

## MANUTENÇÃO DE MICRORGANISMOS: CONSERVAÇÃO E VIABILIDADE

---

Marília Cristina Sola<sup>1\*</sup>; Aline Pedrosa de Oliveira<sup>1</sup>; Janaina Costa Feistel<sup>2</sup>; Cíntia Silva Minafra e Rezende<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Doutoranda, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás - UFG, Goiânia, Goiás, Brasil

<sup>2</sup>Mestranda, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás - UFG, Goiânia, Goiás, Brasil

<sup>3</sup>Docente, Doutora, UFG, Escola de Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Goiás - UFG, Goiânia, Goiás, Brasil

\*Endereço para correspondência: [mcsllilla@yahoo.com.br](mailto:mcsllilla@yahoo.com.br)

---

Recebido em: 04/05/2012 – Aprovado em: 15/06/2012 – Publicado em: 30/06/2012

---

### RESUMO

Diante da necessidade de desenvolvimento biotecnológico e científico, a preservação e a manutenção de materiais biológicos vêm ganhando destaque no cenário mundial. A garantia de sobrevivência de culturas bem como a conservação de suas características morfológicas, fisiológicas e genéticas são primordiais na adequação de métodos de preservação de células humanas, animais e vegetais, bactérias, vírus, fungos e material genético (DNA/RNA), porém não existe uma fórmula ideal ou universal para essa conservação. Desta forma a escolha de um método de manutenção deve ser baseada nas características do material biológico em estudo, assim como nas vantagens e desvantagens de cada técnica disponível. Neste contexto, a preservação *ex situ* em coleções de culturas vem garantindo a sobrevivência, a estabilidade e pureza de linhagens durante longos períodos, empregando diversos métodos de manutenção e principalmente disponibilizando as culturas para a comunidade científica e tecnológica de diversos países.

**PALAVRAS-CHAVE:** Coleções de culturas; Conservação *ex situ*; Métodos de preservação.

### MAINTENANCE OF MICROORGANISMS: STORAGE AND VIABILITY

#### ABSTRACT

The necessity of scientific and biotechnological development, preservation and maintenance of biological materials have been gaining prominence on the world stage. Ensuring the survival of cultures and the preservation of their morphological, physiological and genetic characteristics are paramount in the adequacy of methods of preservation of human cells, animals and plants, bacteria, viruses, fungi and genetic material (DNA/RNA), but there is not a formula for that ideal or universal preservation. Thus, the choice of a maintenance method should be based on characteristics of the biological material under study, as well as the advantages and disadvantages of each available technique. In this context, the *ex situ* preservation of collections of cultures has ensured the survival, stability and purity of lines for long

periods, employing different methods of maintenance and cultures primarily available for scientific and technological communities of several countries.

**KEYWORDS:** Collections of cultures; *Ex situ* conservation; Methods of preservation.

## 1 INTRODUÇÃO

A natureza impõe em seu curso normal que materiais biológicos sigam o ciclo de degeneração e morte, desta forma, algumas características podem se alterar e se perder, com o passar do tempo. A intenção de interromper ou pelo menos retardar o relógio biológico de organismos tem sido alvo desde os tempos mais remotos, tendo alcançado hoje, um potencial significativo de estocagem de amostras biológicas a curto, médio e longo-prazo.

Nesse sentido, o incremento de protocolos mais eficientes de conservação de microrganismos poderá assegurar, de certa forma, a continuidade e expansão de pesquisas nesta área. Tal ação permite o desenvolvimento de estudos capazes de superar barreiras cronológicas e geográficas e, por conseguinte, elucidar as particularidades dos diferentes organismos.

A compreensão do papel de microrganismos no meio ambiente fornece subsídios para o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas, além de ser fundamental no estabelecimento de políticas de biossegurança, visto o caráter patogênico de muitos agentes.

A importância da manutenção e principalmente preservação de microrganismos caracteriza-se como reflexo da necessidade de utilização de organismos ou espécimes a qualquer momento, quer para fins experimentais, didáticos, industriais ou estudos comparativos. Desta forma, conhecer a melhor maneira de preservar culturas bacterianas e dispor de técnicas simples e eficientes, reveste-se de grande valia aos laboratórios de microbiologia.

Para tanto, a sobrevivência do agente não se constitui o único objetivo. Torna-se necessário considerar a viabilidade e principalmente a escolha de métodos que não promovam em maior ou menor grau a ocorrência de mutações ou variabilidades. Isto posto, com reflexo na patogenicidade, virulência ou em características básicas da cultura original, atentando-se para a conservação de microrganismos.

No que tange à estocagem, conservação e manutenção de amostras independentes da origem o que inclui células humanas, animais e vegetais, bactérias, vírus, fungos e material genético (DNA/RNA), há o propósito de diagnóstico e pesquisa, ampliando a aplicação laboratorial. Por consequência, não se aplica para a conservação de amostras biológicas uma fórmula singular, ideal ou universal que determine a eficiência de sua estocagem e preservação por longos períodos (COSTA et al., 2009).

A escolha do método de manutenção mais adequado deve ser baseada pelas características do agente em estudo, assim como pelas vantagens e desvantagens de cada técnica disponível. Para o estudo com células, tecidos e microrganismos, há o anseio pelo desenvolvimento de metodologias mais adequadas à sua conservação, porém, observa-se uma lacuna entre as publicações científicas pertinentes, verificando-se um número reduzido de estudos abordando a problemática da seleção e validação de protocolos principalmente na manutenção de bactérias, bem como na avaliação dos desafios e perspectivas da colheita, processamento, estocagem e manutenção de amostras microbiológicas.

Diante disso, propõe-se com esta revisão, a exposição dos princípios que norteiam o processo de estocagem e manutenção de material microbiológico, tomando como base estudos disponíveis na literatura científica.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Os processos de isolamento, identificação, conservação e a utilização de microrganismos vem sendo considerados como rotina para o desenvolvimento de pesquisas e obtenção de produtos de interesse econômico (ABREU & TUTUNJI, 2004).

No âmbito da ciência, a implantação e manutenção de coleções de culturas permitem a formação de estoques de cepas que podem ser utilizadas experimentalmente em diferentes momentos (GIRÃO et al., 2004).

De acordo com OPLUSTIL (2004), estudos com finalidade clínica, epidemiológica ou científica necessitam a qualquer tempo de cepas de microrganismos para exames complementares e essa demanda faz com que exista a necessidade de se manter a viabilidade dos mesmos por períodos variáveis.

O alvo de qualquer método de manutenção é preservar a viabilidade e principalmente proporcionar estabilidade genética do microrganismo ao isolamento, pelo maior tempo possível, evitando assim a formação excessiva de mutações que alterem suas características. Além disso, procura-se adequar a escolha de uma técnica de conservação baseando-se nas particularidades do agente, nas características do próprio método a ser aplicado, nos custos de manutenção da técnica, da importância do acervo e principalmente na capacidade laboratorial e disponibilidade de equipamentos (ABREU & TUTUNJI, 2004; GIRÃO et al., 2004).

Considerando as exigências dos microrganismos e o manuseio em laboratórios, a manutenção de estirpes podem ocorrer em curtos períodos (dias ou meses), onde as culturas bacterianas podem ser mantidas a temperaturas relativamente baixas (4-10°C). Contudo, se a conservação prolongada apresenta-se como opção mais viável, deve-se optar pelo armazenamento em temperaturas ultra baixas como a criopreservação em freezers a -80°C, em nitrogênio líquido a -196°C ou o processo de liofilização que consiste no congelamento e desidratação das células bacterianas, em atmosfera de vácuo (COSTA & FERREIRA, 1991; CEFAR, 2006; COSTA et al., 2009).

Diante da necessidade de preservação de microrganismos, muitas vezes, busca-se conservar um agente que foi selecionado e melhorado com intuito de manter sua nova identidade. Ainda assim, o objetivo da manutenção de um microrganismo não é somente conservar seu estado inicial evitando mutações indesejáveis, mas também garantir ao máximo a vitalidade das células e a quantidade de células viáveis (PAOLI, 2005; OKAFOR, 2007).

Segundo COSTA & FERREIRA (1991), os métodos de manutenção de microrganismos podem ser classificados de acordo com tempo máximo de preservação:

- Métodos de curto prazo: repique contínuo;
- Métodos de médio prazo: preservação em óleo mineral, preservação em água esterilizada, congelamento a -20°C;
- Métodos de longo prazo: liofilização, criopreservação.

Todos estes métodos permitem a elaboração de estudos retrospectivos e prospectivos, elucidando o estado biológico, etiologia e aspectos epidemiológicos. Entretanto, a escolha adequada de procedimentos de preservação, incluindo a aplicação de um ou a combinação de mais métodos, permite uma análise fenotípica e genotípica mais satisfatória, quando se pensa na conservação de microrganismos a longo prazo (GIRÃO et al., 2004).

Diversos protocolos de estocagem têm sido desenvolvidos e aplicados, porém, a maioria não tem se mostrado plenamente eficaz, visto as peculiaridades de cada agente a ser conservado e até mesmo pelas características das técnicas, por isso, vem se justificando a conjunção de dois ou mais protocolos a fim de se garantir a melhor recuperação dos microrganismos (GREEN, 2008; COSTA et al., 2009).

As descrições de BOZIARIS & ADAMS (2001) e VIEIRA et al. (2007), revelaram que as bactérias, em específico, na tentativa de sobrevivência mediante a utilização de métodos de conservação nos alimentos, são capazes de produzir mecanismos de respostas, como proteínas especializadas para resistência térmica (*heat-proteins*), mudanças estruturais da membrana com alteração na saturação de ácidos graxos visando à proteção contra baixas temperaturas e reparo de material genético, demonstrando a capacidade de recuperação de células injuriadas, quando em ambiente favorável, após um curto período de tempo.

Considerando o emprego de métodos de conservação sobre alimentos, os microrganismos podem estar presentes em uma amostra sob três estados: inviabilizados (apresentando injúria letal e impossibilidade de multiplicação), com injúria subletal (apesar de ter sofrido danos em suas estruturas celulares, encontra-se hábil para multiplicação sob condições favoráveis) e viáveis (COSTA & FERREIRA, 1991; BAATI et al., 2000; VIEIRA et al., 2007). Desta forma, a capacidade de recuperação de microrganismos viáveis norteia a eleição do método de manutenção.

## **2.1 MÉTODO DE MANUTENÇÃO A CURTO PRAZO**

### **2.1.1 Repicagem contínua ou periódica**

A técnica de repique contínuo, também chamado de subcultivo ou repicagem periódica, é um método simples e tradicional de manutenção de culturas em laboratório. Por ser uma das mais antigas técnicas de conservação, tem sido bastante utilizada para se obter a viabilidade de microrganismos, principalmente de bactérias (COSTA & FERREIRA, 1991; ROMEIRO, 2006).

O método consiste na inoculação do microrganismo em meio adequado, incubação em ambiente favorável à multiplicação e estocagem em baixas temperaturas, após sua multiplicação. Nesta situação, é aconselhável o armazenamento de culturas sob refrigeração (5 a 8°C), em busca da redução do metabolismo dos microrganismos e o aumento entre os intervalos de repiques das culturas, proporcionando a conservação de leveduras em média de um a três meses e de bactérias em torno de cinco a doze meses (COSTA & FERREIRA, 1991; GREEN, 2008).

Apesar de alguns autores preconizarem o armazenamento das culturas sob refrigeração, COSTA & FERREIRA (1991) relataram a possibilidade de incubação em temperatura ambiente, alertando a necessidade de monitoração, a fim de evitar a desidratação do meio de cultura e a consequente privação de elementos essenciais aos microrganismos.

BARKER (2002) e ROMEIRO (2006) mencionaram que a repetição do processo para novos meios deve ser realizada em intervalos de tempo condizentes com as necessidades e particularidades de cada microrganismo, avaliando-se as condições ótimas e período máximo de sobrevivência entre as diferentes cepas. Entretanto, é aconselhável que a transferência de culturas seja realizada antes que o substrato do meio seja totalmente utilizado pelos microrganismos, ou então se desidrate. PASSADOR et al. (2010) sugerem que os métodos de repicagens

periódicas para fungos devem ser realizados em intervalos de três ou quatro meses, a fim de evitar o consumo total do substrato do meio de cultura e se evite o acúmulo excessivo de metabólitos fúngicos, já que estes se comportam como agentes mutagênicos.

MURRAY (2003) sugeriu que para minimizar o efeito da desidratação, os isolados devem ser conservados em tubos de ensaio com tampa rosqueável ou selados com parafina, em ambientes protegidos da luz e de variações de temperatura, mantendo preferencialmente uma faixa entre 5 e 8°C.

COSTA & FERREIRA (1991) descreveram que este método clássico, apresenta como vantagens a facilidade e o baixo custo, por não provocar estresse ou injúria celular e não necessitar de reativação dos microrganismos. Entretanto, apresenta maior risco de contaminação em decorrência da constante manipulação das culturas devido aos repiques contínuos e periódicos; perdas de características genéticas decorrentes de mutações; necessidade de maior espaço físico para armazenamento das culturas; logística inconveniente quanto à postagem; variabilidade entre as cepas e conseqüentemente entre os intervalos de repiques para cada microrganismo armazenado (ROMEIRO, 2006).

A idade das culturas e, principalmente, a frequência de repicagens devem ser avaliadas para o emprego deste método de manutenção, pois, as culturas mais velhas acabam por gerar culturas-filhas modificadas, levando-se em consideração a ocorrência de alterações tanto de caráter morfológico quanto fisiológico. Ainda assim, apesar do risco de comprometimento da estabilidade genética, a manutenção por repicagens periódicas traz consigo outro problema considerável, como a perda da patogenicidade ou virulência de algumas bactérias, daí a necessidade de verificação periódica das características de cada isolado (COSTA & FERREIRA, 1991; ROMEIRO, 2006).

COSTA et al. (2009) descreveram que a composição do meio de cultura pode interferir na resistência das células, no entanto, existem dois conceitos que se opõem sobre qual a composição ideal de meio de cultivo na manutenção de microrganismos: meios com boa composição de nutrientes ou meios menos elaborados, do ponto de vista nutricional.

Considerando a manutenção de bolores e leveduras, os meios devem conter baixa concentração de açúcares fermentadores para evitar o crescimento micelial exagerado e prevenir alterações. Neste caso, procura-se utilizar meios que propiciem o mínimo de crescimento micelial acompanhado do máximo desenvolvimento das frutificações ou estruturas de propagação e resistência. Quanto à manutenção de fungos esporulantes, preconiza-se a utilização de esporos e não de micélios durante a repicagem, visto que os esporos tendem a manter as características genéticas originais durante o processo de estocagem (PIMENTEL & FIGUEIREDO, 1989; PEREIRA et al., 2008; PASSADOR et al., 2010).

## **2.2 MÉTODOS DE MANUTENÇÃO A MÉDIO PRAZO**

### **2.2.1 Manutenção em óleo mineral**

Este método de conservação é uma alternativa simples que consiste na aplicação de uma camada de óleo mineral esterilizado sobre uma cultura, a fim de limitar a quantidade de oxigênio disponível, causando assim uma redução no metabolismo e conseqüentemente na taxa de multiplicação do agente (RHODES, 1957; COSTA & FERREIRA, 1991; ROMEIRO, 2006).

CANHOS et al. (2004) e COSTA et al. (2009) afirmaram que esta técnica proporciona uma maior longevidade às estirpes, quando comparada à repicagem periódica, bem como redução da velocidade de desidratação do meio de cultura, em consequência da diminuição de oxigênio. Diversas bactérias e fungos podem ser conservados por esta técnica, sendo armazenados com sucesso por dois a três anos, visto a redução na atividade metabólica e nas transferências para outros meios de cultura. Entretanto, comparando com outros métodos, apresenta desvantagens equivalentes à técnica de subcultivo, como a possibilidade de contaminações, instabilidade genética e dificuldades com a utilização do óleo (esterilização e manuseio).

A manutenção de microrganismos submersos em óleo mineral promove a redução do consumo de oxigênio em torno de 10% em poucas horas. COSTA & FERREIRA (1991) e ROMEIRO (2006) afirmaram que camadas de óleo superiores a 1 cm não devem ser utilizadas, mediante a redução da viabilidade dos microrganismos em condições de total exaustão de oxigênio. Caso a conservação de culturas seja feita em tubo inclinado, o óleo deve ser adicionado até que todo o meio esteja recoberto, pois o contato dos microrganismos com o ar promove desidratação total da cultura pela evaporação da água.

Considerando o sucesso na manutenção de microrganismos, verifica-se que os óleos utilizados nesta técnica devem ser de boa qualidade e pureza, apresentar alta viscosidade, densidade relativa entre 0,8 e 0,9 à temperatura de 20°C e, além disso, não devem conter produtos tóxicos, sendo a parafina e a vaselina, os mais recomendados para a manutenção de microrganismos em curto prazo (BARKER, 2002; ROMEIRO, 2006).

Outra preocupação quanto à qualidade dos óleos utilizados neste método se recorre ao processo de esterilização. CEFAR (2006) sugere que para a esterilização destes produtos, a autoclavagem não é a técnica ideal, preconizando-se o aquecimento por meio de um forno a 170°C por uma a duas horas. Pesquisas afirmam que neste procedimento, deve-se evitar a formação de umidade a fim de se eliminar riscos de contaminação e se ter um controle de temperatura, pois sua elevação pode resultar na formação de produtos tóxicos aos microrganismos em estoque. GUERNA (1981) relatou a existência de dois procedimentos possíveis para a esterilização do óleo mineral: autoclavagem a 1 atm por 30 minutos seguida de secagem a 150°C, ou aquecimento à 170°C por uma hora. Alternativamente LELLIOT & STEAD (1987) recomendaram autoclavagem a 121°C e 15lb de pressão por 15 minutos, seguida de permanência em estufa a 100°C por uma noite para remoção de água.

ROMEIRO (2006) observou que inicialmente, o cultivo dos microrganismos deve ser em meio inclinado, respeitando-se o tempo de incubação de 18 a 24 horas, sob temperatura de 25 a 28°C. Após a observação de multiplicação bacteriana no meio de cultivo, deve-se realizar a adição do óleo de forma asséptica, limitando uma altura de um a dois cm acima do ponto mais alto do meio inclinado. Relata também que a temperatura de conservação do meio após adição do óleo pode variar entre 4°C e 20°C, sofrendo ajustes mediante as necessidades individuais de cada agente.

No tocante, ROMEIRO (2006) afirma ainda que a recuperação dos microrganismos mantidos sob conservação em óleo mineral baseia-se apenas na transferência das culturas para outro meio sólido ou líquido. Entretanto, PEREIRA et al. (2008) e PASSADOR et al. (2010) preconizam que na transferência de culturas preservadas por este método, seja utilizado o mesmo meio de cultivo utilizado

durante a manutenção e sugerem que a retirada dos microrganismos deve ser precedida pela drenagem total da camada de óleo.

Neste contexto, observa-se que a alternativa de preservação de microrganismos em óleo mineral possui as mesmas vantagens que o repique contínuo, diferindo somente na longevidade da cultura, que se apresenta por maiores intervalos. Pesquisadores relatam que as bactérias podem ser conservadas por períodos de um a sete anos dependendo da espécie, enquanto fungos sobrevivem por um a cinco anos, e leveduras até sete anos (COSTA & FERREIRA, 1991; ABREU & TUTUNJI, 2004; COSTA et al., 2009).

### **2.2.2 Manutenção em água esterilizada**

A preservação em água destilada esterilizada ou também conhecida pelo método de Castellani consiste no armazenamento de microrganismos em água esterilizada ou solução salina, sendo indicada na preservação de microrganismos sensíveis a baixas pressões osmóticas de soluções hipotônicas (PIMENTEL & FIGUEIREDO, 1989; COSTA & FERREIRA, 1991; NEUFELD & OLIVEIRA, 2008).

Esta técnica deve ser utilizada preferencialmente com culturas jovens, com cerca de 10 a 15 dias, e busca redução do metabolismo, com consequente latência das células diante da restrição de fontes nutritivas (COSTA & FERREIRA, 1991; ABREU & TUTUNJI, 2004).

O método se baseia na transferência de culturas para frascos contendo uma solução de água esterilizada, com posterior armazenamento sob temperatura ambiente. PIMENTEL & FIGUEIREDO (1989), COSTA & FERREIRA (1991) e ROMEIRO (2006) sugerem a utilização de suspensões bem concentradas de células, a partir de um crescimento em meio sólido ou a inclusão de blocos de ágar contendo os microrganismos.

Apesar do baixo custo e reprodutibilidade, nota-se os riscos de contaminação das culturas e um possível comprometimento na estabilidade genética de alguns microrganismos. Quanto à utilização dos blocos de ágar em água, sua aplicação é restrita a microrganismos que tenham grande aderência ao ágar como bolores e algumas leveduras (COSTA & FERREIRA, 1991; ROMEIRO, 2006).

De uma forma geral, a utilização de água destilada esterilizada como meio de manutenção tem sido proposto com sucesso para bactérias fitopatógenas, esporos do gênero *Bacillus* e vírus da hepatite (APARECIDO et al., 2001; NEUFELD & OLIVEIRA, 2008; PASSADOR et al. 2010).

Considerando bolores e leveduras, resultados satisfatórios têm sido obtidos no que se refere à viabilidade, estabilidade, pureza e patogenicidade. APARECIDO et al. (2001) afirmaram que este método além de garantir a preservação das características originais da cultura por longos períodos, promove a ausência de contaminação por ácaros, apresenta baixo custo por utilizar somente água destilada e revela a necessidade de pequeno espaço físico para acondicionar os frascos, além de ser empregado para um grande número de gêneros e espécies de fungos.

NEUFELD & OLIVEIRA (2008) também observaram eficiência na aplicação desta técnica, ao avaliarem a manutenção de 15 cepas de dermatófitos por um longo período. Após 11 anos de conservação destes espécimes, observaram que 93,3% (14 cepas) foram avaliadas como viáveis e sem alterações morfológicas, demonstrando assim, a efetividade deste método de conservação sob água destilada esterilizada na manutenção de cepas de dermatófitos por longos períodos de tempo.

### 2.2.3 Congelamento comum

O congelamento comum se baseia 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 microrganismos por períodos de três meses a dois anos, devido a uma redução significativa no metabolismo celular (COSTA & FERREIRA, 1991; CEFAR, 2006; TORTORA et al., 2012).

Trata-se de um método simples, menos oneroso, não requer equipamentos sofisticados, nem mesmo no preparo do material. Como desvantagem, verifica-se possível redução da viabilidade de alguns microrganismos, em função dos danos causados às células em decorrência da formação de cristais de gelo e da variação eletrolítica na faixa de temperatura utilizada (ROMEIRO, 2006; VIEIRA et al., 2007; MEDEIROS, 2008).

SILVA et al. (2008) buscando avaliar a viabilidade dos microrganismos presentes em uma coleção de cultura, semearam um total de 328 leveduras dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rodothorulla* em caldo cérebro-coração contendo glicerol, mantendo-as sob refrigeração por sete dias e posterior congelamento a -20°C, sob três diferentes períodos de tempo. Após três anos de congelamento, observaram recuperação de 99,0% das leveduras (72 viáveis/73 microrganismos congelados). No segundo período (três anos e seis meses) observaram a viabilidade de 100% das cepas congeladas (96 leveduras congeladas e viáveis após o descongelamento). No último grupo, após o congelamento de 159 leveduras por quatro anos, notaram uma redução da viabilidade das culturas com 90,6% de recuperação (144 leveduras). Diante dos resultados, observaram que o emprego de baixas temperaturas foi vantajoso por seu baixo custo, fácil execução, além de ter favorecido a conservação de quase totalidade das leveduras por 48 meses.

## 2.3 MÉTODOS DE MANUTENÇÃO A LONGO PRAZO

### 2.3.1 Liofilização

A técnica de liofilização caracteriza-se na conservação de microrganismos por meio da dessecação rápida de culturas que se encontravam em estado de congelamento. A remoção do vapor de água presente em amostras biológicas viáveis em estado de congelamento apresenta-se como alternativa capaz de retardar o relógio biológico estabelecido pela natureza. Desta forma, a liofilização e a criopreservação são as técnicas mais empregadas na conservação da biodiversidade microbiana, sendo uma das chaves para a realização dos serviços de coleção de culturas microbiológicas (DAY & MCLELLAN, 1995; MYAMOTO-SHINOHARA et al., 2000; PAOLI, 2005; COSTA et al., 2009).

A liofilização é considerada uma das técnicas mais eficientes para a manutenção de microrganismos, justamente por garantir a viabilidade dos agentes por 17 a 20 anos e ser aplicável para a maioria deles, com exceção de algas e protozoários (COSTA & FERREIRA, 1991; CANHOS et al., 2004; PASSADOR et al., 2010).

Uma grande variedade de coleções de culturas depende deste processo para garantir e preservar a diversidade de seus espécimes, por isso, tem sido utilizada como método de referência para a preservação a longo prazo (ABREU & TUNTUNJI, 2004; COSTA et al., 2009).



A técnica se baseia na remoção da água intracelular de materiais biológicos congelados, por sublimação, evitando a formação de cristais de gelo, capazes de provocar danos às estruturas celulares, além da degradação de enzimas presentes no citosol, levando a morte dos agentes (COSTA & FERREIRA, 1991; MORGAN et al., 2006).

Basicamente, a liofilização pode ser definida como um processo de desidratação sob condições de vácuo, constituído por três etapas: congelamento, desidratação primária e desidratação secundária. O congelamento promove a inércia do material a ser liofilizado, gerando uma interrupção das reações químicas e atividades biológicas, sendo por isso uma das fases mais críticas. Posteriormente, a amostra biológica sofre desidratação por meio de sublimação, seguindo-se com o emprego de temperaturas de secagem, sob pressões reduzidas (PAOLI, 2005; COSTA et al., 2009).

Apesar da liofilização ser amplamente empregada na manutenção de diferentes microrganismos e ser considerada uma técnica de conservação a longo prazo, as etapas que compõem o processo são capazes de causar injúrias ou danos celulares como alterações na permeabilidade da membrana celular, o que leva ao aumento da sensibilidade a alguns agentes seletivos, aumento da fase lag de multiplicação celular e a necessidade de incremento nutricional (CUNHA et al., 1998; CANHOS et al., 2004; MORGAN et al., 2006).

Na tentativa de contornar os danos celulares, substâncias protetoras podem ser adicionadas durante o desenvolvimento de microrganismos, antes do congelamento ou da secagem. Vale destacar que a escolha destas substâncias varia com o microrganismo alvo da liofilização, porém compostos como o soro bovino, leite desnatado, glicerol, betaína, adonitol, sacarose, glicose, lactose, trealose e alguns polímeros como dextran e polietilenoglicol podem oferecer proteção para muitas espécies (HUBÁLEK, 2003; PAOLI, 2005; COSTA et al., 2009).

Os procedimentos de estocagem e acondicionamento influenciam significativamente na vida de prateleira dos materiais liofilizados. Desta forma, os produtos liofilizados, armazenados em ampolas ou frascos de vidro, devem ser acondicionados em ambientes com baixa umidade, baixas temperaturas, abrigo de oxigênio, luz e contaminantes (DAY & MCLELLAN., 1995; MORGAN et al., 2006).

Considerando a manutenção de bactérias, verifica-se que a viabilidade relativa após a liofilização decresce entre as bactérias formadoras de esporos, Gram positivas e Gram negativas, algas e alguns protozoários, fato facilmente explicado pelas diferenças na morfologia. MIYAMOTO-SHINOHARA (2008) ao avaliarem a taxa de sobrevivência das bactérias Gram positivas imediatamente após a execução da liofilização, verificaram maiores índices, quando comparado às Gram negativas, sob as mesmas condições, sugerindo desta forma maior resistência à desidratação pelas Gram positivas, provavelmente pela sua estrutura celular diferenciada. Quanto à avaliação durante o período de estocagem, observaram também que a taxa de sobrevivência de algumas espécies se mantém fixa com o passar do tempo, enquanto a de outras espécies apresentam um declínio durante os primeiros cinco anos, tendendo a estabilizar por volta dos 15 anos.

Com relação aos vírus, UHLENHAUT et al. (2005) detectaram uma considerável infectividade em modelos experimentais de liofilizados tanto entre vírus envelopados quanto não envelopados. Quanto aos fungos, grande parte das coleções de culturas utilizam a liofilização como método de conservação de microrganismos, justamente por atingirem uma manutenção de viabilidade de

algumas espécies por períodos de 17 a 21 anos. Contudo, fungos não esporulados ou que possuem esporos excessivamente delicados não suportam o processo de liofilização, sendo necessário o emprego de técnicas menos impactantes (COSTA et al., 2009).

MIYAMOTO-SHINOHARA et al. (2000) avaliaram por 10 anos as taxas de sobrevivência de 10 espécies de microrganismos após liofilização e preservação sob vácuo a 5°C. Observaram que imediatamente após a liofilização, os índices de sobrevivência variaram entre as leveduras, bactérias Gram positivas e Gram negativas.

A taxa de sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foi cerca de 10% imediatamente após a liofilização, além disso, os índices de sobrevivência não diminuíram muito durante o período de armazenamento de 10 anos. As bactérias Gram positivas apresentaram maiores índices de sobrevivência que as Gram negativas, onde as espécies *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium glutamicum* e *Streptococcus mutans*, revelaram em torno de 80% de sobrevivência, após o processo de desidratação. As espécies *Brevibacterium* e *Corynebacterium* não reduziram a taxa de sobrevivência durante o período de armazenamento, enquanto *S. mutans* diminuiu para cerca de 20% após 10 anos. Quanto às bactérias Gram negativas, a sobrevivência de *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens* e *Alcaligenes faecalis*, foi cerca de 50%, onde a redução ocorreu nos primeiros cinco anos e posteriormente se estabilizou em cerca de 10% (MIYAMOTO-SHINOHARA et al., 2000).

Posteriormente, MIYAMOTO-SHINOHARA et al. (2006) avaliaram a sobrevivência de uma variedade de espécies de microrganismos liofilizados, submetidos à estocagem por períodos superiores a 20 anos. Os diferentes agentes foram submetidos à liofilização, selagem a vácuo em ampolas e estocagem em ambiente escuro a 5°C.

Dentre as espécies avaliadas, pelos autores supra mencionados, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, após recuperação da desidratação, apresentou apenas 8% de sobrevivência. Quando avaliada posteriormente, apresentou os melhores índices dentre todos os microrganismos testados, alcançando uma taxa de sobrevivência de 97,7% por ano. Quanto às bactérias Gram negativas, na avaliação feita após a liofilização, as espécies *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* e *Enterobacter cloacae*, apresentaram sobrevivência de 42,6%, 33,5% e 50,8%, respectivamente, revelando índices maiores que o observado para a *S. cerevisiae*, contudo a perda subsequente a estocagem foi superior a encontrada na *S. cerevisiae*, com taxas de sobrevivência anual correspondendo a 91%, 87,5% e 84,5%.

Os mesmos autores observaram que entre as bactérias Gram positivas avaliadas, as espécies *Lactobacillus acidophilus* e *Enterococcus faecium*, apresentaram sobrevivência pós-liofilização de respectivamente 62,5% e 85,2%. A avaliação subsequente constatou para ambas as espécies, um índice anual de 96% de sobrevivência durante a estocagem, valores estes superiores aos encontrados entre bactérias Gram negativas. Ainda, como conclusão do estudo, destacaram que a sobrevivência das espécies pode ser atribuída ao alto nível de dessecação e da vedação das ampolas, sob condições de vácuo.

Considerando a ampla utilização da técnica na manutenção de microrganismos, verifica-se que o método oferece alta estabilidade do material a ser conservado, baixa taxa de mutação e contaminação; não requer monitoramento nem

manutenção frequente, além de ocupar pouco espaço no armazenamento. Quanto ao transporte de culturas de referência ou até mesmo materiais de rotina, o liofilizado pode ser transportado a longas distâncias em temperatura ambiente, não havendo necessidade de refrigeração. Como desvantagem verifica-se a necessidade de equipamentos onerosos para a desidratação do material, além dos custos com o preparo das culturas (MORGAN et al., 2006, ZAMORA et al., 2006; MIYAMOTO-SHINOHARA et al., 2008).

### **2.3.2 Criopreservação**

A criopreservação consiste na manutenção de uma variedade de tipos celulares sob baixas temperaturas, tendo como principal objetivo a redução de injúrias aos materiais biológicos, incluindo células animais e vegetais, bactérias, fungos, vírus e tecidos, durante o processo de congelamento e estocagem a frio (WOLFE & BRYANT, 2001; COSTA et al., 2009).

Este método compreende a manutenção de materiais a baixas temperaturas (-20°C a -80°C em freezers) e ultra baixas temperaturas (-150°C a -196 °C em containeres de nitrogênio líquido). No que tange a conservação dos microrganismos, a estocagem a baixas temperaturas, apesar de eficiente, pode comprometer a qualidade das amostras armazenadas, visto a possibilidade de variações de temperatura em freezers. Já os sistemas de nitrogênio líquido garantem o armazenamento a temperaturas constantes e por longos períodos (SU et al., 1996; WOLFE & BRYANT, 2001; PAOLI, 2005).

Embora a eficiência da conservação em temperaturas ultra baixas seja garantida, VYSEKANTSEV et al., (2005) sugeriram que, alterações cíclicas da temperatura de -196°C até -130°C ou -100°C resultam na morte dos microrganismos armazenados, ressaltando desta forma, o cuidado ante a movimentação e transporte de exemplares criopreservados.

DUMONT et al., (2004) e COSTA et al., (2009) relataram que apesar da existência de diversas técnicas de manutenção de microrganismos, o princípio do congelamento-descongelamento se manteve entre os mais importantes e viáveis para a preservação celular.

Considerando as altas taxa de sobrevivência de microrganismos que a criopreservação proporciona, pesquisadores buscam aprimorar a técnica quanto a sua utilização, principalmente pelo aspecto prático, visto a recuperação e obtenção de células viáveis, mas também na redução de possíveis mutações genéticas. Entretanto, faz-se necessário frisar que os protocolos de criopreservação necessitam de adequação metodológica acessível e aplicável para a diversidade de microrganismos existentes (PAOLI, 2005; COSTA et al., 2009).

Diante da importância do método e sua aplicação na conservação de materiais biológicos, é necessário destacar que a criopreservação de microrganismos é dependente de uma série de fatores como a espécie a qual se pretende preservar, suas particularidades como tamanho e estrutura celular, a fase e taxa de desenvolvimento, exigências como temperatura de incubação, composição dos meios de cultivo, pH, osmolaridade, tolerância ao oxigênio, teor de água das células, teor lipídico, composição do meio para congelamento, temperatura e tempo de estocagem, e condições para recuperação das culturas (DAY & MCLELLAN, 1995; COSTA et al., 2009).

Outro parâmetro interferente e de grande relevância na criopreservação é a taxa de resfriamento. Quando os materiais biológicos a serem conservados são submetidos ao resfriamento lento, ocorre uma redução gradativa da temperatura,

porém se estabelece uma curva de resfriamento extremamente rápida capaz de prevenir as injúrias celulares, e ao mesmo tempo lenta, o suficiente para permitir um nível de desidratação capaz de evitar a formação de gelo intracelular. A vitrificação compreende a utilização de taxas de resfriamento extremamente altas, porém a adição de crioprotetores em altas concentrações promove a redução de água antes do resfriamento, impedindo assim a formação de cristais de gelo e os consequentes danos estruturais (COSTA et al., 2009; SPUTTEKA & ROWEB, 2011).

Durante o processo de congelamento, o desafio das células não se caracteriza na resistência sob temperatura de armazenamento de  $-196^{\circ}\text{C}$ , mas sim na capacidade de suportar as possíveis alterações decorrentes pela passagem pelas faixas intermediárias de temperatura ( $+19^{\circ}\text{C}$  a  $+8^{\circ}\text{C}$  e  $-15^{\circ}\text{C}$  a  $-60^{\circ}\text{C}$ ), tanto durante o congelamento quanto no descongelamento (MAZUR, 1984; COSTA & FERREIRA, 1991; OLIVEIRA, 2007).

A metodologia padrão para a criopreservação tem início na refrigeração do material biológico, mantendo-o a temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$ . Nesta etapa, não se evidencia danos às estruturas celulares, desde que as amostras estejam diluídas em meios adequados (OLIVEIRA, 2007; COSTA et al., 2009). Com a redução da temperatura, pode ser determinada uma faixa crítica, entre  $+19$  e  $+8^{\circ}\text{C}$ , na qual os microrganismos poderão sofrer algum tipo de injúria celular. Quando este resfriamento é realizado de uma forma inadequada, o fenômeno determinado como choque térmico provoca danos irreversíveis como alterações na membrana plasmática com consequente aumento da permeabilidade e perda de íons e moléculas intracelulares, além da redução do metabolismo (WATSON, 2000).

Quando o processo de redução de temperatura atinge a faixa de  $-6^{\circ}\text{C}$  a  $-15^{\circ}\text{C}$ , verifica-se a cristalização da água presente no meio, o aumento da concentração de soluto na fração descongelada e a ausência de formação de cristais de gelo intracelular pelo controle da membrana plasmática. Quando o material atinge a temperatura crítica de  $-60^{\circ}\text{C}$  verifica-se a inércia celular, sendo possível realizar a imersão do material em nitrogênio líquido, para seu armazenamento e conservação (WATSON, 2000; OLIVEIRA, 2007).

Diante da forte influência que a taxa de resfriamento exerce sobre a viabilidade celular, DUMONT et al., (2004) verificaram em seu estudo a viabilidade de cinco tipos celulares (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* e uma célula humana da linhagem leucocitária K562) frente a diferentes taxas de resfriamento, durante a criopreservação. Classificaram a viabilidade celular em três escalas: alta viabilidade para baixas taxas de resfriamento ( $5$  a  $180^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), permitindo o efluxo do conteúdo de água celular, prevenindo a cristalização intracelular; baixa viabilidade para taxas intermediárias de resfriamento ( $180$  a  $5.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), levando a prevalência do fluxo de calor sobre o efluxo de água e a consequente cristalização (onde o fluxo de água está em direção ao meio externo); e alta viabilidade para taxas de resfriamento muito altas, onde há indução de um rápido fluxo de calor com consequente vitrificação intracelular, antes mesmo do efluxo de água.

Os referidos autores verificaram que para todos os tipos celulares investigados, a viabilidade mostrou-se maior nas taxas de resfriamento baixas e muito altas, fato este que pode ser explicado pela competição entre o fluxo de calor e o efluxo de água na célula, durante o processo de congelamento-descongelamento. Nos casos de taxas mais baixas de resfriamento, o calor latente de congelamento da água celular permitiu a saída de água e preveniu desta forma, a formação de cristais de gelo no espaço intracelular. As taxas intermediárias de

resfriamento conferiram um retardo na vitrificação intracelular, e se caracterizaram fator negativo para a viabilidade do espécime, levando a morte celular decorrente aos danos pela cristalização durante o efluxo de água pela membrana plasmática. Já nas altas taxas de resfriamento, as células foram capazes de se congelar, sem qualquer alteração no volume celular e apresentaram viabilidade considerável após descongelamento. Apesar do comportamento geral dos espécimes envolvidos, os resultados podem ser alterados por influência do tamanho da célula, presença de parede celular e permeabilidade à água (DUMONT et al., 2004).

### **2.3.2.1 Danos decorrentes do processo de criopreservação**

A criopreservação requer alguns cuidados para que seja realmente eficiente. Diversos fatores podem afetar a viabilidade e estabilidade celular, no entanto os danos celulares são decorrentes principalmente do comportamento da água sob condições de baixas temperaturas. A crioinjúria ou lesão celular causada durante os processos de congelamento e descongelamento é um processo letal relacionado à formação de extensos cristais de gelo intracelular e estes são capazes de alterar as estruturas da membrana plasmática, modificando o fluxo de água para o meio extracelular (desidratação) e ao aumento da concentração intracelular de solutos (WATSON, 2000; OLIVEIRA, 2007; CASTRO et al., 2011).

Durante o congelamento, as células estão suscetíveis à desidratação e instabilidade osmótica devido à alteração das concentrações de sais das células. Em condições normais, a solução extracelular apresenta-se em maior proporção que a intracelular, e por isso, o congelamento extracelular tende a ocorrer primeiro. Os solutos contidos no meio externo se concentram numa pequena fração de água sob estado líquido, passando a apresentar uma maior pressão osmótica, e promover o fluxo de água para fora da célula. Altas concentrações intracelulares inibem a formação de gelo, entretanto a desidratação decorrente e a elevada concentração de íons podem ocasionar danos às células (WOLFE & BRYANT, 2001; HUBÁLEK, 2003).

Diante da complexidade do processo de congelamento, verifica-se que os mecanismos de efluxo de água juntamente com a formação de longos e protuberantes cristais de gelo são os responsáveis pelos danos irreversíveis que atingem a membrana plasmática e que muitas vezes podem ocasionar a morte celular. A extensão dos danos causados pelo gelo intracelular depende do grau de formação de gelo e do tamanho dos cristais. Desta forma, algumas alternativas são muito utilizadas para minimizar estas ocorrências, como a utilização de agentes crioprotetores com vistas a prevenir a cristalização mediante a redução da atividade de água, adoção de uma taxa de congelamento uniforme (aproximadamente 1°C por minuto) e a prática de um processo de descongelamento rápido (banho-maria a 37°C) (ABREU & TUTUNJI, 2004; COSTA et al., 2009).

### **2.3.3.2 Agentes conservantes para criopreservação**

Considerando a importância da conservação de microrganismos por longos períodos, POLGE et al. (1949) na tentativa de prevenção ou até mesmo na redução dos efeitos adversos dos métodos de preservação de amostras biológicas, por uma descoberta acidental, verificaram a proteção efetiva do glicerol sobre materiais biológicos. Posteriormente, a ação protetora de outras substâncias foram descobertas e intensamente utilizadas na rotina laboratorial, como o dimetilsulfóxido (DMSO), o metanol e o etilenoglicol (BAATI et al., 2000; HUBALEK et al., 2003).

Diante da necessidade de utilização dos agentes crioprotetores, muitos estudos tem sido desenvolvidos na busca de otimizar a escolha de diferentes crioprotetores, diferentes concentrações, relação do tempo e da temperatura para sua adição durante o processo de congelamento e até mesmo quanto a possível toxicidade que estes agentes podem oferecer ao material biológico a ser conservado (DAY & MCLELLAN, 1995; COSTA et al., 2009; CASTRO et al., 2011).

Atualmente, crioprotetores como a sacarose, trealose, glicerol e dimetilsulfóxido (DMSO), vem sendo utilizados na criopreservação de microrganismos, nas concentrações de 10% a 15%, garantindo a viabilidade de agentes como *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Serratia marcescens*, *Lactobacillus* sp., *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outras bactérias (LUDLAM et al., 1989; BAATI et al., 2000). Estudos demonstram que a utilização de glicerol ou DMSO em concentrações acima de 20%, apresentam efeitos deletérios aos microrganismos devido a sua toxicidade, sendo então um obstáculo na sobrevivência das estirpes durante o congelamento (FAHY, 1986; ANDREATTI FILHO et al., 2007; FAHY, 2010; CASTRO et al., 2011).

Os crioprotetores caracterizam-se por moléculas de baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e baixa toxicidade celular, sendo classificados com relação à capacidade de penetração em materiais biológicos, como crioprotetores penetrantes (intracelulares) ou crioprotetores não penetrantes (extracelulares) (COSTA & FERREIRA, 1991; HUBÁLEK, 2003; OLIVEIRA, 2007).

Os crioprotetores não penetrantes ou extracelulares são moléculas capazes de induzir o aumento na osmolaridade do meio externo, promovendo a saída de água do meio intracelular para o meio extracelular, prevenindo desta forma, a formação de cristais de gelo intracelular durante o congelamento (HUBÁLEK, 2003; FULLER, 2004). São substâncias apropriadas para a preservação de microrganismos, visto a capacidade de recobrir a superfície celular, formando uma camada viscosa capaz de estabilizar a parede celular e membrana plasmática, minimizando e reparando os possíveis danos causados pela manutenção em baixas temperaturas. Destacam-se nesse grupo: mono, oligo e polissacarídeos, manitol, sorbitol, dextran, metilcelulose, albumina, gelatina, polivinilpirrolidona, polietilenoglicol, óxido de polietileno, entre outros (HUBÁLEK, 2003; OLIVEIRA, 2007).

Os crioprotetores penetrantes ou intracelulares atuam nas células por meio de suas propriedades coligativas, levando a redução do ponto crioscópico. Deste modo, uma maior quantidade de água permanece no estado líquido sob baixas temperaturas, levando a redução na concentração intracelular de solutos e proporcionando um ambiente menos prejudicial aos microrganismos durante o congelamento (WATSON, 2000).

Estes compostos são capazes de realizar ligações com as moléculas de água, levando a uma significativa redução na formação e no tamanho dos cristais de gelo, bem como as concentrações de soluto tanto no meio extracelular quanto no intracelular, destacando-se o etanol, o glicerol, o metanol, o etilenoglicol, o polietilenoglicol, o propilenoglicol, a acetamida, a dimetilformamida, a metilacetamida e o dimetilsulfóxido (HUBÁLEK, 2003; OLIVEIRA, 2007; COSTA et al., 2009).

Diante do emprego dos diversos agentes crioprotetores, verifica-se a ampla utilização do glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), soro sanguíneo e a soroalbumina, leite desnatado, sacarose, extrato de levedura, glicose, metanol, sorbitol, extrato de malte, dextran e o etilenoglicol (COSTA et al., 2009; CASTRO et al., 2011). Entretanto, a escolha do agente crioprotetor deve ser baseada também nos efeitos

tóxicos particulares de cada substância ou mesmo pela indução de estresse osmótico, o que aumenta a possibilidade de alteração do perfil morfológico e/ou genético dos espécimes, além do risco de morte celular (HUBÁLEK, 2003; FULLER, 2004; OLIVEIRA, 2007).

Além da classificação em crioprotetores penetrantes (intracelulares) ou não penetrantes (extracelulares), estas substâncias podem ser diferenciadas pela sua viscosidade. Crioprotetores de alta viscosidade, como o propilenoglicol e os sacarídeos, atuam principalmente em processos onde são aplicadas rápidas taxas de resfriamento como na conservação de espermatozóides, eritrócitos e bactérias. Já os crioprotetores de baixa viscosidade, como o dimetilsulfóxido (DMSO) e o metanol, proporcionam uma proteção inferior, justamente por não provocarem mudanças estruturais no material biológico durante os processos de congelamento com taxas rápidas de resfriamento (MORRIS et al., 2006; COSTA et al., 2009).

Considerando as particularidades dos microrganismos, do método de manutenção e dos crioprotetores, ANDREATTI FILHO et al. (2007) propuseram avaliar a capacidade de proteção da microbiota cecal cultivada em aerobiose, congelada em nitrogênio líquido e associada à crioprotetores como o glicerol, DMSO, sacarose e trealose sob pintos de corte desafiados experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis. Os pintos de corte de um dia foram tratados com microbiota cecal cultivada em aerobiose, sob tempos de congelamento diferenciados (90, 200, 290 e 360 dias) e em conjunto com os crioprotetores usuais. Posteriormente, os animais foram desafiados com as cepas de *Salmonella sp* e os autores puderam determinar a eficácia ou não dos tratamentos empregados, verificando a quantidade de microrganismos viáveis presente na microbiota. No tempo zero (antes do congelamento), os tratamentos com crioprotetores e o grupo controle não diferiram entre si, pois todas as aves apresentaram *Salmonella sp* (100%). A proporção de microrganismos viáveis foi maior aos 90 dias quando os microrganismos foram congelados com sacarose (10,58 Log<sub>10</sub> UFC/ml) e menor quando tratados com glicerol (7,73 Log<sub>10</sub> UFC/ml).

ANDREATTI FILHO et al., (2007) contabilizando 200 dias de congelamento, constataram que as maiores contagens de UFC foram provenientes dos tratamentos com sacarose e no grupo controle, seguidos pelo DMSO. Aos 290 dias de congelamento, a menor quantidade de microrganismos viáveis foi no tratamento com glicerol enquanto os maiores índices foram com sacarose e no grupo controle. Já nos 360 dias de congelamento, a menor contagem foi ao tratamento com sacarose e a maior utilizando o glicerol.

Apesar dos resultados, foi possível concluir no estudo que o efeito benéfico esperado dos crioprotetores não foi tão significativo, pois a microbiota cecal conservada com ou sem crioprotetores, manteve-se adequada, garantindo efetividade mesmo até 360 dias de congelamento. Além da viabilidade do agente, verificou-se uma redução no número de aves infectadas e conseqüentemente a colonização cecal por *S. enterica* ser. Enteritidis.

Neste contexto, cabe ressaltar que os crioprotetores em altas concentrações são tóxicos para as células, resultando em baixas taxas de sobrevivência, e parte dessa toxicidade é decorrente de alterações na composição bioquímica das membranas e pelo estresse osmótico (HUBÁLEK, 2003; CASTRO, 2011).

## 2. 4 COLEÇÕES DE MICRORGANISMOS (*EX SITU*)

Diante da diversidade biológica que o planeta possui e a busca pelo desenvolvimento tecnológico e científico em que muitos países se encontram, os Núcleos ou Serviços de Coleções de Culturas tornaram-se responsáveis por um amplo trabalho em microbiologia, sendo responsáveis na colheita, manutenção e distribuição de microrganismos vivos e sem variações genéticas (cepas de referência), atendendo assim as requisições para diversos fins, incluindo atividades de ensino e pesquisa, controle de qualidade e biotecnologia (HOLLAND et al., 2003; ABREU & TUTUNJI, 2004 ).

Atualmente existem vários centros de coleções de culturas, podendo citar os núcleos com relevância mundial como a ATCC (American Type Culture Collection), de Manyland, nos EUA; a DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) na Alemanha; o IMI (International Mycological Institute), com sede na Inglaterra; o CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures), em Baar-Delft, Holanda; o IFO (Institute For Fermentation), em Osaka, Japão; o JCM (Japan Collection of Microorganisms), em Wako, Japão e a MUCL (Mycotheque De L.Universite Catholique de Luvain), localizada em Luvain-le-Neuve, Bélgica (CAVALCANTI, 2010).

A World Federation for Culture Collections (WFCC) e a European Culture Collection Organization (ECCO), atuam como fóruns de discussão, agrupando uma massa crítica de coleções e usuários a fim de facilitar o progresso da conservação genética *ex situ*. O WFCC reúne em torno de 700 sócios, pertencentes a 62 países e conta com aproximadamente 470 coleções registradas no World Data Center for Microorganisms (WDCM). Das coleções cadastradas no WDCM estima-se a manutenção de mais de um milhão de cepas, onde 44% são fungos, 43% bactérias, 2% vírus, 1% células vivas e 10% espécimes como plasmídeos, plantas, células animais e algas (ABREU & TUTUNJI, 2004; COSTA et al., 2009).

No Brasil, o último levantamento nacional identificou a existência de 43 núcleos de pesquisa registrados no Centro Mundial de Dados de Microrganismos (WDCM), porém apenas 16 prestavam serviço para usuários de outras instituições. Nas 80 coleções que os núcleos abrigam, estão armazenados acervos de microrganismos associados a enfermidades em humanos, animais e plantas, destacando a Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo/SP; a Coleção de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello – Campinas/SP; Coleção de Culturas IBSBF do Instituto Biológico- Campinas/SP; Coleção de Culturas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)- Rio de Janeiro/RJ; o Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), localizado no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro; o Hospital de Medicina Tropical de São Paulo; a Universidade Federal de Pernambuco e o Centro Especializado em Micologia Médica, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (CEMM) (ABREU & TUTUNJI, 2004; CANHOS et al., 2004).

Diante da imensa diversidade genética entre os microrganismos e a necessidade de conservação destes recursos, verifica-se a importância da intercomunicação entre os núcleos de coleções de culturas a fim de fortalecer o desenvolvimento de pesquisas no país, propiciando novas aplicações biotecnológicas dos microrganismos e possibilitando a abertura de novas linhas de pesquisa.



### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A manutenção de microrganismos é um recurso prático e científico para a atividade laboratorial, diagnóstica e de pesquisa, permitindo ampla exploração biológica.

A conservação e viabilidade de culturas, por outro lado, pode ser divergente, por vezes contraditória, entre grupos de pesquisa e seus objetos de estudo e exploração. Para tanto, muitas técnicas têm sido avaliadas.

Pensar em manter, estocar e preservar coleções significa assegurar um patrimônio de culturas e bancos genéticos com atenção à morfologia, fisiologia, respostas celulares e teciduais, bem como sua associação à patogenicidade e infectividade, no caso de agentes patogênicos.

A variabilidade das populações microbianas determina a comparação experimental quanto ao melhor método, melhor temperatura e período de tempo para condições específicas, ou a combinação de dois ou mais métodos.

As coleções de culturas são ferramentas fundamentais para profissionais, estreitando o conhecimento e fortalecendo a interação dos grupos, suplantando fronteiras para a multidisciplinariedade dos segmentos de ensino, pesquisa, agropecuária, medicina, agronomia, indústrias, biotecnologia e meio ambiente, de forma atemporal e sem delimitação geográfica.

Diversos países têm sugerido a ampliação de coleções, com a formalização de redes distribuídas pelo mundo, incluindo normas padronizadas, harmonização de ações, gerenciamento de informação, bem como a transparência da comunicação. Tudo isso, para que as coleções de culturas passem a ser de propriedade mundial, com aplicação destinada à comunidade, para seu bem estar e segurança.

### REFERÊNCIAS

ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microrganismos do UniCEUB. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, v.02 n.2, p. 236-25, 2004

ANDREATTI FILHO, R. L.; LIMA, E. T.; OKAMOTO, A. S.; SAMPAIO, H. M. Uso de microbiota cecal congelada com crioprotetores em pintos infectados experimentalmente com *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, n.3, p.647-653, 2007.

APARECIDO, C. C.; EGYDIO, A. P. M.; FIGUEIREDO, M. B. Avaliação de três diferentes métodos utilizados na Micoteca do Instituto Biológico de São Paulo para preservação de fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.27, p.421-424, 2001.

BARKER, K. **Na bancada. Manual de iniciação científica em laboratórios de pesquisas biomédicas**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 474 p.

BAATI, L; FABRE-GEA, C.; AURIOL, D. Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing on the viability and cellular protein levels. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 241-247, sep. 2000.

BOZIARIS, I.S.; ADAMS, M.R. Temperature shock, injury and transient sensitivity to nisin in Gram negatives. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, p. 715-724, 2001.

CANHOS, V. P.; UMINO, C. Y.; MANFIO, G. P. **Coleções de culturas de microrganismos**. Resumo: Coleções de culturas de microrganismos. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP - Centro de Referência em Informação Ambiental - CRIA, 2004.

CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 39, n.2, p. 1-18, 2011.

CAVALCANTI, S. D. B. **Aplicação de metodologias de preservação e caracterização de fungos na coleção de culturas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 2010. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.22, n. 3, p. 263-268, 1991.

COSTA, E. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MELO, V. S. P.; ARAUJO, S. A. C.; ROLIM, B. N. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, Goiânia, v. 19, n. 2, p.111-122, 2009.

CEFAR EM NOTÍCIAS. **Procedimentos para a conservação de microrganismos**. Informativo Cefar de Microbiologia. Ano III - Ed. 13 - Jan/Fev/2006 – Circulação Bimestral

CUNHA, M. L. R. S.; NERVINO, C. V.; HIROOKA, E. Y. Parâmetros causadores de injúria celular em estafilococos, com ênfase a microrganismos competidores. *Revista de ciências farmacêuticas*, v. 19, n. 2, p. 167-182, 1998.

DAY, J. G.; MCLELLAN, M. R. **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. New Jersey: Humana Press, 1995.

DUMONT, F.; MARECHAL, P.A.; GERVAIS, P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 3, p. 268-272, 2004.

FAHY, G. M. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. **Cryobiology**. New York, v. 23, n. 1; p.1-13, feb./1986.

FAHY, G.M. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**. New York, v. 60, sup.3, p. 45-53,jul. 2010.

FULLER, B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. **CryoLetters**, London, v. 25, n. 6, p. 375-388, 2004.

GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.37, n.3,p. 229-233, mai/jun. 2004.

GREEN, L. H. **Practical handbook of microbiology**. CRC: London, 2 ed. 2008.

GHERNA, R. L. Preservation. **Manual of Methods for General Microbiology. American Society for Microbiology**. Washington. 1981. 524 p

HOLLAND, N. T.; SMITH, M. T.; ESKENAZI, B.; BASTAKI, M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 543, p. 217-234, 2003.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, New York, v. 46, p. 205-229, 2003.

LELLIOTT, R. A.; STEAD, D. E. Methods for the Diagnosis of Bacterial Plant Disease. **Blakwell Scientific Publications**. Oxford. 1987. 216p.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 247, n.16, p.125-142, 1984.

MEDEIROS, A. W. **Acompanhamento de métodos de congelamento de bactérias**. 2008. 32p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Biomedicina – Centro Universitário Feevale).

MIYAMOTO-SHINOHARA, Y.; IMAIZUMI, T.; SUKENOBE, J.; MURAKAMI, Y.; KAWAMURA, S.; KOMATSU, Y. Survival rate of microbes after freeze-drying and long term storage. **Cryobiology**, New York, v. 4, n. 3, p. 251-255, nov./ 2000.

MIYAMOTO-SHINOHARA, Y.; SUKENOBE, J.; IMAIZUMI, T.; NAKAHARA, T. Survival curves for microbial species stored by freeze-drying. **Cryobiology**, New York, v. 52, n. 1, p. 27-32, feb./ 2006.

MIYAMOTO-SHINOHARA Y, SUKENOBE J, IMAIZUMI T, NAKAHARA T. Survival of freeze-dried bacteria. **The Journal of general and applied microbiology**, Tokyo, v. 54, n.1, p. 9-24, feb./ 2008.

MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. Preservation of microorganisms by drying – a review. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.66, n. 2, p.183-193, aug. 2006.

MORRIS, G. J.; GOODRICH, M.; ACTON, E.; FONSECA, F. The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions: effects on cryopreservation. **Cryobiology**, New York, v. 52, p. 323-334, 2006.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**. 8th ed., ASM Press, Washington DC, 2003. 2113p.

NEUFELD, P. M.; OLIVEIRA, P. C. Preservação de dermatófitos pela técnica da água destilada estéril. **Revista Brasileira Análises Clínicas**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 167-169, 2008.

OKAFOR, N. **The Preservation of the Gene Pool in Industrial Organisms: Culture Collections**. In: Modern industrial microbiology and biotechnology. Science Publishers, p. 171-178, 2007.

OLIVEIRA, C. H. **Avaliação das características do espermatozóide de equino congelado submetido a inclusão e remoção do colesterol das membranas**. 2007. 87p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais.

OPLUSTIL, C. P. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2004.

PAOLI, DE P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, p. 897-910, 2005.

PASSADOR, M. M.; PIRES, G. C. C.; FINATTI, D.; APARECIDO, C. C.; FIGUEIREDO, M. B. Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca “Mário Barreto Figueiredo”. **Biológico**, São Paulo, v.72, n.1, p.51-55, jan./jun., 2010.

PEREIRA, N. J.; BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Tecnologia de bioprocessos – Séries em Biotecnologia**, v. 1 . Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. 62 p.

PIMENTEL, C. P. V.; FIGUEIREDO, M. B. Métodos de preservação de fungos em meio de cultura. **Biológico**, São Paulo, v.55, n.1/2, p.27-33, 1989.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKERS, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, London, v. 164, p. 666, 1949.

RHODES, M. E. The preservation of Pseudomonas under mineral oil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 20, n. 1, p.108–118, apr. 1957.

ROMEIRO, R. S. **Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas**. Material didático, Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 2006.

SILVA, J. O.; COSTA, P. P. RECHE, S. H. C. Manutenção de leveduras por congelamento a - 20°C. **Revista Brasileira Análises Clínicas**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 73-74, 2008.

SPUTTEKA, A.; ROWEB, A. W. Looking Back from the Future to the Present: Biopreservation Will Get Us There! **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, Freiburg, v. 38, p. 85–87, 2011.

SU, S. C.; GARBERS, S.; RIEPER, T. D. TONIOLO, P. Temperature variations in upright mechanical freezers. **Cancer Epidemiologic Biomarkers**, Philadelphia, v. 5, n.2, p. 139-140, feb. 1996.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 964p.

UHLENHAUT, C.; DÖRNER, T.; PAULI, G.; PRUSS, A. Effect of lyophilization on the infectivity of enveloped and non-enveloped viruses in bone tissue. **Biomaterials**, Surrey, v. 26, p. 6558-6564, 2005.

VIEIRA, V. R.; NASCIMENTO, V. P.; BORSOI, A.; SANTOS, L. R. Efeito do congelamento na contagem de *Salmonella Enteritidis* pelo método do número mais provável (NMP) em cecos de frangos de corte. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 14, n. 2, p. 140-147. 2007.

VYSEKANTSEV, I. P.; GURINA, T. M.; MARTSENYUK, V. F.; PETRENKO, T. F.; KUDOKOTSEVA, E. V.; KOSHCHIY, S. V.; GROSHEVOY, M. I. Probability of lethal damages of cryopreserved biological objects during storage. **Cryo Letters**, London, v. 26, n. 6, p. 401- 408, 2005.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, London, v.60/61, p.481-492, 2000.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, Surrey, v. 24, p. 438-450, 2001.

ZAMORA, L. M.; CARRETERO, C.; PARÉS, D. Comparative survival rates of lactic acid bacteria isolated from blood, following spray-drying and freeze-drying. **Food Science and Technology International**, London, v. 12, p. 77-84, feb. 2006.