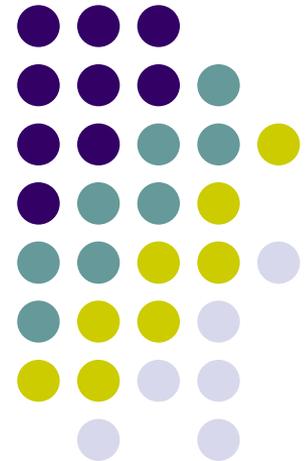


Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное бюджетное государственное образовательное учреждение
высшего образования «Оренбургский государственный университет»
Химико-биологический факультет
Кафедра биохимии и микробиологии

Методы исследования микроорганизмов и использование бактерий в биоиндикации

Лекция 16

Лектор: Давыдова Ольга Константиновна, к.б.н., доцент



План лекции:



- Методы исследования микроорганизмов
 - Метод микроскопических наблюдений и особенности микроскопии микроорганизмов
 - Некультивируемые формы бактерий
 - Учёт живых/неживых клеток
 - Микроэлектродный метод.
 - Радиоизотопный метод.
 - Обнаружение микроорганизмов по их липидному профилю
 - Обнаружение и идентификация микроорганизмов на основе их геномных последовательностей
 - Полимеразная цепная реакция
 - Гибридизация макромолекул
 - Обнаружение и идентификация микроорганизмов на основе репортерных генов
 - Гены β -глюкуронидазы (GUS), люциферазы (LUC/LUX), хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT)
 - Гены зеленого флюоресцентного белка (GFP)
- Роль микроорганизмов как индикаторов загрязнения окружающей среды

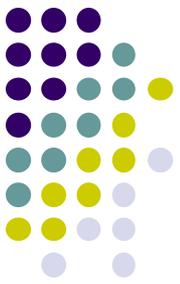
Особенности микроскопии микроорганизмов



- МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ НАБЛЮДЕНИЯ-способы изучения очень мелких, неразличимых невооруженным глазом объектов с помощью микроскопов.
- С помощью световой микроскопии можно исследовать подвижность микроорганизмов.
- Фазово-контрастная микроскопия применяется для изучения живых микроорганизмов и клеток в культуре ткани.
- Темнопольная микроскопия позволяет изучить спирохет и обнаружить крупных вирусов.
- Люминесцентная микроскопия используется в диагностических целях для наблюдения живых или фиксированных микроорганизмов, окрашенных люминесцирующими красителями в очень больших разведениях, а также при выявлении различных антигенов и антител с помощью иммунофлюоресцентного метода.
- С помощью электронного микроскопа изучают ультратонкое строение микроорганизмов и тканей, а также проводят иммунную электронную микроскопию.

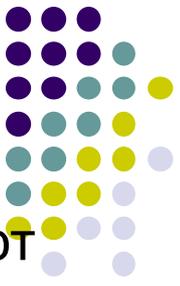


НФБ



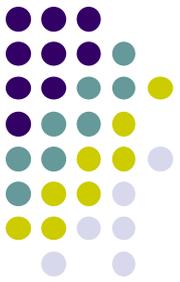
- Некультивируемыми называют такие формы микроорганизмов, которые в ответ на действие неблагоприятных факторов прекращают рост на питательных средах, но сохраняют жизнеспособность, а при улучшений условий культивирования возобновляют пролиферацию.
- Для выявления некультивируемых форм в организме или клиническом материале наиболее широко используются молекулярно-генетические методы: полимеразная цепная реакция и ее различные модификации, лигазная цепная реакция, техника гибридизации тотальной клеточной РНК, полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой.
- Некультивируемые формы патогенных бактерий можно обнаружить в организме человека и животных , в продуктах питания, в объектах окружающей среды: в воде и в почве.
- Экспериментальные и гипотетические сведения об обнаружении некультивируемых форм в окружающей среде дополняют работы об индукторах некультивируемого состояния и реверсии.

Учёт живых/неживых клеток



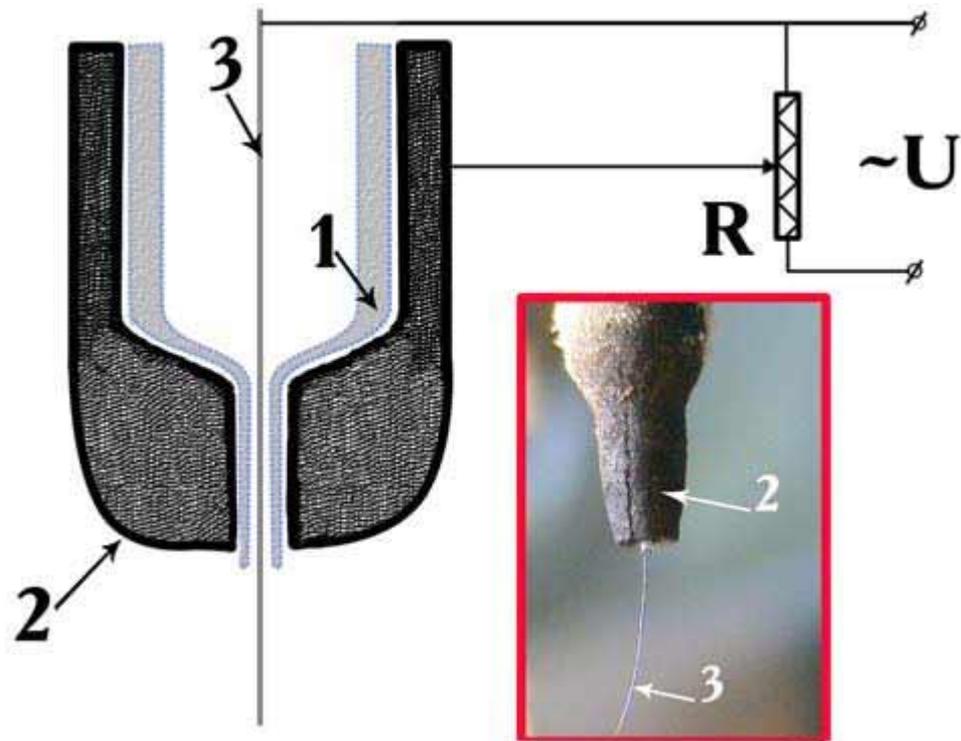
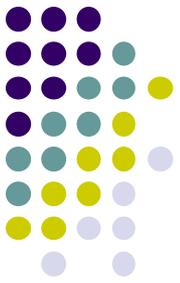
- Для тотального учёта клеток микроорганизмов используют флуоресцентные красители – акридин оранжевый, DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole), FITC (fluorescein isothiocyanate) и др.
- Для выявления живых, активных клеток бактерий используют FDA (fluorescent diacetate) и SFDA (5-sulfofluorescein diacetate).
- Разработаны комплексы красителей, позволяющие выявлять мертвые и живые клетки водно одновременно – Live/Dead (содержит набор красителей Syto 9, окрашивающий живые клетки и иодид пропидия – PI, окрашивающий мертвые клетки). При промывании Syto 9 остается в клетках с ненарушенными мембранами и вымывается из клеток с повреждёнными, тогда как PI остается в клетках в том числе и с повреждёнными мембранами.

Микроэлектродные методы



- Методы исследования с использованием микроэлектродов получили свое название потому, что диаметр их регистрирующей поверхности составляет около одного микрона.
- Микроэлектроды бывают металлическими и стеклянными.
 - Металлический микроэлектрод представляет собой стержень из специальной высокоомной изолированной проволоки с регистрирующим кончиком.
 - Стеклянный микроэлектрод диаметром около 1 мм изготавливается из специального стекла - пирекса, с тонким незапаянным кончиком, заполненным раствором электролита.
- Микроэлектроды позволяют проникать в микроокружение клеток в природных эконических условиях, измеряя там градиент pH, температуры, концентрации кислорода и т.д.

Микроэлектродные методы



Схематическое изображение устройства для электрохимической заточки платиновых кончиков. В красной рамке показано фото реального устройства.

1 – стеклянный капилляр, 2 – графитовый корпус устройства, 3 – платиновая проволока, R – низкоомный резистор

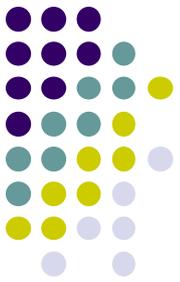
Радиоизотопные методы



- В биологии в основном применяются изотопы с β - и γ -излучениями.

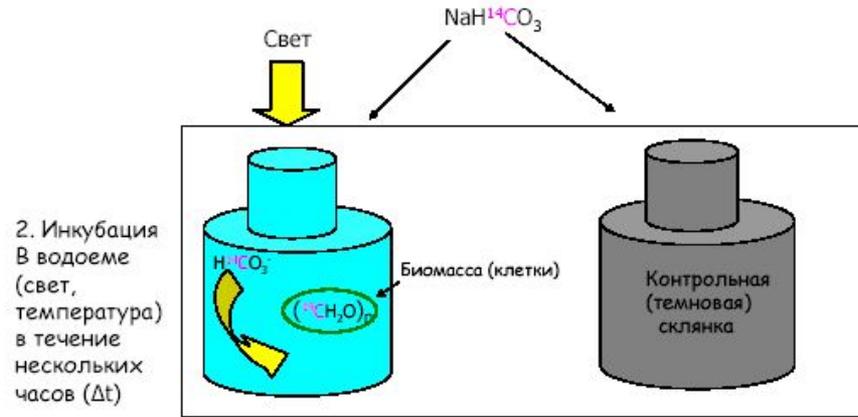
Изотоп	Период полураспада	Тип распада	Энергия МэВ
Тритий	12,26 лет	β	0,018
Углерод-14	5568 лет	β	0,155
Сера-35	87,2 сут	β	0,167
Хлор-36	$3 \cdot 10^5$ лет	β	0,714
Фосфор-32	14,3 сут	β	1,710
Иод-131	8,06 сут	γ	0,810
Иод-125	60 сут	γ	0,035

Радиоизотопные методы



Изотопные методы оценки скоростей микробных процессов на примере ассимиляции CO_2 (первичной продукции):

1. Добавка растворимого меченого субстрата с радиоактивностью R (имп/мин):



4. Фильтрация и определение радиоактивности клеток на фильтре $r_{\text{биом}}$, имп/мин

Расчет скорости ассимиляции C для обеих склянок:

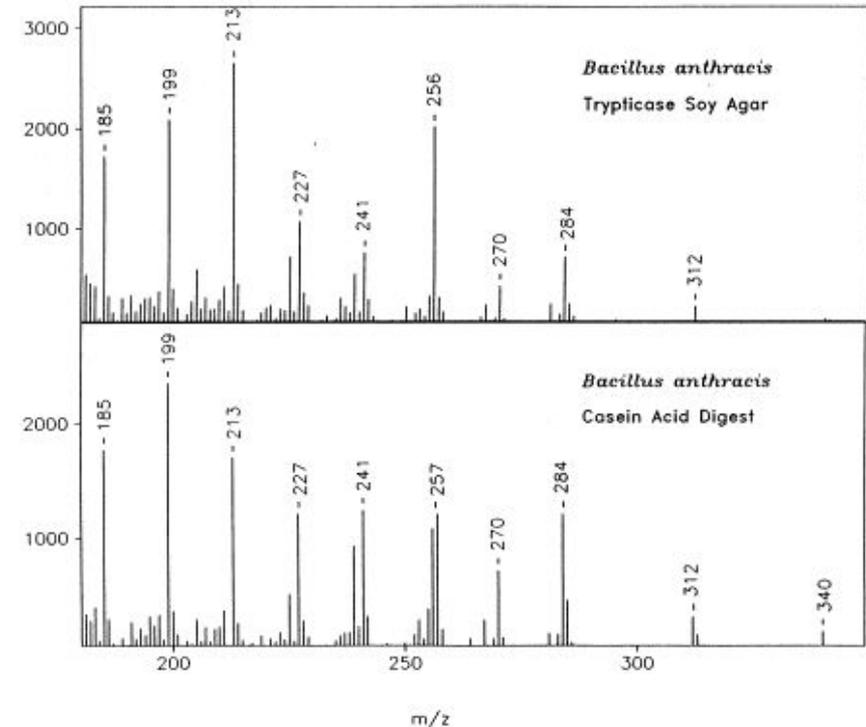
$$P_{\text{свет}} - P_{\text{темн}} = \frac{r_{\text{биом}}}{R} \frac{C_{\text{карб}}}{\Delta t}, \text{ мгС/л в сутки}$$

Скорость фотосинтеза = $P_{\text{свет}} - P_{\text{темн}}$, мгС/л в сутки

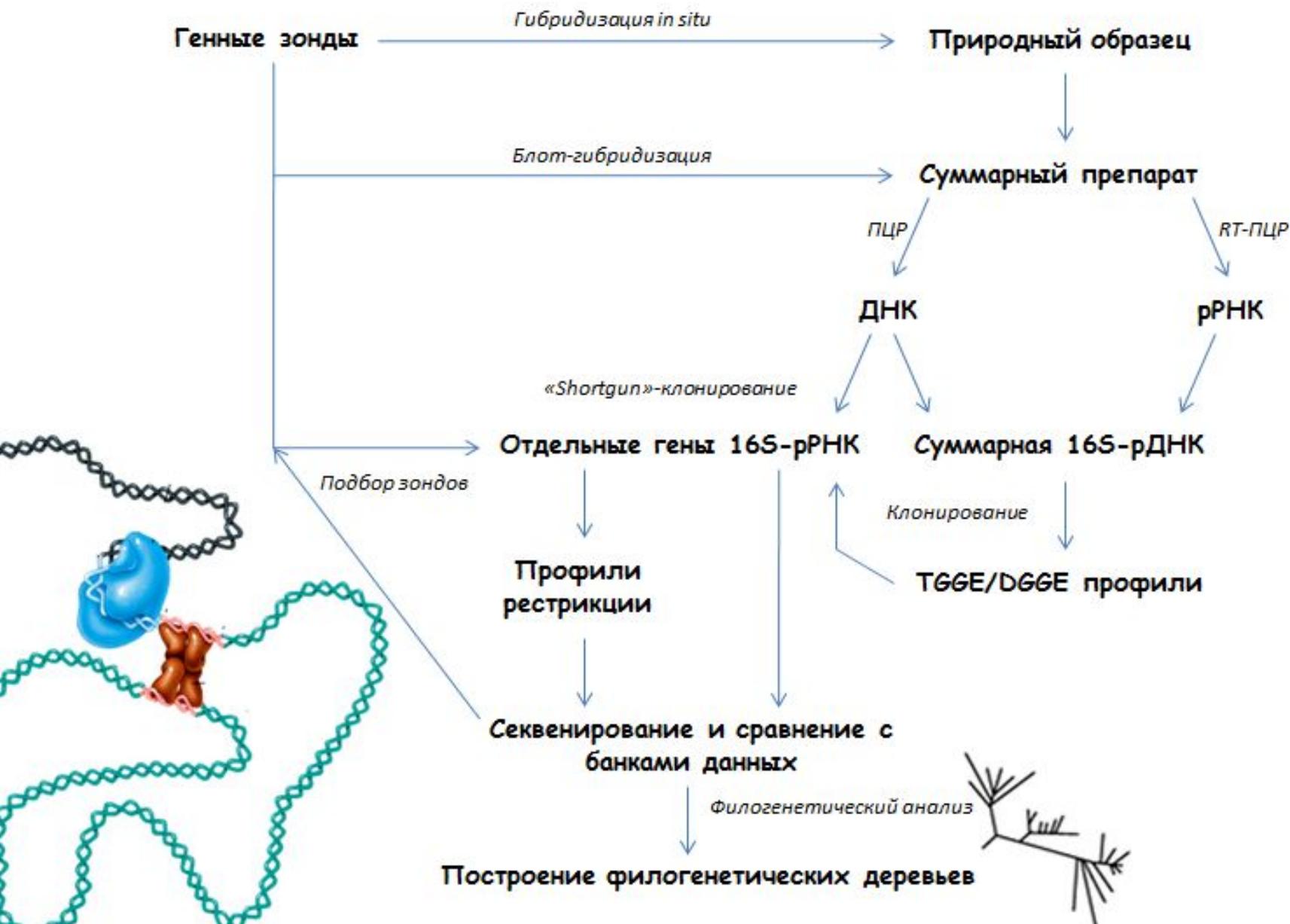


Идентификация микроорганизмов по их липидному профилю

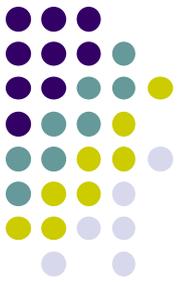
- Липидный состав микроорганизмов отличается друг от друга. Существует 6 классов липидов, каждый из которых состоит из индивидуальных с 6 и более структурными особенностями, это легло в основу идентификации микроорганизмов, но микроорганизмы могут менять свой профиль в зависимости от возраста культуры и условий культивирования клеток.
- Анализ основан на изучение и сравнение метиловых эфиров жирных кислот, входящих в состав липидов.
- Процесс включает эстерификацию липидов, метилирование входящих в их состав жирных кислот, их разделение на хроматографических колонках и количественное определение с помощью газовой хроматографии или высокоэффективной жидкостной хроматографии.



Использование молекулярно-биологических методов (анализ микробных сообществ)



Полимеразная цепная реакция

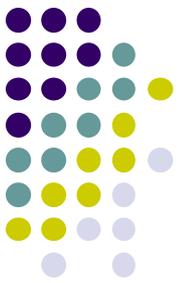


- ПЦР- молекулярно-биологическая реакция, позволяющая получить большое количество копий конкретного фрагмента ДНК.
- Искомый фрагмент может быть частью очень сложной смеси нуклеиновых кислот.
- Исходным материалом может быть даже единственная молекула ДНК.

Принцип ПЦР

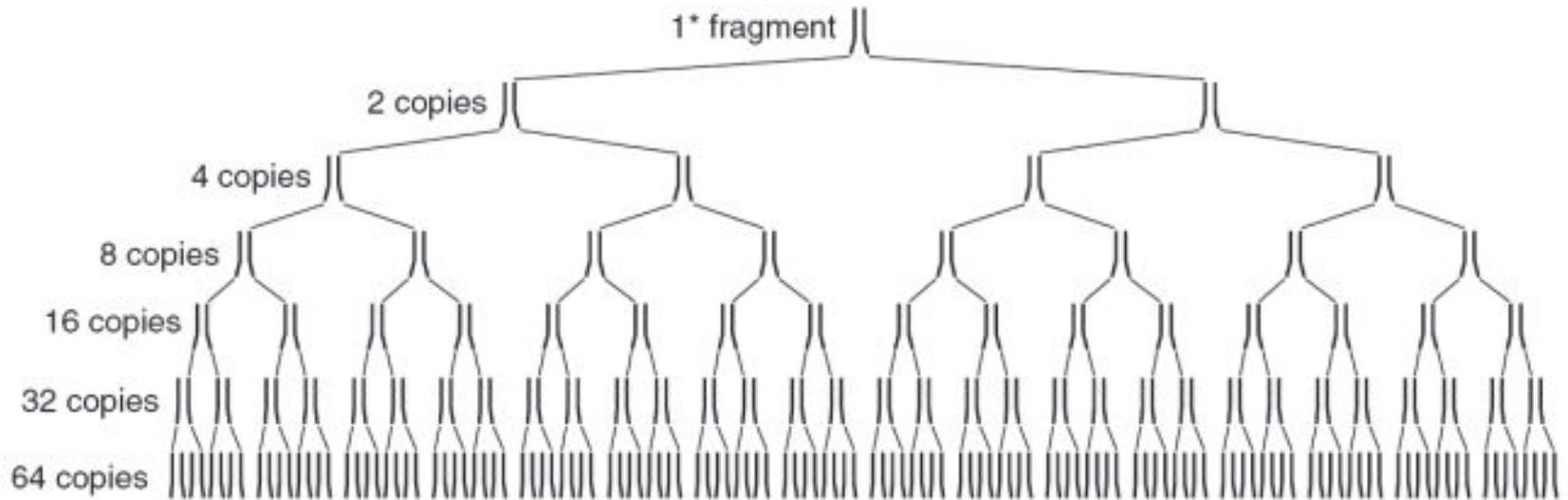
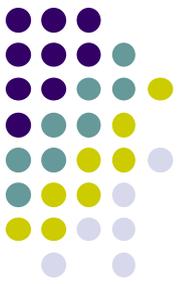


Полимеразная цепная реакция



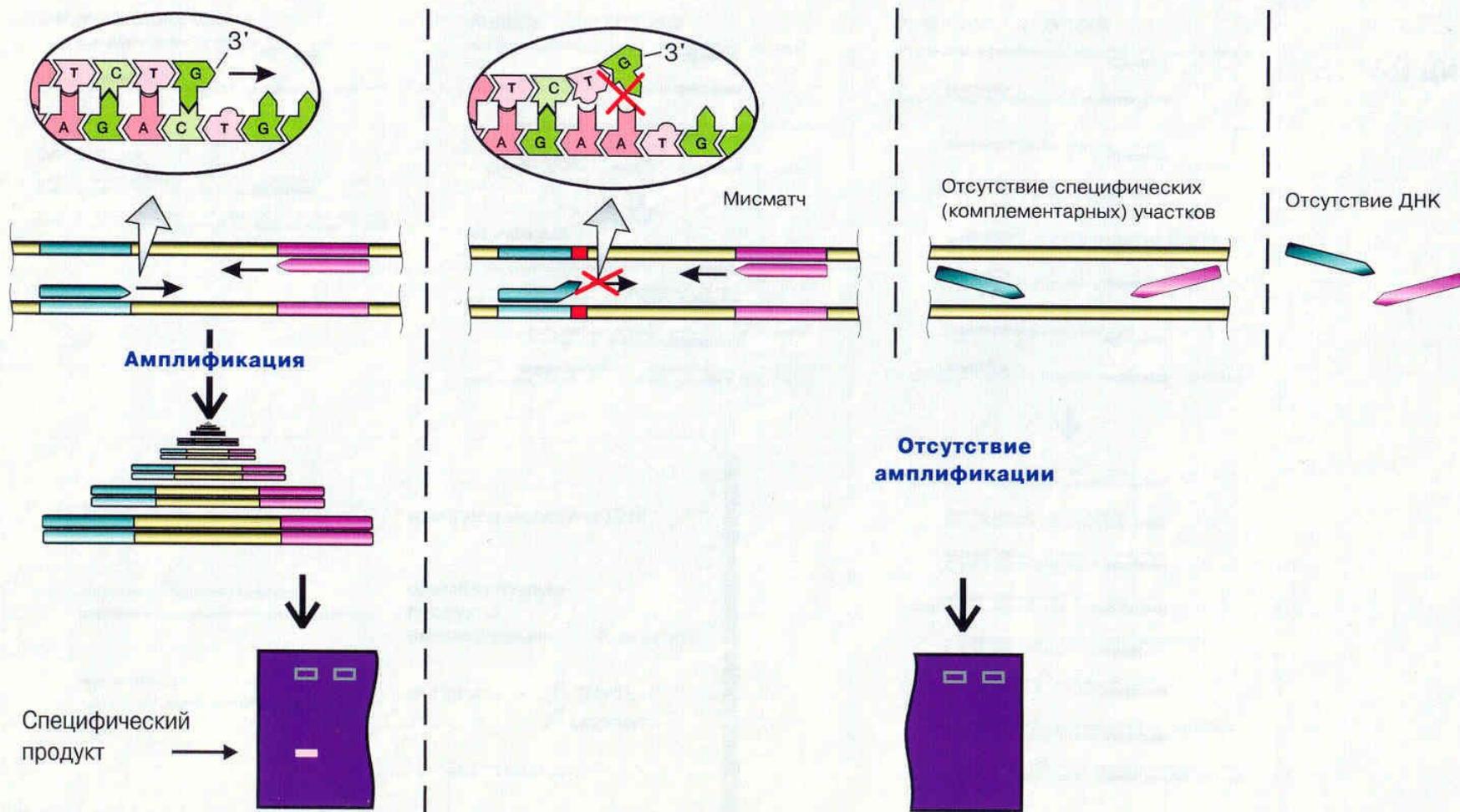
- ПЦР (PCR) позволяет многократно воспроизводить (амплифицировать) выбранный фрагмент ДНК.
- Для этого нужно иметь в своем распоряжении два олигонуклеотида (праймера), каждый из которых будет гибридизоваться с одной из цепей на противоположных концах подлежащего амплификации фрагмента ДНК, достаточное количество дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и специальную термостабильную ДНК-полимеразу. Праймер синтезируют, а полимеразу получают из термостабильных бактерий.
- На первой стадии двунитевую ДНК нагревают до 90°C для разделения цепей и получения однонитевой ДНК. Затем смесь охлаждают, чтобы произошла гибридизация с праймерами. Комплементарные цепи ДНК синтезируются в обоих направлениях, начиная от праймеров. Этот циклический процесс (цикл 1) повторяют с той же самой реакционной смесью (цикл 2, 3 и т.д.) 20-30-кратно.

ПЦР как молекулярная копировальная машина («молекулярный ксерокс»)

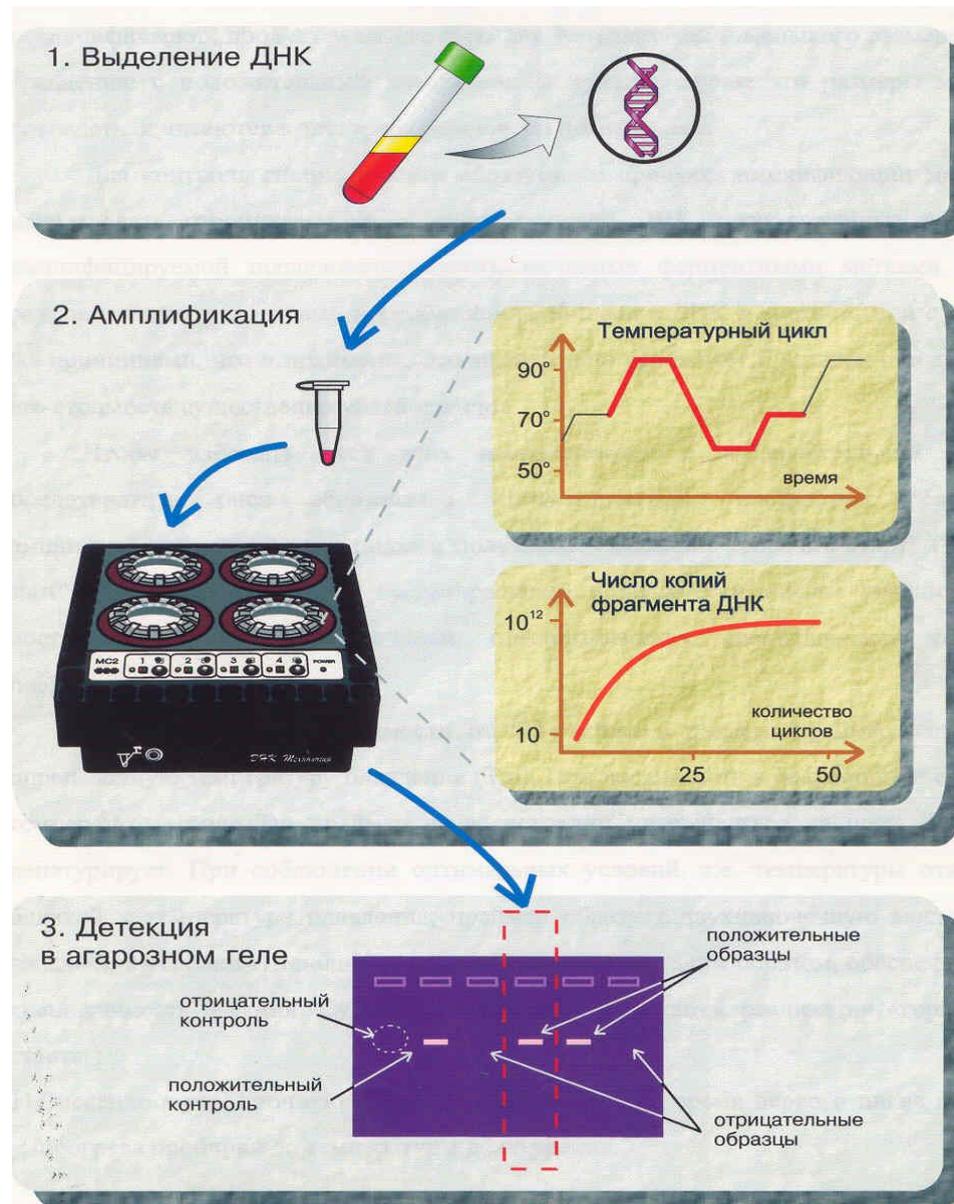
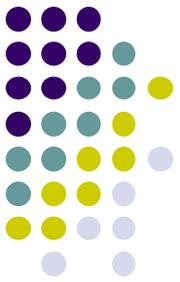


После 6 циклов ПЦР образуется 64 идентичных копии исходного генетического локуса (ампликона)

Специфичность ПЦР



Стадии метода ПЦР

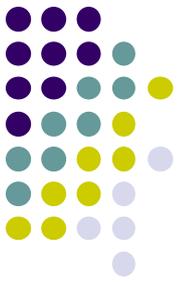


Появление метода ПЦР обусловило:



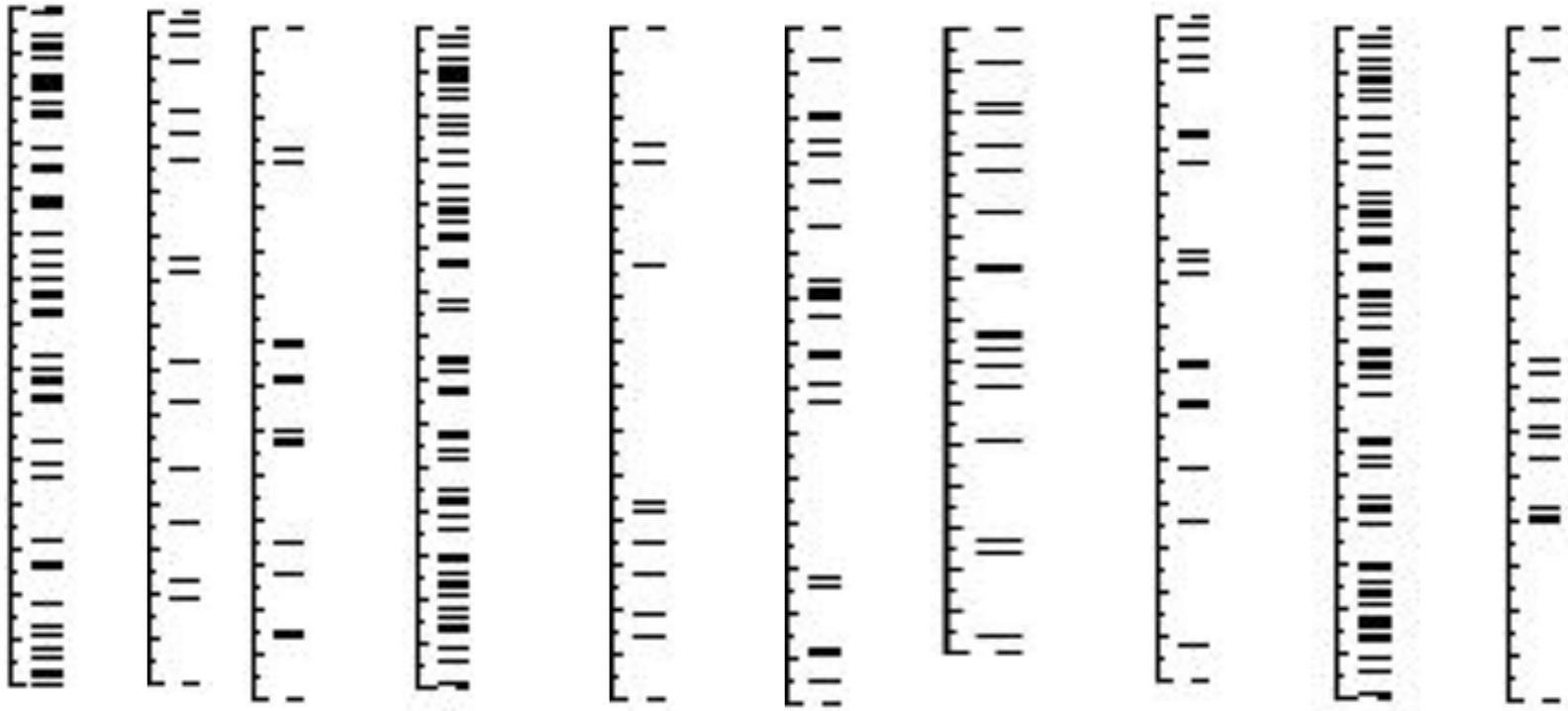
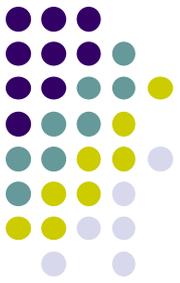
- Расшифровка нуклеотидной последовательности геномов ряда микроорганизмов,
- Описание основных принципов использования коротких, искусственно синтезированных молекул ДНК (праймеров),
- Обнаружение уникальных микроорганизмов, ферментная система которых (ДНК-полимераза) термостабильна, что позволяет сохранять ей свою активность при 95 C° и использовать её для проведения полимеразной цепной реакции

В настоящее время могут выявляться:

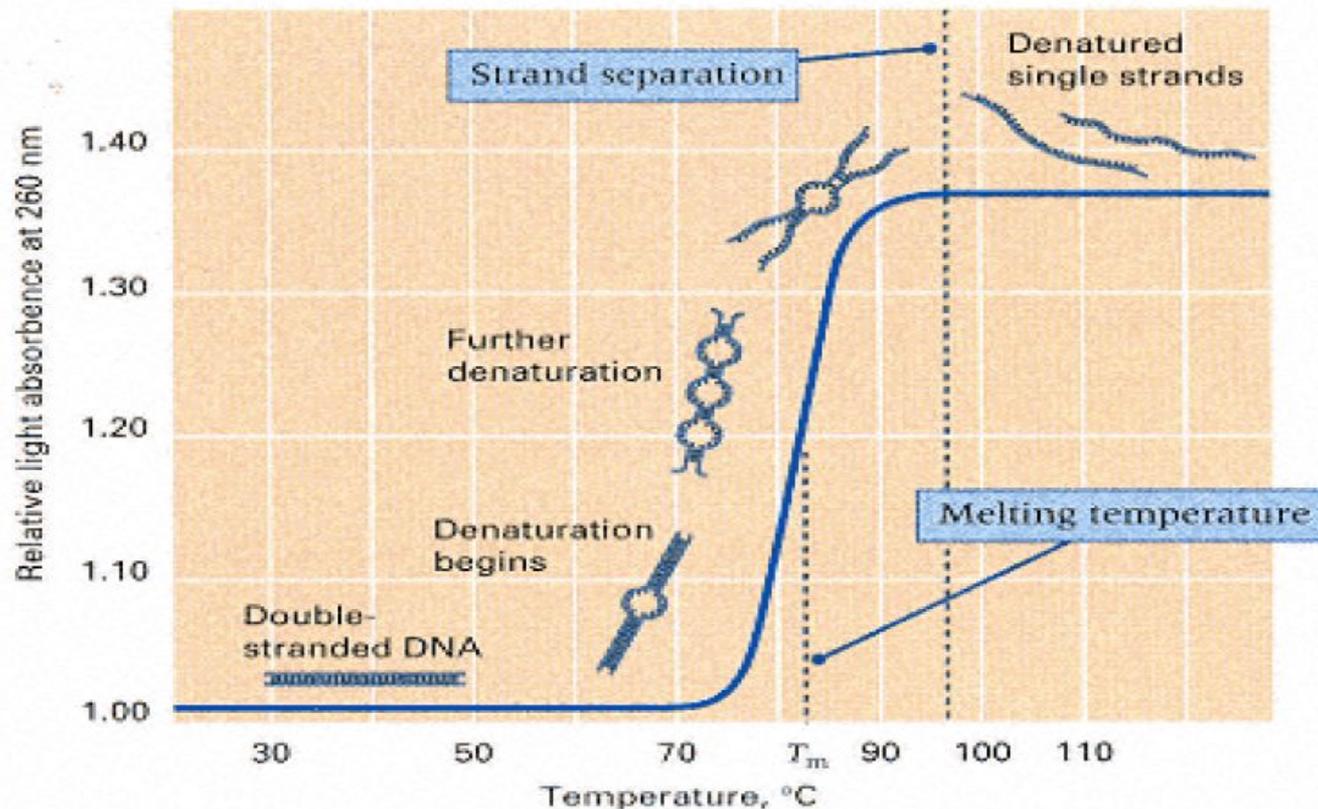
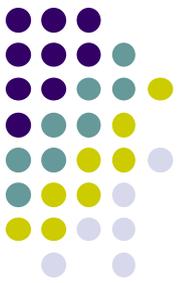


- *Chlamydia trachomatis*
- *Chlamydia pneumoniae*
- *Ureaplasma urealyticum*
- *Mycoplasma hominis*
- *Mycoplasma fermentans*
- *Mycoplasma genitalium*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Gardnerella vaginalis*
- (*Trichomonas vaginalis*)
- *Neisseria gonorrhoeae*
- Herpesviridae type 1,2
- (Herpes human virus type 6)
- Cytomegalovirus
- Epstein-Barre virus
- ДНК вирусов папилломы человека (type 16, 31, 33, 35; 18, 39, 45, 59; 52, 56, 58, 66)
- virus Hepatitis A
- virus Hepatitis B .
- virus Hepatitis C
- virus Hepatitis D
- virus Hepatitis E
- virus Hepatitis G
- virus Hepatitis TT
- клещевой энцефалит31.
- краснуха
- острый энтерит новорожденных и детей раннего возраста
- *Treponema pallidum* (сифилис)
- *Mycobacterium tuberculosis* (туберкулез)
- *Helicobacter pylori*
- *Corinebacterium diphteriae*
- *Salmonella* spp.
- *Shigella* spp.
- *Campylobacter jejuni*
- И целый ряд других клинически значимых микроорганизмов

Генетический штрих-код штаммов бактерий

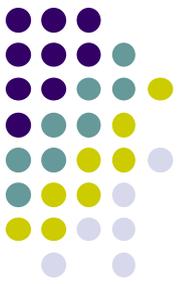


Молекулярная гибридизация

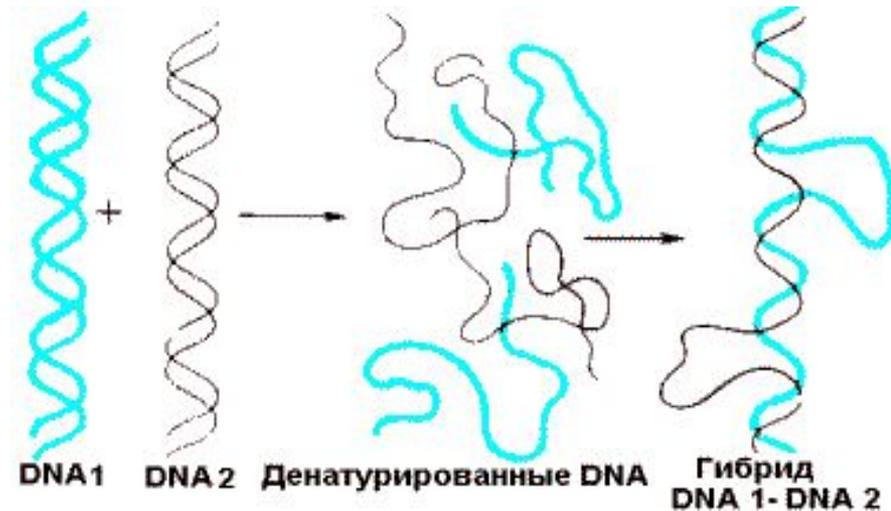


- При нагревании до 100°C водородные связи между комплементарными парами оснований разрушаются и ДНК диссоциирует на две самостоятельные цепочки. Этот процесс назван денатурацией ДНК («плавлением»). Выдерживание комплементарных цепей при температуре 65°C приводит к их спариванию и восстановлению структуры двойной спирали (гибридизация, или «отжиг»).

Молекулярная гибридизация

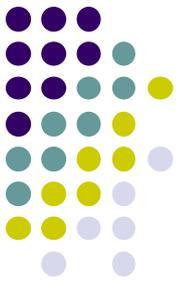
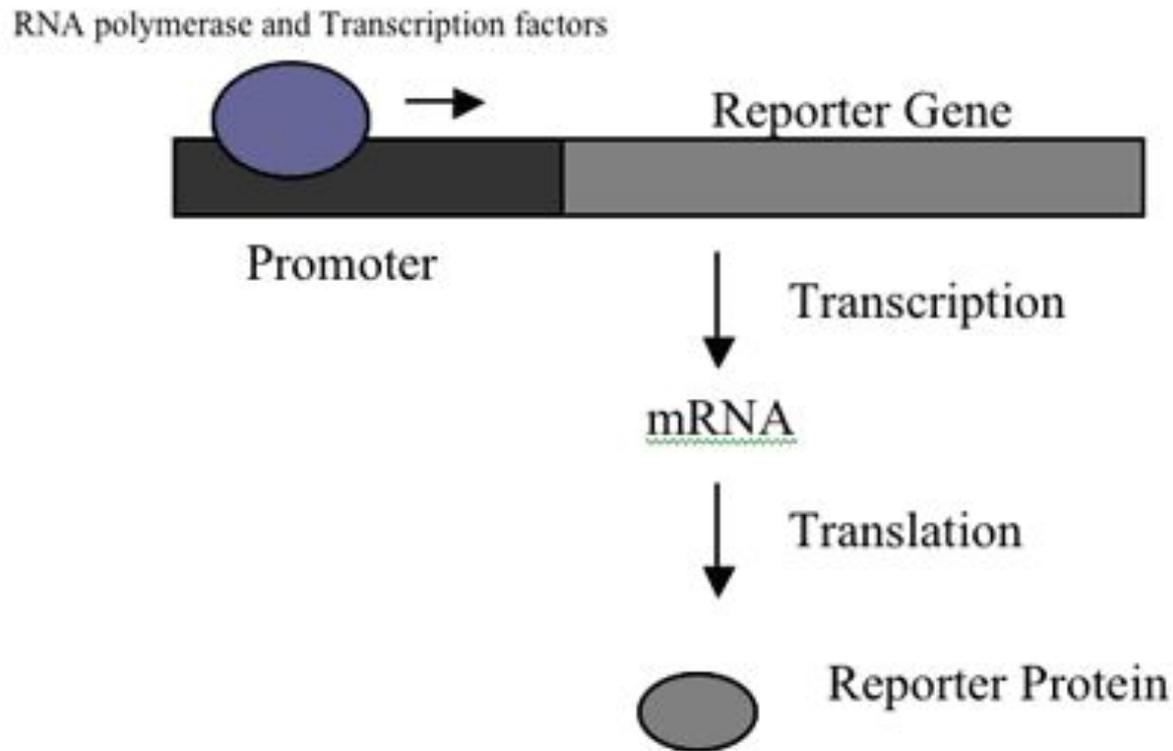


- Если свести вместе продукты денатурации целых молекул ДНК, лишь частично совпадающих по нуклеотидным последовательностям, то в условиях ренатурации будут возникать двуцепочечные молекулы не только из гомологичных цепей, но и из цепей разных ДНК. Этот процесс называют **молекулярной гибридизацией**.
- Чем ближе по первичной структуре сводимые ДНК, тем будет больше протяжённость спирализованных участков в гибридной молекуле. По доле последних можно количественно оценивать сходство нуклеотидных последовательностей ДНК разных организмов и таким образом судить о степени их генетической близости.



Репортерные гены

- кодируют нейтральные для клеток белки, наличие которых в тканях может быть легко тестировано

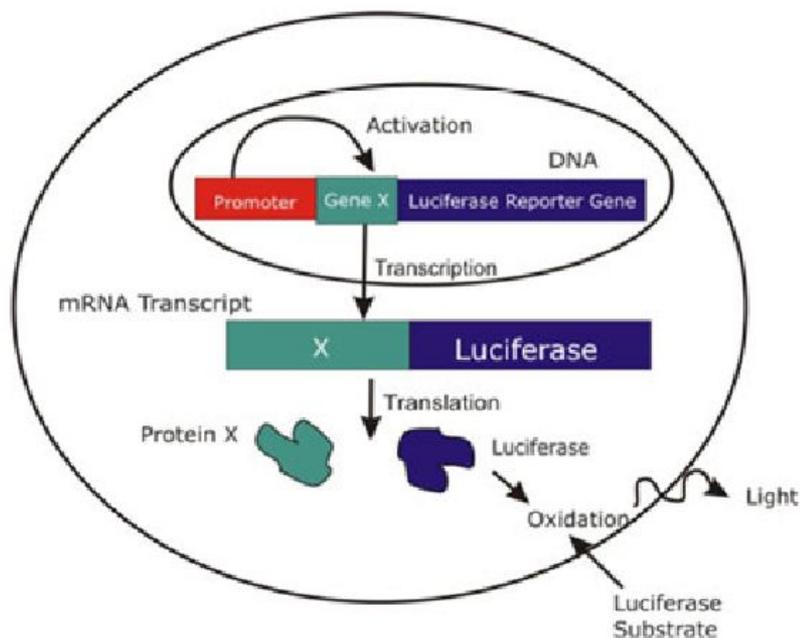


Репортерные гены



Репортерные гены стали неоценимым инструментом в изучении экспрессии генов. Их широко используют в биомедицинских и фармацевтических исследованиях, а также в молекулярной биологии и биохимии. Ген состоит из двух функциональных частей: одна (область кодирования) – это ДНК-последовательность, дающая информацию о производимом белке. Другая часть (промотор) – специфичная ДНК-последовательность, связанная с областью кодирования; которая регулирует транскрипцию гена. Промотор либо активирует, либо подавляет экспрессию гена.

Цель анализа репортерного гена – измерить регуляторный потенциал неизвестной ДНК-последовательности. Это может быть сделано путем сшивки последовательности промотора с легко определяемым репортерным геном, например, таким, который кодирует люциферазу светлячка.



Репортерные гены



- В качестве репортерных используются гены β -глюкуронидазы (*GUS*), зеленого флюоресцентного белка (*GFP*), люциферазы (*LUC/LUX*), хлорамфениколацетилтрансферазы (*CAT*). К настоящему времени наиболее часто используют гены *GUS* и *GFP* и, в меньшей степени, *LUC* и *CAT*.
- ген ***GUS*** является модифицированным геном из *E.coli*, позволяет подбирать соответствующие субстраты для спектрофотометрического или флуориметрического определения активности фермента, а также для гистохимического окрашивания тканей *in situ* (например, в синий цвет). Фермент достаточно стабилен: он устойчив к нагреванию и к действию детергентов. В процессе замораживания-оттаивания потери активности *GUS* не происходит. Стабилен и активен от нескольких часов до нескольких суток.
- ***CAT*** - гены выделены из *Escherichia coli*. Этот фермент катализирует реакцию переноса ацетильной группы от ацетил-КоА к хлорамфениколу. Определяется гистохимически, по изменению окраски ткани при добавлении соответствующего субстрата.
- ***LUC/LUX*** - ген кодирует фермент люциферазу (клонирована из бактерий и светлячка). Для определения активности ферментов необходимо специальное оборудование - флуориметр и цифровая видеокамера с амплификатором светового сигнала. Фермент теряет активность при действии детергентов и повышенной температуры.

Методы детекции



Обычные репортерные гены - это бета-галактозидаза, бета-глюкуронидаза и люцифераза. Для определения белка, экспрессируемого репортерным геном, используются различные методы детекции – люминесценция, абсорбция и флуоресценция (см. ниже).

Репортер	Метод детекции		
	Люминесценция	Флуоресценция	Абсорбция
Люцифераза	+		
Бета-галактосидаза (GUS)	+	+	+
Бета-глюкуронидаза (β -Gal)	+	+	
Выделяемая из плаценты щелочная фосфатаза (SEAP)	+		+
Зеленый флуоресцентный протеин (GFP)		+	

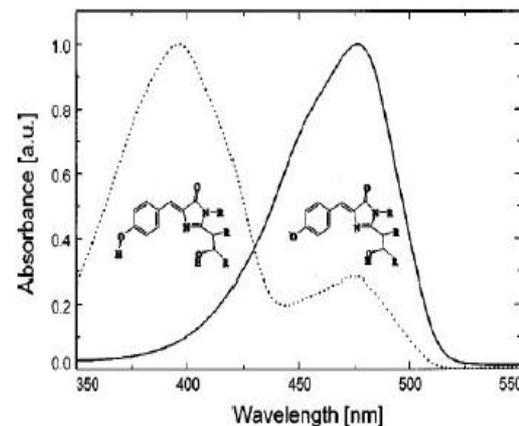
Green Fluorescent Protein (GFP)



GFP обладает способностью флюоресцировать в видимой (зеленой) области спектра при облучении длинноволновым УФ. Эта флюоресценция обусловлена непосредственно белком, для ее проявления не требуется субстратов или кофакторов. Благодаря этому свойству ген GFP является очень перспективным репортерным геном, позволяющим проводить разнообразные прижизненные (недеструктивные) исследования с трансгенными организмами.

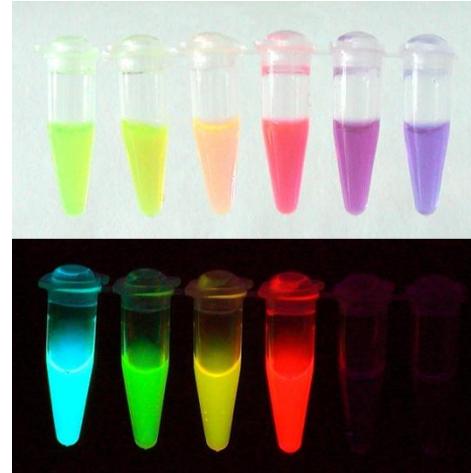
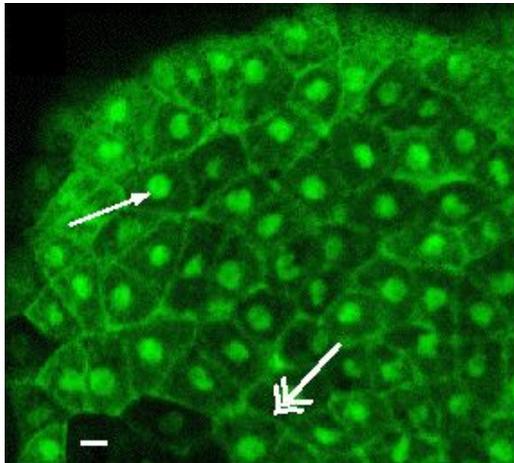


(a)



(b)

Green Fluorescent Protein (GFP)



Микробы-индикаторы

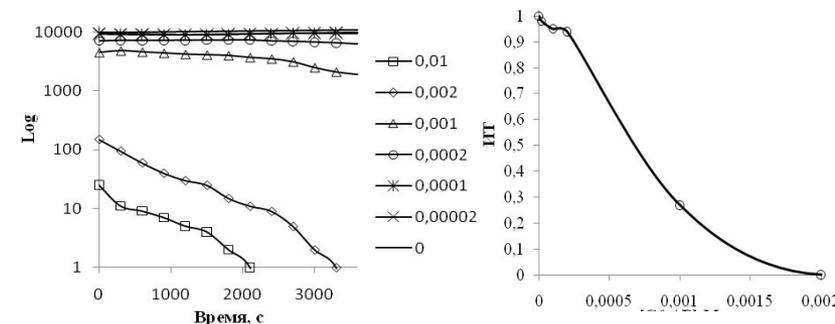
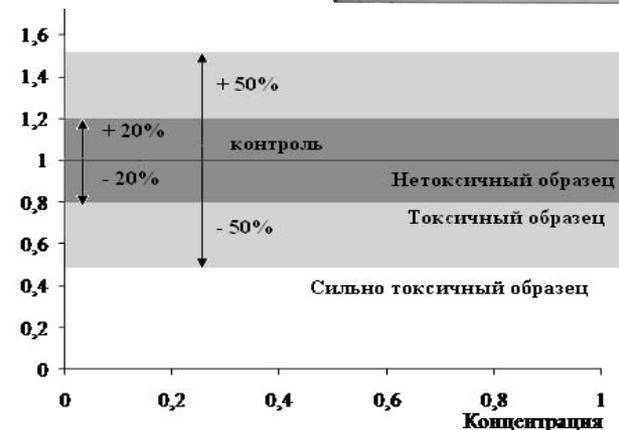
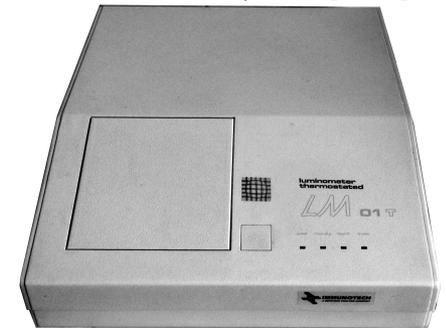


- Микробная индикация - эффективный инструмент для мониторинга загрязнений
- При этом микробная индикация не конкурирует с методами химического анализа, а лишь дополняет их
- Биологические индикаторы интересны тем, что реакция живого организма позволяет оценить антропогенное влияние на среду обитания живого мира в показателях, отвечающих реальным условиям
- Индикаторами фекального загрязнения воды и почвы являются сульфатредуцирующие бактерии, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus faecalis*, *Balantidium coli*, *Entamoeba histolytica*, *Naegleria gruberi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* и др.
- *Streptococcus faecalis* является показателем свежего фекального загрязнения, *Clostridium perfringens* – индикатором некачественной очистки воды. *Pseudomonas aeruginosa* очень часто используется для контроля качества воды в системе водоснабжения больничных учреждений.
- К бактериям-индикаторам загрязнения среды кадмием относятся: *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas marina*. *Nitrosomonas europaea*, *Alcaligenes faecalis* – угнетается рост и развитие, изменяется экспозиция генерации
- Показателями ртутного загрязнения воды являются бактерии родов *Flavobacterium*, *Escherichia*, *Sarcina*, *Enterobacter*, *Achromobacter*, *Brevibacterium*.

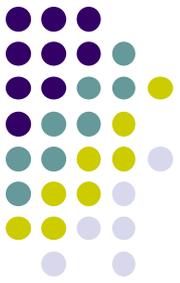
Микробы-индикаторы



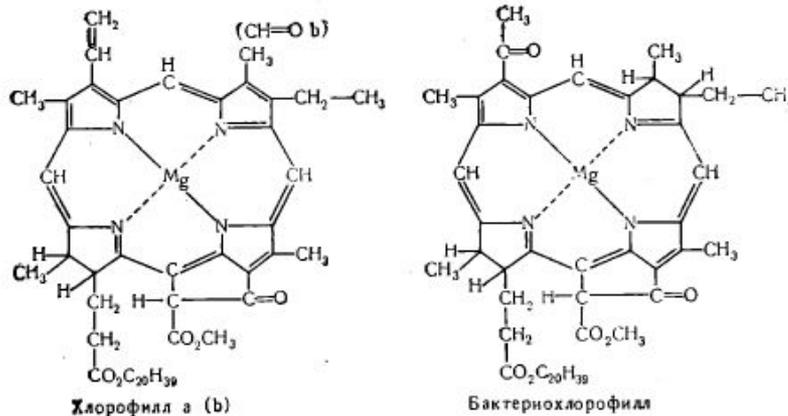
- Методы люминесцентного бактериального тестирования распространены во всех развитых странах мира. Они широко используются в качестве первичного быстрого количественного лабораторного теста на химическую токсичность и безопасность проб воды и водных вытяжек из различных объектов окружающей среды. В России в качестве тест-объекта используются препараты лиофилизированных люминесцентных бактерий или ферментные системы из этих бактерий серии «Эколюм».
- Сущность метода основана на тушении свечения бактерий загрязнителями различной природы. Уменьшение интенсивности свечения обратно пропорционально токсическому эффекту. Критерием токсического действия является изменение величины интенсивности биолюминесценции тест-объекта в исследуемой пробе по сравнению с контрольной пробой, не содержащей токсических веществ. Количественная оценка параметра тест-реакции выражается в виде безразмерной величины — индекса токсичности.



Действие света на микроорганизмы



Фотосинтезирующие бактерии обладают одной из наиболее простых и стабильных систем для сбора и эффективной трансформации солнечной энергии по сравнению с другими фотосинтезирующими организмами (растения, водоросли и др.)



Пигмент	Цвет	Микроорганизм
Каротиноиды	Красный, оранжевый, желтый	Микобактерии, сарцины, актиномицеты (защитает от ультрафиолета)
Хиноновые	Желтые	Микобактерии туберкулеза
Меланиновые	Черные, коричневые	бактериоиды
Пирроловые	Ярко-красные	<i>Serratia marcescens</i> , актиномицеты
Фенозиновые	Сине-зеленые, при этом может меняться	Синегнойная палочка (пиоцианин)

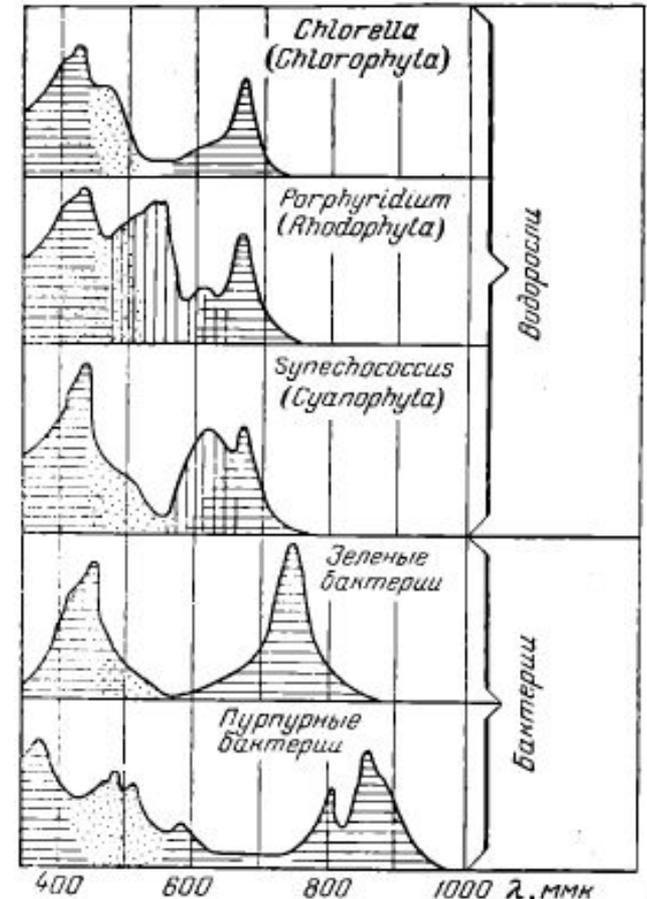


Рис. 38. Спектры поглощения клеток различных фотосинтезирующих микроорганизмов (Stanier и Cohen-Bazire, 1957)

Каротиноиды



- Одним из универсальных механизмов адаптации к световому излучению высокой интенсивности и защиты от токсичных форм фотосенсибилизированного кислорода является синтез каротиноидных пигментов. Характерным примером может служить яркая окраска микроорганизмов, живущих в условиях высокой освещенности (в воздухе, на поверхности скал, обнажений горных пород, в высокогорье и т.д.).

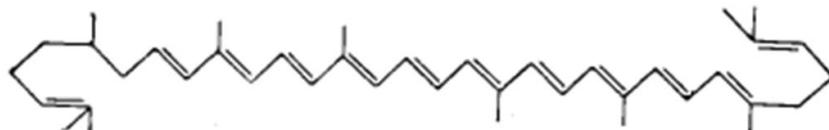


Рис. 28. Ликопин

Таблица 7

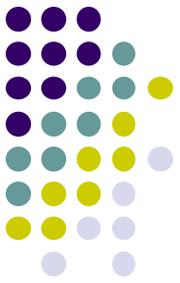
Максимумы поглощения основных каротиноидов пурпурных бактерий (Goodwin, 1956; Goodwin, Land, 1956)

Каротиноид	Максимумы поглощения пигментов (нм) в петролейном эфире			Окраска
	445	470	502	
Ликопин	445	470	502	Коричнево-оранжевая
P-481	454	481	514	Пурпурно-оранжевая
Сфероиден (Y)	426	451	482	Желтая
Сфероиденон (R)	458	480	512	Красно-пурпурная
Спириллоксантин	463	491	525	Пурпурная
Родопин	445	470	501	Коричнево-оранжевая
Родовибрин (ОН-P-481)	455	481	514	Пурпурно-оранжевая
ОН-Y	426	452	482	Желтая
P-512	485	512	543	Темно-пурпурная
ОН-R	452	480	512	Пурпурно-оранжевая
Деметилированный спириллоксантин	465	491	525	Пурпурная

Вероятная структура каротиноидов фотосинтезирующих бактерий (Jensen, Cohen-Barize, Stanier, 1961)

Наименование	Структура
Родопин	
P-481	
Родовибрин (ОН-P-481)	
Монодеметилированный спириллоксантин	
Спириллоксантин	
Сфероиден (Y)	

Влажность и микробиологическая порча продуктов



- С уменьшением содержания воды в субстрате интенсивность развития микробов падает, а при уменьшении содержания воды ниже определенного предела их развитие может прекратиться совсем
- Поскольку вода непосредственно участвует в гидролитических процессах, ее удаление или связывание за счет увеличения содержания соли или сахара тормозит многие реакции и ингибирует рост микроорганизмов, таким образом удлиняя сроки хранения продуктов
- В продуктах с низкой влажностью могут происходить окисление жиров, неферментативное потемнение, потеря водорастворимых веществ (витаминов), порча, вызванная ферментами. Активность микроорганизмов здесь подавлена. В продуктах с промежуточной влажностью могут протекать разные процессы, в том числе с участием микроорганизмов. В процессах, протекающих при высокой влажности, микроорганизмам принадлежит решающая роль

Классификация товаров по влажности и требования к оптимальному влажностному режиму

Группировка продуктов по влажности	Диапазон ОВВ, %	Группа продуктов
Сухие	Не выше 65	Бакалейные продукты: мука, крупа, соль, сахар, макаронные изделия, пряности: сухофрукты
Умеренные	70-75	Кондитерские товары, вина, кофе, чай (не более 70 %) Фруктово-ягодные изделия, масло сливочное, маргарин
	Не выше 75	
Влажные	80-85	Молочные продукты, мясо, рыба, тыквенные овощи, лук, чеснок, ликеро-водочные изделия, вина, яйца и яйцепродукты
Повышенной влажности	90-95	Большинство видов плодов и овощей, замороженные плоды, овощи, мясо, рыба, квашенные овощи

Содержание влаги (%) в пищевых продуктах изменяется в широких пределах:

Мясо	65-75	Мука	12-14
Молоко	87	Кофе-зерна (обжаренные)	5
Фрукты, овощи	70-95	Сухое молоко	4
Хлеб	35	Пиво, соки	87-90
Мед	20	Сыр	37
Масло, маргарин	16-18	Джем	28