

Loeng 1

Sissejuhatus

Keskkonna mikrobioloogia on teadus, mis uurib neid mikroorganisme, kes elavad looduslikes või kunstlikes keskkondades. Ühe uurimisvaldkonnana käsitletakse keskkonna mikrobioloogias veel keskkonda saastavaid mikroorganisme. Kunstlikeks keskkondadeks võivad olla nii laboratoorsed süsteemid kui ka inimese poolt loodud struktuurid looduses. Vee- ja mullamikrobioloogia on üks osa keskkonnamikrobioloogiast. Keskkonnamikrobioloogia rajajateks loetakse S. Winogradsikit ja M. Beijerincki. Keskkonnamikrobioloogia kiire areng algas 1960 ja iseseisva distsipliinina kinnitus 1970. Murranguliseks loetakse aega alates 1990, millal võeti kasutusele molekulaarsed meetodid.

Mikroobiökoloogia ja keskkonna mikrobioloogia

Mõistet **mikroobiökoloogia** kasutatakse üldise mõistena, kui kirjeldatakse mikroobide olemasolu või nende poolt läbi viidud protsesse nende elupaikades.

Mikroobiökoloogia uurib mikroobide käitumist ja mikroobseid protsesse nende looduslikus keskkonnas (mikrokeskkonnas).

Keskkonna mikrobioloogia tegeleb mikroobsete protsessidega suuremal skaalal - mullas ja vees.

Populatsioon on kogum sarnaste tunnustega üksikorganisme. Sarnased tunnused tulenevad populatsiooni üksikorganismide sarnasest või identsest esivanemast. Mikrobioloogias võib populatsioon koosned ühe liigi (alamliigi, varieteedi) individidest.

Koosluse moodustavad kõik organismid, mis leiduvad antud elupaigas. Tihti käsitletakse eraldi teatud tüüpi kooslusi: bakterikooslus, seenekooslus, vetikakooslus.

Konsortsium on mõiste, mida kasutatakse assotsiatsioonile olevate bakterite kohta. Kasutatakse seda mõistet juhul, kui kirjeldatakse omavahel funktsionaalses seoses olevaid mikroorganisme. See võib olla kahest või rohkemast mikroobi liigist koosnev assotsiatsioon, mis viib läbi kombineeritud metaboolseid protsesse, mille toimumine oleks väga aeglane või puuduks üldse, kui kõik assotsiatsioonile osalevad liigid ei ole esindatud. Konsortsium on koosluse funktsionaalne alaühik.

Mikroorganismide mitmekesisus

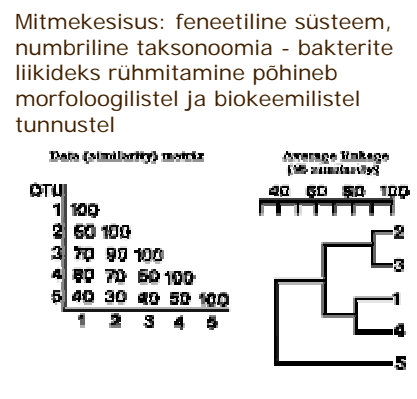
Mitmekesisus e. diversiteet on liikide rohkus koosluses, ökosüsteemis või maastikul. (Ökoloogialeksikon, 1992)

Traditsiooniliselt põhineb koosluste mitmekesisuse hindamine liigilise koosseisu määramisel, konkreetsete liikide arvukuse hindamisel ja iga liigi funktsiooni teadmisel. Mikroorganismide puhul on kõigi nende näitajate usaldusväärne määramine hetkel veel võimatu.

Mõiste mitmekesisus kasutamine mikroorganismide puhul on erinev kui makro-organismide korral. Mikroorganismide puhul ei ole võimalik mitmekesisuse hindamiseks kasutada üksnes organismi morfoloogilisi ja anatoomilisi tunnuseid, vaid tuleb kasutada lisaks veel spetsiifilisi füsioloogilisi tunnuseid. Rohkem kui 100 aastat põhineski mikroobide mitmekesisuse hindamine fenotüübilistel tunnustel ning mikroobide sarnasuse hindamiseks kasutati **numbrilist taksonoomiat**. 20 aastat tagasi arvati, et ca 40% prokarüootidest on teada, praegusel hetkel on isegi 5% väga optimistlik hinnang. Hetkel hinnatakse bakterite liikide arvuks maakeral 300 000 kuni 1 miljon liiki, samas kui Bergey käsiraamat sisaldab ainult 3100 kirjeldatud bakteriliiki. Kirjanduse andmetel võib 1 grammis mullas olla kuni 10 000 erinevat bakteriliiki.

Miks on mikroorganismide mitmekesisusest nii vähe teada? See tuleneb meetodilistest probleemidest: ei ole olemas laboratoorset kasvukeskkonda, mis sobiks üheaegselt paljudele bakteritele või arhedele; raske on eraldada pindadele kinnitunud või biokilest mikroorganisme; suur osa teadaolevast informatsioonist bakterite kohta põhineb puhaskultuurides saadud tulemustel, mis ei pruugi kehtida looduslikus keskkonnas.

Suur osa (95-99%) vees ja mullas elavatest bakteritest on **mittekultiveeritavad ('nonculturable') bakterid**. Need on bakterid, kes on eeldatavasti funktsionaalsed, väga aeglase metabolismiga ja kohanenud oligotroofsetele (väga madal toitainete kontsentratsioon) tingimustele, mida ei ole siiani võimalik laboris jäljendada.



Selleks, et uurida ja kirjeldada mikroorganismide (bakterite, arhede ja seente) mitmekesisust keskkonnas, on kasutusele võetud molekulaarsed meetodid, mille puhul ei ole vaja organismi eelnevalt isoleerida puhaskultuuri. Siin on probleemiks see, et need molekulaarsed meetodid tuginevad hästi kirjeldatud ja läbiuuritud organismidel, keda kasvatatakse puhaskultuuris.

Mikroorganismide mitmekesisuse erinevad variandid

Morfoloogiline mitmekesisus. Bakterite kuju ja suurus on väga varieeruvad: kepikesed, kokid, spiraalid, filamendid (*Beggiatoa*, *Thioploca*), hargnevad filamendid (*Streptomyces*), amorfised (*Sulfolobus*), tähekujuised (*Stella*). Tihti esinevad bakterid agregaatidena - ahelad, tetraadid, rosettid. Suurus on väga varieeruv, tavaline suurus 1-10µm, min- max 0.1-660 µm.

Struktuuriline mitmekesisus: Gram+ (üks välismembraan, paks rakukest), Gram- (kaks välismembraani, õhuke rakukest), ripsmed, flagellid, pilid, kapslid, spoorid

Metaboolne mitmekesisus: kemoheterotroofid süsinik ja energia saadakse orgaanilistest ühenditest; kemoautotroofid – raku süsinik saadakse CO₂ fikseerimise teel, energia saadakse anorgaanilistest ühenditest; ftoheterotroofid – raku süsinik saadakse orgaanilistest ühenditest, energia saadakse valgusest; fotoautotroofid - raku süsinik saadakse CO₂ fikseerimise teel, energia saadakse valgusest.

Ökoloogiline mitmekesisus. Mere- ja magevesi (kuni 4-5 M), temperatuur (-5...118°C), pH 0...11, sümbioos (inter- ja intratsellulaarne, mikroobsed matid), kõrgel ja sügaval (veetilgad pilvedes, põhjavees, õlimaardlates, ookeanipõhjas 10 000 m, 1000 atm)

Käitumuslik mitmekesisus. Liikumine ja (foto-, kemo-, magnet-)taksis, erinevad elutsüklid – sporulatsioon.

Mikroobide mitmekesisuse uurimine molekulaarsete meetodite abil

Molekulaarsete meetodite kiire areng võimaldab uurida mikroorganismide mitmekesisust uuel, geneetilisel tasemel. Mikroobid grupeeritakse vastavalt nende geenide sarnasusele, mis väljendab ka nende evolutsioonilist vahekorda. Eeldades, et enamik looduses eksisteerivatest bakterirakkudest pole kultiveerimise teel kättesaadavad, on viimastel aastatel üha enam kasutusele võetud molekulaarseid meetodeid, mille abil on võimalik uurida otse keskkonnast eraldatud bakterikoosluste DNA-d ja vältida kultiveerimise selektiivsusest tulenevaid probleeme. Sellised molekulaarbioloogilised meetodid nagu nukleiinhapete ekstraheerimine, polümeraasi ahelreaktsioon (PCR), DNA kloneerimine ja sekveneerimine on teinud võimalikuks uute meetodite arengu, mis on suuresti muutnud meie arusaamist mikroobikooslustest ja mikroobide mitmekesisustest looduses.

Molekulaarsetest markeritest kasutatakse mikroobide mitmekesisuse uurimisel kõige rohkem ribosomaalse operoni geene (16S rDNA, 5S rDNA), samuti ribosomaalsete geenide vahelist intergeenset piirkonda, samuti kasutatakse DNA güraasi B alaühiku GyrB, RNA polümeraasi δ⁷⁰ faktori, elongatsioonifaktori geeni EF-Tu ja ATPaasi b –alaühiku järjestusi

Molekulaarsetest markeritest saadud informatsiooni põhjal jaotatakse elusorganismid kolme **domeeni**: eubakterid, arhed ja euakrüoodid. Bakterite puhul on kokku leitud 56 suuremat alamjaotust (hõimkonda), nendest 26 on kultiveeritavate esindajatega (uues Bergey määrajas on 23 hõimkonda), arhede puu koosneb kolmest hõimkonnast.

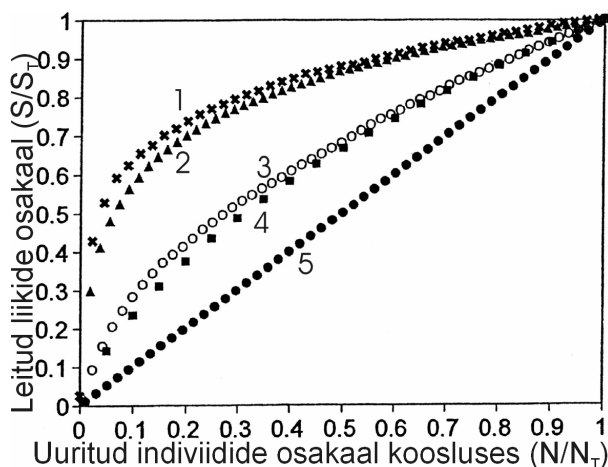
Ribosomaalse RNA järjestuste põhjal ei ole võimalik teha järeltõlget bakterite fülogeneesi kohta. rRNA andmete alusel näivad enamus suuremaid bakterite rühmi pärinevat ühes ja samast eellasest (esivanemast).

Puudub korrelatsioon fülogeneetiliste rühmade ja fenotüübiliste tunnuste (feneetilise süsteemi) vahel.

Probleemid molekulaarsete meetodite kasutamisel: DNA-I põhinevad meetodid sõltuvad DNA eraldamise kvaliteedist. Erinevad bakterid lüüsuvad erinevalt, seega on võimalik et osa bakterirakke ei lüüsu üldse, seega jääb osa bakterite DNA-st keskkonnast eraldamata. Praimerite järjestused, mida kasutatakse polümeraasahelreaktsioonis, on koostatud publitseeritud järjestuste põhjal, mis ei pruugi adekvaatselt kajastada mittekultiveeritavate bakterite järjestusi. Polümeraasi ahelreaktsiooni käigus võivad tekkida kimeersed produktid.

Polüfaasiline taksonoomia

Polüfaasilise taksonoomia puhul püütakse saavutada, kasutades erinevaid andmeid, uuritava mikroobi sellist klassifitseerumist, mille puhul oleks võimalikult vähe vasturääkivusi. Need klassifitseerimisel kasutatavad andmed võivad olla biokeemilised testid, rasvhappeline koostis, DNA sõrmejäljed (fingerprinting) ja geenijärjestused.



Näide: Erinevate koosluste mitmekesisuse võrdlus

Akumulatsioonikõverad

1. Michigani taimed
2. Costa Rica linnud
3. Mikroobikooslus inimese suust
4. Costa Rica ööliblikad
5. Vihmametsade mulla mikroobikooslus

OTU –(*operational taxonomic unit*) -antud juhul tähistab ühte liiki.

Kui akumulatsioonikõver läheneb platoole (näiteks jooned 1 ja 2), siis on koosluse liigiline mitmekesisus hästi kirjeldatud st. isegi kui jätkata uurimistööd (suurendada proovide arvu), siis uusi liike tõenäoliselt ei leita ja mitmekesisuse hinnang ei muutu. Kui akumulatsioonikõver on sirge (näiteks joon 5),

siis uurimistöö käigus tuleb kogu aeg uusi liike juurde ning vastavalt sellele suureneb ka mitmekesisus (liikide arv). Seega on vihmametsade mulla mikroobikoosluse mitmekesisus tunduvalt suurem kui ülejäänud joonisel esitatud kooslustel. Costa Rica ööliblikate mitmekesisus on lähedane inimese suu mikroobikoosluse liigilise mitmekesisusega.

Viiteid kirjandusele:

- Bacterial Biodiversity: a Time for Place, ASM News, October 1999
 Phylogeny of Bacteria beyond the 16S rRNA Standard, ASM News, November 1999
 Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. 2000 Research in Microbiology, 151: 167-177.
 Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity AEM, Volume 67, no. 10, p. 4399-4406, 2001
 Phylogeny of bacteria: are we now close to understanding it? ASM News, Vol 68, No 6, 284-291, 2002
 Genome trees and the Tree of Life. TRENDS in Genetics, Vol.18 No.9 September 2002
 Estimating prokaryotic diversity and its limits. PNAS, 2002 vol. 99 no. 16
 New approaches to analyzing microbial biodiversity data. Current Opinion in Microbiology 2003, 6:282-287
 The ring of life provides evidence for a genome fusion origin of eukaryotes. Nature 431, 152 - 155 (09 September 2004)
 Re-evaluating prokaryotic species. Nature Reviews Microbiology, 3, 2005.

Loengukursuse käigus kasutatavad raamatud:

- Microbial diversity. O. Ogunseitan, 2005
 Principles and applications of soil microbiology. D. Sylvia, 1998
 Soil microbiology and biochemistry, 2nd edition, Paul & Clark, 1996
 The dictionary of environmental microbiology. Stetzenbach & Yates, 2003