

Diversidade Bacteriana & Microbiota

Cristiane Guzzo
Departamento de Microbiologia
ICB-USP

BMM 160 – Microbiologia Básica para Farmácia

Objetivo da Aula

- ▶ Origem da Vida
- ▶ Metabolismo Primitivo
- ▶ Diversidade Microbiana
- ▶ Filogenia, Taxonomia e Sistemática

Origem da Vida

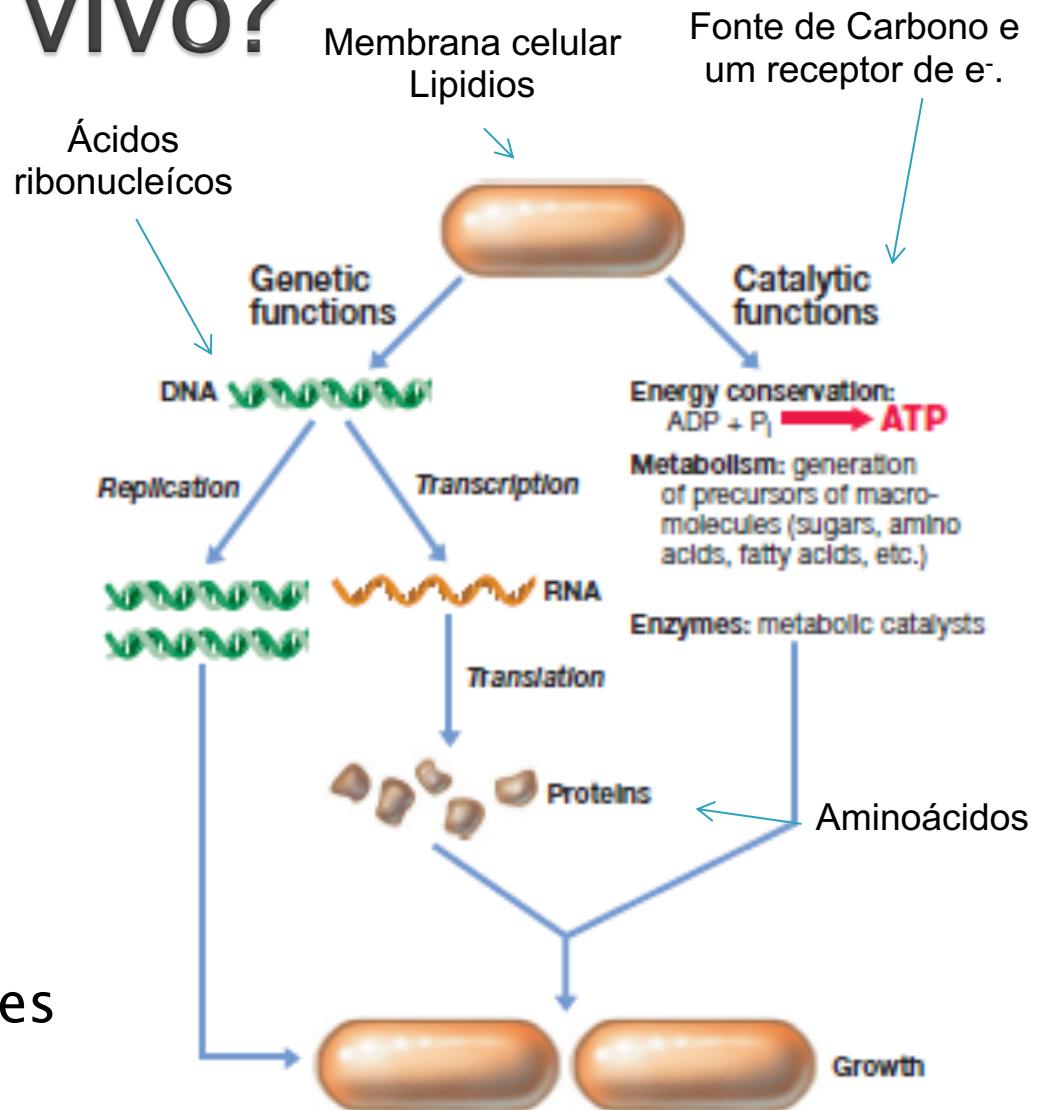


O que é um ser vivo?

O que é um ser vivo?

▶ Capaz:

- Compartimentalização (parede celular)
- Multiplicar (crescimento)
- Metabolizar compostos químicos (produção de energia)
- Evoluir (novas propriedades biológicas)



Como compostos inanimados criaram seres vivos?

Materia inanimada
(CH_4 , H_2O , CO_2 , NH_4^+)

Geração Espontânea ?

Origem da Vida?



Primeira célula



Lípidio
Nucleotideo
Polisacarideo
Ácucares e carboidratos
aa

Populações de células



Células altamente complexas e diversas

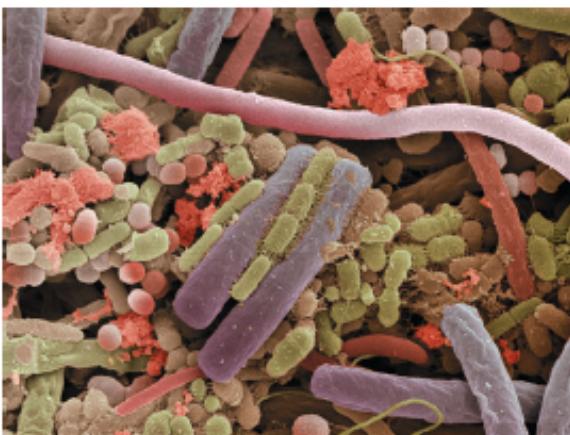
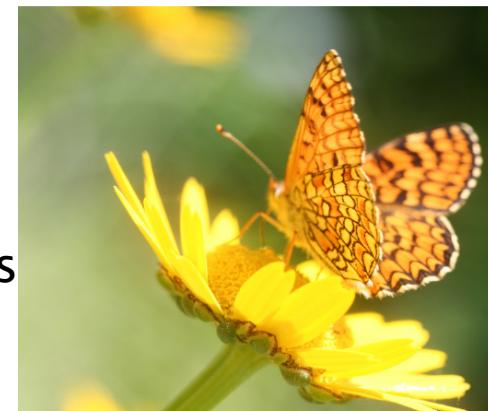


Figure 1.10 Human oral bacterial community. The oral cavity of warm-blooded animals contains high numbers of various bacteria, as shown in this electron micrograph (false color) of cells scraped from a human tongue.



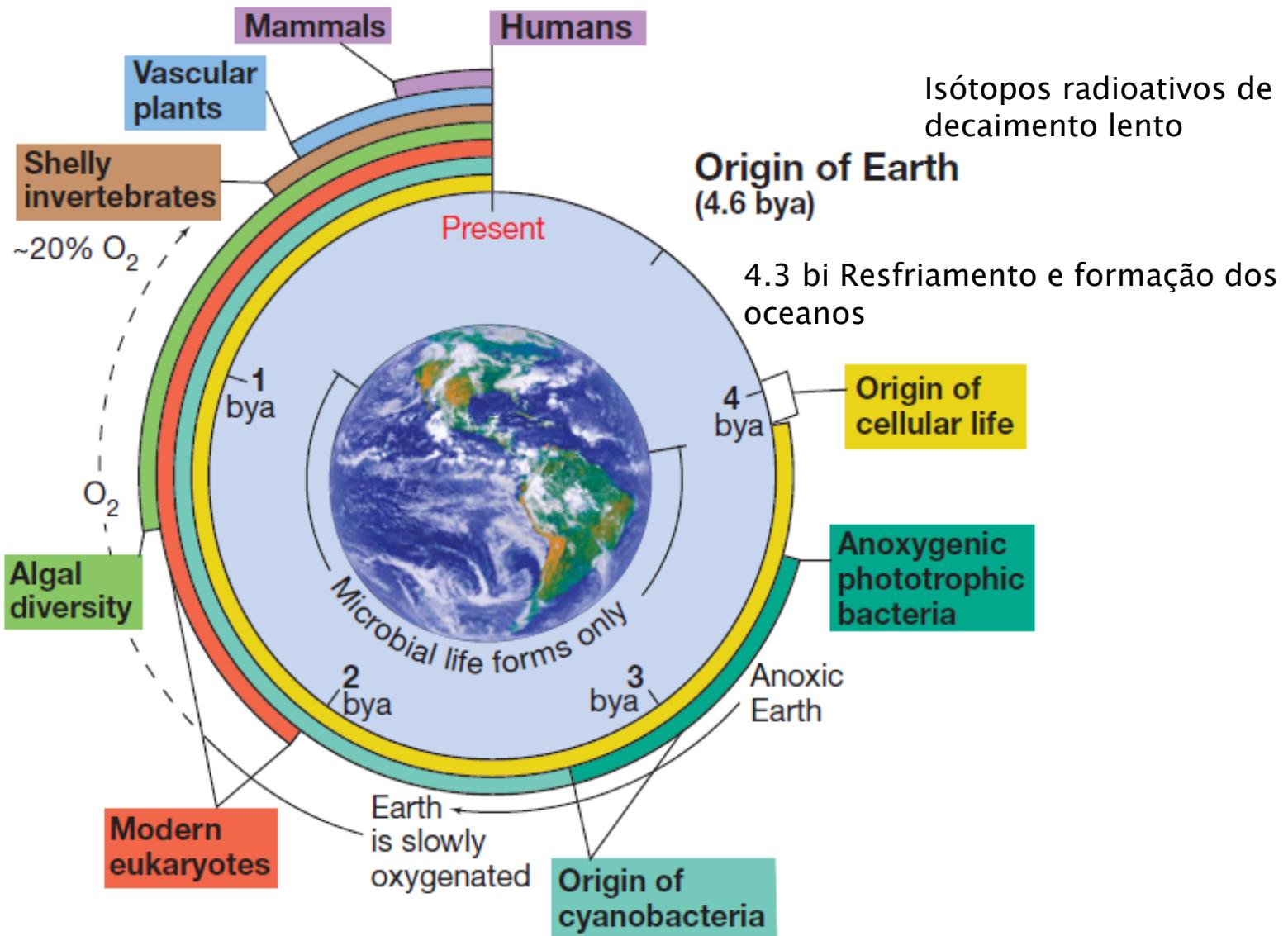
Origem da Vida

- ▶ Existem várias teorias – pergunta sem resposta
- ▶ Entender o que estava acontecendo na Terra a 4.6 bilhões de anos.

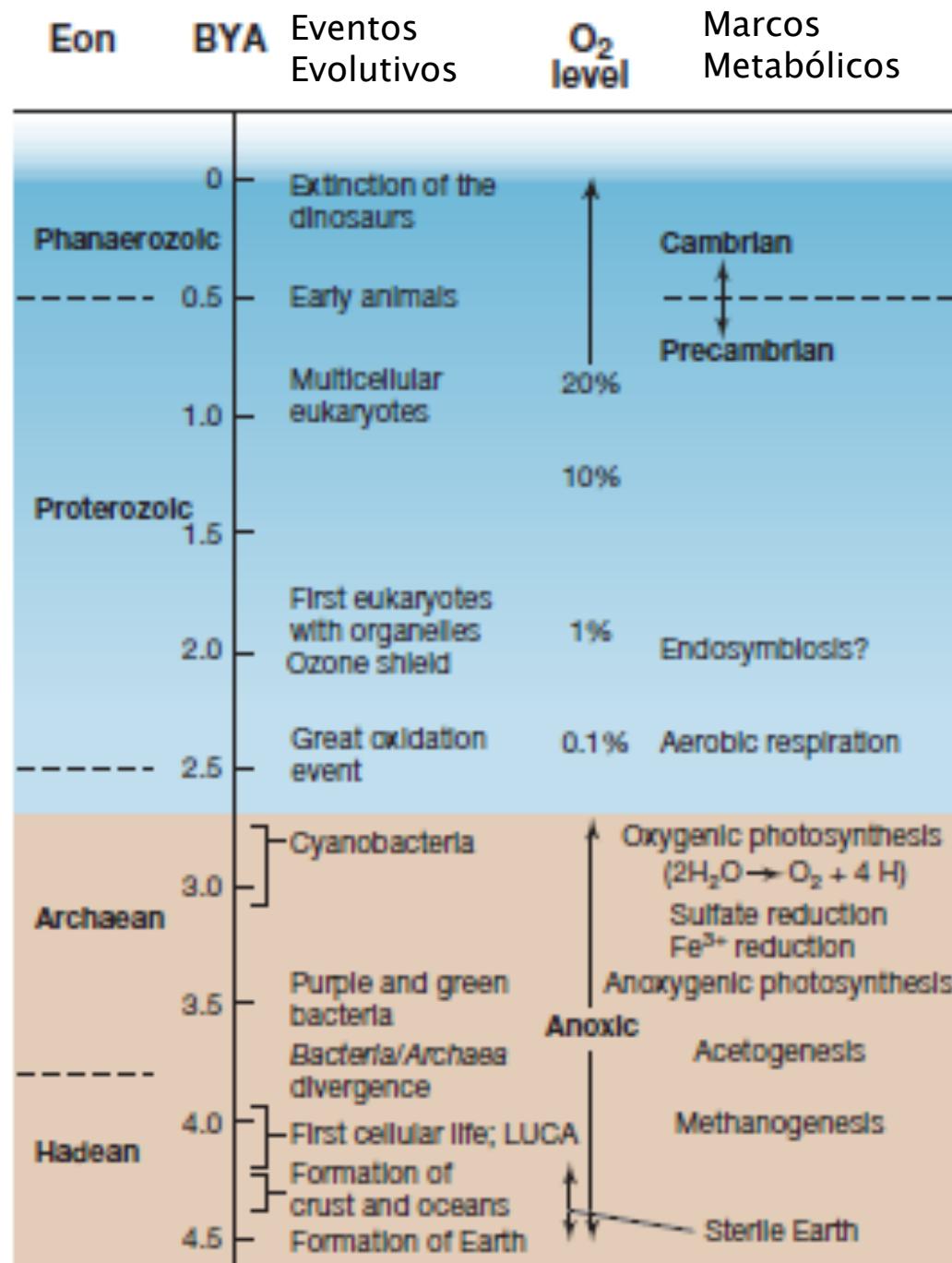
Alguns vídeos interessantes

- ▶ https://www.youtube.com/watch?v=xpB_uk1A8RQ
- ▶ <https://www.youtube.com/watch?v=xyhZcEY5PCQ>
- ▶ https://www.youtube.com/watch?v=uO_mFuNpy8c

Visão Geral da Evolução da Terra

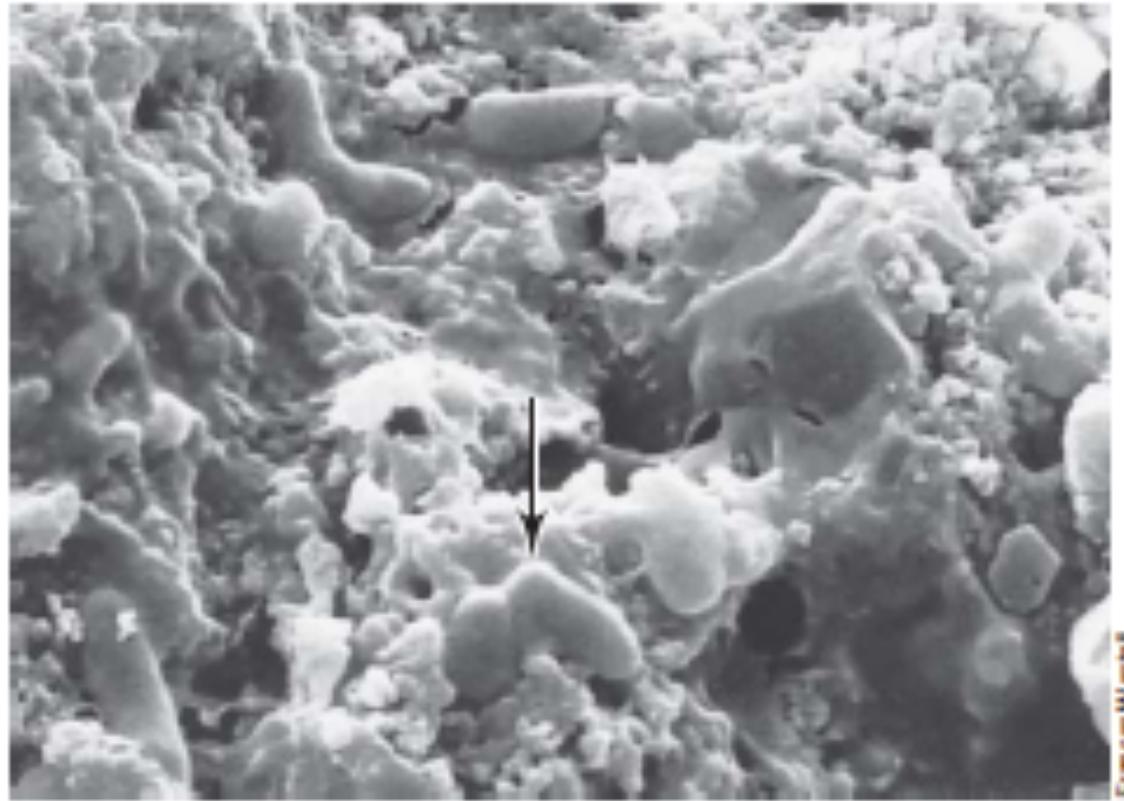


Hoje



Origem da Terra

Evidência de Vida microbiana – rochas antigas com microfósseis de bactérias (bacilo)



Rocha de 3.45 bia
estromatólito

Estromatólitos

- ▶ Massas microbianas misturadas com compostos minerais que formam estruturas parecidas com rochas
- ▶ Estrematólitos primitivos – Bactérias fototróficas filamentosas (relacionadas as bactérias verdes não sufuroosas)

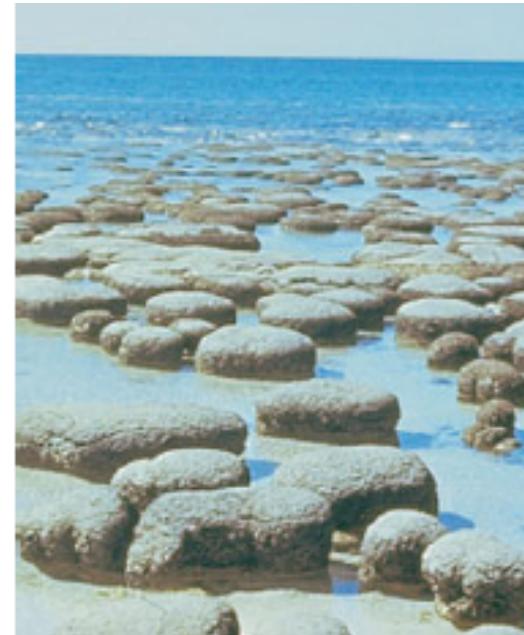
Estrematólito mais antigo
conhecido, com 3.5 bia

(Grupo Warrawoona – Austrália)



Malcolm Walter

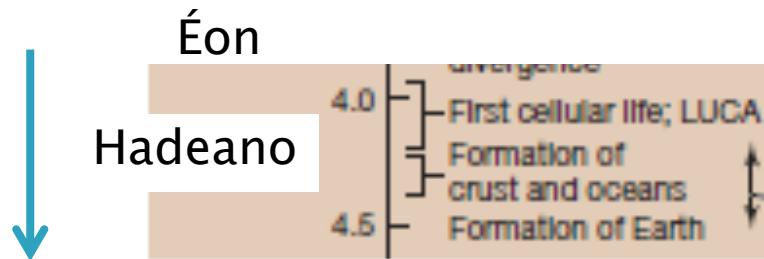
Estrematólito modernos
(Baía Shark – Austrália)



Malcolm Walter

Rocha Sedimentar mais antiga

- ▶ Complexo Gnaisse Itsaq (Groelandia)
 - 3.86 bilhões de anos



- Terra havia resfriado para permitir a condensação do vapor de água
 - Formação dos oceanos
- No entanto, a presença de $ZrSiO_4$ e sua datação mostra que a formação dos oceanos ocorreu 4.4 – 4.3 bi

Primeiras Teorias da Origem da Via

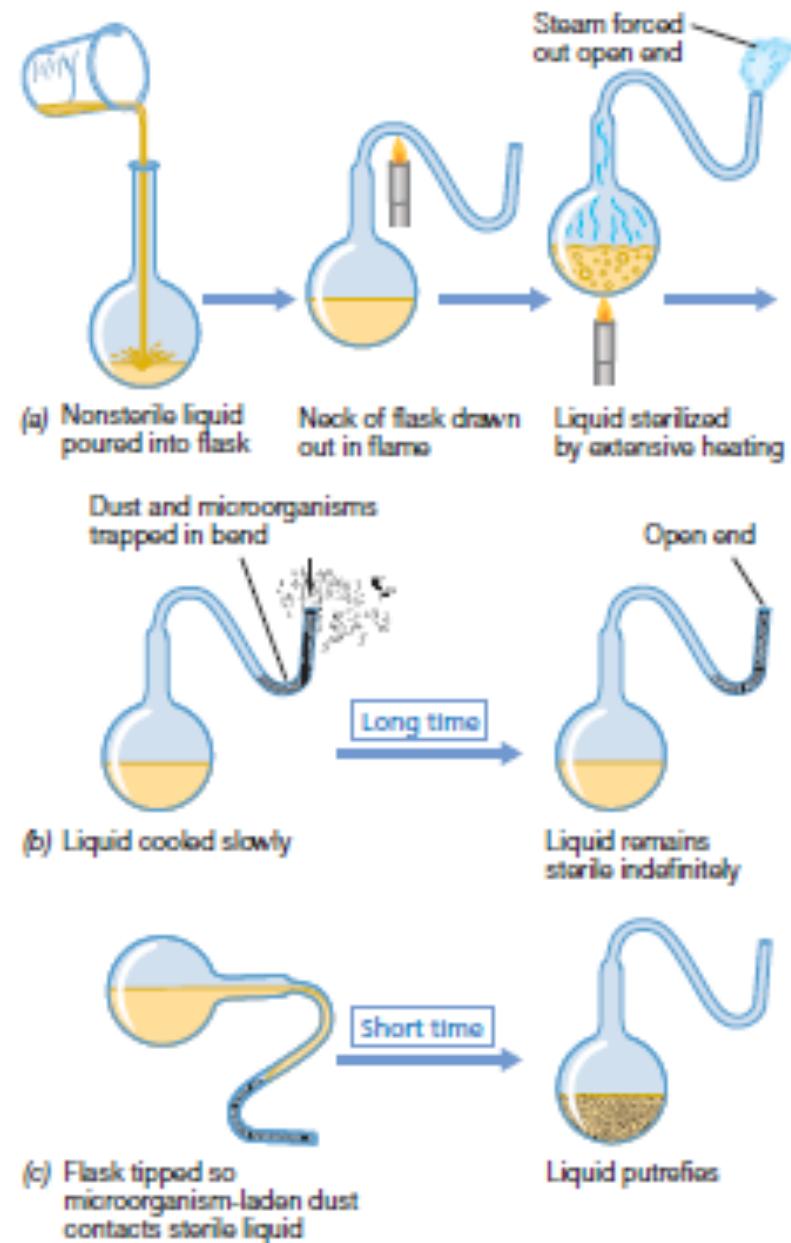
Origem da Vida

- ▶ Teoria da Biogêneses (Geração espontânea)

Itens não viventes + calor do sol - energia celestial - gera vida)

Trapos sujos+trigo gera camundongos

- ▶ 1862 – Luis Paster que acabou com a teoria da Geração espontânea
- ▶ 1859 – É publicado o livro “Sobre a Origem das Espécies por meio da seleção natural” Charles Darwin
 - Variabilidade aleatória + Seleção
 - Origem do LUCA – Pequena fonte de água morna



Origem da Vida - Caldo Primordial

Materia inanimada
(CH_4 , H_2O , CO_2 , NH_4^+)

Em algum momento isso
aconteceu



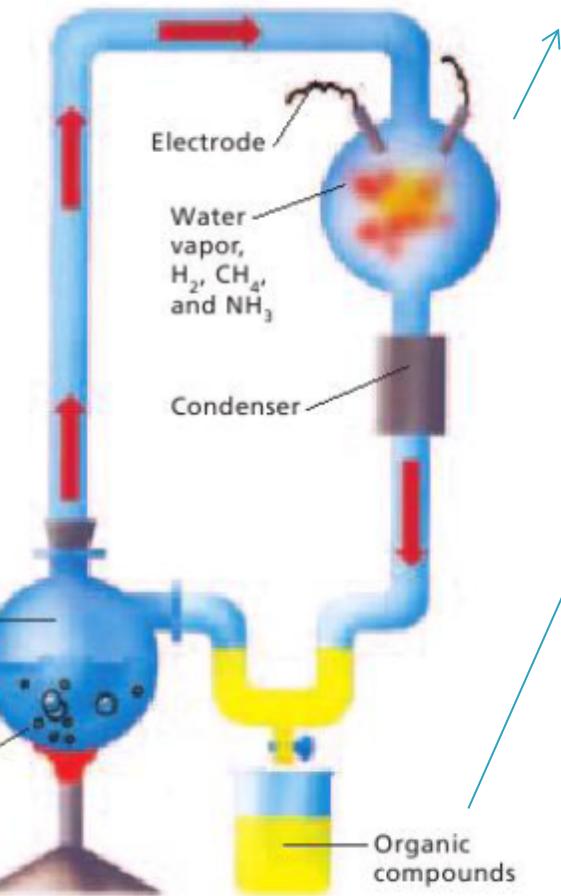
Primeira célula



Teoria da Sopa Primordial

Máquina de Miller SL (1953) – 6 meses

Descargas elétricas – mimetizar a atmosfera Terrestre



O maior problema é tirar o O₂ do sistema

Depois de 5 dias – Gly e Ala

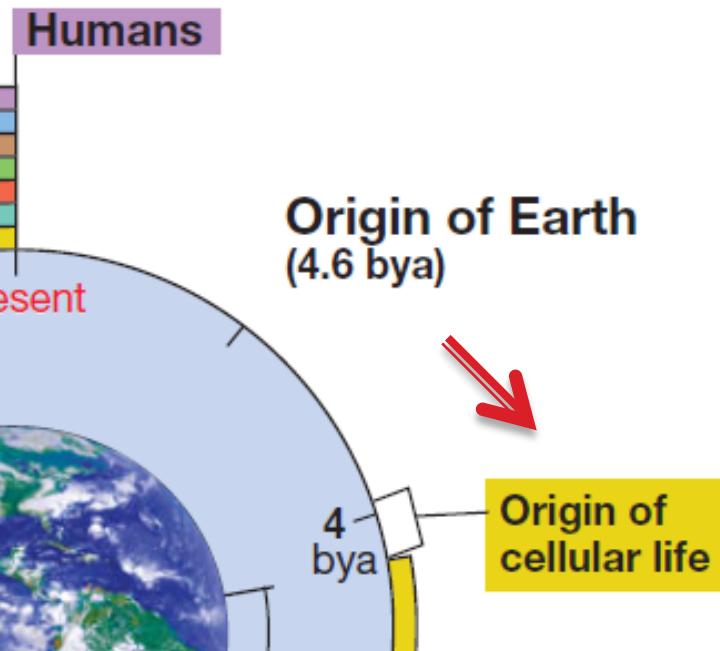
A mistura de gases presente na Terra primitiva irradiada com UV ou descargas elétricas deu origem à moléculas orgânicas

Não foi possível sintetizar célula *in vitro*

- ▶ 1960 – A atmosfera Terrestre não tinha NH_4^+ e nem CH_4 – Invalidava a máquina de Miller
- ▶ Miller repetiu seus experimentos sem NH_4^+ e CH_4 e obteve os mesmos resultados

Evidencias de que a vida não surgiu na Superfície

Ambiente Hostis a vida



- grandes variações de temperatura
 $> 1000^{\circ}\text{C}$
- Choques constantes com meteoros
- Tempestades
- Radiação UV

Teoria Panspermia

- ▶ As primeiras formas de vida originou do espaço
 - 1969 (Australia) caiu um meteorito que continham vários compostos orgânicos – lipídios e aminoácidos
 - 1970 – Nuvéns de poeira no espaço também tem compostos orgânicos complexos, radiação UV converteu matéria simples em compostos orgânicos complexos.
 - Espaço – condição não encontrada na Terra é o Vácuo

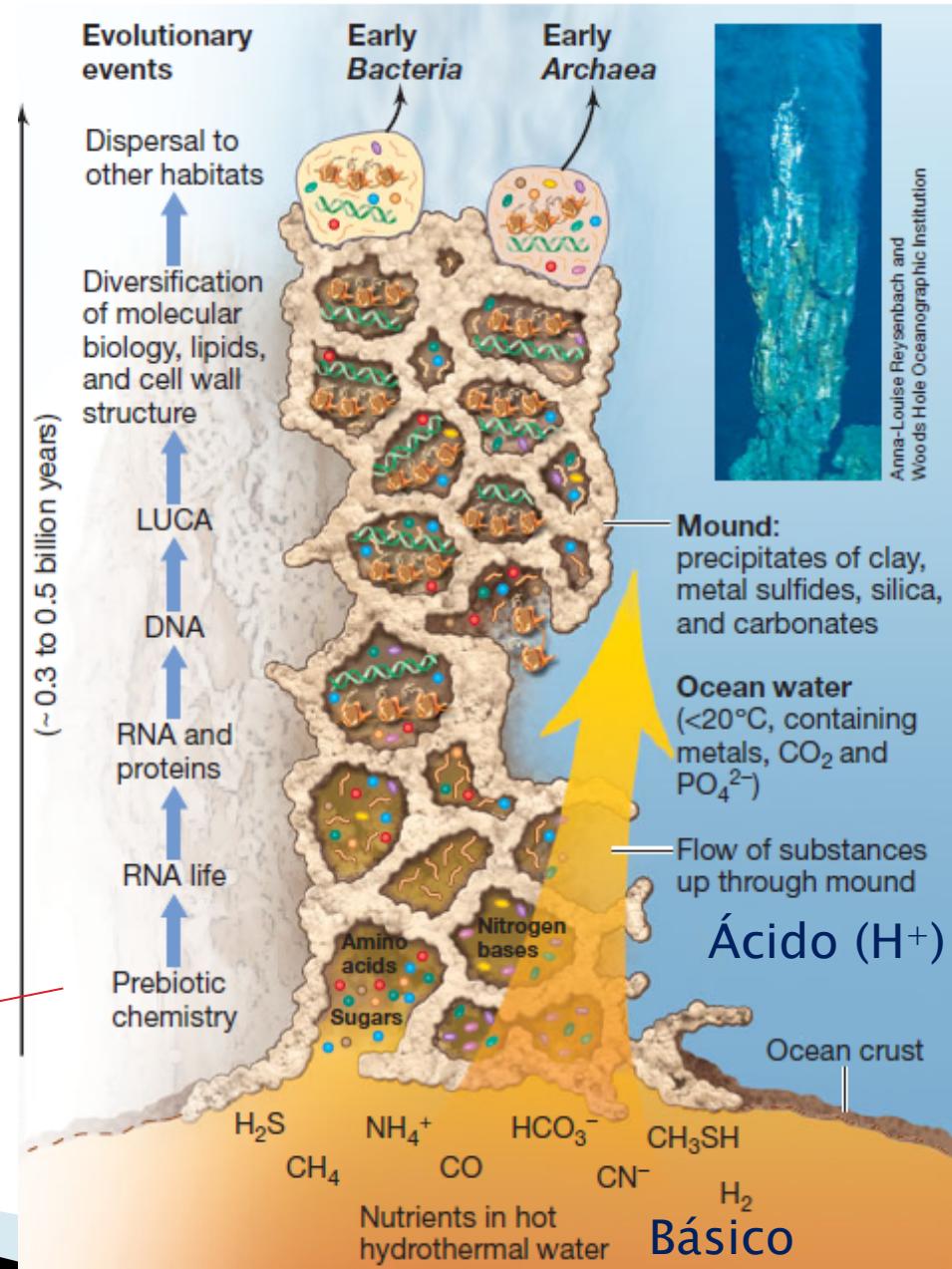
Origem da Vida – Subsuperfície

- ▶ Fontes hidrotermais no leito oceânico – muito abaixo da superfície
- ▶ Menos hostis e mais estáveis

Origem da Vida – Subsuperfície

Composta: Pírita (FeS), Argila, sílica e carbonato.

Porosas
Ricas em FeS e Níquel



LUCA - Último ancestral Universal Comum

FeS (pirita) e NiS catalisam a formação de aa, pepetídios, açucares, bases nitrogenadas

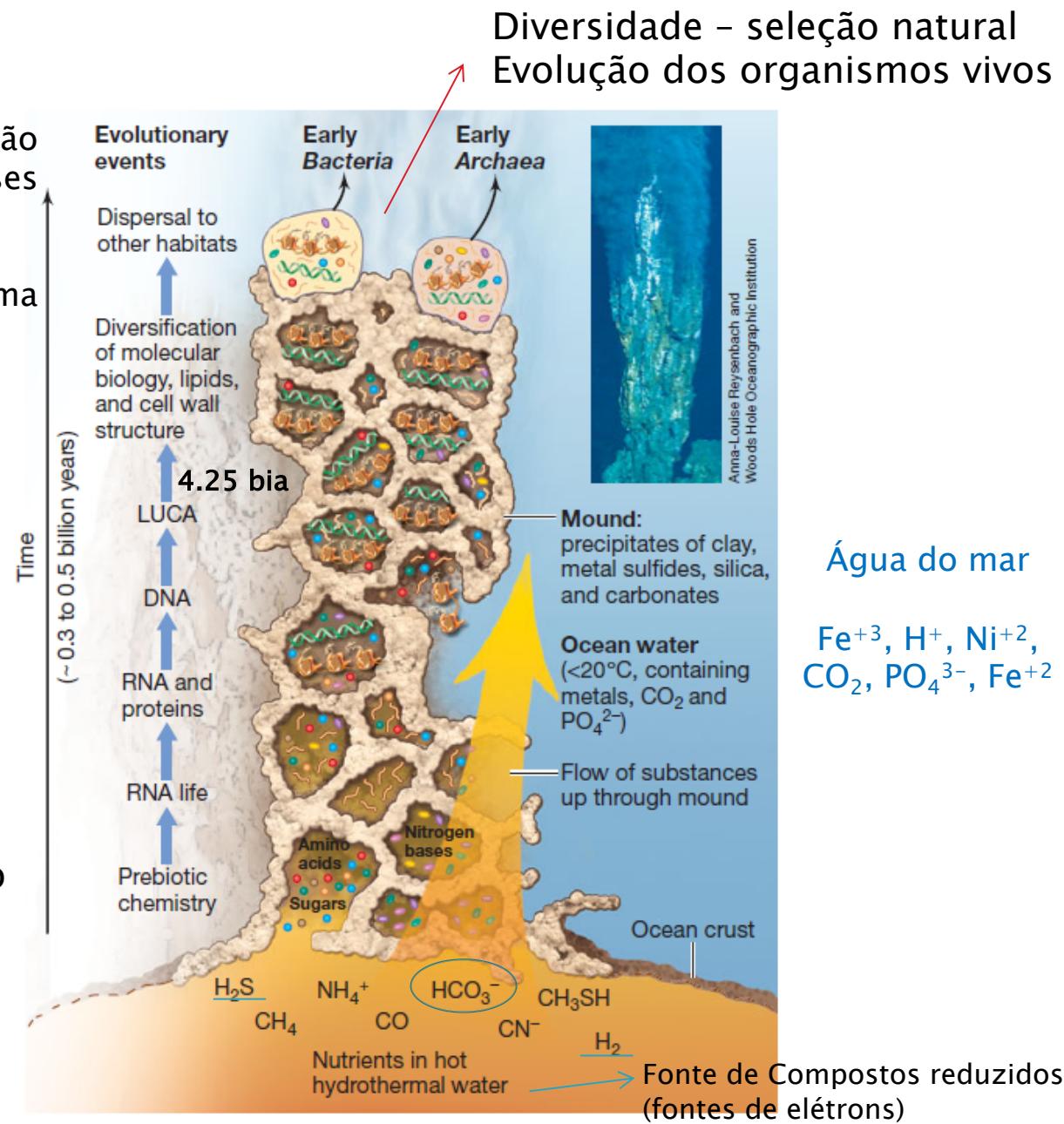
O fosfato encontrado no mar forma os nucleotídeos AMP e ATP.

Argila catalisa a formação de RNA

RNA (capacidade catalítica e informacional)– autoreplicante, catalisar, Sintetizar proteínas primitivas

Proteínas assumiram o papel catalítico dos RNA

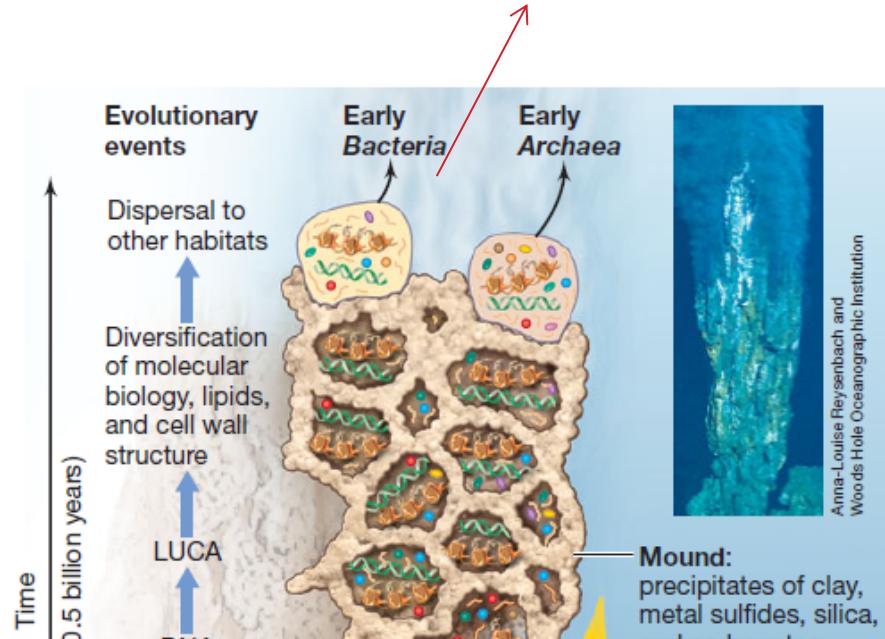
Surgimento do DNA (informação genética – mais estável que o RNA)



Formação da Célula

- ▶ Proteínas embebidas em lipídeos – transformou as vesículas em um ambiente permeável – para armazenamento de energia e síntese de DNA.
- ▶ Armazenamento de RNA e DNA podem ter originado a primeiras célula autoreplicante tornando as independes dos precipitados de FeS

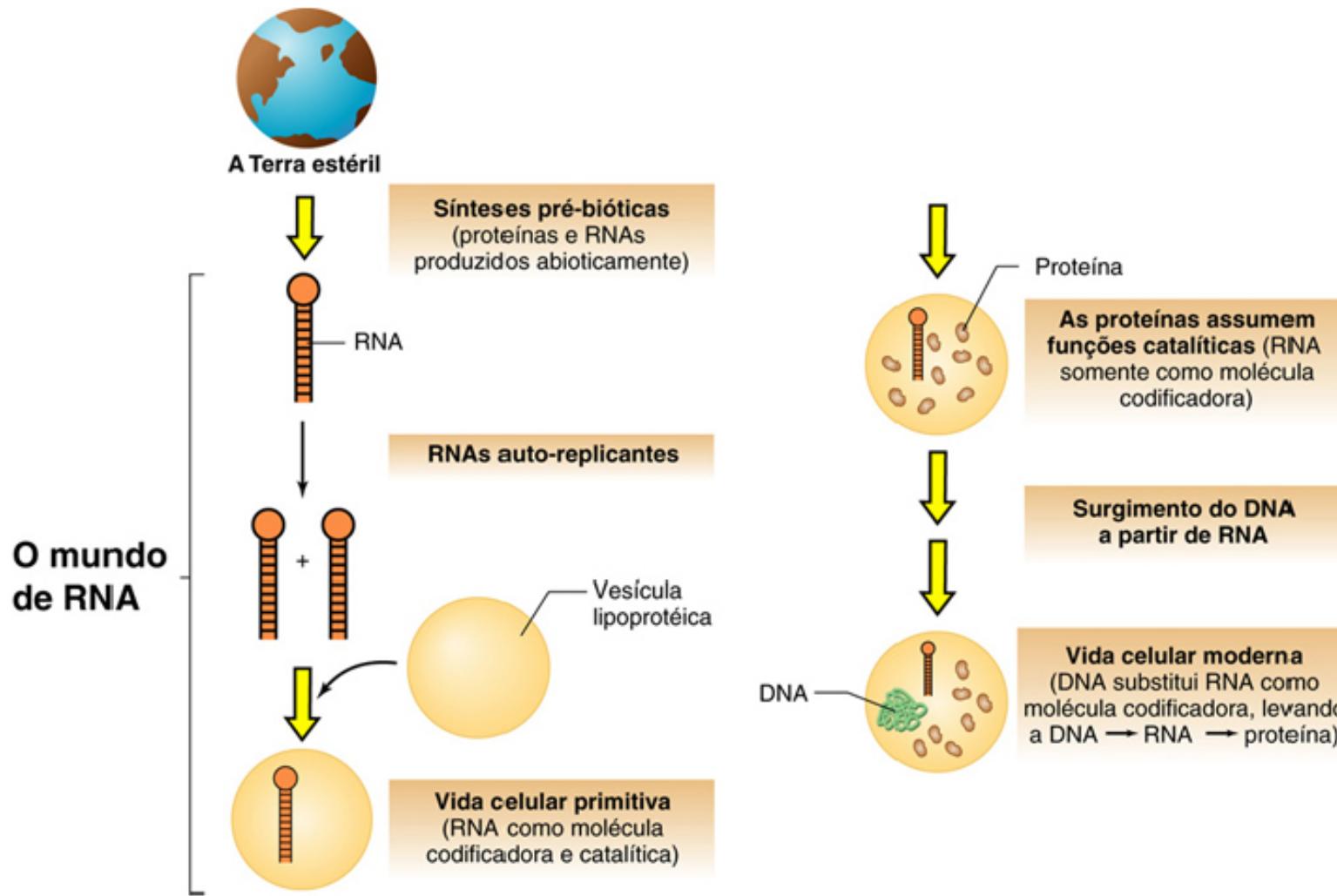
Diversidade – seleção natural
Evolução dos organismos vivos



Bactérias e *Archaea* possuem paredes celulares diferentes e devem ter se formado de forma idenpendentes

O papel do RNA na origem da vida

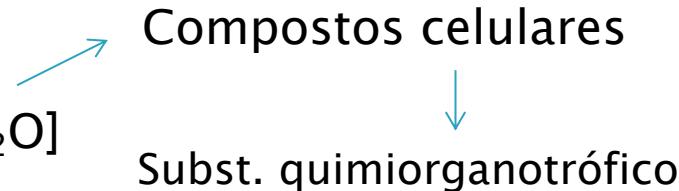
– Primeiro sistema auto replicante e pode atuar como catalisador



Metabolismo Primitivo

- ▶ Terra era anóxica e continha poucos compostos orgânicos.
 - Primeiros organismos provavelmente – Anaeróbicos e autotróficos (bactéria *Aquifex* – hipertermófilo, autotrófico, anaeróbio, genoma pequeno)

- Abundância de H_2 e CO_2 na Terra remota



- Fonte de carbono era obtida pela redução do CO_2 pelo H_2
- Algo parecido ocorre com *Archaea* hipertermófilas (oxidam H_2 e reduzem S^0)
- Fonte constante de H_2

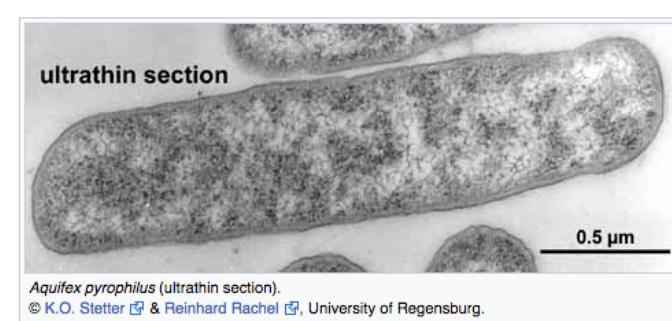


Ecology

As a hyperthermophilic bacterium, *Aquifex aeolicus* grows in extremely hot temperatures such as near volcanoes or hot springs. They grow optimally at temperatures around 85 degrees but can grow at temperatures up to 95 degrees. It needs oxygen for its metabolic machinery, but it can function in relatively low levels of oxygen (*A. pyrophilus* can grow in levels of oxygen as low as 7.5 ppm). *A. aeolicus* can grow on hydrogen, oxygen, carbon dioxide, and mineral salts (Deckert *et al.* 1998). *Aquifex* species form large cell aggregates, which can be comprised of up to 100 individual cells.



Aquifex aeolicus [\[link\]](#). © K.O. Stetter & Reinhard Rachel, University of Regensburg.

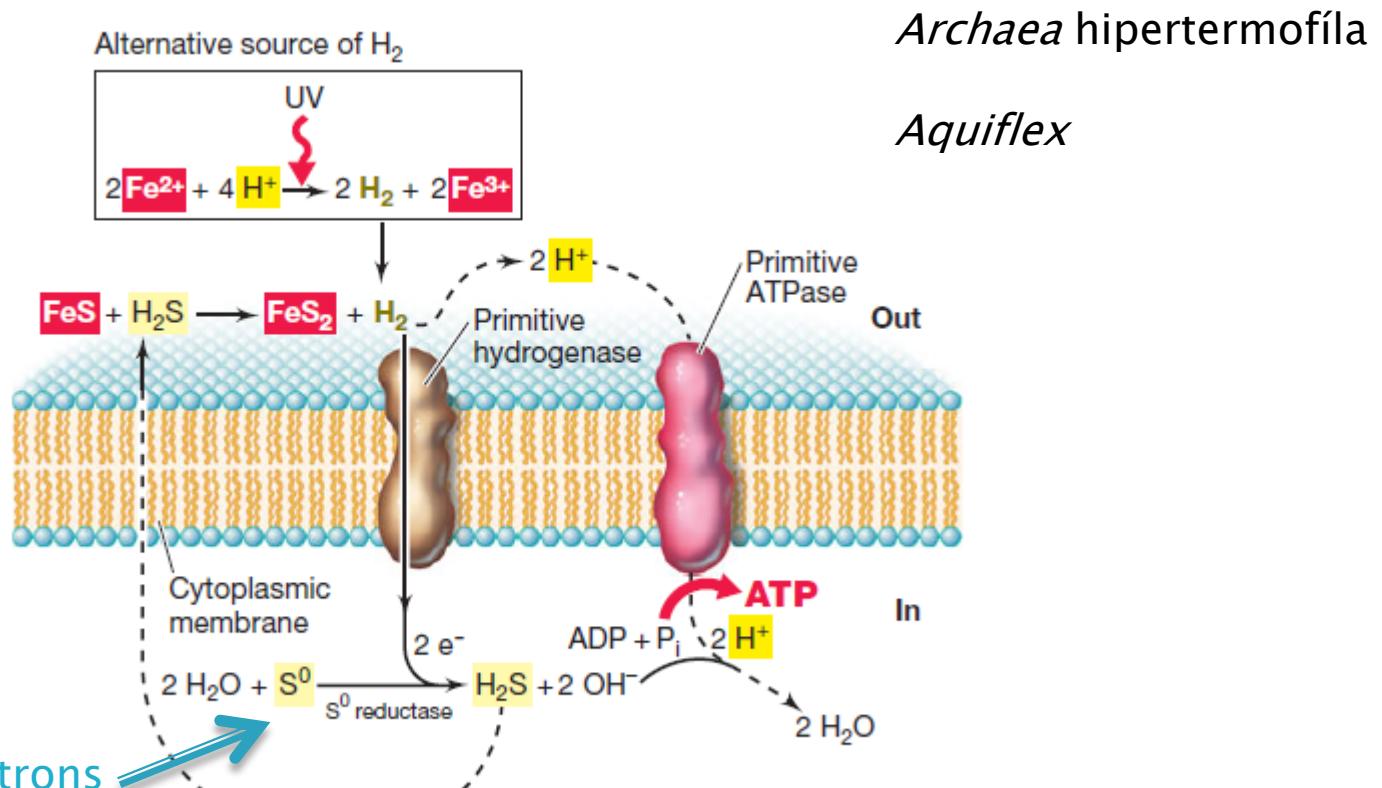


Aquifex pyrophilus (ultrathin section).

© K.O. Stetter [\[link\]](#) & Reinhard Rachel [\[link\]](#), University of Regensburg.



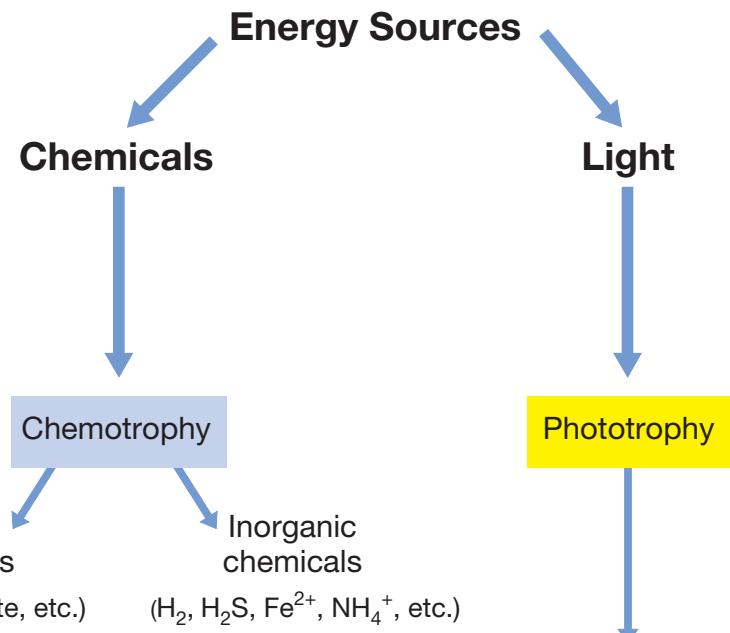
H_2 poderia ter alimentado a ATPase primitiva para a produção de ATP



Suprimento ilimitado de enxofre (grande abundância de compostos sufurosos)
Poucas enzimas para esse processo

Diversidade metabólica

Fonte de energia

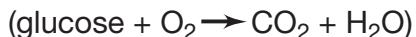


Fonte de carbono

Autotróficos: CO_2

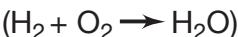
Heterotróficos:
compostos orgânicos

Chemoorganotrophs



ATP

Chemolithotrophs



ATP

Phototrophs

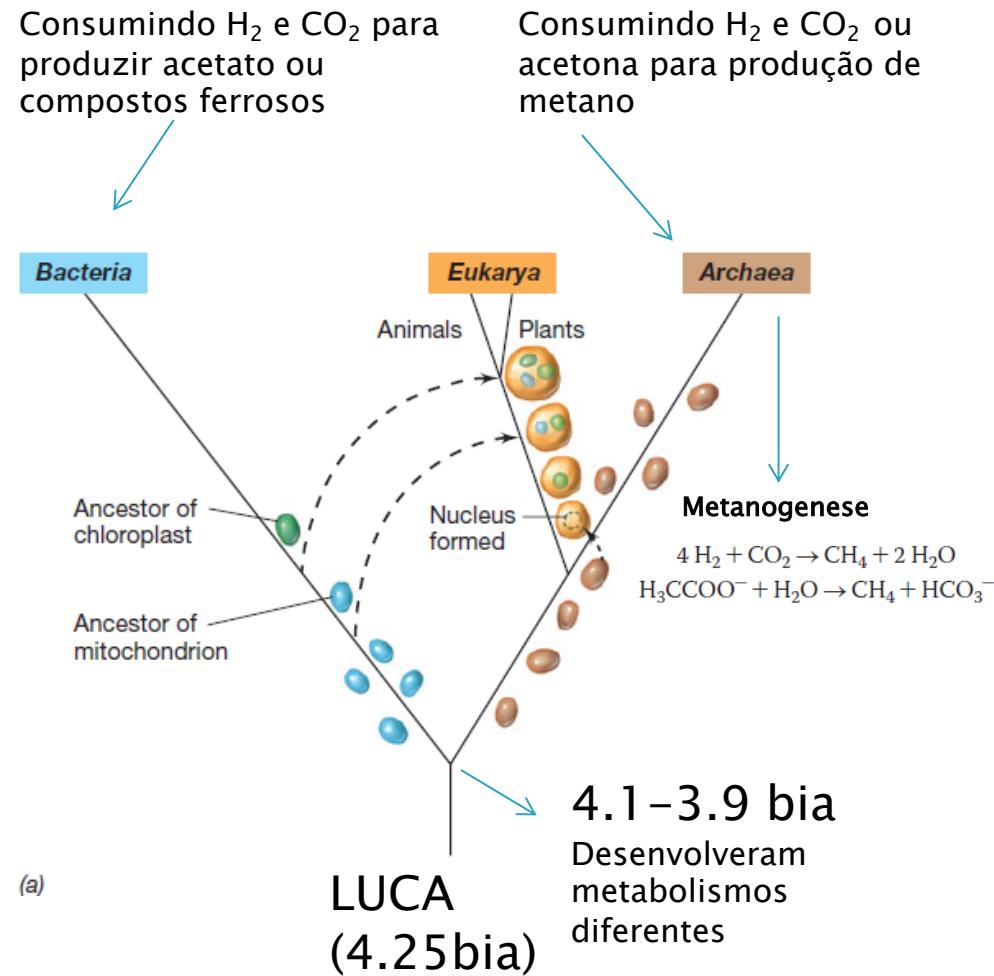
(light)

ATP

Diversidade: classificação de organismos por habitat

	Muito alta	Alta	Moderada	Baixa
Temperatura	hipertermófilos	termófilos	mesófilos	psicrófilos
pH	acidófilos	acidófilos	neutrófilos	alcalófilos
Oxigênio		aeróbicos	aeróbicos	microaerófilos
Osmolaridade	halófilos			
Pressão	barófilos			

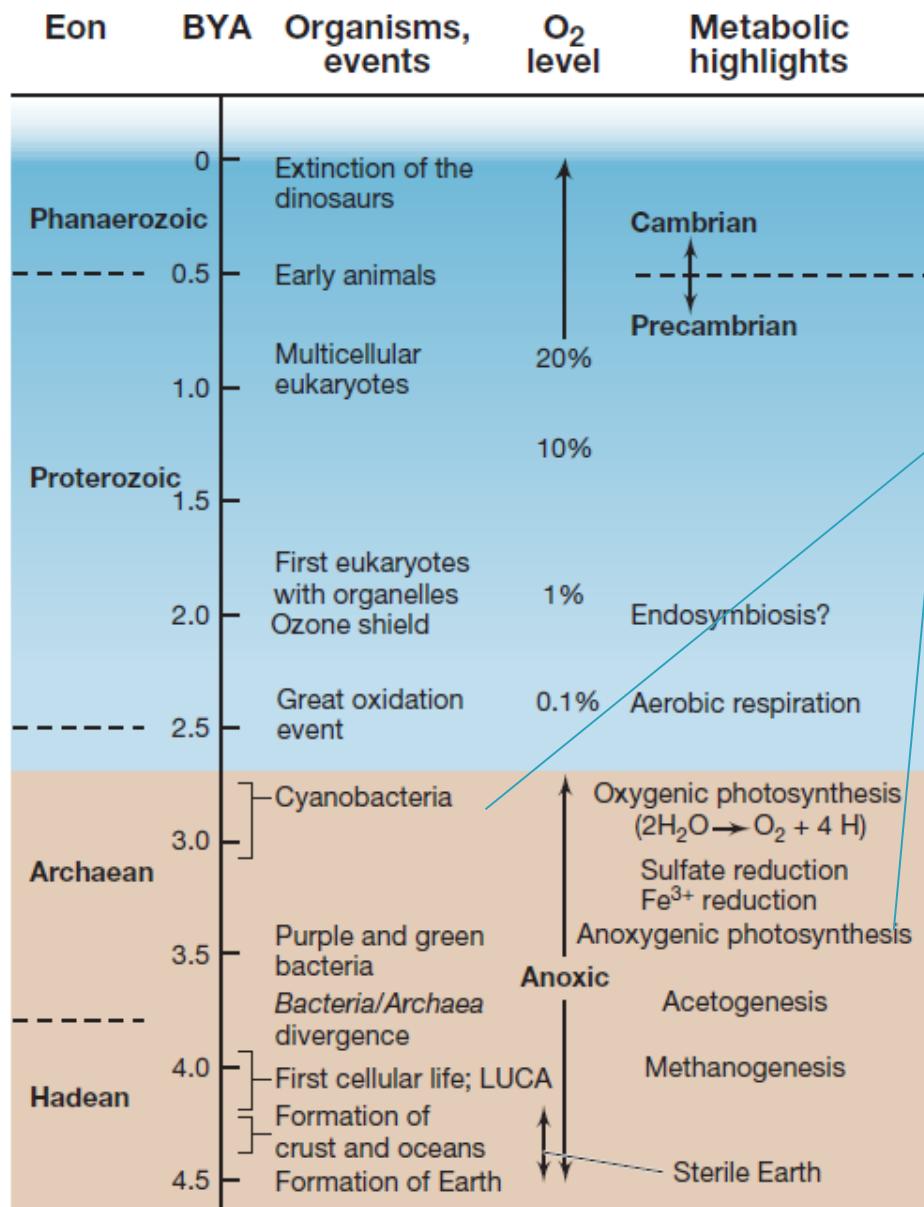
Diversidade Metabólica e Morfológica



Archaea

Algumas características interessantes:

- A maioria são extremófilas
- Altas temperaturas
- Extremos de pH e salinidade
- Todos são quimiotróficos
- Exceção: *Halobacterium* pode usar luz para obter energia (forma muito diferente dos fototróficos)

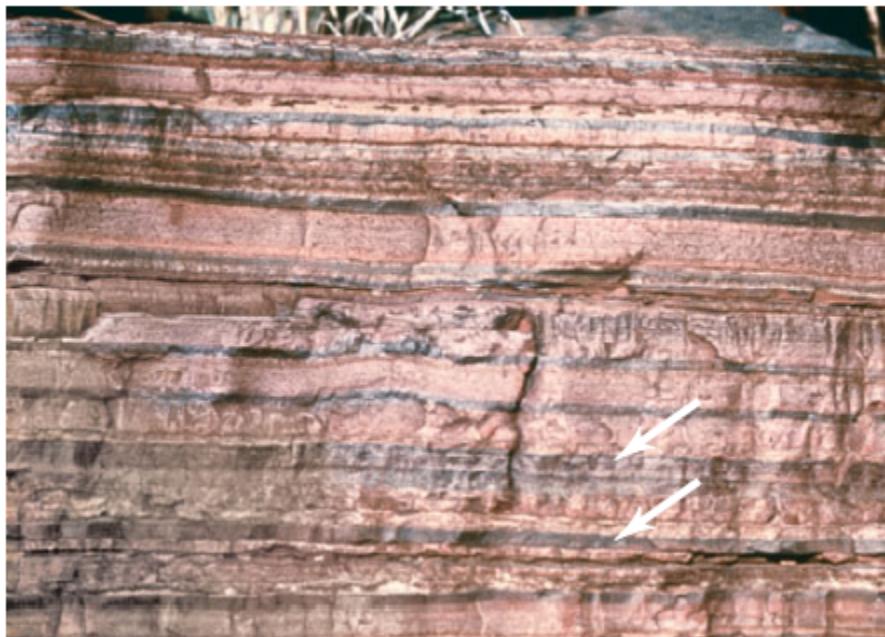


- 3.2 bia fototrofia (só em bactérias)
Utilização da Luz solar (como fonte de energia) possibilitou a diversificação
- 2.7 bia a linhagem de cyanobacterias desenvolveu a capacidade de usar água ao invés de H_2S na redução do CO_2 , liberando O_2 e não S^0
- O surgimento da fotossíntese oxigênica alterou o curso da evolução

Atmosfera oxigenada

Formação ferríferas bandadas

Camadas de óxido de ferro e silicatos de ferro

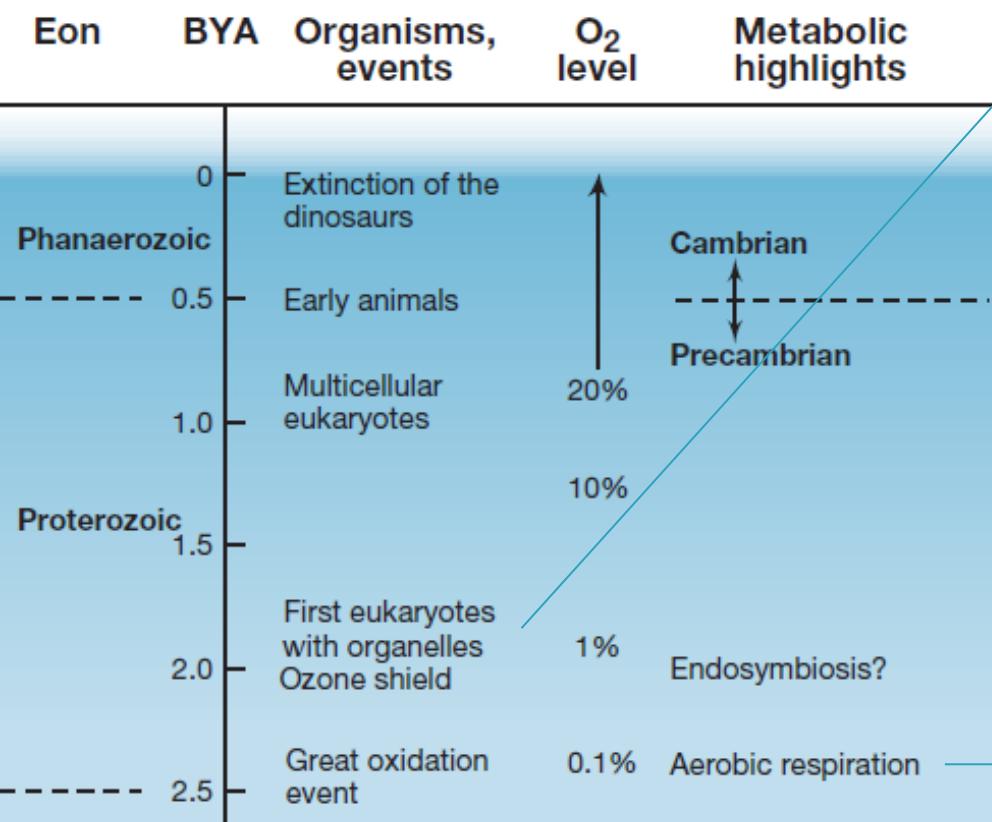


Cianobactérias surgiram a 2.7 bia

PQ levou 300 milhões de anos para
começar a acumular O₂

$\text{Fe}^{+2} + \text{O}_2 \rightarrow$ óxidos de ferro que se
acumularam em formação ferríferas

Para ter acumulo de O₂ tem que ter consumido o ferro abundante



Formação da camada de ozônio

Sem isso eles teriam que ficar abaixo da superfície oceânica, lugares terrestres protegidos

Organismos puderam disseminar por toda superfície terrestre – Criando grande diversidade

Evolução nas vias metabólicas
Organismos anaeróbicos ficaram restritos em seus habitat (principalmente as *archaea*)

Facultativos diversificaram rapidamente

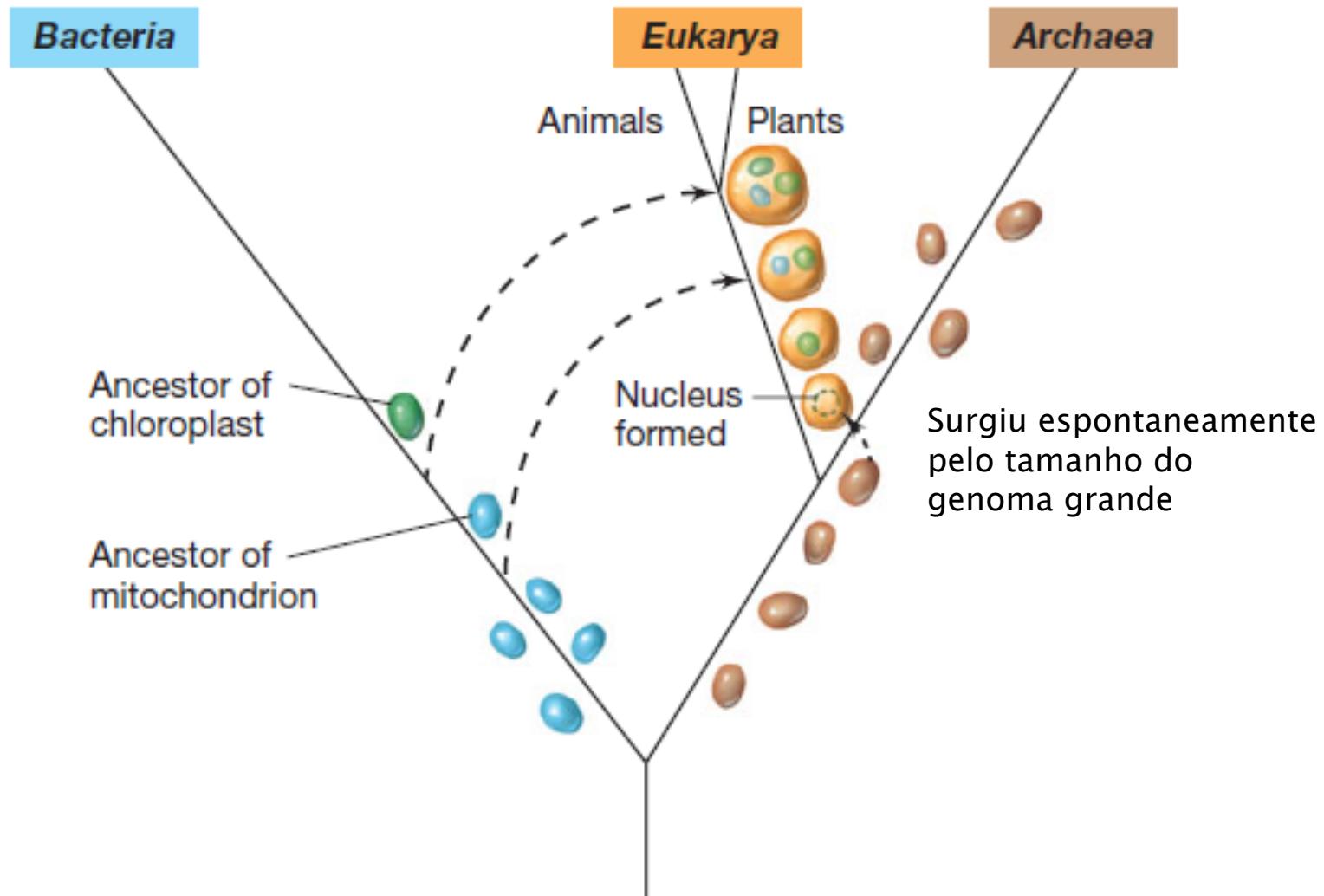
Origem dos eucariotos – Endossimbioótica

- ▶ Bactérias e as *Archaea* perduram por 2 bia até surgir os organismos eucarióticos
- ▶ 2 bia surgiu os organismos eucarióticos –
 - Possuem Núcleo envolto por membrana
 - **possui organelas**
 - Surgiram após o surgimento de uma atmosfera com O₂
- ▶ Endossimbiose
 - Mitocôndrias e os cloroplastos



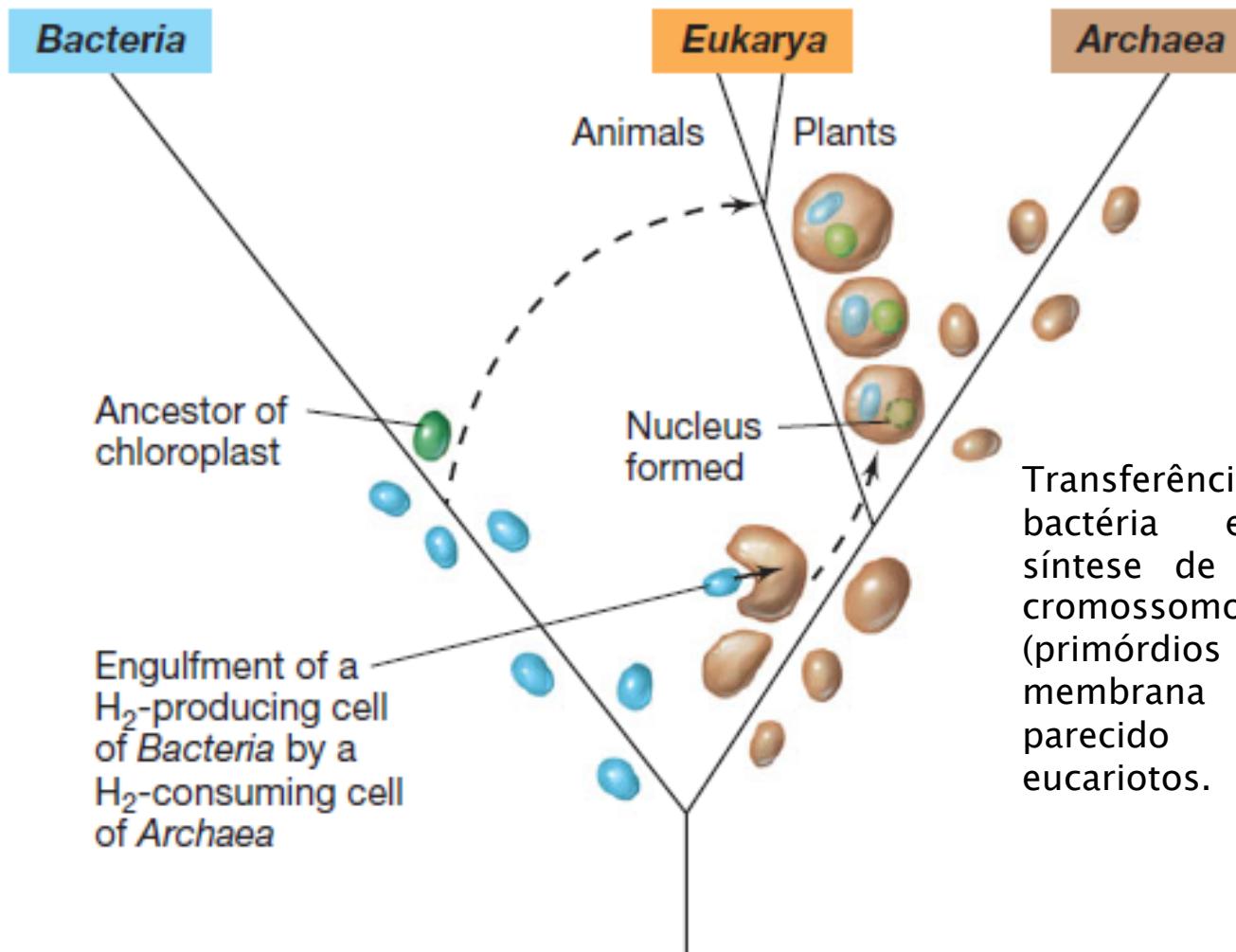
Bactérias quimiorganotróficas
(metabolismos aeróbico facultativo)
– Protoplastaria – Rhizobium ou Riquétsia –
intra-celulares)

Origem dos eucariotos – Endossimbioótica



Origem dos eucariotos – Endossimbioótica

Hipótese do hidrogênio



Transferência de genes da bactéria envolvidos na síntese de lípido para o cromossomo da célula nova (primórdios do núcleo) – membrana de bactéria é parecido com a de eucariotos.

Células eucarióticas são quimeras

Table 16.1 Major characteristics of Bacteria, Archaea, and Eukarya^a

Characteristic	Bacteria	Archaea	Eukarya
Morphological and genetic			
Prokaryotic cell structure	Yes	Yes	No
Cell wall	Peptidoglycan	No peptidoglycan	No peptidoglycan
<u>Membrane lipids</u>	Ester-linked	Ether-linked	Ester-linked
Membrane-enclosed nucleus	Absent	Absent	Present
DNA present in covalently closed and circular form	Yes	Yes	No
Histone proteins present	No	Yes	Yes
RNA polymerases (Figure 7.2)	One (4 subunits)	One (8–12 subunits)	Three (12–14 subunits each)
Ribosomes (mass)	70S	70S	80S
<u>Initiator tRNA</u>	Formylmethionine	Methionine	Methionine
Introns in most genes	No	No	Yes
Operons	Yes	Yes	No
Capping and poly(A) tailing of mRNA	No	No	Yes
Plasmids	Yes	Yes	Rare
Sensitivity to chloramphenicol, streptomycin, kanamycin, and penicillin	Yes	No	No

Evolução

A evolução é guiada em grande parte pela seleção natural proposta por Charles Darwin 1859



Processo de modificação de características através de **mudanças genéticas** que se tornam hereditária

Mutações

- Erros no processo de replicação
- radiação UV

Duplicação génica (parálogos)
Transferência horizontal de genes
Recombinação
Perda de genes (parasitas obrigatórios)

Seleção Natural

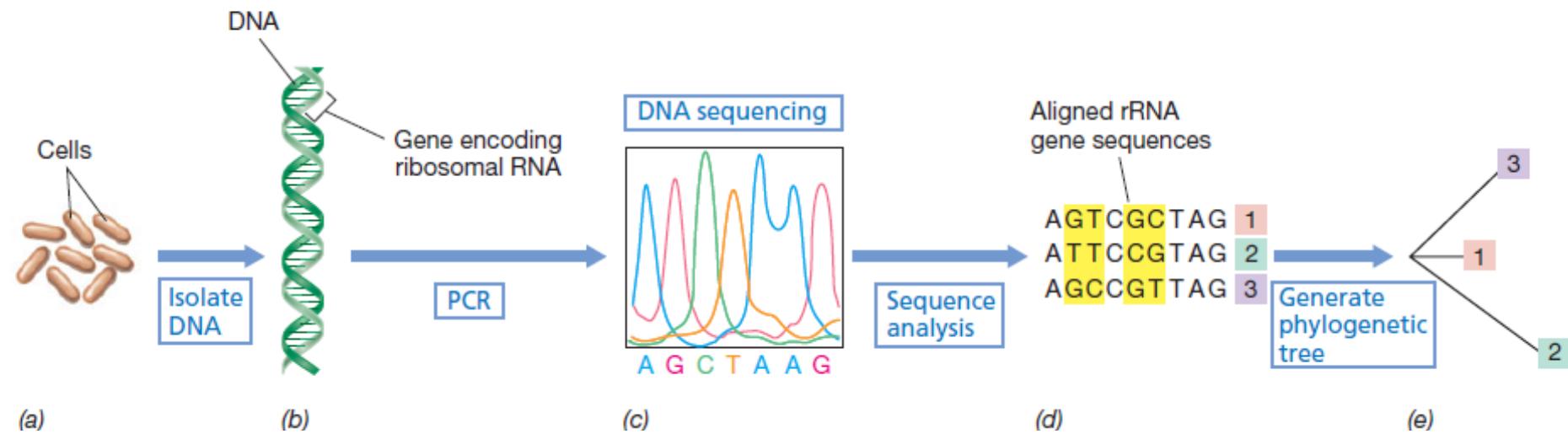
Filogenia, Taxonomia e Sistemática

- ▶ Filogenia – Árvore Filogenética
 - Relação evolutiva entre os microorganismos
- ▶ Taxonomia
 - Caracteriza, nomeia e posiciona os organismos em grupos (baseou-se principalmente em aspectos fenotípicos)
 - Atualmente é Polifásico: fenótipo + genótipo + filogenético
- ▶ Sistemática Microbiana
 - Estudo da diversidade e as relações entre microorganismos

Análise Evolutiva – Árvore Filogenética

- ▶ Woese – RNA ribossômico (SSU rRNA) – 16S (procarioto) ou 18S (eucarioto)
 - Distribuídos Universalmente
 - Função constante entre os organismos vivos
 - Modificam lentamente – altamente conservados
 - Tamanho adequado para análise evolutiva

Filogenia Microbiana

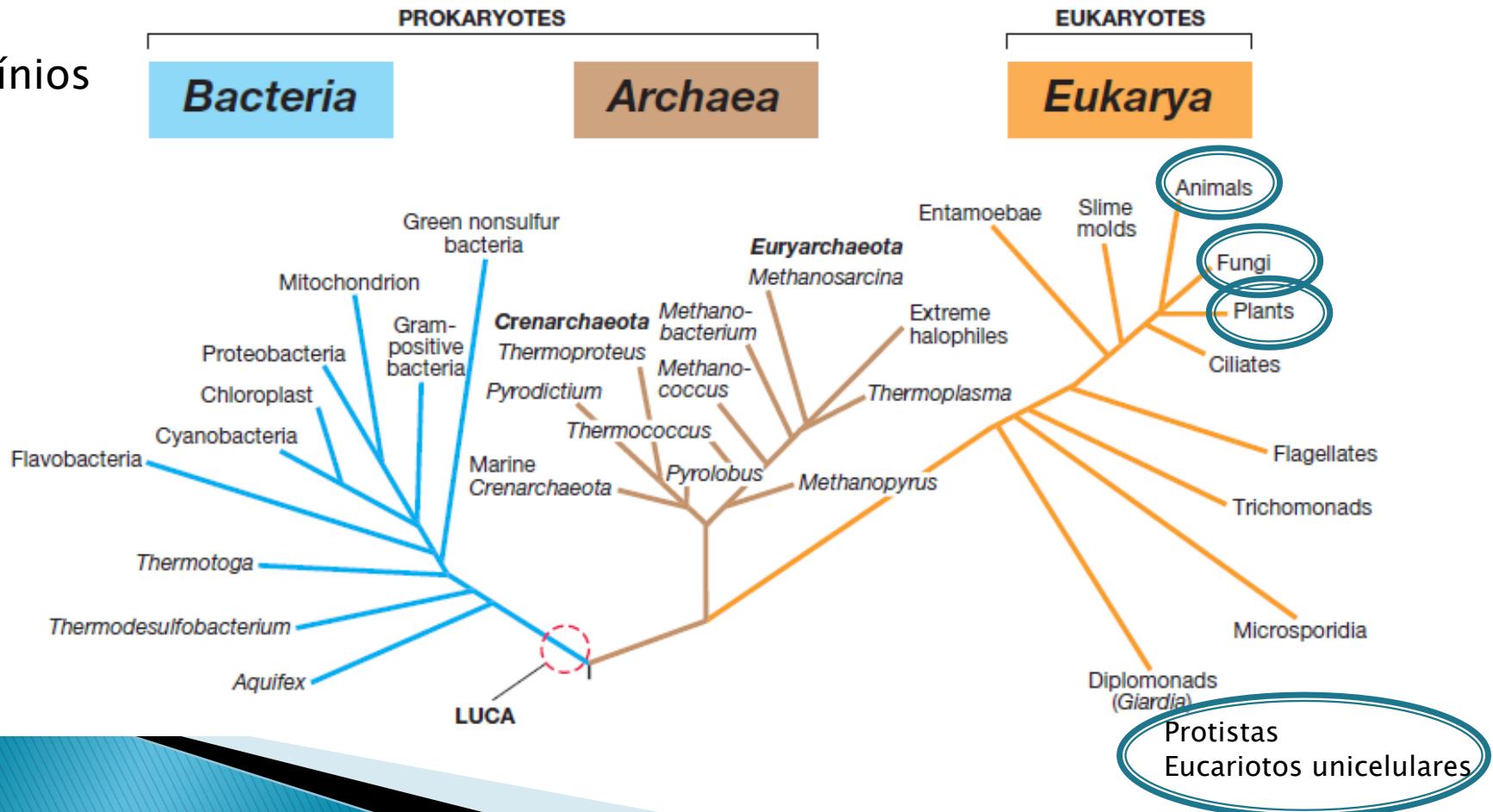


- ▶ Assim são construídas as ÁRVORES FILOGENÉTICAS
(Wose estabeleceu que existem 3 domínios - *Bacteria*, *Archaea* e *Eucaria*)

Filogenia Microbiana

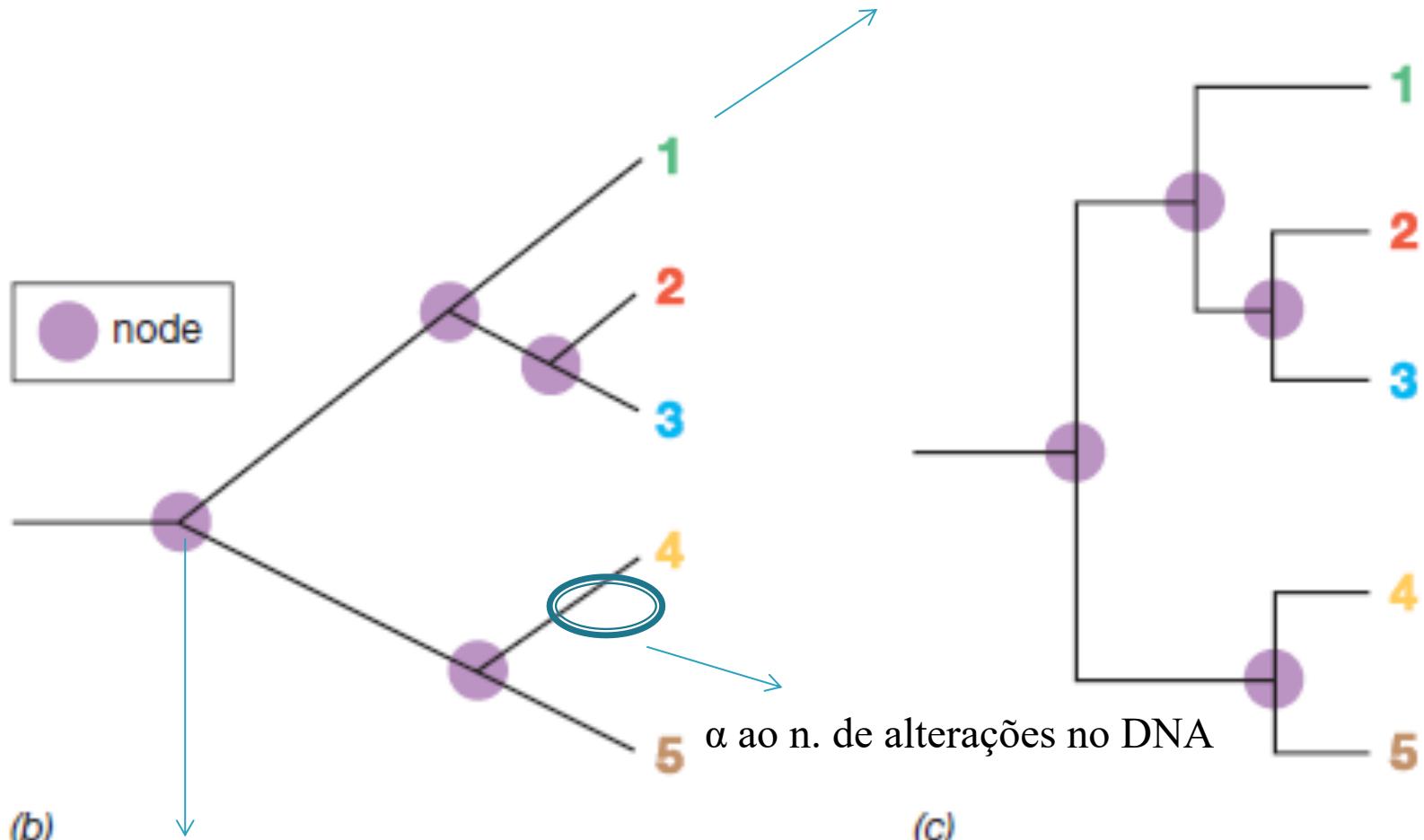
Antigamente os seres vivos eram agrupados em: Plantas, animais, fungos, protistas e bactérias

Domínios



Árvore Filogenética

Ramos – linhagens individuais



α ao n. de alterações no DNA

Filogenia Microbiana

- ▶ Muitos genes comuns nos três Domínios, apesar de terem divergidos a milhares de anos (ter vindo de transferência horizontal) – Promiscuamente transferidos entre populações primitivas
- ▶ Ao longo do tempo foi bloqueado a transferência horizontal irrestrita
 - ▶ Exemplo: endonucleases
- ▶ Gerou diferentes espécies
- ▶ Usar a filogenia para auxiliar na Identificação e na Classificação (Taxonomia)

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

- Algumas sequencias são **específicas** e algumas são **genéricas**

	Localização	ARCHAEA	BACTERIA	EUKARYA
CACYYG	315	0	>95	0
AAACUCAAA	910	3	100	0
AAACUUAAAG	910	100	0	100
YUYAAUUG	960	100	<1	100
CAACCYYCR	1110	0	>95	0
UCCCUG	1380	>95	0	100
UACACACCG	1400	0	>99	100
CACACACCG	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

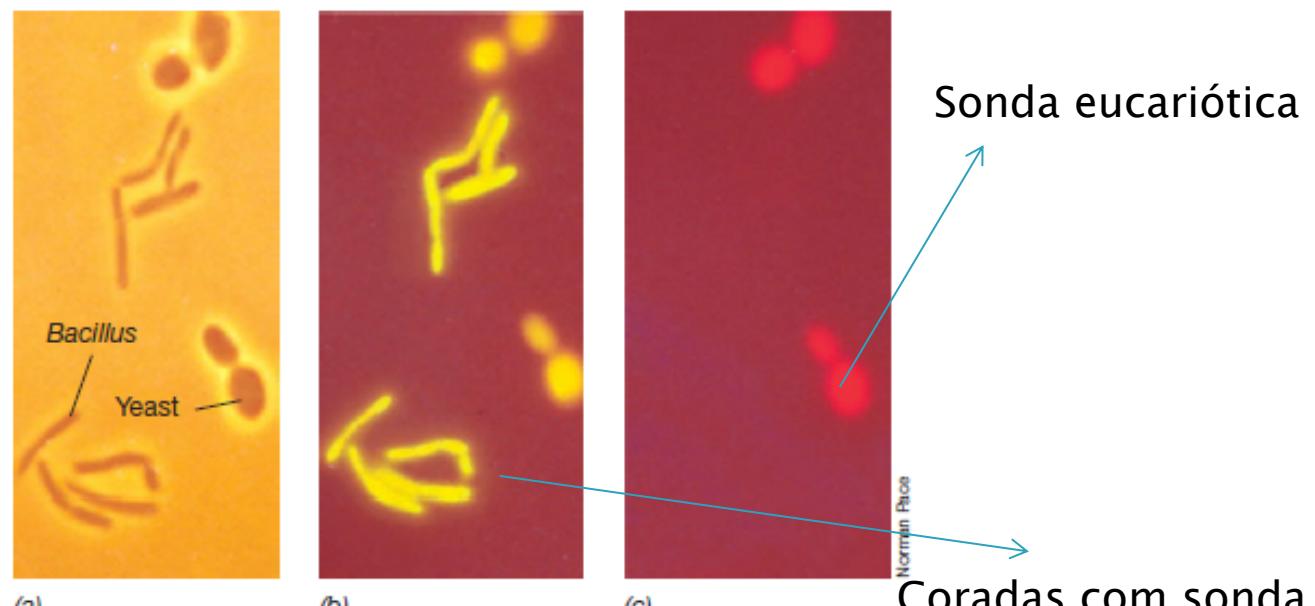


Figure 16.17 Fluorescently labeled rRNA probes: Phylogenetic stains. (a) Phase-contrast photomicrograph of cells of *Bacillus* mega-

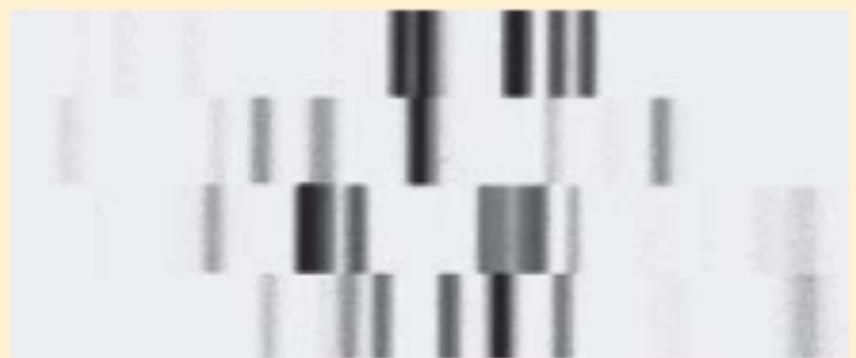
Árvore filogenética de uma comunidade microbiana

- ▶ Amplificar e sequenciar a SSU (small subunit) rRNA de uma população microbiana e gerar uma árvore filogenética – Importante para ecologia

Ribotipagem

- ▶ DNA genômico
- ▶ Digestão com enzimas de restrição
- ▶ Padrão das bandas (Finger print)
- ▶ Hibridização com uma sonda marcada de rRNA (16S da rRNA)
- ▶ Rápido e específico
- ▶ **Descriminação entre espécies**
- ▶ Padrão das bandas (mapa de restrição para plasmídeo) é o ribotipo

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



Carl A. Batt

Sistemática e Taxonomia

- ▶ Muitos fenótipos são usados para caracterizar os organismos

Table 16.2 Some phenotypic characteristics of taxonomic value

Category	Characteristics
Morphology	Colony morphology; Gram reaction; cell size and shape; pattern of flagellation; presence of spores, inclusion bodies (e.g., PHB, ^a glycogen, or polyphosphate granules, gas vesicles, magnetosomes); capsules, S-layers or slime layers; stalks or appendages; fruiting-body formation
Motility	Nonmotile; gliding motility; swimming (flagellar) motility; swarming; motile by gas vesicles
Metabolism	Mechanism of energy conservation (phototroph, chemoorganotroph, chemolithotroph); utilization of individual carbon, nitrogen, or sulfur compounds; fermentation of sugars; nitrogen fixation; growth factor requirements
Physiology	Temperature, pH, and salt ranges for growth; response to oxygen (aerobic, facultative, anaerobic); presence of catalase or oxidase; production of extracellular enzymes
Cell lipid chemistry	Fatty acids ^b ; polar lipids; respiratory quinones
Cell wall chemistry	Presence or absence of peptidoglycan; amino acid composition of cross-links; presence or absence of cross-link interbridge
Other traits	Pigments; luminescence; antibiotic sensitivity; serotype; production of unique compounds, for example, antibiotics

^aPHB, poly-β-hydroxybutyric acid (Section 3.10).

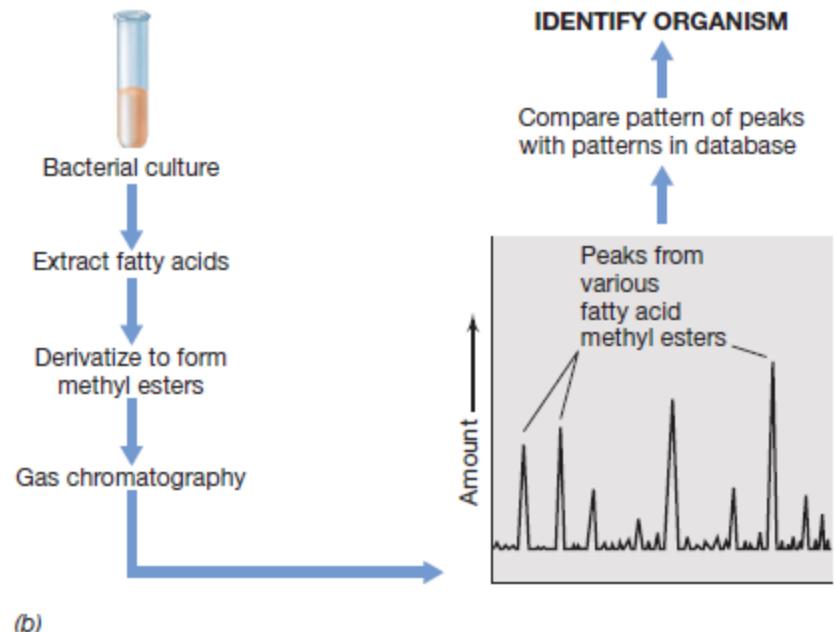
^bFigure 16.19

Análise dos ácidos graxos nas membranas

- ▶ Técnica de FAME – Fatty acid methyl ester
- ▶ Amplamente usado em laboratório clínico
- ▶ Pode identificar uma espécie bacteriana em particular
- ▶ Padronização nos experimentos, pois temperatura e outros fatores modificam o resultado

Classes of Fatty Acids in Bacteria	
Class/Example	Structure of example
I. Saturated: tetradecanoic acid	<chem>O=C(CCCCCCCCCCCCC)C3</chem>
II. Unsaturated: omega-7-cis hexadecanoic acid	<chem>O=C(CCCCCCCCC=CC(=O)O)C3</chem>
III. Cyclopropane: cis-7,8-methylene hexadecanoic acid	<chem>O=C(CCCCCCCCC1CCC(C)CC1)C3</chem>
IV. Branched: 13-methyltetradecanoic acid	<chem>O=C(CCCCCCCCC(C)(C)C)C3</chem>
V. Hydroxy: 3-hydroxytetradecanoic acid	<chem>O=C(O)C(CCCCCCCCCCCCC)C3</chem>

(a)



(b)

Análise Genotípica

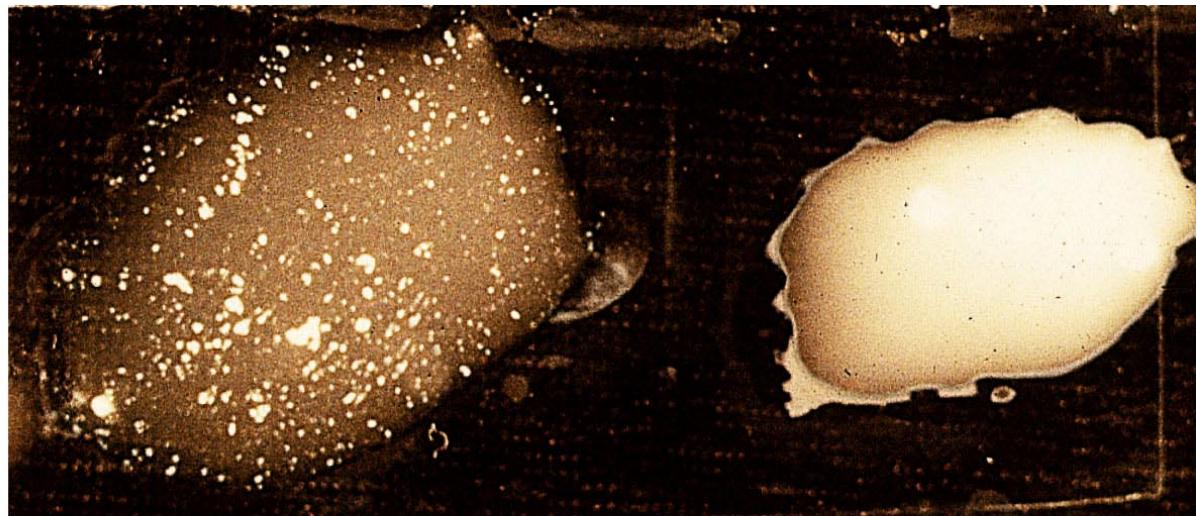
- ▶ Com a era genômica, vários genomas foram sequenciados e depositados em banco de dados públicos
- ▶ Análise comparativa destas sequências podem ser usadas para a taxonomia
- ▶ Alguns métodos genotípicos:

Table 16.3 Some genotypic methods used in bacterial taxonomy

Method	Description/application
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

Outros métodos

- ▶ Sorologia – Teste de aglutinação
 - Anticorpo conhecido – testa contra um organismo desconhecido

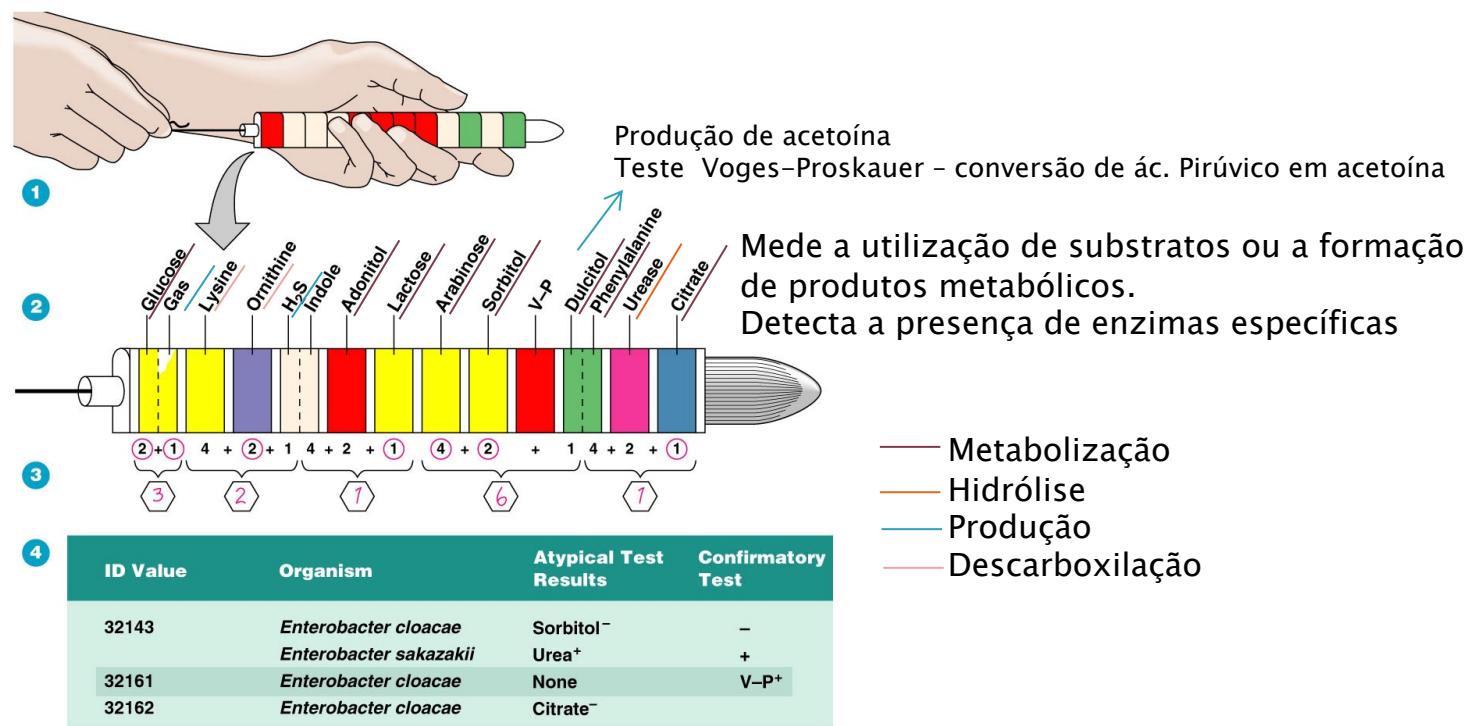


+

-

Outros métodos

- ▶ Teste Bioquímico rápido (atividade enzimática) – Exemplo para 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)

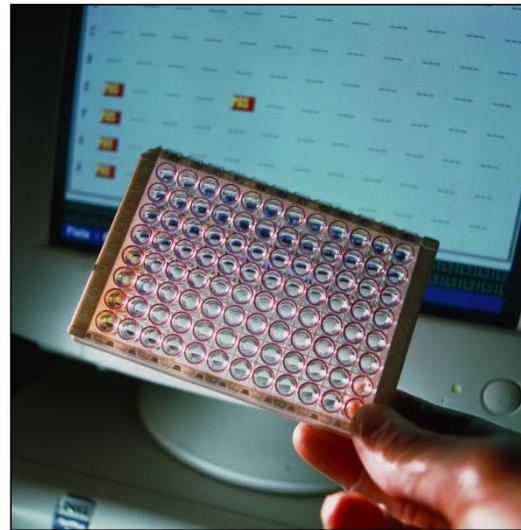


Outros métodos

- ▶ Ensaio de ELISA.
- ▶ Placa com diferentes anticorpos aderidos.
- ▶ Incuba com um organismo desconhecido



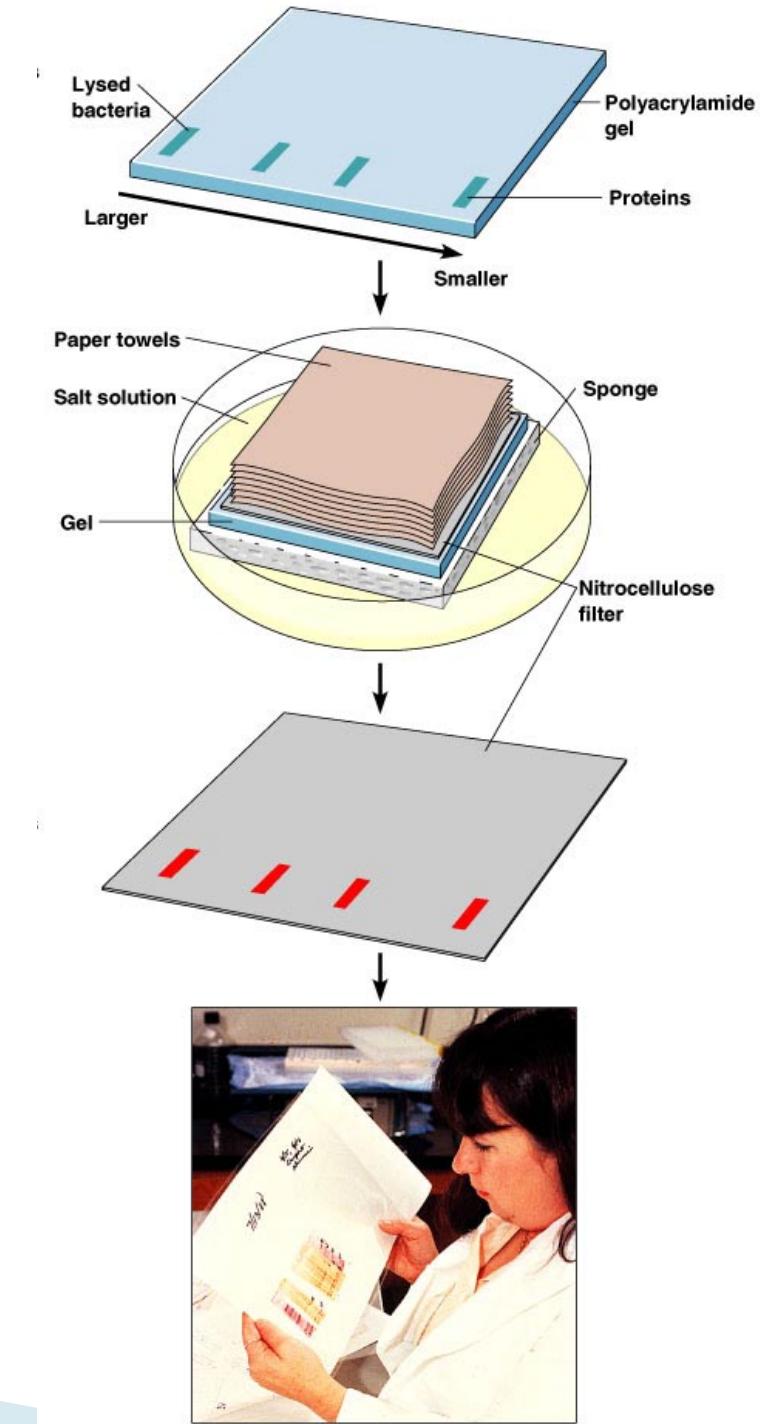
(a)



(b)

Outros Métodos

- ▶ Western Blotting
- ▶ Usa o soro do paciente



Classificação dos organismos

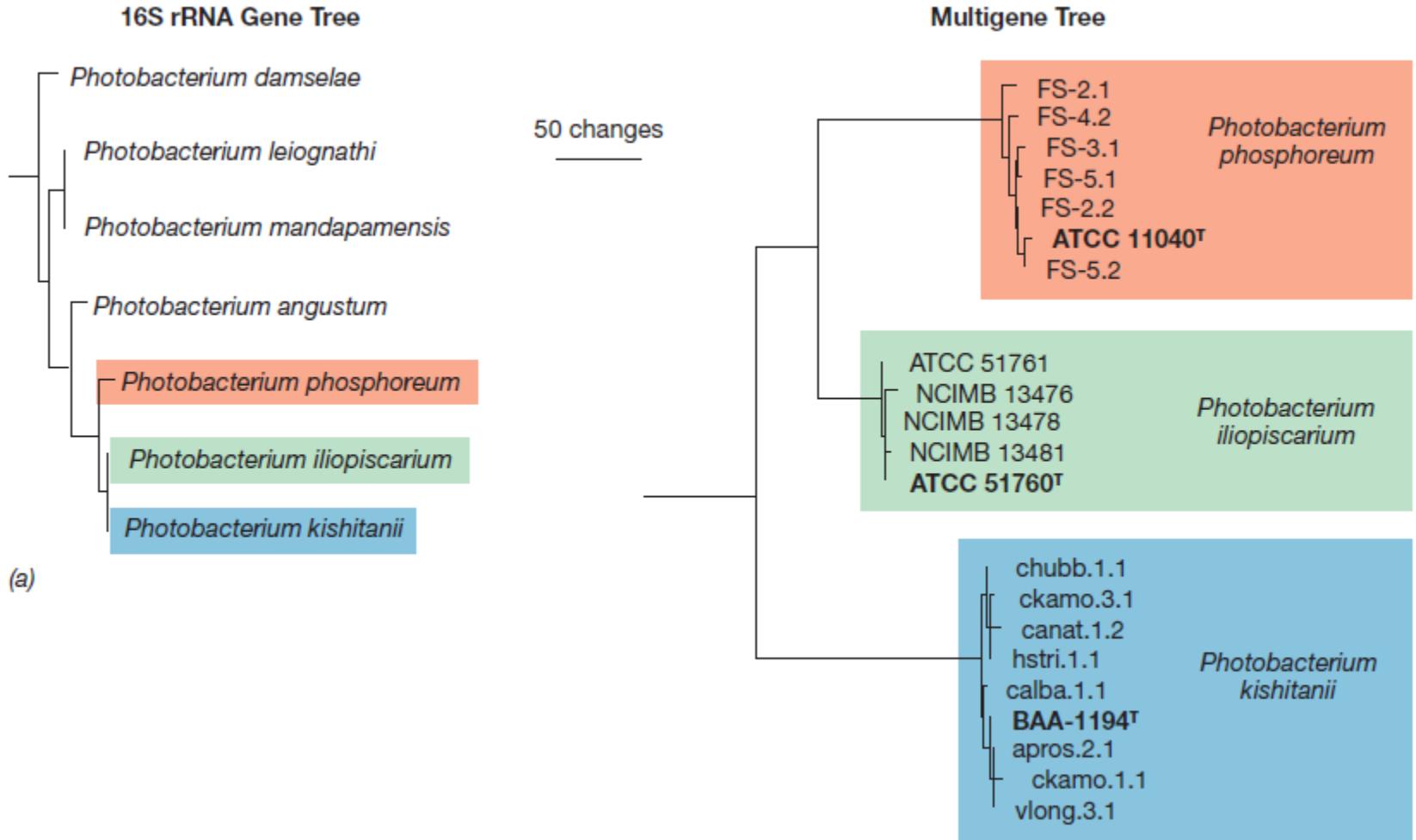
- ▶ Todos os nomes de espécies biológicas seguem o mesmo padrão: Gênero seguido da Espécie (com formato itálico).
- ▶ A primeira letra do gênero deve ser maiúscula e as demais em minúsculo.
- ▶ Espécie: É um conjunto de linhagens que compartilham alto grau de similaridade em vários aspectos (hibridização DNA–DNA de 70 % e rRNA 16S de mais de 97%) – organismos procariotos (assexuada)
- ▶ Organismos sexuados – cruzamento entre espécies gera um ser infértil
- ▶ Exemplo: *Methanopyrus kandleri*⁵⁶

Taxon	Nome
Domínio	<i>Archaea</i>
Filo	<i>Euryarchaeota</i>
Classe	<i>Methanopyri</i>
Ordem	<i>Methanopyrales</i>
Família	<i>Methanopyraceae</i>
Gênero	<i>Methanopyrus</i>
Espécie	<i>kandleri</i>



- ▶ Taxonomia combina :
 - ▶ Dados fenotípicos
 - ▶ Genotípicos
 - ▶ Filogenéticos

Conjunto de Linhagens forma uma espécie



Especiação Bacteriana Surgimento de novas espécies

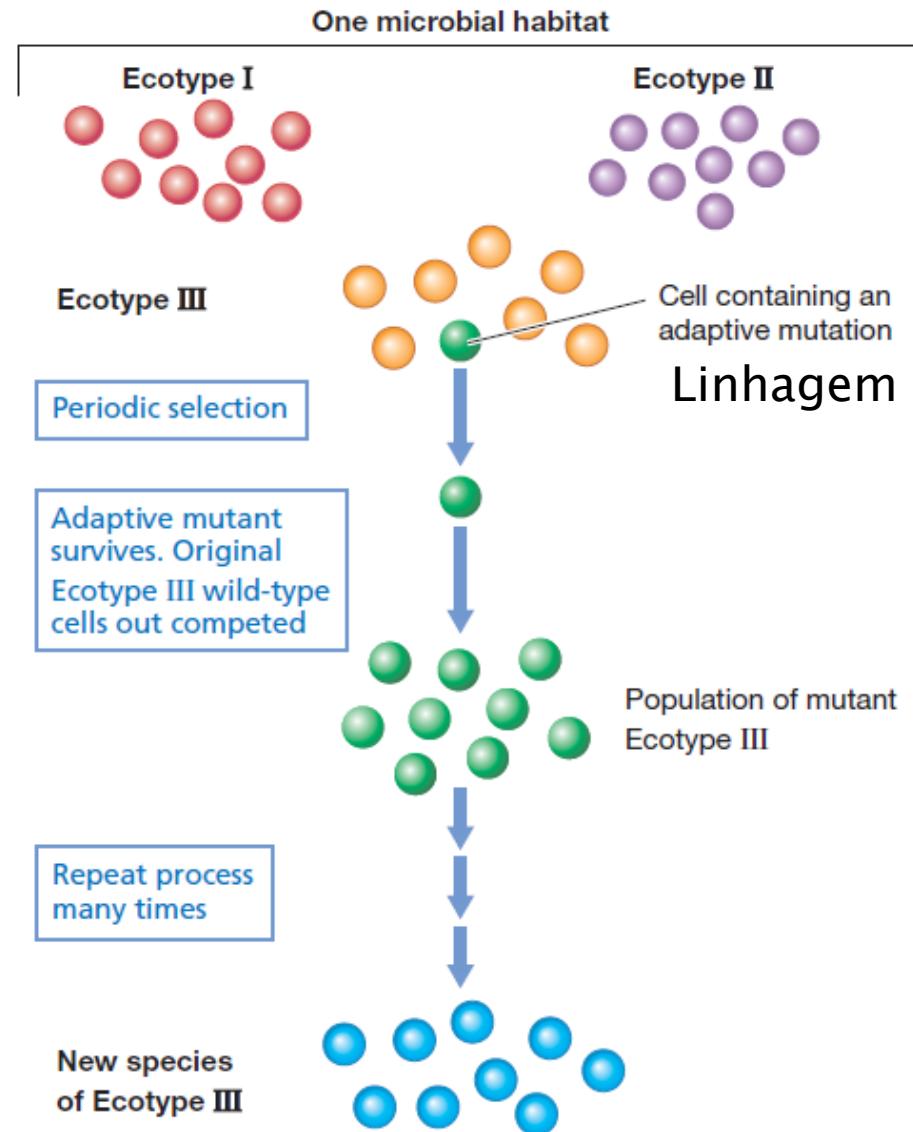
Processo de Seleção Periódica

Ecotipo:

População que compartilham um determinado recurso

Dois passos na evolução

- 1 – Mutação
- 2 – Seleção Periódica

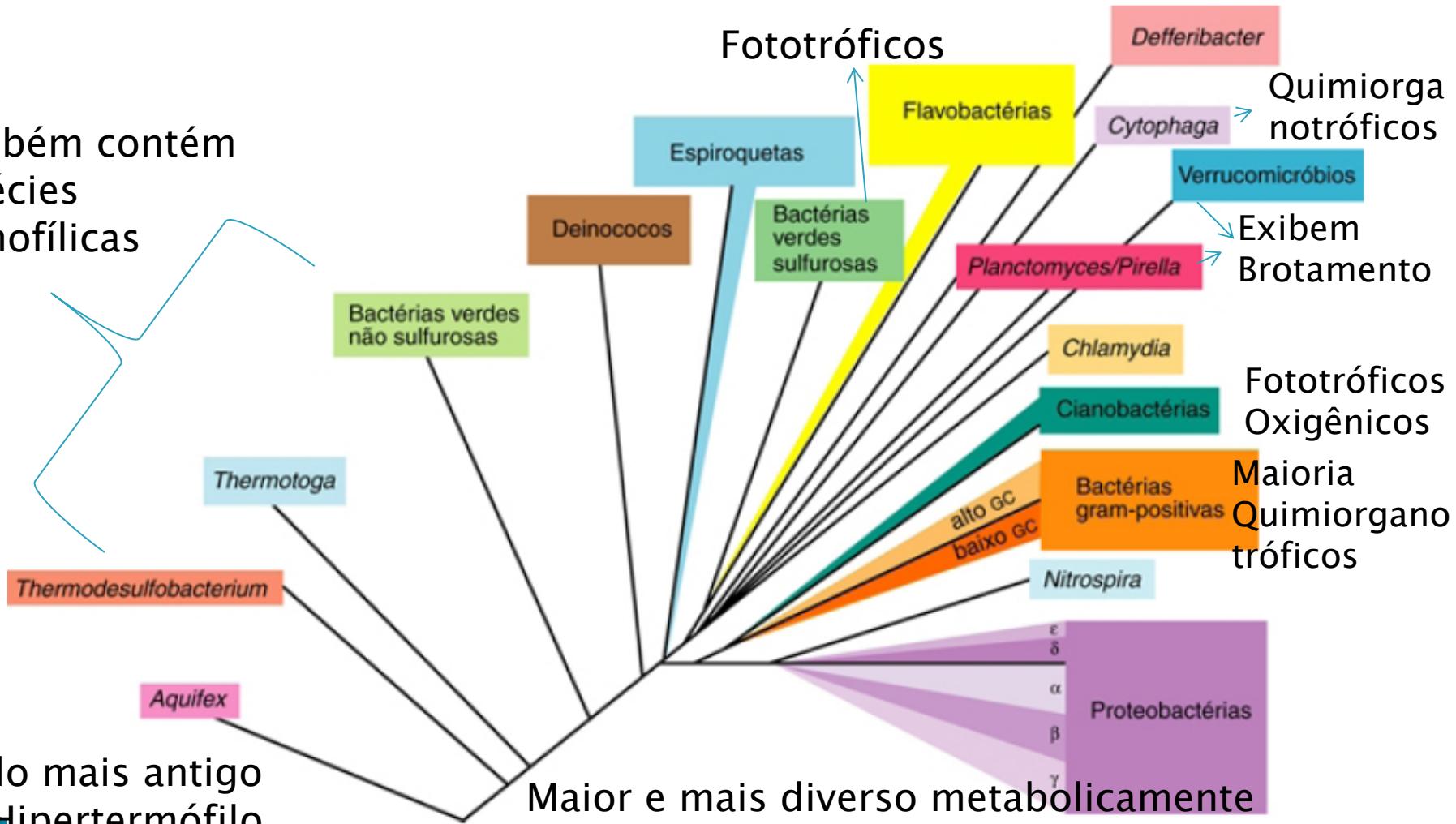


Classificação e Nomenclatura

- ▶ Nomenclatura
 - Nome binomial em latim ou grego
 - Seguir 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

Domínio de *Bacterias*

Também contém espécies termofílicas



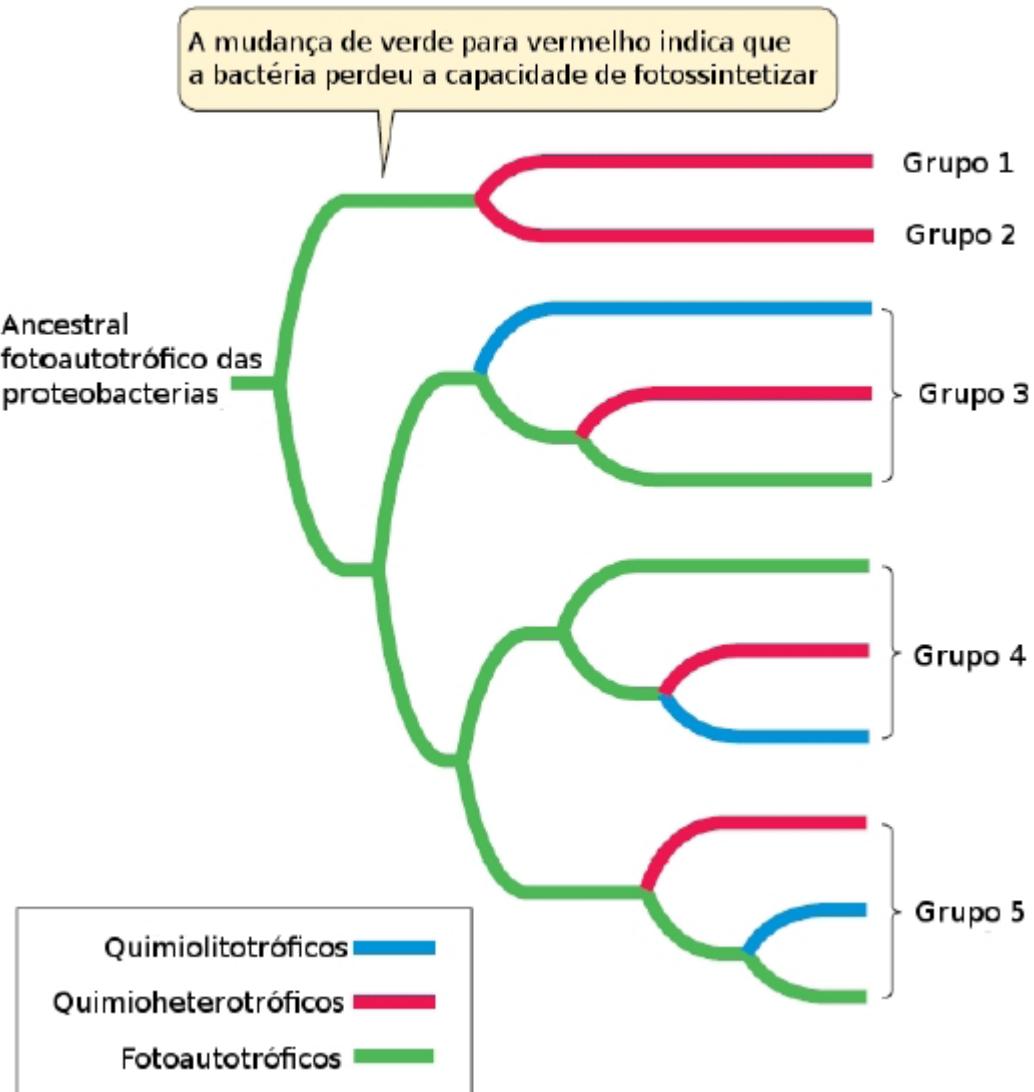
Filo mais antigo

- Hipertermófilo
- Quimiolitrotrofico
- Oxidam H₂

Maior e mais diverso metabolicamente
Ampla variedade de Formas
Importância médica, agrícola e industrial
Todos G-

Proteobactérias

- ▶ É o maior grupo de bactérias descritas
- ▶ Também conhecidas como bactérias púrpuras
- ▶ Fantástica diversidade metabólica
- ▶ Ancestral das proteobactérias era provavelmente fotoautotrófico
- ▶ Alguns grupos perderam a capacidade de fazer fotossíntese



Bancos de Dados de Organismos

Table 16.5 Some national microbial culture collections

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

Questão

- ▶ Porque o surgimento do RNA deve ter tido um papel essencial no surgimento da vida?
- ▶ Quais técnicas permitem distinguir diferentes espécies, diferentes cepas, diferentes gêneros e diferentes domínios?