

ESTUDO PRÉVIO DE TÉCNICAS DE QUANTIFICAÇÃO DIRETA DE *Ralstonia solanacearum* cepa RS

EDUARDO RAMOS PEDROSA¹; MARIA LUIZA DE OLIVERIA ZANINI ²;
KETNEN RIFFEL CHAGAS³; PATRICIA SILVA DIAZ⁴

¹Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão – pedrosahangouts@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – luizaznn@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – rieffelketnen@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – bilicadiaz@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Existem diversos métodos para quantificar microrganismos, diretos ou indiretos, e, com o uso desses métodos, é possível obter uma estimativa da quantidade de bactérias necessária para diversas aplicações científicas e industriais como a fermentação. Essa quantificação é essencial para garantir a reproduzibilidade e a padronização de experimentos e processos industriais, assegurando que as condições iniciais sejam sempre as mesmas (Martins et al., 2024).

Os métodos indiretos se baseiam na medida de atividade metabólica, produtos da atividade metabólica ou por absorbância e transmitância (O'Toole, 1983), sendo comum o uso de turbidimetria, que é medição de turbidez de uma solução, e a espectrofotometria, que mede a densidade óptica de um meio. Dentre os métodos diretos, se destaca a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Essa técnica se utiliza do crescimento de células viáveis de uma amostra em placas de Petri, assim quantificando as vivas sem o uso de coloração ou equipamentos específicos (Wilson et al., 2017).

A bactéria fitopatogênica *Ralstonia solanacearum* tem despertado grande interesse na pesquisa e produção de bioplásticos. Essa espécie é capaz de sintetizar poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)), uma molécula polimérica utilizada como reserva de energia. Além disso, esse polímero possui propriedades físicas e mecânicas semelhantes a plásticos de origem petroquímica. Estima-se que, após a fermentação, cerca de metade do peso da bactéria seja composta somente por P(3HB) (Alves et al., 2019), o que o torna as bactérias que o produzem promissoras para a produção de bioplásticos (Zanini, 2023).

Porém, o crescimento de *R. solanacearum* em tecidos vegetais, provavelmente leva à formação de colônias que podem ser ligadas a biofilmes, que geram agregados celulares (Kumar et al., 2015), e a formação de grandes aglomerados de células podem gerar resultados consideravelmente imprecisos, tendo em vista que o método de contagem de UFC baseia-se na suposição imprecisa de que cada colônia se origina de uma única bactéria (Rahman; Butzin, 2024). Para isso, é utilizado a adição de uma baixa concentração de surfactante, que são compostos capazes de diminuir a tensão da interface entre as substâncias, atuando como detergentes, agentes umectantes e dispersantes, podendo assim romper biofilmes ou perturbar a sua formação (Allegrone et al., 2021).

O objetivo deste estudo visa validar um protocolo de quantificação de *Ralstonia solanacearum* cepa RS com o uso PBS com Tween 20 como surfactante, buscando um método eficaz para contagem direta, para que assim

seja possível quantificar esse microrganismo, em especial, para a otimização da produção de bioplásticos, garantindo a reproduzibilidade dos resultados.

2. METODOLOGIA

2.1. Microrganismo

A bactéria utilizada no estudo foi *Ralstonia solanacearum* cepa RS, isolada do solo do Rio Grande do Sul e que pertence ao acervo de microrganismos do Laboratório de Biopolímeros do CDTec da UFPel (RODRIGUES et al., 2015). O microrganismo foi mantido criopreservado com o meio *Yeast Malt* (YM) (Extrato de Malte: 2,7 g/L (KASVI®); Extrato de Levedura: 2,7 g/L (KASVI®); Peptona: 4,5 g/L (KASVI®) e Sacarose: 35 g/L) com pH ajustado para 6 (JEANES et al., 1974). A reativação se deu em agitador horizontal orbital *overnight* a 32 °C e 150 rpm.

2.2. Diluição Seriada

Foram realizadas duas diluições em série distintas: a diluição controle, contendo 900 µL de Tampão fosfato-salino (PBS) e 100 µL de *R. solanacearum* cepa RS, até a nona diluição(10^{-9}); e a diluição com PBS Tween (PBST) em três concentrações diferentes: PBST 0,5%; PBST 0,2%; e PBST 0,1%. Cada concentração foi diluída até 10^{-9} , contendo 900 µL de PBST adicionado com 100 µL de *R. solanacearum* cepa RS, homogeneização por vortex e pipetagem de 100 µL no *Eppendorf* seguinte, sucessivamente.

2.3. Semeadura em placas de Petri

Foram utilizadas Placas de Petri com meio *Nutritive Yeast Agar* (NYA) (Peptona: 5 g/L(KASVI®); Extrato de Levedura: 1 g/L (KASVI®); Extrato de Carne: 3 g/L (KASVI®); Glicose:5 g/L (NEON®); Ágar-Ágar: 14 g/L (Dinâmica®)). O plaqueamento foi dado em duplicata, em que foram adicionados 50 µL de cada diluição em cada metade da placa. A diluição foi espalhada com alça de *Drigalski*, e as placas foram mantidas na estufa por 24 horas a 32 °C.

2.4. Contagem

A contagem foi feita por quantificação visual, e os dados foram utilizados na equação de unidades formadoras de colônia (UFC) por mL.

$$UFC/ml = (Número\ de\ colônias \times Fator\ de\ diluição) \div Volume\ semeado(ml)$$

Em que é utilizado o número de colônias contadas multiplicado pelo fator de diluição, dividido pelo volume pipetados nas placas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a contagem das colônias nas diluições de 10^{-5} a 10^{-8} foram obtidos os seguintes resultados (quadro 1):

Fator de diluição	Controle		PBST 0,1%		PBST 0,2%		PBST 0,5%	
	Contagem	UFC/mL	Contagem	UFC/mL	Contagem	UFC/mL	Contagem	UFC/mL
10^{-5}	175 \pm 5,6	$3,5 \times 10^8$	252 \pm 4,2	5×10^8	259 \pm 0	$5,2 \times 10^8$	132 \pm 26,8	$2,6 \times 10^8$
10^{-6}	40,5 \pm 3,5	$8,1 \times 10^8$	34 \pm 1,4	$6, \times 10^8$	51 \pm 1,4	1×10^9	41 \pm 5,6	$8,2 \times 10^8$
10^{-7}	7,5 \pm 0,7	$1,5 \times 10^9$	5,5 \pm 0,7	$1,1 \times 10^9$	7,5 \pm 2,1	$1,5 \times 10^9$	10 \pm 0	2×10^9

10^{-8}	$69,5 \pm 9,1$	$1,4 \times 10^{11}$	$25,5 \pm 0,7$	10×10^{10}	$2,5 \pm 0,7$	5×10^9	$1,5 \pm 2,1$	3×10^9
-----------	----------------	----------------------	----------------	---------------------	---------------	-----------------	---------------	-----------------

Quadro 1: Média da contagem da *Ralstonia solanacearum* cepa RS com diferentes concentrações de PBST (0,1%; 0,2%; 0,5%) e controle, nas diluições 10^{-5} a 10^{-8} . Os valores representam a média \pm desvio padrão e o resultado da fórmula UFC/ml aplicada em cada diluição.

De acordo com os dados apresentados, observou-se a problemática da contagem de UFC controle, em que há um aumento inesperado do número de colônias na diluição 10^{-8} . Além disso, as concentrações 0,1% e 0,2% de PBST resultaram em um aumento na média de quantidade de UFC por placa em todas as diluições, com a concentração de 0,2% de PBST apresentando um aumento de 67% de colônias em relação à primeira diluição do quadro 1 e obteve uma regressão mais linear do que comparado às outras concentrações.

O aumento no número de bactérias é causado principalmente pela perda do biofilme e desagregação das bactérias, causando dispersão celular, assim cada bactéria viva é viável para formar uma unidade formadora de colônia, tornando assim uma contagem mais precisa e as diluições lineares (KAPLAN, 2010).

Em contraste, a concentração mais alta de 0,5% de PBST demonstrou um efeito inibitório, reduzindo a contagem em 25% em relação ao controle na diluição 10^{-5} . O mecanismo de ação em altas concentrações pode ser a toxicidade direta, onde o surfactante interage e causa a disruptão da membrana celular da bactéria (Al-Adham et al., 2021).

Ao observar UFC/ml na concentração 0,1% de PBST na diluição 10^{-5} e 10^{-6} , seguindo a ISO 7218 (2024) com a contagem entre 50 a 300 colônias por placa, mostrou que 5×10^{-8} UFC/ml e 6×10^{-8} , respectivamente, sendo consideradas os resultados mais próximo ao número de bactérias anterior à diluição seriada.

De acordo com a literatura, o Tween 20 pode prevenir a formação de biofilme, previne a agregação celular e a formação de biofilme mesmo depois que os componentes do biofilme são produzidos (Wu et al., 2013).

Observou-se uma discrepância entre as médias da contagem e os valores de UFC/mL na diluição 10^{-6} para a concentração de 0,1% de PBST. Os resultados obtidos não demonstraram a relação de proporcionalidade de 1:10 esperada entre as unidades formadoras de colônia, porém de acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA, 2018) a contagem pode diferir consideravelmente para uma determinada amostra em um determinado meio, além disso a familiarização com os procedimentos de contagem é um requisito importante para os analistas

4. CONCLUSÕES

Este estudo prévio indicou que o uso de Tween 20 em baixas concentrações causa a desagregação celular, assim melhorando a contagem direta da bactéria *Ralstonia solanacearum* cepa RS. Ainda sim, o estudo em questão necessita maior número de repetição dos testes e outras metodologias devem ser estudadas e aplicadas para verificar a técnica mais efetiva de contagem direta.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ADHAM, I. S. I. et al. A review of the antimicrobial activity of thermodynamically stable microemulsions. *Letters in Applied Microbiology*, 19 out. 2021.

ALLEGGRONE, G. et al. Diverse Effects of Natural and Synthetic Surfactants on the Inhibition of *Staphylococcus aureus* Biofilm. *Pharmaceutics*, v. 13, n. 8, p. 1172,

29 jul. 2021.

HUMAN FOODS PROGRAM. **Best Practices in Microbiological Methodology**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/best-practices-microbiological-methodology>>. Acesso em: 27 ago. 2025.

JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides – New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, v. 28, p. 34-40, 1974.

KAPLAN, J. B. Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 205–218, 5 fev. 2010.

KUMAR, J. S. et al. Detection of Quorum Sensing Molecules and Biofilm Formation in *Ralstonia solanacearum*. **Current Microbiology**, 1 dez. 2015.

MARIANE IGANSI ALVES et al. Optimization of *Ralstonia solanacearum* cell growth using a central composite rotational design for the P(3HB) production: Effect of agitation and aeration. **PLOS ONE**, v. 14, n. 1, p. e0211211–e0211211, 29 jan. 2019.

MARTINS, C. T. et al. Simultaneous enumeration of yeast and bacterial cells in the context of industrial bioprocesses. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 51, 1 jan. 2024.

O'TOOLE, D. K. Methods for the direct and indirect assessment of the bacterial content of milk. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 55, n. 2, p. 187-201, 1983.

RAHMAN, K. M. T.; BUTZIN, N. C. Counter-on-chip for bacterial cell quantification, growth, and live-dead estimations. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 782, 8 jan. 2024.

RODRIGUES, A. A. et al. Seleção e identificação de linhagens bacterianas produtoras do bioplástico poli(3-hidroxibutirato). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 9, n. 1, 30 jul. 2015.

WILSON, C. et al. Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review. **Research & Reviews: Journal of Engineering and Technology**, v. 6, n. 4, 24 out. 2017. Disponível em: <http://www.rrojj.com/open-access/quantitative-and-qualitative-assessment-methods-for-biofilm-growth-a-minireview-.pdf>

WU, C. et al. Disruption of *E. coli* amyloid-integrated biofilm formation at the air-liquid interface by a polysorbate surfactant. **Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids**, v. 29, n. 3, p. 920–926, 22 jan. 2013.

ZANINI, M. L. **Universidade Federal de Pelotas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.** Dissertação. [s.l: s.n.]. Acesso em: 22 ago. 2025.