

EFEITO DA TREALOSE NA LIOFILIZAÇÃO DE *Rhizobium etli* E *Rhizobium tropici*

Pedro Antonio Arraes Pereira¹

Ann Oliver²

John Crowe²

Fredrick Bliss²

Uma das maiores limitações da indústria de inoculantes é assegurar um número alto de células de rizóbio no produto usado pelos produtores. Isto tem importância redobrada especialmente quando existe a possibilidade de mudança do veículo do inoculante da turfa para óleo mineral.

O processo de liofilização é o mais indicado para conservação de estirpes de rizóbio por um longo período de tempo. Entretanto, alguns efeitos indesejáveis, como denaturação de proteínas sensíveis e diminuição da viabilidade de vários tipos de células, são freqüentes quando esse método é usado. Para proteger as células desse dano biológico, várias substâncias têm sido usadas durante o processo de liofilização.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da trealose na liofilização e conservação de duas estirpes contrastantes de rizóbio: *Rhizobium tropici*, CIAT 899, e *Rhizobium etli*, CFN 42. As estirpes foram crescidas em meio Yem, com agitação a 28°C por 72 horas. O número de células obtidas para as estirpes CIAT 899 e CFN 42 foi $3,8 \times 10^{12}$ e $2,0 \times 10^{12}$, respectivamente. As células foram crescidas em tubos "ependorf" e ressuspendidas com uma solução de 100 mm de trealose ou com uma solução de 7% de peptona mais sacarose.

A introdução da trealose e outros excipientes nas células foi feita usando um aparelho controlado por computador. O processo de congelamento das células das bactérias foi feito a uma taxa de 5°C /min até alcançar a fase de transição. O composto (1-2) glucan foi extraído de colônias removidas das placas de Petri, ressuspendidas em água estéril e filtradas em filtros tipo milipore com 0,2 µm. A T_m das células foi determinada com espectrofotômetro de infravermelho Fourier transformado.

¹ Pesquisador, Ph.D., EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAF), Caixa Postal 179, 74001-970 Goiânia, GO.

² Professor, Ph.D., Universidade da Califórnia, Davis, Estados Unidos.

As células foram imediatamente congeladas a -80°C à velocidade de $99^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e, em seguida, transferidas para um liofilizador com a temperatura do condensador a -50°C , com vácuo de 10 torr. As amostras, sob essas condições, ficaram a -40°C , durante a fase primária de liofilização. Após a secagem secundária, o conteúdo residual de água foi reduzido ao valor mínimo. O processo de liofilização teve uma duração de pelo menos 18 horas. Sob essas condições, o conteúdo de água residual foi de aproximadamente 0,02 g de água/g peso.

As células liofilizadas foram reidratadas em água esterilizada e, depois, plaqueadas em meio Yem para a contagem do número de células. Os tubos de "ependorf" que continham as células liofilizadas foram colocados em incubadoras às seguintes temperaturas: 4°C , 30°C e 40°C . Após três amostras de cada estirpe de rizóbio, foi avaliada a sobrevivência das bactérias depois de 0, 120 e 280 horas de incubação. O número de colônias foi analisado com os dados transformados em log, em delineamento experimental completamente randomizado. A análise estatística foi feita com o programa MSTAT.

A T_m foi medida de uma família de espectros tomados em diversas temperaturas. O ponto médio da curva foi determinado como a temperatura do ponto médio da fase de transição. Para as duas estirpes de rizóbio, a fase de transição do lipídio foi centrada ao redor de 0°C . Resultados similares foram obtidos com *E. coli*, mas a fase de transição do *Bacillus thuringiensis* foi centrada em 12°C . O processo de liofilização diminuiu a sobrevivência das células, quando comparadas com células não liofilizadas para ambas as estirpes de rizóbio. A trealose diminuiu consideravelmente o efeito negativo da liofilização para as duas estirpes de rizóbio, quando comparadas com peptona mais sacarose como excipiente (Tabela 1 e Figura 1).

TABELA 1. Efeito da liofilização na sobrevivência de células de duas estirpes de rizóbio tratadas com uma solução de trealose, ou de peptona mais sacarose, comparadas com o controle.

Estirpe de rizóbio	Meio Yem	Peptona + Sacarose	Trealose
	-----número de rizóbio/ml*-----		
CIAT 899	12,0 ^b **	11,0b	11,4c
CFN 42	12,3 ^a	7,6b	11,8c

* Valores transformados de log.

** Utilizou-se o teste de LSD para separar médias para a mesma estirpe a 5% de probabilidade.

A trealose também aumentou a sobrevivência das células depois de 120 e 280 horas, sob temperaturas de 30°C e 40°C (Tabela 2). Na estirpe CFN 42, este efeito foi observado em todas as temperaturas de armazenamento, em contraste com a estirpe CIAT 899, que parece ser mais resistente a estresses ambientais, como altas temperaturas e acidez do solo, em condições de campo. Por outro lado, esta estirpe produz grandes quantidades de glucan cíclico, que parece ter capacidade protetora similar à da trealose.

TABELA 2. Efeito da trealose comparada com a peptona mais sacarose na sobrevivência de células de rizóbio incubadas à três temperaturas por 120 ou 280 horas.

Estirpe de rizóbio	Temperatura (°C)	120 horas		280 horas	
		Peptona + sacarose	Trealose	Peptona + sacarose	Trealose
-----número de rizóbio/ml*-----					
CIAT 899	4	10,06a**	11,24a	9,79a	10,27 ^a
	30	8,78 ^a	9,63a	7,63a	9,33b
	40	8,88 ^a	9,81a	6,37a	8,17b
CFN 42	4	6,10 ^a	10,39b	6,57a	9,05b
	30	4,46 ^a	10,3b	3,6a	8,81b
	40	4,15 ^a	10,3b	3,44a	7,87b

* Os valores são transformados de log. ** Utilizou-se o teste de LSD para comparar os tratamentos dentro de uma mesma temperatura e estirpe.

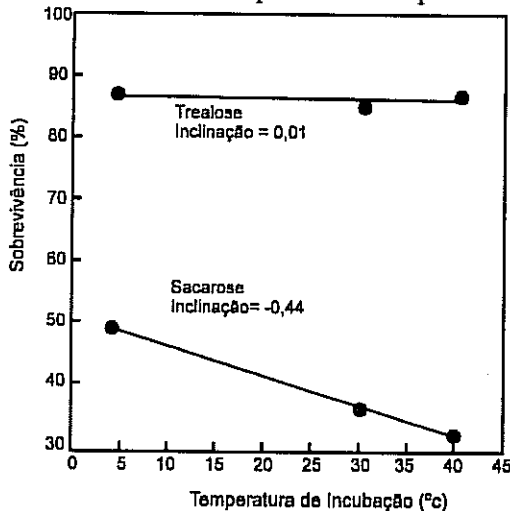


FIG. 1. Efeito da temperatura de incubação em células de *Rhizobium etli* e *Rhizobium tropici* liofilizadas com trealose ou sacarose.