

VBNC: Viable but not Culturable Cells

Stefano Dumontet



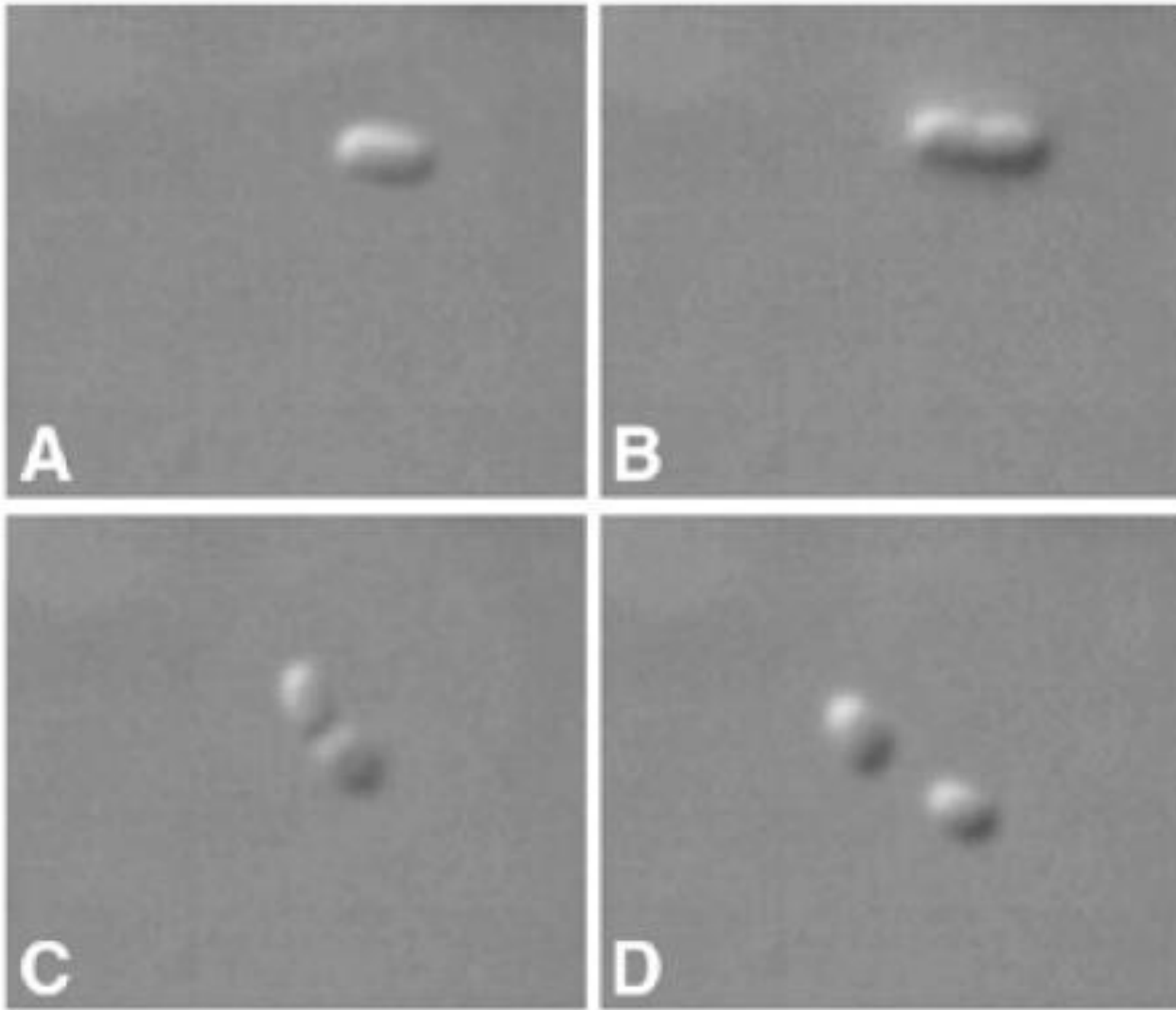
Avvertenza

I materiali presenti in queste diapositive sono frutto sia di lavoro personale che di ricerche effettuate sul web, su libri e su articoli scientifici e divulgativi.

Ove possibile, sono state riportate le fonti da cui si è desunto il materiale.

La crescita di microrganismi in laboratorio è stata la pietra angolare della microbiologia sin da quando Robert Koch ha coltivato per la prima volta i batteri con successo alla fine del diciannovesimo secolo. Tuttavia, ancora oggi, la maggior parte dei microrganismi rimane non coltivabile. Sono varie le spiegazioni sulla difficoltà di coltivare i batteri in laboratorio, compresa la mancanza di nutrienti essenziali, condizioni osmotiche non favorevoli, temperature incubazione non adeguate, basso tasso di crescita, sviluppo di microcolonie e presenza di cellule senescenti o scarsamente vitali e di cellule vitali ma non coltivabili (VBNC). VBNC si riferisce a uno stato in cui i batteri sono metabolicamente attivi, ma non sono più coltivabili di con i terreni di coltura di routine. Apparentemente è una strategia di sopravvivenza che è stata adottata da molti microrganismi in risposta a difficili condizioni ambientali. Le cellule batteriche nello stato VBNC possono riguadagnare la coltivabilità in condizioni favorevoli. La «rianimazione» delle cellule VBNC potrebbe essere un modo importante per coltivare i microrganismi, altrimenti incoltivabili, presenti in molti ambienti.

Chiedersi se le cellule batteriche siano vive o morte è una domanda importante e nello stesso tempo affascinante. La risposta a questa semplice domanda è spesso alla base di decisioni relative a questioni quali la sicurezza del cibo e dell'acqua potabile, la sterilità dei prodotti farmaceutici e simili. È affascinante perché in realtà è una domanda piuttosto impegnativa a cui rispondere. Il microbiologo, osservando una singola cellula batterica al microscopio non può accertarne lo stato vitale, anche se si può affermare che, poiché esiste, deve essere stata viva in qualche momento! Questo problema è unico per il microbiologo, poiché un biologo che si occupa di altri organismi può, ad esempio, può facilmente determinare se un topo in una gabbia sia vivo o no.



Divisione cellulare del batterio *Enterobacter aerogenes*. L'osservazione di una singola cellula (A) non permette di valutare il suo stato vitale. Nel caso la cellula cominci a dividersi (B e C), abbiamo la prova che la singola cella in (A) era viva. Lo stato di vitalità delle cellule della progenie (D) a sua volta non può essere determinato a meno che non mostrino a loro volta la capacità di crescere e dividersi.

Crescita e divisione costituiscono la base dei metodi microbiologici standard per l'analisi della vitalità dei batteri. La vitalità è equiparata alla coltivabilità i terreni di coltura sintetici. La coltivabilità a sua volta è definita come la capacità di una singola cellula di produrre una popolazione distinguibile dall'osservatore, di solito una colonia visibile sulla superficie di una piastra di un terreno di coltura agarizzato.

Recentemente, è stato proposto che alcune specie di batteri facilmente coltivabili, se soggetti a carenza prolungata di nutrienti, o altri stress, possono entrare in uno stato di sopravvivenza a lungo termine che non ne permettono la rilevabilità con test di coltivabilità (la questione se le cellule batteriche siano vive o morte è limitata a specie di batteri facilmente coltivabili in laboratorio).

Quando specie di batteri facilmente coltivabili sono sottoposte ad una estrema limitazione di nutrienti, il conteggio delle cellule coltivabili diminuisce, mentre il conteggio totale delle cellule al microscopio di solito rimane costante al livello iniziale. Questo porta all'aumento nel tempo (di solito diverse settimane) di numeri sostanziali di cellule non coltivabili. La spiegazione più semplice è che le cellule non coltivabili siano morte, e in effetti questa è la considerazione di base dei metodi basati sulla cultura. È stata avanzata una spiegazione alternativa che presume che le cellule non coltivabili si trovino in una condizione "vitale ma non coltivabile"(VBNC) stato in cui rimangono vitali ma non possono essere coltivate in laboratorio su terreni sintetici di coltura.

In condizioni di stress molti **batteri non sporigeni** possono entrare in uno stato metabolico alternativo nel quale le cellule sono vitali ma non coltivabili su terreni di coltura artificiali

Le cellule rimangono vitali e potenzialmente patogene, visto che possono riattivare il loro potenziale patogeno una volta riacquistata la piena funzionalità metabolica.

Queste forme “dormienti”, “quiescenti”, “microcisti” or “spore-like” costituiscono un’ importante strategia di sopravvivenza di *Vibrio cholerae* e altri batteri.

Questa strategia permette ai batteri di ridurre la loro taglia da 15 a 300 volte.

In questo stato di “*animazione sospesa*” i batteri non possono dividersi e riducono:

- tasso di respirazione
- metabolismo
- degradazione delle macromolecole

Questa strategia permette ai batteri di sopravvivere in condizioni ambientali difficili, come variazioni di temperatura e limitazioni di nutrienti.

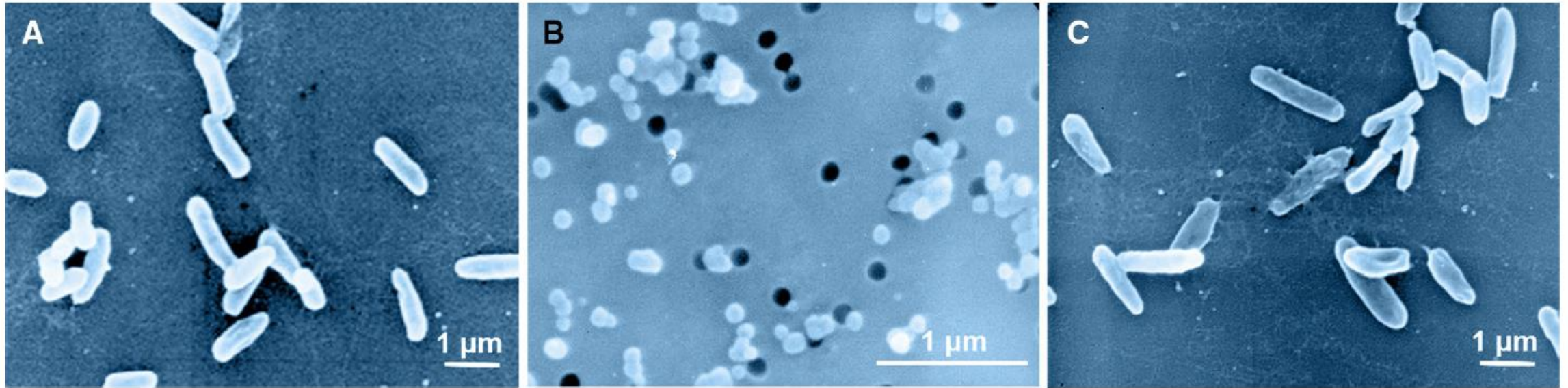


Fig. 3 Morphological characteristics of *Vibrio harveyi* SF1 analyzed with a scanning electron microscope. **a** Normal cells; **b** VBNC cells; **c** Resuscitated cells

Perché le cellule batteriche possono diventare VBNC

Fattori fisici:

alta/bassa temperatura, alta/bassa salinità (stress osmotico), pH subottimale, condizioni redox subottimali, luce solare, irraggiamento, essiccazione, stress da alta pressione.

Fattori chimici:

Scarsità di nutrienti, effetto tossico esercitato da antibiotici, conservanti alimentari, disinfettanti (ad esempio la clorazione), nitriti, metalli pesanti, inquinanti organici, esposizione ad altri composti tossici

Fattori biotici:

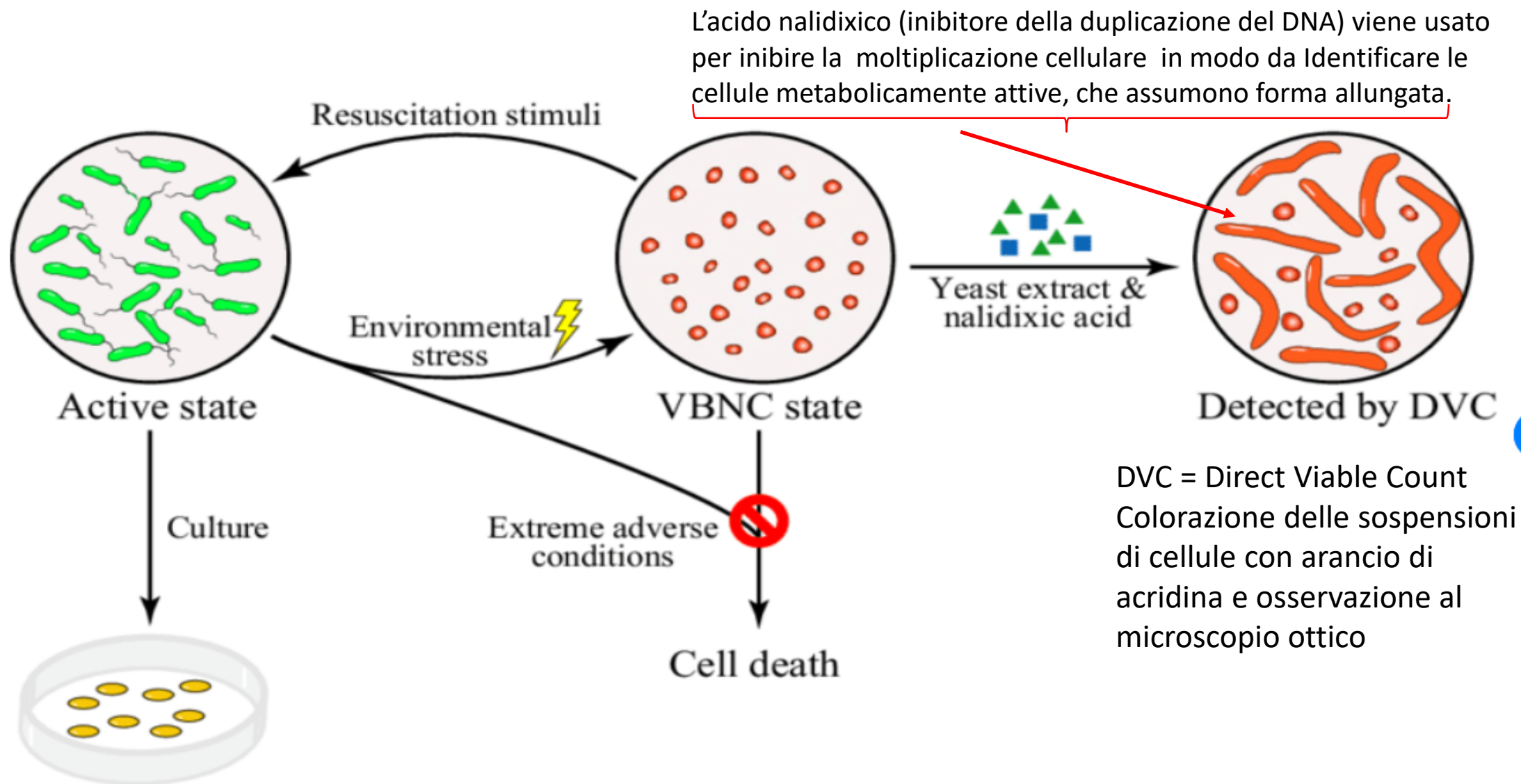
Il protozoo *Acanthamoeba castellanii* è in grado di indurre lo stato VBNC in *Aeromonas hydrophila* mentre le cellule VBNC del patogeno del corallo *Vibrio shiloi* sono state associate con la presenza dell'anellide polichete *Hermodice carunculata*. In un altro caso, lo stato VBNC in cellule di *Legionella pneumophila* è stato causato dall'ameba *Hartmannella vermiformis*. Le cause sono state identificate sia nella diminuzione di nutrienti dovuti alla competizione che alla produzione di metaboliti tossici.

Nell'ambiente naturale, i microrganismi sono sottoposti a una varietà di sollecitazioni per fronteggiare le quali sono necessarie specifiche strategie che consentano di resistere a condizioni dannose per la crescita. La possibilità di entrare nello stato VBNC è vantaggioso per la sopravvivenza a lungo termine dei batteri, altrimenti gli stress ambientali potrebbero potenzialmente avere effetto deleteri su intere popolazioni. Le cellule in stato VBNC possono successivamente rianimarsi quando lo stress è meno acuto o quando le cellule ricevono segnali circa il ristabilimento di favorevoli condizioni ambientali.

Nello stato VBNC i batteri adottano tassi di crescita inferiori e livelli ridotti di metabolismo, come un rallentamento della frequenza respiratoria, del trasporto dei nutrienti e della sintesi di macromolecole. Molte specie batteriche VBNC riducono le dimensioni cellulari, come ad esempio la formazione di cellule coccoidi con aumento dello spazio periplasmico. La diminuzione del rapporto superficie/volume può aiutare i batteri a ridurre il loro fabbisogno energetico. Spesso i batteri VBNC possono mantenere la loro integrità cellulare e le loro capacità di replicazione. Le cellule VBNC contengono concentrazioni ridotte di citoplasma, proteine totali e acidi grassi di membrana, ma mantengono livelli di ATP relativamente alti.

In virtù di questi cambiamenti, le cellule VBNC hanno una maggiore resistenza agli antibiotici e agli stress fisici e chimici che le cellule non coltivabili.

Non è chiaro se il potenziale di virulenza di patogeni in stato VBNC è mantenuto oppure no. Alcuni patogeni in stato VBNC non sono incapaci di causare malattie fino a quando non riacquistano la piena coltivabilità. Al contrario, altri rimangono potenzialmente patogeni e continuano esprimere i determinanti di patogenicità, come le tossine.



L'acido nalidixico (inibitore della duplicazione del DNA) viene usato per inibire la moltiplicazione cellulare in modo da identificare le cellule metabolicamente attive, che assumono forma allungata.

DVC = Direct Viable Count
Colorazione delle sospensioni di cellule con arancio di acridina e osservazione al microscopio ottico

The life cycle of VBNC cells. VBNC refers to a physiological state where bacteria are metabolically active, but are no longer culturable on conventional growth media. It is a survival strategy adopted by many bacteria in response to harsh environmental conditions, and the VBNC cells may return to culturable state under favorable conditions

L'ipotesi VBNC ha spesso generato accesi dibattiti che riguardano le presunte inadeguatezze di metodi standard di coltivazione batterica e la presunta minaccia per la salute pubblica posta da batteri nello stato VBNC.

D'altra parte, l'osservare che le tecniche colturali oggi disponibili sono inadeguate alla coltivazione di cellule in stato di stress mette in evidenza un il punto focale dell'ipotesi VBNC: se l'ipotesi è vera e le cellule non sono coltivabili, come si può applicare un test di coltivabilità?

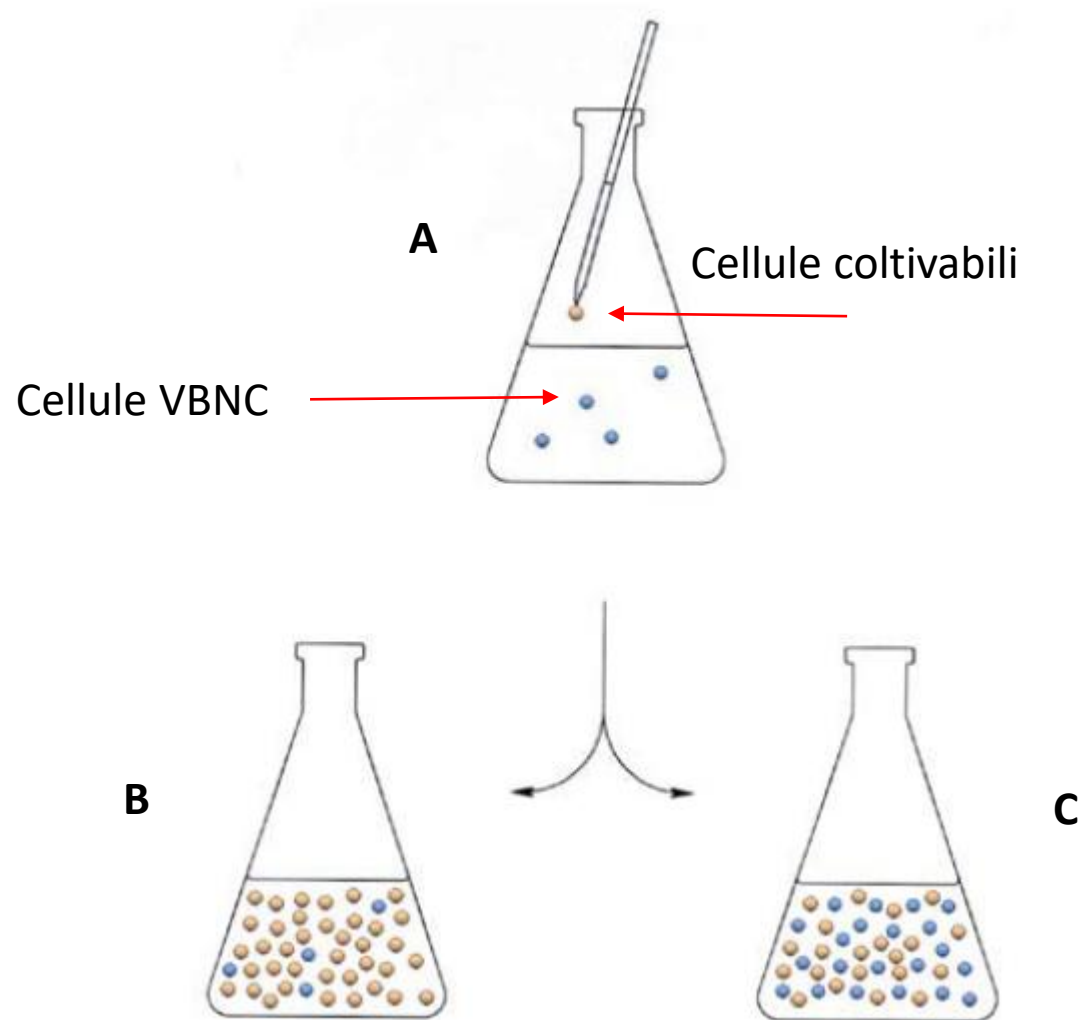
La conferma dell'ipotesi VBNC richiederebbe il recupero di cellule coltivabili da una popolazione di cellule non coltivabili. Ci sono state numerose segnalazioni della comparsa di cellule coltivabili in popolazioni di cellule non coltivabili dopo l'aggiunta di nutrienti in un processo chiamato "rianimazione".

È stato suggerito che la presenza di cellule coltivabili può essere richiesta per la produzione di un fattore in grado di innescare la rianimazione di cellule non coltivabili.

Ovviamente, non è possibile semplicemente mescolare cellule coltivabili e non coltivabili dello stesso ceppo, perché, in questo modo, non sarebbe possibile determinare, dopo l'aggiunta di nutrienti e incubazione, se le cellule che si sviluppano sono quelle «resuscitate» o quelle aggiunte.

Invece è possibile un "recupero in coltura mista" (MCR), metodo che impiega batteri facilmente distinguibili dal batterio in esame.

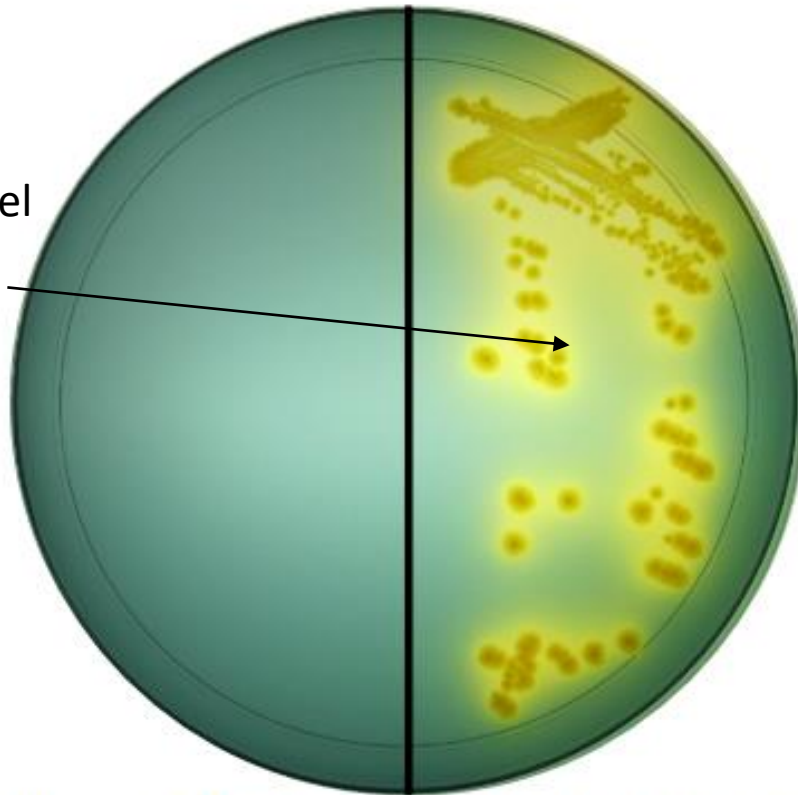
Recupero delle cellule VBNC con il metodo della coltura mista (MCR)



La beuta A contiene cellule non coltivabili (pallini blu) di un batterio in condizione VBNC in un mezzo nutritivo appropriato per la loro crescita. Cellule vitali di un ceppo batterico diverso da quello in stato VBNC (pallini arancioni) vengono aggiunte nella beuta A. Se le cellule coltivabili rianimano le cellule non coltivabili, entrambi i tipi di cellule aumentano di numero (beuta C). Se la crescita è limitata alle cellule coltivabili, solo quel tipo di cellula aumenta di numero (beuta B) e le cellule VBNC rimangono non coltivabili. La chiave del test MCR è che i due tipi di cellule siano facilmente discriminabili.

Crescita di cellule di *Vibrio cholerae* su agar TCBS

Acidificazione del terreno per la fermentazione del saccarosio



Without HT-29

With HT-29

Cellule VBNC preventivamente coltivate in assenza del ceppo batterico HT-29

Cellule VBNC preventivamente coltivate in presenza del ceppo batterico HT-29

TCBS Agar (tiosolfato-citrato-bile-saccarosio). Terreno selettivo utilizzato per l'isolamento di *Vibrio cholerae* e di altri vibrioni da campioni clinici, alimentari o ambientali.

Composizione: peptone, estratto di Lievito, sodio citrato, sodio tiosulfato, ferro citrato, sodio cloruro, bile bovina, saccarosio, blu di bromotimolo, blu di timolo, agar

Il citrato di sodio, il tiosolfato di sodio e la bile bovina sono agenti selettivi. Il sodio favorisce la crescita dei vibrioni, che sono organismi alofili. Il tiosolfato di sodio è una fonte di zolfo e, interagendo con il citrato ferrico, mette in evidenza la produzione di solfuro di idrogeno. Il blu di bromotimolo e il blu di timolo sono indicatori di pH.

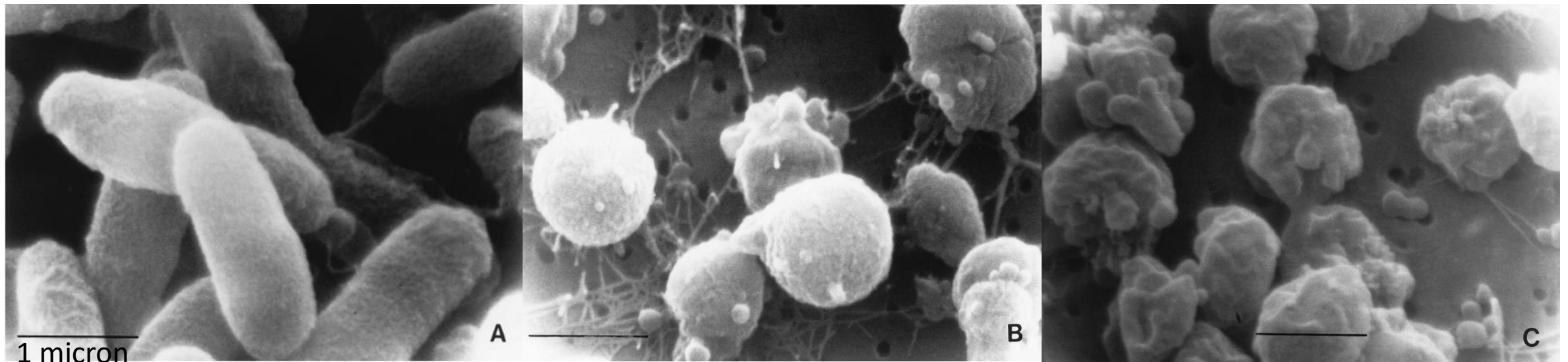
Imamura, D., Mizuno, T., Miyoshi, S., & Shinoda, S. (2015). Stepwise changes in viable but nonculturable *Vibrio cholerae* cells. *Microbiology and Immunology*, 59(5), 305–310.

Differenza tra cellule danneggiate e cellule VBNC

Un danno cellulare porta allo stato di *injured cell*. Tale stato può essere invertito in condizioni appropriate per consentire alla cellula danneggiata di riprendere la crescita. La morte nei batteri è definita come il punto in cui l'entità del danno è al di là della capacità di ripresa della crescita.

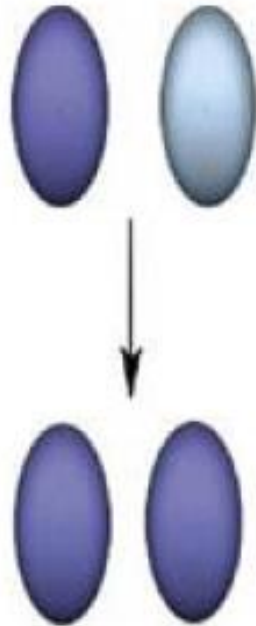
L'ipotesi VBNC, al contrario, postula uno specifico programma di differenziazione in uno stato di sopravvivenza a lungo termine, cosa nettamente diversa dalla degenerazione in una cellula danneggiata, seguita da un'ulteriore degenerazione che può portare alla morte. Inoltre, la rianimazione dallo stato VBNC è definita come la conversione di cellule non coltivabili in cellule coltivabili, anche senza alcun cambiamento del numero di cellule dovuto alla ricrescita

VBNC

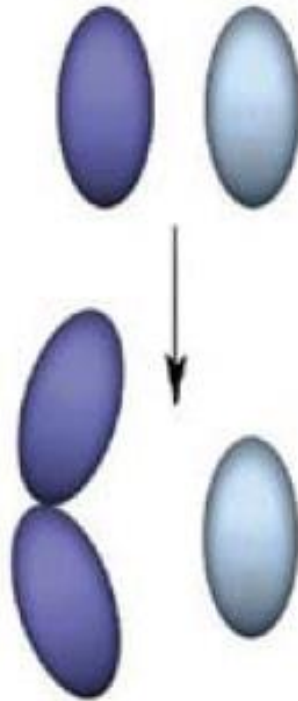


Micrografie elettroniche a scansione di *V. parahaemolyticus* . A) cellule giovani in fase logaritmica di crescita; B) cellule allevate in limitazione di nutrienti per 1 settimana a 3,5 °C; C) cellule allevate in limitazione di nutrienti per 6 settimane a 3.5 °C.

Resuscitation



Regrowth



Ricrescita vs rianimazione. Una miscela di cellule coltivabili (blu scuro) e cellule non coltivabili (blu chiaro) vengono sottoposte a una tecnica di rianimazione. Se l'unica risposta è la crescita delle cellule coltivabili, allora si è verificata la ricrescita (a destra). Se c'è conversione di cellule non coltivabili in cellule coltivabili senza alcun cambiamento nel numero di cellule a causa della ricrescita (a sinistra), si è verificata la vera rianimazione.

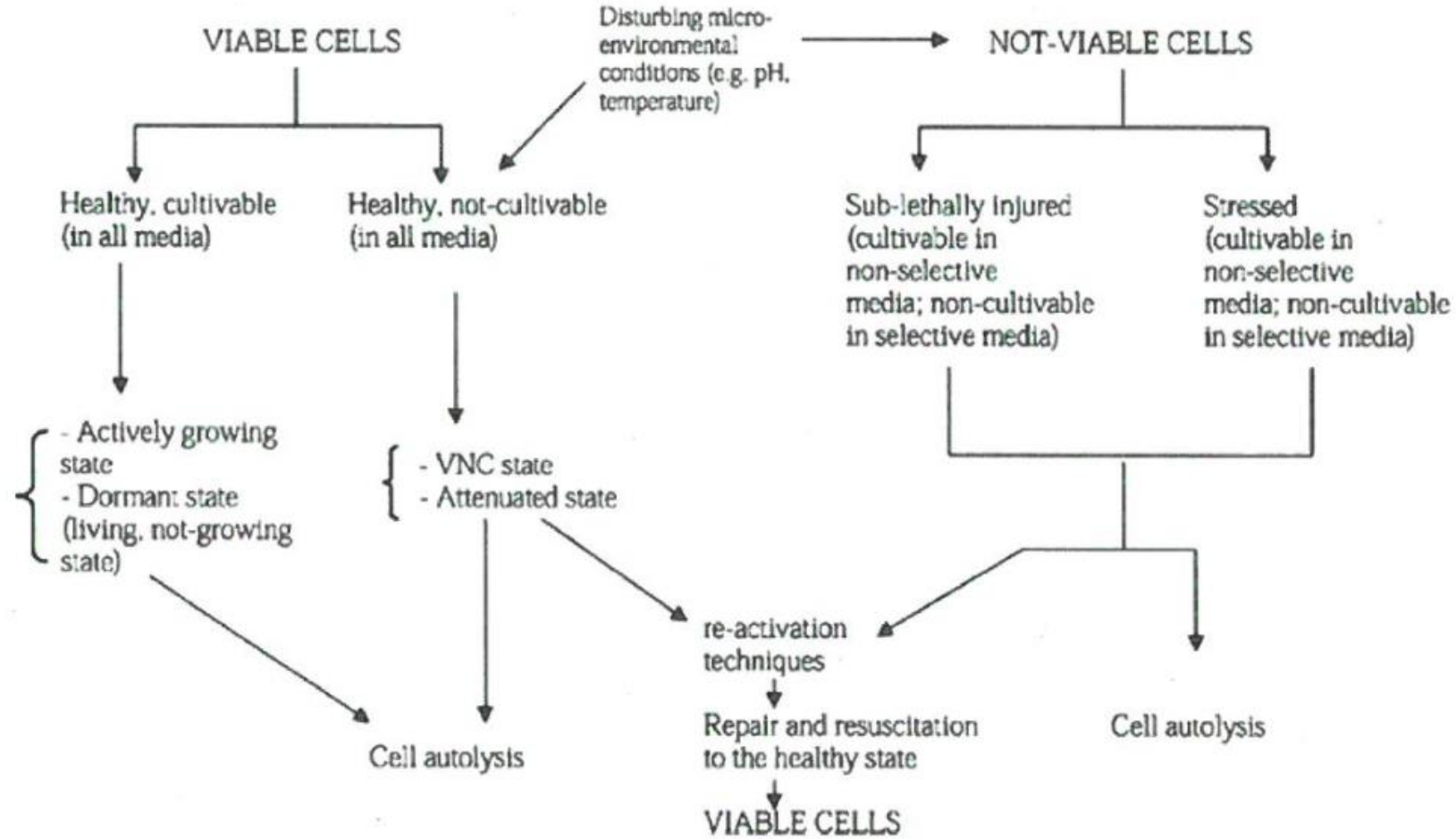


Fig. 1.2 Ecophysiological phenomena related to the cultivation ability of microbial cells in natural ecosystems (Giraffa and Neviani 2001)

Cellule VBNC: il caso di *Vibrio cholerae*

Sistematica del genere *Vibrio*

Specie associate a patologie umane	Specie ambientali patogene per organismi acquatici
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>V. damsela</i>
<i>Vibrio mimicus</i>	<i>V. salmonicida</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>V. penaeicida</i>
<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>V. Anguillarum</i>
<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>V. ichthyoeneri</i>
<i>Vibrio hollisae</i>	<i>V. ordalii</i>
<i>Vibrio metschnikovii</i>	<i>V. pectenicida</i>

Patologie causate da *Vibrio* spp.

Intestinali

Colera

Gastroenteriti

Extra-intestinali

Setticemia

Epatopatie

Infezioni di ferite

Setticemia

Fattori di virulenza

Tossina colerica

Tossina colera-like

Proteasi

Lipasi

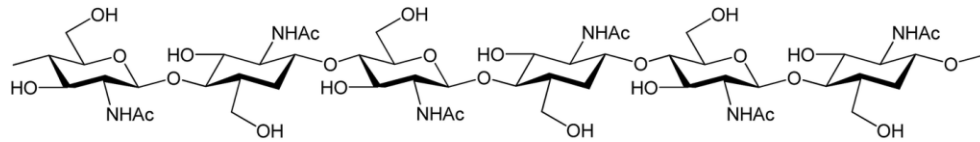
Colonising Antigen Factor

Lectine, adesine, fimbriae,
lipolisaccaridi

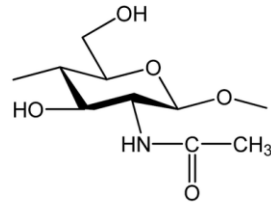
Flagelli

Molte specie del genere *Vibrio* possono:

Idrolizzare la chitina con chitinasi

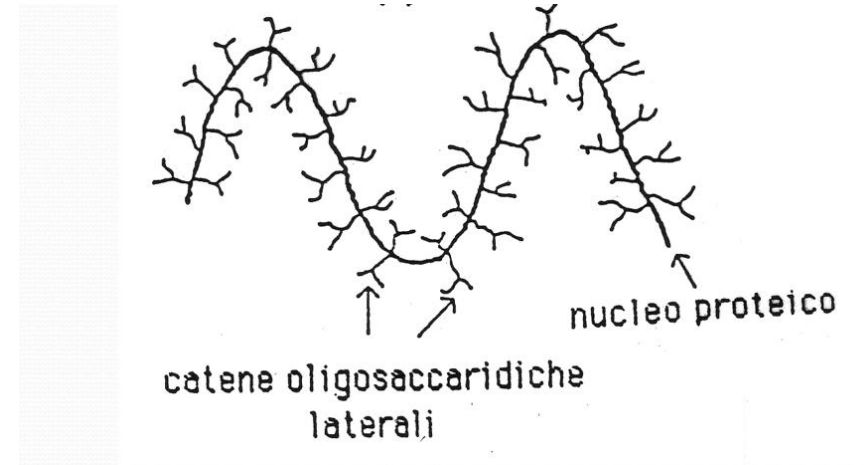


Chemical structure of chitin



Repeating unit of chitin

Idrolizzare la mucina (glicoproteina) con mucinasi



Tutte le specie di *Vibrio* sono alofile o alotolleranti.

V. cholerae e *V. mimicus* sono definiti non-alofili perché possono crescere sia in presenza che in assenza di sali.

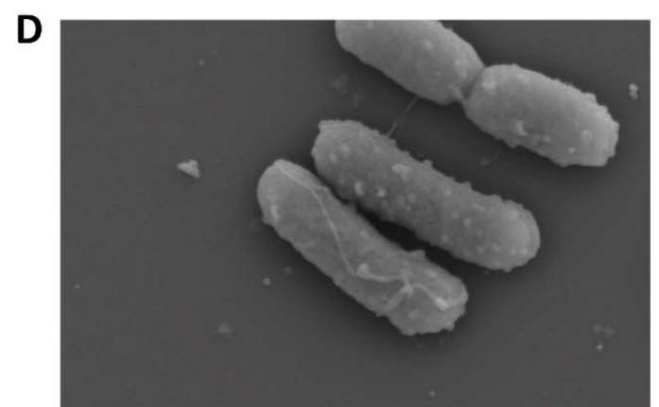
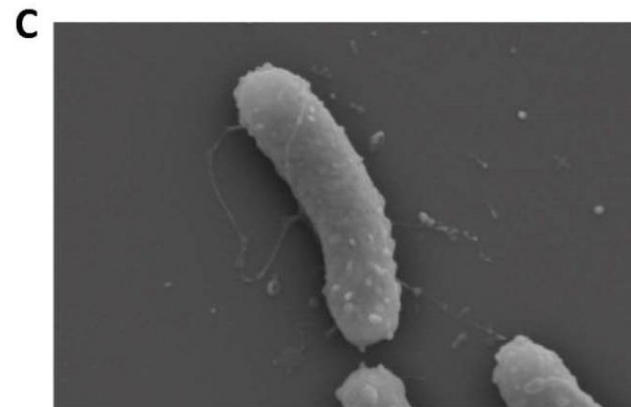
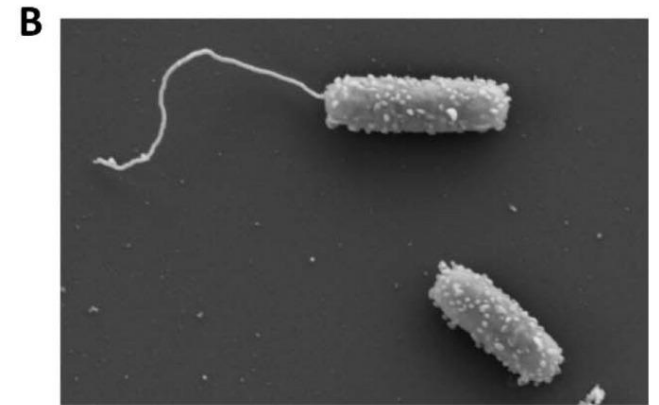
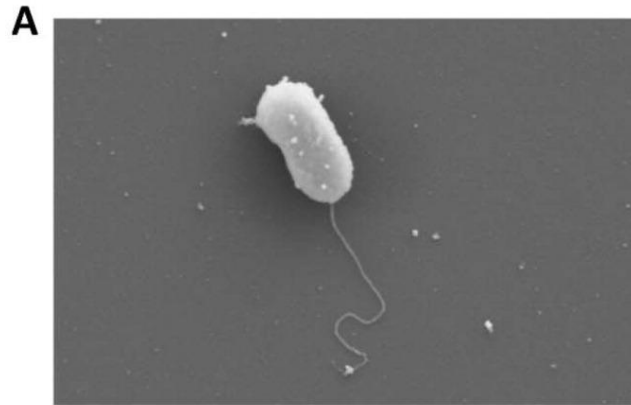
Vibrio cholerae.

Chemiorganotrofo

Alofilo

Strategia *r*

Capace di stabilire relazioni
ecologiche con organismi marini

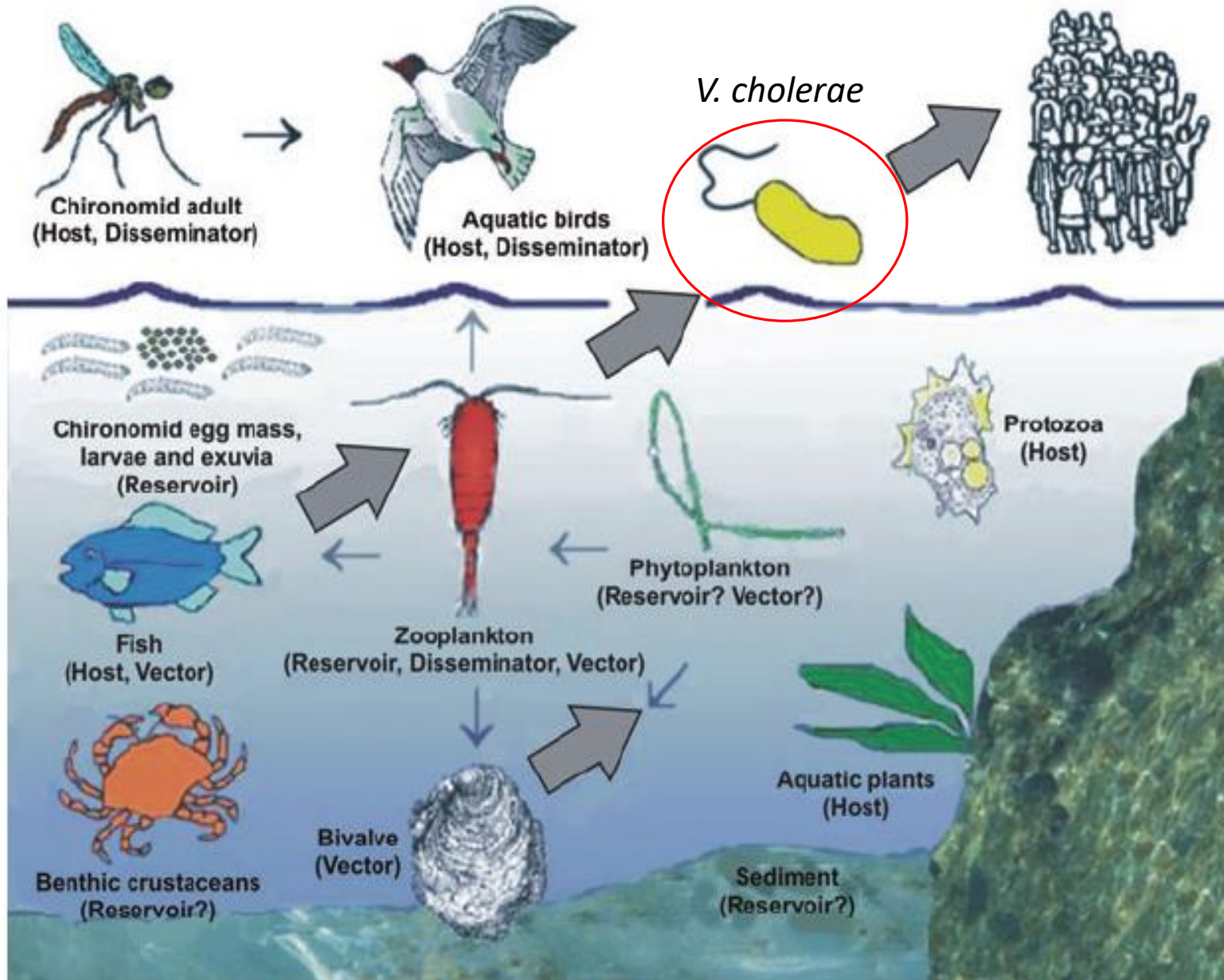


Negli ambienti acquatici *Vibrio cholerae* è associato a una varietà di organismi, compresi gli animali con esoscheletro chitinoso (ad esempio i copepodi), piante acquatiche, protozoi, molluschi bivalvi, uccelli acquatici, così come substrati abiotici (ad esempio sedimenti). La maggior parte di questi serbatoi ambientali sono ben noti e rappresentano luoghi dove l'agente patogeno vive, mantenendo intatto il suo potenziale patogeno.

I serbatoi ambientali servono anche come disseminatori di *V. cholerae* attraverso dei vettori. Possono essere responsabili dello svilupparsi di un'epidemia, possono essere fondamentali per l'endemicità del colera e influenzano l'evoluzione della virulenza di questi patogeni.

Oltre al ruolo ben conosciuto dello zooplancton come il più grande serbatoio ambientale per *V. cholerae*, altri serbatoi giocano un ruolo nell'epidemiologia del colera favorendo la persistenza dell'agente patogeno durante i periodi inter-epidemici. Poco si sa sui fattori ecologici che influenzano la sopravvivenza di *V. cholerae* in associazione con substrati acquatici biotici e abiotici.

Serbatoi ambientali e ospiti di *V. cholerae* nell'ambiente acquatico



Le frecce di colore scuro indicano interazioni trofiche o accidentali. Le frecce più spesse indicano la trasmissione da serbatoi ambientali e/o ospiti all'uomo, ad esempio il consumo di crostacei crudi o parzialmente cotti e di pesce crudo, ingestione di acqua da stagni o fiumi durante la fioritura del fitoplancton

La prolungata sopravvivenza di *V. cholerae* degli ambienti acquatici è stata associata alle relazioni stabilite con diversi organismi

Anabena variabilis e *Microcystis aeruginosa* (cianobatteri)

Skeletonema costatum (diatomea)

Ascophyllum nodosum (feofita)

Eichloronia crassipes (giacinto d'acqua)

Lemna minor (lenticchia d'acqua)

Rhizoclonium fontanum (alga verde filamentosa)

Copepodi

Uova di Chironomidi (Famiglia di insetti Ditteri simili alle zanzare, ma privi di apparato boccale pungente)

Vibrionaceae, chitinasi e mucinasi

La mucinasi è in grado di degradare

- 1) La mucina dell'epidermide dei pesci
- 2) Lo strato mucillaginoso delle cellule algali
- 3) La mucina delle cellule intestinali di animali a sangue caldo

Lo strato mucillaginoso che riveste le cellule del cianobatterio *Anabena variabilis* può ospitare *V. cholerae* in concentrazioni da 1.000 a 5.000 volte superiori a quelle riscontrate nella colonna d'acqua.

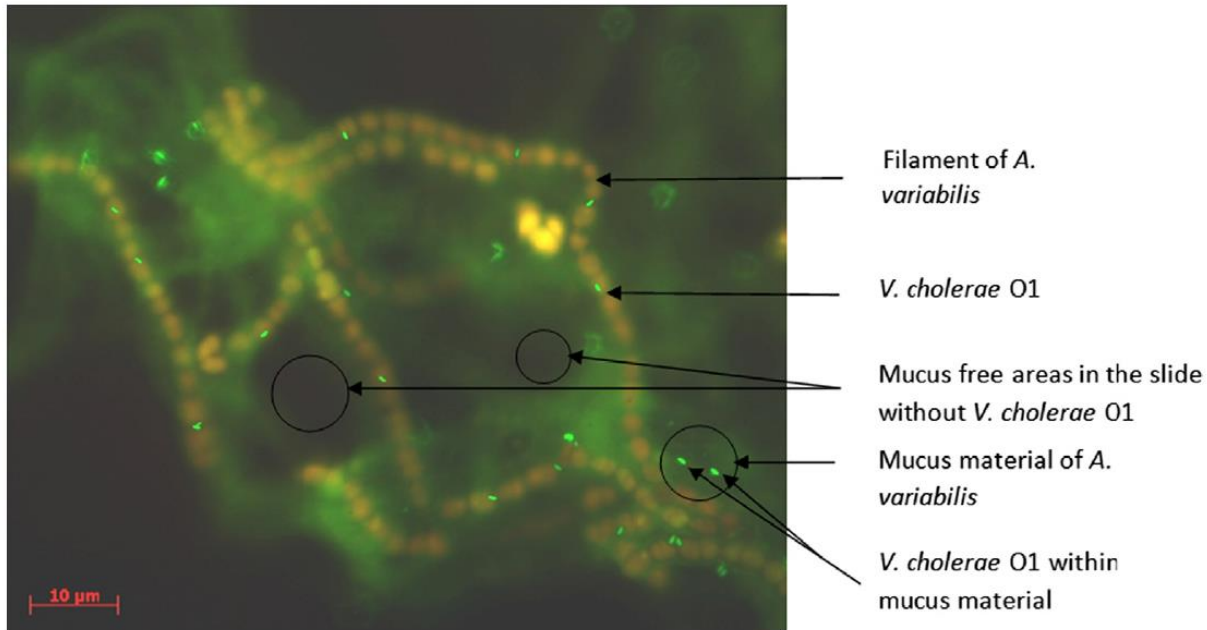


Fig. 1a. Association of *V. cholerae* O1 with *A. variabilis* in microcosm.

Associazione di *Vibrio cholerae* con lo strato mucoso che riveste le cellule del cianobatterio *Microcystis aeruginosa*

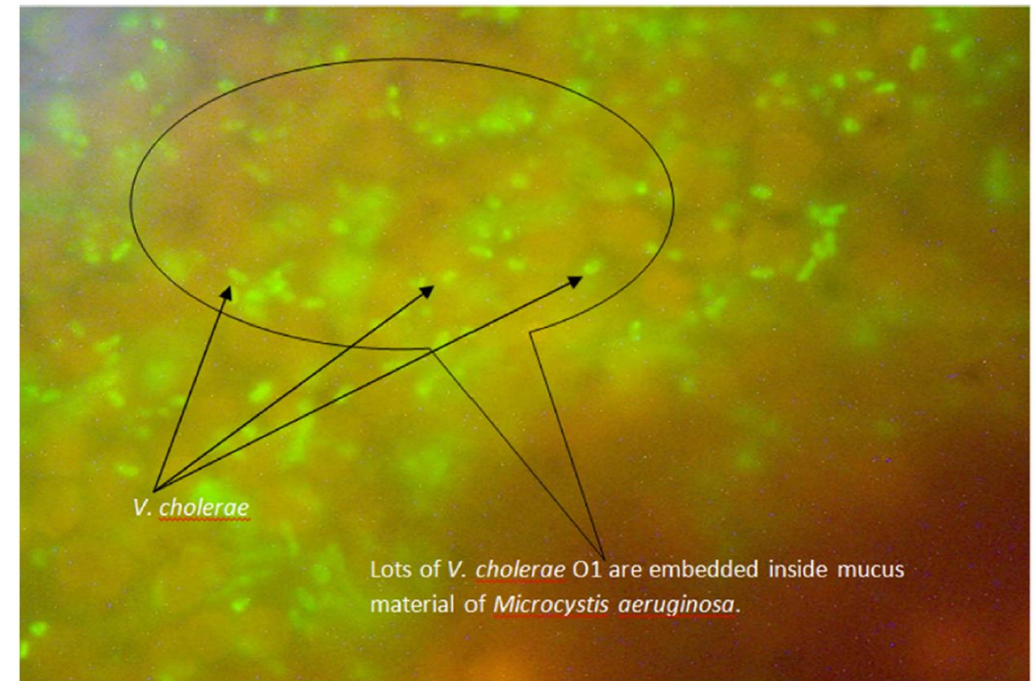


Fig. 1b. Association of *Vibrio cholerae* O1 with *Microcystis aeruginosa*.

Rhizoclonium sp.



V. cholerae può colonizzare
Rizoclonium fontanum
moltiplicandosi rapidamente e
rilasciando alte concentrazioni di
tossina colerica

Photographer: Ken Thomas

<https://bie.ala.org.au/species/NZOR-6-56186#overview>

Le uova di Chironomidi sono un possibile serbatoio naturale di *V. cholerae*. Le uova Chironomidi possono ospitare *V. cholerae* sia in forma vitale che VBNC. Meno dello 0,5% delle cellule *V. cholerae* presenti nelle masse di uova e osservate al microscopio a fluorescenza hanno prodotto colonie (stato VBNC).

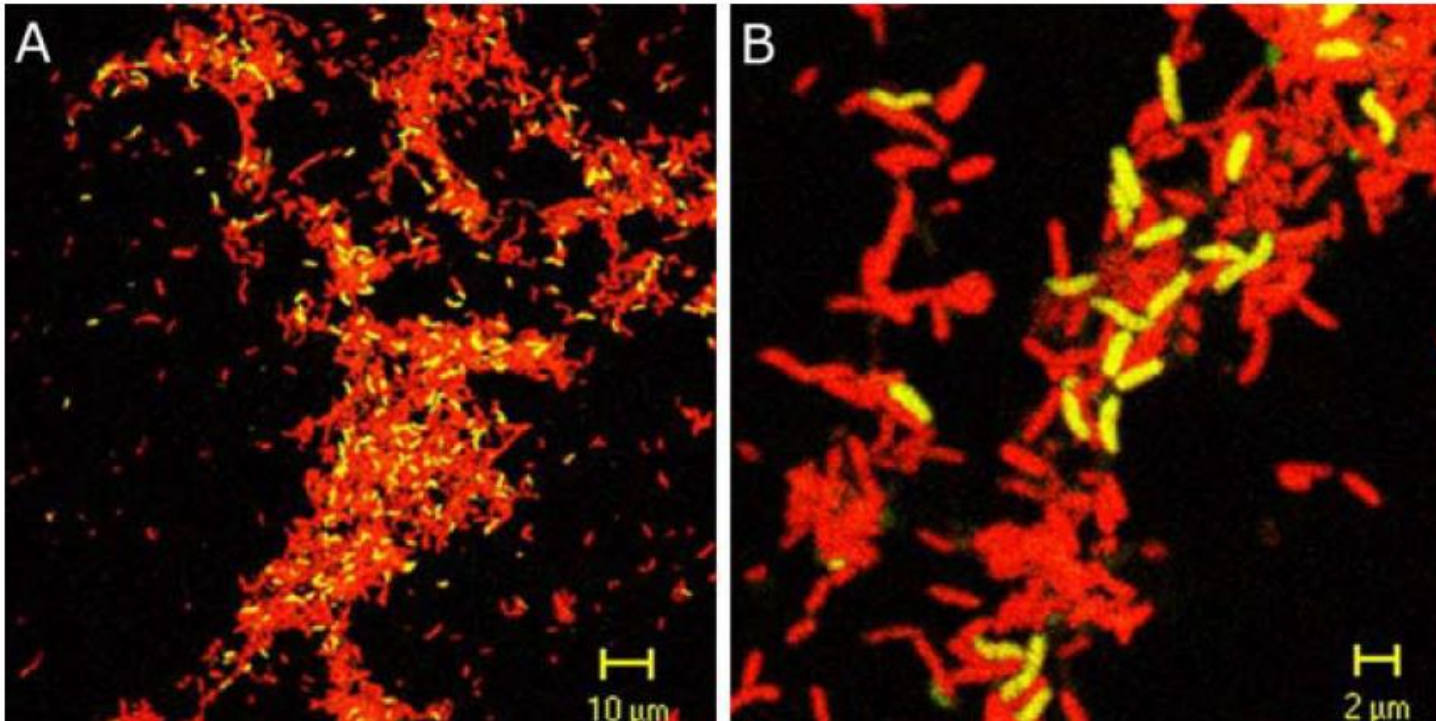
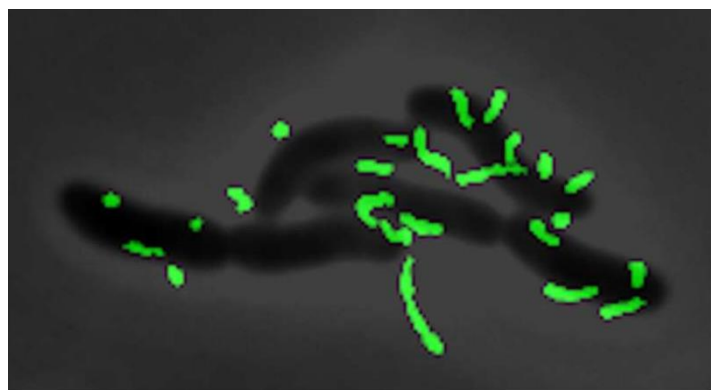
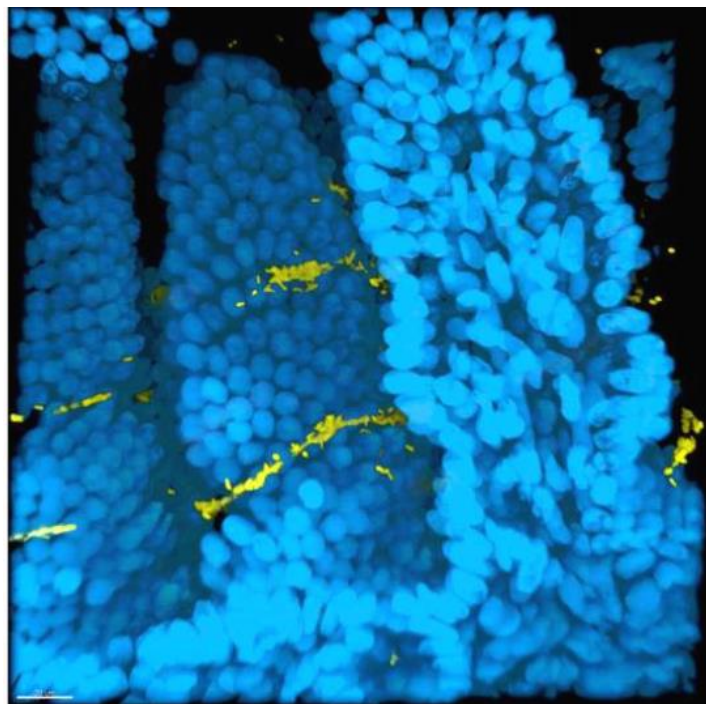
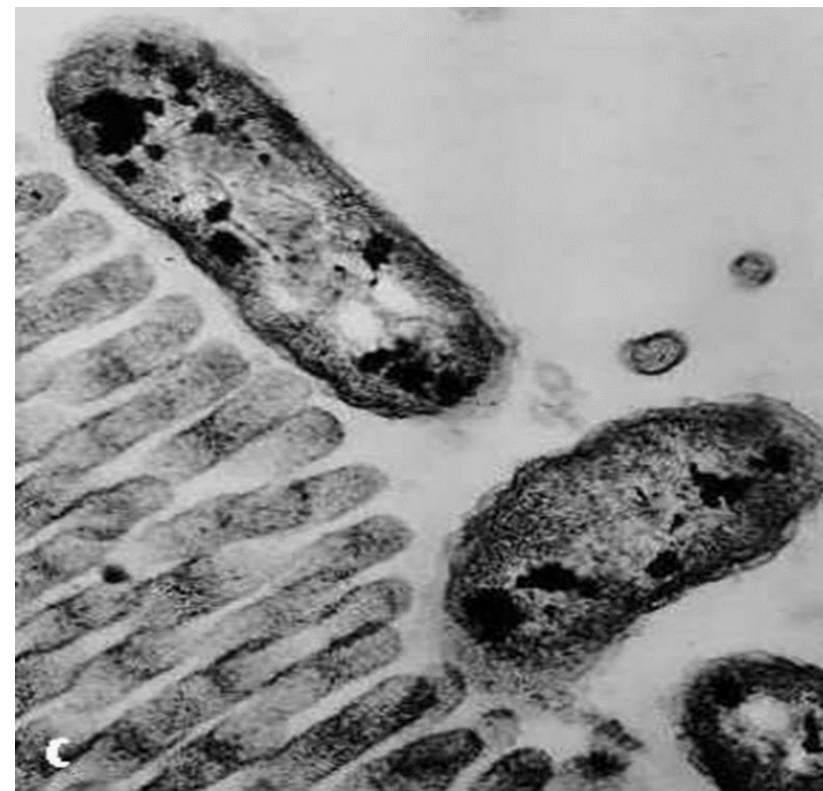


Figure 2. *V. cholerae* in a crushed egg mass that was taken after 48 h incubation. *V. cholerae/mimicus* are yellow (MAL2 probe) and all other bacteria are red (EUB 338 probe). (A) Low magnification. (B) Higher magnification.

Cellule di *Vibrio cholerae* (gialle) che colonizzano i villi intestinali (blu).



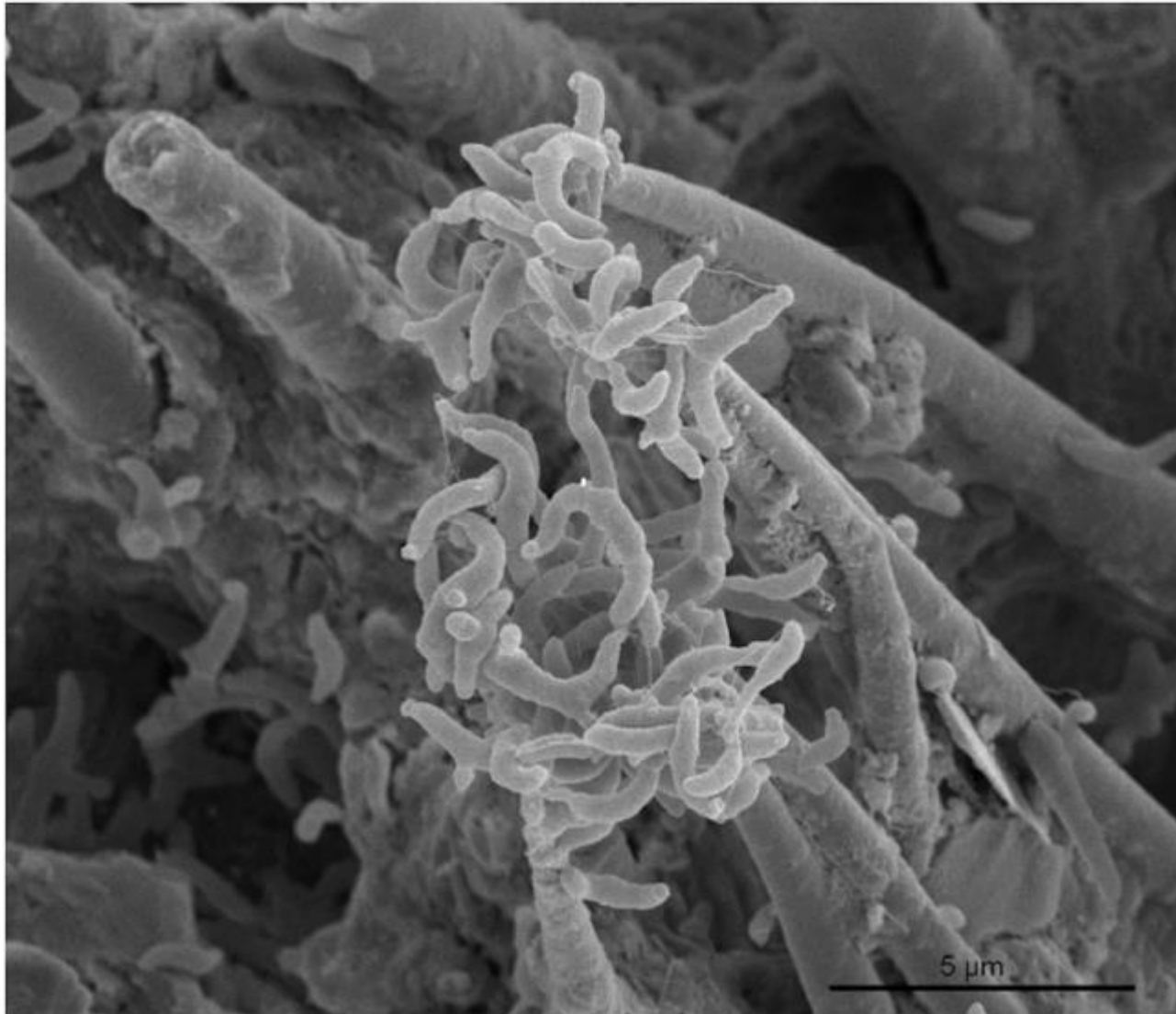
Colonizzazione dell'intestino umano da parte di *Vibrio cholerae*.



Vibrio cholerae usa appendici (pili) per aderire alle superfici. In questa immagine, i pili sono evidenziati con un colorante verde fluorescente

Vibrionaceae, chitinasi e mucinasi

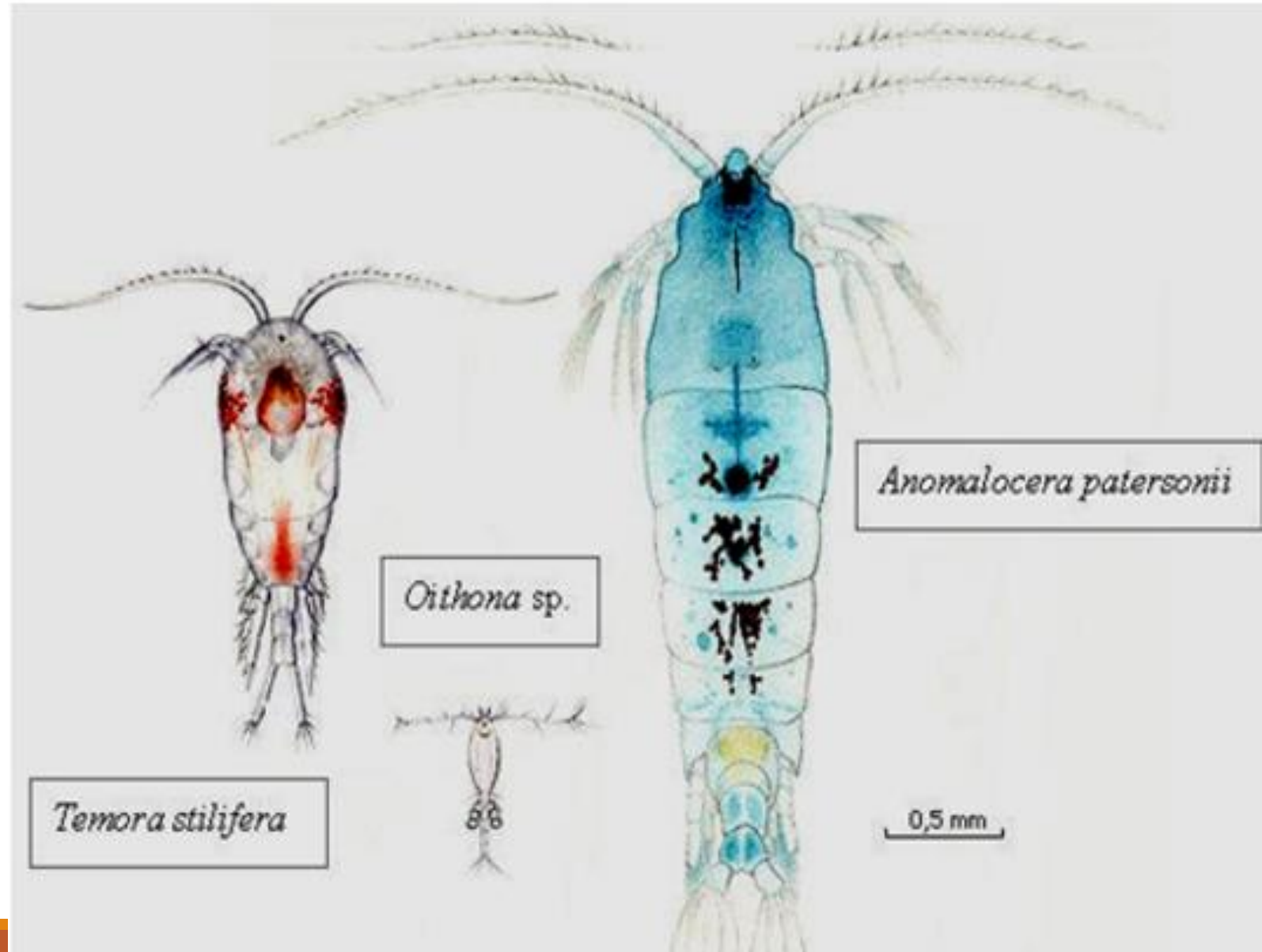
- ❖ la chitinasi aiuta *Vibrio* spp.
nella colonizzazione dei copepodi e di altra fauna marina, come granchi e gamberi
- ❖ la chitinasi (il monomero della chitina è uno dei costituenti dei mucopolisaccaridi) assiste *Vibrio* spp. nell'azione patogena negli animali a sangue caldo

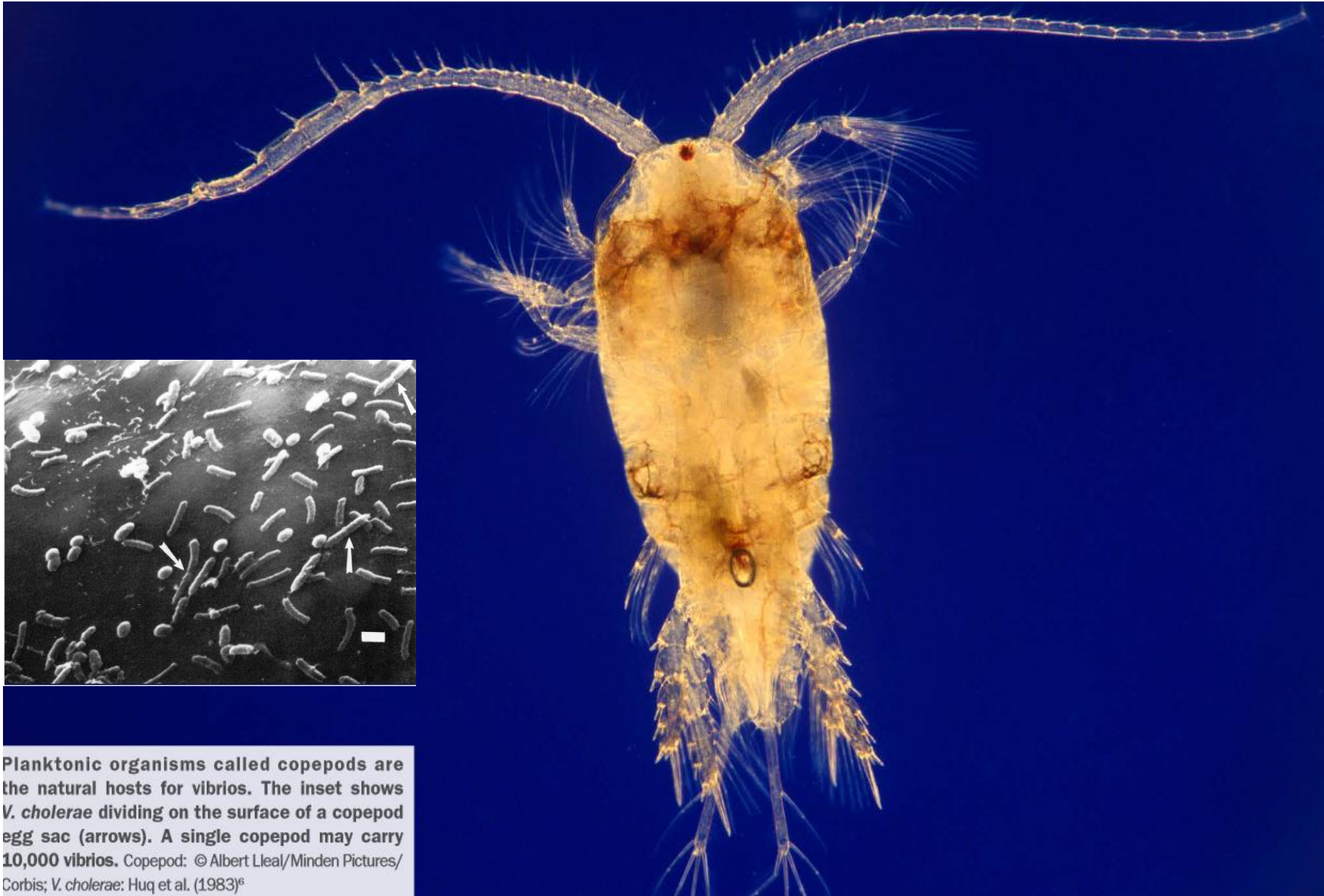


Vibrio cholerae che colonizza il carapace di un granchio

Klose, K. E., and Satchell, K. J. F. (2018). *Vibrio* 2017: The Seventh International Conference on the Biology of Vibrios. *J. Bacteriol.* 200:JB.00304–00318.

Copepodi





Planktonic organisms called copepods are the natural hosts for vibrios. The inset shows *V. cholerae* dividing on the surface of a copepod egg sac (arrows). A single copepod may carry 10,000 vibrios. Copepod: © Albert Lleal/Minden Pictures/Corbis; *V. cholerae*: Huq et al. (1983)⁶

Huq, A., West, P. A., Small, E. B., Huq, M. I., & Colwell, R. R. (1984). Influence of water temperature, salinity, and pH on survival and growth of toxigenic *Vibrio cholerae* serovar O1 associated with live copepods in laboratory microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(2), 420-424.

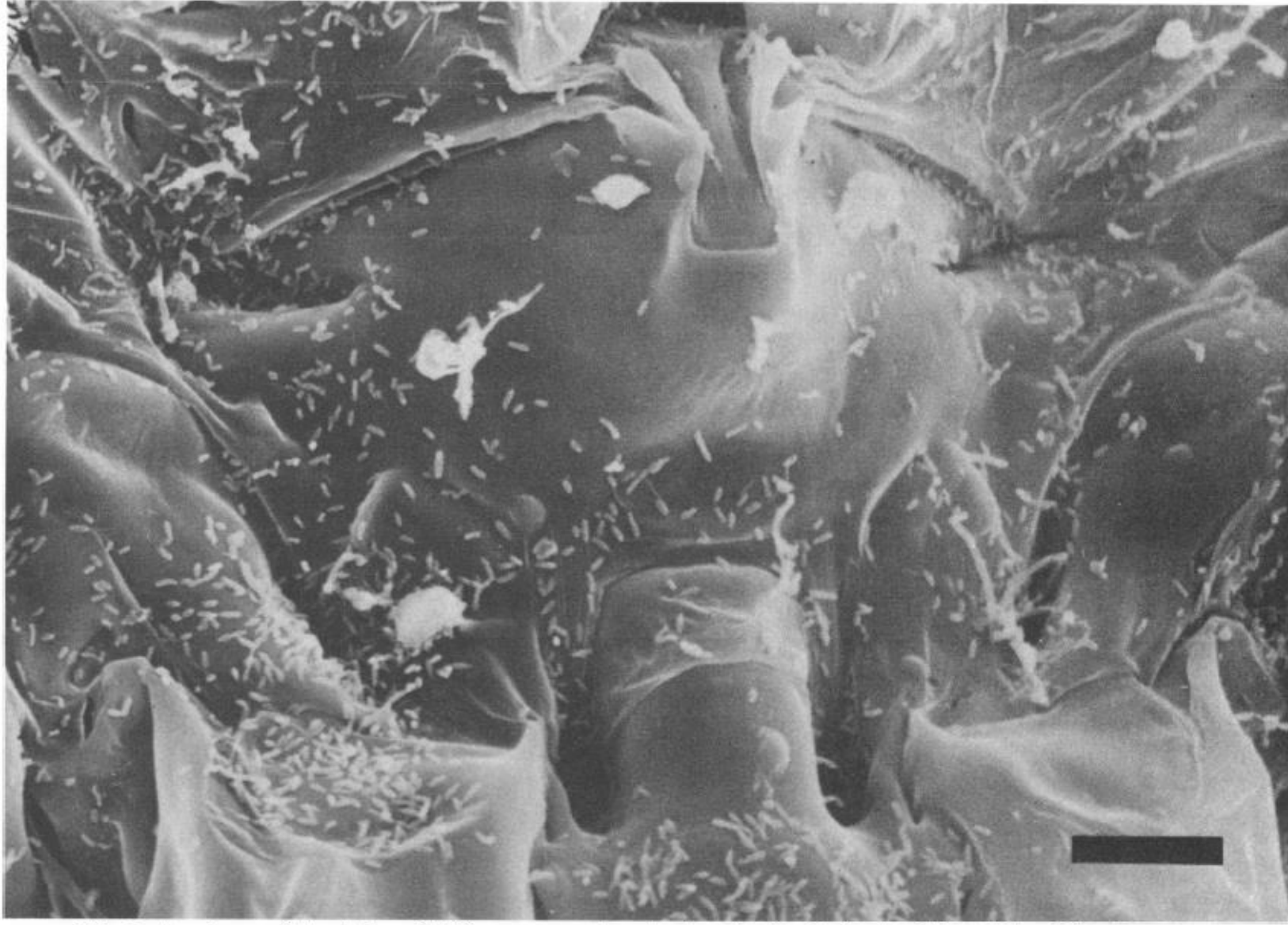


FIG. 6. Attachment of *V. cholerae* CA401 to a copepod oral region after incubation for 36 h at 15‰ salinity. Bar, 10 μm .

Significato ecologico delle relazioni tra batteri patogeni e copepodi

- Flessibilità ecologica
- Sito di adesione
- Disponibilità di fonti di C
- Trasporto su lunghe distanze
- Trasferimento lungo la catena alimentare

Significato epidemiologico delle relazioni tra batteri patogeni e copepodi

- Mantenimento della piena vitalità ed infettività
- Trasporto su lunghe distanze
- Ogni singolo copepode diviene un potenziale sito di contaminazione

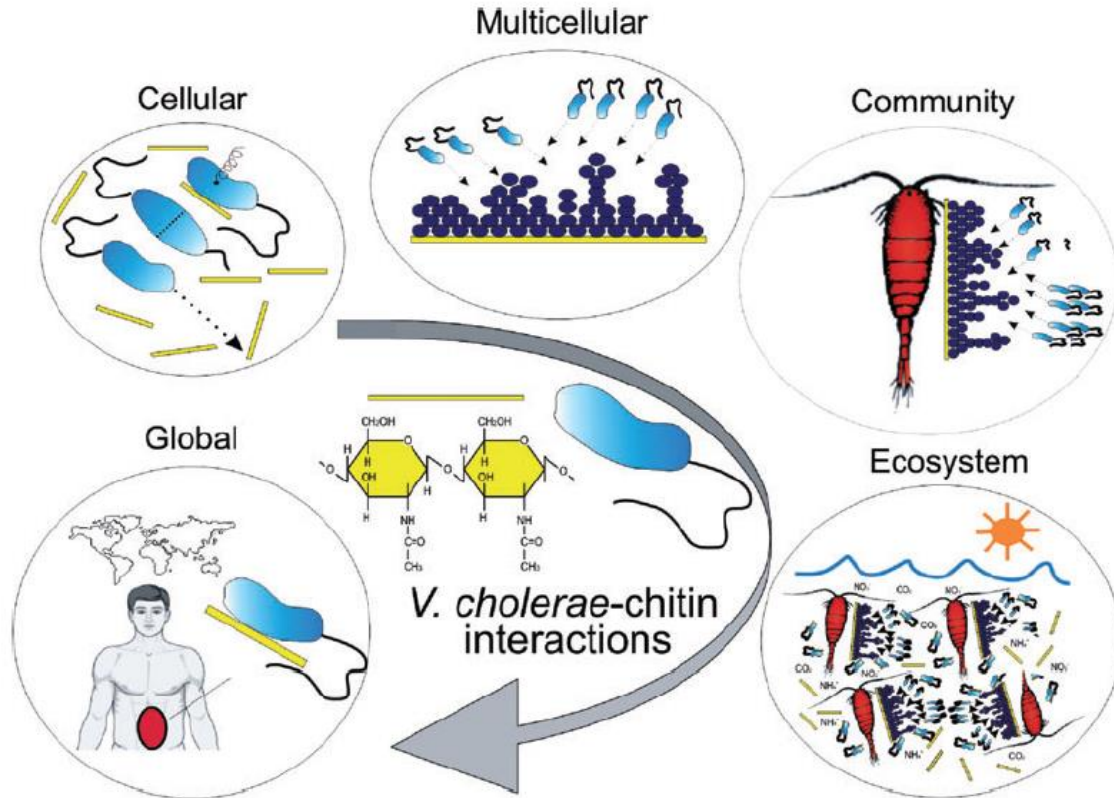
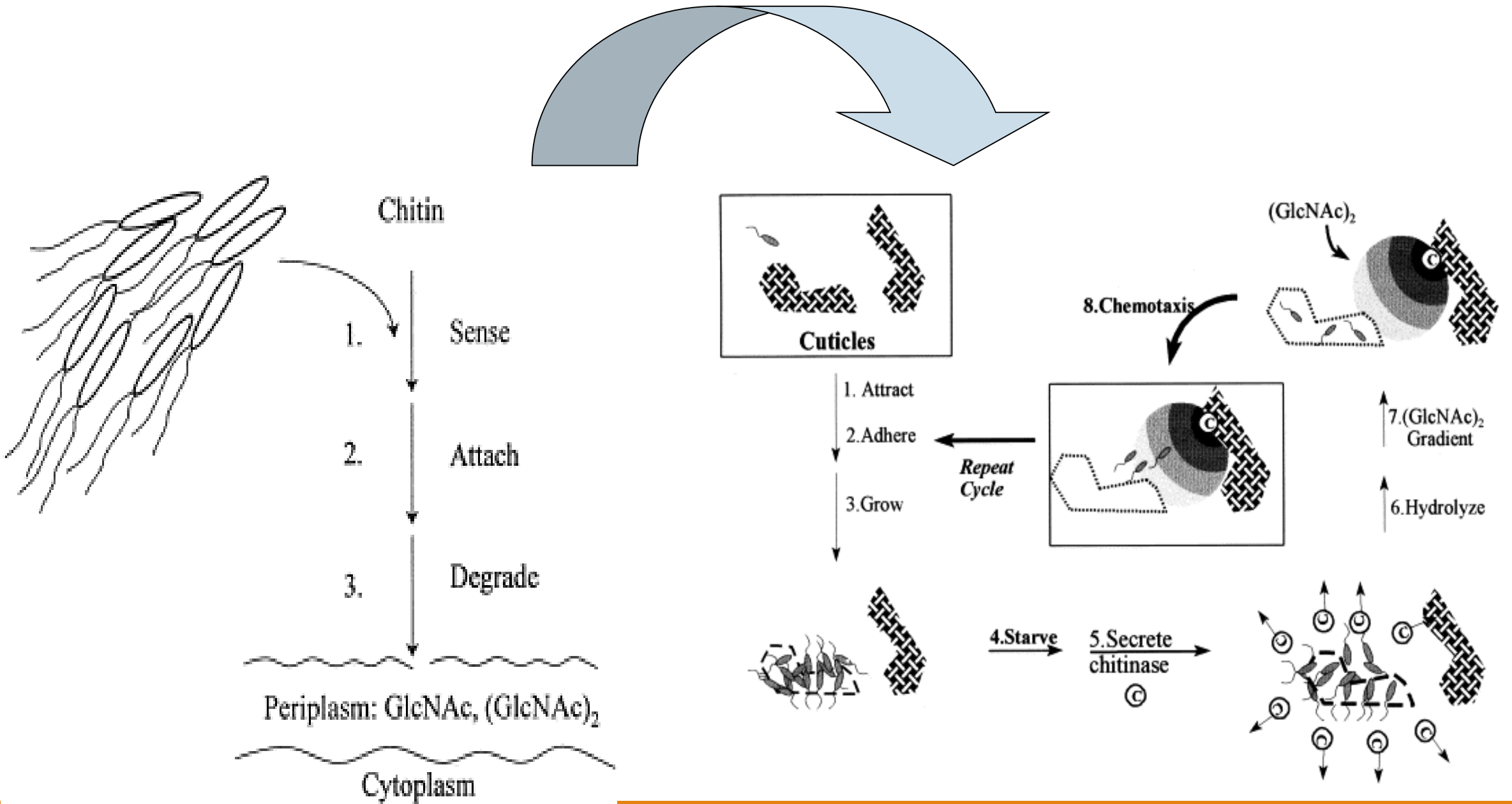


Fig. 1. Global impact of *V. cholerae*-chitin binding at different hierarchical scales in the environment, comprising: cell response (e.g. cell multiplication, chemotaxis, competence), biofilm formation, association with chitinous organisms, C and N cycling, and pathogenicity for humans.

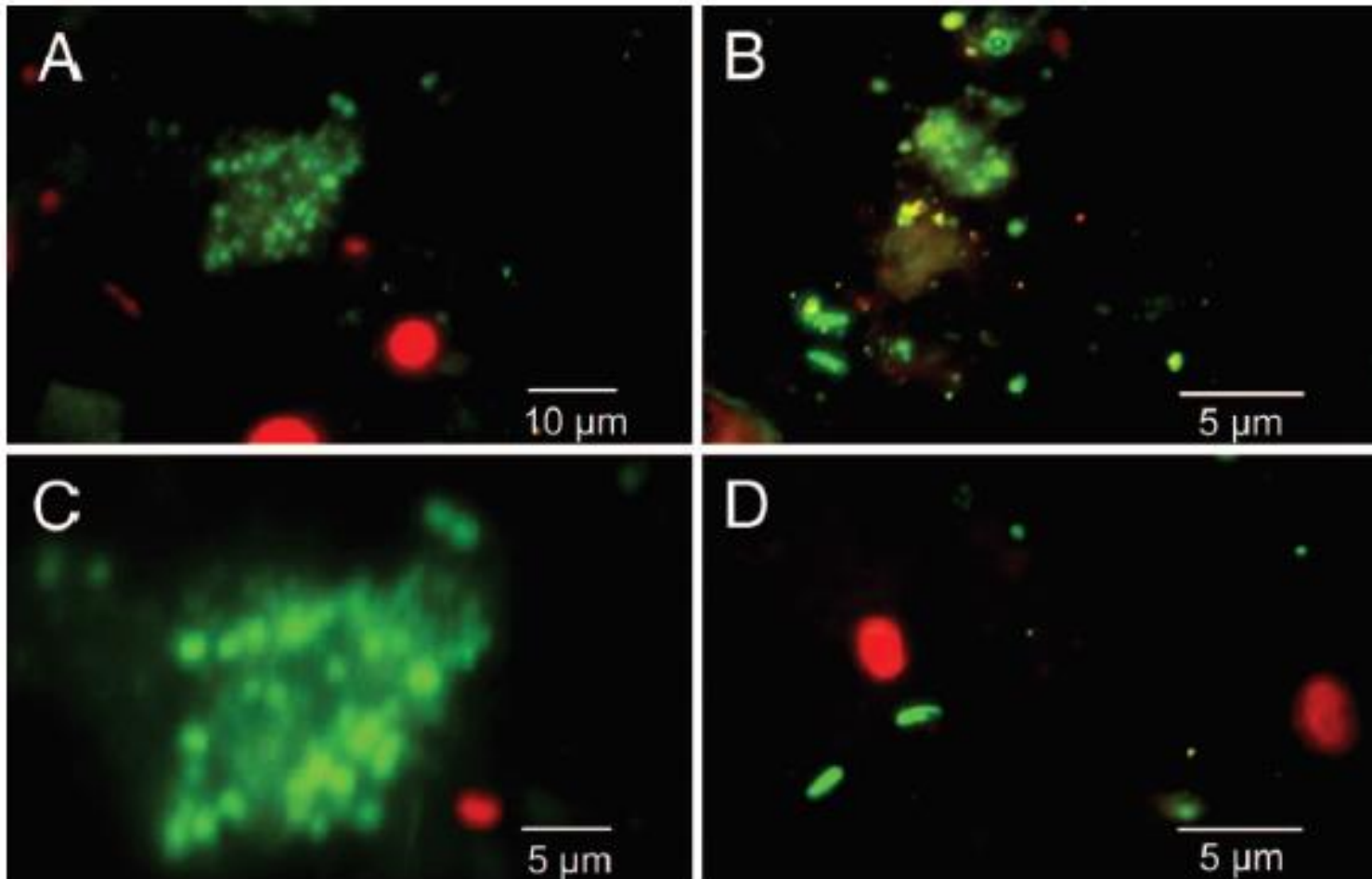
L'interazione di *Vibrio cholerae* con la chitina è un esempio di successo di interazione di un batterio con un substrato complesso. La chitina è uno dei polimeri più abbondanti sulla terra e forse il più abbondante nell'ambiente acquatico.

L'associazione di *V. cholerae* con organismi acquatici che producono chitina ha fornito al microrganismo una serie di vantaggi, compresa la disponibilità di cibo, l'adattamento ai gradienti nutritivi dell'ambiente, la tolleranza allo stress e la protezione dai predatori. Proprietà emergenti delle interazioni tra *V. cholerae* e chitina si verificano a più livelli gerarchici nell'ambiente e includono risposte metaboliche e fisiologiche cellulari (chemiotassi, moltiplicazione cellulare, formazione di biofilm, relazione commensale e simbiotica con organismi superiori, ciclo di nutrienti e patogenicità per l'uomo).



Molti ricercatori hanno segnalato l'esistenza di cellule di *Vibrio cholerae* O1 e O139 in forma VBNC in campioni di acqua di mare in aree in cui il colera è endemico. *Vibrio cholerae* in forma VBNC è presente, anche quando non ci sono epidemie, in forma di biofilm su vari substrati.

Questi dati suggeriscono che le cellule di *Vibrio cholerae* O1 e O139 in stato VBNC sono le fonti di infezione in queste aree e che tale stato possono facilmente superare situazioni ambientali sfavorevoli.



Rilevazione basata su anticorpi fluorescenti di *V. cholerae* O1 VBNC in campioni d'acqua. Sono mostrati aggregati di cellule VBNC che reagiscono con anticorpi monoclonale fluorescenti anti *V. cholerae* O1 e cellule planctoniche di *V. cholerae* O1 (B e D). C mostra ad un ingrandimento più elevato un ammasso di cellule VBNC, che appare contenere cellule O1 di *V. cholerae* di forma normale che cellule coccoidi.

Faruque, S. M., Biswas, K., Udden, S. N., Ahmad, Q. S., Sack, D. A., Nair, G. B., & Mekalanos, J. J. (2006). Transmissibility of cholera: in vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(16), 6350-6355.