

PRESERVAÇÃO DE *Xanthomonas arboricola* pv pruni POR LIOFILIZAÇÃO

**ANA CLÁUDIA DA SILVA PÔRTO¹; ANGELITA DA SILVEIRA MOREIRA²;
PATRÍCIA DIAZ DE OLIVEIRA³; KARINE LASTE MACAGNAN⁴; MARIANE
IGANSI ALVES⁵; CLAIRE TONDO VENDRUSCOLO⁶**

¹ Curso Superior de Tecnologia em Alimentos – CCQFA- UFPEL– anaclaudia1294@gmail.com

² Química de Alimentos - CCQFA- CDTec- UFPEL – angelitadasilveiramoreira@gmail.com

³ Biotecnologia - CDTec- UFPEL- bilicadiaz@yahoo.com.br

⁴ PPGb- CDTec- UFPEL- karinemacagnan@hotmail.com

⁵ PPGCTA-DCTA-UFPEL- marianeigansialves@hotmail.com

⁶ Química de Alimentos - CDTec-UFPEL- claire.vendruscolo@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O isolamento, identificação e conservação se caracterizam como práticas imprescindíveis para o desenvolvimento de pesquisas, processos e obtenção de produtos de interesse econômico com base em microrganismos (GIRÃO et al., 2004). No âmbito da ciência, a implantação e manutenção de coleções de culturas permitem a formação de estoques de cepas, que podem ser utilizadas experimentalmente em diferentes momentos (GUEDES et al., 2004). Considerando as exigências dos microrganismos e o manuseio em laboratórios, a manutenção de estirpes pode ocorrer por curtos períodos (dias, semanas ou meses), quando baseadas em repiques contínuos, onde as culturas bacterianas são mantidas a temperaturas relativamente baixas (4-10°C) (COSTA et al., 2009); ou técnicas alternativas, baseadas principalmente na desidratação sobre suporte inerte, como papel e porcelana, que permitem a preservação mesmo em temperatura ambiente. Há também técnicas de manutenção adequadas para longos períodos (anos), como a liofilização (BOROWSKI, 2011). Ainda assim, a manutenção de um microrganismo não é somente garantir ao máximo a quantidade de células, mas também conservar seu estado inicial, evitando mutações indesejáveis (PAOLI, 2005; OKAFOR, 2007).

A técnica de liofilização caracteriza-se na conservação de microrganismos por meio da dessecação rápida de culturas que se encontravam em estado de congelamento. Apresenta-se como alternativa capaz de retardar o relógio biológico estabelecido pela natureza. Desta forma, a liofilização e a criopreservação são as técnicas mais empregadas na conservação da biodiversidade microbiana, sendo uma das chaves para a realização dos serviços de coleção de culturas (MYAMOTOSHINOHARA et al., 2000; PAOLI, 2005; COSTA et al., 2009).

Diferentes bactérias apresentam diferentes taxas de sobrevivência frente à liofilização. Assim, o presente trabalho teve como objetivo determinar a sobrevivência em sete dias após a liofilização de inóculos das cepas DJ, FH, FJ de *Xanthomonas arboricola* pv pruni codificadas como adicionados de crioprotetor.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção e determinação da concentração celular do inóculo

Utilizou-se três cepas de *Xanthomonas arboricola* pv pruni, codificadas como DJ, FH e FJ pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Biopolímeros do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas, preservadas, durante 13 anos Através de repiques multiplicativos em meio sólido SPA (HAYWARD, 1964), armazenados sob refrigeração (4-8°C).

Células oriundas de cultivos frescos (72h) em meio SPA sólido foram resuspensas em meio *Yeast Malt* (YM) líquido (JEANES, 1974). Um volume de 100mL foi incubado em Erlemeyers de 250 mL, em agitador incubador orbital a 250 rpm, a uma temperatura de 28°C ± 2°C durante 24 h.

Após, para determinação da concentração celular do inóculo obtido realizou-se a técnica de diluição até 10⁻⁸, seguidas de plaqueamento das diluições 10⁻⁵ até 10⁻⁸ em placas incubadas a 28°C por 48 horas para posterior contagem, conforme esquema na Fig.1.

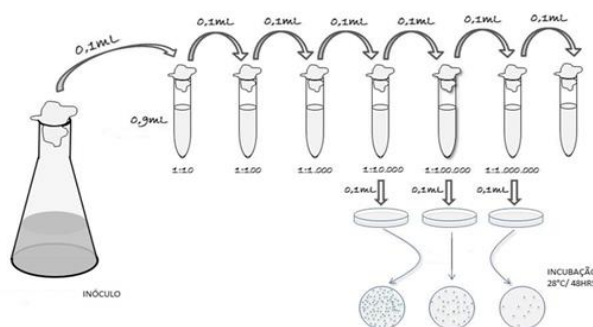


FIGURA 1. Técnica de diluição.

2.2 Liofilização

Os inóculos foram diluídos com o crioprotetor composto de triptona, manitol, glutamato sódico, gelatina, fosfato monobásico de sódio e fosfato dibásico de sódio, segundo Ellner (1978), na proporção de 60:40 (v/v), correspondendo a um volume final de 2mL. Colocou-se em frascos estéreis tipo penicilina com capacidade para 10mL. Em seguida, congelou-se as amostras em bandejas de inox a - 18°C e posteriormente foram inseridas no liofilizador modelo EDWARDS Micro Moduloy durante 24 horas. Finalmente, armazenou-se os frascos com a cultura liofilizada à temperatura de 4°C.



FIGURA 2. Inóculo liofilizado.

2.3 Reativação das cepas

Reativou-se as cepas DJ, FH, FJ, liofilizadas durante sete dias e, mediante reidratação com meio YM líquido durante aproximadamente 30min. Para avaliar a viabilidade das bactérias, retirou-se 100µL dessa suspensão e fez-se diluições decimais até 10^{-8} , seguidas de plaqueamento das diluições 10^{-5} até 10^{-8} , em meio sólido SPA, e incubou-se a 28°C por 48 horas. Após, contou-se as colônias típicas e expressou-se o resultado em unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC.mL⁻¹) de suspensão bacteriana reidratada, descontada a diluição realizada pela adição do crioprotetor.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na preservação das cepas DJ, FH, FJ estão dispostos abaixo na Tab.1.

TABELA 1. Concentração celular (UFC.mL⁻¹) e sobrevivência (%) de células preservadas por liofilização durante sete dias.

Cepa	Concentração celular inicial	Concentração celular final	Sobrevivência
DJ	$1,0.10^9$	$8,4.10^7$	8,4
FH	$9,7.10^8$	$5,6.10^7$	5,8
FJ	$9,0.10^8$	$4,0.10^7$	4,4

Todas mantiveram-se viáveis após sete dias de armazenamento a 4°C. Pode-se observar um pequeno decréscimo, na ordem de uma década, na concentração de todas as cepas, com percentuais de sobrevivência bastante semelhantes. Células de bactérias produtoras de exopolissacarídeo (EPS) são, de modo geral, bastante resistentes à liofilização. BOROWSKY (2011) determinou, para inóculos da cepa FH obtidos pela mesma metodologia do presente trabalho, uma preservação bastante semelhante, de 6%. Ao recuperar células desta mesma cepa, preservadas durante 12 anos por liofilização, encontrou, apesar do percentual de mortalidade de 85% no período, uma concentração final de $8,7.10^7$; o que atesta a adequabilidade da técnica para esta bactéria.

Células de *Beijerinckia* sp 7070, bactéria produtora do EPS clairana, foram liofilizadas e avaliadas com e sem a adição de crioprotetor, após uma década de armazenamento a -4°C. As células tiveram 100% de sobrevivência com crioprotetor e 22% sem crioprotetor (BLACK et al., 2008). Segundo (HUBALEK, 2003), o uso de agentes crioprotetores apropriados aumenta a sobrevivência consideravelmente, pois protegem a célula microbiana dos efeitos deletérios das etapas do congelamento e reidratação.

4. CONCLUSÕES

As três cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* apresentaram uma preservação bastante satisfatória e condizente com os dados da literatura após a liofilização de inóculos adicionados de crioprotetor, corroborando a viabilidade deste método de preservação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLACK, I. M.; OLIVEIRA, C. F.; ALVES, F. G.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Viabilidade de células de *Beijerinckia* sp 7070, liofilizadas com e sem adição de crioprotetor, após 10 anos de armazenamento, à temperatura de -4°C. In: **XVII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E X ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**, 2008, Pelotas. Anais do XVII Congresso de Iniciação Científica e X Encontro de Pós-Graduação, 2008
- BOROWSKI, J.M ; **Influência de métodos clássicos e alternativos de preservação de cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* na produção, viscosidade e composição química da xantana**. 2011. 103f. Dissertação – (Mestrado) – Curso de Pós - Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.
- COSTA, E. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MELO, V. S. P.; ARAUJO, S. A. C.; ROLIM, B. N. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, Goiânia, v. 19, n. 2, p.111-122, 2009.
- ELLNER, P. D. **Current Procedures in Clinical Bacteriology**. 1.ed. Springfield: Charles Thomas, 1978. 223p
- GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.37, n.3,p. 229-233, mai/jun. 2004.
- HOLLAND, N. T.; SMITH, M. T.; ESKENAZI, B.; BASTAKI, M. **Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies**. **Mutation Research, Amsterdam**, v. 543, p. 217-234, 2003.
- HUBALEK, Z. **Protectants used in the cryopreservation of microorganisms**. **Cryobiology**, v.46, p. 205–229, 2003.
- JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides – New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, v. 28, p. 34-40, 1974.
- MIYAMOTO-SHINOHARA, Y.; IMAIZUMI, T.; SUKENOBE, J.; MURAKAMI, Y.; KAWAMURA, S.; KOMATSU, Y. **Survival rate of microbes after freeze-drying and long term storage**. **Cryobiology**, New York, v. 4, n. 3, p. 251-255, nov./ 2000.
- NDOYE, B.; WEEKERS, F.; DIAWARA, B.; GUIRO, A. T.; THONART, P. Survival and preservation after freeze-drying process of thermoresistant acetic acid bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa. **Journal of Food Engineering**, v.79, p. 1374-1382, 2007.
- OKAFOR, N. The Preservation of the Gene Pool in Industrial Organisms: Culture Collections. In: Modern industrial microbiology and biotechnology. **Science Publishers**, p. 171-178, 2007.
- PAOLI, DE P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, p. 897-910, 2005.