

Avaliação Experimental da Viabilidade de *Escherichia coli* após Congelamento de Longa Duração

Ricardo Felipe Soares, Paulo Sérgio de Abreu Junior, Liana Kalczuk, Priscila Correia Fernandes
Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA) – São José dos Campos – SP, Brasil

Resumo – A conservação eficiente de amostras bacterianas é crucial para investigações e aplicações laboratoriais. Protocolos com crioprotetores e armazenamento em baixas temperaturas permitem preservar linhagens ao longo do tempo. Neste estudo, avaliamos a viabilidade de *Escherichia coli* após 2 anos e 6 meses de armazenamento a -20°C por meio de (i) ensaios de viabilidade metabólica, (ii) crescimento em meios seletivos e não seletivos, (iii) testes de suscetibilidade a antimicrobianos e (iv) contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), com o objetivo de verificar a eficácia da estratégia de armazenamento. As amostras foram descongeladas a 25°C e imediatamente submetidas aos ensaios. Os resultados indicam que *E. coli* permaneceu viável mesmo após o período prolongado de congelamento. A manutenção de espécimes viáveis permite estudos sobre evolução e virulência microbianas e a avaliação de contramedidas em incidentes com agentes biológicos, configurando um recurso relevante para a bioengenharia e a defesa biológica.

Palavras-chave: Congelamento de longa duração, *Escherichia coli*, Viabilidade.

I. INTRODUÇÃO

A preservação de amostras microbianas é uma prática essencial em laboratórios de microbiologia, garantindo a manutenção de cepas de interesse para pesquisas futuras, estudos evolutivos e aplicações clínicas ou industriais [1], [2], sabendo que a preservação de linhagens microbianas, normalmente, está baseada em experiências práticas de laboratório. O armazenamento de culturas, frequentemente realizado por criopreservação em freezers (-20°C a -80°C) ou em nitrogênio líquido, permite que experimentos possam ser retomados, além de contribuir para a padronização de testes e a constituição de bancos microbianos de alta qualidade [3], [4]. A adoção sistemática dessas estratégias tem impacto direto na otimização de recursos laboratoriais e na garantia de reprodutibilidade dos resultados, fatores fundamentais para o avanço científico [5].

A escolha do momento e da técnica adequada para a preservação microbiana está relacionada tanto à natureza da amostra quanto ao objetivo do estudo. O armazenamento de microrganismos é empregado para minimizar perdas de variabilidade genética, proteger linhagens raras ou evoluídas, assegurar o acesso a microrganismos viáveis mesmo após longos períodos de estocagem [2], [6].

Esse procedimento é de suma importância em bancos de microrganismos, experimentos evolutivos, transplantes de microbiota fecal e aplicações ambientais ou industriais, além de favorecer a reutilização de recursos em laboratórios de rotina [4], [7]. A implementação de protocolos adequados de preservação também é recomendada para garantir biossegurança e integridade dos isolados [1].

No contexto da Defesa Química, Biológica, Radiológica e Nuclear (DQBRN), a preservação de amostras biológicas viáveis por longos períodos é crucial. Para isso, a biopreservação adequada garante a estabilidade e a caracterização apropriada dos isolados. Essa prática é fundamental pois, com a adoção de padronização e controle de qualidade, viabiliza-se a realização de análises retrospectivas e novos experimentos que, por sua vez, sustentam o desenvolvimento de diagnósticos, terapias e vacinas [8], [9].

Além disso, a manutenção de repositórios bem documentados amplia a reprodutibilidade entre laboratórios e orienta a definição de contramedidas mais adequadas em resposta a agentes biológicos emergentes ou reemergentes [10].

Diversos métodos de preservação têm sido avaliados quanto à eficiência e ao impacto sobre a viabilidade e a diversidade microbiana. O congelamento profundo, especialmente a -80°C , com uso de crioprotetores como glicerol ou Dimetilsulfóxido (DMSO), destaca-se como o padrão ouro para a maioria das bactérias, mantendo características genéticas e fenotípicas por anos [1], [5]. Alternativas como leite desnatado, etanol absoluto ou óleo alimentar também têm sido testadas para otimização de protocolos em ambientes com recursos limitados [5], [11]. A escolha da concentração do crioprotetor, a taxa de resfriamento e a remoção adequada após descongelamento são fatores críticos para maximizar a sobrevivência celular, além da necessidade de evitar múltiplos ciclos de congelamento-descongelamento para preservar alelos raros e manter a diversidade da população [2].

Para verificar a viabilidade da *Escherichia coli* (*E. coli*) após longo período de congelamento (-20°), diferentes testes laboratoriais são recomendados, cada um avaliando aspectos distintos do metabolismo e da integridade celular. O enriquecimento em caldo BHI permite a detecção do potencial de crescimento em ambiente nutritivo, sendo um indicador inicial de viabilidade [5]. A semeadura em ágar Eosin Methylene Blue (EMB) auxilia na confirmação do crescimento bacteriano, além de permitir avaliação morfológica e seletividade para Gram-negativos como a *E.coli* [11]. O teste colorimétrico com resazurina serve como marcador de atividade metabólica, evidenciando respiração e viabilidade celular de forma rápida e econômica [1]. A contagem de unidades formadoras de colônia por ml (UFC/ml) fornece uma estimativa quantitativa de células viáveis presentes na amostra[6] enquanto o teste de antibiograma é fundamental para verificar se o perfil de resistência microbiana foi mantido ao longo do congelamento [12].

Diante do impacto da criopreservação prolongada sobre a viabilidade e estabilidade de microrganismos, torna-se fundamental investigar como diferentes estratégias de armazenamento influenciam a recuperação de bactérias após longos períodos de congelamento.

Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a viabilidade da *Escherichia coli* após dois anos e seis meses de estocagem em condições controladas, utilizando uma combinação de testes laboratoriais para mensurar tanto o potencial de crescimento quanto a manutenção das características metabólicas e de resistência antimicrobiana.

II. MÉTODOS

No período de abril a junho de 2025, foram realizados diversos experimentos para atestar a viabilidade da cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) criopreservada desde setembro de 2022. O experimento foi conduzido com uma linhagem específica de *E.coli*, já conhecida no meio científico e registrada pela American Type Culture Collection (ATCC), sob o código 25922. A linhagem adquirida na apresentação liofilizada importada dos Estados Unidos por meio de um fornecedor do mercado brasileiro.

Em novembro 2022, a bactéria liofilizada foi reconstituída e em enriquecida em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (KASVI®) em processo aeróbico a 37°C por 24 horas, após os trabalhos serem realizados naquela ocasião, sobraram 50 ml da solução de *E. Coli* em caldo enriquecido, que se adotou o nome da solução BHIe, para facilitar a descrição dos métodos desse estudo. Para que a cepa pudesse ser armazenada para utilização posterior, essa cepa foi preparada para criopreservação.

A. Preparação da amostra e congelamento

Adicionou-se 12,5 mL de criopreservante Glicerina (solução 100% glicerina bidestilada) a 50 mL do caldo BHIe [5], sendo este volume dividido em 20 tubos tipo Eppendorf com capacidade para 2 mL embalados por membrana semipermeável (Parafilm). Os tubos foram identificados com o nome do pesquisador responsável pelo procedimento, o conteúdo do tubo e a data de início da criopreservação. Os tubos foram mantidos à temperatura de -20°C [5], [11] capacidade de temperatura mínima obtida no freezer

disponível no Laboratório de Bioengenharia (LABBIO) do Instituto Tecnológico de Aeronáutica (ITA).

B. Descongelamento da amostra e teste de enriquecimento

Em abril de 2025, novos estudos com a bactéria *Escherichia coli* foram iniciados para avaliar a viabilidade de uma amostra criopreservada. A amostra foi descongelada à temperatura ambiente (25 °C) até o derretimento total. Em seguida, uma alíquota de 10 µL foi retirada com uma alça calibrada estéril descartável (XPLAST) e semeada em 5 mL de caldo BHI. A cultura foi incubada a 37 °C por 24 horas em estufa bacteriológica (Nova Instruments).

A observação de turbidez na solução indicou a presença de uma cepa viável, apta para ser utilizada em experimentos subsequentes.

C. Teste colorimétrico para checagem de viabilidade

Adicionalmente, o metabolismo ativo de um microorganismo também pode ser observado por meio de uma análise colorimétrica. A análise da presença de um metabolismo ativo da *E.coli* foi efetuada realizando-se o teste com solução de resazurina preparada no laboratório de bioengenharia com 10 ml de soro fisiológico e 1,5 mg de resazurina (Resazurina reagente P.A., ACS Científica, COD R13190001), formulando uma solução de resazurina a 0,15% p/v. Este ensaio foi realizado em triplicata, em cada tubo foram adicionados 3 ml de cloreto de sódio 0,9% com 100 µL da solução enriquecida de BHIe e 10 µL de solução de resazurina. As três soluções obtidas foram submetidas a um processo de agitação com o auxílio do agitador mecânico tipo Vortex (KASVI, modelo K40-1020) durante um período de 5 segundos, com o objetivo de homogeneizar a solução. Para além dos três tubos de ensaio, foi preparada uma solução controle com os mesmos componentes das soluções anteriores, exceto pela adição da solução enriquecida de BHIe.

A observação da modificação cromática foi efetuada de forma visual com uma espera de até 4 horas para verificar se haveria alteração de cor. Ensaio colorimétrico com resazurina já são realizados há mais de 30 anos como teste de viabilidade celular [13], [14]. A resazurina, um indicador de oxirredução, sofre um processo de redução quando ocorre metabolismo celular, tendo como produto final a resorufina. Neste processo, a resazurina, que apresenta uma coloração azul, é reduzida a resorufina que exibe uma coloração rosa fluorescente[13], [14].

D. Contagem de Unidade Formadoras de Colônia por volume da amostra (UFC/mL)

Para a determinação da concentração de unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro, realizou-se diluição seriada da amostra na razão de 1:10, partindo da solução original até a diluição 10⁻⁷. Inicialmente, foram adicionados 9 mL de solução estéril de cloreto de sódio 0,9% (Equiplax) a sete tubos de ensaio de vidro, previamente esterilizados em autoclave (Autoclave Vertical CS Primatec) por 15 minutos a 121°C. No primeiro tubo (10⁻¹), adicionou-se 1 mL da solução BHIe, seguida de homogeneização em vórtex por 4 segundos[15]. Em seguida, transferiu-se 1 mL da

III . RESULTADOS

diluição 10^{-1} para o tubo 10^{-2} , repetindo o procedimento sequencialmente até a diluição 10^{-7} .

Após a conclusão das diluições, alíquotas de 0,1 mL de cada tubo foram transferidas para placas de ágar Eosina Metil Blue (EMB). O processo foi feito em triplicata. A semeadura na superfície do ágar foi realizada por espalhamento (spread plate) utilizando alça de espalhamento descartável em T (Cralplast cod. 611), aplicando três giros para assegurar melhor distribuição do inóculo. As placas foram então incubadas em estufa (NOVA Instruments) a 37°C por 24 horas.

Decorrido o período de incubação, procedeu-se à contagem das colônias formadas. Foi considerado como diluição padrão aquela que apresentou entre 30 e 300 colônias [12], [16], sendo esta utilizada para o cálculo da concentração de UFC/mL na amostra analisada. O ágar EMB foi empregado por ser seletivo para enterobactérias, permitindo também a identificação característica de colônias de *Escherichia coli*, que apresentam coloração verde-metálica em decorrência da fermentação da lactose presente no meio.

E. Teste de sensibilidade antimicrobiana (Antibiograma)

Com o objetivo de avaliar possíveis alterações fenotípicas na cepa de *Escherichia coli* após exposição a baixas temperaturas, foi realizado um teste de sensibilidade a antimicrobianos por difusão em disco. Inicialmente, 10 μL da solução BHI foram inoculados em uma placa de Petri contendo ágar BHI (Brain Heart Infusion), seguida de semeadura por estriamento. A placa foi incubada em estufa por 18 horas a 37°C (incubação *overnight*) para permitir o crescimento bacteriano.

Após a incubação, foram preparadas três suspensões bacterianas, cada uma contendo 4 mL de solução de NaCl 0,9% em tubos de ensaio. De duas a três colônias isoladas foram transferidas para cada tubo e homogeneizadas com auxílio de um agitador tipo Vortex. A turbidez das suspensões foi comparada visualmente com um tubo padrão 0,5 da escala de McFarland (Nefelobac®, Probac do Brasil). Caso a suspensão estivesse mais turva que o padrão, foi adicionada solução salina; se menos turva, foram acrescidas novas colônias. Após o ajuste, a concentração estimada de células viáveis foi considerada equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL [17], [18].

Para a inoculação das placas, utilizou-se um cotonete estéril (marca: [inserir]) embebido na suspensão ajustada. O excesso de líquido foi removido pressionando-se o cotonete contra a parede interna do tubo. Procedeu-se à semeadura por espalhamento superficial (spread plate) sobre placas de ágar Mueller-Hinton (KASVI®), realizando-se a rotação das placas para assegurar distribuição homogênea do inóculo.

Foi elaborado um mapa de posicionamento dos discos de difusão, com padronização da distância entre eles em todas as placas. Os antibióticos utilizados foram aqueles disponíveis no laboratório no momento do experimento: ceftriaxona (CRO30), ciprofloxacino (CIP25), gentamicina (GEN10), nitrofurantoína (NIT300) e sulfametoxazol + trimetoprima (SUT25). Todos os discos utilizados obedeciam aos critérios e concentrações estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.

As placas foram incubadas em estufa (marca: NOVA Instruments) a 37°C por 24 horas [19] Ao final do período, foram realizadas três leituras de halos de inibição ao redor de cada disco. As medidas dos diâmetros dos halos foram feitas com auxílio de um paquímetro B-TEK (código: BT-364).

A. Descongelamento da amostra e teste de enriquecimento

Após o descongelamento da amostra bacteriana estocada por longo período, procedeu-se ao teste de enriquecimento utilizando caldo BHI. Observou-se alteração visual significativa no meio após o período de incubação. O caldo, que originalmente apresentava aspecto límpido e translúcido na ausência de crescimento bacteriano, tornou-se visivelmente turvo, indicando possível presença e multiplicação de células viáveis da cepa analisada. Essa mudança de aspecto é compatível com o crescimento microbiano ativo, sinalizando que a amostra manteve viabilidade mesmo após o congelamento. A turvação foi homogênea em todas as amostras analisadas. Observou-se alteração visual significativa no meio após o período de incubação.

B. Viabilidade da amostra por teste colorimétrico

O teste colorimétrico utilizando solução de resazurina demonstrou resultados positivos quanto à atividade metabólica das amostras. Quinze minutos após a adição do indicador às três réplicas testadas, foi observada uma nítida mudança de coloração: de azul para rosa fluorescente. O teste colorimétrico utilizando solução de resazurina demonstrou resultados positivos quanto à atividade metabólica das amostras. Quinze minutos após a adição do indicador às três réplicas testadas, foi observada uma nítida mudança de coloração: de azul para rosa fluorescente.

O tempo de reação rápido e o padrão uniforme entre as amostras sugerem não apenas viabilidade, mas também integridade funcional da cepa. Esses achados confirmam que, mesmo após prolongado congelamento, a bactéria manteve capacidade de gerar reações metabólicas mensuráveis.



Fig. 1. Testes colorimétricos com resazurina. A mudança de cor revela metabolismo ativo

C. Contagem de Unidade Formadoras de Colônia por volume da amostra (UFC/mL)

As contagens de colônias bacterianas realizadas nas placas semeadas revelaram crescimento significativo. As diluições de 10^{-1} a 10^{-5} apresentaram densidade bacteriana elevada, com número de colônias superior à capacidade de contagem precisa (TMTC – *too many to count*), tabela 1. Já as diluições de 10^{-6} e 10^{-7} apresentaram crescimento de colônias com condições de contagem para verificação da diluição padrão. Apenas a diluição 10^{-6} apresentou quantidade de colônia dentro dos padrões estatisticamente aceitáveis (30 a 300 colônias), sendo

encontrado o valor de 114×10^7 UFC/mL. Observou-se o desenvolvimento de colônias com formato circular e com coloração verde metálica compatíveis com *Escherichia coli* em todas as placas semeadas.

D. Teste de sensibilidade antimicrobiana (Antibiograma)

O teste de difusão em disco demonstrou sensibilidade da cepa de *Escherichia coli* analisada frente a todos os antibióticos testados. Os halos de inibição formados ao redor dos discos, cujos valores estão descritos na tabela 1, foram comparados aos pontos de corte estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Com base nesses parâmetros, todos os antibióticos - ceftriaxona (CRO30), ciprofloxacino (CIP25), gentamicina (GEN10), nitrofurantoína (NIT300) e sulfametoxazol + trimetoprima (SUT25) - apresentaram halos compatíveis com perfis de sensibilidade da *E.coli* aos antibióticos testados.

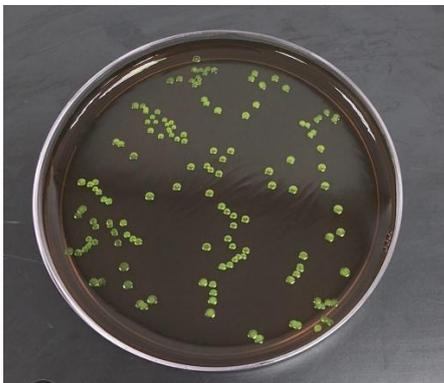


Fig. 2. Crescimento de colônias verdes metálicas em ágar EMB característico de *Escherichia coli*. Solução de diluição 10^{-6}

TABELA I. SENSIBILIDADE ANTIMICROBANA DETECTADA POR DISCO DE DIFUSÃO

antibióticos	Placa 1	Placa 2	Placa 3	média	CLSI	Sensibilidade
CRO	25	24	24	24,3	>23	Sensível
CIP	31	31	31	31,0	>26	Sensível
GEN	25	26	26	25,7	>15	Sensível
SUT	19	0	19	19,0	>16	Sensível
NIT	21	15	21	19,0	>17	Sensível

IV. DISCUSSÃO

A turvação observada no caldo BHI evidencia a eficácia do meio como agente de enriquecimento [5], [20]. E sugere uma densidade celular suficientemente elevada para provocar alterações visíveis em sua transparência. Tal turbidez indica que as células bacterianas mantiveram atividade metabólica suficiente para se multiplicar, resultando no acúmulo de biomassa em suspensão. Esse fenômeno está diretamente relacionado ao aumento da concentração bacteriana no meio, o que reforça a viabilidade das amostras analisadas

A alteração observada na coloração é indicativa da presença de metabolismo celular ativo, uma vez que a resazurina é reduzida a resorufina em ambientes com atividade redox, típica de células viáveis, como já descrito em outros estudos sobre o uso de resazurina [14], [21]. A ocorrência dessa mudança dentro do intervalo de tempo esperado já descrito

anteriormente[22] reforça que a *Escherichia coli* manteve seu padrão metabólico, sugerindo que suas características metabólicas[13] foram preservadas mesmo após mais de dois anos de criopreservação. Apesar da análise ter sido feita por observação visual, não desqualifica o valor do teste, pois a redução ocorrida na resazurina é claramente perceptível (mudança de cor).

Dentre as diluições com contagem viável, a de 10^{-6} foi selecionada como padrão para quantificação, por apresentar número de colônias dentro da faixa ideal (30 a 300 colônias por placa), conforme estabelecido por protocolos laboratoriais e literatura especializada. O uso do meio diferencial EMB possibilitou a observação de colônias com coloração metálica característica, típica de *E. coli*, reforçando a identidade fenotípica da cepa utilizada como já descrito em trabalhos anteriores [11] Esses achados evidenciam não apenas a robustez da metodologia empregada, como também a manutenção da viabilidade celular mesmo após um período prolongado de criopreservação. Não foi possível comparar a quantidade de UFC/ml desse teste com a amostra antes do congelamento, pois não foi encontrado nenhum registro nos arquivos do laboratório de bioengenharia.

Os discos de difusão utilizados seguem os padrões estabelecidos pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). A uniformidade dos halos de inibição observados sugere que a exposição prolongada ao congelamento não induziu resistência adquirida, tampouco comprometeu estruturas genéticas associadas aos mecanismos de resposta antimicrobiana. Esses achados são particularmente relevantes para estudos voltados à conservação de amostras bacterianas, reforçando sua aplicabilidade em análises fenotípicas subsequentes. A cepa utilizada neste estudo, *Escherichia coli* ATCC 25922, é a mesma cepa de referência empregada pelo CLSI [23] para validação dos diâmetros dos halos de sensibilidade em enterobactérias. Dessa forma, foi possível comparar os resultados obtidos com os valores de referência, demonstrando a ausência de alterações fenotípicas significativas decorrentes do processo de criopreservação e demonstrando sensibilidade aos antibióticos testados.

V. CONCLUSÃO

Apesar dos testes fenotípicos realizados neste estudo indicarem a manutenção das características bacterianas após congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por mais de dois anos, a ausência de análises genômicas limita a possibilidade de descartar alterações genéticas sutis não detectáveis pelos métodos empregados. Dessa forma, não é possível excluir completamente a ocorrência de modificações em níveis genômicos, proteômicos ou metabolômicos. Ainda assim, os resultados obtidos sugerem estabilidade funcional da cepa após o descongelamento, sem evidência de perda de viabilidade ou alteração fenotípica detectável.

Os testes de viabilidade demonstraram que o uso de glicerol como criopreservante e armazenamento à temperatura de -20°C foram adequados para a preservação da amostra analisada por um período longo (2 anos e 6 meses) preservando as características metabólicas e fenotípicas da *Escherichia coli*.

Ao abordar esses aspectos, este trabalho contribui para o fortalecimento de boas práticas em preservação microbiana, bem como para a padronização de protocolos aplicados em

laboratórios de microbiologia e pesquisas que dependem da integridade de estoques bacterianos. Tais estudos são cruciais para a integridade da pesquisa, uma vez que garantem que o uso de cepas congeladas não comprometa a validade e a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

A compreensão da viabilidade a longo prazo de microrganismos em condições específicas de congelamento é de suma importância estratégica para a bioengenharia e a defesa biológica. Em bioengenharia, essa capacidade assegura a estabilidade de amostras e linhagens celulares para pesquisa e produção. Paralelamente, para a defesa biológica, o conhecimento dos limites de sobrevivência é indispensável para a manutenção segura de estoques de referência e a validação de sistemas de detecção, reduzindo o tempo de resposta a potenciais ameaças.

REFERÊNCIAS

- [1] N. Guo, Q. Wei, and Y. Xu, "Optimization of cryopreservation of pathogenic microbial strains," Dec. 01, 2020, *KeAi Communications Co.* doi: 10.1016/j.jobb.2020.11.003.
- [2] K. Sprouffske, J. Aguilar-Rodríguez, and A. Wagner, "How archiving by freezing affects the genome-scale diversity of *Escherichia coli* populations," *Genome Biol Evol*, vol. 8, no. 5, pp. 1290–1298, May 2016, doi: 10.1093/gbe/evw054.
- [3] X. Li *et al.*, "Effects of Stool Sample Preservation Methods on Gut Microbiota Biodiversity: New Original Data and Systematic Review with Meta-Analysis," *Microbiol Spectr*, vol. 11, no. 3, Jun. 2023, doi: 10.1128/spectrum.04297-22.
- [4] H. Soukupova, V. Rehorova, I. Cibulkova, and F. Duska, "Assessment of Faecal Microbiota Transplant Stability in Deep-Freeze Conditions: A 12-Month Ex Vivo Viability Analysis," *J Clin Lab Anal*, vol. 38, no. 7, Apr. 2024, doi: 10.1002/jcla.25023.
- [5] E. K. Saeki, L. P. Farhat, and É. A. Pontes, "Efficiency of cryoprotectants glycerol and skimmed milk for microorganisms freezing," *Acta Veterinaria Brasilica*, vol. 9, no. 2, pp. 195–198, 2015.
- [6] A. Biclou *et al.*, "Effect of cryopreservation medium conditions on growth and isolation of gut anaerobes from human faecal samples," *Microbiome*, vol. 10, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1186/s40168-022-01267-2.
- [7] K. Heylen, K. Ettwig, Z. Hu, M. Jetten, and B. Kartal, "Rapid and simple cryopreservation of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria," *Appl Environ Microbiol*, vol. 78, no. 8, pp. 3010–3013, Apr. 2012, doi: 10.1128/AEM.07501-11.
- [8] B. Budowle *et al.*, "Quality sample collection, handling, and preservation for an effective microbial forensics program," Oct. 2006. doi: 10.1128/AEM.01165-06.
- [9] J. Jaskiewicz, S. M. Wolf, M. Toner, and R. D. Sandlin, "Biopreserving Pathogens: Promise & Peril," *Journal of Law, Medicine and Ethics*, vol. 52, no. 3, pp. 624–636, 2024, doi: 10.1017/jme.2024.125.
- [10] J. Daly, "The Importance of Biological Collections for Biosecurity and Biodiversity," 2010. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/254386222>
- [11] E. N. Mahmmoud, "Comparison of preservation methods of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria," *J Pure Appl Microbiol*, vol. 14, no. 3, pp. 2173–2180, Sep. 2020, doi: 10.22207/JPAM.14.3.58.
- [12] E. A. Rettedal, H. Gumpert, and M. O. A. Sommer, "Cultivation-based multiplex phenotyping of human gut microbiota allows targeted recovery of previously uncultured bacteria," *Nat Commun*, vol. 5, Aug. 2014, doi: 10.1038/ncomms5714.
- [13] P. Costa, A. T. P. C. Gomes, M. Braz, C. Pereira, and A. Almeida, "Application of the resazurin cell viability assay to monitor *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* inactivation mediated by phages," *Antibiotics*, vol. 10, no. 8, Aug. 2021, doi: 10.3390/antibiotics10080974.
- [14] D. Lavogina *et al.*, "Revisiting the Resazurin-Based Sensing of Cellular Viability: Widening the Application Horizon," *Biosensors (Basel)*, vol. 12, no. 4, Apr. 2022, doi: 10.3390/bios12040196.
- [15] S. T. Bruckbauer, B. B. Minkoff, D. Yu, V. L. Cryns, M. M. Cox, and M. R. Sussman, "Ionizing radiation-induced proteomic oxidation in *Escherichia coli*," *Molecular and Cellular Proteomics*, vol. 19, no. 8, pp. 1375–1395, Aug. 2020, doi: 10.1074/mcp.ra120.002092.
- [16] Steven T. Bruckbauer, "Experimental Evolution of Extreme Resistance of Ionizing Radiation in *Escherichia coli* After 50 Cycles of selection." *J Bacteriol*, vol. 191, no. 16, pp. 5240–5252, Aug. 2009, doi: 10.1128/JB.00502-09.
- [17] I. H. Said-Salman, F. A. Jebaii, H. H. Yusef, and M. E. Moustafa, "Evaluation of wi-fi radiation effects on antibiotic susceptibility, metabolic activity, and biofilm formation by *Escherichia coli* 0157h7, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis*," *J Biomed Phys Eng*, vol. 9, no. 5, pp. 579–586, Oct. 2019, doi: 10.31661/jbpe.v0i0.1106.
- [18] A. Pegios *et al.*, "The Effect of Electromagnetic Radiation Transmitted from Routers on Antibiotic Susceptibility of Bacterial Pathogens," *J Biomed Phys Eng*, vol. 12, no. 4, pp. 327–338, 2022, doi: 10.31661/jbpe.v0i0.2111-1433.
- [19] M. P. Weinstein, *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019.
- [20] N. Ermenlieva *et al.*, "Lyophilized *Escherichia coli* strains stored for 40–50 years: morphological, serotypic, biochemical characteristics and drug sensitivity," *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, vol. 37, no. 1, pp. 309–316, 2023, doi: 10.1080/13102818.2023.2191737.
- [21] J. Petiti, L. Revel, and C. Divieto, "Standard Operating Procedure to Optimize Resazurin-Based Viability Assays," Apr. 01, 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/bios14040156.
- [22] J. Petiti, L. Revel, and C. Divieto, "Standard Operating Procedure to Optimize Resazurin-Based Viability Assays," Apr. 01, 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/bios14040156.
- [23] M. P. Weinstein, *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019.