



Lezione 6: La filogenesi dei batteri

DOTT. ROSA ANNA NASTRO – STANZA 425° - 4°PIANO, LATO NORD

EMAIL: ROSA.NASTRO@UNIPARTHENOPE.IT

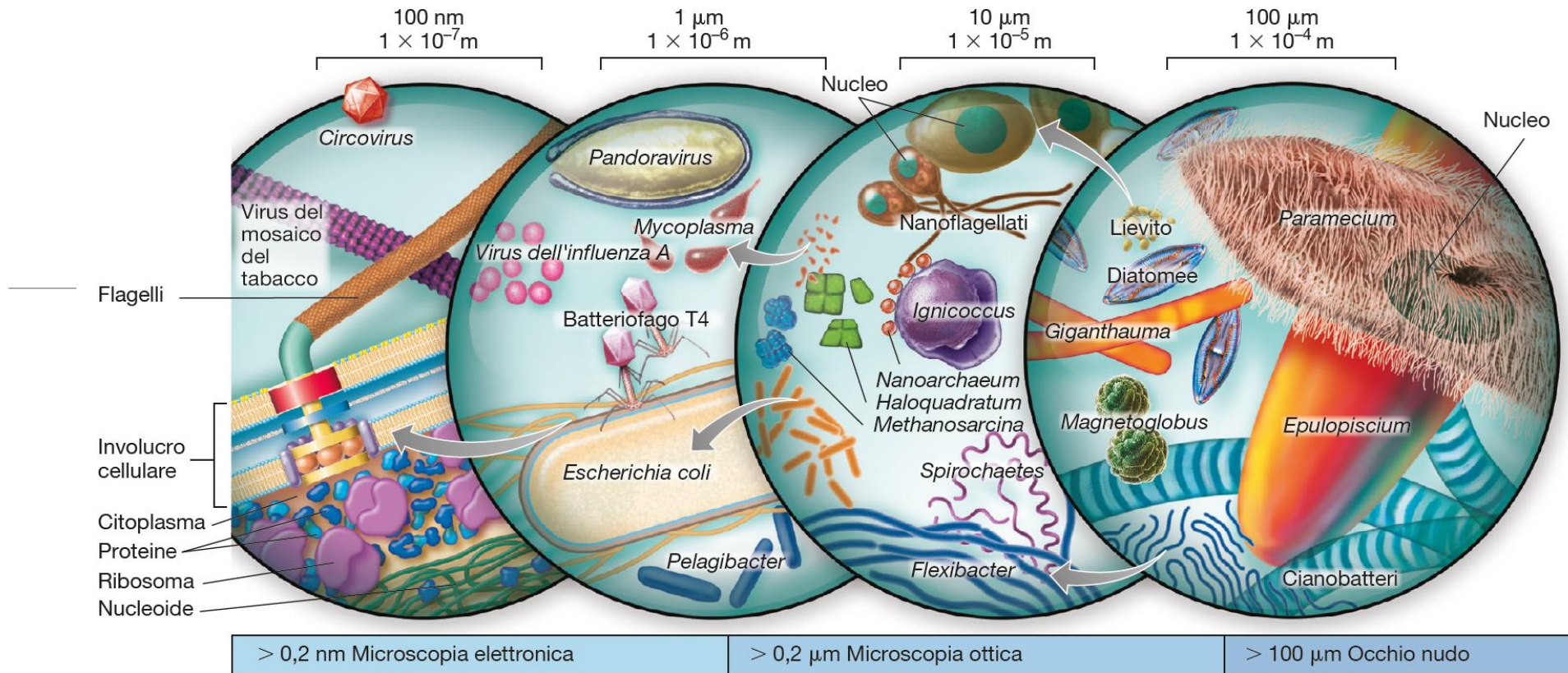


Figura 1.9 La grande varietà delle dimensioni e delle forme microbiche.

La più piccola forma microbica nota è il circovirus (20 nm), mentre il più grande microrganismo qui raffigurato è il batterio *Epulopiscium* (700 μm): la lunghezza del secondo equivale a 35000 volte la lunghezza del primo! Alcuni protozoi possono essere ancora più grandi di *Epulopiscium* (lunghezza > 2 mm) e sono visibili a occhio nudo.

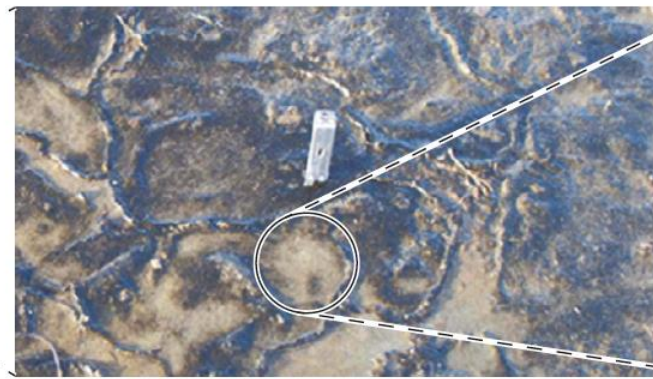
Nella figura sono rappresentate specie di *Eukarya*: *Paramecium* (300 μm × 85 μm), diatomee (*Navicula*, 50 μm × 12 μm), lieviti (*Saccharomyces*, 5 μm) e nanoflagellati (*Cafeteria*, 2 μm); specie di *Bacteria*: *Epulopiscium* (700 μm × 80 μm), cianobatteri

(*Oscillatoria*, filamenti multicellulari con diametro di 10 μm), *Magnetoglobus* (aggregato multicellulare, diametro 20 μm), *Spirochaetes* (2-10 μm × 0,25 μm), *Flexibacter* (filamenti di 5-100 μm × 0,5 μm), *Escherichia coli* (2 μm × 0,5 μm), *Pelagibacter* (0,4 μm × 0,15 μm) e *Mycoplasma* (0,2 μm); specie di *Archaea*: *Giganthauma* (filamento multicellulare con diametro di 10 μm), *Ignicoccus* (6 μm), *Nanoarchaeum* (0,4 μm), *Haloquadratum* (2 μm), *Methanosarcina* (2 μm per ogni cellula); e specie di virus: *Pandoravirus* (1 mm × 0,4 μm), batteriofago T4 (200 nm × 90 nm), *virus dell'influenza A* (100 nm), *virus del mosaico del tabacco* (300 nm × 20 nm), *Circovirus* (20 nm).



Daniel H. Buckley

(a)



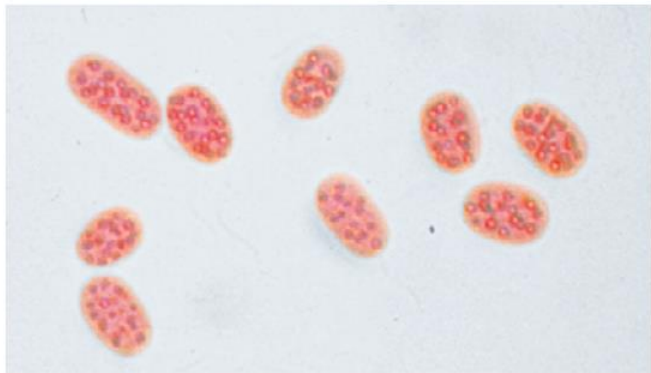
Daniel H. Buckley

(b)



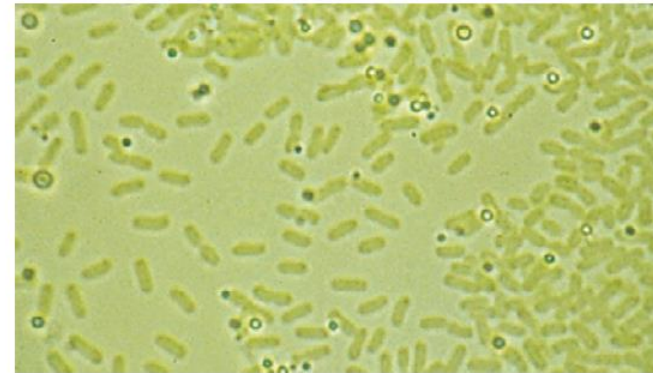
Daniel H. Buckley

(c)



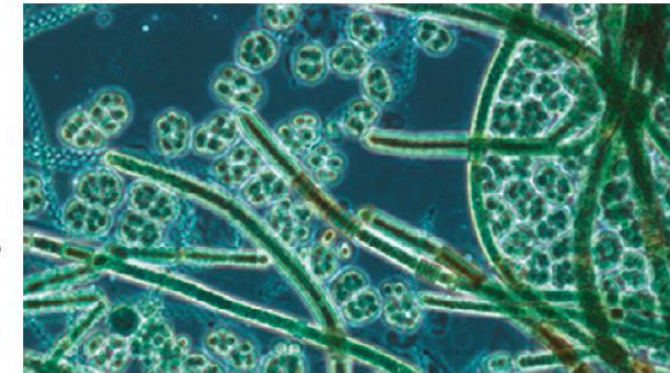
Norbert Pfennig

(d)



Norbert Pfennig

(e)



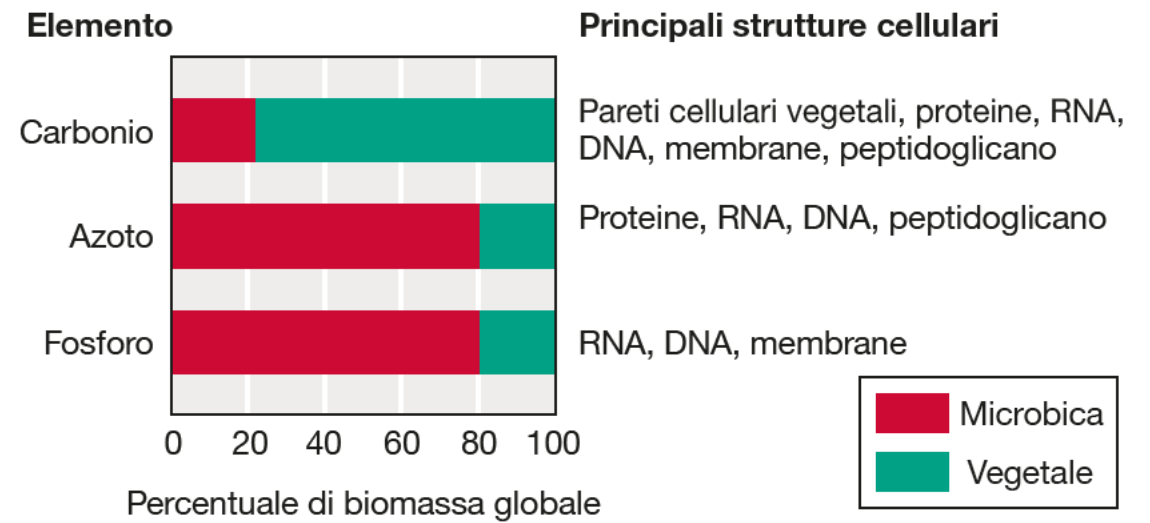
Daniel H. Buckley

(f)

Figura 1.11 Microrganismi fototrofi. I primi fototrofi vivevano in tappeti microbici. (a) Tappeti microbici nella Great Sippewissett Marsh, una palude salmastra del Massachusetts, negli USA. (b) I tappeti sviluppano una struttura coesa che si forma sulla superficie del sedimento. (c) Questa sezione del tappeto mostra le stratificazioni colorate che si formano per la presenza di fotopigmenti. I cianobatteri formano lo strato verde più vicino alla superficie, i batteri rossi sulfurei formano gli strati rosso

e giallo sottostanti, e i batteri verdi sulfurei formano lo strato verde più in basso. La scala incisa sul coltellino è in centimetri. (d) Batteri rossi sulfurei, (e) batteri verdi sulfurei e (f) cianobatteri visualizzati grazie alla microscopia in campo chiaro e in contrasto di fase. I batteri sulfurei rossi e verdi sono fototrofi anossigenici comparsi sulla Terra molto prima dell'evoluzione dei fototrofi ossigenici (cioè dei *Cyanobacteria*) (si veda la Figura 1.10a).

Figura 1.12 Contributo delle cellule microbiche alla biomassa globale. I microrganismi costituiscono una porzione significativa del carbonio (C) e la maggior parte dell'azoto (N) e del fosforo (P) della biomassa di tutti gli organismi della terra. C, N e P sono i macronutrienti di cui gli organismi viventi hanno più bisogno. La biomassa animale non è indicata in quanto costituisce una frazione minore (<0,1%) della biomassa globale complessiva.



Quanti procarioti sulla Terra?

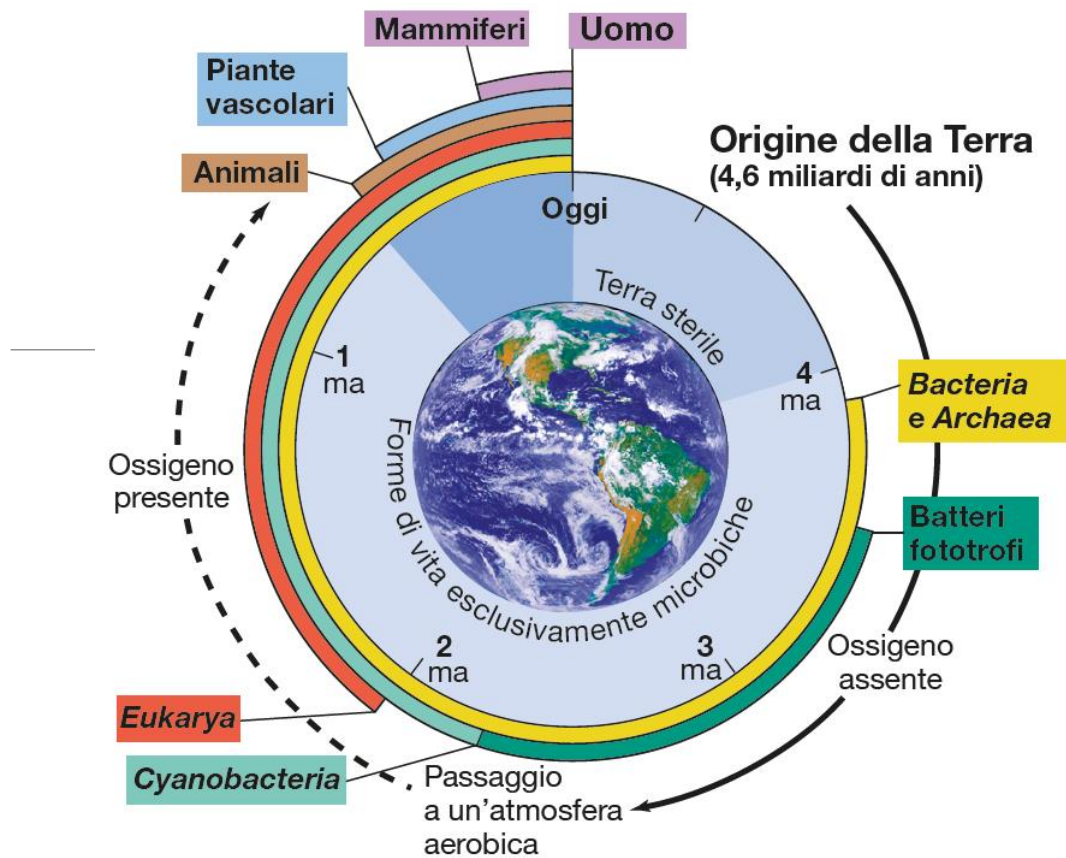
Procarioti → «*The unseen majority*» (Withman et al., 1998)

Habitat	Numero procarioti x 10 ²⁸	Pg(1Pg = 10 ¹⁵ g) C nei procarioti
Acque	12	2,2
Sedimenti oceanici	355	303
Suolo	26	26
Sottosuolo	25-250	22-215
Totale	415-640	353-546

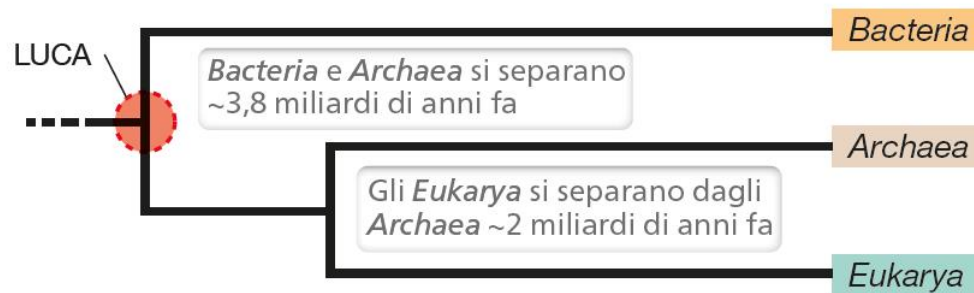
P= 9-14 Pg
N= 85 – 130 Pg



60%-100% del carbonio contenuto
nelle piante della Terra!



(a)



(b)

Figura 1.10 Sintesi dell'evoluzione della vita sulla Terra in base al tempo e all'origine dei domini cellulari. (a) In origine, la Terra era sterile e anossica. La vita cellulare, sotto forma di *Bacteria* e *Archaea*, era già presente circa 3,8 miliardi di anni fa. Con l'evoluzione dei batteri fototrofi chiamati *Cyanobacteria* iniziò l'ossigenazione graduale dell'atmosfera. Nonostante la presenza dell'ossigeno nell'atmosfera terrestre venga fatta risalire a 2,4 miliardi di anni fa, il livello attuale di O_2 atmosferico fu raggiunto solo 500-800 milioni di anni fa. (b) I tre domini evolutivi degli organismi cellulari sono: *Bacteria*, *Archaea* ed *Eukarya*. Per primi comparvero *Bacteria* e *Archaea*. Da questi ultimi discendono gli *Eukarya*, evolutisi in un secondo momento. LUCA: antenato universale comune (*Last Universal Common Ancestor*).

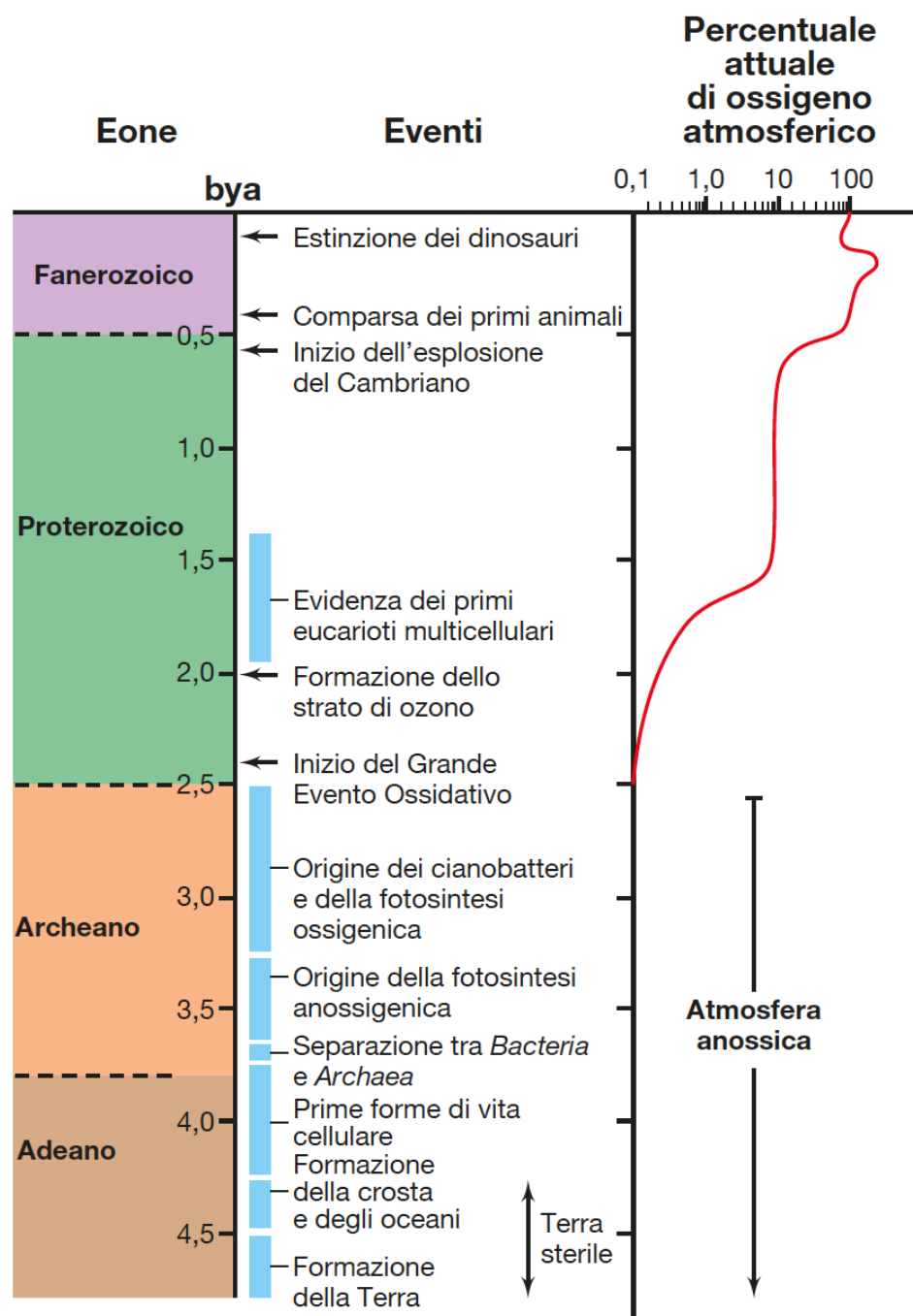
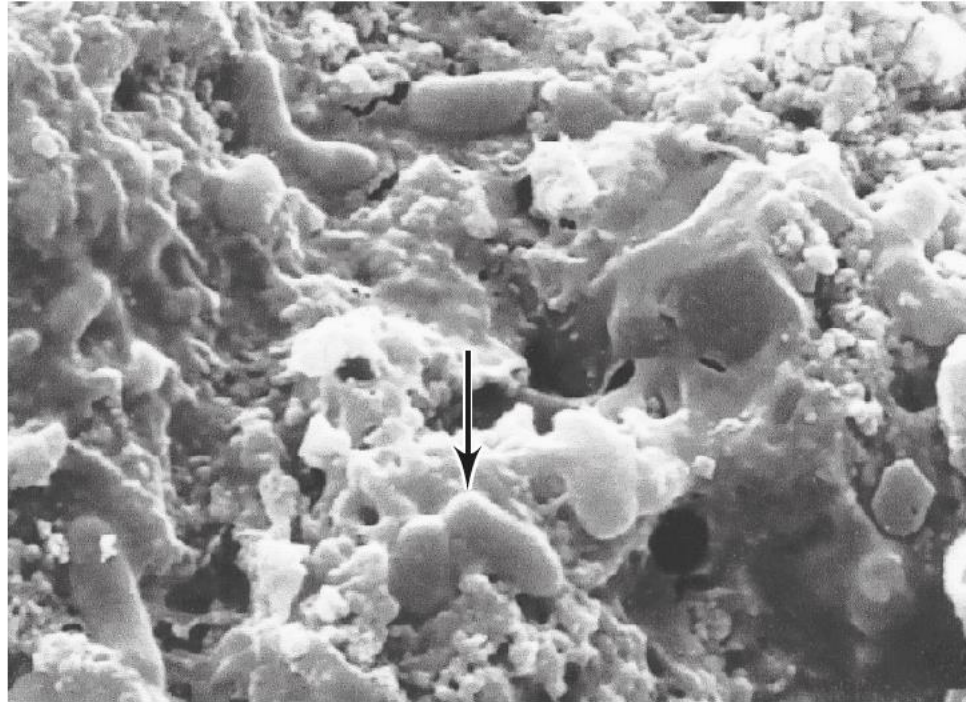
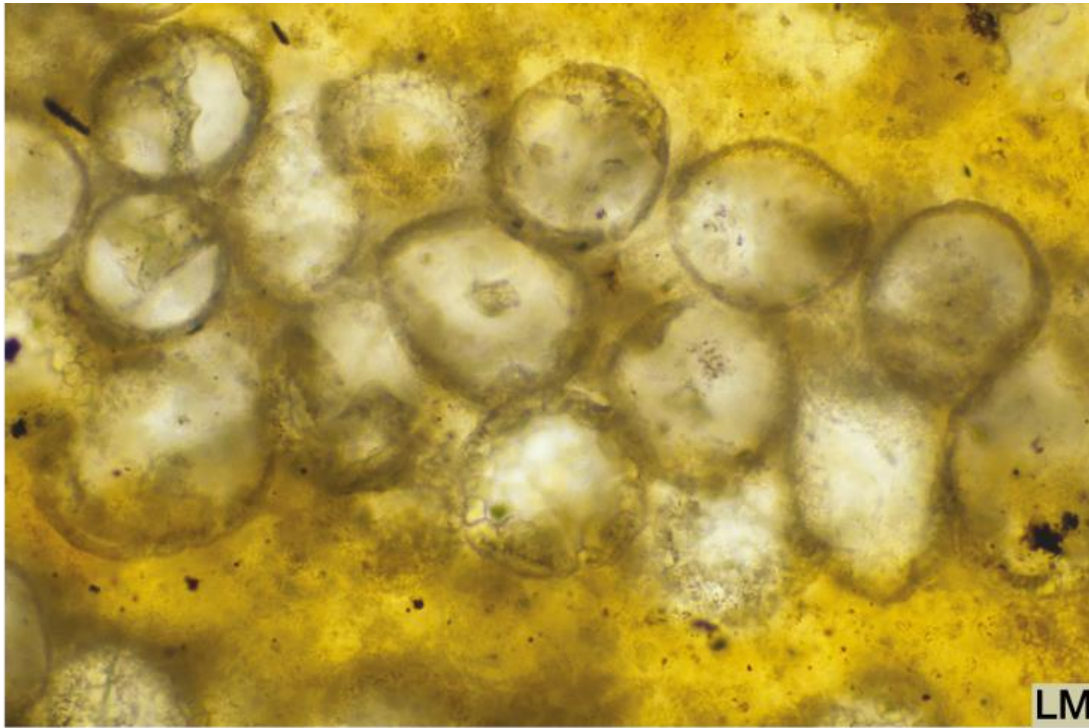


Figura 13.1 Principali pietre miliari nell'evoluzione biologica, variazioni della chimica atmosferica del pianeta Terra e diversificazione metabolica dei microrganismi. La più antica datazione per l'origine della vita è fissata in prossimità della nascita del pianeta, mentre l'origine della fotosintesi ossigenica è ricondotta al Grande Evento Ossidativo, avvenuto circa 2,4 miliardi di anni fa (MAF). Bisogna considerare che l'ossigenazione dell'atmosfera da parte del metabolismo dei cianobatteri è stato un processo graduale, che si è protratto durante un periodo lungo circa 2 miliardi di anni. Si confronti questo schema con la Figura 1.10 relativa al riepilogo infografico della vita sulla Terra dall'origine del pianeta ai giorni d'oggi.



Frances Westall

Figura 13.2 Vita microbica primordiale. Fotografia al microscopio elettronico a scansione di microfossili di batteri presenti in rocce di 3,45 miliardi di anni provenienti dal Baberton Greenstone Belt in Sud Africa. Si notino i batteri a bastoncino (freccia) adesi alle particelle di matrice minerale. Le cellule hanno un diametro di circa $0,7 \mu\text{m}$.



A. Fossili di cianobatteri



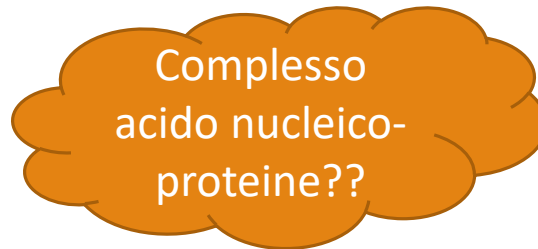
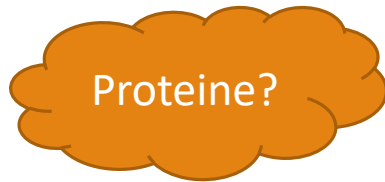
B. Fossili di stromatoliti

FIGURA 1.13. Antichi fossili ritrovati in Wyoming (A) ed in Australia (B)

Già 3,8 miliardi di anni fa la vita procariotica si era affermata sulla Terra in modo permanente

I principali passi dell'evoluzione

1. I primi organismi sono stati frutto di una lunga evoluzione chimica che ha portato alla formazione di amminoacidi e proteine
2. Gocce lipidiche contenenti proteine formarono membrane
3. Tali strutture lipoproteiche acquisirono la capacità di riprodursi



4. I primi organismi erano eterotrofi, solo più tardi comparvero gli autotrofi

La nascita della vita sulla Terra: l' esperimento di Miller-Urey



Stanley Miller in laboratorio, 1952

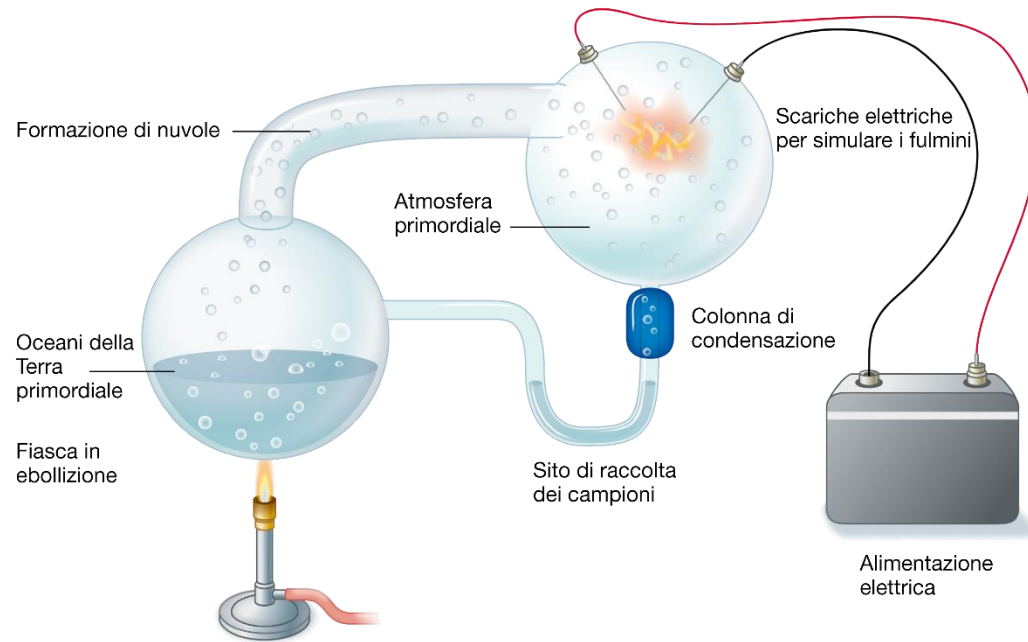


FIGURA B1.3. Esperimento di Miller-Urey. Per studiare l'origine della vita Miller (nella foto) e Urey formularono un'ipotesi sull'atmosfera della Terra primordiale e la riprodussero in un apparecchio chiuso. Dopo aver fornito calore ed elettricità al sistema (per simulare le fonti di energia sulla Terra antica) estrassero dei campioni per analizzarli. Le analisi chimiche mostrarono che si erano formate molecole organiche, inclusi alcuni aminoacidi. L'esperimento suggerì che molecole organiche comunemente impiegate nei sistemi viventi avrebbero potuto formarsi spontaneamente da molecole inorganiche, in condizioni estreme.

La nascita della vita sulla Terra: teoria del mondo ferro-zolfo

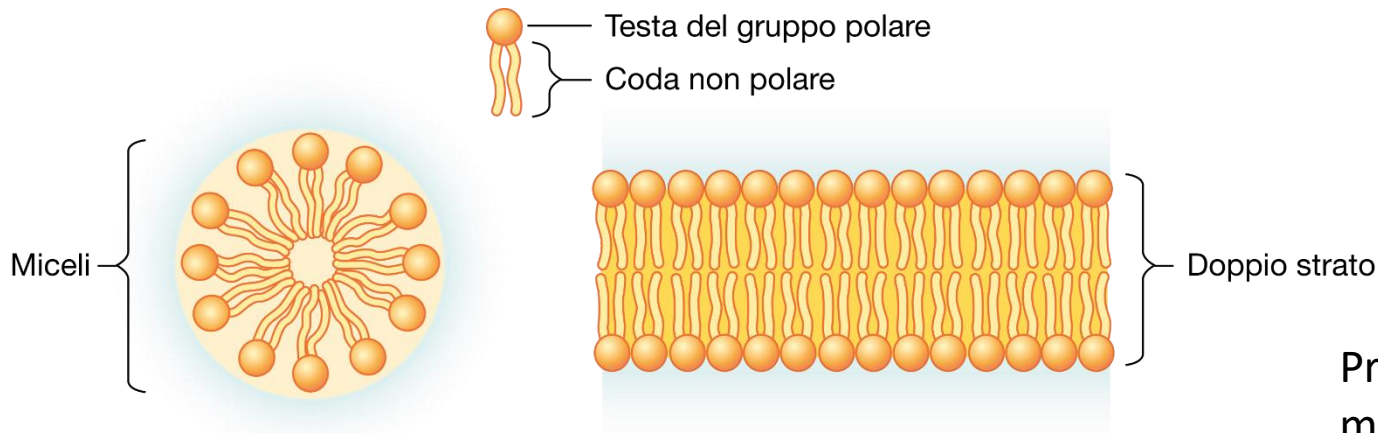


FIGURA 1.14. Micelle e membrane a doppio strato.

Günter Wächtershäuser (1997):
teoria del mondo ferro-zolfo

Produzione di [acido acetico](#) attraverso la catalisi degli ioni metallici.

Aggiunta di un atomo di [carbonio](#) all'acido acetico per produrre [acido piruvico](#) a tre carboni.

Aggiunta di [ammoniaca](#) per formare [amminoacidi](#).

Produzione di [peptidi](#) e poi di [proteine](#).

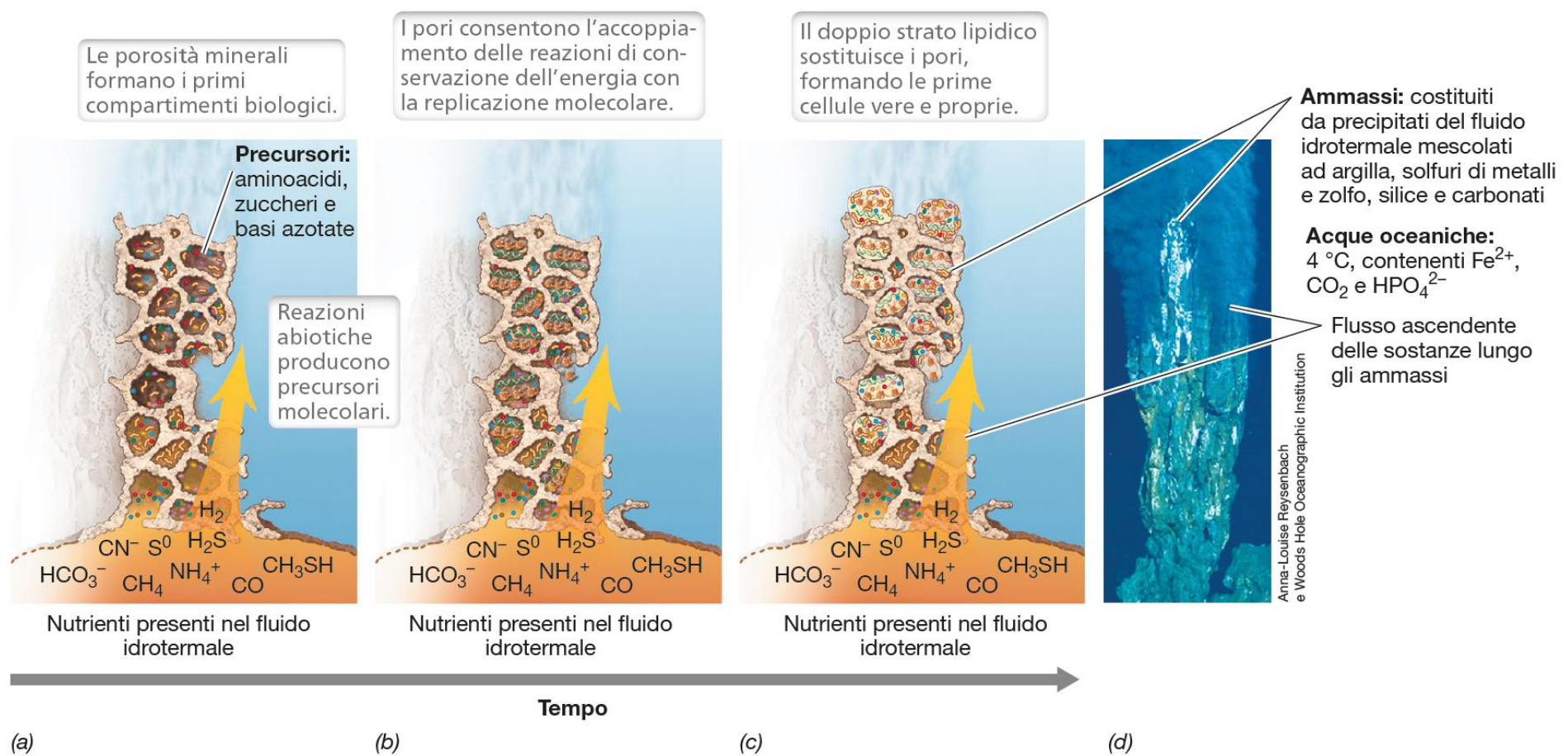


Figura 13.3 Gli ammassi colonnari sottomarini e il loro possibile collegamento con l'origine della vita. È probabile che la vita sulla Terra si sia sviluppata in corrispondenza di sorgenti idrotermali nelle profondità oceaniche. Sono infatti ambienti stabili favorevoli alla vita che offrono energia chimica, precursori necessari alla formazione di molecole biologiche e porosità minerali utili come compartimenti per ospitare reazioni biochimiche pre-cellulari. (a) I precursori molecolari si formano in condizioni abiotiche e si accumulano nelle porosità della matrice minerale. (b) I gradienti chimici che si formano offrono una fonte di energia che alimenta

la replicazione delle molecole biologiche pre-cellulari. (c) Alla fine, le membrane si sostituiscono ai compartimenti minerali portando alla formazione delle prime cellule. (d) Fotografia di un ammasso idrotermale odierno. I fluidi idrotermali bollenti e ricchi di minerali si mischiano con le acque dell'oceano, più fredde e maggiormente ossidate, formando precipitati di ferro e di composti contenenti zolfo, argille, silicati e carbonati. Questi precipitati minerali formano pori che potrebbero aver funzionato come compartimenti ricchi di energia in grado di favorire l'evoluzione delle forme di vita pre-cellulari.

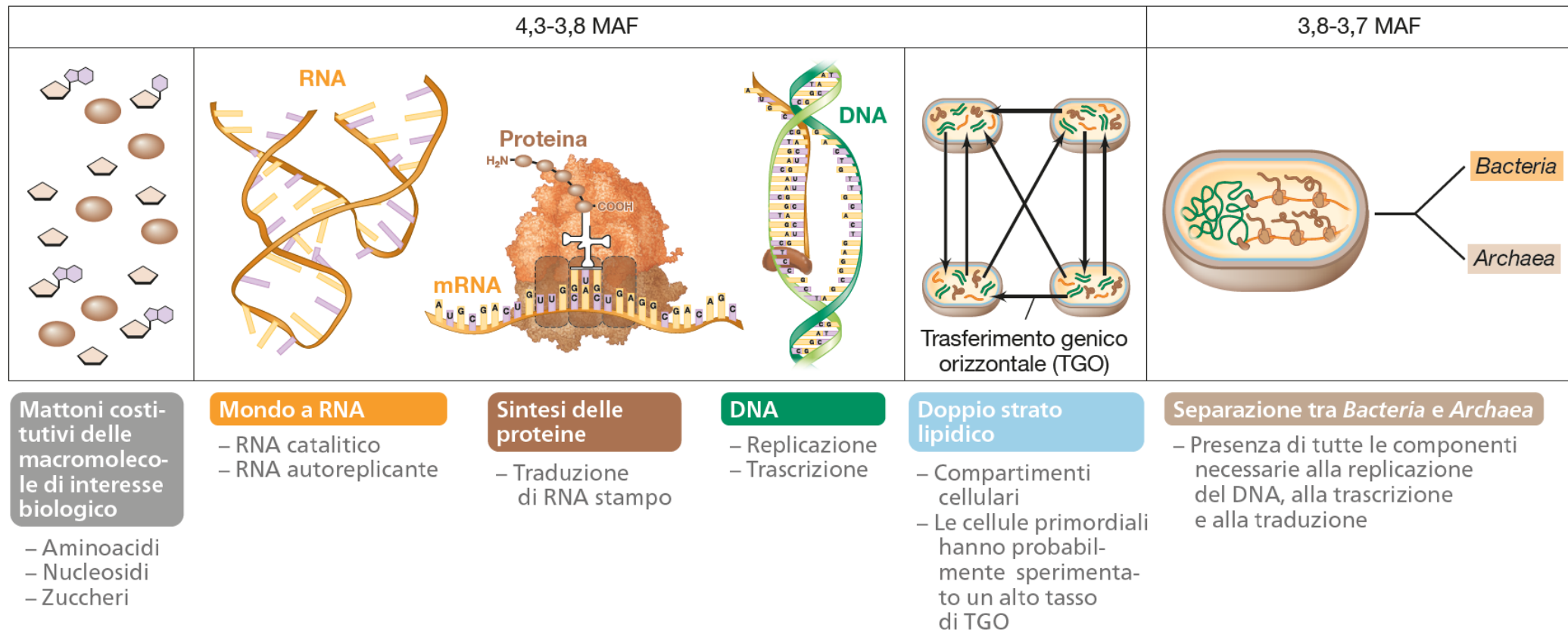


Figura 13.4 Eventi che ipoteticamente hanno preceduto l'origine della vita cellulare. I primi sistemi biologici autoreplicanti si basavano probabilmente su RNA catalitico. A un certo punto, gli enzimi a RNA hanno evoluto la capacità di sintetizzare le proteine, le quali sono diventate a loro volta le principali molecole catalitiche. La conversione dei genomi a base di RNA in quelli a base di DNA ha richiesto l'evoluzione di DNA e RNA polimerasi. Il doppio strato lipidico è il luogo del trasporto degli elettroni e l'evoluzione di questa

struttura ha rappresentato il passaggio fondamentale per i processi di conservazione dell'energia, in aggiunta alla funzione di contenere e proteggere le molecole biologiche. L'ultimo antenato comune universale (LUCA), che ha preceduto la separazione tra *Bacteria* e *Archaea* (si veda la Figura 13.9), era un organismo cellulare che possedeva un doppio strato lipidico e utilizzava DNA, RNA e proteine. Il trasferimento genico orizzontale (TGO) potrebbe aver consentito un passaggio rapido di geni vantaggiosi tra le prime forme di vita.

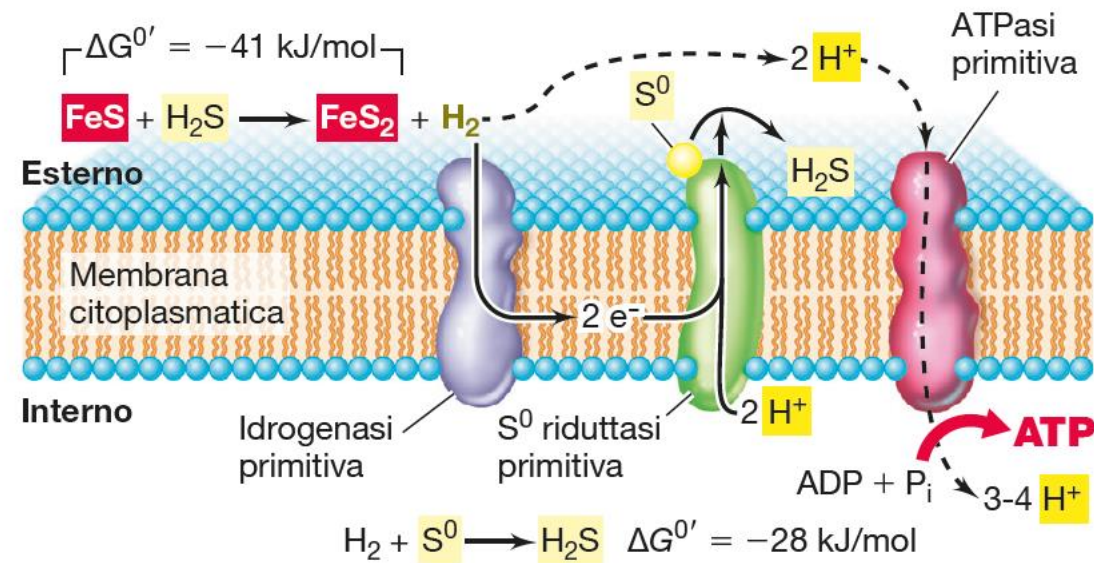


Figura 13.5 Possibile schema di conservazione dell'energia utilizzato dalle cellule primordiali. Le prime cellule potrebbero aver generato energia utilizzando H_2 come donatore di elettroni e S^0 come accettore, due sostanze abbondanti nei sistemi idrotermali ed emesse anche dai vulcani. H_2 può formarsi inoltre in seguito a una reazione abiotica tra FeS e H_2S , due sostanze diffuse sulla Terra primordiale. Queste reazioni potrebbero avere consentito alle prime cellule di colonizzare svariati habitat.



Malcolm Walter

(a)



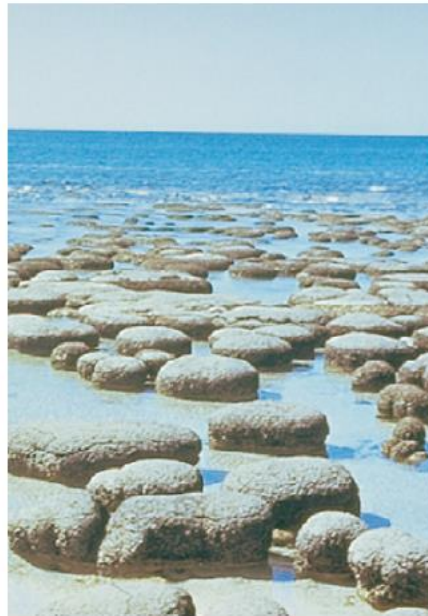
Malcolm Walter

(b)



Daniel H. Buckley

(c)



Malcolm Walter

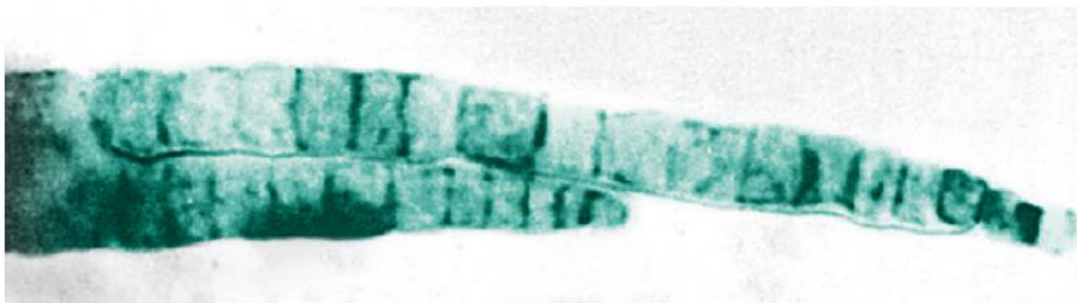
(d)



T.D. Brock

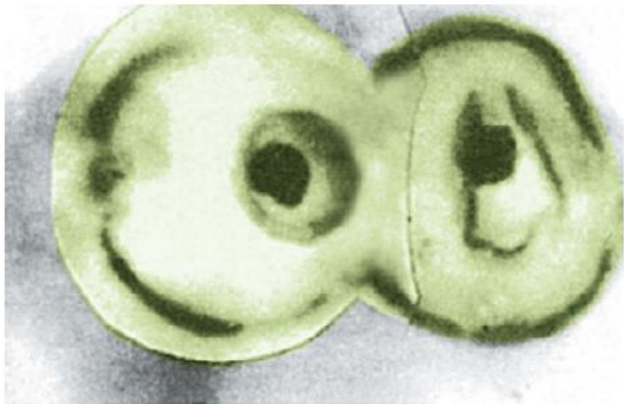
(e)

Figura 13.6 Stromatoliti primordiali e moderne. (a) Le più antiche stromatoliti a oggi conosciute, trovate all'interno di una roccia di 3,5 miliardi di anni proveniente dal Warrawoona Group nell'Australia Occidentale. La foto mostra una sezione verticale della struttura laminare conservata all'interno della roccia. Le frecce indicano le stratificazioni laminari. (b) Stromatoliti di forma conica provenienti da una roccia di natura dolomitica di 1,6 miliardi di anni dell'Australia settentrionale. (c) Stromatoliti moderne, Darby Island, Bahamas. La grande stromatolite in primo piano ha un diametro di circa 1 metro. (d) Moderne stromatoliti formate da cianobatteri termofili presenti nelle pozze termali dello Yellowstone National Park, USA. Ogni struttura è alta circa 2 cm. (e) Moderne stromatoliti nella Shark Bay, Australia. Ciascuna struttura ha un diametro da 0,5 m a 1 m.



J.W. Schopf

(a)



J.W. Schopf

(b)

Figura 13.7 Reperti fossili relativamente recenti di batteri ed eucarioti. (a) Microfossili datati un miliardo di anni provenienti dall’Australia centrale che ricordano i moderni cianobatteri filamentosi. Il diametro delle cellule misura 5-7 μm . (b) Microfossili di cellule eucariotiche provenienti dalle stesse formazioni rocciose. La struttura cellulare è simile a quella di alcune alghe verdi moderne, come le specie di *Chlorella*. Il diametro cellulare è di circa 15 μm . Il colore è stato aggiunto per evidenziare meglio la morfologia cellulare



John M. Hayes

Figura 13.8 Formazioni ferrifere a bande. Falesia alta circa 10 metri nell’Australia Occidentale, costituita da rocce sedimentarie contenenti strati di ossidi di ferro (frecce) intercalati a strati formati da silicati di ferro e da altri materiali silicei. Gli ossidi di ferro contengono ferro in forma ferrica (Fe^{3+}) originatosi a partire da ferro ferroso (Fe^{2+}) generatosi per azione dell’ossigeno rilasciato a seguito della fotosintesi compiuta dai cianobatteri.

Un mondo ad RNA...

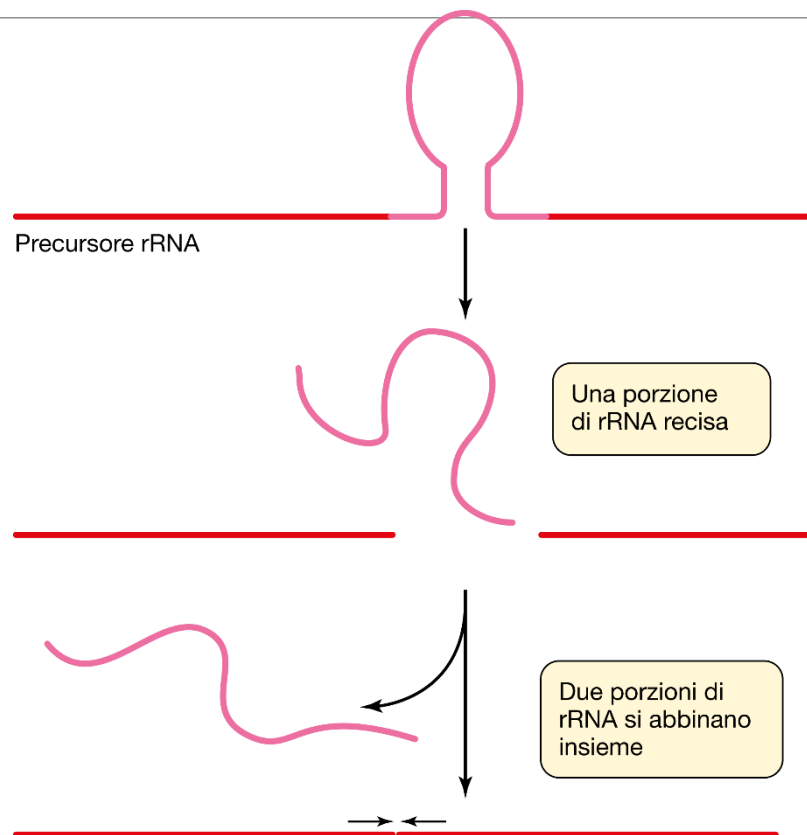
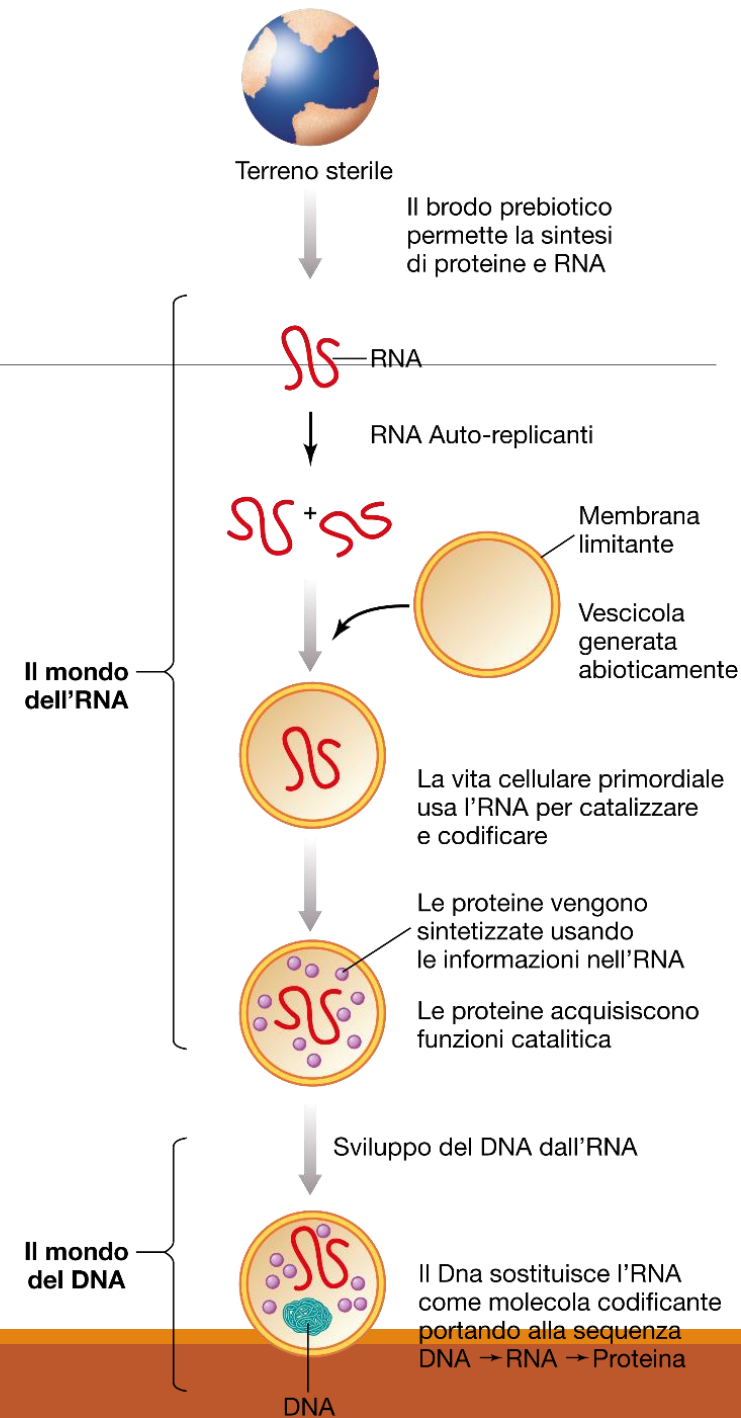


FIGURA B1.4. "Auto-saldatura" (*self-splicing*) delle molecole di RNA. Tom Cech dimostrò che le molecole di RNA ribosomiale del protozoo *Tetrahymena thermophila* si scindono senza l'intervento di enzimi: hanno un'attività catalitica intrinseca. Forme di "auto-saldatura" sono state da allora osservate in varie altre specie. Come si vede nello schema, due porzioni della molecola di RNA si uniscono insieme e la sequenza interposta viene escissa e degradata.



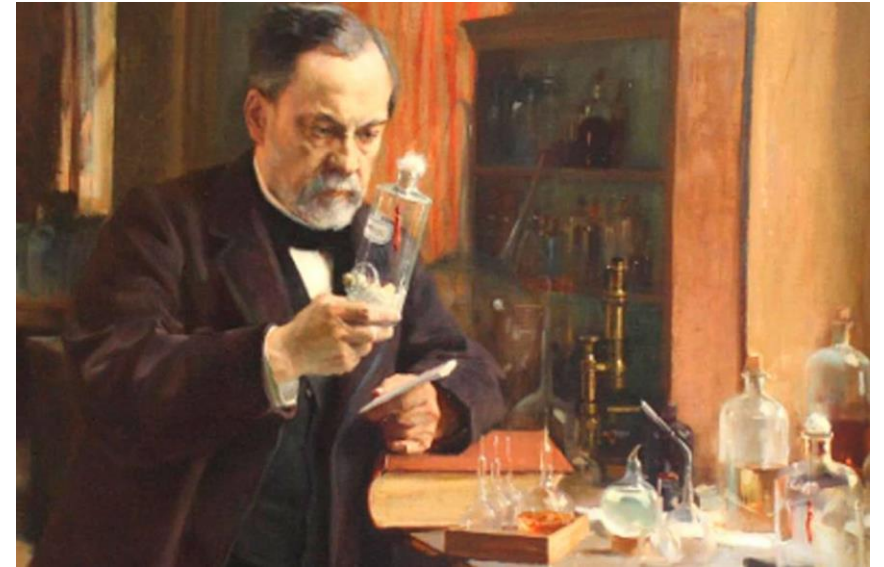
Teoria sull'origine della vita



Aristotele: Teoria generazione spontanea (400 A.C)



Francesco Redi: confuta la teoria di Aristotele (larve di mosca) - 1600



Louis Pasteur: confuta definitivamente la teoria della generazione spontanea (anche per i microrganismi) - 1864

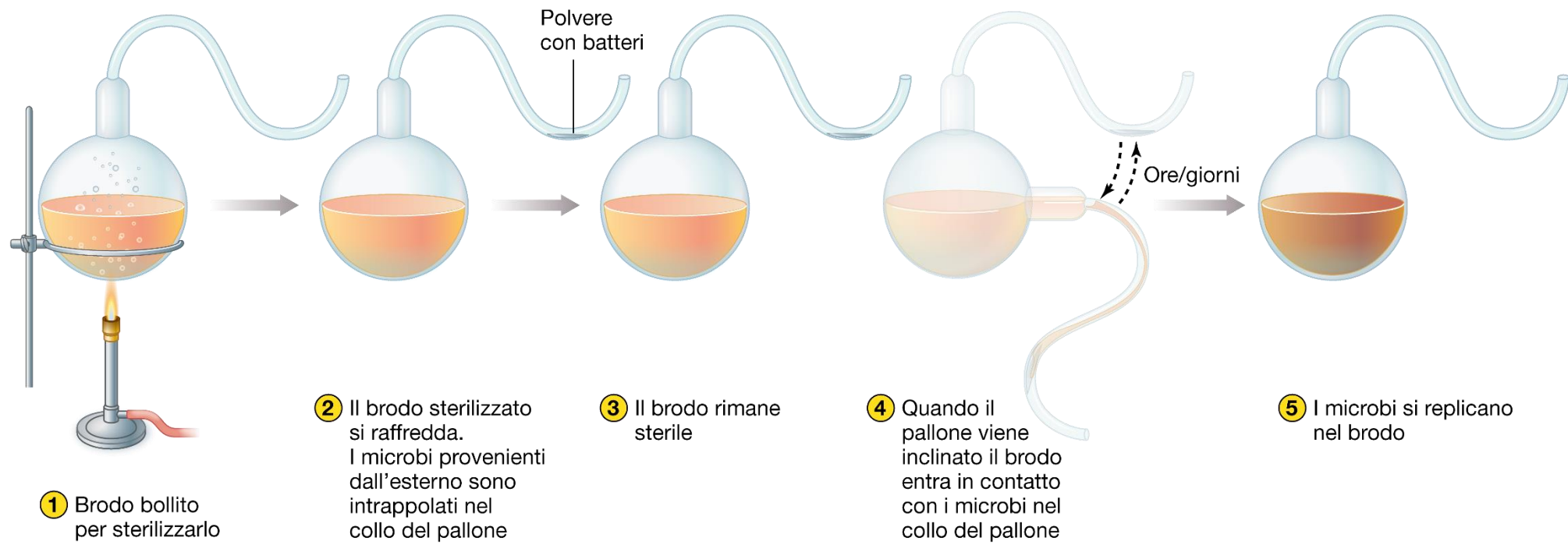
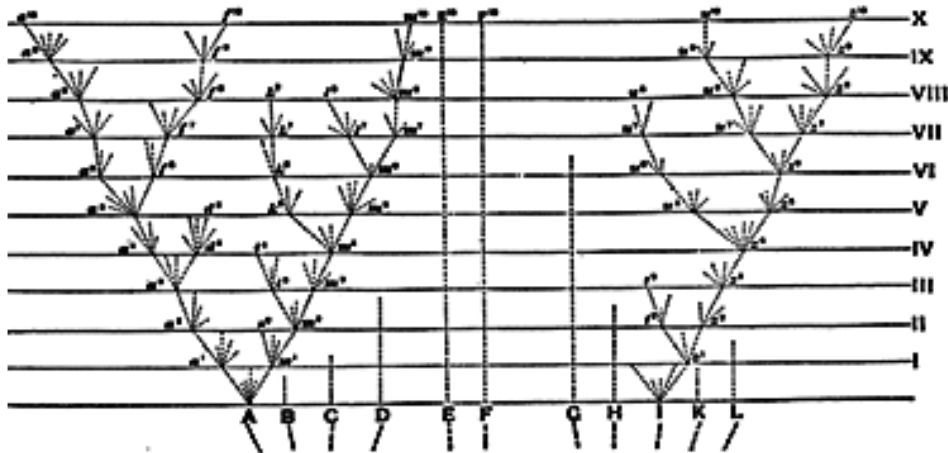


FIGURA 1.26. Schema di processo: Pasteur confuta la generazione spontanea. Dimostrando che la crescita batterica non avveniva nel brodo sterile all'interno di palloni a collo di cigno, ma solo quando il brodo sterile entrava in contatto con contaminanti esterni, Pasteur provò definitivamente che i microrganismi non si generano in modo spontaneo.

I microrganismi ed i regni dei viventi



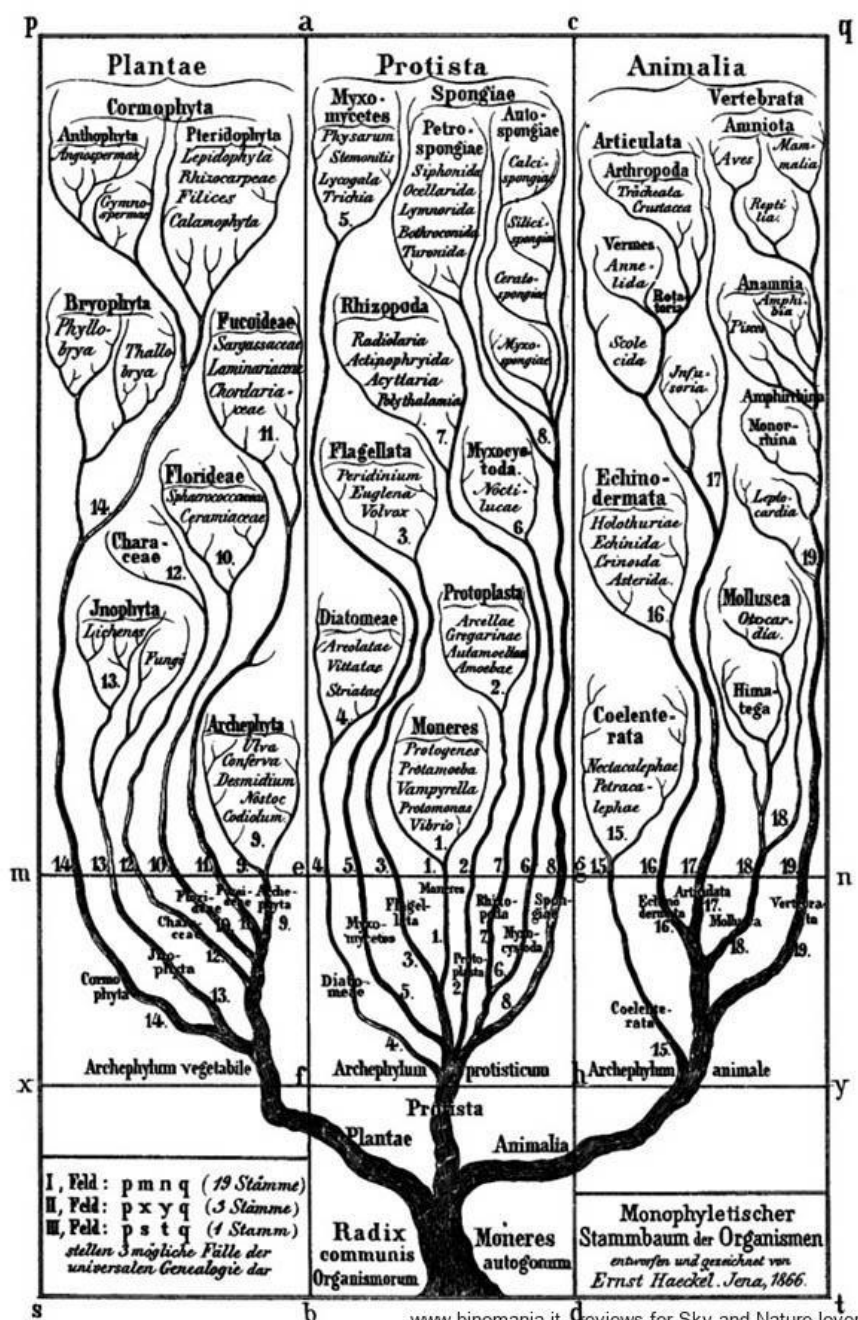
Linneo (1758)
Due Regni
(animali, piante)

I batteri non sono inclusi in alcun regno

Piante	Gruppi contestati	Animali
		Piccoli metazoi Rotiferi Nematodi (alcuni) Artropodi (alcuni)
Alghe fotosintetiche		Protozoi Ciliati
Flagellati (Forme immobili)	Flagellati fotosintetici	Flagellati non fotosintetici
Veri funghi	Mixomiceti	Protozoi ameboidi
Batteri		

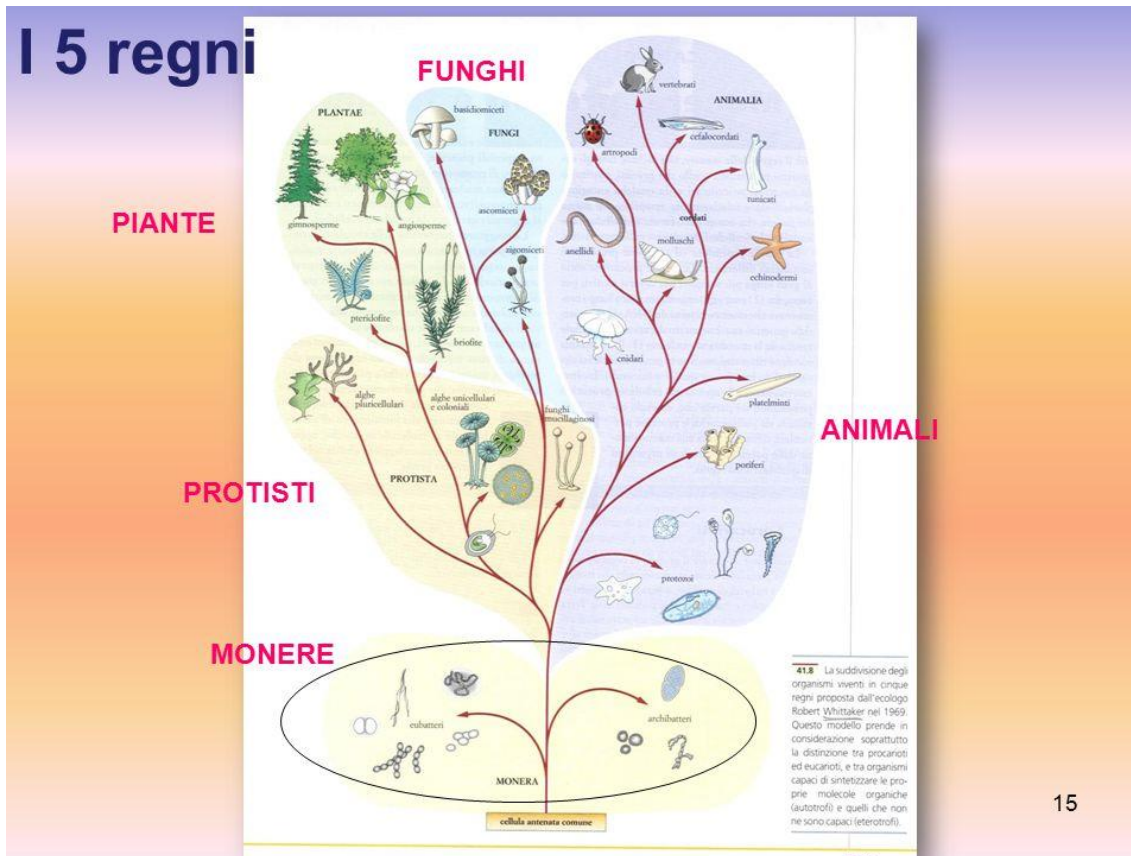
1860

Haeckel, 1866 Tre Regni (Piante, animali, Protisti)



Caratteristiche	Piante	Animali	Protisti
Pluricellularità, estesa differenziazione di cellule e tessuti	Piante a semi Felci Muschi ed epatiche	Vertebrati ed invertebrati	
Unicellulari, pluricellulari con poca o nessuna differenziazione di cellule e tessuti			Alghe Protozoi Funghi Batteri

I microrganismi ed i regni dei viventi

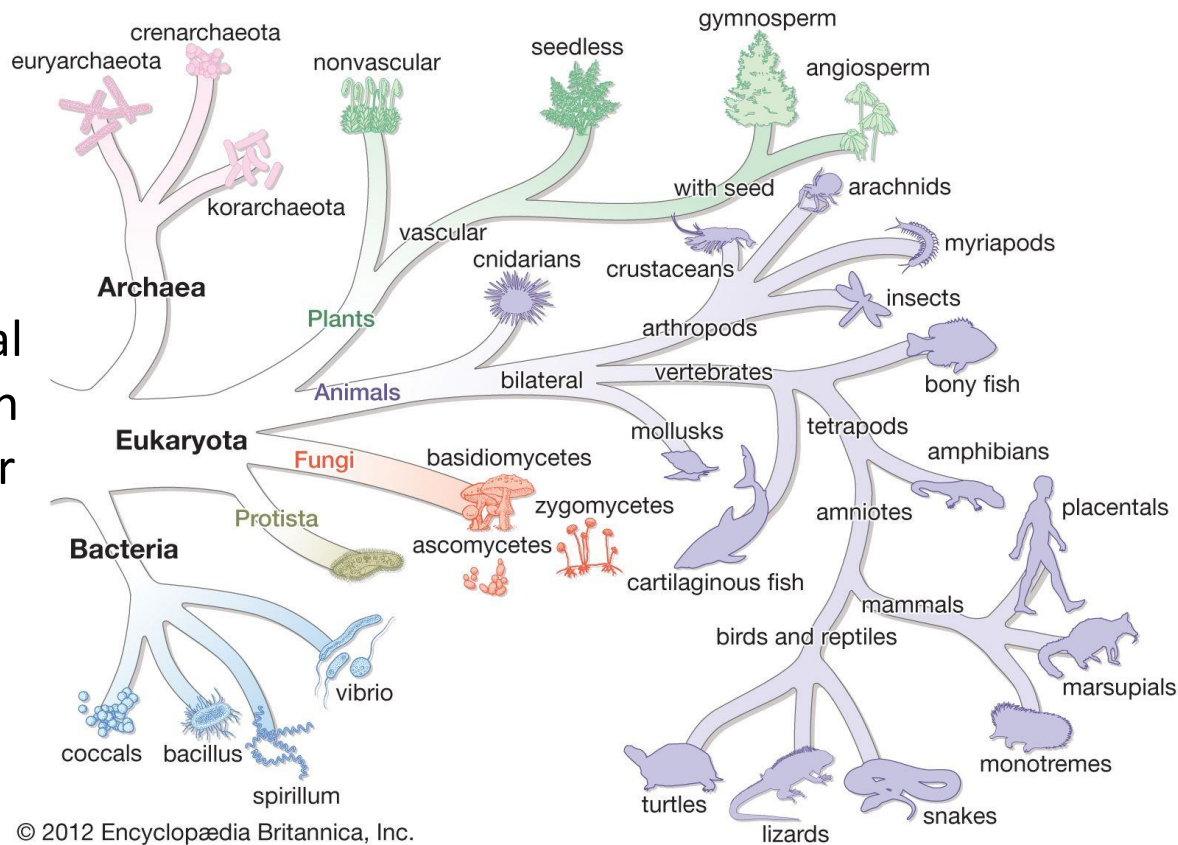


Wittaker - 1969
Cinque Regni
(Animalia, Plantae, Fungi, Protista e Monera)

La classificazione degli organismi era fatta su base citologica

I microrganismi ed i regni dei viventi

Last
Universal
Common
Ancestor



Secondo lo schema proposto da Woese nel 1990, invece, tutti gli organismi viventi sono organizzati in **tre domini** evolutivamente collegati fra loro, rappresentati come tre diramazioni dell'albero della vita

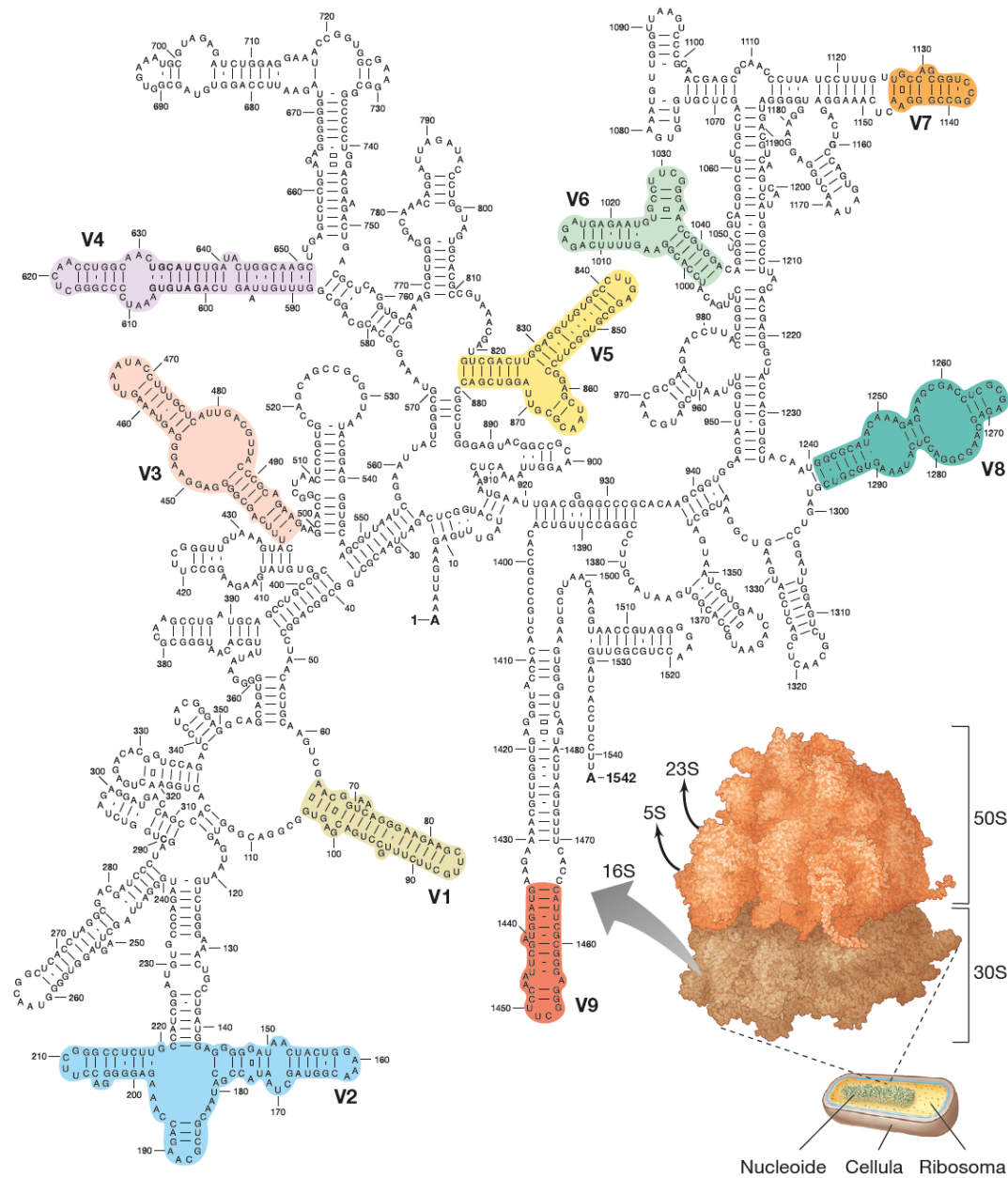


Figura 13.24 RNA ribosomale (rRNA). Struttura primaria e secondaria dell'rRNA 16S di *Escherichia coli* (*Bacteria*). L'rRNA 16S degli *Archaea* ha una struttura secondaria (folding) simile a quella dei *Bacteria*, ma presenta numerose differenze in quella primaria (sequenza). La molecola è composta da regioni conservate

e variabili (V1-V9). Le posizioni indicative delle regioni variabili sono evidenziate con colori diversi. Nell'insetto: il ribosoma 70S dei *Bacteria* è composto dalle subunità 30S e 50S; l'rRNA 16S fa parte della subunità 30S, mentre gli rRNA 5S e 23S fanno parte della subunità 50S.

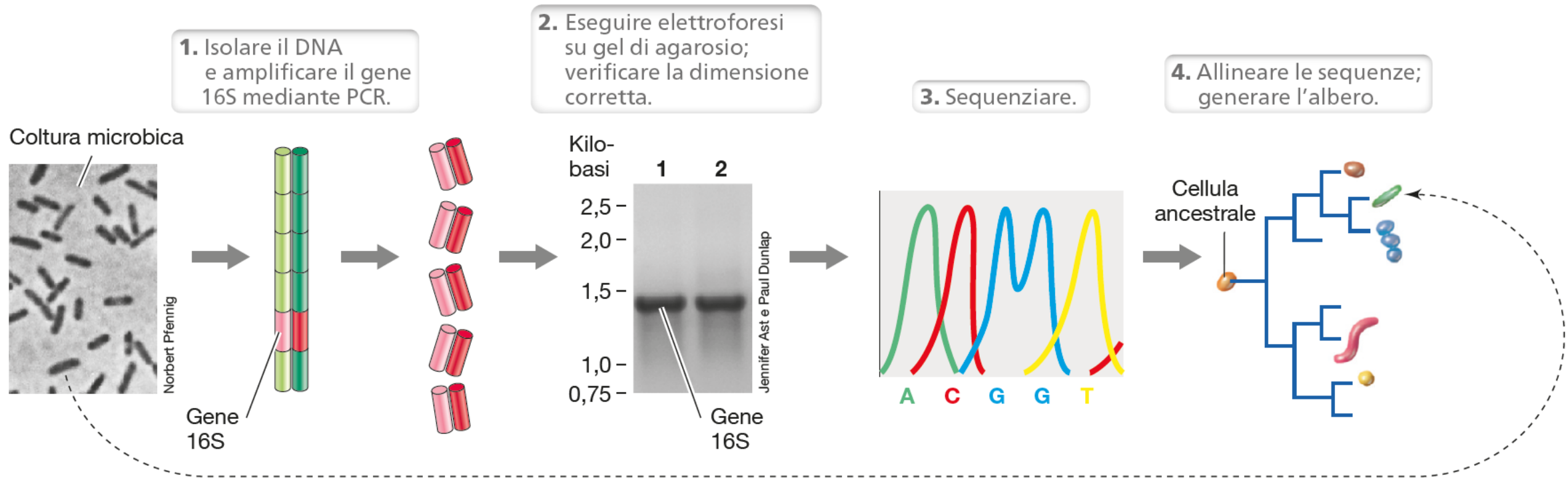


Figura 13.25 Amplificazione per PCR del gene dell'rRNA 16S ricavato da una coltura microbica non identificata. Una volta isolato il DNA, vengono utilizzati primer complementari alle estremità della sequenza genica dell'rRNA 16S (Figura 13.24) per amplificarla mediante PCR. Il prodotto di amplificazione viene poi sottoposto a elettroforesi su un gel di agarosio (corsia 1) e confrontato con uno

standard (corsia 2). Le bande ottenute hanno una lunghezza di circa 1465 nucleotidi (sulla sinistra viene riportata la dimensione in kilobasi con riferimento a marcatori di DNA di dimensione nota). La banda della coltura ignota viene poi excisa dal gel, purificata e sequenziata. La sequenza viene quindi allineata con sequenze di rRNA 16S di altri organismi, e infine viene costruito un albero filogenetico.

Sequenze prima dell'allineamento

1 GGA CCT AAA TTT ATA CCC
 2 GGA AAA GGG CCC AAA CGC
 3 GGA GGG CCT TTT ATA CCC

Differenze di sequenza

	1	2	3
1	-	-	-
2	1	1	-
3	6	1	-

Sequenze dopo l'allineamento

1 GGA --- --- CCT AAA TTT ATA CCC
 2 GGA AAA GGG CCC --- --- AAA CGC
 3 GGA --- GGG CCT --- TTT ATA CCC

	1	2	3
1	-	-	-
2	3	-	-
3	0	3	-

(a)

(b)

Figura 13.26 Allineamento delle sequenze di DNA.

(a) Sono mostrate le sequenze di un'ipotetica regione genica di tre specie diverse, prima e dopo l'allineamento. Un allineamento di sequenza ha lo scopo di consentire la rappresentazione delle posizioni omologhe su colonne verticali. Tale allineamento viene raggiunto inserendo le posizioni mancanti, indicate dai trattini, al fine di ottimizzare la similarità di sequenza per il tratto considerato tra le specie in esame. (b) Le matrici di distanza mostrano il numero delle differenze di sequenza che è possibile attribuire per ogni coppia di specie considerata prima e dopo l'allineamento.