



FERTBIO 2012

A responsabilidade socioambiental da pesquisa agrícola
17 a 21 de Setembro - Centro de Convenções - Maceió/Alagoas

Alternativas de Cultivo para Incremento da Contagem Viável de Bactérias do Solo

Ana Carolina de Souza Cavalcante⁽¹⁾; Érika Cristina Teixeira dos Anjos⁽²⁾; Eliane Aparecida Gomes⁽³⁾; Marcelo Ferreira Fernandes⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Bolsista DTI; Laboratório de Microbiologia do Solo; Embrapa Tabuleiros Costeiros; Av. Beira Mar, 3250; Aracaju; SE; 49025-040; acsc.carol@hotmail.com; ⁽²⁾ Bolsista DCR; Laboratório de Microbiologia do Solo; Embrapa Tabuleiros Costeiros; Av. Beira Mar, 3250; Aracaju; SE; 49025-040; erikaanjos@yahoo.com.br; ⁽³⁾ Pesquisadora, Laboratório de Microbiologia; Embrapa Milho e Sorgo; Rodovia MG 424, KM 45, Sete Lagoas, MG; 35701-970; eliane@cnpmc.embrapa.br; ⁽⁴⁾ Pesquisador; Laboratório de Microbiologia do Solo; Embrapa Tabuleiros Costeiros; Av. Beira Mar, 3250; Aracaju; SE; 49025-040; marcelo@cpatc.embrapa.br.

RESUMO – Os solos contêm uma variedade de bactérias pertencentes a grupos filogenéticos raramente ou ainda não-cultivados podendo apresentar grande potencial biotecnológico. Modificações simples nos métodos de cultivo tradicionais, os quais não são eficientes para recuperação da maioria das bactérias, podem aumentar a diversidade cultivada destes micro-organismos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes meios de cultura diluídos, 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. Extratos de amostras de solo sob cultivo agrícola e florestal foram inoculados com os diferentes tratamentos, sendo as placas incubadas por 10 semanas, a 30°C. Durante este período, o número de colônias (NC) surgidas a cada intervalo semanal foi determinado. Os dados referentes aos NC foram analisados pela técnica de regressão em árvore univariada utilizando-se a biblioteca de acesso público *treesplus*, no programa S-PLUS. Reduções no tamanho do inóculo, meios mais nutritivos e a substituição do ágar pela gelatina aumentaram a recuperação de bactérias do solo durante o período de incubação avaliado.

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

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 habitat 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 gelatina, 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 gelatina propicia uma maior interação entre as populações microbianas com troca de sinais químicos, a qual pode ser essencial ao crescimento de alguns organismos (Davis et al., 2005; Hara et al., 2009).

Investigações de comunidades microbianas com o uso de técnicas moleculares, como 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 diversos ambientes e devem exercer uma relevante importância ecológica (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 e 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. O desenvolvimento de técnicas mais simples e acessíveis à maioria dos pesquisadores para a investigação dessas bactérias raramente ou ainda não isoladas 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.

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 inóculo) 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 Uhlund, com anéis tripartidos de 10 cm de altura foi utilizado, inserindo-se os anéis previamente desinfetados 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} a 10^{-7} , as quais foram utilizadas para inoculação. Dois meios base foram utilizados para cultivo: O VL55 de acordo com Sait et al. (2002) e o ágar nutritivo em quatro concentrações diferentes (sem diluição – AN1, diluído 1:10 – AN2, 1:100 – AN3 e 1:1000 – AN4) contendo, na composição original peptona (5 g L⁻¹), extrato de carne (1.5 g L⁻¹), extrato de levedura (1.5 g L⁻¹) e ágar bacteriológico (16 g L⁻¹) ou gelana (Phytigel, Sigma) (18 g L⁻¹). O pH dos meios foram ajustados para 5.5 e 6.0 respectivamente. 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 µl foram utilizados, os quais foram espalhados com alça de Drigalski sobre as placas contendo aproximadamente 30 ml do meio de cultura sólido. No método da placa derramada ('pour-plate'), 100 µl das diluições foram depositados na placa sendo posteriormente o meio foi vertido e misturado ao inóculo. 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 e posterior identificação pelo 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.

Análise estatística

Os fatores associados à culturabilidade foram definidos por modelos de regressão em árvore (De'Ath e Fabricius, 2000). Para esta análise, os dados de UFCs g⁻¹ de solo após 12 semanas de incubação foram modelados em função dos fatores método de plaqueamento (PP e PE), diluição do inóculo (10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}), agente solidificante (ágar ou gelana), tipo de solo (agrícola ou floresta) e meio de cultura (AN1, AN2, AN3, AN4 e VL55).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito dos fatores de cultivo

O primeiro fator explanatório foi o tipo de meio de cultura, com os meios mais diluídos (AN4 e VL55) apresentando uma média de contagem ($2,80 \times 10^7$ UFC g⁻¹ solo) inferior à observada nos três meios mais concentrados ($9,16 \times 10^7$ UFC g⁻¹ solo) diferindo dos resultados obtidos por Davis et al. (2005), onde os meios com baixas concentrações de nutrientes, como o VL55, resultaram no maior número de colônias após 12 semanas de incubação. No ramo AN4 e VL, foi possível observar que o uso de gelana como agente solidificante foi mais eficiente na contagem de viáveis ($3,93 \times 10^7$ UFC g⁻¹ solo) que o ágar ($1,66 \times 10^7$ UFC g⁻¹ solo). Vantagens quanto as propriedades físicas da gelana, como propiciar um meio de cultura altamente transparente facilitando a observação de colônias menores que 1 mm, são mencionadas contribuindo com o aumento na contagem de UFC (Janssen et al., 2002; Davis et al., 2005; Tamaki et al., 2005).

Dentre os meios AN1, AN2 e AN3, as diluições de 10^{-7} foram superiores ($2,01 \times 10^8$ UFC g⁻¹ solo) na contagem quando comparados às diluições 10^{-5} e 10^{-6} ($5,51 \times 10^7$ UFC g⁻¹ solo). Uma nova partição em função do tamanho do inóculo foi observada entre as diluições 10^{-5} e 10^{-6} , com médias de $1,51 \times 10^7$ e $7,52 \times 10^7$ UFC g⁻¹ solo, respectivamente, confirmando a relação direta entre diluição do inóculo e recuperação de colônias nos meios AN1, AN2 e AN3. O aumento da diluição favorece uma maior culturabilidade em função da menor competição entre espécies. Fatores como o esgotamento de nutrientes, produção de inibidores ou alteração das condições do meio (como pH), devem ser mais intensos em placas com

alta densidade de inóculo inicial (Davis et al., 2005).

O solo agrícola apresentou maior contagem de colônias que o florestal. Na diluição 10^{-6} , as médias para os solos agrícola e florestal foram de $1,07 \times 10^8$ e $4,31 \times 10^7$ UFC g^{-1} solo, respectivamente; na diluição 10^{-7} , os valores correspondentes foram de $2,55 \times 10^8$ e $1,47 \times 10^8$ UFC g^{-1} solo. A maior resistência no cultivo de bactérias do solo florestal provavelmente se dá devido à manutenção da comunidade microbiana, a qual é mais dependente de interações interespecíficas complexas entre micro-organismos e entre estes e plantas e animais.

Uma contagem superior foi observada no AN1 ($9,42 \times 10^7$ UFC g^{-1} solo), comparativamente aos meios AN2 e AN3 (média entre as amostras dos dois meios de $1,76 \times 10^7$ UFC g^{-1} solo), na diluição 10^{-6} do solo de floresta. Observou-se ainda que o método de PE resultou em maior número de UFC g^{-1} de solo que o método de PP ($1,34 \times 10^8$ e $8,08 \times 10^7$, respectivamente). O método do PP oferece um ambiente com menor disponibilidade de O_2 , ao contrário da PE.

A gelana ainda apresentou resultados superiores ao ágar em termos de contagem de viáveis para os meios AN1, AN2 e AN3 na diluição 10^{-7} , independentemente do solo e do método de plaqueamento, e na diluição 10^{-6} , para o solo agrícola plaqueado por PE.

CONCLUSÕES - Reduções no tamanho do inóculo, meios mais nutritivos e a substituição do ágar pela gelana promovem expressivo aumento na recuperação de bactérias do solo.

REFERÊNCIAS

DAVIS, K.E.R.; JOSEPH, S.J.; JANSSEN, P.H. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 71:826-834, 2005.

DE'ATH, G., FABRICIUS, K.E. Classification and regression trees: a powerful yet simple technique for ecological data analysis. **Ecology** 81:3178-3192, 2000.

FRÖHLICH, J.; KÖNIG, H. New techniques for isolation of single prokaryotic cells. **FEMS Microbiol. Rev.** 24:567-572, 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. **Appl. Environ. Microbiol.** 75:2811-2819, 2009.

JANSSEN, P.H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Appl. Environ. Microbiol.** 72:1719-1728, 2006.

JOSEPH, S.J.; HUGENHOLTZ, P.; SANGWAN, P.; OSBORNE, C.A.; JANSSEN, P.H. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 69:7210-7215, 2003.

KAEBERLEIN, T.; LEWIS, K.; EPSTEIN, S.S. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. **Science** 296:1127-1129, 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 high-throughput *in situ* cultivation of "uncultivable" microbial species. **Appl. Environ. Microbiol.** 76:2445-2450, 2010.

SAIT, M.; HUGENHOLTZ, P.; JANSSEN, P.H. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. **Environ. Microbiol.** 4:654-666, 2002.

TAMAKI, H.; SEKIGUCHI, Y.; HANADA, S.; NAKAMURA, K.; NOMURA, N.; MATSUMURA, M.; KAMAGATA, Y. Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. **Appl. Environ. Microbiol.** 71:2162-2169, 2005.

VARTOUKIAN, S.R.; PALMER, R.M.; WADE, W.G. Strategies for culture of 'uncultivable' bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.** 309:1-7, 2010.

ZENGLER, K.; TOLEDO, G.; RAPPÉ, M.; ELKINS, J.; MATHUR, E. J.; SHORT, J. M.; KELLER, M. Cultivating the uncultured. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 99:15681-15686, 2002.

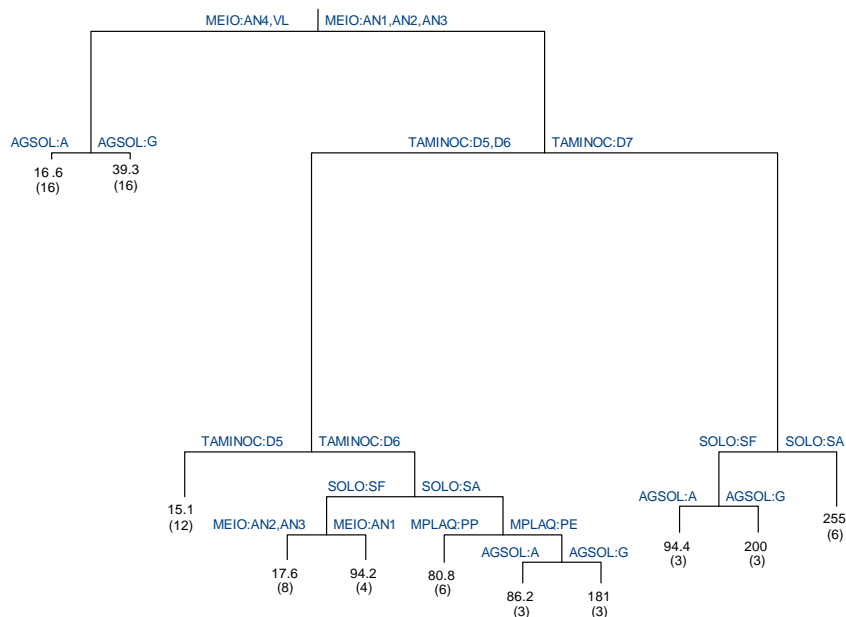


Figura 1 - Fatores de cultivo associados à contagem de células viáveis após 12 semanas de incubação de amostras de solo, de acordo com um modelo de regressão em árvore. Os fatores selecionados pelo modelo incluíram meio de cultura (MEIO), agente solidificante (AG SOL), tamanho de inoculo (TAMINOC), método de plaqueamento (MPLAQ) e tipo de solo (SOLO). Os meios de cultura avaliados foram ágar nutriente sem diluição (AN1), diluído 10 vezes (AN2), 100 vezes (AN3) e 1000 vezes (AN4) e o meio VL55 (VL); os agentes solidificantes, ágar (A) e gelana (G); os métodos de plaqueamento, pour-plate (PP) e placa espalhada (PE); o tamanho do inoculo, as diluições 10^{-6} (D6) e 10^{-7} (D7); e os tipos de solo, agrícola (SA) e florestal (SF). Os valores apresentados em cada nó terminal representam a média de UFC g^{-1} de solo/ 10^6 em cada uma das combinações de cultivo selecionadas pelo modelo. Os números entre parênteses indicam o número de amostras em cada uma destas combinações. Os histogramas abaixo dos nós terminais indicam a distribuição das amostras quanto ao número de UFC g^{-1} solo. Os nós intermediários indicam o fator e as respectivas classes ou valores associados mais importantes para a explicação da variável resposta. O comprimento dos ramos verticais das árvores é proporcional ao grau de explicação da variabilidade dos dados conferido pelo fator incluído na partição anterior. O tamanho da árvore foi selecionado de acordo com o erro relativo mínimo estimado de acordo com processo de auto-validação do modelo.