

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ

Γιώργος Τσιάμης

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας

Firmicutes

Χαμηλού Ποσοστού G+C

The Low G + C Gram-Positive Bacteria

Σημαντικά βακτήρια χαμηλού ποσοστού G+C

ORDER	IMPORTANT GENERA
Clostridiales	Clostridium Epulopiscium Sarcina
Mycoplasmatales	Mycoplasma Spiroplasma Ureaplasma
Bacillales	Bacillus Listeria Staphylococcus
Lactobacillales	Enterococcus Lactobacillus Streptococcus

Clostridiales - *Clostridium*

- Υποχρεωτικά αναερόβια
- Ενδοσπόρια
- Ασθένειες που σχετίζονται με *Clostridium*
 - Tetanus (*C. tetani*)
 - Botulism (*C. botulinum*)
 - Foodborne diarrhea (*C. perfringens*)



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Εκτελούν τη ζύμωση σακχάρων και παράγουν βουτυρικό οξύ. Μερικά από αυτά παράγουν ακετόνη και βουτανόλη (μεγάλη βιομηχανική σημασία)

Δέσμευση N_2 . Ευθύνονται για το μεγαλύτερο ποσοστό αναερόβιας δέσμευσης N_2 στο έδαφος.

CLOSTRIDIUM BOTULINUM

Introduction

- Neuroparalytic disease caused by neurotoxins (BoNTs) produced by bacteria *Clostridium botulinum*.
 - 7 different BoNTs (A-G) produced by different strains of *C. botulinum*.
 - BoNTs A, B, E, and F outbreaks in humans
 - BoNT C in birds
 - BoNT D in cattle
 - BoNT G isolated from soils
 - BoNT A most common and most potent
 - BoNTs also produced by other members of *Clostridia* family.

Important note:

- The toxin is NOT secreted by *C. botulinum*, instead, it is produced during the bacteria's autolysis.

A long history

- Botulism originally known as “sausage poisoning” in late 18th century and throughout 19th century.
 - From Latin *botulus* = sausage
- Bacterial etiology recognized at end of 19th century
 - Outbreak of botulism in Belgium 1895 revealed cause as neuroparalytic toxin produced by anaerobic bacterium
 - Probably Type B
- Outbreak in Germany several years later
 - Bacterium isolated; different from that in Belgium
 - Probably Type A

The 20th Century and Beyond

- 1949 Burgen et al. determines botulinum toxin blocks neurotransmitter release
- 1990 a.a. sequence of one BoNT determined in Niemann's laboratory
- 21st century – 3D structure of BoNT A resolved.

The History Continues...

- First biological toxin used for treatment of human disease
- Manufactured for medical use in 1989 under name “Oculinum”
 - Licensed for treatment of strabismus and blepharospasm (eye conditions characterized by excessive muscle contraction)

Blepharospasm treated with Oculinum



Vangelova, Luba. "Botulinum Toxin: A Poison that Can Heal." Available at:
http://www.fda.gov/fdac/features/095_bot.html.

Medical uses of BoNT

- Now manufactured under the name “Botox”
- Experimentally used for treating migraine headaches, chronic low back pain, stroke, cerebral palsy, and dystonias (neurologic diseases involving abnormal muscle posture and tension)
- Frequent injections allows an individual to develop antibodies
 - Studies carried out to determine feasibility of other strains of BoNT

Cosmetic Use of BoNT

- 1994 FDA denounced the promotion of BoNT use for wrinkles as "an egregious example of promoting a potentially toxic biologic for cosmetic purposes.»
- Botox approved for Cosmetic use in April, 2002

BoNT A (Botox)

Botox injection patient 13 weeks after injection



Sadick, N. and A.R. Herman (2003). "Comparison of Botulinum Toxins A and B in the Aesthetic Treatment of Facial Rhytides." *Dermatologic Surgery* 29:340-347.

BoNT B (Myobloc)

Myobloc injection patient 11 weeks after procedure

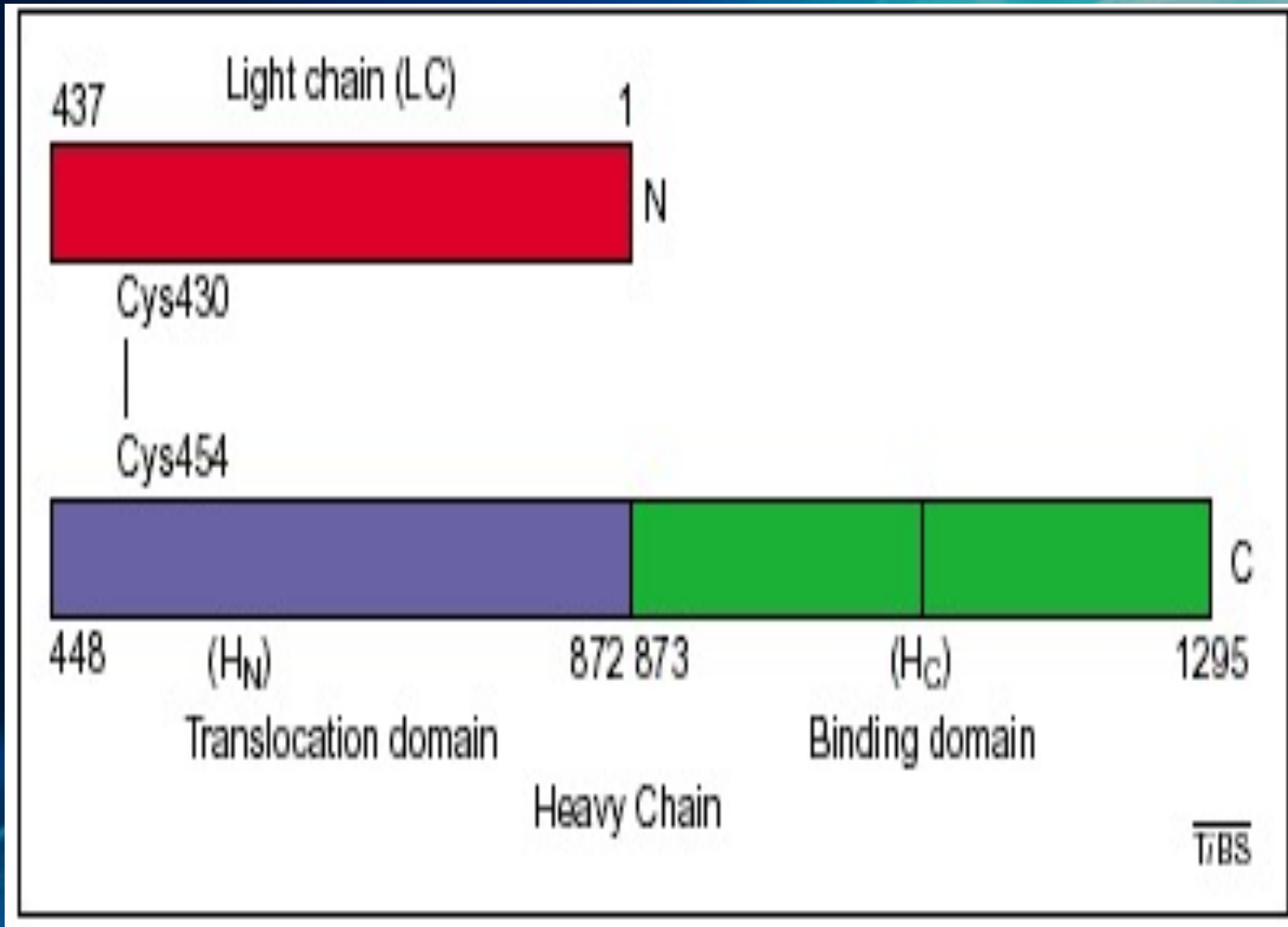


Sadick, N. and A.R. Herman (2003). "Comparison of Botulinum Toxins A and B in the Aesthetic Treatment of Facial Rhytides." *Dermatologic Surgery* 29:340-347.

The Smart Stuff

- Structure:
 - Translated as a single chain precursor (pretotoxin)
 - Cleaved to generate fully active neurotoxin composed of a light chain (LC) and heavy chain (H)
 - Light and heavy chains linked by single disulfide bridge
 - Light chain acts as an endopeptidase
 - When bridge is intact, BoNT has no catalytic activity

More on Structure

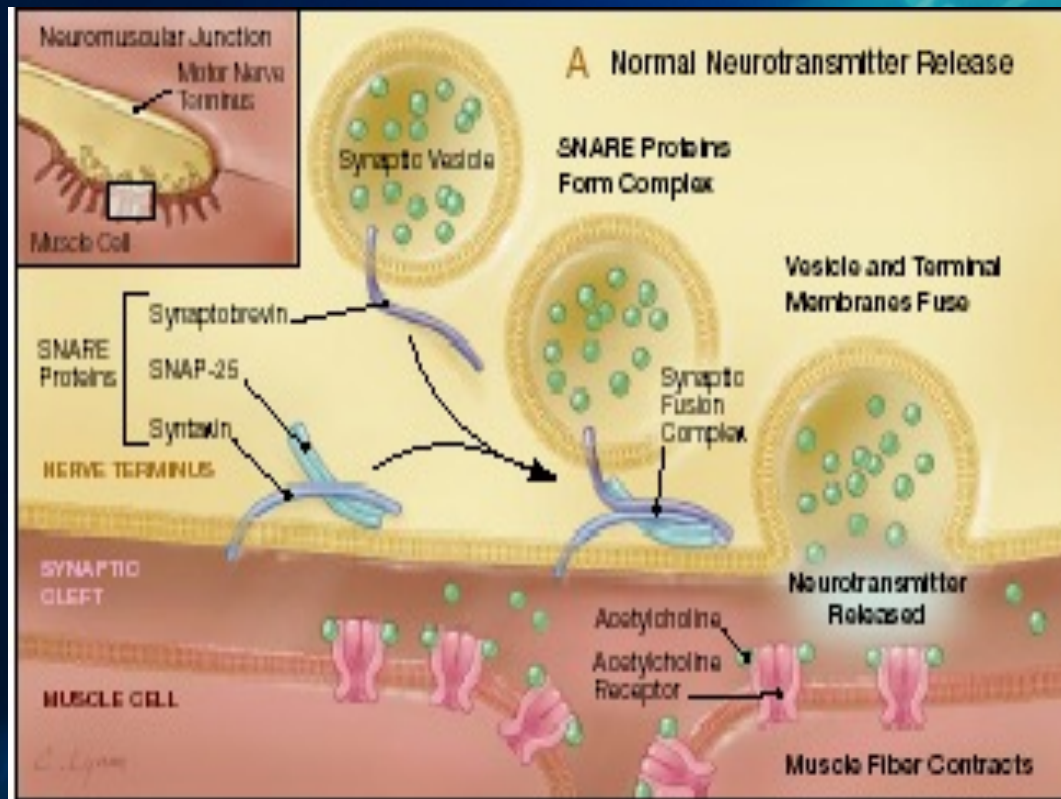


Turton, K., J.A. Chaddock, and K.R. Acharya (2002). "Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility." *TRENDS in Biochemical Sciences* 27(11): 552-558.

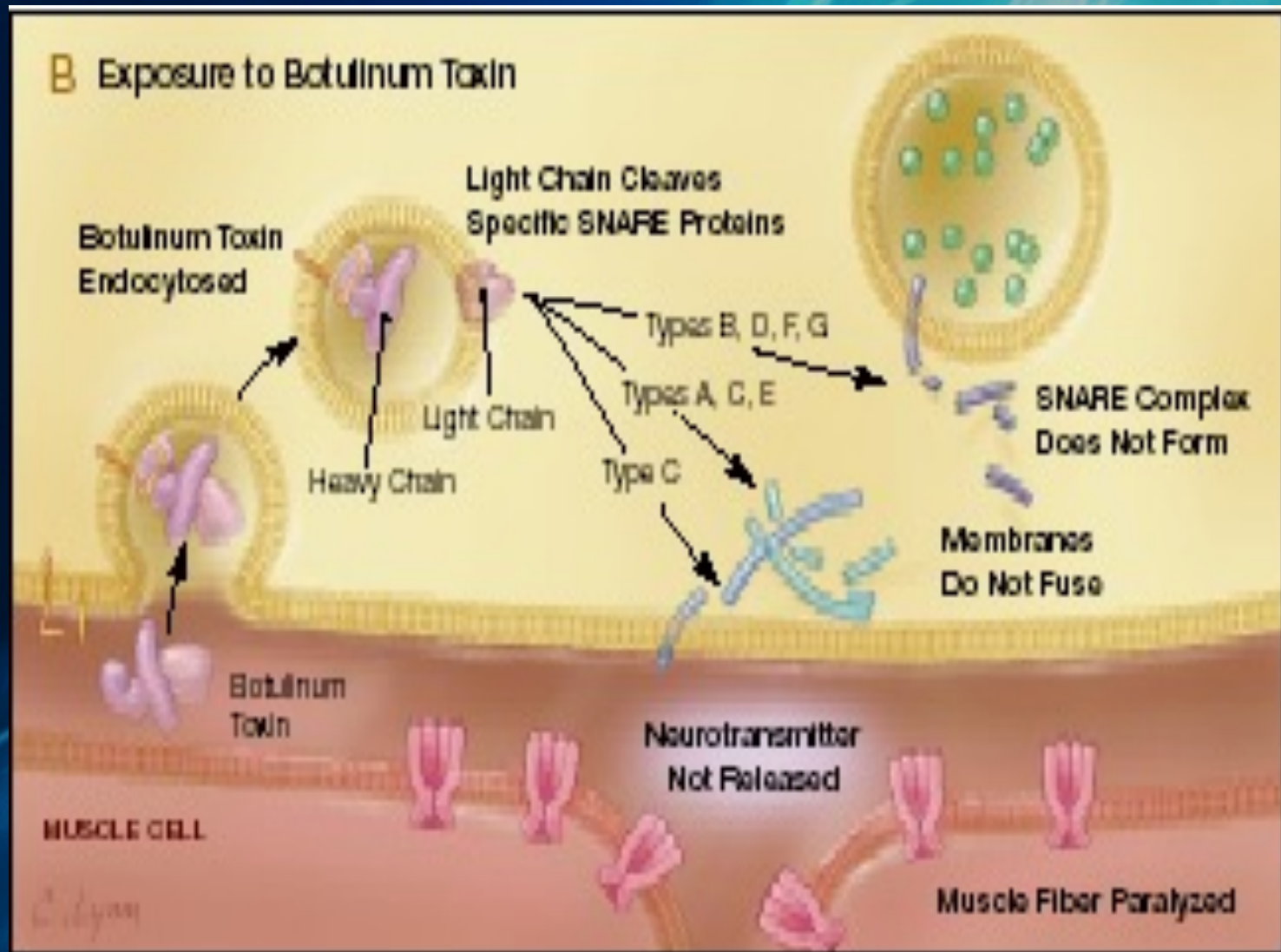
BoNTs prevent neurotransmitter release

- SNARE proteins form complex to allow synaptic vesicles to fuse with plasma membrane → neurotransmitter is released
 - 3 different types of SNARE proteins
 - VAMPs
 - SNAP-25 (cleaved by BoNT A)
 - Syntaxin

BoNTs prevent neurotransmitter release



BoNTs cleave SNARE proteins and prevent Ach release



Bacillales - *Bacillus*

Bacillus

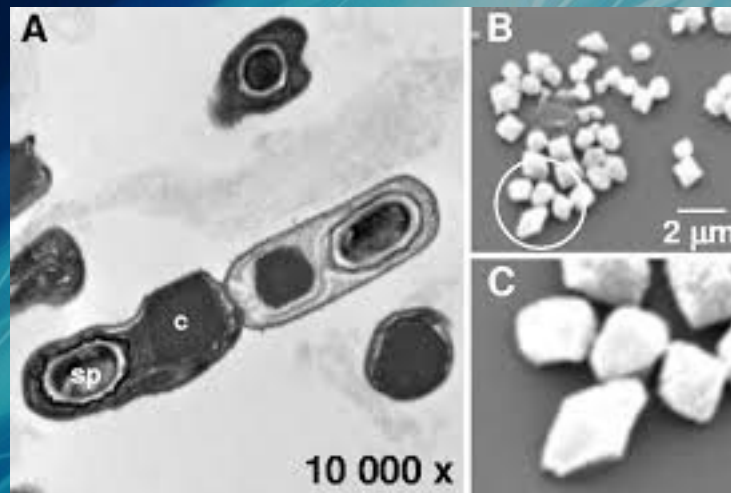
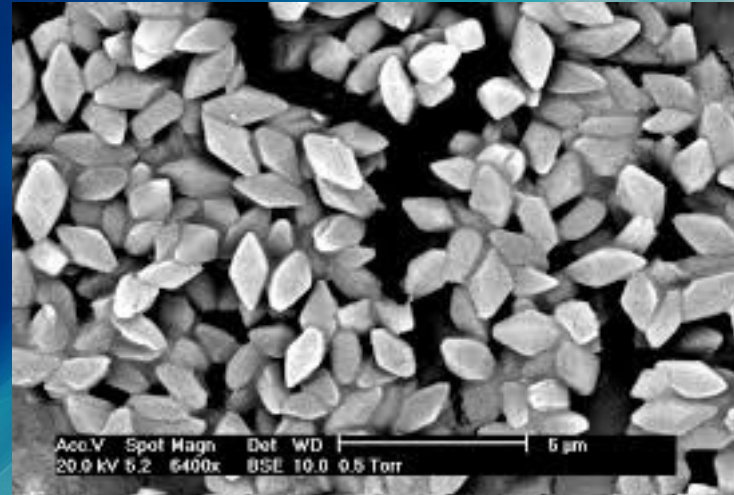
- Ραβδοειδή ικανά να παράγουν ενδοσπόρια
- Πολύ κοινός οργανισμός στο έδαφος (Key player), μόνο μερικά από αυτά είναι παθογόνα
- Ασθένειες και παθογόνα που σχετίζονται με *Bacillus*
 - Anthrax (*B. anthracis*)
 - Insect pathogen (*B. thuringiensis*)
 - Common in environment, occasionally causes food poisoning (*B. cereus*)

Bacillus thuringiensis

B.T.

Χρησιμοποίηση βακτηρίων στη βιολογική καταπολέμηση

- Το σπουδαιότερο βακτήριο που έχει χρησιμοποιηθεί για βιολογική καταπολέμηση είναι ο Βάκιλος *Bacillus thuringiensis* (Bt).
- Το βακτήριο Bt διαθέτει εντομοτοξικές ιδιότητες και χρησιμοποιείται παγκόσμια για τον έλεγχο και την προστασία προνυμφών από Λεπιδόπτερα, Κολεόπτερα.
- Θα πρέπει να τονιστεί ότι ο Βάκιλος δεν προσβάλλει τα τέλεια έντομα και τα αυγά τους.
- Τα σκευάσματα που κυκλοφορούν διατίθενται σαν βρέξιμη σκόνη και αποτελείται από σπόρια και κρυστάλλους του βακτηρίου.
- Ψεκάζονται στα φύλλα ή στο περιβάλλον όπου οι προνύμφες ζουν και τρέφονται.



Κρύσταλλοι και σπόρια από το εντομοπαθογόνο βακτήριο *B. thuringiensis*. Στη φωτογραφία εμφανίζονται και μεμονωμένοι κρύσταλλοι που προέρχονται μετά από την λύση των κυττάρων.

Προνύμφη που έχει θανατωθεί από *B. thuringiensis*.

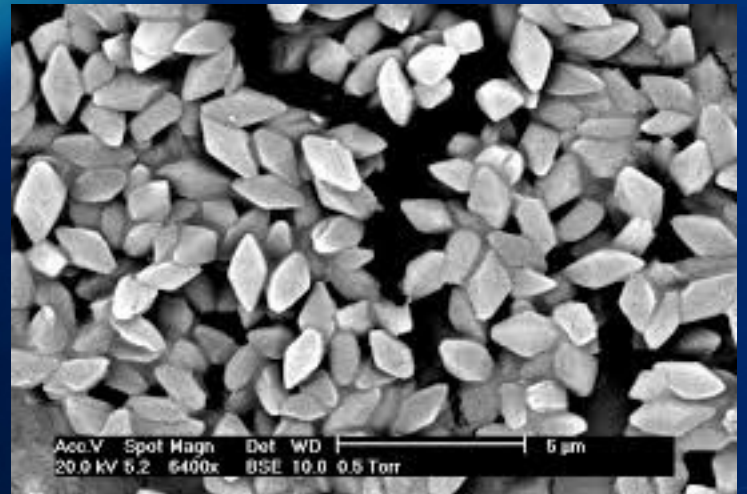
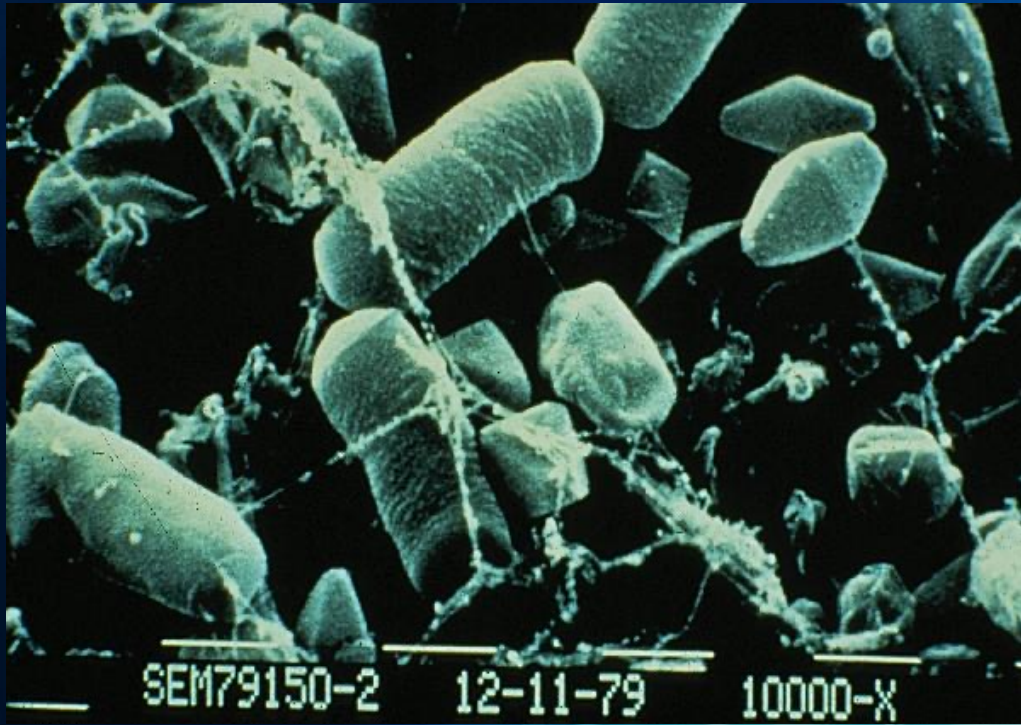


Τρόπος δράσης

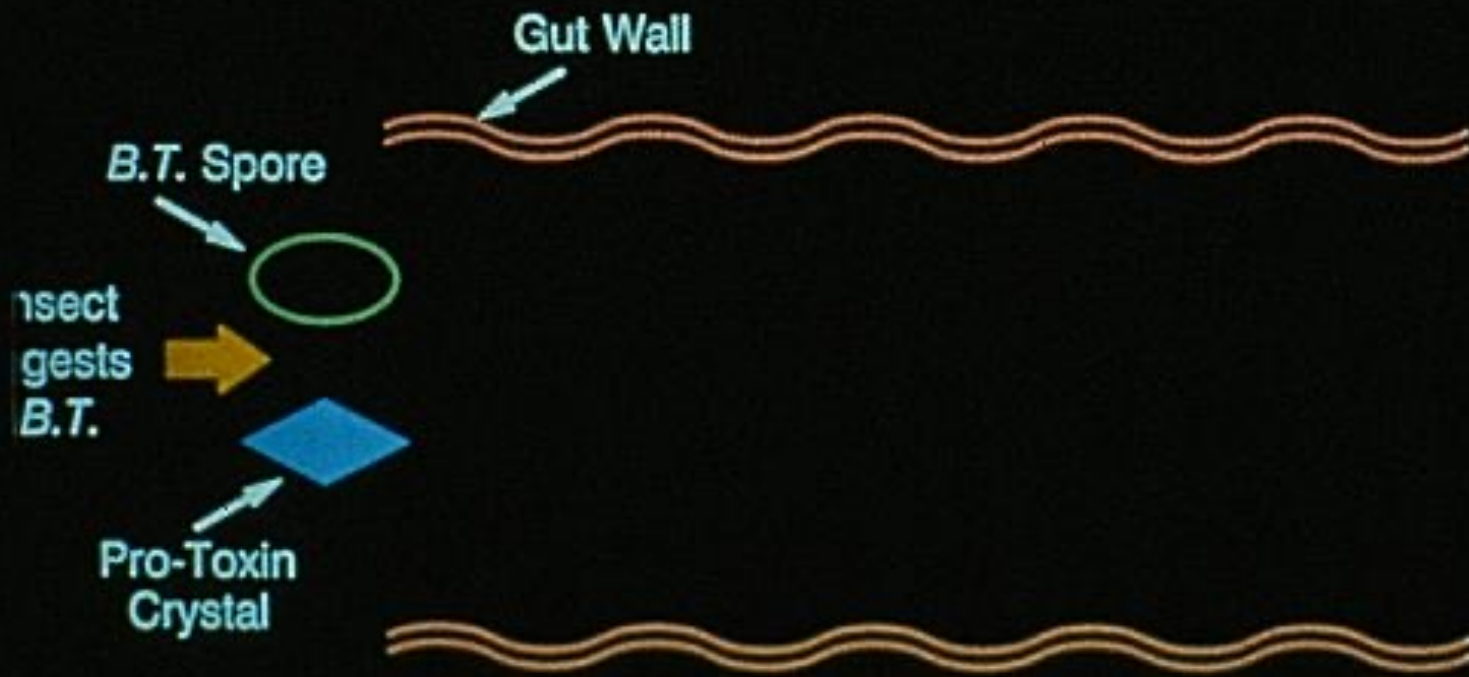
- Οι κρύσταλλοι είναι το συσσωμάτωμα μιας μεγάλης πρωτεΐνης (130kDa) η οποία είναι μία πρωτοξίνη (protoxin) η οποία θα πρέπει πρώτα να ενεργοποιηθεί για να έχει την αναμενόμενη δράση. Η πρωτεΐνη αυτή είναι σχεδόν αδιάλυτη σε κανονικές συνθήκες και για το λόγο αυτό είναι ασφαλής για τους ανθρώπους, ανώτερα ζώα και για τα περισσότερα έντομα. Οι κρύσταλλοι μπορούν να διαλυθούν σε συνθήκες υψηλού pH (πάνω από 9.5), συνθήκες που συναντάμε στο πεπτικό σύστημα των προνυμφών των Λεπιδοπτέρων. Για αυτό το λόγο το Bt είναι ένα πάρα πολύ εκλεκτικό «εντομοκτόνο».

Τρόπος δράσης

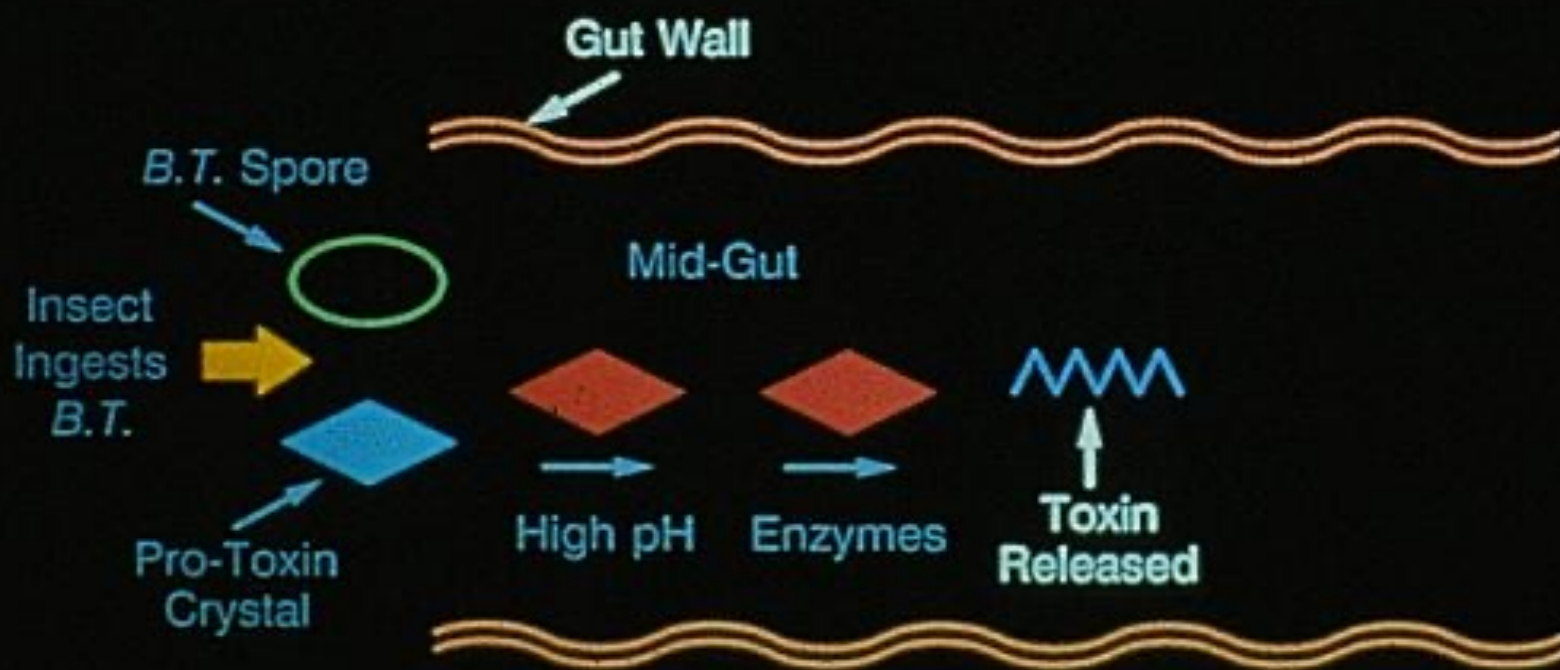
- Μόλις η πρωτεΐνη διαλυθεί σε συνθήκες υψηλού pH (έντερο εντόμου), διασπάται από μία πρωτεάση για να παραχθεί η δραστική μορφή της τοξίνη (60kDa).
- Αυτή η τοξίνη ονομάζεται δ-ενδοτοξίνη και δεσμεύεται στα επιθηλιακά κύτταρα, δημιουργώντας πόρους στην κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα την εξισορρόπηση των ιόντων.
- Σαν αποτέλεσμα το έντερο σταματάει να λειτουργεί, τα επιθηλιακά κύτταρα λύνονται, η προνύμφη σταματά να τρέφεται και το pH του εντέρου μειώνεται λόγω της εξισορρόπησης με το pH του αίματος και στο τέλος η προνύμφη πεθαίνει λόγω σηψαιμίας.



How *B.T.* Kills



How *B.T.* Kills



Ιστορική αναδρομή

- Ο Βάκιλος *B. thuringiensis* βρέθηκε για πρώτη φορά το 1911 στη Γερμανία.
- Χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά σαν εντομοκτόνο στη Γαλλία το 1938 και κατόπιν στις Η.Π.Α. το 1950.
- Αυτά τα αρχικά προϊόντα αντικαταστάθηκαν με πιο αποτελεσματικά στην δεκαετία του 1960, όταν περισσότερο παθογόνα στελέχη βρεθήκαν.
- Για αρκετά χρόνια, η χρησιμοποίηση του Βάκιλλου περιοριζότανε στον έλεγχο των προνυμφών των Λεπιδοπτέρων με την χρησιμοποίηση ενός παθογόνου στελέχους *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.
- Αυτό το στέλεχος αποτελεί τη βάση για την δημιουργία των περισσοτέρων σκευασμάτων.
- Περαιτέρω έρευνα οδήγησε στην ανακάλυψη στελεχών που είναι δραστικά εναντίον προνυμφών από Κολεόπτερα ή Δίπτερα.

Ιστορική αναδρομή

- Τα περισσότερα από αυτά τα στελέχη έχουν την ίδια τοξική δράση αλλά διαφέρουν στην ευρύτητα των εντόμων που μπορούν να προσβάλλουν, πιθανόν λόγω του διαφορετικού βαθμού δέσμευσης της ενδοτοξίνης στους υποδοχείς στο έντερο του εντόμου.
- Για παράδειγμα οι τοξίνες που παράγονται από το στέλεχος *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* έχουν διαφορετικές τοξίνες από αυτές του *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* και είναι εκλεκτικά μόνο για τις προνύμφες των Λεπιδόπτερων, χωρίς να είναι τοξικά σε κανένα άλλο έντομο.
- Σε αντίθεση οι τοξίνες που υπάρχουν και παράγονται από στελέχη του *B. thuringiensis* subsp. *san diego* και subsp. *tenebrionis* είναι τοξικά ως προς τις προνύμφες των Κολεόπτερων και ειδικότερα χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο του δορυφόρου της πατάτας.

Bt τοξίνες και η ταξινόμηση τους

- Στελέχη του *B. thuringiensis* παράγουν δύο είδη τοξινών, τις Cry τοξίνες (crystal), που κωδικοποιούνται από τα *cry* γονίδια και βάση αυτών των γονιδίων οι διάφοροι τύποι του Βάκιλου ταξινομούνται.
- Ο δεύτερος τύπος τοξινών είναι οι κυτολυτικές Cyt τοξίνες (cytolytic), οι οποίες και ενισχύουν την εντομοτοξική αποτελεσματικότητα.
- Πάνω από 50 γονίδια που κωδικοποιούν τις Cry τοξίνες έχουν αναγνωριστεί και χαρακτηριστεί (η γενετική τους αλληλουχία έχει προσδιοριστεί), και έχει επιτρέψει την τοποθέτηση τους και την ταξινόμηση τους σε 15 ομάδες σύμφωνα με την ομολογία που παρουσιάζουν σε επίπεδο DNA.
- Ο πίνακας παρακάτω δείχνει την ταξινόμηση που επικρατεί αυτή την στιγμή.

Ταξινόμηση σύμφωνα με την ομολογία που παρουσιάζεται στα γονίδια *cry* του *B. thuringiensis*.

Γονίδιο	Σχήμα κρυστάλλου	Μέγεθος πρωτεΐνης	Καταπολέμηση
<i>cryI</i> [υποομάδες A(a), A(b), A(c), B, C, D, E, F, G]	Πυραμιδικός	130-138kDa	Λεπιδόπτερα
<i>cryII</i> [υποομάδες A, B, C]	Κυβοειδές	69-71kDa	Λεπιδόπτερα και Δίπτερα
<i>cryIII</i> [υποομάδες A, B, C]	Επίπεδο/μη κανονικό	73-74kDa	Κολεόπτερα
<i>cryIV</i> [subgroups A, B, C, D]	Πυραμιδικός	73-134kDa	Δίπτερα
<i>cryV-IX</i>	Διάφορα	35-129kDa	Διάφορα

Bt plasmids

- Είναι γνωστό από το 1980 ότι οι Cry τοξίνες κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται σε πλασμίδια του *B. thuringiensis*.
- Μπορεί να υπάρχουν και 5-6 πλασμίδια σε ένα στέλεχος του Bt και κάθε πλασμίδιο να κωδικοποιεί και διαφορετικά γονίδια τοξίνης.
- Το χαρακτηριστικό των πλασμιδίων είναι ότι μπορεί να μεταφέρονται από ένα στέλεχος του Bt σε ένα άλλο με μία μέθοδο που ονομάζεται σύζευξη, και για το λόγο αυτό μπορεί να υπάρχουν μια πληθώρα φυσικών συνδυασμών των γονιδίων *cry*.

Διαγονιδιακά φυτά που εκφράζουν την τοξίνη Bt plants.

- Πατάτα
- Καλαμπόκι
- Σόγια
- Βαμβάκι

Βάκιλοι και δημιουργία εδάφους

DO MICROORGANISMS DRIVE SOIL PRIMARY COLONIZATION BY PLANTS IN A POLAR DESERT?

RELEVANT QUESTIONS

- HOW SOIL IS FORMED?
- WHAT DRIVE PRIMARY COLONIZATION BY PLANTS?
- WHAT MICROBES CONTRIBUTE?

GLACIER MORAINES: portions of land released by glaciers

Ice retreatment does not release a soil, but a mineral substrate that is slowly transformed in soil by the way of biological soil crust formation

High arctic glacier moraines, characterized by low atrophic influence, are ideal environments to study PRIMARY COLONIZATION and the role of microorganisms in the SOIL FORMATION PROCESS.

Svalbard islands: latitude 80°N





SITE 1
4 Years
from deglaciation



SITE 6
150 Years
from deglaciation

- time of permanence out of ice
- soil structuring
- plants colonisation and biodiversity
- microbial colonisation



4 years

18 years

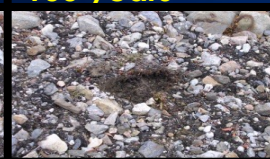
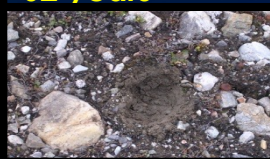
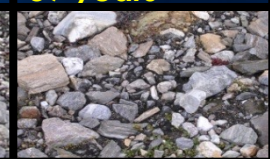
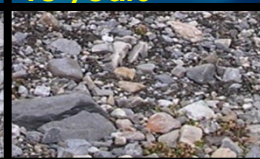
39 years

62 years

100 years

150 years

2000 years



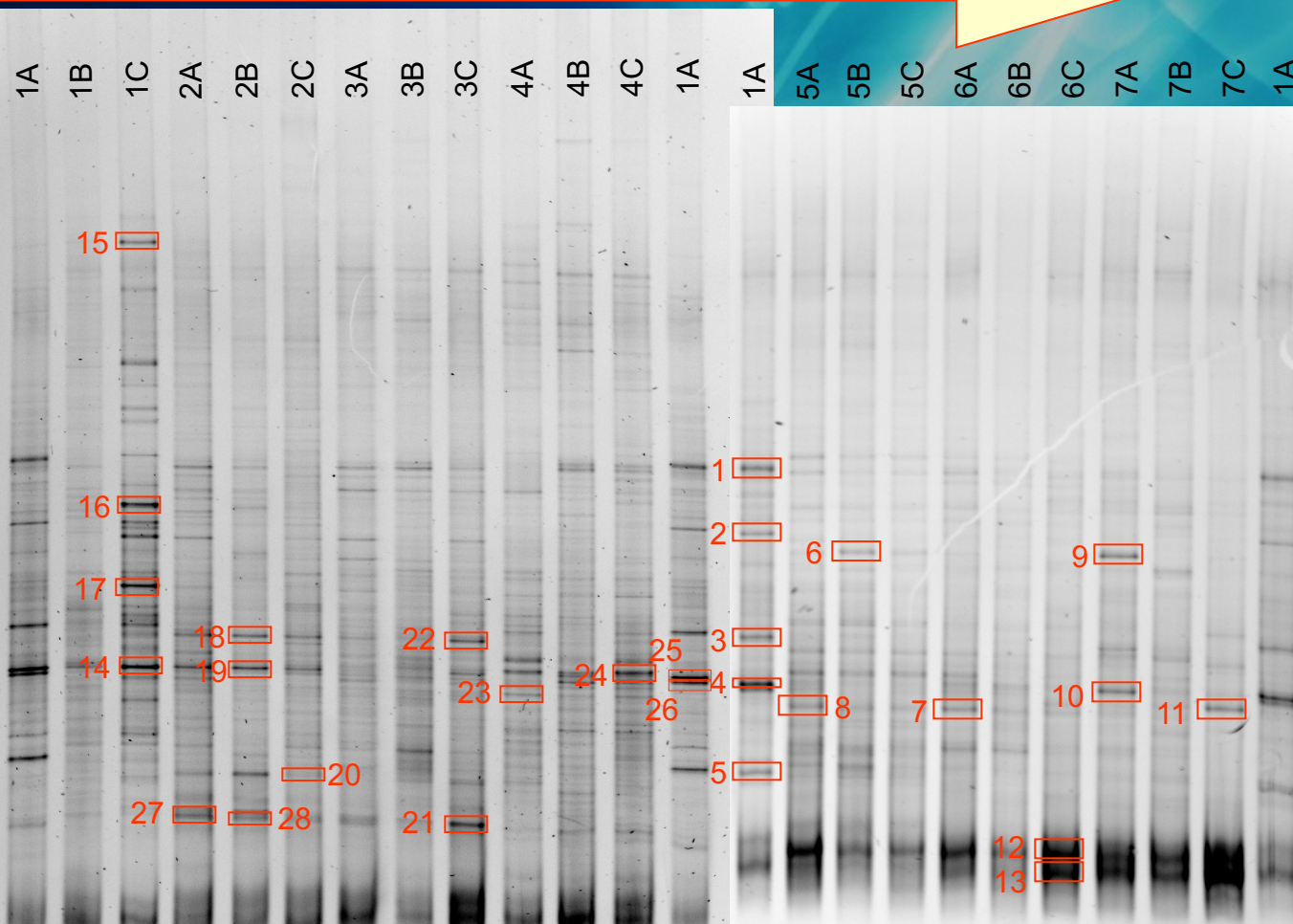
Do the "rhizosphere-effect" can hide the differences present in the microbiota inhabiting different sites of the chronosequence?

- time of permanence out of ice
- soil structuring
- microbial colonisation

40 %

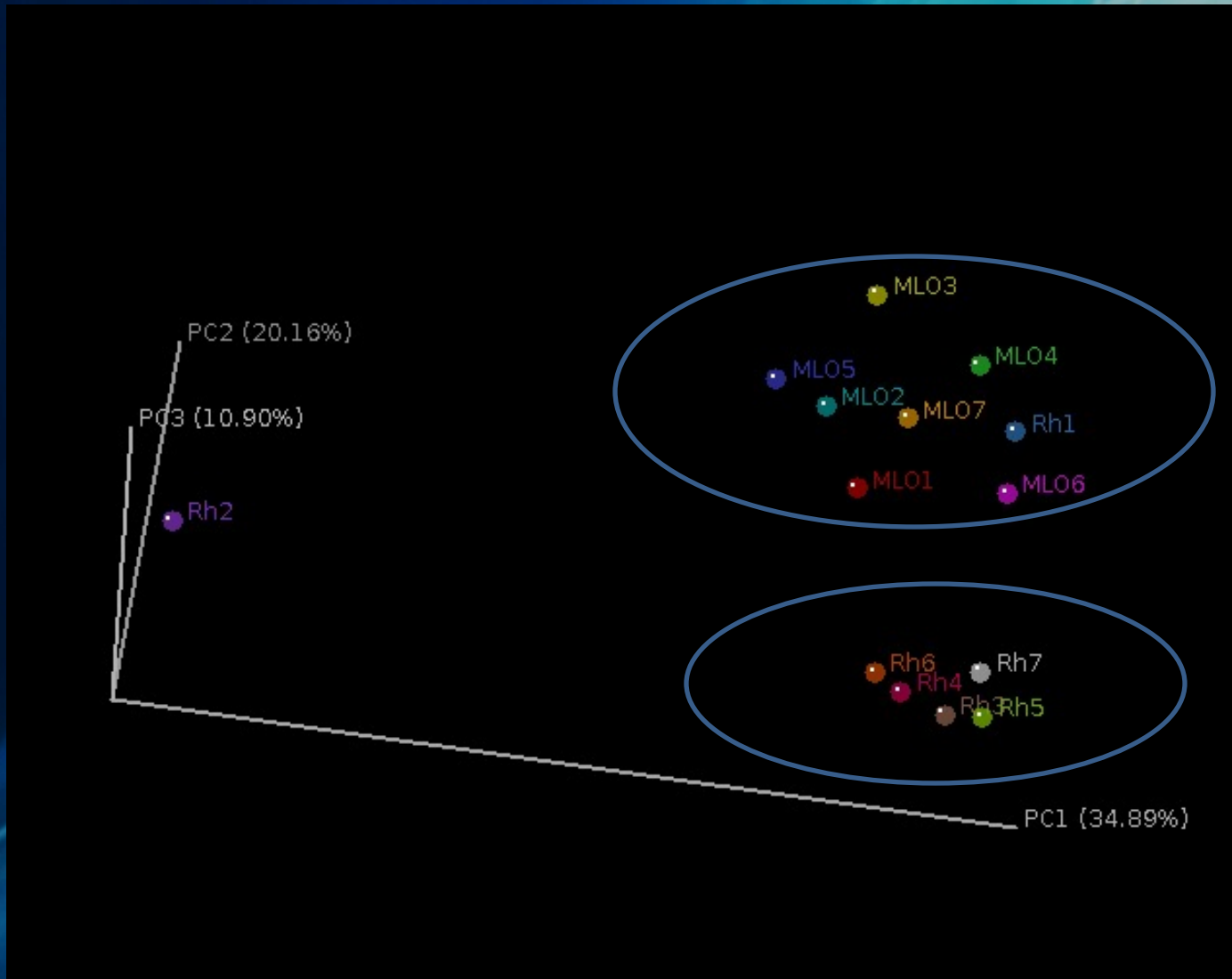
denaturing gradient

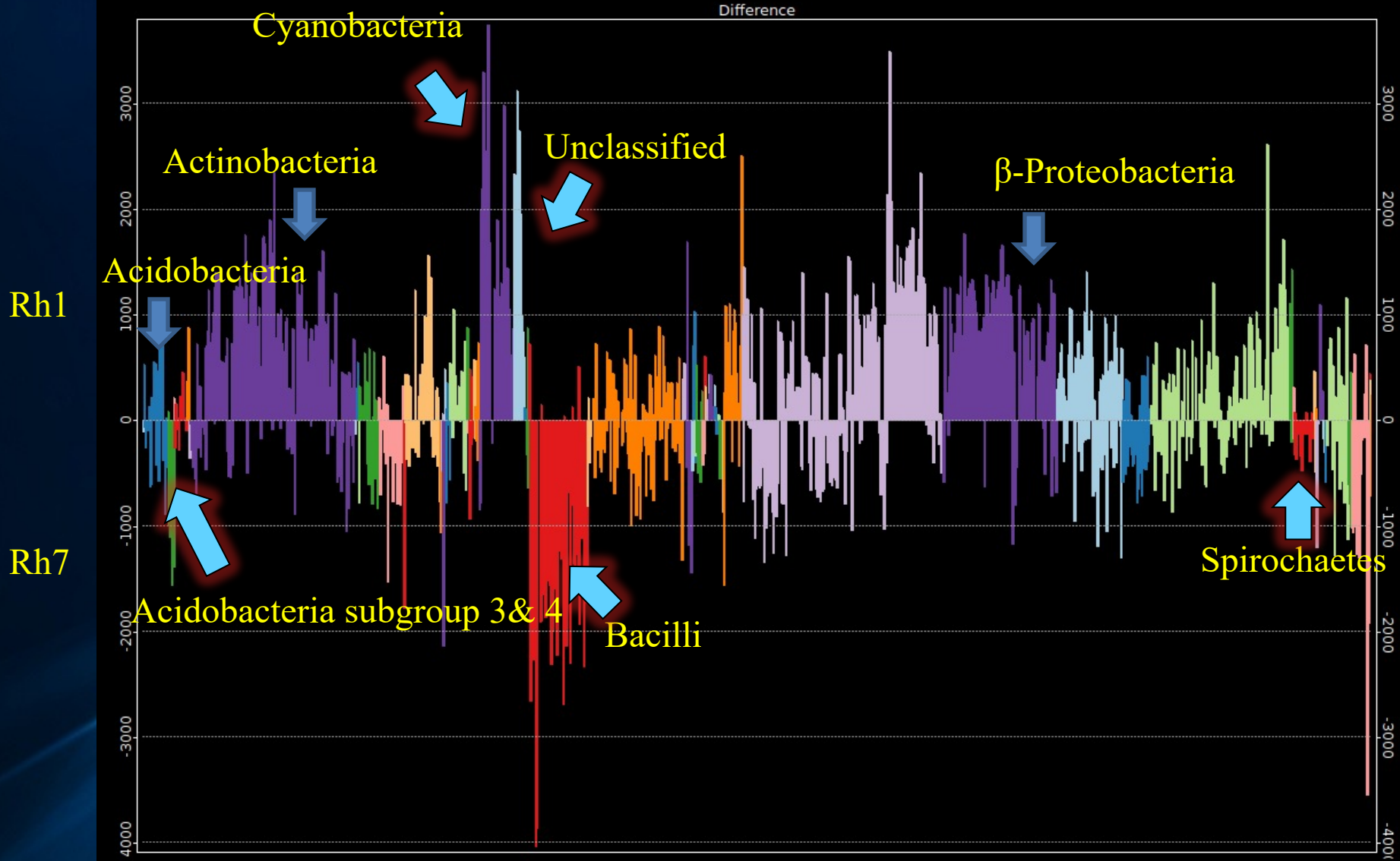
60 %

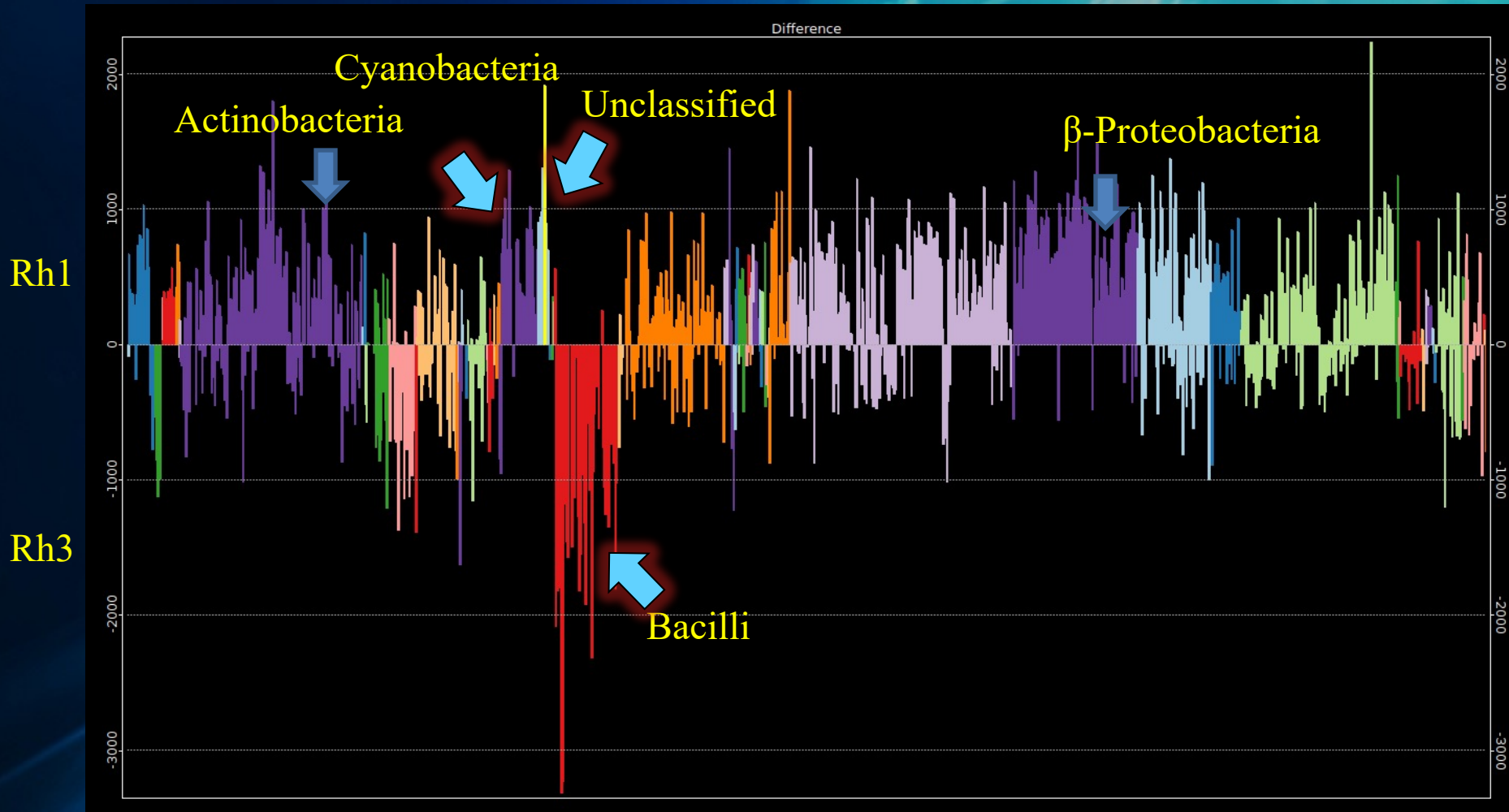


Through the DGGE analysis we are able to detect differences in the microbial community structure of the *Saxifraga* rhizosphere collected along the Hodkinson's chronosequence in correspondence of different stages of soil development.

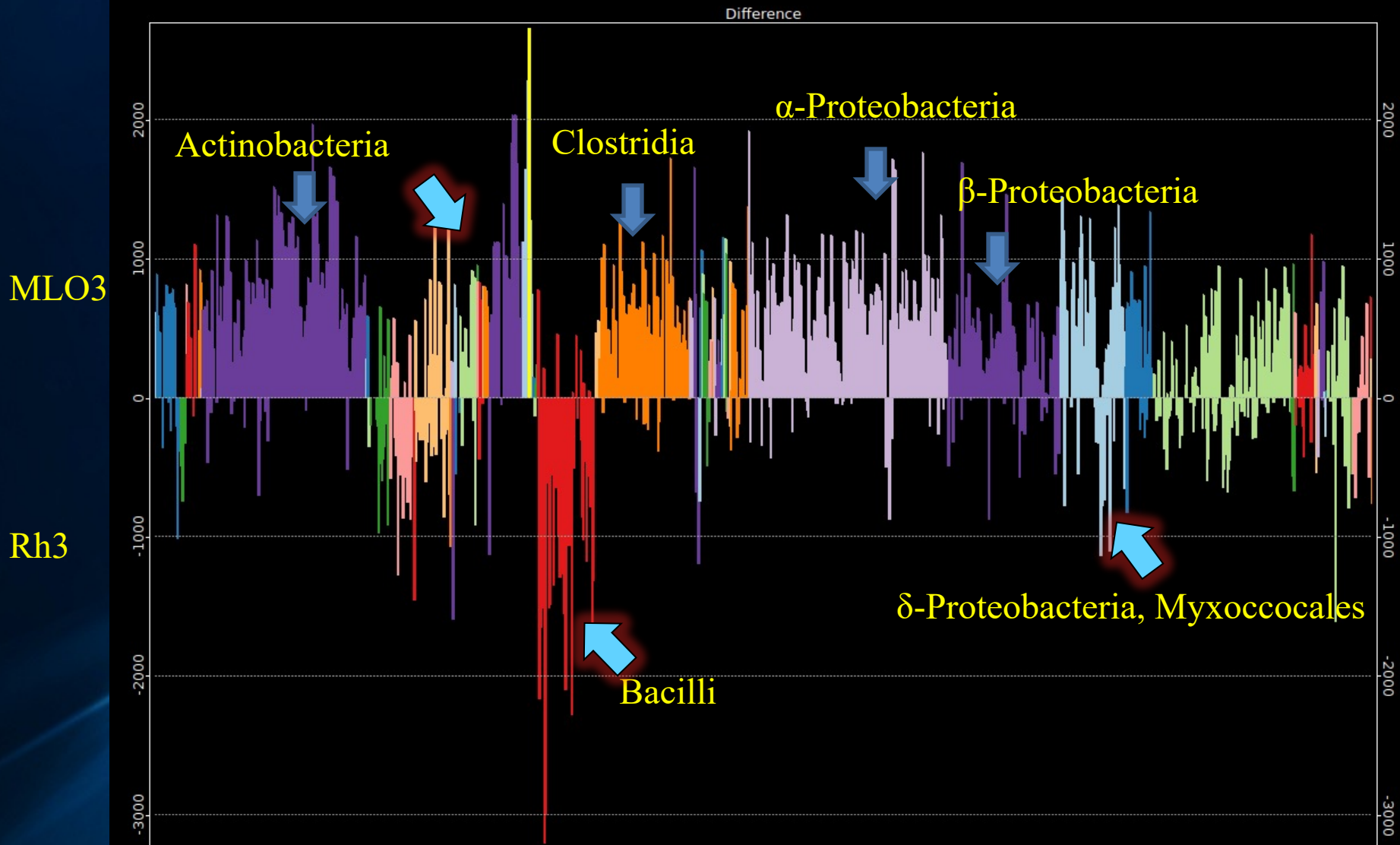
PCoA







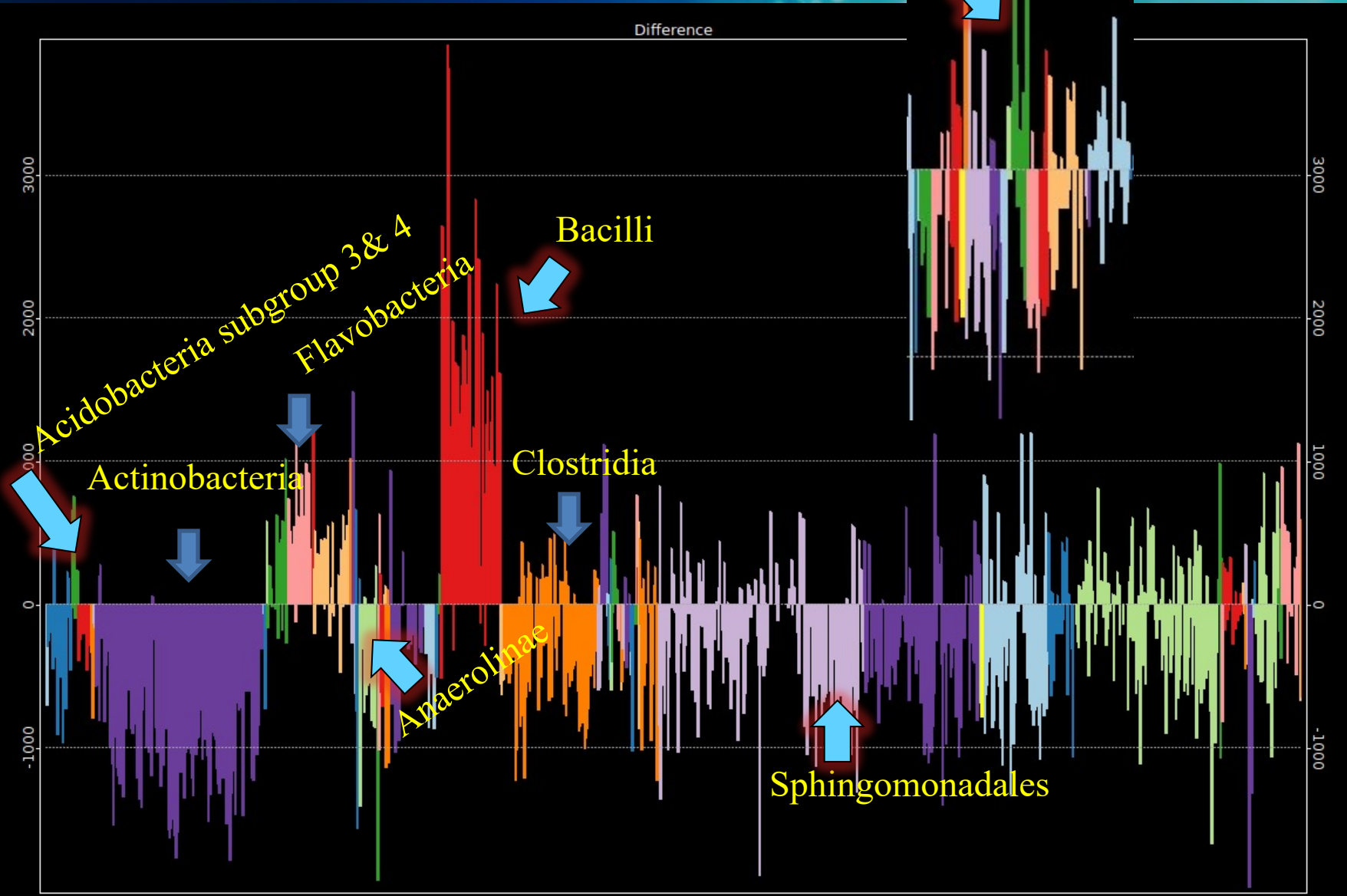
Bacilli appear 39 years after soil exposure and they are absent from the bulk soil (see next slide)

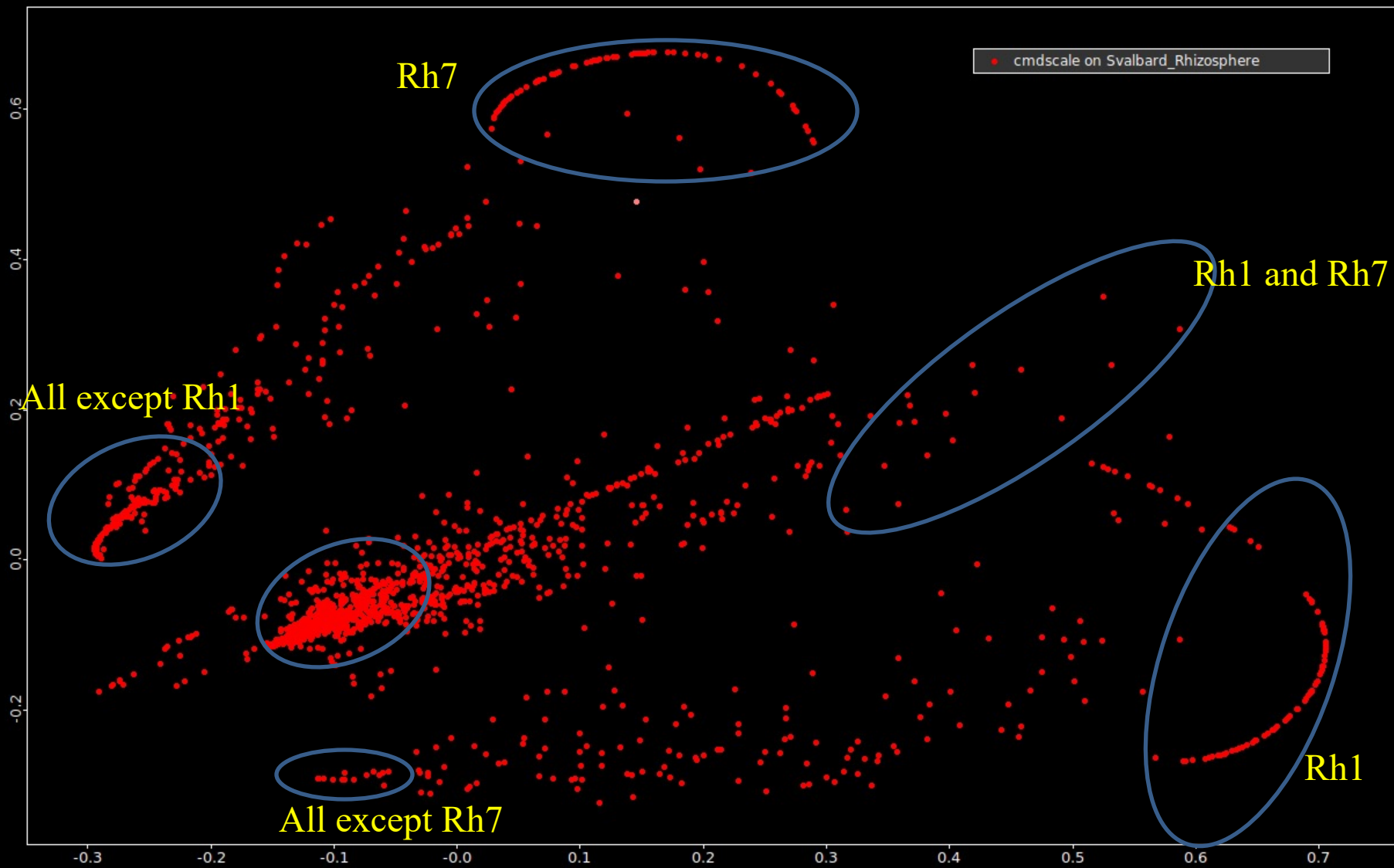


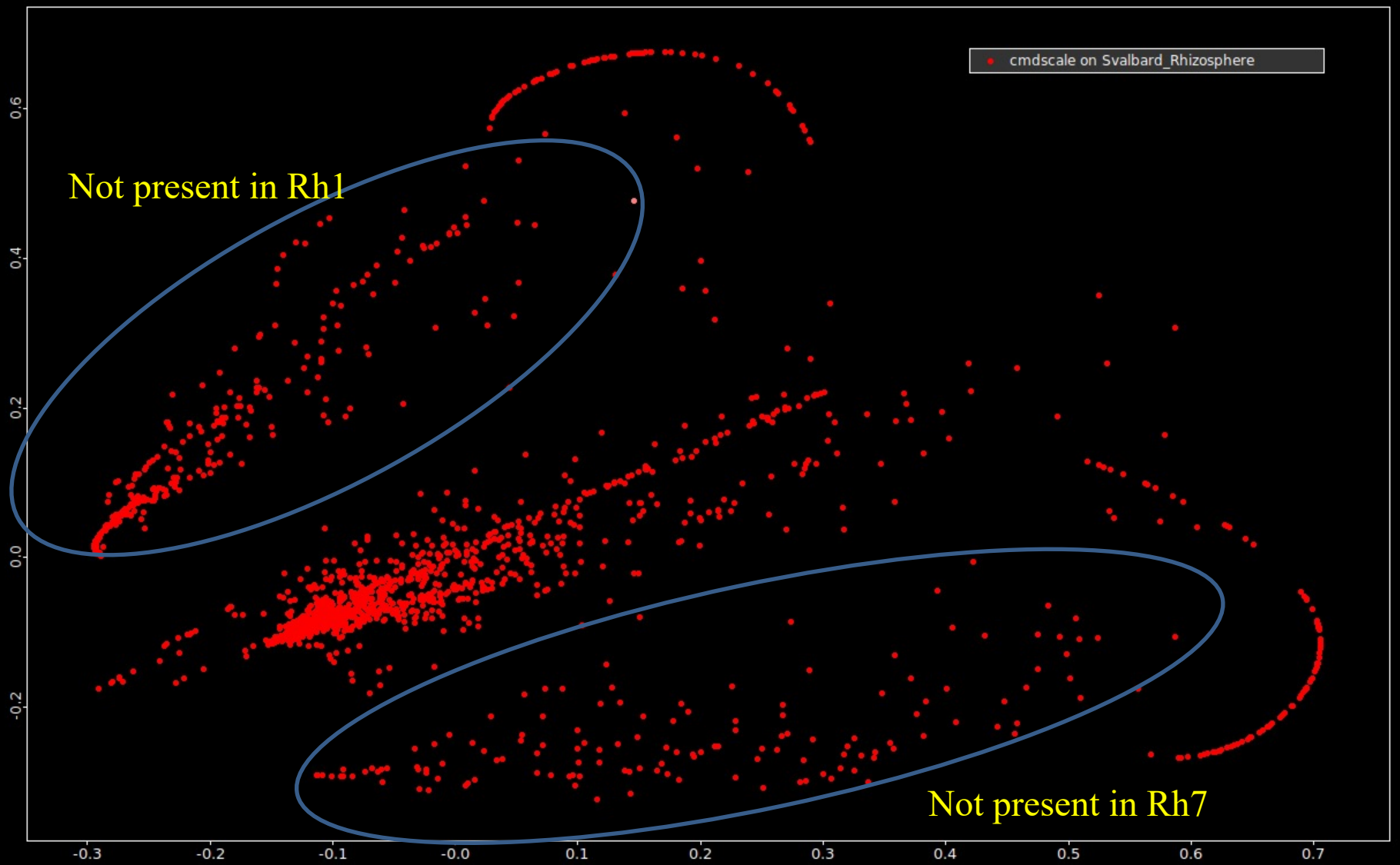
δ - Proteobacteria, Myxococcales

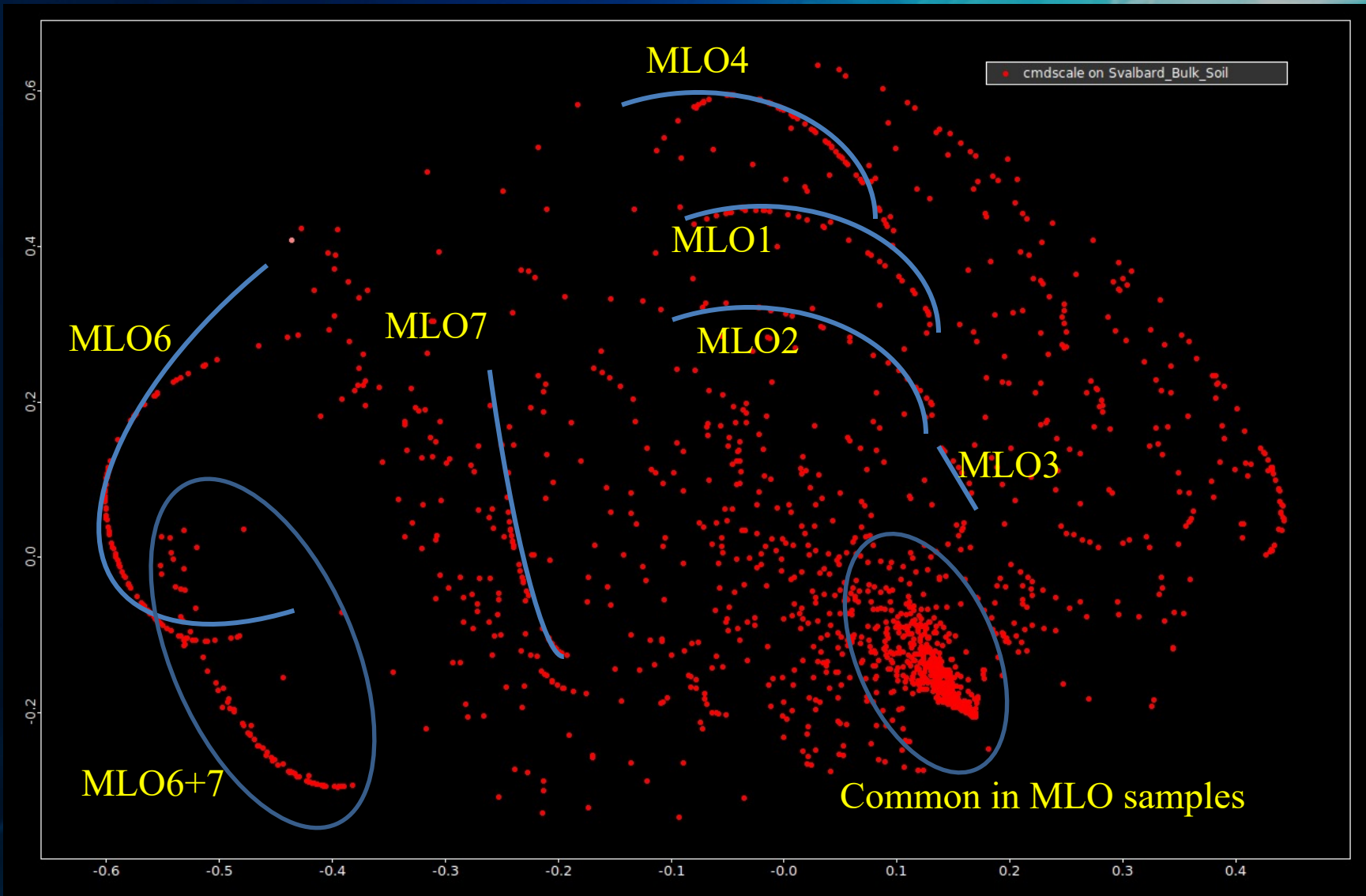
Rh7

MLO7





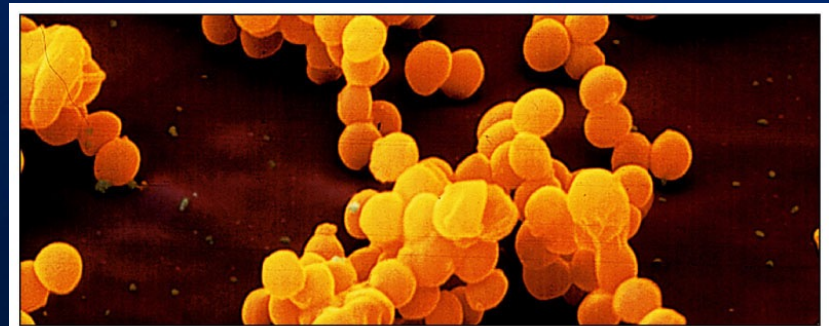




Bacillales - *Staphylococcus*

S. aureus

- Αναπτύσσεται πολύ καλά σε συνθήκες υψηλής πίεσης και χαμηλής υγρασίας
- Η κίτρινη χρωστική προστατεύει το βακτήριο από την αντιμικροβιακή δράση του ήλιου
- Παράγει πολλές τοξίνες που του επιτρέπουν να καταστρέφει ιστούς
- Αναπτύσσει πολύ εύκολα ανθεκτικότητα σε πενικιλίνη
- Σφαιρικά βακτήρια – ανθεκτικά σε περιβαλλοντικό στρες

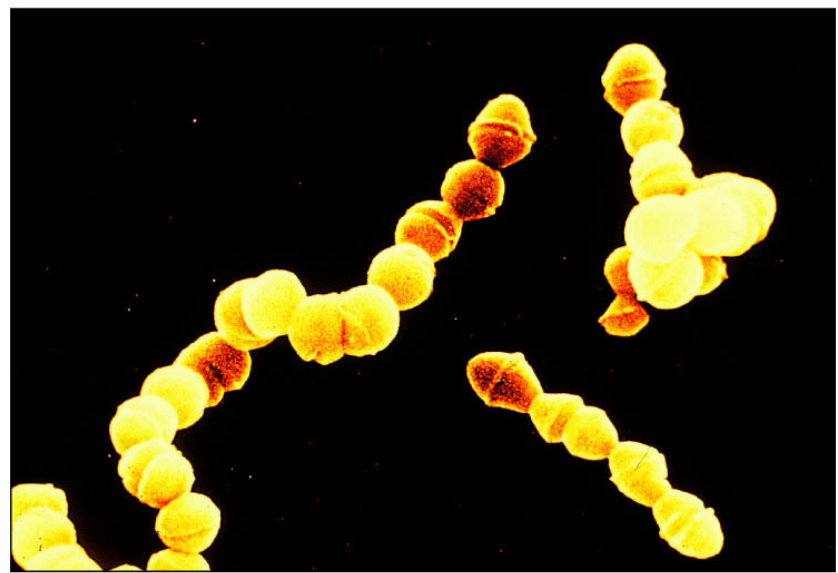


Lactobacillales - *Lactobacillus*

- Αερανεκτικά, τυπικό ραβδόμορφο
- Παράγει γαλακτικό οξύ από απλούς υδατάνθρακες. Αυτό δρα απαγορευτικά στην ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών και τους επιτρέπει να αναπτύσσονται αποκλειστικά.
- Χρησιμοποιούνται για την παρασκευή γιαουρτιού, ξυνόγαλου, τουρσιών (αναπτύσσονται και σε pH 4).

Lactobacillales – *Streptococcus*

κόκκοι σε αλυσίδες



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

- Αερανεκτικά, σφαιρικό και κατά Gram θετικό
- Μερικά είναι παθογόνα στον άνθρωπο και τα ζώα
- Παίζουν σημαντικό ρόλο στη παραγωγή προϊόντων ζύμωσης
- Αιμόλυση-β ερυθροκυττάρων
- Αιμόλυση-α αποχρωματισμό
- Αντιγονικές ομάδες A-O (Lancefield)

Lactobacillales - *Enterococcus*

- Adapted to areas of the body rich in nutrients but low in oxygen
- Persist as contaminants in a hospital environment – high resistance to antibiotics
- *E. faecium* and *E. faecalis* cause infections of surgical wounds and urinary tract, entering the blood stream through invasive procedures

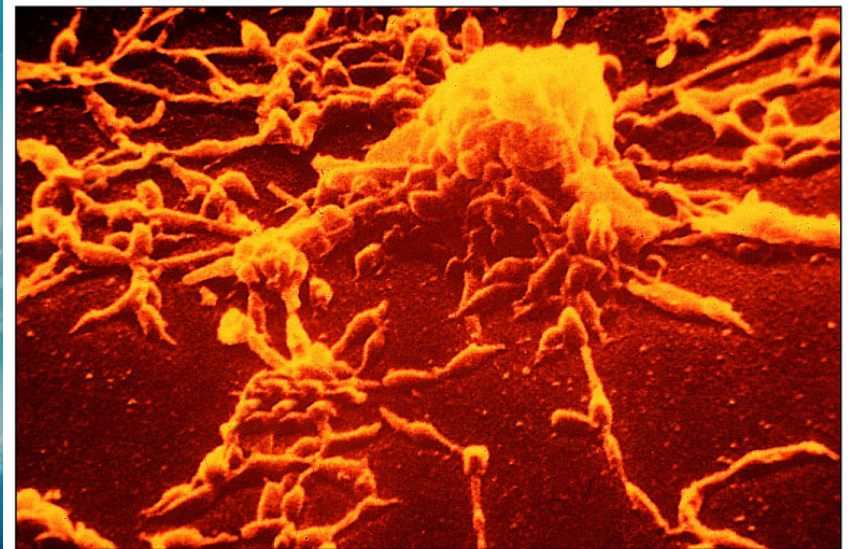
Lactobacillales - *Listeria*

L. monocytogenes

- Can contaminate food, especially dairy products
- Survives within phagocytic cells, can grow at refrigeration temperatures

Mycoplasmatales

- Highly pleomorphic because they lack a cell wall
- Characteristic “fried egg” appearance
- Very small: 0.1-0.25 μ m
- Size and plasticity allow them to pass through filters that retain bacteria
- *M. pneumoniae* – cause of a common form of mild pneumonia



(b)

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Clinical Description

- Firmicutes play an important role in beer, wine, and cider spoilage
- Researcher Jeffrey Gordon and his colleagues found that obese humans and mice had a lower percentage of a family of bacteria called Bacteroidetes and more Firmicutes. But they are not sure if Firmicutes cause obesity or if people who are obese grow more of that type of bacteria.