

Área: Ciência de Alimentos

PREPARO DE SEMENTES DE GIRASSOL (*Helianthus annuus*) PARA TÉCNICA ALTERNATIVA DE PRESERVAÇÃO DA BACTÉRIA *Xanthomonas arboricola*

Joyce Moura Borowski, Karine Laste Macagnan, Carla Lübke Ücker, Angelita da
Silveira Moreira, Claire Tondo Vendruscolo*

*Laboratório de Biopolímeros, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de
Pelotas*

*E-mail: claire.vendruscolo@pq.cnpq.br

RESUMO

A preservação adequada de micro-organismos é uma atividade chave na área de biotecnologia, como na produção de xantana por processos fermentativos. Estudos relacionados a técnicas de preservação da bactéria *Xanthomonas* são fundamentais no desenvolvimento de métodos rápidos, práticos e baratos, que mantenham a estabilidade genética do micro-organismo e sua viabilidade para a produção do polissacarídeo xantana, que possui ampla aplicação na indústria de alimentos. Neste trabalho, estudou-se cinco concentrações diferentes de hipoclorito de sódio para desinfecção de sementes de girassol a serem utilizadas na conservação de *Xanthomonas arboricola* pv pruni. As sementes foram lavadas com solução de hipoclorito e enxaguadas, na sequência, com água destilada e meio de cultivo YM e secas sobre placa de Petri em ambiente estéril; foram então inoculadas com a suspensão bacteriana e armazenadas à temperatura ambiente. Após 3 dias, as sementes foram imersas em YM, para recuperação dos micro-organismos, e a suspensão bacteriana foi espalhada em placas contendo Agar SPA. Observou-se o crescimento da *Xanthomonas* em todas as placas e, em algumas, a presença de contaminações, indicando que a concentração de hipoclorito utilizada foi insuficiente para promover uma boa desinfecção das sementes. A solução contendo 0,5% de hipoclorito foi a mais adequada para o preparo das sementes utilizadas para a preservação de *X. arboricola* pv pruni, pois as placas apresentaram crescimento bacteriano característico, livre de contaminações provenientes da própria semente.

Palavras-chave: *X. arboricola*, xantana, sementes de girassol, lavagem

1 INTRODUÇÃO

Quando cultivadas em meio contendo carboidratos, bactérias do gênero *Xanthomonas* produzem grande quantidade do exopolissacarídeo xantana (BETZ, 1979), um biopolímero amplamente utilizado como espessante, gelificante, estabilizante, agente suspensivo e auxiliar de emulsificação em alimentos, fármacos e indústria petrolífera.

A xantana utilizada industrialmente é sintetizada por *Xanthomonas campestris* pv *campestris* e são comuns na literatura estudos relacionados aos parâmetros de produção desse polímero e suas aplicações. Pesquisadores da Universidade Federal de Pelotas (RS/Brasil) comprovaram que *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* também é capaz de produzir xantana com rendimento e qualidade equivalentes a espécie comercial (VENDRUSCOLO et al., 2006; MOREIRA et al., 2001; BORGES et al., 2009). Desde então, pesquisam a produção, caracterização e aplicação dos biopolímeros produzidos por essa espécie, bem como a manutenção da bactéria viável para a produção de xantana, por técnicas convencionais (repicagem periódica e liofilização) e alternativas (preservação em sementes de girassol, terra e pérolas de vidro).

Diferentes métodos já foram utilizados para a conservação de *Xanthomonas* (JEANES et al., 1976). A liofilização e o congelamento com glicerina são usados como técnicas não-propagativas de preservação, a longo prazo, desse micro-organismos. A repicagem periódica permite algum crescimento microbiano e a conservação, a curto prazo, ocorre através do cultivo de *Xanthomonas* em tubos inclinados, ou placas, com meios sólidos complexos (por exemplo, Agar YM), por 18-20 horas a 25°C, com manutenção a 4°C (CADMUS et al., 1976).

Dentre as técnicas alternativas de conservação de micro-organismos, que se baseiam na diminuição da atividade de água e são caracterizadas por reduzir o metabolismo das células durante o período de armazenamento, destaca-se a preservação em sementes, por sua praticidade e baixo custo (SMITH e ONIONS, 1994). No entanto, a técnica ainda não foi testada para *X. arboricola* pv *pruni*. Assim, todos os estudos relacionados são fundamentais para garantir a eficiência do método para *X. arboricola* pv *pruni*.

Antes da inoculação, as sementes devem ser previamente desinfectadas a fim de possibilitar a preservação e posterior obtenção de culturas axênicas. A desinfecção pode ser

feita por meios físicos (radiação) ou químicos (agentes desinfectantes). A utilização de concentrações muito elevadas de agentes oxidantes neste processo pode alterar componentes da semente ou deixar resíduos do desinfectante, prejudicando a sobrevivência do micro-organismo.

Este trabalho objetivou determinar a concentração ideal de hipoclorito de sódio (NaClO) utilizado para a desinfecção das sementes de girassol (*Helianthus annuus*), nas quais a bactéria *X. arboricola* pv *pruni* será preservada.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

Preparo das sementes de girassol

As sementes de girassol foram desinfetadas com soluções de hipoclorito nas concentrações 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% e 0,5%. Na sequência, foram enxaguadas com água destilada estéril e com meio de cultivo YM. Foram secas sobre placa de Petri em ambiente estéril e armazenadas em frascos de vidro esterelizados.

Preparo do inóculo de *X. arboricola* pv *pruni*

O inóculo foi preparado, de acordo com a patente WO2006047845 (VENDRUSCOLO et al., 2006), a partir de colônias isoladas de *X. arboricola* pv *pruni*, mantidas por repiques mensais em Agar SPA (HAYWARD, 1964).

Inoculação das sementes

Alíquotas de aproximadamente 50µL de inóculo foram adicionadas a cada semente de girassol desinfetadas. As sementes inoculadas, três por frasco, foram armazenadas em mini-dessecadores, previamente esterilizados, construídos em frascos tipo penicilina contendo

sílica gel, coberta por uma camada de lã de vidro e, finalmente, um disco de papel filtro; os mini-dessecadores foram após, armazenados à temperatura ambiente.

Reativação das bactérias inoculadas nas sementes de girassol

Após três dias, as sementes de girassol foram imersas por vinte minutos em 1 mL de meio de cultivo YM; uma alíquota de 100 μ L da suspensão bacteriana foi espalhada em placa de Agar SPA e incubada por 72h a 28°C.

Avaliação da desinfecção das sementes

Para avaliar a eficiência das soluções cloradas, utilizadas na desinfecção das sementes de girassol, observou-se o crescimento da bactéria nas placas de Agar SPA e a presença de contaminações.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura abaixo mostra as placas contendo Agar SPA com o crescimento microbiano verificado.



Figura 1. Placas com crescimento de *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* e contaminação, indicada pela seta.

Independente da concentração da solução de hipoclorito utilizada para a lavagem das sementes, podemos observar que todas elas apresentaram, após reativação da cultura inoculada, crescimento característico de *Xanthomonas*. Isto indica que a presença de

nutrientes nas sementes de girassol forneceu condições micro-ambientais satisfatórias para preservar a viabilidade desta bactérias; mostra, também, que a lavagem posterior à desinfecção foi eficiente, visto o crescimento não ter sido inibido por resíduos de hipoclorito .

No entanto, nas sementes desinfetadas com solução de hipoclorito a 0,1% e 0,2%, observou-se a presença de contaminações, provenientes da própria semente, demonstrando que essas concentrações não garantem uma completa desinfecção das sementes. Em decorrência das contaminações, verificou-se menor crescimento que nos demais tratamentos.

Entre as soluções desinfetantes que inibiram o crescimento de contaminações, concentrações de 0,3%, 0,4% e 0,5%, esta última foi a mais adequada para a manutenção de *X. arboricola* pv pruni, pois resultou em maior crescimento da bactéria; provavelmente devido a um aumento na permeabilidade da cutícula, que permitiu uma maior penetração do micro-organismo.

Salcedo et al. (1992) também avaliaram a conservação de *Xanthomonas* em sementes, no entanto utilizaram *Xanthomonas campestris* e sementes de couve (*Brassica oleracea*). Além de desinfetarem as sementes com hipoclorito de sódio, esterilizaram por radiação gama. As sementes inoculadas com a bactéria foram armazenadas a 4°C por 21 dias. As células apresentaram 10% de viabilidade após o período de conservação.

3 CONCLUSÃO

A técnica de preservação em sementes de girassol foi adequada à preservação de *X. arboricola* pv pruni. O método desenvolvido para o preparo das sementes foi eficiente, sendo selecionada a concentração de 0,5% de hipoclorito de sódio, por proporcionar total desinfecção da semente e maior preservação das células de *Xanthomonas*.

REFERÊNCIAS

BETZ, D.A. Xanthan gum, a biosynthetic polysaccharide for the food industry. *Food Technology in Australia*, p. 11-16, 1979.

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, 2009.

CADMUS, M. C.; JEANES, A. Variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B – 1459: characterization of xanthan products of differing pyruvic acid content. In: SANDFORD, P.A.; LASKIN, A. *Extracellular Microbial Polysaccharides*. Washington: American Chemical Society, v. 1, p. 192 -210, 1977.

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

JEANES A.; ROGOVIN, P.; CADMUS, M. C.; SILMAN, R. W.; KNUSTON, C. 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.

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

SMITH, D.; ONIONS, A.H.S. The preservation and maintenance of living fungi. United Kingdom: CAB International, 1994, 122 p.

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