UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico - CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE CEPAS DE *Xanthomonas arboricola* pv. pruni APÓS LIOFILIZAÇÃO

Lurian Porto Peres

Pelotas, 2018

Lurian Porto Peres

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE CEPAS DE *Xanthomonas arboricola* pv. pruni APÓS LIOFILIZAÇÃO

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Supervisor de Estágio: Msc. Mariane Igansi Alves
Orientador Acadêmico: Profª. Drª. Patrícia Diaz de Oliveira

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P434a Peres, Lurian Porto

Avaliação da viabilidade celular de cepas de Xanthomonas arboricola pv. pruni após liofilização / Lurian Porto Peres ; Patrícia Diaz de Oliveira, orientadora. — Pelotas, 2018.

57 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Preservação. 2. Crioprotetores. 3. Xantana. 4. Bioprocesso. I. Oliveira, Patrícia Diaz de, orient. II. Título.

CDD : 576.162

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Lurian Porto Peres

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE CEPAS DE *Xanthomonas arboricola* pv. pruni APÓS LIOFILIZAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 27 de novembro de 2018.

Banca examinadora:

_____

Profª. Drª. Patrícia Diaz de Oliveira, Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

_____

Profª. Drª. Luciana Bicca Dode, Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

_____

Msc. Mariane Igansi Alves, Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

_____

Profª. Msc. Mariliana Luiza Ferreira Alves, Mestre em Ciência de Alimentos pela Universidade Federal de Lavras.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus e aos meus guias, os quais nunca me deixaram cair em desgraça. Sempre me fizeram pensar nas melhores coisas e mais positivas, fortalecendo a minha fé, da qual sou filha e minha mãe é Obá.

Em segundo lugar, agradeço, de todo o meu coração, à minha mãe, dona Elna. Aquela que incansavelmente fez de tudo para que eu concluísse essa etapa na vida. Nunca se queixou, moveu terra e mar, e não descansou enquanto a nossa vitória não chegasse. Pai, seu Celso, em corpo físico não fostes capaz de me acompanhar, mas sei que em espírito tu torceu e fez tudo o que podia. Essa vitória é mais de vocês do que minha, meus velhos. Agradeço aos meus irmãos, cunhados, sobrinhos, afilhados, amigos da família e à minha tia Ana, que se fez presente, me ajudando, torcendo e vibrando a cada passo que eu dei. Obrigada por tudo. Amo vocês demais.

Agradeço aos meus amigos, fiéis, que se fizeram presente e me fizeram acreditar e não desistir do meu sonho. Não os nomeio por receio de ter o nome de alguém esquecido, o que não é justo, mas sintam-se todos, que de coração me prestigiam, abraçados e agradecidos.

Agradeço, também, aos meus colegas de laboratório, os quais escutaram meus choros, meus desabafos e me impediram de desistir. Camila, Matheus, Maria Luiza e Gabriela, vocês foram meus principais alicerces. Serei grata eternamente.

Agradeço em especial ao Arthur, ao Jean e a Isadora, que foram meus maiores presentes, os quais me ouviram e me ampararam durante uma graduação inteira. Muito obrigada. Eu amo vocês.

Agradeço, de todo o meu coração, às minhas fiéis e amadas amigas, Marina e Priscila, presentes desde o início dessa minha caminhada, antes mesmo de começar a cursar a Biotecnologia. Obrigada por tudo. Com todo o meu amor.

Agradeço à minha orientadora, Profª Drª Patrícia Diaz de Oliveira e Profª Msc. Mariane Igansi Alves pela orientação e paciência. Profª Drª Luciana Bicca Dode, com todo o meu coração, muito obrigada por me abraçar e me manter nos teus braços enquanto eu desmoronava. Agradeço à vocês pelo apoio e por me fazerem continuar neste caminho, buscando sempre por novas experiências.

Resumo

Peres, Lurian Porto. **AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE CEPAS DE *Xanthomonas arboricola* pv. pruni APÓS LIOFILIZAÇÃO.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas.

A preservação dos microrganismos apresenta-se como uma ferramenta importante para processos biotecnológicos industriais e estudos microbiológicos, permitindo o armazenamento de culturas por longos períodos e sua utilização periódica para pesquisa e/ou produção. A bactéria *Xanthomonas arboricola* pv. pruni é responsável por sintetizar o biopolímero conhecido como goma xantana, o qual é utilizado nas mais diversas indústrias. Visando um método para a preservação destas cepas por longos períodos, a liofilização com o uso de crioprotetores apresenta-se como uma técnica capaz de suprir essa necessidade, e tem como objetivo a proteção do tecido biológico. No presente trabalho, seis diferentes cepas da bacteria *Xanthomonas arboricola* pv. pruni foram preservadas pelo método de liofilização adicionadas de crioprotetor, e analisadas quanto a viabilidade celular e a taxa de sobrevivência após o processo de secagem. As cepas 15, 68, 77, 85, 90 e 106 apresentaram uma taxa de sobrevivência, respectivamente de, 7,9%, 6,8%, 17,9%, 14,3%, 10,2% e 1,6% assegurando a sobrevivência do microrganismo. Desta forma, para a preservação de *Xanthomonas arboricola* pv. pruni, por longos períodos, recomenda-se a liofilização e, por períodos curtos, e também para o transporte de culturas, sugere-se a técnica de repique contínuo, podendo esta ser utilizada juntamente com a liofilização.

Palavras-chave: Preservação. Crioprotetores. Xantana. Bioprocesso.

Abstract

Peres, Lurian Porto. **EVALUATION OF THE VIABILITY OF CELLS OF *Xanthomonas arboricola* pv. pruni after freeze-drying**. Course Completion Work (Bachelor of Biotechnology). Federal University of Pelotas.

Preservation of microorganisms is an important tool for industrial biotechnological processes and microbiological studies in general, where it is possible to store cultures for long periods and periodic use for research and/or production. The bacterium *Xanthomonas arboricola* pv. pruni is responsible for synthesizing the biopolymer known as xanthan gum, which is used in many different industries. Aiming for a method to preserve these strains for long periods of time, freeze-drying was highlighted as the best technique, with the aid of cryoprotectants that aims to protect biological tissue. In the present work, strains of the bacterium *Xanthomonas arboricola* pv. pruni were preserved by the freeze-drying method added cryoprotect. As a result, cell viability and survival rate were assessed before and after the freeze-drying process. The strains 15, 68, 77, 85, 90 and 106 had a survival rate of 7.9%, 6.8%, 17.9%, 14.3%, 10.2% and 1.6 % assuring the survival of the microorganism. Thus, for the preservation of *Xanthomonas arboricola* pv. pruni, for long periods, freeze-drying is recommended and, for short periods, and also for the transportation of crops, the technique of continuous pealing is suggested and can be used together with freeze-drying.

Keywords: Preservation. Cryoprotectants. Xanthan. Bioprocess.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. *Xanthomonas* spp.....15

FIGURA 2. Culturas de cepas diferentes de *Xanthomonas arboricola* pv. pruni com meio nutritivo conservado em geladeira por: (A) 23 dias; (B) 18 dias e (C) 20 dias, caracterizadas por colônias mucoides, viscosas e lisas.....20

FIGURA 3. Processo de Liofilização.....25

FIGURA 4. Placas de Petri contendo unidades formadoras de colônia referentes à *Xanthomonas arboricola* pv. pruni.....37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de crioprotetores utilizados microbiologia para preservação de tecidos biológicos.....31

Tabela 2. Período de tempo em que as cepas de *Xanthomonas arboricola* pv pruni, abordadas neste estudo, estiveram liofilizadas.....35

Tabela 3. Percentual de sobrevivência das cepas 15, 68, 77, 85, 90 e 106 de *Xanthomonas arboricola* pv pruni reativadas alguns meses (detalhados na Tabela 2) após serem submetidas ao processo de liofilização.....37

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Taxa de sobrevivência das cepas de Xanthomonas arboricola pv. pruni sem sofrer influências do período de tempo em que permaneceram armazenadas após o processo de liofilização.....39

Sumário

1 INTRODUÇÃO 11
1.1 OBJETIVOS 14
1.1.1 Objetivo Geral 14
1.1.2 Objetivos Específicos 14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 15
2.1 *Xanthomonas arboricola* pv. pruni 15
2.2 Goma Xantana 16
2.3 Manutenção de microrganismos 18
2.3.1 Métodos para a preservação de microrganismos 18
2.3.2 Método de curto prazo 19
2.3.3 Métodos de médio prazo 21
2.3.4 Métodos de longo prazo 24
2.4 Avaliação da viabilidade dos microrganismos após conservação 28
2.5 Crioprotetores 30
3 MATERIAIS E MÉTODOS 33
3.1 Microrganismo 33
3.2 Reagentes 33
3.3 Equipamentos 34
3.4 Condições de preservação de microrganismos no Laboratório de Tecnologia em Bioprocessos 34
3.5 Obtenção e determinação da concentração celular do inóculo 34
3.6 Liofilização 35
3.7 Reativação das cepas de *Xanthomonas* 36
3.8 Contagem de células 36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 37
5 CONCLUSÃO 40
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 41
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 42

1 INTRODUÇÃO

A preservação de 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 sem refrigeração. 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 preservação de *Xanthomonas* já foi motivo de preocupação por causa da instabilidade genética inicialmente creditada a esta bactéria (CADMUS et al., 1976; KIDBY et al.,1977). Galindo, Salcedo e Ramírez (1994) descreveram uma técnica de conservação de *Xanthomonas* em meio sólido *Yeast Malt* (YM), em tubos inclinados, com repiques mensais durante 11 meses, onde a bactéria não apresentou mudanças morfológicas nas colônias e nem alteração na sua capacidade de produção de xantana. Desde 1955 até hoje, a técnica de repique contínuo é utilizada por pesquisadores da área para manutenção de *Xanthomonas*, consistindo na repicagem das bactérias a cada trinta dias e estocadas sob refrigeração à temperatura de aproximadamente 4 °C (HAYNES; WICKERHAM; HESSELTINE, 1955; JEANES et. al., 1976; GUPTE; KAMAT,

1997; SOUZA; VENDRUSCOLO, 1999; VENDRUSCOLO; MOREIRA, 2006; ROTTAVA et al., 2009).

Não existe uma técnica universal para a estocagem e manutenção de microrganismos. Todos os métodos de preservação apresentam vantagens e desvantagens e a escolha do método mais indicado deve considerar os interesses particulares de cada instituição e a finalidade a que se destina a coleção (ROMEIRO, 1996). Dependendo das características do microrganismo e das condições disponíveis, diferentes métodos de conservação do material biológico podem ser utilizados. A *Organization for Economic Cooperation and Development* recomenda que o ultracongelamento e a liofilização sejam usados para a preservação de microrganismos, visto que, para muitas linhagens, estes são considerados os métodos com menos riscos de alterações genéticas, além de garantirem a preservação por longos períodos de tempo (OECD, 2004).

As principais exigências de uma técnica específica de preservação recaem na conservação da viabilidade e das características morfológicas e bioquímicas e na estabilidade genética da cultura microbiana durante o armazenamento. O processo deve ser seguro e, preferencialmente, pouco dispendioso, além de possibilitar o transporte do inóculo estocado e sua reconstituição com facilidade (BOOTH, 1971; BAIOCCO, 1997; CAMEOTRA, 2007). Simplicidade, ausência de necessidade de equipamento sofisticado, rapidez de execução são características adicionais de um bom método de preservação (ROMEIRO, 1996).

A liofilização, na literatura, consta como um dos métodos que asseguram a resistência dos microrganismos com relação ao tempo (HECKLY, 1961). Entretanto, a liofilização de culturas em grande escala teve início somente em 1941 e, desde então, tem-se mostrado bastante adequada para a preservação com uma diminuição significante da ocorrência de mutações. 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 em fase latente por longos períodos de tempo, conversando suas características originais. Apesar de apresentar-se como uma técnica bastante utilizada, existem exceções como da bactéria *Helicobacter pylori* e *Clostridium botulinum*, em virtude das dificuldades na obtenção de crescimento adequado para a pré-secagem (RUDGE, 1991).

O sucesso da liofilização de uma amostra implica na recuperação completa de sua atividade biológica após a reidratação; a sobrevivência após a liofilização reflete a capacidade da célula em resistir aos efeitos do congelamento e secagem. Assim, ensaios de viabilidade são parte integrante da avaliação do produto liofilizado (SUNDARI; ADHOLEYA, 2001). O estoque do material liofilizado por longos períodos sem a necessidade de condições especiais de armazenamento, a facilidade de reconstituição, pela adição de um fluído reidratante, e a facilidade de transporte e distribuição do material biológico, são as vantagens desta técnica de preservação de microrganismos (SUNDARI; ADHOLEYA, 2001).

Davis (1962) avaliou a sobrevivência de 277 culturas, entre elas rizóbios, bactérias, leveduras e actinomicetos, durante 21 anos de armazenamento; apenas três culturas não cresceram a partir do estado liofilizado (dois fungos e uma bactéria). Sharma e Smith (1999) também verificaram a sobrevivência de fungos preservados durante 20 anos por liofilização, das 26 cepas liofilizadas apenas uma não resistiu ao armazenamento, uma apresentou colônia de contaminantes e cinco amostras apresentaram alguma deterioração.

Prabakaran e Hoti (2008) desenvolveram uma técnica para preservar *Bacillus thuringiensis*, um microrganismo de extrema importância para o controle de mosquitos, devido sua alta atividade larvicida. A biomassa do microrganismo foi liofilizada e utilizada para a imobilização com alginato de sódio. A contagem de esporos de *B. thuringiensis* permaneceu, praticamente inalterada, em 10 anos de armazenamento a 4 °C.

Dos métodos existentes para a conservação de *Xanthomonas*, a liofilização mostra-se, até hoje, como o mais seguro para a manutenção da bactéria por longos períodos de tempo (JEANES et al., 1976; KIDBY et al., 1977). Lelliott (1965) determinou a viabilidade de 160 bactérias fitopatogênicas preservadas por liofilização, óleo mineral e solo. Após armazenamento por cinco anos todas as culturas liofilizadas apresentaram-se viáveis, inclusive as espécies de *Xanthomonas.*

Os estudos mais completos sobre liofilização de inóculos de *Xanthomonas* foram realizados por Baiocco (1997). A cepa 280 de *X. campestris* pv. manihotis foi liofilizada com o intuito de preservar a viabilidade celular da bactéria e sua capacidade produtiva de xantana. Analisaram-se os

efeitos das condições de crescimento da bactéria e dos diferentes meios de suspensão e de reidratação das células, nas taxas de sobrevivência do inóculo após a liofilização. Seus resultados mostraram que a viabilidade das culturas de *X. campestris* pv manihotis foi melhor quando suspensas em meio YM adicionado de 10% de leite desnatado, armazenadas a -20 °C e reidratadas em meio YM. Os autores puderam observar que as culturas mantidas em temperatura ambiente por 12 meses, embora com sobrevivência menor, não sofreram deterioração morfológica, mantendo-se estáveis, sem o aparecimento de sublinhagens mutantes.

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.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 *Objetivo Geral*

- Preservar cepas da bactéria *Xanthomonas arboricola* pv. pruni pelo método de liofilização e reativação para análise e comparação da viabilidade celular.

1.1.2 *Objetivos Específicos*

- Preservar as cepas de *Xanthomonas arboricola* pv. pruni pelo método de liofilização;

- Analisar da viabilidade celular e da taxa de sobrevivência através da comparação da concentração bacteriana inicial e final.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Xanthomonas arboricola* pv. pruni

O gênero *Xanthomonas*, pertencente à família Xanthomonadaceae (SADDLER; BRADBURY, 2005) compreende 27 espécies, sendo que apenas uma é um patógeno oportunista de humanos (*Xanthomonas maltophilia*) e as demais fitopatogênicas (HOLT et al., 1993; GARCÍA-OCHOA et al., 2000, PARKINSON et al., 2007). São bastonetes com aproximadamente 0,4-0,7 µm de largura e 0,7-1,8 µm de comprimento, gram-negativas, móveis por flagelo único (1,7-3 µm de comprimento) (Fig.1), quimiorganotróficos, estritamente aeróbios, catalase-positiva e oxidase-negativa (GARCÍA-OCHOA et. al, 2000).

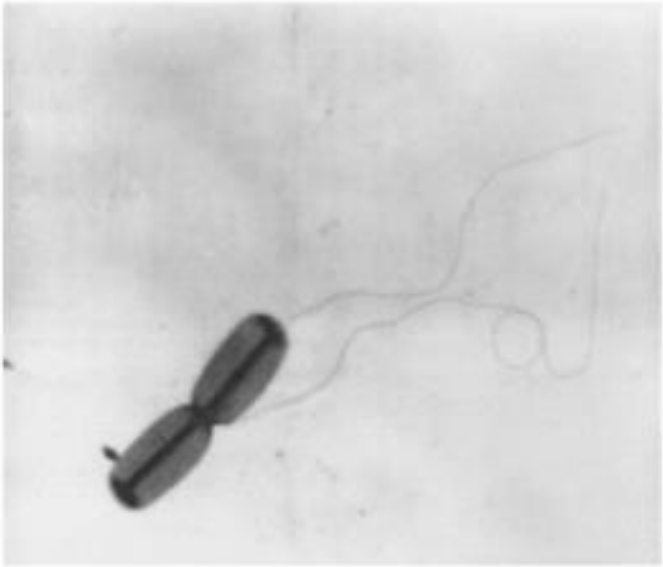


FIGURA 1. *Xanthomonas* spp.
Fonte: GARCÍA-OCHOA et. al, 2000.

O crescimento de *Xanthomonas* em meio sólido Ágar Peptona Sacarose (SPA) (HAYWARD, 1964), é caracterizado por colônias mucoides, viscosas e lisas. Pigmentos amarelos, chamados de xantomonadinas, são sintetizados por todas as espécies da bactéria, porém podem estar ausentes quando ocorre alguma degradação da bactéria e a possível perda das características originais (BRADBURY, 1984; GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

Xanthomonas campestris pv. campestris é utilizada comercialmente para produção de xantana, um biopolímero de ampla aplicação industrial (JEANES, 1974; SUTHERLAND, 1993, GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Entretanto, através de estudos é possível comprovar que, devido à similaridade morfológica e fisiológica, outros patovares como manihotis, begoniae e dieffenbachiae (NITSCHKE; THOMAS 1995; MAYER et al., 2010), e até mesmo outras espécies da bactéria, como o exemplo da *X. arboricola* (SCAMPARINI et al., 1998; VENDRUSCOLO, 2006; BORGES et al., 2009a;b), anteriormente classificada como *X. campestris* pv. pruni, possuem capacidade de produção de xantana em quantidades apropriadas para industrialização.

Até meados dos anos 90, as bactérias do gênero *Xanthomonas* que infectavam crucíferas, como couve-flor, brócolis e repolho e as que infectavam espécies do gênero *Prunus*, como pessegueiros, ameixeiras e amendoeiras, eram consideradas como pertencentes à mesma espécie, *X. campestris*, sendo chamadas de *X. campestris* pathovar campestris e *X. campestris* pathovar pruni, respectivamente. Durante a década de 90, pesquisadores sugeriram uma nova classificação para o gênero, levando em consideração, entre outros fatores, o perfil genético; nesta proposta, espécies foram inseridas e patovares foram elevados ao status de espécie (VAUTERIN et al., 1995; VAUTERIN; SWINGS, 1997).

Em 2001, Moreira et al., levando em conta a composição química das xantanas produzidas, mostrou que o pathovar pruni possuía similaridade com o pathovar juglandis, mas não com o campestris. A reclassificação proposta foi adotada pelo Manual Bergeys, edição 2005 (SADDLER; BRADBURY, 2005), na qual o pathovar pruni foi incluído em uma nova espécie, *X. arboricola*, com a nomenclatura *X. arboricola* pv. pruni.

2.2 Goma Xantana

Na década de 50, pesquisadores do *Northern Regional Research Laboratory* (NRRL) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, pesquisavam microrganismos produtores de gomas de interesse comercial solúveis em água, onde observaram e identificaram uma destas gomas como xantana.(MARGARITIS; ZAJIC, 1978). Na década de 60, pesquisas intensivas

foram realizadas por alguns laboratórios industriais, resultando na produção semi-comercial da xantana Kelzan, pela empresa Kelco, dos Estados Unidos (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

A xantana foi o segundo polissacarídeo microbiano com uso admitido em alimentos. No Brasil, a adição de xantana em alimentos é permitida desde 1965, pelo decreto Lei n° 55.871, da Legislação Brasileira de Alimentos (BRASIL, 1965). Lei esta, que também inclui a dextrana, gelana e curdulana, constituindo assim um dos quatro biopolímeros aprovados pela Food and Drugs Administration (FDA) para uso alimentar (KANG; VEEDER; COTTRELL, 1983).

As vantagens do uso de xantana em relação a outros hidrocolóides, devem-se, marjoritariamente, à suas propriedades reológicas, que permitem alta viscosidade em baixas concentrações, além de estabilidade em ampla faixa de pH (2,5-11) e na presença de sais, sendo afetada apenas na temperatura; a goma xantana também possui grande escala de produção em curto espaço de tempo e propriedades pseudoplásticas, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da tensão de corte (MORRIS, 1976; SUTHERLAND, 1993; ROSALAM; ENGLAND, 2006).

A ampla aplicação da xantana na indústria alimentícia deve-se à sua compatibilidade com ingredientes alimentares, não alimentares e aditivos (CHALLEN, 1993), podendo ser utilizada em produtos de panificação, por apresentar compatibilidade com proteínas, lipídios e outros polissacarídeos, como amido e pectina, aumentando sua vida de prateleira e contribuindo para a estrutura (SUTHERLAND, 1998; PREICHARDT, 2009). A fácil dissolução da xantana em água fria ou quente, proporciona um rápido incremento da viscosidade, possibilitando seu uso em misturas secas para produtos como molhos, recheios e sobremesas.

A adição de xantana melhora a estabilidade de alimentos congelados por meio da ligação da água livre, evitando a sinerese, que é causada por um aumento de associações moleculares entre as cadeias de amido, em particular a retrogradação da amilose, o que resulta na expulsão de água a partir da estrutura do gel (MORRIS, 1990; KATZBAUER, 1998); age como estabilizante em sorvetes e em substitutos de clara de ovo à base de proteína de soro e gelatina; previne aderência e adiciona corpo em géis de frutas, além de

proporcionar viscosidade a molhos utilizados em pizza, inibindo sua absorção pela massa (PEREIRA, 2009; UCKER et al., 2010).

A xantana, em produtos farmacêuticos em geral, é utilizada em emulsões ou suspensões, impedindo a separação de ingredientes não solúveis; já em cosméticos, a principal aplicação é apresentada em cremes e géis, proporcionando suavidade e maciez devido à sua pseudoplasticidade. Em produtos de higiene, sua principal aplicação apresenta-se em cremes dentais e xampus (KATZBAUER, 1998; BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002; MOREIRA, 2002). O uso da xantana nestes produtos é considerado seguro, pois não é genotóxica ou mutagênica (ROLL, 2005; RODRIGUES, 2010). Tão pouco tóxica, evitando a irritação na pele, olhos ou mucosas (PARFITT, 1999).

Na indústria petrolífera, emprega-se como modificador reológico do fluido de perfuração de poços (BORGES et al., 2009b), e na recuperação terciária do petróleo, pois não apresenta propriedades degradantes por cisalhamento (TAYLOR; NASR-EL-DIN, 1993); ter excelente compatibilidade com sais e ser resistente à degradação por temperatura (ROSALAM; ENGLAND, 2006).

Com uma produção mundial de aproximadamente 140 mil toneladas por ano, a xantana é o polissacarídeo microbiano de maior importância econômica, pois movimenta milhões de dólares. (BORSCHIVER; ALMEIDA; ROITMAN, 2012).

2.3 Manutenção de microrganismos

A conservação e a manutenção de microrganismos apresentam-se de suma importância, principalmente, para conservar as características originais do microrganismo que pode ser armazenado e/ou utilizado em pesquisas ou produção com relação à estudos microbiológicos no geral (COSTA & FERREIRA, 1991; ROMEIRO, 2006).

2.3.1 Métodos para a preservação de microrganismos

Visto que a manutenção e preservação de microrganismos, como a *Xanthomonas*, é importante, deve-se procurar métodos que melhor auxiliem neste processo priorizando sua finalidade. Há uma quantidade considerável de

técnicas, convencionais e alternativas, disponíveis para estoque e preservação de isolados microbianos, podendo ser divididas em métodos de curto prazo (repiques periódicos), médio prazo (preservação em óleo mineral e água estéril) e longo prazo, como a liofilização (BOROWSKI, J. M. 2011).

A escolha de uma técnica de preservação para determinado microrganismo depende das características do método, dos custos de manutenção, da importância do acervo, da disponibilidade de equipamentos e reagentes, da finalidade do estudo e da mão-de-obra técnica, pois alguns métodos podem causar a completa inatividade metabólica de microrganismos, necessitando então, de especialização do pesquisador (BOROWSKI, J. M. 2011).

2.3.2 Método de curto prazo

O método de curto prazo para a conservação de microrganismos mais utilizado é o repique contínuo. Através dele é possível preservar células por períodos de 30 dias e mantê-las armazenadas sob refrigeração de 4 ºC, evitando assim, as contaminações e perda das características originais do microrganismo (SMITH; ONIONS, 1994).

2.3.2.1 Repique contínuo

O repique contínuo é uma das técnicas de conservação mais antigas, e ainda assim, bastante utilizada, dependendo do microrganismo e de sua finalidade (COSTA & FERREIRA, 1991; ROMEIRO, 2006). Ela consiste na transferência de células para um novo meio e estocagem em baixas temperaturas após o crescimento. A Figura 2 mostra culturas da bactéria *Xanthomonas arboricola* pv. pruni em placa de Petri com meio nutritivo conservado em geladeira por períodos de tempo variados, sendo estes de uma semana à cinco meses, já bem desenvolvidas e próximas de um novo repique. O repique deve ser refeito antes que o substrato do meio seja completamente consumido pelo microrganismo ou o meio sólido seque completamente. Tubos de ensaio com rolha ou selados com parafina são utilizados para evitar a secagem do meio sólido (ROMEIRO, 2006).

(A) (B) (C)

FIGURA 2. Culturas de cepas diferentes de *Xanthomonas arboricola* pv. pruni com meio nutritivo conservado em geladeira por: (A) 23 dias; (B) 18 dias e (C) 20 dias, caracterizadas por colônias mucoides, viscosas e lisas.
Fonte: autora, 2018.

A baixa temperatura é importante para desacelerar o crescimento celular da linhagem e aumentar o intervalo de transferência da cultura para um meio novo. Este fator minimiza o número de repicagens feitas e é importante para evitar contaminações e seleções de mutantes indesejados. As contaminações podem ocorrer devido a microrganismos do ambiente ou a eventuais erros na hora da manipulação. As culturas são estocadas geralmente refrigeradas sob condições controladas em temperaturas de 4 a 8 ºC (COSTA & FERREIRA, 1991).

COSTA & FERREIRA (1991) descreveram que este método clássico, apresenta como vantagens a facilidade e o baixo custo, por não provocar estresse ou injúria celular e não necessitar de reativação dos microrganismos. Entretanto, entre as desvantagens, observa-se a possível perda das características originais devido a variações genéticas. Outra desvantagem é o alto risco de contaminação por se tratar de crescimento em meio nutritivo, além do espaço físico necessário para o armazenamento desses cultivos também ser maior que o de outras técnicas, além de trabalhoso (ROMEIRO, 2006).

Para minimizar as desvantagens da técnica são necessárias repicagens frequentes, como também já foi mencionado, pois culturas velhas tendem a

produzir culturas-filhas alteradas, tanto do ponto de vista morfológico como fisiológico, como modificações no aspecto e na cor da cultura, perda da capacidade de esporulação, redução ou perda da patogenicidade, perda da capacidade de sintetizar certas substâncias e outras modificações em geral irreversíveis (COSTA & FERREIRA, 1991; ROMEIRO, 2006).

A técnica também pode causar a reversão ou perda de microrganismos mutantes pós melhoramento. As condições de temperatura à que eles são expostos causa diminuição da atividade biológica e faz com que os microrganismos procurem estar em um estado fisiológico basal, que muitas vezes não é compatível com as mutações induzidas (ROMEIRO, 2006).

2.3.3 Métodos de médio prazo

Para a conservação em médio prazo existem algumas técnicas que visam atingir a hipobiose do microrganismo, ou seja, visam a diminuição da atividade metabólica. Os métodos de médio prazo mais utilizados são as técnicas de preservação em óleo mineral e em água estéril (BOROWSKI, 2011).

2.3.3.1 Preservação em óleo mineral

A preservação em óleo mineral é uma alternativa simples, consistindo na aplicação de uma camada de óleo mineral esterilizado sobre uma cultura, limitando a quantidade de oxigênio disponível, ocasionando então, em uma redução na atividade metabólica e, por consequência, diminuição na taxa de multiplicação do agente (RHODES, 1957; COSTA & FERREIRA, 1991; ROMEIRO, 2006). Entretanto, observa-se que camadas de óleo superiores a 1 cm não são aconselhadas, havendo diminuição da viabilidade da cultura, pois o óleo mineral em condições de total exaustão do oxigênio é extremamente tóxico para a maioria dos microrganismos. O óleo também previne a desidratação do meio de cultivo. Tratando-se de cultura em tubo inclinado, todo o meio deve ser coberto, do contrário, os microrganismos em contato com o ar funcionam como uma abertura pela qual a água do meio é drenada e levada para o exterior, causando desidratação total da cultura (COSTA & FERREIRA, 1991; ROMEIRO, 2006).

Os óleos mais recomendados e utilizados para a conservação de microrganismos são a parafina e a vaselina, devido a sua viscosidade e a densidade relativa de 0,8 a 0,9 à temperatura de 20 ºC, os quais não são mais densos que a água e decantam no fundo da cultura líquida. Eles também não devem conter produtos tóxicos à célula (ROMEIRO, 2006).

O método possui as mesmas desvantagens que o repique contínuo, diferindo somente na longevidade da cultura, que por essa técnica é maior, dependendo do microrganismo com o qual trabalha-se. Bactérias sobrevivem por um período longo de 1 a 7 anos dependendo da espécie (COSTA & FERREIRA, 1991; ABREU & TUTUNJI, 2004; COSTA et al., 2009).

2.3.3.2 Preservação em água estéril

O método também é conhecido como método de Castellani, o qual pode ser feito em água estéril ou solução salina. A solução salina é utilizada para a preservação de microrganismos sensíveis a baixas pressões osmóticas de soluções hipotônicas. O método visa reduzir a atividade metabólica e formação de estado latente da célula devido à falta de fontes nutritivas. Uma suspensão de células ou um bloco de ágar contendo o microrganismo é adicionado a uma solução de água estéril e conservado em temperatura ambiente ou refrigerado (PIMENTEL & FIGUEIREDO, 1989; COSTA & FERREIRA, 1991; NEUFELD & OLIVEIRA, 2008).

A técnica consiste no preenchimento de frascos tipo antibiótico de capacidade para 6 mL com 4 mL de água destilada, tampados com algodão e autoclavados a 121 °C e 1 atm por 30 minutos. Ocorre, então, a repicagem dos fungos para os frascos com água em câmara asséptica. Os tampões de algodão são retirados e transfere-se pedaços de meio de cultura contendo o microrganismo. A cultura que será transferida para a solução aquosa deve ser jovem para obter-se resultados satisfatórios. Após a repicagem, os tampões de algodão são substituídos por rolhas de borracha esterilizadas e os frascos são lacrados, evitando contaminação e perda de água (COSTA & FERREIRA, 1991; ABREU & TUTUNJI, 2004).

Estudos utilizando bactérias como *Acinetobacter* e leveduras como *Saccharomyces cereviseae* demonstraram que estes são preservados

satisfatoriamente pelo método aqui descrito (APARECIDO et al., 2001; NEUFELD & OLIVEIRA, 2008). Liao e Shollenberger (2003), por sua vez, ao investigarem a viabilidade de isolados de *P. viridiflava*, *Erwinia* spp. e *X. campestris* após 12, 14 e 8 anos, respectivamente, armazenados em água destilada estéril, verificaram que todos os isolados permaneceram viáveis. Nascimento et al. (2005) verificaram que o método de preservação em água destilada esterilizada propiciou a viabilidade de 100% até os 11 meses para a *X. campestris* pv. viticola; no entanto, aos 12 meses, houve uma redução para 80%.

Dentre as vantagens desse método, podemos observar a possibilidade de armazenamento à temperatura ambiente; a ausência de ataque de ácaros com relação a solução; e o baixo custo do processo, sem necessidade de equipamentos sofisticados. No entanto, existem problemas como a contaminação por outros microrganismos e a instabilidade genética da população (APARECIDO et al., 2001).

2.3.3.3 Congelamento

É um dos métodos de manutenção mais simples e de baixo custo, oferecendo segurança com relação ao armazenamento dos mais variados microrganismos por períodos que vão de três meses à dois anos, devido a redução da atividade metabólica. O método consiste na conservação de agentes em temperaturas entre -4 e -20 °C (COSTA & FERREIRA, 1991; CEFAR, 2006; TORTORA et al., 2012).

A desvantagem do método é a possível redução da sobrevivência e viabilidade celular de alguns microrganismos, visto que o congelamento pode causar danos à membrana celular, como a ruptura, devido a formação dos cristais de gelo e da variação eletrolítica na faixa de temperatura utilizada (ROMEIRO, 2006; VIEIRA et al., 2007; MEDEIROS, 2008).

Estudos liderados por Silva et al. (2008), relatam que o emprego de baixas temperaturas foi vantajoso por seu baixo custo, ser de fácil execução, e ter favorecido a conservação de quase todas as leveduras testadas por 48 meses.

2.3.4 Métodos de longo prazo

Os métodos de conservação a longo prazo, como qualquer outro método listado neste trabalho, são usados de acordo com o tipo de microrganismo e sua finalidade. Os métodos de longo prazo são bastante requisitados em laboratórios que possuem os equipamentos necessários e principalmente nos centros de preservação de culturas. Dentre as técnicas de longo prazo estão a liofilização, o congelamento em ultrafreezers e a criopreservação em nitrogênio líquido (BOROWSKI, 2011).

2.3.4.1 Liofilização

A técnica foi patenteada em 1906, pelos cientistas franceses D'Arsonval e Bouda, sendo classificada como um aperfeiçoamento dos métodos de desidratação empregados para distintos microrganismos, mostrando-se eficiente. O método associa o congelamento e a desidratação sob condições de vácuo, visto que a exposição celular contínua aos solventes concentrados da suspensão apresenta-se de forma perigosa. A técnica consiste na conservação de microrganismos por meio da dessecação rápida de culturas que se encontravam congeladas. A remoção do vapor de água presente em amostras biológicas viáveis em estado de congelamento apresenta-se como alternativa capaz de retardar o relógio biológico estabelecido pela natureza, como demonstrado na Fig. 3. (DAY & MCLELLAN, 1995; MYAMOTO-SHINOHARA et al., 2000; PAOLI, 2005; COSTA et al., 2009).

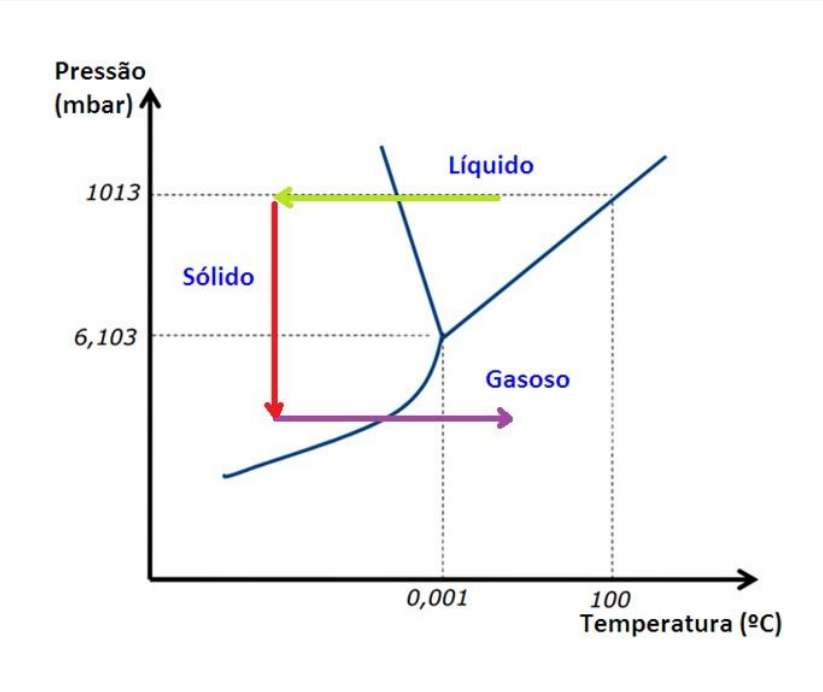


FIGURA 3. Processo de Liofilização. No processo de liofilização, é preciso que o solvente que estava no estado líquido seja congelado e se mantenha em estado sólido como de evidencia a seta verde. Em seguida, a seta vermelha indica que com o auxílio da bomba de vácuo, a pressão interior do equipamento é reduzida. Com a seta roxa, nota-se que é preciso passar a amostra do estado sólido para o estado gasoso sem voltar para o estado líquido, sendo necessário criar situações para que ocorra a sublimação, o que é feito com o aumento da temperatura, sem alterar a pressão.

Fonte: BECKER, 2017.

O método de liofilização apresenta-se dividida em três fases distintas: congelamento da suspensão microbiana; desidratação através da sublimação da água presente, que passa diretamente do estado sólido para o gasoso, sob pressão reduzida e baixa temperatura; e secagem a alto vácuo com temperatura acima de 0 ºC, onde ocorre eliminação total da água, a qual permaneceu adsorvida às partículas sólidas (ROWE, 1971; BAIOCCO, 1997; SIMIONE, 1998).

A liofilização é definida como sendo um método de longo prazo por conservar microrganismos por longos períodos de tempo (17 – 20 anos), apresentando a recuperação completa de sua atividade biológica do microrganismo após a reidratação e a sobrevivência reflete a capacidade da

célula em resistir aos efeitos do congelamento e secagem, com isso, ensaios de viabilidade são parte integrante da avaliação do produto liofilizado (SUNDARI; ADHOLEYA, 2001).

Considerando a manutenção de bactérias, verifica-se a diferença existente entre elas, após a liofilização, com relação à viabilidade celular, a qual decresce entre as bactérias formadoras de esporos, gram-positivas e gram-negativas, algas e alguns protozoários, fato facilmente explicado pelas diferenças na morfologia.

MIYAMTO-SHINOHARA (2008) ao avaliarem a taxa de sobrevivência das bactérias gram-positivas, após a liofilização, verificaram maiores índices, em comparação com as gram-negativas, sob as mesmas condições, sugerindo desta forma, a presença maior de resistência à desidratação pelas gram-positivas, provavelmente por apresentar uma estrutura celular diferenciada. Já em relação ao período de estocagem, observaram que a taxa de sobrevivência de algumas espécies se mantém a mesma com o passar do tempo; em contrapartida, a de outras espécies apresentam um declínio durante os primeiros cinco anos, tendendo a estabilizar por volta dos 15 anos.

Com relação aos vírus, dos tipos envelopados e não envelopados, UHLENHAUT et al. (2005) detectaram uma considerável inefetividade em modelos experimentais de liofilizados. Referente aos fungos, a técnica é bastante utilizada, principalmente por atingirem uma manutenção de viabilidade de algumas espécies por períodos de 17 a 21 anos. Contudo, fungos não esporulados não suportam o processo de liofilização, sendo necessário o emprego de técnicas menos impactantes, como a preservação em óleo mineral (COSTA et al., 2009).

MIYAMOTO-SHINOHARA et al. (2006) avaliaram a sobrevivência de uma variedade de espécies de microrganismos liofilizados, submetidos à estocagem por períodos superiores a 20 anos e obtiveram como conclusão do estudo, que a sobrevida das espécies pode ser atribuída ao alto nível de dessecação e da vedação das ampolas, sob condições de vácuo. O estoque do material liofilizado por longos períodos de tempo sem a necessidade de condições especiais de armazenamento, a facilidade de reconstituição através da reidratação, e a facilidade de transporte e distribuição do material biológico, e a menor taxa de

mutação e contaminação, são mais vantagens desta técnica de preservação de microrganismos (SUNDARI; ADHOLEYA, 2001).

Com relação às desvantagens, as taxas de sobrevivência após liofilização e durante o armazenamento variam entre espécies e gêneros de bactérias (LAPAGE et al., 1970). Contudo, devido aos custos necessários com equipamentos e à complexidade dos procedimentos de liofilização, este método nem sempre pode ser utilizado em laboratórios de pequeno porte. Outras desvantagens da liofilização são os danos e injúrias provocados pelo congelamento e desidratação que afetam as membranas das células microbianas podendo atingir as moléculas de DNA e RNA (HECKLY, 1961; BAIOCCO, 1997).

2.3.4.2 Ultracongelamento

Esta apresenta-se como outra forma de congelamento, a diferindo apenas com relação à temperatura, onde o microrganismo é armazenado à uma temperatura negativa que varia de -20 ºC e -80 ºC (BOROWSKI, 2011).

Gibson e Khoury (1986) sugeriram uma técnica de manutenção de *X. campestris* através deste método, onde as cepas mantiveram sua viabilidade por 28 meses, sendo mais apropriado do que o subcultivo periódico, reduzindo tempo e custo de produção e de reativação das células. No entanto, a técnica é cara e exige equipamentos sofisticados.

2.3.4.3 Preservação em nitrogênio líquido

Este tipo de preservação reduz o metabolismo das células microbianas ao nível limiar, sendo por isso utilizada nas Coleções de Culturas e centros depositários de patentes biológicas (STALPERS; HOOG; VLUG, 1987). É um dos métodos mais efetivos de preservação de microrganismos por períodos prolongados, mais utilizado quando não pode-se preservar através da liofilização (SUMBALI; MEHROTRA, 2009).

A técnica utiliza tanques contendo nitrogênio líquido (-196 ºC) para armazenar ampolas com suspensão de células do microrganismo, que estejam

no final da fase logarítmica de crescimento, juntamente com um crioprotetor, usado com a finalidade de proteger o tecido biológico. As células microbianas permanecem viáveis nesta condição de dez a trinta anos ou mais (BOROWSKI, 2011).

A recuperação das culturas ocorre pela sua retirada do tanque de nitrogênio, descongelamento rápido com moderada agitação em banho de água a 37 ºC e, por fim, seu cultivo convencional. O método elimina as constantes repicagens, economiza tempo e trabalho, previne perdas de culturas por contaminação e garante a viabilidade das culturas por tempo ilimitado (SUMBALI; MEHROTRA, 2009).

Halik (1999) conservou 12 espécies de bactérias termofílicas extremas em nitrogênio líquido, em condições anaeróbias, utilizando dimetilsulfóxido como crioprotetor. Todas as cepas testadas foram preservadas com êxito, apresentando boa estabilidade e altas taxas de sobrevivência após 3 anos de armazenamento. Entretanto, este método exige aparato de elevado custo, reposição do nitrogênio líquido periodicamente para restaurar suas perdas por evaporação (CAMPOS et al., 2004) e cuidado por parte dos manipuladores, visto que há a possibilidade de ocorrer queimaduras acidentais de extrema gravidade.

2.4 Avaliação da viabilidade dos microrganismos após conservação

Uma avaliação periódica da viabilidade celular dos microrganismos frente aos métodos de conservação utilizados é necessária, uma vez que podem responder de maneira distinta aos diferentes métodos. Para tanto, deve-se quantificar a multiplicação celular para garantir o controle de qualidade do método de preservação para cada organismo (SUNDARI; ADHOLEYA, 2001).

De acordo com Hobson, Tothill e Turner (1996) os microrganismos podem ser quantificados de forma direta, contando-se microscopicamente o número de células presentes em um determinado material ou superfície, ou indiretamente, efetuando-se análises da turbidez, determinação do peso seco, concentração de substâncias químicas (proteínas, pesquisa de determinada enzima ou produto final de uma via metabólica, DNA e RNA) ou através da contagem do número de microrganismos viáveis utilizando um meio de cultura apropriado. Assim, os

métodos para a quantificação de microrganismos podem ser divididos em dois principais grupos, aqueles que quantificam o número total de células, viáveis e inviáveis, representados pela contagem microscópica, contagem eletrônica, absorbância, turbidimetria e determinação da biomassa; e aqueles que quantificam somente o número de células viáveis, representados pela contagem em placas, contagem em membranas filtrantes e determinação do número mais provável (HOBSON; TOTHILL; TURNER, 1996).

No método de contagem em placas, uma série de diluições da amostra é espalhada em placas contendo meio sólido e incubadas a uma temperatura adequada ao crescimento. O número de colônias, presentes na placa após incubação, é contado e multiplicado pelo fator de diluição para obter uma contagem viável de unidades formadoras de colônia por mililitro da amostra original ($UFC.mL^{-1}$).

Para efetuar a escolha do método de preservação mais adequado, é necessário observar fatores como: o tipo de microrganismos e sua finalidade, laboratório equipado de acordo com as necessidades do método escolhido e mão-de-obra qualificada, entre outros fatores. Neste presente estudo, o método escolhido foi a preservação pela liofilização, atestando sua potencialidade na conservação de microrganismos por longos períodos de tempo.

2.5 Crioprotetores

É importante ressaltar que ao final do processo de recuperação das cepas liofilizadas, necessita-se de uma boa viabilidade celular. Esta viabilidade é creditada, em grande parte dos casos, pelo uso de agentes crioprotetores em técnicas que tenham como base o congelamento (BOROWSKI, 2011).

Na tentativa de prevenção ou até mesmo na redução dos efeitos adversos dos métodos de preservação de amostras biológicas, por uma descoberta acidental, estudos realizados verificaram a proteção efetiva do glicerol sobre materiais biológicos. Posteriormente, as ações protetoras de outras substâncias foram descobertas e intensamente utilizadas na rotina laboratorial, como o dimetilsulfóxido (DMSO), o metanol, etilenoglicol, glicerina, etilenoglicol, polietilenoglicol, peptona, extrato de levedura, albumina, soro sanguíneo e leite em pó desnatado (BAATI et al., 2000; HUBALEK et al., 2003).

Com a necessidade de utilização dos agentes crioprotetores, muitos estudos são desenvolvidos ao longo dos anos para otimizar a escolha de diferentes crioprotetores, diferentes concentrações, relação do tempo e da temperatura e até mesmo quanto a possível toxicidade que estes agentes podem oferecer ao material biológico a ser conservado (DAY & MCLELLAN, 1995; COSTA et al., 2009; CASTRO et al., 2011).

Os crioprotetores como a sacarose, trealose, glicerol e dimetilsulfóxido (DMSO), são utilizados na criopreservação de microrganismos, nas concentrações de 10% a 15%, garantindo a viabilidade dos microrgamismos (BAATI et al., 2000). Estudos demonstram que a utilização de glicerol ou DMSO em concentrações acima de 20%, apresentam efeitos deletérios aos microrganismos devido a sua toxicidade, gerando problemas na sobrevivência das estirpes durante o congelamento (FAHY, 1986; ANDREATTI FILHO et al., 2007; CASTRO et al., 2011).

Tabela 1. Classificação de crioprotetores utilizados em microbiologia para preservação de tecidos biológicos.

Compostos	Compostos
Sulfóxidos	**Amidas, N-alquilamidas, imida**
Dimetilsulfóxido	Acetamida
Álcoois monohídricos e derivados	Metilacetamida
Metanol	Dimetilformamida
Etanol	Dimetilacetamida
Álcool Polivinílico	**Compostos Heterocíclicos**
Dióis e derivados	Metilpirrolidona
Etilenoglicol	Polivinilpirrolidona
Propilenoglicol	**Aminoácidos e ácidos carbônicos**
Trimetilenoglicol	Prolina
Dietilenoglicol	Glicina
Polietilenoglicol	Ácido glutâmico
Polipropilenoglicol	Ácido aminobutírico
Óxido de Polietileno	Ácido glutárico
Trióis	Acetato de amônio
Glicerol	**Proteínas, peptídeos, polipeptídeos e glicoproteínas**
Poliálcoois	Soro sanguíneo, albuminas
Manitol, sorbitol, dulcitol	Gelatina, peptonas
Monossacarídeos	Glicoproteínas
Glicose	Valinomicina
Xilose	Gramicidina
Dissacarídeos	**Substratos complexos**
Sacarose	Extrato de levedura
Lactose, maltose	Extrato de carne
Trealose	Leite desnatado
Trissacarídeos	Mel
Rafinose	**Surfactantes não iônicos**
Polissacarídeos	Tween 80
Dextrana	
Dextrina	
Amido hidroxietílico	
Goma arábica (Acácia)	

Fonte: HUBÁLEK, 2003.

Os crioprotetores caracterizam-se por moléculas de baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e baixa toxicidade celular, sendo classificados com relação à capacidade de penetração em materiais biológicos, como crioprotetores intracelulares ou crioprotetores extracelulares (COSTA & FERREIRA, 1991; HUBÁLEK, 2003; OLIVEIRA, 2007).

Os crioprotetores extracelulares são moléculas capazes de induzir o aumento na osmolaridade do meio externo, ou seja, a quantidade de partículas dissolvidas em um determinado solvente, promovendo assim, a saída de água do meio intracelular para o meio extracelular, prevenindo desta forma, a formação de cristais de gelo intracelular durante o congelamento (HUBÁLEK, 2003; FULLER, 2004). São substâncias apropriadas para a preservação de microrganismos, mediante sua capacidade de recobrir a superfície celular, formando uma camada viscosa visando a estabilização da parede celular e membrana plasmática, minimizando e reparando os possíveis danos causados pela manutenção em baixas temperaturas (HUBÁLEK, 2003).

Os crioprotetores intracelulares atuam nas células por meio de suas propriedades coligativas, levando a redução do ponto crioscópico, ou seja, redução do congelamento de uma solução pela adição de um soluto de natureza não iônica e não volátil. Deste modo, uma maior quantidade de água permanece no estado líquido sob baixas temperaturas, levando a redução na concentração intracelular de solutos e proporcionando um ambiente menos prejudicial aos microrganismos durante o congelamento (WATSON, 2000). Estes compostos são capazes de realizar ligações com as moléculas de água, levando a uma significativa redução na formação e no tamanho dos cristais de gelo, bem como as concentrações de soluto tanto no meio extracelular quanto no intracelular. (HUBÁLEK, 2003; OLIVEIRA, 2007; COSTA et al., 2009).

Considerando as particularidades dos microrganismos, do método de manutenção e dos crioprotetores, ANDREATTI FILHO et al. (2007) propuseram avaliar a capacidade de proteção da microbiota intestinal cultivada em aerobiose, congelada em nitrogênio líquido e associada à crioprotetores como o glicerol, DMSO, sacarose e trealose sob pintos de corte desafiados experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar enteritidis. Como resultado, foi possível concluir no estudo que o efeito benéfico esperado dos crioprotetores não foi tão

significativo, pois a microbiota intestinal conservada com ou sem crioprotetores, manteve-se adequada, garantindo efetividade mesmo até 360 dias de congelamento. Além da viabilidade do agente, verificou-se uma redução no número de aves infectadas e consequentemente a colonização intestinal por *S. enterica* sorovar enteritidis (HUBÁLEK, 2003; CASTRO, 2011).

A concentração ótima do crioprotetor varia de acordo com o tipo celular, para bactérias e leveduras recomenda-se o uso do glicerol 10% como agente crioprotetor (SIMIONE, 1998). Para a bactéria *X. campestris* pv manihotis, Baiocco (1997) recomendou sacarose ou leite em pó a 10%. Demais estudos realizados avaliando o efeito de crioprotetores demonstram que sua adição aumenta consideravelmente a viabilidade celular, visto que estes protegem a célula contra danos causados pelo congelamento abrupto (ELLNER, 1978; LI et al., 2006; BAIOCCO, 1997).

Em decorrência das informações obtidas a partir desta revisão, o presente trabalho tem como hipótese a preservação das cepas de *Xanthomonas arboricola* pv. pruni de forma eficiente pelo método de liofilização.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

Foram utilizadas seis cepas de *Xanthomonas arboricola* pv. pruni, representadas pelos números 15, 68, 77, 85, 90 e 106 pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Tecnologia de Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Tecnológico, na Universidade Federal de Pelotas, preservadas por repiques mensais em meio sólido SPA ($g.L^{-1}$) composto 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 ºC).

3.2 Reagentes

Utilizou-se os reagentes disponíveis no Laboratório de Tecnologia de Bioprocessos para realização de meios de cultivo e crioprotetor, tais como:

manitol, glutamato de sódio, gelatina, sacarose, ágar, peptona, sulfato de magnésio e fosfato dipotássico.

3.3 Equipamentos

Os equipamentos do Laboratório de Tecnologia de Bioprocessos foram utilizados, tais como: estufa bacteriológica, cabine de fluxo laminar, freezer e ultrafreezer, vórtex, incubador agitador orbital e liofilizador.

3.4 Condições de preservação de microrganismos no Laboratório de Tecnologia em Bioprocessos

A técnica de repique contínuo, a qual migra o microrganismo para um novo meio de cultivo SPA periodicamente, de acordo com Hayward (1964), é utilizada, juntamente com a liofilização, para a preservação de culturas de *Xanthomonas* do Laboratório de Tecnologia de Bioprocessos, disponibilizadas pelo CPACT/EMBRAPA, desde 1996 (SOUZA; VENDRUSCOLO, 1999; DIAZ, 2002; FORESTI, 2003; BORGES, 2004; PINTO, 2005; BORGES, 2007; KLAIC, 2010). No ano de 2017, as atividades de preservação por liofilização das bactérias da bacterioteca do Laboratório de Tecnologia de Bioprocessos foram retomadas (BECKER, 2017). Ainda, incluso no método de liofilização, utiliza-se o método de congelamento, auxiliando na longa duração de armazenamento do microrganismo.

Para repiques em placa, o uso de fita crepe para selá-las foi adotado pelo Laboratório de Tecnologia de Bioprocessos, reduzindo a evaporação de água sem impedir a saída do CO_2, através de sua característica após seu crescimento, depende do tipo de microrganismo (BOROWSKI, 2011).

3.5 Obtenção e determinação da concentração celular do inóculo

O inóculo foi produzido a partir de repiques multiplicativos utilizando o meio SPA sólido composto ($g.L^{-1}$) por: 20,0 sacarose; 5,0 peptona; 14,0 ágar; 0,25 sulfato de magnésio e 0,5 fosfato dipotássico, sendo estes incubados em estufa bacteriológica à 28 ºC por 72 h e ressuspensos em meio SPA líquido

composto ($g.L^{-1}$) por: 20,0 sacarose; 5,0 peptona; 0,25 sulfato de magnésio e 0,5 fosfato dipotássico. Um volume de 10 mL da suspensão bacteriana foi transferido para *Erlemeyer* de 250 mL contendo 40 mL de meio SPA líquido e incubados em agitador incubador orbital a 150 rpm, a 28 °C durante 24 h.

Para a determinação da concentração bacteriana, a técnica de diluição seriada foi realizada até a diluição 10^{-8}, utilizando o meio líquido SPA, seguida de plaqueamento das diluições 10^{-7} e 10^{-8} em placas com meio SPA sólido, as quais foram incubadas a 28 °C por 48 h.

3.6 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 °C em ultrafreezer, e então liofilizadas (Liotop, Liobras ®, Brasil) por 24 h e armazenadas à temperatura de -18 °C, pelo período de tempo demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Período de tempo em que as cepas de *Xanthomonas arboricola* pv. pruni, abordadas neste estudo, permaneceram liofilizadas.

Cepas	**Período de tempo liofilizadas**
15	5 meses
68	1 mês
77	3 meses
85	1 mês
90	1 semana
106	5 meses

3.7 Reativação das cepas de *Xanthomonas*

As cepas de *Xanthomonas arboricola* pv. pruni, armazenadas a -18 ºC durante um período de tempo (Tabela 2) foram reativadas por reidratação com 2 mL de 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 72 h a 28 °C. Após, contou-se as colônias típicas e expressou-se o resultado em unidades formadoras de colônias por mililitros ($UFC.mL^{-1}$). É necessário evidenciar que esta variação de tempo para reativação de uma célula para outra, dá-se por problemas encontrados na rotina de laboratório. Exemplo disso, é a utilização do liofilizador, visto que este equipamento possui bandejas (4) com possibilidade de 21 frascos em cada. Cada cepa liofilizada dispõe de 10 frascos, e dito isto, faz-se necessário uma certa quantidade de cepas, refletindo, então, na variação de tempo. Outro ponto que deve ser ressaltado, é que ainda durante a liofilização, contaminações podem acontecer, anulando o processo, uma vez que, este, agora, precisa ser reiniciado.

3.8 Contagem de células

Com a diluição seriada realizada, dividiu-se a placa de petri em dois lados, os quais receberam um volume de 50 µL cada. Esta técnica é feita para que seja possível ter a contagem em triplicata. As placas foram armazenadas em estufa bacteriológica por 72 h à 28 °C, sendo feita em seguida, a contagem das células, caracterizadas pela forma viscosa, mucoide, de tamanho médio e amarelada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contagem de células é fundamental para a avaliação das cepas e obtenção da taxa de sobrevivência; a mesma é feita através da visualização das unidades formadoras de colônia, demonstradas na Figura 4.

(A) (B)

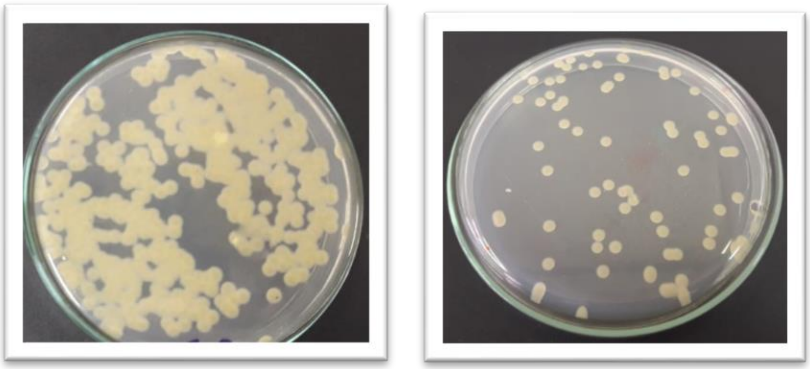


FIGURA 4. Cultivo de células de *Xanthomonas arboricola* pv pruni, no mesmo período de tempo diferindo nas diluições. A imagem (A) representa a diluição seriada de 10^{-6} e a imagem (B) representa a diluição seriada de 10^{-7}, ambas foram incubadas por 72 h à 28 °C.

Fonte: autora, 2018.

Os inóculos preparados para o processo de preservação por liofilização apresentaram concentrações adequadas para a asseguração de sobrevivência dos microrganismos, conforme descrito por Pan et al. (2000) e apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Percentual de sobrevivência das cepas 15, 68, 77, 85, 90 e 106 de *Xanthomonas arboricola* pv pruni reativadas após serem submetidas ao processo de liofilização.

Cepas	Concentração bacteriana do inóculo ($UFC.mL^{-1}$)	Concentração bacteriana após a liofilização ($UFC.mL^{-1}$)	Sobrevivência (%)
15	$0,04 \times 10^{10}$	$0,003 \times 10^{10}$	7,9
68	$0,4 \times 10^{10}$	$0,02 \times 10^{10}$	6,8
77	$3,3 \times 10^{10}$	$0,06 \times 10^{10}$	17,9
85	$1,6 \times 10^{10}$	$0,2 \times 10^{10}$	14,3
90	$3,6 \times 10^{10}$	$0,03 \times 10^{10}$	10,2
106	$0,9 \times 10^{10}$	$0,01 \times 10^{10}$	1,6

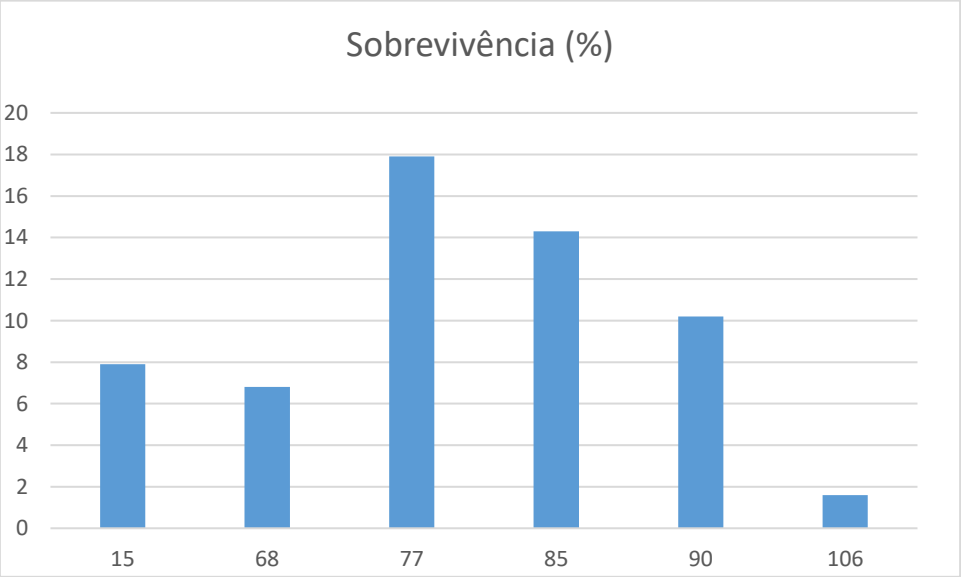
A tabela acima, descreve as cepas utilizadas no presente estudo com suas respectivas taxas de sobrevivência. Apesar de terem sido reativadas em tempos diferentes, este fator não influenciou de forma negativa, visto que o esperado, conforme um maior período de tempo, é que a taxa de sobrevivência diminua, o que não ocorreu com estas cepas. Exemplo disso é a taxa de sobrevivência de 7,9% da cepa 15 de *Xanthomonas*, reativada após 5 meses, em comparação com a cepa 68, reativada após um mês, com uma taxa de sobrevivência de 6,8%. A cepa 77, reativada após 3 meses, obteve uma taxa de sobrevivência de 17,9%, a maior anotada no presente trabalho, seguida das cepas 85 e 90. Em comparação das cepas, a 106 apresentou a mais baixa sobrevivência, ainda que está seja ótima por se apresentar em 10^{10}.

Observou-se, também, que as cepas 85 e 90 necessitaram de 24 h mais do que as outras, na estufa bacteriológica, para um crescimento microbiano visivelmente melhor. García-Ochoa et al., 2000 afirmam que o crescimento de *Xanthomonas* e a possível contagem das unidades formadoras de colônia se dá a partir de 72 h. Entretanto, as cepas citadas (85 e 90) necessitaram de 96 h para demonstrar colônias características de *Xanthomonas,* fator que não foi investigado neste estudo e não implicou de forma alguma, visto que não houve diferença fenotípica, descartando, por exemplo, a presença de mutações.

A sobrevivência durante a liofilização e o armazenamento é dependente, principalmente, das características dos microrganismos, 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 (HECKLY, 1961; BAIOCCO, 1997). Dentre estes fatores, o único modificado neste estudo foi o microrganismo. Assim, pode-se afirmar que a viabilidade celular de *X. arboricola* pv pruni, foi cepa-dependente. O gráfico abaixo demonstra, com mais clareza, a diferença das cepas mediante sua taxa de sobrevivência, sem a influência do período de tempo, reforçando a ideia da bactéria ser cepa-dependente.

Gráfico 1. Taxa de sobrevivência das cepas de Xanthomonas arboricola pv. pruni sem sofrer influências do período de tempo em que permaneceram armazenadas após o processo de liofilização.



Ainda que o genoma de *Xanthomonas* seja caracterizado por uma elevada estabilidade, facilitando sua conservação, sua conservação (MARTÍNEZ-SALAZAR et al., 1993), observou-se, em outros estudos, que podem ocorrer variações fenotípicas em cepas da mesma espécie (NITSCHKE; THOMAS, 1995; MOREIRA et al., 2001; LUVIELMO; VENDRUSCOLO; SCAMPARINI, 2007; BORGES et al., 2009a). Embora na literatura o meio YM seja citado como sendo o mais usado para o cultivo de *Xanthomonas* (HAYNES, 1955; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; VENDRUSCOLO; MOREIRA; VENDRUSCOLO, 2006), foi utilizado, para a multiplicação das bactérias, previamente à liofilização, e também para a reidratação (reativação) do material

liofilizado, o meio SPA, visto que trata-se de um meio não seletivo que é útil para isolamentos bacterianos de propósito geral.

A adição de 40% de crioprotetor ao meio de suspensão das cepas e o armazenamento das culturas a -18 ºC também forneceram condições para que as bactérias liofilizadas permanecessem viáveis. O uso de agentes crioprotetores apropriados aumenta a sobrevivência consideravelmente, protegendo a célula microbiana dos danos causados pelas etapas do congelamento e reidratação (HUBALEK, 2003). Ndoye et al. (2007) liofilizaram bactérias acéticas termorresistentes utilizando manitol como crioprotetor e constataram que as culturas conservadas a 4°C mantiveram-se viáveis por pelo menos 6 meses. Um dos principais motivos para o sucesso da liofilização foi a adição do crioprotetor, que tende a diminuir a atividade de água, e o armazenamento a baixa temperatura.

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.

5 CONCLUSÃO

Como descrito no presente trabalho, os métodos de preservação de microrganismos podem ser utilizados para as cepas de *Xanthomonas arboricola* pv pruni. A escolha do método de liofilização se deu pela possibilidade de armazenar a bactéria visando reduzir perdas de cepas da bacterioteca disponível no Laboratório de Tecnologia de Bioprocessos e diminuir formas mutagênicas que poderiam ocorrer caso outro método fosse utilizado.

As cepas ainda são mantidas através de repiques periódicos no Laboratório de Tecnologia de Bioprocessos até que ocorra a liofilização de todas as presentes.

Como mencionado, ocorreu a busca por uma técnica que mantivesse o microrganismo preservado por um longo período de tempo. A liofilização é um método de custo elevado e que demanda equipamentos sofisticados, e essas são desvantagens se comparadas com outros métodos de preservação. O que acaba por diferenciar a liofilização do congelamento de cepas, é que nesta, a água é retirada totalmente, não ocorrendo a formação de cristais de gelo que causam danos celular, como a ruptura da membrana celular. No congelamento de amostras, ainda que ocorra o uso de crioprotetores, existirá a formação de cristais de gelo, aumentando assim, a chance de ruptura celular.

Segundo HUBÁLEK (2003), o uso de agentes crioprotetores apropriados aumenta a sobrevivência consideravelmente, pois possuem a capacidade de protege a célula microbiana dos efeitos nocivos das etapas do congelamento e reidratação.

Desta forma, 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.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir deste trabalho, pretende-se dar continuidade ao acompanhamento das cepas preservadas através do método utilizado, podendo avaliar se houve ou não mutações, ainda que, no presente estudo tenha-se observado que não houveram diferenças fenotípicas, corroborando com a ausência de possíveis mutações, para então selecionar cepas de *Xanthomonas arboricola* pv. pruni visando a alta produtividade e viscosidade para possível *scale up* industrial.

7 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.02 n.2, p. 236-25, 2004.

ANDREATTI FILHO, R. L.; LIMA, E. T.; OKAMOTO, A. S.; SAMPAIO, H. M. Uso de microbiota cecal congelada com crioprotetores em pintos infectados experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, n.3, p.647-653, 2007.

APARECIDO, C. C.; EGYDIO, A. P. M.; FIGUEIREDO, M. B. Avaliação de três diferentes métodos utilizados na Micoteca do Instituto Biológico de São Paulo para preservação de fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.27, p.421-424, 2001.

BAATI, L; FABRE-GEA, C.; AURIOL, D. Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing on the viability and cellular protein levels. **International Journal of Food Microbiology,** Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 241-247, sep. 2000.

BAIOCCO, L. M. **Estudo de parâmetros para a produção de inóculos liofilizados de *Xanthomonas campestris* pv. manithotis**. 1997. 148p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BECKER, J. G. M.; MACAGNAN, K. L.; ALVES, M. I.; FIORAVANTE, J. B.; MOREIRA, A. S.; OLIVEIRA, P. D. Preservação de Xanthomonas arboricola pv pruni por liofilização. In XXVI Congresso de Iniciação Científica, Pelotas, 2017. **Anais do XXVI Congresso de Iniciação Científica**, 2017.

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.

BORGES, C. D. **Caracterização da goma xantana em função da cepa de *Xanthomonas campestris* pv pruni e das condições operacionais**. 2004. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

BORGES, C. D. **Estudo das condições operacionais na produção de xantana por *X. arboricola* pv pruni para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo**. 2007. 119p.Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

BORGES, C. D.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; VENDRUSCOLO, C. T. The influence of thermal treatment and operational conditions on xanthan produced by *X. arboricola* pv pruni strain 106. **Carbohydrate Polymers**. v.75, p. 262-268, 2009a.

BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T.; MARTINS, A. L.; LOMBA, R. F. T. Comportamento reológico de xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv pruni para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo. **Polímeros**, v.19, p. 160-165, 2009b.

BOOTH, C. **Methods in Microbiology**. London: Academic Press. 1971. 751p.

BORN, K.; LANGENDORFF, V.; BOULENGUER, P. Xanthan. In: **Biopolymers**. Weinheim: Weley-VCH, 2002. p. 259-291.

BORSCHIVER, S.; ALMEIDA, L. F. M.; ROITMAN, T. Monitoramento tecnológico e Mercadológico de biopolímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.18, p. 256-261, 2012.

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.

BRADBURY, J. F. *Xanthomonas*. In: **Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984, p.199-210.

BRASIL. Decreto n° 55.871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto n° 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto n° 691, de 13 de março de 1962. D.O.U.- Diário Oficial da União de 09 de abril de 1965.

CADMUS, M. C., LAGODA, S. P., BURTON, K. A., PITTSLEY, J. F., KNUTSON, C. A., JEANES, A. Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. **Canadian Journal of Microbiology**, v.22, p. 924-928, 1976.

CAMEOTRA, S. S. Preservation of microorganisms as deposits for patent application. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.353, p. 849–850, 2007.

CAMPOS, A. K.; MOTA, M. A., ARAUJO, J. V., CECON, P. R. Atividade predatória, crescimento radial e esporulação de fungos predadores de nematóides *Monacrosporium* spp, submetidos à criopreservação. **Ciência Rural**, v.34, p. 465-469, 2004.

CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae,** Porto Alegre, v. 39, n.2, p. 1-18, 2011.

CEFAR EM NOTÍCIAS. **Procedimentos para a conservação de microrganismos.** Informativo Cefar de Microbiologia. Ano III - Ed. 13 - Jan/Fev/2006 – Circulação Bimestral.

CHALLEN, I. A. Xanthan gum: a multifunctional stabilizer for food products. In: **Food hydrocolloids: structures, properties and functions**. New York: 1993. p. 135-140.

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

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.

DAVIS, R. J. Viability and behavior of lyophilized cultures after storage for twenty-one years. **Journal of bacteriology**, v.85, p. 486-487, 1962.

DAY, J. G.; MCLELLAN, M. R. **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. New Jersey: Humana Press, 1995.

DIAZ, P. S.; ROOL, R. J.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T Produção de xantana por *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101 em diferentes combinações de temperaturas. In XI Congresso de Iniciação Científica, Pelotas, 2002. **Anais do XI Congresso de Iniciação Científica,** 2002.

ELLNER, P. D. **Current Procedures in Clinical Bacteriology.** 1.ed. Springfield: Charles Thomas, 223p. 1978.

FAHY, G. M. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. **Cryobiology**. New York, v. 23, n. 1; p.1-13, feb./1986.

FORESTI, A. P. **Produção e qualidade reológica da xantana sintetizada por diferentes cepas de *Xanthomonas* em meios modificados**. 2003. 61f.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

FULLER, B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. **CryoLetters**, London, v. 25, n. 6, p. 375-388, 2004.

GALINDO, E.; SALCEDO, G.; RAMÍREZ, M.E. Preservation of *Xanthomonas campestris* on agar slopes: effects on xanthan production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.40, p. 634-637, 1994.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery and properties. **Biotechnology Advances**, v.18, p. 549-579, 2000.

GIBSON, L. F.; KHOURY, J. T. Storage and survival of bacteria by ultra-freeze. **Letters in Applied Microbiology**, v.3, p. 127-129, 1986.

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.

GHERNA, R. L. Preservation. Manual of Methods for General Microbiology. **American Society for Microbiolgy**. Washington. 1981. 524 p

GUPTE, M. D.; KAMAT, M. Y. Isolation of wild *Xanthomonas* strains from agricultural produce, their characterization and potencial related to polysaccharide production. **Folia Microbiologica**, v. 42, p. 621-628, 1997.

HALIK, K. A. Preservation of some extremely thermophilic chemolithoautotrophic bacteria by deep-freezing and liquid-drying methods. **Journal of Microbiological Methods**, v.3, p. 177-182, 1999.

HAYNES, W. C.; WICKERHAM, L. J.; HESSELTINE, C. W. Maintenance of cultures of industrially important microorganisms. **Applied Microbiology**, v.3, p. 361-368, 1955.

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

HECKLY, R. J. Preservation of bacteria by lyophilization. **Advances in Applied Microbiology**, v.3, p. 1-76, 1961.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9.ed. London: Williams & Williams, 1993. 787p.

HOBSON, N. S.; TOTHILL, I.; TURNER, A. P. F. Microbial detection. **Biosensors & Bioelectronics,** v.11, p. 455-477, 1996.

HUBALEK, Z. **Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology**, v.46, p. 205–229, 2003.

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

JEANES, A., ROGOVIN, P., CADMUS, M. C., SILMAN, R. W., KNUTSON, C. A. A. Polysaccharide (xanthan) of *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459:

procedures of culture maintenance and polysaccharide production purification and analysis. ARS-NC-51. **Agricultural Research Service**, US Department of Agriculture, Peoria, Illinois, 1976.

KANG, K. S.; VEEDER, G. T.; COTTRELL, I. W. Some novel bacterial polysaccharides of recent development. **Progress in Industrial Microbiology**, v.18, p. 231-257, 1983.

KAMOUN, S.; KADO, C. I. Phenotypic switching affecting chemotaxis, xanthan production, and virulence in *Xanthomonas campestris*. **Applied Environment Microbiology**, v.56, p. 3855-3860, 1990.

KATZBAUER, B. Properties and applications of xanthan gum. **Polymers Degradation and Stability**, v.59, p.81-84, 1998.

KIDBY, D.; SANFORD, P.; HERMAN, A.; CADMUS, M. Maintenance procedures for the curtailment of genetic instability: *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. **Applied and Environmental Microbiology,** v.33, p. 840-845, 1977.

KLAIC, P. M. A. **Desenvolvimento de método de digestão ácida para determinação de sais em xantana e potencialização reológica de xantana de** xanthomonas arboricola **pv pruni por troca iônica**. 2010. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

LAPAGE, S. P.; SHELTON , J. E.; MITCHELL, T. G., MACKENZIE; A. R.. Culture collections and the preservation of bacteria. In: NORRIS, J. R.; RIBBONS, D.W. **Methods in microbiology**. New York: Academic Press Inc. 1970. p. 135-228.

LELLIOTT, R. A. The preservation of plant pathogenic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v.28, p. 181–193, 1965.

LI, Y.; LU, R. H.; LUO, G. F., PANG, W. J.; YANG, G. S. Effects of different cryoprotectants on the viability and biological characteristics of porcine preadipocyte. **Cryobiology,** v.53, p. 240-247, 2006.

LIAO, C. H.; SHOLLENBERGER, L. M. Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline**. Letters in Applied Microbiology,** v. 37, n. 1, p.45-50, 2003.

LUVIELMO, M. M.; VENDRUSCOLO, C. T.; SCAMPARINI, A. R. P. Seleção de linhagens de *Xanthomonas campestris* para a produção de goma xantana. **Semina. Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, p. 161-172, 2007.

MARGARITIS A.; ZAJIC J. E. Biotechnology review: mixing mass transfer and scale-up of polysaccharide fermentations. **Biotechnology Bioengeneering**, v.20, p. 939-1001, 1978.

MARTÍNEZ-SALAZAR, J. M.; PALACIOS, A. N.; SÁNCHEZ, R.; CARO, A. D.; SOBERÓN-CHAVEZ, G. Genetic stability and xanthan gum production in *Xanthomonas campestris* pv campestris NRRL B-1459. **Molecular Microbiology**, v.8, p. 1053-1061, 1993.

MAYER, L.; SILVA, W. P.; MOURA, A. B.; VENDRUSCOLO, C. T. AFLP analysis of *X. axonopodis* and *X. arboricola* strains used in xanthan production studies reveal high levels of polymorphism. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p. 741-748, 2010.

MEDEIROS, A. W. **Acompanhamento de métodos de congelamento de bactérias**. 2008. 32p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Biomedicina – Centro Universitário Feevale).

MIYAMOTO-SHINOHARA, Y.; IMAIZUMI, T.; SUKENOBE, J.; MURAKAMI, Y.;KAWAMURA, S.; KOMATSU, Y. Survival rate of microbes after freeze-drying and long term storage. **Cryobiology**, New York, v. 4, n. 3, p. 251-255, nov./ 2000.

MIYAMOTO-SHINOHARA, Y.; SUKENOBE, J.; IMAIZUMI, T.; NAKAHARA, T. Survival curves for microbial species stored by freeze-drying. **Cryobiology**, New York, v. 52, n. 1, p. 27-32, feb./ 2006.

MIYAMOTO-SHINOHARA Y, SUKENOBE J, IMAIZUMI T, NAKAHARA T. Survival of freeze-dried bacteria. **The Journal of general and applied microbiology**, Tokyo, v. 54, n.1, p. 9-24, feb./ 2008.

MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO,J. L. S.; GIL-TURNES, C.; VENDRUSCOLO, C. T. Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv pruni. **Food Hydrocolloids**, v.15, p. 469-474, 2001.

MOREIRA, A. S. **Produção, caracterização e aplicação de biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* pv pruni.** 2002. 73f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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.

MORRIS, E. R. Molecular origin of xanthan solution properties. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v.172, p.19, 1976.

NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. L. R.; GAMA, M. A. S. Métodos de preservação e crescimento de Xanthomonas campestris pv. viticola em meio de cultura variando temperatura, pH e concentração de NaCl. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 6, p.650-654, 2005.

NDOYE, B.; WEEKERS, F.; DIAWARA, B.; GUIRO, A. T.; THONART, P. Survival and preservation after freeze-drying process of thermoresistant acetic acid

bacteria isolated from tropical products of Subsaharan Africa. **Journal of Food Engineering,** v.79, p. 1374-1382, 2007.

NEUFELD, P. M.; OLIVEIRA, P. C. de. Preservação de dermatófitos pela técnica da água destilada estéril. **Revista Brasileira Análises Clínicas**, v. 40, n. 3, p.167-169, 2008.

NITSCHKE, M.; THOMAS, R. W. S. P. Xanthan gum production by wild-type isolates of *Xanthomonas campestris***. World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.11, p. 502-504, 1995.

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development. **Guidance of operation of Biological Resource Centres** (BRCs). 2004

OLIVEIRA, C. H. **Avaliação das características do espermatozóide de equino congelado submetido a inclusão e remoção do colesterol das membranas**. 2007. 87p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinaria) – Universidade Federal de Minas Gerais.

PAN, A., MOREIRA, A. S., VENDRUSCOLO, C.T. Efeito da concentração inicial do inóculo no crescimento celular e qualidade de biopolímeros de Xantomonas campestris pv. Pruni cepa 06. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 6, n. 3, p. 273 -277, 2000.

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

PARKINSON, N., ARITUA, V., HEENEY, J., COWIE, C., BEW, J., STEAD, D. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p. 2881-2887, 2007.

PARFITT, K. Stabiling and suspending agents. In: **Martindale - The complete drug reference**. 32 ed. London: Pharmaceutical Press, p.1470, 1999.

PEREIRA, E. R. B. **Cobertura de framboesa (*Rubus idaeus*): efeito de espessantes e ácidos no processamento e estabilidade**. 2009. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

PIMENTEL, C. P. V.; FIGUEIREDO, M. B. **Métodos de preservação de fungos em meio de cultura**. Biológico, v. 55, n. 1/2, p. 27-33, 1989.

PINTO, E. P. **Desacetilação de xantana: influência no comportamento reológico**. 2005. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

PRABAKARAN, G.; HOTI, S. L. Immobilization in alginate as a technique for the preservation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for long-term preservation. **Journal of Microbiological Methods**, v.72, p. 91–94, 2008.

PREICHARDT, L. D. **Aplicação de xantana comercial e xantana sintetizada por *Xanthomonas arboricola* pv pruni em bolos sem glúten**. 2009. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

RAIMANN, S. I.; BORGES, C. D.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Caracterização morfológica de *Xanthomonas campestris* pv pruni x produção de xantana. In: XI Congresso de Iniciação Cientifica UFPel e 4º Encontro de pós-gradução, Pelotas, 2002. **Anais do XI Congresso de Iniciação Cientifica UFPel e 4º Encontro de pós-gradução**, 2002.

RHODES, M. E. The preservation of Pseudomonas under mineral oil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 20, n. 1, p.108–118, apr. 1957.

RODRIGUES, A. A. **Avaliação da genotoxicidade e caracterização de xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv pruni.** 2010. 64f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

ROLL, R. **Avaliação da genotoxicidade das xantanas produzidas pelas cepas 06 e 24 de *Xanthomonas campestris* pv pruni através de ensaios cometa e teste de micronúcleos**. 2005. 79f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Agrícola) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

ROMEIRO, R. S. **Preservação de Culturas de Bactérias Fitopatogênicas.** Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia – UFV.Viçosa, MG. 1996. 11p.

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

ROSALAM, S.; ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. **Enzyme and Microbial Technology,** v.39, p. 197-207, 2006.

ROTTAVA I.; BATESINI G.; SILVA M.F.; LERIN L.; DE OLIVEIRA D.; PADILHA F.F.; TONIAZZO G.; TREICHEL H. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. **Carbohydrate Polymers**, v.77, p. 65-71, 2009.

ROWE, T. W. G. Machinery and methods in freeze-drying. **Cryobiology**, v.8, p. 153-172, 1971.

RUDGE, R. H. Maintenance of bacteria by freeze-drying. In: KIRSOP, B. E.; SNELL, J. J. S. **Maintenance of Microorganisms**. London: Academic Press, 1991, p. 31-43.

SADDLER, G. S.; BRADBURY, J. F. *Xanthomonadaceae*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: Springer, v.2, p. 63 – 90, 2005.

SCAMPARINI, A. R. P.; VENDRUSCOLO, C. T,; MOREIRA, A. S.; ZAMBIAZI, R.; SOUZA, A. S. Nem heteropolysaccharedes produced by *Xanthomonas campestris* pv pruni. In: 4th International Food Hydrocolloids Conference, Osaka, 1998. **Anais do 4th International Food Hydrocolloids Conference**, 1998.

SHARMA, B.; SMITH, D. Recovery of fungi after storage for over a quarter of a century. **Wourld Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.15, p. 517-519, 1999.

SILVA, J. O.; COSTA, P. P. RECHE, S. H. C. Manutenção de leveduras por congelamento a - 20°C. **Revista Brasileira Análises Clínicas**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 73-74, 2008.

SIMIONE, F. P. **Cryopreservation Manual**. Nalge Nunc International. 1998.15p.

SMITH, D.; ONIONS, A. H. S. **The preservation and maintenance of living fungi.** CAB International, Wallingford, United Kingdon, 1994.122 p.

SOUZA, A. da S.; VENDRUSCOLO, C. T. Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *X. campestris* pv pruni cepas 24 e 58. **Revista Ciência e Engenharia (Science Engineering Journal)**, v.8, p.115-123, 1999.

STALPERS, J.A.; HOOG, de A.; VLUG, I.J. Improvement of the straw technique for the preservation of fungi in liquid nitrogen. **Mycologia**, v.79, p. 82-89, 1987.

SUMBALI, G.; MEHROTRA, R. S. **Principles of Microbiology**. Tata McGraw-Hill Publishing Company, Noida, 2009, 926p.

SUMBALI, G.; MEHROTRA, R. S. **Principles of Microbiology**. Tata McGraw-Hill Publishing Company, Noida, 2009, 926p.

SUNDARI, K. S.; ADHOLEYA, A. Functional integrity and structural stability of freeze-dried ectomycorrhizal fungi established through viability assays. **Canadian Journal of Microbiology,** v.47, p. 172–177, 2001.

SUTHERLAND, I. W. Xanthan. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. ***Xanthomonas***. London: Chapman & Hall, 1993. p.363-388.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology,** v.16, p.41- 46, 1998.

TAYLOR, K, C.; NASR-EL-DIN, H. A. Xanthan biopolymers: a review of methods for the determination of concentration and for the measurement of acetate and pyruvate content. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v.9, p. 273-279, 1993.

TESSMANN, C. **Caracterização Molecular de *Xanthomonas campestris* pv pruni pela técnica de RAPD e relação da planta hospedeira e com a produção, viscosidade e composição química da xantana**. 2002. 34 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 964p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 964p.

UCKER, C. D. L.; SOMACAL, S.; RODRIGUES, A. A.; RODRIGUES, S. A.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Topping de *Champignon*: Aceitação

Sensorial e Intenção de Compra. In: XIX Congresso de Iniciação Científica, 2010, Pelotas. **Anais do XIX Congresso de Iniciação Científica**, 2010.

UHLENHAUT, C.; DÖRNER, T.; PAULI, G.; PRUSS, A. Effect of lyophilization on the infectivity of enveloped and non-enveloped viruses in bone tissue. **Biomaterials**, Surrey, v. 26, p. 6558-6564, 2005.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas.* **International Journal of Systematic Bacteriology,** v.45, p. 472-489, 1995.

VAUTERIN, L.; SWINGS, J. Are classification and phytopathological diversity compatible in *Xanthomonas*? **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.19, p. 77-82, 1997.

VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S.; SOUZA, A. S.; ZAMBIAZI, R.; SCAMPARINI, A. R. P. Heteropolysaccharide produced by *Xanthomonas campestris* pv pruni C24. In: NISHINARI, K. **Hydrocolloids**. Amsterdam: Elsevier, 2000. p. 187-191.

VENDRUSCOLO, C. T.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; MOREIRA, A. S. **Process for preparing a xanthan biopolymer**. PI0406309-0, WO/2006/047845, 2006.

VIEIRA, V. R.; NASCIMENTO, V. P.; BORSOI, A.; SANTOS, L. R. Efeito do congelamento na contagem de *Salmonella Enteritidis* pelo método do número mais provável (NMP) em cecos de frangos de corte. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 14, n. 2, p. 140-147. 2007.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, London**,** v.60/61, p.481-492, 2000.