

PRESERVAÇÃO PELO MÉTODO DE LIOFILIZAÇÃO DAS CEPAS DE *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* E REATIVAÇÃO PARA AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

LURIAN PORTO PERES¹; MARIANE IGANSI ALVES²; GABRIELA DE QUADROS DA LUZ³; MARIA LUIZA DE OLIVEIRA ZANINI³; JACKSON GABRIEL MORAIS BECKER³; PATRÍCIA DIAZ DE OLIVEIRA⁴

¹ Graduação em Biotecnologia – UFPEL – lurianporto@gmail.com

² PPGCTA – DCTA – UFPEL – marianeigansialves@hotmail.com

³ Graduação em Biotecnologia – UFPEL – ql.gabi@gmail.com; luizaznn@gmail.com; kato_becker@hotmail.com

⁴ PPGB – CDTec; PPGCTA – DCTA – UFPEL – bilicadiaz@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A preservação dos microrganismos apresenta-se como uma ferramenta importante para processos biotecnológicos industriais e estudos microbiológicos no geral, onde torna-se possível o armazenamento de culturas por longos períodos e a utilização periódica para pesquisa e/ou produção (BOROWSKI, 2011). 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, diminuindo assim, a repetição de processos como o isolamento e o melhoramento dos microrganismos (GUEDES et al., 2004).

Considerando que o manuseio de microrganismos em laboratórios exige 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 viáveis, 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).

Deste modo, torna-se possível evidenciar que diferentes bactérias apresentam diferentes taxas de sobrevivência frente à liofilização. Assim, o presente trabalho teve como objetivo determinar a sobrevivência das cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*, representadas pelos números 15 e 106, após cinco meses liofilizadas.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção e determinação da concentração celular do inóculo

Foram utilizadas duas cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*, 15 e 106, pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Biopolímeros do

CDTec - UFPel, preservadas por repiques mensais em meio sólido SPA composto (g.L^{-1}) por: 20,0 sacarose; 5,0 peptona; 14,0 ágar; 0,25 sulfato de magnésio e 0,5 fosfato dipotássico (HAYWARD, 1964), e armazenadas sob refrigeração ($4-8\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Repiques multiplicativos utilizando SPA sólido, foram incubados em estufa bacteriológica à $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 h e ressuspensos em meio SPA líquido. Um volume de 10 mL da suspensão bacteriana foi transferido para Erlenmeyer de 250 mL contendo 40 mL de meio SPA líquido. Os inóculos foram incubados em agitador incubador orbital a 150 rpm, a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h.

Para a determinação da concentração bacteriana, a técnica de diluição seriada foi realizada até a diluição 10^{-8} , seguida de plaqueamento das diluições 10^{-7} e 10^{-8} em placas com meio SPA sólido, as quais foram incubadas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h, conforme esquema na Fig.1.

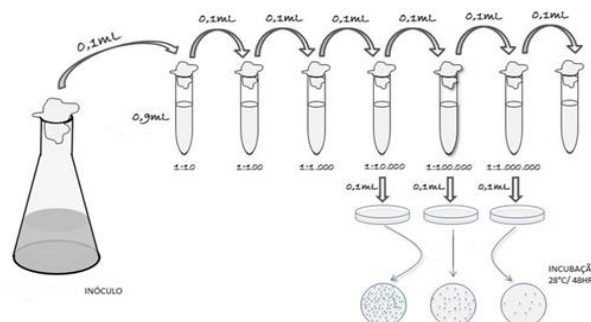


FIGURA 1. Técnica de diluição seriada (Tortora et al, 2011).

2.2. Liofilização

Os inóculos foram diluídos com o crioprotetor composto (g.L^{-1}) por: 0,93 peptona; 0,93 manitol, 0,46 glutamato sódico, 0,46 gelatina, 0,38 fosfato monobásico de sódio e 0,228 fosfato dibásico de sódio (ELLNER, 1978), na proporção de 60 (inóculo): 40 (crioprotetor) (v.v^{-1}). Adicionou-se 2 mL desta suspensão em frascos estéreis, tipo penicilina, com capacidade para 10 mL. Em seguida, congelou-se as amostras a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram liofilizadas (Liotop, Liobras®, Brasil) por 24 h e armazenadas à temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3. Reativação das cepas liofilizadas

As cepas 15 e 106, armazenadas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante o período de cinco meses, 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, seguida de diluições decimais até 10^{-8} , para plaqueamento das diluições 10^{-7} e 10^{-8} , em meio SPA sólido, as quais foram incubadas por 48 h a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após, contou-se as colônias típicas e expressou-se o resultado em unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC.mL^{-1}).

Para fins de comparação e verificação da viabilidade da técnica, foram reativadas três cepas de *Xanthomonas arboricola* pv pruni (71, 80 e 101), liofilizadas, conforme descrito anteriormente, e armazenadas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ pelo período de 1 ano. As cepas foram reativadas como descrito anteriormente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os inóculos preparados para o processo de preservação apresentaram concentrações adequadas para a produção do biopolímero xantana, conforme descrito por Pan et al. (2000) e apresentado na Tabela 1. Após o processo de

preservação houve a diminuição de um log na concentração bacteriana e foram observadas baixas taxas de sobrevivência. Entretanto, a contagem da concentração bacteriana após o processo é suficiente para que ocorra a recuperação do microrganismo, conforme descrito por Bozoglu et al. (1987) que relata que a concentração bacteriana deve ser superior a 10^7 para que possa ser assegurada a sobrevivência durante o processo de liofilização, o longo período de estocagem, a recuperação e propagação da cepa.

Tabela 1. Percentual de sobrevivência das cepas 15 e 106 de *Xanthomonas arboricola* pv pruni reativadas após cinco meses de liofilização.

Cepas	Concentração bacteriana do inóculo (UFC.mL ⁻¹)	Concentração bacteriana após a liofilização (UFC.mL ⁻¹)	Sobrevivência (%)
106	9×10^9	$1,45 \times 10^8$	1,6
15	$4,1 \times 10^8$	$3,25 \times 10^7$	7,9

Para as cepas preservadas por liofilização no ano de 2017, 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. Percentual de sobrevivência das cepas 71, 80 e 101 de *Xanthomonas arboricola* pv pruni reativadas após 7 dias de liofilização no ano de 2017.

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

As cepas abordadas neste estudo mantiveram-se viáveis após a liofilização e armazenamento a -18°C . Pode-se observar um decréscimo em torno de 50% na sobrevivência após o processo de preservação, entretanto, como trata-se de uma manipulação com altas concentrações bacterianas, não houve diminuição no log da concentração.

Bactérias produtoras de exopolissacarídeos (EPS) são, de modo geral, bastante resistentes à liofilização. BOROWSKY (2011) obteve uma taxa de sobrevivência de 6% para cepa 24, preservada pelo mesmo método do presente trabalho. Ao recuperar células desta mesma cepa, preservadas durante 12 anos por liofilização, observou-se, apesar do percentual de mortalidade de 85% no período, uma concentração final de $8,7 \times 10^7$, atestando a adequabilidade da técnica para esta bactéria. E ainda, segundo HUBALEK (2003), o uso de agentes crioprotetores apropriados aumenta a sobrevivência consideravelmente, pois possuem a capacidade de proteger a célula microbiana dos efeitos deletérios das etapas do congelamento e reidratação, como a ruptura celular.

4. CONCLUSÕES

As cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*, abordadas no presente trabalho, apresentaram uma preservação eficiente e condizente com os dados da literatura após o processo de secagem por liofilização de inóculos adicionados de crioprotetor, corroborando a viabilidade celular deste método de preservação.

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.** 103f. Dissertação – (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.
- 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, 223p. 1978.
- GUEDES, A. C.; GOEDERT, C. O.; BUSTAMANTE, P. G.; MOREIRA, J. R. A.; MARIANTE, A. S.; WALTER, B. M. T.; BRANDÃO, C. R. F.; PROENÇA, C. E.B.; MUNHOZ, C. B. R.; MAGALHÃES, C.; SILVA, G. P.; COLLI, G. R.; BRANCHETTI, L.; MENDES, M. S.; VEIGA, R.; MENDONÇA, R. C.L; SILVA, S. R.; CAVALCANTI, T. B.; PEREIRA, T. S.; CANHOS, V. P.; COUTINHO, H. L. C.; VAZOLLER, R.; RUMJANEK, N.; ROSADO, A.; BARROS, E.; AZEVEDO, J. L.; PELLIZARI, V.; MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J. O.; MORAIS, G.; SCHENBERG, A. C. **Estratégia Nacional de Diversidade Biológica. Conservação ex situ.** Disponível em: <http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/politica/gtt/gtt10>. Acesso em: 11 out. 2011
- HAYWARD, A. C. Bacteriophage sensitivity and biochemical type in *Xanthomonas malvacearum*. **Journal of General Microbiology**, v. 33, p. 287-298, 1964.
- HUBALEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v.46, p. 205–229, 2003.
- 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.
- PAN, A., MOREIRA, A. S., VENDRUSCOLO, C.T. Efeito da concentração inicial do inóculo no crescimento celular e qualidade de biopolímeros de *Xanthomonas campestris* pv. *Pruni* cepa 06. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 6, n. 3, p. 273 -277, 2000.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 964p.