



**V CBRG**

Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos  
De 6 a 9 de novembro | Fortaleza-Ceará

## *Preservação*



# V CBRG

Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos  
De 6 a 9 de novembro | Fortaleza-Ceará

## ADEQUAÇÃO DE COLEÇÃO DE MICRORGANISMOS MULTIFUNCIONAIS DA EMBRAPA RORAIMA A MODELO DE GESTÃO

Eliane do Nascimento Cunha Farias<sup>1\*</sup>; Hyanameyka Evangelista de Lima Primo<sup>1</sup>; Krisle da Silva<sup>2</sup>;

<sup>1</sup>Embrapa Roraima. <sup>2</sup>Embrapa Florestas. \*eliane.farias@embrapa.br.

A Embrapa Roraima possui uma Coleção de Microrganismos Multifuncionais (CMMERR) que conta com bactérias e fungos isolados de plantas, raízes e solos de Roraima. Este acervo é resultado de 14 anos de pesquisa na área de Microbiologia do Solo e representa um importante banco de recursos genéticos da região. Em 2016, a coleção da Embrapa Roraima foi incorporada ao projeto “QUALIMICRO: Implementação e Monitoramento de Sistemas da Qualidade nas Coleções Microbianas da Embrapa”, que tem duração de cinco anos (até 2020) e cujo objetivo é implantar e monitorar os requisitos da qualidade propostos no documento orientador Modelo Corporativo de Gestão para as Coleções de Microrganismos da Embrapa– GESTCOL. O cumprimento desses requisitos é fundamental para que a coleção alcance níveis de excelência e atenda a padrões nacionais e internacionais, regulamentações de biossegurança, acessibilidade e harmonização dos procedimentos e processos. Em julho de 2016, foi realizado um diagnóstico da situação da CMMERR quanto ao atendimento dos requisitos. Neste mesmo ano, a equipe recebeu treinamento na Norma Técnica ABNT NBR ISO 17025 e no Modelo Corporativo de Gestão para as Coleções de Microrganismos da Embrapa. A partir da elaboração de um plano de implementação com 47 atividades, foram iniciados os trabalhos de adequação. Até julho de 2018, 18 atividades estavam finalizadas, 10 em andamento e 17 não iniciadas. Ao comparar a situação da coleção antes do início do projeto com o momento atual, houve avanço, principalmente em relação a implementação de processo de gestão na rotina da coleção, o que tem possibilitado melhorias na padronização de protocolos, dos registros de todos os processos, do planejamento de treinamentos de empregados e colaboradores, e no controle de acesso, além do estabelecimento de múltiplas formas de preservação (de longa e média duração) de todos os microrganismos. Ao final do projeto, espera-se que a coleção esteja com o modelo de gestão implantado e garantindo a excelência em todas as atividades.

**Palavras-chave:** coleção de microrganismo; norma de gestão; adequação.

**Agradecimentos:** EMBRAPA.



# V CBRG

Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos  
De 6 a 9 de novembro | Fortaleza-Ceará

## COLEÇÃO DE FUNGOS DO LABORATÓRIO DE MICOLOGIA AMBIENTAL E INDUSTRIAL COMO FONTE DE RECURSOS GENÉTICOS MICROBIANOS

Gabriela Alves Licursi Vieira<sup>1</sup>; Igor Vinicius Ramos Otero<sup>1</sup>; Lara Durães Sette<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. \*larasette@rc.unesp.br

Coleções de cultura de microrganismos são reservas *ex-situ* da biodiversidade microbiana e representam uma fonte importante de recursos biotecnológicos, fornecendo bases para o ensino, pesquisa e para o desenvolvimento de produtos. Essas instituições possuem como finalidade a aquisição, preservação, manutenção e distribuição de microrganismos autenticados e viáveis. A coleção de microrganismos do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI) é parte integrante da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP) e possui em seu acervo microrganismos derivados de ambiente marinho da costa brasileira e microrganismos derivados do ambiente marinho e terrestre da Antártica. O presente trabalho possui como objetivo apresentar a coleção de microrganismos do LAMAI como uma fonte de recursos microbianos para exploração do potencial biotecnológico. Por recomendação da OECD os isolados são mantidos na coleção do LAMAI sob dois métodos de preservação (Castellani e Criopreservação -80 °C), sendo um deles de longo prazo. O acervo da coleção possui aproximadamente 770 microrganismos isolados principalmente a partir de macroinvertebrados (esponjas e cnidários) e sedimento marinho da costa brasileira, e os principais gêneros derivados desse ambiente são *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Além disso, o acervo também conta com aproximadamente 1500 microrganismos isolados a partir de solo, solo associado a raízes de plantas, líquens, sedimento marinho e macroalgas, sendo os principais gêneros de leveduras derivados desse ambiente *Rhodotorula*, *Cryptococcus* e *Leucosporidium* e de fungos filamentosos *Pseudogymnoascus* e *Penicillium*. Quanto ao potencial biotecnológico da coleção, destacam-se a produção de enzimas como proteases, lipases, xilanases, asparaginases e lacases; bem como, a produção de antimicrobianos, biossurfactantes e terpenoides por microrganismos do acervo. Vale ressaltar ainda a utilização desses microrganismos em processos de degradação de xenobióticos poluentes ambientais. Diante disso, a coleção de microrganismos do LAMAI se estabelece como uma valiosa fonte de recursos genéticos microbianos isolados de ambientes extremos e/ou específicos, os quais podem apresentar diferentes propriedades de interesse em processos biotecnológicos.

**Palavras-chave:** antártica; biotecnologia; microrganismos marinhos.

**Agradecimentos:** G.A.L.V. bolsa FAPESP 2018/03372-0; I.V.R.O bolsa CNPq 170714/2017-9; L.D.S bolsa produtividade CNPq 303145/2016-1; Auxílio à pesquisa FAPESP 2016/07957-7.



# V CBRG

Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos  
De 6 a 9 de novembro | Fortaleza-Ceará

## CUMPRIMENTO DE REQUISITO OBRIGATÓRIO DE QUALIDADE DE PRESERVAÇÃO NA COLEÇÃO DE MICRORGANISMOS MULTIFUNCIONAIS DE CLIMA TEMPERADO

Maria Laura Turino Mattos<sup>1\*</sup>; Liane Aldrighi Galarz<sup>1</sup>; Ieda Baade dos Santos<sup>1</sup>; Jennifer Vaz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Clima Temperado. <sup>2</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-RioGrandense. \*maria.laura@embrapa.br

A preservação de microrganismos implica em manutenção do estado viável, livre de contaminação e sem alterações nas suas características genotípicas e fenotípicas. Nesse sentido, a Coleção de Microrganismos de Clima Temperado (CMMCT), nos anos de 2009 e 2010, empregou para o acervo de 190 fungos, o método de preservação em solo seco (PSS) e armazenamentos dos tubos em congelador (-20° C). Em 2015, conforme requisito obrigatório de qualidade para uma coleção de trabalho, verificou-se a viabilidade de 1% desses fungos (19 acessos), constatando-se 100% de acessos viáveis. Objetivou-se neste trabalho avaliar a recuperação e viabilidade desses fungos três anos após essa última verificação. No Grupo 1 constam os fungos preservados em 2009 [*Nigrospora sphaerica* (CMM 46), *Cochliobolus heterostrophus* (CMM 47), *Fusarium anthaphilum* (CMM 48), *Beaveria bassiana* (CMM 131 e CMM 135), *Fusarium* sp. (CMM 483), *Metarhizium anisopliae* (CMM 163), *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (CMM 133 e CMM 134) e CMM 114] e, no Grupo 2, os fungos preservados em 2010 [*Fusarium* sp. (CMM 483, CMM 532 e CMM 534), *Penicillium* sp. (CMM 220, CMM 525, CMM 531 e CMM 542), *Trichoderma* sp. (CMM 527, CMM 530 e CMM 548)]. A recuperação dos fungos constou, inicialmente, do descongelamento dos tubos em temperatura ambiente. Após, retirou-se uma amostra de 0,07g de solo e transferiu-se para tubos *ependorf* contendo 1,0 mL de água destilada, sendo, posteriormente, mantidos em repouso por 20 min. Decorrido este tempo, as amostras foram submetidas à agitação mínima em vórtex e, após, transferiram-se, 100 µl da suspensão para uma placa de Petri contendo o meio Ágar Batata Dextrose, aplicando-se a técnica do espalhamento com alça de *Drigasky*. As placas foram incubadas por 10 e 20 dias a 25° C. A avaliação da recuperação foi feita durante esse período, pela observação visual do crescimento das colônias, considerando-se viável os acessos que apresentaram a formação de micélio. Verificou-se a viabilidade de 40% dos fungos do Grupo 1 e 60% do Grupo 2, preservados pelo método PSS durante nove e oito anos, respectivamente. Os fungos que perderam a viabilidade não cresceram até 20 dias de incubação. Esse resultado constata a importância do controle de qualidade de preservação e indica a necessidade do emprego de um método de preservação de longo termo para os fungos que perderam a viabilidade.

**Palavras-chave:** fungos, qualidade, preservação.

**Agradecimentos:** INCT- MPCPAgro - (CNPq 465133/2014-4, Fundação Araucária-STI, CAPES).



# V CBRG

Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos  
De 6 a 9 de novembro | Fortaleza-Ceará

## IMPLEMENTAÇÃO DO SISTEMA DE GESTÃO DA COLEÇÃO DE MICRORGANISMOS MULTIFUNCIONAIS DE FITOPATOGÊNICOS DA EMBRAPA MILHO E SORGO

Priscila Cordeiro Gomes<sup>1\*</sup>; Maycon Campos Oliveira<sup>1</sup>; Ivanildo Evódio Marriel<sup>1</sup>; Luciano Viana Cota<sup>1</sup>; Fernando Hercos Valicente<sup>1</sup>; Christiane Abreu de Oliveira Paiva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa. \*priscila.gomes@embrapa.br

A Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos (CMMF) da Embrapa Milho e Sorgo foi iniciada em 1991 e preserva mais de 6.000 cepas de microrganismos de interesse agrícola. Com a evolução da coleção, houve a necessidade de implantação de processos gerenciais e operacionais para alcançar níveis de excelência e garantir a harmonização dos procedimentos e processos. A implementação do sistema de gestão da CMMF iniciou-se em 2012, através dos projetos Gestcol e Qualimicro. A metodologia adotada foi a realização de um diagnóstico inicial com base nos requisitos apresentados no Modelo Corporativo de Gestão para as Coleções de Microrganismos da Embrapa (MCGCM) e o processo de implementação foi feito com a elaboração de planos de implementação. O resultado do diagnóstico inicial mostrou que 9% dos requisitos foram atendidos pela CMMF, 32% foram atendidos parcialmente, 56% não foram atendidos e 3% não se aplicam. Para o atendimento aos requisitos foi sugerido no relatório de diagnóstico inicial: a elaboração de Manual da Coleção e dos procedimentos; a implementação de controle dos registros; a realização do cadastro da coleção e dos dados dos microrganismos em sistema computacional específico; a realização de treinamentos à equipe; a padronização da metodologia de conservação e a adequação do espaço físico. A partir do diagnóstico inicial, iniciaram-se as atividades para adequação ao MCGCM com a elaboração dos planos de implementação semestrais com duração de dois anos, do Manual de Gestão da CMMF e dos procedimentos. De acordo com o planejamento, foi implementado o Controle de Registros; o cadastro da coleção em sistema computadorizado, o Alelo Micro, que contempla a sistemática de identificação das linhagens. Foi proporcionado à equipe treinamentos externos e internos. Como a coleção estava distribuída em diferentes laboratórios, optou-se por criar um acervo central adequando o espaço físico para realizar a preservação e o armazenamento do acervo de forma padronizada. O acervo central possui sala climatizada e equipada, com monitoramento da temperatura e contaminação ambiental. Atualmente, a CMMF atende a 90% dos requisitos apresentados no MCGCM e os 10% restantes estão em andamento. Esta implantação de processos foi internalizada na Embrapa Milho e Sorgo como Sistema de Gestão da Coleção e proporcionou uma melhor organização do espaço físico, do patrimônio genético e dos documentos e registros gerados.

**Palavras-chave:** gestão da qualidade; microbiologia agrícola; coleção de cultura.

**Agradecimentos:** Embrapa, CNPq, Fapemig.



# V CBRG

Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos

De 6 a 9 de novembro | Fortaleza-Ceará

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

Clarissa Varajão Cardoso<sup>1</sup>; Eunice Ventura Barbosa<sup>1</sup>; Helena Magalhães<sup>2</sup>; Evelize Folly das Chagas<sup>1</sup>; Helena Carla Castro<sup>1</sup>; Maíra Halfen Teixeira Liberal<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>PPBI - Universidade Federal Fluminense. <sup>2</sup>Centro Estadual de Pesquisa em Sanidade Animal / Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro \*mairahalfen@gmail.com

O armazenamento de 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. A Área de Biotecnologia do CEPGM da PESAGRO-RIO coordena projetos de P&D 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. Até 2010 as cepas eram mantidas à -20°C, sem crioprotetores. Porém em 2011 foi adquirido um freezer -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* com adição de 10% (p/v) glicerol, que são autoclavados separadamente a 115°C/8min, em seguida homogeneizados e acondicionados em criotubos de 3mL. O *Skim Milk* promove proteção extracelular e o glicerol a proteção intracelular, evitando-se perdas durante a formação de cristais de gelo e mantendo-se as estruturas celulares preservadas. As cepas são transferidas para os criotubos, homogeneizadas e levadas ao freezer -20°C/20min, e posteriormente acondicionados no freezer -80°C. Do total de 632 cepas bacterianas isoladas de 2011 a 2018, 442 cepas (69,93%) estão preservadas à -80°C, e 190 (30,07%) estão mantidas à -20°C, em BHI c/ glicerol e/ou *Skim Milk*, para pesquisas e repique programado. Em 2016 e 2017 foram repicadas 427 cepas isoladas entre 2013 e 2015, que estavam mantidas à -80°C, e 100% apresentaram-se viáveis. A periodicidade da reativação das cepas da CMPAP depende da demanda dos pesquisadores, de mão de obra e de material de consumo. 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. A literatura relata a utilização de variadas técnicas de preservação, nenhuma delas plenamente eficaz, sendo por vezes necessária a utilização de técnicas associadas, para garantir uma melhor recuperação da cepa.

**Palavras-chave:** criopreservação; skim milk; glicerol.

**Agradecimentos:** À FAPERJ, à UFF e à PESAGRO-RIO.