

Diversidade, Evolução e Ecologia Bacteriana

Gabriel Padilla
Departamento de Microbiologia
ICB-USP

gpadilla@icb.usp.br

Diversidade

Origem da vida

Tipos celulares

Características dos microrganismos

Diversidade metabólica

Evolução

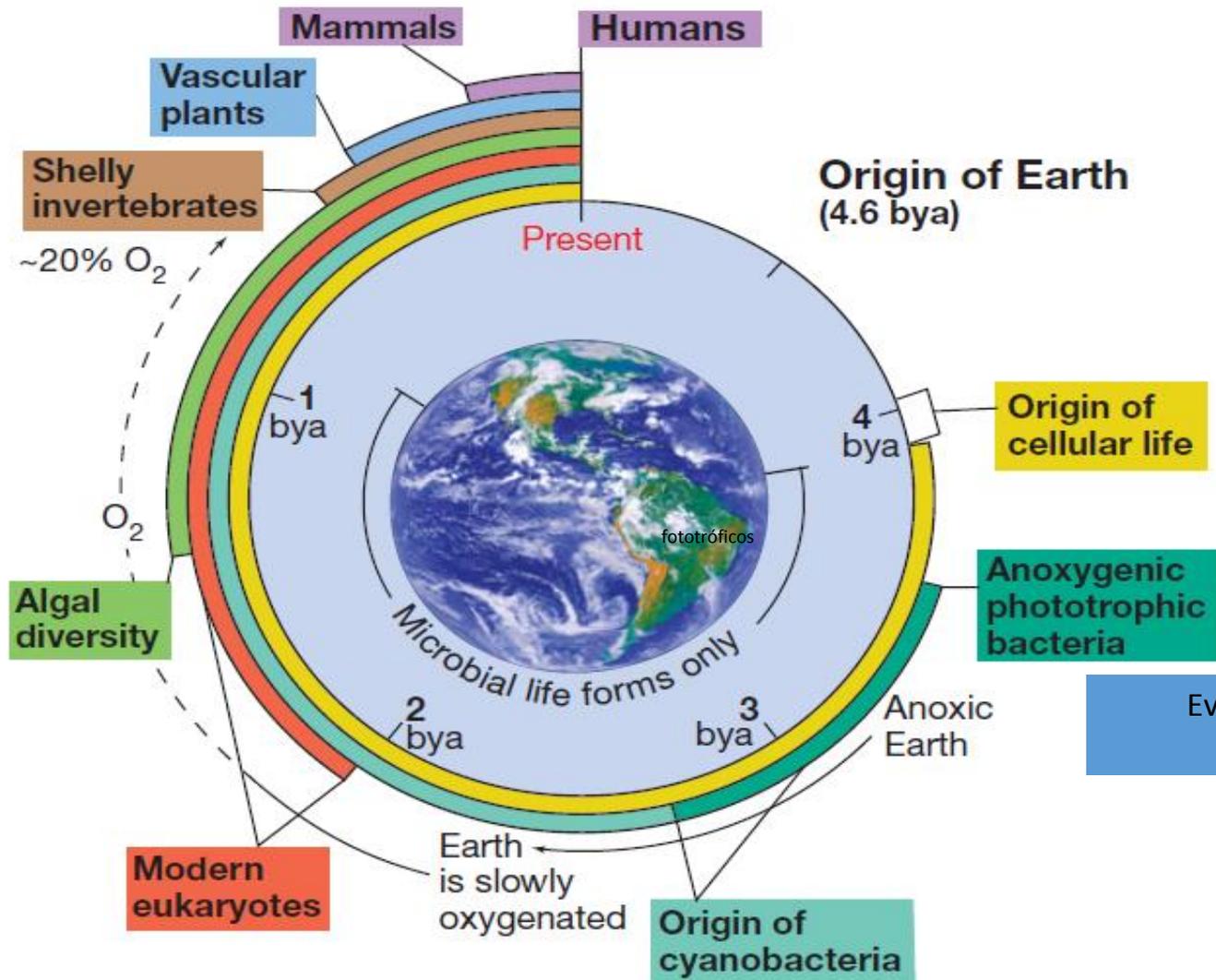
Árvores filogenéticas

Metodologia para estudos de diversidade

Origen da Vida

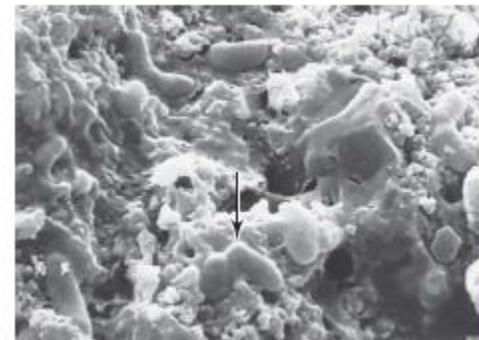
Existem várias teorias
(perguntas sem
respostas)

Entender o que estava
acontecendo na Terra
a 4.6 bilhões de anos.



Isótopos radioativos de decaimento lento

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



Rocha de 3.45 bia estromatólito

3.5 bia – Estromatólitos

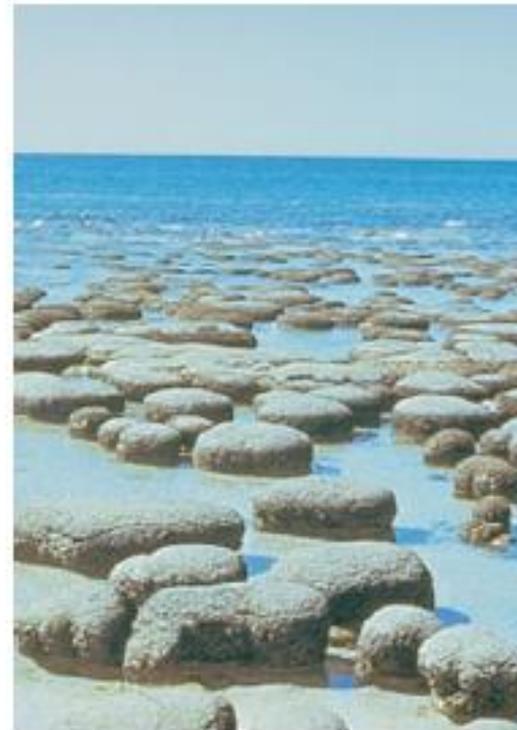
- Massas microbianas misturadas com compostos minerais que formam estruturas parecidas com rochas

Estromatólito mais antigo conhecido,
com 3.5 bias (Austrália)



Malcolm Walter

Estromatólito modernos
(Baía Shark)



Malcolm Walter

Teorias da Origem da Vida

- Teoria da Biogênese (Geração espontânea) (Itens não vivos + calor do sol – energia celestial- gera vida), trapos sujos+trigo gera camundongos
- 1862 – Louis Pasteur que revogou com a teoria da Geração espontânea

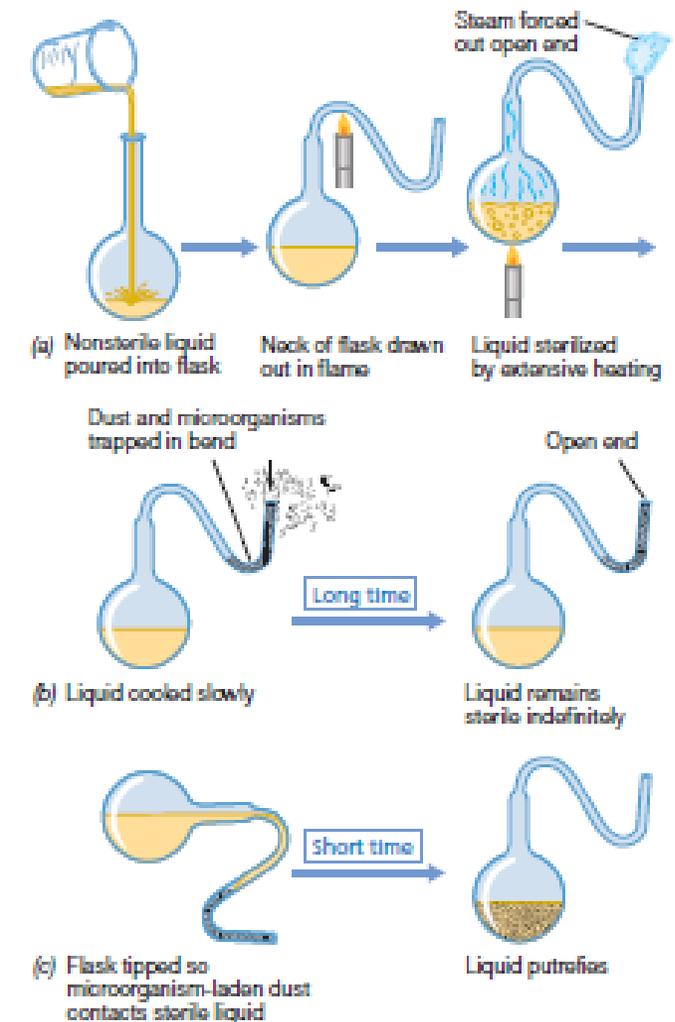


Figure 1.16 The defeat of spontaneous generation: Pasteur's swan-necked flask experiment. In (c) the liquid putrefies because microorganisms enter with the dust.

Mundo Primordial
– Prováveis
condições – Lugar
Tóxico e Quente

Ausência de O₂

Ambiente redutor

CH₄, CO₂, N₂, H₂O, NH₃

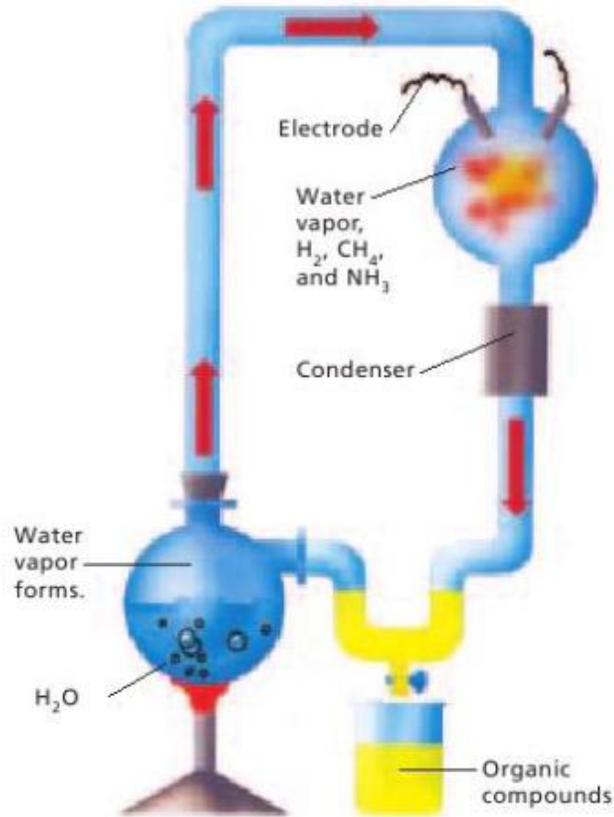
Temperatura > 1000°C

Radiação UV

Descargas elétricas

Provavelmente haviam várias reações químicas ocorrendo nos mares

Colocar em prática a teoria da Sopa Primordial (6 meses para fazer o teste) – Miller SL (1953)



Descargas elétricas – mimetizar a atmosfera Terrestre

O maior problema é tirar o O_2 do sistema, O_2 na presença de H_2 explode. Todos saíram do laboratório

Depois de 5 dias (achavam que iria demorar anos) – observaram a formação Gly e Ala

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

Depois de 60 anos foi possível sintetizar células no laboratório 2-/05/2010 pesquisadores do Instituto J. Craig Venter desenvolveram *Mycoplasma mycoides* sintético

- 1960 – A atmosfera Terrestre não tinha NH_4^+ e nem CH_4 – Invalida o sistema de Miller
- Ele repetiu o experimento e obteve os mesmos resultados



Outras Teorias

- Panspermia - As primeiras formas de vida originou do espaço
 - 1969 (Australia) caiu um meteorito que continham vários compostos orgânicos - lipídios e aminoácidos
 - 1970 – Nuvens de poeira no espaço também tem compostos orgânicos complexos (radiação UV converteu matéria simples em compostos orgânicos complexos)



LUCA – Último ancestral Universal Comum – Last Universal Common Ancestor

FeS (pirita) e NiS catalisam a formação de aa, peptídios, açúcares, bases nitrogenadas

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

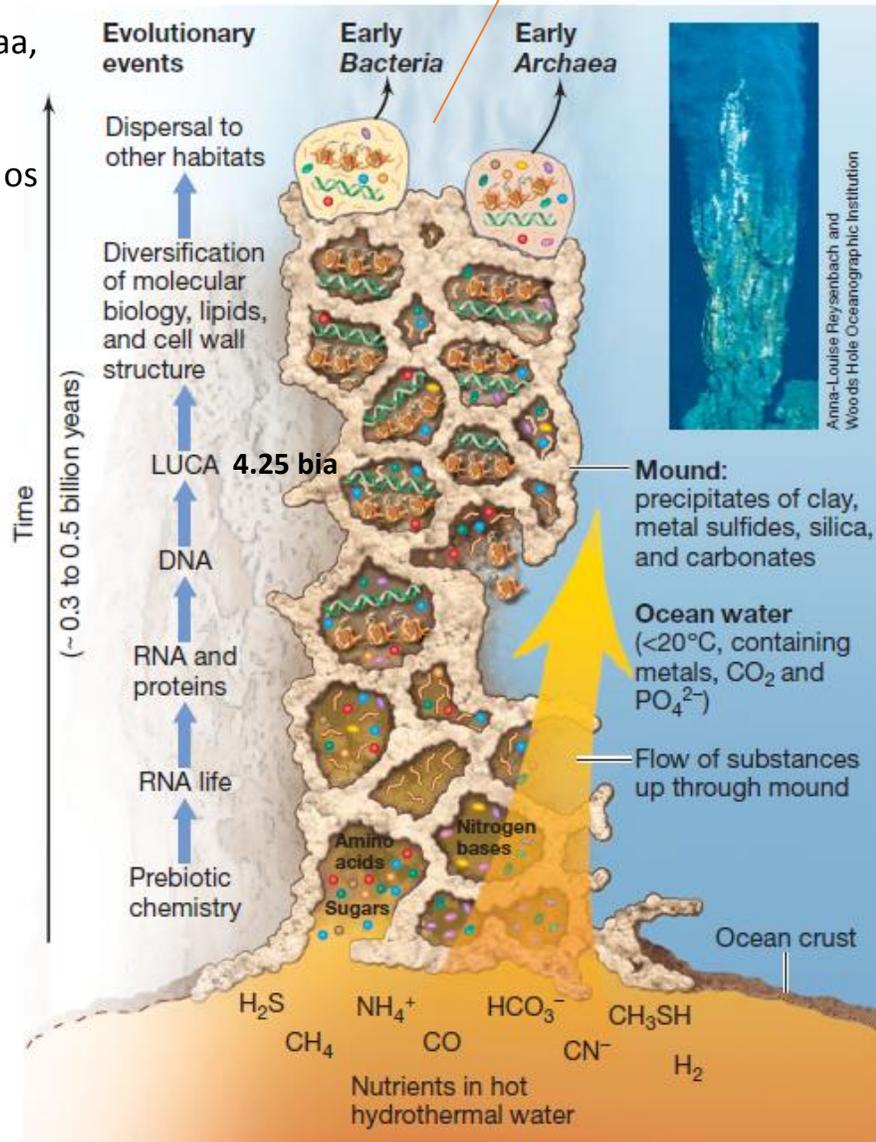
Argila catalisa a formação de RNA

RNA – auto replicante, catalisar, Sintetiza proteínas primitivas

Proteínas assumiram o papel catalítico dos RNA

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

Diversidade – seleção natural
Evolução dos organismos vivos



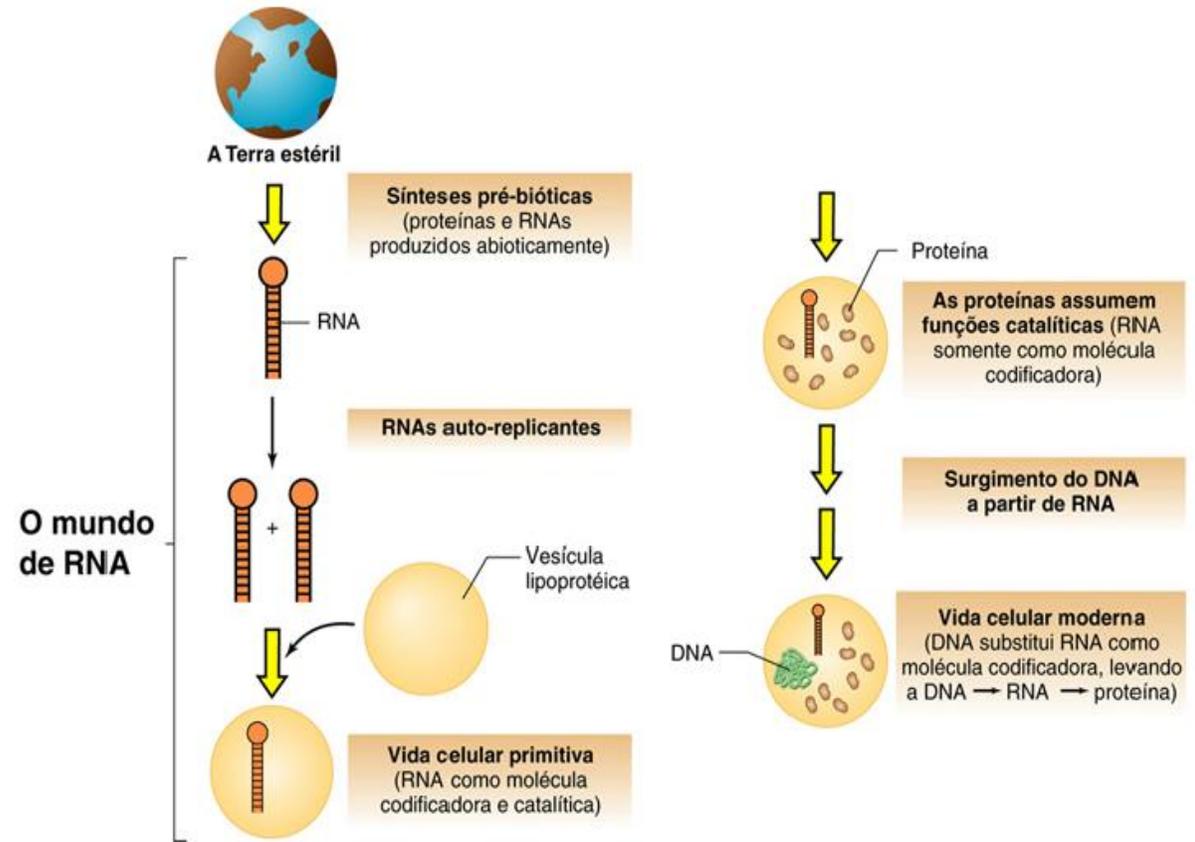
Água do mar
 Fe^{+3} , H^+ , Ni^{+2} , CO_2 , PO_4^{3-} ,
 Fe^{+2}

Teoria da Emergência:
Compostos isolados simples se agrupam para formar sistemas complexos e bem ordenados, resultando em algo inesperado

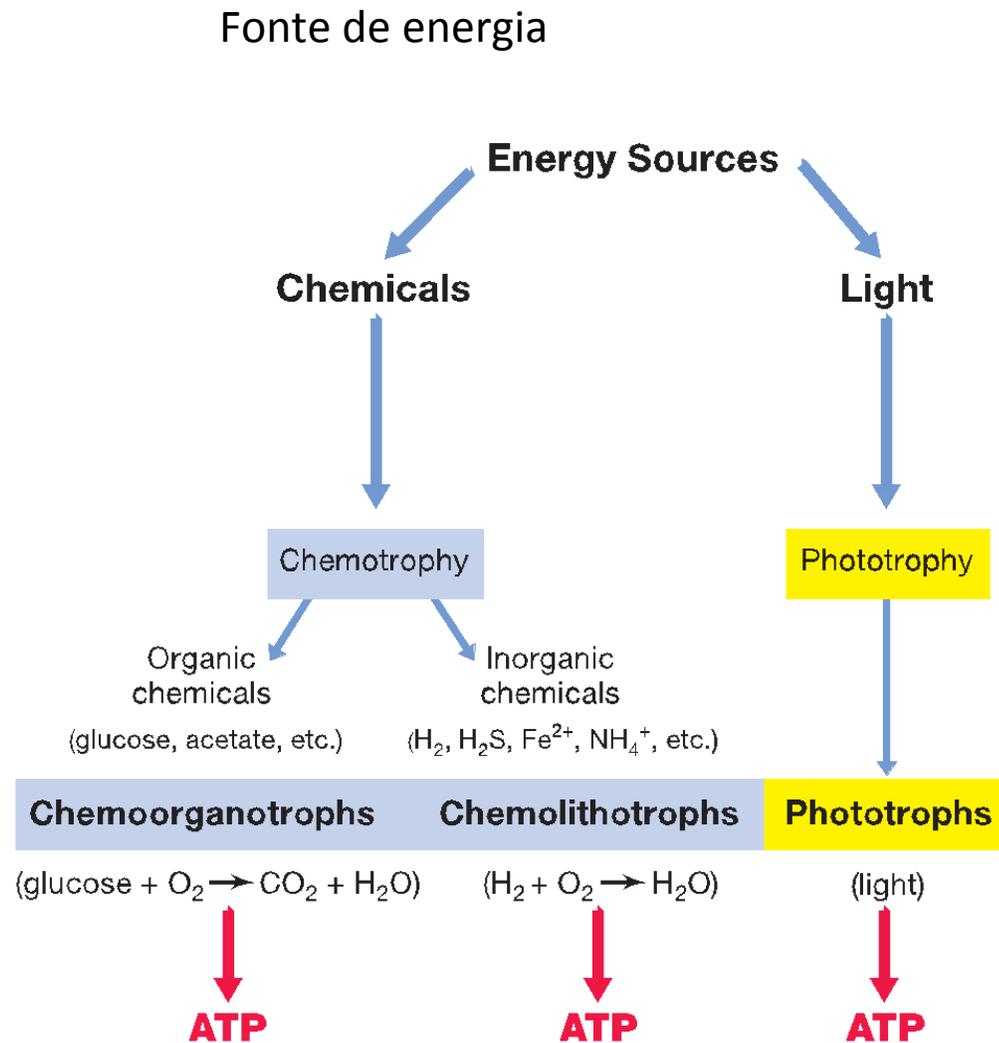
O papel do RNA na origem da vida

- Primeiro sistema auto replicante e pode atuar como catalisador

Primeiro sistema autoreplicante



Diversidade metabólica

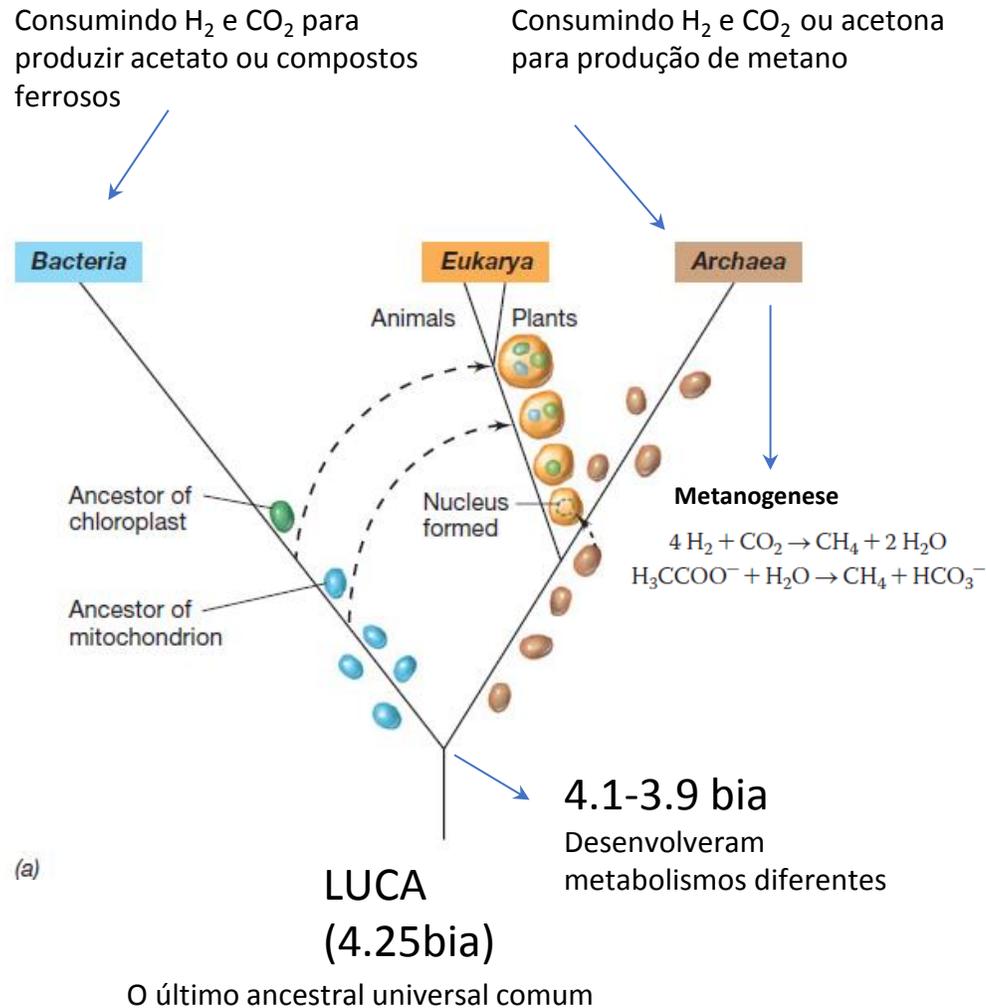


Fonte de carbono

Autotróficos: CO₂

Heterotróficos: compostos orgânicos

Diversidade Metabólica e Morfológica



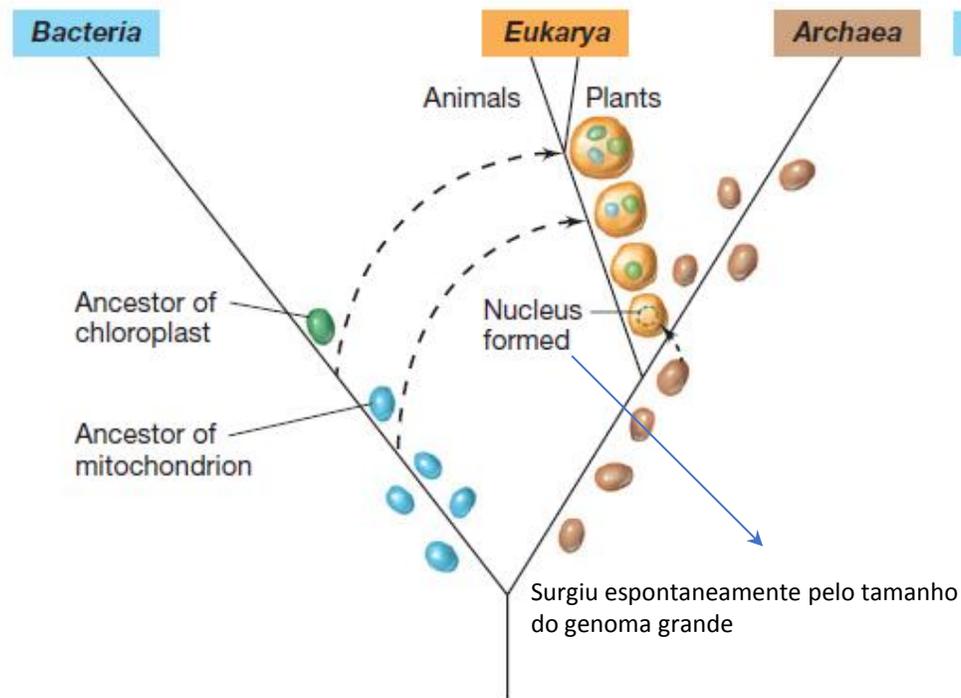
Archaea

Algumas características interessantes:

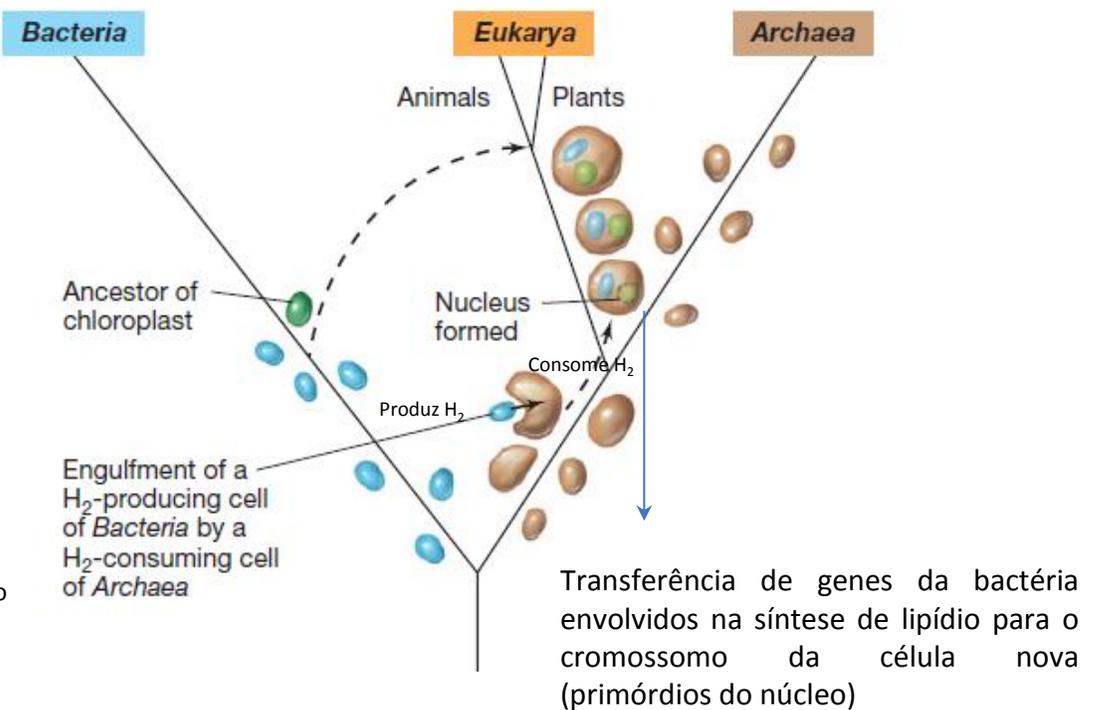
- A maioria são extremófilas
- Altas temperaturas
- Extremos de pH e salinidade
- Todos são quimiotróficos
- Exceção: *Halobacterium* pode usar luz para obter energia (forma muito diferente dos fototróficos)

Origem dos eucariotos - Endossimbioótica

- Como a membrana nuclear foi formada?
- Qual célula adquiriu as mitocôndrias e posteriormente o cloroplasto



Hipótese do hidrogênio





•DIVERSIDADE BIOLÓGICA

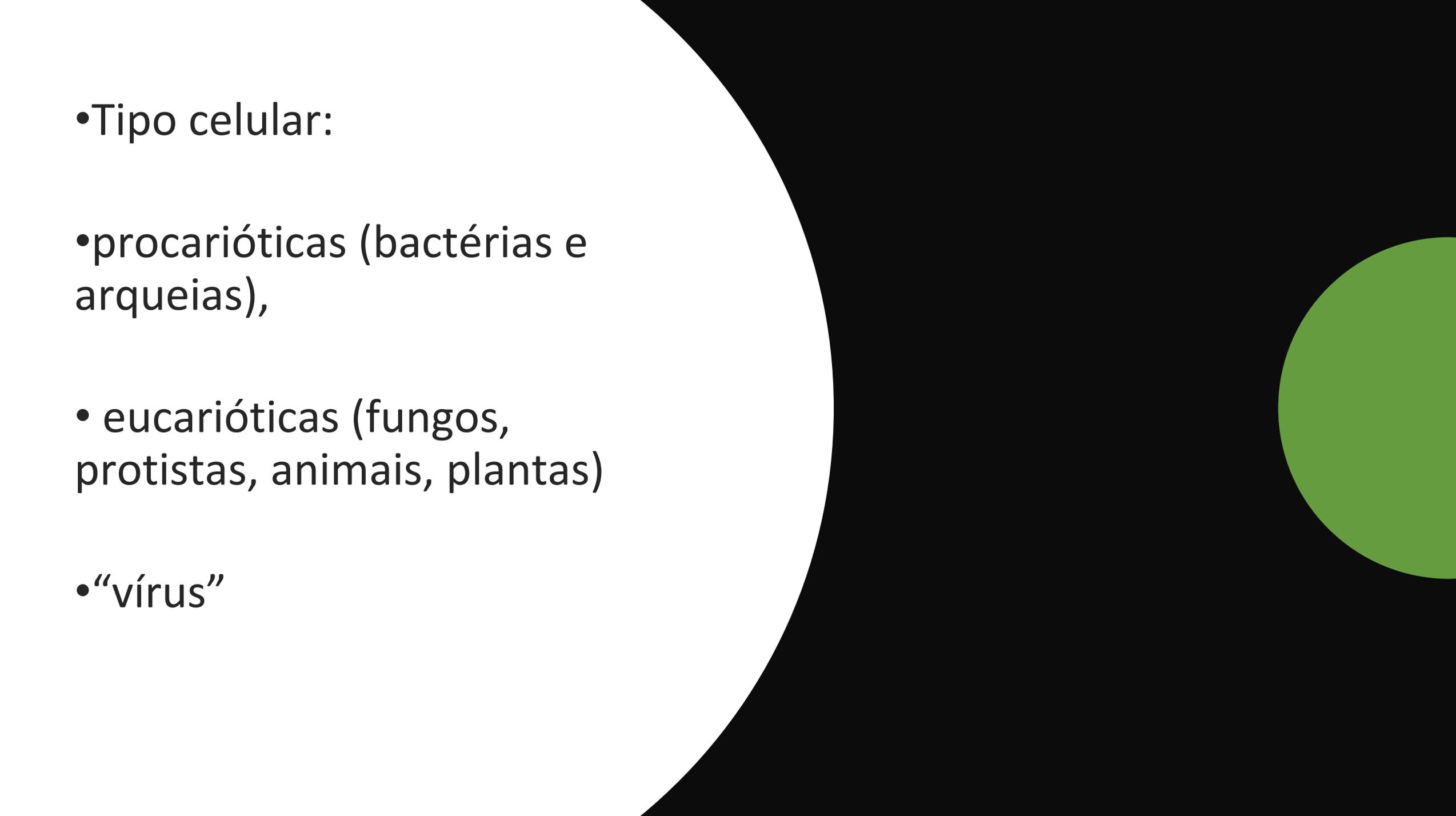
•A diversidade biológica, ou biodiversidade, compreende todas as formas de vida do planeta (animais, plantas e **microorganismos**), suas diferentes relações e funções e os diversos ambientes formados por eles. É responsável pela manutenção e recuperação do equilíbrio e da estabilidade dos ambientes.





O que é um microrganismo?

Um micro-organismo, microrganismo, ou micróbio é um organismo microscópico, que pode existir em forma unicelular ou em uma colônia de células



- Tipo celular:

- procarióticas (bactérias e arqueias),

- eucarióticas (fungos, protistas, animais, plantas)

- “vírus”

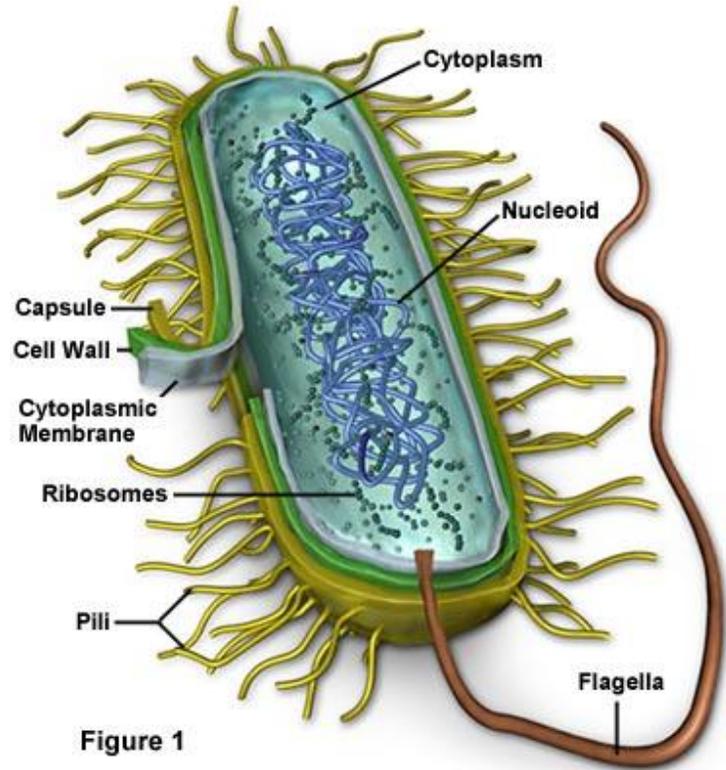
- . O que é um microrganismo?
- . A origem dos microrganismos.
- . Tamanho x quantidade.
- . Importância dos microrganismos

Over 11,000 species of bacteria have been identified using microscopic identification of cell shape and metabolic activity, Gram staining techniques, and genetic identification of RNA and DNA sequences.

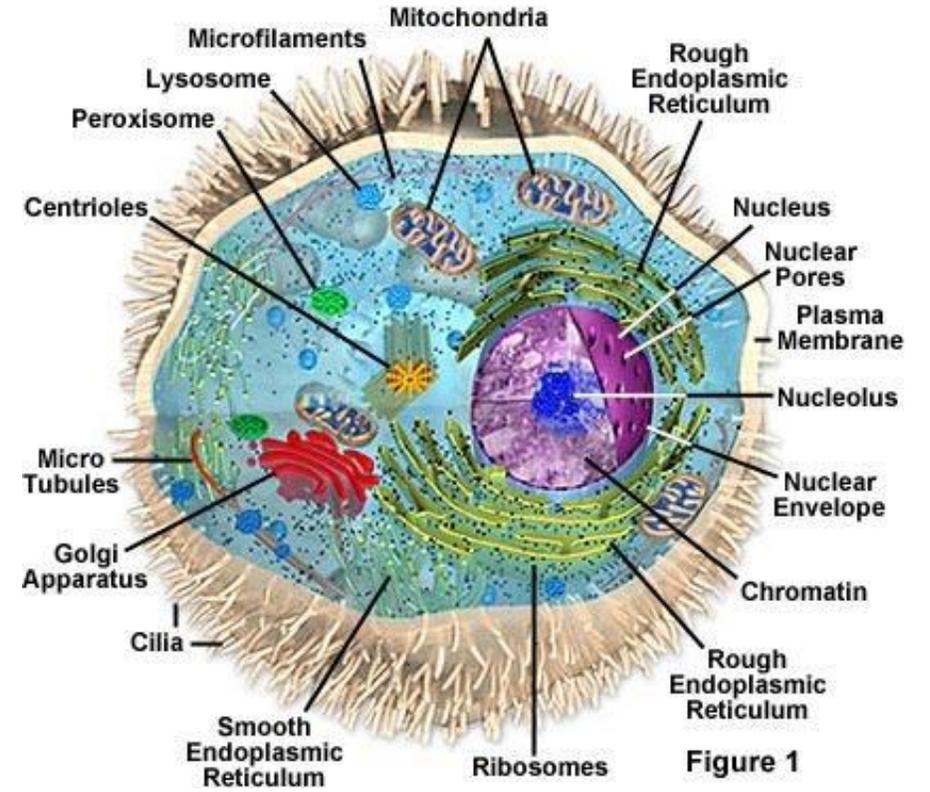
There are 500 named species of archaea, divided into two phyla: the euryarchaeota and the crenarchaeota.

There are eight
Super groupings of eukaryotes,
all of them include single-cell
organisms, and five are
entirely microbial.

Prokaryotic Cell Structure



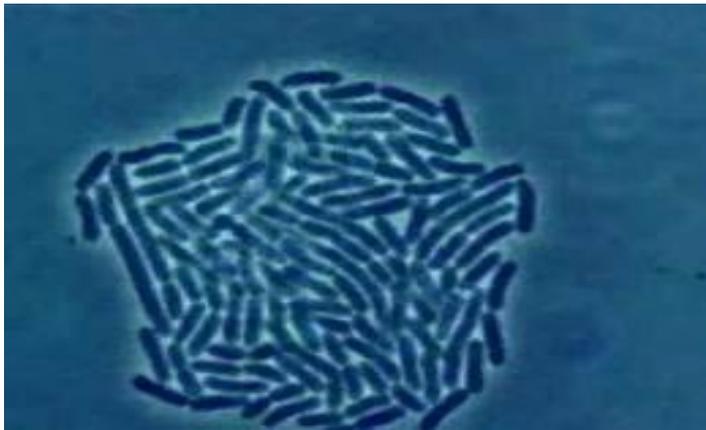
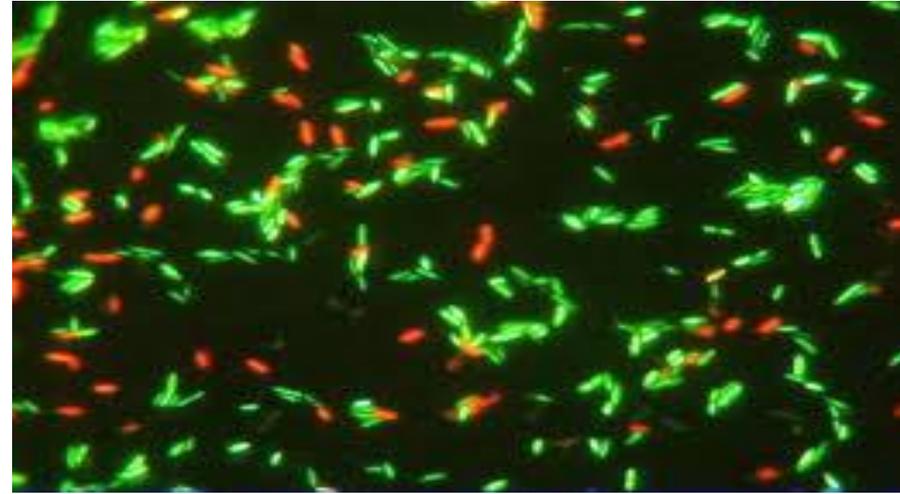
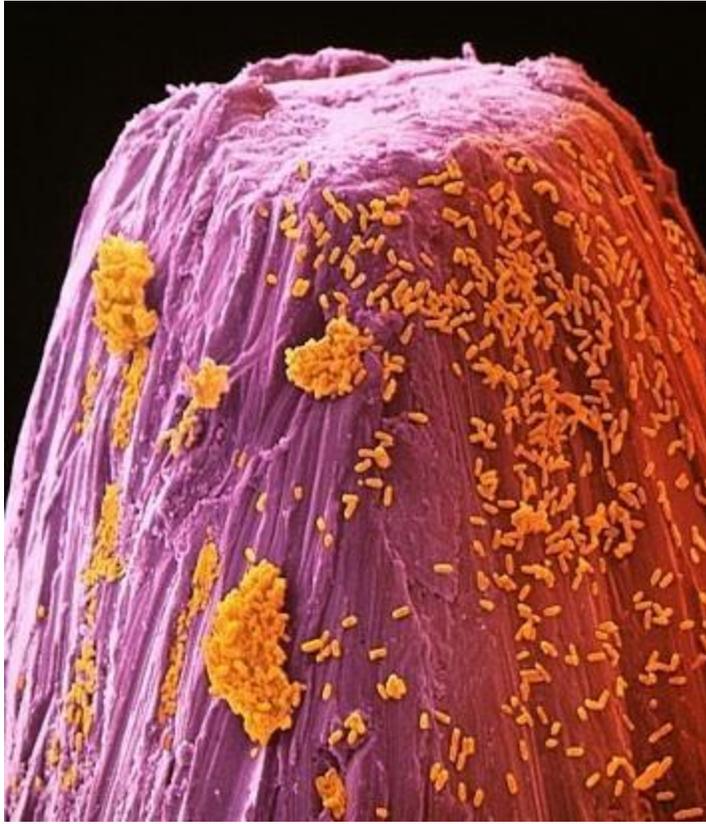
Anatomy of the Animal Cell



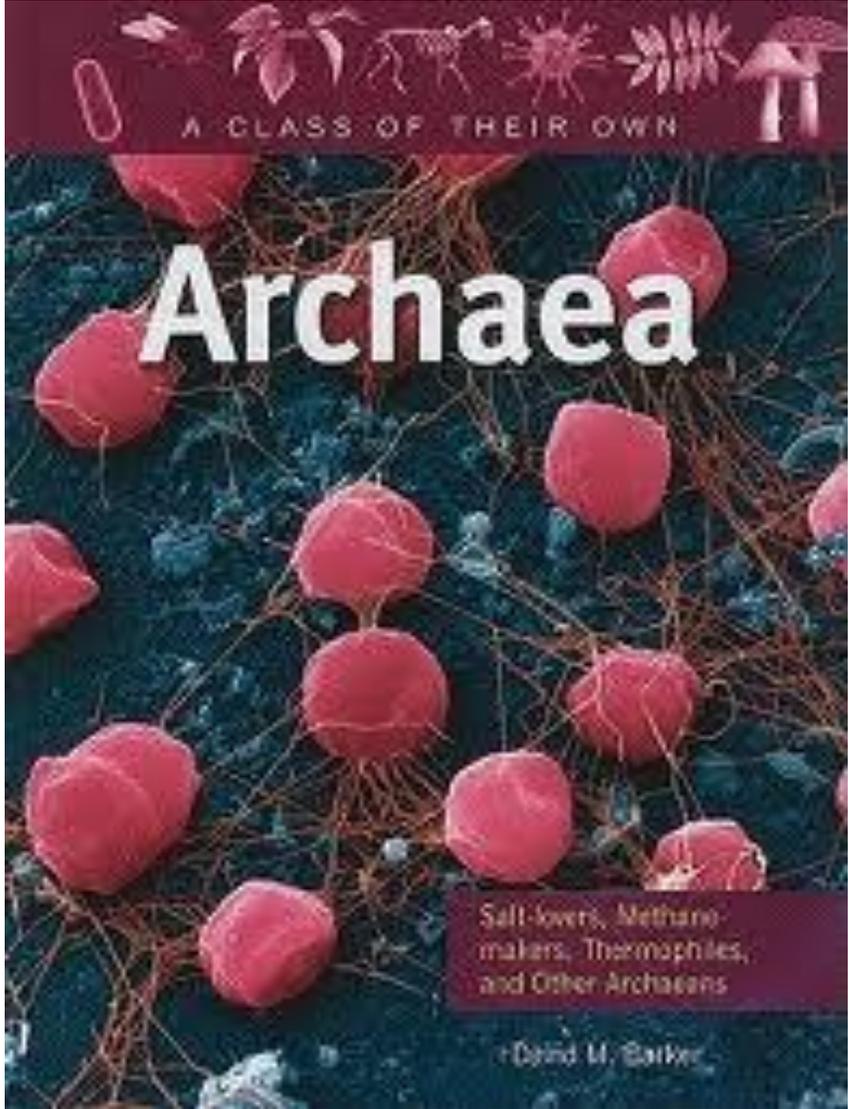
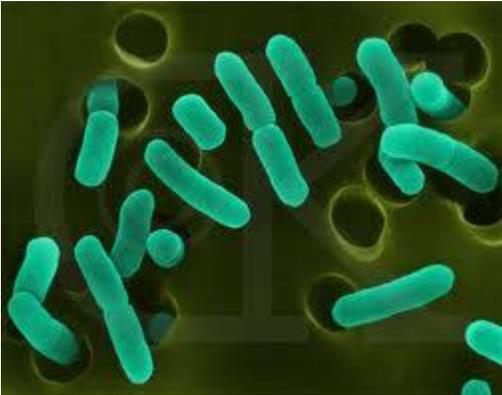
Células procariótica

eucariótica

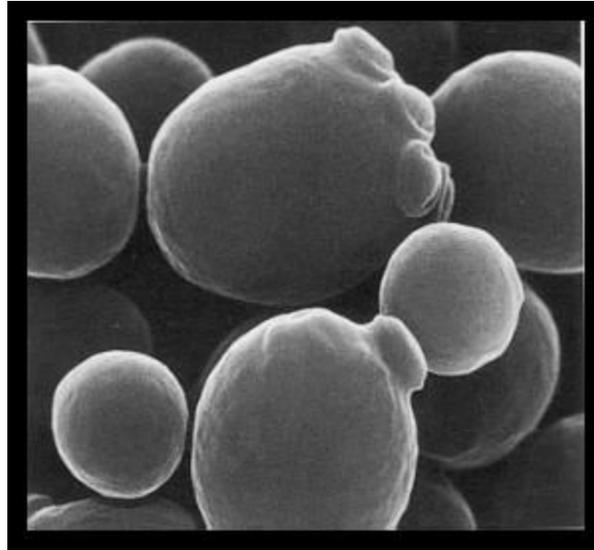
BACTÉRIAS



Arqueias



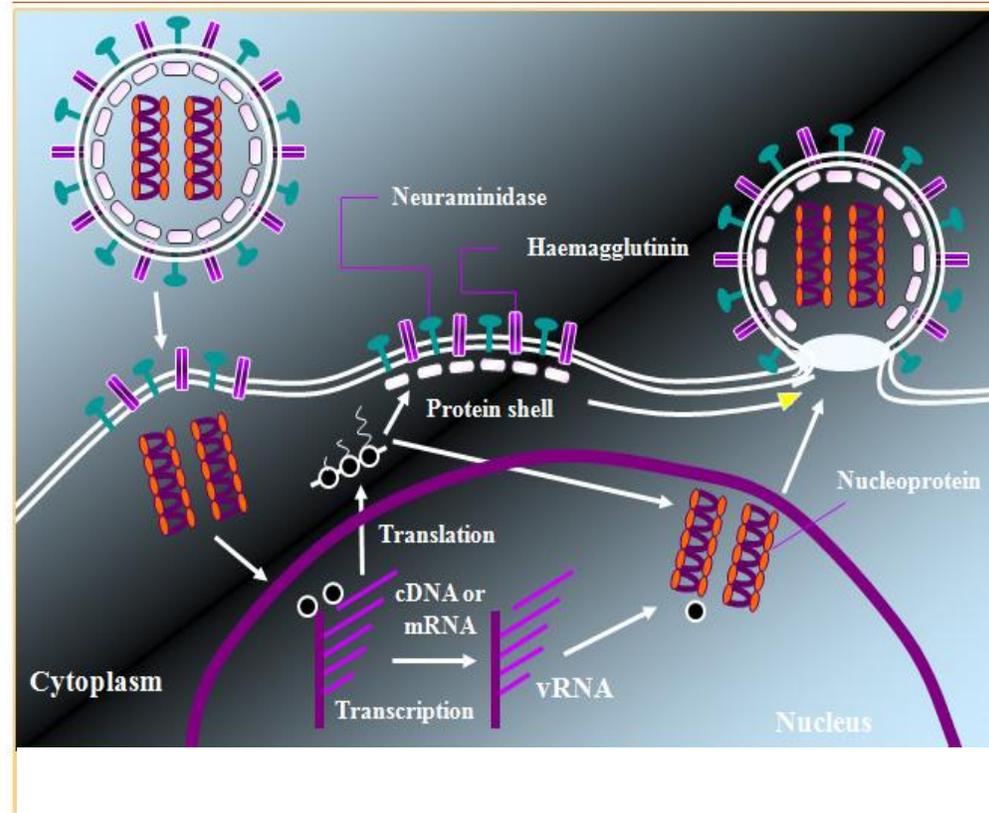
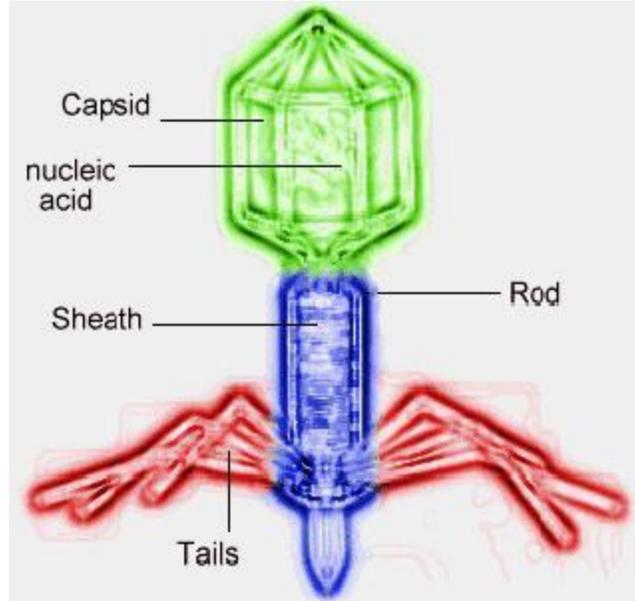
Fungos



Protozoários



VÍRUS



Características comuns aos microrganismos

compartimentalização
e metabolismo;

crescimento,

diferenciação,

comunicação,

movimento

evolução.

1. Metabolism

Uptake of nutrients from the environment, their transformation within the cell, and elimination of wastes into the environment. The cell is thus an *open system*.

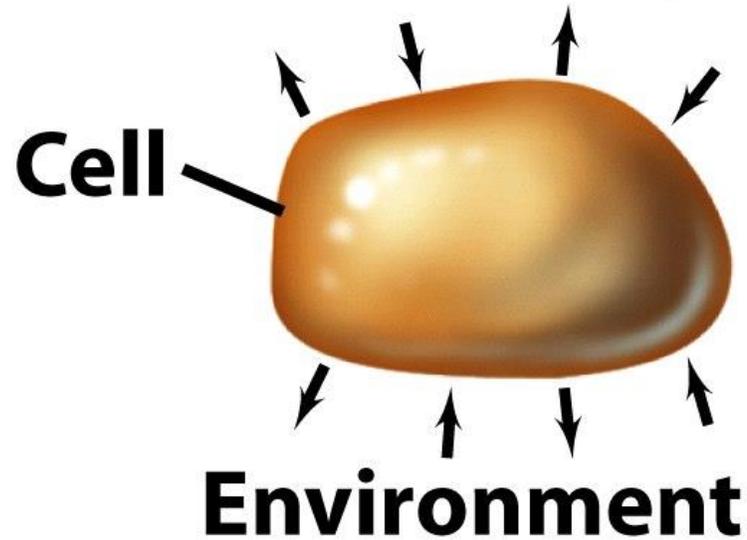


Figure 1-3 part 1 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

2. Reproduction (growth)

Chemicals from the environment are turned into new cells under the direction of preexisting cells.

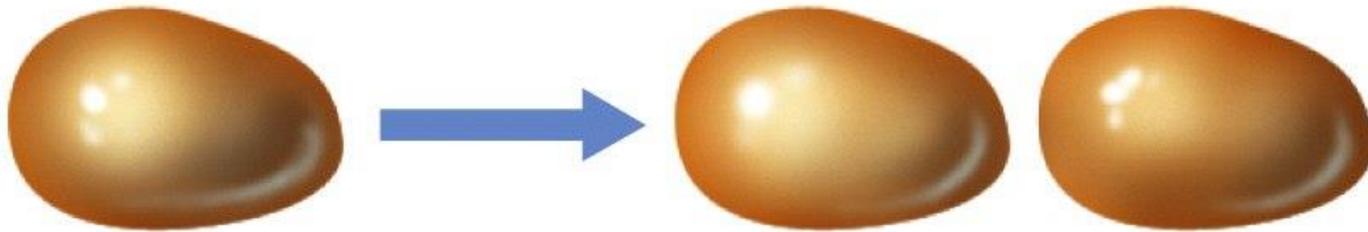


Figure 1-3 part 2 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

3. Differentiation

Formation of a new cell structure such as a spore, usually as part of a cellular *life cycle*.

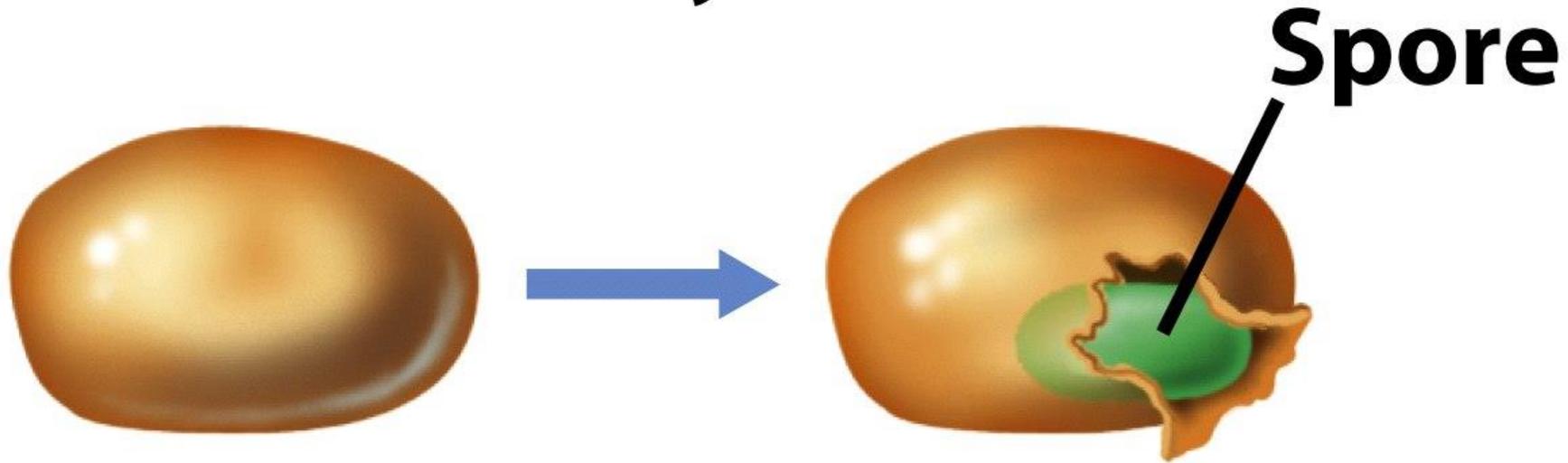


Figure 1-3 part 3 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

4. Communication

Cells *communicate* or *interact* primarily by means of chemicals that are released or taken up.

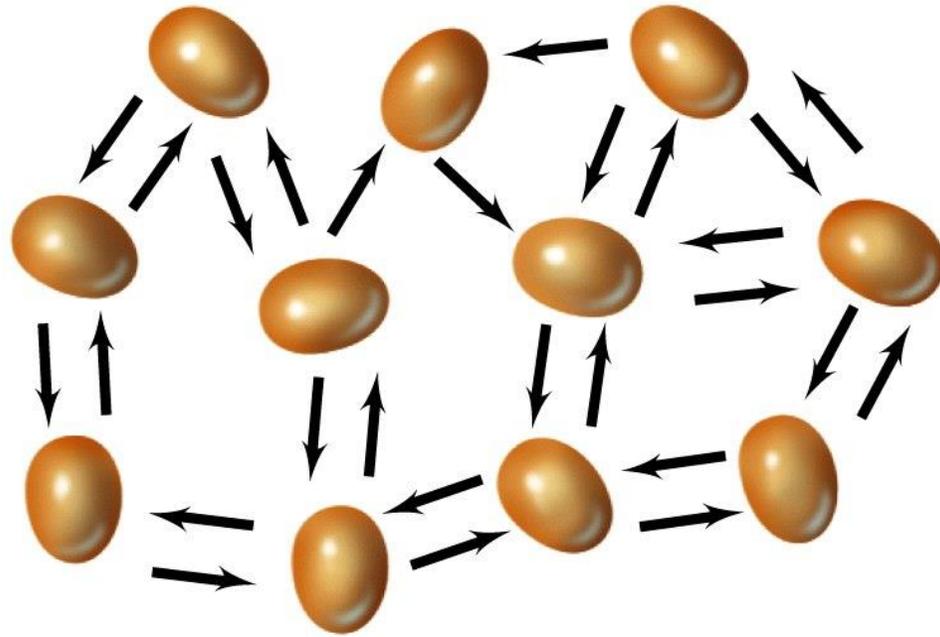


Figure 1-3 part 4 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

5. Movement

Living organisms are often capable of self-propulsion.

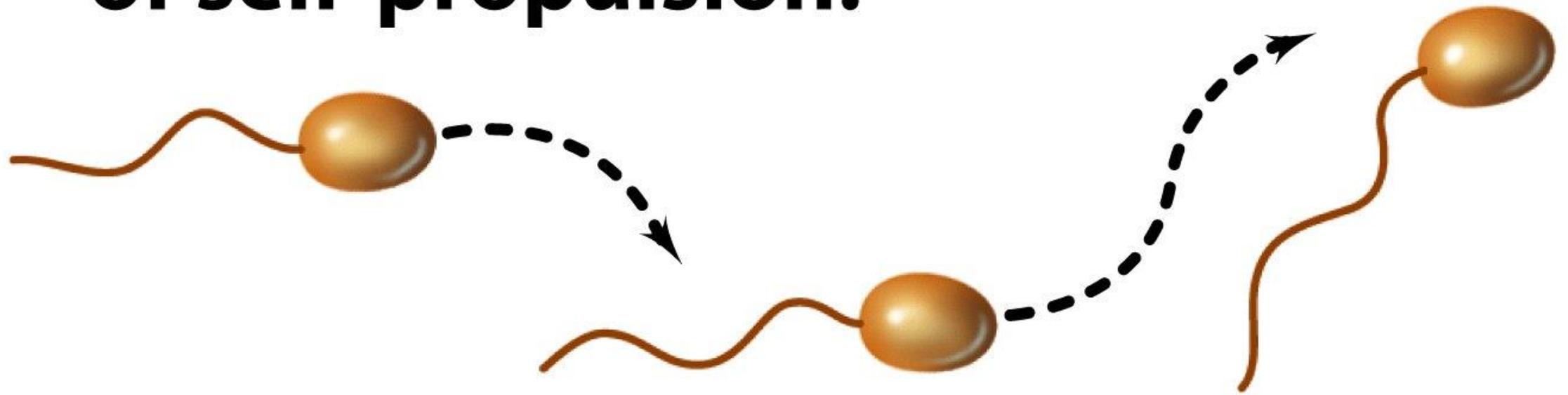
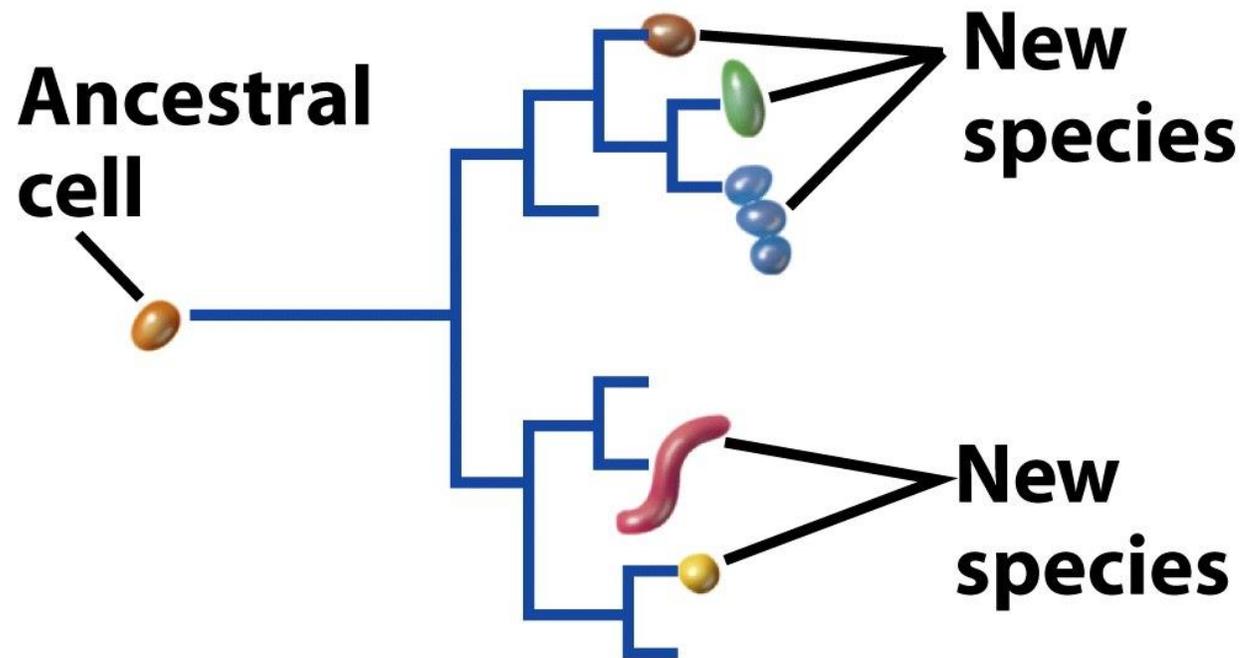


Figure 1-3 part 5 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

6. Evolution

Cells contain genes and *evolve* to display new biological properties. Phylogenetic trees show the evolutionary relationships between cells.





Microrganismos são ubíquos

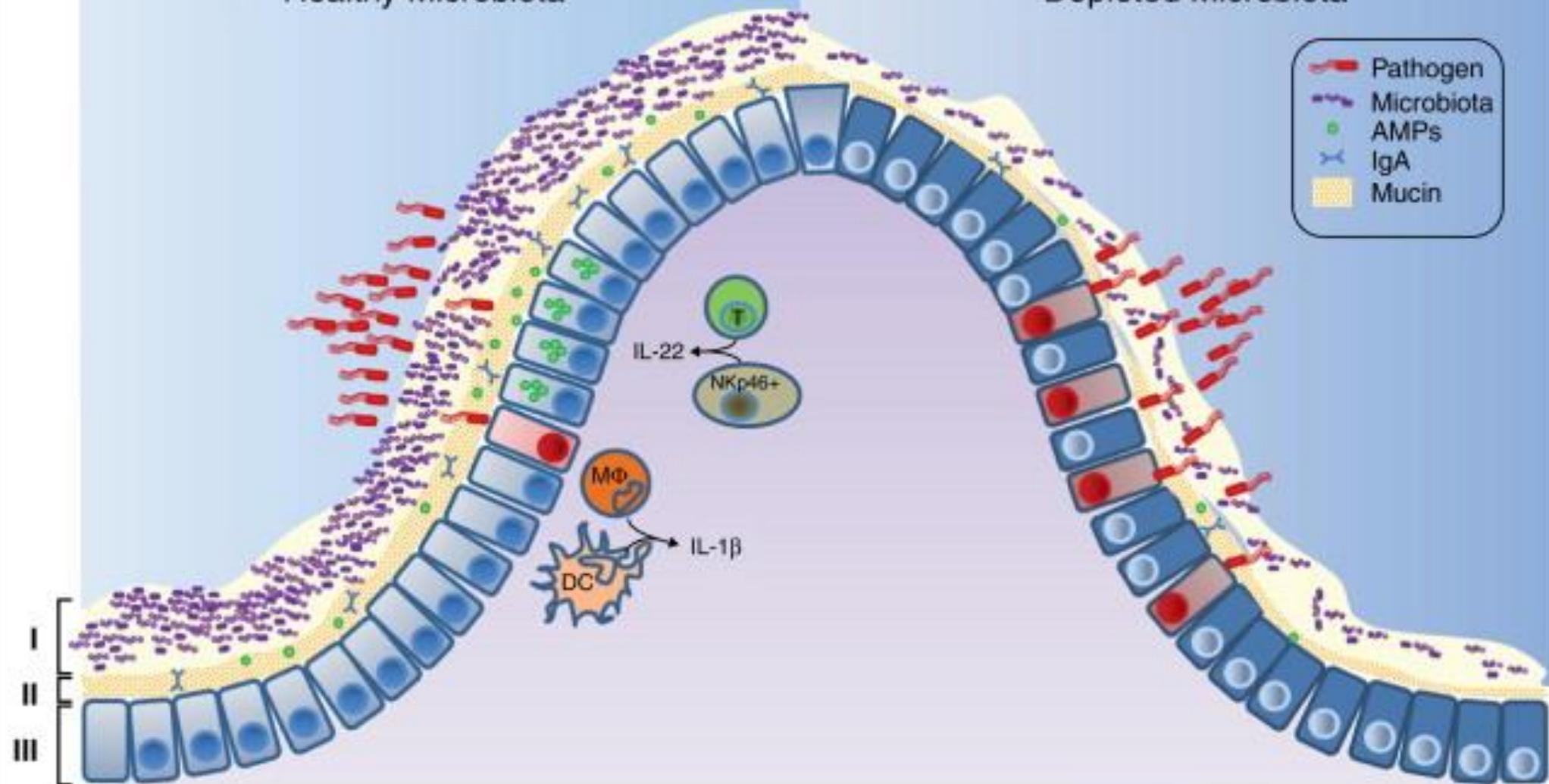


MICROBIOTA

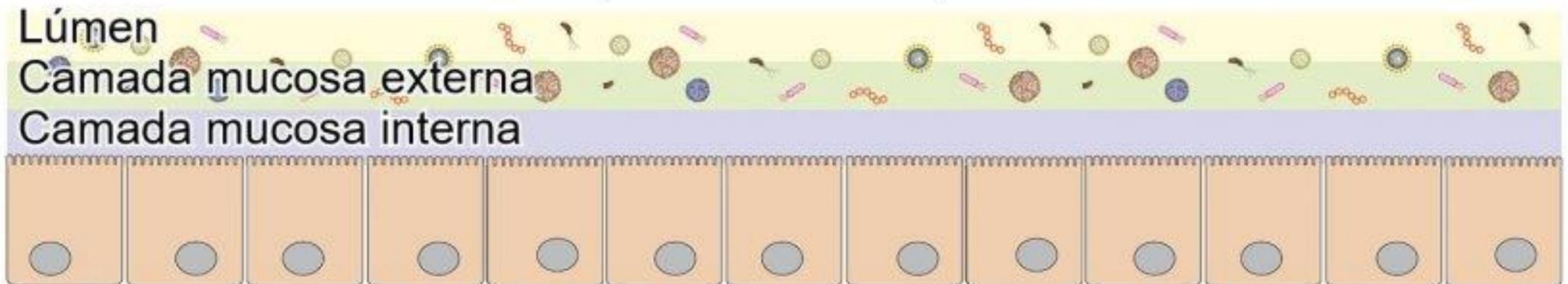


Healthy Microbiota

Depleted Microbiota



Papel da microbiota



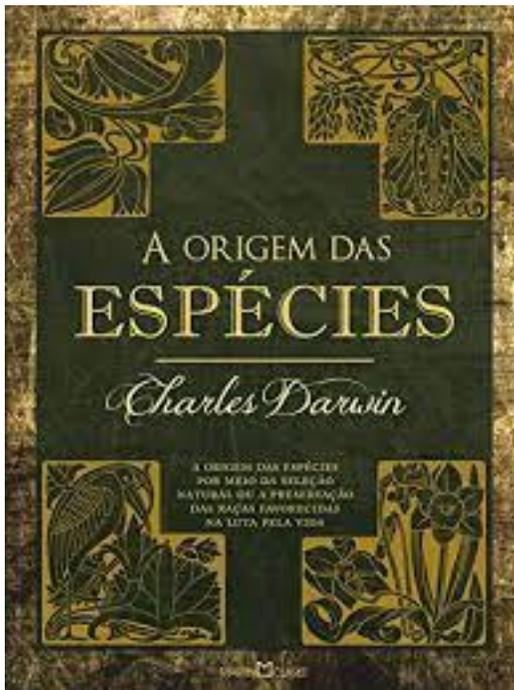
Principais diferenças entre bactérias, arqueas e eucariotos

Característica	Bactéria	Arquea	Eucariótica
Estrutura celular procariótica	sim	sim	não
DNA organizado em CCC	sim	sim	não
Núcleo	Não	não	sim
Ribossomo	70S	70S	80S
Introns	Não	não	sim
Operons	sim	sim	não
Capping e cauda de polyA no mRNA	não	não	sim
Plasmídeos	sim	Sim	raros

	Bactéria	Arqueas	Eucariótos
Nitrificação	sim	não	não
Desnitrificação	sim	sim	não
Redução de S^0 ou SO_4^{2-} para H_2S ou Fe^{3+} para Fe^{2+}	sim	sim	não
Fixação de nitrogênio	sim	sim	não
Metabolismo baseado em rodopsina	sim	sim	não
Quimiolitotrofia (Fe, S, H_2)	sim	sim	não
Vesículas gasosas	sim	sim	não
PHA	sim	sim	não

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

Seleção Natural (características adquiridas conferem habilidades diferenciadas para melhor), maior adequação ao meio

- Mutações
 - Erros no processo de replicação
 - radiação UV
- Duplicação génica (parálogos)
- Transferência horizontal de genes
- Recombinação

Análise Evolutiva – árvore Filogenética

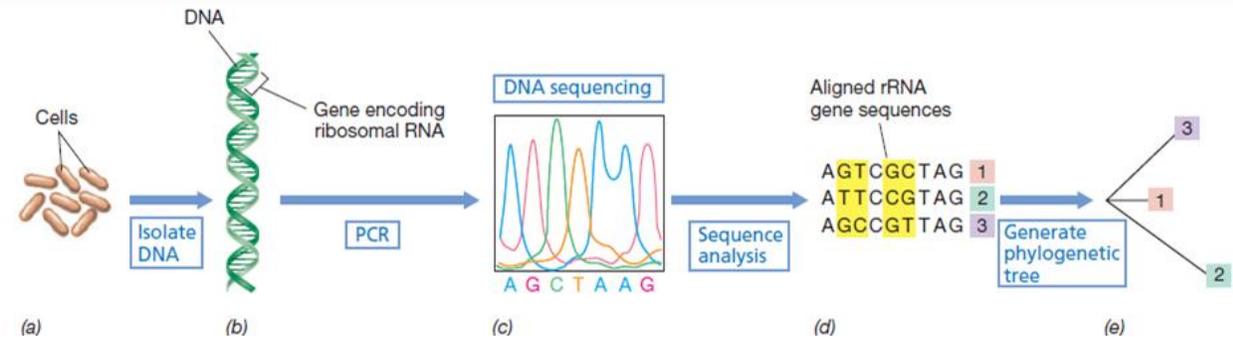
- Carl Woese introduziu o conceito de que a comparação das sequências de DNA que codificam a subunidade menor do RNA ribossômico (SSU rRNA) poderia ser utilizada para distinguir um organismo do outro.

- Distribuídos Universalmente
- Função constante entre os organismos vivos
- Modificam lentamente – altamente conservados
- Tamanho adequado para análise evolutiva

- As sequências de rRNA (16S (procaríoto) ou 18S (eucarioto)) de 2 organismos diferentes são alinhadas, a porcentagem de similaridade é computada e considerada como uma medida da “distância evolucionária” entre os 2 organismos.

- Assim são construídas as ÁRVORES FILOGENÉTICAS

(Woese estabeleceu que existem 3 domínios – Bactérias, Archaea e Eucariótos)



Filogenia Microbiana

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

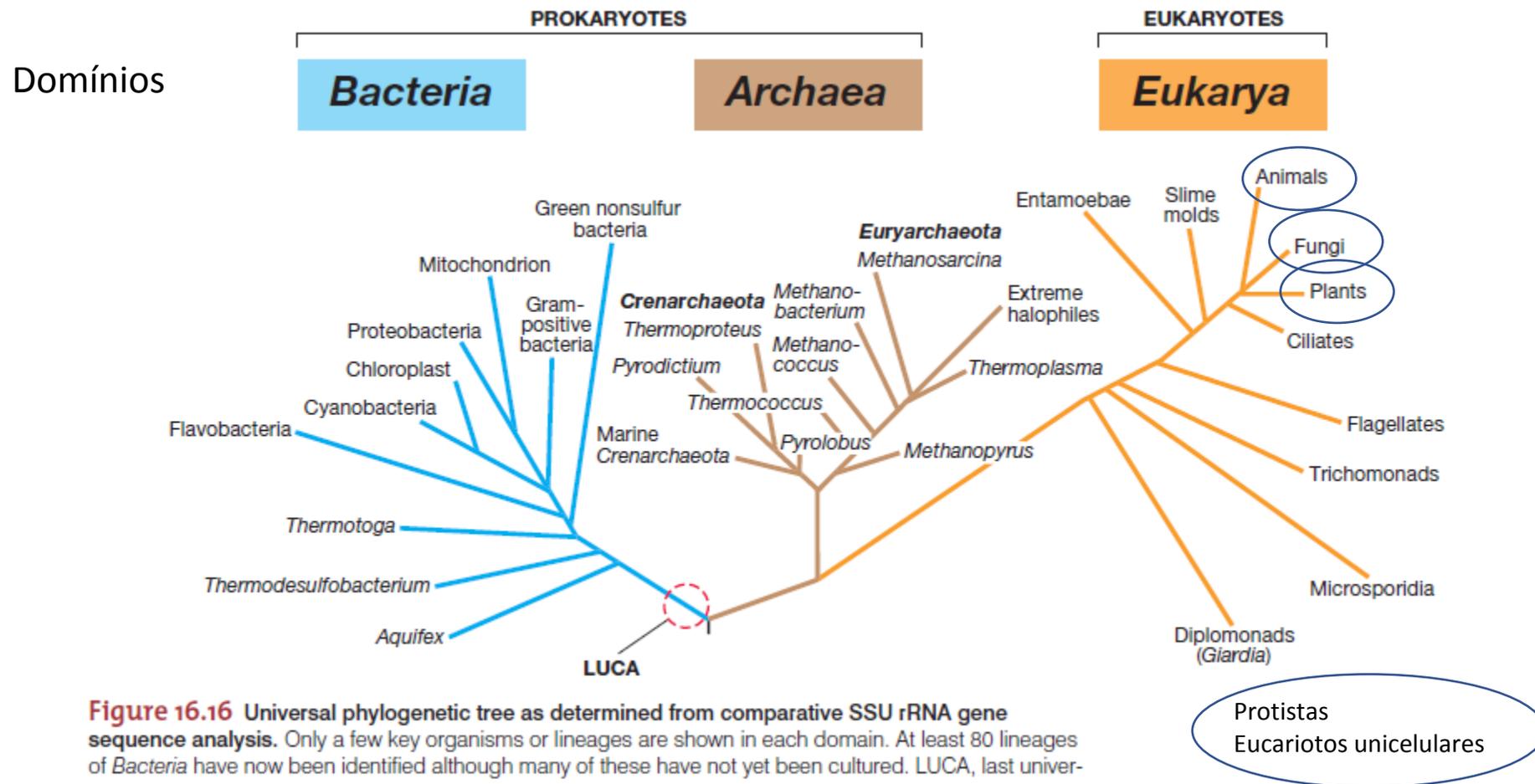


Figure 16.16 Universal phylogenetic tree as determined from comparative SSU rRNA gene sequence analysis. Only a few key organisms or lineages are shown in each domain. At least 80 lineages of *Bacteria* have now been identified although many of these have not yet been cultured. LUCA, last universal common ancestor.

Filogenia Microbiana

- Muitos genes comuns nos três Domínios, apesar de terem divergido 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

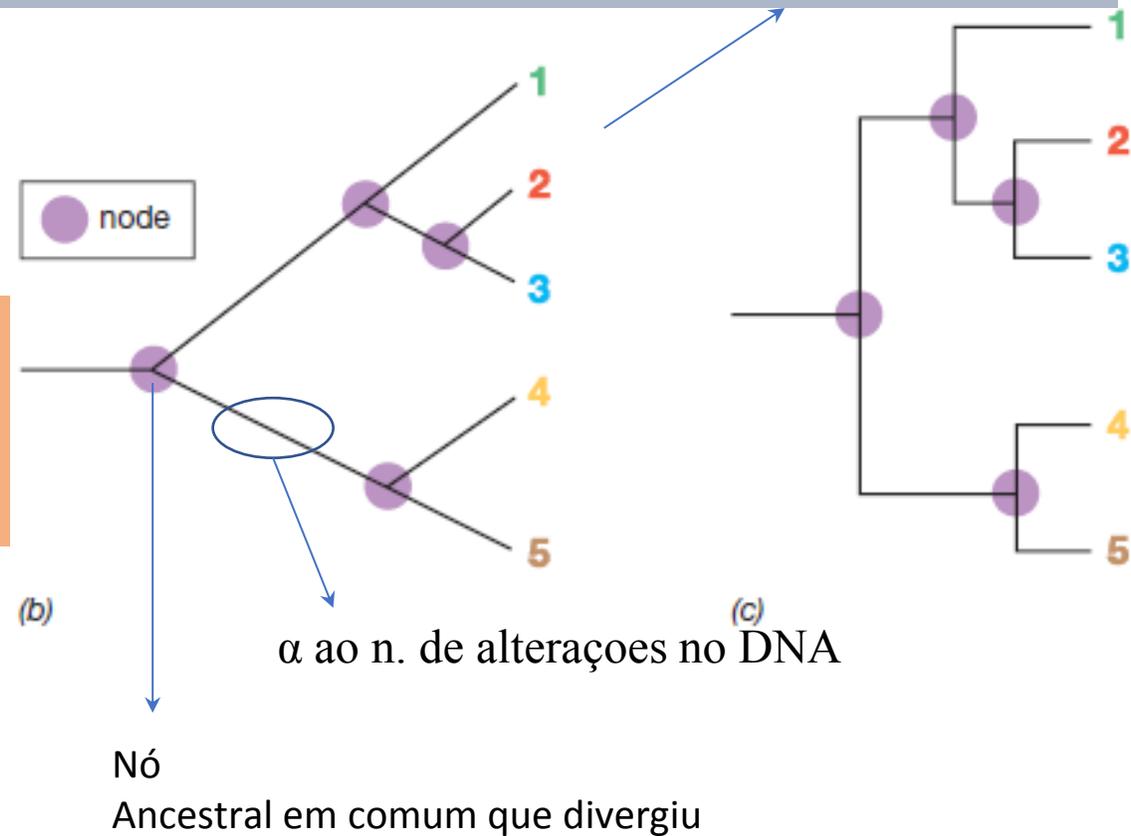
Árvore Filogenética

- Ilustração gráfica das relações entre sequências de genes em estudo

- Nós
- Ramos

Ramos – linhagens individuais

A espécie 2 e 3 são mais relacionadas pq compartilham um ancestral em comum, assim como a 5 e a 4



ED Distância Evolutiva

Organismo	Seqüência	Análise
A	CGUAGACCUGAC	De A → B ocorrem três diferenças, em um total de doze; assim $\frac{3}{12} = 0,25$
B	CCUAGAGCUGGC	
C	CCAAGACGUGGC	
D	GCUAGAUGUGCC	

(a) Alinhamento de seqüências e análise

Distância evolutiva

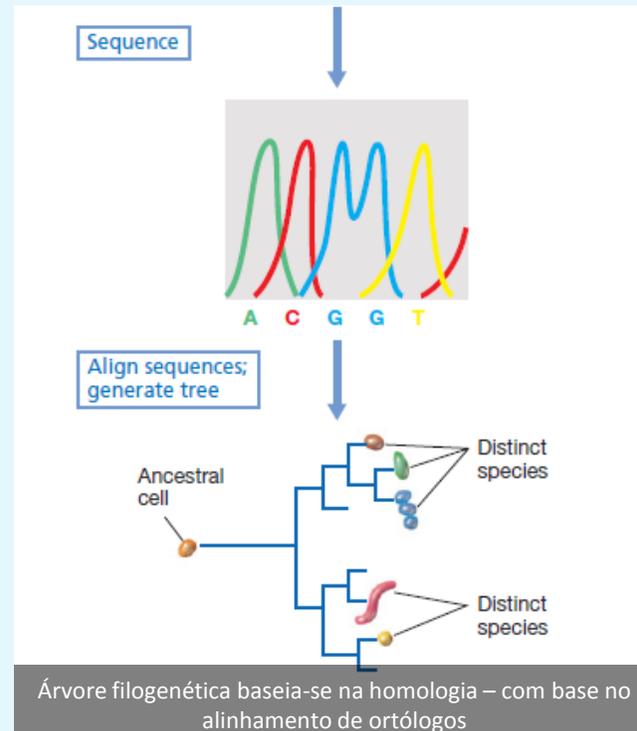
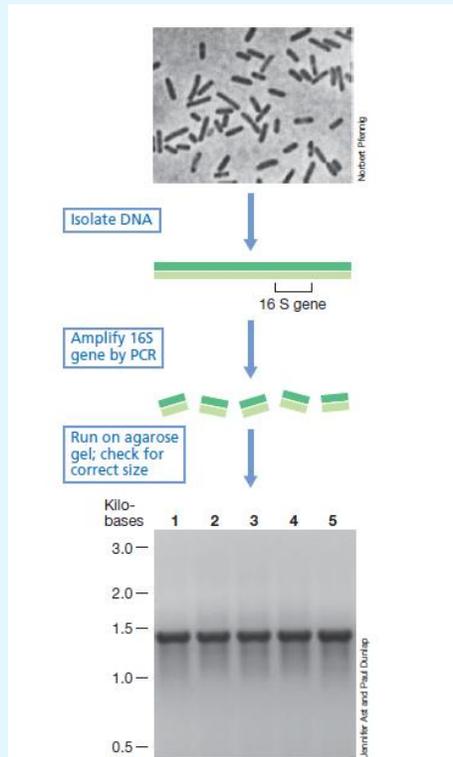
E_D	A	→	B	0,25
E_D	A	→	C	0,33
E_D	A	→	D	0,42
E_D	B	→	C	0,25
E_D	B	→	D	0,33
E_D	C	→	D	0,33

(b) Cálculo da distância evolutiva

Análise Evolutiva – árvore Filogenética

- Outros genes podem auxiliar na filogenia
 - Fator TU de alongação da síntese proteica
 - Hsp60 – choque térmico
 - tRNA sintetases (vários)
- Relógios Moleculares
 - Correlacionam o número de modificações no DNA com o tempo. O problema é que velocidade de mutação não é constante entre os três domínios
 - Correlações diretas e confiáveis são difíceis
 - Medidas relativas são mais confiáveis

Métodos Analíticos



- Amplificação da subunidade 16S da rRNA por PCR
- Sequenciamento

Assinaturas nas sequências de rRNA são usadas para a identificação e classificação

CACYYG	315	0	>95	0
AAACUCAA	910	3	100	0
AAACUUAAG	910	100	0	100
YUYAAUUG	960	100	<1	100
CAACCYYCR	1110	0	>95	0
UCCUG	1380	>95	0	100
UACACACCG	1400	0	>99	100
CACACACCG	1400	100	0	0

- Sequências específicas (assinaturas) são usadas como sondas (fita simples de DNA marcada) para identificação da taxonomia do organismo
- Algumas sequências são específicas e algumas são genéricas
- Pode construir sequências específicas para identificar um grupo alvo

Conceitos Importantes de Evolução

Genes homólogos Genes de organismos distintos herdados a partir do mesmo ancestral. Homologia não significa igualdade, simplesmente origem comum

Genes ortólogos: genes que divergiram por especiação o cada descendente possui uma cópia do gene o tendência à conservar função: ■ ambas instâncias continuam sendo necessárias

- 
- Genes parálogos: genes que divergiram por duplicação
 - os genes parálogos estão presentes em mais de uma cópia
 - Após a divergência a função tende a mudar
 - Similaridade %
 - Identidade %

Como estudar um habitat específico

Características gerais do solo

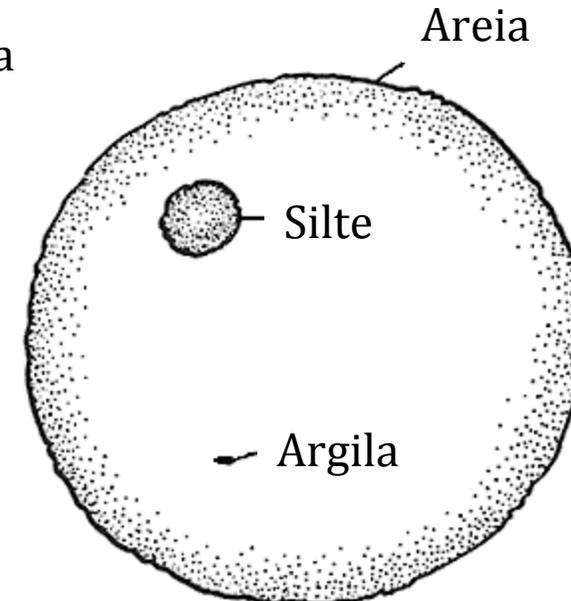
Altamente variáveis temporal e espacialmente, micro e macroestruturalmente

- 1 grama de solo pode conter:

- ✓ 90 (9.10) a 90 bi (9.10⁹) de partículas
- ✓ 10 à 8 milhões (8.10⁶) de cm² de superfície exposta

Estas variações dependem da proporção areia, silte e argila

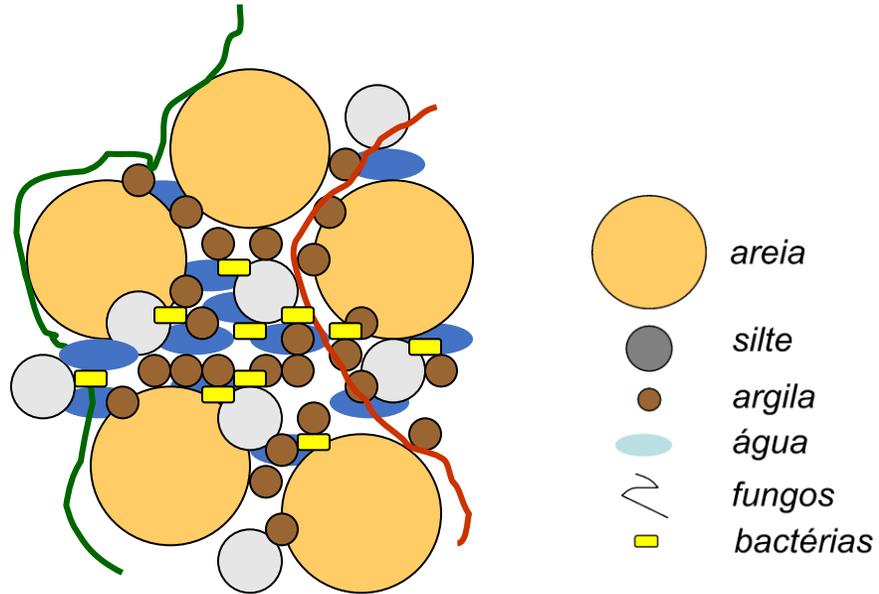
areia > silte > argila



Fonte: www.pnwmg.org

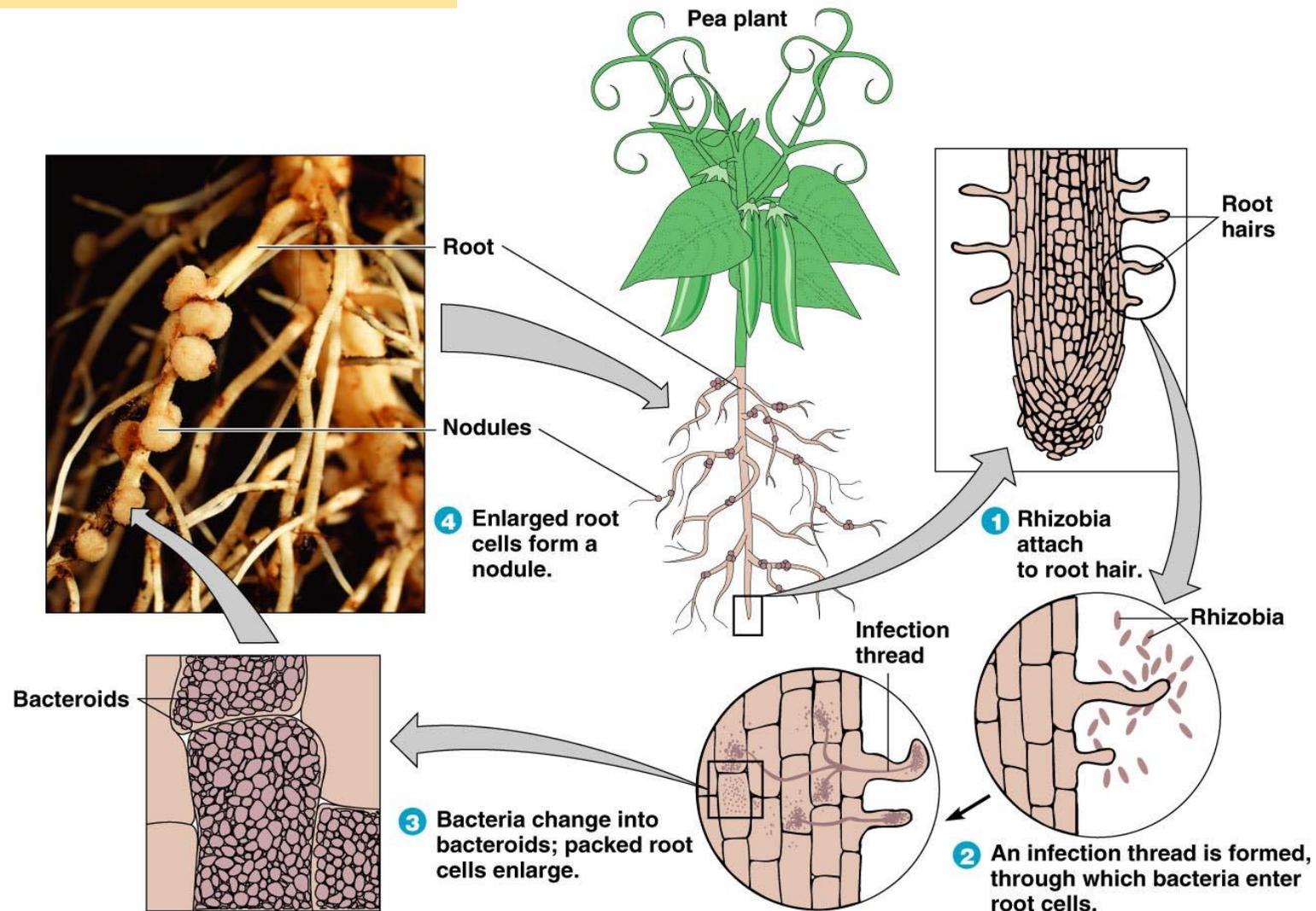
Composição e estrutura do solo

- ✓ Organismos maiores colonizam macroporos
- ✓ Células menores colonizam ambos - macro e microporos

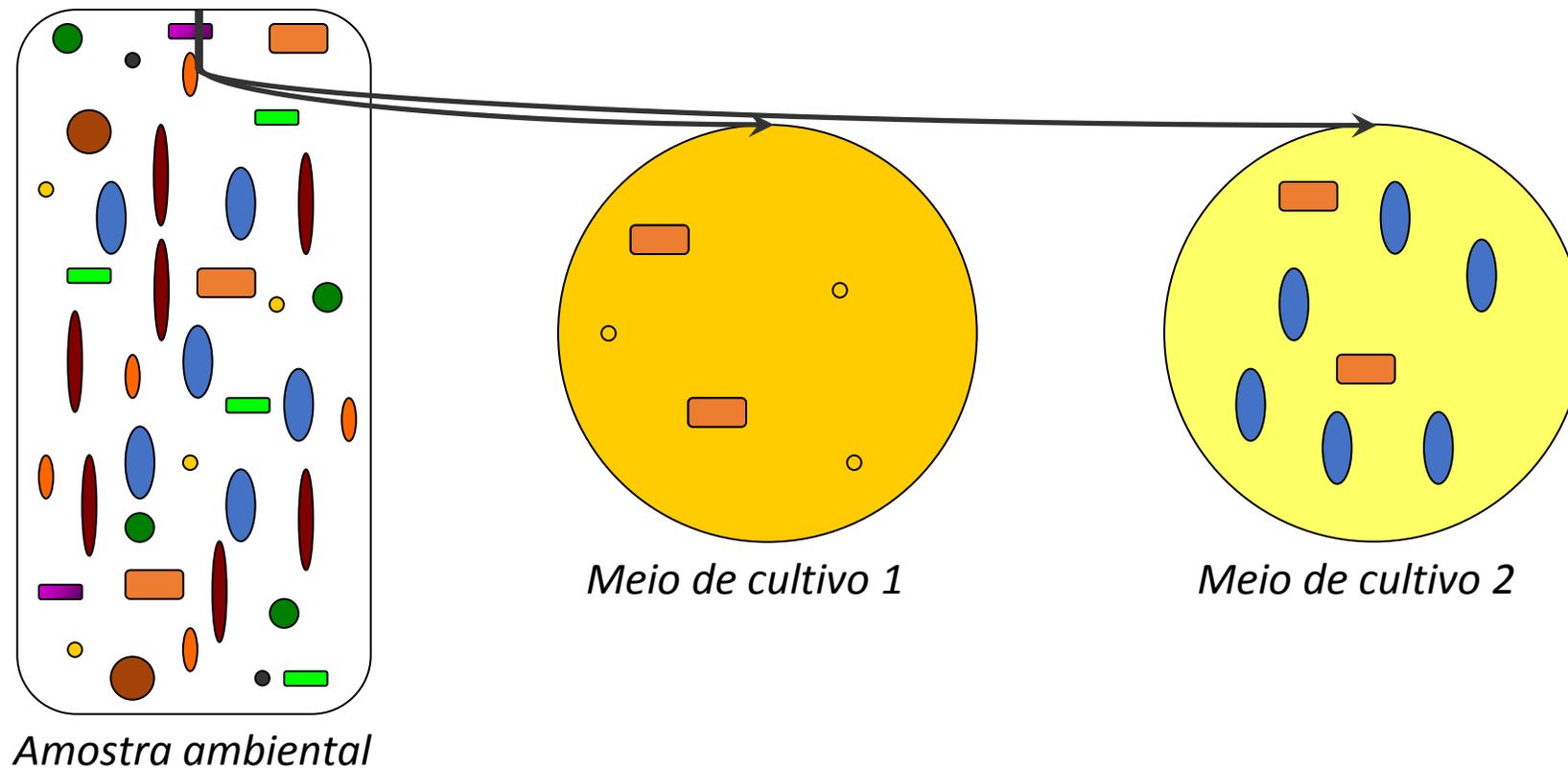


*exemplo de um
agregado de solo*

Associação bactéria-plantas



Como acessar os microrganismos???



Como acessar os microrganismos



Culturabilidade microbiana não é suficiente!!!

- ✓ Baixíssima representatividade da comunidade bacteriana por meio de coleções de cultura
- ✓ Somente 0.5 à 10% dos microrganismos são cultiváveis

Filogenia baseada em sequências de DNA

- ✓ Sequências não mudam em diferentes ambientes
- ✓ Sequências são as mesmas durante o ciclo de vida todo
- ✓ Sequências são compostas das mesmas bases em todos os organismos

... the alphabet of evolution has only four letters: C, G, T, A ...

ACTAGTCGATGCATGCATGCATGCATGCT

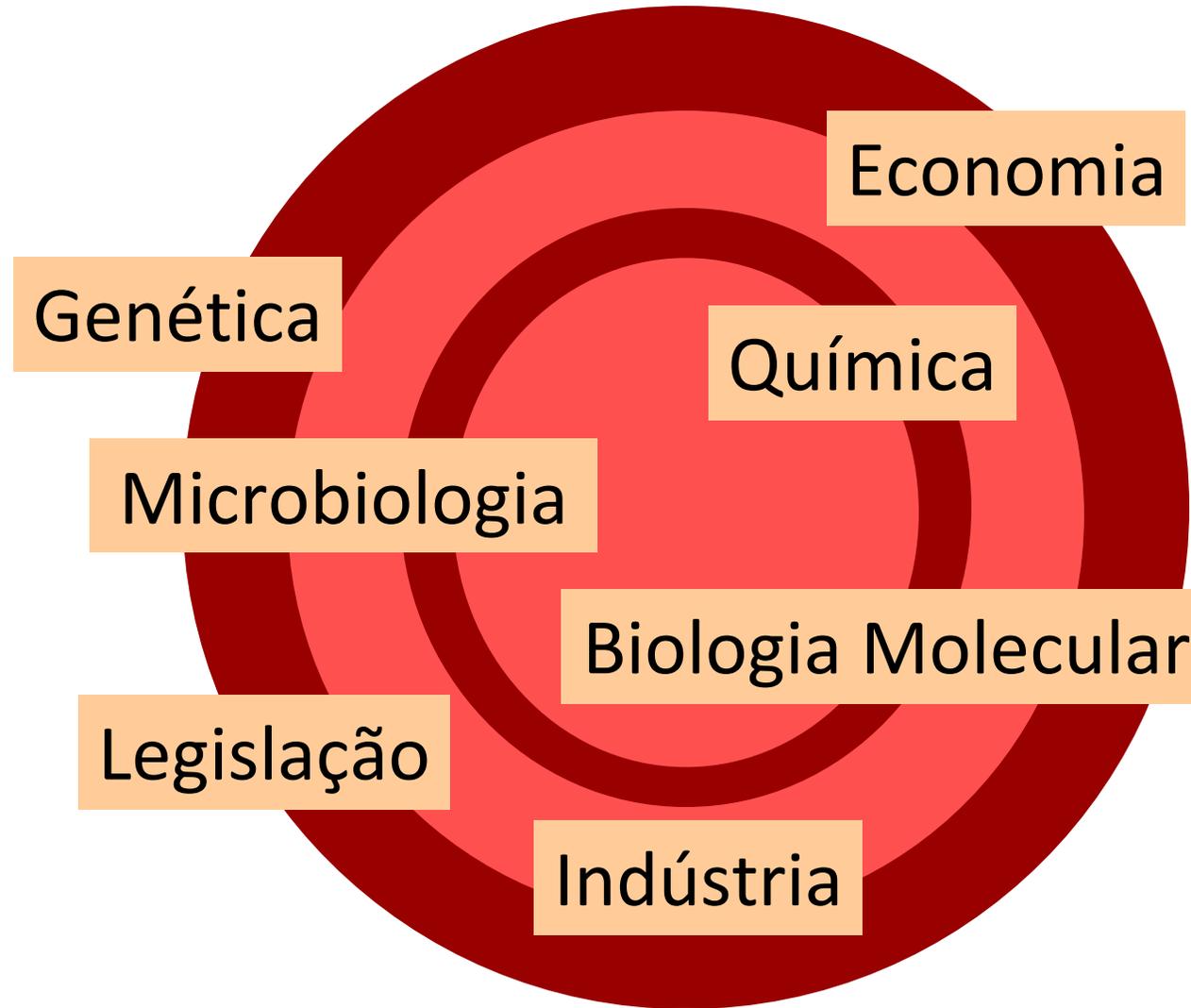
Bioprospecção



- *coleta e exploração de amostras biológicas (plantas, animais, microrganismos)*
- *utilização de conhecimentos locais na descoberta de novos compostos*

Bioprospecção

Assunto multi-disciplinas



Onde buscar os alvos?

"Everything is everywhere, and the environment selects"

"The selective pressure generates natural enriched environments"

Proteínas termotolerantes

Fontes termais,
caatinga

Compostos antimicrobianos

Nichos competitivos

Bactérias PGPR

rizosfera

·
·
·

·
·
·



"Successo da bioprospecção"



Onde buscar os alvos?

"Enriquecimento artificial é possível..."

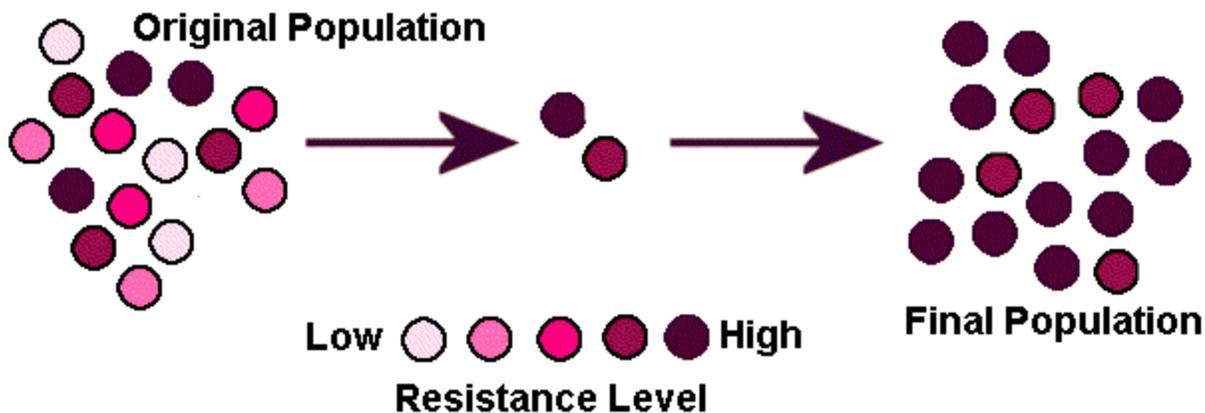
Amostra



Incubação em condições apropriadamente seletivas
(temperatura, salinidade, elicitores, etc...)



Amostras enriquecidas para bioprospecção



Análise Genotípica

- Com a era genômica, miles de 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*

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

Sistemática e Taxonomia

- É o estudo da diversidade dos organismos e suas relações
- Taxonomia, nomeia e classifica os organismos
- Muitos fenótipos são usados para caracterizar os organismos

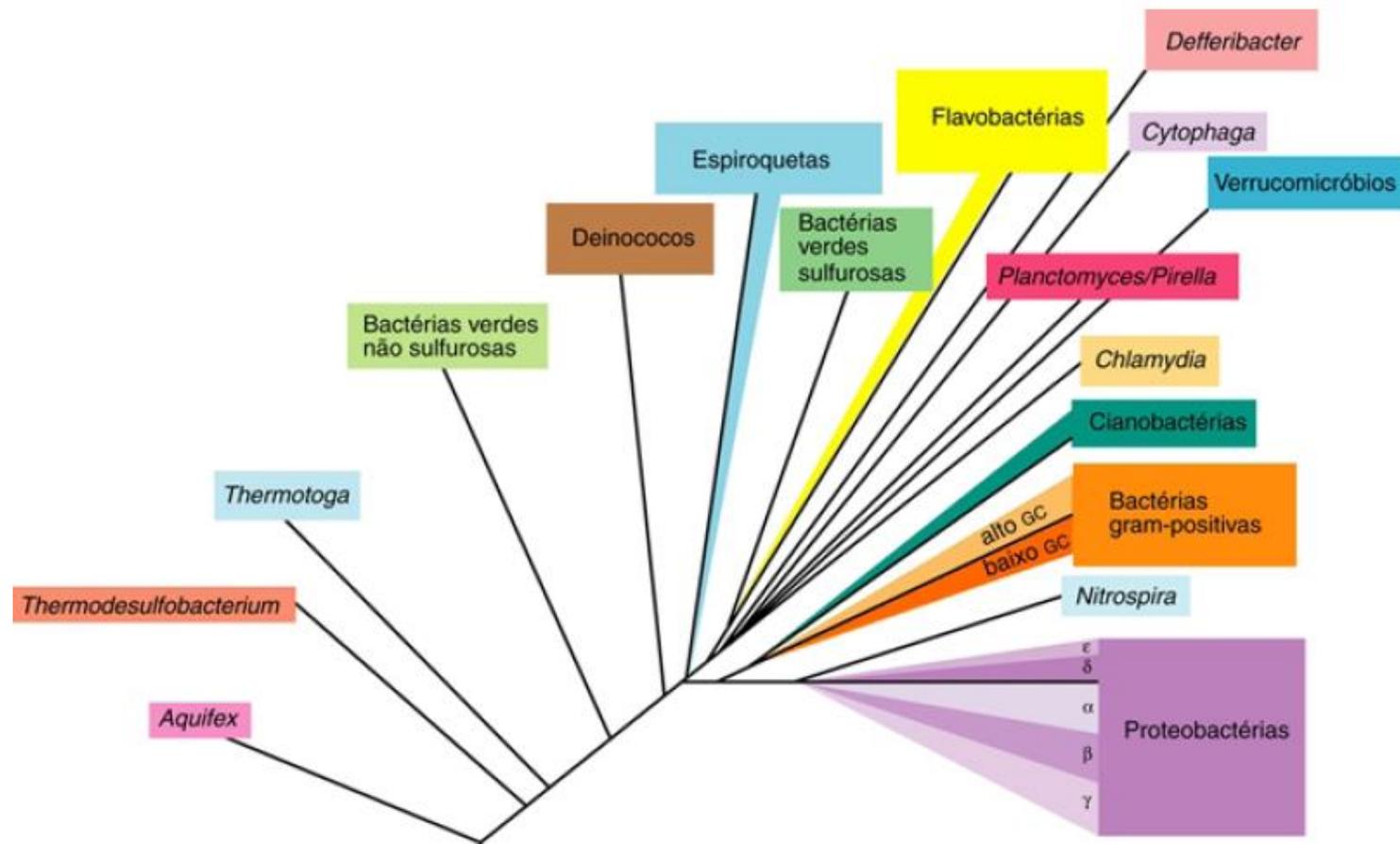
Table 16.2 *Some phenotypic characteristics of taxonomic value*

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 (see Section 3.10).

^bFigure 16.19

Domínio de Bactérias



Protobactérias

- 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

