

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

Pedro Antonio Arraes Pereira<sup>1</sup>  
Ann Oliver<sup>2</sup>  
John Crowe<sup>2</sup>  
Fredrick Bliss<sup>2</sup>

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.

---

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

<sup>2</sup> Professor, Ph.D., Universidade da Califórnia, Davis, Estados Unidos.

As células foram imediatamente congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  à velocidade de  $99^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e, em seguida, transferidas para um liofilizador com a temperatura do condensador a  $-50^{\circ}\text{C}$ , com vácuo de 10 torr. As amostras, sob essas condições, ficaram a  $-40^{\circ}\text{C}$ , 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:  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$  e  $40^{\circ}\text{C}$ . 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  $0^{\circ}\text{C}$ . Resultados similares foram obtidos com *E. coli*, mas a fase de transição do *Bacillus thuringiensis* foi centrada em  $12^{\circ}\text{C}$ . 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 <sup>b</sup> **	11,0b	11,4c
CFN 42	12,3 <sup>a</sup>	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 <sup>a</sup>
	30	8,78 <sup>a</sup>	9,63a	7,63a	9,33b
	40	8,88 <sup>a</sup>	9,81a	6,37a	8,17b
CFN 42	4	6,10 <sup>a</sup>	10,39b	6,57a	9,05b
	30	4,46 <sup>a</sup>	10,3b	3,6a	8,81b
	40	4,15 <sup>a</sup>	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.

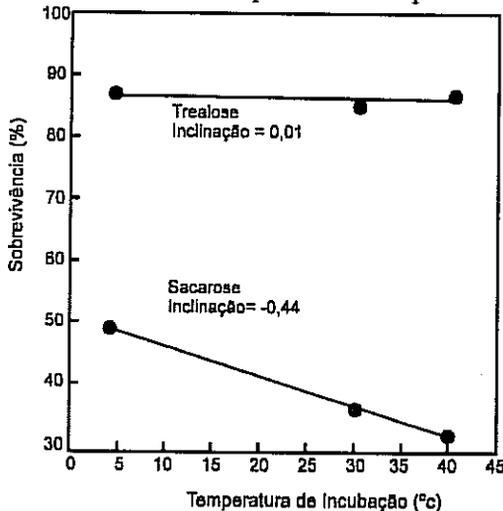


FIG. 1. Efeito da temperatura de incubação em células de *Rhizobium etli* e *Rhizobium tropici* liofilizadas com trealose ou sacarose.