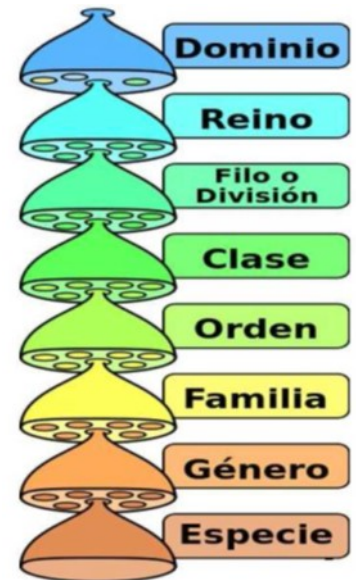


Unidad 2: Clasificación de los microorganismos

Conceptos sobre clasificación de organismos. Diferencias entre células microbianas procariotas y eucariotas. Comparación entre métodos “clásicos” de clasificación y la contribución de los métodos moleculares basados en la comparación de secuencias de macromoléculas a la misma. Concepto de cronómetros moleculares. Taxonomía, sistemática y nomenclatura microbiana: Conceptos sobre Evolución de los microorganismos: El ancestro común universal (LUCA) y los tres Dominios de la vida: Bacterias, Arqueas y Eucariotas. Correlación con la biología de estos organismos. Rol de la transferencia horizontal de genes en la evolución de los mismos. La "especie" microbiana. Secuencia de genomas microbianos completos. Conceptos de genoma “core” y “accesorio” en una especie microbiana.



Objetivo de aprendizaje de esta clase

- ✓ Conceptos de como clasificar microbios en grupos taxonómicos, sus dificultades y ventajas, evolución de la taxonomía
 - ✓ Definición de “especie” microbiana;
- ✓ Aplicaciones de las distintas metodologías utilizadas para identificar y clasificar microbios

Algunos legados de los siglos XIX y XX

Siglo XIX

- 1) Los procedimientos y herramientas usados en microbiología: técnicas asépticas, medios selectivos, enriquecidos, diferenciales, los métodos de coloración para diferenciar microbios;
- 2) La teoría del germen de la enfermedad;
- 3) El rol de los microbios en las transformaciones químicas que definen nuestra atmósfera (*e. g.*, cianobacterias) y la evolución de organismos;
- 4) La Inmunología;
- 5) La quimioterapia

Siglo XX

- 1) Los antimicrobianos y antibióticos;
- 2) La Biología Molecular: métodos para la determinación de la estructura primaria (secuencia) de proteínas y genes, la secuenciación de genomas completos de diferentes células procariontas y eucariotas

Todo esto dio lugar a un crecimiento explosivo en el ritmo de conocimiento de las diferentes formas de MO en la naturaleza



Millones de formas de vida identificadas de amplia diversidad biológica o biodiversidad



Surge la necesidad de su clasificación : Taxonomía

Taxonomía : Es la ciencia de la clasificación de las formas vivas, (del griego ... disposición ordenada) en base a similitudes fenotípicas o genéticas.

Es una ciencia artificial que está sometida a los avances tecnológicos y, por tanto, en continuo cambio.

Flexible y cambiante como debe ser la ciencia

La taxonomía proporciona un ordenamiento, una referencia común para identificar organismos nuevos

-La taxonomía es una herramienta básica necesaria que proporciona un lenguaje universal comunicación.

-Herramienta para comprender la evolución bacteriana y su relación con los otros organismos- Biología evolutiva.

Por que se necesita clasificar los seres vivos?

Para poder estudiar la extraordinaria variedad de formas vivas(biodiversidad) es necesario clasificar

Los biólogos las han clasificado en función de las características que comparten en forma lógica y consistente y que permita además seguir el linaje

Esta clasificación tiene dos requisitos fundamentales

- a) que comprenda a todos los seres vivos conocidos en ese momento y
- b) que ninguno se pueda ubicar en dos categorías diferentes al mismo tiempo

La taxonomía se asienta en tres pilares:

Descripción/identificación – Características morfológicas, fisiológicas, genéticas y evolutivas

Clasificación –agrupación de los organismos basados en su semejanza (características compartidas) de modo que reflejen las relaciones históricas entre los linajes. En categorías o taxas para mostrar grados de similitudes entre organismos

Nomenclatura binomial – asignar un nombre científico en base a ciertas reglas ya establecidas y admitidas internacionalmente (Linnaeus siglo XVIII)

Taxón (del griego taxis=arreglo, poner orden). Término aplicado a un grupo de organismos emparentados, situados en una categoría de un nivel determinado en un esquema de clasificación taxonómica. La jerarquía de los taxones refleja la historia evolutiva de los organismos.

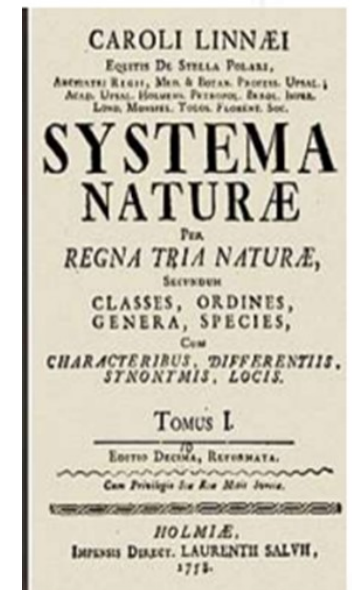
Clasificación de macrobios

Carolus Linnæus (1707-1778) y la aventura de clasificar a la naturaleza. Consolidación de la taxonomía. “Dios creó, Linneo ordenó”

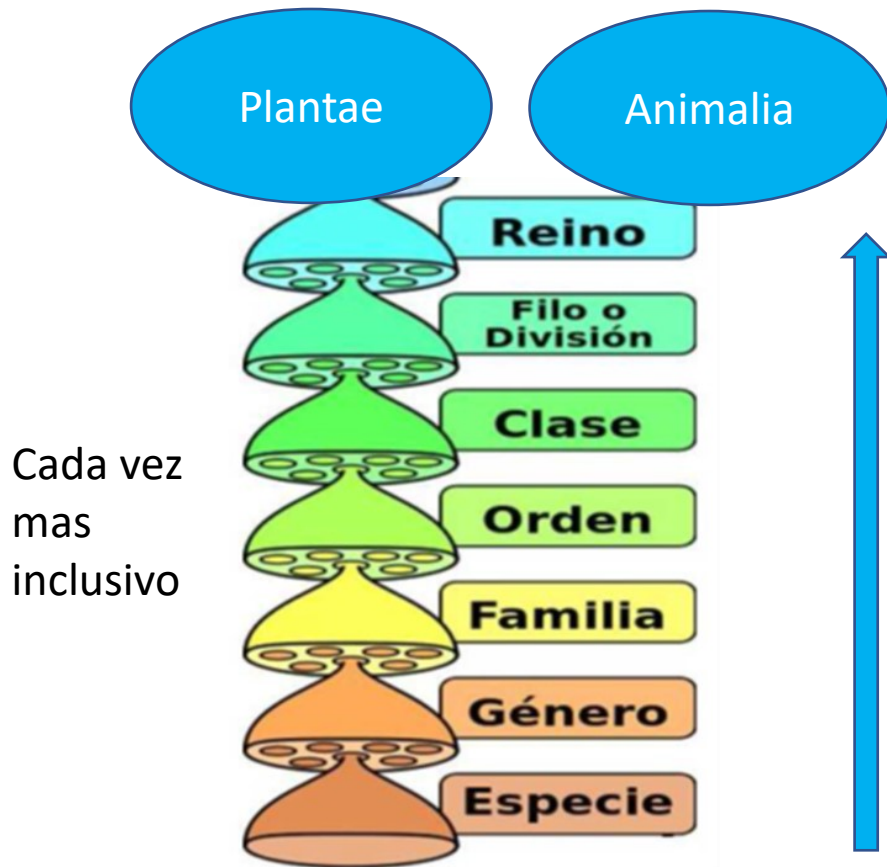
Clasifica a los seres vivos de manera ordenada y jerárquica

Ordenó cada organismo en categorías taxonómicas que van de lo general a lo particular donde todo organismo es clasificado en diferentes rangos taxonómicos comenzando por la **Especie** y luego, un poco mas inclusivo, el Género, Familia etc

Los caracteres taxonómicos son el conjunto de estructuras o funciones que se utilizan para clasificar y relacionar a los individuos agrupándolos en categorías o taxones (taxón es lo mismo que categoría taxonómica)



1-Categorías o jerarquías taxonómicas



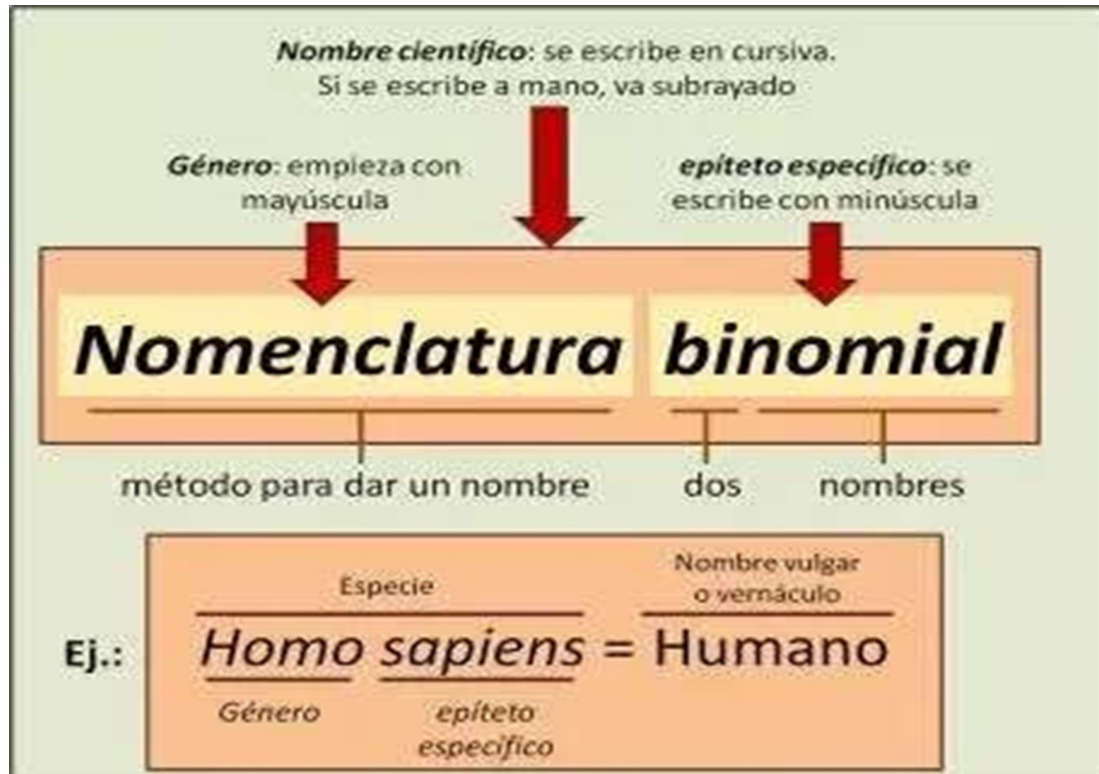
Los organismos que pertenecen a la misma especie comparten las mismas características morfológicas, fisiológicas, genéticas, evolutivas y de comportamiento

Los individuos de la misma especie pueden cruzarse sexualmente entre si y dan progenie fértil. La naturaleza pone el límite

La especie era y es la unidad básica del sistema de clasificación

Una nueva especie surge por algún mecanismo que determina su aislamiento reproductivo

En Systema Naturae (1735) “inventa” la nomenclatura binomial, nombre científico de los organismos



Nombre único a cada especie

Todos los nombres son en latín
La primera palabra del género en **MAYÚSCULA** y la de la especie en **minúscula**, y se escriben en **itálica**

Reino ... Animal



Tipo ... Vertebrados



Clase ... Mamíferos



Orden ... Primates



Familia ... Homínidos



Género ... Homo



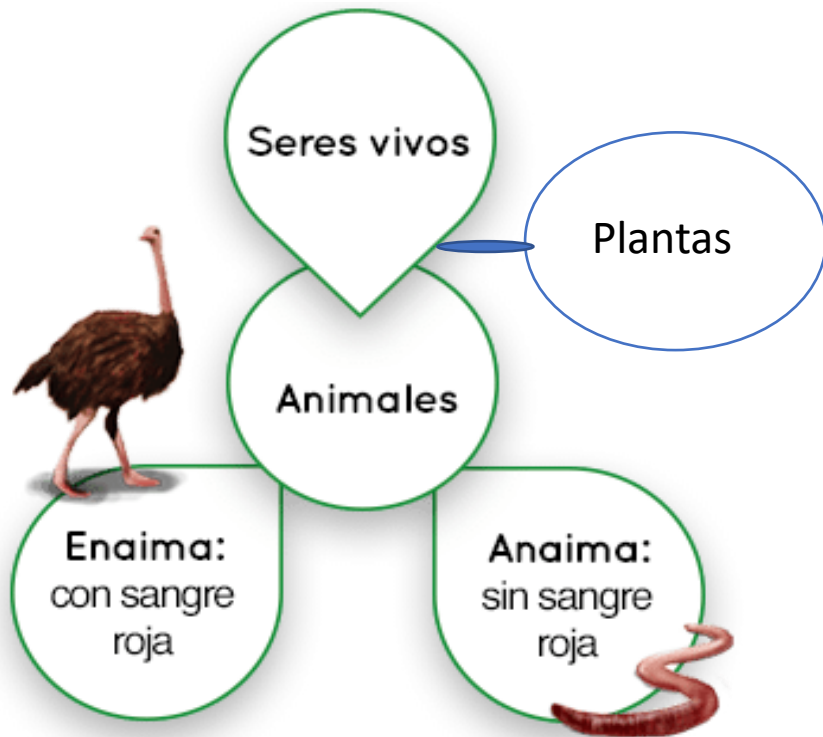
Especie ... Homo sapiens

Reino, Tipo, Clase,
Orden, Familia,
Género y Especie
son las
**CATEGORÍAS
TAXONÓMICAS**

Historia de la taxonomía: Diferentes formas de agrupar

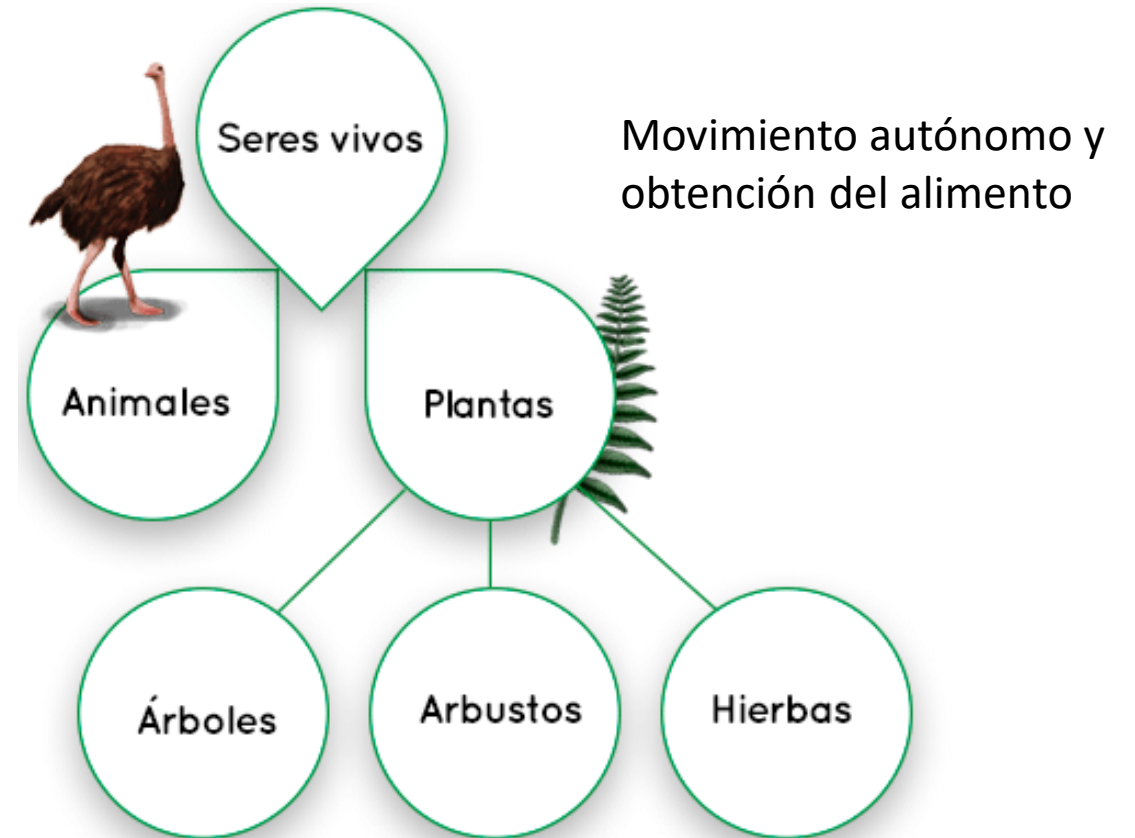
-Clasificación de los organismos: Se basa en las similitudes y diferencias en estructura y apariencia. **Biología comparada.** Aristóteles (500 años a.c.), Teofrasto (300 años a.c.).

Esquema Aristóteles



Introdujo el término especie, "formas similares de vida"

Esquema Teofrasto

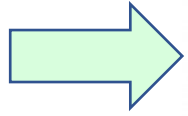


Movimiento autónomo y obtención del alimento

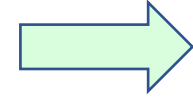
No representan la historia evolutiva

subgrupos

Invencción del microscopio

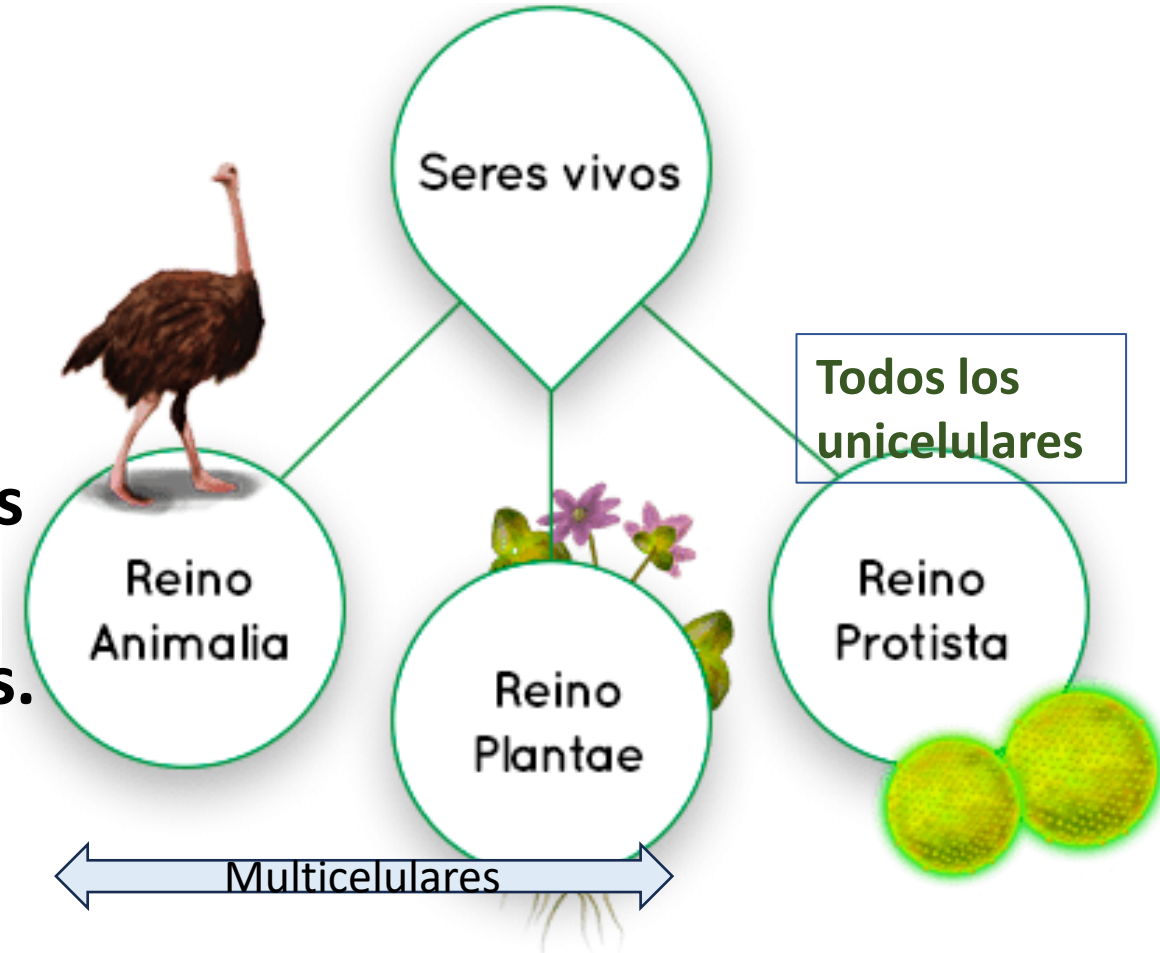


Ernst Haeckel(1866) propone el Reino Protista (todos los unicelulares)



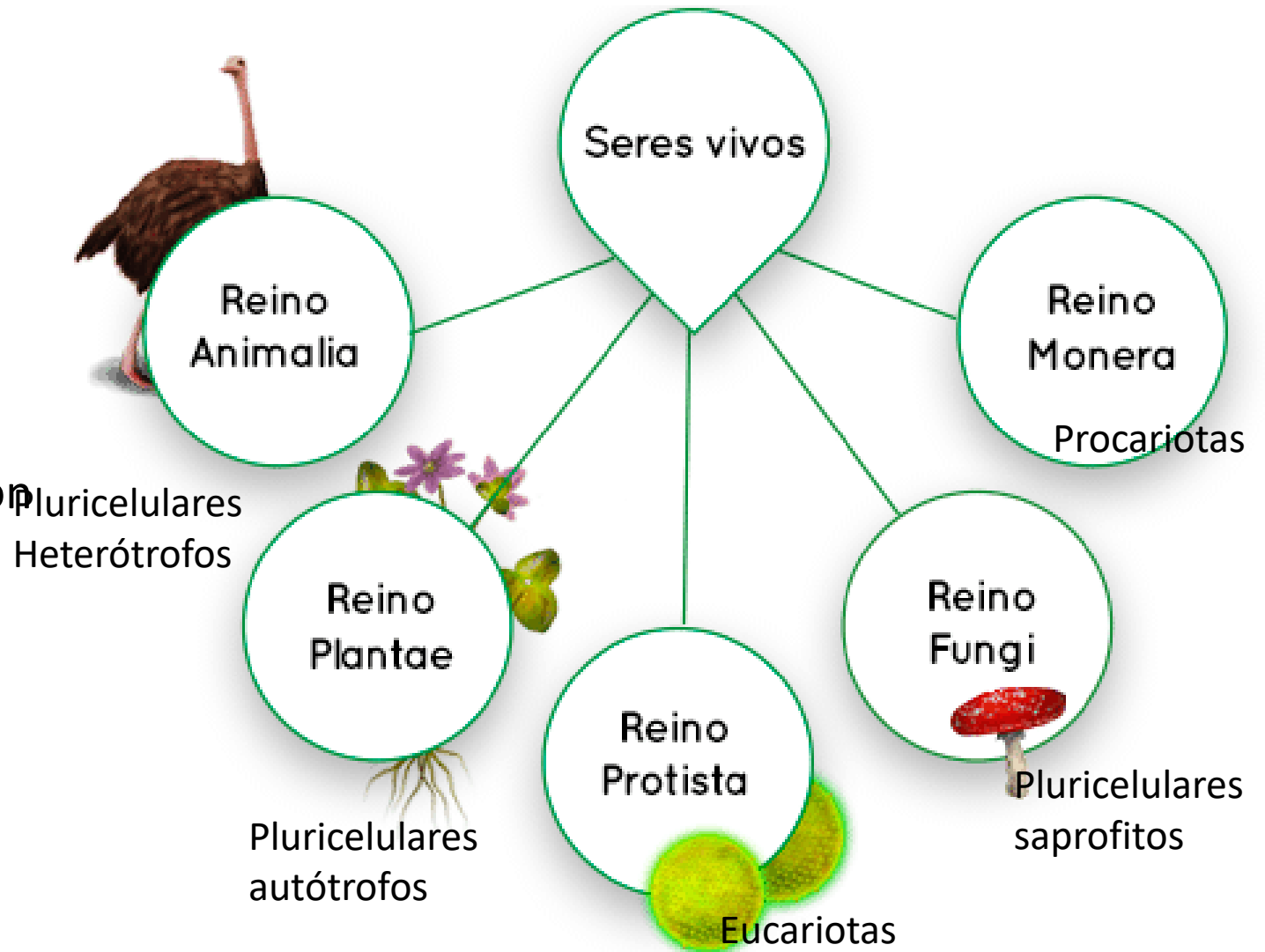
Cuando se comenzaron a estudiar a los organismos unicelulares, la clasificación como plantas o animales no ajustaba. Para resolver este problema, Haeckel creó un tercer reino llamado Protista, donde ubicó a todos los organismos unicelulares (para incluir bacterias, algas y hongos).Carente de complejidad y de tejidos.

No estudio las relaciones evolutivas entre ellos Las moneras eran un filo dentro de los protistas



Robert H. Whittaker (1969)

Con los avances del momento Whittaker propuso un esquema de clasificación con cinco reinos al considerar los siguientes criterios: el tipo celular (procariontes y eucariontes), el nivel de organización (unicelular o pluricelular), el tipo de nutrición (autótrofa o heterótrofa) y el tipo de reproducción (sexual o asexual). Los procariontes fueron colocados en el reino Prokariotae o Monera y los eucariontes los otros cuatro reinos.

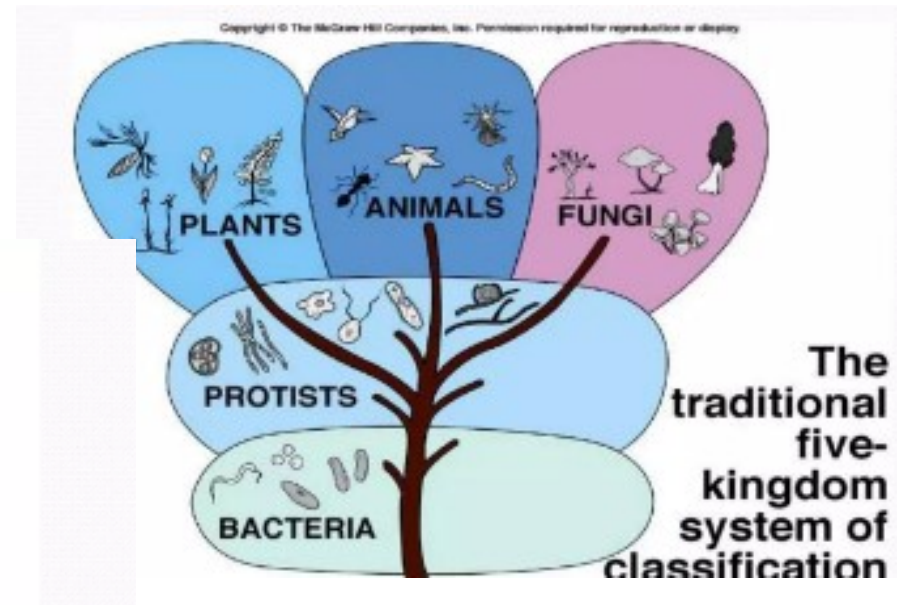
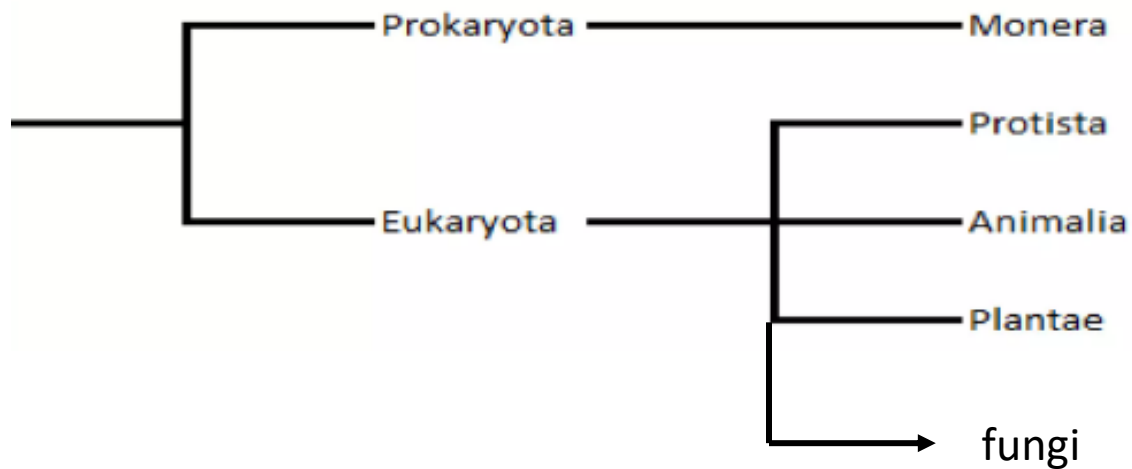


Esquema Robert H. Whittaker








Robert H. Whittaker (1969)

Presencia o
no de núcleo



Robert Whittaker

	Tipo celular Procariota Eucariota	Nivel de organización Unicelular Pluricelular	Nutrición Autótrofa Heterótrofa	Reproducción Sexual Asexual	
Monera	procariota	unicelular	heterótrofa y autótrofa	asexual	bacterias 
Protista	eucariota	unicelular	heterótrofa y autótrofa	sexual y asexual	algas 
Fungi	eucariota	unicelular y pluricelular	heterótrofa	sexual y asexual	hongos 
Plantae	eucariota	pluricelular	autótrofa	sexual y asexual	plantas 
Animalia	eucariota	pluricelular	heterótrofa	sexual y asexual	animales 

Todo cambio cuando se descubrió la estructura del DNA y se llegó a la conclusión de que la historia evolutiva está registrada en la secuencia del DNA



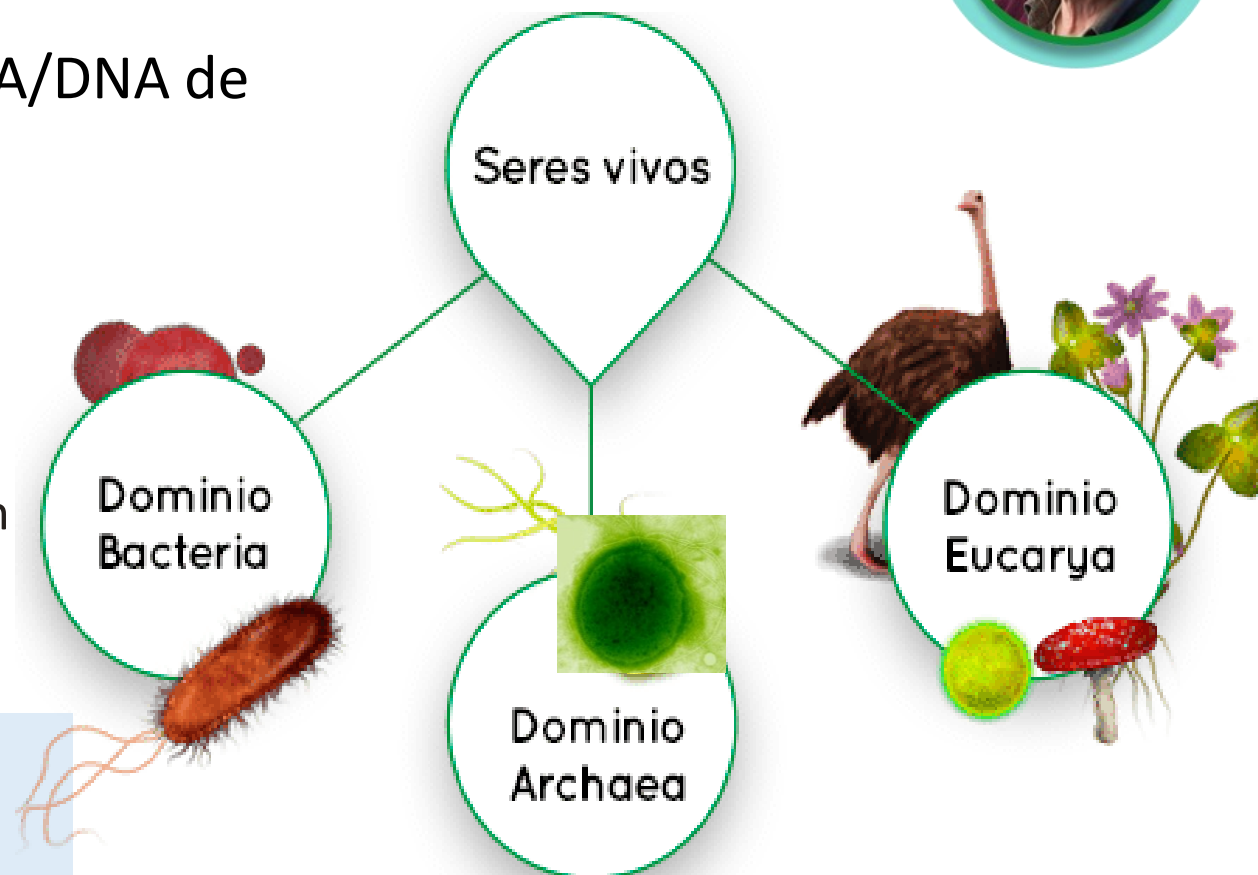
Carl Woese, 1977



Comparo las secuencias de los genes del rRNA/DNA de muchos organismos

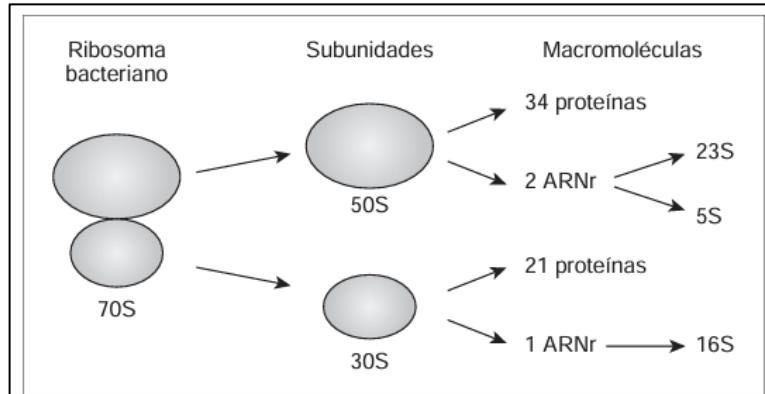
- 1) están distribuidos de manera universal,
- 2) son funcionalmente constantes,
- 3) están muy conservados (es decir, cambian muy lentamente), y
- 4) tienen la longitud adecuada para ofrecer una visión profunda de las relaciones evolutivas

Woese, en 1977 propone la división del Reino Monera en dos grandes grupos, que nombró Bacteria y Archaea. Nivel superior Dominio



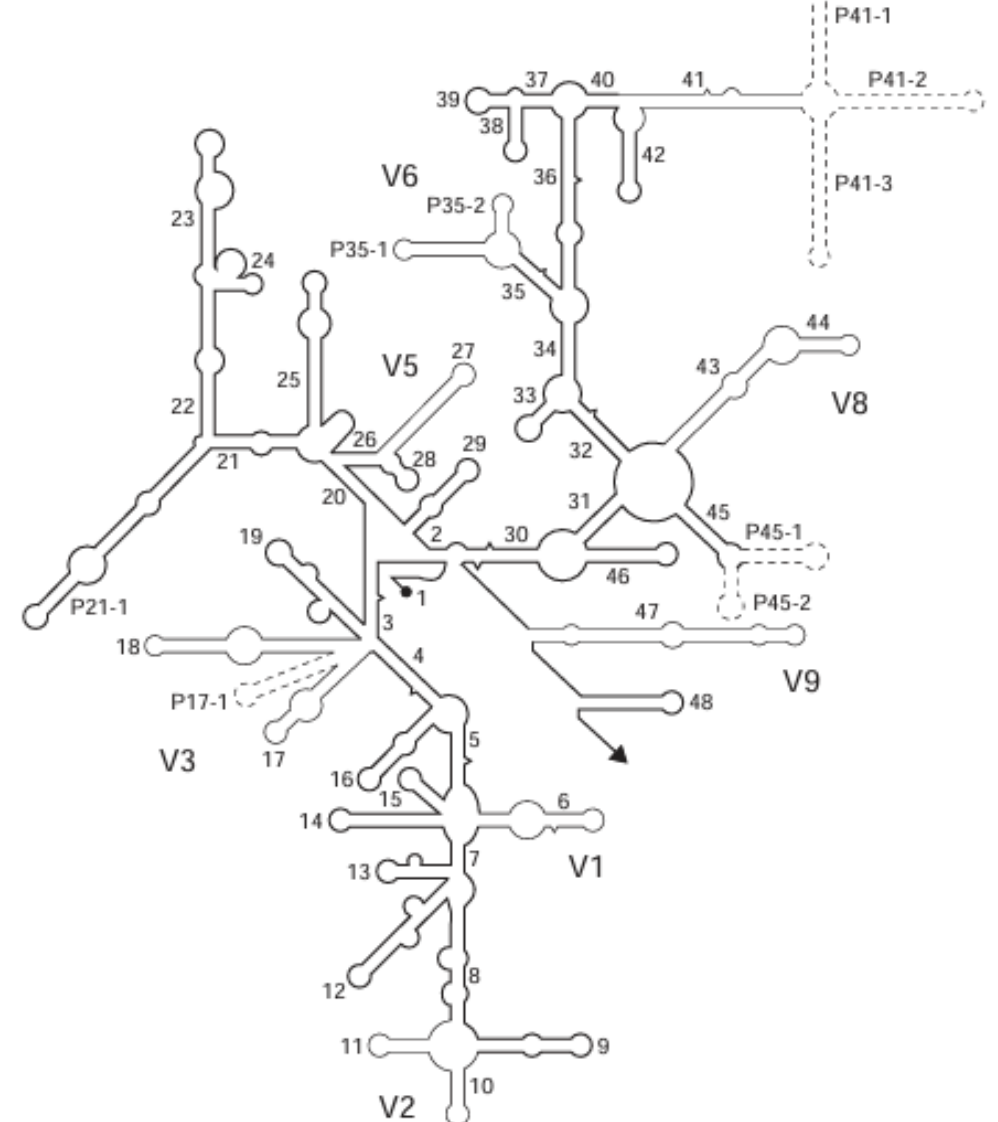
Estos grupos presentan grandes diferencias a nivel de la genética ribosomal, a pesar de que ambos grupos están compuestos por organismos con células procariotas

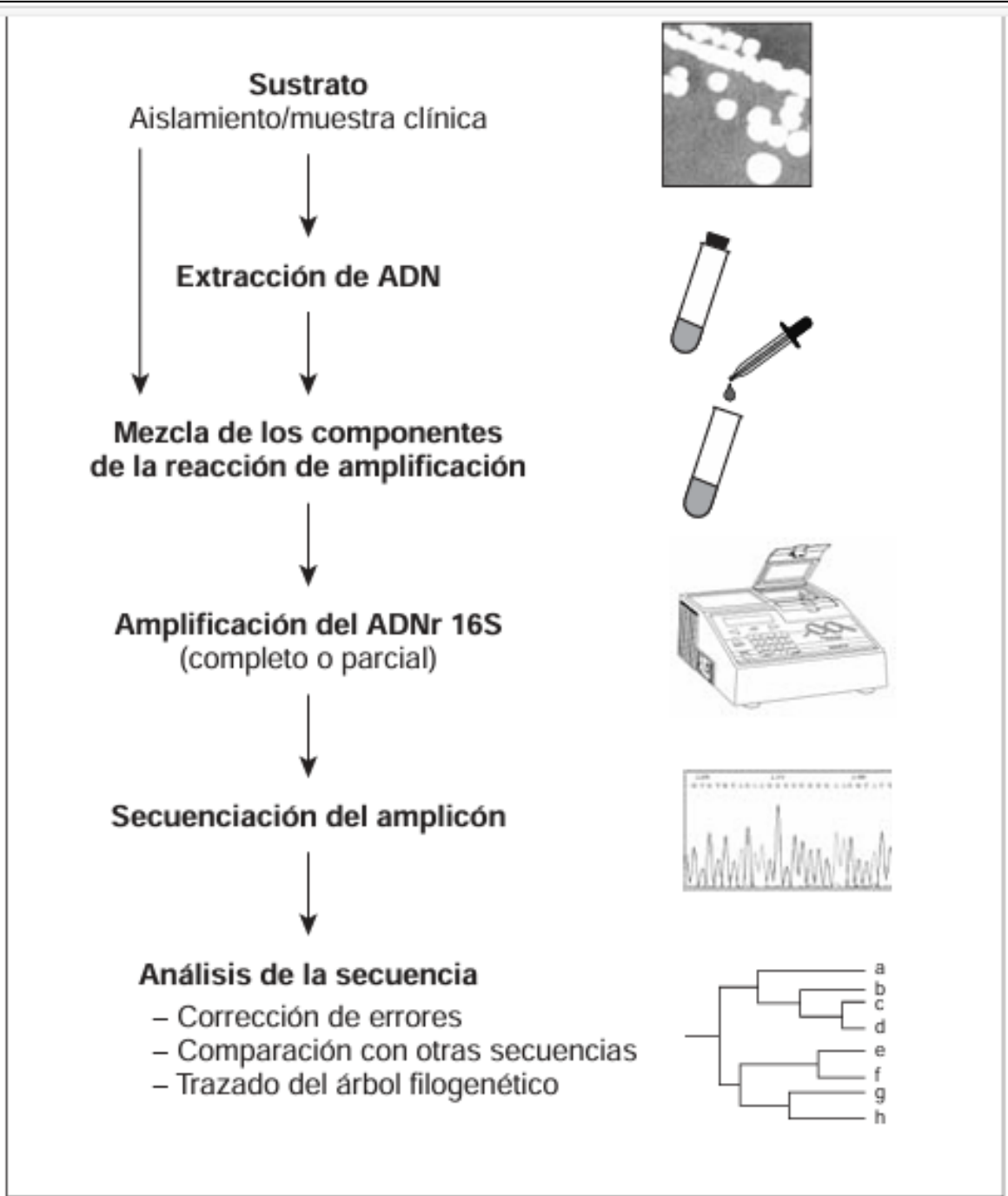
Características relevantes del ARNr 16S para su utilización como herramienta filogenética y taxonómica (rRNA de la subunidad pequeña (SSU rRNA, de *small subunit rRNA*))



Estructura secundaria del ARNr 16S Las hélices comunes a todos los seres vivos, denominadas hélices universales, se numeran de la 1 a la 48, en orden de aparición a partir del extremo 5. Las hélices específicas de procariontes se indican con Pa-b, donde a es el número de la hélice universal precedente y b el número de serie. Las regiones relativamente conservadas se presentan en gris. Las regiones variables, en líneas finas, se designan V1-V9, teniendo en cuenta que V4 es exclusiva de eucariotas. Las regiones que se muestran en líneas discontinuas sólo están presentes en un número limitado de estructuras. Estas secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma

1.500 nt, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosómico 16S (ADNr 16S)



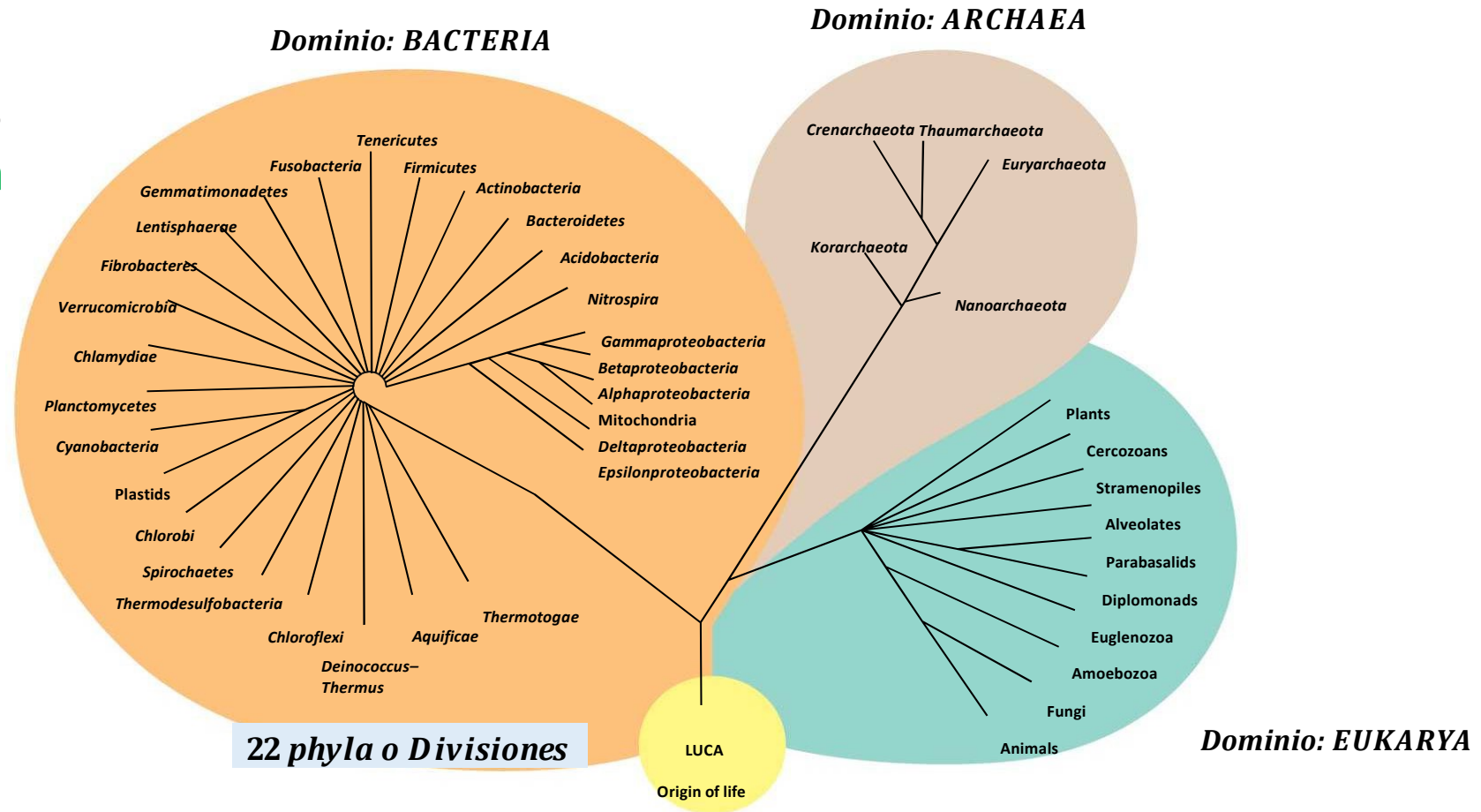


1. Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituye, por tanto, una diana universal para su identificación.
2. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
3. Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas y, junto con las variaciones en los ARNr 18S, a lo largo de toda la escala evolutiva. Los ARNr SSU contienen, sin embargo, suficiente variabilidad para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos.
4. El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S (1.500 nt) minimiza las fluctuaciones estadísticas.
5. La conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
6. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ADNr 16S existen bases de datos amplias, en continuo crecimiento

Figura 4. Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante...

ARN ribosomal 16S/18S registro de la vida evolutiva

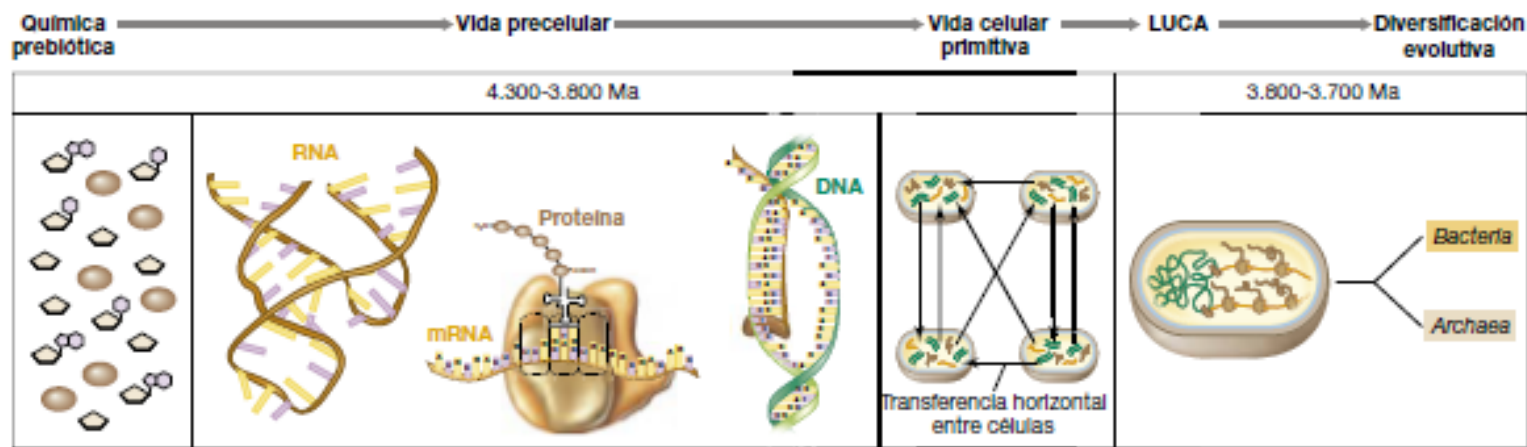
Tres dominios de vida celular que son evolutivamente distintos y, aun así, **comparten ciertos rasgos indicativos de su origen común a partir de un antepasado celular universal LUCA**



La raíz de este árbol universal representa un punto en el tiempo en el que toda la vida existente ahora en la Tierra compartía un antepasado común, el ultimo antepasado común universal, LUCA

Procesos hipotéticos que precedieron al origen de la vida celular

Caldo primitivo moléculas orgánicas	Moléculas que pueden autorreplicarse y que generan variación	Membranas semipermeables que engloban polímeros autorreplicativos. Descendientes. Paso clave englobamiento
-------------------------------------	--------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------



Bloques estructurales biológicos - Aminoácido - Nucleósidos - Azúcares	Mundo de RNA - RNA catalítico - RNA autorreplicativo	Síntesis proteica - Traducción con molde de RNA	DNA - Rep - Tra	Alta frecuencia de transferencias de genes para #mejoras# Población promiscua	Divergencia de Bacteria y Archaea
----------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------	------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------

Formación de barreras, y los caracteres se fueron fijando

Evolución de las vías metabólicas

Organismos fotosintéticos anoxygenic

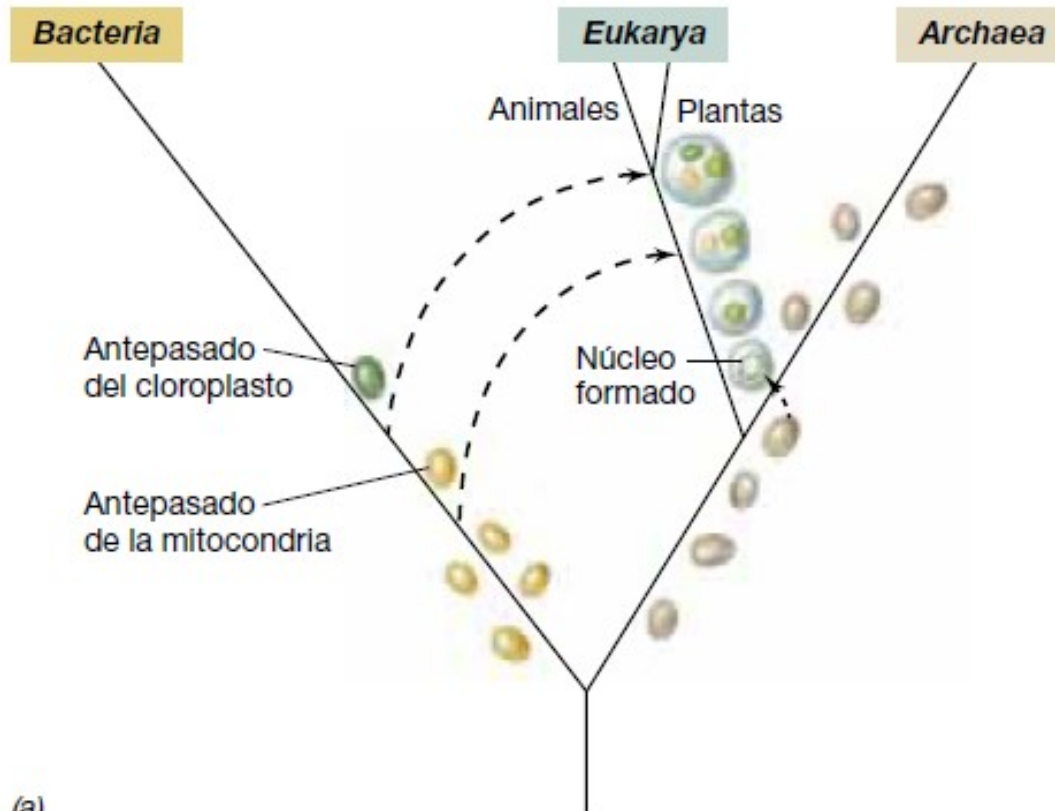
Organismos fotosintéticos oxygenic

Organismos eucariotas

Pluricelularidad

La raíz de este árbol universal representa un punto en el tiempo en el que toda la vida existente ahora en la Tierra compartía un antepasado común, el último antepasado común universal, **LUCA**. **Bicapa lipídica y usaba DNA RNA y proteínas.** **Antes del Luca el ADN paso a ser el material genético que se transmitía a los descendientes por ser mas estable y las membranas lipídicas le dieron individualidad, alta tasa de intercambio**

La simbiosis como motor de la evolución. Quimeras entre dos dominios filogenéticos para formar la célula eucariota (ya se estaba acumulando O₂)



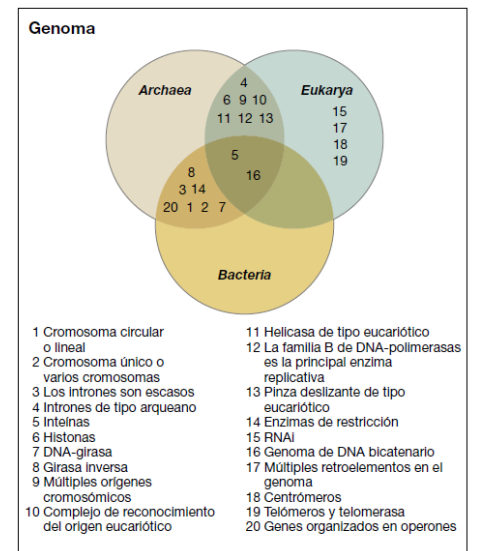
(a)

La línea con núcleo divergió de la línea arqueana, posteriormente adquirió por endosimbiosis al antepasado bacteriano de la mitocondria y más tarde al antepasado cianobacteriano del cloroplasto, punto en el cual la línea con núcleo divergió en los linajes que dieron lugar a las plantas y los animales.

Lynn Margulis: Las células eucariotas son el resultado de la endosimbiosis de células procariotas

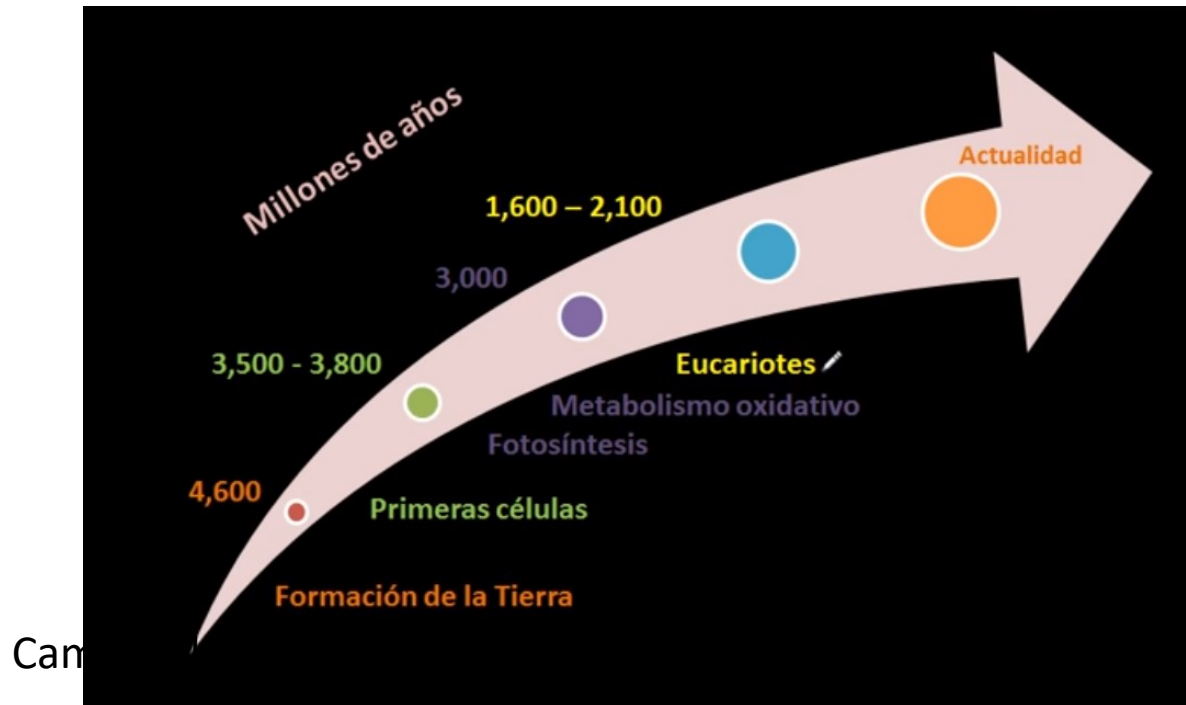


Los eucariotas son quimeras genéticas, contienen genes de al menos dos dominios filogenéticos



¿Como fue este proceso evolutivo?

El proceso evolutivo se refiere a como los organismos cambian en función del tiempo, la selección natural y otros procesos . Es un proceso continuo.



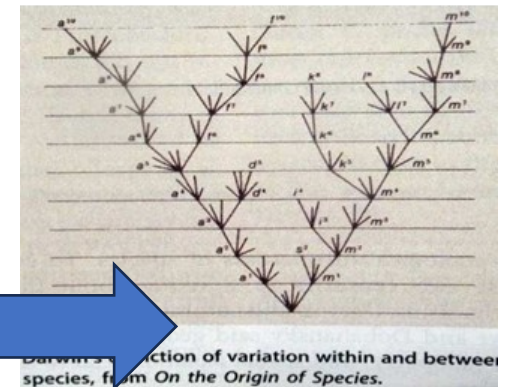
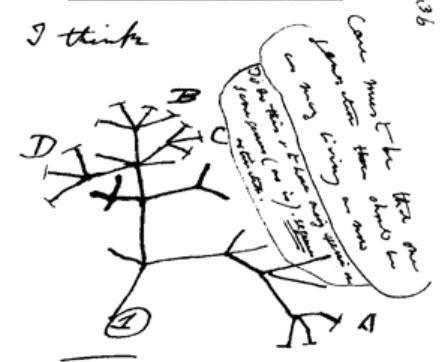
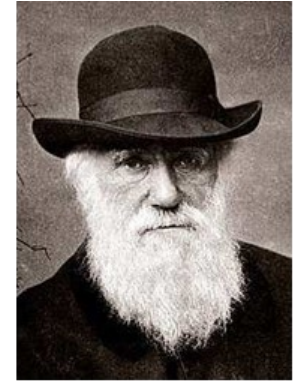
- 1- variación
- 2- selección natural
- 3- herencia
- 4- tiempo
- 5- especiación

Si los cambios evolutivos en una población son lo suficientemente grandes, puede haber una separación reproductiva y la formación de una nueva especie

Estos conceptos se mantienen en todos los dominios pero en los MO tienen particularidades

Charles Darwin y el proceso evolutivo

- ❑ La principal idea de la teoría de la evolución es que todas las formas de vida descienden de un ancestro común y que las especies cambian y se adaptan al entorno a través del proceso de selección natural.
- ❑ La teoría de Darwin o teoría de la evolución brinda una explicación sólida para las similitudes entre organismos y la organización en taxas
- ❑ La evolución de las taxas muestra la evolución o la filogenia de un ancestro relacionado o dicho de otra manera, las similitudes son el resultados de su descendencia de ancestros comunes



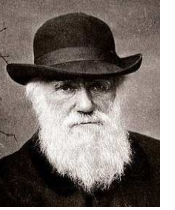
Darwin's prediction of variation within and between species, from *On the Origin of Species*.

¿Como ocurre la evolución de las especies?

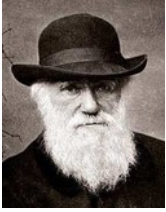


- a) Todas las células contienen DNA , y el DNA pasa de padres a hijos.
- b) Aparecen mutaciones y cambios por recombinación hereditarias que se acumulan en las secuencias de DNA.
- c) Estas mutaciones se producen de manera natural y son una causa importante de las variaciones al azar sobre las que actúa la selección.
- d) Es un proceso continuo....
- e) Es importante recordar que todas las mutaciones se producen al azar; la naturaleza selectiva del entorno no causa mutaciones adaptativas; simplemente selecciona para el crecimiento y la reproducción a aquellos organismos que han sufrido mutaciones que suponen una ventaja en términos de aptitud.

La generación de nuevas especies

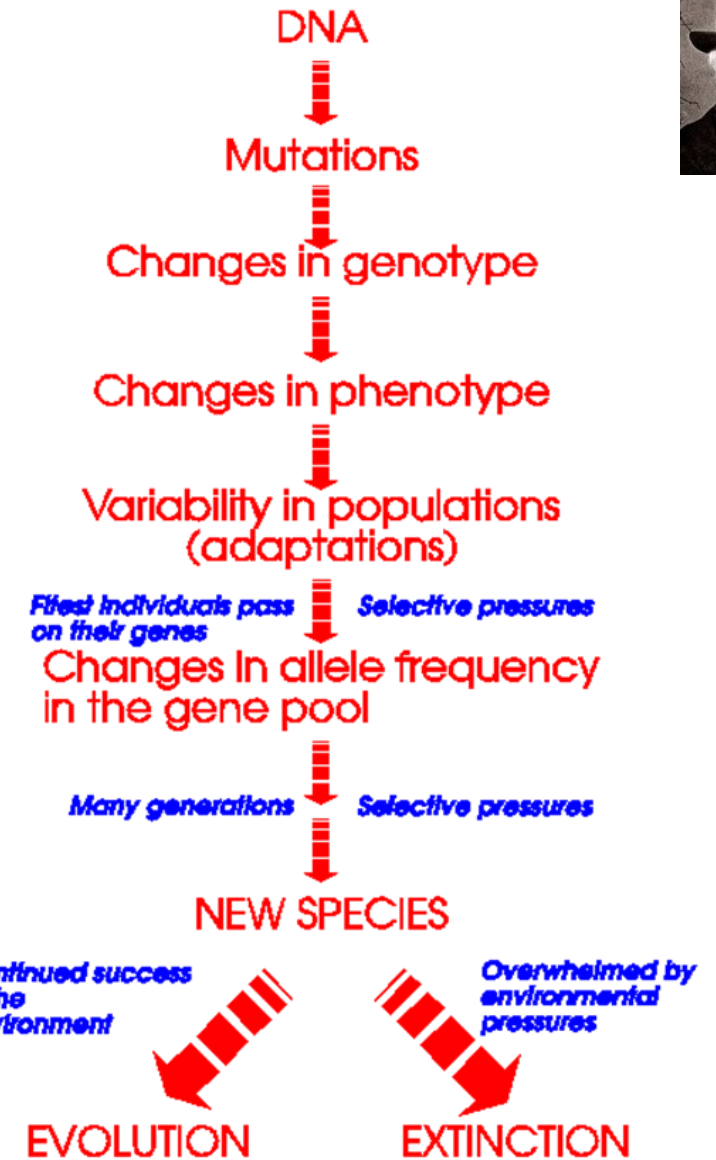


- ❖ **Variación:** *Las organismos sufren cambios*, los cuales son transmitidos a su progenie (hoy: *mutaciones en el ADN*), las mutaciones deletéreas (nocivas) son eliminadas mediante selección natural negativa. La mutación dirige la evolución.
- ❖ Es el *medio ambiente* el que selecciona aquellas mutaciones fortuitas “favorables”, o sea, *las que promueven la adaptabilidad del organismo a ese medio en particular*, y con el tiempo esos cambios aumentan su frecuencia en la población
- ❖ La *acumulación de diferentes mutaciones* entre organismos derivados de un ancestro común al adaptarse a nichos ambientales distintos provocará, eventualmente, la *incompatibilidad* de reproducción sexual (o de apareamiento de cromosomas homólogos) *dando origen a especies distintas*.
- ❖ La diferencia en secuencias nucleotídicas entre dos organismos será función del número de mutaciones acumuladas desde que compartieron un antepasado común. Por consiguiente, las diferencias en las secuencias de DNA se pueden utilizar para inferir relaciones evolutivas.



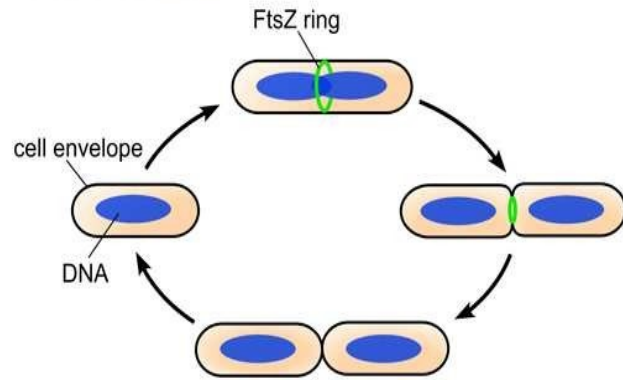
- Mutaciones (**variación**) producidas de manera natural y al azar , acumulación de cambios en el ADN, transmisibles a lo largo del tiempo (**herencia**),
- Y es la **selección natural** la que actúa sobre ellas seleccionando al mas apto para esas condiciones
- La acumulación de mutaciones eventualmente genera una nueva especie, actúa la selección natural (**especiación**)
- La evidencia indica que todos los organismos descienden de un ancestro común.
- **Tiempo**

Como dan lugar estos mecanismos sencillos al origen y la divergencia de las especies microbianas. Cambio de una especie en otra?



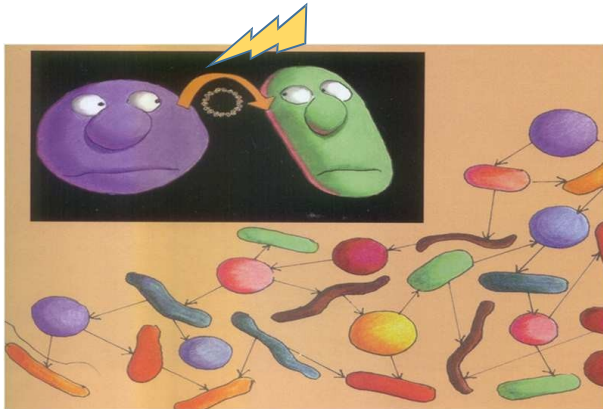
Especiación y Evolución microbiana

BINARY FISSION:



La reproducción sexual es un evento reciente en la evolución (~500 millones de años). El concepto de “*especie*” y “*población*” es así difícilmente aplicable a los microbios (la mayoría de la vida sobre este planeta) donde la reproducción es *asexual* (por división binaria).

¿Como se produce la evolución de los genomas de MO?

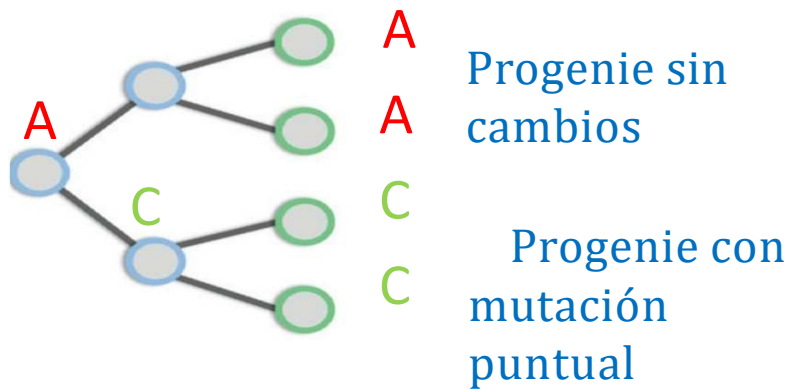
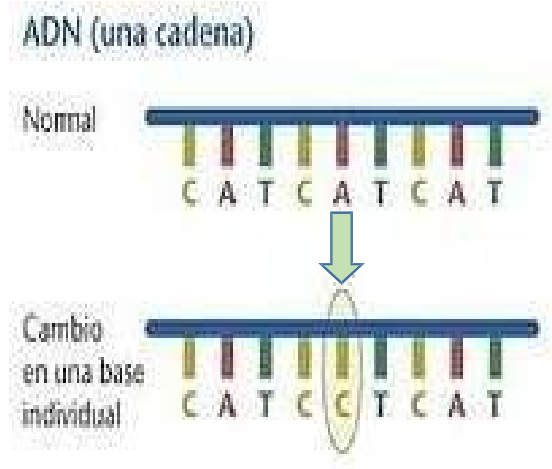


La **variación genética** es producida por la acumulación de mutaciones puntuales, duplicación génica, y (mayoritariamente) por transferencia horizontal de genes (THG), el sexo microbiano.

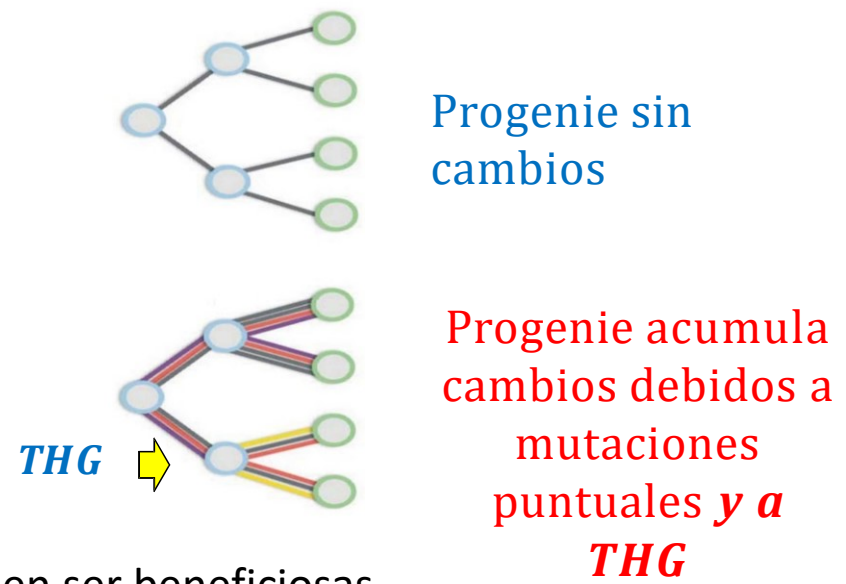
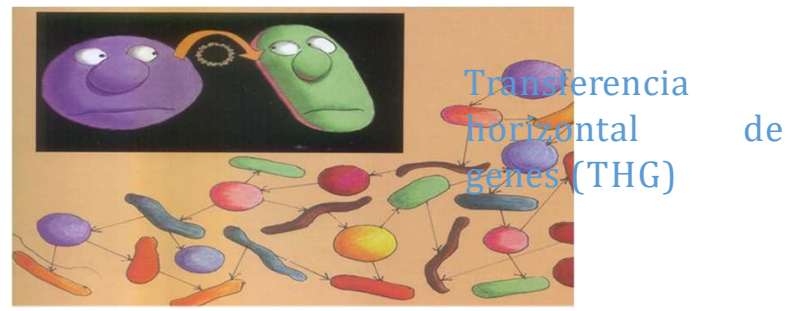


Cuales son los procesos que dan lugar a la variación genética en bacterias? Como evolucionan los genomas bacterianos?

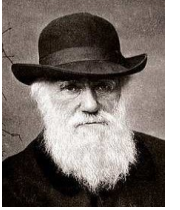
a) Mutacion puntual



b) Mutacion puntual + THG



La mayoría de las mutaciones son neutras o deletéreas pero algunas pueden ser beneficiosas



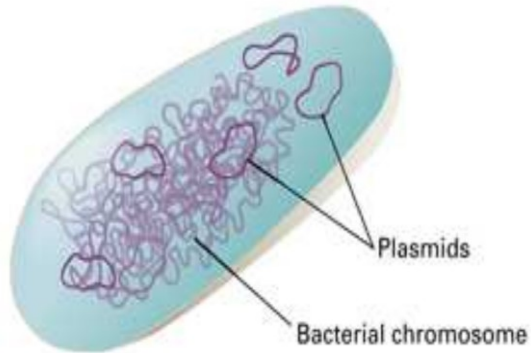
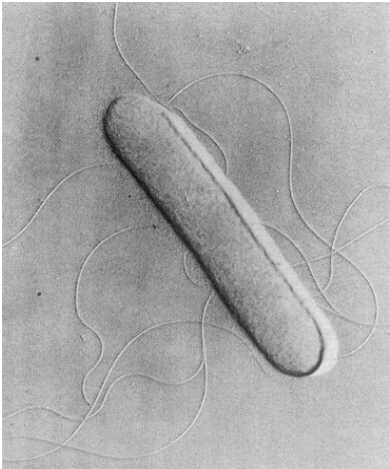
La selección natural también juega un papel importante en la evolución del genoma microbiano



La evolución del genoma microbiano es un proceso complejo y multifacético que involucra la adquisición de nuevos genes (THG) y características, deriva génica, la mutación y la selección natural. Estos procesos pueden conducir a la aparición de nuevas especies y a la adaptación de los microbios a nuevos ambientes y condiciones.

Modelo para estudiar la Evolución en tiempo real.

La bacteria entérica
Escherichia coli:

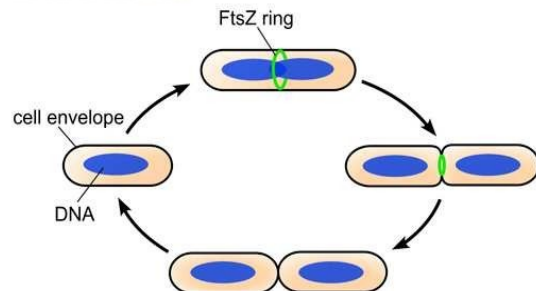


Escherichia coli es una bacteria común que habita en el intestino humano y de animales. Debido a su corto tiempo de generación, gran tamaño de población, facilidad para cultivar en el laboratorio y disponibilidad de información genómica es un modelo de estudio importante y es segura

Longitud: 5 μ m, ADN: $\sim 5 \times 10^6$ de pares de bases, completamente secuenciado

Partiendo de una sola célula de *E. coli* puedo tener mas de 10^9 de células “hijas” en 1 ml de medio rico luego de 33 generaciones en unas pocas horas de cultivo. Rápido crecimiento y reproducción asexual
En teoría todas idénticas, *pero...*

BINARY FISSION:



Factores que contribuyen a cambios en el genoma de *E. coli*

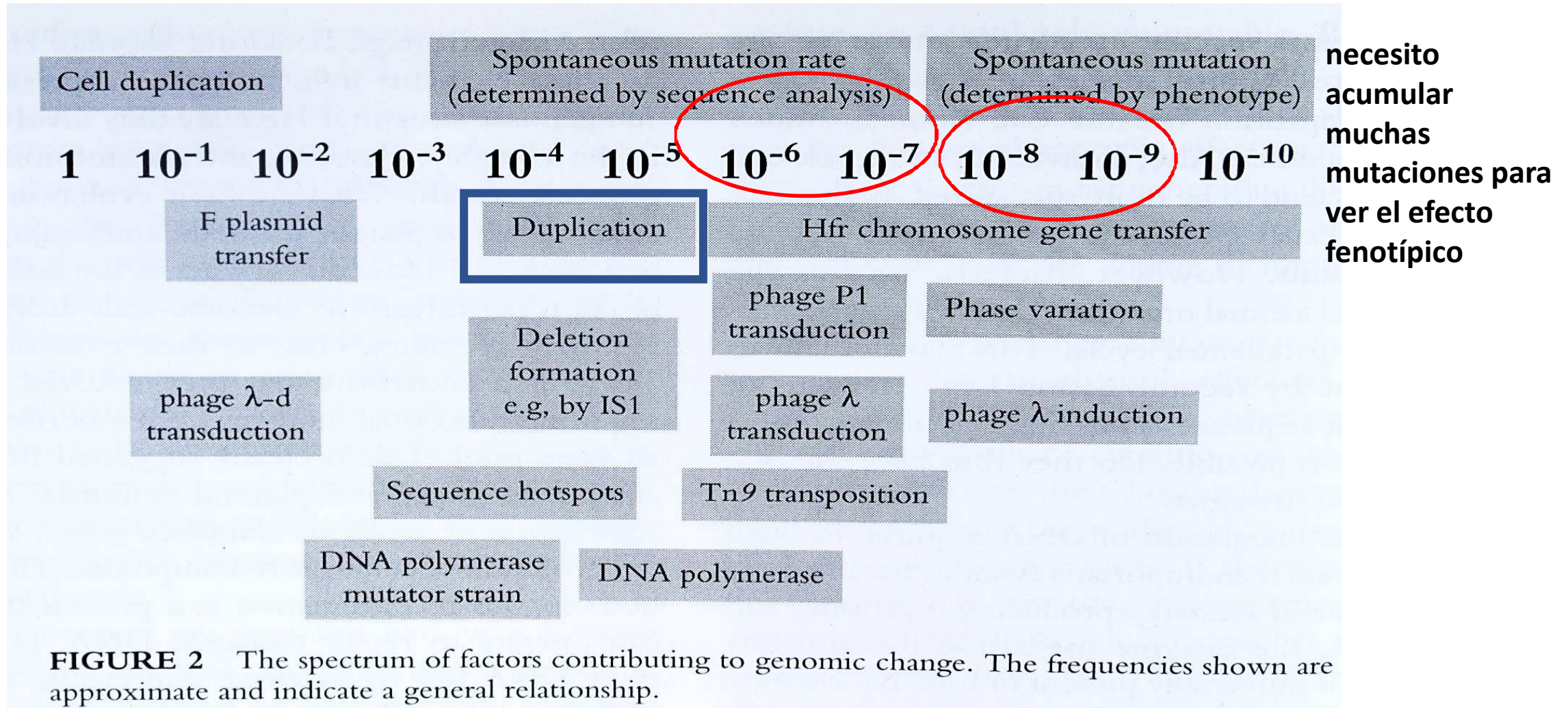
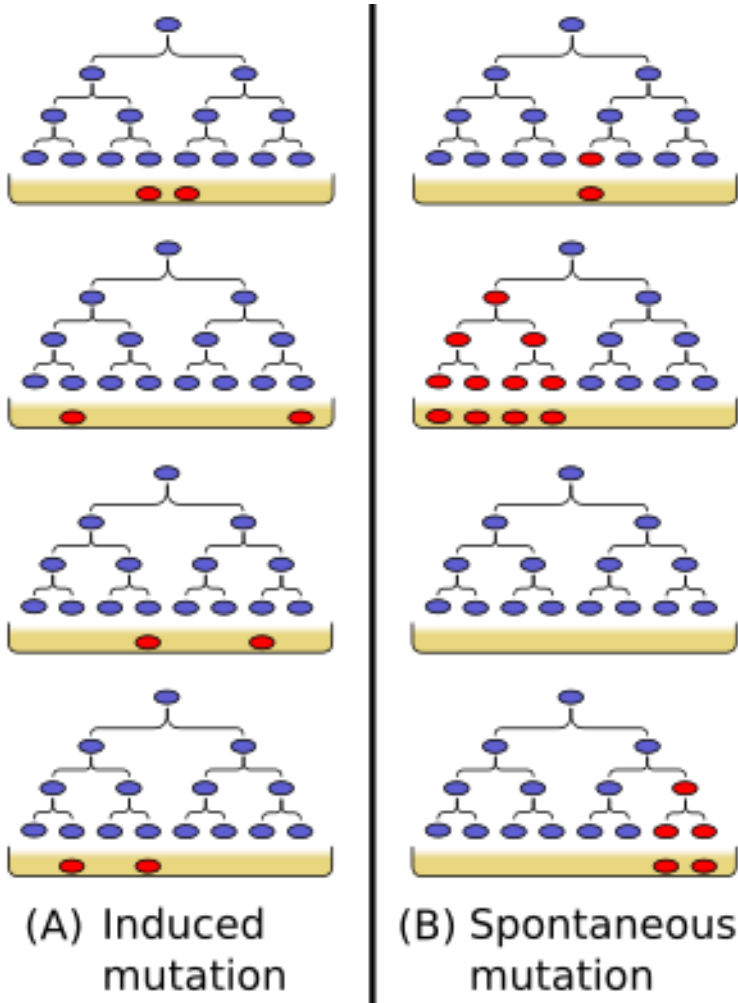


FIGURE 2 The spectrum of factors contributing to genomic change. The frequencies shown are approximate and indicate a general relationship.

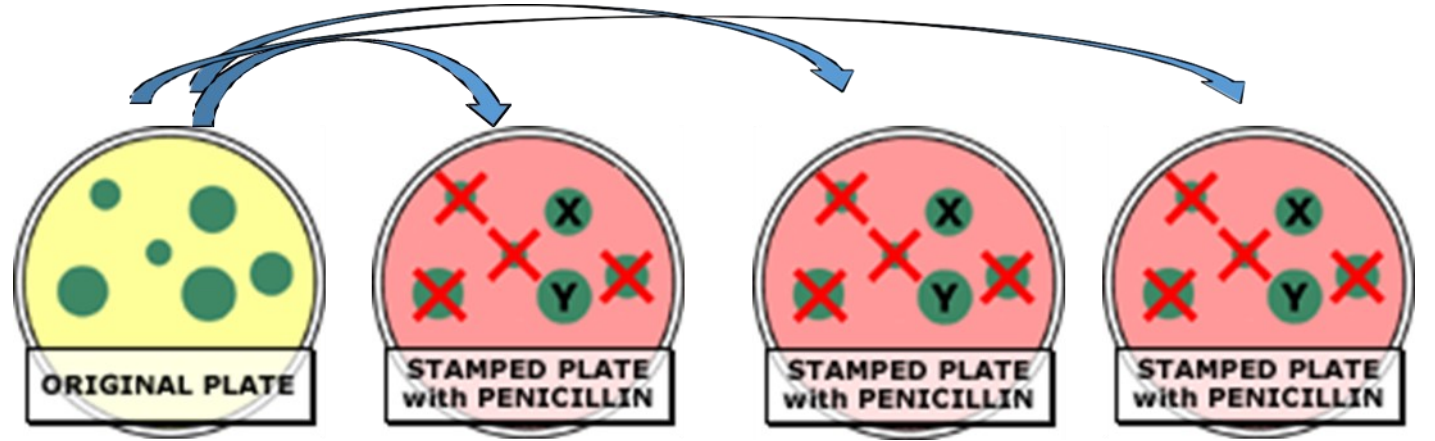
Hay mutaciones neutras, deletéreas o adaptativas mediadas por diferentes causas. Ocurren en ausencia de selección

Mutaciones inducidas versus espontáneas

Experimento de Luria-Delbrück. Distribución y frecuencia de mutación



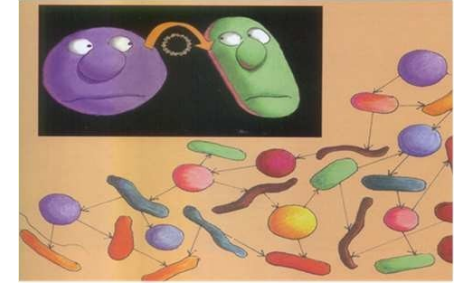
Experimento de E. y J. Lederberg



La mutación estaba antes

Conclusión: Las mutaciones se producen en ausencia de selección y es el hábitat que selecciona aquellas fortuitas que incrementan el fitness del organismo que las posee en ese medio.... se "adapta".

**Pero, y a pesar de todo, existen poblaciones
microbianas *diferenciables*?
Puedo diferenciar líneas evolutivas?**



Pleomorfismos o líneas microbianas ?

¿Existen fuerzas evolutivas que preserven la existencia de líneas microbianas ?o la variación resultaría en un continuo genético, o sea de organismos *multiespecie* portando parte de un *metagenoma (pleomorfismo)*.

Esto es, podemos definir ***taxones*** microbianos, y hacerlos cada vez mas inclusivos? Y como? Como los clasificamos y para que?

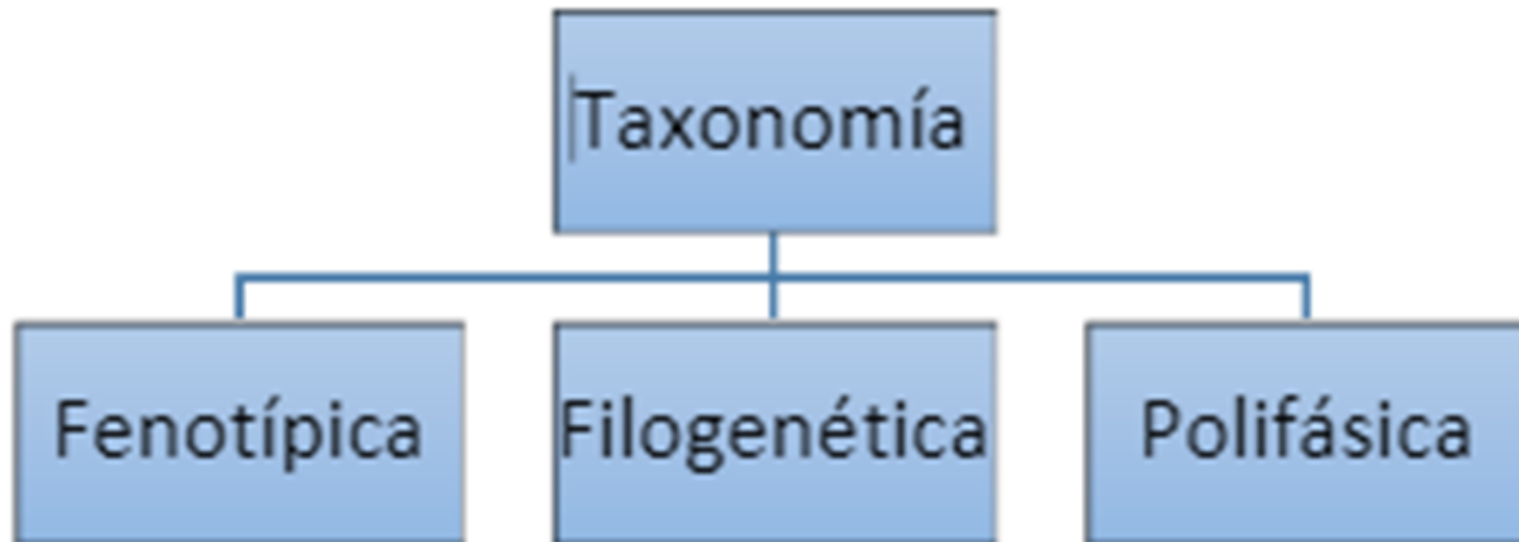
Ya en su época R. Koch ya definía de alguna manera la especie don los medios de cultivo y mostrando el monomorfismo: ***“Aquellos grupos de bacterias que mantienen las características que los diferencian de otros grupos al ser cultivados en el mismo medio y bajo las mismas condiciones deben ser designados como especies, variedades, formas, u otra designación apropiada”.***



Porque importa clasificar los microorganismos

- Salud, Industrial, Biotecnología
 - ✓ Identificación de patógenos,
- ✓ Reconocimiento de nuevos patógenos,
 - ✓ Patentamiento de nuevos microbios,
 - ✓ Definición de cepas “tipo”,
- ✓ Elección de cepas para ensayos de bioactividad,
- ✓ Formulación de medios selectivos de aislamiento,
 - ✓ Determinación de diversidad microbiana,
 - ✓ Validación de procesos,
 - ✓ Control de calidad,
 - ✓ Evaluación de riesgos,
 - ✓ Regulación de cuarentenas,
 - ✓ *et cetera*

Evolución de la Taxonomía Microbiana



Evolución de la Taxonomía Microbiana

Inicialmente: ***Taxonomía Numérica***, basada en caracteres fenotípicos como ensayos bioquímicos (pruebas metabólicas), marcadores químicos (ácidos grasos de membrana), etc. La agrupación de los mismos en base a un coeficiente de ***similitud***, genera un ***fenograma***.

A partir de 1960: ***Taxonomía Molecular***, basada en la secuenciación de genes individuales definidos como ***cronómetros moleculares*** (16S rRNA). Esta información permite la construcción de ***Cladogramas***, y a su vez de ***Árboles Filogenéticos*** que representan una historia evolutiva común (hipotética).

La suma de lo anterior da origen a la ***Taxonomía Polifásica***, clasificación mediante el uso de datos genotípicos y fenotípicos: Composición G+C, hibridación ADN, secuenciación de 16S rRNA, marcadores químicos, electroforesis de proteínas, serología, etc.

Taxonomía numérica o fenética

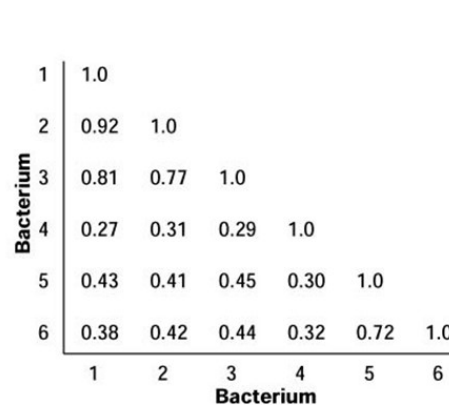
Definición de especie bacteriana en base a características fenotípicas en función de tantas características como fuera posible y de su utilidad para la industria y la medicina.

Ensayos metabólicos y fenotipicos con uso de estándares (cepas tipo)

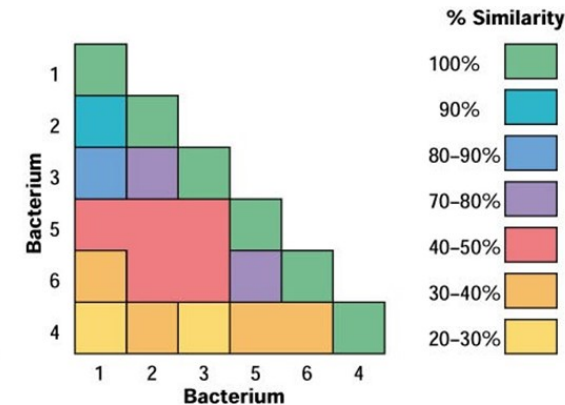


Mas de 85% de similitud con la cepa tipo se considera que es la misma especie. Aún se usa (85 % definido en forma arbitraria)

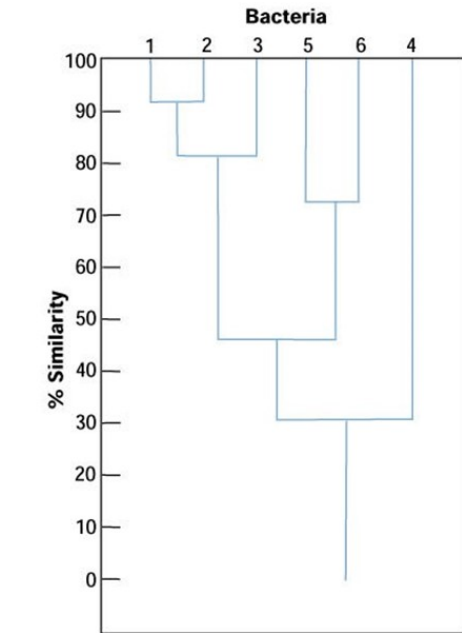
Estimaciones de similitud fenotípica.



(a) Matriz de similitud

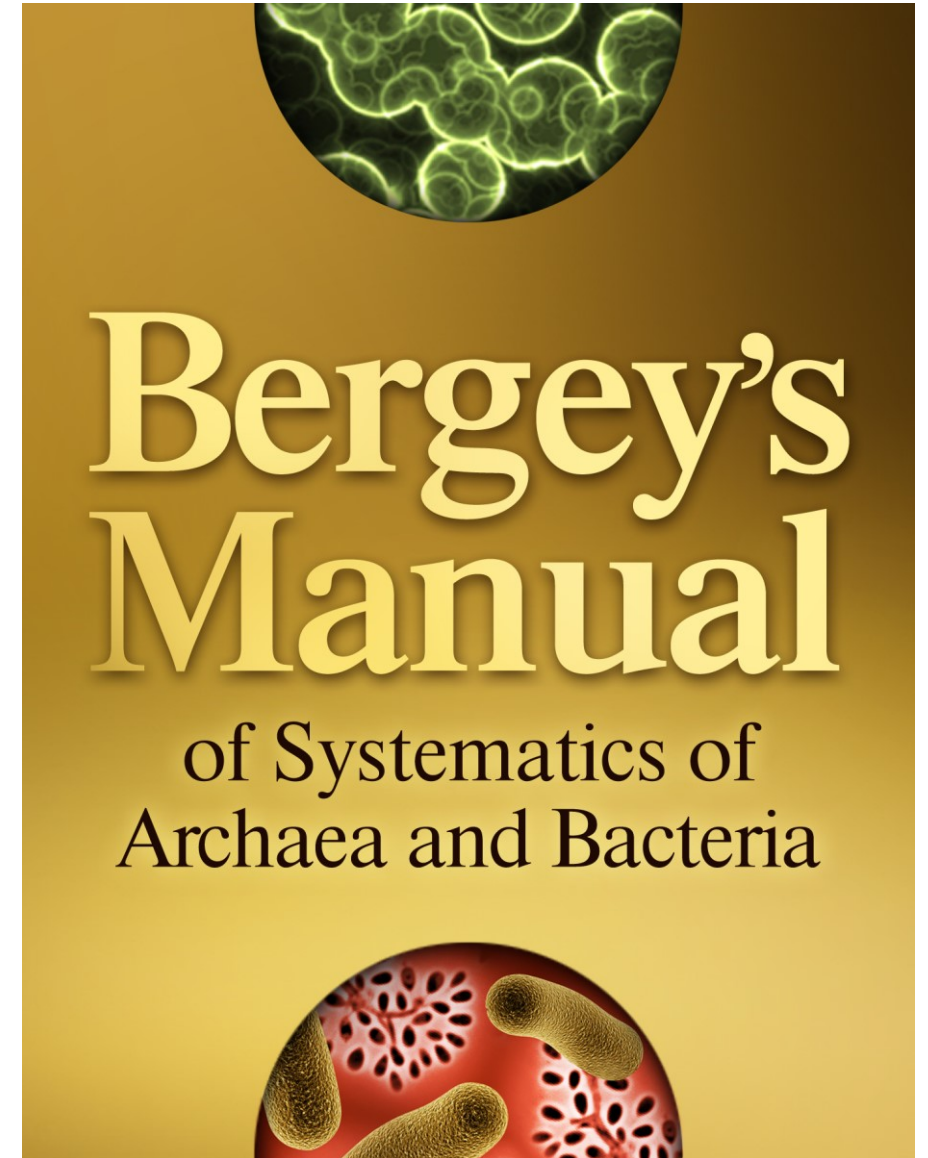


(b) se ordenan y agrupan para formar grupos (clusters)



(c) fenograma

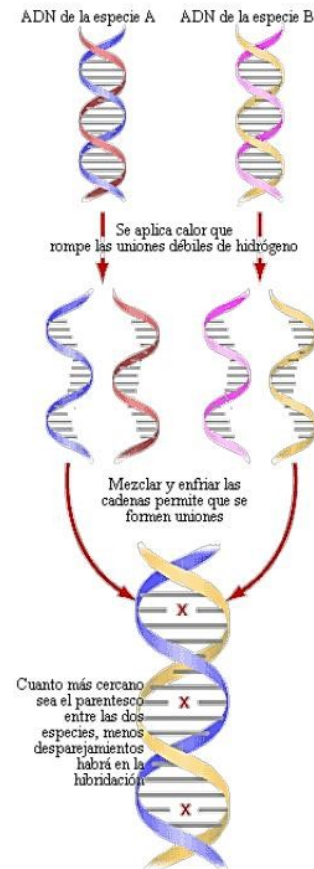
Para el reconocimiento formal de una nueva especie procariota se debe depositar una muestra del organismo en colecciones de cultivo y publicar el nombre y la descripción de la nueva Especie según el sistema binomial. El Bergey's Manual of Systematic ... las principales recopilaciones taxonómicas de bacterias y arqueas. Se utiliza para asistir a las clasificaciones fenotípicas
Existen centros que ofrecen las cepas certificadas o tipo



Taxonomía molecular

Hibridación del ADN (semejanza genómica) y comparación de rRNA y otras macromoléculas

HIBRIDACIÓN ADN



Indice DDH (DDH, de la técnica de hibridación ADN-ADN) se usa para medir la distancia genética entre microorganismos y clasificarlos. Se considera un criterio taxonómico importante para definir especies y géneros.

La semejanza genómica entre los dos organismos se calcula como porcentaje de sonda que se hibrida al problema respecto a un control (que es la sonda de DNA hibridada al DNA del mismo organismo). Un valor de hibridación genómica del 70 % o menos) de dos organismos se considera una prueba de que son especies distintas.

Taxonomía molecular: combina la biología molecular con la bioinformática



Definición de especie bacteriana en base a cronómetros moleculares

Cronómetro molecular: Macromoléculas relacionadas (genes o proteínas) que llevan a cabo la misma función en diferentes organismos (ortólogos), y en las cuales la mayoría de las mutaciones son selectivamente neutras.

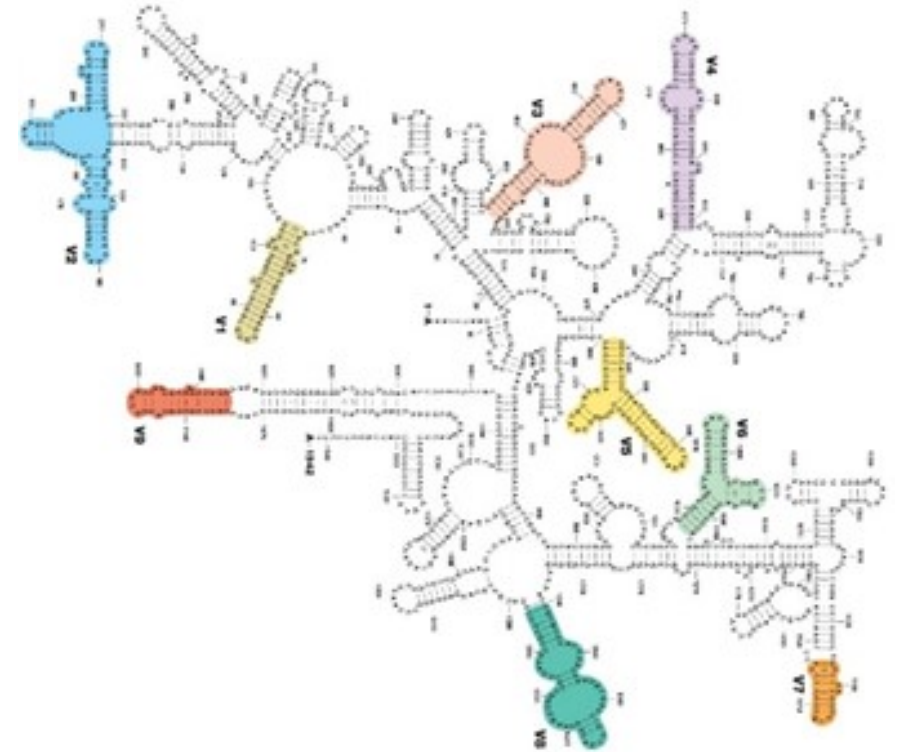
ahora el #parecido# son macromoléculas

- (1) están distribuidos de manera universal,
- (2) son funcionalmente constantes,
- (3) están muy conservados (es decir, cambian muy lentamente),
- (4) tienen la longitud adecuada para ofrecer una visión profunda de las relaciones evolutivas.

Características de los Cronómetros o relojes moleculares

El cronómetro
“universal”:
16S rRNA

- Macromoléculas relacionadas (genes o proteínas) con la misma función en diferentes organismos. **Ortólogos. Conservadas.**
- La longitud de la secuencia debe ser suficiente para que las estimaciones de semejanza tengan validez estadística.
- No debe estar sujeto a **transmisión horizontal.**
- Deben poseer una constancia funcional, de modo que la presión selectiva que actúe sobre la molécula sea mínima (**acumule mutaciones neutras**)
- La tasa de mutación, debe ser lo suficientemente baja como para permitir medir la distancia evolutiva con el ancestro común.
- La cantidad de cambios aumenta proporcionalmente con el tiempo



La secuencia 16S del rRNA muestra una velocidad evolutiva de 1% de divergencia de secuencias por cada 50 millones de años

- **Sus secuencias deben permitir la identificación de regiones de homología y heterogeneidad - Poder alinearse para determinar homologías y variaciones.**

La similitud entre dos macromoléculas está definida por:

- La retención de caracteres ancestrales (útil para alineamientos), zonas de homología
- La emergencia de caracteres nuevos en distintas líneas evolutivas (útil para construir relaciones filogenéticas), zonas de heterogeneidad

- **Podemos ver el #parecido# evolutivo en función de la secuencia de nucleótidos**

La tasa de cambio o número de diferencias es lo que nos permite identificar la distancia evolutiva. **El índice de divergencia entre estas secuencias es proporcional al tiempo de separación de un ancestro común**

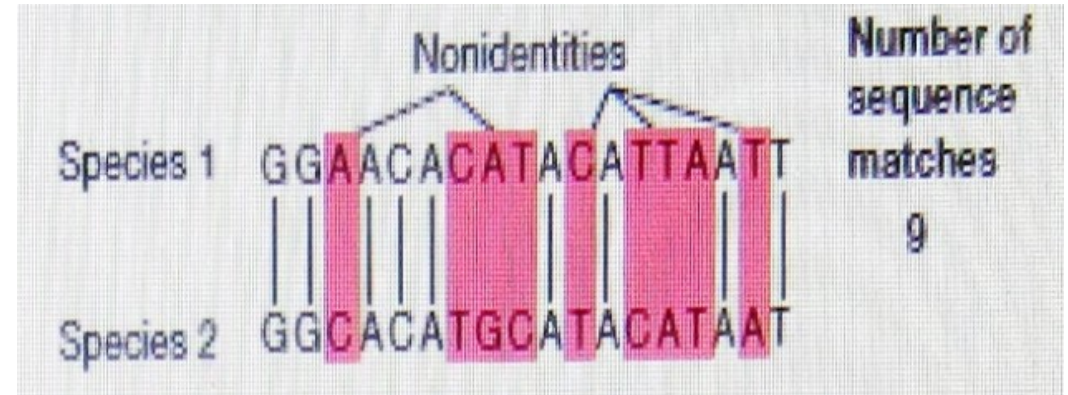
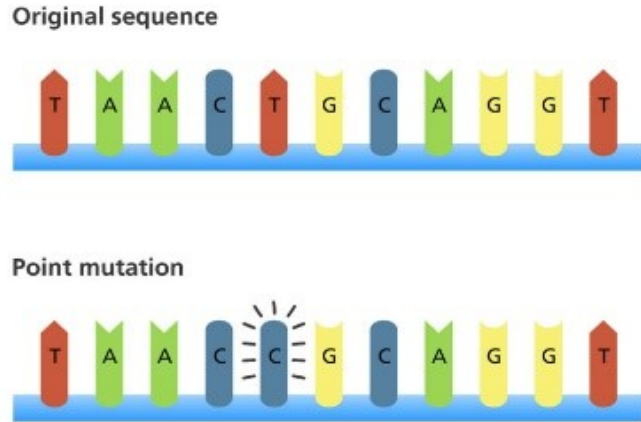
- **Qué cronómetros podemos utilizar para estudiar estos parentescos evolutivos?.**

- El más habitual es el gen que codifica para el 16S ARNr –
- Cada vez es más habitual que se utilicen los genes housekeeping.
- Proteínas del shock térmico - ATPasa - Citocromos - recA; sodA; rpoB; cpn60

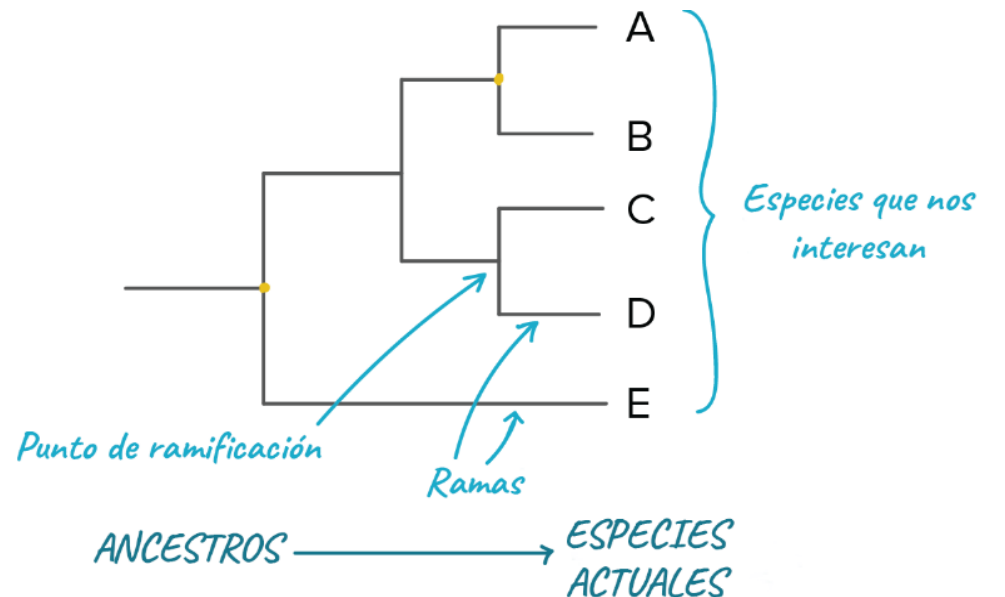
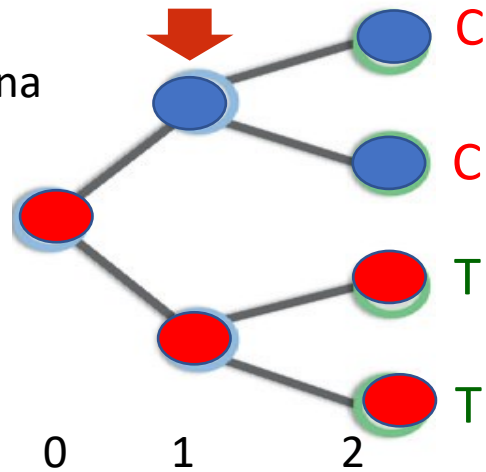
Taxonomía molecular

Técnicas: secuenciación del ADN

Mutaciones en el ADN, transmisión a la progenie

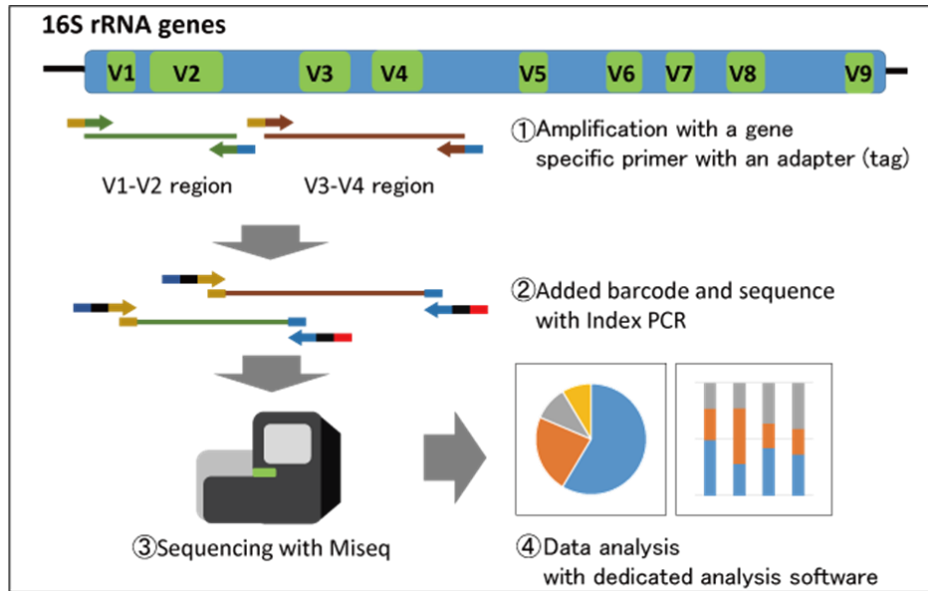


Progenie bacteriana

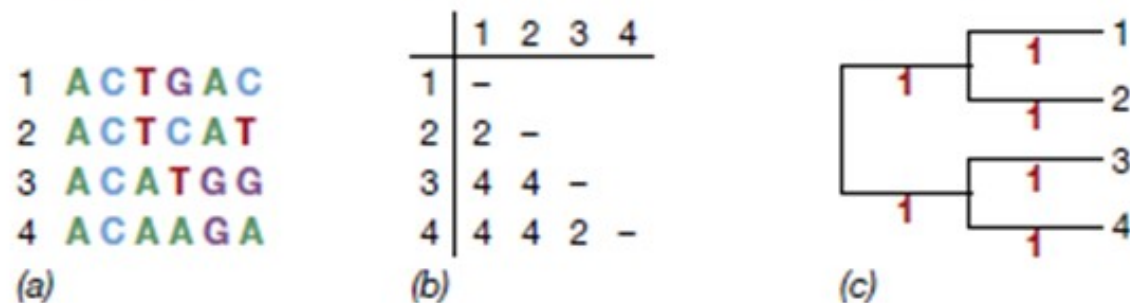
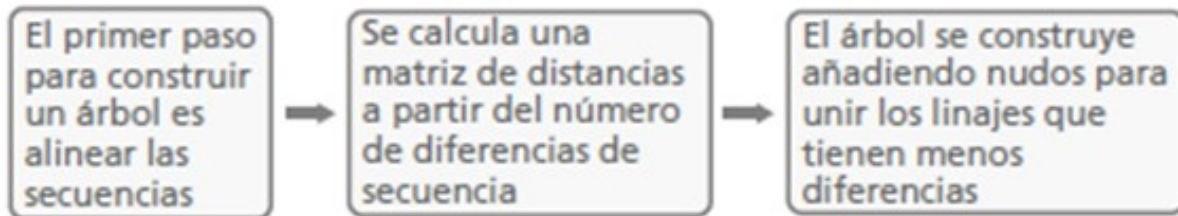


Más cambios mayor tiempo evolutivo

Metodología empelada



- Obtención de secuencias para comparar
 - experimentales
 - de bases de datos
- Alineamiento para “comparar” las secuencias
 - Para esto hay muchos programas en internet Ej. ClustalW
- Aplicación de un modelo evolutivo para reconstruir el pasado de estas secuencias
- Representar los resultados en forma de árbol

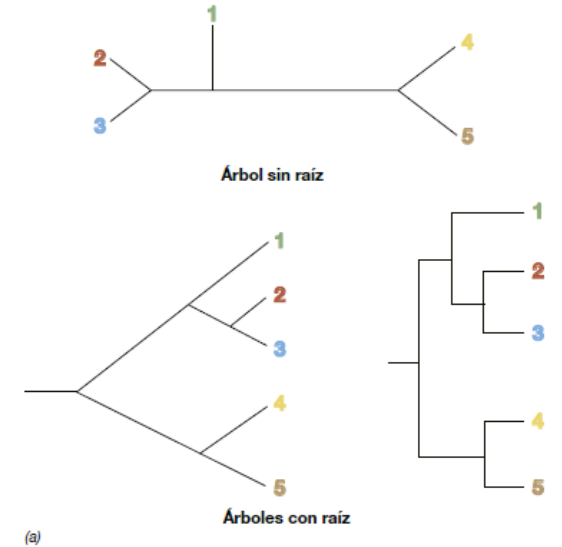
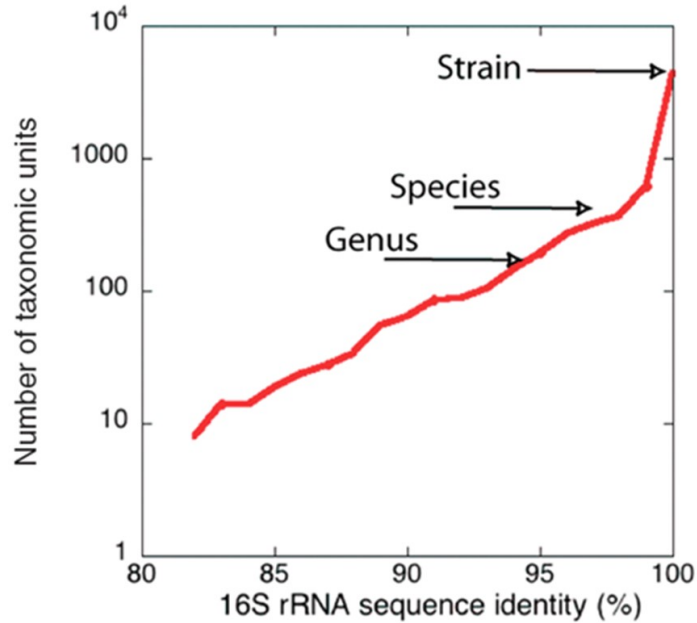


El índice de divergencia entre estas secuencias es proporcional al tiempo de separación de un ancestro común. O sea, permite estimar la distancia evolutiva relativa entre organismos. Cuanto mayor divergencia hay mayor distancia evolutiva

Filogenia* microbiana

* Relaciones evolutivas entre organismos basadas en un ancestro común

- los árboles filogenéticos representan las relaciones evolutivas
 - árbol enraizado – tiene un nodo que representa el ancestro común
 - en el árbol sin raíz se desconoce el ancestro común

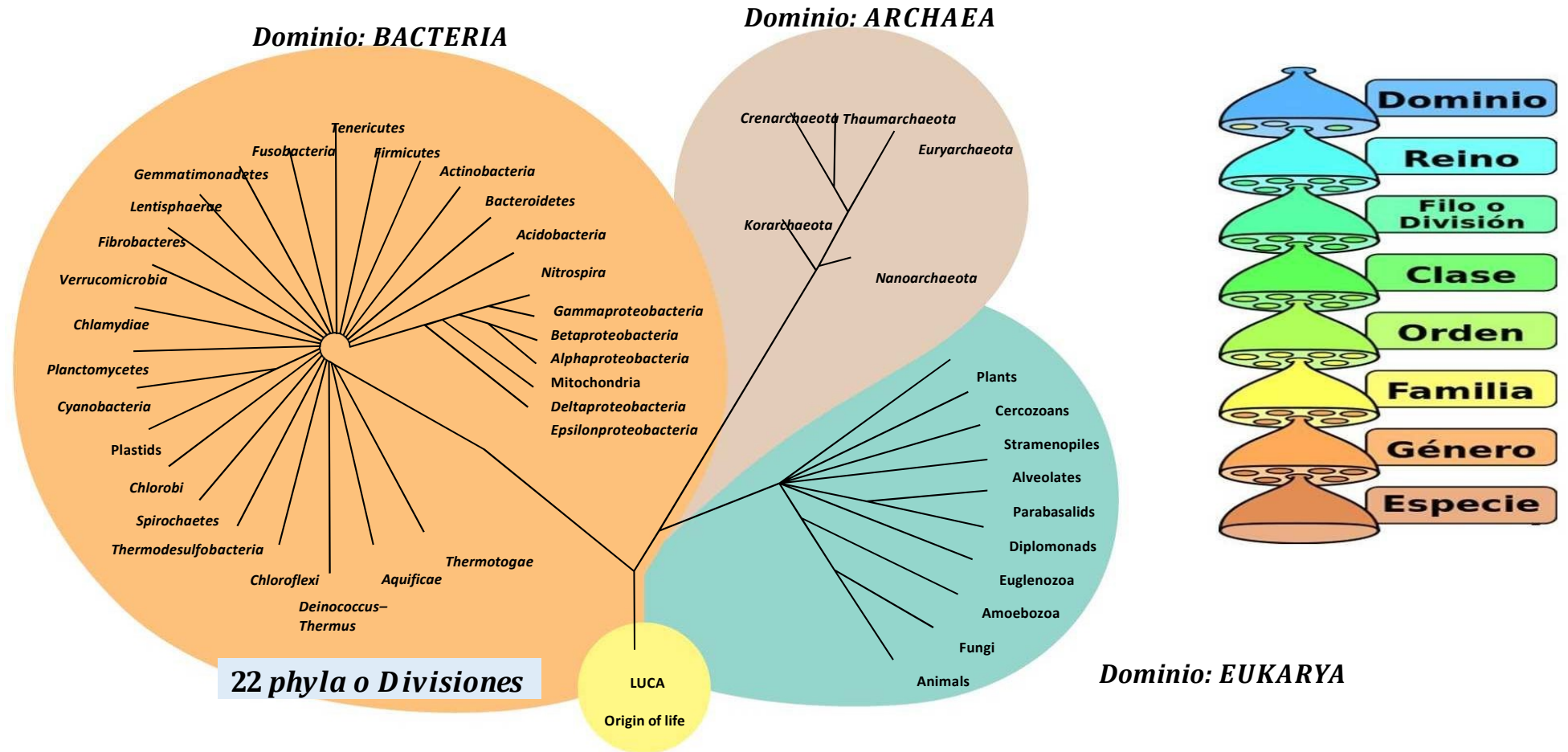


La filogenia molecular cambió el concepto de especie

La filogenia molecular microbiana modifica el concepto de especie y lo refiere al % de identidad entre secuencias de rRNA

El Árbol de la Vida

basado en la comparación de ARN ribosomal 16S/18S



Tres dominios de vida celular que son evolutivamente distintos y, aun así, comparten ciertos rasgos indicativos de su origen común a partir de un antepasado celular universal LUCA

Causas de problemas: Homoplasia, convergencias, paralelismos, reversiones, duplicaciones, THG/recombinación

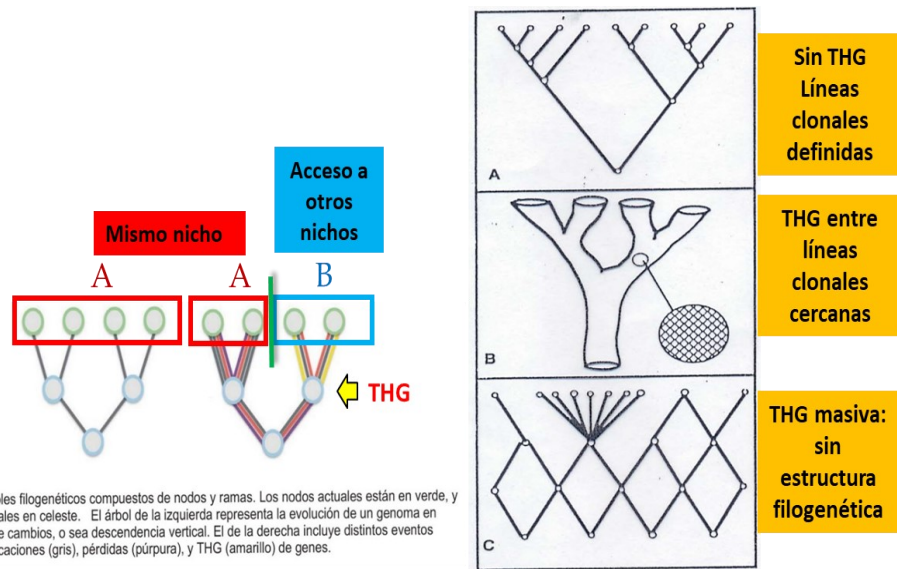
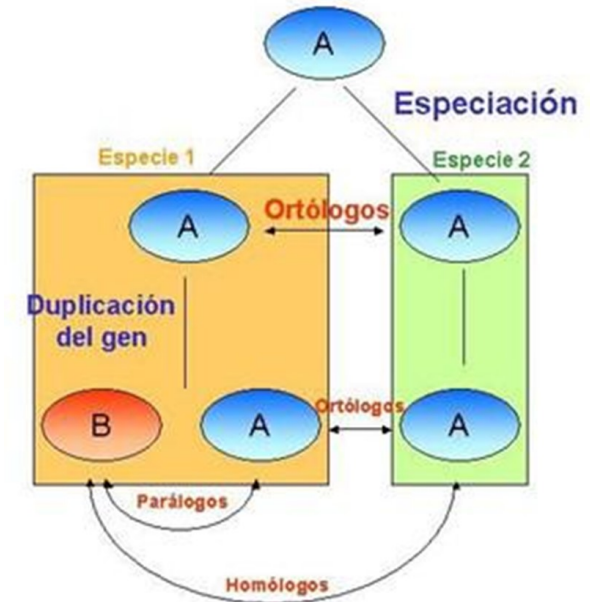


Fig. 1. Árboles filogenéticos compuestos de nodos y ramas. Los nodos actuales están en verde, y los ancestrales en celeste. El árbol de la izquierda representa la evolución de un genoma en ausencia de cambios, o sea descendencia vertical. El de la derecha incluye distintos eventos como duplicaciones (gris), pérdidas (púrpura), y THG (amarillo) de genes.

Homólogos/Ortólogos/Parálogos



La posibilidad de adquirir genes por THG e integrarlos por recombinación hace más difícil el análisis y puede requerir considerar el uso de más de un cronómetro molecular u otras herramientas para asignar especie

Taxonomía Polifásica

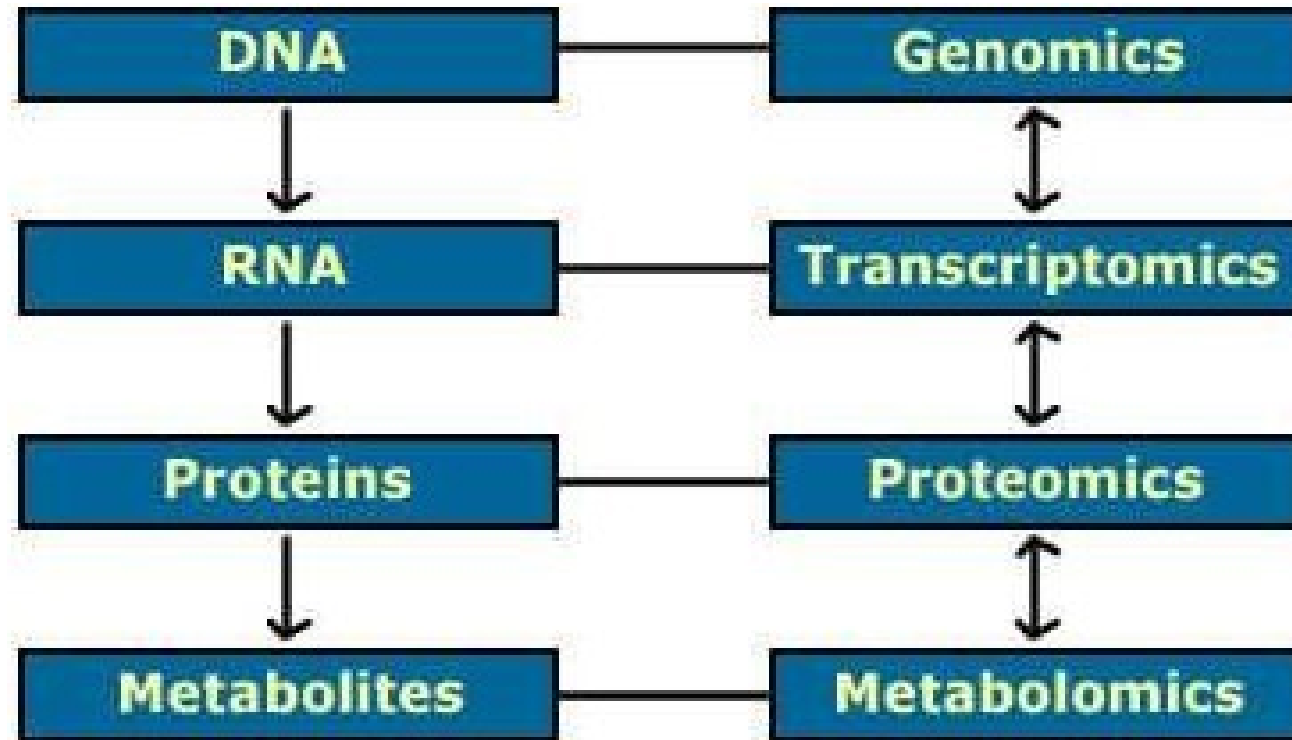
Definición de especie bacteriana en base a múltiples características

Clasificación mediante el uso de datos genotípicos y fenotípicos: Secuenciación y comparación de genomas, mayor cantidad de marcadores fenotípicos y químicos (metabolitos, proteínas), serología, etc. Solución de compromiso para los MO

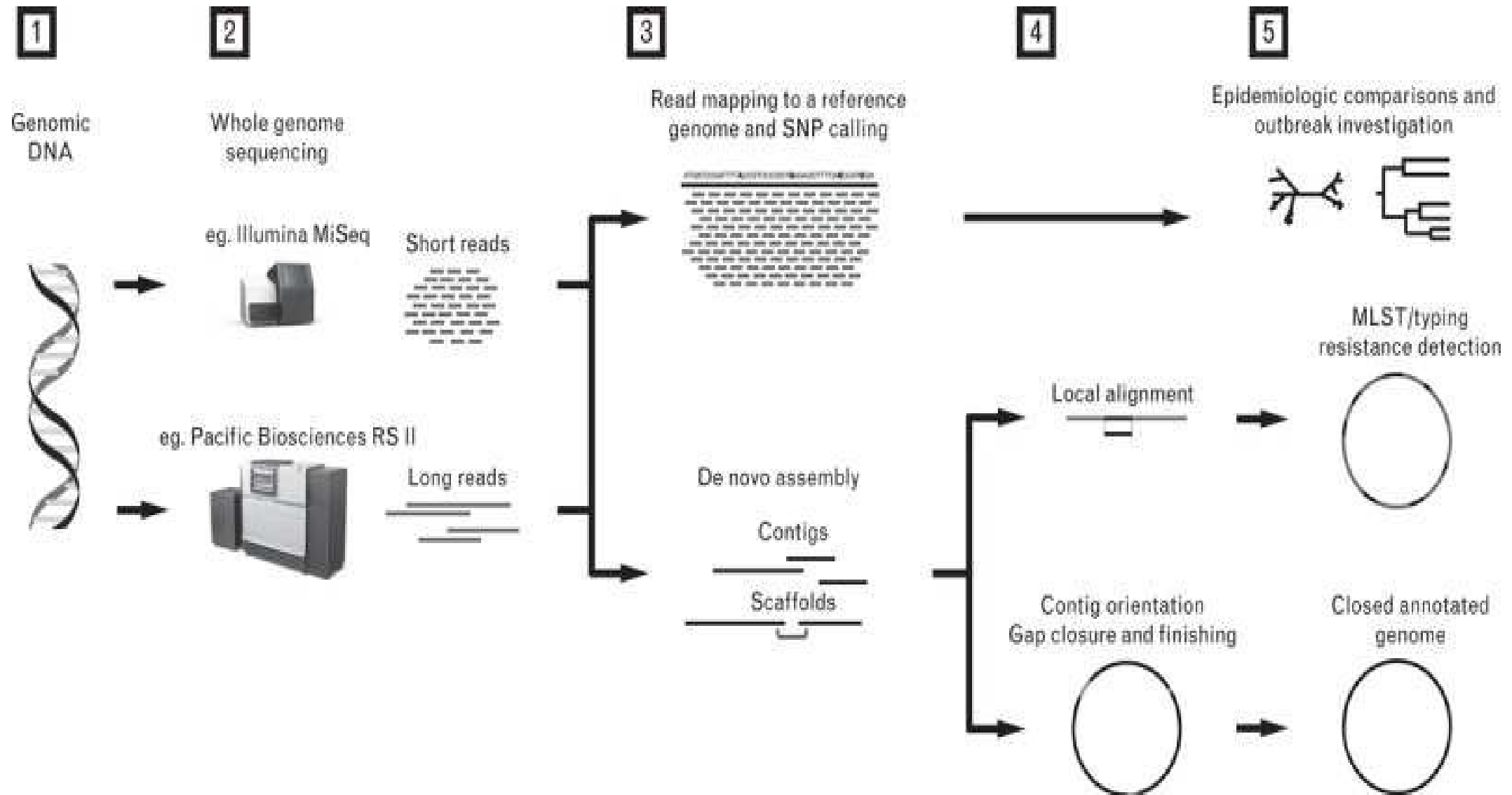
¿Cómo definimos hoy una “especie” bacteriana en base a la taxonomía polifásica de uso actual?

Conjunto de aislamientos (cepas) derivado de un ancestro común en el cual la diversidad genética debida a recombinación permite aún un grado de hibridación de ADN/ADN (DDH) no menor al 70% en condiciones estandarizadas, una identidad de secuencia del 16S rRNA mayor al 98,7%, y consistencia fenotípica.

Impacto de las Ciencias “Ómicas”: Genómica, Transcriptómica, Proteómica, Metabolómica, Metagenómica, Culturómica



Genómica: Secuenciación de genomas completos (SGC) *de bacterias aisladas y cultivadas al estado puro*

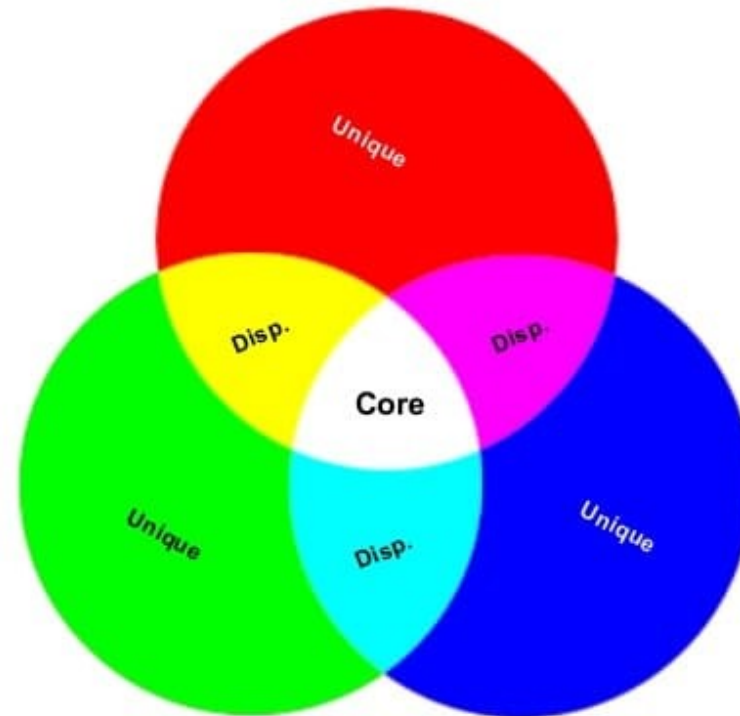


Clasificación usando “ómicas”

La secuenciación masiva de genomas, permitió establecer en que medida la THG contribuyó a la evolución de diferentes grupos bacterianos dentro de la misma especie. En estos casos la secuenciación del ARNr 16S solamente no es suficiente.

GENOMA CORE O ESENCIAL Y PANGENOMA

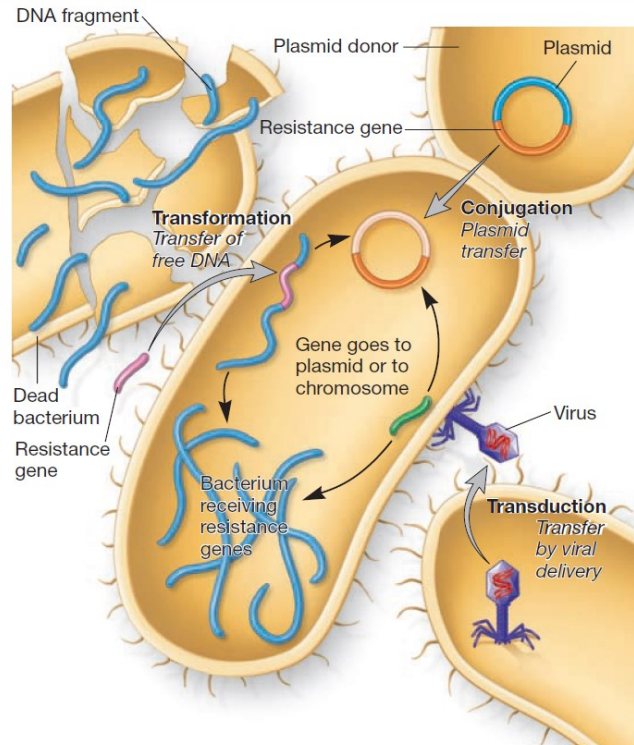
Three genomes



Core
In all 3 strains
($\in N$ strains)

Dispensable
In 2 strains
($\in [2, N-1]$ strains)

Unique
In only 1 strain
($\in 1$ strain)



THG

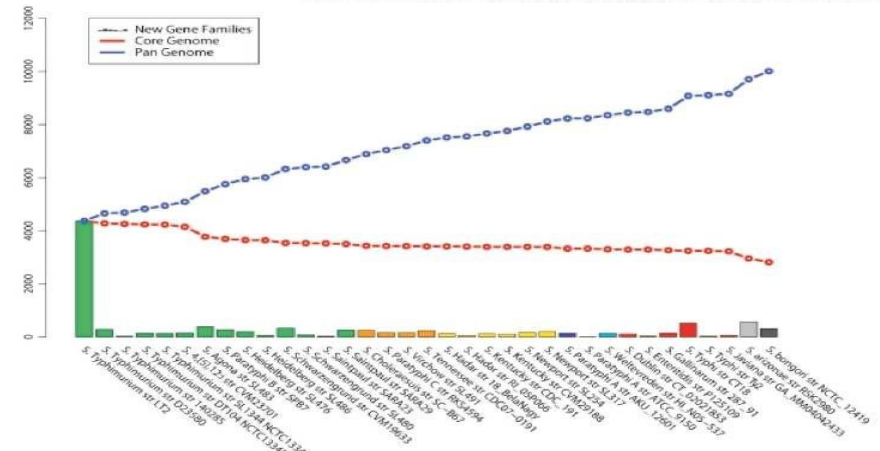
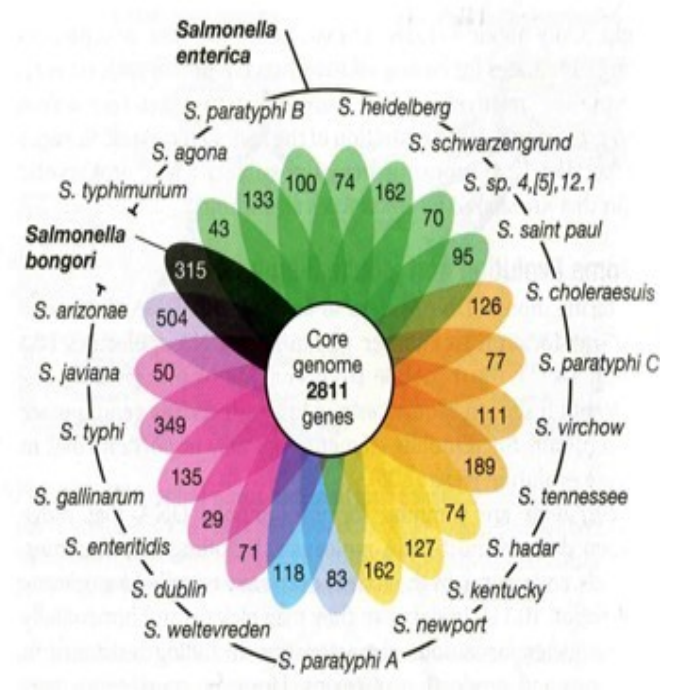
Genomas “core”, “periférico” y “pangenoma” de taxa bacterianas

El genoma “**core**” es el conjunto de genes compartidos por todos los miembros de la especie que han sido secuenciados

El genoma “**periférico**” (“**accesorio**” o “**flexible**”) es el conjunto de genes variables presentes solo en algunos subconjuntos de aislamientos. Es **producto mayormente de los eventos de THG** y permite la adaptación a nichos ecológicos distintos entre los aislamientos. Ej. distintas enfermedades en distintos hospedadores.

La suma de todos los periféricos mas el core es el **Pangenoma** de esa especie.

El core define la especie, es esencial



Genoma pan y core en rojo y en azul se muestra como van variando medida que mas genomas de la especie se van secuenciando

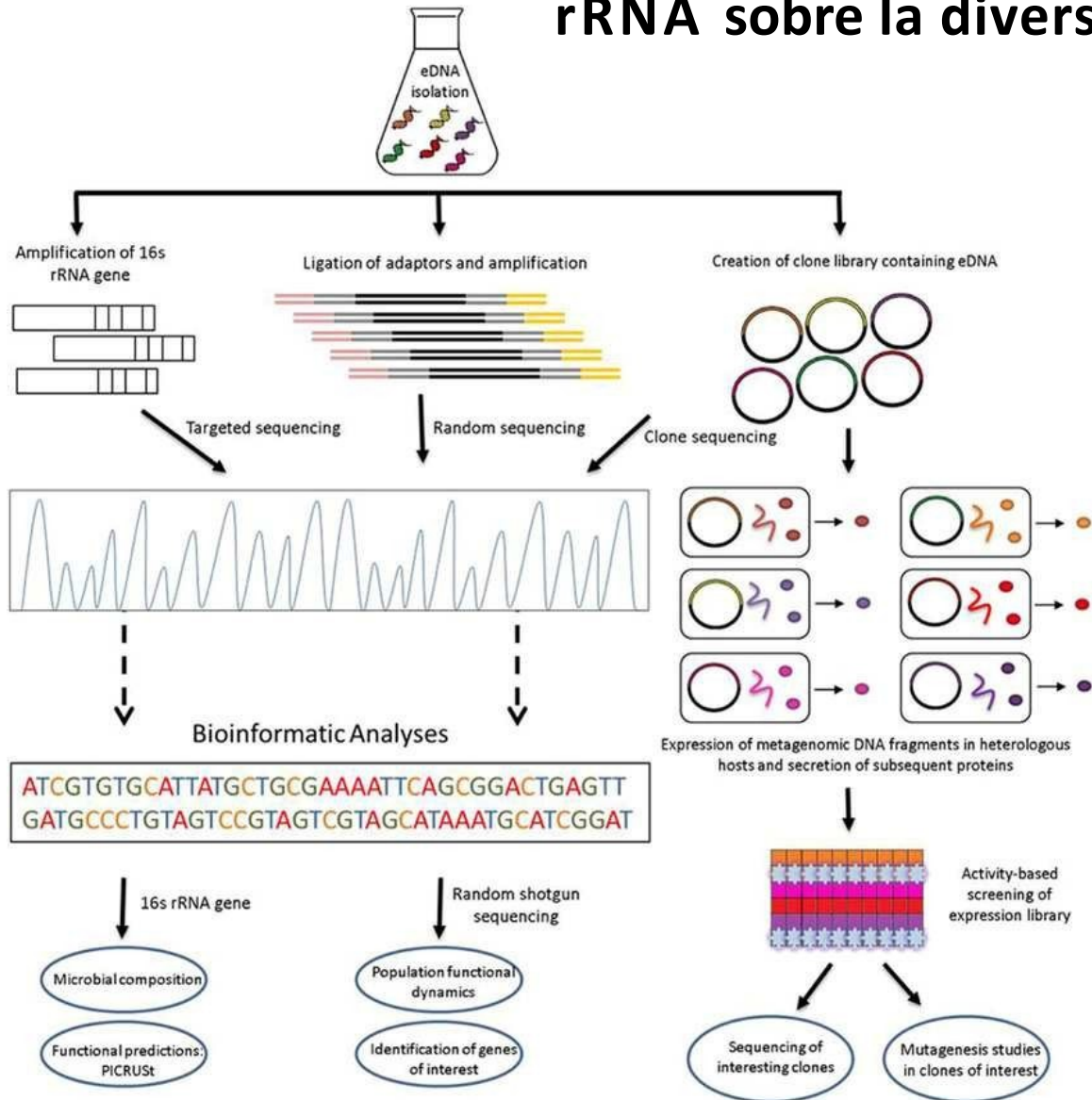
- ✓ La SGC permitió definir un genoma “**core**” de genes compartidos por todos los miembros del taxón en estudio, y un genoma “**periférico**” (también llamado “**accesorio**” o “**flexible**”) de genes presentes solo en algunos subconjuntos de aislamientos del mismo. La suma es el **pangenoma** del taxón. El genoma periférico está sujeto a THG y permite la adaptación a nichos ecológicos distintos.
- ✓ Además permite el cálculo del **ANI** (Average Nucleotide Identity) entre aislamientos. El mismo puede calcularse como el porcentaje de identidad de genes ortólogos, o fragmentando los genomas en segmentos de 1.020 pares de bases y comparando el porcentaje de identidad de segmentos similares entre genomas.

Similitud genómica

- ✓ *Así, el DDH es sustituido por el ANI, donde 70% DDH es equivalente a 94-95% ANI y permite colocar un límite a la “especie” bacteriana.*
Identidad de genes core

Un ANI equivalente a 94-95% permite definir hoy la “especie” bacteriana.

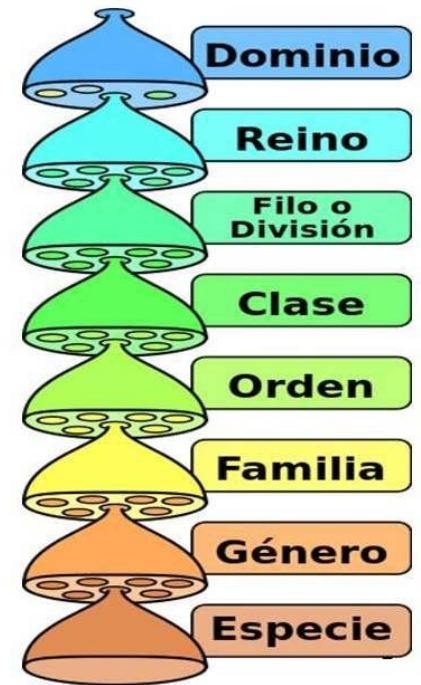
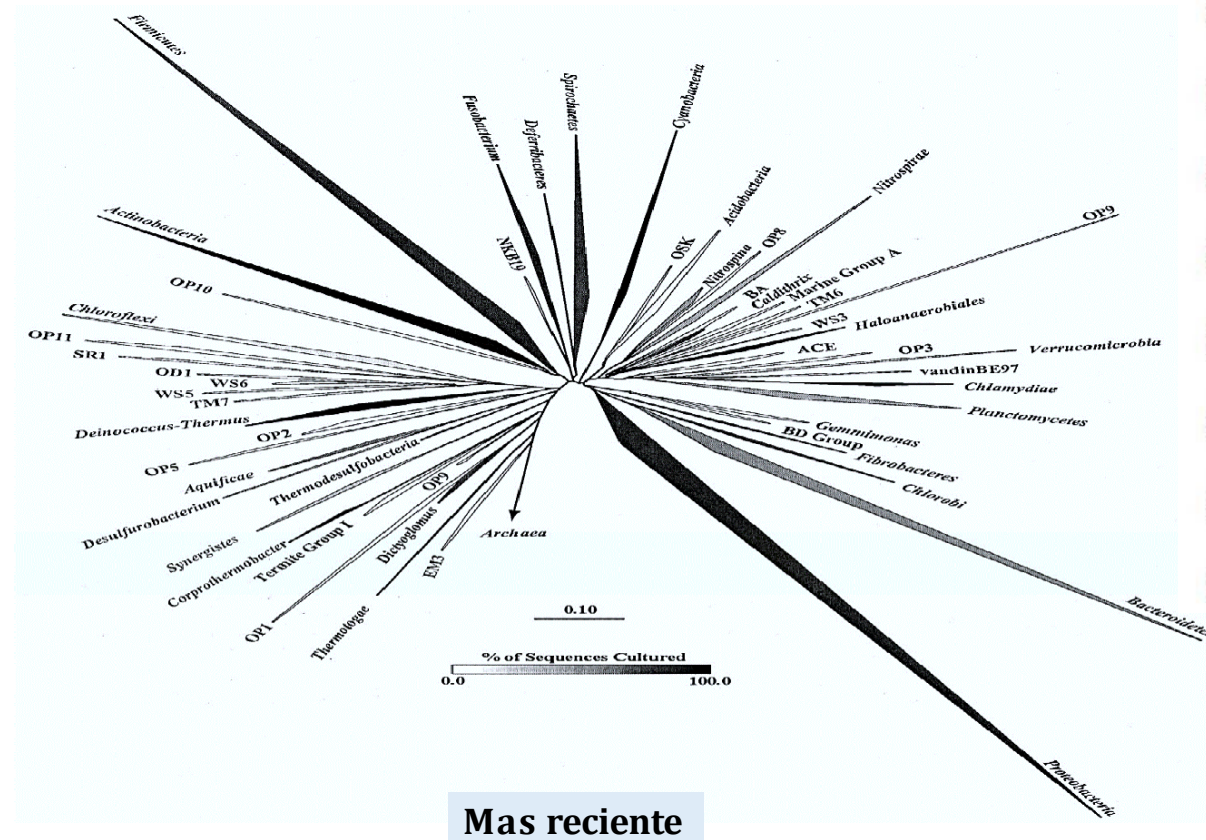
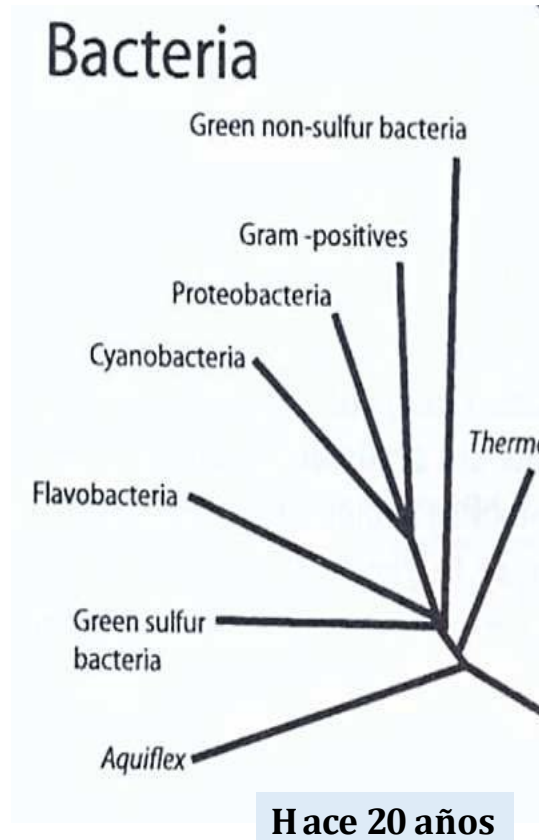
Microbiología sin cultivos: Enseñanzas de la secuenciación de 16S rRNA sobre la diversidad microbiana en ecosistemas



Mientras que los métodos basados en cultivos permitieron el descubrimiento de unas 30 *Phyla* (Divisiones) bacterianas, los métodos de búsqueda de diversidad basados en el número de secuencias distintas de 16S rRNA en distintos ecosistemas expandieron hoy ese número a más de 100 (y continúa)...

ARNr 16S y METAGENÓMICA – SECUENCIACIÓN MASIVA O DE MICROORGANISMOS AISLADOS PARA IDENTIFICARLOS INCLUSO SIN CULTIVO

Árboles filogenéticos de Bacteria basados en 16S rRNA. Aportes de la metagenómica indicando nuevas *Phyla* (División) respecto a las originales



Teóricos de estructura y función



Unidad 3: Estructura celular bacteriana.

Microscopía óptica y electrónica. Estructura de células procariotas. Citoplasma. Nucleoide. Membrana celular. Apéndices de superficie: *pili* y *flagelos*. Polisacáridos de superficie. Cápsula. Pared bacteriana. Estructura del peptidoglicano o mureína. Diferencias basadas en la estructura de la pared: bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Membrana externa de bacterias Gram-negativas. Biosíntesis de la mureína y antibióticos que la afectan. El ciclo celular bacteriano. División celular. Replicación del ADN. Consideraciones morfológicas y bioquímicas. Esporas bacterianas. Composición y función. Mecanismo de la esporulación: *Bacillus subtilis* como paradigma de diferenciación celular. Otros ejemplos de diferenciación celular en bacterias: actinomicetos, rizobios y cianobacterias.

Docente: Prof. Silvia Altabe

Elementos estructurales de las bacterias

