



DEPARTAMENTO DE
MICroBiologia
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Taxonomia e Diversidade de Procariotos

Uma visão geral dos grupos de procariotos

Robson Francisco de Souza
Laboratório de Estrutura e Evolução de Proteínas
robfsouza@gmail.com

Objetivos de aprendizado

- **Taxonomia de Procariotos**
 - Como microrganismos são classificados?
 - Quais são os principais grupos de bactérias?
 - Qual o impacto da metagenômica:
 - No conhecimento atual sobre diversidade dos organismos?
 - Na classificação dos procariotos?

Taxonomia de microrganismos

- **Taxonomia**

- Definição: taxonomia é a ciência que descreve e classifica os organismos
- Objetivo: entender as relações de parentesco entre os diferentes grupos de organismos

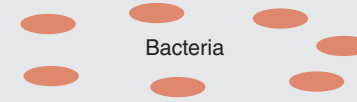
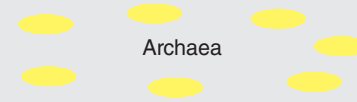
- A taxonomia permite organizar a imensa diversidade de microrganismos em grupos relacionados

- O sistema de classificação taxonômica moderno foi introduzido por **Carl Linnaeus**, botânico e médico sueco que formalizou o sistema de nomenclatura binomial (*Gênero espécie*, no próximo slide)

- Relevância: o estudo baseado nos grupos definidos pela taxonomia permite comparar o efeito de variações na composição da microbiota sobre a saúde humana

Taxonomia

Domínio



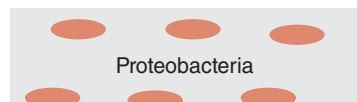
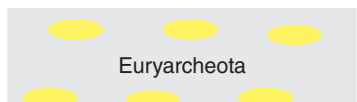
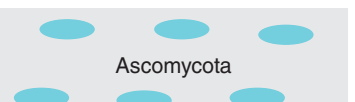
Reino



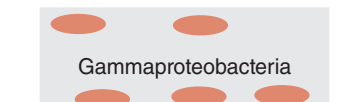
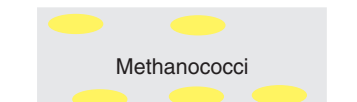
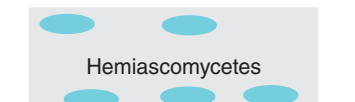
Não é usado

Não é usado

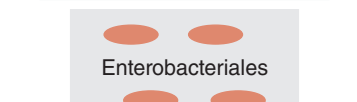
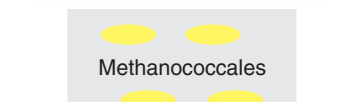
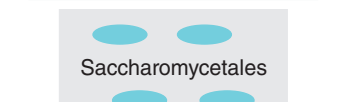
Filo



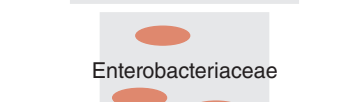
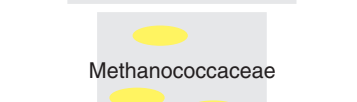
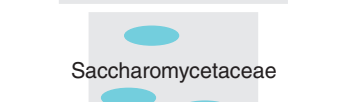
Classe



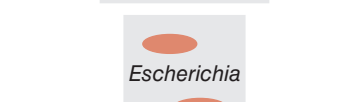
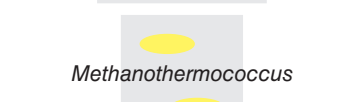
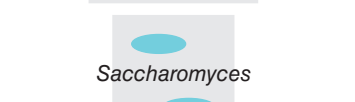
Ordem



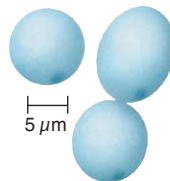
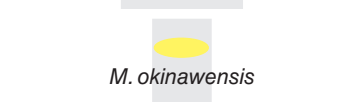
Familia



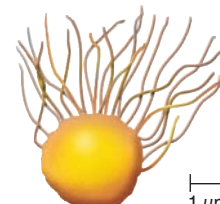
Gênero



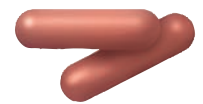
Espécie



Baker's yeast



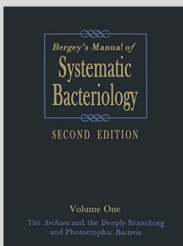
Methanococcus



E. coli



CARL LINNAEUS



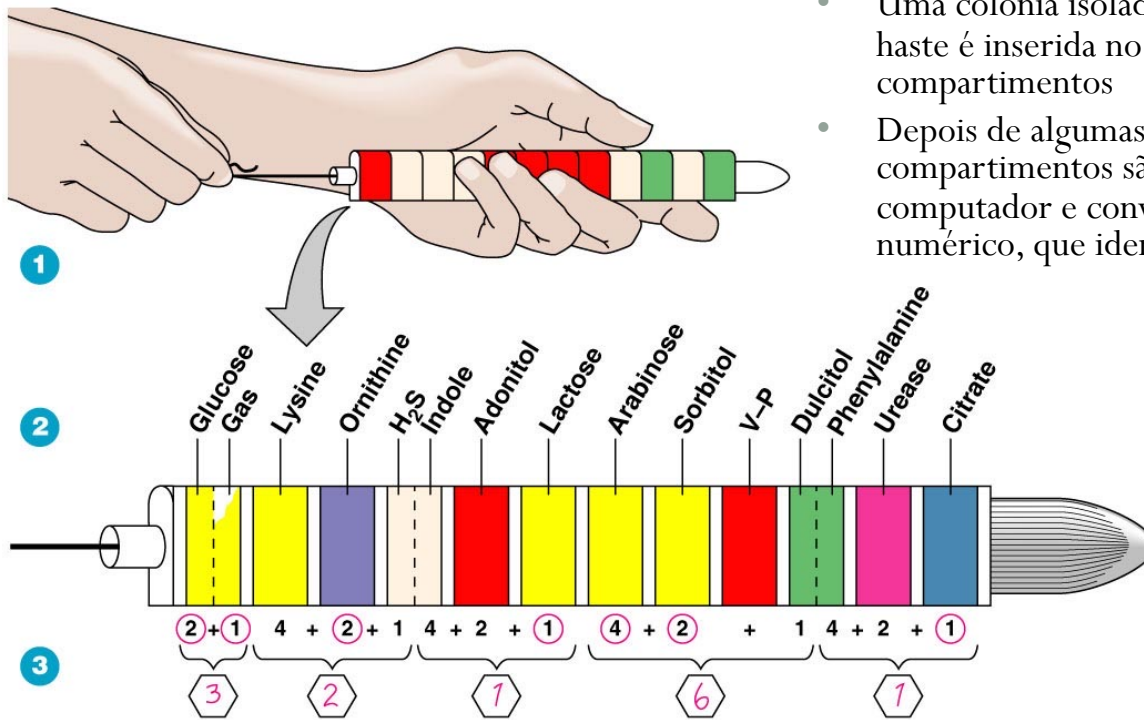
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology
SECOND EDITION
Volume One
The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria

Classificação de organismos

Métodos fenotípicos

- Métodos clássicos, precedem o desenvolvimento da genética e genômica microbiana
- A maioria dos métodos fenotípicos não são usados isoladamente, mas em combinação
- Exemplos:
 - Análise morfológica: forma celular e aparência das colônias
 - Coloração de Gram e outras técnicas de coloração
 - Análises bioquímicas
 - Detecção da atividade de enzimas que estão presentes somente em certo subgrupo de organismos
 - Análise da composição de lipídeos na membrana citoplasmática usando espectrometria de massa: técnica extremamente sensível que permite identificar diferenças de composição entre espécies próximas

Métodos de classificação: perfil bioquímico



- Uma colônia isolada de bactérias é coletada com uma haste e a haste é inserida no tubo, atravessando e contaminando os compartimentos
- Depois de algumas horas, alterações nas cores dos compartimentos são lidas por um *scanner* ligado a um computador e convertidas, automaticamente, em um código numérico, que identifica a espécie de enterobactéria

- O exemplo neste *slide* é específico para bactérias entéricas (*Enterobacteriaceae*), só pode ser aplicado depois da coloração de Gram (bactérias entéricas são Gram-negativas) e de outros testes fenotípicos que comprovem que o organismo sob análise é uma bactéria entérica.

4

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

- Em cada compartimento do tubo, pode ocorrer uma reação química que muda a cor de um indicador (meio diferencial)
- A mudança de cor implica a presença de enzimas características de cada espécie

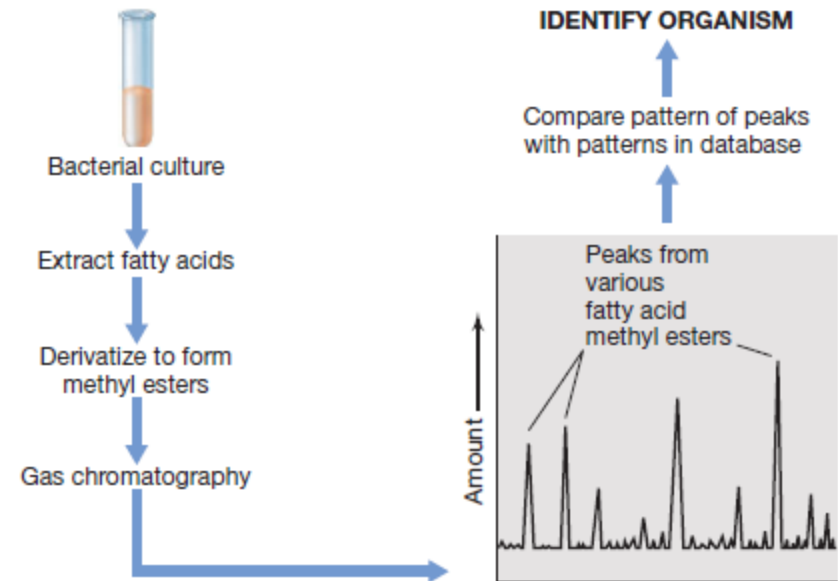
Análise dos ácidos graxos nas membranas

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

(a)



(b)

Classificação de organismos

Métodos genotípicos

- Esses métodos são baseados na detecção da presença de certos genes ou na sequência de nucleotídeos desses genes
- Por avaliarem os genes diretamente, ao invés do fenótipo determinado por esses genes, esses métodos são mais precisos
- São considerados os métodos de referência na área de pesquisa ou usados na clínica quando os métodos fenotípicos são inconclusivos

Classificação de organismos

Métodos genotípicos

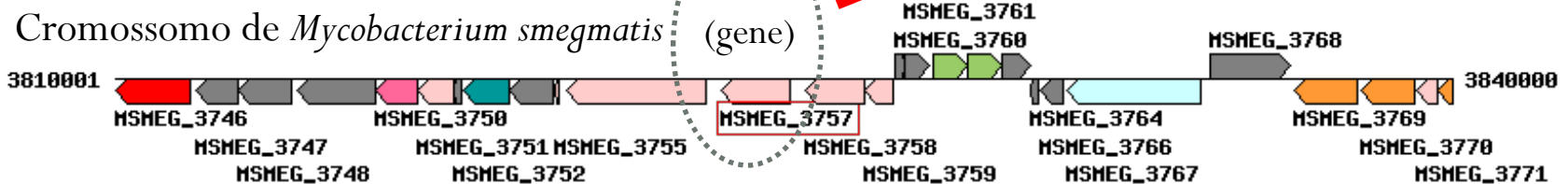
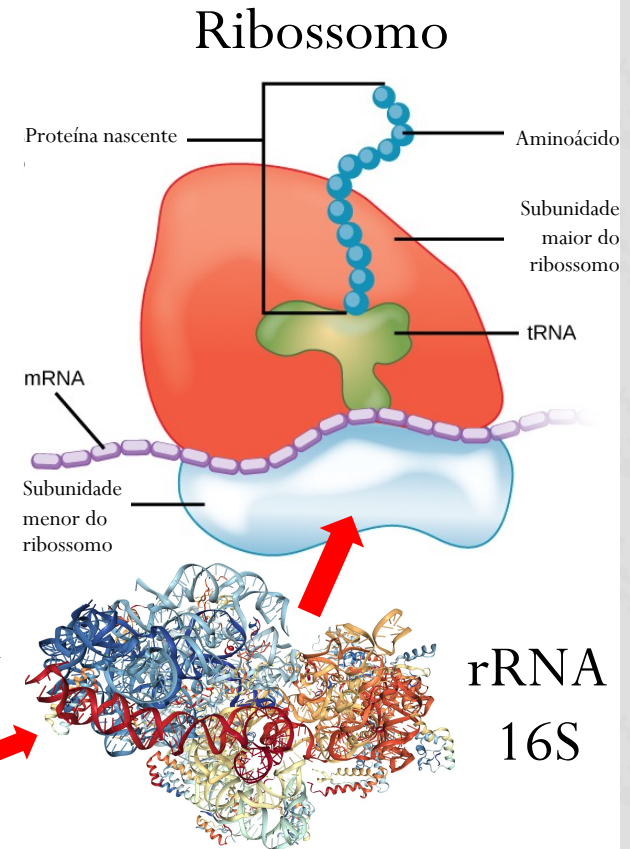
- São muitas vezes baseados na análise de um pequeno número de genes, considerados bons marcadores taxonômicos, tais como:
 - Genes **16S** (procariotos) e **18S** (eucariotos), que codificam a mesma subunidade menor do RNA ribossomal e não codificam proteínas.
 - *gyrB*: DNA girase (replicação do DNA)
 - *recA*: recombinase A (replicação do DNA)
- Para ser bons marcadores taxonômicos, um gene deve
 1. Estar presentes em todos os organismos que se deseja classificar
 2. Conter variação suficiente para discriminar os grupos / espécies de organismos
- Graças ao avanço das tecnologias de sequenciamento de DNA, classificações recentes começam a usar todos os genes dos organismos sob análise (genoma completo) para classificação

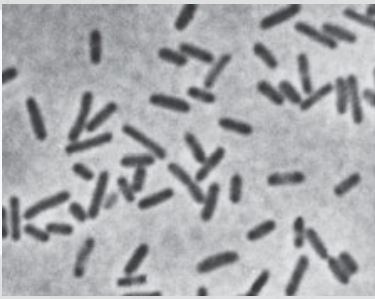
Classificação de organismos

Métodos genotípicos

Gene do RNA ribossomal 16S / 18S (ssrDNA)

- Gene (DNA) que codifica a subunidade menor do ribossomo ou ssrRNA (small subunit ribosomal RNA)
- Nome: 18S (eucariotos) e 16S (procariotos)
- **Importância** na taxonomia moderna
 - Presente em todos os organismos celulares
 - Altamente conservado, acumula em algumas regiões, ao longo de bilhões de anos, um número reduzido de mutações
 - A análise das variações nas regiões conservadas permitiu seu uso para reconstruir as relações entre todas as linhagens de organismos (três domínios da vida).





Norbert Pfenning

Métodos genotípicos

Sequenciamento e filogenia do rRNA 16S

Isolar o DNA



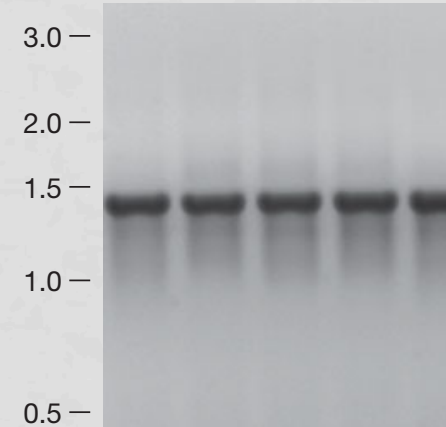
16 S gene

Amplificar o gene 16S



Isolar o gene 16S

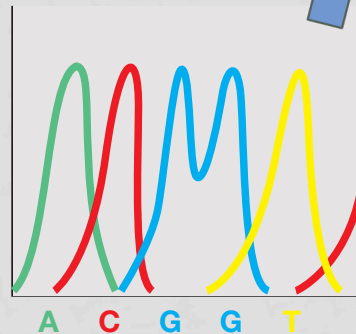
Kilo-bases



Jennifer Ast and Paul Dunlap

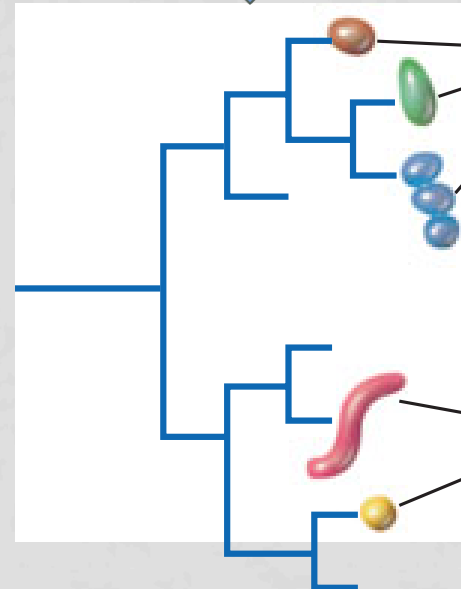
Espécie 1	TACGCAGCCAGATACATGCCAAGATATTTCG
amostra	TTCGCAACCTGATACATCCTAAGATATTTCG
Espécie 2	TTCGCAGCCAGGTACATCCCAAGATATTTCG
Espécie 3	TTCGCAACCAGGTACATCCTAAGATATCCG

Comparação com seqüências conhecidas



Sequenciamento

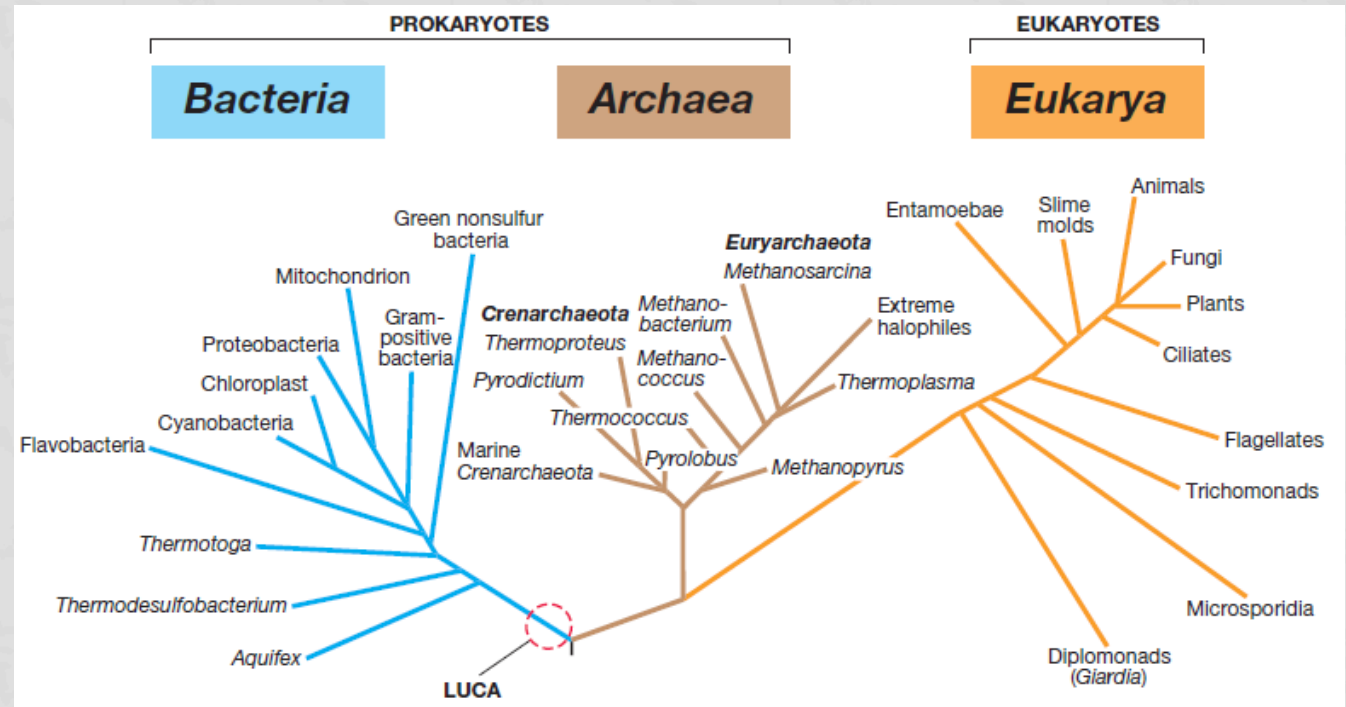
Identificação do grupo ao qual pertence a amostra



Espécie 1
amostra
Espécie 2

Espécie 3
Espécie 4
Espécie 5
Espécie 6

Carl Woese e os três domínios da vida

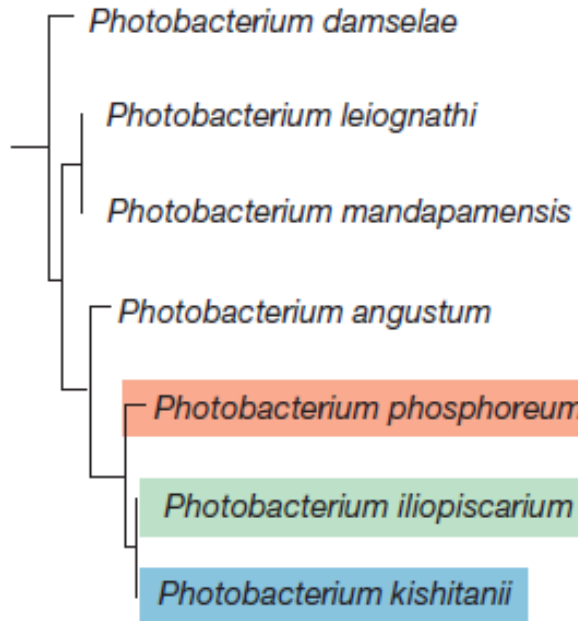


- Revolução na classificação da vida: filogenia universal baseada no *ssrDNA* (acima)
- Transição da classificação baseada em fenótipo para uma baseada em genótipo
- Separação entre Bactérias e Arqueas

Woese, C. R.; G. E. Fox (1977). "Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (11): 5088–5090.

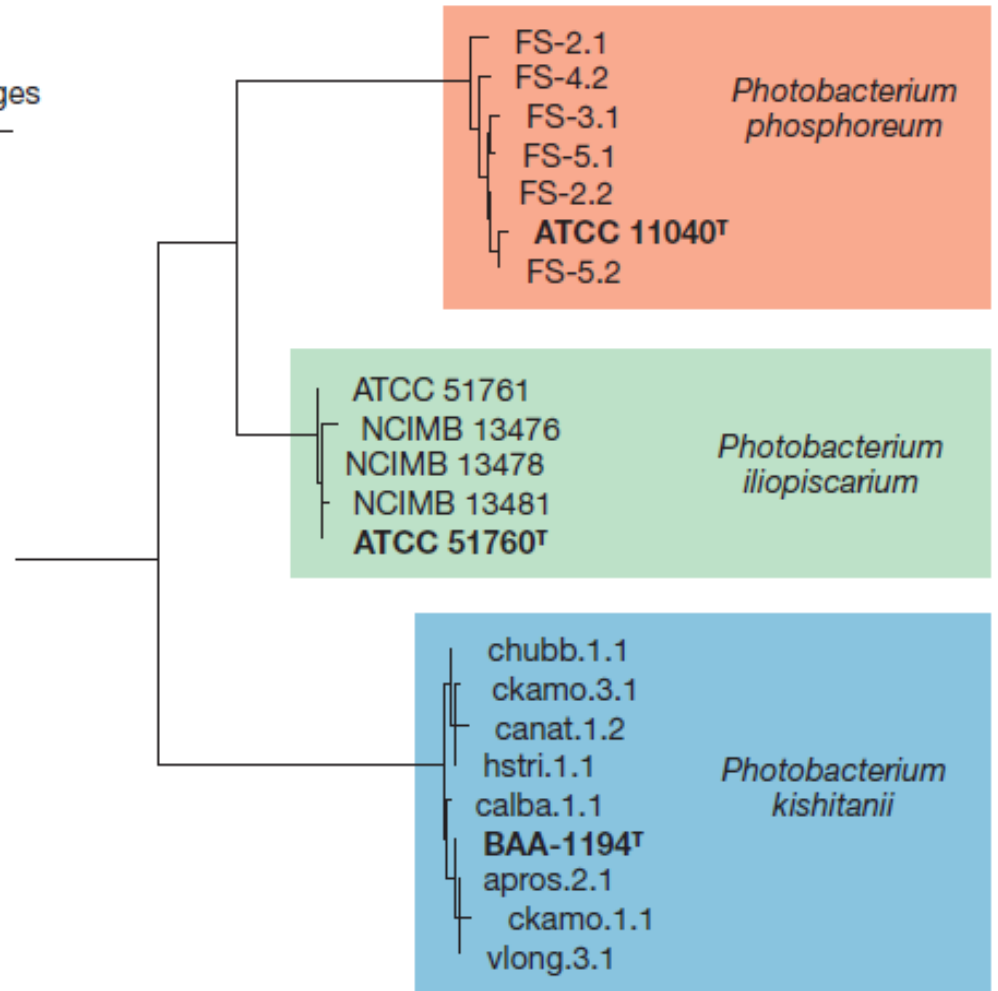
Conjunto de Linhagens forma uma espécie

16S rRNA Gene Tree



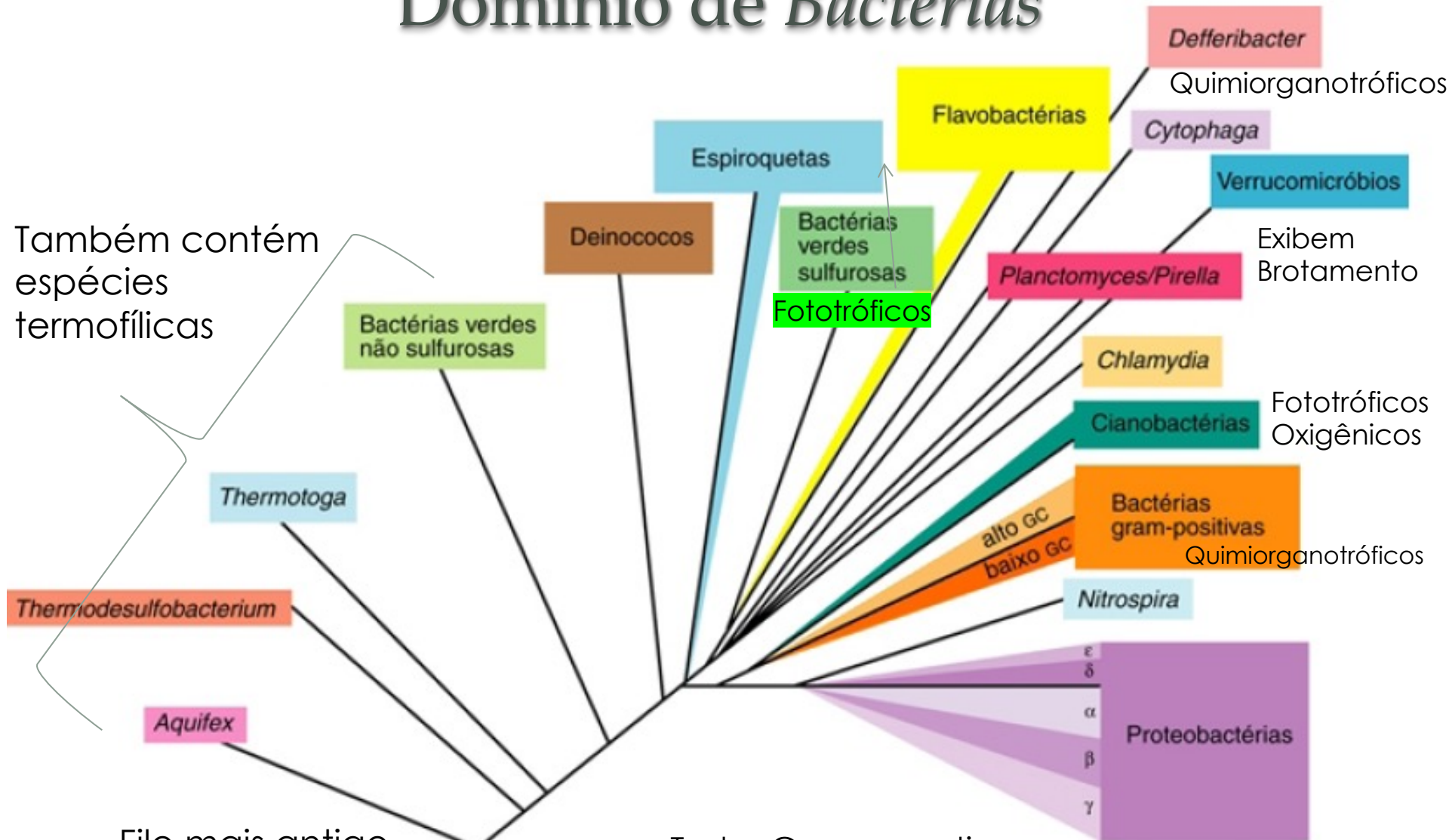
50 changes

Multigene Tree



(a)

Domínio de *Bacterias*



Defferibacter

Quimiorganotróficos

Cytophaga

Verrucomicróbios

Exibem Brotamento

Planctomyces/Pirella

Chlamydia

Fototróficos Oxigênicos

Cianobactérias

Bactérias gram-positivas

Quimiorganotróficos

alto GC
baixo GC

Nitospira

ε
δ
α
β
γ

Proteobactérias

Espiroquetas

Flavobactérias

Bactérias verdes sulfurosas
Fototróficos

Deinococos

Bactérias verdes não sulfurosas

Thermotoga

Thermodesulfobacterium

Aquifex

Também contém espécies termofílicas

- Filo mais antigo
- Hipertermófilo
 - Quimiolitrotrofico
 - Oxidam H₂

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

A era genômica e a metagenômica

- A partir dos anos 2000: o número crescente de genomas completos permitiu que centenas ou milhares de genes em múltiplos genomas fossem usados para inferir filogenias e classificar organismos
- No início, todas as análises de genomas completos, incluindo as voltadas para taxonomia, focaram organismos que os pesquisadores conseguiam **isolar e crescer em laboratório**
- A restrição de cultivar o organismo significa que quase 90% dos microorganismos não podem ser analisados!
- Desde 2010 esses estudos foram suplementados por análises de **genomas incompletos**, obtidos a partir de **amostras ambientais** de **organismos não-cultiváveis**, ou seja, **sem isolar e crescer** os organismos no laboratório (**metagenômica**)
- O sequenciamento de DNA extraído de amostras ambientais não requer o isolamento de células. O DNA sequenciado, portanto, é de uma mistura de organismos que precisam ser identificados no computador
- Resultados da aplicação das técnicas de análise metagenômica, que unem o sequenciamento de DNA ambiental em grande escala com técnicas computacionais poderosas, incluem:
 - Novas linhagens de microrganismos foram descobertas
 - Uma nova visão da árvore da vida, onde os Eucariotos aparecem como descendentes das arqueias

Árvore da vida

Publicada em 2018

baseada em **genomas completos** e em DNA extraído de **amostras ambientais**

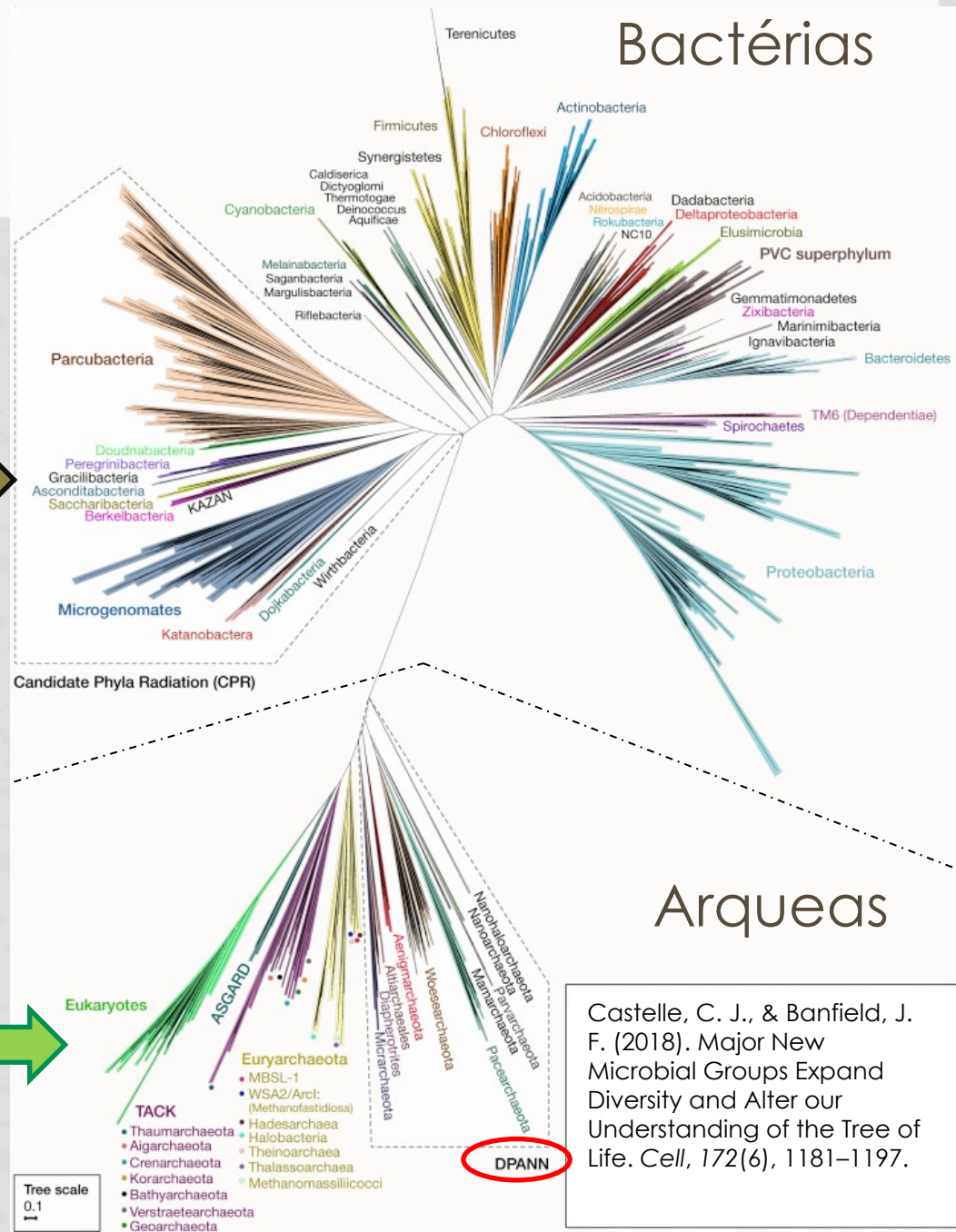
CPR →

Novos tipos de bactérias!

Todas as linhagens nos grupos CPR e DPANN não podem ser cultivadas em laboratório e eram desconhecidas antes da metagenômica!

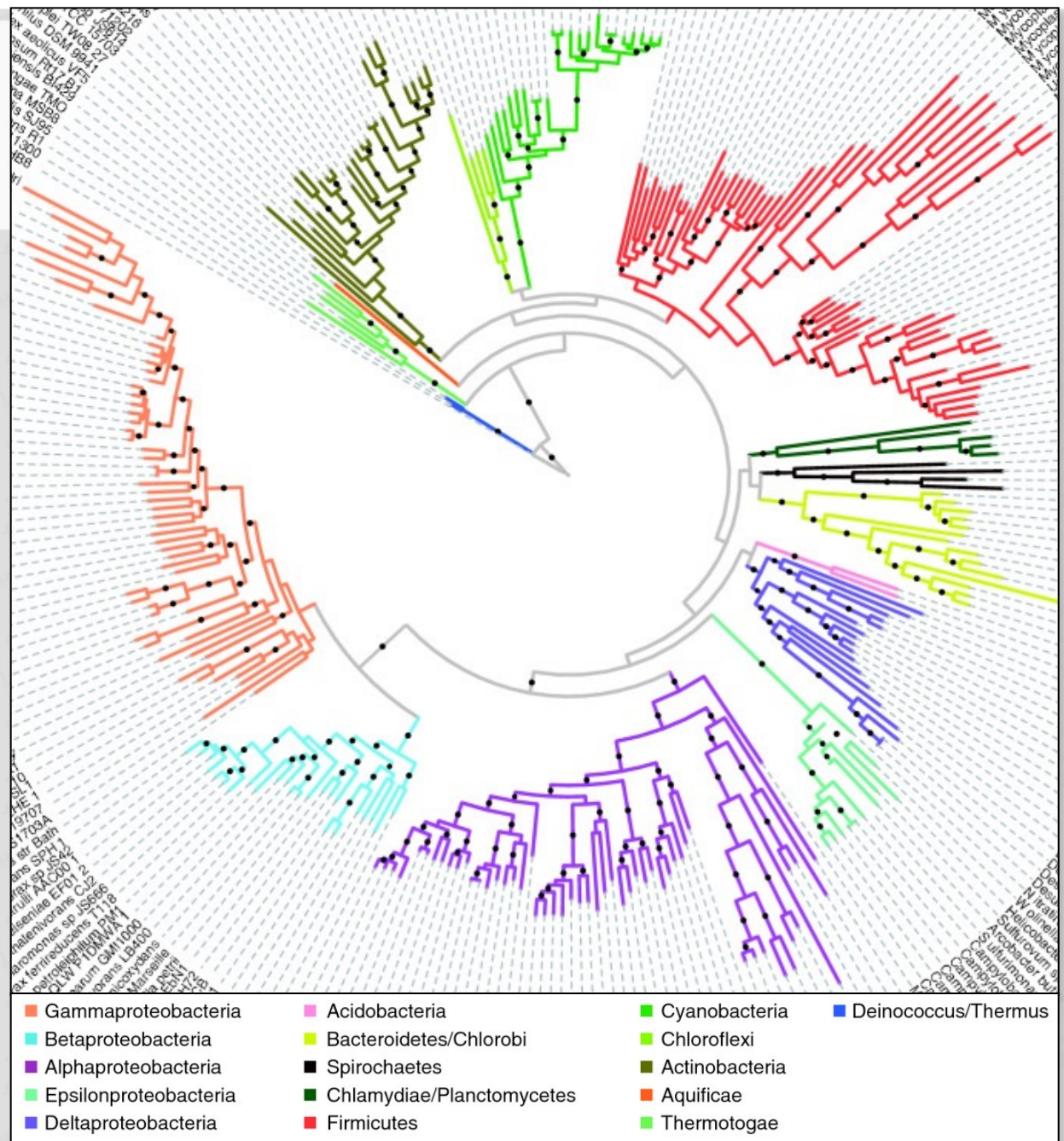
Eucariotos →

Navegue os links acima para conhecer a classificação e diversidade dos organismos



Filogenia das Bacterias

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



Grupos Importantes de Bactérias

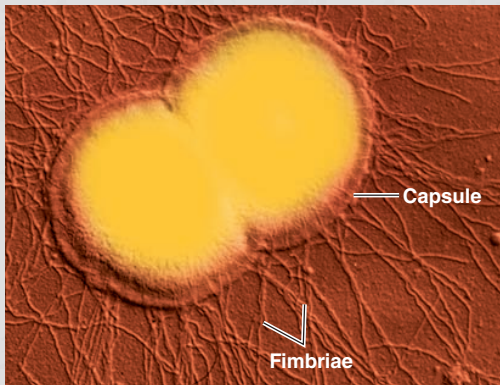
Classificação baseada na sequência do *ssrDNA*

A lista abaixo, assim como os próximos *slides*, mencionam apenas alguns dos grupos mais importantes de bactérias e estão longe de ser exaustivos

- Proteobactérias
- Cianobactérias
- Espiroquetas
- Firmicutes
- Bacteroidetes
- Actinobactérias

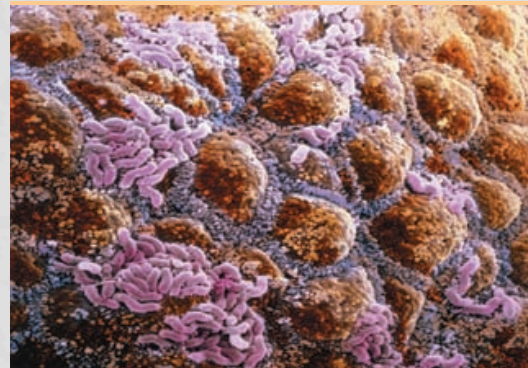
Proteobactérias

- Inclui a maioria das bactérias Gram-negativas
- Maior grupo em termos de diversidade de espécies e fenótipos
- Mitocôndrias de eucariotos derivadas de proteobactérias por endossimbiose



Neisseria gonorrhoea
causa gonorréia

Domínio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Classe	Betaproteobacteria
Ordem	Neisseriales
Família	Neisseriaceae
Gênero	<i>Neisseria</i>
Espécie	<i>N. gonorrhoea</i>



Escherichia coli
comensal, gastroenterite

Domínio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordem	Enterobacteriales
Família	Enterobacteriaceae
Gênero	<i>Escherichia</i>
Espécie	<i>E. coli</i>

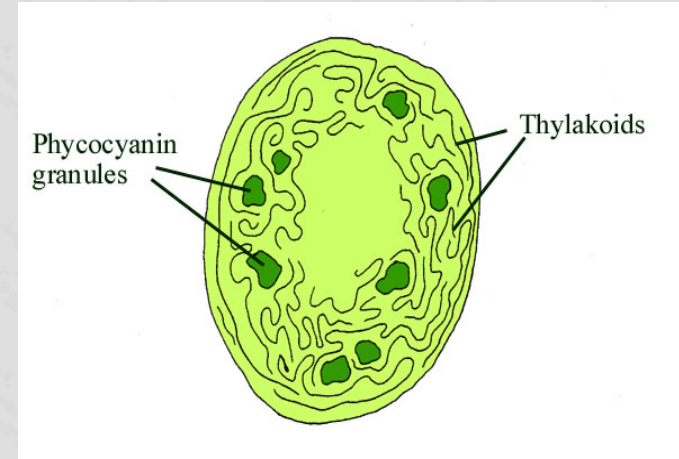
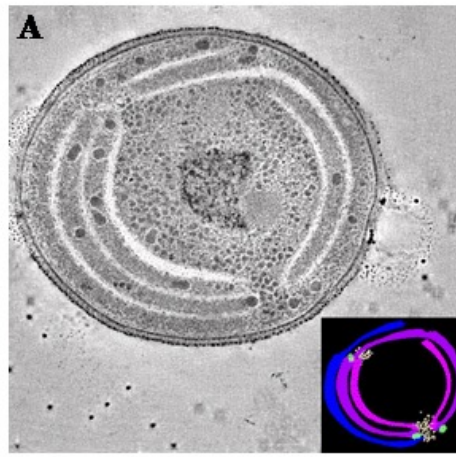


Helicobacter pylori
úlceras, câncer estomacal

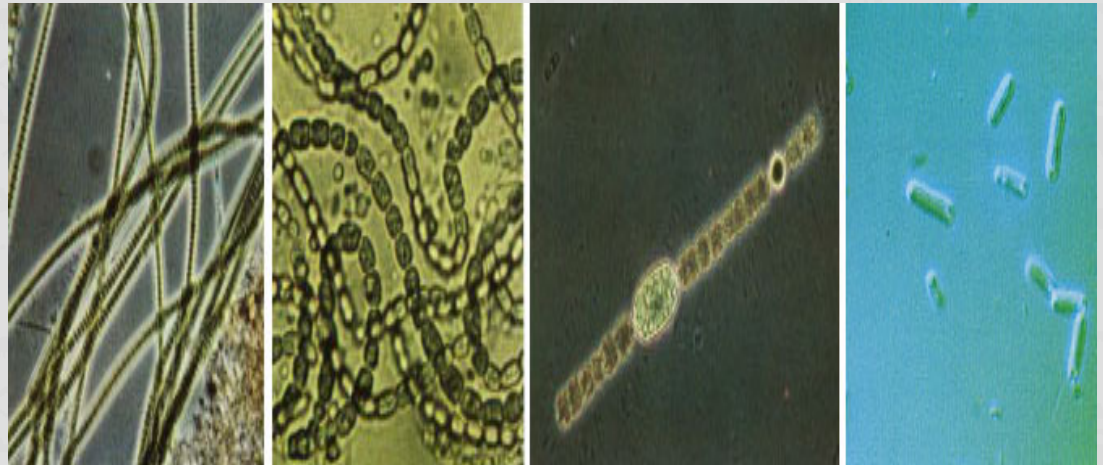
Domínio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Classe	Epsilonproteobacteria
Ordem	Campylobacterales
Família	Helicobacteraceae
Gênero	<i>Helicobacter</i>
Espécie	<i>H. pylori</i>

Cianobactérias

- Grande importância ecológica: ciclos de carbono, oxigênio e nitrogênio
- Modo de vida livre ou comensal (plantas)
- Células isoladas ou colônias
- Utilizam clorofila-A para fotossíntese e liberam gás oxigênio
- Deram origem aos cloroplastos por endossimbiose
- Possuem sistema de membrana interna (tilacóides) semelhante ao dos cloroplastos



Cloroplasto



Anabaena

Espécie fixadora de nitrogênio

Synechococcus

Espécie de ambientes marinhos e águas termais

Espiroquetas

- Morfologia e modos de locomoção únicos
- Possuem forma de um longo cilindro em espiral, parecidas com saca-rolhas
- Possuem um filamento axial e endoflagelo no espaço periplásmico
- Muitas são parasitas de seres humanos. Outros vivem em lamas ou água



Endoflagelo
corte transversal



Borrelia burgdorferi
causador da doença de Lyme



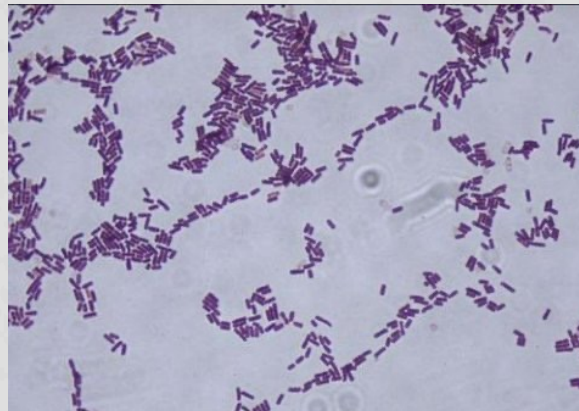
Treponema pallidum
causador da sífilis

Firmicutes

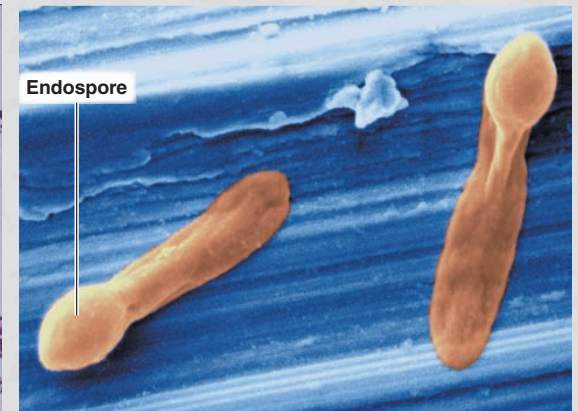
- Grupo diverso de bactérias Gram-positivas
- Também conhecidas como bactérias Gram⁺ de baixo G+C%, em virtude da frequência das bases guanina (G) e citosina (C) no seu DNA ser, média, menor que 50%
- Inclui várias espécies patôgenicas de grande importância médica, como os membros dos gêneros *Staphylococcus*, *Clostridium* e *Streptococcus*
- Muitas espécies importantes vivem no solo (*Bacillus*) e podem representar risco à saúde (*Bacillus anthracis*)
- Outros gêneros, como *Lactobacillus*, incluem espécies importantes na microbiota e que contribuem para a saúde humana



Streptococcus



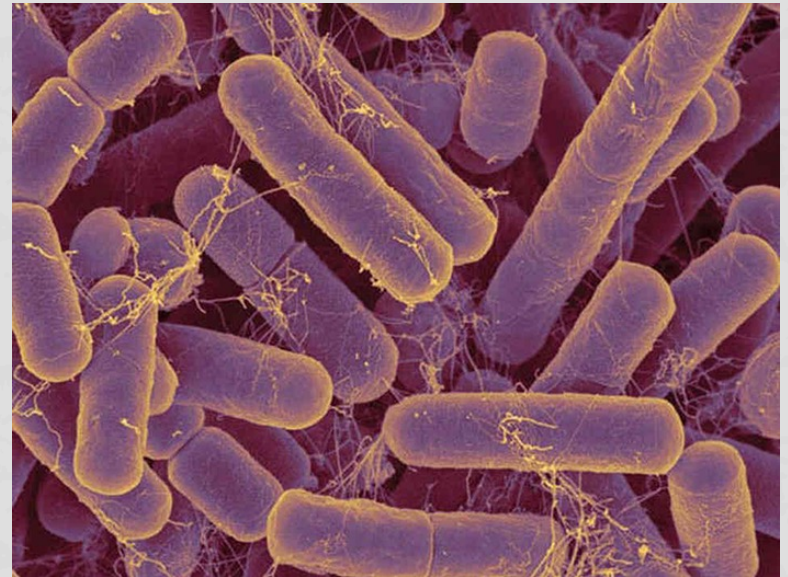
Bacillus subtilis



Clostridium difficile

Bacteroidetes e grupos relacionados

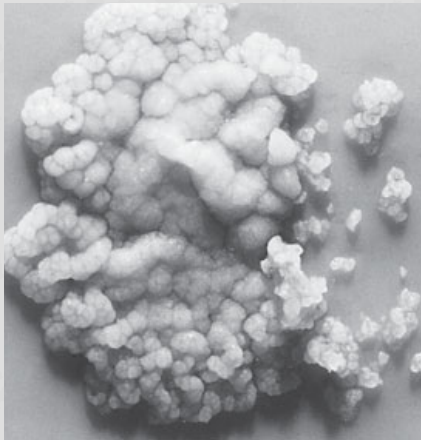
- Juntas com *Fusobacterium* e *Cytophaga*, formam o grupo **CFB**
- Bacilos Gram-negativos de ambientes anaeróbicos (trato gastrointestinal, incluindo a boca (*Fusobacterium*))
- São fermentadores capazes de processar celulose (no estômago de ruminantes) ou de contribuir para a digestão de alimentos de origem vegetal (em humanos)
- Algumas poucas espécies de Bacteroidetes podem ser patógenos oportunista e provocar disbioses, como *Bacteroides melaninogenicus*, que pode infectar feridas em pacientes com imunidade comprometida
- Espécies do gênero *Bacteroides* formam cerca de **30% da microbiota normal** em humanos



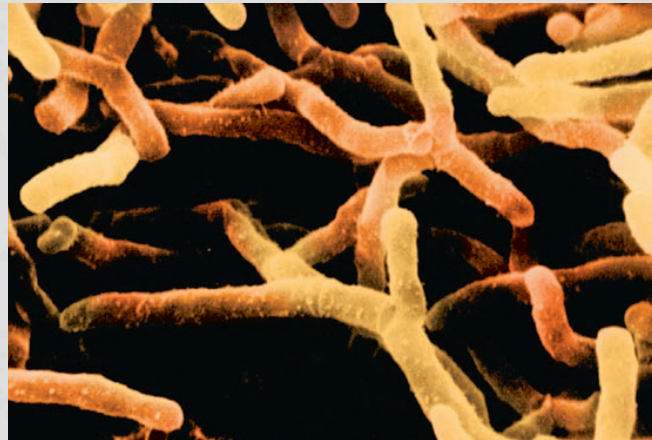
Bacteroides

Actinobacteria

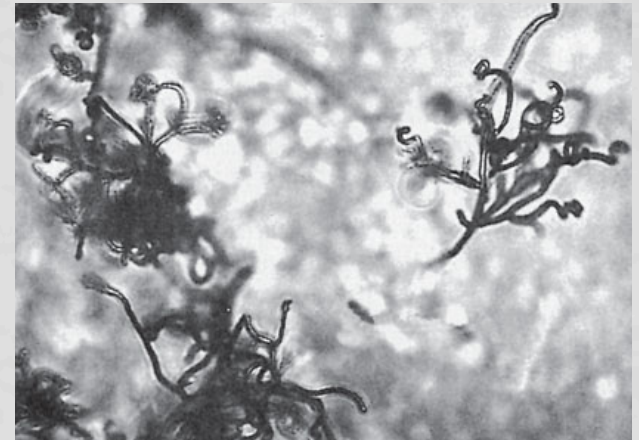
- Bactérias Gram-positivas com alto conteúdo de G+C% (> 50%)
- Incluem muitas espécies patogênicas importantes, como os gêneros *Mycobacterium* (tuberculose e hanseníase), *Nocardia* e outros
- Actinobactérias da famílias Streptomycetaceae (*Streptomyces*, *Kitasatospora*) podem crescer na forma de micélios macroscópicos com múltiplos núcleos e são a principal fonte de antibióticos para a indústria farmacêutica
- Membros do gênero *Propionibacterium* vivem nos poros da pele e podem contribuir para a formação da acne
- Espécies do gênero *Bifidobacterium* vivem no intestino e contribuem positivamente na sua regulação e homeostase



Mycobacterium tuberculosis



Actinomyces



Streptomyces

Principais Grupos Bactérias

Exercício

Os *slides* anteriores mencionaram algumas características de seis grupos importantes de bactérias. Muitos outros grupos não foram abordados.

Navegando nos sites abaixo, familiarize-se com os nomes de outros grupos de procariotos tais como, por exemplo, Chlamydia e Archaea.

<https://eol.org>

<http://www.bacterio.net/-classifphyla.html>

<http://tolweb.org/tree/>

<https://www.itis.gov>

Quando tiver escolhido três grupos faça buscas, na Web e nos livros texto da disciplina, pelas seguintes características dos grupos escolhidos:

- Coloração de Gram mais comum no grupo (e exceções, se houver)
- Forma das células
- Detalhes do metabolismo (aeróbica ou anaeróbica, se é fermentadora)
- Variações na composição da parede celular

Referências

- **Diversidade**

- Introdução à Microbiologia (Tortora, 11ª edição)
 - **Capítulo 10: Classificação de microorganismos**
 - **Capítulo 11: Os procariotos**
- Microbiologia de Brock (13ª edição)
 - Unidade 6: Evolução e diversidade de microorganismos
 - Capítulo 16 – Evolução microbiana e sistemática
 - Capítulo 17 – Bactérias: as proteobactérias
 - Capítulo 18 – Outras bactérias