

Construção de bacterioteca em instituição de ensino superior para fins didáticos e de pesquisa

Bacteriotech construction in a higher education institution for teaching and research purposes

Construcción de bacteriotech en una institución de enseñanza superior con fines de enseñanza e investigación

Recebido: 29/07/2020 | Revisado: 04/08/2020 | Aceito: 10/08/2020 | Publicado: 16/08/2020

Carolina Ferreira Amorim

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1538-6762>

Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana, Brasil

E-mail: cfa.biomed@gmail.com

Ana Carolina Santana de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8335-2359>

Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana, Brasil

E-mail: anasantanoli@yahoo.com

Emanuela Avelar Silva Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2184-4929>

Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana, Brasil

E-mail: eavelarcosta@gmail.com

Resumo

Introdução: As bacteriotecas possuem uma grande relevância para Instituições de Ensino Superior, tanto para uso didático, quanto para uso em pesquisas. Os métodos de estocagem visam preservar os aspectos morfofisiológicos dos espécimes para sua utilização a qualquer momento. As técnicas de conservação microbiana podem ser a curto prazo, médio prazo e longo prazo. Dentre os princípios de cada técnica, os métodos de criopreservação com congelamentos comum e ultracongelamento são associados a aditivos crioprotetores para redução e proteção dos danos relacionado ao congelamento. Ao longo dos anos, a construção das bacteriotecas vem sendo consolidadas por proporcionar a biodisponibilidade bacteriana para os fins didáticos e de pesquisas. **Objetivo:** A presente pesquisa objetivou a construção da bacterioteca para o laboratório de Microbiologia da Unidade de Ensino Superior de Feira de

Santana. **Metodologia:** Foram introduzidas no decorrer da pesquisa 14 bactérias, aplicando a estocagem pelo congelamento a -20°C com glicerol a 20% e leite desnatado a 15% em caldo TSB, além da gestão para manutenção, viabilidade e controle de qualidade executadas em paralelo. **Resultados:** A técnica adotada para a criopreservação em médio prazo com o uso de dois crioprotetores, bem como os procedimentos adotados para viabilidade, puderam garantir durante 1 ano e 4 meses a pureza das cepas disponíveis sem perda da viabilidade. **Conclusão:** Notou-se que a inserção da bacterioteca conseguiu suprir as necessidades acadêmico científico da Instituição, logo as bacterioteca podem ser inseridas com técnicas de fácil execução e de baixo custo.

Palavras-chaves: Bacterioteca; Criopreservação; Ensino; Pesquisa.

Abstract

Introduction: Bacteriotecs have a great relevance for Higher Education Institutions, both for didactic and research use. The storage methods aim to preserve the morphophysiological aspects of the specimens for use at any time. Microbial conservation techniques can be short term, medium term and long term. Among the principles of each technique, cryopreservation methods with common freezing and deep-freezing are associated with cryoprotective additives to reduce and protect freeze-related damage. Over the years, the construction of the bacteotecs has been consolidated by providing bacterial bioavailability for educational and research purposes. Objective: This research aimed at building the bacteriotech for the Microbiology Laboratory of the Higher Education Unit of Feira de Santana. Methodology: 14 bacteria were introduced during the research, applying the storage by freezing at -20°C with 20% glycerol and 15% skimmed milk in TSB broth, in addition to the management for maintenance, feasibility and quality control performed in parallel. Results: The technique adopted for cryopreservation in the medium term with the use of two cryoprotectors, as well as the procedures adopted for viability, could guarantee for 1 year and 4 months the purity of the available strains without loss of viability. Conclusion: It was noted that the insertion of the bacteriotech was able to meet the scientific academic needs of the Institution, so the bacteriotech can be inserted with techniques of easy execution and low cost.

Keywords: Bacteriotech; Cryopreservation; Teaching; Research.

Resumen

Introducción: Los bacterióticos tienen una gran relevancia para las instituciones de educación superior, tanto para el uso didáctico como para la investigación. Los métodos de

almacenamiento tienen por objeto preservar los aspectos morfofisiológicos de los especímenes para su uso en cualquier momento. Las técnicas de conservación microbiana pueden ser de corto, medio y largo plazo. Entre los principios de cada técnica, los métodos de criopreservación con congelación y ultracongelación comunes se asocian con aditivos crioprotectores para reducir y proteger los daños relacionados con la congelación. A lo largo de los años, la construcción de la bacteoteca se ha consolidado proporcionando biodisponibilidad bacteriana con fines educativos y de investigación. Objetivo: Esta investigación tenía como objetivo construir la bacteoteca para el Laboratorio de Microbiología de la Unidad de Enseñanza Superior de Feira de Santana. Metodología: Durante la investigación se introdujeron 14 bacterias, aplicando el almacenamiento por congelación a -20°C con 20% de glicerol y 15% de leche desnatada en caldo TSB, además de la gestión para el mantenimiento, la viabilidad y el control de calidad realizados en paralelo. Resultados: La técnica adoptada para la criopreservación a mediano plazo con el uso de dos crioprotectores, así como los procedimientos adoptados para la viabilidad, podrían garantizar la pureza de las cepas disponibles durante 1 año y 4 meses sin pérdida de viabilidad. Conclusión: Se observó que la inserción del bacteriotecnia podía satisfacer las necesidades académicas y científicas de la Institución, por lo que el bacteriotecnia puede insertarse con técnicas fáciles y de bajo costo.

Palabras clave: Bacteriotech; Criopreservación; Enseñanza; Investigación.

1. Introdução

Com o desenvolvimento biotecnológico e científico, vem emergindo na comunidade científica a preocupação 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 a qualquer momento, quer para fins didáticos ou de estudos comparativos (Sola, Oliveira, Feistel, & Rezende, 2012).

Na Microbiologia, as coleções vivas em laboratório permitem a sua utilização posterior em atividades de ensino e pesquisa, promovendo qualidade nas atividades experimentais, cujo interesse para estas coleções leva-se em consideração os microrganismos de interesse clínico ou com potencial biotecnológico, destacando as bactérias, fungos, protozoários e vírus (Silva & Sá, 2016).

A preservação destes microrganismos nos biobancos podem ser feitas com métodos de repiques contínuos (curto prazo), preservação em óleos minerais, água destilada,

congelamento comum - 20°C (médio prazo), liofilização e ultracongelamento (longo prazo) (Costa & Ferreira, 1991). A escolha para os métodos de estocagem leva-se em consideração o tipo de microrganismo além das vantagens e desvantagem da técnica de preservação (Sola, Oliveira, Feistel, & Rezende, 2012).

Os métodos de congelamento podem ocasionar danos ao microrganismo devido à formação de cristais que podem resultar na sua morte ou em reduções drásticas da sua viabilidade. Portanto, é necessária a adição de crioprotetores cuja ação resguarda contra esses danos gerados pelo congelamento sendo os mais utilizados, devido à eficiência da crioproteção, o dimetilsulfóxido, glicerol, soro sanguíneo, soro de albumina, leite desnatado, sacarose, glicose, peptona, sorbitol, metanol, polivinilpirrolidona e extrato de malte (Hubálek, 2003).

A criação das bacteriotecas vem se consolidando ao longo dos últimos anos em diversas instituições de ensino e pesquisa (Abreu & Tutunji, 2004; Passador, Pires, Finatti, Aparecido, & Figueiredo, 2010). A garantia de sobrevivência de cepas bacterianas, bem como a conservação de suas características morfofisiológicas e genéticas são premissas primordiais na otimização de técnicas de preservação, já que elas permitem desenvolver conhecimentos multidisciplinares e promover maior qualidade no ensino prático em laboratório (Sola, Oliveira, Feistel, & Rezende, 2012).

Deste modo, a presente pesquisa teve o objetivo de construir uma bacterioteca para o laboratório de Microbiologia da Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana (UNEF), para estocagem de bactérias de relevância clínica no intuito de oferecer aos discentes e docentes o seu uso para atividades didático-pedagógicas e de pesquisa.

2. Metodologia

Obtenção das bactérias

As bactérias foram doadas para Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana (UNEF) para a criação da bacterioteca. Inicialmente, no segundo semestre de 2018 foram obtidas as espécies: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus vitulinus* e *Enterococcus faecalis*, identificadas por meio da automação BD Phoenix™. No ano de 2019 a Instituição recebeu a doação do LACEN/Serrinha- BA de bactérias referências (ATCC), sendo elas: *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas*

aeruginosa ATCC27853, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 700603, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC BAA750, *Staphylococcus aureus* ATCC23235. Ao final, totalizou-se 14 bactérias disponíveis para a bacterioteca.

Criopreservação

A técnica adotada para a criopreservação bacteriana usou o congelamento a -20°C com adição dos crioprotetores glicerol a 20% e leite desnatado a 15% em caldo Soja Tripticaseína (TSB). As etapas para o congelamento consistiram em: 1) Incubação da bactéria no caldo TSB; 2) Adição dos crioprotetores no caldo TSB após incubação; 3) Congelamento a -20°C .

Antes de proceder às etapas para o congelamento, as bactérias foram repicadas em Ágar Brain Heart Infusion (BHI) por 24 horas a 37°C e após confirmação da ausência de contaminação através das provas bioquímicas e coloração de Gram, foram inoculadas em 1 mL de caldo TSB e posteriormente submetidas a incubação por 24 horas a 37°C . O crescimento bacteriano no caldo TSB era indicado pela turvação do meio, sendo adicionado então o glicerol a 20% e o leite desnatado a 15%, subsequentemente eram congeladas no freezer a -20°C (Figura 1) por 3 meses.

Figura 1: Bactérias congeladas em tubos *eppendorfs*.



Fonte: Arquivo pessoal, (2020).

Viabilidade bacteriana

Após o descongelamento (trimestrais) em temperatura ambiente, as bactérias eram repicadas em Ágar BHI e incubadas por 48 horas a 37°C . Os repique eram feitas as provas bioquímicas e coloração de Gram para então realizar novos congelamentos a partir desta nova cultura, além de realizar também novos repiques para o uso contínuo.

Repiques das bactérias para uso

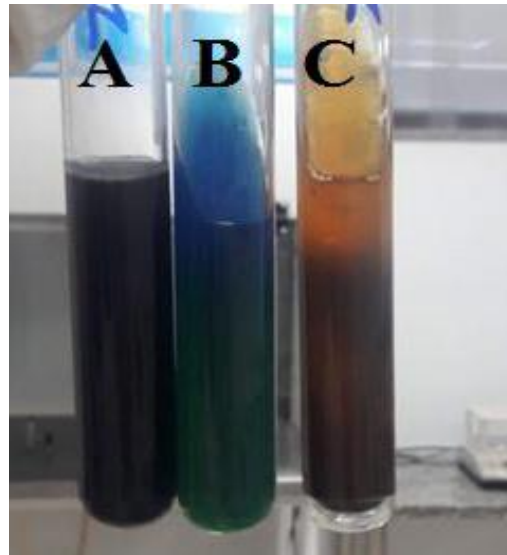
Para manter as bactérias viáveis no decorrer do semestre, estas eram separadas em: Placas Controle, onde ficavam as bactérias para futuros repiques; Tubos para Uso, onde ficavam as bactérias para serem utilizadas pelos discentes e docentes da Instituição, tanto para uso em disciplinas quanto para pesquisas.

Os repiques eram feitos a cada 15 dias, quando se utilizava as Placas Controles para realizar novos inóculos. A cada 3 meses, um novo descongelamento era realizado, oferecendo às bactérias novos meios para manter sua viabilidade. Após sua recuperação pós congelamento, procedia-se à coloração de Gram e provas bioquímicas de identificação. Os Tubos para Uso eram constantemente repicados e mantidos em caldo TSB, paralelamente à manutenção das Placas Controles. Estes tubos ficavam disponíveis para uso docente e discente.

Controle de qualidade

As provas bioquímicas e coloração de Gram eram realizadas periodicamente durante os semestres e nos recessos das aulas, sendo testadas a cada repique as Placas Controles que ficavam à disposição para uso da Instituição e nas bactérias criopreservadas a -20 °C a cada descongelamento, ou seja a cada 3 meses, no intuito de certificar que as bactérias não haviam sido contaminadas o que resultaria no comprometimento da bacterioteca. Para provas bioquímicas das bactérias Gram-negativas (Figura 2) utilizavam-se os meios TSI, SIM, Citrato de Simmons, Fenilalanina, Ureia de Christensen e teste de Oxidase em Fita. Para as Gram-positivas eram usados o Ágar Manitol, Ágar Bile-esculina e o teste de Sensibilidade a Novobiocina.

Figura 2: Provas de identificação bioquímica de Bacilos Gram negativos: (A) produção de H₂S no meio SIM; (B) citrato positivo no meio Citrato de Simmons e (C) produção de H₂S e produção de gás no meio TSI.



Fonte: Arquivo pessoal, (2020).

3. Resultados e Discussão

A construção da bacterioteca na Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana foi bastante satisfatória, para uso nos cursos de Saúde (Biomedicina, Farmácia e Odontologia). A bacterioteca foi utilizada principalmente para aulas práticas das disciplinas de Microbiologia básica e Microbiologia Clínica, e em pesquisas da própria Instituição. Neste sentido, em relação ao uso da bacterioteca seu aproveitamento foi maior em 2019, tanto para uso em aulas práticas quanto para pesquisas comparado a 2018, levando-se em consideração que no ano de 2019 a bacterioteca possuía um acervo maior de bactérias devido a inclusão de bactérias referências (ATCC) propondo maior variedade para o uso acadêmico científico.

Durante os descongelamentos que ocorreram nos meses de janeiro, abril, agosto e dezembro de 2019 (trimestrais), notou-se que as bactérias não sofreram perda de viabilidade e não houve contaminações das espécies durante este período, o que ressalta a questão da boa gestão ao longo de 1 ano e 4 meses da inserção da bacterioteca na Instituição, com a manutenção periódica das cepas.

A criopreservação a -20°C é um método em médio prazo que preserva o microrganismo em baixa temperatura, com manutenção pouco trabalhosa e menos custosa em

comparação a outras técnicas, tais como a liofilização e congelamento em nitrogênio líquido, sem a necessidade de equipamentos mais sofisticados. A criopreservação a -20 °C é indicada para o congelamento em bacteriotecas; no entanto o uso em micotecas não é indicado devido às perdas significativas da viabilidade dos fungos (Abreu & Tutunji, 2004). A indicação para estocagem usando criopreservação é de 3 meses a 2 anos (Tortora, Funke, & Case, 2017).

O uso de crioprotetores nos métodos de congelamentos visam proteger os microrganismos impedindo a formação de cristais de gelo que possam se formar no processo de congelamento o que levaria ao rompimento da membrana plasmática da célula que posteriormente levaria à morte do microrganismo, assim resultando no declínio da viabilidade (Wolfe & Bryant, 1999). O glicerol possui a capacidade de penetrar a membrana através da difusão passiva, diminuindo as concentrações eletrolíticas devido sua propriedade coligativa que diminui os pontos de congelamento, havendo então a redução dos eletrólitos da fração não congelada (Lovelock & Polge, 1954). O leite desnatado é outro crioprotetor cuja atuação está relacionada à interação na fluidez da membrana protegendo-o então, cujo os mecanismos para a crioproteção ainda não estão esclarecidas (Carvalho *et al.*, 2004).

Um estudo testou a associação dos efeitos da eficiência do glicerol a 20% e leite desnatado a 15% em 10 microrganismos, sendo eles: *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, onde foi avaliada a viabilidade desses microrganismos em congelamento a -20°C com descongelamentos periódicos durante 1 ano e 3 meses. Nesse período não houve perda de viabilidade (Saeki, Farhat, & Pontes, 2015). O uso de mais de um crioprotetor pode ter efeitos mais satisfatórios do que aqueles observados individualmente (Hubálek, 2003), corroborando com os resultados observados durante os descongelamentos desta pesquisa.

Outro fator importante para a qualidade para estocagem dos biobancos é a avaliação para certificação da preservação morfofisiológica, pois repiques sucessivos podem levar a modificação dessas cepas a partir de culturas antigas com repiques contínuos. Além disso, outro fator importante é a garantia da pureza das cepas, pois a manipulação pode resultar na contaminação daquela amostra comprometendo o acervo (Costa & Ferreira, 1991; Romeiro, 2006). Logo, a implementação do controle de qualidade para a manutenção destes acervos é tão importante quanto a metodologia para criopreservação.

Estudos demonstram que a implantação de coleções vivas em Instituições de ensino superior enriquecem as metodologias acadêmico científico mas, para tanto, a gestão do mantimento dessas coleções deve seguir além do emprego adequado da criopreservação para os microrganismos destas coleções; a conduta para evitar contaminações usando vidrarias, meios de culturas, crioprotetores, *ependorfs* estéreis além de seguir as condutas adequadas para realização dos procedimentos para o congelamento, inoculação e manuseios das amostras são essenciais. Vale salientar também que as boas práticas na elaboração do Procedimento Operacional Padrão (POP) para conduzir a manutenção e viabilidade desses microrganismos são de suma importância (Abreu& Tutunji, 2004; Oliveira, Maximo, Oliveira, & Monteiro, 2018).

Neste sentido, a técnica adotada para a criopreservação em médio prazo com o uso de dois crioprotetores, bem como os procedimentos adotados para viabilidade, manutenção e controle de qualidade foram cruciais para a gestão da bacterioteca, onde se pode garantir durante 1 ano e 4 meses a pureza das cepas disponíveis sem perda da viabilidade durante os descongelamentos trimestrais com técnicas poucos laboriosas, propondo então uma disponibilidade de bactérias de relevância clínica para o laboratório de Microbiologia da Unidade de Ensino Superior de Feira de Santana.

4. Considerações Finais

Em suma, o desenvolvimento da bacterioteca conseguiu suprir as necessidades acadêmicas voltadas para a utilização didática e em pesquisas, com a disponibilidade dessas bactérias aos discentes e docentes da Instituição. Para tanto, destaca-se alguns pontos importantes para a construção da bacterioteca, sendo elas: I) Gestão: organização da infraestrutura de apoio e disponibilidade de todo o material necessário para a realização de testes para identificação e condições de cultivo de cada microrganismo; e por fim, II) Técnica e controle e qualidade: escolha adequada para os microrganismos em questão, otimização de metodologias de isolamento e de identificação das amostras com base em características morfofisiológicas e bioquímicas das bactérias com avaliações periódicas para manutenção, viabilidade e pureza das amostras. Dessa forma, a construção da bacterioteca oferece uma relevância biotecnológica e didático-pedagógica para área do ensino e pesquisa em Microbiologia.

Referências

- Abreu, M. M. V., & Tutunji, V. L. (2004). Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. *Universitas: Ciências da Saúde (Brasília)*, 2 (2), 236-251.
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., & Gibbs, P. (2004). Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Biotechnol Prog.* 20 (1), 248-254.
- Costa, C. P., & Ferreira, M. C. (1991). Preservação de microrganismos: revisão. *Revista de Microbiologia, (São Paulo)*, 22 (3), 263-268.
- Hubálek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46, 205-229.
- Lovelock, J. E., & Polge, C. (1954). The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. *Byochem J.* 58 (4), 618–622.
- Oliveira, J. M. A., Maximo, C. M., Oliveira, A. S., & Monteiro, D. C. C. (2018). Implantação da coleção de cultura de microrganismos patogênicos do claretiano em Boa Vista – Roraima. *Medicina e Saúde (Rio Claro)*, 1 (2), 73-82.
- Passador, M. M., Pires, G. C. C., Finatti, D., Aparecido, C. C., & Figueiredo, M. B. (2010). Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca “Mário Barreto Figueiredo”. *Biológico, (São Paulo)* 72 (1), 51-55.
- Saeki, E. K., Farhat, L. P., & Pontes, E. A. (2015). Eficiência dos crioprotetores glicerol e leite desnatado para o congelamento de micro-organismos. *Acta Veterinaria Brasilica*, 9 (2), 195-198.
- Silva, M., & Sá, M. R. (2016). Coleções vivas: as coleções microbiológicas da Fundação Oswaldo Cruz. *Museologia & Interdisciplinaridade*, 5 (90), 175-187.

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

Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2017). *Microbiologia* (12a ed.). Porto Alegre: Artmed.

Wolfe, J., & Bryant, G. (1999) Freezing, drying, and/or vitrification of membrane- solute-water systems. *Cryobiology*, 39 (2), 103-129.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Carolina Ferreira Amorim – 40%

Ana Carolina Santana de Oliveira – 30%

Emanuela Avelar Silva Costa – 30%