

MÉTODO DE PRESERVAÇÃO POR LIOFILIZAÇÃO DA BACTÉRIA *Francisella orientalis**

Crystal Lodi CONDE¹, Luis Claudio de Oliveira COUTINHO², Luara Lucena CASSIANO³,
Danielle de Carla DIAS⁴, Leonardo TACHIBANA^{4,5}, Carlos Massatoshi ISHIKAWA⁴, Maria
José Tavares RANZANI-PAIVA⁴, Erna Elisabeth BACH⁴

¹ Mestre em Aquicultura e Pesca - Instituto de Pesca, IP - APTA/SAA, São Paulo, SP, Brasil.

² Bolsista IC PIBIC. ³ Doutoranda, Instituto Biológico, IB - APTA/SAA, São Paulo, SP, Brasil.

⁴ Pesquisador Científico do Instituto de Pesca, IP - APTA/SAA, São Paulo, SP, Brasil.

⁵ Endereço: Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Aquicultura - CPDA, Instituto de Pesca - IP/APTA/SAA. Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, Vila Mariana, CEP: 04014-900, São Paulo, SP, Brasil. e-mail: ltachibana@sp.gov.br.

*Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2019/12937-3; 2019/12099-8.

Palavras-chave: preservação; liofilização; franciselose; *Francisella orientalis*.

INTRODUÇÃO

A *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*, reclassificada como *Francisella orientalis* sp. nov. (RAMIREZ-PAREDES *et al.*, 2020) é uma bactéria fastidiosa, que necessita de cisteína no meio de cultura para o crescimento. A franciselose é uma doença que pode causar granulomas multifocais em órgãos internos como baço, rim e fígado, levando a hiporexia, anorexia e morte, principalmente em tilápias (SOTO *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2015). Pelas suas características fastidiosas, difícil cultivo e preservação, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um protocolo de preservação da *F. orientalis* pelo método de liofilização.

MATERIAL E MÉTODOS

Francisella orientalis (Laboratório PREVET n°0012018) isolada de tilápia-do-nylo, foi cultivada conforme descrito por FERNANDEZ-ALARCÓN *et al.* (2019), no Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos do CPDA/Instituto de Pesca. Após 72 horas de incubação a 25°C, as colônias isoladas foram ressuspensas em água ultrapura e, posteriormente, submetidas à extração de DNA (kit Promega®) e PCR convencional com primers específicos para o gene rDNA 16S FLB (F: GCGGATTAAAGGTGGCCTTTGC e R: CCTGCAAGCTATTAACACTCACAG), amplificando um fragmento de 286 pb (HSIEH *et al.*, 2006). Após a confirmação, as colônias foram semeadas em tubo cônico de 15 mL contendo meio líquido Muller Hinton suplementado com 1% de glicose, 0,1% de hidrócloro de L-cisteína monohidratado e 3% de soro fetal bovino e incubado em estufa B.O.D. a 25°C por 48h.

Em seguida foi preparada uma solução com volume final de 1,0 mL e concentração final de 7% de sacarose e peptona contendo: 0,5 mL de meio de cultura líquido com as cepas bacterianas (5×10^6 UFC mL⁻¹) e 0,5 mL de solução de sacarose e peptona de soja (14%). Essa solução foi acrescida ao frasco de vidro liofilizado (10 mL) contendo algodão hidrófilo no fundo e, acondicionados na estante (amostras mantidas em temperatura ambiente) do liofilizador (JJ Científica), com temperatura do condensador de -50°C e 190 mmHg de vácuo, por 24h e, em seguida os frascos foram armazenados a -20°C por 7 dias. Após este período foi semeada a bactéria liofilizada em tubos cônicos (n = 3) de 15 mL, contendo meio líquido Muller Hinton suplementado e incubados em estufa B.O.D a 25°C por 48h para visualização do crescimento bacteriano pela turvação do meio. Posteriormente, para confirmação do crescimento da *F. orientalis*, foi realizada a extração de DNA com kit *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega®), amplificação pela técnica de PCR (primers específicos, citados acima) e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2,4%. A visualização das bandas foi realizada em analisador de imagem (BioRad®).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises realizadas demonstraram a viabilidade da *F. orientalis* após a liofilização, pois houve turvação do meio líquido de cultivo e amplificação do DNA bacteriano após a PCR com *primers* específicos (Figura 1). Demonstrou-se, portanto, que a liofilização da bactéria é eficiente para a conservação desta espécie, e pode ser armazenada em temperatura de -20°C durante sete dias.

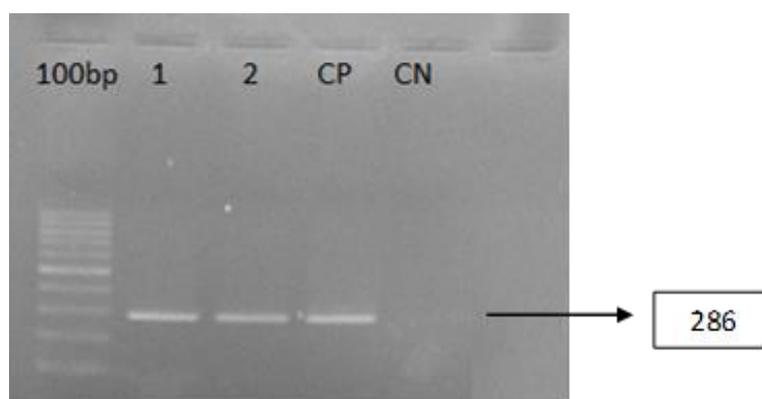


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose (2,4%) dos produtos de DNA amplificados por PCR da *Francisella orientalis*, cultivada em meio líquido após liofilização. 100bp: Marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder, Invitrogen®); 1, 2: Amostras de DNA extraída de meio líquido. CP: controle positivo CN: controle negativo.

O estudo com a conservação das bactérias é muito importante, pois os bancos de armazenamento de bactérias e laboratórios de patologia necessitam de métodos eficientes e com baixo custo para manter o estoque de microrganismos (DE VERO *et al.*, 2019). A *F. orientalis* é bastante sensível aos métodos de congelamento em congelador comum (-20 °C), nitrogênio líquido (-196°C) e ultra congelador (-80°C) e com perda de viabilidade das células.

Este estudo preliminar demonstrou grande eficiência na recuperação da *F. orientalis* após a liofilização e será aprimorado para estudo do tempo e temperatura de armazenamento, para determinar um protocolo seguro para manutenção desta bactéria.

CONCLUSÃO

A bactéria *Francisella orientalis* pode ser recuperada após a liofilização e armazenamento durante sete dias à -20°C.

REFERÊNCIAS

- DE VERO, L.; BONIOTTI, M.B.; BUDRONI, M.; BUZZINI, P.; CASSANELLI, S.; COMUNIAN, R.; GULLO, M.; LOGRIECO, A.F.; MANNAZZU, I.; MUSUMECI, R.; PERUGINI, I.; PERRONE, G.; PULVIRENTI, A.; ROMANO, P.; TURCHETTI, B.; VARESE, G.C. 2019. Preservation, characterization and exploitation of microbial biodiversity: The perspective of the italian network of culture collections. *Microorganisms*, 7(12): 685. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120685>.
- FERNANDEZ-ALARCON, M.F.; SANTANA, A.M.; VIADANNA, P.H.O.; MANZINI, B.; NATORI, M.M.; ISHIKAWA, C.M.; DIAS, D.C.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SQUASSONI, G.H.; COUTO, F.D.; FURLAN, L.R.; TACHIBANA, L. 2019. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged infection by *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* via an intragastric route protocol. *Aquaculture*, 510: 380-385. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.06.007>.
- HSIEH, C.Y.; TUNG, M.C.; TU, C.; CHANG, C.D.; TSAI, S.S. 2006. Enzootics of visceral granulomas associated with Francisella-like organism infection in tilapia (*Oreochromis* spp.). *Aquaculture*, 254(1-4): 129-138. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.044>.
- MARTINS, A.M.C.R.P.F.; CATROXO, M.H.B.; HIPOLITO, M. 2015. *Francisella* spp.: a bactéria emergente responsável por massiva mortalidade na aquicultura. São Paulo: Instituto Biológico, 2015. (Comunicado Técnico, 216). 4p.
- RAMIREZ-PAREDES, J.G.; LARSSON, P.; THOMPSON, K.D.; PENMAN, D.J.; BUSSE, H.J.; ÖHRMAN, C.; SJÖDIN, A.; SOTO, E.; RICHARDS, R.H.; ADAMS, A.; COLQUHOUN, D.J. 2020. Reclassification of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* Ottem et al. 2009 as *Francisella orientalis* sp. nov., *Francisella noatunensis* subsp. *chilensis* subsp. nov. and emended description of *Francisella noatunensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(3): 2034-2048. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004009>.
- SOTO, E.; GRIFFIN, M.; WILES, J.; HAWKE, J.P. 2012. Genetic analysis and antimicrobial susceptibility of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* (syn. *F. asiatica*) isolates from fish. *Veterinary Microbiology*, 154(3-4): 407-412. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.07.030>.