

Ampliação da Diversidade de Bactérias Cultiváveis do Solo pelo Uso de Técnicas Simples de Cultivo

Ana Carolina de Souza Cavalcante¹; Érika Cristina Teixeira dos Anjos²; Marcelo Ferreira Fernandes³

Resumo

Os solos contêm bactérias de grupos filogenéticos raramente ou ainda não-cultivados, os quais podem apresentar grande potencial biotecnológico. Modificações simples nos métodos de cultivo tradicionais podem aumentar a diversidade microbiana cultivada. O objetivo deste estudo foi avaliar diferentes fatores de isolamento para obtenção de isolados raros em amostras de solo sob cultivo agrícola e floresta secundária. A afiliação taxonômica dos isolados foi obtida pelo sequenciamento parcial do DNAr 16S. Dos 122 isolados obtidos, 42 foram classificados como de cultivo raro contendo representantes de filos raramente cultivados, como *Chloroflexi* e *Acidobacteria*, e de famílias ainda não descritas de filos bem caracterizados, como *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*. Períodos curtos de incubação resultam em maior obtenção de isolados raros, comparativamente a períodos mais longos. Métodos de cultivo simples permitem isolar bactérias de filos raramente cultivados ou de famílias ainda não descritas de filos já bem caracterizados.

Palavras-chave: agente solidificante, biotecnologia, diversidade microbiana, viável não-cultivável.

¹ Biólogo, Mestre em Biotecnologia em Recursos Naturais, bolsista DTI/ Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, acsc.carol@hotmail.com.

² Bióloga, Doutora em Ciências Biológicas, bolsista DCR/ Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, erikaanjos@cpatc.embrapa.br.

³ Engenheiro-agrônomo, Doutor em Ciência do Solo, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, marcelo.fernandes@embrapa.br.

Introdução

Aproximadamente 1% do total de espécies bacterianas do solo é cultivado por meio de técnicas convencionais de plaqueamento dificultando o estudo da diversidade bacteriana do solo (JOSEPH et al., 2003). São reconhecidos 61 filós de bactérias com base nas análises do DNAr 16S, dos quais 31 não possuem representantes cultivados (JANSSEN, 2006). A obtenção de isolados raros contribuirá para a ampliação de recursos genéticos para futuras aplicações biotecnológicas (JOSEPH et al., 2003). Para tanto, técnicas de cultivo mais elaboradas foram desenvolvidas. Algumas destas são complexas e de alto custo tornando-se inviáveis à maioria dos pesquisadores (KAEBERLEIN et al., 2002). O objetivo desse estudo foi avaliar alternativas simples de cultivo para obtenção de bactérias do solo raras ou ainda não-cultivadas.

Material e Métodos

Amostras de solo agrícola e florestal foram coletadas no Campo Experimental de Umbaúba da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Diluições seriadas foram realizadas até concentrações de 10^{-5} a 10^{-7} . Os meios utilizados foram VL55 (SAIT et al., 2002) e ágar nutritivo em quatro concentrações (sem diluição – AN1, diluído 1:10 – AN2, 1:100 – AN3 e 1:1000 – AN4) solidificados com ágar (16 g L^{-1}) ou gelana (18 g L^{-1}). Foi utilizado o plaqueamento em superfície (PE) e em placa derramada ('pour-plate', PP). Os isolados foram selecionados aleatoriamente após quatro e doze semanas de incubação a 30°C . Sequências parciais de DNAr 16S dos isolados e representantes de diversos taxa bacterianos da biblioteca SSU 108 REF (www.arb-silva.de) foram analisadas filogeneticamente no website Phylogeny.fr (www.phylogeny.fr). A afiliação dos isolados foi realizada conforme Joseph et al., 2003. O método de classificação em árvore (DE'ATH e FABRICIUS, 2000) foi empregado para modelar a frequência de isolamentos raros e comuns em função dos fatores tempo de incubação (dias), 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) com o pacote estatístico S-Plus (v. 4.0).

Resultados e Discussão

Foram obtidos 122 isolados de bactérias do solo, pertencentes a seis filos (Tabela 1): *Actinobacteria* (35%), *Firmicutes* (34%), *Proteobacteria* (28%), *Acidobacteria*, *Chloroflexi* e *Deinococcus-Thermus* (menos de 1% cada). Foram identificados como de cultivo raro 42 dos 122 obtidos (34%). Foi obtido um representante para *Deinococcus-Thermus*, *Chloroflexi* e *Acidobacteria*, os quais possuem poucos isolados. No entanto, o filo *Acidobacteria* está amplamente distribuído nos solos. Parsley et al., 2011, relataram que micro-organismos deste filo são potenciais produtores de metabólitos secundários, muitos dos quais possuem atividade anticâncer e antibiótica. No filo *Actinobacteria* foram obtidos 43 isolados. Para 14 destes (32,5%) foram propostas novas famílias. Este filo é considerado como uma importante fonte de metabólitos secundários com atividade antibiótica (JOSEPH et al., 2003). *Firmicutes* compreende um total de 41 isolados contendo 16 novos membros incluídos em 12 novas famílias propostas neste estudo. O número de representantes do filo *Proteobacteria* foi 43 com nove novos membros. Mesmo de filos bem representados por diversas bactérias já cultivadas e estudadas foi possível isolar novos integrantes.

Tabela 1. Afiliações filogenéticas de 122 isolados de bactérias do solo selecionados aleatoriamente por meio de análises comparativas de sequências do DNAr 16S.

| Filo | Nº de isolados | Nº de novas famílias | Nº de isolados em novas famílias |
|----------------------------|----------------|----------------------|----------------------------------|
| Acidobacteria | 1 | 0 | 0 |
| Actinobacteria | 43 | 12 | 14 |
| Chloroflexi | 1 | 0 | 0 |
| Deinococcus-Thermus | 1 | 0 | 0 |

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na vertical, não diferem entre si, pelo Teste F, a 5% de probabilidade.

Uma árvore com quatro nós terminais foi capaz de reduzir em 21% a taxa de classificações errôneas no conjunto de 122 isolados entre as classes rara e comum. As variáveis explanatórias incluíram tempo de incubação, agente solidificante e meio de cultura. Apesar da dificuldade de combinação de tratamentos resultando na classe rara foi possível observar algumas tendências (Figura 1).

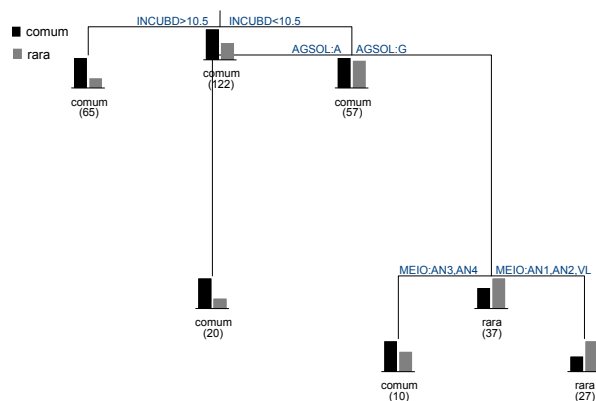


Figura 1. Fatores de cultivo associados ao isolamento de bactérias de cultivos raro e comum, de acordo com um modelo de classificação em árvore. Os fatores selecionados pelo modelo incluíram meio de cultura (MEIO: AN1, AN2, AN3 e AN4 e o VL55 - VL), agente solidificante (AGSOL: ágar - A e gelana - G) e tempo de incubação (INCUBD). Os termos “comum” e “rara” indicam o grupo de bactérias para cada combinação de cultivo. Os números entre parênteses indicam o número de amostras. Os histogramas indicam a distribuição das amostras entre os grupos. A taxa de classificações errôneas do modelo foi de 0,28 e a do modelo nulo, de 0,35.

A maioria dos representantes com *status* de novas famílias foram obtidos com menos de 10 dias de incubação. Em contraposição, diversos outros estudos apontam que períodos prolongados de incubação são importantes na recuperação de bactérias raras (JOSEPH et al., 2003; SAIT et al., 2002). Stevenson et al. (2004) cultivaram membros do filus *Acidobacteria* e *Verrucomicrobia* com período de incubação relativamente curto, como 5 dias e 30 dias, respectivamente. A utilização da gelana resultou em uma maior proporção de bactérias raras sendo, esse efeito, mais notável nos meios AN1, AN2 e VL. Nessas condições, 66% dos isolados foram raros, contra apenas 40% nos meios AN3 e AN4.

Conclusões

Métodos de cultivo simples recuperam bactérias raramente cultivadas. Períodos curtos de incubação favorecem o isolamento de bactérias raras, comparativamente a períodos longos. A substituição do ágar pela gelana do AN, AN 1:10 e VL55 promove o isolamento de bactérias de cultivo raro de amostras de solo.

Referências

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.

JANSSEN, P.H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 72, p. 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.** v. 69, p. 7210-7215, 2003.

KAEBERLEIN, T.; LEWIS, K.; EPSTEIN, S.S. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. **Science** v. 296, p. 1127-1129, 2002.

PARSLEY, L.C.; LINNEMAN, J.; GOODE, A.M.; BECKLUND, K.; GEORGE, I.; GOODMAN, R.M.; LOPANIK, N.B.; LILES, M.R. Polyketide synthase pathways identified from a metagenomic library are derived from a soil Acidobacteria. **FEMS Microbiol. Ecol.** v. 78, p. 176-187, 2011.

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.** v. 4, p. 654-666, 2002.

STEVENSON B.S.; EICHORST S.A.; WERTZ J.T.; SCHMID T.M.; BREZNAK J.A. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 70, p. 4748-4755, 2004.