

Meetodid mulla-ja veemikrobioloogias

1. Bakterite arvukuse määramine

1.1. Elusrakkude arvukus

1.1.1. Väljakülvide meetod tardsöötmele (*plate count, CFU*)

Seda nimetatakse ka Kochi meetodiks ja eelduseks on, et igast tardsöötmele külvatud elusrakust areneb üks koloonia. Seetõttu nimetatakse ka neid elusrakke kolooniaid moodustavateks ühikuteks (*colony-forming units*). Esmalt tehakse detsimaalsete lahjenduste rida uuritavast veest või mullast steriilitud kraanivette või füsioloogilisse lahusesse. Seejärel tehakse lahjendustest pindkülv spaatliga toiteagarile ja asetatakse need sobiva temperatuuri juurde kasvama. Tekkinud kolooniad loendatakse teatud aja möödudes. Hinnatakse, et 1-5% bakterite tegelikust arvust kasvab välja agarplaatidel.

1.1.2. Piiralahjenduste meetod (*most probable number, MPN*)

Meetod põhineb uuritavast materjalist lahjenduste tegemisel ja lahjenduste reast väljakülvidel vedelsöötmetega katseklaasidesse. Eeldusel, et väljakülvatavas materjalis on mikroobid ühtlaselt jaotunud ning kasvuks väljakülvis piisab ühe mikroobiraku sattumisest söötmesse, koostatakse positiivsete katseklaaside arvust sõltuvalt tingnaitaja, mille järgi otsitakse McCrady tabelist arv, mis näitab uuritavate mikroobide tõenäost hulka 1 ml-s selles lahjenduses, kus viimati registreeriti maksimaalne kasv.

1.2.1. **Bakterite arvukuse otsene määramine valgusmikroskoobis** (*direct microscopic count*). Uuritav veeproov või mullasuspensioon filtreeritakse läbi membraanfiltritri. Filtrile jäävad rakud värvitakse spetsiaalsete värvidega ja värvunud rakud loendatakse sõltuvalt värvi tüübist kas valgus- või epifluoresentsmikroskoobis. Vt. allpool ka meetodit FISH.

2. **Biomassi otsene määramine:** fumigatsioon-ekstraktsioon (FE) ja FAME (Fatty Acid Methyl Ester Analysis). **FE** :muld inkubeeritakse kloroformi aurudes. Mullast ekstraheeritakse lahustunud rakusisaldised KCl või K₂SO₄ lahusega. Lahusest määratakse C, N, S või P kontsentratsioon. FAME: mikroobide membraanide koostises olevad lipiidid ekstraheeritakse mullast või veest, muudetakse estriteks ja kogus määratakse kõrgsurvevedelikkromatograafil.

3. **Biomassi kaudne määramine:** substraadi poolt indutseeritud hingamine (SIR). Mullaproovile lisatakse C-allikas (glükoos, org. happed, aminohapped) ja seejärel mõõdetakse eraldunud CO₂ kogust.

Maksimaalne algne hingamisintensiivsus on proportsionaalne mulla mikroobide biomassiga.

4. **Seente biomassi määramine** toimub ergosterooli järgi, kasutades HPLC (kõrgsurvevedelikkromatograaf) või spektrofotomeetrit (282 nm).

5. **Mikroobide aktiivsuse määramine:** mõõdetakse erinevate ensüümide aktiivsusi. N- ringe: nitrogeen (atsetüleeni redutseerimine etüleeni C₂H₂→C₂H₄, ¹⁵N₂-sidumine), N-mineralisatsioon, nitrifikatsioon, denitrifikatsioon (atsetüleeni inhibitsiooni meetod- N₂O-reduktaas inhibeeritakse), proteaas, ureaas. C- ringe: tsellulaas, ksülanaas, kitinaas, lipaas, β-glükosidaas. Fosforiringe: fosfataas, fosfodiesteraas, fosfomonoesteraas. Väävliringe: arüülsulfataas. Rakusisene metabolism: katalaas, dehüdrogeen.

6. **Mikroobide kasvukiiruse (produktiooni) määramine.** Põhineb [³H]tümidiini koguse määramisel, mis seotakse DNA sünteesi käigus mullast või veest

Mikroobikoosluse struktuuri määramine

1. **PLFA** : mikroobikoosluse struktuur määratakse fosfolipiidide struktuuri alusel. Fosfolipiide leidub üksnes mikroobide membraanides. Fosfolipiidid ekstraheeritakse mullast, muudetakse rasvhapete metüülestriteks ja identifitseeritakse gaaskromatograaf-massspektromeetril või kõrgsurve-vedelikkromatograafil. Tulemust interpreteeritakse mitmemõõtmelise analüüsi abil.

2. **Koosluse metaboolne profiil.** Selle meetodi puhul kasutatakse C-allikate komplekti koos redoksvärviga. Levinum on Biolog (<http://www.biolog.com>) mikroplaatide kasutamine. Tulemust interpreteeritakse mitmemõõtmelise analüüsi abil.

3. **FISH** (fluorescence in situ hybridization). Kasutatakse fluorestseeruva märgisega oligonukleotiidide, mis seonduvad rRNA –le. Märgisega rakud loendatakse epifluoresentsmikroskoobi abil.

4. Molekulaarsed meetodid mikroobikoosluse struktuuri uurimisel.

Mikroobikoosluste uurimisel rakendatavad molekulaarsed meetodid võib laias laastus jagada kaheks: osaliseks ja täielikuks koosluse DNA analüüsiks (*partial and whole community DNA analysis*). Osalise analüüsi puhul keskendutakse vaid osale genoomist, markergeenidele, mis amplifitseeritakse PCR-i meetodi abil. Täieliku koosluse analüüsi puhul püütakse uurida kogu informatsiooni, mida eraldatud DNA sisaldab.

Koosluse DNA täielikul analüüsil kasutatakse näiteks kogu genoomse DNA rist-hübridisatsiooni (*total genomic cross-DNA hybridization*), mille puhul eraldatakse ja puhastatakse koosluse DNA ning ühe koosluse DNA hübridiseeritakse teise koosluse DNA-ga. Selle meetodiga saab uurida, kui suur on erinevate koosluste sarnasus. Koosluse enda mitmekesisust saab uurida meetodiga, mille puhul DNA denatureeritakse ja homologsetel üheaahelalistel DNA lõikudel lastakse peale seda renatureeruda (*thermal denaturation and reassociation of whole extracted DNA*). Vastavalt renatureerunud ahelate arvule ajas saab määrata koosluse mitmekesisust.

Koosluse DNA osalise analüüsi puhul uuritakse PCR-i abil kordistatud markerjärjestusi. Markeriteks on enamasti ribosomaalse operoni geenid, kuid kasutust on leidnud ka ribosomaalsete geenide vaheline intergeenne piirkond ja mitte-ribosomaalsed järjestused, näiteks rep-järjestused või juhuslikult genereeritud polümorfused markerid. Analüüsiks kasutatakse kas PCR-i fragmendi klonereimist, millele järgneb restriktsoon- ja/või sekveneerimisanalüüs või geneetilist tüpeerimist (*genetic fingerprinting*). Klonereimismeetodiga on võimalik määrata koosluse liigilist koosseisu ning olemasolevate järjestuste andmebaasi abil saab uusi tüvesid seostada juba identifitseeritudetega. Meetodi peamiseks puuduseks on töö suur maht, kuna koosluse mitmekesisuse tõepäraseks kirjeldamiseks tuleb läbi uurida suur hulk kloonide.

Geneetilise tüpeerimise puhul paljundatakse markerjärjestused PCR-i meetodi abil ja fragmendid eraldatakse agaros- või polüakrüülamiidgeelil vastavalt nende erinevustele pikkuses või primaarjärjestuses. Tulemuseks on kompleksne triibumuster, nn. koosluse "sörmejalg", mis iseloomustab kas kogu kooslust või osa sellest, olenevalt valitud praimeritest. Geneetilise tüpeerimise meetodid on lihtsalt teostatavad ja kiired ning sobivad väga hästi erinevate bakterikoosluste omavaheliseks võrdlemiseks. Välja on töötatud mitmeid meetodeid, mis põhinevad sellel printsiibil.

amoA geeni kasutamine molekulaarse markerina

amoA geen kodeerib ammoniaagi monooksügenaasi α -alaühikut. *AmoA* esineb kõigil autotroofsetel AOB-l. *AmoA* geeni analüüsiks konstrueeritud praimeritepaar on võimeline amplifitseerima ammoniaagi monooksügenaasi α alaühiku 491 nt pikkust fragmenti. Kahjuks on sellel meetodil ka omad puudused: nimelt ei ole heterotroofsed AOB-d märklauaks *amoA* praimeritele, seetõttu *amoA*-l põhinevad lähenemised alahindavad nitrifitseerijate funktsionaalset mitmekesisust. Teiseks puuduseks on asjaolu, et Proteobakterite γ -klassi kuuluvate metanotroofide metaani monooksügenaasi (*mmo*) geen ja *amoA* geen γ -klassi AOB on palju lähemalt seotud kui γ -klassi *amoA* ja β -klassi *amoA* geenid. Sellest järelduvalt pole võimalik molekulaarse märklauana kasutada γ -klassi *amoA*-d koos β -klassi *amoA*-ga ilma, et samaaegselt poleks märklauaks ka *mmo* geen metaani oksüdeerijatel Kolmandaks võib *amoA* geenikoopiate arv varieeruda (tavaliselt genoomis 2 - 3 tükki), mis muudab hindamise keeruliseks.

Jaanis Juhanson i lõputöö 2003

DGGE põhimõte

Denatureeriva gradiendi geel-elektroforeesiga on võimalik eraldada ühepikkusi, kuid erineva primaarjärjestusega DNA fragmente. Kaheaheelised DNA fragmendid elektroforeesitakse läbi polüakrüülamiidgeeli, mis sisaldab denaturantide lineaarset gradienti. Denaturantidena kasutakse kas segu uureast ja formamiidist või temperatuuri, viimasel juhul nimetatakse meetodit temperatuuri gradiendi geel-elektroforeesiks (TGGE). Fragmentide eraldamine põhineb nende erinevatel sulamistemperatuuridel. Kaheaheelise DNA fragmendi sulamine denaturandi kontsentratsiooni või temperatuuri tõustes toimub spetsiifilise mustril põhjal. Teatud pikkusega osad DNA fragmendist, mida nimetatakse sulamisdomäänideks, sulavad kooperatiivselt sulamistemperatuuri T_m juures. Sulamisdomäänid võivad olla 25 kuni mitmesaja aluspaari pikkused. Kahe kõrvuti asetseva domääni T_m -id võivad erineda mitme kraadi võrra ja olla üsna teravalt piiritlevad DNA fragmentide eraldamise aluseks DGGE abil on põhimõte, et primaarjärjestus mõjutab domääni T_m -i ja DNA fragmendi konformatsioon mõjutab tema liikumist geeli maatriksis. DNA molekul elektroforeesitakse läbi polüakrüülamiidgeeli, mis sisaldab DNA denaturantide lineaarset gradienti. DNA molekul siseneb geeli kaheaheelisena ja liigub edasi vastavalt oma molekulmassile. Kui fragment jõuab geelis positsioonile, kus denaturandi kontsentratsiooni ja puhvri temperatuuri koosmõju moodustavad madalaima sulamisdomääni T_m -i, domään hargneb ja fragment takerdub oma hargnenud osaga geeli maatriksis ning tema liikumine aeglustub. Kui denaturantide gradient on õigesti valitud, aeglustuvad teineteisest kas või ainult ühe aluspaari võrra erinevad fragmendid geelis erinevatel positsioonidel ja eralduvad teineteisest foreesi lõpuks.

Liis Kärme lõputöö 2001

Mulla ja vee mikroobikoosluste võrdlemiseks kasutatakse erinevaid geneetilise tüpiseerimise meetodeid. Kõige rohkem kasutatakse 16S rDNA analüüsil põhinevaid meetodeid (**DGGE**- denatureeriva gradiendiga geeli elektroforees, **TGGE**- temperatuuri gradiendi geeli elektroforees, **RFLP**- restriktiooni fragmendi pikkuse polümorfism, **ARDRA**- amplifitseeritud ribosomaalse DNA restriktiooni analüüs). Temperatuuri gradiendi geeli elektroforeesil eraldatakse ühepikkused, kuid erineva järjestusega DNA fragmendid. Meetodi lühikirjeldus: DNA eraldatakse mulla ja veeproovidest, 16S rDNA lõigu amplifitseerimiseks kasutatakse spetsiaalseid GC-klambriga primereid. Amplifitseeritud geenifragmendid eraldatakse geelil temperatuuri või denaturandi gradiendi elektroforeesi aparatuuris. Saadud geeli mustreid võrreldakse omavahel, samuti võib geelist eraldatud 16S rDNA fragmendid sekveneerida. Markergeenidena võidakse DGGE/TGGE meetodi puhul kasutada ka funktsionaalseid gene, näiteks fenooli hüdrokulaas, ammoniaagi monooksügenaas.

DGGE/TGGE (denaturing and thermal gradient gel electrophoresis), **ARDRA** (amplified ribosomal DNA restriction analysis) ja **T-RFLP** (terminal restriction fragment length polymorphism) analüüs. Koosluse DNA ekstraheeritakse ja 16 S rRNA geenid amplifitseeritakse PCR abil (kasutades kas universaalseid, domääni- või rühmaspetsiifilisi primereid. DGGE/TGGE puhul toimub erineva DNA järjestusega PCR produktide lahutamine denatureeriva või temperatuuri gradiendi geelis.

T-RFLP puhul kasutatakse fluorentsismärgisega primereid. Peale PCR kasutatakse 2-4 restriktiooni ensüümi, fragmendid eraldatakse ABI automaatse sekveneerija abil. Meetod vähemalt 5 korda tundlikum kui DGGE/TGGE (detekteeritavate ribotüüpide arv on 5 korda suurem).

ARDRA põhineb PCR produktide restriktsoonianalüüsi fragmentide polümorfismil ja on suurema eraldusvõimega kui T-RFLP, sest kasutatakse kõiki restriktiooni fragmente. Meetod sobib kasutamiseks nii mikroobikoosluste kui ka üksikute tüvede võrdlemiseks. Lisainfo: <http://www.cme.msu.edu/RDP>.

Järjest rohkem kasutatakse mikroobikoosluste uurimisel funktsionaalseid geene. Näiteks on uuritud järgmiste geenide mitmekesisust keskkonnaproovides: *nirS* ja *nirK* – nitriti reduktaas, *dsrAB* - sulfiti reduktaas; *amoA* – ammoniaagi monooksügenaas; *mcr* – metüülkoensüüm M reduktaas. Peamiselt leiavad funktsionaalsed geenid rakendust DGGE ja RFLP analüüsil.

Stabiilsete isotoopide kasutamine mikroobikoosluse uurimisel (*stable-isotope probing SIP*). Seda meetodit kasutatakse aktiivsete bakteripopulatsioonide kindlaks tegemiseks. Keskkonnaproovile lisatakse C^{13} isotoobiga märgistatud substraati, aktiivselt seda substraati metaboliseerivad bakterid lülitavad selle isotoobi oma DNA ja RNA. Koosluse DNA/RNA eraldatakse proovist ja DNA/RNA fraktsioneeritakse vastavalt C^{13} ja C^{12} isotoobi sisalduse järgi ning edasi kasutatakse molekulaarseid meetodeid (DGGE, reaallaja PCR; klonimine).

RISA: Mikroobikoosluse struktuuri analüüsiks kasutatakse ribosomaalse operoni intergeense vaheala analüüsi. Ribosoomi suurt ja väikest alaühikut kodeerivate geenide vahelise piirkonna (vaheala) amplifitseerimiseks kasutatakse spetsiaalseid primereid. Amplifitseeritud produktid lahutatakse geelis. Saadud geeli mustreid võrreldakse omavahel, samuti võib geelist eraldatud DNA fragmendid sekveneerida.

RAPD (random amplified polymorphic DNA). Selle meetodi puhul kasutatakse lühikesi juhuslikke primereid (ca 10 bp), mis seonduvad genoomse DNA erinevatele kohtadele. Tekkinud PCR produktid on erineva pikkusega ja need eraldatakse geelil. Meetod võimaldab võrrelda erinevaid mikroobikooslusi, kuid ei anna informatsiooni koosluste struktuuri (liigilise koosseisu) kohta.

G+C analüüs: guaniini ja tsütosiini (G+C) sisalduse analüüs on väiksema lahutusvõimega kui eelpool loetletud meetodid. Meetod põhineb asjaolul, et prokarüootide DNA G+C suhe varieerub vahemikus 24-76% ja kindlate taksonoomiliste rühmade G+C suhe varieerub vahemikus 3-5%. Suure (60-75%) G+C suhtega organismid on enamasti obligaatsete aeroobid oksüdatiivse metabolismiga, väikese G+C suhtega organismid on fermentatiivse metabolismiga. DNA eraldatakse mullast, töödeldakse spetsiaalse värviga, mis seonduv A-T rikastele DNA piirkondadele, ning tsentrifuugitakse ScCl gradiendis. Sellele järgneb fraktsioneerimine ja analüüs spektrofotomeetrial. G+C suhtel põhinevale DNA fraktsioneerimisele võib järgneda eraldatud DNA fraktsioonide sekveneerimine.

Mikroobikoosluse mitmekesisuse hindamine reassoitsiooni kineetika põhjal. DNA eraldatakse mullast, denatureeritakse üheaahelaliseks DNA-ks ja määratakse selle reassoitsiooni kiirus. Mida rohkem on erinevaid DNA ahelaid, seda aeglasem on reassoitsiooni kiirus.

PCR reaallajas (real-time PCR) See meetod töötati välja 1996 ja põhineb DNA fragmentide amplifikatsiooni jälgimisel reaallajas kasutades fluorestsentsmärgiseid. Analüüsi tulemusena saadakse amplifikatsioonikõverad, mille põhjal on võimalik hinnata algset DNA (matriits, *template*) kogust (absoluutne ja suhteline kvantitatiivne analüüs). Kvantitatiivset reaallaja PCR kasutatakse mikrobioloogias mikroobitüvede ja funktsionaalsete geenide detekteerimiseks, samuti PCR optimeerimiseks. Kuna aparatuur on kallid, siis peamiselt selle meetodi kasutusvaldkonnad on seni olnud meditsiiniline ja toiduainete mikrobioloogia. Meetodi üheks puuduseks on see, et mingi mikroobide funktsionaalse rühma DNA kogus keskkonnas ei pruugi peegeldada seda, kui suur osa sellest rühmast tegelikult on aktiivne.

Probleemid molekulaarsete meetodite kasutamisel: DNA-l põhinevad meetodid sõltuvad DNA eraldamise kvaliteedist. Erinevad bakterid lüüsuvad erinevalt, seega on võimalik et osa bakterirakke ei lüüsu üldse. Praimerite järjestused, mida kasutatakse, on koostatud publitseeritud järjestuste põhjal, mis ei pruugi adekvaatselt kajastada mittekultiveeritavate bakterite järjestusi. Polümeraasi ahelreaktsiooni käigus võivad tekkida kimeersed produktid.

Mikrokiipide kasutamine vee-ja mullamikrobioloogias

Põhiliselt on kiipe kasutatud geeniekspressiooni uurimiseks. Mikrobiökoloogias on kasutusel järgmised kiibi variandid:

Funktsionaalsete geenide kiibid (FGA *functional gene array*), mida rakendatakse funktsionaalsete geenide mitmekesisuse uurimiseks keskkonnas. Näiteks lämmastikuringega seotud geenide (ammoniaagi monooksügenaas *amoA*, nitriti reduktaas *nirS*, *nitK*, metaani monooksügenaas *pmoA*) uurimiseks.

Koosluse genoomsed kiibid (CGA *community genome array*), mille abil uuritakse mikroobikoosluse liigilist koosseisu.

Fülogeneetilised oligonukleotiidide kiibid (POA *phylogenetic oligonucleotide array*), mis põhinevad 16S rDNA põhjal konstrueeritud oligonukleotiididel. Sellised kiibid võimaldavad eristada baktereid erinevatel taksonoomilistel tasemetel.

Probleemid kiipide kasutamisel: keskkonna uuringutes on uuritav materjal (DNA) väga mitmekesine, sisaldab ühendeid mis häirivad DNA hübridisatsiooni kiibil, ning eraldatava DNA kogus on väike.

Metagenoomika

Metagenoomikat defineeritakse kui keskkonnaproovist pärinevate mikroobigenoomide (kollektiivset) funktsionaalset ja geenijärjestustel põhinevat analüüsi. Analüüsi neli põhietappi on järgmised:

- 1) geneetilise materjali isoleerimine
- 2) geneetilise materjali manipuleerimine
- 3) raamatukogu koostamine
- 4) geneetilise materjali analüüsimine (metagenoomi) raamatukogus

Keskmesed järjestuste pikkused on kas < 15kb või suuremad kui 40 kb

Vt lisa: <http://www.bioteach.ubc.ca/Biodiversity/Metagenomics/>

Reaalaja PCR on äärmiselt tundlik meetod nukleiinhapete määramiseks ja kvantifitseerimiseks. Meetod põhineb iga amplifikatsioonitsükli ekstensioonifaasi lõpus toimival fluorestsentssignaali mõõtmisel. Signaali saamiseks kasutatakse reaktsioonisegus fluorestseeruva märgisega komponente, millesteks võivad olla praimerid, oligonukleotiidiproovid või ainult kaheahelisele DNA-le (ehk PCR produktile) seonduv värvaine. Protsessis tekkiv signaal on otseselt seotud proovi hübridisatsiooniga või märgistatud komponendi ja amplikoni interaktsiooniga. Produkti koguse kasvades saadakse ka järjest tugevam fluorestsentssignaal ja produkti kogunemise ajaline dünaamika on kirjeldatav sigmoidse kujuga kõvera abil. Amplifikatsiooniproducti on võimalik kvantifitseerida kõvera eksponentsiaalse faasi algul, kui produkti tekkest saadud signaal ületab nn. mürataseme signaali 10 kordselt. Hilisem fluorestsentssignaali analüüs võimaldab lihtsalt näidata ka mittespetsiifiliste amplifikatsiooniproductide võimalikku tekkimist.

Jaanis Juhanson magistritöö, 2005