



## Recursos Genéticos microbianos

Lara Durães Sette<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Avenida 24A, 1515, CEP: 13506-800, Rio Claro, São Paulo, Brasil. E-mail: larasette@rc.unesp.br

### Informação do artigo

**Editor Chefe:** R.F.A.Veiga  
**Editor Nº Especial:** F.V.D.Souza  
**Ano:** 2019  
**Volume:** 5  
**Número:** 1  
**Página:** 34-41

### Palavras-chave:

*Simbiose*  
*Biotecnologia*  
*Coleção de culturas*  
*Bibliotecas metagenômicas*  
*Preservação*

### RESUMO

Apesar de pequenos, os micro-organismos são de extrema relevância para os processos ecológicos e biotecnológicos. No ambiente, os micro-organismos interagem com eles mesmos e com outros organismos como as plantas e animais. Diversas biomoléculas de origem microbiana são produtos dessas interações e utilizadas de forma benéfica pelos seres humanos. Neste contexto, o material microbiológico é considerado como um insumo tanto no ambiente da pesquisa e desenvolvimento quanto nos processos produtivos. Desta forma, o tratamento desses Recursos Genéticos requer a implementação de um sistema que permita assegurar que os mesmos mantenham as suas características e propriedades. O presente manuscrito aborda a importância ecológica e biotecnológica dos Recursos Genéticos microbianos, com foco na sua obtenção e preservação.

### ABSTRACT

**(Microbial genetic resources)** Though small, microorganisms are extremely relevant for ecological and biotechnological processes. In the environment, microorganisms interact with themselves and with other organisms such as plants and animals. Several biomolecules of microbial origin are products of these interactions and used in a beneficial way by humans. In this context, the microbiological material is considered as an input in the research and development, as well as in the production processes. In this way, the treatment of these genetic resources requires the implementation of a system that ensures the maintenance of their characteristics and properties. The present manuscript reports the ecological and biotechnological importance of microbial genetic resources, with a focus on their obtaining and preservation.

### Introdução

O grupo dos micro-organismos é composto por organismos procaríotos (bactérias e arqueias); eucariotos (fungos filamentosos, leveduras, protozoários e algas microscópicas) e pelos vírus, considerados como acelulares. A habilidade dos micro-organismos para produção de uma variedade de biomoléculas está associada à simplicidade de suas células, ao longo período de tempo de existência em nosso planeta, e à capacidade de realizar mutações em um curto período de tempo, o que os permite “experimentar” e se adaptar. Portanto, a extraordinária atividade dos micro-organismos está baseada em sua notável diversidade metabólica e adaptabilidade genética.

Neste contexto, apresenta-se o termo Recursos Genéticos, cuja definição pode ser considerada como a fração da biodiversidade que tem previsão de uso atual ou potencial (QUEIROZ, 1999).

Estudos sugerem que as primeiras formas de vida foram de origem microbiana. Os organismos procaríotos existem desde cerca de 3 bilhões de anos, enquanto que os seres mais complexos (e.g. plantas e animais) começaram a aparecer a partir de 500 milhões de anos.

Fica assim evidenciado o longo período de tempo de existência e evolução adaptativa dos micro-organismos, levando à diferenciação e diversificação, o que os permitiu ocupar todos os *habitats* disponíveis no planeta terra, incluindo ambientes extremos como os contaminados com

metais e compostos químicos, regiões polares, salinas, entre outros.

Considerando o acima exposto é factível acreditarmos que a maior diversidade genética é possivelmente de origem microbiana. Entretanto, essa diversidade é muito pouco conhecida. Tomando como exemplo o grupo dos fungos, dados da década de 90 indicam que o número de espécies estimado era de 1.500.000, sendo que o número de espécies descritas era de 69.000, ou seja, conhecia-se apenas 5% do valor estimado (HAWKSWORTH, 1991). A estimativa do número de espécies de fungos mais atual é de cerca de 5.000.000 (O'BRIEN et al., 2005), com uma taxa de 1.200 descrições de novas espécies por ano. De acordo com Hibbett et al. (2011) levaremos em torno de 4000 anos para descrever toda a extensão de espécies fúngicas estimadas em nosso planeta. Esses dados evidenciam a magnitude da diversidade microbiana ainda não conhecida e explorada biotecnologicamente.

Dentre os principais fatores para o pouco conhecimento da diversidade microbiana podemos destacar: i) a limitação dos métodos de cultivo (estima-se que somente uma pequena fração da real diversidade microbiana de uma amostra pode ser cultivada em condições laboratoriais; ii) ambientes pouco ou ainda não explorados; iii) escassez de profissionais especializados em sistemática e taxonomia microbiana.

É importante destacar que nem sempre a diversidade filogenética (onde são abordadas as relações evolutivas, tais como família, gênero, espécies) coincide com a diversidade funcional (que aborda as variações morfológicas e funcionais, relacionadas à fisiologia e ecologia), visto que grupos filogeneticamente próximos podem apresentar uma diversidade funcional diferente e grupos filogeneticamente distintos podem apresentar diversidade funcional similar.

Do ponto de vista funcional, são vários os exemplos que atestam a relevância dos Recursos Genéticos microbianos: i) saúde: destacam-se os estudos associados à rapidez e acurácia na identificação de doenças causadas por micro-organismos e o desenvolvimento de métodos de controle; ii) indústria farmacêutica: descoberta e desenvolvimento de novas drogas com atividade antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória, entre outras; iii) indústria de alimentos e bebidas: os produtos fermentados são bons exemplos para esse setor, incluindo os molhos de soja, iogurte, queijos, cervejas e vinhos; iv) agronegócio: destacam-se as pesquisas e produtos voltados para o controle biológico de pragas, além das micorrizas e bactérias fixadoras de nitrogênio; v)

ambiente: processos de biorremediação de ambientes contaminados, incluindo efluentes industriais.

Os Recursos Genéticos microbianos movimentam o setor da bioeconomia, o qual representa a associação entre natureza e valor econômico. Considerando o fato de que a exploração da biodiversidade pode causar prejuízos incalculáveis à natureza, podendo acarretar o extermínio de determinadas espécies, no ano de 1992 durante a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (Rio 92), foi estabelecida a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB). A CDB tem como premissas principais a importância e o valor da diversidade biológica, bem como a soberania dos Estados sobre os seus próprios recursos biológicos. Os objetivos da CDB incluem: i) a conservação da diversidade biológica, ii) a utilização sustentável de seus componentes e iii) a repartição justa e equitativa dos benefícios derivados da utilização dos Recursos Genéticos (CDB, 1992).

O Brasil foi um dos países pioneiros na implementação de uma lei de acesso ao patrimônio genético, ao conhecimento tradicional associado e à repartição de benefícios: a MP 2186-16, de 2001, alinhada à CDB. Entretanto, essa legislação, que visava impedir a biopirataria, acabou por engessar a pesquisa nacional. Atualmente, o uso do material biológico pertencente ao patrimônio genético nacional é regido pela Lei da Biodiversidade (Lei 13.123 de 2015). No caso dos organismos geneticamente modificados (OGMs) a regulamentação envolvendo a construção e uso dos mesmos está a cargo da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Considerando o fato de que os Recursos Genéticos microbianos constituem a base de inúmeros processos biotecnológicos é preciso estar atento às regulamentações para que possamos explorar a diversidade microbiana de forma justa e consciente, gerando benefícios e garantindo o direito de propriedade intelectual.

Do ponto de vista ecológico, os micro-organismos participam ativamente na ciclagem de nutrientes e realizam interações com outros seres vivos, contribuindo para a estabilidade dos ecossistemas.

Os micro-organismos surgiram e se diversificaram previamente aos macro-organismos, os quais por serem maiores e mais complexos forneceram novos potenciais *habitats* ricos em nutrientes e proteção para os micro-organismos. Assim, muitos micro-organismos se tornaram dependentes de seus hospedeiros para a sobrevivência. Por outro lado, as biomoléculas produzidas pelos micro-organismos podem ser usadas como agentes

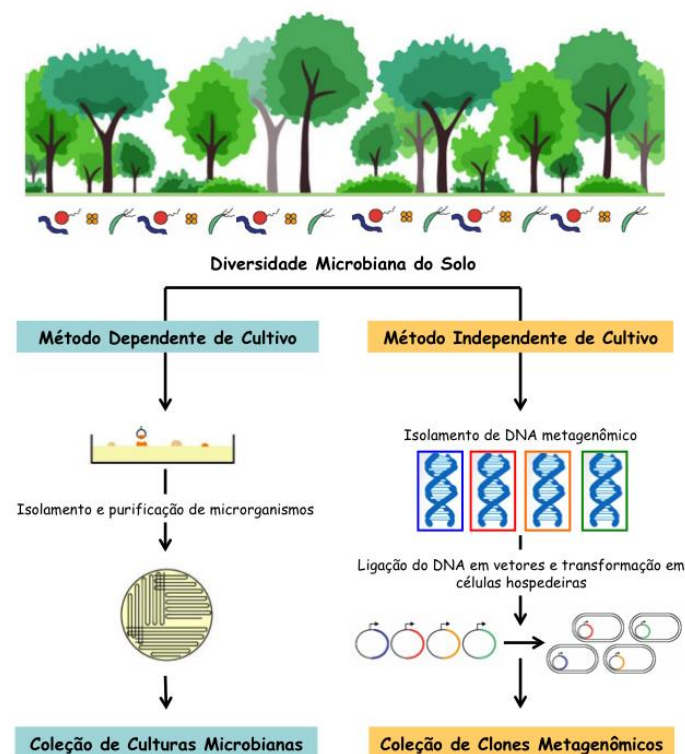
de defesa pelos hospedeiros. Como resultado, plantas e animais têm se envolvido em complexas interações com micro-organismos durante sua evolução (MORAN, 2006).

De acordo com Conti et al. (2012) é muito provável que os produtos naturais (biomoléculas) sejam resultados das interações entre organismos entre si e destes com o ambiente, e que desempenhem funções precisas e definidas nessas associações simbióticas, representando uma das vantagens adaptativas e evolutivas para os organismos produtores.

As relações entre micro-organismos e plantas, micro-organismos e insetos e micro-organismos e humanos estão reportadas nos artigos de divulgação da área de Recursos Genéticos Microbianos nesta presente edição da RGNews.

### Obtenção de Recursos Genéticos microbianos

Independentemente da natureza do estudo que se queira realizar, a obtenção de material biológico de origem microbiana pode ser realizada pela aplicação de duas abordagens: o método dependente e o independente de cultivo. A utilização do primeiro método resultará em uma coleção de culturas microbianas e a utilização do segundo em uma coleção de clones metagenômicos, conhecida também por biblioteca metagenômica (Figura 1).



**Figura 1.** Representação esquemática das estratégias de obtenção de recursos genéticos microbianos. Método dependente de isolamento e cultivo (esquerda) e método independente de isolamento e cultivo (direita).

O isolamento de micro-organismos ainda é uma etapa importante da cadeia produtiva, mesmo levando em conta o fato de que apenas de 1 a 15% da diversidade microbiana presente em uma amostra pode ser recuperada por método dependente de cultivo. Biomoléculas com propriedades de interesse para o setor industrial e ambiental têm sido encontradas nesta parcela recuperada pelo isolamento e cultivo.

Tanto para a obtenção dos micro-organismos quanto para a obtenção de seus genomas (metagenomas), uma boa estratégia de amostragem deve ser implementada e, para tanto, as normas de coleta de material biológico devem ser respeitadas. No Brasil, a legislação que incide sobre a coleta de material biológico pertencente ao patrimônio genético nacional é regida pela IN nº 3 de 2014 do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.

A definição do local da coleta da amostra e do tipo de amostra a ser coletada é uma etapa fundamental do processo de obtenção dos Recursos Genéticos microbianos. O acondicionamento das amostras após coleta e até o processamento das mesmas deve ser realizado de forma apropriada. A refrigeração entre 2°C e 10°C é recomendado para amostras microbiológicas.

Diferentes técnicas de amostragem podem ser aplicadas e o uso das mesmas irá depender da natureza da amostra a ser coletada. Após a coleta do substrato as amostras devem passar por algum tipo de tratamento visando principalmente a separação das células microbianas do substrato ou exposição de seus genomas.

Para o isolamento de células microbianas, amostras de solos e sedimentos são geralmente submetidas a diluições seriadas em água peptonada ou salina. Por outro lado, amostras de água geralmente possuem números de células reduzidos e são então filtradas visando a concentração celular. Amostras sólidas podem ser fragmentadas ou trituradas. É importante destacar que no caso do interesse por micro-organismos que vivem dentro de plantas ou animais, a esterilização da superfície se faz necessária.

A aplicação de diferentes condições de cultivo deve ser considerada para a obtenção de uma maior diversidade microbiana. Assim, meios de cultivo nutritivos, oligotróficos, complexos e diferenciais devem ser utilizados, bem como diferentes temperaturas, pH e condições de oxigenação.

Um método consagrado para o isolamento de micro-organismos da natureza é o enriquecimento, o qual baseia-se no cultivo em meio e condições de incubação que sejam seletivos para o grupo de organismo desejado. Esta técnica é muito utilizada para isolamento em amostras

com baixo número de células microbianas (e.g. ambientes extremos como os reservatórios de petróleo a altas profundidades e temperaturas).

Na tentativa de fornecer as condições ambientais para o desenvolvimento de micro-organismos ainda não cultivados em laboratório, a câmara de difusão é uma alternativa interessante principalmente para o isolamento de procariotos. A câmara é composta por um disco de material inerte com um buraco ao centro onde é colocada uma camada de meio de cultivo sólido inoculado por uma fração da amostra, o qual será coberto na superfície superior e inferior por uma membrana filtrante, permitindo a passagem do oxigênio e de compostos químicos por difusão e a eliminação de metabólitos, e impedindo a entrada e saída das células microbianas. A câmara é colocada no ambiente natural (e.g. solo, sedimento aquático) e deixada por algum tempo. Estudos preliminares relevaram que alguns micro-organismos do ambiente pode adquirir habilidade de se desenvolver em meios de cultivo em placas de Petri após repetidos cultivos na câmara de difusão (BOLLMANN; LEWIS; EPSTEIN, 2007).

Os procedimentos relacionados ao isolamento e purificação de micro-organismos a partir de amostras ambientais são extremamente laboriosos, demandando tempo, necessidade de recursos humanos e material de microbiologia básica. A coleção de cultura microbiana gerada em cada isolamento deve ser devidamente catalogada e preservada. Neste sentido, projetos de pesquisa que envolvem o isolamento de micro-organismos devem garantir a sobrevivência e pureza dos mesmos. Se as condições laboratoriais não forem favoráveis para a manutenção adequada do acervo, cópia do mesmo deve ser transferido (depositado) para uma coleção de cultura estabelecida e confiável, pois será a base para o conhecimento da biodiversidade, interações ecológicas e desenvolvimento tecnológico.

Com relação ao método independente de cultivo, existem diversos protocolos para obtenção de DNA metagenômico, os quais são divididos em diretos e indiretos. O método escolhido para extração deve garantir que o material genético esteja com alta qualidade e em quantidade substancial, incluindo DNA de micro-organismos presentes em baixas concentrações. Os tratamentos de lise celular devem preservar a integridade do DNA extraído visto que para a construção de bibliotecas metagenômicas para análises funcionais os genes e *operons* devem estar inteiros para serem expressos pelo hospedeiro (DIAS et al., 2014).

Para a construção de uma biblioteca metagenômica fragmentos de DNA metagenômico são inseridos em vetores de clonagem pela técnica do DNA recombinante. A escolha do vetor de clonagem dependerá do tamanho do fragmento a ser clonado. Para o estudo de genes e vias metabólicas é recomendável utilizar clones com insertos de DNA de alto peso molecular, aumentando as chances de encontrar *hits* positivos durante o processo de seleção dos clones da biblioteca metagenômica.

O micro-organismo hospedeiro é um ponto importante para construção da biblioteca. Diferentes hospedeiros possuem diferentes capacidades e sistemas heterólogos de expressão gênica. A bactéria *Escherichia coli* é o hospedeiro mais comumente utilizado para a clonagem e expressão de genes em bibliotecas metagenômicas devido ao fato de ter o genoma bem definido e ser fácil de transformar. Entretanto, de acordo com Dias et al., (2014) apenas 40% dos genes presentes na amostra ambiental são expressos pela *E. coli* devido ao não reconhecimento das sequências de sinalização de transcrição de genes alvo. Para evitar essa limitação, hospedeiros alternativos devem ser utilizados.

Para aumentar a proporção de genes ou vias metabólicas de interesse, diferentes estratégias devem ser projetadas para enriquecer a biblioteca metagenômica com as sequências de interesse. Nesses casos, a extração do DNA alvo evita a reprodução da microbiota original, mas pode disponibilizar uma grande quantidade de material genômico de espécies contendo os genes desejáveis. A estratégia principal utilizada para o enriquecimento consiste na adição de compostos particulares de interesse no meio de cultura como única fonte de carbono e energia para obtenção de uma maior proporção de populações que utilizam este composto (DIAS et al., 2014).

Apesar de ser uma ferramenta relativamente nova para a prospecção de Recursos Genéticos microbianos, diversos estudos têm reportado a construção eficiente de bibliotecas metagenômicas. A maioria desses estudos está relacionada a amostras de solos. Entretanto, estudos com amostras de ambientes extremos ou impactados também foram reportados como é o caso de bibliotecas construídas com DNA de amostras de efluentes de refinaria de petróleo (~13.000 clones – SILVA et al., 2012), de amostras de reservatório de petróleo (31.000 clones – VASCONCELLOS et al., 2010) e de solos remotos do Alaska (714.000 clones – ALLEN et al., 2009). No geral essas coleções contemplam um alto número de clones, salientando a importância de se etiquetar/codificar e preservar adequadamente esses Recursos Genéticos para os estudos futuros relacionados à triagem funcional.

A arte da construção de bibliotecas metagenômicas leva tempo e prática para ser dominada. Considerando o substancial desafio e os custos associados à construção das bibliotecas, bem como a dificuldade na obtenção de amostras ambientais raras (e.g. ambientes extremos), devemos encontrar maneiras de maximizar estes valiosos recursos para o compartilhamento dos benefícios. Seria extremamente valioso se as coleções de bibliotecas metagenômicas que podem ser usadas em uma variedade de hospedeiros pudessem ser acessadas pela comunidade científica.

### Preservação de Recursos Genéticos microbianos

Para a preservação de material biológico de origem microbiana, diferentes métodos podem ser utilizados. Na maioria das vezes, os métodos de preservação mais adequados e recomendados exigem equipamentos sofisticados e recursos humanos treinados e habilitados, tanto para operar o equipamento quanto para desempenhar o protocolo operacional estabelecido. Os micro-organismos requerem frequentemente métodos específicos de preservação a fim de que sejam assegurados viabilidade, pureza e estabilidade genética. Os métodos de preservação são classificados como: i) de curta duração, ii) de médio prazo, e iii) de longo prazo. Os métodos de longo prazo são os recomendados em protocolos internacionalmente reconhecidos (Tabela 1).

A liofilização é considerada uma das técnicas mais eficientes para a manutenção de micro-organismos por garantir a viabilidade celular por muitos anos mas não é aplicável para microalgas e protozoários e micro-organismos que não esporulam. Apesar da liofilização ser amplamente empregada na manutenção de diferentes micro-organismos as etapas que compõem o processo podem causar injúrias ou danos celulares como alterações na permeabilidade da membrana celular. Os procedimentos de estocagem e acondicionamento influenciam significativamente na vida de prateleira dos materiais liofilizados. Desta forma, os produtos liofilizados devem ser acondicionados em ambientes com baixa umidade, baixa temperatura (refrigeração) e ao abrigo da luz. O método de liofilização oferece alta estabilidade do material a ser conservado, baixa taxa de mutação e contaminação, além de ser o método mais seguro para o transporte de culturas microbianas (SOLA et al., 2012).

A criopreservação consiste na manutenção das células sob temperaturas ultrabaixas (-80°C a -196 °C), tendo como principal objetivo a redução de injúrias aos

materiais biológicos durante o processo de congelamento e estocagem a frio. A estocagem a baixas temperaturas, apesar de eficiente, pode comprometer a qualidade das amostras armazenadas, tendo em vista a possibilidade de variações de temperatura em freezers. Já os sistemas de nitrogênio líquido garantem o armazenamento a temperaturas constantes e por longos períodos. A criopreservação de micro-organismos é dependente de uma série de fatores e requer alguns cuidados para que seja eficiente (SOLA et al., 2012).

É importante destacar que independentemente do método a ser utilizado, um controle do mesmo deve ser aplicado, principalmente para os métodos de média e longa duração. Assim, a contagem do número de células antes e após o processamento do método de preservação deve ser realizada periodicamente visando determinar a taxa de mortalidade do micro-organismo específico no protocolo utilizado.

Por medidas de segurança e para minimizar a possibilidade de perda de linhagens, cada cultura deve ser mantida por pelo menos dois métodos distintos. De acordo com as normas da Organização para Cooperação e Desenvolvimento econômico (OECD, 2007) pelo menos um dos métodos utilizados deve ser a criopreservação ou a liofilização por serem considerados métodos com menos riscos de alterações genéticas, além de garantir a preservação por longos períodos de tempo.

Ainda, é recomendável que um *back-up* da coleção de culturas ou de clones metagenômicos deva existir em local distinto e separado, evitando os riscos de perda de importantes Recursos Genéticos por motivos de incêndio, enchentes, terremotos, guerras, dentre outras catástrofes ou intempéries da natureza.

Neste contexto, as coleções biológicas são essenciais como suporte ao desenvolvimento de pesquisas e biotecnologia, provendo material biológico com qualidade assegurada e informações associadas. As coleções de culturas microbianas variam em tamanho e função e são classificadas como coleção de pesquisa, coleção de referência, coleção de serviço e coleção para fins patentários (*IDA – International Depository Authority*). Independentemente do tamanho ou natureza institucional a principal função das coleções de culturas microbianas é a preservação e o fornecimento de Recursos Genéticos para a pesquisa e inovação (SMITH, 2012).

A primeira coleção de cultura de serviços registrada foi a Coleção Král criada em 1890 na Universidade de Praga (República Checa), onde culturas de fungos eram comercialmente disponibilizadas (SETTE et al., 2013). Atualmente, cerca de 750 coleções de cultura estão

registradas no *World Data Center for Microorganisms* (WDCM, 2018) e que juntas detêm mais de 2,9 milhões de isolados representantes de uma vasta gama de micro-organismos pertencente ao grupo das bactérias (1,2 milhões), fungos (813 mil) e vírus (37 mil) e de culturas de células (32 mil).

Coleções de serviço, que possuem acervos abrangentes e curadoria profissional, com sistemas de informação que permitem rastrear as condições de processamento, conformidade dos produtos e registros do material biológico distribuído, e que atuam em conformidade com a legislação nacional e internacional, são potenciais candidatas ao status de Centro de Recursos Biológicos (CRBs), uma nova categoria proposta no cenário internacional e que contém a seguinte definição: “...são partes essenciais da infraestrutura de apoio às ciências da vida e biotecnologia, atuando como provedores de serviços, repositórios de células vivas e genomas de organismos e informação relacionada à hereditariedade e funções de sistemas biológicos” (definição adotada no Workshop “Biological Resource Centres”, Tokyo 1999).

Os CRBs devem atender a padrões elevados de qualidade exigidos pelo mercado internacional, comunidade científica e setor industrial no que diz respeito à distribuição de materiais biológicos e informações associadas.

Considerando os desenvolvimentos da biotecnologia e bioeconomia a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) propôs o estabelecimento de um Rede Global de Centros de Recursos Biológicos (GBRCN) (OECD, 2001), a ser consolidada a partir de coleções de serviços reconhecidas como CRBs em seus próprios países.

Existem coleções microbiológicas importantes localizadas no mundo inteiro, as quais atuam como centros de excelência em conservação *ex situ* e taxonomia microbiana, como por exemplo: ATCC (Estados Unidos), BCCM (Bélgica), CBS (Holanda), CFBP (França), DSMZ (Alemanha), ICMP (Nova Zelândia) e JCM (Japão). No Brasil, país megadiverso e detentor de cerca de 20% da diversidade global, o sistema existente de coleções de serviço é ainda incipiente em razão da falta de uma política adequada para o setor.

Entretanto, avanços vêm sendo alcançados. Algumas demandas apresentadas por ações internacionais e a Política Brasileira de Desenvolvimento da Biotecnologia estabelecida pelo Decreto 6.041 (fevereiro de 2007) foram motivando o estabelecimento de uma Rede Brasileira de Centro de Recursos Biológicos (CRB-Br). Os avanços

nesta direção são consequência de várias iniciativas que envolvem instituições como o MCTIC (Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações); INMETRO (Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), TECPAR (Instituto de Tecnologia do Paraná), FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz), EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas), BCRJ (Banco de Cadeias do Rio de Janeiro), CRIA (Centro de Informação Ambiental), INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial) e SBM (Sociedade Brasileira de Microbiologia).

Um programa de capacitação para melhoria da gestão da qualidade em coleções de serviços selecionadas foi implementada com o apoio de MCTIC e o INMETRO lançou o programa de requisitos para credenciamento de CRBs pela norma técnica NIT-DICLA-061 complementada pelos requisitos aplicáveis das Diretrizes de Boas Práticas da OECD para CRBs (HOLANDA et al., 2012).

Mais recentemente, uma nova e importante etapa para o estabelecimento da Rede foi concluída. O MCTIC instituiu a Rede Brasileira de CRBs e sua estrutura foi concluída por meio da Portaria nº 130 (de 18 de fevereiro de 2016). Entretanto, o Conselho Diretor precisa ser designado para dar início às atividades de reconhecimento dos CRBs. A Rede CRB-Br prevê a adesão de outras coleções de serviços associadas, com acervos de interesse e curadoria especializada, que atendam aos requisitos para atuar em consonância com os CRB nas diferentes áreas temáticas (Agronegócio, Saúde, Indústria e Ambiente).

A procura por material biológico em coleções reconhecidas se deve principalmente ao fato de que estas coleções possuem como procedimentos de rotina a realização de testes de controle de qualidade e autenticação do material. Durante o processamento de uma amostra (cultura microbiana) desde o seu registro de entrada na coleção até a sua saída (distribuição), testes de controle de qualidade são realizados em diferentes etapas do processamento, visando avaliação de sua identidade, viabilidade e pureza.

É importante ressaltar que para cada linhagem preservada os dados associados precisam ser mantidos com segurança. Estes dados são relevantes, pois relatam o local e o substrato de onde os micro-organismos foram isolados, o coletor (e instituições); identificação taxonômica; métodos de cultivo e manutenção; características fenotípicas; entre outros. Um conjunto mínimo de dados (MDS) definidos no Guia de Boas Práticas para CRBs (OECD, 2007) precisa ser

disponibilizado para cada micro-organismo mantido na coleção. Para manutenção eficiente e segura das informações associadas as coleções devem implementar sistemas informatizados e executar periodicamente *backups*. Por segurança, arquivos de computador ou cópia dos registros devem ser mantidos separadamente (WFCC, 2010).

Cabe destacar que como repositórios e fornecedores de diversidade microbiana e informações associadas, coleções de culturas e CRBs têm uma papel relevante na promoção da Convenção sobre Diversidade Biológica, especialmente no Protocolo de Nagoya sobre Acesso e Repartição de Benefícios – ABS (CBD, 2011).

**Tabela 1.** Métodos de preservação recomendados no Guia de Boas Práticas para CRBs da OECD (OECD, 2007).

Material Biológico	Método de preservação recomendado
Bactérias e Arqueias	Criopreservação em temperaturas abaixo de -140°C ou a -80°C Secagem a vácuo (liofilização), secagem por congelamento em prateleira, secagem a líquido
Leveduras e Fungos Filamentosos	Criopreservação em temperaturas abaixo de -140°C ou a -80°C Secagem a vácuo (liofilização) ou secagem a líquido Preservação em água ou em óleo: utilizados para fungos que não esporulam
Protozoários	Criopreservação em nitrogênio líquido (abaixo de -140°C)
Microalgas	Meio líquido ou semi-sólido; criopreservação abaixo de -140°C
Vírus	Manutenção <i>in situ</i> ; criopreservação em nitrogênio líquido ou liofilização
Bibliotecas de DNA	Criopreservação do P/H* abaixo de -70°C ou em nitrogênio líquido Secagem a vácuo (liofilização) ou secagem a líquido Preservação do DNA precipitado em etanol

\*P/H = Plasmídeo/Hospedeiro

## Conclusões

Considerando a importância dos micro-organismos na manutenção dos ecossistemas, nas interações benéficas com outros micro-organismos, plantas e animais, e no desenvolvimento da bioeconomia, o estabelecimento de programas nacionais e internacionais que ampliem o acesso, conhecimento, catalogação, preservação e uso desses Recursos Genéticos devem ser estimulados.

Neste contexto, a consolidação da Rede Brasileira de Centros de Recursos Biológicos (Rede CRB-Br) permitirá que o patrimônio genético nacional de origem microbiana seja tratado e preservado adequadamente, assegurando a reprodutibilidade e sustentabilidade dos acervos utilizados em pesquisa e desenvolvimento tecnológico. Em adição, o estabelecimento da Rede CRB-

Br possibilitará a inserção do Brasil na Rede Global de Centros de Recursos Biológicos (GBRCN).

## Agradecimentos

A autora agradece à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro aos projetos de pesquisas (FAPESP #2005/51213-8, #2008/06600-1, #2010/17033-0, #2013/19486-0, #2016/07957-7 e CNPq #558020/2009-4, 204489/2010-1, 504139/2012-9, 304103/2013-6, 303145/2016-1) e na forma de bolsas de estudos relacionados à obtenção, preservação e aplicação biotecnológica dos Recursos Genéticos microbianos.

## Referências

- ALLEN, H.K.; MOE, L.A.; RODBUMRER, J.; GAARDER, A.; HANDELSMAN, J. Resident microbiota of the gypsy moth midgut harbors antibiotic resistance determinants. *DNA Cell Biology*, v. 28, p. 109-117, 2009.
- BOLLMANN, A.; LEWIS, K.; EPSTEIN, S.S. Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the diversity of recovered isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, p. 6386-6390, 2007.
- CONTI, R.; GUIMARÃES, D.O.; PUPO, M.T. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. *Ciência e Cultura*, v. 64, p. 43-47, 2012.
- CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY. *Nagoya Protocol on Access to Genetic Resources and the Fair and*

- Equitable Sharing of Benefits Arising from their Utilization to the Convention on Biological Diversity.** United Nations: Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 2011.
- CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY. United Nations, 28p, 1992. Disponível em: <<http://www.cbd.int/doc/legal/cbd-en.pdf>>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2019.
- DIAS, R.S.; SILVA, L.C.F.; ELLER, M.R.; OLIVEIRA, V.M.; PAULA, S.O.; SILVA, C.C. Metagenomics: Library Construction and Screening Methods. In: BENEDETTI, C. (Org.). **Metagenomics: Methods, Applications and Perspectives**. 1 ed. New York: Nova Science Publishers, 2014, v. 1, pp. 25-38.
- HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. **Mycological Research**, v. 95, p. 641-655, 1991.
- HIBBETT, D.S.; OHMAN, A.; GLOTZER, D.; NUHN, M.; KIRK, P.M.; NILSSON, R.H. Progress in molecular and morphological taxon discovery in fungi and options for formal classification of environmental sequences. **Fungal Biology Reviews**, v. 25, p. 38-47, 2011.
- HOLANDA, P.; CAVALCANTI, E.; BORGES, R.M.H.; SOUZA, W.S. Conformity assessment for biological resource centres (BRC): The Brazilian approach. **World Federation Culture Collection News**. v. 52, p. 11-13, 2012.
- MORAN, N.A. Symbiosis. **Current Biology**, v. 16, R.866, 2006.
- O'BRIEN, H.E.; PARRENT, J.L.; JACKSON, J.A.; MONCALVO, J.M.; VILGALYS, R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5544-5550, 2005.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres**, 2007. Disponível em: <[http://www.oecd.org/document/36/0,3343,en\\_2649\\_34537\\_38777060\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/36/0,3343,en_2649_34537_38777060_1_1_1_1,00.html)> Acesso em: 16 de fevereiro de 2019.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Biological Resource Centres: Underpinning the Future of Life Sciences and Biotechnology. **OECD Publications**, Paris, France, p. 66, 2001.
- QUEIROZ, A.M. Os recursos genéticos vegetais e os melhoristas de plantas. In: QUEIROZ, M.A.; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Eds.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.
- SETTE, L.D.; PAGNOCCA, F.C.; RODRIGUES, A. Microbial culture collections as pillars for promoting fungal diversity, conservation and exploitation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 2-8, 2013.
- SETTE, L.D. **Nota Técnica: Recursos Humanos e Infra-Estrutura para Coleções Microbiológicas**. Disponível em: <<https://www.portaleducacao.com.br/conteudo/artigos/enfermagem/recursos-humanos-e-infra-estrutura-para-colecoes-microbiologicas/2275>> Acesso em: 16 de fevereiro de 2019.
- SILVA, C.C.; HAYDEN, H.; SAWBRIDGE, T.; MELE, P.; KRUGER, R.H.; RODRIGUES, M.V.N.; COSTA, G.G.L.; VIDAL, R.O.; SOUSA, M.P.; TORRES, A.P.R.; VÂNIA, M.J.; SANTIAGO, V.M.J.; OLIVEIRA, V.M. Phylogenetic and functional diversity of metagenomic libraries of phenol degrading sludge from petroleum refinery wastewater treatment system. **AMB Express**, v. 2, p. 18, 2012.
- SMITH, D. Culture Collections. **Advances in Applied Microbiology**, v. 7, p. 73-118, 2012.
- SOLA, M.C.; OLIVEIRA, A.P.; FEISTEL, J.C.; REZENDE, C.S.M. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, p. 1398-1418, 2012.
- VASCONCELLOS, S.P.; ANGOLINI, C.F.F.; GARCIA, I.N.S.; DELLAGNEZZE, B.M.; SILVA, C.C.; MARSAIOLI, A.J.; NETO, E.V.S.; OLIVEIRA, V.M. Screening for hydrocarbon biodegraders in a metagenomic clone library derived from brazilian petroleum reservoirs. **Organic Geochemistry**, v. 41, p. 675-681, 2010.
- WORLD FEDERATION FOR CULTURE COLLECTIONS (WFCC). **Guidelines for the Establishment and Operation of Collections of Culture of Microorganisms**, third ed. Belgium: WFCC Secretariat, 2010.
- World Data Center for Microorganisms (WDCM)**. Disponível em: <<http://refs.wdcm.org/home.htm>> Acesso em: 16 de fevereiro de 2018.