

Microbial flora, probiotics, *Bacillus subtilis* and the search for a long and healthy human longevity

Facundo Rodriguez Ayala, Carlos Bauman, Sebastián Cogliati, Cecilia Leñini, Marco Bartolini and Roberto Grau*

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario. CONICET – Rosario. Argentina.

* Corresponding Author:

Roberto Grau, E-mail: robertograu@fulbrightmail.org

- Yogures deshidratados - Leche en polvo
- Yerba mate - Café - Té
- Sopas instantáneas Frutas
- Pastas - Helados
- Bebidas - Chocolates
- Galletitas Cereales
- Aguas
- Etc. Etc. Etc.



Efectos perjudiciales de las bacterias: patógenos bacterianos transmitidos por contagio o por los alimentos y bebidas



Dr. Roberto Ricardo Grau

**Universidad Nacional de Rosario (UNR)
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
(FCByF)**

CONICET – Rosario

www.microbiologiarosario.org



6 de Noviembre de 2017

LOS CUATRO JINETES DEL APOCALIPSIS:

- 1- LA MUERTE
- 2- LA GUERRA
- 3- EL HAMBRE
- 4- LA PESTE

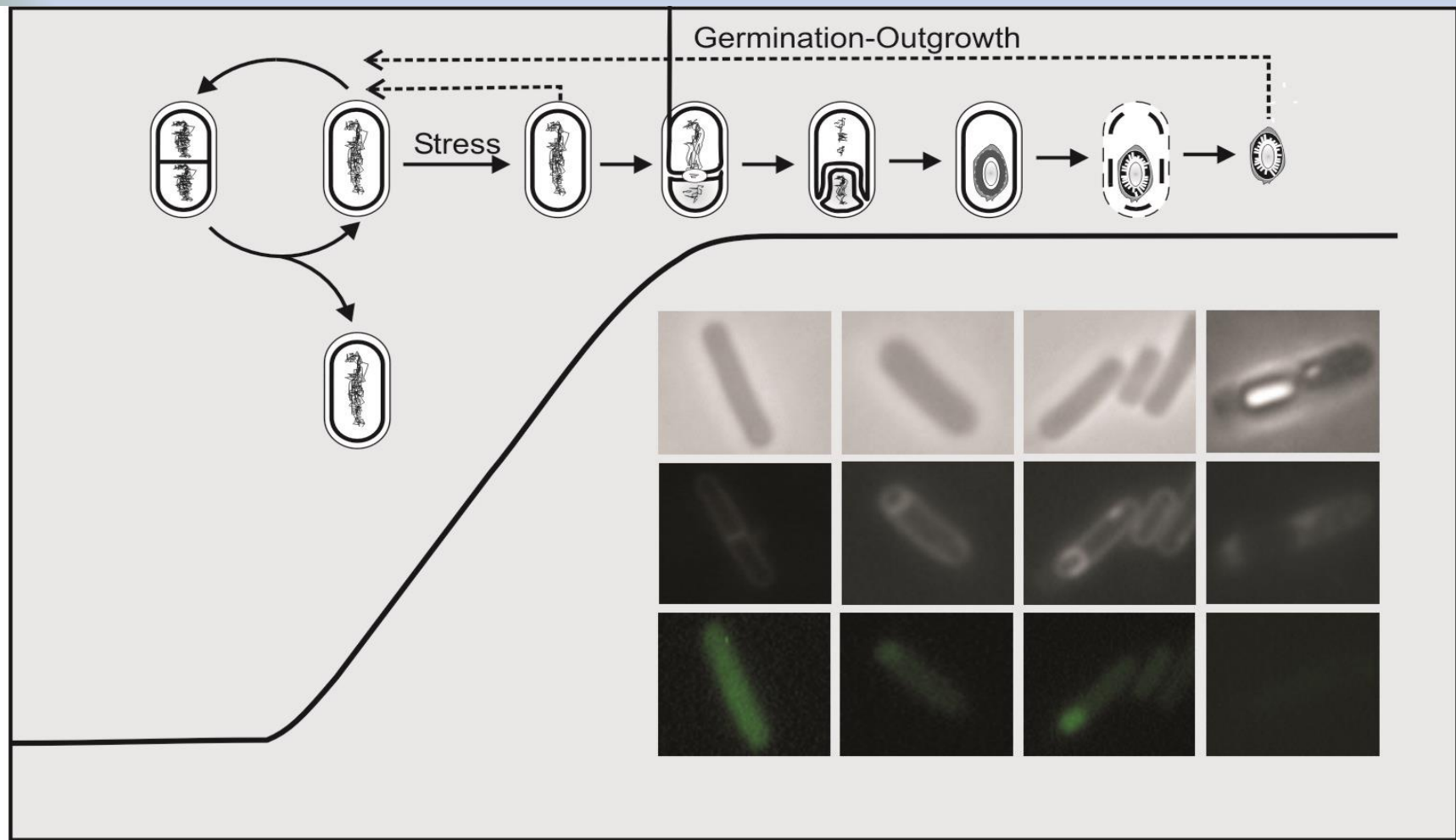
Alberto Durero 1498



1. LOS CUATRO JINETES DEL APOCALIPSIS: la Peste, la Guerra, el Hambre y la Muerte. Alberto Durero talló en 1498 este grabado en madera, que muestra a la humanidad subyu-

gada por estos azotes implacables. La peste negra que barrió Europa en el siglo XIV quedó en la memoria colectiva como una de las peores mortandades de la época.

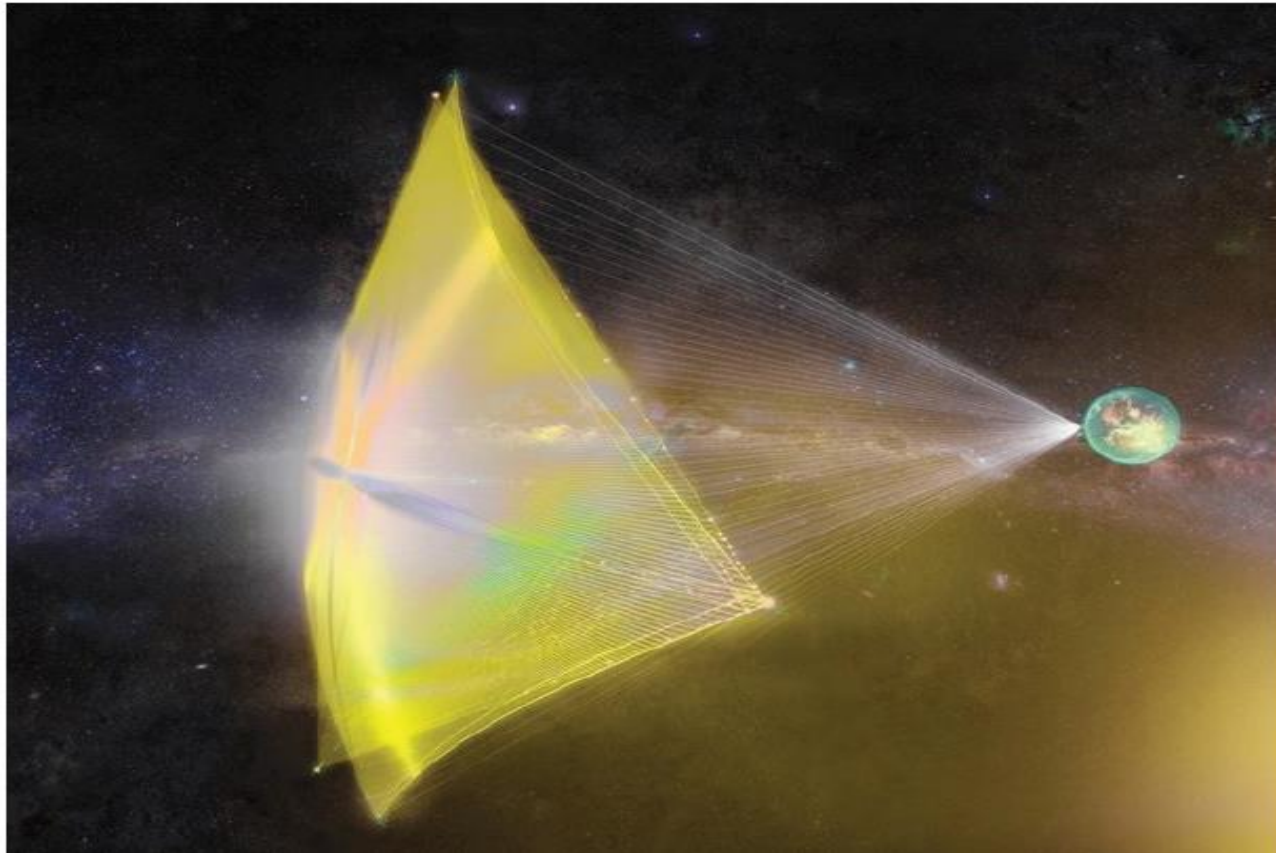
Growth



Time



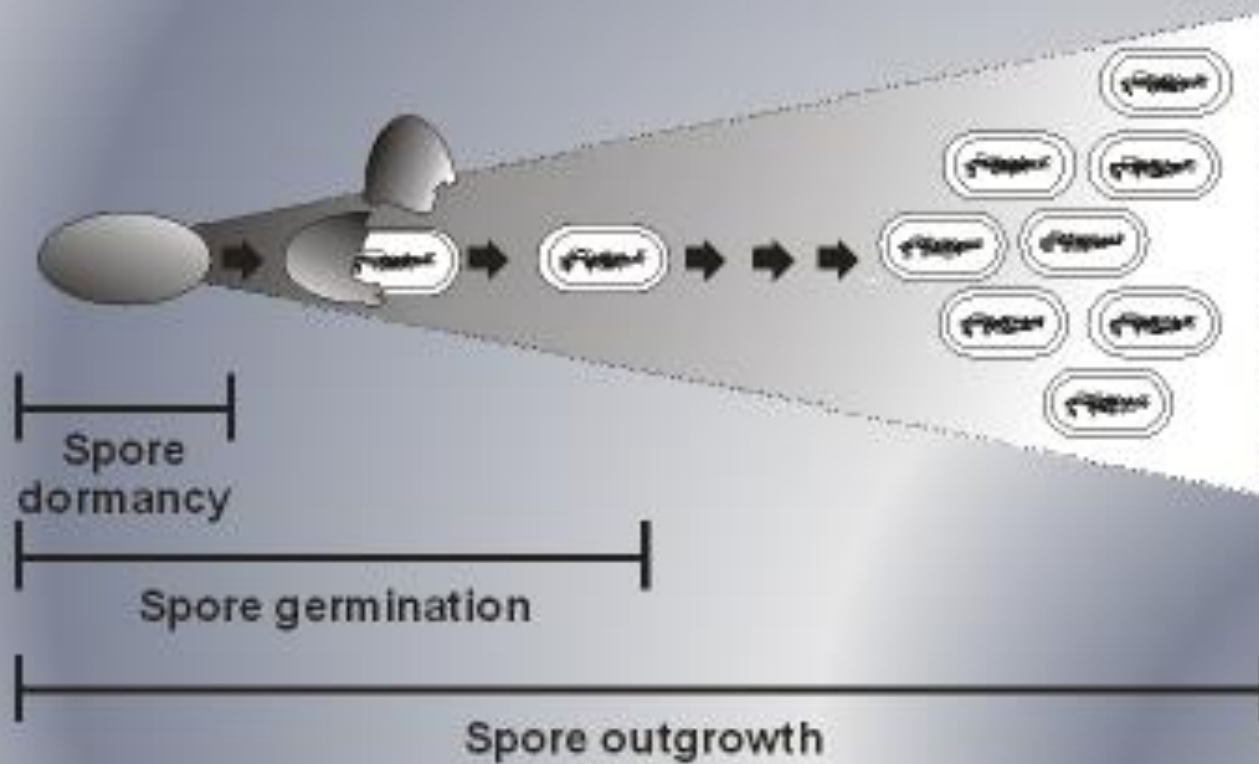
Se estudia enviar bacterias a las estrellas para probar la panspermia



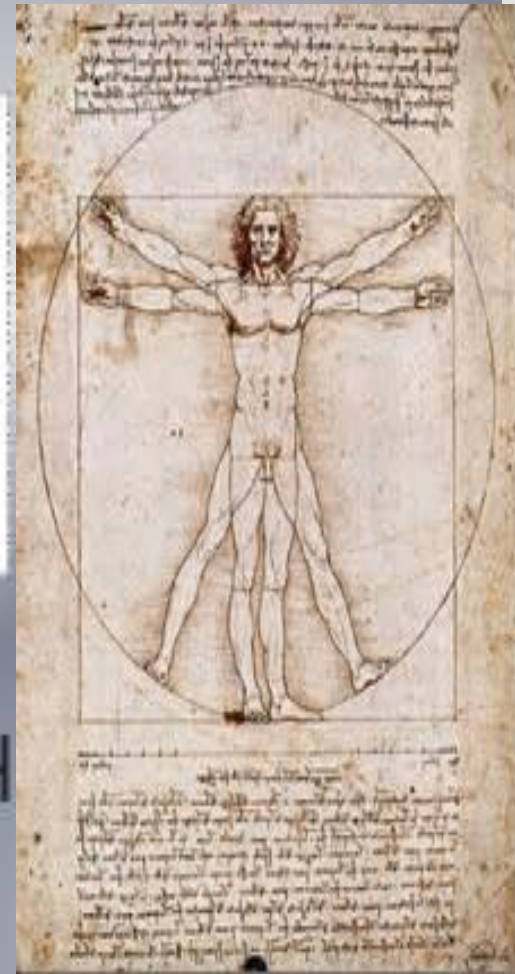
Así lo ha asegurado el físico de la Universidad de Hawai Jeff Kuhn, asesor de [Breakthrough Starshot](#), iniciativa que trabaja en desarrollar tecnología para acelerar pequeñas naves espaciales a vela hasta un 20 por ciento de la velocidad de la luz, usando potentes láseres. Su destino sería el planeta Proxima b, tras un viaje de 20 años. (4×10^{13}) Km

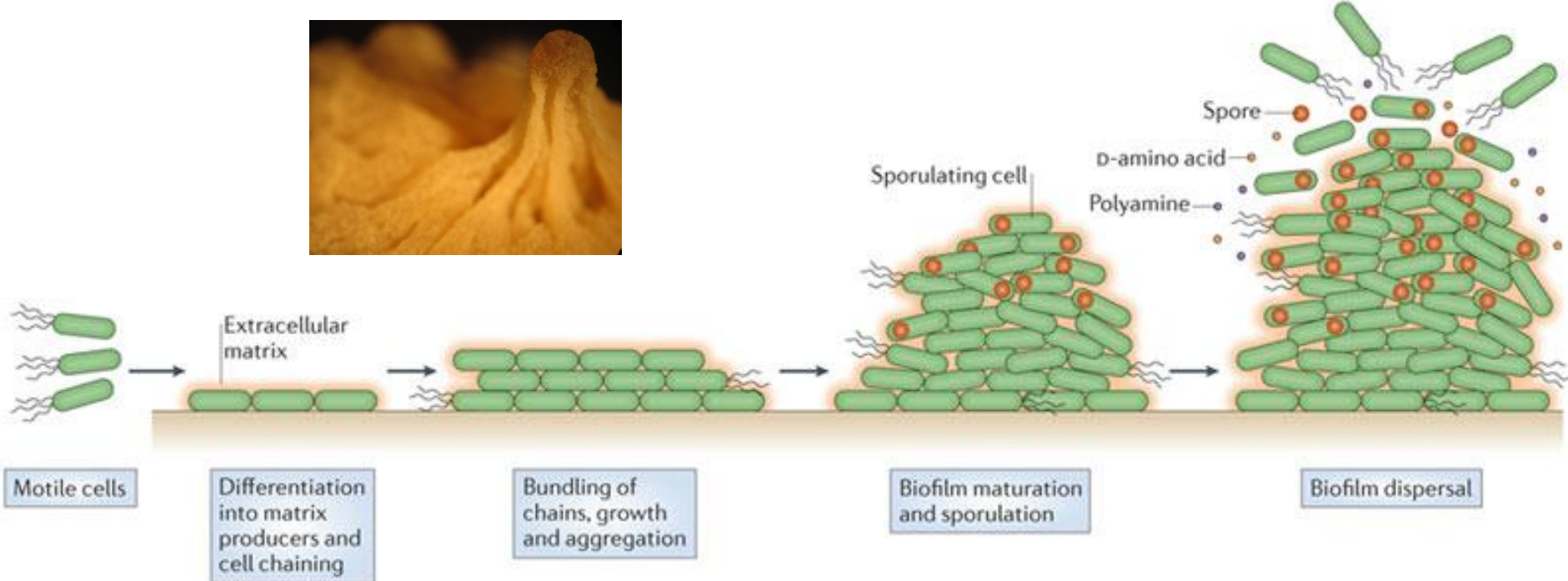
"Creo que sería divertido colocar en una de estas naves una pequeña colonia de Bacillus, enviarla durante 20 años, encenderla, darle algunos nutrientes y ver si todavía está viva, solo para decidir experimentalmente si la panspermia funciona sobre distancias interestelares", dijo Kuhn durante una conferencia celebrada en Stanford por Breakthrough Discuss, [informa Space.com](#).

GERMINACIÓN, MULTIPLICACIÓN Y DISEMINACIÓN



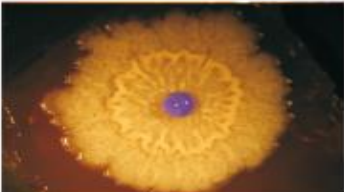
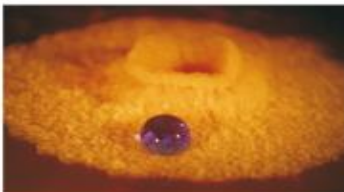
BIOFILMS





Nature Reviews | Microbiology

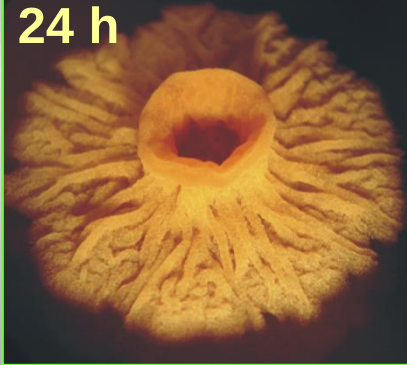
LOS BIOFILMS DE BACILLUS SON MUY ROBUSTOS Y ESTÁN ALTAMENTE ORGANIZADOS. SON UN EJEMPLO DE MULTICELULARIDAD BACTERIANA

STRAIN	JH642	NCIB3610	RG4365	RG3330
				
RELEVANT GENOTYPE	Domesticated WT strain	Undomesticated WT Marburg-related strain	Undomesticated WT Natto-related strain	Domesticated Spo0A-deficient strain

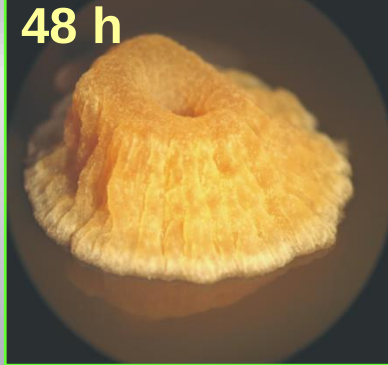
ALGUNOS EJEMPLOS DE BIOFILMS DE *BACILLUS*



24 h



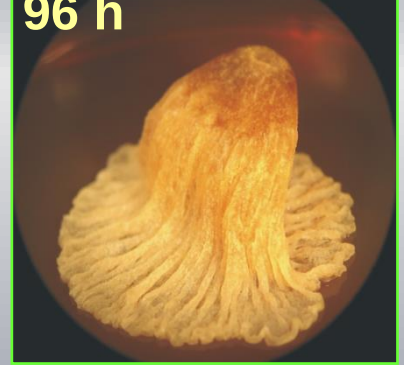
48 h



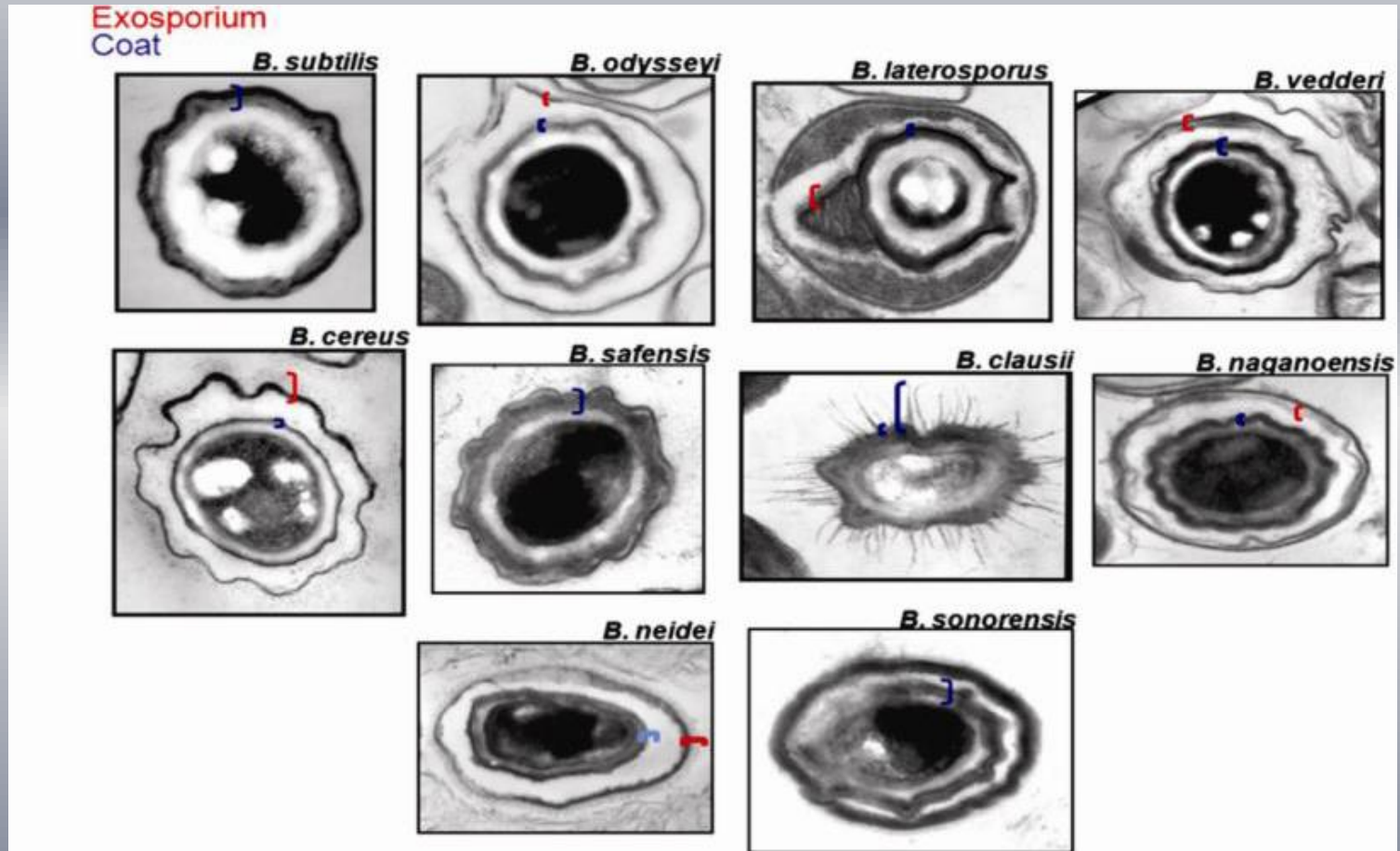
72 h

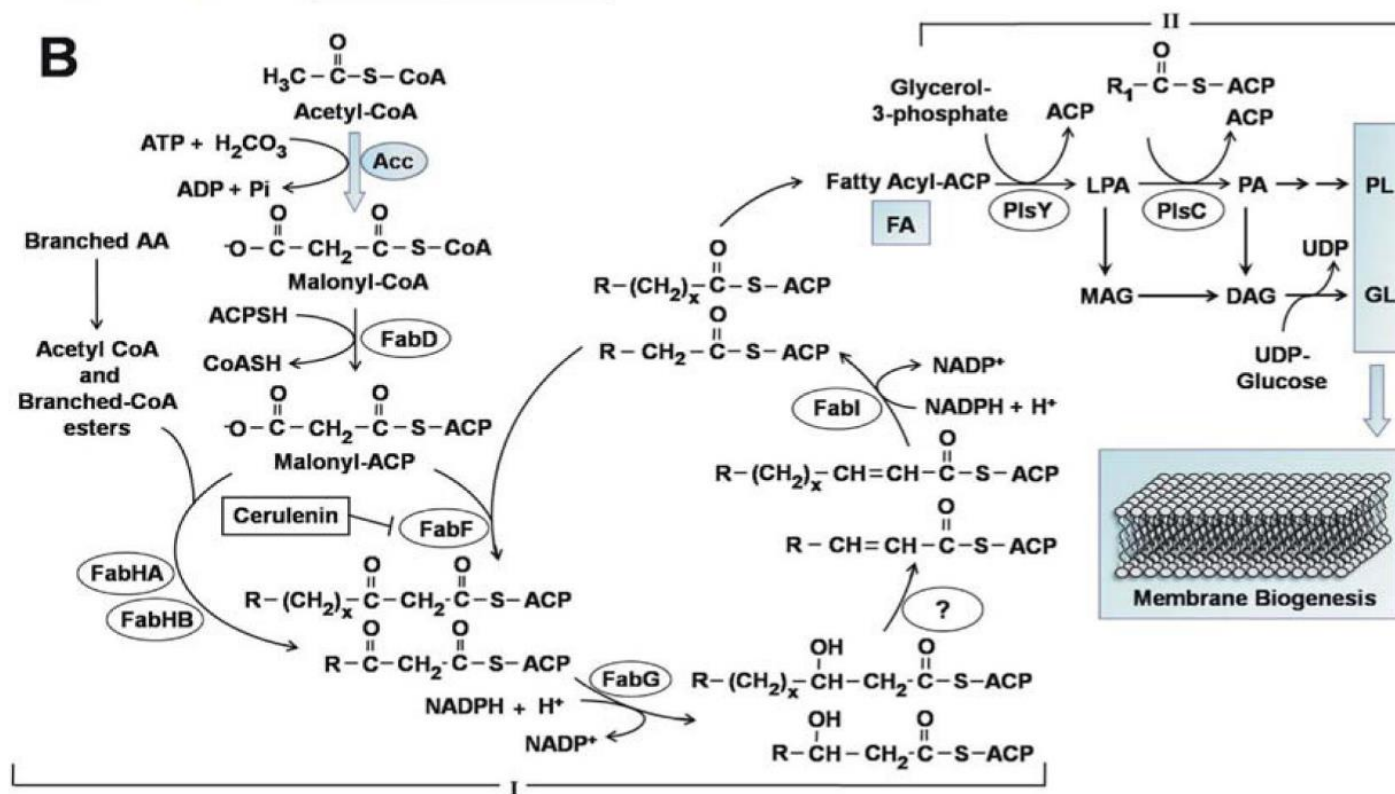
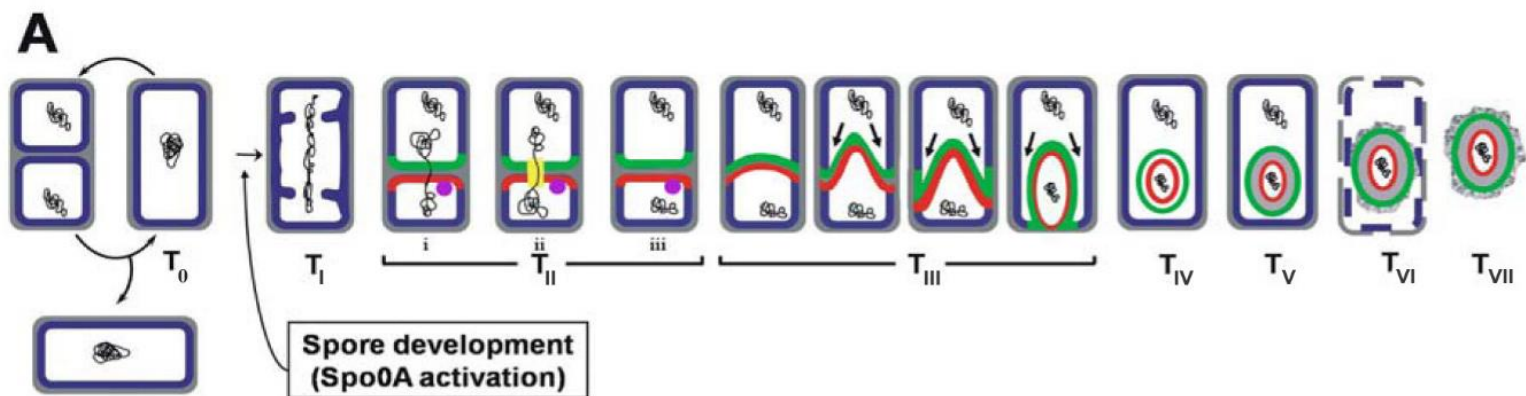


96 h

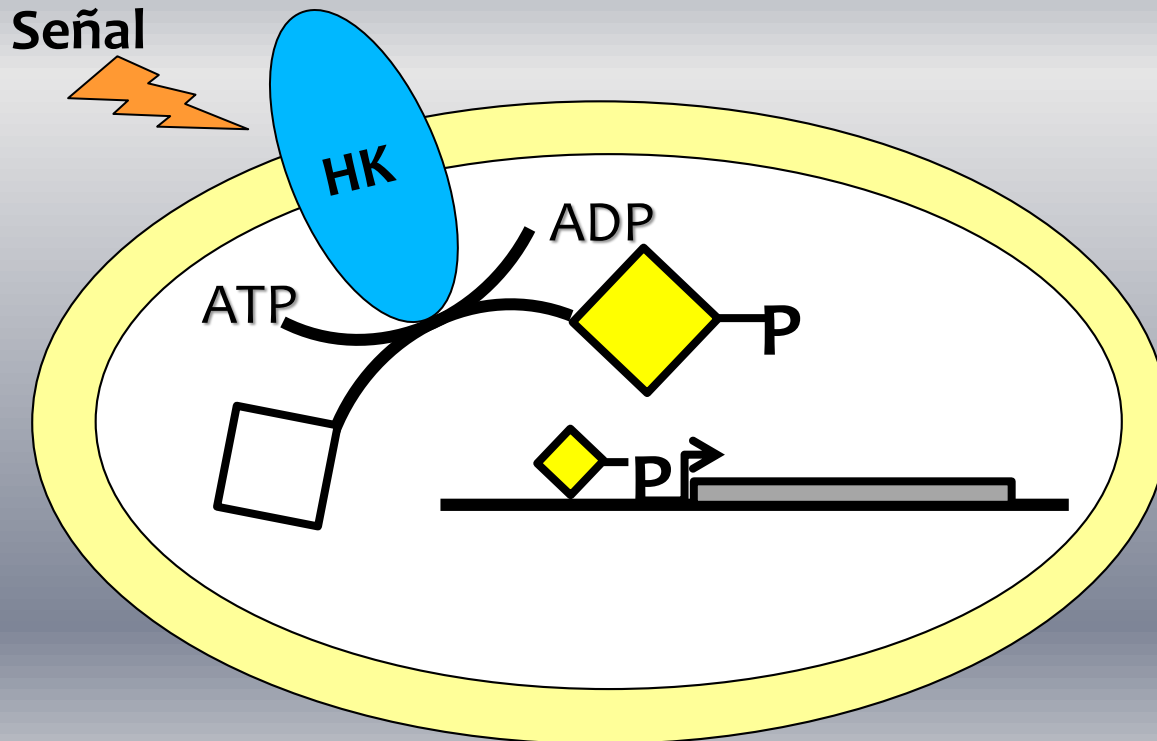


¿CÓMO SE REGULA LA FORMACIÓN DEL BIOFILM Y LAS ESPORAS EN *BACILLUS* ?





¿CÓMO SE REGULA LA FORMACIÓN DEL BIOFILM, LAS ESPORAS Y EL SLIDING EN *BACILLUS* ?

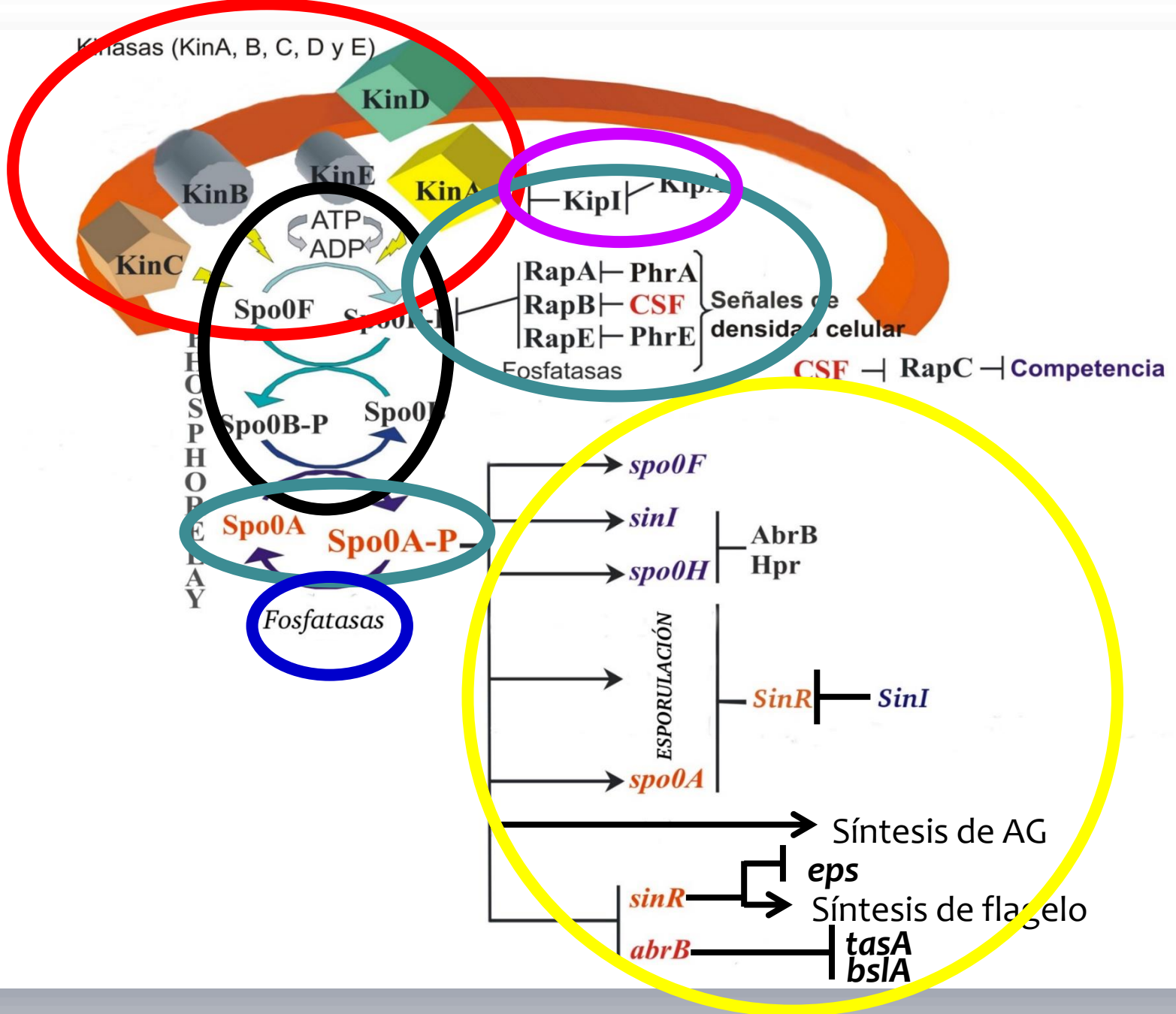


Spo0A

Regulador Maestro



Phosphorelay



El género *Clostridium*

Características generales:

- Bacilos Gram-positivos
- Anaeróbicos
- No reductores desasimilativos de sulfato
- Formadores de endo-esporas

Hábitats naturales:

- Tracto gastrointestinal del hombre y animales
- Suelos y sedimentos de río

Fenómenos asociados a *Clostridium*

Interés Industrial:

- *C. acetobutylicum* → producción de solventes

Interés Clínico:

- *C. botulinum* → botulismo
- *C. tetani* → tétano
- *C. difficile* → diarrea asociada a antibióticos.
"SUPER-BUG"

CLOSTRIDIUM DIFFICILE

THREAT LEVEL
URGENT



This bacteria is an immediate public health threat that requires urgent and aggressive action.



250,000
INFECTIONS PER YEAR



14,000
DEATHS



\$1,000,000,000

IN EXCESS MEDICAL COSTS PER YEAR



Clostridium difficile (*C. difficile*) causes life-threatening diarrhea. These infections mostly occur in people who have had both recent medical care and antibiotics. Often, *C. difficile* infections occur in hospitalized or recently hospitalized patients.

RESISTANCE OF CONCERN

- Although resistance to the antibiotics used to treat *C. difficile* infections is not yet a problem, the bacteria spreads rapidly because it is naturally resistant to many drugs used to treat other infections.
- In 2000, a stronger strain of the bacteria emerged. This strain is resistant to fluoroquinolone antibiotics, which are commonly used to treat other infections.
- This strain has spread throughout North America and Europe, infecting and killing more people wherever it spreads.

PUBLIC HEALTH THREAT

- 250,000 infections per year requiring hospitalization or affecting already hospitalized patients.
- 14,000 deaths per year.
- At least \$1 billion in excess medical costs per year.
- Deaths related to *C. difficile* increased 400% between 2000 and 2007, in part because of a stronger bacteria strain that emerged.
- Almost half of infections occur in people younger than 65, but more than 90% of deaths occur in people 65 and older.
- About half of *C. difficile* infections first show symptoms in hospitalized or recently hospitalized patients, and half first show symptoms in nursing home patients or in people recently cared for in doctors' offices and clinics.



U.S. Department of
Health and Human Services
Centers for Disease
Control and Prevention



Bacterial Spores and its Relatives as Agents of Mass Destruction

Sebastián Cogliati, Juan Gabriel Costa, Facundo Rodriguez Ayala, Verónica Donato and Roberto Grau*

Departamento de Microbiología, Universidad Nacional de Rosario, Argentina and CONICET

Abstract

The term bioterrorism has acquired full force for the planetary consciousness from the very beginning of the new century. Indeed, from the events that occurred during October and November of 2001 with the intentional contamination with spores of pathogenic *Bacillus anthracis*, of letters distributed by the US public postal service and the terrorist attacks in the last months of 2015 in Egypt, France, Mali, Afghanistan, Turkey, USA and other countries have warned again about the reality of the bioterrorist threat and its immeasurable cultural and undesirable economic and political consequences. In this review, we summarize the main structural characteristics that make the spores of Bacilli and Clostridia as the ideal agents for use in bioterrorism. In addition, we discuss the properties of non-sporulating *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever, because of its peculiar resistance, high infectivity and environmental persistence that resembles true spores.

Fenómenos asociados a *Clostridium*

Interés Industrial:

- *C. acetobutylicum* → producción de solventes

Interés Clínico:

- *C. botulinum* → botulismo
- *C. tetani* → tétano
- *C. difficile* → diarrea asociada a antibióticos
- *C. perfringens* → gangrena gaseosa, diarrea asociada a los antibióticos y/o alimentos

La especie *C. perfringens*

- Patógeno causante de enfermedades GI en humanos y animales
- Su virulencia se debe a la producción de diferentes toxinas



4 toxinas letales principales

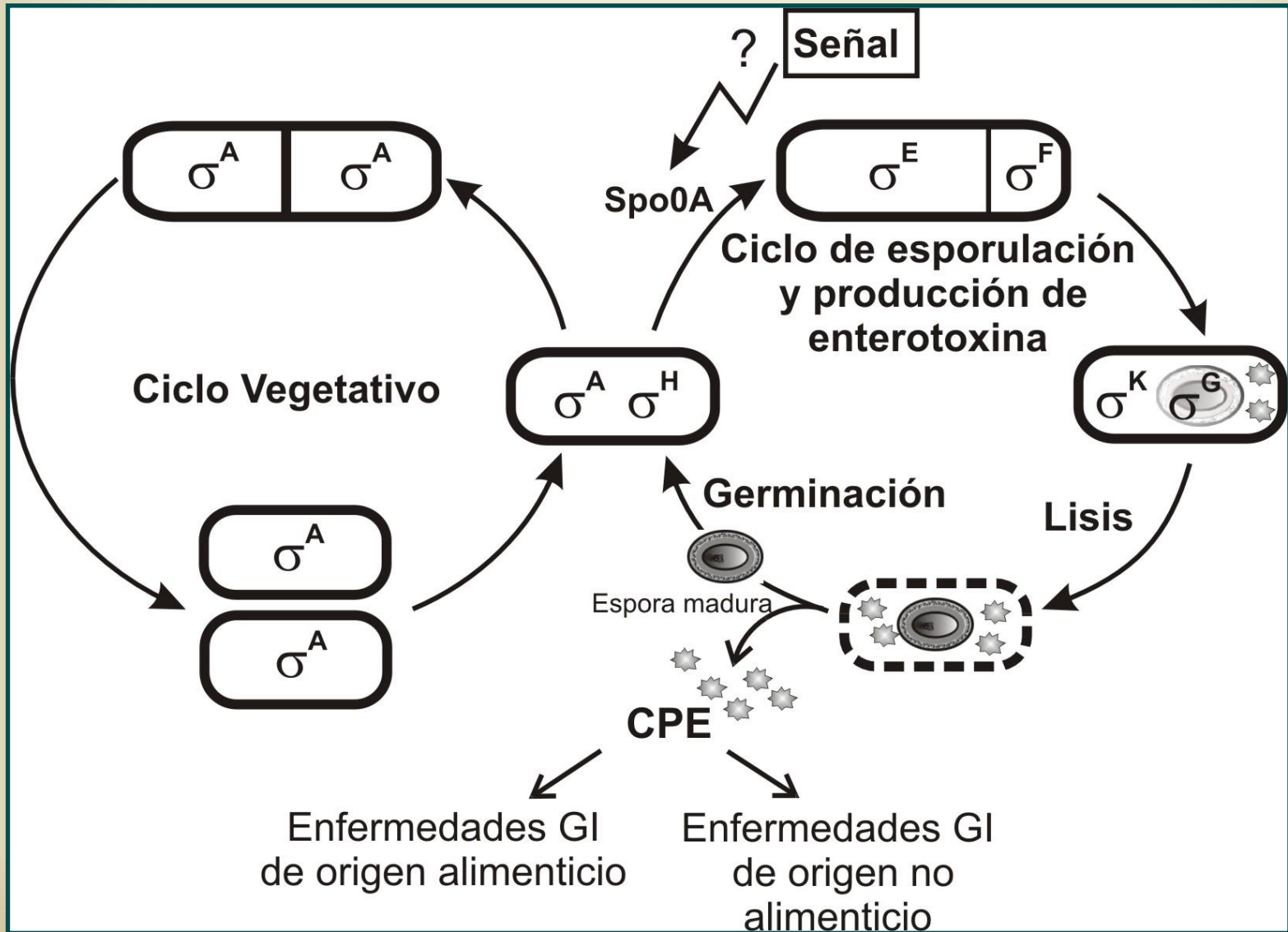
α

β

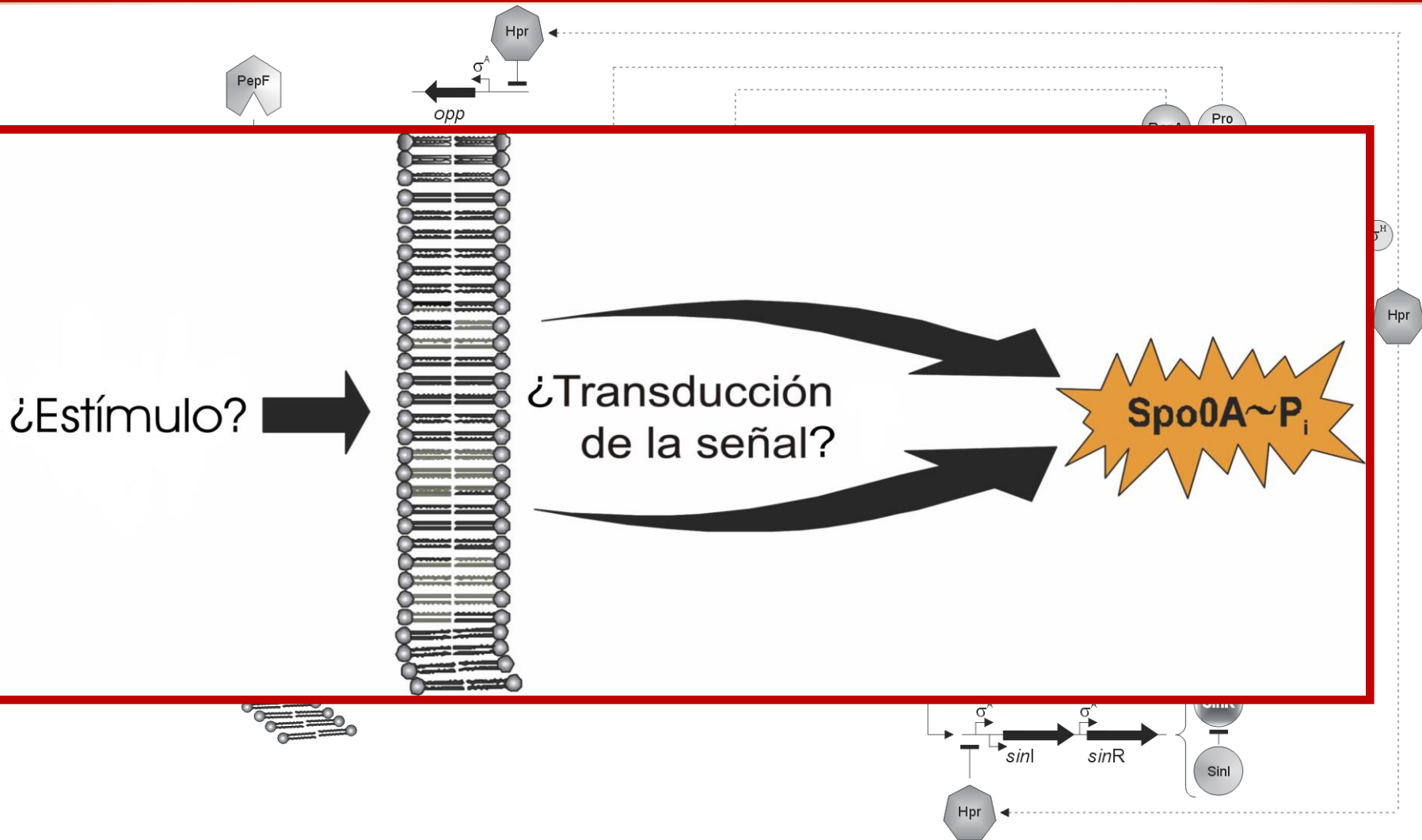
ϵ

ι

Ciclo celular de *C. perfringens* en el tracto GI



Regulación del inicio de la esporulación en *Clostridium*



Estudio de la regulación de la esporulación en *C. perfringens*

Secuencia del inserto contenido en p32



Homología:

- Región 3' de *phoR* de *B. subtilis*.
- Cinco quinasas sensoras de esporulación de *B. subtilis*.

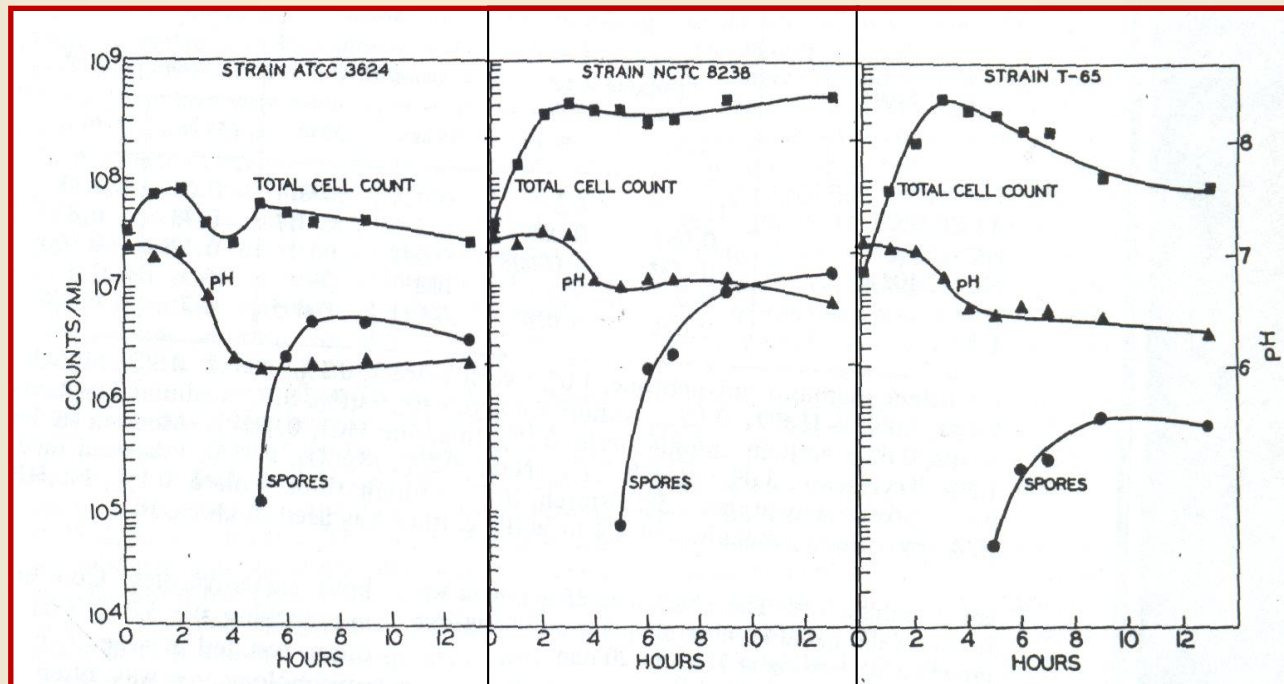


Caracterización molecular de la posible quinasa sensora de la esporulación de *C. perfringens*

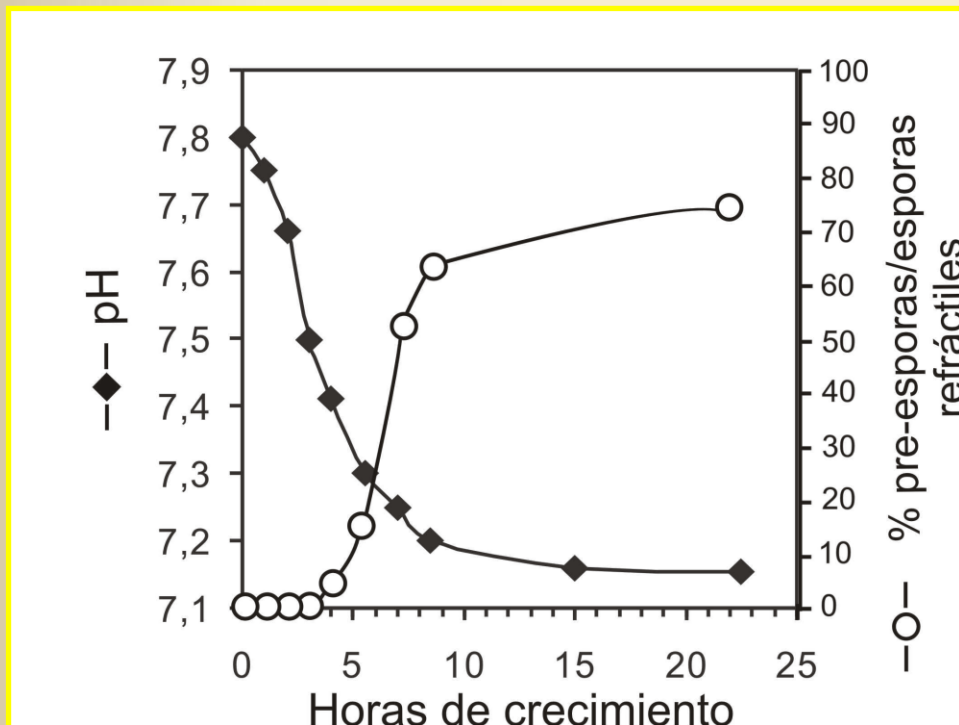


Estudio del rol fisiológico del Pi sobre la esporulación en *C. perfringens* y la producción de CPE

Estudio de la regulación de la esporulación en *C. perfringens*

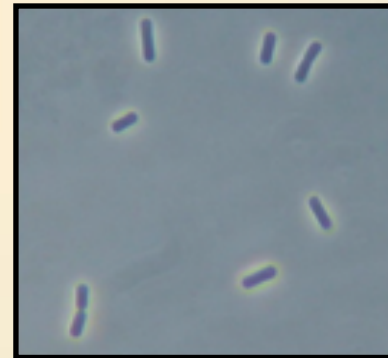


Cinéticas de la aparición de esporas y de la variación del pH

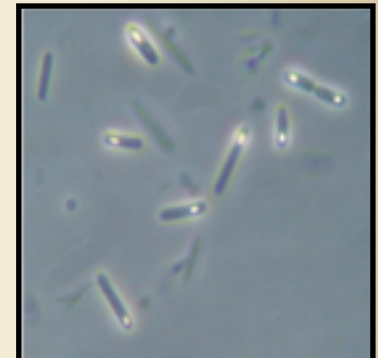


Microscopía

Cél. vegetativas



Pre-esporas



Efecto del Pi sobre la esporulación

Composición del DSSM:

- 1,5% de proteasa peptona
 - 0,4% de extracto de levadura
 - 1% de tioglicolato sódico
 - 0,4% de almidón soluble
-
- 1% de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \rightarrow 35\text{mM}$

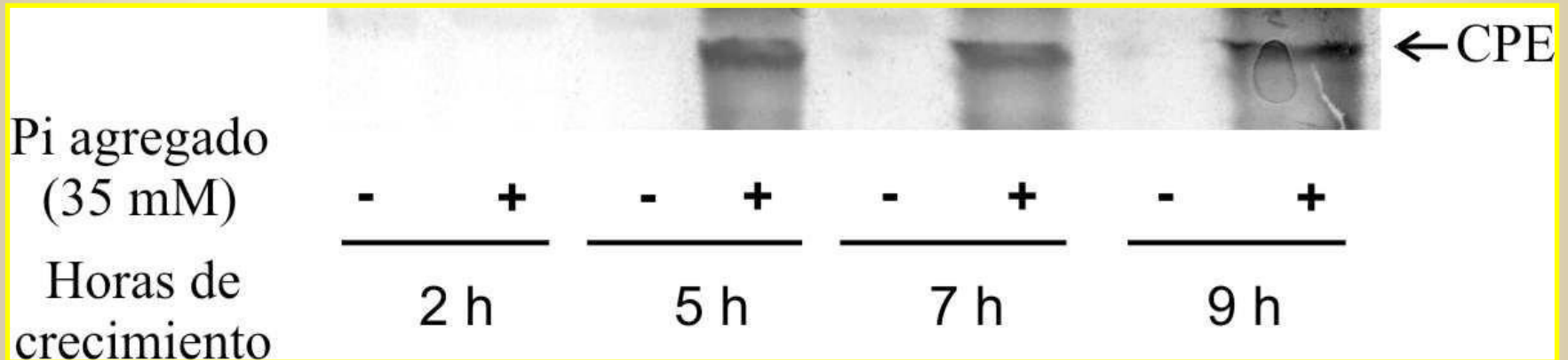
 **DSMM** $\rightarrow$ 2mM Pi

¿Podría ser el Pi o el pH la señal
para la esporulación?

Efecto del Pi sobre la esporulación

Pi agregado (mM)	pH inicial	pH final	Cél. Viables/ ml	Esporas / ml	% esporulación
-	6.62	5.04	4.7×10^8	<10	<0.000002
1	6.65	5.05	2.5×10^8	<10	<0.000004
2	6.66	5.05	3.0×10^8	<10	<0.000003
3	6.68	5.07	1.0×10^8	3.2×10^1	0.00003
5	6.73	5.12	3.7×10^7	2.7×10^6	7.29
7	6.89	5.14	1.9×10^7	4.6×10^6	24.21
10	6.91	5.21	1.3×10^7	6.3×10^6	48.46
15	7.03	5.53	4.5×10^7	3.0×10^7	66.66
20	7.17	5.80	3.9×10^7	3.3×10^7	84.61
25	7.29	6.12	1.3×10^7	1.2×10^7	92.30
30	7.35	6.30	2.0×10^7	2.0×10^7	100
35	7.39	6.40	1.4×10^7	1.4×10^7	100
40	7.50	6.53	2.1×10^7	2.1×10^7	100
45	7.55	6.61	3.6×10^7	3.3×10^7	91.66
50	7.59	6.69	4.2×10^7	3.1×10^7	73.80
60	7.61	6.83	8.0×10^6	1.2×10^6	15.00
70	7.68	7.00	2.5×10^6	6.8×10^4	2.72
80	7.80	7.17	9.3×10^5	1.3×10^3	0.14
90	7.93	7.21	4.5×10^5	2.8×10^2	0.06
100	7.98	7.30	3.1×10^5	1.7×10^1	0.005

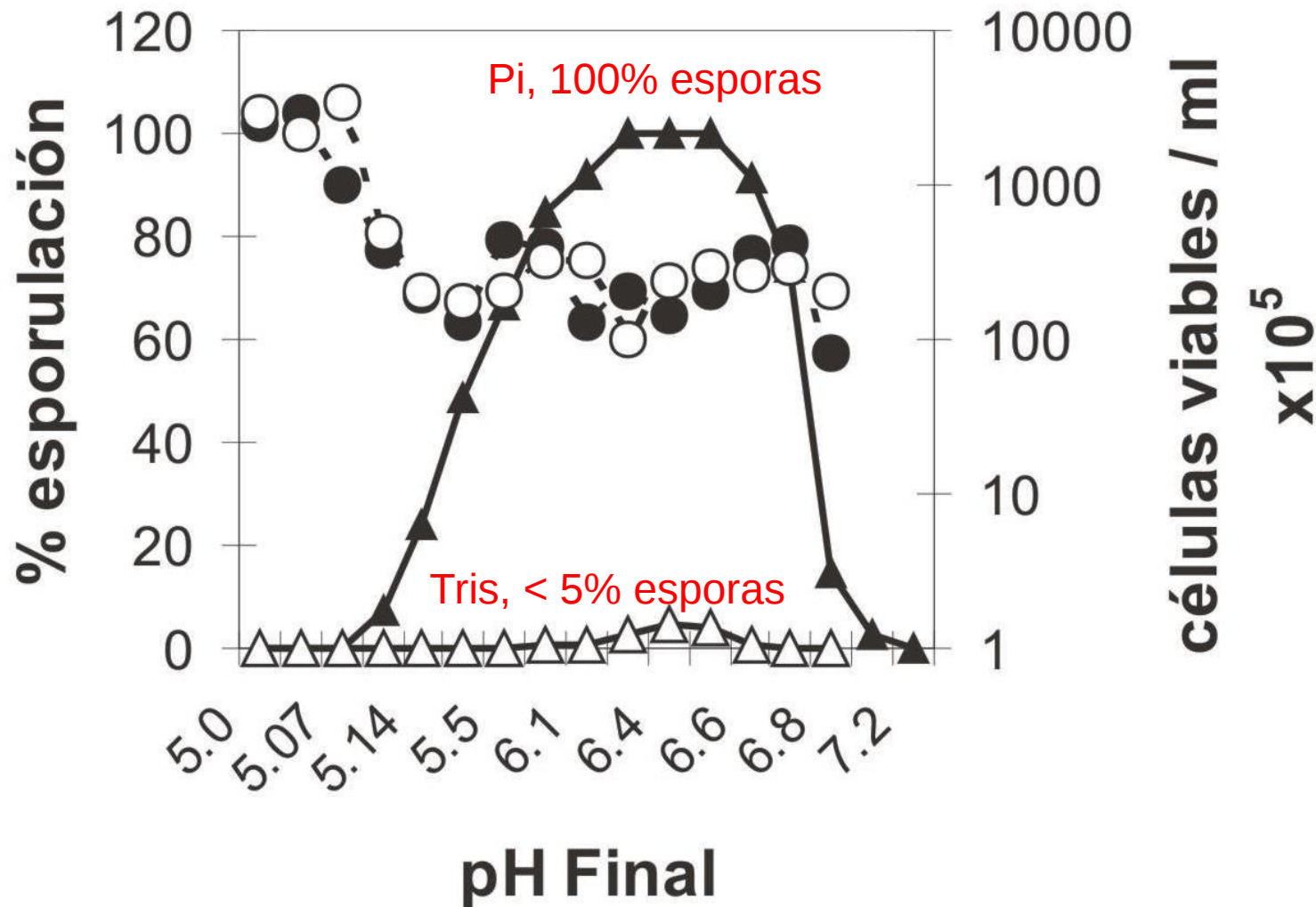
Efecto del Pi sobre la producción de CPE



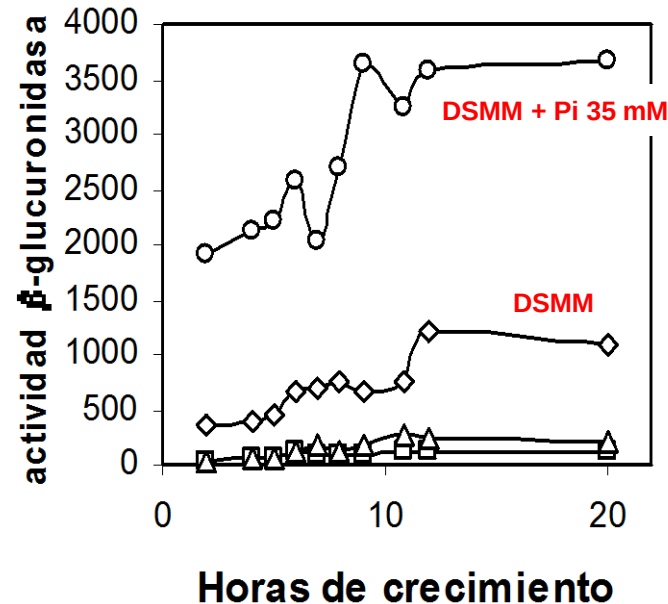
Pi agregado (mM)	pH inicial	pH final	Cél. Viables/ ml	Esporas / ml	% esporulación
-	6.62	5.04	4.7×10^8	<10	<0.000002
1	6.65	5.05	2.5×10^8	<10	<0.000004
2	6.66	5.05	3.0×10^8	<10	<0.000003
3	6.68	5.07	1.0×10^8	3.2×10^1	0.00003
5	6.73	5.12	3.7×10^7	2.7×10^6	7.29
7	6.89	5.14	1.9×10^7	4.6×10^6	24.21
10	6.91	5.21	1.3×10^7	6.3×10^6	48.46
15	7.03	5.53	4.5×10^7	3.0×10^7	66.66
20	7.17	5.80	3.9×10^7	3.3×10^7	84.61
25	7.29	6.12	1.3×10^7	1.2×10^7	92.30
30	7.35	6.30	2.0×10^7	2.0×10^7	100
35	7.39	6.40	1.4×10^7	1.4×10^7	100
40	7.50	6.53	2.1×10^7	2.1×10^7	100
45	7.55	6.61	3.6×10^7	3.3×10^7	91.66
50	7.59	6.69	4.2×10^7	3.1×10^7	73.80
60	7.61	6.83	8.0×10^6	1.2×10^6	15.00
70	7.68	7.00	2.5×10^6	6.8×10^4	2.72
80	7.80	7.17	9.3×10^5	1.3×10^3	0.14
90	7.93	7.21	4.5×10^5	2.8×10^2	0.06
100	7.98	7.30	3.1×10^5	1.7×10^1	0.005

¿Es el Pi o el pH la señal para la esporulación?

Efecto del Pi sobre la esporulación

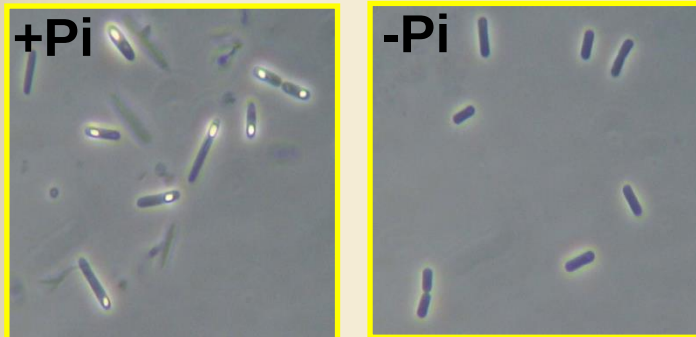


¿A que nivel del desarrollo de la espora actúa el Pi ?

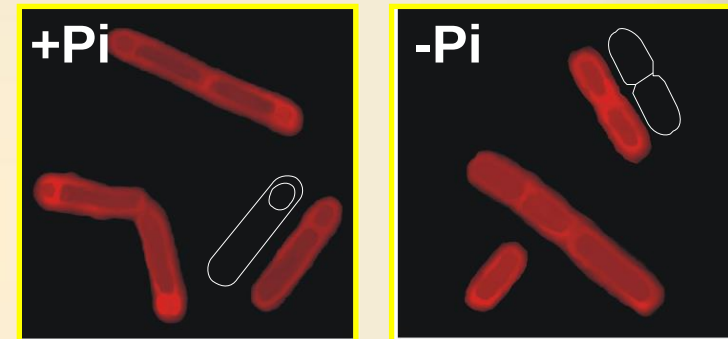


¿A qué nivel del desarrollo de la espora sería requerido el Pi ?

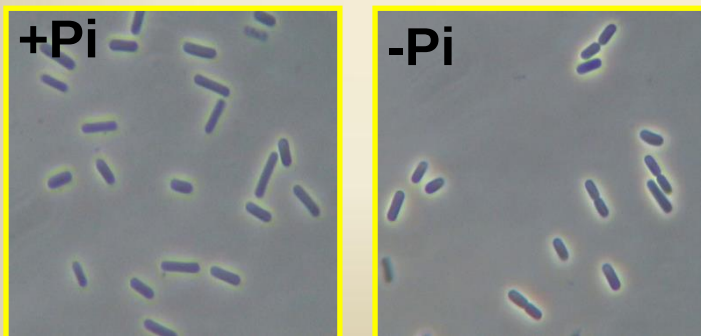
SM101 (cepa tipo salvaje)



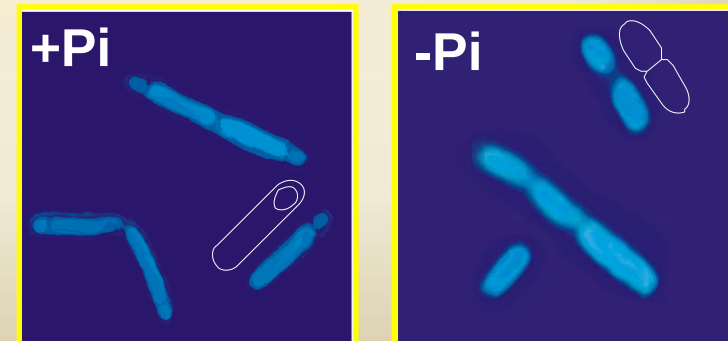
SM101 teñida con FM4-64



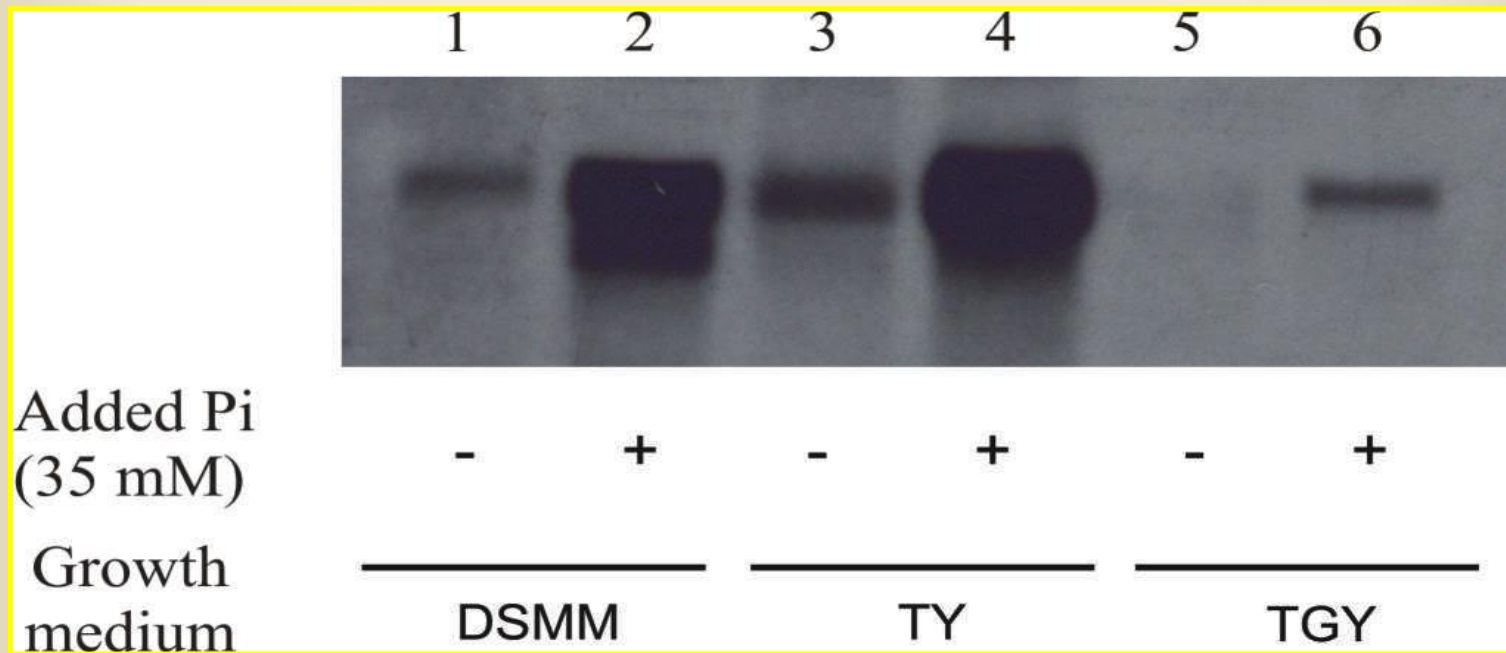
IH101 (mutante *spo0A*)



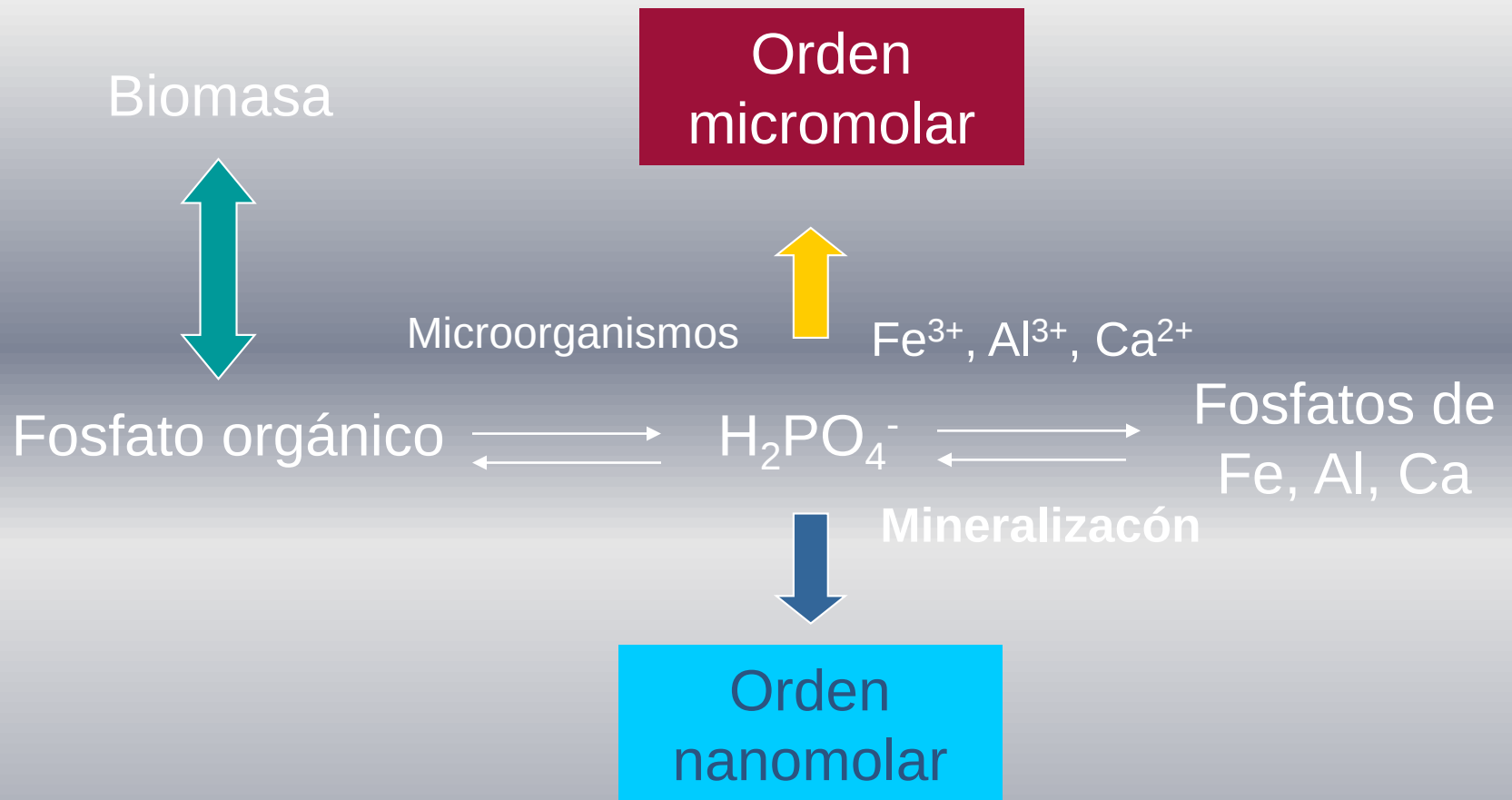
SM101 teñida con DAPI



¿A qué nivel del desarrollo de la espora sería requerido el Pi ?



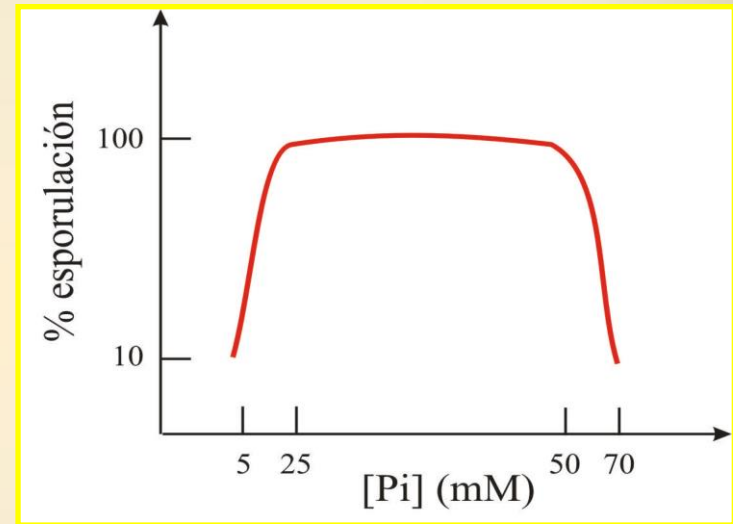
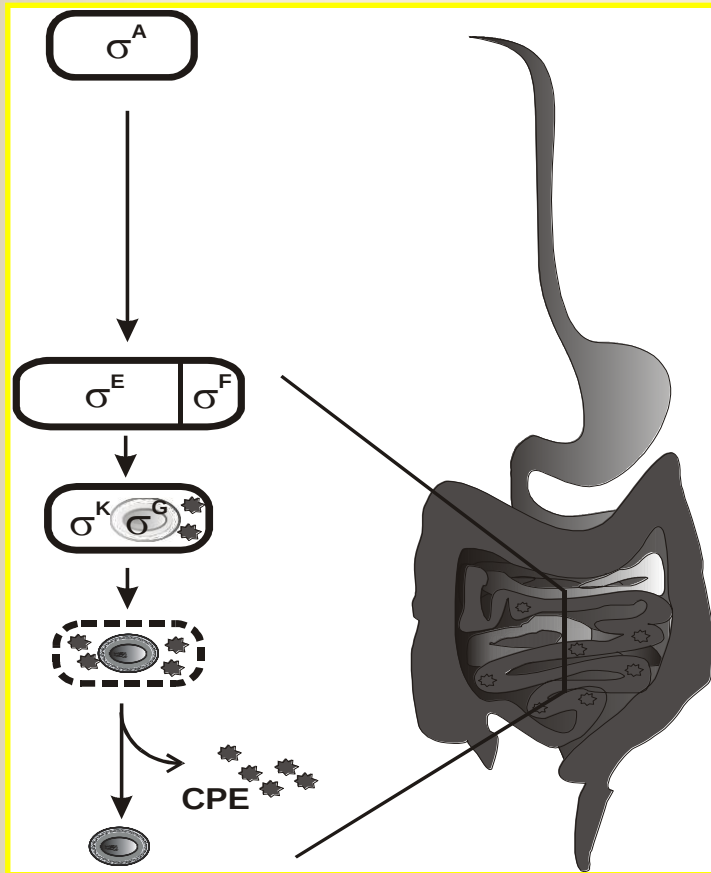
TRANSCRIPCIÓN DEL GEN *spo0A*



¿Rol fisiológico del Pi?

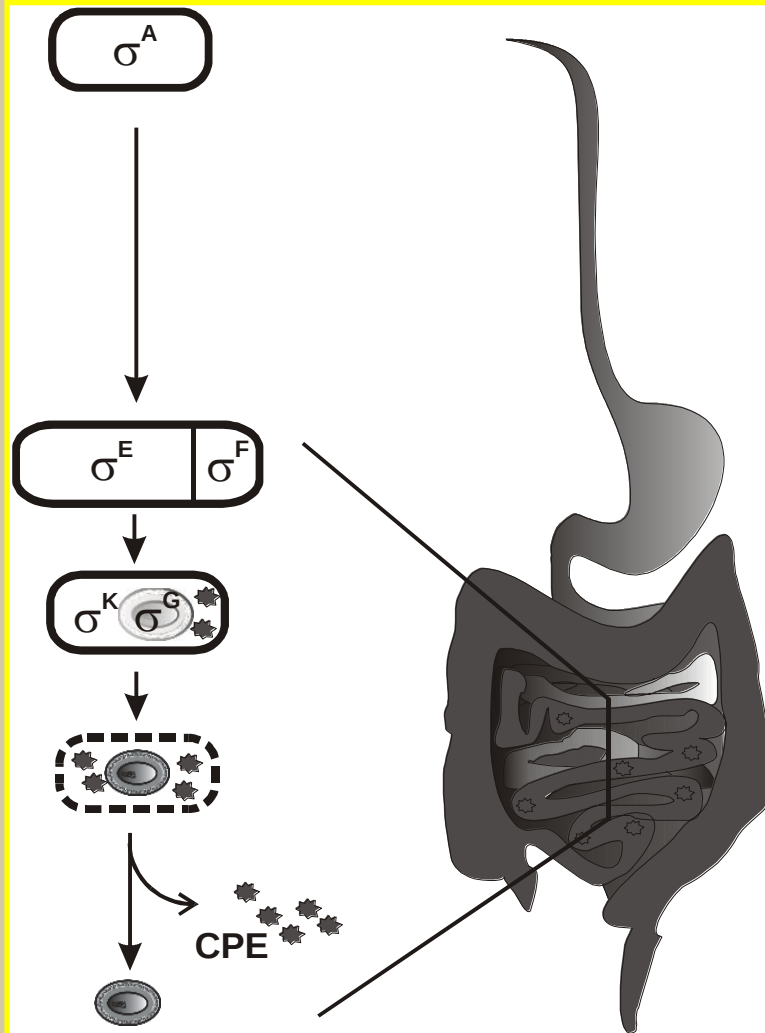
¿Existe algún hábitat natural con niveles de Pi suficientes que permitan a *C. perfringens* esporular?

El hábitat natural de *C. perfringens*



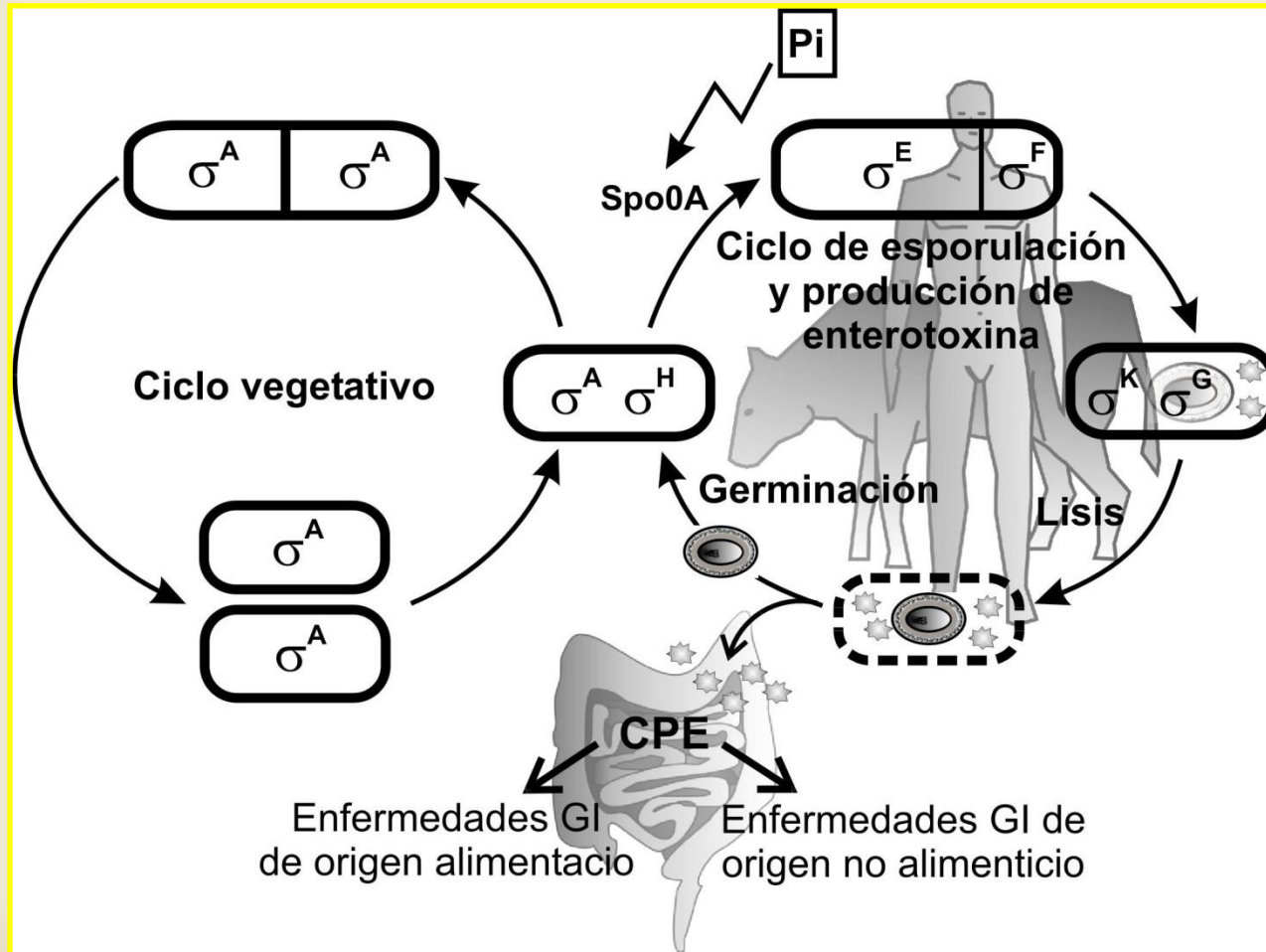
15-30 mM de Pi

El Pi como señal medioambiental, pero no nutricional



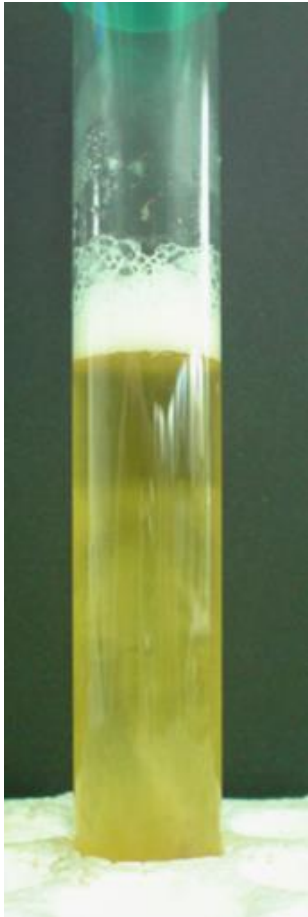
El TGI constituye un medio ambiente rico en nutrientes pero altamente hostil y competitivo

Rol del Pi como señal fisiológica



Regulación catabólica por carbono de los factores de patogenicidad de *Clostridium perfringens* relacionados con la gangrena gaseosa

Gangrena gaseosa



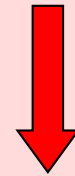
Adherencia



Destrucción de tejido y de vasos sanguíneos por toxinas liberadas.



Anoxia y proliferación

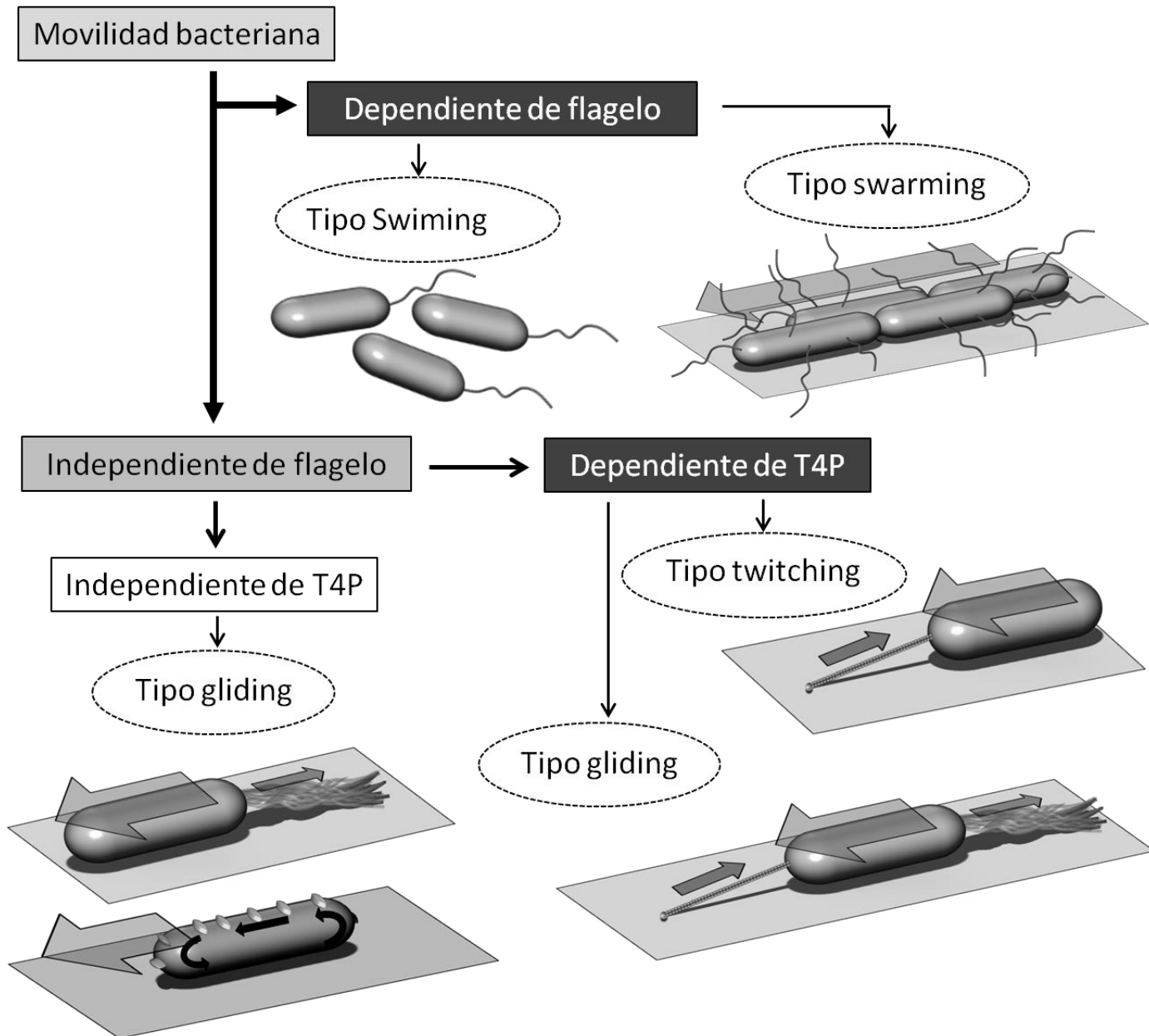


Avance de la gangrena con la consecuente necrosis de los tejidos

Capacidad de desplazarse y producir toxinas mientras destruye tejidos



LA MOVILIDAD COMO FACTOR DE VIRULENCIA



Movilidad en *Clostridium perfringens*.

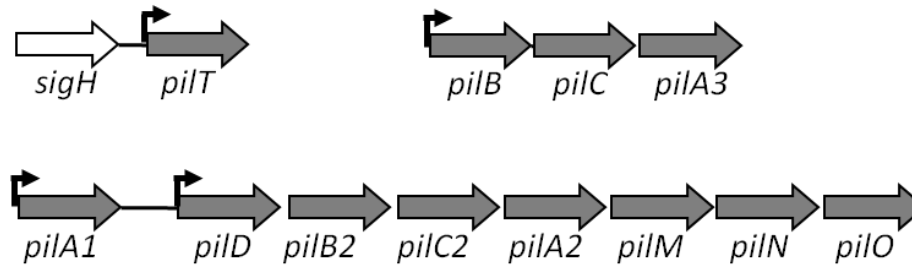
- ❖ *C. perfringens* ha sido originalmente clasificado como no móvil.
- ❖ No posee flagelo.
- ❖ No posee homólogos a genes de sistemas quimiotácticos.



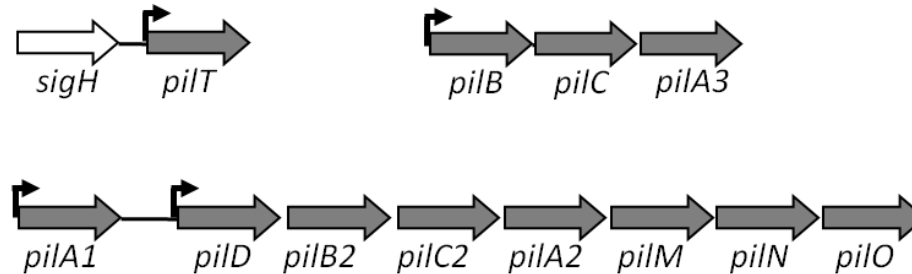
Sin embargo luego de secuenciarse los primeros genomas de *C. perfringens* patógenos se encontró que....

Pili tipo IV y movilidad en *Clostridium perfringens*.

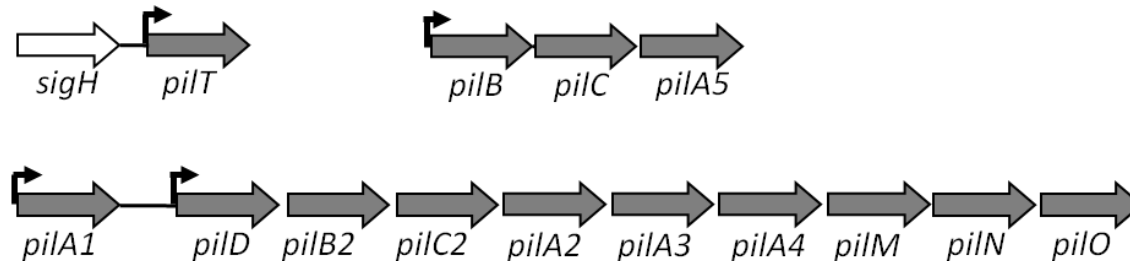
SM101



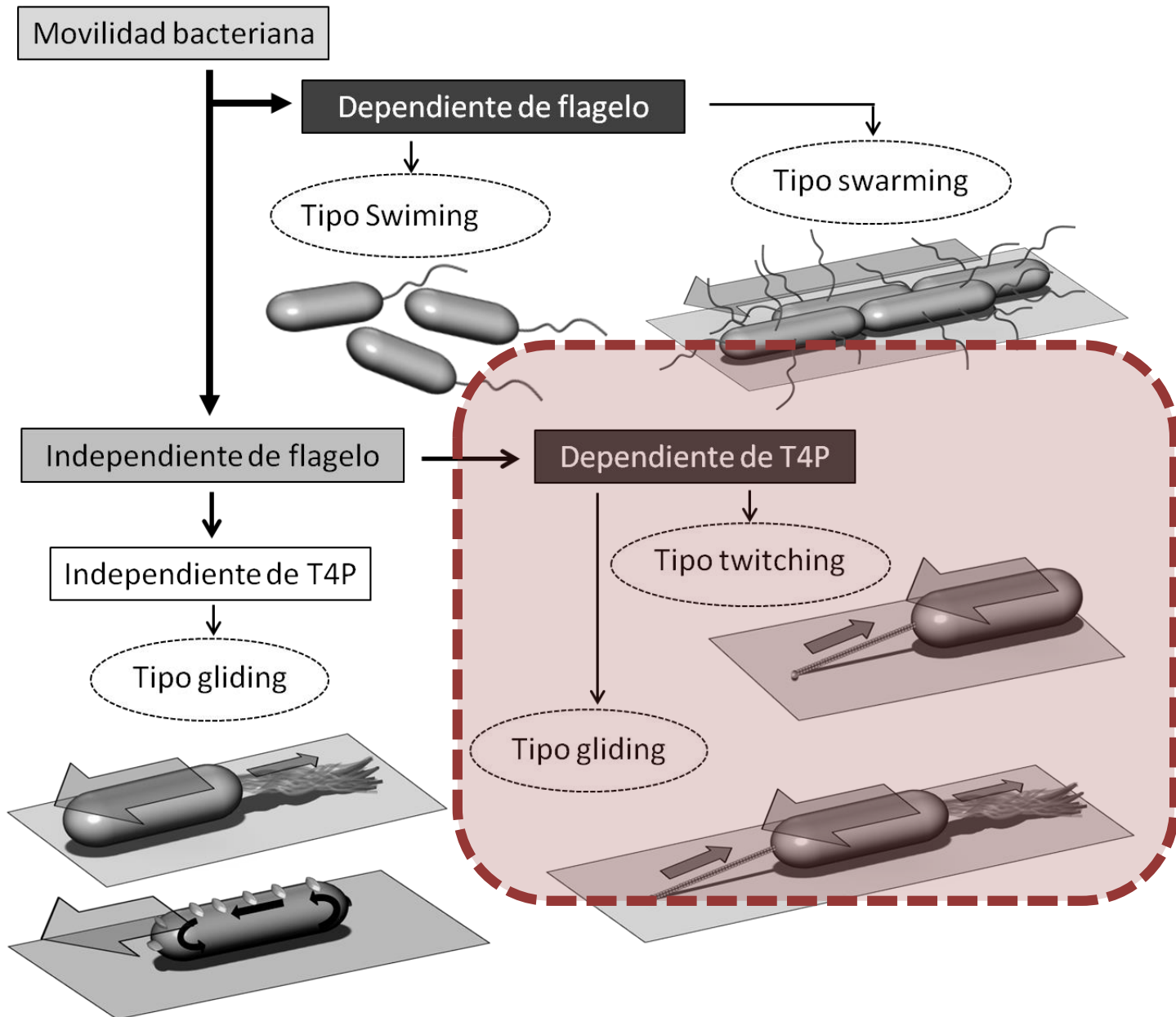
Cepa 13



ATCC13124



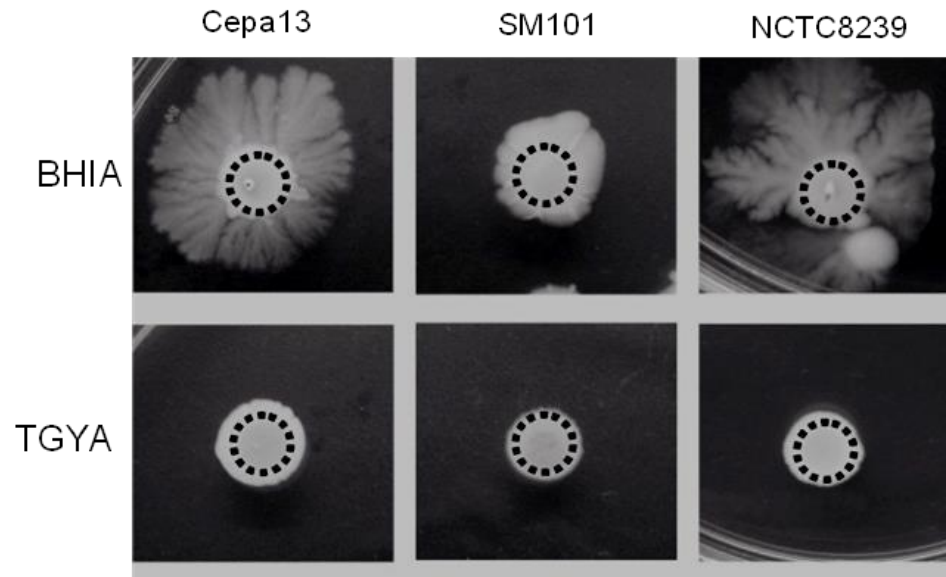
LA MOVILIDAD COMO FACTOR DE VIRULENCIA



Procesos bacterianos mediados por el Pili Tipo IV (T4P).

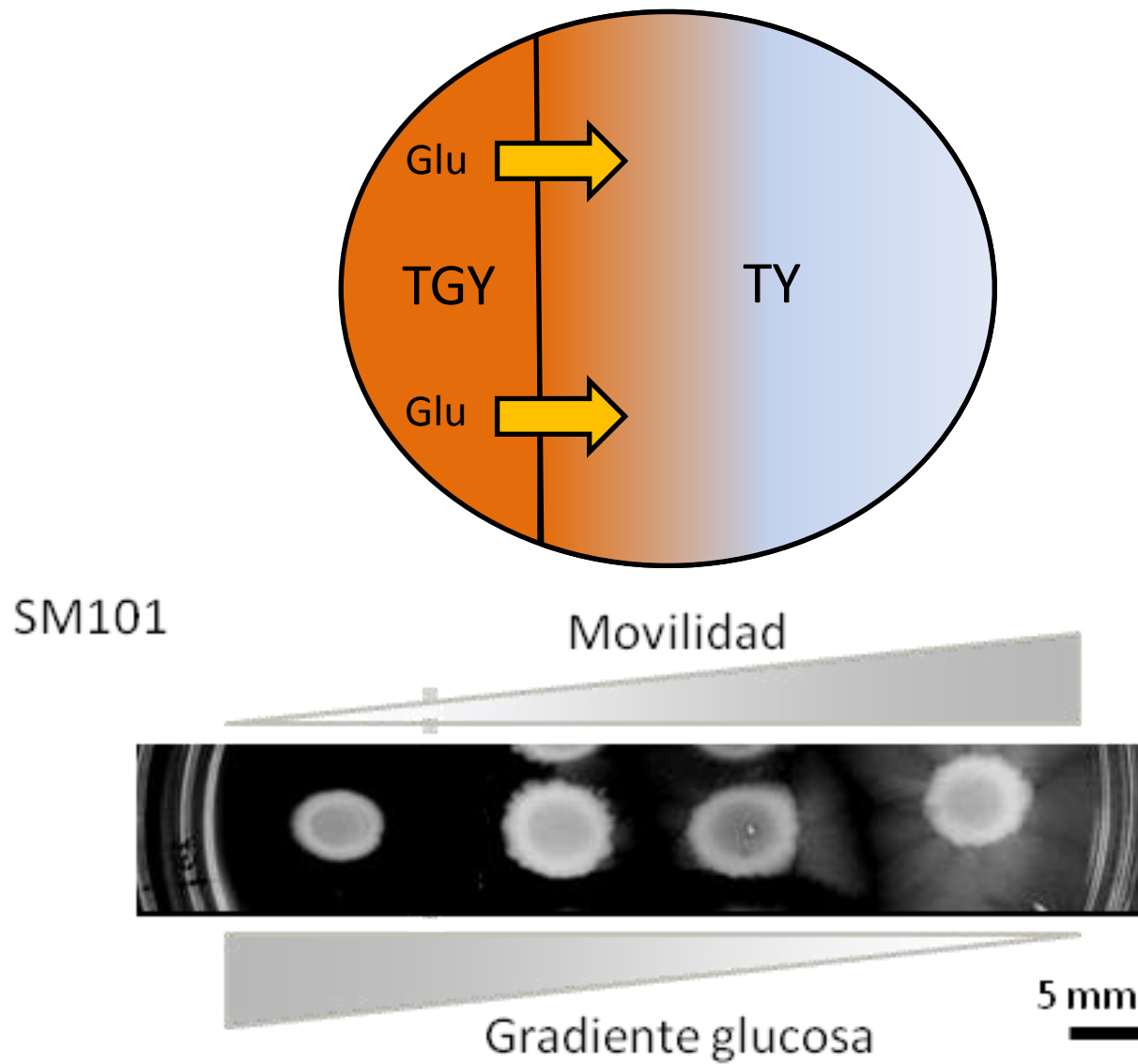
- ❖ Adherencia a superficies bióticas y abióticas.
- ❖ Conjugación bacteriana.
- ❖ Incorporación de ADN exógeno.
- ❖ Formación de comunidades complejas, biofilms.
- ❖ Patogenia.
- ❖ Desplazamientos bacterianos sobre diversas superficies.

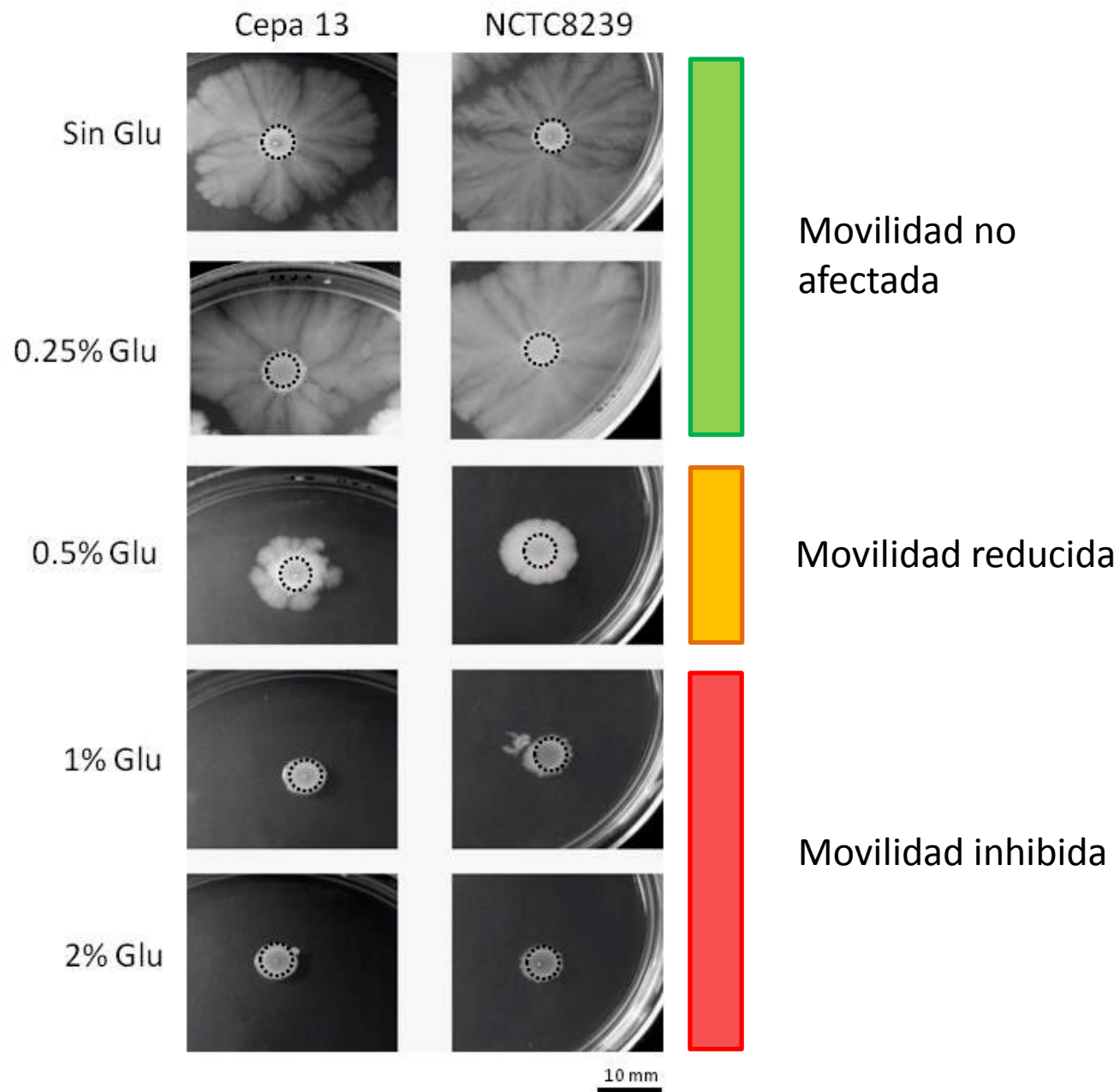
Ensayos de movilidad en placa con *C. perfringens*.



5 mm

Efecto de la concentración de glucosa.

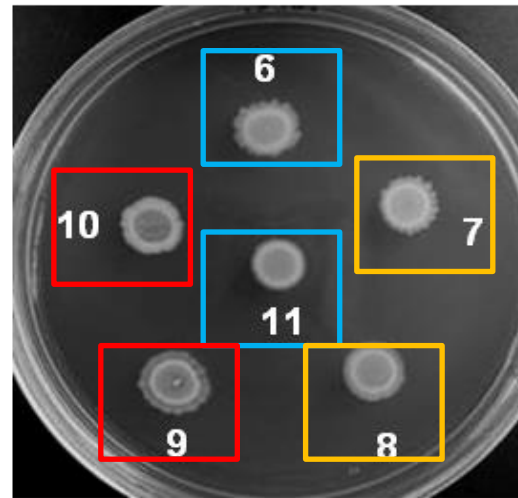
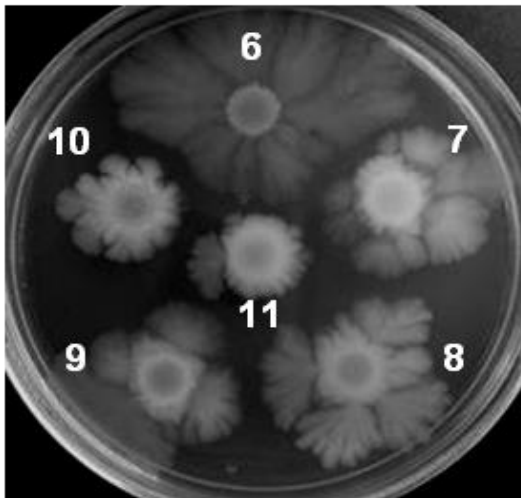
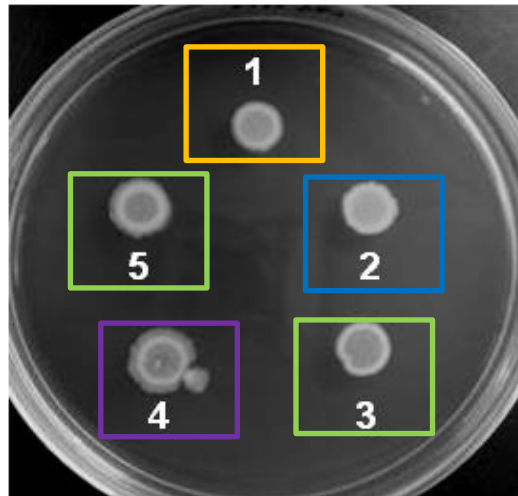




TYA



TGYA



5 mm

Intoxicación
alimentaria

Diarrea esporádica

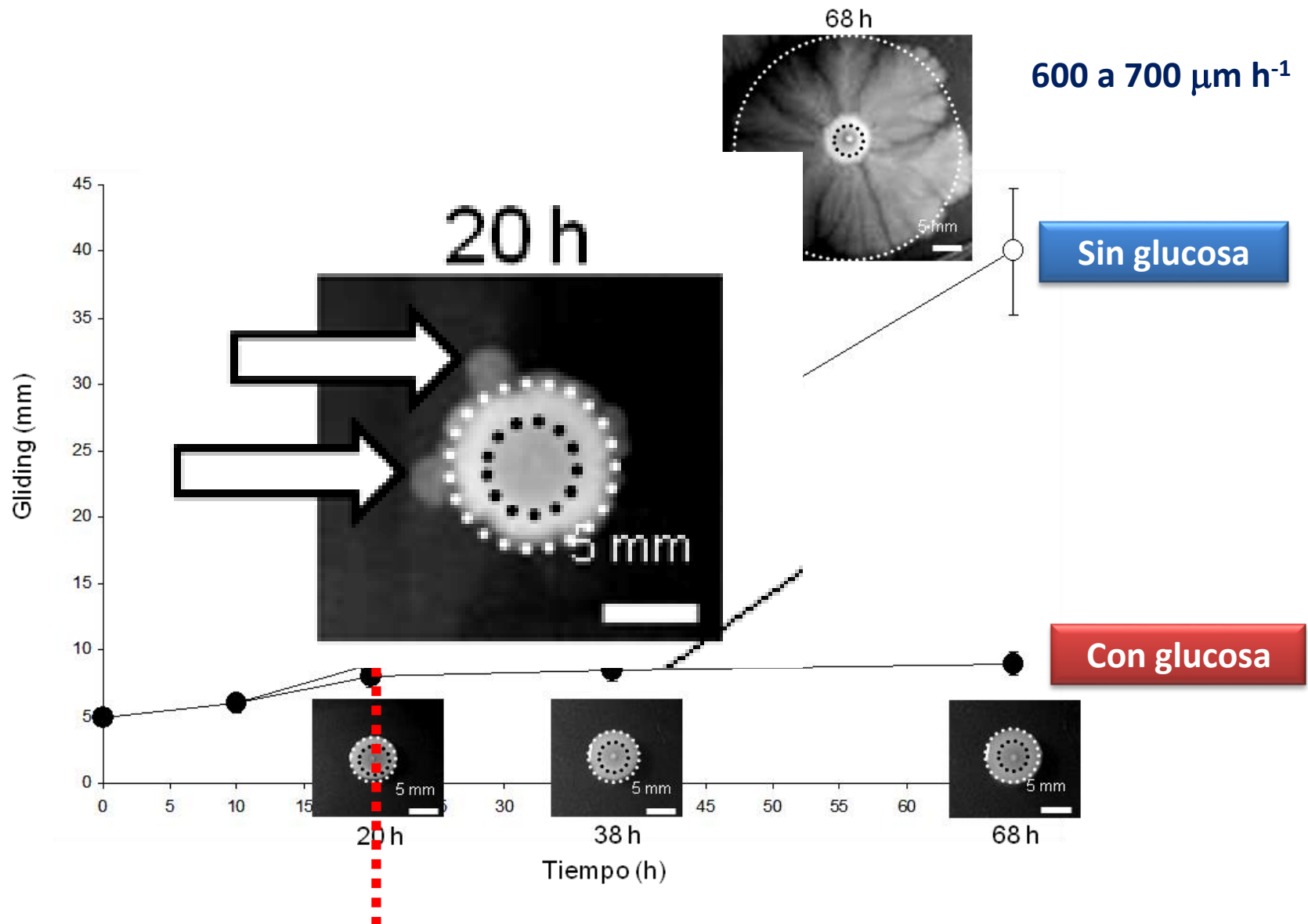
Diarrea asociada al
uso de antibióticos

Diarrea en
caballos

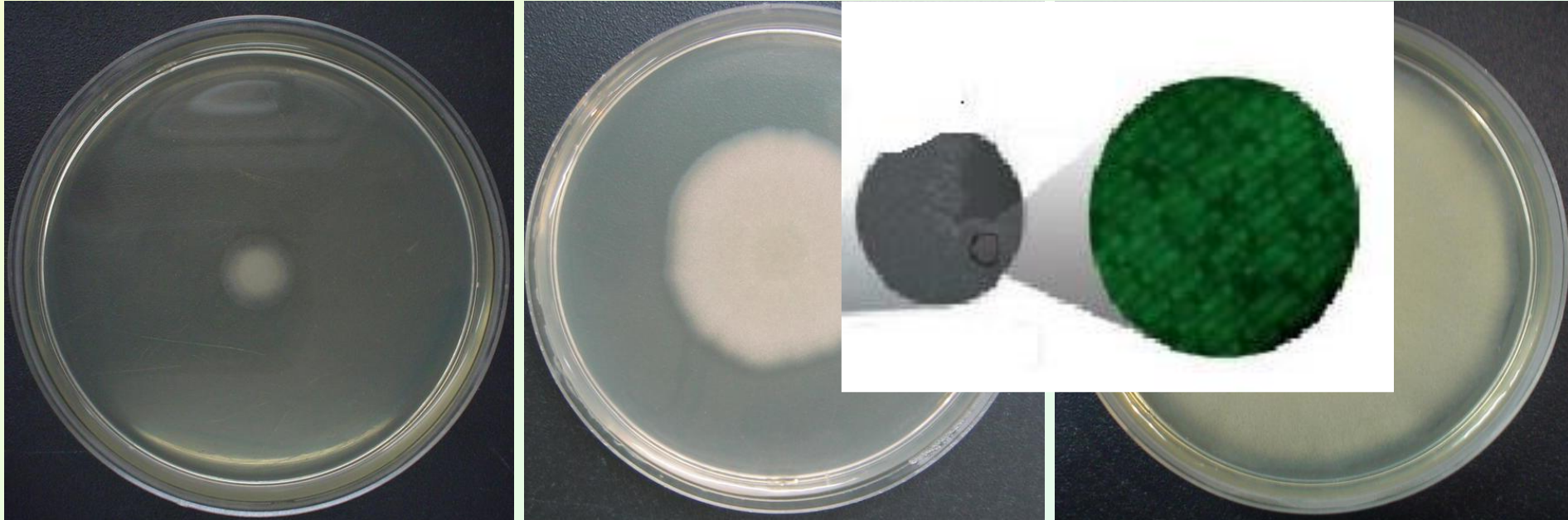
Diarrea en
cerdos

Diarrea en
perros

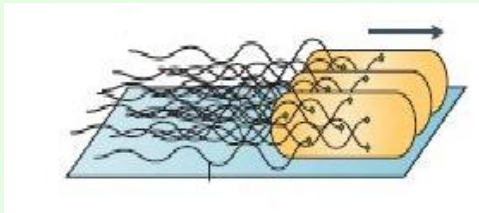
Cinética del gliding de *C. perfringens* causante de gangrena gaseosa.



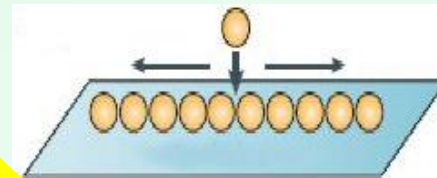
OTRO TIPO DE MOVILIDAD ASOCIADA A SUPERFICIES: EL SLIDING EN *BACILLUS*



Swarming

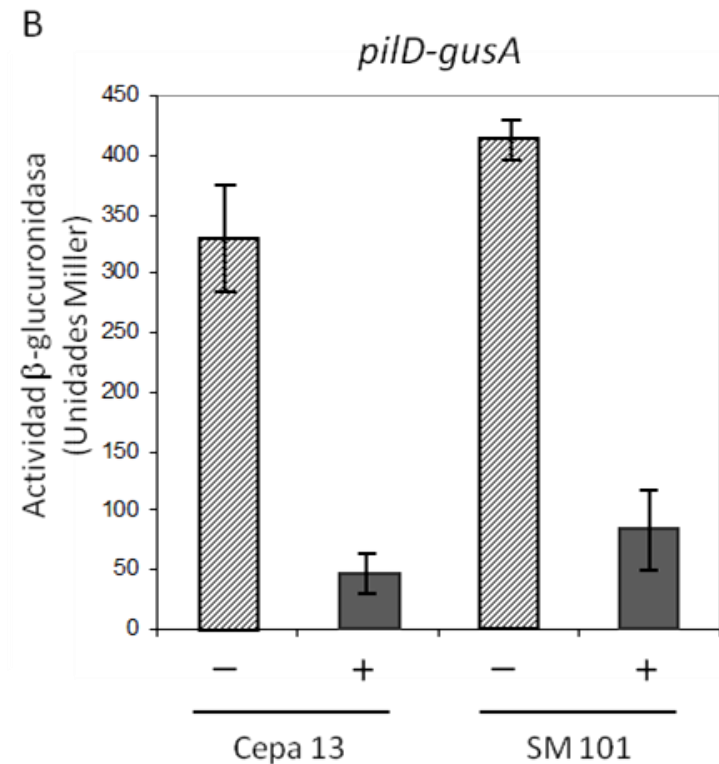
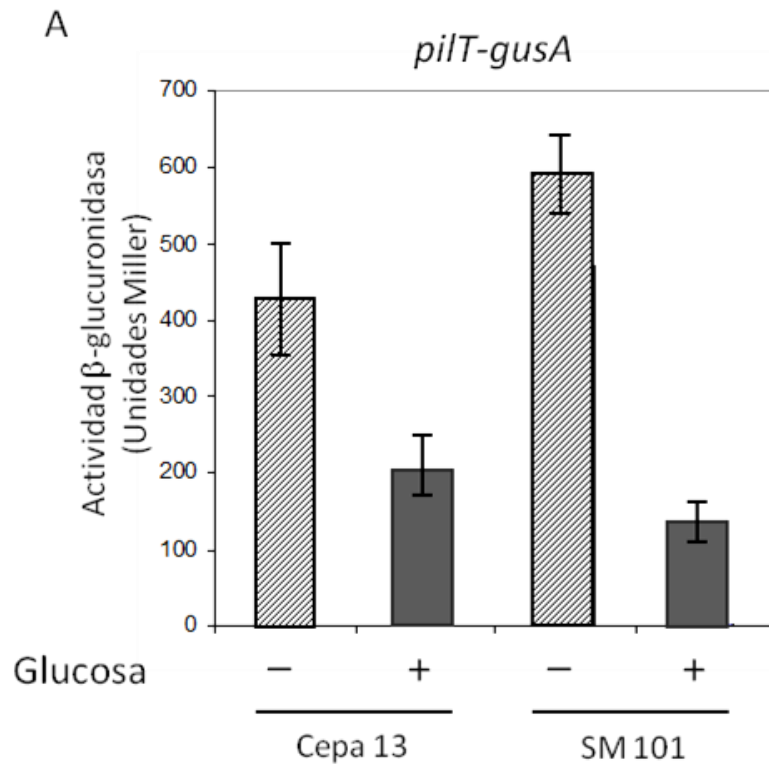
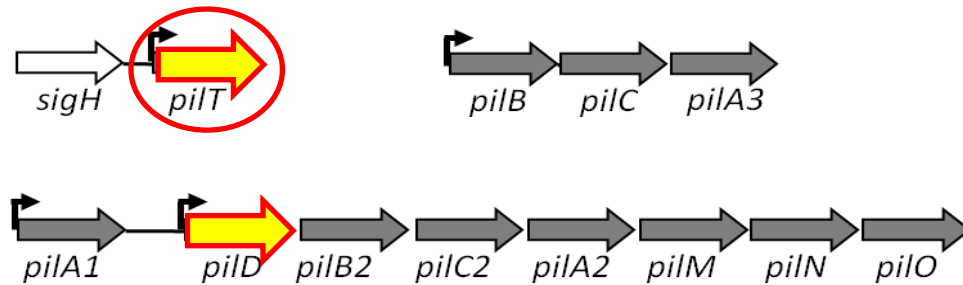


Sliding



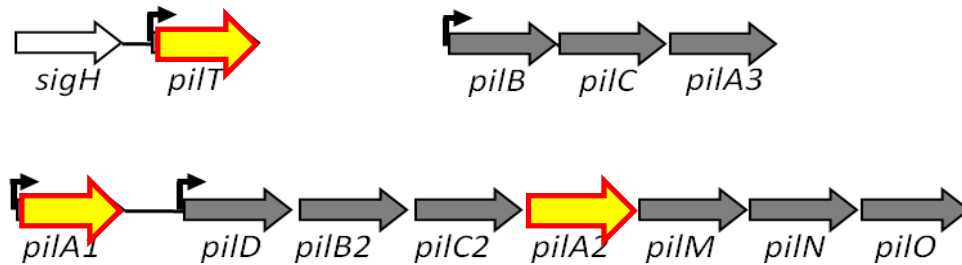
Determinación de la expresión de genes de biosíntesis del T4P.

Cepa 13 / SM101



Determinación de la expresión de genes de biosíntesis del T4P.

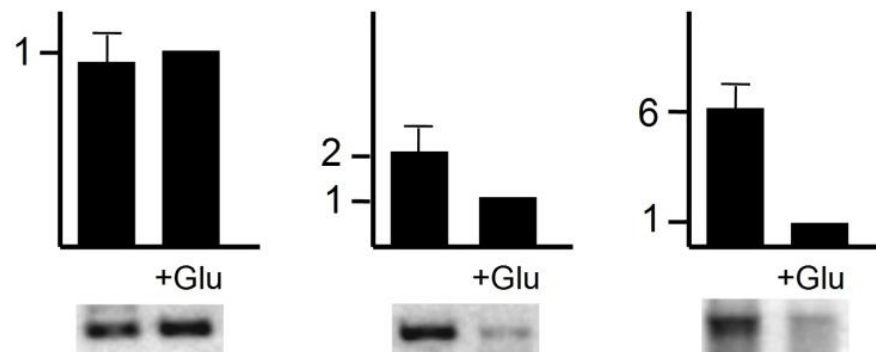
Cepa 13 / SM101



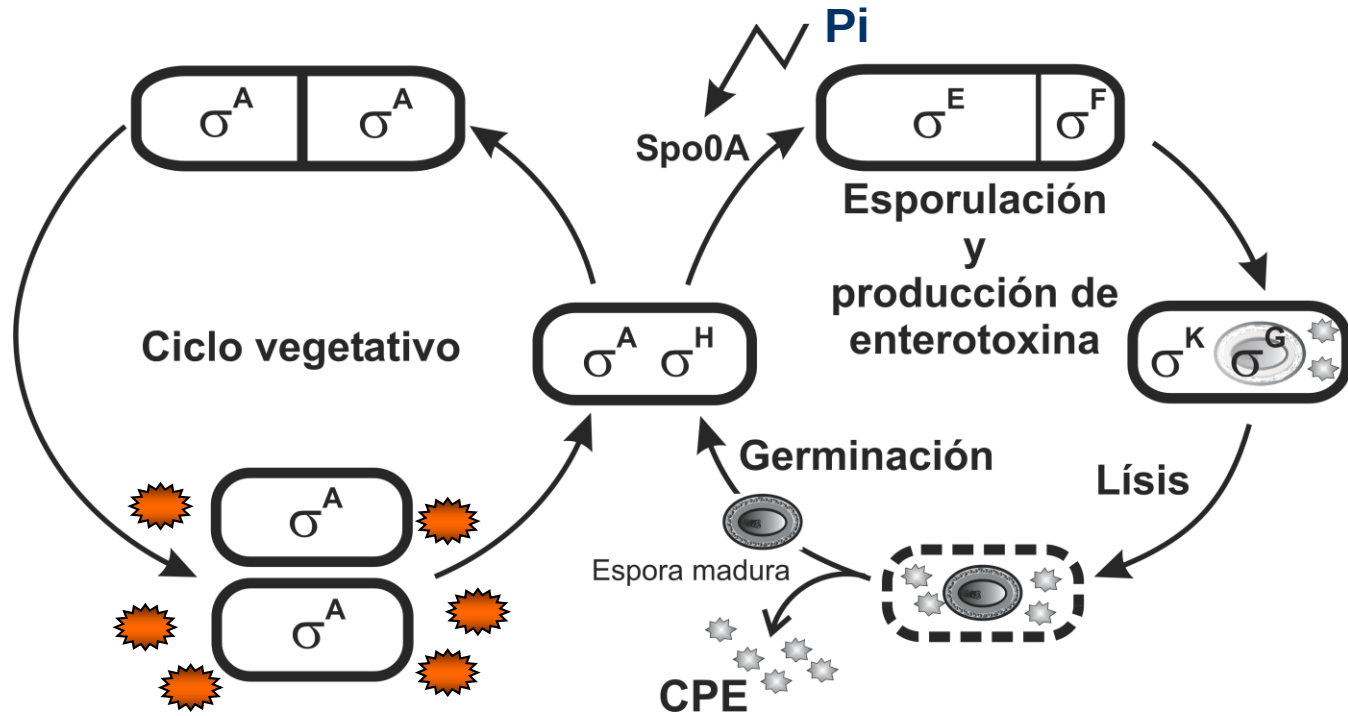
SM101



Cepa 13

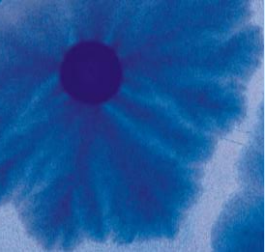


Clostridium perfringens



➤ *C. perfringens*

➤ Gangrena gaseosa, diarrea asociado al uso de antibióticos y consumo de alimentos contaminados



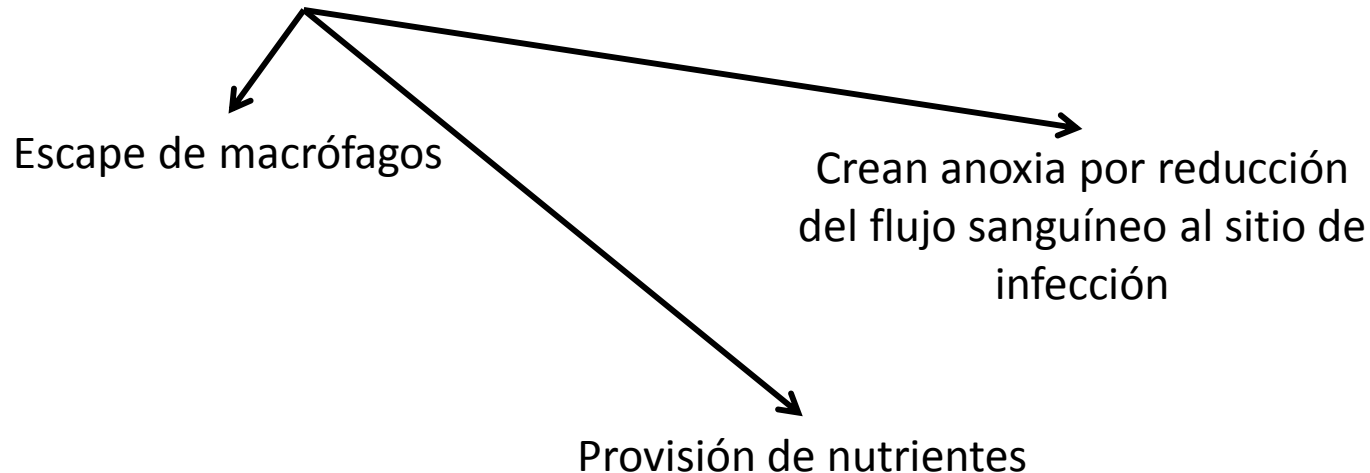
Toxinas producidas por *C. perfringens* Tipo A, cepa 13.

Gen	Nombre	Letra griega	Actividad durante la gangrena gaseosa
<i>plc</i>	PLC (Fosfolipasa C)	Alfa	Fosfolipasa C y Esfingomielasa. Promueve la agregación plaquetaria, generando anoxia por obturación de vasos sanguíneos.
<i>pfoA</i>	PFO (Perfringolisina)	Theta	Citotóxica para macrófagos. Importante en los estadios iniciales de la infección. Involucradas en el escape de <i>C. perfringens</i> al fagosoma del macrófago.
<i>colA</i>	Colagenasa	Kappa	Degradación de colágeno (Avance en el tejido de la gangrena gaseosa).
<i>nagH</i>	Hialuronidasa	Mu	Endo-beta-N-acetilglucosaminidasa sería capaz de actuar sobre tejido conectivo (Avance en el tejido de la gangrena gaseosa).
<i>nanI</i>	Neuraminidasa (Sialidasa)		Remueve ácido siálico de un gran número de glicoproteína, glicolípidos y oligosacáridos; estaría involucrada en la patogenia y nutrición de Clostridium (Avance en el tejido de la gangrena gaseosa).

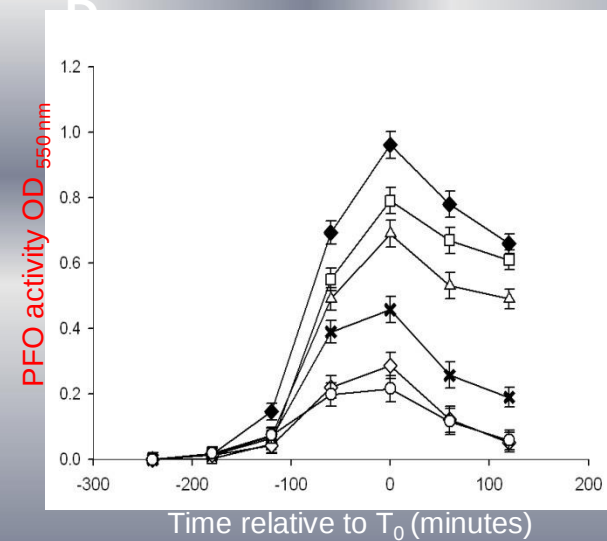
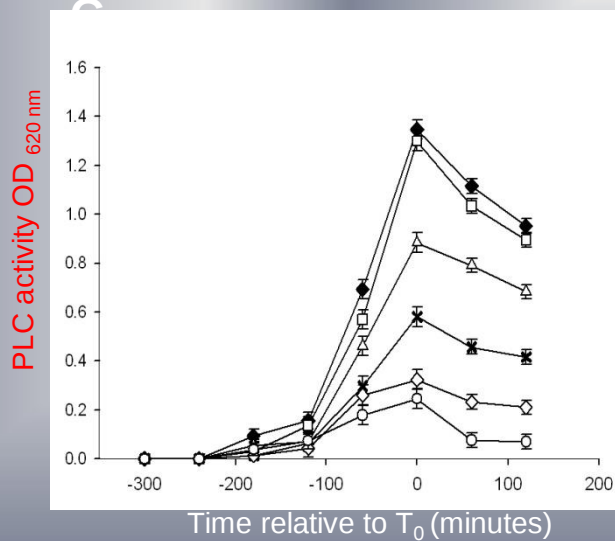
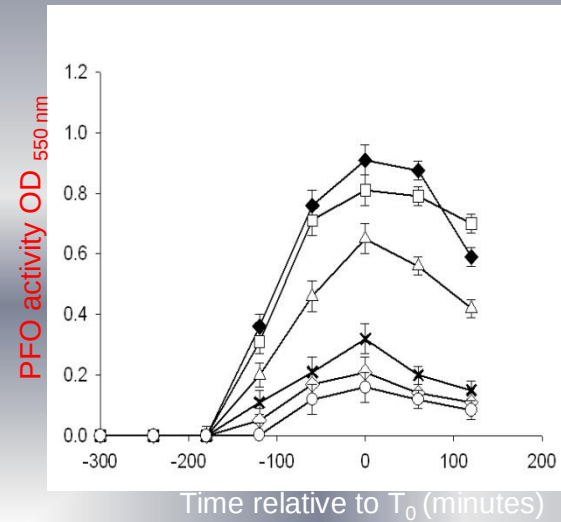
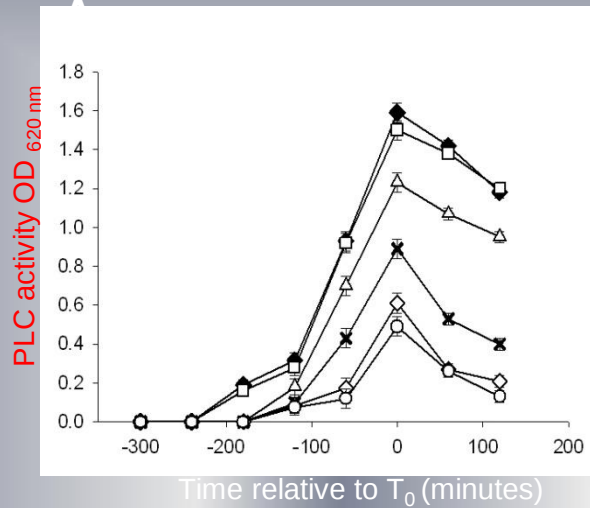
Gangrena gaseosa producida por *Clostridium perfringens*.

- ❖ Infección aguda causada por *C. perfringens* (por ejemplo Cepa 13).
- ❖ Destrucción de tejido, alteraciones en la agregación plaquetaria y en la marginación de leucocitos.
- ❖ Terapia con antibióticos poco eficaz, la gangrena gaseosa puede avanzar hasta 1 cm por hora.

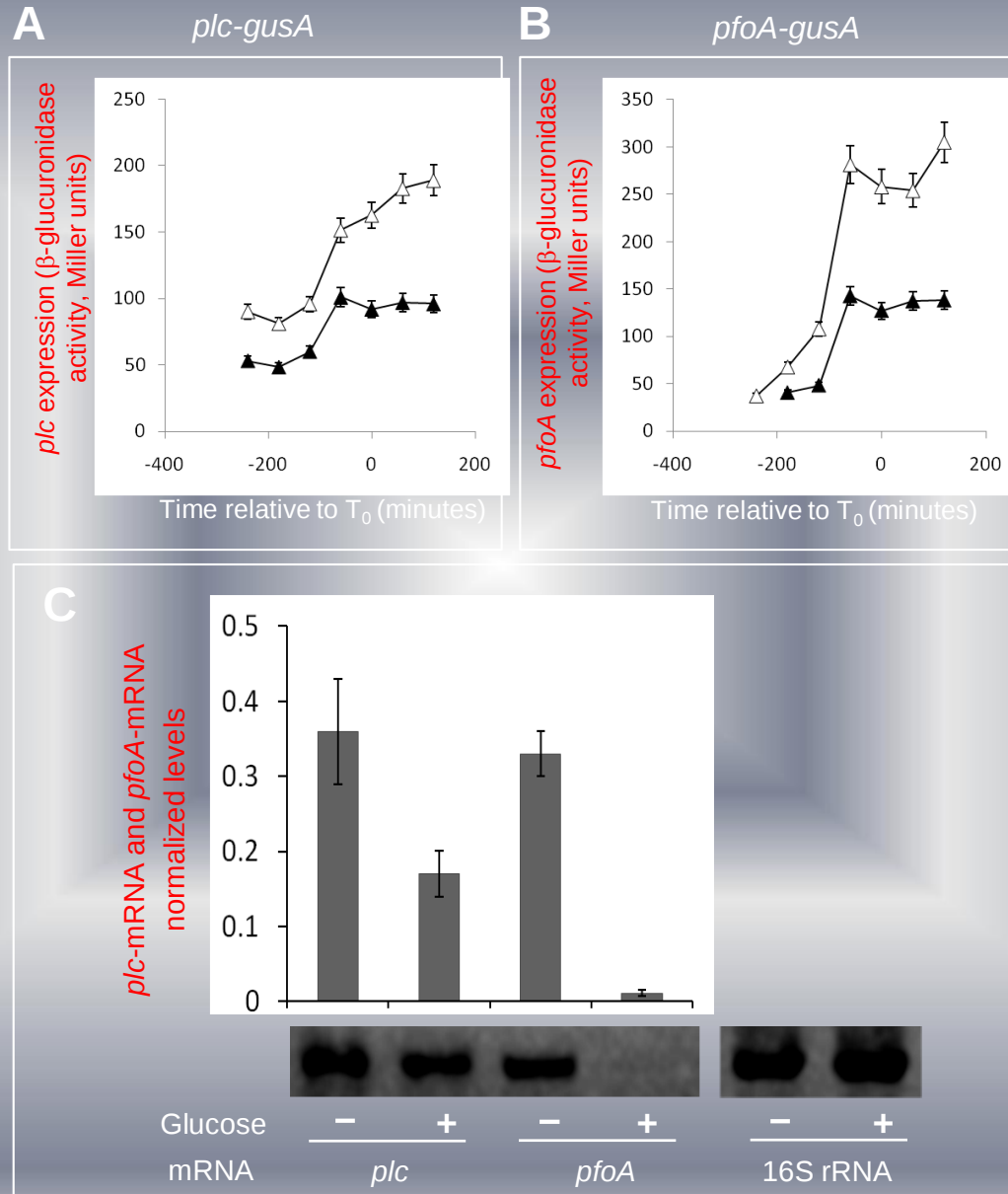
Las toxinas PLC y PFO son esenciales.



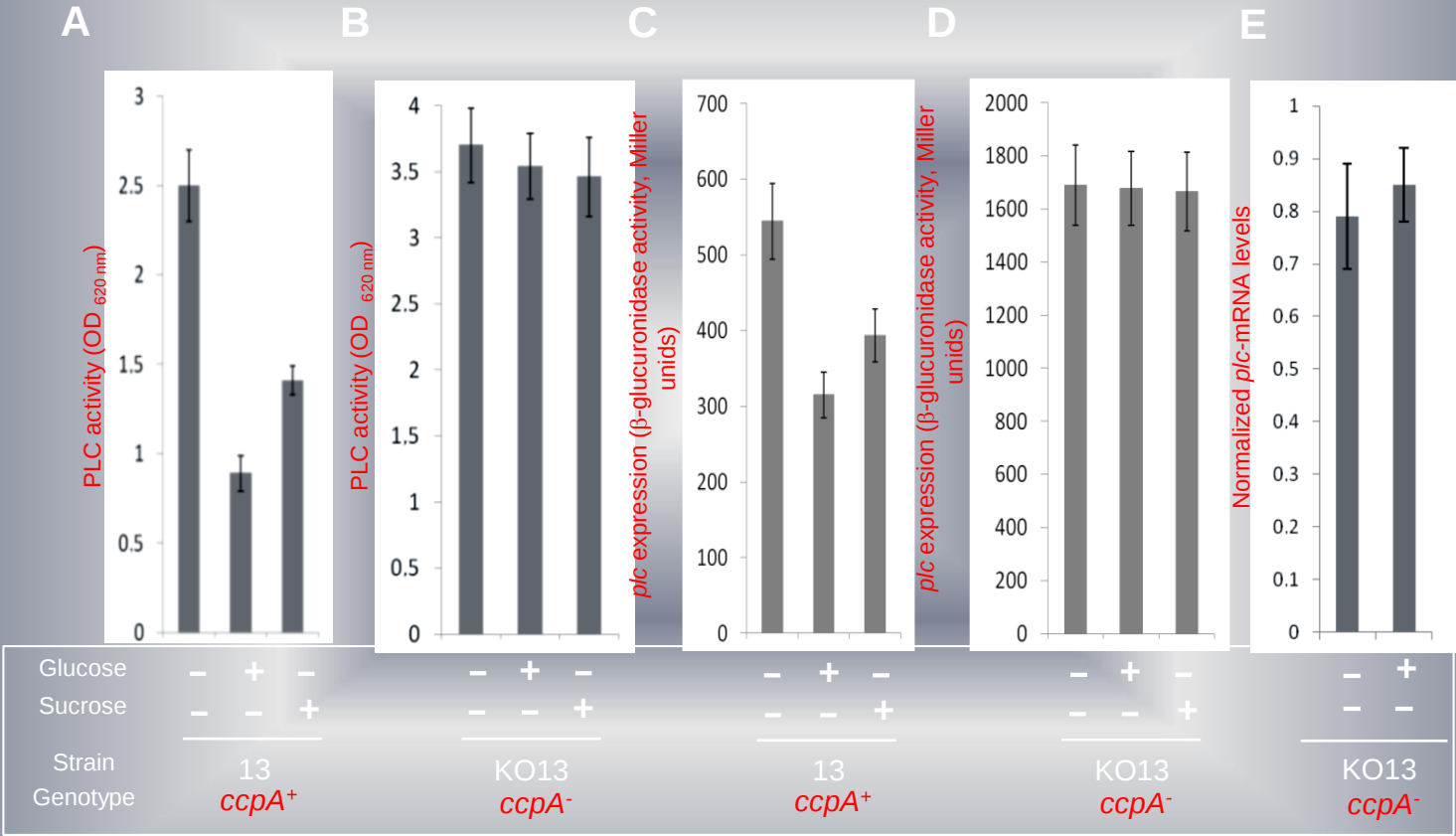
DISMINUCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE TOXINAS DEBIDO A REPRESIÓN CATABÓLICA



REPRESIÓN CATABÓLICA DE LA EXPRESIÓN DE GENES CODIFICANTES PARA TOXINAS

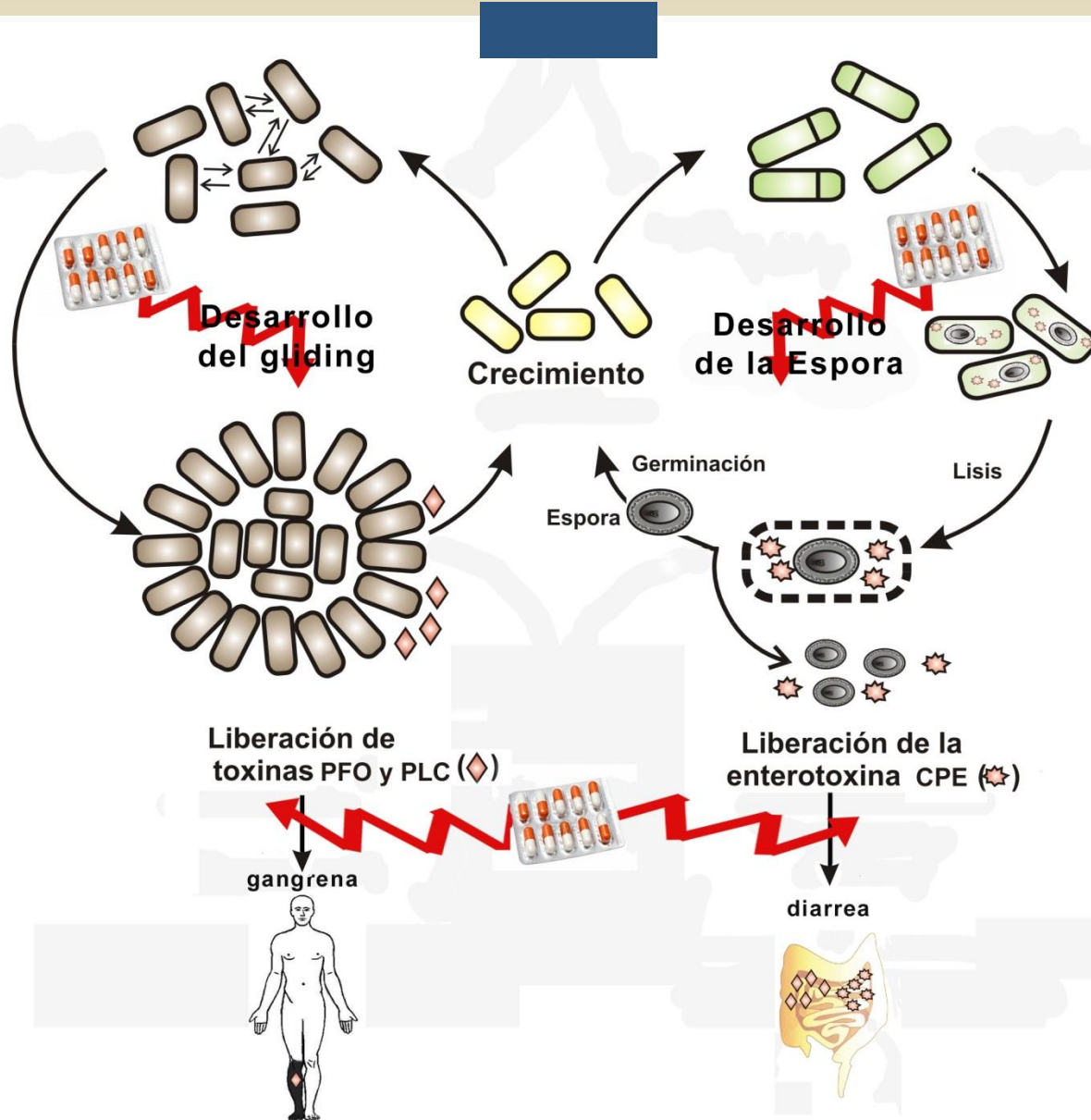


LA PRODUCCIÓN DE TOXINAS Y LA EXPRESIÓN DE SUS GENES CODIFICANTES ESTÁN BAJO EL CONTROL DEL REGULADOR TRANSCRIPCIONAL POR CATABOLITO CcpA



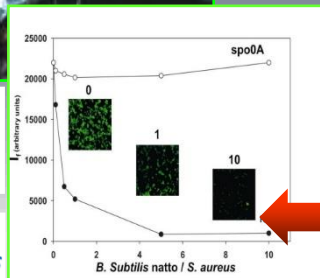
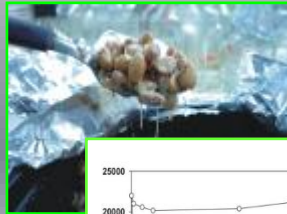


Jaque mate pastor a la Gangrena Gaseosa





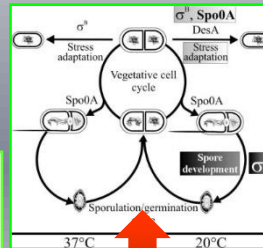
PROBIOTIC SPORES



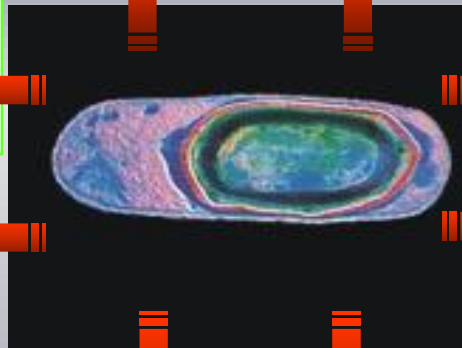
FRUITING BODY FORMATION



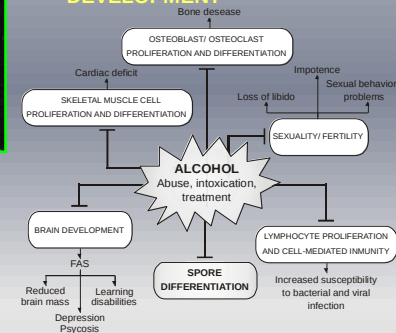
COLD SHOCK



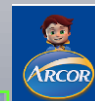
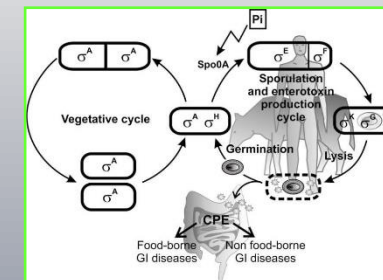
GERMINATION/PANSPERMIA



REGULATION OF DEVELOPMENT



PATHOGENESIS



ECOLOGICAL ANTIBIOTIC PRODUCTION



SOCIO/PSYCHOMICROBIOLOGY

