

PRESERVAÇÃO DE *Xanthomonas* POR LIOFILIZAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO

ANA CLÁUDIA DA SILVA PÔRTO¹; ANGELITA DA SILVEIRA MOREIRA²;
PATRÍCIA DIAZ DE OLIVEIRA³; KARINE LASTE MACAGNAN⁴; VICTORIA DE
MORAES GONÇALVES⁵; JÚLIA BORIN FIORAVANTE⁶

¹ Curso Superior em Tecnologia de 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- victoriahgoncalves@hotmail.com

⁶ PPGCTA-DCTA-UFPEL – juliabfioravanti@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A preservação em estoque de culturas de microrganismos é um processo complexo em virtude do quase inexpressivo conhecimento que se tem a respeito das reações e modificações morfofisiológicas que ocorrem nos microrganismos em condições de armazenamento (GIRÃO *et al.*, 2004). E devido à emergente importância atribuída à estocagem de amostras, muitas instituições têm investido na constituição de estoques (biobancos ou coleções de cultura), implementando técnicas de preservação baseadas em equipamento de elevada tecnologia, mas que atualmente são bastante difundidos, como a criopreservação e a liofilização, bem como na adoção de protocolos próprios e tecnologias apropriadas ao controle de dados (HOLLAND *et al.*, 2003; PAOLI, 2005).

A liofilização é considerada uma das técnicas mais eficientes para a manutenção de microrganismos, justamente por garantir a viabilidade dos sobreviventes por longos períodos e ser aplicável à maioria dos microrganismos (CANHO *et al.*, 2004). A criopreservação consiste na manutenção de uma variedade de tipos celulares sob baixas temperaturas (-20°C, -80°C) (WOLFE & BRYANT, 2001). COSTA *et al.* (2009) relataram que apesar da existência de diversas técnicas de manutenção de microrganismos, o princípio do congelamento-descongelamento se manteve entre os mais importantes e viáveis para a preservação celular.

Diante do exposto o objetivo do trabalho foi avaliar a taxa de sobrevivência de diferentes patovares de *Xanthomonas* codificadas como Xp 104, Xp 50, NRRLB -1459, X.CITRI visando comparar a eficiência entre esses métodos de preservação.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção e determinação da concentração celular do inoculo

Utilizou-se duas cepas de *Xanthomonas arboricola* pv pruni, codificadas como Xp 104, Xp 50, uma cepa de *Xanthomonas campestris* pv citri e uma cepa de *Xanthomonas campestris* pv campestris NRRLB-1459, pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Biopolímeros do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas, preservadas 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 ressuspensas em meio SPA líquido. Um volume de 100mL foi incubado em

erlemeyers de 250 mL, em agitador incubador orbital a 250 rpm, a uma temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 h.

Para o controle de qualidade das técnicas de preservação foram realizadas diluições seriadas e plaqueamentos em condições assépticas, objetivando a determinação da concentração celular dos inóculos. A diluição, para cada cepa, foi realizada da seguinte forma: em 9 eppendorfs adicionou-se 900 μL de meio SPA líquido. Após, adicionou-se 100 μL do respectivo inóculo no 1º eppendorf, obtendo-se assim a diluição 10^{-1} e a partir desse foram feitas diluições seriadas até 10^{-9} .

O plaqueamento das diluições 10^{-6} até 10^{-9} foi realizado em placa contendo meio SPA sólido, delimitadas em duas partes iguais, de modo a plaquear 50 μL de cada diluição em duplicata. Os procedimentos de diluição e plaqueamento podem ser observados na Figura 1.

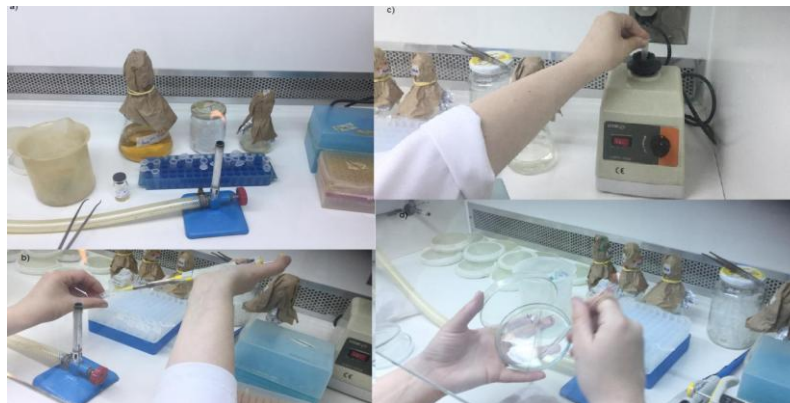


Figura 1. Diluição seriada e plaqueamento realizados no trabalho. Fonte: Autor, 2016.

Após inoculação, as placas foram incubadas em estufa a 28°C por 48h. Após o tempo de incubação, realizou-se a contagem das colônias que cresceram em cada metade da placa de Petri e realizou-se o cálculo do número de unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL), levando-se em consideração a diluição do inóculo.

2.2 Formulação e adição do crioprotetor aos inóculos

Para maior preservação das células, adicionou-se uma solução de crioprotetor ao inóculo, segundo a formulação de Ellner (1978). Os componentes para o preparo de 10mL do crioprotetor, foram separados em três frascos, e as composições parciais são descritos na sequencia; frasco “a” glutamato de sódio 0,23g, gelatina 0,23g, fosfato dissódico anidro 0,19g, fosfato monossódico 0,0076g e água Milli Q 4mL; frasco “b” glicerol 0,465g e água Milli Q 3mL; frasco “c” peptona 0,465g e água Milli Q 3mL. As soluções foram esterilizadas, em autoclave a $121^{\circ}\text{C}/15\text{min}$ e, no momento da utilização, misturadas em Erlenmeyer estéril, com capacidade de 125mL.

2.3 Liofilização e Criopreservação

Inicialmente, os inóculos foram diluídos asepticamente com o crioprotetor, na proporção de 60:40 (v/v), homogeneizados em vórtex e fracionados em porções de 2ml e 1ml e transferidos para frascos estéreis tipo penicilina e para eppendorfs, destinados à liofilização e criopreservação, respectivamente. Todos os frascos foram identificados com o nome da cepa e data, e os maiores selados com parafilme. Todos os frascos foram armazenados em freezer doméstico a -18°C por 24h seguido de congelamento em ultrafreezer a -70°C . para posterior

liofilização. Os eppendorfs aí permaneceram até a reativação e os frascos maiores, após 24h, foram levados ao liofilizador (Liobras®) durante 24 horas; terminado o processo, os frascos foram lacrados e armazenados a -18°C até o momento da reativação. Obtidos os resultados da concentração inicial, essa informação foi adicionada aos rótulos.

2.4 Reativação das cepas

Reativou-se as cepas X.CITRI, Xp.50, Xp.104, NRRLB - 1459 preservadas por liofilização e criopreservação armazenadas entre um período de sete dias e quinze dias, tempo de reativação de acordo com o protocolo adotado pelo laboratório de Biopolímeros, afim de realizar-se o controle de qualidade da preservação. A reidratação foi feita em caldo SPA no mesmo volume preservado de inóculo e crioprotetor por, aproximadamente, 30min, para os inóculos liofilizados. Já os inóculos criopreservados descongelaram à temperatura ambiente antes da realização da técnica de diluição e plaqueamento, conforme descritos no item 2.1.

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, X.CITRI, Xp.50, Xp.104, NRRLB - 1459 estão dispostos abaixo na Tab.1.

Tabela 1. Concentração celular (UFC.mL^{-1}) inicial e após a preservação e taxa de sobrevivência (%) de células preservadas por liofilização e criopreservação.

Inóculo		Liofilização		Criopreservação	
Cepa	Conc.cel. Inicial (UFC.mL^{-1})	Conc. cel. (UFC.mL^{-1})	Taxa de sobrevivência (%)	Conc. Cel. (UFC.mL^{-1})	Taxa de sobrevivência
X.CITRI	$1,1 \cdot 10^9$	$7,3 \cdot 10^7$	6,6	$5,3 \cdot 10^8$	4,8
Xp. 50	$4,1 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^9$	36,5	$7,5 \cdot 10^7$	18,2
Xp. 104	$2,95 \cdot 10^8$	$3,32 \cdot 10^7$	11,2	$4,6 \cdot 10^7$	15,5
NRRLB -1459	$3,0 \cdot 10^8$	$1,23 \cdot 10^8$	41	$2,05 \cdot 10^8$	68,3

*Período de recuperação entre sete e quinze dias.

HECKLY (1961) ressalta que a sobrevivência durante a liofilização e o armazenamento depende, principalmente, das características dos micro-organismos, da concentração da cultura liofilizada, dos meios de multiplicação celular e reidratação empregados, do agente crioprotetor, da temperatura de armazenamento e das condições de recuperação do material liofilizado. Dentre esses fatores, o único modificado neste estudo foi o patovar e o micro-organismo. Assim, pode-se afirmar que a viabilidade celular de *X. arboricola* pv pruni foi cepa dependente, uma vez que as cepas Xp. 50 e Xp. 104 tiveram percentuais de sobrevivência de 36,5% e 11,2 %, respectivamente, frente essa técnica. E também que a espécie *Xanthomonas campestris* foi patovar dependente, onde pode ser visto o percentual de sobrevivência de 6,6% para a cepa X.CITRI (pv citri) e com a cepa NRRLB-1459 (pv campestris) com percentual de 41%. Borowsky (2011) determinou, para inóculos das cepas FH e LF de *X. arboricola*

pv pruni obtidos pela mesma metodologia do presente trabalho, uma preservação bastante semelhante, de 14,5% e 86,1%, respectivamente. O que atesta a adequabilidade da técnica para esta bactéria.

O método de criopreservação também se mostrou eficaz e novamente a cepa NRRLB-1459 teve uma taxa de sobrevivência maior, com 68,3%, seguida das Xp. 50, Xp.104, e X.CITRI com taxas de 18,2%, 15,5% e 4,8%, respectivamente. A adição de crioprotetor adequado é um fator importante para a viabilidade celular, pois proporciona um considerável aumento da sobrevivência (HUBALEK, 2003). Esses agentes protegem a célula microbiana impedindo a formação de cristais de gelo e estabilizando alguns componentes da membrana celular durante os processos de congelamento e descongelamento (ANCHORDOGUY et al., 1987).

4. CONCLUSÕES

Ambos os métodos foram eficientes, e todas as cepas apresentaram taxas de sobrevivência satisfatórias, sendo a cepa NRRLB-1459 a mais resistente ao processo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- CANHOS, V. P.; UMINO, C. Y.; MANFIO, G. P. **Coleções de culturas de microrganismos.** Resumo: Coleções de culturas de microrganismos. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP - Centro de Referência em Informação Ambiental - CRIA, 2004.
- 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.; 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.
- HECKLY, R. J. **Preservation of bacteria by lyophilization.** *Advances in Applied Microbiology*, v.3, p. 1-76, 1961.
- HUBALEK, Z. **Protectants used in the cryopreservation of microorganisms.** *Cryobiology*, v.46, p. 205–229, 2003.
- PAOLI, P. **Biobancos microbiológicos a partir de coleta de amostras para a epidemiologia, diagnóstico e pesquisa.** *FEMS Microbiol Rev.* v. 29, pg. 897-910, 2005.
- WOLFE, J.; BRYANT, G. **Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects.** *International Journal of Refrigeration, Surrey*, v. 24, p. 438-450, 2001.