

Faculdades Integradas de Patos
 Curso de Medicina
 v. 2, n. 3, out/dez 2017, p.827-842
 ISSN: 2448-1394



TÉCNICAS DE OBTENÇÃO, MANUTENÇÃO E REATIVAÇÃO DE CULTURAS MICROBIANAS

TECHNIQUES FOR OBTAINING, MAINTENANCE AND REACTIVATING MICROBIAL CULTURES

Bruna Rodrigues de Sousa
 Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Pombal – Paraíba - Brasil
brunasousa14@hotmail.com

Uyara Nunes de Medeiros Silva
 Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Pombal – Paraíba - Brasil
uyaranunes@hotmail.com

Luziene Rodrigues da Silva
 Faculdades Integradas de Patos – FIP – Patos – Paraíba - Brasil
luzienesilva@gmail.com

Giglielli Modesto Rodrigues Santos
 Faculdades Integradas de Patos – FIP – Patos – Paraíba - Brasil
Gigliellirodrigues@gmail.com

Adriano Sant’Ana Silva
 Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Pombal – Paraíba - Brasil
adriano.santana@ccta.ufcg.edu.br

RESUMO

Objetivo: Realizar uma revisão integrativa da literatura das técnicas de obtenção, preservação e reativação de culturas microbianas, que poderá servir como fonte de conhecimento para escolha da melhor maneira de isolar e preservar culturas, sendo de grande valia aos laboratórios de microbiologia, acadêmicos e profissionais da área.

Métodos: A pesquisa do material foi desenvolvida de modo online na base de periódicos CAPES, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), nas bases de dados Scientific Electronic Library Online (SciELO) e Literatura Internacional em Ciências da saúde (MEDLINE). Os critérios para a seleção da amostra foram os estudos que abordavam no título ou no resumo a temática investigada e que a publicação esteja dentro do período 2000 a 2016.

Resultados: Foi observado que a principal técnica de isolamento de microrganismos é a obtenção de cultura pura, que pode ser preservada por repique contínuo, preservação em óleo mineral, em água destilada, em congelamento a -20°C, secagem, liofilização e criopreservação, a escolha depende exclusivamente do tipo de agente a ser conservado e do tempo máximo pelo qual o pesquisador precisa da cultura estável, podendo esta também ser reativada a qualquer momento dependendo dos métodos de manutenção empregados.

Conclusões: Em suma, não existe uma técnica padrão que seja capaz de preservar todas as formas de microrganismos, muitos fatores devem ser levados em consideração neste processo.

Palavras-Chave: Isolamento. Preservação. Microrganismos.

ABSTRACT

Objective: To carry out an integrative review of the literature on the techniques of obtaining, preserving and reactivating microbial cultures, which may serve as a source of knowledge to choose the best way to isolate and preserve cultures, being of great value to microbiology, academic and professional laboratories Of the area

Methods: The research of the material was developed online on the basis of CAPES journals, Virtual Health Library (VHL), Scientific Eletronic Library Online (SciELO) and International Literature on Health Sciences (MEDLINE) databases. The criteria for the selection of the sample were the studies that approached in the title or the abstract the subject investigated and that the publication is within the period 2000 to 2016.

Results: It was observed that the main technique of isolation of microorganisms is to obtain pure culture, which can be preserved by continuous peeling, preservation in mineral oil, distilled water, freezing at -20°C, drying, lyophilization and cryopreservation. The choice depends exclusively on the type of agent to be retained and the maximum time for which the search needs the stable culture and can also be reactivated at any time depending on the maintenance methods employed.

Conclusions: In short, there is no standard technique that is capable of preserving all forms of microorganisms, many factors must be taken into account in this process.

Keywords: Isolation. Preservation. Microorganisms.

1. Introdução

A partir da década de 1970, houve um acentuado aumento da preocupação com a preservação dos recursos genéticos inclusive dos microrganismos, após o reconhecimento da sua grande importância nos mais diversos setores da sociedade, as práticas de isolamento, cultivo, identificação e preservação das espécies passaram a se tornar desenvolvidas e aprimoradas, se tornando prática indispensável no desenvolvimento científico e tecnológico, atendendo a demandas de matérias primas e insumos para as áreas industrial, farmacêutica e agropecuária e à necessidade de preservação do meio ambiente¹⁻³.

Embora os microrganismos constituam a maior parte da biodiversidade do planeta, estimada em 3.100.000 espécies, apenas 156.000 destas espécies (cerca de 5%) foram descritas até o momento, e pouco mais de 2% deste total está sendo preservado em coleções de culturas, gerando uma necessidade de estratégias de isolamento e seleção dos mesmos para garantir o desenvolvimento de novas pesquisas. Nesse sentido, o incremento de protocolos mais eficientes de conservação de microrganismos assegura, de certa forma, a continuidade e expansão de pesquisas nas áreas de saúde, agricultura, indústria e meio ambiente⁴⁻⁶.

Assim, a preservação e manutenção das culturas microbianas devem ser feitas de forma a garantir sua sobrevivência, estabilidade e pureza durante períodos prolongados de tempo, conservando características genéticas, propriedades morfológicas e fisiológicas, para uma futura utilização, quer para fins experimentais, didáticos, industriais ou estudos comparativos^{7,8}.

Diante dos aspectos citados e os trabalhos disponíveis na literatura, que envolvem dados sobre as técnicas de obtenção, preservação e reativação de culturas microbianas, o presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão integrativa da literatura em periódicos, que poderá servir como fonte de conhecimento para escolha da melhor maneira de isolar e preservar culturas, sendo de grande valia aos laboratórios de microbiologia, acadêmicos e profissionais da área.

2. Métodos

A pesquisa do material foi desenvolvida de modo online na base de periódicos CAPES, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), nas bases de dados Scientific Electronic Library Online (SciELO) e Literatura Internacional em Ciências da saúde (MEDLINE). Os critérios para a seleção da amostra foram os estudos que abordavam no título ou no resumo a temática investigada e que a publicação esteja dentro do período 2000 a 2016.

3. Resultados

A primeira etapa da triagem de microrganismos com potencial de aplicação industrial é o seu isolamento a partir de uma fonte ambiental, como solo, água e ar, onde há a descoberta de novas linhagens de microrganismos de aplicação industrial e econômica através da obtenção de uma cultura pura, que se caracteriza por ser uma cultura de células geneticamente e morfológicamente idênticas⁹⁻¹¹.

A biomassa microbiana é responsável direta e indiretamente por processos microbiológicos e bioquímicos, os quais exercem enorme influência na produtividade e sustentabilidade dos ecossistemas terrestres. Uma colher de solo fértil pode conter bilhões de microrganismos, onde a população é maior nos poucos centímetros do topo do solo, declinando rapidamente com a profundidade^{12, 13}.

O processo de isolamento geralmente ocorre quando uma parte dos recursos naturais, por exemplo, um fragmento de solo é submetido a diluições seriadas em solução salina fisiológica estéril, com posterior semeio em placas de Petri e incubação a temperatura favorável ao crescimento^{14, 15}.

O isolamento de microrganismos permite estudar com mais detalhes, as vias metabólicas, enzimas e produtos intermediários produzidos, através de técnicas convencionais em cultivo em ágar enriquecido, a separação de estirpes microbianas específicas a partir de populações mistas, para auxiliar na disponibilização de um acervo microbiológico significativo preservado e maximizar o rendimento dos processos industriais, produzindo novos produtos^{10, 16}.

Diante da necessidade de preservação de um patrimônio genético, busca-se conservar um microrganismo que foi selecionado e melhorado com intuito de manter sua nova identidade, através de armazenagem, que pode ser descrita em duas categorias: a preservação *in situ* (no local de origem) e a preservação *ex situ* (fora do local de origem)^{10, 3}.

A preservação *ex situ*, a partir de coleções de culturas ocorre com maior prevalência na sociedade sejam elas de trabalho, institucionais ou de serviço, têm uma importância destacada na conservação e exploração da diversidade genética e metabólica de microrganismos^{16, 17}.

As coleções de cultura decorrem da iniciativa dos pesquisadores, que gerenciam as mesmas sem apoio financeiro, pois não existe a desejada institucionalização, entretanto garantem a sobrevivência, 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 por diversos anos^{2, 39}.

No Brasil, existem diversas coleções de culturas, a exemplo da Embrapa que é uma empresa brasileira com reconhecimento internacional referência em tecnologia e pesquisa, que enfatiza pesquisa em diferentes temas e mantém diversas coleções de culturas como bactérias diazotróficas, fungos de interesse no controle biológico, microrganismos fixadores de nitrogênio, dentre outras, onde se registram as informações taxonômicas, ecológicas e fisiológicas sobre as linhagens do acervo^{7, 16, 10}.

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^{18, 19}.

Os métodos de preservação de culturas microbianas podem ser divididos de acordo com o tempo máximo no qual os isolados podem permanecer sem ser manipulados²⁰.

(A) Métodos de curto prazo: repique contínuo;

(B) Métodos de médio prazo: preservação em óleo mineral, preservação em água esterilizada, congelamento a - 20°C e secagem em gel de sílica, solo e papel filtro;

(C) Métodos de longo prazo: liofilização, criopreservação.

Teoricamente, cada microrganismo apresenta um comportamento diferenciado devido as suas peculiaridades intrínsecas e a escolha das formas de manutenção baseia-se nessas características fenotípicas inerentes a cada agente, 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 em maior tempo o maior número de gêneros e espécies possíveis será o mais confiável, passando a ter maior preferência de uso sobre os demais^{9, 21, 22}.

Por consequência, não existe uma fórmula singular, ideal ou universal que determine a eficiência da estocagem e preservação de microrganismos. Entretanto, diversos protocolos de estocagem têm sido desenvolvidos e aplicados, porém, nenhum tem se mostrado plenamente eficaz, requerendo-se a conjunção de dois ou mais métodos, para garantir melhor recuperação das cepas ^{23-25, 4}.

Dentre os métodos de preservação a curto prazo destaca-se a repicagem contínua, também chamada de subcultivo ou repicagem periódica, que se caracteriza por ser uma das técnicas de conservação mais antigas e tradicionais na manutenção de culturas em laboratórios. O método consiste na transferência de um fragmento de uma cultura microbiana para um novo meio de cultura adequado com incubação em ambiente favorável à multiplicação e estocagem sob refrigeração (5 a 8°C), após sua multiplicação, em busca da redução do metabolismo dos microrganismos e o aumento entre os intervalos de repiques das culturas ^{26, 4, 17}.

²⁶, em seu estudo menciona que a repetição do processo de repique deve ser realizada em intervalos de tempo condizentes com as necessidades e particularidades de cada isolado, entretanto, é aconselhável que a transferência de culturas seja realizada antes que o substrato do meio seja totalmente consumido pelos microrganismos, ou antes, que o meio desidrate.

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 uma faixa entre 5 e 8°C. Preferencialmente utilizam-se tubos de ensaio devido à facilidade de transporte, por ocuparem menor espaço e possuírem superfície exposta bem menor em relação à placas de Petri, estando menos sujeitos a contaminações ^{27, 28, 3}.

²⁹, descreveram que a composição nutricional do meio de cultura afeta a resistência da célula, por isso para a manutenção de fungos, os meios devem conter baixa concentração de açúcares fermentadores para evitar o crescimento micelial exagerado e prevenir alterações, bem como 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 ^{30, 31}.

Outro ponto importante com relação ao repique periódico é a idade das culturas que influencia de forma significativa o emprego desse método, pois culturas velhas tendem a produzir culturas-filhas alteradas, do ponto de vista morfofisiológico e genético ^{25, 4}.

Como vantagens, verifica-se que este método é simples, de baixo custo, não requer reativação, não provoca injúria celular, não exige equipamentos sofisticados e promove a viabilidade das células de cinco a doze meses para bactérias e um a três meses para leveduras ²⁸. 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, como virulência; necessidade de maior espaço físico para armazenamento das culturas; variabilidade entre as cepas e conseqüentemente entre os intervalos de repiques para cada microrganismo armazenado ^{25, 26}.

Com relação aos métodos de manutenção a médio prazo, a preservação em óleo mineral foi um método introduzido na fitopatologia nos anos de 1940 e consiste na aplicação de uma camada de óleo mineral esterilizado sobre uma cultura de microrganismos, que deve ser mantida à temperatura ambiente ou em 5 °C, sofrendo ajustes mediante as necessidades individuais de cada agente a fim de reduzir a disponibilidade de oxigênio, causando assim uma redução no metabolismo e conseqüentemente na taxa de multiplicação do microrganismo ^{26, 4, 17}.

O cultivo de isolados deve ser realizado preferencialmente em tubos de ensaio com meio de cultivo inclinado, onde após a observação de crescimento, adiciona-se o óleo mineral de forma asséptica, de modo que todo o meio deve ser recoberto, pois o contato dos microrganismos com o ar promove a desidratação total da cultura visto a evaporação da água, bem como está quantidade de óleo reduz o consumo de oxigênio em torno de 10% em poucas horas. Caso a conservação de culturas seja feita em placas de Petri, camadas de óleo superiores a 1 cm não devem ser utilizadas visto a redução da viabilidade dos microrganismos em condições de total exaustão de oxigênio ^{26, 28}.

Os óleos mais recomendados para a manutenção de microrganismos são a parafina e a vaselina, onde estes 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 ^{32, 26}.

Tal método evita a desidratação do microrganismo, isolando-o do contato com o ar e reduzindo ao mínimo seu metabolismo o que ocasiona maior longevidade às estirpes, quando comparada à repicagem periódica, chegando de um a sete anos para bactérias e um a cinco anos para fungos; além de ser um procedimento barato que não necessita de equipamentos onerosos, onde não há a contaminação por ácaros ^{7, 33, 29, 34}.

Entretanto, esse método também apresenta desvantagens equivalentes à técnica de subcultivo, como a possibilidade de contaminações e de mutações, dificuldades com a utilização do óleo, sua esterilização e manuseio, além de que certos isolados são bastante sensíveis ao óleo, não sobrevivendo à preservação nessas condições ^{33, 29, 34}.

A preservação em água destilada esterilizada foi criada por Castellani em 1939, e por isso leva seu nome, este método foi introduzido no Brasil em 1966 pelo Instituto Biológico, sendo utilizado em todo o país até os dias atuais ^{35, 32, 22}.

Consiste na transferência de uma suspensão de células ou a inclusão de blocos de ágar de 7 mm contendo os microrganismos para um frasco, com a posterior adição de 4 ml de uma solução de água esterilizada ou solução salina a 0,85%, sendo indicada na

preservação de microrganismos sensíveis a baixas pressões osmóticas de soluções hipotônicas^{36, 10}.

Após a transferência da cultura para o frasco, este é tampado com rolha de borracha previamente esterilizada e permanece, durante alguns dias, sob observação, para ser verificada a possibilidade de contaminação durante a transferência. Não havendo contaminações com bactérias que se manifestam pela opacidade da fração líquida, o frasco é lacrado com uma tampa hermética de alumínio, evitando a desidratação, pode-se utilizar também algodão hidrófobo como tampão^{31, 17, 3}.

Este método além de garantir a preservação das características originais da cultura por longos períodos, pode promover a ausência de contaminação por ácaros, apresentar baixo custo por utilizar somente água destilada e revelar a necessidade de pequeno espaço físico para acondicionar os frascos, além de ser empregado para grande número de gêneros e espécies de fungos. Apesar do baixo custo e reprodutibilidade, sua aplicação é restrita a microrganismos que tenham grande aderência ao ágar como nota-se em bolores e algumas leveduras^{31, 17, 22}.

A utilização de água destilada estéril como meio de manutenção tem sido proposta com sucesso para bactérias fitopatógenas, esporos do gênero *Bacillus* e vírus da hepatite, além de fungos que habitam o solo como *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Trichoderma* spp. e *Sclerotium cepivorum*^{7, 19, 31}.

O método de preservação sob congelamento envolve complexos fenômenos onde a água o componente vital das células e fundamental para os processos bioquímicos, é convertida em gelo através de temperaturas relativamente baixas entre 4 e -20°C, sendo indicado somente para microrganismos que suportam o retorno para a temperatura ambiente após serem mantidos em temperaturas inferiores a -20 °C^{4, 11}.

Apresenta-se como um dos métodos de manutenção mais simples e baratos, pois não requer equipamentos sofisticados, nem mesmo quanto ao preparo do material, além de oferecer uma boa viabilidade no armazenamento de diversos microrganismos por períodos de três meses a dois anos^{11, 10}.

Entretanto, em função dos danos causados às células, existe a possibilidade de redução da viabilidade, decorrente da formação de cristais de gelo e da variação eletrolítica na faixa de temperatura utilizada, tal fato pode ser contornado com o uso de crioprotetores e modificações na técnica inerentes à espécie a ser preservada^{26, 28}.

O método de preservação de microrganismos por secagem consiste na inoculação de uma suspensão de agentes sobre carregadores como solo, gel de sílica, carvão ativado, papel filtro, entre outros, promovendo a diminuição do metabolismo via desidratação e baixa temperatura^{4, 5, 10}.

No método de secagem em gel de sílica após esterilização do gel, adiciona-se uma suspensão concentrada de microrganismos (108/ml) em 5ml de leite desnatado ou 10%

(agente protetor previamente esterilizado), posteriormente os frascos são agitados e mantidos em banho-maria por 30 minutos, pois a sílica libera calor quando umedecida. As culturas são mantidas por sete dias à temperatura ambiente, avaliando-se a sua viabilidade e após confirmação de não contaminação são armazenadas a 5 °C. O método apresenta como vantagens a simplicidade de execução, o baixo custo, a não necessidade de equipamentos especiais, o método não proporciona condições para desenvolvimento de ácaros, o mesmo tubo garantir várias ativações do microrganismo, além de viabilidade da cultura por em média onze anos ^{4, 5, 7, 10}.

O método de secagem em solo estéril foi muito utilizado para preservação de coleções de *Fusarium* e *Aspergillus* e consiste na adição de 1 ml de suspensão concentrada de microrganismos em frascos contendo 5g de solo (areia e argila) autoclavado a 121 °C/1 h, onde posteriormente é realizada uma secagem ao ar até atingir cerca de 20% de umidade (p/p) e então é feita a estocagem em baixas temperatura. Não é um processo de aplicação geral e apresenta como vantagens estabilidade dos microrganismos por um tempo médio de cinco a dez anos, baixo custo e várias ativações através do mesmo frasco. Os principais cuidados são a esterilização e a umidade do solo, uso frequente do frasco para reativação (cuidados de contaminação) e, quando se usa suspensão líquida para a inoculação, não se deve utilizar altos volumes para não interferir na umidade do solo (não ocorre a secagem) ^{37, 5, 10}.

O método de secagem em papel filtro consiste em inserir fragmentos de papel-filtro de 1 cm² estéreis em placas de Petri com o microrganismo. Após a colonização dos fragmentos de papel, estes são transferidos para placas estéreis, deixando-os secar em incubadoras a 25 °C por dez dias. Após a secagem os papéis são transferidos para frascos e mantidos a -20 °C ou -80 °C. Este método é mais simples, menos oneroso que os outros e mantém culturas preservadas tão estáveis como os isolados preservados por liofilização. Para a preservação de pequena escala de culturas em laboratório, é menos dispendioso do que o nitrogênio líquido e permite o intercâmbio de amostras entre laboratórios, por ser facilmente transportado ^{38, 28, 5}.

Dentre os métodos de preservação a longo prazo a liofilização vem sendo utilizada como método de referência capaz de retardar o relógio biológico estabelecido pela natureza, chave para a realização dos serviços de coleção de culturas microbiológicas ^{18, 10}.

Consiste na remoção da água intracelular de materiais biológicos viáveis previamente congelados, por sublimação, evitando a formação de cristais de gelo, por serem capazes de provocar danos às estruturas celulares, além da degradação de enzimas presentes no citosol, levando a morte dos agentes ^{7, 13, 29}.

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 considerada uma das etapas mais críticas. Após esta etapa, o espécime ou material é desidratado por sublimação, seguindo-se o emprego de temperaturas de secagem, sob pressões reduzidas^{18, 29}.

A metodologia de Pittombo (1989) consiste em gotejar a suspensão de esporos sobre tiras de papel-filtro no interior de ampolas de vidro. Essas amostras são acopladas ao aparelho liofilizador e submetidas a condições de vácuo e temperaturas que variam de -40 °C a -50 °C, para rápido congelamento³⁹.

Durante o processamento, grande número de células pode sofrer injúria celular, devido ao comportamento peculiar da água em condições de baixas temperaturas. A água congelada expande-se ao cristalizar e, no processo de fusão, tende a recrystalizar e aglutinar, formando longos e protuberantes cristais de gelo, capazes de produzir uma série de danos mecânicos, bioquímicos e osmóticos à célula, além de alterar a permeabilidade da membrana celular, levando ao aumento da sensibilidade a alguns agentes seletivos, ao aumento da fase de latência (ou fase lag) de multiplicação celular e à necessidade de incremento nutricional^{7, 16, 39}.

Na tentativa de contornar os danos celulares vem sendo utilizados nesta técnica meios protetores que são adicionados a suspensão durante o desenvolvimento microbiano, antes do congelamento ou da secagem, a escolha varia conforme com o microrganismo alvo da liofilização. Dentre substâncias protetoras utilizadas estão o leite desnatado, soro bovino, trealose, glicerol, betaína, adonitol, solução de 1% de sacarose, glicose, lactose e alguns polímeros como dextran e polietilenoglicol^{40, 16, 18}.

As principais vantagens de utilização desta técnica são: eficiente preservação de microrganismos por 17 a 20 anos; aplicação na maioria dos agentes, exceto algas e protozoários; não contaminação por ácaros; diminuição de variação de linhagens; redução de espaço na estocagem e não requer o monitoramento nem a manutenção frequente^{34, 10}.

Entretanto os procedimentos de estocagem e acondicionamento influenciam na estabilidade dos materiais liofilizados, sendo recomendado que produtos liofilizados, armazenados em ampolas ou frascos de vidro, devem ser acondicionados em ambientes com baixa umidade, baixas temperaturas até -20 °C, ausência de oxigênio, luz e contaminantes^{13, 28}.

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 a necessidade de refrigeração^{13, 39}.

Além do processo apresentar dificuldades para execução, requerendo conhecimento e domínio da técnica, com a necessidade de equipamentos onerosos para

a desidratação do material e elevados custos para o preparo das culturas, essa técnica demanda grande consumo de tempo e constante necessidade de otimização de protocolos específicos para cada tipo de célula e espécime ^{18, 28, 10}.

Outro método de preservação a longo prazo é a criopreservação, que consiste na manutenção de diversos tipos celulares sob baixas temperaturas, para minimizar o dano a materiais biológicos, incluindo tecidos, células animais e vegetais, bactérias, fungos e vírus durante o processo de congelamento e estocagem a frio ^{41, 18, 5}.

As técnicas de criopreservação podem ser classificadas de acordo com as várias temperaturas de estocagem utilizadas, sendo a principal descritas a partir da estocagem em temperaturas ultrabaixas como -140°C (fase de vapor do nitrogênio) e -196°C (fase líquida do nitrogênio). O sucesso desta técnica depende do espécime em suportar o resfriamento e o subsequente congelamento a -196 °C e o descongelamento no ato de recuperação da cultura, pois o nitrogênio líquido não influencia as características morfológicas e patogênicas dos agentes ^{28, 5, 3}.

O processo de criopreservação, envolve diferentes passos, sendo que o princípio do congelamento-descongelamento se encontra entre os mais importantes e funcionais para a preservação celular, onde consiste primeiramente em resfriar à temperatura ambiente (20°C) o material biológico que deve estar diluído em meio adequado, pois se esse resfriamento for realizado de maneira inadequada, ocorre um fenômeno chamado choque térmico, que induz a prejuízos irreversíveis como danos à membrana plasmática, aumento da permeabilidade, com conseqüente perda de íons e moléculas intracelulares e redução do metabolismo, o ideal é o decaimento de 1°C por minuto, para que alguns destes eventos destrutivos possam ser evitados ^{42, 29, 10}.

A efetividade na criopreservação de agentes biológicos depende de uma série de fatores como a espécie a qual pertence, tipo de cepa, tamanho e estrutura celular, a fase e a taxa de desenvolvimento, a temperatura de incubação, a composição do meio de cultivo, o pH, a osmolaridade e aeração, o teor de água da célula, o teor lipídico e a composição do meio de congelamento, a taxa de resfriamento, a temperatura e o tempo de estocagem, a taxa de aquecimento e o meio de recuperação ^{29, 3}.

Outro parâmetro que interfere especificadamente na criopreservação é a taxa de resfriamento na qual os microrganismos a serem preservados são submetidos, pois o resfriamento lento promove uma redução gradativa da temperatura, estabelecendo uma curva de resfriamento extremamente rápida capaz de prevenir injúria celular, e ao mesmo tempo lenta, capaz de evitar a formação de gelo intracelular. Sendo necessário o uso da técnica de vitrificação, que consiste na utilização de taxas de resfriamento extremamente altas, porém a adição de crioprotetores em elevadas concentrações ^{29, 10, 3}.

Os crioprotetores são moléculas de baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e baixa toxicidade celular, que promovem a redução de água antes do resfriamento, impedindo assim a formação de cristais de gelo e conseqüentemente os danos estruturais. Estes são classificados com relação à capacidade de penetração em materiais biológicos, como crioprotetores intracelulares^{42, 29, 8}.

Os crioprotetores intracelulares ou penetrantes atuam nas células por meio de suas propriedades coligativas, levando a redução do ponto crioscópico, ou seja, 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. Dentre estes compostos, pode-se citar o metanol, o etanol, o etilenoglicol, o propilenoglicol, a dimetilformamida, a metilacetamida, o dimetilsulfoxido (DMSO) e o glicerol^{40, 8}.

Os crioprotetores extracelulares ou não penetrantes induzem 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. Destacam-se nesse grupo: mono, oligo e polissacarídeos, manitol, sorbitol, dextran, metilcelulose, albumina, gelatina, polivinilpirrolidona, polietilenoglicol, óxido de polietileno, entre outros^{7, 40}.

O terceiro estágio da criopreservação é o processo de descongelamento (rápido ou lento). O descongelamento rápido consiste em manter as culturas em banho-maria 25-40°C ou estufa bacteriológica 35-37°C por alguns minutos, até que os cristais de gelo se desfçam, resultando em amostras de significativa viabilidade^{7, 5}.

A estocagem a baixas temperaturas garante o armazenamento a temperaturas constantes e por longos períodos, entretanto os protocolos de criopreservação necessitam de adequação metodológica para cada tipo de microrganismo de interesse^{7, 18, 29}.

Vale ressaltar que essa técnica é dispendiosa por requerer a reposição regular do nitrogênio no nível ideal e exigir um local com ventilação adequada para o armazenamento do container^{38, 5}.

Os requerimentos para a restauração das culturas microbianas após a conservação dependerão exclusivamente do método e do tipo de microrganismo utilizado, sendo que se deve realizar testes para determinar qual o método de revitalização da cepa é mais adequado. No entanto, alguns fatores são comuns às várias culturas^{29, 31}.

Um fator importante na recuperação das culturas microbianas está na concentração celular do material preservado, que depende da taxa de sobrevivência das células ao processo, pois a utilização da concentração inadequada de células para a recuperação

pode gerar um grande crescimento e excessivo número de gerações de células, aumentando a probabilidade de ocorrência de uma mutação^{40, 31}.

Amostras preservadas sob repique contínuo, a reativação das culturas microbianas deve ser realizada a medida que o meio de cultura seja consumido, para que o microrganismo não fique sem nutrição, pois na primeira repicagem há um crescimento lento do agente. O intervalo entre repicagens constitui um dos problemas deste método, pois a meia-vida de culturas preservadas pode variar de dias a meses, em função da espécie^{26, 28}.

Em estudo³⁰ relataram que a transferência de culturas preservadas sob o meio de óleo mineral esterilizado deve ser feita após a drenagem total da camada de óleo e para o mesmo meio de cultivo em que o microrganismo se encontrava durante a preservação.

Amostras preservadas pelo método de Castellani, a recuperação dos microrganismos deve ser realizada a cada cinco anos, pois esse procedimento reativa a fisiologia do microrganismo, podendo garantir a manutenção das características originais por mais um período de preservação em laboratório; entretanto, há a possibilidade de contaminação e alteração dos isolados³⁴.

Em seu estudo⁶ reativou culturas preservadas em água destilada esterilizada, utilizando a transferência de frações da cultura original para tubo de ensaio contendo meio de cultura inclinado ágar extrato de levedura Czapek (CYA) ou caldo glicosado (CG). Os cultivos foram mantidos a 25°C por sete dias para crescimento. Nos resultados da reativação das culturas preservadas em água destilada esterilizada verificou se a manutenção da viabilidade e preservação das características macro e micromorfológicas dos *Penicillium*.

Amostras preservadas sob secagem devem sofrer rehidratação com soluções isotônicas em sua reativação para evitar a destruição de grande parte das células devido ao choque osmótico, posteriormente os agentes devem ser incubados em condições ótimas de crescimento, nos mesmos meios de cultivo anteriores à preservação, podendo estas serem recuperadas de sete a dez dias^{31, 5}.

Amostras liofilizadas também devem ser reidratadas com soluções isotônicas e têm uma melhor restauração quando se é utilizado o mesmo meio de cultivo que foi usado para o crescimento do microrganismo antes da liofilização^{18, 39}.

Na recuperação de amostras criopreservadas sob congelamento em nitrogênio líquido também se utiliza o mesmo princípio, entretanto deve-se realizar o degelo da amostra em banho-maria, posteriormente a cultura deve ser examinada para observar a existência de contaminação e ter a identificação do microrganismo, semeando a solução descongelada em meios de cultivo com mesma composição osmótica e nutritiva. O restabelecimento de crescimento dos microrganismos provenientes de amostra de nitrogênio líquido é muito mais rápido do que amostras que passaram pelos

procedimentos de secagem independentemente da forma em que eles foram conservados: células, esporos, ou micélio vegetativo para fungos^{29, 8,10}.

Após a recuperação da amostra deve-se atentar-se para identificação da pureza das culturas, através de microscopia ou verificação de colônias indesejáveis. Geralmente amostras que serão utilizadas em um processo industrial são testadas em pequenos frascos para verificação desse possível problema^{29, 31}.

4. Conclusões

O isolamento de microrganismos provenientes do solo é uma etapa fundamental para o desenvolvimento da biotecnologia e o comportamento desses isolados microbianos, é um fator importante de seleção do método de preservação mais eficiente.

Os métodos de preservação descritos ao longo do artigo são eficientes para garantir a viabilidade, pureza e autenticidade dos microrganismos, porém, em virtude da biodiversidade destes, não existe uma técnica padrão que seja capaz de preservá-los de forma adequada e generalizada.

Portanto, para a escolha de um método de preservação, devem ser levadas em consideração a capacidade e a manutenção das características fenotípicas, genotípicas e patogênicas das cepas estocadas.

Referências

1. Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ. Principles of Fermentation Technology. 2 Ed. Elsevier Science. 1995.
2. Mello SCM, Silva BT, Wetzel MMVS. Coleções De Culturas Microbianas No Sistema Nacional De Pesquisa Agropecuária - Brasília: Embrapa Recursos Genéticos E Biotecnologia, 2003.
3. Beloti IF. Viabilidade De Fungos Necrotróficos Sob Diferentes Métodos De Preservação. [Dissertação]. Uberlândia: Universidade Federal De Uberlândia. 2015. 101f
4. Green LH. Practical Handbook Of Microbiology. Crc: London, 2 Ed. 2008.
5. Lopes AS. Catalogação Das Espécies Potencialmente Toxigênicas De *Aspergillus*: Ocorrência, Taxonomia Polifásica, Distribuição E Preservação. [Dissertação]. São Paulo: Universidade Estadual De Campinas - Unicamp. 2012. 119f.
6. Silva JC, Fernandes OCCB, Martins MS, Rodrigues-Júnior AC, Teixeira MFS. Atividade Antimicrobiana De Espécies De *Penicillium* Mantidas Sob Duas Condições De Preservação. Revista De La Sociedad Venezolana De Microbiología. 2010;30:48-54.
7. Abreu MMV, Tutunji VL. Implantação E Manutenção Da Coleção De Culturas De Microorganismos Do Uniceub. Universitas Ciências Da Saúde. 2003;02(2):236-251.

8. Sputteka A, Roweb AW. Looking Back From The Future To The Present: Biopreservation Will Get Us There! *Transfusion Medicine And Hemotherapy*. 2011;38:85-87.
9. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. *Microbiologia e Doenças Infecciosas*. Porto Alegre, Artmed. 2005.
10. Anjos TV, Tebaldi ND, Fagian CC. Coleção Preservação De Culturas De Bactérias Fitopatogênicas. *Horizonte Científico*. 2012;(1):1-24.
11. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia*. 10 Ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
12. Pittombo RNM. A Liofilização Como Técnica De Preservação De Material De Pesquisa. *Ciência E Cultura*. 1989; 41: 427- 431.
13. Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation Of Microorganisms By Drying – A Review. *Journal Of Microbiological Methods*. 2006;66(2):183-193.
14. Benuto BC, Corsino DLM, Florentino GB, Rezende MI. Isolamento E Seleção De Microrganismos Produtores De Biossurfactantes Provenientes De Solo E Turfa Contaminados Com Petróleo. In: Simpósio De Bioquímica E Biotecnologia. *Biochemistry And Biotechnology Reports*. 2013;2(3):305-308.
15. Previati R, Silva JRR, Souza CR, Janke L. Isolamento E Quantificação Das Populações De Bactérias Em Geral E De Actinomicetos Presentes No Solo. *Arquivo De Ciência Veterinária E Zoolgia*. 2012;15(2):155-160.
16. Canhos VP. Centros De Recursos Biológicos: Suporte Ao Desenvolvimento Científico E Inovação Tecnológica. *Ciência E Cultura*. 2003;55(3):27-29.
17. Sola MC, Oliveira AP, Feistel JC, Minafra E Rezende CS. Manutenção De Microrganismos: Conservação E Viabilidade. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer*. 2012; 8(14):1398- 1418.
18. Paoli, P. Biobancos Microbiologicos A Partir De Coleta De Amostras Para A Epidemiologia, Diagnóstico E Pesquisa. *Fems Microbiol Reviews*. 2005;29:897-910.
19. Okafor, N. The Preservation of the Gene Pool in Industrial Organisms: Culture Collections. In: *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*. Science Publishers. 2007:171-178.
20. Aparecido CC, Pires GCC, Finatti D, Camilo CM. Preservação De Micro-organismos a - 80 °c. *Biológico*. 2012; 74(1):23-29.
21. Furtado GQ, Alves SAM, Czermainski ABC, Massola JrNS. Preservation Of *Phakopsora Pachyrhizi* Uredospores, *Journal Of Phytopathology*. 2008;(156):62-64.
22. Aparecido CC, Camilo CM. Comparação De Métodos Para A Preservação De Fungos Do Gênero *Colletotrichum* Em Laboratório. *Biológico*. 2013; 75(1):17- 22.
23. Guedes AC, Goedert CO, Bustamante PG, Moreira JRA, Mariante AS, Walter BMT, Brandão CRF, Proença CEB, Munhoz CBR, Magalhães C, Silva GP, Colli GR, Branchetti L, Mendes MS, Veiga R, Mendonça RC, Silva SR, Cavalcanti TB, Pereira TS. Estratégia

Nacional De Diversidade Biológica. Convenção Sobre Diversidade Biológica Artigo "9" - Conservação Ex *Situ*. Outubro De 1998.

24. Brilhante RSN. Estudo Das Dermatofitoses Canina E Felina: Aspectos Epidemiológicos E Comportamentais Do *Microsporium Canis* Frente A Diferentes Métodos De Estocagem. Fortaleza, 2002. 85p. Dissertação (Mestrado Em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual Do Ceará.

25. Girão MD, Prado MR, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Sidrim JJC, Rocha MFG. Viabilidade De Cepas De *Malassezia Pachydermatis* Mantidas Em Diferentes Métodos De Conservação. Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical. 2004;37(3): 229-233.

26. Romeiro RS. Preservação De Culturas De Bactérias Fitopatogênicas. Material Didático, Laboratório De Bacteriologia De Plantas, Departamento De Fitopatologia, Universidade Federal De Viçosa, 2006. Disponível em: <[Http://Www.Ebah.Com.Br/Content/Aaaaafeyj/PreservacaoCulturaFitopatogenica](http://www.ebah.com.br/content/AAAAafeyj/PreservacaoCulturaFitopatogenica)> Acesso Em: 13 De Setembro De 2016

27. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. Manual Of Clinical Microbiology. 8 Ed. Asm Press, Washington Dc, 2003.

28. Alfenas AC, Mafía RG. Métodos Em Fitopatologia. Viçosa. Ed. Ufv. 2007.

29. Costa EC, Teixeira MFS, Dantas TVM, Melo VSP, Araujo SAC, Rolim BN. Princípios Da Estocagem E Preservação De Amostras Microbiológicas. Ciência Animal. 2009;19(2):111-122.

30. Pereira NJ, Bom EPS, Ferrara MA. Tecnologia De Bioprocessos. Séries Em Biotecnologia. Rio De Janeiro: Escola De Química/Ufrj. 2008;(1):62.

31. Passador MM, Pires GCC, Finatti D, Aparecido CC, Figueiredo MB. Manutenção Da Viabilidade E Patogenicidade De Culturas Mantidas Na Micoteca "Mário Barreto Figueiredo". Biológico. 2010; 72(1):51-55.

32. Barker, K. Na Bancada. Manual De Iniciação Científica Em Laboratórios De Pesquisas Biomédicas. Porto Alegre: Artmed, 2002.

33. Canhos VP, Umino CY, Manfio GP. Coleções De Culturas De Microrganismos. Fundação De Amparo À Pesquisa Do Estado De São Paulo, Fapesp - Centro De Referência Em Informação Ambiental - Cria, 2004.

34. Pires GCC, Aparecido CC, Finatti D. Preservação Em Laboratório De Fungos Filamentosos Por Longos Períodos De Tempo. Biológico. 2012;74(1):9- 16.

35. Castellani A. Viability of Some Pathogenic Fungi in Distilled Water. Journal of Tropical Medicine & Hygiene. 1939; 24: 270-276.

36. Neufeld PM, Oliveira PC. Preservação De Dermatófitos Pela Técnica Da Água Destilada Estérel. Revista Brasileira Análises Clínicas. 2008;40(3):167-169.

37. Bueno CJ. Produção e Preservação de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. [Tese]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista. 2004.101p.
38. Fong YK, Anuar S, Lim HP, Tham FY, Sanderson FRA. Modified Filter Paper Technique For Long-Term Preservation Of Some Fungal Cultures. *Mycologist*. 2000;4:127-130.
39. Carvalho FD. Indução De Estruturas Esféricas Ou Similares Durante A Cristalização Da Água Por Processos Físicos Ou Químicos. *Ciência Agrotécnica*. 2007;31(3) 814-820.
40. Hubálek, Z. Protectants Used In the Cryopreservation of Microorganisms. *Cryobiology*. 2003; 46: 205 - 229.
41. Wolfe J, Bryant G. Cellular Cryobiology: Thermodynamic and Mechanical Effects. *International Journal of Refrigeration*. 2001; 24:438-450.
42. OliveiravCH. Avaliação das características do espermatozóide de equino congelado submetido a inclusão e remoção do colesterol das membranas. [Dissertação]. Minas Gerais: Universidade Federal De Minas Gerais - UFMG. 2007. 87p.