

## VIABILIDADE DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *PSEUDOMONAS* PRESERVADAS EM ÁGUA

KARINA FARIAS DE OLIVEIRA<sup>1</sup>; IEDA BAADE DOS SANTOS <sup>2</sup>; MARIA LAURA  
TURINO MATTOS<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas– [karinafariasdeoliveira@gmail.com](mailto:karinafariasdeoliveira@gmail.com)

<sup>2</sup>Embrapa Clima Temperado – [ieda.santos@embrapa.br](mailto:ieda.santos@embrapa.br)

<sup>3</sup>Embrapa Clima Temperado – [maria.laura@embrapa.br](mailto:maria.laura@embrapa.br)

### 1. INTRODUÇÃO

Os processos de isolamento, identificação, conservação e a utilização de microrganismos vem sendo considerados como rotina para o desenvolvimento de pesquisas (ABREU; TUTUNJI, 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 (GIRÃO et al., 2004).

A finalidade da preservação é manter as culturas em estado viável, sem mudanças morfológicas, fisiológicas ou genéticas, assim como manter sua completa viabilidade e estabilidade (MORIWAKI et al., 2009; MATTOS et al., 2018). Além disso, procura-se adequar a escolha de uma técnica de preservação baseando-se nas particularidades do agente, nas características do próprio método a ser aplicado, nos custos de manutenção da técnica, da importância do acervo e principalmente na capacidade laboratorial e disponibilidade de equipamentos (GIRÃO et al., 2004).

Os métodos de manutenção de microrganismos podem ser classificados de acordo com tempo máximo de preservação (COSTA; FERREIRA, 1991). O método de Castellani é um método de médio prazo e consiste no armazenamento de microrganismos em água esterilizada para a redução do metabolismo, com consequente latência das células diante da restrição de fontes nutritivas. Apesar do baixo custo e reprodutibilidade, nota-se os riscos de contaminação das culturas e um possível comprometimento na estabilidade genética de alguns microrganismos (ROMEIRO et al., 2006). Já a liofilização é considerada um método de longo prazo, sendo uma técnica mais eficiente para a preservação de microrganismos, justamente por garantir a viabilidade dos agentes por 17 a 20 anos e ser aplicável para a maioria dos microrganismos (PASSADOR et al., 2010).

Os microrganismos prospectados para o uso agrícola e biotecnológico são preservados na Coleção de Microrganismos Multifuncionais de Clima Temperado (CMMCT), localizada no laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Clima Temperado. Essa coleção possui um acervo de 818 acessos bacterianos preservados em água (método Castellani) e por liofilização. Em cumprimento de requisito obrigatório de qualidade de preservação na CMMCT, é verificada, anualmente, a viabilidade de, no mínimo, 1% dos acessos (MATTOS et al., 2018).

Dentre estes acessos estão preservadas em água 26 bactérias do gênero *Pseudomonas*, isolados do solo e rizosfera do azevém com características fenotípicas já estudadas e que estão em fase de análise para a confirmação da identificação como *Pseudomonas fluorescens* acesso CMM 1 (OLIVEIRA et al., 2016). Essa espécie de bactéria, também preservada em água na CMMCT, tem sido objeto de estudo pela equipe do laboratório por apresentar potencial para biorremediar resíduos do herbicida clomazona no solo (MATTOS et al., 1996).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a viabilidade dos 26 acessos do gênero *Pseudomonas* e um da espécie *Pseudomonas fluorescens* acesso CMM 1, preservadas pelo método de Castellani, visando definir a capacidade desse método para a preservação das características fenotípicas dos microrganismos.

## 2. METODOLOGIA

A pesquisa foi realizada em condições de laboratório, na Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. Foram avaliados 27 acessos do gênero *Pseudomonas*: CMM 987, CMM 989, CMM 990, CMM 991, CMM 993, CMM 995, CMM 996, CMM 997, CMM 998, CMM 999, CMM 1000, CMM 1001, CMM 1002, CMM 1003, CMM 1004, CMM 1005, CMM 1006, CMM 1007, CMM 1008, CMM 1009, CMM 1010, CMM 1011, CMM 1012, CMM 1013, CMM 1014, CMM 1015 e, como padrão, o acesso CMM 1 de *Pseudomonas fluorescens*. As bactérias estavam preservadas em água (método Castellani), desde 2016, em frascos *ependorfs* com água destilada estéril, em duplicata, depositados em armário à temperatura ambiente (25 °C).

O procedimento para a recuperação e verificação da pureza dos acessos consistiu em agitar manualmente um frasco *ependorf*, retirar uma alíquota de 100 µL, depositar sobre cada quadrante de uma placa de Petri contendo Ágar Nutritivo (AN), e espalhar com alça de platina. As placas foram incubadas por 24h a 28 °C, quando verificou-se o crescimento. Os acessos que não apresentaram crescimento até 72 h, foram repicados novamente para caldo nutritivo e incubados a 28 °C com agitação de 180 rpm e, posteriormente, inoculados em placas de Petri contendo AN, por meio da técnica de espalhamento com alça de *Drigalski*.

A verificação da pureza dos acessos foi feita por meio da análise das características fenotípicas dos acessos, que inclui avaliação das características morfológicas e fisiológicas das colônias. Para a análise da morfologia, as bactérias foram repicadas, por meio da técnica de esgotamento, para placas de Petri contendo AN, e incubadas por 24h a 28 °C. As observações realizadas foram: cor, borda, elevação, forma, superfície e caracteres ópticos das colônias em microscópio. A análise das características fisiológicas foi realizada, em triplicata, verificando-se o crescimento em meios King A e King B (24h, 28 °C), observando-se a fluorescência sob luz UV (366 nm) (KING et al., 1954), com base no padrão de referência de *P. fluorescens* (CMM 1).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se a recuperação de 26 acessos, sendo que o acesso CMM 1015, não apresentou crescimento quando cultivado em AN sólido e líquido (72h, 28 °C, 180 rpm). Os acessos recuperados apresentaram pureza e foram avaliados quanto à morfologia das colônias (Tabela 1). Os resultados demonstraram características morfológicas dos acessos típicas do gênero *Pseudomonas* (CMM 1).

Com relação às características fisiológicas, 100% dos acessos apresentaram crescimento em King A, sendo que em 8% (CMM 1009 e CMM 1011) foi constatada a presença de fluorescência, podendo indicar a produção de pigmento *phenazine* (SNEATH, 1986). Em 12% dos acessos (CMM 987, CMM 999 e CMM 1008) não foi verificada a fluorescência, resultado contrário ao obtido anteriormente por Karina et al. (2016). Em King B, 100% dos acessos apresentaram crescimento. Porém, não foi constatada fluorescência em 16% dos

acessos (CMM 995, CMM 997, CMM 1002 e CMM 1006), como havia sido verificado por Karina et al. (2016).

Como a formação do pigmento *pyoverdina* (fluorescente), em meio King B, está presente no crescimento de *Pseudomonas fluorescens*, constata-se que o emprego do método Castellani, preservação de médio prazo, não foi eficaz para a manutenção dessa característica. Por outro lado, destaca-se que os pigmentos *pyoverdina*s apresentam instabilidade química e sua produção pode cessar após prolongados cultivos de laboratório (KRIEG; HOLT, 1984).

Tabela 1. Características morfológicas de acessos de *Pseudomonas* preservados em água, por três anos. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. 2019.

Acessos CMM	Cor	Forma	Elevação	Borda	Superfície	Caracteres ópticos
1 (padrão)	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
987	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
989	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
990	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
991	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
993	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
995	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
996	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
997	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
998	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
999	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
1000	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
1001	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
1002	Creme	Irregular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
1003	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
1004	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
1005	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
1006	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
1007	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
1008	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
1009	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
1010	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
1011	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
1012	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
1013	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente
1014	Creme	Circular	Convexa baixa	Ondulada	áspera	Transparente

#### 4. CONCLUSÕES

O método Castellani garante a viabilidade e pureza de acessos de *Pseudomonas* preservados em água durante três anos. Há necessidade de preservação do acesso CMM 1015 em método de longo termo para manter sua viabilidade. A produção de pigmentos fluorescentes não é estável no método de preservação em água.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, v.2 n.2, p. 236-25, 2004.

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microorganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.22, n. 3, p. 263-268, 1991.

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.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. Cap.4, p.141-145.

MATTOS, M. L. T. & THOMAS, R. W. S. P. Degradation of the herbicide clomazone by *Pseudomonas fluorescens*. In: **INTERNATIONAL BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION SYMPOSIUM**, 10., Hamburg 1996. Anais... Hamburg: Dechema, 1996. p.623-630.

MATTOS, M. L. T.; GALARZ, L. A.; SANTOS, I. B. dos; VAZ, JENNIFER. Cumprimento de requisito obrigatório de qualidade de preservação na coleção de microorganismos multifuncionais de clima temperado. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS**. 5., Fortaleza, 2018. RG News, 2018. p.157.

MORIWAKI, C, Cassiana MAZZER, C; PAZZETTO, R ; MATIOLI, G. Avaliação de métodos para manutenção e preservação de bactéria esporulada produtora da enzima CGTase. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, Maringá, v.31, n.2, p. 113-118, 2009 DOI: 10.4025/actascihealthsci.v31i2.6910.

OLIVEIRA, K.F; GALARZ,L.A; VALGAS, R.A; MARIA LAURA TURINO MATTOS, M.L.T. Caracterização fenotípica de bactérias isoladas da rizosfera do azevém em solo sob processo de biorremediação do herbicida clomazona. In **XXV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, Pelotas, 2016.

PASSADOR, M. M.; PIRES, G. C. C.; FINATTI, D.; APARECIDO, C. C; FIGUEIREDO, M. B. Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca "Mário Barreto Figueiredo". **Biológico**, São Paulo, v.72, n.1, p.51-55, jan./jun., 2010.

ROMEIRO, R. S. **Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas**. Material didático, Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 2006.

SOLA, M. C.; OLIVEIRA, A. P.; FEISTEL J. C; MINAFRA , C. S. R. Manutenção de microorganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, N.14; p. 1 3 9 8, 2012.