



XIX CONGRESO

DE LA SOCIEDAD

**ESPAÑOLA DE
FITOPATOLOGÍA**

TOLEDO 2018

8 al 10 de octubre

*Identificación y conservación de bacterias
fitopatógenas,
siguiendo los estándares de un Centro de
Recursos Microbianos*



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

M^a Carmen Macián Rovira, *Curator* de procariotas



**XIX CONGRESO
DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FITOPATOLOGÍA**

CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS

Métodos de conservación

Liofilización

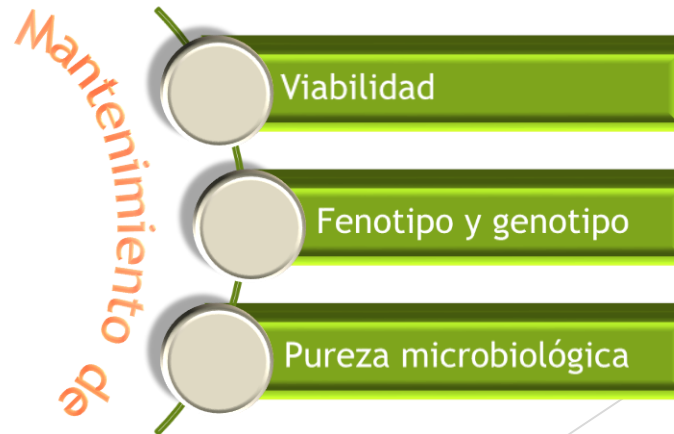
Crioconservación (congelación)

Desecación (L-dry)

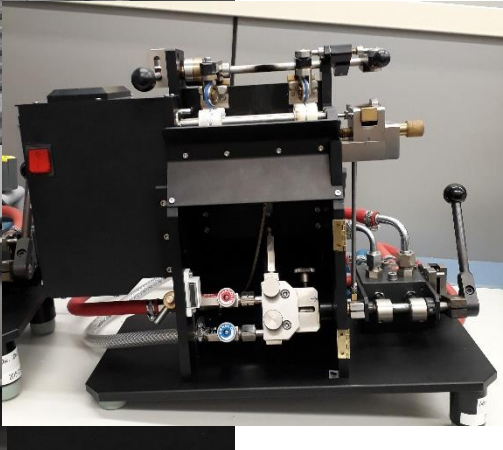
Suspensión en agua

Resiembra periódica

Objetivos de un método de conservación



CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS



Crioconservación

- Buena viabilidad a largo plazo
- Disponible en cualquier laboratorio
- Requiere congeladores -80°C
- Más difícil acceso a las muestras



Liofilización

- Buena viabilidad a largo plazo
- Fácil almacenamiento
- Fácil suministro
- Requiere equipos específicos



CRIOCONSERVACIÓN: Viabilidad

El agua congelada no es biológicamente activa

El metabolismo cesa (material estabilizado)

Se aplica tanto a microorganismos como líneas celulares, tejidos, alimentos, etc

Factores a considerar

- Material a conservar
- Empleo de crioprotectores
- Velocidad de congelación
- Temperatura de almacenamiento
- Velocidad de descongelación

CRIOCONSERVACIÓN: Viabilidad

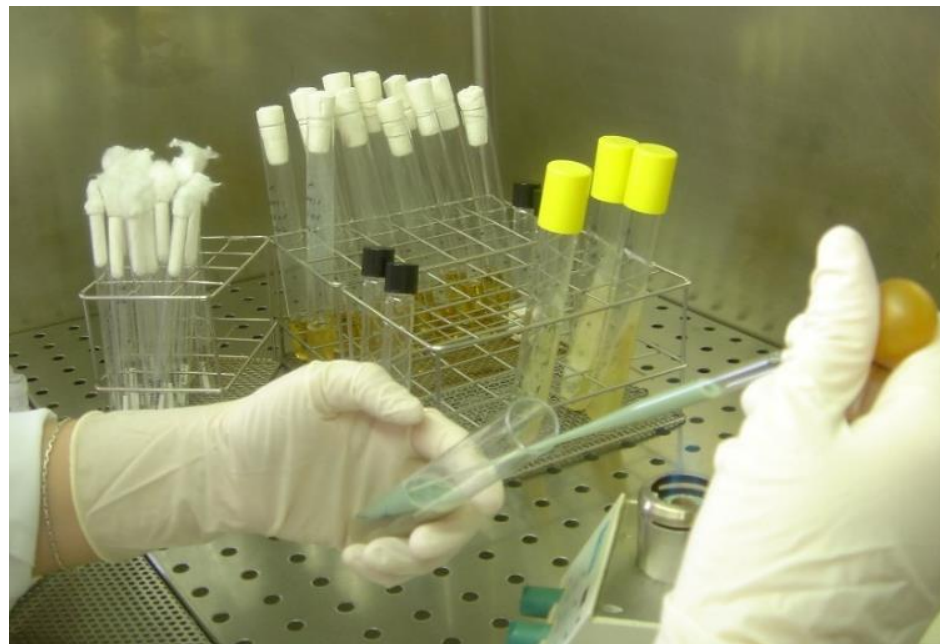
Material a conservar

Cultivos frescos / formas de resistencia

Medio sólido (recogida por irrigación / arrastre) / medio líquido (centrifugación)

Evitar factores de estrés (p. ej. O₂ con anaerobios estrictos, choques térmicos, osmóticos o de pH)

Densidad celular alta (>10⁸ células/ml)

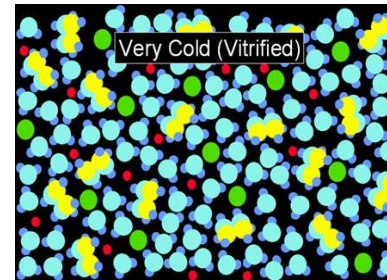
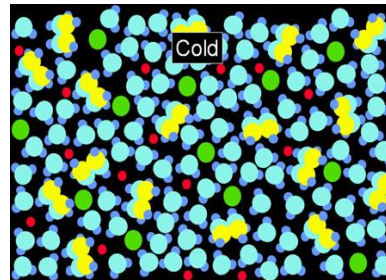
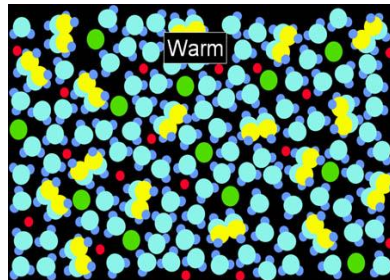
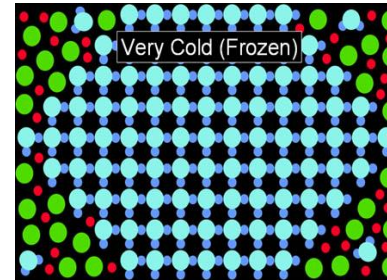
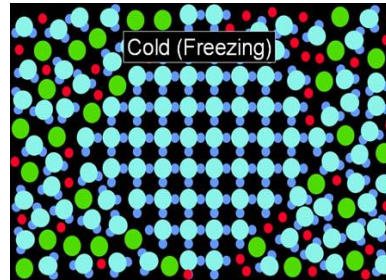
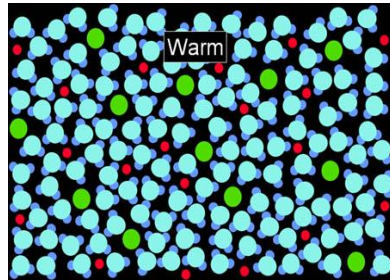
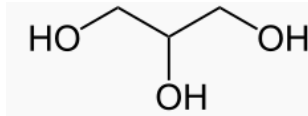


CRIOCONSERVACIÓN: Viabilidad

Crioprotectores

Minimizar daños celulares

Glicerol
Glicerina
1,2,3-propanotriol



CRIOCONSERVACIÓN: Viabilidad

Velocidad de congelación / descongelación

Son etapas críticas pues concentran el mayor daño celular

Se recomienda controlar la velocidad de congelación y programar con equipos adecuados*

Se recomienda que la descongelación sea rápida para evitar daños por recristalización

*ej. Coolcell Biocision -1°C/min



CRIOCONSERVACIÓN: Viabilidad

Temperatura de almacenamiento

Equipos	Temp.	Inconvenientes
Nitrógeno líquido	-196 °C	Riesgos de manipulación Coste de mantenimiento
Nitrógeno vapor	-150 a -178 °C	Riesgos de manipulación Coste de mantenimiento
Ultracongeladores	-80 °C	Dependencia del suministro eléctrico
Congelador	-20 °C	Continúa la formación de cristales y el metabolismo celular

glicerol	
-80 °C	15 %
-20 °C	35 %

CRIOCONSERVACIÓN

ESTABILIDAD GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA

Buena porque el metabolismo está parado

No hay divisiones ni por tanto deriva

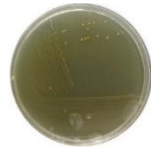
Pocos daños o cambios específicos sobre el material genético

PUREZA

Manipulaciones mínimas → bajo riesgo de contaminación

CRIOCONSERVACIÓN a -80°C

Bacterias cultivadas en medio sólido



Bacterias cultivadas en medio sólido

Bacterias cultivadas en medio líquido



Recoger células con una torunda o asa estéril y depositar en el microtubo con glicerol



Lote no homogéneo

Suspensión celular 10E8 aprox en medio de cultivo fresco o solución salina



Añadir 500 ul a un microtubo con 1 ml de glicerol 20%



Lote homogéneo

Centrifugar 3000 rpm 20 min 4°C

Eliminar sobrenadante y resuspender pellet en medio fresco o solución salina

Añadir 500 ul a un microtubo con 1 ml de glicerol 20%

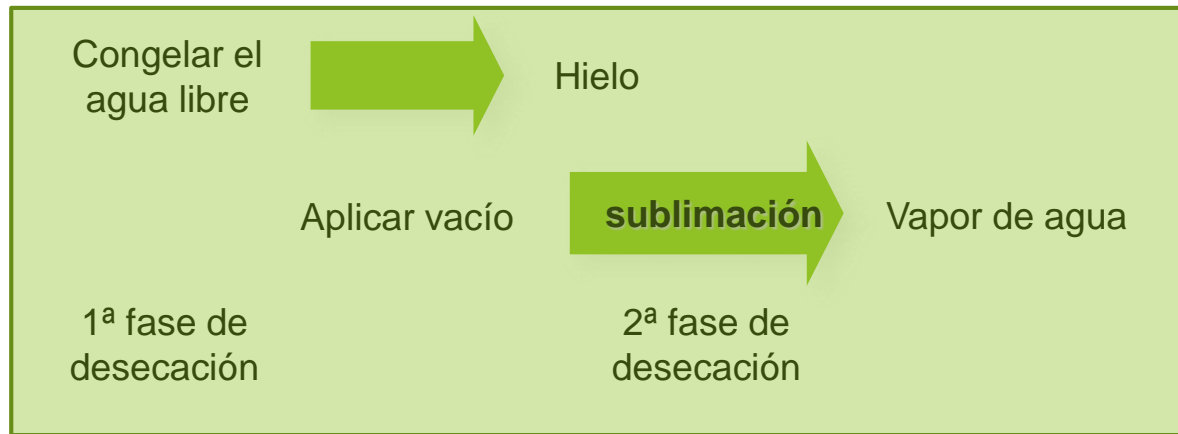
Liofilización

LIOFILIZACIÓN

El agua libre se elimina por sublimación

El metabolismo cesa (material estabilizado)

Se aplica también a alimentos, DNA, materiales, ...



Daños durante la congelación, como en la crioconservación

Daños durante la sublimación

Daños por mal sellado

LIOFILIZACIÓN

Objetivos de un método de conservación

Mantenimiento de

- Viabilidad
- Fenotipo y genotipo
- Pureza microbiológica

LIOFILIZACIÓN: VIABILIDAD

○ Características del microorganismo	Gram + mejor que las Gram -
○ Cultivo y recolección de las células	Crioprotector apto para la liofilización Viales de vidrio neutro (no Pyrex o borosilicato)
○ Concentración celular	10^8 - 10^9 células /ml
○ T ^a durante la sublimación	Inferior a -50°C
○ Grado de deshidratación alcanzado	Lo más alto posible (<i>residual moisture content</i> bajo)
○ Atmósfera en el tubo	Tubos cerrados al vacío
○ Almacenamiento	Lugar fresco, seco y en oscuridad

LIOFILIZACIÓN: VIABILIDAD

Crioprotectores aptos para la liofilización (*lioprotectores*)

No sirven si el producto final pierde la consistencia de polvo (glicerol)

Tampoco los que presentan toxicidad porque se puede acentuar el efecto letal (DMSO)

Algunas sales y surfactantes desplazan el punto de sublimación y la muestra “hierve” (el agua pasa por la fase líquida)

•Inositol 5%

Bacterias

•Inositol 5% + medio de cultivo (2:1)

Bacterias marinas

•Leche descremada 10%

Streptomyces

•Leche 10% + Glucosa 15% (1:1)

Anaerobios

•Leche 10% + medio de cultivo (1:1)

Bifidobacterium

•Leche 10% + medio de cultivo (1:1)

Arqueas

•Leche 10% + medio de cultivo (1:1)
•Ácido glutámico 0,067 M

Bacterias lácticas

Bacterias fitopatógenas

Clase (subclase)

Alphaproteobacteria

Actinobacteria

Betaproteobacteria

Gammaproteobacteria

Especie

“Candidatus *Liberibacter* spp.”

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus*

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens*

Ralstonia solanacearum

Xylophilus ampelinus

Xanthomonas axonopodis pv. *citri*

Xanthomonas campestris pv. *phaseoli*

Xanthomonas campestris pv. *pruni*

Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria*

Xanthomonas fragariae

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae*

Xylella fastidiosa

Inositol 5%

LIOFILIZACIÓN

ESTABILIDAD GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA

Buena por la paralización metabólica (desechado y vacío)

No hay divisiones ni por tanto deriva

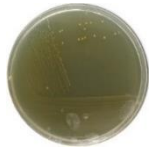
Pocos daños o cambios específicos sobre el material genético

PUREZA

Más manipulaciones que en la congelación → mayor riesgo de contaminación



LIOFILIZACIÓN



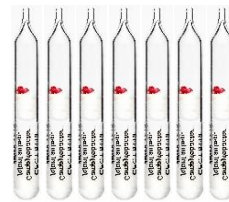
Bacterias cultivadas en medio sólido



Suspensión celular 10E8 aprox en el crioprotector



Repartir 200 ul por vial



Lote homogéneo

Bacterias cultivadas en medio líquido



Centrifugar 3000 rpm 20 min 4°C



Eliminar sobrenadante y resuspender pellet en el crioprotector



Repartir 200 ul por vial

Liofilización vs congelación

- ▶ Ambos son métodos de primera elección
- ▶ La liofilización da problemas de viabilidad en **arqueas y bacterias delicadas**
- ▶ La liofilización tiene más riesgos de contaminación (**incluyendo la apertura**)
- ▶ Pero aventaja a la congelación en facilidad para distribución y almacenamiento

Desecación: L-Dry

DESECACIÓN: L-DRY

Preparar el taco de leche

- Poner 700 ul de leche descremada al 20% en el fondo del tubo
- Poner tapón de algodón

- Congelar con N2 líquido

- Liofilizar overnight



Preparar la suspensión celular y los viales L-Dry

- Preparar una suspensión celular muy concentrada utilizando medio líquido y leche descremada 10% (1:1)

- Colocar 1 gota de esa suspensión celular en el centro del taco de leche

- Colocar los viales en un recipiente con silicagel para que se mantengan secos

- Poner los tubos en el manifold durante 18-24h

- Estrechar

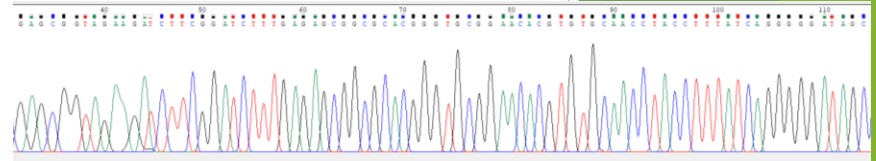


Identificación de bacterias fitopatógenas

Identificación de bacterias fitopatógenas

► Secuencia parcial del gen 16S rRNA

- Gen universal
- Cobertura completa en procariontas



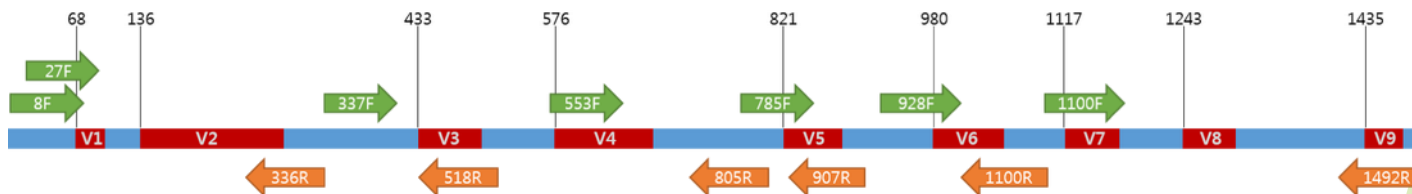
Bacterias 61.828
Arqueas 2.832

EZBioCloud <https://www.ezbiocloud.net>

silva



Tamaño: 1522 bp → suficiente con 1000 bp desde el extremo 5'



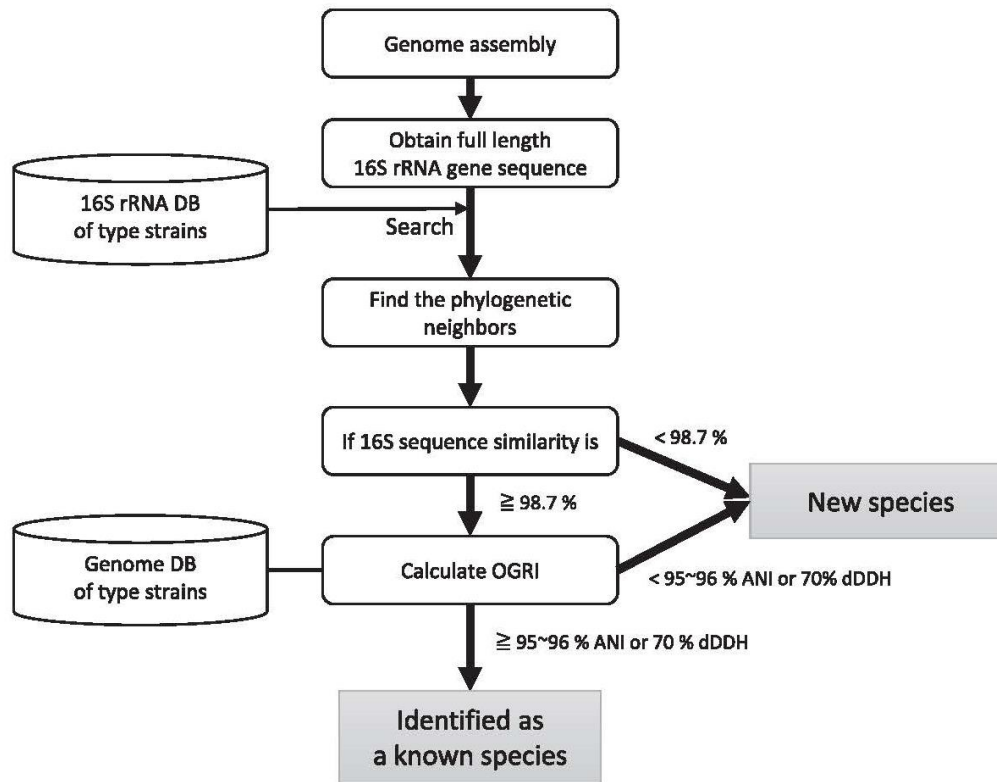


Fig. 1. Workflow of genome based classification at the species level. To recognize new genera, phylogenomic treeing should be used.

Overall genome relatedness index (OGRI)
ANI: Average Nucleotide Identity
dDDH: Digital DDH

List of hits from EzBioCloud 16S database

Select hits by database

All
 Valid names only

Tasks	Hit taxon name	Hit strain name	Accession	Similarity	Diff/Total nt	Completeness (%)
<input type="button" value="↕"/> <input type="radio"/>	Methylobacterium dankookense	SW08-7(T)	FJ155589	98.79	17/1405	99.9
<input type="button" value="↕"/> <input type="radio"/>	Methylobacterium hispanicum	GP34(T)	AJ635304	97.07	41/1398	99.6
<input type="button" value="↕"/> <input type="radio"/>	Methylobacterium gregans	002-074(T)	AB252200	96.93	43/1399	99.9
<input type="button" value="↕"/> <input type="radio"/>	Methylobacterium trifolii	TA73(T)	FR847848	96.89	42/1350	95.9
<input type="button" value="↕"/> <input type="radio"/>	Methylobacterium radiotolerans	JCM 2831(T)	CP001001	96.80	45/1405	100.0
<input type="button" value="↕"/> <input type="radio"/>	Methylobacterium jeotgali	S2R03-9(T)	DQ471331	96.74	45/1379	98.1

List of hits from EzBioCloud 16S database

Select hits by database

Tasks	Hit taxon name	Hit strain name	Accession	Similarity	Diff/Total nt	Completeness (%)
<input type="button" value="↕"/> <input type="radio"/>	Bacillus megaterium	NBRC 15308(T)	JJMH01000057	99.73	4/1474	100.0
<input type="button" value="↕"/> <input type="radio"/>	Bacillus aryabhatai	B8W22(T)	EF114313	99.59	6/1474	100.0
<input type="button" value="↕"/> <input type="radio"/>	Bacillus flexus	NBRC 15715(T)	BCVD01000224	98.71	19/1474	100.0
<input type="button" value="↕"/> <input type="radio"/>	Bacillus paraflexus	RC2(T)	FN999943	98.26	24/1381	94.6
<input type="button" value="↕"/> <input type="radio"/>	Bacillus qingshengii	G19(T)	JX293295	97.96	29/1420	96.3
<input type="button" value="↕"/> <input type="radio"/>	AM888178_s	TSWCSN2	AM888178	96.56	50/1454	98.6

- ▶ Cálculo de OGRIs
- ▶ Secuencia parcial de otros genes: *rpoB*, *rpoD*, *gyrB*, *recA*, ...

Gracias

