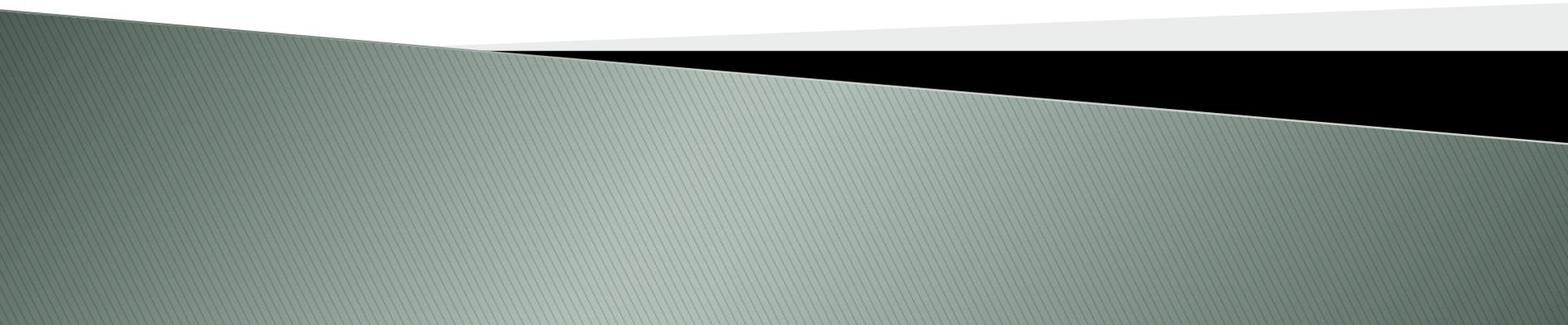


# Diversidade e Evolução Bacteriana

Robson Francisco de Souza  
Laboratório de Estrutura e Evolução de Proteínas  
Departamento de Microbiologia  
ICB-USP

BMM0271 – Microbiologia Básica para Odontologia



# Objetivo da Aula

- Introdução aos métodos de classificação e identificação
- Conceitos de taxonomia e sistemática
- Breve introdução à diversidade bacteriana

# Classificação X Identificação

- **Classificação**

- Organização dos organismos vivos em grupos
- Construída a partir da análise das semelhanças e diferenças entre os organismos
- Busca refletir a história evolutiva dos organismos

- **Identificação**

- Processo de determinação da espécie ou gênero ao qual um novo isolado ou amostra de microorganismos

# Técnicas laboratoriais de Identificação

- Métodos Fenótipicos
  - Caracterização morfológica
  - Métodos sorológicos
  - FAME
- Análise Genotípica
  - FISH
  - Ribotipagem
  - Hibridização DNA-DNA
  - rep-PCR

# Métodos fenotípicos

Na maioria dos casos, é necessários combinar várias tipos de dados fenotípicos antes que seja possível identificar um organismo.

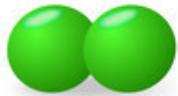
## Exemplos de características usadas na classificação e/ou identificação de microorganismos

Morfologia celular	Forma; Coloração de Gram; presença/ausência de flagelos; corpos de inclusão; esporos; tamanho
Aparência da colônia	Pigmentos; hemólise; forma; tamanho
Fermentação de carboidratos	Produção de ácidos ou gás
Hidrólise de aminoácidos	Produção de amônia
Fisiologia (condições para cultivo)	Temperatura ótima; pH; concentração de oxigênio
Produtos da fermentação	Butirato; lactato; acetato
Antígeno	Anticorpos monoclonal ou policlonal contra proteínas ou açucares da superfície celular
Lipídeos	Menaquinonas, ácidos graxos de cadeia longa
Perfil enzimático	Presença /ausência de enzimas; mobilidade eletroforética
Peptidoglicano	Composição de aminoácidos na ligações cruzadas

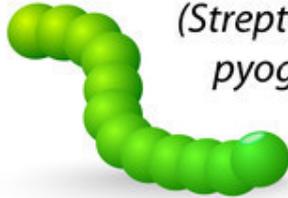
# Métodos fenotípicos: morfología

## COCCI

depositphotos



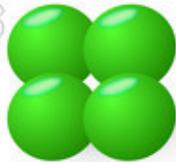
**Diplococci**  
(*Streptococcus pneumoniae*)



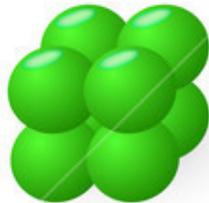
**Streptococci**  
(*Streptococcus pyogenes*)

### **Tetrad**

depositphotos



**Staphylococci**  
(*Staphylococcus aureus*)



**Sarcina**  
(*Sarcina ventriculi*)

## BACILLI

depositphotos



**Chain of bacilli**  
(*Bacillus anthracis*)



**Flagellate rods**  
(*Salmonella typhi*)

depositphotos



**Spore-former**  
(*Clostridium botulinum*)

## OTHERS

depositphotos



**Vibrios**  
(*Vibrio cholerae*)

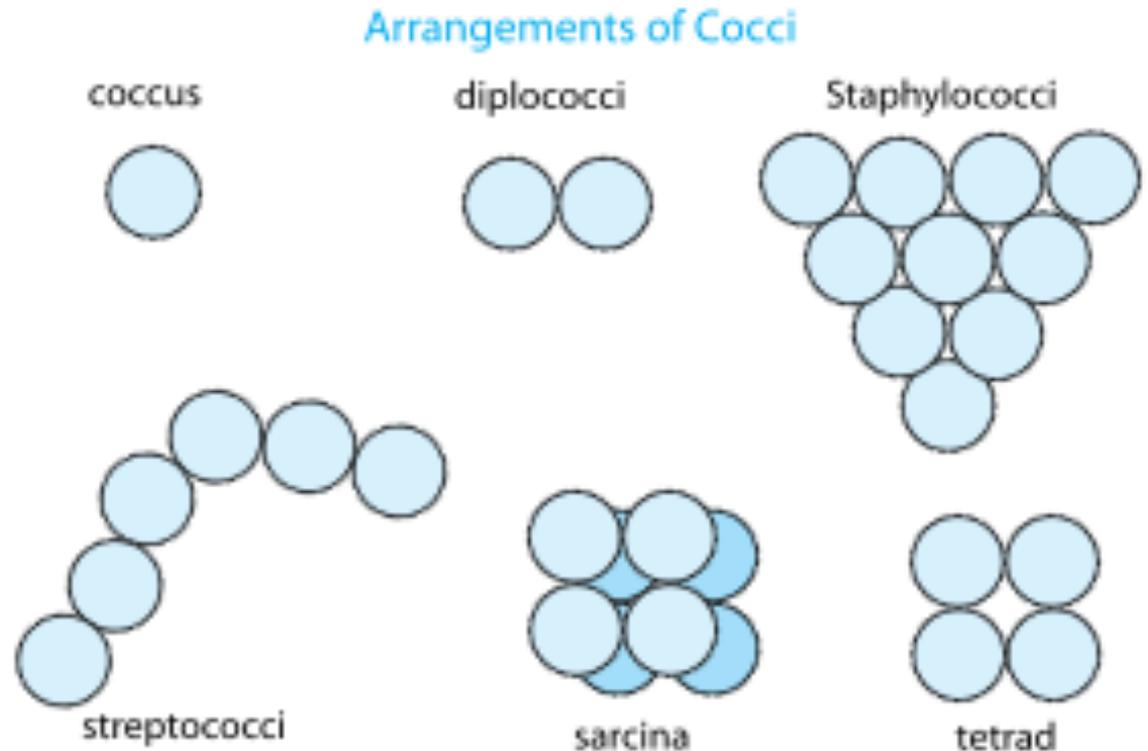
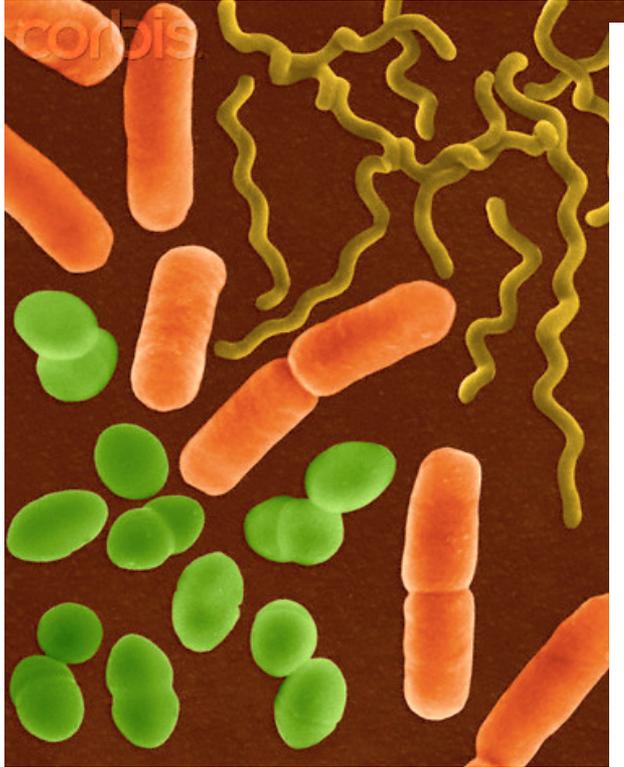


**Spirilla**  
(*Helicobacter pylori*)



**Spirochaetes**  
(*Treponema pallidum*)

# Métodos fenotípicos: arranjo



- Assim como a forma, dadas condições ótimas e padronizadas de cultivo, a organização espacial das células é estável e característica de cada espécie
- A dependência nas condições de cultivo limita a utilidade dessa característica

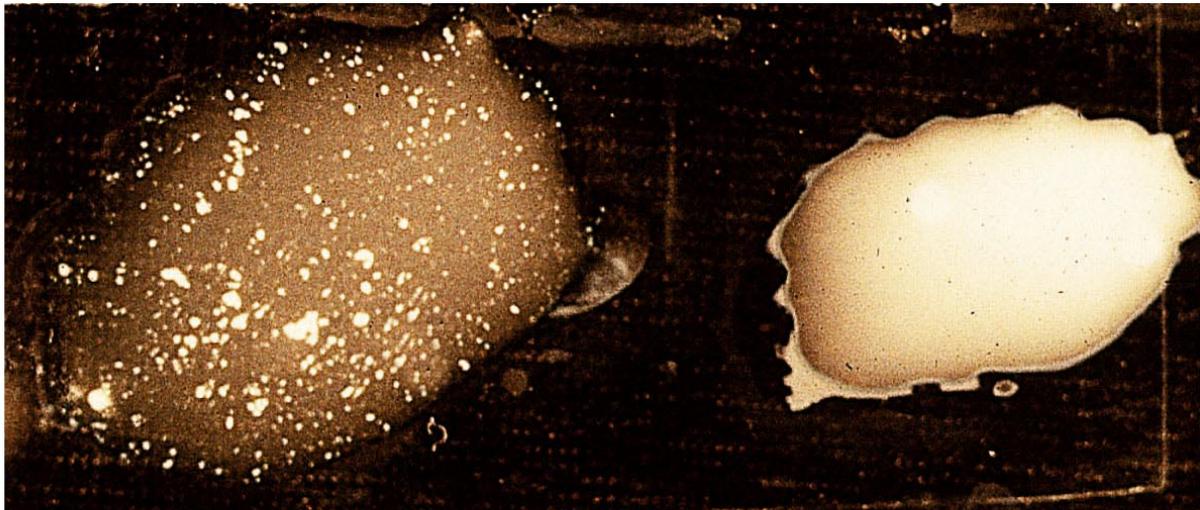
# Métodos fenotípicos

- Sorologia: o teste de aglutinação

A aplicação de um anticorpo contra um organismo desconhecido permite a verificação da presença de antígenos característicos de um certo grupo de bactérias pela observação de agregados de células.

+

-

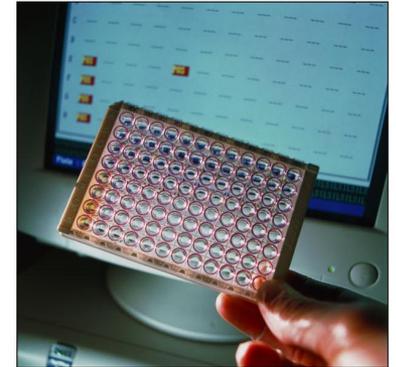


# Métodos fenotípicos

- Ensaio de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
- Placa com diferentes anticorpos aderidos
- Incuba com um organismo desconhecido (antígenos)

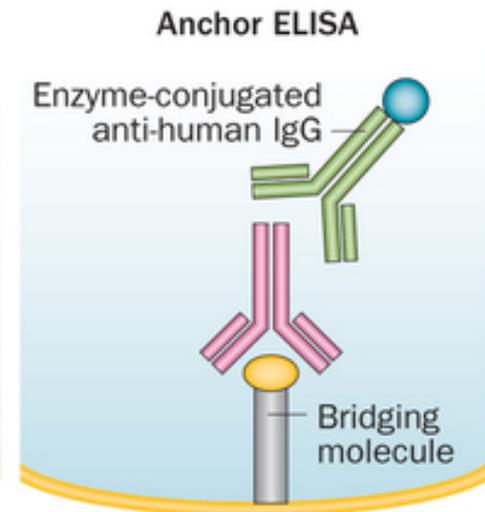
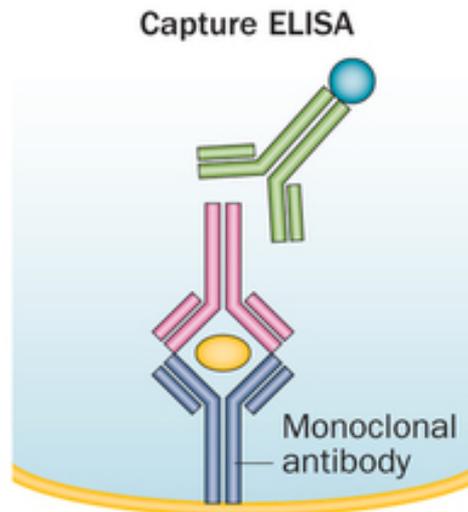
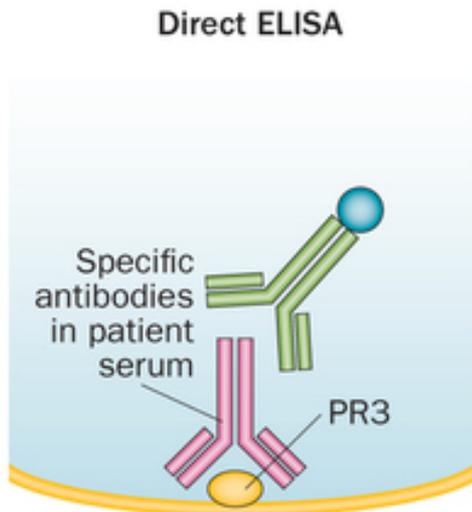


(a)



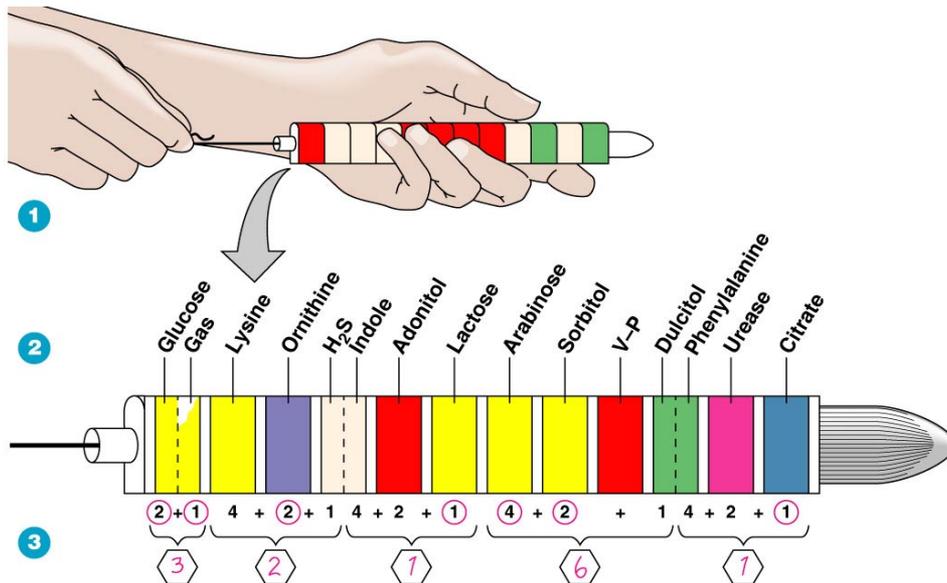
(b)

Copyright © 2007 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



# Testes bioquímicos

- Identificam as bactérias presentes com base no perfil de atividade enzimática
- Exemplo: teste de bactérias entéricas (família **Enterobacteriaceae**)
- A mudança de cor é um indicativo que houve reação química e a formação de produtos ácidos por exemplo (indicadores de pH)

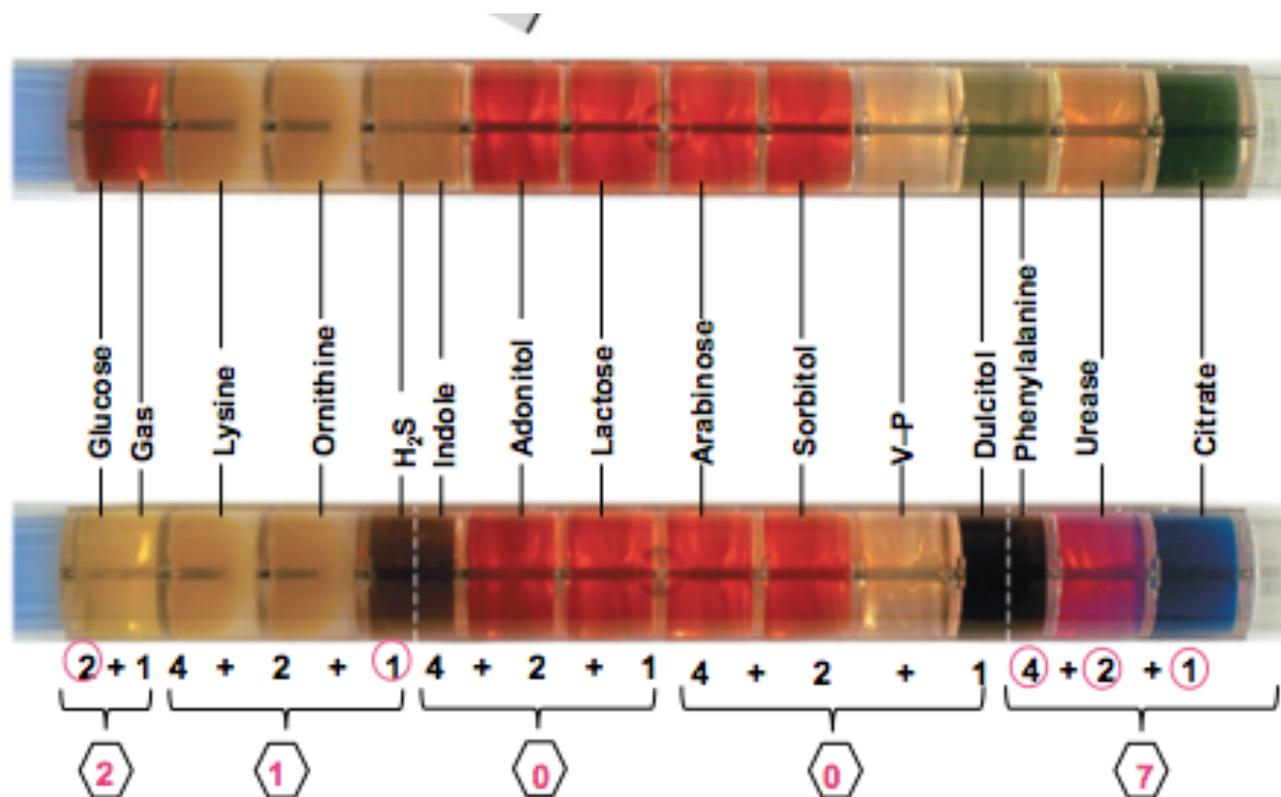


Cada ensaio mede a utilização de substratos ou a formação de produtos metabólicos que indicam a presença de enzimas específicas.

Exemplos de marcadores:

- Hidrólise de açúcares acidifica o meio (pH)
- Produção de gases
- Teste **Voges-Proskauer (V-P)**: produção de acetoína pela conversão de ácido pirúvico em acetoína

ID Value	Organism	Atypical Test Results	Confirmatory Test
32143	<i>Enterobacter cloacae</i>	Sorbitol <sup>-</sup>	-
	<i>Enterobacter sakazakii</i>	Urea <sup>+</sup>	+
32161	<i>Enterobacter cloacae</i>	None	V-P <sup>+</sup>
32162	<i>Enterobacter cloacae</i>	Citrate <sup>-</sup>	



sm

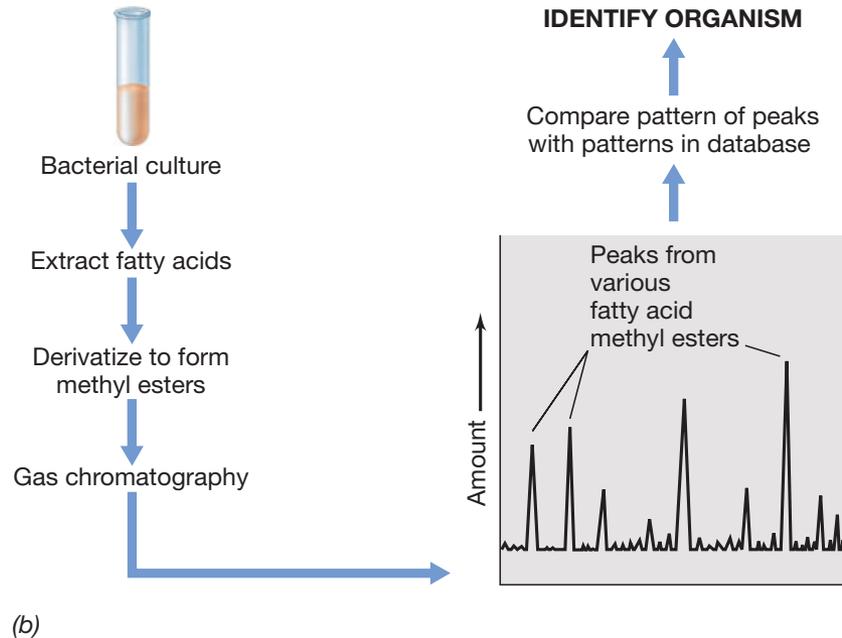
ID Value	Organism	Atypical Test Results	Confirmatory Test
21006	<i>Proteus mirabilis</i>	Ornithine <sup>-</sup>	Sucrose
21007	<i>Proteus mirabilis</i>	Ornithine <sup>-</sup>	
21020	<i>Salmonella choleraesuis</i>	Lysine <sup>-</sup>	

# FAME: Análise dos ácidos graxos nas membranas

## Classes of Fatty Acids in *Bacteria*

Class/Example	Structure of example
I. <b>Saturated:</b> tetradecanoic acid	$\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{12}-\text{CH}_3$
II. <b>Unsaturated:</b> omega-7-cis hexadecanoic acid	$\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_6-\text{C}(\text{H})=\text{C}(\text{H})-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$
III. <b>Cyclopropane:</b> cis-7,8-methylene hexadecanoic acid	$\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_7-\text{C}(\text{H})-\text{C}(\text{H})-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}_3$
IV. <b>Branched:</b> 13-methyltetradecanoic acid	$\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{11}-\text{C}(\text{H})(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_3$
V. <b>Hydroxy:</b> 3-hydroxytetradecanoic acid	$\text{HO}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{C}(\text{H})(\text{OH})-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CH}_3$

(a)



- FAME: **F**atty **A**cid **M**ethyl **E**ster (metil-ésteres de ácidos graxos)
- Amplamente usado em laboratórios clínicos
- Seu nível de resolução permite identificar **espécies bacterianas**
- Exige a padronização dos experimentos, uma vez que temperatura e outros fatores modificam o resultado

# Análise Genotípica

- Com a introdução das técnicas de biologia molecular, vários marcadores genéticos foram introduzidos
- Com a introdução de métodos de sequenciamento de DNA, a análise comparativa de sequências passou a ser usada na taxonomia e classificação de microrganismos
- Exemplos de métodos genotípicos:

**Table 16.3** *Some genotypic methods used in bacterial taxonomy*

<i>Method</i>	<i>Description/application</i>
DNA–DNA hybridization	Genome-wide comparison of sequence similarity. Useful for distinguishing species within a genus
DNA profiling	Ribotyping (Section 16.9), AFLP, rep-PCR (Figure 16.21). Rapid method to distinguish between species and strains within a species
Multilocus sequence typing	Strain typing using DNA sequences of multiple genes (Figure 16.22). High resolution, useful for distinguishing even very closely related strains within a species
GC ratio	Percentage of guanine–cytosine base pairs in the genome. If the GC ratio of two organisms differs by more than about 5%, they cannot be closely related, but organisms with similar or even identical GC ratios may be unrelated. Not much used now in taxonomy because of poor resolution
Multiple-gene or whole genome phylogenetic analyses	Application of cladistic methods to subsets of genes or to whole genomes from the organisms to be compared. Yields better phylogenetic picture than single-gene analyses

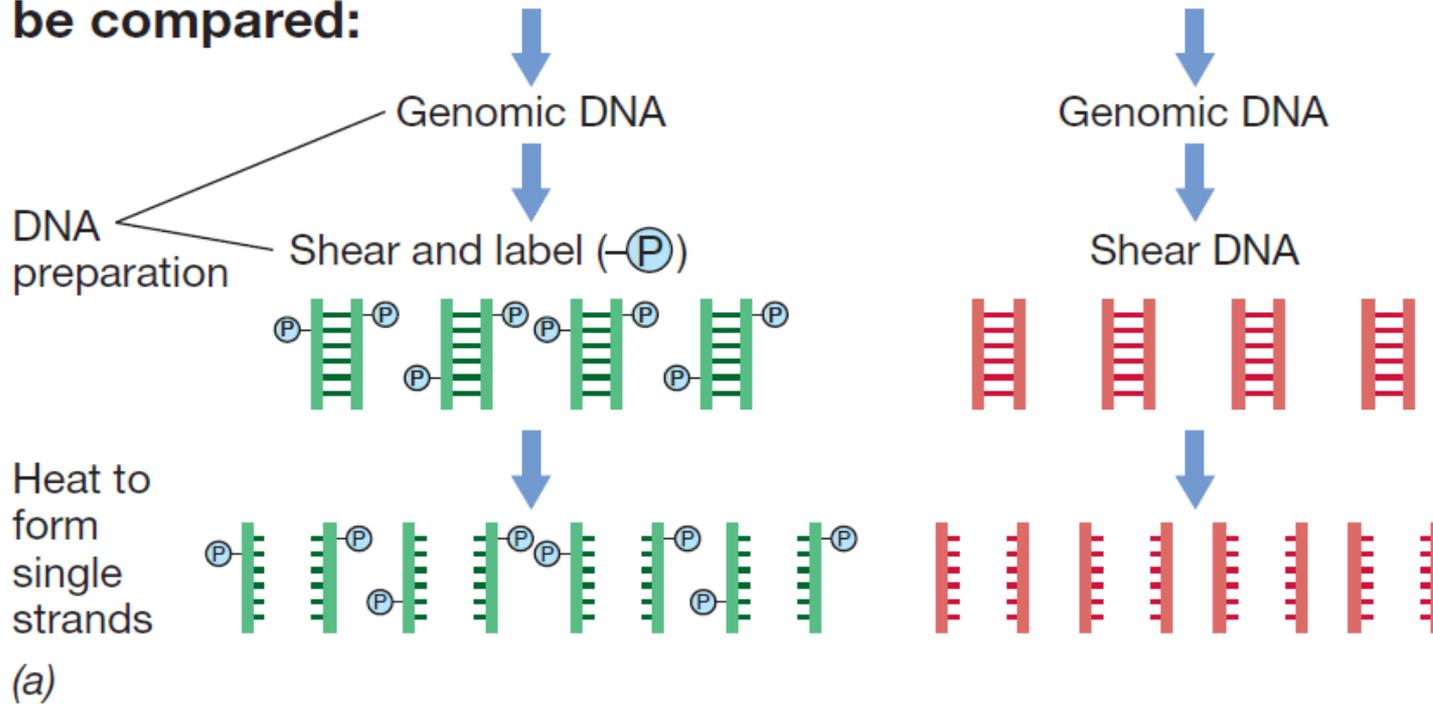
# Métodos genotípicos

## Hibridização DNA-DNA

Organisms to be compared:

Organism 1

Organism 2

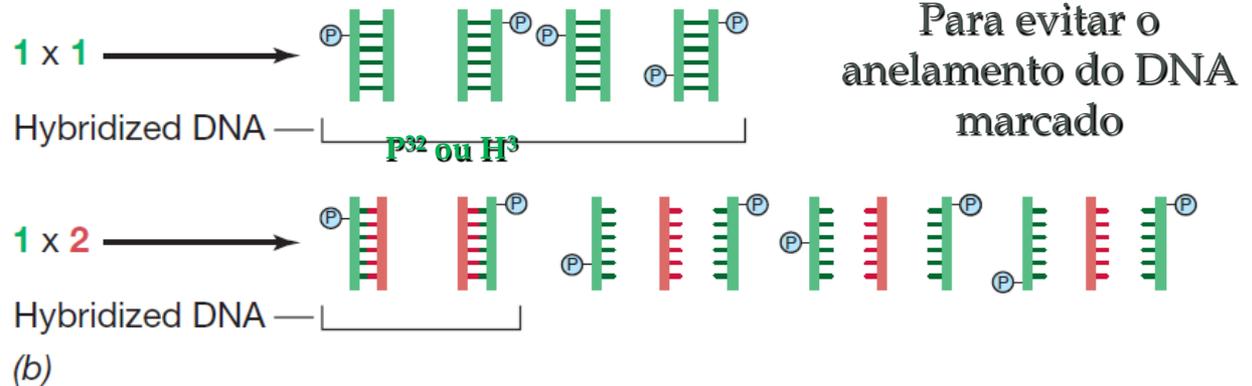


# Hibridização DNA-DNA

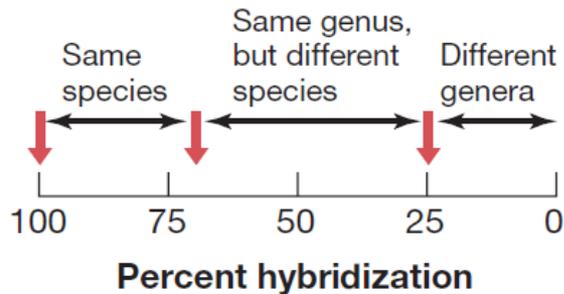
1. Marcado
2. Digerido (frag. pequenos)
3. Aquecido
4. Misturado
5. Resfriado
6. DNA dupla fita não hibridizado é separado
7. Mede a radioatividade e compara com um controle (100%)

## Hybridization experiment:

Mix DNA, adding unlabeled DNA in excess:



## Results and interpretation:



1 x 1  
100%  
↓  
Same strain (control)

1 x 2  
<25%  
↓  
1 and 2 are likely different genera

**Diferenciação entre espécies**

# Assinaturas nas sequências de rRNA são usadas para a Identificação e Classificação

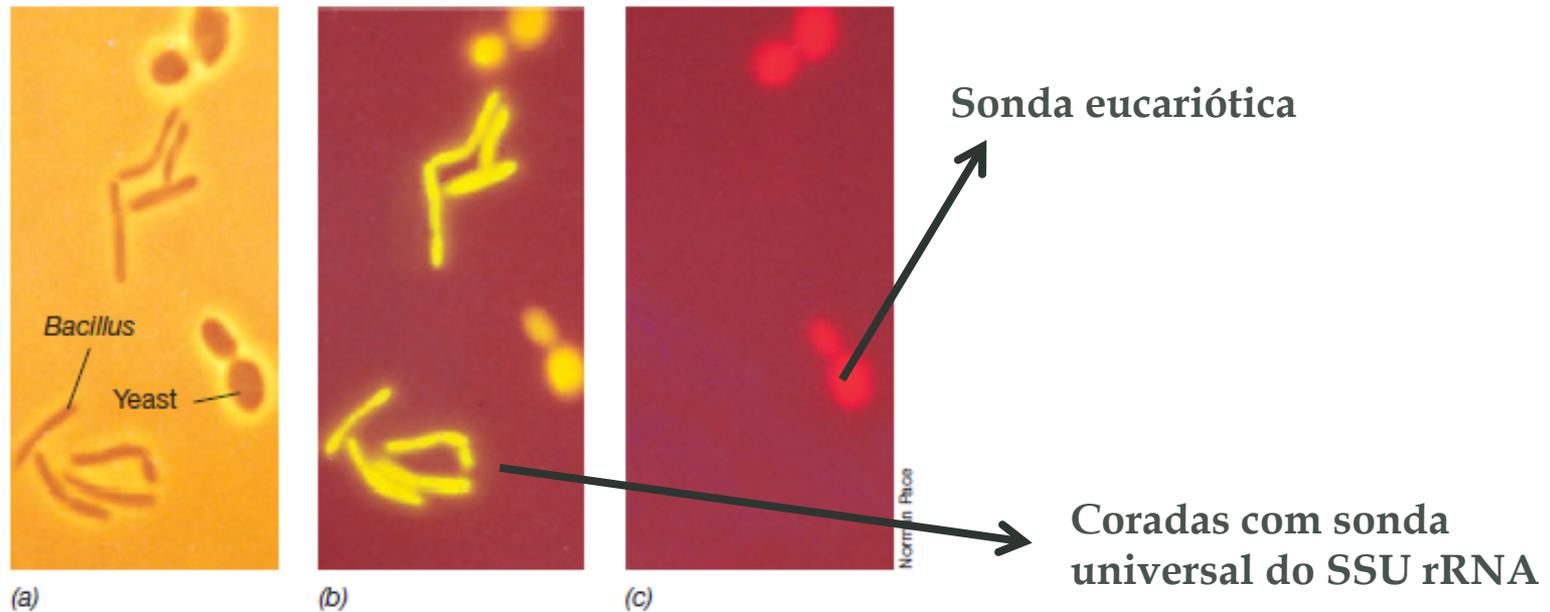
- Algumas sequências são **específicas** e outras são **ausentes em um domínio**

	Localização	ARCHAEA	BACTERIA	EUKARYA
<b>CACYYG</b>	315	0	>95	0
AAACUCAA	910	3	100	0
<b>AAACUAAAAG</b>	910	100	0	100
<b>YUYAAUUG</b>	960	100	<1	100
<b>CAACCYCR</b>	1110	0	>95	0
<b>UCCUG</b>	1380	>95	0	100
<b>UACACACCG</b>	1400	0	>99	100
<b>CACACACCG</b>	1400	100	0	0

# FISH – Fluorescent in situ Hybridization

- Sonda é ligada a um corante fluorescente
- Aplicar diretamente **em células** em cultura ou no ambiente natural
- Usada em diagnóstico clínico de pacientes (identificação do patógeno)

## Fotografia de Contraste de fase

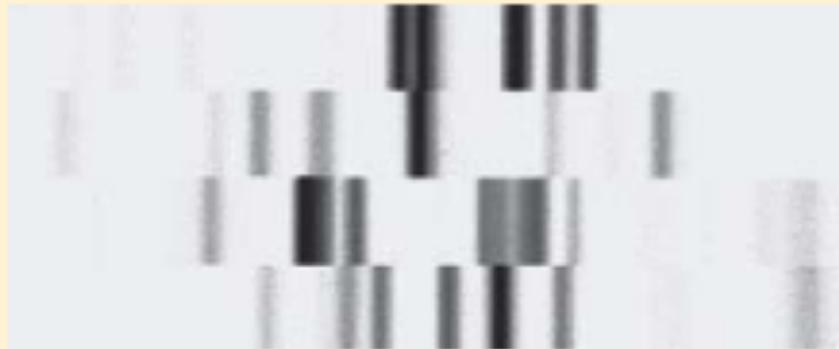


**Figure 16.17** Fluorescently labeled rRNA probes: Phylogenetic stains. (a) Phase-contrast photomicrograph of cells of *Bacillus mega-*

# Métodos genotípicos: ribotipagem

- Obter DNA genômico
- Digerí-lo com enzimas de restrição
- Hibridizar com uma sonda marcada de rRNA (16S da rRNA)
- O padrão das bandas (**ribotipo**) forma a assinatura de cada organismo
- Método rápido e que permite separar **espécies**

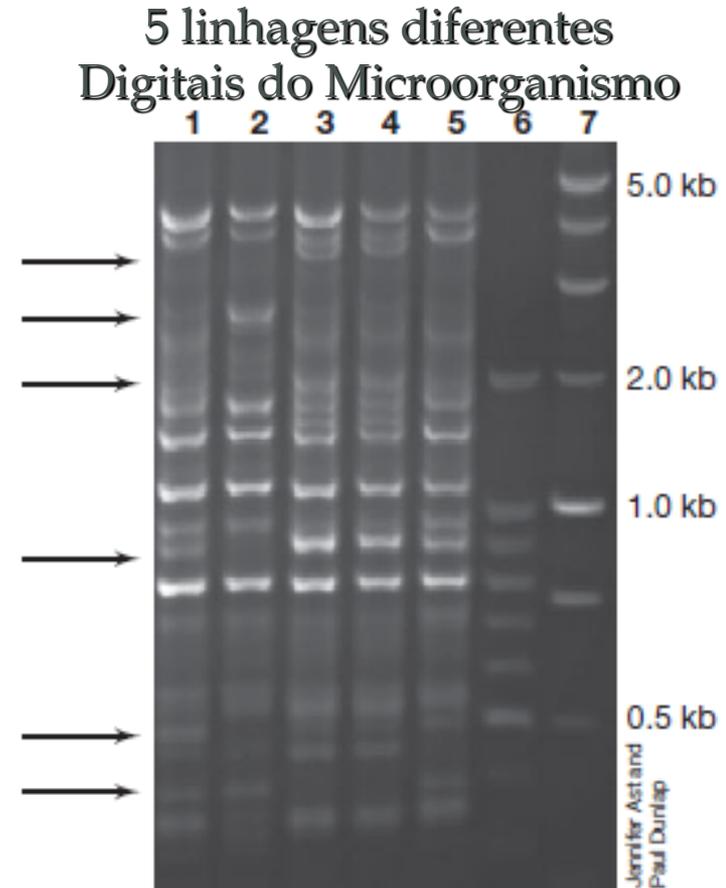
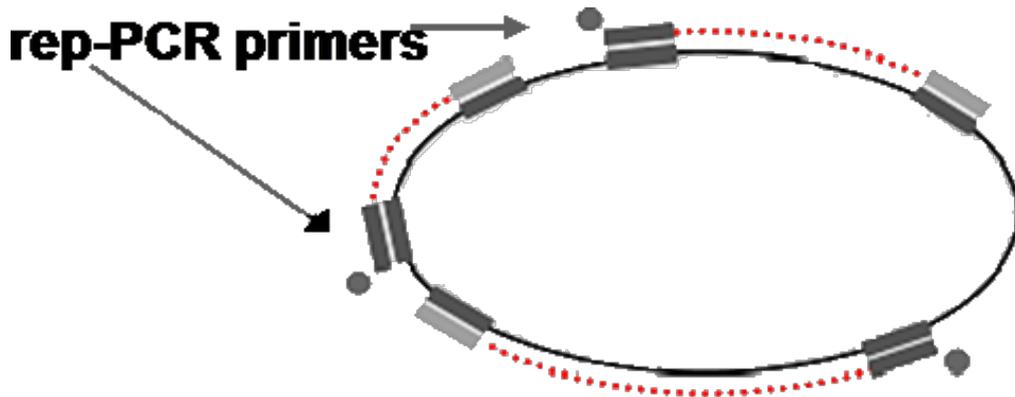
*Lactococcus  
lactis*  
*Lactobacillus  
acidophilus*  
*Lactobacillus  
brevis*  
*Lactobacillus  
kefir*



Carl A. Batt

# Identificação pelo perfil das Bandas rep-PCR (*repetitive extragenic palindromic PCR*)

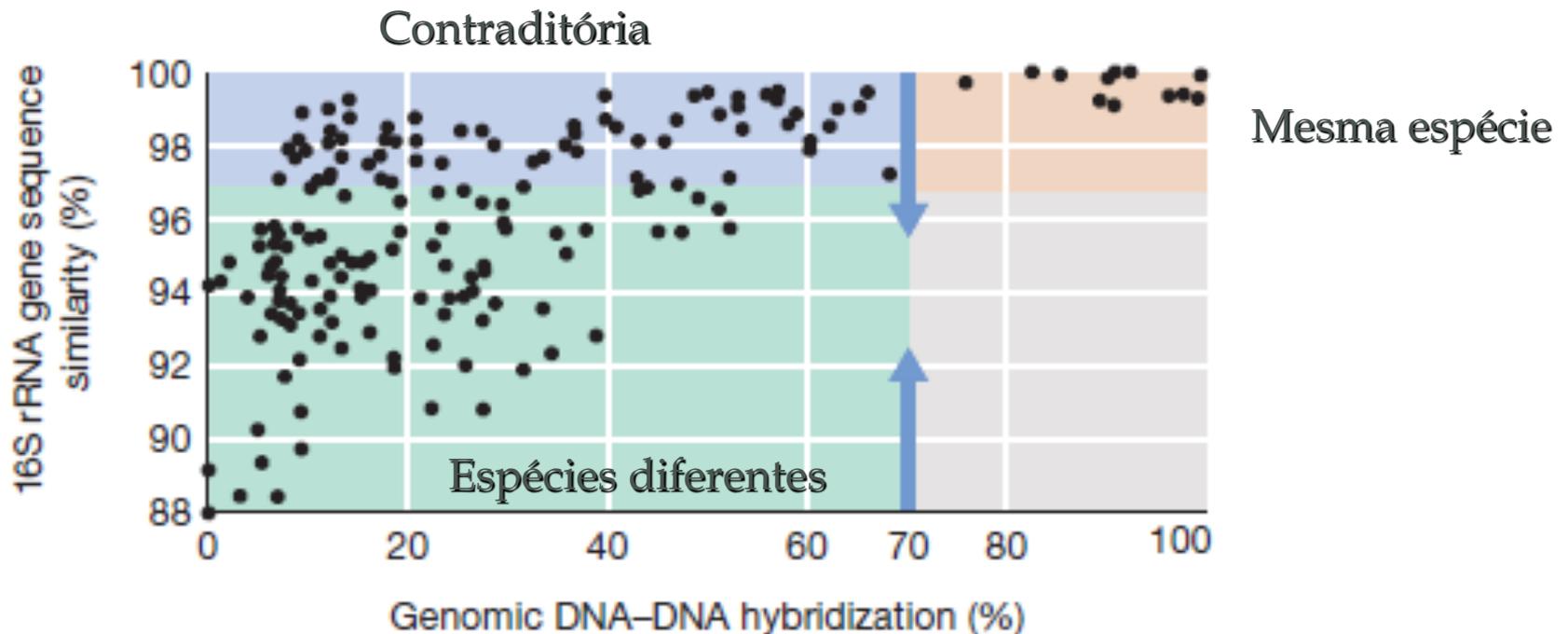
- Avalia a presença de variações na sequência de marcadores
- Baseia-se em fragmentos altamente conservados e repetitivos ao longo do genoma
- PCR com um par de primers específicos e verifica o padrão de bandas
- **Pode diferenciar linhagens**



# Conceito de espécie para procariotos

Quando a hibridização de DNA resulta em valores menores de 70%, esse método começa a dar resultados incompatíveis com a análise filogenética do gene 16S. Acima desse valor, o gene 16S tem sempre mais de 97% de identidade

Como as duas técnicas são os métodos genotípicos de referência para classificação de novas espécies, convencionou-se utilizar esse limite como padrão na definição de espécies



# Classificação de procariotos

# Classificação e Nomenclatura

- Nomenclatura
  - Segue regras específicas
  - Código Internacional de Nomenclatura de bactérias (contem as regras)
  - “**Manual de Bergey**” - contem informações de todos os organismos classificados
  - “**Os procariotos**” – fornece informações detalhadas sobre cultivo, isolamento, tem mais de 4100 páginas

# Regra de nomenclatura

- Todos os nomes de espécies biológicas seguem o mesmo padrão: gênero seguido da espécie (com formato *itálico*).
- A primeira letra do gênero deve ser **Maiúscula** e as demais em minúsculo.

## Níveis hierárquicos na classificação de microorganismos

Domínio	Bacteria
Filo	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordem	Lactobacillales
Família	Streptococcaceae
Gênero	<i>Streptococcus</i>
Espécie	<i>Streptococcus mutans</i>
Serotipo*	<i>Streptococcus mutans</i> serotype c
Linhagem*	<b><i>Streptococcus mutans</i> NCTC 10449**</b>

\*These ranks are not formally recognised in taxonomy, but are of great practical importance.

\*\*NCTC = National Collection of Type Cultures.

# Bancos de Dados de Organismos

**Table 16.5** *Some national microbial culture collections*

<i>Collection</i>	<i>Name</i>	<i>Location</i>	<i>Web address</i>
ATCC	American Type Culture Collection	Manassas, Virginia	<a href="http://www.atcc.org">http://www.atcc.org</a>
BCCM/LMG	Belgium Coordinated Collection of Microorganisms	Ghent, Belgium	<a href="http://bccm.belspo.be">http://bccm.belspo.be</a>
CIP	Collection de l'Institut Pasteur	Paris, France	<a href="http://www.pasteur.fr">http://www.pasteur.fr</a>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	Braunschweig, Germany	<a href="http://www.dsmz.de">http://www.dsmz.de</a>
JCM	Japan Collection of Microorganisms	Saitama, Japan	<a href="http://www.jcm.riken.go.jp">http://www.jcm.riken.go.jp</a>
NCCB	Netherlands Culture Collection of Bacteria	Utrecht, The Netherlands	<a href="http://www.cbs.knaw.nl/nccb">http://www.cbs.knaw.nl/nccb</a>
NCIMB	National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria	Aberdeen, Scotland	<a href="http://www.ncimb.com">http://www.ncimb.com</a>

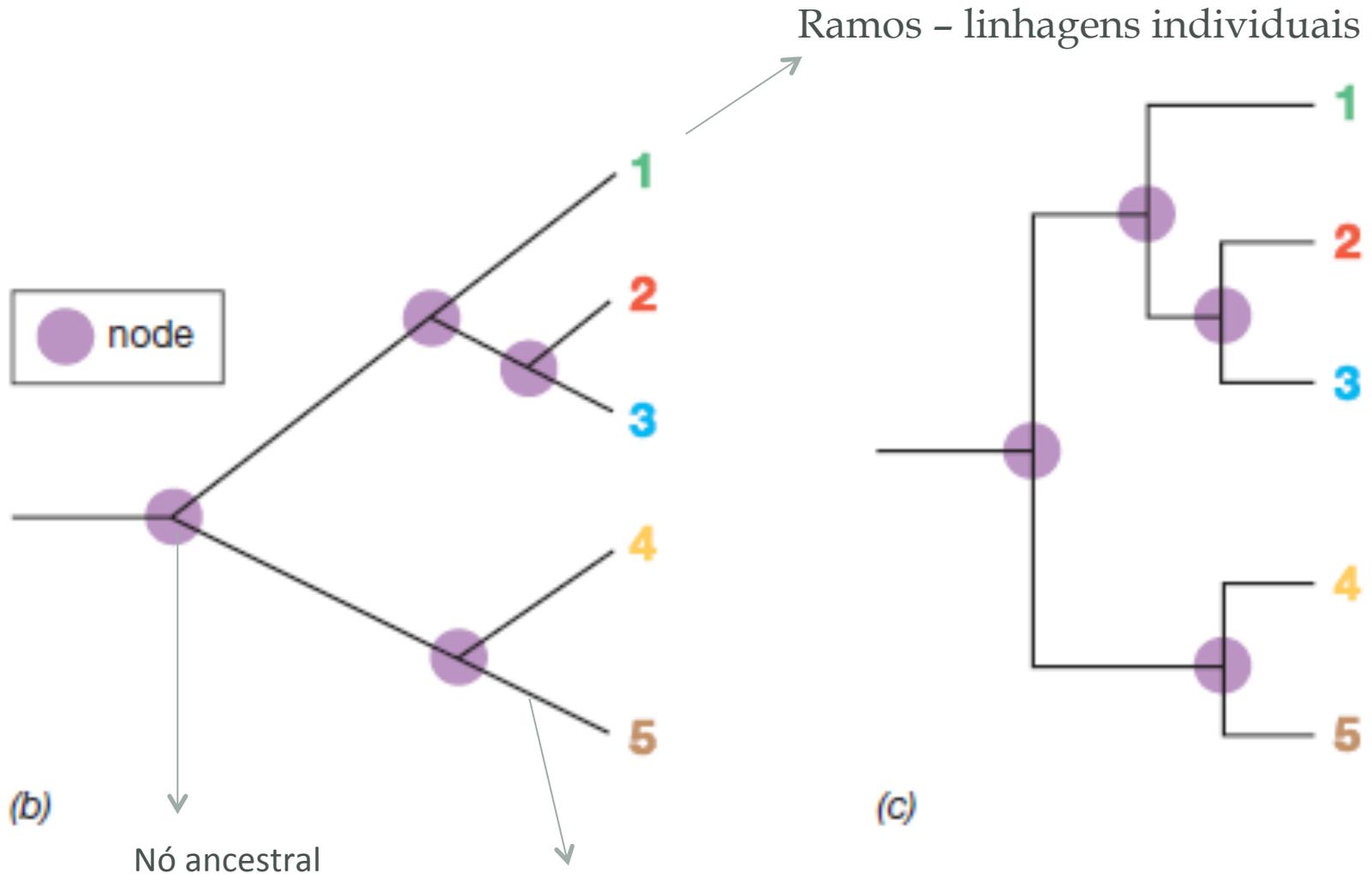
## Bancos de Dados Taxômicos

<b>Nome</b>	<b>Endereço WWW</b>	<b>Comentário</b>
NCBI Taxonomy	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy</a>	
Open Tree of Life	<a href="https://tree.opentreeoflife.org/">https://tree.opentreeoflife.org/</a>	Projeto colaborativo que inclui a versão mais moderna da taxonomia universal

# Filogenia, Taxonomía & Sistemática

- **Filogenia = Árvore Filogenética**
  - Representa a relação evolutiva entre os organismos
  
- **Taxonomia**
  - Caracteriza, nomeia e posiciona os organismos em grupos
  - Atualmente é polifásico: fenótipo + genótipo + filogenético
  
- **Sistemática Microbiana**
  - Estudo das relações entre microorganismos
  - Filogenética é o ramo da sistemática que estuda como inferir árvores filogenéticas

# Árvore Filogenética



O comprimento do ramo é proporcional ao número de substituições acumuladas

# Distância Evolutiva

Organismo	Seqüência	Análise
A	CGUAGAC <sup>~</sup> CCUG <sup>~</sup> AC	De A → B ocorrem três diferenças, em um total de doze; assim $\frac{3}{12} = 0,25$
B	CCUAGAG <sup>~</sup> CCUG <sup>~</sup> GC	
C	CCAAGACGUGGC	
D	GCUAGAUGUGCC	

(a) Alinhamento de seqüências e análise

## Distância evolutiva

$E_D$	A	→	B	0,25
$E_D$	A	→	C	0,33
$E_D$	A	→	D	0,42
$E_D$	B	→	C	0,25
$E_D$	B	→	D	0,33
$E_D$	C	→	D	0,33

(b) Cálculo da distância evolutiva

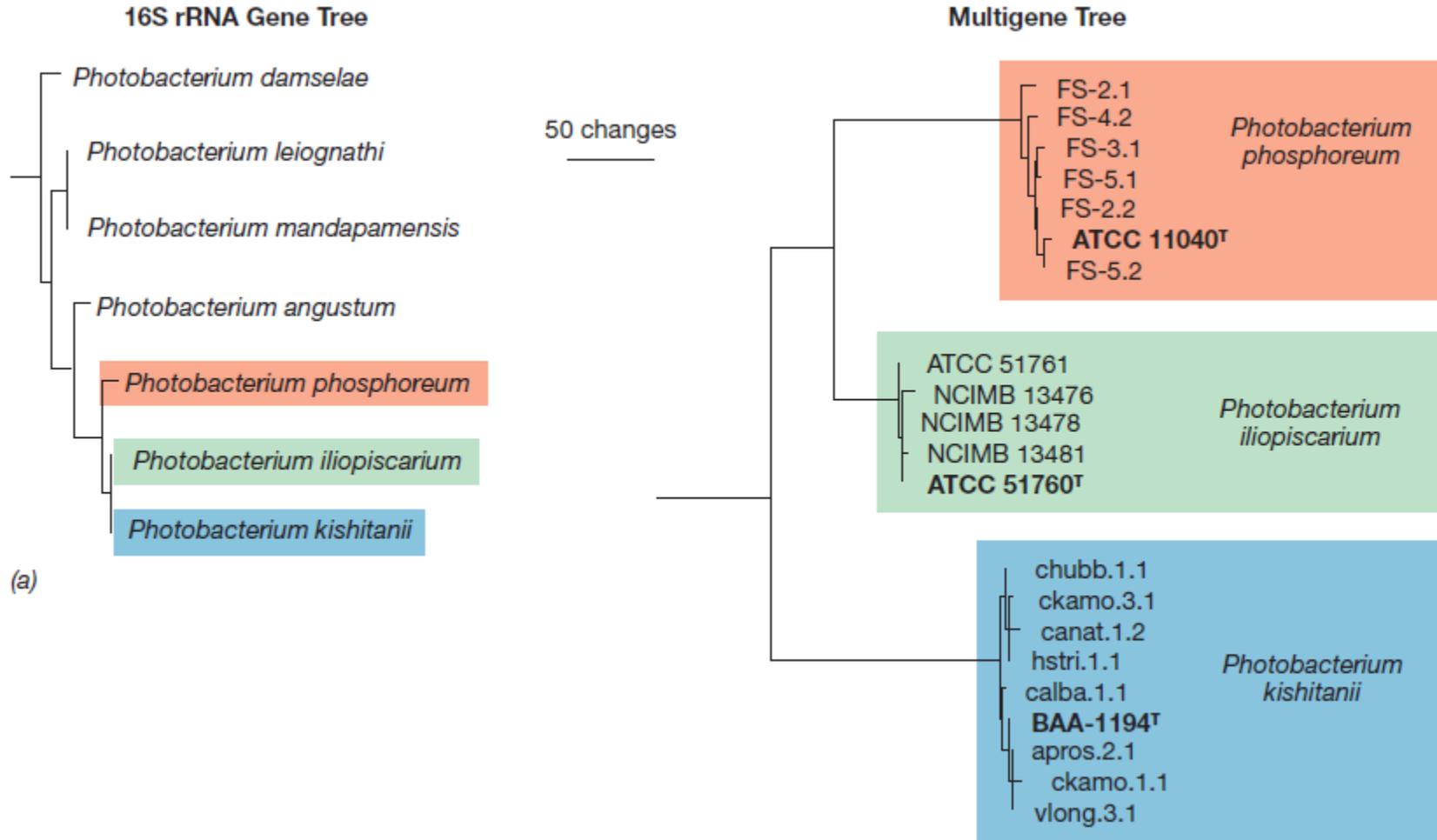
# Análise Evolutiva – Árvore Filogenética

- Subunidade menor do RNA ribossômico (SSU rRNA)
  - 16S (árqueas e bactérias) e 18S (eucariotos)
  - Distribuídos Universalmente
  - Função constante entre os organismos vivos
  - Evoluem lentamente => altamente conservados
  - Tamanho adequado para análise evolutiva

# Análise Evolutiva – árvore Filogenética

- Além do 16S, mesmo depois de bilhões de anos de evolução, outros genes comuns aos três domínios ainda podem ser identificados e usados em filogenias
- Exemplos
  - Fator TU de alongação da síntese proteica
  - Hsp60 – choque térmico
  - tRNA sintetases (vários)
- Quando analisando linhagens mais próximas, outros genes podem conter mais informação sobre a história dos organismos

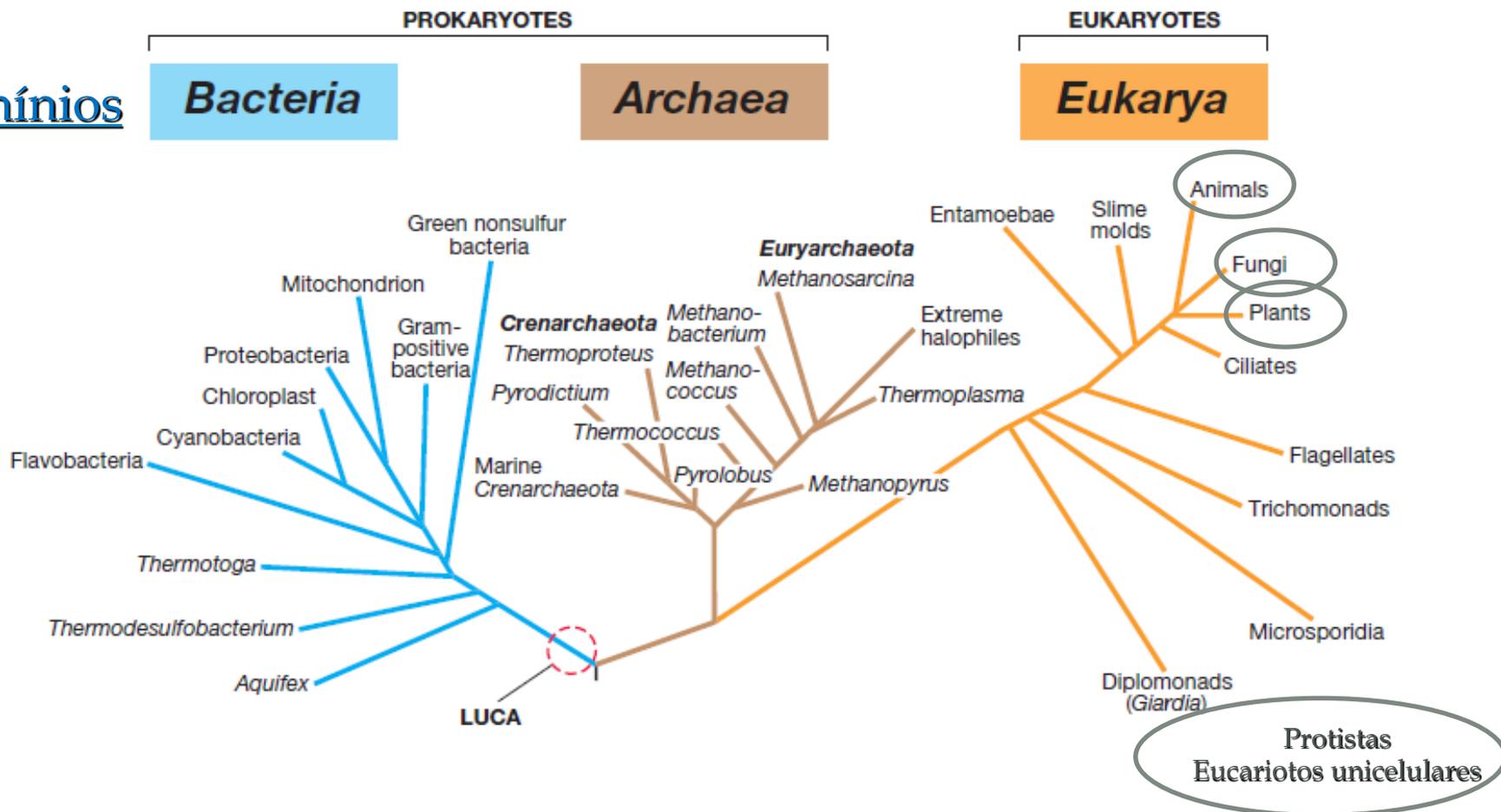
# Linhagens ou cepas: mesma espécie



# Filogenia Microbiana

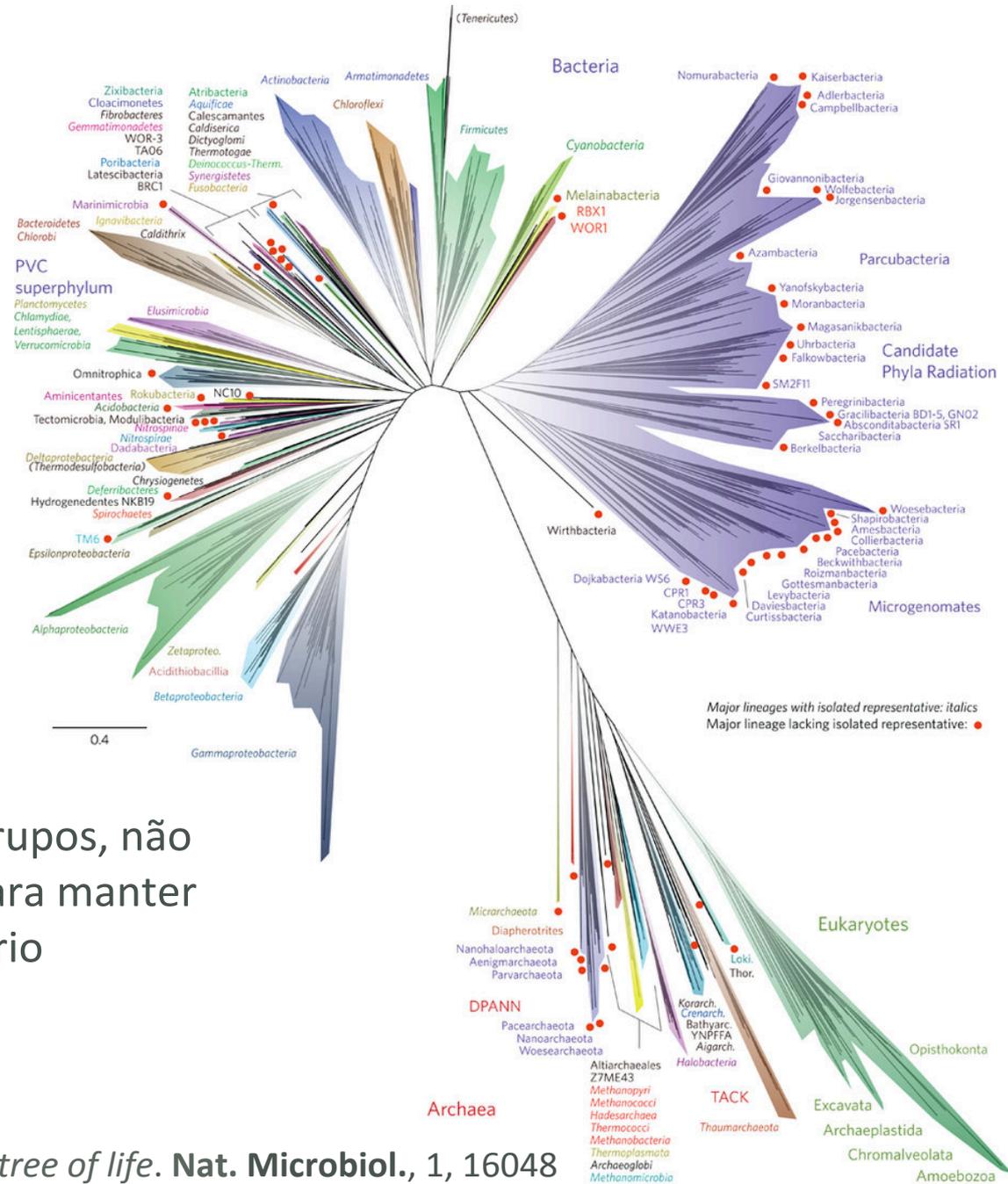
Com base na filogenia do RNA 16S, Woese estabeleceu que existem três tipos de organismos celulares: *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*

## Domínios



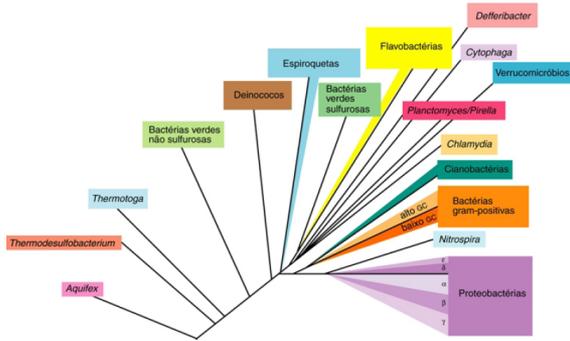
# A nova visão da árvore da vida: dois domínios

- Eucariotos descendem de um subgrupo de arqueas
- Grupos completamente novos de bactérias são identificados em amostras ambientais
- Para a maioria dos novos grupos, não são conhecidos métodos para manter culturas puras em laboratório



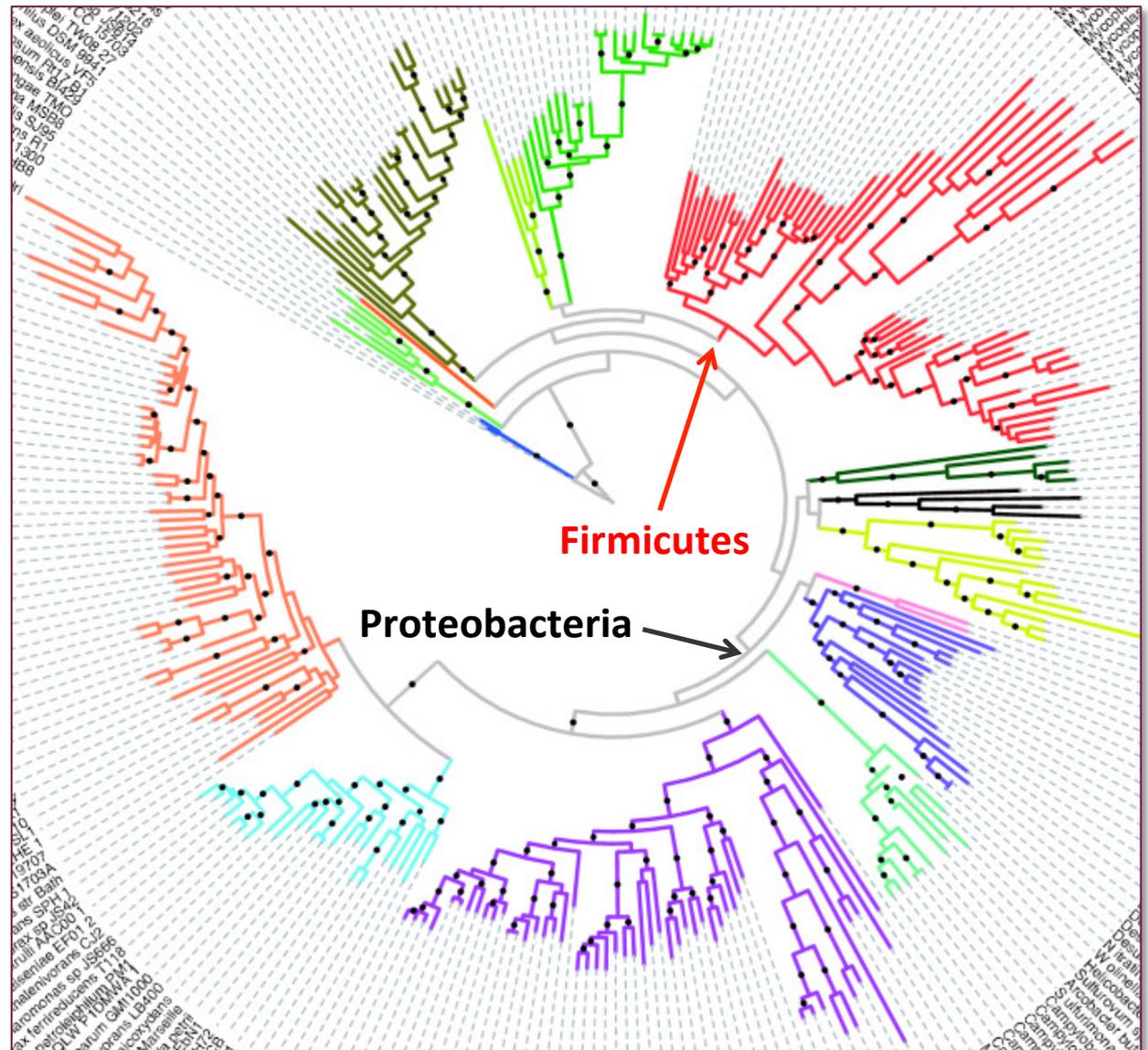


# Filogenia das Bacterias



À direita: árvore de máxima verossimilhança construída a partir do alinhamento concatenado de 31 proteínas codificadas por genes *housekeeping*

<http://itol.embl.de>  
<http://tolweb.org/tree/>



- Gammaproteobacteria
- Betaproteobacteria
- Alphaproteobacteria
- Epsilonproteobacteria
- Deltaproteobacteria

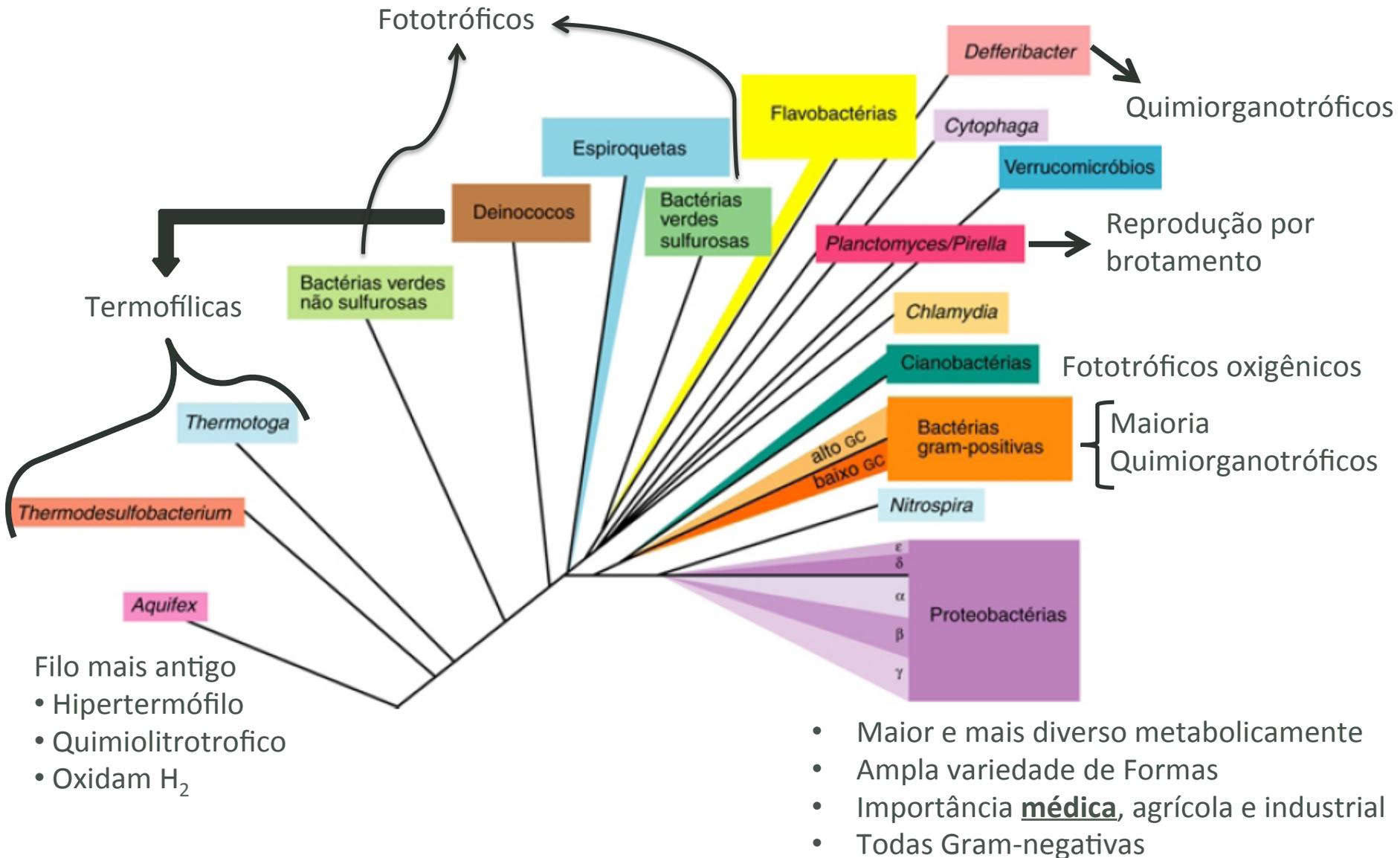
- Acidobacteria
- Bacteroidetes/Chlorobi
- Spirochaetes
- Chlamydiae/Planctomycetes
- Firmicutes

- Cyanobacteria
- Chloroflexi
- Actinobacteria
- Aquificae
- Thermotogae

- Deinococcus/Thermus

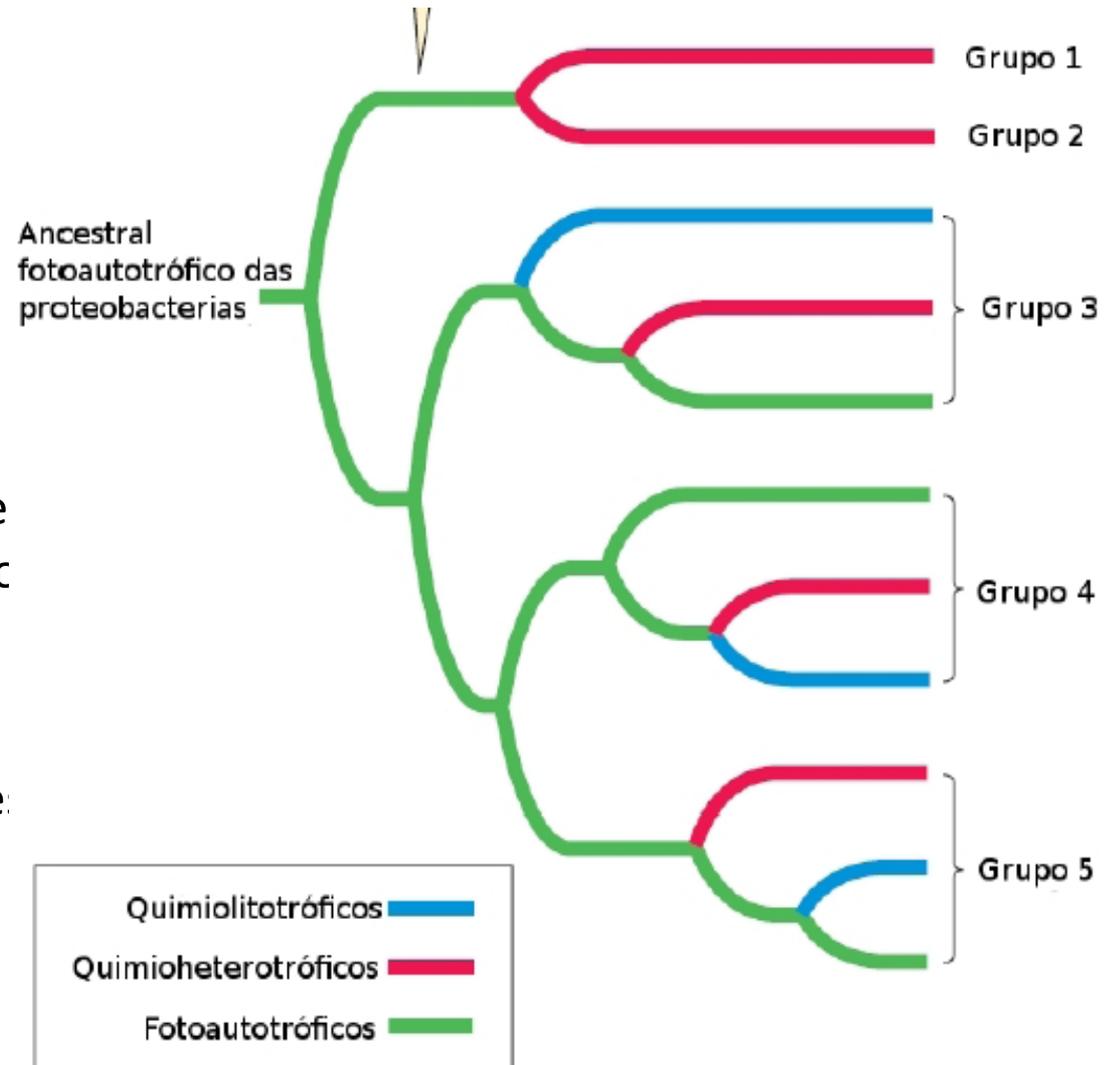
Wu, M. and Eisen, J.A. (2008) A simple, fast, and accurate method of phylogenomic inference. *Genome Biology*, 9, R151.

# Principais grupos de *Bacterias* & Metabolismo



# Protobactérias

- É o maior grupo de bactérias descritas
- Fantástica diversidade metabólica
- Ancestral das proteobaterias e provavelmente fotoautotrófico
- Alguns grupos perderam a capacidade de fazer fotossíntese



# Referências

- Tortora et al. Microbiologia 11<sup>a</sup> edição (2013).
  - Capítulo 10: Classificação de Microorganismos
  - Capítulo 11: Os procariotos: domínios Bacteria e Arquea
- Microbiologia de Brock 13<sup>a</sup> edição (2012)
  - Unidade 6: Evolução microbiana e Sistemática
- Marsh e Martin Microbiologia Oral 5<sup>a</sup> edição (2009)
  - Capítulo 3 : A microflora oral residente