

EFICIÊNCIA DOS CRIOPROTETORES GLICEROL E LEITE DESNATADO PARA O CONGELAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS

[Efficiency of cryoprotectants glycerol and skimmed milk for microorganisms freezing]

Erika Kushikawa Saeki^{1*}, Lúcio Pupo Farhat², Érica Almeida Pontes²

¹INSTITUTO ADOLFO LUTZ – CLR IAL – Presidente Prudente-V (Avenida Cel. José Marcondes, 2357 – Jd. Paulistano – Presidente Prudente -SP).

²AMBIENTALE – Laboratório de Análises Ambientais e de Alimentos Ltda. (Avenida Governador Parigot de Souza, 391 – Zona 01 – Maringá-PR).

RESUMO – A preservação das características originais e viabilidade das cepas-padrão são requisitos essenciais para a sua reprodução em rotinas laboratoriais e centros de pesquisas. Este estudo objetivou analisar o método de preservação de bactérias e leveduras por congelamento comum com adição de glicerol 20% ou leite desnatado 15%. A criopreservação foi realizada em freezer a temperatura de -10 a -20 °C entre os meses de Dezembro de 2013 a Março de 2015. Foram analisadas a viabilidade de 10 micro-organismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Choleraesuis ATCC 7001, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. Após 1 ano e 3 meses, a recuperação em ambos crioprotetores foi de 100%. Os métodos avaliados foram eficientes para a preservação e é uma técnica prática para ser utilizada na rotina laboratorial.

Palavras-Chave: criopreservação; crioprotetores; métodos de preservação; cepas-padrão.

ABSTRACT – The preservation of the original features and feasibility of microorganisms strains are essential requirements for reproduction in laboratory routines and research centers. This study aimed to analyze the method of preservation of bacteria and yeast by common freezing with addition of 20% glycerol or 15% skim milk. Cryopreservation was performed on domestic freezer at temperature -10 to -20°C between the months of December 2013 to March 2015. We analyzed the feasibility of 10 microorganisms: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Choleraesuis ATCC 7001, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 and *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048. After 1 year and 3 months, the recovery in both cryoprotectant was 100%. All methods were efficient for the preservation and is a practical technique to be used for routine monitoring.

Keywords: cryopreservation; cryoprotectants; preservation methods; microorganisms strains.

* Autor para correspondência. E-mail: erikak@ial.sp.gov.br

INTRODUÇÃO

Cepas-padrão são culturas provenientes de uma coleção de culturas reconhecida nacional e/ou internacionalmente, acompanhadas de um certificado contendo a descrição de suas características fenotípicas e genotípicas. Durante o armazenamento as culturas estão sujeitas a alterações genotípicas, que resultam em modificações da sua atividade fisiológica ou de sua morfologia (Brumano et al., 2011). Por isso, a implantação e manutenção de coleções de culturas permitem a formação de estoques de cepas e de grande importância para serem utilizadas nas rotinas laboratoriais e em centros de pesquisas (Paoli, 2005).

O principal objetivo da preservação de culturas é a extensão do tempo de sobrevivência das cepas armazenadas e proporcionar estabilidade genética do micro-organismo, evitando assim a formação excessiva de mutações que alterem suas características (Girão et al., 2004; Dellaretti, 2014).

Métodos com maior sucesso são aquelas que reduzem o metabolismo do micro-organismo. Isso pode ser realizado por desidratação ou congelamento, onde se utiliza meios com baixa tensão de oxigênio e baixas temperaturas. O congelamento comum baseia-se na conservação de agentes em temperaturas relativamente baixas entre -4 e -20°C. Apresenta-se como um dos métodos de manutenção mais simples e baratos, além de oferecer boa segurança para o armazenamento de diversos micro-organismos por períodos de três meses a dois anos, devido a uma redução significativa no metabolismo celular (Sola et al., 2012).

Agentes crioprotetores são substâncias adicionadas à suspensão celular com o objetivo de proteger as células contra danos durante o congelamento e descongelamento. Muitos estudos tem sido desenvolvidos na busca de otimizar a escolha de diferentes crioprotetores com diferentes

concentrações. Dentre os crioprotetores utilizados incluem-se o leite desnatado, caldo nutritivo tamponado com glicerol, dimetil sulfoxido (DMSO) ou glicerol (Hubálek, 2003; Brumano et al., 2011).

Este estudo objetivou comparar os métodos de congelamentos com crioprotetores glicerol a 20% e o leite desnatado a 15% para a preservação de bactérias e leveduras.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de Dezembro de 2013 a Março de 2015 foram avaliadas a viabilidade de 10 micro-organismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Choleraesuis ATCC 7001, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* sub. *pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763.

As cepas foram ativadas em Ágar Tríplice Soja (TSA) a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 ± 2 horas. Após a confirmação da ausência de contaminação em meios seletivos e diferenciais, foram semeadas com inóculo pesado em caldo infusão cérebro-coração (BHI) com 20% de glicerol e leite desnatado a 15%, distribuídos previamente em microtubos graduados de 1,5 mL. Após a distribuição nos microtubos, estes foram mantidos por refrigeração por 5 dias, e posteriormente armazenados em freezer de -10 a -20°C.

Para verificar a viabilidade das cepas, os microtubos foram retirados do congelamento mês a mês e as cepas foram semeadas novamente em Ágar Tríplice Soja (TSA) e Ágar seletivo, conforme o micro-organismo (Tabela 1). As placas foram incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 ± 2 horas.

Tabela 1. Descrição dos meios de cultura seletivos utilizados para verificar a viabilidade dos micro-organismos.

Espécies (bactérias e levedura)	ATCC	Meio de cultura seletivo
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	25923	Ágar Baird-Parker (ABP)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	Ágar Baird-Parker (ABP)
<i>Enterococcus faecalis</i>	19433	Ágar m-Enterococcus
<i>Salmonella</i> Typhimurium	14028	Ágar desoxicolato lisina xilose (XLD)
<i>Salmonella</i> Choleraesuis	7001	Ágar desoxicolato lisina xilose (XLD)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883	Ágar eosina azul de metileno (EMB)
<i>Escherichia coli</i>	25922	Ágar eosina azul de metileno (EMB)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	Ágar eosina azul de metileno (EMB)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	Ágar m-PA-C
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9763	Ágar Sabouraud Dextrose

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, os resultados da viabilidade de culturas congeladas em caldo BHI a 20% de glicerol e leite desnatado a 15% comprovam a alta eficiência do processo, pois 100% dos micro-organismos apresentaram-se viáveis por 1 ano e 3 meses. Neste período de armazenamento também não houve contaminação destes micro-organismos por outras bactérias e fungos.

Oplustil et al. (2010) recomendam que bactérias Gram-positivas sejam armazenadas a -20 °C em glicerol ou leite desnatado por 1-3 anos e Gram-negativas em sacarose e lactose por 1-2 anos.

Estudo realizado com 328 leveduras (gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rodothorulla*) preservadas no glicerol 20% e congelamento a -20°C apresentaram viabilidade de 99% por 3 anos e 6 meses (Silva et al., 2008). Cepas de *Salmonella Enteritidis* foram avaliadas e não apresentaram diferença na redução bacteriana e tempo de armazenamento a -20°C por 1, 3 e 7 dias em água peptonada tamponada (Vieira et al., 2007).

As espécies de *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Borrelia burgdorferi*, *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* foram preservados em leite desnatado 10% a -80°C e houve resultados acima de 90% na sua recuperação (Cody et al., 2008). Outros micro-organismos como *Lactobacillus lactis* subsp *lactis* e *Lactobacillus rhamnosus* também apresentaram eficiência comprovada na preservação com do leite desnatado (Volkert et al., 2008; Leandro et al., 2013).

A refrigeração entre 2-8°C, anterior ao congelamento das culturas, impede que ocorra diferenças drásticas de temperatura evitando o choque térmico (Silva et al., 2008; Nery et al., 2001). Além disso, uma das condições mais importantes para o sucesso da criopreservação é a composição do meio usado para o congelamento. Agentes crioprotetores reduzem o estresse físico e químico derivado do congelamento e do degelo das células. As características físico-químicas ideais para um crioprotetor devem abranger baixo peso molecular, alta solubilidade em água e baixa toxicidade celular (Aguiar et al., 2012).

O glicerol funciona como um bom crioprotetor e deve ser adicionado a concentrações finais de entre 15 a 50% (Spencer & Spencer, 1996). Sua atividade de crioproteção foi inicialmente aplicada em 1913 para a preservação de *Escherichia coli* durante seis meses à temperatura de -20 °C. Este crioprotetor é bioquimicamente compatível com as estruturas celulares e, desta forma, as células podem ser

preservadas e recuperadas suas funções quando descongeladas (Abreu & Tutunji, 2003). Além disso, o efeito protetor do glicerol é representado por propriedades coligativas, diminuição do ponto de congelamento e consequente redução das concentrações de eletrólitos na fração não-congelada da amostra (Aguiar et al., 2012).

O leite desnatado pode atuar na proteção ao congelamento devido à atuação dos diferentes componentes do leite na estrutura da célula (Leandro et al., 2013). O cálcio pode também ser o responsável em contribuir para a estabilidade das enzimas celulares (Cody et al., 2008).

CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que o congelamento comum entre -10 a -20°C com os crioprotetores glicerol a 20% e leite desnatado a 15%, após a refrigeração por 5 dias é uma técnica alternativa para a conservação de micro-organismos durante o período de 1 ano e 3 meses.

O congelamento comum é um método simples e não requer equipamentos sofisticados, por isso é uma técnica prática para ser utilizada na rotina laboratorial.

REFERÊNCIAS

- Abreu M.M.V. & Tutunji V.L. 2003. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. *Universitas Ciênc. Saúde*. 2 (2):236-251.
- 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. *Acta Vet. Bras.* 6(2): 80-92.
- Brumano L.P., Ângelo F.F., Amaral L.H., Pinto C.L.O., Almeida J.A.A., Pinto M.A.O. 2011. Estirpes bacterianas-padrão, formas de obtenção de doação e sua manutenção em laboratórios de ensino e pesquisa. *Rev. Interdisc. Estudos Experim.* 3:21-26.
- Cody W.L., Wilson J.W., Hendrixon D.R., Melver K.S., Hagman K.E., Ott C.M., Nickerson C.A., Schurr M.J. 2008. Skim mik enhances the preservation of thawed -80°C bacterial stocks. *J.Microbiol. Methods*. 75(1): 135-138.
- Dellaretti E. M. 2014. Preservação de fungos em temperaturas baixas. Monografia, Universidade Federal São João Del-Rei. 29p.
- Girão M.D., Prado M.R., Brillante R.S.N., Cordeiro R.A., Monteiro A.J., Sidrim J.J.C., Rocha M.F.G. 2004. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. *Rev. Soc. Bras. Med. Tropical*. 37 (3): 229-233.
- Hubálek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 46: 205-229.
- Leandro E.S., Conceição L.L., Carvalho A.F., Costa M.D., Moraes C.A. 2013. Efeito de protetores e tratamentos de estresse na sobrevivência de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ao congelamento. *Rev Inst Latic "Candido Tostes"*. 390 (68):37-40.

Nery S.A., Melhem M.S.C. & Gomes A.M.L. 2001. Manutenção da levedura *Cryptococcus* sp por congelamento. *Laes & Haes*. 129: 194-198.

Oplustil C.P., Zacoli C.M. & Tobouti N.R. 2010. Procedimentos básicos em Microbiologia Clínica. 3ª ed. Editora Servier, São Paulo, 544p.

Paoli P. 2005. Biobancos microbiológicos a partir de coleta de amostras para a epidemiologia, diagnóstico e pesquisa. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 897-910.

Silva J.O., Costa P.P. & Reche S.H.C. 2008. Manutenção de leveduras por congelamento a -20°C. *RBAC*. 40(1): 73-74.

Sola M.C., Oliveira A.P., Feistel J.C., Rezende C.S.M. 2012. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. *Enciclopédia Biosfera*. 8 (14): 1398-1418.

Spencer J.F. & Spencer D.M. 1996. Maintenance and culture of yeasts. *Methods Mol. Biol.* 53:5-15.

Vieira V.R., Nascimento V.P., Borsoi A., Santos L.R. 2007. Efeito do congelamento da contagem de *Salmonella* Enteritidis pelo método do número mais provável (NMP) em cecos de frangos de corte. *Rev. FZVA*. 14(2): 140-147.

Volkert M., Ananta E., Luscher C., Knorr D. 2008. Effect of air freezing, spray freezing, and pressure shift freezing on membrane integrity and viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *J. Food Engineering*. 87(4): 532-540.