiske salter kan bindes til DNA (Boom et al., 1990). Her fungerer natrium som en bro mellom silikapartiklene og DNAet, slik at det negativt ladete oksygenet i fosfatryggraden til DNAet bindes til silikapartiklene.

Fekalt materiale er et komplekst sammensatt materiale med bakterielt DNA fra både Gram-negative og Gram-positive bakterier, i tillegg til sporer, som gjør det utfordrende å ekstrahere DNA fra alle grupper. Mekanisk ødeleggelse med bruk av kuler, som kolliderer med celler og sporer ved risting, er derfor en effektiv metode for å preparere fekal materiale for DNA-ekstraksjon (Salonen et al., 2010), siden både sporer og celler kan ødelegges på denne måten og dermed penetreres av lysisbuffer.

1.4 Polymerasekjedereaksjon

Polymerasekjedereaksjon (PCR) syntetiserer en spesifikk DNA-sekvens i en gjentakende tretrinnsprosess, slik at antall syntetiserte DNA-sekvenser øker eksponentielt (Mullis et al., 1986). På denne måten kan det lages millioner av DNA-kopier ut fra små mengder DNA. I reaksjonen må det tilsettes DNA-templat, primere, nukleotider og DNA-polymerase. DNA-templatet fungerer som mal for PCR-produktet. Primerne er spesifikke oligonukleotider som er komplementære til ca. 20 baser (kjent fra før) på hver side av den dobbelte DNA-tråden (DNA-templatet) som skal syntetiseres. De fire nukleotidene adenin, tymin, cytosin og guanin er byggesteinene som PCR-produktet lages av, og det er DNA-polymerasen som setter sammen nukleotidene i riktig rekkefølge med utgangspunkt fra primerne (Garibyan & Avashia, 2013).

Det første trinnet i PCR er denaturering av DNA-trådene. Dette innebærer at temperaturen øker til over smeltepunktet for DNA-trådene (ca. 95°C), slik at de to komplementære trådene separeres fra hverandre ved bryting av hydrogenbindingene mellom nukleotidene i de to trådene. I det neste trinnet, kalt hybridisering, senkes temperaturen til 50-60°C (avhengig av primeregenskaper), slik at primerne kan binde seg til den komplementære sekvensen av DNA-trådene. I det tredje trinnet økes temperaturen til ca. 72°C, slik at DNA-polymerasen kan syntetisere en ny DNA-tråd ut fra primerne komplementær til DNA-templattråden (Garibyan & Avashia, 2013).

For å kvalitetssjekke DNAet etter PCR brukes gjerne gelelektroforese, som bruker elektrisk spenning for å skille DNA-fragmenter, men PCR har også blitt utviklet for å kunne kvantifisere DNAet direkte.

1.4.1 Kvantitativ polymerasekjedereaksjon

Kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR) måler mengden primerspesifikt DNA som finnes i prøven ved hjelp av en fluorescensreporter som binder seg til dobbeltrådet DNA. Etter hver PCR-syklus genererer reportermolekylet et fluorescenssignal som øker proporsjonalt med mengden amplifisert produkt (Kubista et al., 2006). I starten vil signalet være lavt på grunn av lite amplifisert produkt og kan ikke skilles fra bakgrunnsstøyen, men etter hvert som mengden PCR-produkt øker, vil lyssignalet akkumulere og komme over deteksjonsgrensen. Dette kalles terskelverdien og minste antall sykluser som kreves for å komme over terskelverdien blir angitt som Ct (threshold cycle) (Arya et al., 2005). Ct-verdien er nyttig for å bestemme mengden PCR-produkt og ut ifra denne kan man kalkulere antall DNA-kopier av den bestemte sekvensen som finnes i den opprinnelige prøven. Ct-verdien bestemmes ut fra DNA-mengden som er til stede fra starten av reaksjonen. Lav Ct-verdi indikerer høyt DNA-innhold i prøven, mens høy Ct-verdi indikerer lavt DNA-innhold, siden flere sykluser må til for å få et signal over bakgrunnsstøyen.

1.4.2 Dråpebasert digital polymerasekjedereaksjon

Dråpebasert digital polymerasekjedereaksjon (ddPCR) bruker samme primere og prober som qPCR, men gjør det mulig å kvantifisere absolutt mengde DNA-molekyler med større nøyaktighet (Baker, 2012). Her fordeles DNA-molekyler i dråper hvor noen ikke inneholder templat-DNA, mens andre inneholder ett eller flere templatkopier, og etter amplifisering brukes endepunktanalyse for å bestemme andelen positive og negative dråper (Hindson et al., 2011). I en dråpegenerator gjør vakuüm at prøve og olje dras gjennom en væskestrøm slik at dråper genereres. Dråpene strømmer til en samlingsbrønn hvor de legger seg over overskuddsoljen og kan pipetteres ut på en PCR-plate. Tilstedeværende DNA i dråpene amplifiseres så med PCR, før platen flyttes til en dråpeleser, hvor dråper fra hver brønn suges opp og flyter mot en fluorescensdetektor én etter én. Hver dråpe som inneholder templat vil dermed generere et fluorescenssignal, slik at andelen positive (med DNA) og negative (uten DNA) dråper kan bestemmes. Når dråpevolumet er kjent, kan andelen positive dråper brukes til å kalkulere den absolutte konsentrasjonen av målsekvensen.

1.5 Sekvensering

Tidligere var kunnskapen om det mikrobielle samfunnet i hovedsak basert på dyrkning, biokjemi og mikroskopi (Escobar-Zepeda et al., 2015), men sammen med ideen om å bruke ribosomale RNA-gener som molekylære markører for taksonomi (Woese & Fox, 1977) og utviklingen av sekvenseringsmetoder ble det enklere å utføre kulturuavhengige studier av mikrobefund.

Sanger-sekvensering er en første-generasjonssekvenseringsmetode utviklet av Frederick Sanger og hans kollegaer på 1970-tallet (Sanger et al., 1977). Denne metoden består av fire parallelle reaksjoner som hver inneholder én type dideoksyribonukleotidtrifosfat (ddNTP), som mangler 3'OH-gruppen, sammen med de vanlige typene deoksyribonukleotid (dNTP), primere og DNA-polymerase. Når DNA-polymerasen setter på en ddNTP vil dermed sekvenseringen termineres, noe som gir mange DNA-fragmenter av ulik størrelse. Ved å se på reaksjonene med elektroforese på polyakrylamidgel, vil man se DNA-fragmenter av ulik størrelse som gjør at man kan lese av sekvensen. Sanger-sekvensering er en krevende og kostbar prosess, som kun tar opptil 96 sekvenser med en gjennomsnittslengde på 650bp per runde (Escobar-Zepeda et al., 2015), og behovet for raskere og mindre kostbare metoder ga opphav til neste-generasjonssekvensering.

Neste-generasjonssekvensering har gjort det mulig å produsere enorme mengder data og kan brukes til full genomsekvensering, som gir mulighet for å sammenligne organismer i storskala og evolusjonært på en kostnadseffektiv måte (Metzker, 2010). Med sitt høye utbytte og lave kostnad har Illumina-sekvensering blitt en av de mest populære neste-generasjonssekvenseringsmetodene (Escobar-Zepeda et al., 2015). Ved Illumina-sekvensering brukes en glassplate, kalt flow cell, dekket med to typer oligonukleotider. Disse er komplementære til adaptersekvenser i primerne som bindes til DNA-fragmentene som skal sekvenseres, og DNA-fragmentene vil derfor hybridisere med oligonukleotidene på flow cell (Illumina, 2016). En polymerase lager en komplementærtråd til DNA-sekvensen, før det dobbeltrådede DNAet denatureres og originaltemplatet fjernes. Deretter danner den gjenværende tråden en bro via hydrogenbinding til den andre typen oligonukleotid på flow cell. En polymerase amplifiserer en komplementærtråd og hydrogenbindingen brytes via denaturering, som resulterer i to enkelttrådede kopier av DNA-sekvensen festet til flow cell. Broamplifiseringen gjentas mange ganger og foregår samtidig i millioner av klynger av DNA-kopisekvenser. Dette resulterer i klonal amplifisering av alle DNA-fragmentene. Til slutt

kløyves og fjernes reverstrådene, slik at selve sekvenseringen kan starte. 3`-enden på forwardtrådene blokkeres for å forhindre uønsket primerhybridisering.

I Illumina-sekvenseringen, kalt sekvensering ved syntese, blir det tilsatt fire ulike reversible terminatorbaser hvor 3'-OH-gruppen er blokkert med et fluorescerende molekyl (Metzker, 2010). Dette gjør at DNA-sekvensen kun kan tilføres ett av de konkurrerende nukleotidene om gangen. En lyskilde, gjerne en laser, eksiterer klyngene og det avgis et fluorescerende signal i en bestemt farge ut fra basens identitet basert på lysets bølgelengde og signalstyrke. Hundrevis av klynger sekvenseres parallelt. Etter deteksjon blir fargen kjemisk fjernet og syklusen kan gjentas for neste base. Til slutt kan basesekvensen til DNA-molekylet leses av ut fra fargekodene. Avlesingslengden bestemmes av antall sykluser, og maksimum avlesingslengde for Illumina-sekvensering med Miseq er på 300bp (Escobar-Zepeda et al., 2015).

Etter at selve DNA-sekvensene er avlest, vaskes avlesingsproduktet bort og det sekvenseres fra indeksprimerne, slik at det er mulig å sette DNA-sekvensene tilbake med riktig prøve. Avlesingen foregår på samme måte som avlesingen i første sekvenseringsrunde og avlesingsproduktet vaskes bort til slutt. Etter sekvenseringen blir det samlede prøvebiblioteket separert basert på de unike indeksene. Avlesinger med lik struktur grupperes sammen, og forward- og reversavlesinger blir parett.

1.6 Membranintegritet

Cellemembranen er viktig for alt livet på jorda for å definere cellen og samhandle med utsiden, og membranintegritet brukes derfor som en biomarkør for levende celler (Emerson et al., 2017). Ved å bruke fluorescensfargestoffer som binder til DNA kan metoden brukes for å skille mellom levende og døde celler. Et eksempel er fargestoffene SYTO[®] 9 og propidiumjodid (PI), som brukes i farging med LIVE/DEAD[®] BacLight[™]-reagens fra Molecular Probes. SYTO[®] 9 fluorescerer grønt og kan trenge inn i alle celler, mens PI fluorescerer rødt og kan kun trenge inn i celler med skadet membran (Boulos et al., 1999). Dette gjør at celler med skadet membran fluorescerer rødt, mens celler med intakt membran fluorescerer grønt. Det finnes flere metoder og reagenser for å måle membranintegritet og Nogva et al. (2003) utviklet en PCR-metode for å skille celler med intakt og svekket membran ved bruk av ethidium monoazide.

1.6.1 Ethidium monoazide og propidium monoazide

Ethidium monoazide (EMA; Phenanthridium, 3-amino-8-azido-5-ethyl-6-phenyl, bromide) er et DNA-interkalerende fargestoff med en azide-gruppe som kan binde seg til dobbeltrådet DNA (Graves et al., 1981). Ved fotolyse konverteres azide-gruppen til et reaktivt nitrene, som bindes kovalent til DNA (Soejima et al., 2007). Denne bindingen kan ikke reverseres og gjør at DNAet fra celler med skadet membran ikke kan amplifiseres med PCR (Nogva et al., 2003). Fritt EMA reagerer med H₂O-molekyler og konverteres til hydroksylamin, og vil derfor ikke kunne binde seg til DNA på et senere tidspunkt (Nocker & Camper, 2009). EMA kan hovedsakelig kun trenge inn i celler med svekket membranintegritet og er derfor effektiv for å kunne skille mellom døde og levende bakterier. Metoden har vist positive resultater både i rene enkeltkulturer (Nogva et al., 2003) og i blandingskulturer (Rudi et al., 2005). I noen tilfeller kan membranen være intakt en periode etter at cellen har mistet evnen til å vokse, for eksempel ved eksponering for lave UV-doser eller noen typer antibiotika (Rudi et al., 2005), noe som kan føre til falske resultater av levende celler.

Det har imidlertid blitt vist at EMA ikke er selektiv for celler med skadet membran i alle bakterier og kan trenge inn i levende celler (Nocker & Camper, 2006; Nocker et al., 2006). Nocker et al. (2006) testet derfor metoden med propidium monoazide (PMA), som viste seg å være mer selektiv og kun trenge inn i celler med skadet membran. Dette har antagelig sammenheng med at PMA har høyere positiv ladning enn EMA (Nocker et al., 2006). Soejima et al. (2007) fant ut at EMA i konsentrasjoner på 100 µg/ml hadde bakteriedødelig effekt, men at dette ikke var tilfelle ved EMA-konsentrasjoner på 10 µg/ml eller lavere. Den dødelige effekten var knyttet til den kovalente bindingen til DNA under fotolyse, og evnen til å trenge inn i levende celler varierer mellom arter (Nocker et al., 2006).

1.7 IMPACT-studiet

IMPACT- (Immunology and Microbiology in Prevention of Allergy among Children in Trondheim) studiet er et mor-barn-studium utført i Trondheim som et nøstet case-kohort-studium som undersøkte påvirkningen tarmmikrobiotaen har på immunsystemet, astma, atopiske og allergiske sykdommer (Oien et al., 2006). Studiet startet i år 2000 og omfatter 720 mor-barnpar, hvor avføringsprøver ble tatt av mor under svangerskapet og av barna 3-10 dager etter fødsel, ved 4 måneders alder, 1 års alder og 2 års alder.

1.8 Målsetting

Clostridia assosiert med en voksens tarmmikrobiota ser ikke ut til å bli overført fra mor til barn ved fødsel, men har en senere tilegnelse og etablering (Avershina et al., 2016). Siden disse bakteriene er obligat anaerobe, er det derfor naturlig å anta at de koloniserer tarmen via sporer. Browne et al. (2016) dyrket fram flere sporedannende bakterier fra human avføring som var behandlet med etanol og denne etanolbehandlingen ble brukt som utgangspunkt for protokollen i denne masteroppgaven.

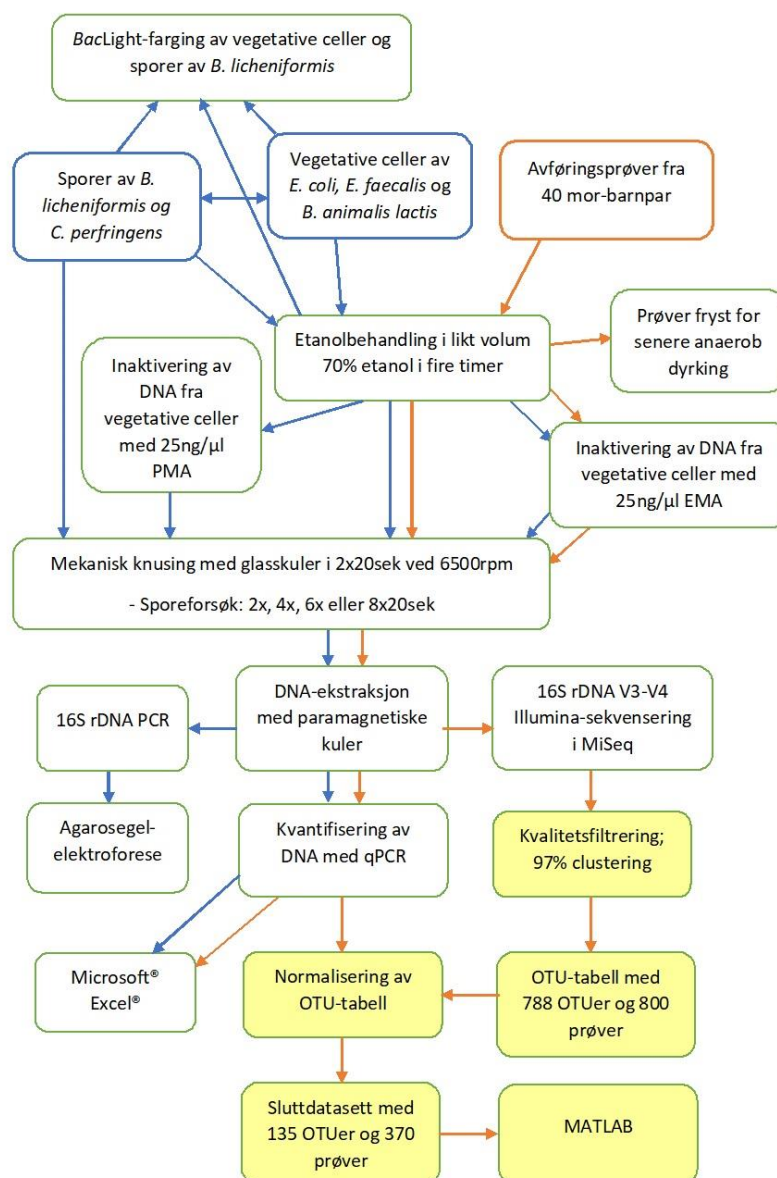
Målet for denne masteroppgaven har vært å utvikle en protokoll for å isolere og karakterisere clostridiesporer i avføringsprøver fra barn og mødrene deres ved bruk av kulturuavhengig metode. For å gjøre dette ble følgende delmål utført:

- Det ble utviklet en protokoll for å isolere spore-DNA fra en blandingskultur av bakteriesporer og vegetative celler ved å bruke etanol og DNA-interkalerende fargestoffer.
- Denne protokollen ble brukt i kombinasjon med Illumina-sekvensering for å karakterisere Clostridia-sporer i avføringsprøver fra 40 mor-barnpar hentet fra IMPACT-studiet
- Det ble undersøkt om det var sporesammensetningsoverlapp mellom mødrene og barna deres.

2. Materialer og metoder

2.1 Forsøksoppsett

Proessen for å utvikle en protokoll for isolering av DNA fra sporer, og isolere spore-DNA fra avføringsprøver er illustrert i et flytskjema (Figur 1). Det ble tatt utgangspunkt i metoden til Browne et al. (2016), som blandet prøvene med likt volum av 70% etanol og lot dem stå aerobt i fire timer ved romtemperatur. I denne masteroppgaven var målet å identifisere bakteriene med dyrkningsuavhengig metode, og metoden ble derfor videreutviklet med EMA for å forhindre amplifisering av DNA fra den etanolsensitive delen av prøvene.



Figur 1: Flytskjema for arbeidet i masteroppgaven. Blå piler viser prosesser som er gjort i forbindelse med utvikling av protokollen og oransje piler viser prosesser som er gjort med avføringsprøvene. Gule ruter viser prosesser utført av postdoktor Ekaterina Avershina.

2.1.1 Modellbakterier for protokollutvikling

For å utvikle protokollen brukt i denne masteroppgaven ble det valgt bakterier som er vanlige å finne i tarmen og som er relativt enkle og raske å dyrke. Både fakultativt anaerobe, strikt anaerobe og sporedannende representanter ble brukt. Representanter fra tre av de fire største phylum i tarmen ble tatt med: Actinobacteria, Proteobacteria og Firmicutes. En tabelloversikt over bakteriene som er brukt finnes i Vedlegg C (Tabell C1).

Escherichia coli tilhører phylum Proteobacteria og er en Gram-negativ, fakultativt anaerob ikke-spor-dannende stavbakterie, som ble oppdaget av Theodor Escherich under et studium av tarmmikrober hos spedbarn og deres rolle i fordøyelse og sykdom påbegynt i 1884 (Blount, 2015). Bakterien lever i hovedsak i tarmen hos pattedyr, men er også funnet hos andre dyr, som fisk, fugler og reptiler. Den kan også leve i jord, vann, planter og mat. På grunn av sin utbredte forekomst og raske vekst på mange forskjellige næringsmedier har *E. coli* blitt en velstudert modellorganisme. Selv om *E. coli*-stammer som lever i tarmen vanligvis er kommensale og ikke gjør skade, kan de opptre som opportunistiske patogener og forårsake sykdom (Tenaillon et al., 2010). Det finnes også patogene stammer som kan forårsake potensielt dødelige sykdommer.

Enterococcus faecalis er en Gram-positiv, fakultativt anaerob, ikke-spor-dannende kokkbakterie tilhørende phylum Firmicutes og finnes både i mennesketarmen, hos andre dyr og i omgivelsene (Fisher & Phillips, 2009). Arten tilhører melkesyrebakteriene og har probiotiske egenskaper (Nueno-Palop & Narbad, 2011), men kan forårsake sykdom og er en utbredt årsak til blant annet urinveisinfeksjoner og bakteriemi. Bakterien er relativt stresstolerant med stor vekstrekkevidde både når det gjelder temperatur, pH og salt (Fisher & Phillips, 2009).

Bifidobacterium animalis lactis er en Gram-positiv, ikke-spor-dannende bakterie tilhørende phylum Actinobacteria funnet i fermentert melk og avføring fra blant annet mennesker og kylling (Masco et al., 2004). Bakterien vokser anaerobt i melk og melkebaserte produkter, men er oksygentolerant. Med sine probiotiske egenskaper er den derfor velkjent som probiotika (Jungersen et al., 2014).

Bacillus licheniformis er en Gram-positiv, fakultativt anaerob sporedannende bakterie tilhørende phylum Firmicutes og er blant annet isolert fra humant fekalt materiale (Hoyles et al., 2012), selv om jord er det største reservoaret for *Bacillus* (Hong et al., 2009).

Clostridium perfringens er en Gram-positiv, obligat anaerob, sporedannende bakterie tilhørende phylum Firmicutes (Brynestad & Granum, 2002). Bakterien er en vanlig årsak til matforgiftning, og er vanlig i jord og tarmen til varmblodige dyr og mennesker, men finnes i de fleste miljøer.

2.1.2 Forsøksmateriale

Escherichia coli, *Enterococcus faecalis* og *Bifidobacterium animalis lactis* ble brukt som representanter for vegetative celler, hvor *E. coli* var Gram-negativ representant, *E. faecalis* var Gram-positiv representant og *B. animalis lactis* var anaerob representant. Av sporer ble det valgt å bruke *Bacillus licheniformis* fordi den er enklere å dyrke fram enn *Clostridium*, men *Clostridium perfringens* (mottatt som ren sporesuspensjon fra NMBU, Adamstuen; Vedlegg A) ble brukt som validering av protokollen for å se at den hadde samme effekt på *Clostridium*-sporer som på *Bacillus*-sporer.

Forsøkene ble gjentatt flere ganger og utført i dubletter med både vegetative celler og sporer blandet eller hver for seg. DNA ble forsøkt amplifisert med PCR eller qPCR og det ble gjort forsøk med både generelle og bakteriespesifikke primere. DNA fra *E. coli* ble brukt som positiv kontroll og sterilt, nukleasefritt H₂O ble brukt som negativ kontroll i protokollutviklingen.

Avføringsprøver fra 40 mor-barnpar hentet fra IMPACT-studiet (Oien et al., 2006) ble behandlet med den ferdigutviklede protokollen. Hvert mor-barnpar bestod av fem avføringsprøver, en prøve tatt fra mor under svangerskapet og prøver tatt fra barnet ved alderen tre eller ti dager, fire måneder, ett år og to år. Prøvene som ble valgt var basert på at det fantes hele tidsserier og de fleste hadde kjent forventet innhold av Clostridia (Ravi et al., 2015) (Vedlegg C, tabell C2). Avføringsprøvene ble oppbevart i et sterilt «Cary Blair transport and holding medium» og var fryst ved -20°C innen to timer etter prøvetaking. De ble innen én måned fryst ned ved -80°C, men har senere vært fryst ved -40°C.

Av fekal materiale i sterilt «Cary Blair transport and holding medium» (BD Diagnostics, Sparks, MD) ble 1ml tatt ut fra hver prøve og pulssentrifugert opptil ca. 1200rpm med IEC Micromax pulssentrifuge. Supernatant ble deretter tatt ut og blandet med 1% natriumklorid (NaCl) i volum 1:2 (700µl avføringsprøve + 700µl NaCl) og 1:9 (100µl avføringsprøve + 800µl NaCl). 600µl fra hver fortykning ble tatt ut for etanolbehandling, mens resterende volum ble fryst ved -40°C.

2.2 Dyrkningsbetingelser

2.2.1 Kulturer av vegetative celler

For å lage overnatte kulturer av hver av bakteriene *E. coli* og *E. faecalis* (laboriestammer), ble 10ml Brain Heart Infusion-medium (BHI; 37g/L; Sigma Aldrich, USA) tilsatt 100µl bakteriekultur og inkubert over natten ved 37°C og 100rpm.

Av *Bifidobacterium animalis lactis* (BB-12®) ble 100µl kultur overført til 5ml MRS-medium (DeMan, Rogosa, Sharpe; 52g/l) med L-cystein (0,5g/l) og satt anaerobt i boks med Oxoid™ AnaeroGen™ (Thermo Scientific) ved 37°C og 100rpm i tre dager, før 100µl ble reinokulert i 10ml medium og inkubert ved samme betingelser i ytterligere to dager.

2.2.2 Sporesuspensjon

Protokollen som ble brukt for å lage sporesuspensjon ble hentet fra masteroppgaven til Kidd (2013) og Madslie et al. (2014). *Bacillus licheniformis* NVH1289 (hentet fra NMBU, Adamstuen) fra blodagar ble forkultivert i Luria-Bertani-medium (Vedlegg A) over natten ved 225rpm i 37°C. 20µl forkultur ble så overført til en erlenmeyerkolbe med 100ml Bacto-MS sporuleringsmedium (vedlegg A). Denne ble satt ved 225rpm i 37°C. Undersøkelse i fasekontrastmikroskop ble gjort daglig for å se om kulturen besto av >90% sporer. Etter åtte dager besto kulturen av >90% sporer (lyse i fasekontrastmikroskop) og ble dermed høstet ved sentrifugering i 50ml Falconrør i 20min ved 3900xg i 4°C. Supernatant ble fjernet og pellet vasket i 10ml sterilt, kaldt Milli Q-H₂O, før sentrifugering i 10min ved 3900xg i 4°C.

Sporesuspensjonen ble holdt på is.

Supernatant ble fjernet og pellet ble resuspendert i 3ml 20% NycoDenz (filtersterilisert; Axis-Shield, Skottland) og lagt på toppen av to lag med henholdsvis 4ml 50% NycoDenz-løsning (nederst) og 4ml 45% NycoDenz-løsning (midten) i 15ml Falconrør. Rørene ble sentrifugert i 80min ved 3900xg i 4°C, før NycoDenz-laget ble fjernet og sporene resuspendert i 10ml sterilt, kaldt Milli Q-H₂O. De ble deretter sentrifugert i 10min ved 3900xg i 4°C. Sporene ble vasket i 10ml sterilt, kaldt Milli Q-H₂O inntil sporesuspensjonen var >98% ren. Sporene ble lagret ved 4°C i fem dager før bruk.

2.3 Drap av vegetative celler

Med utgangspunkt i metoden til Browne et al. (2016) ble suspensjoner av bakteriesporer og vegetative bakterieceller behandlet med likt volum 70% etanol i fire timer aerobt ved

romtemperatur ved 250-300rpm i en thermoshaker TS-100 (SIA Biosan, Latvia) for å drepe de vegetative bakteriecellene. For å vaske bort etanolen ble suspensjonene spunnet ned ved 13000rpm i 5min, supernatant fjernet og pellet resuspendert i samme mengde 1% NaCl som opprinnelig suspensjonsvolum. Vaskingen ble utført to ganger.

For utvikling av protokollen ble det brukt både rene kulturer av hver spore-/cellekultur og blandinger av de ulike artene. Blandingene bestod av enten sporer fra *B. licheniformis* og én, to eller tre bakteriecellearter (*E. coli*, *E. faecalis* og *B. animalis lactis*), eller blandinger med bare bakteriecellearter.

Etter etanolbehandling ble celle- og sporesuspensjonene delt, slik at én del ble satt av (fryst med glasskuler ved -20°C) for DNA-ekstraksjon uten mer behandling (kontroll), mens den andre delen ble videre behandlet for å inaktivere DNA fra vegetative celler. Avføringsprøvene ble delt i tre, hvor den tredje delen ble fryst ved -40°C.

2.4 Inaktivering av DNA fra vegetative celler

Ethidium monoazide bromide (EMA; Molecular Probes) eller propidium monoazide (PMA; Biotium, USA) i konsentrasjon 1mg/ml ble tilsatt til etanolbehandlede prøver i eppendorfrør til en sluttkonsentrasjon på 25ng/μl. Det ble inkludert en kontroll med H₂O. Prøvene ble satt mørkt ved romtemperatur i 5min før lyseksposering ved 460nm i en PAUL-plattform (Photo Activation Universal Light platform, GenIUL, Spania). Prøver med PMA ble kun prøvd lyseksponert i 15min, mens prøver med EMA ble først prøvd lyseksponert i 15min, før det ved senere gjentakelser av eksperimentet ble prøvd både 15min og 30min for å optimalisere eksperimentet. Avføringsprøver ble lyseksponert i 30min.

2.5 DNA-ekstraksjon

Etter behandling ble alle prøver tilsatt 0,25g syrevaskete glasskuler (≤106μm; Sigma-Aldrich, Tyskland). Avføringsprøver som kun var etanolbehandlet ble fryst ved -20°C i påvente av mekanisk knusing. Alle prøver ble mekanisk knust i MagNA Lyser (Roche, Tyskland) eller FastPrep[®]-24 (MP Biomedicals, USA) i 2x20sek ved 6500rpm med avkjøling på is mellom rundene, for deretter å bli spunnet ned ved 13000rpm i 5min.

Det ble gjort forsøk med 4x20sek mekanisk knusing av etanolbehandlede sporer av *B. licheniformis* for å se om dette økte DNA-utbyttet. Ubehandlede og etanolbehandlede sporer av *C. perfringens* ble testet med både 2x20sek, 4x20sek, 6x20sek og 8x20sek med 1min avkjøling mellom hver runde for å se om DNA-utbyttet her var annerledes fra *B. licheniformis*.

DNA-ekstraksjon ble utført med Mag midi kit (LGC Genomics, Storbritannia) etter Mag midi-protokoll, hvor 50µl ferdig lysert supernatant først ble blandet med 50µl lysis-buffer og 5µl proteinase i en KingFisher-96-plate (Thermo Scientific, USA) og satt i KingFisher Flex-robot (Thermo Scientific, USA) ved 55°C i 10min for proteinasebehandling. Deretter ble etanol tilsatt, før paramagnetiske silikapartikler i saltkonsentrasjon, ble brukt til DNA-ekstraksjon i KingFisher Flex-robot med magnet, hvor DNAet ble vasket først i én buffer og deretter to ganger i en annen buffer. Til slutt ble saltet fjernet med en elueringsbuffer, slik at DNAet løsnet fra silikapartiklene, og 50µl supernatant med isolert DNA ble tatt ut. For avføringsprøver ble 1:1:1-blanding av *E. coli*, *E. faecalis* og *B. animalis lactis* brukt som positiv kontroll, mens 1% NaCl ble brukt som negativ kontroll.

2.6 Evaluering av DNA-mengden i prøvene

2.6.1 Kvalitativ polymerasekjedereaksjon

Hver reaksjon inneholdt 1x HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load (Solis Biodyne, Estland), 0,2µM Mangala F-1 forwardprimer (CoverAll; Genetic Analysis), 0,2µM 16S UR reversprimer (CoverAll; Genetic Analysis), 2µl DNA-templat og sterilt nukleasefritt H₂O (VWR, USA) til et sluttvolum på 25µl. Se Vedlegg B for primersekvenser.

DNA-amplifisering ble utført i en 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) med initial denaturering ved 95°C i 15 minutter, før 20 gjentakende sykluser med denaturering 95°C i 30 sekunder, hybridisering ved 55°C i 30 sekunder og elongering ved 72°C i 1 minutt og 20 sekunder. Til slutt ble det lagt til en syklus på 72°C i 7 minutter, før prøvene ble avkjølt til 10°C.

DNAet ble undersøkt med gelelektroforese. Gelelektroforese bruker elektrisk spenning for å skille DNA-fragmenter som, på grunn av sin negative ladning, vil vandre mot den positive polen i et elektrisk felt. DNA-fragmenter av ulik størrelse skilles med hensyn til DNA-molekylvekten, slik at korte DNA-fragmenter vandrer raskere enn lange DNA-fragmenter.

PCR-produkt ble tilsatt i brønner på 1% agarosegel tilsatt 2µl peqgreen (Peqlab, Tyskland) per 50ml agarosegel og separert ved 80 volt i 30min. Peqgreen binder seg til dobbelttrådet DNA og fluorescerer i UV-lys. Dette tilsettes for å synliggjøre DNAet på gelen. 1kb eller 100bp DNA-ladder (Solis BioDyne, Estland) ble brukt for å vise fragmentstørrelse. Gelen ble visualisert med Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR System (Bio-Rad, USA).

2.6.2 Kvantitativ polymerasekjedereaksjon (qPCR)

Hver reaksjon bestod av 1x HOT FIREPol[®] EvaGreen[®] qPCR Supermix (Solis BioDyne, Estland), 0,2µM forwardprimer, 0,2µM reversprimer, 1µl DNA-templat og sterilt nukleasefritt H₂O (VWR, USA) til et sluttvolum på 20µl. qPCR ble utført i 96-brønners LightCycler qPCR-plater (Roche, Tyskland) i LightCycler[®] 480 (Roche, Tyskland). Kvantifisering av prøver med *C. perfringens* ble utført i Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, USA). For å kontrollere at fritt EMA var fullstendig fjernet etter lyseksoneringen ble DNA fra *E. coli* tilsatt som positiv kontroll i EMA-H₂O-prøver.

Kvantifisering av prøver bestående av *B. licheniformis* og vegetative celler ble utført med både generelle primere for 16S rRNA-genet (CoverAll (Genetic Analysis) og PRK (Yu et al., 2005)) og bakteriespesifikke primere for *E. coli* (EC23S857-F/ EC23S857-R) (Chern et al., 2011), *Enterococcus* (Ent-F/Ent-R) (Collado et al., 2009), *Bifidobacterium* (clpC-F/clpC-R) (Ventura et al., 2006) og *Bacillus licheniformis* (rpoB-F/ rpoB-R) (Madslie et al., 2012). Kvantifisering av prøver med *C. perfringens* og avføringsprøver ble kun utført med PRK-primere (Yu et al., 2005). Se Vedlegg B for primersekvenser.

For CoverAll-primere, PRK-primere og primere for *Bacillus licheniformis* ble qPCR utført med initial denaturering ved 95°C i 15min, før en 40 gangers gjentakende syklus med denaturering ved 95°C i 15sek, hybridisering ved 55°C i 30sek og elongering ved 72°C i 1min og 20sek. For bakteriespesifikke primere for *E. coli*, *Enterococcus* og *Bifidobacterium* ble qPCR kjørt med initial denaturering ved 95°C og en 40 gangers gjentakende syklus med denaturering ved 95°C i 30sek og hybridisering/elongering ved 60°C i 1min og 20sek. For begge programmene ble det kjørt smeltepunktanalyse til slutt.

2.7 LIVE/DEAD[®] BacLight[™]-farging

Suspensjonene bestod av rene kulturer med sporer fra *Bacillus licheniformis*, vegetative celler fra *Escherichia coli*, vegetative celler fra *Enterococcus faecalis* eller vegetative celler fra

Bifidobacterium animalis lactis. For hver art ble halvparten av suspensjonen behandlet med likt volum 70% etanol ved 250rpm i fire timer ved romtemperatur. Deretter ble de spunnet ned i 5min ved 13000rpm og pellet ble resuspendert i 1% NaCl. Vaskesteget ble utført to ganger.

LIVE/DEAD® *BacLight*TM Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Inc.) for fluorescensmikroskop ble brukt sammen med «protokoll for bakteriesuspensjon med kit L7007 eller L7012» med 0,3 % DMSO. 250µl etanolbehandlet suspensjon og 250µl ubehandlet suspensjon fra hver bakteriekultur ble tilsatt 0,75µl LIVE/DEAD® *BacLight*TM-reagens (sluttkonsentrasjon 3µl/ml), blandet godt og satt mørkt i 15min ved romtemperatur, før undersøkelse i fluorescensmikroskop. Bilder ble tatt.

2.8 Illumina-sekvensering (MiSeq)

2.8.1 Preparering av bibliotek

Amplifisering av DNA som skulle sekvenseres ble gjort i en to-stegprosess med primere for V3-V4-regionen av 16S rRNA-genet i prokaryote organismer (PRK) (Yu et al., 2005). Først ble DNA amplifisert med PRK-primere og deretter med primere modifisert med Illumina-adaptore (Illumina, USA; Vedlegg B), for å gjøre reaksjonene mer robuste og få en jevnere amplifisering. 80 prøver (fire mor-barnpar) ble amplifisert i hver plate.

Primere med Illumina-adaptore hadde 576 mulige primerkombinasjoner (16 forwardprimere og 36 reversprimere). Det ble derfor kjørt to sekvenseringsrunder (à 400 prøver) for å sekvensere alle de 800 prøvene, og det ble brukt 16 forwardprimere og 30 reversprimere.

For amplifisering av DNA med PRK-primere (Yu et al., 2005) bestod hver reaksjon av 1x Hot FirePol® Blend Master Mix Ready to Load (Solis Biodyne, Estland), 0,2µM PRK341F forwardprimer (Vedlegg B), 0,2µM PRK806R reversprimer (Vedlegg B), 1µl DNA-templat og sterilt, nukleasefritt H₂O (VWR, USA) til et sluttvolum på 25µl. Amplifiseringen ble utført med initial denaturering ved 95°C i 15min, før 25 sykluser med denaturering ved 95°C i 30sek, hybridisering ved 50°C i 30sek og elongering ved 72°C i 45sek. Til slutt ble et siste elongeringssteg ved 72°C i 7min utført, før PCR-produktet ble avkjølt til 10°C.

En automatisert opprensing av PCR-produktene ble utført med 0,1% Sera Mag Beads solution etter AMPure-protokoll med AMPure XP-kuler (Beckman-Coulter, USA) i forhold 1:1 i en Biomek® 3000 (Beckman-Coulter, USA).

AMPure XP-kuler er paramagnetiske polystyrenkuler dekket av magnetitt og brukes for å rense DNA for dNTPs, salter, primere og primerdimere. DNA-fragmenter, som er negativt ladet, danner reversible bindinger med karboksylmolekyler på kuleoverflaten (Hawkins et al., 1994) i nærvær av 20% polyetylen glykol (PEG) og 2,5M NaCl.

Med DNAet bundet til kulene, ble 120µl 80% etanol brukt til å rense DNAet når kulene var festet til en magnet. Overflødig væske, uten DNA, kunne dermed enkelt fjernes mens rørene sto i magneten. Dette ble gjentatt to ganger. Til slutt ble sterilt, nukleasefritt H₂O (VWR, USA) tilsatt, slik at karboksylbindingene ble brutt og ferdig rensset DNA kunne tas ut av AMPure-løsningen med supernatanten for videre bruk.

For indeks-PCR ble 1x FIREPol[®] Master Mix Ready to Load og sterilt nukleasefritt H₂O (VWR, USA) blandet sammen til et sluttvolum på 14µl per reaksjon og fordelt. Deretter ble det tilsatt unike primerkombinasjoner med 0,2µM sluttkonsentrasjon per primer (Illumina, USA; Vedlegg B) til hver reaksjon med Eppendorf epMotion 5070 (Eppendorf, Tyskland) og 1µl DNA-templat av rensset PCR-produkt. Sluttvolumet var på 25µl.

Fragmentene ble så amplifisert med initial denaturering ved 95°C i 5min, før 10 gjentakende sykluser med denaturering ved 95°C i 30sek, hybridisering ved 55°C i 1min og elongering ved 72°C i 45sek. Et siste elongeringssteg ved 72°C i 7min ble utført, før PCR-produktet ble avkjølt til 10°C.

DNA-konsentrasjonen av PCR-produktet ble kvantifisert med Qubit[®] dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Invitrogen) i 96-brønners plater på FLX 800 CSE (Cambrex) for å sikre lik konsentrasjon av hver prøve i sekvenseringsbiblioteket. Hver plate (totalt 10stk) inneholdt 80 prøver, positiv kontroll, negativ kontroll og fire standarder av TE med konsentrasjoner på 0ng/µl, 1ng/µl, 10ng/µl, 50ng/µl).

Konsentrasjonen til hver av de 800 prøvene ble deretter kalkulert ut ifra standardkurven med 50ng/µl som cut off-verdi etter følgende formel:

$$y = (\text{slope} \times \text{fluorescens}) - \text{intersect}$$
$$\text{Volum per prøve} = \frac{50\text{ng}/\mu\text{l}}{y}$$

Alle prøvene som skulle sekvenseres sammen (henholdsvis plate 1-5 og plate 6-10) ble så normalisert og samlet til et bibliotek i Biomek[®] 3000-robot (Beckman Coulter). Det ble brukt et maksvolum på 10µl og et minimumsvolum på 1µl per prøve.

Det samlede biblioteket ble så rensset med 0,1% Sera Mag Speed Beads-løsning etter Ampure-protokoll med 0,8X μ l AMPure XP-kuler (Beckman-Coulter, USA). Her ble biblioteket rensset to ganger i 80% etanol på samme måte som tidligere beskrevet og 35 μ l ferdig rensset produkt ble til slutt overført til nytt eppendorfrør og sjekket på 1% agarosegel (ca. 550-600bp). 5 μ l ble tatt ut for kvantifisering med dråpebasert digital polymerasekjedereaksjon (ddPCR), mens det resterende ble fryst ved -20°C for bruk i sekvenseringen.

2.8.2 Dråpebasert digital PCR

Av 5 μ l ferdig rensset og samlet prøvebibliotek ble det laget en fortynningsrekke fra 10^{-2} - 10^{-9} fortynninger. Hver reaksjon bestod av 1x Super mix for EvaGreen (Bio-Rad, USA), 0,2 μ M IlluminaColoniF forwardprimer (Illumina; Vedlegg B), 0,2 μ M IlluminaColoniR reversprimer (Illumina; Vedlegg B), 2 μ l DNA-templat og sterilt, nukleasefritt H₂O (VWR, USA) til et sluttvolum på 22 μ l. PCR-produkt fra fortynningsrekken 10^{-3} - 10^{-9} ble brukt som DNA-templat. 20 μ l fra hver reaksjonsblanding og 70 μ l olje ble overført til en dråpegenereringskasset, inkludert negativ kontroll, og dråper ble generert med BIO-RAD QX200™ Droplet Generator (Bio-Rad, USA).

Dråpene ble så overført til en PCR-plate og forseglet, og PCR ble utført med initial denaturering ved 95°C i 5min, før 40 gjentakende sykluser med denaturering ved 95°C i 30sek, amplifisering ved 60°C i 30sek og elongering ved 72°C i 45sek. Det ferdigamplifiserte PCR-produktet ble deretter avkjølt til 4°C i 5min, før oppvarming til 90°C i 5min og til slutt avkjølt til 4°C. Kvantifisering og visualisering ble til slutt utført med BIO-RAD QX 200™ Droplet Reader (Bio-Rad, USA).

Konsentrasjon av de samlede bibliotekene ble så kalkulert og fortennet til 4nM i Tris pH 8,5 for å forhindre under- eller overgruppering på flow-cellen.

2.8.3 Biblioteksdenaturering

For å denaturere biblioteket ble 5 μ l 4nM samlet bibliotek blandet med 5 μ l 0,2N NaOH, vortextet og sentrifugert ved 280xg ved 20°C i 1min, før inkubering ved romtemperatur i 5min for denaturering av DNAet. HT1 hybridiseringsbuffer ble deretter tilsatt for å fortynne biblioteket til en konsentrasjon på 20pM denaturert bibliotek i 1mM NaOH. Dette ble holdt på is inntil videre preparering.

Det denaturerte biblioteket ble videre fortennet med HT1 til en sluttkonsentrasjon på 8pM, dette ble invertert og pulssentrifugert.

PhiX-biblioteket ble blandet med Tris pH 8,5 til en sluttkonsentrasjon på 4nM. 4nM PhiX-

bibliotek ble så blandet med 0,2N NaOH til en sluttkonsentrasjon på 2nM, vortexet og inkubert ved romtemperatur i 5min for denaturering. HT1 hybridiseringsbuffer ble så tilsatt til PhiX-biblioteket til en sluttkonsentrasjon på 20pM, før fortynning til 8pM. Det denaturerte PhiX-biblioteket ble holdt på is inntil videre preparering.

Prøvebibliotek ble blandet med 15% PhiX-bibliotek til et sluttvolum på 600µl for å øke heterogeniteten og inkubert ved 96°C i 2min for denaturering. Det kombinerte biblioteket ble så invertert og satt i isvannbad i 5min, før det umiddelbart ble tilsatt i en MiSeq v3 reagentkassetten. Reagentkassetten ble satt inn i MiSeq® (Illumina, USA) og instruksjoner i software ble fulgt.

2.9 Dataanalyse

Analyse av qPCR-resultatene ble gjort med LinRegPCR, som er basert på prosedyrer beskrevet i Ruijter et al. (2009), for prøver amplifisert med LightCycler® 480 (Roche, Tyskland), eller Bio-Rad CFX Maestro for prøver amplifisert med Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, USA). Resultatene ble videre analysert i Microsoft® Excel® for Office 365.

Antall DNA-kopier ble kvantifisert ut fra qPCR-resultatene med formelen:

$$10^{10} / PCR\text{efficiency}^{Ct}$$

Hvor det antas at det trengs 10^{10} DNA-kopier for å få fluorescenssignal (Knut Rudi, personlig meddelelse).

Analysene av Illumina-sekvenserte data ble gjort av postdoktor Ekaterina Avershina. Råsekvensene ble paret, demultipleksert og kvalitetsfiltrert, og Illumina-indekser og PRK-primere ble fjernet, før sekvensene ble samlet i operasjonelle taksonomiske enheter (OTUer) med 97% sekvenslikhet med *uparse*-algoritme i *usearch* v 8.0 (Edgar, 2013). For å finne chimera ble OTUene filtrert mot ChimeraSlayer («gold») database (Haas et al., 2011). Taksonomien ble funnet med Greengenes v13.8 database.

2.9.1 Normalisering av OTU-tabellen

For å finne ut hvilken fortynning som burde brukes for videre analyser, ble det regnet ut en gjennomsnittlig Ct-verdi for hver aldersgruppe i hver fortynning fra qPCR-resultatene. Fortynningen med størst forhold mellom kun etanolbehandlede prøver og etanol- og EMA-behandlede prøver ble brukt for videre analyser.

Alle kun etanolbehandlede prøver med Ct-verdi over 30 og alle etanol- og EMA-behandlede prøver med Ct-verdi over 35,5 ble fjernet fra datasettet. I tillegg ble alle OTUer som representerte mindre enn 1% av den totale bakteriemengden i de etanolbehandlede prøvene fjernet for å redusere ytterligere sekvenseringsforstyrrelser.

OTU-tabellen ble transformert for å kalkulere totalt antall 16S rRNA-kopier i prøvene med formelen:

$$16S \text{ rRNA kopier fra qPCR} = \frac{\text{Antall sekvenser i gitt OTU}}{\text{Totalt antall sekvenser i prøve}}$$

2.9.2 Statistikk

Av qPCR-resultatene ble det utført tosidig Student-T-test av utvalg med ulik varians i Microsoft® Excel® for Office 365 med funksjonen TTEST(matrise1;matrise2;2;3).

Standardavvik av Ct-verdiene ble kalkulert med funksjonen STDAV.S, som bruker formelen:

$$\sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

Der x er utvalgsgjennomsnittet og n er utvalgsstørrelsen.

Alle statistiske analyser av de sekvenserte prøvene ble gjort av postdoktor Ekaterina Avershina med MATLAB R2016b (MathWorks Ltd., USA). For å estimere signifikante forskjeller mellom ulike grupper ble det brukt ikke-parametrisk Kruskal-wallis-test, hvor p-verdien ble korrelert for multippel testing med Benjamini-Hochberg-korreksjon (Benjamini & Hochberg, 1995).

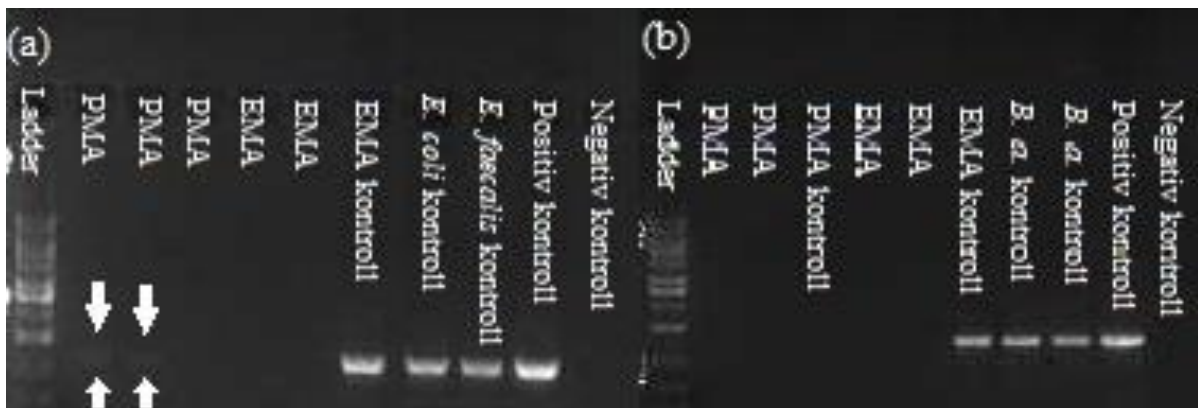
For å estimere om den økte relative mengden av OTUer i prøver fra mødre etter EMA-behandling kunne forklares av tilfeldigheter, ble prøver fra den etanolbehandlede delen av datasettet tilfeldig valgt ved å ha subsampling-dypet tilsvarende sekvenseringsdypet av den EMA-behandlede delen. Det ble så sammenlignet om antall 16S rRNA-kopier tilhørende de signifikant endrede OTUene etter EMA-behandling var forskjellige fra de simulerte.

Om det var en forskjell mellom forventet og observerte funn av OTUer mellom mor og barn-prøver ble estimert med Chi-kvadrattest. Det ble laget en gjennomsnittlig barneprofil basert på median relativ hyppighet, og «Temporal Insights into Microbial Ecology» (TIME) ble brukt for å estimere lengdevariasjoner i datasettet (Baksi et al., 2018).

3. Resultater

3.1 Optimalisering av metode for å inaktivere DNA fra vegetative celler

Det ble gjort to forsøk med blanding av DNA fra *E. coli* og *E. faecalis* behandlet med PMA hvor DNAet ikke ble inaktivert (Figur 2a). Forsøk gjort med DNA fra *B. animalis lactis* ble inaktivert og viste ikke bånd (Figur 2b). For å kontrollere at det ikke var fritt PMA/EMA igjen i prøvene etter lysaktivering, ble det lagt til en kontroll hvor H₂O behandlet med PMA eller EMA ble tilsatt *E. coli*-DNA i PCR-reaksjonen. Ingen av kontrollene med PMA viste amplifisering av *E. coli*-DNA, noe som kunne indikere at det fortsatt var fritt PMA igjen i prøvene etter lysaktivering. EMA-behandling viste ikke amplifisering av DNA fra verken blandingen med *E. coli* og *E. faecalis*, eller DNA fra *B. animalis lactis*. Positive kontroller for EMA viste amplifisering av DNA og indikerte at det ikke var mer fritt EMA i prøvene etter lysaktivering. PMA ble derfor tatt ut av eksperimentet og kun EMA ble brukt i senere forsøk.



Figur 2: Gelelektroforese av PCR-produkt av DNA fra vegetative celler amplifisert med CoverAll-primere. Størrelse er illustrert med 1kb ladder og bånd på ca. 1200bp. Vegetative celler ble behandlet med PMA eller EMA. Kontroller av vegetative celler er kun etanolbehandlet. Kontroller for PMA og EMA, i tillegg til positiv kontroll ble tilsatt *E. coli*-DNA (tidligere ekstrahert og kvantifisert) i PCR-reaksjonen. a) PCR-produkt av DNA fra *E. coli* og *E. faecalis* viste amplifisering (svake bånd indikert mellom piler) etter PMA-behandling, men ikke etter EMA-behandling. b) PCR-produkt av DNA fra *B. animalis lactis* viste ikke amplifisering etter noen av behandlingene.

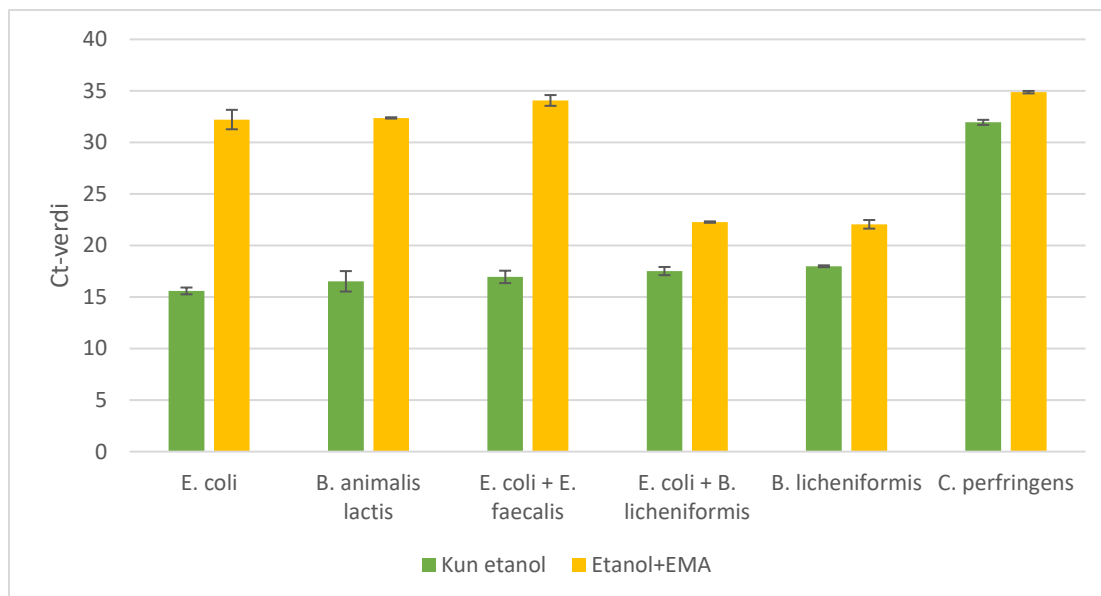
DNA fra sporene (*B. licheniformis*) ble amplifisert etter EMA-behandling (Figur 3), men viste svakere bånd enn ved kun etanolbehandling. Det ble derfor gjort en kvantifisering av de samme prøvene med qPCR med to replikater fra hver prøve. Disse resultatene viste at det var en forskjell i DNA-mengden mellom kun etanolbehandlede prøver og etanol- og EMA-behandlede prøver. DNA-mengden kvantifisert med CoverAll-primere viste at det ikke var en signifikant forskjell mellom 2x20sek og 4x20sek mekanisk knusing av etanolbehandlede sporer ($p = 0,11$), som hadde gjennomsnittlige Ct-verdier på henholdsvis $17,6 \pm 0,2$ [Ct-verdi

± standardavvik] og $17,1 \pm 0,1$. Etter etanol- og EMA-behandling med lysaktivering i 15min var de gjennomsnittlige Ct-verdiene på $22,5 \pm 0,3$ sykluser og $22,1 \pm 0,3$ sykluser for prøver mekanisk knust i henholdsvis 2x20sek og 4x20sek ($p = 0,07$). Etter 30min lysaktivering var de gjennomsnittlige Ct-verdiene på $21,4 \pm 0,2$ sykluser og $21,4 \pm 0,4$ sykluser for henholdsvis 2x20sek og 4x20sek mekanisk knusing ($p = 0,99$). Det var en signifikant forskjell mellom 15min og 30min lysaktiveringstid ($p < 0,001$ for 2x20sek mekanisk knusing og $p = 0,02$ for 4x20sek mekanisk knusing). Det ble derfor valgt å bruke 30min lysaktivering og 2x20sek mekanisk knusing videre.



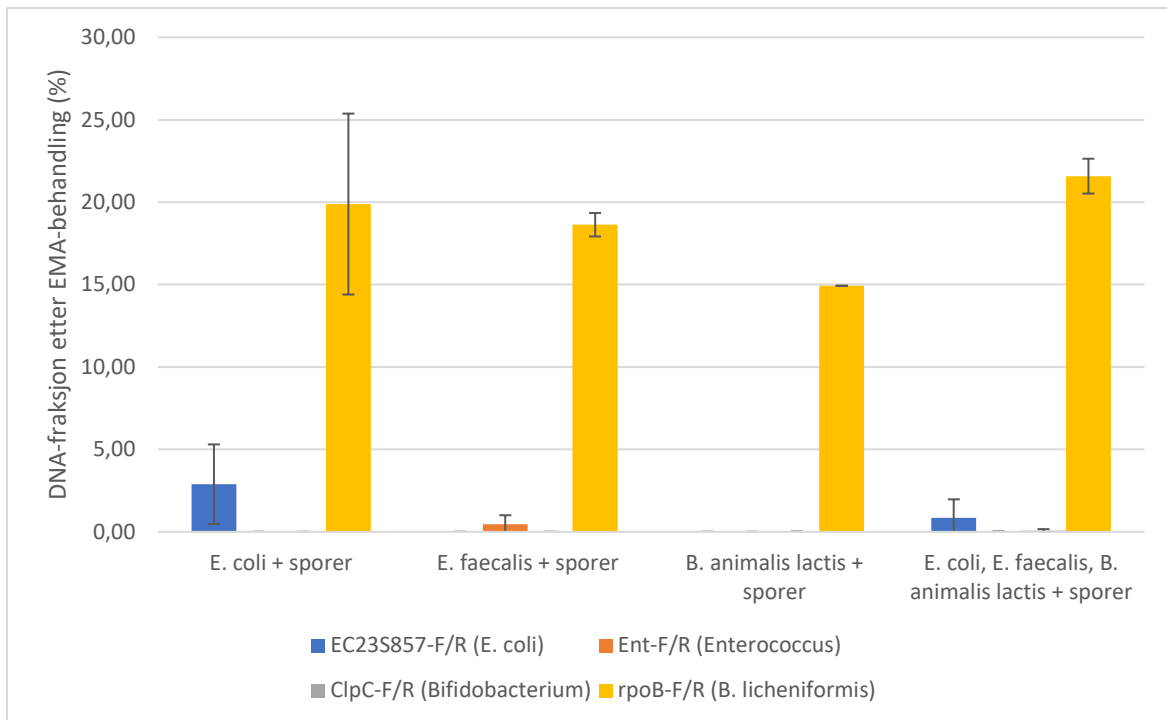
Figur 3: Gelelektroforese av PCR-produkt av spore-DNA amplifisert med CoverAll-primere. Bånd av PCR-produkt er på ca. 1200bp og vist med 1kb ladder. Sporer av *Bacillus licheniformis* NVH1289 ble etanol- og EMA-behandlet med lysaktivering i 15min eller 30min, og mekanisk knust i 2x20sek eller 4x20sek i MagNA Lyser. *B. l.* kontroll er kun etanolbehandlet. DNA fra *E. coli* er brukt som positiv kontroll og EMA-kontroll.

Det var større nedgang i amplifisert DNA etter EMA-behandling for prøver som inneholdt kun vegetative celler i forhold til prøver som i tillegg inneholdt sporer ($p = 9,62 \times 10^{-5}$) (Figur 4). For vegetative celler var det en gjennomsnittlig nedgang i antall 16S rDNA-kopier tilsvarende 16,5 Ct, mens for sporer var det en gjennomsnittlig nedgang i antall 16S rDNA-kopier tilsvarende 3,9 Ct.



Figur 4: Gjennomsnittlige Ct-verdier \pm standardavvik av to replikater for prøver kun behandlet med etanol og prøver behandlet med EMA i tillegg. *B. licheniformis* og *C. perfringens* ble tilsatt prøvene som sporer. Prøvene ble kvantifisert med PRK-primere.

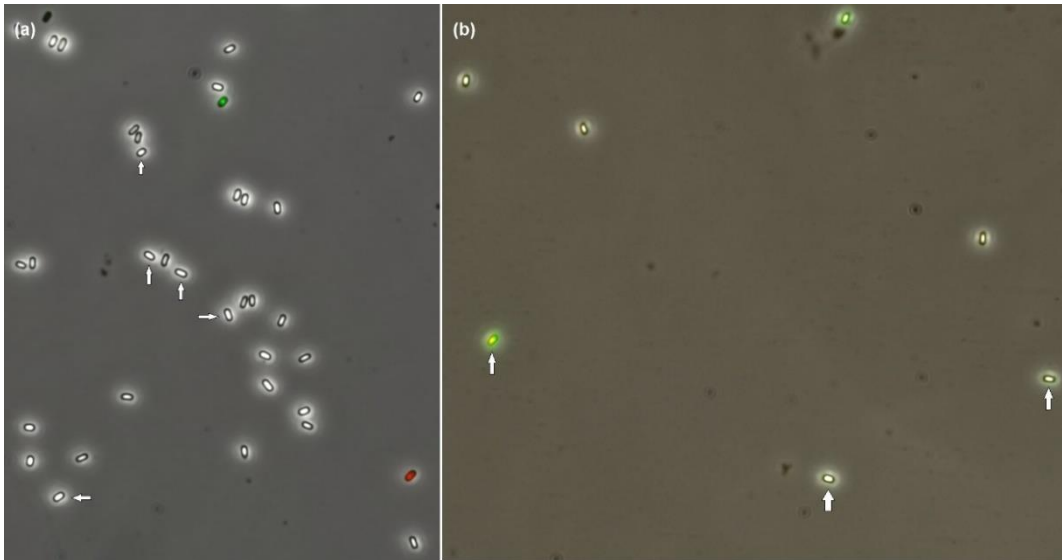
Prøvene ble kvantifisert med spesifikke primere for hver av de fire bakteriene *E. coli*, *E. faecalis*, *B. animalis lactis* og *B. licheniformis* (Figur 5). Denne testen viste også en signifikant større nedgang i andel vegetative celler i forhold til sporer ($p < 0,001$). Resultatene viste at prøver med *E. coli* og *B. licheniformis* inneholdt $19,89\% \pm$ standardavvik på $5,49$ prosentpoeng av spore-DNA og $2,89\% \pm 2,42$ prosentpoeng av *E. coli*-DNA i forhold til det som ble funnet i kun etanolbehandlete prøver. Prøver med *E. faecalis* og sporer inneholdt $18,63\% \pm 0,71$ prosentpoeng av spore-DNA og $0,47\% \pm 0,54$ prosentpoeng av *E. faecalis*-DNA i forhold til kun etanolbehandlete prøver. Prøver med *B. animalis lactis* og sporer inneholdt $14,93\% \pm 0,01$ prosentpoeng av spore-DNA og $<0,00\% \pm 0,00$ prosentpoeng av *B. animalis lactis*-DNA i forhold til kun etanolbehandlete prøver. Prøver med en blanding av *E. coli*, *E. faecalis*, *B. animalis lactis* og sporer inneholdt $21,58\% \pm 1,06$ prosentpoeng av spore-DNA, $0,84\% \pm 1,13$ prosentpoeng av *E. coli*-DNA, $0,01\% \pm 0,01$ prosentpoeng av *E. faecalis*-DNA og $0,07\% \pm 0,09$ prosentpoeng av *B. animalis lactis*-DNA i forhold til kun etanolbehandlete prøver.



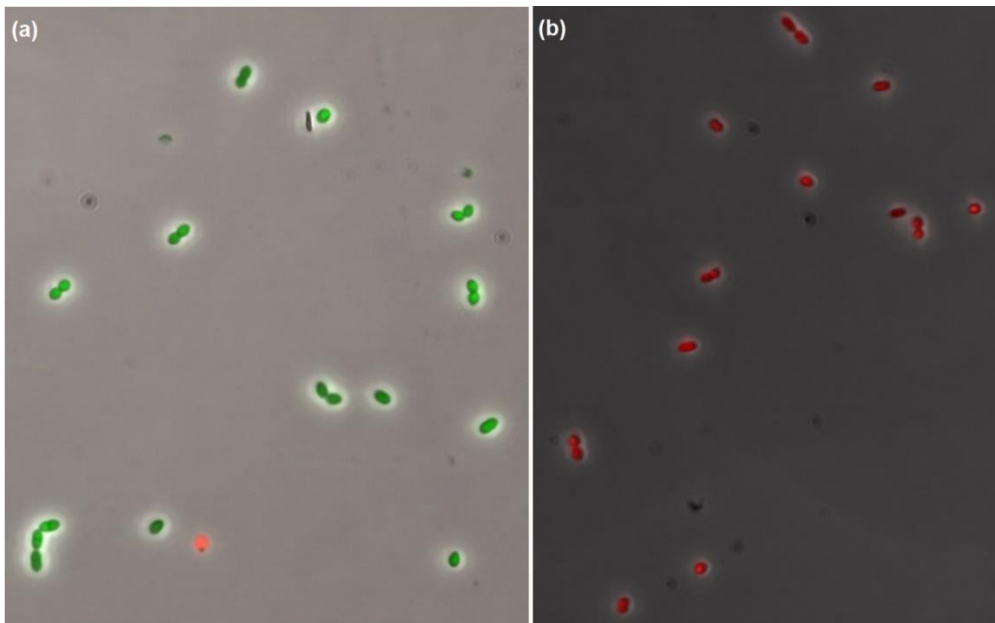
Figur 5: Antall prosent (%) DNA igjen i prøver etter både etanol- og EMA-behandling i forhold til prøver som kun var etanolbehandlet. Prøver med blanding av sporer og vegetative celler ble kvantifisert med spesifikke primere for hver bakterieart og reduksjonen i prosent (%) ble estimert ut fra antall DNA-kopier i prøvene for kun etanolbehandlete prøver og både etanol- og EMA-behandlede prøver. Sporer er av arten *Bacillus licheniformis*.

3.2 Visualisering av etanoleffekten på sporer og vegetative celler

For å undersøke om etanolbehandlingen hadde påvirkning på *Bacillus*-sporene ble suspensjoner undersøkt med LIVE/DEAD® *BacLight*™-farging i fluorescensmikroskop med og uten etanolbehandling. Sporer av *Bacillus licheniformis* NVH1289 viste liten grad av farging både før og etter etanolbehandling (Figur 6). Noen sporer var svakt grønnfarget etter etanolbehandling, men de fleste var ufarget. LIVE/DEAD® *BacLight*™-farging av vegetative celler viste grønne celler (levende) før etanolbehandling og røde celler (døde) etter etanolbehandling i fluorescensmikroskop, som illustrert med *Enterococcus faecalis* i Figur 7.



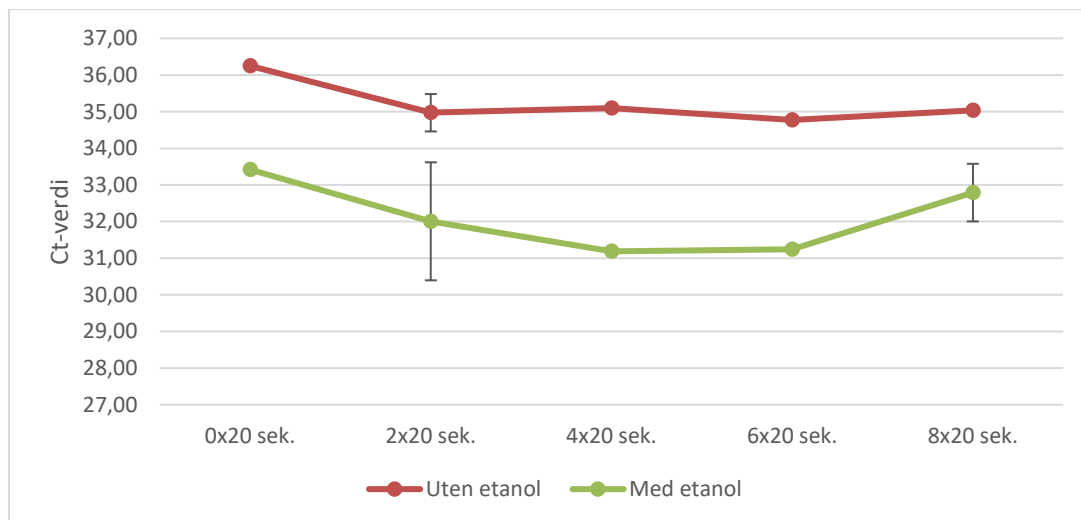
Figur 6: Sporer av *Bacillus licheniformis* NVH1289 farget med *BacLight*-kit sett i fluorescensmikroskop (a) før etanolbehandling og (b) etter etanolbehandling i fire timer. Pilene indikerer faselyse sporer. Det var noen sporer som ble svakt grønnfarget etter etanolbehandling.



Figur 7: *BacLight*-farging av *Enterococcus faecalis* i fluorescensmikroskop viste (a) levende (grønne) celler før etanolbehandling og (b) døde (røde) celler etter etanolbehandling i fire timer.

3.3 Validering av protokollen med sporer fra *Clostridium perfringens*

For å se om DNA-mengden fra sporene økte etter etanolbehandling av *Clostridium* på samme måte som for *Bacillus* ble prøver av *C. perfringens* kvantifisert med qPCR før og etter etanolbehandling og med ulikt antall runder mekanisk knusing. Figur 8 viser at DNA-mengden økte med i underkant av tre sykluser for etanolbehandlede sporer i forhold til ubehandlede sporer. Uten etanolbehandling var det ubetydelig forskjell mellom mekanisk knusing i 2x20sek og 4x20sek, etter etanolbehandling var det i gjennomsnitt 0,83 sykluser økning i DNA-mengden ved 4x20sek i forhold til 2x20sek. Økningen i DNA-mengden for etanolbehandlede prøver i forhold til prøver som ikke var etanolbehandlet var signifikant ($p = 0,0006$), men det var ikke en signifikant forskjell mellom etanolbehandlede prøver som var mekanisk knust i 2x20sek eller mer ($p = 0,48$ mellom 2x20sek og 4x20sek, $p = 0,63$ mellom 2x20sek og 6x20sek, $p = 0,65$ mellom 2x20sek og 8x20sek).

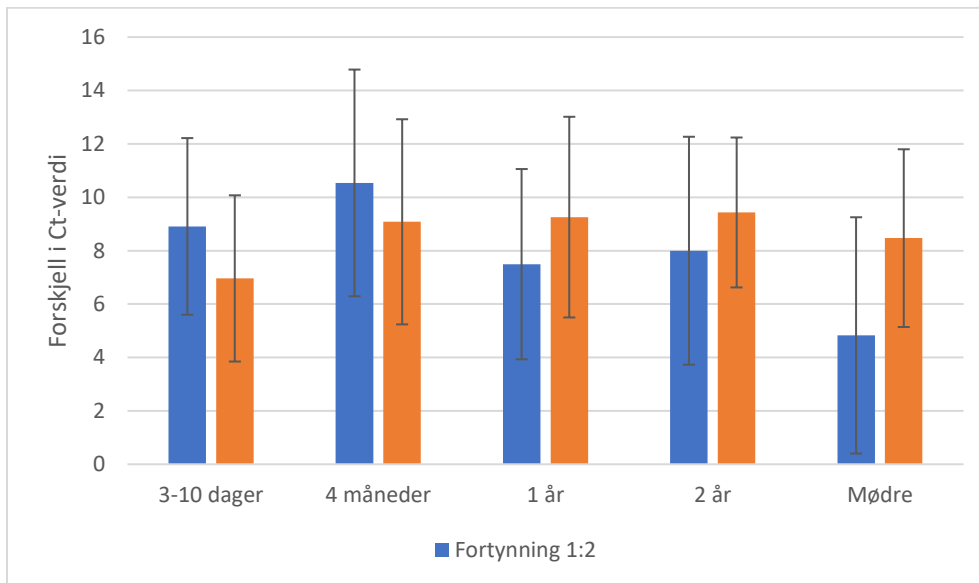


Figur 8: Gjennomsnittlige Ct-verdier \pm standardavvik fra qPCR av sporer fra *Clostridium perfringens* med eller uten etanolbehandling mekanisk knust i MagNa Lyser i nx20 sek ved 6500rpm. Det var en signifikant forskjell mellom prøver som var etanolbehandlet og prøver som ikke var etanolbehandlet, men ingen signifikant forskjell med økt mekanisk knusing for etanolbehandlede prøver.

Forsøk med sporer av *C. perfringens* viste en økning på 2,9 Ct fra prøver som kun var etanolbehandlet til prøver som var etanol- og EMA-behandlet, men de høye Ct-verdiene for sporene, som sees i Figur 8, viste at det generelt var lavt innhold av sporer i prøvene med *C. perfringens*. I samme forsøk med EMA-behandling av prøver viste *E. coli* en gjennomsnittlig økning på 9,4 Ct og *E. faecalis* en økning på 13,0 Ct etter EMA-behandling. Disse prøvene hadde en høyere DNA-andel enn sporene med Ct-verdier på $22,6 \pm 0,6$ [Ct-verdi \pm standardavvik] for *E. coli* og $21,0 \pm 0,3$ for *E. faecalis* for kun etanolbehandlede prøver.

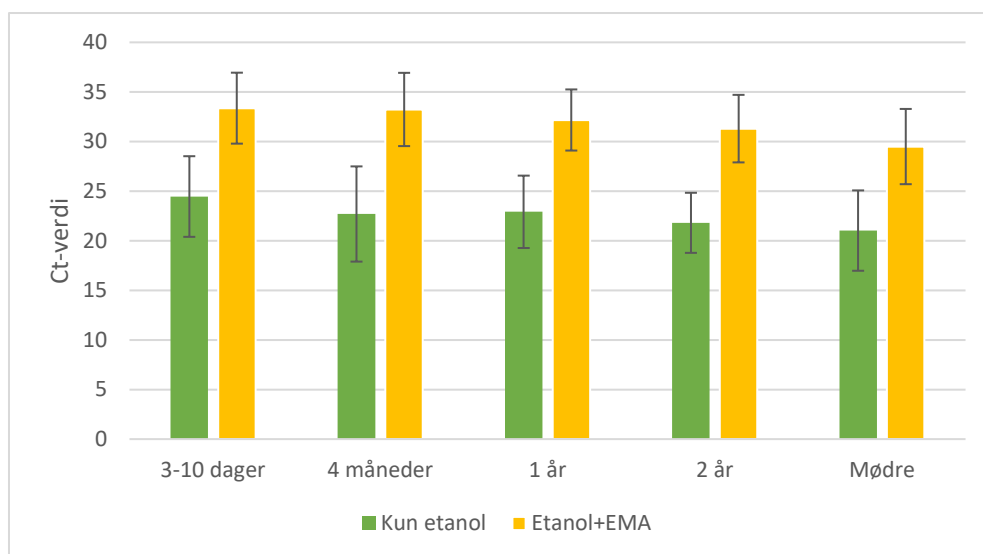
3.4 Kvantifisering av DNA i avføringsprøver

Ct-verdier fra qPCR av alle avføringsprøvene ble sammenlignet for å bestemme hvilken fortynning som skulle brukes under analysene av resultatene. Disse resultatene viste at prøvene for mødrene, i tillegg til barn 1 og 2 år, måtte fortynnes for at EMA-behandlingen skulle gi optimalt resultat (Figur 9), noe som antagelig har sammenheng med økt partikkelmengde i disse prøvene.



Figur 9: Gjennomsnittlig forskjell i Ct-verdi \pm standardavvik mellom prøver kun behandlet med etanol og prøver som i tillegg var behandlet med EMA.

Med de mest optimale fortynningene, som dermed var 1:2 fortynning for barn 3-10 dager og 4 måneder og 1:9 fortynning for barn 1 år, barn 2 år og mødrene, viste Ct-verdi \pm standardavvik for prøver med henholdsvis kun etanolbehandling og både etanol- og EMA-behandling $24,5 \pm 4,1$ sykluser og $33,4 \pm 3,6$ sykluser for barn 3-10 dager, $22,7 \pm 4,8$ sykluser og $33,2 \pm 3,7$ sykluser for barn 4 måneder, $22,9 \pm 3,6$ sykluser og $32,2 \pm 3,1$ sykluser for barn 1 år, $21,8 \pm 3,0$ sykluser og $31,3 \pm 3,4$ sykluser for barn 2 år, og $21,0 \pm 4,1$ sykluser og $29,5 \pm 3,8$ sykluser for mødrene (Figur 10).

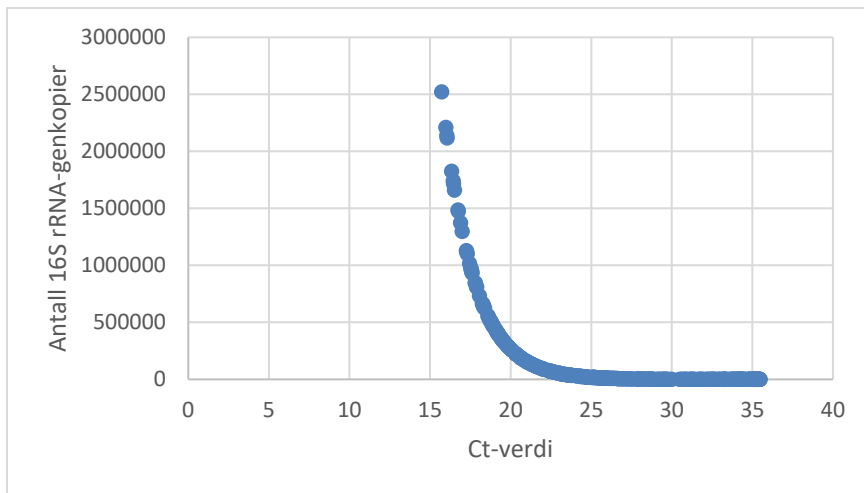


Figur 10: Gjennomsnittlig Ct-verdi \pm standardavvik for avføringsprøver kun behandlet med etanol og avføringsprøver som i tillegg var behandlet med EMA. Det ble brukt 1:2 fortyning i NaCl for barn 3-10 dager og 4 måneder, og 1:9 fortyning i NaCl ble brukt for barn 1 år, barn 2 år og mødre.

3.5 Generelt om avføringsprøvene

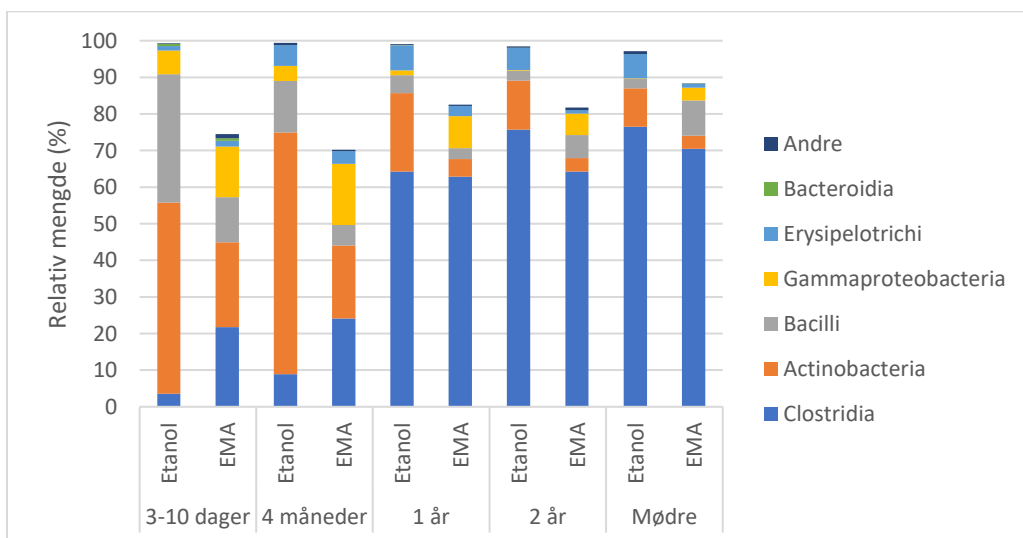
Med optimale fortyninger inneholdt datasettet i alt 4199136 parede sekvenser fordelt med 3225416 sekvenser i kun etanolbehandlete prøver og 973717 sekvenser i både etanol- og EMA-behandlede prøver. Prøver som kun var etanolbehandlet inneholdt i gjennomsnitt 16127 ± 11167 [sekvenser \pm standardavvik] og hadde en gjennomsnittlig Ct-verdi på $22,6 \pm 4,1$ sykluser. Etanol- og EMA-behandlede prøver inneholdt i gjennomsnitt 4869 ± 9562 sekvenser og hadde en gjennomsnittlig Ct-verdi på $31,9 \pm 3,8$ sykluser.

For å finne totalt antall 16S rRNA-kopier i prøvene ble OTU-tabellen transformert ved å multiplisere andelen sekvenser tilhørende en gitt OTU med det absolutt antall 16S rRNA-kopier kvantifisert med qPCR (Figur 11). OTUer som inneholdt mindre enn 1% av sekvensene funnet i kun etanolbehandlete prøver ble utelatt, og sluttdatasettet bestod dermed av 190 kun etanolbehandlete prøver med gjennomsnittlig 310150 ± 470811 16S rRNA-kopier og 180 etanol- og EMA-behandlede prøver med gjennomsnittlig 6830 ± 28112 16S rRNA-kopier fordelt på 135 OTUer og totalt 60157885 16S rRNA-kopier. Sluttdatasettet viste en reduksjon i antall 16S rRNA-kopier på 97,8% i etanol- og EMA-behandlede prøver i forhold til kun etanolbehandlete prøver.



Figur 11: Datasettet ble transformert slik at antall sekvenser funnet med Illumina-sekvenseringen korrelerte med totalt antall 16S rRNA-kopier i prøvene.

I prøvene som kun var etanolbehandlet bestod rundt 90% av det mikrobielle samfunnet av bakterier innen klassene Clostridia, Actinobacteria og Bacilli (Figur 12). Etter EMA-behandling var Actinobacteria redusert i både mor- og barnprøvene. Andelen Clostridia var signifikant anrikt i avføringsprøvene fra spedbarn ved 3-10 dager og fire måneder etter EMA-behandling (FDR < 0,001), men ikke hos mødrene eller barn 1 år og 2 år. Bacilli var signifikant anrikt i prøvene fra mødre (FDR < 0,05), men signifikant redusert i spedbarnsprøvene ved 3-10 dager og fire måneder (FDR < 0,05). Det var ingen forandring av Bacilli ved 1- og 2 års alder.



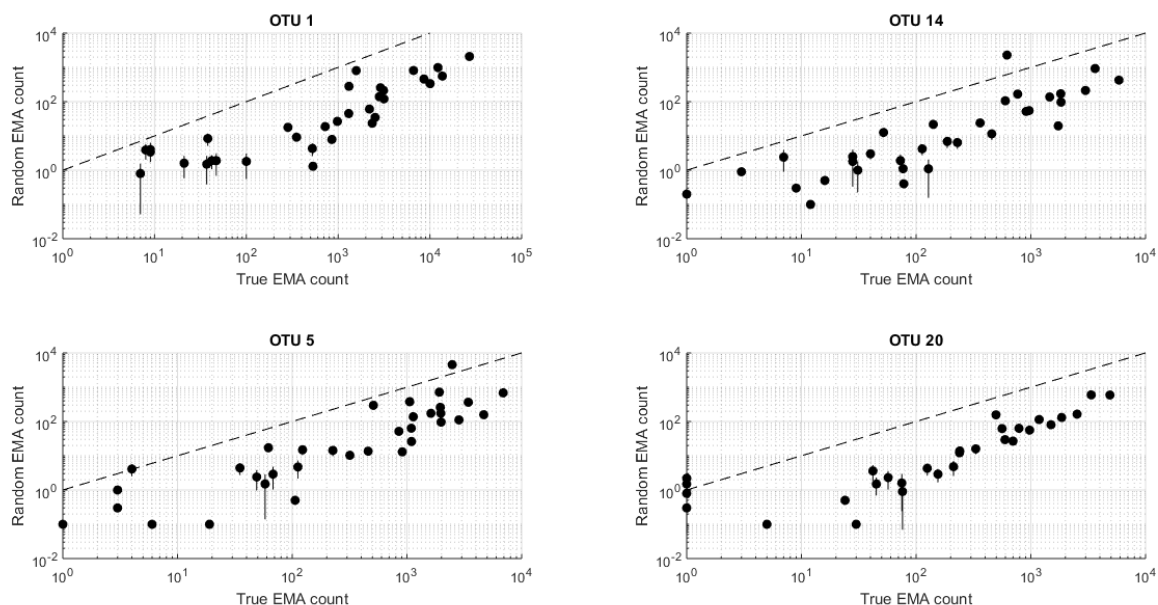
Figur 12: Oversikt over den gjennomsnittlige bakteriesammensetningen i hver aldersgruppe for kun etanolbehandlete prøver (etanol) og prøver som var etanol+EMA-behandlet (EMA). OTUene som tilsvarte under 1% av relativ mengde i den kun etanolbehandlete delen av prøvene utgjorde mye støy i etanol+EMA-andelen av prøvene og ble derfor utelatt.

3.6 OTUer med signifikant anrikning etter EMA-behandling

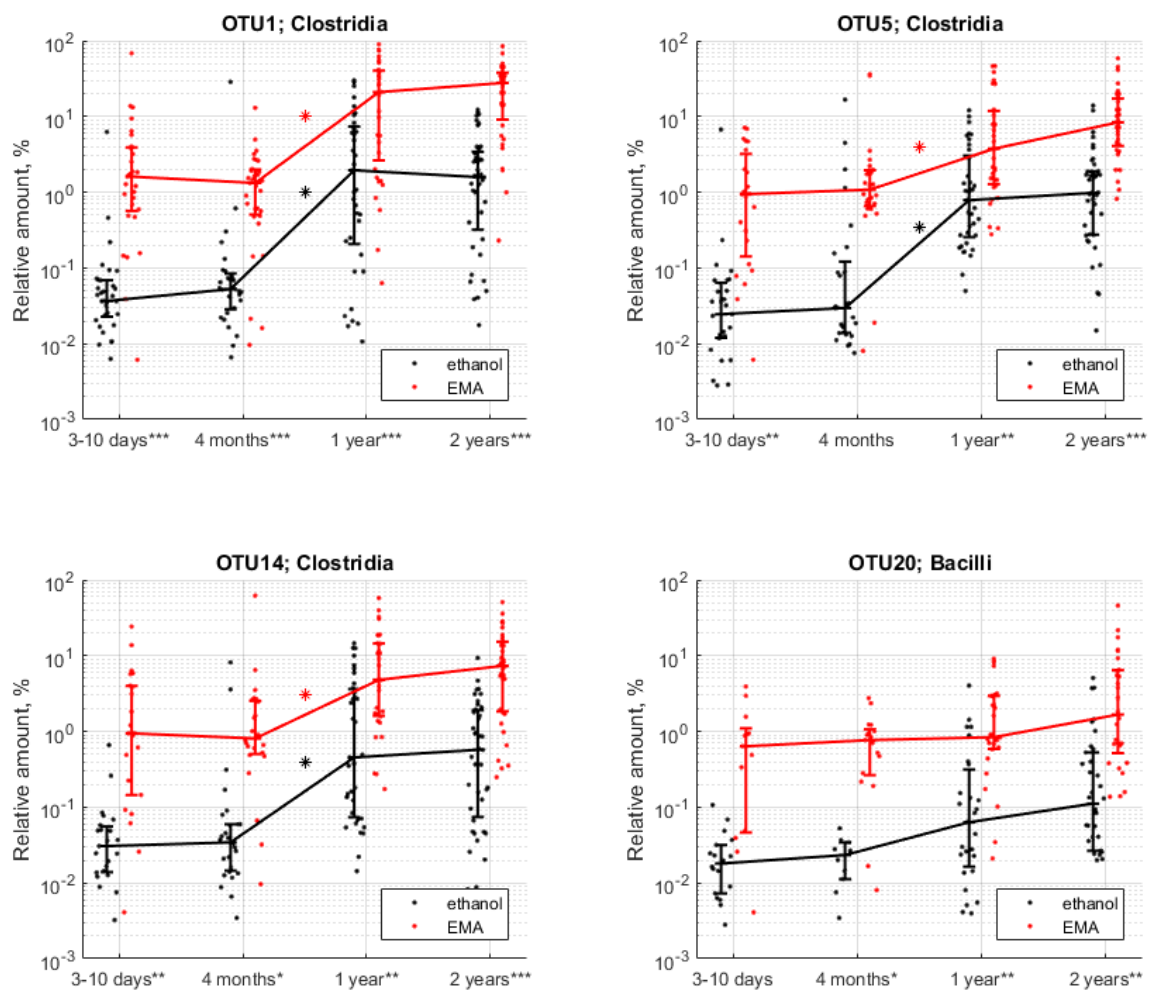
Tre OTUer tilhørende klassen Clostridia og én OTU tilhørende klassen Bacilli hadde en signifikant høyere andel 16S rRNA-kopier etter etanol- og EMA-behandling i forhold til ved kun etanolbehandling enn det som var tilfeldig forventet (FDR < 0,05). Dette var OTU1 (*Romboutsia*), OTU5 (Peptostreptococcaceae), OTU14 (*Clostridium sensu stricto*) og OTU20 (*Turicibacter*) (Figur 13).

De tre OTUene tilhørende Clostridia (OTU1, OTU5 og OTU14) hadde en signifikant økning av 16S rRNA-kopier etter etanol- og EMA-behandling i forhold til kun etanolbehandling både i prøvene fra barna (Figur 14) og i prøvene fra mødrene (Figur 15) (FDR<0,05). I tillegg hadde disse OTUene en generell økning i relativ mengde ved 1 års alder i forhold til tidligere prøvetidspunkter både i kun etanolbehandlede prøver og i etanol- og EMA-behandlede prøver. Den økte relative mengden holdt seg stabil også ved 2 års alder.

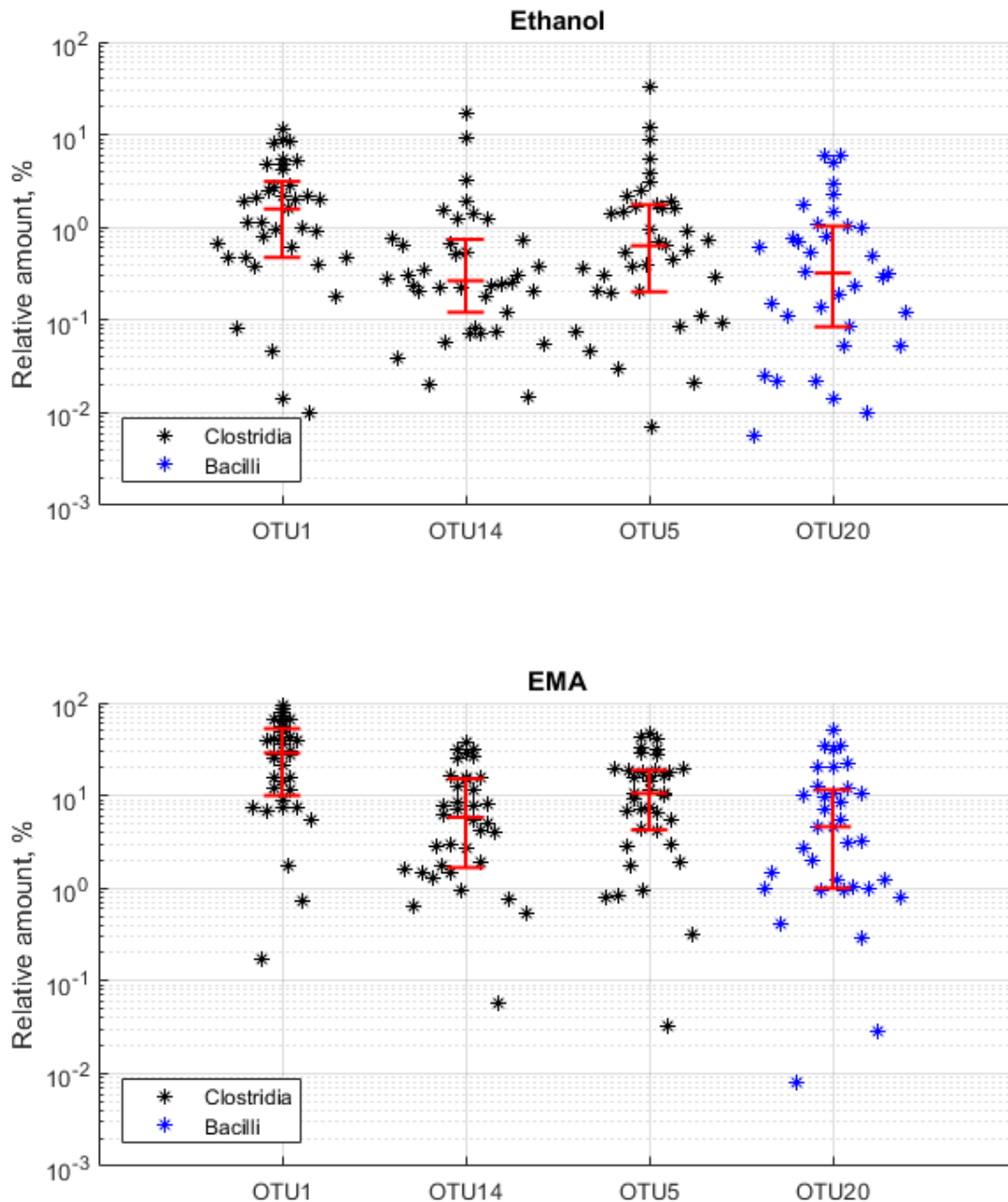
Den etanol- og EMA-behandlede andelen av OTUen fra klassen Bacilli (OTU20) var først signifikant forskjellig fra den kun etanolbehandlede delen ved fire måneders alder (Figur 14), og her holdt den relative mengden seg stabil under forsøksperioden.



Figur 13: For å se om de signifikant anrikete OTUene kunne forklares med tilfeldigheter ble det laget et simulert datasett for mødrene. OTUene hadde høyere frekvens enn det som var tilfeldig forventet.



Figur 14: OTUer med signifikant økning i relativ mengde (%) 16S rRNA-kopier etter EMA-behandling av avføringsprøver fra barn. *FDR < 0,05; **FDR < 0,01; ***FDR < 0,001.



Figur 15: OTUer med signifikant økning i relativ mengde (%) DNA-kopier etter EMA-behandling av avføringsprøver fra mødre.

Det var ingen indikasjon på overføring av EMA-anrikete OTUer fra mor til barn, da det ikke ble funnet korrelasjon mellom mødrenes etanol+EMA-andel og barnas etanol- og etanol+EMA-andeler.

4. Diskusjon

Clostridia er den mest tallrike bakterieklassen i en voksens tarmmikrobiota, men det er fortsatt ukjent hvordan og når disse bakteriene etablerer seg i tarmen. De er sporedannende, obligat anaerobe arter som ikke overlever i aerobe omgivelser og det er derfor antatt at de etablerer seg i tarmen via sporer. I denne masteroppgaven er det utviklet en protokoll for å isolere DNA fra sporer, for dermed å kunne undersøke mengden av disse bakteriene fra barn 3-10 dager og fram til 2 års alder, i tillegg til mødrene.

4.1 Effekten av EMA-behandling for anrikning av spore-DNA

Med mål om å isolere DNA kun fra sporer i denne oppgaven var det nødvendig å forhindre amplifikasjon av DNA fra de vegetative cellene. I motsetning til sporer er de fleste vegetative celler sensitive for etanol og dette er derfor et godt utgangspunkt for å drepe de vegetative cellene uten å drepe sporene. Browne et al. (2016) fant flere sporedannende bakterier etter etanolbehandling av avføringsprøver, noe som dermed ble utgangspunktet for protokollen som ble brukt i denne masteroppgaven. Etanol dreper de vegetative cellene, men skader ikke DNAet, som derfor fortsatt vil være til stede i prøvene. EMA, som trenger inn i celler med svekket membranintegritet, ble derfor brukt for å forhindre amplifikasjon av DNA i videre analyser. At EMA i noen bakteriearter kan trenge inn i levende celler (Nocker et al., 2006; Soejima et al., 2007) var ikke nødvendig å ta hensyn til i denne oppgaven, da målet var å fjerne alt DNA fra vegetative celler, som allerede var drept med etanol.

Sporer er robuste og økt tid med mekanisk knusing kan gi et signifikant større DNA-utbytte (Grzeskowiak et al., 2016). Det var derimot ikke en signifikant effekt av å øke tiden med mekanisk knusing i denne oppgaven, men mekanisk knusing i seg selv hadde effekt.

Etanolbehandlingen viste derimot en større effekt og det at DNA-mengden var tilsvarende høyere også for prøver som ikke ble mekanisk knust, kan tyde på at etanol har en påvirkning på sporene. Sporer er resistente mot etanol alene, men etanol kan ha dødelig effekt på sporene ved kombinasjon med andre behandlinger, som for eksempel varme. I *Bacillus subtilis* har denne effekten vist seg å være knyttet til endring av integriteten til innermembranen (Loison et al., 2016). Det kan derfor være at etanol har en effekt på sporene, men at denne effekten ikke er nok til å drepe sporene alene.

For kort lyseksponeeringstid under EMA-behandlingen kan føre til at fritt EMA fortsatt er til stede i prøvene etter avsluttet behandling (Wang et al., 2009). Fritt EMA kan dermed binde seg til DNA på et senere tidspunkt og føre til falske døde celler. Dette er i samsvar med resultatene i denne masteroppgaven, da økt lyseksponeeringstid av EMA-behandlede sporer ga en signifikant økning i antall DNA-kopier. Dette kan også være årsaken til at DNA fra *E. coli* tilsatt i PCR-reaksjonen til prøver hvor H₂O var behandlet med PMA ikke ble amplifisert, da økt lyseksponeeringstid ikke ble forsøkt med PMA.

Selv om flere studier har vist at EMA kan trenge inn i levende celler av ulike bakteriearter, er det lite litteratur som sier noe om effekten EMA har på sporer. Levende sporer er i utgangspunktet generelt impermeable (Comas-Riu & Vives-Rego, 2002), og det ble derfor antatt at EMA ikke kunne trenge inn i sporene. Rawsthorne et al. (2009) viste at det var mulig å skille levende sporer av *Bacillus subtilis* fra døde sporer ved bruk av PMA. Det ble også skrevet at EMA ikke fungerte til dette formålet, uten å utdype dette nærmere. EMA har blitt testet for å forhindre amplifikasjon av DNA fra døde vegetative celler av to termofile, sporedannende bakterier i meieriprodukter (Ohkubo et al., 2019) og det ble i dette studiet funnet lav nedgang i DNA fra sporer etter EMA-behandling. Det var en nedgang i antall DNA-kopier fra sporer etter EMA-behandling i forhold til ved kun etanolbehandling i denne masteroppgaven. Om denne nedgangen skyldtes allerede svekkete/døde sporer, tilstedeværelse av vegetativt DNA i sporesuspensjonen eller at EMA kan trenge inn i hvilende, levende sporer er usikkert og bør undersøkes nærmere. Effekten av EMA uten forhåndsbehandling med etanol ble ikke testet i denne oppgaven, da propidiumjodid ble brukt i mikroskopistudiet, som viste liten grad av farging. Dersom EMA har en sterkere gjennomtrengningskraft enn propidiumjodid på sporene, kan det være at PMA ville vært et bedre utgangspunkt dersom høyere konsentrasjoner og lengre lyseksponeeringstid hadde blitt testet. Reduksjonen av antall DNA-kopier etter EMA-behandling var uansett såpass mye høyere for vegetative celler i forhold til for sporer at det var mulig å skille prøver som inneholdt sporer fra prøver som kun inneholdt vegetative celler.

4.2 Karakterisering av Clostridia anriket etter EMA-behandling

Clostridia var anriket etter EMA-behandling hos barna opptil 4 måneders alder, noe som tyder på at det er sporer til stede allerede ved tidlig alder. Av de fire OTUene med signifikant økning i relativ mengde etter EMA-behandling tilhører tre OTUer klassen Clostridia og er

beskrevet som sporedannende arter. OTU1 og OTU5 tilhører familien Peptrostreptococcaceae, hvor OTU5 kun ble klassifisert på familienivå. OTU1 tilhører slekten *Romboutsia*, som består av anaerobe, sporedannende, Gram-positive eller Gram-variable bakterier (Gerritsen et al., 2014). OTU14 ble klassifisert som *Clostridium* senso stricto, beskrevet som den riktige *Clostridium*-slekten tilhørende *Clostridium* cluster I, bestående av anaerobe, Gram-positive, sporedannende arter (Lawson & Rainey, 2016). Den økte relative mengden av disse OTUene fra 1 års alder både i kun etanolbehandlede prøver og i både etanol- og EMA-behandlede prøver kan være en indikasjon på at sporene ligger latent fram til rundt 1 års alder. Det ble ikke tatt prøver mellom 4 måneder og 1 års alder og det kan derfor ikke slås fast når denne økningen i relativ mengde skjer, annet enn at det er mellom 4 måneder og 1 års alder. At det ikke ble funnet en korrelasjon av etanolresistente OTUer mellom mor og barn kan være en indikasjon på at disse bakteriene koloniserer tarmen via sporer, slik Avershina et al. (2016) antok, og at disse stammer fra omgivelsene. OTUene var tilstede allerede på et tidlig stadium, noe som tyder på at koloniseringen starter tidlig, men antagelig senere enn under fødsel. Avershina et al. (2016) fant en negativ korrelasjon mellom visse typer Clostridia og *Bifidobacterium breve*, og dersom disse Clostridia kommer inn i kroppen som sporer tidlig i livet, kan det være at de ikke germinerer og vokser fram før denne bifidobakterien reduseres.

OTU20, klassifisert som *Turicibacter* innen klassen Bacilli, har tidligere blitt klassifisert som anaerobe, Gram-positive, ikke-sporedannende bakterier (Bosshard et al., 2002), men det har senere blitt beskrevet stammer funnet i avføring som har sporuleringsgener (Auchtung et al., 2016; Cuiv et al., 2011). At det ikke er funnet sporer er ikke et sikkert bevis på at bakterien ikke kan danne sporer, da det kan være andre forhold enn de testede som må til for at bakterien skal sporulere (Galperin, 2013). Browne et al. (2016) fant en etanolresistent fenotype av *Turicibacter sanguinis* under deres studium av sporedannende tarmbakterier, noe som indikere at noen stammer av *Turicibacter* er i stand til å danne sporer og antagelig også er tilfelle for OTU20 funnet i denne masteroppgaven.

EMA-behandlede prøver er også etanolbehandlet, men her var målet å fjerne de vegetative cellene, slik at kun DNA fra etanolresistente arter ble sekvensert. I motsetning til sekvensering, hvor DNA fra døde bakterier kan ha blitt identifisert, er det ved dyrkning kun arter som har overlevd etanolbehandlingen som kan identifiseres. En utfordring med dyrkning er at mange arter ikke lett lar seg dyrke (Stewart, 2012), noe som kan føre til en underestimert av antall arter. Dyrkningsbetingelser er derfor en viktig faktor i slike studier.

34 prøver fra åtte mor-barnpar hentet fra de kun etanolbehandlede prøvene som ble fryst ned under laboratoriearbeidet i denne masteroppgaven har senere blitt dyrket og sekvensert med Sanger-sekvensering av hele 16S rRNA-genet (manuskript under bearbeidelse). De fire OTUene som ble funnet som signifikant anrikt etter EMA-behandling i denne masteroppgaven ble også funnet i de samme prøvene under dyrkningsstudiet, noe som styrker antagelsen om at 16S rRNA-kopiene i disse OTUene kommer fra sporer.

EMA forhindret amplifikasjon av DNA fra en stor andel av de vegetative cellene i denne masteroppgaven, men klarte ikke å fjerne alt. Fekalt materiale er svært komplekst og sammensatt med en stor andel partikler som kan påvirke og inhibere analytiske reaksjoner. Mørke prøver kan i tillegg forhindre at EMA kryssbinder til DNA på grunn av at lyset ikke klarer å trenge igjennom prøvene (Wagner et al., 2008). Barn på 4 måneder eller yngre har et kosthold i hovedsak basert på melk, i motsetning til barn på 1-2 år hvor ernæringen hovedsakelig baseres på fast føde. Prøvene fra barn på 1-2 år og mødrene var derfor mørkere og hadde en høyere andel partikler i denne masteroppgaven. En 1:9-fortynningsratio av prøvene fra mødrene og barn 1-2 år ga derfor bedre lysgjennomtrengningsevne og dermed lavere andel DNA etter EMA-behandling enn 1:2-fortynningsratio.

EMA-behandlede prøver hadde generelt lavt DNA-innhold, og studier har vist at det er en korrelasjon mellom lavt DNA-innhold og økt andel sekvenser som skyldes kontaminasjon (Milani et al., 2017). Det er mange steg underveis i prosessen fra EMA-behandling til ferdig sekvenserte prøver som kan gi kontaminasjon. Det ble funnet en høyere relativ mengde gammaproteobacteria i EMA-behandlede prøver og noe av årsaken til dette kan være et resultat av kontaminasjon. De negative kontrollene ble ikke sekvensert og det kan derfor ikke bekreftes om de samme sekvensene var til stede her, men *Pseudomonas*, som er en vanlig kontaminant (Salter et al., 2014) var hyppig å finne i EMA-andelen av prøvene. I tillegg er ikke EMA-behandlingen godt nok optimalisert for å fjerne alt av vegetativt DNA, og det er flere inhibitorer i fekalt materiale som kan påvirke kryssbindingen av EMA til DNA. På grunn av dette var det nødvendig med strenge kriterier for å kunne karakterisere en OTU som sporer. Selv om det fortsatt var vegetativt DNA igjen i prøvene, var det flere OTUer som hadde en høyere relativ mengde igjen etter EMA-behandling enn det som var forventet som tilfeldig. Av de største klassene var Actinobacteria sterkt redusert i forhold til Clostridia og Bacilli. I overensstemmelse med at Clostridia og Bacilli er klasser som inneholder endosporedannende arter, mens Actinobacteria ikke danner endosporer, er dette derfor forventet og ønsket effekt som korrelerer med funnene fra protokollutviklingen.

5. Konklusjon og framtidig arbeid

Resultatene her støtter antagelsen om at Clostridia etablerer seg i tarmen via sporer. De fire OTUene som ble funnet inneholdt ganske sikkert sporer, en antagelse som senere har blitt styrket ved dyrkning. Den økte mengden av de signifikante Clostridia-OTUene, OTU5 tilhørende Peptostreptococcaceae, OTU1 tilhørende *Romboutsia* og OTU14 tilhørende *Clostridium sensu stricto*, som ble funnet ved ett års alder kan være en indikasjon på at disse OTUene koloniserer tarmen som sporer tidlig i livet, men ligger latent fram til de rette betingelsene forekommer rundt ett års alder. At det ikke ble funnet korrelasjon mellom mødrene og barna deres for disse OTUene tyder på at de kommer fra omgivelsene tidlig i livet framfor å ha blitt overført fra mødrene under fødselen.

Metoden som er brukt i denne masteroppgaven gjør det mulig å isolere spore-DNA fra avføringsprøver, men det er fortsatt nødvendig med flere tester for å forbedre metoden ytterligere. Det er indikasjoner på at EMA trenger inn i en andel av sporene og årsaken til dette må undersøkes nærmere. På grunn av at metoden ikke er optimal, var det nødvendig med strenge kriterier for å kunne si at en OTU inneholdt sporer. Dersom metoden forbedres kan det derfor være mulig å karakterisere flere OTUer på denne måten.

Referanser

- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N. & Patel, H. R. H. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5 (2): 209-219. doi: Doi 10.1586/14737159.5.2.209.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G. H., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., et al. (2011). Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species. *Science*, 331 (6015): 337-341. doi: 10.1126/science.1198469.
- Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., et al. (2013). Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*, 500 (7461): 232-6. doi: 10.1038/nature12331.
- Auchtung, T. A., Holder, M. E., Gesell, J. R., Ajami, N. J., Duarte, R. T., Itoh, K., Caspi, R. R., Petrosino, J. F., Horai, R. & Zarate-Blades, C. R. (2016). Complete Genome Sequence of Turicibacter sp. Strain H121, Isolated from the Feces of a Contaminated Germ-Free Mouse. *Genome Announc*, 4 (2). doi: 10.1128/genomeA.00114-16.
- Avershina, E., Lundgard, K., Sekelja, M., Dotterud, C., Storro, O., Oien, T., Johnsen, R. & Rudi, K. (2016). Transition from infant- to adult-like gut microbiota. *Environmental Microbiology*, 18 (7): 2226-2236.
- Baker, M. (2012). Digital PCR hits its stride. *Nature Methods*, 9 (6): 541-544.
- Baksi, K. D., Kuntal, B. K. & Mande, S. S. (2018). 'TIME': A Web Application for Obtaining Insights into Microbial Ecology Using Longitudinal Microbiome Data. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Benjamini, Y. & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Statistical Methodology*, 57 (1): 289-300.
- Blount, Z. D. (2015). THE NATURAL HISTORY OF MODEL ORGANISMS The unexhausted potential of E. coli. *Elife*, 4.
- Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M. M. M., Jansen, C. L., Wertheimvandillen, P. M. E. & Vandernoordaa, J. (1990). Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic-Acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (3): 495-503.
- Bosshard, P. P., Zbinden, R. & Altwegg, M. (2002). Turicibacter sanguinis gen. nov., sp nov., a novel anaerobic, Gram-positive bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 1263-1266.
- Boulos, L., Prevost, M., Barbeau, B., Coallier, J. & Desjardins, R. (1999). LIVE/DEAD (R) BacLight (TM): application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*, 37 (1): 77-86.
- Browne, H. P., Forster, S. C., Anonye, B. O., Kumar, N., Neville, B. A., Stares, M. D., Goulding, D. & Lawley, T. D. (2016). Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. *Nature*, 533 (7604): 543-546. doi: 10.1038/nature17645.
- Brynstad, S. & Granum, P. E. (2002). Clostridium perfringens and foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology*, 74 (3): 195-202.
- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y. Q., Feng, Q., Jia, H. J., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., Xie, H. L., Zhong, H. Z., et al. (2015). Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host & Microbe*, 17 (5): 690-703.
- Chern, E. C., Siefring, S., Paar, J., Doolittle, M. & Haugland, R. A. (2011). Comparison of quantitative PCR assays for Escherichia coli targeting ribosomal RNA and single copy genes. *Letters in Applied Microbiology*, 52 (3): 298-306.
- Collado, M. C., Delgado, S., Maldonado, A. & Rodriguez, J. M. (2009). Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Lett Appl Microbiol*, 48 (5): 523-8. doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02567.x.
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H. & Farrow, J. A. (1994). The phylogeny of the genus Clostridium: proposal of five

- new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol*, 44 (4): 812-26. doi: 10.1099/00207713-44-4-812.
- 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.
- Cuiv, P. O., Klaassens, E. S., Durkin, A. S., Harkins, D. M., Foster, L., McCorrison, J., Torralba, M., Nelson, K. E. & Morrison, M. (2011). Draft Genome Sequence of *Turicibacter sanguinis* PC909, Isolated from Human Feces. *Journal of Bacteriology*, 193 (5): 1288-1289.
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N. & Knight, R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (26): 11971-11975.
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10 (10): 996-+.
- Emerson, J. B., Adams, R. I., Roman, C. M. B., Brooks, B., Coil, D. A., Dahlhausen, K., Ganz, H. H., Hartmann, E. M., Hsu, T., Justice, N. B., et al. (2017). Schrödinger's microbes: Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems. *Microbiome*, 5: 86. doi: 10.1186/s40168-017-0285-3.
- Escobar-Zepeda, A., de Leon, A. V. P. & Sanchez-Flores, A. (2015). The Road to Metagenomics: From Microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics. *Frontiers in Genetics*, 6.
- Fakhry, S., Sorrentini, I., Ricca, E., De Felice, M. & Baccigalupi, L. (2008). Characterization of spore forming Bacilli isolated from the human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 105 (6): 2178-2186.
- Finegold, S. M., Song, Y. L. & Liu, C. X. (2002). Taxonomy - General comments and update on taxonomy of clostridia and anaerobic cocci. *Anaerobe*, 8 (5): 283-285.
- Fisher, K. & Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155 (Pt 6): 1749-57. doi: 10.1099/mic.0.026385-0.
- Galperin, M. Y. (2013). Genome Diversity of Spore-Forming Firmicutes. *Microbiol Spectrum*, 1 (2). doi: 10.1128/microbiolspectrum.TBS-0015-2012.
- Garibyan, L. & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*, 133 (3): 1-4. doi: 10.1038/jid.2013.1.
- Gerritsen, J., Fuentes, S., Grievink, W., van Niftrik, L., Tindall, B. J., Timmerman, H. M., Rijkers, G. T. & Smidt, H. (2014). Characterization of *Romboutsia ilealis* gen. nov., sp nov., isolated from the gastro-intestinal tract of a rat, and proposal for the reclassification of five closely related members of the genus *Clostridium* into the genera *Romboutsia* gen. nov., *Intestinibacter* gen. nov., *Terrisporobacter* gen. nov and *Asaccharospora* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64: 1600-1616.
- Graves, D. E., Watkins, C. L. & Yielding, L. W. (1981). Ethidium-Bromide and Its Photoreactive Analogs - Spectroscopic Analysis of Deoxyribonucleic-Acid Binding-Properties. *Biochemistry*, 20 (7): 1887-1892.
- Grzeskowiak, L., Zentek, J. & Vahjen, W. (2016). Physical Pre-Treatment Improves Efficient DNA Extraction and qPCR Sensitivity from *Clostridium Difficile* Spores in Faecal Swine Specimens. *Current Microbiology*, 73 (5): 727-731.
- Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander, S. K., Sodergren, E., et al. (2011). Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Research*, 21 (3): 494-504.
- Hawkins, T. L., O'connor-Morin, T., Roy, A. & Santillan, C. (1994). DNA Purification and Isolation Using a Solid-Phase. *Nucleic Acids Research*, 22 (21): 4543-4544.
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., Bright, I. J., Lucero, M. Y., Hiddessen, A. L., Legler, T. C., et al. (2011). High-Throughput Droplet Digital

- PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Analytical Chemistry*, 83 (22): 8604-8610.
- Hong, H. A., To, E., Fakhry, S., Baccigalupi, L., Ricca, E. & Cutting, S. M. (2009). Defining the natural habitat of *Bacillus* spore-formers. *Research in Microbiology*, 160 (6): 375-379.
- Hoyles, L., Honda, H., Logan, N. A., Halket, G., La Ragione, R. M. & McCartney, A. L. (2012). Recognition of greater diversity of *Bacillus* species and related bacteria in human faeces. *Research in Microbiology*, 163 (1): 3-13.
- Illumina. (2016). *Illumina DNA sequencing*. Tilgjengelig fra: <http://www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing.html> (lest 26.11.2018).
- Ivanov, I. I. & Honda, K. (2012). Intestinal Commensal Microbes as Immune Modulators. *Cell Host & Microbe*, 12 (4): 496-508.
- Jakobsson, H. E., Abrahamsson, T. R., Jenmalm, M. C., Harris, K., Quince, C., Jernberg, C., Bjorksten, B., Engstrand, L. & Andersson, A. F. (2014). Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarean section. *Gut*, 63 (4): 559-566.
- Jungersen, M., Wind, A., Johansen, E., Christensen, J. E., Stuer-Lauridsen, B. & Eskesen, D. (2014). The Science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12((R)). *Microorganisms*, 2 (2): 92-110. doi: 10.3390/microorganisms2020092.
- Kidd, S. W. A. (2013). *The role of gerK operon in germination of Bacillus licheniformis spores*. Master Thesis: Norwegian University of Life Science.
- Koransky, J. R., Allen, S. D. & Dowell, V. R. (1978). Use of Ethanol for Selective Isolation of Sporeforming Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 35 (4): 762-765.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27 (2-3): 95-125. doi: 10.1016/j.mam.2005.12.007.
- Lawson, P. A. & Rainey, F. A. (2016). Proposal to restrict the genus *Clostridium* Prazmowski to *Clostridium butyricum* and related species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66: 1009-1016.
- Liu, C. X., Finegold, S. M., Song, Y. J. & Lawson, P. A. (2008). Reclassification of *Clostridium coccoides*, *Ruminococcus hansenii*, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, *Ruminococcus luti*, *Ruminococcus productus* and *Ruminococcus schinkii* as *Blautia coccoides* gen. nov., comb. nov., *Blautia hansenii* comb. nov., *Blautia hydrogenotrophica* comb. nov., *Blautia luti* comb. nov., *Blautia producta* comb. nov., *Blautia schinkii* comb. nov and description of *Blautia wexlerae* sp nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 1896-1902.
- Loison, P., Gervais, P., Perrier-Cornet, J. M. & Kuimova, M. K. (2016). Effect of ethanol perturbation on viscosity and permeability of an inner membrane in *Bacillus subtilis* spores. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1858 (9): 2060-2069.
- Lopetuso, L. R., Scaldaferrri, F., Petito, V. & Gasbarrini, A. (2013). Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathogens*, 5.
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K. & Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489 (7415): 220-230.
- Madslie, E. H., Olsen, J. S., Granum, P. E. & Blatny, J. M. (2012). Genotyping of *B. licheniformis* based on a novel multi-locus sequence typing (MLST) scheme. *Bmc Microbiology*, 12.
- Madslie, E. H., Granum, P. E., Blatny, J. M. & Lindback, T. (2014). L-alanine-induced germination in *Bacillus licheniformis*-the impact of native *gerA* sequences. *Bmc Microbiology*, 14.
- Masco, L., Ventura, M., Zink, R., Huys, G. & Swings, J. (2004). Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1137-1143. doi: 10.1099/ijs.0.03011-0.

- Metzker, M. L. (2010). APPLICATIONS OF NEXT-GENERATION SEQUENCING Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11 (1): 31-46.
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turroni, F., Mahony, J., Belzer, C., Palacio, S. D., Montes, S. A., Mancabelli, L., et al. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81 (4).
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1: 263-73.
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J. & Setlow, P. (2000). Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (3): 548-+.
- Nocker, A. & Camper, A. K. (2006). Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (3): 1997-2004.
- Nocker, A., Cheung, C. Y. & Camper, A. K. (2006). Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods*, 67 (2): 310-320.
- Nocker, A. & Camper, A. K. (2009). Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. *Fems Microbiology Letters*, 291 (2): 137-142.
- Nogva, H. K., Dromtorp, S. M., Nissen, H. & Rudi, K. (2003). Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques*, 34 (4): 804-+.
- Nueno-Palop, C. & Narbad, A. (2011). Probiotic assessment of Enterococcus faecalis CP58 isolated from human gut. *International Journal of Food Microbiology*, 145 (2-3): 390-394.
- Ohkubo, Y., Uchida, K., Motoshima, H. & Katano, N. (2019). Species-specific real-time PCR assay for enumeration of Anoxybacillus flavithermus and Geobacillus stearothermophilus spores in dairy products. *International Dairy Journal*, 93: 15-21.
- Oien, T., Storro, O. & Johnsen, R. (2006). Intestinal microbiota and its effect on the immune system - A nested case-cohort study on prevention of atopy among small children in Trondheim: The IMPACT study. *Contemporary Clinical Trials*, 27 (4): 389-395.
- 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.
- Perez-Munoz, M. E., Arrieta, M. C., Ramer-Tait, A. E. & Walter, J. (2017). A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*, 5.
- Rajilic-Stojanovic, M. & de Vos, W. M. (2014). The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *Fems Microbiology Reviews*, 38 (5): 996-1047.
- Ravi, A., Avershina, E., Foley, S. L., Ludvigsen, J., Storro, O., Oien, T., Johnsen, R., McCartney, A. L., L'Abée-Lund, T. M. & Rudi, K. (2015). The commensal infant gut meta-mobilome as a potential reservoir for persistent multidrug resistance integrons. *Scientific Reports*, 5.
- Rawsthorne, H., Dock, C. N. & Jaykus, L. A. (2009). PCR-Based Method Using Propidium Monoazide To Distinguish Viable from Nonviable Bacillus subtilis Spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (9): 2936-2939.
- Rodriguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N., Avershina, E., Rudi, K., Narbad, A., Jenmalm, M. C., et al. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26.
- Rudi, K., Moen, B., Dromtorp, S. M. & Holck, A. L. (2005). Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (2): 1018-1024.

- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. B. & Moorman, A. F. M. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, 37 (6).
- Salonen, A., Nikkila, J., Jalanka-Tuovinen, J., Immonen, O., Rajilic-Stojanovic, M., Kekkonen, R. A., Palva, A. & de Vos, W. M. (2010). Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: Effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *Journal of Microbiological Methods*, 81 (2): 127-134.
- Salter, S. J., Cox, M. J., Turek, E. M., Calus, S. T., Cookson, W. O., Moffatt, M. F., Turner, P., Parkhill, J., Loman, N. J. & Walker, A. W. (2014). Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *Bmc Biology*, 12.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74 (12): 5463-5467.
- Setlow, B., Atluri, S., Kitchel, R., Koziol-Dube, K. & Setlow, P. (2006). Role of dipicolinic acid in resistance and stability of spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-protective alpha/beta-type small acid-soluble proteins. *Journal of Bacteriology*, 188 (11): 3740-3747.
- Setlow, P. (2007). I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends in Microbiology*, 15 (4): 172-180.
- Soejima, T., Iida, K. I., Oin, T., Taniai, H., Seki, M., Takade, A. & Yoshida, S. I. (2007). Photoactivated ethidium monoazide directly cleaves bacterial DNA and is applied to PCR for discrimination of live and dead bacteria. *Microbiology and Immunology*, 51 (8): 763-775.
- Stackebrandt, E., Kramer, I., Swiderski, J. & Hippe, H. (1999). Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*. *Fems Immunology and Medical Microbiology*, 24 (3): 253-258.
- Stewart, E. J. (2012). Growing Unculturable Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 194 (16): 4151-4160.
- Talukdar, P. K., Olguin-Araneda, V., Alnoman, M., Paredes-Sabja, D. & Sarker, M. R. (2015). Updates on the sporulation process in *Clostridium* species. *Research in Microbiology*, 166 (4): 225-235.
- Tam, N. K. M., Uyen, N. Q., Hong, H. A., Duc, L. H., Hoa, T. T., Serra, C. R., Henriques, A. O. & Cutting, S. M. (2006). The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *Journal of Bacteriology*, 188 (7): 2692-2700.
- Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J. P., Ugarte, E., Munoz-Tamayo, R., Paslier, D. L. E., Nalin, R., et al. (2009). Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental Microbiology*, 11 (10): 2574-2584.
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B. & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8 (3): 207-217.
- Tetz, G. & Tetz, V. (2017). Introducing the sporobiota and sporobiome. *Gut Pathogens*, 9.
- Ventura, M., Canchaya, C., Del Casale, A., Dellaglio, F., Neviani, E., Fitzgerald, G. F. & van Sinderen, D. (2006). Analysis of bifidobacterial evolution using a multilocus approach. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 2783-2792.
- Wagner, A. O., Malin, C., Knapp, B. A. & Illmer, P. (2008). Removal of free extracellular DNA from environmental samples by ethidium monoazide and propidium monoazide. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (8): 2537-2539.
- Wang, L., Li, Y. & Mustapha, A. (2009). Detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 by ethidium monoazide real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 107 (5): 1719-1728.
- Woese, C. R. & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (11): 5088-90.
- Yu, Y., Lee, C., Kim, J. & Hwang, S. (2005). Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng*, 89 (6): 670-9. doi: 10.1002/bit.20347.
- Yutin, N. & Galperin, M. Y. (2013). A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environmental Microbiology*, 15 (10): 2631-2641.

Vedlegg A: Oppskrifter

Bacto-MS sporuleringsmedium

Difco™ Nutrient Broth	8g/L
ZnCl ₂	12,5μM
CuCl ₂	2,5μM
MgCl ₂	1mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	5mM
Na ₂ MoO ₄	2,5μM
CoCl ₂	2,5μM

dH₂O ble tilsatt og mediet autoklavert ved 121°C i 20 min. Avkjøl.

Etter autoklaving ble følgende filtersterilisert og tilsatt:

FeSO ₄	1μM
MnSO ₄	66μM
Ca(NO ₃) ₂	1mM

Luria-Bertani medium

Tryptone	10g
NaCl	10g
Gjærekstrakt	5g
H ₂ O	→ 950ml

pH ble regulert til 7,0 av 5N NaOH og H₂O ble tilsatt til 1l.

Protokoll for sporer av *Clostridium perfringens* (NMBU, Adamstuen)

Koloni av *Clostridium perfringens* på blodagar ble inokulert i 5ml Robertson-medium og inkubert anaerobt ved 37°C i sju dager. Kulturen ble så utsatt for varmesjokk ved 72°C i 20min, før 100µl ble overført til 10ml FTG (fluid-thioglycollate-medium) og inkubert anaerobt ved 37°C over natten.

1ml FTG-kultur ble så overført til 100ml DS-medium (med raffinose) og inkubert anaerobt ved 37°C i 16 timer. Kulturen ble undersøkt med fasekontrastmikroskop for å bestemme antall sporer.

Kulturen ble tatt ut av anaerobt kammer og holdt på is. Den ble fordelt med 25ml i hver av fire 50ml-Falconrør og sentrifugert ved 4500rpm og 4°C i 25min, før supernatant ble fjernet og pellet resuspendert i sterilt Milli-Q-vann (totalt 25ml). Sentrifugeringen ble gjentatt og supernatant fjernet, før overføring til 15ml-Falconrør. Vaskingen ble så gjentatt med 15ml Milli-Q-vann. Vaskingen ble gjentatt fire ganger og den rene sporekulturen ble lagret ved 4°C.

Vedlegg B: Primere

Primere brukt i PCR og qPCR

CoverAll-primere for bakteriers 16S rRNA-gen (Genetic Analysis):

Mangala-F1 (forward, 5'-TCCTACGGGAGGCAGCAG-3'),

16SUR (revers, 5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3').

Amplicon-størrelse: 1200bp.

Primere for prokaryotes 16S rRNA-gen (Yu et al., 2005):

PRK341F (forward, 5'-CCTACGGGRBGCASCAG-3'),

PRK806R (revers, 5'-GGACTACYVGGGTATCTAAT-3').

Amplicon-størrelse: 466bp.

Primere for *Bifidobacterium clpC* (Ventura et al., 2006):

clpC-F (forward, 5'-GAGTACCGCAAGTACATCGAG-3'),

clpC-R (revers, 5'-CATCCTCATCGTCGAACAGGAAC-3').

Amplicon-størrelse: 561bp.

Primere for *E. coli* 16S rRNA-gen (Chern et al., 2011):

EC23S857-F (forward, 5'-GGTAGAGCACTGTTTtGGCA-3'),

EC23S857-R (revers, 5'-TGTCTCCCGTGATAACtTTCTC-3').

Primere for *Enterococcus* 16S rRNA-gen (Collado et al., 2009):

Ent-F (forward, 5'-CCTTATTGTTAGTTGCCATCATT-3'),

Ent-R (revers, 5'-ACTCGTTGTACTIONTCCCATTGT-3').

Amplicon-størrelse: 144bp.

Primere for *Bacillus licheniformis* (Madslie et al., 2012)

rpoB-F (forward, 5'-AGGTCAACTAGTTCAGTATGGACG-3'),

rpoB-R (revers, 5'-AAGAACCGTAACCGGCAACTT-3').

Amplicon-størrelse: 580bp.

Primere brukt i Illumina-sekvensering (Illumina, USA):

Sekvensen for unik indeks vises i rødt.

Forward (5'-3'):

aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgetcttccgatct**agtcaa**CCTACGGGRBGCASCAG

Revers (5'-3');

caagcagaagacggcatacagat**ttgact**gtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatctGGACTACYVGGGTATCTAAT

Primere brukt i ddPCR (Illumina, USA):

IlluminaColoniF (forward, 5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCT-3'),

IlluminaColoniR (reverse, 5'-CCAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT-3').

Vedlegg C: Tabeller

Tabell C1: Bakterierarter brukt for å utvikle protokoll for isolering av DNA fra sporer.

Art	Orden	Klasse	Phylum	Gram-farging	Respirasjon
<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriales	Gammaproteobacteria	Proteobacteria	Gram-negativ	Fakultativ anaerob
<i>Enterococcus faecalis</i>	Lactobacillales	Bacilli	Firmicutes	Gram-positiv	Fakultativ anaerob
<i>Bifidobacterium animalis lactis</i>	Bifidobacteriales	Actinobacteria	Actinobacteria	Gram-positiv	Anaerob
<i>Bacillus licheniformis</i> NVH1289	Bacillales	Bacilli	Firmicutes	Gram-positiv	Fakultativ anaerob
<i>Clostridium perfringens</i>	Clostridiales	Clostridia	Firmicutes	Gram-positiv	Obligat anaerob

Tabell C2: IMPACT-prøver med ID og tidligere målt relativ mengde (%) Clostridia i avføringsprøver fra mødrene.

Prøve-ID	Clostridia (%)	Prøve-ID	Clostridia (%)	Prøve-ID	Clostridia (%)
2058	21,225	2088	69,025	1485	89,475
2214	46,3	1965	69,15	1520	90
1367	49,35	924	69,4	307	90,025
303	57,8	2244	71	1392	90,3
303	59,275	1369	71,725	1454	90,35
2213	58,475	1951	73,05	2622	90,525
20077	62,075	1135	73,275	306	91,075
1642	63,2	2573	79,775	2556	92,5
1555	63,225	2256	87,125	2243	92,875
1946	64,925	2225	87,15	20074	94,65
2632	65,2	2542	87,3	2150	95,45
1659	66,85	2553	88,775	1313	ukjent
2549	66,9	1643	88,975	1944	ukjent
217	68,35	2170	89,275		



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway