

Moleculaire detectie

Diagnose in natuurlijke afbraakprocessen

Welke bacteriën zijn waar, en wat doen ze daar? Een snelle, specifieke en gevoelige detectie van micro-organismen en hun activiteit is belangrijk om het functioneren van verschillende bacteriesoorten in hun leefomgeving te begrijpen en te kunnen beïnvloeden.

Toepassingen

Deltares ontwikkelt en gebruikt moleculaire methoden voor detectie van micro-organismen. Voorbeelden waar deze methoden met succes zijn toegepast:

- monitoring van waterkwaliteit tijdens industriële productieprocessen en afvalwaterzuivering;
- beheersing van ongewenste biofilmaangroei in koelwaterinstallaties;
- monitoring van biologische afbraak in verontreinigde bodems en stortplaatsen.

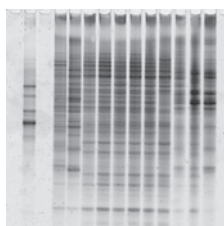
Snelle detectie

Klassieke detectiemethoden zijn vaak gebaseerd op het kweken van bacteriën in het laboratorium. Van de bacteriën die in water, bodem en sediment voorkomen, is echter minder dan één procent kweekbaar in het laboratorium (tabel 1).

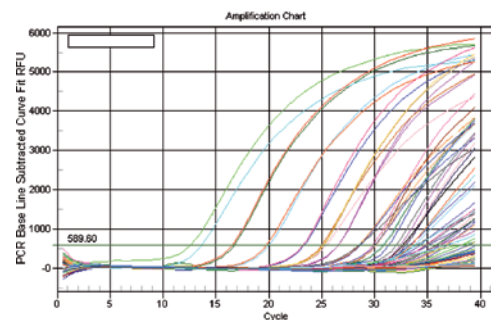
Tabel 1. Kweekbaarheid als percentage van het totaal aantal bacteriecellen (Aman, 1995)

Habitat	Culturability (%)*
Seawater	0.001-0.1
Coastal water	0.1-3
Freshwater	0.25
Freshwater lake	0.1-1
Sediment	0.25
Soil	0.3

* Culturable cells are expressed as colony forming units



Figuur 2. Denaturing Gradient Gel Electroforese (DGGE) profiel



Figuur 1. Q-PCR van 16SrRNA van *Dehalococcoides sp.* (dechlorerende bacteriën)

Moderne moleculaire technieken zoals Deltares die hanteert, zijn bij uitstek geschikt om de diversiteit van complexe microbiële ecosystemen te helpen ontrafelen. In combinatie met klassieke methoden – zoals microscopie, kweken, vloeistof- en gaschromatografie en chemische analyse – vormen moleculaire technieken een krachtig middel voor een efficiënte diagnose.

Moleculaire detectie is:

- Gericht op het aantonen van genetische informatie;
- Snel, specifiek en gevoelig.

Moleculaire detectie geeft antwoord op vragen als:

- Welke bacteriën zijn waar aanwezig en hoeveel zijn er?
- Zijn er pathogene en/of productbedervende micro-organismen en afbraakbacteriën aanwezig?
- Welke micro-organismen zijn actief en welke processen katalyseren ze?

Tabel 2. Toepassingsgeschiktheid van verschillende moleculaire detectietechnieken

Microbial groups		
Detection	Target gene	Remark
Total Bacteria	Bacterial 16S rRNA	
Total Archaea	Archeal 16S rRNA	
Denitrifying bacteria	Nitrate reductase (NarG)	$\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$
Denitrifying bacteria	Nitrite reductase (NirS or NirK)	$\text{NO}_2 \rightarrow \text{NO}$
Denitrifying bacteria	Nitrous oxide reductase (NosZ)	$\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$
Iron-reducing bacteria	Geobacteriales 16S rRNA	
Sulphate-reducing bacteria	Sulfite-reductase (dsrA or dsrB)	
Microbial corrosion	Fe-hydrogenase (hydA) NiFeSe-hydrogenase (hysA)	
Methanogenic Archaea	Methyl-CoM reductase	

Pathogenic bacteria		
Detection	Target gene	Remark
Cyanobacteria	Cyanobacteria 16S rRNA Microcystis 16S rRNA McyD toxine	
Legionella sp.	5s rRNA mipA	Legionella group Legionella pneumophila
Enterobacteriaceae	Enterobacteriaceae 16S rRNA	Indicator of faecal contamination
Escherichia coli	Glucuronidase	Indicator of pathogenic faecal contamination

Biological transformation of pollutants		
Detection	Target gene	Remarks
Mineral oil*	Alkane mono-oxygenase (alkA)	Alkane hydroxylation
BTEX*	Catechol-1,2-dioxygenase Catechol-2,3-dioxygenase	Aerobic ring-cleavage
TEX	Benzylsuccinyl-CoA synthase (BssA)	Anaerobic ring-cleavage
MTBE	MTBE mono-oxygenase (MM) Isobutyryl-CoA mutase (ICMA)	MTBE \rightarrow TBA Degradation of 2-HIBA
1,2-dichloroethane	Alkane dehalogenase (dhIA) 16S rRNA specific for Dehalococcoides, Desulfotobacterium and/or Dehalobacter	Aerobic dechlorination Anaerobic dechlorinating bacteria
PCE & TCE	16S rRNA specific for Dehalococcoides, Desulfotobacterium, Sulfurospirillum, Dehalobacter, Desulfuromonas and/or Desulfomonile	Anaerobic dechlorinating bacteria
TCE	Trichloroethene reductase (TceA)	TCE \rightarrow cis-DCE
Cis-DCE & VC	Dehalococcoides spp. 16S rRNA	Anaerobic dechlorinating bacteria
VC	Vinylchloride reductase (vcrA and/or bucA)	Anaerobic, VC \rightarrow ethene
VC	Expoxyalcane coenzyme M transferase (EaCoMT)	Aerobic VC degradation

* In development

Toepassingen voor diverse microbiële ecosystemen:

- Verontreinigde bodems en grondwater;
- Stortplaatsen;
- Biofilms en biocorrosie (o.a. koelwatersystemen);
- (Afval)waterzuiveringsinstallaties (o.a. actief slib);
- Industriële procesinstallaties (o.a. voedingsmiddelenindustrie).

Beschikbare expertise en faciliteiten bij Deltares (tabel 2)

- Extractie van bacterieel DNA en RNA uit diverse matrices (grond, water en biofilms);
- FISH (Fluorescente In Situ en RNA Hybridisatie) analyse voor microscopische detectie en kwantificering van specifieke bacteriën;
- (Q)PCR (Polymerase Chain Reaction) detectie van bacteriesoorten middels amplificatie van specifieke genen, bijv. 16S rRNA (figuur 1);
- DGGE (Denaturing Gradient Gel Elektroforese) analyse voor het ontrafelen van de samenstelling van microbiële populaties (figuur 2);
- Detectie van enzymactiviteiten (bv. ATP etc);
- Laboratoria voor algemeen microbiologisch onderzoek en moleculaire analyses (kolom experimenten, batches etc);
- Up-to-date kennis van microbiële ecologie, milieu-analyse, ervaring met software en databases voor moleculaire identificatie van micro-organismen.

Contact

Unit Bodem- en Grondwatersystemen
Afdeling Geo milieu onderzoekslaboratorium

Fredericke Hannes
fredericke.hannes@deltares.nl
T +31 (0)88 335 78 32

Jan Gerritse
jan.gerritse@deltares.nl
T +31 (0)6 300 73 547

Meer info: secretariaat-bgs@deltares.nl