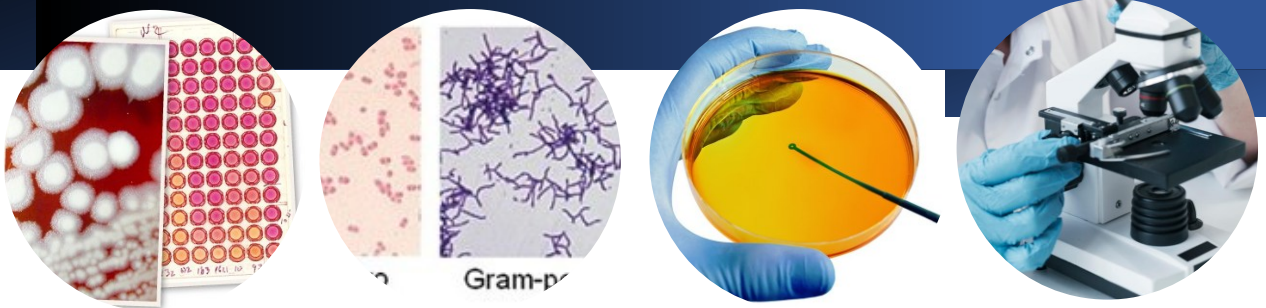


MICROBIOLOGIA: DA TEORIA A PRÁTICA LOT2053

Profa. Tatiane da Franca Silva

2

Microbiologia Clássica



- Caracterização morfológica e Bioquímica
- Isolamento e Cultivo
- Microscopia

3

CRESCIMENTO MICROBIANO

Em resposta a pressão osmótica

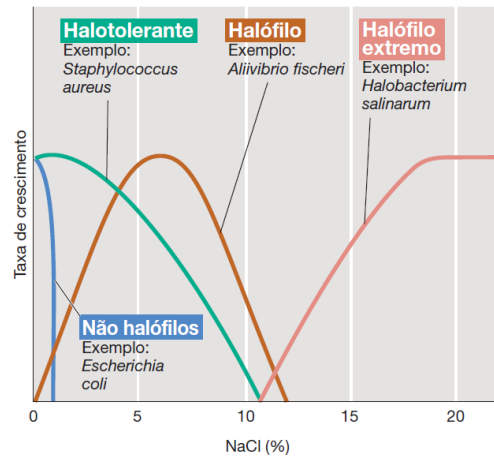


Figura 5.26 Efeito da concentração de NaCl no crescimento de microrganismos com diferentes tolerâncias ou necessidades de sal. A concentração de NaCl ótima para microrganismos marinhos, como *Aliivibrio fischeri*, é de cerca de 3%; para halófilos extremos, é entre 15 e 30%, dependendo do organismo.

Fonte: Mandigan et al., 2016

4

CULTIVO DE CONDIÇÕES ANÓXICAS



(a)



(b)

Figura 5.28 Incubação sob condições anóxicas. (a) Jarra de anaerobiose. Uma reação química no envelope acondicionado na jarra produz $H_2 + CO_2$. O H_2 reage com o O_2 presente na jarra, na superfície de um catalisador de paládio, originando H_2O ; a atmosfera final contém N_2 , H_2 e CO_2 .

(b) Câmara de anaerobiose para a manipulação e incubação de culturas sob condições anóxicas. A câmara de ar situada à direita, que pode ser evacuada e preenchida com gás livre de O_2 , serve como porta para a colocação e remoção dos materiais da câmara.

Fonte: Mandigan et al., 2016

5

MICROSCOPIA

7



Figura 2.12 Alguns procariontes são muito grandes. Fotomicrografia de campo escuro de dois procariontes gigantes, espécies de bactérias. (a) *Epididymus fabulosus*. A célula bacilar exibe aproximadamente 600 μm (0,6 mm) de comprimento e 75 μm de largura, sendo apresentada com quatro células do protótipo bacteriano *Pantoea*; cada uma medindo cerca de 150 μm de comprimento. (b) *Thiomargarita namibiensis*, um grande organismo quimiolitotrófico de enxofre, sendo atualmente o maior procarionte conhecido. Cada célula apresenta cerca de 400 a 750 μm de largura.

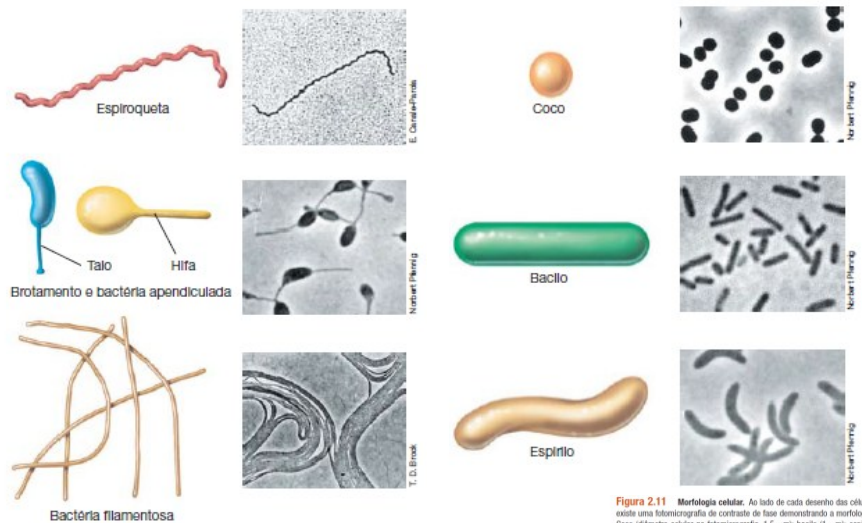


Figura 2.11 Morfologia celular. Ao lado de cada desenho das células existe uma fotomicrografia de contraste de fase demonstrando a morfologia. Coco (diâmetro celular na fotomicrografia, 1,5 μm); bacilo (1 μm); espirilo (1 μm); espiroqueta (0,25 μm); bactérias com broto e hifa (2 μm); bactérias filamentosas (0,8 μm). Todas as fotomicrografias são de espécies de bactérias. Nem todas estas morfologias são conhecidas entre as arqueias.

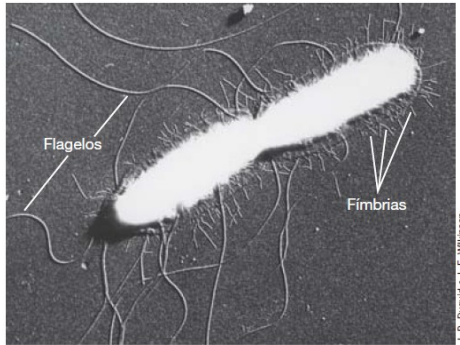
Fonte: Mandigan et al., 2016

MICROSCOPIA: IDENTIFICAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR

8

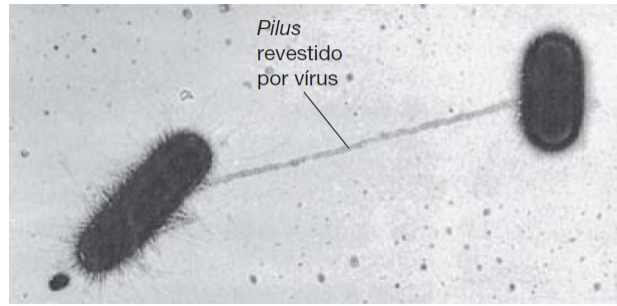
MICROSCOPIA: IDENTIFICAÇÃO DE ESTRUTURAS

□ Fimbrias e Pili



J. P. Duguid e J. F. Wilkinson

Figura 2.33 Fimbrias. Micrografia eletrônica de uma célula de *Salmonella typhi* em divisão, revelando flagelos e fimbrias. Uma única célula exibe largura de aproximadamente 0,9 μm .

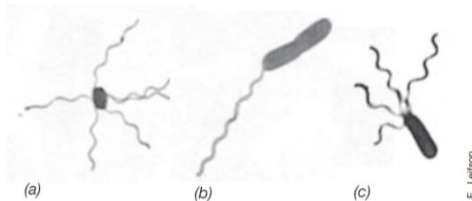


Charles C. Brinton, Jr.

Figura 2.34 Pili. O pilius de uma célula de *Escherichia coli*, que está realizando conjugação (uma forma de transferência genética) com uma segunda célula, é revelado pelos vírus que se aderiram a ele. As células apresentam cerca de 0,8 μm de largura.

Fonte: Mandigan et al., 2016

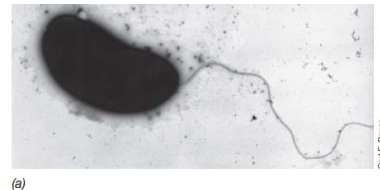
9



E. Leifson

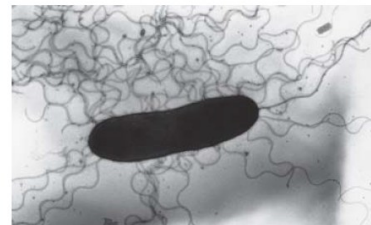
Figura 2.48 Flagelos bacterianos. Fotomicrografias ópticas clássicas, tiradas por Einar Leifson, de bactérias apresentando diferentes arranjos flagelares. As células foram coradas pelo método de Leifson de coloração de flagelos. (a) Peritríquio. (b) Polar. (c) Lofotríquio.

□ Flagelo: mobilidade natatória



(a)

Carl E. Bauer



(b)

Carl E. Bauer

Figura 2.49 Flagelos bacterianos corados negativamente, observados ao microscópio eletrônico de transmissão. (a) Um único flagelo polar. (b) Flagelos peritríquios. Em ambas as micrografias são apresentadas células da bactéria fototrófica *Rhodospirillum centenum*, que apresentam largura de aproximadamente 1,5 μm . As células de *R. centenum* geralmente exibem flagelação polar, mas, sob certas condições de crescimento, passam a apresentar um padrão de flagelação peritríquia. Ver também a Figura 2.59b para uma foto da colônia de *R. centenum* vista em microscópio de luz com um gradiente de luz.

Fonte: Mandigan et al., 2016

10

□ Velocidade e Movimento do Flagelo

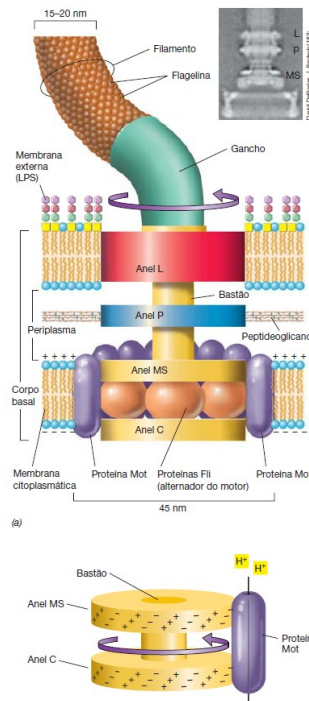
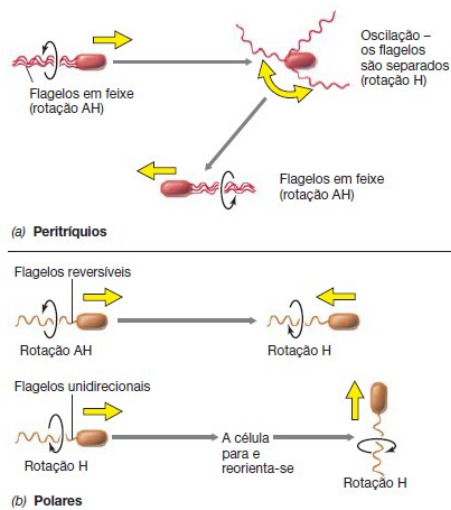


Figura 2.54 Tipos de movimento em procariotes com flagelação peritríquica e polar. (a) Peritríquica: a movimentação para frente é promovida por todos os flagelos girando no sentido anti-horário (AH), formando um feixe. A rotação no sentido horário (H) promove a oscilação da célula, e o retorno à rotação no sentido anti-horário leva a célula a mover-se em uma nova direção. (b) Polares: as células alteram a direção revertendo a rotação flagelar (o que puxa a célula, em vez de empurrá-la) ou, no caso de flagelos unidirecionais, parando periodicamente para a reorientação, e então movimentando-se para frente pela rotação dos flagelos em sentido horário. As setas amarelas indicam a direção de movimentação da célula.

Figura 2.51 Estrutura e função do flagelo em bactérias gram-negativas. (a) Estrutura. O anel L está embutido na membrana citoplasmática, e o anel P no peptidoglicano. O anel MS está embutido na membrana citoplasmática, e o anel C, no citoplasma. Um canal estreito é formado no bastão e no filamento, por meio do qual as moléculas de flagelina difundem-se para atingir o sítio de síntese flagelar. As proteínas Mot atuam como o motor flagelar, enquanto as proteínas Fl atuam como o alternador do motor. O motor flagelar gira o filamento, propulso a célula pelo meio. No detalhe: micrografia eletrônica de transmissão de um corpo basal flagelar de *Salmonella enterica*, onde os vários anéis estão identificados. (b) Função. Um modelo de "torção do protão" foi proposto para explicar a rotação do flagelo. Os prótons, fluindo por meio das proteínas Mot, podem exercer forças sobre as cargas presentes nos anéis C e MS, consequentemente girando o rotor.

Fonte: Mandigan et al., 2016

11

MICROSCOPIA: IDENTIFICAÇÃO DE ESTRUTURAS

□ Cápsula

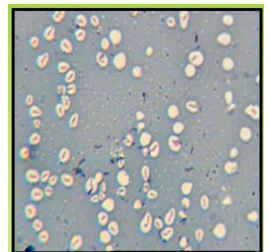
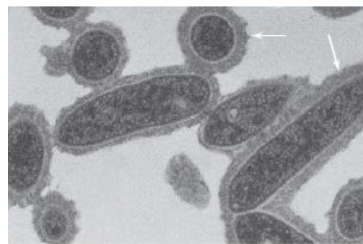
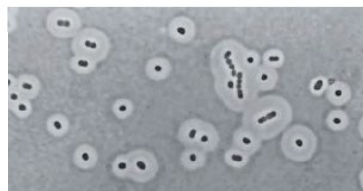
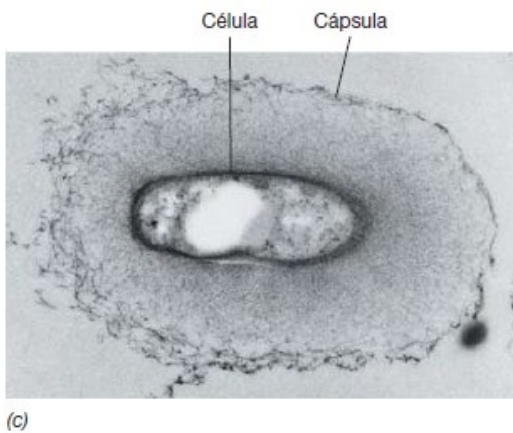


Figura 2.32 Cápsulas bacterianas. (a) Cápsulas de esporos de *Bacillus subtilis*, observadas após coloração negativa com tinta naquim em microscopia de contraste de fase. A tinta naquim não penetra na cápsula e, consequentemente, a cápsula aparece como uma região clara circundando a célula, a qual se apresenta escura. (b) Micrografia eletrônica de transmissão de uma seção fina de células de *Bacillus subtilis* encapsuladas, revelando as cápsulas (setas) claramente evidentes, o diâmetro da célula é de aproximadamente 0,8 µm. (c) Micrografia eletrônica de transmissão de uma seção fina de *Bacillus subtilis*, corada com urânio de células, revelando a cápsula. A célula possui aproximadamente 0,7 µm de largura.

12

MICROSCOPIA: IDENTIFICAÇÃO DE ESTRUTURAS

Endosporo

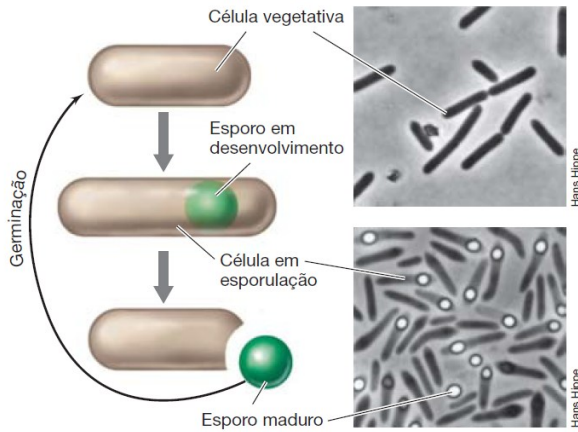


Figura 2.43 Ciclo de vida de uma bactéria formadora de endosporos. Fotomicrografias de contraste de fase de células de *Clostridium pasteurii*. Uma célula apresenta cerca de 0,8 µm de largura.

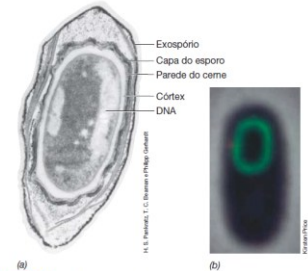


Figura 2.45 Estrutura do endosporo bacteriano. (a) Micrografia eletrônica de transmissão de uma seção fina de um endosporo de *Bacillus megaterium*. (b) Fotomicrografia de fluorescência de uma célula de *Bacillus subtilis* em processo de esporulação. A área em verde deve-se a um corante que cora especificamente uma proteína de esporulação presente na capa do esporo.

13

ENDOSPORULAÇÃO

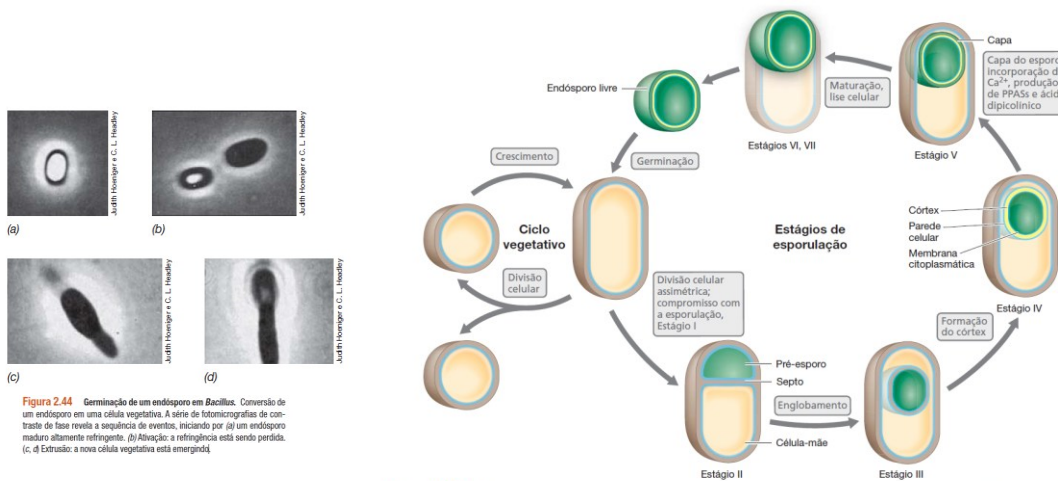


Figura 2.47 Estágios da formação de um endosporo. Os estágios são definidos com base em estudos genéticos e análises microscópicas da esporulação em *Bacillus subtilis*, o organismo-modelo para estudos de esporulação.

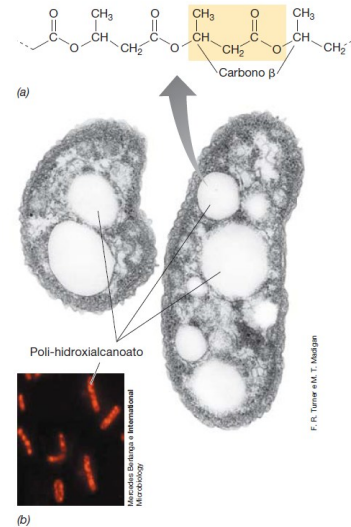
14

INCLUSÕES CELULARES

- Polímeros de armazenamento de carbono poli-b-hidroxicanoato (PHA) e ácido poli b-hidroxibutóico (PHB)



Figura 2.35 Poli-β-hidroxicanoatos. (i) Estrutura química do poli-β-hidroxicanoato, um PHA comum. Uma unidade monomérica é ilustrada cíclica. Outros PHAs são sintetizados pela substituição dos longos cadeias de hidrocarboneto pelo grupo -CH₂ no carbono β. (ii) Micrografia eletrônica de uma seção fina de células de uma bactéria contendo grânulos de PHB. Foto colorida: células de uma bactéria contendo PHA coradas com vermelho do NiO.

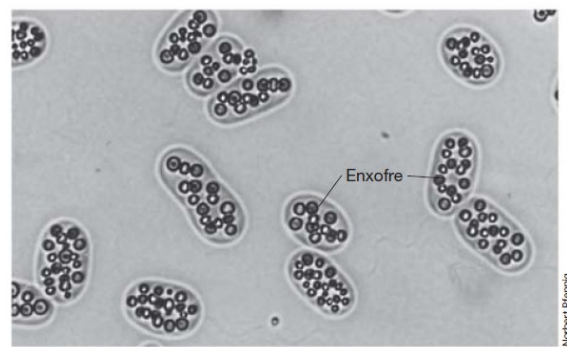


15

- Polifosfato, enxofre e minerais carbonatos



Figura 2.36 Polifosfato e produtos de armazenamento de enxofre. (a) Fotomicrografia de contraste de fase de células de *Heliobacterium modesticaldum* mostrando polifosfato e grânulos escuros; a célula possui aproximadamente 1 μm de diâmetro. (b) Fotomicrografia de campo claro de



células da bactéria púrpura sulfurosa *Isochromatium buderi*. As inclusões intracelulares são grânulos de enxofre formados pela oxidação de sulfeto de hidrogênio (H₂S). Uma célula mede aproximadamente 4 μm de largura.

16

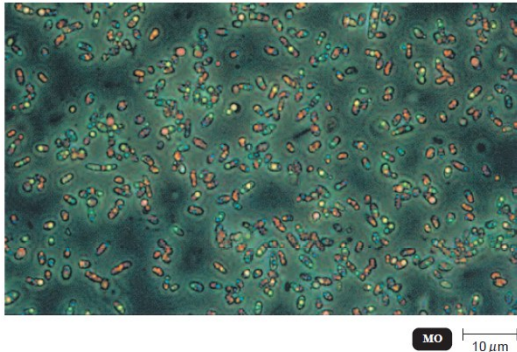


Figura 11.14 Bactérias púrpuras sulfurosas. Essa microfotografia de células do gênero *Chromatium* mostra os grânulos intracelulares de enxofre como objetos multicoloridos e refratários. A razão do acúmulo de enxofre pode ser resumida pela observação da equação 2 na discussão.

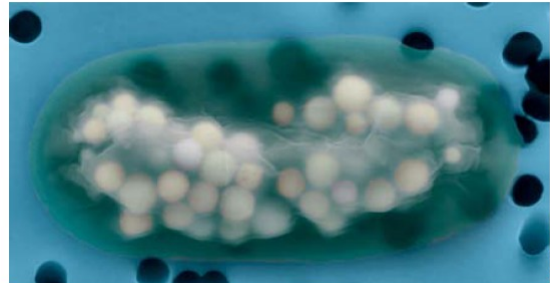


Figura 2.37 Biomineralização por uma cianobactéria. Micrografia eletrônica de uma célula da cianobactéria *Gleomargarita* contendo grânulos do material bentonita $[(Ba, Sr, Ca)_6Mg(CO_3)_{13}]$. A célula mede aproximadamente 2 μm de largura.

17

☐ Magnetossomo

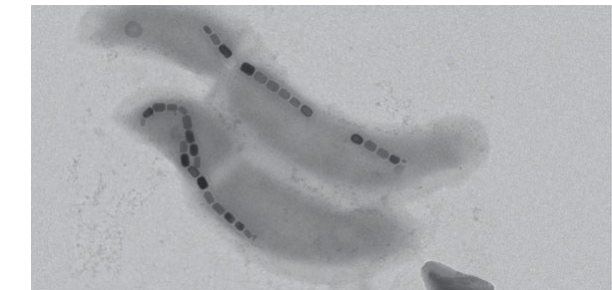
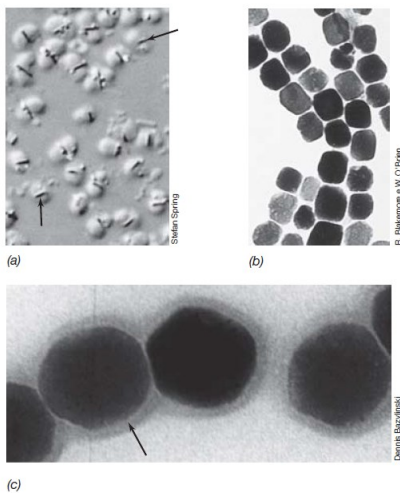
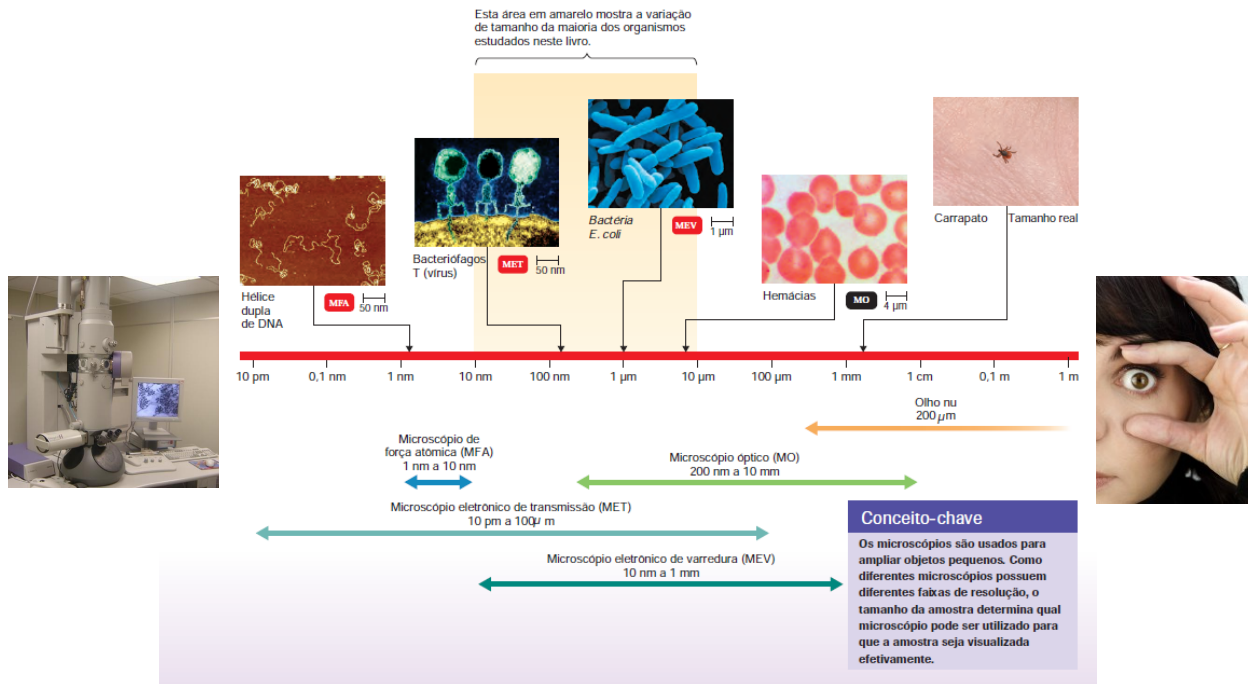


Figura 2.38 Bactérias magnetotáticas e magnetossomos. (a) Micrografia de contraste por interferência diferencial de bactérias cocoides magnetotáticas; observe os magnetossomos (setas). Uma célula apresenta 2,2 μm de largura. (b) Magnetossomos isolados da bactéria magnetotática *Magnetospirillum magnetotacticum*; cada partícula apresenta cerca de 50 nm de comprimento. (c) Micrografia eletrônica de transmissão de magnetossomos de um coco magnético. A seta indica a membrana que envolve cada magnetossomo. Um único magnetossomo apresenta cerca de 90 nm de largura.

18



19

MICROSCOPIA

ÓPTICO



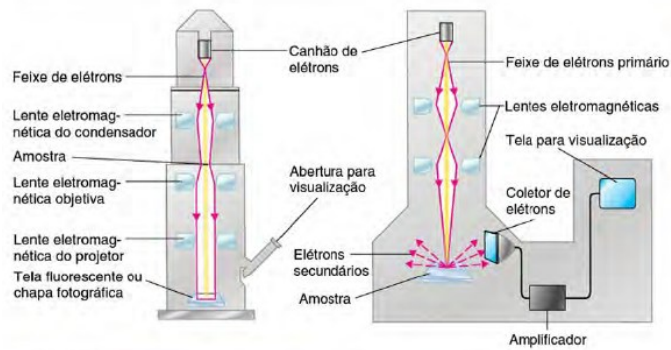
ELETRÔNICO



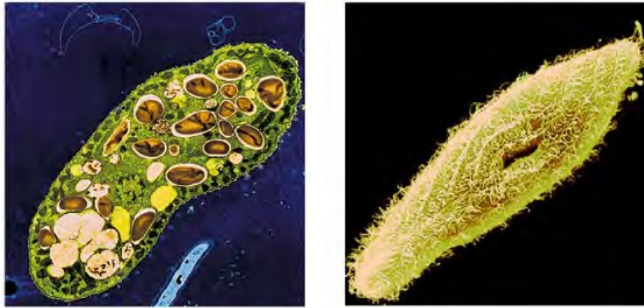
VARREDURA POR Sonda



20



MICROSCÓPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) E DE VARREDURA (MEV)



Fonte: Tortora et al., 2012

21

BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS E NEGATIVAS

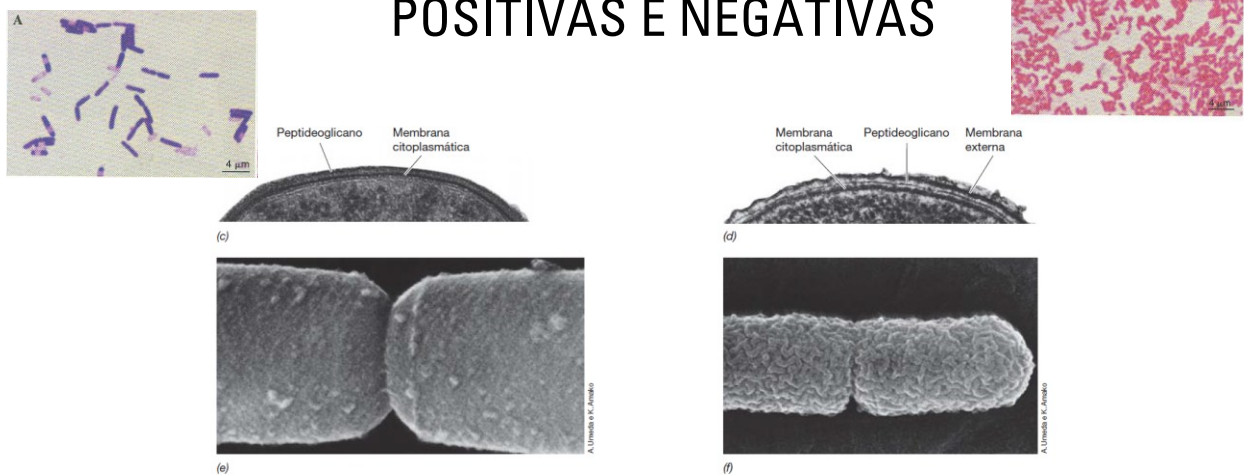
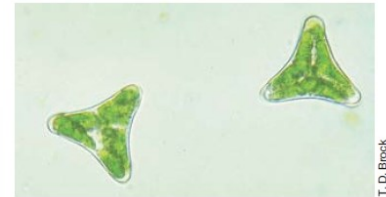
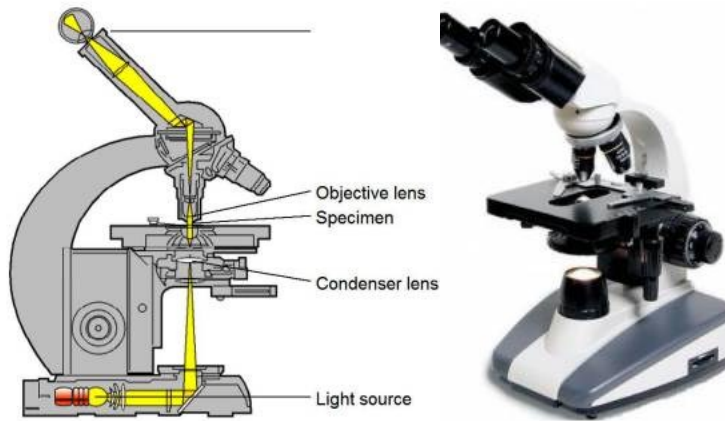


Figura 2.24 Paredes celulares de bactérias. (a, b) Diagramas esquemáticos de paredes celulares gram-positivas e gram-negativas. (c, d) Micrografias eletrônicas de varredura de bactérias gram-positivas e gram-negativas, respectivamente. Observe as diferenças na textura da superfície das células apresentadas. Cada célula em MET tem aproximadamente 1 μm de largura.

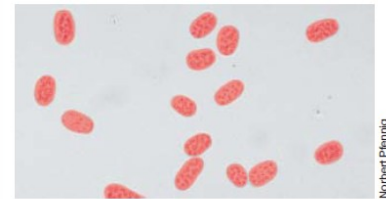
22

MICROSCÓPIO OPTICO CAMPO CLARO

❖ Mais simples. Morfologia celular



(a)



(b)

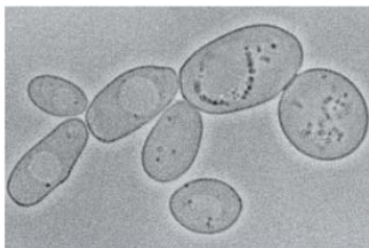
Figura 2.2 Fotomicrografias de campo claro de microrganismos pigmentados. (a) Uma alga verde (eucarioto). As estruturas verdes são cloroplastos. (b) Bactérias purpúreas fototróficas (procarioto). A célula da alga apresenta aproximadamente 15 μm de largura, e as células bacterianas, cerca de 5 μm .

23

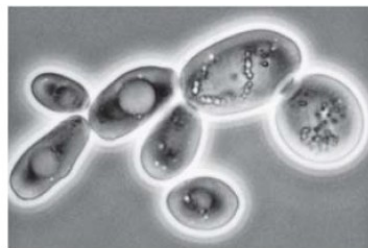
MICROSCÓPIO DE CONTRASTE DE FASE E DE CAMPO ESCURO

❑ Contraste de fase: índice de refração da luz difere entre a célula e o meio

❑ Campo escuro: o espécime atingido apenas lateralmente pela luz



(a)



(b)



(c)

Figura 2.5 Células observadas por diferentes tipos de microscopia óptica. O mesmo campo de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* visualizado por meio de (a) microscopia de campo claro, (b) microscopia de

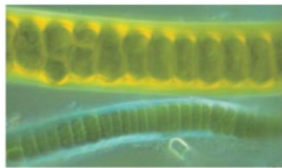
contraste de fase e (c) microscopia de campo escuro. Largura média das células de 8 a 10 μm .

24

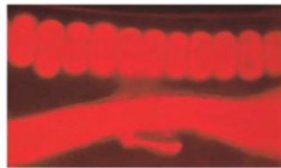
MICROSCÓPIO DE FLUORESCÊNCIA

❑ Fluoróforo

❑ Células podem ter autofluorescência



(a)



(b)

Figura 2.6 Microscopia de fluorescência. (a, b) Cianobactérias. As mesmas células são observadas por microscopia de campo claro (a) e por microscopia de fluorescência (b). As células fluoescem em vermelho porque

contêm clorofila *a* e outros pigmentos. (c) Fotomicrografia de fluorescência de células de *Escherichia coli* tornadas fluorescentes pelo tratamento com o corante fluorescente DAPI, que se liga ao DNA.

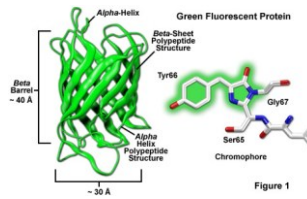


Figure 1

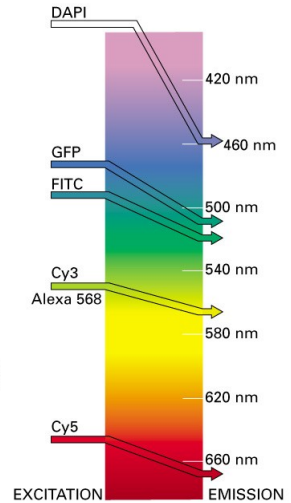
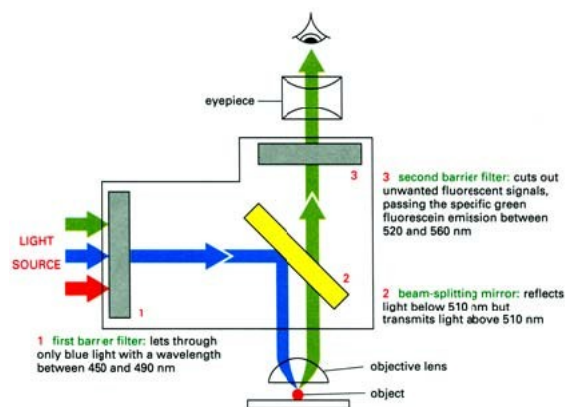


Figure 9-13. Molecular Biology of the Cell, 4t

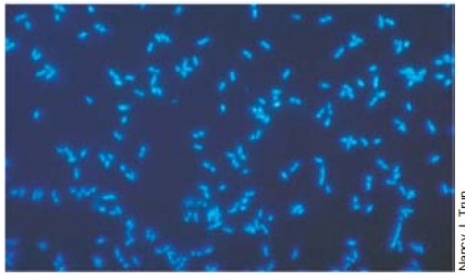
25



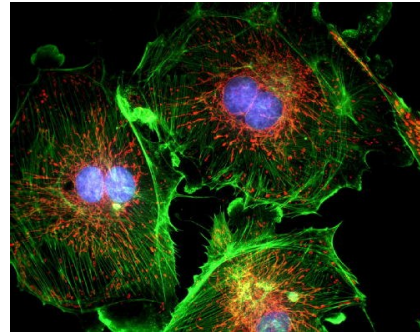
26

MICROSCÓPIO DE FLUORESCÊNCIA

- Fluoróforos podem ser introduzidos na célula por coloração ou engenharia genética



(a)

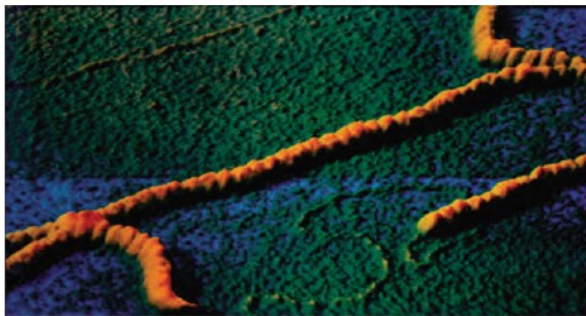


Nancy J. Trun

Figura 2.6 Microscopia de fluorescência. (a, b) Cianobactérias. As mesmas células são observadas por microscopia de campo claro (a) e por microscopia de fluorescência (b). As células fluorescem em vermelho porque contêm clorofila a e outros pigmentos. (c) Fotomicrografia de fluorescência de células de *Escherichia coli* tornadas fluorescentes pelo tratamento com o corante fluorescente DAPI, que se liga ao DNA.

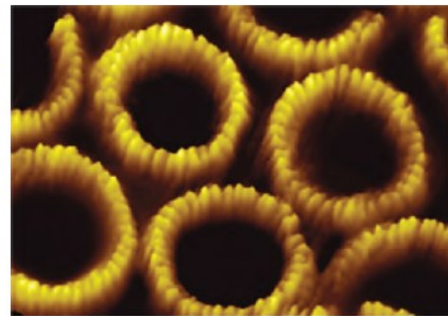
27

MICROSCÓPIO DE VARREDURA POR SONDA



(a)

MT 50 μm



(b)

MFA 12 nm

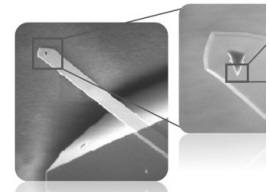
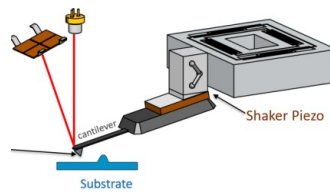
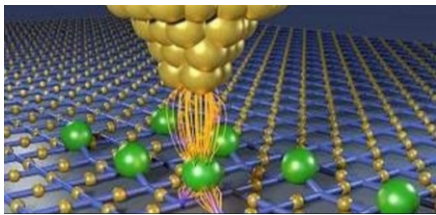
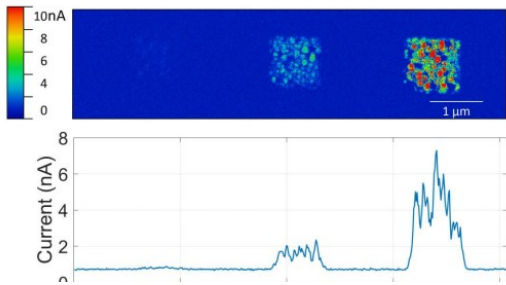
Figura 3.11 Microscopia de varredura por sonda. (a) Imagem da microscopia de tunelamento (MT) da proteína RecA de *E. coli*. Essa proteína está envolvida no reparo do DNA. (b) Imagem da microscopia de força atômica (MFA) da toxina perfringoliscina O de *Clostridium perfringens*. Essa toxina promove a formação de buracos em membranas plasmáticas.

Fonte: Tortora et al., 2012

- Força Atômica
- Tunelamento

Utilizam diferentes tipos de sondas para examinar a superfície da amostra

28



29

A micrograph showing a sample being scanned by an optical microscope. A hand is visible holding the sample, and the microscope objective is positioned above it.

A row of seven small bottles containing different colored liquids, likely dyes or stains. The colors range from light blue to dark red. Each bottle has a label with text, including "PART 101" and "PART 102".

A diagram of the electromagnetic spectrum. The visible light range is highlighted in yellow and labeled "Visível". The spectrum is divided into regions: "ondas de rádio", "ondas curtas", "infravermelho", "visível", "ultravioleta", "raios X", and "raios gama". A color bar on the right shows the visible spectrum from 400 nm (violet) to 750 nm (red). The label "Comprimento de onda (nm)" is next to the color bar.

COLORAÇÃO EM MICROSCOPIA ÓPTICA

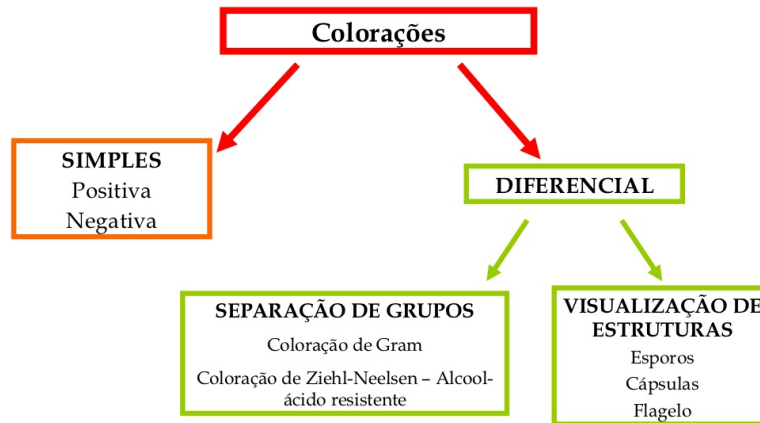
- Uso de corantes
- Cromóforo: Molécula ou parte de uma molécula capaz de absorver a luz em determinado comprimento de onda visível
- Problemas com toxicidade!

30

TIPOS DE COLORAÇÃO EM MICROSCOPIA ÓPTICA



31

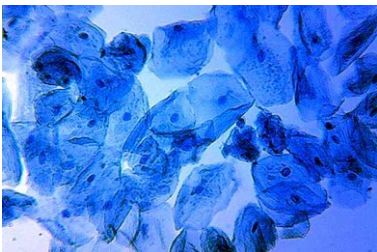


COLORAÇÃO SIMPLES

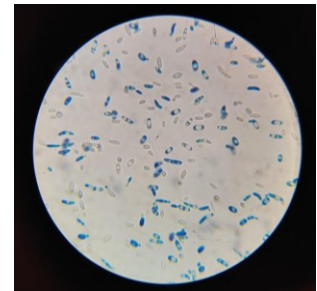
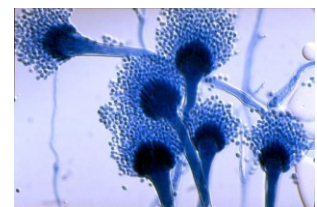
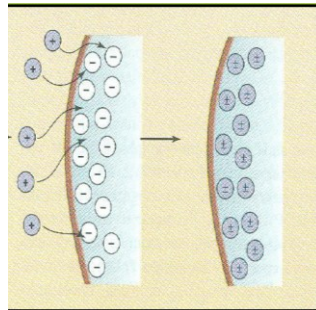
Utiliza um único corante

1. Positiva

→ **corante de carga positiva** que se liga a carga negativa da superfície das células e do Material Genético.



Ex: Azul de Metileno

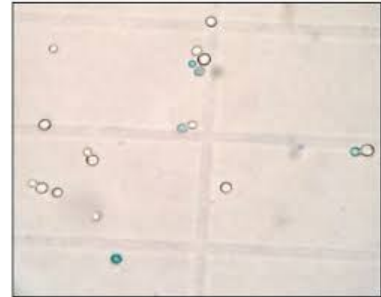
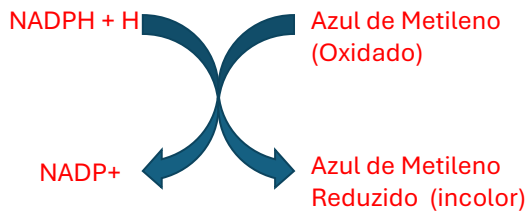
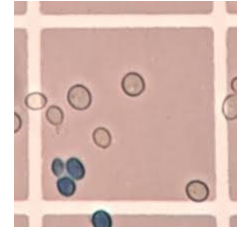


Viabilidade Celular

32

COLORAÇÃO VITAL

Verifica a viabilidade das células, através da ocorrência de reações bioquímicas. **Baixa toxicidade.**



33

COLORAÇÃO SIMPLES

2. Negativa

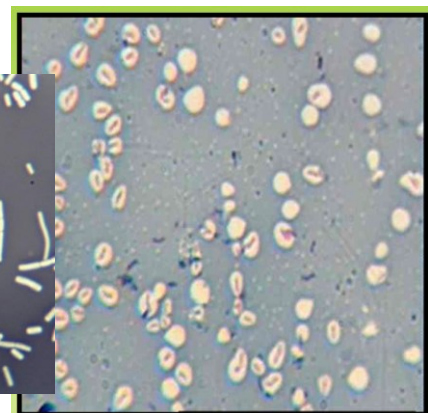
→ **corante com carga negativa** é repelido da superfície das células.



Bacillus cereus



Bacillus cereus



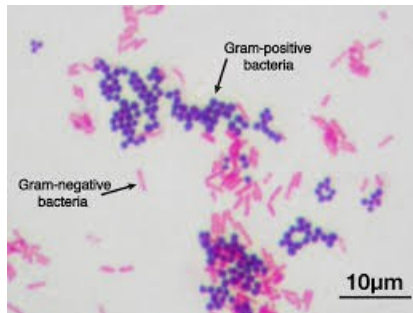
Bactéria encapsulada

34

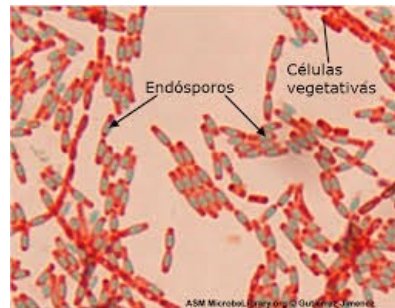
COLORAÇÃO DIFERENCIAL

→ Uso de dois corantes contrastes. Geram **coloração diferentes entre grupos distintos ou estruturas**

Coloração de Gram



Visualização de estruturas



35

Abordagem Molecular



- Estudos com o RNA ribossomal (16S e 18S)
- Identificação de Espécies – DNA Barcode
- Moléculas marcadoras

36

Tabela 1.2 Distribuição dos microrganismos dentro e fora da superfície da Terra^a

Hábitat	Porcentagem total
Subsuperfície marinha	66
Subsuperfície terrestre	26
Solo superficial	4,8
Oceanos	2,2
Todos os outros hábitats ^b	1,0

^aDados compilados por William Whitman, University of Georgia, USA; referem-se aos números totais (estima-se que cerca de $2,5 \times 10^{30}$ células) de bactérias e arqueias. Esse enorme grupo de células contém, coletivamente, cerca de 5×10^{17}

37

BIODIVERSIDADE

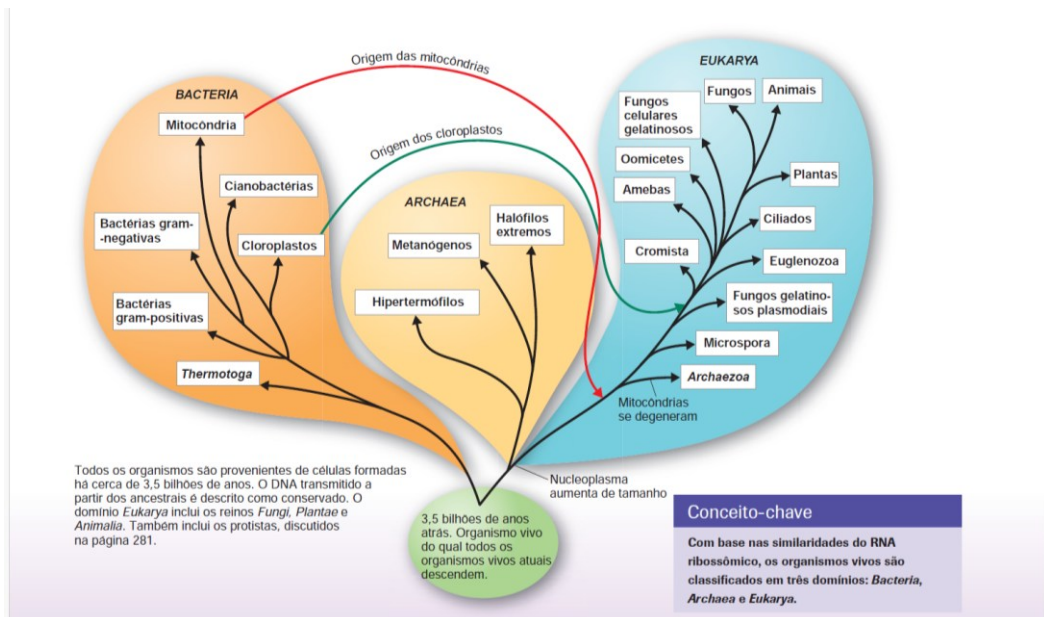
A desconhecida biodiversidade da Terra

Para cada espécie de ser vivo conhecida no planeta, há 100 mil por serem identificadas, de acordo com a projeção de um grupo da Universidade de Indiana, Estados Unidos. Segundo esse trabalho, a Terra deve abrigar 1 trilhão de espécies de microrganismos, das quais 99,999% permanecem desconhecidas. O levantamento se baseou em informações de bancos de dados



Grande Fonte Prismática, no Parque Nacional de Yellowstone: águas ricas em microrganismos ainda não identificados

38



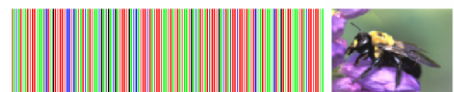
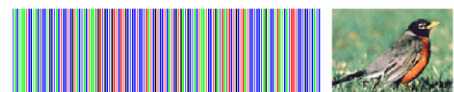
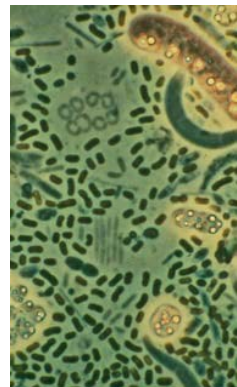
Fonte: Tortora et al., 2012

39

DNA barcoding

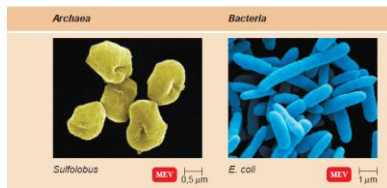
❖ Proposta: Uma maneira simples de identificar espécies pelo DNA

❖ Região do DNA curtas e padronizadas para identificar espécies de plantas, animais, fungos e microrganismos

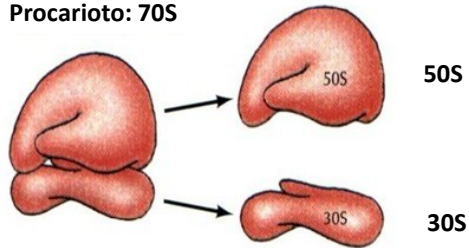


40

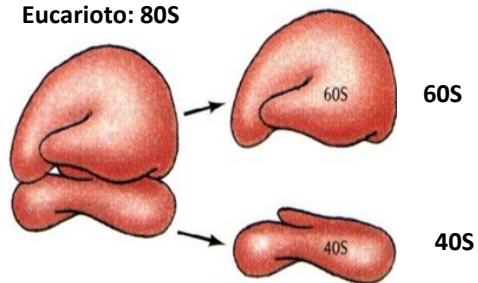
Ribossomo Procarioto X Eucarioto



Procarioto: 70S



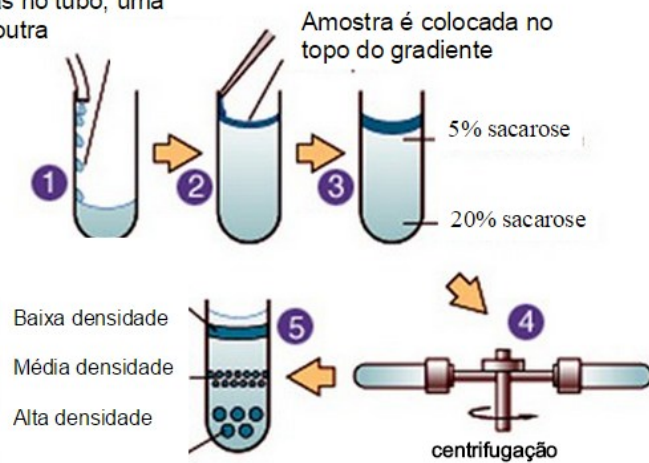
Eucarioto: 80S



41

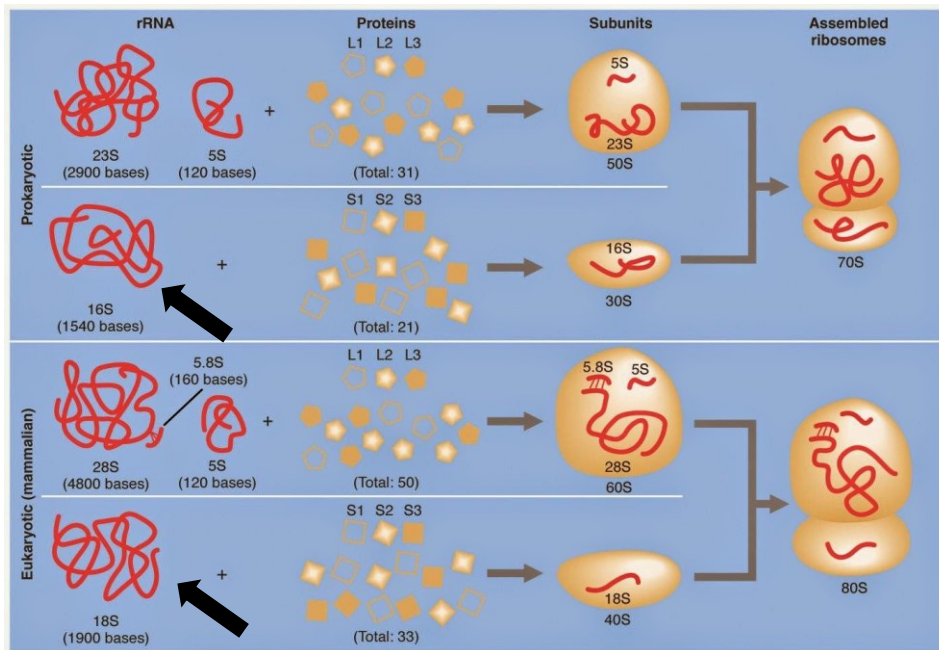
Valor S

Soluções de sacarose com densidades diferentes são colocadas no tubo, uma sobre a outra



42

As Frações do Ribossomo



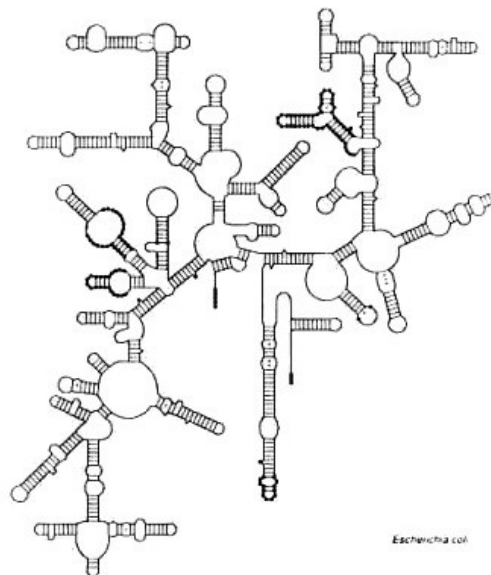
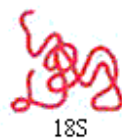
43

RNA Ribossomal – Subunidade Menor

**Procarioto
(Bacteria e Archae)**



Eucarioto



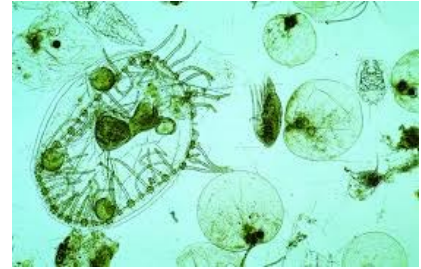
44

Análise do gene do RNA ribossomal

Ferramenta
para análise
de diversidade

Identificação
de espécies,
sem cultivo

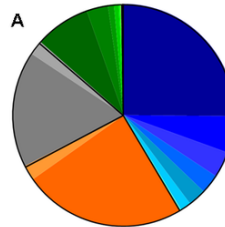
Exemplos:



Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity

Seung Yeo Moon-van der Staay^{*,†}, Rupert De Wachter[‡] & Daniel Vault^{*,‡}

A



Stramenopiles, 41%	■ Bacillariophyta
	■ Pelagophyceae
	■ Chrysophyceae-Synurophyceae
	■ Dictyochophyceae
	■ MOCH
	■ Stramenopiles; Ochrophyta; unclassified
	■ Boldophyceae-and-relatives
Alveolata, 26%	■ Dinophyceae
	■ Syndiniales
Hacrobia, 19%	■ Prymnesiophyceae
	■ Cryptophyceae
	■ Mamielophyceae
	■ Prasin-Clade-VII
Archaeplastida, 13%	■ Pyramimonadales
	■ Prasin-Clade-I-B
	■ Archaeplastida; Chlorophyta; unclassified
	■ Archaeplastida; unclassified
	■ Chlorodendrophyceae
Excavata, 0.2%	■ Euglenozoa

45

Ciência da Metagenômica



- Estudo dos microrganismos e suas comunidades no contexto de seu habitat natural.
- Mais de 10.000 genomas microbianos podem se sequenciados em um único experimento.

46

METAGENÔMICA: GENÔMICA AMBIENTAL

- ❑ Genômica: total de genes de um organismo
- ❑ 1 célula de cada vez!

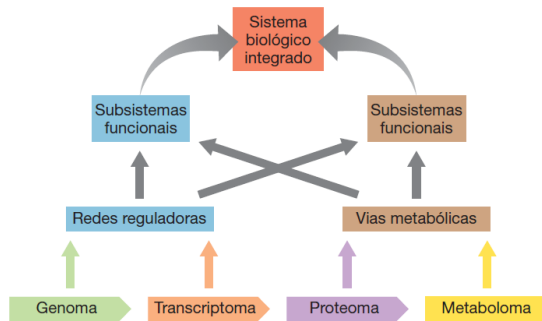


Figura 6.24 Os componentes da biologia de sistemas. Os resultados de várias análises “ômicas” são combinados e, posteriormente, integrados formando uma visão maior da inteira biologia de um organismo.

Fonte: Mandigan et al., 2016

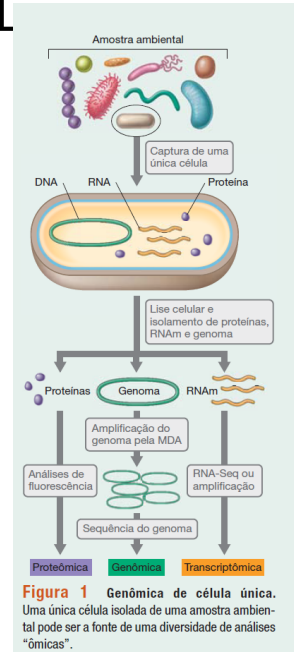


Figura 1 Genômica de célula única. Uma única célula isolada de uma amostra ambiental pode ser a fonte de uma diversidade de análises “ômicas”.

47

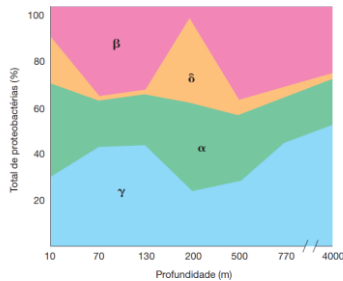


Figura 6.25 Metagenômica de Proteobacteria no oceano. A distribuição de acordo com a profundidade dos principais subgrupos (alfa α , beta β , gama γ e delta δ) de Proteobacteria no Oceano Pacífico está demonstrada na figura. Muitos outros grupos de bactérias estão também presentes (não demonstrado). Dados adaptados de Kembel, S.W., J.A. Eisen, K.S. Pollard, e J.L. Green. 2011. *PLoS One* 6: e23214.

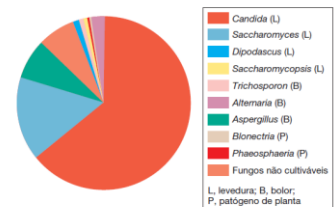
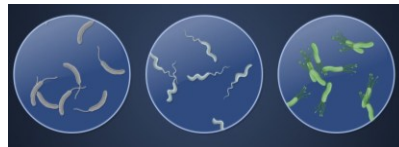


Figura 6.26 O microbioma murino. Os dados mostram a população fúngica do intestino do camundongo. O gráfico mostra que os fungos mais comuns são as leveduras. Dados adaptados de Iliev, I.D., et al. *Science* 336: 1314–1317 (2012).

io

bui-



METAGENÔMICA : GENÔMICA AMBIENTAL

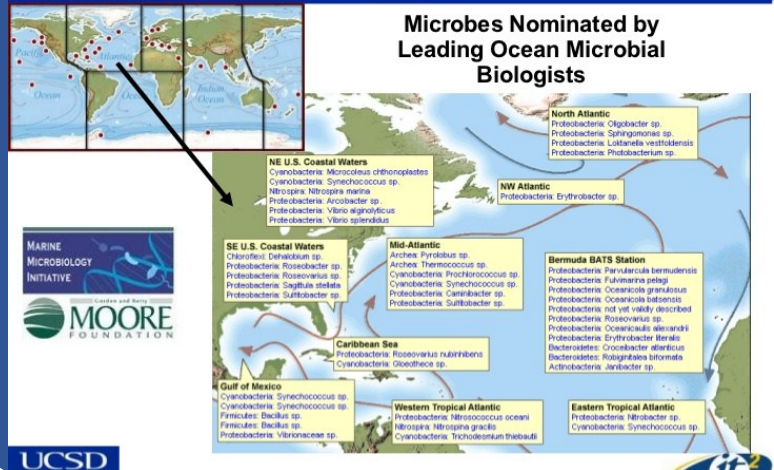
Total de genes dos organismos que habitam um ambiente

48



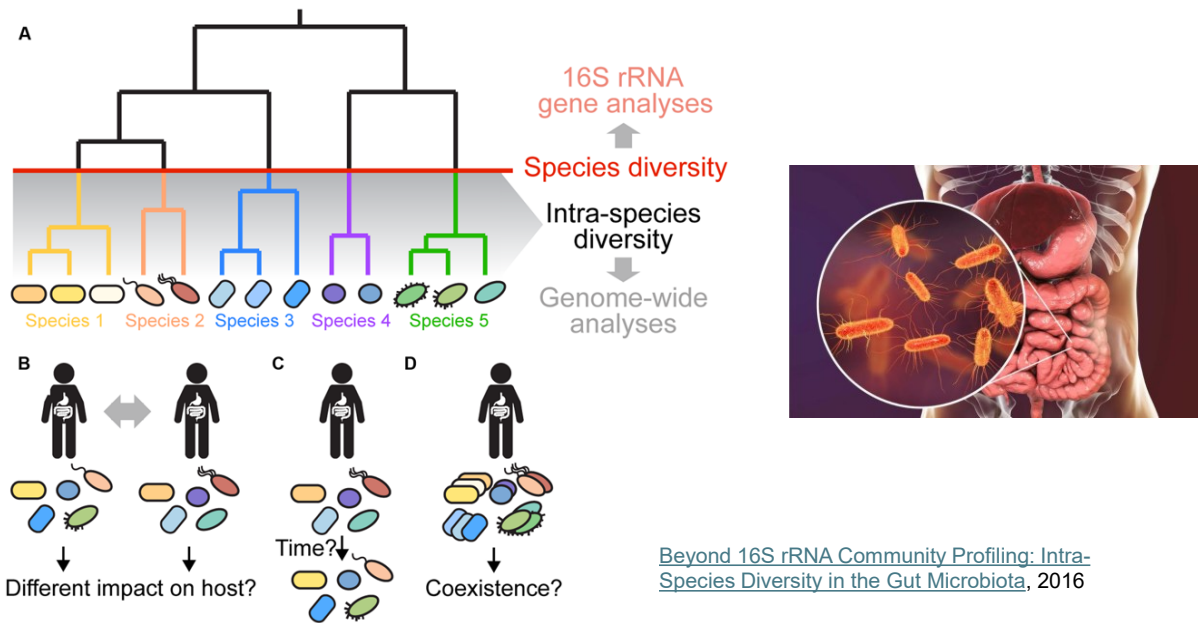
Collecting sea water samples from the Sargasso Sea for the whole genome shotgun sequencing of microbial populations. (Photo supplied by The Center for the Advancement of Genomics.)

Moore Microbial Genome Sequencing Project Selected Microbes Throughout the World's Oceans



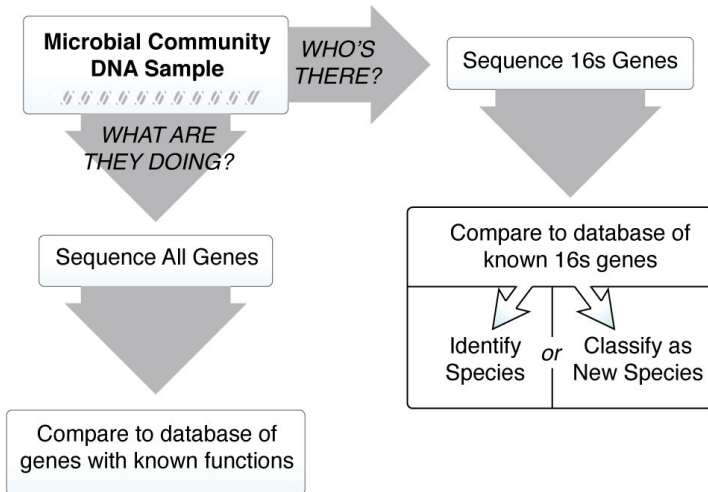
49

MICROBIOMA HUMANO



50

Metagenômica e RNA Ribossomal



Collecting sea water samples from the Sargasso Sea for the whole genome shotgun sequencing of microbial populations. (Photo supplied by The Center for the Advancement of Genomics.)

