

## KÖRNYEZETI ÁRTALMAK ÉS A BIODIVERZITÁS

A biodiverzitás és az evolúció alappillére a genetikai diverzitás. A genetikai diverzitásban fellépő veszteségek nagyon gyakran atropogén stressz hatására következnek be: ezt a jelenséget „genetikai erózióknak” is nevezi a modern szakirodalom.

A környezetszennyezéseknek a genetikai diverzitásra gyakorolt káros hatása minden kétséget kizáróan bebizonyosodott, de a várható károsodás, a kockázat mértékének megadására ma még nincs megfelelő módszerünk és objektív mérőszámunk.

A genetikai diverzitást jellemző mutatók, „indexek” általában nem objektív, kvantitatív mérőszámok, hanem relatív jellemzők.

Egységes és minden szempontból megfelelő metodika sem létezik a genetikai diverzitás kvantitatív mérésére, emiatt az Európában egységesen alkalmazott környezeti kockázatfelmérési metodikába sem illeszthetőek a diverzitásra kapott eredmények.

Mindezek ellenére nagy léptekkel halad ez a tudományág a megoldás felé, hiszen a modern géntechnikák kifejlődése újabb lökést adott és a hagyományos morfológiai, biokémiai és fiziológiai vizsgálatok mellé felsorakoztak a molekuláris-, elsősorban a DNS-technikák, melyek ismertetését és rendszerezését a 2. részjelentésben megadtuk.

A BME-MGKT környezeti mikrobiológia csoportjában is megindult a hagyományos mikrobiológiai módszerek mellett a modern géntechnikai módszerek fejlesztése és alkalmazása, utóbbi elsősorban a FISH technikára építve, melynek fizikai alapjait is megteremtettük egy fluoreszcens mikroszkóp, értékelő szoftver és a megfelelő eszközök és vegyszerek beszerzésével.

A projektben szereplő mindkét témakört támogatjuk a molekuláris genetikai alapok tisztázásával.

- A.) A biodegradálható szerves szennyezőanyagokkal szennyezett talajok esetében elsősorban a biodegradálható szennyezőanyaghoz, mint energiaforrásul szolgáló szubsztrárhoz való alkalmazkodást vizsgáljuk hagyományos mikrobiológiai, biokémiai és modern géntechnikai módszerekkel.
- B.) A toxikus fémekkel szennyezett terület talajában a nehézfémekhez adaptálódott baktérium- és gombasejtek illetve közösségek egyes fiziológiai, biokémiai és genetikai jellemzőit vizsgáljuk.

A vegyi anyagok genetikai erózív hatásának számszerűsítése az ökotoxikológia egyik célja. Ez a mikrobiológiai, ökotoxikológia és molekuláris biológiai módszerek együttes alkalmazását kívánja meg. Ebbe az irányba tettünk néhány kezdő lépést az új bioremediációs technológiák alapjait kutató projekt keretében.

## 5. TALAJBAKTÉRIUMOK KÖZÖSSÉGÉNEK JELLEMZÉSE GÉNTECHNIKAI MÓDSZEREKKEL: FLUORESZCENS IN SITU HIBRIDIZÁCIÓ

A fluorszcens *in situ* hibridizációt, a FISH módszert adaptáltuk talaj-mikroorganizmusok vizsgálatára, különös tekintettel szerves szennyezőanyagok degradációjára képes mikroorganizmusok valamint nehézfém-tűrő mikrobák detektálására, mennyiségi és minőségi meghatározására.

A fluorszcens *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 fluorezcens festékekkel jelölt oligonukleotid próba a sejt morfológiájának változtatása nélkül bejut a sejtbe, ahol specifikusan kötődik a komplementer target szekvenciához. Ezután a jelölt oligonukleotid próba hibridizációja mikroszkóppal vizsgálható. Abban az esetben, ha az emittált fény eltérő hullámhosszúságú, egyszerre több, különböző festékekkel jelölt oligonukleotid próba hibridizációja is detektálható.

A módszer lépései a következők:

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

### A FISH módszer korlátai

A talaj mikroorganizmusok vizsgálata során a legnagyobb hibát okozó tényezők:

- (1) a talajszemcsék autofluoreszcenciája, mely rontja a jel/zaj arányt és eltakarhatja a specifikus fluorszcens jelet,
- (2) a mikroorganizmusok autofluoreszcenciája pl. fonalagomba és élesztőgomba fajoknál, *Pseudomonas*oknál (Brown and Lowbury, 1996), cianobaktériumoknál (Schönhuber et al., 1999) és methanogéneknekél (Sorensen et al., 1997),
- (3) a speciális próba non-specifikus kötődése a talajszemcsékhez,
- (4) a talajszemcsék által eltakart mikrobák detektálásának hiánya,
- (5) a lassan növekvő, kis rRNS tartalmú és kis intenzitású jelet adó talajlakó mikroorganizmusok detektálásának hiánya,
- (6) a hibridizációs próba gátolt bejutása G+ sejtekbe,
- (7) a mikolsav-tartalmú G+ sejteknél a hibridizációs próba különösen nagymértékben gátolt sejtbe jutása, amelynek kiküszöböléséhez speciális fixálásra és mintaelőkészítésre van szükség.

A FISH módszer ezen korlátaira kell megoldást találni a talajmikroorganizmusok megbízható meghatározása érdekében. A jel/zaj arány javítható a jel intenzitását befolyásoló fixálási eljárásokkal és a hibridizációs próba penetrációját elősegítő módszerek optimalizálásával, illetve a fluorezcens festék fényérzékenységet csökkentő anyagok alkalmazásával.

A talaj mikroorganizmusokra adaptált FISH technika optimális paramétereinek beállításához az alábbi körülmények között vizsgáltuk a módszer hatékonyságát.

- 1./a, Talajszemcse – mikroba elválasztása rázatással, ultrahangos kezeléssel
- 1./b, Talajhoz adott *Pseudomonas fluorescens* inokulum visszanyerése a hozzáadást követően illetve 1 napos adaptáció után
- 2., Talajszemcsék autofluoreszcenciájának vizsgálata DAPI szűrőn keresztül megvilágított preparátumnál
- 3., Talajszemcsékhez nem specifikusan kötődő eubakteriális próba (EUB 338) vizsgálata steril talajban
- 4., Három különböző fixálási eljárás összehasonlítása: 3,5 % -os formaldehiddel, 4%-os PFA-val (paraformaldehid) vagy etanollal történő fixálás
- 5., Talajszuszpenzióban a hibridizáció hatékonyságának vizsgálata. Az összes élő és élettelen sejtet megfestő DAPI (fluoreszcens festék) által detektált sejtek számának és az EUB 338-as próbával hibridizált élő baktériumok számának összehasonlítása.
- 6., A próba sejtbe jutását (permeabilizáció) elősegítő kezelés lizozim, proteináz K és 1 M HCl alkalmazásával
- 7., Az etanolos dehidratáció hibridizáció hatékonyságára gyakorolt hatása

## 5.1. Anyagok és módszerek

Talajok előkészítése

- Kontroll: 2 g nedves barna erdőtalajhoz (1,5 g száraz talajhoz) 19 ml steril vizet adtunk.
- Kontroll+*Pseudomonas fluorescens*: 2 g nedves barna erdőtalajhoz (1,5 g száraz talajhoz) 1 ml húslé tápoldatban fenntartott *Pseudomonas fluorescens* inokulumot és 18ml steril vizet adtunk.

Húslé tápoldat összetevői:

3 g húskivonat	0.5 g NaCl
5 g glükóz	5 g pepton

1000 cm<sup>3</sup> víz  
pH~7.0

- Talajszemcse–mikroorganizmus elválasztása

1./a, Rázatás után a felülúszó vizsgálatával

A talajszuszpenziót 2 órán át rázógépen rázattuk, majd ülepedés után a felülúszó 1ml-ét centrifugáltuk 12 000 rpm fordulatszámmal 5 percig.

1./b, Rázatás és centrifugálás után a felülúszó vizsgálatával

A 2 órás rázatást követően a talajszuszpenziót 1000 rpm fordulatszámon 5 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót második lépésben 12000 rpm fordulatszámon 5 percig centrifugáltuk.

2., Ultrahangos kezeléssel

A talajszemcséket az adszorbeált mikroorganizmusoktól 5 perces ultrahangos fürdővel próbáltuk elválasztani, majd a talajszemcsék ülepedése után a felülúszó 1ml-ét centrifugáltuk 12000 rpm fordulatszámmal 5 percig. A tiszta kultúrával végzett kísérletben bizonyítottuk, hogy 5 perces ultrahangos kezelés még nem károsítja a mikroorganizmusokat.

## 5.2. A fluoreszcens *in situ* hibridizáció módszere

A fluoreszcens *in situ* hibridizáció módszerét Amann *et al.* (1990) és Manz *et al.* (1992) nyomán dolgoztuk ki.

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, (9:1 v/v) vagy hőkezelés valamint további, permeabilitást növelő lépés szükséges (Roller et al., 1994).

### 5.2.1. Rögzítési módszerek

#### 1/a., Paraformaldehiddel történő (PFA) fixálás Gram negatív sejtek meghatározására

Oldatok:

- 3\*PBS
- 1\*PBS
- frissen elkészített 4% paraformaldehid

#### 4% paraformaldehid elkészítése

33 ml 60–65 °C-os desztillált vízhez keverés közben 2 g paraformaldehidet adtunk, amely 40 µl 10 n NaOH hozzáadását követően teljesen feloldódott. Az oldathoz ezután 16,5 ml 3\*PBS puffert adtunk, majd az elegyet 0.45 µm-es szűrőn leszűrve azonnal felhasználtuk.

#### Fixálás (Amann et al. 1990, Manz et al. 1992)

A sejteket centrifugáltuk, 1\*PBS oldattal mostuk, 1\*PBS-ben szuszpendáltuk, majd háromszoros térfogatnyi paraformaldehid hozzáadását követően 3 órán át szobahőmérsékleten, ill. egy éjszakán át 4 °C-on inkubáljuk. Ezt követően a sejteket centrifugáltuk, 1\*PBS pufferrel mostuk. (1 térfogatnyi abs. etanol hozzáadása után a sejtek –20°C-on hosszú ideig tárolhatók.)

#### Fixálás 3,5%-os formaldehiddel

Amann et al. 1990 és Manz et al. 1992 hibridizációs protokolljától eltérően, fixáltuk a talajmikroorganizmusokat a talajszuszpenzióhoz egytized térfogatban adott 35%-os formaldehiddel is.

#### 1/b., Etanollal történő fixálás Gram pozitív sejtek meghatározására, közvetlenül hibridizáció előtt)

A sejtek centrifugálását követően mostuk a pelletet 1\*PBS-sel, 1\*PBS-ben szuszpendáltuk, majd fixáltuk a sejteket 1 térfogatnyi jéghideg abs. etanol hozzáadásával. A fixált sejtek –20°C-on rövid ideig tárolhatók.

### 5.2.2. A hibridizációs próba penetrációját elősegítő permeabilizáció

#### 1. Lizozimes kezelés (Wagner et al. 1998, Schönhuber et al. 1997)

A rögzített és dehidratált sejtekre 20 µl 20 mg/ml-es lizozim oldatot pipettázunk (min. 10000 U/mg, Reanal). A lizozimot 100 mM Tris/HCl és 50mM EDTA pH 8,0 pufferben oldottuk.

Az enzimes kezelés időtartama szobahőmérsékleten 30 perc volt. Ezt követően a tárgylemezt desztillált vízzel mostuk, majd az enzimreakció leállítására érdekében megismételtük az etanolos dehidratációt.

## 2. Enzimes kezelés proteináz K-val

A lizozimes kezelést követően a dehidratáció előtt 0,05 mg/ml proteináz K (30 U/mg, SIGMA) oldatot adtunk a mintához. Az enzimes kezelést szobahőmérsékleten 5 perc után állítottuk le dehidratációval.

## 3. Savas hidrolízis 1M HCl-dal (Macnaughton et al. 1994)

A sejteket 1 M HCl oldattal 50-60 percen keresztül 37°C-on inkubáltuk.

### **5.2.3. A hibridizáció folyamata és a nem hibridizált próbahányad eltávolítása mosással**

A vizsgálni kívánt RNS-sel komplementer fluoreszcens jelöléssel ellátott próbát előmelegített hibridizációs pufferben kell nagyon pontosan meghatározott körülmények között a mintához adni (Amann *et al.* 1990, Manz *et al.* 1992). 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.

*Hibridizációs puffer összetétele (Manz et al. 1992)*

360 µl 5M NaCl

40 µl 1M Tris/HCl pH 8,0

Formamid és MQ ultra tiszta víz az alkalmazott mennyiségnek megfelelően

4 µl 10% SDS

Formamid % (v/v)	Formamid (µl)	MQ (µl)
0	0	1600
5	100	1500
10	200	1400
15	300	1300
20	400	1200
25	500	1100
30	600	1000
35	700	900
40	800	800
45	900	700
50	1000	600
60	1100	500
65	1200	400
70	1300	300

*Mosó puffer összetétele (Manz et al. 1992)*

1 ml 1M Tris/HCl pH 8,0

A hibridizációs puffer formamidtartalmának megfelelően 5M NaCl és 0,5 M EDTA pH 8,0

A 20%-os, illetve annál nagyobb formamidkoncentrációknál 500 µl EDTA-t kell adni a

mosó pufferhez

50 µl 10% SDS

Formamid % a hibridizációs pufferben	NaCl (mol/l)	NaCl (µl)
0	0,900	9000
5	0,636	6300
10	0,450	4500
15	0,318	3180
20	0,225	2150
25	0,159	1490
30	0,112	1020
35	0,080	700
40	0,056	460
45	0,040	300
50	0,028	180
55	0,020	100
60	0,008	40
70	0,000	0 – csak 350 µl EDTA

A zselatinnal bevont tárgylemezre sejtkoncentrációtól függően 2-15 µl fixált sejtszuszpenziót pipettáztunk és 46°C-on 10 percig szárítottuk. A rögzítés alatt elkészítettük a hibridizációs puffert, amelyet felhasználásáig szobahőmérsékleten tároltunk. A minta rögzítését követte a sejtek dehidratációja 50, 80 és 100 %-os etanolban, 3-3 percen keresztül. Ezalatt felolvasztottuk az oligonukleotid próbát. A rögzített és dehidratált mintához, a sejtek érintése nélkül 10 µl hibridizációs puffert és abban elosztatva 1 µl (30 ng/µl Cy3 festékkel jelölt) oligonukleotid próbát pipettáztunk. A tárgylemezt Falcon csőbe helyezve 46°C-on 1,5 órán át inkubáltuk. A megfelelő nedvességtartalmat a szintén a Falcon csőbe helyezett a hibridizációs puffer maradékával megnedvesített papírvattával biztosítottuk. A hibridizáció ideje alatt elkészítettük, és 48°C-ra felmelegítettük a mosó puffert, amelynek kis részével leöblítettük a tárgylemezt, majd beleállítva azt 10 percig 48°C-os vízfürdőben inkubáltuk. A mosó puffert jéghideg desztilláltvízzel távolítottuk el, majd szárítottuk a tárgylemezeket. A preparátumot a fényérzékeny festék fluoreszcens fényének fakulását gátló anyaggal, Citifluorral (Citifluor Ltd., London, UK) vontuk be, majd mikroszkóppal vizsgáltuk a mintát.

#### 5.2.4. Az alkalmazott hibridizációs próba

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). 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 baktériumokat az univerzális EUB338 eubakteriális próba hibridizációja által detektáltuk, amellyel bizonyítható a fixálás eredményessége, a próba megfelelő sejtbe jutása.

Hibridizációs próba:	Szekvencia	Target rRNS	Jelölés
EUB 338 (Stahl and Amann 1991)	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S, 338-355 baktériumok	Cy3 –fotostabil cianin alapú festék

### **5.3. Összes élő és élettelen sejt számának meghatározása DAPI festéssel**

Az alkalmazott univerzális DNS-hez kötődő fluoreszcens festék a (DAPI) 4',6-diamidino-2-fenilindol (Merck).

A tárgylemezen rögzített sejtekre 20 µl 0.1 µg/ml DAPI oldatot pipettáztunk, 10 perc 25°C-on sötétben történő inkubálás után PBS pufferrel majd ultra tiszta vízzel (MQ) mostuk a sejteket. A DAPI-val festett sejteket DAPI (Nikon, Japan) filterrel vizsgáltuk.

A preparátumokat Episcopic Fluorescent Attachment V-FM-feltétell ellátott Nikon Eclipse E400-as mikroszkóppal vizsgáltuk. Az UV fényforrást nagynyomású Hg-gőzlámpa biztosította (Nikon, Japan). A hibridizációs próba jelét a G2-A (EX 510-560nm, DM 575nm, BA 590nm) szűrő segítségével, a DAPI által jelzett sejteket a DAPI szűrővel (EX 340-380, DM 400, BA 435-485) detektáltuk 40x Plan Fluor (Nikon, Japan) és 100x Plan Fluor (Nikon Japan) objektívekkel. A képeket SPOT INSIGHT Color (Diagnostic Instruments Inc., Michigan, USA) kamerával készítettük és a kamerához tartozó szoftverrel értékeltük.

### **5.4. Eredmények**

A talajszemcse-mikroba elválasztásának és a fixálás hatékonyságának optimalizálását, valamint a megfelelő hibridizációs körülmények beállítását célzó kísérleteink eredményeit az 5.4.1 és az 5.4.2 pontban, valamint az 5.1 táblázatban foglaltuk össze.

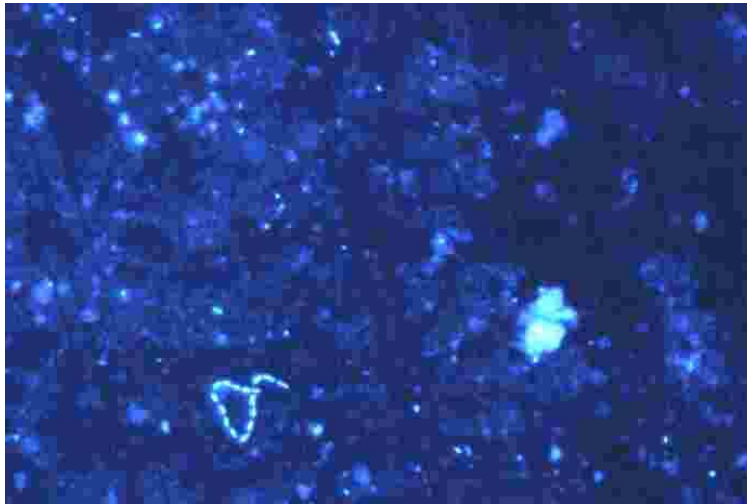
#### 5.4.1. Talajszemcse-mikroba elválasztásának, sejtek visszanyerésének és a fixálás hatékonyságának vizsgálata

5.1. táblázat: Talajszemcse–mikroba elválasztása, sejtek visszanyerése, fixálás hatékonyságának vizsgálata

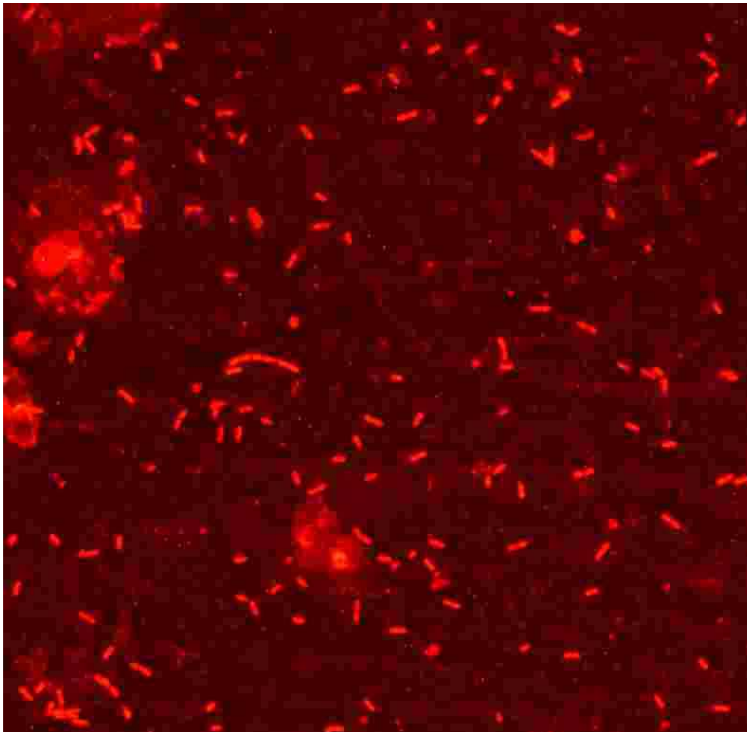
Minta	Talajszemcse mikroba elválasztása	Fixálás módja	Eredmény értékelése	Lehetséges megoldások
1. Kontroll talaj	Rázatás 2h	Formalin 3.5 %	DAPI festéssel sok sejt látszik (2. Kép), az EUB338 próbával csak ennek kis hányada hibridizált Lehetséges okok: 1. Csak a baktériumhoz köt a próba, sok gomba volt a talajban, 2. A fixálás nem megfelelő, a hibridizációs próba bejutása a sejtekbe gátolt, egyéb permeabilizációt elősegítő kezelésre is szükség van	A hibridizáció optimalizálása a hibridizációs pufferben beállított különböző formamidkoncentrációkkal. Permeabilizáció lizozimmal, proteináz K-val, 1M HCl-lel
2. Kontroll talaj + <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rázatás 2h	Formalin 3.5 %	A talajhoz adott inokulum visszanyerése hatékony, ugyanakkor más talajmikroorganizmusok nem hibridizáltak az EUB 338-as próbával. Fixálás hatékony volt, a DAPI-val megfestett sejtek mennyisége megegyezik az EUB 338-as próbával hibridizált sejtek mennyiségével. (3. Kép)	
3. Kontroll talaj	Ultrahang 5 min	Formalin 3.5 %	Nagyon kevés sejt látszik a DAPI-val festett mintában, a talajszemcse-mikroorganizmus elválasztás nem volt megfelelő, vagy 5 min ultrahang már károsította a sejteket	Hosszabb ultrahangos kezelés és utána a sejtek épségének vizsgálata
4. Kontroll talaj + <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ultrahang 5 min	Formalin 3.5 %	Visszanyerés gyenge hatásfokú volt, kevés apró sejt festődött DAPI festékkel, az EUB 338-as hibridizációs próba az összes megfestődött sejteknek csak nagyon kis százalékával hibridizált	
5. Kontroll talaj	Rázatás 2h	PFA 4%	DAPI festéssel sok sejt látszik viszont az EUB338 próbával csak ennek kis hányada hibridizált Lehetséges okok: 1. Csak a baktériumhoz köt a próba, sok gomba volt a talajban, 2.A fixálás nem megfelelő, a hibridizációs próba bejutása a sejtekbe gátolt, egyéb permeabilizációt elősegítő kezelésre is szükség van	Permeabilizáció lizozimmal, proteináz K-val, 1M HCl-lel
6. Kontroll talaj + <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rázatás 2h	PFA 4%	A talajhoz adott <i>Pseudomonas fluorescens</i> sejtek visszanyerése megfelelő, viszont a talaj mikroflórájának elválasztása a talajszemcséktől gyenge hatásfokú.	Hosszabb ultrahangos kezelés és ultrahanggal hosszabb ideig kezelt tiszta kultúrában a sejtek épségének vizsgálata
7. Kontroll talaj	Ultrahang 5 min	PFA 4%	DAPI festéssel sem látszanak sejtek, ultrahangos kezelés nem volt hatással a talajszemcse-mikroorganizmus deszorpcióra.	
8. Kontroll talaj + <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ultrahang 5 min	PFA 4%	Visszanyerés gyenge hatásfokú volt, kevés apró sejt festődött DAPI festékkel és az EUB 338-as hibridizációs próbával	

Az 5 perces ultrahangos kezelés hatását vizsgáltuk *Pseudomonas fluorescens* kultúrán. Az ultrahang nem károsította a sejteket, amelyek 5 perc elteltével még aktívan mozogtak.





5.1. kép DAPI festékekkel jelölt sejtek 3,5% formaldehiddel fixált kontroll talajban.



5.2. kép: *Pseudomonas fluorescens* inokulummal beoltott 3,5 % formaldehiddel fixált kontroll talaj szuszpenziójáról készített kép EUB 338-as próbával történő hibridizációt követően

#### **5.4.2. Talajszemcse-mikroorganizmus elválasztása centrifugálással és a permeabilizáció hatásának vizsgálata**

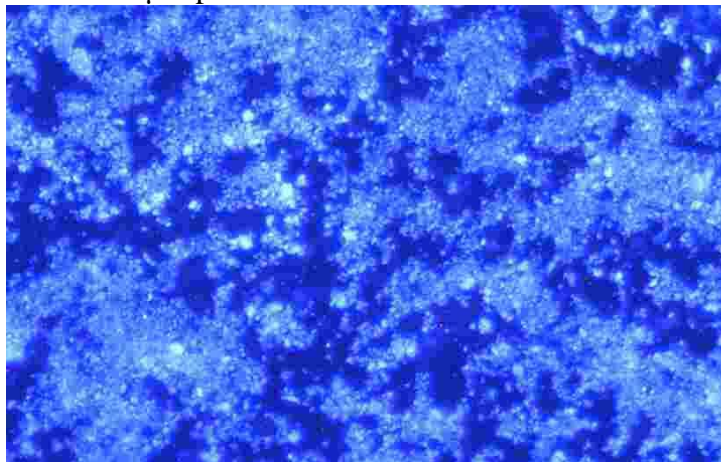
A mikroorganizmusok deszorpcióját talajszemcsékről a további kísérletekben 2 órás rázatással, azt követő ülepítéssel és a felülúszó centrifugálásával értük el. A felülúszókat 1000 rpm és 2000 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk, majd az új felülúszóból 12000 rpm fordulatszámon 5 perc centrifugálással gyűjtöttük össze a mikroba pelletet.

A hibridizációs próba sejtbe jutásának elősegítésére lizozimmal, proteináz K-val, 1M HCl-lel kezeltük a sejteket.

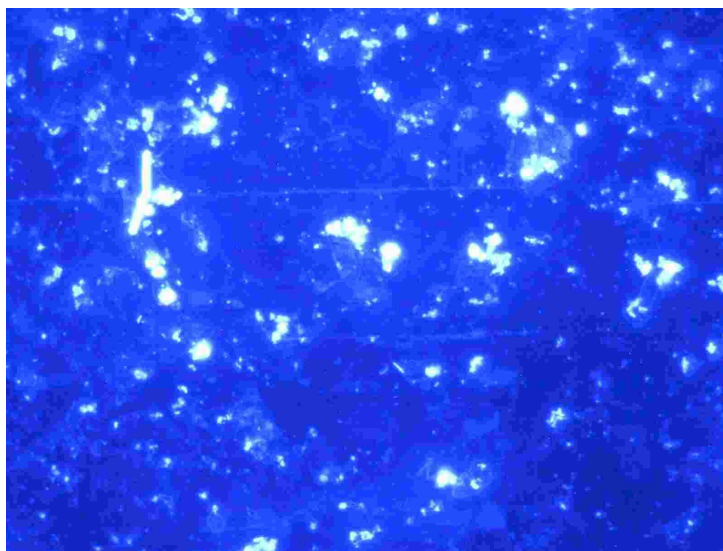
A frissen elkészített 4%-os PFA oldatot a talajszuszpenzióhoz adtuk, majd egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk. G+ sejtek esetében az irodalom etanolos fixálást javasol, ezért a talajszuszpenziókat 50% etanollal is fixáltuk.

#### Talajszemcse-mikroorganizmus elválasztása

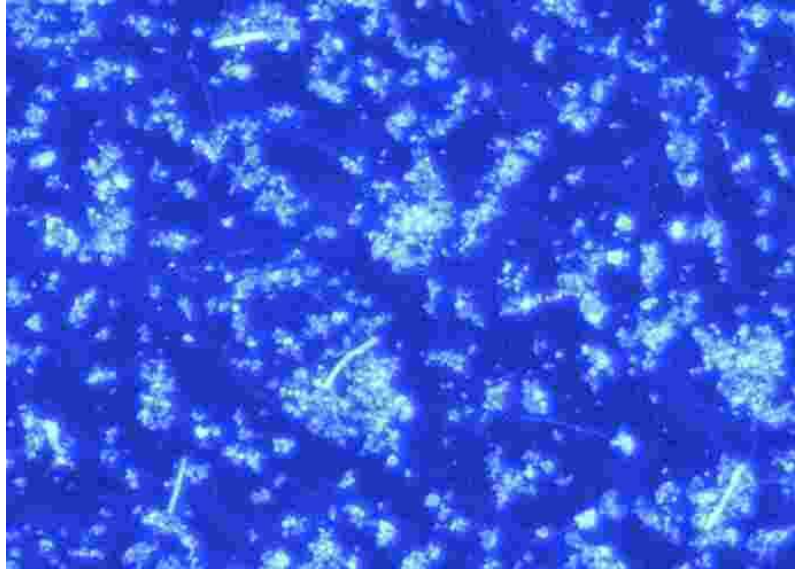
A DAPI-val festett minták vizsgálata során megállapítottuk, hogy a rázatás után közvetlenül a felülúszóból, és az ülepedést követően a felülúszóból nyert szuszpenzióban a talajszemcsék nagy aránya zavarta a kiértékelést (5.3. kép), a mikroorganizmusok elválasztása a talajszemcséktől nem volt megfelelő. Az 1000 rpm fordulatszámon centrifugált szuszpenzió felülúszójából vett mintában a talajszemcsék aránya jelentősen kevesebb volt (5.4. Kép). A 4. kísérletben, 2000 rpm fordulatszámon történő centrifugálás során feltehetőleg a mikroorganizmusok egy részét a talajjal együtt lecentrifugáltuk. A tökéletesebb elválasztás érdekében további kísérletekre van szükség. Az elválasztás problémájára megoldás lehet a talajszuszpenzió átszűrése 40 µm pórusméretű szűrőn.



5.3. kép Az ülepedést követően a felülúszóból nyert és DAPI-val festett szuszpenzióban a talajszemcsék nagy aránya zavarta a kiértékelést.



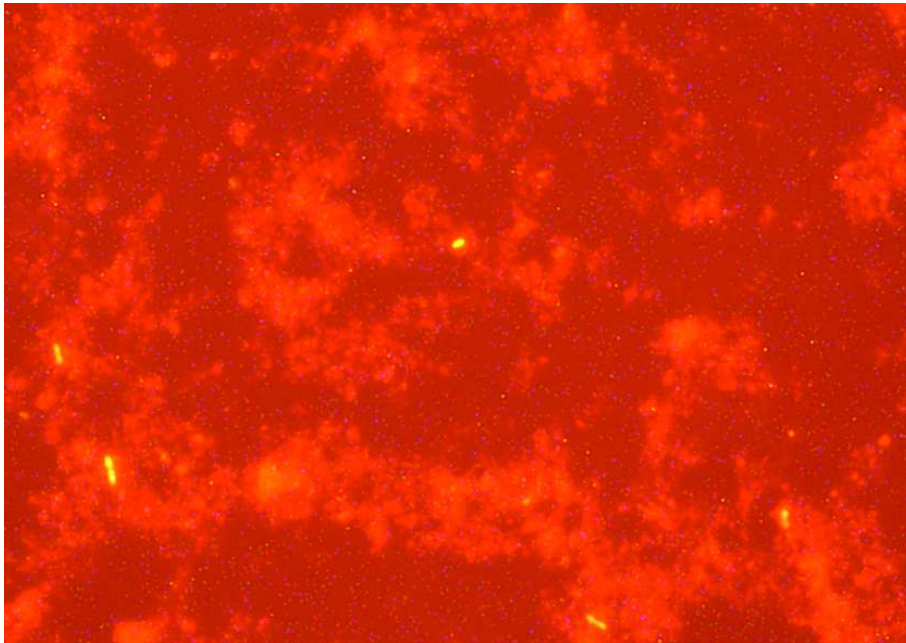
5.4. kép Az 1000 rpm fordulatszámon centrifugált szuszpenzió felülúszójából vett mintában a talajszemcsék aránya jelentősen kisebb volt. (DAPI-val festett minta)



5.5. Kép 2000 rpm fordulatszámon történő centrifugálás során a talajjal együtt feltehetőleg a mikrobák egy részét lecentrifugáltuk.

#### Permeabilizáció hatása

Az etanollal fixált sejtek lizozim, lizozim + proteináz K keverék, 1 M HCl hatására lizáltak, a mintákban nem maradtak ép sejtek. A PFA-val fixált szuszpenziók esetében (5.6. kép) csak a lizozimmel kezelt kísérletben detektáltunk több mikrobát, mint a kontroll mintában.



5.6. Kép EUB 338-as univerzális próbával hibridizált, PFA-val fixált és lizozimmel permeabilizált sejtek

További lépések a FISH módszer fejlesztésére talaj mikroorganizmusok detektálására

- A mikroorganizmus-talajszemcse elválasztása további talaj diszpergálását gyorsító, mikrobákat deszorbeáló adalékanyagokkal, mint pl. nátrium-pirofoszfát, PEG6000, Chelex, PVPP és rövidebb rázatási idővel
- A szuszpenzióból a talajszemcsék elválasztása 40µm pórusméretű szűrőn
- A hibridizáció optimalizálása a hibridizációs pufferben beállított optimális formamidkoncentrációval

További célok

- Szennyezőanyag hatására a talaj mikroorganizmus közösségben bekövetkező változások detektálása, monitoringja, a mikroorganizmusok adaptációjának nyomon követése szerves szennyezőanyag és nehézfémek hatására
- Speciális enzimek indukciójának vizsgálata mRNS-re tervezett hibridizációs próbákkal.
- Új, speciálisan kötődő fluoreszcens festékek szintetizálása és kipróbálása

#### Irodalomjegyzék az 5. fejezethez

- Amann, R. I.**, Krumholz, L. and Stahl, D.A. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172, 762-770.
- Amman, R.I.** et al. 1995. Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
- Bader, J.L.**, Gonzalez, G., Goodell, P.C., Ali, A.S., Pillai, S.D. (1999): Aerobic reduction of hexavalent chromium in soil by indigenous microorganisms. *Bioremediation J.* 3, 201-211.
- Bossio, D.A.**, Scow, K.M. (1995): Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4043-4050.
- 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.
- Cervantes, C.**, Vaca, S. (1991): Chromates resistance and detoxification in Bacteria. *Revista Latinoamericana de Microbiologia* 33, 71-76.
- Cervantes, C.** (1995): Bacterial resistance to arsenic compounds. *Revista Latinoamericana de Microbiologia* 37, 387-395.
- Cervantes, C.**, Chavez, J., Vaca, S (1991): Mechanisms of bacterial resistance to heavy metals. *Revista Latinoamericana de Microbiologia* 33, 61-70.
- DataMost** (1994): StatMost for Windows - Statistical analysis and scientific graphics. DataMost Corporation, Salt Lake City.
- Dobler, R.**, Saner, M., Bachofen, R.. (2000): Population changes of soil microbial communities induced by hydrocarbon and heavy metal contamination. *Bioremediation J.* 4, 41-56.
- Engelen, B.**, Meinken, K., von Wintzingerode, F., Heuer, H., Malkomes, H.P., Backhaus, H. (1998): Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2814-2821.
- Garland, J.L.**, Mills, A.L. (1991): Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2351-2359.
- Garland, J.L.** (1996): Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential C source utilization. *Soil Biol. Biochem.* 28, 213-221.
- Gauch, H.G.** (1982): *Multivariate Analysis in Community Ecology*. 298 pp. Cambridge University Press, Cambridge.
- Haack, S.K.**, Garchow, H., Klug, M.J., Forney, L. (1995): Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1458-1468.
- Horvath, B.**, Gruiz, K. (1996): Impact of metalliferous ore mining activity on the environment in Gyongyosroszi, Hungary. *Sci. Total Environ.* 184, 215-227.

- Kelly, J.J., Tate, R.L.I.** (1998): Use of BIOLOG for the analysis of microbial communities from zinc-contaminated soils. *J. Environ. Qual.* 27, 600-608.
- Knight, B.P., McGrath, S.P., Chaudri, A.M.** (1997): Biomass carbon measurements and substrate utilization patterns of microbial populations from soils amended with cadmium, copper, or zinc. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 39-43.
- 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'Donnell, A.G. and 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., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. and Schleifer, K.H.** 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclass of proteobacteria. Problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 593-600.
- Roane, T.M., Kellogg, S.T.** (1996): Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. *Can. J. Microbiol.* 42, 593-603.
- 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.
- Schönhuber, W., Fuchs, B., Juretschko, S. and Amann, R.** 1997. Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3268-3273
- 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.
- Smalla, K., Wachtendorf, U., Heuer, H., Liu, W.T., Forney, L.** (1998): Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1220-1225.
- 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. and Amann, R.** 1991. Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics. In *Sequencing and Hybridization Techniques in Bacterial Systematics*, 205-248. Ed. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M.. Chichester: Wiley.
- Thalmann, A.** 1968. Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtsch. Forsch.* 21:249-258.
- Van der Meer, J. R., Devos, W. M., Harayama, S., Zehnder, A. J. B.,** 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.* 56, 677-694.
- 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.
- Woese, C.R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271.
- Zak, J.C., Willig, M.R., Moorhead, D.L., Wildman, H.G.** (1994): Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach. *Soil Biol. Biochem.* 26, 1101-1108.