

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial



Dissertação

INFLUÊNCIA DE MÉTODOS CLÁSSICOS E ALTERNATIVOS DE PRESERVAÇÃO
DE CEPAS DE *Xanthomonas arboricola* pv pruni NA PRODUÇÃO,
VISCOSIDADE E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA XANTANA

Joyce Moura Borowski

Pelotas, 2011

JOYCE MOURA BOROWSKI

**INFLUÊNCIA DE MÉTODOS CLÁSSICOS E ALTERNATIVOS DE PRESERVAÇÃO
DE CEPAS DE *Xanthomonas arboricola* pv pruni NA PRODUÇÃO,
VISCOSIDADE E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA XANTANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Agroindustrial.

Comitê de orientação: Prof^a. Dr^a. Angelita da Silveira Moreira
Prof^a. Dr^a. Claire Tondo Vendruscolo

Pelotas, 2011

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

B726i Borowski, Joyce Moura

Influência de métodos clássicos e alternativos de preservação de cepas de *Xanthomonas arboricola* pv pruni na produção, viscosidade e composição química da xantana / Joyce Moura Borowski ; orientador Claire Tondo Vendruscolo.- Pelotas, 2011.- 103f. ; il.- Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.

1.*Xanthomonas arboricola* pv pruni 2.Preservação
3.Técnicas Convencionais 4.Técnicas alternativas I.Vendruscolo,
Claire Tondo (orientador) II. Título.

CDD 664.725

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Angelita da Silveira Moreira – UFPel (Presidente/Co-orientadora)

Prof^a. Dr^a. Francine Padilha – UNIT

Prof^a. Dr^a. Caroline Dellinghausen Borges – UFPel

Prof^a. Msc. Andréa Miranda Teixeira – UERGS Cachoeira do Sul

Dedico,

Aos meus pais Zeno e Nadir, pelo amor incondicional,
e à minha irmã Diéllen, pela amizade sem limites.

AGRADECIMENTOS

Sempre, em primeiro lugar, agradeço a Deus, presença constante na minha vida, pela saúde, força e coragem que me concede em todos os momentos.

Aos meus pais Zeno e Nadir, meu orgulho, minha base, exemplos de luta e perseverança. Obrigada por sempre fazerem tudo por mim e para mim, apesar das dificuldades. Obrigada pelo amor, companheirismo, apoio e, principalmente, pela confiança que sempre depositam em mim. Amo vocês! À minha irmã Diéllen, minha pequena grande mulher, por tornar tudo mais fácil com sua palavra amiga, conforto nas horas difíceis e a melhor risada nos momentos de alegria. Ao meu afilhado Robson, que me serviu de exemplo de esperança no término deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado. Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, pela oportunidade, e ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico, da Universidade Federal de Pelotas, por ceder equipamentos e dependências para a realização deste trabalho.

À Prof.^a Dra. Claire Tondo Vendruscolo, pela oportunidade de trabalho no Laboratório de Biopolímeros desde 2005, pela confiança, amizade, amparo e companhia. À Prof.^a Dra. Angelita da Silveira Moreira, pela paciência em me orientar, pelos ensinamentos, amizade, inúmeras vezes que me socorreu, aconselhou, bronqueou e me incentivou. Obrigada de coração, Claire e Angelita, por me acolherem como filha!

Aos membros da banca de avaliação deste trabalho, Prof.^a Dra. Francine Padilha e às queridas Carol e Andréa, que orgulhosamente chamo de Prof.^a Dra. Caroline Borges e Prof.^a Msc. Andréa Miranda, exemplos de determinação e profissionalismo.

A todos os colegas do Laboratório de Biopolímeros, por aguentarem minhas constantes reclamações de contaminação! À Amanda, que se eu pudesse colocaria na minha comissão de orientação, pelas incontáveis vezes que me ajudou e facilitou meu trabalho com suas ideias. À Fernanda, por nunca negar auxílio, pela preocupação com meu trabalho e comigo. Ao Fernando e à Ane pela amizade. À Andiará, Luiza e Miguel pelas palavras de

consolo e momentos de descontração. E por fim, aos amados estagiários do laboratório, Andrey, Carla, Dóris, Karine, Matheus e Simara, pelas enormes listas de meios e materiais que preparavam, pelos finais de semana e feriados que me acompanhavam, pelo abraço na hora do desânimo. Sem vocês nada seria possível! Obrigada pelo carinho e amizade “extra-laboratório”!

Às minhas lindezas Lidi, Grê, Rê e Mi: as melhores amigas, as melhores companhias, as melhores conversas! Cada uma, do seu jeito, colaborou para realização de mais esta etapa e as quero por perto nas próximas que virão! Amo de coração!

A todos os amigos que demonstraram interesse pelo meu trabalho e se preocuparam comigo quando as coisas não davam certo. Em especial a Cléo, pela ajuda sempre que solicitada, ao Cristiano pelas palavras de conforto e ânimo via MSN e ao Luís Felipe pela amizade. Aos novos amigos da Embrapa, Rafael e Vanessa, pela paciência e à querida Julia, por “segurar as pontas”.

“Não confunda jamais conhecimento com sabedoria.
Um o ajuda a ganhar a vida o outro a construir uma vida.”

Sandra Carey

Resumo

BOROWSKI, Joyce Moura. Influência de métodos clássicos e alternativos de preservação de cepas de *Xanthomonas arboricola* pv pruni na produção, viscosidade e composição química da xantana. **2011. 103f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.**

Métodos adequados de preservação, além de manterem a viabilidade e a estabilidade genética dos micro-organismos, devem ser práticos e pouco dispendiosos. Bactérias do gênero *Xanthomonas* são amplamente pesquisadas e utilizadas industrialmente para produzir xantana, o polissacarídeo microbiano de maior importância comercial. O estudo da preservação da viabilidade celular deste micro-organismo constitui uma necessidade primordial para dar suporte e continuidade a essas pesquisas. Neste trabalho verificou-se a eficiência de técnicas tradicionais de preservação e testou-se métodos alternativos para conservação de *X. arboricola* pv pruni. Avaliou-se viabilidade celular, capacidade produtiva, viscosidade e composição química de xantanas produzidas por três cepas, aqui codificadas como HJ, FH e LF, mantidas por técnicas convencionais, liofilização e repiques periódicos, durante 12 anos, e por técnicas alternativas, em sementes de girassol, pérola de vidro e solo estéril, durante 7, 15 e 30 dias. Os repiques sucessivos mantiveram viáveis todas as cepas. A preservação por liofilização foi cepa dependente, obtendo-se taxas de sobrevivência de 0,031%, 14,5% e 86,1%, respectivamente, com menor valor correspondendo a $2,6 \cdot 10^5$ UFC.mL⁻¹. Nos métodos alternativos a preservação foi método-tempo-cepa dependente, sendo que a preservação em sementes resultou na maior viabilidade, variando entre 0,071 a 0,003%. Os repiques sucessivos no meio SPA não prejudicaram a capacidade produtiva, verificando-se aumento de 49% e 47% para as cepas HJ e LF, respectivamente, e redução de 9% para FH, quando comparada com os valores prévios. A liofilização causou redução apenas à cepa LF; entretanto, a passagem adicional no meio nutritivo SPA reverteu esta redução e ocasionou um aumento de aproximadamente 81%. Para os métodos alternativos, a capacidade produtiva foi tempo-cepa dependente, sendo verificada diminuição no 7° e 15° dia e recuperação no 30° dia. O repique no meio SPA aumentou a viscosidade das xantanas das cepas HJ e FH e reduziu para a cepa LF. A liofilização ocasionou aumento na viscosidade para a cepa FH, que não foi revertido pela passagem adicional em SPA. Os métodos alternativos causaram reduções aleatórias na viscosidade. Independentemente do método utilizado, as cepas preservadas continuaram a apresentar os monômeros esperados para a xantana do patovar pruni, glicose, manose, ramnose e ácido glicurônico. Para a preservação de *X. arboricola* pv pruni, por longos períodos, recomenda-se a liofilização e, por períodos curtos, e também para o transporte de culturas, sugere-se as técnicas alternativas testadas; estas contornam os problemas de custos de equipamentos, escassez de mão-de-obra, dificuldade no transporte de amostras e espaço físico para o armazenamento do estoque.

Palavras chave: *Xanthomonas arboricola* pv pruni. Preservação. Técnicas convencionais. Técnicas alternativas.

Abstract

BOROWSKI, Joyce Moura. Influence of classics and alternatives preservation methods of strains of *Xanthomonas arboricola* pv pruni in xanthan production, viscosity and chemical composition. 2011. 103f. **Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.**

Appropriate methods of preservation, while maintaining the viability and genetic stability of micro-organisms, should be practical and inexpensive. Bacteria of the genus *Xanthomonas* are widely researched and used industrially to produce xanthan gum, a microbial polysaccharide of most commercial importance. The study of preservation of cell viability of this micro-organism is a prime necessity to support and continue this research. In this work we verified the effectiveness of traditional techniques of preservation and tested alternative methods for conservation of *X. arboricola* pv pruni. We assessed cell viability, production capacity, viscosity and chemical composition of xanthan produced by three strains, here coded as HJ, HF and LF, maintained by conventional techniques, freeze drying and the periodic sampling for 12 years, and alternative techniques, in seeds sunflower, glass bead and sterile soil for 7, 15 and 30 days. The successive sampling maintained all strains viable. Preservation by freeze-drying was strain dependent, resulting in survival rates of 0.031%, 14.5% and 86.1%, respectively, with lower value corresponding to $2 \times 6.10^5 \text{CFU.mL}^{-1}$. In the alternative methods, the preservation was time-strain dependent, and the preservation in seeds resulted in higher viability, ranging from 0.071 to 0.003%. The successive samplings in SPA medium did not harm the productive capability and there was an increase of 49% and 47% for strains HJ and LF, respectively, and reduction of 9% for FH, when compared with the previous values. Freeze-drying caused a reduction only to the strain LF, however, the additional passage in SPA medium reversed this reduction and caused an increase of approximately 81%. For alternative methods, the production capability was time- strain dependent, and we found a decrease in the 7th and 15th days and recovery in the 30th day. The sampling in SPA medium increased the viscosity of xanthan of strains HJ and FH and reduced for the strain LF. Freeze- drying caused an increase in viscosity for the strain FH, which was not reversed by further passage in SPA. Alternative methods have caused random reductions in viscosity. Whichever method is used, the preserved strains continued to show the expected monomer for the pathovar pruni xanthan, glucose, mannose, rhamnose and glucuronic acid. For the preservation of *X. arboricola* pv pruni for long periods, it is recommended freeze-drying, and for short periods, and also for transportation of cultures, it is suggested alternative techniques tested; these circumvent these problems cost of equipment, shortage of labor, work, difficulty in transportation of samples and floor space for storage of inventory.

Key words: *Xanthomonas arboricola* pv pruni. Preservation. Convencional techniques. Alternative techniques.

Lista de Figuras

Figura 1 - <i>Xanthomonas campestris</i> (micrografia 12000x).....	19
Figura 2 - Estrutura molecular da xantana produzida por <i>X. campestris</i> pv <i>campestris</i>	26
Figura 3 - Efeito de crioprotetores na sobrevivência de células congeladas.....	36
Figura 4 – Estruturação do primeiro experimento.....	50
Figura 5 – Estruturação do segundo experimento.....	54
Figura 6 – Mini-dessecadores confeccionados com uma camada de sílica gel, uma camada de lã de vidro e cobertos com papel pardo.....	55
Figura 7 – Frascos contendo solo e cobertos com papel pardo.....	56
Figura 8 – Frascos contendo células de <i>Xanthomonas arboricola</i> pv <i>pruni</i> liofilizadas armazenadas à temperatura (A) ambiente e armazenadas a - 18°C (B).....	62
Figura 9 - Viscosidade (mPas) vs taxa de deformação (s^{-1}), a 25°C, de soluções aquosas de xantana a 3% (m/v), produzidas por cepas preservadas por liofilização (LIO), liofilização e reativação com duas passagens em meio sólido SPA (LIO 2) e por repique mensal em meio sólido SPA (SPA).....	68

Figura 10 - Placas com crescimento de *Xanthomonas arboricola* pv pruni e contaminação, indicada pelas setas..... 71

Figura 11 – Cromatografia em camada delgada (CCDC) de xantanas produzidas por cepas preservadas por técnicas alternativas, sendo: 1) 7 dias em sementes; 2) 15 dias em sementes; 3) 30 dias em sementes; 4) 7 dias em pérolas; 5) 15 dias em pérolas; 6) 30 dias em pérolas; 7) 7 dias em solo; 8) 15 dias em solo; 9) 30 dias em solo. Padrões de glicose (P1), ramnose (P2), manose (P3) e ácido glicurônico (P4), no sistema: clorofórmio:metanol:ácido acético:água 40:40:10:10 (v/v/v/v), gel de sílica 60 F254, padrões de glicose, ramnose, manose e ácido glicurônico e revelador anisaldeído sulfúrico..... 79

Lista de Tabelas

Tabela 1 Concentração celular e percentual de sobrevivência de células preservadas por liofilização durante 12 anos.....	59
Tabela 2 Crescimento celular de <i>X. arboricola</i> em 24h de cultivo em meio líquido YM.....	64
Tabela 3 Produção de xantana* por células preservadas por técnicas convencionais, comparada com valores prévios (controle)**	65
Tabela 4 Relação entre número inicial de células e produção de xantana*, comparados a valores prévios (controle)**	67
Tabela 5 Viscosidade, a 25°C e 10s ⁻¹ , das soluções aquosas a 3% (m/v) de xantanas produzidas por células preservadas por técnicas convencionais, comparada com valores prévios (controle)*.....	69
Tabela 6 Concentração celular e percentual de sobrevivência de células preservadas por técnicas alternativas.....	73
Tabela 7 Produção de xantana* por cepas preservadas por técnicas alternativas.....	79
Tabela 8 Viscosidade, 25°C a 10s ⁻¹ , das soluções aquosas de xantana a 3% produzidas por células preservadas por técnicas alternativas, comparadas com valores de viscosidade de xantana produzida por células preservadas por repiques mensais em SPA.....	78

Tabela 9 Concentração celular e percentual de sobrevivência de células preservadas por técnicas convencional e alternativas.....	80
Tabela 10 Produção de xantana* por cepas preservadas por técnicas convencionais e alternativas.....	82
Tabela 11 Viscosidade, a 25°C e 10s ⁻¹ , das soluções aquosas de xantana a 3% produzidas por cepas preservadas por técnicas convencionais e alternativas.....	83

SUMÁRIO

Lista de Figura.....	09
Lista de Tabela.....	11
Introdução.....	15
1. Revisão de Literatura.....	19
1.1 <i>Xanthomonas</i>	19
1.2 Goma xantana.....	21
1.2.1 Histórico, propriedades e aplicações.....	21
1.2.2 Produção.....	22
1.2.3 Composição química.....	26
1.2.4 Viscosidade.....	27
1.3 Manutenção de micro-organismos.....	29
1.3.1 Métodos para a preservação de micro-organismos.....	31
1.3.1.1 Métodos propagativos.....	31
1.3.1.2 Métodos não-propagativos e semi-propagativos.....	34
1.3.1.2.1 Métodos convencionais.....	34
1.3.1.2.1.1 Liofilização e secagem por atomização.....	37
1.3.1.2.1.2 Ultra congelamento.....	40
1.3.1.2.1.3 Conservação em nitrogênio líquido.....	40
1.3.1.2.2 Métodos alternativos.....	42
1.3.1.2.2.1 Tiras de papel.....	42
1.3.1.2.2.2 Sílica gel, pérolas de vidro ou porcelana.....	43
1.3.1.2.2.3 Sementes e grãos de cereais	44
1.3.1.2.2.4 Solo e areia estéreis.....	44
1.3.1.2.2.5 Água destilada.....	45
1.4 Avaliação da viabilidade dos micro-organismos após a conservação.....	46
1.5 Escolha do método de preservação.....	47
2 Material e métodos.....	49
2.1 Material.....	49
2.1.1 Micro-organismos.....	49
2.1.2 Reagentes.....	49
2.1.3 Equipamentos.....	49
2.2 Métodos.....	50
2.2.1 Avaliação de métodos clássicos utilizados para a preservação de <i>X. arboricola</i>	50
2.2.1.1 Preservação por liofilização.....	51
2.2.1.1.1 Liofilização e armazenamento.....	51
2.2.1.1.2 Reativação e determinação da viabilidade celular.....	51
2.2.1.1.3 Propagação de células em meio sólido a partir da suspensão bacteriana reativada.....	51
2.2.1.1.4 Propagação de células em meio sólido a partir de colônias isoladas.....	52
2.2.1.2 Preservação por repiques mensais.....	52

2.2.1.2.1 Repiques mensais.....	52
2.2.1.2.2 Propagação de células em meio sólido a partir de colônias isoladas.....	52
2.2.1.3 Produção de xantana e avaliação da capacidade produtiva.....	52
2.2.1.4 Viscosidade.....	53
2.2.1.5 Composição química.....	53
2.2.2 Avaliação de métodos alternativos para a manutenção de <i>X. arboricola</i>	54
2.2.2.1 Multiplicação celular.....	54
2.2.2.2 Preservação das células de <i>X. arboricola</i>	54
2.2.2.2.1 Armazenamento em sementes de girassol.....	54
2.2.2.2.2 Armazenamento em pérolas de vidro.....	56
2.2.2.2.3 Armazenamento em solo estéril.....	56
2.2.2.3 Recuperação das células conservadas, avaliação da viabilidade e propagação em meio sólido.....	57
2.2.3 Análise estatística.....	57
3 Resultados e discussão.....	58
3.1 Influência dos métodos convencionais de preservação de <i>X. arboricola</i>	58
3.1.1 Viabilidade celular.....	58
3.1.2 Produção de xantana.....	64
3.1.3 Viscosidade.....	68
3.1.4 Composição química.....	70
3.2 Influência dos métodos alternativos de preservação de <i>X. arboricola</i>	71
3.2.1 Viabilidade celular.....	72
3.2.2 Produção de xantana.....	75
3.2.3 Viscosidade.....	76
3.2.4 Composição química.....	79
3.3 Comparação entre métodos clássicos e alternativos de preservação de <i>X. arboricola</i>	80
3.3.1 Viabilidade celular.....	80
3.3.2 Produção de xantana.....	81
3.3.3 Viscosidade.....	82
4 Conclusão.....	84
Referências.....	86

INTRODUÇÃO

A correta preservação de micro-organismos é fundamental na microbiologia industrial (SIMIONE, 1998; CAMEOTRA, 2007), pois é cada vez maior o número de substâncias obtidas via fermentativa, tais como enzimas, vitaminas, aminoácidos, polissacarídeos, entre outras (CARVALHO et al., 2005; SILVA et al., 2005; CANILHA et al., 2005).

Polímeros sintetizados por bactérias, fungos e leveduras recebem o nome de biopolímeros microbianos. Dentre esses, os do tipo polissacarídicos possuem um elevado valor comercial e são, comumente, chamados de gomas ou hidrocolóides devido à capacidade de formarem soluções viscosas e géis em meio aquoso, à semelhança de outras gomas tradicionais de origem vegetal (SCAMPARINI; ROSSATO, 1990; MAUGERI FILHO, 2001). Os biopolímeros microbianos são uma alternativa válida como substituintes dessas gomas, pois apresentam algumas características similares e outras vantajosas, como propriedades específicas que os qualificam para o desenvolvimento de novos produtos. A produção de gomas microbianas não é suscetível às condições climáticas, contaminação marinha ou falha na colheita, que prejudicam a oferta das gomas tradicionais e, além disso, apresentam maior uniformidade em sua qualidade, pois sua produção pode ser controlada cuidadosamente (VENDRUSCOLO, 1995). Adicionalmente, existem técnicas genéticas que permitem obter polissacarídeos com propriedades específicas (MAUGERI FILHO, 2001; PADILHA, 2003). Tem-se observado um grande interesse do setor alimentício, farmacêutico, químico e petroquímico por estes compostos.

Entre os polímeros microbianos, a xantana apresenta merecido destaque devido suas propriedades reológicas, responsáveis por sua grande utilização na indústria de alimentos. Esse exoheteropolissacarídeo, produzido comercialmente pela bactéria *Xanthomonas campestris* (LILLY; WILSON; LEARCH, 1958; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; ROSALAM; ENGLAND, 2006),

ainda não é produzido no Brasil, sendo totalmente importado. No entanto, o país apresenta potencial para fabricação de xantana em escala industrial; as bactérias do gênero *Xanthomonas* são abundantes na microbiota brasileira e o substrato para síntese do polímero representa um baixo custo de produção, já que o país dispõe das matérias-primas básicas (açúcar, extrato de levedura e álcool) para a produção de xantana (VENDRUSCOLO, 1995; MOREIRA, et al., 2001; PADILHA, 2003). Como suporte para produção ainda têm-se a bacterioteca da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Clima Temperado (EMBRAPA/CPACT), que possui uma coletânea de cepas de *Xanthomonas* isoladas ao longo de mais de 30 anos de pesquisas realizadas pelos fitopatologistas dessa unidade. Além disso, já existem várias patentes nacionais sobre diferentes processos de obtenção de xantana (SCAMPARINI; ROSATO, 1990; VENDRUSCOLO; MOREIRA; VENDRUSCOLO, 2006; DRUZIAN; BRANDÃO; NERY, 2007; NERY; BRANDÃO; DRUZIAN, 2009; GOMES et al., 2010; PADILHA et al., 2010).

A grande aplicabilidade industrial da xantana e seu amplo mercado mundial vêm estimulando os pesquisadores da área a desenvolverem estudos sobre as melhores condições de multiplicação celular da *Xanthomonas*, parâmetros de produção, recuperação e purificação deste exopolissacarídeo, bem como estudo sobre as suas propriedades, a fim de obter a melhor relação de rendimento e qualidade reológica do produto sintetizado (SILMAN; ROGOVIN, 1970; CASAS; SANTOS; GARCÍA-OCHOA, 2000; VENDRUSCOLO et al., 2000; DIAZ, 2002; ANTUNES et al., 2003; BORGES 2004; BORGES et al., 2009a).

No entanto, xantanas com propriedades reológicas inadequadas, baixo rendimento e, conseqüente, custo de produção elevado, podem ser sintetizadas por sublinhagens decorrentes do contínuo subcultivo da bactéria durante a etapa de produção do inóculo (RAMÍREZ et al., 1988). Pesquisas relatam que repiques sucessivos da bactéria aumentam a probabilidade de mutações espontâneas e aleatórias (KIDBY et al., 1977; RAIMANN et al., 2002). Deste modo, a utilização de inóculos de *Xanthomonas* adaptados ao meio, estáveis e livres de sublinhagens improdutivas, torna-se fundamental para incrementar a produtividade do processo fermentativo (BAIOCCO, 1997).

A manutenção de células de *Xanthomonas* viáveis e estáveis constitui-se numa das prioridades das pesquisas relacionadas à xantana. Os procedimentos conhecidos para a preservação da bactéria são classificados apenas como adequados ou inadequados (SALCEDO et al., 1992), e são escassos na literatura os relatos sobre o desempenho quantitativo dos métodos utilizados para a conservação desse micro-organismo.

Pesquisadores do Laboratório de Biopolímeros (Centro de Desenvolvimento Tecnológico/Universidade Federal de Pelotas), em parceria com a EMBRAPA/CPACT, geraram as patentes nacional (PI 0406309-0) e internacional (WO2006047845) sobre produção de xantana por *Xanthomonas arboricola* pv pruni. Seus trabalhos comprovaram que esta bactéria é capaz de produzir xantana com rendimento e qualidade equivalentes às xantanas comerciais (MOREIRA et al., 2001; VENDRUSCOLO; MOREIRA; VENDRUSCOLO, 2006; BORGES et al., 2009b). Produção, caracterização e aplicação dos biopolímeros produzidos por esta espécie são os alvos destas pesquisas há quase duas décadas. As culturas de *X. arboricola* pv pruni do Laboratório de Biopolímeros têm sido mantidas por liofilização, método convencional, porém de alta tecnologia, e por repiques mensais em placas contendo meio sólido SPA (*Sucrose Peptone Agar*).

Técnicas simples de conservação de micro-organismos, de baixo custo, com rapidez de execução, elevado grau de eficiência e que não requeiram equipamentos sofisticados são importantes em qualquer laboratório de pesquisa. Assim sendo, este trabalho teve como objetivo geral estudar a eficiência de técnicas convencionais de manutenção de *X. arboricola* pv pruni, bem como testar métodos alternativos para preservação desse micro-organismo, a fim de manter a bactéria viável para a síntese de xantana de alta qualidade.

Os objetivos específicos desta pesquisa foram:

- Determinar a eficiência de métodos tradicionais de preservação, liofilização e repiques mensais em meio sólido SPA, após um período de 12 anos, sobre a viabilidade, capacidade produtiva, viscosidade e composição química da xantana produzida pelas cepas HJ, FH e LF de *X. arboricola* pv pruni, mediante comparação aos resultados prévios ao período de preservação.

- Verificar a influência da readaptação das células liofilizadas ao meio sólido de propagação na capacidade produtiva e qualidade da xantana produzida pelas cepas estudadas.
- Verificar a influência de métodos alternativos de conservação em sementes de girassol (*Helianthus annuus*), pérolas de vidro e solo estéril, em temperatura ambiente, na viabilidade celular, capacidade produtiva, viscosidade e composição química das xantanas produzidas, utilizando células oriundas de repiques mensais em meio sólido SPA.
- Comparar as técnicas convencionais e alternativas avaliadas quanto à manutenção da viabilidade das cepas de *Xanthomonas*, produção e viscosidade da xantana.

1 Revisão de Literatura

1.1 *Xanthomonas*

O gênero *Xanthomonas*, pertencente à família *Xanthomonadaceae* (SADDLER; BRADBURY, 2005) e compreende, atualmente, 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 μ m de largura e 0,7-1,8 μ m de comprimento, gram-negativas, móveis por flagelo único (1,7-3 μ m de comprimento) (Fig.1), quimiorganotróficos, estritamente aeróbios, catalase-positiva e oxidase-negativa (GARCÍA-OCHOA et. al, 2000).

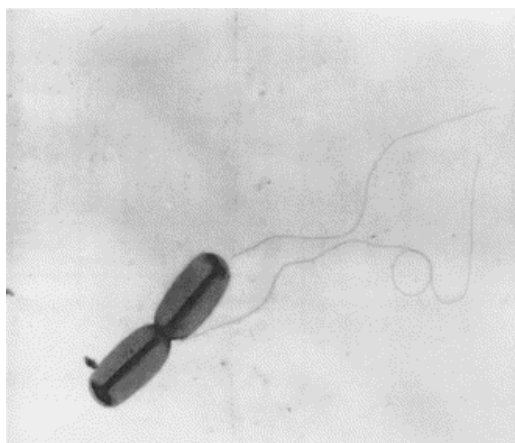


Figura 1 - *Xanthomonas campestris* (micrografia 12000x).
Fonte: GARCÍA-OCHOA et al., 2000.

O crescimento de *Xanthomonas* em meio sólido *Yeast Malt* (YM) (HAYNES; WICKERHAM; HESSELTINE, 1955) é caracterizado por colônias mucóides, viscosas e lisas. Pigmentos amarelos, chamados de xantomonadinas, são sintetizados por todas as espécies da bactéria, porém

podem estar ausentes quando ocorre alguma degradação (BRADBURY, 1984; GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

X. 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). Porém, estudos comprovam que, devido à similaridade morfológica e fisiológica, outros patovares como *manihotis*, *begoniae* e *dieffenbachiae* (NITSCHKE; THOMAS 1995; TESSMAN, 2002; LUVIELMO; VENDRUSCOLO; SCAMPARINI, 2007; ROTTAVA et al., 2009; MAYER et al., 2010), e mesmo outras espécies da bactéria como *X. arboricola* (SCAMPARINI et al., 1998; SOUZA; VENDRUSCOLO, 1999; VENDRUSCOLO et al., 2000; MOREIRA et al, 2001; MOREIRA, 2002; PAN; MOREIRA; VENDRUSCOLO, 2000; BORGES, 2004; PINTO, 2005; VENDRUSCOLO; MOREIRA; VENDRUSCOLO, 2006; BORGES et al., 2009a;b), anteriormente classificada como *X. campestris* pv *pruni*, também 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* patovar *campestris* e *X. campestris* patovar *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, mostraram que o patovar *pruni* possuía similaridade com o patovar *juglandis*, mas não com o *campestris*. A reclassificação proposta foi adotada pelo Manual Bergeys, edição 2005 (SADDLER; BRADBURY, 2005), na qual o patovar *pruni* foi incluído em uma nova espécie, *X. arboricola*, com a nomenclatura *X. arboricola* pv. *pruni*.

1.2 Goma xantana

1.2.1 Histórico, propriedades e aplicações

Na década de 50, pesquisadores do *Northern Regional Research Laboratory* (NRRL) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, descobriram a xantana enquanto identificavam micro-organismos produtores de gomas de interesse comercial solúveis em água (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 nº 55.871, da Legislação Brasileira de Alimentos (BRASIL, 1965). Juntamente com a dextrana, gelana e curdulana, constitui-se em um dos quatro biopolímeros aprovados pela *Food and Drugs Administration* (FDA) para uso alimentar (KANG; VEEDER; COTTRELL, 1983).

As maiores vantagens do uso de xantana em relação a outros hidrocolóides devem-se, principalmente, à suas propriedades reológicas, que permitem a formação de soluções viscosas a baixas concentrações (0,05-1,0%), além de estabilidade em ampla faixa de pH (2,5-11) e temperatura (10-90°C), grande escala de produção em curto espaço de tempo e propriedades pseudoplásticas (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). Por ser compatível com proteínas, lipídios e outros polissacarídeos, como amido e pectina, a xantana pode ser utilizada em produtos de panificação, aumentando sua vida de prateleira e contribuindo para a estrutura (SUTHERLAND, 1998; PREICHARDT, 2009). A fácil dissolução da xantana em água fria ou quente, proporcionando rápido incremento da viscosidade, possibilita 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 (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 tem sido utilizada no desenvolvimento sobremesas livres de ingredientes de origem animal, como *mousse* de maracujá, mirtilo e framboesa (ALVES et al., 2011; COUTO et. al., 2011; KUCK et al., 2011).

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

Na indústria petrolífera é empregada como modificador reológico do fluido de perfuração de poços (BORGES et al., 2009b), e na recuperação terciária do petróleo, por não ser sujeita à degradação 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 40 a 50 mil toneladas por ano, a xantana é o polissacarídeo microbiano de maior importância econômica, pois movimentava cerca de 270 milhões de dólares anualmente (BORSCHIVER; ALMEIDA; ROITMAN, 2008) e o crescimento da demanda está estimado a uma taxa contínua de 5 a 10% ao ano (ROSALAM; ENGLAND, 2006).

1.2.2 Produção

A produção de xantana, tradicionalmente, é realizada em duas fases: a primeira, onde se promove a multiplicação celular da bactéria, e a segunda, quando ocorre a síntese do biopolímero (JEANES, 1974; SCAMPARINI; ROSATO, 1990; VENDRUSCOLO; MOREIRA; VENDRUSCOLO, 2006). Culturas puras de *X. campestris* são cultivadas por fermentação aeróbica

submersa, em batelada. O meio esterilizado composto de carboidratos, fonte de nitrogênio e sais minerais é inoculado com a cultura selecionada, seguido por incubação. O polímero é precipitado em solvente (isopropanol, etanol ou acetona), seco e moído (GODET, 1973; GONZALES et al., 1989; GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

As condições operacionais empregadas durante a fermentação, tais como micro-organismo (NITSCHKE; THOMAS, 1995; MOREIRA et al., 2001; ANTUNES et al., 2003; LUVIELMO; VENDRUSCOLO; SCAMPARINI, 2007) meio de produção (CADMUS et al., 1978; VENDRUSCOLO et al., 2000; ANTUNES et al., 2000a; BOROWSKI et al., 2006; BORGES et al., 2011), aeração (MOREIRA et al., 2003; BOROWSKI; BORGES; VENDRUSCOLO, 2006; BORGES et al., 2009), agitação (MOREIRA et al., 2003; BORGES et al., 2009a), temperatura (DIAZ et al., 2002), pH (VENDRUSCOLO et al., 2004; BORGES et al., 2009a) e tempo de fermentação (SOUZA; VENDRUSCOLO, 1999) influenciam no rendimento do biopolímero.

Moreira et al. (2001) realizaram um *screening* com dezoito cepas do patovar pruni de *X. arboricola* em incubador-agitador, avaliando rendimento, viscosidade e composição química dos polímeros obtidos. Os resultados encontrados pelos autores demonstraram que o rendimento de xantana é dependente da bactéria utilizada no processo fermentativo e do tempo de incubação, mas que rendimento e viscosidade de xantana não estão necessariamente relacionados. Já Luvielmo, Vendruscolo e Scamparini (2007) avaliaram a produção de xantana por diferentes patovares de *Xanthomonas* (*begoniae*, *malvacearum*, *dieffenbachiae*, *campestris*, *vesicatoria*, *manihotis*) em incubador-agitador; o melhor desempenho com relação à produção e qualidade de xantana foi obtido com os patovares *manihotis*, *begoniae* e *dieffenbachiae*, com uma produção de 10,8g.L⁻¹, 9,0g.L⁻¹ e 8,5g.L⁻¹, respectivamente.

A composição adequada do meio de fermentação é um fator primordial para uma produção ótima de xantana (GARCÍA-OCHOA; SANTOS; FRITSCH, 1992; GARCÍA-OCHOA; SANTOS; ALCÓN, 1995; GARCÍA-OCHOA et al., 2000). O primeiro substrato relatado para a produção do biopolímero continha 2% de glicose, 0,02% de nitrogênio e 0,2% de fostato (ROGOVIN; ANDERSON; CADMUS, 1961, apud BAIOTTO, 1997). A partir de então, vários

estudos foram realizados sobre os requerimentos nutricionais das *X. campestris*, a fim de determinar uma composição de meio de fermentação adequada para a síntese do polímero.

Gupte e Kamat (1997) avaliaram, em incubador orbital, glicose, sacarose e amido como fontes iniciais de carbono para a produção de xantana e constataram maior valor ($4,0\text{g.L}^{-1}$) quando utilizaram sacarose na concentração de $50,0\text{g.L}^{-1}$.

Cadmus et al. (1978) e Souw e Demain (1979), consideraram a presença de potássio fundamental para um bom rendimento de xantana e relataram que sua ausência reduz a qualidade da xantana produzida pelo patovar *campestris*. Diaz, Moreira e Vendruscolo (2001), estudando em incubador-agitador a cepa 06 de *X. arboricola* pv *pruni*, atingiram máxima produção de xantana ($5,7\text{g.L}^{-1}$) quando utilizaram este sal na concentração de $5,0\text{g.L}^{-1}$.

García-Ochoa, Santos, e Fritsch (1992) demonstraram que o magnésio influencia na multiplicação celular, enquanto o enxofre na produção de xantana, e consideraram a concentração de $0,2\text{g.L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ como valor excelente. Casas, Santos e García-Ochoa (2000) estudaram a produção da xantana sintetizada por *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459, com diferentes concentrações de nitrogênio ($0,57$; $1,14$ e $2,29\text{g.L}^{-1}$), na forma de nitrato de amônio, e verificaram que houve um incremento na produção quando aumentaram a concentração de nitrogênio, tendo seu máximo quando foi utilizado $1,14 \text{g.L}^{-1}$. Diaz, Moreira e Vendruscolo (2001) demonstraram a importância da concentração do fósforo na produção; quando este foi suprimido do meio ou reduzida à metade sua concentração, a produção também foi reduzida em 66% e 45%, respectivamente.

Vários trabalhos já foram desenvolvidos utilizando fontes alternativas para a produção de xantana, com intuito de reduzir o custo total do processo e incrementar seu rendimento. Antunes et al. (2000a) e Foresti (2003) utilizaram efluente do processo de parboilização do arroz na produção de xantana, em shaker, obtendo $5,6\text{g.L}^{-1}$ e $7,7\text{g.L}^{-1}$, respectivamente, quando este meio foi adicionado de sacarose. Borges (2007), utilizando o mesmo meio, em bioreator, obteve $22,0\text{g.L}^{-1}$. Nitschke, Rodrigues e Schinatto (2001) avaliaram o rendimento de xantana em fermentador, utilizando três formulações de meios à base de soro de leite, e obtiveram maior produção ($14,7\text{g.L}^{-1}$) com o uso de

soro de leite integral. Já Nery et al. (2008) suplementaram o soro de leite com uréia e fosfato e obtiveram $21,9\text{g.L}^{-1}$ de xantana, sintetizada em agitador orbital. Vendruscolo, Pan e Moreira (2002) verificaram a influência da adição de fibra de soja na produção de xantana em incubador-agitador, através de oito formulações de meios de fermentação; a fibra influenciou positivamente elevando consideravelmente a produção do biopolímero. Pinto, Pan e Vendruscolo (2002) utilizaram farelo de arroz como fonte de carbono para a produção de xantana em incubador-agitador; o meio contendo 3% deste substrato obteve a maior produção ($5,1\text{g.L}^{-1}$), superior ao meio padrão com sacarose ($4,0\text{g.L}^{-1}$).

Para o crescimento do *X. campestris*, os melhores intervalos de pH e temperatura são entre 6,0 - 7,5 e de 25 a 27°C, respectivamente, e para a produção de xantana, pH entre 6,0 e 8,0, controlado pelo uso de álcalis, e temperatura em torno de 28°C (ESGALHADO; ROSEIRO; COLLAÇO, 1995; GUPTÉ; KAMAT, 1997; CASAS; SANTOS; GARCÍA-OCHOA, 2000). Diaz et al. (2002) demonstraram que temperatura utilizada no processo afeta diretamente a produção de xantana; em incubador agitador orbital, observaram que a temperatura de crescimento celular de 28°C e um incremento de 2°C, na fase de produção, favorece o rendimento de xantana ($8,1\text{g.L}^{-1}$). Gupte e Kamat (1997) avaliaram a produção xantana por *X. campestris* nos pHs 5,0, 7,0 e 9,0 e obtiveram, em pH 5,0 e 7,0, $13,6\text{ g.L}^{-1}$ e $17,0\text{g.L}^{-1}$ de xantana, respectivamente. Já em pH 9,0 a síntese do polímero reduziu-se drasticamente para $3,1\text{g.L}^{-1}$. Resultados semelhantes foram obtidos por Borges et al. (2009a) que estudaram a produção de xantana, em fermentador, nas mesmas faixas de pH e também em pH não controlado; o maior rendimento de xantana foi $16,0\text{g.L}^{-1}$ em pH 7,0. Luvielmo (2007), utilizando *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95, avaliou a influência de diferentes pHs (8,0 a 12,0) e diferentes tempos de *stress* alcalino (1h a 4h), na produção e a qualidade da xantana. O maior valor de produção de xantana foi atingido em *stress* alcalino com pH 12,0 , seguido pelo pH 11,0 e pH 8.

Além disso, os níveis de agitação e aeração, quando a produção é realizada em fermentador, devem ser ajustados para evitar a limitação na transferência de oxigênio, decorrente da alta viscosidade do meio pela formação do polissacarídeo, o que prejudicaria sua síntese pela bactéria

(SUTHERLAND, 1993; BORGES, 2004). Peters et al. (1989) analisaram a influência da velocidade de agitação (200, 400, 600 e 800rpm) a uma taxa de aeração de 0,33vvm; a maior produção ocorreu em 800rpm atingindo 16,4g.L⁻¹. Casas, Santos e García-Ochoa (2000) analisaram a produção de xantana em diferentes velocidades de agitação (100, 300, 500 e 800rpm) com fluxo de ar 1vvm; a produção máxima ocorreu em 500rpm alcançando em torno de 17,5g.L⁻¹. Borowski, Borges e Vendruscolo (2006) estudaram o efeito isolado da aeração (0,5 e 1vvm), com uma única velocidade de agitação (600rpm), no rendimento da xantana sintetizada por *X. arboricola* e obtiveram valor máximo de produção de 16,9g.L⁻¹ quando utilizaram taxa de aeração de 0,5vvm.

1.2.3 Composição química

Normalmente, a estrutura monomérica da xantana (Fig. 2) possui duas unidades de glicose, duas de manose e uma de ácido glicurônico, na proporção molar de 2,8: 2,0: 2,0, e grupos piruvato e acetil (CADMUS et al., 1978; GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

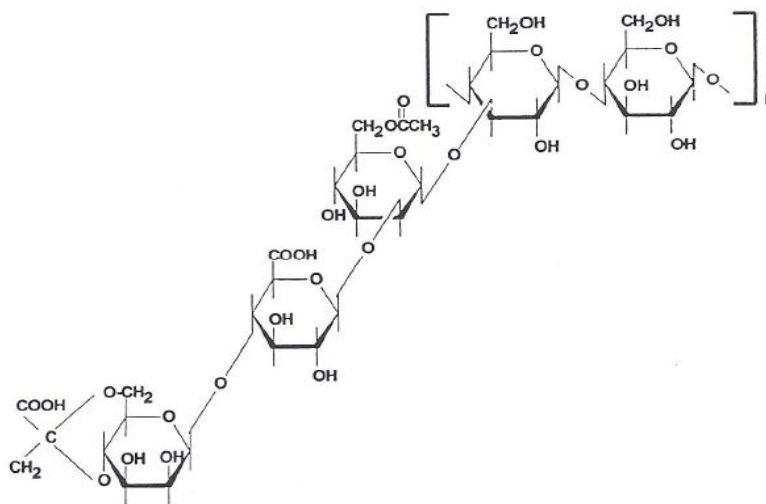


Figura 2 - Estrutura molecular da xantana produzida por *X. campestris* pv *campestris*.

Fonte: BECKER et al., 1998.

No entanto, estudos revelam que a composição e proporção destes constituintes podem variar com a espécie de *Xanthomonas* utilizada. *X. vesicatoria*, por exemplo, possui galactose no lugar de manose (ORENTAS; SLONECKER; JEANES, 1963). Já *X. arboricola* apresenta, além de glicose,

manose e ácido glicurônico, ramnose (VENDRUSCOLO et al., 2000; MOREIRA, 2002; KLAIC, 2010). Nos grupamentos acetil e piruvato tem-se observado que variações nas espécies de *Xanthomonas* causam maiores diferenças nas quantidades destes substituintes do que na qualidade (ORENTAS; SLONECKER; JEANES, 1963; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002).

Estudos demonstram que o meio de cultura e as condições operacionais influenciam tanto no rendimento quanto na estrutura da xantana (GARCÍA-OCHOA; SANTOS; FRITSCH, 1992). Variações no tempo de incubação e na aeração influenciam no teor de monossacarídeos presentes (VENDRUSCOLO et al., 2000; MOREIRA, 2002), já variações nas taxas de agitação tem influência direta na síntese dos substituintes acetil e piruvato (BORGES et al., 2008).

Alterações na composição química também podem ocorrer em decorrência dos procedimentos pós-fermentativos, como recuperação e purificação do biopolímero (CALLET; MILAS; RINAUDO, 1987; CASAS, SANTOS; GARCÍA-OCHOA, 2000, BORGES et al., 2009a).

1.2.4 Viscosidade

A viscosidade das soluções de xantana depende da bactéria utilizada (ANTUNES et al., 2000b) e parâmetros empregados no processo fermentativo para obtenção do biopolímero (FUNAHASHI; YOSHIDA; TAGUCHI, 1987; TORRES et al., 1993; VENDRUSCOLO et al., 2000; ANTUNES et al., 2000a; BORGES et al., 2008). Processos pós-fermentativos, como a troca-iônica e a desacetilação, também possibilitam a obtenção de xantanas com diferentes propriedades reológicas para diversas aplicações (KLAIC, 2010; PINTO; FURLAN; VENDRUSCOLO, 2011).

Souza e Vendruscolo (1999) verificaram a influência da linhagem utilizada no processo fermentativo na viscosidade do polímero produzido. Soluções aquosas, a 3% (m/v) de xantanas, produzidas por *X. arboricola* cepas 24 e 58, analisadas em reômetro, apresentaram valores de aproximadamente 5.000mPa.s e 300mPa.s, respectivamente, numa taxa de deformação de $10s^{-1}$.

Borowski et al. (2006) analisaram a viscosidade das soluções aquosas a 1% (m/v) de xantana produzidas em sete meios de fermentação diferentes, em

agitador orbital, demonstrando que a viscosidade é influenciada pela composição do meio de produção e pela cepa utilizada. A viscosidade das soluções de xantana sintetizadas no meio padrão e seus derivados (MPII, MPIIb e MPIIc, respectivamente) apresentaram valores superiores e significativamente diferentes aos demais meios. O valor mais elevado de viscosidade foi de 453mPa.s na taxa de deformação 10s^{-1} a 25°C , no meio MPII. A adição de ácido cítrico ao meio padrão (MPIIb) contribuiu para o aumento da produção de xantana, no entanto promoveu um decréscimo na viscosidade do polímero, quando comparado com o meio padrão.

Borges, Moreira e Vendruscolo (2003) avaliaram, em reômetro rotativo, a qualidade reológica da xantana sintetizada, em biorreator por *X. arboricola*, em diferentes tempos de incubação. Seus resultados mostraram uma viscosidade máxima das soluções de xantana em 66h de fermentação (5.560mPa.s a 25°C), a partir deste tempo a viscosidade começou a decrescer. Um estudo sobre a influência do pH e agitação do processo fermentativo na viscosidade da xantana foi realizado por Borges et al. (2009a). Soluções aquosas de xantana a 0,5% (m/v), produzidas nos pHs 5,0, 7,0 e 9,0 e taxas de agitação de 200, 400 e 600rpm foram analisadas em reômetro a 25°C e taxa de cisalhamento de $0,01-100\text{s}^{-1}$. Os autores encontraram valor máximo de viscosidade, 200mPa.s, em pH 7,0 e 400rpm de agitação, comprovando que pH e agitação no qual o processo fermentativo, em biorreator, é conduzido também influencia na viscosidade da xantana.

Borowski, Borges e Vendruscolo (2006) testaram o efeito da aeração (0,5 e 1,0vvm) na qualidade reológica da xantana sintetizada por *X. arboricola* em fermentador, demonstrando que a maior viscosidade de soluções aquosas a 0,5% (m/v) (315mPa.s) foi atingida pela utilização da taxa de aeração de 1vvm. Estes resultados assemelham-se aos encontrados por Cadmus et al. (1978), que estudaram a influência da taxa de aeração (0,25 a 1,5vvm) na viscosidade da xantana, alcançando maior viscosidade em maior aeração (0,75vvm e 1,5vvm). Um decréscimo nos valores da viscosidade foi constatado por Borges (2004) utilizando altas taxas de aeração 3vvm e 2vvm.

As soluções de xantana têm sua viscosidade diretamente relacionada à composição química, tanto qualitativa como quantitativa (CADMUS et al., 1978;

MOREIRA et al., 2001; MOREIRA, 2002; BORGES, 2007; BORGES et al., 2009a).

Moreira et al. (2001) e Moreira (2002) observaram que a viscosidade da xantana produzida por *X. arboricola* é influenciada pelo conteúdo de açúcares que compõe a molécula; para os autores, xantanas com alto teor de manose apresentam maiores viscosidades. Borges et al. (2008) verificaram comportamento semelhante ao observar que uma diminuição no conteúdo de manose coincide com uma diminuição na viscosidade de xantana produzida pelo mesmo patovar. O ácido glicurônico, assim como a manose, parece desempenhar influência favorável na viscosidade de polímeros produzidos pelo patovar pruni (ANTUNES, 2000).

O conteúdo de piruvato e acetato afeta as interações entre as moléculas de xantana e entre a xantana e outros polímeros (KANG; PETTITT, 1993; GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Segundo autores como Sandford et al. (1977), Smith et al. (1981) e Lechner et al. (1996), o conteúdo de ácido pirúvico pode ser utilizado como um indicador da qualidade reológica, sendo que xantanas com alto conteúdo de piruvato (> 4%) apresentam viscosidade superior àquelas com conteúdo inferior (0,5 a 3%). Para as xantanas produzidas pelo patovar pruni, entretanto, este não parece ser um fator primordial (SILVEIRA et al., 2008; KLAIC, 2010).

A desacetilação da molécula, no entanto, parece incrementar a viscosidade das soluções (SLONEKER; JEANES, 1962; TAKO; NAKAMURA, 1984). Borowski, Borges e Vendruscolo (2007) trataram termicamente o caldo fermentado produzido por *X. arboricola*, em biorreator, e verificaram que este tratamento pós-fermentativo promoveu a desacetilação da molécula (1,8% de acetil), conseqüentemente um incremento da viscosidade (220mPa.s). Segundo Tako e Nakamura (1984) através da desacetilação do polímero, a viscosidade da solução é aumentada pela maior associação intermolecular.

1.3 Manutenção de micro-organismos

O sucesso da microbiologia industrial depende do isolamento, identificação, seleção, caracterização e conservação das linhagens utilizadas nos processos. Para garantir a reprodutibilidade dos resultados e a

continuidade em pesquisa e processos biotecnológicos, os cientistas são confrontados com a tarefa de estabilizar geneticamente células vivas. Assim, a manutenção de micro-organismos que produzem metabólitos de interesse comercial tornou-se um desafio constante nesta área (ROMEIRO, 1996; SIMIONE, 1998; CAMEOTRA, 2007).

Existem Coleções de Culturas instaladas por todo mundo que conservam a diversidade microbiana a longo prazo, sendo guardiãs de recursos genéticos de vital importância para a ciência e a sociedade. Os métodos comumente utilizados para a preservação destas culturas são a liofilização, armazenamento em nitrogênio líquido e congelamento a -70°C (CAMEOTRA, 2007). O armazenamento de culturas liofilizadas e em nitrogênio líquido são considerados os métodos de conservação mais aceitos e mais confiáveis há muitos anos (HECKLY, 1961; BAIOTTO, 1997; CAMEOTRA, 2007). Alguns micro-organismos precisam ser preservados em seu meio de crescimento, como por exemplo espécies de *Thiobacillus*. Já alguns fungos exigem camadas de óleo mineral para a preservação (CAMEOTRA, 2007). No entanto, os micro-organismos, mesmo dentro de uma espécie, diferem em sua tolerância aos vários métodos de preservação. Por isso, é improvável que um único método forneça as condições ideais para todas as linhagens de uma Coleção de Cultura científica ou industrial (SNELL, 1991).

Grande parte das técnicas utilizadas para a preservação de micro-organismos envolve tecnologias altamente especializadas, equipamentos sofisticados e sistemas de armazenamento em ambientes de temperaturas muito baixas. Embora estes métodos sejam eficazes, são geralmente muito caros e mais exigentes em relação à mão de obra qualificada (HAYS et al., 2005). Assim, técnicas alternativas (HUNT; GOUREVITCH; LEIN, 1958; GRIVEL; JACKSON, 1969; LIAO; SHOLLENBERGER, 2003) e também variações de métodos convencionais (MALIK, 1990; HALIK, 1999; VALENTINE et al., 2011), têm sido estudadas pelos pesquisadores da área a fim de instituir tecnologias mais baratas e práticas para a manutenção de células vivas.

1.3.1 Métodos para a preservação de micro-organismos

Há uma quantidade considerável de técnicas, convencionais e alternativas, disponíveis para estoque e preservação de isolados microbianos, podendo ser divididas em propagativas (repiques periódicos), semi-propagativas (preservação em sementes, solo e água estéreis) e não-propagativas (liofilização, ultracongelamento, conservação em nitrogênio líquido, sílica gel e pérolas de vidro).

1.3.1.1 Métodos propagativos

Técnicas propagativas, caracterizadas pelo crescimento contínuo, envolvem constantes transferências do micro-organismo de um meio saturado para um novo meio nutritivo (recém preparado), antes que o substrato restante seja completamente consumido (SMITH; ONIONS, 1994). Os meios utilizados podem ser sólidos ou líquidos; os sólidos podem estar em placas de Petry ou em tubos de ensaio inclinados e, ainda, serem estocados com ou sem líquido de cobertura. O armazenamento das culturas deve ser feito, preferencialmente, sob refrigeração (4 a 10°C).

O sucesso da manutenção de micro-organismos em placas contendo meio sólido baseia-se na transferência de colônias isoladas e bem desenvolvidas da cultura, evitando-se contaminantes, antes que ocorra o esgotamento significativo dos nutrientes ou o acúmulo em níveis inaceitáveis de metabólitos prejudiciais ao desenvolvimento, no meio de origem (SMITH; ONIONS, 1994).

O método é considerado bastante prático, pois tem baixo custo e os isolados são facilmente recuperados (SMITH; ONIONS, 1994). A grande vantagem da técnica refere-se à experiência adquirida por quem manuseia as culturas, já que estando familiarizado com as características das colônias, pode reconhecer rapidamente contaminação ou alteração morfológica nas mesmas. Mesmo sendo laborioso e exigente no que se refere à mão-de-obra especializada, o método é muito utilizado para manter os micro-organismos viáveis por longos períodos em laboratórios de pesquisa, principalmente para determinados fungos cuja natureza não permite a aplicação de outras técnicas (FIGUEIREDO; PIMENTEL, 1989).

Geralmente, as culturas preservadas por repicagens em tubos inclinados são cobertas por uma camada de óleo mineral ou glicerol. Porém, quando a conservação é realizada em placas de Petri, não é comum esse recobrimento, pois a superfície da placa despende quantidades maiores de óleo. Figueiredo e Pimentel (1989) recomendaram alguns cuidados para utilização do óleo mineral e do glicerol como líquidos de cobertura de culturas, como pureza elevada, esterilização e secagem em forno para eliminação do excesso de água. Além disso, a superfície da cultura deve ser totalmente recoberta pelo líquido utilizado, para se evitar o chamado “efeito pavio”, que é a perda de umidade através da zona descoberta; e as repicagens provenientes das culturas recobertas devem ser realizadas somente após a drenagem total dos líquidos de cobertura. O recobrimento com óleo mineral ou glicerol previne a desidratação do meio de cultura e diminui o oxigênio disponível, reduzindo a atividade metabólica dos micro-organismos, assim, a frequência das repicagens pode ser menor. No entanto, a rotina de repiques torna-se mais trabalhosa pelos inconvenientes gerados pelo manuseio destas substâncias densas e/ou oleosas. Também a concentração de CO₂ no micro-ambiente, ocasionada pela redução das trocas gasosas, pode ter efeito deletério sobre alguns micro-organismos mais sensíveis (FIGUEIREDO; PIMENTEL, 1989). Uma alternativa, para repiques em placa, é o fechamento das mesmas com fita crepe, que reduz a evaporação de água mas não impede a saída do CO₂, visto ser porosa; esta técnica foi adotada pelo Laboratório de Biopolímeros já há vários anos.

A temperatura de armazenamento das culturas repicadas, após seu crescimento, depende do tipo de micro-organismo que está sendo preservado. As amostras armazenadas em temperatura ambiente estão expostas a alterações que elevam a frequência de mutações, o que pode ocasionar a perda das culturas (APARECIDO; FIGUEIREDO, 1997). Para fungos, o estoque em temperaturas entre 5 e 10°C reduz o metabolismo e permite repicagens apenas a cada cinco ou seis meses (FIGUEIREDO; PIMENTEL, 1989). As bactérias apresentam uma redução considerável na taxa de multiplicação quando mantidas em temperaturas de refrigeração (em torno de 4°C), o que minimiza riscos de comprometimento da sua estabilidade genética. Ainda assim, algumas bactérias como *Pseudomonas cepacia*, sobrevivem

melhor se mantidas por este método e armazenadas à temperatura ambiente (FAHY; PERSLEY, 1983).

Apesar de algumas bactérias manterem-se viáveis após sucessivos repiques, pode ocorrer perda da patogenicidade ou virulência ou da capacidade de metabolização de determinados substratos. Por isso, há a necessidade de verificação periódica das características dos isolados, o que constitui uma das desvantagens deste método de preservação (ROMEIRO, 1996). Culturas de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, por exemplo, tendem a perder rapidamente a patogenicidade em meio de cultura devido à acidificação (KIRALY et al., 1974).

Outras desvantagens da manipulação frequente de culturas são possíveis contaminações, troca acidental de etiquetas e dessecação do meio de cultura, que ocorre principalmente quando o armazenamento é feito sob refrigeração, onde a umidade relativa quase sempre é mais baixa que a do meio ambiente, e sem líquido de cobertura (ROMEIRO, 1996).

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). Até a década de 90, acreditava-se que a manutenção em meio sólido inclinado não era adequada para preservar as culturas por mais de 3 meses, com repiques a cada 14 dias (JEANES, et al., 1976). Entretanto, Galindo, Salcedo e Ramírez (1994) descreveram uma técnica de conservação de *Xanthomonas* em meio sólido YM, em tubos inclinados, com repiques mensais durante 11 meses. A bactéria não apresentou mudanças morfológicas nas colônias e nem alteração na sua capacidade de produção de xantana.

Até hoje os pesquisadores da área utilizam o método de repiques periódicos para manutenção de *Xanthomonas*, porém, as bactérias são repicadas a cada trinta dias e estocadas à temperatura de aproximadamente 4°C (HAYNES; WICKERHAM; HESSELTINE, 1955; JEANES et. al., 1976; GUPTA; KAMAT, 1997; SOUZA; VENDRUSCOLO, 1999; VENDRUSCOLO; MOREIRA; VENDRUSCOLO, 2006; ROTTAVA et al., 2009). A técnica é utilizada, juntamente com a liofilização, para a preservação de culturas de *Xanthomonas* do Laboratório de Biopolímeros, disponibilizadas pelo CPACT/EMBRAPA, desde 1996 (SOUZA; VENDRUSCOLO, 1999; DIAZ, 2002;

FORESTI, 2003; BORGES, 2004; PINTO, 2005; BORGES, 2007; KLAIC, 2010).

1.3.1.2 Métodos não-propagativos e semi-propagativos

Quando a manutenção de culturas por transferências constantes não é satisfatória para a preservação das características genéticas do micro-organismo, pode-se utilizar qualquer método não-propagativo de conservação que envolva a suspensão do metabolismo celular a níveis basais, pelo uso de temperaturas e/ou atividade de água muito baixas (HAYNES; WICKERHAM; HESSELTINE, 1955). Existem, ainda, métodos semi-propagativos, que não suspendem totalmente a multiplicação celular microbiana, mas nos quais o desenvolvimento é mínimo.

Técnicas modernas e de alta tecnologia, baseadas no resfriamento e/ou desidratação, como a liofilização, o ultracongelamento (-80°C) e o congelamento em nitrogênio líquido (-196°C), são tão consolidadas na microbiologia que passaram a ser consideradas técnicas convencionais para a manutenção de culturas microbianas. Por outro lado, técnicas tradicionais, de baixa tecnologia, passaram a ser consideradas alternativas.

1.3.1.2.1 Métodos convencionais

Avanços na criopreservação levaram a métodos que permitem a manutenção de uma variedade de células em baixa temperatura, sem problemas com contaminação e perda de viabilidade de culturas. Variações nos métodos de criopreservação são pesquisadas a fim de determinar quais fatores afetam a sobrevivência e a recuperação das espécies mantidas a baixas temperaturas, já que processos de injúria celular podem ocorrer tanto na etapa de congelamento quanto no descongelamento (GOOS; DAVIS; BUTTERFIELD, 1967).

Tanto no congelamento lento quanto no congelamento rápido, ocorre formação de cristais de gelo no interior das células microbianas, que podem promover injúria física às células no momento do descongelamento (GROUT; MORRIS; McLELLAN, 1990). Em condições ótimas de congelamento, os efeitos deletérios são minimizados, uma vez que ocorre formação uniforme de gelo intra e extracelular, impedindo a saída de líquido do interior das células.

Durante o congelamento rápido o tamanho dos cristais formados é menor (GEHRKE; PRALLE; DECKWER, 1992). Velocidade rápida de descongelamento, combinada ao congelamento ótimo de amostras, gera boas condições de recuperação das culturas, pois evita a injúria celular (MERYMAN; WILLIAMS; DOUGLAS, 1977).

A eficácia da criopreservação de micro-organismos é influenciada pela espécie, cepa, tamanho e forma da célula, temperatura de incubação, composição do meio de crescimento, pH, temperatura e duração do armazenamento e meio de recuperação (ASHWOOD-SMITH, 1980; KIRSOP; SNELL, 1984).

Para ser útil em aplicações industriais, é importante que as bactérias permaneçam viáveis, mantenham suas funções celulares e propaguem-se após desidratação, armazenamento e reidratação (MALIK, 1988; POTTS, 2001). Bactérias desidratadas e congeladas também podem perder a viabilidade devido à reidratação, o que pode alterar as estruturas das proteínas (PECCIA et al., 2001). Assim, uma das mais importantes condições é a composição do meio utilizado para suspender os organismos para o congelamento. Embora os micro-organismos congelados sobrevivam sem um aditivo de proteção, a presença de crioprotetores adequados normalmente aumenta a sobrevivência consideravelmente (HUBALEK, 2003; BACK et al., 2008). Estes agentes protegem a célula microbiana dos efeitos deletérios do congelamento e descongelamento (Fig. 3), impedindo a formação de cristais de gelo e estabilizando alguns componentes da membrana celular. Os crioprotetores agem criando condições similares àsquelas geradas pela velocidade ideal de congelamento, promovendo estabilização da membrana plasmática (ANCHORDOGUY et al., 1987).

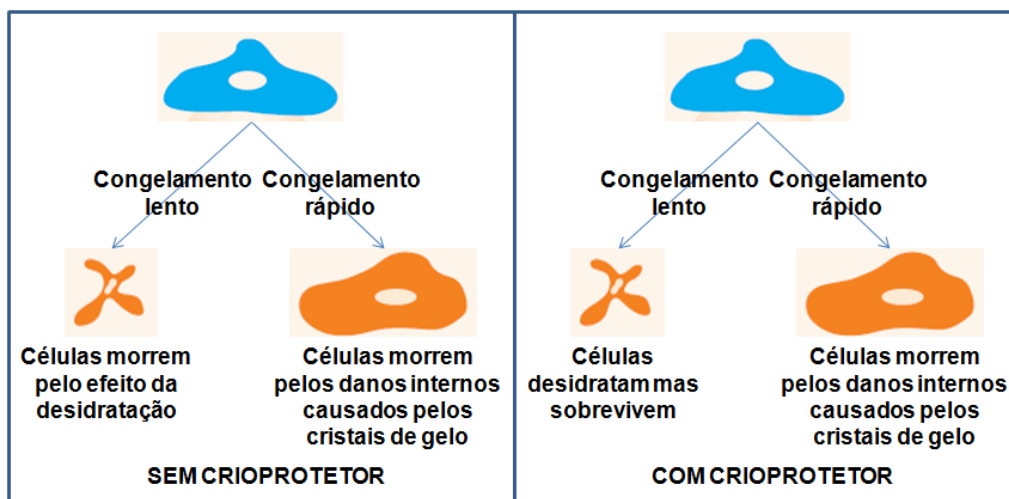


Figura 3 - Efeito de crioprotetores na sobrevivência de células congeladas.
Fonte: Adaptado de Ryan, (1994).

Dentre a variedade de crioprotetores existentes, os mais utilizados, com resultados satisfatórios, são o dimetilsulfóxido, glicerol, soro sanguíneo ou soro de leite, albumina, leite desnatado, peptona, extrato de levedura, sacarose, glicose, metanol, polivinilpirrolidona (PVP), sorbitol e extrato de malte. Para a maioria das células o glicerol é o agente mais empregado porque, geralmente, é menos tóxico que o dimetilsulfóxido (HUBALEK, 2003). Alguns autores recomendam misturas complexas como crioprotetores e que normalmente contém proteínas, glicídeos ou poliálcoois em sua composição (ELLNER, 1978; LI et al., 2006).

A maneira mais correta de adicionar o agente de proteção à suspensão de células é diluí-lo para a concentração desejada no meio fresco de crescimento prévio. Assim, os efeitos potencialmente deletérios das reações químicas que geram calor são diminuídos e garante-se uma exposição uniforme das células ao agente crioprotetor (SIMIONE, 1998). Há, entretanto, recomendações de centrifugação ou outro meio para prévia concentração celular, e posterior suspensão as células na solução crioprotetora (BAIOCCO, 1997). 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%.

1.3.1.2.1.1 Liofilização e secagem por atomização

A manutenção de bactérias pela técnica de liofilização foi realizada pela primeira vez em 1911 por Hammer, que provou que culturas liofilizadas resistiam mais tempo do que culturas preservadas pelos métodos tradicionais da época (HECKLY, 1961). Entretanto, a liofilização de culturas em grande escala iniciou-se somente em 1941 e, desde então, tem-se mostrado bastante adequada para a preservação das características genéticas de microorganismos. Embora a liofilização seja aplicável a muitas bactérias, não pode ser utilizada para *Helicobacter pylori* e *Clostridium botulinum*, em virtude das dificuldades na obtenção de crescimento adequado para a pré-secagem (RUDGE, 1991).

O método consiste de três etapas 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°C, onde ocorre eliminação da água que permaneceu adsorvida às partículas sólidas (ROWE, 1971; BAIOTTO, 1997; SIMIONE, 1998).

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 fluido reidratante, e a facilidade de transporte e distribuição do material biológico, são as vantagens desta técnica de preservação de microorganismos (SUNDARI; ADHOLEYA, 2001). 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; BAIOTTO, 1997).

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 micro-organismo de extrema importância para o controle de mosquitos, devido sua alta atividade larvicida. A biomassa do micro-organismo foi liofilizada e utilizada para a imobilização com alginato de sódio. A contagem de esporos de *B. thuringiensis* permaneceu praticamente inalterada, com diminuição de $4,37.10^8 \text{UFC.mg}^{-1}$ para $4,23.10^8 \text{UFC.mg}^{-1}$ em 10 anos de armazenamento a 4°C. O desenvolvimento da técnica de imobilização em matriz de alginato pode ser facilmente padronizado, sendo vantajoso não apenas para a preservação de *B. thuringiensis* a longo prazo, mas para outros micro-organismos.

Dos métodos descritos para a conservação de *Xanthomonas*, a liofilização tem-se mostrado 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*, as quais apresentaram meia vida média de 0,84 anos. Recentemente, foi realizado um estudo sobre a viabilidade dos micro-organismos pelo Ministério da Agricultura, Florestas e Pescas (MAFF) do Japão, das 256 cepas de *Xanthomonas* avaliadas, todas se apresentaram viáveis após um ano de conservação pela técnica de liofilização (NAGAI et al., 2005).

Um dos estudos mais completos sobre liofilização de inóculos de *Xanthomonas* foi realizado 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. A autora analisou 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. 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.

A secagem por atomização (*spray-drying*) consiste em pulverizar uma suspensão de micro-organismos, a alta velocidade, em uma câmara de ar aquecido a temperaturas de até 200°C. As gotículas formadas passam direto do estado líquido para o sólido em um curto espaço de tempo, devido à grande superfície de contato do material atomizado (CORCORAN et al., 2004). O objetivo de preservar células através desta técnica é permitir o armazenamento em temperatura ambiente. Devido as despesas do armazenamento refrigerado ou congelado, a redução da temperatura de estocagem nem sempre é uma opção vantajosa para aumentar o período de armazenamento. Assim, possíveis mudanças em outras condições, como a umidade relativa do ambiente de armazenamento e a presença de oxigênio, podem ser realizadas (MORGAN et al., 2006).

Desmond et al. (2002) secaram por atomização um suspensão de *Lactobacillus paracasei*, obtendo 100% de sobrevivência após uma semana de armazenamento a 4°C e 15°C. No entanto, houve uma queda de 20-80% da viabilidade celular em quatro semanas para ambas as temperaturas, devido a lesões celulares durante o armazenamento. Danos à membrana celular dos micro-organismos são, muitas vezes, consequência da secagem por atomização, e tem sido atribuídos, principalmente, aos efeitos do calor e desidratação (LIEVENSE et al., 1994).

Silva (2003) estudou a técnica de secagem por atomização para preservar a bactéria *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280, visando a manutenção de sua viabilidade celular e capacidade produtiva de xantana. A autora também avaliou diferentes fluidos para a suspensão e reidratação dos concentrados celulares. A maior taxa de sobrevivência (aproximadamente

98%) foi alcançada pela utilização de 10% de leite desnatado reconstituído como meio de suspensão das células, aliada com temperaturas menores do ar dentro da câmara, armazenamento do material seco a 5°C e água destilada como fluido de reidratação do concentrado celular atomizado.

1.3.1.2.1.2.Ultra congelamento

Culturas cultivadas em tubos contendo meio sólido inclinado podem ser colocadas diretamente no freezer. Fungos inoculados em vários substratos orgânicos, tais como grãos de cereais, blocos de ágar, partes de planta e papel filtro, depois de secos, também podem ser congelados (CARMICHAEL, 1956).

A maioria das culturas de fungos permanece viável quando congeladas em temperaturas de -20° a -80°C. Nakasone, Peterson e Jong (2004), relataram a preservação de ascomicetos e basidiomicetos em tubos contendo 10% de glicerol, por até cinco anos sob ultracongelamento a -80°C. Kitamoto et al. (2002) avaliaram a sobrevivência de 66 fungos, entre eles ascomicetos e zigomicetos, congelados a -85°C com 10% de glicerol; todas as culturas mantiveram-se viáveis por mais de dez anos.

Gibson e Khoury (1986) sugeriram uma técnica de manutenção de *X. campestris* através de ultracongelamento. Uma suspensão de cultura bacteriana foi inoculada em frascos contendo 1mL de meio composto por 3% de peptona, 2% de leite desnatado reconstituído e 4% de glicerol, sendo imediatamente armazenados a -80°C. As cepas preservadas por este método mantiveram sua viabilidade por 28 meses. O método foi 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.

1.3.1.2.1.3 Conservação em nitrogênio líquido

A conservação em nitrogênio líquido 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 micro-organismos por períodos prolongados, sendo utilizado para aqueles que não podem ser liofilizados (SUMBALI; MEHROTRA, 2009).

A técnica consiste em armazenar, em tanques contendo nitrogênio líquido (-196°C), ampolas ou *vials* com suspensão de células do micro-organismo, que estejam no final da fase logarítmica de crescimento, juntamente com um crioprotetor. As células microbianas permanecem viáveis nesta condição de dez a trinta anos, ou mais. A recuperação das culturas ocorre pela sua retirada do tanque de nitrogênio, descongelamento rápido com moderada agitação em banho de água a 37°C e, por fim, seu cultivo convencional (SUMBALI; MEHROTRA, 2009).

O método elimina o inconveniente de constantes repicagens, economiza tempo e trabalho, previne perdas de culturas por contaminação e garante a viabilidade das culturas por tempo ilimitado, pois o metabolismo do micro-organismo torna-se inteiramente inibido. Em alguns casos oferece vantagens significativas sobre a liofilização, como por exemplo, para *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* (SAFRONOVA; NOVIKOVA, 1996).

Faria et al. (1999) avaliaram a viabilidade de 24 isolados de fungos, mantidos na coleção de culturas do Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (EMBRAPA/CENARGEN) preservados por liofilização e em nitrogênio líquido. As taxas de germinação de conídios preservados em nitrogênio líquido diminuíram, em média, menos de 13,3% após 16 a 84 meses de armazenamento. Já para os fungos preservados por liofilização a perda de viabilidade variou, em média, de 28,6% a 94,5%, num período de 29 a 49 meses armazenamento. Os resultados demonstraram a eficiência do método de conservação em nitrogênio líquido na preservação da viabilidade de fungos entomopatogênicos, superando a liofilização.

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, apresentaram 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; SUMBALI; MEHROTRA, 2009) e cuidado por parte dos manipuladores, visto a possibilidade de ocorrer queimaduras acidentais de extrema gravidade.

1.3.1.2.2 Métodos alternativos

Existem ainda 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 (SMITH; ONIONS, 1994). Algumas das técnicas cessam totalmente o metabolismo celular, sendo consideradas não-propagativas, como as realizadas em tiras de papel, pérolas de vidro, porcelana e sílica gel. Já outras permitem alguma multiplicação celular (semi-propagativas), mesmo sendo baixa, como em grãos de cereais e amostras de solo estéril.

1.3.1.2.2.1 Tiras de papel filtro

Tiras de papel filtro comum, previamente esterilizadas, podem ser inoculadas com uma suspensão microbiana, secas em ambiente estéril, transferidas para mini-dessecadores contendo sílica gel e armazenadas em geladeira, por determinado período de tempo. O método é pouco dispendioso e perfeitamente utilizável por instituições ou laboratórios que não dispõem de equipamentos mais sofisticados como liofilizador (ROMEIRO, 1996). Esta tem sido uma das técnicas mais utilizadas pela EMBRAPA/CPACT para preservação das *Xanthomonas*.

A técnica de preservação em tiras de papel tem sido utilizada para armazenar vírus, sem a necessidade de condições especiais, para uso futuro do material genético. Pitcovski et al. (1999) armazenaram cepas do vírus da doença de Gumboro com sucesso em tiras de papel, por 30 dias. Wamburra (2006) inoculou cepas do vírus da doença de Newcastle (VDN) em papéis filtro para posterior reação em cadeia da polimerase (PCR). As cepas mantiveram-se vivas nos papéis por 150 dias a temperatura ambiente. Segundo o autor, o método pode ser usado com segurança para armazenamento e transporte de amostras de VDN aos laboratórios designados para estudos moleculares, sem a necessidade de refrigeração. O autor considera o método desenvolvido útil para o transporte de amostras para outras partes do mundo, se as devidas precauções forem tomadas.

O armazenamento do protozoário *Acanthamoeba* por este método foi descrito por Pens e Rott (2008), tiras de papel filtro foram impregnadas com cistos de amebas e transferidas para um criotubo. As tiras foram desidratadas

a 30°C por 24 horas e após armazenadas em temperatura ambiente. A viabilidade da *Acanthamoeba* foi avaliada e os cistos permanecem viáveis e puros por, pelo menos, um ano.

A preservação de *X. campestris* em tiras de papel foi descrita por Kidby et al. (1977); para tal utilizaram tiras de papel Whatman secas e estéreis, as quais foram imersas numa cultura concentrada do micro-organismo. A técnica mostrou-se adequada para a manutenção não-propagativa dessas cepas, a curto prazo, visto que, 79% das 36 linhagens apresentaram-se viáveis após o período de conservação. Segundo os autores, a produção de xantana pelas bactérias preservadas através desse método foi igual à produção através de outras formas tradicionais de inoculação. Além disso, as células produziram um inóculo viável, sem tendência à degeneração durante o curso da fermentação. Porém, a manutenção não propagativa das culturas estoques em tiras de papel não substitui a preservação por longo prazo no estado liofilizado, pois a cada três meses um novo lote de inóculos precisa ser preparado.

1.3.1.2.2.2 Sílica gel, pérolas de vidro ou porcelana

A preservação de micro-organismos em sílica gel é utilizada, principalmente, para manter fungos esporulados, quando equipamentos para liofilização ou para armazenamento em nitrogênio líquido não estão disponíveis. O *Fungal Genetics Stock Center* tem utilizado esta técnica com sucesso, desde 1962, para preservar cepas de *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa* (NAKASONE; PETERSON; JONG, 2004).

Hunt, Gourevitch e Lein (1958) descreveram métodos para a preservação de culturas microbianas por desidratação com sílica gel anidra. As técnicas têm sido utilizadas para preservar fungos (LANGE; BOYD, 1968) e uma variedade de espécies bacterianas (NORRIS, 1963). Embora o maior emprego deste método seja para a conservação de fungos, Grivell e Jackson (1969) relataram que a técnica também é vantajosa para bactérias, como *Pseudomonas denitrificans*, que permaneceu viável por aproximadamente 27 meses quando armazenada em sílica gel.

Alguns pesquisadores utilizam pérolas de vidro ou porcelana no lugar de sílica gel. As condições de umidade reduzida nas pérolas de vidro ou porcelana

e na sílica gel impedem o crescimento e o metabolismo de fungos e previnem a presença de contaminantes (SMITH; ONIONS, 1994).

1.3.1.2.2.3 Sementes e grãos de cereais

Várias espécies de fungos já foram armazenadas em sementes de aveia, cevada, trigo, centeio e sorgo por até 10 anos (SINGLETON et al., 1992; NAKASONE; PETERSON; JONG, 2004). Para preservar espécies de *Rhizoctonia*, as sementes de cevada, aveia, ou trigo são embebidas em água contendo cloranfenicol ($250\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante uma noite, para auxiliar na desinfecção. A água é removida, as semente são colocadas em frascos com tampa de rosca que são autoclavados por 1 hora a 121°C , por mais de 2 dias consecutivos. Os frascos são inoculados com as culturas e incubados de 23 a 27°C por 7 a 10 dias. Em seguida, as culturas são secas em uma câmara de secagem, as tampas dos frascos são apertadas e envolvidas com Parafilm®; os frascos são armazenados a -25°C (SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991).

Salcedo et al. (1992) avaliaram a conservação de *X. campestris* em sementes de *Brassica oleracea* esterilizadas por radiação gama e lavagens em hipoclorito de sódio. As sementes foram imersas em suspensão contendo $10^9\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ de *Xanthomonas* e armazenadas a 4°C por 21 dias. Embora essa técnica seja de fácil inoculação e preserve a bactéria em seu habitat natural, a viabilidade das células após o período de conservação foi de 10% da inicial.

1.3.1.2.2.4 Solo e areia estéreis

Alguns fungos podem ser preservados facilmente e com sucesso por muitos anos em solo seco ou areia estéreis. Este método tem se mostrado apropriado para fungos como *Septoria*, *Pseudocercospora* (NAKASONE; PETERSON; JONG, 2004) e *Rhizoctonia* (SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991).

Baseia-se na inoculação da suspensão microbiana, que se deseja preservar, no solo ou areia, secos e estéreis, e armazenamento em temperatura ambiente ou sob refrigeração. Solos com capacidade de retenção de água de 20 a 25% têm demonstrado melhores resultados; turfa e argila têm sido os tipos de solos mais utilizados e embora outros substratos como carbonato de cálcio, fosfato ácido de cálcio e serragem tenham sido sugeridos, solo e areia são os mais satisfatórios (FIGUEIREDO; PIMENTEL, 1989). É

importante considerar que o solo apresenta uma microbiota bastante diversificada e sua esterilização demanda cuidados especiais. Lelliott e Stead (1987) recomendam coletar o solo e secá-lo ao ar, peneirá-lo em peneira de orifício de 2mm e autoclavá-lo a 121°C por 1 hora, por 3 dias sucessivos. Já Fahy e Persley (1983) aconselham secar o solo ao ar, adicionar água estéril, autoclavar a 121°C por 1 hora, por 3 dias consecutivos, e testar sua esterilidade em um meio de cultura. Se o solo estiver estéril, o autor recomenda secar em forno a 105°C e armazenar em dessecador até o momento de utilização.

O método de preservação em solo minimiza as chances de variabilidade genética, permite armazenamento à temperatura ambiente por longo período (aproximadamente 5 anos) e é de baixo custo. No entanto, impossibilita a visualização de contaminações (FIGUEIREDO; PIMENTEL, 1989).

Dentre as desvantagens da técnica ainda pode-se citar o crescimento de cepas selvagens, quando o armazenamento é feito em temperatura ambiente, demora no crescimento do micro-organismos após recuperação da cultura, devido à dormência causada pelas condições de desidratação, e também, mudanças morfológicas nas colônias (NAKASONE; PETERSON; JONG, 2004).

1.3.1.2.2.5 Água destilada

A técnica foi primeiramente descrita para fungos patogênicos por Castellani, em 1939. A simplicidade é a grande vantagem do método, embora haja risco de contaminação e a estabilidade genética possa ser comprometida por permitir algum crescimento microbiano. Consiste em autoclavar frascos contendo água destilada, transferir pedaços do meio de cultura para os frascos e armazenar à temperatura ambiente (fungos) ou sob refrigeração (bactérias) (FIGUEIREDO; PIMENTEL, 1989).

Wakimoto et al. (1982) e Van Elsas et al. (2001) mostraram que a bactéria *Ralstonia solanacearum*, isolada de solo, não apenas sobrevive em água estéril por vários meses, mas também se multiplica por várias gerações. Iacobellis e Devay (1986) relataram que outras bactérias fitopatogênicas incluindo *Agrobacterium tumefaciens* e *Pseudomonas syringae* ssp. *syringae* podem sobreviver em água estéril por mais de 20 anos.

Liao e Shollenberger (2003) verificaram que, após 12-16 anos, de armazenamento em água estéril, as bactérias *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas viridiflava*, *Erwinia* spp. e *Cytophaga johnsonae*, associadas com a podridão pós-colheita de produtos frescos, mantiveram-se viáveis e foram capazes de ser recuperadas por plaqueamento da cultura preservada em meio sólido. Outras bactérias como *Xanthomonas campestris*, *Salmonella* spp., *Listeria* spp. e *Yersinia enterocolitica* mantiveram-se viáveis de 3 a 8 anos.

O método Castellani, além de economicamente viável para laboratórios de pequeno porte, tem a capacidade de retomar algumas características macroscópicas das colônias, perdidas durante a repicagem periódica (RODRIGUES; LÍRIO; LACAZ, 1992).

Apesar da simplicidade, a conservação de bactérias em água pura não tem sido adotada por laboratórios de microbiologia, provavelmente devido à falta de dados experimentais baseados em estudos de vários anos para validar a confiabilidade do método. Além disso, embora algumas fitobactérias já terem sido testadas, ainda são escassos os dados sobre manutenção de bactérias de importância clínica, industrial ou ambiental, em água estéril (LIAO; SHOLLENBERGER, 2003).

1.4 Avaliação da viabilidade dos micro-organismos após conservação

Periodicamente deve-se avaliar a viabilidade celular dos micro-organismos frente aos métodos de conservação utilizados, 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 micro-organismos 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 micro-organismos viáveis utilizando um meio de cultura apropriado.

Assim, os métodos para a quantificação de micro-organismos podem ser divididos em dois principais grupos, aqueles que quantificam o número total de células, viáveis e inviáveis, representados pela contagem microscópica, contagem eletrônica, absorvância, 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). A principal desvantagem do método de contagem em placas é o longo período de incubação (normalmente 24-72h) e a habilidade do operador (HOBSON; TOTHILL; TURNER, 1996). Existem, ainda, equipamentos que realizam o espalhamento das diluições nas placas, o que previne a adesão das colônias.

1.5 Escolha do método de preservação

Não existe uma técnica universal para a estocagem e manutenção de micro-organismos. 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 micro-organismo e das condições disponíveis, diferentes métodos de conservação do material biológico podem ser utilizados. Até que um grupo de micro-organismos torne-se totalmente conhecido, não é aconselhável depender de um único método para a manutenção da cultura (HAYNES; WICKERHAM; HESSELTINE, 1955; CAMEOTRA, 2007). A *Organization for Economic Cooperation and Development* recomenda que pelo menos um dos métodos utilizados seja o ultracongelamento ou a liofilização, visto que, para muitas linhagens, estes são

considerados 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; BAIOTTO, 1997; CAMEOTRA, 2007). Simplicidade, ausência de necessidade de equipamento sofisticado, rapidez de execução são características adicionais de um bom método de preservação (ROMEIRO, 1996).

2 Material e métodos

Conduziu-se os experimentos no Laboratório de Biopolímeros, do Centro de Desenvolvimento Tecnológico – Universidade Federal de Pelotas.

2.1 Material

2.1.1 Micro-organismos

Utilizou-se neste estudo três cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*, aqui codificadas como HJ, FH e LF. Manteve-se os estoques das bactérias por liofilização e por repiques periódicos mensais em meio sólido SPA (HAYWARD, 1964), armazenados a 4°C.

2.1.2 Reagentes

Utilizou-se neste trabalho os seguintes reagentes: extrato de levedura (Himedia®), extrato de malte (Acumedia®), glicose anidra P.A. (Synth®), peptona (Himedia®), sacarose P.A. (Synth®), fosfato de potássio dibásico P.A. anidro (Vetec®), sulfato de magnésio P.A. heptahidratado (Synth®), fosfato de amônio monobásico P.A. (Synth®), ácido clorídrico (Fmaia®), padrão de glicose (Merck®), padrão de ramanose (Merck®), padrão de manose (Merck®), padrão de ácido glicurônico (Merck®), clorofórmio (Synth®), metanol (Synth®), ácido acético (Synth®), anisaldeído sulfúrico (Synth®).

2.1.3 Equipamentos

Para a realização dos experimentos utilizou-se os seguintes equipamentos: incubador orbital com controle de temperatura (B. Braun Biotech International®, modelo Certomat BS-1), balança analítica (Quimis®, modelo BG 400), estufa de cultura tipo B.O.D. (Eletrolab®, modelo EL101), estufa para esterilização (Olidex CZ®), estufa para secagem (Fabbe®), autoclave vertical (Prismatec®, modelo CS), cabine de fluxo laminar (Veco®) contendo lâmpada

ultravioleta (UV-C, 253,7nm,), reômetro (HAAKE®, modelo RS150), bico de Bunsen e vidrarias em geral.

2.2 Métodos

2.2.1 Avaliação de métodos clássicos utilizados para a preservação de *X. arboricola*

Avaliou-se a eficiência dos métodos liofilização e repicagens periódicas sobre a viabilidade, capacidade produtiva, viscosidade e composição química da xantana produzida por *X. arboricola* pv pruni cepas HJ, FH e LF.

O fluxograma abaixo representa a estruturação deste experimento.

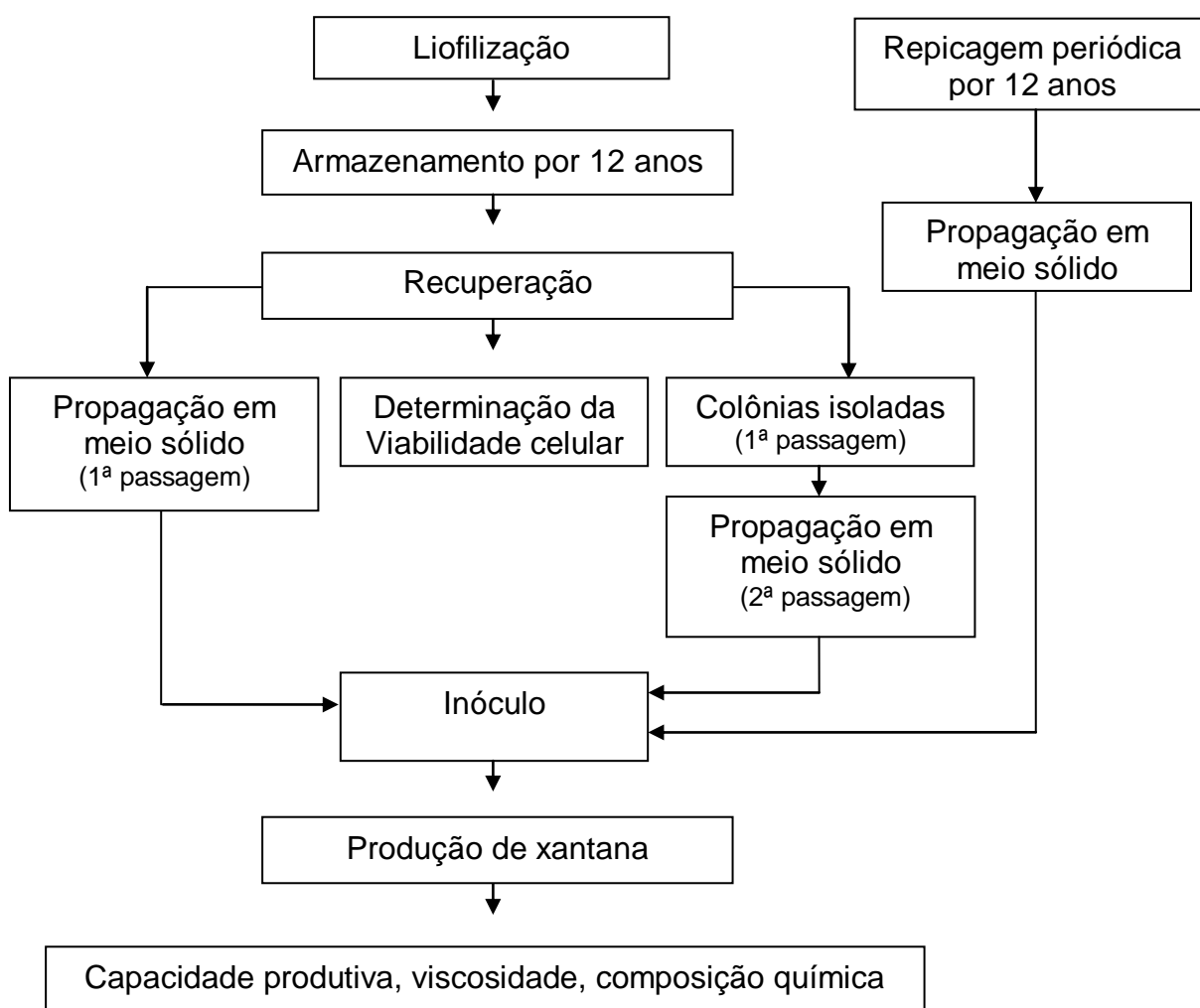


Figura 4 – Estruturação do primeiro experimento.

2.2.1.1 Preservação por liofilização

2.2.1.1.1. Liofilização e armazenamento

Inóculos foram preparados em 1999 por Moreira (2010a) a partir de colônias isoladas de *X. arboricola* pv *pruni* cepas HJ, FH e LF, de acordo com a patente WO2006047845 (VENDRUSCOLO; MOREIRA; VENDRUSCOLO, 2006), contendo $1,4 \cdot 10^9$ UFC.mL⁻¹, $1,0 \cdot 10^9$ UFC.mL⁻¹ e $1,2 \cdot 10^9$ UFC.mL⁻¹, respectivamente. Os inóculos foram diluídos com o crioprotetor na proporção de 60:40 (v/v), perfazendo um volume de 2mL, colocados em frascos tipo penicilina estéreis. Após a liofilização foram armazenados a -18°C e a temperatura ambiente. O crioprotetor utilizado foi composto de triptona, manitol, glutamato sódico, gelatina, fosfato monobásico de sódio e fosfato dibásico de sódio, segundo Ellner (1978).

2.2.1.1.2 Reativação e determinação da viabilidade celular

Reativou-se as culturas de *X. arboricola*, do banco de armazenamento de micro-organismos do Laboratório de Biopolímeros, liofilizadas há 12 anos, mediante reconstituição (reidratação) com meio YM líquido por 20 minutos. Para avaliar a viabilidade das bactérias, retirou-se 100µL dessa suspensão e fez-se diluições decimais até 10⁻⁵, seguidas de plaqueamento das diluições 10⁻² até 10⁻⁵, em meio sólido SPA, e incubação em estufa de cultura. Após, contou-se as colônias típicas de *X. arboricola* e expressou-se o resultado em unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC.mL⁻¹) de suspensão bacteriana reidratada.

2.2.1.1.3 Propagação de células em meio sólido a partir da suspensão bacteriana reativada

Espalhou-se com uma alça de platina 100µL da suspensão bacteriana reativada em placas contendo meio sólido SPA. Incubou-se as placas segundo a patente WO2006047845 (VENDRUSCOLO; MOREIRA; VENDRUSCOLO, 2006). Utilizou-se as placas com crescimento de *X. arboricola* para produção de inóculo, e posterior produção de xantana.

2.2.1.1.4 Propagação de células em meio sólido a partir de colônias isoladas

Plaqueou-se, por esgotamento, uma alçada da suspensão bacteriana recuperada (item 2.2.1.1.2) em meio sólido SPA (1ª passagem). Incubou-se e utilizou-se as colônias isoladas para novo crescimento em SPA (2ª passagem) e posterior produção de inóculo e de xantana (VENDRUSCOLO; MOREIRA; VENDRUSCOLO, 2006).

2.2.1.2 Preservação por repiques mensais

2.2.1.2.1 Repiques mensais

Os repiques mensais têm sido realizados, sistematicamente, a partir de colônias isoladas de *X. arboricola*, em meio sólido SPA seguido de incubação até crescimento de colônias típicas de *Xanthomonas*. Armazena-se cada repique sob refrigeração (4°C) até a próxima transferência para um meio fresco.

2.2.1.2.2 Propagação de células em meio sólido a partir de colônias isoladas

Utilizou-se as colônias isoladas para novo crescimento em SPA e posterior produção de inóculo e de xantana (VENDRUSCOLO; MOREIRA; VENDRUSCOLO, 2006)

2.2.1.3 Produção de xantana e avaliação da capacidade produtiva

Realizou-se a produção de xantana segundo patente WO2006047845, (VENDRUSCOLO; MOREIRA; VENDRUSCOLO, 2006) em duas fases: a primeira para multiplicação celular (produção de inóculo) e a segunda para produção de xantana.

No final do processo recuperou-se a xantana pela insolubilização mediante adição de etanol ao caldo fermentado, na proporção de quatro partes de álcool para uma de caldo. Secou-se o polímero precipitado em estufa para secagem a 56°C, triturou-se e armazenou-se em recipientes de vidro (VENDRUSCOLO; MOREIRA; VENDRUSCOLO, 2006). Avaliou-se a capacidade produtiva de xantana por essas cepas através de métodos gravimétricos e expressou-se o resultado em gramas de polímero seco por litro de caldo fermentado (g.L⁻¹).

Durante a produção do inóculo, avaliou-se a concentração das bactérias nos tempos 0h e 24h de incubação, através de diluições seriadas seguidas de plaqueamento. A determinação da concentração celular inicial (0h) no meio de fermentação foi feita mediante cálculo de diluição, considerando-se o volume de inóculo e o volume final.

2.2.1.4 Viscosidade

Para as análises de viscosidade, preparou-se soluções aquosas de xantana a 3% (m/v) em água deionizada. Agitou-se as soluções por 2 horas à temperatura ambiente. Após 24h, mensurou-se a viscosidade das soluções em reômetro, no módulo rotativo, a 25°C. Utilizou-se sistema placa-placa, sensor PP35TI, e taxa de deformação de 0,01 a 100s⁻¹.

2.2.1.5 Composição química

Avaliou-se a composição química das xantanas sintetizadas pela caracterização qualitativa dos açúcares e ácidos derivados das xantanas produzidas.

Identificou-se os monossacarídeos e ácido derivado nas xantanas sintetizadas por Cromatografia de Camada Delgada (CCDC), de acordo com Moreira, Souza e Vendruscolo (1998). Para tal, hidrolisou-se as xantanas em tubos fechados com solução de ácido clorídrico 2M, na proporção de 3:100 (m/v), em banho-maria a 80°C por 16h. Filtrou-se a solução de xantana hidrolisada e aplicou-se a amostra em cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F254, juntamente com os padrões de glicose, ramanose, manose e ácido glicurônico. Após, eluiu-se com clorofórmio:metanol:ácido acético:água, na proporção de 40:40:10:10 (v/v/v/v). Revelou-se as cromatofolhas com anisaldeído sulfúrico e aquecimento com pistola até completo desenvolvimento das colorações típicas; visualizou-se as bandas e registrou-se imediatamente através de digitalização em *scanner*.

Comparou-se todos os resultados obtidos com os resultados prévios à liofilização, quando a bactéria *X. arboricola* era mantida por repicagem periódica em meio sólido YM (MOREIRA et al., 2001; MOREIRA, 2002; FORESTI, 2003).

2.2.2 Avaliação de métodos alternativos para a preservação de *X. arboricola*

Avaliou-se a influência de métodos alternativos de preservação sobre a viabilidade, capacidade produtiva, viscosidade e composição química da xantana produzida por *X. arboricola* pv pruni cepas HJ, FH e LF.

O fluxograma abaixo representa a estruturação deste experimento.

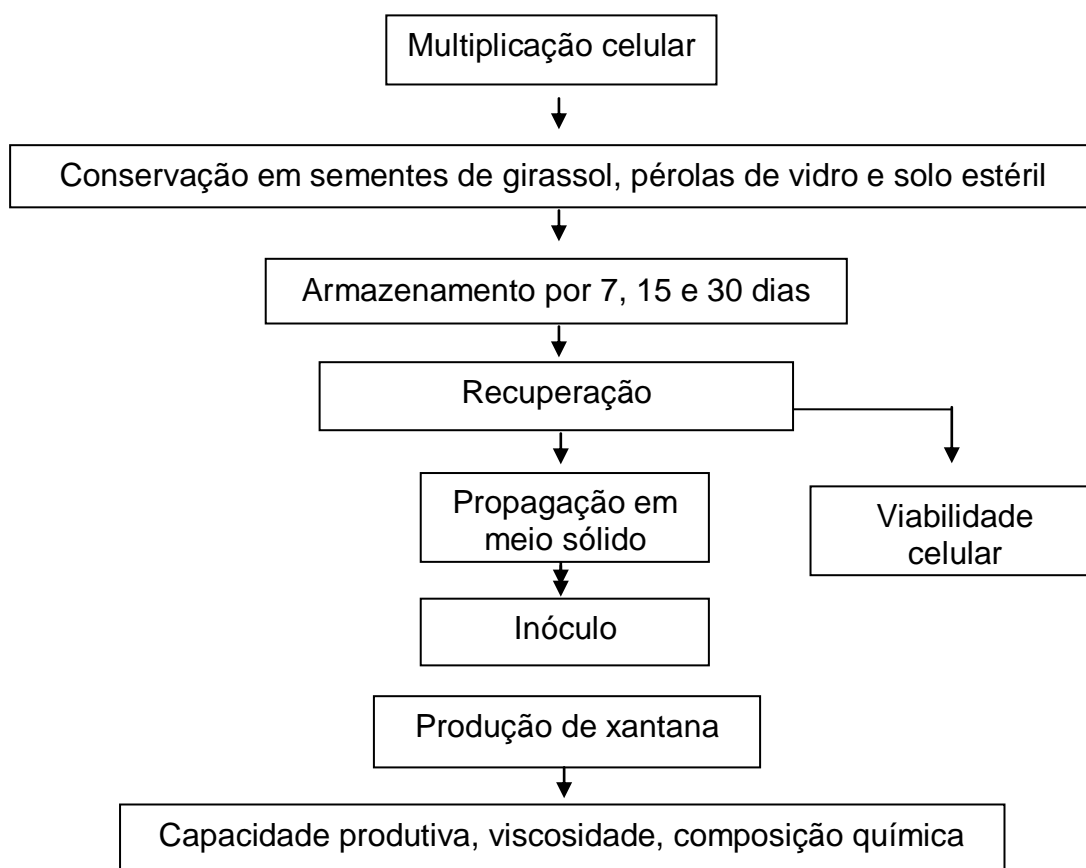


Figura 5 – Estruturação do segundo experimento.

2.2.2.1 Multiplicação celular

Multiplicou-se as células de *X. arboricola* pv pruni cepas HJ, FH e LF, em meio líquido, a partir de colônias isoladas mantidas em meio sólido SPA, segundo os procedimentos preconizados para a produção de inóculo na patente WO2006047845 (VENDRUSCOLO; MOREIRA; VENDRUSCOLO, 2006).

2.2.2.2 Preservação das células de *X. arboricola*

2.2.2.2.1 Armazenamento em sementes de girassol

Desinfectou-se com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) sementes de girassol (*Helianthus annuus*) adquiridas no comércio local. A fim de determinar a concentração ideal desta solução, imergiu-se as sementes em soluções contendo 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5% de cloro, por 20 minutos. Na sequência, enxaguou-se, sob condições assépticas, com água destilada estéril e com meio de cultivo YM. Secou-se sobre placa de Petri, à temperatura ambiente e em ambiente estéril, e armazenou-se em frascos de vidro esterelizados.

Para testar a sobrevivência das células nas sementes desinfectadas com diferentes concentrações do sanitizante, adicionou-se, assepticamente, alíquotas de 50µL de meio contendo células bacterianas a cada semente e secou-se em ambiente estéril. Armazenou-se as sementes em temperatura ambiente, em mini-dessecadores previamente esterilizados, montados em frascos tipo penicilina contendo sílica gel, coberta por uma camada de lã de vidro e um disco de papel filtro (Fig. 6).



Figura 6 – Mini-dessecadores confeccionados com uma camada de sílica gel, uma camada de lã de vidro e cobertos com papel pardo.
Fonte: Autora.

Para avaliar a eficiência do método na desinfecção das sementes de girassol, após três dias da inoculação, colocou-se três sementes de girassol por 20 minutos em 1mL de meio de cultivo YM; espalhou-se uma alíquota de 100µL da suspensão bacteriana em placa contendo meio sólido SPA e incubou-se por 72h. Observou-se o crescimento bacteriano característico e a presença de contaminações nas placas, a fim de selecionar a concentração ideal de NaClO.

Inoculou-se as sementes desinfectadas com novos meios contendo as células bacterianas, que foram acondicionadas, em número de três, nos mini-

dessecadores. Armazenou-se a temperatura ambiente, em dessecadores, por 7, 15 e 30 dias.

2.2.2.2.2 Armazenamento em pérolas de vidro

Inicialmente, lavou-se as pérolas de vidro com água corrente e detergente. Em seguida, enxaguou-se com água destilada estéril, secou-se em estufa e autoclavou-se a 121°C por 1 hora. A seguir, mergulhou-se, assepticamente, grupos de 6 pérolas em 250µL de meio inoculado durante 20 minutos e, em seguida, colocou-se as mesmas sobre papel filtro por aproximadamente 20 minutos, para retirar o excesso de inóculo. Colocou-se, então, as pérolas nos mini-dessecadores e armazenou-se em temperatura ambiente, por 7, 15 e 30 dias.

2.2.2.2.3 Armazenamento em solo estéril

Coletou-se a amostra de solo utilizadas neste trabalho e secou-se em estufa a 100°C *overnight*. Em seguida, determinou-se a capacidade de retenção de água deste solo, colocando-se 5g do solo em um funil contendo papel filtro umedecido, adicionou-se água lentamente até que a primeira gota se formasse no ápice do papel. A quantidade de água adicionada ao solo correspondeu à sua capacidade de retenção de água, que deve ser de 20 a 25% (FIGUEIREIDO; PIMENTEL, 1989).

Após a determinação da capacidade de retenção de água do solo, colocou-se 5g em vidros tipo penicilina, vedou-se e recobriu-se com papel alumínio e papel pardo (Fig. 7). Autoclavou-se os frascos por 1h a 121°C e secou-se em estufa, por dois dias consecutivos.



Figura 7 – Frascos contendo solo e cobertos com papel pardo.
Fonte: Autora.

Em ambiente asséptico, verteu-se lentamente 50µL do inóculo em cada vidro contendo o solo. Os frascos permaneceram abertos dentro da câmara de fluxo por cerca de 5 minutos, até que todo o volume de inóculo fosse absorvido. Vedou-se os vidros e armazenou-se em dessecador, à temperatura ambiente, por 7, 15 e 30 dias.

2.2.2.3 Recuperação das células conservadas, avaliação da viabilidade e propagação em meio sólido

Após cada período de armazenamento, recuperou-se as bactérias inoculadas, mergulhando-se 3 sementes, 3 pérolas e a porção superior do solo que continha a região inoculada, respectivamente, em *eppendorfs* contendo 1mL de meio de cultivo YM por 20 minutos.

Após a recuperação das culturas, avaliou-se a viabilidade celular das mesmas através de diluições seriadas das suspensões bacterianas obtidas. Espalhou-se as diluições 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} em placas contendo meio sólido SPA, incubou-se em estufa por 48h, e realizou-se a contagem das colônias de *X. arboricola* presentes nas placas.

Utilizou-se as bactérias recuperadas a partir das sementes de girassol, pérolas de vidro e solo estéril como pré-inóculo para a produção de xantana, através da propagação em meio sólido SPA, conforme descrito anteriormente.

Fez-se as avaliações da capacidade produtiva, viscosidade e composição química, conforme citado no primeiro experimento (itens 2.2.1.3, 2.2.1.4 e 2.2.1.5).

2.2.3 Análise estatística

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata e os resultados de produção de xantana foram submetidos à análise de variância, com comparação das médias pelo teste de Tukey com 5% de significância.

3 Resultados e discussão

Os resultados obtidos, em acordo com os experimentos realizados, foram estruturados em dois subitens, métodos clássicos e métodos alternativos.

3.1 Influência dos métodos convencionais de preservação de *X. arboricola*

Para determinar-se a adequabilidade dos repiques periódicos e da liofilização para a preservação de *X. arboricola* avaliou-se viabilidade das células liofilizadas, produção, viscosidade e composição química da xantana produzida utilizando os micro-organismos mantidos por liofilização e repique.

3.1.1 Viabilidade celular

As cepas estudadas neste trabalho têm sido mantidas por repiques sucessivos em meio sólido, a partir de colônias clones, há mais de 12 anos, o que mostra a eficiência da técnica para o patovar pruni em termos de manutenção de células viáveis.

Todas as cepas liofilizadas mantiveram-se viáveis após 12 anos de armazenamento a -18°C . Os resultados obtidos podem ser observados na tab.

1.

Tabela 1 – Concentração celular e percentual de sobrevivência de células preservadas por liofilização durante 12 anos

Cepa	Concentração celular inicial (UFC.mL ⁻¹)*	Concentração celular (UFC. mL ⁻¹) após 12 anos	Percentual de sobrevivência (%) após 12 anos de liofilização
HJ	8,4.10 ⁸	2,6.10 ⁵	0,031
FH	6,0.10 ⁸	8,7.10 ⁷	14,5
LF	7,2.10 ⁸	6,2.10 ⁸	86,1

*Cultivo celular diluído com 40% de crioprotetor, obtido a partir de células mantidas por repicagens mensais em meio sólido YM

Anteriormente à liofilização, as linhagens de *X. arboricola* avaliadas neste trabalho eram preservadas, no Laboratório de Biopolímeros, exclusivamente por repicagens periódicas em meio sólido YM (*Yeast Malt*), proposto por Haynes, Wickerham e Hesseltine, em 1955 (SOUZA; VENDRUSCOLO, 1999). Segundo Sutherland (1993), as colônias de *Xanthomonas* são, normalmente, mucóides, brilhantes e arredondadas. Entretanto, Moreira (2010b), verificou que, não raramente, durante as repicagens, surgiam colônias atípicas, não brilhantes e de aspecto ressecado, com formato irregular; tais colônias foram denominadas “crespas”. A identidade dessas colônias foi confirmada por testes bioquímicos e pela capacidade de produção do biopolímero xantana em meio líquido, que não se mostrou alterada, bem como a qualidade do polímero produzido. Contudo, para evitar possíveis perdas das culturas, as bactérias foram liofilizadas. Tessman (2002) introduziu a utilização do meio SPA (*Sucrose Peptone Agar*), sugerido por Hayward (1964), para as repicagens. Observou-se que as colônias repicadas neste meio eram maiores, com coloração mais clara e maior viabilidade. Assim, os repiques mensais para preservação das cepas de *Xanthomonas* mantidas no Laboratório de Biopolímeros passaram a ser realizados sistematicamente no meio sólido SPA.

A cepa LF apresentou maior resistência às condições da técnica de liofilização e de armazenamento, com uma redução na concentração celular de apenas 13,9%. A cepa HJ, ao contrário, teve aproximadamente 99% de morte celular; o que não inviabiliza a técnica, levando-se em consideração o elevado

número ainda restante de células viáveis. Estes resultados não parecem estar relacionados com a capacidade produtiva ou qualidade do biopolímero xantana produzido. Sabe-se que os polímeros polissacarídicos possuem função protetora sobre os micro-organismos, tanto no processo de liofilização quanto na reidratação das células (BACK et al., 2008). Mas, no caso das cepas analisadas, uma maior capacidade produtiva (que já pode ocorrer durante a fase de crescimento celular) ou viscosificante do polímero produzido não parece ter sido a causa de maior índice de sobrevivência, visto que a cepa HJ, para a qual se determinou produção e viscosidade medianas, em relação às outras cepas, teve o menor índice de sobrevivência das células.

A sobrevivência durante a liofilização e o armazenamento depende, principalmente, das características dos micro-organismos, 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; BAIOTTO, 1997). Dentre estes fatores, o único modificado neste estudo foi o micro-organismo. Assim, pode-se afirmar que a viabilidade celular de *X. arboricola* pv *pruni*, foi cepa-dependente. Mesmo o genoma de *Xanthomonas* sendo caracterizado por uma elevada estabilidade, o que facilita sua conservação (MARTÍNEZ-SALAZAR et al., 1993), observou-se que podem ocorrer variações fenotípicas em cepas da mesma espécie, principalmente em relação à quantidade e qualidade de xantana produzida (NITSCHKE; THOMAS, 1995; MOREIRA et al., 2001; ANTUNES et al., 2003; LUVIELMO; VENDRUSCOLO; SCAMPARINI, 2007; BORGES et al., 2009a), patogenicidade, tamanho e coloração de colônias (KAMOUN; KADU, 1990; NITSCHKE; THOMAS, 1995; RAIMANN et al., 2002). Esta demonstração de ocorrência de variações diversas entre cepas corrobora a determinação de que a sobrevivência das bactérias foi cepa-dependente.

Os demais fatores que afetam a sobrevivência dos micro-organismos após a liofilização foram ajustados, neste trabalho, para que contribuíssem para manutenção das células. A literatura cita o meio YM como sendo o mais adequado para o cultivo de *Xanthomonas* (HAYNES, 1955; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; VENDRUSCOLO; MOREIRA; VENDRUSCOLO, 2006), por isso, ele foi utilizado para a multiplicação das bactérias, previamente à liofilização, e também para a reidratação (reativação) do material liofilizado.

A adição de 40% de crioprotetor ao meio de suspensão das cepas e o armazenamento das culturas a -18°C também forneceram condições para que as bactérias liofilizadas permanecessem viáveis. O uso de agentes crioprotetores apropriados aumenta a sobrevivência consideravelmente, pois protegem a célula microbiana dos efeitos deletérios das 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. Para os autores, os principais motivos para o sucesso da liofilização foram a adição do crioprotetor, que tende a diminuir a atividade de água, e o armazenamento a baixa temperatura.

Back et al. (2008) avaliaram a viabilidade de células de *Beijerinckia* sp 7070 liofilizadas com e sem a adição de crioprotetor, após uma década de armazenamento a -4°C . As células tiveram 100% de sobrevivência com crioprotetor, e sem crioprotetor ocorreu uma redução de 78% do número de células viáveis. A solução crioprotetora utilizada mostrou-se muito eficiente, e a elevada sobrevivência, mesmo na ausência de crioprotetor, deve-se à presença do exopolissacarídeo produzido pela bactéria durante crescimento que, neste caso, atuou como crioprotetor.

Baiocco (1997) também utilizou YM para a multiplicação celular de *X. campestris* pv *manihotis* e posterior suspensão das células para serem liofilizadas. Entretanto, para recuperação, empregou YM adicionado de 10% de leite desnatado reconstituído como meio de suspensão; as células bacterianas apresentaram 80% de sobrevivência após 12 meses de liofilização, valor semelhante ao verificado para a cepa LF de *X. arboricola* pv *pruni*, cerca de 86%, após 12 anos de preservação. Segundo Baiocco (1997), as proteínas, o soro de leite e a lactose presentes no leite desnatado fornecem uma matriz protetora para as macromoléculas celulares durante a reidratação. A autora ainda constatou que a melhor temperatura para o armazenamento da cepa liofilizada, independente dos meios de crescimento e suspensão utilizados, foi a temperatura abaixo da temperatura do congelamento. Neste trabalho verificou-se resultado semelhante, pois o armazenamento das culturas liofilizadas em temperatura ambiente comprometeu a sobrevivência das três cepas, causando morte celular total após 12 anos. A Fig. 8 mostra a diferença

de coloração entre as culturas liofilizadas armazenadas a -18°C e em temperatura ambiente.

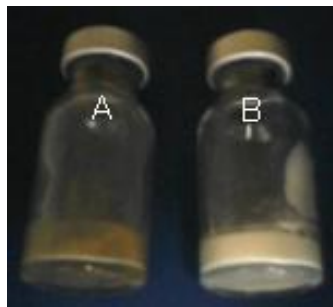


Figura 8 – Frascos contendo células de *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* liofilizadas armazenadas à temperatura (A) ambiente e armazenadas a -18°C (B).

Fonte: Autora

Além disso, Baiocco (1997) mostrou que o tempo de reidratação também determina os resultados obtidos. Reidratação demasiado longa pode induzir a resultados falsamente inferiores. A taxa de sobrevivência celular foi maior quando a cultura liofilizada foi reidratada rapidamente, por 10 ou 20 minutos, antes do repique em meio sólido.

O baixo percentual de sobrevivência, após a liofilização, da cepa HJ, principalmente, pode ser atribuído às características específicas desta linhagem, que apresentou maior sensibilidade ao processo de liofilização. Normalmente, são observados efeitos deletérios na população inicial de micro-organismos de uma amostra liofilizada, pois ficam sujeitos a danos e injúrias provocados pelas etapas de congelamento, desidratação e secagem, que compõem a técnica (HECKLY, 1961; CASTRO; TEIXEIRA; KIRBY, 1997). Mudança na permeabilidade da parede celular dos micro-organismos, quebra das moléculas de DNA e RNA e danos nas membranas bacterianas, acarretando perda de proteínas superficiais e conteúdo citoplasmático, são os principais responsáveis pela diminuição da viabilidade após a liofilização (BRENNAN et al., 1986; WANG, et al., 2009).

No entanto, a injúria representa uma condição temporária das células liofilizadas, que ao recuperarem seu estado fisiológico natural, voltam a multiplicar-se normalmente e não mais apresentam qualquer característica que permita distingui-las das células originais (BEUCHAT, 1978; BAIOTTO, 1997), como foi verificado com a cepa HJ, neste trabalho. Mesmo com uma redução

de mais de 99% em sua concentração celular, a cepa HJ apresentou crescimento considerável em meio líquido YM após 24h. Além disso, quando a cepa HJ foi recuperada e teve duas passagens por meio sólido SPA, observou-se que a capacidade multiplicativa das células em meio líquido YM, no período de 24h, aumentou consideravelmente (tab. 2). Os resultados comprovaram que a injúria celular causada pela técnica de liofilização é transitória, sendo que, após a readaptação das culturas recuperadas em meio nutritivo, elas retornam ao seu estado de desenvolvimento normal. A cepa LF teve o mesmo comportamento da HJ. A cepa FH, entretanto, apesar de ter multiplicação significativa em 24h de cultivo em YM, como as outras duas cepas analisadas, demonstrou sua readaptação já com uma passagem no meio nutritivo, pois quando ocorreu uma segunda passagem no meio de cultivo sólido, seu crescimento celular em 24h em meio líquido não foi expressivamente superior ao ocorrido com apenas uma passagem em meio sólido.

A tabela abaixo apresenta uma comparação entre a concentração inicial, no tempo zero de incubação, e a concentração final, em 24h, das suspensões celulares das diferentes cepas em meio de cultivo YM, preservadas pelos métodos convencionais avaliados neste trabalho.

Tabela 2 – Crescimento celular de *X. arboricola* em 24h de cultivo em meio líquido YM

Cepa	Técnica de Preservação	Concentração celular inicial (UFC.mL ⁻¹)	Concentração celular final (UFC.mL ⁻¹)
HJ	Liofilização	6,0.10 ⁸	8,8.10 ⁸
	Liofilização e repique em SPA*	6,4.10 ⁸	1,3.10 ⁹
	Repique mensal em SPA	7,0.10 ⁸	4,0.10 ⁹
FH	Liofilização	1,9.10 ⁹	6,4.10 ⁹
	Liofilização e repique em SPA*	2,0.10 ⁹	4,9.10 ⁹
	Repique mensal em SPA	9,0.10 ⁸	7,0.10 ⁹
LF	Liofilização	1,6.10 ⁸	5,0.10 ⁹
	Liofilização e repique em SPA*	5,0.10 ⁸	3,0.10 ⁹
	Repique mensal em SPA	6,0.10 ⁷	2,8.10 ⁹

*Células liofilizadas reativadas e, na sequência, submetidas a duas passagens em meio sólido SPA

De acordo com a tab. 2, o método de repicagens periódicas em meio sólido SPA demonstrou menor eficiência para a cepa LF, resultando em concentração celular inicial menor, quando comparado aos valores obtidos após preservação pela liofilização ou liofilização seguida de repique em meio sólido. No entanto, após 24h de cultivo em meio líquido YM, a concentração celular foi equivalente para as três técnicas.

3.1.2 Produção de xantana

Quando se avalia a eficiência de um método de preservação de *Xanthomonas*, não só a sobrevivência das células durante o período de armazenamento, como também sua capacidade produtiva de xantana deve ser considerada.

Neste trabalho, a produção de xantana foi dependente da cepa utilizada no processo fermentativo e da técnica pela qual esta linhagem foi conservada, como mostra a tab. 3.

Tabela 3 – Produção de xantana* por células preservadas por técnicas convencionais, comparada com valores prévios (controle)**

Cepa	Técnica de preservação	Produção de xantana (g.L ⁻¹)
HJ	Controle	5,1
	Liofilização	6,4±0,20 ^b
	Liofilização e repique em SPA***	6,0±0,20 ^c
	Repique mensal em SPA	7,6±0,20 ^a
FH	Controle	5,6
	Liofilização	5,8±0,12 ^b
	Liofilização e repique em SPA***	6,5±0,11 ^a
	Repique mensal em SPA	5,1±0,29 ^c
LF	Controle	4,2
	Liofilização	3,6±0,02 ^c
	Liofilização e repique em SPA***	7,6±0,06 ^a
	Repique mensal em SPA	6,2±0,18 ^b

*Média de três análises ± desvio padrão. Letras diferentes, para a mesma cepa, indicam diferença estatística pelo teste de Tukey em nível de significância de 5% de probabilidade.

**Produção de xantana (g.L⁻¹) por cepas preservadas por repiques mensais em meio sólido YM, previamente à liofilização

***Células liofilizadas reativadas e, na sequência, submetidas a duas passagens em meio sólido SPA

Comparando-se o rendimento de xantana antes e depois da liofilização, observou-se que a cepa FH não teve sua capacidade produtiva afetada pela liofilização e armazenamento por 12 anos, mantendo seu rendimento em torno de 5,8g.L⁻¹ (FORESTI, 2003)¹. Já a produção de xantana pela cepa LF

¹ Para comparação, selecionou-se os resultados de trabalhos realizados em períodos o mais próximo à liofilização das cepas empregadas neste estudo; sendo que os resultados foram obtidos previamente à data de publicação citada.

apresentou uma redução de, aproximadamente, 15% após a liofilização (MOREIRA, 2002).

Os resultados obtidos para a técnica de repiques mensais em meio sólido SPA parecem, inicialmente, proporcionar melhores resultados que a liofilização, em termos de produção de xantana, para as cepas HJ e LF. Entretanto, a liofilização, seguida da recuperação das culturas e duas passagens em meio sólido SPA da cepa LF, ocasionou um incremento na produção, demonstrando que os danos causados pela liofilização podem ser revertidos após passagem adicional em meio sólido adequado. Assim, podemos afirmar que para a cepa HJ a preservação por repique em meio sólido SPA foi mais eficiente; a cepa LF teve sua capacidade produtiva ao longo dos anos melhor preservada ao se utilizar a técnica de liofilização; para a cepa FH, ambos métodos foram adequados.

Conforme discutido por García-Ochoa et al. (2000) e confirmado por outros autores, a produção de xantana é cepa-dependente (MOREIRA et al., 2001; BORGES, 2004; TEIXEIRA, 2005; BORGES, 2007). Rottava et al. (2009) avaliaram a produção de xantana pelas cepas 1167, 254 e 607 de *X. campestris* pv *campestris*, em incubador agitador, e também verificaram que a produção de xantana depende da linhagem utilizada. Seus valores de produção assemelham-se ao deste trabalho, variando de 5,9 a 7,5g.L⁻¹.

A literatura cita que a concentração inicial do inóculo utilizado no processo fermentativo influencia no rendimento da xantana (PAN; MOREIRA; VENDRUSCOLO, 2000). Até determinados valores, aumentos na concentração do inóculo ocasionaram incrementos, nem sempre significativos estatisticamente, na produção de xantana. Entretanto, existiam faixas de concentrações que resultavam em valores equivalentes. Neste trabalho, as concentrações dos inóculos variaram de $1,2 \cdot 10^8$ a $9,0 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹, diferença que segundo Pan, Moreira e (2000) não resultaria em produções diferenciadas. Como mostra a tab. 4, que compara, a concentração inicial de células no meio de fermentação e a produção de xantana, em função do método de preservação utilizado, concentrações iniciais menores podem gerar uma maior produção, comprovando a influência do método de preservação não só na viabilidade celular, mas também na capacidade produtiva.

Tabela 4 - Relação entre número inicial de células e produção de xantana*, comparados a valores prévios (controle)**

Cepa	Técnica de preservação	Concentração celular inicial (UFC.mL ⁻¹) no meio de fermentação	Produção de xantana (g.L ⁻¹)
HJ	Controle	2,0.10 ⁸	5,1
	Liofilização	1,2.10 ⁸	6,4±0,20 ^b
	Liofilização e repique em SPA***	1,8.10 ⁸	6,0±0,20 ^c
	Repique mensal em SPA	5,6.10 ⁸	7,6±0,20 ^a
FH	Controle	1,4.10 ⁸	5,6
	Liofilização	9,0.10 ⁸	5,8±0,12 ^b
	Liofilização e repique em SPA***	6,8.10 ⁸	6,5±0,11 ^a
	Repique mensal em SPA	5,3.10 ⁸	5,1±0,29 ^c
LF	Controle	1,7.10 ⁸	4,2
	Liofilização	7,0.10 ⁸	3,6±0,02 ^d
	Liofilização e repique em SPA***	1,6.10 ⁸	7,6±0,06 ^a
	Repique mensal em SPA	3,9.10 ⁸	6,2±0,18 ^b

*Média de três análises ± desvio padrão. Letras diferentes, para a mesma cepa, indicam diferença estatística pelo teste de Tukey em nível de significância de 5% de probabilidade.

**Concentração celular e produção de xantana (g.L⁻¹) por cepas preservadas por repiques mensais em meio sólido YM, previamente à liofilização

***Células liofilizadas reativadas e, na sequência, submetidas a duas passagens em meio sólido SPA

3.1.3 Viscosidade

A análise de viscosidade das soluções aquosas de xantana foi realizada para avaliar a influência dos diferentes métodos de preservação na qualidade dos polímeros. Todas as xantanas analisadas mantiveram comportamento pseudoplástico característico, isto é, a viscosidade diminuiu com o aumento da taxa de cisalhamento (Fig. 9). Este comportamento é comum em soluções de

polissacarídeos microbianos (CACIK; DONDO; MARQUÉS, 2001; RAO; SURESH; SURAIISKUMAR, 2003) e o esperado para xantana (SANDFORD et al., 1977).

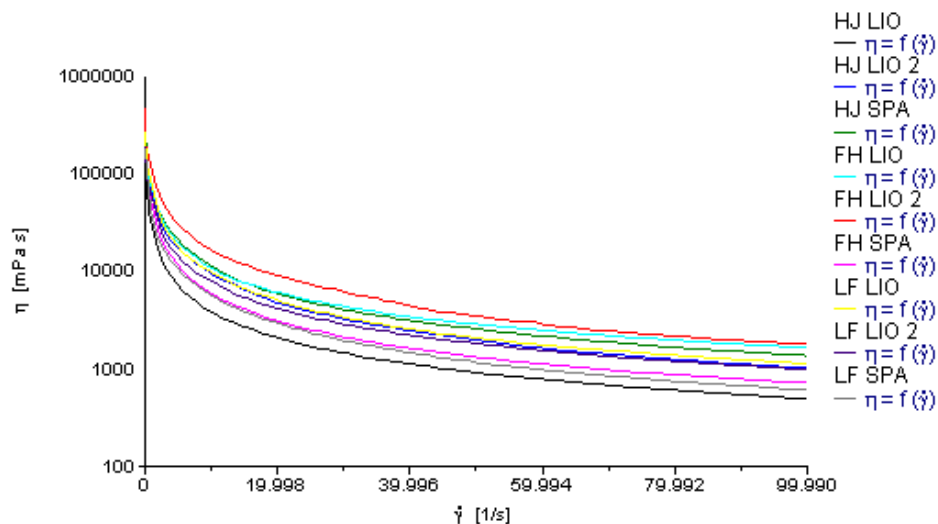


Figura 9 - Viscosidade (mPas) vs taxa de deformação (s^{-1}), a $25^{\circ}C$, de soluções aquosas de xantana a 3% (m/v), produzidas por cepas preservadas por liofilização (LIO), liofilização e reativação com duas passagens em meio sólido SPA (LIO 2) e por repicagem mensal em meio sólido SPA (SPA).

Os autores que têm estudado as diversas cepas de *X. arboricola* pv pruni verificaram diferenças na viscosidade das soluções aquosas das xantanas produzidas, demonstrando ser a viscosidade cepa-dependente (ANTUNES et al. (2000b), MOREIRA et al., 2001; FORESTI, 2003, BORGES, 2007). De Vuyst e Vermeire (1994) e Nitschke, Rodrigues e Schinatto (2001), trabalhando com outros patovares, também verificaram que o comportamento reológico da xantana é influenciado pela variação genética das cepas de um mesmo patovar.

A tab. 5 mostra a viscosidade aparente das soluções aquosas de xantana a 3% (m/v), produzidas pelas cepas preservadas nos diferentes métodos, em uma taxa de cisalhamento de $10s^{-1}$. Os valores de viscosidade variaram de 3.635 a 16.399mPas.s, nas condições citadas.

Tabela 5 - Viscosidade, a 25°C e 10s⁻¹, das soluções aquosas a 3% (m/v) de xantanas produzidas por células preservadas por técnicas convencionais, comparada com valores prévios (controle)*

Técnica de preservação	Viscosidade (mPa.s)		
	HJ ^a	FH ^a	LF ^b
Controle	7.600	4.500	11.000
Liofilização	3.635	9.911	7.790
Liofilização e repique em SPA**	8.596	16.399	9.700
Repique mensal em SPA	11.085	5.451	5.873

*Viscosidade das soluções aquosas a 3% (m/v) de xantanas produzidas por cepas preservadas por repiques mensais em meio sólido YM, previamente à liofilização

**Células liofilizadas reativadas e, na sequência, submetidas a duas passagens em meio sólido SPA

^aFORESTI, 2003; ^bMOREIRA, 2002

Os resultados também demonstraram que a viscosidade das soluções aquosas de xantana, neste trabalho, foi dependente do método de preservação empregado para a manutenção das cepas, e que as cepas responderam diferentemente aos métodos testados. Analisando individualmente os valores de viscosidade das xantanas, observou-se que, com exceção da cepa LF, que sofreu redução de aproximadamente 47%, os repiques sucessivos no meio SPA resultaram em aumento da viscosidade; como anteriormente à liofilização os repiques eram realizados no meio YM, depreende-se que o meio SPA, apesar de favorecer a produção, reduz a viscosidade da xantana produzida pela cepa LF. A técnica de liofilização diminuiu para 3.635mPa.s, aproximadamente a metade da viscosidade do polímero da cepa HJ previamente à liofilização, que era de 7.600mPa.s (FORESTI, 2003). Para a cepa LF observou-se uma redução menos expressiva, enquanto que a cepa FH, paradoxalmente, teve um inesperado aumento de 120% na viscosidade do polímero produzido. Para as cepas HJ e FH, que tiveram aumento de viscosidade após repiques no meio nutritivo SPA, a passagem adicional nesse meio induziu a um aumento na viscosidade; este comportamento pode ser atribuído a ação positiva do meio sólido SPA sobre o metabolismo da bactéria. A cepa LF, que não demonstrou boa adaptação ao meio SPA durante os repiques sucessivos, teve a viscosidade reduzida após a passagem adicional em SPA, confirmando sua melhor adaptação ao meio YM.

3.1.4 Composição química

As xantanas produzidas por cepas preservadas pelos métodos convencionais avaliados também continham ramnose, manose, glicose e ácido glicurônico, como o esperado para o patovar pruni.

Sabe-se que a grande maioria das espécies de *Xanthomonas* apresenta glicose, manose e ácido glicurônico em sua composição (ORENTAS; SLONEKER; JEANES, 1963; CADMUS et al., 1976). Entretanto, dependendo do micro-organismo, outros açúcares podem ser encontrados (ORENTAS; SLONECKER; JEANES, 1963). Este fato, inclusive, ajudou a fundamentar a reclassificação do gênero (MOREIRA, 2001; SADDLER; BRADBURY, 2005). Os autores que têm estudado a produção de xantana por *X. arboricola* verificaram a presença desses mesmos compostos, além de ramnose, na composição química desta espécie, que difere, assim, da xantana produzida por *X. campestris* (VENDRUSCOLO et al., 2000, ANTUNES, 2000; MOREIRA et al., 2001; BORGES, 2007).

Vários fatores, além do micro-organismo, podem influenciar a composição química da xantana produzida, principalmente no que diz respeito ao teor de acetil e piruvato, mas alterações nas proporções dos monômeros (monossacarídeos e ácido glicurônico) podem ser observadas. Entretanto, pequenas alterações nem sempre são detectadas por CCDC. Moreira et al. (2001), estudando a composição química de xantana produzida por diversas cepas de *X.arboricola*, verificaram que os carboidratos encontravam-se em diferentes proporções; entretanto, polímeros da cepa 06, produzidos em diferentes tempos de fermentação, com viscosidades significativamente diferentes, apresentaram um mesmo perfil cromatográfico em CCDC. Já Klaic (2010) detectou diferenças nos polímeros produzidos em pH diferentes, sendo verificado mais manose no polímero produzido em pH 7,0 e ramnose nos polímeros produzidos em pH 7,0 e 9,0.

3.2 Influência dos métodos alternativos de preservação de *X. arboricola*

Avaliou-se a influência da preservação em sementes de girassol, pérolas de vidro e solo estéril na viabilidade celular, produção, viscosidade e composição química da xantana.

Para a preservação em sementes, antes da inoculação, as sementes devem ser previamente desinfetadas 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.

A Fig. 10 mostra as placas contendo meio sólido com o crescimento microbiano verificado nas sementes desinfetadas com cinco concentrações de NaClO.



Figura 10 - Placas com crescimento de *Xanthomonas arboricola* pv pruni e contaminação, indicada pelas setas.

Fonte: Autora.

Independentemente da concentração da solução de hipoclorito utilizada para a lavagem das sementes observa-se que todas elas apresentaram, após reativação da cultura inoculada, crescimento característico de *Xanthomonas*. 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 estas concentrações não garantiram uma completa desinfecção das mesmas. Em decorrência das contaminações, verificou-se menor crescimento que nos demais tratamentos.

Entre as soluções desinfectantes 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, pela análise visual; provavelmente devido a um aumento na permeabilidade da cutícula da semente, que permitiu uma maior penetração do micro-organismo.

Para preservar espécies do fungo *Rhizoctonia* em sementes de cevada, aveia, e trigo, Sneh, Burpee e Ogoshi (1992) descrevem que as sementes devem permanecer uma noite embebidas em uma solução de cloranfenicol ($250\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e depois serem autoclavadas por 1 hora a 121°C por mais de 2 dias consecutivos, para garantir a completa desinfecção das mesmas. No entanto, sementes mais sensíveis, podem não suportar o calor excessivo da autoclavagem, sofrendo degradação de componentes que, quando presentes, contribuem com a preservação do micro-organismo. A técnica utilizada neste trabalho é, comparativamente, mais simples, rápida e econômica.

Para a técnica de preservação em solo estéril determinou-se, inicialmente, a capacidade de retenção de água da terra utilizada, pois a literatura cita que valores entre 20 a 25% de retenção são ideais para a absorção do inóculo (FIGUEIREIDO; PIMENTEL, 1989). O solo utilizado neste estudo apresentou 24% de retenção de água.

3.2.1 Viabilidade celular

As três cepas avaliadas apresentaram-se viáveis após 30 dias de armazenamento pelas técnicas alternativas testadas (tab. 6). A sobrevivência das células foi dependente do método de preservação, do período de armazenamento e da linhagem utilizada, nesta ordem.

Tabela 6 – Concentração celular e percentual de sobrevivência de células preservadas por técnicas alternativas

Cepa	Concentração celular inicial (UFC.mL ⁻¹)	Técnica de preservação	Concentração celular (UFC.mL ⁻¹) e percentual de sobrevivência					
			7 dias		15 dias		30 dias	
HJ	3,0.10 ⁹	Sementes de girassol	9,3.10 ⁵	0,031	8,4.10 ⁵	0,028	6,0.10 ⁵	0,020
		Pérola de vidro	6,0.10 ³	0,078	2,3.10 ³	0,0008	2,0.10 ³	0,00007
		Solo estéril	6,9.10 ⁵	0,023	3,0.10 ⁵	0,010	2,1.10 ⁵	0,007
FH	6,0.10 ⁹	Sementes de girassol	2,4.10 ⁶	0,040	1,6.10 ⁶	0,026	2,1.10 ⁵	0,003
		Pérola de vidro	5,8.10 ³	0,00006	3,8.10 ³	0,00004	2,3.10 ³	0,00002
		Solo estéril	6,6.10 ⁵	0,011	4,1.10 ⁵	0,007	2,5.10 ⁵	0,004
LF	3,1.10 ⁹	Sementes de girassol	2,2.10 ⁶	0,071	1,8.10 ⁶	0,058	3,4.10 ⁵	0,011
		Pérola de vidro	7,9.10 ³	0,0002	4,4.10 ³	0,0001	2,0.10 ³	0,00006
		Solo estéril	4,8.10 ⁵	0,042	9,9.10 ⁴	0,007	7,3.10 ⁴	0,002

Considerando-se que o número inicial de células inoculadas nas sementes, pérolas e terra foi em torno de 10^9 UFC.mL⁻¹, com uma pequena variação entre as cepas, observou-se que a técnica alternativa de conservação em sementes manteve o maior percentual de sobrevivência de células, para as três cepas avaliadas. Sugere-se que a presença de nutrientes nas sementes forneceu condições micro-ambientais satisfatórias para preservar a viabilidade das *Xanthomonas*. Salcedo et al. (1992) também avaliaram a conservação de *Xanthomonas* em sementes, no entanto utilizaram *X. campestris* e sementes de couve (*Brassica oleracea*). Um número de aproximadamente $1,3.10^4$ células foi inoculado por semente. As sementes foram mantidas a 4°C durante 21 meses, a viabilidade bacteriana mostrou oscilações, mas após 20 meses foi de 10% do inicial. Segundo os autores, o método apresenta como vantagens a fácil inoculação, ausência de transferências, menor risco de contaminação, além de melhorar a taxa de crescimento das bactérias no meio de cultivo, após recuperação.

O sucesso da preservação em solo envolve inúmeros aspectos, como tipo de solo utilizado, tipo de micro-organismo, condições da cultura a ser estocada, esterilização e conteúdo de água do solo, conteúdo de gases no frasco de armazenamento e condições ambientais sob as quais a técnica foi conduzida (SHEARER; ZEYEN; OOKA, 1974).

Neste trabalho foram adotadas algumas precauções para que a *Xanthomonas* permanecesse viável após a estocagem em solo. A cultura inoculada no solo foi multiplicada em meio nutriente e condições de temperatura, tempo e agitação adequadas para o crescimento de *Xanthomonas*, a inoculação foi feita a partir de elevada concentração de células, o solo foi esterilizado por 1h a 121°C, por dois dias consecutivos, e todas as etapas da técnica foram realizadas em condições assépticas, para garantir somente a presença da bactéria em questão.

A tab. 6 mostra que as cepas HJ e FH, quando preservadas em solo, tiveram uma diminuição muito pequena do percentual de sobrevivência em cada período de armazenamento. Já a cepa LF teve uma diminuição maior da viabilidade celular durante os 30 dias de armazenamento.

A manutenção de micro-organismos em solo ou areia tem se mostrado apropriada para fungos como *Septoria* (SHEARER; ZEYEN; OOKA, 1974),

Pseudocercospora e *Rhizoctonia* (SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991). Shearer, Zeyen e Ooka (1974) estocaram espécies de *Septoria* durante 20 meses a 4°C, no escuro; as espécies permaneceram viáveis sem perder sua capacidade esporulante e patogenicidade após o período de armazenamento.

Das três técnicas alternativas avaliadas, a preservação em pérola de vidro foi a menos eficiente para a manutenção da viabilidade celular de *Xanthomonas*, visto que, ocorreu maior morte celular para as três cepas.

São escassos na literatura os dados sobre a preservação de microorganismos em pérolas de vidro, a maioria dos trabalhos aborda a conservação em sílica gel. Ambos têm o mesmo princípio de desidratação e supressão do metabolismo celular, no entanto, o uso de sílica gel é mais eficiente no que diz respeito à manutenção do ambiente com baixa umidade. Trollope (1975) armazenaram 33 bactérias e 22 fungos em sílica gel anidra, 64% das bactérias e 77% dos fungos sobreviveram por um ano ou mais, quando armazenados em temperatura ambiente. Já o armazenamento a 4°C, aumentou o período de sobrevivência, 73% das bactérias e todos os fungos testados sobreviveram por mais de um ano.

Como esperado, em todas as técnicas utilizadas, a sobrevivência foi inversamente proporcional ao tempo de armazenamento. Em 7 e 15 dias à temperatura ambiente houve uma pequena redução na concentração celular de todas as cepas; porém, após 30 dias de manutenção a redução foi maior.

Analisando os resultados de sobrevivência das três cepas (tab. 5), percebe-se que a cepa LF apresentou os melhores índices de sobrevivência e HJ os piores, resultado idêntico ao verificado para a liofilização (item 2.1.1).

O baixo percentual de sobrevivência das células das três cepas de *Xanthomonas* não inviabiliza as técnicas alternativas testadas, que podem ser utilizadas, comprovadamente, para a preservação a curto prazo dessa bactéria, principalmente, e para o transporte de culturas, já que as técnicas não exigem armazenamento a baixas temperaturas.

3.2.2 Produção de xantana

O rendimento de xantana por células preservadas através de métodos alternativos foi dependente, também, da cepa e das técnicas de manutenção utilizadas. No geral, observou-se que as três cepas avaliadas tiveram sua

capacidade produtiva de xantana reduzida após 7 e 15 dias; no 30º dia de preservação, entretanto, observou-se recuperação nos valores de produção (tab. 6), que continuaram cepa dependente. A produção de xantana variou entre $4,2\text{g.L}^{-1}$, para a cepa LF preservada em pérola durante 7 dias, e $7,8\text{g.L}^{-1}$, para a cepa HJ preservada em sementes por 30 dias.

A tabela abaixo apresenta uma comparação entre a produção de xantana pelas cepas preservadas pelas técnicas alternativas testadas.

Tabela 7 – Produção de xantana* por cepas preservadas por técnicas alternativas

Cepa	Técnica de preservação	Controle**	Produção de xantana (g.L^{-1})		
			7 dias	15 dias	30 dias
	Sementes de girassol		$7,1\pm 0,35^b$	$7,1\pm 0,34^b$	$7,8\pm 0,31^a$
HJ	Pérola de vidro	7,6	$7,6\pm 0,18^a$	$7,2\pm 0,94^b$	$7,6\pm 0,29^a$
	Solo estéril		$7,2\pm 0,73^a$	$6,8\pm 0,21^b$	$7,2\pm 0,20^a$
	Sementes de girassol		$5,0\pm 0,17^b$	$4,6\pm 0,14^b$	$5,9\pm 0,19^a$
FH	Pérola de vidro	5,1	$4,9\pm 0,46^a$	$4,7\pm 0,12^a$	$5,0\pm 0,19^a$
	Solo estéril		$5,3\pm 0,09^a$	$4,2\pm 0,25^b$	$5,3\pm 0,30^a$
	Sementes de girassol		$5,7\pm 0,20^a$	$5,7\pm 0,81^a$	$6,0\pm 0,16^a$
LF	Pérola de vidro	6,2	$4,2\pm 0,07^c$	$5,5\pm 0,20^b$	$6,1\pm 0,25^a$
	Solo estéril		$4,9\pm 0,09^b$	$6,0\pm 0,20^a$	$6,1\pm 0,43^a$

**Média de três análises \pm desvio padrão. Letras diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística pelo teste de Tukey em nível de significância de 5% de probabilidade.

**Produção de xantana (g.L^{-1}) por cepas preservadas por repiques mensais em meio sólido SPA

Comparando-se o rendimento do biopolímero produzido por cepas mantidas por repicagem periódica e através de métodos alternativos, observou-se que estes últimos podem ser utilizados para a manutenção das cepas de *Xanthomonas*, a curto prazo, visto que sua capacidade produtiva de xantana permanece praticamente inalterada.

3.2.3 Viscosidade

A preservação das linhagens através de técnicas alternativas não modificou a reologia das soluções aquosas a 3% (m/v) das xantanas

produzidas. Todas as amostras apresentaram o comportamento pseudoplástico esperado.

A viscosidade, como já determinado anteriormente no item 3.1.3 foi dependente da cepa. Na taxa de cisalhamento de 10s^{-1} , as maiores viscosidades foram as das xantanas produzidas pela cepa HJ (tab. 8), que também apresentou maior viscosidade quando a bactéria foi mantida por repicagem mensal em meio sólido SPA (12.500mPa.s). Entretanto, todas as viscosidades foram inferiores às verificadas nas soluções das xantanas preservadas por sucessivos repiques em SPA, ou seja, valor apresentado antes da conservação por métodos alternativos. As viscosidades das xantanas produzidas pelas cepas preservadas pelas técnicas alternativas avaliadas variaram de 2.240 a 10.500 mPas.s, representando reduções de 66 a 20%. É provável que as reduções tenham sido aleatórias, visto não ter sido possível observar-se padrões relacionados às cepas, métodos de preservação ou período de armazenamento.

Tabela 8 – Viscosidade, 25°C a 10s⁻¹, das soluções aquosas de xantana a 3% produzidas por células preservadas por técnicas alternativas, comparadas com valores de viscosidade de xantana produzida por células preservadas por repiques mensais em SPA.

Técnica de preservação	Viscosidade (mPa.s)								
	HJ ^a			FH ^b			LF ^c		
	7	15	30	7	15	30	7	15	30
Sementes de girassol	9.130	7.780	7.950	2.930	3.120	2.830	3.930	3.550	2.610
Pérola de vidro	8.720	7.690	8.790	3.730	3.600	2.240	2.360	4.350	3.170
Solo estéril	7.940	10.500	8.500	3.160	4.430	2.460	5.240	3.320	3.430

^a12.500mPa.s

^b6.550mPa.s

^c6.330mPa.s

3.2.4 Composição química

Pelo cromatograma (Fig. 11) pôde-se observar que as xantanas produzidas por cepas preservadas por métodos alternativos continham ramnose, manose, glicose e ácido glicurônico, como o esperado para o patovar pruni (ver item 3.1.4).

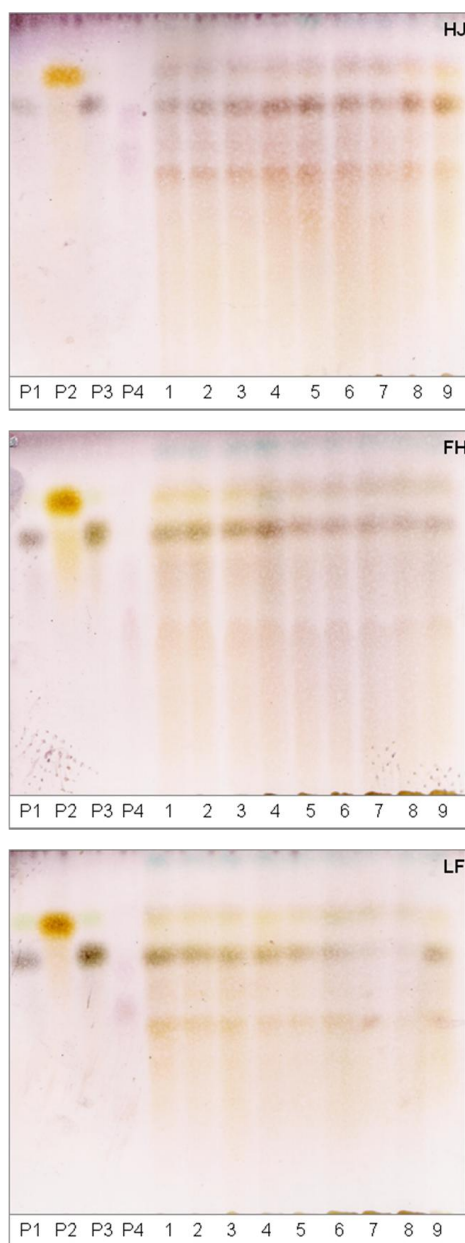


Figura 12 - Cromatografia em camada delgada (CCDC) de xantanas produzidas por cepas preservadas por técnicas alternativas, sendo: 1) 7 dias em sementes; 2) 15 dias em sementes; 3) 30 dias em sementes; 4) 7 dias em pérolas; 5) 15 dias em pérolas; 6) 30 dias em pérolas; 7) 7 dias em solo; 8) 15 dias em solo; 9) 30 dias em solo. Padrões de glicose (P1), ramnose (P2), manose (P3) e ácido glicurônico (P4), no sistema: clorofórmio:metanol:ácido acético:água 40:40:10:10 (v/v/v/v), gel de sílica 60 F₂₅₄, padrões de glicose, ramanose, manose e ácido glicurônico e revelador anisaldeído sulfúrico.

3.3 Comparação entre métodos clássicos e alternativos de preservação de *X. arboricola*

Comparou-se a viabilidade das cepas de *X. arboricola* preservadas por técnicas convencionais e alternativas, bem como sua capacidade produtiva e viscosidade das xantanas produzidas.

3.3.1 Viabilidade celular

Os resultados comparativos entre o método clássico de liofilização e os alternativos podem ser observados na tab. 9.

Tabela 9 – Concentração celular e percentual de sobrevivência de células preservadas por técnicas convencional e alternativas

Técnica de preservação	Concentração celular (UFC.mL ⁻¹) e Percentual de sobrevivência					
	HJ		FH		LF	
Liofilização	6,0.10 ⁵	0,031	8,7.10 ⁷	14,5	6,2.10 ⁸	86,1
Sementes de girassol	6,0.10 ⁵	0,020	2,1.10 ⁵	0,003	3,4.10 ⁵	0,011
Pérolas de vidro	2,0.10 ³	0,00007	2,3.10 ³	0,00002	2,0.10 ²	0,00006
Solo estéril	2,1.10 ⁵	0,007	2,5.10 ⁵	0,004	7,3.10 ⁴	0,002

De modo geral, o método de liofilização proporcionou os maiores índices de preservação para todas as cepas, seguido da preservação em sementes de girassol. A cepa HJ, que teve os menores índices de preservação por liofilização, ao contrário das demais, teve índice de preservação em sementes muito próximo ao obtido por liofilização, considerando as proporções da diferença de tempo de armazenamento. Desse modo, a preservação em sementes da cepa HJ, por períodos curtos, como o que ocorre quando o objetivo é o transporte do micro-organismo, mostra-se uma técnica bastante viável.

Oliveira et al. (2011) avaliaram o efeito da liofilização, congelamento com glicerol a -20°C e repiques na produção, crescimento e viabilidade de esporos

de *Beauveria bassiana*. Os resultados encontrados indicam que o repique periódico é o melhor método para a conservação desta espécie fúngica. No entanto, para armazenamento a longo prazo o congelamento em glicerol mostrou ser o método mais eficaz de preservação.

Sharma e Smith (1999) comparando a preservação de fungos em sílica gel, óleo mineral e por liofilização, constataram que o processo de liofilização foi a técnica que proporcionou as maiores viabilidades para estes micro-organismos.

Windels, Burnes e Kommendahl (1993) avaliaram a sobrevivência de espécies de *Fusarium* em solo e sílica gel após 5 e 10 anos de armazenamento. Em 5 anos, a viabilidade foi de 94% em solo e de 92% em sílica; já em 10 anos, a viabilidade manteve-se praticamente a mesma no solo (92%), mas diminuiu na sílica (82%). Estes resultados são muito superiores aos obtidos neste experimento para preservação da bactéria *X. arboricola*, confirmando a capacidade maior de sobrevivência dos fungos em ambientes de baixa concentração de água livre.

3.3.2 Produção de xantana

Comparando a produção de xantana por linhagens preservadas por métodos clássicos e alternativos, percebeu-se que o rendimento foi mais dependente da cepa de *Xanthomonas* utilizada no processo de fermentativo do que da técnica empregada para sua conservação (tab. 10).

Tabela 10 - Produção de xantana* por cepas preservadas por técnicas convencionais e alternativas

Técnica de preservação	Produção de xantana (g.L ⁻¹)		
	HJ	FH	LF
Repicagem mensal em SPA	7,6 ^{ab} ±0,20	5,1 ^b ±0,29	6,2 ^a ±0,18
Liofilização	6,4 ^c ±0,20	5,8 ^a ±0,12	3,6 ^b ±0,02
Sementes de girassol	7,8 ^a ±0,31	5,9 ^a ±0,19	6,0 ^a ±0,16
Pérolas de vidro	7,6 ^{ab} ±0,29	5,3 ^b ±0,30	6,1 ^a ±0,25
Solo estéril	7,2 ^b ±0,20	5,0 ^b ±0,19	6,1 ^a ±0,43

*Média de três análises ± desvio padrão. Letras diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística pelo teste de Tukey em nível de significância de 5% de probabilidade.

As cepas HJ e FH apresentaram pequenas variações de produção nos métodos avaliados. Apenas a produção de xantana pela cepa LF liofilizada apresentou valor muito inferior aos verificados para as cepas preservadas pelas outras técnicas. Entretanto, este é o método que proporcionou a maior sobrevivência e, como demonstrado no item 3.1.2, a capacidade produtiva é facilmente recuperada pela passagem do micro-organismo em meio nutritivo sólido adequado, corroborante a importância da liofilização como método preservativo para esta cepa.

3.3.3 Viscosidade

Comparando-se a viscosidade das soluções aquosas de xantanas produzidas por cepas preservadas pelos métodos clássicos com a das cepas mantidas 30 dias por técnicas alternativas, observou-se que a viscosidade é dependente da linhagem e da técnica de conservação empregada (tab. 11). Pela tabela percebe-se que todas as xantanas apresentaram comportamento pseudoplástico.

Tabela 11 - Viscosidade, a 25°C e 10s⁻¹, das soluções aquosas de xantana a 3% produzidas por cepas preservadas por técnicas convencionais e alternativas

Técnica de preservação	Viscosidade de xantana (mPa.s)											
	HJ				FH				LF			
	10	30	60	100	10	30	60	100	10	30	60	100
Repicagem mensal em SPA	12.500	4.130	2.180	1.360	6.550	2.170	1.130	721	6.330	1.980	985	613
Liofilização	4.200	1.480	788	496	11.800	4.420	2.490	1.650	10.600	3.440	1.780	1.140
Sementes de girassol	7.950	2.930	1.600	1.030	2.830	1.050	576	372	2.610	981	556	371
Pérolas de vidro	8.790	3.210	1.750	1.120	2.240	871	495	326	3.170	1.150	640	421
Solo estéril	8.500	1.430	823	645	2.460	924	509	333	3.430	1.220	661	425

4 Conclusão

Tanto os métodos clássicos de preservação quanto os alternativos, avaliados neste trabalho, foram adequados para a manutenção da viabilidade das células de *X. arboricola* pv *pruni*, entretanto, para os métodos não-propagativos, a liofilização possibilitou percentuais de preservação maiores.

A liofilização é indicada para a conservação por longos períodos, quando se dispõe dos equipamentos necessários, no entanto, quando as culturas são utilizadas frequentemente, o uso de repiques periódicos torna-se mais prático; deve-se, no entanto, pré-definir o meio mais adequado para cada cepa. Para preservação por períodos curtos e também para o transporte de culturas, recomenda-se o uso das técnicas alternativas, principalmente em sementes de girassol, que não exigem equipamentos e armazenamento a baixas temperaturas. A capacidade produtiva das cepas preservadas por liofilização, método dessecativo, foi, no geral, pouco afetada, demonstrando que a passagem das culturas em meio nutritivo é suficiente para que elas retomem seu metabolismo normal. Nos métodos alternativos, a capacidade produtiva foi dependente do tempo de preservação, ocorrendo, inicialmente, redução. Como os métodos alternativos utilizados também são baseados em dessecação, é provável que também ocorra o incremento após a passagem em meio nutritivo.

A viscosidade e a composição química das xantanas sintetizadas foram cepa-método-dependente. As cepas, quando preservadas por liofilização, tiveram a viscosidade do polímero reduzida, mas assim como para a capacidade produtiva, esta foi recuperada após passagem em meio nutritivo adequado.

Finalmente, sugere-se o uso de mais de uma técnica de preservação para a manutenção de cepas de *Xanthomonas pruni*, para evitar possíveis perdas e alterações, e também a verificação periódica da viabilidade das culturas.

Futuramente, pretende-se dar continuidade ao acompanhamento das cepas preservadas através dos métodos alternativos avaliados, a fim de se determinar o período de armazenamento viável para cada técnica. Também se pretende verificar se a passagem adicional em meio nutriente pode reverter os danos causados pela preservação por métodos alternativos.

Referências

- ALVES, F. G.; LAUFFER, M. L.; BOROWSKI, J. M.; VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S. *Mousse de maracujá livre de ingredientes de origem animal: elaboração e análise sensorial*. **Higiene Alimentar**, v. 25, p. 1199-1200, 2011.
- ANCHORDOGUY, T. J.; RUDOLPH, A. S.; CARPENTER, J. F.; CROWE, J. H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. **Cryobiology**, v.24, p. 324-331, 1987.
- ANTUNES, A. E. C. **Produção, viscosidade e composição química de xantana por *Xanthomonas campestris* pv pruni em meios convencionais e alternativos**. 2000. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- ANTUNES, A. E. C.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Síntese de biopolímeros xantana em meios convencionais e alternativos: viscosidade x composição. **Revista Brasileira de Agrocência**, v.6, p. 123-125, 2000a.
- ANTUNES, A. E. C.; VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S. Viscosidade aparente de biopolímeros produzidos por diversas cepas de *Xanthomonas campestris* pv pruni. **Revista Ciência e Engenharia**, v.9, p. 83-87, 2000b.
- ANTUNES, A. E. C.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Screening of *Xanthomonas campestris* pv pruni strains according to their production of xanthan and its viscosity and chemical composition. **Brasilian Journal of Food Technology**, v.6, p. 317-322, 2003.
- APARECIDO, C. C.; FIGUEIREDO, M. B. Manutenção das características originais de diferentes fungos fitopatogênicos preservados por períodos superiores a vinte anos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.64, p. 59, 1997.
- ASHWOOD-SMITH, M. J. Preservation of microorganisms by freezing, freeze-drying and desiccation, In: **Low Temperature Preservation in Medicine and Biology**. Tunbridge Wells: Pitman Medical, 1980. p. 219–252.
- BACK, I. M.; OLIVEIRA, C. F.; ALVES, F. G.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Viabilidade de células de *Beijerinckia* sp 7070,

liofilizadas com e sem adição de crioprotetor, após 10 anos de armazenamento, à temperatura de -4°C. In: XVII Congresso de Iniciação Científica e X Encontro de Pós-Graduação, 2008, Pelotas. **Anais do XVII Congresso de Iniciação Científica e X Encontro de Pós-Graduação**, 2008.

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

BECKER, A.; KATZEN, F.; PÜHLER, A.; IELPI, L. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.50, p. 145-152, 1998.

BEUCHAT, L.R. Injury and repair of Gram-Negative bacteria, with special consideration of the involvement of the cytoplasmic membrane. **Advances in Applied Microbiology**, v.23, p. 219-243, 1978.

BORGES, C. D. ; MOREIRA, A. S. ; VENDRUSCOLO, C. T. Qualidade reológica da xantana sintetizada em diferentes tempos de incubação por *Xanthomonas campestris* pv pruni 101. In: 5º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2003, Campinas. **Anais do 5º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, 2003.

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.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; AYUB M. A. Z. Influence of agitation and aeration in xanthan production by *Xanthomonas campestris* pv pruni strain 101. **Revista Argentina de Microbiología**, v.40, p. 81-85, 2008.

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.

BORGES, C. D.; BOROWSKI, J. M.; REDIES, C. R.; MICHELS, R.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Screening of *Xanthomonas* strains is still an important tool to improve xanthan gum production and rheological properties. In: 3rd French Brazilian Meeting on Polymer, 2011, Florianópolis. **Anais do 3rd French Brazilian Meeting on Polymer**, 2011.

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

BOROWSKI, J. M.; REDIES, C. R.; MICHELS, R.; BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T. Xantana sintetizada por cepas de *Xanthomonas campestris* pv pruni em diferentes meios de cultivo. In: XV Congresso de Iniciação Científica, 2006, Pelotas. **Anais do XV Congresso de Iniciação Científica**, 2006.

BOROWSKI, J. M.; BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T. Influência da composição química no comportamento reológico da xantana. In: XV Congresso de Iniciação Científica, 2006, Pelotas. **Anais do XV Congresso de Iniciação Científica**, 2006.

BOROWSKI, J. M.; BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T. Produção e viscosidade da xantana sintetizada por *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 115 em diferentes condições de aeração. In: XVI Congresso de Iniciação Científica, 2007, Pelotas. **Anais do XVI Congresso de Iniciação Científica**, 2007.

BORSCHIVER, S.; ALMEIDA, L. F. M.; ROITMAN, T. Monitoramento tecnológico e Mercadológico de biopolímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.18, p. 256-261, 2008.

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

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.

BRENNAN, M.; WANISMAIL, B.; JOHNSON, M. C.; RAY, B. Cellular damage in dried *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Food Protection**, v.49, p. 47-53, 1986.

CACIK, F.; DONDO, R. G.; MARQUÉS, D. Optimal control of a batch bioreactor for the production of xanthan gum. **Computer Chemical Engineering**, v.25, p. 409-418, 2001.

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.

CADMUS, M. C.; KNUTSON, C. A.; LAGODA, A. A.; PITTSLEY, J. E.; BURTON, K. A. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 20, p. 1003-1014, 1978.

CALLET, F.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Influence of acetyl and piruvate contents on rheological properties of xanthan in dilute solution. **International Journal Biological Macromolecular**, v.9, p. 291-293, 1987.

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.

CANILHA, L.; SILVA, D. D. V.; CARVALHO, W.; MANCILHA, I. M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa. Parte III: polissacarídeos e enzimas. **Revista Analytica**, v.20, p. 32-40, 2005.

CARMICHAEL, J. W. Frozen storage for stock cutltures of fungi. **Mycologia**, v.48, p. 378-381, 1956.

CARVALHO, W.; SILVA, D. D. V.; CANILHA, L.; MANCILHA, I. M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa. Parte I: ácidos orgânicos. **Revista Analytica**, v.18, p. 70-76, 2005.

CASAS, J. A.; SANTOS, V. E.; GARCÍA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operacional conditions: molecular structure and rheological properties. **Enzyme and Microbiology Technology**, v.26, p. 282-291, 2000.

CASTRO, H. P.; TEIXEIRA, P. M.; KIRBY, R. Evidence of membrane damage in *Lactobacillu bulgaricus* following freeze drying. **Journal of Applied Microbiology**, v.82, p. 87-94, 1997.

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

CORCORAN, B. M.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p. 1024–1039, 2004.

COUTO, A. F.; BOROWSKI, J. M.; ÜCKER, C. D. L.; VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S. *Mousses de framboesa (Rubus ideaus) alternativas livres de ingredientes de origem animal e tradicionais: análise sensorial*. **Higiene Alimentar**, v. 25, p. 215-216, 2011.

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

DESMOND, C.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; COLLINS, K.; ROSS, R. P. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray-drying. **International Dairy Journal**, v.11, p. 801–808, 2001.

DE VUYST, L.; VERMEIRE, A. Use of industrial medium components for xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.42, p. 187-191, 1994.

DIAZ, P. S.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Efeitos da concentração dos sais $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, MgSO_4 e K_2HPO_4 na produção e viscosidade da xantana sintetizada por *Xanthomonas campestris* patovar pruni. In: 6º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2001, Gramado. **Anais do 6º Congresso Brasileiro de Polímeros**, 2001.

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.

DIAZ, P. S. **Influência de parâmetros físicos e químicos e da adição de íons no comportamento reológico de gomas xantana**. 2002. 65f Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

DRUZIAN, J. I.; BRANDÃO, L. V.; NERY, T. B. R. Produção de polissacarídeo tipo xantana por *Xanthomonas* em meio fermentativo com glicerol ou glicerina. PI0705950-7, 2007.

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

ESGALHADO, M. E.; ROSEIRO, J. C.; COLLAÇO, M. T. A. Interactive effects of pH and temperature on cell growth and polymer production by *Xanthomonas campestris*. **Process Biochemistry**, v.30, p. 667-671, 1995.

FAHY, P. C.; PERSLEY, G. J. **Plant Bacterial Diseases - A Diagnostic Guide**. Sidney: Academic Press. 1983. 393p.

FARIA, M. R.; MARTINS, I.; MELLO, R.; TIGANO, M. S. Entomopathogenic fungal (Hyphomycetes) collection: assessment of conidial viability. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 1597-1503, 1999.

FIGUEIREDO, M. B.; PIMENTEL, C. P. V. Métodos de preservação de fungos em culturas. **Biológico**, v.55, p.27-33, 1989.

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.

FUNAHASHI, H.; TOSHIOMI, Y.; TAGUCHI, H. Effect of glucose concentration on xanthan gum production by *X. campestris*. **Journal of Fermentation Technology**, v.65, p. 603-606, 1987.

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.; FRITSCH, A. P. Nutritional study of *Xanthomonas campestris* in xanthan gum production by factorial design of experiments. **Enzyme Microbial and Technology**, v.14, p. 991-996, 1992.

GARCÍA-OCHOA F, SANTOS VE, ALCÓN A. Xanthan gum production: an unstructured kinetic model. **Enzyme and Microbial Technology**, v.17, p. 206–217, 1995.

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.

GEHRKE, H. H.; PRALLE, K.; DECKWER, W. D. Freeze drying of microorganisms – influence of cooling rate and survival. **Food Biotechnology**, v.6, p. 35-49, 1992.

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

GODET, P. Fermentation of polysaccharide gums. **Process Biochemistry**, v.8, p. 33-34, 1973.

GOMES, G. V. P.; DRUZIAN, J. I.; COSTA, L. A. S.; PADILHA, F. Produção do polissacarídeo tipo goma xantana por fermentação de resíduos de crustáceos e bivalves. PI 011100001119, 2010.

GONZALES, R.; JOHNS, M. R.; GREENFIELD, P. F.; PACE, G. W. Xanthan gum precipitation using ethanol. **Process Biochemistry**, v.24, p. 200-203, 1989.

GOOS, R. D.; DAVIS, E. E.; BUTTERFIELD, W. Effect of warming rates on the viability of frozen fungus spores. **Mycologia**, v.59, p. 59-66, 1967.

GRIVELL, A. R.; JACKSON, J. F. Microbial preservation with silicagel. **Journal of General Microbiology**, v.58, p. 423– 425, 1969.

GROUT, B.; MORRIS, J.; McLELLAN, M. Cryopreservation and the maintenance of cell lines. **Trends in Biotechnology**. v.8, p. 293-297, 1990.

GUPTA, M. D.; KAMAT, M. Y. Isolation of wild *Xanthomonas* strains from agricultural produce, their characterization and potential 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.

HAYS, H. C. W. T.; MILLNER, P. A.; JONES, J. K.; RAYNER-BRANDESC, M. H. A novel and convenient self-drying system for bacterial preservation. **Journal of Microbiological Methods**, v.63, p. 29–35, 2005.

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.

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

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.

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

HUNT, G. A.; GOUREVITCH, A.; LEIN, J. Preservation of cultures by drying on porcelain beads. **Journal of Bacteriology**, v.76, p. 453-457, 1958.

IACOBELLIS, N. S.; DEVAY, J. E. Long-term storage of plantpathogenic bacteria in sterile distilled water. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, p. 388–389, 1986.

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.

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.

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.

KANG, K. S.; PETTIT, D. J. Xanthan, gellan, wellan and rhamosan. In: WHISTLER, R. I.; BEMILLER, J. N. **Industrial gums**. New York: Academic Press, 1993. p. 341-398.

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.

KIRALY, Z.; KLEMENT, Z.; SOLYMOZY, F.; VOROS, J. **Methods in plant pathology**. Budapest: Elsevier Scientific Pub., 1974. 910p.

KIRSOP, B. E.; SNELL, J. J. **Maintenance of Microorganisms**, New York: Academic Press, 1984. 75p.

KITAMOTO Y.; SUZUKI A.; SHIMADA S.; YAMANAKA K. A new method for the preservation of fungus stock cultures by deepfreezing. **Mycoscience**, v.43, p. 143-149, 2002.

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.

KUCK, L. S.; ALVES, F. G.; COUTO, A. F.; SOMACAL, S.; MOREIRA, A. da S.; VENDRUSCOLO, C. T. A mousse de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade) para população portadora de intolerância à lactose ou alérgica a proteínas de origem animal. **Higiene Alimentar**, v. 25, p. 169-170, 2011.

LANGE, B. J.; BOYD, W. J. R. Preservation of fungal spores by drying on porcelain beads. **Phytopathology**, v.58, p. 1711-1712, 1968.

- 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.
- LECHNER, M. D.; GEHRKE, K.; NORDMEIER, E. **Makromolekulare chemie**. Berlin: Birkhäuser, 1996. 532p.
- LELLIOTT, R. A. The preservation of plant pathogenic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v.28, p. 181–193, 1965.
- LELLIOTT, R. A.; STEAD, D. E. **Methods for the diagnosis of bacterial plant disease**. Oxford: Blakwell Scientific Publications, 1987. 216p.
- 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, p. 45–50, 2003.
- LIEVENSE, L. C.; VERBEEK, M. A. M.; NOOMEN, A; VAN'T RIET, K. Mechanism of dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.41, p. 90–94, 1994.
- LILLY, V. G.; WILSON, H. A.; LEARCH, J. G. Bacterial polysaccharides II. Laboratory Scale production of polysaccharides by species *X. campestris*. **Applied Microbiology**, v.6, p. 105-109, 1958.
- LUVIELMO, M. M. **Estudo do efeito do “stress” alcalino na produção de goma xantana**. 2007. 160f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- 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.
- MALIK, K. A. Survival and stability of microorganisms during freeze-drying. **Cryobiology**, v.25, p. 517, 1988.
- MALIK, K. A. A simplified liquid drying method for the preservation of microorganisms sensitive to freezing and freeze-drying. **Journal of Microbiological Methods**, v.12, p. 125–132, 1990.
- MARGARITIS A.; ZAJIC J. E. Biotechnology review: mixing mass transfer and scale-up of polysaccharide fermentations. **Biotechnology Bioengineering**, 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.

MAUGERI FILHO, F. Produção de Polissacarídeos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI W.; SCHMIDELL W., **Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., 2001, p. 125-153.

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.

MERYMAN, H.T.; WILLIAMS, R.J.; DOUGLAS, M. Freezing injury from solutions effects and its prevention by natural or artificial cryoprotection. **Cryobiology**, v.14, p. 287- 302, 1977.

MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. Preservation of micro-organisms by drying: A review. **Journal of Microbiological Methods**, v.66, p. 183–193, 2006.

MOREIRA, A. S.; SOUZA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Determinação de composição de biopolímero por cromatografia em camada delgada. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.4, p. 222-224, 1998.

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.

MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; GIL-TUNES, C.; VENDRUSCOLO, C. T. Effect of air and stirring on the synthesis of xanthan by *Xanthomonas campestris* pv *pruni* strain 06. In: VII International Hydrocolloides Conference, Gelf, 2003. **Anais do VII International Hydrocolloides Conference**, 2003.

MOREIRA, A. S. **Liofilização de cepas de *Xanthomonas arboricola***. Pelotas, Universidade Federal de Pelotas, 2010a. (Comunicação oral).

MOREIRA, A. S. **Ocorrência de colônias mutantes durante a preservação de *X. arboricola* pv *pruni* por repiques em meio sólido YM**. Pelotas, Universidade Federal de Pelotas, 2010b. (Comunicação oral).

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

NAGAI, T.; TOMIOKA, K.; TAKEUCHI, K.; IIDA, M. Evaluation of Preservation Techniques of Microorganism Resources in the MAFF Genebank. **Japan Agricultural Research Quartely**, v.39, p. 19 – 27, 2005.

NAKASONE, K. K.; PETERSON, S. W.; JONG, S. C. Preservation and distribution of fungal cultures. In: MUELLER, G. M.; BILLS, G. F.; FOSTER, M. S. **Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods**. Amsterdam: Elsevier, 2004, p. 37–47.

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.

NERY, T. B. R.; BRANDÃO, L. V.; ESPIRIDIANO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I. Biossíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: rendimento e viscosidade. **Química Nova**, v. 31, p. 1937-1941, 2008.
NERY, T. B. R.; BRANDAO, L. V.; DRUZIAN, J. I. Bioconversão de carboidratos de resíduos da agroindústria de frutas em polissacarídeo tipo goma xantana. PI0701765-0, 2009.

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.

NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para a produção de goma xantana por *X. campestris* C7L1. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, p. 82-85, 2001.

NORRIS, D. O. A porcelain-bead method for storing *Rhizobium*. **Empire Journal of Experimental Agriculture**, v.31, p. 255-258, 1963.

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

OLIVEIRA, I.; PEREIRA, J. A.; BENTO, A.; BAPTISTA, P. Viability of *Beauveria bassiana* isolates after storage under several preservation methods. **Annals of Microbiology**, v.61, p. 339-344, 2011.

ORENTAS, D. G.; SLONEKER, J. H.; JEANES, A. Pyruvic acid content and constituent sugars of exocellular polysaccharides from different species of the genus *Xanthomonas*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.9, p. 427-430, 1963.

PADILHA, F. F. **Produção de biopolímeros sintetizados por micro-organismos modificados geneticamente**. 2003. 210f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PADILHA, F.; ARAÚJO, Y. L. F. M.; CARDOSO, J. C.; GOMES, G. V. P.; COSTA, L.; DRUZIAN, J. I. Utilização de resíduos de crustáceos como substratos fermentativos, suplementado ou não, para produção de biopolímero tipo goma xantana. PI011100001110. 2010.

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

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

PECCIA, J., WERTH, H. M., MILLER, S., HERNANDEZ, M. Effects of relative humidity on the ultraviolet induced inactivation of airborne bacteria. **Aerosol Science and Technology**, v.35, p. 728–740, 2001.

PENS, C. J. ; ROTT, M. B . *Acanthamoeba* spp. cysts storage in filter paper. **Parasitology Research**, v.103, p. 1229-1230, 2008.

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.

PETERS, H.; HERBST, H.; HESSELINK, P.; LÜNSDORF, H.; SCHUMPE, A.; DECKWER, W. The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, p. 1393-1397, 1989.

PINTO, E. P.; PAN, A. F.; VENDRUSCOLO, C. T. Utilização do farelo de arroz como fonte de carbono para a produção de xantana. In: XI Congresso de Iniciação Científica, Pelotas, 2002. **Anais do XI Congresso de Iniciação Científica**, 2002.

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.

PINTO, E. P.; FURLAN, L.; VENDRUSCOLO, C. T. Chemical deacetylation natural xanthan (Jungbunzlauer®). **Polímeros**, v.21, p. 47-52, 2011.

PITCOVSKI, J.; SHMUELI, E.; KRISPEL, S.; LEVI, N. Storage of viruses on filter paper for genetic analysis. **Journal of Virological Methods**, v.83, p. 21-26, 1999.

POTTS, M. Desiccation tolerance: a simple process? **Trends in Microbiology**, v.9, p. 553–559, 2001.

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 Científica UFPel e 4º Encontro de pós-graduação, Pelotas, 2002. **Anais do XI Congresso de Iniciação Científica UFPel e 4º Encontro de pós-graduação**, 2002.

RAMÍREZ, M. E.; FUCIKOVSKY, L.; JIMÉNEZ, G.; QUINTERO, R.; GALINDO, E. Xanthan gum production by altered pathogenicity variants of *X. campestris*. **Applied Microbiology and Biotechnololy**, v.29, p. 5-10, 1988.

RAO, Y. M.; SURESH, A. K.; SURAIISHKUMAR, G. K. Free radical aspects of *Xanthomonas campestris* cultivation with liquid phase oxygen supply strategy. **Process Biochemistry**, v.38, p. 1301–1310, 2003.

RODRIGUES, E. G.; LÍRIO, V. S.; LACAZ, C. D. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.34, p. 159-165, 1992.

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.

- 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.
- RYAN, J. General Guide for Cryogenically Storing Animal Cell Cultures, TC-CI-559.1994. Corning, Inc. Technical Buletin.
- 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.
- SAFRANOVA, V. I.; NOVIKOVA, N. I. Comparison of two methods for root nodule bacteria preservation: Lyophilization and liquid nitrogen-freezing. **Journal of Microbiological Methods**, v.24, p. 231-237, 1996.
- SALCEDO, G.; RAMÍREZ, M. E.; FLORES, C.; GALINDO, E. Preservation of *Xanthomonas campestris* in *Brassica oleracea* seeds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.37, p.723-727, 1992.
- SANDFORD, P. A.; PITTSLEY, J. E.; KNUTSON, C. A.; WATSON, P. R.; 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. p. 192 -210, 1977.
- SCAMPARINI, A. R. P., ROSATO, Y. B. Processo de produção de goma xantana, PI 8805325-3, 1990.
- 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. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.15, p. 517-519, 1999.

SHEARER, B. L.; ZEYEN, R. J.; OOKA, J.J. Storage and behaviour in soil of *Septoria* species isolated from cereals. **Phytopathology**, v.64, p. 163–167, 1974.

SILMAN, R. W.; ROGOVIN, P. Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: laboratory investigation. **Biotechnology Bioengineering**, v.12, p. 75-83, 1970.

SILVA, C. M. R. **Preservação de *Xanthomonas campestris* pv *manihotis* cepa 280 através técnica de secagem por atomização**. 2003. 97f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SILVA, D. D. V.; CARVALHO, W.; CANILHA, L.; MANCILHA, I. M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa. Parte II: aminoácidos e vitaminas. **Revista Analytica**, v.19, p. 62-73, 2005.

SILVEIRA, C. F.; PREICHARDT, L. D.; FIGUEIREDO, R. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S. Modificações químicas promovidas por tratamento térmico em xantanas obtidas por *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*. In: XVI Encontro de Química da Região Sul, 2008, Blumenau. **Anais do XVI Encontro de Química da Região Sul**, 2008.

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

SLONEKER, J. H.; JEANES, A. Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B - 1459. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 40, p. 2066-207, 1962.

SMITH, I. H.; SYMES, K. C.; LAWSON, C. J.; MORRIS, E. R. Influence of the pyruvate of xanthan on macromolecular association in solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 3, p. 129-134, 1981.

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

SNEH, B.; BURPEE, L.; OGOSHI, A. **Identification of *Rhizoctonia* species**. APS PRESS The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 1991.133p.

SNELL, J. J. S. General introduction to maintenance methods. In: KIRSOP, B. E.; DOYLE, A. **Maintenance of microorganisms and cultures cells: a manual of laboratory methods**. 2ed. London: Academic Press Inc, p. 21-30, 1991.

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.

- SOUW, P.; DEMAIN A. L. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. **Applied Environment of Microbiology**, v.37, p. 1186-1192, 1979.
- 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.
- 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.
- TAKO, M.; NAKAMURA, S. Rheological properties of deacetylated xanthan in aqueous-media. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.48, p. 2987-2993, 1984.
- 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.
- TEIXEIRA, A. M. **Tempo de fermentação na produção e qualidade de xantana e no perfil eletroforético de *X. campestris* pv *pruni***. 2005. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- 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.
- TORRES, L. G.; BRITO, E.; GALINDO, E.; CHOPLIN, L. Viscous behavior of xanthan solutions from a variant strain of *Xanthomonas campestris*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.75, p. 58-64, 1993.
- TROLLOPE, D. R. The preservation of bacteria and fungi on anhydrous silica gel: an assessment of survival over four years. **Journal of Applied Microbiology**, v.38, p. 115–120, 1975.
- 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.

VALENTINE, N. B.; WUNSCHER, S. C.; VALDEZ, C. O.; KREUZER, H.; BARTHOLOMEW, R. A.; STRAUB, T. M.; WAHL, K. L. Preservation of viable *Francisella tularensis* for forensic analysis. **Journal of Microbiological Methods**, v.84, p. 346–348, 2011.

VAN ELSAS, J. D.; KASTELEIN, P.; DE BRIES, P. M. e VAN OVERBEEK, L. S. Effects of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* bv.2 in irrigation water. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p. 842–854, 2001.

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. **Produção e caracterização do biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp isolada do solo cultivado com cana-de-açúcar da região de Ribeirão Preto-São Paulo-Brasil**. 1995. 143f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas.

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.; PAN, A. F.; MOREIRA, A. S. Utilização de fibra de soja para a redução de custo no processo de obtenção de xantana. In: XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, 2002. **Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2002.

VENDRUSCOLO, C. T.; AYUB, M. A. Z.; VENDRUSCOLO, J. L.S.; MOREIRA, A. S. The pH control as a tool for obtaining of a different xanthan by *Xanthomonas campestris* pv pruni. In: 7th International Conference Hydrocolloids, Melbourn, 2004. **Anais do 7th International Conference Hydrocolloids**. 2004.

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

WAKIMOTO, S.; UTATSU, I.; MASUO, N., HAYASHI, N. Multiplication of *Pseudomonas solanacearum* in pure water. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, v.48, p. 620–627, 1982.

WAMBURA, P. N. Impregnation and storage of Newcastle disease virus on to filter papers and detection of viral RNA by a single tube RT-PCR assay. **African Journal of Biotechnology**, v.5, p. 21-24, 2006.

WANG, B.; TIAN, F. W.; LI, J. R.; CHEN, W.; ZHANG, H. Impact of membrane permeability in lactic acid bacteria during freeze-drying. **Microbiology**, v.36, p. 684-688, 2009.

WINDELS, C. E.; BURNES P. M.; KOMMENDAHL, T. *Fusarium* species stored on silica gel and soil for ten years. **Mycologia**, v.85, p. 21-23, 1993.