

Diversidade e Ecologia Microbiana

Welington Luiz de Araújo
wlaraujo@usp.br

Engenharia Ambiental - 2018

Diversidade microbiana

Diversidade Biológica

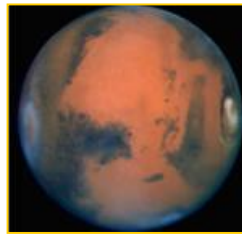


Conhecer, preservar e fazer uso sustentável

Diversidade microbiana

A busca pelo conhecimento da diversidade biológica

Qual a Diversidade biológica em outros planetas?



E a do passado?



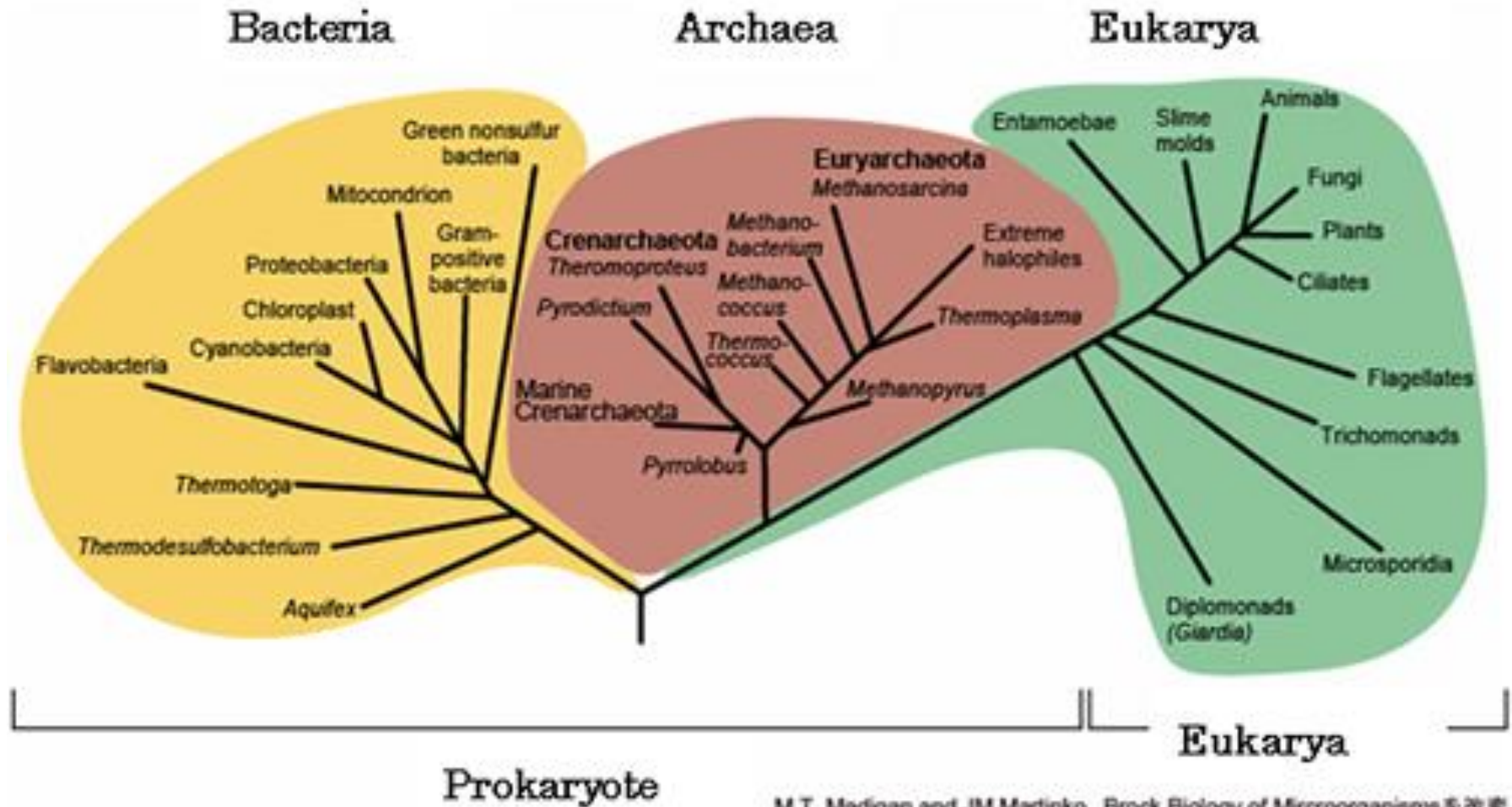
Diversidade microbiana

- **Diversidade $\neq$ riqueza de espécies**
- **Riqueza de espécies:** o número de espécies em uma área
- **Diversidade:** a variedade e a abundância relativa de espécies

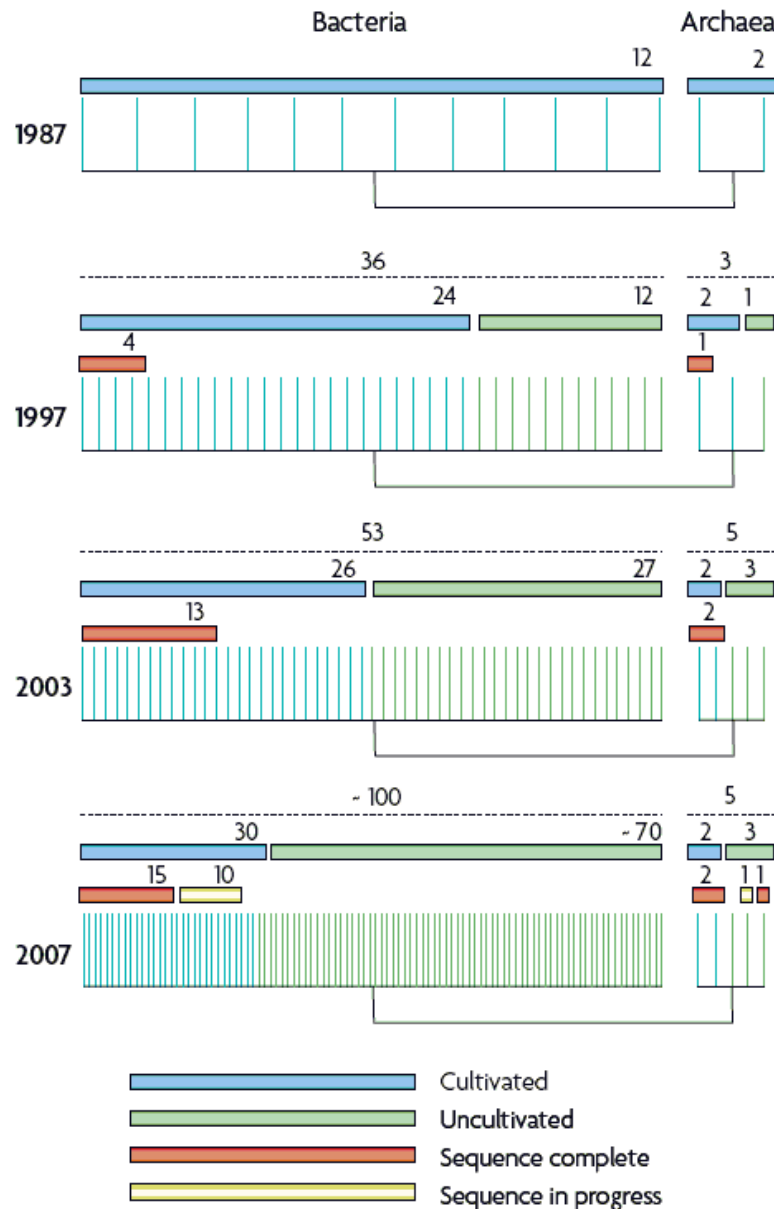
- Existem três tipos de diversidade: alfa (α), beta (β) e gama (γ).
- Diversidade α ou local é a diversidade dentro de um habitat ou comunidade (é restrito)
- Diversidade γ , ou regional, é a diversidade de uma grande área, bioma, continente, ilha, etc.
- Diversidade β é a diversidade entre habitats ou outra variação ambiental qualquer, medindo o quanto a composição de espécies varia de um lugar para outro.

- **Diversidade:** necessário identificar e conhecer os grupos biológicos e o ambiente

Quem são os micro-organismos?



O conhecimento sobre a diversidade microbiana aumenta



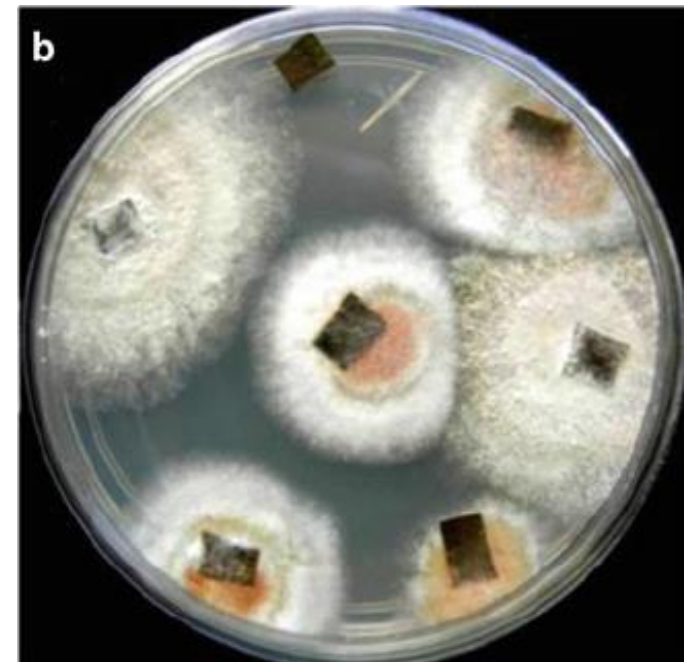
- Novos filos
- Novas vias metabólicas
- Novos mecanismos de interação

Isolamento de Micro-organismos

- ✿ O isolamento de micro-organismos permite quantificar e identificar membros de uma comunidade microbiana
- ✿ O tipo de ambiente a ser avaliado interfere na estratégia para obter a suspensão de células
 - ❖ O solo deve ser agitada em solução tampão
 - ❖ Para remoção da comunidade microbiana de superfícies, as amostras devem ser agitadas em solução contendo bolinhas de vidro.
 - ❖ Compostos surfactantes (p.e. Tween 80) podem ser utilizados para facilitar a dispersão
- ✿ Diluições ou concentração de amostras podem ser necessárias.
 - ❖ Para amostras de solo, diluições apropriadas são necessárias.
 - ❖ Para amostras de água e ar, podem ser utilizados filtros para concentrar as células das amostras

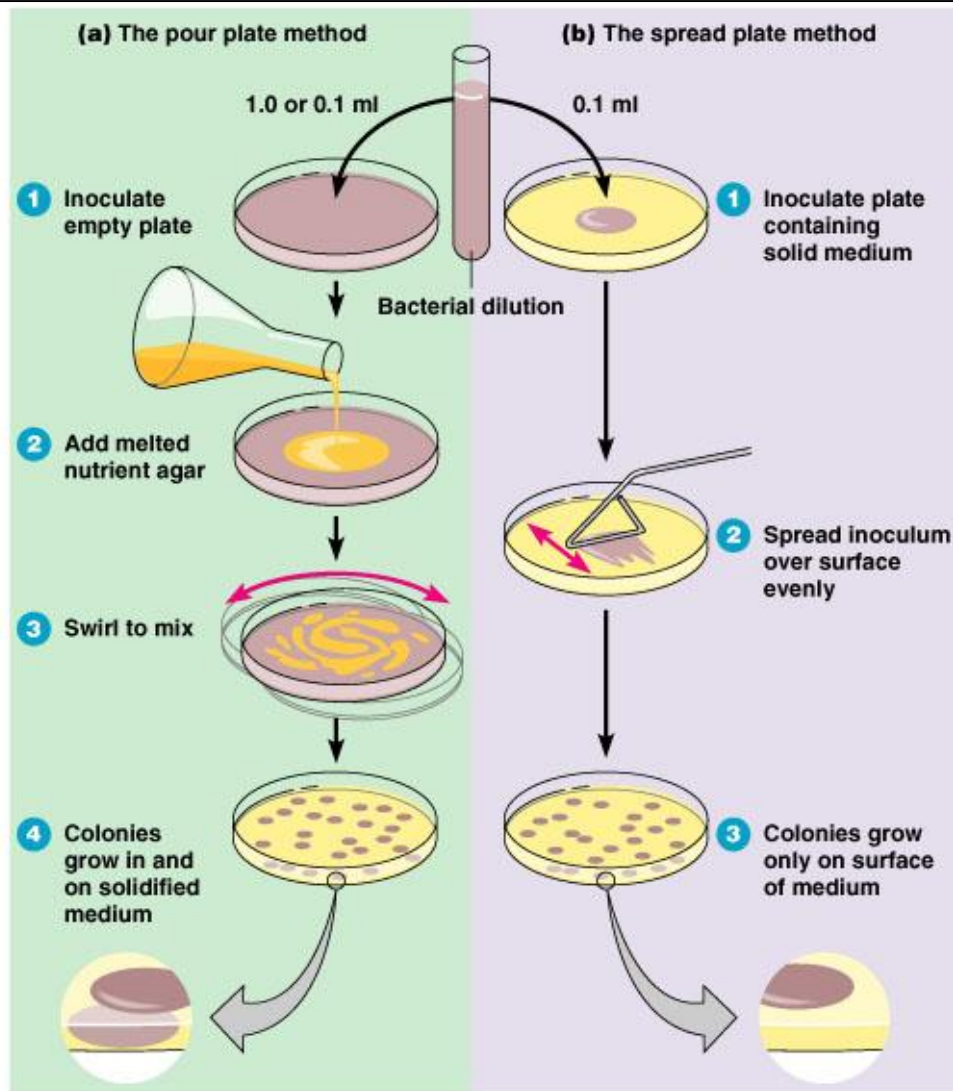
Isolamento de Micro-organismos

- ✱ Seletividade dos meios de cultivo permite avaliar grupos microbianos específicos
- ✱ O número de colônias deve estar entre 30 e 300 UFC.g de amostra⁻¹. ou permitir a observação de colônias isoladas



Isolamento de Micro-organismos

Método de sementeira em Placa de Petri



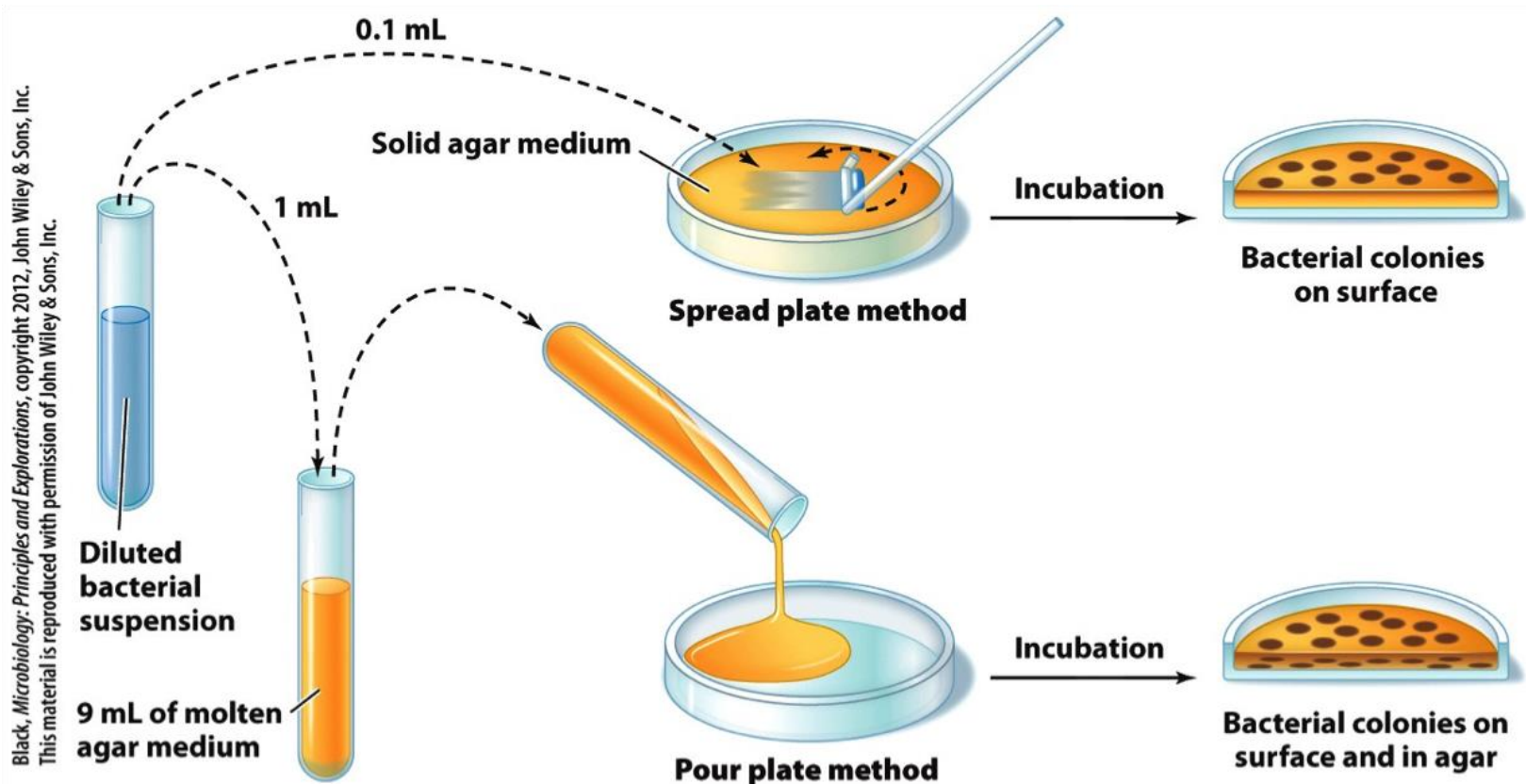
Método da Sobrecamada
Meio de cultura
sobre as células

Método de espalhamento
sobre o meio de cultura

Isolamento de Micro-organismos

Método de semeadura em Placa de Petri

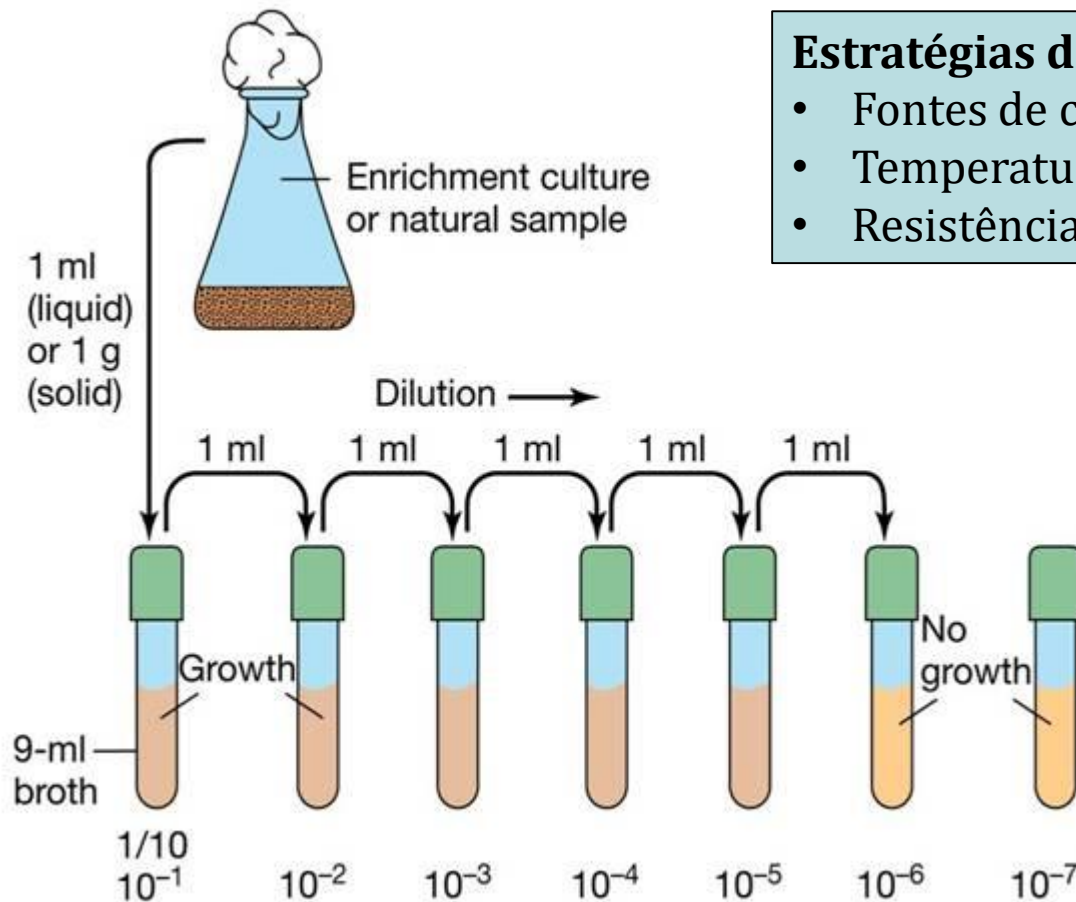
Método de espalhamento - sobre o meio de cultura



Método da Sobrecamada - Células no Meio de cultura

Isolamento de Micro-organismos

Método de enriquecimento



Estratégias de enriquecimento:

- Fontes de carbono
- Temperatura
- Resistência a fatores físico-químicos e etc

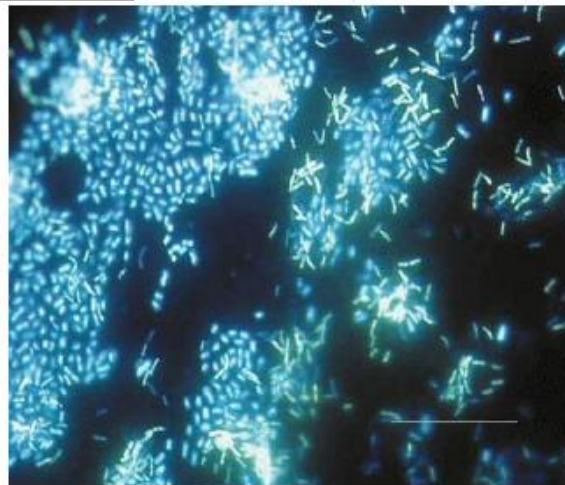
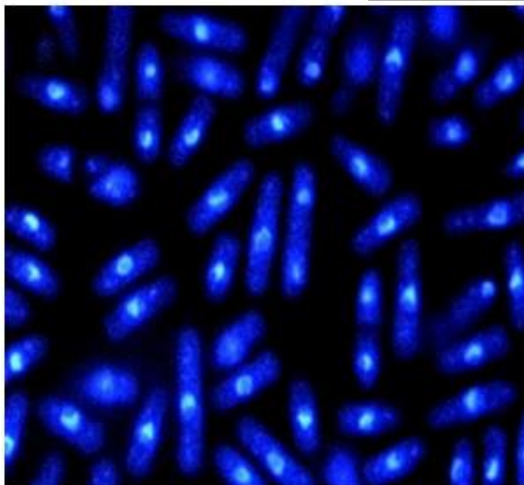
Detecção de Micro-organismos

Método de coloração por DAPI ou Acridina Laranja (AO)

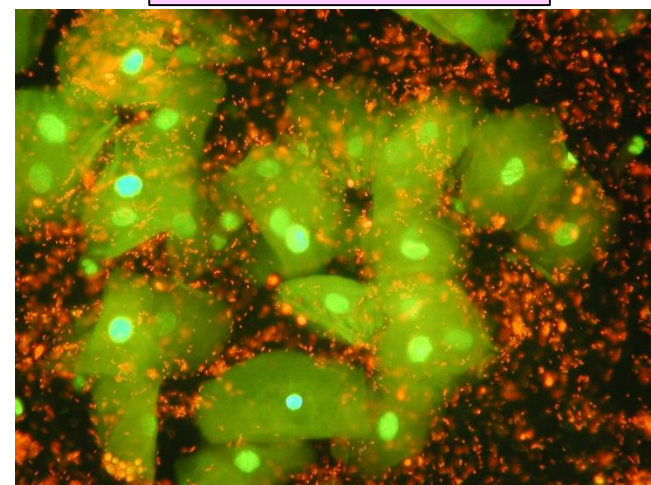
Estratégias:

- DAPI (diamidino-2-phenylindole) cora as células de azul fluorescente
- AO cora de laranja ou laranja esverdeado
- Fluorescência é observada sobre Luz U.V.
- Permitem a quantificação de micro-organismos ao microscópio de fluorescência.
- São inespecíficos pois coram os ácidos nucleicos
- Não permite diferenciar células vivas de células mortas

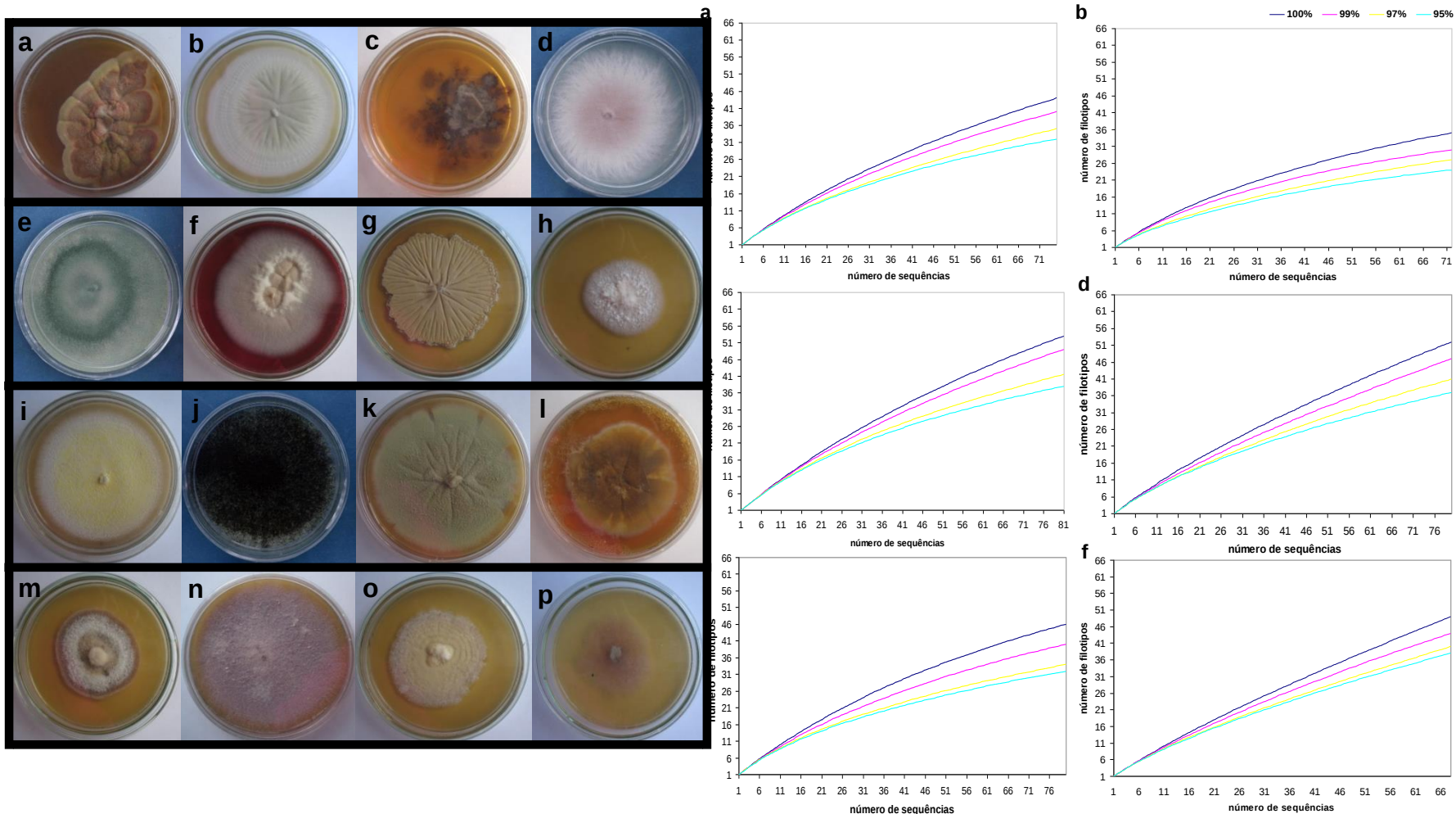
DAPI



Acridina Laranja

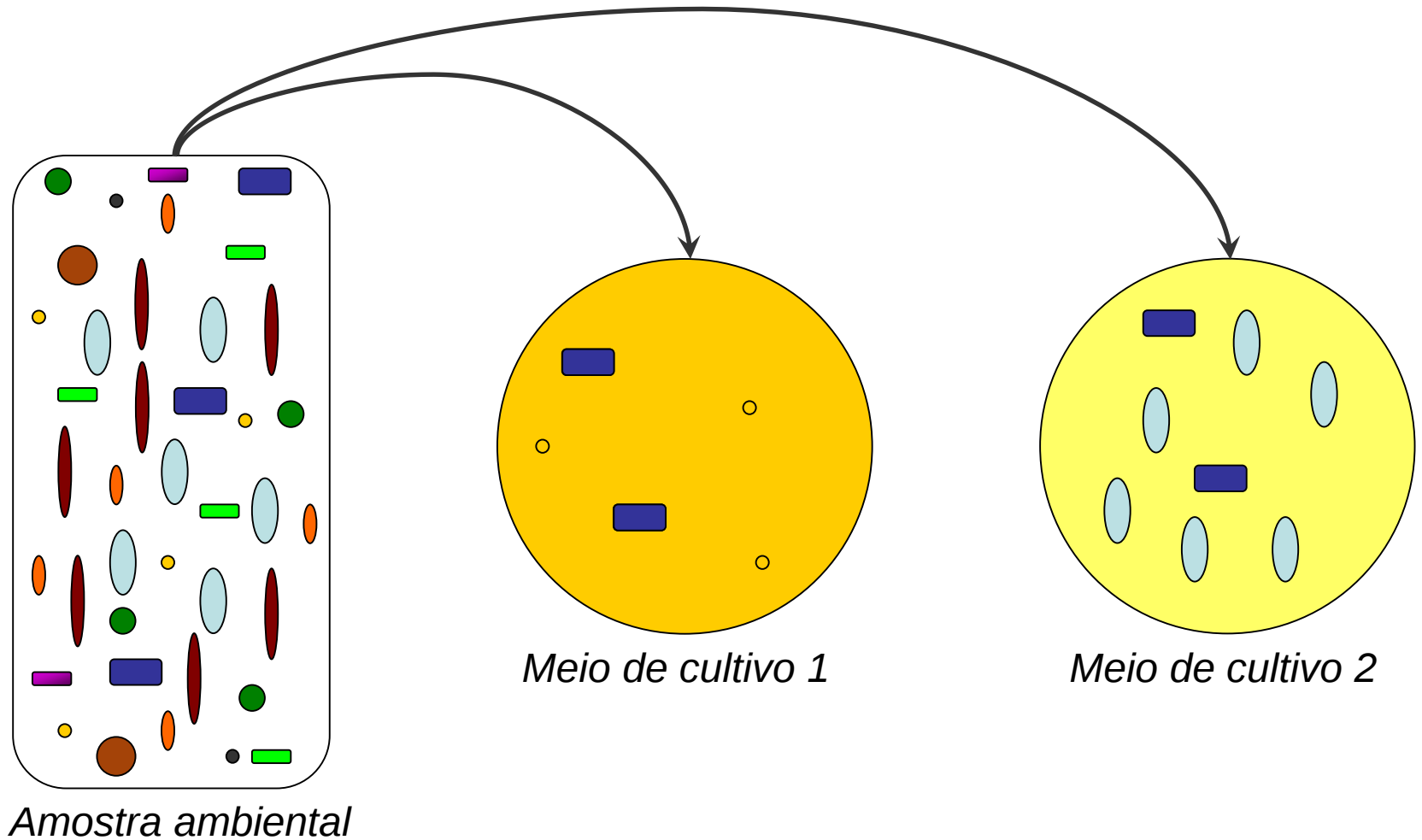


Diversidade microbiana cultivável



Riqueza de espécies é alta, mas o que observamos está abaixo da realidade

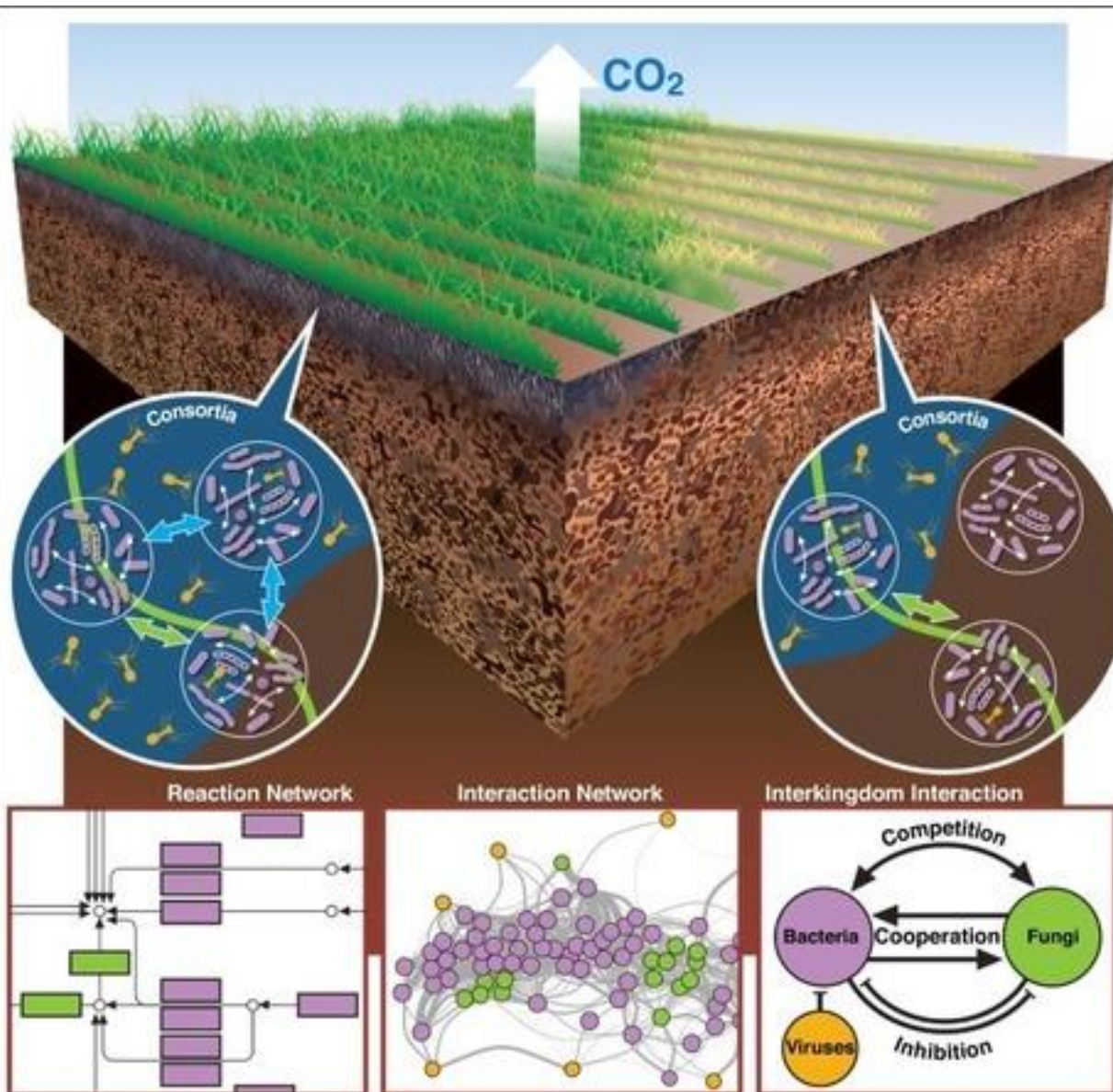
Culturabilidade



Inconsistência entre a Diversidade observada e a isolada

- ✱ Baixa culturabilidade microbiana
- ✱ Seletividade dos meios de cultivo
- ✱ Seletividade das condições de cultivo: CO₂, O₂, temperatura, fonte de C, N, fatores de crescimento e etc.
- ✱ Pequena representatividade da comunidade *in vivo* (coleções de culturas) - identificação

Microbiologia do solo

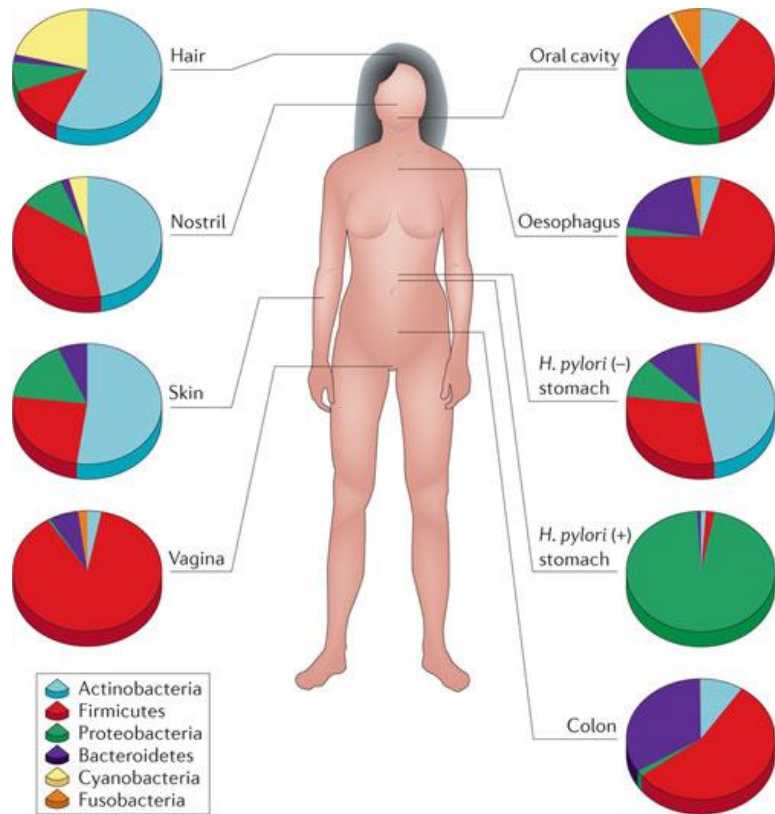


Métodos de avaliação da Diversidade

Comunidade Bacteriana de Soja

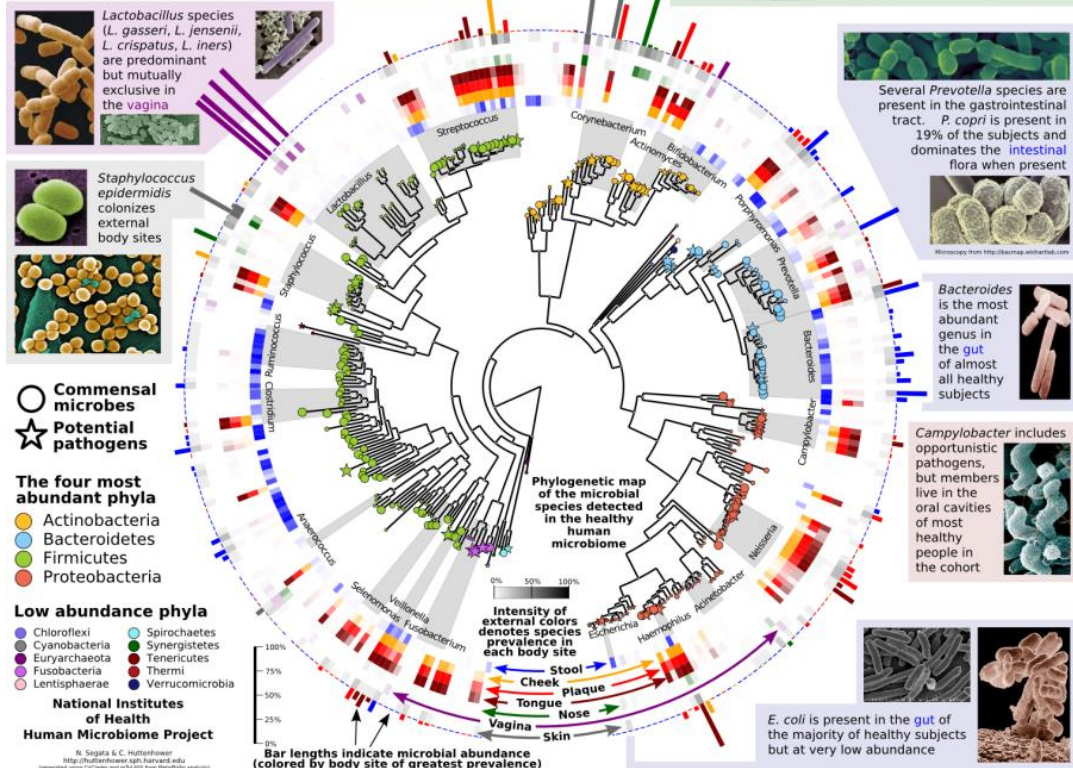
Espécies observadas por isolamento	Espécies observadas por DGGE
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.
<i>Erwinia</i> sp.	<i>Erwinia</i> sp.
<i>Pantoea</i> sp.	<i>Pantoea</i> sp.
<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Enterobacter</i> sp.
<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Acinetobacter</i> sp.
<i>Agrobacterium</i> sp.	<i>Agrobacterium</i> sp.
<i>Caulobacter/Asticcacaulis</i>	
<i>Ralstonia picketti</i>	
<i>Burkholderia</i> sp.	
<i>Klebsiella</i> spp.	
	<i>Bradyrhizobium</i> spp.
	<i>Herbaspirillum</i> sp.
	<i>Xanthomonas</i> sp.
	<i>Stenotrophomonas malthophilia</i>

Microbioma Humano



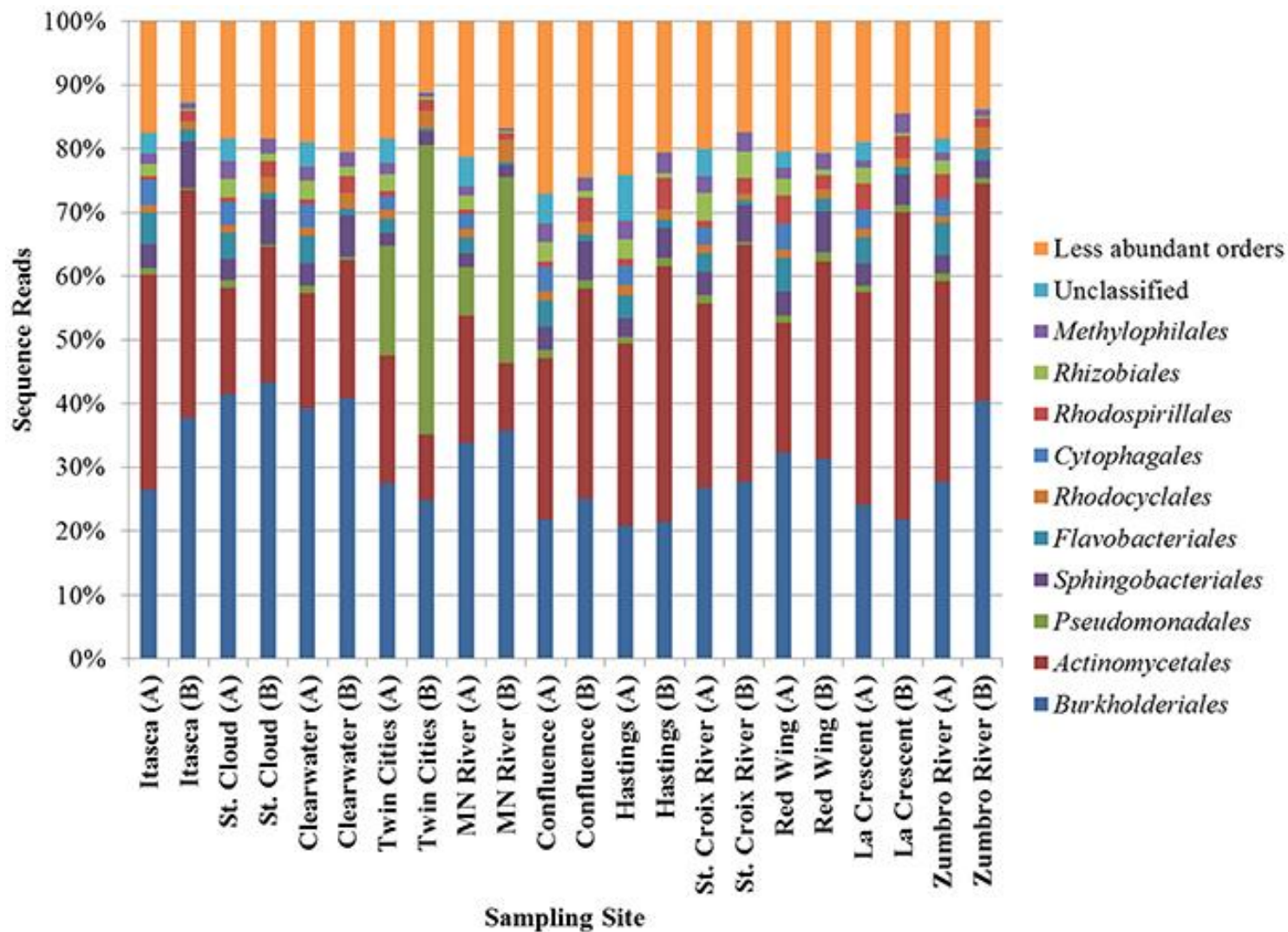
Nature Reviews | Genetics

A map of diversity in the human microbiome

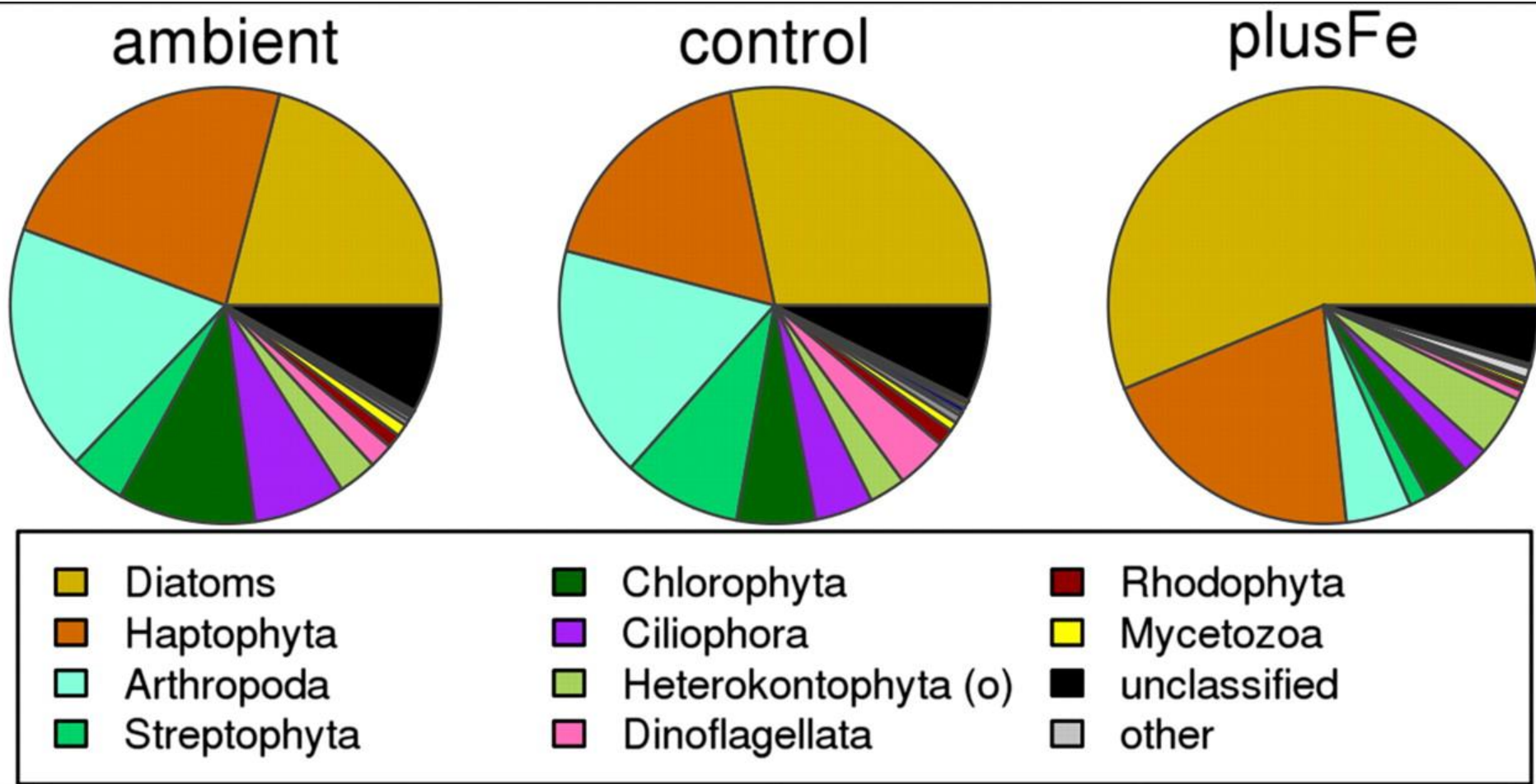


Métodos Independentes de Cultivo

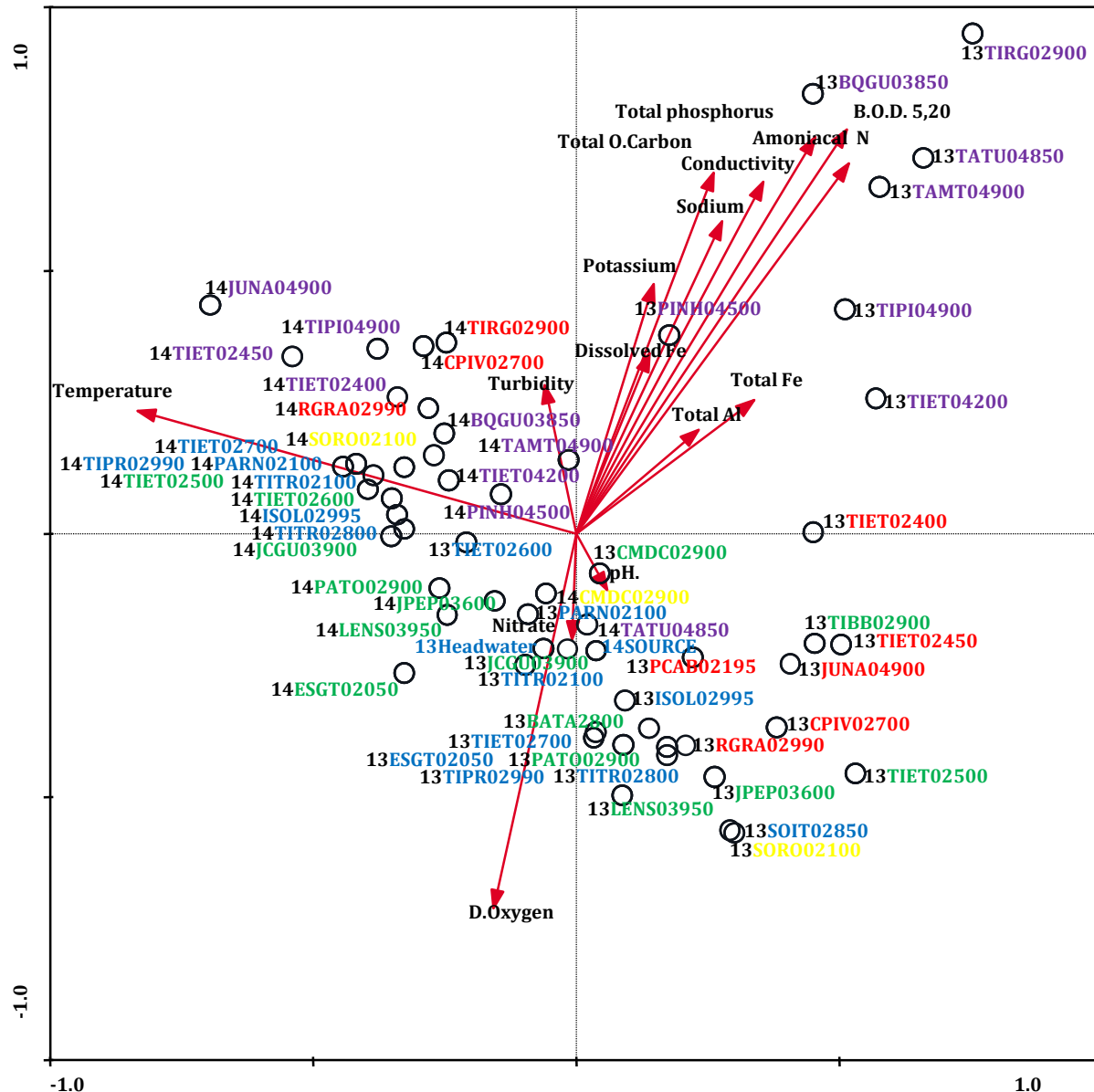
Diversidade



Diversidade Microbiana – Correlação com fatores ambientais



Diversidade Microbiana – Correlação com fatores ambientais



Rio Tietê

**Índice de Qualidade
de água:**

Péssimo

Ruim

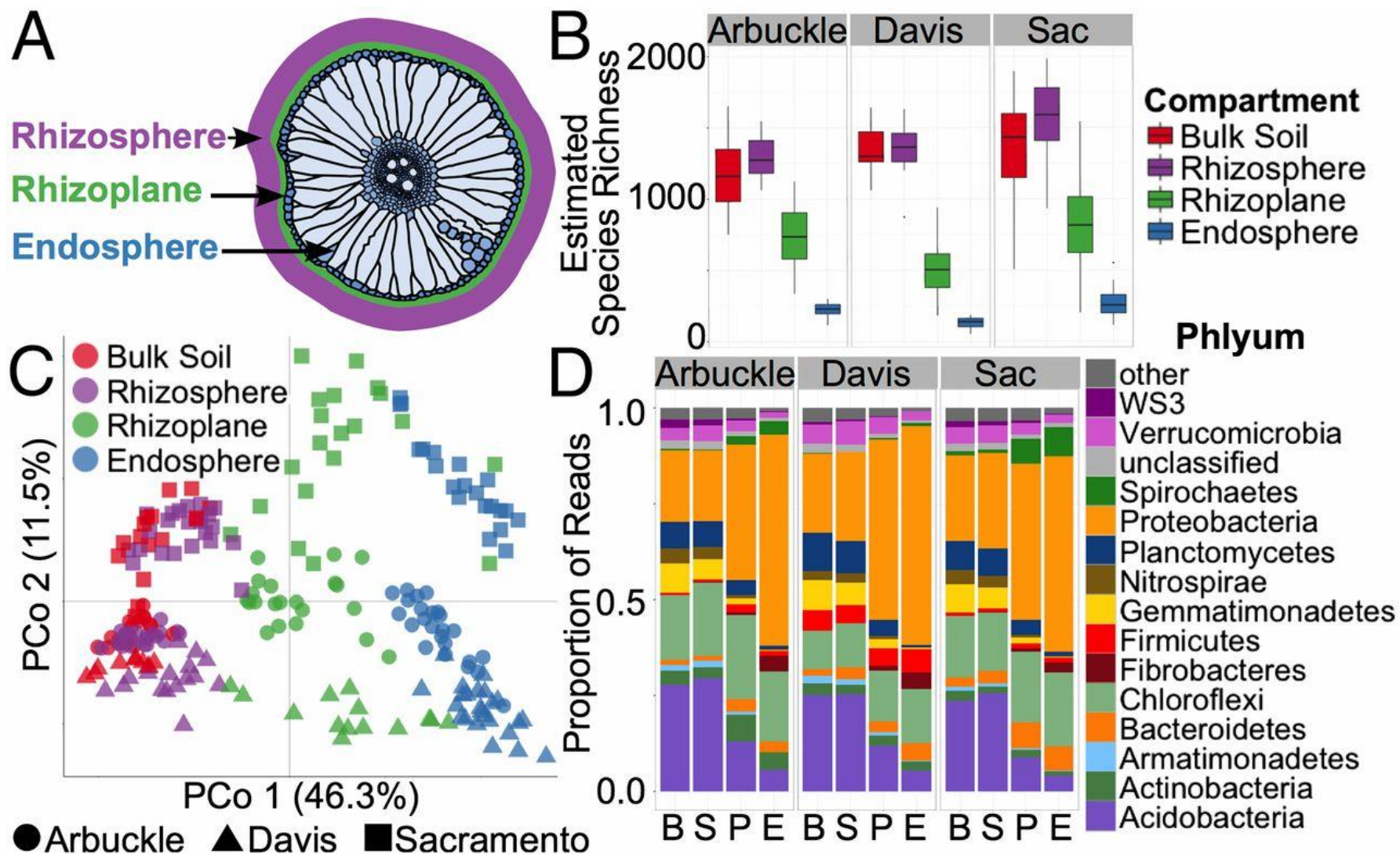
Regular

Bom

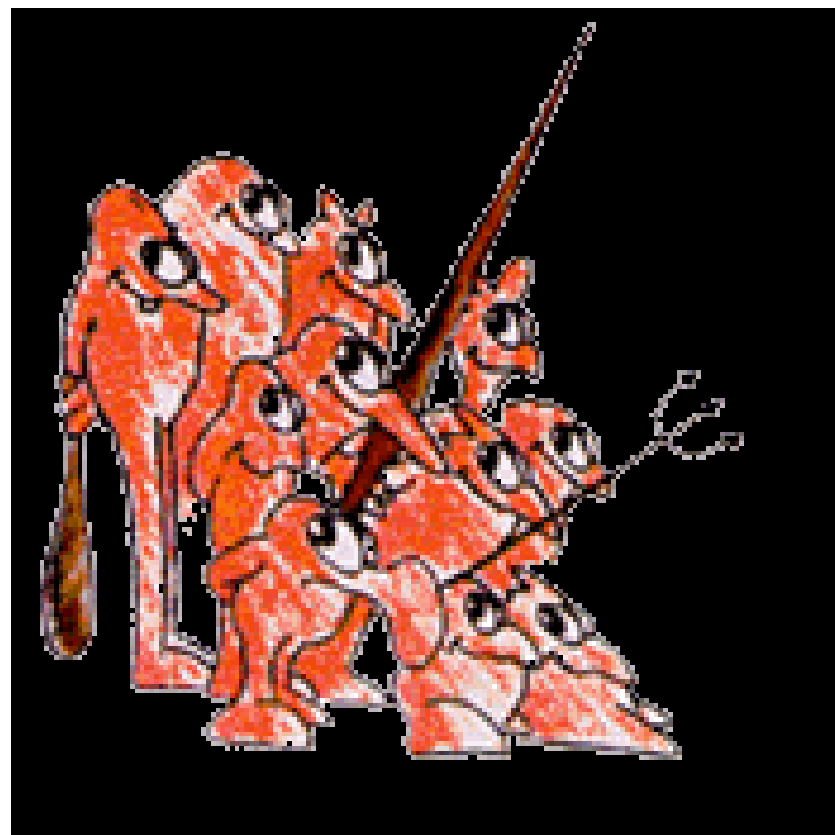
Ótimo

- A comunidade bacteriana responde à distribuição de nutrientes, metais e oxigênio dissolvido
- Existe sobreposição de pontos, sugerindo que ocorre uma transição da diversidade microbiana entre pontos.

Diversidade de bactérias associadas à planta de arroz



Status no ambiente



Tipos de interação micro-organismos no solo

Simbiose parasítica:

O microrganismo em determinada fase do seu ciclo de vida parasita o hospedeiro, retirando nutrientes sem benefícios mútuos.

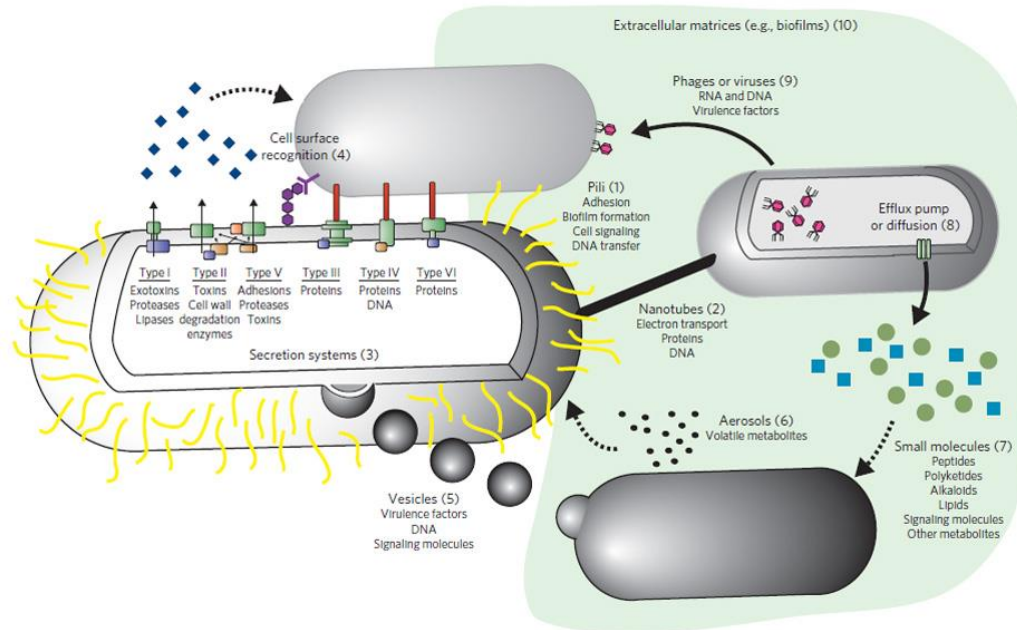
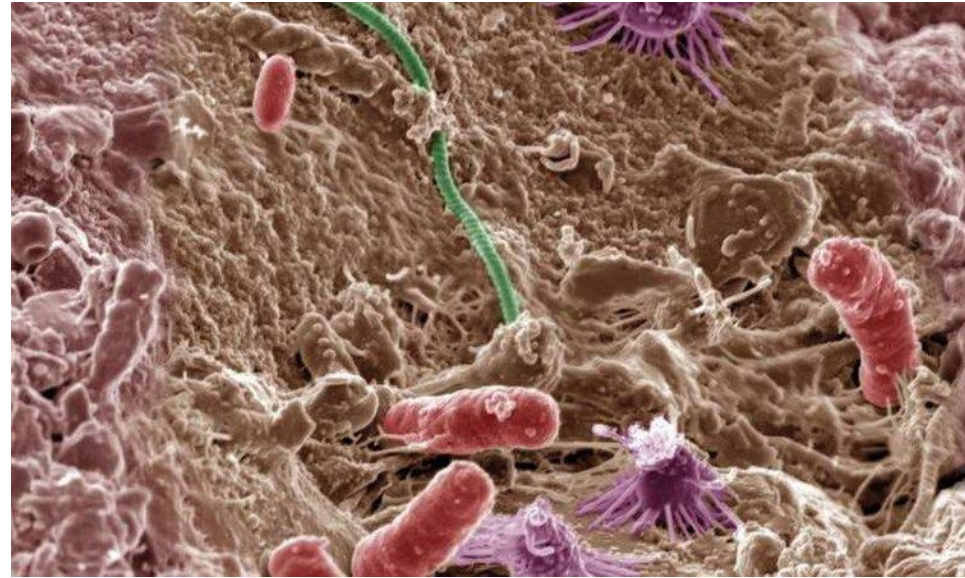
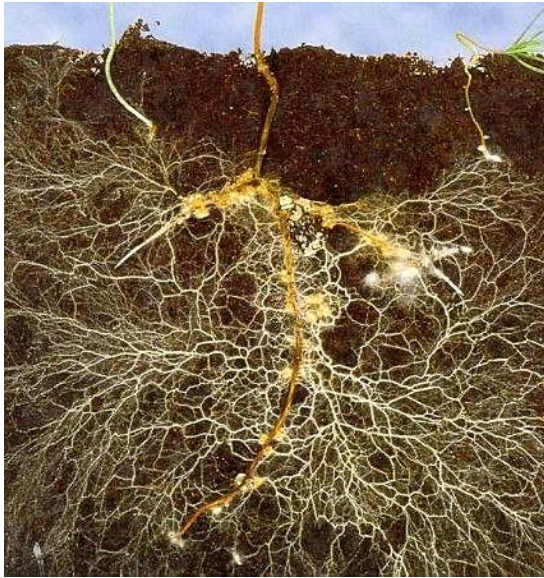
Simbiose mutualística:

O microrganismo em determinada fase do seu ciclo de vida interage com o hospedeiro, obtendo nutrientes e melhorando o desempenho do parceiro em determinadas condições.

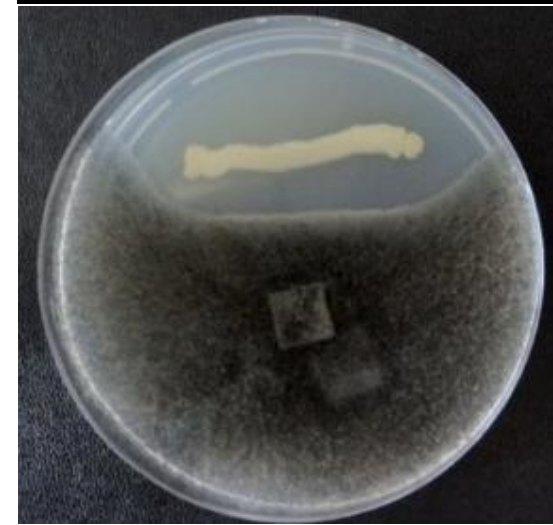
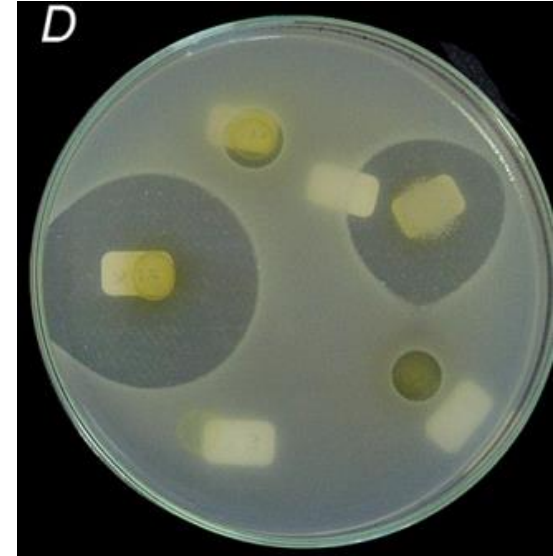
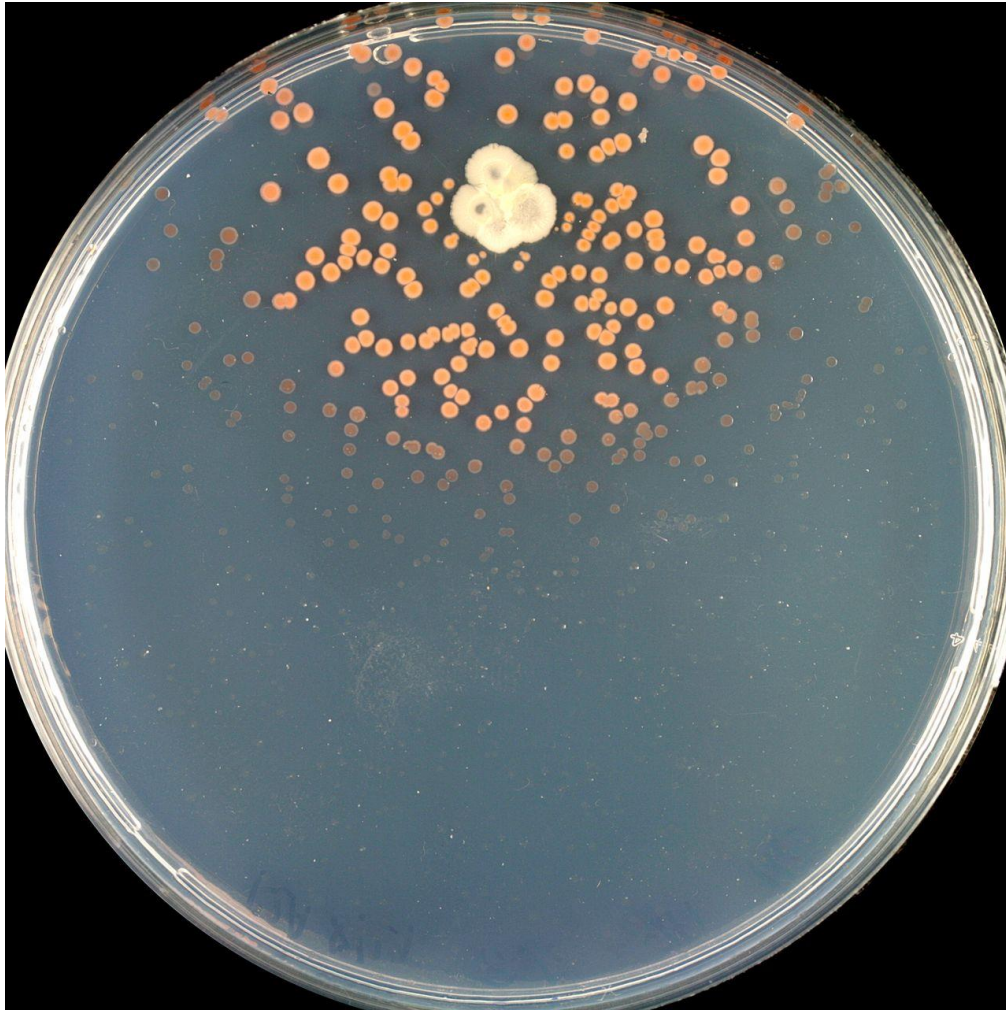
Importância dos micro-organismos no solo

- Os micro-organismos do solo afetam a estrutura (agregação) e fertilidade do solo
- Contribui para a disponibilidade de nutrientes (degradação da matéria orgânica, formação do húmus, fixação de N e germinação de sementes
- Degrada pesticidas e produtos químicos do solo
- Contribui para o crescimento e produtividade das plantas
- Contribui com a estabilidade do solo por meio de diferentes processos bioquímicos
- Reduz a incidência de patógenos no solo (solos supressivos).

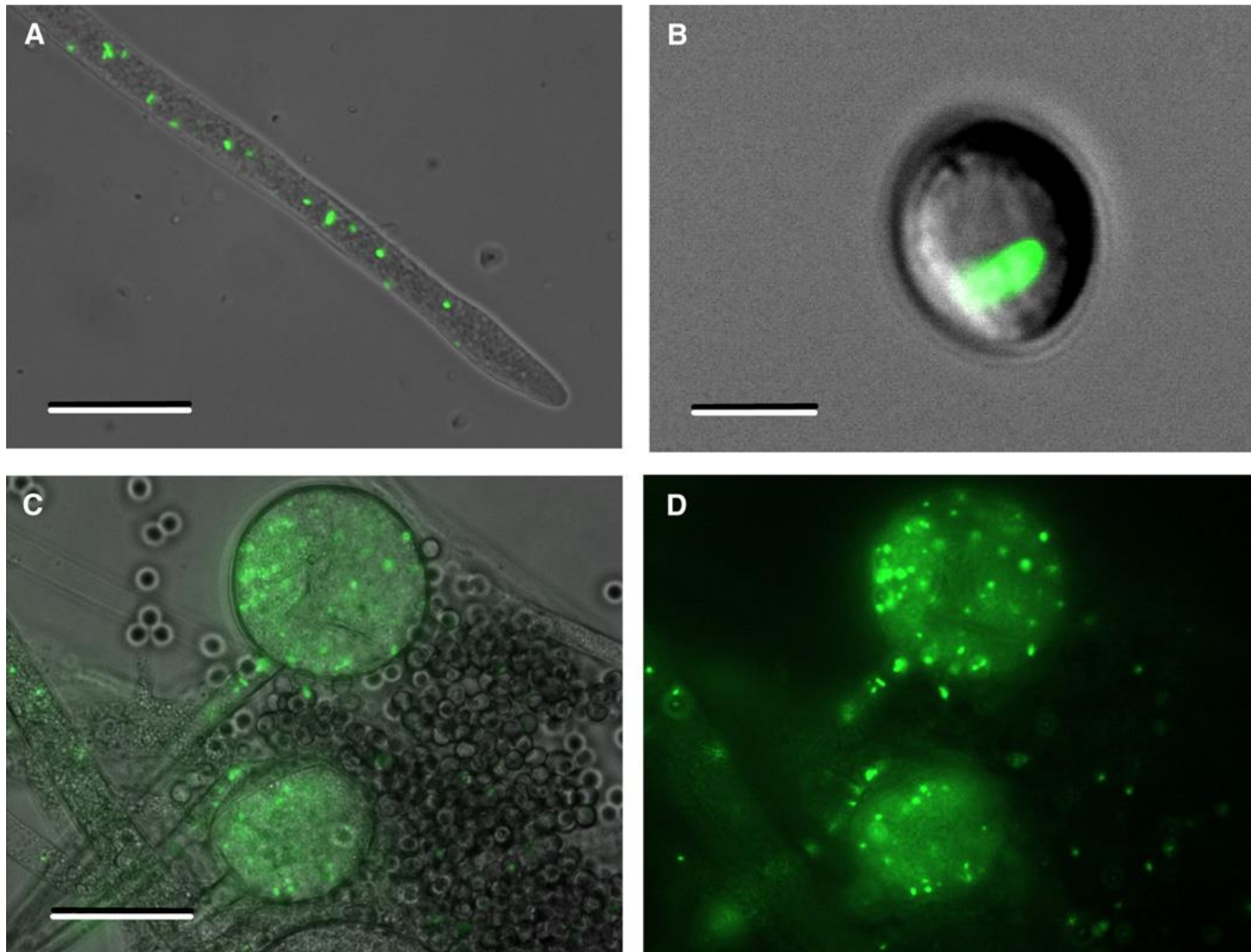
Interações Microbianas



Interações microbianas



Interação entre *Rhizopus microporus* e uma Endobactéria



(A) Hypha showing bacteria migrating to the tip (scale bar represents 25 mm). (B) A single vegetative spore containing a rod-shaped GFP-labeled endobacterium (scale bar represents 2 mm). (C and D) Sporangiophores, sporangia, and spores formed after restitution of the symbiosis (white light and fluorescence mode, scale bar represents 30 mm).

Interação entre *Rhizopus microporus* e uma Endobactéria

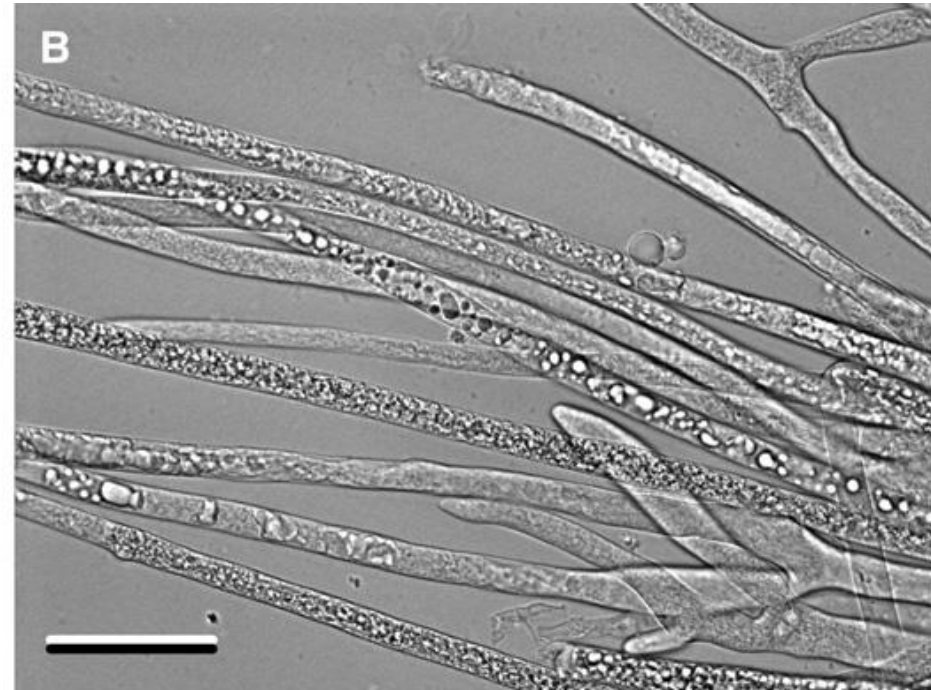


Monitoring Microinjection of GFP-Labeled Endosymbionts into the Fungus and Migration within the Hyphae
Micrographs (A)–(E) are screen captures taken at 0.5 min intervals. Scale bar represents 10 μ m. Red arrow indicates site of laser injection; white arrows highlight GFP-labeled bacteria and direction of their migration.

Interação entre *Rhizopus microporus* e uma Endobactéria

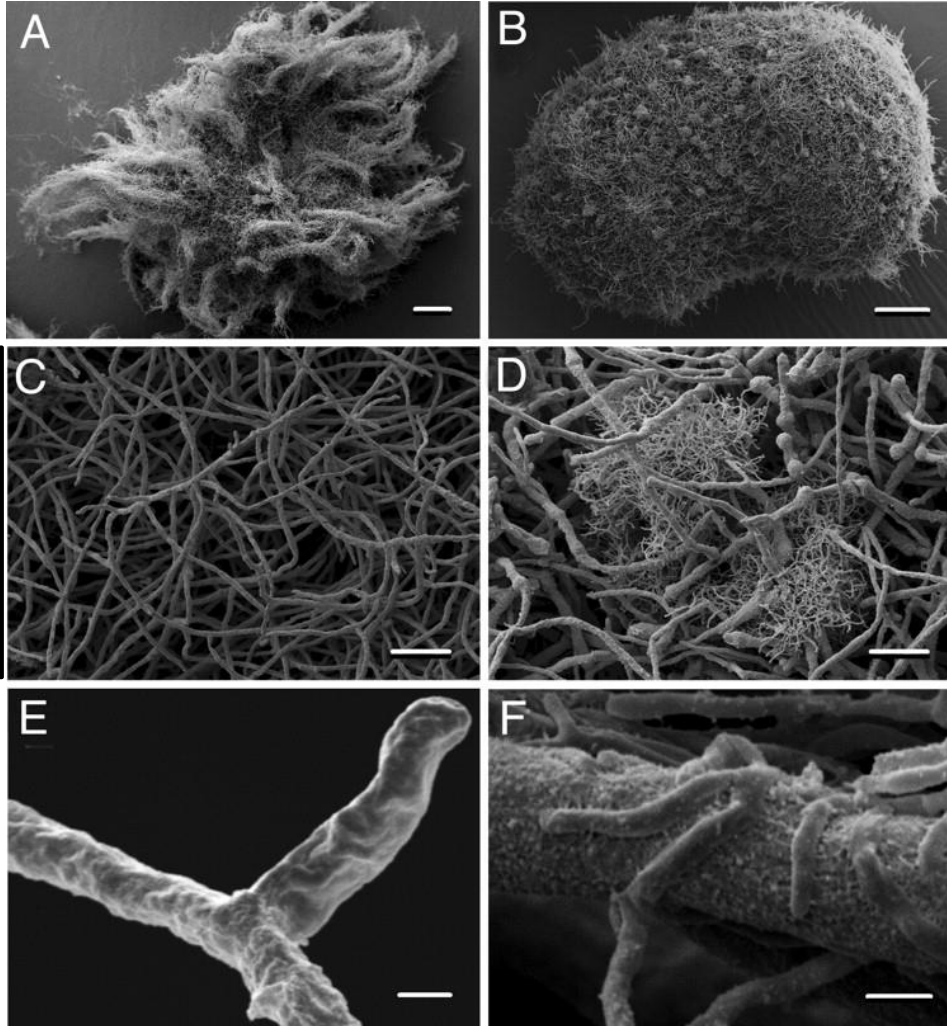


Aparência típica da linhagem selvagem, contendo a endobactéria.



A linhagem curada não forma esporângio.
A barra de escala representa 30 μ m.

Interação entre *Aspergillus nidulans* e *Streptomyces hygroscopicus*

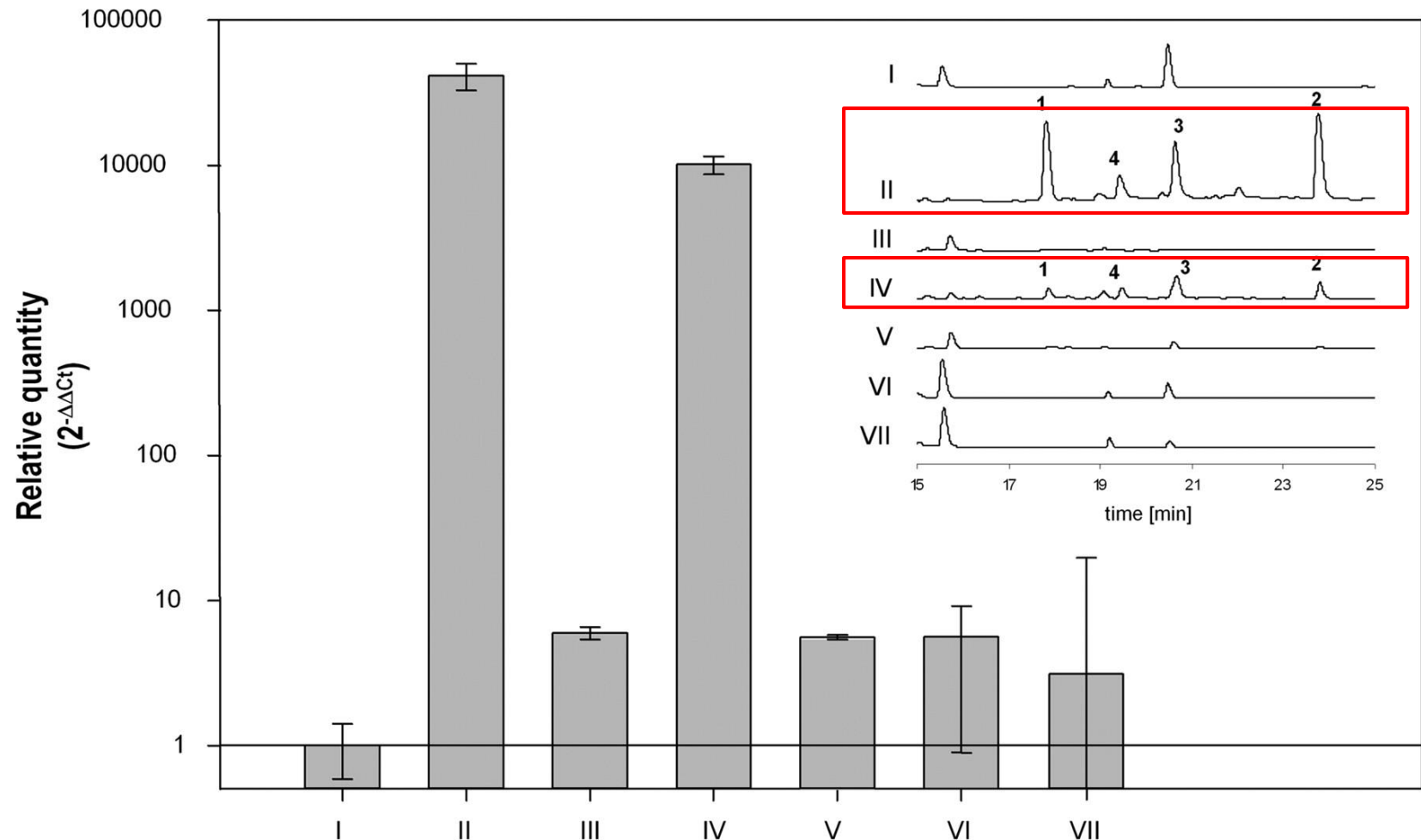


(B) Scanning electron micrograph of *A. nidulans* coincubated with *S. hygroscopicus*. (Scale bar: 200 μm .)

(D) Magnification of B. (Scale bar: 20 μm .)

(F) Further magnification of D showing the close contact between the filamentous bacteria and fungal mycelia.

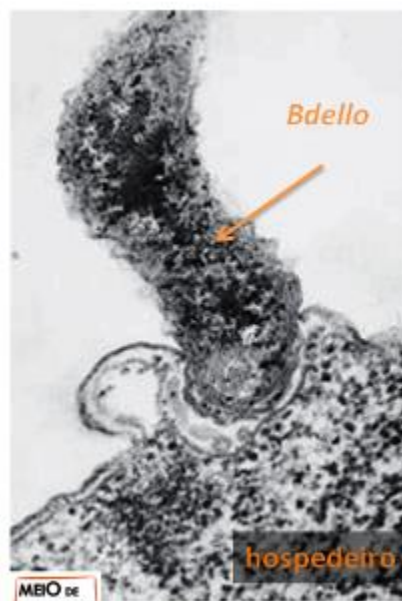
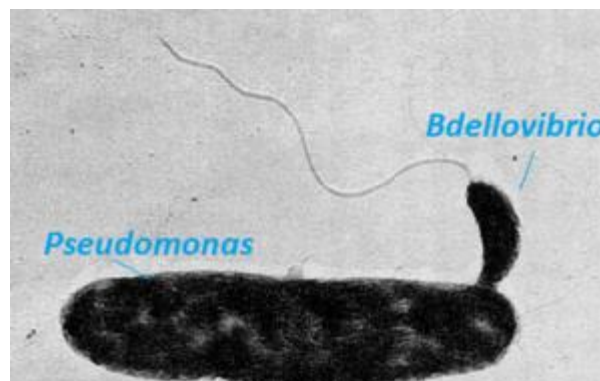
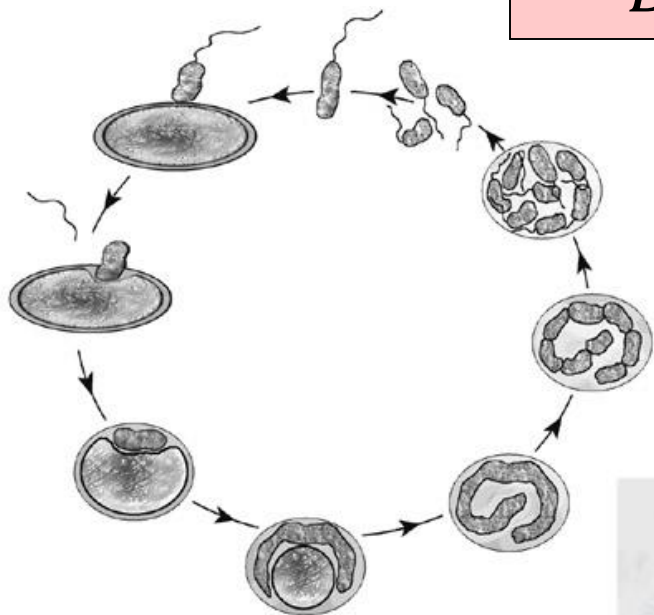
Quantidade relative de mRNA do gene orsA (AN7909) da policetídeo e análise de HPLC do sobenadante da cultura.



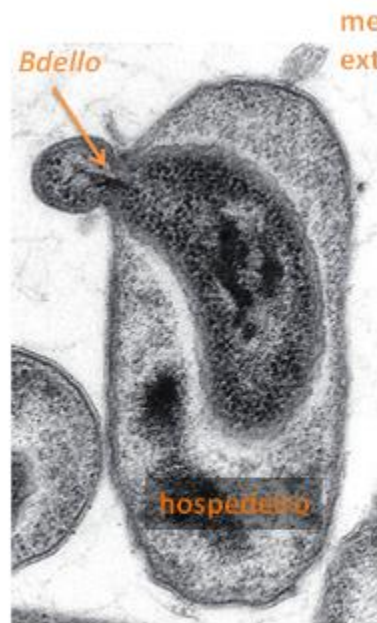
PKS *orsA* (AN7909) gene expression and HPLC profiles of supernatants. I: Control, *A. nidulans*. **II: Cocultivation of *A. nidulans* and *S. hygroscopicus* (1/20).** III: *A. nidulans* culture, inoculation with filtered *S. hygroscopicus* culture supernatant. **IV: Cocultivation of *A. nidulans* and *S. hygroscopicus*, inoculation with 1/100 volume of *S. hygroscopicus* culture.** V: Cocultivation of *A. nidulans* and *S. hygroscopicus* (1/100) separated by a dialysis bag. VI: Cultivation of *A. nidulans*, inoculation with 1/20 volume culture supernatant of a coculture of *A. nidulans* WT and *S. hygroscopicus*. VII: Cultivation of *A. nidulans* with 1/20 volume culture supernatant of a coculture of *A. nidulans* Δ *orsA* (Δ AN7909) strain and *S. hygroscopicus*.

Predação de bactéria por bactéria

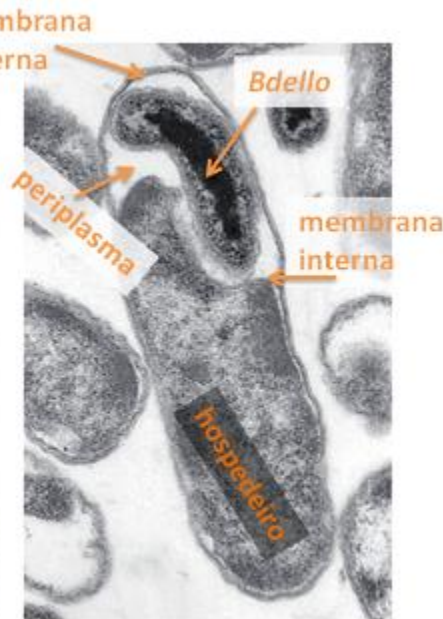
Bdellovibrio bacteriovorus



Adesão



Penetração

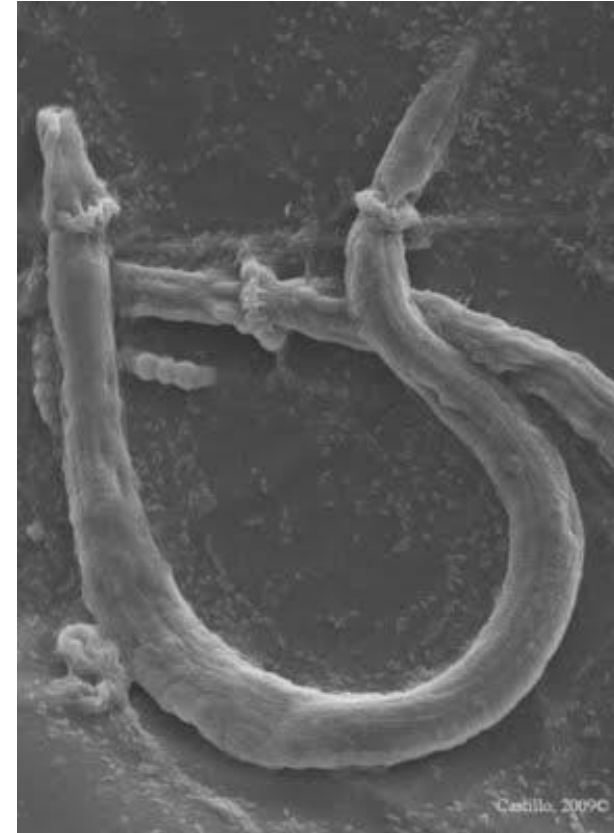


Estabelecimento

Predação de eucarioto por fungos



Alga sendo
predada por fungo



Principalmente pelo fungo *Paecilomyces* spp.
Formação de anel de constrição

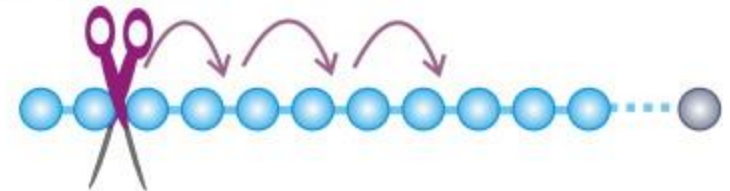
Fungo e insetos - controle biológico



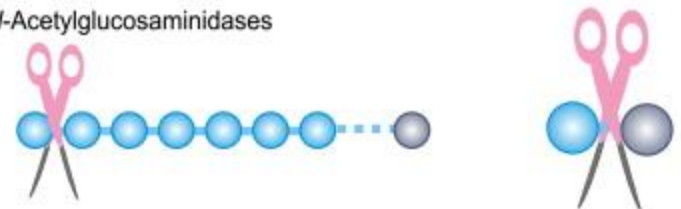
Endochitinases



Exochitinases

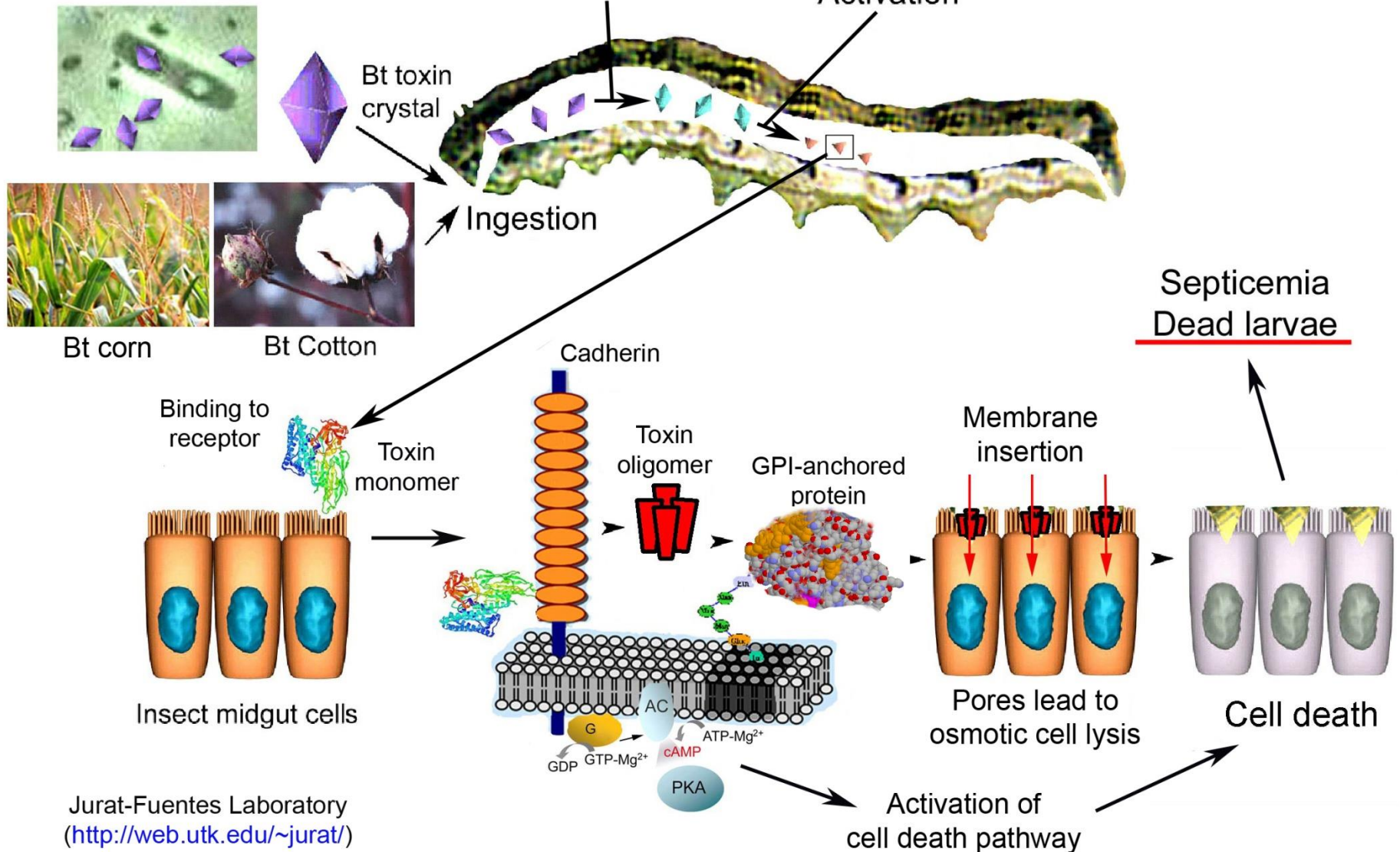


N-Acetylglucosaminidases

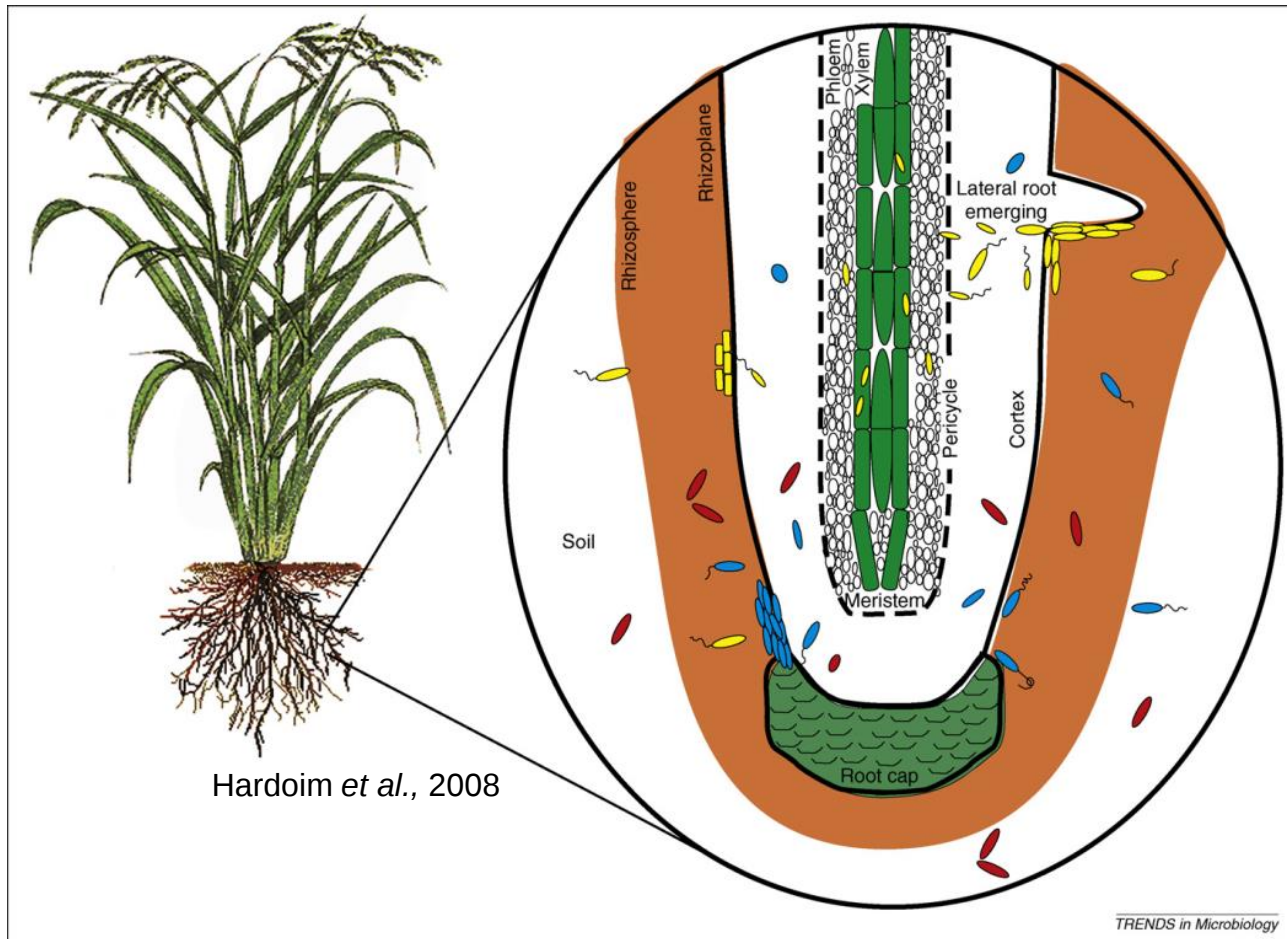


Bacillus thuringiensis – controle de insetos

Bacillus thuringiensis (Bt)

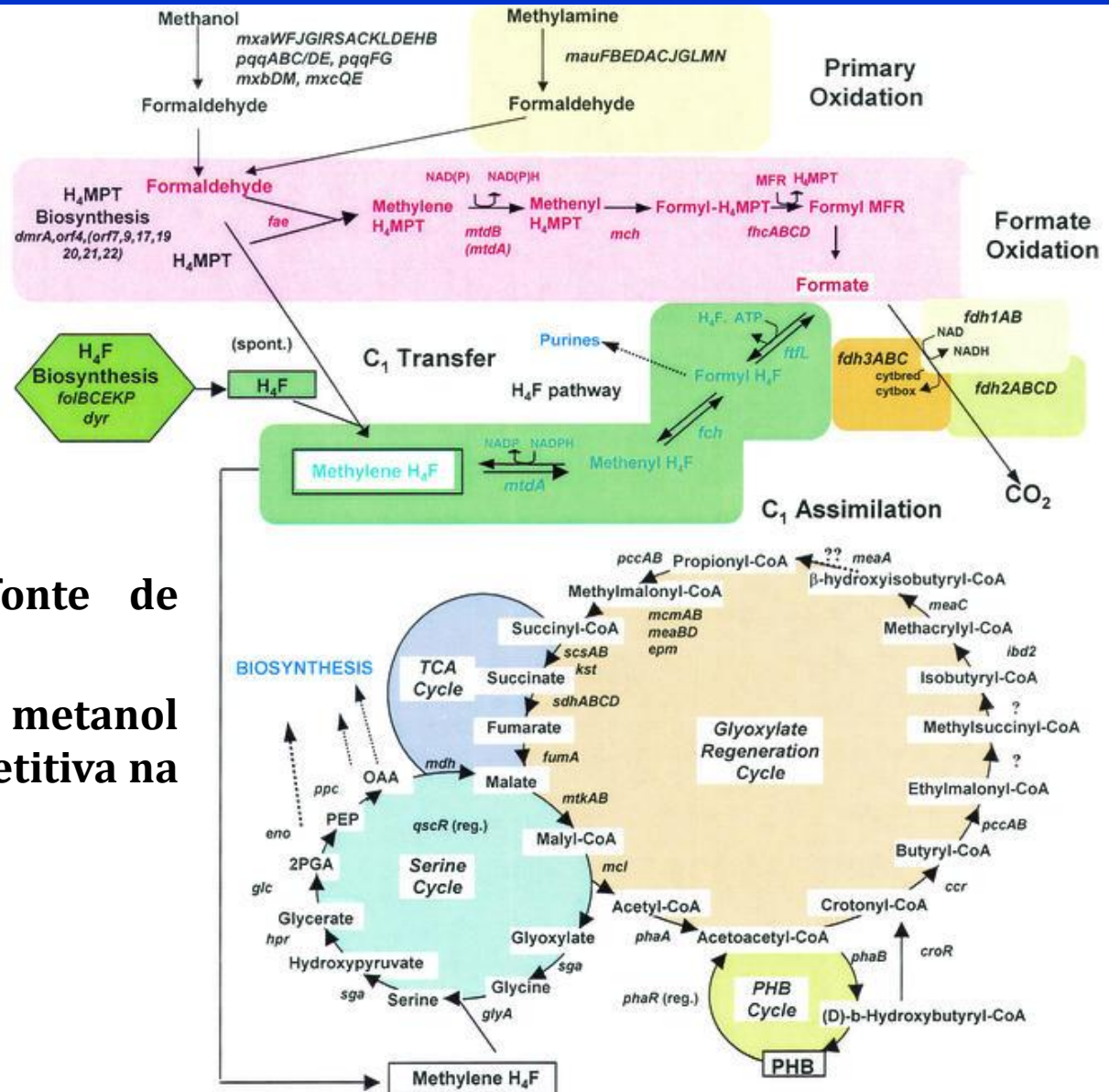


Interação plantas micro-organismos



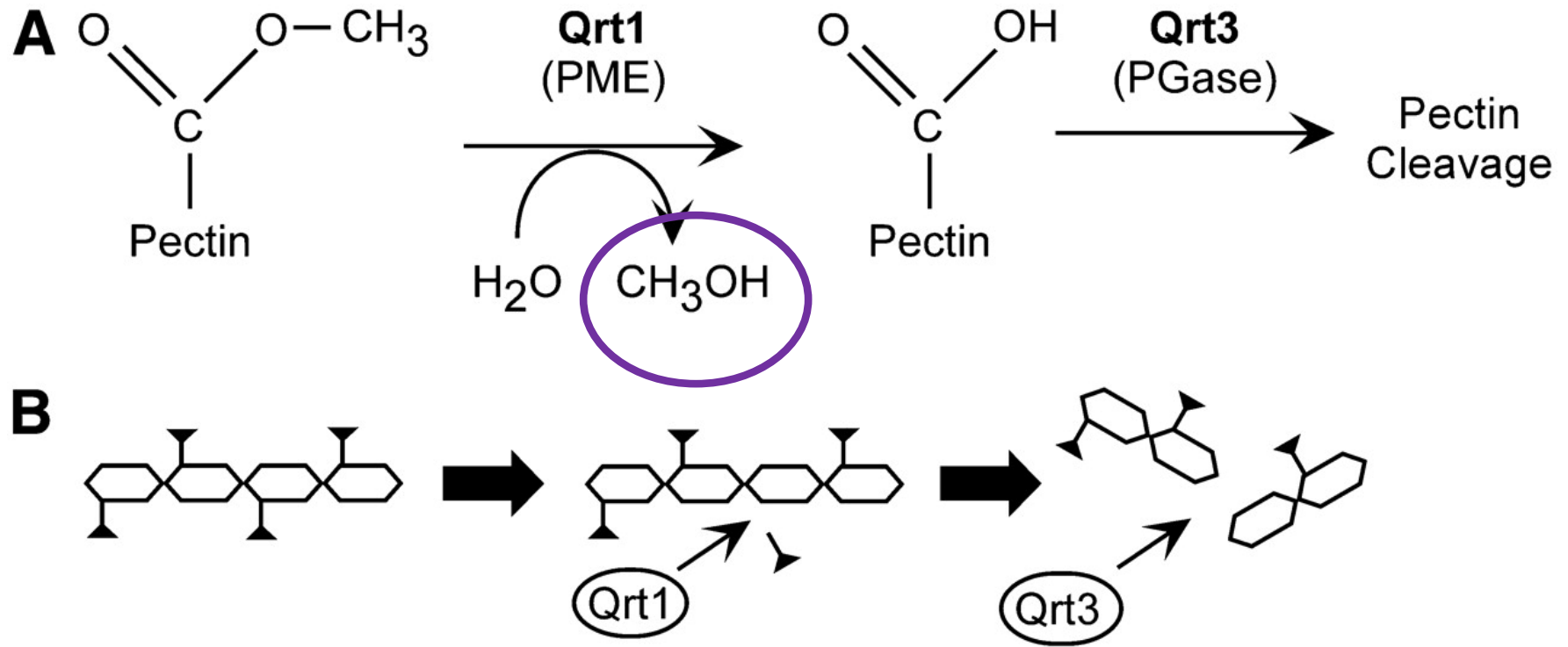
Durante esta interação, diferentes moléculas são produzidas

Methylobacterium na planta hospedeira



- Utiliza metanol como fonte de carbono e energia
- Capacidade de utilizar metanol aumenta habilidade competitiva na planta.

Methylobacterium na planta hospedeira

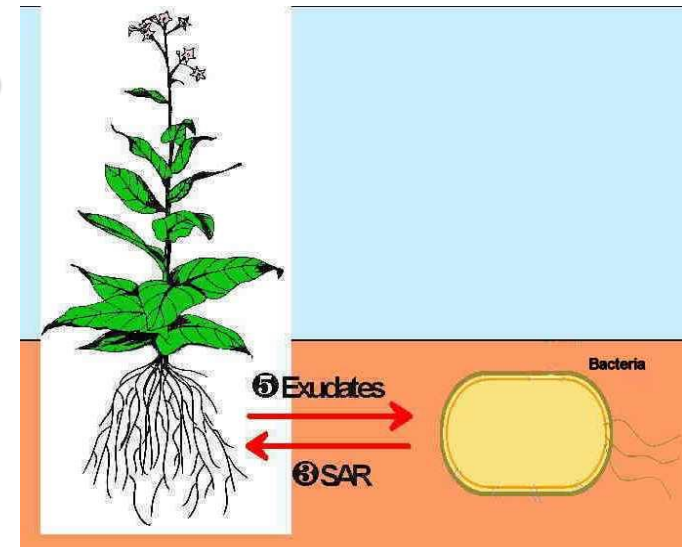


- ❏ Ação da enzima Pectin-methylesterase libera metanol durante a degradação da pectina.
- ❏ Metanol pode ser liberado pelas folhas via estômatos
- ❏ Pectin-methylesterase também pode regular os níveis de etanol.

Interação micro-organismos – plantas

Reconhecimento do hospedeiro

- **Genótipo da planta e do micro-organismo;**
- **Condições abióticas;**
- **Condições bióticas**

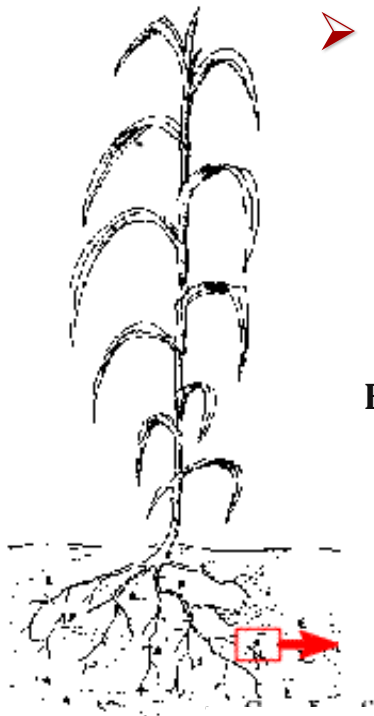


Germinação

Estimulação

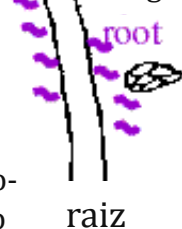
Rizotropismo

Colonização



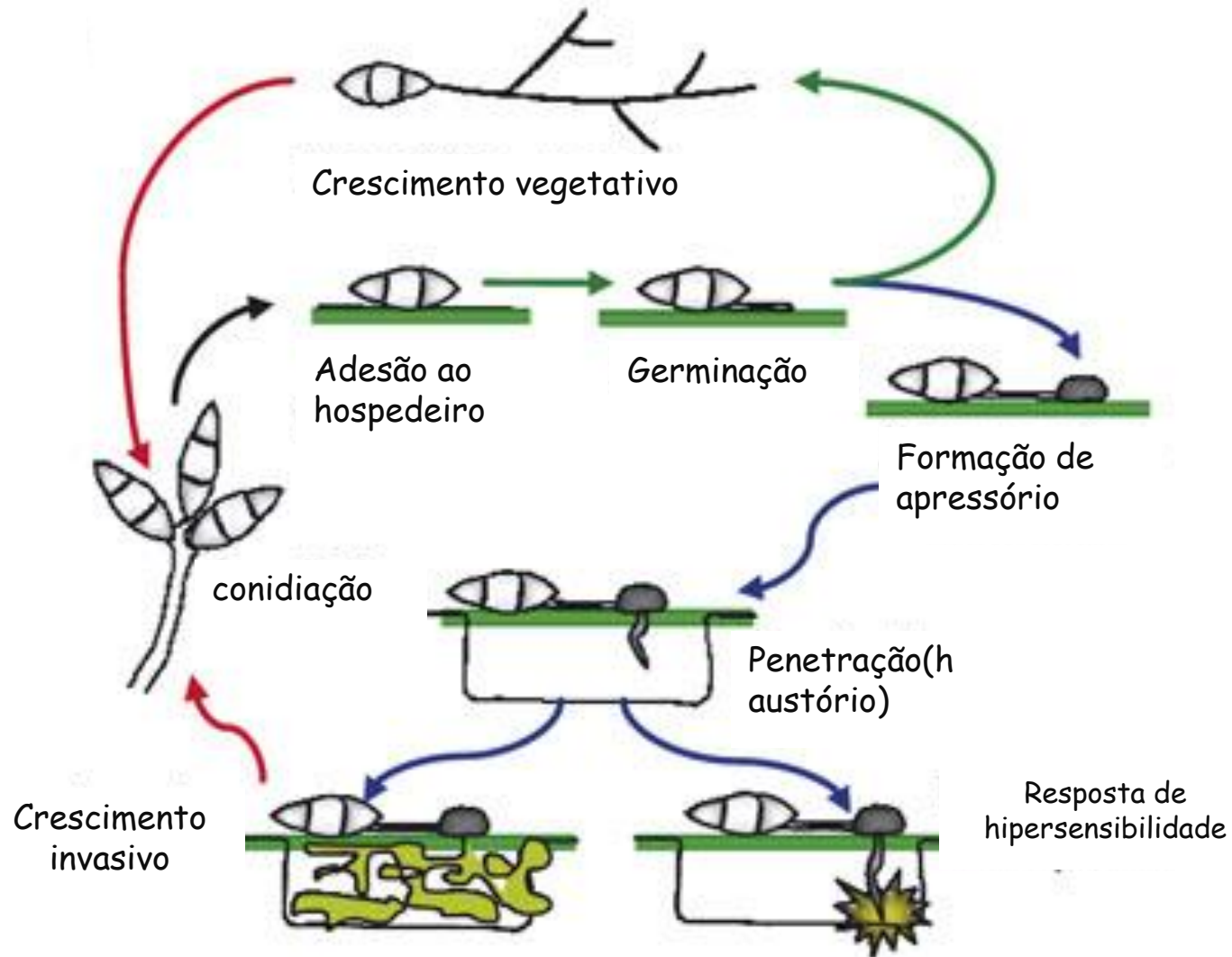
Presença do micro-organismo no solo

Exsudados das raízes estimulam o micro-organismo

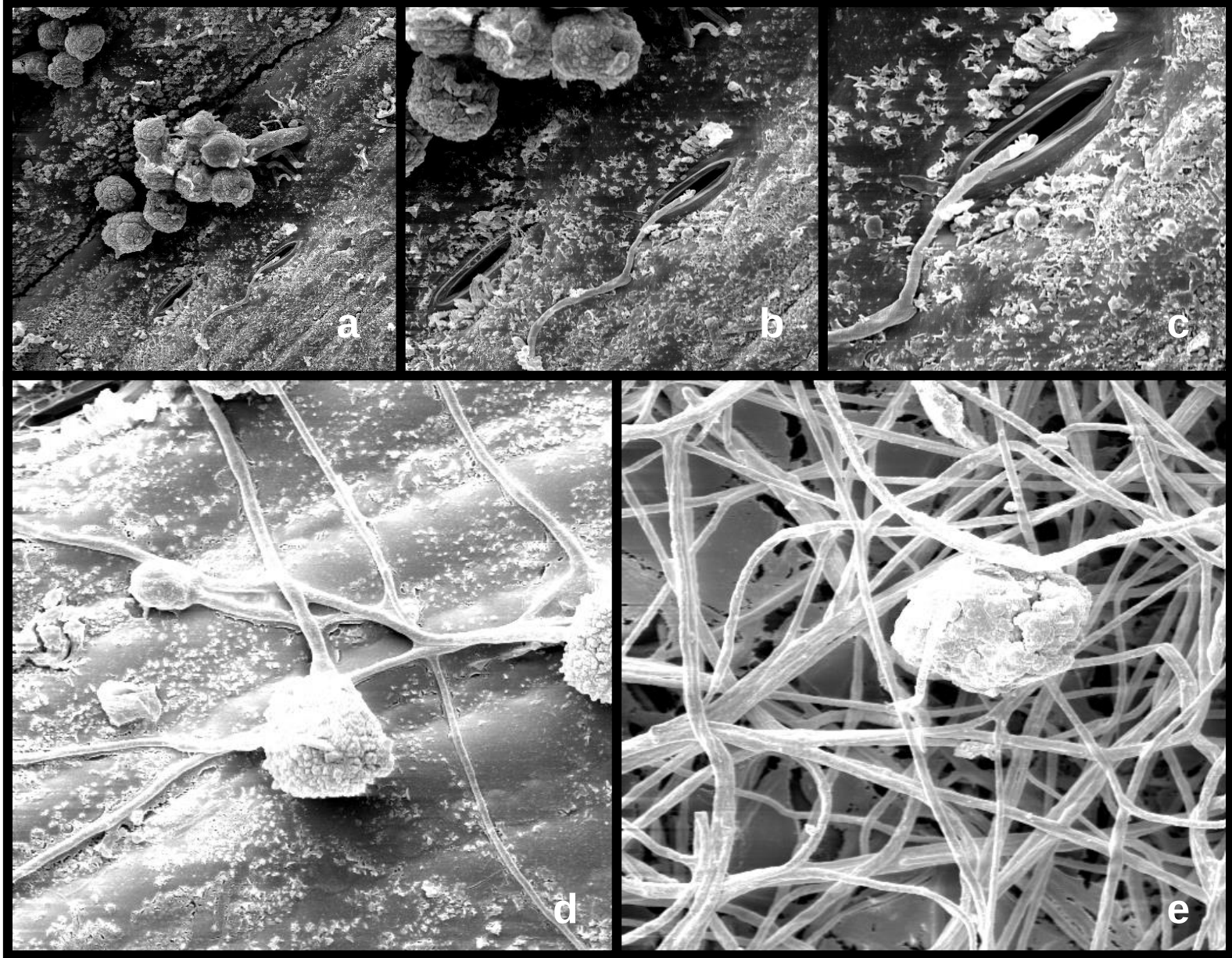


haustório

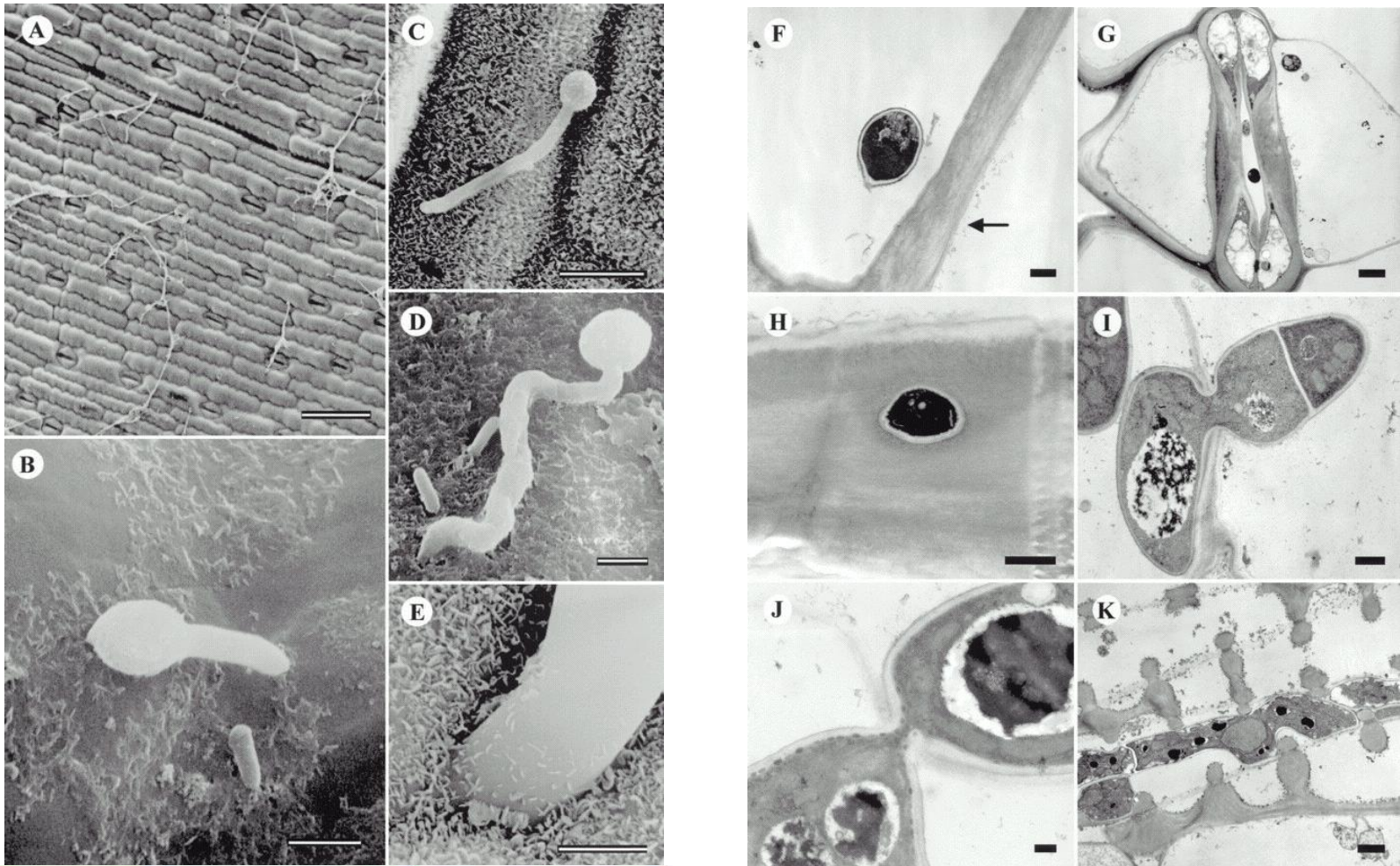
Interação com organismos hospedeiros - plantas



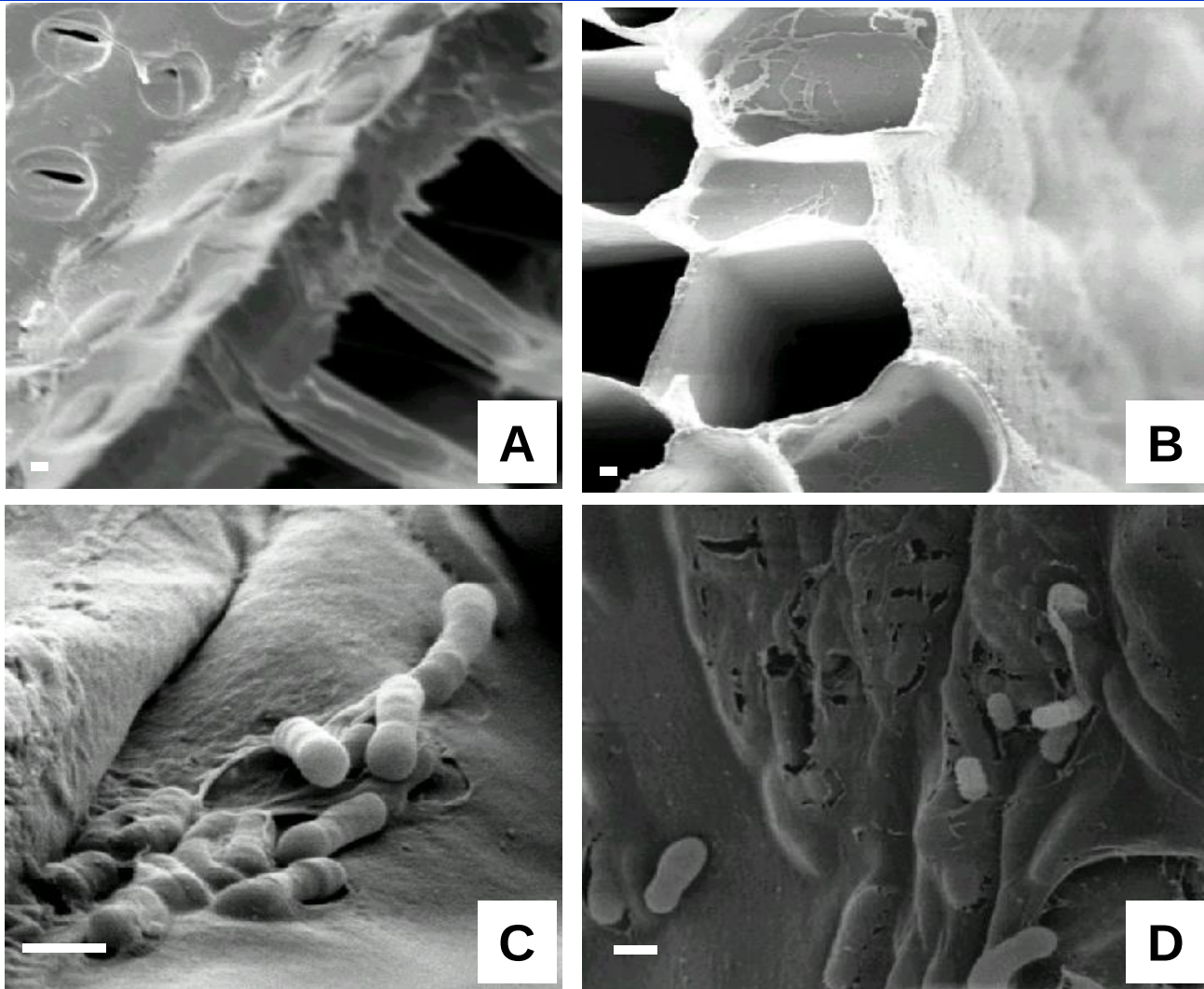
Interação com organismos hospedeiros - plantas



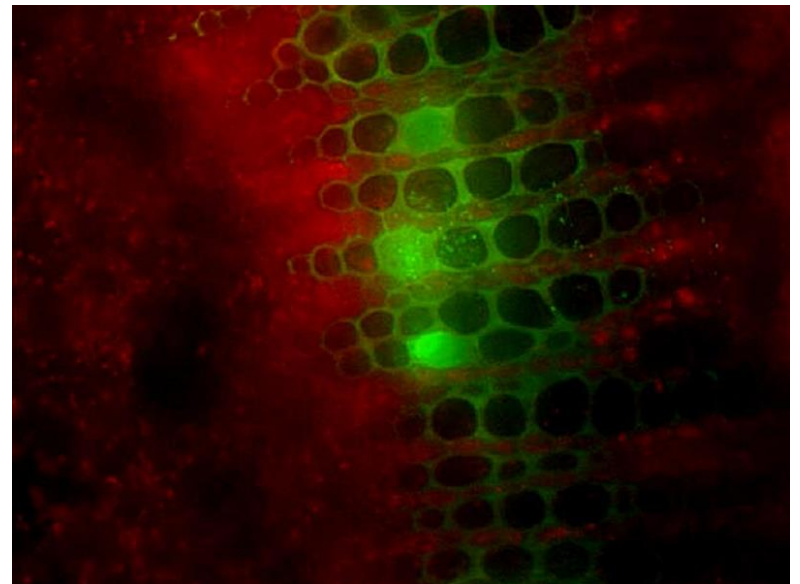
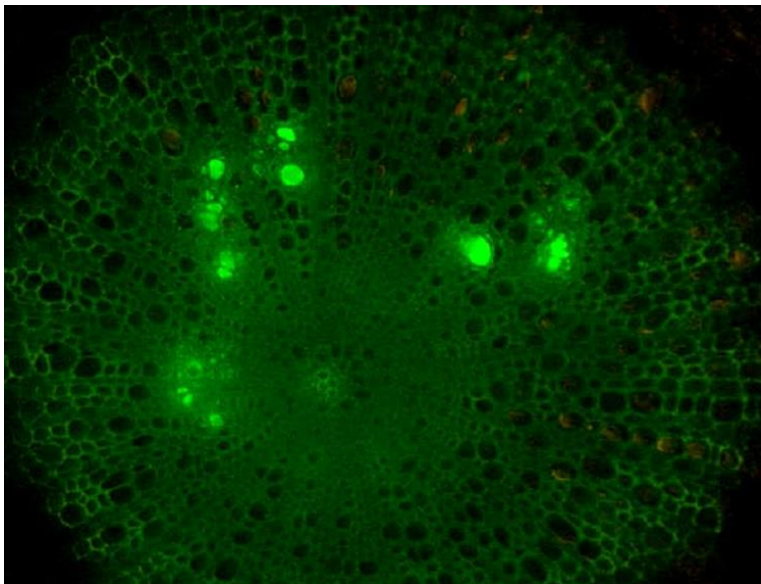
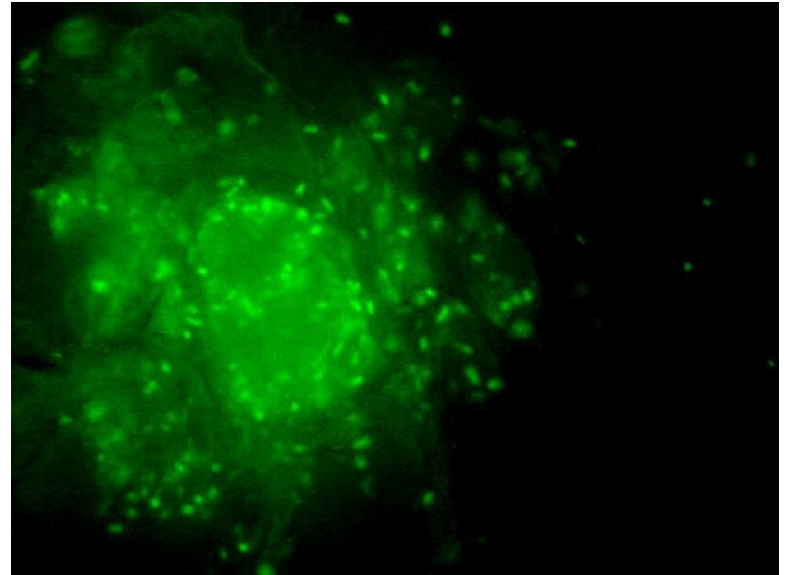
Interação com organismos hospedeiros - plantas



Interação com organismos hospedeiros - plantas



Interação com organismos hospedeiros - plantas

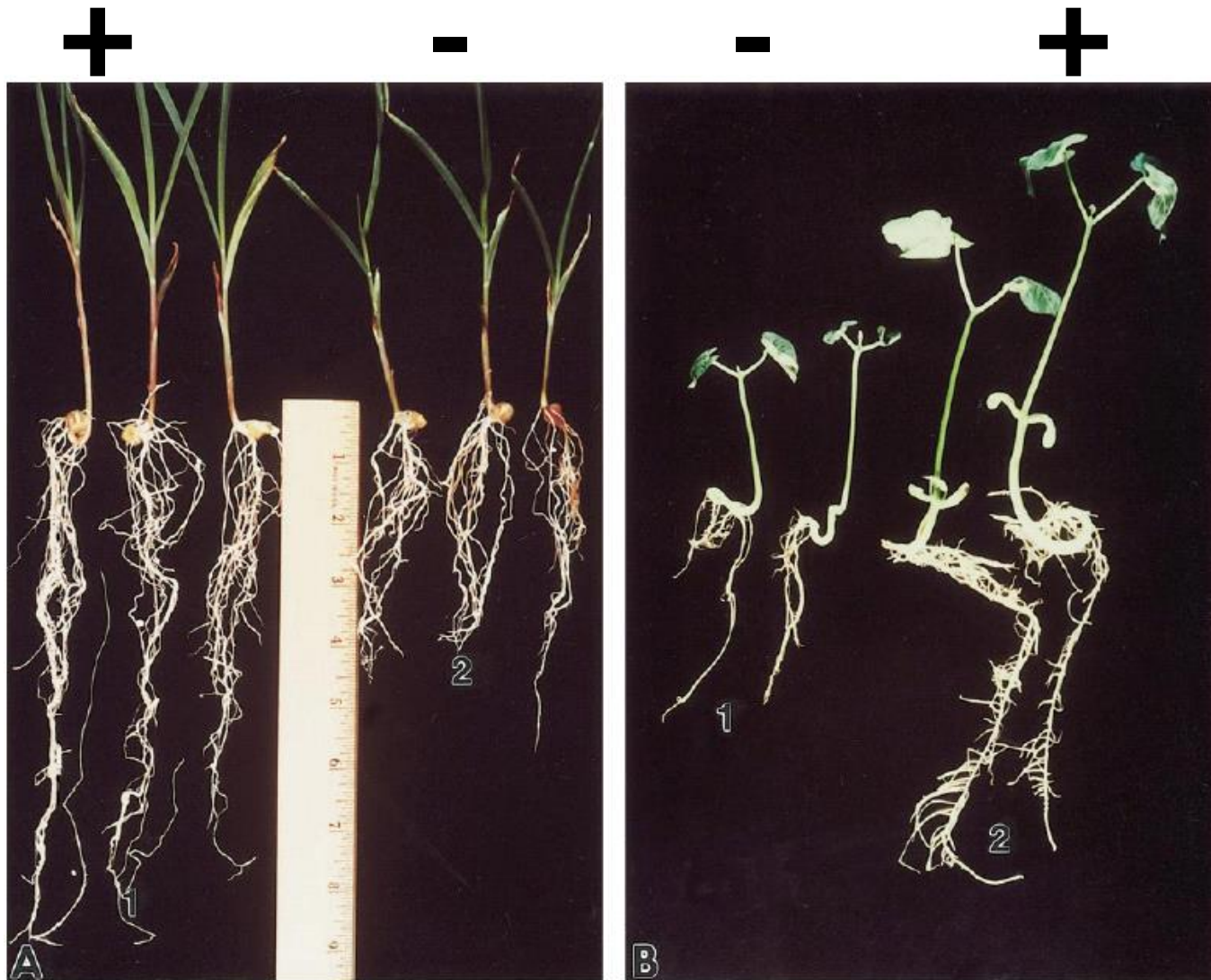


Papel dos micro-organismos nas plantas

Micro-organismos causadores de doenças em plantas



Promoção de crescimento vegetal



Resistência Sistêmica

↳ Resistência de plantas à patógenos e insetos

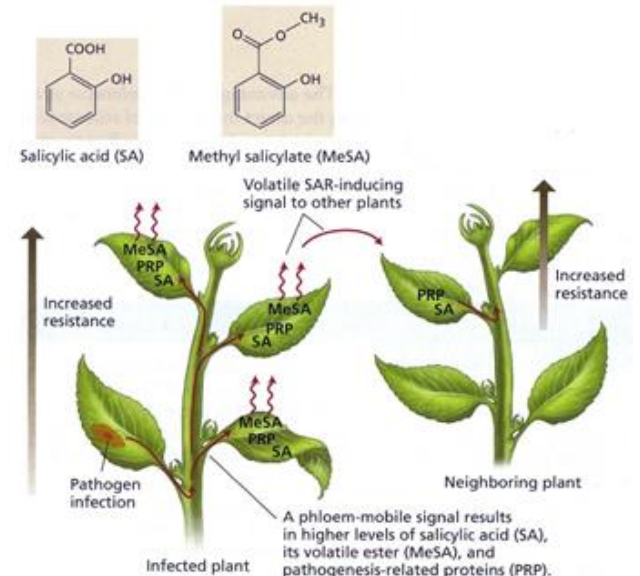
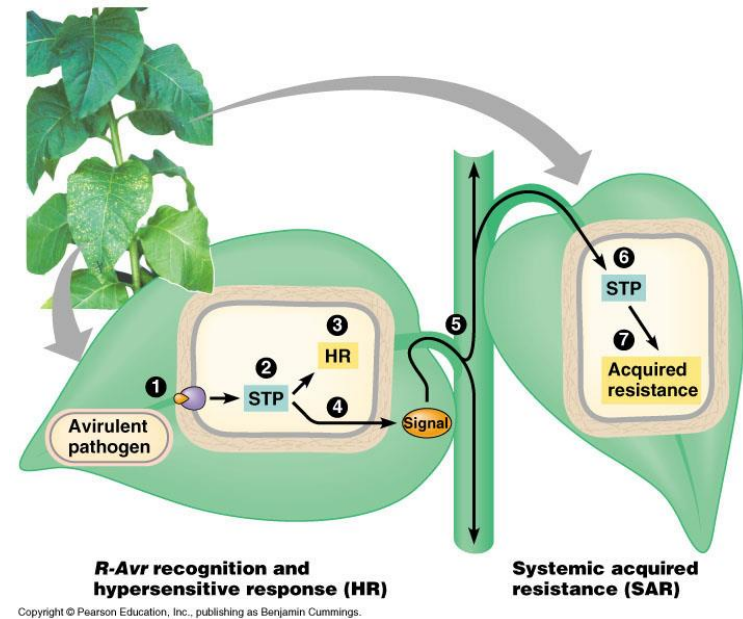
↳ Resistência sistêmica

Resistência sistêmica induzida (ISR)

Resistência sistêmica adquirida (SAR)

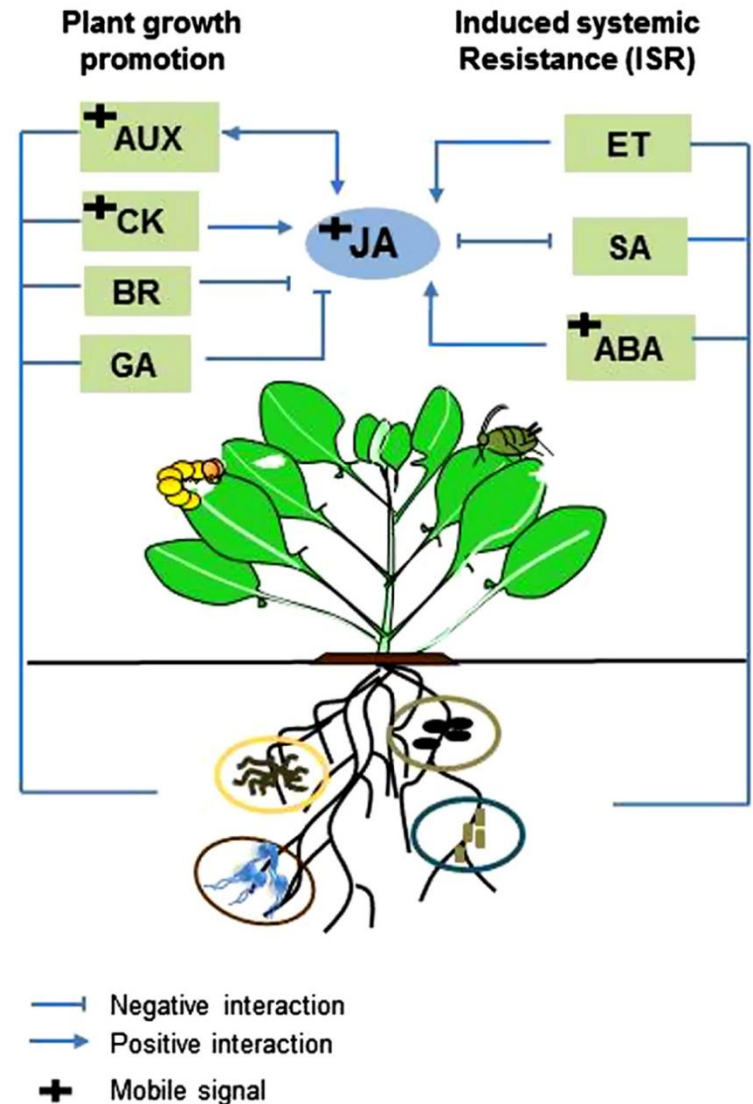
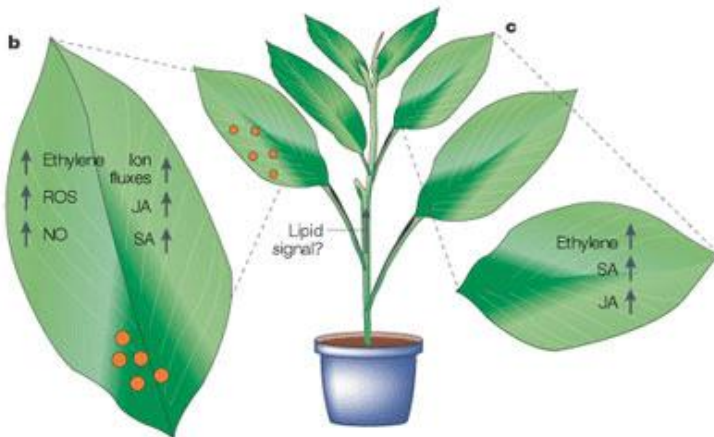
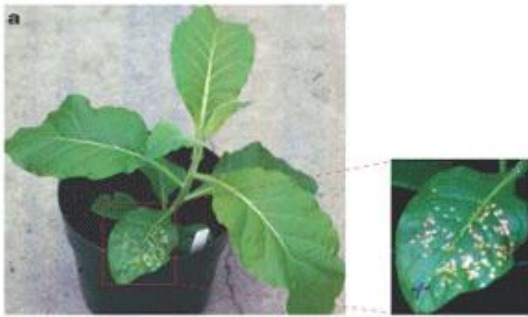
Resistência Sistêmica Adquirida - SAR

- desencadeada no hospedeiro por um organismo patogênico
- planta produz e acumula ácido salicílico
- expressão de proteínas de resistência (PRs)
- ativação de morte celular e reação de hipersensibilidade.



Resistência Sistêmica Induzida - ISR

- ↪ Induzida por organismo não patogênico - Rizobactérias
- ↪ Independe do acúmulo de ácido salicílico.
- ↪ Desencadeada por alteração nos níveis de etileno e ácido jasmônico.



Hora de descansar e... aula prática

