MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS DE INTERESSE AMBIENTAL

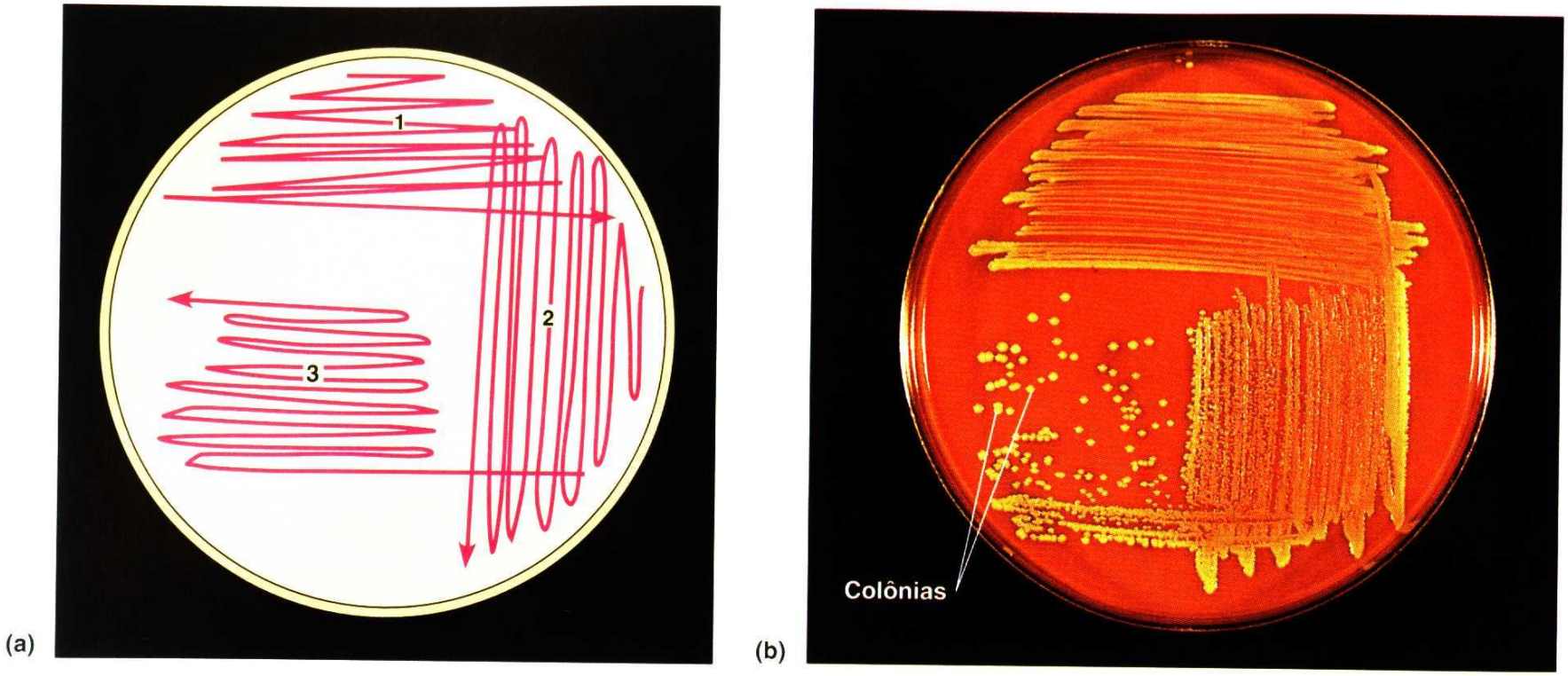


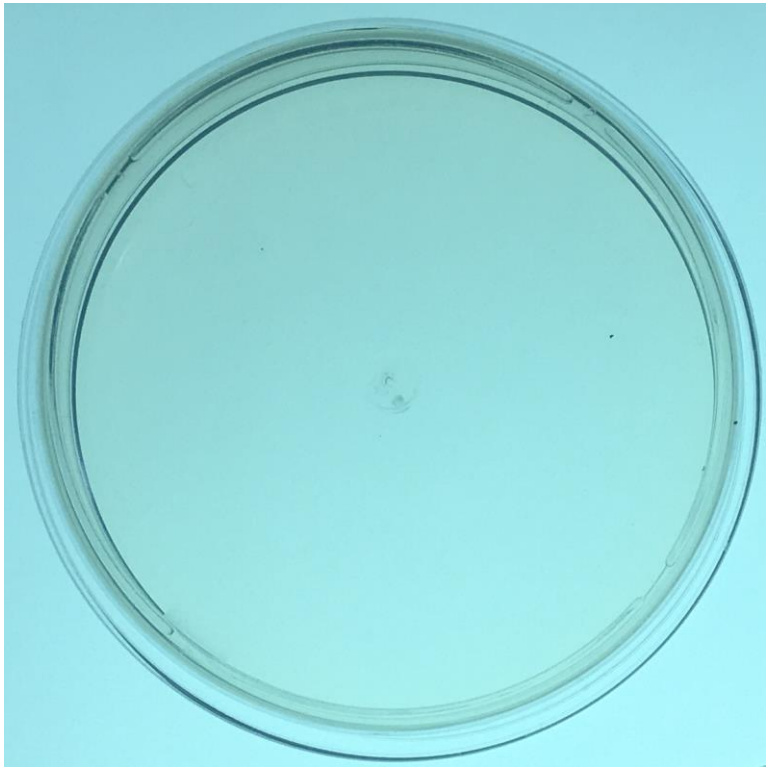
Figura 6.10 Método de plaqueamento utilizado na obtenção de colônias isoladas de bactérias. **(a)** A direção da semeadura está indicada por flechas. A semeadura na região 1 é realizada a partir da mistura original da bactéria. A alça de inoculação deve ser esterilizada entre as fases de inoculação 1, 2 e 3. Nas fases 2 e 3 deve-se retirar com a alça uma pequena região da anterior desta forma diluindo o número de organismos a cada semeadura. Existem diferentes variantes desta metodologia. **(b)** Pode-se observar na fase de isolamento 3 a presença de colônias bacterianas isoladas de dois tipos diferentes.

TIPOS DE MEIOS DE CULTURA – Seletivo x Diferencial

É importante ter clareza que os conceitos de meio seletivo e diferencial estão associados ao planejamento em sua formulação. Ou seja, estes meios não são obtidos ao acaso, são planejados para terem um propriedade adequada para um uso específico.

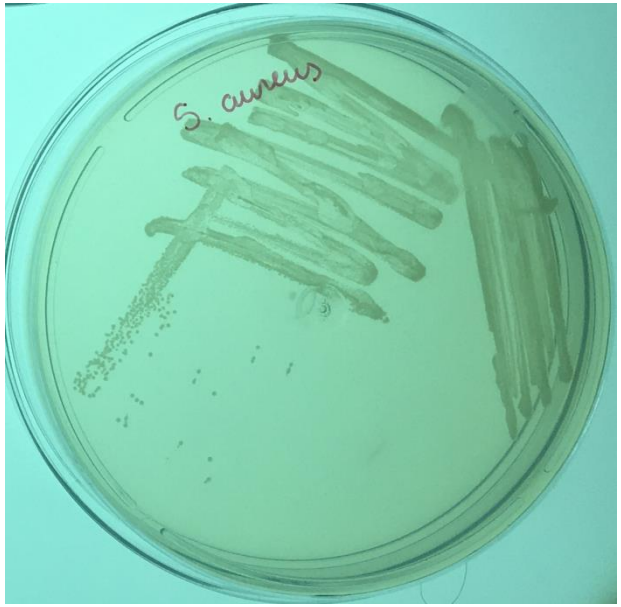
Seletivo: São preparados de forma a favorecer o crescimento do microrganismo de interesse, impedindo o crescimento de outros. Podem ser adicionados agentes que inibem outras bactérias. Podem ser adicionados nutrientes que privilegiam um grupo particular. Podem mesmo não ser adicionado um nutriente ao meio que será suprido por componentes do ar (N_2 – fixadoras de nitrogênio, CO_2 - autotróficas)

Diferencial: O microrganismo de interesse apresenta um crescimento característico nestes meios permitindo sua fácil diferenciação em relação a outros.

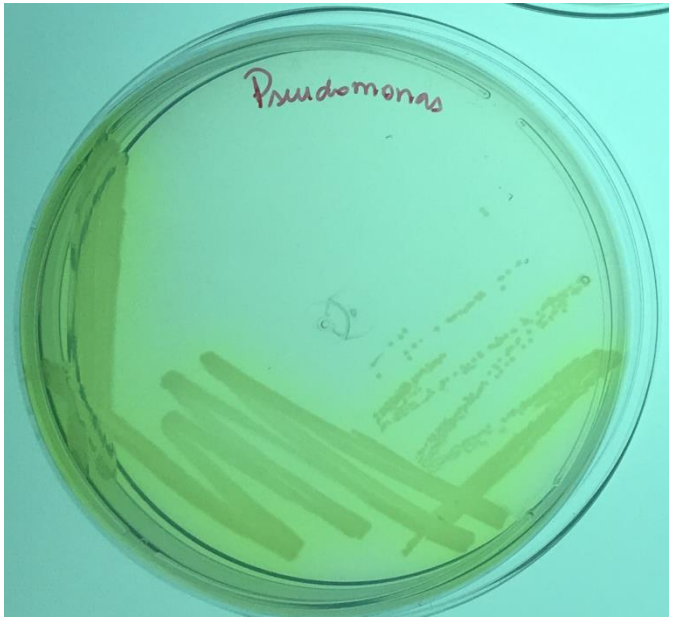


Agar Nutrinte

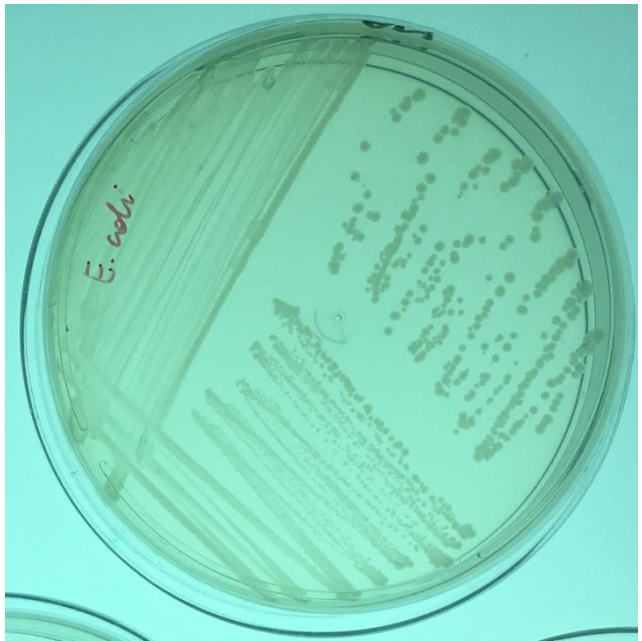
S.aureus



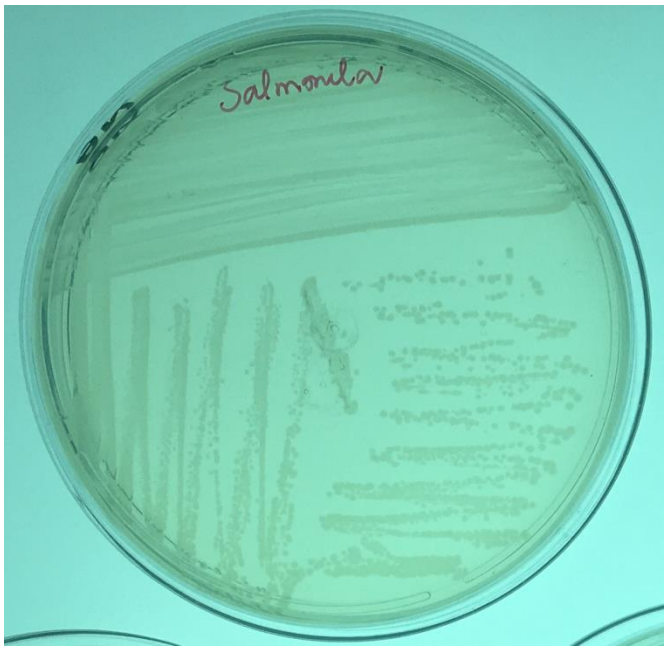
Pseudomonsas



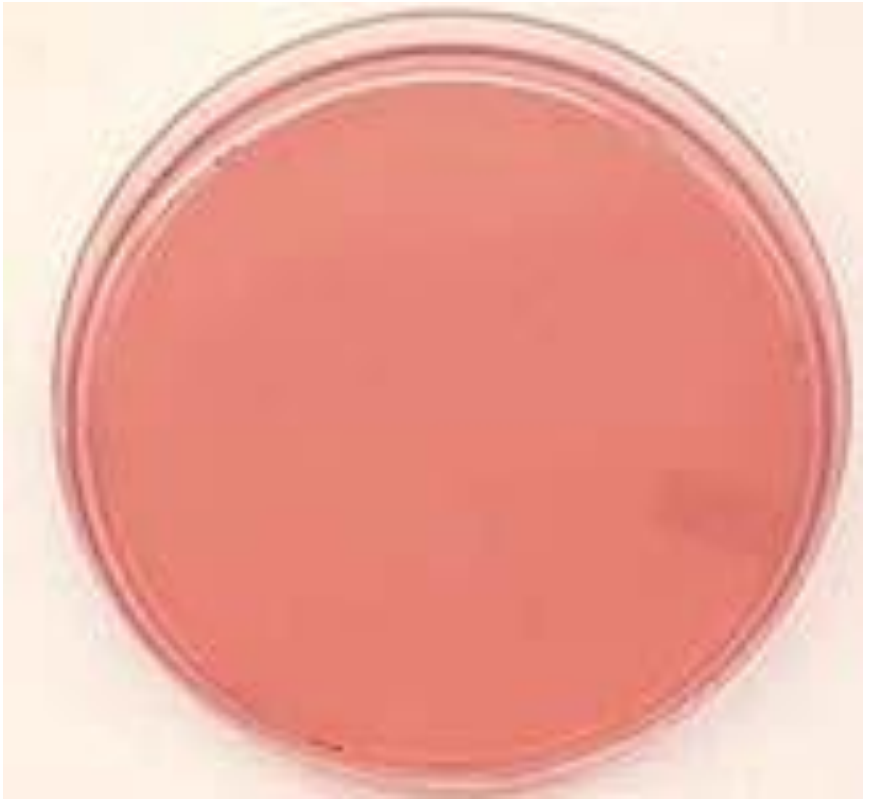
E.coli



Salmonella sp.

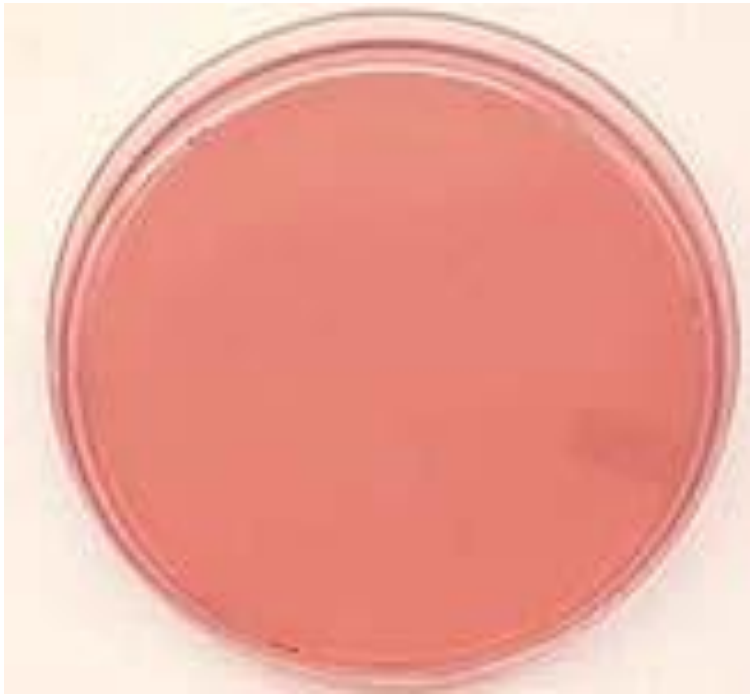


Agar McConkey

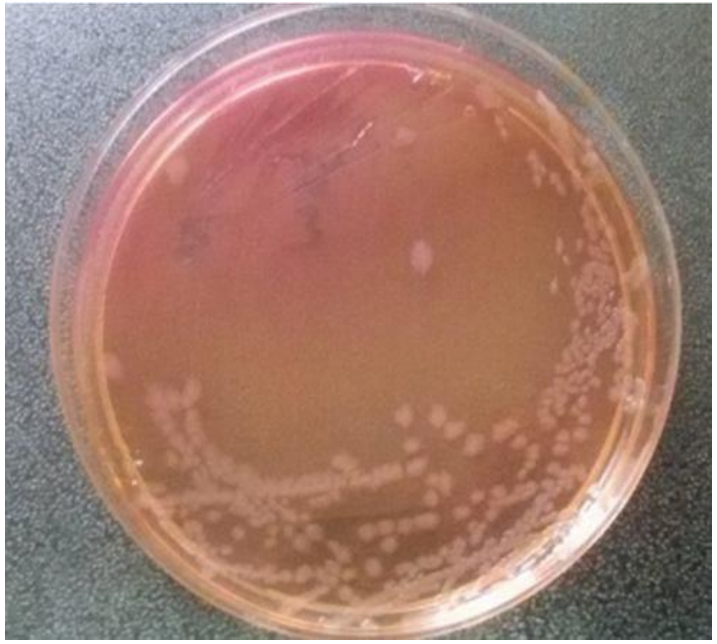


Vermelho Neutro 6,8 – 8,0 Vermelho – amarelo

S.aureus

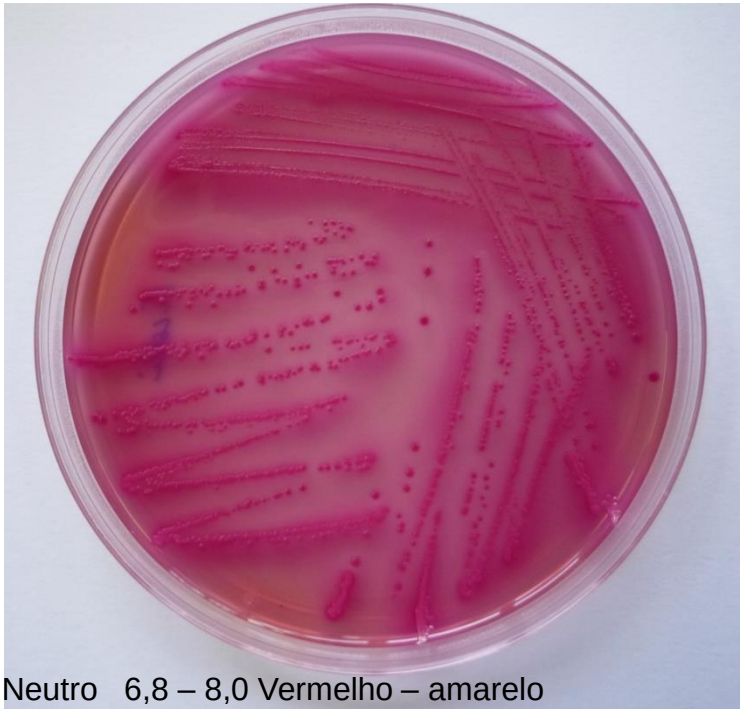


Pseudomonas

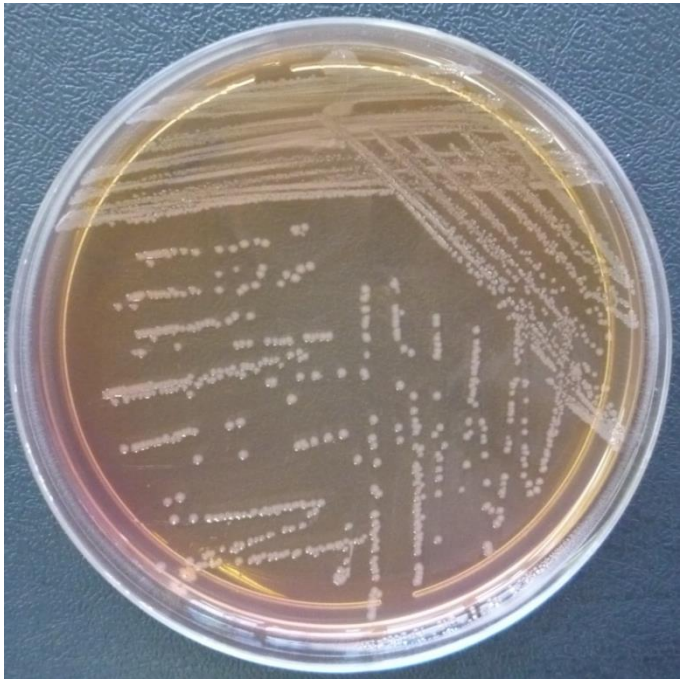


Source: Bhoj Raj Singh
https://www.researchgate.net/profile/Bhoj_Singh

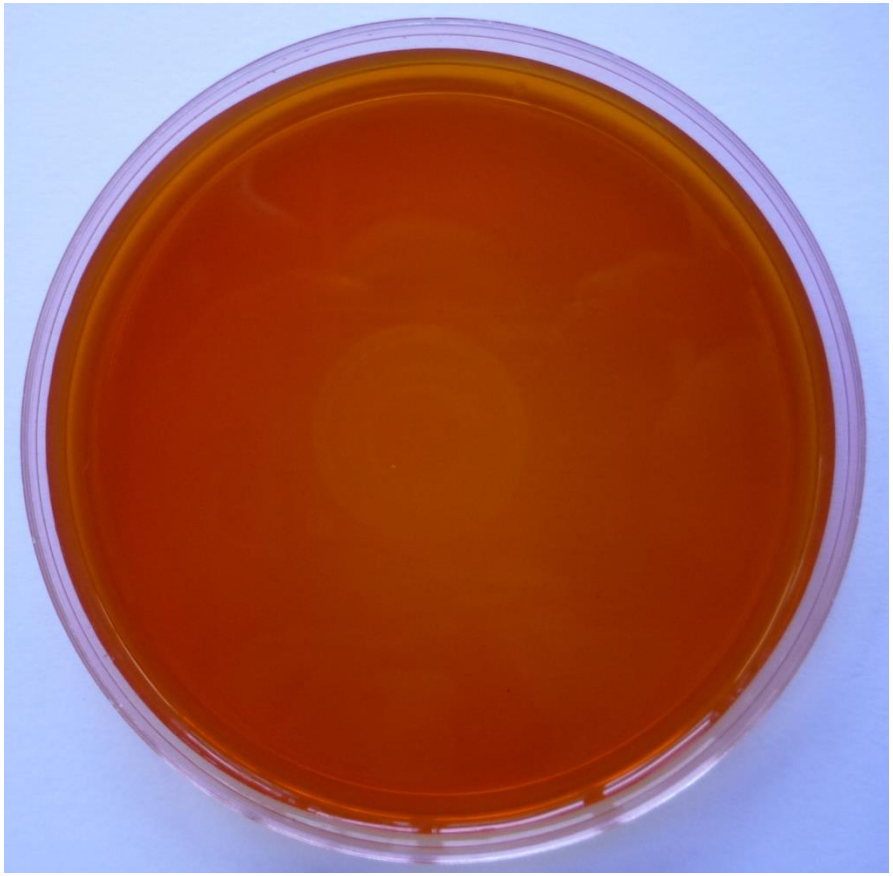
E.coli



Salmonella sp.



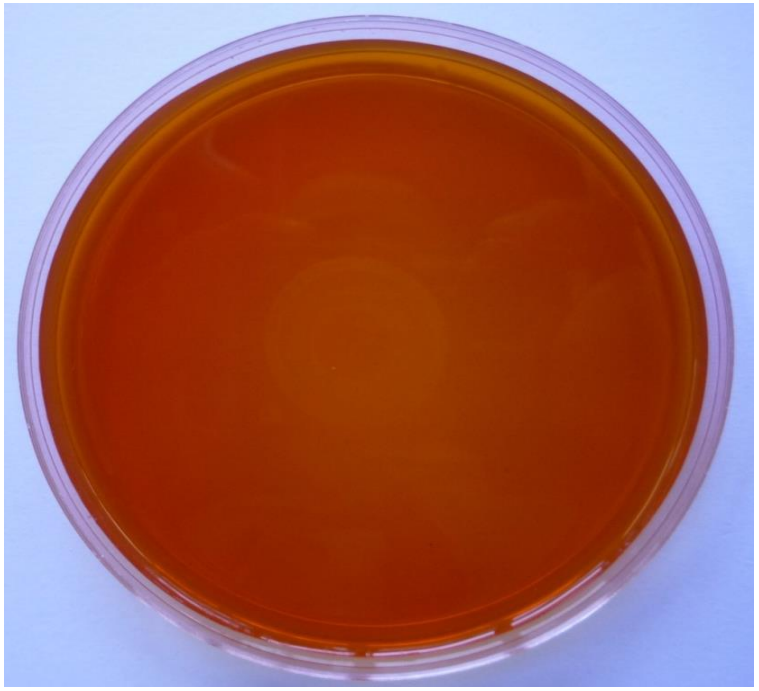
Vermelho Neutro 6,8 – 8,0 Vermelho – amarelo



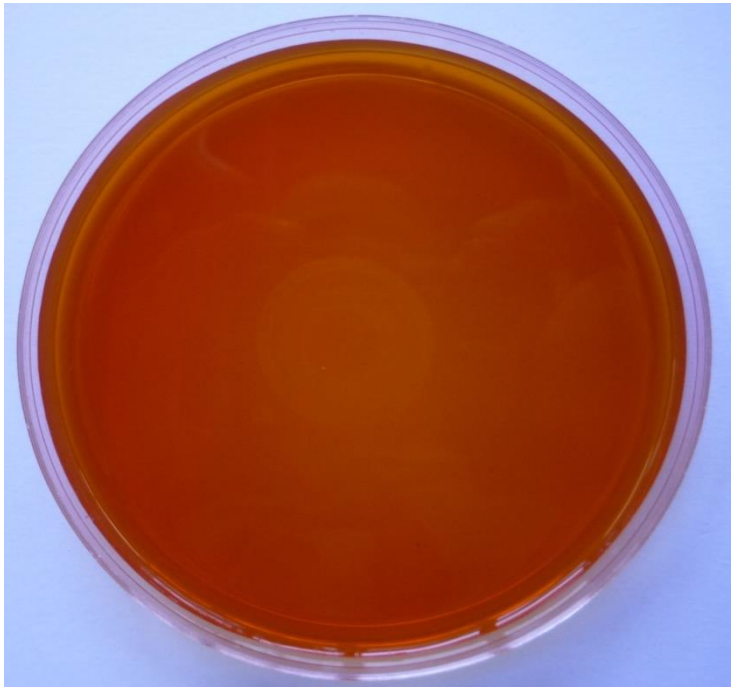
Agar Verde Brilhante

Vermelho de fenol 6,4 – 8,2 Amarelo – vemelho

S.aureus

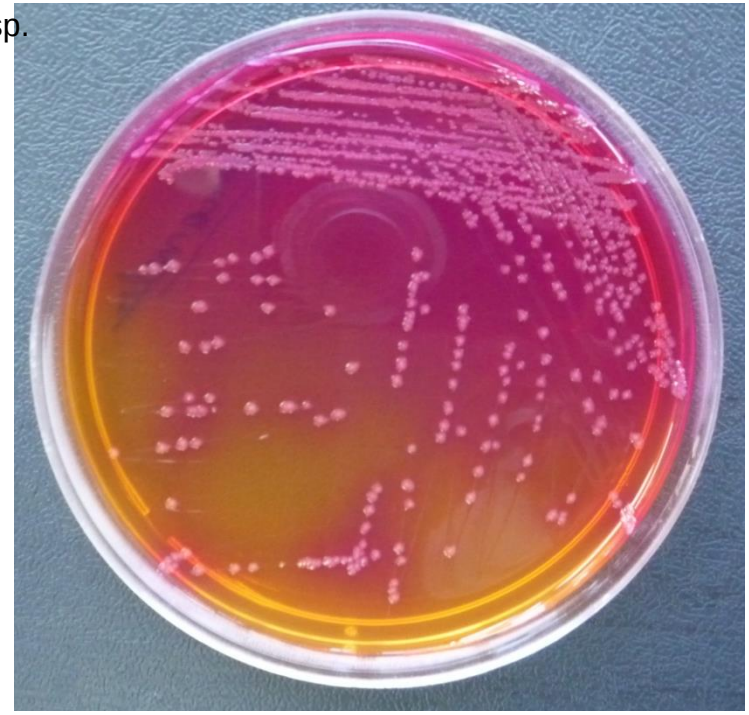


V.cholerae

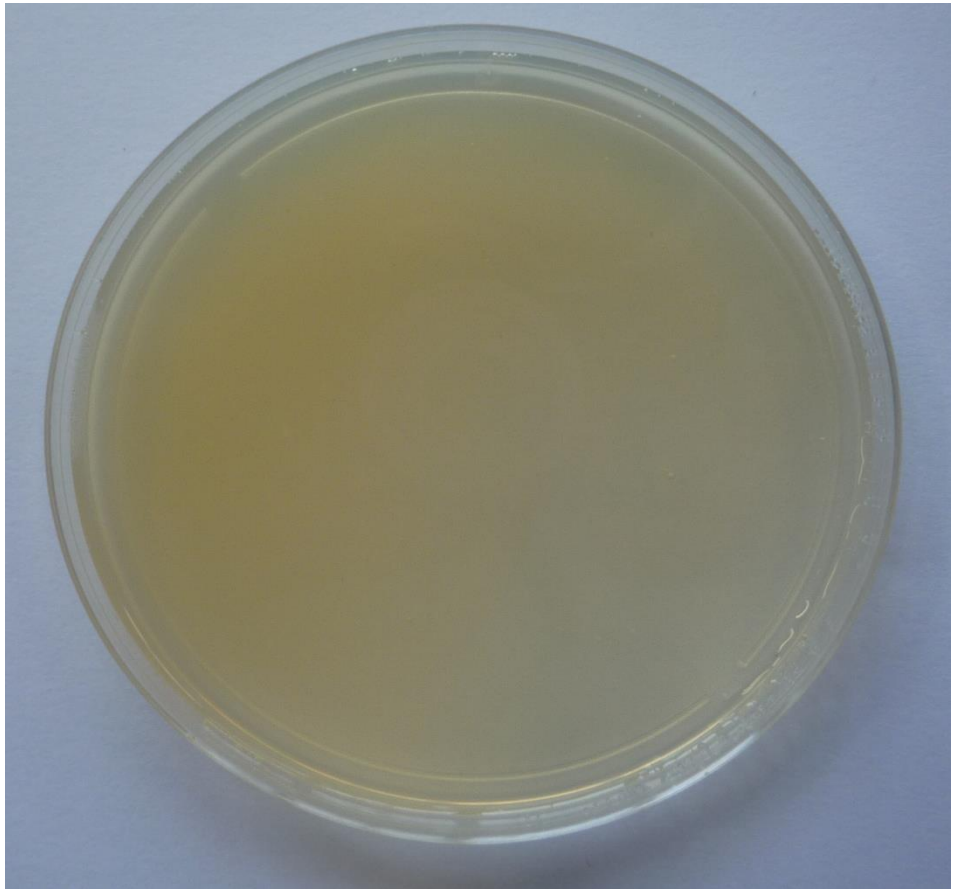


E.coli

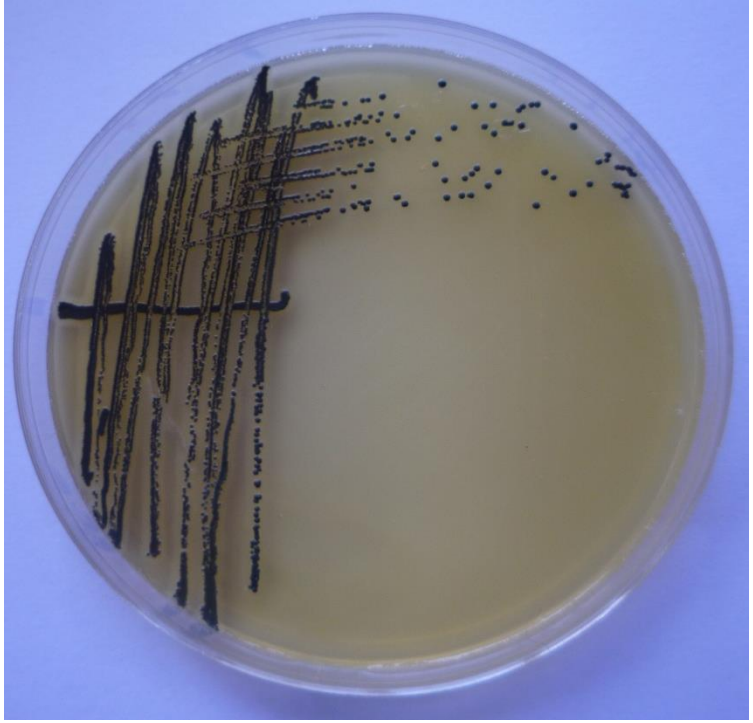
Salmonella sp.



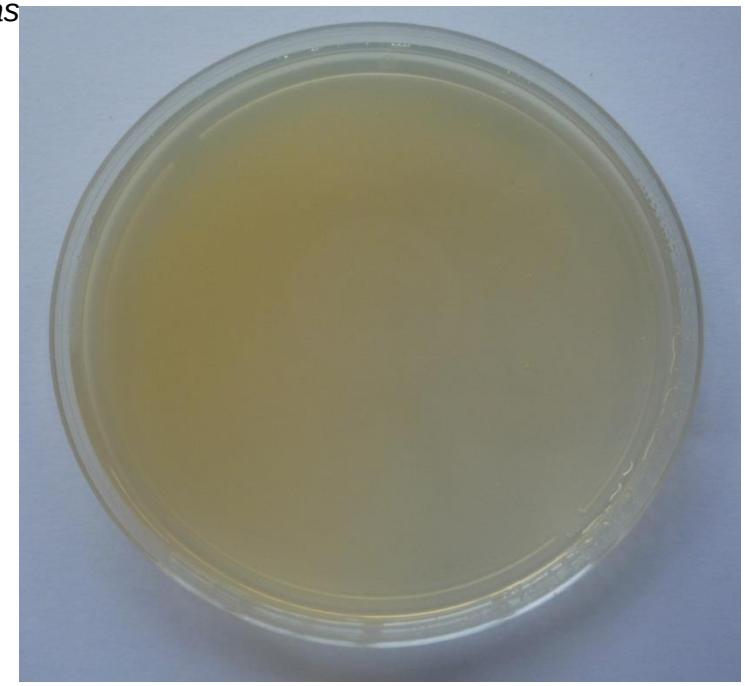
Agar Baird Parker



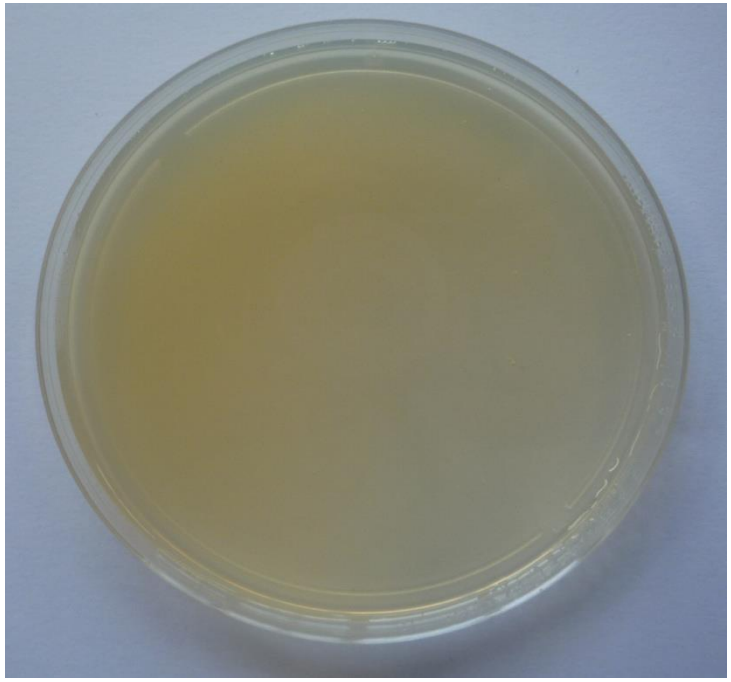
S.aureus



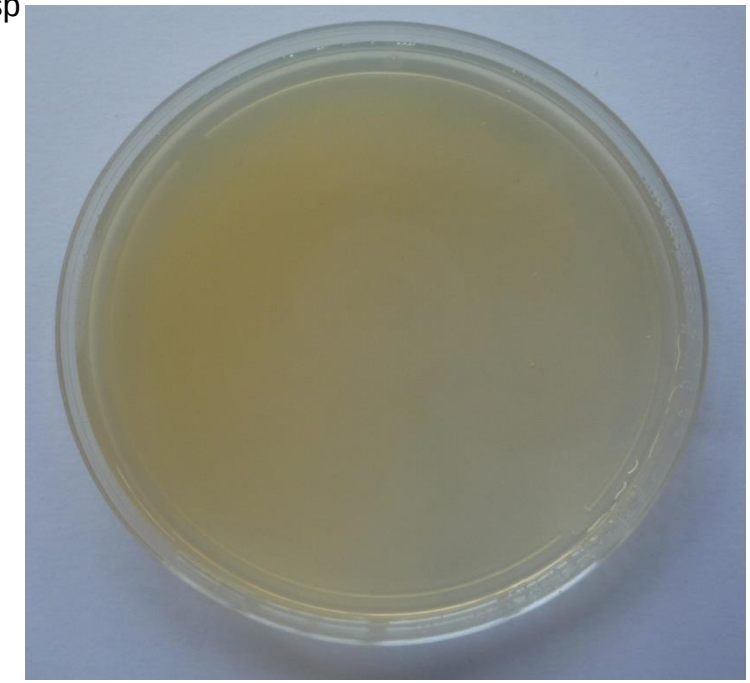
Pseudomonas

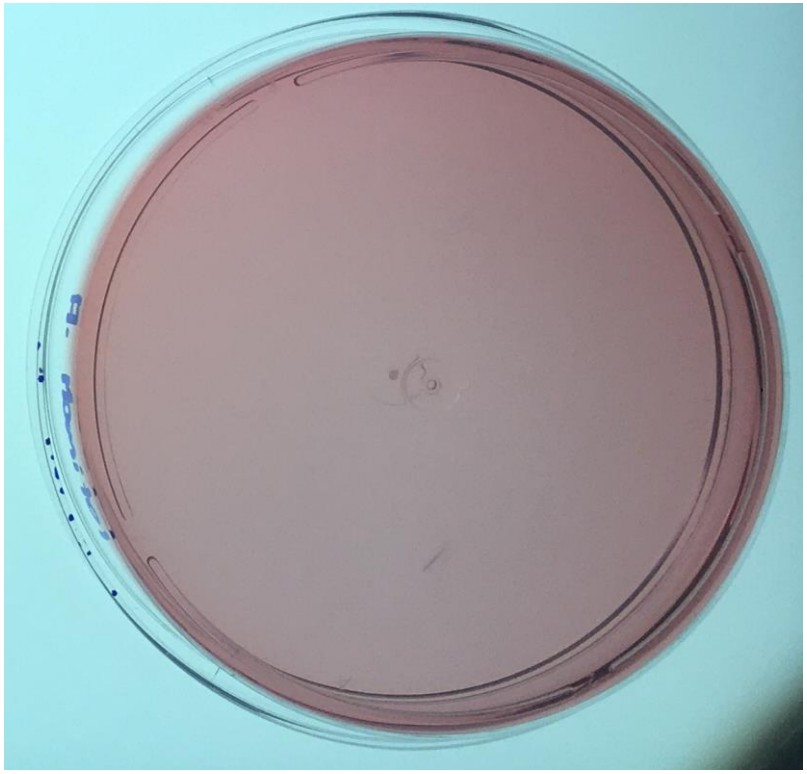


E.coli



Salmonella sp

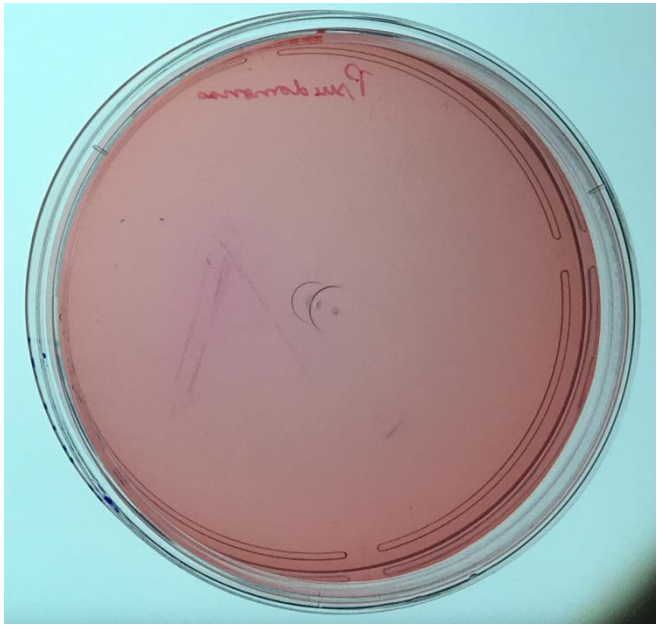




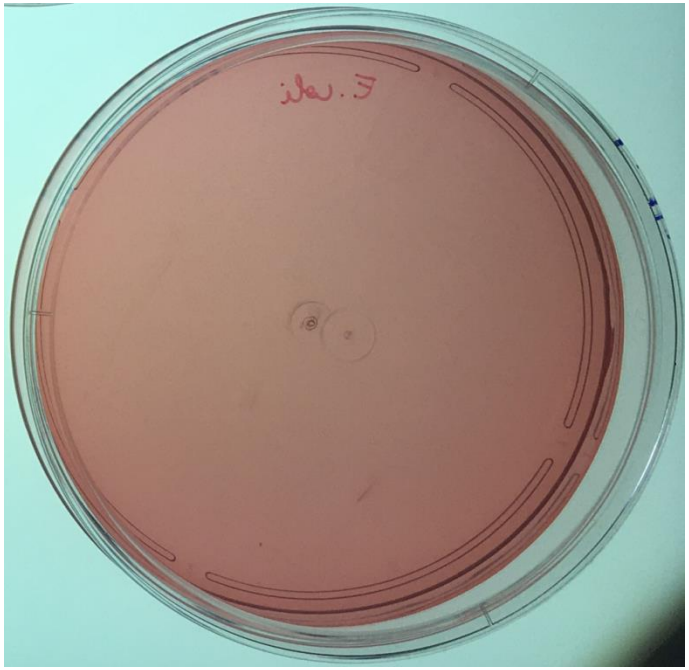
Agar Manitol Salgado

S.aureus

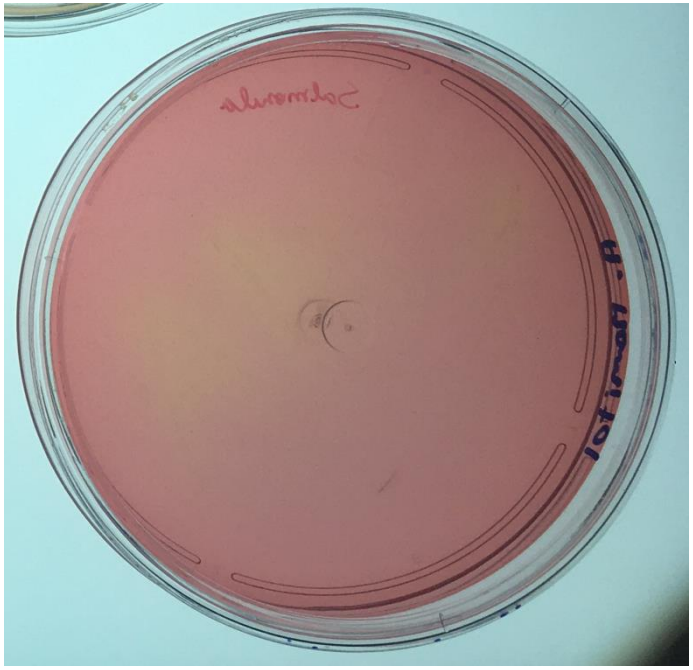
Pseudomonsas

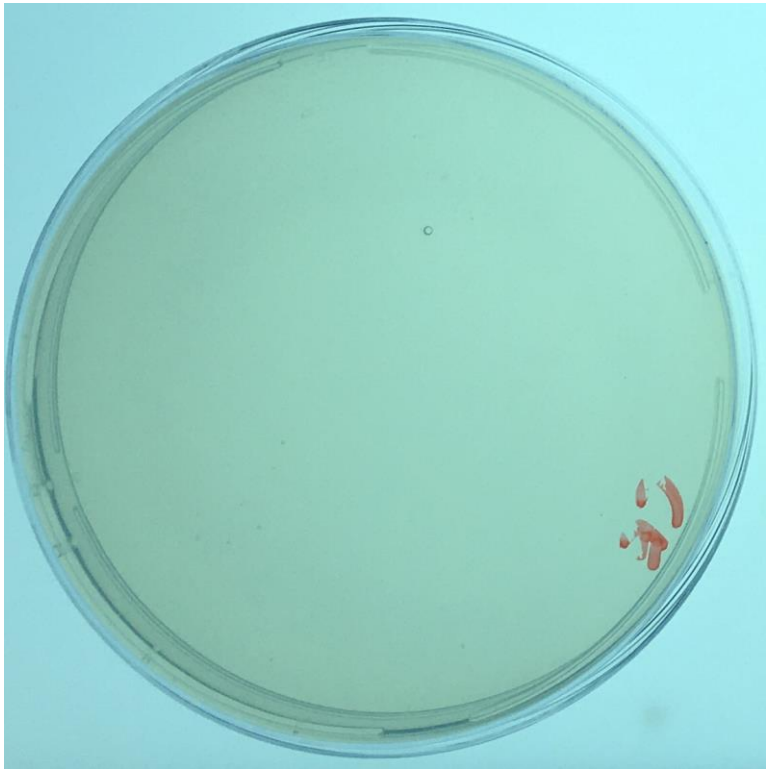


E.coli



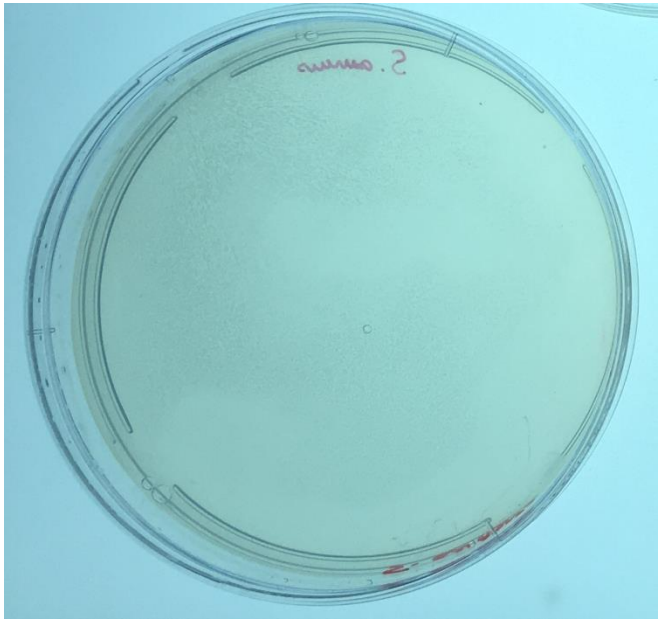
Salmonella sp.



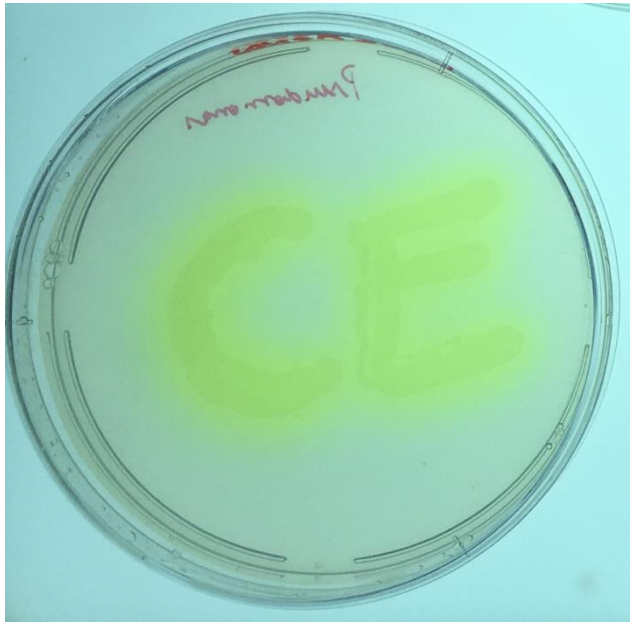


Agar Cetrimide

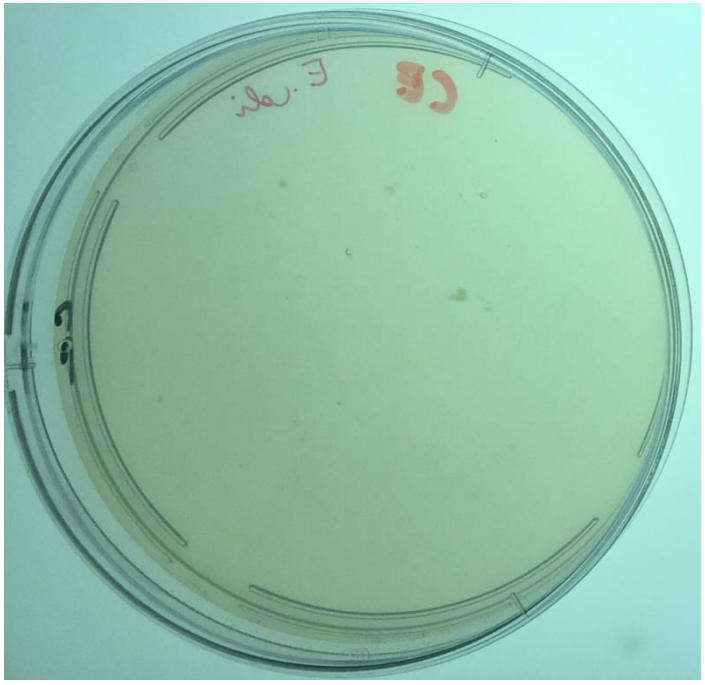
S.aureus



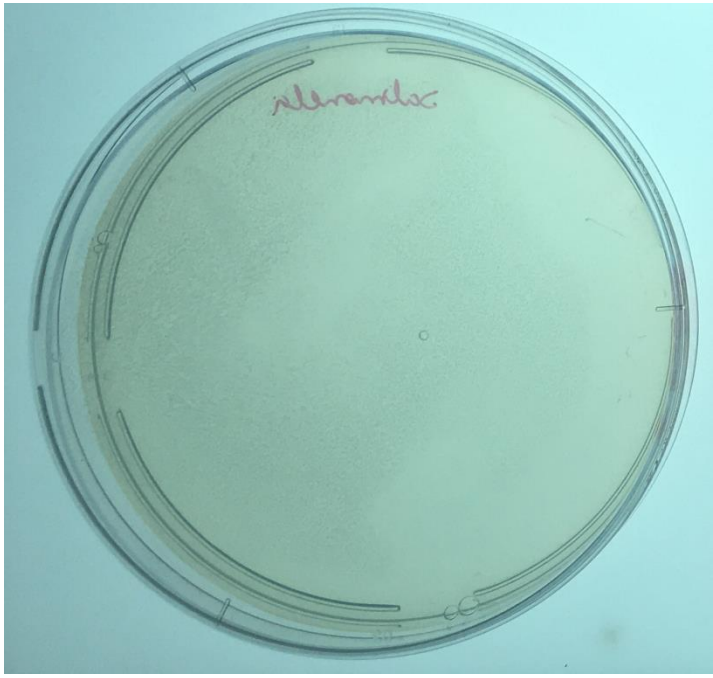
Pseudomonsas



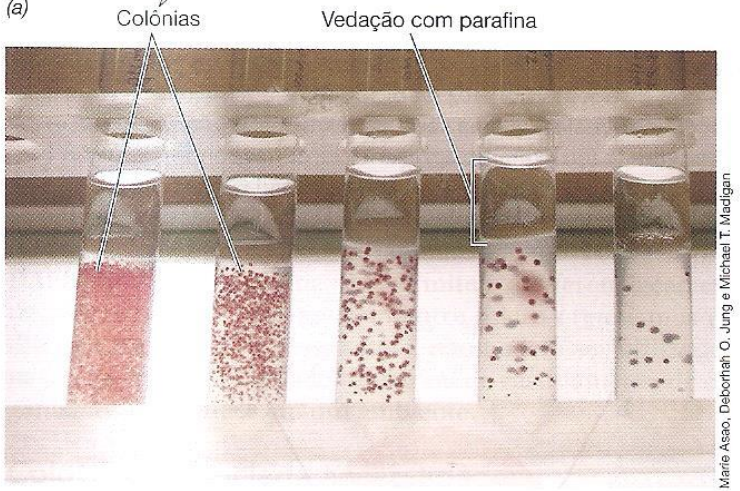
E.coli



Salmonella sp.



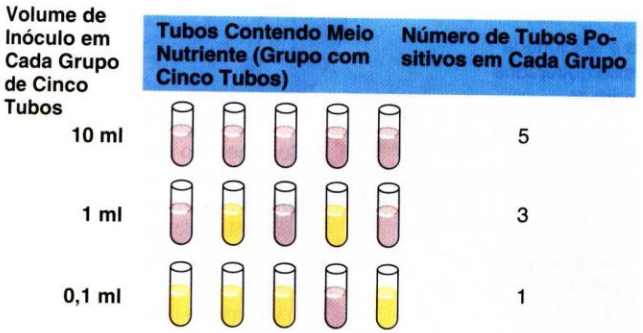
(a)



(b)

Figura 22.3 **Métodos de culturas puras.** (a) Organismos que formam colônias distintas em placas geralmente são de fácil purificação. (b) Colônias de bactérias púrpuras fototróficas, em tubos de diluição em ágar. Da esquerda para a direita, uma série de diluições foi estabelecida, originando colônias isoladas. Os tubos são vedados com uma mistura estéril de parafina e óleo mineral, para manter a anaerobiose.

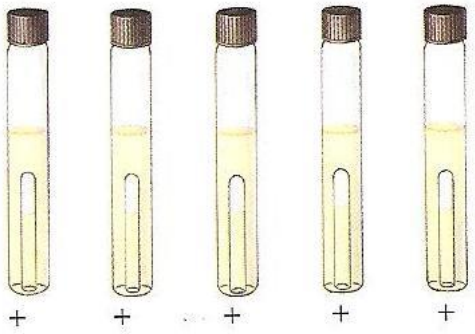
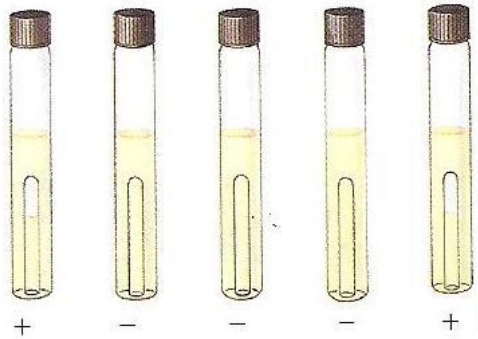
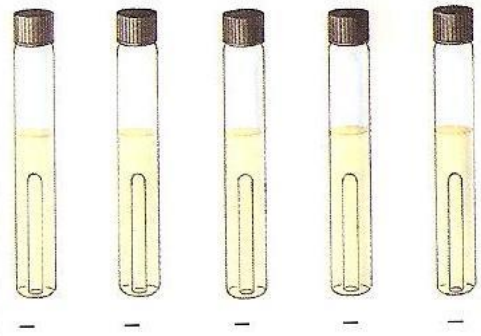
QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO – Número Mais Provável



Combinações de Tubos Positivos	Índice de NMP/100 ml	Limites com 95% de Confiabilidade	
		Inferior	Superior
4-2-0	22	9	56
4-2-1	26	12	65
4-3-0	27	12	67
4-3-1	33	15	77
4-4-0	34	16	80
5-0-0	23	9	86
5-0-1	30	10	110
5-0-2	40	20	140
5-1-0	30	10	120
5-1-1	50	20	150
5-1-2	60	30	180
5-2-0	50	20	170
5-2-1	70	30	210
5-2-2	90	40	250
5-3-0	80	30	250
5-3-1	110	40	300
5-3-2	140	60	360

Figura 6.18 **Método do número mais provável (MNP).** Neste exemplo, são apresentados três grupos de tubos, cada grupo contendo cinco tubos. Cada tubo do primeiro grupo de cinco tubos recebe 10 ml de inóculo, como, por exemplo, uma amostra de água. Cada tubo do segundo grupo de cinco tubos recebe 1 ml de amostra, e do terceiro grupo, 0,1 ml cada. Todos os cinco tubos do primeiro grupo apresentaram crescimento bacteriano, ou seja, resultado positivo, demonstrando a existência de um grande número de bactérias na amostra. No segundo grupo, que recebeu apenas um décimo do inóculo inicial, apenas três tubos apresentaram resultado positivo. No terceiro grupo, que recebeu um centésimo do inóculo inicial, apenas um dos tubos foi positivo. A tabela do MNP nos permite calcular o número estatisticamente provável de bactérias presentes na amostra. O número de tubos positivos é anotado para cada grupo de tubos: na região sombreada do exemplo, os tubos 5, 3 e 1. Se analisarmos esta combinação em uma tabela de MNP, concluiremos que 110% é o índice do MNP, para 100 ml de amostra. Estatisticamente, isso significa que 95% das amostras de água que apresentam esse resultado contêm entre 40-300 bactérias, sendo 110 o número mais freqüente.

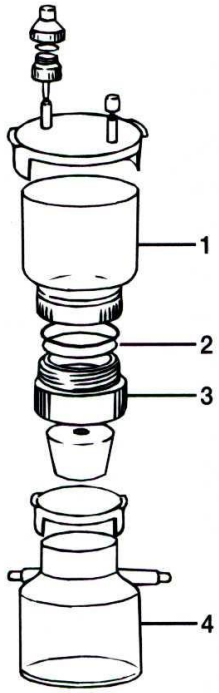
Quando pode ser utilizado o método do número mais provável para a determinação do número de bactérias em uma amostra?

Volume de Diluição Adicionado	Resultados das Culturas	Número de Tubos Positivos
10 ml		5
1 ml		2
0,1 ml		0

➢ **Fig. 6.10 Teste do número mais provável (NMP).** Os tubos nos quais bolhas de gás são visíveis (marcados com +) contêm organismos.

QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO – Membrana Filtrante

Figure 6.6 A Millipore Membrane Filter System. (*a*) Parts of the filter assembly. Some of the more important components are the following: (1) funnel, (2) membrane filter, (3) filter holder base and support, and (4) receiver flask. (*b*) A complete filtering system. The sample is poured into the funnel and sucked through a membrane filter with the use of vacuum.



(a)

(b)

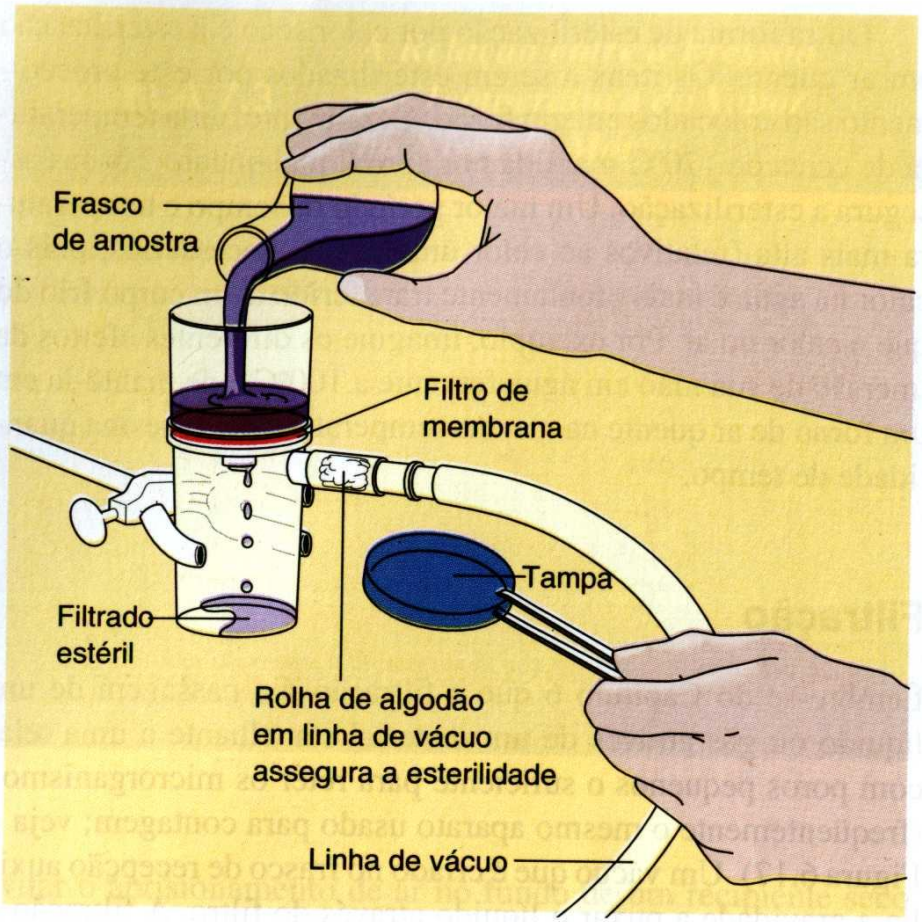


Figura 7.3 Esterilização com filtro, com uma unidade plástica descartável, pré-esterilizada. A amostra é colocada na câmara superior e forçada através do filtro de membrana pelo vácuo, na câmara inferior. Os poros no filtro de membrana são menores que as bactérias, e assim, as bactérias são retidas no filtro. A amostra esterilizada pode então ser decantada da câmara inferior. Um equipamento similar com discos de filtro removíveis é usado para contar as bactérias em amostras (veja a Figura 6.17).

Existem filtros com poros pequenos o suficiente para reter vírus.

QUANTIFICAÇÃO DO CRESCIMENTO – Membrana Filtrante

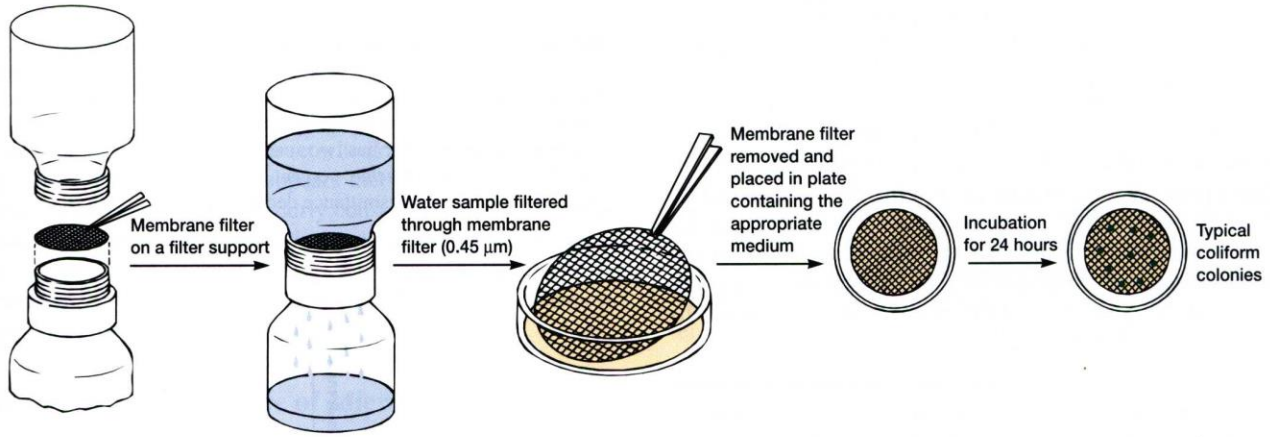


Figure 6.7 **The Membrane Filtration Procedure.**

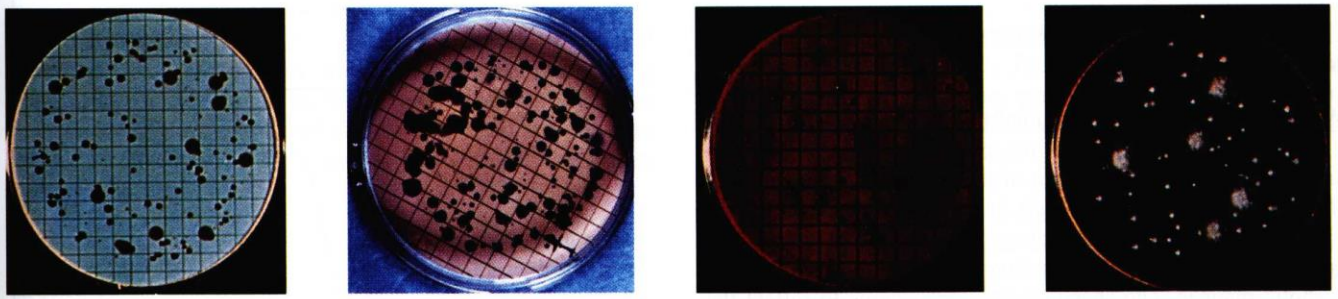


Figure 6.8 **Colonies on Membrane Filters.** Membrane-filtered samples grown on a variety of media. (*a*) Standard nutrient media for a total bacterial count. An indicator colors colonies red for easy counting. (*b*) Fecal coliform medium for detecting fecal coliforms that form blue colonies. (*c*) m-Endo agar for detecting *E. coli* and other coliforms that produce colonies with a green sheen. (*d*) Wort agar for the culture of yeasts and molds.

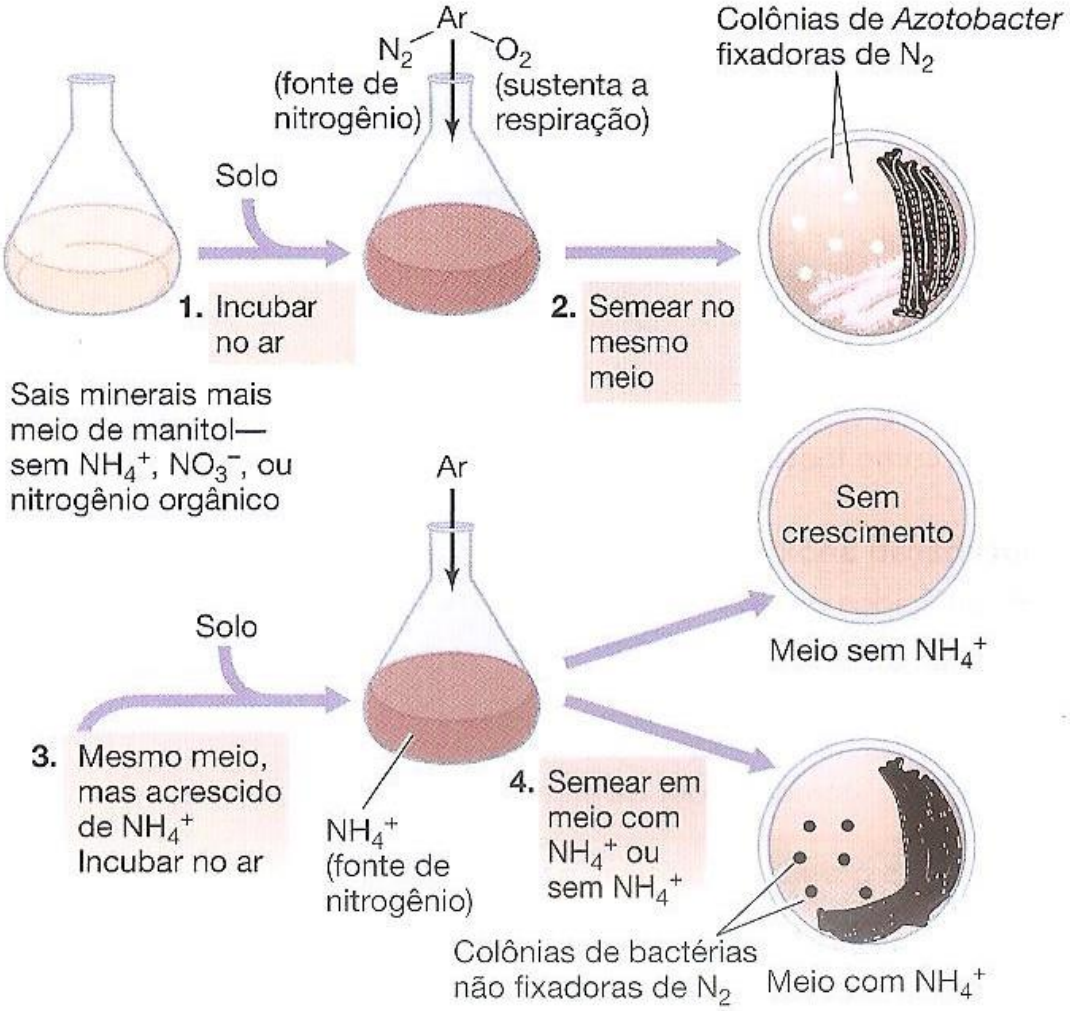


Figura 22.1 **O isolamento de *Azotobacter*.** A seleção de bactérias aeróbias fixadoras de N_2 geralmente resulta no isolamento de *Azotobacter* ou relacionados. Contrariamente, o enriquecimento com formas fixadas de nitrogênio, tais como NH_4^+, raramente resulta em bactérias fixadoras de N_2, porque a pressão seletiva pela fixação de nitrogênio é perdida. Ver na Seção 1.9 e Figura 1.17 informações sobre a importância histórica da bactéria *Azotobacter*.

Tabela 22.1 Alguns métodos de cultura de enriquecimento de bactérias fototróficas e quimiolitotróficas

Bactérias fototróficas de luz: principal fonte de C, CO_2

Incubação no ar	*Organismos enriquecidos*	*Inóculo*
N_2 como fonte de nitrogênio	Cianobactérias	Água de lago ou lagoa; lodos ricos em sulfeto; água estagnada; esgoto bruto; matéria úmida de folhas em decomposição; solo úmido exposto à luz
NO_3^- como fonte de nitrogênio, 55°C	Cianobactérias termofílicas	Camadas microbianas de fontes termais
Incubação anóxica		
H_2 ou ácidos orgânicos; N_2 como única fonte de nitrogênio	Bactérias púrpuras não sulfurosas, heliobactérias	Idem ao item anterior mais água de lagos hipolimnéticos; solo pasteurizado (heliobactérias); massas microbianas para espécies termofílicas
H_2S como doador de elétrons	Bactérias púrpuras e verdes sulfurosas	
Fe^{2+}, NO_2^- como doador de elétrons	Bactérias púrpuras	

Bactérias quimiolitotróficas na ausência de luz: CO_2 como principal fonte de C (o meio deve ser desprovido de C orgânico)

Incubação no ar: respiração aeróbia

Doador de elétrons	*Aceptor de elétrons*	*Organismos enriquecidos*	*Inóculo*
NH_4^+	O_2	Bactérias oxidantes de amônia (*Nitrosomonas*)	Solo, lodo; efluente de esgoto
NO_2^-	O_2	Bactérias oxidantes de nitrito (*Nitrobacter*, *Nitrospira*)	
H_2	O_2	Bactérias do hidrogênio (vários gêneros)	
H_2S, S^0, $S_2O_3^{2-}$	O_2	*Thiobacillus* spp.	
Fe^{2+}, pH baixo	O_2	*Acidithiobacillus ferrooxidans*	
Incubação anóxica			**Inóculo**
S^0, $S_2O_3^{2-}$	NO_3^-	*Thiobacillus denitrificans*	Lodo, sedimentos de lagos, solo
H_2	NO_3^- + extrato de levedura	*Paracoccus denitrificans*	

Tabela 22.2 Alguns métodos de cultura de enriquecimento para bactérias quimiorganotróficas e anaeróbias estritas[a]

Bactérias quimiorganotróficas na ausência de luz

Incubação no ar: respiração aeróbia

Doador de elétrons e fonte de nitrogênio	*Aceptor de elétrons*	*Típicos organismos enriquecidos*	*Inóculo*
Lactato + NH_4^+	O_2	*Pseudomonas fluorescens*	Solo, lodo; sedimentos de lagos; vegetação em decomposição; pasteurizar o inóculo (80°C por 15 *min*) para o enriquecimento de todos *Bacillus*
Benzoato + NH_4^+	O_2	*Pseudomonas fluorescens*	
Amido + NH_4^+	O_2	*Bacillus polymyxa*, outros *Bacillus* spp.	
Etanol (4%) + 1% de extrato de levedura, pH 6,0	O_2	*Acetobacter, Gluconobacter*	
Ureia (5%) + 1% de extrato de levedura	O_2	*Sporosarcina ureae*	
Hidrocarbonetos (p. ex., óleo mineral, gasolina, tolueno) + NH_4^+	O_2	*Mycobacterium, Nocardia, Pseudomonas* (∞ Figura 24.19)	
Celulose + NH_4^+	O_2	*Cytophaga, Sporocytophaga* (∞ Figura 16.36)	
Manitol ou benzoato, N_2 como fonte de N	O_2	*Azotobacter*	

Incubação anóxica: respiração anaeróbia

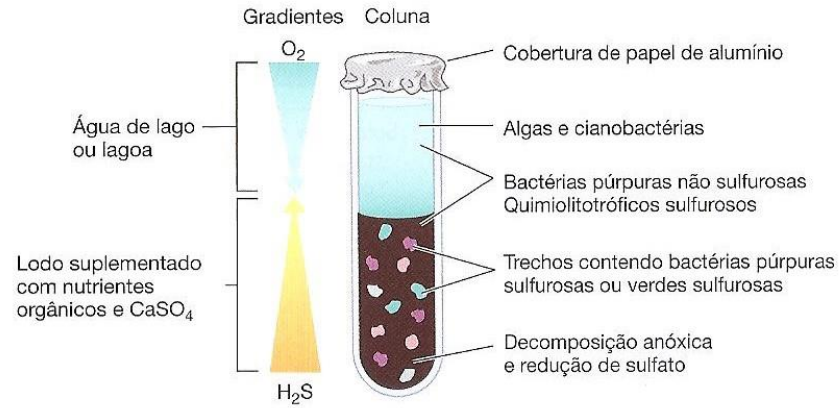
Doador de elétrons	*Aceptor de elétrons*	*Organismos enriquecidos*	*Inóculo*
Ácidos orgânicos	KNO_3	*Pseudomonas* (espécies denitrificantes)	Solo, lodo; sedimentos de lagos
Extrato de levedura	KNO_3	*Bacillus* (espécies denitrificantes)	
Ácidos orgânicos	Na_2SO_4	*Desulfovibrio, Desulfotomaculum*	
Acetato, propionato, butirato	Na_2SO_4	Oxidantes de ácidos graxos e redutores de sulfato	Como acima; ou digestor de lodo de esgoto; *conteúdo do rúmen; sedimentos marinhos*
Acetato, etanol	S^0	Desulfuromonas	
Acetato	Fe^{3+}	*Geobacter, Geospirillum*	
Acetato	ClO_3^-	Várias bactérias redutoras de clorato	
H_2	Na_2CO_3	Metanogênicos (apenas espécies quimiolitotróficas), homoacetogênicos	Lodo, sedimentos, lodo de esgoto
CH_3OH	Na_2CO_3	*Methanosarcina barkeri*	
CH_3NH_2 ou CH_3OH	KNO_3	*Hyphomicrobium*	
Hidrocarbonetos	Na_2SO_4 ou KNO_3	Bactérias anóxicas degradadoras de	Água doce ou sedimentos marinhos

Extrato de levedura	KNO_3	*Bacillus* (espécies denitrificantes)	
Ácidos orgânicos	Na_2SO_4	*Desulfovibrio, Desulfotomaculum*	
Acetato, propionato, butirato	Na_2SO_4	Oxidantes de ácidos graxos e redutores de sulfato	Como acima; ou digestor de lodo de esgoto; *conteúdo do rúmen; sedimentos marinhos*
Acetato, etanol	S^0	Desulfuromonas	
Acetato	Fe^{3+}	*Geobacter, Geospirillum*	
Acetato	ClO_3^-	Várias bactérias redutoras de clorato	
H_2	Na_2CO_3	Metanogênicos (apenas espécies quimiolitotróficas), homoacetogênicos	Lodo, sedimentos, lodo de esgoto
CH_3OH	Na_2CO_3	*Methanosarcina barkeri*	
CH_3NH_2 ou CH_3OH	KNO_3	*Hyphomicrobium*	
Hidrocarbonetos	Na_2SO_4 ou KNO_3	Bactérias anóxicas degradadoras de hidrocarbonetos	Água doce ou sedimentos marinhos

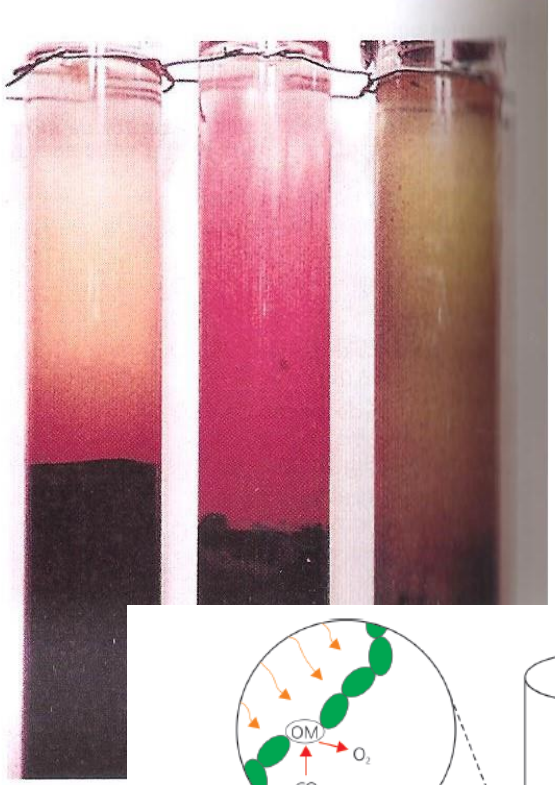
Incubação anóxica: fermentação

Doador de elétrons e fonte de nitrogênio	***Aceptor de elétrons***	***Organismos enriquecidos***	***Inóculo***
Glutamato ou histidina	Nenhum aceptor de elétrons exógeno acrescentado	*Clostridium tetanomorphum* ou outras espécies proteolíticas de *Clostridium*	Lodo, sedimentos de lagos; matéria vegetal ou animal em decomposição; laticínios (bactérias lácticas e propiônicas); conteúdo de rúmen ou intestinal (bactérias entéricas); lodo de esgoto; solo; pasteurizar o inóculo para enriquecimentos de *Clostridium*
Amido + NH_4^+	Nenhum	*Clostridium* spp.	
Amido + N_2 como fonte de N	Nenhum	*Clostridium pasteurianum*	
Lactato + extrato de levedura	Nenhum	*Veillonella* spp.	
Glicose ou lactose + NH_4^+	Nenhum	*Escherichia, Enterobacter*, outros organismos fermentativos	
Glicose + extrato de levedura (pH 5)	Nenhum	Bactérias lácticas (*Lactobacillus*)	
Lactato + extrato de levedura	Nenhum	Bactérias propiônicas	
Succinato + NaCl	Nenhum	*Propionigenium*	
Oxalato	Nenhum	*Oxalobacter*	

Todos os meios devem conter um sortimento de sais minerais, incluindo N, P, S, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Ca^{2+}, e outros elementos traço (∞ Seções 5.1-5.3). Determinados organismos podem requerer vitaminas ou outros fatores de crescimento. Esta tabela visa oferecer uma visão geral de métodos de enriquecimento e não menciona o efeito que a temperatura de incubação pode causar no isolamento de espécies termofílicas (alta temperatura), hipertermofílicas (temperatura muito alta) e psicrofílicas (baixa temperatura), ou o efeito que o pH ou a salinidade extremos podem exercer, presumindo-se ter havido disponibilidade de um inóculo apropriado.



(a)



(b)

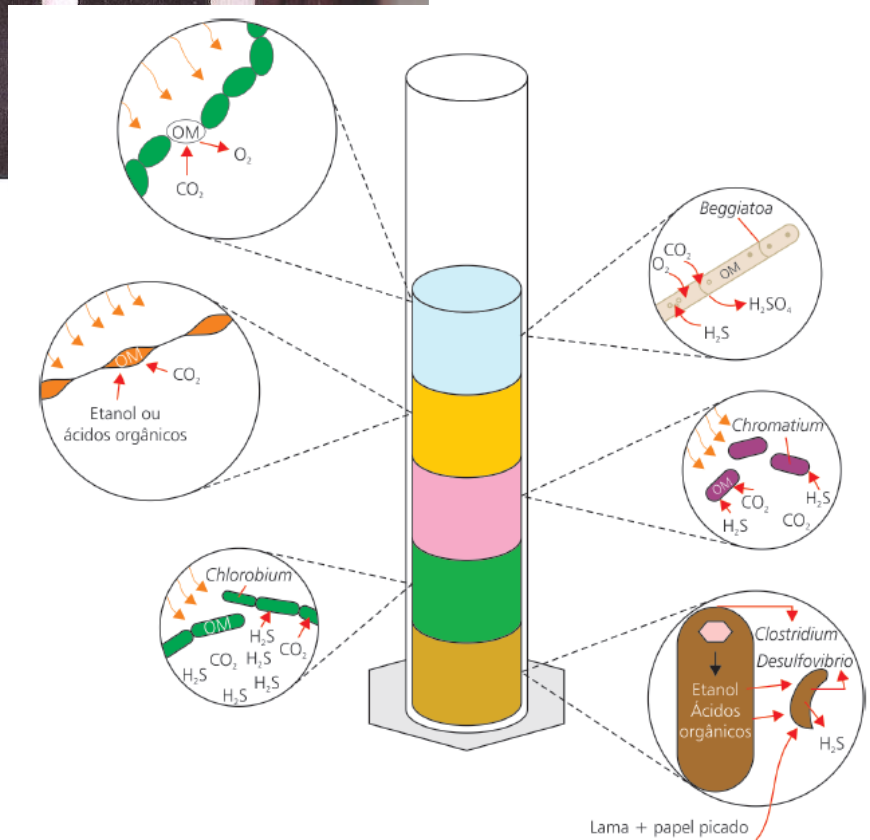
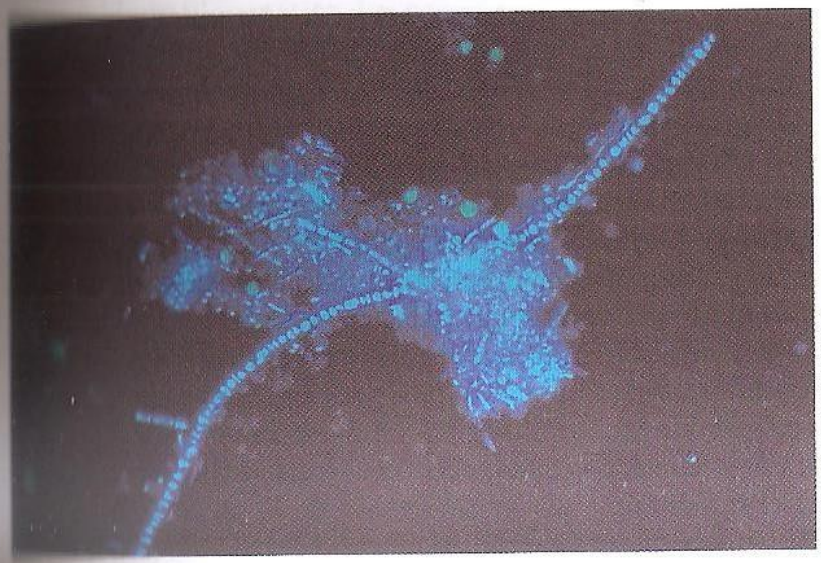


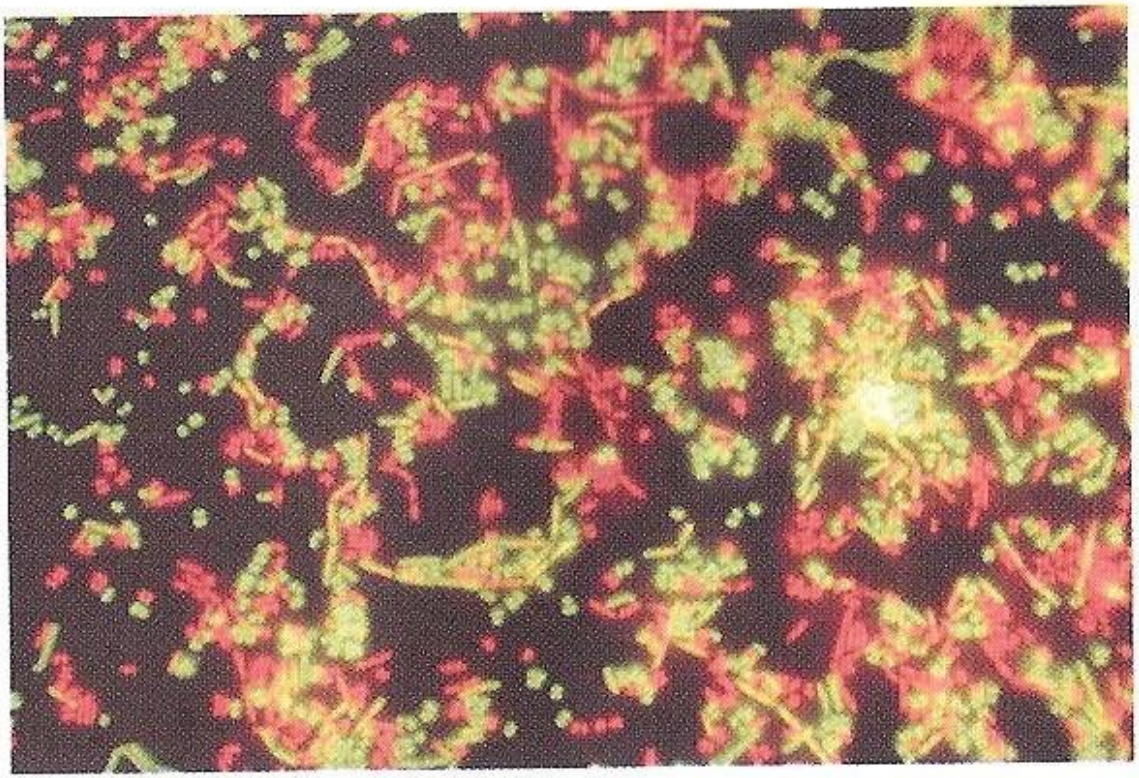
Figura 22.2 **A coluna de Winogradsky.** (a) Visão esquemática de uma coluna típica. A coluna é incubada de modo a receber luz solar de baixa intensidade. Bactérias quimiorganotróficas crescem ao longo de toda a coluna, as aeróbias e microaerófilas nas regiões superiores, as anaeróbias nas zonas contendo H_2S. A decomposição anóxica, levando à redução de sulfato, gera um gradiente de H_2S. Bactérias verdes e púrpuras sulfurosas estratificam-se conforme sua tolerância ao H_2S. (b) Foto de colunas de Winogradsky que permaneceram anóxicas até o topo; cada coluna apresentou florescimento de uma bactéria fototrófica diferente. Da esquerda para a direita: *Thiospirillum jenense, Chromatium okenii* (ambas bactérias púrpuras sulfurosas) e *Chlorobium limicola* (bactérias verdes sulfurosas).



Marc Mussman e Michael Wagner

Marc Mussman e Michael Wagner

Figura 22.6 Corantes fluorescentes não específicos. (a) DAPI e (b) laranja de acridina. Ambas as fotomicrografias revelam comunidades microbianas presentes no lodo ativado de uma estação municipal de tratamento de água de rejeitos. Com laranja de acridina, as células contendo baixas concentrações de RNA coram-se em verde.



Molecular Probes, Inc., Eugene, OR

Figura 22.7 **Coloração associada à viabilidade.** Células vivas (verdes) e mortas (vermelhas) de *Micrococcus luteus* (cocos) e *Bacillus cereus* (bacilos) coradas com o corante associado à viabilidade bacteriana LIVE/DEAD BacLight™.

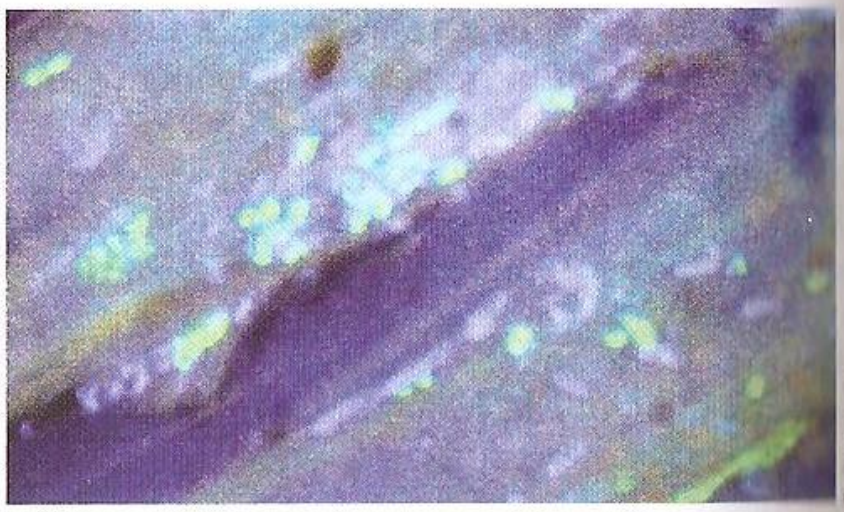
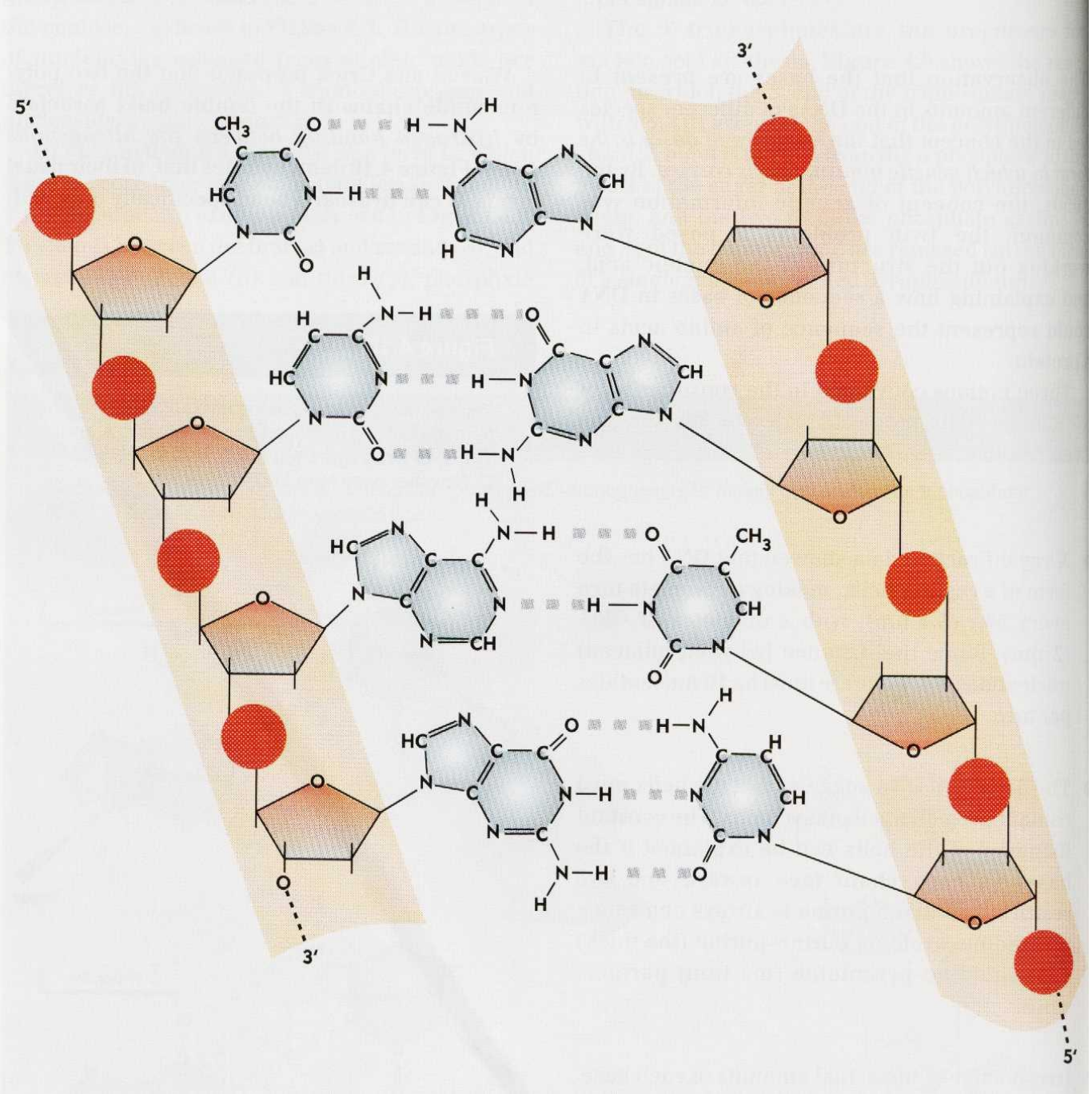


Figura 22.9 **A proteína verde fluorescente.** Células de *Pseudomonas fluorescens* modificadas por engenharia genética, expressando a proteína verde fluorescente e observadas por microscopia laser confocal. As células estão aderidas às raízes da cevada e fluorescem em verde. As células coradas em azul são componentes da microbiota normal das raízes da cevada e foram coradas com o corante DAPI (Figura 22.6a).

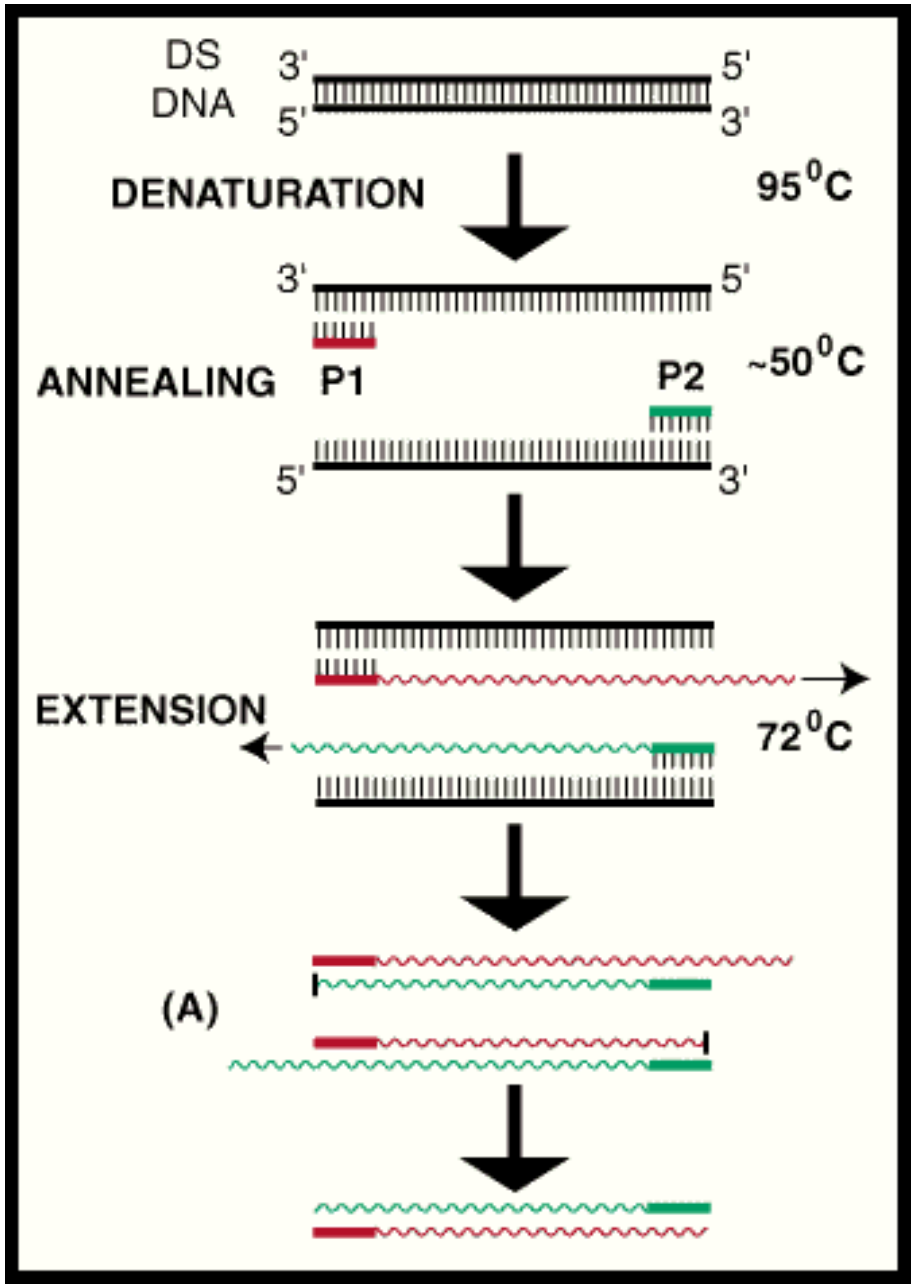
A dupla hélice possui uma largura constante pois as bases sempre se complementam

T-A

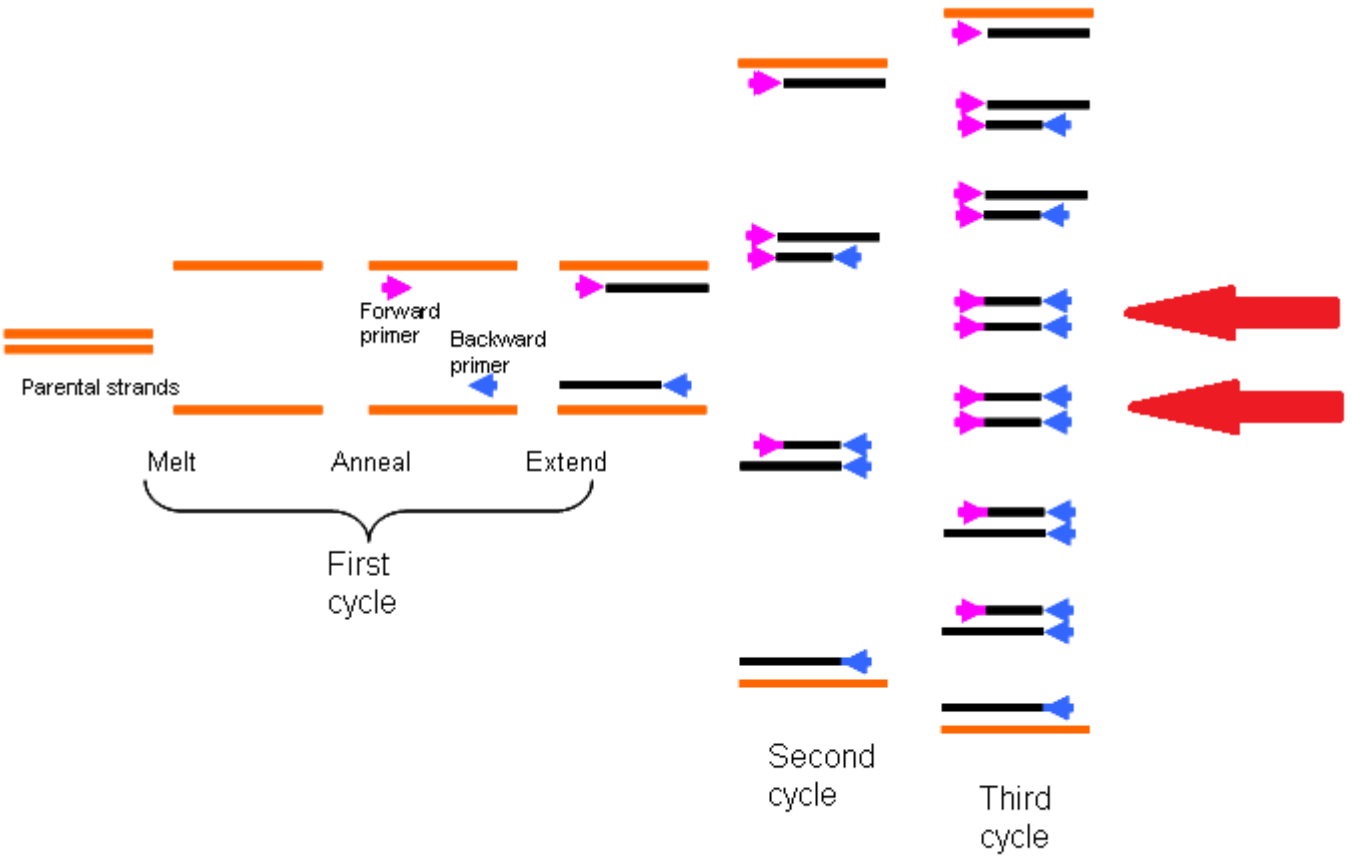
C-G



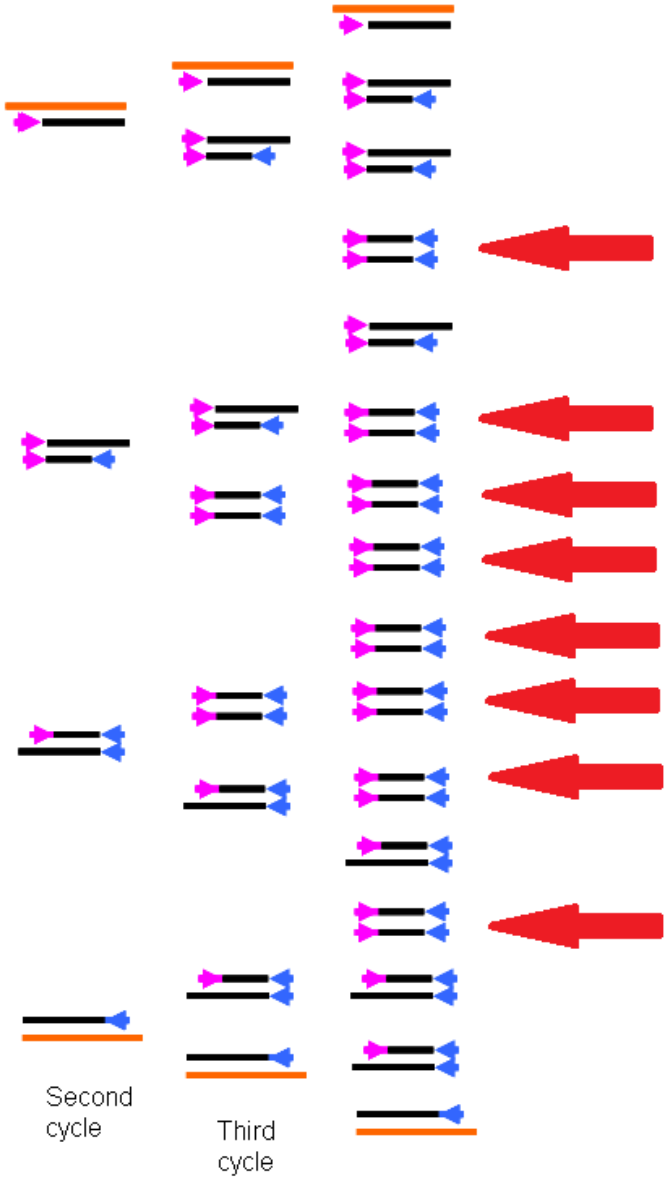
PCR


DS
DNA
3'
5'
5'
3'
DENATURATION
95⁰C
3'
5'
ANNEALING
P1
P2
~50⁰C
5'
3'
EXTENSION
72⁰C
(A)

PCR


Forward primer
Backward primer
Parental strands
Melt
Anneal
Extend
First cycle
Second cycle
Third cycle

PCR



PCR

Ciclos	DNA	Alvo	não alvo
0	1	0	1
1	2	0	2
2	4	0	4
3	8	2	6
4	16	8	8
5	32	22	10
6	64	52	12
7	128	114	14
8	256	240	16
9	512	494	18
10	1024	1004	20
11	2048	2026	22
12	4096	4072	24
13	8192	8166	26
14	16384	16356	28
15	32768	32738	30
16	65536	65504	32
17	131072	131038	34
18	262144	262108	36
19	524288	524250	38
20	1048576	1048536	40
21	2097152	2097110	42
22	4194304	4194260	44
23	8388608	8388562	46
24	16777216	16777168	48
25	33554432	33554382	50
26	67108864	67108812	52
27	134217728	134217674	54
28	268435456	268435400	56
29	536870912	536870854	58
30	1073741824	1073741764	60

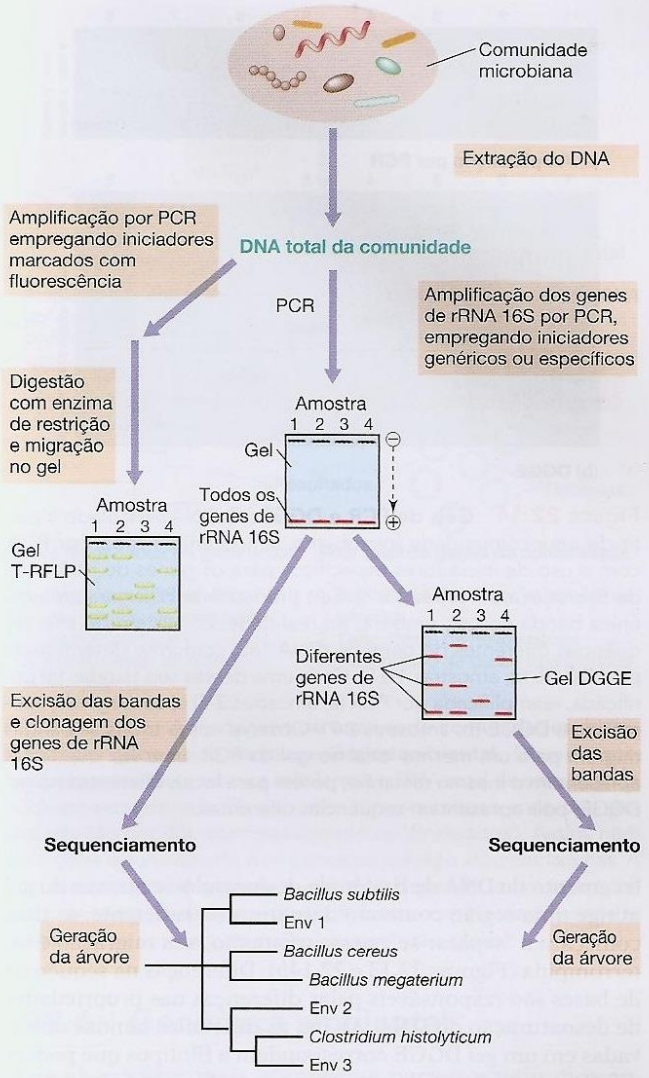


Figura 22.13 **Etapas de uma análise da biodiversidade de um único gene de uma comunidade microbiana.** A partir do DNA total da comunidade, os genes de rRNA 16S são amplificados utilizando, no exemplo de DGGE, iniciadores que têm como alvo apenas *Bacteria* Gram-positivas. As bandas originadas na PCR são excisadas e os diferentes genes de rRNA 16S são separados por clonagem ou DGGE. Após o sequenciamento, uma árvore filogenética é construída. *Env* indica uma sequência ambiental (filotipo). Em análises de T-RFLP, o número de bandas indica o número de filotipos. Em géis de DGGE ou T-RFLP, as bandas que migram para a mesma localização geralmente indicam o mesmo filotipo.

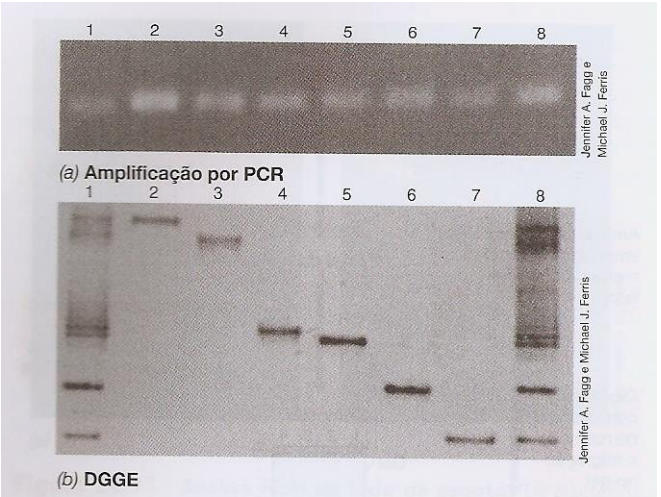
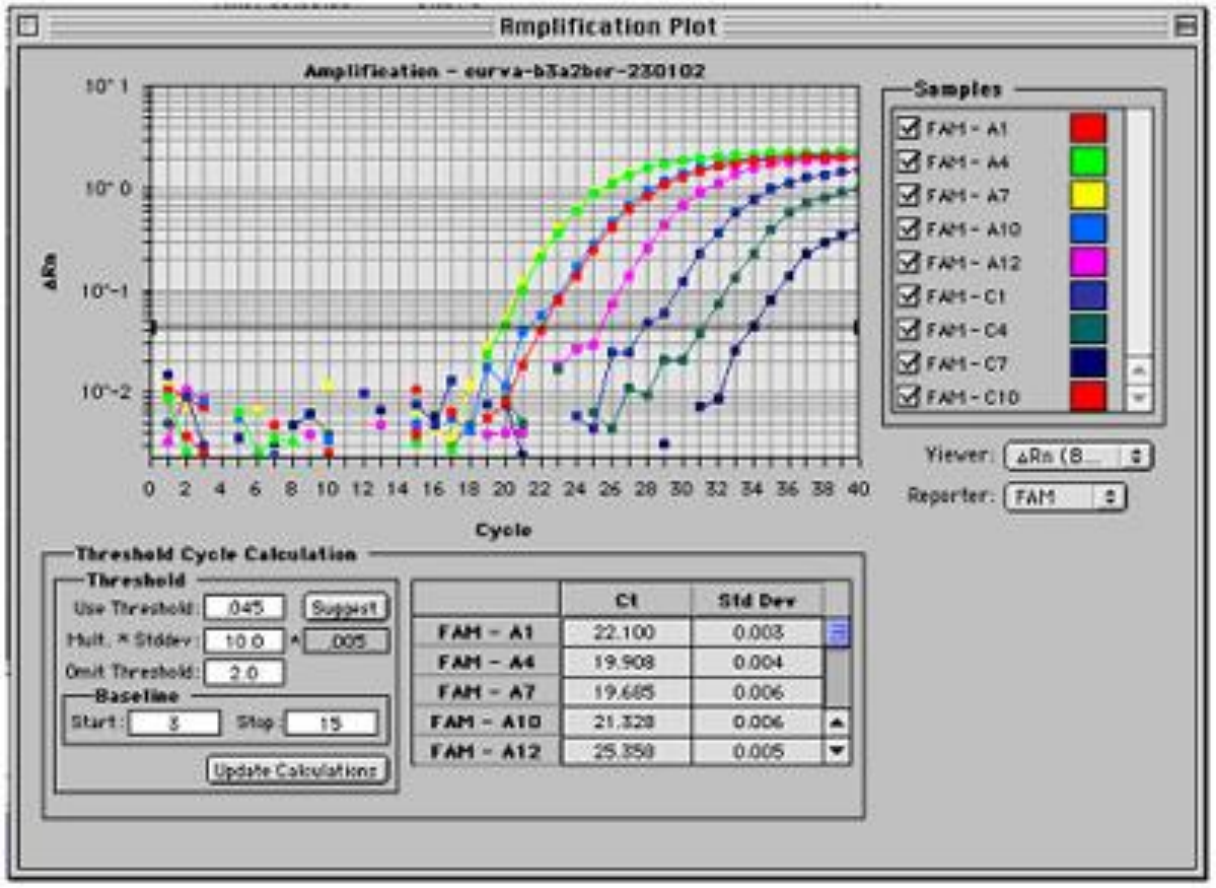


Figura 22.14 **Géis de PCR e DGGE.** O DNA foi isolado a partir de uma comunidade microbiana, sendo amplificado por PCR, com o uso de iniciadores específicos para os genes de rRNA 16S de *Bacteria* (*a*; amostras 1 e 8). Seis produtos de PCR geraram uma única banda no gel, embora, na realidade, consistam de seis sequências diferentes do gene de rRNA 16S, conforme determinado pela DGGE (*b*; amostras 1 e 8). Cada uma dessas seis bandas foi purificada, reamplificada por PCR (*a*; amostras 2-7) e, em seguida, submetida à DGGE (*b*; amostras 2-7). Observe como todas as bandas migram para um mesmo local no gel da PCR, uma vez que todas apresentam o mesmo tamanho, porém para locais diferentes no gel DGGE, pois apresentam sequências diferentes.

PCR EM TEMPO REAL (QUANTITATIVO)



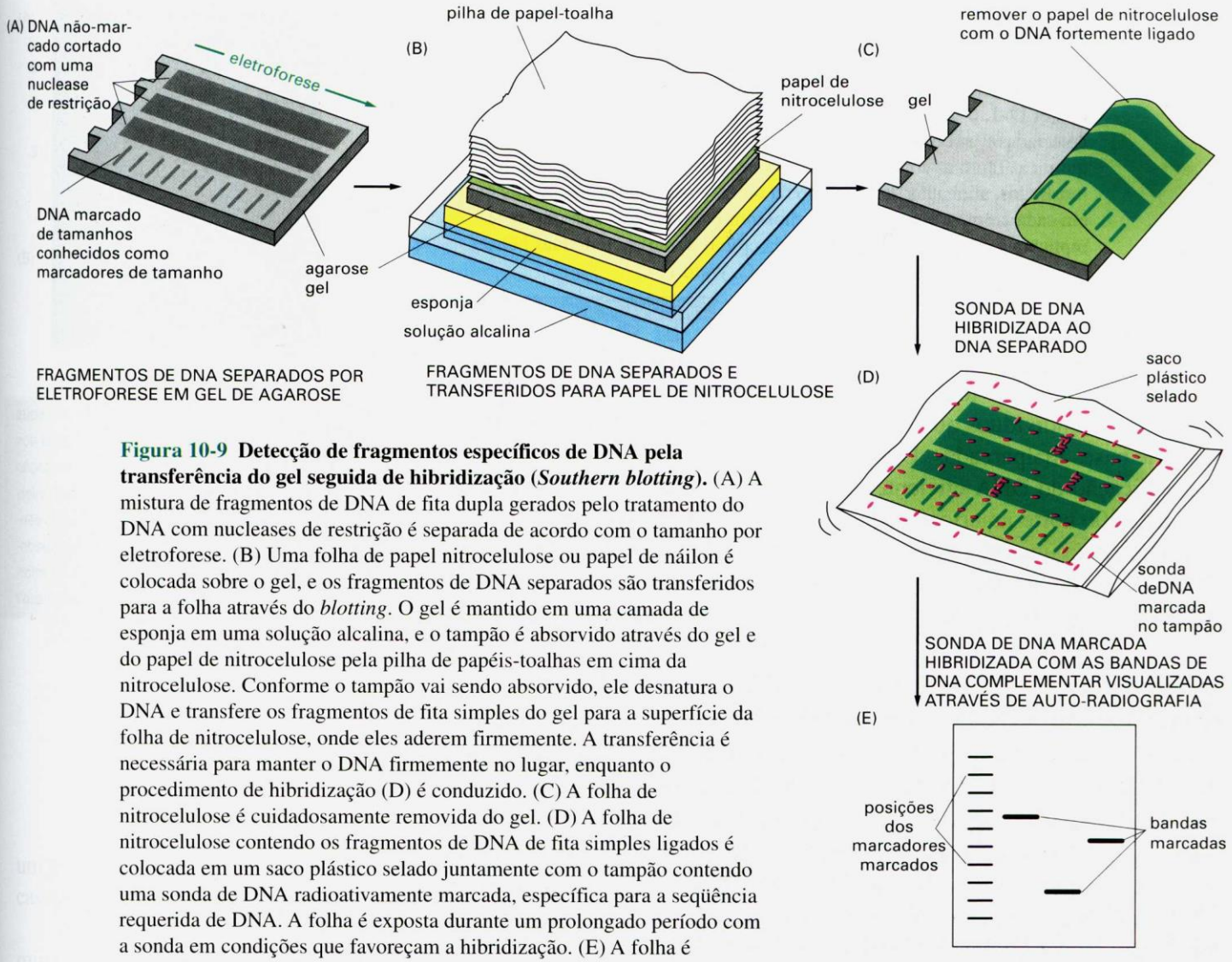
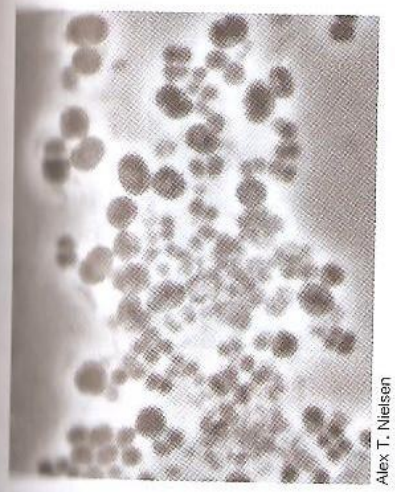
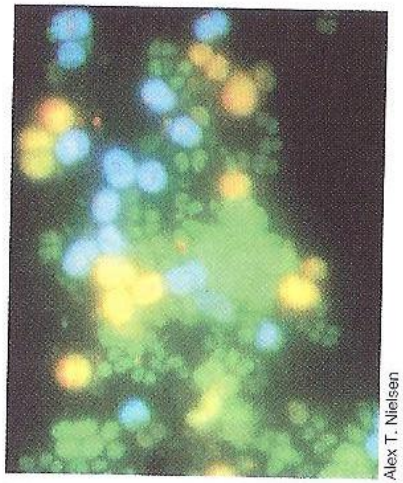


Figura 10-9 Detecção de fragmentos específicos de DNA pela transferência do gel seguida de hibridização (*Southern blotting*). (A) A mistura de fragmentos de DNA de fita dupla gerados pelo tratamento do DNA com nucleases de restrição é separada de acordo com o tamanho por eletroforese. (B) Uma folha de papel nitrocelulose ou papel de náilon é colocada sobre o gel, e os fragmentos de DNA separados são transferidos para a folha através do *blotting*. O gel é mantido em uma camada de esponja em uma solução alcalina, e o tampão é absorvido através do gel e do papel de nitrocelulose pela pilha de papéis-toalhas em cima da nitrocelulose. Conforme o tampão vai sendo absorvido, ele desnatura o DNA e transfere os fragmentos de fita simples do gel para a superfície da folha de nitrocelulose, onde eles aderem firmemente. A transferência é necessária para manter o DNA firmemente no lugar, enquanto o procedimento de hibridização (D) é conduzido. (C) A folha de nitrocelulose é cuidadosamente removida do gel. (D) A folha de nitrocelulose contendo os fragmentos de DNA de fita simples ligados é colocada em um saco plástico selado juntamente com o tampão contendo uma sonda de DNA radioativamente marcada, específica para a seqüência requerida de DNA. A folha é exposta durante um prolongado período com a sonda em condições que favoreçam a hibridização. (E) A folha é removida do saco e lavada meticulosamente, para que somente moléculas de sonda que hibridizaram ao DNA no papel permaneçam ligadas. Depois da auto-radiografia, o DNA que hibridizou com a sonda marcada aparecerá como bandas na auto-radiografia. Uma adaptação desta técnica para detectar seqüências específicas de RNA é chamada de *Northern blotting*. Neste caso, moléculas de mRNA são submetida à eletroforese pelo gel e a sonda é normalmente uma molécula de DNA de fita simples.

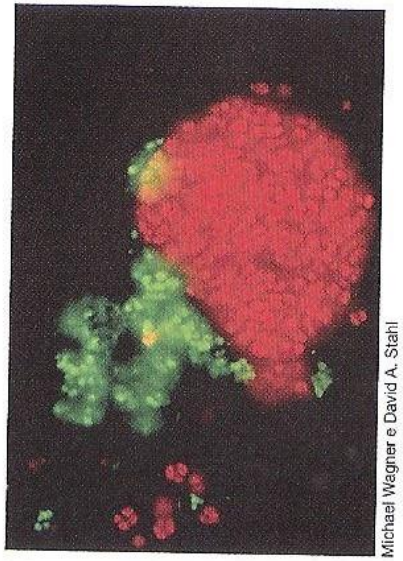


(a)

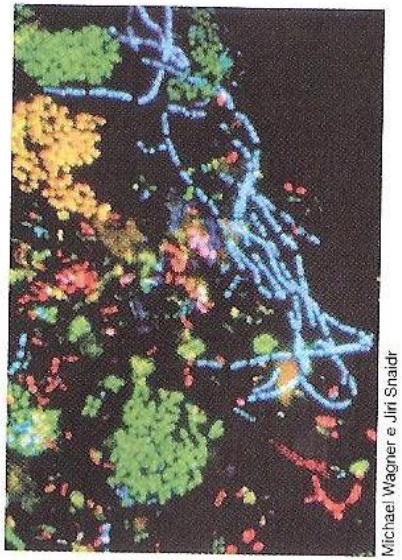


(b)

Figura 22.10 **Morfologia e diversidade genética.** As fotomicrografias apresentadas, (*a*) contraste de fase e (*b*) FISH filogenética, são o mesmo campo de células. Embora as grandes células ovaladas apresentem morfologia e tamanho incomuns para células procarióticas e pareçam similares por microscopia de contraste de fase, os corantes filogenéticos revelam tratar-se de células geneticamente distintas (uma cora-se em amarelo e outra cora-se em azul). As células ovais coradas em azul ou amarelo têm cerca de 2,25 μm de diâmetro. As células verdes, em pares ou agrupamentos, têm diâmetro aproximado de 1 μm.



(a)



(b)

Figura 22.11 **Análise FISH de lodo de esgoto.** (*a*) Bactérias nitrificantes. Em vermelho, bactérias oxidantes de amônia; em verde, bactérias oxidantes de nitrito. (b) Micrografia *laser* de varredura confocal de uma amostra de lodo de esgoto. A amostra foi tratada com três sondas filogenéticas FISH, cada qual contendo um corante fluorescente diferente (verde, vermelho ou púrpura), tendo como alvo um diferente grupo de *Proteobacteria*. As células coradas em verde, vermelho ou púrpura reagiram somente com uma única sonda; as células coradas em azul e amarelo reagiram com múltiplas sondas, originando as diferentes cores.

Sequenciamento DNA

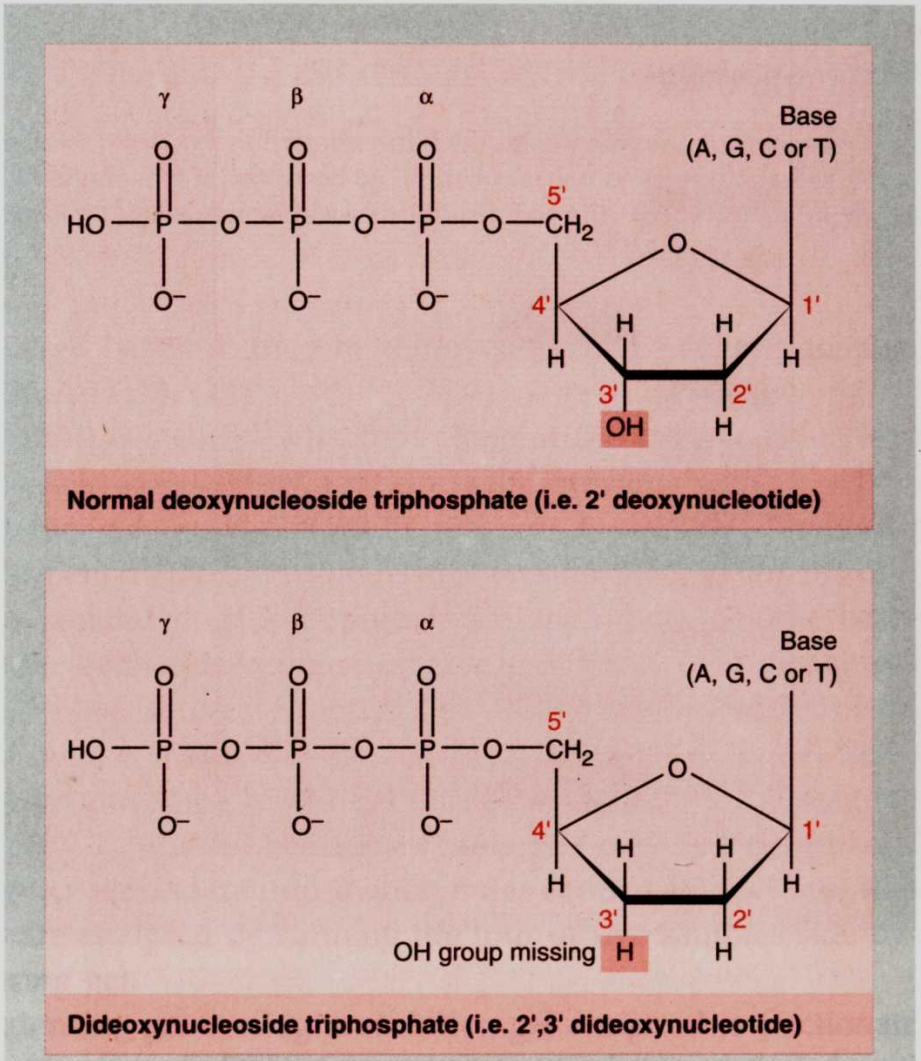


Fig. 9.3 Dideoxynucleoside triphosphates act as chain terminators because they lack a 3′-OH group. Numbering of the carbon atoms of the pentose is shown (primes distinguish these from atoms in the bases). The α, β, and γ phosphorus atoms are indicated.

DNA template to be sequenced:

3' GGGCCTAAGCCTTAAACTGAAGGTTATGCCCCTTAGCC 5'

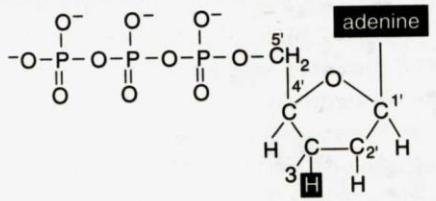
The sequencing primer is annealed to the denatured template to initiate DNA sequencing:

3' GGGCCTAAGCCTTAAACTGAAGGTTATGCCCCTTAGCC 5'
   | | | | | | | | | | |
5' CCCGGATTCGG3'

Deoxyribonucleotides used:

dCTP, dATP, dTTP, dGTP

Dideoyribonucleotide used to teminate DNA sequencing in the "A" tube:



Sequencing Reactions in the tube (A* indicates sequencing was terminated by a dideoxy ATP):

3' GGGCCTAAGCCTTAAACTGAAGGTTATGCCCCTTAGCC 5'
5' CCCGGATTCGGA*

3' GGGCCTAAGCCTTAAACTGAAGGTTATGCCCCTTAGCC 5'
5' CCCGGATTCGGAA*

3' GGGCCTAAGCCTTAAACTGAAGGTTATGCCCCTTAGCC 5'
5' CCCGGATTCGGAATTTGA*

3' GGGCCTAAGCCTTAAACTGAAGGTTATGCCCCTTAGCC 5'
5' CCCGGATTCGGAATTTGACTTCCA*

3' GGGCCTAAGCCTTAAACTGAAGGTTATGCCCCTTAGCC 5'
5' CCCGGATTCGGAATTTGACTTCCAA*

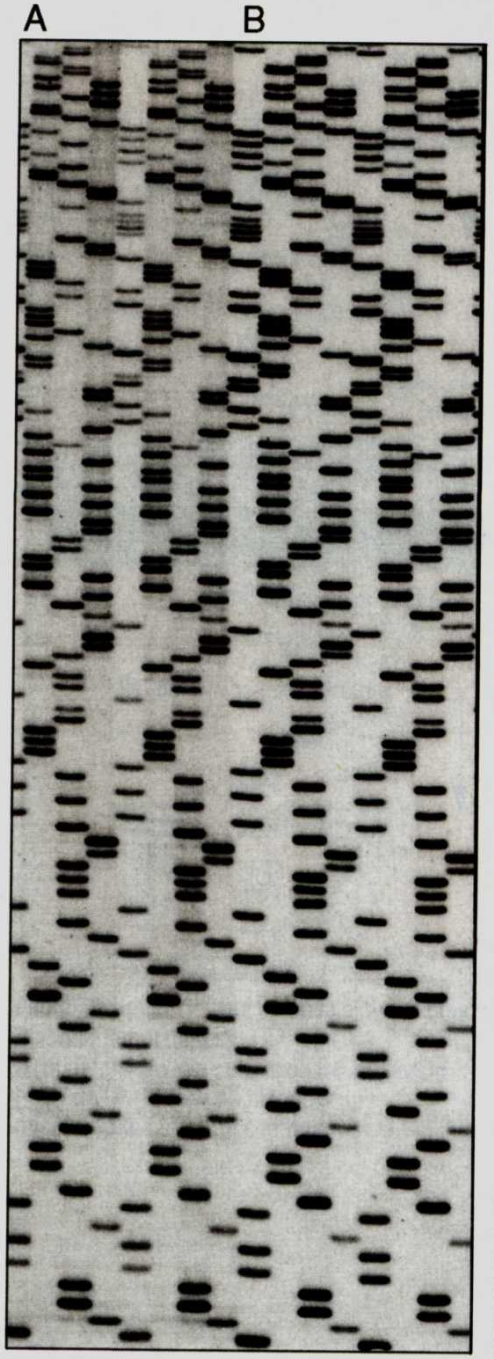
3' GGGCCTAAGCCTTAAACTGAAGGTTATGCCCCTTAGCC 5'
5' CCCGGATTCGGAATTTGACTTCCAA*

3' GGGCCTAAGCCTTAAACTGAAGGTTATGCCCCTTAGCC 5'
5' CCCGGATTCGGAATTTGACTTCCAATA*

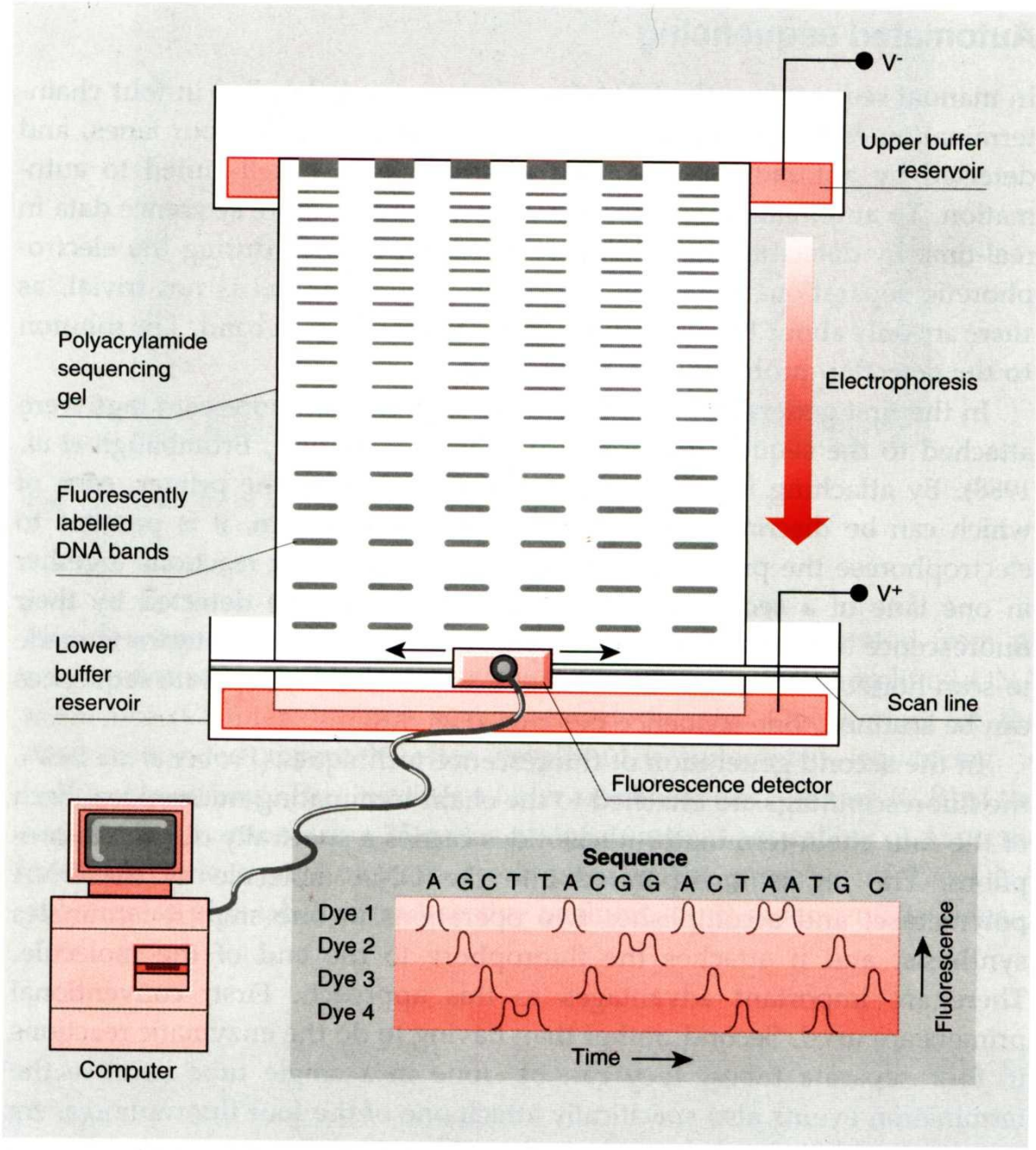
3' GGGCCTAAGCCTTAAACTGAAGGTTATGCCCCTTAGCC 5'
5' CCCGGATTCGGAATTTGACTTCCAATACGGGGA*

3' GGGCCTAAGCCTTAAACTGAAGGTTATGCCCCTTAGCC 5'
5' CCCGGATTCGGAATTTGACTTCCAATACGGGGAA*

Figure 4.12 DNA sequencing: the "A" tube reaction. A hypothetical DNA sequence is used to illustrate how dideoxy sequencing is conducted. Either the primer or one of the deoxyribonucleotides is radiolabeled to allow detection of the banding pattern on x-ray film. Three other reaction tubes for "G", "C", and "T" would be used to obtain the DNA sequence.



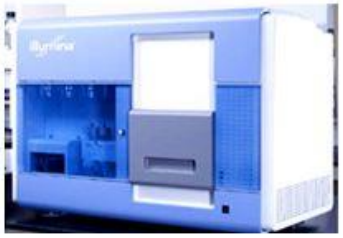
Sequencing results from 1 µg plasmid DNA using: glycol/heat denaturation method (A) and rapid alkali denaturation together with ^{33}P and Sequenase Quick Denature Plasmid Sequencing Kit (B).


V-
Upper buffer reservoir
Polyacrylamide sequencing gel
Electrophoresis
Fluorescently labelled DNA bands
V+
Lower buffer reservoir
Scan line
Fluorescence detector
Computer
Sequence
A G C T T A C G G A C T A A T G C
Dye 1
Dye 2
Dye 3
Dye 4
Fluorescence
Time

legaBACE DNA Analysis System

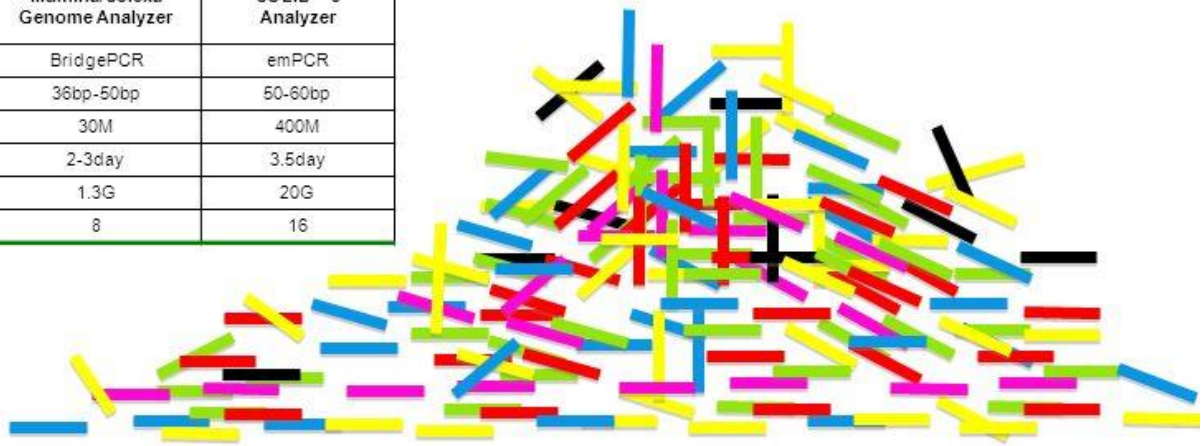
egaBACE DNA Analysis System offers the flexibility needed for medium- to high-roughput sequencing and genotyping.

SEQUENCIAMENTO



Next-generation deep sequencing platforms produce millions of short reads in one run

	454 Genome Sequencer FLX	Illumina/Solexa Genome Analyzer	SOLiD™ 3 Analyzer
Amplification	emPCR	BridgePCR	emPCR
Read length	400bp	36bp-50bp	50-60bp
Read number	>1M	30M	400M
Time	10h	2-3day	3.5day
Bases	400-600M	1.3G	20G
Sample	16	8	16



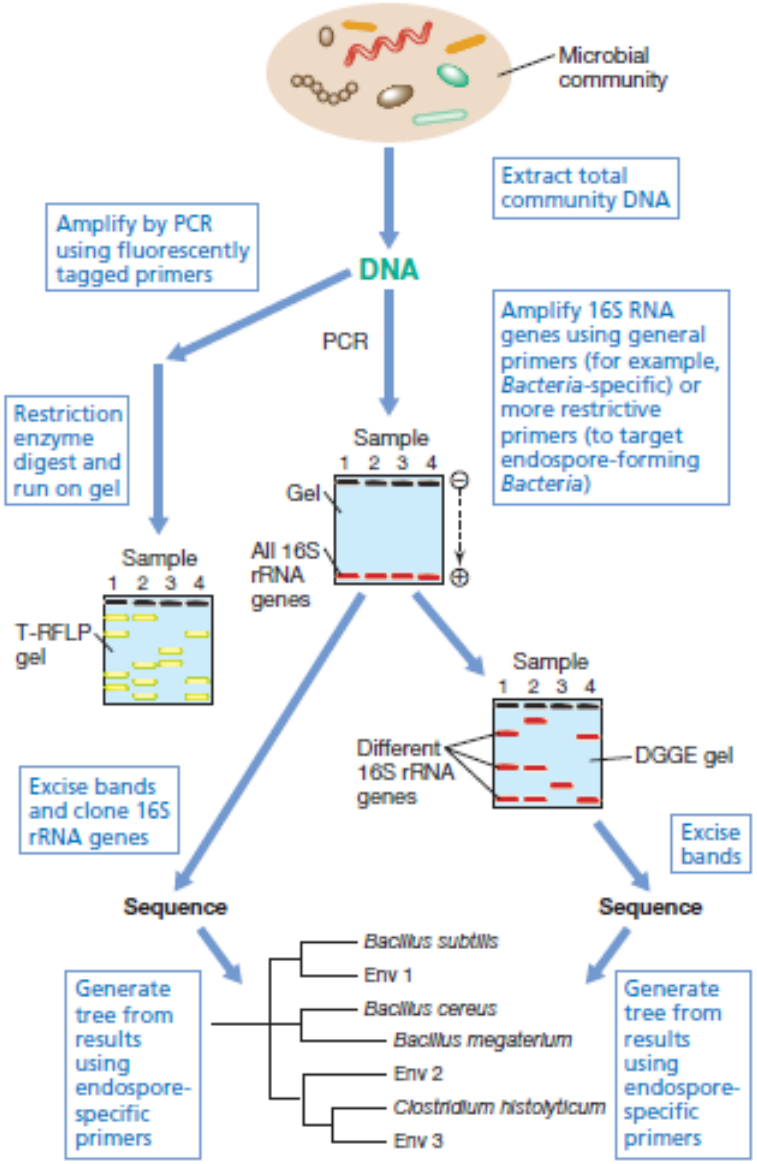


Figure 22.12 Steps in single-gene biodiversity analysis of a microbial community. From total community DNA, 16S rRNA genes are amplified using, in the DGGE example, primers that target only *Firmicutes*, a group of gram-positive *Bacteria*. The PCR bands are excised and the different 16S rRNA genes separated by either cloning or DGGE. Following sequencing, a phylogenetic tree is generated. "Env" indicates an environmental sequence (phylotype). In T-RFLP analyses, the number of bands indicates the number of phylotypes.

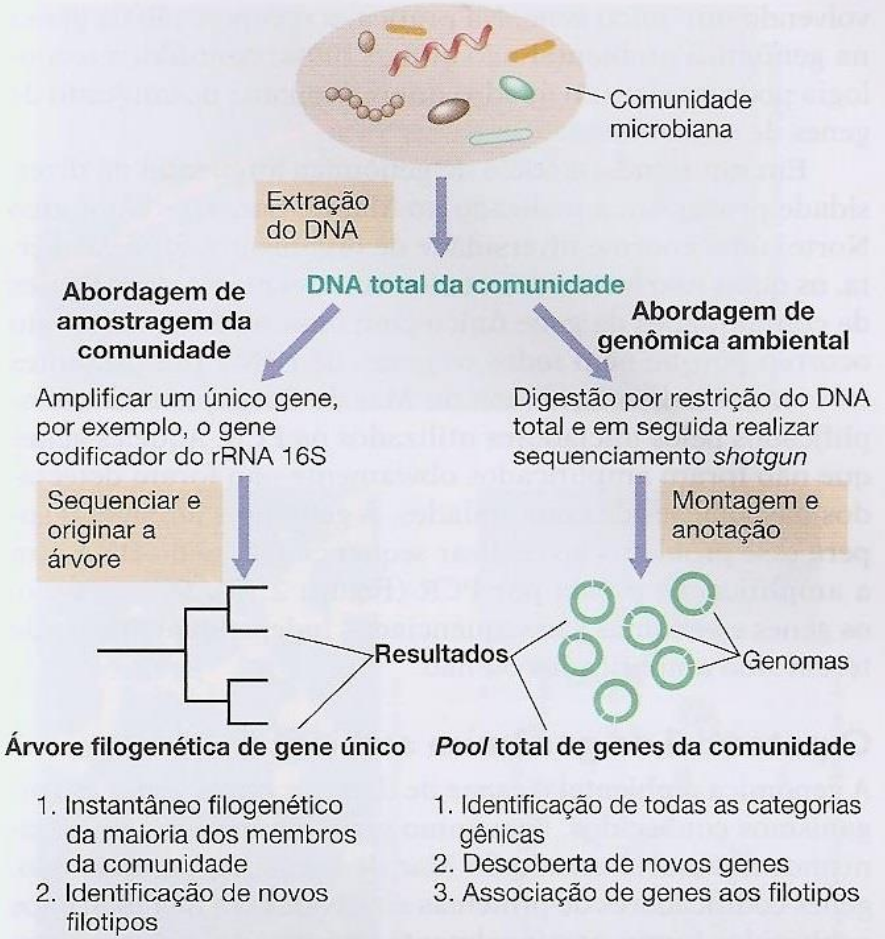
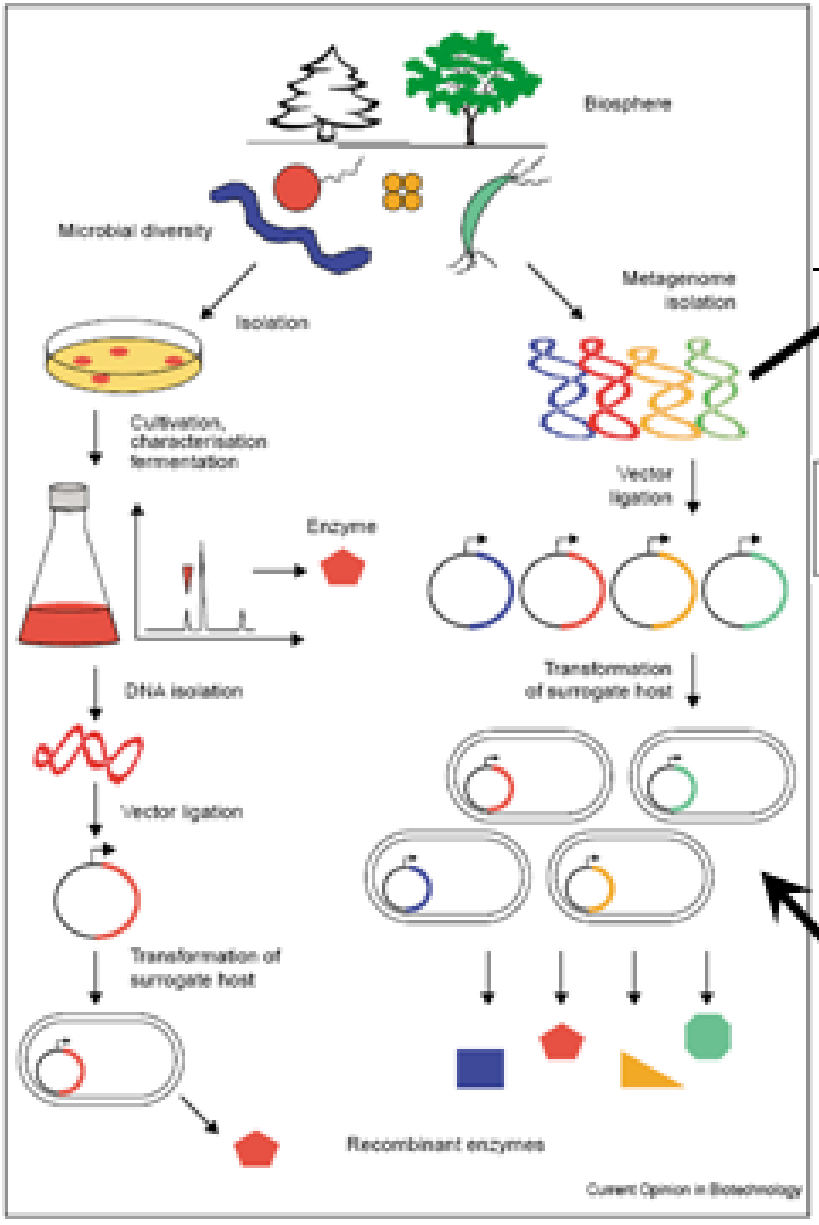
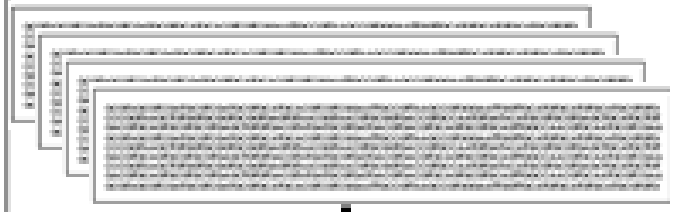


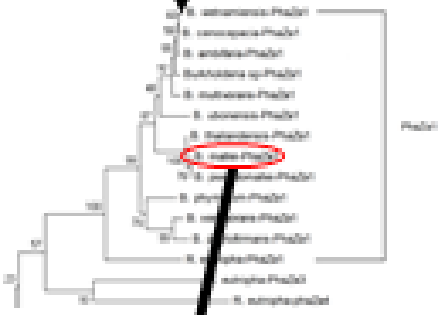
Figura 22.16 Abordagens de análise de comunidades microbianas por gene único *versus* genômica ambiental. Observe que, na abordagem da genômica ambiental, o DNA total da comunidade pode ser sequenciado. Os genomas são montados e anotados, porém não são obtidos genomas completos "finalizados". Assim, nem todo gene é considerado e os genomas exibirão algumas lacunas. A recuperação total dos genes é variável e depende, entre outros fatores, da complexidade do hábitat; hábitats com pouca diversidade normalmente apresentam melhor recuperação global.

METAGENOMA



Sequencing





Gene synthesis

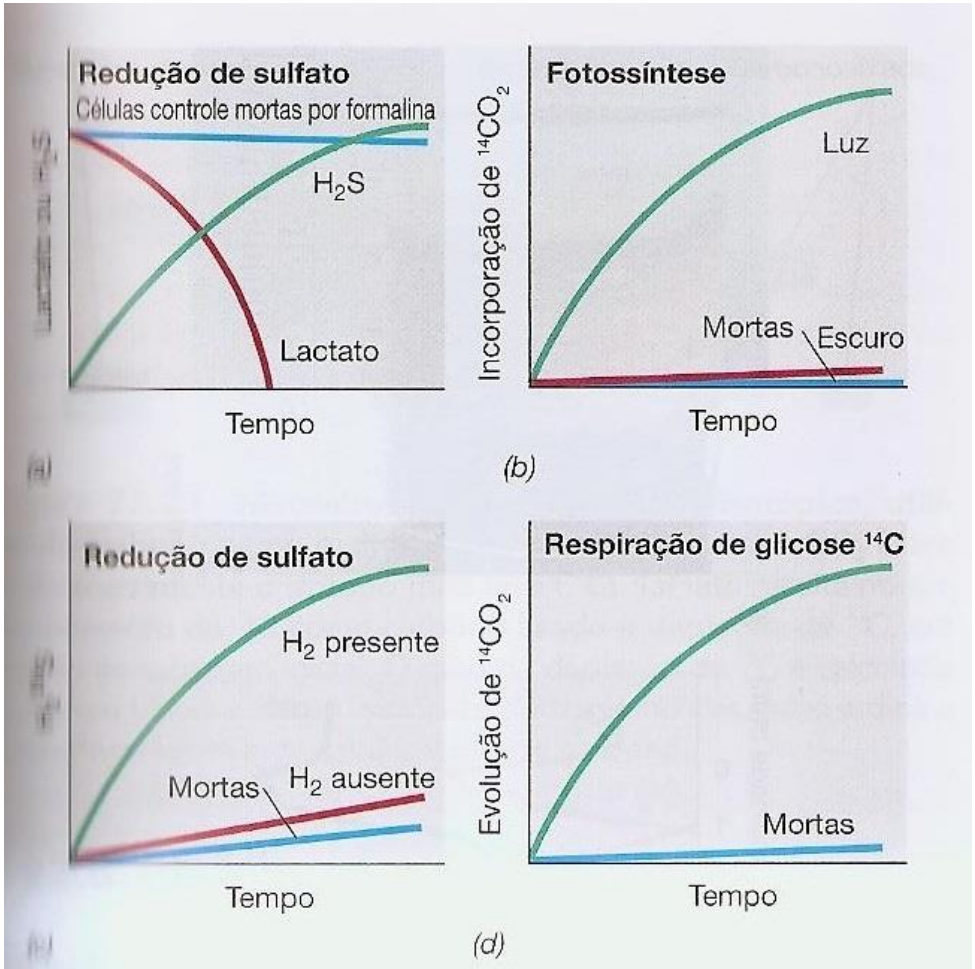


Figura 22.17 Medidas das atividades microbianas. (*a*) Análise química das transformações do lactato e H_2S durante a redução de sulfato. (*b*-*d*) Medidas radioisotópicas. (*b*) Medida da fotossíntese com $^{14}CO_2$. (*c*) A redução de sulfato medida com $^{35}SO_4^{2-}$. (*d*) Produção de $^{14}CO_2$ a partir de glicose ^{14}C.

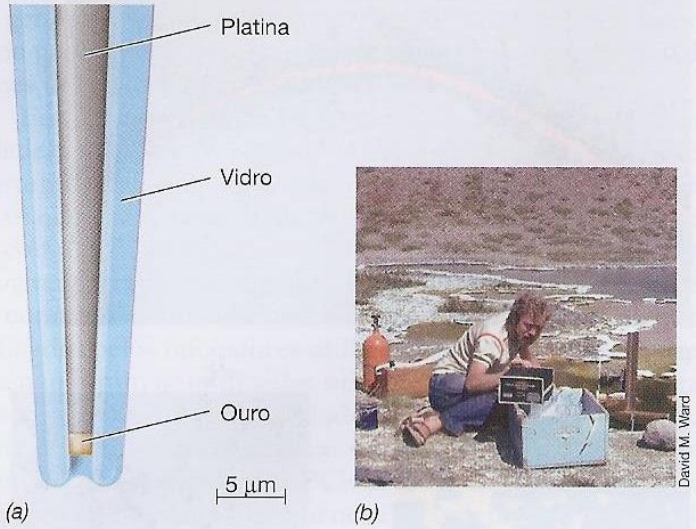


Figura 22.19 **Microeletrodos.** (*a*) Desenho esquemático de um microeletrodo de oxigênio. A haste de platina atua como um catodo e, quando aplicada um voltagem, o O_2 é reduzido a H_2O, originando uma corrente. A corrente resultante da redução de O_2 na superfície de ouro do catodo é proporcional à concentração de oxigênio na amostra. Observe a escala do eletrodo. (*b*) Microeletrodos sendo utilizados em uma massa microbiana localizada em uma fonte termal.

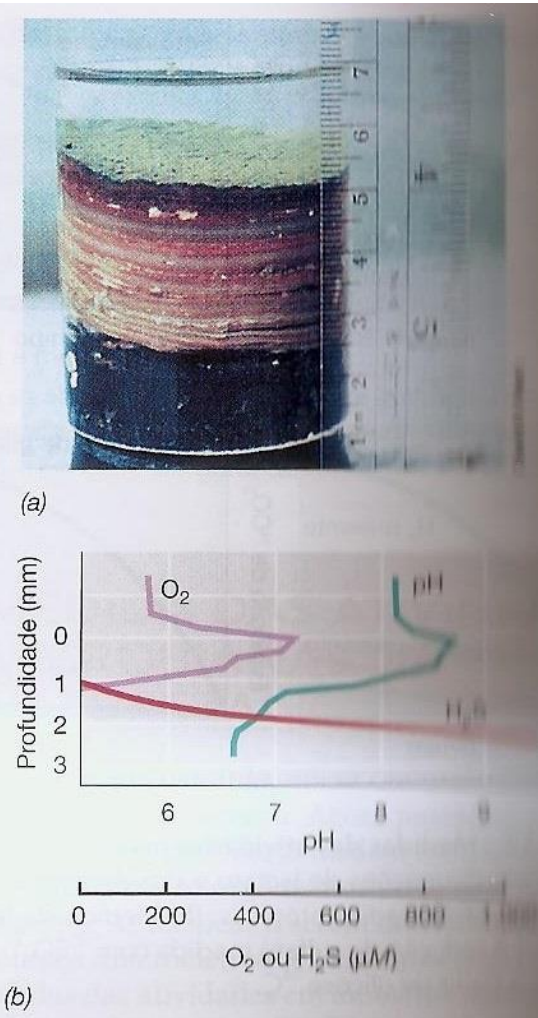


Figura 22.20 **Massas microbianas e o uso de microeletrodos para seu estudo.** (*a*) Fotografia de um núcleo, tirada da [illegible] oriunda de uma massa microbiana de fonte termal, [illegible] zada no experimento resumido na parte (*b*). A camada [illegible] escuro) contém cianobactérias, sob as quais encontram-se [illegible] madas de bactérias fototróficas anoxigênicas (em laranja [illegible] mente *Chloroflexus* e *Roseiflexus*. A espessura da massa [illegible] 2cm. (*b*) Perfis de oxigênio, sulfeto e pH em uma massa [illegible] uma fonte termal. Observe a escala em milímetros na [illegible]

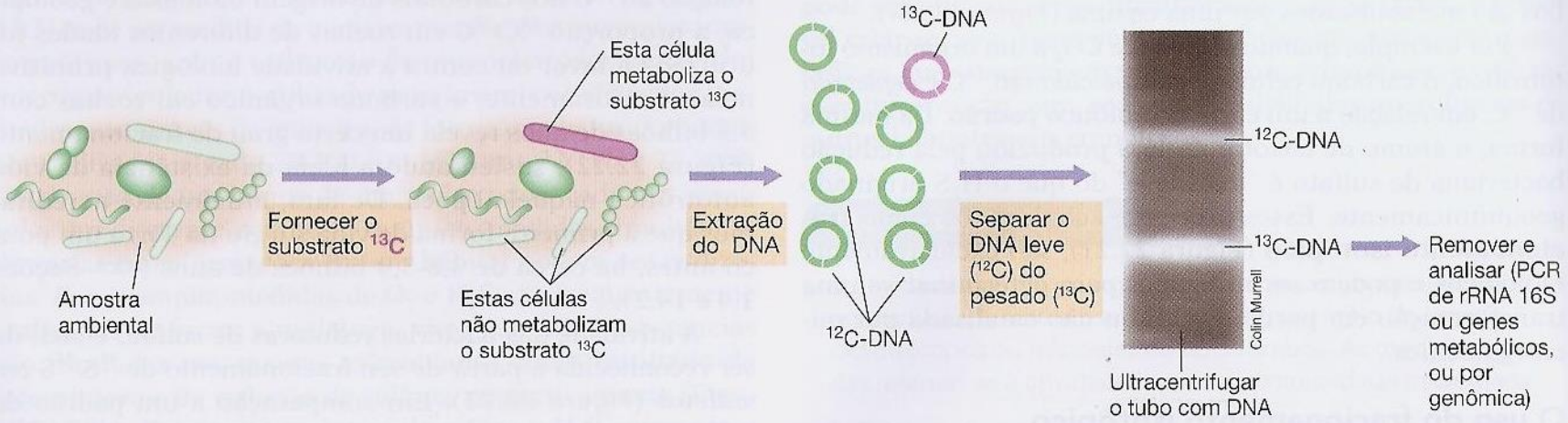


Figura 22.24 **Sondagem com isótopos estáveis.** A comunidade microbiana de uma amostra ambiental recebe um substrato ^{13}C específico. Os organismos capazes de metabolizar o substrato produzirão ^{13}C-DNA à medida que crescem e dividem-se; o ^{13}C-DNA pode ser separado do DNA mais leve (^{12}C) pela centrifugação com gradiente de densidade (foto). O DNA isolado é então submetido a análises de genes específicos ou do genoma completo.

MUTAÇÕES

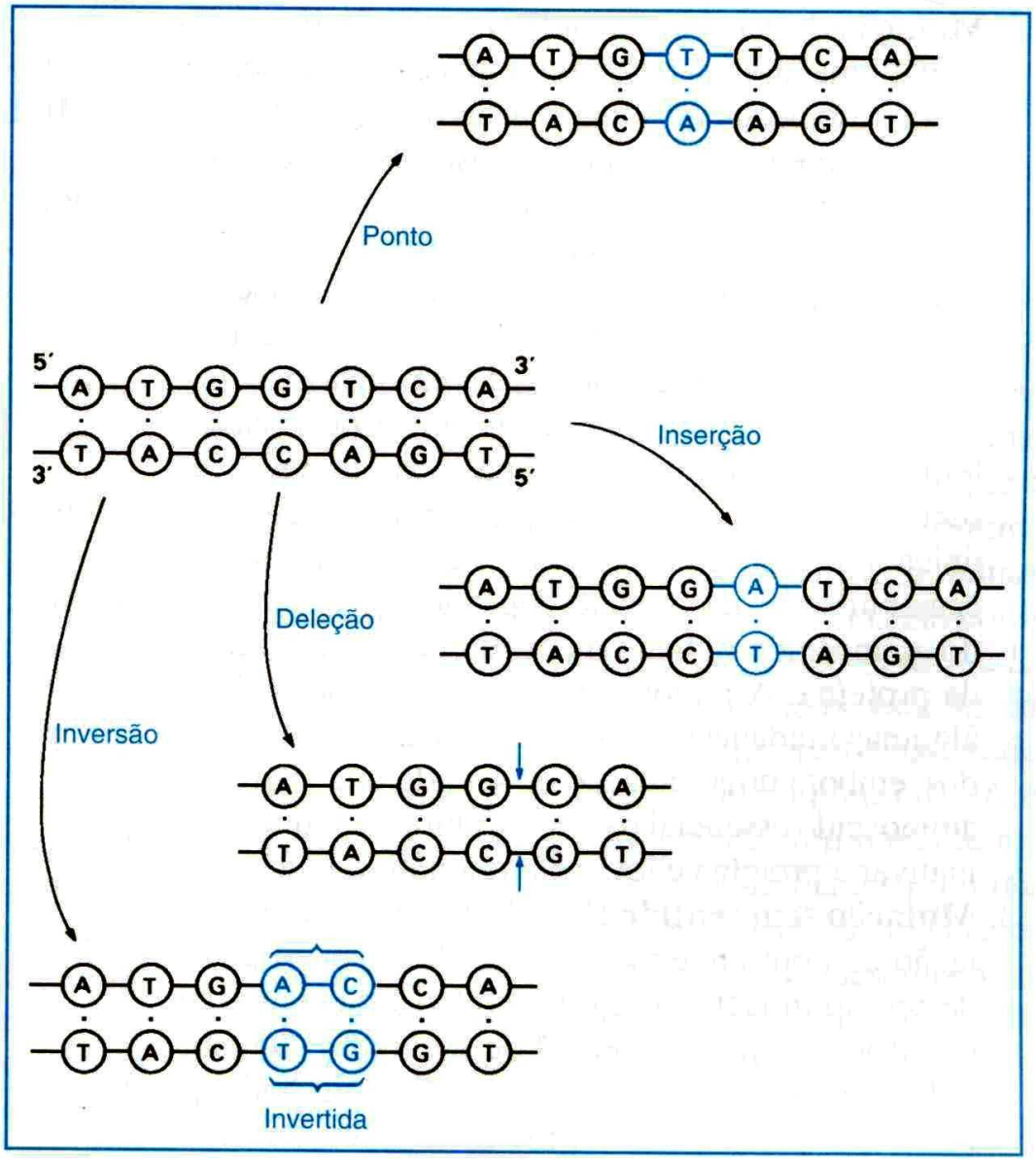
Genótipo e Fenótipo

- Genótipo - Composição genética do organismo

- Fenótipo - Manifestação do genótipo

Alteração do material genético

- Mutações: espontâneas ou induzidas


Ponto
Inserção
Deleção
Inversão
Invertida
5′
3′
3′
5′

Mutações do ponto de vista fenotípico.

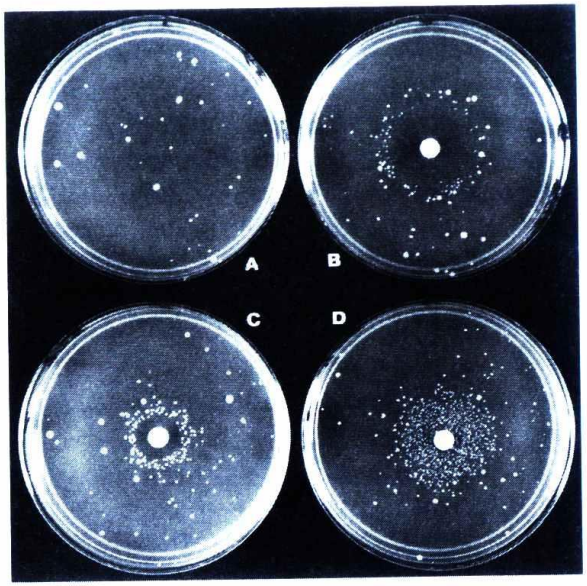
Mutantes auxotróficos – afetados na biossíntese de metabólito essencial. Dependem que seja fornecido no meio de cultura (Ex. aminoácidos, nucleotídeos, etc).

Mutantes condicionais letais – A proteína sintetizada é apenas funcional em determinada condição (temperatura por exemplo). Permitem estudar genes essenciais.

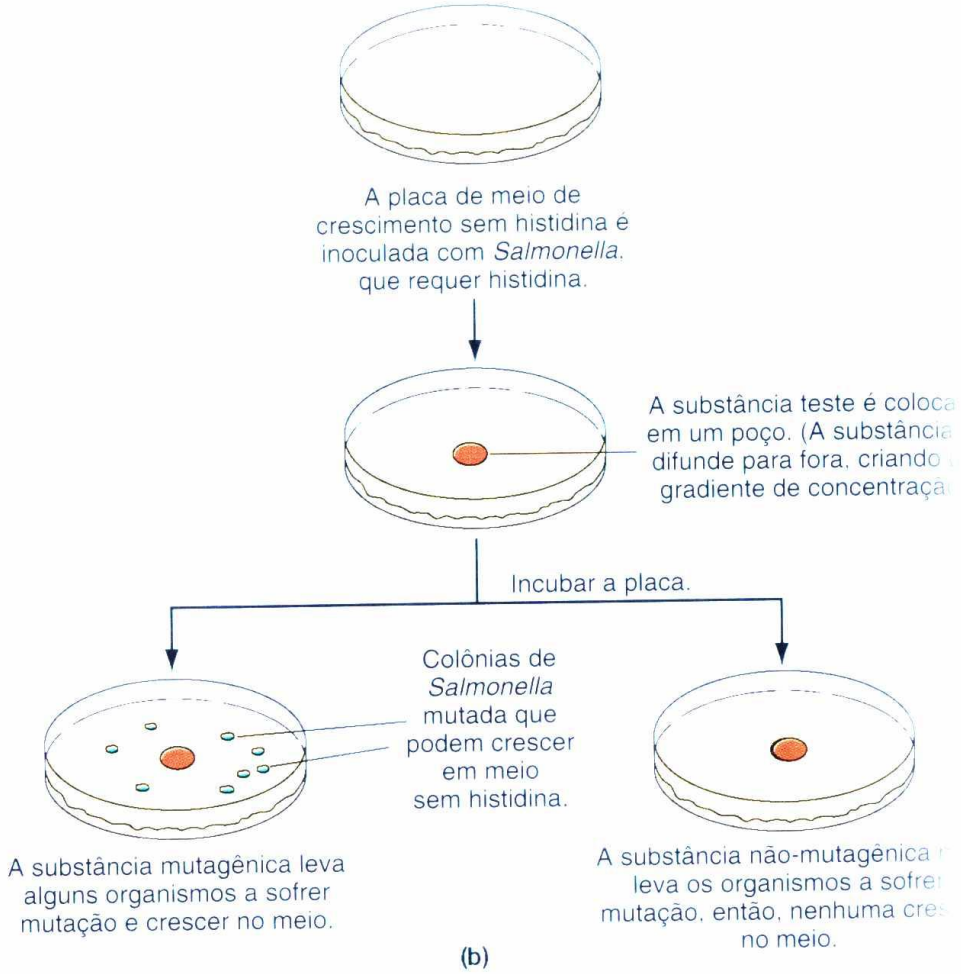
Mutantes resistentes – A proteína afetada pelo agente antimicrobiano se torna insensível.

Mutantes regulatórios – Passam a expressar constitutivamente o gene (Ex. mutantes no gene *lacI*).

Teste de Ames



(a)



(b)

Fig. 7.25 Teste de Ames para analisar as propriedades mutagênicas de substâncias químicas. (a) Placas usadas no teste de Ames. (b) O teste é usado para determinar se uma substância é um mutagênico e, conseqüentemente, um carcinogênico em potencial.