

## AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE QUATRO DIFERENTES CRIOPROTETORES NA PRESERVAÇÃO DE *Staphylococcus aureus*

Ana Verena Pimentel Leal de Moraes Rego<sup>1</sup>; Maíra dos Santos Silva<sup>2</sup>; Rodrigo Souza Conceição<sup>2</sup>; Bruna Aparecida Souza Machado.

<sup>1</sup>Graduando em Farmácia na Universidade Federal da Bahia. Iniciação Científica – CNPq; anaverena.com@gmail.com

<sup>2</sup>Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; brunam@fieb.org.br

### RESUMO

A preservação associada ao uso de crioprotetores tem sido um dos métodos mais utilizados para o armazenamento a longo prazo de microrganismos, principalmente porque essa técnica é capaz de garantir a conservação das características originais das cepas-padrão. O presente estudo objetivou avaliar a eficácia do *Skim milk* e do glicerol como crioprotetores na preservação da cepa-padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. A preservação foi feita nos freezers a -20 e a -80°C, inicialmente apenas entre os meses de dezembro de 2022 e março de 2023. Foram realizados testes de viabilidade e pureza após um dia do congelamento e depois de 3 meses, com intuito de avaliar o método quanto a capacidade de manutenção da sobrevivência e pureza do microrganismo. Posterior à análise dos resultados, os métodos foram eficientes para a preservação, confirmando que o uso de agentes crioprotetores no congelamento da bactéria *Staphylococcus aureus*, pode ser empregado na rotina laboratorial.

**PALAVRAS-CHAVE:** Agentes crioprotetores; Cepa-padrão; Preservação; *Staphylococcus aureus*;

### 1. INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento biotecnológico e científico, a comunidade científica tem se preocupado cada vez mais com a preservação e a manutenção de materiais biológicos e de microrganismos vivos em laboratório. A importância da manutenção deve-se à necessidade de utilização de organismos ou espécimes para ensaios científicos, bem como para uso em controle de qualidade laboratorial.<sup>1</sup> Além disso, a preservação de cepas tem como objetivo principal conservar o estado inicial do microrganismo evitando mutações indesejáveis, alcançando ao mesmo tempo a máxima preservação da vitalidade das células e o número de células viáveis.<sup>2</sup>

Dado isso, para se obter os melhores resultados a escolha de um método de preservação adequado é essencial. Esta escolha é feita de acordo com as características fenotípicas da bactéria, do comportamento de cada espécie frente aos métodos de preservação, bem como de acordo com as vantagens e desvantagens de cada técnica e com o tempo máximo que as cepas podem permanecer preservadas. Por conseguinte, o tempo de preservação define a classificação dos métodos de manutenção, sendo eles de curto prazo (repique contínuo), médio prazo (preservação em óleo mineral, preservação em água esterilizada, congelamento a -20°C e secagem em gel de sílica, solo e papel filtro) ou de longo prazo (liofilização e criopreservação).<sup>3</sup>

Todavia, os métodos de congelamento a médio (-20°C) e a longo prazo se não forem realizados da maneira eficaz de acordo com as necessidades de cada microrganismo, pode ocasionar um efeito deletério, principalmente na membrana celular e vir a causar a morte celular, por causa da formação de cristais no interior da célula. Portanto, é necessária a adição de crioprotetores cuja ação resguarda contra esses danos gerados pelo congelamento.<sup>4</sup>

Dessa forma, os agentes crioprotetores são substâncias que serão adicionadas aos meios de suspensão e irão reduzir o estresse físico e químico causado pelo congelamento e descongelamento das células, garantindo assim que as características originais das cepas-padrão sejam mantidas. Porém, para que esse resultado seja atingido, os crioprotetores devem ter baixo peso molecular e baixa toxicidade celular, além de apresentar alta solubilidade em água. Exemplos desses agentes são: metanol, metilacetamida, DMSO, glicerol, polissacarídeos, manitol e skim milk.<sup>5,6</sup>

Em vista disso, o presente trabalho focou no método por médio (-20°C) e longo prazo (-80°C), comparando a eficiência e a viabilidade entre quatro diferentes tipos de crioprotetores, das cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

## 2. METODOLOGIA

Foi utilizado uma cepa da bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 do laboratório de Microbiologia do Instituto SENAI de Sistemas Avançados de Saúde (ISI – SAS). Estas cepas foram reativadas a partir do repique no meio Ágar Triptona de Soja (TSA) seguido de incubação por 24 horas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Após reativação, foi confirmado a ausência de contaminação a partir da visualização macroscópica e microscópica com a coloração de Gram e repique em meio seletivo Ágar Manitol Salgado. Posteriormente, foi realizado outro repique no meio TSA seguida da inoculação das cepas por 24 horas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Antes de proceder ao congelamento foi realizado um último repique com adição na suspensão dos meios, os seguintes crioprotetores: Skim milk 15% em Caldo Triptona de Soja (TSB) mais glicerol 20%, skim milk 15% em água, glicerol 10% em TSB e glicerol 15% em TSB. Sendo todos os testes repetidos em 10 tubos, e congelados a  $-20$  e  $-80^\circ\text{C}$ , seguido do teste de viabilidade após um dia do congelamento com objetivo de avaliar a atividade metabólica das cepas congeladas. As concentrações dos crioprotetores foram escolhidas com base nos estudos de Amorim, C.F., et al.<sup>4</sup> e Becheleni, F. R. C., et al.<sup>7</sup> com as devidas adições e alterações.

Após três meses de congelamento, as cepas foram submetidas a um novo teste de viabilidade com inoculação em TSA por 24 horas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , com posterior análise macroscópica, teste de gram e teste de catalase para confirmar pureza das amostras.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, os resultados obtidos utilizando os crioprotetores skim milk 15% em TSB com glicerol 20%, skim milk 15% em água, glicerol 10% em TSB e glicerol 15% em TSB foram satisfatórios e se mostraram eficientes, sendo comprovados a partir do teste de viabilidade com a realização de novos repiques no meio de cultura seletivo ágar manitol salgado 24 horas após o congelamento.

O primeiro teste, portanto, confirmou a eficácia da preservação de viabilidade, onde todas as cepas testadas, tanto as congeladas a  $-20$  e a  $-80^\circ\text{C}$  se mostraram viáveis e puras a partir da realização do teste de Gram e avaliação das características fenotípicas. Por conseguinte, esse processo foi repetido após três meses da preservação, adicionando apenas o teste de catalase para comprovar a pureza e repetindo o repique no meio seletivo ágar manitol salgado e o teste de gram. Portanto, o resultado do teste de catalase comprovou mais uma vez, a eficiência da preservação frente a utilização dos agentes crioprotetores, onde houve crescimento em todas as placas e sem contaminação. A eficácia é comprovada visto que não houve desvio e o resultado obtido se repetiu em todos os testes, conseqüentemente obtendo um desvio aceitável. Porém observou-se que, nas placas em que se utilizou os crioprotetores glicerol 10% e glicerol 15%, os dois em TSB na temperatura  $-20^\circ\text{C}$ , houve um menor crescimento se comparado com os outros crioprotetores na temperatura  $-80^\circ\text{C}$ . Apesar de ainda ser necessário a realização do teste de viabilidade quando o congelamento completar seis meses e um ano, fica evidente que, com a diminuição do crescimento das bactérias, a manutenção das cepas a  $-20^\circ\text{C}$  é uma estratégia a médio prazo, enquanto que a  $-80^\circ\text{C}$ , a longo prazo.

Posto isso, a utilização dos crioprotetores Skim milk e glicerol no congelamento e na manutenção da bactéria *Staphylococcus aureus* se mostrou eficaz. Sendo que, o glicerol, por diminuir o ponto de congelamento e reduzir na fração não congelada os eletrólitos, apresenta um excelente efeito protetor tornando-se o crioprotetor mais utilizado no congelamento de microrganismos.<sup>5</sup> O skim milk, por sua vez, atua eficientemente na estabilização da bicamada lipídica durante o congelamento, além de contribuir na estabilidade das enzimas celulares. Isso ocorre em razão da presença da lactose e do cálcio, componentes do leite.<sup>5,8,9</sup>

Outro fator importante a ser levado em conta além do uso dos crioprotetores, é anteceder ao congelamento, a refrigeração nas temperaturas entre  $2$  e  $8^\circ\text{C}$ , de modo que evite o choque térmico que possa vir a ocorrer devido a diferença de temperatura.<sup>8</sup>

## 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os quatro crioprotetores foram capazes de conferir proteção durante o congelamento a  $-20$  e a  $-80^\circ\text{C}$  para as cepas da bactéria *Staphylococcus aureus*, por inicialmente três meses. Este resultado, portanto, reitera a utilização dos agentes crioprotetores a fim preservar e conservar os microrganismos sem causar danos na estrutura tanto morfológica, bioquímica, quanto genética das bactérias.

Se faz necessário a continuação da avaliação dos métodos a longo prazo para que se possa validar os métodos para uso prolongado.

## Agradecimentos

Ao Centro Universitário SENAI CIMATEC e ao CNPq pelo apoio financeiro.

## 5. REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> Sola, M. C., Oliveira, A. P., Feistel, J. C., Rezende, C. S. M. **Manutenção de microrganismos: Conservação e viabilidade**. Goiânia: **Enciclopédia biosfera**, 2012.
- <sup>2</sup> Passador, M. M., Pires, G. C. C., Finatti, C. C., Figueiredo, M. B. **Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca “Mário Barreto Figueiredo”**. São Paulo: Biológico, 2010.
- <sup>3</sup> Sousa, B. R., et al. **Técnicas de obtenção, manutenção e reativação de culturas microbianas**. Patos: Journal of Medicine and Health Promotion, 2017.
- <sup>4</sup> Amorim, C. F., Oliveira, A. C. S., Costa, E. A. S. **Construção de bacterioteca em instituição de ensino superior para fins didáticos e de pesquisa**. Feira de Santana: Research, Society and Development, 2020.
- <sup>5</sup> Aguiar T. A. F., Teixeira M. F. S., Teles C. H. A., Martins G. R, Bezerra R. Q. J, Costa E.C. 2012. **Princípios básicos da criomicrobiologia: Enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores**. Fortaleza: Acta Veterinária Brasilica, 2012.
- <sup>6</sup> Freitas, A. B., Endres, C. M., Martini, D., Castel, A. P. D. **Ação dos crioprotetores glicose, trealose e quitosana na manutenção da viabilidade de células de Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae após liofilização**. Revista Ciência Animal Brasileira, 2020.
- <sup>7</sup> Becheleni, F. R. C., Sales, M. L., Campolino, M. L. **Aplicação biotecnológica da bactéria *Bacillus thuringiensis* no controle biológico da lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda***. Revista Brasileira de Ciências da Vida, 2017.
- <sup>8</sup> Saeki, E. K., Farhat, L. P., Pontes, É. A. **Eficiência dos crioprotetores glicerol e leite desnatado para o congelamento de micro-organismos**. Acta Veterinária Brasilica, 2015.
- <sup>9</sup> Leandro, E.S., Conceição L.L., Carvalho A.F., Costa M.D., Moraes C.A. **Efeito de protetores e tratamentos de estresse na sobrevivência de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ao congelamento**. Minas Gerais: Revista do Instituto Laticínios "Candido Tostes", 2013.