

UPORABA OLIGONUKLEOTIDNIH SOND IN PRETOČNE CITOMETRIJE ZA ANALIZO BAKTERIJSKE ZDRUŽBE V BIOLOŠKIH ČISTILNIH SISTEMIH

Luka LIPOGLAVŠEK^{a)} in Gorazd AVGUŠTIN^{b)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija.

^{b)} Isti naslov, izr.prof., dr., mag.

Delo je prispelo 1999-10-07, sprejeto 2000-04-10.

Received October 07, 1999, accepted April 10, 2000.

IZVLEČEK

Proučevanje združbe mikroorganizmov v aktivnem blatu z obstoječimi mikrobiološkimi metodami predstavlja nerešljiv problem, kadar želimo ugotavljati ne le število vseh mikroorganizmov v vzorcu temveč tudi število bakterij specifičnih bakterijskih subpopulacij. Opisali smo metodo za hitro analiziranje aktivnega blata z uporabo dveh različno označenih oligonukleotidnih sond in pripadajočih detektorjev fluorescence pretočnega citometra. S pomočjo sond EUB338-Cy3 in fD1-FITC, specifičnih za vse bakterije, smo postavili model in ga preizkusili s 16S rRNK sondo NSO190-FITC, specifično za kemolitotrofne oksidatorje amonija iz β -podskupine proteobakterij. Ugotovili smo, da je bilo v vzorcu 16,3% bakterij, ki jih prepozna omenjena sonda. Kot možno izboljšavo smo preizkusili učinek tripano modrega na avtofluorescenco in fluorescence s sondami hibridiziranih celic. Tripansko modro zniža raven zelene avtofluorescence in nespecifične fluorescence, ne vpliva pa na fluorescence specifično hibridiziranih celic.

Ključne besede: čistilni sistemi / biološki čistilni sistemi / aktivno blato / mikrobiologija / bakterije / analitske metode / rRNK sonde / pretočna citometrija / oksidatorji amonija

THE USE OF FLOW CYTOMETRY AND OLIGONUCLEOTIDE PROBES FOR BACTERIAL COMMUNITY STRUCTURE ANALYSIS IN BIOLOGICAL WASTEWATER TREATMENT SYSTEMS

ABSTRACT

Investigation of microbial community structure in activated sludge is often complicated. When not only total bacterial counts, but also counts of bacterial subpopulations are to be determined, existing methods are not successful. In the present article, a method for analysis of activated sludge with two, differently labelled oligonucleotide probes and affiliated flow cytometric detectors is described. Oligonucleotide probes EUB338-Cy3 and fD1-FITC, specific for all bacteria were used to set the experimental model for flow cytometry analysis. This model was then used to analyze activated sludge sample with 16S rRNA targeted probe NSO190-FITC, specific for ammonia oxidizing bacteria from β -subclass of *Proteobacteria*. In the examined sample 16.3% of bacteria hybridized with this probe. Finally, effects of tripan blue on cell autofluorescence and probe-specific fluorescence were investigated. Tripan blue did not alter the FITC-probe-specific fluorescence, while the level of autofluorescence and nonspecific fluorescence dropped.

Key words: wastewater treatment systems / biological wastewater treatment systems / activated sludge / microbiology / bacteria / analytical methods / rRNA probes / flow cytometry / ammonia-oxidizing bacteria

UVOD

S čiščenjem komunalnih in industrijskih odpadnih vod pred izpustom v vodotoke precej zmanjšamo obremenjevanje okolja. Za čiščenje komunalnih in nekaterih industrijskih odpadnih vod predstavlja najpomembnejši del procesa t.i. biološko čiščenje (Brock in sod., 1994). To temelji na sposobnosti organizmov, večinoma mikroorganizmov, med katerimi prevladujejo bakterije, da iz vode privzemajo organske in anorganske snovi, ter jih uporabljajo kot hranila za svojo rast. Glavna namena biološkega čiščenja sta zmanjšanje biološke potrebe po kisiku v vodi in odstranitev prekomerne količine hranil, predvsem dušika in fosforja.

Vemo, da so najpomembnejši mediator transformacij v aktivni biomasi čistilnih sistemov bakterije in da je bakterijska združba aktivnega blata zelo pestra. Vsaka fiziološka skupina bakterij prispeva svoj delež k transformacijam, ki privedejo do odstranitve hranil iz sistema. Različne odpadne vode se lahko zelo razlikujejo po fizikalno kemičnih lastnostih, prav tako pa se lahko tudi zelo spreminjajo značilnosti vode na posamezni napravi. Nihanja v sestavi vode dostikrat vplivajo na učinkovitost čistilne naprave. Laboratorijski poskusi kažejo, da je sestava združbe odvisna od količine določenih hranil (Holben in sod., 1998; Prinčič in sod., 1998). Medtem ko lahko glavne presnovne spremembe merimo kemično, ni dosti znanega o odzivih posameznih skupin bakterij na spremembe v njihovem okolju. Preprosto določanje števila različnih bakterij, bi v kombinaciji z merjenjem aktivnosti omogočalo lažje spremljanje samega procesa.

Klasično določanje števila bakterij z gojitvenimi tehnikami je večinoma neprimerno. Raziskovalci ocenjujejo, da smo sposobni *in vitro* gojiti le od 1 do 15% bakterij iz vzorca aktivnega blata (Wagner in sod., 1993). Poleg tega so spoznali, da gojitvene metode niso primerne za opis vrstne pestrosti (Juretschko in sod., 1998), hkrati pa so dostikrat izredno zamudne.

Drugo možnost za kvantifikacijo predstavljajo molekulske biološke metode. Ena od njih je hibridizacija *in situ* (Amann in sod., 1990a). V osemdesetih letih so s preučevanjem ribosomskih genov začeli ugotavljati filogenetski položaj različnih mikroorganizmov (Woese, 1987). Danes je poznanih največ bakterijskih sekvenc 16S rRNK. Spoznali so tudi, da so nekateri predeli rRNK specifični za različne bakterijske skupine. Na podlagi teh podatkov lahko pripravimo oligonukleotide, s katerimi lahko označimo naprimer vse bakterije, β - proteobakterije ali samo eno bakterijsko vrsto. Ponavadi sonde označimo s fluorescentnim označevalcem, mikrobnne celice, ki jih označene sonde prepoznajo, pa odkrivamo s fluorescentnim mikroskopom. Hibridizirane vzorce lahko analiziramo tudi s pretočnim citometrom (Davey in Kell, 1996).

Pretočni citometer je aparat, ki s hitrostjo do nekaj tisoč celic na sekundo zazna nekatere lastnosti posamezne celice. Najpomembnejši del je pretočna celica, kjer se vzorec razporedi v tanek tok, v katerem so celice razporejene ena za drugo. Tok celic gre skozi tanek snop svetlobe, od celice odbito svetlobo pa zazna več detektorjev, ki jo pretvorijo v električni signal. Jakosti signala se nato pripiše vrednost. S tem je dogodek uvrščen na primeren kanal in osnovni rezultat analize je histogram, ki nam prikaže število celic (dogodkov) na vsakem od kanalov (grafikon 7). Dobimo lahko dva tipa podatkov o celici. Prvi tip predstavljajo odboji svetlobe pod različnimi koti, drugega pa fluorescence različnih valovnih dolžin.

Lastnost celic, da lomijo svetlobo, je že dolgo poznana. Merjenje optične gostote in merjenje odbite svetlobe pod pravim kotom, t.i. nefelometrija, se že dolgo uporabljata za približno oceno celične mase v raztopinah. Dejansko se svetloba na delcu razprši v vse smeri. Današnji pretočni citometri merijo dve značilnosti odboja svetlobe. Svetlobo, razpršeno pod majhnimi koti (2-15°), imenujemo prednji odboj (angl.: forward-scatter) in svetlobo odbito pod večjimi koti (15-90°), čemur pravimo stranski odboj (angl.: side-scatter). Prednji odboj se uporablja kot relativna mera za velikost celic (Sharpless in sod., 1977). Na stranski odboj najbolj vpliva refrakcijski indeks delca. Tako je stranski odboj merilo za granuliranost celice.

Z uporabo fluorescence se pokažejo vse zmožnosti pretočne citometrije. Prvo možnost uporabe predstavlja avtofluorescenca organizmov. To pogosto uporabljajo za zaznavo barvil v morskih algah. Pri večini drugih aplikacij pa predstavlja avtofluorescenca resen problem. Druga, precej širša je možnost uporabe fluorokromov. Različni fluorokromi fluorescirajo v različnih območjih svetlobnega spektra, zmeraj pa je valovna dolžina emitirane svetlobe daljša od vzbujevalne svetlobe. Zaradi različnih zamikov med vzbujevalno in emitirano svetlobo lahko tudi pri istem viru svetlobe opazujemo različne fluorescence. Tako pridemo do velikega števila parametrov, ki jih lahko spremljamo (Davey in Kell, 1996).

Dodatna možnost pretočne citometrije je fizično ločevanje celic - razvrščanje (cell sorting). Raztopino, ki preide pretočno celico, aparat razbije na drobne kapljice. Te vsebujejo največ eno celico in na osnovi podatkov, ki jih je analiziral pretočni citometer, se na želeni kapljici ustvari naboj. Na podlagi tega lahko določene celice - kapljice ločimo od ostalih.

Prvi korak pri pridobivanju podatkov je nastavitev občutljivosti detektorjev v pravo območje. Zlasti pri delu z bakterijami zajamemo običajno v to območje tudi veliko šuma. Večino šuma se lahko uspešno znebimo s postavitvijo praga (angl: threshold). Če delec pri izbranem parametru preseže vrednost praga, se aktivirajo še drugi detektorji in zabeležijo merjene vrednosti. Če pa delec ne preseže vrednosti, ki je postavljena kot prag, se njegova prisotnost ne zazna. Število shranjenih podatkov lahko zmanjšamo tudi tako, da se omejimo le na populacijo, ki jo določimo na enem izmed grafikonov z izbiro tako imenovanih vrat (angl: gate). Poleg enoparameternih histogramov lahko rezultate predstavimo kot tridimenzionalne dvoparametne histograme, dvoparametne točkovne (angl: dot plot, grafikon 1) in orisne grafikone (angl: contour plot). Novejša programska oprema omogoča tudi tridimenzionalne točkovne prikaze. Tudi pri prikazu podatkov se lahko omejimo na eno izmed populacij z izbiro vrat.

Kombinacijo pretočne citometrije in *in situ* hibridizacije so že uporabili za analizo mikroorganizmov aktivnega blata (Wallner in sod., 1995). S sondo, ki hibridizira z vsemi bakterijami, so uspeli označiti 70 do 80% celic, označenih z barvilom DAPI, ki se specifično veže na nukleinske kisline. Vzorce so analizirali z različnimi 16S rRNK sondami, specifičnimi za različno velike bakterijske skupine. Mikroskopska in citometrična štetja so se ujemale. Za analizo so potrebovali dva različna eksitacijska laserja, mi pa smo želeli postopek prilagoditi aparaturi z enim laserjem.

MATERIAL IN METODE

Priprava in fiksacija vzorca

Vzorec aktivnega blata smo odvzeli sredi oksigene faze eksperimentalnega sekvenčnega reaktorja na Kemijskem inštitutu v Ljubljani. Ker je vzorec vseboval mikrobno združbo v kompaktnih skupkih, t.i. flokulah, smo morali vzorec najprej obdelati. Za citometrično analizo smo vzorec pripravili z večkratnim zaporednim stresanjem v 10 mM PBS (pH 7,4). Po vsakem stresanju smo s 5 minutnim posedanjem ločili večje flokule od manjših in prostih celic. Vse zgornje faze smo združili in vzorec fiksirali 90 minut v 4% formaldehidu (Amann in sod., 1990b). Vzorec smo shranili v etanolu v PBS (1:1) pri -20°C .

Hibridizacija

Hibridizacijo smo izvajali po postopku, rahlo drugačnem od metode, ki so jo opisali Manz in sod. (1992). Reakcijski volumen je bil 200 μl . Reakcijska mešanica je vsebovala 5 ng/ μl posamezne sonde, 20 μl vzorca in ustrezno količino formamida ter hibridizacijskega pufra (0,1% SDS, 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,9 M NaCl). Hibridizacija je potekala 16 ur pri temperaturi

46° C. Uporabljene sonde so našete v preglednici 1. Označene so bile s sulfoizocianinskim fluorokromom Cy3, z emisijskim maksimumom pri 565 nm in fluorescein izotiocianatom (FITC), z emisijskim maksimumom pri 520 nm. Hibridizacijo smo ustavili z dodatkom 1 ml ledeno hladnega PBS (pH 8,0). Pred analizo na pretočnem citometru smo vzorec centrifugirali in resuspendiral v 1 ml ledeno hladnega PBS (pH 8,0).

Preglednica 1. Uporabljene oligonukleotidne sonde
Table 1. Oligonucleotide probes used

Sonda Probe	Specifičnost Specificity	Sekvenca (5'-3') Sequence(5'-3')	%FA*	Vir Reference
EUB338	bakterije bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	**30	Amann in sod., 1990a
fD1	bakterije bacteria	TGAGCCAGGATCAAACCTCT	30	Weisburg in sod., 1991
NSO190	oksidatorji amonija ammonia-oxidizing bacteria	CGATCCCCTGCTTTTCTCC	55	Mobarry in sod., 1996.

* Količina formamida v hibridizacijskem pufru.

Formamide concentration in the hybridization buffer.

** Pri hibridizacijah z več sondami je koncentracija formamida ustrezala sondi, ki potrebuje več formamida.

When more probes were used in hybridization formamide concentration suited the probe with higher formamid requirement.

Tripansko modro (Mosiman in sod., 1997)

Za poskuse s tripansko modrim smo po končani hibridizaciji vzorec centrifugirali in dodali 1ml ledeno hladne raztopine tripansko modrega v PBS s koncentracijo 1µg/ml. Vzorec smo inkubirali 10 min pri 4° C. Po inkubaciji smo vzorec analizirali s pretočnim citometrom.

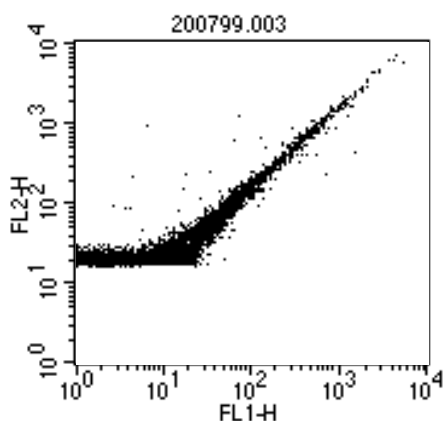
Pretočna citometrija

Analiza je potekala na aparatu FACScan (Becton Dickinson). Hibridizirani vzorec smo po potrebi redčili (od 1:1 do 1:5) s PBS, pH 8,0, tako da je analiza potekala s približno 500 dogodki na sekundo pri večji hitrosti (60 µl ± 7 µl/min) in približno 200 dogodki na sekundo pri manjšem pretoku vzorca (12 µl ± 3 µl/min). Izvor svetlobe je bil 15mW argonski laser, ki obratuje pri 488nm. Uporabljali smo štiri detektorje: za prednji odboj je to fotodioda, za stranski odboj in obe fluorescenci pa so to fotopomnoževalke. Za detekcijo fluorokroma FITC smo uporabljali filter 530/30 BP (FL1), za detekcijo Cy3 pa 585/42 BP (FL2). Meritve smo opravili s standardno programsko opremo (CELLQuest v3.1) na računalniku Power Macintosh 7300. Natančnost ločevanja je bila za vse štiri parametre 256 ali 1024 kanalov. Signal je bil na koncu še primerno linearno ali logaritemsko elektronsko ojačan.

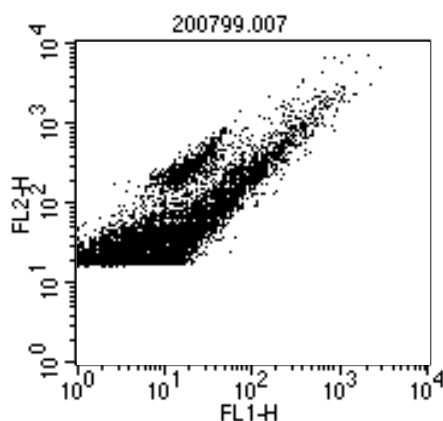
REZULTATI IN RAZPRAVA

Ločitev celic od ostalih delcev v vzorcu smo dosegli s hibridizacijo bakterij z oligonukleotidno sondo EUB338, ki je označena s fluorokromom Cy3. Fluorescenco le-tega smo merili z detektorjem FL2. Na tem detektorju smo postavili tudi prag, s čimer smo iz analize izključili vse dogodke, ki zagotovo niso predstavljali celic. Ker smo poleg odkrivanja in štetja

vseh mikrobnih celic želeli predvsem razviti metodo, s katero bi vzorec hkrati hibridizirali s specifičnimi sondami označenimi s fluorokromom FITC, ki ga zaznavamo z detektorjem FL1, in s tem kvantificirali posamezne skupine bakterij v vzorcu, so rezultati predstavljeni na diagramu zelene (FL1) in oranžne (FL2) fluorescence. Na grafikonu 1 je prikazan rezultat analize nehibridiziranega vzorca.



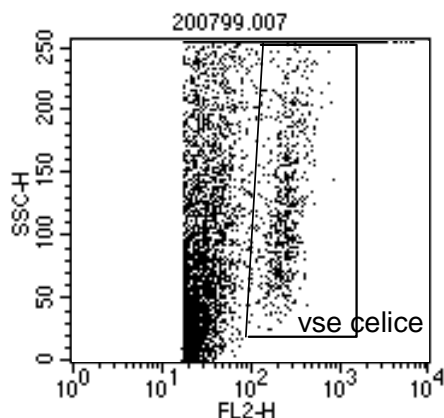
Grafikon 1. Pretočno citometrijska analiza nehibridiziranega vzorca aktivnega blata.
Graph 1. Flow cytometric analysis of activated sludge sample.



Grafikon 2. Pretočno citometrijska analiza vzorca aktivnega blata hibridiziranega z oligonukleotidno sondo EUB338, označeno s Cy3.
Graph 2. Flow cytometric analysis of activated sludge sample after hybridization with oligonucleotide probe EUB 338, labelled with Cy3.

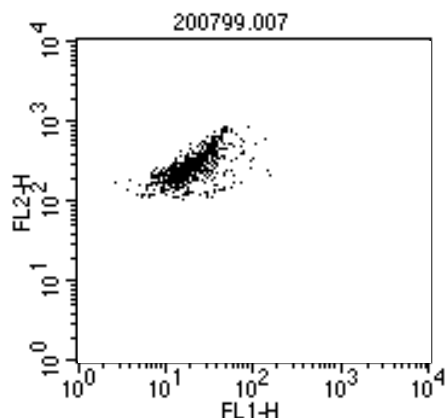
Delci v vzorcu avtofluorescirajo tako oranžno kot zeleno. Na grafikonu 2 je prikazan rezultat analize istega vzorca, hibridiziranega s sondo EUB338-Cy3. Nastavitve aparata so enake pri vseh meritvah, zato lahko grafikone neposredno primerjamo. Jakost oranžne fluorescence večine dogodkov se je povečala, izstopa pa skupina dogodkov v zgornjem levem kvadrantu. Najenostavneje smo to skupino dogodkov, ki smo jih spoznali za mikrobnice, omejili od ostalih na diagramu oranžne fluorescence in stranskega odboja, kot je prikazano na grafikonu 3. Na tem diagramu se položaj celic ne spremeni v primeru, ko je vzorec hibridiziran še s sondo označeno s FITC, zato smo tu postavili vrata "vse celice". Na grafikonu 4 so prikazani le dogodki znotraj teh vrat.

Na osnovi podanih rezultatov in rezultatov hibridizacije še z drugo, za vse bakterije specifično sondo (fD1, označeno s FITC), smo določili vrata "FITC -" in "FITC +". Na grafikonu 5 so prikazane celice hibridizirane le s sondo EUB338, na grafikonu 6, pa celice hibridizirane z obema sondama. Na grafikonu 5 vidimo, da sta lažno pozitivna le 2 dogodka, kar predstavlja 0,25% vseh. Iz grafikona 6 lahko razberemo, da večina celic po hibridizaciji intenzivno fluorescira v območju detektorja FL1. Del populacije ostane znotraj vrat "FITC -". Očitno je, da del populacije, ki je hibridiziral s sondo EUB338, pri danih pogojih hibridizacije ni hibridiziral s sondo fD1. To, da se je jakost fluorescence povečala tudi tem celicam, lahko razložimo s pojavom nepravilne vezave s FITC obarvanih sond. Ta razlaga se sklada tudi z v nadaljevanju predstavljenimi ugotovitvami.



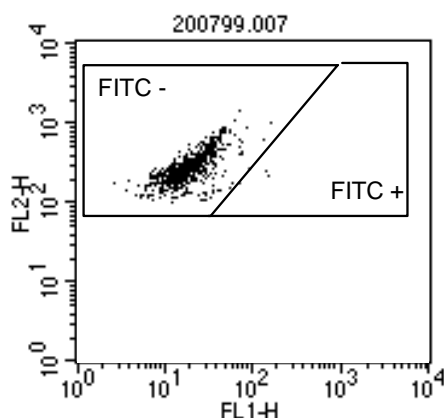
Grafikon 3. Prikaz izbire vrat "vse celice" za ločitev celic od ostalih dogodkov.

Graph 3. Cells were separated from other events with gates "vse celice".



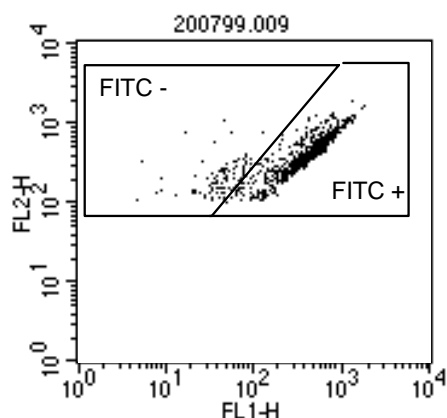
Grafikon 4. Pretočno citometrijska analiza vzorca aktivnega blata hibridiziranega z oligonukleotidno sondo EUB338, označeno s Cy3. Prikazani so le dogodki znotraj vrat "vse celice".

Graph 4. Flow cytometric analysis of activated sludge sample after hybridization with oligonucleotide probe EUB 338, labelled with Cy3. Only events inside the gate "vse celice" are shown.



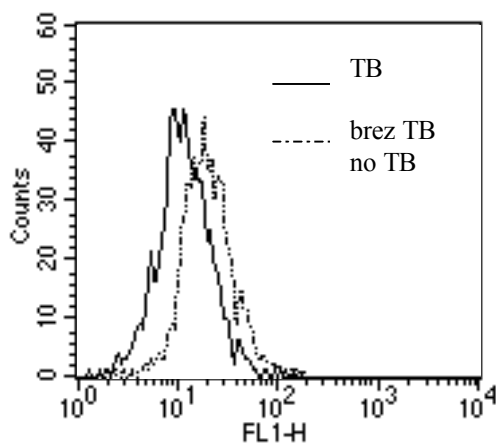
Grafikon 5. Pretočno citometrijska analiza vzorca aktivnega blata hibridiziranega z oligonukleotidno sondo EUB338, označeno s Cy3. Prikazana je postavitve vrat FITC + in FITC - na podlagi rezultatov na grafikonih 5 in 6.

Graph 5. Flow cytometric analysis of activated sludge sample after hybridization with oligonucleotide probe EUB 338, labelled with Cy3. Gates FITC + and FITC - were set after examination of graph 5 and 6.



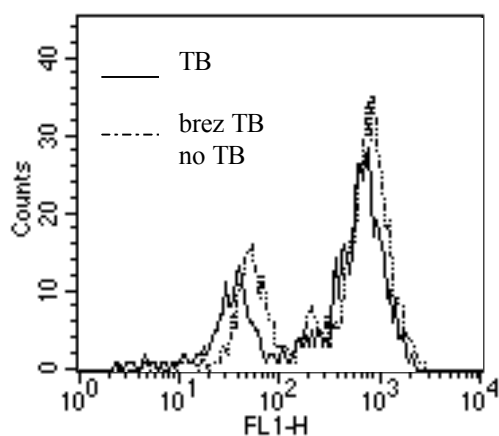
Grafikon 6. Pretočno citometrijska analiza vzorca aktivnega blata hibridiziranega z oligonukleotidnima sondama EUB338, označeno s Cy3, in fD1, označeno s FITC. Prikazana je postavitve vrat FITC + in FITC - na podlagi rezultatov na grafikonih 5 in 6.

Graph 6. Flow cytometric analysis of activated sludge sample after hybridization with oligonucleotide probes EUB 338, labelled with Cy3 and fD1, labelled with FITC. Gates FITC + and FITC - were set after examination of graph 5 and 6.



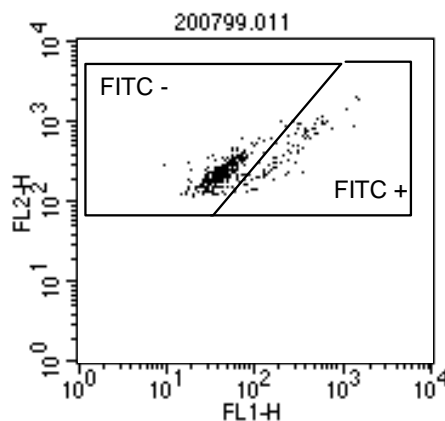
Grafikon 7. Pretočno citometrijska analiza vzorca aktivnega blata hibridiziranega z oligonukleotidno sondo EUB338, označeno s Cy3. Neprekinjena črta prikazuje celice, barvane s tripansko modrim (TB), prekinjena pa nebarvane (brez TB).

Graph 7. Flow cytometric analysis of activated sludge sample after hybridization with oligonucleotide probe EUB 338, labelled with Cy3. Solid line represents cells treated with Tripan Blue (TB), dashed one represents untreated cells (no TB).



Grafikon 8. Pretočno citometrijska analiza vzorca aktivnega blata hibridiziranega z oligonukleotidnima sondama EUB338, označeno s Cy3 in fD1, označeno s FITC. Neprekinjena črta prikazuje celice barvane s tripansko modrim (TB), prekinjena pa nebarvane.

Graph 8. Flow cytometric analysis of the activated sludge sample after hybridization with oligonucleotide probes EUB 338, labelled with Cy3 and fD1, labelled with FITC. Solid line represents cells treated with Tripan Blue (TB), dashed one represents untreated cells (no TB).



Grafikon 9. Analiza vzorca aktivnega blata hibridiziranega s sondo NSO190, označeno s FITC.

Graph 9. Analysis of the activated sludge sample after hybridization with oligonucleotide probe NSO190.

Da bi preprečili FITC pozitivne dogodke, ki bi bili posledica avtofluorescence in da bi jasneje ločili specifično hibridizirane celice od nespecifične fluorescence, smo v našem modelu preizkusili metodo, ki so jo na humanih limfocitih razvili Mosiman in sodelavci (1997). Ugotovili so, da tripansko modro znižuje celično avtofluorescenco in nespecifično fluorescenco, ne vpliva pa na fluorescenco specifično hibridiziranih celic. Rezultate našega dela prikazujemo

na grafikonih 7 in 8. Prvi histogram prikazuje primerjavo jakosti zelene fluorescence med s tripansko modro barvanimi in nebarvanimi celicami. Prikazani so le dogodki znotraj vrat "vse celice". V obeh primerih smo celice najprej hibridizirali s sondo EUB338-Cy3. Vidimo lahko, da se je jakost avtofluorescence po uporabi tripansko modrega zmanjšala. Na drugem histogramu je narejena enaka primerjava, le da so v tem primeru celice hibridizirane s sondama EUB338-Cy3 in FD1-FITC. Vrh močnejše fluorescirajočih celic se po obdelavi s tripansko modrim skoraj ne premakne, medtem ko se fluorescenca šibkeje fluorescirajočih celic zmanjša.

Na grafikonu 9 so predstavljeni rezultati analize aktivnega blata s sondo značilno za kemolitotrofne oksidatorje amonija, ki pripadajo β - podskupini proteobakterij, z zgoraj opisano metodo. Omenjena analiza je pokazala, da je v vzorcu aktivnega blata iz sekvenčnega reaktorja 16,3% bakterij, ki jih je prepoznala sonda NSO190.

Največje težave pri tovrstni analizi so povezane z razbitjem flokul do posameznih celic in nadaljnjo ločitvijo celic od ostankov flokul. To je tudi vzrok za veliko število dogodkov pri analizi, ki se ne odzivajo na hibridizacijo tako kot celice. Poleg izboljšanja priprave vzorca bo potrebno v prihodnje s čistimi kulturami in s primerjalno metodo (naprimer mikroskopskim štetjem) ugotoviti natančnost opisane metode

POVZETEK

Klasično mikrobiološko določanje števila bakterij v aktivnem blatu z gojitvenimi tehnikami je večinoma neprimerno, še posebej kadar nas zanima število bakterij v posameznih bakterijskih skupinah (naprimer vrstah, rodovih, itn.). Kombinacija pretočne citometrije in hibridizacije *in situ* je dokaj nov pristop k proučevanju mikrobnih združb. Z oligonukleotidnimi sondami, ki so komplementarne odsekom ribosomske RNK lahko označimo različne bakterijske skupine. Fluorescenca fluorokroma, s katerim vnaprej označimo sonde, lahko zaznajo detektorji pretočnega citometra. Ti lahko merijo tudi več signalov posamezne celice hkrati s hitrostjo nekaj sto celic v sekundi.

Sondo EUB338, specifično za vse bakterije, smo uporabili za ločevanje bakterijskih celic od drugih delcev. To sondo, označeno s fluorokromom Cy3, smo zaznavali z detektorjem FL2. Drugi detektor (FL1) smo uporabili za merjenje intenzitete fluorescence sond, označenih s fluorokromom FITC. Z uporabo različno specifičnih sond, označenih s FITC, skupaj z eubakterijsko sondo, označeno s Cy3, lahko kvantificiramo bakterijske subpopulacije v aktivnem blatu. Sonda NSO190, označena s FITC, specifična za kemolitotrofne oksidatorje amonija, ki pripadajo β - podskupini proteobakterij, s katero smo analizirali vzorec aktivnega blata, je prepoznala 16,3% odstotka bakterij.

Velik problem pri analizi aktivnega blata predstavlja avtofluorescenca. Da bi znižali jakost avtofluorescence, smo v zgoraj opisanem sistemu preizkusili učinek tripansko modrega. Ta je, tako kot v že opisanih poskusih, znižal nivo avtofluorescence in nespecifične fluorescence, ni pa vplival na fluorescenca FITC.

SUMMARY

Viable plate counts and other classical microbiological techniques are not suitable for enumerating bacterial populations in activated sludge, specially when we want to analyze specific microbial subpopulations. A combination of flow cytometry and *in situ* hybridization is a relatively new approach to microbial community structure analysis. Different bacterial subpopulations can be marked with oligonucleotide probes that target ribosomal RNA segments. Probes which are fluorescently labelled can than be detected with flow cytometer. Its detectors

can analyze more than one fluorescent signal from one cell simultaneously, with pace of several hundred cells per second.

Probe EUB338, specific for all bacteria, was used for separating bacterial cells from other events. This probe, labelled with Cy3 was detected by FL2 detector. Second detector (FL1) was used for detection of probes labelled with FITC. With application of probes, specific for different bacterial groups and labelled with FITC, simultaneously with Cy3 labelled eubacterial probe, it is possible to enumerate bacterial subpopulations in activated sludge. Probe NSO190, labelled with FITC, specific for ammonia oxidizing bacteria from β - subclass of *Proteobacteria* detected 16.3% of all bacteria in analyzed sample.

Autofluorescence represents an obstacle in activated sludge analysis. In order to depress the level of autofluorescence in model described above, effects of tripan blue were investigated. As in previously described models, tripan blue did not alter the FITC-probe-specific fluorescence, while the level of autofluorescence and nonspecific fluorescence dropped.

ZAHVALA

Delo sta s sofinanciranjem nakupa pretočnega citometra omogočila Centralna čistilna naprava Kamnik - Domžale in Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano R Slovenije.

VIRI

- Amann, R.I./ Krumholz, L./ Stahl, D.A.. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.*, 172(1990a), 762-770.
- Amann, R.I./ Binder, B.J./ Olson, R.J./ Chisholm, W./ Devereux, R./ Stahl, D.A. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(1990b), 1919-1925.
- Brock, T.D./ Madigan, M.T./ Martinko, J.M./ Parker. *J. Biology of microorganisms*. 7th. ed. Englewood Cliffs, New Jersey, Prentice-Hall International, Inc. 1994,904 s.
- Davey, H.M./ Kell, D.B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol. Rev.*, 60(1996), 641-696.
- Holben, W.E./ Noto, K./ Sumino, T./ Suwa, Y. Molecular analysis of bacterial communities in a three-compartment granular activated sludge system indicates community-level control by incompatible nitrification processes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(1998), 2528-2532.
- Juretschko, S./ Timmermann, G./ Schmid, M./ Schleifer, K.H./ Pommerening-Röser, A./ Koops, H.P./ Wagner, M. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(1998), 3042-3051.
- Manz, W./ Amann, R./ Ludwig, W./ Wagner, M./ Schleifer, K.H. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15(1992), 593-600.
- Mobarry, B.K./ Wagner, M./ Urbain, B./ Rittmann, B.E./ Stahl, D.A. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organisation of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(1996), 2156-2162.
- Mosiman, L.V./ Petterson, K.B./ Canterero, L./ Goolsby, L.C. Reducing cellular autofluorescence in flow cytometry: an *in situ* method. *Cytometry(Communications in clinical cytometry)*, 30(1997), 151-156.
- Prinčič, A./ Mahne, I./ Megušar, F./ Poul, E.A./ Tiedje, J.M. Effects of pH and oxygen and ammonium concentrations on the community structure of nitrifying bacteria from wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(1998), 3584-3590.
- Sharpless, T.K./ Bartholdi, M./ Melamed, M.R. Size and refractive index dependence of simple forward angle scattering measurements in a flow system using sharply-focused illumination. *J. Histochem. Cytochem.*, 25(1977), 845-856.
- Wagner, M./ Amann, R./ Lemmer, H./ Schleifer, K. H.. Probing activated sludge with proteobacteria-specific oligonucleotides: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(1993), 1520-1525.
- Wallner, G./ Erhart, R./ Amann, R. Flow cytometric analysis of activated sludge with ribosomal RNA targeted probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(1995), 1859-1866.

Lipoglavšek, L. in Avguštin, G. Uporaba ... sond in pretočne citometrije za analizo ... v bioloških čistilnih sistemih.

Weisburg, W.G./ Barns, S.M./ Pelletier, D.A./ Lane, D.J.. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol., 173(1991), 697-703.

Woese, C.R.. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51(1987), 221-271.