



Benedito Rodrigues da Silva Neto
(Organizador)

Estado da Arte da Pesquisa em Recursos Genéticos

Benedito Rodrigues da Silva Neto
(Organizador)

Estado da Arte da Pesquisa em Recursos Genéticos

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora
Copyright © Atena Editora
Copyright do Texto © 2019 Os Autores
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora
Editora Executiva: Prof^a Dr^a Antonella Carvalho de Oliveira
Diagramação: Rafael Sandrini Filho
Edição de Arte: Lorena Prestes
Revisão: Os Autores

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^a Dr^a Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Prof^a Dr^a Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof^a Dr^a Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Prof^a Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof^a Dr^a Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof^a Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof^a Dr^a Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof^a Dr^a Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof.^a Dr.^a Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Conselho Técnico Científico

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Prof.ª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof.ª Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof.ª Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
E79	Estado da arte da pesquisa em recursos genéticos [recurso eletrônico] / Organizador Benedito Rodrigues da Silva Neto. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-628-7 DOI 10.22533/at.ed.287191609 1. Genética – Pesquisa – Brasil. I. Silva Neto, Benedito Rodrigues da. CDD 575.1
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

Apresentamos o livro “Estado da Arte da Pesquisa em Recursos Genéticos”, um material rico e direcionado à todos acadêmicos e docentes da subárea da biologia denominada genética.

Sem sombra de dúvidas a genética e suas aplicações tem influenciado diversas pesquisas promissoras em todo o mundo, contribuindo de forma significativa na saúde, agricultura, economia e biotecnologia. Compreender essa ciência e suas diferentes interfaces é um dos objetivos principais do conteúdo desta obra.

A genética aliada à revolução tecnológica tem contribuído grandemente com o avanço no campo da pesquisa básica e aplicada. Da mesma forma as descobertas propiciadas pelos estudos e artigos de diversos pesquisadores possibilitaram um entendimento mais amplo desta importante área. Como sabemos a genética possui um campo vasto de aplicabilidades que podem colaborar e cooperar grandemente com os avanços científicos e entender um pouco mais da pesquisa e recursos genéticos é o enfoque desta obra.

Assim abordamos aqui assuntos relativos aos avanços e dados científicos aplicados aos recursos genéticos, oferecendo um breve panorama daquilo que tem sido feito no país. O leitor poderá se aprofundar em temas direcionados à variabilidade, diversidade genética, produtividade, variedades tradicionais, inovação, proteômica, novos protocolos, fruteiras nativas, populações, gargalo, seleção, variedade genética, produtividade, migração, criopreservação, dentre outros.

Esperamos que mais uma vez o conteúdo deste material possa somar de maneira significativa aos novos conceitos aplicados à genética, influenciando e estimulando cada vez mais a pesquisa nesta área em nosso país. Parabenizamos cada autor pela teoria bem fundamentada aliada à resultados promissores, e principalmente à Atena Editora por permitir que o conhecimento seja difundido e disponibilizado para que as novas gerações se interessem cada vez mais pelo ensino e pesquisa em genética.

Desejo à todos uma ótima leitura!
Benedito Rodrigues da Silva Neto

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
AVALIAÇÃO AGRONÔMICA DE GENÓTIPOS DE MANDIOCA EM ANGOLA	
Rosalina Esperança Da Silva Carlos	
Sandra Domingos João Afonso	
Ricardo Franco Cunha Moreira	
Elaine Costa Cerqueira-Pereira	
DOI 10.22533/at.ed.2871916091	
CAPÍTULO 2	5
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PRODUTIVO E CARACTERÍSTICAS MORFOFISIOLÓGICAS DE AMOSTRAS DE VARIEDADES DE FEIJÃO-CAUPI DO ACRE PARA DESENVOLVIMENTO DE PROGÊNIES E SELEÇÃO DE LINHAGENS	
Caroline Nascimento dos Santos	
Joões Alves da Silva Pereira	
Vanderley Borges dos Santos	
Hiuri Negreiros de Albuquerque	
Mateus Martins da Silva	
Matheus Matos do Nascimento	
Maria Rosângela da Silva Melo	
Wilson José dos Santos	
DOI 10.22533/at.ed.2871916092	
CAPÍTULO 3	11
CARACTERIZAÇÃO DE ACESSOS DE AÇUCENA (<i>Amaryllidaceae</i>) COLETADOS NO ESTADO DO CEARÁ	
Rita de Cassia Alves Pereira	
Ana Cecília Ribeiro de Castro	
Antônio Marcos Esmeraldo Bezerra	
DOI 10.22533/at.ed.2871916093	
CAPÍTULO 4	18
CONSERVAÇÃO DE TECIDOS DO APARELHO UROGENITAL DE AVES MANTIDOS EM SORO FISIOLÓGICO SOB-REFRIGERAÇÃO POR ATÉ 48 HORAS PARA EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	
Tauane Catilza Lopes Fernandes	
Shaline Séfara Lopes Fernandes	
DOI 10.22533/at.ed.2871916094	
CAPÍTULO 5	26
DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Campomanesia adamantium</i> (Cambess.) O. Berg POR MEIO DE CARACTERES AGROMORFOLÓGICOS	
Diego Cerveira de Souza	
Terezinha Aparecida Teixeira	
DOI 10.22533/at.ed.2871916095	
CAPÍTULO 6	36
DIVERSIDADE GENÉTICA DO BACURIZEIRO (<i>Platonia insignis</i> MART.) UTILIZANDO O MARCADOR ISSR EM CHAPADINHA – MA	
Jonas Alves Mesquita	
Edyane Moraes dos Santos	
André Luiz Raposo Barros	
Gabriel Garcês Santos	
Claudio Adriano de Jesus Nascimento	

Luana Corrêa Silva
Phelipe Silva de Araújo
José de Ribamar Silva Barros
DOI 10.22533/at.ed.2871916096

CAPÍTULO 7 46

ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DA ABELHA TIÚBA (*Melipona fasciculata* SMITH, 1854 - HYMENOPTERA, APIDAE) BASEADA NO MARCADOR ISSR

Diego Marques Costa Silva
Gustavo Lucas Bezerra Tinoco
Jonas Alves Mesquita
Laelson Rodrigues Ferreira e Ferreira
Hugo Almeida Ferreira
Edyane Moraes dos Santos
José de Ribamar Silva Barros

DOI 10.22533/at.ed.2871916097

CAPÍTULO 8 58

MEL DE TIÚBA: AUMENTO DA PRODUÇÃO DE MEL POR MEIO DA MELIPONICULTURA MIGRATÓRIA

Gustavo Lucas Bezerra Tinoco
Diego Marques Costa Silva
Jonas Alves Mesquita
Hugo Almeida Ferreira
Laelson Rodrigues Ferreira e Ferreira
Gabriel Garcês Santos
José De Ribamar Silva Barros

DOI 10.22533/at.ed.2871916098

CAPÍTULO 9 67

USO DE CRIOPROTETORES PARA A PRESERVAÇÃO DE COLEÇÕES MICROBIANAS MANTIDAS PARA PD&I

Eunice Ventura Barbosa
Clarissa Varajão Cardoso
Helena Magalhães *In memoriam*
Evelize Folly das Chagas
Helena Carla Castro
Maíra Halfen Teixeira Liberal

DOI 10.22533/at.ed.2871916099

SOBRE O ORGANIZADOR..... 79

ÍNDICE REMISSIVO 80

USO DE CRIOPROTETORES PARA A PRESERVAÇÃO DE COLEÇÕES MICROBIANAS MANTIDAS PARA PD&I

Eunice Ventura Barbosa

Instituto de Biologia - Universidade Federal Fluminense

Niterói - Rio de Janeiro

Clarissa Varajão Cardoso

Instituto de Biologia - Universidade Federal Fluminense

Niterói – Rio de Janeiro

Helena Magalhães *In memoriam*

Centro Estadual de Pesquisa em Sanidade Animal Geraldo Manhães Carneiro (CEPGM) - Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro

Niterói - Rio de Janeiro

Evelize Folly das Chagas

Instituto de Biologia - Universidade Federal Fluminense

Niterói - Rio de Janeiro

Helena Carla Castro

Instituto de Biologia - Universidade Federal Fluminense

Niterói - Rio de Janeiro

Maíra Halfen Teixeira Liberal

Centro Estadual de Pesquisa em Sanidade Animal Geraldo Manhães Carneiro (CEPGM) - Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro

Niterói – Rio de Janeiro

microrganismos por longos períodos é importante para a sua utilização em Pesquisa, Desenvolvimento & Inovação (PD&I). A correta preservação das cepas é fundamental para evitar contaminações e mutações, podendo levar à perda das características morfológicas, fisiológicas e genéticas. O Laboratório de Biotecnologia do CEPGM da PESAGRO-RIO realiza exames para o diagnóstico, a prevenção e o controle de enfermidades em animais de produção, e mantém a “Coleção de Microrganismos Patogênicos para Animais de Produção”. Até 2010 as cepas eram mantidas à -20°C, sem crioprotetores. Porém em 2011 foi adquirido um ultrafreezer -80°C, e 595 cepas congeladas à -20°C foram reativadas e avaliadas quanto à viabilidade, identidade e pureza. Dessas, apenas 64 (10,76%) estavam viáveis. Desde então segue-se o protocolo de preservação à -80°C, utilizando o *Skim Milk* comercial com adição de 10% (p/v) glicerol, que são autoclavados separadamente a 121°C/15min, e em seguida homogeneizados e acondicionados em criotubos de 3mL, levados ao freezer -20°C por 2 dias, e posteriormente acondicionados no ultrafreezer -80°C. Do total de 632 cepas bacterianas isoladas de 2011 a 2018, 442 cepas (69,93%) estão preservadas à -80°C em *Skim Milk* com glicerol, e 190 (30,07%) à -20°C em BHI com glicerol, para futuras pesquisas. Em 2016 e 2017 foram

RESUMO: O armazenamento de

repicadas 427 cepas isoladas entre 2013 e 2015, que estavam mantidas à -80°C, e 100% apresentaram-se viáveis. Os resultados indicam que o uso de crioprotetores favoreceu a preservação e a estabilidade das cepas, tanto no congelamento à -80°C como à -20°C.

PALAVRAS-CHAVE: Criopreservação; *Skim Milk*; Glicerol.

ABSTRACT: Storage of microorganisms for long periods is important for your use in Research, Development & Innovation. The correct preservation of strains is essential to avoid contamination and mutations, which can lead to the loss of morphological, physiological and genetic characteristics. The Biotechnology Laboratory of the CEPGM of the PESAGRO-RIO performs exams for the diagnosis, prevention and control of diseases in farm animals, and maintains the “Collection of Pathogenic Microorganisms for Farm Animals”. Up to 2010 strains were maintained at -20°C, without cryoprotectants. However, in 2011, a -80°C freezer was purchased, and 595 strains frozen at -20 °C were reactivated and evaluated for viability, identity and purity. Of these, only 64 (10.76%) were viable. Since then we follow the preservation protocol at -80°C, using the Skim Milk commercial added with 10% (w/v) glycerol, which are autoclaved separately at 121°C/15min, and then homogenized and packed in 3mL cryotubes, taken to the -20°C freezer for 2 days, and subsequently packed in -80°C freezer. Of the total of 632 bacterial strains isolated from 2011 to 2018, 442 strains (69.93%) are preserved at -80°C in Skim Milk with glycerol, and 190 (30.07%) in BHI with glycerol, at -20°C in BHI with glycerol for future researches. In 2016 and 2017 we worked with 427 strains isolated between 2013 and 2015, which were kept at -80°C, and 100% were viable. The results indicate that the use of cryoprotectants favored the preservation and stability of strains in both freezing at -80°C and at -20°C.

KEYWORDS: cryopreservation; Skim Milk; Glycerol

1 | INTRODUÇÃO

Atividades de diagnóstico e de pesquisa epidemiológica de Recursos Genéticos Microbianos de origem animal estão diretamente relacionadas com Defesa Sanitária Animal, Medicina Veterinária Preventiva, Saúde Pública e Segurança dos Alimentos, uma vez que Saúde Animal envolve questões relacionadas às enfermidades dos animais, às doenças zoonóticas, e ao controle dos riscos em toda a cadeia alimentar, visando assegurar ao consumidor a oferta de alimentos seguros e, ao animal, o seu bem-estar (LIBERAL *et al*, 2013).

Paralelamente, os microrganismos representam uma importante fonte de recursos genéticos para avanços e estudos biotecnológicos, assim como para o desenvolvimento de novos fármacos, aplicações na saúde, agricultura, indústria e meio ambiente (OLIVEIRA *et al*, 2006).

Ao longo dos anos, pesquisadores vêm destacando a importância do

conhecimento da biodiversidade microbiana para o desenvolvimento humano e animal. Nesta temática, o aprimoramento de técnicas destinadas à conservação de espécimes microbiológicas é de grande valia para a conservação e manutenção das mesmas. Muitas instituições investem na elaboração de estoques (biobancos) de cepas através de inúmeras técnicas de preservação, como por exemplo a liofilização (Figura 1) e a criopreservação (FIGUEIREDO, 2001; HOLLAND *et al*, 2003; PAOLI, 2005).



Figura 1. Equipamento de liofilização.

KEITH (1913), foi responsável por um dos primeiros relatos sobre a criopreservação de microrganismos utilizando diversos agentes como possíveis crioprotetores (Quadro 1), em temperaturas abaixo de 0°C, por um período entre 4 a 8 meses. Com o resultado de seus experimentos, o cientista chegou às seguintes conclusões:

- Existe uma relação direta entre a temperatura e o tempo de preservação;
- As baixas temperaturas não destroem as bactérias: ao contrário, por diminuir o metabolismo bacteriano elas favorecem a sua preservação durante mais tempo;
- Peptonas adicionadas aos meios de preservação ajudam na manutenção e na viabilidade da amostra.

Crioprotetores	Temperatura	Resultado
Suspensão Aquosa	-20°C	1% se manteve viável após 5 dias e inviável após algumas semanas.
Leite puro e diluído	-20°C	Quanto menos diluído o leite maior a taxa de recuperação.
Glicerina (5 a 42%) em água	-20°C	A maioria permaneceu viável por até 6 meses.

Solução de Açúcar de Cana 10% sobre crescimento em ágar após 24 horas	-10°C	A maioria permaneceu viável por até 8 meses.
---	-------	--

Quadro 1. Exemplos de crioprotetores e sua viabilidade (Fonte: KEITH,1913).

Segundo COSTA (2010), ainda não existe um método de conservação padrão, e que determine a eficiência da estocagem dos microrganismos a longo prazo. A preservação deve ser capaz de garantir a viabilidade, a isenção de contaminações e a estabilidade genética das células microbianas (QUINN *et al*, 2005). Sendo assim, a escolha do procedimento mais adequado para a conservação das cepas vai depender das características do espécime em estudo, e das vantagens e desvantagens das técnicas disponíveis (COSTA, 2010).

São imprescindíveis a manutenção e o armazenamento de forma cuidadosa, utilizando-se técnicas e protocolos já validados previamente. Portanto, a maior preocupação quanto aos métodos de preservação, como a criopreservação, reside nos efeitos sobre a estabilidade dos espécimes (HOLLAND *et al*, 2003). A criopreservação é caracterizada pelo emprego de metodologias que possibilitam a manutenção de uma variedade de organismos e/ou tipos celulares em condições de baixas temperaturas (COSTA, 2010).

Tecnologias à base de refrigeração promovem um significativo retardo nas taxas de deterioração de bens perecíveis. A utilização de baixas temperaturas, como ocorre por exemplo na criopreservação, favorecem a estocagem de organismos vivos por longos períodos. A criopreservação destaca-se como uma das técnicas mais empregadas na conservação da biodiversidade microbiana (DAY & MCLELLAN, 1995; MYAMOTO-SHINOHARA *et al*, 2000; PAOLI, 2005).

Avanços em pesquisas científicas desenvolveram métodos que possibilitaram que diferentes tipos celulares se mantivessem viáveis em baixas temperaturas. Técnicas de criopreservação são empregadas para a preservação de microrganismos, células teciduais, pequenos organismos multicelulares e organismos mais complexos, como embriões (SIMIONE, 1998).

Alguns projetos de pesquisa objetivam melhorar a manutenção do padrão morfológico, genético, bioquímico ou fisiológico, impedindo alterações nos componentes da parede celular e perda de virulência; sendo que, grande parte dos bancos de coleções usam pelo menos duas metodologias de estocagem, visando garantir a manutenção e viabilidade das cepas (SILVA *et al*, 1994; BRILHANTE *et al*, 2004; GIRÃO *et al*, 2004).

Em todos os continentes as Instituições de Ensino e Pesquisa procuram manter as suas Coleções de Culturas Microbianas, uma vez que elas desempenham um papel relevante na conservação *ex situ* de microrganismos nativos, na distribuição e identificação de Recursos Genéticos Microbianos, bem como na organização e disponibilização de informações associadas aos seus acervos. O armazenamento de microrganismos por longos períodos é extremamente importante para a sua utilização

em Pesquisa, Desenvolvimento & Inovação (PD&I). A correta preservação das cepas é fundamental para evitar contaminações e mutações, podendo levar à perda das características morfológicas, fisiológicas e genéticas (LIBERAL *et al*, 2013).

O Centro Estadual de Pesquisa em Sanidade Animal Geraldo Manhães Carneiro (CEPGM), da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO) mantém, há mais de quatro décadas, o “Banco de Germoplasma de Microrganismos de Interesse em Medicina Veterinária e Saúde Pública”. Nele estão preservadas cepas de bactérias isoladas de animais pesquisados em Projetos de Pesquisa específicos, e, também, cepas oriundas de animais atendidos na prestação de serviços de diagnóstico. Dispõe-se, ainda, de cepas recebidas de Instituições de Ensino e Pesquisa Nacionais e Estrangeiras, bem como amostras de Coleções de Culturas de Referência Nacionais e Internacionais, de Coleções Biológicas Científicas e de Coleções de Serviço nacionais.

Em 1992, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) fez um levantamento sobre as Coleções de Cultura de Microrganismos relacionados à Agropecuária, e publicou o “Catálogo de Bancos Ativos de Germoplasma de Microrganismos”, onde foram listadas as Coleções de Micro-organismos mantidas por diferentes Instituições Nacionais (LIBERAL *et al*, 2013). Nesse Catálogo foi incluído o “Banco de Germoplasma de Microrganismos” do CEPGM da PESAGRO-RIO, que vem sendo preservado e ampliado, desde então.

A Área de Biotecnologia do CEPGM da PESAGRO-RIO coordena projetos de PD&I que visam ao diagnóstico, à prevenção e ao controle de enfermidades que acometem os animais de produção. No laboratório, o patógeno é isolado, identificado e mantido na “Coleção de Microrganismos Patogênicos para Animais de Produção” (CMPAP), que integra a Vertente Microbiana de Recursos Genéticos, da Embrapa. A CMPAP foi implantada em 1976 e, atualmente, preserva cerca de 700 cepas bacterianas importantes em Sanidade Animal e Saúde Pública. Esse material genético preservado é essencial para pesquisa, desenvolvimento e inovação tecnológica no Agronegócio, destacando-se como um valioso “bem intangível”, que pode ser utilizado, inclusive, para a preparação de um Plano Nacional de Biossegurança na Pecuária Brasileira, no caso de ameaça de uma guerra biológica.

Ressalta-se, ainda, que na busca por inovação, os recursos genéticos microbianos se destacam como uma oportunidade para o desenvolvimento de produtos e/ou processos ligados à biotecnologia, gerando perspectivas ambientais e serviços ecológicos sustentáveis com foco no agronegócio.

A bioprospecção - atividade de pesquisa que visa identificar componentes do patrimônio genético e/ ou informação sobre conhecimento tradicional associado com o potencial de uso comercial - é um dos principais caminhos para o desenvolvimento sustentável da pecuária nacional, promovendo-se o aumento da produtividade das cadeias produtivas animais, e, ainda, a disponibilização de inovações tecnológicas aplicáveis em várias regiões do País (LIBERAL *et al*, 2013).

2 | METODOLOGIA

Atividades de diagnóstico e de pesquisa epidemiológica de Recursos Genéticos Microbianos de origem animal desenvolvidas pela Equipe Técnica do CEPGM da PESAGRO-RIO levaram à criação da “Coleção de Microrganismos Patogênicos para Animais de Produção” (CMPAP). A CMPAP está vinculada ao Projeto componente “Coleções Institucionais de Microrganismos”, da “Vertente Microbiana de Recursos Genéticos”, do Portfólio “Gestão Estratégica de Recursos Genéticos para Alimentação, Agricultura e Bioindústria” da Embrapa (REGEN), compondo o Macroprograma 1: “Grandes Desafios Nacionais”. Os projetos associados contam com a parceria de Unidades da Embrapa (Recursos Genéticos e Biotecnologia, Gado de Leite, e Agroindústria de Alimentos), e Instituições de P&D, tais como: FIOCRUZ, UERJ, UFRJ, UFF, UNB, UENF, e UFRGS, dentre outras.

Origem das Amostras

As cepas bacterianas mantidas na CMPAP são oriundas de isolamentos de materiais biológicos coletados de animais vivos ou que tenham vindo à óbito. Estas amostras são provenientes de Projetos de Pesquisa, prestação de serviços de diagnóstico e de cepas de referência com relevância para a Defesa Sanitária Animal e Saúde Pública.

Isolamento e Identificação Microbiana

Após a coleta e o isolamento, os microrganismos de interesse são selecionados em meios nutrientes e seletivos para posterior caracterização fenotípica e genotípica.

São utilizados métodos da Bacteriologia Clássica (Figura 2) e da Microbiologia Molecular (Figura 3) como forma de identificação das cepas, e quando demandado, genes de virulência e de resistência são pesquisados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

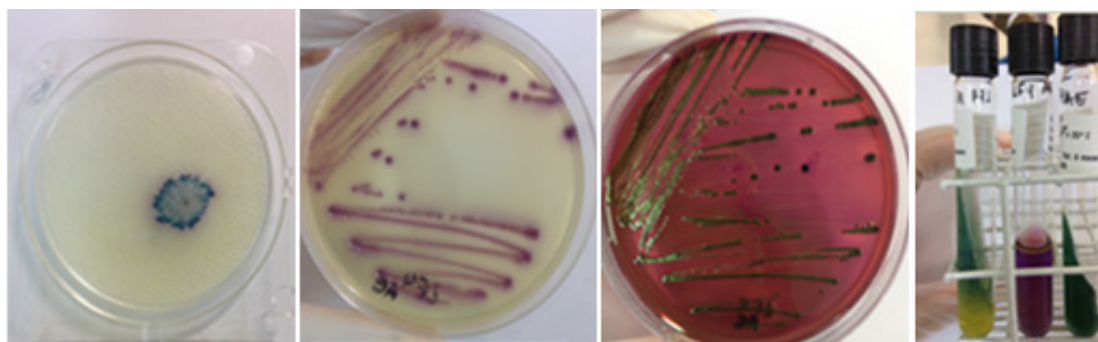


Figura 2. Confirmação da viabilidade, identidade, e pureza das cepas bacterianas por meio de testes bioquímicos.

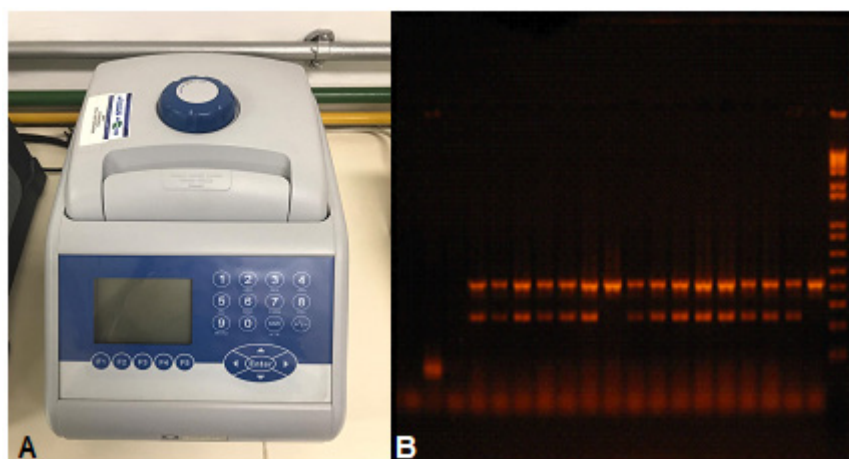


Figura 3. Equipamentos de Biologia Molecular. A. Termociclador para realização do ensaio da PCR. B. Visualização do resultado no gel de eletroforese.

Após a avaliação da espécie microbiana, estas são analisadas e verificadas quanto à melhor forma de conservação: qual o tipo de crioprotetor e a faixa de criogenia a ser escolhida.

Manutenção das Cepas

Para a manutenção das cepas, as amostras são semeadas em Tríplice Soja Ágar (TSA) a 37°C durante 24 horas, fazendo-se um inóculo bem denso. Decorrido o tempo de incubação, o inóculo crescido é transferido para o crioprotetor escolhido, em criotubos graduados de 3 mL e homogeneizados no vórtex (Figura 4).

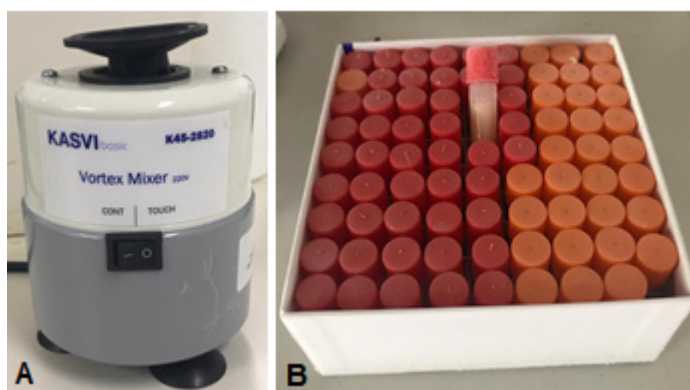


Figura 4. Conservação das amostras em criotubos. A. Equipamento vórtex utilizado para incorporação das amostras no meio de criopreservação. B. Estoque das amostras em criotubos com identificação, em caixas apropriadas para conservação em baixas temperaturas.

Em seguida, esses criotubos são mantidos em freezer (-20°C) por 2 dias, e posteriormente armazenados em ultra freezer (-80°C), conforme Figura 5. Os crioprotetores usados no Laboratório de Biotecnologia do CEPGM são: o *Skim Milk* com glicerol (10%) e Caldo Infusão Cérebro-Coração (BHI) com glicerol (15%).



Figura 5. Equipamento ultra freezer -80°C do CEPGM da PESAGRO-RIO.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A periodicidade da reativação das cepas da CMPAP depende da demanda dos pesquisadores, da mão de obra laboratorial disponível e da aquisição do material de consumo necessário para os repiques.

Até 2010, as cepas eram mantidas à -20°C, sem crioprotetores. Porém, em 2011, após a aquisição do ultra freezer -80°C, 595 cepas que estavam congeladas à -20°C foram reativadas, e avaliadas quanto à viabilidade, identidade e pureza. Dessas, apenas 64 (10,76%) estavam viáveis.

Desde então, segue-se o protocolo de criopreservação à -80°C, utilizando o *Skim Milk* com adição de 10% (p/v) de glicerol. Esse meio pode ser adquirido comercialmente, ou preparado com leite em pó desnatado. Para o meio comercial a autoclavação recomendada pelo fabricante é de 121°C durante 15 minutos. Já para o preparo com o leite em pó desnatado é de 115°C durante 8 minutos.

Do total de 632 cepas bacterianas isoladas de 2011 a 2018, 442 cepas (69,93%) estão preservadas à -80°C em *Skim Milk* com glicerol, e 190 (30,07%) à -20°C em BHI com glicerol, para futuras pesquisas.

Entre 2016 e 2017 foram reativadas 427 cepas que haviam sido isoladas nos anos de 2013 a 2015, e que estavam mantidas à -80°C. Destas, 100% apresentaram-se viáveis.

Os principais gêneros de microrganismos patogênicos provenientes de animais de produção, e as cepas de referência que compõem a CMPAP, estão preservados nas Subcoleções: Bactérias Gram-negativas; Bactérias Gram-positivas e Fastidiosas (Tabela 1). As cepas servem para utilização em projetos de PD&I, teses e monografias, estudos epidemiológicos, pesquisa de genes de virulência, determinação de resistência à antimicrobianos, estudos moleculares, protocolos para bioprospecção, e estudos das ciências ômicas, e, ainda, para o diagnóstico diferencial de doenças emergentes

e zoonoses.

Caracterização das cepas	Subcoleção		
	Gram-negativas	Gram-positivas	Fastidiosas
Cepas de pesquisa e diagnóstico	94	291	42
Cepas de referência	8	7	0
Total	102	298	42
Total Geral		442	

Tabela 1. Relação de cepas bacterianas provenientes de projetos de pesquisa, diagnóstico e referência.

Os resultados obtidos indicaram que o uso de crioprotetores adequados favoreceram a preservação e a estabilidade das cepas, tanto no congelamento à -20°C (Tabela 2) como à -80°C (Tabela 3).

Subcoleção	Grupos			Total
	I	II	III	
Gram-Negativas	Entéricas: <i>E. coli</i> = 57 <i>Salmonella</i> spp. = 2	<i>Vibrionaceae</i> e <i>Aeromonadaceae</i> = 0	Não Entéricas = 37	96
Gram-Positivas	<i>Streptococcaceae</i> = 7	<i>Staphylococcaceae</i> = 50	Bastonetes = 16	73
Fastidiosas	Anaeróbios: <i>Clostridium chauvoei</i> = 2 <i>Clostridium septicum</i> = 1 <i>Clostridium</i> sp. = 4	Outros: <i>Archanobacterium pyogenes</i> = 14		21
	Total			190

Tabela 2. Relação do número de cepas bacterianas mantidas à -20°C em BHI com glicerol e/ou *Skim Milk* com glicerol.

Gram-negativas	Subcoleção				
	Gram-positivas	Gram-positivas	Fastidiosas		
<i>Salmonella</i> sp.	1	<i>Streptococcus</i> sp.	20	<i>Haemophilus somnus</i>	6
<i>Escherichia coli</i>	47	<i>S. aureus</i>	147	<i>Archanobacterium pyogenes</i>	36

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	<i>Staphylococcus</i> sp.	57
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	<i>Enterococcus faecalis</i>	1
<i>Pasteurella multocida</i>	20	<i>Enterococcus</i> sp.	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	<i>S. epidermidis</i>	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	<i>Corynebacterium</i> sp.	10
<i>Serratia marcescens</i>	5	<i>Rhodococcus equi</i>	47
<i>Serratia liquefaciens</i>	5		
<i>Citrobacter freundii</i>	3		
<i>Serratia</i> sp.	1		
<i>Klebsiella</i> sp.	1		
Total = 94		Total = 291	
Total Geral = 427			
		Total = 42	

Tabela 3. Relação do número de cepas bacterianas mantidas à -80°C.

De acordo com a literatura, a utilização de aditivos crioprotetores tem como objetivo contornar problemas relacionados com a instabilidade dos microrganismos frente aos processos de preservação (WESSMAN *et al*, 2011),

O glicerol é quimicamente compatível com as estruturas celulares, permitindo a manutenção e a recuperação dessas estruturas após o descongelamento (ABREU & TUTUNJI, 2003), e vem se destacando como o aditivo crioprotetor mais utilizado em microbiologia (HUBÁLEK, 2003).

Essa característica vem sendo comprovada nas nossas pesquisas, onde após 4 anos de congelamento utilizando-se o glicerol, as amostras criopreservadas se mantiveram viáveis. Resultado que está de acordo com o trabalho publicado por SAEKI e colaboradores (2015), onde após 1 ano e 3 meses de congelamento, as amostras também se mantiveram viáveis.

Em trabalho realizado por MEDEIROS e colaboradores (2009), foi avaliado a conservação das amostras bacterianas em *Skim Milk* e TSB (Tríplice Soja Broth) com glicerol 20%, e após 1 ano as amostras foram ativadas e se apresentaram viáveis, com exceção das amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, mantidas no TSB com glicerol 20%.

OPLUSTIL e colaboradores (2010), destacaram que, para a uma melhor manutenção das amostras, as bactérias Gram-positivas devem ser armazenadas em glicerol ou no leite desnatado durante 1 a 3 anos, e as Gram-negativas devem ser conservadas em sacarose e lactose por 1 a 2 anos, ambas em temperaturas entre -20°C e -80°C.

4 | CONCLUSÃO

As coleções de cultura são essenciais para a preservação das espécies microbiológicas, e para garantir que as pesquisas não sejam prejudicadas com o

passar do tempo. É necessária uma maior visibilidade dos bancos de germoplasma, com o intuito de suprir a demanda de material biológico para profissionais, empresas e universidades.

A literatura relata que a utilização de variadas técnicas de preservação, podem não ser plenamente eficazes e dependem muitas vezes da espécie a ser preservada. Por vezes, é necessária a utilização de técnicas associadas para uma melhor recuperação da cepa, garantindo-se a sua futura utilização.

No campo da criopreservação muitos estudos ainda são necessários para um melhor entendimento em relação ao processo, aos crioprotetores mais adequados, à temperatura e ao tempo ideal de armazenamento. Todos esses parâmetros influenciam na qualidade da amostra a ser estocada e por isso destacamos a necessidade de investimentos em estudos específicos, para cada Família e Gênero bacteriano, de importância para aplicação em PD&I.

AGRADECIMENTO

FAPERJ, PESAGRO-RIO, UFF e CAPES.

REFERÊNCIAS

ABREU, M. M. V. & TUTUNJI, V. L. **Implantação e manutenção da coleção de culturas de microrganismos do UniCEUB**. Universitas Ciênc. Saúde. 2003; 2 (2):236-251.

BRILHANTE, R. S. N.; CAVALCANTE, C. S. P.; SOARES-JUNIOR, F. A.; MONTEIRO, A. J.; BRITO, E. H. S.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Evaluation of Microsporum canis in different methods of storage**. Medical Mycology. 2004; 42:499-504.

COSTA, E. C. **Conservação de amostras do vírus da Raiva mediante diferentes protocolos de criopreservação**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará. 2010; 115p.

DAY, J. G. & MCLELLAN, M. R. **Cryopreservacion and Freezing-Drying Protocols**. New Jersey: Humana Press. 1995.

FIGUEIREDO, M. B. **Métodos de preservação de fungos patogênicos**. Biológico. 2001; 63 (1/2):73-82.

GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Viabilidade de cepas de Malassezia pachydermatis mantidas em diferentes métodos de conservação**. Rev Soc Bras Med Trop. 2004; 37 (3):229- 233.

HOLLAND, N. T.; SMITH, M. T.; ESKENAZI, B.; BASTAKI, M. **Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies**. Mutat Res. 2003; 543:217-234.

HUBÁLEK, Z. **Protectants used in the cryopreservation of microorganisms**. Cryobiol. 2003; 46(3):205-29.

KEITH, S. C. **Factors influencing the survival of bacteria at temperatures in the vicinity of the freezing point of water.** Science 1913; 37(962): 877–879. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/37/962/877/tab-article-info>. Acesso em: 05 de junho de 2019.

LIBERAL, M. H. T.; SOUZA, R. de M.; MAGALHÃES, H. Aplicação da legislação brasileira de acesso e repartição de benefícios para o diagnóstico e a pesquisa epidemiológica de recursos genéticos microbianos de origem animal. *In*: FERREIRA, S. N.; SAMPAIO, M. J. A. M. (Org.). **Biodiversidade e conhecimentos tradicionais associados: implementação da legislação de acesso e repartição de benefícios no Brasil.** 2013. SBPC São Paulo, 153-168.

MEDEIROS, A. W.; BECKER, A. P.; PICOLI, S. **Acompanhamento de Métodos de Congelamento de Bactérias.** 2009. NewsLab - edição 95.

MYAMOTO-SHINOHARA, Y.; IMAIZUMI, T.; SUKENOBE, J.; MURAKAMI, Y.; KAWAMURA, S.; KOMATSU, Y. **Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage.** Cryobiol. 2000; 41:251-255.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. **Divisão de Recursos Microbianos. Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA).** Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2006; p.1-19.

OPLUSTIL, C. P.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R.; SINTO, S. I. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica.** 2004; 2.ed. São Paulo, SP: Sarvier, 340 p.

PAOLI, P. **Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research.** FEMS Microbiol Rev. 2005; 29:897-910.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia e Doenças Infecciosas,** Porto Alegre, Artmed. 2005; 512p.

SAEKI E. K.; FARHAT L. P.; PONTES, E. A. **Eficiência dos crioprotetores glicerol e leite desnatado para o congelamento de micro-organismos.** Acta Veterinaria Brasilica. 2015; v.9, n.2, p. 195-198.

SILVA, A. M. M.; BORBA, C. M.; OLIVEIRA, P. C. **Viability and morphological alterations of *Paracoccidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil for long periods of time.** Mycoses. 1994; 37:165-169.

SIMIONE, F. P. **Cryopreservation Manual.** Nalge International Coop, 1998. Disponível em: <http://www.nalgenelabware.com/techdata/technical/cryo.pdf> Acesso em 05 de junho de 2019.

WESSMAN P.; MAHLIN, D.; AKHTAR, S.; RUBINO, S.; LEIFER, K.; KESSLER, V.; HAKANSSON, S. **Impact of matrix properties on the survival of freeze-dried bacteria.** J Sci Food Agric. 2011; 91(14):2518-28.

SOBRE O ORGANIZADOR

BENEDITO RODRIGUES DA SILVA NETO Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso (2005), com especialização na modalidade médica em Análises Clínicas e Microbiologia (Universidade Candido Mendes - RJ). Em 2006 se especializou em Educação no Instituto Araguaia de Pós graduação Pesquisa e Extensão. Obteve seu Mestrado em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto de Ciências Biológicas (2009) e o Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (2013) da Universidade Federal de Goiás. Pós-Doutorado em Genética Molecular com concentração em Proteômica e Bioinformática (2014). O segundo Pós doutoramento foi realizado pelo Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás (2015), trabalhando com o projeto Análise Global da Genômica Funcional do Fungo *Trichoderma Harzianum* e período de aperfeiçoamento no Institute of Transfusion Medicine at the Hospital Universitätsklinikum Essen, Germany. Seu terceiro Pós-Doutorado foi concluído em 2018 na linha de bioinformática aplicada à descoberta de novos agentes antifúngicos para fungos patogênicos de interesse médico.

Palestrante internacional com experiência nas áreas de Genética e Biologia Molecular aplicada à Microbiologia, atuando principalmente com os seguintes temas: Micologia Médica, Biotecnologia, Bioinformática Estrutural e Funcional, Proteômica, Bioquímica, interação Patógeno-Hospedeiro.

Sócio fundador da Sociedade Brasileira de Ciências aplicadas à Saúde (SBCSaúde) onde exerce o cargo de Diretor Executivo, e idealizador do projeto “Congresso Nacional Multidisciplinar da Saúde” (CoNMSaúde) realizado anualmente, desde 2016, no centro-oeste do país.

Atua como Pesquisador consultor da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Goiás - FAPEG. Atuou como Professor Doutor de Tutoria e Habilidades Profissionais da Faculdade de Medicina Alfredo Nasser (FAMED-UNIFAN); Microbiologia, Biotecnologia, Fisiologia Humana, Biologia Celular, Biologia Molecular, Micologia e Bacteriologia nos cursos de Biomedicina, Fisioterapia e Enfermagem na Sociedade Goiana de Educação e Cultura (Faculdade Padrão). Professor substituto de Microbiologia/Micologia junto ao Departamento de Microbiologia, Parasitologia, Imunologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás. Coordenador do curso de Especialização em Medicina Genômica e Coordenador do curso de Biotecnologia e Inovações em Saúde no Instituto Nacional de Cursos. Atualmente o autor tem se dedicado à medicina tropical desenvolvendo estudos na área da micologia médica com publicações relevantes em periódicos nacionais e internacionais. Contato: dr.neto@ufg.br ou neto@doctor.com

ÍNDICE REMISSIVO

A

Abelha sem ferrão 58
Amarílis 11, 13, 15, 16

B

Bulbos 11, 13, 14, 15, 16

C

Cerrado 17, 26, 27, 28, 34, 35, 37, 38, 39, 45, 58, 59
Criopreservação 68, 69, 70, 73, 74, 77

D

Descritores 3, 11, 15, 33
Diversidade Genética 1, 2, 6, 9, 16, 26, 28, 29, 34, 36, 38, 40, 41, 43, 44, 46, 48, 51, 53, 55, 57

F

Fruteiras Nativas 26, 35

G

Gabirobeira 26, 27
Gargalo 36, 40, 42, 43
Glicerol 21, 67, 68, 73, 74, 75, 76, 78

I

Inovação 18, 67, 71

M

Manihot Esculenta 1, 4
Migração 18, 23, 58, 62, 63, 64

P

Populações 12, 14, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 47, 48, 51, 52, 53, 54, 57, 59
Produtividade 2, 5, 26, 27, 29, 32, 33, 48, 58, 60, 63, 71
Proteômica 18, 79
Protocolo 18, 21, 22, 36, 39, 67, 74

R

Reserva 36, 38, 41, 42, 43

S

Seleção 5, 7, 9, 28, 32, 33, 44, 46, 49, 52, 53, 54, 55

Skim Milk 67, 68, 73, 74, 75, 76

V

Variabilidade 1, 4, 5, 7, 9, 12, 26, 29, 30, 32, 33, 35, 38, 47, 48, 51, 52, 55, 56

Variedade Genética 46

Variedades Tradicionais 5, 7

Vigna Unguiculata 5, 6, 10

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-628-7

