



Методы идентификации микроорганизмов. Часть 1. Идентификация на основании фенотипических признаков микроорганизма

Вдовина Татьяна Владимировна,
Кафедра промышленной биотехнологии
ФГБОУ ВО КНТУ
tvkirilina@gmail.com

Идентификация микроорганизмов

Таксономические категории

- вид (species),
- род (genus),
- семейство (familia),
- порядок (ordo),
- класс (classis),
- отдел (divisio),
- царство (regnum)
- надцарство (domen)

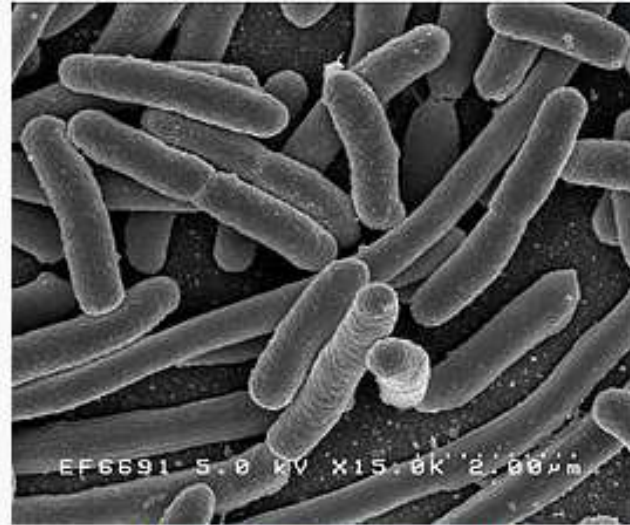
p.*Bacillus* = *Bacillus* sp.

Bacillus subtilis = *B.subtilis*

Bacillus subtilis X33

род вид штамм

Кишечная палочка



Научная классификация

промежуточные ранги [\[показать\]](#)

Домен: Бактерии

Тип: Протеобактерии

Класс: Гамма-протеобактерии

Порядок: *Enterobacteriales* RAHN
1937

Семейство: Энтеробактерии

Род: Эшерихии

Вид: Кишечная палочка

Международное научное название

Escherichia coli (MIGULA 1895)

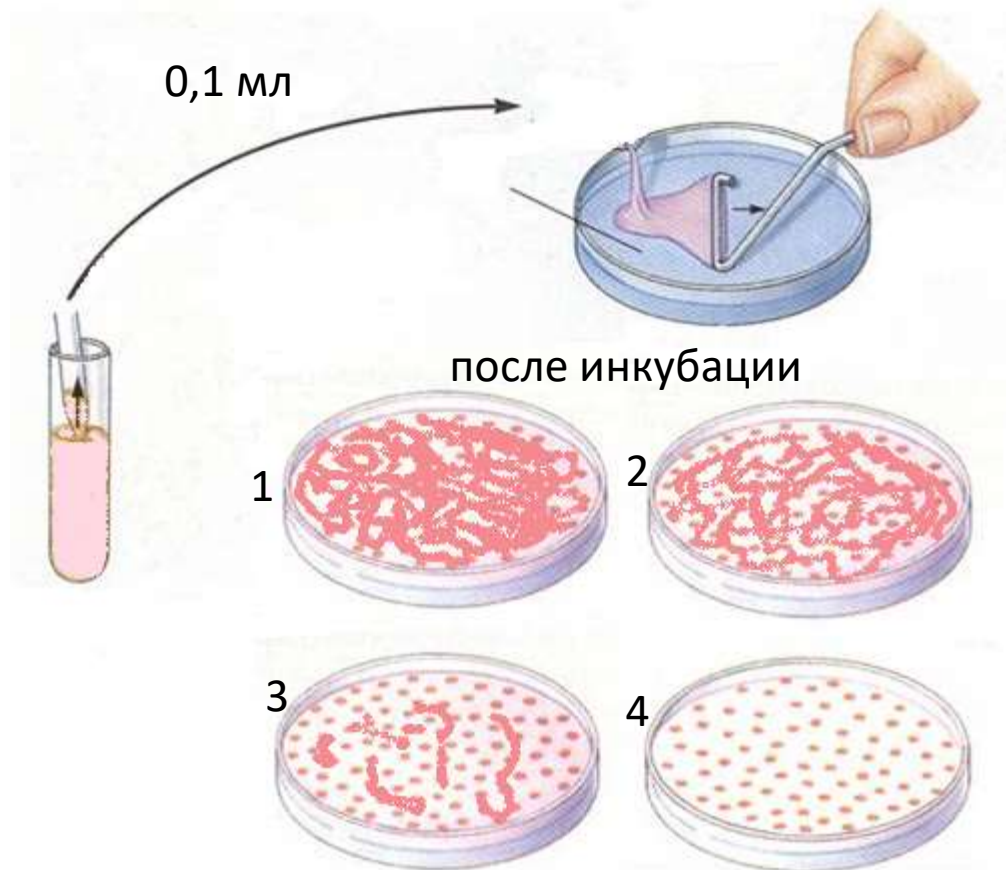
CASTELLANI and CHALMERS 1919

Классический метод идентификации

Методы идентификации на основании фенотипических признаков микроорганизма

- дифференциальное культивирование на питательных средах:
 - получение накопительной культуры;
 - выделение чистой культуры.

Выделение чистой культуры

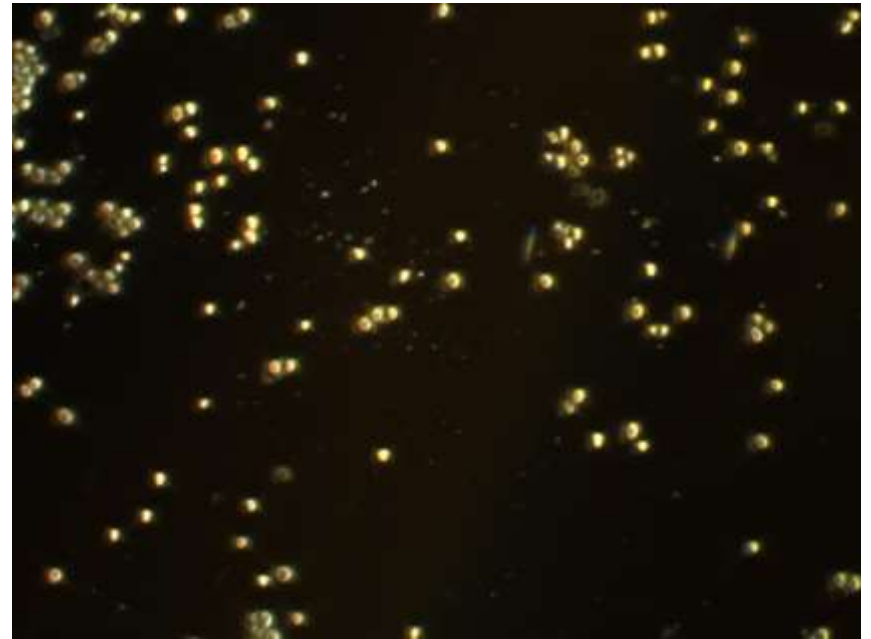
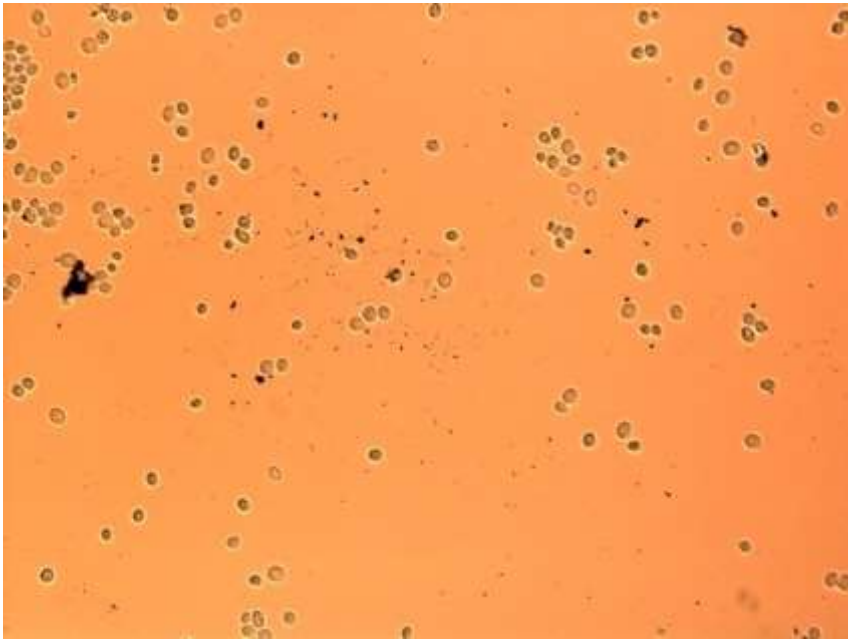


Идентификация на основании фенотипических признаков микроорганизма

- **Морфологические признаки:**

- форма клеток и их взаимное расположение;
- размеры клеток;
- способность к спорообразованию;
- наличие капсул и клеточных включений;
- способность к движению;
- дифференциальная окраска(например, по Граму).

Микроскопия



Saccharomyces cerevisiae, 400x

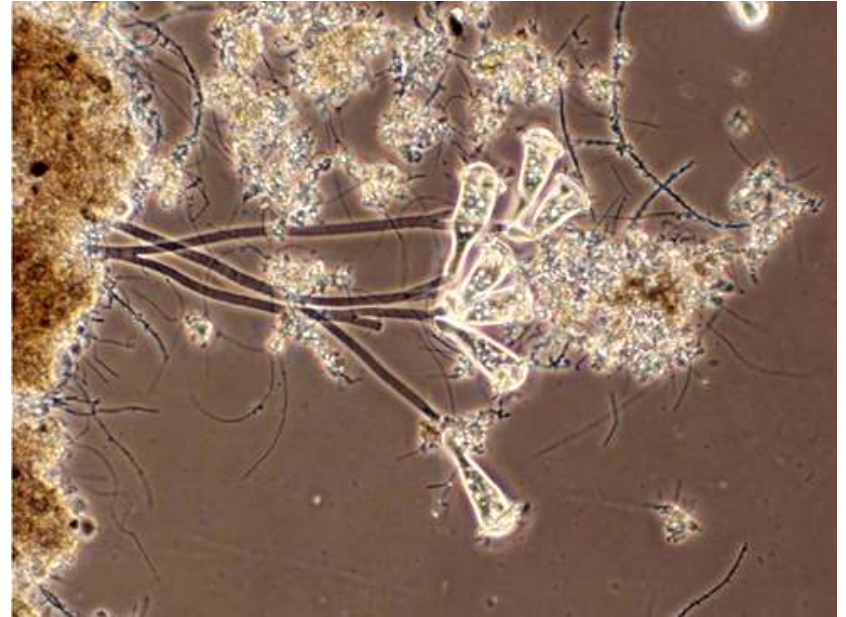
В СВЕТЛОМ ПОЛЕ

В ТЕМНОМ ПОЛЕ

Фазово-контрастная микроскопия



в светлом поле

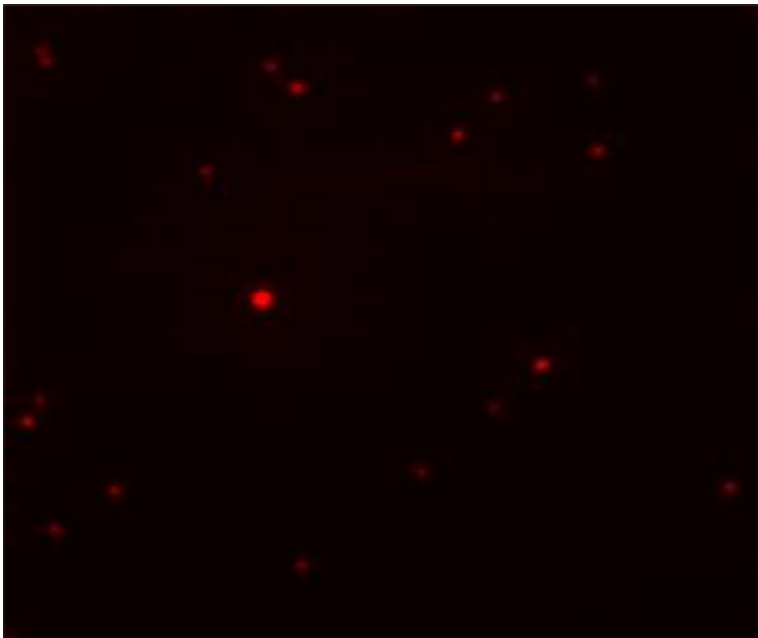


в фазовом контрасте

Микробиоценоз активного ила, 400х

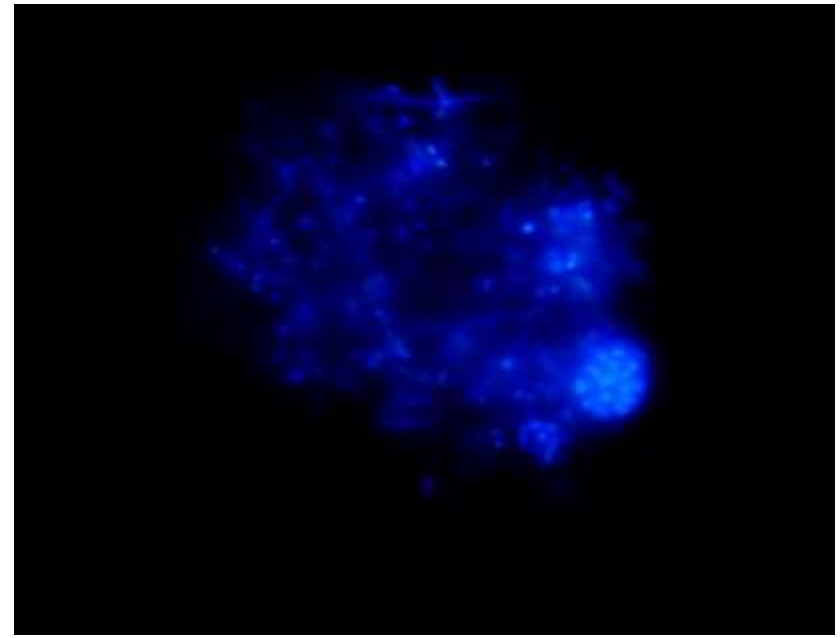
Флуоресцентная микроскопия

Собственная флуоресценция



Микроводоросли р. *Chlorella* , 400 х.
Хлорофилл обуславливает собственную
флуоресценцию микроводорослей

Наведенная флуоресценция



Хлопья активного ила, 1000х.
Краситель DAPI

Методы окрашивания

- **Флуоресцентное окрашивание**

- **DAPI (4',6-диамидо-2-фенилиндол)** общий краситель для идентификации микроорганизмов в природных образцах.

- Клетки, окрашенные DAPI, флуоресцируют ярко-синим цветом.

- Окрашивает **нуклеиновую кислоту**.

- Неспецифическое фоновое окрашивание иногда является проблемой.

- Нет дифференциации живых или мертвых клеток (количественная оценка)!**

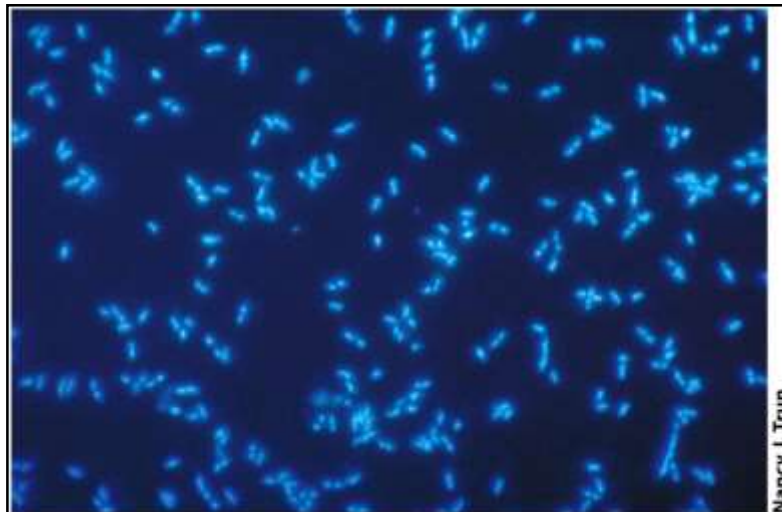
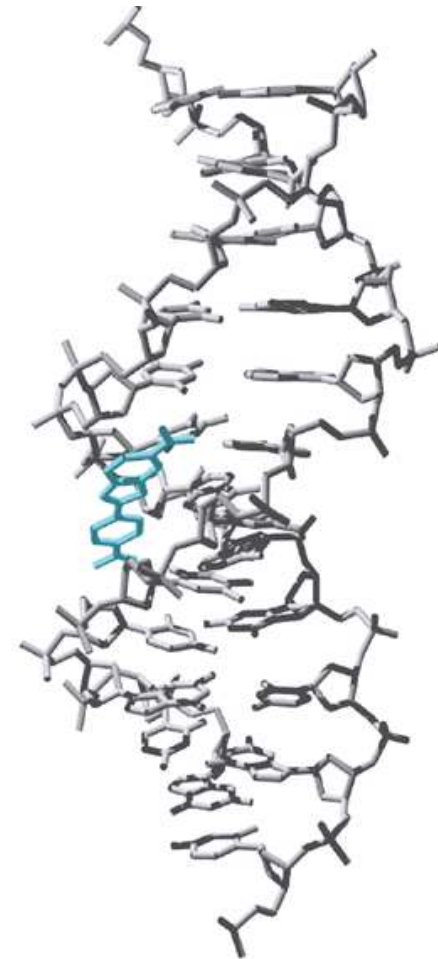
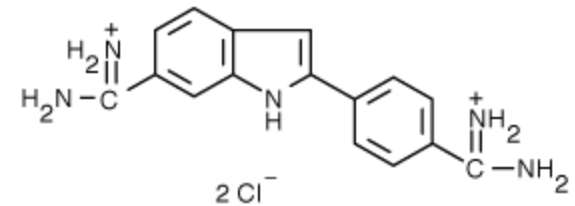
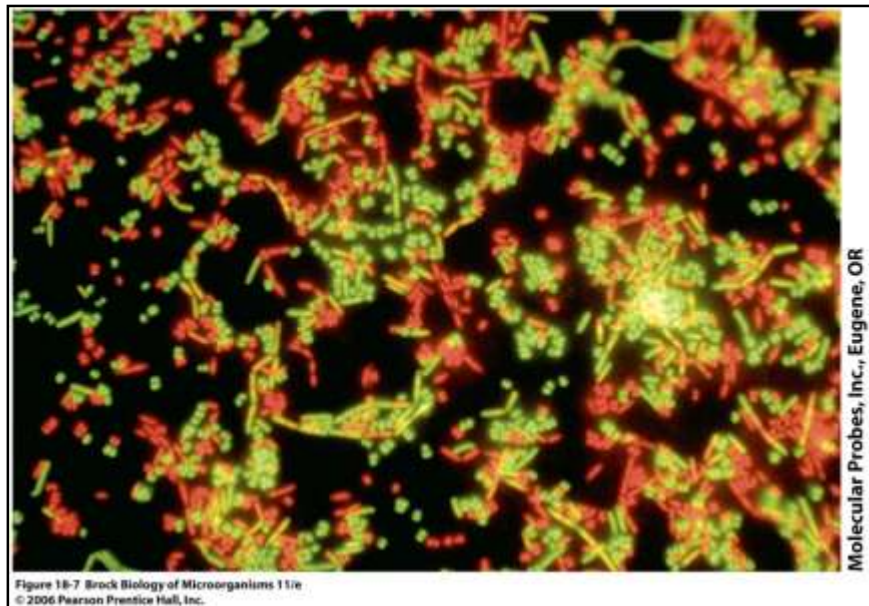


Figure 18-6 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Nancy J. Trun

Методы окрашивания



Зеленые клетки = живые

Красные клетки = мертвые

- **Флуоресцентное окрашивание**

- Дифференцировка независимо от того, интактна цитоплазматическая мембрана или нет.

- Два красителя добавлены к клеткам.

- Зеленый флуоресцентный краситель проникает во все клетки, жизнеспособные или нет.

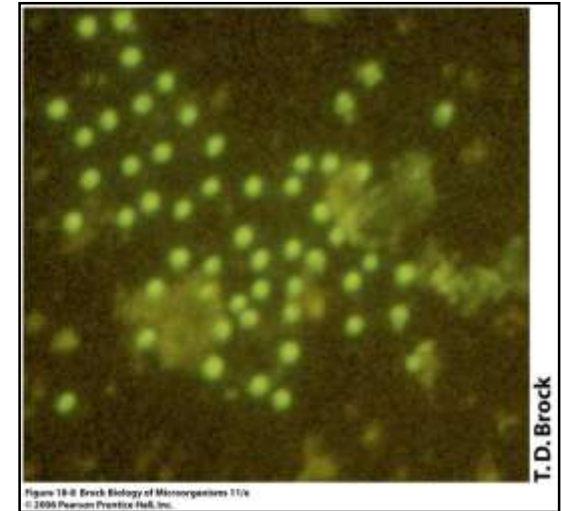
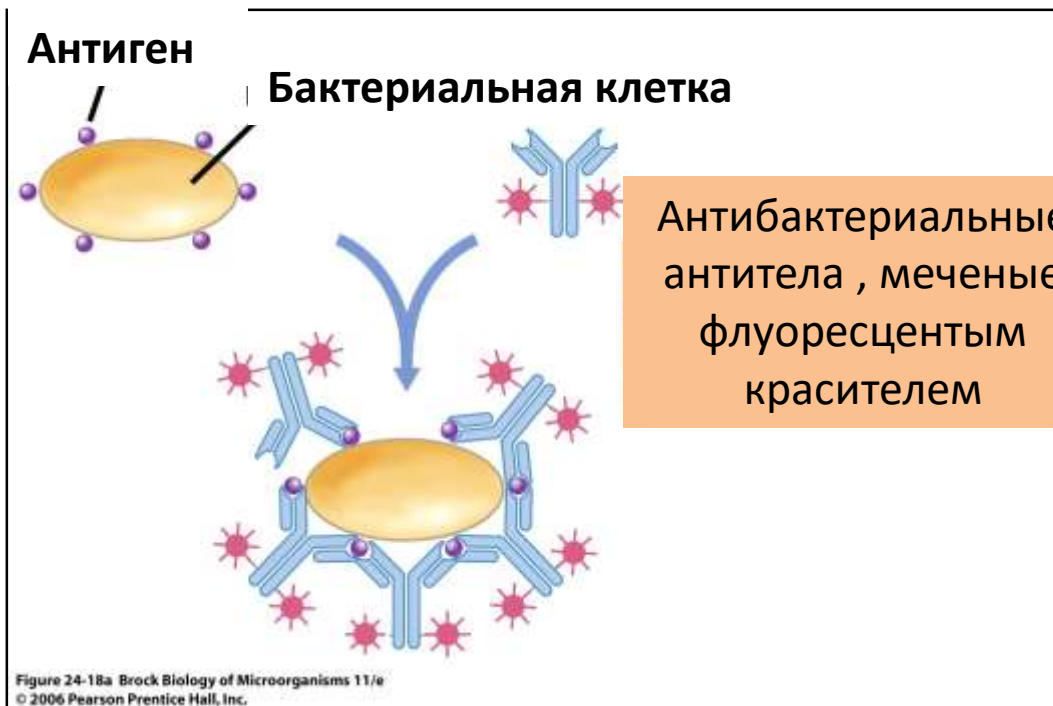
- Красный краситель (йодид пропидия) проникает только в клетки без интактной оболочки (мертвые).

- Большая проблема с неспецифическим фоновым окрашиванием (не подходит для образцов из окружающей среды).

- **Дифференциация живых или мертвых клеток (количественная оценка и жизнеспособность)!!**

Флуоресцентные антитела

- Высокая специфичность в отношении поверхностных составляющих конкретного организма.
- Позволяет отслеживать организм в сложной среде обитания (например, почва, клинический образец)



Sulfolobus acidocaldarius
(ARCHAEA) на
сульфатных почвенных
частицах

Флуоресцентные антитела



Clostridium septicum: окрашивание антителами, мечеными изотиоцианатом флуоресцеина (желто-зеленая флуоресценция).

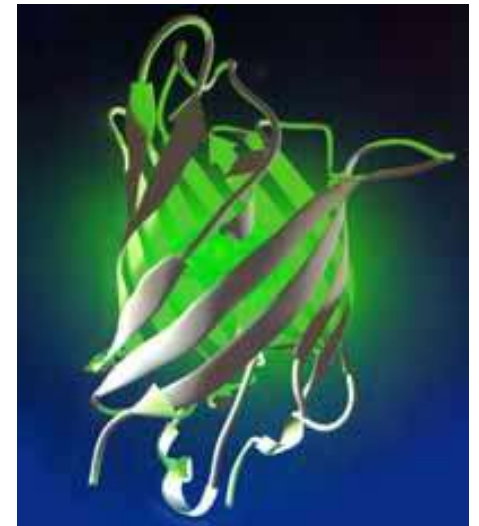
Clostridium chauvoei: окраска антителами, мечеными родамином В (красно-оранжевая флуоресценция)

Green Fluorescent Protein (клеточная метка)

Зеленый флуоресцентный белок (GFP) делает клетки автофлуоресцентными и является средством отслеживания клеток, введенных в окружающую среду.

Маркерная система

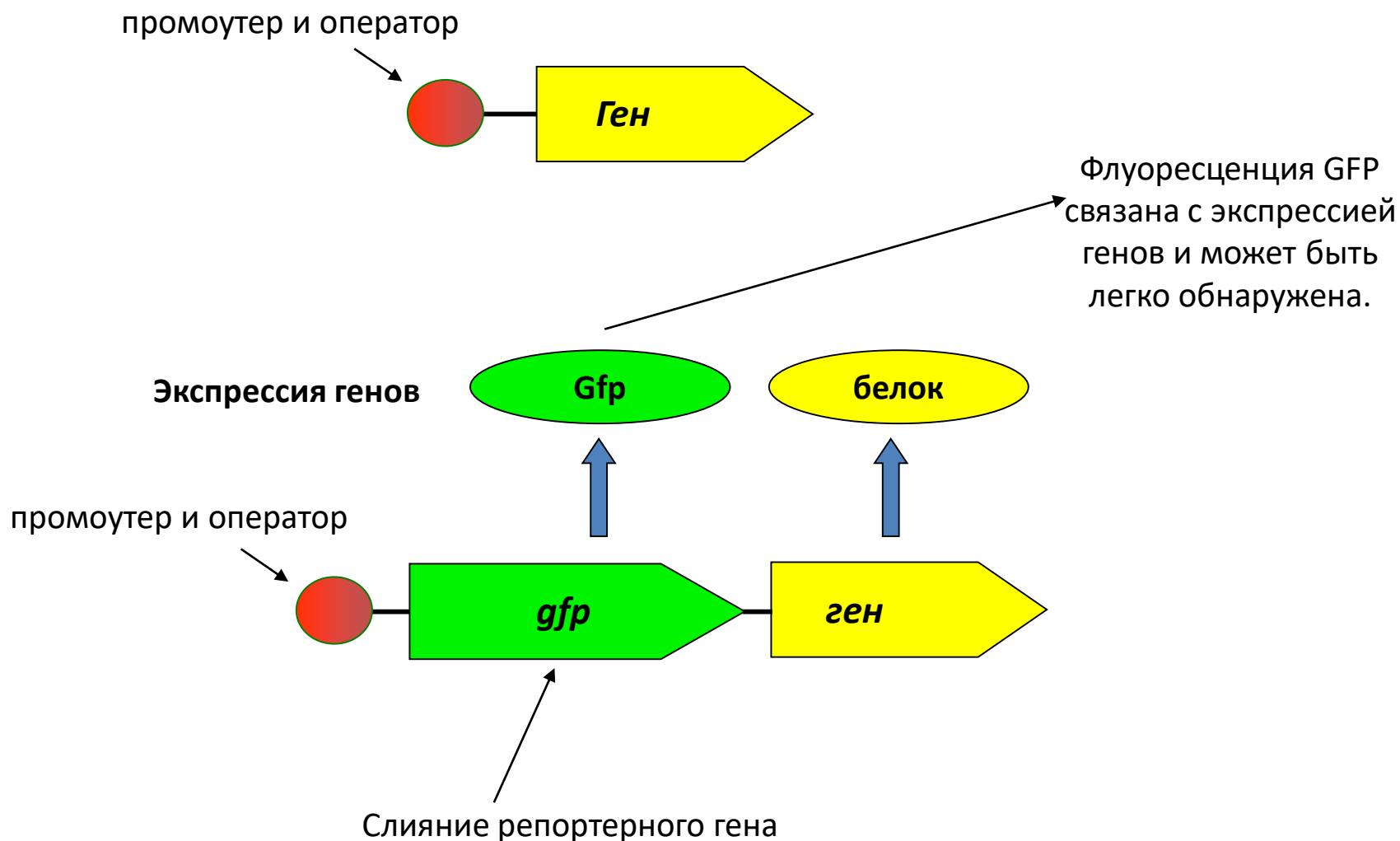
- Идеальная система молекулярных маркеров:
 - Ген *gfp* обнаружен у медузы *Aequoria victoria* (Эукариоты!).
 - GFP излучает зеленый свет с длиной волны 508 нм при возбуждении УФ-светом с длиной волны 296 нм.
 - Не требует добавления субстратов.
 - Не является видоспецифичным.
 - Все, что требуется, — это экспрессия генов в клетке-хозяине и посттрансляционная модификация.



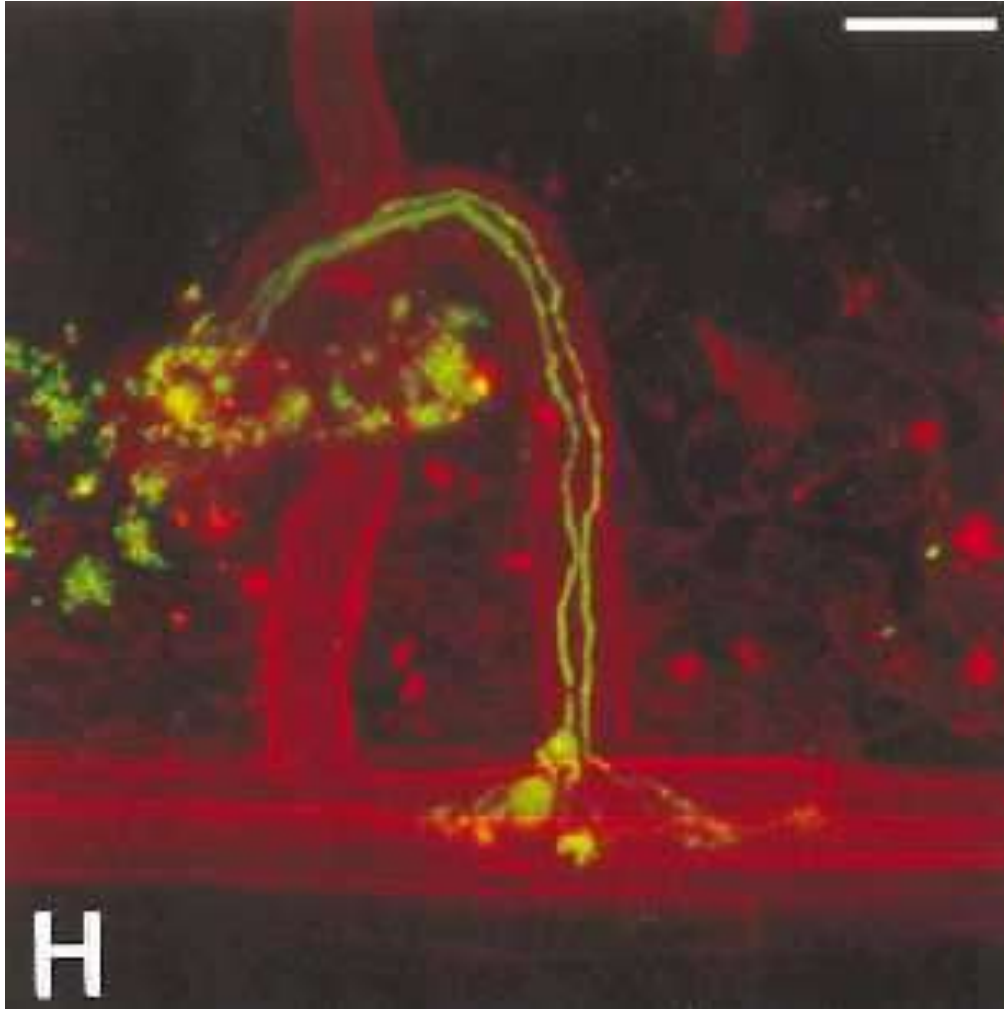
Использование *gfp*

- Существует 2 основных направления применения репортерного гена *gfp*:
 - Он может находиться под контролем конститутивно экспрессируемого промотора.
 - Это означает, что бактерии все время постоянно производят *gfp*.
 - Его можно соединить с геном, который экспрессируется только при определенных условиях.
 - Бактерии будут флуоресцировать только тогда, когда условия подходят для экспрессии исследуемого гена.

Визуализация регуляции генов с использованием слияния репортерных генов GFP



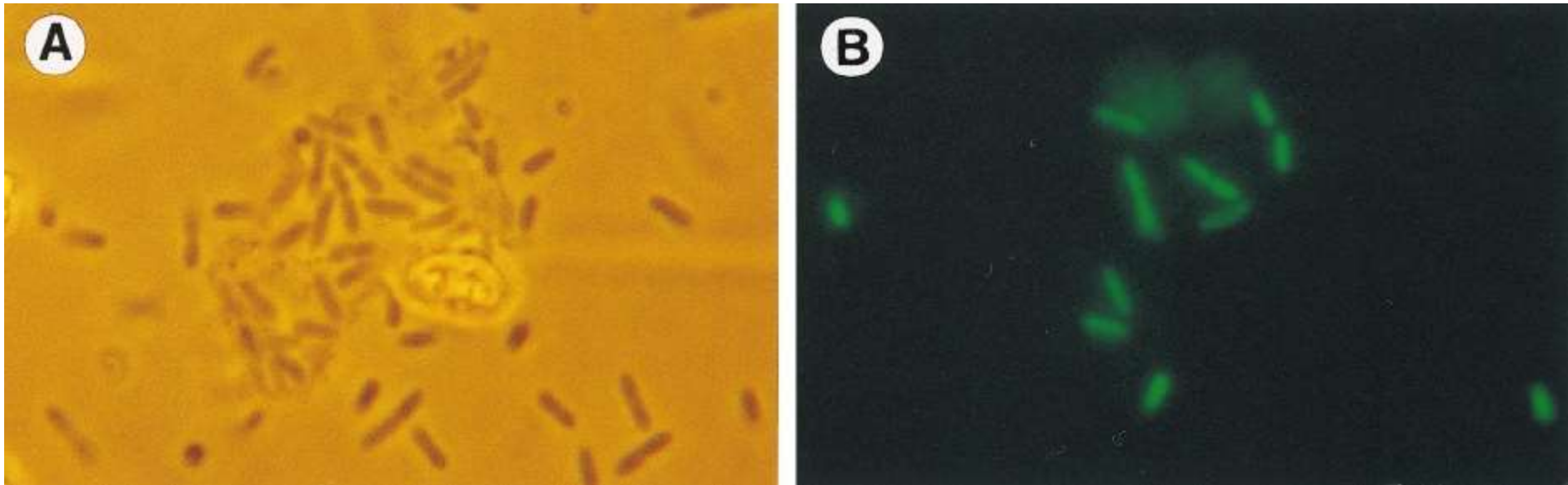
Применение GFP



- Исследование ранних стадий симбиоза между ризобиями и их растением-хозяином.
- Помеченные GFP ризобии перемещаются по инфекционной нити в корень растения

Применение GFP

- GFP – маркер для *Pseudomonas* spp.



- Детекция маркированных *Pseudomonas* spp. в смешенной культуре

GFP „репортерный ген“

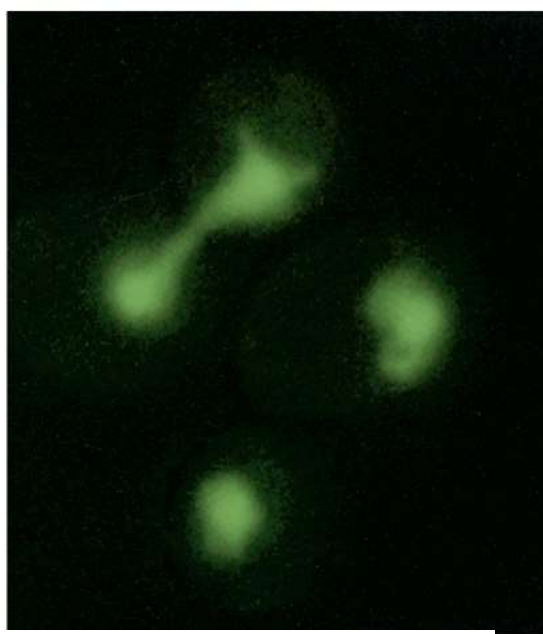
GFP GFP как метка для локализации белка in vivo

GFP-Fusionsprotein



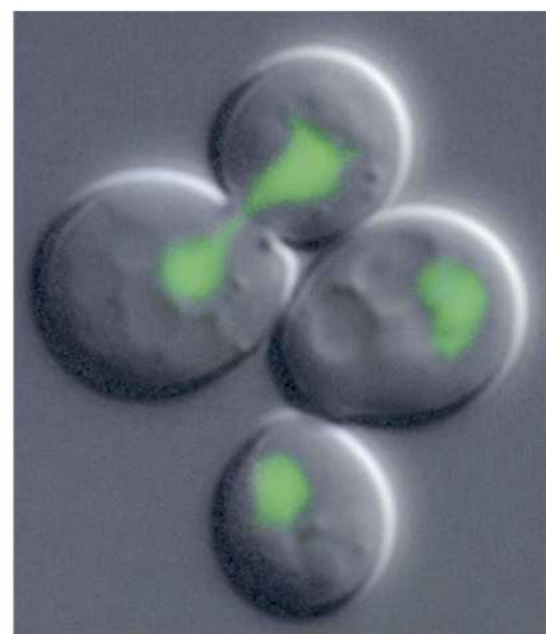
Jason A. Kahana and Pamela A. Silver

А) Дифференциально-интерференционная контрастная микроскопия



Jason A. Kahana and Pamela A. Silver

Б) Флуоресцентная микроскопия



Jason A. Kahana and Pamela A. Silver

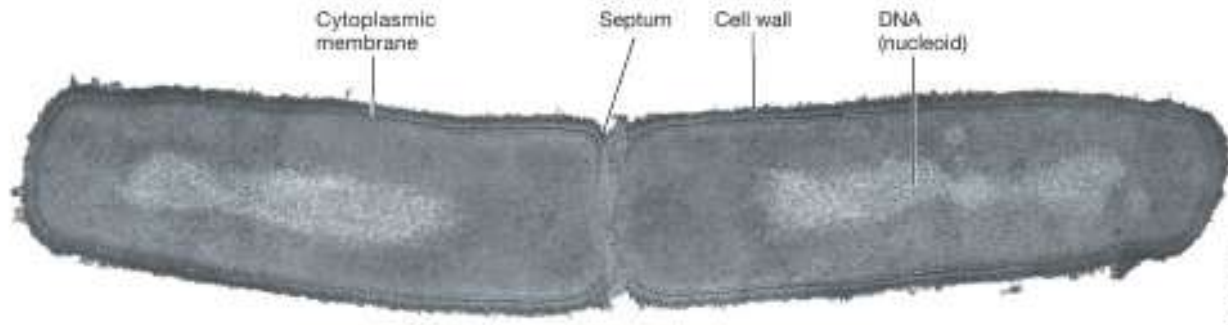
С) Наложение двух фотографий

Pho2 (DNA-binding protein) в дрожжах

Сравнение светового и электронного микроскопов

| | Электронный | Световой |
|-------------------------------------|---|--|
| Источник излучения | электроны | свет |
| Длина волны | 0,005 нм | 400 - 700 нм |
| Максимальное разрешение на практике | 5-20 нм СЭМ 0,5 нм ТЭМ | 200 нм |
| Максимальное полезное увеличение | x100,000 СЭМ x250,000 ТЭМ | x1500 |
| Линзы | электромагнитные | стеклянные |
| Объект | не живой, обезвоженный, относительно маленький или тонкий удерживается на маленькой медной сетке в вакууме | живой или неживой обычно лежит на предметном стекле |
| Распространенные красители | содержат цветные металлы, которые отражают электроны | цветные красители |
| Изображение | чёрно-белое | цветное |

Электронная микроскопия



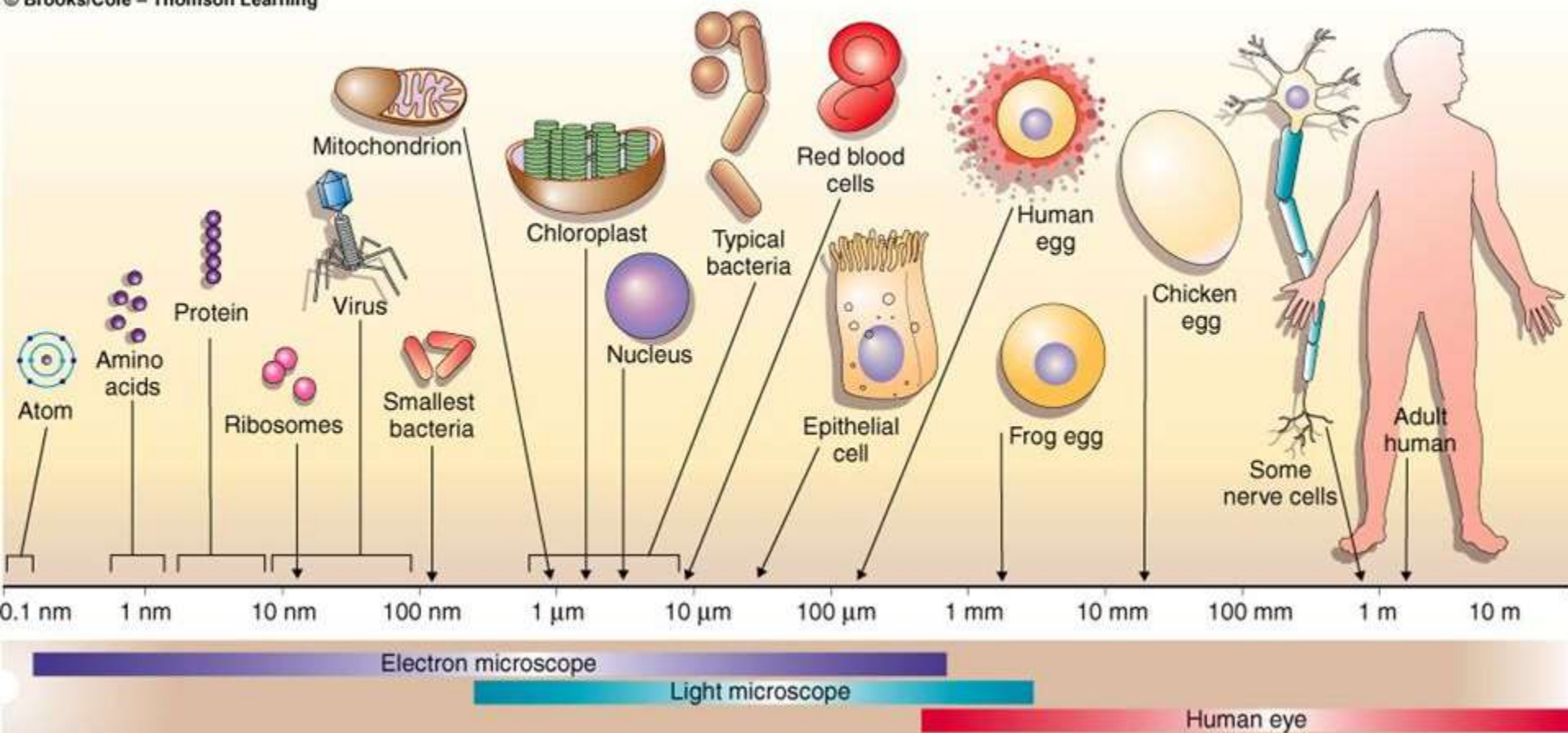
Трансмиссионный электронный микроскоп. Микрофотография тонкого среза делящейся бактериальной клетки, диаметр клетки 0,8 мкм



Сканирующий электронный микроскоп. Микрофотография бактериальных клеток, диаметр отдельных клеток порядка 0,75 мкм

Размеры биоагентов и способы их визуализации

© Brooks/Cole – Thomson Learning



Идентификация на основании фенотипических признаков микроорганизма

• Культуральные признаки:

- присутствие, характер развития пленки и ее цвет;
- наличие мути ;
- присутствие, характер осадка и его цвет.
- форма колоний ;
- профиль колоний;
- край колоний;
- размеры;
- поверхность;
- оптические свойства поверхности;
- цвет .

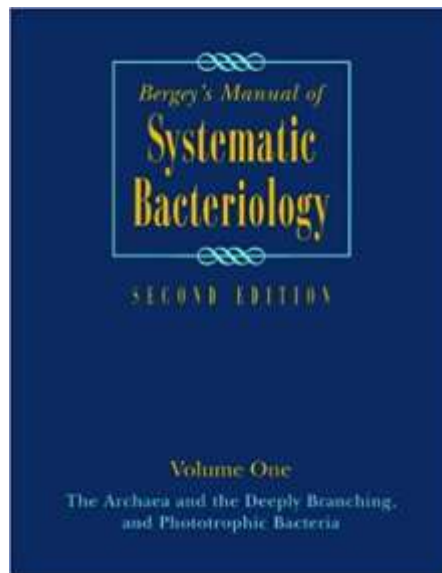
на жидких
средах

на плотных
средах

Идентификация на основании фенотипических признаков микроорганизма

- **Физиолого- биохимические признаки**
 - сахаралитические свойства
 - протеолитические свойства ;
 - образование сероводорода и аммиака;
 - отношение к кислороду;
 - наличие фермента каталазы.
 - и д.р.

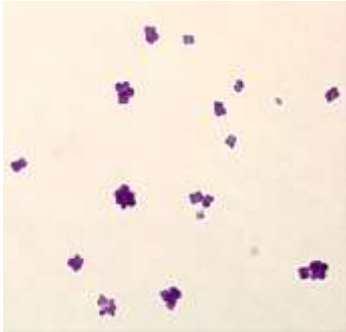

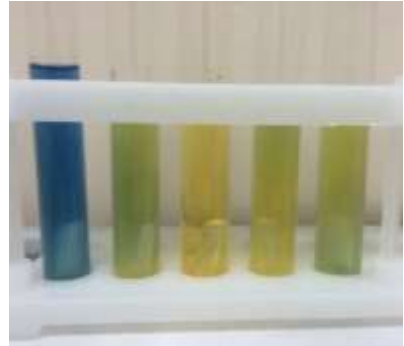
Определитель бактерий Берджи

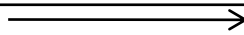


Последнее издание включает 5 томов:

- Volume 1 (2001): The *Archaea* and the deeply branching and phototrophic *Bacteria*
- Volume 2 (2005): The *Proteobacteria*
- Volume 3 (2009): The *Firmicutes*
- Volume 4 (2011): The *acteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes*, *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae* and *Planctomycetes*
- Volume 5 (2012): The *Actinobacteria*

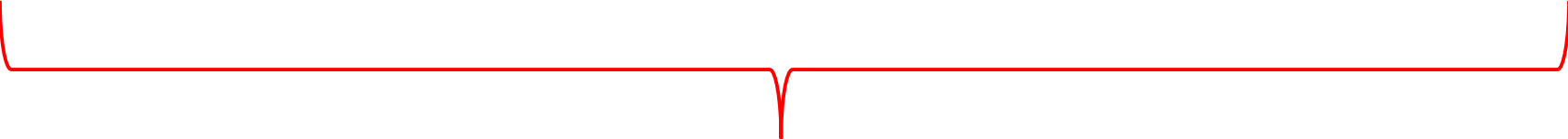
Пример: фенотипические признаки

| Морфологические | Культуральные | Физиолого-биохимические |
|--|--|---|
|  <p>Результат окраски по Граму, 1000х</p> |  <p>Колонии на агаризованной питательной среде</p> |  <p>Результат оценки сахаралитической активности</p> |
| кокки | ярко желтые колонии | гетеротрофные микроорганизмы - используют сахарозу, глюкозу, лактозу, глицерин |
| d = 2 мкм | средних размеров | |
| располагаются в кубических пакетах | круглой формы | |
| Gr ⁺ | плоские в профиле | имеют протеолитические ферменты - разжижают желатину |
| спор не образуют | с гладкой блестящей поверхностью | аэробы |
| неподвижны | | имеют фермент каталаза |



Недостатки фенотипической идентификации

- субъективность выбора и ограниченность набора изучаемых таксономических признаков и их оценки;
- высокая изменчивость микроорганизмов;
- малая информативность (фенотипически проявляется только 5-20 % информации генома);
- трудоемкость, высокие требования к уровню квалификации персонала, сравнительно низкая стандартизация;
- трудности выделения чистой культуры:
 - в естественных условиях микроорганизмы существуют в сообществах;
 - культивирование и анализ чистых культур предоставляют ограниченную информацию о фактической роли микроорганизма в его естественной среде обитания ;
- не все микроорганизмы можно культивировать в искусственных условиях;
- **существование некультивируемых видов микроорганизмов**



по фенотипическим признакам
ошибочно идентифицируется до 30-50 % культур