

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Biociências

SUELEN RIBEIRO RABELLO

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MIXOBACTÉRIAS PRESENTES  
EM FOLHAS DE ÁRVORES DO PARQUE FARROUPILHA, PORTO  
ALEGRE, RS**

Porto Alegre

2010

SUELEN RIBEIRO RABELLO

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MIXOBACTÉRIAS PRESENTES  
EM FOLHAS DE ÁRVORES DO PARQUE FARROUPILHA, PORTO  
ALEGRE, RS**

Trabalho de Conclusão apresentado ao Curso de Ciências Biológicas do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação da Professora Dr. Marisa da Costa, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia desta Universidade.

Porto Alegre

2010

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, à Professora Marisa da Costa pela oportunidade, orientação entusiasmada e muito coerente, conselhos e disponibilidade sempre que necessário.

Aos queridos amigos e colegas da graduação Beta, Diego e Márcia, pelos incentivos, ajuda e desabafos.

Aos colegas da Bioplus Sara, Tiago e Roger, pelo apoio e incentivo.

Ao Jardel, pelas lindas fotografias, presença constante, apoio e compreensão, tornando essa jornada mais fácil de ser traçada.

À minha mãe, Ana Maria Ribeiro, e à minha avó materna, Ana Simões da Fonseca, pelo crédito incondicional sempre.

## RESUMO

Mixobactérias são bactérias Gram negativas encontradas principalmente no solo, associadas à matéria orgânica de origem vegetal. Elas apresentam um ciclo de vida incomum entre os procariotos e marcado por comportamentos sociais. Na presença de nutrientes, deslizam, deixando um trilho de muco, por superfícies à procura de alimento e, quando encontram, alimentam-se em conjunto. Quando não há nutrientes disponíveis, iniciam um processo de morfogênese cooperativa que culmina na formação de corpos de frutificação com mais de  $10^5$  células e que contém estruturas de resistência características, os mixósporos. O isolamento e a purificação de mixobactérias são processos trabalhosos e demorados, devido, principalmente, à produção de muco e ao crescimento lento desses organismos. Entretanto, em virtude do seu comportamento complexo e grande potencial biotecnológico, torna-se importante observar a diversidade das mixobactérias, como ponto de partida para estudos de isolamento e aplicação de seus biocompostos. Este trabalho teve como objetivo testar métodos que possibilitem o isolamento e a identificação de mixobactérias bacteriolíticas presentes em folhas sofrendo decomposição natural. A partir de quarenta e cinco folhas coletadas, obtiveram-se dezesseis corpos de frutificação que se desenvolveram sobre a superfície das folhas. Não foi possível obter nenhum isolado utilizando-se o método de purificação de transferências sucessivas para novos meios de cultivo. Entretanto, a partir do perfil morfológico dos corpos de frutificação, procedeu-se a possível identificação dessas estruturas, resultando em oito corpos de frutificação de *Myxococcus* sp., dois de *Chondromyces* sp. e um de *Coralloccoccus* sp..

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Distribuição global de locais em que foram coletados solos contendo mixobactérias.....	10
Figura 2: Movimento de projeções de <i>Myxococcus xanthus</i> em direção a uma colônia de <i>Micrococcus luteus</i> . ....	13
Figura 3: Deposição de muco por <i>Myxococcus xanthus</i> enquanto desliza pelo ágar. (A) Cepa A <sup>+</sup> S <sup>+</sup> . (B) Cepa A <sup>+</sup> S <sup>-</sup> . (C) Cepa A <sup>-</sup> S <sup>+</sup> . ....	13
Figura 4: Cultura de mixobactéria apresentando ondas espirais e concêntricas.....	15
Figura 5: (A) Modelo para o estágio inicial de formação de corpo de frutificação. (B) Agregado de células de <i>M. xanthus</i> . ....	16
Figura 6: Cultura de mixobactéria onde os agregados negros correspondem a corpos de frutificação no começo do desenvolvimento.....	16
Figura 7: (A) Modelo para o estágio final de formação de corpo de frutificação. (B) Montículo de células de <i>M.xanthus</i> .....	17
Figura 8: Esquema do ciclo de desenvolvimento de <i>Myxococcus xanthus</i> .....	18
Figura 9: Fotografia aérea do Parque Farroupilha indicando, com letras ou números os locais aproximados das quatro primeiras coletas realizadas neste estudo.....	22
Figura 10: Corpos de frutificação de P41 (possível <i>Myxococcus</i> sp.) na superfície da folha após 4 dias de cultivo.....	26
Figura 11: Primeiro isolamento de P41 após 15 dias de cultivo.....	27
Figura 12: Corpos de frutificação de P21 na superfície da folha após 15 dias de cultivo.....	27
Figura 13: Corpos de frutificação de 111 (possível <i>Myxococcus</i> sp.) na superfície da folha após 7 dias de cultivo.....	28
Figura 14: Primeiro isolamento de 111 após 13 dias de cultivo.....	28
Figura 15: Corpo de frutificação de 131 (possível <i>Chondromyces</i> sp.) na superfície da folha após 9 dias de cultivo.....	29
Figura 16: Primeiro isolamento de 131 após 13 dias de cultivo.....	29
Figura 17: Corpos de frutificação de 132 (possível <i>Myxococcus</i> sp.) na superfície da folha após 9 dias de cultivo.....	30
Figura 18: Corpos de frutificação de 112 (possível <i>Myxococcus</i> sp.) após 13 dias de cultivo.....	30

Figura 19: Corpos de frutificação de 113 (possível <i>Myxococcus</i> sp.) na superfície da folha após 13 dias de cultivo.....	31
Figura 20: Corpo de frutificação de 133 (possível <i>Chondromyces</i> sp.) na superfície da folha após 13 dias de cultivo.....	31
Figura 21: Primeiro isolamento de 133 após 5 dias de cultivo. ....	32
Figura 22: Corpos de frutificação de 121 (possível <i>Myxococcus</i> sp.) na superfície da folha após 13 dias de cultivo.....	32
Figura 23: Primeiro isolamento de 231 (possível <i>Corallocooccus</i> sp.) após 49 dias de cultivo em ágar WCX com <i>E.coli</i> . ....	33
Figura 24: Segundo isolamento de 231 após 19 dias de cultivo em ágar CY.....	33
Figura 25: Corpos de frutificação de 371 na superfície da folha após 9 dias de cultivo.....	34
Figura 26: Primeiro isolamento de 371 após 8 dias de cultivo. ....	34
Figura 27: Segundo isolamento de 371 após 24 dias de cultivo. ....	35
Figura 28: Detalhe da estrutura presente no segundo isolamento de 371. ....	35
Figura 29: Corpos de frutificação de 441 e 442 na superfície da folha após 20 dias de cultivo.....	36
Figura 30: Corpos de frutificação de 431 (possível <i>Myxococcus</i> sp.) na superfície da folha após 7 dias de cultivo.....	36
Figura 31: Corpos de frutificação de 422 (seta vermelha) na superfície da folha após 19 dias de cultivo.....	37
Figura 32: Corpos de frutificação de 432 na superfície da folha após 19 dias de cultivo.....	37

## LISTA DA TABELAS

	<b>Página</b>
Tabela 1 – Relação dos diferentes tempos de lavagem, modo de secagem das folhas, tipos de incorporação de <i>E. coli</i> utilizados e formas de acondicionamento das placas.....	25
Tabela 2 – Relação das características morfológicas dos corpos de frutificação observados, tempos transcorridos até a detecção, meios de cultivo utilizados e a situação do isolamento das cepas.....	38

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1 Importância.....	9
2.2 Locais de ocorrência.....	10
2.3 Motilidade por deslizamento.....	11
2.4 Corpos de frutificação.....	14
2.5 Isolamento e identificação.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Cultivo de <i>Escherichia coli</i> ATCC 11105.....	21
3.2 Coleta das amostras.....	21
3.3 Lavagem das folhas.....	22
3.4 Secagem das folhas.....	22
3.5 Isolamento.....	23
3.6 Incubação.....	23
3.7 Observação dos cultivos.....	24
3.8 Purificação.....	24
3.9 Identificação.....	24
3.10 Registro fotográfico.....	24
4. RESULTADOS.....	26
5. DISCUSSÃO.....	39
6. CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

## 1. INTRODUÇÃO

As mixobactérias são bactérias Gram negativas que apresentam um ciclo celular diferenciado comparado com outras bactérias. Elas são importantes por estarem presentes na maioria dos ambientes naturais aeróbios onde exista matéria orgânica de origem vegetal. Elas podem nutrir-se a partir de restos vegetais ou pela predação de outras bactérias, sendo um grupo importante na decomposição de compostos no ambiente e possíveis produtoras de enzimas líticas ou outros compostos que podem interferir com o metabolismo de outras células procarióticas ou eucarióticas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As mixobactérias (ordem Myxococcales) pertencem à subdivisão Delta do filo Proteobacteria, possuindo alto conteúdo de G+C (entre 64 e 72 mol%) e um dos maiores genomas entre os procariotos (Dawid, 2000; Reichenbach, 2005). Elas apresentam-se como bastonetes Gram-negativos relativamente grandes (0,6-1,2 por 3-15µm), aeróbicos estritos e com células vegetativas unicelulares (Shimkets *et al.*, 2006; Dawid, 2000; Reichenbach, 1999). Existem basicamente três morfologias celulares no grupo, células longas e delgadas com bordos afilados (ou fusiformes), células cilíndricas com bordos arredondados ou células cilíndricas em forma de cubo com bordos truncados ou arredondados, que permitem a distinção, ao microscópio óptico, respectivamente, das subordens *Cystobacterineae*, *Sorangineae* e *Nannocystineae* (Reichenbach, 2005).

## 2.1 Importância

Segundo Reichenbach (2005), a única aplicação prática das mixobactérias é como produtores de metabólitos secundários, o que as tornou uma das mais ricas fontes de compostos entre as bactérias.

Uma grande proporção de cepas de mixobactérias produz algum tipo de composto com atividade biológica e esses metabólitos são quimicamente muito diferentes (Shimkets *et al.*, 2006). Dentre as classes de substâncias produzidas, podem-se citar (1) inibidores de síntese protéica, como a mixovalargina, que também ataca membranas celulares, e as tugacinas, que apresentam atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*; (2) compostos que interferem no transporte de elétrons, como mixotiazol, mixalamida, auraquina e sorafena, que apresentam atividade antifúngica; (3) compostos que interferem na síntese de ácidos nucleicos de bactérias Gram-positivas, como mixosporina, coralopironina e sorangicina; e (4) substâncias, como o epotilon, que atuam sobre a síntese de actina ou tubulina, impedindo a divisão celular e levando à apoptose (Irschik & Reichenbach, 1985; Buntin *et al.*, 2010; Dawid, 2000; Lee *et al.*, 2007).

De acordo com Shimkets e colaboradores (2006), o inibidor produzido por mixobactérias mais promissor é o epotilon, atualmente utilizado como droga antitumoral em câncer de mama, de próstata e melanoma metastático (Egerton, 2010; Vishnu & Tan, 2010; Ott *et al.*, 2010)

Considerando que uma parcela expressiva do genoma de *Myxococcus xanthus* é dedicada ao metabolismo secundário, espera-se que, explorando o potencial biossintético desses organismos, o espectro e o número de compostos encontrados equiparem-se aos dos actinomicetos (Goldman *et al.*, 2006; Shimkets *et al.*, 2006).

Apesar de não ter sido demonstrado experimentalmente, outro papel importante é solubilizar grandes moléculas, restos celulares e outros detritos biológicos (Shimkets *et al.*, 2006). Ou seja, elas produzem enzimas líticas que podem ter interesse comercial. Além disso, devido às interações intercelulares observadas no seu ciclo de desenvolvimento, tanto durante o deslizamento quanto na formação do corpo de frutificação, as mixobactérias representam uma classe

ideal para o estudo de comunicação e cooperação entre os procariotos (Wireman & Dworkin, 1975).

## 2.2 Locais de ocorrência

As mixobactérias podem ser encontradas em praticamente qualquer lugar, habitando todas as zonas climáticas e tipos de vegetação (Reichenbach, 1999; Reichenbach, 2005). Entretanto, observa-se maior abundância de espécies em regiões quentes e sazonalmente secas, como o sudoeste dos Estados Unidos, México, norte da Índia, Ilhas Canárias e Egito (Shimkets *et al.*, 2006; Reichenbach, 1999). Seu habitat genuíno é o solo, inclusive arenoso, árido e ártico (Dawid, 2000; Brockman, 1976; Brockman, 1967; Brockman & Boyd, 1963; Dawid *et al.*, 1988). A figura 1 indica a distribuição global de mixobactérias isoladas a partir de amostras de solo.

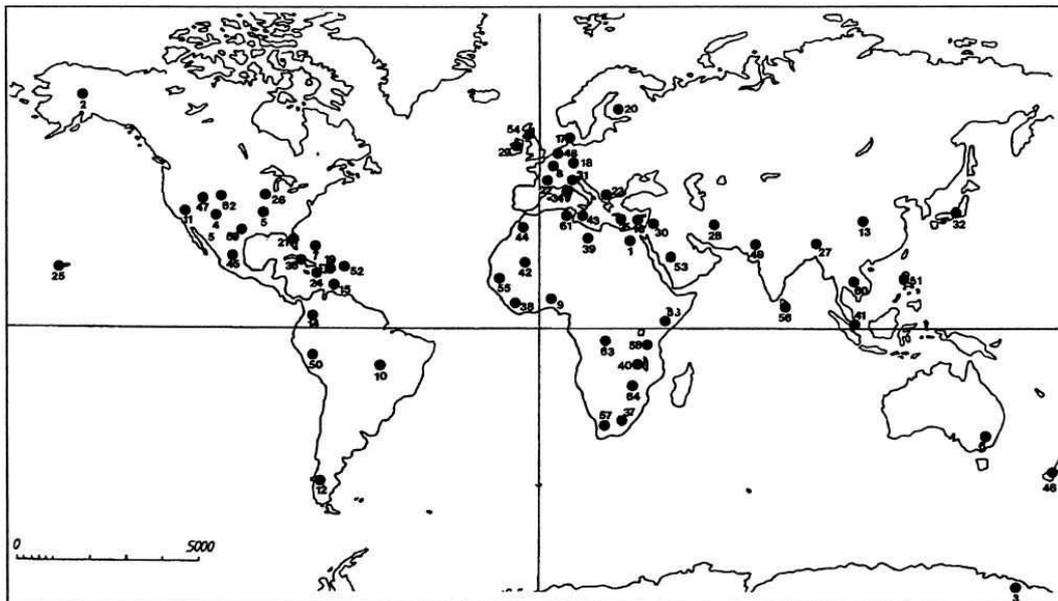


Figura 1: Distribuição global de locais em que foram coletados solos contendo mixobactérias. Reproduzido de Dawid, 2000.

Ocorreram também descrições da presença do grupo em ambientes de água doce, ambientes marinhos, esterco de herbívoros, restos de plantas em decomposição e cascas de árvores vivas ou mortas (Jeffers, 1964; Carlson & Pacha,

1968; Fudou *et al.*, 2002; Iizuka *et al.*, 2003; Shimkets *et al.*, 2006). Ainda não foram encontrados representantes anaeróbicos, acidofílicos e termofílicos, embora Gerth & Müller (2005) tenham relatado o isolamento e identificação de mixobactérias termofílicas moderadas, provenientes de climas quentes e semi-áridos, crescendo a 48°C (Reichenbach, 2005).

Existem apenas dois relatos da presença de mixobactérias no Brasil, datados da década de 1970 e indicando a ocorrência dessas bactérias em solo arenoso e solo de floresta tropical (Dawid, 1978 apud Dawid, 2000; Drozdowicz, 1972 apud Dawid, 2000)

### 2.3 Motilidade por deslizamento

As mixobactérias frutificantes, ou seja, aquelas que formam corpos de frutificação, apresentam um ciclo de desenvolvimento complexo e bastante incomum entre os procariotos. Na presença de nutrientes, as células se movimentam por deslizamento em uma variedade de superfícies à procura de alimento, fase na qual elas crescem e dividem-se indefinidamente por fissão binária (Hartzell & Youderian, 1995; Shimkets, 1990). Esse tipo de motilidade por deslizamento (do inglês, *gliding motility*) também está presente em outros grupos não relacionados filogeneticamente, como *Cytophaga-Flavobacterium*, *Lysobacter*, *Herpetosiphon* e muitas cianobactérias (Reichenbach, 2005). O deslizamento das mixobactérias consiste em um deslocamento suave, sem rotação, na mesma direção do eixo longo da célula, com paradas ocasionais e mudanças de direção, em média, a cada 6-8 minutos (Dworkin & Kaiser, 1985; Blackhart & Zusman, 1985). Para mudar de direção, ao invés de fazer curvas em forma de “U”, elas alteram a polaridade da célula, transformando a parte dianteira em parte traseira e vice-versa (Kaiser, 2003). A velocidade de deslizamento das células depende do substrato e da temperatura e é geralmente muito lenta para ser observada ao microscópio, mas, sob condições ótimas, pode atingir 13-15µm/ min (Shimkets *et al.*, 2006; Reichenbach, 2005).

O isolamento e estudo de mutantes para os genes responsáveis pela motilidade revelaram a presença de dois diferentes motores de deslizamento, que geralmente trabalham juntos: o motor **A** e o motor **S** (Hodgkin, 1979). O padrão A

(de aventureiro) foi nomeado dessa forma devido à habilidade de movimento de células individuais, evidente na parte mais externa de colônias de mutantes  $A^+S^-$ . Já nos bordos de colônias de indivíduos  $A^-S^+$ , observaram-se aglomerados de muitas células, o que levou o padrão a receber o nome de **S** (de social).

O sistema de motilidade **A** permite que as células se desloquem de forma individual, sem contato direto com outras células, ou como projeções (do inglês, *flares*) finas e longas (Shimkets *et al.*, 2006; Shimkets, 1990). Na natureza, esse sistema permite que elas se dispersem para procurar alimento e se movimentem dentro de grupos celulares. O mecanismo exato da motilidade **A** ainda é desconhecido. A hipótese mais aceita atualmente é a de Wolgemuth e colaboradores (2002), que propõem a existência de estruturas, em ambos os pólos da célula, a partir das quais a extrusão de muco geraria a força propulsiva para empurrar a célula para a frente. Nesse modelo, somente um dos pólos liberaria muco por vez e ele ficaria depositado na forma de trilhos de muco sobre a superfície.

Outra hipótese afirma que um dispositivo na superfície da célula produz ondas progressivas na superfície celular e, conseqüentemente, o movimento por deslizamento (Lünsdorf & Reichenbach, 1989; Freese *et al.*, 1997). Além disso, foi sugerido por Mignot e colaboradores (2007) que complexos de adesão transitórios, dispostos em intervalos regulares ao longo da célula, ligam-se externamente ao substrato e internamente a uma proteína do citoesqueleto semelhante à actina. O movimento dessa proteína geraria a rotação e o movimento celular.

A maquinaria da motilidade **A** também é responsável pelo fenômeno da elasticotaxia, descrito por Stanier (1942) como a orientação do movimento das células perpendicularmente a linhas de estresse em ágar alongado ou comprimido, tornando-as assimetricamente alongadas (Fontes & Kaiser, 1999). Dworkin (1983) demonstrou que quando uma colônia expansiva de *Myxococcus xanthus* passa próxima a uma colônia de bactéria da qual possa se alimentar ela estende uma projeção em direção ao alimento (Figura 2).

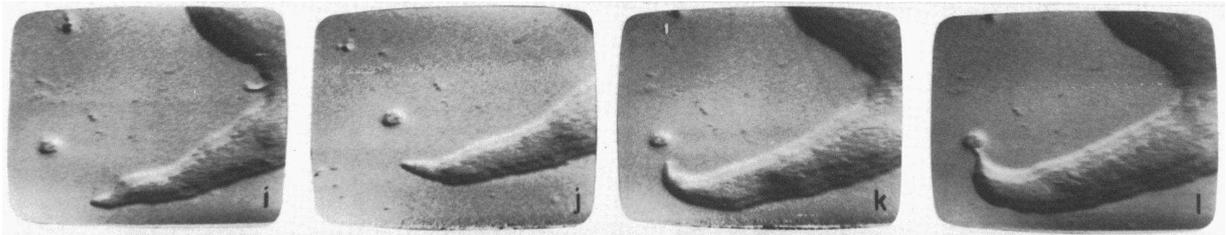


Figura 2: Movimento de projeções de *Myxococcus xanthus* em direção a uma colônia de *Micrococcus luteus*. Reproduzido de Dworkin, 1983.

As mixobactérias deslizantes deixam um trilho de muco na superfície do ágar por onde passam e supõe-se que ele esteja relacionado com a motilidade **A**, uma vez que mutantes **A<sup>+</sup>S<sup>-</sup>** apresentam trilhos de muco evidentes em microscópio de contraste de fase (Figura 3) (Dawid, 2000; Kaiser, 2003).

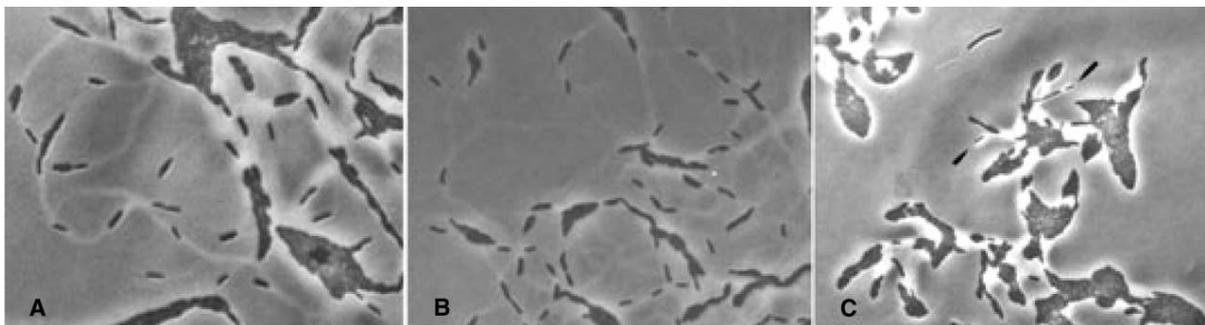


Figura 3: Deposição de muco por *Myxococcus xanthus* enquanto desliza pelo ágar. (A) Cepa **A<sup>+</sup>S<sup>+</sup>**. (B) Cepa **A<sup>+</sup>S<sup>-</sup>**. (C) Cepa **A<sup>-</sup>S<sup>+</sup>**. Reproduzido de Wolgemuth *et al.*, 2002.

O papel que o muco desempenha é, provavelmente, manter as células na superfície (Reichenbach, 2005). É possível que pelo mesmo motivo do movimento direcionado a alvos apropriados (elasticotaxia), as bactérias deslizantes apresentem a tendência de seguir um rastro de muco pré-existente (Kaiser, 2003; Burchard, 1982). Quando uma célula começa a cruzar um rastro, ela muda o seu curso e passa a seguir o trilho já estabelecido (Kaiser, 2003). Burchard (1982) relatou, inclusive, que os rastros de bactérias deslizantes não contêm propriedades espécie-específicas, podendo ser seguidos por diferentes cepas da mesma espécie ou mesmo por espécies diferentes. Uma de suas observações foi *Stigmatella aurantiaca* seguindo o trilho de *Myxococcus xanthus*. Tal comportamento pode ser vantajoso para as espécies que se alimentam de outras bactérias deslizantes, favorecendo o rastreamento da presa. Entretanto, poderia ser um problema durante

a formação do corpo de frutificação, resultando em estruturas constituídas por células de mais de uma espécie (Burchard, 1982).

O sistema de motilidade **S** permite o movimento somente se as células estão a certa distância uma da outra sendo importante, na natureza, em eventos que exibem comportamento social das mixobactérias, como a formação do corpo de frutificação (Kaiser & Crosby, 1983 apud Shimkets *et al.*, 2006; Shimkets *et al.*, 2006). Kaiser (1979) publicou um estudo com diferentes cepas de *Myxococcus xanthus* e concluiu que a maioria das células apresentou tufo de pili do tipo IV (também chamados de fímbricas) no seu pólo principal e que esses pili estavam diretamente relacionados com a motilidade **S**. De acordo com o mesmo autor, em publicação posterior a motilidade **S** é similar, geneticamente e funcionalmente, à motilidade por contração de muitas bactérias Gram-negativas, como as do gênero *Pseudomonas* e *Neisseria* (Kaiser, 2000).

Shi e Zusman (1993) concluíram que a firmeza e a umidade do substrato são provavelmente os responsáveis pelas diferentes propriedades das motilidades **A** e **S** e que o fato de algumas espécies, como *M. xanthus*, apresentarem dois tipos de sistema de motilidade com diferentes vantagens seletivas pode significar uma melhor adaptação a ambientes ecologicamente e fisiologicamente diversos.

Isoladamente, os sistemas **A** e **S** não são críticos para o deslizamento, uma vez que cepas de *Myxococcus xanthus* com mutações em um dos sistemas mantêm a outra forma de motilidade. Entretanto, quando há mutações em ambos simultaneamente, não ocorre motilidade (Hartzell & Youderian, 1995).

## 2.4 Corpos de frutificação

O ciclo de vida das mixobactérias tem continuidade quando o crescimento vegetativo cessa pela ausência de nutrientes. Assim, por um processo de morfogênese cooperativa, ocorre a transição para a fase de desenvolvimento, na qual de  $10^5$  a  $10^7$  células apresentam um movimento coordenado para centros de agregação onde formam estruturas multicelulares únicas entre os procaríotos, os corpos de frutificação (Dworkin & Kaiser, 1985; Shimkets *et al.*, 2006). Em algumas espécies, como *Stigmatella aurantiaca*, esse processo é estimulado pela presença

de luz (Qualls *et al.*, 1978). Sob condições ótimas, as mixobactérias completam as fases de alinhamento, ondulação, fluxo e agregação, que compõem esse complexo processo de desenvolvimento, entre 12h e 14h, durante o qual, as células monitoram a densidade celular, controlam o ritmo de diversos eventos de desenvolvimento, empregam comportamentos táticos e orientam-se tridimensionalmente no espaço (Dawid, 2000; Alber *et al.*, 2004; Dworkin, 1996).

Para a formação do corpo de frutificação, as células de *Myxococcus xanthus* utilizam-se de dois sinais químicos. O primeiro é o sinal A, um sinal de *quorum sensing* difusível que inicia a construção da frutificação, a partir da avaliação da densidade celular (Igoshin *et al.*, 2004; Sogaard-Andersen *et al.*, 2003). O outro é o sinal C, uma proteína de superfície que coordena o movimento das células através do contato entre elas, além de regular a forma do corpo de frutificação e local de esporulação (Sogaard-Andersen *et al.*, 2003; (Igoshin *et al.*, 2004),

Antes da construção do corpo de frutificação, frequentemente, uma cultura passa por uma fase de reversões sincronizadas da polaridade da célula, alinhando-as em uma direção de movimento (Igoshin *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2009). Isso se manifesta na formação de ondas de densidade itinerantes (do inglês, *traveling density waves*), com as cristas sendo caracterizadas por alta densidade celular e as depressões, por baixa densidade (Figura 4) (Igoshin *et al.*, 2004).



Figura 4: Cultura de mixobactéria apresentando ondas espirais e concêntricas. As linhas escuras correspondem a cristas de alta densidade celular. Reproduzido de Igoshin *et al.*, 2004.

Quando ocorrem colisões em locais da cultura suficientemente densos para atrasar ambos os motores de motilidade, as porções de alta densidade celular são

obrigadas a desacelerar, criando zonas de congestionamento de milhares de células, que se mantêm imóveis por diversas horas, formando agregados celulares tridimensionais que originarão os corpos de frutificação (Figura 5) (Igoshin *et al.*, 2004; Kaiser, 2003).

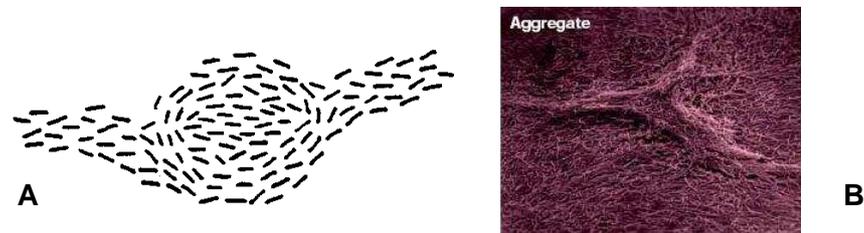


Figura 5: (A) Modelo para o estágio inicial de formação de corpo de frutificação. Reproduzido de Koch & White, 1998. (B) Agregado de células de *M. xanthus*. Reproduzido de Kaiser, 2003.

Os congestionamentos independem das ondas itinerantes para se formar, mas, quando estão acompanhados delas, eles sempre ocorrem em locais onde duas cristas interceptam a periferia da cultura (Figura 6) (Igoshin *et al.*, 2004).

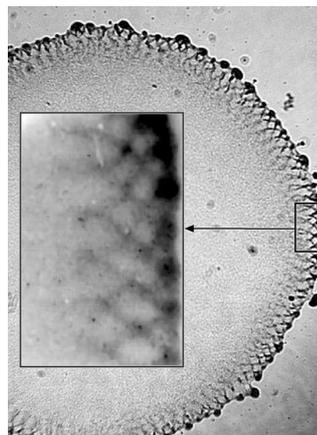


Figura 6: Cultura de mixobactéria onde os agregados negros correspondem a corpos de frutificação no começo do desenvolvimento. Reproduzido de Igoshin *et al.*, 2004.

Nas regiões de baixa densidade celular adjacentes aos congestionamentos, as células começam a se movimentar por longos períodos de tempo, rapidamente e com baixa frequência de reversão de polaridade, o que caracteriza a fase de fluxo. No momento em que encontram os agregados de células, elas não conseguem penetrá-los, devido à sua alta densidade, são desviadas de lado e ficam presas enquanto deslizam em trajetória circular ao redor desses congestionamentos. Os agregados vão ficando mais altos à medida que as células deixam a área plana de motilidade circular, em sua base, e passam a mover-se para cima em padrões

espirais, umas em cima das outras (Figura 7) até que eles atinjam o tamanho de corpos de frutificação maduros (Igoshin *et al.*, 2004; Koch & White, 1998).

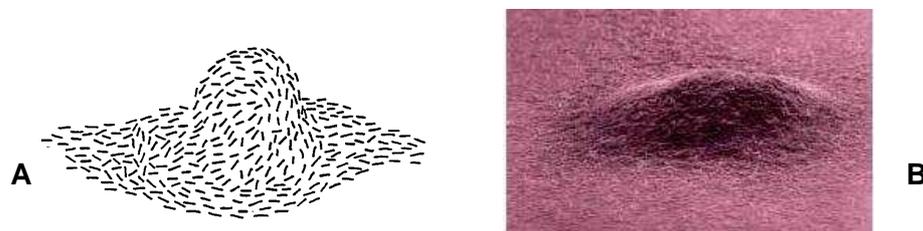


Figura 7: (A) Modelo para o estágio final de formação de corpo de frutificação. Reproduzido de Koch & White, 1998. (B) Montículo de células de *M. xanthus*. Reproduzido de Kaiser, 2003.

O tamanho dos corpos de frutificação geralmente varia entre 10 e 100 $\mu$ m, podendo ser maior. A forma, a estrutura e a cor são espécie-específicas, o que faz com que as espécies de mixobactérias sejam principalmente definidas de acordo com suas morfologias. Entretanto, sabe-se que formas similares já foram observadas por espécies completamente não relacionadas e que a forma e a cor são características que podem variar dentro das espécies (Shimkets *et al.*, 2006).

A maioria das mixobactérias apresenta no ápice do corpo de frutificação uma ou mais cápsulas com paredes bem definidas, interior rígido e resistente, chamadas de esporangiólos (do inglês, *sporangioles*), onde se encontram os mixósporos (Dawid, 2000; Shimkets *et al.*, 2006). Os mixósporos são células assexuadas, dormentes e resistentes contra dessecação, calor, ultrassonificação e radiação ultravioleta (Dawid, 2000). Isso permite a sua sobrevivência no ambiente em condições desfavoráveis por muitos anos (Shimkets, 1990). A morfologia dos esporos de mixobactérias também é variável, podendo apresentar uma mudança maior ou menor com relação à célula vegetativa original, dependendo do gênero (Shimkets *et al.*, 2006).

A formação dos mixósporos ocorre nos esporangiólos ou nos corpos de frutificação em desenvolvimento, através da morfogênese das células vegetativas, tornando-as redondas, menores e refringentes (Dawid, 2000). Sabe-se que a esporulação em mixobactérias está relacionada à atividade de autólise, mas não há concordância sobre a função e a quantidade de células envolvidas nessa atividade (Wireman & Dworkin, 1977; O'Connor & Zusman, 1988). Células vegetativas em

cultura líquida podem ser induzidas a se transformar em mixósporos, rapidamente e sincronizadamente, através da adição de glicerol ou álcool fenílico (Dworkin & Gibson, 1964).

Os mixósporos permitem que o organismo suporte extremos ambientais e persista por longos períodos em condições que podem não ser ótimas para o crescimento. Entretanto, a função do corpo de frutificação é mais sutil. Seu principal propósito, além de facilitar a distribuição para outros habitats, é assegurar que um novo ciclo de vida seja iniciado com uma grande população, com intuito de hidrolisar conjuntamente biopolímeros extracelulares pela ação de exoenzimas comuns, utilizando essas fontes nutricionais com eficiência máxima (Reichenbach, 2005; Dawid, 2000).

Na figura 8 pode-se observar um esquema do ciclo de desenvolvimento de *Myxococcus xanthus*.

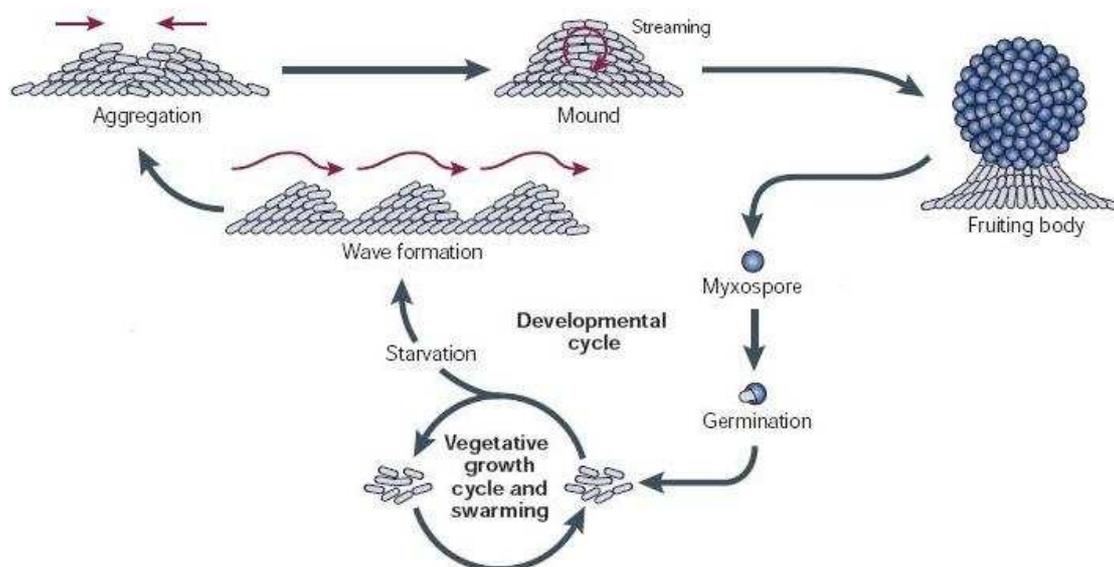


Figura 8: Esquema do ciclo de desenvolvimento de *Myxococcus xanthus*. Reproduzido de Kaiser, 2003.

## 2.5 Isolamento e identificação

As mixobactérias são organismos comuns, encontrados em vasto número em

uma grande quantidade de ambientes. Entretanto, elas não são frequentemente observadas pelos microbiologistas, pois não podem ser manipuladas com sucesso da mesma forma que as demais bactérias (Peterson, 1969). Devido à sua matriz mucóide, as células de mixobactérias não se dispersam facilmente, ficando sub-representadas em análises que utilizam diluição e plaqueamento de solo, por exemplo (Shimkets *et al.*, 2006). Outro problema é que, devido ao seu crescimento lento, elas são competidores pobres nas técnicas usuais empregadas em microbiologia, sendo cobertas rapidamente pelo crescimento de outros micro-organismos, como fungos filamentosos (Peterson, 1969).

Além disso, em meios pobres, elas se desenvolvem como colônias expansivas delicadas que passam despercebidas facilmente, enquanto que, em meios ricos, permanecem compactas e não são reconhecidas como mixobactérias, o que dificulta a seleção de meios que favoreçam o seu crescimento enquanto inibem o dos competidores (Shimkets *et al.*, 2006; Peterson, 1969).

O isolamento de mixobactérias pode ocorrer a partir de corpos de frutificação que se desenvolvem em amostras ambientais ou de colônias expansivas crescendo em culturas sólidas. Os substratos naturais mais recomendados para o isolamento são o solo, cascas de árvores vivas ou mortas, esterco de herbívoros e restos de plantas (Shimkets *et al.*, 2006). As técnicas empregadas para o isolamento variam, dependendo da amostra utilizada e das características metabólicas de interesse (mixobactérias degradadoras de celulose ou bacteriolíticas).

Após a detecção do corpo de frutificação ou da colônia expansiva, o próximo passo é a purificação, geralmente demorada, obtida através de sucessivas transferências para meios contendo *E. coli* inativada ou não. Caso a pureza não seja obtida dessa forma, podem-se tentar outros métodos como aquecimento de suspensão de corpos de frutificação, tratamento dessa suspensão com coquetel de antibióticos, incubação de culturas a temperaturas elevadas ou, ainda, transferência para meio contendo cristal violeta ou “pellets” de esterco (Reichenbach, 2005; Zhang *et al.*, 2003).

A identificação de um isolado é baseada principalmente em suas características morfológicas: forma e tamanho das células vegetativas e dos mixósporos; morfologia da colônia expansiva e, especialmente, na forma, tamanho,

cor e estrutura dos corpos de frutificação (Reichenbach, 2005). Assim, a taxonomia atual baseia-se, sobretudo, nas mixobactérias cultiváveis e produtoras de corpos de frutificação (Jiang *et al.*, 2007). Quando aplicada, a identificação molecular utiliza o seqüenciamento do gene do rRNA 16S e comparação com sequências previamente publicadas em bancos de dados, apesar da existência de primers específicos para duas das três subordens do grupo (Neil *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2005). Atualmente as mixobactérias são classificadas em três subordens, seis famílias, dezessete gêneros e aproximadamente cinqüenta espécies (Shimkets *et al.*, 2006). Entretanto, em estudo comparando métodos convencionais de isolamento com métodos independentes de cultivo aplicados à mesma amostra, observou-se que os métodos moleculares detectam uma diversidade muito maior de mixobactérias. Isto indica que deve haver muitas outras bactérias na ordem Myxococcales que ainda não foram descobertas por não formarem corpos de frutificação ou por apresentarem essas estruturas de forma atípica ou imperceptível (Wu *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2007).

A análise filogenética de sequências de rRNA 16S suporta a classificação baseada na morfologia dos isolados e indica que as mixobactérias são um grupo coerente dentro das Deltaproteobactérias (Spröer *et al.*, 1999; Ludwig *et al.*, 1983; ).

Considerando que a diversidade de mixobactérias em ambientes brasileiros é pouco conhecida e que a pequena quantidade de relatos deve estar relacionada à dificuldade de isolamento destas bactérias, este estudo tem como objetivo testar métodos, baseados em cultivo, que possibilitem o isolamento e identificação de mixobactérias bacteriolíticas presentes em folhas, em processo de degradação natural.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Cultivo de *Escherichia coli* ATCC 11105**

Para ser incorporada ao meio de cultura ou utilizada na forma de sobrecamada, *E. coli* foi cultivada em 5 mL de caldo infusão de cérebro e coração por 24h a 37°C. Esse crescimento foi inoculado em Erlenmeyer contendo 250 mL de caldo infusão cérebro e coração e mantido em incubadora-agitadora a 37°C por 24h. A cultura foi inativada em banho-de-água a 80°C por 30 minutos e centrifugada a 5000 rpm (Sigma 2K15) por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado com solução salina 0,85% estéril, adicionada até completar o volume do frasco de centrífuga. Foi realizada uma nova centrifugação, seguida de nova lavagem do precipitado com solução salina e uma última centrifugação. O precipitado resultante foi recolhido em frasco do tipo Falcon estéril e ressuscitado em solução salina 0,85% estéril.

Para ser utilizada na forma de estrias no ágar, *E. coli* foi semeada pelo método do espalhamento, em ágar triptose de soja e incubada em estufa a 37°C por 24h (adaptado de Shimkets *et al.*, 2006; Gaspari *et al.*, 2005).

#### **3.2 Coleta das amostras**

Foram realizadas cinco coletas (em maio, junho, agosto, setembro e outubro de 2010) em locais distintos do Parque Farroupilha (Figura 9) e uma em uma residência de Porto Alegre. Nas coletas Piloto, 1, 2 e 3, foram coletadas 10 folhas, enquanto que na coleta 4, foram 5 folhas. O critério para a coleta das folhas era recuperar as caídas no solo, apresentando degradação e próximas à base do tronco de árvores com diâmetro do tronco maior do que 15 cm (Neil *et al.*, 2005).

As folhas foram coletadas individualmente, assepticamente colocadas em sacos plásticos descartáveis para congelamento de alimentos e levadas

imediatamente ao laboratório. As embalagens plásticas foram mantidas abertas, à temperatura ambiente e em local iluminado até a realização da lavagem.



Figura 9: Fotografia aérea do Parque Farroupilha indicando, com letras ou números, os locais aproximados das quatro primeiras coletas realizadas neste estudo.

### 3.3 Lavagem das folhas

Cada folha foi acondicionada em um frasco de vidro estéril, no qual foi adicionado um volume pequeno de água destilada estéril contendo cicloheximida (Sigma Chemical Co., St Louis MO, USA) a  $80 \mu\text{g/mL}$ , o suficiente para cobrir a folha (Shimkets *et al.*, 2006).

Os frascos foram colocados em agitador horizontal e deixados a aproximadamente 200 rpm por, pelo menos, 1 minuto, 1 hora ou 2 horas.

### 3.4 Secagem das folhas

Foram testadas diferentes formas de secagem das folhas após a lavagem:

(1) deixar a folha secar naturalmente após seu depósito no meio de cultivo.

(2) secagem da folha com papel filtro estéril. Para isso, encostou-se o papel filtro na folha, com auxílio de pinças, até ser retirado o excesso de umidade.

(3) depositar a folha lavada em placa de Petri contendo um pedaço de papel filtro estéril e deixá-la secando na estufa a 30°C ou 37°C por 48h ou 24h.

### 3.5 Isolamento

Para realizar o isolamento após a lavagem e, em alguns casos, após a secagem, as folhas foram depositadas na superfície de Ágar WCX (Ágar ágar 1,5%; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,1%; cicloheximida 25 µg/mL) sendo a incorporação de *E. coli* no meio conforme abaixo:

(1) Utilização do método de sobrecamada. Espalhamento de 100µL de uma suspensão de *E. coli* a 0,25 mg/µL inativada com alça de Drigalski sobre o meio com movimentos em forma de oito.

(2) Utilização do método de profundidade. Adição de 750µL de uma suspensão de *E. coli* a 0,25 mg/µL no meio ainda líquido (placas de 90mm).

(3) Adição de estrias de *E. coli* não inativada na superfície do meio (cultivo de 24h em meio sólido).

### 3.6 Incubação

As placas contendo as folhas foram incubadas em temperatura ambiente, próximas a uma fonte natural de luz e acondicionadas de duas formas:

(1) cada placa acondicionada individualmente em um saco plástico não selado, idêntico ao utilizado na coleta;

(2) placas mantidas em pote plástico fechado com tampa, não selada, e contendo um frasco com sílica.

Os diversos tempos de lavagem, formas de secagem, variações na incorporação de *E. coli* utilizadas e modos de acondicionamento das, aplicados às diferentes coletas, encontram-se resumidos na Tabela 1.

### **3.7 Observação dos cultivos**

Após o terceiro dia, cada cultivo foi observado diariamente, com auxílio de microscópio estereoscópico (100, 200 e 400X), à procura de corpos de frutificação sobre as folhas ou sobre a superfície do meio ou colônias expansivas sobre a superfície do meio.

### **3.8 Purificação**

Cada corpo de frutificação detectado foi coletado, com auxílio de agulha ou alça de platina, e semeado pelo método de esgotamento em Ágar CY (Tryptona 0,3%; Extrato de Levedura 0,1%;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,1%; Ágar ágar 1,5%; Cicloheximida a 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), adaptado de Shimkets e colaboradores.(2006) ou Ágar WCX com *E.coli* inativada incorporada no meio.

### **3.9 Identificação**

A identificação dos corpos de frutificação detectados foi realizada através da análise do seu perfil morfológico, conforme Reichenbach (2005) e Shimkets *et al.* (2006).

### **3.10 Registro fotográfico**

As amostras e corpos de frutificação foram registrados com câmera digital Sony modelo Cybershot DSC-W290 não acoplada ao microscópio estereoscópico.

Tabela 1 – Relação dos diferentes tempos de lavagem, modo de secagem das folhas, tipos de incorporação de *E. coli* utilizados e formas de acondicionamento das placas.

<b>Coleta</b>	<b>Tempo de lavagem</b>	<b>Secagem das folhas</b>	<b>Tipo de incorporação de <i>E. coli</i></b>	<b>Acondicionamento das placas</b>
Piloto	1h	-	Sobrecamada, Inativada	Sacos plásticos individuais
1	1h	-	Profundidade, Inativada	Sacos plásticos individuais
2	1h 15min	Papel filtro estéril	Ágar WCX (sem <i>E. coli</i> )	Sacos plásticos individuais
3	2h	37°C, 48h 30°C, 24h	Estrias, não inativada	Pote plástico com sílica
4	1min (rápida)  2h (lenta)	Papel filtro estéril	Estrias, não inativada Profundidade, Inativada  Estrias, não inativada	Pote plástico com sílica

#### 4. RESULTADOS

Os corpos de frutificação observados foram nomeados com uma sequência alfanumérica de acordo com a coleta (P, 1, 2, 3 ou 4), número da folha (de 1 a 10 nas primeiras coletas e de 1 a 5 na última) e ordem em que foram detectados na mesma folha (1,2,3,...).

As imagens dos corpos de frutificação detectados e de algumas colônias obtidas podem ser observadas nas figuras 10 a 32.

A tabela 2 relaciona as características morfológicas dos corpos de frutificação observados, os tempos transcorridos até a detecção dessas estruturas, bem como os meios de cultivo utilizados e a situação dos isolamentos.

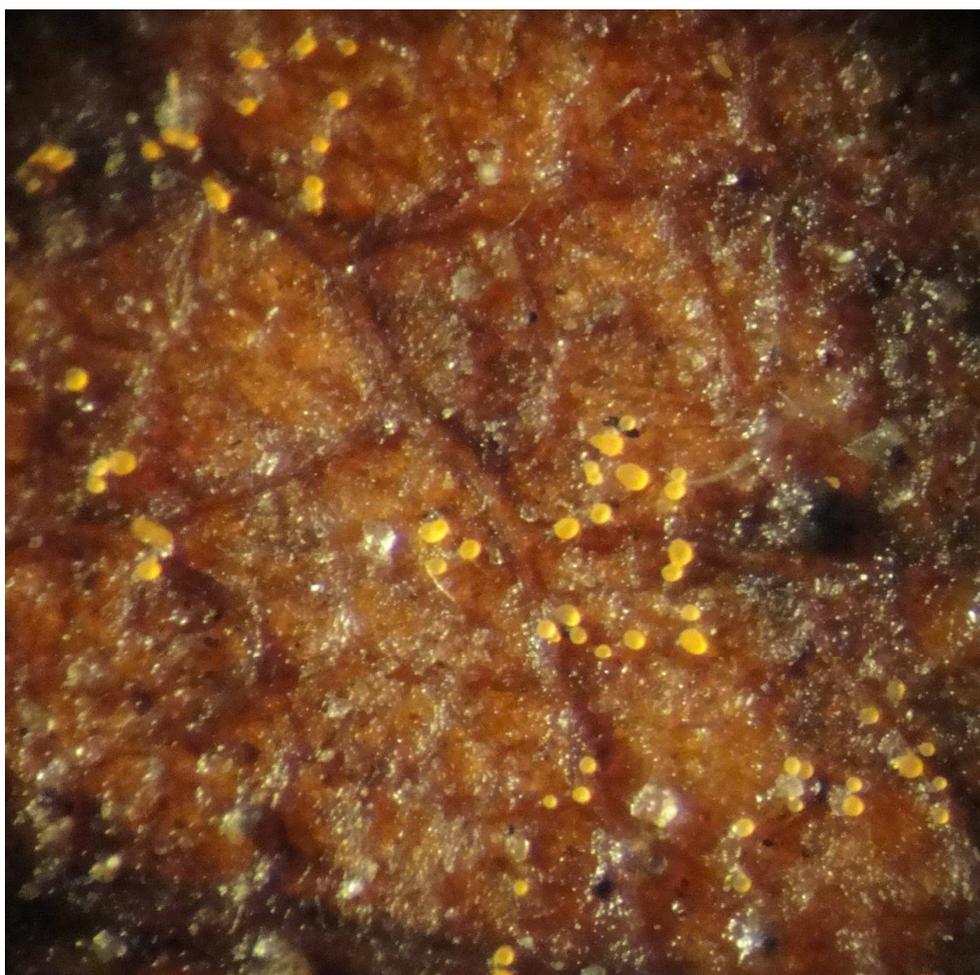


Figura 10: Corpos de frutificação de P41 (possível *Myxococcus sp.*) na superfície da folha após 4 dias de cultivo. Aumento de 40x + 2x (câmera fotográfica).

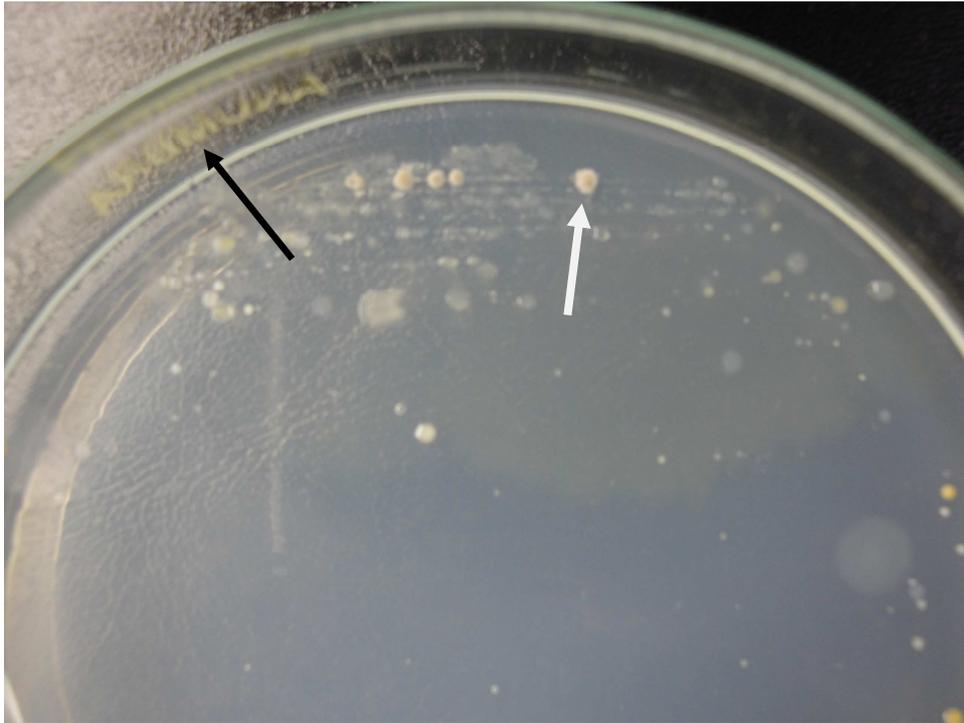


Figura 11: Primeiro isolamento de P41 após 15 dias de cultivo. É possível observar hifas de fungo filamentososo (seta preta) e colônias de actinomiceto (seta branca).

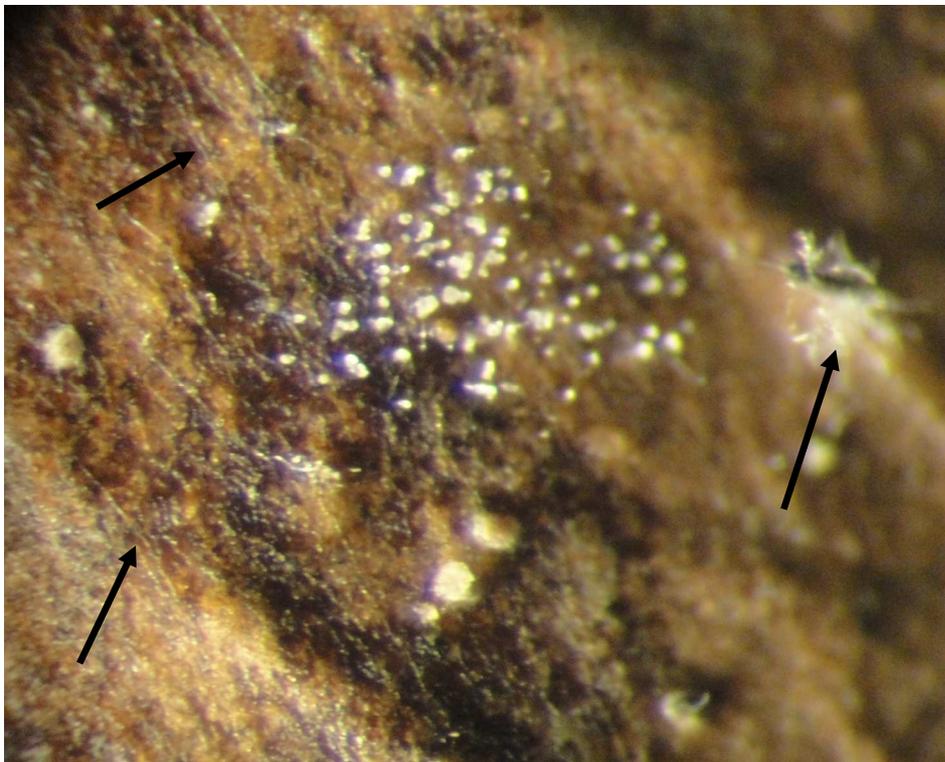


Figura 12: Corpos de frutificação de P21 na superfície da folha após 15 dias de cultivo. É possível observar hifas de fungo filamentososo (setas pretas). Aumento de 40x + 3x (câmera fotográfica).

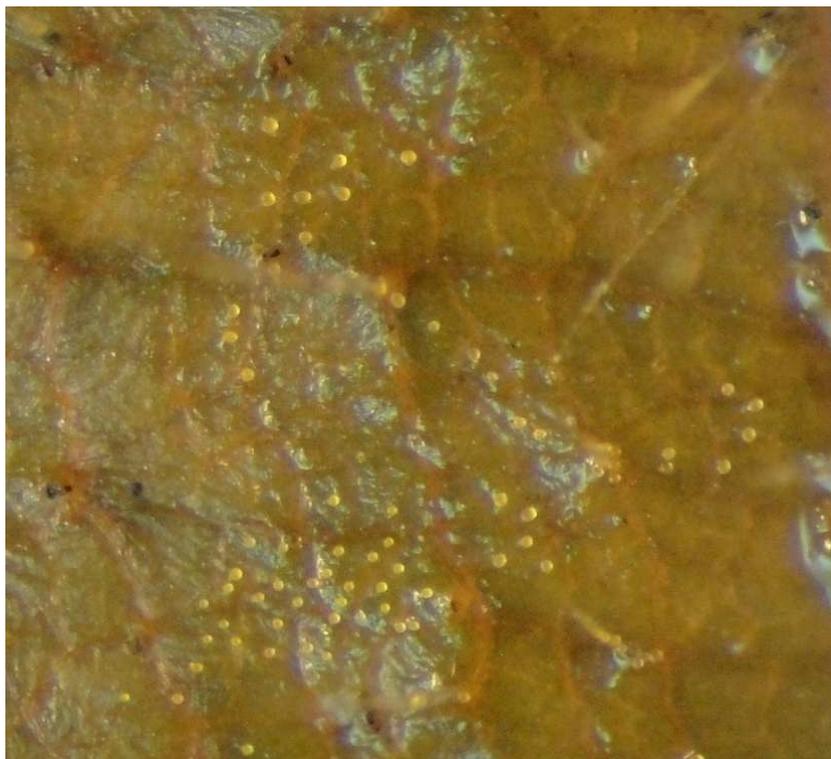


Figura 13: Corpos de frutificação de 111 (possível *Myxococcus sp.*) na superfície da folha após 7 dias de cultivo. Aumento de 40x.

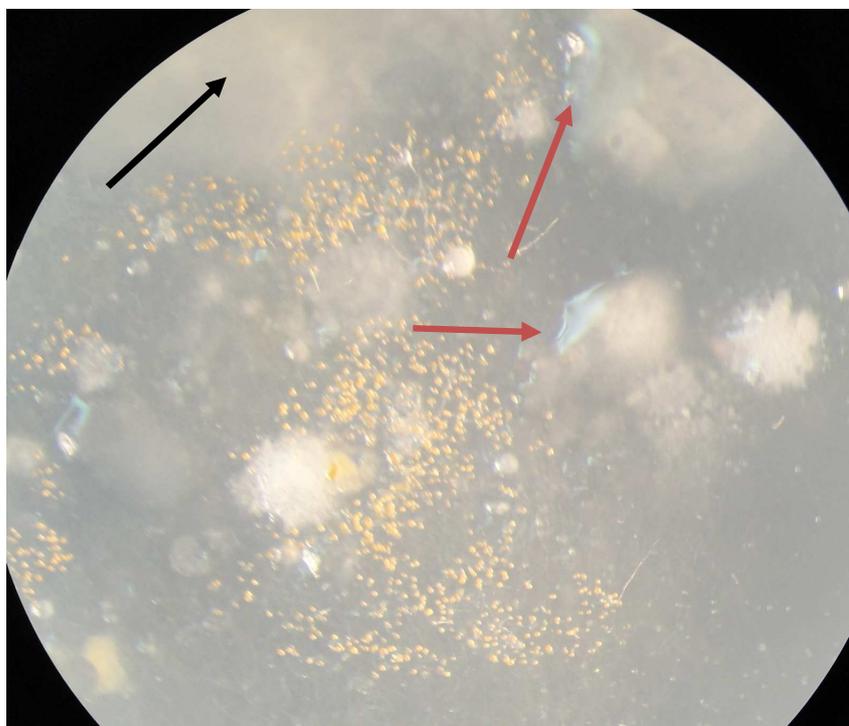


Figura 14: Primeiro isolamento de 111 após 13 dias de cultivo. É possível observar colônia de fungo filamentosos (seta preta) e presença de muco (setas vermelhas). Aumento de 40x.

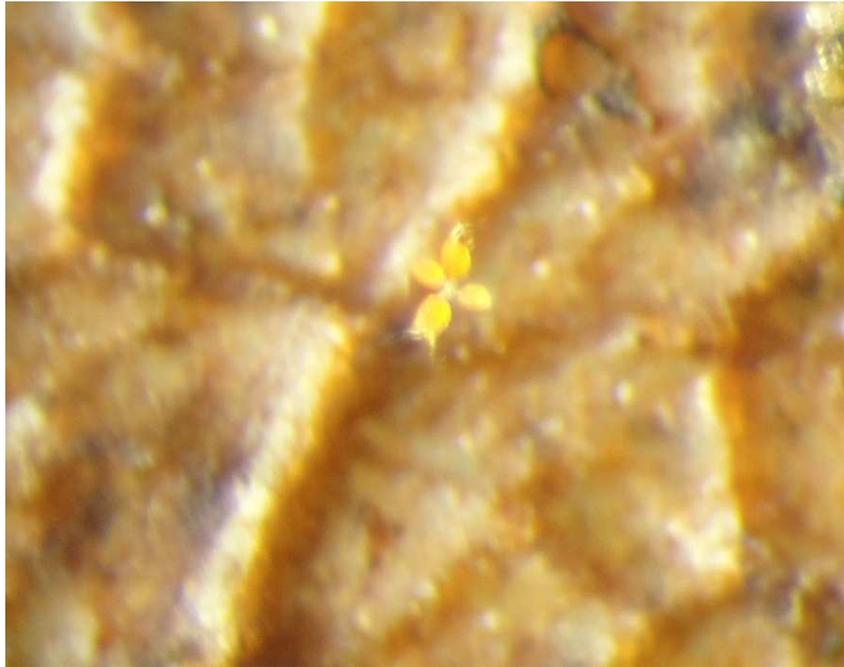


Figura 15: Corpo de frutificação de 131 (possível *Chondromyces sp.*) na superfície da folha após 9 dias de cultivo. Aumento de 40x + 3x (câmera fotográfica).

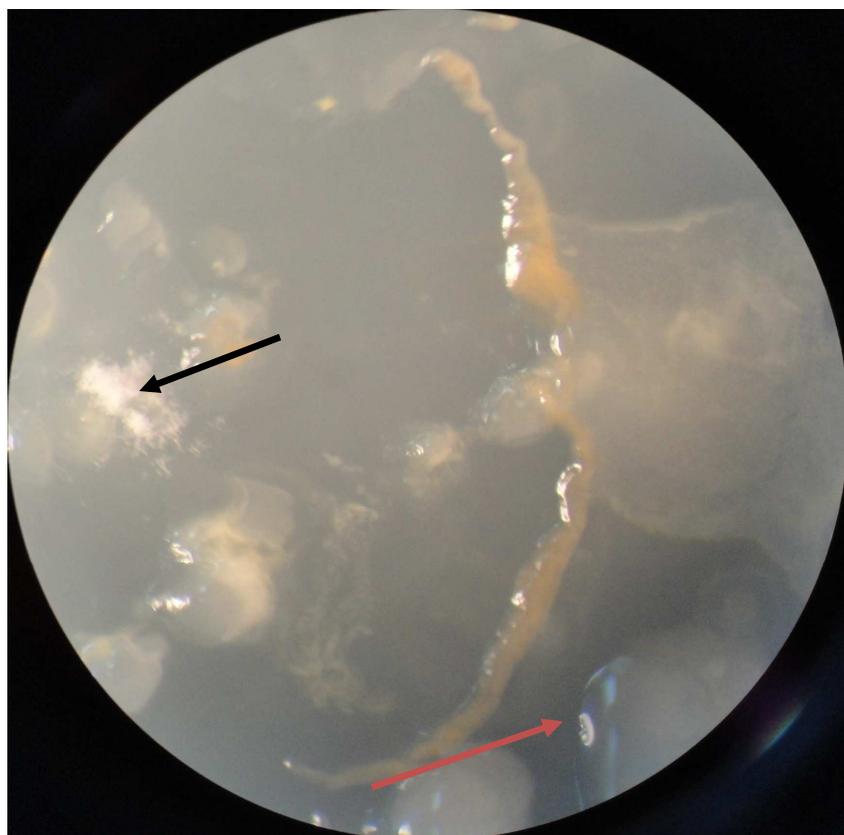


Figura 16: Primeiro isolamento de 131 após 13 dias de cultivo. É possível observar colônias de fungo filamentososo (seta preta) e presença de muco (seta vermelha). Aumento de 40x.

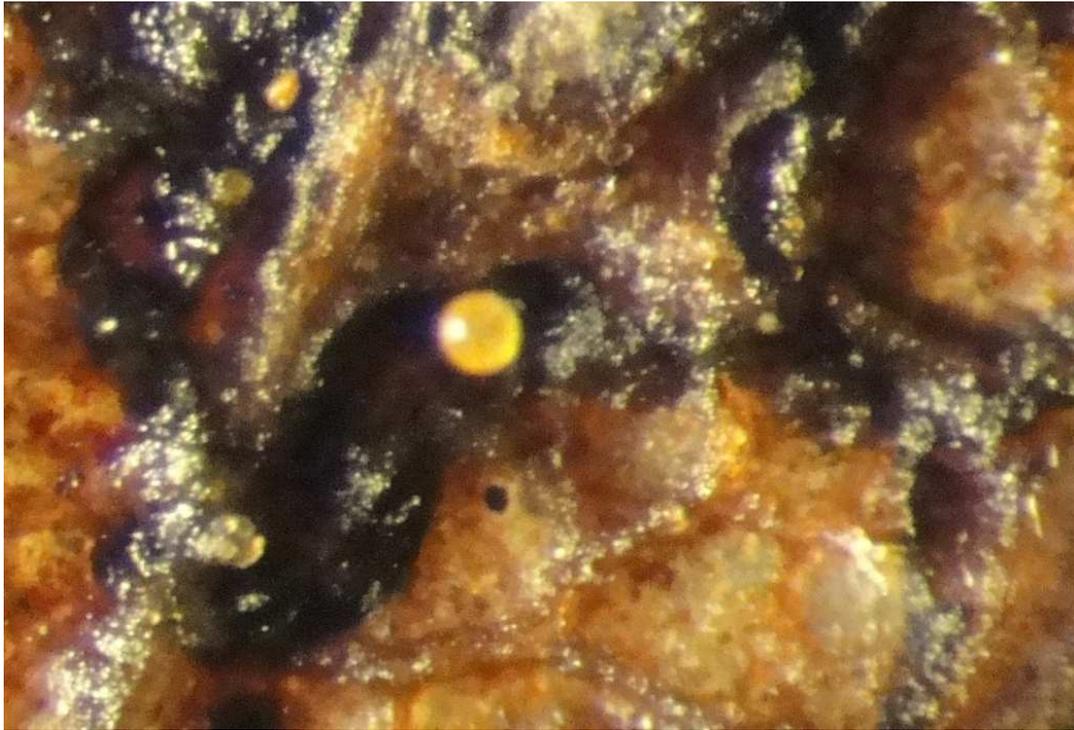


Figura 17: Corpos de frutificação de 132 (possível *Myxococcus sp.*) na superfície da folha após 9 dias de cultivo. Aumento de 40x + 2x (câmera fotográfica).

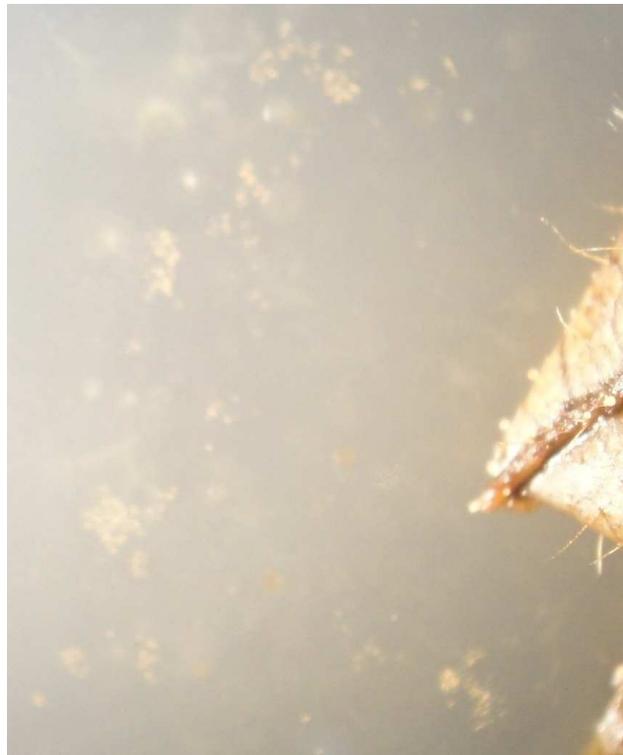


Figura 18: Corpos de frutificação de 112 (possível *Myxococcus sp.*) após 13 dias de cultivo. Aumento de 40x.

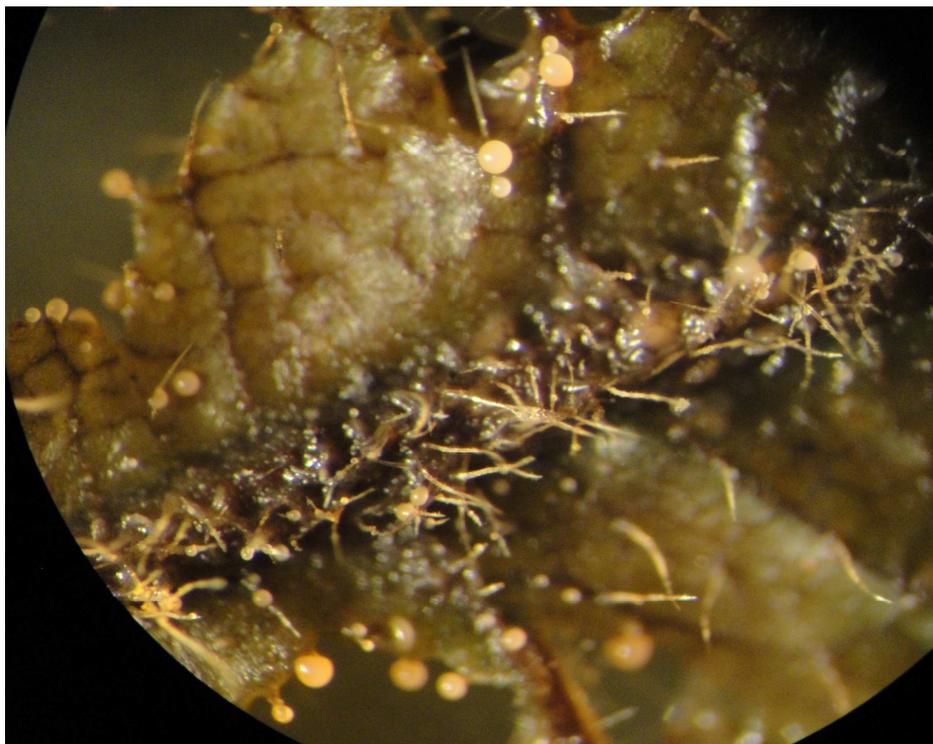


Figura 19: Corpos de frutificação de 113 (possível *Myxococcus sp.*) na superfície da folha após 13 dias de cultivo. Aumento de 40x+ 3x (câmera fotográfica).



Figura 20: Corpo de frutificação de 133 (possível *Chondromyces sp.*) na superfície da folha após 13 dias de cultivo. Aumento de 40x + 2x (câmera fotográfica).



Figura 21: Primeiro isolamento de 133 após 5 dias de cultivo. Aumento de 40x.

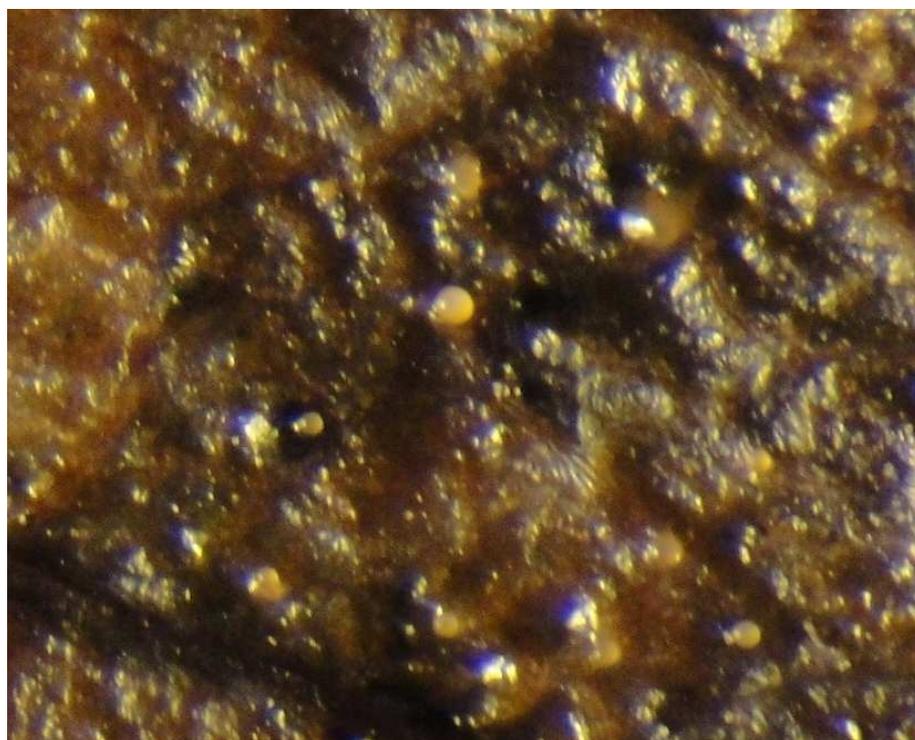


Figura 22: Corpos de frutificação de 121 (possível *Myxococcus* sp.) na superfície da folha após 13 dias de cultivo. Aumento de 40x.

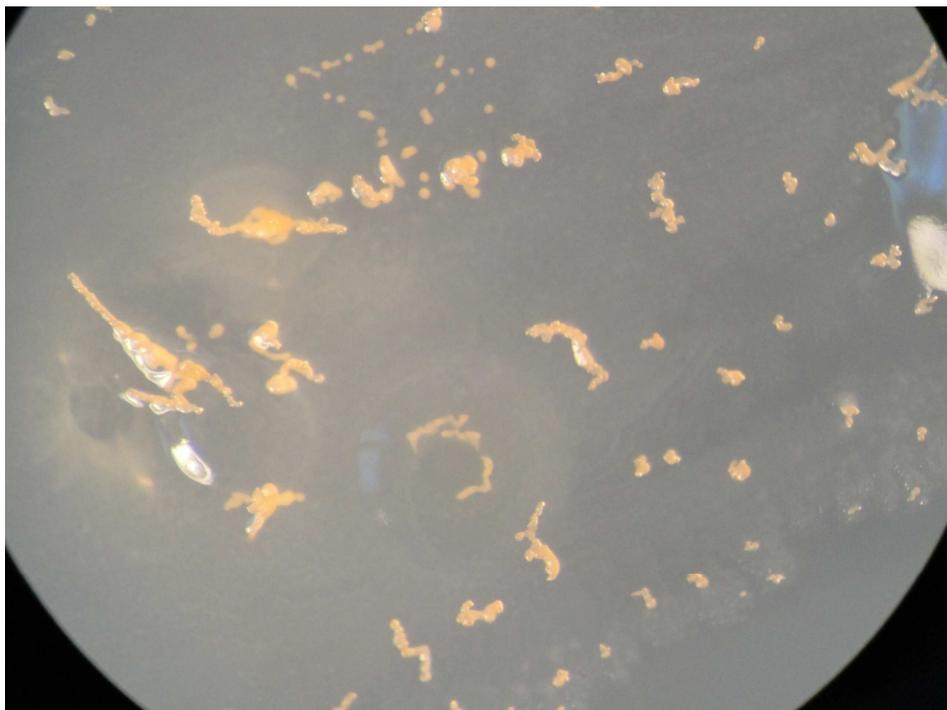


Figura 23: Primeiro isolamento de 231 (possível *Corallococcus* sp.) após 49 dias de cultivo em ágar WCX com *E.coli*. Aumento de 40x + 1,6x (câmera fotográfica).

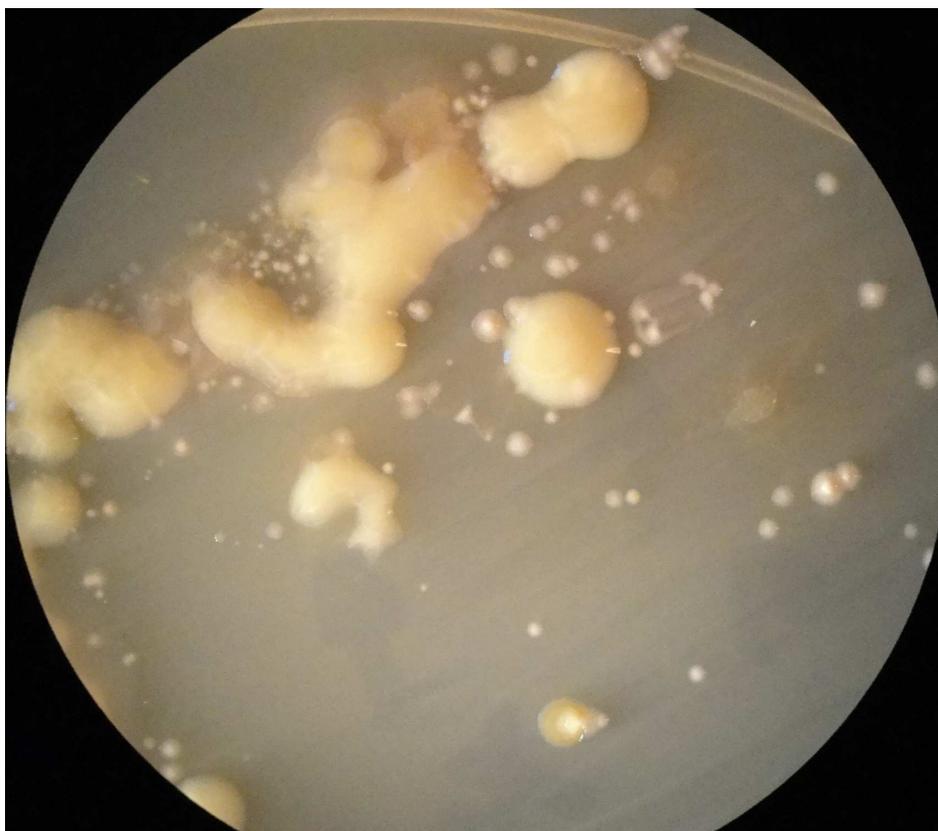


Figura 24: Segundo isolamento de 231 após 19 dias de cultivo em ágar CY. Aumento de 40x.



Figura 25: Corpos de frutificação de 371 na superfície da folha após 9 dias de cultivo. Aumento de 40x.

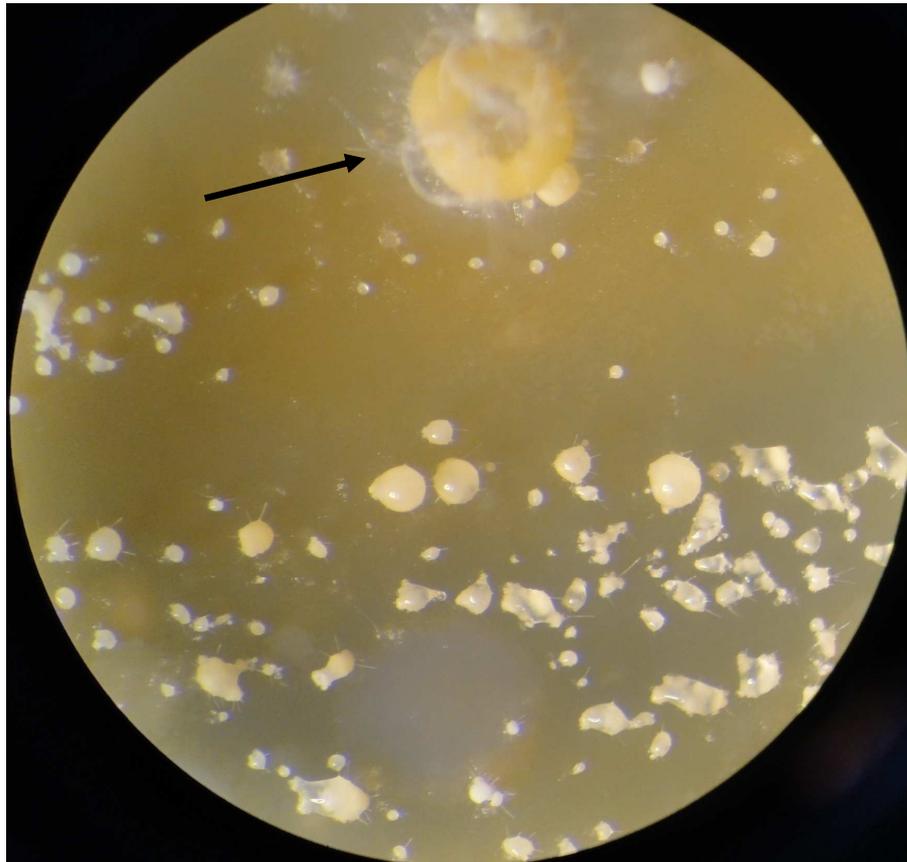


Figura 26: Primeiro isolamento de 371 após 8 dias de cultivo. É possível observar corpos de frutificação com morfologia diferente dos observados na folha e hifas de fungo filamentososo (seta preta). Aumento de 40x.

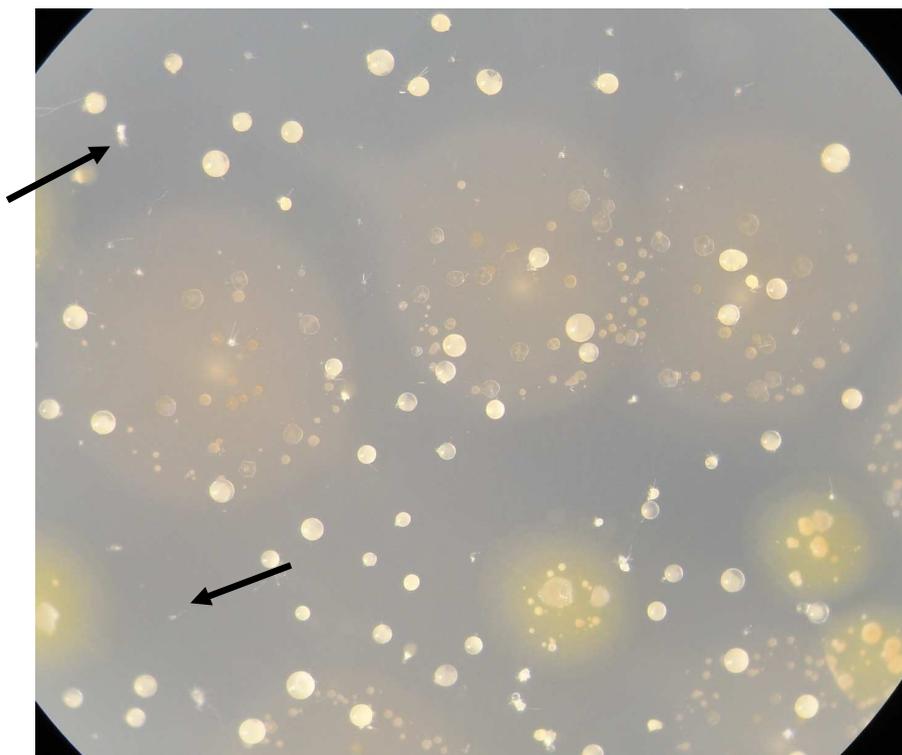


Figura 27: Segundo isolamento de 371 após 24 dias de cultivo. É possível observar novas estruturas além dos corpos de frutificação, além de hifas de fungo filamentososo (setas pretas). Aumento de 40x.



Figura 28: Detalhe da estrutura presente no segundo isolamento de 371. Aumento de 40x + 2,7x (câmera fotográfica).



Figura 29: Corpos de frutificação de 441 (seta branca) e 442 (seta vermelha) após 20 dias de cultivo. É possível observar hifas de fungo filamentososo (setas pretas). Aumento de 40x.

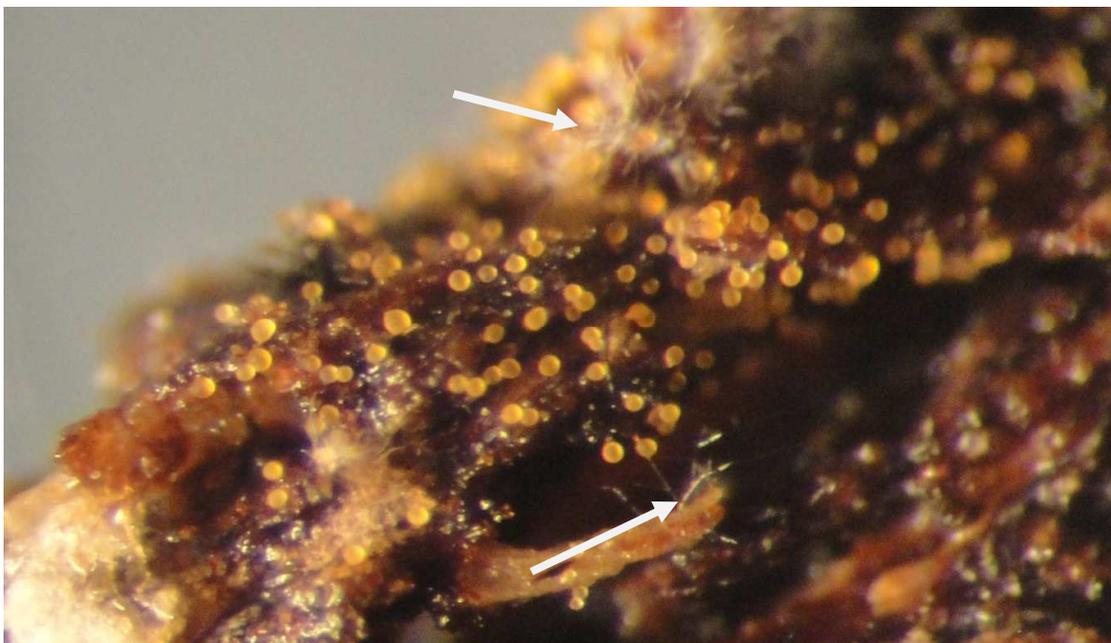


Figura 30: Corpos de frutificação de 431 (possível *Myxococcus sp.*) após 7 dias de cultivo. É possível observar hifas de fungo filamentososo (setas brancas). Aumento de 40x + 2x (câmera fotográfica).

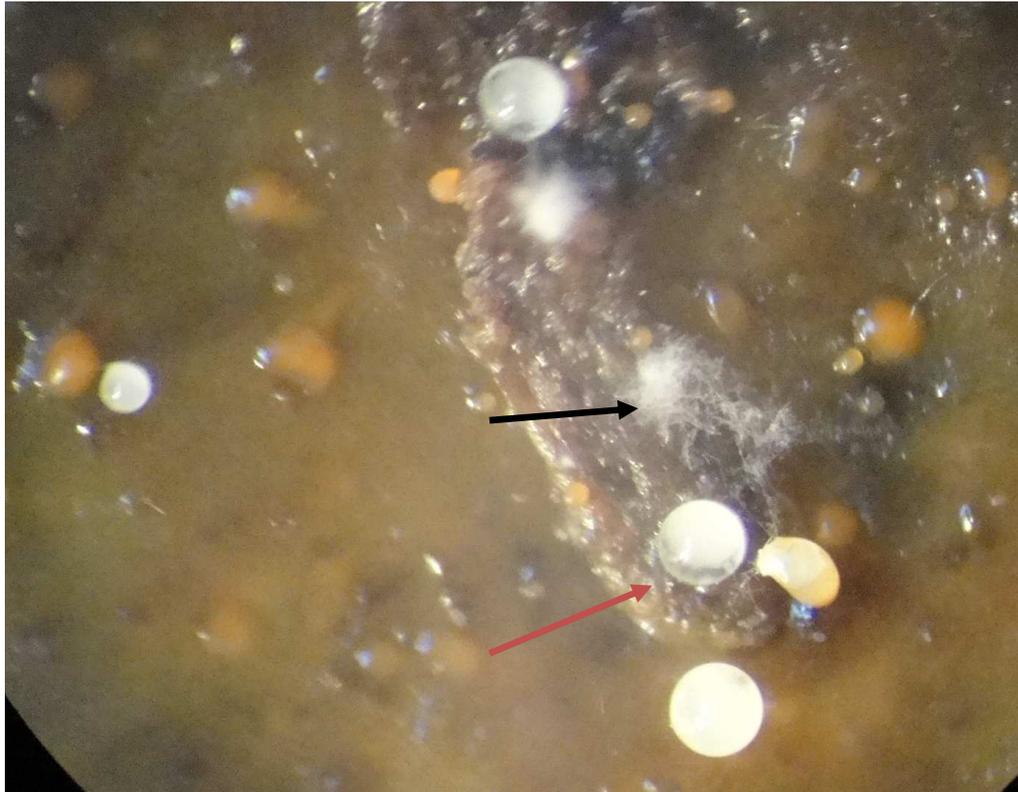


Figura 31: Corpos de frutificação de 422 (seta vermelha) após 19 dias de cultivo. É possível observar colônias de fungo filamentososo (seta preta). Aumento de 40x + 2x (câmera fotográfica).

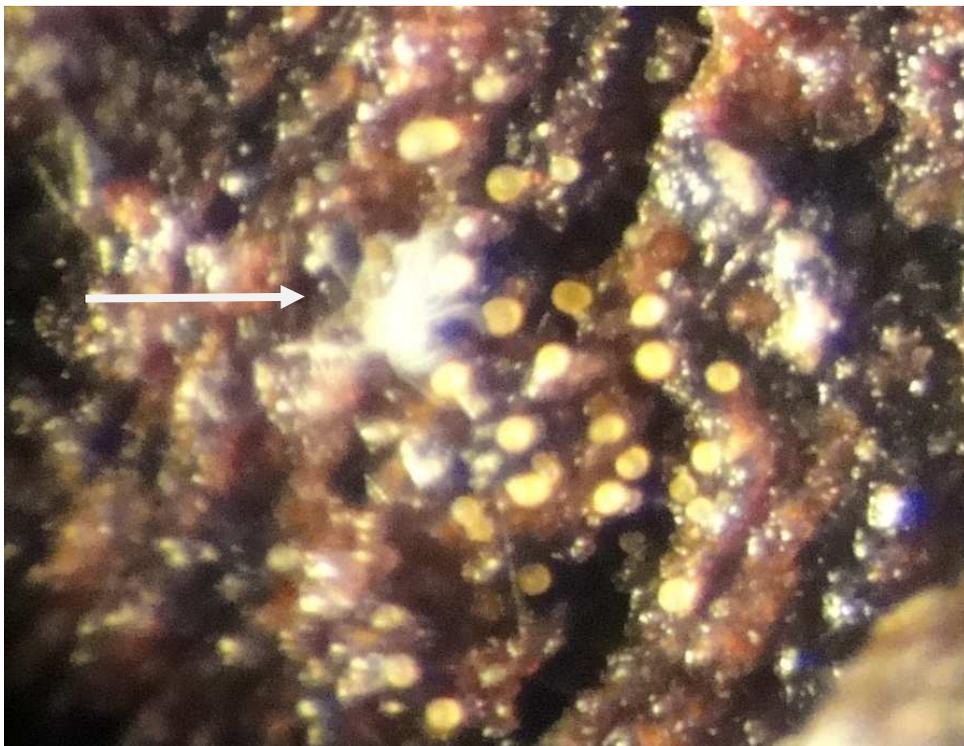


Figura 32: Corpos de frutificação de 432 após 19 dias de cultivo. É possível observar colônias de fungo filamentososo (seta preta). Aumento de 40x + 2,3x (câmera).

Tabela 2 – Relação das características morfológicas dos corpos de frutificação observados, tempos transcorridos até a detecção, meios de cultivo utilizados e a situação do isolamento das cepas.

Coleta	CF observado <sup>1</sup>	Características do corpo de frutificação	Tempo até a observação	Tipo meio e de incorporação de <i>E. coli</i> em WCX <sup>2</sup>	Situação do isolamento
<b>Piloto</b>	P41	Cor laranja, consistência macia e viscosa, ápice esférico simples, comprimido na base	4 dias	WCX, profundidade	Negativo
	P21	Pequeno, cor branca, aparência vítrea	15 dias	WCX , profundidade	Negativo
<b>1</b>	111	Cor laranja, consistência macia e viscosa, ápice esférico simples, comprimido na base	7 dias	WCX , profundidade	Negativo
	131	Cor laranja, ápice subdividido em quatro partes, comprimido na base	9 dias	WCX , profundidade	Negativo
	132	Cor laranja, consistência macia e viscosa, ápice esférico simples, comprimido na base	9 dias	WCX , profundidade	Negativo
	112	Na superfície do ágar; Cor laranja, consistência macia e viscosa, ápice esférico simples, comprimido na base	13 dias	WCX , profundidade	Negativo
	113	Grande, cor laranja, consistência macia e viscosa, ápice esférico simples, comprimido na base	13 dias	WCX , profundidade	Negativo
	133	Cor laranja, ápice subdividido em, pelo menos, sete partes, caule de sustentação branco	13 dias	WCX , profundidade	Negativo
	121	Cor laranja claro, consistência macia e viscosa, ápice esférico simples, comprimido na base	13 dias	WCX , profundidade	Negativo
	<b>2</b>	231	Cor laranja claro, consistência macia e viscosa, ápice esférico simples, comprimido na base	12 dias	WCX, profundidade; CY <sup>3</sup>
<b>3</b>	371	Cor amarelo claro opaco, ápice cilíndrico, alongado, possivelmente elevado por pedúnculo	9 dias	CY	Negativo
<b>4</b>	421	Colônias transparentes na superfície do ágar, fora das estrias de <i>E.coli</i>	4 dias	WCX , profundidade	Negativo
	441	Cor bege, superfície rugosa, formato cônico, possível cápsula protegendo os esporos	4 dias	CY	Em isolamento
	442	Cor bege, ápice esférico, possível cápsula protegendo os esporos	4 dias	CY	Negativo
	431	Cor laranja, consistência macia e viscosa, ápice esférico simples, comprimido na base	7 dias	CY	Negativo
	422	Cor branca, consistência viscosa, ápice globoso, haste de sustentação, fiozinhos saindo da base do ápice	19 dias	CY	Em isolamento
	432	Cor laranja, consistência macia e viscosa, ápice esférico simples comprimido na base	19 dias	CY	Negativo

1, CF: Numeração do corpo de frutificação observado; 2,WCX: Ágar ágar 1,5%; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,1%; cicloheximida 25 µg/mL; 3, CY: Triptona 0,3%; Extrato de Levedura 0,1%; CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O 0,1%; Ágar ágar 1,5%; Cicloheximida a 25 µg/mL.

## 5. DISCUSSÃO

Segundo a literatura, é recomendado para o isolamento de mixobactérias bacteriolíticas o uso de estrias de *E. coli* não-inativada em forma de cruz, depositando uma pequena quantidade de amostra na intersecção entre as duas estrias (Gaspari *et al.*, 2005; Neil *et al.*, 2005; Shimkets *et al.*, 2006). Era esperado que os corpos de frutificação se desenvolvessem sobre a massa de células de *E. coli* devido sua atividade bacteriolítica e capacidade de movimento, o que não foi observado neste estudo (Neil *et al.*, 2005). Entretanto, dos dezesseis corpos de frutificações observados durante o estudo, quinze encontravam-se sobre as folhas. Uma possibilidade é a de que as mixobactérias não tenham se movimentado em direção às células de *E. coli*, tendo permanecido na superfície da folha, onde, devido à escassez de nutrientes, geraram as suas estruturas de resistência. Caso essa movimentação também tenha ocorrido, é provável que as células de mixobactérias tenham utilizado a isca como fonte de nutrientes, mas não tenham desenvolvido colônias características ou corpos de frutificação, o que impediu a sua detecção, fato que foi descrito por outros autores (Shimkets *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007). Também, devido à presença constante de fungos, talvez ocorresse concorrência entre estes micro-organismos, o que pode ter dificultado o movimento e a multiplicação das mixobactérias. Além disso, várias amostras foram descartadas em razão desta contaminação, impedindo a observação desta movimentação.

Considerando que os corpos de frutificação foram detectados, na maioria, na superfície das folhas, não é possível relacionar as diferentes formas de oferecimento de *E. coli*, ou sua ausência, com a variedade de frutificações encontradas nas diferentes coletas. Assim, não se pode considerar como bacteriolítico nenhum dos representantes do grupo observados.

Os corpos de frutificação detectados apareceram entre os dias 4 e 19 de incubação, de acordo com o previsto por Shimkets *et al.* (2006), de que a maioria das frutificações aparece nos primeiros dias e os demais podem levar até vinte dias para serem observados. Não pareceu haver uma relação direta entre a morfologia da estrutura (uma das características para se estabelecer o gênero) e o tempo

decorrido até a detecção, confirmando que existe, dentro do grupo das mixobactérias, uma variação no tempo necessário para frutificar e que tal diferença também está presente dentro de um mesmo gênero, caso sejam confirmadas as possíveis identificações realizadas.

Com relação à diversidade de mixobactérias, observou-se que ela foi maior nas folhas provenientes de uma residência de Porto Alegre (coleta 4), do que nas folhas coletadas do local original de interesse. O Parque Farroupilha, apesar de ser um patrimônio ambiental da cidade, conta com a visita permanente de pessoas, principalmente nos finais de semana, e encontra-se situado entre avenidas com fluxo intenso de veículos que impactam de forma negativa esse ambiente, interferindo certamente na diversidade de espécies encontradas. Essa hipótese é corroborada pelo fato de que quase todas as mixobactérias são atraídas para habitats com ricas comunidades microbianas, podendo colonizá-las e utilizá-las como alimento (Shimkets *et al.*, 2006).

Observou-se de uma a quatro morfologias diferentes de corpos de frutificação em cada uma das coletas. Uma vez que, em cada coleta, foram processadas dez folhas (exceto na coleta 4, a partir da qual foram utilizadas apenas cinco folhas), essa diversificação apresenta-se como satisfatória. Em pesquisas desenvolvidas com solo, o número de isolados relatados por amostra são superiores, mas deve-se considerar que este ambiente é mais rico em mixobactérias e outros micro-organismos (Gaspari *et al.*, 2005; Neil *et al.*, 2005).

Um dos contratempos presentes durante os experimentos, que certamente contribuíram para diminuir a diversidade de mixobactérias encontradas, foi a contaminação por fungos filamentosos que se desenvolveram sobre o meio e folhas durante e, certamente, antes da formação de algumas colônias ou corpos de frutificação das mixobactérias. Sabe-se que, durante o isolamento dessas bactérias, podem ocorrer contaminações por esses micro-organismos, além de amebas, nematóides e ácaros (Shimkets *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2005). A lavagem antes da semeadura tem a finalidade de remover esses micro-organismos e a adição de cicloheximida na água de lavagem e no meio é realizada, principalmente, para diminuir a contaminação por fungos que se aderem mais fortemente à superfície da planta (Shimkets *et al.*, 2006). Não foram detectadas amebas no cultivo das folhas e

a eventual presença de nematóides e ácaros não perturbou os procedimentos previstos, diferentemente da presença dos fungos filamentosos.

Na tentativa de eliminar estes contaminantes, foram testados diversos tempos de lavagem das folhas antes de sua deposição no meio de cultura e, depois, duas formas de acondicionamento das placas. Em todas as combinações possíveis, as contaminações estiveram presentes desde a primeira semana de cultivo, o que indica que a metodologia utilizada não foi eficiente para eliminar completamente os fungos filamentosos. Inclusive, notou-se não haver diferença entre a quantidade de colônias de fungo filamentoso presentes quando compara-se os tempos de lavagem rápida (1min) e lenta (2h) em folhas da mesma planta, aplicados na coleta 4. Porém, verificou-se que a secagem das folhas com papel filtro estéril combinada com a incubação das placas em frasco plástico contendo sílica diminuiu a continuidade de crescimento dos fungos filamentosos, ou seja, as colônias estavam presentes nos cultivos, mas não se desenvolviam a ponto de ocupar a placa toda. Com isso, foi possível prosseguir com os isolamentos.

Outra dificuldade encontrada foi obter culturas isoladas. Principalmente devido à presença de fungos filamentosos, não foi possível dar continuidade aos isolamentos dos corpos de frutificação semeados em ágar WCX com *E.coli* incorporada. Entretanto, nas poucas placas em que a contaminação não estava presente, as colônias formadas não eram características de mixobactéria, o que também ocorreu com as culturas semeadas em ágar CY.

O que pode explicar esse insucesso é o método de purificação utilizado, sugerido por Shimkets e colaboradores (2006), que não se mostrou adequado neste estudo. Devido à presença de outros micro-organismos na superfície das folhas, durante a transferência dos corpos de frutificação para um novo meio de cultura, bactérias associadas às mixobactérias cresceram mais rapidamente no meio, possivelmente impedindo o seu desenvolvimento. Isso se deve provavelmente à riqueza em nutrientes dos meios utilizados, como o ágar CY, por exemplo. Essa hipótese é corroborada por Peterson (1969), que afirma que as mixobactérias são competidores pobres, apesar da sua produção de substâncias bacteriolíticas, sendo rapidamente cobertas pelas colônias de outros micro-organismos ou nem mesmo chegando a desenvolver uma colônia detectável.

## 6. CONCLUSÃO

Após o presente estudo, pode-se afirmar que mixobactérias estão presentes no sul do Brasil, associadas a folhas em decomposição, e que é possível detectá-las utilizando a metodologia descrita.

Contudo, como não foi possível obter isolados, as próximas abordagens de trabalho com mixobactérias presentes em folhas de árvores devem considerar o uso combinado de mais de um método de purificação para otimizar tempo e resultados. Adicionalmente, a técnica para detecção também pode ser aperfeiçoada, associando métodos descritos na literatura ao acondicionamento em pote plástico contendo sílica, de forma a buscar condições não favoráveis ao desenvolvimento de contaminações por fungo filamentoso.

Caso o interesse seja obter uma grande diversidade de isolados, é recomendado o uso de amostras de outra origem, como solo ou “pellets” de esterco de herbívoros, que comprovadamente estão associadas a um número maior de micro-organismos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBER, M. S., JIANG, Y., KISKOWSKI, M. A. (2004) Lattice gas cellular automation model for rippling and aggregation in myxobacteria, *Physica D*, 191, 343–358.
- BLACKHART, B. D., ZUSMAN, D. (1985) “Frizzy” genes of *Myxococcus xanthus* are involved in control of the frequency of reversal of gliding motility, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 8767–8771.
- BUNTIN, K., IRSCHIK, H., WEISSMAN, K. J., LUXENBURGER, E., BLÖCKER, H., MÜLLER, R., (2010) Biosynthesis of thuggacins in myxobacteria: comparative cluster analysis reveals basis for natural product structural diversity, *Chem. Biol.*, 17(4), 342-356.
- BROCKMAN, E. R., BOYD, W. (1963) Myxobacteria from soils of the alaskan and canadian artic, *J. Bacteriol.*, 86, 605-606.
- BROCKMAN, E. R. (1967) Fruiting myxobacteria from the South Carolina coast, *J. Bacteriol.*, 94, 4, 1253-1245.
- BROCKMAN, E. R. (1976) Myxobacters from arid mexican soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 32 (4), 642-644.
- BURCHARD, R. P. (1982) Trail following by gliding bacteria, *J. Bacteriol.*, 152 (1), 495-501.
- CARLSON, R. V., PACHA, R. E. (1968) Procedure for the isolation and enumeration of myxobacteria from aquatics habitats. *Appl. Microbiol.*, 16 (5), 795-796.
- DAWID, W., GALLIKOWSKI, C. A., HIRSCH, P. (1988) Psychrophilic myxobacteria from antarctic soils. *Polarforschung* 58 (213), 271-278.
- DAWID, W. (2000) Biology and global distribution of myxobacteria in soils, *FEMS Microbiol. Rev.*, 24, 403–427.
- DWORKIN, M., GIBSON, S. M. (1964) A system for studying microbial morphogenesis: rapid formation of microcysts in *Myxococcus Xanthus*, *Science*, 146, 243–244.

- DWORKIN, M. (1983) Tactic behavior of *Myxococcus Xanthus*, *J. Bacteriol.*, 154, 452–459.
- DWORKIN, M., KAISER, D. (1985) Cell interactions in myxobacterial growth and development, *Science*, 230, 18–24.
- DWORKIN, M. (1996) Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria, *Microbiol. Rev.*, 60, 70–102.
- EGERTON, N. (2010) Optimizing ixabepilone treatment schedules in patients with advanced or metastatic breast cancer, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 66 (6), 1005-1012.
- FONTES, M., KAISER, D. (1999) *Myxococcus* cells respond to elastic forces in their substrate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 8052–8057.
- FREESE, A., REICHENBACH, H., LUNSDORF, H. (1997) Further characterization and in situ localization of chain-like aggregates of the gliding bacteria *Myxococcus fulvus* and *Myxococcus Xanthus*, *J. Bacteriol.*, 179, 1246–1252.
- FUDOU, R., JOJIMA, Y., IIZUKA, T., YAMANAKA, S. (2002) *Haliangium ochraceum* gen. nov., sp. nov. and *Haliangium tepidum* sp. nov.: novel moderately halophilic myxobacteria isolated from coastal saline environments, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 48 (2), 109-115.
- GASPARI, F., PAITAN, Y., MAININI, M., LOSI, D., RON, E.Z., MARINELLI, F. (2005) Myxobacteria isolated in Israel as potential source of new anti-infectives, *J. Appl. Microbiol.*, 98 (2), 429–439.
- GERTH, K., MÜLLER, R. (2005) Moderately thermophilic myxobacteria: novel potential for the production of natural products isolation and characterization, *Environ. Microbiol.*, 7 (6), 874-880.
- GOLDMAN, B. S., NIERMAN, W. C., KAISER, D., SLATER, S. C., DURKIN, A. S., EISEN, J. A., RONNING, C. M., BARBAZUK, W. B., BLANCHARD, M., FIELD, C., HALLING, C., HINKLE, G., IARTCHUK, O., KIM, H. S., MACKENZIE, C., MADUPU, R., MILLER, N., SHVARTSBEYN, A., SULLIVAN, S. A., VAUDIN, M., WIEGAND, R., KAPLAN, H. B. (2006) Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103 (41), 15200-15205.

- HARTZELL, P. L., YOUNDERIAN, P. (1995) Genetics of gliding motility and development in *Myxococcus Xanthus*, *Arch. Microbiol.*, 164, 309-323.
- HODGKIN, J., KAISER, D. (1979) Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales): two gene systems control movement, *Molec. Gen. Genet.*, 171, 177–191.
- IGOSHIN, O. A., KAISER, D., OSTER, G. (2004) Breaking symmetry in myxobacteria, *Curr Biol.*, 14 (12), R459-R462.
- IIZUKA, T., JOJIMA, Y., FUDOU, R., HIRAIISHI, A., AHN, J-W., YAMANAKA, S. (2003) *Plesiocystis pacifica* gen. nov., sp. nov., a marine myxobacterium that contains dehydrogenated menaquinone, isolated from the Pacific coasts of Japan, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 189-195.
- IRSCHIK, H., REICHENBACH, H. (1985) The mechanism of action of myxovalargin a, a peptide antibiotic from *Myxococcus fulvus*, *J Antibiot.*, 38 (9), 1237-1245.
- JEFFERS, E. E. (1964) Myxobacters of a freshwater lake and its environs, *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl.*, 14 (3), 115-136.
- JIANG, D. M., WU, Z. H., ZHAO, J. Y., LI, Y. Z. (2007) Fruiting and non-fruited myxobacteria: a phylogenetic perspective of cultured and uncultured members of this group, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 44 (2), 545-552.
- KAISER, D. (1979) Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus Xanthus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 5952–5956.
- KAISER, D. (2000) Bacterial motility: how do pili pull?, *Curr. Biol.*, 10, R777–R780.
- KAISER, D. (2003) Coupling cell movement to multicellular development in myxobacteria, *Nat. Rev. Microbiol.*, 1, 45-54.
- KOCH, A. L., WHITE, D. (1998) The social lifestyle of myxobacteria. *BioEssays*, 20, 1030–1038.
- LEE, S. H., SON, S. M., SON, D. J., KIM, S. M., KIM, T. J., SONG, S., MOON, D. C., LEE, H. W., RYU, J. C., YOON, D. Y., HONG, J. T. (2007) Epothilones induce human colon cancer SW620 cell apoptosis via the tubulin polymerization independent activation of the nuclear factor-kappaB/IkappaB kinase signal pathway, *Mol. Cancer Ther.*, 6 (10), 2786-97.

- LUDWIG, W., SCHLEIFER, H. H., REICHENBACH, H., STACKEBRANDT, E. (1983) A phylogenetic analysis of the myxobacteria *Myxococcus fulvus*, *Stigmatella aurantiaca*, *Cystobacter fuscus*, *Sorangium cellulosum* and *Nannocystis exedens*, *Arch. Microbiol.*, 135, 58–62.
- LÜNSDORF, H., REICHENBACH, H. (1989) Ultrastructural details of the apparatus of gliding motility of *Myxococcus fulvus* (Myxobacteriales), *J. Gen. Microbiol.*, 135, 1633–1641.
- MIGNOT, T., SHAEVITZ, J. W., HARTZELL, P. L., ZUSMAN, D. R. (2007) Evidence that focal adhesion complexes power bacterial gliding motility, *Science*, 315, 853-856.
- NEIL, R.B., HITE, D., KELRICK, M. I., LOCKHART, M. L., LEE, K. (2005) Myxobacterial biodiversity in an established oak-hickory forest and a savanna restoration site, *Curr. Microbiol.*, 50 (2), 88–95.
- O'CONNOR, K. A., ZUSMAN, D. R. (1988) Reexamination of the role of autolysis in the development of *Myxococcus xanthus*, *J. Bacteriol.*, 170 (9), 4103-4112.
- OTT, P. A., HAMILTON, A., JONES, A., HAAS, N., SHORE, T., LIDDELL, S., CHRISTOS, P. J., DOYLE, L. A., MILLWARD, M., MUGGIA, F. M., PAVLICK, A. C. (2010) A phase II trial of the epothilone b analog ixabepilone (BMS-247550) in patients with metastatic melanoma, *PLoS One*, 5 (1), e8714.
- PETERSON, J. E. (1969) Isolation, Cultivation and Maintenance of the Myxobacteria. In: J.R. Norris and D.W. Ribbons (Eds), *Methods in Microbiology*. Vol. 3. Part 2. Orlando: Academic Press.
- QUALLS, G. T., STEPHENS, K., WHITE, D. (1978) Lightstimulated morphogenesis in the fruiting myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*, *Science*, 201, 444–445.
- REICHENBACH, H. (1999) The ecology of the myxobacteria, *Environ. Microbiol.*, 1, 15–21.
- REICHENBACH, H. (2005) The Myxococcales In: G. M. Garrity (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2<sup>nd</sup> ed. Part 3: The Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. New York: Springer-Verlag.

- SHI, W., ZUSMAN, D. R. (1993) The two motility systems of *Myxococcus xanthus* show different selective advantages on various surfaces, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 3378-3382.
- SHIMKETS, L. J. (1990) Social and developmental biology of myxobacteria, *Microbiol. Rev.*, 54 (4), 473-501.
- SHIMKETS, L. J., DWORKIN, M., REICHENBACH, H. (2006) The myxobacteria, In DWORKIN, M. (Ed.), *The prokaryotes*. Vol. 7. New York: Springer.
- STANIER, R. Y. (1942) A note on elasticotaxis in myxobacteria, *J. Bacteriol.*, 44, 405–412.
- SOGAARD-ANDERSEN, L., OVERGAARD, M., Lobedanz, S., Ellehauge, E., Jelsbak, L., Rasmussen, A. A. (2003) Coupling gene expression and multicellular morphogenesis during fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*, *Mol. Microbiol.*, 48 (1), 1–8
- SPRÖER, C., REICHENBACH, H., STACKEBRANDT, E. (1999) The correlation between morphological and phylogenetic classification of myxobacteria, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, 1255–1262.
- VISHNU, P., TAN, W. W. (2010) Update on options for treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer, *Onco Targets Ther.*, 3, 39-51.
- WIREMAN, J. W., DWORKIN, M. (1975) Morphogenesis and developmental interactions in myxobacteria, *Science*, 189 (4202), 516-523.
- WIREMAN, J. W., DWORKIN, M. (1977) Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *Myxococcus Xanthus*, *J. Bacteriol.*, 129, 796–802.
- WOLGEMUTH, C., HOICZYK, E., KAISER, D., OSTER, G. (2002) How myxobacteria glide, *Curr. Biol.*, 12, 369–377.
- WU, Z. H., JIANG, D. M., LI, P., LI, Y. Z. (2005) Exploring the diversity of myxobacteria in a soil niche by myxobacteria-specific primers and probes, *Environ. Microbiol.*, 7 (10), 1602-1610.
- WU, Y., KAISER, A. D., JIANG, Y., ALBER, M. S. (2009) Periodic reversal of direction allows Myxobacteria to swarm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106 (4), 1222-1227.

ZHANG, L., WANG, H., FANG, X., STACKEBRANDT, E., DING, Y. (2003) Improved methods of isolation and purification of myxobacteria and development of fruiting body formation of two strains, *J. Microbiol. Methods*, 54 (1), 21-27.