



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

GRACIETE DE SOUZA SILVA

**COMPORTAMENTO FENOTÍPICO, GENOTÍPICO E DE PRODUÇÃO  
DE GOMA XANTANA DA *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*  
IBSBF 2103 EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE PRESERVAÇÃO**

**Salvador BA  
2015**

GRACIETE DE SOUZA SILVA

**COMPORTAMENTO FENOTÍPICO, GENOTÍPICO E DE PRODUÇÃO  
DE GOMA XANTANA DA *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*  
IBSBF 2103 EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE PRESERVAÇÃO**

Orientador: Dr. Cleber Alberto Schmidt  
Co-orientador: Dr<sup>a</sup> Janice Izabel Druzian

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia - Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre.

**Salvador BA  
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Processamento Técnico, Biblioteca Universitária de Saúde,  
**Sistema de Bibliotecas da UFBA**

S586 Silva, Graciete de Souza.

Comportamento fenotípico, genotípico e de produção de goma xantana da *Xanthomonas campestris* pv. *Mangiferaeindicae* IBSBF 2103 em diferentes condições de preservação / Graciete de Souza Silva. - Salvador, 2015.

83 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Cleber Alberto Schmidt.  
Coorientadora: Profa. Dra. Janice Izabel Druzian.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2015.

1. Ácidos graxos. 2. Bactérias. 3. Biopolímeros. 4. Goma xantana 5. *Xanthomonas campestris*. 6. Eletroforese em Gel de Campo Pulsado. I. Schmidt, Cleber Alberto. II. Druzian, Janice Izabel. III. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDU: 577.11

## TERMO DE APROVAÇÃO

GRACIETE DE SOUZA SILVA

### COMPORTAMENTO FENOTÍPICO, GENOTÍPICO E DE PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA DA *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103 EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE PRESERVAÇÃO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 30 de setembro de 2015.

#### BANCA EXAMINADORA



---

Dr. Cleber Alberto Schmidt  
Universidade Federal da Bahia  
Orientador



---

Dr<sup>a</sup>. Aláise Gil Guimarães  
Universidade Federal da Bahia



---

Dr<sup>a</sup>. Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira  
Universidade do Porto – Portugal

À minha família pelo apoio e força sempre,  
EU DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela graça de iniciar e concluir mais um projeto em minha vida.

Aos meus pais: Francisco e Madalena, pelo amor e incentivo de sempre em meio às dificuldades.

Aos meus irmãos: Francilene, Graciene, Regiane e Emerson, pelo carinho em muitos momentos e por verdadeiramente torcerem pelo meu sucesso.

A todos os colegas do *Laboratório de Análises Aplicadas e de Biomateriais* e do *Laboratório de Controle Microbiológico, Produtos Farmacêuticos e Cosméticos*, pela colaboração, apoio e pelos momentos de descontração, os quais tornaram meus dias mais leves e divertidos.

Em especial, agradeço a Augusto, Carol, Elisiane, Denilson, Luzinete e Prícila, pela disponibilidade e contribuição neste trabalho. Muito obrigada pelo conhecimento compartilhado.

Aos que dividiram moradia, alegrias, aflições, distrações ou tudo isto junto: Eron, Gabi, Elisângela, Fabi, Maicon, Túlio, Fred, Ismara, Olívia, Élia e Rogério.

Ao Professor Cleber Schmidt, ao qual externo minha admiração pela competência como profissional e a minha gratidão pela paciência e orientação.

À Professora Janice Druzian, pela oportunidade concedida, pelos ensinamentos, pela dedicação e comprometimento com a pesquisa.

À Professora Soraia Cordeiro e toda sua equipe do *Laboratório de Microbiologia Clínica* da UFBA, pela disponibilidade e contribuição na realização das análises do perfil genético.

À CAPES e ao Projeto CNPq/CAPES PVE (400170/2014-5) pelo auxílio financeiro.

**“Não é o desafio com que nos deparamos que determina quem somos e o que estamos nos tornando, mas a maneira com que respondemos a ele. Somos combatentes, idealistas, mas plenamente conscientes porque ter consciência não nos obriga a ter teorias sobre as coisas: só nos obriga a sermos conscientes.**

**Problemas para vencer, liberdade para provar. E, enquanto acreditarmos nos nossos sonhos, nada será por acaso.”**

*Henfil*

## RESUMO

A obtenção otimizada de goma xantana a partir de cepas nativas está condicionada a diversas variáveis, sobretudo, àquelas inerentes à própria cepa microbiana utilizada no processo. Para serem úteis em aplicações industriais, é importante que as bactérias permaneçam viáveis, mantenham suas funções celulares e propaguem-se bem após a conservação. As condições de estocagem e manutenção das bactérias devem preservar a pureza e suas características fenotípicas e genotípicas, que em conjunto confirmam a identificação do gênero e da espécie microbiana e garantem uma maior reprodutibilidade do rendimento e propriedades de seus produtos metabólicos. Este trabalho apresenta em seu primeiro capítulo uma revisão da literatura sobre os principais tópicos relacionados ao estudo e, em seu segundo capítulo, traz uma prospecção de publicações científicas dos últimos 10 anos, na qual são considerados os principais autores, o número de publicações anuais e os principais periódicos que divulgam trabalhos relacionados a composição de ácidos graxos celulares bacterianos, que são importantes características fenotípicas usadas como biomarcadores taxonômicos de microrganismos. Este capítulo serviu como base para definir a abordagem deste assunto no estudo realizado posteriormente com a *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103 descrito no capítulo III, no qual são apresentados os dados de monitoramento fenotípico e genotípico da cepa que foi mantida por seis meses nas condições de congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  e sob refrigeração ( $3-8^{\circ}\text{C}$ ) com repiques mensais em ágar inclinado YM. Os resultados revelaram a estabilidade da *Xanthomonas* quanto aos aspectos morfocoloniais, perfil genético e bioquímico em ambos os métodos de preservação. Na análise do perfil de ácidos graxos da cepa, foram identificados e quantificados 13 compostos, cuja concentração se mostrou mais estável nas células mantidas à  $-80^{\circ}\text{C}$ . A variação quantitativa de alguns destes ácidos indicou possível carência de nutrientes ou estresse das células cultivadas em ágar YM inclinado e mantidas sob refrigeração, as quais metabolizaram goma xantana com viscosidade mais baixa e em menor quantidade. O perfil de fragmentação cromossômica obtido com enzima de macro restrição *XbaI* e revelado por eletroforese de campo pulsado apresentou apresentou 17 fragmentos distintos, com tamanhos de, no máximo, 485 kilobases (kb). Não foram observadas variações na fragmentação cromossomal entre os subcultivos mantidos nas duas condições de armazenamento durante o período avaliado. O procedimento de manutenção da cepa a  $-80^{\circ}\text{C}$  resultou em menores variações nas características fenotípicas avaliadas, o que provavelmente influenciou positivamente as características quali e quantitativas da xantana produzida.

**Palavras-chave:** Ácidos graxos bacterianos. Biopolímeros. Goma xantana. *Xanthomonas campestris*. PFGE.

## ABSTRACT

The optimized production of xanthan gum with native bacterial strains depends on several conditions, particularly those inherent to the microbial strain used in the process. To be useful in industrial applications, it is important that the bacteria remain viable, maintain their cellular functions and propagate well after storage periods. The conditions of storage and maintenance of the bacteria must preserve its microbiological purity, as well as, the phenotypic and genotypic characteristics, which together confirm the identification of microbial gender and species, ensuring metabolic production with better reproducibility in terms of yielding and properties. The first chapter of this work comprises a literature review of the main topics related to this study and, the second chapter provides a prospecting of scientific publications from the last 10 years, in which are considered the main authors, the number of annual publications and leading journals that publish articles related to the bacterial cellular fatty acids, which is an important phenotypic characteristic used as taxonomic biomarkers of microorganisms. The chapter II served as the basis for the approaching of this subject in the study with the *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103 described at the Chapter III, which shows phenotypic and genotypic monitoring data of the strain maintained in freezing conditions at  $-80^{\circ}\text{C}$  and in YM agar slant under refrigeration ( $3-8^{\circ}\text{C}$ ) during six months. The results showed the stability of *Xanthomonas* regarding morphocolonial aspects, genetic and biochemical profile in both preservation methods. The fatty acid analysis profile of this strain showed 13 compounds, which were identified and quantified. The cells kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  showed a more stable concentration of all fatty acids. The quantitative variation of these fatty acids observed in the cells maintained on YM agar slant under refrigeration, is an indicative of possible nutritional deficiencies or other stress condition associated to this maintenance condition. Such cells metabolized xanthan gum with low viscosity and, in fewer amounts. The chromosomal fragmentation profile obtained with the macro restriction enzyme *XbaI*, revealed by pulsed field gel electrophoresis, showed 17 distinct fragments with maximum size of 485 kilobases (kb). No variations in the chromosomal fragmentation profile among the subcultures maintained in both storage conditions were observed during the studied period. The maintenance procedure of the *Xanthomonas* strain at  $-80^{\circ}\text{C}$  showed lower variations in all phenotypic characteristics observed, which probably had a positive influence on the qualitative and quantitative characteristics of the xanthan gum produced.

**Keywords:** Bacterial fatty acids. Biopolymers. Xanthan gum. *Xanthomonas campestris*. PFGE.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPITULO I

Figura 1 - Sintomas da mancha angular em folhas de mangueira (A) e <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> cultivada em ágar YM (B). .....	19
Figura 2 - Goma xantana produzida por <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> 2103.....	20
Figura 3 - Biossíntese da Goma Xantana. ....	20
Figura 4 - Biossíntese de lipídeos simples. ....	28
Figura 5 - Biossíntese do ácido palmítico (C16:0). ....	29
Figura 6 - Estruturas de ácidos graxos comuns em culturas microbianas: cadeia saturada (A), insaturada com conformação cis (B), insaturada com conformação trans (C), configuração iso (D), configuração anteiso (E), ciclopropano (F) e hidroxila (G). ....	31

### CAPITULO II

Figura 1 - Número de artigos publicados no portal da CAPES de acordo com temas específicos. ....	44
Figura 2 - Número de artigos publicados de acordo com temas específicos no Science Direct. ....	45
Figura 3 - Principais revistas que publicam artigos sobre ácidos graxos bacterianos citadas no portal CAPES. ....	47
Figura 4 - Principais revistas que publicam artigos sobre ácidos graxos bacterianos citadas no Science Direct.....	47
Figura 5 - Número de artigos sobre ácidos graxos bacterianos publicados nos últimos 10 anos, disponibilizados no portal da CAPES. ....	48
Figura 6 - Número de artigos sobre ácidos graxos bacterianos publicados nos últimos 10 anos, disponibilizados no Science Direct. ....	48
Figura 7 - Principais autores e o número de artigos publicados relacionados ao tema ácido graxo celular de bactérias, encontrados nas bases de dados Science Direct e portal da CAPES. ....	49

### CAPITULO III

Figura 1 - Repiques do 5º mês de avaliação da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> 2103 propagada em ágar YM após manutenção em ultra freezer a -80°C (A) e refrigeração por 3 – 8°C (B).....	61
---	----

Figura 2 - Perfil cromatográfico dos ácidos graxos identificados na <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> IBSBF 2103 mantida à -80°C e sob refrigeração (3-8°C) em ágar YM inclinado, 5º mês, obtidos por CG-DIC com coluna capilar CP-WAX 58 (FFAP) CB. ....	65
Figura 3 - Variação da composição percentual média dos ácidos graxos da <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> IBSBF 2103 estocada em freezer a -80°C e mantida por repiques mensais (3-8°C), no primeiro mês (T0) e nos 5 meses subsequentes (T1, T2, T3, T4 e T5).....	67
Figura 4 - Concentração média dos principais ácidos graxos da <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> IBSBF 2103 mantida sob congelamento (-80°C) e refrigeração (3 – 8°C), em função do tempo.....	68
Figura 5 - Relação da concentração média entre os ácidos graxos C18:1 $\omega$ 9 cis e C18:1 $\omega$ 9 trans da <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> IBSBF 2103, mantida sob congelamento (-80°C) e refrigeração (3 – 8°C), em função do tempo. ....	70
Figura 6 - Perfil de fragmentação cromossomal da <i>X. campestris mangiferaeindicae</i> IBSBF 2103 obtido com enzima de restrição XbaI e separação por eletroforese de campo pulsado (PFGE) em gel de agarose a 1,2% (p/v) com tampão TBE 0,5x a 14°C, pulsos de 2 a 30s, 23h a 6 V cm <sup>-1</sup> . Coluna A: marcadores de tamanho (kilobases-kb); B: subcultivo congelado -80°C; C; D; E; F e G: subcultivos em ágar YM inclinado a 3-8°C do 1º ao 5º mês, respectivamente; <b>H</b> : repetição do subcultivo do 3º mês.....	72
Figura 7 - Viscosidade aparente da goma xantana produzida pela <i>X. campestris mangiferaeindicae</i> IBSBF 2103 mantida em diferentes condições de armazenamento. Suspensão de xantana a 0,5% (m/v) / 25s-1 / 25°C.....	74
Figura 8 - Relação entre a viscosidade aparente (mPa.s) e a concentração de goma xantana (g/L) obtida com a <i>X. campestris mangiferaeindicae</i> IBSBF 2103 mantida em diferentes condições de armazenamento durante 5 meses.....	75
Figura 9 - Viscosidade aparente da goma xantana obtida de <i>X. campestris</i> pv. 2103 mantida a -80°C e a 3-8°C por repiques mensais. Concentração de 0,5% (m/v) a 25°C. ....	76

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

Tabela 1 - Escopo da busca nas bases de dados. ....	43
Tabela 2 - Número de artigos por assunto após o refinamento. ....	44
Tabela 3 - Número de artigos publicados por espécie de bactéria. ....	46

### CAPÍTULO III

Tabela 1 - Características morfológicas e bioquímicas da <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> IBSBF 2103. ....	63
Tabela 2 - Especificação dos principais ácidos graxos identificados na <i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> IBSBF 2103 por GC-DIC e GC-MS. ....	66
Tabela 3 – Produção da goma xantana produzida pela <i>X. campestris mangiferaeindicae</i> IBSBF 2103 utilizando sacarose (2%) em fermentador rotativo a 28°C, 250 rpm e 120 h. ....	73

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
2.1 Objetivo Geral .....	16
2.2 Objetivo Específico .....	16
<b>CAPÍTULO I: Revisão da Literatura</b>	
1 <i>Xanthomonas</i> spp.....	18
2 GOMA XANTANA .....	19
3 MANUTENÇÃO E PRESERVAÇÃO DE MICROORGANISMOS .....	23
3.1 Repicagem Contínua ou Subcultivo .....	23
3.2 Ultracongelamento.....	24
4 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS .....	25
5 ÁCIDOS GRAXOS CELULARES BACTERIANOS.....	26
5.1 Biossíntese dos Ácidos Graxos Celulares Bacterianos .....	27
5.2 Identificação de Ácidos Graxos Celulares Bacterianos.....	30
5.3 Nomenclatura de Ácidos Graxos Celulares Bacterianos.....	31
6 PERFIL GENÉTICO E TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA.....	32
REFERÊNCIAS .....	34
<b>CAPÍTULO II: Prospecção Tecnológica - Perfil de Ácidos Graxos Celulares na Identificação e Caracterização Bacteriana</b>	
1 INTRODUÇÃO.....	41
2 METODOLOGIA.....	42
3 RESULTADOS .....	43
3.1 Conteúdo dos Artigos Publicados .....	43
3.2 Principais Periódicos .....	46
3.3 Publicações Anuais.....	48
3.4 Principais Autores .....	49
4 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS .....	50

**CAPÍTULO III: Influência das Condições de Preservação sobre o Perfil Genético e de Ácidos Graxos Celulares, Comportamento Bioquímico e Produção de Goma Xantana da *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103.**

RESUMO .....	53
ABSTRACT .....	54
1 INTRODUÇÃO.....	55
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	57
2.1 Reativação do Microrganismo.....	57
2.2 Manutenção do Microrganismo.....	57
2.3 Pureza Microbiana.....	57
2.4 Provas Bioquímicas .....	57
2.5 Perfil de Ácidos Graxos Bacterianos.....	58
2.6 Perfil Genético.....	59
2.7 Produção de Goma Xantana e Viscosidade Aparente .....	59
2.8 Análise estatística .....	60
3 RESULTADOS .....	60
3.1 Pureza Microbiana.....	60
3.2 Perfil Fisiológico e Bioquímico.....	62
3.3 Perfil de Ácido Graxo Bacteriano .....	64
3.4 Perfil Genético.....	71
3.5 Produção e Viscosidade Aparente da Goma Xantana .....	72
4 CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS .....	78
<b>APÊNDICE A - CROMATOGRAMAS DO PADRÃO BAME INJETADO NO CG-DIC (A) E NO CG-EM (B).....</b>	<b>81</b>
<b>APÊNDICE B - ESPECTROS DE MASSA DOS ÁCIDOS GRAXOS DO PADRÃO ANALÍTICO BAME.....</b>	<b>82</b>
<b>APÊNDICE C – CONCENTRAÇÃO RELATIVA DOS PRINCIPAIS ÁCIDOS GRAXOS DA <i>Xanthomonas c.</i> 2103.....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As diferentes espécies de *Xanthomonas* podem sintetizar xantanas com características diferenciadas de viscosidade, textura, quantidade e estabilidade. Diante desta afirmativa, quando há conhecimento sobre o comportamento da espécie produtora é possível estabelecer se o polímero sintetizado é eficiente e se este pode ser conduzido para uma determinada aplicação. Por este motivo, busca-se estudar as características dos microrganismos produtores deste biopolímero.

A *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* pertence à família Pseudomonaceae, sendo conhecida por ser o agente causal da mancha angular ou cancro bacteriano em mangueiras. Esta subespécie, que se desenvolve em colônias de pigmentação clara ou ausente em meio contendo ágar, produz goma xantana em diferentes condições de fermentação, apresentando bons resultados com o uso de fontes alternativas de substratos fermentescíveis, de acordo com trabalhos publicados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Análises Aplicadas e de Biomateriais (LAPBIM) da Universidade Federal da Bahia.

A goma xantana é um polissacarídeo microbiano de grande importância para a aplicação industrial, pois possui excelentes propriedades pseudoplásticas, apresenta alta viscosidade em baixas concentrações e estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura. Estas características tornam o polímero muito útil na indústria alimentícia, farmacêutica, petrolífera e de produtos agrícolas.

O maior problema na produção de polímeros microbianos como a xantana está associado à reprodutibilidade das suas propriedades, principalmente devido a manutenção da pureza microbiana, concentração celular, fase de crescimento, tempo de multiplicação, mutação intrínseca ou induzida por fatores externos e mutações genéticas durante a manutenção das cepas.

As técnicas de estocagem, transferência, cultivo e manutenção das culturas bacterianas devem preservar a pureza e as características fenotípicas e genotípicas que em conjunto, confirmam a identificação do gênero e da espécie microbiana. Portanto, o monitoramento da pureza, comportamento bioquímico, perfil genético e de ácidos graxos da cepa microbiana pode contribuir para uma maior reprodutibilidade do rendimento e das propriedades de seus metabólitos.

Buscando contribuir com os estudos que têm por objetivo a melhoria das características qualitativas e quantitativas da produção de biopolímeros bacterianos, o presente trabalho foi desenvolvido a fim de avaliar se a cepa IBSBF 2103 da *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* sofre alterações ou influências nas suas características

fenotípicas, genotípicas e de produção de xantana durante sua manutenção em laboratório sob duas condições distintas de preservação, o ultracongelamento em meio líquido e o resfriamento em ágar inclinado.

Esta dissertação está estruturada em três capítulos. O primeiro é uma revisão da literatura, o segundo trata de uma prospecção tecnológica de artigos científicos com o tema “perfil de ácidos graxos celulares de bactérias” e o terceiro capítulo aborda os resultados obtidos durante seis meses de avaliação e monitoramento da cepa IBSBF 2103 da *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* produtora de goma xantana.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Monitorar alterações fenotípicas e genotípicas da *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103 durante os procedimentos de manutenção da cepa em duas condições distintas de preservação, visando identificar a condição que resulte em menor impacto sobre estas características e sobre a capacidade de produção de goma xantana por este microrganismo.

### 2.2 Objetivo Específico

- Determinar o perfil bioquímico e fisiológico da *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* preservada nas condições de congelamento (ultra freezer a -80°C) e refrigeração (3 a 8°C);
- Estabelecer a composição qualitativa e quantitativa de ácidos graxos celulares da *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* por técnica de cromatografia gasosa;
- Determinar o perfil genético (*fingerprint*) da *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* por meio da técnica de eletroforese de campo pulsado – PFGE;
- Avaliar os efeitos das condições de preservação e do tempo de estocagem da *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* sobre a pureza microbiana, comportamento bioquímico e fisiológico, perfil genético e de distribuição quantitativa e qualitativa de ácidos graxos celulares desta cepa de *Xanthomonas*;
- Observar a ocorrência de alterações de ordem fenotípica (bioquímica e composição de ácidos graxos) e genotípica da *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, correlacionando com possíveis variações quali e quantitativas da produção de goma xantana para estabelecer a melhor técnica de preservação desta cepa.

## **CAPÍTULO I**

---

### **Revisão da Literatura**

## 1 *Xanthomonas* spp.

Originada do grego, a palavra *Xanthomonas* significa “xanthos” = amarelo e “monas” = unidade (KRIEG e HOLT, 1994; MAC FADDIN, 2000). O gênero *Xanthomonas* está distribuído em 1470 famílias, apresentam 3636 genes únicos. Dentre estes genes, merecem atenção os receptores de ferro, os sintetizadores de flagelo, aqueles envolvidos com metabolismo energético, sistema secretório tipo II, sistema secretório tipo III e os envolvidos com quimiotaxia (MOREIRA et al., 2005).

As células bacterianas de *Xanthomonas* normalmente apresentam flagelo único, consequentemente dispõem de motilidade, apresentam-se dispostas isoladamente em forma de bastonetes retos, facilmente visíveis ao microscópio óptico. Caracterizam-se como Gram-negativas, oxidase negativas, catalase positivas, não redutoras de nitrito, apresentam resultados positivos para esculina e negativos para hidrólise da gelatina. Têm bom crescimento na faixa de temperatura entre 28 - 30°C e não cresce a 40°C (KRIEG e HOLT, 1994; MAC FADDIN, 2000). O tempo médio de crescimento varia de 2 a 3 dias e normalmente são aeróbias ou microaerofílicas, o que facilita o cultivo em laboratório (PAGLIARINI e DRUZIAN, 2007).

A maioria dos membros do gênero *Xanthomonas* produz um pigmento amarelo associado à membrana celular externa, chamado xantomonadina (STARR et al., 1977). Embora seja uma característica importante para identificação do gênero, algumas linhagens podem não apresentar a pigmentação. A ausência da xantomonadina não exclui o organismo do gênero se outras características estiverem de acordo (GARRITY et al., 2005).

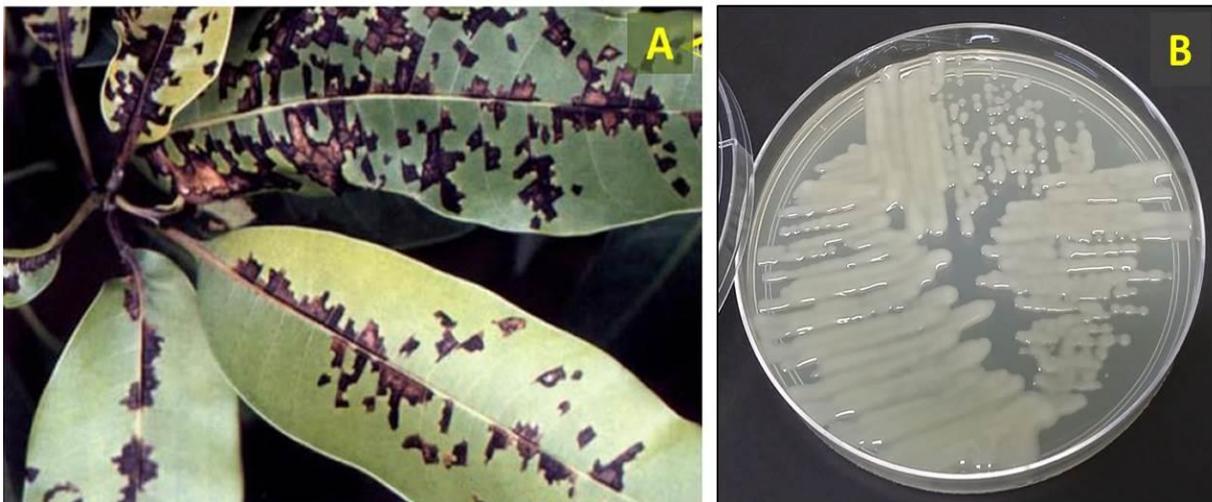
As *Xanthomonas* são quimio-organotróficas e estritamente aeróbias, com um tipo de metabolismo respiratório que requer oxigênio como aceptor de elétrons terminais. São essencialmente fitopatogênicas, com exceção da espécie *Xanthomonas maltophila*, capazes de provocar importantes doenças em uma extensa variedade de plantas cultivadas (herbáceas e lenhosas), bem como em plantas nativas (GARCÍA-OCHOA, 2000).

A espécie *X. campestris* tem sido dividida em mais de 140 patovares, indicando sua alta diversidade patogênica (BERTHIER et al., 1993). A *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* por exemplo, é relatada como o agente causal da mancha angular ou cancro bacteriano em mangueiras (GAGNEVIN, LEACH e PRUVOST, 1997; NASCIMENTO e MARIANO 2004; TRINDADE et al., 2007) (Figura 1.A).

A subespécie *mangiferaeindicae* apresenta geralmente colônias com aspecto brilhante com bordas lisas e uma coloração esbranquiçada em meio ágar-nutritivo, pois não produz ou

produz pouca xantomonadina (Figura 1.B), com exceção de alguns patovares ou isolados de um mesmo patovar (SWINGS, VAUTERIN e KERSTER, 1993).

**Figura 1** - Sintomas da mancha angular em folhas de mangueira (A) e *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* cultivada em ágar YM (B).



Fonte A: Trindade (2007)

Fonte B: Acervo pessoal (2015)

A maioria dos patovares de *X. campestris* e outras espécies produzem exopolissacarídeos (EPS). Por serem bactérias fitopatogênicas em sua maioria, esta produção de EPS está relacionada com a sua sobrevivência em ambientes hostis, proteção contra o desidratação, concentração de minerais e nutrientes, redução do contato com moléculas hidrofóbicas ou carregadas e fixação na superfície do vegetal hospedeiro (BREWIN, 1991; DUNGER et al., 2007; ROTTAVA et al., 2009) .

O EPS produzido por bactérias do gênero *Xanthomonas* é definido como goma xantana. Em função de suas excelentes propriedades físico-químicas e aplicações industriais, os fatores que afetam sua produção e caracterização têm sido amplamente estudados.

## 2 GOMA XANTANA

A goma xantana é um heteropolissacarídeo sintetizado por bactérias do gênero *Xanthomonas* por meio de processo fermentativo aeróbico, que utiliza a glicose ou sacarose como principal substrato (BRANDÃO et al., 2008) (Figura 2).



A rota biossintética da goma xantana envolve pelo menos três etapas, que têm início com a conversão de açúcares simples em precursores nucleotídicos; segue com o encaixe das sub-unidades pentassacarídicas aos carreadores poliprenol-fosfato da membrana citoplasmática e a adição dos grupos acetil e piruvato; finalizando com a polimerização das unidades pentassacarídicas e secreção do polímero (IELPI, COUSO e DANKERT, 1993; DA SILVA et al., 2002).

A massa molecular da goma xantana é  $2 \times 10^6$  Dalton (Da), podendo alcançar até  $30 \times 10^6$  Da. A estrutura primária do biopolímero normalmente consiste de uma unidade pentassacarídica composta de D-glicose, resíduos de ácido D-glucurônico e de manose, em uma proporção molar de 2:2:1, com quantidades variáveis de grupos substituintes piruvato e acetil. A cadeia principal da xantana é composta por unidades de D-glicose ( $\beta$ -1,4) ligada a cadeias laterais trissacarídicas compostas por unidades de manose ( $\beta$ -1,4) e de ácido glucurônico ( $\beta$ -1,2) (ROSALAM e ENGLAND, 2006; VIDHYALAK, VALLINACHIYAR e RADHIKA, 2012).

Soluções aquosas desse biopolímero apresentam excelentes propriedades reológicas, atribuídas ao seu caráter pseudoplástico, além de estabilidade da viscosidade em ampla faixa de pH e temperatura (ROSALAM e ENGLAND, 2006). Comercialmente, este polissacarídeo é aplicado como estabilizante de emulsões, agente de suspensão e espessante no setor alimentício, farmacêutico e de produtos agrícolas (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Na indústria de petróleo, a goma xantana é utilizada como agente de controle de mobilidade na recuperação do óleo e lama de perfuração de poços (SUTHERLAND, 2002).

O uso da xantana na indústria de alimentos foi aprovado nos Estados Unidos em 1969 pelo Food and Drug Administration – FDA (FONTANIELLA et al., 2002). Desde sua inclusão na produção alimentícia em larga escala, tem sido utilizada como substituto parcial de gordura em bolos, reduzindo o teor gorduroso entre 50% a 60% sem alterar o aspecto e características organolépticas. Entre suas funcionalidades destaca-se também a manutenção da estabilidade e atividade de água, diminuição do teor de umidade em aproximadamente 20%, proporcionando um produto final com maior volume em relação ao convencional (ZAMBRANO et al., 2005).

Do ponto de vista comercial, a goma xantana é o polissacarídeo microbiano mais importante, com uma produção mundial de cerca de 30.000 toneladas por ano, movimentando um mercado de aproximadamente 408 milhões de dólares. As principais indústrias produtoras de xantana são Kelco (EUA), Rhône-Poulenc (França), Pfizer (EUA) e Mero-Rousselot-Santia (França) (PRADELLA, 2006). Atualmente acredita-se que o volume de produção

ultrapassa o valor relatado em 2006, sendo o Grupo Fufeng (China) o maior produtor mundial (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

Industrialmente existe um aumento na demanda por biopolímeros (goma xantana, polihidroxialcanoato – PHA, alginato, entre outros) como substituintes parciais de polissacarídeos clássicos como o amido e celulose, tanto por suas propriedades funcionais únicas, quanto por serem obtidos a partir de fontes renováveis e sintetizados em menor tempo.

A xantana utilizada no Brasil ainda é importada na sua totalidade (BORGES et al., 2009). Entretanto, de acordo com Menezes e colaboradores (2012), o país possui os insumos básicos utilizados durante o processo, como o açúcar de cana e o etanol (solvente usado na precipitação do biopolímero), o que o torna um potencial centro de produção deste polímero.

Neste contexto, a importância da produção de goma xantana no país despertou o interesse no desenvolvimento de pesquisas para caracterização genética e fenotípica das linhagens produtoras, a fim de compreender as relações com o rendimento de produção e qualidade do biopolímero (VAUTERIN, YANG e SWINGS, 1996; LUVIELMO, VENDRUSCOLO e SCAMPARINI, 2007; MOITINHO, 2012).

A obtenção otimizada de goma xantana a partir de cepas nativas, por exemplo, está condicionada a diversas variáveis entre as quais, aquelas inerentes à própria cepa utilizada no processo, como a pureza microbiana, concentração celular, fase de crescimento, tempo de multiplicação e mutação intrínseca ou induzida por fatores externos. Xantanas com propriedades reológicas inadequadas, baixo rendimento e consequente custo de produção elevado, podem ser sintetizadas por sub-linhagens decorrentes do contínuo cultivo da bactéria durante a etapa de produção do inóculo (RAMÍREZ et al., 1988). Algumas pesquisas relatam que repiques sucessivos da bactéria aumentam a probabilidade de mutações espontâneas e aleatórias (KIDBY et al., 1977; RAIMANN et al., 2002).

De acordo com Kidby e colaboradores (1977), a probabilidade de degeneração da cultura é diretamente proporcional ao número de gerações microbianas envolvidas. Os autores relataram que células de *Xanthomonas* mantidas por subcultivos periódicos a cada 14 dias mostraram-se viáveis para produção de xantana somente durante 3 meses de avaliação.

Para serem úteis 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). A utilização de inóculos de *Xanthomonas* adaptados ao meio, estáveis e livres de sub-linhagens improdutivas, torna-se fundamental para incrementar a produtividade do processo fermentativo.

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 poucos os relatos na literatura sobre o desempenho quantitativo dos métodos utilizados para a conservação desse microrganismo.

### **3 MANUTENÇÃO E PRESERVAÇÃO DE MICRORGANISMOS**

A importância da manutenção e principalmente preservação de culturas bacterianas advém da necessidade de se dispor do organismo ou espécime a qualquer momento, quer para fins experimentais, didáticos, industriais ou estudos comparativos. Desta forma, conhecer a melhor maneira de preservar culturas bacterianas e dispor de técnicas simples e eficientes para isso é fundamental em laboratórios de microbiologia (SOLA, 2012).

Grande parte das técnicas utilizadas para a preservação de microrganismos 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 e LEIN, 1958; LIAO e SHOLLENBERGER, 2003) e também variações de métodos convencionais (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.

De acordo com Borowisk (2011) 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).

As técnicas de repiques contínuos e ultracongelamento com agentes crioprotetores têm sido muito empregadas nos laboratórios de microbiologia. Por constituírem o foco deste trabalho, estas duas técnicas serão descritas de forma mais detalhada.

#### **3.1 Repicagem Contínua ou Subcultivo**

O repique ou subcultivo consiste na inoculação do microrganismo em meio adequado, incubação em ambiente favorável a multiplicação e estocagem em baixas temperaturas após sua multiplicação (COSTA e FERREIRA, 1991; GREEN, 2008). Para minimizar o efeito da

desidratação, os isolados devem ser conservados em tubos de ensaio com tampa rosqueável ou selados com parafina, armazenados em ambientes protegidos da luz e de variações de temperatura, devendo ser mantidos preferencialmente entre 5 e 8°C (MURRAY, 2003).

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

O repique contínuo é considerado bastante prático, pois tem baixo custo e os isolados são facilmente recuperados. Por ser um método simples, caracteriza-se como técnica tradicional de manutenção de culturas em laboratório, sendo bastante utilizada para se obter a viabilidade de microrganismos, principalmente de bactérias (COSTA e FERREIRA, 1991; ROMEIRO, 2006).

A grande vantagem da repicagem periódica refere-se à experiência adquirida por quem manuseia as culturas, já que, estando familiarizado com as características das colônias, pode-se reconhecer rapidamente uma contaminação ou alteração morfológica nas mesmas (BOROWSKI, 2011).

No caso da preservação de bactérias do gênero *Xanthomonas*, houve uma 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 campestris* em meio sólido YM (*yeast malt*) em tubos inclinados. Após repiques mensais durante 11 meses, observaram que a bactéria não apresentou mudanças morfológicas nas colônias e nem alteração na sua capacidade de produção de xantana. Esta técnica de manutenção da *Xanthomonas* à temperatura de 4°C, com repiques a cada 30 dias passou a ser utilizada em vários trabalhos (GUPTE e KAMAT, 1997; SOUZA e VENDRUSCOLO, 1999; ROTTAVA et al., 2009).

### **3.2 Ultracongelamento**

O ultracongelamento está relacionado à conservação de microrganismos em freezer com temperatura em torno de -80°C e, por ser tão consolidado na microbiologia, assim como outras técnicas modernas, tem sido considerado um procedimento convencional para a

manutenção de culturas microbianas. Por outro lado, técnicas tradicionais, de baixa tecnologia, passaram a ser consideradas alternativas (BOROWSKI, 2011).

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

Apesar de microrganismos congelados sobreviverem sem um aditivo de proteção, a presença de crioprotetores adequados normalmente aumenta consideravelmente a sobrevivência das culturas (HUBALEK, 2003). Estes agentes protegem a célula microbiana dos efeitos deletérios do congelamento e descongelamento, impedindo a formação de cristais de gelo e estabilizando alguns componentes da membrana celular.

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).

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 adicionado ao caldo de cultivo (SIMIONE, 1998). Alguns autores recomendam misturas complexas como crioprotetores e que normalmente contém proteínas, glicídeos ou poliálcoois em sua composição (LI et al., 2006).

#### **4 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE BACTÉRIAS**

Os microrganismos não possuem características morfológicas suficientes que permitam a sua distinção. Frequentemente são classificados de acordo com a observação de detalhes anatômicos, entretanto, algumas culturas são muito semelhantes entre si para serem classificadas por suas estruturas. No microscópio, espécies bacterianas que diferem quanto às suas propriedades metabólicas ou fisiológicas podem parecer iguais apesar de serem pequenos bastonetes ou pequenos cocos. Um tamanho maior ou a presença de estruturas intracelulares nem sempre significa uma classificação fácil. Sendo assim, os microbiologistas desenvolveram uma variedade de métodos que testam reações metabólicas e outras características que possibilitam o agrupamento e identificação de microrganismos (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012; ZANGENAH et al., 2013).

As bactérias foram por muitos anos, identificadas através de provas bioquímicas tradicionais, as quais podem levar até mais de 20 horas para gerar o resultado. Algumas cepas não são muito bem identificadas pelo método tradicional, em que são preparados todos os substratos de reação e a análise é feita em tempo mais longo (FRAZÃO, 2014). No entanto, resultados mais exatos e precisos podem ser obtidos com essa metodologia quando realizada por métodos automatizados em microescala (ZANGENAH et al., 2013).

Os métodos bioquímicos tradicionais foram substituídos gradualmente por métodos mais rápidos ou sistemas automatizados, tais como Vitek<sup>®</sup>, Biolog<sup>®</sup> e Bac tray<sup>®</sup>. No início da década de 70, o uso de substratos liofilizados em matrizes plásticas permitiu a identificação de vários isolados clínicos em até 24 horas. Na segunda metade da década de 70, alguns sistemas de identificação automatizados foram criados a partir destes testes rápidos (STAGER, 1997).

Assim, a utilização de kits contendo substratos bioquímicos e enzimáticos para a identificação bacteriana simplificou e melhorou a precisão das análises de caracterização fenotípica e por isso tem sido adotada em vários experimentos (DUGGAL et al., 2012; PACHECO, 2009).

O sistema Bac tray<sup>®</sup> consiste em um kit para identificação bioquímica rápida para bacilos Gram-negativos oxidase negativa, microrganismos fermentadores ou não da glicose e bacilos Gram-negativos oxidase positiva. É composto por 3 conjuntos de provas bioquímicas com 30 substratos desidratados que garantem sensibilidade ao sistema (LABORCLIN, 2015).

## **5 ÁCIDOS GRAXOS CELULARES BACTERIANOS**

Os tipos e proporções de ácidos graxos presentes nos lipídeos da membrana citoplasmática e membrana externa das células bacterianas são importantes características fenotípicas destes microrganismos.

Os lipídeos compõem estruturalmente as membranas biológicas de células bacterianas e, em sua maioria, são descritos como fosfolipídeos. Outros lipídeos, tais como os carotenoides, são responsáveis pela pigmentação vermelha, laranja e amarela de alguns microrganismos e alguns também funcionam como estoque energético (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

A composição de ácidos graxos nas células varia entre as diferentes espécies bacterianas, podendo também variar dentro de uma mesma espécie, devido às diferenças de temperatura, pois o crescimento em baixas temperaturas promove a biossíntese de ácidos de cadeias mais curtas, enquanto o crescimento em temperaturas mais elevadas promove a síntese de ácidos de cadeia laterais de fitanil, em vez de ácidos graxos. Os ácidos graxos mais comuns encontrados em lipídeos de bactérias contêm de 12 a 20 carbonos (MADIGAN et al., 2010).

Os ácidos graxos podem ser empregados como biomarcadores de grupos taxonômicos de fungos, bactérias Gram-negativas, bactérias Gram-positivas, actinomicetos e microeucariotos. Além disso, alguns ácidos graxos são típicos em função de determinados grupos funcionais adicionais, o que permite o uso de técnicas para monitorar alterações em populações microbianas envolvidas em alguns processos específicos (FERNANDES e CHAER, 2010).

Yang e colaboradores (1993) avaliaram 975 cepas de *Xanthomonas* que incluíam representantes de sete espécies de *Xanthomonas* (*X. albilineans*, *X. axonopodis*, *X. campestris*, *X. fragariae*, *X. maltophilia*, *X. oryzae* e *X. populi*), 134 patovares de *X. campestris* e 2 patovares de *X. oryzae* e outras cepas relacionadas. Observaram que, pelo menos, 65 diferentes ácidos graxos foram encontrados em quantidades variáveis entre os membros do gênero *Xanthomonas* estudados e que nove ácidos graxos [ácido undecanóico (*i*-C11:0), iso 3-hidroxiundecanóico (3-OH *i*-C11:0), 3-hidroxidodecanóico (3-OH C12:0), iso 3-hidroxitridecanóico (3-OH *i*-C13:0), iso-pentadecanóico (*i*-C15:0), palmitoléico (C16:1 $\omega$ 7), palmítico (C16:0), *i*-C17:1 e iso-heptadecanóico (*i*-C17:0)] foram identificados em mais de 99% das 966 estirpes, sendo portanto, considerados como os mais comuns no gênero.

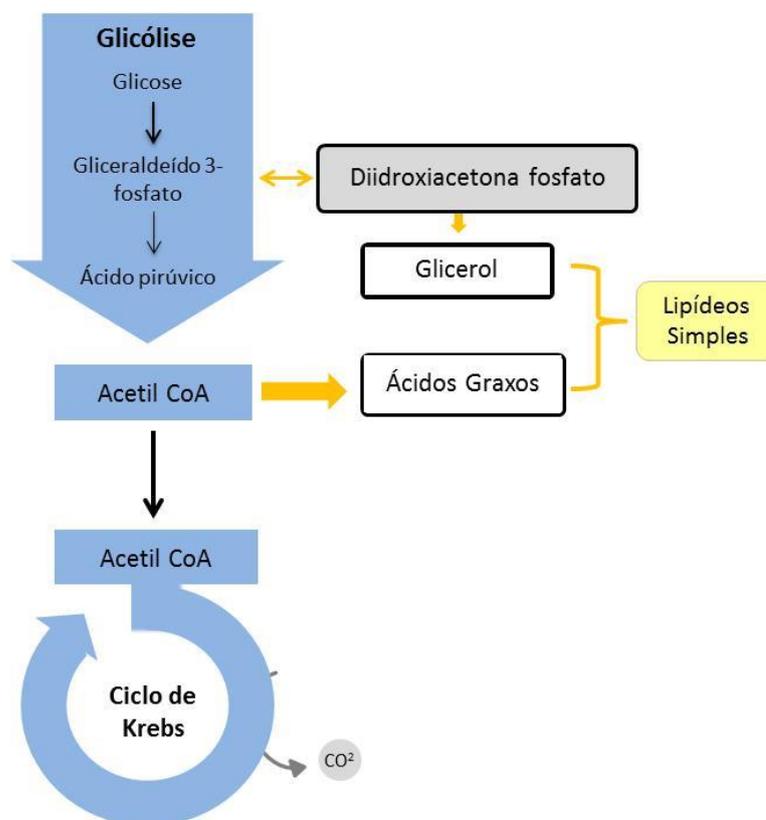
Não há relatos da composição lipídica celular da subespécie *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*, por isso faz-se necessário um estudo da identificação e caracterização dos ácidos graxos desta cepa, uma vez que esta composição é única para cada espécie de microrganismo, podendo ser empregada para classificação de grupos taxonômicos.

## 5.1 Biossíntese dos Ácidos Graxos Celulares Bacterianos

As bactérias sintetizam uma grande variedade de ácidos graxos, e em geral, esses ácidos graxos são constantes para uma espécie em particular.

No processo de síntese dos lipídeos simples, os ácidos graxos são montados quando dois fragmentos de carbono, denominados acetil CoA (derivados do ácido pirúvico), são sucessivamente adicionados um ao outro (Figura 4). As unidades de montagem das gorduras e outros lipídeos são acopladas via reação de síntese de desidratação que requer energia, nem sempre na forma de ATP. Os produtos da quebra de lipídeos após oxidação biológica suprem o ciclo de Krebs (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012).

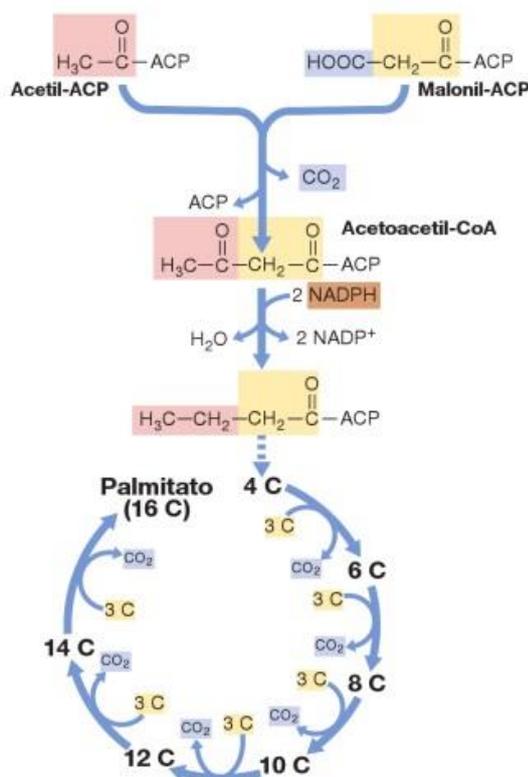
**Figura 4 - Biossíntese de lipídeos simples.**



Fonte: Tortora, Funke e Case (2012).

Em cada etapa da síntese dos ácidos graxos, os dois átomos de carbono que participam do processo contam com o auxílio de uma proteína denominada proteína carreadora acil (ACP, *acyl carrier protein*). A ACP liga-se ao ácido graxo em crescimento à medida que é sintetizado, liberando-o quando atinge seu comprimento final (MADIGAN et al., 2010). A Figura 5 representa este processo com o ácido palmítico (C16:0), um ácido graxo comum em células bacterianas.

Figura 5 - Biossíntese do ácido palmítico (C16:0).



Fonte: Madigan e colaboradores (2010)

Embora os ácidos graxos sejam sintetizados pela adição sequencial de dois fragmentos de carbonos (acetil coA), no processo de crescimento da cadeia carbônica, cada unidade contendo dois carbonos é doada pelo malonato, um composto contendo três carbonos que se liga à ACP, formando malonil-ACP. À medida que cada resíduo malonil é doado, uma molécula de CO<sub>2</sub> é liberada (MADIGAN et al., 2010).

A biossíntese de ácidos graxos é um processo essencial para a maioria das células vivas, mas também é energeticamente cara. Sendo assim, os microrganismos preservam a quantidade de lipídeos em um nível mínimo satisfatório por meio de mecanismos homeostáticos (SCHUJMAN e DE MENDOZA, 2008).

Os lipídeos neutros consistem em importantes fontes de reserva de energia celular em eucariotos, podendo também ser formados pela hidrólise do fosfato de fosfolipídeos após a morte celular. Os glicolipídeos são de ocorrência muito variável entre os diferentes grupos microbianos, sendo encontrados em membranas e parede celular de bactérias e algas. Diferentemente dos glicolipídeos, os fosfolipídeos são constituintes universais e majoritários das membranas celulares. Em função da rápida clivagem dos fosfolipídeos após a morte celular, a composição de ácidos graxos nesta classe de lipídeos é considerada um indicador da

composição da microbiota viável das amostras (KING, WHITE e TAYLOR, 1977; WHITE et al., 1979).

## 5.2 Identificação de Ácidos Graxos Celulares Bacterianos

Diversos protocolos têm sido empregados para extração e identificação de ácidos graxos celulares, os quais diferem quanto ao tipo de compostos recuperados nas amostras. Essas diferenças são associadas basicamente ao uso ou não de etapas de fracionamento de lipídeos totais e das reações empregadas para a liberação dos ácidos graxos das células microbianas.

Os protocolos mais comuns são os de perfis de ácidos graxos de fosfolipídeos – PLFA; ácidos graxos de lipídeos com ligações éster (EL-FA) e ácidos graxos totais extraíveis, utilizando a técnica de identificação de ésteres metílicos de ácidos graxos, tradicionalmente conhecida pela sigla FAME (*fatty acids methyl esters*), que deriva do protocolo comercial para identificação de culturas microbianas puras MIDI<sup>®</sup> (SASSER, 1990; FERNADES e CHAER, 2010).

Estudos mostram que os resultados obtidos com a técnica FAME para identificação microbiana, a partir de extratos totais de células, são equivalentes àqueles obtidos por métodos mais tradicionais, complexos e demorados, como as provas bioquímicas, utilizadas para o mesmo fim (HAACK et al., 1994).

A identificação dos ácidos graxos totais extraíveis é feita por comparação entre o perfil cromatográfico obtido a partir da célula microbiana isolada e uma biblioteca de perfis de ácidos graxos de microrganismos conhecidos (SASSER, 1990).

A análise consiste em quatro etapas: saponificação, metilação, recuperação dos compostos metilados e uma lavagem da fase orgânica. Na primeira etapa, o material biológico é tratado com uma solução de NaOH (1:1, v/v) e aquecido a 100°C para promover a lise celular, liberando os ácidos graxos dos lipídeos celulares e convertendo-os em sais de sódio (sabão). A etapa de metilação, realizada em seguida, aumenta a volatilidade dos compostos formados na saponificação, adequando-os a análise cromatográfica. Esta reação ocorre após a adição de uma mistura de ácido forte e metanol, seguida por incubação a 85°C. Os FAME produzidos são recuperados com adição de um solvente orgânico (ex.: hexano) resultando na separação da fase orgânica, que contém os FAME, e a fase aquosa-alcoólica contendo os compostos mais polares. A fase orgânica é tratada com solução alcalina fraca para lavagem de resíduos ácidos e analisada por cromatografia gasosa (FERNADES e CHAER, 2010).

A técnica FAME tem sido utilizada em laboratórios clínicos, de análise de alimentos e laboratórios de análise de solos, onde a identificação de patógenos ou de outros riscos associados às bactérias deve ser realizada rotineiramente (GUO et al., 2010; PACHECO e PINTO, 2010; FERNANDES, SAXENA e DICK, 2013). É utilizada também na caracterização e diferenciação de espécies bacterianas (YANG et al., 2012; AZEVEDO et al., 2014).

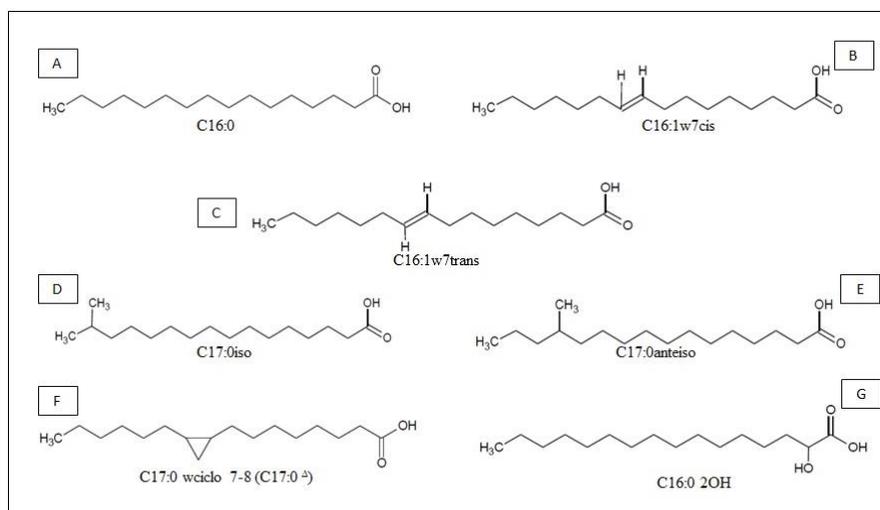
Segundo Pacheco (2009), mais de 300 ácidos graxos e compostos relacionados já foram encontrados em bactérias analisadas pela metodologia FAME. A riqueza de informações contidas nestes compostos pode ser avaliada não somente pela presença ou ausência de cada ácido, mas também pela análise quantitativa dos mesmos.

### 5.3 Nomenclatura de Ácidos Graxos Celulares Bacterianos

As nomenclaturas abreviadas de ácidos graxos são bastante comuns. São constituídas do número de carbonos na cadeia, seguida de dois pontos, o número de duplas ligações e sua localização a partir da proximidade com a metila da molécula. O grupo metila é o carbono número 1. Assim, um ácido graxo com uma dupla ligação entre o sexto e o sétimo carbono, a contar do grupo metila, é um ácido graxo  $\omega 6$  (ômega 6).

A composição de ácidos graxos de bactérias pode variar intensamente, incluindo diferenças no comprimento de cadeia, presença ou ausência de duplas, anéis, cadeias ramificadas ou grupos hidroxil (Figura 6).

**Figura 6 - Estruturas de ácidos graxos comuns em culturas microbianas: cadeia saturada (A), insaturada com conformação cis (B), insaturada com conformação trans (C), configuração iso (D), configuração anteiso (E), ciclopropano (F) e hidroxila (G).**



Fonte: Adaptação de Pacheco (2009)

O ácido graxo saturado apresenta uma cadeia carbônica sem a presença de duplas ligações (Figura 6.A), enquanto que o insaturado possui duplas ligações na cadeia (Figura 6.B). No caso de ácidos insaturados com duplas ligações na configuração *cis*, estes apresentam hidrogênios ligados à dupla, na mesma posição (Figura 6. B); no ácido graxo *trans*, os hidrogênios ligados à dupla aparecem em posições opostas (Figura 6.C). O termo “*iso*” é empregado para indicar que um grupo metila ocorre no penúltimo carbono da cadeia (Figura 6.D) e o termo “*anteiso*” indica a presença do grupo metila no antepenúltimo carbono da cadeia (Figura 6.E).

O número e posição das ligações duplas normalmente são específicos de uma espécie ou grupo, sendo estas ligações adicionadas pela dessaturação de um ácido graxo saturado. Os ácidos de cadeia ramificada e com número ímpar de carbonos são biossintetizados utilizando uma molécula iniciadora, que contém um ácido graxo de cadeia ramificada ou um grupo propionil (C<sub>3</sub>), respectivamente (MADIGAN et al., 2010).

O ciclopropano representado na Figura 6.F é um composto sintetizado a partir do C16:1 $\omega$ 7 *cis* com a adição do grupo carbono na posição da dupla ligação. A Figura 6.G corresponde a um ácido graxo com 16 carbonos na cadeia, onde uma hidroxila é adicionada ao segundo carbono, contado a partir da carbonila (PACHECO, 2009).

## 6 PERFIL GENÉTICO E TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA

O emprego de técnicas de separação eletroforética para estudo da diversidade genética de membros do gênero *Xanthomonas* pode ser feito por meio de várias abordagens (BARAK e GILBERTSON, 2003). Análise do polimorfismo no DNA, utilizando-se a técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) em conjunto com a avaliação da variabilidade na agressividade de infestação da planta, foi empregada para avaliar a estrutura de uma população de *Xanthomonas* da Colômbia e da Venezuela e, em ambos os casos, houve alto grau de diversidade entre os isolados (RESTREPO e VERDIER, 1997; VERDIER et al., 1998). Isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* provenientes de regiões com características edafoclimáticas distintas foram avaliados por meio da técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphism – AFLP) e os resultados foram consistentes com aqueles obtidos a partir de RFLP, sendo que algumas combinações de primer do AFLP diferenciaram isolados que não se apresentaram distintos no RFLP (RESTREPO et al., 1999).

A eletroforese é uma técnica simples e versátil que permite a separação de proteínas e ácidos nucleicos. A eletroforese de campo pulsado (PFGE - *pulsed-field gel electrophoresis*) foi desenvolvida em meados dos anos 80 e é considerada uma importante ferramenta para estudos epidemiológicos, pois permite a comparação cromossômica entre os organismos (DIJKSHOORN e TOWNER, 2001; TORTORA et al., 2012).

Na eletroforese de campo pulsado (PFGE), o DNA é submetido a dois campos elétricos em ângulos diferentes pelo tempo de pulso programado, por exemplo, a cada 4 segundos. O procedimento é baseado na utilização de endonucleases de restrição para gerar fragmentos de alto peso molecular a partir da clivagem do DNA cromossômico, que são separados por meio da aplicação de um campo elétrico em direções alternadas (LIEBANA, 2002).

No momento em que ocorre o redirecionamento do campo elétrico, as moléculas de DNA são forçadas a se reorientarem paralelamente ao campo antes de migrarem em direção ao polo positivo, sendo esta a principal diferença entre a PFGE e a eletroforese em gel de agarose convencional. O tempo gasto nesse processo de mudança de orientação é denominado tempo de pulso, no qual os fragmentos menores se adaptam mais rapidamente do que os maiores (MAGALHÃES et al., 2005).

Com relação às enzimas de restrição, estas reconhecem e clivam somente uma determinada sequência de bases nucleotídicas no DNA e sempre da mesma maneira (TORTORA et al., 2012). Assim, a escolha das enzimas é uma etapa importante, pois devem gerar poucos fragmentos para permitir a análise de todo o DNA cromossomal da bactéria (MARTINEZ e TADDEI, 2008).

A interpretação da análise é realizada por meio da visualização das bandas de fragmentos de DNA em gel de agarose, corados geralmente por brometo de etídio, que ao ser submetido à luz ultravioleta emite fluorescência (TENOVER et al., 1995).

## REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, A.F. et al. Fatty acid profiles in *Leishmania spp.* isolates with natural resistance to nitric oxide and trivalent antimony. **Parasitology**, v.113, p.19–27, 2014.
- 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. p.219–252, 1980.
- BARAK, J.D., GILBERTSON, R.L. Genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, the causal agent of bacterial leafspot of lettuce. **Phytopathology**, v.93, n.5, p.596-603, 2003.
- BERTHIER, Y. et al. Characterization of *Xanthomonas campestris* pathovars by rRNA gene restriction patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.3, p.851-859, 1993.
- BORGES, C. D. et al. Comportamento reológico de xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v.19. n.2, p.160-165. 2009.
- BOROWSKI, J.M. **Influência de métodos clássicos e alternativos de cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* na produção, viscosidade e composição química da xantana**. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.
- BRANDÃO, L. V. et al. Produção de goma xantana obtida a partir do caldo de cana. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.217-222, 2008.
- BREWIN, N.J. Development of the legume root nodule. **Annual Review Cell Biology**. v.7. p.191-226, 1991.
- CADMUS, M. C. et al. 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.
- COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.22, n. 3, p.263-268, 1991.
- DA SILVA, F.R et al. Fastidious gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters**, v.203, p.165-171, 2001.
- DAWES, W.; SUTHERLAND, W. **Microbial Physiology Book Description**. Blackwell Science. 2nd Ed. p.394, 1992.
- DUGGAL, S. et al. Comparison of na automated system with conventional identification and antimicrobial susceptibility testing. **International Scholarly Research Network Microbiology**, New York, v.2012, p.1-4, 2012.
- DUNGER, G. et al. Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. **Archives of Microbiology**. v.188, p.127–135. 2007.
- DYE, D.W. The inadequacy of the usual determinative tests for the identification of *Xanthomonas* spp. **New Zealand Journal of Science**. v.5, p.393-416. 1962.
- FERNANDES, M. F.; CHAER, G. M. **Análise de Perfis de ácidos graxos como ferramenta para estudos em microbiologia do solo**. 1.ed.Documentos: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 37p, 2010.
- FERNANDES, M.F.; SAXENA, J.; DICK, R.P. Comparison of Whole-Cell Fatty Acid (MIDI) or Phospholipid Fatty Acid (PLFA) Extractants as Biomarkers to Profile Soil Microbial Communities. **Microbial Ecology**. v.66, p.145–157, 2013.
- FONTANIELLA, B. et al. Identification of xanthans isolated from sugarcane juices obtained from scalded plants infected by *Xanthomonas albilineans*. **Journal of Chromatography B**, v.81, p.270-275. 2002.
- FOOD INGREDIENTS BRASIL Nº 17- 2011. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/busca.php>. Acesso em 15 jun. 2015.
- FRAZÃO, L.A. **Estudo comparativo de métodos bioquímicos, perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e método molecular para a caracterização fenotípica e genotípica de bactérias ácido-láticas isoladas da microbiota fecal de Papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) no Brasil**. 2014. 103 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. 2014.

- GAGNEVIN, L.; LEACH, J.E.; PRUVOST, O. Genomic variability of the *Xanthomonas* pv. *mangiferaeindicae* of mango bacterial black spot. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.1, p.246-253, 1997.
- GALINDO, E.; SALCEDO, G.; RAMIREZ, M. E. Preservation of *Xanthomonas campestris* on agar slopes: Effects on xanthan Production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.40, p.634-637, 1994.
- GARCÍA-OCHOA, F. et al. Xanthan gum: production, recovery and properties. **Biotechnology Advances**, v.18, 7, p.549-579, 2000.
- GARRITY, G. M. et al. **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**. v. 2: The Proteobacteria, Part B: The Gamma proteobacteria. 2005.
- GREEN, L. H. **Practical handbook of microbiology**. CRC: London, 2 ed. 2008.
- GUO, A. et al. Tracing the food sources of isolated strains of *Listeria monocytogenes* through fatty acid profiles analysis. **Food Control**. v.21, p.1092–1098, 2010.
- 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.
- HAACK, S.K.H. et al. Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**. v.60, p.2483–2493, 1994.
- 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.
- HAYS, H.C.W.T. et al. A novel and convenient self-drying system for bacterial preservation. **Journal of Microbiological Methods**, v.63, p.29–35, 2005.
- HAYWARD, A.C. **The hosts of Xanthomonas**. In *Xanthomonas* (Swings, J.G. and Civerolo, E.L., eds), pp. 1–17. London: Chapman & Hall. 1993.
- 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.
- IELPI, L.; COUSO, R.O.; DANKERT, M.A. Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.9, p.2490-2500, 1993.
- JEANES, A. et al. Polysaccharide (xanthan) of *Xanthomonas campestris* NRL B-1459: procedures for culture maintenance and polysaccharide production, purification, and analysis. **Agricultural Research Service-U.S. Department of Agriculture. ARS-NC-51**, p.14, 1976.
- KIDBY, D. et al. Maintenance procedures for the curtailment of genetic instability: *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. **Applied and Environmental Microbiology**, v.33, p.840-845, 1977.
- KING, J. D.; WHITE, D. C.; TAYLOR, C. W. Use of lipid composition and metabolism to examine to examine structure and activity of estuarine detrital microflora. **Applied and Environmental Microbiology**, v.33, n.5, p.1177-1183, 1977.
- KIRSOP, B.E.; SNELL, J.J. **Maintenance of Microorganisms**, New York: Academic Press, 1984. 75p.
- KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of determinative bacteriology**. 9<sup>o</sup> Ed. Editora Williams & Wilkins, p.787, 1994.
- LABORCLIN, Brasil. Sistema de Identificação versão 2.4 Bactray. Instruções de uso. Disponível em: <http://www.laborclin.com.br/produto.asp?id=880108>. Acesso em 15 mai. 2015.
- LETISSE, F. et al. Kinetic analysis of growth and xanthan gum production with *Xanthomonas campestris* on sucrose, using sequentially consumed nitrogen sources. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.55, p.417-422, 2001.
- LI, Y. et al. 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.
- LIEBANA, E. Molecular tools for epidemiological investigations of *S. entérica* subspecies *entérica* infections. **Research in Veterinary Science**, Londres, v.72, p.169-75, 2002.
- 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 Tecnológica**, v.28, n.2, p.161-172. 2007.
- MAC FADDIN, J. S. **Biochemical test for identification of medical bacteria**. Lippincott Williams & Wilkins, 3th ed, 2000.
- MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MAGALHÃES V. et al. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia uma revisão técnica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.64, n. 2, p.155-161, 2005
- MALIK, K. A. Survival and stability of microorganisms during freeze-drying. **Cryobiology**, v.25, p.517, 1988.
- MARTINEZ, M. B.; TADDEI, C.R. **Métodos de Diagnóstico**. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 5.ed. Ed.Atheneu, Cap. 14, p.117-125. 2008.
- MENEZES, J.D.S. et al. Produção biotecnológica de goma xantana em alguns resíduos agroindustriais, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**; v.8, n. 8, p.1761-1776. 2012.
- MOITINHO, B.M. **Análise da expressão diferencial de genes relacionados à produção de xantana em *Xanthomonas arboricola* e *Enterobacter cloacae***. 2012. 182 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, 2012.
- MOREIRA, L.M. et al. Análise comparativo entre os genomas completos de *Xanthomonas* e *Xylella*. **A Journal of Integrative Biology**; v.9, n.1, p.43-76. 2005.
- MURRAY, P.R. et al. **Manual of clinical microbiology**. 8th ed., ASM Press, Washington DC, 2113p.2003.
- NASCIMENTO, A.R.P.; MARIANO, R.L.R. Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.301-307, 2004.
- OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, Whashington, v.37, p.1661–1669, 1999.
- PACHECO, F.L.C.; PINTO, T.D.J.A. The Bacterial Diversity of Pharmaceutical Clean Rooms Analyzed by the Fatty Acid Methyl Ester Technique. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.64, p.156-166, 2010.
- PACHECO, F.L.C. **Identificação Bacteriana por Derivação de Ácidos Graxos**. 2009.168 f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- PAGLIARINI, A. P.; DRUZIAN, J. I. Produção de goma xantana por fermentação do resíduo de suco de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.26-31. 2007.
- PORTELA, R.B. et al. Modelagem da Produção de Goma Xantana por *Xanthomonas*. **Horizonte científico**. v.1, n. 8, p.1-6. 2008.
- POTTS, M. Desiccation tolerance: a simple process? **Trends in Microbiology**, v.9, p.553–559, 2001.
- PRADELLA, J.G.C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos**. Relatório técnico n.84396-205. Centro de Tecnologia de Processos e Produtos. Laboratório de Biotecnologia Industrial – LBI/CTPP. São Paulo. 2006.
- RAIMANN, S. I. et al. 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. et al. Xanthan gum production by altered pathogenicity variants of *X. campestris*. **Applied Microbiology and Biotechnololy**, v.29, p.5-10, 1988.
- RESTREPO, S.; VERDIER, V. Geographical differentiation of the population of *Xanthomonas axonopodis* pv.*manihotis* in Colombia. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.11, p.4427-4434, 1997.

- RESTREPO, S. et al. AFLP fingerprinting: an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Microbiology**, v.145, p.107-114, 1999.
- ROSALAM, S.; ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, 2, p.197-207, 2006.
- ROMEIRO, R. S. **Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas**. Material didático, [online], Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 2006. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAFey4AJ/preservacao-cultura-fitopatogenica#>. Acesso em 15 de jun. de 2015.
- ROTTAVA I. et al. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. **Carbohydrate Polymers**, v.77, p.65-71, 2009.
- SALCEDO, G. et al. Preservation of *Xanthomonas campestris* in *Brassica oleracea* seeds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.37, p.723-727, 1992.
- SASSER, M. **Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids**. Tech. Note #101. Newark, DE: Microbial ID, 1990.
- SCHUJMAN, G. E.; DE MENDOZA, D. Regulation of type II fatty acid synthase in Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v.11, n. 2, p.148-152, 2008.
- SIMIONE, F. P. **Cryopreservation Manual**. Nalge Nunc International. 1998.15p.
- SMITH, D.; ONIONS, A. H. S. **The preservation and maintenance of living fungi**. CAB International, Wallingford, United Kingdom, 1994.122 p.
- SOLA, M.C. et al. **Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade**. Enciclopédia Biosfera, v.8, 2012.
- 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.
- STAGER, C.E. Automated microbial identification systems. In: TORTORELLO, M.L.; GENDEL, S.M. **Food Microbiological analysis: new technologies**. New York: Marcel Dekker, 1997, cap.7, p.91-113.
- STARR, M. P. **The genus *Xanthomonas***, p.742-763 In Starr M. P., Stolp H., Truper H. G., Balows A., Schlegel H. G., editors. (ed.), *The prokaryotes*, vol. 1 Springer Verlag, Berlin, Germany. 1981.
- STARR, M. P. et al. Chemotaxonomic significance of the xanthomonadins, novel brominated arylpolyene pigments produced by bacteria of the genus *Xanthomonas*. **Archives of Microbiology**, n.113. p.1-9. 1977.
- SUTHERLAND, I. A. Sticky Business. Microbial Polysaccharides: Current Products and future Trends. **Microbiology Today**, v.29, p.70-71, 2002.
- SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; KERSTER, K. **The bacterium *Xanthomonas***. In: SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E.L. (Ed.). *Xanthomonas*. London : Chapman & Hall, p.127-156. 1993.
- TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.33, n.9, p.2233-2239, 1995.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- TRINDADE, L.C. **Diagnose molecular do cancro bacteriano da videira causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola***. 2007. 184 f. Tese (Doutorado), Universidade de Brasília. 2007.
- TRINDADE, L.C. et al. Development of molecular method for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira**, v.33, p.16-23, 2007.
- VALENTINE, N.B. et al. Preservation of viable *Francisella tularensis* for forensic analysis. **Journal of Microbiological Methods**, v.84, p.346-348, 2011.
- VAUTERIN, L.; YANG, P.; SWINGS, J. Utilization of fatty acid methyl esters for the differentiation of new *Xanthomonas* species. **International Journal of Systematics Bacteriology**, v.46, p.298-304, 1996.
- VIDHYALAK, S.R.; VALLINACHIYAR, C.; RADHIKA, R. Production of xanthan from agro-industrial waste. **Journal of Advanced Research**, v.3, p.56-59, 2012.

WHITE, D.C. et al. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractible lipid phosphate. **Oecologia**, v.40, p.51-62, 1979.

YANG, C. et al. Cellular Fatty Acids as Chemical Markers for Differentiation of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter calcoaceticus*. **Biomedical and Environmental Sciences**, v.25, n.6, p.711-717, 2012.

YANG, P. et al. Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.16, p.47-71, 1993.

ZAMBRANO, F. et al. Efeito das gomas guar e xantana em bolos como substitutos de gordura. **Brazilian Journal of Food Technology**. v.8, n.1, p.63-71, 2005.

ZANGENAH, S. et al. Identification of clinical *Pasteurella* isolates by MALDI-TOF a comparison with VITEK 2 and conventional microbiological methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v.77, n.2, p.96-98, 2013.

## **CAPÍTULO II**

---

### **Prospecção Tecnológica: Perfil de Ácidos Graxos Celulares na Identificação e Caracterização Bacteriana**

(Apresentado e publicado no “International Symposium on Technological Innovation”)



## PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS CELULARES NA IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BACTERIANA

Graciete de Souza Silva<sup>1</sup>; Ismara Santos Rocha<sup>2</sup>; Janice Izabel Druzian<sup>3</sup>;  
Cleber Alberto Schmidt<sup>4</sup>

Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos – PgAli; Universidade Federal da Bahia – UFBA –  
Salvador/BA - Brasil

<sup>1</sup>[graci.ete@hotmail.com](mailto:graci.ete@hotmail.com); <sup>2</sup>[ismararocha@hotmail.com](mailto:ismararocha@hotmail.com); <sup>3</sup>[janicedruzian@hotmail.com](mailto:janicedruzian@hotmail.com); <sup>4</sup>[cleber.alberto@ufba.br](mailto:cleber.alberto@ufba.br)

**Resumo** - Os ácidos graxos podem ser empregados como biomarcadores de grupos taxonômicos de diversos microrganismos, como bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Constituem a membrana citoplasmática de todos os microrganismos e são típicos em função de determinados grupos funcionais adicionais. Esta individualidade na composição dos ácidos graxos permite o uso de técnicas para monitorar alterações em populações microbianas envolvidas em processos específicos. Considerando a importância da divulgação de pesquisas científicas relacionadas com temas envolvendo metodologias para identificação e caracterização de bactérias, desenvolveu-se este estudo com o objetivo de fazer um monitoramento tecnológico tendo por base a busca por artigos relacionados com a composição de ácidos graxos celulares bacterianos, publicados nos últimos 10 anos. Os resultados revelaram quais os principais autores, o número de publicações por ano e as principais revistas acadêmicas que publicam trabalhos sobre o tema abordado.

**Palavras-chave** – Biomarcadores. Lipídeos. Membrana. Prospecção.

**Abstract** - The fatty acids can be used as biomarkers of different taxonomic groups of microorganisms, such as Gram-negative and Gram-positive bacteria. They are part of the cytoplasmic membrane of all microorganisms and are typical in terms of specific additional functional groups. The unique composition of fatty acids in each microorganism allows the use of techniques to monitoring changes in microbial populations involved in specific processes. Considering the importance of disseminating scientific research related to issues involving methodologies for the identification and characterization of bacteria, this study was developed with the aim of make a technological monitoring based on the search for articles related to cellular fatty acid composition of bacteria, published in last 10 years. The results revealed the main authors, the number of publications per year and the major academic journals that publish papers about the topic.

**Keywords** – Biomarkers. Lipids. Membrane. Prospecting.

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização dos perfis de ácidos graxos para a investigação da estrutura das comunidades microbianas é baseada no fato de alguns grupos microbianos, como bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, serem relativamente enriquecidos em tipos químicos específicos destes compostos, os quais podem ser empregados como biomarcadores destes grupos (PACHECO, 2009). Deste modo, muitos pesquisadores estão analisando a composição de ácidos graxos de células de microrganismos a fim de correlacioná-la com uma determinada espécie microbiana (SILVA, 2006; GUO et al., 2010; YANG et al., 2012; AZEVEDO et al., 2014).

Os ácidos graxos são componentes lipídicos celulares, sendo que a maior parte das moléculas desta natureza localiza-se na membrana celular, como os glicolipídeos, os fosfolipídeos e também os ácidos graxos constituintes dos lipopolissacarídeos, com cadeia carbônica variando de 9 a 12 átomos (WELCH, 1991). Devido ao grande número de ácidos graxos encontrados na parede e nas membranas celulares e também pelo fato dessas moléculas serem um traço genético estável e altamente conservado dentro de um grupo taxonômico, a composição de ácidos graxos pode ser utilizada com sucesso na identificação de bactérias (STANGER e DAVIS, 1992). Para Dickstein e colaboradores (2001), essa identificação pode ser específica ou até intraespecífica.

Além de biomarcadores taxonômicos, alguns ácidos graxos são típicos de determinados grupos funcionais, o que permite o uso da técnica para monitorar alterações em populações microbianas, inclusive de bactérias, envolvidas em processos específicos (FERNANDES e CHAER, 2010).

Diversos protocolos de extração de ácidos graxos têm sido propostos, os quais diferem na abrangência dos compostos recuperados das amostras estudadas, o que está relacionado basicamente com o uso ou não de etapas de fracionamento de lipídeos totais obtidos e das reações empregadas para a liberação de ácidos graxos das células microbianas. Fernandes e Chaer (2010) apresentam em um estudo sobre microbiologia do solo, os métodos de extração de ácidos graxos totais baseados no protocolo comercial MIDI (MIDI-FAME), a extração de ácidos graxos com ligações éster por método adaptado de Schutter e Dick (2000), e a extração de ácidos graxos derivados de fosfolipídeos.

Na verdade, a análise de ácidos graxos de cadeia curta (ácidos graxos voláteis) já era rotineiramente utilizada para identificação de bactérias anaeróbicas, mas somente com o advento das colunas capilares de sílica fundida, que permitem a recuperação de hidroxídeos e a resolução de muitos isômeros, tornou-se possível utilizar a cromatografia gasosa de ésteres

metfílicos de ácidos graxos de células íntegras para identificar uma grande variedade de microrganismos (FERNANDES, 2006).

O protocolo FAME (Fatty Acid Methyl Ester), que é normalmente o mais utilizado, baseia-se na identificação de ácidos graxos entre 9 e 20 carbonos de comprimentos. Os picos são automaticamente nomeados e quantificados pelo sistema, que gera um relatório com o nome do microrganismo sob identificação.

Na prática, as células bacterianas são tratadas para a liberação de seus ácidos graxos, estes são convertidos para uma forma derivada de metil éster, tornando-os voláteis e passíveis de análise no cromatógrafo gasoso - CG (WELCH, 1991).

A amostra após a injeção na coluna do CG, sob um fluxo de hidrogênio e aumento gradual de temperatura, tem seus ácidos graxos separados pela diferença dos tempos de retenção. Ao eluirm da coluna, o detector grava os picos e suas áreas cuja quantidade relativa reflete a concentração de ácidos graxos presentes na amostra. O tempo de retenção de uma mistura conhecida de ácidos graxos é utilizado para calcular o comprimento da cadeia.

Para identificação de microrganismos, o perfil de ácidos graxos obtido é comparado a uma base de dados utilizando-se o programa de reconhecimento “Microbial Identification System” (MIDI), o qual contém as bibliotecas “Sherlock” com mais de 100 mil análises de isolados, obtidos de seleções confiáveis de várias partes do mundo para evitar agrupamentos geográficos (SASSER, 2001).

Considerando a relevância da divulgação de artigos e demais trabalhos científicos relacionados com temas atuais envolvendo metodologias para identificação e caracterização de bactérias, o presente estudo foi desenvolvido com a finalidade de fazer um monitoramento tecnológico baseado na busca por artigos científicos relativos a este assunto, publicados nos últimos 10 anos.

## **2 METODOLOGIA**

Para a pesquisa da tecnologia descrita em artigos referentes à composição de ácidos graxos de bactérias, foi elaborada uma estratégia de busca que combinou palavras-chaves em inglês para a análise na base de dados *Scopus* do portal de periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e no buscador acadêmico *Science Direct* (Tabela 1). Foram analisados os artigos científicos publicados nos últimos 10 anos.

Tabela 1 - Escopo da busca nas bases de dados.

Palavras-chaves (título, resumo ou palavras-chave)					Nº de Artigos nas Bases Consultadas	
Fatty acid	Bacteria cells	Cellular	Strains	Bacteria	<i>Science Direct</i>	<i>Scopus - CAPES</i>
X	X				338	26503
X		X			2054	79921
X			X		1130	31776
X				X	1586	45690

Nos artigos encontrados na busca utilizando as palavras *fatty acid* e *bacteria cells* foram identificados os principais autores e as principais revistas que publicam trabalhos relacionados com o tema do estudo, assim como a evolução do número de publicações nos últimos 10 anos e o assunto enfatizado em cada pesquisa.

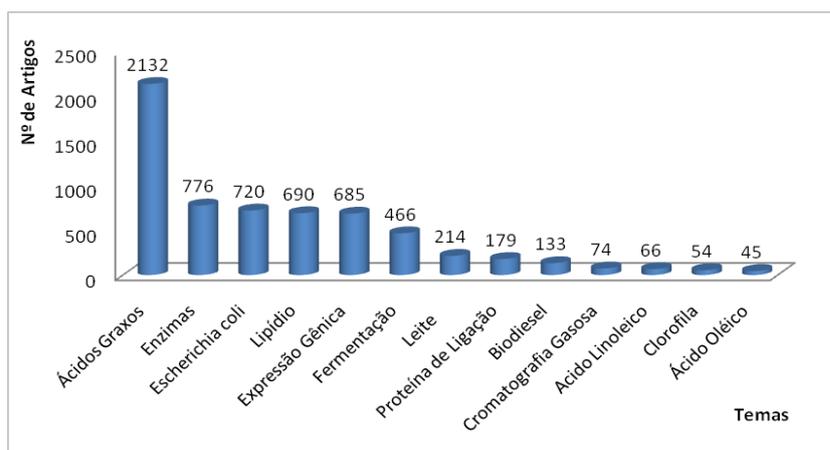
Para contagem dos dados e construção dos gráficos e tabelas desta prospecção, foi utilizado o software Excel<sup>R</sup> 2010 (Microsoft).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Conteúdo dos Artigos Publicados

O monitoramento tecnológico realizado no portal de periódicos da *CAPES*, com as palavras-chave *fatty acid* e *bacteria cells*, resultou em 26.503 artigos de vários idiomas, sendo a maioria em inglês. Do total de artigos encontrados nesta base de dados (Figura 1), foi verificado que 48% estão relacionados ao tema pretendido nesta prospecção, os quais estão distribuídos entre os assuntos *ácidos graxos*, *lipídio*, *cromatografia gasosa*, *ácido linoléico* e *ácido oléico*. A Figura 1 foi construída a partir da relação disponibilizada no portal da *CAPES*, contendo os principais temas dos artigos encontrados.

**Figura 1 - Número de artigos publicados no portal da CAPES de acordo com temas específicos.**



Visando obter artigos mais relacionados com o foco deste monitoramento, refinou-se a busca com os temas *ácidos graxos*, *lipídio* e *cromatografia gasosa* para possibilitar uma avaliação detalhada dos trabalhos. Desta última análise foram obtidos 629 artigos, os quais estavam distribuídos entre os temas apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2 - Número de artigos por assunto após o refinamento.**

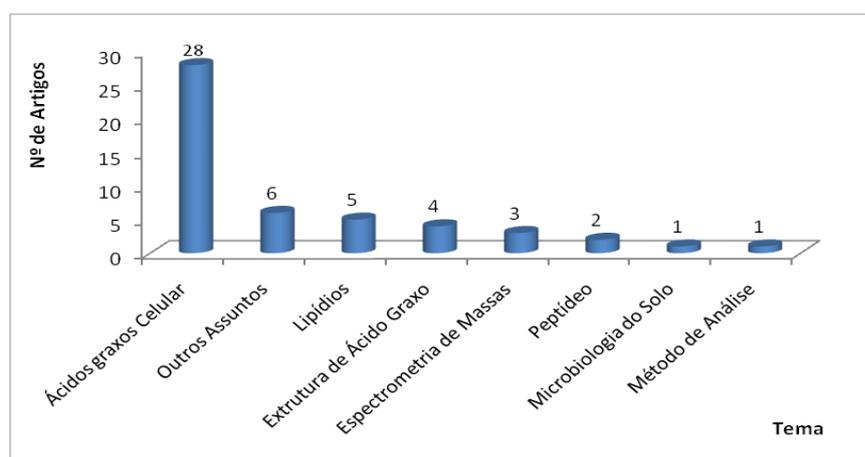
Assunto	Nº de Artigos
Bactéria	235
Fosfolipídeos	89
Espectrometria de massas	86
Ésteres	62
Proteínas de bactérias	45
Temperatura	31
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
Fígado	20
<i>Salmonella typhimurium</i>	13
<i>Listeria monocytogenes</i>	12
Salinidade	11
Análise de ácidos graxos	5

De acordo com os resultados obtidos na busca por artigos no portal da CAPES, foi possível constatar a divulgação de um grande número de pesquisas envolvendo a identificação da composição de ácidos graxos, com ênfase em alguns temas específicos como a identificação bacteriana por espectrometria de massas, comparando o perfil de ácidos graxos celulares obtido por cromatografia gasosa com os perfis de bibliotecas específicas (PETER et al. 2006; GU et al. 2010; NAGY et al. 2014) ou simplesmente a identificação dos ácidos

graxos e do conteúdo de fosfolipídeos presentes na membrana celular de bactérias conhecidas (ERAS et al. 2008; YANG et al. 2012; AZEVEDO et al. 2014).

No buscador acadêmico *Science Direct*, o resultado da busca também foi refinado para que fossem obtidos os artigos com conteúdos mais relacionados ao tema desta prospecção. O gráfico da Figura 4 apresenta a distribuição dos artigos em áreas específicas e o número de publicações nos últimos 10 anos no *Science Direct*.

**Figura 2 - Número de artigos publicados de acordo com temas específicos no Science Direct.**



Os artigos encontrados no tema *ácidos graxos celulares* foram analisados de forma mais detalhada e verificou-se que os trabalhos mostram a composição de ácidos graxos da membrana celular de algumas bactérias, como por exemplo o estudo da engenharia de *Escherichia coli* para sintetizar os ácidos graxos livres e a estrutura destes lipídeos (HANDKE et al., 2011; REBECCA et al., 2012), a composição lipídica de *Geobacillus thermophilic* (SIDDHARTH et al., 2014) e a composição da membrana de *Bacillus cereus* e *Salmonella typhi* (AYARI et al., 2009) (Tabela 3).

Apesar do grande número de publicações relacionadas ao tema desta prospecção, notou-se que até o momento poucas espécies bacterianas foram caracterizadas quanto ao perfil de ácidos graxos que compõe sua membrana, indicando uma área de pesquisa que tem um grande potencial de crescimento.

**Tabela 3 - Número de artigos publicados por espécie de bactéria.**

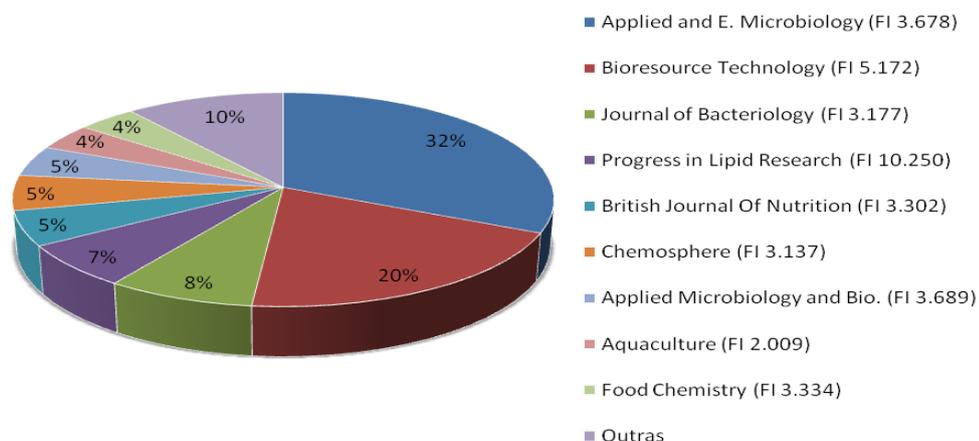
<b>Bactéria Analisada</b>	<b>Nº de Artigos</b>
<i>Escherichia coli</i>	5
<i>Salmonella</i>	3
<i>Pseudomonas</i>	3
<i>Lactobacillus</i>	2
<i>Bacillus</i>	2
<i>Geobacillus thermophilic</i>	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1
<i>Bacterium moritella japonica</i>	1
<i>Rhodopseudomonas</i>	1
<i>Legionella pneumophila</i>	1
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1
<i>Syntrophomonas erecta</i>	1
<i>Campylobacter jejuni</i>	1
<i>Listeria monocytogenes</i>	1
<i>Enterobacter sakazakii</i>	1
<i>Leishmania spp</i>	1

### 3.2 Principais Periódicos

Foi possível constatar, tanto na base da *CAPES* como no *Science Direct*, que as principais revistas que publicam artigos na área de abrangência desta prospecção possuem fator de impacto elevado, com uma média de 4,073. Esta informação pode ser útil na escolha do periódico para uma futura publicação, já que este parâmetro indica o nível de publicações e citações de uma revista (Figura 3 e 4).

No portal da *CAPES*, das revistas obtidas na análise podem ser destacadas a *Applied and Environmental Microbiology*, com o maior número de artigos relacionados (cerca de 50 artigos), *Bioresource Technology* (30 artigos) e o *Journal of Bacteriology* (12 artigos), entre outros periódicos com menor número de artigos publicados (Figura 3).

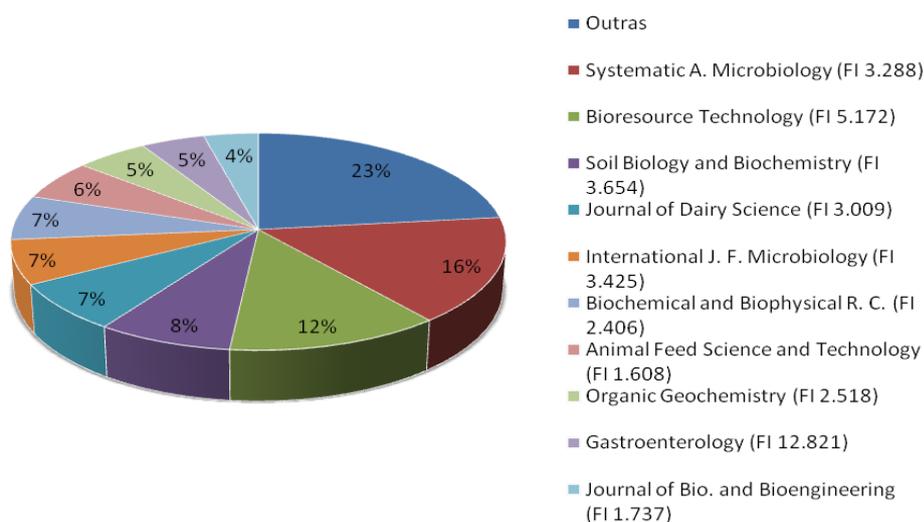
**Figura 3 - Principais revistas que publicam artigos sobre ácidos graxos bacterianos citadas no portal CAPES.**



FI= Fator de Impacto

No buscador acadêmico *Science Direct*, notou-se que diferentes periódicos apresentaram trabalhos relacionados com o tema, sendo que os principais foram o *Systematic and Applied Microbiology*, com 16% dos artigos publicados e o *Bioresource Technology*, com 12% (Figura 4). Os fatores de impacto variaram de 1,608 a 12,821 para os periódicos encontrados neste buscador.

**Figura 4 - Principais revistas que publicam artigos sobre ácidos graxos bacterianos citadas no Science Direct.**



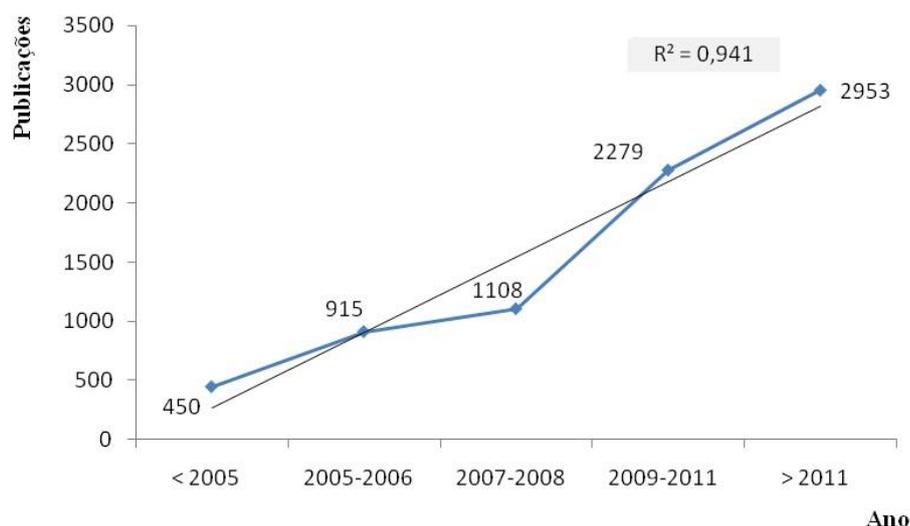
FI= Fator de Impacto

### 3.3 Publicações Anuais

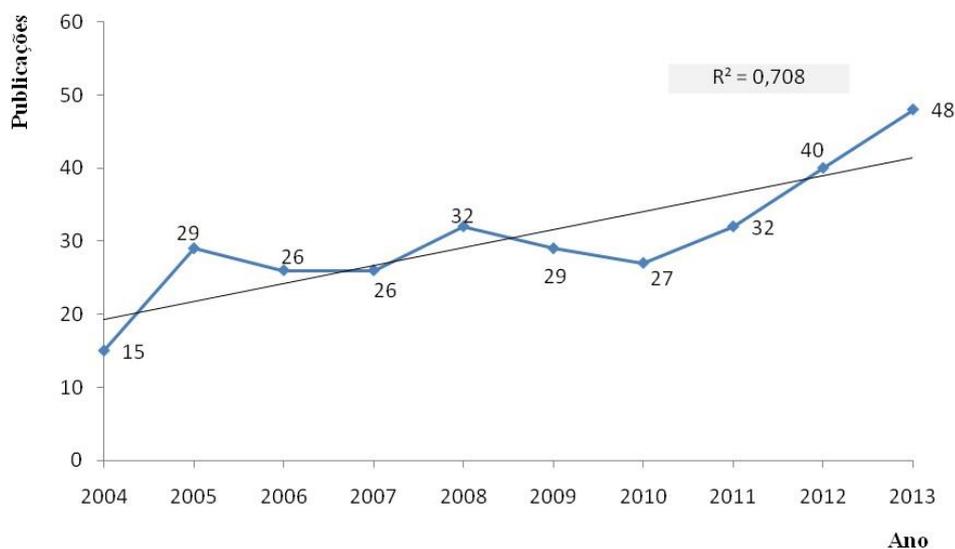
Com relação ao número de artigos científicos divulgados por ano, disponibilizados no portal da *CAPES* e *Science Direct*, foi verificado que nos últimos 10 anos o estudo da composição de ácidos graxos de células de bactérias vêm aumentando de forma linear, conforme mostram as Figura 5 e 6.

Esta ascendência no número de artigos publicados a cada ano demonstra claramente o avanço tecnológico nesta área da microbiologia com destaque para a identificação e caracterização de isolados bacterianos.

**Figura 5 - Número de artigos sobre ácidos graxos bacterianos publicados nos últimos 10 anos, disponibilizados no portal da CAPES.**



**Figura 6 - Número de artigos sobre ácidos graxos bacterianos publicados nos últimos 10 anos, disponibilizados no Science Direct.**

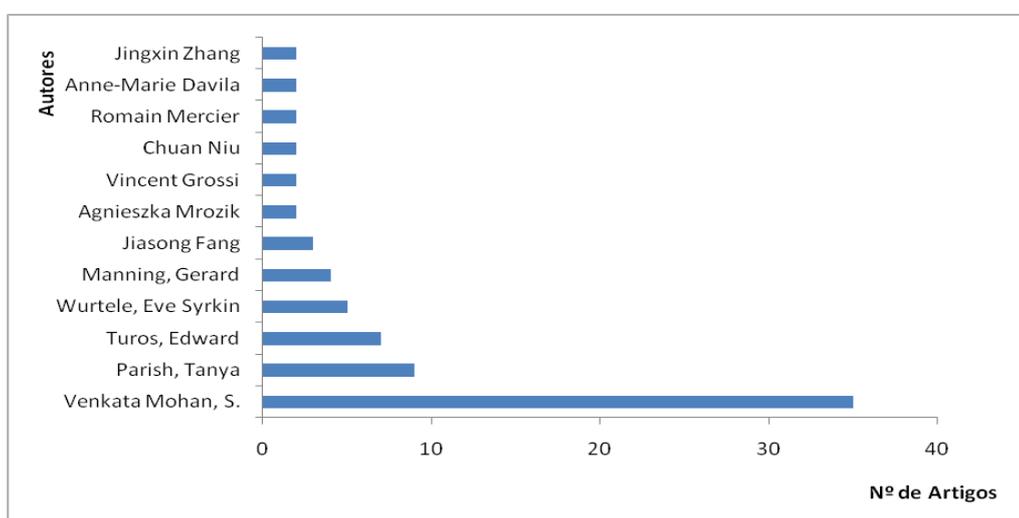


### 3.4 Principais Autores

A partir dos resultados da análise dos artigos das duas bases de dados, foram identificados os principais autores que publicam artigos relacionados à composição de ácidos graxos de bactérias nos últimos 10 anos.

Notou-se que o maior número de artigos são de autoria de *Yenkata Mohan, S.*, representando 46% dos artigos. Cerca de 12% são de autoria de *Parish Tanya*. Estes dados podem ser visualizados no gráfico da Figura 7, construído a partir dos resultados obtidos nas bases *Science Direct* e Portal *CAPES*.

**Figura 7 - Principais autores e o número de artigos publicados relacionados ao tema ácido graxo celular de bactérias, encontrados nas bases de dados Science Direct e portal da CAPES.**



## 4 CONCLUSÃO

A partir do monitoramento tecnológico dos artigos científicos publicados desde 2004 no Portal da *CAPES* e no *Science Direct*, foi possível constatar que existe um avanço crescente nas pesquisas sobre a composição de ácido graxos bacterianos, sendo que os principais periódicos que estão disseminando este conhecimento são revistas acadêmicas altamente conceituadas, com fator de impacto médio elevado.

Dentro deste contexto de ascensão e, considerando que, a caracterização da composição de ácidos graxos bacterianos é um campo vasto e ainda pouco explorado, fica evidente a importância do investimento em pesquisas neste assunto.

## REFERÊNCIAS

- AYARI, S.; DUSSAULT, D.; MILLETTE, M.; HAMDI, M.; LACROIX, M. Changes in membrane fatty acids and murein composition of *Bacillus cereus* and *Salmonella typhi* induced by gamma irradiation treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v.135, n.1, p.1-6, 2009.
- AZEVEDO, A.F.; DUTRA, J.L.L.; SANTOS, M.L.B.; SANTOS, D.A.; ALVES, P.B.; MOURA, T.R.; ALMEIDA, R.P.; FERNANDES, M.F.; SCHER, R.; FERNANDES, R.P.M. Fatty acid profiles in *Leishmania spp.* isolates with natural resistance to nitric oxide and trivalent antimony. **Parasitology**, v.113, p.19–27, 2014.
- CAPES - **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**. Disponível em: [http://www-periodicos-capes-gov-br.ez10.periodicos.capes.gov.br/index.php?option=com\\_phome](http://www-periodicos-capes-gov-br.ez10.periodicos.capes.gov.br/index.php?option=com_phome), acesso em: 25 de Maio de 2014.
- DICKSTEIN, E.R., JONES, J.B.; STEAD, D.E. Automate Techniques. In: Schaad, N.W., Jones, J.B., CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. APS, St. Paul, USA. 3° edition, 373p., 2001.
- ERAS, J.; ORÓ, R.; TORRES, M.; CANELA, R. Direct quantitation of fatty acids present in bacteria and fungi: stability of the cyclopropane ring to chlorotrimethylsilane. **Journal of agricultural and food chemistry**. v.56, n.13, 2008, p.4923-4932.
- FERNANDES, M. F. **Fatty acid profiling of soil microbial communities: A comparison of extraction methods and temporal dynamics in plant residue amended soils**. (Dissertation). Crop and Soil Science, Oregon State University, Corvallis, 154 p.2006.
- FERNANDES, M. F.; CHAER, G. M. **Análise de Perfis de ácidos graxos como ferramenta para estudos em microbiologia do solo**. 1.ed.Documentos: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 37p, 2010.
- GU, Q.; DAVID, F.; LYNEN, F.; RUMPEL, K.; XU, G.; DE VOS, P.; SANDRA, P. Analysis of bacterial fatty acids by flow modulated comprehensive two-dimensional gas chromatography with parallel flame ionization detector/mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v.1217, n.26, p.4448-4453, 2010.
- GUO, A.; LIU, T.; XIE, J.; WANG, H.; YANG, H.; ZHENG, H.; CHEN, T.; ZHANG, M.; MA, M. Tracing the food sources of isolated strains of *Listeria monocytogenes* through fatty acid profiles analysis. **Food Control**. v.21, p.1092–1098, 2010.
- NAGY, E. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a new possibility for the identification and typing of anaerobic *bacteria*. **Future Microbiology**, v.9, n.2, p.217-233, 2014.
- PACHECO, F.L.C. **Identificação Bacteriana por Derivação de Ácidos Graxos**. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos – Universidade de São Paulo, 168f., São Paulo, 2009.
- PETER, D.; MARC, V.; CINDY, S.; BERNARD, D.; HANS, D.; JEAN, S. Mining fatty acid database for detection of novel compounds in aerobic bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v.66, n.3, p.410-433, 2006.
- REBECCA, M.L.; BRIAN, F.P. Engineering *Escherichia coli* to synthesize free fatty acids. **Biotechnology**, v.30, n.12, p.659-667, 2012.
- HANDKE, P.; LYNCH, S.A.; GILL, R.T. Application and engineering of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli* for advanced fuels and chemicals. **Metabolic Engineering**, v.13, n.1, p.28-37, 2011.
- SASSER, M. **Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids**.Tech. Note #101. Newark, DE: Microbial ID, 1990.
- SCHUTTER, M. E.; DICK, R. P. Comparison of fatty acid methyl ester (FAME) methods for characterizing microbial communities. **Soil Science Society of America Journal, Madison**, v.64, p.1659-1668, 2000.
- SCIENCE DIRECT. **Buscador Acadêmico**. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/>, acesso em: 25 de Maio de 2014.
- SIDDHARTH, P.S.; SUSAN, A.J.; LEEANDREW, J.T.; PARKSON, L.C.; DANIELA, N.C.; JENNY, M.B. Lipid composition of thermophilic *Geobacillus sp.* strain GWE1, isolated from sterilization oven. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.180, p.61-71, 2014.
- SILVA, M.R. **Diversidade Genética de *Xanthomonas campestris pv. campestris* no Brasil**. Tese (Doutorado), Programa de Pós-graduação em Fitopatologia – Universidade Federal de Viçosa. 67f. Viçosa, 2006.

STEGER, C.E., DAVIS, J.R. Automated systems for identification of microorganism. **Clinical Microbiology Reviews**, v.5, n.3, p.302-327, 1992.

WELCH, D.F. Application of cellular fatty acid analysis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.4, n.4, p.422-438, 1991.

YANG, C.; GUO, Z.B.; DU ZONG, M.; YANG, H.Y.; BI YU, J.; WANG, G.Q.; TAN YA, F. Cellular Fatty Acids as Chemical Markers for Differentiation of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter calcoaceticus*. **Biomedical and Enviromental Sciences**, v.25, n.6, p.711-717, 2012.

### **CAPÍTULO III**

---

Influência das Condições de Preservação sobre o Perfil Genético e de Ácidos Graxos Celulares, Comportamento Bioquímico e Produção de Goma Xantana da *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103.

**Influência das Condições de Preservação sobre o Perfil Genético e de Ácidos Graxos Celulares, Comportamento Bioquímico e Produção de Goma Xantana da *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103.**

**RESUMO**

As condições de preservação, transferência, cultivo ou manutenção de culturas microbianas devem manter sua pureza, características genéticas e fenotípicas que em conjunto confirmam a identificação do gênero e da espécie microbiana e garantem uma maior reprodutibilidade do rendimento e propriedades de seus produtos metabólicos. Buscando estabelecer o perfil genético, bioquímico e de ácidos graxos celulares da *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103, assim como identificar possíveis alterações nestas características e sua relação com o rendimento e viscosidade da xantana produzida por este microrganismo, o presente estudo monitorou a cepa, que foi preservada nas condições de congelamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  e refrigeração ( $3-8^{\circ}\text{C}$ ) com repiques mensais em meio YM ágar inclinado, durante seis meses. Ao longo do período de avaliação, os resultados revelaram a estabilidade da cepa 2103 da *Xanthomonas* quanto aos aspectos morfocoloniais, de perfil genético e de reações bioquímicas nos dois métodos de preservação. Foi possível estabelecer o perfil de ácidos graxos da cepa, com a identificação e quantificação de 13 compostos, cuja concentração se mostrou mais estável nas células mantidas à  $-80^{\circ}\text{C}$ . A concentração de alguns destes ácidos indicaram possível carência de nutrientes ou estresse das células cultivadas em ágar inclinado e mantidas sob refrigeração, as quais sintetizaram goma xantana de viscosidade mais baixa e em menor quantidade. O perfil genético obtido por eletroforese de campo pulsado utilizando a enzima de macro restrição *Xba*I gerou 17 fragmentos distintos, com tamanhos de, no máximo 485 kilobases (kb). Não foram observadas variações no perfil de distribuição dos fragmentos de restrição cromossomal entre os subcultivos mantidos nas duas condições de armazenamento durante o período avaliado. O procedimento de manutenção da cepa a  $-80^{\circ}\text{C}$  resultou em menores variações nas características fenotípicas avaliadas, o que provavelmente influenciou positivamente as características quali e quantitativas da xantana produzida.

**Palavras-chaves:** Ácidos Graxos Bacterianos. Biopolímeros. Goma Xantana. PFGE. *Xanthomonas campestris*.

## ABSTRACT

The conditions of storage, transfer, cultivation and maintenance of microbial cultures should preserve its microbiological purity and phenotypic and genotypic characteristics, which together, confirm the identification of microbial gender and species, ensuring metabolic production with better reproducibility in terms of yielding and properties. In order to establish the genetic profile, biochemical characteristics and composition of cellular fatty acids of the *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103, as well as, to identify possible changes in these characteristics and its relationship with the yielding and viscosity of the xanthan produced by this microorganism, this study monitored the strain stored at freezing conditions (-80°C) and subcultured monthly on YM agar slants at 3-8°C, during six months. Throughout this period, the results showed the stability of this *Xanthomonas* strain concerning to morphocolonial characteristics, genetic profile and biochemical reactions in both preservation methods. The fatty acid analysis profile of this strain showed 13 compounds, which were identified and quantified. The cells kept at -80°C showed more stable concentration of all fatty acids. The quantitative variation of these compounds observed in the cells maintained on agar slant under refrigeration, is an indicative of possible nutritional deficiencies or other stress condition associated to this maintenance condition. Such cells metabolized lower amounts of xanthan gum, with lower viscosity. The chromosomal fragmentation profile obtained with the macro restriction enzyme *Xba*I, revealed by pulsed field gel electrophoresis, showed 17 distinct fragments with maximum size of 485 kilobases (kb). Variations in the chromosomal fragmentation profile among the subcultures maintained in both storage conditions were not observed during the studied period. The maintenance procedure of the *Xanthomonas* strain at -80°C showed lower variations in all phenotypic characteristics observed, which probably had a positively influence on the qualitative and quantitative characteristics of the xanthan gum produced.

**Keywords:** Biopolymers. Bacterial fatty acids. PFGE. Xanthan gum. *Xanthomonas campestris*.

## 1 INTRODUÇÃO

Bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* são amplamente pesquisadas por serem responsáveis pela produção industrial de goma xantana (GX), o polissacarídeo microbiano de maior importância comercial (CAMEOTRA, 2007; MENEZES et al., 2012). Diversas bactérias deste gênero produzem o biopolímero, sendo a espécie *campestris* a mais utilizada para este fim (ROSALAM e ENGLAND, 2006; PALANIRAJ e JAYARAMAN, 2011).

A goma xantana é um polissacarídeo de origem microbiana produzido pelas bactérias do gênero *Xanthomonas*. Os polissacarídeos microbianos são carboidratos poliméricos de alto peso molecular presentes na membrana externa celular na forma de lipopolissacarídeos (LPS) ou então secretado como polissacarídeo capsular (CPS) formando uma camada associada à superfície celular, que também pode ser excretada no meio de cultivo como polissacarídeo extracelular (EPS) para possibilitar vida livre à célula microbiana, permitindo sua aderência e colonização em superfícies onde os nutrientes se acumulam. Esses exopolissacarídeos protegem as células da desidratação e de outros fatores de estresse ambiental, além de ajudar na fixação de minerais e nutrientes próximo a bactéria. A goma xantana é um EPS heteropolimérico composto por glicose, manose e ácido glucurônico (KUMAR e MODY, 2007; CUTHBERTSON et al., 2009).

A produção deste biopolímero é de grande interesse comercial e algumas subespécies têm se destacado por obter altos rendimentos de goma xantana a partir da fermentação de resíduos industriais, como é o caso da *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae*, avaliada em estudos recentes em nosso grupo de trabalho (BRANDÃO, ESPERIDIÃO e DRUZIAN, 2010; BRANDÃO et al., 2013; ASSIS et al., 2014).

Devido à sua estrutura, a xantana apresenta comportamento pseudoplástico, alta viscosidade e solubilidade aquosa. Também apresenta estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura (GARCIA-OCHOA et al., 2000). É muito utilizada na indústria alimentícia, em formulações farmacêuticas, de moagem de papel, esmaltes cerâmicos e produtos agrícolas (ROSALAM e ENGLAND, 2006).

As *Xanthomonas* são bactérias Gram-negativas, flageladas, com formato de bastonetes retos, facilmente visíveis ao microscópio óptico e crescem bem na faixa de temperatura entre 28 - 30°C (MAC FADDIN, 2000). O gênero caracteriza-se como oxidase negativo, catalase positivo, não redutor de nitrito, reagem positivamente no teste de hidrólise da esculina e não hidrolisam a gelatina, entre outras reações bioquímicas. O tempo médio de crescimento é de 2

a 3 dias e são normalmente aeróbias ou microaerófilas, o que facilita o cultivo em laboratório (PAGLIARINI e DRUZIAN, 2007).

O gênero *Xanthomonas* é caracterizado pela presença ácidos graxos de cadeia ramificada e do tipo “hidroxi”. A diversidade de ácidos graxos encontrada neste gênero, aliada ao fato de que essas moléculas se constituem um traço genético estável e altamente conservado em um grupo taxonômico, torna a análise deste perfil uma ferramenta valiosa na identificação de estirpes novas e desconhecidas (YANG et al., 1993; VAUTERIN, YANG e SWINGS, 1996).

A composição de ácidos graxos celulares vem sendo estudada por muitos pesquisadores a fim de correlacioná-la com a espécie microbiana ou para monitorar alterações em populações de microrganismos (GUO et al., 2010; YANG et al., 2012; AZEVEDO et al., 2014). Entretanto, não foram encontrados relatos de estudos relacionando este perfil lipídico com técnicas de armazenamento e manutenção de bactérias ou com a produção de biopolímeros.

A manutenção laboratorial de bactérias que produzem metabólitos de interesse comercial tem se tornado um desafio constante para a biotecnologia. Além de manter a viabilidade e estabilidade genética, as técnicas de conservação desses microrganismos devem ser práticas e econômicas. A instabilidade genética da *Xanthomonas*, inicialmente percebida em alguns estudos foi motivo de preocupação até a década de 90 (CADMUS et al., 1976; KIDBY et al., 1977). Acreditava-se que a manutenção em meio sólido inclinado não era adequada para preservar as culturas por mais de três meses, com repiques a cada 14 dias (JEANES et al., 1976). Mais tarde, novos procedimentos foram estabelecidos para a preservação adequada de bactérias desta espécie, o que possibilitou a manutenção de características morfológicas e de produção de xantana (GALINDO, SALCEDO e RAMIREZ, 1994).

O presente estudo buscou estabelecer e monitorar o perfil bioquímico, genético e de ácidos graxos celulares da cepa IBSBF 2103 de *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* preservada na condição de congelamento a -80°C em meio líquido contendo glicerol como agente crioprotetor, e mantida sob refrigeração (3-8°C) em ágar YM (yeast malt) inclinado, com repiques mensais durante 6 meses, na tentativa de identificar possíveis alterações fenotípicas e genotípicas, bem como a influência destas condições sobre o rendimento e qualidade da xantana produzida.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Reativação do Microrganismo

A cepa liofilizada de *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103, oriunda da Coleção de Culturas do Instituto Biológico (IBSBF, Campinas/SP) foi suspensa em 2,0 mL de caldo YM (Yeast Malt) estéril, contendo 0,3% de extrato de malte, 0,3% de extrato de levedura, 0,5% de peptona e 1,0% de glicose. Após incubação a 28°C por 24 horas em estufa bacteriológica, transferiu-se asépticamente uma alíquota de 100 µL da suspensão para placas de Petri contendo o mesmo meio YM com 2,0% (m/v) de ágar. Após a inoculação de superfície, o microrganismo foi incubado a 28°C por 48 h para permitir sua propagação.

### 2.2 Manutenção do Microrganismo

A manutenção da cepa reativada e propagada foi realizada de duas maneiras. Uma parte foi transferida para tubos criogênicos contendo caldo YM e glicerol 10% (v/v) e congelada em ultra freezer a -80°C (GALINDO, SALCEDO e RAMIREZ, 1994). Outra parte foi subcultivada em tubos selados contendo ágar YM inclinado (28°C, 48 h) e armazenados sob refrigeração (3 – 8°C), com repiques a cada 30 dias para outro tubo com meio de cultura recente (JEANES et al., 1976).

A cada 30 dias, os repiques em ágar e a cepa reativada do freezer foram avaliados quanto à pureza microbiana, perfil genético e bioquímico, capacidade de produção da GX e análise qualitativa e quantitativa de ácidos graxos celulares.

### 2.3 Pureza Microbiana

A pureza microbiana dos repiques mantidos sob refrigeração e congelamento foi avaliada pelas características morfocoloniais do microrganismo no meio de cultura e, microscopicamente, pelo estudo da forma, arranjo e reação de coloração das células bacterianas à técnica de Gram.

### 2.4 Provas Bioquímicas

O acompanhamento do comportamento bioquímico foi realizado com o kit comercial Bactray (Laborclin®) por meio dos seguintes testes: *o*-nitro-fenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG), arginina dehidrolase (ADH), lisina descarboxilase (LDC), ornitina descarboxilase (ODC), sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), urease (URE), acetoína (VP), L-fenilalanina (PD),

triptona (IND), citrato de sódio (CIT), malonato (MAL), ramnose (RHA), adonitol (ADO), arabinose (ARA), salicina (SAL), inositol (INO), sorbitol (SOR), sacarose (SAC), manitol (MAN), rafinose (RAF), cetrimide (CET), acetamida (ACE), maltose (MLT), esculina (ESC), L-arginina (ARG), indol (IND).

A partir da suspensão bacteriana padronizada frente à escala 0,5 de MacFarland (DO = 0,152 a 600 nm), transferiu-se 1 mL para o conjunto de reação, seguido de homogeneização e incubação a 28°C por 24 h. A leitura dos compartimentos de reação foi realizada a partir da coloração desenvolvida, seguindo as instruções do sistema de identificação.

## 2.5 Perfil de Ácidos Graxos

O processo de extração e esterificação dos lipídeos celulares foi realizado com base no protocolo descrito por Sasser (2009) para identificação de culturas microbianas puras, denominado MIDI<sup>®</sup> (MIDI-FAME), com algumas adaptações.

A massa celular da *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103, cultivada em ágar YM, foi separada da goma gerada durante o cultivo por centrifugação a 18800 x g a 10°C\15 min. A biomassa sedimentada no tubo foi seca a 35°C em estufa bacteriológica, 24 h. A lise celular e liberação dos ácidos graxos na forma de sais de sódio foi obtida por processo de saponificação (1 mL de NaOH 3,75M em metanol:água, 1:1 ) com 30 mg da biomassa. Após metilação (2 mL HCl 3M em metanol:água, 2:1), os compostos foram recuperados com a adição de isoctano (1,25 mL) por separação de fases. A fase inferior (hidro alcoólica) foi descartada e a fase superior (orgânica), contendo os ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) foi submetida à lavagem com solução alcalina (NaOH 0,3M) para remoção dos resíduos e extratos orgânicos. A fase orgânica foi transferida para *vials* que foram fechados em atmosfera inerte de N<sub>2</sub> para injeção no cromatógrafo.

A identificação dos ácidos graxos (AG) celulares foi realizada por comparação com os tempos de retenção do padrão de ésteres metílicos de ácidos bacterianos (BAME, Supelco) e confirmada por espectrometria de massas. A quantificação dos AG foi realizada por normalização, sendo os resultados expressos em percentagem relativa de área (FERNANDES, SAXENA e DICK; NASCIMENTO et al., 2013; AZEVEDO et al., 2014).

Os EMAG foram analisados por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama – CG-DIC (Varian, CP 3800) e por espectrometria de massas – CG-EM (Perkin Elmer, Claurus 500), utilizando uma coluna capilar CP-WAX 58 (FFAP) CB (25 m x 0,25 mm x 0,2 µm) sob temperatura inicial de 150°C, com rampa a 180°C, 210°C até atingir 230°C. Os

parâmetros analíticos foram: temperatura do injetor e detector de 250°C e 280°C, respectivamente; fluxo de 1,3 mL.min<sup>-1</sup> para o gás de arraste He, 30 mL.min<sup>-1</sup> para o gás auxiliar (*make-up*) N<sub>2</sub>, 30 mL.min<sup>-1</sup> para o H<sub>2</sub> e 300 mL.min<sup>-1</sup> para ar sintético; razão de divisão (*split*) de 1:100; . O volume de 1µL foi injetado em triplicata.

## 2.6 Perfil Genético

O DNA genômico total dos isolados de *X. campestris* pv. 2103 foi extraído utilizando o protocolo descrito por Cooksey e Graham (1989) modificado. A partir de colônias recentes e isoladas da *X. campestris* pv. 2103 oriundas dos subcultivos a 3 - 8°C e a -80°C, foram preparadas suspensões bacterianas em 1,0ml de solução salina 0,9% com turvação com OD entre 0,5-0,6 a 450nm. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso com 300µl de tampão (NaCl 1M; Tris-HCl 10 mM, pH 7,6) contendo 4µL de lisozima (25mg/mL). O plug preparado com a adição de 300µL do gel a 2% e resfriado a 0°C por 10 minutos, foi transferido para solução contendo 2ml do tampão EC (Tris-HCl 6 mM, NaCl 1M, EDTA 100 mM, Brij-58 0,5%, desoxicolato de sódio 0,2%, lauril sarcosine de sódio 0,5%) com 40µL de lisozima (25mg/mL) e 5U/ml (5µL de solução a 2000U/ml) de mutanolisina. Após incubação a 37°C por 2 h, os plugs foram lavados 2 vezes, durante 30 min. em tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) a 37°C. Após adição de 2 mL de tampão ES (EDTA 93,1g, lauril sarcosine de sódio 0,5g, proteinase K 0,1 mg/mL, água ultrapura 500 mL) as amostras foram incubadas a 55°C, 12 horas. Após a lavagem dos plugs com tampão TE durante 1 h, estes foram transferidos para a solução contendo a enzima de restrição *Xba*I (20U/plug) e incubados a 37°C por 3h. A separação ocorreu em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE 0,5x (tris 1M, ácido bórico 0,9M, EDTA 0,01M), a 14°C, durante 23 h, pulso de 2 a 30s e 6 V/cm. O gel, revelado com brometo de etídio, foi fotografado para registro (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989).

## 2.7 Produção de Goma Xantana e Viscosidade Aparente

A partir de 50 mL de meio YM padrão inoculado com a *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103 e incubado a 28°C, 24 h, em agitador rotativo a 180 rpm, transferiu-se 20% do inóculo (~10<sup>11</sup> UFC/mL) para erlenmeyer (250 mL) contendo 80 mL do meio fermentativo elaborado com 2,0% de sacarose, suplementado com 0,01% de uréia e 0,1% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. A fermentação aeróbica transcorreu em agitador rotativo a 28°C, 250 rpm por 120 h (NERY et al., 2008).

O caldo fermentativo contendo GX foi centrifugado a 10°C e 18800 x g (HITACHI, CR-GIII) por 15 min. para remoção celular. A goma foi precipitada com adição de acetona P.A. ao meio fermentado (3:1). O biopolímero obtido foi seco em estufa a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 24 h e moído com auxílio de gral e pistilo para a determinação gravimétrica da produção ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e viscosidade aparente.

A viscosidade da GX foi medida em função da taxa de cisalhamento de 25 a  $1000 \text{ s}^{-1}$  à  $25^\circ\text{C}$  em viscosímetro (Haake Rheotest) com dispositivo de cilindros concêntricos. Utilizou-se 25 mL da solução aquosa de GX a 0,5% (m/v), preparada e mantida sob refrigeração a  $4^\circ\text{C}$  por 12 h antes das medições. O efeito da taxa de cisalhamento na viscosidade da solução do biopolímero foi descrito pelo modelo cinético de Ostwald-de Waele:  $\mu = K.(\dot{\gamma})^{n-1}$ , onde K é o índice de consistência, n é o índice do comportamento do fluxo,  $\mu$  é a viscosidade aparente e  $\dot{\gamma}$ , a taxa de cisalhamento.

## 2.8 Análise estatística

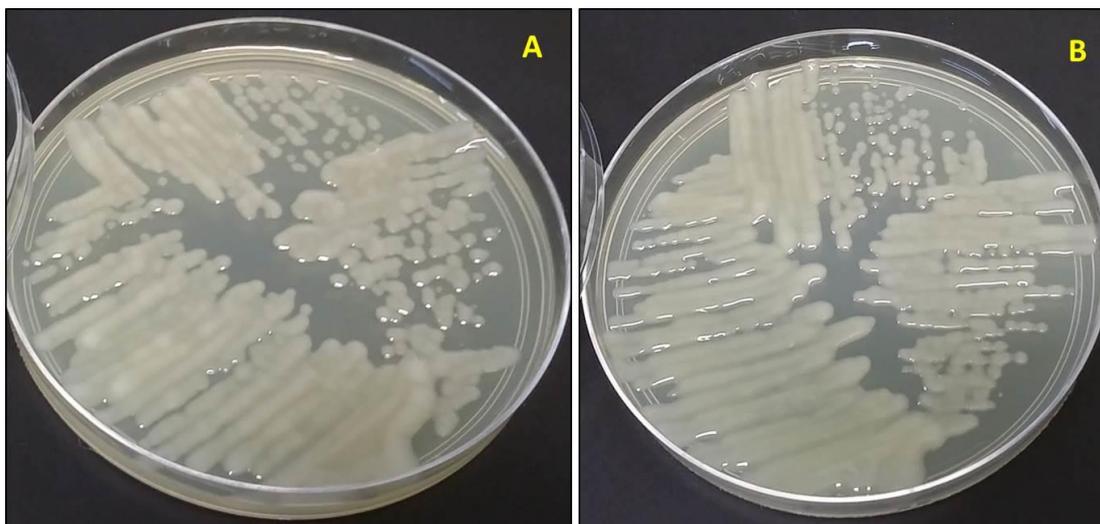
Os dados foram submetidos a análise estatística descritiva simples para avaliação de fatores como a média, desvio padrão e desvio padrão relativo utilizando o software Excel 2010 (Microsoft). A inferência estatística foi realizada pelo teste de Tukey a 5% de significância, no software Statistical Package for the Social Sciences - SPSS, versão 13.0.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Pureza Microbiana

A manutenção das características morfocoloniais com aspecto gomoso, brilhante, bordas lisas e sem pigmentação amarelada, típico das colônias de *X. campestris mangiferaeindicae*, foi observada para todos os repiques preservados em ágar YM mantidos sob refrigeração ( $3-8^\circ\text{C}$ ), durante o período avaliado. As mesmas características foram observadas para a cultura inicial preparada a partir do inóculo liofilizado e nas culturas ativadas após armazenamento à  $-80^\circ\text{C}$  (Figura 1).

**Figura 1-** Repiques do 5º mês de avaliação da *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* 2103 propagada em ágar YM após manutenção em ultra freezer a -80°C (A) e refrigeração por 3 - 8°C (B).



A reação de coloração das células ao teste de Gram, sob observação microscópica, indicou resultado negativo. Em todos os repiques avaliados, foram observados bastonetes retos e não pigmentados pelo corante. A manutenção da negatividade ao corante Gram serviu como prova auxiliar na confirmação da pureza microbiana após a manutenção por repique em ágar YM inclinado e sua estocagem em temperatura de refrigeração.

A subespécie *mangiferaeindicae* apresenta geralmente um aspecto brilhante com bordas lisas e uma coloração esbranquiçada em meio ágar-nutritivo, pois não produz ou produz pouca xantomadina, pigmento característico das bactérias do gênero *Xanthomonas*, com exceção de alguns patovares ou isolados de um mesmo patovar (SWINGS, VAUTERIN e KERSTER, 1993). Estas características também foram relatadas por Pruvost e colaboradores (1998) que avaliaram a diversidade fenotípica de 68 cepas de *X. mangiferaeindicae*, sendo que destas, 5 cepas apresentaram colônias com pigmentação amarelada. Entretanto, todas foram Gram-negativas.

O comportamento da *Xanthomonas* durante a sua manutenção já foi estudado por outros autores. Galindo, Salcedo e Ramirez (1994), por exemplo, descreveram uma técnica de conservação da *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 e sua variante, denominada E2, em tubos com ágar YM inclinado, com repiques a cada 30 dias durante 11 meses. As cepas estudadas foram avaliadas somente na condição de manutenção sob refrigeração e não apresentaram mudanças morfológicas nas colônias e nem alteração na capacidade de produção de goma xantana em sistema de shaker. Apesar de algumas bactérias manterem-se viáveis após sucessivos repiques, pode ocorrer alteração de características fenotípicas, como

perda da patogenicidade ou virulência e até mesmo alteração na sua capacidade de metabolização de determinados substratos (KIDBY et al., 1977; ROMEIRO, 1996). Por isso, há a necessidade de verificação periódica das características dos isolados.

A comprovação da manutenção da pureza microbiana é importante para confirmar que a cultura não foi contaminada com outro microrganismo, principalmente no caso das células armazenadas em ágar YM inclinado a 3-8°C e repicadas a cada 30 dias, que são mais suscetíveis à contaminação. Esta observação garante que todos os lotes de goma xantana foram produzidos a partir de culturas puras, e que durante o período avaliado, o microrganismo manteve suas características fisiológicas e morfocolônias.

### **3.2 Perfil Fisiológico e Bioquímico**

A partir dos resultados apresentados na Tabela 1, pode-se estabelecer um perfil bioquímico mínimo da cepa IBSBF 2103 da *X. campestris*, que foi avaliada por meio de 10 reações enzimáticas e 13 provas de utilização de fontes de carbono a partir de substratos específicos.

Foi observado que o microrganismo apresentou comportamento bioquímico e fisiológico muito regular em todos os tempos e temperaturas de conservação, exceto nos dois últimos tempos avaliados (T4 e T5) com a técnica de repique e manutenção a 3-8°C, para os testes de esculina e sacarose, que passaram a apresentar resultado fracamente positivo e para os testes de sorbitol e manitol, que passaram de fracamente positivo para negativo. Estas variações estão possivelmente associadas a deficiências metabólicas pontuais em função do tempo de armazenamento no ágar YM inclinado sob refrigeração e também, pela interpretação visual do ponto final colorimétrico, que não mudou totalmente.

**Tabela 1 - Características morfológicas e bioquímicas da *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103.**

	Testes	T1		T2		T3		T4		T5		PRUVOST, et al., 1998*
		-80°C	3-8°C									
Características morfológicas	Coloração de Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pigmentação da colônia	apigmentada		apigmentada								
	Crescimento na Cetrimida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N
Reações enzimáticas	ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N
	L-Arginina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Lisina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ornitina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H <sub>2</sub> S (sulfeto)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N
	Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Produção de acetoina (VP)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L-fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	±	+	±	+	
Utilização de fontes de carbono	Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N
	Malonato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
	Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Sorbitol	±	±	±	±	±	±	±	-	±	-	-
	Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	±	+	±	+
	Manitol	±	±	±	±	±	±	±	-	±	-	+/-
	Acetamida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

T1= 30 dias, T2= 60 dias, T3= 90 dias, T4= 120 dias, T5= 150 dias; (±) reação fracamente positiva; (+) reação positiva; (-) reação negativa; (+/-) variações entre as cepas estudadas; (N) não analisado. \**X. campestris mangiferaeindicae*.

Em relação às reações enzimáticas, com exceção da esculina, as demais reações foram negativas, comprovando que a *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103 não possui as enzimas responsáveis pela hidrólise dos substratos. Considerando estas provas enzimáticas, o comportamento da cepa analisada foi similar aos resultados obtidos por Pruvost e colaboradores (1998) que estudaram 68 cepas de *X. campestris mangiferaeindicae*. Gama e colaboradores (2011) também encontraram resultados semelhantes para os testes da L-arginina, urease e indol em 3 cepas deste microrganismo.

Os microrganismos produziram ácidos a partir da arabinose e também na reação com a sacarose. Para a maltose e manitol, além de outros substratos, Pruvost e colaboradores (1998) encontraram cepas de *X. campestris mangiferaeindicae* que apresentaram reação positiva e/ou negativa (Tabela 1).

A *Xanthomonas* avaliada não degradou a glicose pela via butilenoglicólica, pois não se observou a produção de acetoína em nenhum dos tempos avaliados, conforme resultados negativos do teste de Voges-Proskauer (VP). Dessa forma, conclui-se que a fermentação da glicose realizada pela bactéria ocorre pela via ácida mista. A *X. campestris* pv. 2103 também reagiu negativamente aos testes de desaminação da fenilalanina, hidrólise do triptofano pela triptofanase, utilização de citrato e malonato como fontes de carbono.

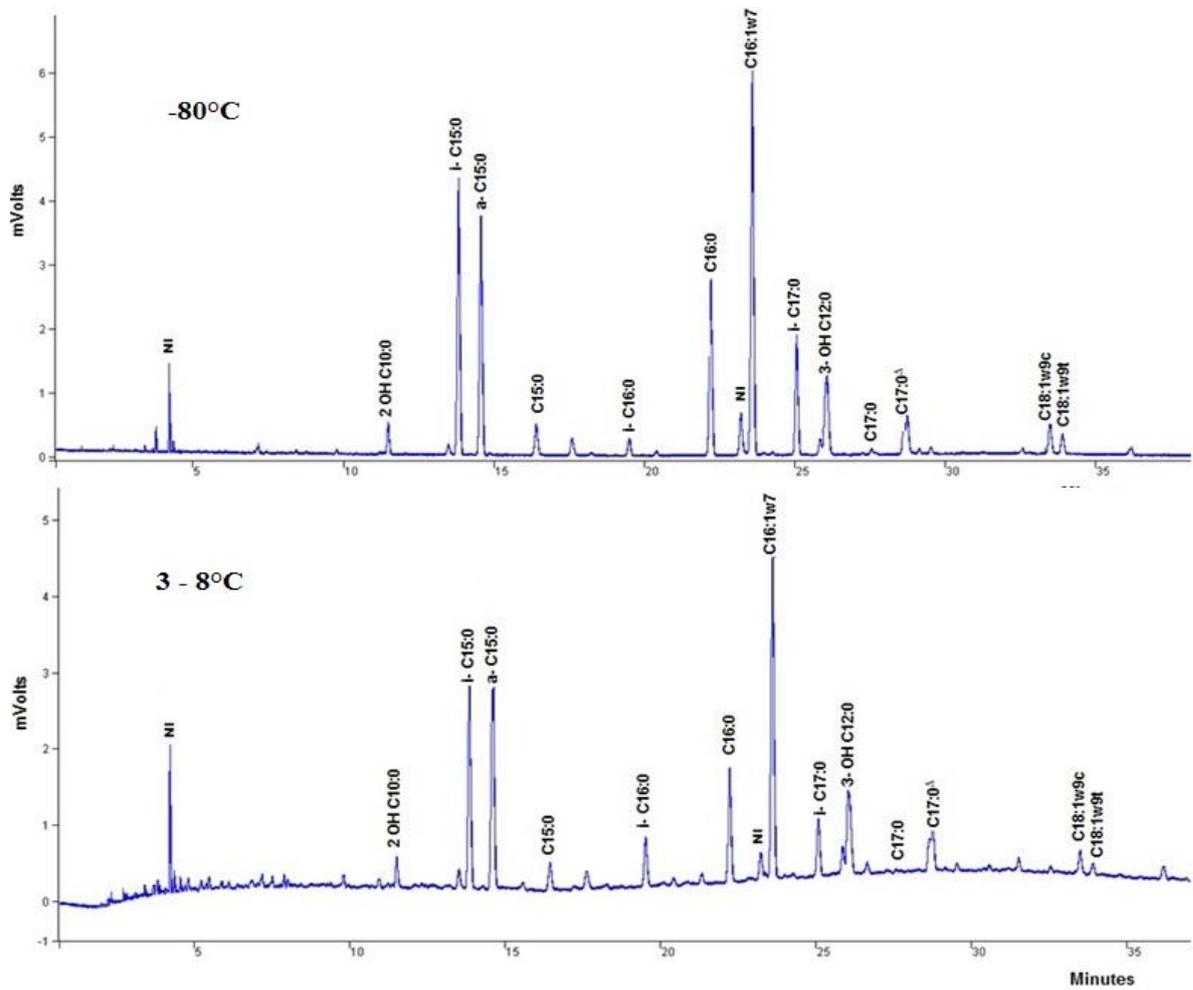
A *X. campestris* pv. 2103 não apresentou crescimento (turvação) em cetrimida. No teste da acetamida verificou-se reação positiva, indicando que a bactéria utiliza esta substância como fonte de carbono. A reação também foi positiva para o teste de hidrólise da esculina, detectada com citrato férrico amoniacal.

### **3.3 Perfil de Ácido Graxo Celular Bacteriano**

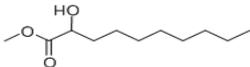
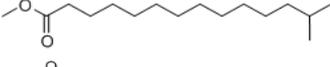
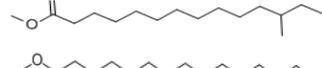
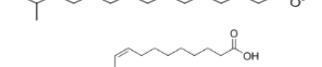
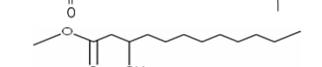
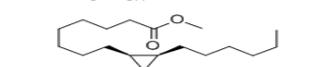
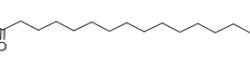
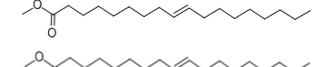
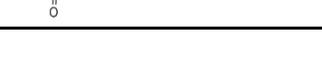
Os principais ácidos graxos da *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* 2103 foram identificados por comparação com os tempos de retenção do padrão de ésteres metílicos de ácidos bacterianos (BAME, Supelco), injetados no CG-DIC e CG-MS (Apêndice A). Os espectros de massa dos ácidos graxos contidos no padrão BAME, bem como suas estruturas moleculares estão dispostos no apêndice B.

Os microrganismos mantidos em ambas as técnicas de conservação apresentaram o mesmo perfil qualitativo de ácidos graxos ao longo do estudo (Figura 2). Em sua maioria, são constituídos por estruturas de cadeia linear, conforme apresentado na Tabela 2.

Figura 2 - Perfil cromatográfico dos ácidos graxos identificados na *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103 mantida à -80°C e sob refrigeração em ágar YM inclinado, 5º mês, obtidos por CG-DIC com coluna capilar CP-WAX 58 (FFAP) CB.



**Tabela 2 - Especificação dos principais ácidos graxos identificados na *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103 por GC-DIC e GC-MS.**

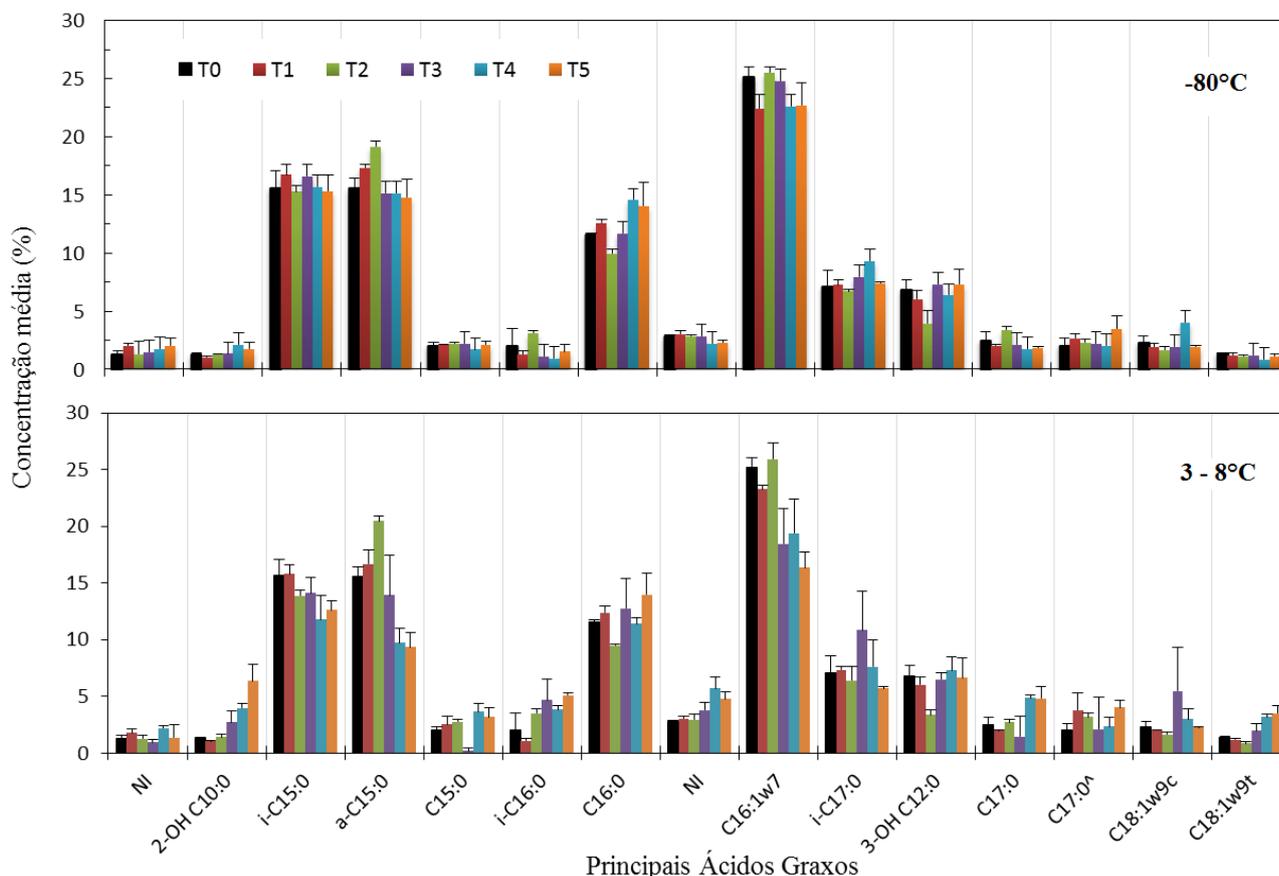
Sigla	Ácido Graxo	Estrutura molecular
NI	Não Identificado	-
2-OH 10:0	Ácido 2-hidroxicaprílico	
i-15:0	Ácido iso-pentadecanóico	
a-15:0	Ácido anteiso-pentadecanóico	
15:0	Ácido pentadecanóico	
i-16:0	Ácido iso-hexadecanóico	
16:1w7	Ácido palmitoleico	
16:0	Ácido palmítico	
i-17:0	Ácido iso-heptadecanóico	
3-OH 12:0	Ácido 3-hidroxidodecanóico	
17:0 <sup>Δ</sup>	Ciclopropil C17:0	
17:0	Ácido heptadecanóico	
18:1ω9c	Ácido oleico	
18:1ω9t	Ácido eláidico	

Os principais EMAG identificados na cepa de *Xanthomonas* sob estudo foram quantificados mensalmente durante o acompanhamento da manutenção do microrganismo. Realizou-se a normalização das áreas cromatográficas e os resultados foram expressos em percentagem relativa de área (%).

A Figura 3 apresenta os resultados obtidos para as células microbianas recém-ativadas e para as alíquotas do microrganismo preservado em freezer e mantido por repiques mensais em ágar durante o período de avaliação.

As concentrações médias de todos os ácidos graxos identificados nas amostras de *Xanthomonas campestris* pv. 2103 estão também detalhadas no apêndice C.

**Figura 3 - Variação da composição percentual média dos ácidos graxos da *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103 estocada em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  e mantida por repiques mensais ( $3-8^{\circ}\text{C}$ ), no primeiro mês (T0) e nos 5 meses subsequentes (T1, T2, T3, T4 e T5).**



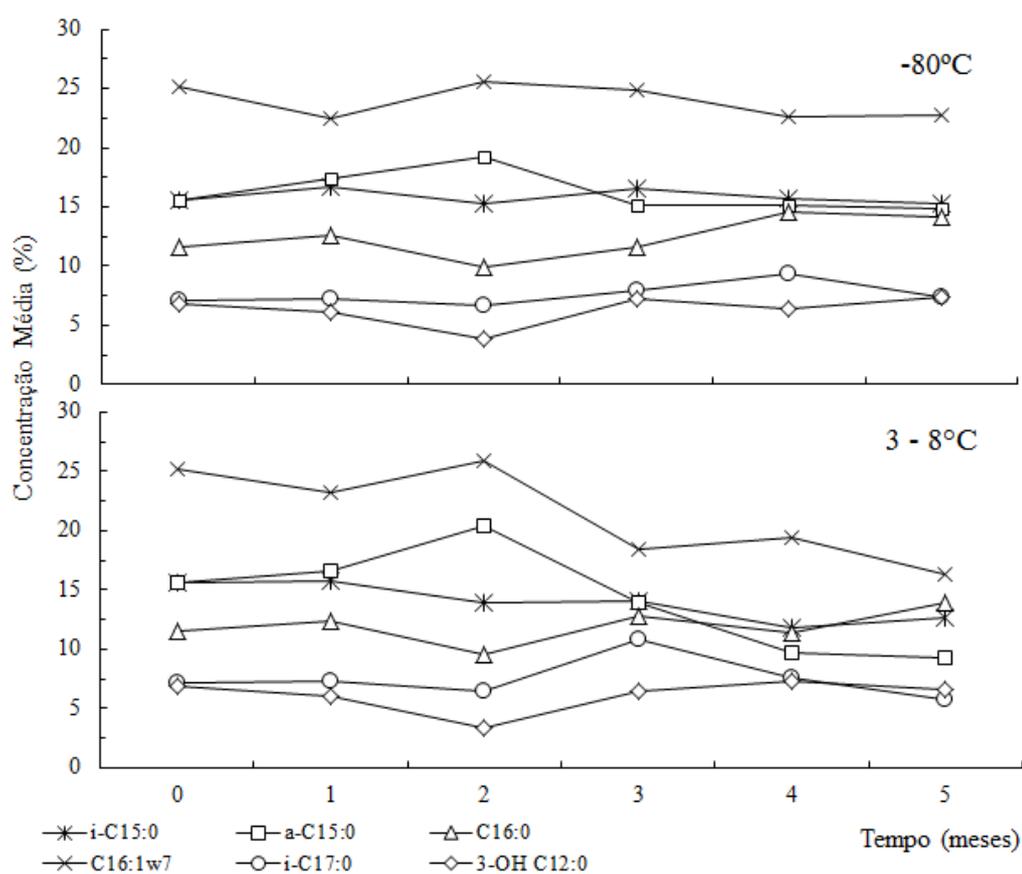
Dos principais AG identificados, os que se apresentaram em maior concentração em ambas as condições de estocagem foram, nesta ordem, palmitoleico (C16:1w7); *anteiso*-pentadecanóico (a-C15:0); *iso*-pentadecanóico (i-C15:0); palmítico (C16:0); *iso*-heptadecanóico (i-C17:0) e o 3-hidroxidodecanóico (3-OH C12:0).

A utilização de perfis de AG para estudos taxonômicos do gênero *Xanthomonas*, indica que centenas de cepas pertencentes a 7 espécies este gênero bacteriano (*X. albilineans*, *X. axonopodis*, *X. campestris*, *X. fragariae*, *X. maltophilia*, *X. oryzae* e *X. populi*) contêm pelo menos 65 diferentes ácidos graxos, em quantidades variáveis. Entre os 9 ácidos graxos mais comuns detectados em 99% das 966 estirpes de *Xanthomonas* testadas por Yang e colaboradores (1993), quatro também foram identificados neste trabalho com a *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* 2103, que são os ácidos 3-OH C12:0, i-C15:0, C16:1w7 e o C16:0.

Pode-se observar que a *Xanthomonas* mantida sob congelamento apresentou as menores variações na quantificação dos 6 principais ácidos graxos realizada durante os 6 meses, com coeficientes de variação de 3,1% a 17,6%, contra 9,8% a 30% calculados para o microrganismo repicado e mantido sob refrigeração.

A Figura 4 apresenta a variação da concentração média dos AG identificados em maior concentração nos microrganismos mantidos nos dois métodos de preservação, partindo do perfil da cultura recém-ativada (tempo 0).

**Figura 4 - Concentração média dos principais ácidos graxos da *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103 mantida sob congelamento (-80°C) e refrigeração (3 – 8°C), em função do tempo.**



A maioria dos ácidos se comportou de forma semelhante ao longo dos meses, sendo que as maiores variações foram detectadas nas células repicadas e mantidas sob refrigeração, como no caso do ácido palmitoleico (C16:1w7) que apresentava uma concentração média de 25% nos primeiros meses, chegando a 16% no último mês de avaliação. Ainda assim, esta concentração foi superior ao valor encontrado por Vauterin, Yang e Swings (1996) que quantificaram 13% deste mesmo ácido em outras espécies de *Xanthomonas campestris*.

A concentração do ácido *iso*-pentadecanóico (i-C15:0) manteve-se constante apenas nos dois primeiros meses de repiques das células conservadas em refrigeração, com uma concentração média em torno de 15%. Nas últimas avaliações deste método de conservação (3-8°C) houve uma redução, chegando a 12% no quinto repique (Figura 4), diferente do que ocorreu com as células mantidas congeladas, as quais apresentaram médias mais próximas da concentração inicial (15,6%).

Foi observado que a manutenção das células microbianas nos dois primeiros meses favoreceu a produção do ácido graxo *anteiso*-pentadecanóico (a-C15:0) que apresentou um aumento de 61,6 e 65,7% no segundo mês de repique das células congeladas e refrigeradas, respectivamente, em relação ao mês de ativação do microrganismo. No entanto, a partir do terceiro mês de repique as células mantidas congeladas apresentaram uma redução na concentração deste ácido, atingindo valores próximos aos do início da análise, enquanto que nos repiques mantidos sob refrigeração o teor do ácido graxo a-C15:0 reduziu em mais de 50% (Figura 4).

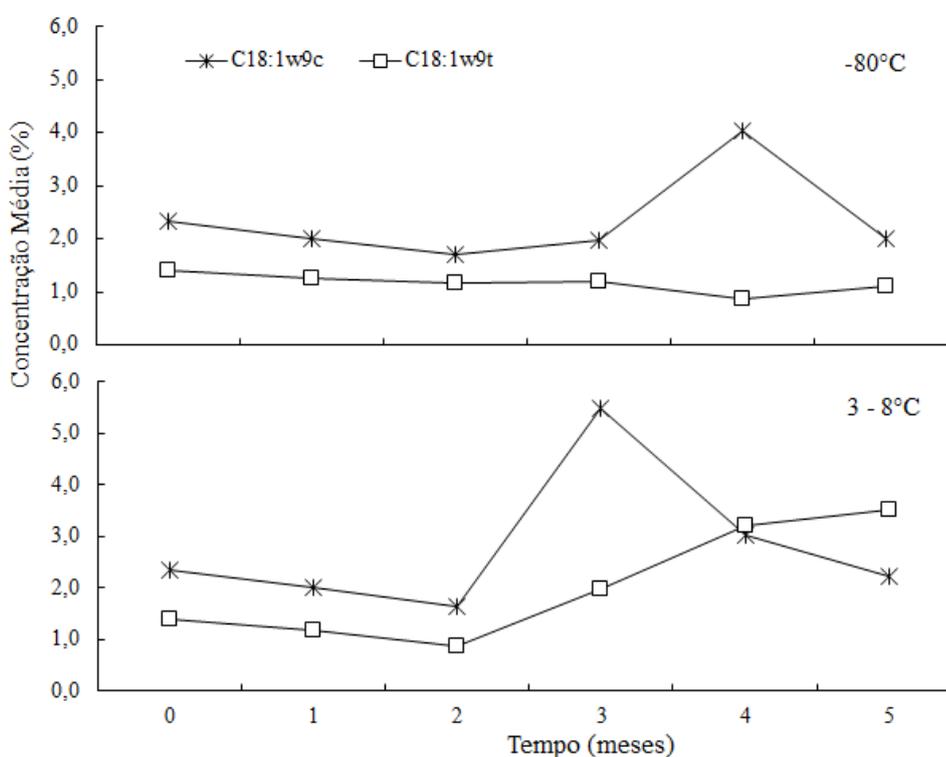
Outros AG, como o palmítico (C16:0) e o 3-hidroxidodecanóico (3-OH C12:0), apresentaram variações semelhantes entre as técnicas de preservação estudadas, com concentrações médias iniciais em torno de 12% e 6%, respectivamente, chegando a 13% e 7% no final. Ambos os valores foram superiores aos encontrados por Vauterin, Yang e Swings (1996) que quantificaram uma média de 4% para o C16:0 e 3% para o 3-OH C12 em outras espécies de *Xanthomonas*.

O ácido graxo *iso*-heptadecanóico (i-C17:0) também se manteve constante nos dois primeiros meses, com uma média geral em torno de 7%, percentual similar ao encontrado por outros autores (VAUTERIN, YANG e SWINGS, 1996). Houve uma variação na concentração deste ácido graxo a partir do terceiro repique, sobretudo nos valores obtidos com as células mantidas sob refrigeração, as quais apresentaram um aumento superior a 70% no terceiro mês e atingiram um teor médio abaixo do valor inicial, no último mês de avaliação (5,7%).

Outro dado relevante detectado neste estudo foi a proporção dos AG C18:1w9 *cis* e *trans* nas células repicadas e mantidas sob refrigeração. Em condições normais, a conformação *cis* ocorre com mais frequência nas duplas ligações dos AG naturais, sendo portanto, mais abundante que o isômero *trans* na composição celular bacteriana. Entretanto, vários fatores de estresse ambiental podem provocar aumento no número de isômeros *trans* e redução dos isômeros *cis* (GUCKERT e HOOD, 1986; KIEFT e RINGELBERG, 1994; PIETIKÄINEN e HIUKKA, 2000; CRONAN, 2002). Tal fato foi observado na subcultura

repicada e mantida em ágar YM inclinado, que a partir do 2º mês apresentou elevação na concentração do isômero *trans* do ácido graxo elaídico (C18:1w9t) até ultrapassar a concentração do seu isômero *cis* (ácido oleico, C18:1w9c) no 4º mês de acompanhamento, mantendo-se assim até a última avaliação (Figura 5). Esta inversão na proporção dos isômeros *cis* e *trans* não foi observada para a subcultura de *Xanthomonas* mantida a -80°C, que apresentou a forma *cis* em maior concentração durante o período de avaliação.

**Figura 5 - Relação da concentração média entre os ácidos graxos C18:1w9 *cis* e C18:1w9 *trans* da *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103, mantida sob congelamento (-80°C) e refrigeração (3-8°C), em função do tempo.**



Yang e colaboradores (2012) identificaram o perfil lipídico de uma espécie de *Acinetobacter*, que também é uma bactéria Gram-negativa, e constataram que o ácido oleico (C18:1w9c) estava presente em maior concentração, com 42%. Neste experimento, a *Xanthomonas* pv. 2103 apresentou um perfil de ácidos graxos distintos como era esperado e obteve o ácido palmitoleico (C16:1w7) em maior quantidade (Figura 5).

As bactérias Gram-negativas contêm, em geral, alguma combinação de ácidos graxos de cadeia saturada, insaturada, hidroxil e ciclopropanos. Além disso, elas ocasionalmente também podem conter ácidos *iso* e/ou *anteiso*. Nas Gram-positivas predominam os ácidos de cadeia ramificada (PACHECO & PINTO, 2010).

Whittaker (2009) usou a mesma técnica para identificar bactérias Gram-negativas e identificou que os principais ácidos graxos são de cadeia linear, a exemplo dos ácidos saturados C12:0, C14:0, C15:0 e C16:0, alguns hidroxilados como o 3OH C14:0, o *iso*-C16:1 e outros insaturados também foram detectados (C16:1w7c e C18: 1w7c), em espécies de *Yersinia*.

Apesar das moléculas de ácidos graxos estarem intimamente relacionadas à porção denominada de lipídeo A, que forma a base estrutural de conexão dos lipopolissacarídeos (LPS) à membrana externa da *Xanthomonas* spp. e de outras células microbianas Gram-negativas, não foi possível estabelecer correlação entre as variações observadas na concentração de ácidos graxos celulares e a produção e viscosidade da goma xantana obtida durante o período de investigação da *X. campestris* pv. *manginiferaeindicae* 2103. De fato, a maior parte do processo de formação do polímero é intracelular e sua rota biossintética envolve 3 estágios que são a conversão de moléculas de açúcar para formar precursores nucleotídeos; a montagem das subunidades pentassacarídicas no carreador poliprenol-fosfato intra-membrana, juntamente com os grupos acetil e piruvato e, por último, a polimerização das unidades pentassacarídicas repetidas culminando com a secreção do polímero (IELPI, CORSO e DANKERT, 1993; DA SILVA et al., 2001).

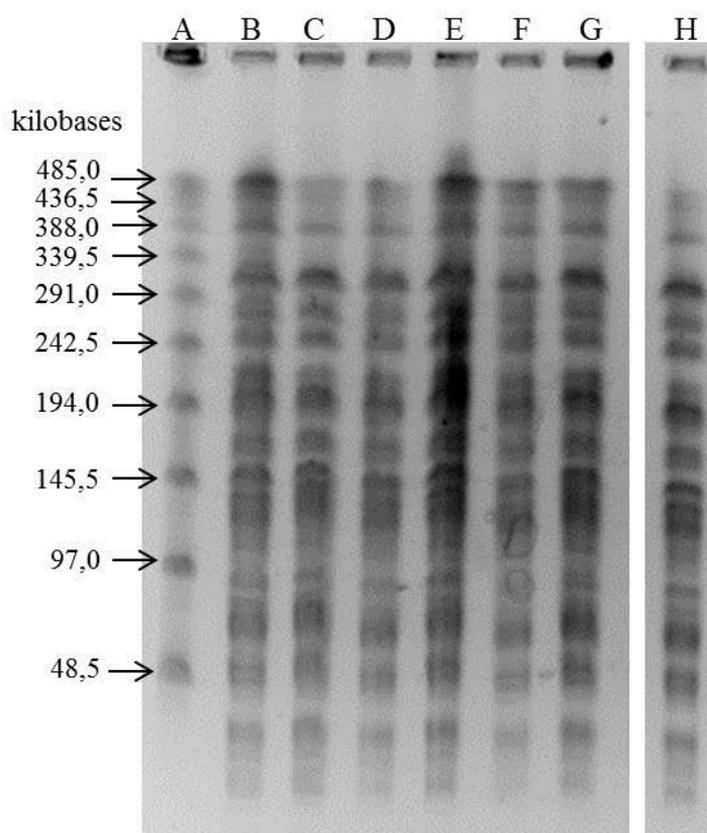
### 3.4 Perfil Genético

A digestão cromossomal do DNA da *X. campestris* pv. *manginiferaeindicae* 2103 mantida nas diferentes condições de armazenamento ao longo do período de avaliação foi realizada com a enzima de restrição *Xba*I e gerou 17 fragmentos distintos com tamanho de, no máximo 485 kb. A Figura 6 apresenta uma separação eletroforética típica obtida em todos os experimentos, na qual é possível observar que todos os subcultivos do microrganismo apresentaram perfil de fragmentação semelhante, caracterizando assim a estabilidade genotípica da bactéria ao longo dos seis meses de avaliação nas duas condições de estocagem. Gagnevin e colaboradores (1997) realizaram a análise do DNA genômico de 138 cepas da *X. campestris* pv. *manginiferaeindicae* por técnica distinta da PFGE. Os autores empregaram a análise de polimorfismo por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) que gera um padrão específico de fragmentação, impossibilitando a comparação com os resultados aqui obtidos.

A eletroforese de campo pulsado (PFGE) é utilizada para separar grandes fragmentos de restrição e, não foi encontrado na literatura qualquer referência sobre o perfil de separação

genético da espécie de *Xanthomonas* sob estudo utilizando esta técnica, entretanto Chan e Goodwin (1999) utilizando PFGE com a enzima de corte *Xba*I, comprovaram a diferenciação genética de vários isolados de 2 cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, que geraram de 21 a 58 fragmentos com tamanho de, no máximo, 398 kb. Verificaram também que o tamanho e distribuição dos fragmentos cromossomais gerados foram altamente reprodutível entre os experimentos independentes realizados com esta técnica.

**Figura 6 - Perfil de fragmentação cromossomal da *X. campestris mangiferaeindicae* IBSBF 2103 obtido com enzima de restrição *Xba*I e separação por eletroforese de campo pulsado (PFGE) em gel de agarose a 1,2% (p/v) com tampão TBE 0,5x a 14°C, pulsos de 2 a 30s, 23h a 6 V cm<sup>-1</sup>. Coluna A: marcador de tamanho (kilobases-kb); B: subcultivo congelado -80°C; C, D, E, F e G: subcultivos em YMA inclinado a 3-8°C do 1° ao 5° mês, respectivamente; H: repetição do subcultivo do 3° mês.**



### 3.5 Produção e Viscosidade Aparente da Goma Xantana

A *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* 2103 produziu GX em ambas as condições de conservação durante todo período de avaliação. Entretanto, o rendimento de produção se manteve constante apenas com a cepa mantida sob congelamento, em torno de 3 g/L. O subcultivo que sofreu repiques mensais apresentou uma redução significativa na produção de

xantana a partir do segundo repique (T2), conforme a Tabela 3. A diferença no rendimento médio da goma produzida (g/L) entre os microrganismos mantidos nas duas condições de estocagem foi significativa ( $p < 0,05$ ) quando analisado pelo teste de Tukey.

Os valores obtidos foram ligeiramente inferiores ao rendimento obtido em um estudo anterior realizado por nosso grupo (BRANDÃO et al., 2013), que foi de 4 g/L, utilizando a mesma cepa e condições semelhantes de produção.

Em outros trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, quantidades superiores de produção de xantana por esta cepa foram obtidos a partir da fermentação com meios alternativos e heterogêneos de soro de mandioca em shaker, chegando a 13,8 g/L (BRANDÃO, ESPERIDIÃO E DRUZIAN, 2010) e da fermentação com glicerina residual de biodiesel em biorreator (ASSIS et al., 2014) atingindo uma produção 5,6 g/L em condições otimizadas. A utilização de um substrato fermentescível convencional, contendo sacarose, com menor capacidade de produção de GX, foi necessária para garantir condições padronizadas de fermentação da GX ao longo deste estudo.

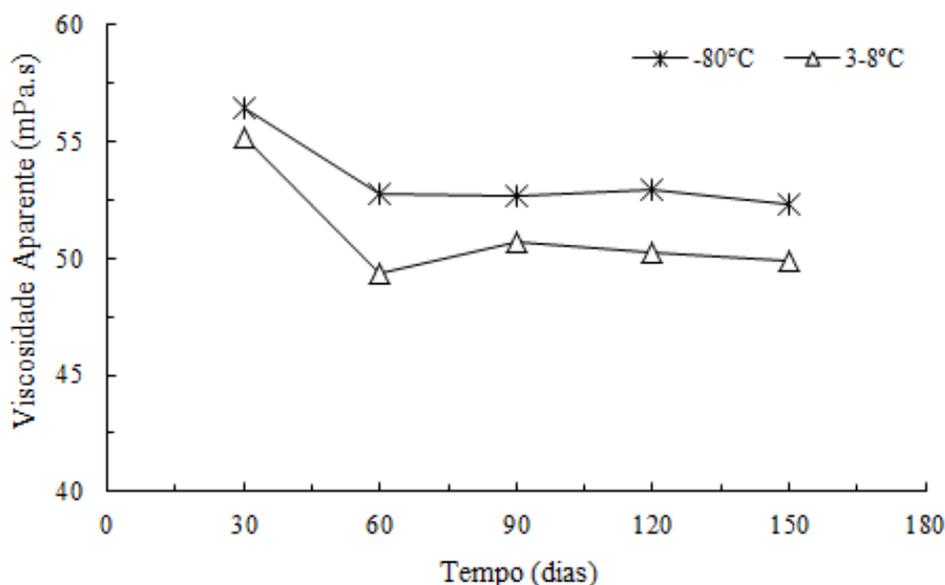
**Tabela 3 – Produção da goma xantana produzida pela *X. campestris mangiferaeindicae* IBSBF 2103 utilizando sacarose (2%) em fermentador rotativo a 28°C, 250 rpm e 120 h.**

Técnica de Conservação	Produção (g/L) ± Desvio Padrão				
	1º Mês	2º Mês	3º Mês	4º Mês	5º Mês
-80°C	3,21±0,22 <sup>a</sup>	3,05±0,31 <sup>a</sup>	2,93±0,34 <sup>a</sup>	2,78±0,05 <sup>a</sup>	3,11±0,27 <sup>a</sup>
3-8°C	3,13±0,1 <sup>a</sup>	1,82±0,34 <sup>b</sup>	2,37±0,29 <sup>b</sup>	2,21±0,17 <sup>b</sup>	2,17±0,28 <sup>b</sup>

Médias seguidas por letras<sup>ab</sup> diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste Tukey, entre os tempos de avaliação da produção. (n=3)

A Figura 7 apresenta a variação da viscosidade, na menor taxa de cisalhamento (25 s<sup>-1</sup>) a 25°C, durante o período de avaliação.

**Figura 7 - Viscosidade aparente da goma xantana produzida pela *X. campestris mangiferaeindicae* IBSBF 2103 mantida em diferentes condições de armazenamento. Suspensão de xantana a 0,5% (m/v) / 25s-1 / 25°C.**

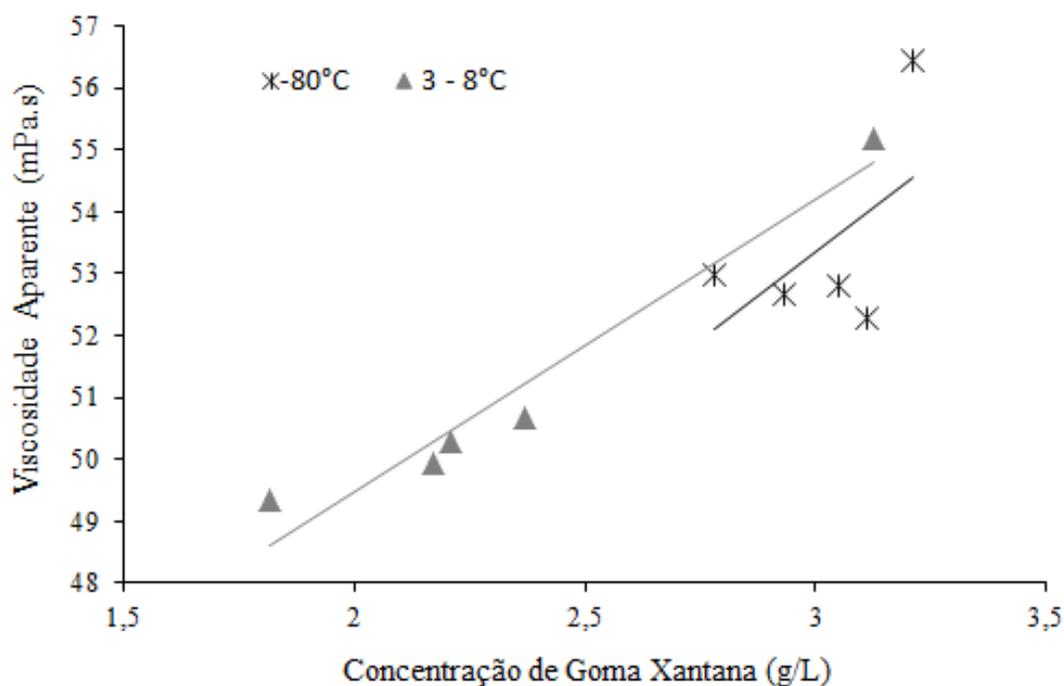


As células mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  produziram gomas com viscosidade aparente superior às gomas resultantes das células armazenada em ágar inclinado sob refrigeração ( $3-8^{\circ}\text{C}$ ) e repicada mensalmente, apresentando uma média geral de 53 mPa.s contra 51 mPa.s, respectivamente. Ambas apresentaram uma redução da viscosidade nos primeiros meses, sendo que as gomas obtidas a partir dos repiques mantidos em refrigeração apresentaram uma redução maior, em torno de 10% (Figura 7).

A partir do 2º mês, a viscosidade da goma obtida das células congeladas à  $-80^{\circ}\text{C}$  apresentou-se mais constante, com valores próximos de 52,7 mPa.s, ao passo que as gomas dos repiques mantidos em refrigeração tiveram um aumento de 3% do 2º para o 3º mês, mantendo-se relativamente constantes nos meses seguintes.

Foi observado que a viscosidade das xantanas produzidas pela *Xanthomonas* pv. 2103 foi proporcional ao rendimento de produção da xantana, assim como resultados obtidos por Brandão, Esperidião e Druzian (2010), usando a mesma cepa. As xantanas obtidas de processos fermentativos com maior taxa de produção foram as mais viscosas. Na Figura 8, pode-se observar que, à medida que a concentração de goma aumenta a viscosidade também se eleva.

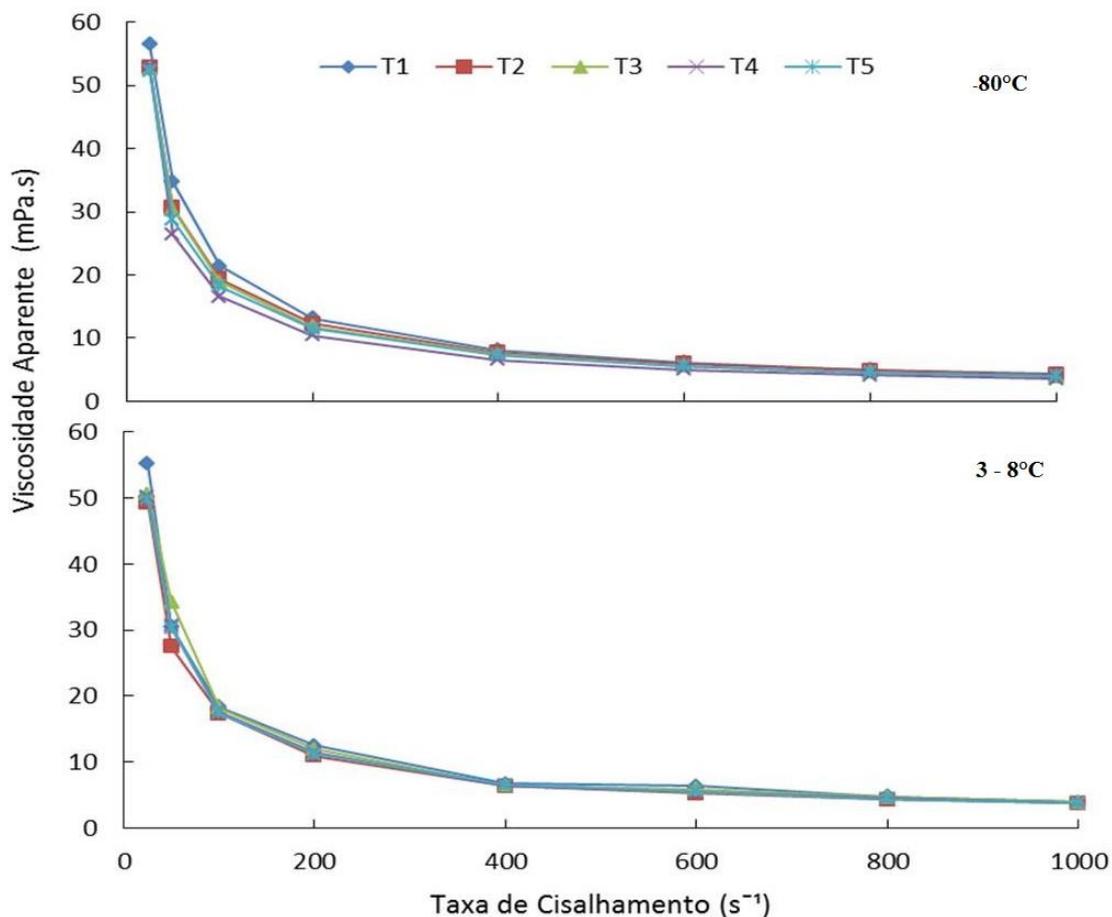
Figura 8 - Relação entre a viscosidade aparente (mPa.s) e a concentração de goma xantana (g/L) obtida com a *X. campestris mangiferaeindicae* IBSBF 2103 mantida em diferentes condições de armazenamento durante 5 meses.



A viscosidade atribui importantes características à goma xantana, como o poder espessante em soluções aquosas, propriedades reológicas e pseudoplásticas, favorecendo sua aplicação industrial (MENEZES et al., 2012; KIOSSEGLOU et al., 2003).

As xantanas produzidas pela cepa congelada e repicada apresentaram comportamento pseudoplástico, típico deste polissacarídeo, que diminui com o aumento da taxa de cisalhamento (Figura 9).

**Figura 9 - Viscosidade aparente da goma xantana obtida de *X. campestris*. pv. 2103 mantida a  $-80^{\circ}\text{C}$  (A) e a  $3-8^{\circ}\text{C}$  por repiques mensais (B). Concentração de 0,5% (m/v) a  $25^{\circ}\text{C}$ .**



Essa pseudoplasticidade acentua qualidades sensoriais de muitos alimentos, realçando o sabor e palatabilidade, e diminui a sensação de gomosidade percebida na boca (KATZBAUER, 1998). Na indústria petrolífera, este comportamento pseudoplástico da GX pode fornecer baixa viscosidade à broca de perfuração, onde a taxa de cisalhamento é alta, e alta viscosidade no espaço anular, onde o cisalhamento é baixo (BYONG, 1996).

#### 4 CONCLUSÃO

A pureza microbiana das células mantidas sob congelamento e sob refrigeração se manteve constante, assegurando que todos os lotes de goma foram produzidos a partir de culturas de *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103 sem qualquer indício de contaminação. O comportamento bioquímico da cepa de *Xanthomonas* estudada não foi influenciado pelos métodos e tempo de preservação avaliados neste trabalho. No entanto, observa-se claramente que, as células microbianas mantidas sob refrigeração e repicadas mensalmente apresentaram maior variação na concentração dos ácidos graxos, na produção de goma xantana e sua viscosidade aparente. Além disso, a avaliação quantitativa de alguns ácidos indicaram uma possível deficiência de nutrientes ou estresse das células subcultivadas em ágar inclinado, mantidas sob refrigeração.

As células de *Xanthomonas* armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  apresentaram concentrações mais constantes de ácidos graxos, bem como um rendimento médio de GX superior e com maior viscosidade aparente. Dessa forma, quando comparada com a técnica de repique, pode-se inferir que a manutenção da cepa a  $-80^{\circ}\text{C}$  afetou em menor extensão suas características fenotípicas, o que certamente teve influência positiva sobre as características quali e quantitativas da GX produzida. Assim sendo, conclui-se que o ultracongelamento é a forma mais adequada de estocagem deste microrganismo para procedimentos de produção de goma xantana.

O padrão de fragmentação cromossomal, obtido por PFGE com a enzima *Xba*I, também se mostrou inalterado em todos os subcultivos, confirmando a estabilidade genética do microrganismo no período e em todas as condições avaliadas.

Este trabalho também traz, pela primeira vez, a descrição do perfil bioquímico, genético e de composição de ácidos graxos celulares da *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103, contribuindo assim com informações importantes para os estudos de caracterização deste microrganismo.

## REFERÊNCIAS

- ASSIS, D.J. et al. A study of the effects of aeration and agitation on the properties and production of xanthan gum from crude glycerin derived from biodiesel using the response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.172, p.2769–2785, 2014.
- AZEVEDO, A.F. et al. Fatty acid profiles in *Leishmania spp.* isolates with natural resistance to nitric oxide and trivalent antimony. **Parasitology**, v.113, p.19–27, 2014.
- BRANDÃO, L.V. et al. Bioconversion of crude glycerin derived from biodiesel to xanthan gum. **Brazilian Journal of Chemical Engineering** (no prelo), 2013.
- BRANDÃO, L.V.; ESPERIDIÃO, M.C.A.; DRUZIAN, J.I. Utilização do soro de mandioca como substrato fermentativo para a biosíntese de goma xantana: viscosidade aparente e produção. **Polímeros**, v.20, n3, p.175-180, 2010.
- BYONG, H.L. **Fundamentals of food biotechnology**. United States: VCH Publishers Inc.; 1996.
- CADMUS, M.C. et al. Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. **Canadian Journal of Microbiology**, v.22, p. 924-928, 1976.
- CAMEOTRA, S. S. Preservation of microorganisms as deposits for patent application. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.353, p.849–850, 2007.
- CHAN, J.W.Y.F.; GOODWIN, P.H. Differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* as determined by PFGE and RFLP. **European Journal of Plant Pathology**. v.105, p.867–878, 1999.
- COOKSEY, D.A.; GRAHAM, J.H. Genomic fingerprinting of two pathovars of phytopathogenic bacteria by rare-cutting restriction enzymes and field inversion gel electrophoresis. **Phytopathology**, v.79, p.745–750, 1989.
- CRONAN, J.E. Phospholipid modifications in bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p.202-205, 2002.
- CUTHBERTSON, L. et al. Pivotal roles of the outer membrane polysaccharide export and polysaccharide copolymerase protein families in export of extracellular polysaccharides in gram-negative bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.73, p.155–177, 2009.
- DA SILVA, F.R. et al. Fastidious gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters**, v.203, p. 165-171, 2001.
- FERNANDES, M.F.; SAXENA, J.; DICK, R.P. Comparison of Whole-Cell Fatty Acid (MIDI) or Phospholipid Fatty Acid (PLFA) Extractants as Biomarkers to Profile Soil Microbial Communities. **Microbial Ecology**. v.66, p.145–157, 2013.
- GALINDO, E.; SALCEDO, G.; RAMIREZ, M. E. Preservation of *Xanthomonas campestris* on agar slopes: Effects on xanthan Production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.40, p.634-637, 1994.
- GAMA, M.A.S. et al. Polyphasic characterization of pigmented strains of *Xanthomonas* pathogenic to cashew trees. **Plant Disease Journal**, v.95, p.793-802, 2011.
- GAGNEVIN, L.; JAN, E.L.; OLIVIER, P. Genomic Variability of the *Xanthomonas* pathovar *mangiferaeindicae*, agent of mango bacterial black spot. **Applied and Environmental Microbiology**. v.63, n.1, p.246–253, 1997.
- GARCÍA-OCHOA, F. et al. Xanthan gum: production, recovery and properties. **Biotechnology Advances**, v.18, n.7, p. 549-579, 2000.
- GUCKERT, J. B.; HOOD, M. A. Phospholipid ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: Increases in the trans/cis ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, p. 794-801, 1986.
- GUO, A. et al. Tracing the food sources of isolated strains of *Listeria monocytogenes* through fatty acid profiles analysis. **Food Control**. v.21, p.1092–1098, 2010.
- IELPI, L.; COUSO, R.O; DANKERT, M.A. Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. **Journal of Bacteriology**. 175, 2490-2500, 1993.

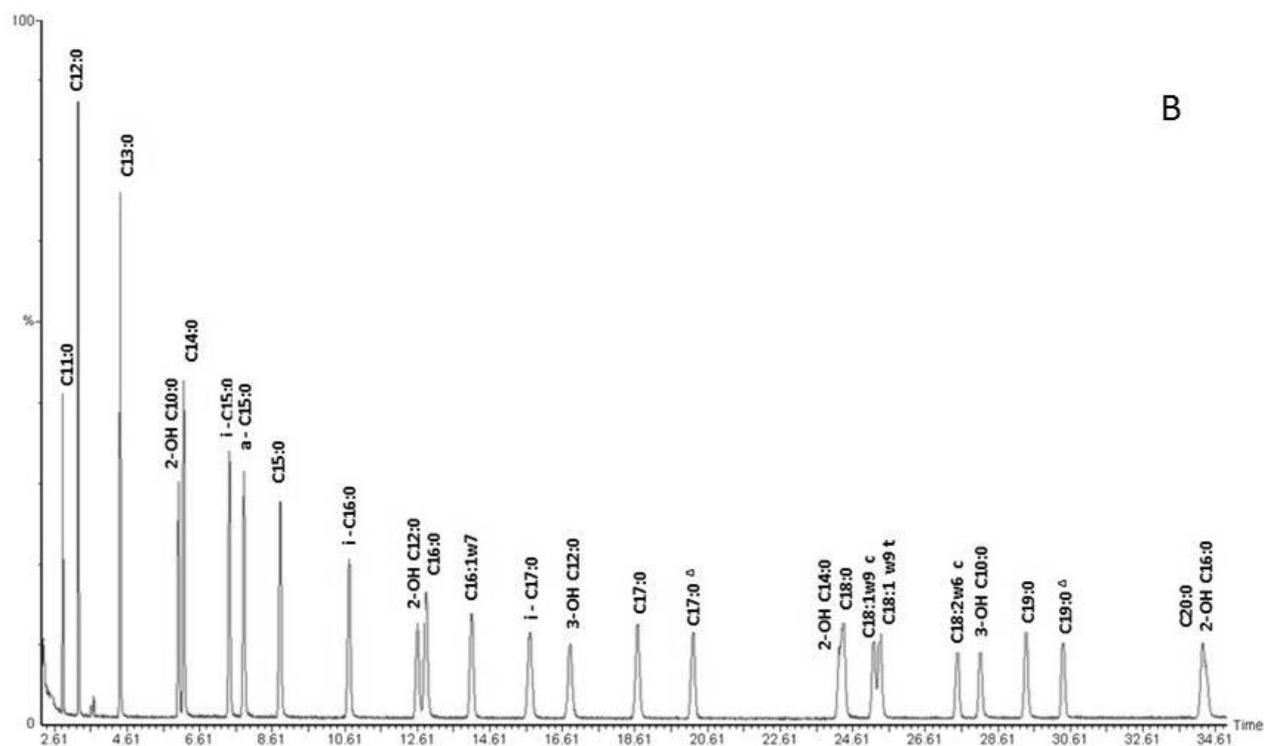
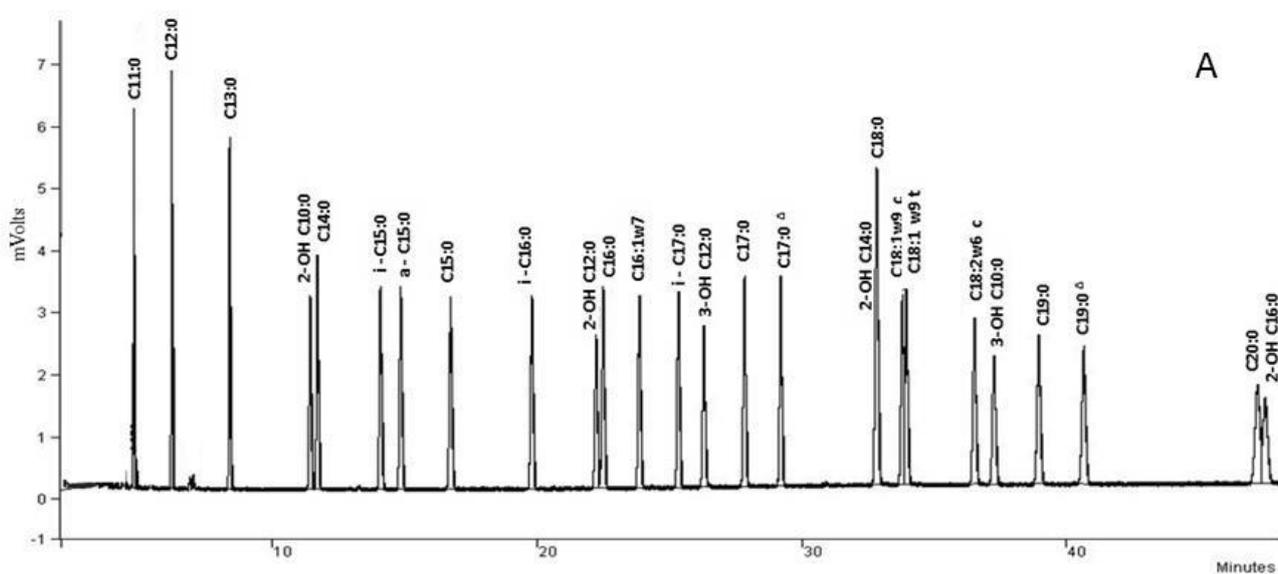
- JEANES, A. et al. Polysaccharide (xanthan) of *Xanthomonas campestris* NRL B-1459: procedures for culture maintenance and polysaccharide production, purification, and analysis. **Agricultural Research Service-U.S. Department of Agriculture. ARS-NC-51**, p.14, 1976.
- KATZBAUER, B. Properties and applications of xanthan gum. **Polymer Degradation and Stability**, v.59, p.81-84. 1998.
- KIDBY, D. et al. Maintenance procedures for the curtailment of genetic instability: *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. **Applied and Environmental Microbiology**, v.33, p.840-845, 1977.
- KIEFT, T. L.; RINGELBERG, D. B. Changes in ester-linked phospholipid fatty acid profiles of subsurface bacteria during starvation and desiccation in a porous medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p. 3292-3299, 1994.
- KIOSSEOGLU, A. et al. Functionality of médium molecular weight xanthan gum produced by *x. campestris* atcc1395 in batch culture. **Food Research International**, v.36, p.425-430. 2003.
- KUMAR, A.S.; MODY, K.; JHA, B. Bacterial exopolysaccharides - a perception. **Journal of Basic Microbiology**, v.47, p.103-117, 2007.
- MAC FADDIN, J. S. **Biochemical test for identification of medical bacteria**. Lippincott Williams & Wilkins, 3th ed, 2000.
- MENEZES, J.D.S. et al. Produção biotecnológica de goma xantana em alguns resíduos agroindustriais, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**; v.8, n. 8, p.1761-1776. 2012.
- NASCIMENTO, I.A. et al. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. **Bioenerg Research**, v.6, p. 1-13, 2013.
- NERY, T.B.R. et al. Biossíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: rendimento e viscosidade. **Química Nova**, v.31, p.1937-1941, 2008.
- PACHECO, F.L.C.; PINTO, T.D.J.A. The Bacterial Diversity of Pharmaceutical Clean Rooms Analyzed by the Fatty Acid Methyl Ester Technique. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.64, p.156-166, 2010.
- PAGLIARINI, A. P.; DRUZIAN, J. I. Produção de goma xantana por fermentação do resíduo de suco de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p. 26-31. 2007.
- PALANIRAJ, A.; JAYARAMAN, V. Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. **Journal of Food Engineering**, v.106, p.1–12, 2011.
- PIETIKÄINEN, J.; HIUKKA, R. et al. Does short-term heating of forest húmus change its properties as a substrate for microbes? **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p.277-288, 2000.
- PRUVOST, O. et al. Phenotypic diversity of *xanthomonas* sp. *mangiferaeindicae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p.115–124, 1998.
- 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 compestris* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, 2, p.197-207, 2006.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- SASSER, M. **Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids**. Tech. Note #101. Newark, DE: Microbial ID, 1990. Last revised July 2009. Available in: [http://www.midi-inc.com/pdf/MIS\\_Technote\\_101.pdf](http://www.midi-inc.com/pdf/MIS_Technote_101.pdf).
- SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; KERSTER, K. **The bacterium Xanthomonas**. In: SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E.L. (Ed.). *Xanthomonas*. London : Chapman & Hall, p.127-156. 1993.
- VAUTERIN, L.; YANG, P.; SWINGS, J. Utilization of fatty acid methyl esters for the differentiation of new *Xanthomonas* species. **International Journal of Systematics Bacteriology**, v.46, p.298-304, 1996.

WHITTAKER, P. Comparison of *Yersinia pestis* to other closely related *Yersinia* species using fatty acid profiles. **Food Chemistry**, v.116, p.629–632, 2009.

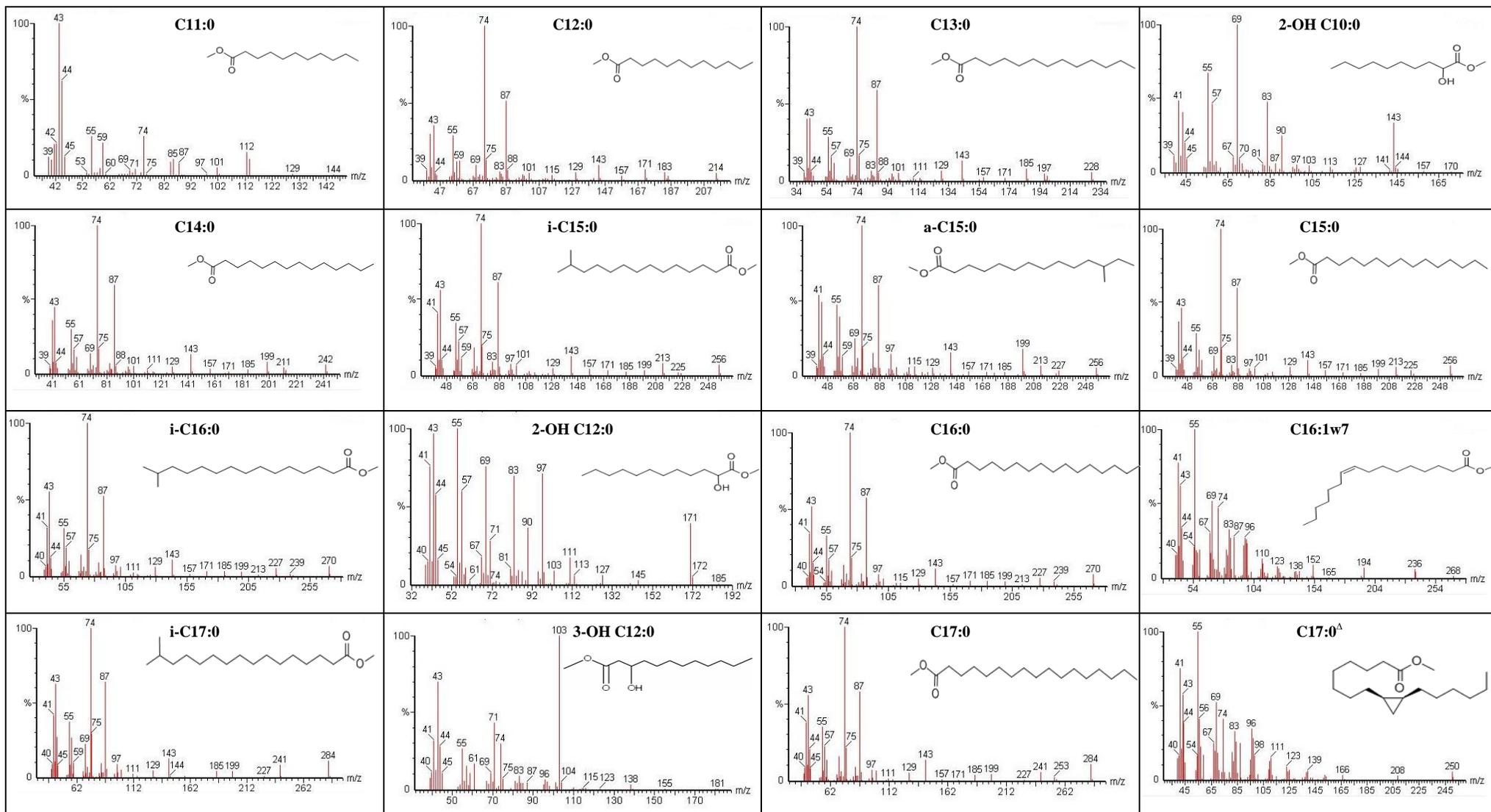
YANG, C. et al. Cellular fatty acids as chemical markers for differentiation of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter calcoaceticus*. **Biomedical and Environmental Sciences**, v.25, n.6, p.711-717, 2012.

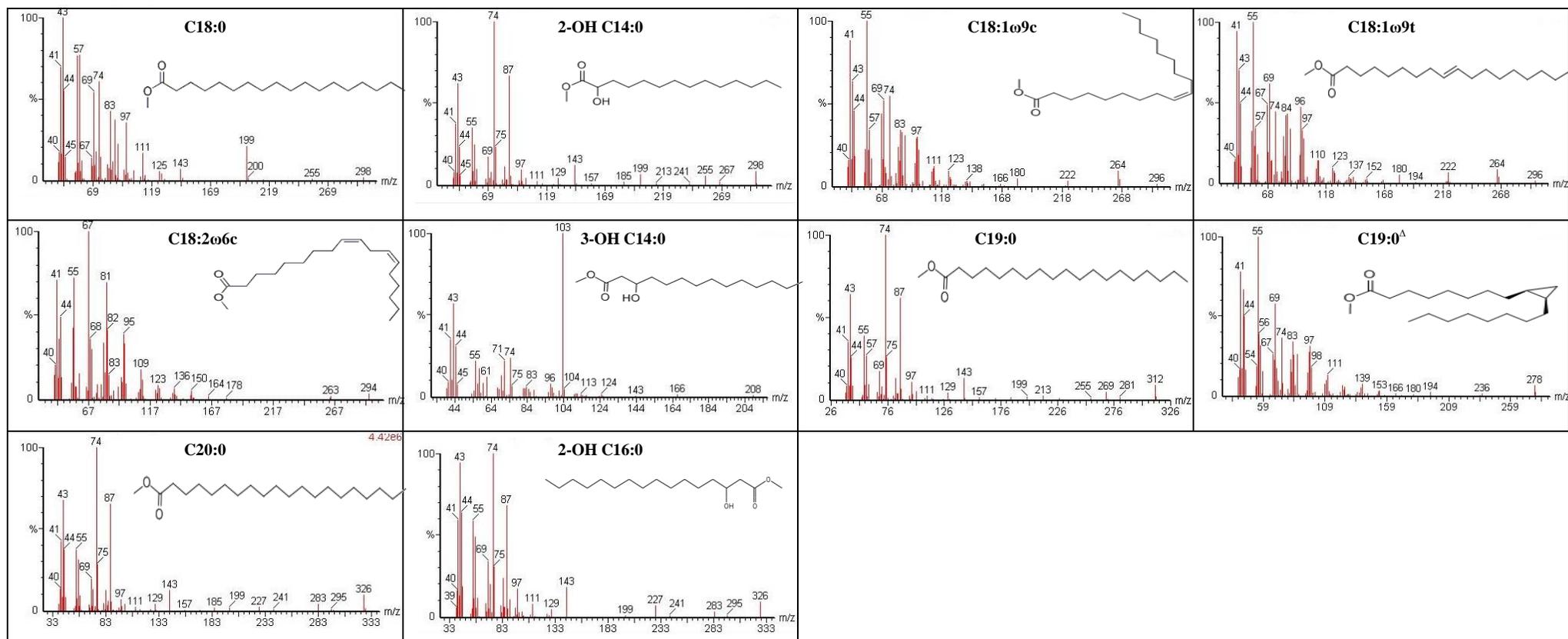
YANG, P. et al. Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.16, p.47-71, 1993.

APÊNDICE A - CROMATOGRAMAS DO PADRÃO BAME INJETADO NO CG-DIC (A) E NO CG-MS (B).



## APÊNDICE B - ESPECTROS DE MASSA DOS ÁCIDOS GRAXOS DO PADRÃO ANALÍTICO BAME





**APÊNDICE C – CONCENTRAÇÃO RELATIVA DOS PRINCIPAIS ÁCIDOS GRAXOS DA *X. campestris* 2103**

Principais Ácidos Graxos	Concentração (%)										
	Ativação	1º Mês		2º Mês		3º Mês		4º Mês		5º Mês	
		-80°C	3-8°C								
<b>NI</b>	1,28 ±0,3	2,01 ±0,2	1,81 ±0,4	1,34 ±1,0	1,27 ±0,3	1,46 ±0,1	0,93 ±0,3	1,77 ±0,4	2,20 ±0,2	2,05 ±0,6	1,35 ±1,2
<b>2-OH C10:0</b>	1,27 ±0,1	1,07 ±0,1	1,05 ±0,1	1,27 ±0,03	1,42 ±0,2	1,36 ±0,04	2,73 ±1,0	2,11 ±0,03	3,98 ±0,4	1,79 ±0,6	6,34 ±1,5
<b>i-C15:0</b>	15,63 ±1,5	16,76 ±0,9	15,78 ±0,8	15,30 ±0,5	13,89 ±0,5	16,60 ±0,2	14,14 ±1,4	15,75 ±0,1	11,77 ±2,1	15,35 ±1,4	12,60 ±0,8
<b>a-C15:0</b>	15,58 ±0,8	17,37 ±0,3	16,67 ±1,2	19,19 ±0,4	20,47 ±0,4	15,16 ±0,1	13,94 ±3,5	15,19 ±0,4	9,71 ±1,3	14,79 ±1,6	9,34 ±1,3
<b>C15:0</b>	2,06 ±0,3	2,12 ±0,1	2,53 ±0,7	2,22 ±0,1	2,76 ±0,2	2,21 ±0,04	0,18 ±0,2	1,73 ±0,05	3,65 ±0,7	2,15 ±0,2	3,19 ±0,85
<b>i-C16:0</b>	2,00 ±1,5	1,29 ±0,3	1,08 ±0,2	3,12 ±0,2	3,51 ±0,4	1,14 ±0,1	4,68 ±1,9	0,99 ±0,05	3,85 ±0,3	1,54 ±0,6	5,12 ±0,2
<b>C16:0</b>	11,56 ±0,2	12,59 ±0,3	12,41 ±0,6	9,94 ±0,4	9,51 ±0,1	11,67 ±0,1	12,78 ±2,6	14,57 ±0,1	11,42 ±0,5	14,09 ±2,0	13,98 ±1,9
<b>NI</b>	2,83 ±0,1	3,08 ±0,3	3,05 ±0,2	2,86 ±0,1	2,94 ±0,5	2,88 ±0,05	3,80 ±0,7	2,19 ±0,05	5,72 ±1,0	2,34 ±0,1	4,78 ±0,6
<b>C16:1<math>\omega</math>7</b>	25,18 ±0,9	22,43 ±1,2	23,26 ±0,3	25,52 ±0,5	25,92 ±1,4	24,83 ±0,3	18,44 ±3,1	22,64 ±0,1	19,38 ±3,1	22,73 ±1,9	16,37 ±1,4
<b>i-C17:0</b>	7,10 ±1,4	7,28 ±0,4	7,34 ±0,3	6,74 ±0,1	6,43 ±1,2	7,95 ±0,4	10,87 ±3,4	9,32 ±0,04	7,62 ±2,4	7,42 ±0,1	5,71 ±0,1
<b>3-OH C12:0</b>	6,84 ±0,9	6,09 ±0,7	6,05 ±0,7	3,92 ±1,1	3,39 ±0,4	7,30 ±0,4	6,51 ±0,6	6,37 ±0,03	7,28 ±1,2	7,35 ±1,3	6,63 ±1,8
<b>C17:0</b>	2,51 ±0,7	2,01 ±0,1	1,98 ±0,1	3,39 ±0,2	2,74 ±0,2	2,13 ±0,1	1,47 ±1,8	1,73 ±0,05	4,87 ±0,3	1,83 ±0,1	4,84 ±1,0
<b>C17:0<sup>Δ</sup></b>	2,07 ±0,6	2,66 ±0,4	3,79 ±1,5	2,35 ±0,2	3,21 ±0,3	2,26 ±0,4	2,09 ±2,8	2,05 ±0,05	2,37 ±0,8	3,47 ±1,1	4,01 ±0,6
<b>C18:1<math>\omega</math>9c</b>	2,34 ±0,5	1,99 ±0,2	2,01 ±0,1	1,71 ±0,2	1,64 ±0,2	1,98 ±0,3	5,48 ±3,8	4,04 ±0,04	3,01 ±1,0	1,99 ±0,03	2,24 ±0,04
<b>C18:1<math>\omega</math>9t</b>	1,39 ±0,05	1,25 ±0,1	1,18 ±0,1	1,17 ±0,1	0,87 ±0,1	1,18 ±0,3	1,96 ±0,7	0,87 ±0,05	3,20 ±0,3	1,10 ±0,2	3,52 ±0,7
<b>Σ Ácidos Graxos Saturados</b>	64,55	66,58	64,89	65,09	64,12	65,52	67,3	67,76	64,15	66,31	67,75
<b>Σ Ácidos Graxos Insaturados</b>	28,91	25,67	26,45	28,4	28,43	27,99	25,88	27,55	25,59	25,82	22,13