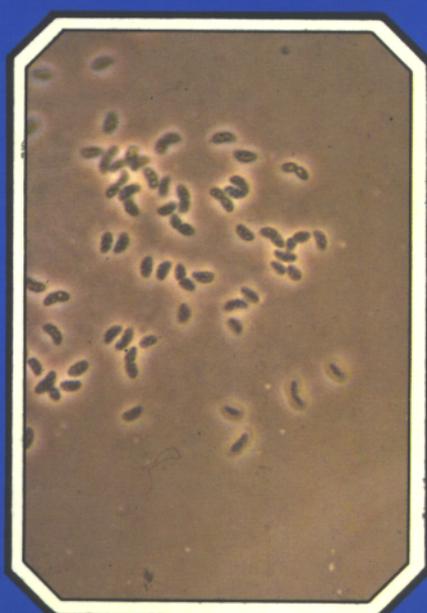
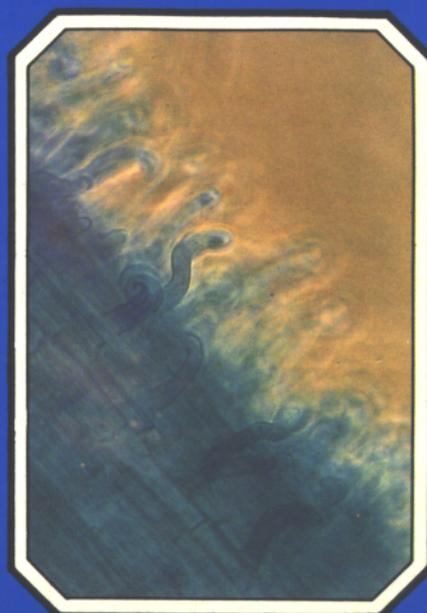
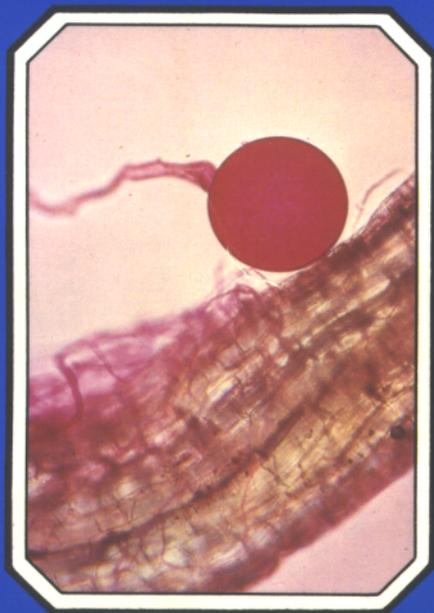


MANUAL DE MÉTODOS EMPREGADOS EM ESTUDOS DE MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA



CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA DO RIZÓBIO

Ricardo S. Araujo¹

7.1. Introdução

Na rotina de trabalho de um laboratório onde se realizam pesquisas em microbiologia do solo, são freqüentes as vezes em que se necessita de uma forma para a identificação rápida de um determinado organismo, sobretudo das estirpes de bactérias mais comumente estudadas.

Uma das formas mais rápidas de se identificarem bactérias é através de características morfológicas, como forma e tamanho das células ou colônias e número de flagelos, através de propriedades fisiológicas, como a habilidade de utilizar certos substratos ou de alterar o pH do meio, e através de características bioquímicas como a reação à coloração de Gram. Há inúmeras outras formas pelas quais o microbiologista treinado e perceptivo pode identificar “seus” organismos. Há, por exemplo, aqueles que conhecem, pelo cheiro, se uma placa de cultura de *Rhizobium* está contaminada ou não, ou se as *Escherichia coli* estão crescendo satisfeitas em suas mornas incubadoras.

Neste capítulo serão apresentadas algumas técnicas simples que facilitam a caracterização dos rizóbios. O equipamento mais complexo necessário é um microscópio com uma objetiva de óleo de imersão (100X; ver capítulo 1) e um dispositivo (opcional) para contraste de fase. Cabe ao microbiologista adequar os procedimentos às condições de seu laboratório, combinando-os com sua experiência para melhor identificação dos organismos de trabalho.

7.2. Características Morfológicas

7.2.1. Tamanho das Células

Apesar de não ser possível determinar, com facilidade, as dimensões exatas das células bacterianas, pode-se obter uma noção relativa de seu tamanho pela simples observação de uma cultura ao microscópio. O procedimento é bem simples:

- 1) fazer uma montagem em uma lâmina de microscópio limpa, aplicando cerca de 1/2 alça de cultura líquida ou de células suspensas de placas e cobrindo com uma lamínula;
- 2) levar ao microscópio para observar. Com a objetiva de 40X, observar bem o tamanho, a forma, e o movimento das bactérias na lâmina. Se houver uma corrente muito forte, repetir a montagem, aplicando menos líquido;

¹ Pesquisador, Ph.D., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP), Cx. Postal 179, CEP 74001-970, Goiânia, GO.

- 3) mudar para a objetiva de 100X (óleo de imersão) e repetir as observações. Neste ponto, o microbiologista deve decidir qual das duas magnificações é mais confortável a seus olhos, permitindo-lhe maior tempo de observação de espécies e agilidade em sua identificação.

7.2.2. Forma da Célula

As células bacterianas apresentam as mais variadas formas, indo desde bastonetes retos a espirais, cocos (esferas), ramificadas e outras formas bizarras. Os rizóbios são relativamente desinteressantes no que se refere à forma das células que, em cultura, são bastonetes. Sua forma pode ser facilmente observada na montagem da seção anterior.

Uma maneira um pouco menos tediosa de se observar a forma das células bacterianas é através de uma simples coloração. Os rizóbios são facilmente coloridos pelo procedimento abaixo:

- 1) transferir uma alça de água destilada esterilizada para uma lâmina de microscópio limpa. Com a alça esterilizada na chama de um bico de Bunsen, transferir um pouco de material de uma colônia, tirada de uma placa, para a água na lâmina e misturar bem. Espalhar para cobrir uma área de 1 cm²;
- 2) para culturas líquidas, transferir uma alça de cultura diretamente para a lâmina e espalhar por uma área de cerca de 1 cm²;
- 3) deixar os esfregaços secarem ao ar, fixá-los ao calor da chama de bico de Bunsen e deixar esfriar;
- 4) cobrir a lâmina com solução de fucsina carbólica diluída por 60 segundos. Enxaguar cuidadosamente em água corrente e secar em papel absorvente.

Solução de fucsina carbólica:

Fucsina básica	1g
Etanol	10mL
Solução de fenol a 5%	100mL

- 5) observar ao microscópio com objetivas de 40X e 100X.

Quando isolados diretamente dos nódulos, os rizóbios, na forma de bacteróides, podem apresentar alguma variação morfológica. Os bacteróides de nódulos de trevo (Figura 7.1), por exemplo, podem ter as formas de tacapes, tês (T), agás (H), ípsilons (Y) e cruzeiros (X).



FIGURA 7.1.
Microfotografia eletrônica de bacteróides isolados dos nódulos de trevo.

Alguns outros, como os dos nódulos do feijoeiro, não apresentam formas bizarras, apenas são maiores que as células em cultura. A preparação de lâminas para a observação de bacteróides é simples:

- 1) retirar um ou mais nódulos das raízes lavadas de uma leguminosa;
- 2) desinfestar a superfície do nódulo por imersão, com agitação, em solução de água sanitária comercial a 40% (v/v), por 1 min, seguida de três lavagens, sucessivas, de 1 min cada, com água destilada esterilizada;
- 3) transferir o nódulo para um tubo de ensaio, adicionar cerca de 0,5 mL de água destilada esterilizada, e macerá-lo com um bastão de vidro até obter uma suspensão leitosa; acrescentar mais nódulos ou água se for necessário;
- 4) fazer um esfregaço, com uma pipeta Pasteur, do macerado de nódulos sobre uma lâmina de microscópio limpa e secar o esfregaço passando a lâmina, rapidamente, algumas vezes, sobre a chama de um bico de Bunsen. Deixar esfriar;
- 5) cobrir o esfregaço com a solução de violeta cristal para o teste de coloração de Gram (ver capítulo 2), e deixar repousar por 5 min à temperatura ambiente;
- 6) lavar a lâmina sob água corrente para remover o excesso de corante, e deixar secar ao ar.

Observar ao microscópio sem lamínula, aplicando o óleo de imersão diretamente sobre o esfregaço. Os bacteróides estarão coloridos de violeta.

7.2.3. Motilidade

Os rizóbios são bactérias que exibem movimento característico, relativamente lento. O movimento das células pode ser observado ao microscópio nas mesmas montagens empregadas para a observação de seu tamanho. Se as bactérias não estiverem sendo arrastadas pela corrente sob a lamínula, pode-se observar seu movimento ativo. é também comum observarem-se células cujos flagelos estão presos à lamínula e que, por isso, não conseguem se deslocar, mas se movem em torno do mesmo eixo, continuamente.

Uma forma indireta de se observar o movimento dos rizóbios é através de placas de motilidade. Nestes testes, empregam-se placas com meio de cultura “mole”, em que as células migram, e o movimento é medido em termos do diâmetro da zona de migração.

Procedimento:

- 1) preparar placas com meio de cultura YM (capítulo 2) ou TY (capítulo 10) com 0,5% de ágar. Observar, ao verter o meio, que as placas sejam e estejam completamente planas. Guardar as placas em geladeira por dois a três dias, antes do uso. Retirá-las da geladeira cerca de duas horas antes de inoculá-las, para secar a condensação;
- 2) preparar culturas matrizes das estirpes em teste, repicando-as para placas com meio sólido (utilizar o meio das placas de motilidade). Incubar a 28° C, até o pleno desenvolvimento das colônias;

- 3) utilizando palitos de madeira esterilizados, transferir o inóculo das placas matrizes para as placas de motilidade, apenas espetando o meio mole com os palitos contendo inóculo. Várias repetições da mesma estirpe podem ser inoculadas na mesma placa e em placas separadas;
- 4) incubar as placas a 28° C por dois a 10 dias, dependendo da velocidade de crescimento, medindo o diâmetro das zonas de migração, com régua, diariamente. Com este procedimento pode-se, inclusive, comparar as taxas de migração de diferentes estirpes em meio de cultura. É, ainda, um excelente procedimento para a identificação de mutantes com motilidade alterada (maior, menor, nula), após inserção de transpósons (ver capítulo 11).

7.2.4. Flagelos

Os flagelos são interessantes estruturas bacterianas que participam da locomoção celular. Em alguns casos pode ser interessante determinar, por exemplo, se mutantes não-motivos perderam seus flagelos. O procedimento a seguir pode ser empregado para a coloração de flagelos para a observação microscópica:

- 1) crescer as culturas em tubos com meio de cultura apropriado, solidificado com ágar a 1,5%, e inclinado. Cerca de meia hora antes de fazer a amostragem, adicionar um volume de solução de peptona (5 g/L), para onde as bactérias nadarão;
- 2) centrifugar esse líquido e lavar o pellet mais uma vez com solução de peptona (5 g/L). Centrifugar novamente. Ressuspender cuidadosamente (para evitar perda dos flagelos) em solução aquosa de formalina a 10% (v/v), até ficar ligeiramente turvo;
- 3) deixar o conteúdo de uma alça dessa suspensão correr por uma lâmina de microscópio limpa, inclinada a 45° e secar ao ar;
- 4) com um lápis próprio para marcar vidros, desenhar um retângulo ao redor do esfregaço.
- 5) transferir 1 mL da solução de corante para a lâmina, sem deixar vazar sobre as bordas do retângulo. Deixar colorir por sete a 15 min. O tempo ideal de coloração deve ser determinado experimentalmente para cada caso.

Assim que começar a se formar uma película dourada sobre a superfície do corante e aparecer um precipitado quando a lâmina for iluminada por baixo, dispensar a película de corante fazendo-a flutuar, em água corrente, sobre a lâmina. Deixar secar ao ar e examinar ao microscópio. As bactérias e os flagelos adquirem coloração vermelha.

7.2.5. Forma das Colônias

As bactérias podem organizar-se em colônias com características distintas, tanto na natureza, como em meio de cultura líquido ou sólido. Por exemplo, as células podem estar arrançadas individualmente, em pares, em cadeias, tétrades e filamentos. Os rizóbios aparecem, em meio líquido, como células individuais e, às vezes, em aglomerados sem forma distinta.

Em meio sólido, as colônias de rizóbios são, geralmente, discretas, redondas, variando de achatadas a cônicas, ou até em forma de cúpula (Figura 7.2). As margens das colônias são normalmente lisas. Quando as colônias crescem sob a superfície do meio elas adquirem a forma característica de lentes biconvexas.

As colônias dos rizóbios podem ser branco opaco, ou leitosas, e até translúcidas. Elas podem ser brilhosas ou foscas, podendo escurecer no centro quando a cultura fica mais velha. Alguns rizóbios podem produzir colônias rosadas ou amareladas, mas são incomuns.

O tempo necessário para as colônias atingirem seu máximo desenvolvimento, em placas, varia de 3 a 5 dias para estirpes de crescimento rápido (4 mm-5 mm) até 7 a 12 dias no caso das estirpes de crescimento mais lento (1 mm-4 mm). A velocidade de crescimento varia com a temperatura de incubação, a origem do inóculo (cultura ou nódulo) e a composição do meio. O tamanho das colônias também pode diminuir em placas superpovoadas.

Algumas estirpes de rizóbios, sobretudo as de crescimento rápido, apresentam colônias com aspecto bastante gomoso (Figura 7.3), principalmente em placas com meio de cultura rico em carbono (ex.: YM). Em alguns casos, as colônias chegam a pingar nas tampas das placas que são incubadas invertidas. Esse aspecto gomoso se deve à produção de exopolissacarídeos (EPS), polímeros de glicose e outras hexoses que compõem as cápsulas das bactérias (Figura 7.4). Em meios de cultura com baixo teor de carbono (ex.: TY, LB), as bactérias tendem a produzir colônias “secas”. As cápsulas bacterianas podem ser observadas por coloração e microscopia. Os dois métodos descritos a seguir são excelentes para essa finalidade.

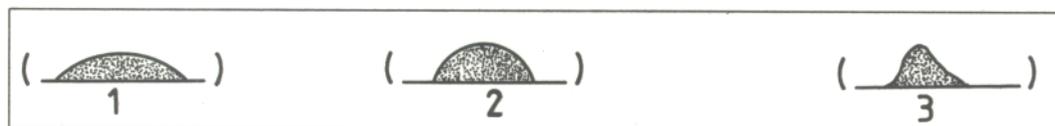


FIGURA 7.2. Tipos de colônias de rizóbios em placas com meio sólido: 1- colônia achatada; 2- colônia em forma de cúpula; e 3- colônia cônica.

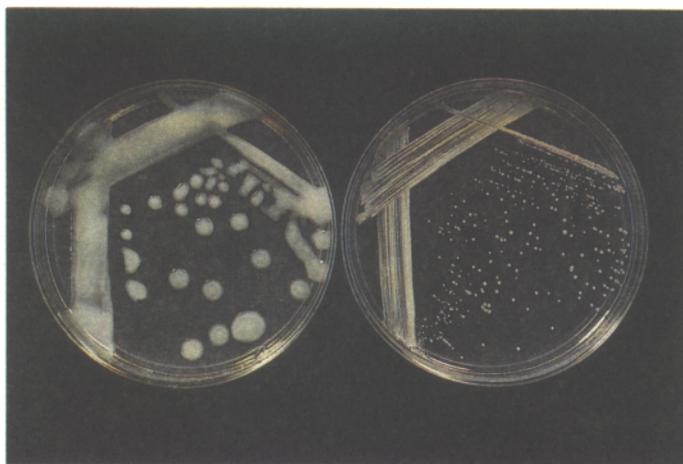


FIGURA 7.3. Aspecto de colônias de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* em placas com meio YM. À esquerda, colônias gomosas (KIM5s) e à direita, colônias secas (KM5021).

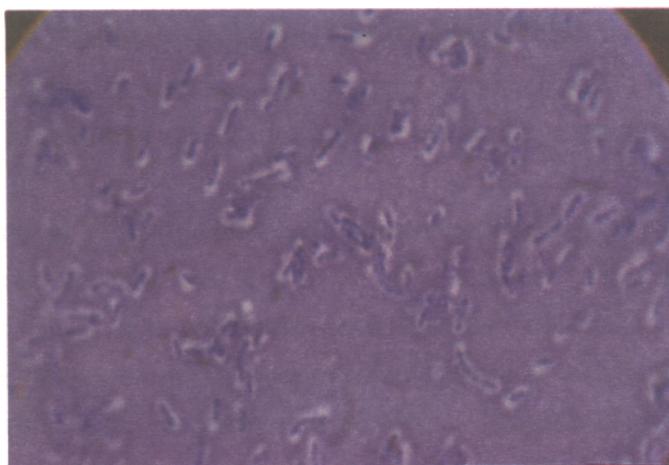


FIGURA 7.4. Cápsulas de *Rhizobium etli* coloridas com violeta cristal.

Procedimento N° 1 (Duguid, 1953)

- 1) transferir uma alça cheia de tinta preta, tipo nanquim, para uma lâmina de microscópio limpa e misturar à tinta uma alça cheia da cultura de bactérias (as bactérias crescidas em placas produzem cápsulas maiores). Cobrir apenas uma parte da mistura com uma lamínula;
- 2) exercer pressão sobre a lamínula, com o auxílio de várias folhas de papel absorvente, até o aparecimento de um fluido de cor marrom;
- 3) examinar ao microscópio com objetivas de 40X e 100X (imersão). As cápsulas aparecem como zonas claras ao redor do organismo, contra o fundo escuro.

Procedimento N° 2 (Araujo, 1993)

- 1) partindo de culturas novas, em placas, fazer suspensões celulares em água, de forma a gerar uma suspensão turva;
- 2) preparar esfregaços dessas suspensões em lâminas de microscópio limpas e fixá-los levemente ao calor;
- 3) colorir os esfregaços por 5 min, submergindo as lâminas em solução de violeta cristal da coloração de Gram (ver capítulo 2). Lavar, gentilmente, com água corrente e deixar secar ao ar;
- 4) examinar em óleo de imersão ao microscópio.

As células bacterianas adquirem a cor violeta, enquanto as cápsulas, ao seu redor, permanecem descoloridas (Figura 7.4).

7.2.6. Inclusões Celulares

Os rizóbios apresentam, em suas células, grandes inclusões de poli- β -hidroxibutirato. O método a seguir é eficiente para colorir essas inclusões, facilitando sua observação e demonstração.

Procedimento:

- 1) preparar um esfregaço da mistura, conforme descrito na seção 7.2.2, e imergir numa solução de negro-sudão a 0,3% (p/v) em etilenoglicol, filtrada. Deixar colorir por 15 min, determinando o tempo ideal experimentalmente;
- 2) drenar e deixar secar ao ar, sobre papel absorvente;
- 3) imergir e retirar a lâmina, várias vezes, em xileno, e secar sobre papel absorvente;
- 4) tratar a lâmina em água corrente, secar sobre papel absorvente, e examinar.

As inclusões de poli- β -hidroxibutirato aparecem como gotas azul-escuras, enquanto as partes citoplasmáticas do organismo adquirem uma coloração rosada.

7.2.7. Microscopia de Contraste de Fase

Quando se dispõe de um microscópio com dispositivo para contraste de fase (ver capítulo 1), pode-se empregar esse recurso para observar a morfologia celular dos rizóbios, para contagens microscópicas, etc.

Podem-se utilizar montagens a úmido, conforme descrito na seção 7.2.1. Deve-se verificar que o microscópio esteja devidamente ajustado para o contraste de fase, de acordo com as instruções do fabricante. Podem-se observar as lâminas com as objetivas de 40X a 100X (imersão). Os rizóbios aparecem como células escuras, variando de cinza a violeta, dependendo do microscópio, contra um fundo claro.

7.3. Características Fisiológicas

7.3.1. Taxa de crescimento

Uma das características mais importantes nos estudos de bactérias, sobretudo os de fisiologia e genética, é a taxa de crescimento das estirpes, ou seja, o tempo de geração nos diferentes meios de cultura empregados nas atividades de pesquisa. Essas informações servem, por exemplo, para se verificar a pureza e a estabilidade cultural das estirpes. A elaboração de curvas de crescimento e determinação dos tempos de geração foram detalhadas no capítulo 4.

7.3.2. Absorção de Corantes

As células dos rizóbios geralmente não absorvem o corante vermelho-congo quando as placas são incubadas no escuro. Essa propriedade permite que se empregue este corante em estudos que envolvam o plaqueamento de misturas de outras bactérias com os rizóbios (capítulo 2).

Após o crescimento, as colônias dos contaminantes adquirem cor vermelha forte, enquanto as dos rizóbios permanecem brancas ou levemente rosadas (ver capítulos 2 e 4). A reação depende da concentração de vermelho congo e da idade da cultura. As colônias dos rizóbios absorvem o corante se as placas forem incubadas à luz, ou se forem expostas à luz durante uma hora ou mais após ter ocorrido o crescimento. No caso de culturas muito velhas de rizóbios que acidificam o meio (ver 7.3.3), pode haver uma mudança na coloração do meio, que passa a violeta devido à acidez. Para maiores detalhes ver os capítulos 2 e 4.

7.3.3. Modificação do pH do Meio de Cultura

De uma forma bem grosseira, os rizóbios podem ser divididos em três classes quanto à reação de indicadores de pH adicionados ao meio de cultura: estirpes que acidificam o meio, estirpes que alcalinizam o meio, e estirpes que não alteram o pH do meio de cultura. As placas do meio YM adicionadas de azul de bromotimol (capítulo 2), recém-preparadas, têm um pH em torno de 6,8 e a cor verde. Os rizóbios de crescimento lento tendem a alcalinizar o meio de cultura, causando uma mudança na cor do indicador, nas placas, para azul. Os rizóbios de crescimento rápido costumam apresentar reação ácida, tornando o meio de cultura amarelo (Figura 7.5). A observação da cor do meio de cultura, nessas placas, permite a detecção rápida de contaminantes nas culturas de trabalho.

7.3.4. Crescimento em Meios Modificados

Quando não se dispõe de manitol e extrato de levedura pode-se modificar o meio de cultura básico, pois os rizóbios são capazes de utilizar carbono e nitrogênio de outras fontes. O procedimento abaixo ajuda a determinar as condições mais adequadas para o crescimento das estirpes de interesse.

- 1) preparar 1500 mL de uma solução contendo apenas os sais do meio YM (capítulo 2). Adicionar 28 g de ágar e derreter na autoclave ou em banho-maria. Dispensar o meio de cultura em volumes de 12 mL para tubos de ensaio. Esterilizar esses tubos com meio na autoclave e mantê-los derretidos em um banho-maria a 48° C;
- 2) preparar solução estoque, a 10 g/100 mL, de manitol, sacarose, arabinose e glicerol. Esterilizar a solução de arabinose por filtração e as demais na autoclave;
- 3) preparar água de levedura (capítulo 4) e solução de extrato de levedura a 0,5 g/100 mL, extrato de soja a 0,4 g/100 mL e NH₄Cl a 0,4 g/100 mL. Esterilizar na autoclave;
- 4) pipetar para dentro de placas de Petri esterilizadas, separadamente, 1,5 mL de cada uma das soluções do item 2 acima e 1,5 mL de cada uma das soluções do item 3 acima e adicionar, em cada placa, o conteúdo de um tubo com meio com ágar e sais, de forma a obter todas as 16 combinações possíveis entre fontes de carbono e de nitrogênio;
- 5) misturar imediatamente após a adição do ágar, girando as placas para incorporar as soluções ao meio. Deixar as placas assentarem durante uma noite;
- 6) inocular as placas com as culturas em teste e comparar o crescimento nos diferentes meios após três a 10 dias de incubação à temperatura apropriada.



FIGURA 7.5. Colônias de *Rhizobium tropici* CIAT899 em placas com meio YM contendo azul de bromotimol. Colônias amareladas porque absorvem o corante acidificado.

7.3.5. Resistência Intrínseca a Antibióticos

A habilidade dos rizóbios de resistir, naturalmente, a concentrações baixas de diferentes antibióticos permite a elaboração de antibiogramas para as estirpes de interesse. A resistência intrínseca aos antibióticos (RIA) pode ser empregada, em rizobiologia, para comparar e/ou caracterizar diferentes estirpes, para auxiliar a escolha de estirpes para estudos de sorologia e como marcador de estirpes empregadas em estudos ecológicos. Os resultados obtidos em diferentes laboratórios demonstram que é possível, em muitos casos, distinguir estirpes, crescendo em meio YM contendo antibióticos, por intermédio de seu crescimento diferencial. Não se deve assumir, porém, que é sempre possível distinguir entre estirpes por meio da RIA, entendendo-se que quanto maior for o número de antibióticos empregados na comparação das estirpes, maiores são as chances de observar diferenças. É importante que se padronizem as condições de ensaio, em cada laboratório, com a finalidade de se obter reprodutividade. A composição e pH do meio de cultura, as técnicas de esterilização, a temperatura do meio de cultura no momento da adição dos antibióticos, o volume de meio de cultura em cada placa, o estágio de crescimento da cultura em teste e a quantidade de inóculo são alguns dos aspectos que podem e devem ser padronizados. Um outro fator crítico é a preparação das soluções estoque de antibióticos. A seguir, são apresentadas instruções sobre como preparar soluções estoque dos antibióticos mais comumente empregados nesses estudos.

Relação de antibióticos, veículos para solução e nomes comerciais de produtos contendo o princípio ativo (produtos que podem ser encontrados em farmácias)

1) ácido nalidíxico - dissolver em água-metanol 1:1

Nomes comerciais: Betaxina, Cybis, Dixiben, Eucisten, Innoxalon, Kusnarin, Nalidicon, Nalitucsan, Narigix, NegGram, Nevigramon, Nicelate, Nogram, Poleon, Specifin, Uriben, Uriclar, Uralgin, Urodixin, Uroman, Uroneg, Uropan, Wintomylon.

2) Ampicilina - dissolver em água-etanol 1:1

Nomes comerciais: Adobacillin, Alpen, Anfipen, Ampí-Bol, Bonapicilin, Grampenil, Guicitrina, Copharcilin, Nuvapen, Synpenin, Viccillin, Ultrabion, Ampipenin, Amplisom, Ampimed, Ampí-Penyl, Totalciclina, Ampipenix s, Amblosin, Ampicin, Amplital, Austrapen, Binotal, Britacil, Doktacillin, Marisilan, Pen-Bristol, Penbritin, Penbrock, Peniciclina, Pentrex, Pentrexyl, Ponecil, Polycillin, QI Damp, Tokiocillin, Totacillin, Totapen.

3) Cloranfenicol - dissolver em água-etanol 1:1

Nomes comerciais: Aflicetyn, Amphicol, Anacetin, Aquamycetin, Austracol, Chemicetina, Chlomycol, Chloramex, Chloramphilin, Chloramsaar, Chlorasol, Chloricol, Chlorocaps, Chlorocid, Chloromycetin, Chloronitrin, Cidocetine, Ciplamycetin, Cloramficin, Cloramicol, Clorócyn, Cloromisan, Cylphenicol, Duphenicol, Embacitin, Enicol, Enteromycetin, Farmicetina, Fenicol, globenicol, Interomycetine, Intramycetin, Juvamycetin, Kamaver, Kemicetyne, Klorita, Leukomycin, Levomicetine, Levomycetin, Loromisin, Mastiphen, Medichol, Mieloretin, Micoclorina, Microcetina, Mychel, Mycinol, Novomycetin, Opclor, Pantovermil, Paraxin, Quemiketina, Ronfenil, Septicol, Sintomicetina, Sno Phenicol, Stanomycetin, Synthomycetine, Tega-Cetin, Teococin, Tifomycine, Treomicetina, Unimycetin, Veticol, Viceton.

4) Eritromicina - dissolver em água-etanol 1:1

Nomes comerciais: Erythromicin A, Abomacetin, EMU, Ery Derm, Ery-Tab, Erythrocin, Erythromast 36, Erythromid, ERYC, Erycin, Erycinum, Ilotycin, Rectin, Staticin, Torlamicina.

5) Espectinomicina - dissolver em água

Nomes comerciais: Spectan, Spectogard, Stanilo, Togamycin, Trobicin.

6) Estreptomicina (sulfato) - dissolver em água

Nomes comerciais: Agristep, Streptobrettin, Streptorex, Vetstrep.

7) Kanamicina (Sulfato) - dissolver em água

Nomes comerciais: Cantrex, Cristalomicina, Kamycin, Kamynex, Kanabristol, Kanacedin, Kanamytrex, Kanasig, Kanatrol, Kanicin, Kannasyn, Kantrex, Kantrox, Klebcil, Otokalixin, Resistomycin (Bayer), Ophthalmokalixan, Kantrexil, Kano, Kanescin, Kanaqua.

8) Neomicina (B sulfato) - dissolver em água-etanol 1:1

Nomes comerciais: Bykomycin, Fraquinol, Myacine, Neosulf, Neomix, Neobrettin, Tuttomycin.

9) Rifampicina - dissolver em água:metanol 1:1

Nomes comerciais: Rifa, Rifadin, Rifadine, Rifaldin, Rifaprodin, Rifobac, Riforal, Rifoldine, Rimactan.

10) Tetraciclina (HCl) - dissolver em água-etanol 1:1

Nomes comerciais: Achro, Achromycin V, AlaTet, Ambracyn, Artomycin, Cefracycline, Cyclopar,

Diacycline, Dumocyclin, Mephacyclin, Partrex, Quadracycline, Quatrex, Remicyclin, Ricycline, Rocyline, Stilciclina, Subamycin, Supramycin, Sustamycin, Tefilin, Teline, Telotrex, Tetrabakat, Tetrabid, Tetrablet, Tetrachel, Tetracompre, Tetra-D, Tetrakap, Tetralution, Tetramavan, Tetramycin, Tetrosol, Tetra-Wedel, Topicycline, Totomycin, Triphacyclin, Unicin, Unimycin, Vetquamycin-324.

11) Trimethoprim - dissolver em água-metanol 1:1

Nomes comerciais: Monotrim, Proloprim, Syraprim, Tiempe, Trimanyl, Trimopan, Trimplex, Wellcoprim.

Preparo e utilização de soluções de antibióticos

Os antibióticos não podem ser autoclavados, pois eles perdem sua ação. As soluções de antibióticos devem ser preparadas da seguinte forma:

- Pesar o antibiótico - na maioria das vezes são preparadas soluções estoque com a concentração de 100 mg/mL. Pesar 500 mg de antibiótico e transferir para um tubo de ensaio limpo. Adicionar 5 mL de água destilada esterilizada, ou 2,5 mL de etanol ou metanol, conforme o antibiótico, e 2,5 mL de água destilada esterilizada. Dissolver completamente.

- Filtrar a solução em filtro miliporo de 0,2 μm a 0,4 μm , dispensando o filtrado para um tubo de ensaio com tampa rosqueada previamente esterilizado. Não esquecer de anotar no tubo o nome do antibiótico, a data de preparo e a concentração.

- Armazenar as soluções de antibióticos filtradas no congelador ou freezer. Descongelar a solução antes de misturar a quantidade necessária ao meio de cultura. Todo o manuseio das soluções filtradas deve ser feito assepticamente e usando-se pipetas ou ponteiras para pipetadores previamente esterilizadas.

Procedimento:

- 1) preparar as soluções estoque de antibióticos conforme descrito;
- 2) preparar meio de cultura YM com 1,5% de ágar, esterilizar e resfriar em banho-maria para a temperatura de 45° a 55° C;
- 3) incorporar ao meio de cultura resfriado a quantidade de solução estoque de antibiótico necessária para obter as concentrações finais adequadas, que variam de acordo com o organismo em estudo; preparar, também, placas sem antibióticos para servirem de controle do crescimento;
- 4) verter exatamente 25 mL de meio de cultura para cada placa, e identificar os antibióticos e as concentrações; as placas com antibióticos devem ser preparadas 24 h a 72 h antes do uso, e não devem ter água condensada sobre a superfície do meio;
- 5) crescer as culturas das estirpes em teste em tubos de ensaio ou frascos contendo meio de cultura YM líquido, sem antibióticos, pelo tempo necessário, até atingirem o final da fase logarítmica de crescimento;

- 6) preparar mapas que indiquem a posição de cada uma das estirpes em teste nas placas com antibióticos, de forma a ser possível identificar cada estirpe nos meios com diferentes antibióticos;
- 7) transferir, com palitos de madeira ou cotonetes, esterilizados, o inóculo de cada uma das estirpes dos tubos ou frascos com meio líquido para as placas contendo os antibióticos e para as placas controle (estas devem ser as últimas da série de placas para garantir que o palito ou cotonete contenha inóculo viável até a última placa). Alternativamente, pode-se transferir um volume de inóculo conhecido (50 μ L a 100 μ L) dos frascos ou tubos de cultura para as placas, com o auxílio de uma micropipeta; em ambos os casos, pelo menos três repetições devem ser feitas;
- 8) incubar as placas inoculadas a 28° C e observar o crescimento após o tempo de incubação necessário para cada organismo.

Uma forma alternativa e menos subjetiva de se determinar a RIA dos rizóbios é através do crescimento em meio líquido contendo os antibióticos. Nesse caso, ao invés de se prepararem placas com os antibióticos, estes são incorporados ao meio líquido que é, então, dispensado em volumes de 5 mL em tubos ou frascos que são, posteriormente, inoculados com as estirpes em teste e incubados pelo tempo necessário. Devem-se incluir tubos com meio de cultura sem antibióticos como controle. O crescimento é avaliado pela medição da absorbância (densidade ótica) das culturas a 600 nm, considerando-se como resistentes aquelas culturas cuja densidade ótica for pelo menos 50% daquela observada nos tubos sem antibiótico.

7.4. Características Bioquímicas

7.4.1. Coloração de Gram

A coloração de Gram é a técnica diferencial mais importante aplicada às bactérias. Teoricamente, elas poderiam ser divididas em dois grupos: Gram-positivas e Gram-negativas; na prática, porém, há situações em que um organismo é Gram-variável. Essa técnica foi desenvolvida pelo físico dinamarquês Christian Gram em 1884. As diferenças na coloração das células se devem às diferenças nas estruturas dos envelopes celulares bacterianos.

As células das bactérias Gram-negativas são envoltas por duas membranas, a membrana citoplasmática (interna) e a membrana celular (externa). Ambas as membranas apresentam estruturas típicas de camadas duplas de lipídios e são separadas por um espaço periplásmico e por uma camada de peptidoglican, constituída de polissacarídeos e proteínas interligadas. A membrana celular é rica em lipídios e proteínas e é recoberta por uma espessa camada de lipopolissacarídeos responsáveis pelas características antigênicas desses organismos. As bactérias Gram-positivas não apresentam a membrana celular encontrada nas Gram-negativas e, em seu lugar, elas apresentam uma camada externa rígida de peptidoglican ou mureína, com uma estrutura mais complexa. As diferenças na composição da parede celular acarretam diferenças na permeabilidade das células a certas substâncias. O teste de coloração de Gram baseia-se nessas diferenças. O procedimento para a coloração de Gram está descrito no capítulo 2.

7.4.2. Outras Características Bioquímicas

Existe uma série de outras características bioquímicas que servem para a caracterização dos rizóbios, sobretudo se as estirpes de trabalho têm marcas como a produção de determinados metabólitos que podem ser identificados em meio de cultura, ou perfis característicos de proteínas celulares ou lipopolissacarídeos da parede celular. Apesar de não serem detalhadas aqui, duas técnicas são particularmente importantes: eletroforese de proteínas celulares (totais ou de frações) e eletroforese de lipopolissacarídeos em géis de poli(acrilamida). O procedimento para a corrida de géis de proteínas está detalhado no capítulo 11. Para a corrida de géis para a separação dos lipopolissacarídeos da membrana celular o seguinte procedimento pode ser utilizado:

- 1) crescer as bactérias até a fase estacionária em tubos ou frascos com meio de cultura TY líquido;
- 2) centrifugar alíquotas de 1 mL a 14.000 rpm durante 1 min;
- 3) lavar as células uma vez com 1 mL de Tris a 10 mM, pH 7,6;
- 4) ressuspender as células em 100 μ L de tampão TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8,0) e ferver por 10 min;
- 5) resfriar as suspensões obtidas para 60° C e adicionar proteinase-K dissolvida em tampão TE para obter uma concentração final de 0,2 mg/mL;
- 6) incubar a mistura a 60° C por 1 hora e centrifugar a 14.000 rpm por 1 min para precipitar o lixo celular;
- 7) determinar a concentração de KDO [ácido 2-ceto-3-deoxioctanóico (2-keto-3-deoxyoctanoic acid) nos sobrenadantes para equalizar as quantidades de KDO (e, conseqüentemente, de LPS) aplicadas a cada uma das canaletas do gel. Esta etapa tem como objetivo a obtenção de coloração mais uniforme no gel para permitir a comparação entre as espécies e quantidades de lipopolissacarídeos;
- 8) para a separação dos lipopolissacarídeos, submeter as amostras à eletroforese em géis com 12% de acrilamida, a uma intensidade de 10 mA;
- 9) após a corrida, colorir os géis com nitrato de prata para revelar os lipopolissacarídeos.

Método para quantificar KDO

O ácido 2-ceto-3-deoxioctanóico (KDO) é um importante indicador da presença de lipopolissacarídeos, pois é um açúcar característico daquelas moléculas. A quantificação dos lipopolissacarídeos de uma amostra pode ser realizada, indiretamente, medindo-se a quantidade de KDO.

Procedimento (cuidado, usar luvas e avental protetor):

- 1) preparar os reagentes;
periodato - dissolver ácido periódico (HIO_4) em solução de H_2SO_4 , a 0,125 N, de modo a obter uma concentração final de 0,025 N;

ácido sulfúrico diluído - diluir H_2SO_4 em água destilada para uma concentração final de 0,02N;
arsenito de sódio - 0,2 N de arsenito de sódio dissolvido em 0,5 N HCl (CUIDADO: o arsenito de sódio é venenoso; não inalar a poeira, lavar bem as mãos após o uso e não pipetar o reagente com a boca);

ácido tiobarbitúrico - dissolver 0,3% de ácido tiobarbitúrico em água e ajustar o pH para 2,0;

- 2) misturar cerca de 100 μ L de material contendo LPS (fazer diluições dos extratos) com 100 μ L de H_2SO_4 a 0,02 N e aquecer a 100° C para liberar o KDO do LPS;
- 3) ajustar o volume para 200 μ L com H_2SO_4 a 0,02 N. Adicionar 250 μ L de periodato, misturar e deixar repousar à temperatura ambiente por 20 min;
- 4) adicionar 500 μ L da solução de arsenito de sódio e incubar, à temperatura ambiente, por 2 min;
- 5) adicionar 2mL da solução de ácido tiobarbitúrico, misturar e aquecer a 100°C por 20 min. Após esse tratamento, deverá aparecer uma coloração rosada nos tubos;
- 6) deixar esfriar e ler a absorbância a 548 nm;
- 7) determinar a concentração de KDO por interpolação dos resultados das amostras em uma curva padrão elaborada pelo mesmo procedimento, a partir de soluções puras de KDO contendo de 0 mg a 100 mg/mL. Caso as leituras das amostras caiam fora da curva padrão, fazer novas diluições dos extratos até obter leitura dentro da curva.

7.5. Considerações Finais

O trabalho diário com os rizóbios exige que os laboratoristas e pesquisadores sejam capazes de reconhecer e identificar determinadas estirpes com freqüência. A existência de métodos que permitam essa identificação de forma rápida é um grande auxílio no sentido de se economizar o tempo que seria consumido na identificação mais criteriosa dos organismos. A maior parte das técnicas descritas neste capítulo é empregada todos os dias nos laboratórios de rizobiologia, agilizando muito os trabalhos. Não existe uma receita de bolo sobre quais os procedimentos mais adequados para cada situação, ou sobre as combinações de procedimentos que facilitem a identificação dos organismos. Cabe ao microbiologista avaliar e escolher quais procedimentos se adaptam mais às suas condições de trabalho.

7.6. Referências Bibliográficas

- ARAUJO, R.S. **Mutational analysis of the cell surface and nodulation competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli***. Madison: University of Wisconsin, 1993. 118p. (Tese de Doutorado).
- DUGUID, J.P. The demonstration of bacterial capsules and slime. **J. Pathol. Bacteriol.**, v.63, p.673-685, 1953.

Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária
 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA
Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão - CNPAF
Centro Nacional de Pesquisa de Soja - CNPSo

MANUAL DE MÉTODOS EMPREGADOS EM ESTUDOS DE MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA

Editores:

Mariangela Hungria

Ricardo S. Araujo

EMBRAPA
Serviço de Produção de Informação
Brasília, DF
1994