



AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NO CULTIVO DE XANTHOMONAS CITRI SUBSP. CITRI

Larissa Siqueira Soares¹, Paula Thaís Requena Nocchi², Juliana Glória Franco³, Danielle Sayuri Yoshida Nanami⁴, Camila de Cassia da Silva⁵, William Mário de Carvalho Nunes.⁶

RESUMO: Os meios de cultura são valiosas ferramentas em fitobacteriologia para diversos objetivos. O isolamento de microrganismos em meio de cultura é o primeiro passo para qualquer trabalho de pesquisa, sendo que, quase nenhum tipo de pesquisa é realizável, sem cultivá-los. Diversos são os meios de cultura existentes para o cultivo de bactérias, porém, poucos são os trabalhos que os estudam. Buscando a máxima eficiência, levando em consideração o desenvolvimento bacteriano, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes meios de cultura, como Nutriente Agar (NA), Manitol Glutamato Yeast (MGY), Kado (D5), 523, Luria Bertani (LB), Dextrose Yeast Glutamato (DYGS), Yeast Dextrose Carbonate (YDC) e Wilbrink (WB) no cultivo de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Folhas de genótipos de *Citrus* spp. com sintomas de Cancro Cítrico foram coletadas e a bactéria foi isolada, multiplicadas e transferidas para micro-tubos contendo solução de tampão fosfato salino (PBS), de onde teve suas concentrações ajustadas. Uma alíquota de 25 µL da suspensão bacteriana foi transferida para os meios de cultura a serem avaliados. Durante 5 dias, num intervalo de 12 em 12 horas, as colônias foram observadas a olho nu quanto à cor, viscosidade e formato, o número de colônias foram contados. Todas colônias apresentaram cor amarela, aspecto mucoide e formato circular e superfície convexa. De todos os meios de cultura, apenas D5 não se mostrou eficiente no cultivo de *X. citri* subsp. *citri*. Os demais meios permitiram um desenvolvimento bacteriano satisfatório, sendo o meio MGY, que apresentou o maior número de colônias de *X. citri* subsp. *Citri* em sua superfície.

PALAVRAS-CHAVE: Diâmetros. Isolamento, Número de colônias, Suspensão bacteriana.

1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* é o agente etiológico do cancro cítrico (SCHAAD et al., 2006), doença que causa graves prejuízos às regiões citrícolas. Seus sintomas são caracterizados como lesões eruptivas, corticosas e de coloração parda, podendo ser observados em toda a parte aérea da planta (BELASQUE JUNIOR et al., 2008), como folhas, ramos e frutos. Nas folhas, as lesões são circundadas por um halo amarelo e são salientes tanto na face abaxial quanto na adaxial. Nos frutos as lesões são semelhantes as das folhas, porém são maiores podendo ter fissuras no centro. Nos ramos os sintomas aparecem sem a presença de halo amarelo (LARANJEIRA et al., 2005). Levando-se em consideração a importância econômica da citricultura brasileira, pesquisas que visam a supressão do desenvolvimento de *X. citri* subsp. *citri* são necessárias. A maioria das pesquisas necessitam do isolamento do microrganismo que se está estudando. Sendo assim, pode-se considerar que o cultivo de um microrganismo é parte fundamental de um trabalho de pesquisa (ROMEIRO, 2001). Desta forma, os meios de cultura representam importante papel, sendo que sua finalidade é o cultivo e manutenção in vitro de microrganismos. A maioria dos organismos cultiváveis cresce em meios contendo uma fonte de carbono e nitrogênio, além de outros elementos em menor quantidade (ALFENAS; MAFIA, 2007). Diversos são os meios de cultura existentes para o cultivo de bactérias, porém, poucos são os trabalhos que estudam a eficiência destes meios. Ao testar diferentes meios de cultivo, pode-se conhecer melhor a necessidade nutricional dos microrganismos e conhecer a eficiência de tais suplementos também é muito útil na escolha do melhor meio a ser utilizado. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de diferentes meios de cultura, Nutriente Agar (NA), Manitol Glutamato Yeast

¹ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada - UEM/NBA, Maringá - Paraná. Bolsista CNPQ. soares_lari@hotmail.com

² Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada - UEM/NBA, Maringá - Paraná. Maringá – PR. Bolsista da Capes. thaisnocchi@hotmail.com

³ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Agronomia; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada - UEM/NBA, Maringá - Paraná. jugloriafranco@gmail.com

⁴ Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada - UEM/NBA, Maringá – Paraná. Bolsista CNPq. Daninanami@hotmail.com

⁵ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia; Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada - UEM/NBA, Maringá – Paraná. Bolsista da Capes. silva.camila@live.com

⁶ Orientador, Professor Doutor no Curso de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá – Maringá – PR. Bolsista de produtividade do CNPq. wmcnunes@uem.br



(MGY), Kado (D5), 523, Luria Bertani (LB), Dextrose Yeast Glutamato (DYGS), Yeast Destrose Carbonate (YDC) e Wilbrink (WB) no cultivo deisolados de *X. citri* subsp. *citri*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento teve início com a coleta de folhas com sintomas de cancro de diferentes genótipos de *Citrus* spp. do Pomar Experimental localizado no município de Maringá-PR. Este pomar fez parte de um estudo de resistência ao cancro cítrico, onde diferentes genótipos de *Citrus* spp. foram avaliados e comparados quanto à suscetibilidade à esta doença. Apesar de nenhum genótipo ser imune ao cancro, eles possuem diferentes graus de suscetibilidade, existindo genótipos mais suscetíveis e menos suscetíveis (CARVALHO et al., 2014). As amostras de folhas sintomáticas coletadas, de genótipos com diferentes níveis de suscetibilidade, em pomar experimental de Maringá foram encaminhadas ao laboratório do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia Aplicada (NBA), da Universidade Estadual de Maringá (UEM), onde foi realizado o isolamento da bactéria em estudo. A técnica de isolamento foi empregada utilizando uma lesão por amostra. As lesões foram recortadas das folhas e mergulhadas em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito 1% por 3 minutos e enxaguadas 3 vezes em água para a remoção de impurezas e outros microrganismos residentes do filoplano. Cada lesão foi então triturada em almofariz de gesso contendo 1000 µL de solução salina, tornando-se então uma suspensão bacteriana. Desta suspensão foi pipetada uma alíquota de 50 µL e transferida para micro-tubo contendo 450 µL de solução salina. Este procedimento foi repetido por quatro vezes, tendo a finalidade de obter uma suspensão bacteriana mais limpa e menos concentrada, para ser possível a posterior visualização de colônias individualizadas em meio de cultura. Deste modo foram obtidas diluições de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , respectivamente. Uma alíquota de 50 µL da suspensão bacteriana mais diluída (10^{-4}) foi transferida para a superfície do meio de cultura Nutriente Agar (NA) em placas de Petri e espalhada com alça Drigalski. As placas foram então incubadas a 28 °C para o desenvolvimento da bactéria. Com 48 horas de incubação foi possível visualizar as colônias individualizadas de *X. citri* subsp. *citri*. As colônias foram repicadas em placa de Petri contendo meio NA com o auxílio de uma alça de platina e após nova incubação a 28 °C por 48 horas houve intensa multiplicação deste microrganismo. As bactérias multiplicadas foram transferidas para micro-tubos contendo solução de tampão fosfatossalino (PBS) e armazenadas em refrigerador, sendo posteriormente repicadas para os meios de culturas estudados. Para os ensaios laboratoriais, foram preparados 8 diferentes meios de cultura, sendo estes, o meio Nutriente Agar (NA), Manitol Glutamato Yeast (MGY), Kado (D5), 523, Luria Bertani (LB), Dextrose Yeast Glutamato (DYGS), Yeast Destrose Carbonate (YDC) e Wilbrink (WB) para manutenção dos isolados de *X. citri* subsp. *citri* provenientes de 23 genótipos de *Citrus* spp. Os meios de cultura foram preparados, autoclavados à 121°C e 1 atm por 20 minutos e vertidos em placas de Petri. Foi então realizado o ajuste de concentração da suspensão bacteriana em tampão fosfato salino (PBS) com auxílio de aparelho de espectrofotômetro para 10^8 UFC/mL correspondente a uma leitura de 0,3 à 630nm de comprimento de onda (BELASQUE JUNIOR; JESUS JUNIOR, 2006). Da suspensão com concentração de 10^8 UFC/mL, uma alíquota de 25µL foi transferida para micro-tubo contendo 250µL de solução salina. Este procedimento foi repetido por sete vezes, tendo a finalidade de obter uma suspensão bacteriana menos concentrada, para ser possível a visualização, contagem das colônias individualizadas nos diferentes meios de cultura testados. Posteriormente ao ajuste de concentração e diluições, uma alíquota de 25 µL da suspensão bacteriana foi transferida para as placas de Petri contendo os meios de cultura a serem avaliados. As placas foram incubadas em estufa à 28°C e a avaliação foi realizada de 12 em 12 horas durante 5 dias. Foram realizadas 3 repetições para cada isolado e meio de cultura testado. As colônias bacterianas foram visualizadas a olho nu quanto à cor, viscosidade e formato. O número total de colônias em cada placa foram contadas e foram analisadas, utilizando-se o programa estatístico SAS(SAS Institute, 2010) com o intuito de analisar qual foi o meio de cultura que mostrou ser mais eficiente para o desenvolvimento bacteriano.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Todas as colônias de *X. citri* subsp. *citri* desenvolvidas nos diferentes meios de cultura apresentaram cor amarela, aspecto mucóide e forma circular e superfície convexa. De todos os meios de cultura avaliados, apenas um não se mostrou eficiente. Apesar de ser um meio de cultura seletivo para *Xanthomonas*, não foi observado crescimento bacteriano no meio D5. Quanto aos demais meios de cultura avaliados, em todos foi observado o crescimento bacteriano.

No que concerne ao número de colônias, o meio MGY, com uma média aproximada de 446 colônias, foi o que apresentou a maior média de número de colônias quando comparado aos demais meios de cultura. Em segundo lugar segue o meio NA com média aproximada de 365 colônias e em terceiro está o meio de cultura WB apresentando cerca de 225 colônias. Em seguida estão os meios 523, LB e DYGS com médias de 173, 150 e 129 colônias, respectivamente. Por último, o meio YDC se mostrou com eficiência bem inferior aos demais quando se trata de crescimento bacteriano, apresentando apenas 54 colônias. Considerando que o número de colônias por placa para contagem deve variar de 30 a 300 (MAPA, 1993; WANG et al., 2011), o meio MGY e NA ultrapassaram



este limite. Sendo assim, seria necessário a realização de mais uma diluição de 1:10 antes da transferência da suspensão bacteriana na superfície do meio de cultivo. Oito diluições seriadas de 1:10 ao invés de sete, após o ajuste de concentração para 10^8 UFC.mL⁻¹, possivelmente faria com que a média de colônias do meio MGY e NA ficasse dentro do limite aceitável, porém a média do meio YDC ficaria abaixo deste limite para contagem. Contudo, vale ressaltar que tal limite de número de colônias por placa interfere apenas na contagem, não mudando o fato que MGY foi o meio de cultivo que favoreceu o maior desenvolvimento de *X. citri subsp. citri*.

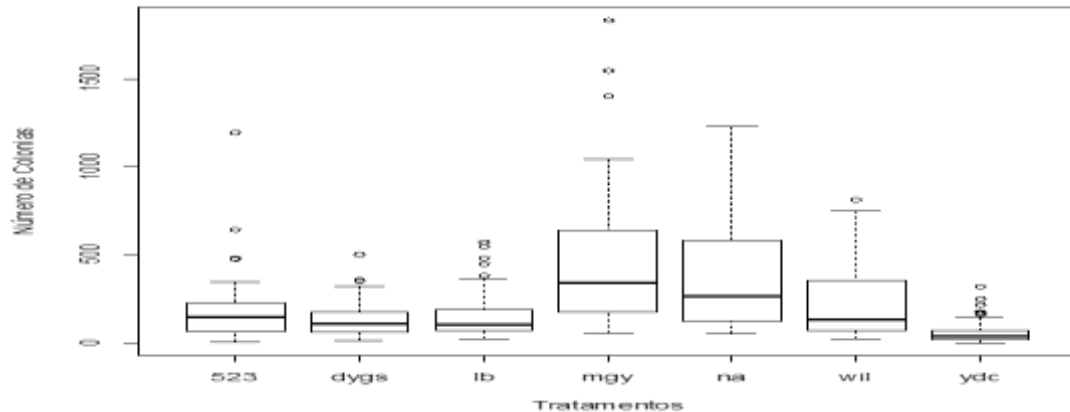


Figura 1. Distribuição do número de colônias de *Xanthomonas citri subsp. citri* nos meios de cultivo 523, Dextrose Yeast Glutamato (DYGS), Luria Bertani (LB), Manitol Glutamato Yeast (MGY), Nutriente Agar (NA), Wilbrink (WB) e Yeast Destrose Carbonate (YDC).

4 CONCLUSÃO

Considerando todos os aspectos de eficiência para um meio de cultura, o meio MGY é o mais indicado para ser utilizado rotineiramente para isolamento e manutenção de *X. citri subsp. citri*, visto sua eficiência nutricional em permitir um desenvolvimento de grande número de colônias em comparação aos demais meios estudados.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007. 382p
- BELASQUE JR., J.; BERGAMIN FILHO, A. Estratégias de controle do cancro cítrico. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 143-148, 2006.
- BELASQUE JR., J.; JACIANI, F.J.; MARIN, R. D.; BARBOSA, J.C. Tamanho da amostra para quantificação do diâmetro de lesões de cancro cítrico. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.4, p.317-322. 2008.
- CARVALHO, S.A.; NUNES, W.M.C.; BELASQUE JR, J.; MACHADO, M.A.; CROCE FILHO, J.; BOCK, C.H.; ABDO, Z. A comparison of resistance to Asiatic citrus canker among different genotypes of Citrus spp. in a long-term canker-resistance field screening experiment in Brazil. **Plant Disease**, v.1, p. 1-41, 2014. "First Look" paper. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-14-0384-RE> .
- LARANJEIRA, F.F.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; COLETTA-FILHO, H.D. Fungos, procariotos e doenças abióticas. In: Mattos Junior, D., et al. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag. Centro APTA Citros Sylvio Moreira. p. 509 -566, 2005.
- ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa. UFV, 2001. 279p.
- SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A. E AGARKOVA, I. V. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 690–695, 2006.
- WANG, N.; STRUGNELL, R.; WIJBURG, O.; BRODNICKI, T. Measuring Bacterial Load and Immune Responses in Mice Infected with *Listeria monocytogenes*. **Journal of Visualized Experiments**, v. 54, p. 1-10, 2011.