

بررسی کارایی روش زنجیره‌ای پلی‌مرآز با نسخه برداری معکوس در تعیین اشریشیا کلی موجود در آب آشامیدنی

حمید ابطی^{*۱}، محمد جواد قنادزاده^۲، علی هاتف سلمانیان^۳، احسان غزنوی راد^۴، مسعوده کریمی^۵

خلاصه

سابقه و هدف: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرآز (Polymerase chain reaction; PCR) از نظر سرعت، دقت و کارایی نسبت به سایر روش‌های تشخیص اشریشیاکلی در آب، ارجحیت دارد. بروز نتایج مثبت کاذب از معایب این روش است و برای رفع این مشکل می‌توان از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرآز معکوس (Reverse transcriptase- polymerase chain reaction; RT-PCR) استفاده نمود. در این تحقیق سعی گردیده تا علاوه بر تعیین کارایی روش RT-PCR، میزان حساسیت این روش برای شناسایی اشریشیاکلی آب در مقایسه با روش MPN (Most Probable Number) نیز مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها: با استفاده از ترادف ژنی 16srRNA اشریشیاکلی پرایمرهای SR(S rRNA و SF (S rRNA Forward (Reverse طراحی شدند. رقت‌های مختلف از باکتری در آب مقطر تهیه شده و سوسپانسیون باکتری از دو نوع فیلتر FHLF و HAWP، عبور داده شد. سپس، RT-PCR انجام گردید. شناسایی آلودگی ۱۵ حلقه چاه آب شهر اراک و مقایسه آن با روش MPN برای بررسی کارایی روش فوق انجام گرفت.

نتایج: یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که RT-PCR قادر است وجود باکتری در رقت‌های مختلف را شناسایی کند. فیلترهای هیدروفوبیک از جمله FHLF در مقایسه با فیلترهای هیدروفیلیک HAWP توانایی بالاتری در جدا سازی باکتری‌ها دارند. به علاوه، مقایسه شناسایی آلودگی آب با دو روش RT-PCR و MPN انجام گرفته در این تحقیق نشان دهنده کارایی بالای روش RT-PCR بود. نتیجه‌گیری: با استفاده از RT-PCR که حساسیت بیشتری نسبت به روش MPN دارد، می‌توان وجود باکتری حتی در رقت‌های بسیار پایین را نشان داد. همچنین، فیلترهای هیدروفوبیک نسبت به فیلترهای هیدروفیلیک قدرت بیشتری در جذب باکتری‌ها دارند.

واژگان کلیدی: آلودگی آب، اشریشیا کلی، واکنش زنجیره ای پلی‌مرآز معکوس

فصلنامه علمی - پژوهشی فیض، دوره چهاردهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۹، صفحات ۴۲۵-۴۲۰

مقدمه

brilliant- MacConkey, Endo, eosin methylene blue (green-lactose-bile) برای شناسایی عوامل بیماری‌زا در آب علاوه بر اینکه وقت‌گیر و پرهزینه هستند، از دقت کافی نیز برخوردار نمی‌باشند؛ به همین علت برای شناسایی وجود عوامل بیماری‌زا در آب روش‌های جدیدی در دست مطالعه است [۱]. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرآز (PCR) از جمله روش‌هایی است که می‌تواند جایگزین مناسبی برای آزمایشات رایج باشد. این روش حساس، دقیق و سریع بوده و کارایی استفاده از آن در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است. بیان شده است که روش فوق قادر به شناسایی حتی یک باکتری در ۱۰۰ میلی لیتر آب است [۲، ۳]. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرآز روشی حساس و دقیق بوده که با استفاده از آن نه تنها وجود آلودگی مشخص می‌گردد، بلکه نوع باکتری را نیز می‌توان تعیین نمود [۴]. پایداری نسبتاً بالای DNA در محیط باعث می‌گردد تا نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرآز در مورد سلول‌های مرده نیز مثبت گردد. برخی مطالعات نشان می‌دهند که انجام PCR با باکتری‌های کشته شده توسط جوشاندن و یا اشعه UV با انجام PCR بر روی باکتری‌های زنده نتیجه مشابهی را خواهد داشت. مطالعات صورت گرفته بر روی اشریشیاکلی و

وجود میکروب‌های بیماری‌زا از مهمترین معضلات بهداشتی آب آشامیدنی است و شناسایی و حذف این عوامل از مسایل مهم بهداشتی آب به‌شمار می‌آیند. در روش‌های تشخیصی، از باکتری اشریشیاکلی به‌عنوان نشان‌گر بررسی آلودگی آب به فاضلاب استفاده می‌گردد. روش‌های معمول نظیر MPN و کشت آب در محیط‌های مربوط به آنتروباکتریاسه نظیر

^۱ استادیار، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

^۲ مربی، گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اراک

^۳ دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، دانشگاه علوم

پزشکی تهران

^۴ مربی، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم

پزشکی اراک

^۵ کارشناس، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه

علوم پزشکی اراک

* نشانی نویسنده مسوول:

دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی و ملکولی

دورنویس: ۰۸۶۱۴۱۷۳۵۲۶

تلفن: ۰۸۶۱۴۱۷۳۵۰۲

پست الکترونیک: h_abtahi2@yahoo.co.uk

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۹/۸/۳۰

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۲/۱۷

فناوری) می‌باشد. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک (Merck) و آنزیم‌ها و سایر عوامل استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرآز از شرکت سیناژن (ایران) تهیه گردید.

طراحی و تهیه پرایمرها:

در این مطالعه با استفاده از ژن 16s rRNA (شماره دسترسی: EF620925) از باکتری اشریشیاکلی ترادف پرایمرهای زیر استفاده گردید:

Forward: 5' CGA GTG GCG GAC GGG TGA GT (FROM 81)

Reverse: 5' TCG ACA TCG TTT ACG GCG TGG A (FROM 786)

پرایمرهای طراحی شده توسط شرکت MWG آلمان (نماینده فرآیند دانش آراین) ساخته شد.

رقت‌های آب و فیلتراسیون:

ابتدا رقت‌های متوالی از باکتری اشریشیاکلی در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب استریل تهیه گردید. برای تهیه رقت‌های باکتری از محلول شماره یک مک فارلند استفاده شد. بدین منظور ابتدا سوسپانسیون محلول شماره ۱ مک فارلند از باکتری تهیه شد. سپس از این سوسپانسیون رقت‌های متوالی ۸/۱۰۰ تا ۱/۱۶۰۰ در دو سری (جدول شماره ۱) تهیه گردید. برای تأیید صحت تعداد باکتری در رقت‌ها یک میلی‌لیتر از هر رقت باکتری در محیط نوترینت آگار به صورت پور پلیت (Pour Plate) استفاده شد.

لیستریا مونوسیتوزنز نیز نشان می‌دهند که نتیجه فرآیند PCR بر باکتری‌های اتوکلاو شده مثبت است [۵]. عیوب ذکر شده برای روش‌های شناسایی ارگانیزم‌ها بر پایه DNA باعث گردیده تا روش‌های دیگری از جمله غنی سازی اولیه قبل از آزمایش PCR توصیه گردد. با وجود اینکه این روش باعث افزایش کارایی آزمایش و شناسایی بین نمونه‌های زنده و مرده می‌شود، ولی مستلزم افزایش مدت زمان تست می‌باشد؛ در عین حال در صورتی که تعداد باکتری‌های مرده بالا باشد، می‌تواند باعث بروز نتیجه مثبت کاذب در این آزمایشات نیز گردد [۶]. با توجه به پایداری اندک RNA در محیط، تعیین وجود RNA با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرآز معکوس می‌تواند نشان‌گر مناسبی برای سلول‌های زنده به‌شمار آید. نکته مهم در استفاده از روش RT-PCR تعیین کارایی آن در شناسایی تعداد کم باکتری‌ها در آب می‌باشد. در این تحقیق سعی شده است تا با تهیه رقت‌های مختلف از باکتری اشریشیاکلی در آب کارایی روش RT-PCR در شناسایی آن مورد بررسی قرار گیرد. علاوه بر آن نقش دو فیلتر هیدروفیلیک (HWAP) و هیدروفوبیک (FHLP) در جداسازی باکتری و نتیجه واکنش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی در تابستان ۱۳۸۸ انجام گرفته است. باکتری مورد استفاده در این تحقیق اشریشیاکلی سویه DH5 α (تهیه شده از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست

جدول شماره ۱- رقت‌های تهیه شده از کلی فرم

رقت	۸/۱۰۰	۴/۱۰۰	۲/۱۰۰	۱/۱۰۰	۱/۲۰۰	۱/۴۰۰	۱/۸۰۰	۱/۱۶۰۰
تعداد باکتری	۸	۴	۲	۱	۱	۱	۱	۱
حجم آب (میلی لیتر)	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰	۸۰۰	۱۶۰۰

نظر پس از افزودن یک میکرولیتر اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA با غلظت ۲۵ میلی مولار) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

غلظت عوامل RT-PCR جهت تکثیر RNA به شرح زیر استفاده گردید: دو میکروگرم از RNA و ۲۰ میکرومول پرایمر برگشت اضافه شد و به مدت نیم ساعت در ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس ۱۰ میلی مولار دزوکسی نوکلئوزید تری فسفات (dNTP)، ممانعت کننده از فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز به میزان ۲۰ واحد بافر با غلظت نهایی ۱X افزوده شد. پس از انکوباسیون به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۲۰۰ واحد آنزیم M-MuLV Reverse Transcriptase اضافه گردید و به مدت

یک سری از رقت‌ها از فیلتر FHLP (شرکت میلی پور با قطر ۰/۵ میکرون) و سری دوم از فیلتر HAWP (شرکت میلی پور با قطر ۰/۴۵ میکرون) عبور داده شدند. سپس در شرایط استریل فیلترها در داخل میکروتیوب ۰/۵ قرار گرفته و ۵۰ میکرولیتر از آب حاوی یک دهم درصد دی اتیل پیروکربنات (DEPC water) به میکروتیوب‌ها افزوده گردید. میکروتیوب‌ها با شدت ورتکس شده تا باکتری‌ها از سطح فیلتر به مایع داخل میکروتیوب رها شوند.

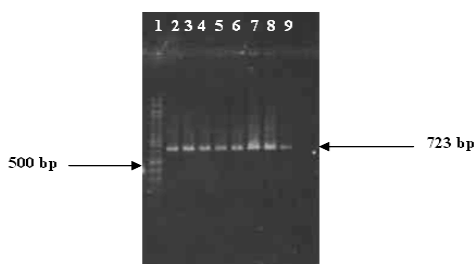
تخلیص RNA و انجام RT-PCR:

برای تخلیص RNA از کیت RNX-plus (شرکت سیناژن) و برای حذف آلودگی DNA از RNA خالص شده از آنزیم Deoxyribonuclease I استفاده گردید. برای حذف آنزیم مورد

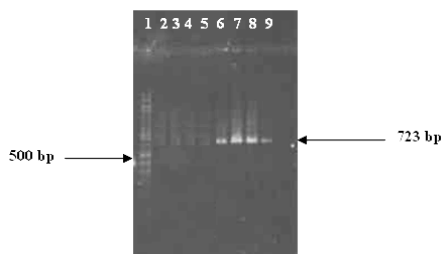
نتایج

کشت رقت‌های تهیه شده در محیط کشت نوترین آگار به روش پور پلیت تعداد باکتری‌ها را تایید نمود. نتیجه RT-PCR رقت‌ها پس از فیلتراسیون نشان داد که این روش قادر است تا وجود ۱ باکتری در حجم ۱۶۰۰ میلی لیتر آب پس از فیلتراسیون با فیلتر هیدروفوبیک (FHLP) را شناسایی کند. در RT-PCR رقت‌ها قطعه برابر ۷۲۳ bp دیده شد (شکل‌های ۱ و ۲). همچنین، نتایج مربوط به مقایسه دو روش RT-PCR و MPN در جدول شماره ۲ آمده است.

شکل شماره ۱- نتیجه RT-PCR رقت‌های باکتری فیلتر شده با



FHLF - ردیف ۱: مارکر BP ۱۰۰ - ردیف ۲: رقت ۱/۱۶۰۰ -
 ردیف ۳: ۱/۸۰۰ - ردیف ۴: ۱/۴۰۰ - ردیف ۵: ۱/۲۰۰ - ردیف ۶:
 رقت ۱/۱۰۰ - ردیف ۷: رقت ۲/۱۰۰ - ردیف ۸: رقت ۴/۱۰۰ -
 ردیف ۹: رقت ۸/۱۰۰



شکل شماره ۲- نتیجه RT-PCR رقت‌های باکتری فیلتر شده با
 AWP - ردیف ۱: مارکر BP ۱۰۰ - ردیف ۲: رقت ۱/۱۶۰۰ -
 ردیف ۳: ۱/۸۰۰ - ردیف ۴: ۱/۴۰۰ - ردیف ۵: ۱/۲۰۰ - ردیف ۶:
 رقت ۱/۱۰۰ - ردیف ۷: رقت ۲/۱۰۰ - ردیف ۸: رقت ۴/۱۰۰ -
 ردیف ۹: رقت ۸/۱۰۰

جدول شماره ۲- مقایسه نتایج دو روش RT-PCR و MPN نمونه‌های ۱۵ چاه تامین کننده آب شرب شهر اراک

شماره چاه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵
RT-PCR	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MPN	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-

یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. پس از تولید cDNA برای تکثیر آن از PCR استفاده گردید. برای این منظور از غلظت‌های عوامل زیر جهت PCR استفاده شد: یک میلی مولار از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت، ۲/۵ میلی مولار از یون منیزیم، ۲۰۰ میلی مولار از هر یک از دزوکسی نوکلئوزید تری فسفات‌ها، ۲/۵ واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase و بافر PCR با غلظت 1X. حجم نهایی مخلوط PCR با آب مقطر استریل به ۵۰ میکرولیتر رسید و پس از آن برنامه زیر استفاده گردید: مرحله اول PCR متشکل از ۳۵ چرخه که هر یک از سه قسمت تشکیل شده است. قسمت اول دناتور کردن (۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه)، قسمت دوم برای اتصال پرایمرها به DNA الگو (۴۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه)، قسمت سوم جهت تکثیر ژن هدف (۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه) است. پس از خاتمه چرخه‌ها، تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و برای یک چرخه انجام شد. برای بررسی نهایی محصولات PCR، الکتروفورز آن بر روی ژل آگارز ۱ درصد در بافر تریس بازی - اسید بوریک - EDTA (pH = ۸) انجام گرفت. بررسی نتیجه الکتروفورز با استفاده از رنگ آمیزی آن با محلول اتیدیوم بروماید و مشاهده آن با دستگاه ترانس لومیناتور UV انجام گرفت.

بررسی نمونه‌های آب چاه با RT-PCR و MPN:

برای تعیین کارایی RT-PCR در شناسایی حداقل تعداد باکتری در آب و اهمیت نوع فیلترهای هیدروفوبیک در نتایج آن، از هریک از ۱۵ حلقه چاه تامین کننده آب شهر اراک ۲۵۰ میلی لیتر آب در ظروف استریل طبق استاندارد جمع‌آوری گردید. از روش MPN تنها برای بررسی هم‌خوانی با روش RT-PCR استفاده شد و وجود کلی‌فرم در نمونه‌های تهیه شده با استفاده از هر دو روش بررسی گردید. در روش RT-PCR یک‌صد میلی لیتر آب با استفاده از فیلتر FHLP صاف شده و سپس وجود اشریشیاکلی در آن بررسی شد. آزمایش MPN به روش سه لوله‌ای انجام گرفت و بر اساس تولید یا عدم تولید گاز تعداد اشریشیاکلی تعیین شد. داده‌های حاصل از سنجش نمونه‌ها از نقطه نظر آلودگی میکروبی و آزمون مولکولی جمع‌آوری و در قالب جدول مربوط منعکس گردید.

بحث

حاضر نشان می‌دهد روش RT-PCR علاوه بر اینکه قادر به شناسایی یک باکتری در ۱۰۰ میلی لیتر آب است، توانایی تشخیص یک باکتری در حجم‌های بالاتر (تا ۱۶۰۰ میلی لیتر آب) را نیز دارد. تفاوت اخیر بین این مطالعه با دیگر مطالعات را باید در استفاده از فیلترهای هیدروفوبیک برای تغلیظ باکتری‌ها بیان نمود. در مطالعه Bej و همکاران نشان داده شده است فیلترهای هیدروفوبیک نسبت به فیلترهای هیدروفوبیک توانایی بالایی را در جذب باکتری‌ها دارند [۹]. در بررسی حاضر نتایج مربوط به RT-PCR فیلتر هیدروفوبیک نشان داد حتی رقت‌های پایین باکتری عبور داده شده از این فیلترها توسط این روش ملکولی قابل شناسایی است. علت این افزایش کارایی به واسطه از دست ندادن باکتری و در نتیجه حضور اسیدهای نوکلئیک باکتری می‌باشد. در عین حال با وجود اینکه قطر منافذ فیلترهای هیدروفوبیک (نظیر HAWP) کمتر از فیلترهای FHLP است، این فیلترها قدرت کمتری را در جذب باکتری نشان می‌دهند. فیلترهای HAWP تنها قادر به جداسازی باکتری‌ها در رقت‌های بالاتر از چهار باکتری در یک صد میلی لیتر آب هستند؛ به عبارت دیگر با استفاده از این فیلترها شناسایی باکتری‌ها در رقت‌های پایین‌تر از چهار باکتری توسط روش RT-PCR قابل استفاده نمی‌باشد؛ بنابراین استفاده از روش PCR در سیستم‌های تصفیه و ضد عفونی آب به علت پایداری ملکول DNA نتیجه آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرآز مثبت کاذب خواهد بود. بر این اساس برای بررسی آلودگی در سیستم‌های تصفیه آب استفاده از روش‌های ملکولی نظیر PCR نمی‌تواند اثر مواد ضد عفونی کننده بر روی شاخص آلودگی آب را نشان دهد. برای رفع این مشکل می‌توان از دیگر مولکول‌های سلول از جمله RNA که پایداری نسبتاً کمی دارد استفاده نمود و برای تعیین وجود RNA در محیط لازم است از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرآز معکوس استفاده شود.

نتیجه‌گیری

RT-PCR روشی با کارایی بالا در تعیین آلودگی باکتری آب بوده و استفاده از فیلترهای هیدروفوبیک می‌تواند کارایی این روش را افزایش دهد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از معاونت محترم آموزش و تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی اراک که امکانات لازم جهت انجام این تحقیق را فراهم نمودند.

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که RT-PCR قادر است حتی یک باکتری در حجم ۱۶۰۰ میلی لیتر آب را تعیین نماید و افزایش این کارایی تنها در نمونه‌هایی دیده می‌شود که توسط فیلتر هیدروفوبیک (FHLP) صاف گردیده باشند. نتایج RT-PCR چاه‌های آب نیز نشان می‌دهد که روش RT-PCR عین بالا بودن کارایی در تشخیص باکتری در اغلب موارد نسبت به روش MPN نیز ارجحیت دارد. اگرچه استفاده از تکنیک‌های ملکولی در تشخیص عوامل عفونی از بسیاری جنبه‌ها نسبت به روش‌های کشت و تشخیص باکتری‌ها از نظر سرعت جواب دهی و دقت در تشخیص ارجحیت دارند، ولی برخی تکنیک‌های موجود از جمله PCR دارای نتایج مثبت کاذب می‌باشند؛ دلیل این امر به واسطه ردیابی و تکثیر ژن باکتری حتی در باکتری‌های مرده است [۴]. لذا برای شناسایی باکتری‌های زنده از تکنیک‌هایی از جمله RT-PCR می‌توان بهره برد. در این تحقیق سعی شد تا میزان کارایی این روش نسبت به یکی از روش‌های معمول شناسایی آلودگی میکروبی آب (MPN) مقایسه گردد. علاوه بر دقت و کارایی بالای RT-PCR در تشخیص آلودگی آب کاهش مدت زمان شناسایی باکتری از اهمیت بالایی برخوردار است؛ به طوری که در آزمایش معمول MPN حداقل به ۲۴ ساعت برای تعیین آلودگی نیاز است، در حالی که در روش RT-PCR این زمان به ۶ تا ۷ ساعت کاهش می‌یابد. به طور کلی تکنیک‌هایی که بر پایه اسیدهای نوکلئیک می‌باشند تنها موقعی می‌توانند وجود سلول‌های زنده را ثابت کنند که ملکول هدف پایداری کمی پس از مرگ سلولی داشته باشد. ملکول mRNA در داخل سلول زنده به طور مرتب در حال تکثیر و افزایش بوده و بر عکس DNA نیمه عمر بسیار کوتاهی دارد، به طوری که پس از مرگ سلولی مقدار آن به سرعت در سلول کاهش می‌یابد. علت این کاهش به واسطه کارایی بالای پیوندهای فسفو دی استر نسبت به آنزیم‌های هیدرولیز کننده در ملکول RNA نسبت به DNA است. بنابراین تعیین وجود ملکول mRNA نشانه خوبی برای اثبات وجود سلول‌های زنده است. در مطالعه Sheridan و همکاران با استفاده از روش RT-PCR ثابت شده است که این ملکول تنها در سلول‌های زنده و ویرو کلرا و لژیونلا پنموفیلا دیده می‌شود [۷]. نکته مهم در استفاده از روش‌هایی نظیر RT-PCR بررسی کارایی این روش‌ها در تعیین عوامل آلودگی آب است. Liu و همکاران نشان داده‌اند که روش RT-PCR قابلیت شناسایی باکتری در سوسپانسیون با ۱CFU/ml را ندارد [۸]. این در حالی است که نتایج تحقیق

References:

- [1] Toze S. PCR and the detection of microbial pathogens in water and waste water. *Wat Res* 1999; 33(17): 3545- 56.
- [2] Procop GW. Molecular diagnostics for the detection and characterization of microbial pathogens. *Clin Infect Dis* 2007; 45 Suppl 2: S99-S111.
- [3] Vaitilling M, Gendre F, Brignon P. Direct Detection of Viable Bacteria, Molds, and Yeasts by Reverse Transcriptase PCR in Contaminated Milk Samples after Heat Treatment. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64(3): 1157-60.
- [4] Horáková K, Mlejnková H, Mlejnek P. Direct detection of bacterial fecal indicators in water samples using PCR. *Water Sci Technol* 2006; 54(3): 135-40.
- [5] Kobayashi H, Oethinger M, Tuohy MJ, Procop GW, Hall GS, Bauer TW. Limiting false-positive polymerase chain reaction results: detection of DNA and mRNA to differentiate viable from dead bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 64(4): 445-7.
- [6] Sabat G, Rose P, Hickey WJ, Harkin JM. Selective and sensitive for PCR amplification of Escherichia coli 16S rRNA Genes in soil. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(2): 844- 9.
- [7] Sheridan GE, Masters CI, Shallcross JA, MacKey BM. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in Escherichia coli cells. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64(4): 1313-8.
- [8] Liu Y, Gilchrist A, Zhang J, Li XF. Detection of Viable but Nonculturable *Escherichia coli* O157: H7 Bacteria in Drinking Water and River Water. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(5): 1502-7.
- [9] Bej AK, Mahbubani MH, Dicesare JL, Atlas RM. Polymerase chain reaction-gene probe detection of microorganisms by using filter-concentrated samples. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57(12): 3529-34.