

Genkunnskap gir nye muligheter for praktisk overvåkning og påvisning av mikroorganismer i vann

Av Knut Rudi,
Olav M. Skulberg og
Kjetill S. Jakobsen

Knut Rudi er forsker ved MATFORSK, Norsk institutt for næringsmiddelforskning
Olav M. Skulberg er seniorforsker ved Norsk institutt for Vannforskning- NIVA
Kjetill S. Jakobsen er professor ved Avdeling for generell genetikkk ved Biologisk institutt, Universitetet i Oslo

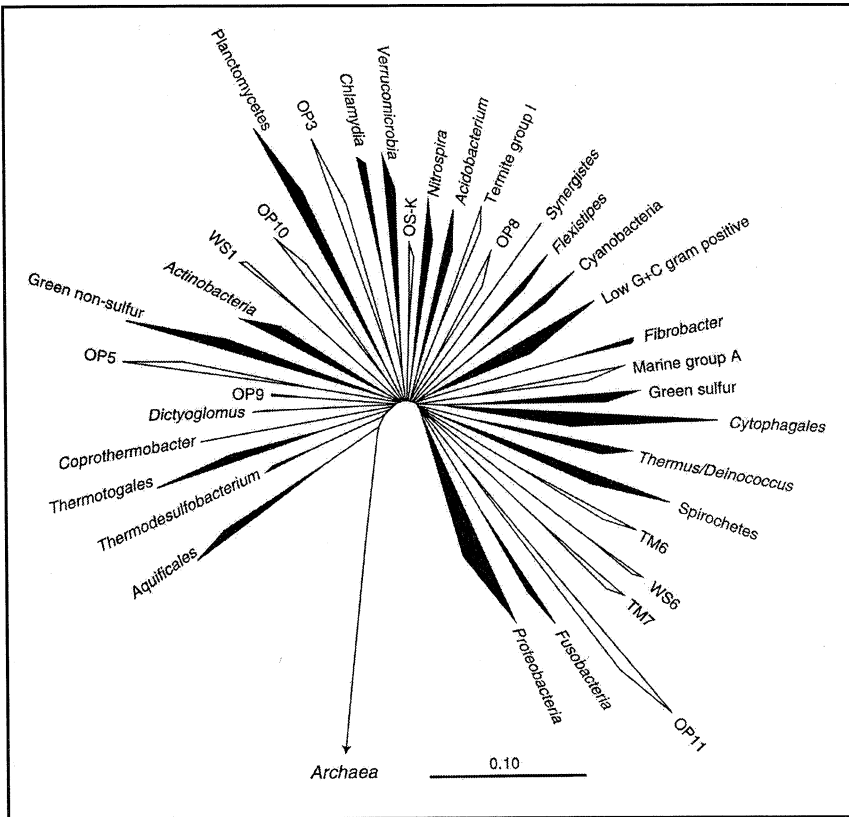
I denne artikkelen vil vi ta for oss hvordan basal genetisk kunnskap kan brukes til overvåkning og påvisning av mikroorganismer i vann. DNA revolusjonen og den omfattende grunnleggende forskningen som utføres i dag på et stadig voksende antall mikroorganismer som bakterier, alger og protozoer har gitt oss et verktøy – gen sekvenser – som gir oss en ny dimensjon i vannanalyser. Vi vil i det følgende legge spesielt vekt på vår egen forskning på cyanobakterier (blågrønnalger), hvor de spørsmål vi har stilt oss angående evolusjon har ført til utvikling av helt ny metodikk for klassifisering, påvisning og overvåkning av cyanobakterier.

Det er et stort behov for nye metoder for analyse av mikroorganismer i vann. Bare de ti siste årene har det skjedd en eksplosjonsartet utvikling i genetiske teknikker (DNA teknikker). Disse teknikkene har nå begynt å få innpass i vannanalyse. En av fordelene med disse

er at de gir objektive kriterier for identifisering og klassifisering, gjennom diagnostiske DNA sekvenser. Slike DNA sekvenser kan brukes på forskjellige evolusjonære nivåer, både for identifisering av slekter og arter. DNA analysen kan også hjelpe oss i å finne andre karakterer som kan brukes til identifisering.

Gener som brukes til å studere slektskap mellom organismer

DNA sekvenser har et stort spekter av evolusjonære rater. Enkelte gener, som f. eks. gener som koder for ribosomalt RNA, har en så lav evolusjonær rate at de kan brukes til å studere slektskapsforhold for alt liv. Andre, ikke-kodende områder derimot, f.eks. mikrosatelitter (korte repeterte sekvenser f.eks. CA gjentatt fra 10 – 100 ganger), kan brukes til å skille individer i en populasjon.



Figur 1. Evolusjonært tre for genet som koder for ribosomalt RNA. Treet viser de fylogenetiske gruppene av bakterier (bakterie-domenene) som har blitt identifisert, samt nye potensielle domener. Domener med to eller flere bakterier er vist som "kjegler". Treet er konstruert ved bruk av ARB datapakken .

Skal man studere en mikroorganisme, eller for den slags skyld en hvilken som helst organisme ved hjelp av DNA, må man velge seg en DNA markør. En DNA markør er rett og slett et område i arvestoffet som man studerer. Valg av markører må gjøres ut fra hvilke problemstillinger man ønsker å belyse. Det er viktig at man velger et område som hverken har for lav, eller for høy

mutasjonsrate i forhold til hva man ønsker å studere. Dette er essensielt fordi den variasjonen man finner i markøren brukes til å lage en modell dvs. det evolusjonstree (fylogenetiske tre) som forklarer mutasjonsmønsteret best mulig. Et evolusjonstre beskriver hvordan forskjellige organismer har skilt lag i evolusjonen. Siden mutasjoner er relativt sjeldne hendelser, kan disse brukes

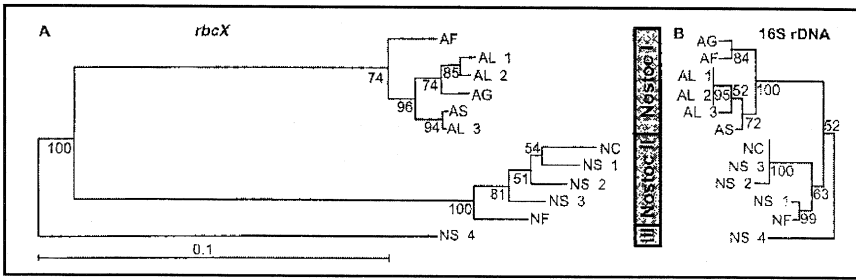
til å definere grenene i treet. Dersom det har vært for mange mutasjoner mellom to organismer vil det være vanskelig å lage en (entydig) modell for evolusjonen, fordi sjansen for fram- og tilbake-mutasjoner er relativt stor. På den andre siden, dersom mutasjonsraten er for lav, vil man ikke finne nok mutasjoner slik at en god modell kan lages. Den mest brukte markøren i evolusjonære studier er genene som koder for ribosomalt RNA. Disse genene finnes i alle organismer. Forskjellige posisjoner i genene har en stor variasjon i evolusjonær rate, slik det kan brukes til å studere organismer på forskjellige taksonomiske nivåer (Figur 1). Men det utvalget av fylogenetiske markører som anvendes vokser raskt, og det finnes markører som utelukkende anvendes for bestemte grupper av organismer (f.eks. *rbcL* hos alger og grønne planter).

Morfologiske trekk hos cyanobakterier er bevart gjennom milliarder av år - men har genene deres forandret seg?

Organismer som liknet på dagens cyanobakterier var blant det første livet som oppstod på jorda for mer enn 3 milliarder år siden. Det finnes 2.2 milliarder år gamle mikrofosiler som morfologisk sett ikke er mulig å skille fra cyanobakterier som lever i dag. Et fundamentalt spørsmål når det gjelder cyanobakterie-evolusjon, er om likhetene mellom fosiler og moderne organismer reflekterer homologi, eller ana-

logi. For å studere gen-evolusjonen til cyanobakteriene – i lys av det vi vet om fossilene – har vi undersøkt 3 forskjellige genområder; et genområde som koder for ribosomalt RNA, et område som koder for et intron (det vil si et ikke-kodende, men transkribert område), og til slutt et aminosyre-kodende område.

Tidlig på 90-tallet ble det identifisert introner i genene som koder for tRNA både i kloroplaster og i cyanobakterier. Dette ledet til en antagelse om at intronet har vært stabilt gjennom det meste av evolusjonshistorien, og at det kanskje til og med er et reliket fra en RNA verden. Våre studier, derimot, sår tvil ved denne hypotesen. Den tilfeldige distribusjon av intronet og det fylogenetiske slektskap mellom intronene hos de ulike artene antyder at intronet kan være mobilt. Det vil si at intronet kan “hoppe” rundt i genomet, og det kan også overføres mellom forskjellige arter av cyanobakterier. (Rudi og Jakobsen 1997), (Rudi og Jakobsen 1999). De opprinnelige arbeidene på dette intronet (Kushel et al. 1990, Xu et al. 1990) konkluderte som nevnt med at dette selvsplesende intronet ikke er, eller har vært, mobilt (iallefall ikke på en milliard år!), og en nylig undersøkelse fra et av det samme fagmiljøet har fastholdt at intronet ikke kan eller har flyttet på seg (Paquin et al. 1997). Våre resultater er imidlertid i tråd med undersøkelser av andre selvsplesende introni, som f.eks det funn at selvsplesende intron kan spre seg fra sopp til høyere planter (Cho et al. 1998). Det er klart at mobile DNA sekvenser slik



Figur 2. Avvikende evolusjonsmønster mellom nært beslektede arter for genene *rbcX* (viktig for foldingen av RuBisCo) (A) og rDNA (B) distanse tre for *Nostoc* linje I, II, and III. Trærne ble beregnet ved hjelp av "neighbor-joining" metoden fra datapakken PHYLIP med en distanse-matrise derivert fra Kimura sin to-parameter modell. Tallene ved forgreningene viser den statistiske støtten (i prosent) for grenmønsteret. Forkortelser på artene er: AL 1, *Anabaena lemmermannii* NIVA-CYA 266/1; AL 2, *A. lemmermannii* NIVA-CYA 83/1; AL 3, *A. lemmermannii* NIVA-CYA 281/1; AS, *Anabaena* sp. stamme NIVA-CYA 267/4; AF, *Aphanizomenon flos-aquae* NIVA-CYA 142; AG, *Aphanizomenon gracile* NIVA-CYA 103; NS 1, *Nostoc* sp. stamme NIVA-CYA 124; NS 2, *Nostoc* sp. stamme NIVA-CYA 194; NS 3, *Nostoc* sp. stamme NIVA-CYA 308; NS 4, *Nostoc* sp. stamme NIVA-CYA 246; NC, *N. commune*; NF, *N. flagelliforme*.

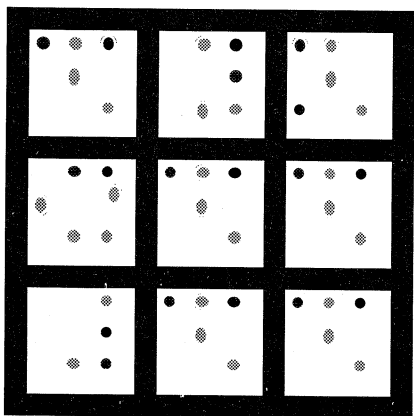
som disse intronene ikke er egnet som fylogenetiske markører, men nettopp fordi de er mobile i et evolusjonært perspektiv og derfor finnes hos noen og er borte hos andre nærbeslektede arter, er en egenskap som kan anvendes til å skille mellom visse stammer av cyanobakterier.

Utvexling av genetisk materiale mellom beslektede stammer; en reparasjonsmekanisme som fører til langtidsstabilisering av cyanobakterier?

Både genene som koder for ribosomalt RNA og genene som koder for D-ribose 1,5-bisphosphate carboxyoxxygenase (RuBisCo involvert i karbon fiksering), finner vi et evolusjonsmønster med flere grupper av nært kan være viktig

slektede organismer, mens avstandene mellom de forskjellige gruppene er relativt store. Det er to mulige forklaringer på et slikt mønster, enten har hver gruppe et relativt nytt felles opphav, eller så har DNA sekvensene innen hver gruppe blitt homogenisert på grunn av utveksling av genetisk materiale. Våre observasjoner støtter den siste modellen. Mutasjonene innen hver gruppe synes å være randomisert, samtidig som de fylogenetiske trærne er forskjellige for 16S rDNA og RuBisCo (vist for RuBisCo-genet *rbcX* i Figur 2, Rudi et al. 1998a).

Det har vært en diskusjon om utveksling av genetisk materiale for bakterier er en mekanisme for DNA reparasjon. Vår modell trekker DNA reparasjons-hypotesen ennå lenger, ved at vi foreslår at utveksling av genetisk materiale



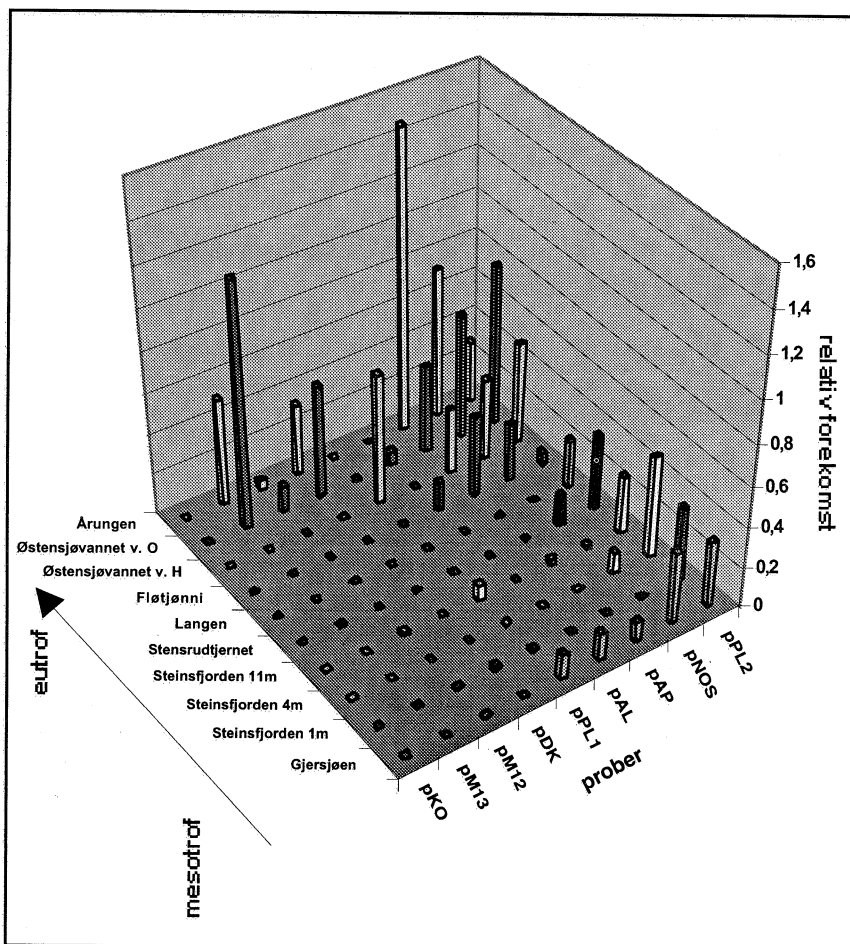
Figur 3. Påvisningsformat for bakterie-test. Bakterie DNAet i vann-prøven hybridiseres til syntetisk laget "indikator"-DNA som representerer de ulike artene eller stammene man ønsker å teste for. Hybridiseringen skjer i grunne, små brønner på en plate (f.eks mikrotiter-plate). Alternativt kan den utføres med indikator-DNA festet til en membran eller DNA-chip. Dette er alle hendige format som gjør de enkelt å automatisere prosessen. Resultatet avleses som fargeflekker eller fluorescens for de respektive bakteriene i prøven. Graden av fargeintensitet/fluorescens er et mål den mengden av bakterier som er i prøven.

være viktig for langtidsstabilisering av karakterer . I den modellen vi er kommet fram til, ligger det at det største evolusjonære problemet for cyanobakteriene ikke er å evolvere nye egenskaper, men faktisk å bevare de egenskapene de allerede har. Cyanobakteriene har kanskje oppnådd sin optimale "form" ut fra de evolusjonære forutsetningene de har. Som en følge av dette, spiller utvekslingen av genetisk materiale for nært beslektede organismer en

viktig rolle for bevaringen av fenotypiske karakterer.

Original grunnforskning fører til praktisk anvendelse

Cyanobakterier skaper store praktiske problemer på grunn av oppblomstringer, og fordi mange av artene kan produsere farlige giftstoffer. Noen av giftstoffene er dødelige, andre gir lettere forgiftninger slik som kvalme, oppkast og diaré. Cyanobakteriene er problematiske i forbindelse med drikkevann, særlig i tempererte strøk, men også i Norge er det blitt slått alarm mange ganger. Cyanobakterier kan være vanskelige å diagnostisere, dvs. artsbestemme, og metodene som brukes i dag, er lite presise og tar relativt lang tid å utføre. Dessuten må man ofre livet til et høyt antall laboratoriedyr for å teste giftinnholdet i vannprøver. Har man derimot informasjon om gensekvensene til giftige alger og bakterier samt beslektede arter som ikke er giftige, kan man basert på genene lage enkle, sikre og presise tester for giftige alger (Rudi et al. 1997, 1998b, 1998c). Ved å anvende DNA er det også mulig å automatisere hele deteksjonsprosessen slik at man kan ha apparatur stående ute i vannet hele tiden, og dermed få «online»-rapporter om algeforekomst. Automatisk apparatur som måler alger og bakterier basert på DNA, er ennå ikke utviklet, men vår forskningsgruppe har utviklet tester som påviser bestemte cyanobakterier og dinoflagellater. En metode for påvisning av den svært gif-



Figur 4. Uttesting av vannprofilanalyse på 8 lokaliteter. Lokalitetene er rangert ut fra næringsrikhet/forurensing, dvs fra "moderat forurenset" (mesotrof) til "forurenset" (eutrof). Søylen viser den relative forekomst av en gitt organisme i en prøve. De forskjellige DNA probene som er brukt, er spesifikke for forskjellige bakteriegrupper. pKO – Phormidium, pMI3, pMI2, pDK – Microcystis, pPL1 – Planktothrix, pAL, pAP – Aanaabaena / Aphanizomenon, pNOS – Nostoc, pPL2 – ikke spesifikk for en bestemt gruppe. Eksempelvis inneholder Gjersjøen potensielt giftige blågrønnalger av typene Planktothrix (probe pPL1) og Aanaabaena/Aphanizomenon (probe pAP, pAL og pNOS).

tige dinoflagellaten *Pfiesteria piscicida* – som vi har utviklet sammen med amerikanske forskere – benytter seg av en DNA metode som er svært effektiv for å finne forskjeller mellom genene (heteroduplex mobilitets analyse - HMA). Dette kombineres med spesifikk amplifisering av *Pfiesteria* gener (Oldach et al. 1999).

Når det gjelder den fullstendige framgangsmåten for å påvise cyanobakterier, går metodikken her ut på først å konsentrere opp cellene ved å binde dem til magnetiske partikler (Ugelstadkuler), så isolere DNAet ved hjelp av de samme kulene (Rudi et al. 1986b), og deretter utføre en gentisk test hvor sluttresultatet leses av som en fargereaksjon som kan kvantifiseres (Figur 3). Det spesielle med testen vi har utviklet, er at DNA prober blir merket ved hjelp av et enzym, som gjør testen så nøyaktig at vi kan skille helt ned til enkeltmutasjoner (Rudi et al. 1998c). Denne prosessen kan utføres for eksempel ved hjelp av en såkalt DNA- eller bio-brikke ("DNA chip"). Vi holder på for tiden å utvikle tester og brikker som vi håper skal kunne tilbys for salg. Siden dette er helt nye prosesser, har vi tatt patent på den spesielle fremgangsmåten.

DNA analyser av vannlokaliteter i Norge avslører cyanobakterier i drikkevann

Metodikken vi har utviklet, er nylig blitt testet på 8 vann-lokaliteter. Både forurensede og rene vann ble valgt i uttestingen. Vi inkluderte flere forskjellige

typer lokaliteter for å undersøke hvor godt systemet vil kunne fungere under rutinemessig diagnostisk analyse. Av spesiell interesse var analysen av Gjersjøen (råvannskilde for vannforsyning) og Steinsfjorden (viktig lokalitet for krepsing, fiske og rekreasjon). Vår uttesting på de 8 lokalitetene viste at det var potensielt giftige cyanobakterier tilstede i 7 av disse (Fig. 4). Det var en klar tendens i økning av mengde og artsmangfold av potensielt giftige cyanobakterier med økende forurensingsgrad. Tilstedeværelsen av potensielt giftige blågrønnalger i innsjøer som Gjersjøen, og Steinsfjorden tilsier at det burde utføres tester for bestemmelse av toksinkonsentrasjoner i vannmassene. Det ble også påvist en helt ny cyanobakterie i Steinsfjorden. Dette isolatet tilhører sannsynligvis slekten *Synechococcus*. Slekten *Synechococcus* inngår i nanoplanktonet. Det er fort gjort å overse disse ved tradisjonell mikroskopisk undersøkelse.

Framtidig biologisk vannovervåkning

Det hersker i dag liten tvil om at DNA-tester vil dominere framtidig biologisk vanntesting og overvåkning. Det er også åpenbart at dette vil stille krav til opplæring av personell og omstrukturering av laboratorier som driver vannundersøkelse, noe som utvilsomt vil være en utfordring for fagmiljøet. På den andre siden vil DNA-baserte tester muliggjøre "on-line" systemer som samtidig påviser og kvantifiserer et variert utvalg av mikroorganismer. Biologisk vannovervåkning vil med andre

ord bli sikrere og mindre ressurskrevende på sikt. Dette åpner for hensiktsmessig å kunne teste eller overvåke vannkvalitet på en mer praktisk og økonomisk måte enn i dag.

I dag tilbys DNA-chip teknologi som et rutinemessig verktøy i medisinsk diagnose, og det er ingen dristig spådom at "DNA-chip'er" for vannkvalitet vil være kommersielt tilgjengelig om svært få år. Tilgang på rent vann vil være en særlig viktig problemstilling i det neste århundre, og DNA testene vil bli en nøkkel til formålstjenlig bedømmelse av vannets sunnhetstilstand.

Vår forskning har vært støttet av en NFR-bevilgning (Strategisk universitets-program, prosjekt nr 107622/420) til KSJ.

Referanser

Cho, Y, Qiu, Y-L, Kuhlman, P. & Palmer, J.D. (1998) Explosive invasion of plant mitochondria by a group I intron. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 95, 1444-1449

Hugenholtz, P., Goebel, B. M. & Pace, N. R. (1998). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* 180, 4765-74.

Kuhsel, M. G., Strickland, R. & Palmer, J. D. (1990). An ancient group I intron shared by eubacteria and chloroplasts. *Science* 250, 1570-3.

Paquin, B., Kathe, S. D., Nierzwicki-

Bauer, S. A. & Shub, D. A. (1997). Origin and evolution of group I introns in cyanobacterial tRNA genes. *J Bacteriol* 179, 6798-806.

Oldach, D., Delwiche, C. F., Jakobsen, K. S., Tengs, T., Brown, E., Kempton, J., Steidinger, K., Glasgow, H., Burkholder, J. & Rublee, P. Identification of *Pfiesteria piscicida* and other toxin-producing dinoflagellates in estuarine waters and algal cultures guided by Heteroduplex Mobility Assay. *Proc Natl Acad Sci (USA)* in press.

Rudi, K. & Jakobsen, K. S. (1997). Cyanobacterial tRNA(Leu)(UAA) group I introns have polyphyletic origin. *FEMS Microbiol Lett* 156, 293-8.

Rudi, K. & Jakobsen, K.S. (1999). The distribution and evolution of tRNA^{Leu}(UAA) group I introns in the cyanobacterial radiation. *J. Bacteriol* 181, 3445-3451.

Rudi, K., Skulberg, O. M., Larsen, F. & Jakobsen, K. S. (1997). Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, V7, and V8. *Appl Environ Microbiol* 63, 2593-9.

Rudi, K., Skulberg, O. M. & Jakobsen, K. S. (1998a). Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phylogenetically related strains. *J Bacteriol* 180, 3453-61.

Rudi, K., Larsen, F. & Jakobsen, K. S. (1998b). Detection of toxin-producing cyanobacteria by use of paramagnetic beads for cell concentration and DNA purification. *Appl Environ Microbiol* 64, 34-7.

Rudi, K., Skulberg, O. M., Larsen, F. & Jakobsen, K. S. (1998c). Quantification of toxic cyanobacteria in water by use of competitive PCR

followed by sequence-specific labeling of oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 64, 2639-43.

Xu, M. Q., Kathe, S. D., Goodrich-Blair, H., Nierzwicki-Bauer, S. A. & Shub, D. A. (1990). Bacterial origin of a chloroplast intron: conserved self-splicing group I introns in cyanobacteria. *Science* 250, 1566-70.