DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO E DE BAIXO CUSTO PARA *Liberibacter crescens* BT-1

Sofia Iassunik (PIBIC/FA), Blendon-Lee Silva Martins (DFA/UEM), Regina Aparecida Correia Gonçalves (DFA/UEM), Arildo José Braz de Oliveira (DFA/UEM), Fabrícia Gimenes (DBS/UEM), Jean Lopes da Silva (Coorientador), Benício Alves de Abreu Filho (Orientador). E-mail: baafilho@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas, Microbiologia, Biologia/ Microbiologia de Alimentos.

Palavras-chave: Huanglongbing; Bactérias Fastidiosas; Cultivo bacteriano.

RESUMO

O Huanglongbing (HLB) é uma das principais patologias da citricultura mundial, pois afeta a economia do setor, ao produzir frutos defeituosos e de baixa qualidade. Seu agente etiológico é a *Candidatus* Liberibacter asiaticus, uma bactéria fastidiosa que ainda não é cultivada em meio axênico. Dessa forma, a *Liberibacter crescens* é utilizada como modelo experimental, porque é a única bactéria cultivada do seu gênero. Este trabalho teve como objetivo avaliar meios de cultura alternativos e de baixo custo para *L. crescens*. Foram avaliados diversos meios de cultura, como BM7a/BM7b (meios inspirados no meio de cultivo pré-definido para *L. crescens*, BM7), GYPMI, MS, BHI, MRS e outras formulações. Os cultivos foram incubados a 28 °C e o crescimento bacteriano foi acompanhado pela densidade óptica de 620 nm. De modo geral, os meios avaliados apresentaram baixa variação nos valores de densidade óptica e os repiques realizados não apresentaram resultados expressivos. Sendo assim, fica evidente a necessidade de novos testes, para identificar um meio de cultura mais favorável para *L. crescens*.

INTRODUÇÃO

O Huanglongbing (HLB), ou greening, é uma das patologias mais devastadoras que acometem a citricultura mundial. Ela é causada pelo fitopatógeno *Candidatus* Liberibacter asiaticus, uma bactéria restrita ao floema e, portanto, ainda não cultivada em meio axênico. Sendo assim, as pesquisas nessa área utilizam a *Liberibacter crescens* como modelo experimental, porque é a única bactéria cultivada do seu gênero (SENA-VÉLEZ *et al.*, 2019).

A *L. crescens* é um bacilo Gram-negativo, isolado de um mamoeiro Babaco doente, porém, não se sabe se a bactéria é um patógeno vegetal. Sua sequência do gene 16S rRNA apresenta 94,7% de similaridade com a do gene 16S rRNA da *Ca.* Liberibacter asiaticus (FAGEN *et al.*, 2014).

O cultivo de patógenos fastidiosos de plantas depende de um meio de cultura nutricionalmente complexo, principalmente para as bactérias restritas ao floema, que possui maior complexidade fisiológica e nutricional, em comparação ao xilema. Até o momento *L. crescens* possui três meios descritos, dentre eles, destaca-se o BM7 (MERFA *et al.*, 2019; SENA-VÉLEZ *et al.*, 2019).

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo utilizou a cepa *Liberibacter crescens* BT-1, doada pela Citrus BR, armazenada a -20 °C no Laboratório de Microbiologia de Água, Ambiente e Alimentos da Universidade Estadual de Maringá (UEM). A cepa foi raspada da placa original doada, armazenada e cultivada por 14 dias em BM7, sendo então transferidos 50 µL desse caldo para cada tubo contendo os diferentes meios testados, cujos componentes estão descritos na Tabela 1: BM7a e BM7b (formulações inspiradas no BM7), GYPMI (meio de *Phytomonas* spp.), *Brain Heart Infusion* (BHI), Murashige e Skoog (MS) e Man, Rogosa e Sharpe (MRS). Também foram avaliados MRS e BHI suplementados com 5% de FBS (Soro Fetal Bovino) e a mistura de vitaminas (10 mL/L) do BM7a/BM7b, além do BM7a suplementado com água de coco, como fonte nutricional alternativa. Devido à limitação de recursos para meios de cultura de custo elevado, a padronização do inóculo foi realizada por volume, não sendo possível a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) ou a padronização por densidade óptica inicial. Os cultivos foram incubados a 28 °C, temperatura indicada para o crescimento da bactéria. Para avaliar o crescimento bacteriano, foi utilizado um leitor de microplacas (Multiskan FC Microplate Photometer) a 620 nm, com leituras a cada 3-4 dias, utilizando 200 µL do inóculo em um poço e 200 µL do meio não inoculado em outro poço (branco); os dados apresentados do inóculo correspondem ao ensaio mais representativo, dentre os 2-3 ensaios realizados. Sedimentos celulares (*pellets*) observados ao longo do cultivo foram avaliados por coloração de Gram para verificação morfológica preliminar.

Tabela 1. Componentes dos meios de cultura avaliados

Meio	Componentes (concentração)
BM7a	FBS 50 mL/L; KOH 3,75 g/L; citrato de sódio ~2,94 g/L; glicose 1%; mistura de sais (KCl 38, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 4, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20 g/L); minerais traço ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,1, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,3, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,17, $ZnCl_2$ 0,1, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,04, H_3BO_3 0,005, Na_2MoO_4 0,09 g/L); vitaminas (ácido fólico 2, piridoxina·HCl 10, riboflavina 5, tiamina·HCl 5 mg/L)
BM7b	BM7a; soro de laranja 9,1 g/L; meio Schneider 100 mL/L; PBS 100 mL/L
GYPMI	Base BHI 7,4 g; KCl 2 g; hemina 2 mg; extrato de levedura 0,5 g
MS	Base do meio MS
BHI	Base BHI 37 g/L
MRS	Base MRS 68,2g/L

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação dos meios de cultura revelou, de modo geral, valores de densidade óptica baixos e constantes, indicando crescimento bacteriano limitado. Esse resultado condiz com as exigências nutricionais e o tempo de crescimento lento da *L. crescens*, que apresenta tempo de duplicação de 36,7 horas em condições adequadas (FAGEN *et al.*, 2014). Além disso, os baixos valores observados podem estar relacionados à baixa sensibilidade da leitura espectrofotométrica a 620 nm para detecção de baixas densidades celulares.

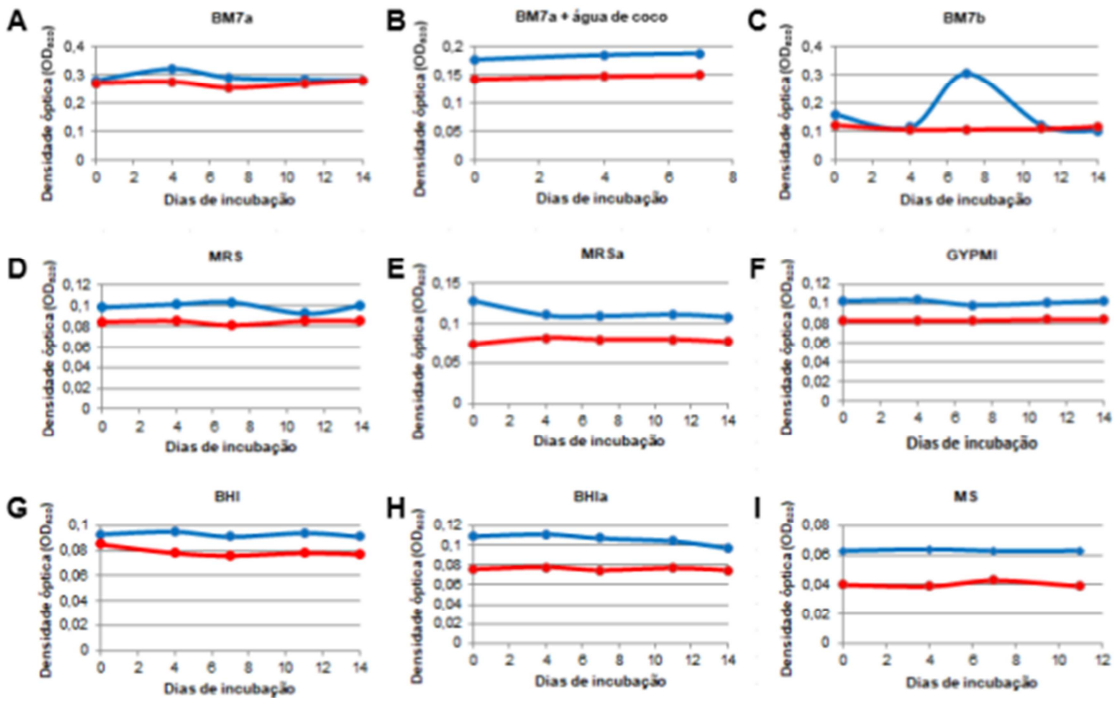


Figura 1. Densidade óptica dos meios de cultura avaliados durante o período de incubação. (A) BM7a; (B) BM7a + água de coco; (C) BM7b; (D) MRS; (E) MRSa; (F) GYPMI; (G) BHI; (H) BHIa; e (I) MS. As linhas azuis representam os meios de cultura inoculados, enquanto as linhas vermelhas representam os respectivos ensaios não inoculados (branco)

Os gráficos foram separados para facilitar a interpretação dos resultados. De modo geral, os valores de OD do inóculo permaneceram relativamente constantes ao longo do período de incubação. O meio BM7b (Figura1. C) apresentou os maiores valores de OD_{620}, atingindo 0,304 no sétimo dia de incubação, o que pode indicar crescimento de *L. crescens*. Entretanto, esse resultado deve ser interpretado com cautela, pois foram observadas estruturas esbranquiçadas no meio durante o cultivo, que provavelmente interferiram na leitura espectrofotométrica, superestimando o crescimento real.

Os ensaios realizados a partir de repiques apresentaram resultados não expressivos, demonstrando que o procedimento não foi capaz de induzir crescimento bacteriano sustentado. Observou-se ainda a formação de sedimento celular (*pellet*) no fundo de alguns tubos. como no BM7a suplementado com água de coco (Figura 2). Na Figura 3, é possível observar a coloração de Gram realizada a

partir do *pellet* gerado em um inóculo de MS, revelando morfologia compatível com bacilo Gram-negativo. Essa análise, no entanto, caracteriza apenas a morfologia celular e não confirma a identidade específica de *L. crescens*, nem descarta contaminação — uma confirmação adicional (ex.: PCR) seria necessária para validar esse achado com segurança.



Figura 2. Formação de *pellet* no BM7a com água de coco

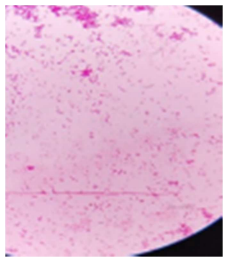


Figura 3. Coloração de Gram de *pellet* formado no meio MS

CONCLUSÕES

Os resultados indicaram, de modo geral, baixo crescimento de *Liberibacter crescens* BT-1 na maioria dos meios testados, confirmando a dificuldade já descrita na literatura para o cultivo dessa bactéria. O meio BM7b, embora tenha apresentado valores de densidade óptica superiores aos observados nos demais meios, é de interpretação limitada devido à provável interferência de estruturas esbranquiçadas na leitura espectrofotométrica. Os resultados reforçam a necessidade de testes futuros com outras formulações e condições de cultivo, incluindo a padronização do inóculo por densidade óptica ou contagem de UFC, quando houver acesso a meios de cultivo compatíveis. Além disso, um maior número de repetições independentes será necessário para confirmar a reprodutibilidade dos resultados observados, especialmente para o BM7b.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Professor Dr. Benício Alves de Abreu Filho, ao Me. Jean Lopes da Silva e aos meus colegas de laboratório que me acompanharam durante essa pesquisa. Também agradeço à Fundação Araucária pelo incentivo financeiro. Todos foram importantíssimos para o desenvolvimento desse trabalho.

REFERÊNCIAS

FAGEN, J. R.; LEONARD, M. T.; COYLE, J. F. *et al. Liberibacter crescens* gen. nov., sp. nov., the first cultured member of the genus *Liberibacter*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 64, n. 7, p. 2461-2466, jul. 2014. Disponível em: https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.063255-0. Acesso em: 25 ago. 2026.

MERFA, M. V.; PÉREZ-LÓPEZ, E.; NARANJO, E. *et al.* Progress and obstacles in culturing '*Candidatus* Liberibacter asiaticus', the bacterium associated with huanglongbing. **Phytopathology**, v. 109, n. 7, p. 1092-1101, 2019. Disponível em: https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PHYTO-02-19-0051-RVW. Acesso em: 25 ago. 2026.

SENA-VÉLEZ, M.; HOLLAND, S. D.; AGGARWAL, M. *et al.* Growth dynamics and survival of *Liberibacter crescens* BT-1, an important model organism for the citrus Huanglongbing pathogen "Candidatus Liberibacter asiaticus**". Appl. Environ. Microbiol.**, v. 85, n. 21, e01656-19, 2019. Disponível em: https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.01656-19. Acesso em: 25 ago. 2026.