

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ Ι

Γιώργος Τσιάμης

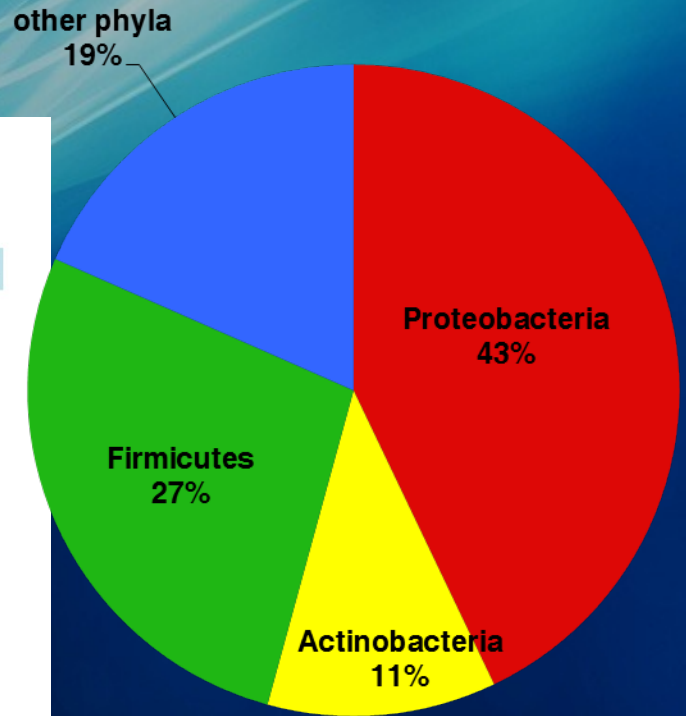
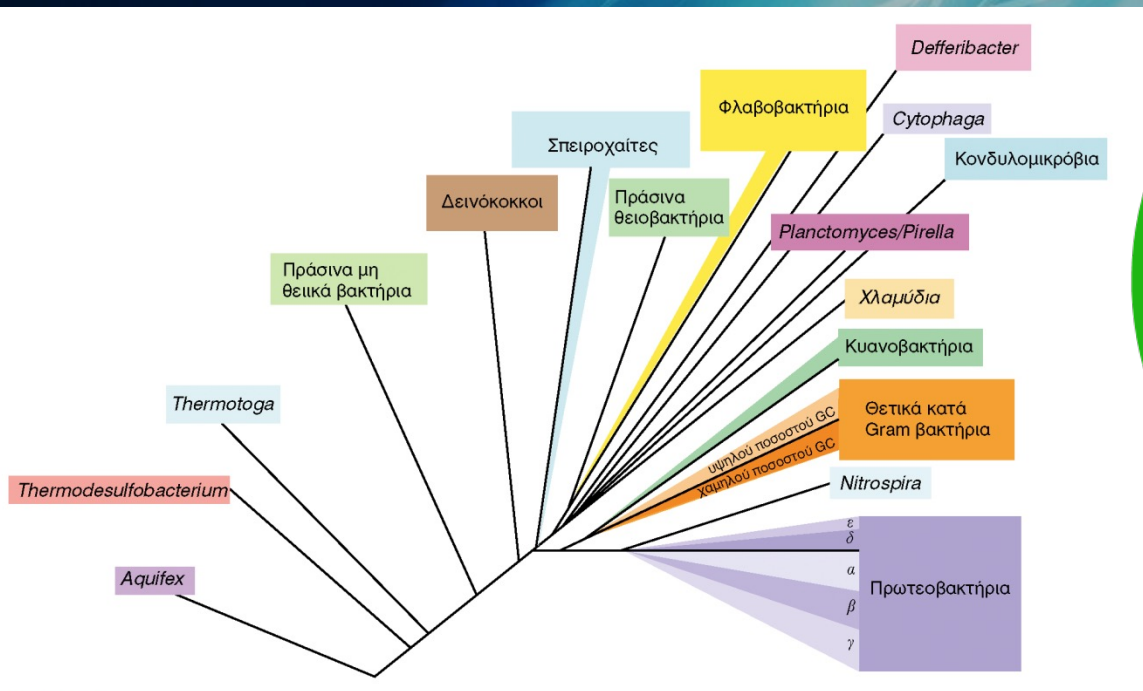
Αναπληρωτής Καθηγητής

Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας

ΠΡΩΤΕΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

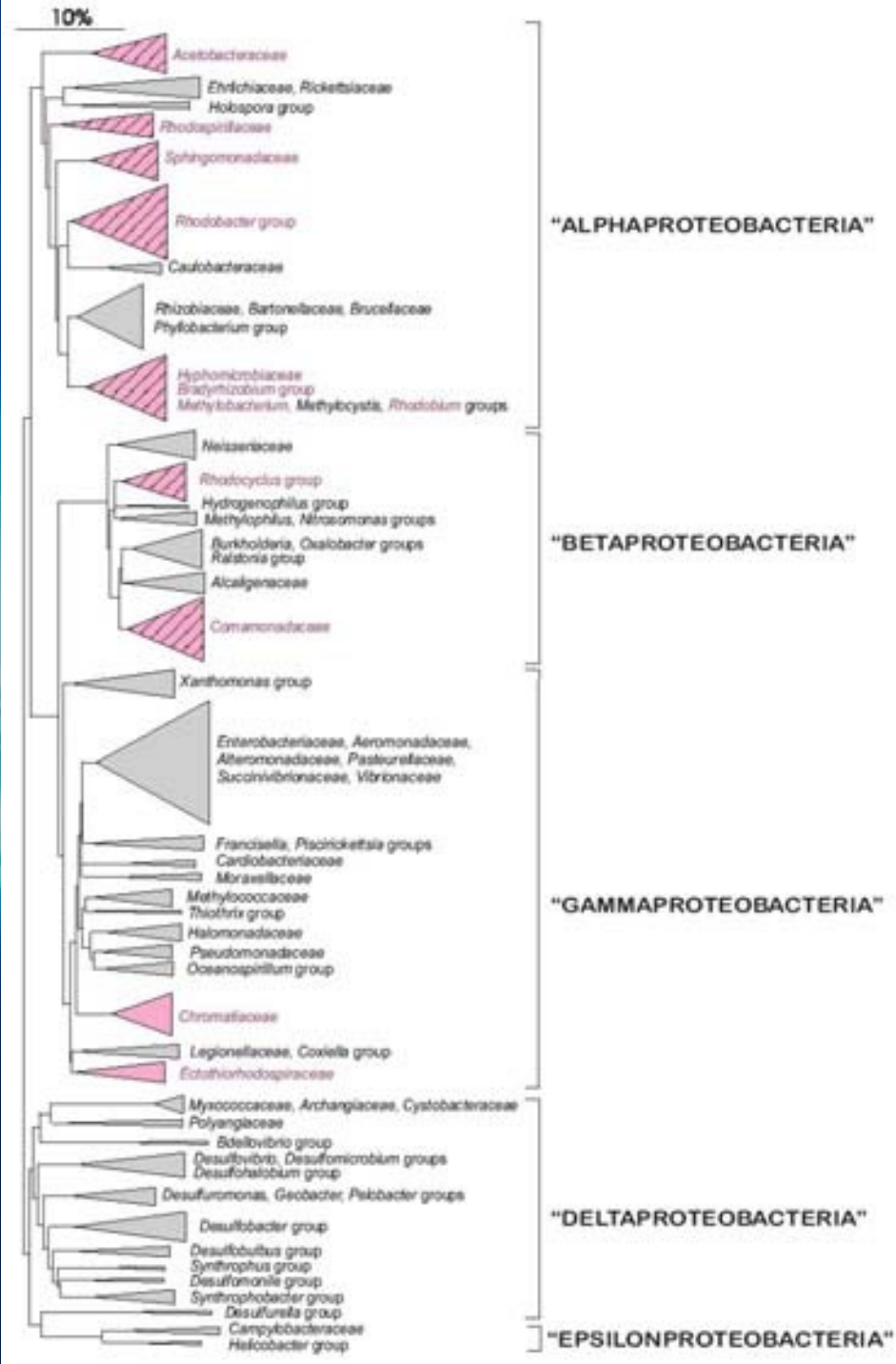
- Αρνητικά κατά Gram
- Πλειονότητα των γνωστών κατά Gram βακτηρίων γεωργικής, ιατρικής και βιομηχανικής σημασίας
- Πήραν το όνομα τους από τον θεό Πρωτέα που μπορούσε να πάρει διαφορετικές μορφές (Stackebrandt), αντικατοπτρίζοντας τη μεγάλη ποικιλότητα μορφολογιών που συναντάμε
- 5 κύριες φυλογενετικές υποδιαίρεσεις
- α, β, γ, δ, και ε.

Genome projects 2008



2289 bacterial genomes

- Προέκυψαν από ένα κοινό φωτοσυνθετικό πρόγονο
- αυτή η δυνατότητα στη συνέχεια χάθηκε από διάφορες γραμμές και νέες μεταβολικές ικανότητες αποκτήθηκαν
- Αντιπροσωπεύουν πάνω από το 40% του συνόλου των προκαρυωτικών γενών
more than 460 genera and more than 1600 species (in 2002)
- μεγάλης βιολογικής σημασίας
- ακραία μεταβολική ποικιλότητα
- free-living vs. endosymbionts
- βασικό ρόλο στους κύκλους του άνθρακα, θείου και του αζώτου
- ιατρικώς σημαντικά είδη
- προέλευση των μιτοχονδρίων ανιχνεύεται στα alpha-proteobacteria



Μεταβολική ποικιλότητα

- Ακραία ποικιλομορφία των ενεργειακών ροών μηχανισμών:

χημειοργανότροφα: *Escherichia coli*

chemolithotrophs: *Nitrosomonas*, *Acidithiobacillus*

φωτότροφα: *Rhodospirillum*, *Chromatium*

- απίστευτη ποικιλομορφία μορφολογίας: cocci, rods, curved, spiral, ring-shaped, appendaged, filamentous and sheated forms
- Μερικά έχουν πολύπλοκο τρόπο ανάπτυξης
- Κινητικότητα, πολική / peritrichous flagella or gliding motility
- Ελεύθερα (.e.g. *Pseudomonas*), συμβιωτικά (*Rhizobium*), ενδο-συμβιωτικά (*Rickettsia*)

Metabolic diversity

- Relationship to oxygen

strict aerobes to strict anaerobes, facultative anaerobes and microaerophiles

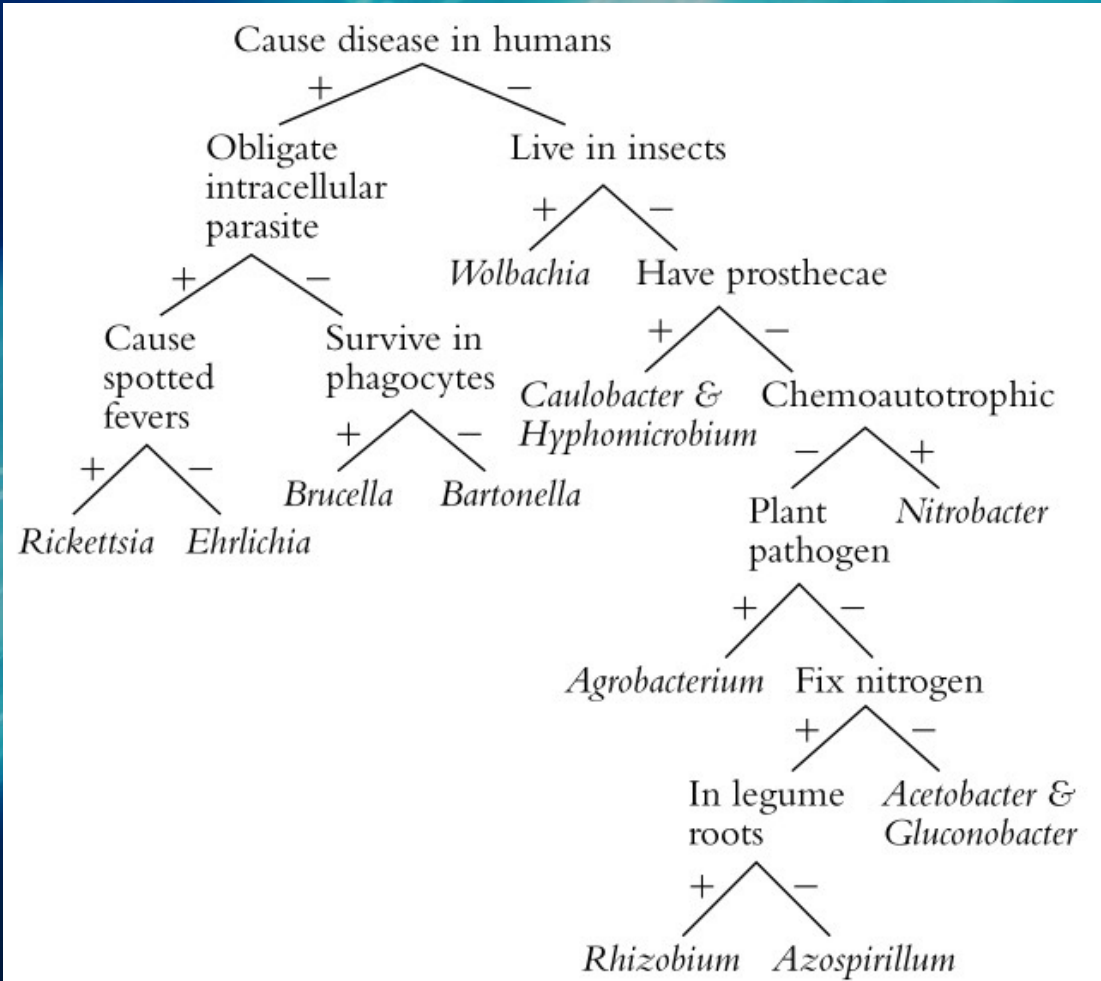
- Temperature

thermophiles: *Thiomonas thermosulfata*

psychrophiles: *Polaromonas*

ΠΡΩΤΕΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

Gram-negative



α - ΠΡΩΤΕΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

Παθογόνα ανθρώπων:

Bartonella

B. hensela Cat-scratch disease

Brucella Brucellosis

α - ΠΡΩΤΕΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

Υποχρεωτικά ενδοκυττάρια παράσιτα:

Ehrlichia. Tick-borne, ehrlichiosis

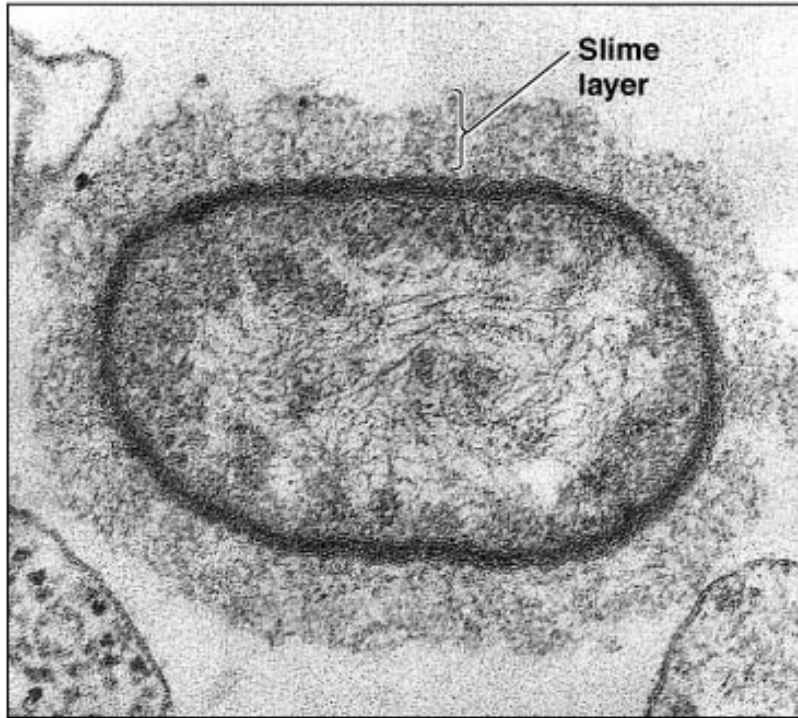
Rickettsia. Arthropod-borne, spotted fevers

R. prowazekii Epidemic typhus

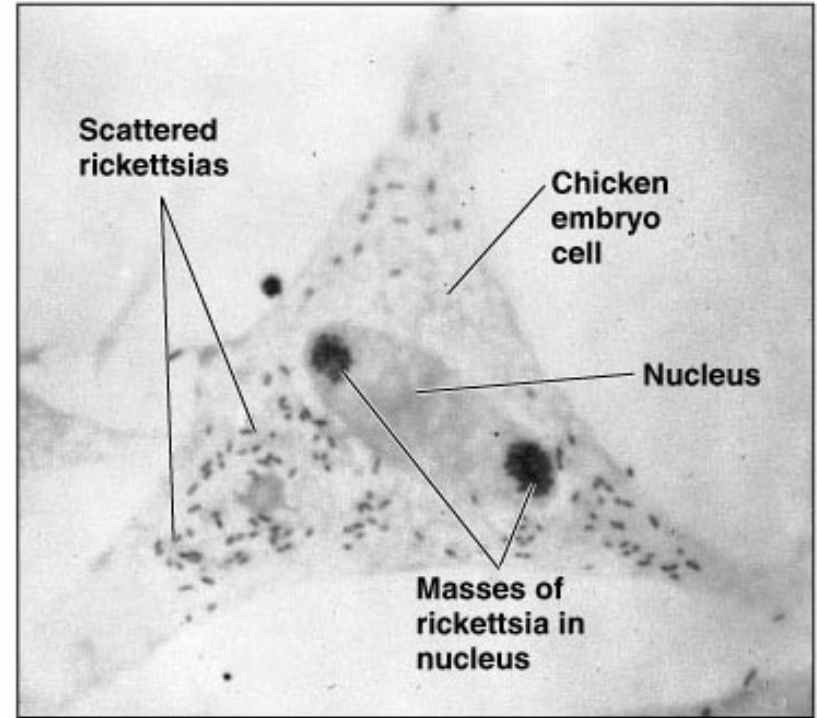
R. typhi Endemic murine typhus

R. rickettsii Rocky Mountain Spotted Fever

α - ΠΡΩΤΕΟΒΑΚΤΗΡΙΑ



(a) Rickettsia

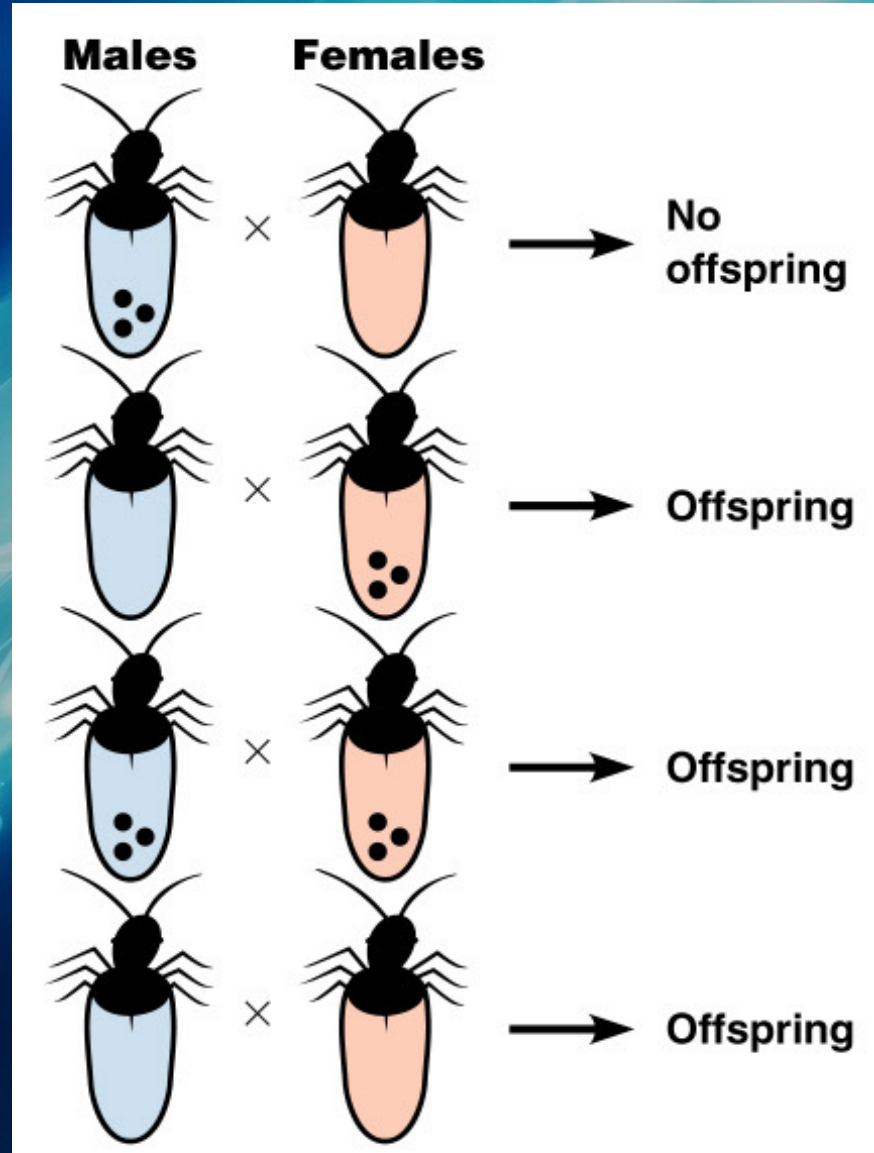


(b) Rickettsias in chicken embryo cell

α - ΠΡΩΤΕΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

Wolbachia.

Αρθρόποδα,
έντομα,
νηματώδεις



SYMBIOSIS

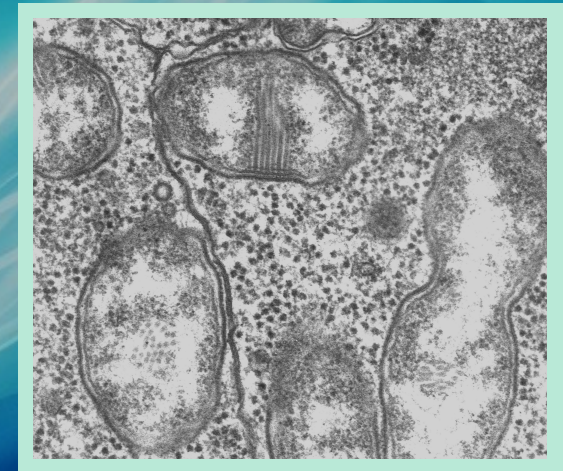
“The living together of dissimilarly named organisms”

)A .de Bary, 1879(

Do Parasites Rule the World?

New research shows that parasites not only control the behavior of their hosts, they can change entire ecosystems to suit their needs

Συμβιωτικά Βακτήρια και Αρθρόποδα



- Πηγή θρεπτικών συστατικών
- Επηρεάζουν τη φυσιολογία
- Επηρεάζουν αναπαραγωγικές λειτουργίες

Γονιδιωματική και Μεταγονιδιωματική



Συμβιωτικά Βακτήρια:

- *Buchnera*, *Blochmannia*, *Blattabacterium*, *Serratia symbiotica*, *Rickettsia* species, *Wolbachia*, *Wigglesworthia glossinidia*, *Sodalis glossinidius*

Είδη Αρθροπόδων:

- Many species including mosquito species, aphid, tsetse fly, *Rhodnius* bug

Μεταγονιδιώματα:

- *Bemisia tabaci* και *Bactrocera oleae*

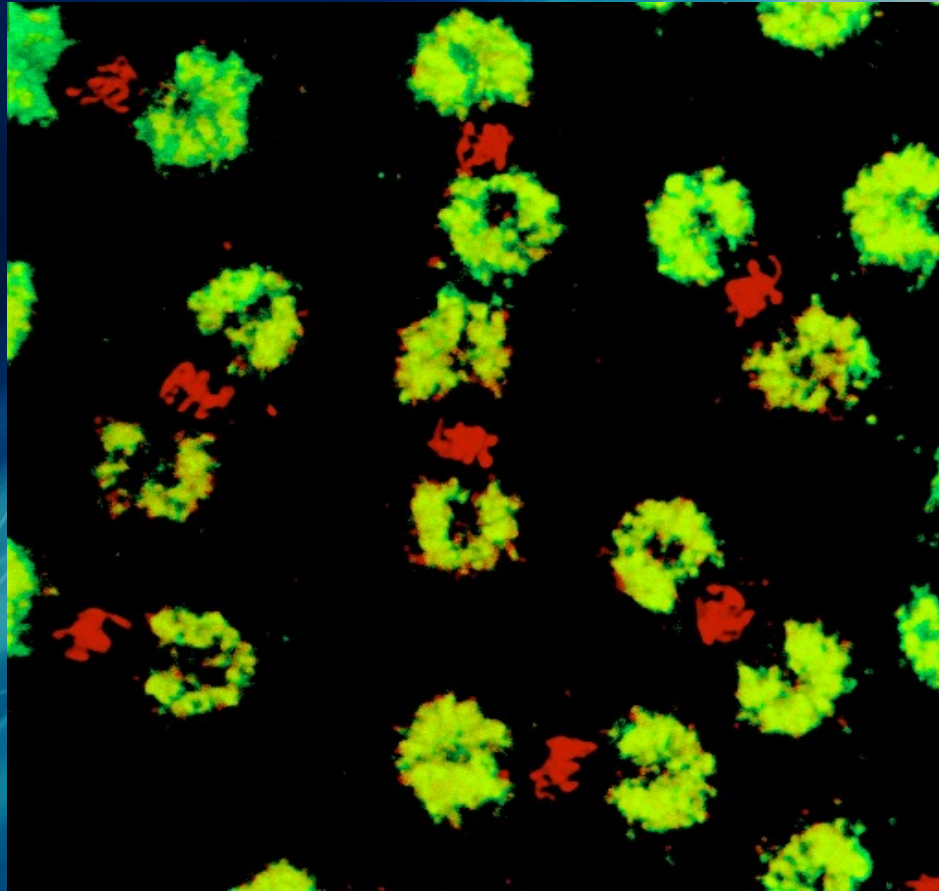
Symbiont-based Control Strategies (SCS)



- Use symbionts for pest and disease management

- Ongoing efforts:
 - Pierce disease
 - Fiji disease virus
 - Chagas disease
 - Trypanosomiasis
 - Malaria, Dengue virus, Lymphatic filariasis
 - Aphids, Whiteflies, Tephritids

Wolbachia: ένα υποχρεωτικά ενδοκυττάριο και μητρικά κληρονομούμενο α-πρωτεοβακτήριο



Εύρος ξενιστών της *Wolbachia*

Αρθρόποδα

- Έντομα
- Ακάρεα
- Ισόποδα
- Αράχνες

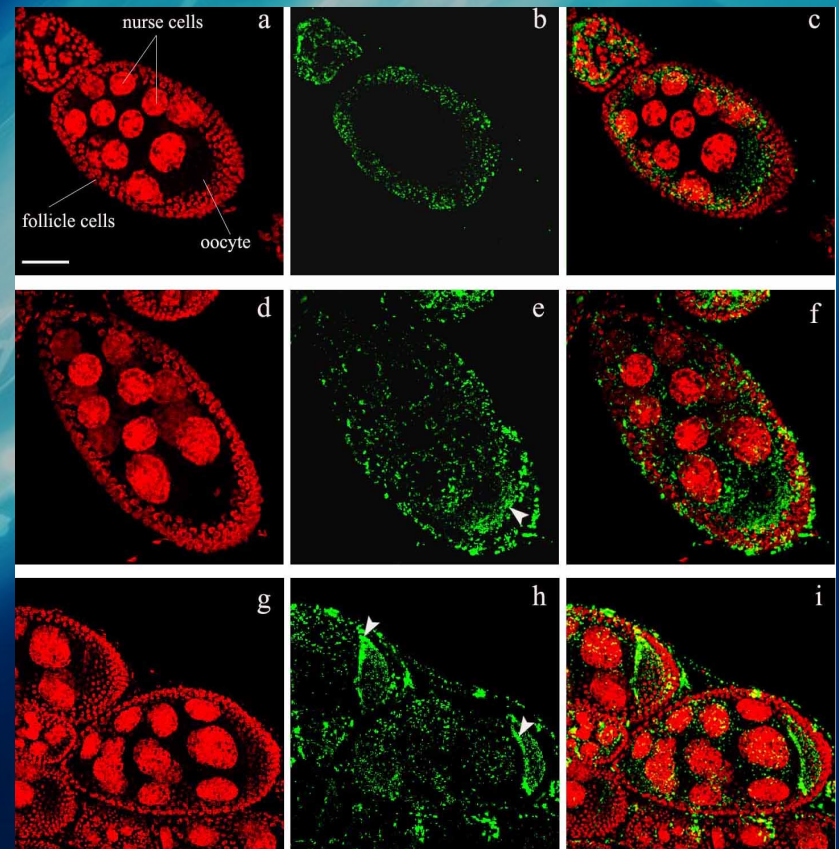
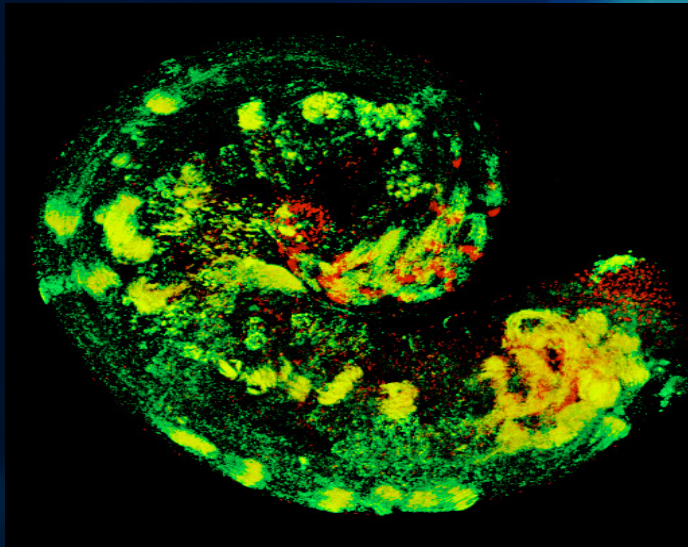
Νηματώδεις

- νηματώδεις της φιλαρίασης

Μη Μολυσμένα

- *Ceratitis capitata*
- *Bactrocera oleae*
- *Aedes aegypti*
- *Anopheles gambiae*
- *Dendroctonus* sp.

Η *Wolbachia* κατά τη σπερματογένεση & ωογένεση στη *Drosophila*



Wolbachia-επαγόμενες αναπαραγωγικές ανωμαλίες



Η *Wolbachia* επάγει αναπαραγωγικές ανωμαλίες όπως:

- Θηλυκοποίηση (Feminization)
 - Παρθενογένεση (Parthenogenesis)
 - Θανάτωση αρσενικών (Male-killing)
 - Κυτταροπλασματική Ασυμβατότητα (Cytoplasmic Incompatibility, CI)
-
- Εξάπλωση
 - Αντιβιοτικά

Uni-Directional CI



uninfected
♂



infected
♂



uninfected
♀



infected
♀



Bi-Directional CI



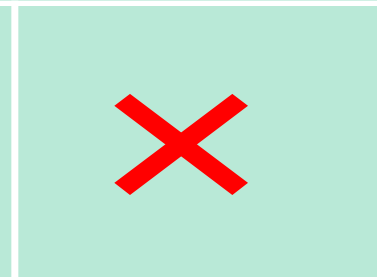
Infected A
♂



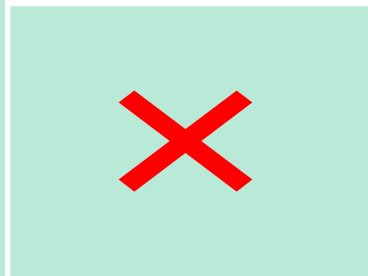
Infected B
♂



Infected A
♀



Infected B
♀



Εύρος ξενιστών της *Wolbachia* στα Tephritidae



~5000 είδη

54 είδη έχουν ελεγχθεί

18 είδη έχουν βρεθεί μολυσμένα

Bactrocera species, *Anastrepha suspensa*, *Rhagoletis cerasi*, *R. medax*, *R. pomonella*

Wolbachia και *Ceratitis capitata*



Απουσία *Wolbachia*

Μία μόνο αναφορά στη Βραζιλία

Παρουσία *Enterobacteriaceae*

Wolbachia και *Bactrocera oleae*



Απουσία *Wolbachia*

Παρουσία *Acetobacter tropicalis*

Wolbachia & Εφαρμογές I



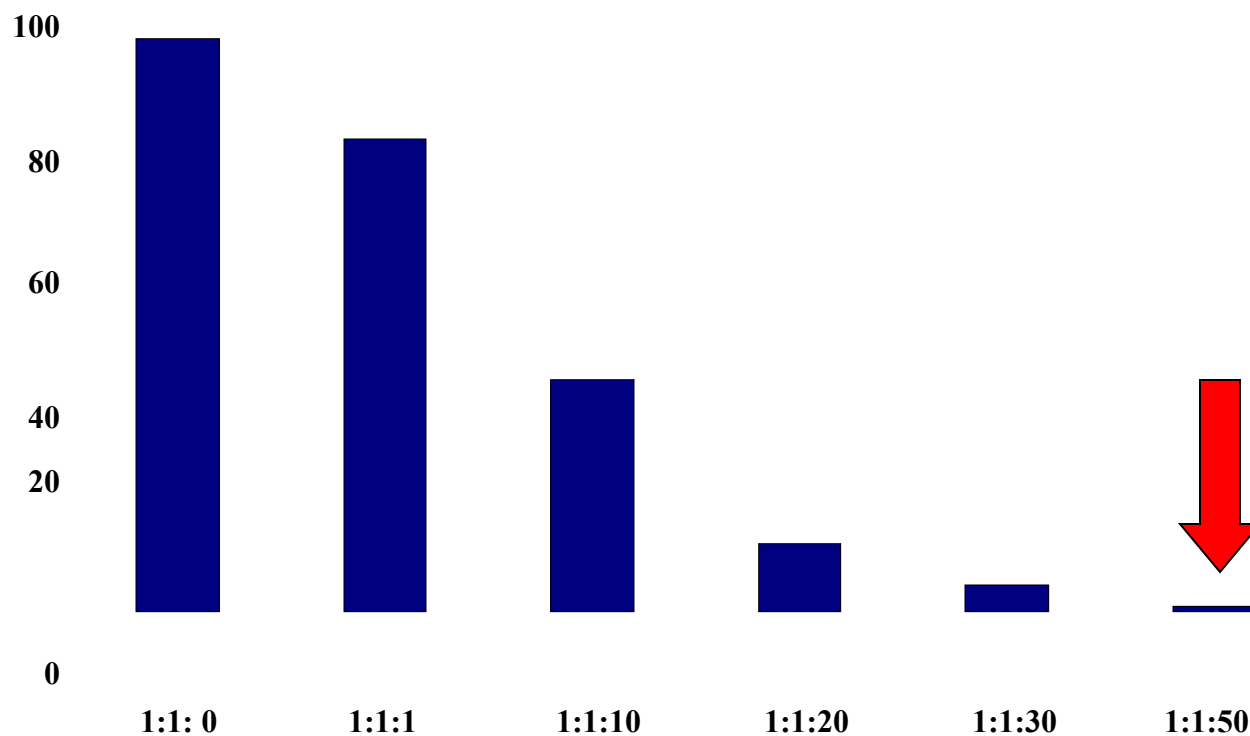
Δέκτης: Στέλεχος Μπενάκειο

- Δότης: *Rhagoletis cerasi*
- Δύο επιμολυσμένες ισομητρικές σειρές:
88.6 (wCer2) and S10.3 (wCer4).
- 100% επίπεδα μόλυνσης (>8 χρόνια, 80 γενιές).
- 100% έκφραση ΚΑ σε ατομικές γενετικές διασταυρώσεις.

Wolbachia & Εφαρμογές II



Έκκόλαψη αβγών (%)



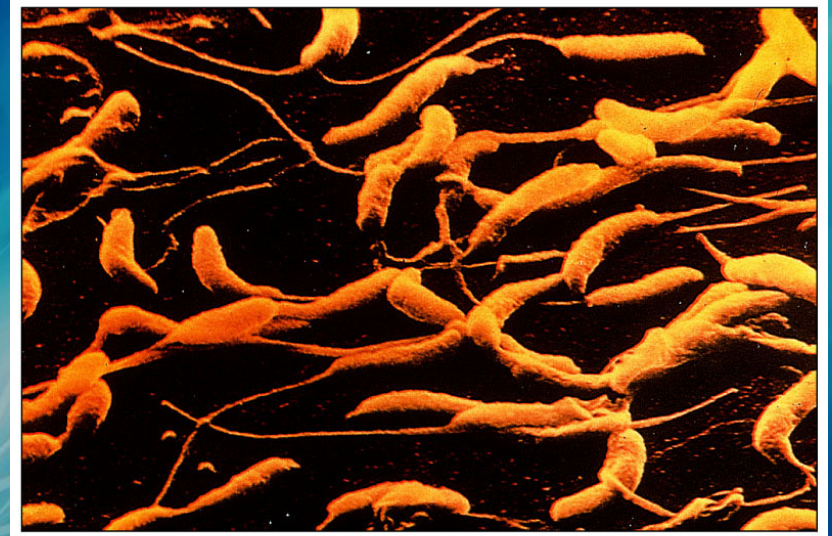
Αναλογία Μολυσμένων Αρσενικών

Αριθμός Ενηλίκων	300	300	300	306	290	520
Σύνολο αβγών	3000	3000	2097	1688	858	700

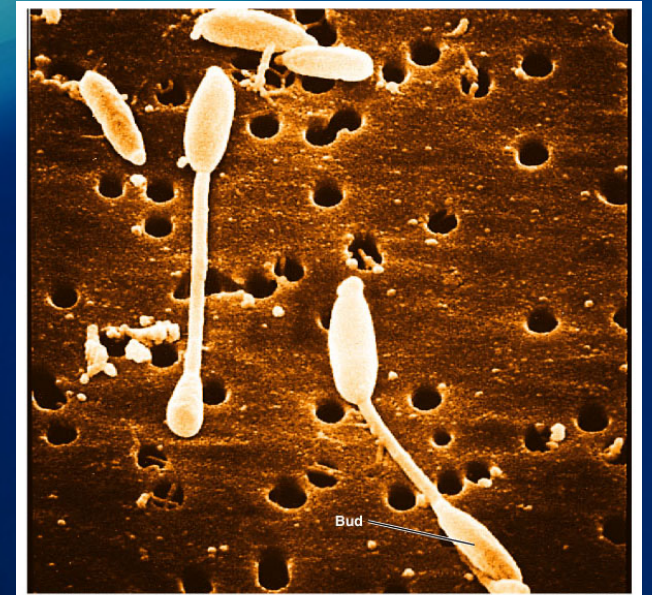
α - ΠΡΩΤΕΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

Have prosthecae:

Caulobacter. Stalked
bacteria found in lakes



Hyphomicrobium. Budding
bacteria found in lakes



α - ΠΡΩΤΕΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

Παθογόνα φυτών:

Agrobacterium.
Μεταφορά πλασμιδίου
και δημιουργία
νεοπλασίας
(κορρονωτού καλλού)



Terms describing the location of microbial habitats related to plants:

Epiphytic = organisms growing on the surface of photosynthetic organisms

Phyllosphere = area surrounding the leaf and impacted by it

Rhizoplane (ρίζοπλανές) = root surface

Rhizosphere = area surrounding the root and impacted by it

Profiles of a plant pathogens

1. *Agrobacterium*

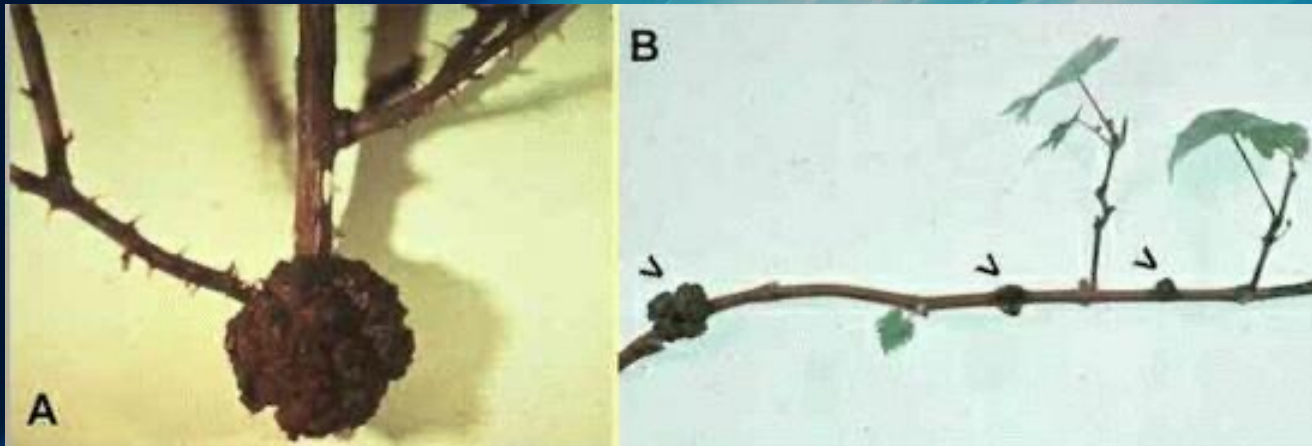


Figure A. Large gall formed at the base of the stem of a rose bush.

Figure B. A series of galls (arrowheads) along a branch of a grapevine.



Agrobacterium tumefaciens causes crown gall disease of a wide range of dicotyledonous (broad-leaved) plants, especially members of the rose family such as apple, pear, peach, cherry, almond, raspberry and roses.

A. tumefaciens is a Gram-negative, non-spore-forming, motile, rod-shaped bacterium, closely related to *Rhizobium* which forms nitrogen-fixing nodules on clover and other leguminous plants.

Most of the genes involved in crown gall disease are not borne on the chromosome of *A. tumefaciens* but on a large **plasmid**, termed the *T_i* (**tumour-inducing**) plasmid. In the same way, most of the genes that enable *Rhizobium* strains to produce nitrogen-fixing nodules are contained on a large plasmid termed the *Sym* (symbiotic) **plasmid**.

Thus, the characteristic biology of these two bacteria is a function mainly of their plasmids, not of the bacterial chromosome.

Agrobacterium is significant as a tool to insert foreign DNA into a plant.

Basically, the bacterium transfers part of its DNA to the plant, and this DNA integrates into the plant's genome, causing the production of tumors and associated changes in plant metabolism.

virA

(πρωτεϊνική κινάση, φωσφορυλιώνει *virG*)

virG

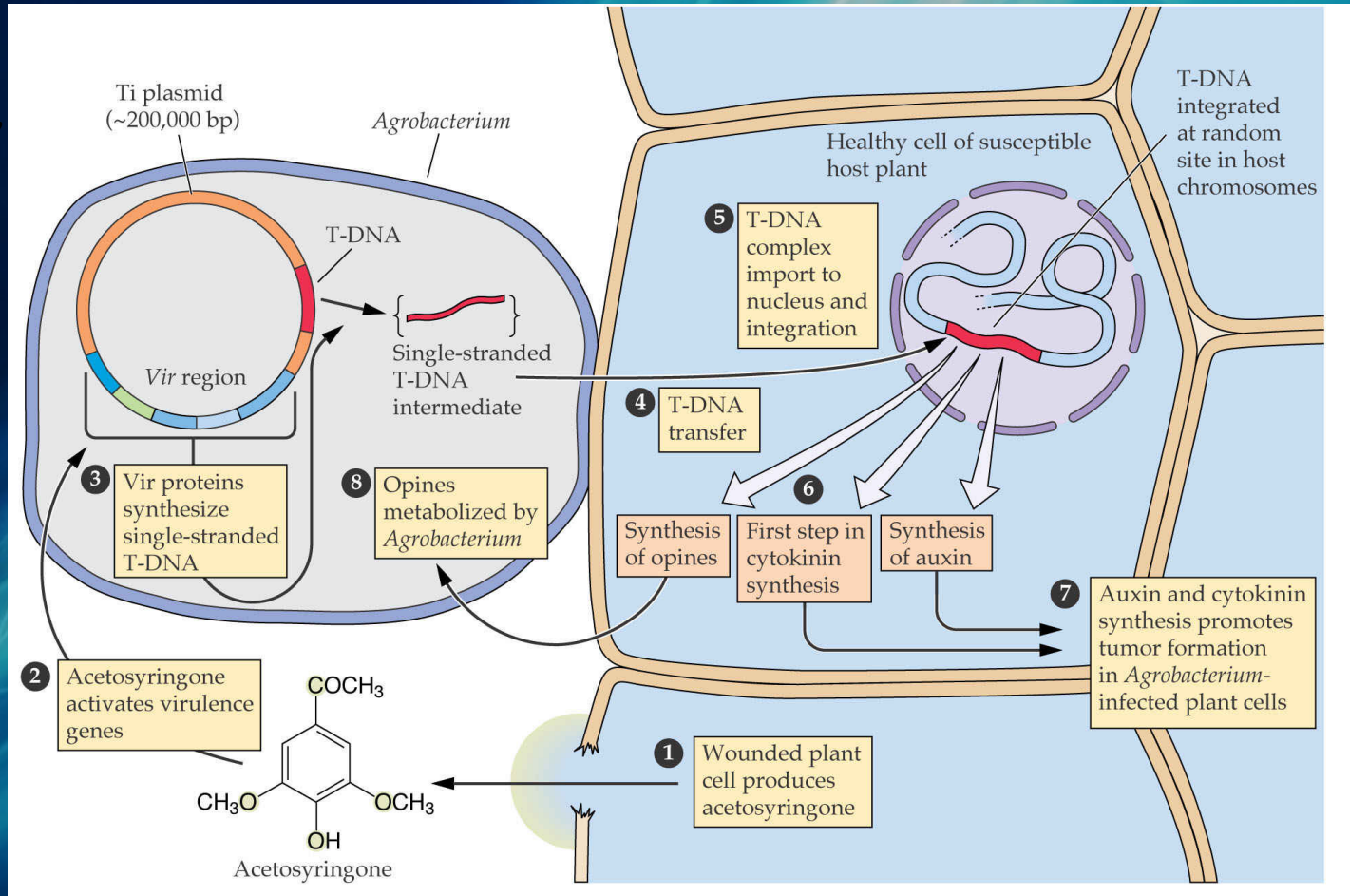
(ρυθμιστικός παράγοντας)

virD

(ενδονουκλεάση)

virE

(μεταφέρει DNA), *virB* βοηθάει στη μεταφορά ssDNA, localized in membrane)



The central role of plasmids in these bacteria can be shown easily by "curing" of strains. If the bacterium is grown near its maximum temperature (about 30°C in the case of *Agrobacterium* or *Rhizobium*) then the plasmid is lost and pathogenicity (of *Agrobacterium*) or nodule-forming ability (of *Rhizobium*) also is lost. However, loss of the plasmid does not affect bacterial growth in culture - the plasmid-free strains are entirely functional bacteria.

In laboratory conditions it is also possible to cure *Agrobacterium* or *Rhizobium* and then introduce the plasmid of the other organism.

Introduction of the T_i plasmid into *Rhizobium* causes this to form galls; introduction of the *Sym* plasmid into *Agrobacterium* causes it to form nodule-like structures, although they are not fully functional.

Studies such as these raise many interesting and challenging questions about the nature of bacteria.

For example, what does the name of a bacterial species or genus really mean, if the organism can change so drastically by loss or gain of a non-essential plasmid?

And how much gene exchange occurs by means of plasmids and other mobile genetic elements within natural populations?

It is important to note that only a small part of the plasmid (the T-DNA) enters the plant; the rest of the plasmid remains in the bacterium to serve further roles. When integrated into the plant genome, the genes on the **T-DNA** code for:

- **production of cytokinins**
- **synthesis and release of novel plant metabolites - the opines and agrocinopines.**

The plant hormones upset the normal balance of cell growth, leading to the production of galls and thus to a nutrient-rich environment for the bacteria.

The opines are unique amino acid derivatives, different from normal plant products, and the agrocinopines similarly are unique phosphorylated sugar derivatives.

All these compounds can be used by the bacterium as the sole carbon and energy source, and because they are absent from normal plants they provide *Agrobacterium* with a unique food source that other bacteria cannot use.

A. tumefaciens has been used extensively for genetic engineering of plants.

This is achieved by engineering selected genes into the T-DNA of the bacterial plasmid in laboratory conditions so that they become integrated into the plant chromosomes when the T-DNA is transferred.

A few of the commercial applications of T-DNA technologies:

Some commercial releases of transgenic plants

Crop and release date	Name	Company	Novel properties
Tomato (1994)	Flavr Savr	Calgene	Vine-ripened flavour, shelf life
Tomato (1995)		Zeneca	Consistency of tomato paste
Cotton Potato Maize (1996-97)	Bollgard NewLeaf YieldGuard	Monsanto	<i>Bacillus thuringiensis</i> toxin for insect resistance
Soybean Canola (rape) Cotton (1995-96)	Roundup Ready	Monsanto	Glyphosate herbicide resistance

Τι είναι γενετική τροποποίηση;

Μεταβολή του γενετικού υλικού-DNA-με τρόπο που δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί φυσικά με την σύζευξη ή τον φυσικό ανασυνδυασμό

Απολύτως ελεγχόμενη μεταφορά επιλεγμένων γονιδίων

Ταχεία και ρυθμιζόμενη μέθοδος γενετικής βελτίωσης φυτών-ζώων-μικροοργανισμών χωρίς ταξινομικούς φραγμούς

Γιατί χρειάζονται οι γενετικές τροποποιήσεις στους φυτικούς οργανισμούς;

Προσδίδουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά όπως:

- ✓ Ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα – έντομα – ιούς
- ✓ Ανθεκτικότητα σε υψηλή αλατότητα– pH – ακραίες τιμές θερμοκρασίας
- ✓ Βελτίωση ποιοτικών και ποσοτικών γνωρισμάτων
(π.χ.επιβράδυνση της ωρίμανσης, αλλαγή χρώματος άνθρων κ.α.)
- ✓ Παραγωγή νέων προϊόντων (εμβόλια, φάρμακα)

ΣΥΜΒΑΤΙΚΟ ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ

Bt-11





Οι σημαντικότερες καλλιέργειες γενετικά τροποποιημένων οργανισμών

Σόγια Roundup Ready



ελαιοκράμβη



Λευκό καλαμπόκι Βt

Καλαμπόκι (21%)

Σόγια (61%)

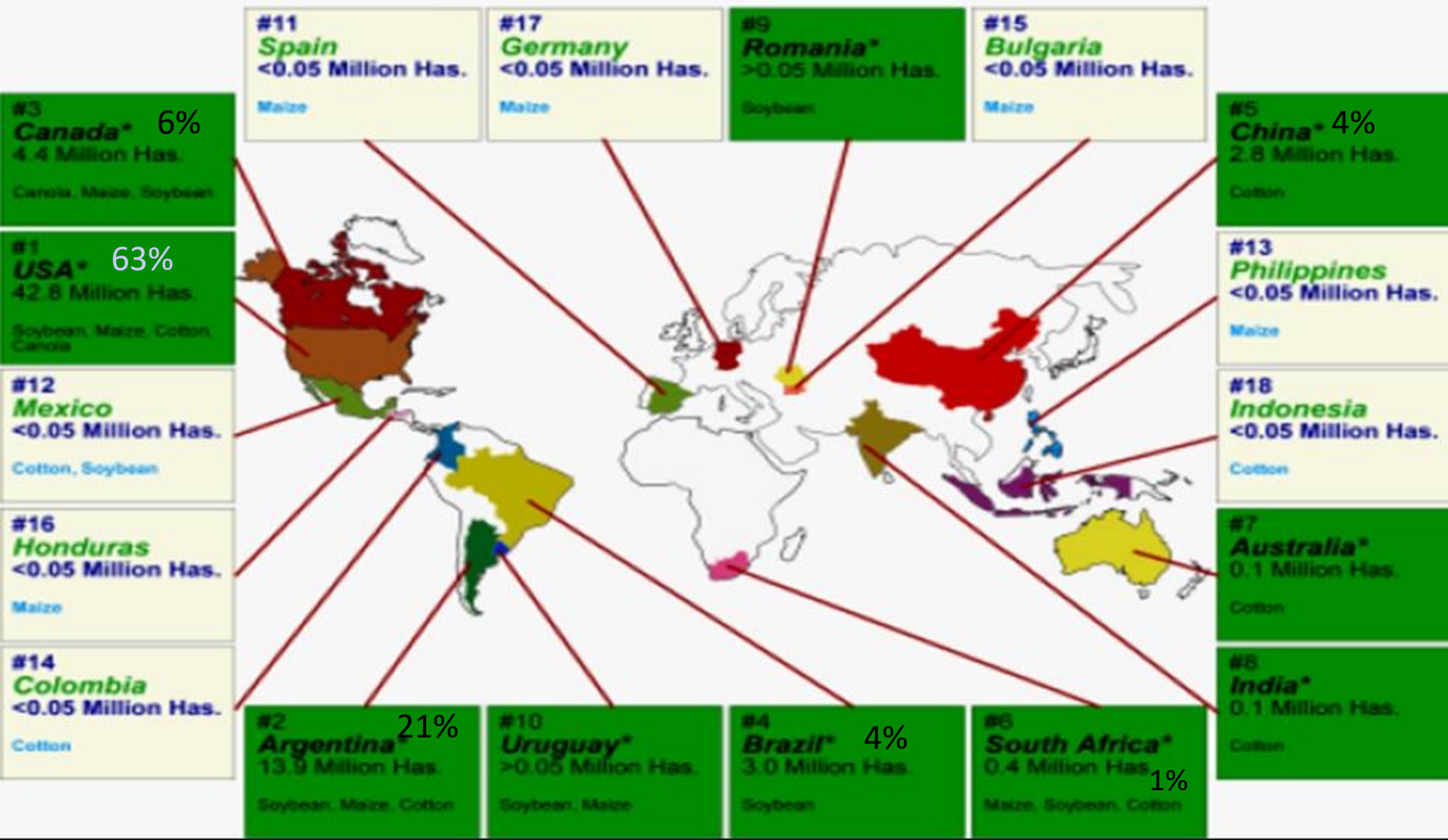
Βαμβάκι (12%)

Ελαιοκράμβη (5%)

Ρύζι

Τομάτα

Κατανομή της παγκόσμιας παραγωγής διαγονιδιακών φυτών



ΕΙΣΑΓΩΓΗ DNA ΣΕ ΦΥΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Με σύζευξη μέσω του συστήματος *Agrobacterium tumefaciens* (64%)

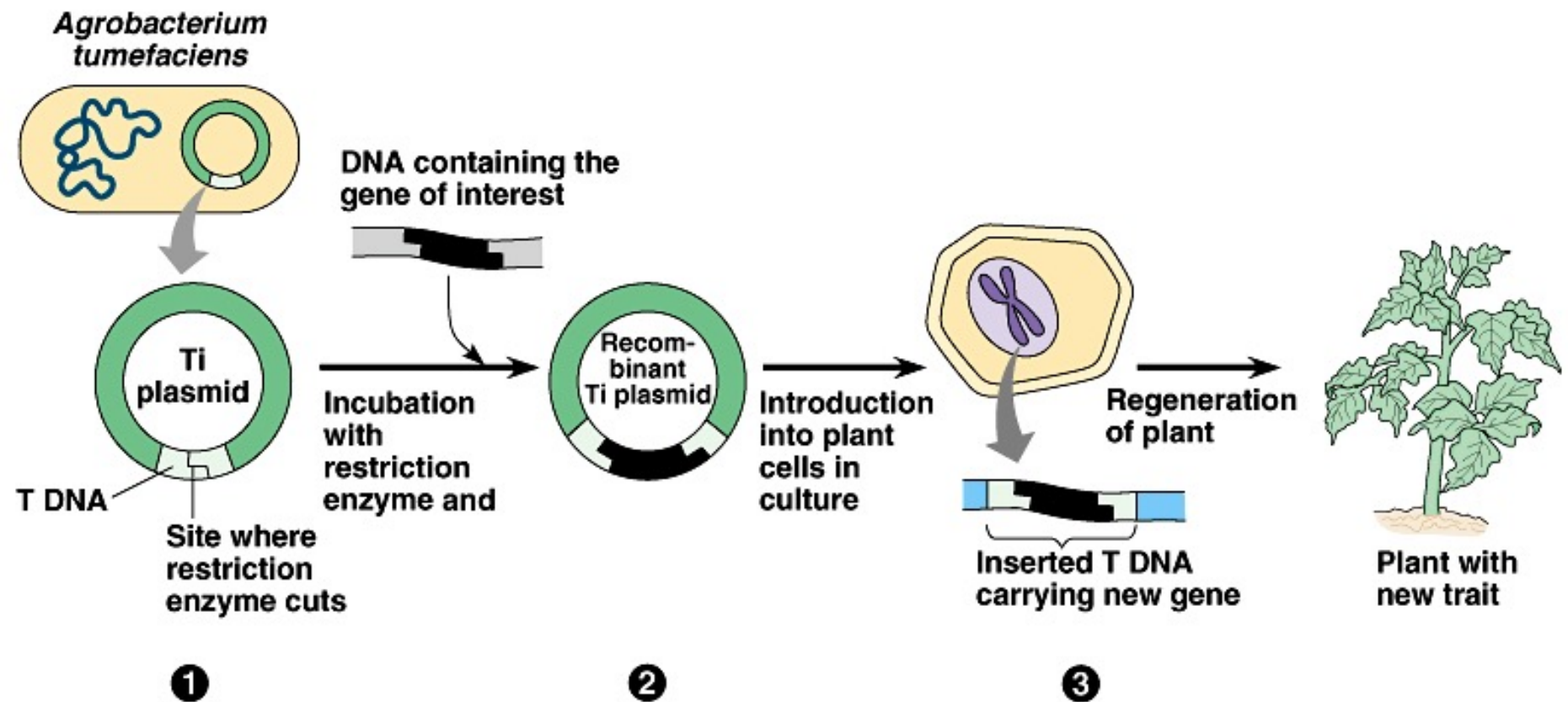
“Καθαρού” DNA με:

α) Βομβαρδισμό (21%)

β) Ηλεκτροδιάτρηση

γ) PEG

Using the Ti plasmid as a vector for genetic engineering in plants



Potential Applications

Genetically modify plants to...

produce vaccines in their fruit (e.g. polio vaccine)

be resistant to disease and pests

require less fertilizer, pesticides and herbicides

Bt-11

ανθεκτικότητα σε έντομα
ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα



Ostrinia nubilalis
Πυραλίδα του Αραβοσίτου



Δομή Γενετικής Τροποποίησης



Bt 176

ανθεκτικότητα σε έντομα
ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα

Δομή Γενετικής Τροποποίησης



MON 810

ανθεκτικότητα σε έντομα

Δομή Γενετικής Τροποποίησης



“Golden” rice contrasted with ordinary rice



Transgenic Rice

Genetically modify plants to produce beta-carotene

Beta Carotene is converted to vitamin A in humans

Vitamin A deficiency leads to poor vision and high susceptibility to disease

~70% of children <5 years old in SE Asia suffer from vit. A deficiency

α - ΠΡΩΤΕΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

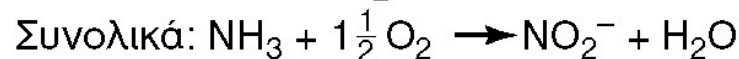
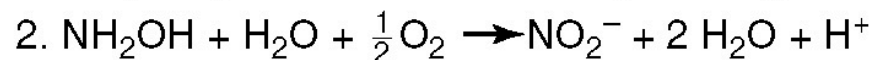
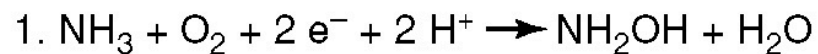
Χημειοαυτοτροφικά:

Οξείδωση αζώτου για παραγωγή ενέργειας

Fix CO₂

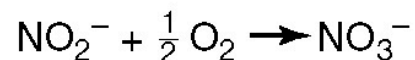


Νιτροζοποιητικά βακτήρια



$$\Delta G^{0'} = -275 \text{ kJ/αντίδραση}$$

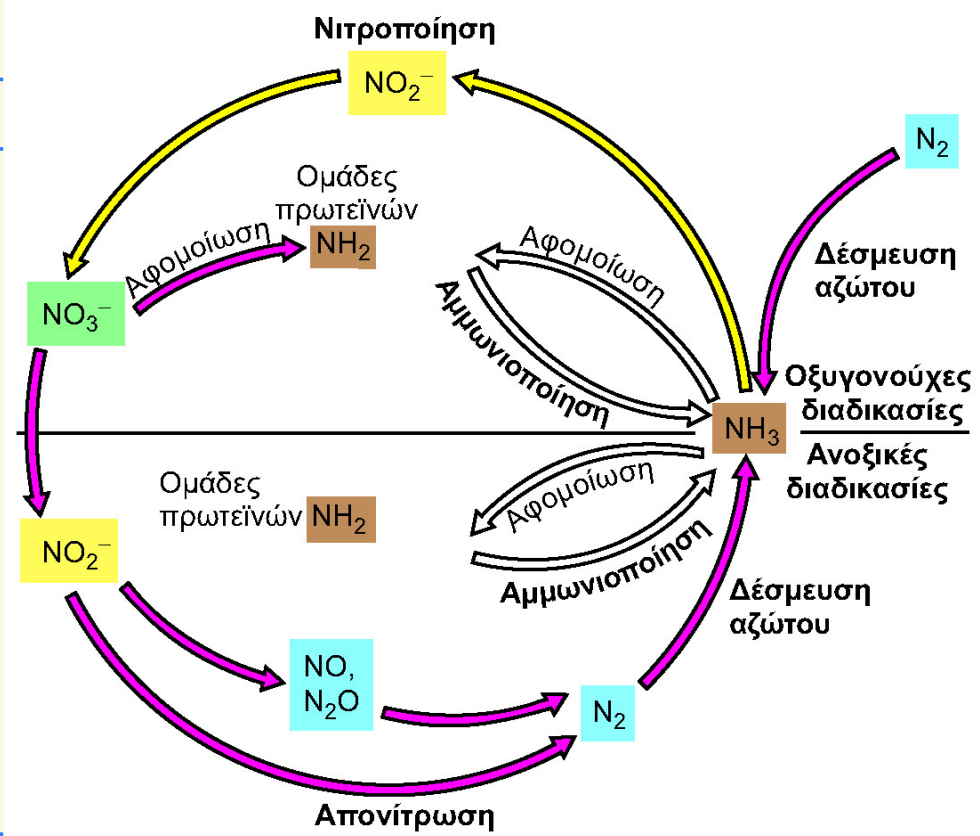
Νιτροποιητικά βακτήρια



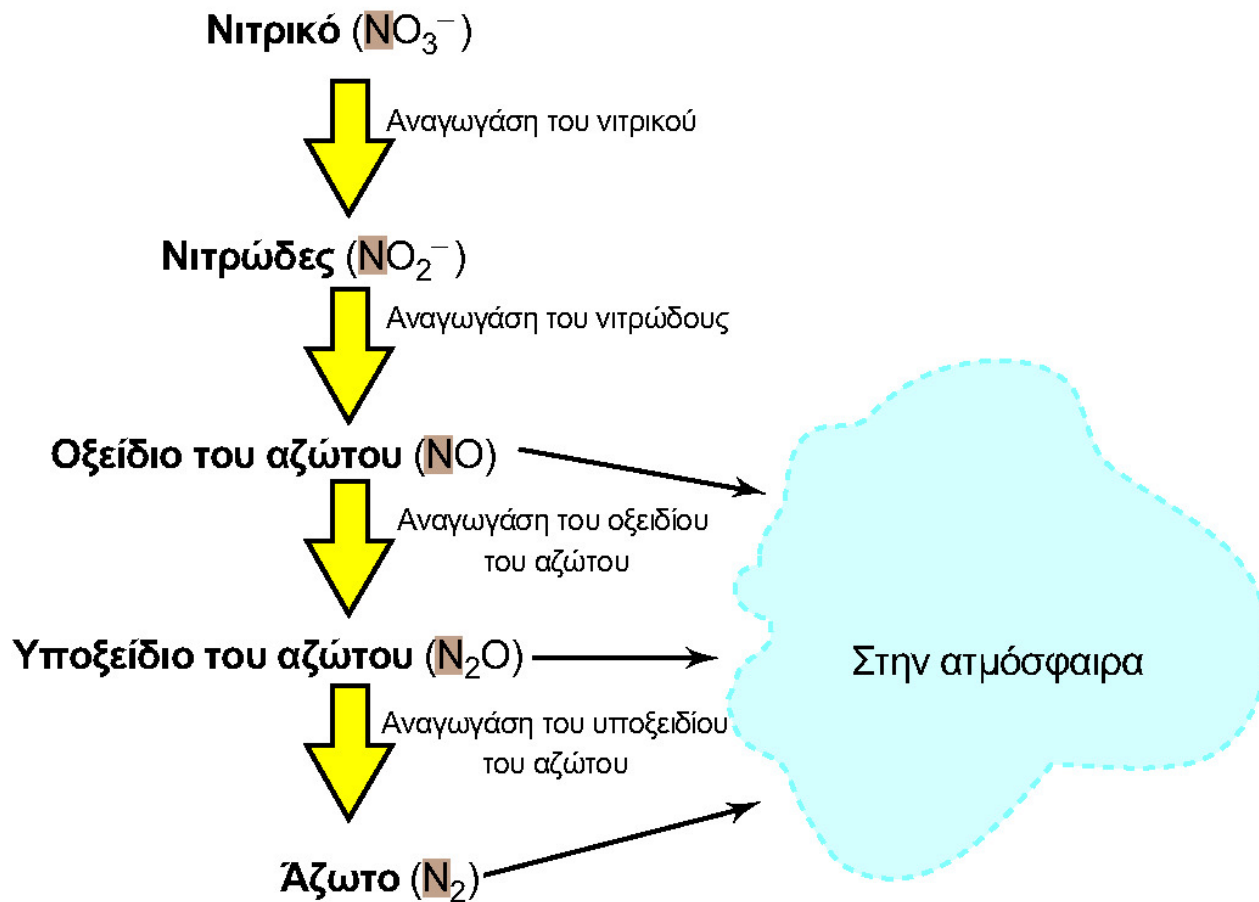
$$\Delta G^{0'} = -74,1 \text{ kJ/αντίδραση}$$

Σημαντικές διαδικασίες και προκαρυώτες στον κύκλο του αζώτου

Διαδικασίες	Παραδείγματα οργανισμών
Νιτροποίηση ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^-$) $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$ $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$	<i>Nitrosomonas</i> <i>Nitrobacter</i>
Απονίτρωση ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$)	<i>Bacillus</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Pseudomonas</i>
Δέσμευση N_2 ($\text{N}_2 + 8\text{H} \rightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_2$)	
Μη συμβιωτικά	
Αερόβια	<i>Azotobacter</i> Κυανοβακτήρια
Αναερόβια	<i>Clostridium</i> , πορφυρά και πράσινα βακτήρια
Συμβιωτικά	<i>Rhizobium</i> <i>Bradyrhizobium</i> <i>Frankia</i>
Αμμωνιοποίηση (οργανικό-N $\rightarrow \text{NH}_4^+$)	Πολλοί οργανισμοί



Εικόνα 19.29 Οξειδοαναγωγικός κύκλος του αζώτου. Με κίτρινα βέλη υποδεικνύονται οι αντιδράσεις οξείδωσης και με κόκκινα οι αντιδράσεις αναγωγής.



Εικόνα 17.36 Βήματα στην αποδομητική αναγωγή του νιτρικού. Μερικοί οργανισμοί, π.χ. η *Escherichia coli*, μπορούν να ολοκληρώσουν μόνο το πρώτο βήμα. Όλα τα ένζυμα που συμμετέχουν στη διαδικασία βρίσκονται υπό γονιδιακή καταστολή από την οποία αποδεσμεύονται με την επικράτηση ανοξικών συνθηκών. Επίσης, γνωρίζουμε ότι μέσω αποδομητικού μεταβολισμού ορισμένοι προκαρυώτες μπορούν να ανάγουν NO_3^- προς NH_4^+ .

α - ΠΡΩΤΕΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

Αζωτοδεσμευτικά:

Azospirillum

Αναπτύσσονται στο έδαφος χρησιμοποιώντας θρεπτικά που αποβάλλονται από τα φυτά Fix nitrogen

Rhizobium

Δεσμεύουν άζωτο στις ρίζες των φυτών



α - ΠΡΩΤΕΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

Παραγωγή οξικού οξέος από αιθυλική αλκοόλη:

Acetobacter

Gluconobacter