



AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE BACTÉRIAS ESTOCADAS EM CALDO BHI-GLICEROL A -20°C HÁ QUATRO ANOS

VIABILITY ASSESSMENT OF BACTERIA STORED IN BHI-GLYCEROL BROTH AT -20°C FOUR YEARS AGO

EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE BACTERIAS ALMACENADAS EN CALDO BHI-GLICEROL A -20 °C HACE CUATRO AÑOS

Ludmilla Sousa Oliveira¹, Mallu Santos Mendonça Lopes², Mário Paulo Amante Penatti³, Denise Von Dolinger de Brito Röder⁴, Ralciane de Paula Menezes⁵

e493900

<https://doi.org/10.47820/recima21.v4i9.3900>

PUBLICADO: 09/2023

RESUMO

Com o desenvolvimento biotecnológico e científico, surge a necessidade da preservação de micro-organismos em laboratório para fins de diagnóstico, pesquisa ou ensino. Dessa forma, este trabalho objetiva analisar a viabilidade de bactérias estocadas há quatro anos, utilizando a técnica de criopreservação. Foi avaliada a viabilidade de 70 isolados bacterianos, sendo 17 espécies de bactérias Gram positivas e 53 bactérias Gram negativas, estocadas em tubos criogênicos contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI) e glicerol, mantidos em freezer a -20°C desde 2019. Para reativação dos isolados, as suspensões bacterianas foram descongeladas e semeadas em placas de Ágar Mueller Hinton e o restante do material em tubos contendo caldo BHI e incubado em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. Os resultados demonstraram que 84,3% (59) das amostras apresentaram crescimento satisfatório e sem contaminação, sendo que as bactérias Gram negativas alcançaram a maior taxa de viabilidade (84,9% - 45) em comparação com as Gram positivas (82,3% - 14). Sendo assim, o presente estudo demonstrou que o congelamento de bactérias em caldo BHI-glicerol a -20°C é uma técnica eficaz para a conservação de bactérias Gram negativas por longos períodos.

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias. Estocagem de micro-organismos. Métodos de preservação.

ABSTRACT

With the biotechnological and scientific advancements, the need for preserving microorganisms in laboratories for diagnostic, research, or educational purposes arises. Thus, this study aims to analyze the viability of bacteria stored for four years using the cryopreservation technique. The viability of 70 bacterial isolates was evaluated, including 17 species of Gram-positive bacteria and 53 species of Gram-negative bacteria stored in cryogenic tubes containing Brain Heart Infusion (BHI) broth and glycerol, maintained in a -20°C freezer since 2019. To reactivate the isolates, bacterial suspensions were thawed and plated on Mueller Hinton Agar plates, while the remaining material was added to tubes containing BHI broth and incubated in a bacteriological incubator at 35°C for 24 hours. The results demonstrated that 84.3% (59) of the samples showed satisfactory growth without contamination, with Gram-negative bacteria achieving a higher viability rate (84.9% - 45) compared to Gram-positive bacteria (82.3% - 14). Therefore, this study demonstrates that freezing bacteria in BHI-glycerol broth at -20°C is an effective technique for the long-term conservation of Gram-negative bacteria.

KEYWORDS: Bacteria. Storage of microorganisms. Preservation methods.

¹ Universidade Federal de Uberlândia, Graduando em Enfermagem.

² Universidade Federal de Uberlândia, Graduando em Biomedicina.

³ Universidade Federal de Uberlândia, Docente do Curso Técnico de Análises Clínicas da Escola Técnica de Saúde. Graduado em Biomedicina pelo Centro Universitário Barão de Mauá, Mestre e Doutor em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Estadual de Campinas.

⁴ Universidade Federal de Uberlândia, Docente do Instituto de Ciências Biomédicas. Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Uberlândia, Mestre em Imunologia e Parasitologia Aplicadas pela Universidade Federal de Uberlândia, Doutorado em Patologia Molecular pela Universidade de Brasília e PhD em Microbiologia Clínica.

⁵ Universidade Federal de Uberlândia, Técnica de Laboratório da Escola Técnica de Saúde. Graduada em Biomedicina pela Universidade Federal de Uberlândia, Mestre e Doutora em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina - UFU.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE BACTÉRIAS ESTOCADAS EM CALDO BHI-GLICEROL A -20°C HÁ QUATRO ANOS
Ludmilla Sousa Oliveira, Mallu Santos Mendonça Lopes, Mário Paulo Amante Penatti,
Denise Von Dolinger de Brito Röder, Ralciane de Paula Menezes

RESUMEN

Con el desarrollo biotecnológico y científico, existe la necesidad de preservar los microorganismos en el laboratorio con fines de diagnóstico, investigación o enseñanza. Así, este trabajo tiene como objetivo analizar la viabilidad de las bacterias almacenadas hace cuatro años, utilizando la técnica de criopreservación. Se evaluó la viabilidad de 70 aislados bacterianos, 17 especies de bacterias Gram-positivas y 53 bacterias Gram-negativas, almacenadas en tubos criogénicos que contienen caldo de Infusión Cerebral Corazón (IHB) y glicerol, mantenidos en un congelador a -20°C desde 2019. Para reactivar los aislamientos, las suspensiones bacterianas se descongelaron y se sembraron en placas de Agar Mueller Hinton y el resto del material en tubos que contenían caldo BHI y se incubaron en un horno bacteriológico a 35°C durante 24 horas. Los resultados mostraron que el 84,3% (59) de las muestras mostraron un crecimiento satisfactorio y ninguna contaminación, y las bacterias Gram-negativas alcanzaron la mayor tasa de viabilidad (84,9% - 45) en comparación con las Gram-positivas (82,3% - 14). Así, el presente estudio demostró que la congelación de bacterias en caldo de BHI-glicerol a -20°C es una técnica eficaz para la conservación de bacterias Gram-negativas durante largos períodos.

PALABRAS CLAVE: Bacterias. Almacenamiento de microorganismos. Métodos de conservación.

INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento biotecnológico e científico, surge a necessidade da preservação de micro-organismos em laboratório para fins de diagnóstico, pesquisa ou ensino (Oplustil *et al.*, 2020). Como cada micro-organismo apresenta peculiaridades intrínsecas, a escolha das formas de manutenção baseia-se na avaliação das características fenotípicas, no comportamento de cada espécie frente aos métodos de preservação, bem como nas vantagens e desvantagens de cada técnica. Aquele que for capaz de preservar por mais tempo o maior número de gêneros e espécies possíveis será o mais confiável e terá preferência de uso sobre os demais (De Sousa *et al.*, 2017).

Hodiernamente existem diversas técnicas de preservação a curto, médio e longo prazo, que diferenciam entre si quanto ao tempo de conservação da viabilidade e das características dos isolados, como ainda quanto ao custo e tempo para execução. Como técnica de conservação a curto prazo, temos o subcultivo periódico dos isolados microbianos, uma técnica simples e de baixo custo. Entretanto, é uma técnica que demanda tempo, pode apresentar maior risco de contaminação da amostra devido a múltiplos manuseios, além da possibilidade da perda das características de resistência e virulência dos isolados, como consequência do repique frequente (De Abreu; Tutunji, 2004; Sola, 2011; Guo; Wei; Xu, 2020).

Já para conservação a médio prazo, podemos citar a técnica de preservação em ágar nutriente acrescido de óleo mineral, que atua para reduzir a quantidade de oxigênio disponível para o micro-organismo e, conseqüentemente, reduzir a taxa de multiplicação. Apesar de ser uma metodologia simples, de fácil execução e com baixo custo, pode ter como desvantagens a instabilidade genética do micro-organismo e a demora no processo de reativação (Sola, 2011).

A criopreservação é uma técnica de preservação a longo prazo muito eficiente, podendo manter viável por anos diferentes tipos celulares, tais como: bactérias, fungos, células de animais e vegetais; em temperaturas baixas (entre -20°C e -196°C). A formação de cristais decorrentes do congelamento pode causar injúrias na parede celular inviabilizando as amostras, para que isso não ocorra existem



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE BACTÉRIAS ESTOCADAS EM CALDO BHI-GLICEROL A -20°C HÁ QUATRO ANOS
Ludmilla Sousa Oliveira, Mallu Santos Mendonça Lopes, Mário Paulo Amante Penatti,
Denise Von Dolinger de Brito Röder, Ralciane de Paula Menezes

crioprotetores que são adicionados ao meio protegendo a célula de possíveis danos, dentre os quais destacam-se: glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), metanol e etilenoglicol (Costa *et al.*, 2009; Sola, 2011; Jungare; Radha; Sreekanth, 2022).

Além desse método, existe também a liofilização, uma técnica de excelência que mantém a viabilidade de diversos tipos de espécimes por até 20 anos. Este procedimento se baseia na conservação da amostra biológica por meio da desidratação a vácuo. Apresenta como benefícios o baixo risco de contaminação e mutação genética do material, além da utilização de volume reduzido para conservação, facilitando o armazenamento. Contudo, é uma técnica que necessita de pessoal qualificado, equipamentos adequados, além de ser um método que demanda tempo e ter um alto custo (Costa *et al.*, 2009; Sola, 2011; Guo; Wei; Xu, 2020).

Não há um método de conservação considerado ideal e universal, dessa forma, o laboratório pode definir qual meio deve ser utilizado de acordo com as espécies de micro-organismos a serem preservadas, viabilidade técnica, disponibilização de recurso financeiro, tempo de necessidade de armazenamento e finalidade para qual será destinado a preservação. No entanto, é sabido que os meios nutritivos devem ser evitados pois a preservação visa reduzir o metabolismo do microrganismo (Oplustil *et al.*, 2020).

A criação de bacteriotecas vem se consolidando ao longo dos últimos anos em instituições de ensino e pesquisa. A garantia de sobrevivência de isolados bacterianos, bem como a conservação de suas características são primordiais na otimização de técnicas de preservação, já que elas permitem desenvolver conhecimentos multidisciplinares e promover maior qualidade no ensino prático em laboratório (Amorim; Oliveira; Costa, 2020).

Diante do exposto, e da necessidade da manutenção de micro-organismos em laboratórios de microbiologia para fins de ensino e pesquisa utilizando um método viável economicamente, e que permita a preservação dos isolados a médio/longo prazo; o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de bactérias que foram armazenadas há mais de quatro anos, utilizando a técnica de criopreservação.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi analisado a viabilidade de 70 isolados bacterianos sendo 17 amostras de bactérias Gram positivas (*Staphylococcus coagulase negativa* [1], *Staphylococcus warneri* [1], *Staphylococcus capitis* [4], *Staphylococcus aureus* [5], *Staphylococcus epidermidis* [2], *Staphylococcus hominis* [1] e *Enterococcus faecalis* [3]) e 53 amostras de bactérias Gram negativas (*Pseudomonas putida* [1], *Pseudomonas aeruginosa* [1], *Serratia marcescens* [7], *Serratia liquifaciens* [2], *Stenotrophomonas maltophilia* [4], *Klebsiella pneumoniae* [6], *Klebsiella oxytoca* [2], *Enterobacter aerogenes* [12], *Enterobacter agglomerans* [5], *Escherichia coli* [8], *Enterobacter cloacae* [2] e *Acinetobacter baumannii* [3]), estocados em frascos contendo caldo *Brain Heart Infusion* (Sigma-Aldrich® - Estados Unidos) acrescido de glicerol (Isofar - Brasil) e mantidos em freezer a -20°C desde meados de 2019. Os espécimes bacterianos encontram-se armazenados no laboratório do Curso Técnico em Análises



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

AValiação da Viabilidade de Bactérias Estocadas em Caldo BHI-Glicerol a -20°C Há Quatro Anos
Ludmilla Sousa Oliveira, Mallu Santos Mendonça Lopes, Mário Paulo Amante Penatti,
Denise Von Dolinger de Brito Röder, Ralciane de Paula Menezes

Clínicas da Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia e foram obtidos em projetos de pesquisa desenvolvidos anteriormente no mesmo laboratório.

Para evitar danos às células microbianas, os tubos contendo as suspensões bacterianas foram descongelados totalmente, conforme descrito a seguir: após retirar os tubos do freezer, as tampas foram desrosqueadas para evitar aumento da pressão interna do tubo. Em seguida, eles foram mantidos em banho-maria a 35-37°C até o descongelamento total das suspensões. Posteriormente, 10 µL da suspensão foram semeados em placas contendo ágar Müller Hinton (Sigma-Aldrich® - Estados Unidos) e o restante do material em tubos contendo caldo BHI. O material então foi incubado em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. O crescimento bacteriano foi constatado pela visualização de colônias nas placas com ágar Müller Hinton ou pela turvação do caldo BHI.

Alíquotas de 10 µL das amostras que apresentaram crescimento apenas em caldo BHI foram semeadas em outras placas contendo ágar sangue de carneiro 5% e incubado a 35°C por 24 horas. A não formação de colônias no meio sólido e não turvação do caldo BHI indicou ausência de crescimento microbiano e, conseqüentemente, perda da viabilidade do micro-organismo.

Para determinar a pureza dos isolados considerados viáveis, as características morfológicas das colônias foram avaliadas. Além disso, os isolados foram submetidos à avaliação microscópica após coloração pelo método de Gram e a provas bioquímicas clássicas para confirmar a identificação do isolado em nível de espécie e, assim, garantir a pureza dos mesmos (Oplustil *et al.*, 2020).

As amostras que foram constatadas com contaminação, foram submetidas a técnica de isolamento. Para o isolamento, foi utilizado o meio seletivo Manitol (Isofar - Brasil) para as bactérias Gram positivas e o *Eosin Methylene Blue* (EMB - Isofar - Brasil) para as bactérias Gram negativas. As amostras que obtiveram sucesso no isolamento foram submetidas a confirmação de espécie conforme descrito anteriormente, e em seguida, foram armazenadas.

Os resultados foram apresentados na forma de tabela, sendo as informações sobre a viabilidade dos isolados estocados e a pureza das suspensões expressos em frequências absolutas e relativas.

RESULTADOS

A maioria dos isolados estocados estavam viáveis e sem contaminação, sendo que 84,3% (59) das amostras apresentaram crescimento satisfatório, 10% (7) não apresentaram crescimento e 5,7% (4) encontravam-se contaminadas com *Bacillus* sp., não sendo possível recuperar os isolados após semeadura em meios seletivos. A frequência da viabilidade dos isolados de cada espécie está apresentada na Tabela 1.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR
ISSN 2675-6218

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE BACTÉRIAS ESTOCADAS EM CALDO BHI-GLICEROL A -20°C HÁ QUATRO ANOS
Ludmilla Sousa Oliveira, Mallu Santos Mendonça Lopes, Mário Paulo Amante Penatti,
Denise Von Dolinger de Brito Röder, Ralciane de Paula Menezes

Tabela 1 – Viabilidade dos isolados bacterianos estocados em caldo BHI-glicerol a -20°C

Espécie	Gram	TOTAL (N)	Crescimento (N)	Viabilidade % (N)
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	Positivo	1	(1)	100% (1)
<i>Staphylococcus warneri</i>	Positivo	1	(1)	100% (1)
<i>Staphylococcus capitis</i>	Positivo	4	(4)	100% (4)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positivo	5	(3)	60% (3)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Positivo	2	(2)	100% (2)
<i>Staphylococcus hominis</i>	Positivo	1	(1)	100% (1)
<i>Enterococcus faecalis</i> ¹	Positivo	3	(2)	67% (2)
<i>Pseudomonas putida</i>	Negativo	1	(1)	100% (1)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo	1	(1)	100% (1)
<i>Serratia marcescens</i>	Negativo	7	(7)	100% (7)
<i>Serratia liquifaciens</i>	Negativo	2	(2)	100% (2)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negativo	4	(4)	100% (4)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ²	Negativo	6	(5)	50% (3)
<i>Klebsiella oxytoca</i> ³	Negativo	2	(1)	0% (0)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Negativo	12	(11)	92% (11)
<i>Enterobacter agglomerans</i> ³	Negativo	5	(5)	80% (4)
<i>Escherichia coli</i>	Negativo	8	(8)	100% (8)
<i>Enterobacter cloacae</i>	Negativo	2	(1)	50% (1)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Negativo	3	(3)	100% (3)

Nota: ¹ 1 amostra contaminada com *Bacillus* sp., e o espécime microbiano foi reisolado

² 3 amostras contaminadas, sendo 2 com *Bacillus* sp. e 1 com *Coccus* sp. sendo essa última reisolada

³ 1 amostra contaminada com *Bacillus* sp e não foi possível ser recuperada

As bactérias Gram negativas alcançaram a maior taxa de viabilidade (84,9% - 45) em comparação com as Gram positivas (82,3% - 14). Dentre as Gram negativas os gêneros *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Escherichia* e *Acinetobacter* atingiram o percentual de 100% de aproveitamento; ao passo que os gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter* oscilaram nesse mesmo critério, alcançando 37,5% (3) e 84,2% (16) isolados viáveis, respectivamente. Em relação as bactérias Gram



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

AValiação da Viabilidade de Bactérias Estocadas em Caldo BHI-Glicerol a -20°C há Quatro Anos
Ludmilla Sousa Oliveira, Mallu Santos Mendonça Lopes, Mário Paulo Amante Penatti,
Denise Von Dolinger de Brito Röder, Ralciane de Paula Menezes

positivas, o gênero *Staphylococcus*, com exceção da espécie *S. aureus* (60% - 3), também alcançaram 100% de aproveitamento, enquanto o gênero *Enterococcus* atingiu 67% (2) de viabilidade.

Algumas amostras que apresentaram contaminação na reativação do estoque foram recuperadas através da semeadura em meios seletivos para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Alguns estoques de *Enterobacter agglomerans* (20% - 1), *Klebsiella oxytoca* (50% - 1), *Klebsiella pneumoniae* (33,3% - 2) e *Enterococcus faecalis* (33,3% - 1), encontravam-se contaminados por *Bacillus* sp. Além disso, uma amostra de *Klebsiella pneumoniae* estava contaminada com cocos Gram-positivo.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa têm impacto econômico, social, ambiental, científico e acadêmico positivo, pois foi constatada a viabilidade da maioria dos isolados estocados há mais de três anos, reforçando que a técnica de criopreservação em caldo BHI-glicerol pode ser adotada por laboratórios de pesquisa e ensino, para o estoque e preservação de espécies bacterianas.

O presente estudo obteve 84,3% de amostras recuperadas após quatro anos, estocadas em caldo BHI-glicerol. Saeki, Farhat e Pontes (2015) realizaram um estudo com espécies semelhantes armazenadas em caldo BHI acrescido de glicerol a 20% e leite desnatado a 15%, mantidos congelados entre -10 a -20°C, e obtiveram uma frequência maior de viabilidade (100%) em amostras estocadas por 1 ano e 3 meses. Essa taxa elevada de viabilidade pode estar relacionada com o tempo reduzido de estocagem (1 ano e 3 meses) em comparação com os isolados avaliados neste estudo.

Outro estudo avaliou a efetividade de 328 leveduras de diversos gêneros (*Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rodothorulla*) criopreservadas em BHI e glicerol (20%) a -20°C, e os resultados mostraram que após o período de quatro anos 90,6% (144/159) das cepas foram recuperadas; e após os períodos de 3 anos e 3 anos e 6 meses verificou-se que 99% dos isolados encontravam-se viáveis (Silva; Costa; Reche, 2008). Sendo assim, para a efetividade da técnica deve-se considerar o tempo recomendado, o meio de cultura e criopreservador utilizado além do equipamento utilizado para manter os isolados congelados. Isso, porque, freezers *frost-free* não são aconselhados devido a probabilidade de oscilação de temperatura, podendo implicar em danos celulares ou modificação das características do microrganismo resultando em inviabilidade da amostra (Oplustil *et al.*, 2020).

Além das variantes mencionadas acima, outras podem ser importantes para a recuperação de estirpes na sua totalidade, tais como: temperatura de incubação, pH e composição do meio de cultura utilizado para o cultivo e recuperação da amostra, osmolaridade e aeração, teor de água e lipídio da célula, tipo cepa, extensão e estrutura celular, fase e taxa de desenvolvimento, além da técnica utilizada no momento de descongelamento da amostra (Sola, 2011, *apud* Day; Mclellan, 1995; Costa *et al.*, 2009).

De acordo com Oplustil *et al.* (2020) as bactérias Gram-positivas podem ser armazenadas em freezers a -20°C com os crioprotetores glicerol ou *skim milk*, já as Gram-negativas podem ser



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR ISSN 2675-6218

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE BACTÉRIAS ESTOCADAS EM CALDO BHI-GLICEROL A -20°C HÁ QUATRO ANOS
Ludmilla Sousa Oliveira, Mallu Santos Mendonça Lopes, Mário Paulo Amante Penatti,
Denise Von Dolinger de Brito Röder, Ralciane de Paula Menezes

armazenadas nas mesmas condições em meios com *skim milk*, glicerol, sacarose ou lactose. Nesse sentido, através dos resultados encontrados tanto nos estudos mencionados anteriormente, como nesta pesquisa, é possível afirmar que o glicerol pode ser eficiente para preservação dos dois grupos de bactérias, uma vez que a taxa de viabilidade encontrada foi alta.

O glicerol é um crioprotetor amplamente utilizado por ter um custo relativamente baixo, ser eficaz e biocompatível com estruturas celulares. Além disso, ele faz parte da classe de crioprotetores intracelulares, portanto, retarda o congelamento intracelular e reduz os efeitos danosos à parede celular. Ademais, o glicerol pode ser menos tóxico que alguns crioprotetores. Entretanto, estudos recomendam que a concentração segura é de até 20%, acima disso pode ser nocivo aos microrganismos (De Abreu; Tutunji, 2004; Frank; Simione, 1998; Sola, 2011).

Um estudo realizado com cultura pura de GP2 de *Bacillus subtilis* e outros 10 isolados em diferentes concentrações de glicerol evidenciou que, de fato, a proporção de amostras recuperadas quando as concentrações do crioprotetor estavam a 15% foram maiores do que quando estavam a 30%, apresentando conformidade com os estudos supracitados (Bhattacharjee; Chrungoo; Joshi, 2021). Além disso, o descongelamento em banho maria a 37°C parece ser mais eficaz para a restauração das amostras quando comparada ao descongelamento em temperatura ambiente (Bhattacharjee; Chrungoo; Joshi, 2021; Jungare; Radha; Sreekanth, 2022).

Embora haja um avanço científico e tecnológico neste campo, foi encontrado um número reduzido de pesquisas que abordassem a criopreservação de micro-organismos com glicerol de forma geral. Nesse sentido, seria pertinente a realização de pesquisas para compreender a fundo qual método de conservação seria mais eficaz e para qual tipo de micro-organismos é mais adequado a sua utilização.

CONSIDERAÇÕES

Este estudo encontrou um percentual superior a 80% de amostras bacterianas viáveis após quatro anos de armazenamento. Espécies de bactérias Gram negativas obtiveram uma taxa maior de aproveitamento quando comparada com as espécies Gram positivas.

Dessa forma, o presente estudo demonstrou que o congelamento de bactérias em caldo BHI-glicerol a -20°C é uma técnica eficaz para a preservação de bactérias a médio prazo. Essa metodologia pode ser considerada uma técnica de excelência e escolha, pois apresenta baixo custo e fácil execução/manuseio. Entretanto, deve-se ater a oscilações de temperatura, concentração do crioprotetor e tempo de armazenamento.

REFERÊNCIAS

AMORIM, C. F.; OLIVEIRA, A. C. S. de; COSTA, E. A. S. Bacteriotech construction in a higher education institution for teaching and research purposes. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. e212997101, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i9.7101. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/7101>.



RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR
ISSN 2675-6218

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE BACTÉRIAS ESTOCADAS EM CALDO BHI-GLICEROL A -20°C HÁ QUATRO ANOS
 Ludmilla Sousa Oliveira, Mallu Santos Mendonça Lopes, Mário Paulo Amante Penatti,
 Denise Von Dolinger de Brito Röder, Ralciane de Paula Menezes

BHATTACHARJEE, K.; CHRUNGOO, N. K.; JOSHI, S. R Projeto de criopreservação para células bacterianas: uma abordagem engenhosa não convencional. **Anais da Academia Nacional de Ciências, Índia Seção B: Ciências Biológicas**, v. 811-820, 2021.

COSTA, E. C. *et al.* Princípios Da Estocagem E Preservação De Amostras Microbiológicas. **Ciência Animal**, Goiânia, v. 19, n. 2, p.111-122, 2009.

DE ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. **Universitas Ciênc. Saúde**, v. 2, n. 2, p. 237-252, 2004.

DE SOUSA, B. R. *et al.* Técnicas de obtenção, manutenção e reativação de culturas microbianas. **Journal of Medicine and Health Promotion**, v. 2, n. 3, p.827-842, 2017.

FRANK, P.; SIMIONE, M. Cryopreservation Manual Nalge Nunc International. **INTERNET: <http://www.nalgenelabware.com/techdata/technical/cryo.pdf> (Marzo, 27, 2006)**, 1998.

GUO, Ning; WEI, Qiang; XU, Yi. Otimização da criopreservação de cepas microbianas patogênicas. **Revista de Biossegurança e Biossegurança**, v. 2, p. 66-70, 2020.

JUNGARE, K. A.; RADHA, R.; SREEKANTH, D. Criopreservação de amostras biológicas – Uma breve revisão. **Materiais Hoje: Procedimentos**, v. 51, p. 1637-1641, 2022.

OPLUSTIL, C. P. *et al.* **Procedimentos básicos em Microbiologia Clínica**. 4. ed. São Paulo: Editora Servier, 2020, 742p.

SAEKI, E. K.; FARHAT, L. P.; PONTES, E. A. Eficiência Dos Crioprotetores Glicerol E Leite Desnatado Para O Congelamento De Micro-Organismos. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 9, n. 2, p.195-198, 2015.

SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; RECHE S. H. C. Manutenção de leveduras por congelamento a -20°C. **Rev. bras. anal. Clin**, p. 73-74, 2008.

SOLA, M. C. **Manutenção de microrganismos**: conservação e viabilidade. 2011. 31f. Tese (Doutorado em ciência animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001, a Escola Técnica de Saúde por disponibilizar recursos e o laboratório de Análises Clínicas para realização da pesquisa, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelas bolsas de Iniciação Científica concedidas.