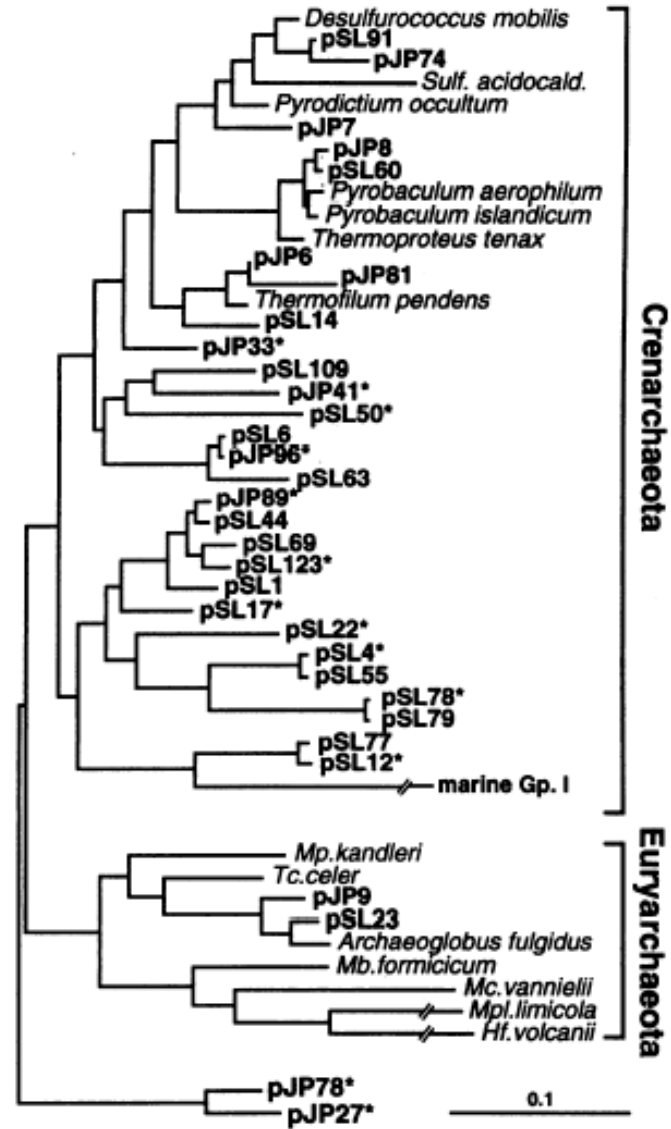
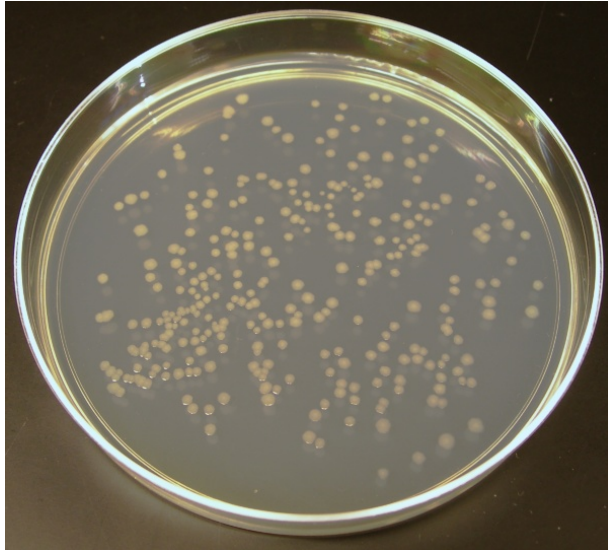


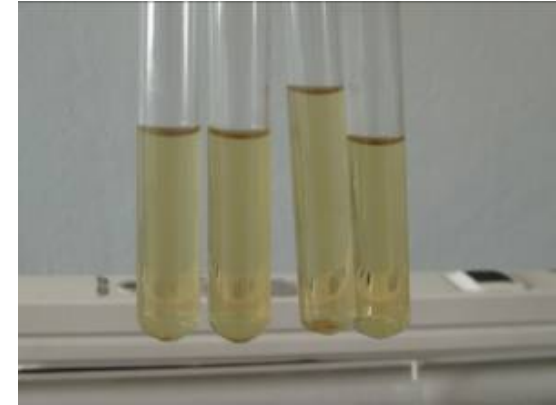
Лекция 3  
Лабораторные культуры  
Некультивируемые микроорганизмы



# КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СРЕДЫ

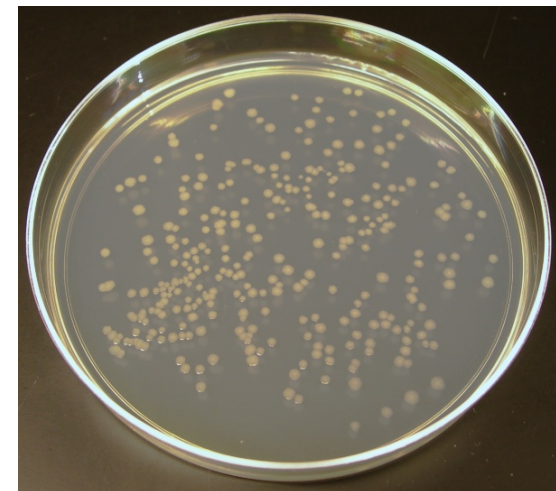
## Жидкие

- рост всех клеток, присутствующих в культуре
- легко делать измерения количества клеток, убыли субстратов, прибыли продуктов и пр. (динамика роста)



## Твердые

- рост отдельных колоний
- выделение чистой культуры, подсчет колоний (КОЕ)



# КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СРЕДЫ

## Богатые

– большое количество богатых энергией субстратов и факторов роста

## Бедные/синтетические

– минеральные соли, известное количество известного субстрата

В жидкой среде – быстрый рост, большое количество биомассы, присутствуют неизвестные микрокомпоненты, необходимые для роста

На твердой среде – крупные, легко заметные колонии

Но: условия, отличные от большинства природных мест обитания

Ближе к природным условиям  
При росте на жидкой среде можно определить потребление конкретного субстрата и влияние конкретных факторов роста

Но: не вырастут микроорганизмы, зависящие от неизвестных нам факторов роста

# ЭЛЕКТИВНЫЕ СРЕДЫ

Среды, обеспечивающие преимущества для определенной группы микроорганизмов (=получение накопительных культур – Виноградский)

Многokратные пересевы и посеы разведениями могут позволить выделение чистой культуры даже в жидкой среде

Пример:

- Выделение нитрифицирующих бактерий:
- Литоавтотрофы, окисляющие аммоний в нитрит
- Минеральная среда с аммонием как источником энергии и  $\text{CO}_2$  как источником углерода
- Детекция нитрита -> рост нитрификаторов
- Многократный пересев разведениями

Чем элективнее условия, тем легче получить чистую культуру



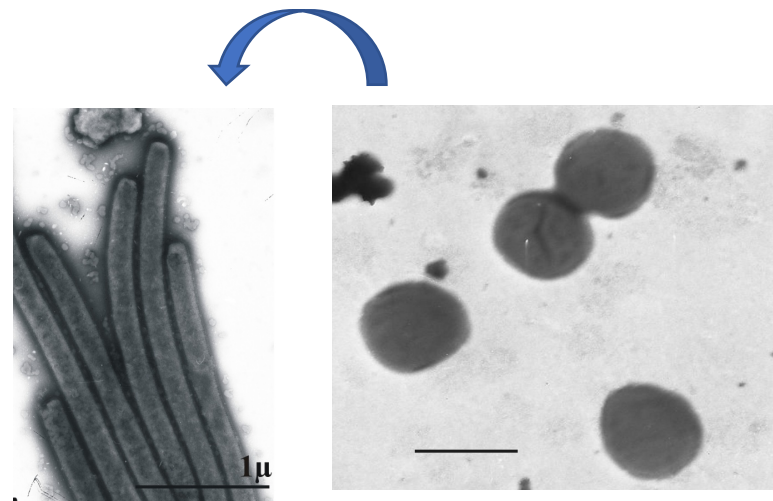
# Еще ухищрения....

Стерильная вода из исходного местообитания в качестве минерального фона

Стерильный осадок из исходного местообитания в качестве источника микроэлементов

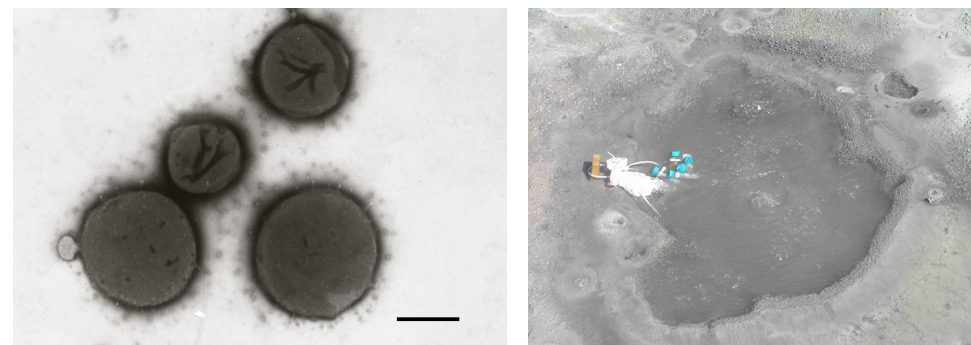
Стерильная культуральная среда другой бактерии в качестве источника факторов роста

Инкубация *in situ* – микробные ловушки



*Thermofilum*

*Desulfurococcus*



# ВАЖНО: ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ

Соответствуют условиям в месте отбора пробы:

Температура – например, 60°C, если проба была взята в горячем источнике-> термофилы

Большинство мезофильных микроорганизмов лучше растет при 37°C

Психрофилы (холодолюбивые микроорганизмы) – растут при низких температурах (0 – 10°C)



# ВАЖНО: ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ

Соответствуют условиям в месте отбора пробы:

pH – в большинстве местообитаний нейтральный, но может быть и кислым или щелочным

Есть микроорганизмы, очень чувствительные к небольшим сдвигам в pH (морские, например)

pH может меняться в процессе роста (например, при брожении микроорганизм вырабатывает кислоты), поэтому в среду всегда добавляется буфер





# ВАЖНО: ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ

Соответствуют условиям в месте отбора пробы:

Соленость

Для большинства микроорганизмов невысокая – несколько г/л

У морских микроорганизмов – десятки г/л (20-35)

У галофилов – сотни г/л (до насыщенного раствора)

Микроорганизмы ультрапресных водоемов (болот) растут только при очень низкой концентрации солей (обычная среда разводится в 20 раз)



# ВАЖНО: ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ

Соответствуют условиям в месте отбора пробы:

## Аэрация

Аэробные условия – свободный доступ кислорода.  
Ватные пробки, колпачки, качалки (для лучшей аэрации)

Анаэробные условия – герметично закрытая посуда,  
свободный объем заполнен очищенным от кислорода газом –  $N_2/CO_2$  80:20 или другими

Микроаэробные условия – в заполненную газом пробирку или флакон добавляется небольшое количество кислорода (от 1 до 10%)

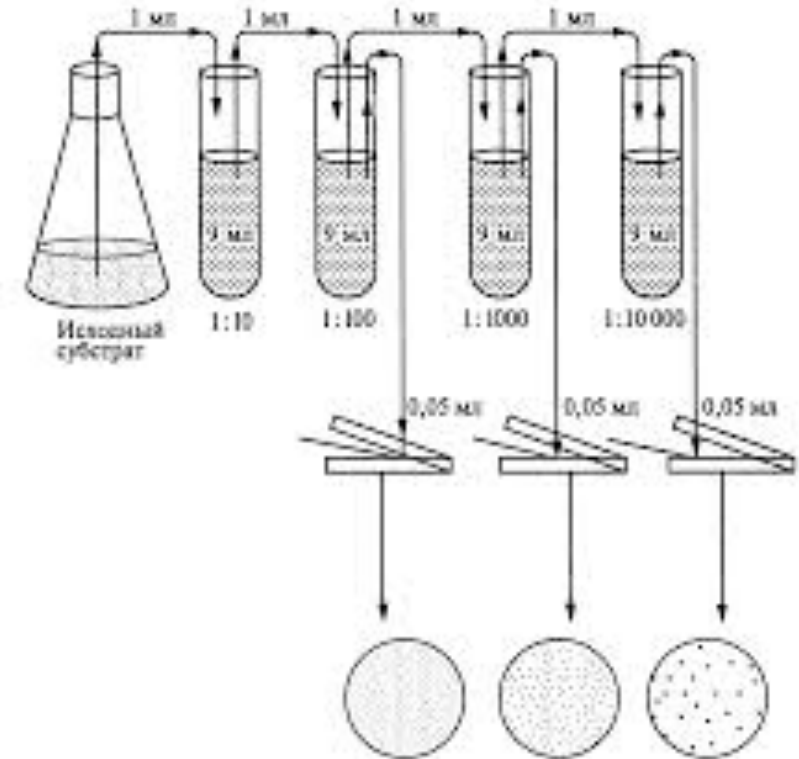


# Как получить чистые культуры?

Сделать 10-кратные разведения в жидкой среде

Из каждого разведения посеять 0.1 мл на чашку Петри и растереть шпателем

Из последней чашки с ростом пересеять колонии на такую же жидкую или агаризованную среду



# Культивирование анаэробов

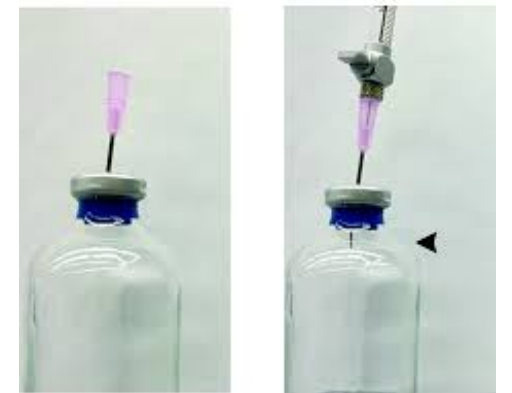
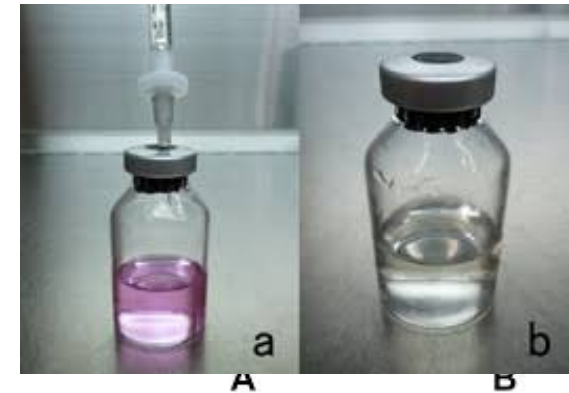
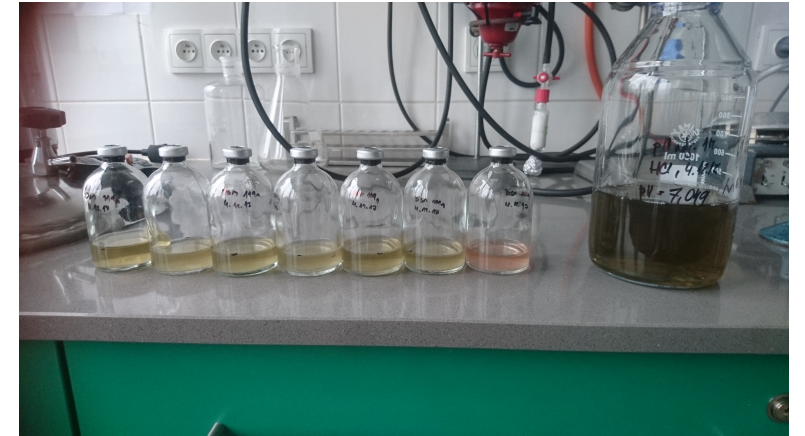
Пробирки, флаконы или бутылки с пробками из бутиловой резины, прижатыми завинчивающимися крышками

Среду разливают под током очищенного от следов кислорода газом

Добавляют  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  –сульфид натрия, он связывает остатки кислорода

Индикатор резазурин показывает, достаточно ли среда восстановлена для роста строгих анаэробов

Посевы делают шприцами



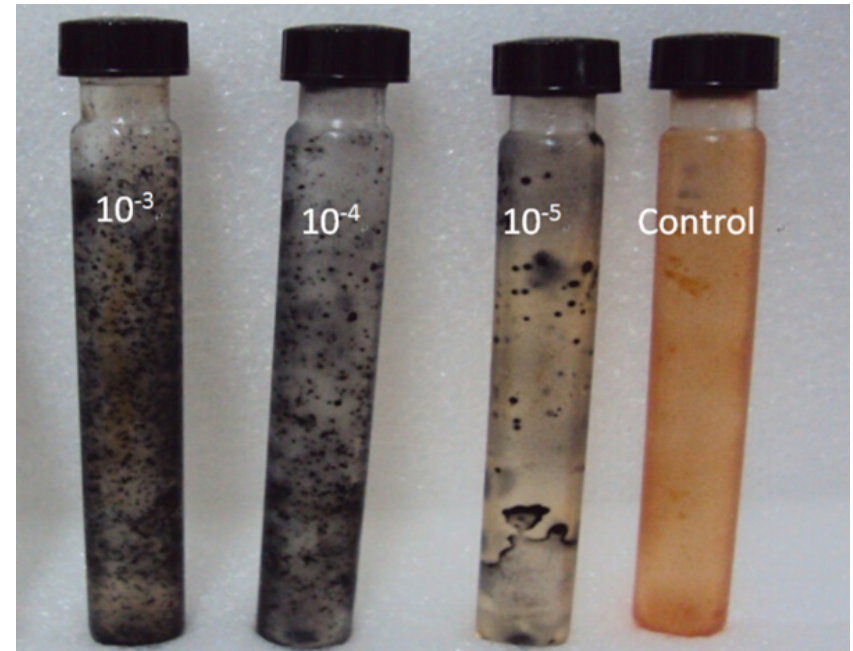
# Культивирование анаэробов

Как получить чистые культуры анаэробов?

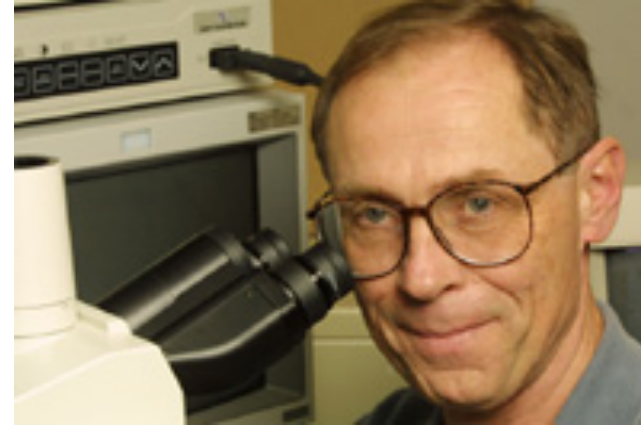
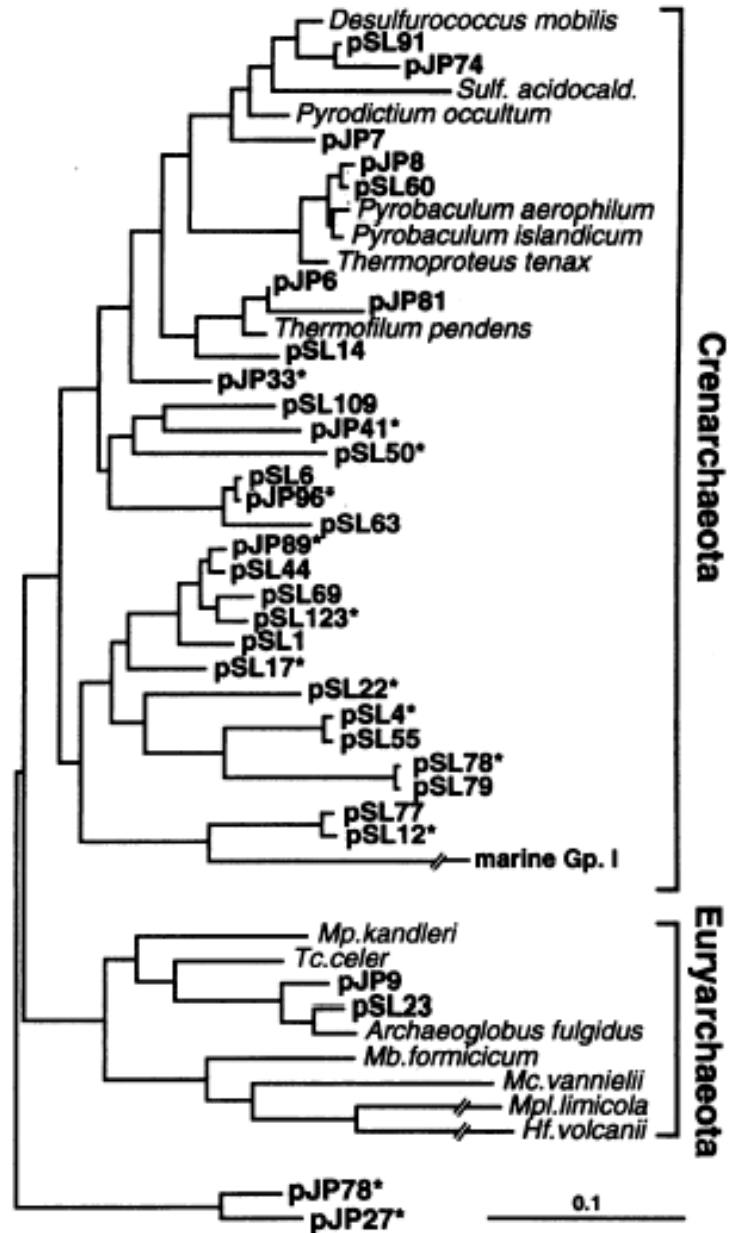
Разведения в жидкой среде

Посев разведений в ролл-тюбы (пробирки Хангейта)

Посев разведений на чашки Петри в анаэробном боксе или анаэроостате







Норман Пейс: в лабораторных культурах известно лишь 5% микроорганизмов, существующих в природе

Археи в Обсидиан Пул (Йеллоустоунский Национальный Парк, США)



Разнообразие бактерий в горячих источниках Йеллоустоунского Национального Парка

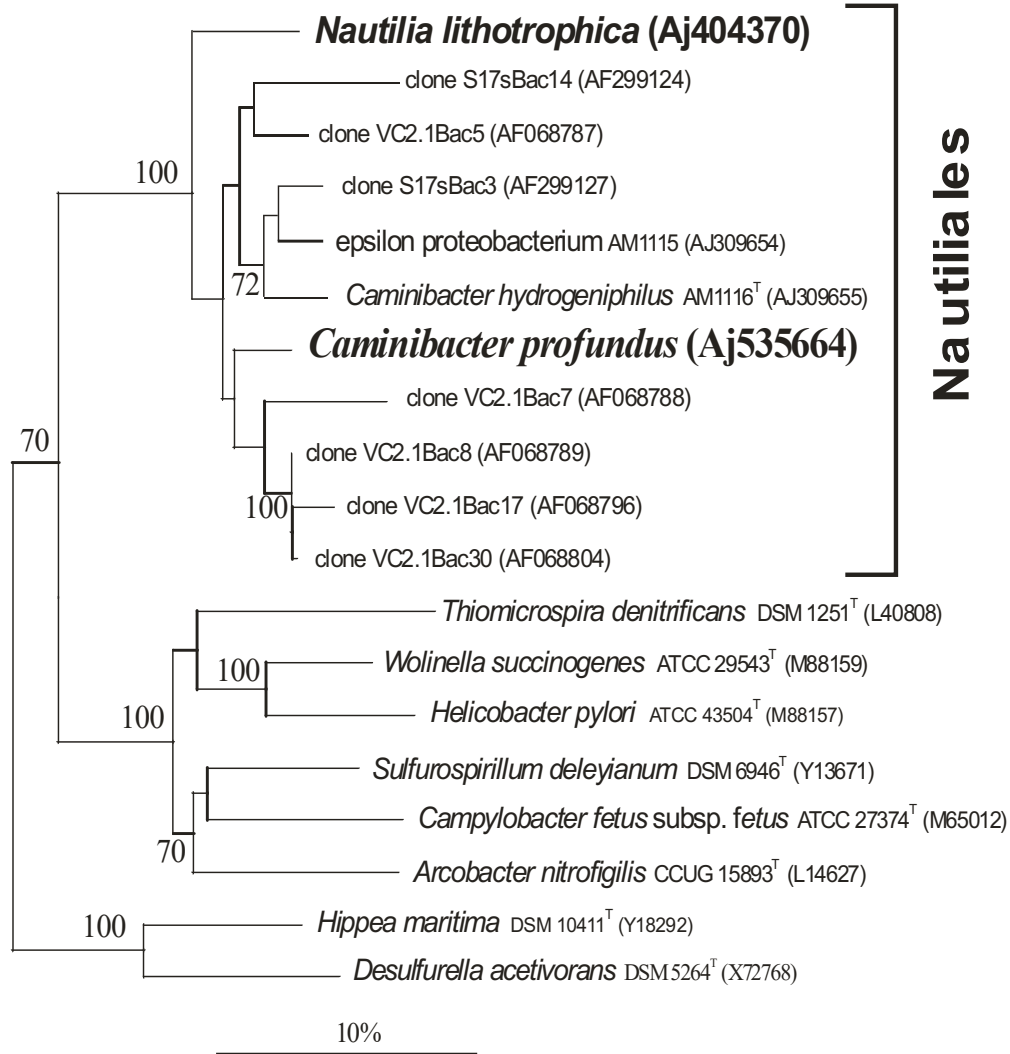
# Причины «некультивируемости»

- Не подобрали подходящие субстрат, окислитель, источник углерода
- Не подобрали условия культивирования (температура, pH, ионная сила раствора)
- Не хватает «факторов роста» (витамины, аминокислоты, жирные кислоты)
- Не те или в недостаточном количестве микроэлементы
- Ингибирование продуктом, который в естественных условиях убирается спутниками
- Слишком высокая концентрация субстрата
- Редуцированность метаболических путей

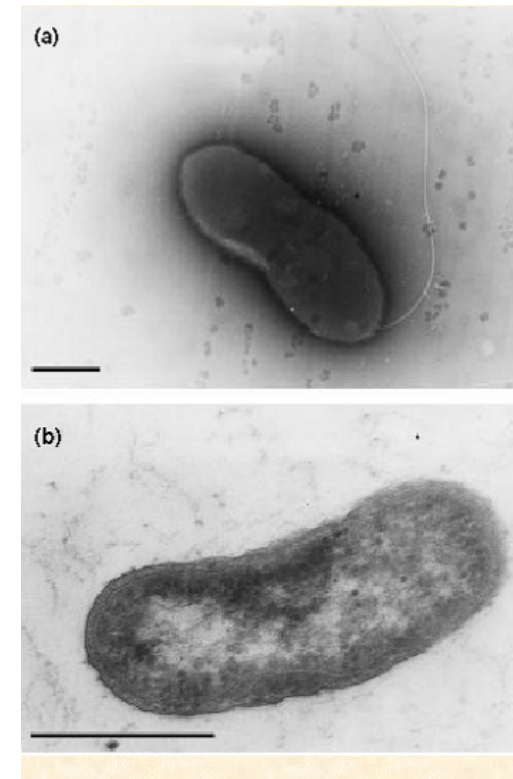
# Причины «некультивируемости»

- Не подобрали подходящие субстрат, окислитель, источник углерода
- Не подобрали условия культивирования (температура, pH, ионная сила раствора)
- Не хватает «факторов роста» (витамины, аминокислоты, жирные кислоты)
- Не те или в недостаточном количестве микроэлементы
- Ингибирование продуктом, который в естественных условиях убирается спутниками
- Слишком высокая концентрация субстрата
- Редуцированность метаболических путей

# Order Nautiliales



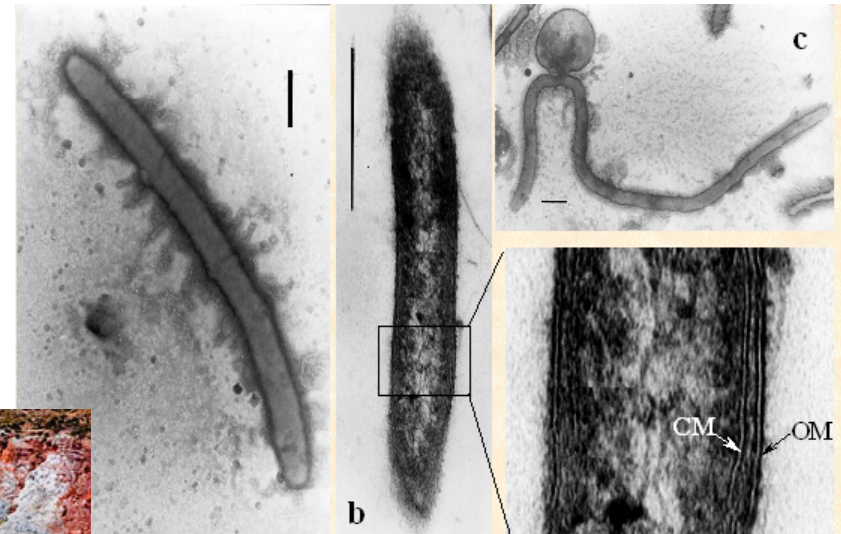
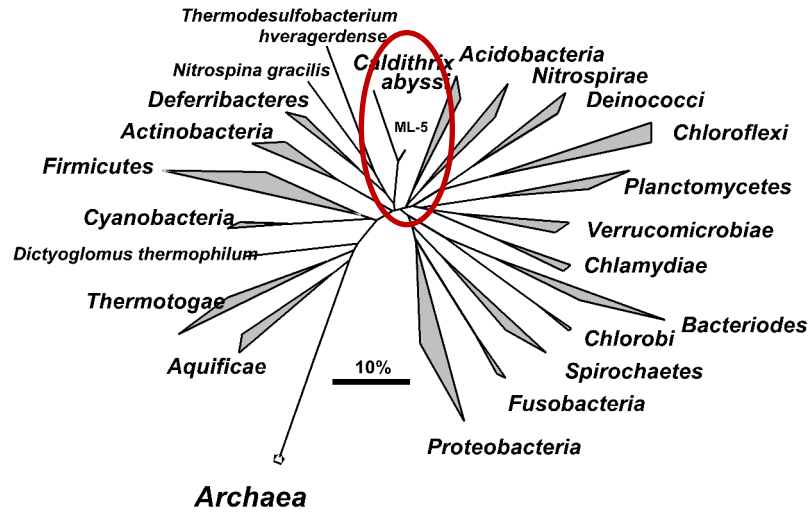
Маргарита Мирошніченко



*Nautilia lithotrophica*



У микроорганизма, выделенного из глубоководных гидротерм, нашелся родственник, обитающий рядом с островом Милос в Греции



Маргарита  
Мирошниченко



Miroshnichenko et al., IJSEM, 2010, 60: 2120 - 2123

*Caldithrix palaeochoriensis* – «почти случайное попадание»

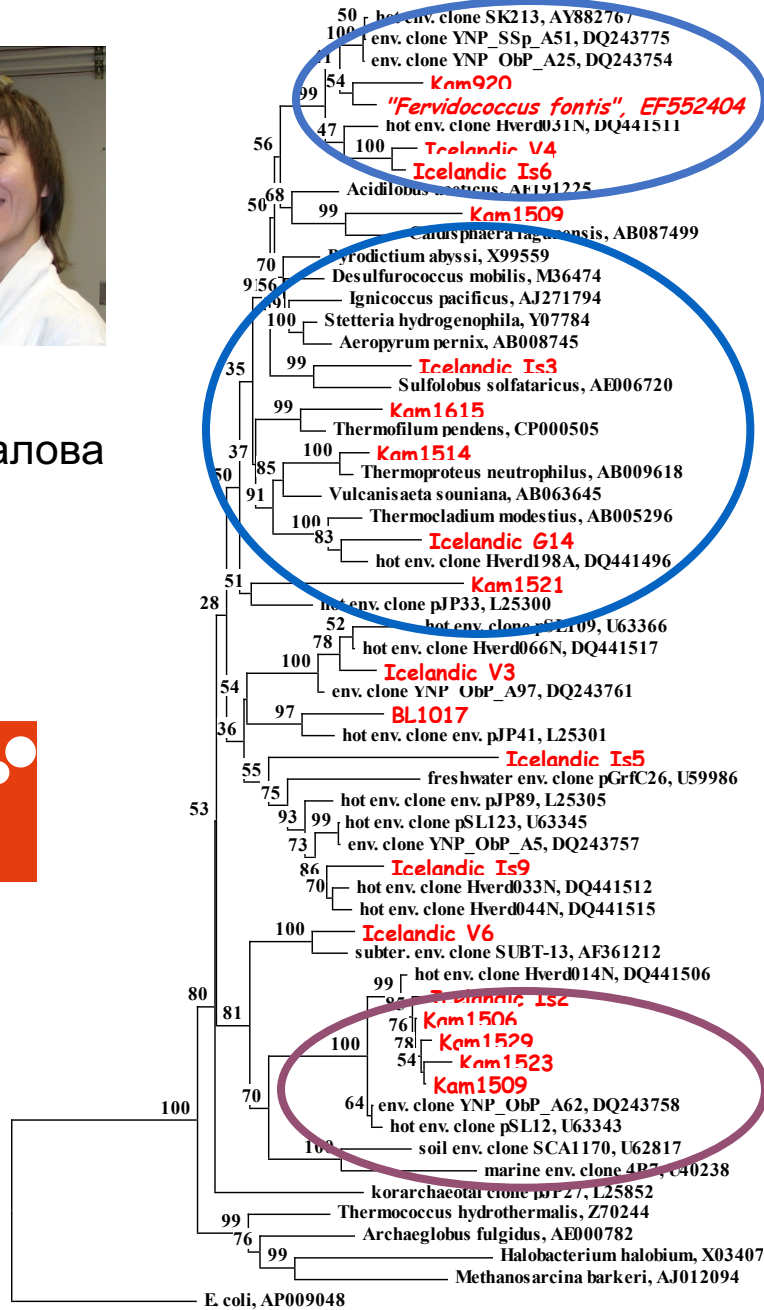


# Причины «некультивируемости»

- Не подобрали подходящие субстрат, окислитель, источник углерода
- **Не подобрали условия культивирования (температура, pH, ионная сила раствора)**
- Не хватает «факторов роста» (витамины, аминокислоты, жирные кислоты)
- Не те или в недостаточном количестве микроэлементы
- Ингибирование продуктом, который в естественных условиях убирается спутниками
- Слишком высокая концентрация субстрата
- Редуцированность метаболических путей



Анна  
Перевалова



**Crenarchaeota** 55-85°C

uncultured *Desulfurococcales*

cultured *Desulfurococcales*

*Sulfolobales* 75-94°C

*Thermoproteales*

Miscellaneous  
*Crenarchaeota* 60°C

group 1.2 57-72°C

group 1.1b

*Euryarchaeota*

Perevalova et al., AEM,  
2008, 74:7620-7628



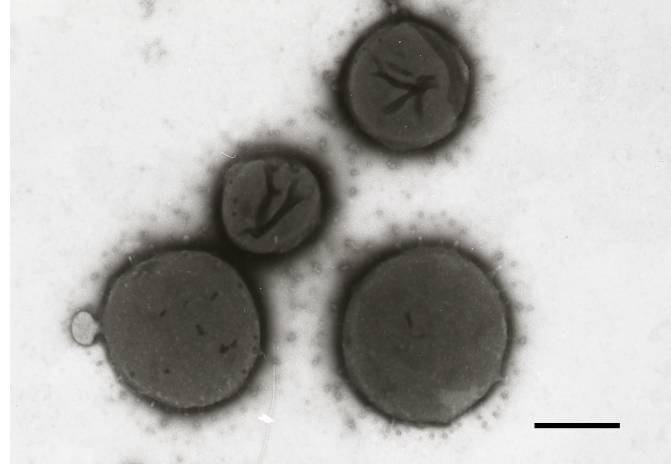


Анна Перевалова



*Perevalova et al., IJSEM, 2010,60:2082-2088*

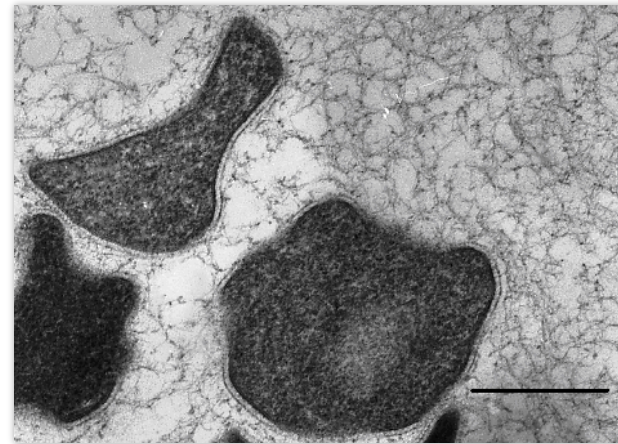
## Order *Fervidicoccales*



T 55-85°C  
(T<sub>opt</sub> 70°C)

pH<sub>opt</sub> 6.0-6.5

Anaerobe



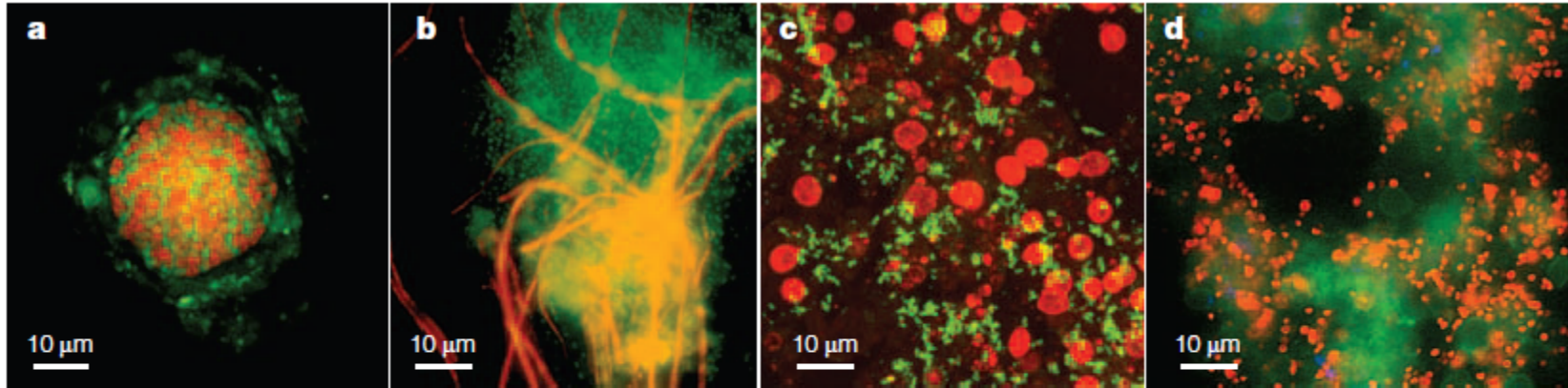


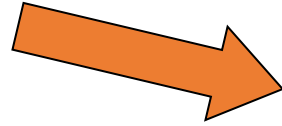
Figure 2 | **Visualization of uncultivated archaea in various environments by fluorescence *in situ* hybridization (FISH).**  
**a** | ANME-2C euryarchaeota (red) in association with sulphate-reducing bacteria (green) in sediments above methane hydrates. Image courtesy of T. Lösekann and K. Knittel, Max-Planck Institute for Marine Microbiology, Bremen, Germany. **b** | The freshwater euryarchaeon SM1 (green; belonging to group Pendant-33 in FIG. 1) in association with *Thiotrix* (red). Image courtesy of C. Moissl and R. Huber, University of Regensburg, Germany. **c** | *Cenarchaeum symbiosum* (green; belonging to group I.1A in FIG. 1) from the sponge *Axinella mexicana* (nuclei in red). Image courtesy of C. Preston, Monterey Bay Aquarium Research Institute, Moss Landing, USA. **d** | Crenarchaeota (red; belonging to group I.1B in FIG. 1) of tomato roots, enriched (associated bacteria in green). Image courtesy of H. Simon, Oregon Health & Science University, Beaverton, USA.

## Метод FISH – Fluorescent In Situ Hybridization

*Schleper et al., Nature Revs Microbiol. 2005, 3:479-489*

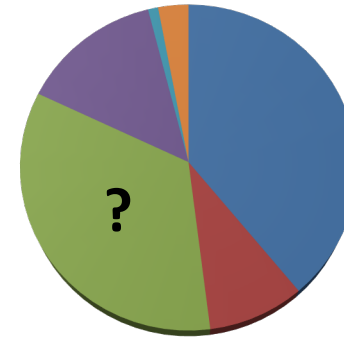
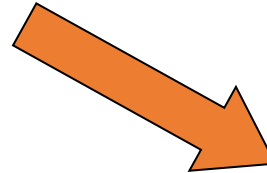


Выделение ДНК



**ДНК**

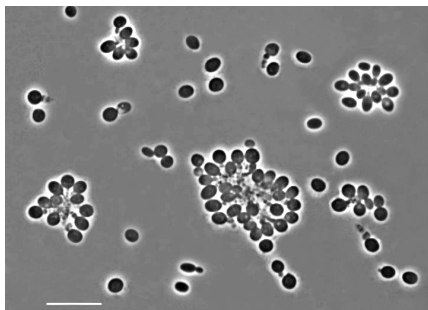
NGS секвенирование



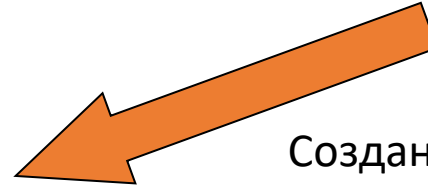
Получение накопительной культуры



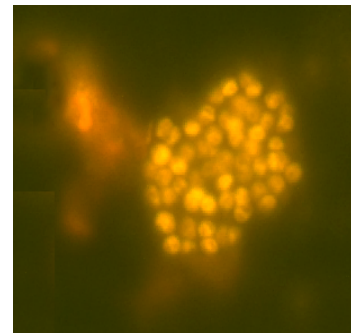
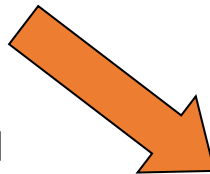
Получение чистой культуры



Создание флуоресцентных зондов



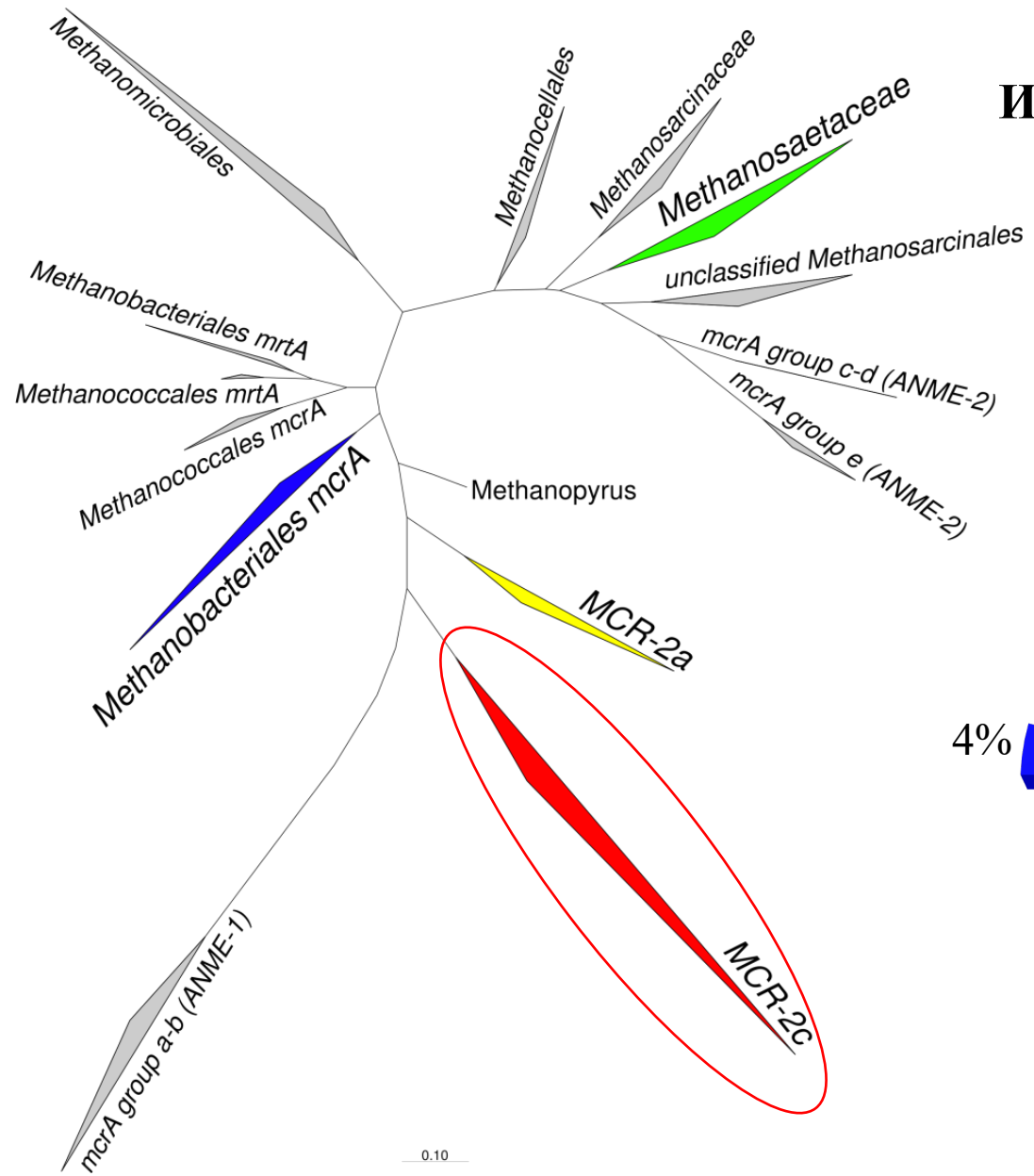
FISH



Субстрат ??

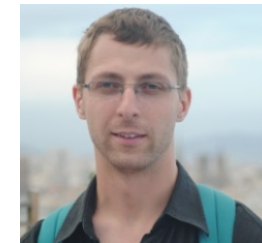


# Оценка разнообразия и соотношения различных групп метаногенов в источнике 2012 на основе секвенирования фрагментов гена *mcrA*

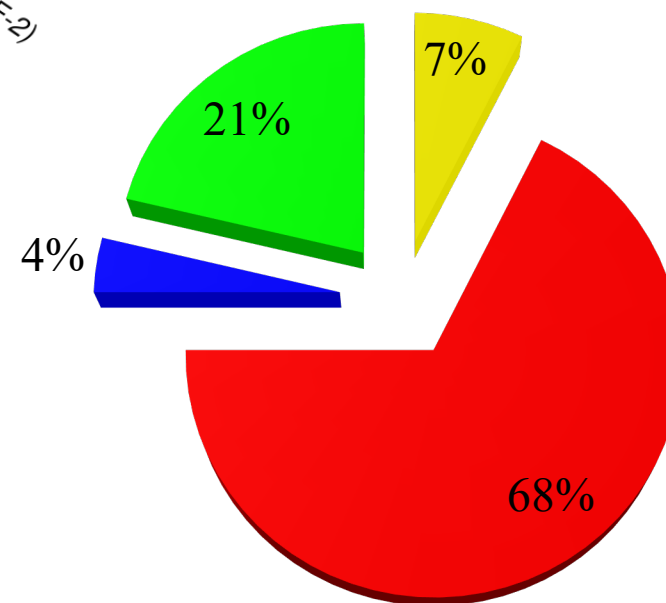


Источник 2012 (Т 58°C, pH 5.7)

- MCR-2a
- MCR-2c
- *Methanobacteriales*
- *Methanosaetaceae*



Александр Меркель



108 клонов

# Причины «некультивируемости»

- Не подобрали подходящие субстрат, окислитель, источник углерода
- Не подобрали условия культивирования (температура, pH, ионная сила раствора)
- **Не хватает «факторов роста» (витамины, аминокислоты, жирные кислоты)**
- **Не те или в недостаточном количестве микроэлементы**
- **Ингибирование продуктом, который в естественных условиях убирается спутниками**
- Слишком высокая концентрация субстрата
- Редуцированность метаболических путей

# Причины «некультивируемости»

Слишком медленный рост – организм проигрывает в конкуренции за субстрат с быстрорастущими микроорганизмами

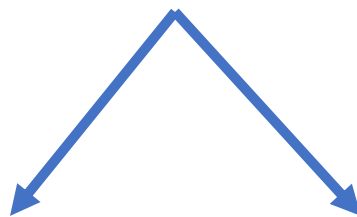


- Ингибирование роста конкурентов – например, бактерий антибиотиками при культивировании архей
- Разведение суспензии так, чтобы в ячейку планшета попадали единичные клетки
- Отделение нужной клетки «лазерным пинцетом»

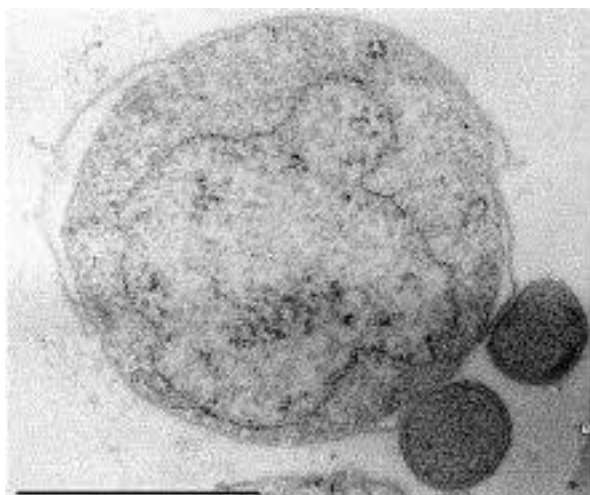
# Причины «некультивируемости»

- Не подобрали подходящие субстрат, окислитель, источник углерода
  - Не подобрали условия культивирования (температура, pH, ионная сила раствора)
  - Не хватает «факторов роста» (витамины, аминокислоты, жирные кислоты)
  - Не те или в недостаточном количестве микроэлементы
  - Ингибирование продуктом, который в естественных условиях убирается спутниками
  - Слишком высокая концентрация субстрата
- 
- **Редуцированность метаболических путей**

## Некультивируемые микроорганизмы – статус *Candidatus*

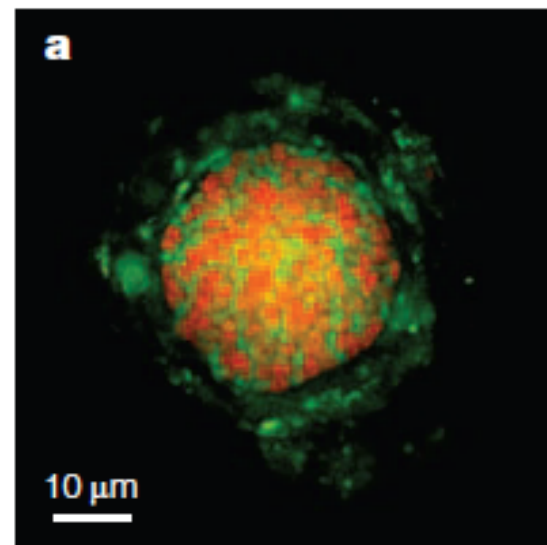


Не получены в чистой культуре,  
но растут в лабораторных консорциумах



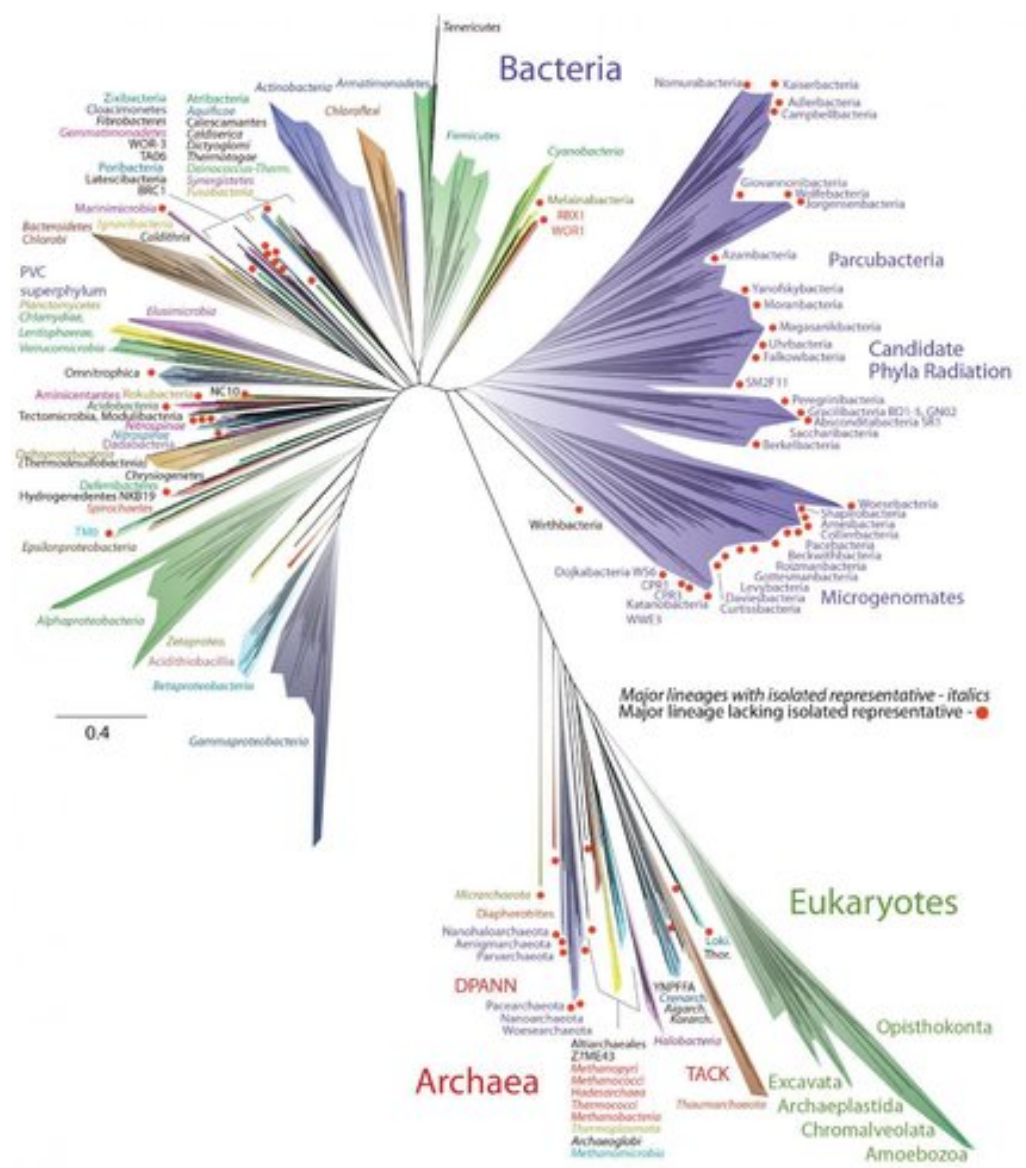
*Nanoarchaeota*

Очень медленный рост,  
лабораторную культуру получить невозможно



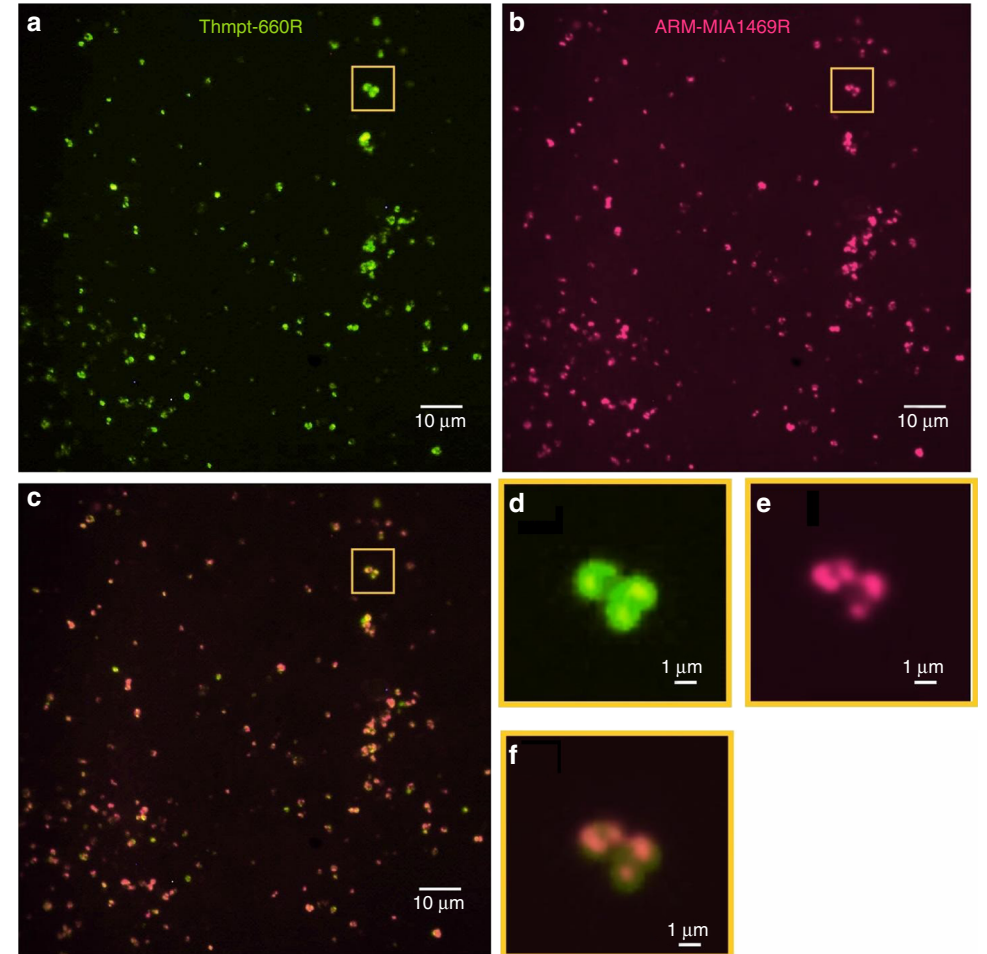
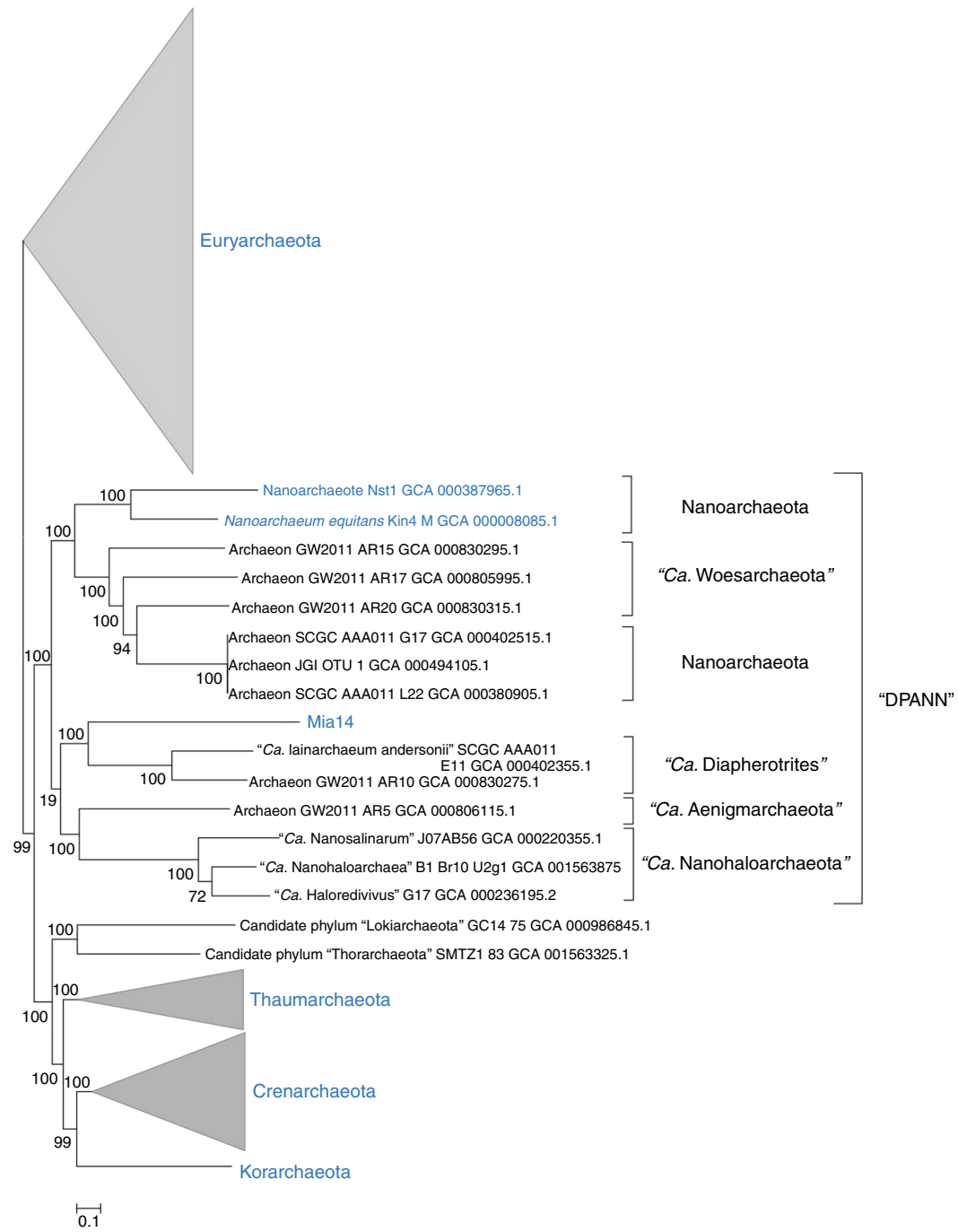
Консорциум,  
анаэробно  
окисляющий метан





Джил Банфилд

Nature, March 10 2016

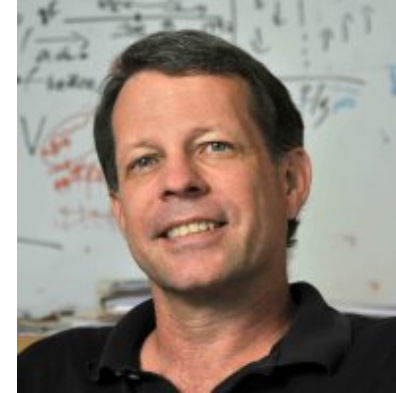
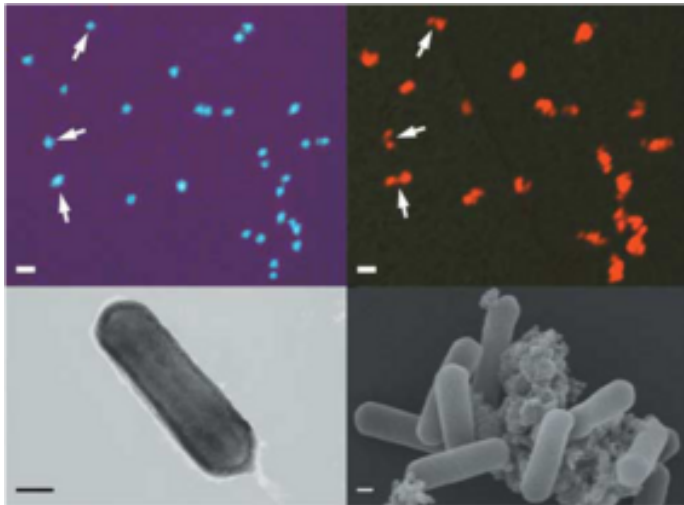


# НИТРИФИЦИРУЮЩИЕ АРХЕИ

“Морской снег” - хлопья в толще воды холодных морей -  
*Thaumarchaeota*

Затем удалось отсеквенировать большой кусок ДНК с геном  
16S рРНК и функциональным геном

И только потом из аквариума в Сиэтле была выделена первая  
нитрифицирующая архея - *Nitrosopumilus*



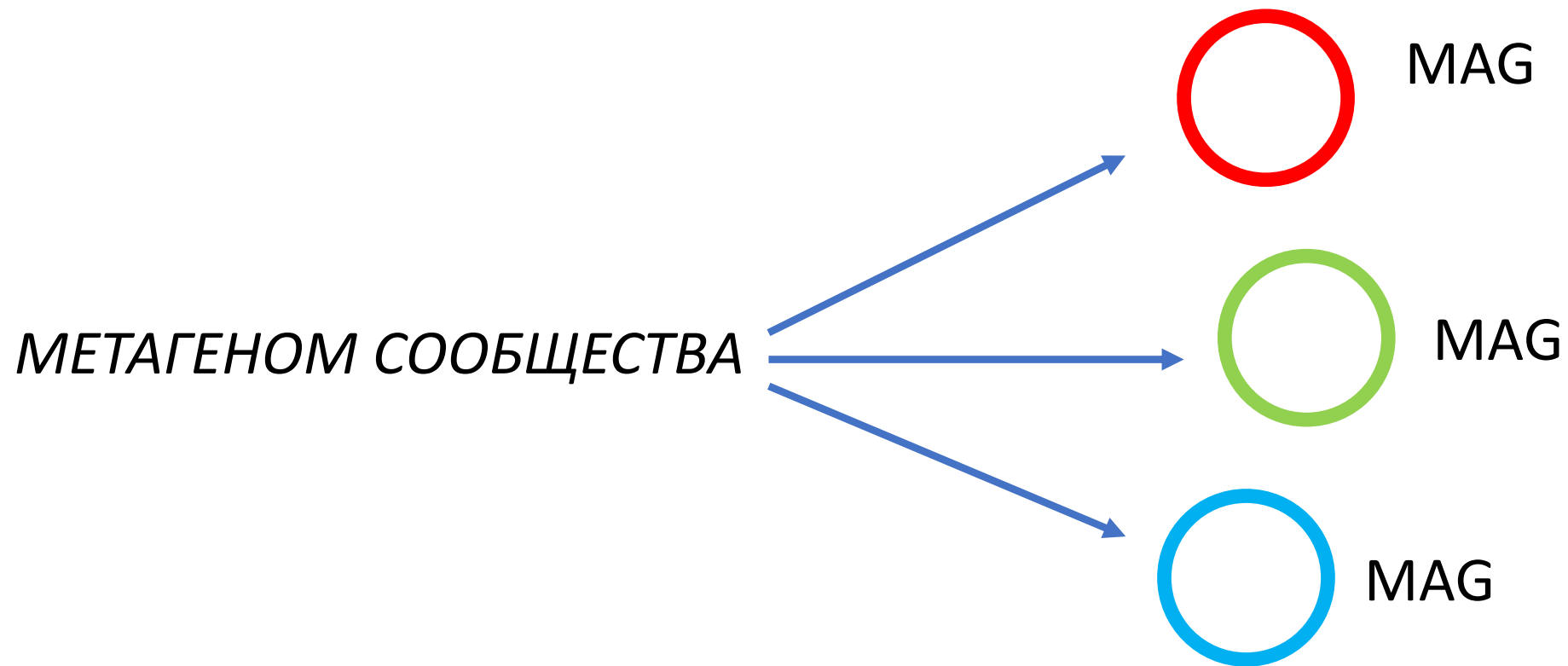
Ed De Long



Christa Schleper



David Stahl

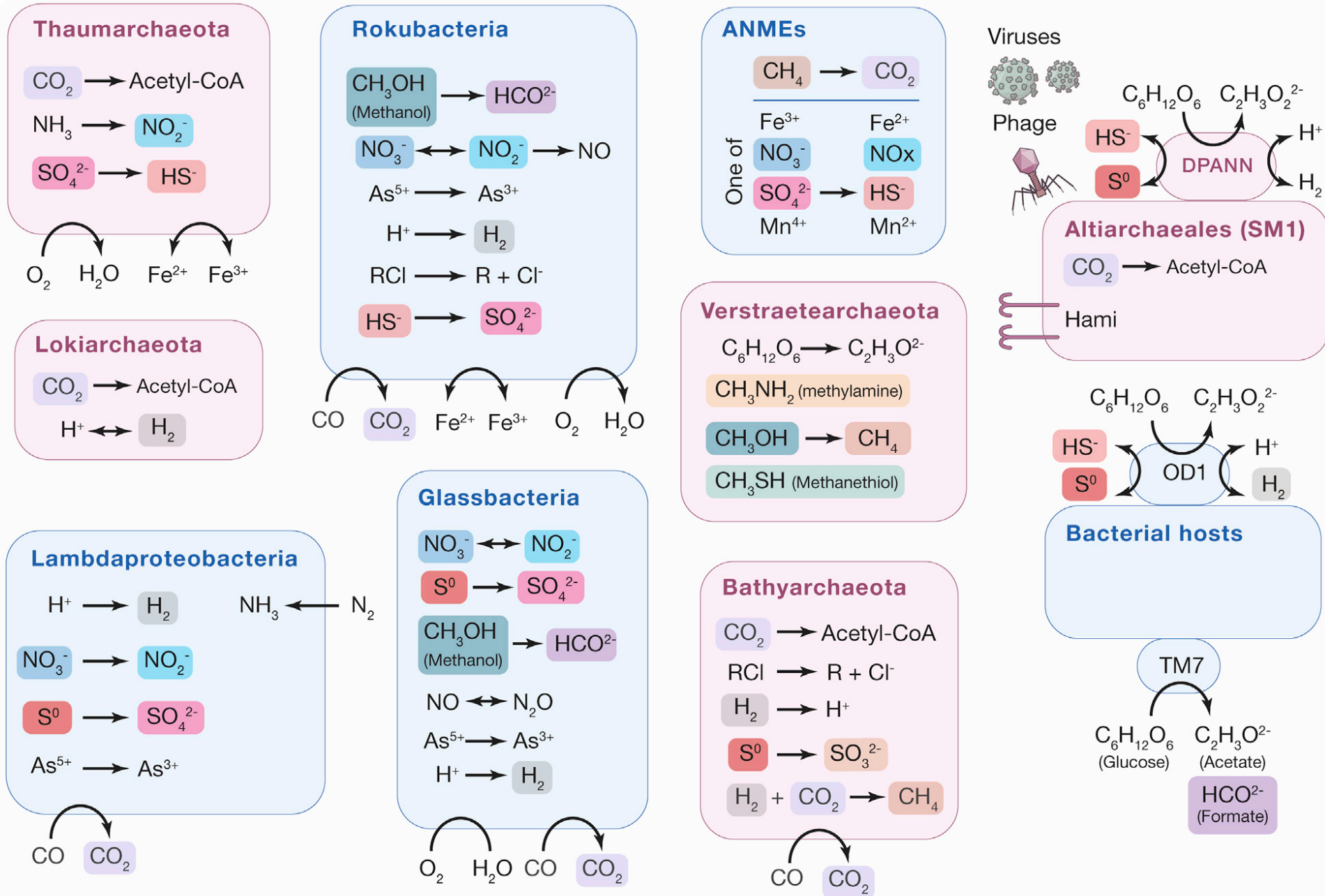


Анализ МАГов дает информацию для попыток культивирования

SINGLE CELL GENOME - ГЕНОМ ЕДИНИЧНОЙ КЛЕТКИ

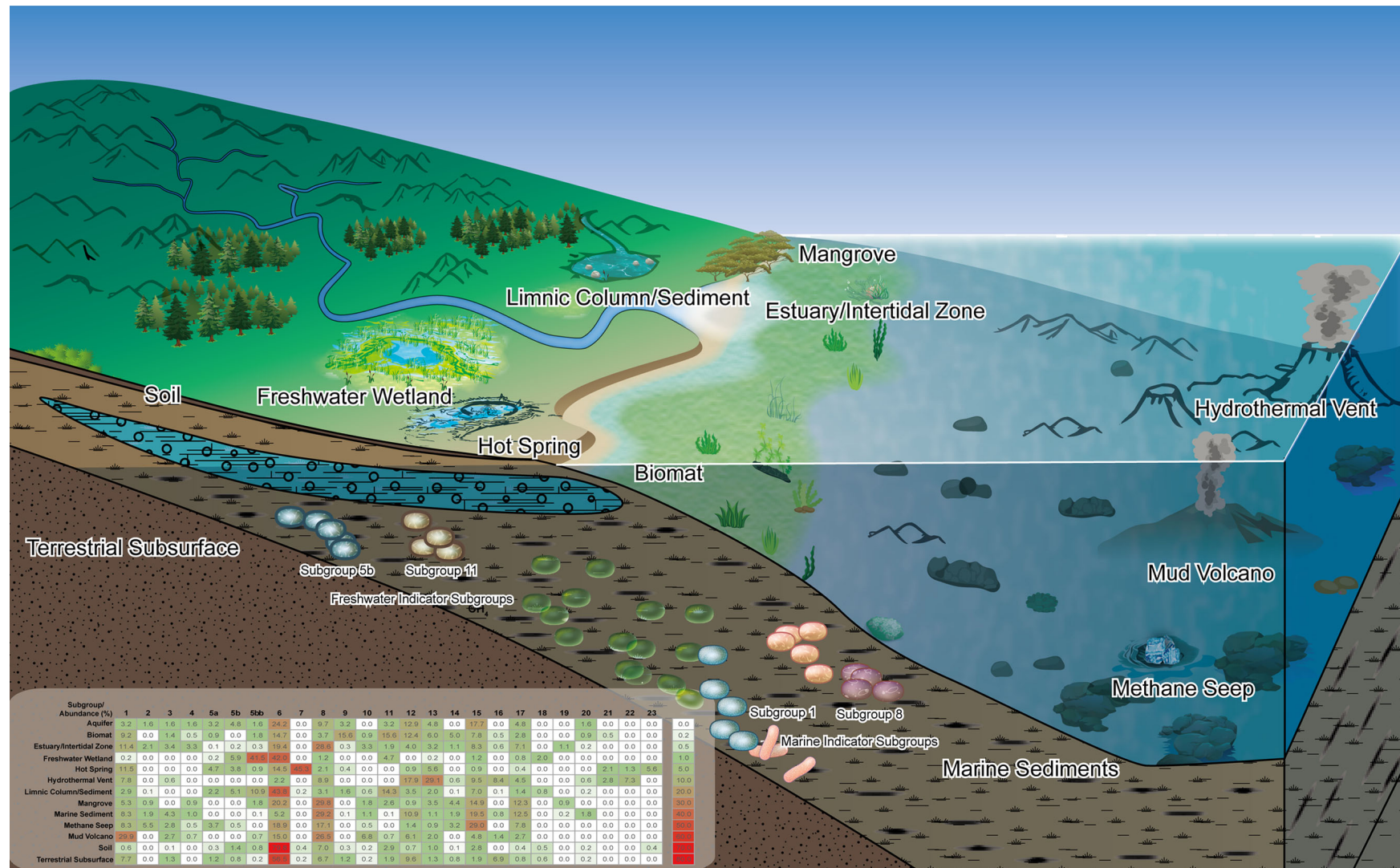


**A**



## Какие организмы следует выделять?

- если у них есть искомые (целевые) свойства ← прикладные задачи
  - если они представляют новые филогенетические линии
  - если у них есть новые метаболические пути
- } микробное разнообразие
- если это массовые, широко распространенные новые группы ← экологическая роль

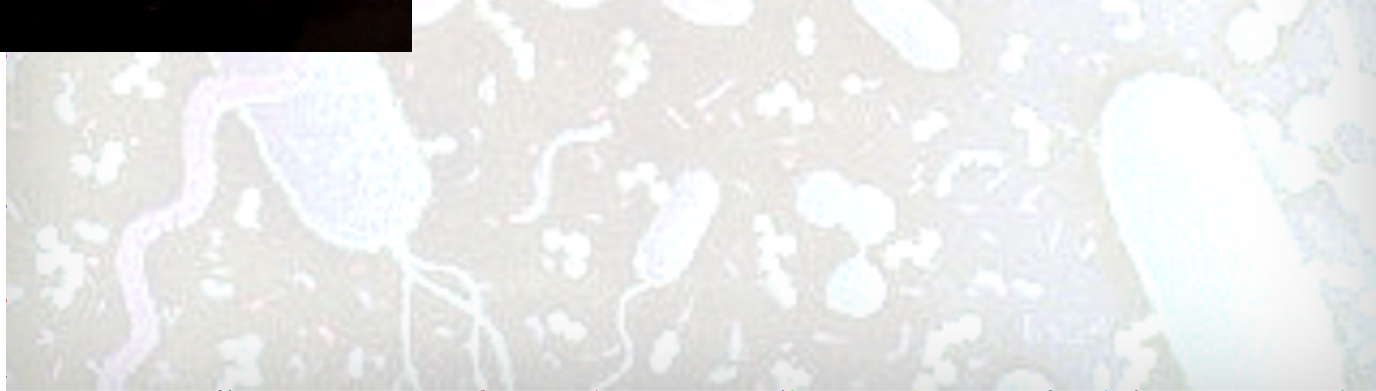


Распространение *Bathyarchaeota*

# Преимущества культивирования

- Видно, какие свойства проявляются в фенотипе
- Микроорганизм можно исследовать и использовать
- Доступны свойства микроорганизма, кодирующиеся неизвестными генами







**Охота за микробами продолжается!**