

PRESERVAÇÃO DE *Xanthomonas arboricola* pv pruni POR LIOFILIZAÇÃO

**JACKSON GABRIEL MORAIS BECKER¹; KARINE LASTE MACAGNAN²;
MARIANE IGANSI ALVES³; JÚLIA BORIN FIORAVANTE⁴; ANGELITA DA
SILVEIRA MOREIRA⁵, PATRÍCIA DIAZ DE OLIVEIRA⁶**

¹Graduação em Biotecnologia – UFPEL – kato_becker@hotmail.com

²PPGB – CDTec – UFPEL – karinemacagnan@hotmail.com

³PPGCTA – DCTA – UFPEL – marianeigansialves@hotmail.com

⁴PPGCTA – DCTA – UFPEL – juliabfioravante@hotmail.com

⁵PPGCTA – DCTA; PPGB – CDTec – UFPEL – angelitadasilveiramoreira@gmail.com

⁶PPGB – CDTec; PPGCTA – DCTA – UFPEL – bilicadiaz@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A preservação de microrganismos pauta-se como uma prática essencial para o desenvolvimento de pesquisas, bioprocessos e obtenção de produtos, economicamente viáveis, oriundos de processos naturais (GIRÃO et al., 2004). A formação de estoques de cepas é um método vantajoso, pois além de permitir o uso descontínuo de uma mesma cultura, é possível usá-la em diferentes momentos nos experimentos (PAOLI, 2005).

Considerando que o manuseio de microrganismos em laboratórios exige certo cuidado, a manutenção de cepas pode ocorrer por curtos períodos (podendo ser dias, semanas ou meses), quando feitas por repiques contínuos, onde as culturas bacterianas são mantidas a temperaturas 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 visa não somente garantir ao máximo a quantidade de células, mas também conservar seu estado inicial, evitando mutações indesejáveis e perdas na viabilidade celular (PAOLI, 2005).

A liofilização é uma técnica utilizada para a conservação de microrganismos por meio da dessecação rápida de culturas que se encontram em estado de congelamento. Apresenta-se como alternativa capaz de manter o microrganismo inativado. 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 (PAOLI, 2005; COSTA et al., 2009).

De modo geral, as bactérias apresentam diferentes taxas de sobrevivência frente à liofilização. Assim, o presente trabalho teve como objetivo determinar a viabilidade celular das cepas 71, 80 e 101 após 7 dias da liofilização, assim como, das cepas 82, 24 e 87, recuperadas após 16 anos de liofilização, de *Xanthomonas arboricola* pv pruni.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção e determinação da concentração celular do inóculo

Foram utilizadas três cepas de *Xanthomonas arboricola* pv pruni (71, 80 e 101) pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Biopolímeros do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas, preservadas por repiques mensais em meio sólido SPA (HAYWARD, 1964), e armazenadas sob refrigeração (4-8 °C).

Repiques multiplicativos em meio SPA sólido incubados à 28 °C por 72 h foram ressuspensos em meio SPA líquido. Um volume de 10 mL da suspensão bacteriana foi adicionado em Erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL de meio. Os inóculos foram incubados em agitador incubador orbital a 150 rpm, a uma temperatura de 28°C durante 24h.

Para a determinação da concentração bacteriana do inóculo obtido realizou-se a técnica de diluição seriada até a diluição 10^{-9} , seguidas de plaqueamento das diluições 10^{-6} até 10^{-9} em placas incubadas a 28 °C por 48 h, e posterior contagem, conforme esquema na Fig.1.

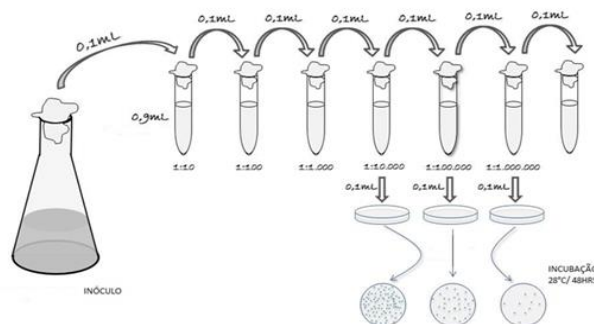


FIGURA 1. Técnica de diluição seriada (WORDPRESS, 2012).

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 (ELLNER, 1978), na proporção de 60 (inóculo): 40 (crioprotetor) (v/v). Adicionou-se 2 mL desta suspensão em frascos estéreis, tipo penicilina, com capacidade para 10 mL. Em seguida, congelou-se as amostras em bandejas de inox a -18°C e, posteriormente, foram inseridas no liofilizador (Liotop, Liobras, Brasil) para secagem durante 24 horas. Finalmente, armazenou-se os frascos com a cultura liofilizada à temperatura de -18°C .

2.3 Reativação das cepas liofilizadas

As cepas 71, 80 e 101, armazenadas a -18°C durante 7 dias, foram reativadas por reidratação com 2 mL meio SPA líquido durante 20 min. Para avaliar a viabilidade das bactérias, homogeneizou-se e retirou-se 100 μL dessa suspensão e fez-se diluições decimais até 10^{-9} , seguidas de plaqueamento das diluições 10^{-5} até 10^{-7} , em meio sólido SPA, e incubou-se a 28 °C por 48 h. Após, contou-se as colônias típicas e expressou-se o resultado em unidades formadoras de colônias por mililitros ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) de suspensão bacteriana reidratada, levando em consideração a diluição realizada pela adição do crioprotetor.

Para fins de comparação e verificação da viabilidade da técnica, foram reativadas três cepas de *Xanthomonas arboricola* pv pruni (82, 24 e 87), liofilizadas como anteriormente e armazenadas a -18°C durante 16 anos; entretanto, para estas cepas não encontrou-se registro da concentração inicial. As cepas foram reativadas como descrito anteriormente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na preservação das cepas 71, 80 e 101 estão expressos na tabela 1.

Tabela 1. Percentual de sobrevivência das cepas 71, 80 e 101 de *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* reativadas após 7 dias de liofilização.

Cepas	Concentração bacteriana do inóculo (UFC.mL ⁻¹)	Concentração bacteriana após a liofilização (UFC.mL ⁻¹)	Sobrevivência (%)
71	6,8 x 10 ⁹	2,9 x 10 ⁹	42,6
80	4,2 x 10 ⁹	2,1 x 10 ⁹	50,0
101	5,4 x 10 ⁹	3,0 x 10 ⁹	55,5

Os inóculos preparados para o processo de preservação apresentou altas concentrações, conforme recomendado por Bozoglu et al. (1987), os quais sugerem que a concentração bacteriana deve ser superior a 10⁷ para que possa ser assegurada a sobrevivência durante o processo de liofilização, o longo período de estocagem, a recuperação e propagação da cepa.

Todas as cepas mantiveram-se viáveis após a liofilização e armazenamento a - 18 °C. Pode-se observar um decréscimo em torno de 50% na concentração bacteriana após o processo de preservação, entretanto, como trabalhou-se com altas concentrações bacterianas, não houve diminuição no log da concentração. As três cepas apresentaram percentuais de sobrevivência semelhantes.

Para as cepas preservadas por liofilização em 2001, observou-se uma alta concentração bacteriana, conforme tabela 2. Tal fato evidencia a resistência dessas bactérias ao passar por processo de secagem que pode causar danos celulares tais como rompimento da membrana celular, alterações na permeabilidade da membrana celular, aumento da fase lag de multiplicação celular e a necessidade de incremento nutricional (MORGAN et al., 2006).

Tabela 2. Viabilidade celular das cepas 82, 24 e 87 de *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* reativadas após 16 anos de liofilização.

Cepas	Concentração bacteriana (UFC.mL ⁻¹)
82	3,3x10 ⁸
24	6,2x10 ⁸
87	2,1x10 ⁸

Bactérias produtoras de exopolissacarídeos (EPS) são, de modo geral, bastante resistentes à liofilização. BOROWSKY (2011) obteve taxa de sobrevivência de 6% para cepa FH, preservada pela mesma metodologia do presente trabalho. 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 x 10⁷, atestando a adequabilidade da técnica para esta bactéria.

4. CONCLUSÃO

Todas as cepas de *Xanthomonas arboricola* pv pruni apresentadas neste trabalho apresentaram uma viabilidade celular satisfatória após o processo de secagem por liofilização e condizente com os dados da literatura.

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.

BOZOGLU, T. F.; OZILGEN, M.; BAKIR, U. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 9, p. 531–537, 1987.

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, 2004.

HAYWARD, A. C. Bacteriophage sensitivity and biochemical type in *Xanthomonas malvacearum*. **Journal of General Microbiology**, v. 33, p. 287-298, 1964.

MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. Preservation of microorganisms by drying – a review. **Journal of Microbiological Methods**, v.66, n. 2, p.183-193, 2006.

PAOLI, DE P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, p. 897-910, 2005.

WORDPRESS. **Técnica da diluição seriada de quantificação de população microbiana**. 2012. Acessado em 01 out. 2017. Online. Disponível em: <https://bacilosnasopa.wordpress.com/tag/tecnica-de-diluicao-seriada/>