

Como Isolar e Identificar *Burkholderia silvatlantica**

Liamara Perin¹
Jean Luiz Simões Araújo²
José Ivo Baldani²
Verônica Massena Reis²

Introdução

Os microrganismos representam o compartimento mais rico em diversidade química e molecular na natureza. Além disso, constituem a base de processos ambientais como ciclos biogeoquímicos e cadeias alimentares, bem como mantêm relações vitais entre si e com os organismos superiores, desempenhando inúmeras funções no ambiente.

Dentre os organismos com alto potencial agrícola e biotecnológico, encontra-se o gênero *Burkholderia*. Descrito em 1992, conta atualmente com 29 espécies descritas, 4 espécies "candidatus" (seqüência depositada mas não o indivíduo) e mais 5 espécies sendo propostas. Colonizam diversos nichos ecológicos e são importantes componentes da comunidade microbiana do solo. *B. cepacea* foi a primeira espécie descrita (YABUUCHI et al., 1992), causadora de podridão em casca de cebola (BURKHOLDER, 1950). Outras espécies provocam doenças em animais e humanos e podem ser encontradas em pacientes com Fibrose Cística (MIRALLES et al., 2004; RIBEIRO et al., 2002). Porém, a maioria delas não são patogênicas e podem promover o crescimento em plantas pela fixação biológica de nitrogênio e produção de fitormônios (BEVIVINO et al., 1998; PEIX et al., 2001). Várias espécies foram usadas em trabalhos de biorremediação (TIEDJE et al., 1999), controle biológico (CAIN et al., 2000) e na indústria pela produção de biopolímeros (BRAMER et al., 2001).

Das espécies descritas, 7 são diazotróficas, 5 estão sendo propostas como diazotróficas e

estudos mostraram que isolados de mais 3 espécies fixam nitrogênio atmosférico na rizosfera, em tecidos internos de gramíneas ou formando nódulos em leguminosas.

Estudos com a cultura da cana-de-açúcar, mostraram que esta planta convive com inúmeras bactérias diazotróficas em sua rizosfera ou tecidos internos e não se sabe até o momento qual espécie, ou quais espécies, participam em maior número ou eficiência no nitrogênio fixado biologicamente. Bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* foram isoladas de plantas de cana-de-açúcar (BODDEY, 2003; REIS et al., 2004), porém o completo entendimento de sua dinâmica ainda é escasso. Inúmeros trabalhos são desenvolvidos pelo grupo de pesquisa em Fixação Biológica de Nitrogênio em plantas não leguminosas da Embrapa Agrobiologia, procurando conhecer a ecologia, diversidade e contribuição dos organismos já descritos e busca de espécies ainda não identificadas. Estes estudos levaram ao isolamento da espécie *B. silvatlantica*, isolada de plantas de cana-de-açúcar, milho e abacaxi, e a metodologia usada para o isolamento desta bactéria de plantas de cana-de-açúcar, é descrita neste documento.

2. Metodologia

Foram coletadas amostras de rizosfera e de planta de 11 cultivares de cana-de-açúcar em cultivos comerciais nas cidades de Paranavaí no Estado do Paraná, Piracicaba em São Paulo, Campos dos Goytacazes e Seropédica no Rio de Janeiro e Timbaúba em Pernambuco. As amostras compostas com 10g de raízes e de colmos, foram

* Referente ao projeto 02.02.513

¹ Doutoranda em Agronomia - Ciência do Solo, UFRRJ. E-mail: liaperin@yahoo.com.br

² Pesquisadores da Embrapa Agrobiologia, CP 74505, Cep: 23851-970, Seropédica, RJ. E-mail: jean@cnpab.embrapa.br; ibaldani@cnpab.embrapa.br; veronica@cnpab.embrapa.br

submetidas a desinfestação superficial com cloramina T a 1% (DÖBEREINER et al., 1995). Em seguida, foram trituradas em liquidificador de uso doméstico com 90 mL de solução salina e permaneceram em repouso por uma hora a temperatura ambiente. As amostras com 10g de solo da rizosfera, para avaliação das bactérias localizadas na rizosfera permaneceram durante uma hora sob agitação constante de 150 rpm. Posteriormente, todas as amostras foram diluídas, seriadamente, até 10^{-6} em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina. Uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição foi inoculada, com 3 repetições, nos meios de cultura semi-sólidos JMV (BALDANI, 1996) e LGI (DÖBEREINER et al., 1995). Os frascos inoculados permaneceram em incubação a 30°C e no escuro durante 7 dias, e posteriormente efetuado a contagem do Número Mais Provável (NMP), conforme (DÖBEREINER et al., 1995).

Após contagem, os 6 últimos frascos das diluições com crescimento positivo de cada amostra, foram riscados em placas contendo os respectivos meios de cultura na forma sólida. Após 7 a 10 dias de incubação, cada colônia com formato diferente foi inoculada nos respectivos meios semi-sólidos, que, quando apresentaram película foram novamente riscados em placas para confirmação da pureza. Este processo, denominado purificação, se repetiu até a obtenção de placas com apenas um tipo de organismo.

Quando puros, os isolados foram estocados em glicerol 50% (glicerol diluído 50% em água), a -20°C.

3. Resultados

A população de bactérias diazotróficas em associação com cana-de-açúcar foi maior na rizosfera e raízes e variou de 10^3 a 10^6 células por grama de massa fresca no meio de cultura LGI, e 10^3 a 10^8 em meio de cultura JMV.

As maiores populações, no meio de cultura LGI, foram observadas nas cultivares de cana-de-açúcar de Paranaíba-PR e Campos do Goytacazes-RJ e não foi observado crescimento neste meio de cultura em amostras provenientes de São Paulo e em poucas amostras de Pernambuco.

A maioria das amostras de raízes e rizosfera das cultivares testadas cresceram no meio de cultura JMV, e menor população foi observada na parte aérea das plantas. Neste, obteve-se maiores populações, provavelmente devido a presença de 100 mg extrato de levedura por litro de meio de cultura.

O uso de extrato de levedura no meio de cultura semi-sólido ainda não é consenso. Os meios de cultivos são muito seletivos e podem não representar o ambiente de vida de alguns organismos, sendo necessário a adição de fatores de crescimento. Uma estratégia de sucesso foi o desenvolvimento do meio de cultura LGI-P caldo. A adição de 5 mL de caldo de cana ao meio de cultura LGI-P, levou a contagem e isolamento de maiores populações de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (REIS et al., 1994). Neste caso, o caldo de cana tornou o meio de cultura semelhante ao ambiente natural deste organismo e foi um estímulo para seu crescimento nessas condições. Testes mostraram que a adição de 20 mg de extrato de levedura por litro de meio de cultura auxilia no crescimento das bactérias isoladas neste trabalho, sem inibir a atividade da enzima nitrogenase (dados não apresentados), podendo, desta maneira substituir os 100 mg usados inicialmente.

O procedimento usado para isolamento, neste trabalho, diferiu do recomendado pela literatura. Optou-se por riscar diretamente em placas as amostras crescidas em meio de cultura semi-sólido usadas na contagem. Diferindo da literatura, que recomenda neste momento, repicar 2 vezes consecutivas no respectivo meio de cultura semi-sólido. Como dito anteriormente, os meios de cultura podem não representar o ambiente de alguns organismos e, desta maneira, exercer forte pressão seletiva, podendo ocorrer competição entre os organismos presentes em uma película. Tentando amenizar a pressão seletiva exercida pelo meio de cultura e a competição entre os organismos, as amostras foram diretamente riscadas em placas. Após crescidas, foram selecionadas as colônias diferentes, e cada colônia, sozinha, foi inoculada em triplicata em frascos com meio semi-sólido, acrescido de 20 mg de extrato de levedura por litro de meio de cultura. Usando esta estratégia, foram isolados 76 isolados de *Burkholderia* spp., 43 em meio de

cultura JMV e 33 de LGI, sendo 32 deles pertencentes à espécie *B. silvatlantica*. A eficácia desta estratégia foi comprovada em isolamento de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* de plantas de milho, onde optou-se por repicagens sucessivas em meio de cultura semi sólido antes da seleção de colônias em placas, neste caso apenas 3 isolados do gênero *Burkholderia* foram obtidos (CRUZ et al., 2005).

Em meio de cultura semi-sólido, as bactérias formaram película na superfície, característica comum entre os diazotróficos isoladas de plantas não leguminosas, como apresentada na figura 1.

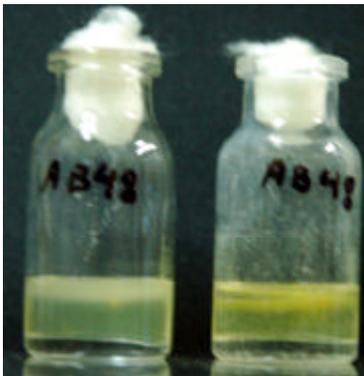


Figura 1: Película formada por *B. silvatlantica*, isolado PR2, em de meio de cultura JMV e LGI, respectivamente, com 5 dias de incubação.

Em meio de cultura sólido LGI as colônias se apresentaram muito pequenas, dificultando a visualização e passou-se a usar o meio de cultura JMV para o crescimento em placa destas bactérias. Em meio de cultura JMV, os isolados de *B. silvatlantica* diferiram da estirpe M130 (BR 11340), da espécie proposta *B. brasilense* e da estirpe Ppe8 (BR 11340), padrão da espécie *B. tropica* (Figura 2).

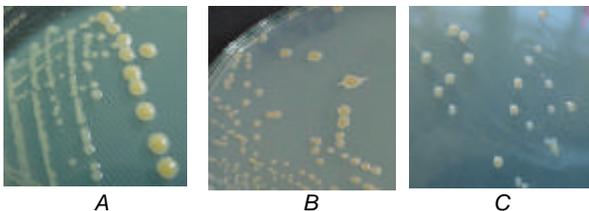


Figura 2: Morfologia de colônias em meio de cultura JMV de isolados do gênero *Burkholderia* spp. obtidos de plantas de cana-de-açúcar. A: estirpe M130; B: estirpe Ppe8; C: isolado PR2.

Formaram colônias pequenas, borda inteira, forma circular, cor amarela intensa e pouco gomosas. Inicialmente se assemelham à Ppe8, porém, com mais de 10 dias de crescimento, estes isolados

diferiram de Ppe8, passando de colônias convexas para pulvinadas. A diferença entre colônias convexas e pulvinadas é a elevação. As colônias pulvinadas são mais elevadas, podendo servir como proteção à enzima nitrogenase (Figura 3).

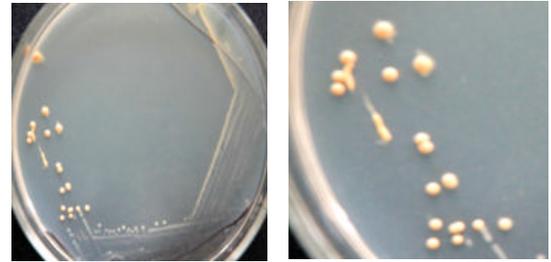


Figura 3: Morfologia de colônias em meio de cultura JMV do isolado PR2 de *B. silvatlantica*. Fotografias mostrando a elevação das colônias com diferentes níveis de aproximação.

Foram obtidos 32 isolados da espécie *B. silvatlantica*, nos 4 estados amostrados e de 9 das 11 cultivares analisadas. Os resultados mostram que esta espécie possui ampla distribuição, ocorrendo em canais de nordeste ao sul do Brasil e suas colônias são facilmente reconhecidas em placas com meio de cultura JMV, dispensando o uso de técnicas mais caras para sua identificação.

4. Referências Bibliográficas

BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* ssp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** 1996. 234 f. Tese (Doutorado em Agronomia -Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L. Efficacy of *Burkholderia cepacea* MCI7 in disease suppression and growth promotion of maize. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 31, p. 225-231, 1998.

BODDEY, L. H. **Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia*, isoladas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) cultivadas na Austrália e no Brasil.** 2003. 109 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

BRAMER, C. O.; VANDAMME, P.; SILVA, L. F. da; GOMEZ, J. G. C.; STEINBUCHER, A. *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 1709-1713, 2001.

BURKHOLDER, W. H. Sour skin, a bacteria rot of onion bulbs. **Phytopathology**, St. Paul, v. 40, p. 115-117, 1950.

CAIN, C. C.; HENRY, A. T.; WALDO, R. H.; CASIDA, L. J.; FALKINHAM, J. O. Identification and characteristics of a novel *Burkholderia* strain with broad-spectrum antimicrobial activity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 4139-4141, 2000.

CRUZ, B. B. G.; PERIN, L.; REIS, V. M. Quantificação e caracterização da bactérias diazotróficas associadas a plantas de milho. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23., 2005, Santos, SP. **Resumos...** Santos: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2005. p. 280.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60 p.

MIRALLES, I. S.; MACIEL, M. do C.; ALVES, A.; FERREIRA, M. R. *Burkholderia pseudomallei*: a case report of a human infection in Ceará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 46, p. 51-54, 2004.

REIS, V. M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 10, p. 401-404, 1994.

RIBEIRO, J. D.; RIBEIRO, M. A. G. de O.; RIBEIRO, A. F. Controvérsias na fibrose cística-do pediatra ao especialista. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 78, Suplemento, p. 171-186, 2002.

TIEDJE, J. M.; ASUMING BREMPONG, S.; NUSSLEIM, K.; MARSH, T. L.; FLYNN, S. J. Opening the black box of soil microbial diversity. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 13, p. 109-122, 1999.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, L.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacea* (Palleroni e Holmes, 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 36, p. 1251-1275, 1992.

Comunicado Técnico, 86

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia

BR465 – km 7
Caixa Postal 74505
23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil
Telefone: (0xx21) 2682-1500
Fax: (0xx21) 2682-1230
Home page: www.cnpab.embrapa.br
e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

1ª impressão (2006): 50 exemplares



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Comitê de publicações

Eduardo F. C. Campello (Presidente)
José Guilherme Marinho Guerra
Maria Cristina Prata Neves
Verônica Massena Reis
Robert Michael Boddey
Maria Elizabeth Fernandes Correia
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente

Revisor e/ou ad hoc: Rosa Maria Pitard e Sérgio Miana de Faria
Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix.
Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia.