

Μικροβιακή Οικολογία

**Εισαγωγικές έννοιες
Συμβατικές και βιοχημικές τεχνικές**

Μικροβιακή Οικολογία

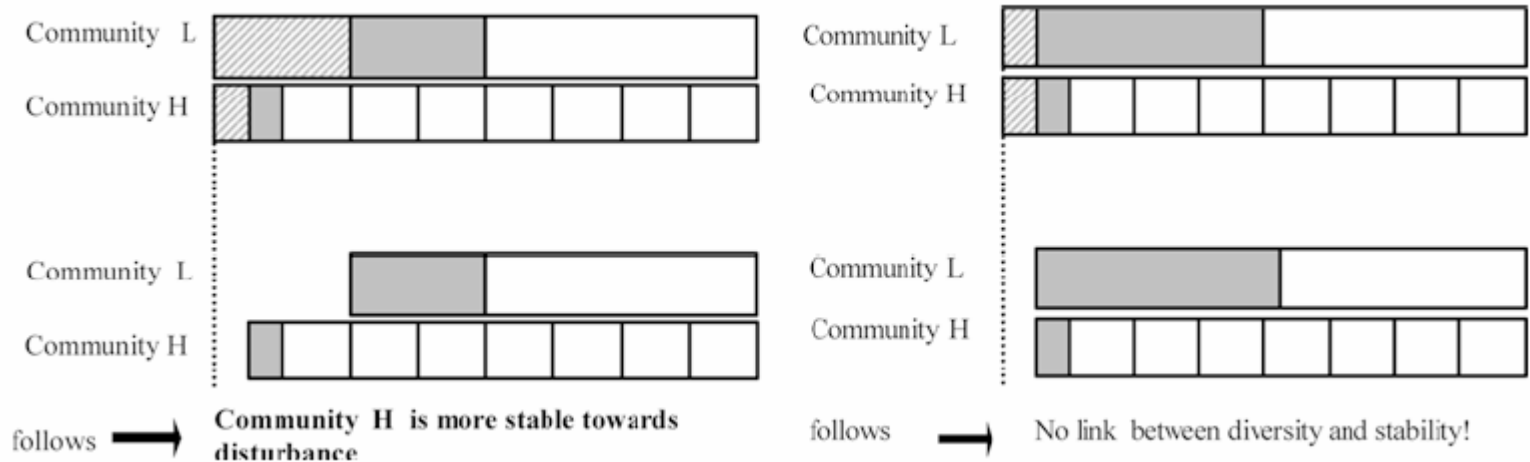
Αναφέρεται στον οικοφυσιολογικό ρόλο των μικροοργανισμών σε χερσαία, υδάτινα αλλά και αέρια οικοσυστήματα

1 γραμμάριο εδάφους μπορεί να περιέχει ως και 10 δις μικροοργανισμούς!!

Μικροβιακή Οικολογία

Οι περισσότερες οικολογικές θεωρίες δεν είναι απόλυτα εφαρμόσιμες στην μικροβιακή οικολογία διότι δημιουργήθηκαν με βάση οικοσυστήματα βασιζόμενα σε ζώα και φυτά

- «Σε οικοσυστήματα με αυξημένη εισροή ενέργειας και βιοποικιλότητα η απώλεια ενός είδους δεν θα έχει σημαντική επίδραση στην σταθερότητα του οικοσυστήματος» McArthur 1955
- «Η απώλεια ενός ή περισσότερων ειδών είναι σε απόλυτο βαθμό και επηρεάζει εξίσου την σταθερότητα των οικοσυστημάτων ανεξάρτητα από την βιοποικιλότητα τους» May 1973



Θεωρίες στην Μικροβιακή Οικολογία

- **Θεωρία της παραλλακτικότητας των εισροών:**

Αύξηση της ποικιλότητας των εισροών σε ένα οικοσύστημα αυξάνει οδηγεί σε αύξηση της μικροβιακής ποικιλότητας και της παραγωγικότητας του οικοσυστήματος μέχρι ενός σημείου που αρχίζει αντίθετη πορεία λόγω ανταγωνισμού μεταξύ των ειδών (Tilman 1982)

- **Θεωρία της ασφάλειας:** *Αυξημένη μικροβιακή ποικιλότητα συνεπάγεται αυξημένη παραγωγικότητα και μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε εξωγενείς καταπονήσεις (Yachi and Loreau 1999)*

- Τα οικοσυστήματα χαρακτηρίζονται τόσο με βάση της σύστασή τους σε είδη όσο και με βάση της λειτουργία τους

Ποιές είναι οι λειτουργίες της μικροβιακής κοινότητας σε ένα εδαφικό οικοσύστημα?

Γεωχημικοί κύκλοι C, N, P, S, Fe

Microbial Structure vs Microbial Function

Μεταβολές στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας φαίνεται ότι δεν συνεπάγονται πάντα ή απαραίτητα μεταβολές και στην λειτουργία



Functional redundancy

Μια συγκεκριμένη λειτουργία (νιτροποίηση) μπορεί να συνεχίζει να εκτελείται από ένα μικρό αριθμό μελών της μικροβιακής κοινότητας παρά την μείωση της ποικιλότητας

Τι σημαίνει το **functional redundancy** για την μικροβιακή οικολογία;

Εκτός της μελέτης μεταβολών στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας θα πρέπει να μελετήσουμε παράλληλα και την αντίστοιχη λειτουργία στην οποία συμμετέχουν οι μικροοργανισμοί

Νιτροποίηση – Νιτροποιητικά βακτήρια και αρχαία

Απονιτροποίηση – Απονιτροποιητικά βακτήρια

Αποσύνθεση οργανικής ουσίας – Βασιδιομύκητες και Ακτινοβακτήρια

Πως μετράμε την λειτουργία της μικροβιακής κοινότητας;

- Δραστηριότητα ενζύμων μικροβιακής προέλευσης που ελέγχουν βήματα σε κύκλου στοιχείων όπως C (κυτταρινάση, β-γλυκοσιδάση), N (μονοξειδάση αμμωνίου, νιτρογενάση) - *In vitro*
- Χρήση ραδιοισοτόπων (^{14}C , ^{15}N) – *In situ*

Πως μετράμε την μικροβιακή ποικιλότητα;

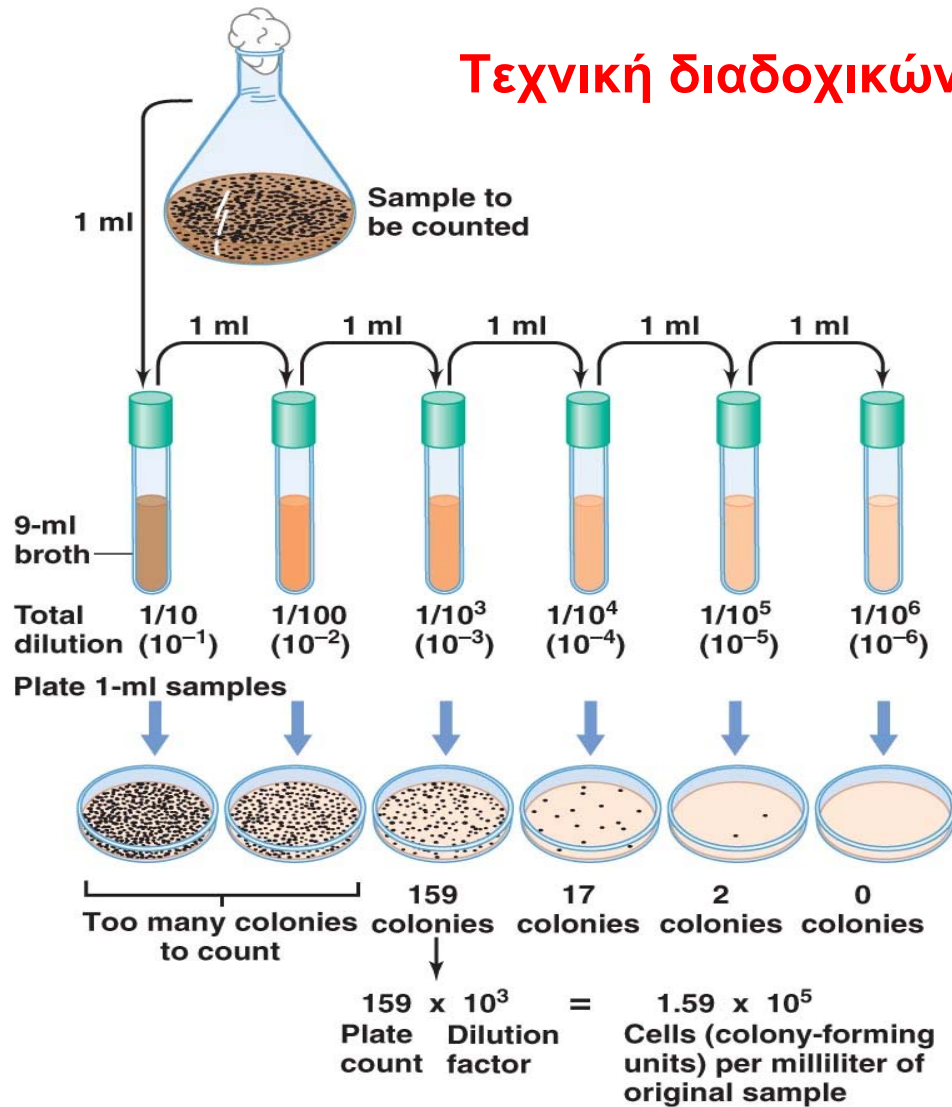
- Συμβατικές μικροβιολογικές μέθοδοι που προϋποθέτουν καλλιέργεια σε θρεπτικά υποστρώματα
«1-10% των μικροοργανισμών αναπτύσσονται στα μέχρι σήμερα γνωστά θρεπτικά μέσα»
- Βιοχημικές και Μοριακές βιολογικές μέθοδοι που δεν προϋποθέτουν καλλιέργεια των μικροοργανισμών

Συμβατικές μικροβιολογικές μέθοδοι

- Καταμέτρηση σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα για διαφορετικές (φυλογεννετικά) ομάδες μικροοργανισμών
 - Potato Dextrose Agar (PDA) για μύκητες
 - Bacillus broth για βακτήρια του γένους *Bacillus*
 - Glycerol-casein Agar για ακτινοβακτήρια
 - Soil Extract Agar για ετερότροφα βακτήρια

Συμβατικές μικροβιολογικές μέθοδοι

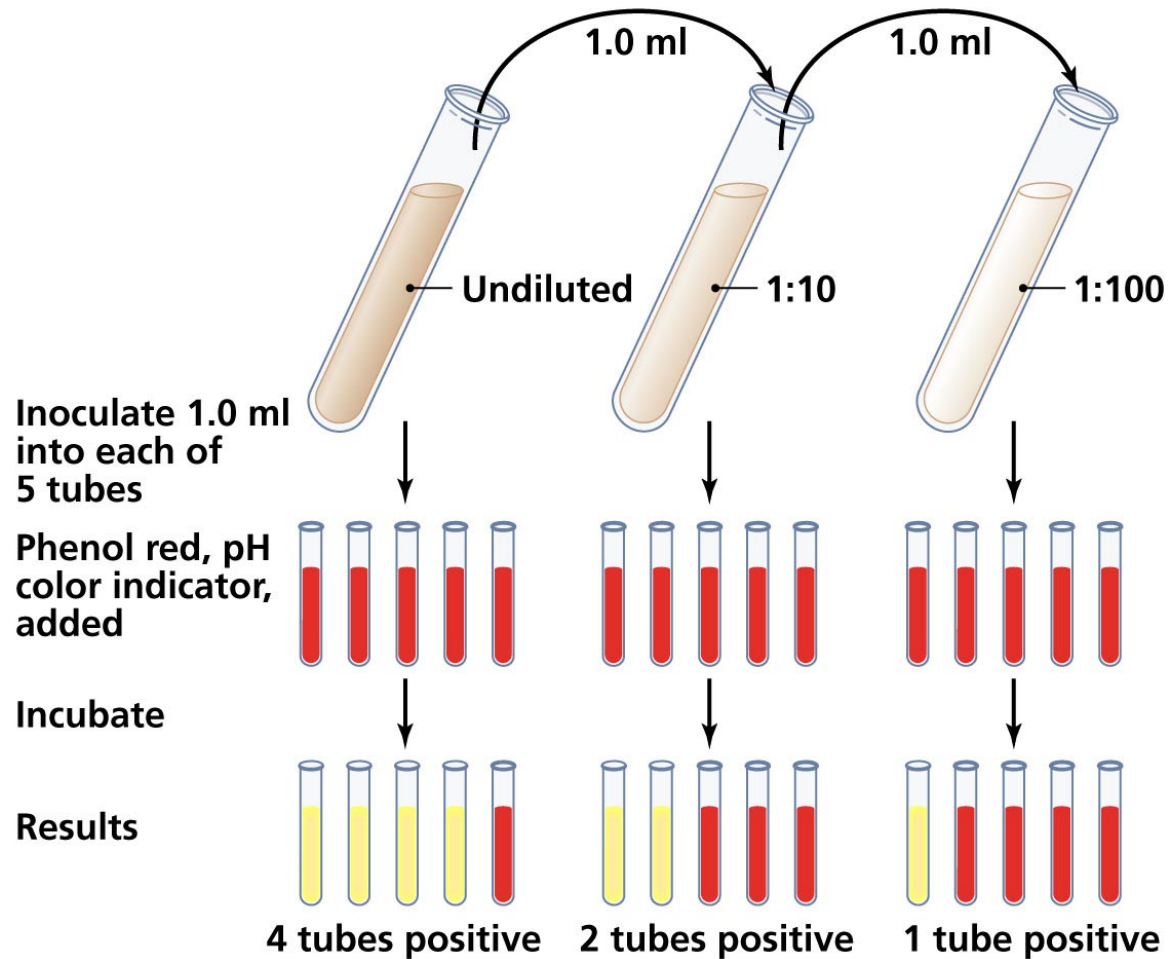
Τεχνική διαδοχικών αραιώσεων



Καταμέτρηση μικροοργανισμών με συγκεκριμένο φαινότυπο (functional groups)

- Νιτροποιητικά βακτήρια
- Διαλυτοποιητικά βακτήρια
- Αζωτοδεσμευτικά βακτήρια
- Θειο-αναγωγικά βακτήρια

Μέθοδος *Most Probable Number*



No. of Tubes Positive in			MPN in the inoculum of the middle set of tubes
first set	middle set	last set	
0	0	0	<0.01
0	0	1	0.02
0	1	0	0.02
0	2	0	0.04
1	0	0	0.02
1	0	1	0.04
1	1	0	0.04
1	1	1	0.06
1	2	0	0.06
2	0	0	0.05
2	0	1	0.07
2	1	0	0.07
2	1	1	0.09
2	2	0	0.09
2	3	0	0.12
3	0	0	0.08
3	0	1	0.11
3	1	0	0.11
3	1	1	0.14
3	2	0	0.14
3	2	1	0.17
4	0	0	0.13
4	0	1	0.17
4	1	0	0.17
4	1	1	0.21
4	1	2	0.26
4	2	0	0.22
4	2	1	0.26
4	3	0	0.27
4	3	1	0.33
4	4	0	0.34

Πίνακας καταγραφής MPN

→ 0.26 x 10³

Βιοχημικές Τεχνικές

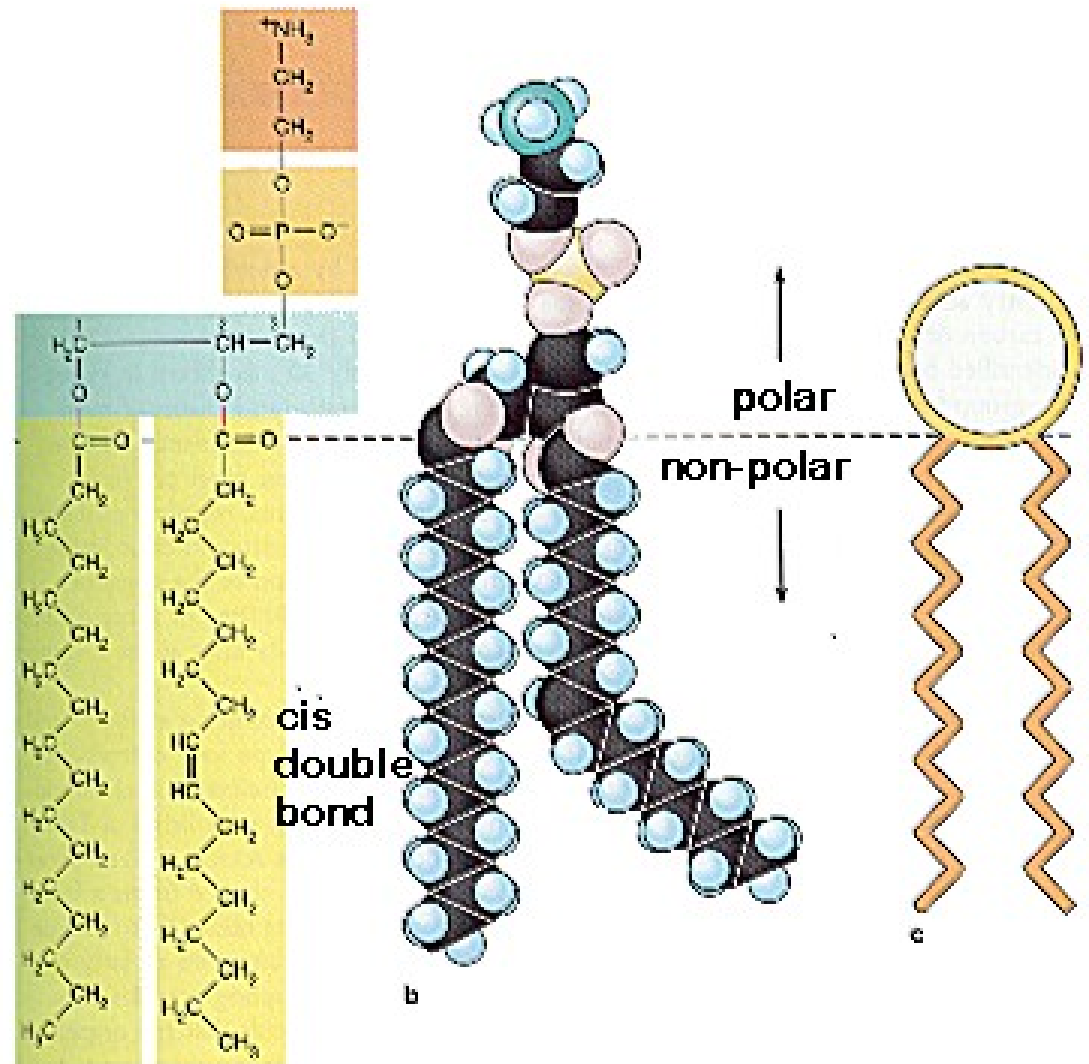
στην μικροβιακή οικολογία

- **PLFAs (Phospholipid Fatty Acid Analysis)**
- Ανάλυση Λιποκινονών
- BIOLOG

PLFAs

Τα λιπαρά οξέα των φωσφολιπιδίων που βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες των βακτηρίων, μυκήτων, πρωτοζώων εκχυλίζονται από περιβαλλοντικά δείγματα και χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτες μεταβολών στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας

Τα φωσfolιπίδια είναι
αμφιπαθητικά μόρια
που αποτελούνται **από**
ένα υδρόφοβο τμήμα
(λιπαρό οξύ) και **ένα**
πολικό, υδρόφιλο
τμήμα γλυκερόλη –
φωσφορικό



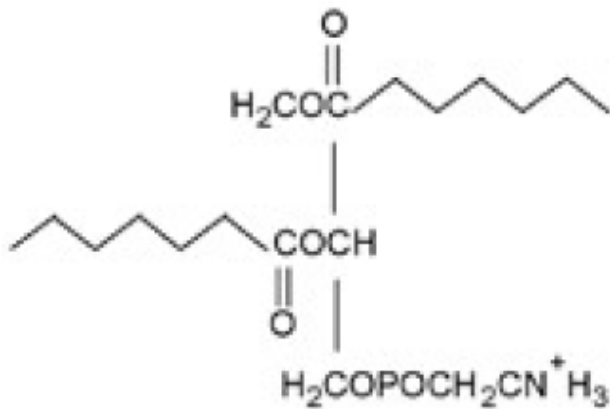
Γιατί τα PLFAs είναι αξιόπιστοι βιοδείκτες;

- Βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες όλων των ζωντανών οργανισμών και δεν συσσωρεύονται σε όργανα αποθήκευσης των μικροοργανισμών
- Διασπώνται άμεσα σε ουδέτερα λιπίδια μετά τον θάνατο του μικροοργανισμού
- Μπορούν να εκχυλιστούν και να αξιολογηθούν ποσοτικά και ποιοτικά με σύγχρονες αναλυτικές μεθόδους δίνοντας έτσι και ποσοτικά στοιχεία για την μικροβιακή κοινότητα του εδάφους

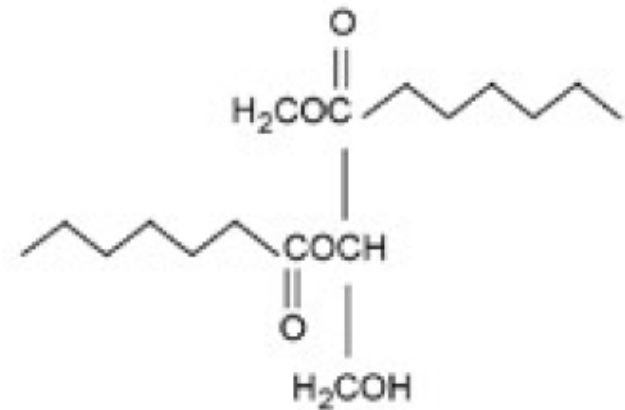
Τα φωσφολιπίδια διασπώνται αμέσως μετά τον θάνατο του μικροοργανισμού από ενδογενής φωσφολιπάσες με απομάκρυνση του πολικού φωσφορικού τμήματος προς **διγλυκερίδια**

Viable

Non-viable



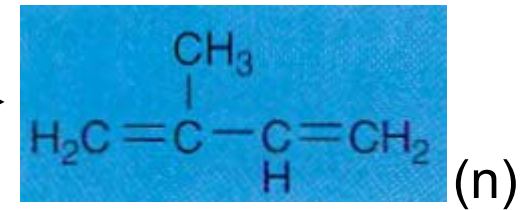
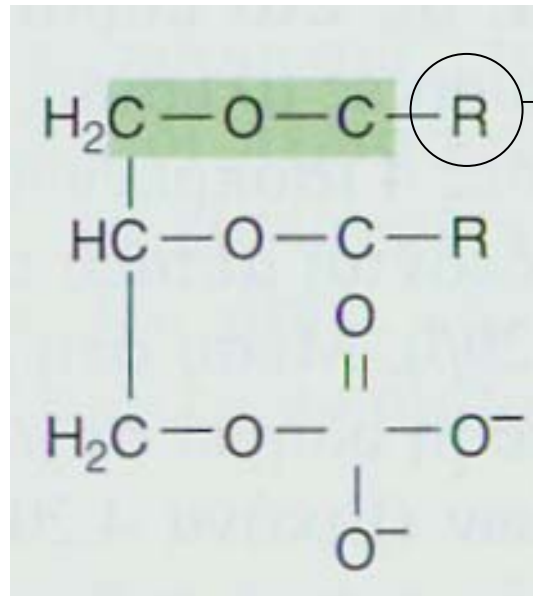
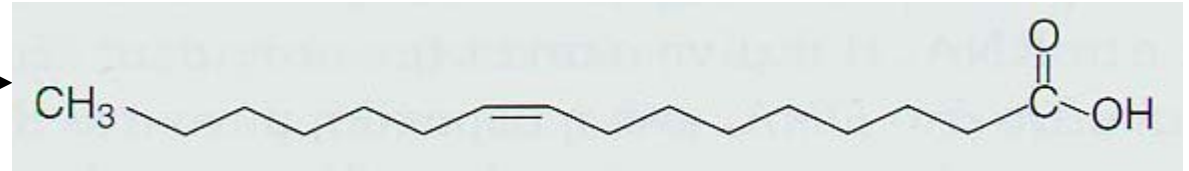
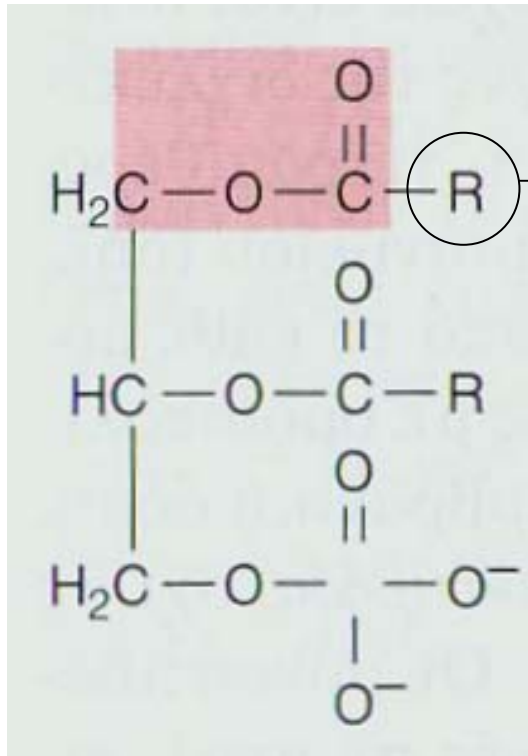
phospholipase
→
cell death



Polar lipid, PLFA

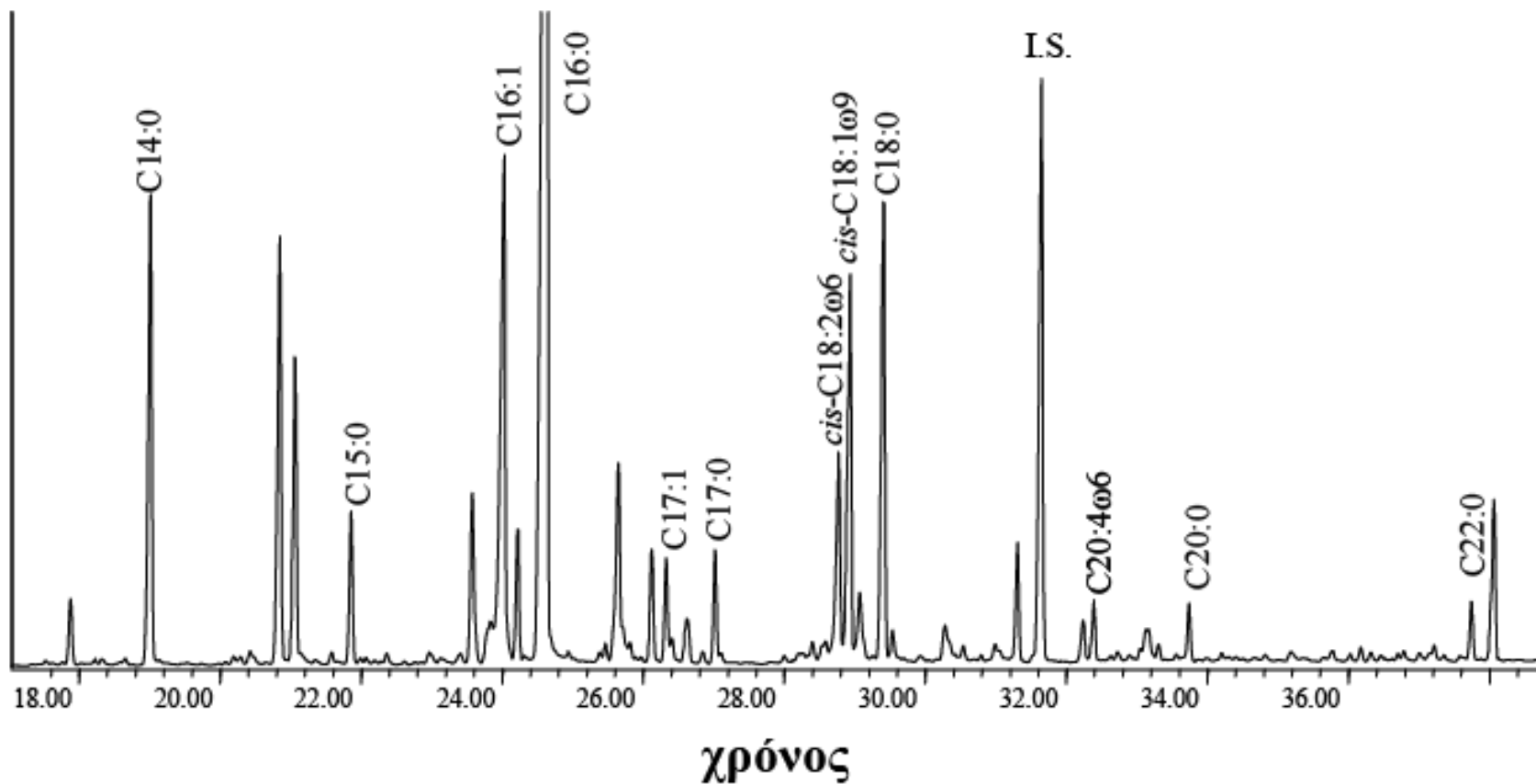
Neutral lipid, DGFA

Εστερικός δεσμός των φωσfolιπιδίων σε προκάρυα, ευκάρυα



ισοπρένιο

Αιθερικός δεσμός των φωσfolιπιδίων σε Αρχαία



Χρωματογράφημα από αέριο χρωματογράφο με ανίχνευση Ιονισμού Φλόγας (FID) όπου σε 40 min ανιχνεύονται τα σημαντικότερα λιπαρά οξέα των φωσφολιπιδίων της μικροβιακής κοινότητας του εδάφους

Ομάδες PLFAs με βάση τα παρακάτω χαρακτηριστικά τους:

- 1. Συνολικό αριθμό ατόμων C*
- 2. Αριθμό και θέση διπλών δεσμών*
- 3. Πλευρικές αλυσίδες*

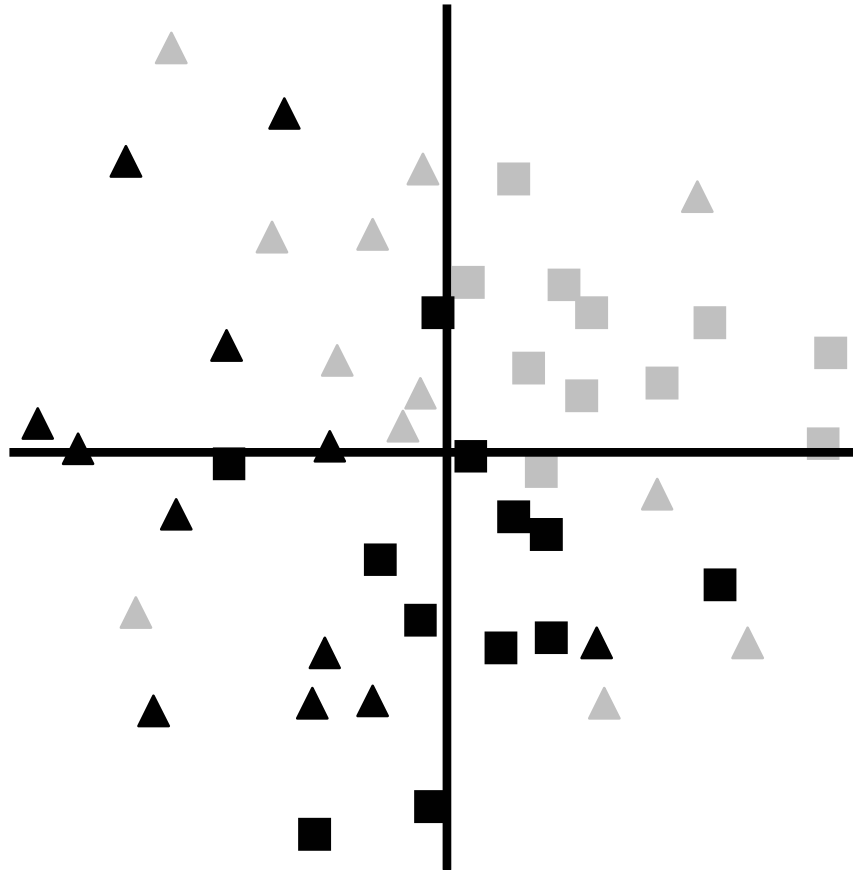
Παράδειγμα

- $16:0$ = 16 C, χωρίς διπλό δεσμό
- $18:2\omega 5$ = 18 C, με δύο διπλούς δεσμούς με τον πρώτο στο 5ο άτομο C από το αλειφατικό άκρο
- $a15:0$ = 15 C, χωρίς διπλό δεσμό με anteiso-πλευρική αλυσίδα

Μερικά PLFAs είναι βιοδείκτες ομάδων μικροοργανισμών

- Βακτήρια θετικά κατά Gram: i14:0, i15:0, i-17:0
- Βακτήρια αρνητικά κατά Gram: cy19:0, cy17:0, 16:1 ω 7, 18:1 ω 9cis/trans
- Μύκητες: 18:2 ω 6, 16:1 ω 5 (Δενδρόμορφοι μυκορριζικοί μύκητες)
- Ακτινοβακτήρια: 10Me17:0, 10Me18:0
- Θείο-αναγωγικά βακτήρια: i-17:1
- Μεθανιότροφα βακτήρια: 16:1 ω 8c, 18:1 ω 8c

Αποτύπωμα μικροβιακής κοινότητας



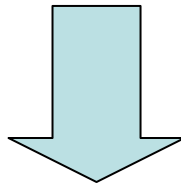
Εφαρμογή στατιστικών αναλύσεων πολύ-μεταβλητότητας όπως:

- Principle Components Analysis (PCA)

- Cluster analysis

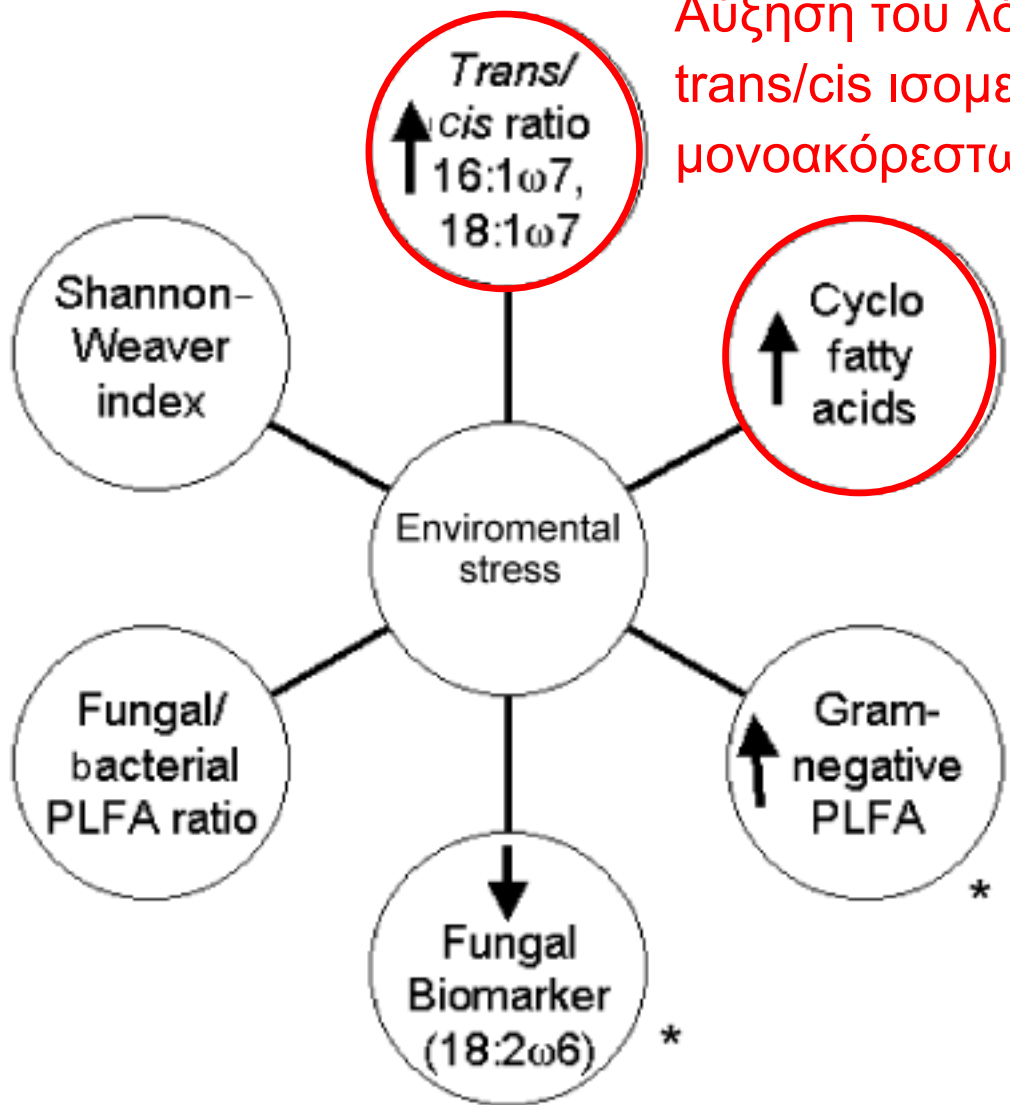
Χρήση των φωσφολιπιδίων ως δείκτες φυσιολογικής κατάστασης της μικροβιακής κοινότητας

Υψηλές ποσότητες συγκεκριμένων φωσφολιπιδίων έχει αποδειχτεί ότι αποτελούν δείκτες ότι η μικροβιακή κοινότητα, βρίσκεται υπό συνθήκες στρες



Οι μικροοργανισμοί μεταβάλλουν την σύσταση των φωσφολιπιδίων στις κυτταρικές τους μεμβράνες ώστε να προσαρμόσουν την λειτουργικότητα και ανθεκτικότητα των μεμβρανών στις νέες περιβαλλοντικές συνθήκες

Ποιοι είναι αυτοί οι δείκτες;



Αύξηση του λόγου
trans/cis ισομερών δύο
μονοακόρεστων PLFAs

Αύξηση της συγκέντρωσης
των cy17:0, cy19:0 PLFAs
σε σχέση με τα μητρικά τους
μόρια 16:1 ω 7cis, 18:1 ω 7cis

Πλεονεκτήματα PLFAs

- Παρέχουν εικόνα της 'ζωντανής' μικροβιακής κοινότητας
- Η συνολική ποσότητα των PLFAs αποτελούν δείκτη του μεγέθους της βιομάζας
- Στατιστική ανάλυση μπορεί να δώσει πληροφορίες για την επίδραση διαφόρων παραγόντων στην σύσταση της μικροβιακής κοινότητας
- Η αναλογία μεταξύ διαφόρων λιπαρών οξέων παρέχει γενικές πληροφορίες για την φυσιολογική κατάσταση της μικροβιακής κοινότητας (στρες ή φυσιολογική)

Μειονεκτήματα PLFAs

- Ορισμένα PLFAs που θεωρούνται δείκτες για συγκεκριμένες ομάδες μικροοργανισμών περιέχονται σε σημαντικές ποσότητες και σε μικροοργανισμούς άλλων ομάδων
- Δύσκολος ο ακριβής ποσοτικός προσδιορισμός των PLFAs που ανιχνεύτηκαν σε περιβαλλοντικά δείγματα (π.χ. Υποθέτουμε ότι ο ανιχνευτής του GC παρουσιάζει όμοια ευαισθησία για όλα τα PLFAs!!!)
- Παρέχει πληροφορίες για την μικροβιακή κοινότητα σε επίπεδο ομάδας μικροοργανισμών και όχι σε επίπεδο είδους ή γένους (όπως DNA, RNA-PCR methods)

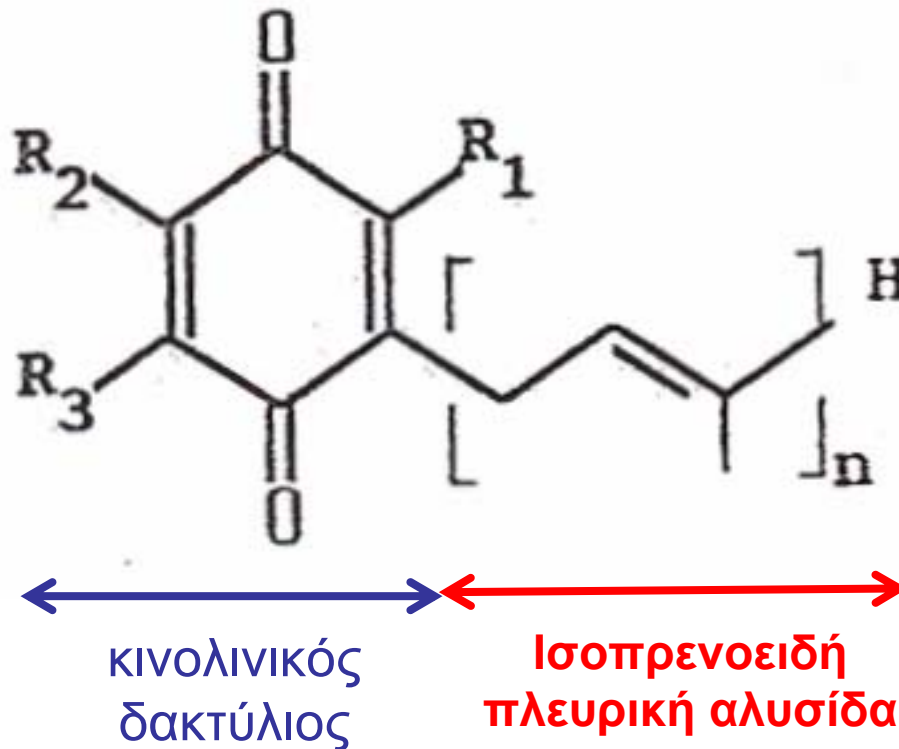
Βιοχημικές Τεχνικές

για προσδιορισμό της μικροβιακής ποικιλότητας

- PLFAs (Phospholipid Fatty Acid Analysis)
- **Ανάλυση Αναπνευστικών Λιποκινονών**
- BIOLOG plates

Τι είναι οι λιποκινόνες;

Αποτελούν απαραίτητους φορείς ηλεκτρονίων στους μηχανισμούς αναπνοής όλων των μικροοργανισμών

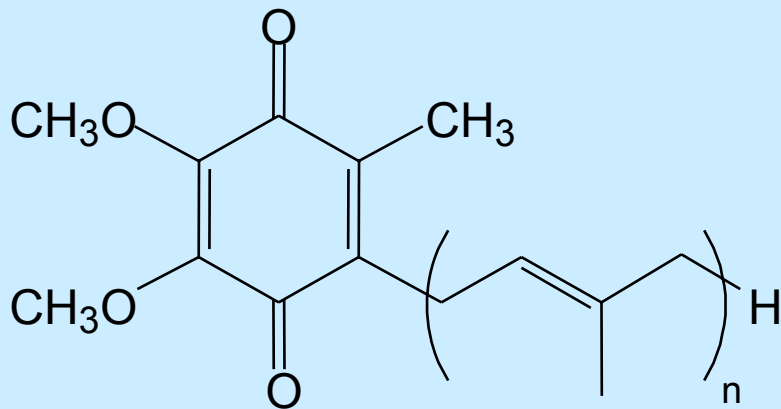


Λιποκινόνες – Γιατί Βιοδείκτες;

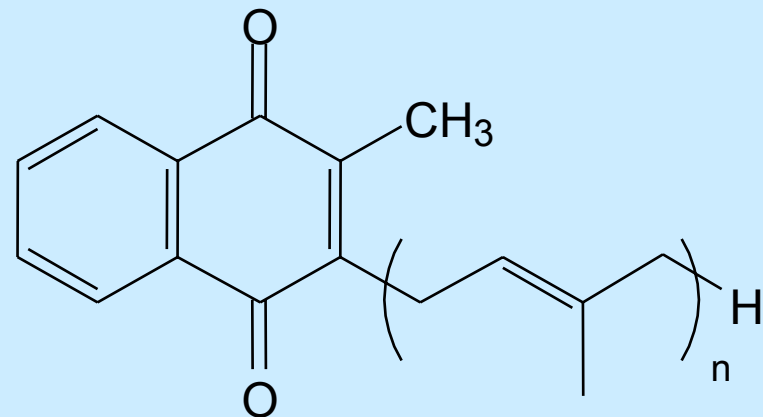
- Όλοι οι αερόβιοι και μερικοί αναερόβιοι μικροοργανισμοί έχουν αναπνευστικές λιποκινόνες
- Συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί παράγουν σε υψηλές ποσότητες μια συνήθως μορφή **λιποκινόνης – δείκτη**
- Η συνολική ποσότητα λιποκινονών έχει βρεθεί ότι είναι ανάλογη της συνολικής βιομάζας του εδάφους
- Μπορούν να προσδιοριστούν ποιοτικά και ποσοτικά με Υγρή Χρωματογραφία (HPLC)

Κατηγορίες αναπνευστικών λιποκινονών

- Ναφθοκινόνες (πχ. **Menaquinones**)
- Βενζοκινόνες (πχ. **Ubiquinones**)
- Βενζοθειοφαινοκινόνες



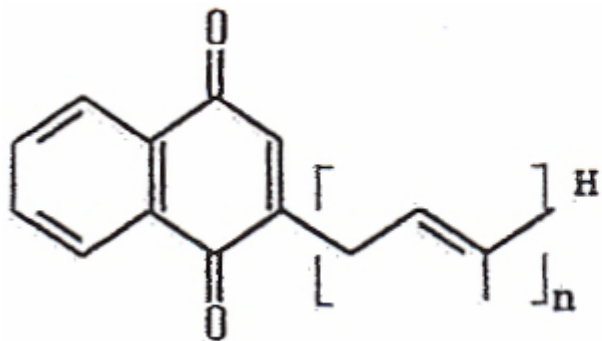
Ubiquinones
(Q-n)



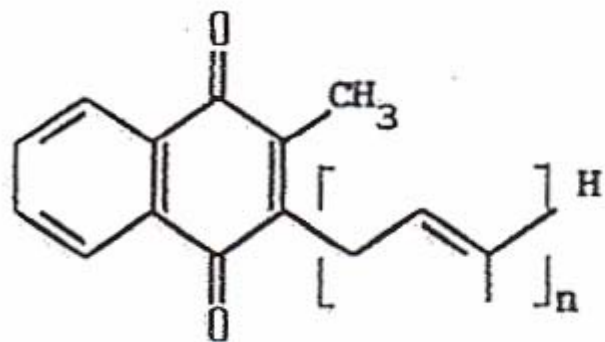
Menaquinones
(Mk n)

Μενακινόνες

Αποτελούν τις πιο συχνά απαντούμενες λιποκινόνες στα βακτήρια



Demethyl-menaquinone (DMK-n)



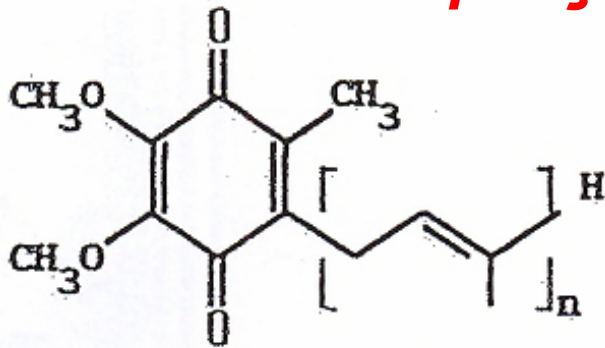
Menaquinone (MK-n)

Μενακινόνες

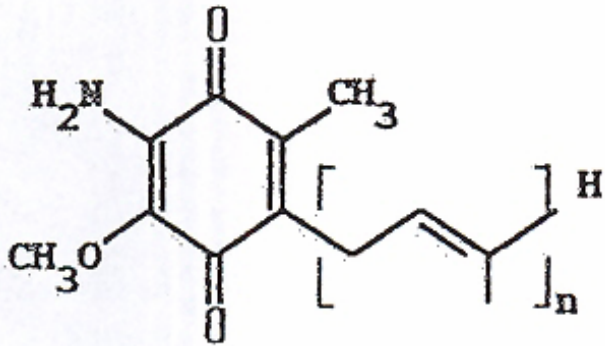
- **MK6** - Bacterioidetes (*Cytophaga*, *Flavobacterium* sp.)
- **MK7** - *Staphylococcus*, *Bacillus*
- **MK7(H2)** – *Brevibacterium*
- **MK8** – *Lactobacillus*
- **MK8(H2) –(H4)** - *Rhodococcus*, *Nocardia*
- **MK9** – *Arthrobacter*
- **MK9(H2)** – *Corynebacterium*
- **MK9 (H4)** – *Cellulomonas*
- **MK9(H6) ή (H8)** – *Streptomyces*
- **MK10** – *Rathaybacter*
- **MK10(H2 – H8)** - *Glycomyces*, *Nocardiopsis*, *Thermomonospora*
- **MK11 and 12** – *Microbacterium*, *Agrococcus*, *Aureobacterium*

Ουμπικινόνες - Ροδοκινόνες

Απαντώνται κυρίως στα α-, β- και γ-Πρωτεοβακτήρια



Ubiquinone (Q-n)



Rhodoquinone (RQ-n)

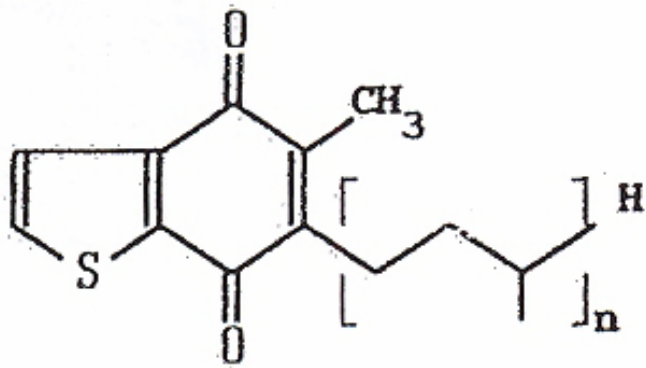
α-proteobacteria Q9 – Agrobacterium, Rhizobium

β-proteobacteria Q8 – Escherichia coli, Nitrosomonas, Stenotrophomonas

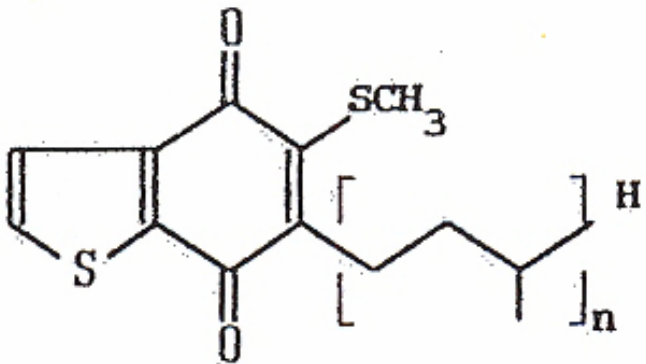
γ-proteobacteria ;Q10 – Pseudomonas

Βενζοθειοφαινοκινόνες

Κυρίως παρατηρούνται σε θερμόφιλα και οξεόφιλα Αρχαία



Sulfolobus quinone (SQ-n)



Caldariella quinone (CQ-n)

Πως διαφοροποιούνται οι λιποκινόνες μεταξύ βακτηρίων;

Διαφοροποιήσεις υπάρχουν και στο αρωματικό τμήμα του μορίου τους αλλά κυρίως παρουσιάζονται στην ισοπρενοειδή αλυσία

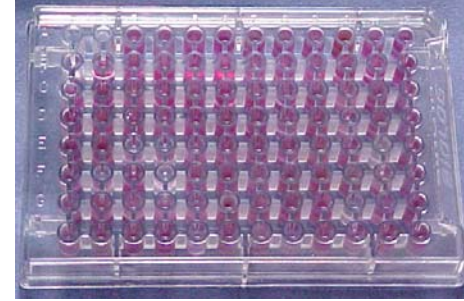
- Προσθήκη CH_3 στον δακτύλιο
- Διαφοροποίηση στο μήκος της ισοπρενοειδούς αλυσίδας (4 -15 μονάδες ισοπρενίου)
- Βαθμός κορεσμού της ισοπρενοειδούς αλυσίδας και θέση διπλών δεσμών

Βιοχημικές Τεχνικές

για προσδιορισμό της μικροβιακής ποικιλότητας

- PLFAs
- Ανάλυση Λιποκινονών
- **BIOLOG - CLPP**

BIOLOG



- Microtitre plates (96 κελία) που περιέχουν 95 υποστρώματα όπως υδατάνθρακες, αμινοξέα, καρβοξυλικά οξέα, αμίνες, αμίδια και πολυμερή + 1 **κελί-Μάρτυρα**
- Όλα τα κελία περιέχουν **tetrazolium dye**
- Προσθήκη υδατικού εκχυλίσματος εδάφους στα κελιά, επώαση για επιλεγμένο χρονικό διάστημα και παρακολούθηση της ανάπτυξης χρώματος που οφείλεται στην οξείδωση του υποστρώματος με παράλληλη αναγωγή του tetrazolium προς ιώδες formazan

BIOLOG plates

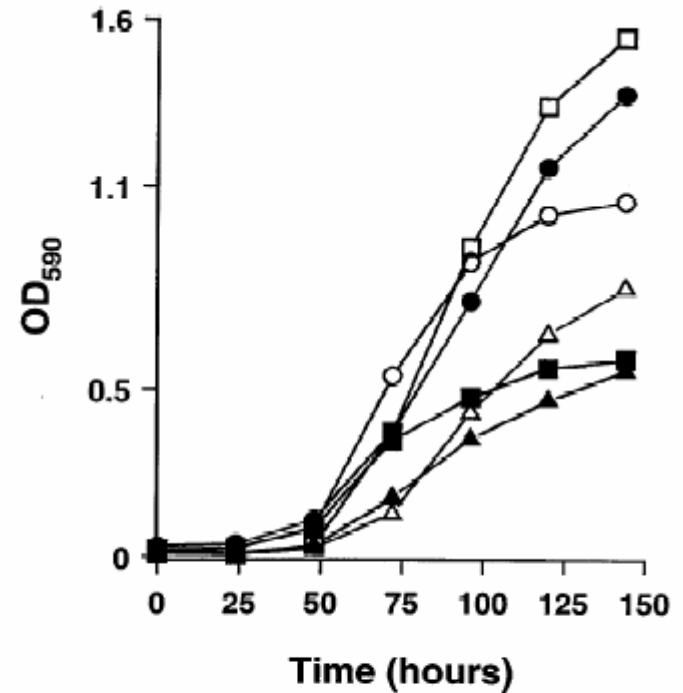
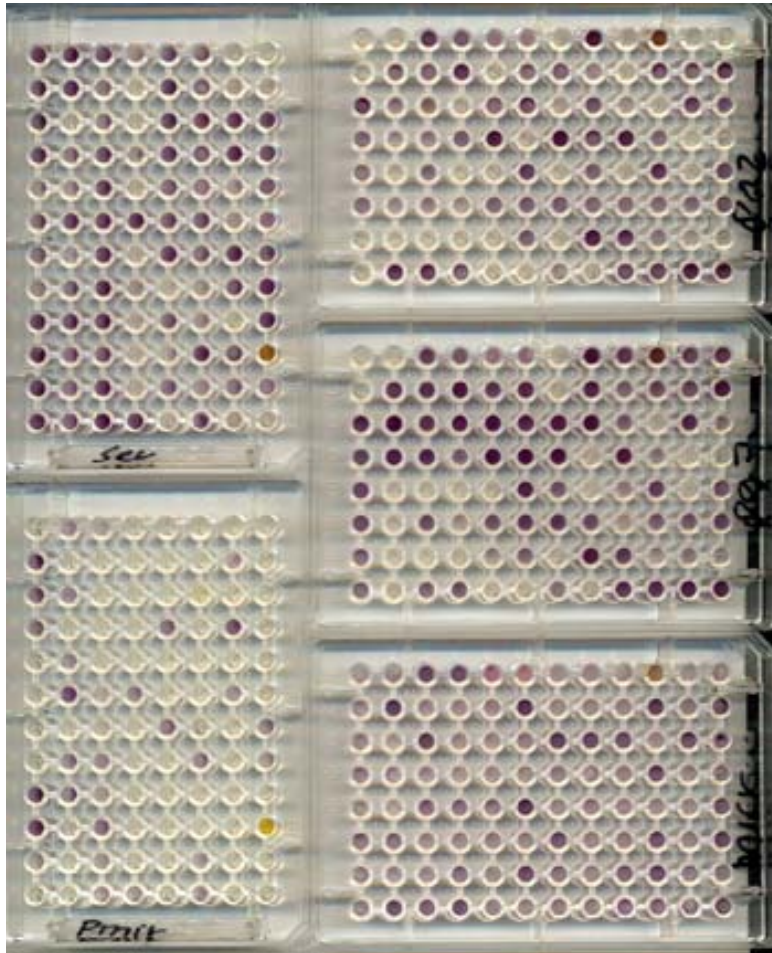


Fig. 1. Mean rate of colour development for samples from Borrowdale over 144 h for different groups of carbon sources: carbohydrates (●), carboxylic acids (○), amino acids (□), amides (■), phenolic acids (△) and long chain aliphatic acids (▲)

Υποστρώματα στα BIOLOG GN

Carbohydrates

N-Acetyl-D-galactosamine
N-Acetyl-D-glucosamine
Adonitol
L-Arabinose
D-Arabitol
Cellobiose
i-Erythritol
D-Fructose
L-Fucose
D-Galactose
Gentiobiose
 α -D-Glucose
m-Inositol
 α -Lactose
Lactulose
Maltose
D-Mannitol
D-Mannose
D-Melibiose
 β -Methylglucoside
Psicose
D-Raffinose
L-Rhamnose
D-Sorbitol
Sucrose
D-Trehalose
Turanose
Xylitol

Esters

Mono-methylsuccinate
Methylpyruvate

Polymers

Glycogen
 α -Cyclodextrin
Dextrin
Tween 80
Tween 40

Carboxylic acids

Acetic acid
cis-Aconitic acid
Citric acid
Formic acid
D-Galactonic acid lactone
D-Galacturonic acid
D-Gluconic acid
D-Glucosaminic acid
D-Glucuronic acid
 α -Hydroxybutyric acid
 β -Hydroxybutyric acid
 γ -Hydroxybutyric acid
p-Hydroxyphenylacetic acid
Itaconic acid
 α -Ketobutyric acid
 α -Ketoglutaric acid
 α -Ketovaleric acid
D,L-Lactic acid
Malonic acid
Propionic acid
Quinic acid
D-Saccharic acid
Sebacic acid
Succinic acid

Alcohols

2,3-Butanediol
Glycerol

Amides

Succinamic acid
Glucuronamide
Alaninamide

Phosphorylated chemicals

D,L- α -Glycerol phosphate
Glucose-1-phosphate
Glucose-6-phosphate

Amino acids

D-Alanine
L-Alanine
L-Alanyl-glycine
L-Asparagine
L-Aspartic acid
L-Glutamic acid
Glycyl-L-aspartic acid
Glycyl-L-glutamic acid
L-Histidine
Hydroxy-L-proline
L-Leucine
L-Ornithine
L-Phenylalanine
L-Proline
L-Pyroglutamic acid
D-Serine
L-Serine
L-Threonine
D,L-Carnitine
 γ -Aminobutyric acid

Aromatic chemicals

Inosine
Urocanic acid
Thymidine
Uridine

Brominated chemicals

Bromosuccinic acid

Amines

Phenylethylamine
2-Aminoethanol
Putrescine

Υποστρώματα που βρίσκονται στο BIOLOG GN και έχουν αναφερθεί να παράγονται στην ριζόσφαιρα

Carbohydrates	Carboxylic acids	Amino acids	Phenolic acids	Long chain aliphatic acids
<i>A</i>				
arabinose	acetic acid	L-alanine	hydroxy benzoic acid*	oleic acid*
D-fructose	citric acid	L-alanyl-glycine	ferulic acid*	palmitic acid*
D-galactose	alpha-hydroxy butyric acid	L-asparagine	coumaric acid*	stearic acid*
alpha-D-glucose	alpha-keto valeric acid	L-aspartic acid	sinapic acid*	linolenic acid*
maltose	malonic acid	hydroxy L-proline	caffeic acid*	
D-raffinose	propionic acid	L-leucine	chlorogenic acid*	
L-rhamnose	succinic acid	L-ornithine	protocatechuic acid*	
sucrose	fumaric acid*	L-phenylalanine		
ribose*	oxalic acid*	L-serine		
xylose*	glycolic acid*	L-threonine		
	tartaric acid*	gamma-amino butyric acid		
	malic acid*	tryptophan*		
	oxaloacetic acid *	methionine*		
		lysine*		
		arginine*		
		glycine*		
		valine*		

BIOLOG ή CLPP

Community Level Physiological Profiling

Αρχικά **(λανθασμένα)** θεωρήθηκε ότι παρέχουν πληροφορίες για την καταβολική ή λειτουργική ποικιλότητα της μικροβιακής κοινότητας

Αποδείχθηκε ότι παρέχουν **μόνο** συγκριτικές πληροφορίες για την μικροβιακή ποικιλότητα μεταξύ δύο οικοσυστημάτων

BIOLOG

- BIOLOG GN
- BIOLOG GP
- **BIOLOG GN2** (εξέλιξη των GN)
- **ECOPLATES** (31 υποστρώματα αντιπροσωπευτικά της ριζόσφαιρας)
- BIOLOG FF (για μύκητες)
- BIOLOG MT

Πλεονεκτήματα

- Απλή και γρήγορη μέθοδος συγκριτικής αξιολόγησης της σύστασης της μικροβιακής κοινότητας μεταξύ παρόμοιων οικοσυστημάτων (έδαφος – ριζόσφαιρα – ρυττασμένο έδαφος)
- Σχετικά χαμηλό κόστος

Μειονεκτήματα

- Τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται δεν είναι αντιπροσωπευτικά από το περιβάλλον (**Λύση: ECOPLATE**)
- Η επώαση ευνοεί την ανάπτυξη πλεοτροφικών βακτηρίων (γ-πρωτεοβακτήρια) στα κελία που καταναλώνουν τα υποστρώματα αλλά δεν αποτελούν σημαντικά μέλη της βακτηριακής κοινότητας στο έδαφος – εμβόλιο
- Οι μύκητες δεν λαμβάνονται υπόψη καθώς δεν ανάγουν το tetrazolium dye (**Λύση: BIOLOG FF**)
- Τα αποτελέσματα εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το επίπεδο του αρχικού εμβολίου (**Λύση: Κανονικοποίηση δεδομένων**)