



XXXIII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo

Solos nos biomas brasileiros: sustentabilidade e mudanças climáticas
31 de julho à 05 de agosto - Center Convention - Uberlândia/Minas Gerais

AMPLIAÇÃO DA DIVERSIDADE CULTIVÁVEL DE BACTÉRIAS DO SOLO PELO USO DE TÉCNICAS SIMPLES DE CULTIVO

Ana Carolina de Souza Cavalcante⁽¹⁾; Érika Cristina Teixeira dos Anjos⁽²⁾; Marcelo Ferreira Fernandes⁽³⁾

⁽¹⁾ Mestranda; Núcleo de Pós-Graduação em Biotecnologia; Universidade Federal de Sergipe; Av. Marechal Rondon, s/n, Bairro Jardim Rosa Elze, São Cristóvão – SE, CEP: 49100-000; acsc.carol@hotmail.com; ⁽²⁾ Bolsista DCR; Laboratório de Microbiologia do Solo; Embrapa Tabuleiros Costeiros; Av. Beira Mar, 3250; Aracaju; SE; 49025-040; ericaanjos@yahoo.com.br; ⁽³⁾ Pesquisador; Laboratório de Microbiologia do Solo; Embrapa Tabuleiros Costeiros; Av. Beira Mar, 3250; Aracaju; SE; 49025-040; marcelo@cpac.embrapa.br.

Resumo – Os solos são habitados por uma grande variedade de bactérias pertencentes a grupos filogenéticos raramente ou ainda não cultivados, os quais podem apresentar grande potencial biotecnológico. Modificações simples dos métodos de cultivo tradicionais para isolamento e meios de cultura apresentam potencial para incrementar a diversidade cultivada de bactérias do solo. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de meios de cultivo, agentes solidificantes, métodos de plaqueamento, períodos de incubação e tamanho do inóculo sobre o surgimento de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias do solo. Amostras de solo sob cultivo agrícola e floresta foram inoculadas de acordo com os diferentes tratamentos, sendo as placas incubadas por 10 semanas, a 30°C. O número de colônias (NC) surgidas a cada intervalo semanal foi determinado. Os dados de NC foram analisados pela técnica de regressão em árvore univariada utilizando-se a biblioteca de acesso público *treesplus*, no programa S-PLUS. Observou-se o crescimento de uma maior quantidade de bactérias no método de espalhamento em superfície e com uso de inóculos mais diluídos. Maiores velocidades de surgimento de colônias são verificadas durante as duas primeiras semanas de incubação. Meios de cultura menos concentrados favorecem isolamento de bactérias de crescimento lento, o contrário sendo verdadeiro para os meios mais concentrados. O uso de meios de cultura oligotróficos, inóculos mais diluídos e períodos de incubação prolongados permite a recuperação de maior proporção de bactérias tardias, as quais devem ser constituídas em grande proporção por espécies ainda pouco conhecidas ou até então não-cultivadas.

Palavras-Chave: viável não-cultivável, meios de cultura, agente solidificante.

INTRODUÇÃO

O cultivo e enumeração das populações bacterianas presentes no solo é um dos maiores desafios para os microbiologistas do solo há mais de um século. Apenas 1 – 10% das espécies bacterianas do solo são obtidas por meio de técnicas de plaqueamento. Tais métodos oferecem um ambiente artificial em laboratório com meios de cultura que diferem do hábitat natural desses

microrganismos, não fornecendo as condições necessárias para o surgimento de colônias e resultando na perda de muitas células viáveis. Dessa maneira, a maioria das bactérias é referida como não-cultiváveis (Vartoukian et al., 2010). Essa limitação tem dificultado a compreensão da diversidade de espécies presentes no solo, assim como da fisiologia, da genética bacteriana, do papel que exercem no ecossistema e do potencial biotecnológico que não está sendo totalmente explorado.

Um dos fatores associados à “não culturabilidade” é o tempo restrito de incubação. É reconhecido que o aumento desse período resulta numa maior contagem de viáveis, principalmente em meios com baixas concentrações de nutrientes (Davis et al., 2005; Zengler et al., 2002). Períodos de incubação prolongados, na ordem de meses, são importantes para a obtenção de novos isolados (Janssen et al., 2002).

Outros fatores determinantes da culturabilidade são as condições físico-químicas do meio de cultura, as quais podem ser modificadas de modo a tornarem-se mais similares à dos habitats naturais e potencializar o crescimento de diferentes organismos. Dentre estas modificações citam-se o pH que se aproxime ao do solo de interesse (Sait et al., 2006), ambientes com menores concentrações de oxigênio requeridos por bactérias microaerófilas (Hara et al., 2009), diminuição nas concentrações de substratos orgânicos ou inorgânicos para aqueles que apresentam crescimento lento, como no caso de algumas bactérias oligotróficas (Zengler et al., 2002) e requerimento de nutrientes específicos, como a disponibilização de várias fontes de carbono. Além disso, o próprio ágar, frequentemente utilizado como agente solidificante, demonstra desvantagens relacionadas às suas propriedades físicas quando comparado a goma gelana, a qual oferece um meio de cultura altamente límpido, facilitando a observação de colônias menores do que 1 mm. Evidências apontam que o uso de goma gelana propicia uma maior interação entre as populações microbianas com troca de sinais químicos (Davis et al., 2005; Hara et al., 2009), a qual pode ser essencial ao crescimento de alguns organismos.

Essa limitação tem sido parcialmente superada com o uso de técnicas ecológicas moleculares, as quais têm permitido a investigação de comunidades microbianas do solo por métodos independentes de cultivo. Estudos

relacionados a análises comparativas de genes do RNAr 16S revelaram a presença de muitos novos grupos de bactérias ainda não cultivados por métodos de plaqueamento. Vários desses grupos são bastante abundantes em variados tipos de ambientes e devem exercer uma relevante importância ecológica, no entanto raramente são cultivados (Joseth et al. 2003).

Técnicas novas e mais sofisticadas estão sendo desenvolvidas e utilizadas para obter novos isolados em ambientes microbianos complexos na tentativa de se conhecer melhor a diversidade destas bactérias. Tais métodos incluem o uso de micromanipuladores e pinças ópticas (Fröhlich & König, 2000), a construção de ambientes naturais simulados (Kaeberlein et al., 2002), células encapsuladas em microgotas de gel (Zengler et al., 2002) e uso de chips de isolamento (Nichols et al., 2010). São métodos especializados, alguns de alto custo e improváveis de serem adotados, no curto prazo, pela maioria dos pesquisadores. Surge, então, a necessidade de desenvolver técnicas mais simples para a investigação dessas bactérias raramente ou ainda não isoladas. O cultivo a partir de métodos mais acessíveis à maioria dos pesquisadores contribui para o avanço científico na área da microbiologia. Além disso, estudos paralelos com culturas puras em laboratório seria um complemento bastante significativo para a investigação do potencial biotecnológico destes novos organismos. Representantes raramente isolados pertencentes ao filo *Actinobacteria*, o qual ocorre predominantemente nos solos e possui vários membros com provável potencial de produzir substâncias utilizadas para fabricação de antibióticos, foram obtidos em estudos recentes por meio de técnicas de cultivo modificadas (Joseph et al., 2003). A obtenção de isolados dessas bactérias possibilita o estudo relacionado à produção de novos antibióticos, contribuindo tanto para ampliar a base de recursos genéticos para exploração biotecnológica quanto para o melhor entendimento de suas funções no ecossistema.

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de diferentes condições de cultivo (meios de cultivos com concentrações variáveis, diferentes agentes solidificantes, métodos de plaqueamento, períodos de incubação prolongados e variações no tamanho do inóculos) sobre a recuperação de bactérias cultivadas do solo.

MATERIAL E MÉTODOS

Tratamentos e amostragem:

Amostras de solo utilizadas nos isolamentos foram coletadas em áreas sob cultivo de milho e sob um fragmento de Mata Atlântica do Campo Experimental de Umbaúba da Embrapa Tabuleiros Costeiros (Umbaúba, Sergipe). Para estas amostragens, um trado tipo Uhland, com anéis tripartidos de 10 cm de altura foi utilizado, inserindo-se os anéis previamente desinfetados com etanol 70% a 10 cm de profundidade. As amostras foram embaladas em papel alumínio, transportadas de forma intacta à temperatura ambiente e dentro de sacolas plásticas. Foram

utilizados os dois centímetros intermediários da amostra de solo indeformada. Imediatamente antes dos procedimentos para isolamento das bactérias, o solo foi peneirado em peneiras de malha com abertura de 2 mm de diâmetro.

Cultivo e isolamento:

Foram utilizados 25 g de solo em 100 ml do diluente (NaCl 0,85%) contendo 20 g de contas de vidro com 4 mm de diâmetro. Os frascos foram agitadas durante 30 min a 160 rpm para extração das bactérias contidas nos agregados de solo. Diluições seriadas foram realizadas até obter as concentrações de 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} , as quais foram utilizadas para inoculação. O meio utilizado para cultivo foi ágar nutritivo em três concentrações diferentes (sem diluição, diluído 1:10 e 1:100) contendo, na composição original, 5 g de peptona, 1,5 g de extrato de carne, 1,5 g de extrato de levedura e 16 g de ágar bacteriológico ou 18 g de gelana (Phytigel, Sigma) para 1000 ml de água destilada. O pH foi ajustado para 6,0, conforme o pH dos solos estudados. Dois métodos para plaqueamento foram utilizados, o de espalhamento em superfície e em placa derramada ('pour-plate'). No método de espalhamento em superfície, inóculos de 100 μ l das diluições 10^{-6} ou 10^{-7} foram utilizados, os quais foram espalhados na superfície das placas contendo aproximadamente 30 ml do meio de cultura sólido com alça de Drigalski. No método da placa derramada ('pour-plate'), 1 ml das diluições 10^{-6} ou 10^{-7} foi utilizado como inóculo. Posteriormente, as placas foram incubadas à temperatura de 30°C por um período de três meses. Foram feitas contagens semanais das colônias surgidas durante todo o período de incubação. Colônias foram selecionadas aleatoriamente após o período de quatro e doze semanas para obtenção de culturas puras para posterior identificação por sequenciamento do DNAr 16S. As bactérias obtidas em cultura pura estão preservadas em óleo mineral a 4°C e em glicerol a -20°C e -80°C. A culturabilidade nas diferentes condições testadas foi definida como o número de unidades formadoras de colônias (UFCs) viáveis g^{-1} solo, surgidas por semana, durante o período de incubação.

Análise estatística

Os fatores associados à culturabilidade foram definidos por modelos de regressão em árvore (De'ath e Fabricius, 2000) utilizando-se uma biblioteca treesplus, de domínio público, instalada no pacote estatístico S-Plus (v. 4.0). Esta análise utilizou os dados de UFCs g^{-1} solo surgidas por semana como variável resposta e os fatores (método de plaqueamento, diluição, período de incubação, agente solidificante, tipo de solo e meio de cultura) como variáveis explanatórias.

Os fatores estabelecidos para análise foram:

- 1) plaqueamento (PLAC), em pour plate (PP) e placa espalhada (PE);
- 2) diluição do inóculo (DIL), 10^{-5} (D5) e 10^{-6} (D6) para o método da placa espalhada e 10^{-6} (D6) e 10^{-7} (D7) para o método da placa derramada;
- 3) período (PER), precoce surgimento em até 2ª semanas (PREC), intermediário da 3ª a 6ª semana (INT) e tardio da 7ª a 10ª semana (TARD);
- 4) agente solidificante, ágar (A) e gelana (G);
- 5) tipo de solo, agrícola (SA) e de floresta (SF);

6) meio de cultura (MEIO), sem diluição (AN1), diluído 10 vezes (AN2) e diluído 100 vezes (AN3).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que a diluição do inóculo foi o fator mais determinante da culturabilidade das bactérias (Figura 1). Inicialmente, dois grupos de amostras (ramos da árvore) foram verificados, um contendo as diluições (D5, D6), o qual apresentou valor médio de $0,53 \text{ UFC g}^{-1}$ solo semana⁻¹, e outro, composto pelas amostras (D7), com valor de 2,88 para esta variável. Esta maior culturabilidade em D7 provavelmente ocorreu em função da menor inibição ou sobreposição do crescimento de espécies de crescimento lento pelas de crescimento rápido nas placas com inóculo reduzido. A inibição da culturabilidade pode estar associada a fatores como o esgotamento de nutrientes, produção de inibidores ou alteração das condições do meio (e.g. pH), os quais devem ser mais intensos em placas com alta densidade de inóculo inicial (Davis et al., 2005). Em ambos os ramos, observou-se maior probabilidade de aparecimento de UFCs no período precoce. É bastante conhecida a tendência de alguns microrganismos apresentarem rápido crescimento populacional como estratégia de sobrevivência diminuindo, inicialmente, a pressão da competição interespecífica. Este fato é conhecido dentre aqueles microrganismos classificados como estrategistas 'r'. Atribuímos tal característica às colônias que surgiram no período precoce.

Nos ramos D5 e D6, não houve nenhum fator adicional relevante associado ao surgimento de colônias nos períodos de incubação INT e TARD. Já no período precoce há maior tendência para o surgimento de colônias no método PE ($2,15 \text{ UFC g}^{-1}$ solo semana⁻¹) em relação à PP (média de $0,63 \text{ UFC g}^{-1}$ solo semana⁻¹). Tais métodos diferem quanto à acessibilidade de O_2 às bactérias. Deste modo, concluímos que a maior parte dos organismos cultiváveis no período precoce deve ter preferência por ambientes com maiores pressões de oxigênio. No entanto, o estudo com métodos que ofereçam variações dessa condição, como o da placa derramada ('pour-plate'), permitiria a exploração de maior diversidade de espécies, visto que muitas bactérias requerem condições de baixas pressões de oxigênio, como as microaerófilas, representadas, por exemplo, por ampla gama de espécies de bactérias diazotróficas, de potencial biotecnológico para culturas de importância econômica (Hara et al., 2009).

Nas amostras D7, observou-se maior surgimento de UFC g^{-1} solo semana⁻¹ no período PREC. Neste período ocorreu uma distinção entre o meio mais diluído (AN3), no qual foram obtidas em média $3,69 \text{ UFC g}^{-1}$ solo semana⁻¹, e os menos diluídos (AN1 e AN2), com valor médio correspondente de 8,73. Tal fato é compatível com a ideia de que bactérias que crescem rapidamente requerem ambientes com maior concentração de nutrientes. Podemos observar ainda que o solo A (agrícola) apresenta uma maior contagem de UFC média em comparação ao solo F (floresta). Inferimos que solos sob ambientes mais estáveis

apresentem comunidades microbianas com maior complexidade de interações interespecíficas, as quais são de difícil reprodução em um meio de cultura artificial de laboratório.

Nos períodos INT e TARD, os meios mais diluídos são preponderantes em recuperar bactérias em relação ao meio AN1, sem diluição.

Não foi observado efeito dos agentes solidificantes.

Em síntese, observou-se que o uso de meios de cultura oligotróficos, inóculos mais diluídos e períodos de incubação prolongados permitiu a recuperação de maior proporção de bactérias tardias, as quais devem ser constituídas em grande proporção por espécies ainda pouco conhecidas ou até então não-cultivadas. Em etapa posterior deste trabalho, a identificação dos isolados obtidos será realizada pelo sequenciamento do DNAr 16S. Por meio da comparação destas sequências com bases de dados de DNAr 16S será possível detectar quais isolados correspondem a espécies ainda não cultivadas. Estes resultados permitirão selecionar condições de cultivo simples adequadas para incrementar probabilidade de obtenção de novos taxa bacterianos do solo.

CONCLUSÕES

1. Métodos de cultivo simples permitem recuperar bactérias com diferentes características morfológicas, em períodos de incubação prolongados, na ordem de meses;

2. Inóculos mais diluídos (10^{-7} vezes) e meios de cultura com baixas concentrações de nutrientes facilitam o isolamento de um maior número de bactérias tardias aumentando as chances de obter representantes pertencentes a filos com poucos ou nenhuns isolados em cultura pura;

3. O surgimento de bactérias no período precoce ocorre principalmente no método de plaqueamento em superfície;

4. Em solos agrícolas obtem-se maior número de UFC g^{-1} solo quando comparados aos solos com influência de florestas;

5. Meios de cultivo mais concentrados favorecem o isolamento de bactérias de surgimento rápido; ao contrário, meios mais diluídos aumentam a probabilidade de recuperação de bactérias de crescimento lento.

REFERÊNCIAS

- DAVIS, K.; JOSEPH, S.J.; JANSSEN, P.H. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 2, p. 826 – 834, 2005.
- DE'ATH, G.; FABRICIUS, K.E. Classification and regression trees: a powerful yet simple technique for ecological data analysis. *Ecology*, v. 81, p. 3178 – 3192, 2000.
- FRÖHLICH, J.; KÖNIG, H. New techniques for isolation of single prokaryotic cells. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 24, p. 567 – 572, 2000.
- HARA, S.; HASHIDOKO, Y.; DESYATKIN, R.V.; HATANO, R.; TAHARA, S.; High Rate of N_2 Fixation by East Siberian Cryophilic Soil Bacteria as Determined by Measuring Acetylene Reduction in Nitrogen-Poor Medium Solidified with Gellan Gum. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 9, p. 2811 – 2819, 2009.
- JANSSEN, P.H.; YATES, P.S.; GRINTON, B.E.; TAYLOR, P.M.; SAIT, M. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e

Verrucomicrobia. Applied and Environmental Microbiology, v. 68, n. 5, p. 2391 – 2396, 2002.

JOSEPH, S.J.; HUGENHOLTZ, P.; SANGWAN, P.; OSBORNE, C.A.; JANSSEN, P.H. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. Applied and Environmental Microbiology, v. 69, n. 12, p. 7210 – 7215, 2003.

KAEBERLEIN, T.; LEWIS, K.; EPSTEIN, S.S. Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environmental. Science, v. 296, n. 5570, p. 1127 – 1129, 2002.

NICHOLS, D.; CAHOON, N.; TRAKHTENBERG, E.M.; PHAM, L.; MEHTA, A.; BELANGER, A.; KANIGAN, T.; LEWIS, K.; EPSTEIN, S.S. Use of Ichip for highthroughput in situ cultivation of “uncultivable” microbial species. Applied and Environmental Microbiology, v. 76, n. 8, p. 2445 – 2450, 2010.

SAIT, M.; DAVIS, K.E.R.; JANSSEN, P.H. Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum *Acidobacteria* occurring in soil. Applied and Environmental Microbiology, v. 72, n. 3, p. 1852 – 1857, 2006.

VARTOUKIAN, S.R.; PALMER, R.M.; WADE, W.G. Strategies for culture of ‘unculturable’ bacteria. FEMS Microbiology Letters, v. 309, p. 1 – 7, 2010.

ZENGLER, K.; TOLEDO, G.; RAPPE, M.; ELKINS, J.; MATHUR, E.J.; SHORT, J.M.; KELLER, M. Cultivating the uncultured. Proceedings of the National Academy of Science, v. 99, p. 15681 – 15686, 2002.

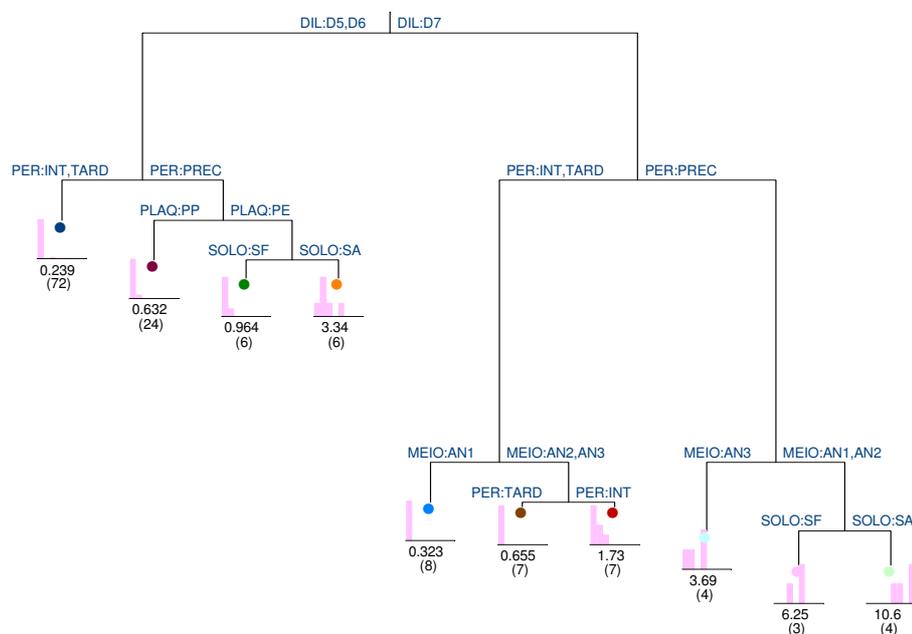


Figura 1. Fatores de cultivo associados à taxa de surgimento de colônias por grama de solo ($\text{UFC g}^{-1} \text{ solo semana}^{-1}$) de acordo com um modelo de regressão univariada em árvore. Valores na extremidade dos nós terminais da árvore correspondem à média de $\text{UFC g}^{-1} \text{ solo semana}^{-1}$ em cada condição descrita pelas bifurcações nos nós intermediários. Valores entre parênteses representam o número de amostras incluídas em cada nó terminal. O modelo obtido explicou 80% da variabilidade dos dados de $\text{UFC g}^{-1} \text{ solo semana}^{-1}$. O modelo selecionado corresponde á árvore modal de menor erro relativo após procedimento de reamostragem de 20 subconjuntos com 90% dos dados totais avaliados (“bootstrap”). Legendas dos fatores de cultivo e seus respectivos níveis: DIL: diluição do inoculo (D5, D6 e D7 correspondem às diluições de 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} do solo); PER: período de incubação (PREC, INT, TARD) correspondem a precoce (0 a 2 semanas), intermediário (3 a 6 semanas) e tardio (7 a 10 semanas); PLAQ: método de plaqueamento (PP, PE) correspondem a pour plate e placa espalhada; SOLO: (SA, SF) correspondem a solo agrícola e solo de floresta; MEIO: meio de cultura (AN1, AN2, AN3) correspondem a ágar nutritivo sem diluição, diluído 10 vezes e diluído 100 vezes.