

Természetes szennyezőanyag-csökkenés követésére alkalmas molekuláris biológiai technikák

Gruiz Katalin

Bevezetés	1
A 16S rRNS technikák alkalmazási területei.....	6
A PCR módszer.....	6
PCR alkalmazási területei	8
PCR módszertan.....	9
Talajminták előkészítése PCR módszerhez.....	11
A talajból kinyert DNS tisztítása.....	12
<i>In situ</i> hibridizációs módszerek.....	13
Biomarkerek vizsgálata	13
Molekuláris biológiai módszerek alkalmazásának korlátai	14
Talajmikroorganizmusok minőségi és mennyiségi vizsgálata direkt megjelenítéssel, mikroszkópos <i>in situ</i> detektálással	14
Talajmikroorganizmusok minőségi és mennyiségi meghatározása fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizációval	15
Hibridizációs próbák és festésük.....	16
A módszer korlátai	18
Hibás, pozitív eredmények.....	18
Hibás, negatív eredmények	18

Bevezetés

A molekuláris biológia és a mikrobiális ökológia egyesítése olyan új, nukleinsav vizsgálatán alapuló technikák kifejlesztéséhez vezetett, amelyekkel speciális génszekvenciák jelenlétét lehet meghatározni, illetve az adott gének expresszióját lehet követni természetes mikrobapopulációkban. Ezen módszerek különösen fontosak, pl. bioremediáció monitorálásában.

DNS és RNS vizsgálatokkal jellemezhető egy szennyezett terület mikroorganizmusközössége, struktúrája, katabolikus aktivitása, valamint meghatározható a biodegradációba bevont mikrobák degradatív enzimkapacitása.

Jellemezhetőek a szennyezőanyag hatására a mikrobapopulációban bekövetkező változások, mint pl. fajeloszlás, egyedsűrűség megváltozása. A mért adatok a szennyezetlen, kontroll területeken mért eredményekkel együtt feltétlenül szükségesek egy terület öntisztulóképességének becsléséhez és az optimális remediációs technológia tervezéséhez.

A molekuláris biológiai vizsgálatokhoz olyan hatékony eljárásokra van szükség, amelyekkel a nukleinsav a környezeti mintákból nagy tisztasággal kinyerhető, és a keresett gének szekvenciáinak megfelelő próba előállítható.

Mikroorganizmusok jelenlétének minőségi és mennyiségi meghatározására, mikrobiális aktivitás mérésére, valamint mikroorganizmus populáció diverzitásának vizsgálatára alkalmas módszereket foglalja össze az 1. Táblázat.

1. Táblázat Molekuláris biológiai technikák mikroorganizmus-populációk vizsgálatára

MÓDSZER	ALKALMAZÁS	ELŐNYÖK, HÁTRÁNYOK
SPECIÁLIS DNS SZEKVENCIA VAGY MIKROORGANIZMUS JELENLÉTÉNEK VIZSGÁLATA		
<u>PCR specifikus primerekkel</u>	4-kloro-benzoát lebontásért felelős <i>cba</i> gének detektálása (Wyndam et al., 1994).	Viszonylag gyors módszer a specifikus DNS fragment jelenlétének meghatározására. Speciális mikroorganizmusok jelenléte kimutatható. Hátránya, hogy a csupasz DNS-eket és az élettelen sejteket is méri (Power, 1998).
	<i>nahAc</i> gének detektálása üledékekben (Herrick et al., 1993).	
	<i>nahAa</i> gének perzisztenciája talajban (Romanowski et al., 1993).	
	<i>BphC</i> gén meghatározása folyami üledékből (Erb and Wagner-Dobler, 1993).	
<u>Teljes sejt <i>in situ</i> hibridizációja</u>	16S rRNS-se végzett hibridizáció alapelvei és alkalmazásai (Amman et al.).	A mikroorganizmusok direkt láthatóvá tételére alkalmas módszer. Általában 16S rRNS próbákkal végzik a hibridizációt. Taxonómiailag rokon mikrobacsoportok meghatározására alkalmas eljárás. A rendszer előzetes ismerete nélkül kivitelezhető. A próbák hibás kötődését többféle próba és festék alkalmazásával kell kontrollálni.
	<i>nahAa</i> gént tartalmazó sejtek detektálása epi-fluoreszcens mikroszkóppal (Hodson et al., 1995).	
<u>DNS:DNS hibridizáció</u>	Általános elvek és alkalmazások (Holben et al., 1988).	Hátránya, hogy kereszthibridizáció fordulhat elő. Gén szakaszok előfordulása vizsgálható. Speciális mikroorganizmusok jelenléte kimutatható. Viszonylag gyorsan és könnyen kivitelezhető módszer. A detektálás alsó határa viszont magas. Izolált DNS vagy baktériumtelep vizsgálható ezzel a technikával.
	Bakteriális nehézfém-rezisztenciáért felelős gének detektálása talajban (Diels and Mergeay, 1990).	
	4-kloro-benzoát lebontásért felelős <i>cba</i> gének detektálása (Fulthorpe and Wyndam, 1989).	
	2,4-D katabolikus gének vizsgálata (Holben et al., 1992).	
	4-kloro-bifenil degradációjáért felelős gének kimutatása (Pettigrew and Sayler, 1986).	
<u>PCR nem specifikus primerekkel</u>	Sokgazdás plazmidok vizsgálata (Gotz et al., 1996).	Közel azonos DNS target szekvenciát tartalmazó rokon mikroorganizmusok csoportját lehet meghatározni. A módszerrel kimutathatóak a taxonómiai elhelyezkedésükben vagy enzimmészletükben hasonlító mikroorganizmusok.

MIKROORGANIZMUSOK MENNYISÉGI MEGHATÁROZÁSA

<u>MPN-PCR és kompetitív PCR módszere specifikus primerekkel</u>	A kompetitív PCR általános alapelvei (Diviacco et al., 1992; Siebert and Larrick, 1992).	A mintában levő target DNS-ek számának meghatározása. A target DNS-ek mennyiségéből következtetni lehet a mikroorganizmus populáció méretére. Az eltérő amplifikációs hatékonyság és a különböző targetek miatt szemi-quantitatív eljárás. A mennyiségi meghatározáshoz ismerni kell a targetszekvenciák kópiaszámát a sejten belül (Farrelly et al., 1995).
	Kompetitív PCR alkalmazása nem tenyészhető talajbaktériumok esetén (Lee et al., 1996).	
	MPN-PCR módszere (Sykes et al., 1992).	
<u>In situ hibridizáció</u>	Mennyiségi meghatározás flow-citometriával (Wallner et al., 1996). Felszín alatti anoxikus toluol degradáló mikroorganizmusok meghatározása (Hess et al., 1997).	A mikroszkópos detektáláshoz megfelelő méretű populációra van szükség. Munkaigényes módszer, de automatizálással (képanalízissel) megkönnyíthető az értékelés.
<u>Detektálás antitestekkel</u>	Általános alapelvek és alkalmazások (Schmidt, 1973; McDermott, 1997). Nitrobacter populáció detektálása és mennyiségi meghatározása (Degrange and Bardin, 1995).	Speciális, élő mikroorganizmusokat detektál mikroszkóppal. A módszer sikerét nagyban befolyásolja az antitestek minősége. Az értékelés munkaigényes és nehézkes, de flow-citometriás eljárással megkönnyíthető.
<u>DNS:DNS hibridizáció</u>	A bakteriális higany-rezisztenciáért felelős gének mennyiségi meghatározása (Brakay et al., 1989).	A DNS targetszekvenciák mennyiségi meghatározása (Holben et al., 1988).

DIVERZITÁS VIZSGÁLATA

<u>Direkt eljárással extrahált DNS-ből vagy izolált mikrobákból specifikus primerekkel végzett PCR-t követő RFLP, DGGE, klónozás és szekvenenciaanalízis</u>	Általános áttekintés (Hugenholtz and Pace, 1996; Stahl, 1997).	Egy adott mikroorganizmus-csoporton belül a rokon DNS szekvenciák jelenlétét és diverzitását lehet vizsgálni a módszerrel. Nem mennyiségi meghatározás.
	Ammónia-oxidálók vizsgálata (Stephen et al., 1996).	
	PAH-degradáló mikroorganizmusok vizsgálata (Mueller et al., 1997).	
	Szulfát-redukálók vizsgálata 16S rDNS fragmentek amplifikációja és DGGE analízise (Wawer and Muyzer, 1995).	
<u>In situ hibridizáció</u>	Természetes mikrobaközösségek genetikai diverzitásának vizsgálata (Amman et al., 1996). Nitrifikáló baktériumok meghatározása szennyvízkezelő telepen (Wagner et al., 1993).	Taxonómiai kapcsolatok csoportok jelenléte vizsgálható. Nem szükséges a vizsgált rendszer előzetes ismerete.
<u>DNS:DNS hibridizáció</u>	Olajmező mikrobaközösség összetétele (Voordouw et al., 1991).	Mikrobiális közösség összetétele, legnagyobb gyakorisággal előforduló fajok vizsgálata. Viszonylag egyszerű és gyorsan kivitelezhető technika. A próbákat a rendszer ismerete, izolált, tiszta mikrobatenyészetek alapján kell tervezni.

<u>Környezeti minták alapján, DNS szekvenálást követően genomkönyvtár készítése</u>	Oligotróf oceánvízről Crenarchaea meghatározása (De Long, 1997).	A mikroorganizmus közösségen belül előforduló mikrobafajok jelenlétének és diverzitásának vizsgálata. Detektálhatóak korábban nem tenyésztett organizmusok.
<u>Microchip, microarray</u>	Nitrifikálók vizsgálata 16SrDNS oilgonukleotid próbák alapján microchipes technikával (Guschin et al., 1997).	Mikroorganizmus közösség összetételének és a fajok előfordulásának meghatározására gyors, automatizált eljárás.
MIKROBIÁLIS AKTIVITÁS VIZSGÁLATA		
<u>RT-PCR módszer</u>	Fenol degradációért felelős <i>dmpN</i> gén vizsgálata SBR reaktorban (Selvaratnam et al., 1995).	Speciális mRNS-ek detektálása.
<u>RNS:RNS hibridizáció</u>	<i>mer-A</i> mRNS mennyiségi meghatározása vízi ökoszisztémában (Nazaret et al., 1994). <i>nahA</i> gén transzkripciója talajban (Sayler et al., 1989).	Mennyiségi meghatározás nehézkes. Speciális mRNS-ek detektálása. Könnyű mennyiségivé tenni a módszert, bár a detektálási határ viszonylag magas.
<u>In situ hibridizáció</u>	<i>P. stutzeri nir</i> génjének és Frankia fajok <i>nifH</i> génjének vizsgálata (Prin et al., 1993).	Speciális mRNS-ek mikroszkópos vizsgálata. Csak nagy mennyiségben expresszálo génekre alkalmazható.
<u>Western blott és immunológiai detektálás</u>	Nitrát-reduktáz expressziójának vizsgálata <i>Paracoccus denitrificans</i> -ban (Baumann et al., 1996). Denitrifikáló baktériumok vizsgálata talajban (Coyne et al., 1989).	Fehérjeextraktumokban speciális fehérjék detektálására alkalmas eljárás. Kizárólag nagy mennyiségben előforduló fehérjék vizsgálatára használható. Az eljárás sikere az antitestek minőségétől függ. Az esetleges kereszt-reakciókat vizsgálni kell.

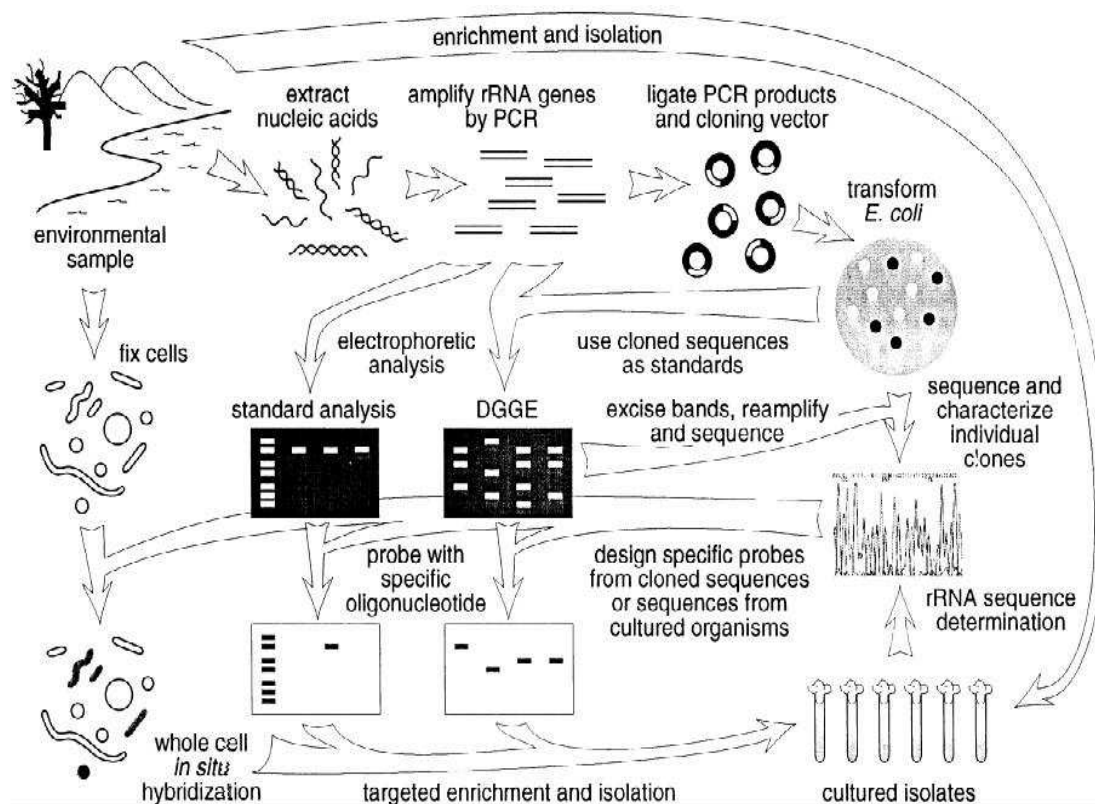
Korábban DNS:DNS **telephibridizáció** módszerét használták a környezetmérnökök, viszont ennek hátránya, hogy csak azon sejtek vizsgálhatóak, amelyek laboratóriumi körülmények között, táptalajon tenyészthetők. Ez a talaj mikrobapopulációjának nagyon kis hányada (0,01–10%), melyet okozhat részben az, hogy egyes fajok metabolikus előnyük miatt képesek túlnőni a többi lassabban szaporodó fajra, így azok nem lesznek detektálhatóak, valamint az általános táptalaj is szelektálja a mikroorganizmusokat. A környezeti mintákból izolált tenyészthető baktériumok számáról ad összefoglalást a 2. Táblázat. Ugyanakkor az actinomyeták és a gombák élőcsíraszámát a lemezöntéses módszerrel könnyű túlbecsülni, mert a talajban spóráként jelenlevő mikroorganizmusok a körülmények megváltozására válaszul telepet képeznek. A mintavétel tehát nem reprezentatív.

A Földön az élő szervezetekben felhalmozott szén mennyiségét 1000×10^{15} g-ra becsülik. Ennek mintegy felét, $350-550 \times 10^{15}$ g szenet a prokarióták (baktériumok és archeák) tartalmazzák. Amint az a táblázatból kitűnik, a teljes biomassza közel felét teszik ki azok a prokarióták, melyeket ma kizárólag a "molekuláris ökológia" módszereivel lehet vizsgálni. A talajban található prokarióták átlagos generációs idejét 900 napra becsülik, melynek fő oka valószínűleg a megszerezhető tápanyag korlátozott mennyisége. Az ilyen körülményekhez adaptálódott mikroorganizmusok túlnyomó többsége képtelen a laboratóriumi körülmények között nagy bőségben "elé dobott" tápanyag hasznosítására, azaz a számottevően gyorsabb növekedésre. Az ilyen prokarióták hagyományos módszerekkel történő vizsgálata eleve lehetetlen.

2. Táblázat Tenyészthető baktériumok aránya a különböző környezeti elemekben

Élőhely	Prokarióta biomassa	Becsült átlagos generációs idő	Laborban tenyészthető prokarióták %
Tengervíz	300×10^{15} g C	1.5 nap (autotrófok) 16 nap (heterotrófok) 300 nap (200 m alatt)	0.001-0.1
Édesvíz	2.2×10^{15} g C	-	0.25
Mezotróf tó	-	-	0.1-1
Folyótorkolat	-	-	0.1-3
Aktivált iszap	-	-	1-15
Üledékek	-	-	0.25
Talaj	26×10^{15} g C	900 nap	0.3
Mély rétegek	$22-215 \times 10^{15}$ g	Több száz év	?? (<<0.1)

A telephibridizáció kifejlesztését követte a **DNS direkt vizsgálata** környezeti mintákból, amellyel megkerülhetővé vált a mikroorganizmusok tenyésztése, és reprezentatívvá vált a mintavétel. Ezt a technikát fejlesztették tovább **PCR módszer** beépítésével, majd **mRNS, rRNS extrakciós eljárások** kifejlesztésével. Ezáltal lehetővé vált a **biológiai aktivitás in situ vizsgálata** és a teljes közösségi szerkezet pontosabb jellemzése. A mikrobiális populációk minőségi és mennyiségi vizsgálatára a fent említett módszerek mellett lehetőséget nyújt a **mikroszkópos in situ direkt detektálás**. Ezeket a technikákat szemlélteti az 1. ábra.



1. ábra Mikroorganizmusok minőségi meghatározásának módszerei környezeti mintákból

A 16S rRNS technikák során a legtöbb esetben a **kódoló DNS szakaszból** készítenek PCR terméket, és ennek a terméknek a szekvenciáját határozzák meg. A másik lehetőség reverz PCR segítségével közvetlenül a 16S rRNS-ről készíteni PCR terméket. **Az előbbi, általánosan alkalmazott esetben prokarióta genomi DNS-t (gDNS-t) kell izolálni**, míg az utóbbi esetben teljes prokarióta RNS izolálására van szükség (amit a mindenütt jelenlévő, rendkívül stabil RNáz enzimek megnehezítenek).

A 16S rRNS technikák alkalmazási területei

- Molekuláris rendszertan.
- Új izolátumok gyors meghatározása, rendszertani besorolása.
- Nem tenyésztendő baktériumok azonosítása, rendszertani helyének meghatározása.
- Molekuláris ökológia: Ismert baktériumcsoportok kimutatása a környezeti mintákban. *In situ* PCR és *in situ* hibridizációs technikákkal jól tanulmányozható a környezeti mintákban az egyes (köztük a laborban nem tenyésztendő) baktériumcsoportok aránya, elhelyezkedése, környezeti stresszekre adott válaszreakciója, a populációk arányának változása, stb.

A 16S rRNS technikákkal megszerzett információt gyakran kiegészítik egyéb génekre specifikus PCR-el. A legtöbb esetben valamely baktériumcsoportra jellemző, erősen konzervált kulcsenzim génjét használják. Ez a technika a rendszertani információ mellett arra is választ ad, hogy egy "adott életmódot folytató" baktériumcsoport jelen van-e a vizsgált mintában, s ha igen, milyen mennyiségben. A PCR termékek szekvenálásával sokszor a 16S rRNS szekvenciákhoz hasonlóan alkalmazható fejlődéstani kapcsolatok meghatározására is.

A PCR módszer

Szelektív módszer, előnye a hagyományos technikákkal szemben, hogy speciális DNS fragment, ezáltal egy adott organizmuscsoport illetve organizmus vizsgálatát teszi lehetővé. A speciális, kiválasztott DNS szekvencia amplifikációja enzimes reakciók ismétlődésével *in vitro* körülmények között megy végbe. Minden egyes PCR ciklusban a DNS mennyisége a reakcióelegyben duplázódik, azaz 25-30 ciklus után 10^6 -szorosra a kezdeti DNS mennyiségnek. A reakció végterméke gélelektroforézissel vizsgálható.

Érzékeny módszer, néhány DNS kópia jelenléte esetén is kimutatható a keresett szekvencia. A módszer egyben univerzális is, a mikroorganizmusok bármely mintában detektálhatóak. A PCR speciális alkalmazásával meghatározható a target DNS mennyisége környezeti mintákban. Mérhető a mikroorganizmusok száma, feltéve, hogy a target DNS kópiaszáma a sejten belül ismert. Detektálhatóak a kapcsolt gének csoportjai is, ezáltal a funkcionális vagy taxonómiai szempontból rokon mikroorganizmusok. Ez utóbbi esetben a primerek a DNS konzervált régiójához kapcsolódnak a 16S rDNS ill. 23S rDNS-en belül. PCR alkalmazásával a szennyezőanyagok degradációs útvonalai is vizsgálhatóak, pl. aromás gyűrűs vegyületek dioxigenáz enzimeit kódoló gének detektálhatóak. A PCR összekapcsolható reverz transzkriptáz reakcióval, ezáltal lehetővé téve mRNS-ek ezen keresztül mikroorganizmusok aktivitásának mérését.

PCR módszerrel létrehozhatóak egyszálú v. kétszálú hibridizációs DNS próbák, amelyeket környezeti minták vizsgálatára lehet használni. Radionukleotidokkal előállított próbák hibridizációját szcintillátorral kvantitatívan lehet analizálni. Egyszálú DNS próbát egy primer

hozzáadásával lehet létrehozni, ez esetben aszimmetrikus amplifikáció játszódik le, ahol nincs szükség felfűtési szakaszra.

A PCR alkalmazása környezeti mintákban nehézségekbe ütközik, mert a DNS polimerázt kémiai és fizikailag egyaránt gátolják a talaj komponensei, mint pl. talajkolloid szemcsék, amelyek egyrészt fizikailag gátolják a DNS és primer kapcsolódását, valamint stabilizálják a primer-dimer kapcsolatot. Szervetlen és szerves anyagok egyaránt kifejthetnek kémiai gátló hatást, pl. vastartalmú vegyületek, huminsavak. Ezért a reakció kivitelezéséhez nagyon tiszta DNS-re van szükség, és a mérés kvantitatívvá tételéhez speciális módszer szükséges. Kevés minta esetén nem jól reprodukálható az eredmény. A módszer hátránya ezen felül még, hogy mivel a DNS target keverékben van jelen, ezért eltérő lehet az amplifikációs hatékonysága (Pepper and Dowd, 2002).

PCR módszerek

Normál PCR

A primer pár specifikusan köt a target DNS-hez és az általuk közrefogott szekvencia amplifikálódik. A legfontosabb lépések a következők:

1. Denaturáció: 91-95 °C
2. Primerek kapcsolódása a specifikus target szekvenciához: a primerek szekvenciájától függő hőmérsékleten
3. Szintézis, illetve láncnövekedés
4. A láncnövekedést hőmérséklet-emelkedés állítja meg
5. A hőmérséklet-ciklust 20-40-szer ismétli

Nested PCR

A nested PCR reakcióban a normál PCR reakciót egy újabb PCR reakció követi, új oligonukleotid primerekkel, amelyek specifikus target szekvenciái az első reakcióterméken belül helyezkednek el. Az első reakcióterméket tisztítás után vagy közvetlenül viszik a következő PCR reakcióba. A nested PCR egyik változata, amikor a két primerpárt különböző olvadáspontúra tervezik, a külső primerpár hosszabb, és magasabb olvadáspontú, míg a belső alacsonyabb hőfokon már elválik a target szekvenciától. Így az első 20 ciklusban, a kisebb mennyiségben adagolt külső primerpár által közrefogott szekvencia amplifikálódik, majd alacsonyabb hőfokon a belső primerek is képesek a target szekvenciához kötődni, és a belső kisebb termék képződését lehetővé tenni.

Touchdown PCR

Ezzel az eljárással a reakció specifitása és érzékenysége növelhető. A primerkapcsolódási hőmérséklet folyamatos növelésével a legspecifikusabb termék szelektálódik

Hot-Start PCR

A nem specifikus termék és a primer-dimerek keletkezésének elkerülésére alkalmas módszer. Lényege, hogy egy alapvető összetevő kivételével minden egyszerre kerül a reakcióelegybe. A hiányzó összetevő, pl. a primerek, Mg^{2+} vagy a DNS polimeráz egy 5-10 percig tartó 95 °C-os előfűtés és 80 °C-ra történő visszahűtés után kerülnek az elegybe. Kedveltebb megoldás a magasabb hőmérsékleten olvadó, a hiányzó komponenst tartalmazó viaszadalék alkalmazása, vagy anti-Taq antitestek használata, amelyek Taq-polimerázt gátló hatása a hőmérséklet emelkedésével irreverzibilis denaturációja révén megszűnik. Kifejlesztettek olyan Taq-polimerázt is, amely nem aktiválódik 80°C-ra történő felfűtés előtt.

Booster PCR

A primer-dimerek keletkezése úgy is kiküszöbölhető, hogy az első ciklusokban kis mennyiségű primert adnak a reakcióelegybe. 15 ciklus után 0,1 μM -ra egészítik ki a primer koncentrációt és további 30-40 ciklust futtatnak le.

Ez az eljárás különösen fontos abban az esetben, ha kevesebb, mint 1000 targetszekvencia van az amplifikálandó mintában.

Two-Step PCR

Magasabb olvadáspontú (min. 65°C) primerek tervezésével a primer kapcsolódása és a láncnövekedés lépése összekapcsolható, ezáltal maximális lesz a reakció specifikitása, miközben időigénye csökken.

Multiplex PCR

Különösen fontos szerepe van a multiplex PCR-nek a detektálható, de nem tenyésztendő patogén mikroorganizmusok kimutatásában. Ekkor egyszerre több specifikus primerpár van a reakcióelegyben, és minden amplifikált szekvencia ugyanazon mikrobfaj genomjának részlete. Multiplex PCR-rel egyszerre több faj is detektálható, a fajokra jellemző target szekvenciákhoz tervezett különböző primerpárokkal.

RT-PCR

RT-PCR módszer első lépéseként az egyszálú RNS-ről egy RNS-függő DNS polimeráz, egy reverz transzkriptáz enzim cDNS-t készít, majd ez a cDNS templát amplifikálódik normál PCR reakcióban. A normál PCR reakcióban a hőmérséklet emelkedésével a reverz transzkriptáz denaturálódik és a Taq polimeráz aktiválódik. Ma már olyan DNS polimerázok is kaphatóak, melyek DNS-polimeráz aktivitása mellett reverz transzkriptáz aktivitásuk is, van (pl. rTth polimeráz), és hatékonyabban megy végbe a reakció, mint a kétenzimes esetben. Az RT-PCR módszer egyik fő alkalmazási területe RNS vírusok kimutatása környezeti mintákból.

PCR alkalmazási területei

Enzimaktivitás mérése

Környezeti minták enzimaktivitása becsülhető a genomi DNS adott enzimet kódoló konzervált régiójára, vagy plazmidok szekvenciájára tervezett primerekkel. Például pJP4-es plazmidból nyert primerekkel végzett PCR-rel több különböző faj 2,4-dikloro-fenoxi-ecetsav degradatív potenciálja együttesen becsülhető.

Az éppen expresszálandó fehérjék vizsgálatára alkalmas a néhány perc élettartamú mRNS-ek RT-PCR-rel történő amplifikálása.

Mikrobiális diverzitás vizsgálata

16S rDNS amplifikációjával, majd restriktions fragmenthossz-polimorfizmus módszerével és a specifikus sávok szekvenálásával környezeti minták mikrobiális diverzitása vizsgálható. A 16S rDNS szekvenciákat a konzervált régiókra tervezett univerzális primerekkel lehet amplifikálni.

A PCR termékek tovább vizsgálhatóak denaturáló gradiens gél elektroforézissel (DGGE) illetve hőmérséklet gradiens gél elektroforézissel (TGGE), melynek során a különböző A+T illetve G+C tartalomnak megfelelően válnak el a kétszálú DNS-ek egyszálúvá.

Nested-PCR és multiplex-PCR eljárásokkal vizsgálható egy környezeti minta mikrobiális közössége.

DNS fingerprint készítése PCR-rel

Számos eljárás létezik mikroorganizmus DNS fingerprint készítésére baktériumok identifikálására, alfajok meghatározására izolált mikrobákból. Ilyen módszer, pl. az AP-PCR, amelynek egy 10 bázis hosszúságú random primerrel a mikrobiális genom több szekvenciája amplifikálódik, és standard körülmények esetén az adott mikroorganizmusra jellemző komplex DNS sávminta jelenik meg a gélen.

Gyakrabban alkalmazott eljárás a repetitív szekvenciákra tervezett (általában 20 bázis hosszúságú) primerekkel végzett amplifikáció, melynek során szintén fajra jellemző DNS ujjlenyomat látható az elektroforetikus képen. (Ilyen módszerek, pl. a REP, a repetitív intergénés palindrom szekvenciákra tervezett PCR.)

DNS mennyiségi meghatározása PCR módszerrel

Ismert mennyiségben a környezeti mintához adott kontroll templáttal és külön primerrel végzett PCR-rel a vizsgálni kívánt target szekvencia és a belső standard templát együtt amplifikálható, majd a termékek gél elektroforézissel elválaszthatóak. A sávok intenzitása denzitométerrel összehasonlítható, kalibrációs görbe alapján pedig a templát mennyiségére lehet következtetni.

Másik lehetőség DNS kvantifikálására a HPLC-vel történő meghatározás, a meghatározandó minta addícióját követően.

A Perkin-Elmer Corp. által kidolgozott TaqMan módszerrel még pontosabban meghatározható a minta DNS tartalma. Lényege, hogy egy, a két végén festékekkel ellátott próba kapcsolódik a PCR termékhez a szekvencián belül. Amikor a két jelzés közel van egymáshoz, azaz ép próbákban, az egyik festék (signal) által emittált fluoreszcens fényt a próba másik végéhez kapcsolt festék (quencher) képes elnyelni. A 3' végen módosított próbát a Taq-polimeráz nem képes meghosszabbítani. A templát amplifikációja során a próba 5' végével találkozó Taq-polimeráz bázisról bázisra lebontja a próbát, a próba két végén levő festék távol kerül egymástól, és a szignál jelzés emissziója detektálhatóvá válik. Az emisszió lineáris növekedését a kezdeti ciklusokban standard görbéhez lehet viszonyítani, és a kiindulási DNS mennyiséget lehet számolni.

Hasonló megoldás a DNS mennyiségi meghatározásában a SYBER Green fluoreszcens festék emissziójának vizsgálata. Ez a festék a kétszálú DNS-hez képes kapcsolódni, és minden ciklus végén mérve, a keletkezett termék aktuális mennyiségével arányos jelet ad. Előnye még ennek a Real-Time PCR módszernek, hogy az amplifikáció végén olvadási görbék felvételével pontosan ellenőrizhető a specifikus termék jelenléte, így könnyen optimálható az eljárás.

PCR módszertan

Primerek tervezése

Abban az esetben, ha specifikus gént szeretnénk amplifikálni, vagy egy adott mikroorganizmus faj detektálása a cél, olyan szekvenciájú primereket kell tervezni, amely specifikus a keresett DNS-re nézve és kizárólag a keresett target szekvenciához kapcsolódik. Ha egy mikroorganizmus csoport jelenlétének kimutatása a cél a DNS konzervált régiójára kell a primert tervezni.

Általános primertervezési szempont, hogy a néhány 100-1000 bázispárnyi target szekvenciát közrefogó primerek 17-30 bázis hosszúságúak, nem tartalmaznak komplementer régiót, azaz nem képeznek egymással primer-dimereket. A legtöbb primer G+C tartalma több mint 50% a magasabb olvadáspont érdekében. A nem specifikus termékek elkerülése és a primerek azonos amplifikációjának érdekében lényeges, hogy olvadáspontjuk megegyezzen. Az olvadáspont és

a target szekvenciához való kapcsolódási hőmérséklet sokféle, az irodalomból jól ismert eljárással és egyenlettel számolható (pl. DNASTar Inc., Madison, Wis. által leírt módszer).

Az amplifikáció specifitása

Alapvetően a kiválasztott primerek specifitása biztosítja a kívánt termék amplifikációját. Ezen kívül a reakció paramétereinek változtatásával, a specifitás mértéke befolyásolható. Ilyen optimalizálható paraméterek, pl. a primerkapcsolódási hőmérséklet, melynek növelésével (50-55 °C-ra) a hibás kapcsolódások száma elkerülhető. A maximális kapcsolódási hőmérséklet 10 °C-kal kevesebb a primer olvadáspontjánál. Mindazonáltal a specifitás növelésével az érzékenység csökken.

A detektálás érzékenysége

Különösen fontos a detektálás érzékenységének megadása kis kópiaszámban jelenlevő DNS vizsgálatánál. A módszer érzékenyebbé tehető az amplifikáció optimalizálásával, a ciklusok számának növelésével, illetve a target DNS mennyiségének dúsításával.

Általános PCR protokoll

A standard 100µl-es PCR reakcióelegyet (összetételét a 3. táblázat mutatja) jégen tartott 0,5 vagy 0,2 ml-es polipropilén csövekbe kell összemérni. A csövek minősége rendkívül fontos a megfelelő hőátadás szempontjából. A 3. táblázat tartalmazza a standard PCR reakcióelegy összetevőit.

3. táblázat Standard PCR reakcióelegy

Komponens	Mennyiség (µl)
H ₂ O	61,5-66,5
10x reakció puffer *	10
dNTP (1,25 mM)	16
Primer 1 (0,1 µg/µl)	1,0
Primer 2 (0,1 µg/µl)	1,0
Templát DNS	5-10
Taq (5 U/µl)	0,5
	Σ 100 µl

* A reakció puffer összetétele: 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ 0,01 % zselatin.

Általános PCR hőmérsékletprogram

1. Denaturáció: 94 °C, 1,5 min
 2. Primertapadás: 55-60 °C, 1min
 3. Lánchosszabbítás: 72 °C, 1 min
- 25 ciklust követően 7-10 percig tartja 72 °C-on majd az enzimes reakciót 4 °C-ra hűtve állítja le.

PCR adalékok

Az irodalomban sokféle adalékot leírtak, amelyek hozzájárulnak a termék mennyiségének növeléséhez. A megfelelő primer-target kapcsolat kialakításának elősegítésére dimetil-szulfoxid (1,1-5%), formamid (1,25-10%) és glicerin (15-20%) alkalmazása ajánlott. A glicerin növeli, a formamid pedig csökkenti a Taq polimeráz termostabilitását. Nem ionos

detergenssek, mint pl., Nonidet P-40, Tween 20 és Triton X-100 (0,01-0,1%) elősegíthetik a megfelelő primertapadást és stabilizálják a Taq polimerázt. Bovine serum albumin (BSA) (10-100 µg/ml) stabilizálja a polimerázt, nagy sókoncentráció esetén viszont kicsapódik a PCR pufferben. 0,01%-ban adalékolt zselatin szintén stabilizálja a polimerázt. Ammónium-szulfát hozzáadásával (10-25 mM) elősegíthető a primer-target kapcsolódás.

A PCR termékek ellenőrzése

A megfelelő szekvencia amplifikációjának bizonyítására lehetséges módszer a gél elektroforézis, melynek során a mintával együtt indított DNS létra alapján meghatározható a PCR termék mérete. A kívánt szekvencia ellenőrzése lehetséges Southern hibridizációval. Meggyőződhetünk a helyes termék keletkezéséről egy újabb, nested PCR elvégzésével is.

A PCR hátránya és korlátai

Az egyik fő problémát az okozza mikroorganizmusok kimutatásánál, hogy nem csupán az élő mikrobákat detektálja, hanem az extracelluláris DNS-eket is. A módszer három legfőbb korlátja a következő: kis mintamennyiség, PCR inhibeáló anyagok jelenléte környezeti mintákban, laboratóriumi szennyezés, amely téves reakciót eredményez.

A szennyezés elkerülése a PCR során

A legfontosabb szempont a minták, a PCR és a termékek időben és térben történő elválasztása.

1. A minta előkészítését és az amplifikált termékek további feldolgozását (gélelektroforézis, hibridizáció) a PCR reakcióelegy összeállításától és magától a reakciótól szeparált helységben kell végezni. A reakcióelegyet lamináris áramlású fülkében, steril körülmények között kell összeállítani.
2. A reakcióelegy összeállításához, külön, kizárólag erre a célra kijelölt PCR pipetta-sort kell használni.
3. Csak molekuláris biológiai célokra felhasználható ultra-tiszta vizet, valamint autoklávban sterilizált PCR puffert ajánlott használni.
4. Az összetevőket kis részekre bontva érdemes tárolni. Szétosztás előtt mindig össze kell keverni az elegyeket.
5. A munka során eldobható kesztyűk viselete nagyon fontos.
6. Az enzimet, dNTP-t, templátot, primereket tartalmazó csöveket nyitás előtt centrifugálni kell.
7. A vak, DNS-t nem tartalmazó kontrollt mindig legutoljára kell bemérni.
8. A DNS elegyhez pipetázása maradjon utoljára, és minden minta hozzáadása után közvetlenül le kell zárni a csöveket.
9. Hot start PCR sokat javíthat a reakció specifitásán.
10. Két negatív kontroll használata javasolt. Az első a minták bemérése előtt, az oldószer DNS-mentességének ellenőrzésére, a másik a bemérés végén, a keresztszennyeződések vizsgálatára.

Talajminták előkészítése PCR módszerhez

Sejtek extrakciója talajból

A talajpartikulumoktól homogenizálás után centrifugálással választja el a mikroorganizmusokat.

Felületaktív anyagok adagolásával elősegíthető a talajkolloidokhoz és humuszanyagokhoz kötődött sejtek deszorbeálása, majd oldószeres extrakcióval a sejtek kinyerése. (Oldószerként

alkalmazhatóak Na-oldatok, foszfát-pufferek, kalcium oldatok.) A sejtek kinyerési hatékonysága függ a talaj minőségétől és a mikroorganizmusok fajtájától egyaránt. Durva szemcsés talajból könnyebben kinyerhetők a sejtek. A fiatal, gyorsan növekedő mikrobák esetén nagyobb kinyerés érhető el, mint a régóta talajban lévő egyedeknél. Egyes fajok, amelyek képesek poliszacharid szekrécióra még szorosabban kötődnek a talajszemcsékhez. Differenciált centrifugálással javítható a talajpartikulumoktól való elválasztás. Mindezen problémák ellenére az extrakciós módszer sokkal reprezentatívabb mintavételt jelent, mint a hígításos, lemezöntéses eljárás. Az extrakciót és a huminsavaktól való tisztítást követően a totál biomassa lizálható 98 °C-on a termocyclerben majd a polimeráz láncreakció beindítható.

Talajbaktériumok direkt lízise

Az eljárás kihagyja a sejtek és talajszemcsék elválasztásának lépését, a mikrobacejteket közvetlenül a talajban lizálják, majd a DNS-t izolálják többszöri tisztítási lépésben teszik szennyeződésmentessé.

Leggyakrabban lizozimot illetve Na-dodecil-szulfátot (SDS) alkalmaznak lizáló ágensként. A módszer hátránya, hogy nagy kolloidtartalmú talajoknál a DNS megkötődik a kolloidok felületén. Problémát okoz, hogy a lízis nem elég hatékony és a kinyert DNS egyben eukarióta eredetű is lehet. A visszanyerési hatékonyság általában 20-30 %.

Talajminták direkt lízise

Ogram és munkatársai által kidolgozott protokollt módosítva a következő eljárás alkalmas a talajminták direkt lízisére:

1. 10 g nedves talajminta inkubálása 1mM Na-foszfát pufferben (pH 7,0) 0,25 g SDS-sel 70 °C-on 30 percig.
2. A minták homogenizálása 5 percenként vortexszel.
3. 5 g, 200-300 µm átmérőjű, valamint 5 g 1000 µm átmérőjű üvegyöngy hozzáadása és a szuszpenzió 30 perces rázatása.
4. A talaj és törmelék elválasztása a DNS-től.
5. A felülúszó jégen tartása újabb csőben 15-30 percig, az SDS kicsapására
6. Az SDS csapadék eltávolítása 10 °C-on 10 perces, 10000 rpm-en történő centrifugálással megoldható.
7. A felülúszó tartalmazza a tisztítandó DNS-t.

A baktériumok lizálására az irodalomban sok egyéb módszer található. Például hősokk alkalmazása, fagyasztó-fűtő ciklusokkal, vagy az ultrahangos feltárás módszere.

A talajból kinyert DNS tisztítása

A tisztítási eljárásra feltétlenül szükség van a PCR-t inhibeáló szennyezőanyagok, mint pl., huminsavak, fém ionok eltávolításához. Az irodalomban nagyon sokféle módszerre található pontos leírás. Gyakrabban alkalmazott tisztítási módszerek a CsCl gradiens egyensúlyi centrifugálás, a Sephadex-Chelex, vagy a hidroxipapatit oszlopon történő tisztítás, illetve a speciálisan talajból kinyert DNS további szennyeződésmentesítésére alkalmas Elutip d oszlopok (Schleicher & Schuell, Keene, N.H.) alkalmazása. Közkezdelt megoldás a sejtek *in situ* lízisének és a DNS extrakcióját is magába foglaló, rövid idő (kevesebb, mint 1 óra) alatt kivitelezhető mikrobiális közösség DNS-ének vizsgálatához a különböző standardizált kitek használata. Ilyen a kereskedelemben kapható kitek, pl. a „Fast DNA soil kit” (Bio 101 Inc., Carlsbad, Calif.) valamint a „Soil DNA extraction kit” (Mo Bio Laboratories Inc., Solana Beach, Calif.)

mRNS extrakciója talaj mikroorganizmusokból

mRNS vizsgálatával a bioremediáció során szennyezőanyag lebontásában résztvevő, indukálható enzimek jelenléte kimutatható.

mRNS kinyerése hasonló a DNS extrakcióhoz, a módszer nehézségét az mRNS-ek kis száma és gyors bomlása okozza.

A DNS extrakciós eljárásból eliminálni kell a lúgos hidrolízist és az enzimes emésztést. Helyette fenol-kloroformot és SDS-t tartalmazó elegyben melegítik a sejteket. Keverést, rázatást és centrifugálást követően kloroformos extrakciót kell végezni.

Az RNS-t ezután alkoholban kicsapják és dietil-piro-karbonátban (DEPC) visszaoldva DN-ázzal kezelik. Ismételt alkoholos kicsapás után -80°C -on DEPC-ben tárolják.

rRNS extrakciója talaj mikroorganizmusokból

A rRNS lebomlásának elkerülése érdekében a kinyerés során nagyon gondos munkát kell végezni. Golyós malomban végzett mechanikus lizálást fenolos extrakció követ, majd a kinyert nukleinsavat hexa-decil-trimetil-ammonium-bromid (CTAB) és NaCl elegyében veszik fel, hogy az együtt extrahálódott szennyeződések eltávolítsák. A CTAB-ot fenol-kloroform elegyével extrahálják, majd az RNS-t kicsapják.

Megoldható a rRNS-ek előállítására DNS izolálásával, majd a megfelelő 16S v. 23S rRNS gének amplifikálása révén.

A kinyert RNS szintén szolgálhat targetül DNS próbák számára, illetve lehet templát reverz transzkripcióban.

***In situ* hibridizációs módszerek**

Ezeknél az eljárásoknál a jelzett próba specifikusan köt az egyszálú target szekvenciához a sejten belül. Fluoreszcens *in situ* hibridizációnál a fluoreszcens festékekkel jelzett oligonukleotid köt a rRNS target szekvenciájához. Az aktív sejtekben a rRNS nagy számban van jelen, így a mikroszkópban erős jelet kapunk. Taxonómiai vizsgálatokra is alkalmas a módszer, mert a rRNS konzervált és variábilis régiójához is tervezhető általános ill. fajspecifikus próba. Különböző fluoreszcens festékekkel jelölt oligonukleotidokkal egyszerre vizsgálható egy mikrobaközösség. Jól értékelhető információ nyerhető a látható, de nem tenyésztető sejtekről. Ezzel a molekuláris biológiai módszerrel *in situ* mérhető a sejtek aktivitása, specifikus mRNS darabok detektálásával adott enzimek termelődése. Ez utóbbi eljárás korlátja, hogy kevés mRNS és csak rövid ideig van jelen a sejten belül.

Biomarkerek vizsgálata

A szennyezőanyagok biológiailag hatásos dózisa mérhető biomarkerekkel, fehérjéken, DNS-en, lipideken bekövetkező változás vizsgálatával. Mérhető reaktív szennyezőanyag, pl. aromás amin expozíciója. Vizsgálható speciális enzimek, pl. metallothionein, hősokk fehérje, antioxidáns enzim kifejeződése valamint megzavart funkciók ill. megváltozott struktúrák, mint pl. populáció összetételbeli változása, DNS mutációja, DNS repair enzimek termelése, enziminhibíció. A biomarkerek használatát genetikailag módosított organizmusokkal bővítik, amelyekben azon géneket, amelyekre a szennyezőanyag hatással van jól mérhető terméket expresszáló marker génekkel kapcsolják össze. Ilyen markerek, pl. luciferáz enzim, GFP (green fluorescence protein), β -galaktozidáz.

Biokémiai és genetikai módszerekkel jellemezhető a szennyezőanyag bontására képes mikrobapopuláció diverzitása, aktivitása és a mikroorganizmusok kölcsönhatása. Mikroorganizmusok fajeloszlása és enzimtermelése vizsgálható antitestekkel.

A szennyezőanyagok degradációját többek között befolyásolja a bontóképes mikroorganizmusok száma, a katabolikus enzimek expressziója, a jelenlevő szennyezőanyag minősége és hozzáférhetősége, valamint az alternatív szénforrások hozzáférhetősége.

Biodegradatív potenciál becslésére adott területen specifikus antitestekkel, gyors és érzékeny módszerrel detektálhatóak a mikroorganizmusok és az általuk expresszált fehérjék.

Molekuláris biológiai módszerek alkalmazásának korlátai

A kutatók által közzétett adatok adott szennyezőtípus, talaj, geográfiai viszonyok esetén érvényesek.

A genetikai adatbázisok hiánya.

Ha a keresett gén előfordulási aránya alacsony, gyenge jelet kapunk. Ekkor nagyobb talajmennyiségből kell kiindulni.

Előfordulhat, hogy nem a detektált gén által expresszált fehérje tölti be a katabolikus funkciót. Ez adódhat ismeretlen biokémiai útvonalak szerepe miatt, illetve nem eléggé specifikus próba kereszthibridizációjából. Erre a problémára megoldás lehet specifikusabb, erősebben kötődő gén-próba alkalmazása, valamint a hibridizációs eredmények megerősítése PCR módszerrel.

Korábban hibát okozott, hogy a különböző talajtípusokból különbözőképpen extrahálható a nukleinsav. Ezt a problémát megoldotta a Universal 16S rDNS próba kifejlesztése, amelynek révén lehetővé vált, hogy specifikus genotípusoknak a teljes populációhoz viszonyított százalékos arányát meghatározzuk. Ehhez természetesen tudni kell, hogy egy keresett gén milyen kópiaszámban van jelen egy sejtben, és a 16S rDNS-nek mi az előfordulási gyakorisága.

Talajmikroorganizmusok minőségi és mennyiségi vizsgálata direkt megjelenítéssel, mikroszkópos *in situ* detektálással

A mikroorganizmusok minőségi és mennyiségi meghatározását természetes környezetükben az ökoszisztéma minimális zavarásával a leghatékonyabban mikroszkópos vizsgálattal lehet végezni.

A PCR módszerhez hasonlóan a mikroszkópos vizsgálatok nagy előnye a látható, de nem tenyésztető mikroorganizmusok meghatározásának lehetősége. Hátránya lehet viszont a jelenlevő mikrobák számának túlbecslése, ugyanis speciális festési eljárás nélkül az élő és holt sejtek nem különíthetőek el. Általánosságban elmondható, hogy nehézségekbe ütközik a talaj mikroorganizmusok direkt mennyiségi meghatározása a mikrobák kis mérete, valamint a háttér zavaró hatása (homályosság, illetve epi-fluoreszcens detektálásnál a talajszemcsék által okozott autofluoreszcencia) miatt. Kis munkatávolságra és nagy nagyításra van szükség ahhoz, hogy a mikrobák társulását vizsgálni lehessen. Talajszemcsékkel aggregálódott mikroorganizmusok vizsgálatához nem elegendő fázis-kontraszt vagy interferencia mikroszkóp használata a zavaró háttér miatt.

A mikroszkópos detektálási technikákat foglalja össze a 4. táblázat.

4. táblázat Talaj mikroorganizmusok mikroszkópos vizsgálati módszerei

Módszer	Cél, előnyök, hátrányok	Festés vagy technika
Fénymikroszkópia	Általános technikák	Sokféle színezési eljárás
Sötét háttérű mikroszkópia	Baktériumok számlálása, bakteriális mozgás, növekedés vizsgálata	
Fázis-kontraszt mikroszkópia	Mikrobacsoportok morfológiai identifikálása, mikrobák növekedésének vizsgálata, mikroorganizmusok mennyiségi meghatározása	
Interferencia kontraszt mikroszkópia	Biofilm szerkezetének vizsgálata	
Fluoreszcens-mikroszkópia – mikroorganizmusok genomjának vizsgálata	Aktív mikroorganizmusok meghatározása	Fluoreszcens festékek Acridine orange 4',6'-Diamidino-2-fenilindol Tetrazolium festék Fluoreszcens diacetát
	Baktériumok identifikálása, speciális gének expressziójának kimutatása. A módszer hátránya, hogy a lassú anyagcseréjű talajbaktériumokban kevesebb RNS van, és a fluoreszcens fény intenzitása kisebb	Fluoreszcens festékekkel jelölt oligonukleotid próbák hibridizációja
	A környezetbe mesterségesen juttatott inokulum detektálása és monitoringja	GFP gének
	Mikrobiális ökológiai vizsgálatok	Immunofluoreszcencia
Elektronmikroszkópia	A mikroorganizmusok térbeli elrendeződésének vizsgálata	

Talajmikroorganizmusok minőségi és mennyiségi meghatározása fluoreszcens *in situ* hibridizációval

A fluoreszcens *in situ* hibridizáció lehetővé teszi a baktériumok gyors és pontos minőségi és mennyiségi meghatározását természetes környezetükben. A mikroszkópos analízis legfontosabb előnye a többi molekuláris biológiai technikával szemben, hogy információt ad a mikroorganizmusok morfológiai jellemzőiről, szerkezetéről, számáról, térbeli elhelyezkedéséről. A módszer elve, hogy a fluoreszcens festékekkel jelölt oligonukleotid próba a sejt morfológiájának változtatása nélkül bejut a sejtbe, ahol specifikusan köt a komplementer

target szekvenciához. Egyszerre több, különböző festékekkel jelölt oligonukleotid próba hibridizációja vizsgálható, ha az emittált fény eltérő hullámhosszúságú.

A módszer lépései a következők:

1. A minta fixálása
2. Speciális mintaelőkészítés
3. Hibridizáció
4. A nem hibridizált próbák eltávolítása mosással
5. A minták értékelése mikroszkóppal, dokumentáció

Hibridizációs próbák és festésük

A hibridizációs próba tervezésénél a legfontosabb szempontok a megfelelő specifitás, érzékenység és a próba sejtbe jutása. A próbák 15-30 bázis hosszúságúak, a rövidebb oligonukleotidok könnyebben bejutnak a sejtekbe, viszont kevesebb festéket lehet hozzájuk kapcsolni (Moter and Göbel, 2000).

Több különböző jelölési eljárás létezik.

A legegyszerűbb módszer a fluoreszcens festékek direkt kötése az oligonukleotidhoz.

Kémiai úton aminolinkerrel a próba 5' végéhez csatolható a festékmolekula vagy enzimes reakcióban terminális transzferázzal kapcsolható a 3' véghez fluoreszcens festékekkel jelölt nukleotid.

A FISH módszer érzékenysége növelhető indirekt detektálással, amikor fluoreszcens jelölésű antitest kötődését vizsgálják az oligonukleotid próbához kapcsolt digoxigenin (DIG) molekulához (Zarda et al., 1991).

A módszer érzékenysége tovább növelhető a detektálásba beépített enzimes reakcióval. Ekkor nem közvetlenül az oligonukleotid próbához kapcsolt DIG molekula antitestjét jelölik fluoreszcens festékekkel, hanem az antitesthez csatolt enzim, az alkáli-foszfátáz defoszforilálja a 2-hidroxi-3-naftoesav-2-fenililid-foszfátot (HNPP) piros fényel fluoreszkáló formává.

Schönhuber és munkatársai (1997) kifejlesztették egy még hatékonyabb technikát, amelyben fluoreszcein-tiramid szubsztrátot átalakító torma peroxidáz enzimet kapcsoltak az oligonukleotidhoz.

Fluoreszcens festékek

Különböző hullámhosszúságú fényel gerjeszthető, illetve fényt emittáló fluorkrómok detektálása lehetővé teszi több mikroorganizmus szimultán vizsgálatát. Ehhez kombinált szűrőblokkal felszerelt mikroszkópra van szükség. A festékeknek határozott emissziós csúcsokat kell adni, hogy jól elválaszthatóak legyenek egymástól. A kis gyakorisággal előforduló targeteket kell a legfényesebb festékekkel jelölni. Általánosan elterjedt festékek a következők: fluoreszcein-származékok (pl. fluoreszcein-izotiocianát (FITC)), rhodamin-származékok (pl. tetrametil-rhodamin-izotiocianát (TRITC)), cianin-származékok (mint pl. Cy3, Cy5). Ez utóbbiak adják a legfényesebb jelet, és kevésbé fakulnak besugárzás hatására. A DNS-hez nagy affinitással kötődő 4',6-diamidin-2-fenilindol dihidroklorid (DAPI), a mikroorganizmusok mennyiségi meghatározására alkalmas kék fluoreszcens festék (Moter and Göbel, 2000).

Riboszómális rRNS, a FISH target molekulája

A mikroorganizmusok vizsgálatára genetikai stabilitása, szerkezete –konzervált és variábilis régiói és nagy kópiaszáma miatt legáltalánosabban használt target molekula a 16S rRNS (Woese, 1987; Amann et al., 1995). A próbák tervezéséhez megfelelő szoftverek állnak rendelkezésre, pl. a Münchener Műszaki Egyetem Mikrobiológia Tanszéke által kifejlesztett ARB programcsomag (<http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de>). Az irodalomban más

target molekulák tervezésére is vannak adatok, pl. 23S rRNS molekula (Amann et al. 1995), 18S rRNS molekula (Li et al., 1997) valamint mRNS (Wagner et al., 1998) detektálására.

A mikroorganizmusok fixálása

A hibridizáció előtt szükség van a mikroorganizmusok fixálására a sejt átjárhatóvá tételére a fluoreszcens próbák számára, a sejt épségének fenntartására, valamint az RNS-ek védelmére, lebomlásuk megakadályozására. Fixálni lehet a mikrobákat kicsapószerrel, mint pl. etanollal, metanollal vagy keresztkötéseket létrehozó ágensekkel, pl. aldehidekkel. Gram-negatív baktériumok vizsgálata esetén általában 3-4 v/v%-os formaldehid vagy paraformaldehid megfelelő fixálást biztosít, míg Gram-pozitív baktériumok meghatározásához etanol (50%), etanol/formalin, (9:1v/v) vagy hőkezelés valamint további, permeabilitást növelő lépés szükséges (Roller et al., 1994).

Minta előkészítése

A mikroorganizmusok tárgylemezhez való jobb rögzítése érdekében ajánlott a tárgylemez felületét bevonóanyaggal kezelni. Alkalmazható erre a célra pl. zselatin (Amann et al., 1990) vagy poli-L-lizin (Lee et al., 1999). A fixált baktériumokat a tárgylemezen etanollal kell dehidratálni. Gram-pozitív baktériumok esetében további enzimes (pl. lizozimes) kezelésre van szükség (Wagner et al., 1998) a peptidoglikán láncok felnyitásához. A mikolsavat tartalmazó *Mycobacterium*, *Nocardia* vizsgálatához 1M HCl-val végzett savas kezelés vagy mutanolizinnel történő permeabilizálás javasolt (Macnaughton et al., 1994; Schuppler et al., 1998; Erhart et al., 1997).

Hibridizáció

A vizsgálni kívánt RNS-sel komplementer fluoreszcens jelöléssel ellátott próbát előmelegített hibridizációs pufferben kell nagyon pontosan meghatározott körülmények között a mintához adni. A legfontosabb hibridizációt befolyásoló körülmények a formamid koncentrációja és a hibridizáció hőmérséklete. Formamid adagolásának hatására a hidrogén-hidak gyengítése révén csökken a nukleinsav olvadáspontja, alacsonyabb hőmérsékleten nagy pontossággal megy végbe a hibridizáció.

A hibridizáció optimális paraméterei: sötét kamrában, nedves közegben, 37-50°C hőmérséklettartományban minimum 30 percig, de akár több óráig is tarthat. A hibridizációt követi a tárgylemezek óvatos mosása desztillált vízzel a nem kötődött próbák eltávolítása érdekében. A mikroszkópos vizsgálat előtt a mintához fluoreszcens festékek besugárzásából adódó fakulás elleni színtartó anyagot kell adni.

Dokumentáció

A minták értékelhetőek keskeny sávú filterrel felszerelt hagyományos, epifluoreszcens mikroszkóppal. CCD kamerával lehetőség van a képek digitalizálására és analizálására. Ezáltal meghatározható a mikroorganizmusok száma a környezeti mintában és az rRNS tartalom alapján mérhető az egyes sejtek aktivitása (Li et al., 1997; Poulsen et al., 1993). Nagyfelbontású epifluoreszcens mikroszkóppal a bakteériumok térbeli elrendeződése tovább vizsgálható (Manz et al., 2000). Vastag minták, pl. flokkulum, biofilm vagy szövet vizsgálatánál éles képet lehet kapni konfokális lézer szkennig mikroszkóppal (CLSM). A FISH által szolgáltatott jelet flow citométerrel is lehet detektálni. Mindazonáltal a flow citometriás vizsgálat nem ad információt a mikrobák morfológiájáról sem térbeli elrendeződésükről.

A módszer korlátai

Hibás, pozitív eredmények

Autofluoreszcenciából adódó hibás, pozitív eredmények

Különösen nagy gondot okoz a mikroorganizmusok autofluoreszcenciája, pl. penész és élesztő fajoknál, Pseudomonasoknál (Brown and Lowbury, 1996), cianobaktériumoknál (Schönhuber et al., 1999) és methanogéneknél (Sorensen et al., 1997).

Autofluoreszcenciát okozhat a mikroorganizmusok környezete, élettere pl. a talaj. Az autofluoreszcencia nem csupán a jel/zaj arányt rontja, de a specifikus fluoreszcens jelet eltakarhatja. A jel/zaj arány javításához hozzájárulhat a jel intenzitását befolyásoló fixálási eljárások optimalizálása, illetve megfelelő, a fluoreszcens festék fényérzékenységét csökkentő anyagok alkalmazása. A keskeny sávú szűrőkkel az autofluoreszcencia hatása csökkenthető.

A mikroorganizmusok számának túlbecslése a nem specifikus kötések következtében

Az oligonukleotid próbák pontos tervezése rendkívül fontos. Minden FISH kísérletben szükség van pozitív kontrollra és negatív kontrollra egyaránt. Ez utóbbi több rokon faj target szekvenciáját tartalmazza, amelyek néhány bázissal térnek el a meghatározni kívánt mintától. Gondot okozhat az is, ha az irodalomban szereplő szekvenciák hibásak, ezért érdemes a specifitás meghatározásával kezdeni a vizsgálatot. Ahhoz, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy valóban a meghatározni kívánt mikroorganizmust detektáltuk, két eltérő target szekvenciájú és különböző festékkel jelölt próbát érdemes használni. Ahol mindkét jel látható, valóban a kérdéses mikrobát detektáltuk (Moter and Göbel, 2000).

Hibás, negatív eredmények

A próbák gátolt sejtbe jutásából adódó hibás, negatív eredmények

Mikolsav tartalmú Gram-pozitív sejtelnél jelentős problémát okoz az oligonukleotid próba korlátozott sejtbe jutása, ezért speciális fixálásra és mintaelőkészítésre van szükség.

A target szekvenciához való gátolt hozzáférésnek köszönhető gyengébb jel

A rRNS háromdimenziós struktúrája miatt a próbák nem azonos eséllyel férnek hozzá a target szekvenciához. Az oligonukleotid próbák érzékenységét befolyásolja a lasszó-, hajtú-alkazat és a rRNS-fehérje kapcsolat egyaránt (Fuchs et al., 1998).

Kis rRNS tartalom révén mért hibás eredmények

Lassan növekvő sejtek kis intenzitású jelet adnak, ezért fényes fluoreszcens festékek (Cy3) alkalmazása célszerű. A jel intenzitása növelhető több különböző target szekvenciához tartozó oligonukleotid próba használatával.

Fényérzékeny festékek kifakulásából következő alulbecslés

A festékek fényintenzitásának drasztikus csökkenését keskeny sávú filterrel, fotostabil cianin alapú festékekkel és a fény elhalványodását gátló anyagokkal lehet redukálni.

Univerzális próbákkal végzett hibridizáció

Univerzális próbával (pl. EUB338) végzett FISH-sel bizonyítható, hogy a gyenge jelet nem a fixálás, a próba gátolt bejutása a sejtbe vagy a sejt rRNS tartalma okozza (Amann et al., 1990). Az univerzális próba nem specifikus kötődését 16S rRNS-hez és a sejt egyéb elemeihez egy komplementer, nem specifikus próbával (NON338) lehet vizsgálni. Abban az

esetben kielégítő az eredmény, ha a NON338 próbával végzett hibridizáció nem ad jelet (Wallner et al., 1993).

Irodalomjegyzék

- Amman, R.I.** et al., 1995. Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
- Amann, R.,** Krumholz, L., Stahl, D.A., 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172, 762-770.
- Amann, R.,** Snaidr, J., Wagner, M., Ludwig, W., Sclifer, K.H., 1996. *In situ* visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. *J. Bacteriol.* 178, 3496-3500.
- Barkay, T.,** Liebert, C., Gillmann, M., 1989. Hybridization of DNA probes with whole-community genome for detection of genes that encode microbial responses to pollutants: *mer* genes and Hg²⁺ resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1574-1577.
- Baumann, B.,** Snozzi, M., Zehnder, A.J.B., van der Meer, J.R., 1996. Dynamics of denitrification activity of *Paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. *J. Bacteriol.* 178, 143-149.
- Brown, V.I.,** Lowbury, E.J.L., 1996. Use of an improved cetrinide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Pathol.* 18, 752-756.
- Coyne, M.S.,** Arunakumari, A., Averill, B.A., Tiedje, J.M. 1989. Immunological identification and distribution of dissimilatory heme *cd* and non-heme copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2924-2931.
- Diels, L., Mergeay, M.,** 1990. DNA probe-mediated detection of resistant bacteria from soils highly polluted by heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1485-1491.
- Degrange, V., Bardin, R.,** 1995. Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2093-2098.
- DeLong, E.F.,** 1997. Genomic approaches in environmental microbiology: analysis of uncultivated prokaryote genomes. ASM General Meeting, Miami Beach.
- Diviacco, S.** et al., 1992 A novel procedure for quantitative Polymerase Chain Reaction by coamplification of competitive templates. *Gene* 122, 313-320.
- Erb, R.W., Wagner-Dobler, I.,** 1993. Detection of polychlorinated biphenyl degradation genes in polluted sediments by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4065-4073.
- Erhart, R.,** Bradford, D., Seviour, R.J., Amann, R., Blackall, L.L., 1997. Development and use of fluorescent *in situ* hybridization for the detection and identification of *Microthrix parvicella* in activated sludge. *System. Appl. Microbiol.* 20, 310-318.
- Farely, V.,** Rainey, F.A., Stackebrandt, E., 1995. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2798-2801.
- Fries, M.R.,** Zhou, J., Tiedje, J.M., 1994. Isolation, characterization and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2802-2810.
- Fuchs, B.M.,** Wallner, G., Beisker, W., Schwippl, I., Ludwig, W., Amann, R., 1998. Flow cytometric analysis of the *in situ* accessibility of *E. coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4973-4982.
- Fulthorpe, R.R., Wyndham, R.C.,** 1989. Survival and activity of a 3-chlorobenzoate-catabolic genotype in a natural system. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1584-1590.
- Gotz, A.,** Pukall, R., Smit, E., Tietze, E., Prager, R., Tschape, H., van Elsas, J.D., Smalla, K., 1996. Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2521-2526.
- Guschin, D.Y.,** Mobarry, B.K., Proudnikov, D., Stahl, D.A., Rittmann, B.E., Mirzabekov, A.D., 1997. Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2397-2402.
- Herrick, J.B.,** Madsen, E.L., Batt, C.A., Ghiorse, W.C., 1993. Polymerase chain reaction, amplification of naphthalene-catabolic and 16S rRNA gene sequences from indigenous sediment bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 687-694.
- Hess, A.,** Zarda, B., Hahn, D., Häner, A., Stax, D., Höhener, P., Zeyer, J., 1997. *In situ* analysis of denitrifying toluene- and m-xylene-degrading bacteria in a diesel fuel contaminated laboratory aquifer column. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2136-2141.

- Hodson, R.E.**, Dustman, W.A., Garg, R.P., Moran, M.A., 1995. *In situ* PCR for visualization of microscale distribution of specific genes and gene products in prokaryotic communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4074-4082.
- Holben, W.E.**, Jansson, J.K., Chelm, B.K., Tiedje, J.M., 1988. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacteria community. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 703-711.
- Holben, W.E.**, Schroeter, B.M., Calabrese, V.G.M., Olsen, R.H., Kukor, J.K., Biederbeck, V.O., Smith, A.E., Tiedje, J.M., 1992. Gene probe analysis of soil microbial populations selected by amendment with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3941-3948.
- Hugenholtz, P., Pace, N.R.**, 1996. Identifying microbial diversity in the natural environment: A molecular phylogenetic approach. *Tr. Biotechnol.* 14, 190-197.
- Lee, S.Y.**, Bollinger, J., Bezdicsek, D., Ogram, A., 1996. Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3405-3412.
- Lee, N.**, Nielsen, P.H., Andreasen, K.H., Juretschko, S., Nielsen, J.L., Schleifer, K.H., Wagner, M., 1999. Combination of fluorescent *in situ* hybridization and microautoradiography – a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1289-1297.
- Li, S.**, Spear, R.N., Andrews, J.H., 1997. Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of *Aureobasidium pullulans* on microscopic slides and leaf surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3261-3267.
- Macnaughton, S.J.**, O'donnel, A.G., Embley, T.M., 1994. Permeabilization of mycolic-acid-containing actinomycetes for *in situ* hybridization with fluorescently labelled oligonucleotide probes. *Microbiology* 140, 2859-2865.
- Manz, W.**, Arp, G., Schumann-Kindel, G., Szewzyk, U., Reitner, J., 2000. Widefield deconvolution epifluorescence microscopy combined with fluorescence *in situ* hybridization reveals the spatial arrangement of bacteria in sponge tissue. *J. Microbiol. Methods* 40, 125-134.
- McDermott, T.R.**, 1997. Use of fluorescent antibodies for studying the ecology of soil- and plant-associated microbes. In: Hurst, C.J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D., Walter, M.J. (Eds.), *Manual of environmental microbiology*, American Society for Microbiology, Washington, pp. 473-481
- Moter, A., Göbel, U.B.**, 2000. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 41, 85-112.
- Mueller, J.G.**, Devereux, R., Santavy, D.L., Lantz, S.E., Willis, S.G., Pritchard, P.H., 1997. Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading bacteria from geographically diverse soils. *Ant. Leeuwenhoek Int. J.* 71, 329-343.
- Nazaret, S.**, Jeffrey, W.H., Saouter, E., Von Haven, R., Barkay, T., 1994. *merA* gene expression in aquatic environments measured by mRNA production and Hg(II) volatilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4059-4065.
- Pepper, I.L., Dowd, S.E.**, 2002. PCR applications for plant and soil microbes. In: Hurst, C.J., Crawford, R.L., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D. (Eds.) *Manual of Environmental Microbiology*-second edition. American Society for Microbiology Press, Washington
- Pettigrew, C.A., Sayler, G.S.**, 1986. The use of DNA:DNA colony hybridization in the rapid isolation of 4-chlorobiphenyl degradative bacterial phenotypes. *J. Microbiol. Meth.* 5, 205-213.
- Poulsen, L.K.**, Ballard, G., Stahl, D.A., 1993. Use of rRNA fluorescence *in situ* hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1354-1360.
- Power, M.**, van der Meer, J.R., Tchelet, R., Egli, T., Eggen, R., 1998. Molecular-based methods can contribute to assessments of toxicological risks and bioremediation strategies. *Journal of Microbiological Methods* 32, 107-119.
- Prin, Y.**, Mallein-Gerin, F., Simonet, P., 1993. Identification and localization of *Frankia* strains in *Alnus* nodules by *in situ* hybridization of *nifH* mRNA with strain-specific oligonucleotide probes. *J. Exp. Botany* 44, 815-820.
- Romanowski, G.**, Lorenz, M.G., Wackernagel, W., 1993. Use of polymerase chain reaction and electroporation of *E. coli* to monitor the persistence of extracellular plasmid DNA introduced into natural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3438-3446.
- Roller, C.**, Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1994. *In situ* probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* 140, 2849-2858.
- Sayler, G.S.**, Fleming, J., Applegate, B., Werner, C., Nikbakht, K., 1989. Microbial community analysis using environmental nucleic acid extracts. In: Hattori, T., Ishida, Y., Maruyama, Y., Morita, R.Y., Uchida, A. (Eds.), 5th International symposium on Microbial Ecology. Japan Scientific Societies Press, Kyoto, pp. 658-662.
- Schmidt, E.L.**, 1973. Fluorescent antibody techniques for the study of microbial ecology. *Bull. Ecol. Comm. (Stockholm)* 17, 67-76.
- Schönhuber, W.**, Zarda, B., Eix, S., Rippka, R., Herdmann, M., Ludwig, W., Amann, R., 1999. *In situ* identification of Cyanobacteria with horseradish peroxidase-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1259-1267.

- Schuppler, M.,** Wagner, M., Schön, G., Göbel, U.B., 1998. *In situ* identification of nocardioform actinomycetes in activated sludge using fluorescent rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microbiology* 144, 249-259.
- Selveratnam, S.,** Schoedel, B.A., McFarland, B.L., Kulpa, C.F., 1995. Application of reverse transcriptase PCR for monitoring expression of the catabolic *dmpN* gene in a phenol-degrading sequencing batch reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3981-3985.
- Siebert, P.D.,** Larrick, J.W., 1992. Competitive PCR. *Nature* 359, 557-558.
- Sorensen, A.H.,** Torsvic, V.L., Torsvic, T., Poulsen, L.K., Ahring, B.K., 1997. Whole-cell hybridization of *Methanosarcina* cells with two new oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3043-3050.
- Stahl, D.A.,** 1997. Molecular approaches for the measurement of density, diversity and phylogeny. In: Hurst, C.J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D., Walter, M.J. (Eds.), *Manual of environmental microbiology*, American Society for Microbiology, Washington, pp. 102-114.
- Stephen, J.R.,** McCaig, A.E., Smith, Z., Prosser, J.I., Embley, T.M., 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4147-4154.
- Sykes, P.J.,** Neoh, S.H., Brisco, M.J., Hughes, E., Condon, J., Morley, A.A., 1992. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques* 13, 444-449.
- Voordouw, G.,** Voordouw, J.K., Karkhoff-Schweizer, R.R., Fedorak, P.M., Wetslake, D.W.S., 1991. Reverse sample genome probing, a new technique for identification of bacteria in environmental samples by DNA hybridization, and its application to the identification of sulphate-reducing bacteria in oil field samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3070-3078.
- Wagner, M.,** Amann, R., Lemmer, H., Schleifer, K.H., 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1520-1525.
- Wagner, M.,** Schmid, M., Juretschko, S., Trebesius, K.H., Bubert, A., Goebel, W., Schleifer, K.H., 1998. *In situ* detection of a virulence factor mRNA and 16S rRNA in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 160, 159-168.
- Wallner, G.,** Amann, R., Beisker, W., 1993. Optimizing fluorescent *in situ* hybridization of suspended cells with rRNA-targeted oligonucleotide probes for the flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14, 136-143.
- Wallner, G.,** Steinmetz, I., Bitter, S.D., Amann, R., 1996. Combination of rRNA-targeted hybridization probes and immunoprobes for the identification of bacteria by flow cytometry. *Sys. Appl. Microbiol.* 19, 569-576.
- Wawer, C.,** Muyzer, G., 1995. Genetic diversity of *Desulfovibrio* spp. In environmental samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of NiFe hydrogenase gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2203-2210.
- Woese, C.R.,** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271.
- Wyndam, R.C.,** Nakatsu, C., Peel, M., Cashore, A., Ng, J., Szilagy, F., 1994. Distribution of the catabolic transposon Tn5271 in a groundwater bioremediation system. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 86-93.
- Zarda, B.,** Amann, R., Wallner, W., Schleifer, K.H., 1991. Identification of single bacterial cells using digoxigenin-labelled rRNA-targeted oligonucleotides. *J. Gen. Microbiol.* 137, 2823-2830.