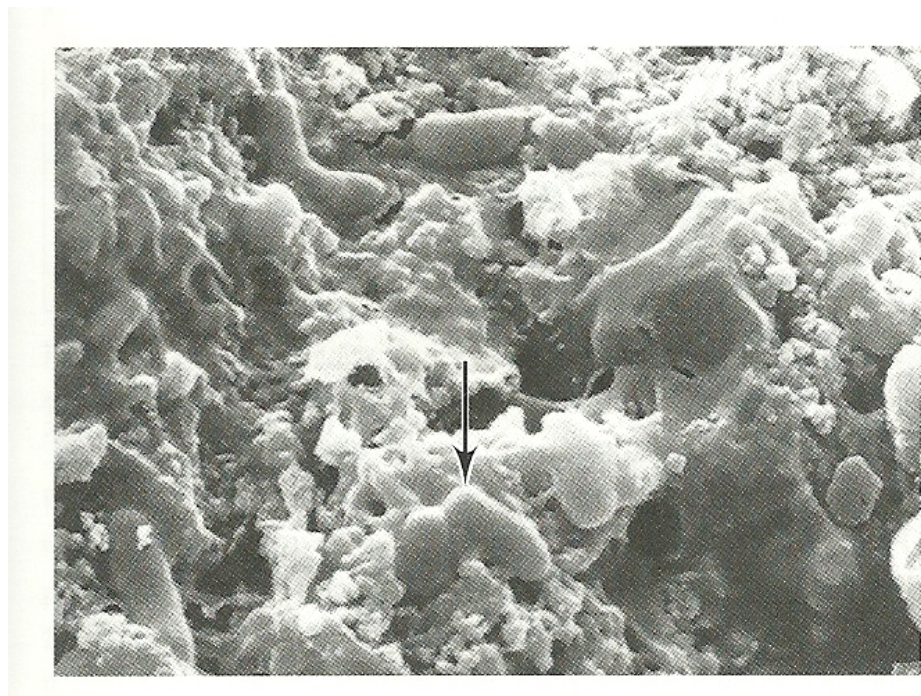


Μικροβιακή Εξέλιξη και Συστηματική

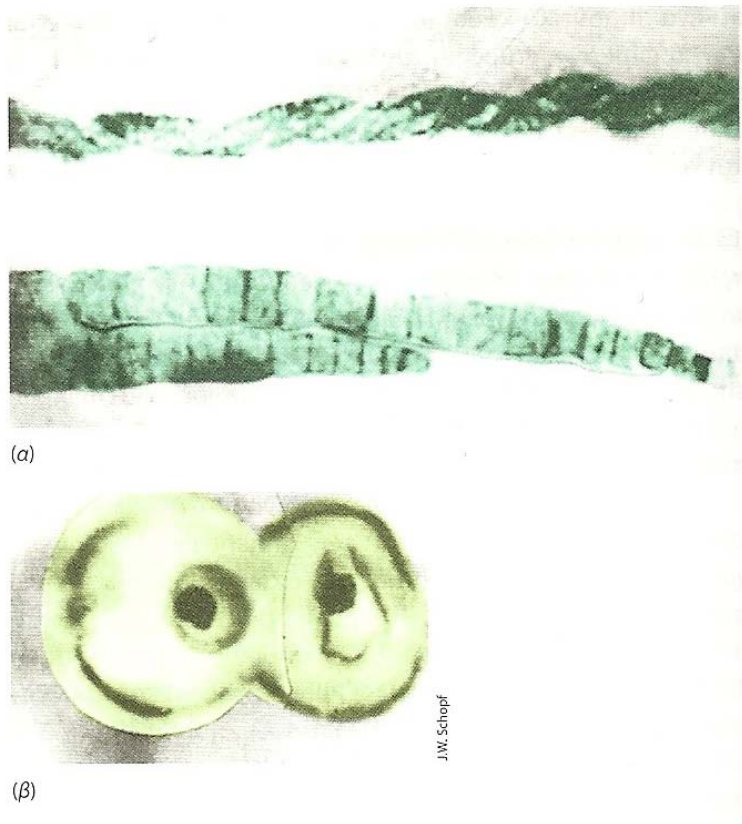
Πρώιμη γη, προέλευση και διαφοροποίηση της ζωής

- Η γη έχει ηλικία 4.5 δισεκατομμύρια έτη περίπου.
- Ορισμένα αρχέγονα πετρώματα περιέχουν μικροαπολιθώματα με σχήμα βακτηρίων.



Σχ.143. Αρχέγονη μικροβιακή ζωή. Ηλεκτρονικό μικρογράφημα σάρωσης μικροαπολιθώματος βακτηρίου από πετρώματα ηλικίας 3.45 δις ετών της Ζώνης Barbeton Greenstone στην Νότια Αφρική.

- Απολιθωμένοι μικροβιακοί σχηματισμοί (**στρωματόλιθοι**) απαντούν σε πετρώματα ηλικίας 3.5 δις ετών.
- Οι στρωματόλιθοι σχηματίζονται όταν είδη μικροβιακών στρωμάτων προκαλούν την εναπόθεση ανθρακικών ή πυριτικών ορυκτών (**απολίθωση**).

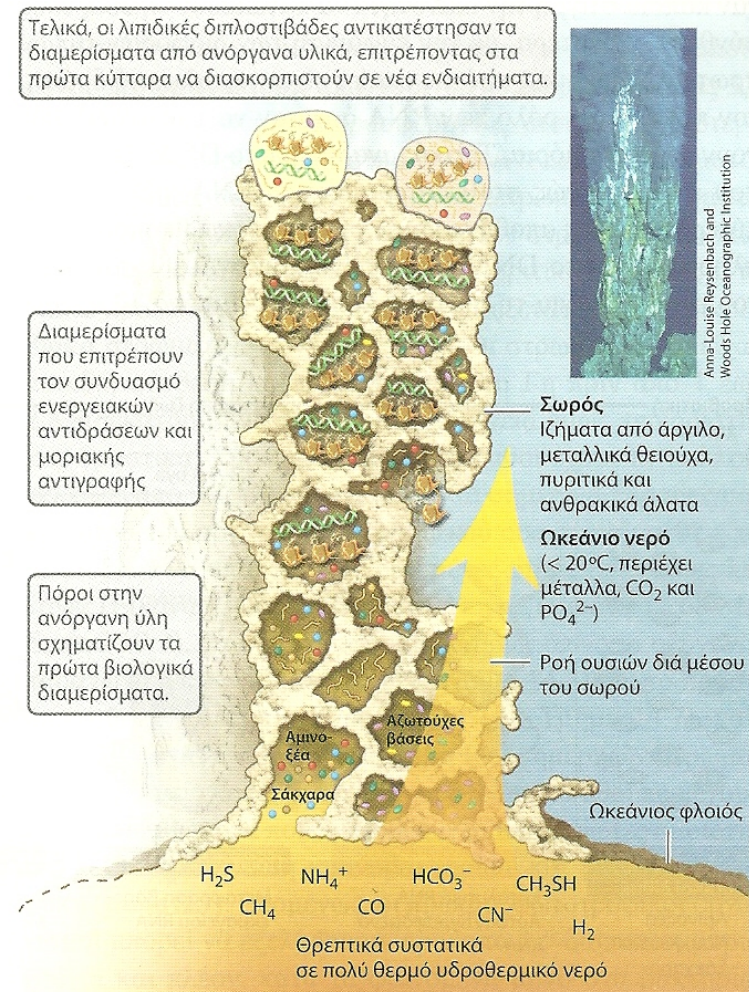


Σχ.144. Απολιθώματα βακτηρίων και ευκαρυωτών.

(α) Μικροαπολιθώματα ηλικίας 1 δις ετών από την κεντρική Αυστραλία, τα οποία μοιάζουν με σημερινά νηματοειδή κυανοβακτήρια.

(β) Μικροαπολιθώματα ευκαρυωτικών κυττάρων. Η κυτταρική δομή είναι παρόμοια με ορισμένων σύγχρονων πράσινων φυκών (π.χ. *Chlorella*).

- Η ατμόσφαιρα στην πρώιμη γη είχε ελάχιστες ποσότητες οξυγόνου (αναγωγικό περιβάλλον).
- Εκτός από νερό, υπήρχε ποικιλία αερίων (CH_4 , CO_2 , N_2 , NH_3 , H_2S και μικροποσότητες CO και H_2) και σημαντικές ποσότητες FeS .
- Επιπλέον, η επιφάνεια της γης ήταν πολύ θερμότερη από ότι σήμερα (εικάζεται ότι τα πρώτα 500 εκατομμύρια χρόνια η θερμοκρασία ήταν $>100^\circ\text{C}$).
- Η ζωή ενδέχεται να πρωτοεμφανίστηκε σε βάθος αρκετά χαμηλότερο από την επιφάνεια της γης, σε υδροθερμικές πηγές στον πυθμένα των ωκεανών.



Σχ.145. Μοντέλο του εσωτερικού ενός υδροθερμικού σωρού. Ένθετο: φωτογραφία πραγματικού υδροθερμικού σωρού.

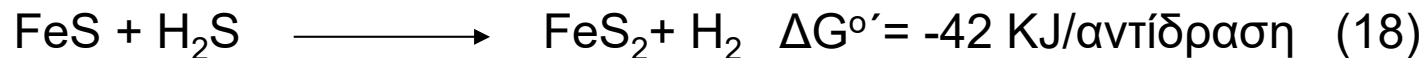
- Σήμερα, είναι γνωστό ότι η σύνθεση των βιολογικά σημαντικών μορίων είναι δυνατόν να συμβεί σε αναγωγικές ατμόσφαιρες που περιέχουν τα παραπάνω μόρια παρουσία πλούσιων πηγών ενέργειας.
- Πηγές ενέργειας στην πρωτόγονη γη αποτελούσαν η υπεριώδης ακτινοβολία (UV) του ήλιου, οι ηλεκτρικές εκκενώσεις των κεραυνών, η ραδιενέργεια, η εκλυόμενη θερμότητα από την πρόσκρουση μετεωριτών και η θερμική ενέργεια από την ηφαιστειακή δράση.
- Αν μίγματα αερίων παρόμοια με εκείνα που πιστεύεται ότι υπήρχαν στην πρωτόγονη γη δεχθούν ηλεκτρικές εκκενώσεις στο εργαστήριο, μπορεί να προκύψει πληθώρα βιοχημικά σημαντικών μορίων (σάκχαρα, αμινοξέα, πουρίνες, νουκλεοτίδια, θειοεστέρες, λιπαρά οξέα).

- Βιοχημικά μόρια με κρίσιμο ρόλο (π.χ. πυροσταφυλικό οξύ) έχουν παραχθεί σε υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες που χαρακτηρίζουν υποθαλάσσιες υδροθερμικές πηγές.
- Ορισμένες από αυτές τις βιοχημικές δομικές μονάδες πολυμερίζονται σχηματίζοντας πολυπεπτίδια, πολυνουκλεοτίδια και άλλα σημαντικά μακρομόρια.
- Άνυδρες εκτεθειμένες επιφάνειες πυλού, πυρίτη, κλπ, λειτούργησαν πιθανόν ως υπόβαθρα για αντιδράσεις πολυμερισμού βιολογικών μακρομορίων παρέχοντας ένα σταθερό, σχετικά ξηρό περιβάλλον για τη σύνθεση και συσσώρευση μακρομορίων.

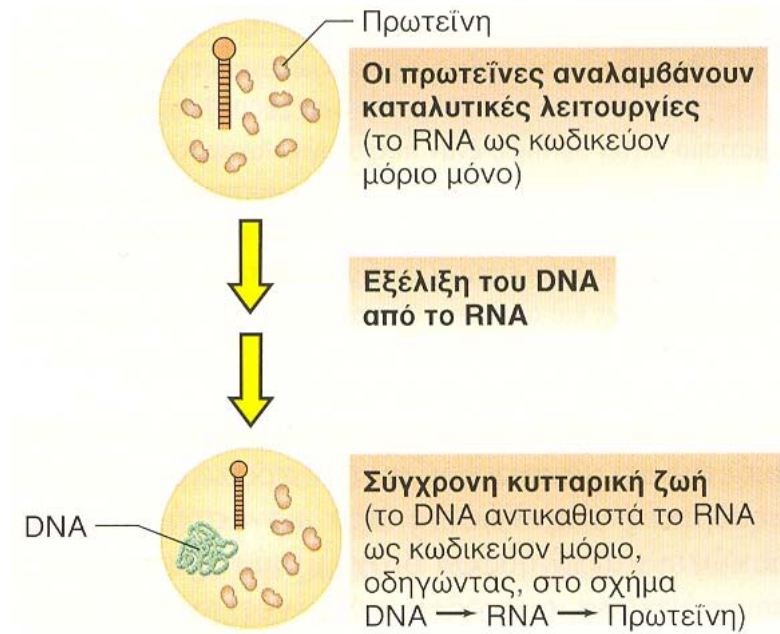
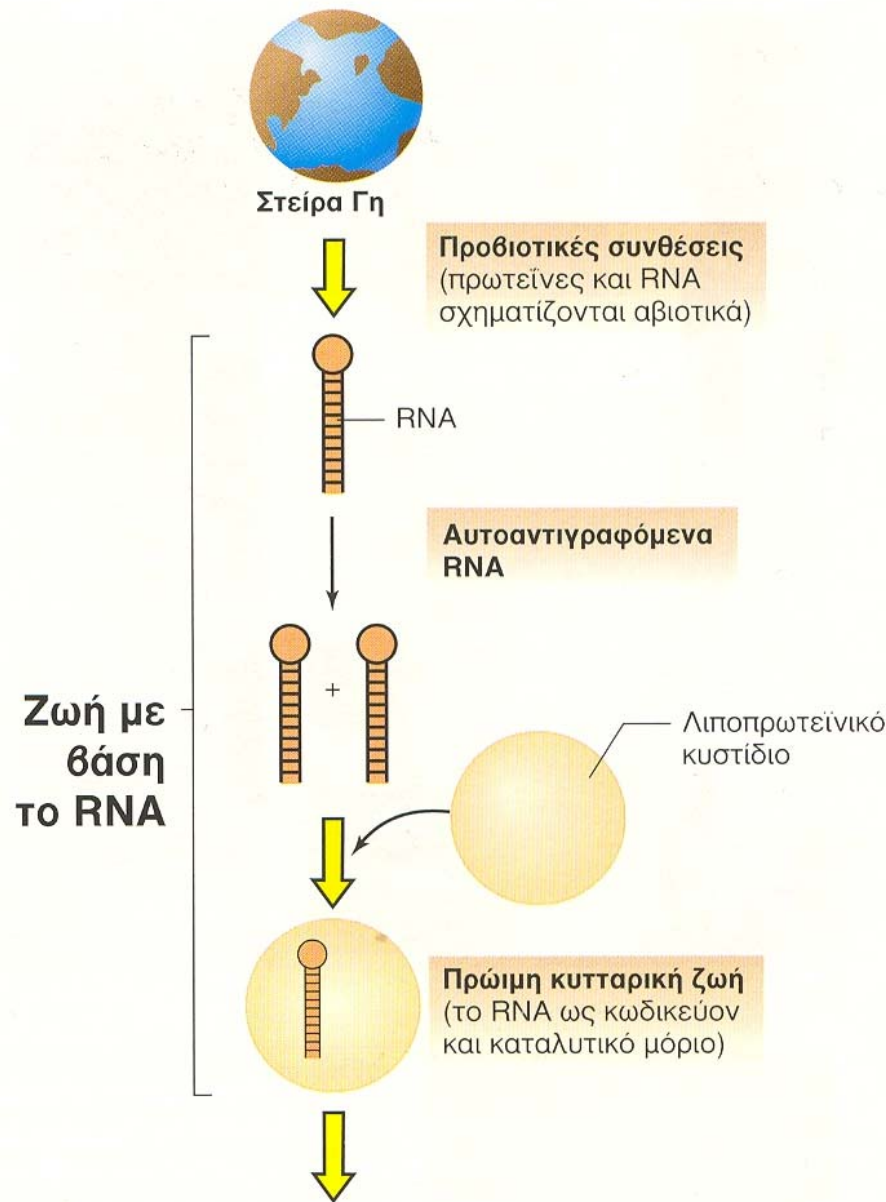
Πρωτόγονη ζωή: Ο κόσμος του RNA

- Βασιζόμενοι στην ανακάλυψη ότι ορισμένα είδη RNA έχουν καταλυτική δράση, πολλοί επιστήμονες πιστεύουν σήμερα ότι οι πρώτες μορφές ζωής δεν διέθεταν καθόλου DNA.
- Σε έναν κόσμο με βάση το RNA, τα μόρια RNA θα λειτουργούσαν απλώς για να αναπαράγουν τον εαυτό τους και μάλλον θα εκτελούσαν τον ελάχιστο αριθμό απαραίτητων για αυτό το σκοπό καταλυτικών αντιδράσεων.
- Οι μελέτες διάφορων καταλυτικών RNA έδειξαν ότι είναι δυνατόν να καταλυθούν διάφορες αντιδράσεις, όπως της σύνθεσης νουκλεοτιδίων από σάκχαρα και αζωτούχες βάσεις.
- Οι πρώτες κυτταρικές μορφές ζωής εξελίχθηκαν όταν αυτοαντιγραφόμενα μόρια RNA βρέθηκαν εγκλωβισμένα σε λιποπρωτεϊνικά κυστίδια.
- Καθώς οι πρωτεΐνες επιδεικνύουν πολύ μεγαλύτερο βαθμό καταλυτικής εξειδίκευσης, οι πρωτόγονοι οργανισμοί ωθήθηκαν προς τις πρωτεΐνες ως κύριους βιοκαταλύτες.

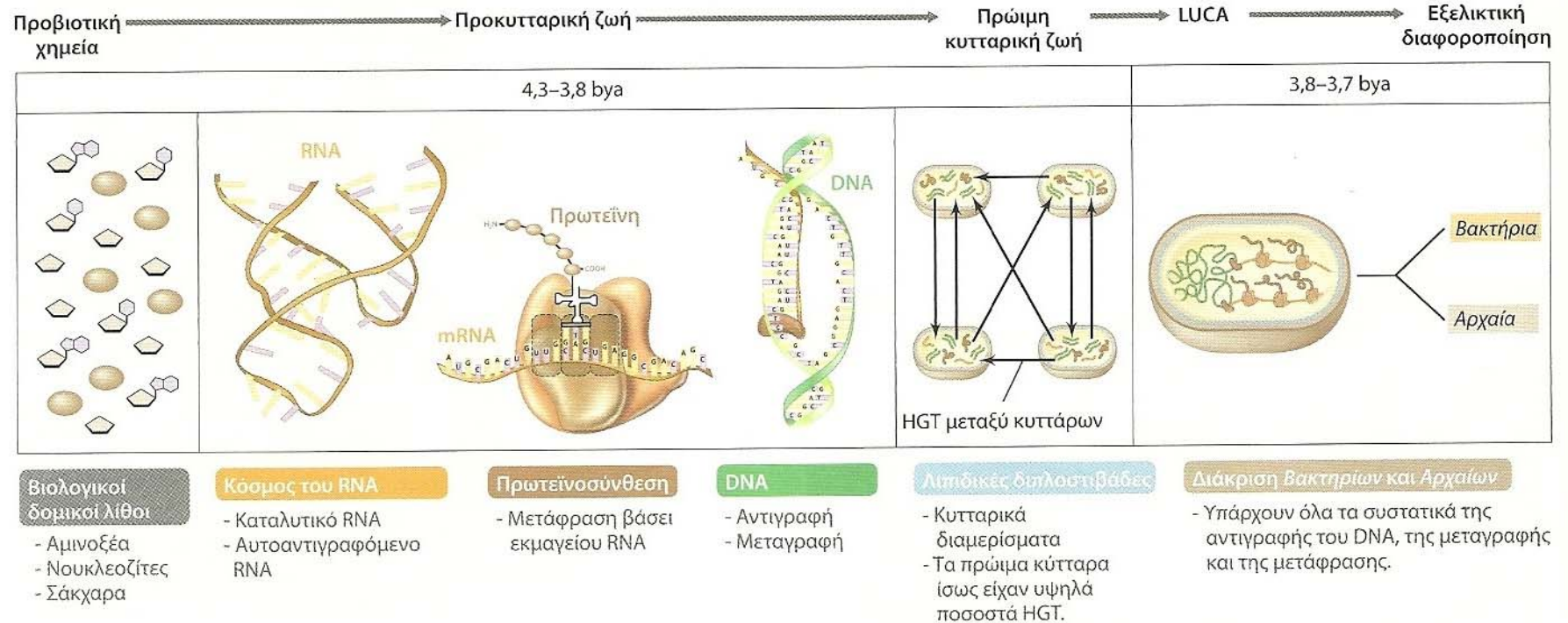
- Η καθιέρωση του DNA ως γονιδιώματος του κυττάρου πιθανόν προέκυψε από την εξελικτική πίεση προς την κατεύθυνση της μεγαλύτερης αποδοτικότητας και πιστότητας της αντιγραφής, καθώς οι DNA πολυμεράσες είναι πιο ακριβείς από τις RNA πολυμεράσες.
- Ο τελευταίος καθολικός πρόγονος (last universal ancestor, *LUCA*) πρέπει να εμφανίστηκε πριν από 3.7-3.8 δις έτη, πριν τον διαχωρισμό των βακτηρίων από τα αρχαία.
- Οι πρωτόγονοι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούσαν πιθανόν την παρακάτω εξώθερμη αντίδραση για την παραγωγή ενέργειας:



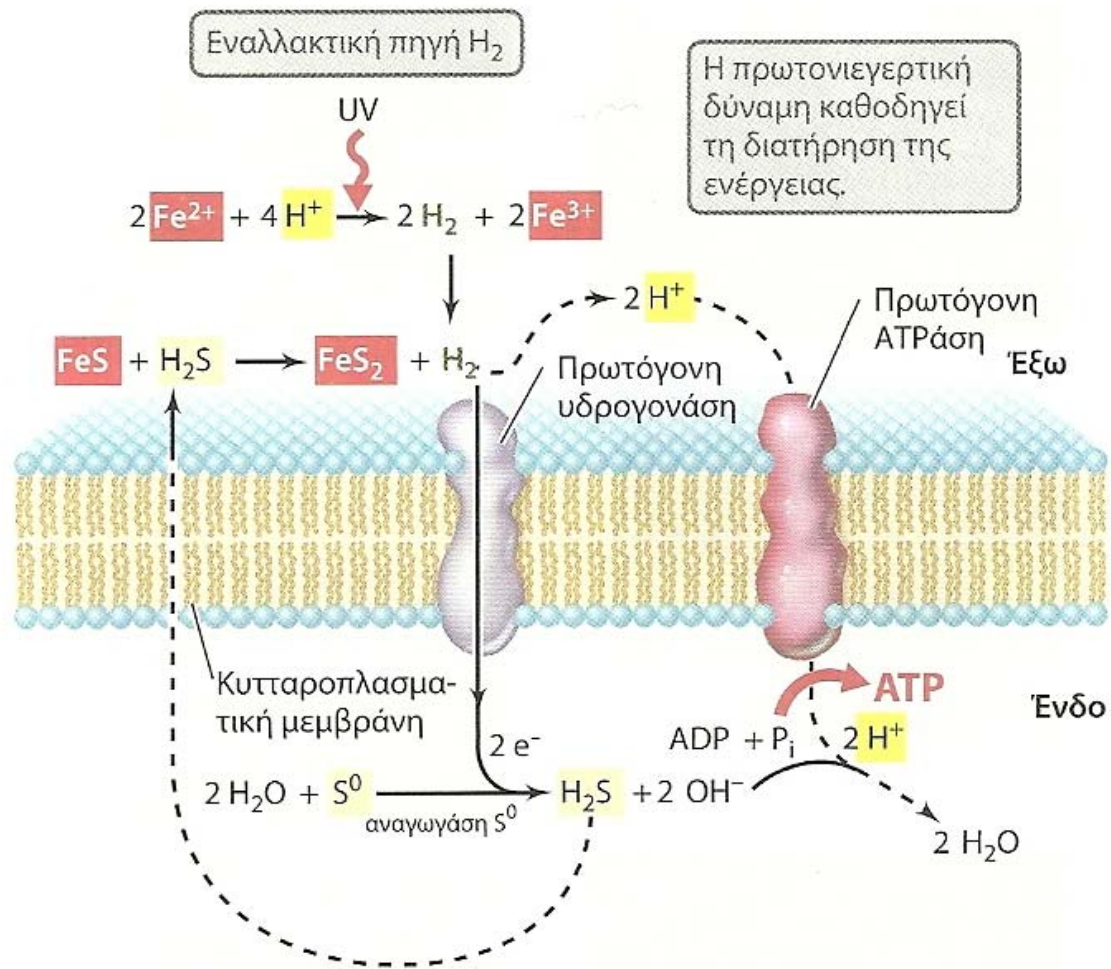
- Τα πρωτόγονα κύτταρα χρησιμοποίησαν πιθανόν το παραγόμενο H_2 για να δημιουργήσουν την πρωτονιοκίνητη δύναμη για την παραγωγή ATP από μια πρωτόγονη ATP συνθάση.



Σχ.146. Πιθανό σενάριο για την εξέλιξη της κυτταρικής μορφής ζωής.

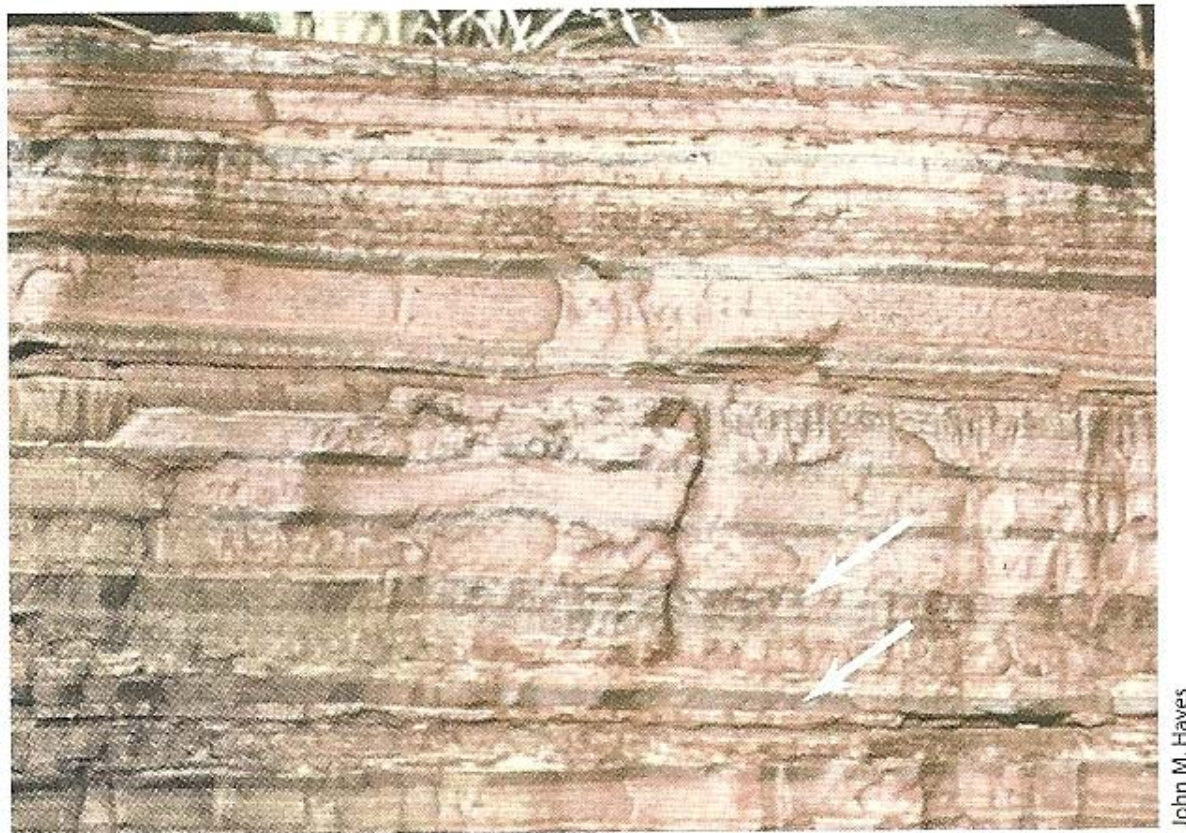


Σχ.147. Υποθετικά συμβάντα που οδήγησαν στην εμφάνιση κυτταρικής ζωής.



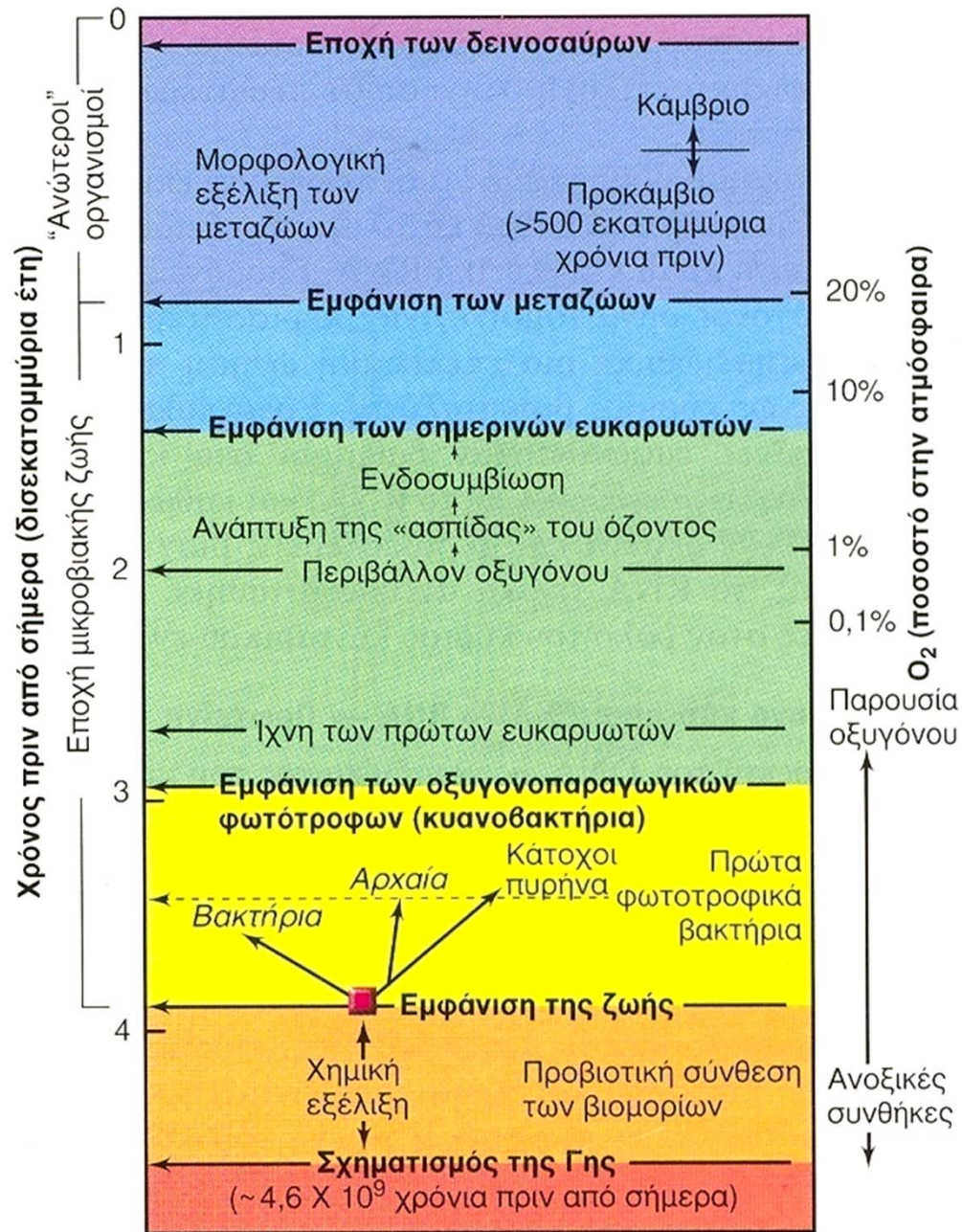
Σχ.148. Υποθετικός μηχανισμός παραγωγής ενέργειας από πρωτόγονο κύτταρο.

- Αποφασιστική καμπή στην ιστορία της γης αποτέλεσε η εξέλιξη της οξυγονοπαραγωγικής φωτοσύνθεσης στα κυανοβακτήρια.
- Οι οργανισμοί αυτοί εμφανίστηκαν πριν από 2.5-3.3 δις έτη, αλλά το O₂ που παρήγαγαν δεν συσσωρεύτηκε στην ατμόσφαιρα, καθώς οι αναγωγικές ουσίες (π.χ. FeS) που υπήρχαν αντιδρούσαν αυθόρμητα με το O₂.
- Πριν από 2.4 δις έτη, τα επίπεδα του O₂ κυμαίνονταν σε 1ppm, εξαιρετικά μικρή συγκέντρωση, ικανή, όμως, για να ξεκινήσει το **Μεγάλο Συμβάν της Οξείδωσης**.
- Τα οξείδια του τρισθενούς σιδήρου που σχηματίζονταν καθίζαναν σε μεγάλες ποσότητες στον βυθό των θαλασσών, δημιουργώντας **ζωνώδεις σχηματισμούς σιδήρου**.



Σχ.149. Ζωνώδεις σχηματισμοί σιδήρου.

- Σταδιακά με την συσσώρευση O_2 , η ατμόσφαιρα άλλαξε από αναγωγική σε οξειδονούχο και σχηματίστηκε O_3 , το οποίο απορροφά ισχυρά σε μήκη κύματος μέχρι 300nm , προστατεύοντας το DNA από την υπεριώδη ακτινοβολία.



Σχ.150. Σταθμοί ορόσημα βιολογικής εξέλιξης.

Ευκαρυώτες και οργανίδια: Ενδοσυμβίωση

- Η **ενδοσυμβιωτική θεωρία** υποστηρίζει ότι ένα αερόβιο βακτήριο παγίωσε τη θέση του στο κυτταρόπλασμα κάποιου πρωτόγονου ευκαρυώτη προμηθεύοντάς του ενέργεια, διασφαλίζοντας ως αντάλλαγμα ένα προστατευτικό περιβάλλον και την απρόσκοπτη παροχή θρεπτικών υλικών.

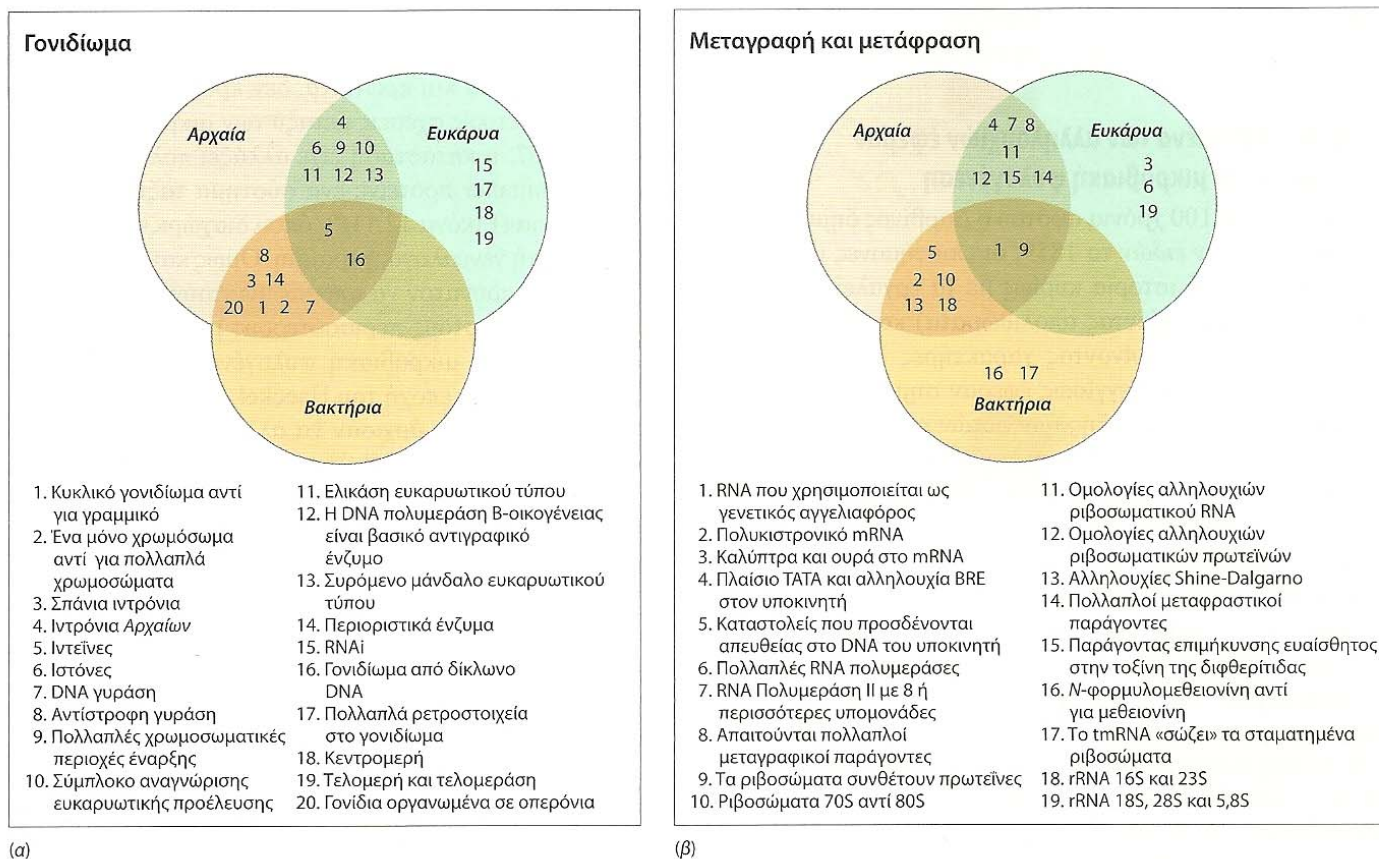
- Παρόμοια, η ενδοσυμβιωτική ενσωμάτωση ενός φωτοτροφικού παραγωγού οξυγόνου θα προσέδιδε φωτοσυνθετικές ικανότητες σε ένα πρωτόγονο ευκαρυώτη, έτσι ώστε αυτός να πάψει να εξαρτάται από οργανικές ενώσεις για παραγωγή ενέργειας.

- Αδιάσειστα στοιχεία στηρίζουν την άποψη ότι τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες ήταν άλλοτε βακτήρια:

1. Οι χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια περιέχουν ριβοσώματα προκαρυωτικού τύπου,

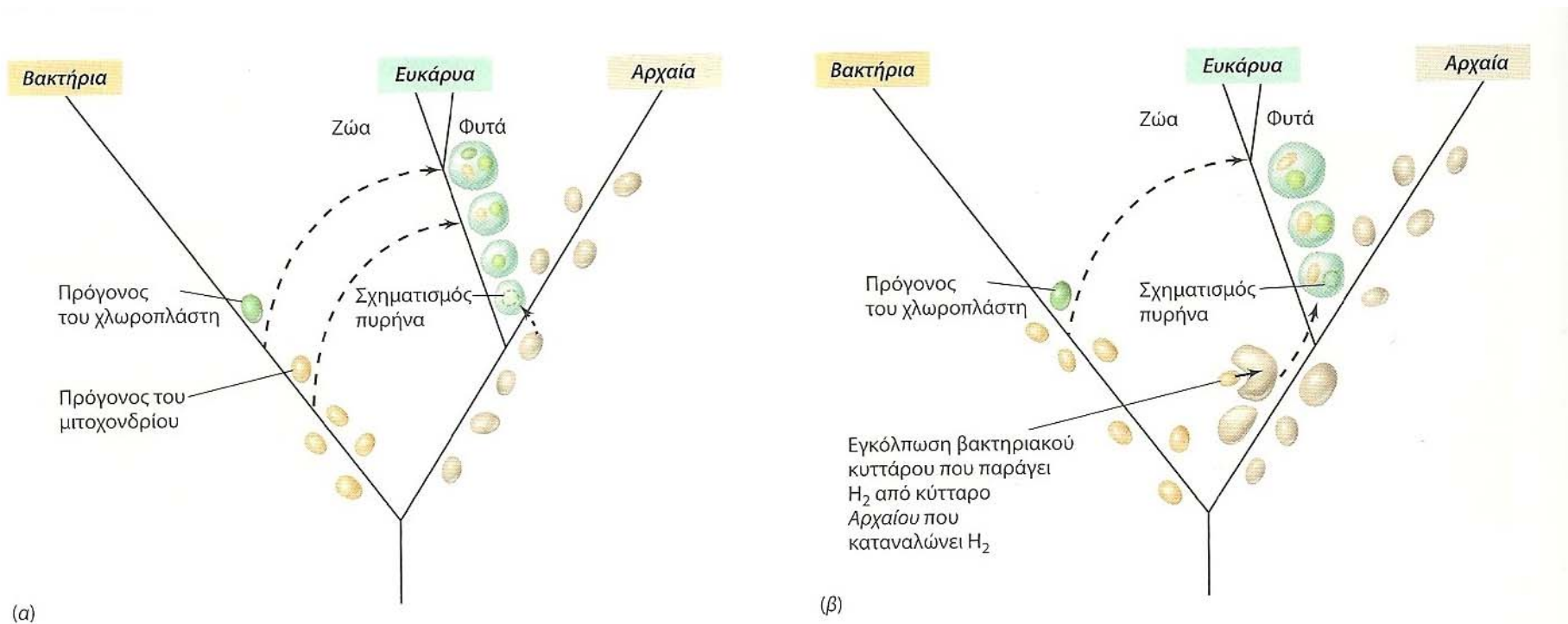
2. Ορισμένα ριβοσώματα των χλωροπλάστων και μιτοχονδρίων διαθέτουν αλληλουχίες RNA που χαρακτηρίζουν συγκεκριμένα βακτήρια, και η λειτουργία τους παρεμποδίζεται από τα ίδια αντιβιοτικά που επιδρούν στα ριβοσώματα αυτόνομων βακτηρίων, και

3. Τα μιτοχόνδρια και οι χλωροπλάστες περιέχουν μικρές ποσότητες κυκλικού DNA, χαρακτηριστικού των προκαρυωτών.



Σχ.151. Μοριακά χαρακτηριστικά των 3 χώρων. (α) Χαρακτηριστικά γονιδιώματος. (β) Χαρακτηριστικά μεταγραφής και μετάφρασης.

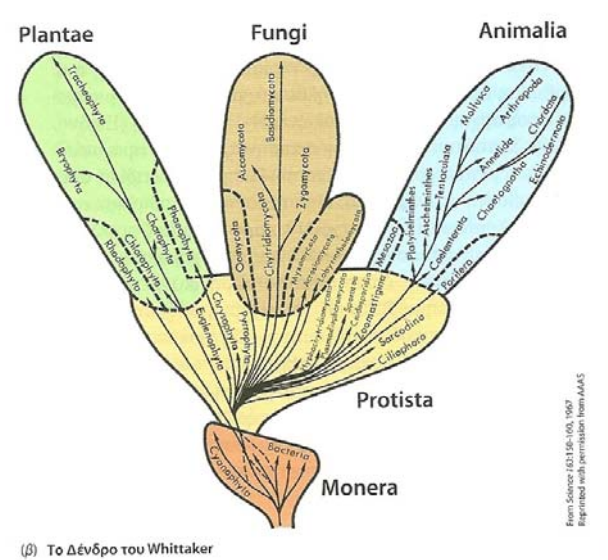
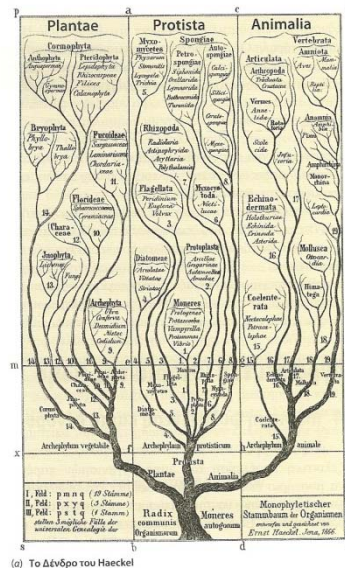
- Το σημερινό ευκαρυωτικό κύτταρο είναι μια γενετική χίμαιρα: αποτελείται από γονίδια βακτηρίων και αρχαίων.
- Δυο υποθέσεις έχουν προταθεί για τον σχηματισμό του ευκαρυωτικού κυττάρου (Σχήμα 152).



Σχ.152. Ενδοσυμβιωτικά μοντέλα προέλευσης ευκαρυωτικού κυττάρου. (α) Σειρά εμπύρηνων κυττάρων απέκλινε από τη γραμμή των αρχαίων. (β) Η υπόθεση του υδρογόνου.

Ζωντανά απολιθωματα: Το DNA καταγράφει την ιστορία της ζωής

- Το 1859 ο Δαρβίνος δημοσίευσε την **Καταγωγή των ειδών**.
- Το 1866 ο Ernest Haeckel υποστήριξε ότι οι μονοκύτταροι οργανισμοί (*Monera*) ήταν πρόγονοι άλλων μορφών ζωής.
- Το 1967 ο Robert Whittaker πρότεινε ένα σύστημα ταξινόμησης με 5 βασίλεια.



Σχ.153. Πρώιμες προσπάθειες απεικόνισης του οικουμενικού δέντρου της ζωής.
 (α) Το δέντρο της ζωής όπως δημοσιεύθηκε το 1866 από τον Ernest Haeckel.
 (β) Το δέντρο της ζωής όπως δημοσιεύθηκε το 1969 από τον Whittaker.

Νέες μέθοδοι ταξινόμησης: Εξελικτικά χρονόμετρα

Επιλέγοντας το σωστό χρονόμετρο

- Η **εξελικτική απόσταση** μεταξύ 2 οργανισμών μπορεί να υπολογισθεί από τις διαφορές στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων ή των αμινοξέων σε ομόλογα μακρομόρια.
- Πρέπει όμως να επιλεγούν τα κατάλληλα μόρια, τα οποία θα πρέπει:
 1. Να έχουν μια οικουμενική διασπορά στην ομάδα που θα μελετήσουμε,
 2. Να είναι λειτουργικώς ομόλογα σε κάθε μικροοργανισμό, δηλαδή οι φυλογενετικές συγκρίσεις πρέπει να βασίζονται σε μόρια με πανομοιότυπη λειτουργία,
 3. Να είναι δυνατή η επακριβής αντιστοίχιση των 2 μορίων, έτσι ώστε να αναγνωρίζονται περιοχές αλληλουχιών που είναι όμοιες και άλλες που διαφέρουν, και

4. Η αλληλουχία του επιλεγμένου μορίου να μεταβάλλεται με κατάλληλο ρυθμό για τη μετρούμενη εξελικτική απόσταση (οι πολλές αλλαγές καθιστούν δυσανάγνωστο το εξελικτικό αρχείο).

- Πολλά μόρια έχουν δοκιμαστεί ως μοριακά χρονόμετρα (κυτοχρώματα, φερρεδοξίνες, διάφορα γονίδια, ριβοσωματικά RNAs, κλπ).

- Σύμφωνα με τον Carl Woese (δεκαετία 1970), τα ριβοσωματικά RNAs αποτελούν εξαιρετικά μόρια για την εξακρίβωση σχέσεων μεταξύ οργανισμών, καθώς:

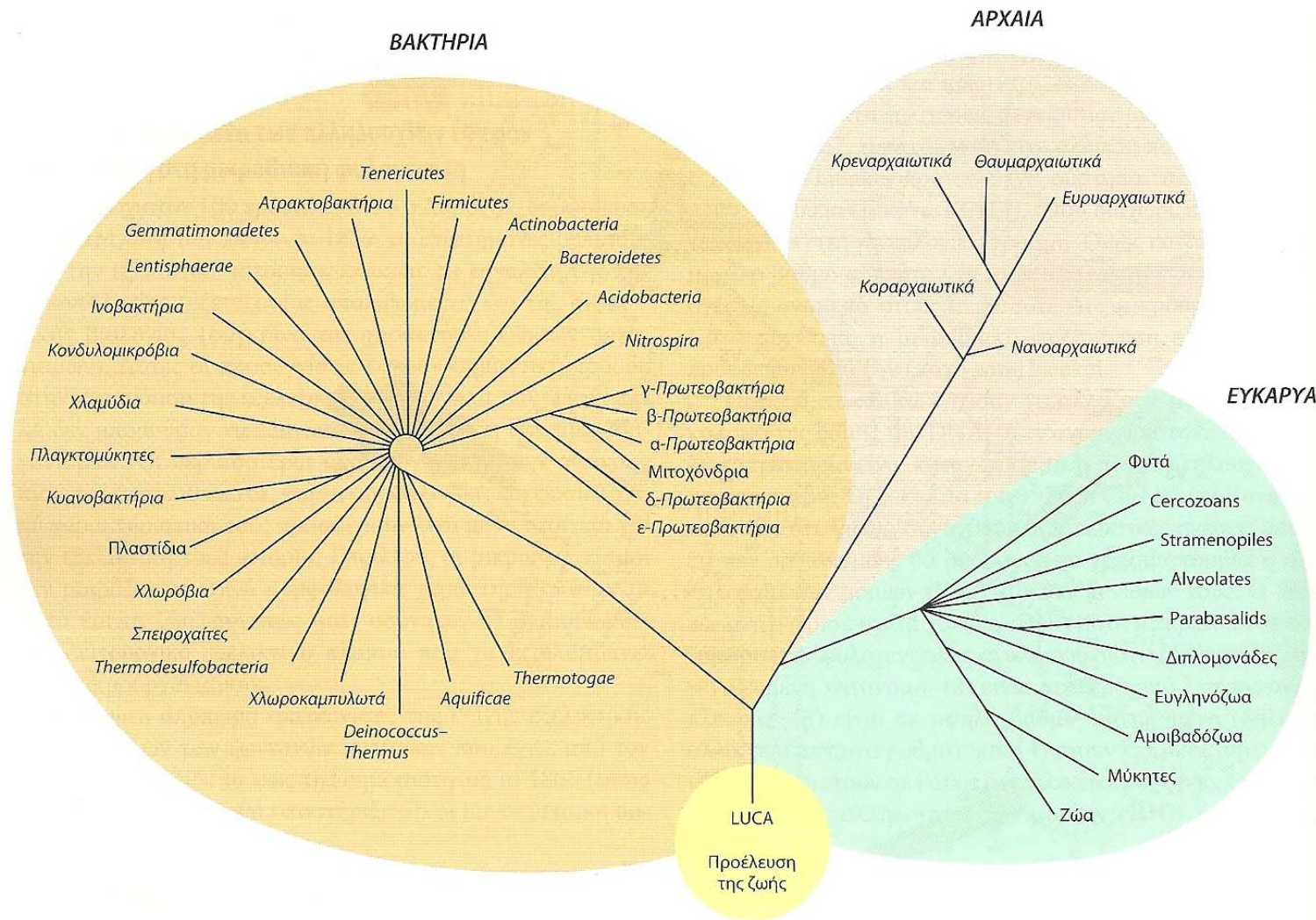
1. Έχουν σταθερή λειτουργικότητα,

2. Είναι οικουμενικώς κατανεμημένα,

3. Έχουν μετρίως διατηρημένη αλληλουχία σε ένα ευρύ φάσμα φυλογενετικών αποστάσεων, και

4. Έχουν επαρκές μήκος για να αναγνωριστούν οι εξελικτικές σχέσεις.

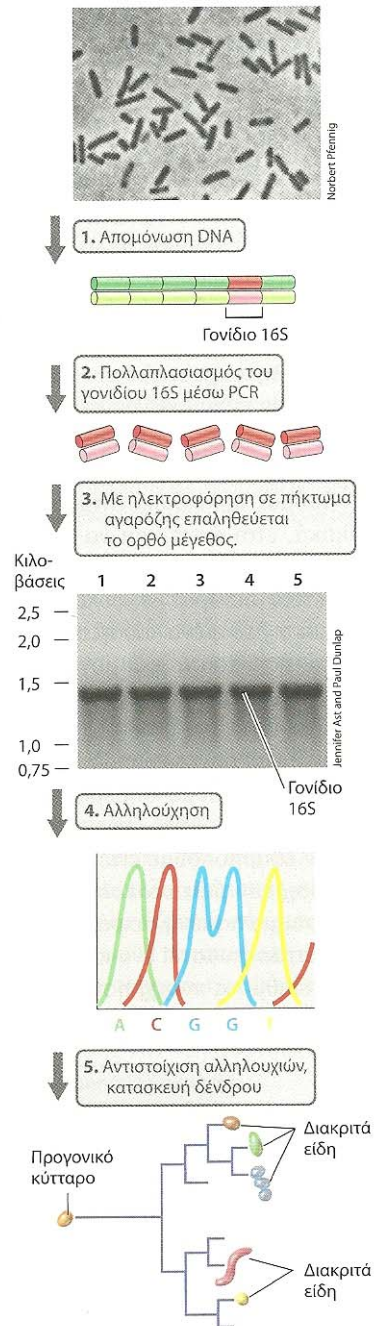
- Εφόσον ο αριθμός των διαφορετικών δυνατών αλληλουχιών σε μεγάλα μόρια, όπως στο rRNA, είναι τεράστιος, η ομοιότητα μεταξύ 2 αλληλουχιών αποτελεί ένδειξη φυλογενετικής σχέσης.
- Το 16S rRNA (18S για τα ευκαρυωτικά) περιέχει αρκετές περιοχές με εκτενώς συντηρημένες αλληλουχίες και επίσης χαρακτηρίζεται από σημαντική μεταβλητότητα σε άλλες περιοχές.
- Συνεπώς, έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα για την ανάλυση της φυλογένεσης.



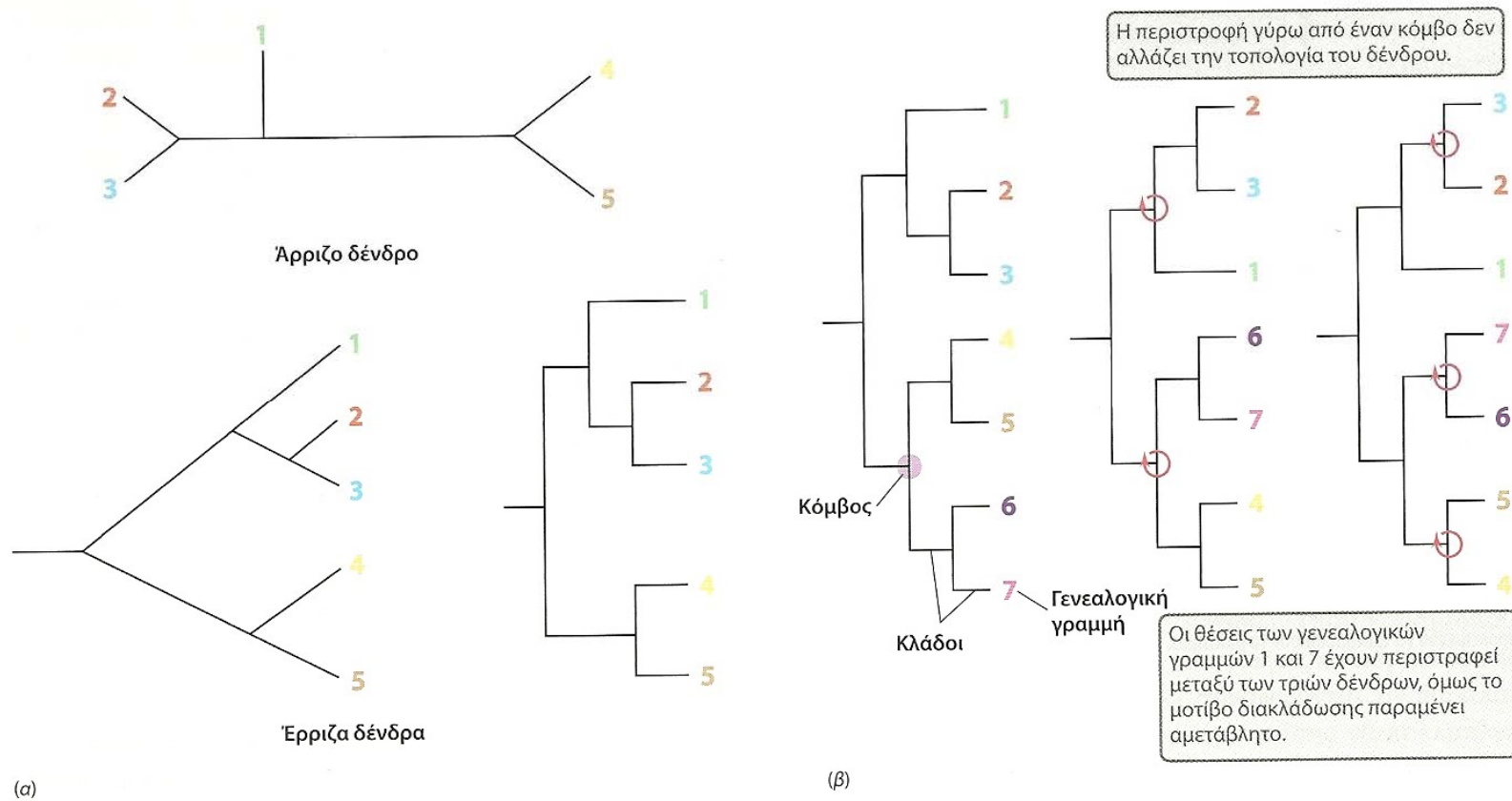
Σχ.154. Οικουμενικό φυλογενετικό δέντρο που βασίζεται στη συγκριτική ανάλυση αλληλουχιών γονιδίων SSU rRNA.

Μοριακή φυλογένεση: Αποκρυπτογραφώντας τις μοριακές αλληλουχίες

- Οι μέθοδοι για τον προσδιορισμό αλληλουχιών rRNAs είναι πλέον μέθοδοι ρουτίνας.
- Οι αλληλουχίες συγκρίνονται με τις υπάρχουσες στη βάση δεδομένων (Ribosomal Database Project-RDP).
- Για την ενίσχυση γονιδίων που κωδικοποιούν το rRNA χρησιμοποιείται η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR και στη συνέχεια προσδιορίζεται η αλληλουχία του προϊόντος PCR (αλληλούχιση κατά Sanger).
- Η παραπάνω μέθοδος είναι ταχεία και παρουσιάζει εξειδίκευση με τη χρήση εκκινητών PCR, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί προς τις διατηρημένες αλληλουχίες στα rRNAs.



Σχ.155. Προσδιορισμός αλληλουχίας rRNA με PCR.



Σχ.156. Φυλογενετικά δένδρα. (α) Παραδείγματα άρριζων και έρριζων φυλογενετικών δένδρων. (β) Ισοδύναμες εκδοχές του ίδιου φυλογενετικού δένδρου.

Φυλογενετικοί ανιχνευτές και FISH

- Οι ανιχνευτές μπορεί να είναι περισσότερο ή λιγότερο εξειδικευμένοι, π.χ. υπάρχουν «καθολικοί» ανιχνευτές που υβριδοποιούνται με αλληλουχίες rRNA οποιουδήποτε οργανισμού και ανιχνευτές κατάλληλης εξειδίκευσης που υβριδοποιούνται με rRNA συγκεκριμένων ειδών.
- Αν στον ανιχνευτή προσδεθεί μια φθορίζουσα χρωστική, η υβριδοποίηση των ανιχνευτών με κυτταρικά rRNAs μπορεί να παρατηρηθεί με μικροσκόπιο.
- Η επίδραση κατάλληλων αντιδραστηρίων στα κύτταρα καθιστά τις μεμβράνες διαπερατές και επιτρέπει τη διείσδυση του μίγματος ανιχνευτή/χρωστικής.
- Μετά την υβριδοποίηση του ανιχνευτή με το rRNA, τα κύτταρα φθορίζουν ομοιόμορφα και εξετάζονται με μικροσκόπιο φθορισμού (φθορίζουσα υβριδοποίηση *in situ*, **FISH**).
- Η τεχνολογία FISH χρησιμοποιείται ευρέως στην μικροβιακή οικολογία και στην κλινική διαγνωστική, παρακάμπτοντας την καλλιέργεια μικροοργανισμών στο εργαστήριο (άμεσα αποτελέσματα).

Χαρακτηριστικά των πρωταρχικών «χώρων» της ζωής

- Αν και οι πρωταρχικοί «χώροι» (βακτήρια, αρχαία και ευκάρυα) καθορίζονται κυρίως με βάση τις αλληλουχίες του rRNA, κάθε «χώρος» χαρακτηρίζεται από έναν αριθμό φαινοτυπικών ιδιοτήτων.
- Ορισμένα από τα χαρακτηριστικά είναι μοναδικά για έναν δεδομένο «χώρο», ενώ άλλα απαντούν σε δύο από τους τρεις «χώρους».

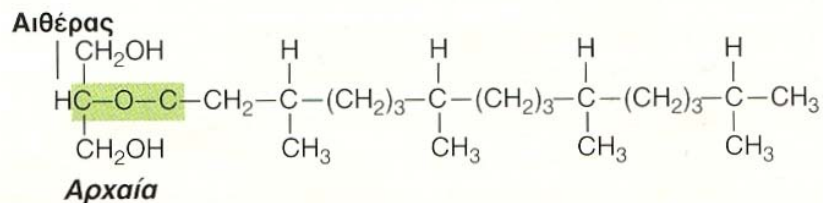
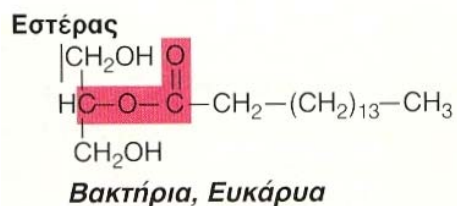
Κυτταρικά τοιχώματα

- Σχεδόν όλα τα βακτήρια έχουν κυτταρικά τοιχώματα που περιέχουν πεπτιδογλυκάνη (εξαιρέσεις είναι μέλη των *Planctomyces-Pirellula*, των οποίων τα κυτταρικά τοιχώματα αποτελούνται από πρωτεΐνη και μέλη των *Mycoplasma-Clamidia*, που στερούνται κυτταρικών τοιχωμάτων).

- Η πεπτιδογλυκάνη θεωρείται, συνεπώς, ως «μόριο-υπογραφή» για πολλά είδη βακτηρίων (ουσιαστικά ανιχνεύεται το μουραμικό οξύ που εμφανίζεται αποκλειστικά στην πεπτιδογλυκάνη).
- Τα αρχαία και τα ευκάρια στερούνται πεπτιδογλυκάνης.
- Στα αρχαία υπάρχουν διάφοροι τύποι κυτταρικών τοιχωμάτων, αποτελούμενοι από ψευδοπεπτιδογλυκάνη (ανάλογο της πεπτιδογλυκάνης), ενώ σε μερικά είδη τα τοιχώματα αποτελούνται από πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες.
- Στα ευκάρια, όταν υπάρχουν κυτταρικά τοιχώματα αποτελούνται συνήθως από κυτταρίνη ή χιτίνη.

Λιπίδια

- Τα λιπίδια των βακτηρίων και ευκαρύων αποτελούνται από λιπαρά οξέα συνδεδεμένα με εστερικό δεσμό με το μόριο γλυκερίνης.
- Αντιθέτως, στα λιπίδια των αρχαίων απαντώνται αιθερικοί δεσμοί.
- Στα βακτήρια και ευκάρυα, στα λιπίδια υπάρχουν λιπαρά οξέα με ευθείες αλυσίδες, ενώ στα αρχαία υδρογονάνθρακες με διακλαδισμένες αλυσίδες (φυτανύλια).
- Σε ορισμένα αρχαία, η μεμβρανική δομή των λιπιδίων είναι μονοστοιβάδα, αντί διπλοστοιβάδας.



Σχ.157. Λιπίδια στα βακτήρια, αρχαία και ευκάρυα.

RNA πολυμεράση

- Τα βακτήρια περιέχουν έναν απλό τύπο RNA πολυμεράσης με απλή τεταρτοταγή δομή ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$), ενώ οι RNA πολυμεράσες των αρχαίων είναι πιο πολύπλοκες, μοιάζοντας με αυτές των ευκαρύων.

Χαρακτηριστικά της πρωτεϊνοσύνθεσης

- Αν και τα ριβοσώματα των βακτηρίων και των αρχαίων έχουν το ίδιο μέγεθος (70S σε σχέση με το μέγεθος των ριβοσωμάτων των ευκαρύων 80S), αρκετά βήματα στην πρωτεϊνοσύνθεση των αρχαίων μοιάζουν περισσότερο με αυτά των ευκαρύων.
- Στα βακτήρια, το κωδικόνιο έναρξης (AUG) ενσωματώνει φορμυλομεθειονίνη, ενώ αντίθετα στα αρχαία και τα ευκάρυα μεθειονίνη (μη τροποποιημένη).

- Τα περισσότερα αντιβιοτικά που αναστέλλουν την πρωτεϊνοσύνθεση των βακτηρίων, δεν επιδρούν στην πρωτεϊνοσύνθεση των αρχαίων ή ευκαρύων.
- Οι ριβοσωματικές πρωτεΐνες των αρχαίων και ευκαρύων μοιάζουν περισσότερο μεταξύ τους από λειτουργική άποψη, σε σχέση με αυτές των βακτηρίων.

Άλλα χαρακτηριστικά

- Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός χαρακτηριστικών που μπορεί να χρησιμεύσει για τη διαφοροποίηση των οργανισμών σε επίπεδο «χώρων».

Μικροβιακή συστηματική

- **Συστηματική** είναι η μελέτη της ποικιλότητας των οργανισμών και των σχέσεών τους.
- **Ταξινόμια** είναι η επιστήμη που χαρακτηρίζει, ονομάζει και κατηγοριοποιεί τους οργανισμούς σύμφωνα με καθορισμένα κριτήρια.
- Η βακτηριακή ταξινόμια χρησιμοποιεί συνδυασμό μεθόδων (φαινοτυπικές, γονοτυπικές και φυλογενετικές αναλύσεις) (**πολυφασική ταξινόμια**).

Η έννοια των ειδών

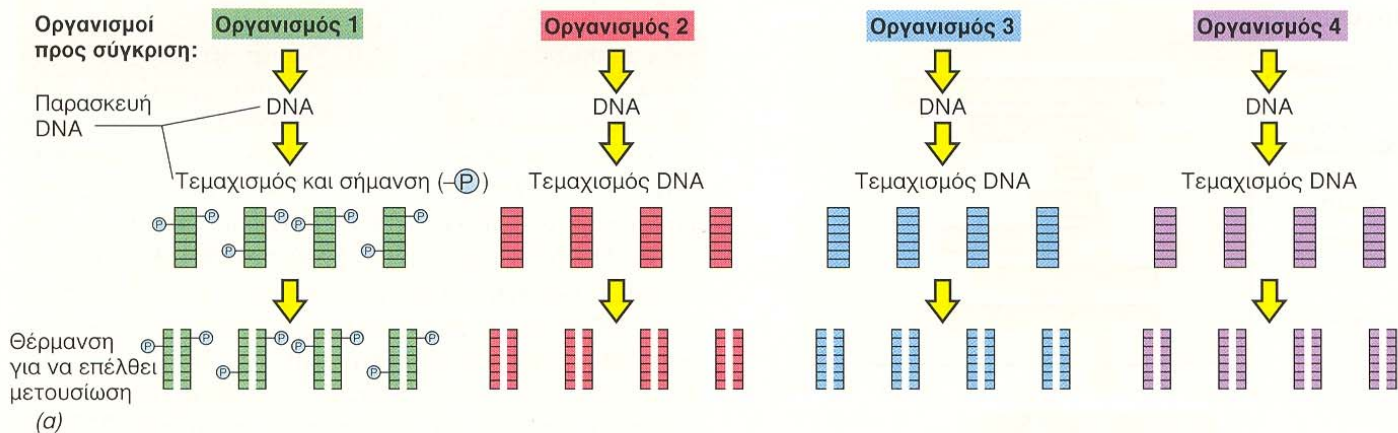
- Στον κόσμο των φυτών και των ζώων, **είδος** θεωρείται ένας πληθυσμός από άτομα που μπορούν να διασταυρωθούν υπό φυσιολογικές συνθήκες και να παράγουν γόνιμους απογόνους.
- Ο πληθυσμός αυτός πρέπει να είναι απομονωμένος ως προς την δυνατότητα αναπαραγωγής από άλλους πληθυσμούς.

Η έννοια των ειδών στην μικροβιολογία

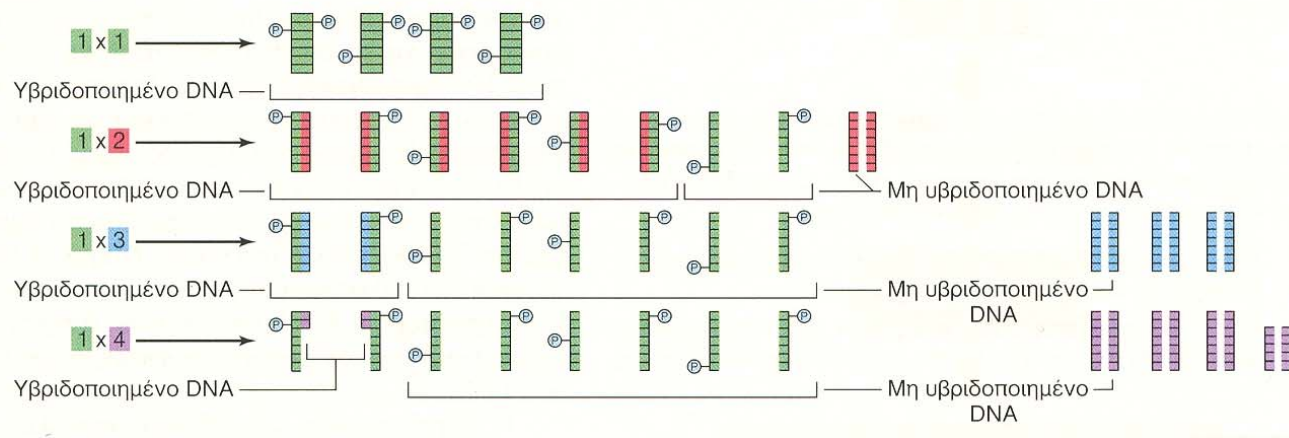
- Καθώς οι προκαρυώτες είναι απλοειδείς οργανισμοί που αναπαράγονται αφυλετικά, η έννοια «παράγουν γόνιμους απογόνους» δεν έχει νόημα.
- Από **ταξινομική σκοπιά**, όλα τα μέλη ενός είδους θα πρέπει να είναι γενετικά και φυλογενετικά ομοιογενή και τα χαρακτηριστικά τους να είναι διακριτά από αυτά που περιγράφονται σε άλλα είδη.
- Επιπλέον, ένα είδος θα πρέπει να είναι μονοφυλετικό, δηλαδή όλα τα στελέχη θα πρέπει να μοιράζονται έναν κοινό πρόγονο.
- Η **φυλογενετική έννοια** του είδους ορίζει ένα μικροβιακό είδος ως μια ομάδα στελεχών που μοιράζονται ορισμένα διαγνωστικά χαρακτηριστικά, είναι γενετικά ομοιογενή και έχουν ένα μοναδικό πρόσφατο κοινό πρόγονο.

Υβριδοποίηση DNA:DNA

- Οι αλληλουχίες έχουν μεγάλη σημασία, γιατί αν δύο οργανισμοί έχουν τις ίδιες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων, τότε είναι πιθανόν να περιέχουν παραπλήσια, αν όχι πανομοιότυπα γονίδια.
- Η γονιδιωματική υβριδοποίηση μετρά τον βαθμό ομοιότητας αλληλουχιών και είναι χρήσιμη για τη διάκριση οργανισμών με στενή συγγένεια μεταξύ τους.
- Στην πράξη, μόριο DNA-ανιχνευτής που απομονώθηκε από κάποιον οργανισμό ιχνηθετείται με φθορίζουσα ή ραδιενεργό σήμανση (π.χ. ^{32}P ή $^3\text{H}_2$), τεμαχίζεται σε μικρά κομμάτια και μετουσιώνεται με θέρμανση.
- Κατόπιν, ο ανιχνευτής προστίθεται σε μονόκλωνο και τεμαχισμένο DNA-στόχο που έχει απομονωθεί από άλλο μικροοργανισμό και το μίγμα ψύχεται (επανασύζευξη των DNA κλώνων).
- Στη συνέχεια, προσδιορίζεται το ποσοστό του ανιχνευτή που υβριδοποιήθηκε με τον στόχο σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (θεωρείται ως 100%).



Πείραμα υβριδοποίησης: Ανάμειξη DNA από δύο οργανισμούς – μη ιχνηθετημένο DNA προστίθεται σε περίσσεια:



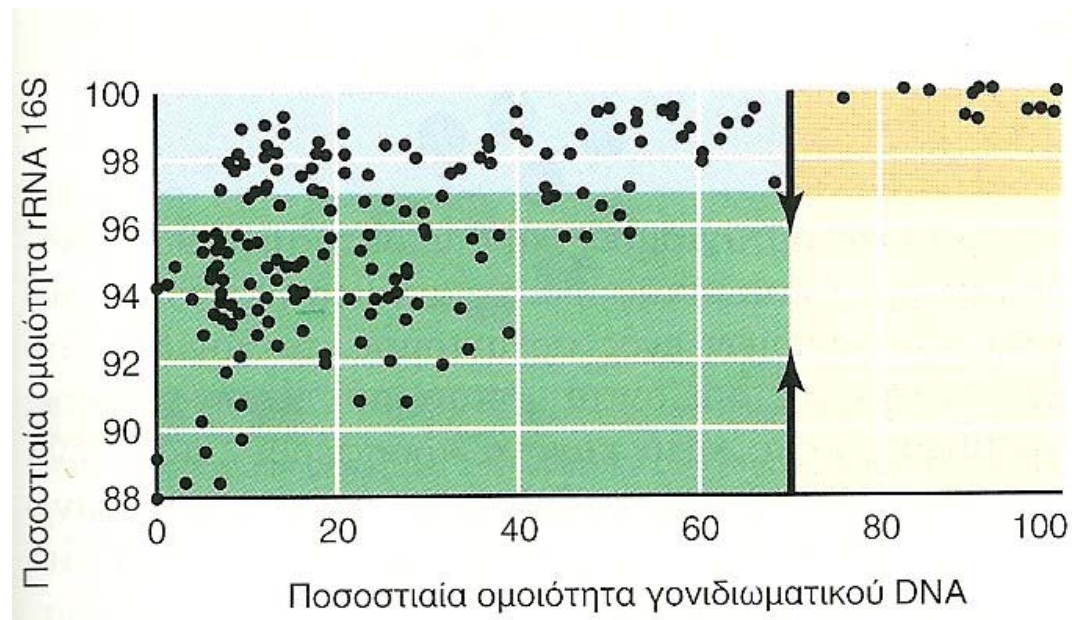
Αποτελέσματα και ερμηνεία:



Σχ.158. Η γονιδιωματική υβριδοποίηση ως ταξινομικό εργαλείο.

- Αν και δεν υπάρχει καμία, κατά σύμβαση, αποδεκτή τιμή βαθμού υβριδοποίησης μορίων DNA για να τοποθετηθούν στην ίδια ταξινομική βαθμίδα, για να θεωρηθούν 2 οργανισμοί ως ίδια είδη, συνίσταται τιμή υβριδοποίησης 70% τουλάχιστον και 25-30% για το ίδιο γένος.
- Υβριδοποίηση εντελώς άσχετων οργανισμών είναι <10%.
- Επίσης, ισχύει ότι ένας προκαρυώτης του οποίου η αλληλουχία rRNA 16S διαφέρει τουλάχιστον κατά 3% από εκείνη άλλων μικροοργανισμών θα πρέπει να θεωρείται ως νέο είδος.
- Η παραπάνω πρόταση στηρίζεται από την παρατήρηση ότι DNA από 2 βακτήρια των οποίων οι αλληλουχίες των rRNA 16S είναι όμοιες σε ποσοστό <97%, κατά κανόνα υβριδοποιούνται σε ποσοστό <70% (ελάχιστη τιμή ένδειξης ότι οι 2 μικροοργανισμοί ανήκουν στο ίδιο είδος).

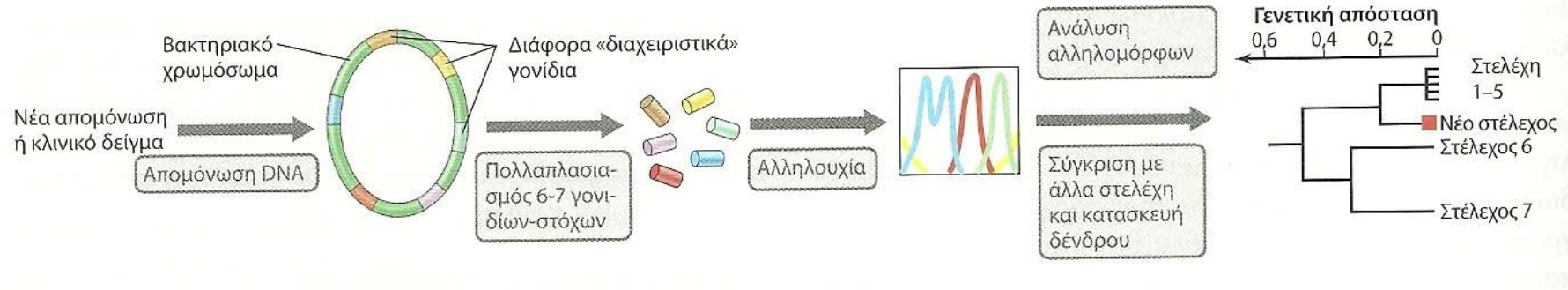
- Ωστόσο, κάποιοι μικροοργανισμοί με παραπλήσιες αλληλουχίες rRNA έχουν γονιδιώματα αρκετά διαφορετικά μεταξύ τους.
- Κατά συνέπεια, διάφορα νέα είδη δεν θα γίνονταν αντιληπτά αν στηριζόμασταν αποκλειστικά στην αλληλουχία rRNA SSU.
- Επομένως, σε επίπεδο ειδών είναι συχνά απαραίτητη η πολυφασική ταξινόμια.
- Για ταξινόμηση σε ανώτερο όμως επίπεδο, ο προσδιορισμός της αλληλουχίας rRNA είναι συνήθως αρκετός.



Σχ.159. Συσχετισμός μεταξύ ομοιότητας αλληλουχιών rRNA 16S και υβριδοποίησης γονιδιωματικού DNA σε διάφορα ζεύγη οργανισμών.

Ταξινομικές μέθοδοι

Προσδιορισμός αλληλουχίας πολυγενετικού τύπου

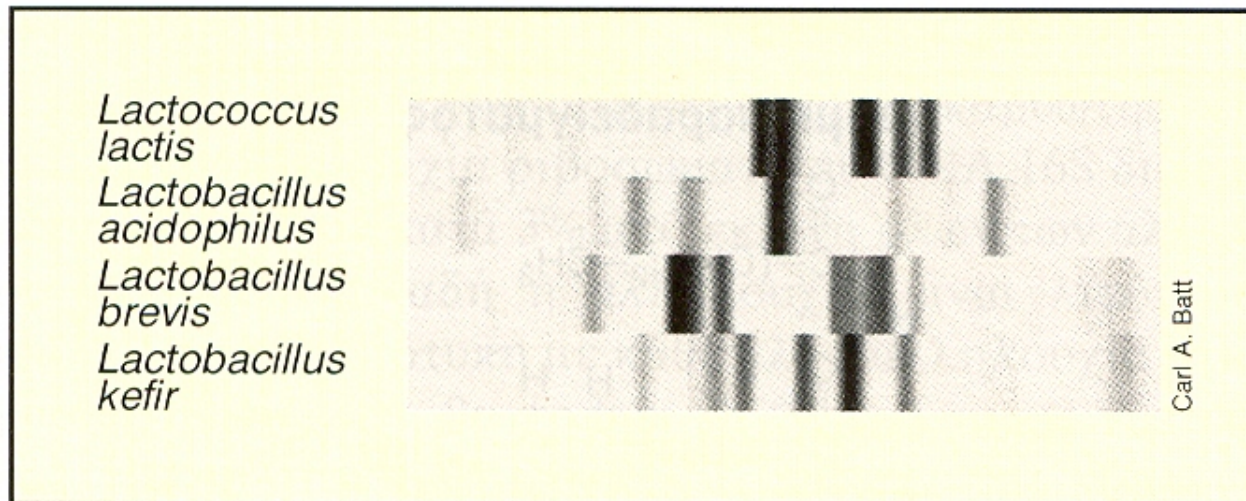


Σχ.160. Προσδιορισμός αλληλουχίας πολυγενετικού τύπου.

Καθορισμός ριβοτύπου

- Ο **καθορισμός ριβοτύπου** στηρίζεται σε αναλύσεις rRNA, αλλά δεν περιλαμβάνει προσδιορισμό αλληλουχιών.
- Βασίζεται στο πρότυπο ζωνών ηλεκτροφόρησης, όταν DNA ενός συγκεκριμένου οργανισμού υφίσταται τη δράση περιοριστικών ενζύμων.
- Τα θραύσματα διαχωρίζονται και υβριδοποιούνται με ανιχνευτή rRNA (μοριακό δακτυλικό αποτύπωμα).
- Μεγάλη ποσότητα DNA ή DNA που κωδικοποιεί rRNA 16S και τα σχετικά με αυτό γονίδια στο οπερόνιο rRNA, το οποίο ενισχύεται με PCR, υφίσταται πέψη με ένα ή περισσότερα ένζυμα περιορισμού και τα προϊόντα της πέψης υβριδοποιούνται με ειδικό ανιχνευτή, αφού πρώτα διαχωριστούν με ηλεκτροφόρηση.

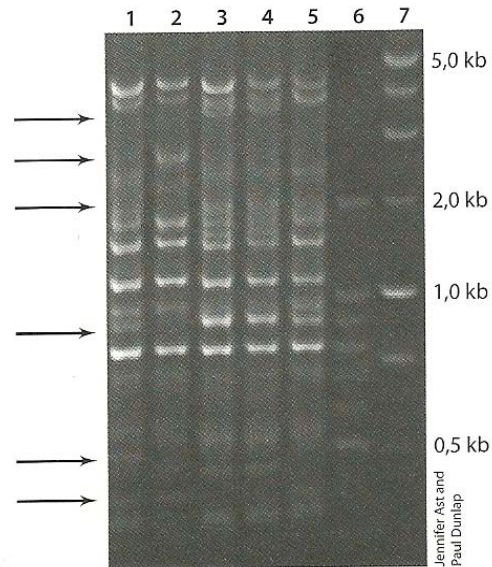
- Στη συνέχεια, η εικόνα που σχηματίζουν τα θραύσματα DNA στα πηκτώματα συγκρίνεται με αντίστοιχους τύπους πέψης από οργανισμούς αναφοράς σε μια βάση δεδομένων.
- Επειδή οι διαφορές στις αλληλουχίες rRNA μεταξύ δύο οργανισμών μεταφράζονται σε παρουσία ή απουσία σημείων δράσης των ενζύμων περιορισμού, το συνολικό πρότυπο των θραυσμάτων δεδομένου βακτηριακού είδους είναι μοναδικό για το είδος αυτό.
- Ο καθορισμός ριβοτύπου είναι μια γρήγορη (καθώς δεν απαιτείται καθορισμός αλληλουχιών) και εξειδικευμένη μέθοδος.



Σχ.161. Καθορισμός ριβοτύπου.

rep-PCR

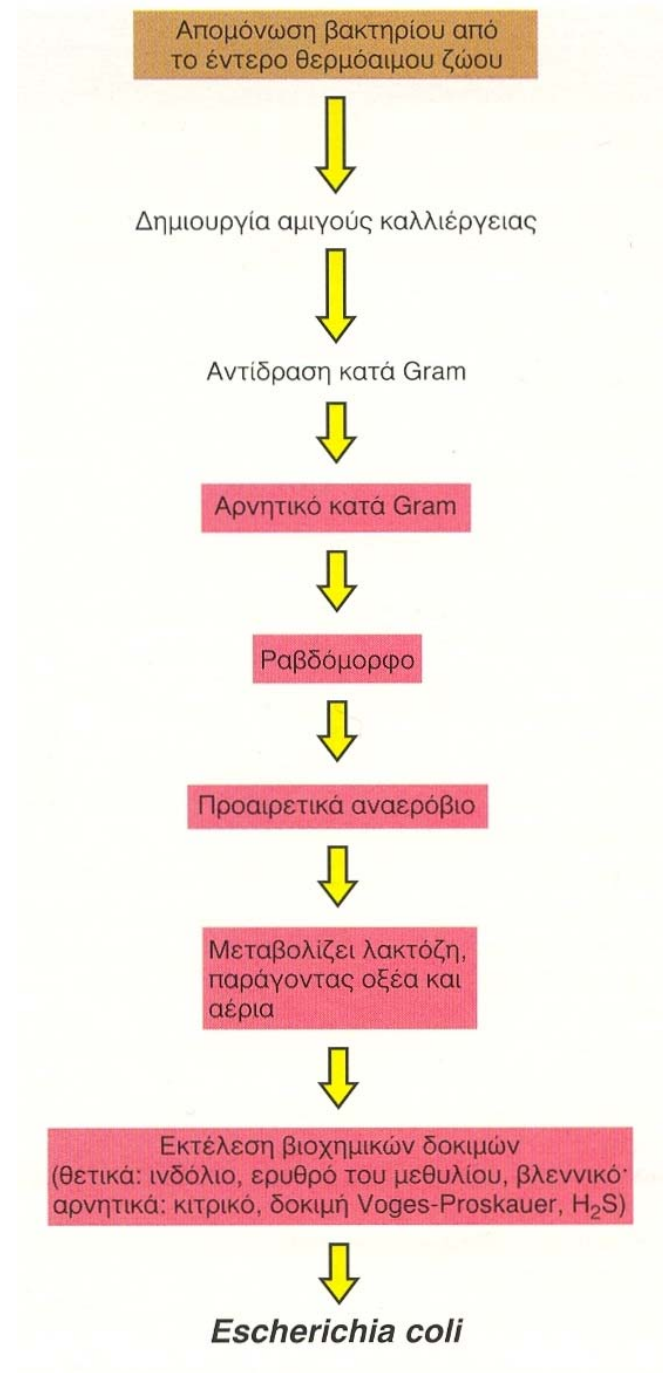
- Βασίζεται στην παρουσία υψηλά συντηρημένων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA.
- Σχεδιάζονται εκκινητές συμπληρωματικοί προς τις συγκεκριμένες αλληλουχίες και πολλαπλασιάζονται τμήματα του γονιδιώματος μέσω PCR, τα οποία διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση.



Σχ.162. Αποτύπωση DNA με rep-PCR.

Φαινοτυπικές αναλύσεις

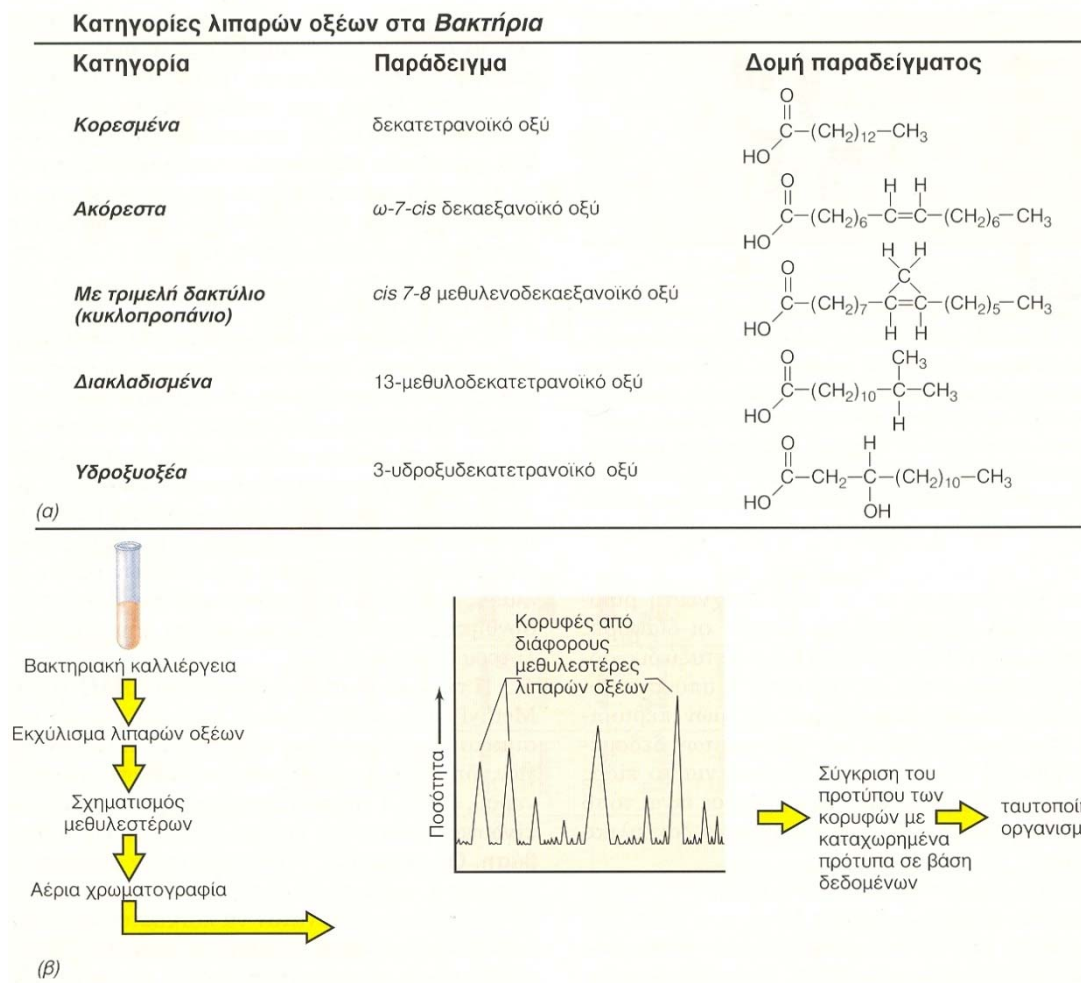
Σχ.163. Παράδειγμα φαινοτυπικής ταυτοποίησης μικροοργανισμού.



Ανάλυση λιπαρών οξέων: FAME

- Μια άλλη μέθοδος ταυτοποίησης βακτηρίων στηρίζεται στον χαρακτηρισμό των τύπων και των αναλογιών λιπαρών οξέων στα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών.
- Δεδομένου ότι η σύνθεση των λιπαρών οξέων στους προκαρυώτες μπορεί να ποικίλλει σημαντικά (διαφορές στο μήκος της αλυσίδας και την παρουσία ή απουσία ακόρεστων ομάδων, διακλαδισμένων αλυσίδων, υδροξυλομάδων, κλπ), το συνολικό πρότυπο λιπαρών οξέων έχει διαγνωστική χρησιμότητα.
- Στην πράξη, τα λιπαρά οξέα που απομονώνονται από κύτταρα που έχουν καλλιεργηθεί σε πρότυπες συνθήκες μετατρέπονται σε μεθυλεστέρες, οι οποίοι ανιχνεύονται με αέρια χρωματογραφία.
- Το χρωματογράφημα που λαμβάνεται συγκρίνεται με βάση δεδομένων, η οποία περιέχει τα πρότυπα των λιπαρών οξέων χιλιάδων βακτηρίων που έχουν καλλιεργηθεί στις ίδιες συνθήκες.

- Οι αναλύσεις FAME απαιτούν αυστηρή προτυποποίηση, αφού η σύνθεση των λιπαρών οξέων ενός οργανισμού ποικίλλει με τη θερμοκρασία, τη φάση ανάπτυξης (εκθετική ή στάσιμη), και σε μικρότερο βαθμό, το υγρό καλλιέργειας.



Σχ.164. Ανάλυση FAME για την ταυτοποίηση βακτηρίων.

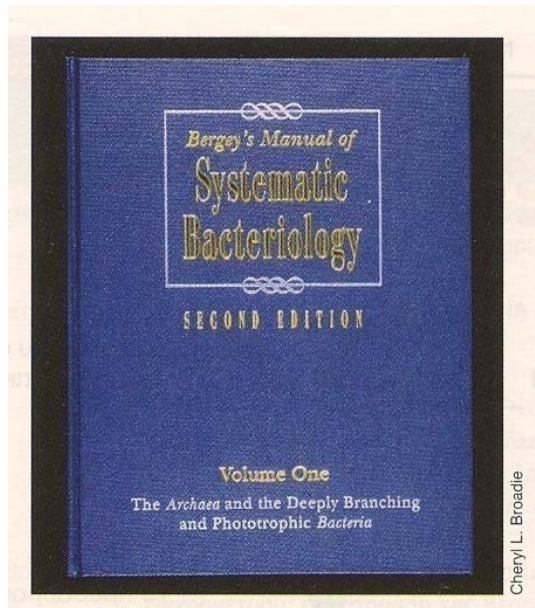
Ταξινόμηση και ονοματολογία

- Ένα είδος συνήθως ορίζεται από χαρακτηριστικά αρκετών στελεχών.
- Ομάδες ειδών ομαδοποιούνται σε **γένη**.
- Με βάση τα μοριακά κριτήρια, διαφορές >5-7% στην αλληλουχία rRNA 16S υποδεικνύουν ένα νέο γένος.
- Ομάδες από γένη ομαδοποιούνται σε **οικογένειες**, ομάδες οικογενειών σε **τάξεις**, κλπ.
- Έτσι έχουμε: **είδος, γένος, οικογένεια, τάξη, ομοιοταξία, φύλο, «χώρος»**.
- Κατά την ταυτοποίηση ενός άγνωστου οργανισμού, είναι απαραίτητο ο οργανισμός να ικανοποιεί όλα τα ταξινομικά κριτήρια των διάφορων επιπέδων, π.χ. όλα τα είδη του γένους *Allochromatium* πρέπει να είναι ραβδόμορφα, πορφυρά, Gram (-) θειοβακτήρια.
- Με άλλα λόγια, όσο «κατεβαίνουμε» από τον «χώρο» στο είδος, τα κριτήρια γίνονται λιγότερο γενικά και περισσότερο εξειδικευμένα.

- Ακολουθώντας το **διωνυμικό σύστημα** (*Carl Linnaeus*), οι μικροοργανισμοί έχουν επίθετα είδους και γένους.
- Τα ονόματα είναι συνήθως λατινικά ή εκλατινισμένα ελληνικά (*Bacillus subtilis*, *B. cereus*, κλπ), περιγράφοντας κάποια ιδιότητά τους.
- Όταν ένας μικροοργανισμός απομονώνεται και θεωρείται ως μοναδικός, πρέπει να ληφθεί μια απόφαση για το αν είναι αρκούντως διαφορετικός από άλλα είδη, ώστε να περιγραφεί ως νέος ή ίσως ακόμη και ως νέο γένος (οπότε αυτόματα γενάται και νέο είδος).
- Η Διεθνής Επιτροπή Συστηματικής των Προκαρυωτών (*International Committee on the Systematics of Prokaryotes, ICSP*) επιβλέπει την ονοματολογία και την ταξινόμια των βακτηρίων και αρχαίων.

- Για να αποκτήσει επίσημη ταξινόμική υπόσταση το νέο γένος ή είδος, δημοσιεύεται μια λεπτομερής περιγραφή του απομονωμένου μικροοργανισμού, καθώς και η προτεινόμενη ονομασία του, ενώ μια βιώσιμη καλλιέργειά του κατατίθεται σε τουλάχιστον 2 συλλογές καλλιεργειών [π.χ. ATCC (American Type Culture Collection), DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), κλπ].
- Οι συλλογές διατηρούνται υπό κατάψυξη (-80 έως -196°C) ή σε λυοφιλιωμένη μορφή.
- Αν η περιγραφή ενός μικροοργανισμού δημοσιευθεί σε άλλο περιοδικό εκτός από το *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM)* της επίσημης έκδοσης του αρχείου για την ταξινόμια και την κατάταξη των προκαρυωτών και ζυμομυκήτων, τότε ένα αντίγραφο του δημοσιευμένου άρθρου πρέπει να υποβληθεί σε αυτό το περιοδικό και η ονομασία να επικυρωθεί πριν γίνει δεκτή ως νέα μικροβιολογική ταξινόμική μονάδα.
- Αν και καμία πηγή δεν αναγνωρίζεται ως επίσημη στο πεδίο της μικροβιακής ταξινόμιας, το **Εγχειρίδιο Συστηματικής Βακτηριολογίας του *Bergey*** αποτελεί αναφορά πρώτης επιλογής.

- Το **Εγχειρίδιο Συστηματικής Βακτηριολογίας του *Bergey*** είναι ένας κατάλογος πρότυπων και μοριακών πληροφοριών για όλα τα αναγνωρισμένα είδη προκαρυωτών κατά τον χρόνο δημοσίευσής του.
- Ένα δεύτερο έργο αναφοράς είναι μια πολύτομη εργασία με το όνομα ***The Prokaryotes***.
- Συλλογικά, το **Εγχειρίδιο Συστηματικής Βακτηριολογίας του *Bergey*** και το ***The Prokaryotes*** προσφέρουν θεμελιώδεις πληροφορίες της μικροβιακής φυλογενετικής και ταξινομίας.



Σχ.165. Η δεύτερη έκδοση του Εγχειριδίου Συστηματικής Βακτηριολογίας του *Bergey*.