UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - RIO CLARO

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LUÍZA MARTINEZ PERDIGUEIRO

BANCO DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS A INSETOS SOCIAIS

Rio Claro
2009

LUÍZA MARTINEZ PERDIGUEIRO

BANCO DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS A INSETOS SOCIAIS

Orientador: Fernando Carlos Pagnocca

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2009

576 Perdigueiro, Luiza Martinez
P433b Banco de microrganismos associados a insetos sociais / Luiza Martinez Perdigueiro. - Rio Claro : [s.n.], 2009
79 f. : il., figs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Fernando Carlos Pagnocca

1. Microorganismos. 2. Banco de microorganismos. 3. Insetos sociais. 4. Leveduras. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Dedico aos meus pais,

minhas irmãs e ao Thiago,

o melhor namorado do mundo!

AGRADECIMENTOS

Minha jornada na Unesp começou de forma muito emocionante. Estavamos todos aguardando a chamada da lista de espera no Anfiteatro do IB. Eram tantos alunos que a sala ficou lotada e os pais tiveram que aguardar do lado de fora. O friozinho na barriga foi uma sensação idescritível. Quando meu nome foi chamado e saí da sala, meu pai já havia ligado para minha família contando a novidade! Recebi um abraço tão aconchegante que nunca me esquecerei. Depois, todos os alunos chamados tiveram que descer para uma sala do IB para fazer a matrícula. Tive a sorte de escolher um ótimo lugar para sentar: ao lado da pessoa que seria minha melhor amiga e companheira para todos os momentos bons e ruins da faculdade. Tenho que agradecer muito à Cíntia, uma pessoa incrível com quem convivi durante esses quatro anos e que vou sentir muita falta de agora em diante. Passamos por bons momentos durante esses anos! Perdi até as contas de quantas vezes eu fui chamada de Cíntia e ela de Luíza! Por professores e até mesmo o pessoal da sala (mesmo até depois de quatro anos de convivência).

Depois da matrícula, veio o medo e a responsabilidade de morar longe da família. Foram momentos difíceis, mas superados. Tive um apoio enorme do Thiago, a quem agradeço muito. Um namorado carinhoso, companheiro, prestativo e paciente, sempre ouvindo minhas tristezas por estar longe de casa. Sei que ele sabe que esse momento foi muito difícil, e apesar de achar que eu tive que passar por isso sozinha, quero que saiba que nunca me senti sozinha tendo ele ao meu lado. Também devo muito a ele esse meu Trabalho de Conclusão de Curso, que sem seus conhecimentos na área da Computação não ficaria tão perfeito como ficou. Minha família também me apoiou muito nessa mudança: meu pai, minha mãe e minhas irmãs Júlia e Helena.

Durante o meu primeiro ano, minha vizinha que mais me fez companhia foi a Bianca. Morávamos em uma “kit-rep” como ela mesma definia. Cada uma morava em sua kit, mas nos sentíamos como numa república, pois fazíamos tudo juntas. Essa amizade também foi muito importante para que eu não me sentisse sozinha durante esse ano de adaptação.

Agradeço também ao Bruno, Andréa e Bairral, pelos vários trabalhos e relatórios que fizemos juntos e que sempre davam certo, por mais que pensássemos que estava tudo errado. Os melhores trabalhos foram os de PCC no McDonald's, não é mesmo?

Minha bixete e amiga de cursinho Vivi também merece um espaço especial deste agradecimento. A Vivi veio para a Unesp depois de uma saga e tanto! Ficou um tempo hospedada na minha casa e também me apoiou em momentos difíceis.

Devo muito também à turma do "L" da kitnet pelos momentos de descontração, festas de aniversários, amigo secreto e jantares improvisados. Paulinha, Débora, Camila e Bruna, que são pessoas muito especiais e que infelizmente só no meu último ano juntamos essa turma. Agradeço principalmente à Paulinha, que todos os dias almoçava e jantava comigo! E que também me apresentou às melhores bixetes do mundo: Fingers, Malu, Carioca, Dani e Brejela.

E por fim, agradeço ao pessoal do laboratório: Tati, Paula, André, Aline, Thais, Derlene, Iéti, Liu, Ife e principalmente meu Orientador professor Doutor Fernando Carlos Pagnocca, que já no meu primeiro ano da faculdade me aceitou como estagiária em seu laboratório.

Enfim, tenho muitas memórias boas desses meus quatro anos de faculdade. Quando entrei não via a hora de me formar, mas agora que cheguei lá olho para trás com lágrimas nos olhos de saudade das coisas boas que passei. Sentirei muita falta de todos os amigos, do pessoal da sala, da minha casinha... É triste ter que ir embora, mas levo comigo muito aprendizado e lembranças boas dos momentos que passei com os amigos! Obrigada a todos!

Reverência ao Destino

- Carlos Drummond de Andrade

Falar é completamente fácil, quando se tem palavras em mente que expressem sua opinião.
Difícil é expressar por gestos e atitudes o que realmente queremos dizer, o quanto queremos dizer, antes que a pessoa se vá.

Fácil é julgar pessoas que estão sendo expostas pelas circunstâncias.
Difícil é encontrar e refletir sobre os seus erros, ou tentar fazer diferente algo que já fez muito errado.

Fácil é ser colega, fazer companhia a alguém, dizer o que ele deseja ouvir.
Difícil é ser amigo para todas as horas e dizer sempre a verdade quando for preciso. E com confiança no que diz.

Fácil é analisar a situação alheia e poder aconselhar sobre esta situação.
Difícil é vivenciar esta situação e saber o que fazer. Ou ter coragem pra fazer.

Fácil é demonstrar raiva e impaciência quando algo o deixa irritado.
Difícil é expressar o seu amor a alguém que realmente te conhece, te respeita e te entende. E é assim que perdemos pessoas especiais.

Fácil é mentir aos quatro ventos o que tentamos camuflar.
Difícil é mentir para o nosso coração.

Fácil é ver o que queremos enxergar.
Difícil é saber que nos iludimos com o que achávamos ter visto. Admitir que nos deixamos levar, mais uma vez, isso é difícil.

Fácil é dizer "oi" ou "como vai?"
Difícil é dizer "adeus". Principalmente quando somos culpados pela partida de alguém de nossas vidas.

Fácil é abraçar, apertar as mãos, beijar de olhos fechados.

Difícil é sentir a energia que é transmitida. Aquela que toma conta do corpo como uma corrente elétrica quando tocamos a pessoa certa.

Fácil é querer ser amado.
Difícil é amar completamente só. Amar de verdade, sem ter medo de viver, sem ter medo do depois. Amar e se entregar. E aprender a dar valor somente a quem te ama.

Fácil é ouvir a música que toca.
Difícil é ouvir a sua consciência. Acenando o tempo todo, mostrando nossas escolhas erradas.

Fácil é ditar regras.
Difícil é seguí-las. Ter a noção exata de nossas próprias vidas, ao invés de ter noção das vidas dos outros.

Fácil é perguntar o que deseja saber.
Difícil é estar preparado para escutar esta resposta. Ou querer entender a resposta.

Fácil é chorar ou sorrir quando der vontade.
Difícil é sorrir com vontade de chorar ou chorar de rir, de alegria.

Fácil é dar um beijo.
Difícil é entregar a alma. Sinceramente, por inteiro.

Fácil é sair com várias pessoas ao longo da vida.
Difícil é entender que pouquíssimas delas vão te aceitar como você é e te fazer feliz por inteiro .

Fácil é ocupar um lugar na caderneta telefônica.
Difícil é ocupar o coração de alguém. Saber que se é realmente amado.

Fácil é sonhar todas as noites.
Difícil é lutar por um sonho.

Eterno, é tudo aquilo que dura uma fração de segundo, mas com tamanha intensidade, que se eterniza, e nenhuma força jamais o resgata.

SUMÁRIO

Página
1. INTRODUÇÃO 9
1.1. Funções da Coleção 14
1.2. Criopreservação 15
2. OBJETIVOS 17
3. MATERIAL E MÉTODOS 18
4. RESULTADOS 22
4.1. Página Inicial 22
4.1.1. CEIS 22
4.1.2. Laboratório de Microbiologia 22
4.1.3. O Mundo das Leveduras 22
4.2. Seção de Consultas 23
4.2.1. Consulta por Rack 23
4.2.2. Consulta por Caixa 25
4.2.3. Consulta por Estirpe 26
4.2.4. Consulta por Espécie 31
4.2.5. Consulta por Substrato 33
4.2.6. Consulta por Depositor 35
4.2.7. Consulta por Local Coletado 36
4.2.8. Consulta por Local Armazenado 38
4.2.9. Consulta por Sequenciamento 39
4.3. Seção de Gerenciamento 41
4.3.1. Gerenciar Rack 42
4.3.2. Gerenciar Caixa 44
4.3.3. Gerenciar Estirpe 48
4.3.4. Gerenciar Espécie 60
4.3.5. Gerenciar Substrato 62
4.3.6. Gerenciar Depositor 62
4.3.7. Gerenciar Local Coletado 63
4.3.8. Gerenciar Local Armazenado 65
4.3.9. Gerenciar Sequenciamento 65

4.3.10. Gerenciar Usuário 66
4.3.11. Gerenciar Arquivos 68
4.4. Seção de Arquivos 68
5. DISCUSSÃO 71
6. CONCLUSÕES 73
7. REFERÊNCIAS 74

1. INTRODUÇÃO

Uma das pesquisas realizadas no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) tem como foco o estudo de microrganismos associados a insetos sociais (abelhas, vespas, formigas e cupins). À medida que essas pesquisas foram sendo desenvolvidas, desde 1996, teve início uma coleção temática de microrganismos, surgindo assim a idéia e a necessidade da criação de um Banco de Microrganismos. Pela dinâmica do laboratório de Microbiologia, novas estirpes são continuamente incorporadas a esse acervo.

Um volume grande de informações sobre diferentes microrganismos é gerado em função de atividades de rotina e pesquisa realizadas com as linhagens dos acervos de coleções de culturas. A informação, por exemplo, pode ser referente às características genotípicas e fenotípicas das culturas, aplicações industriais, caracteres taxonômicos, resposta a diferentes métodos de preservação, histórico de coleta e status relativo a processos de patente. Existe uma tendência crescente de informatização desses dados (CANHOS, 1990; CANHOS et al., 1993). Estas informações, associadas à disponibilidade de linhagens e material genético, conduzirão a grandes avanços em sistemática microbiana e outras áreas de microbiologia básica e aplicada, como saúde humana, animal e de plantas, bem como ecologia microbiana, além de novas aplicações industriais, para a agricultura e para o meio ambiente (CANHOS, 1996).

Os microrganismos são as entidades bióticas mais numerosas e antigas, capazes de colonizar com sucesso cada nicho ecológico possível do planeta. Suas presença e atividade são essenciais para o funcionamento e equilíbrio dos ecossistemas. Além disso, os microrganismos representam uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento econômico sustentável. Estratégias tradicionais de isolamento e seleção de microrganismos têm garantido o desenvolvimento de novos fármacos e aplicações nas áreas de saúde, agricultura, indústria e meio ambiente (OLIVEIRA et al, 2006).

A diversidade de atividades metabólicas e produtos microbianos tem grande aplicação em diversos setores da indústria e, em especial, para o desenvolvimento da biotecnologia. Coleções de culturas contribuem para o desenvolvimento científico e tecnológico, através da realização de atividades especializadas de serviço e suporte científico em microbiologia básica e aplicada, incluindo a preservação *ex situ* de germoplasma microbiano; caracterização taxonômica e identificação de isolados; organização e disseminação de informações de cunho científico e tecnológico (CANHOS, 1996).

O aumento crescente da área agrícola e cultivável ameaça não apenas os macroorganimos, mas também os microrganismos a eles associados e podemos facilmente deduzir que o desaparecimento de uma espécie vegetal ou animal pode significar também a extinção de muitos microrganismos ainda totalmente desconhecidos para Ciência e pelo homem. Os microrganismos são essenciais para o meio ambiente e seu biota, contribuindo para a estabilidade de ecossistemas, atuando em diferentes níveis tróficos, em interações bióticas e abióticas, e na biogeosfera, alterando os constituintes atmosféricos gasosos. Os microrganismos constituem a principal forma de ciclagem de compostos químicos na biosfera, incluindo a degradação e a transformação de poluentes industriais (TIEDJE, 1994). Assim, a preservação dessas estirpes microbianas, enquanto ainda é possível recuperá-las do meio em que vivem, é estratégica para o desenvolvimento biotecnológico de nosso país no século XXI.

O material biológico representa um novo insumo tanto no ambiente da pesquisa e desenvolvimento quanto nos processos produtivos, cujo tratamento requer a implementação de um sistema que permita assegurar, para todos os efeitos, que um dado material biológico mantenha as características nele identificadas ou a ele atribuídas. Neste contexto, as coleções biológicas são essenciais para o suporte ao desenvolvimento da biotecnologia, provendo insumos, material biológico certificado e informações associadas (OLIVEIRA et al, 2006).

A instalação de um Banco de Microrganismos no laboratório é necessária para a preservação e organização de um material biológico com grande potencial para exploração em pesquisa, desenvolvimento tecnológico e que pode servir também como material de ensino e divulgação científica. Há a necessidade de agregar valor às coleções e seus materiais para garantir a sua auto-sustentabilidade e dar continuidade ao esforço de gerações de cientistas que têm isolado,

identificado, caracterizado e depositado a diversidade microbiana nas coleções de culturas (LIMA, 2008). É fundamental que culturas puras e autenticadas estejam prontamente disponíveis (em coleções *ex situ*) para o desenvolvimento de projetos tecnológicos, além de uma gama de conhecimentos associados, como procedimentos de isolamento, cultivo e manutenção dos organismos, bem como preservação de longo termo do material e suas características de interesse (CANHOS, 1996). A maneira mais eficaz de se conservar microrganismos relevantes para o desenvolvimento científico e tecnológico é a preservação *ex situ* em coleções de culturas (US Congress, 1987). Microrganismos isolados e identificados, quando preservados por processos adequados (e.g., liofilização e ultra-congelamento), podem ser armazenados por longos períodos, conservando suas características genéticas e propriedades industriais (CANHOS, 1996).

O isolamento, identificação, seleção, caracterização, conservação e uso de microrganismos é prática imprescindível para o desenvolvimento de processos e obtenção de produtos de interesse econômico. A implantação e manutenção de coleções de culturas proporcionam estoques de linhagens nativas, que podem ser utilizadas em diversos programas de interesse da sociedade (GUEDES et al, 2004).

Como infra-estrutura fundamental na conservação da biodiversidade e distribuição de recursos genéticos, as coleções de serviço merecem atenção especial. A operação e o gerenciamento de coleções microbiológicas de serviço requerem capacitação técnica especializada e infra-estrutura específica, além de cuidados especiais com relação às práticas de controle de qualidade, biossegurança e autenticação de seus acervos (OLIVEIRA et al, 2006).

Nos países em desenvolvimento, as coleções de culturas não têm merecido a devida atenção de formuladores de políticas para biotecnologia, agências de financiamento e órgãos governamentais. Geralmente as coleções são consideradas subprodutos da pesquisa, em especial da pesquisa básica, e as suas atividades e manutenção são consideradas atribuições e responsabilidades dos próprios investigadores. Nesses países, o governo e grande parte do setor empresarial privado ignoram a importância dessa coleções como infra-estrutura relevante para a inovação tecnológica e para a competitividade industrial. Em contraponto, coleções de culturas e bancos genômicos são considerados peça fundamental em programas de bioprospecção e desenvolvimento em empresas atuantes no setor de biotecnologia em países industrializados (CANHOS, 1996).

No Brasil, na maioria dos casos, as coleções são fruto da iniciativa de pesquisadores individuais e são mantidas de forma precária, por falta de incentivo e recursos. Algumas, inclusive, convivem com a ameaça eminente de desaparecimento, devido ao afastamento de seus responsáveis, por falta de reconhecimento e institucionalização adequadas. As coleções de cultura nacionais, em geral, não dispõem sequer do mínimo indispensável para sua manutenção em condições satisfatórias para atender à demanda de um país em franco desenvolvimento, como o Brasil (CANHOS, 1994).

As atividades de rotina e pesquisa aplicadas às linhagens resultam em uma quantidade significativa de informações. A identificação microbiológica decorre, inicialmente, de provas bioquímicas, mas o uso de técnicas de biologia molecular, no futuro, pode enriquecer o conhecimento a esse respeito, além de possibilitar a solução de problemas de classificação, relacionados à caracterização e à definição de novos táxons, em diversos grupos de microrganismos (ABREU; TUTUNJI, 2004). No Laboratório de Microbiologia do CEIS, este material está atualmente em coleções fragmentadas, pois foi estudado em projetos diferentes e está apenas armazenado, não estando totalmente catalogado nem organizado numa forma global. Alguns microrganismos já foram estocados há algum tempo e podem não estar mais viáveis, sendo necessária essa verificação. Também é necessária a checagem da pureza e autenticação dessas culturas e a complementação do estudo com algumas análises fisiológicas e genômicas.

É importante salientar que muitos pesquisadores têm solicitado a colaboração do laboratório para a utilização desses microrganismos em estudos paralelos, o que aumenta ainda mais a importância da manutenção *ex situ* das leveduras. As coleções de culturas tem atuado na integração da comunidade científica, explorando as competências existentes e desenvolvendo tecnologias inovadoras para coletar, gerenciar, integrar, analisar e compreender os diversos microrganismos (ABREU; TUTUNJI, 2004). Assim, é importante verificar se todas estão viáveis e catalogá-las, organizando-as em um banco de culturas que permita acesso rápido aos usuários. Culturas puras obtidas de coleções de referência são utilizadas em atividades de ensino, estudos taxonômicos, identificação de patógenos e testes de controle de qualidade de produtos e materiais (CANHOS, 2006). Portanto, o material biológico preservado por métodos adequados em coleções de culturas tem uma ampla gama

de aplicações nas áreas de saúde, agropecuária, indústria e meio ambiente (CANHOS, 2006).

Coleções de culturas são centros de conservação que tem a função de coletar organismos relevantes para estudos científicos e aplicações tecnológicas, tornando-os disponíveis para usuários interessados. A maneira mais eficaz de conservar microrganismos de importância econômica é a preservação em coleções. Assim, a preservação e manutenção das culturas devem ser feitas de forma a garantir sua sobrevivência, estabilidade e pureza durante períodos prolongados de tempo, conservando características genéticas e propriedades morfológicas/fisiológicas (ABREU; TUTUNJI, 2004).

Finalmente, outro aspecto relevante é o nível de informatização das coleções e a sua capacidade de gerarem catálogos electrônicos. Neste domínio específico verificamos algumas dificuldades por parte das coleções em tornar aberta parte da sua informação já informatizada (LIMA, 2007) . A percentagem de informatização das coleções nas diferentes instituições é, naturalmente, variável, mas em geral, a maioria das coleções tem menos de 50% dos registos digitalizados. Apenas no caso do domínio microbiano se verifica que metade das coleções tem mais de 50% da informatização realizada. Constata-se, no entanto, que são as maiores coleções que apresentam as menores taxas de informatização, o que tem como consequência que 92% do total de espécimes das coleções nacionais se encontrem em instituições com menos de 25% da informatização concluída (LIMA, 2007) .

A situação da biodiversidade neste início de século XXI pode ser caracterizada pela combinação de processos acelerados de destruição de ecossistemas primários associados a esforços mobilizadores para a conservação e uso sustentável da biodiversidade e de grandes avanços em tecnologia de informação e comunicação de dados. Esta combinação de fatores está conduzindo à emergência de uma nova área de desenvolvimento científico e tecnológico, denominada informática para biodiversidade (CANHOS et al, 2006). Com o avanço da bioinformática, ferramentas que unem a biologia com a informática passaram a ganhar um espaço muito importante nos laboratórios. A informática pode auxiliar a biologia no armazenamento de dados em computadores, o que facilita a organização do laboratório e as consultas, as quais podem ser feitas virtualmente. Um dos recursos que pode ser muito utilizado para isso é o banco de dados, que é um conjunto de informações relacionadas entre si, referentes a um mesmo assunto e

organizadas de maneira útil, com o propósito de servir de base para que o usuário recupere informações, tire conclusões e tome decisões.

Em vista disso, com esse projeto, pretendemos organizar toda a coleção, criando um acervo completo com todos os microrganismos obtidos em pesquisas anteriores, bem como ir adicionando as novas estirpes que são isoladas frequentemente no laboratório de Microbiologia do CEIS dentro dessa nova sistemática.

Pretendemos também selecionar estirpes com potencial para desenvolvimento de processos biotecnológicos como produção de açúcares raros, fragrâncias, enzimas, utilização de glicerol, biotransformação e biorremediação. As estirpes armazenadas e catalogadas poderão ser disponibilizadas para outros pesquisadores e pessoas interessadas, como já vem sendo feito. Informações sobre as estirpes do Banco de Microrganismos como características da espécie, fotos de morfologia, ficha de classificação, entre outras informações relevantes estarão disponíveis online. A expansão e a atualização dinâmica das bases de informação sobre microrganismos são fundamentais para futuros desenvolvimentos em biotecnologia e estratégias de desenvolvimento sustentável. Novas técnicas para a geração de dados químicos e moleculares, associadas ao desenvolvimento de novas ferramentas para a análise e disseminação on-line de dados, estão conduzindo a saltos quânticos em biologia básica e aplicada. Estes desenvolvimentos estão possibilitando novas interpretações filogenéticas e permitindo novas estratégias de análise molecular da diversidade e ecologia microbianas, conduzindo a programas de screening de alto desempenho para a obtenção de novas linhagens de interesse industrial e ambiental (BULL et al., 1992), e mesmo genes de interesse isolados, diretamente do meio ambiente (CANHOS, 1996).

1.1. Funções da Coleção

- Coleção: coleções de culturas são centros de conservação de recursos genéticos. Têm como função incorporar continuamente aos seus acervos organismos relevantes para estudos científicos e aplicações tecnológicas, visando a torná-los disponíveis para usuários interessados.

- Preservação e manutenção: culturas microbianas são preservadas e mantidas por coleções, de forma a garantir sua sobrevivência, estabilidade e pureza durante períodos prolongados de tempo, empregando métodos de preservação, como liofilização e ultracongelamento. Em interações com pesquisadores ou parceiros industriais, as coleções podem manter em seus acervos linhagens associadas a estudos de campo e mesmo depósitos confidenciais de linhagens utilizadas em processos de produção industrial.

- Informação: as atividades de rotina e pesquisa com linhagens do acervo resultam em uma quantidade significativa de informação de cunho científico e tecnológico. Essa informação, quando não for de caráter confidencial, deve estar organizada de forma coerente e ser disponibilizada ao usuário (gratuitamente ou não), sendo tão importante quanto a própria linhagem. A disponibilização de dados de caracterização taxonômica e tecnológica de linhagens de uma coleção favorece e facilita a busca de organismos para aplicações específicas, bem como contribui para o melhor conhecimento dos organismos em si próprios.

- Pesquisa: coleções de culturas realizam pesquisas de interesse específico, como, por exemplo, em métodos de preservação, manutenção de culturas e taxonomia. Dado o perfil da equipe, muitas coleções realizam projetos ou contratos com outras instituições de pesquisa e/ou empresas do setor industrial para a realização de projetos de bioprospecção e pesquisa de linhagens microbianas para aplicações específicas em processos industriais. Este tipo de interação com o setor produtivo é bastante interessante, uma vez que muitas coleções detêm um conhecimento específico ímpar sobre isolamento, cultivo e biologia de diversos grupos de microrganismos.

Coleções de culturas não são, portanto, meros depositórios e arquivos de linhagens. Coleções de culturas são centros de excelência em conservação *ex situ*, mantendo e estudando um pool genético para usufruto de gerações futuras, e oferecem serviços fundamentais para a comunidade científica e tecnológica industrial do país (CANHOS, 1996).

1.2. Criopreservação

O processo de criopreservação envolve diferentes passos. O primeiro é preparar as culturas para o congelamento. Para prevenir a desidratação, trabalha-se

para que todos os fluidos celulares se solidificarem juntos. Isso pode evitar a alteração na concentração dos minerais e prevenir a formação de cristais de gelo e consequente ruptura da parede celular. Para tanto, os agentes protetores do congelamento devem ser adotados. O glicerol é bioquimicamente compatível com as estruturas celulares e, portanto, frequentemente usado para preservação. Dessa forma, as células podem ser preservadas por um tempo indefinido e recuperar suas funções normais quando forem devidamente descongeladas (BLACKMORE, 1996).

Em um processo de congelamento lento, as células apresentam perda de água. Quando os cristais de gelo se formam, eles se expandem e podem destruir a parede das células. Todo o material intracelular pode alterar a proporção ácido-base e causar extremo aumento dos seus níveis de concentração (BLACKMORE, 1996). A intensidade em que ocorre o congelamento é crucial neste fenômeno. Um rápido congelamento diminui os efeitos danosos das diferentes formações dos cristais de gelo, mas leva ao aumento da quantidade de gelo intracelular. Já o congelamento mais lento, resulta em grande perda de água pelas células e menos gelo interno, mas aumenta os efeitos do desequilíbrio osmótico. Quanto maior a permeabilidade celular, maior será a perda de água e, portanto, é mais provável que tolerem melhor o congelamento rápido que as células menos permeáveis. O uso de aditivos ou químicos crioprotetores, que servem para proteger as células durante o congelamento, pode diminuir os danos provocados pela concentração do soluto e pela formação dos cristais de gelo. Os agentes crioprotetores mais comumente usados são o DSMO (dimetilsulfóxido) e o glicerol (SIMONE, 1998).

Para controlar todos os processos que envolvem o congelamento de culturas, é necessário que haja adequada documentação que indique, para cada amostra, a metodologia de congelament/preservação adotada, a localização e identificação do material estocado e a data do congelamento. Outros dados importantes são: o código da amostra congelada, as provas de identificação e responsável, meios de armazenamento e também, a origem de cada amostra (ABREU; TUTUNJI, 2004).

Uma coleção de culturas não é uma mera “colecionadora” de linhagens. Coleções de Cultuas são centros de excelência, agindo como unidades de conservação *ex situ*, mantendo e estudando um *pool* genético para as gerações futuras, oferecendo serviços fundamentais para a comunidade científica e tecnológica (ABREU; TUTUNJI, 2004).

2. OBJETIVOS

- criação de um banco de dados para organizar, catalogar, localizar e disponibilizar dados referentes à coleção de microrganismos associados a insetos sociais atualmente existente no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), Unesp, Rio Claro, SP.

- reativação de algumas estirpes para verificar a viabilidade, a pureza e assim renovar o acervo, incluindo os devidos registros;

- permitir a inclusão rápida na Coleção de Culturas do CEIS das novas estirpes que são obtidas nos vários estudos em desenvolvimento.

- disponibilizar online as informações para outros pesquisadores e público em geral.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto teve como ponto de partida as culturas pré-estocadas, pois era o trabalho mais urgente a ser feito, uma vez que elas precisavam ser avaliadas rapidamente. Depois, organização pode ser expandida para todas as outras estirpes de estocagem mais recente.

Para verificar a viabilidade dessas estirpes antes de estocá-las no ultra-freezer, os seguintes passos foram realizados: a cultura foi retirada do local em que estava estocado e semeada em placas pequenas com meio sólido com cloranfenicol 10mg % (antibiótico). Aproximadamente dois dias depois, foram colocados os microrganismos em criotubos contendo glicerol 15% e pérolas de vidro (tratadas overnight com ácido nítrico, lavadas com água destilada e esterilizadas em tubos). Todos os criotubos foram etiquetados (duas etiquetas, para garantir que o código da estirpe permaneça no criotubo) e vedados, para evitar contaminação e que os tubos sejam abertos, uma vez que o ultra-freezer também é utilizado por outros laboratórios no CEIS e podem então ser acidentalmente violados. Este mesmo processo foi realizado para verificar a viabilidade e pureza de algumas outras estirpes já armazenadas no ultra-freezer.

É importante ressaltar que após preparados os criotubos com pérolas de vidro contendo microrganismos, estes foram levados ao freezer a -20℃ durante 2 a 3 horas e depois levados ao ultra-freezer a -80℃ no lugar certo previamente catalogado, para manter a organização.

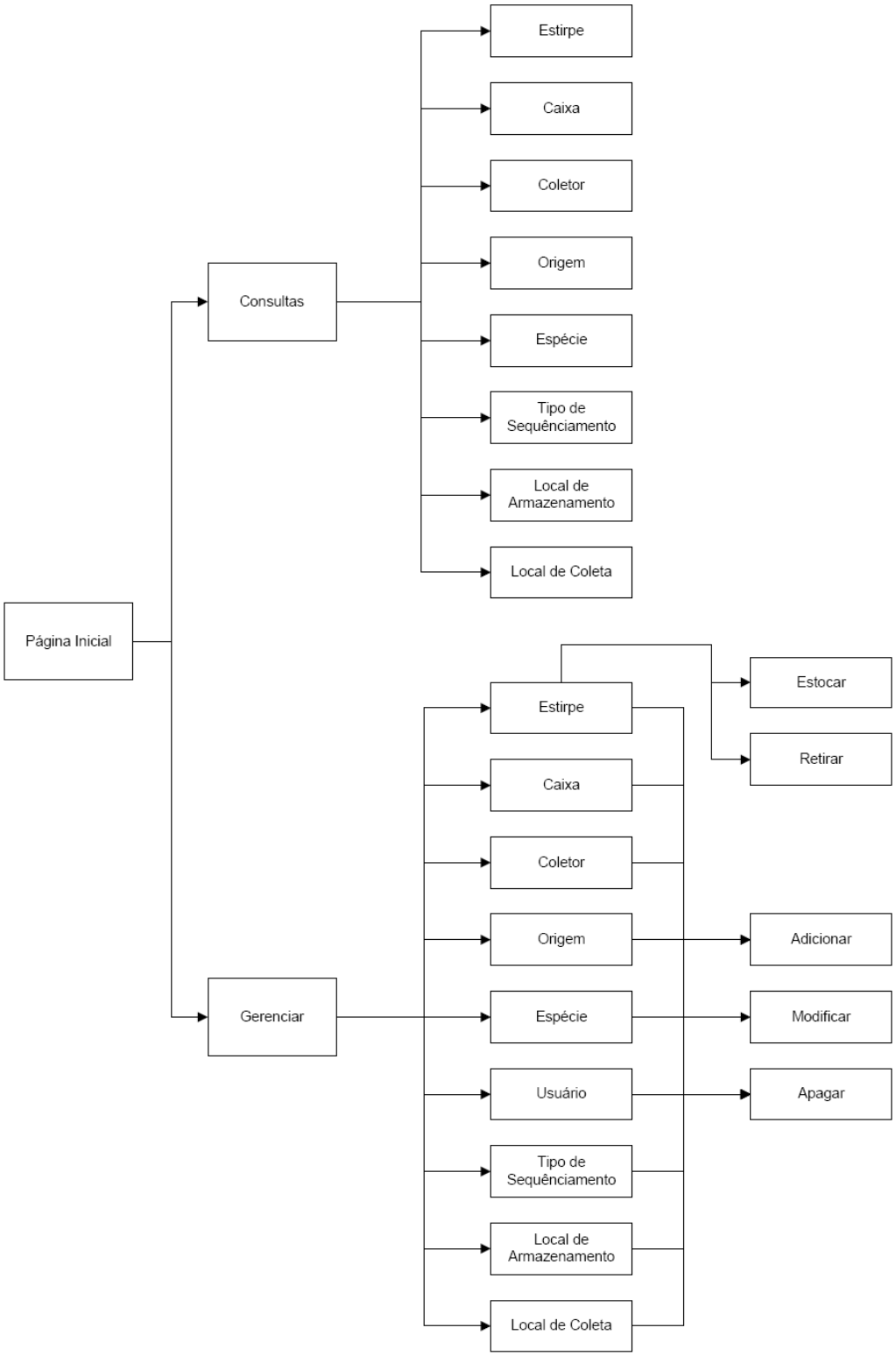
Essa parte de catalogação foi feita a partir da utilização de um banco de dados. Para isso, um SGBD (sistema de gerenciamento de banco de dados) foi utilizado, como por exemplo, o MySQL, que é um sistema simples de ser utilizado. Entretanto a consulta nele não é intuitiva e, portanto, não é fácil. Para solucionar esse problema, linguagens de programação foram usadas para criar páginas para facilitar o acesso ao banco de dados.

Os sistemas de bancos de dados trabalham com tabelas. O Banco de Microrganismos deve conter as racks que estao no ultra-freezer, caixas em que as

estirpes estarão armazenadas, o local em que estas caixas se encontram, os coletores, os locais de coleta, entre muitos outros dados. Depois, esses dados podem ser relacionados.

Para consultar esses dados, uma linguagem de programação (PHP) foi utilizada. Dessa forma, a consulta pode ser feita de uma forma mais clara e de fácil entendimento. Várias páginas foram criadas para que as estirpes sejam adicionadas e consultadas, de modo a tornar o banco acessível aos usuários internos (gerenciamento) e externos (usuários/visitantes). Muitos dados poderão ser inseridos, como código da estirpe, número da caixa, coletor, origem (espécie associada), tipo de sequenciamento realizado, local em que a caixa está armazenada e local de coleta. Os dados interagem de acordo com o Organograma 1.

Organograma 1 - Como os dados interagem



Enquanto que o acesso via “Consultas” ficará disponível online para qualquer interessado, o acesso via “Gerenciar” será possível apenas através de senha do laboratório, o que permitirá a alimentação contínua do banco, bem como protegerá as informações que julgarmos que deverão permanecer indisponíveis por um certo tempo, como por exemplo, sequências gênicas ou outras informações ainda não publicadas.

Ao abrir a página inicial o usuário terá acesso a 3 outros links, a saber: i) página do CEIS (Centro de Estudos de Insetos Sociais); ii) Laboratório de Microbiologia e; iii) Mundo das Leveduras, local onde o responsável pelo banco de microrganismos e pelo Laboratório de Microbiologia (prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca) mantém um vínculo com a comunidade externa e interna, apresentando temas e assuntos envolvendo microrganismos (especialmente leveduras) numa linguagem bastante acessível.

Como o público externo poderá consultar estes dados, foi criada também uma ficha para cada estirpe contendo informações sobre alguns aspectos da Biologia desse microrganismo, bem como fotos de morfologia celular e colonial, classificação taxonômica e outros dados que possam ser úteis aos usuários, como resultados dos testes fisiológicos e sequenciamento. Tais informações poderão ser úteis para o público externo e também para outros pesquisadores interessados, pois uma das finalidades do Banco de Microrganismos é permitir o intercâmbio dos espécimes.

4. RESULTADOS

O Banco de Microrganismos teve início a partir da necessidade de organizar a coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia do CEIS, a qual cresce continuamente à medida que novas pesquisas são desenvolvidas. No estágio atual, o Banco de Microrganismos resultou num grande projeto com diversos tipos de consultas e um local muito bem organizado onde cada dado deve ser inserido em páginas específicas. Existe também a possibilidade de colocar arquivos, como fotos, artigos científicos relacionados às pesquisas realizadas no laboratório, protocolos utilizados entre outros.

Esta interface online criada é dividida em diversas seções, que permitem fazer Consultas, Gerenciar e visualizar os Arquivos.

4.1. Página Inicial

A página inicial (figura 1) traz um texto com um breve histórico do Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS). Além disso, ela apresenta também 3 links de outros sites importantes para o laboratório.

4.1.1. CEIS

4.1.2. Laboratório de Microbiologia

4.1.3. O Mundo das Leveduras

Figura 1 – Página Inicial

4.1. Seção de Consultas

Ao acessar o Banco de Microrganismos os pesquisadores do laboratório e externos podem ver os microrganismos que estão sendo ou que já foram incorporados à base de dados. A partir das informações de cada estirpe, as pessoas podem saber de qual substrato ela foi isolada, a espécie, se foi realizado sequenciamento ou não, a data da coleta, o local da coleta (com dados de GPS e mapa), a data em que foi estocada em ultra-freezer, o depositor e o local em que ela se encontra armazenada (ultra-freezer, rack, posição na rack, caixa e posição na caixa). Os pesquisadores podem realizar essas pesquisas de diferentes formas, descritas a seguir.

4.1.1. Consulta por Rack

Nesta seção, é possivel ver todas as racks que estão no ultrafreezer (figura 2). Ao clicar em uma rack, aparece um mapa mostrando quais caixas estão armazenadas (figura 3).

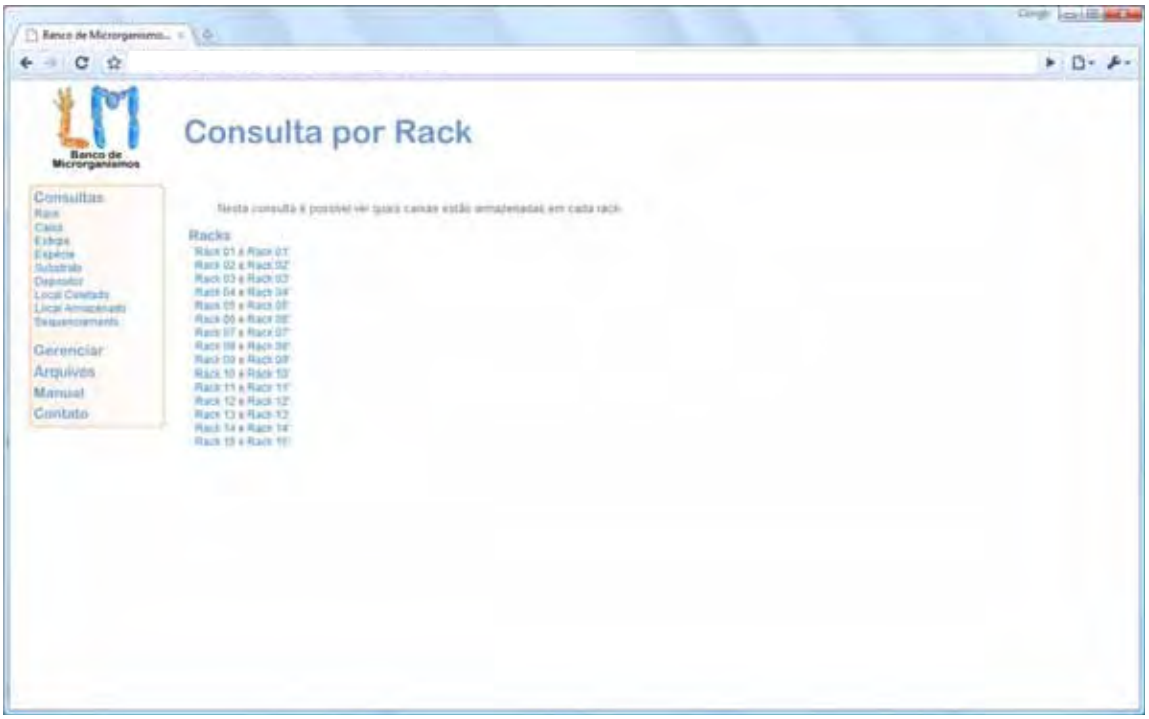


Figura 2 – Consulta por Rack mostrando todas as racks do Banco

Figura 3 – Rack 1 mostrando quais caixas estão armazenadas nela

4.1.2. Consulta por Caixa

Nesta seção, é possível ver todas as caixas e suas cópias (figura 4). Ao clicar em uma caixa, aparece um mapa da caixa mostrando todas as estirpes que estão armazenadas (figura 5).

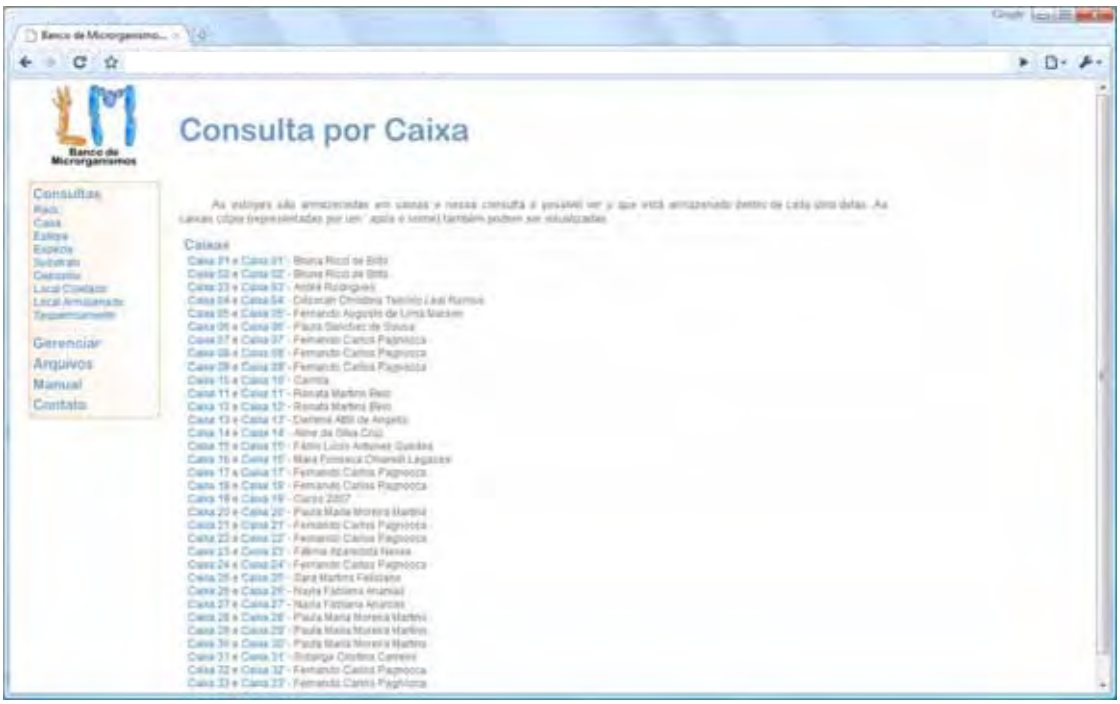


Figura 4 – Consulta por caixa mostrando todas as caixas do Banco

Figura 5 – Caixa 4 mostrando quais estirpes estão armazenadas nela

4.1.3. Consulta por Estirpe

Nesta seção, é possível ver todas as estirpes catalogadas no banco (figura 6). Para facilitar a busca, existe um campo onde se deve digitar o código de uma estirpe (ou parte dele) para localizá-la. Ao clicar em um código, aparece uma ficha (figura 7) com:

- Dados da Estirpe: Código do Laboratório, Código do Depositor, Local de Armazenamento (nome do ultrafreezer), Nome da Rack, Posição na Rack, Nome da Caixa, Posição na Caixa, o Substrato de onde a estirpe foi isolada, a Espécie, o Tipo de Sequenciamento feito durante o estudo e a Data da Última Estocagem;

- Dados da Coleta: Local de Coleta (País, Estado, Cidade, Local), GPS (com um link que abre o mapa), a Data da Coleta e o Depositor;

- Dados da Cópia: Local de Armazenamento, Nome da Rack, Posição na Rack, Nome da Caixa e Posição na Caixa. A “estirpe cópia” sempre fica numa outra caixa com o mesmo nome da caixa original seguida por um apóstrofe e a caixa cópia sempre fica na rack com o mesmo nome da rack original seguida por um apóstrofe também, em outro ultrafreezer (por medida se segurança).

Além das fichas de Dados da Estirpe, Dados da Coleta e Dados da Cópia, existe um campo com observação, que o depositor pode colocar informações adicionais que julgar necessário. Pode também haver três links – Mais Informações, Testes Fisiológicos e Fotos –, quando o depositor inserir esses dados. Essas 3 páginas são protegidas por senha, ou seja, apenas pessoas autorizadas podem ter acesso.

Figura 6 – Consulta por estirpe mostrando todas as estirpes do Banco

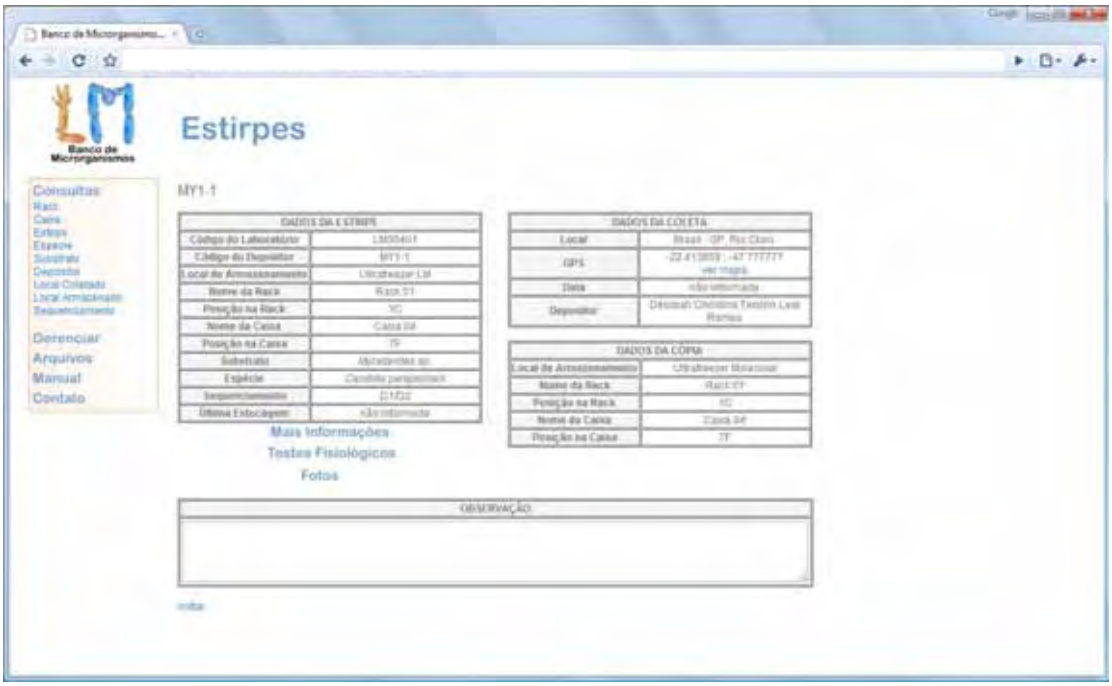


Figura 7 – Ficha da estirpe MY1-1 utilizada como exemplo

4.1.3.1. Mais Informações

Essa página contém dados mais específicos da estirpe (figura 8). Existem várias fichas:

- Características: com uma breve descrição de características macroscópicas e microscópicas da estirpe;
- Identificação: Presuntiva e Final;
- Isolamento/Estocagem: Técnica de Isolamento, Meio de Manutenção, Técnica de Preservação, Temperatura Ótima e Data de Estocagem;
- Observações Adicionais
- Sequenciamento: Tipo de Região, a Sequência em formato FASTA, o código de acesso no BLAST e a similaridade obtida;
- Referências: Referências Bibliográficas, Publicações e Número em Outras Coleções.

Para acessar essa página, é necessário ter um login e uma senha, ou seja, apenas os usuários cadastrados no banco poderão ver esses dados adicionais.

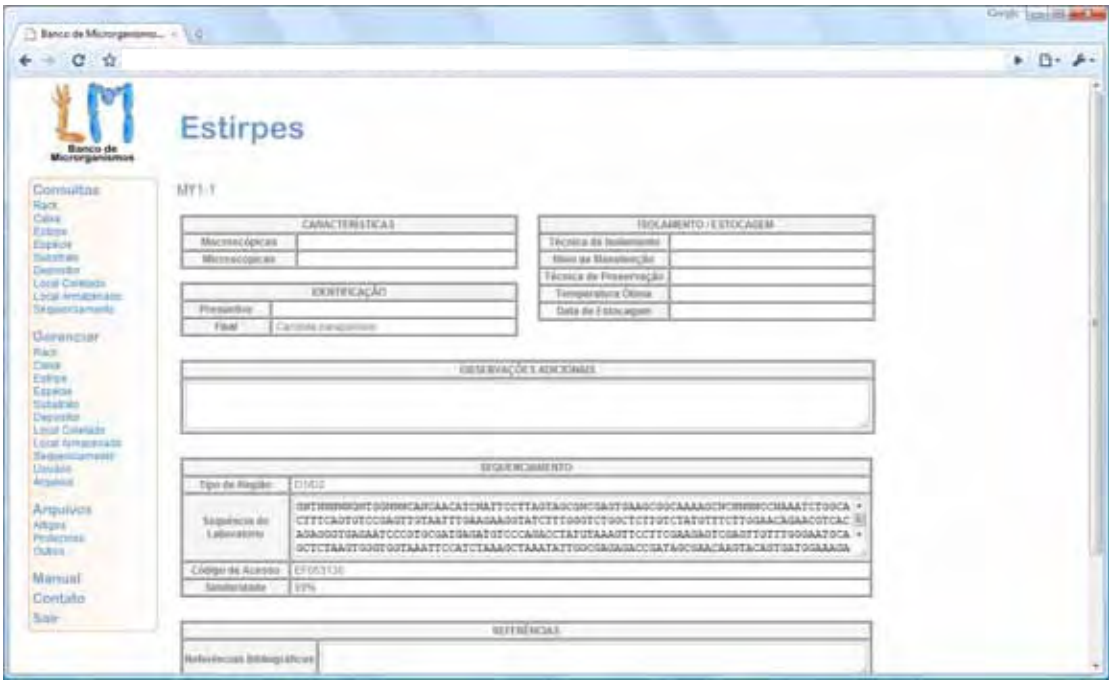


Figura 8 – Mais Informações da estirpe MY1-1 usada como exemplo

4.1.3.2. Testes Fisiológicos

Esta página mostra os resultados dos testes fisiológicos realizados com a estirpe (figura 9).

Para acessar essa página, é necessário ter um login e uma senha, ou seja, apenas os usuários cadastrados no banco poderão ver esses dados adicionais.

Figura 9 – Testes Fisiológicos da estirpe MY1-1

4.1.3.3. Fotos

Esta página contém fotos da estirpe tiradas durante o estudo (figura 10).

Para acessar essa página, é necessário ter um login e uma senha, ou seja, apenas os usuários cadastrados no banco poderão ver esses dados adicionais.

Figura 10 – Fotos da estirpe MY1-1

4.1.4. Consulta por Espécie

Nesta seção, é possível ver todas as espécies registradas no Banco de Microrganismos (figura 11). Para facilitar a busca, existe um campo onde é possível digitar o nome da espécie (ou apenas o gênero) para localizá-la. Ao clicar na espécie desejada, aparece uma tabela com todas as estirpes dessa espécie e a caixa e a posição em que elas se encontram (figura 12). Além disso, algumas espécies podem conter o link “Mais Informações”, no qual aparecerá uma ficha com a classificação (Reino, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie) e um texto sobre a biologia da espécie (figura 13).

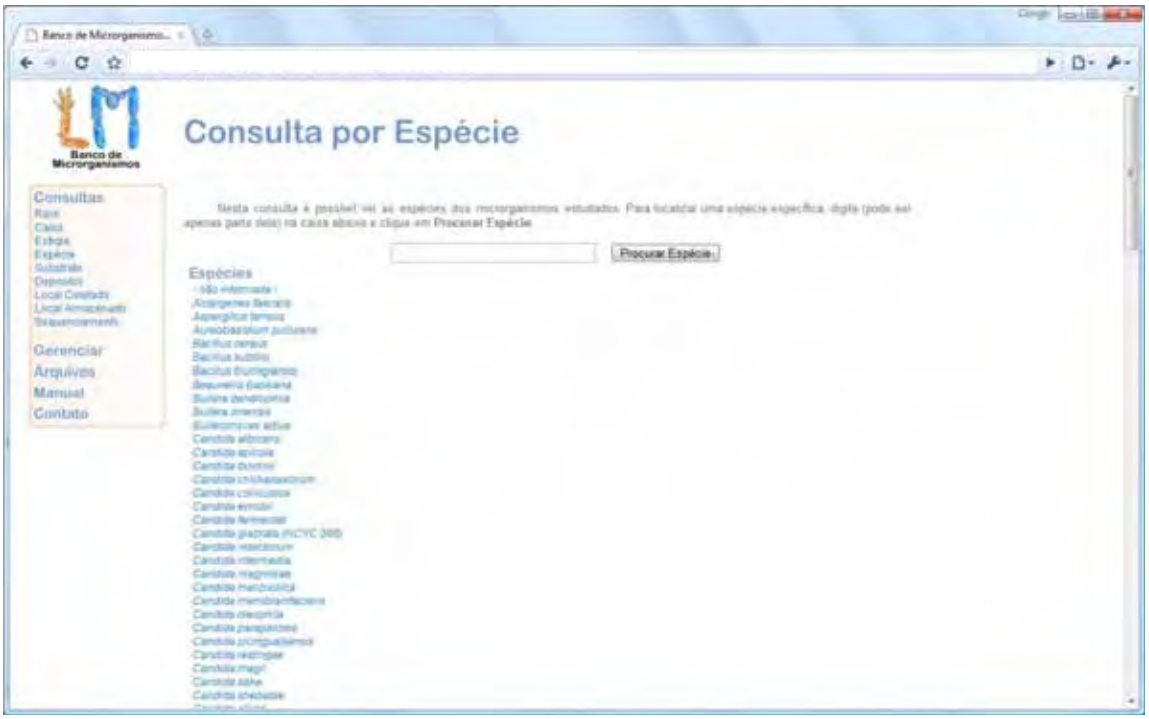


Figura 11 – Consulta por espécie mostrando todas as espécies do Banco

Figura 12 – *Candida parapsilosis* mostrando todas as estirpes dessa espécie

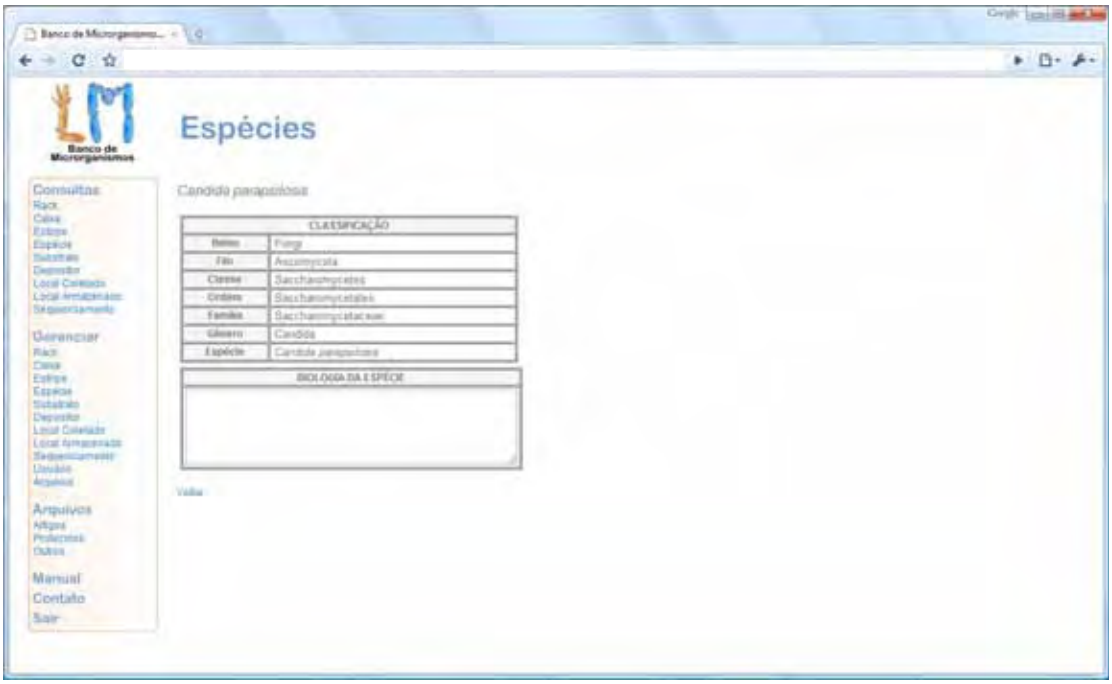


Figura 13 – Mais Informações da espécie *Candida parapsilosis*

4.1.5. Consulta por Substrato

Nesta seção, é possível ver os substratos dos quais foram isolados os microrganismos (figura 14). Para facilitar a busca, existe um campo para colocar o nome do substrato (ou parte dele) para localizá-lo. Ao clicar no substrato desejado, aparece uma tabela com todas as estirpes que foram isoladas desse substrato e a caixa e posição em que elas se encontram (figura 15).

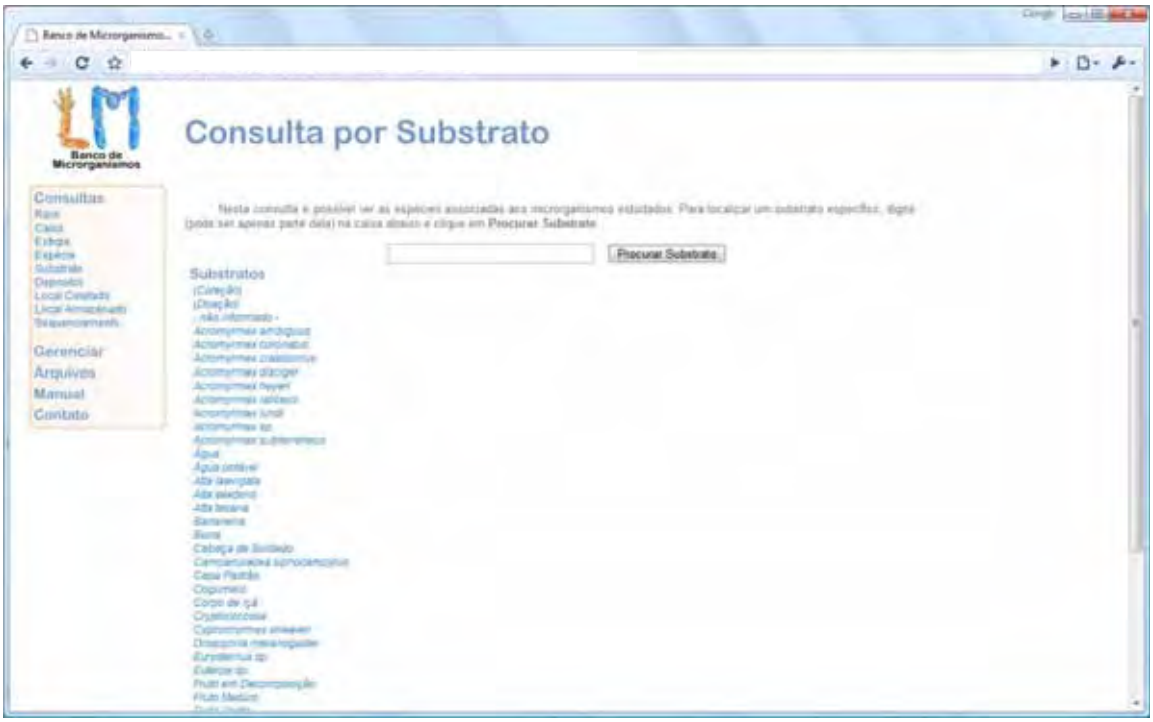


Figura 14 – Consulta por substrato mostrando todos os substratos dos quais foram isolados microrganismos

Figura 15 – *Mycocepurus goeldii* mostrando todas as estirpes que foram isoladas dessa formiga e suas localizações no Banco

4.1.6. Consulta por Depositor

Nesta seção, é possível ver os nomes de todos os depositores (figura 16). Ao clicar no nome do depositor, aparece uma lista com todas as estirpes estudadas por ele (figura 17).

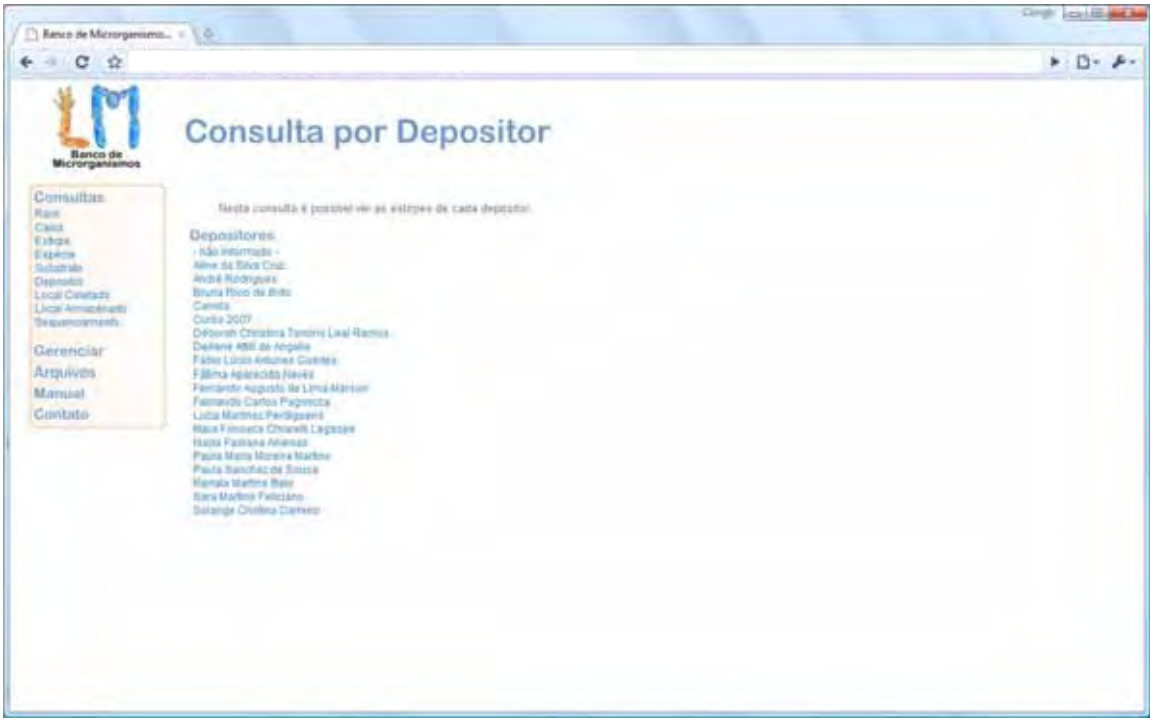


Figura 16 – Consulta por Depositor mostrando todos os pesquisadores do Laboratório de Microbiologia

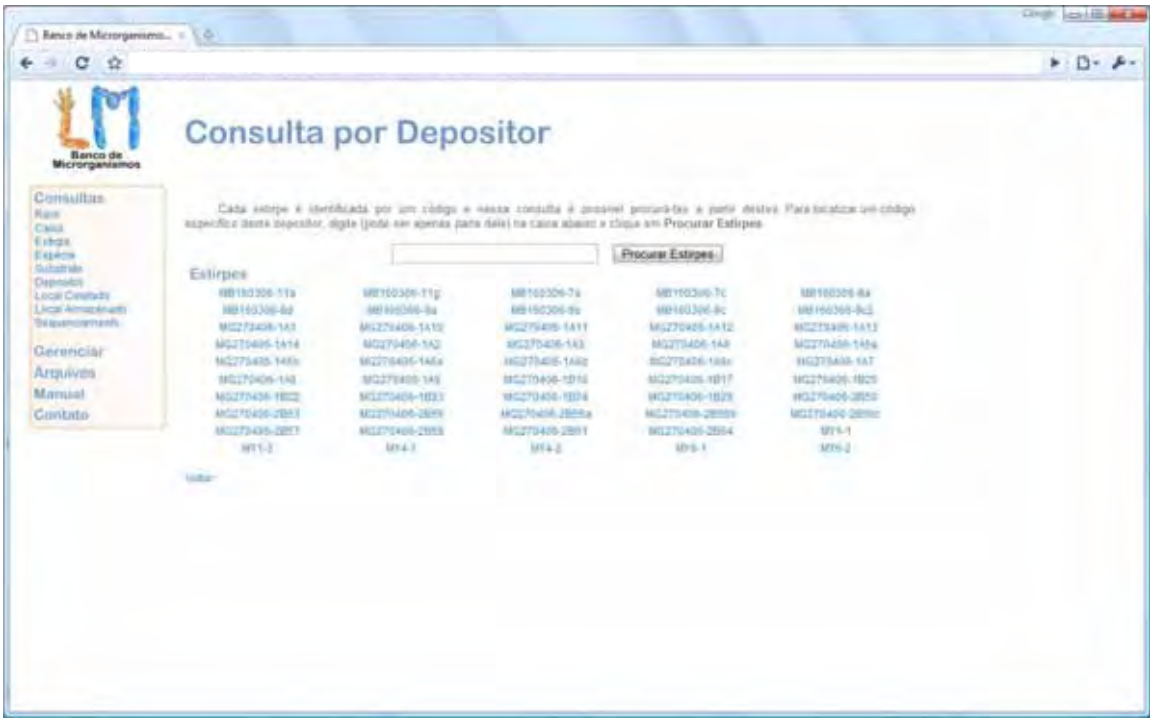


Figura 17 – Lista de todas as estirpes estudadas por um pesquisador

4.1.7. Consulta por Local Coletado

Nesta seção, é possível ver todos os locais em que foram coletados substratos para isolar os microrganismos (figura 18). A tabela mostra o País, Estado, Cidade e especificação do local (quando necessário – por exemplo o nome de um Parque, Fazenda, Floresta etc) e um link que abre em outra janela um mapa que mostra exatamente o ponto que que a amostra foi coletada. Ao clicar em um Local de Coleta, aparece uma lista dos substratos coletados no local (figura 19).

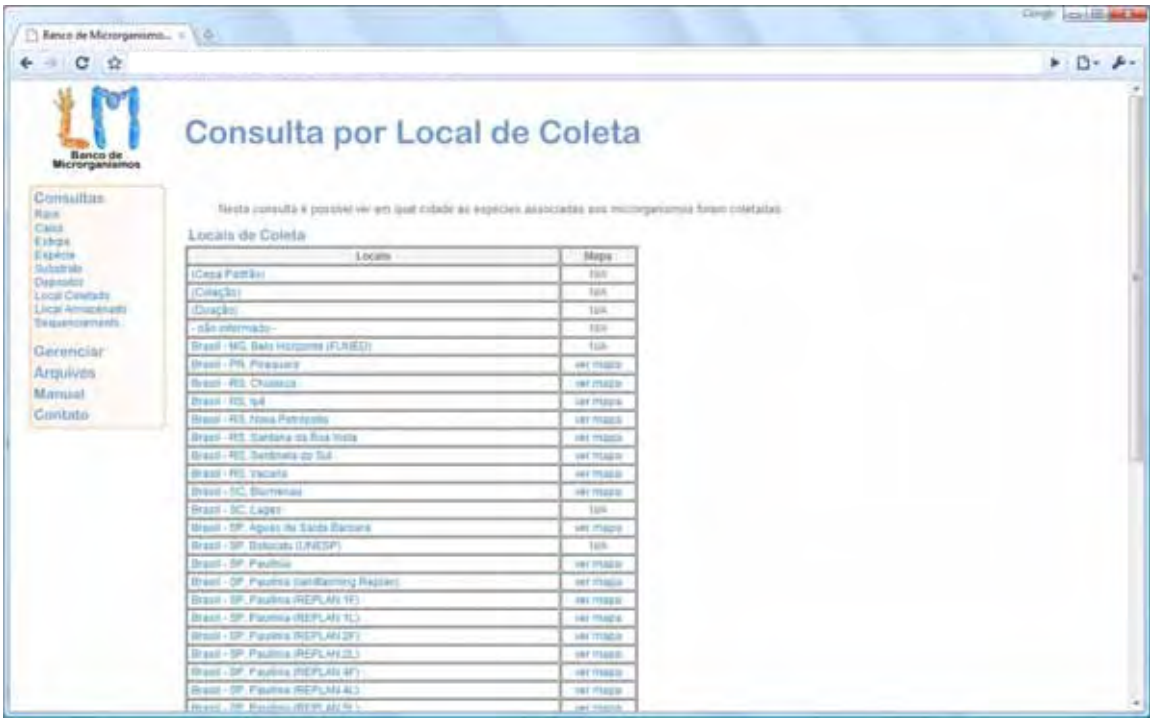


Figura 18 – Consulta por Local de Coleta mostrando todos os locais em que foram coletados substratos para isolar estirpes

Figura 19 – Lista de todos os substratos coletados em um local

4.1.8. Consulta por Local Armazenado

Nesta seção, é possível ver todos os locais de armazenamento (ultrafreezer) (figura 20). Ao clicar no nome de um ultrafreezer, aparece uma lista com todas as racks armazenadas nele (figura 21).

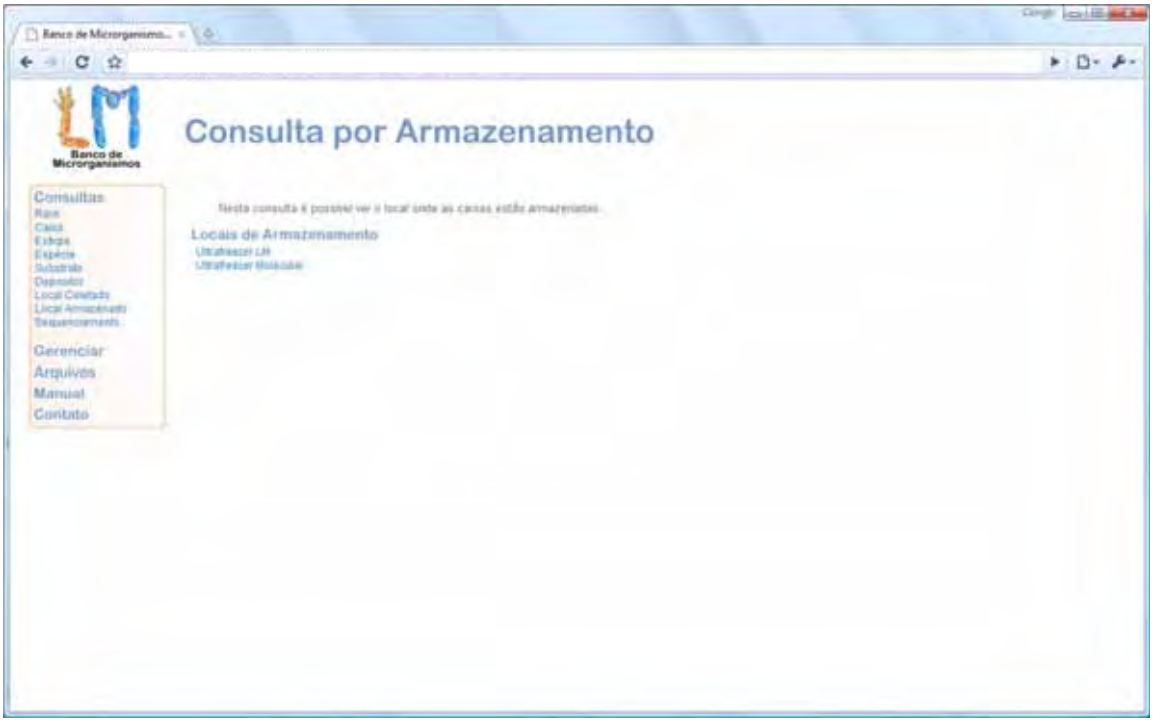


Figura 20 – Consulta por Local de Armazenamento mostrando todos o ultrafreezeres

Figura 21 – Lista de todas as racks armazenadas em um ultrafreezer

4.1.9. Consulta por Sequenciamento

Nesta seção, é possível ver os tipos de sequenciamentos feitos, ou seja, a região escolhida para ser sequenciada (figura 22). Ao clicar em um tipo, aparece uma lista com as espécies identificadas a partir desse tipo de sequenciamento (figura 23).

Figura 22 – Consulta por Sequenciamento mostrando os tipos (regiões) de sequenciamento

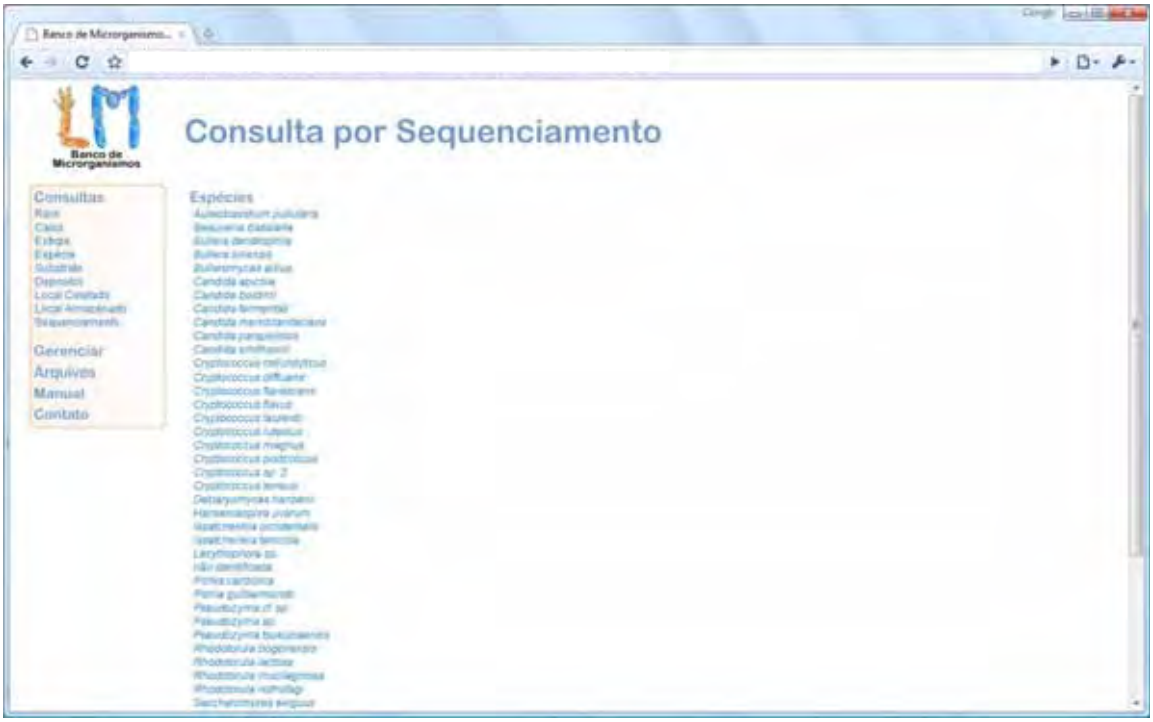


Figura 23 – Lista de todas as espécies que foram identificadas a partir de um determinado tipo de sequenciamento

4.2. Seção de Gerenciamento

Esta seção é protegida por senha (figura 24), ou seja, apenas os usuários cadastrados no Banco de Microrganismos têm acesso. Ela tem como objetivo permitir que os pesquisadores do laboratório insiram, modifiquem ou apaguem os dados no Banco (figura 25).

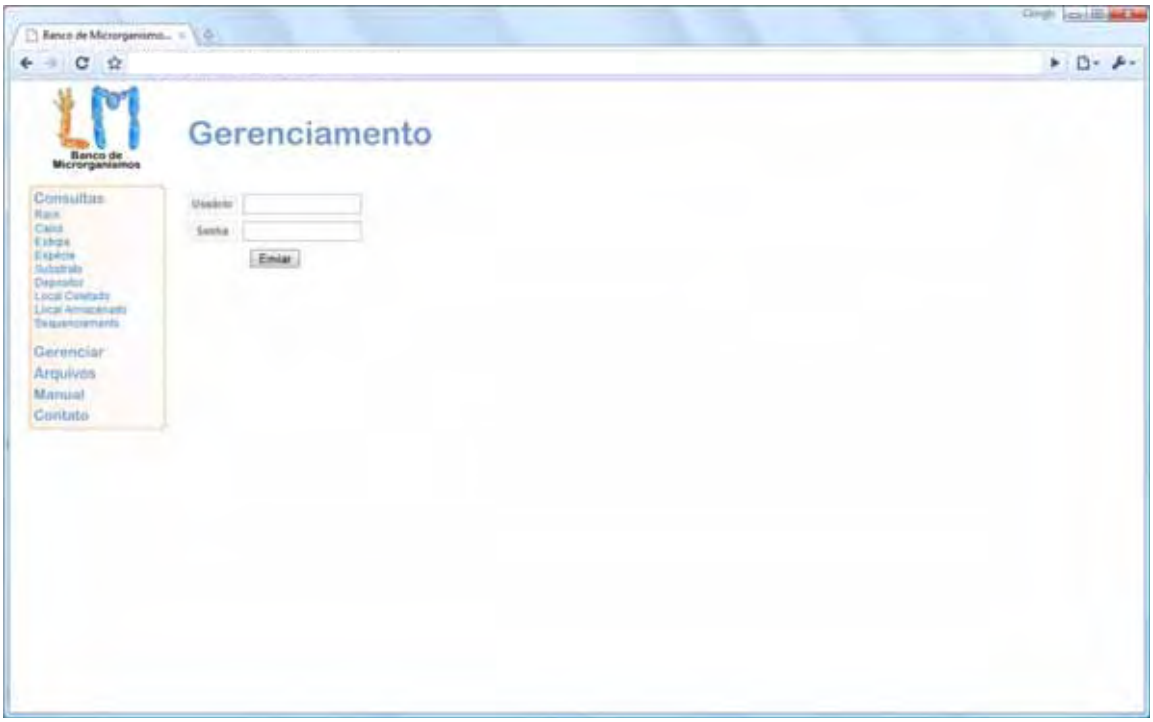


Figura 24 – Seção de Gerenciamento: página de login

Figura 25 – Página inicial da seção de Gerenciamento

Existem diversas seções para que os dados sejam inseridos, que são descritas a seguir.

4.2.1. Gerenciar Rack

Nesta seção, é possível criar, modificar e apagar as racks (figura 26).

Figura 26 – Gerenciar Rack mostrando as operações possíveis (Criar, Modificar e Apagar)

4.2.1.1. Criar

Para criar uma rack, é necessário escolher o local que ela e sua cópia serão guardadas (em qual ultrafreezer), o nome da rack e o número de linhas e de colunas.

4.2.1.2. Modificar

Na parte de modificar a Rack, é possível mudar o nome e o local que ela e sua cópia estão guardadas (figura 27). Deve-se abrir a lista abaixo da figura “Modificar” e escolher a rack que se deseja modificar, e então escolher o local que ela será armazenada, o local da cópia e o nome.

Figura 27 – Modificar Rack mostrando quais dados podem ser alterados

4.2.1.3. Apagar

Para apagar, somente as racks vazias poderão ser apagadas, para que nenhum dado seja perdido. Deve-se abrir a lista abaixo da figura “Apagar” e escolher a rack que se deseja apagar.

4.2.2. Gerenciar Caixa

Nesta seção, é possível criar, estocar, retirar, modificar e apagar caixas (figura 28).

Figura 28 – Gerenciar Caixa mostrando as operações possíveis (Criar, Estocar, Retirar, Modificar e Apagar)

4.2.2.1. Criar

Para criar uma caixa, é necessário escolher um nome e digitar o número de linhas e colunas existentes.

4.2.2.2. Estocar

Para estocar uma caixa, deve-se clicar em estocar, depois escolher a caixa a ser armazenada (figura 29) e então clicar no botão “ESTOCAR” da rack e posição que se deseja (figura 30). Apenas as posições vazias aparecem com o botão “ESTOCAR”.

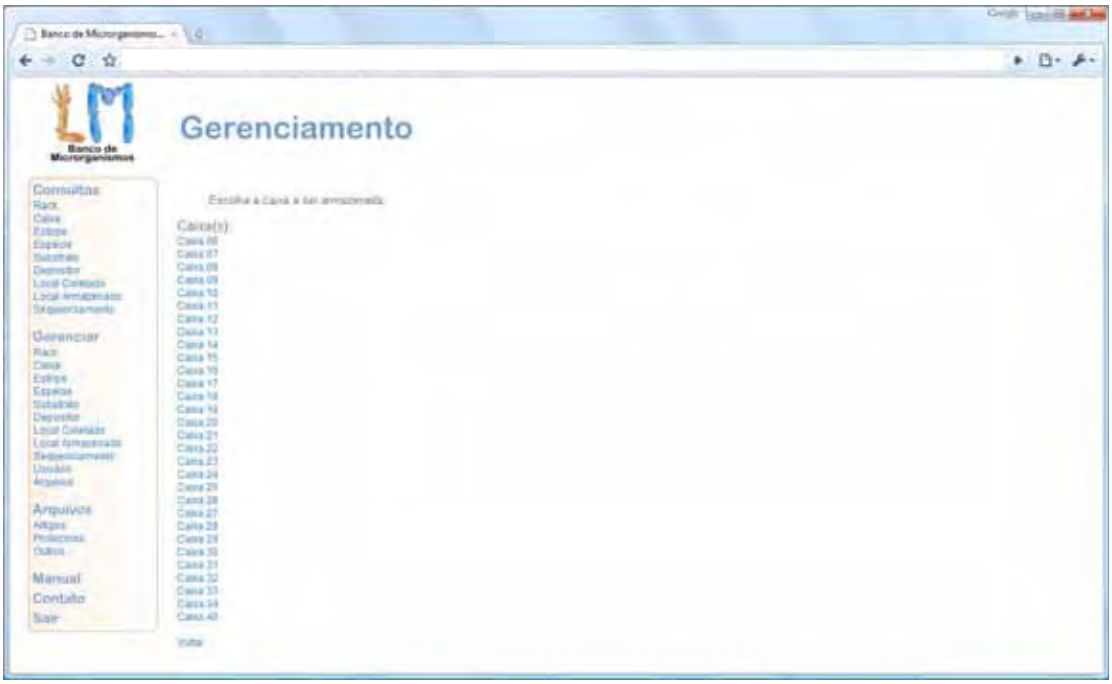


Figura 29 – Estocar Caixa mostrando todas as caixas que ainda não foram estocadas

Figura 30 – Estocar Caixa mostrando quais as posições vazias nas racks

4.2.2.3. Retirar

Para retirar a caixa da rack, deve-se escolher a caixa a ser retirada, e então clicar no botão “RETIRAR” (figura 31). Ela não será apagada do Banco, só sairão da rack. Ela então voltará para a lista das caixas não armazenadas (figura 30) e poderá depois ser armazenada em outra posição ou em outra rack.

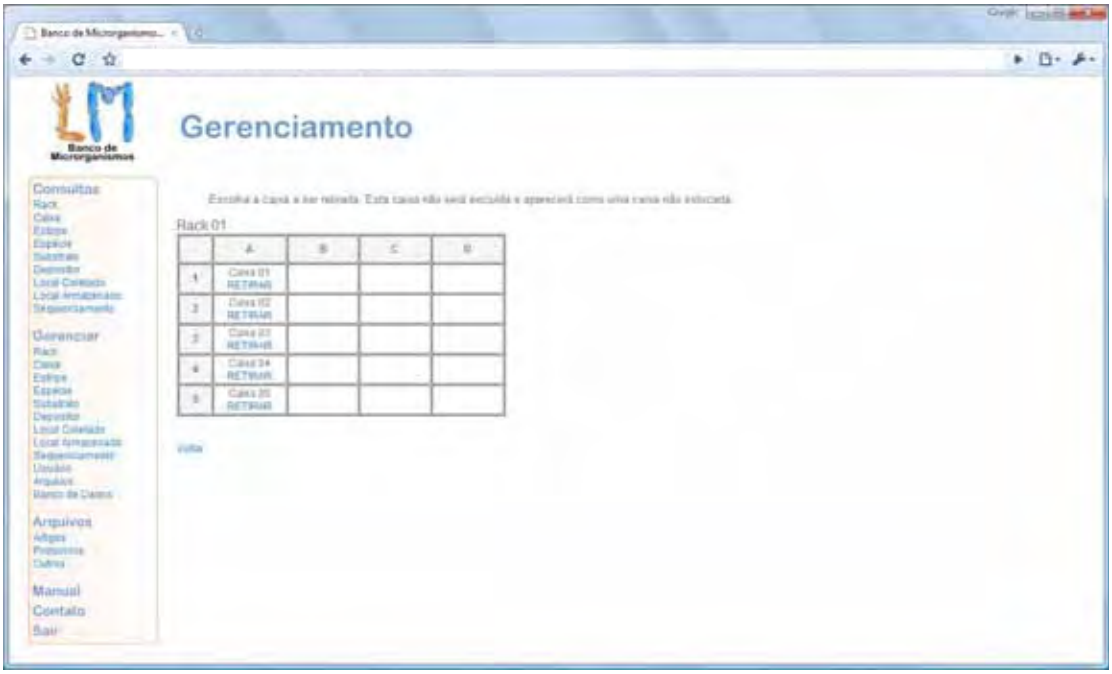


Figura 31 – Retirar Caixa da rack mostrando as caixas já armazenadas

4.2.2.4. Modificar

Na parte modificar caixa, é possível mudar o nome da caixa (figura 32). Deve-se abrir a lista abaixo da figura “Modificar” e escolher a caixa que se deseja modificar, e então escolher o novo nome.

Figura 32 – Modificar Caixa mostrando que só o nome da caixa pode ser alterado

4.2.2.5. Apagar

Para apagar, somente as caixas vazias poderão ser apagadas, para que nenhum dado seja perdido. Deve-se abrir a lista abaixo da figura “Apagar” e escolher a caixa que se deseja apagar.

4.2.3. Gerenciar Estirpe

Nesta seção é possível criar, estocar, retirar, modificar e apagar estirpes (figura 33).

Figura 33 – Gerenciar estirpe mostrando mostrando as operações possíveis (Criar, Estocar, Retirar, Modificar e Apagar)

4.2.3.1. Criar

Para criar uma estirpe, é necessário preencher uma ficha com diversos dados (figura 34). Os dados são: Código, Depositor, Substrato, Espécie, Sequenciamento, Local de Coleta, Cópia (selecionar a caixa se tiver cópia e deixar em branco se ná tiver), Data de Coleta, Data de Estocagem e Observação (se achar necessário). Destes dados, o Depositor, Substrato, Espécie, Sequenciamento e Local de coleta devem estar previamente cadastrados no Banco, para que eles apareçam nas listas. Isso evita que os pesquisadores tenham que digitar dados muitas vezes repetidos, o que poderia levar a erros.

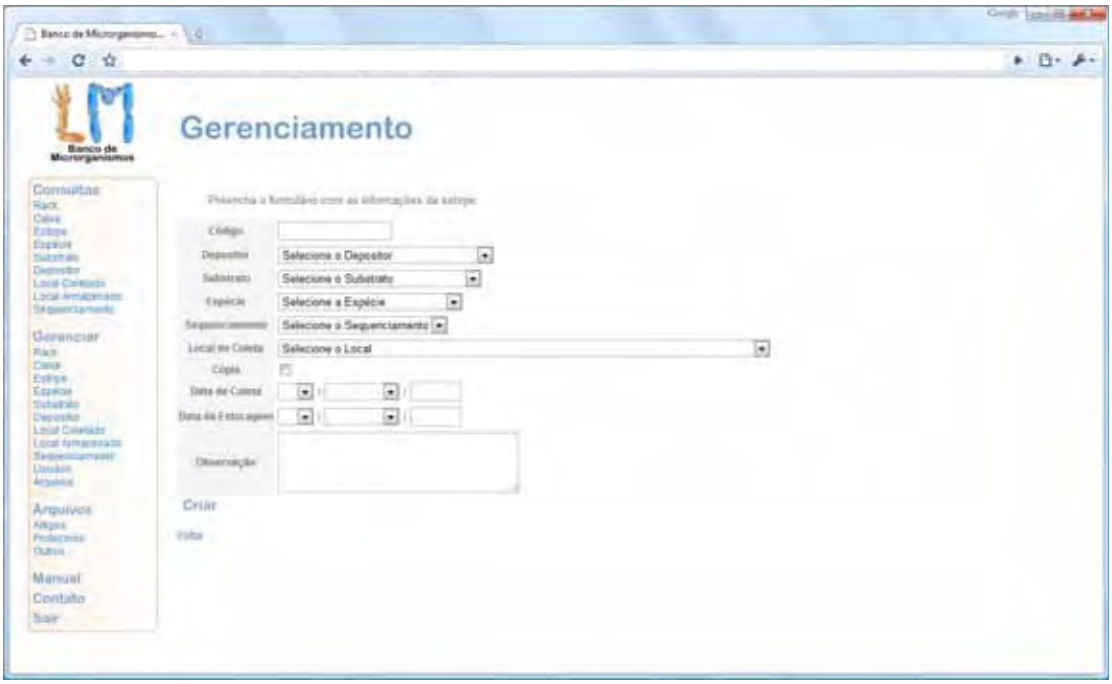


Figura 34 – Ficha que deve ser preenchida para criar uma estirpe no Banco

4.2.3.2. Estocar

Para estocar uma estirpe, é necessário escolher o Depositor (figura 35), depois clicar no código da estirpe que se deseja estocar (figura 36) e então escolher a caixa e posição e clicar no botão “ESTOCAR” (figura 37). Apenas as posições vazias aparecem com o botão “ESTOCAR”. Na lista das caixas, aparecerão apenas as caixas vazias e as pertencentes ao depositor. Quando um depositor coloca uma estirpe em uma caixa vazia, esta passa a pertencer a ele.

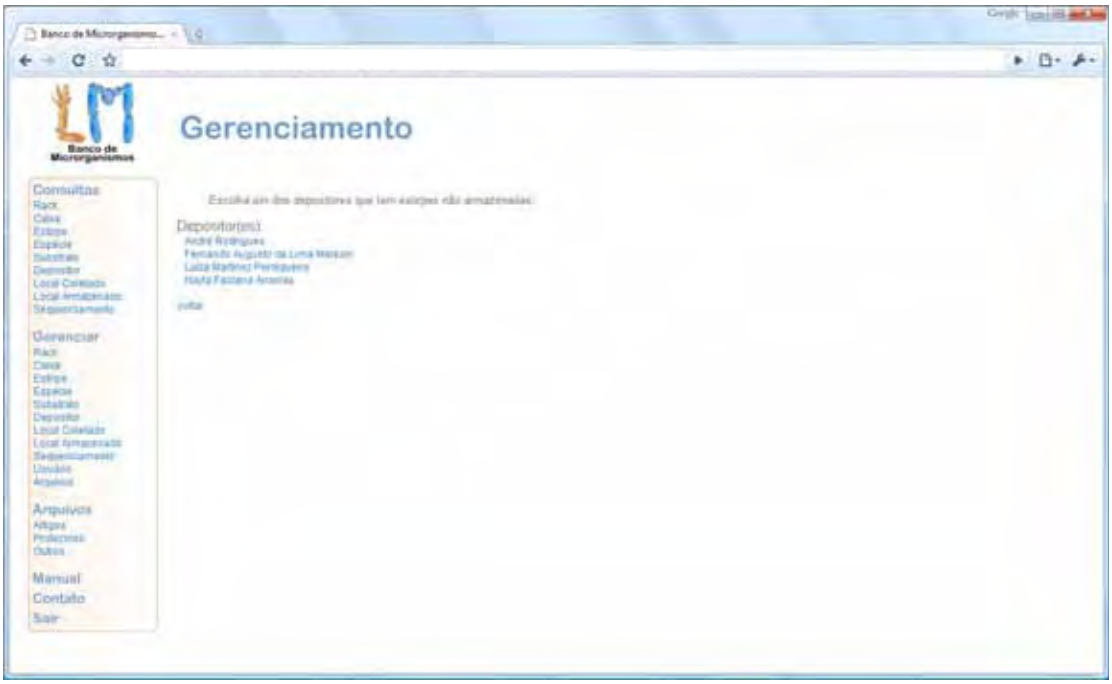


Figura 35 – Estocar Estirpe: selecionar o depositor

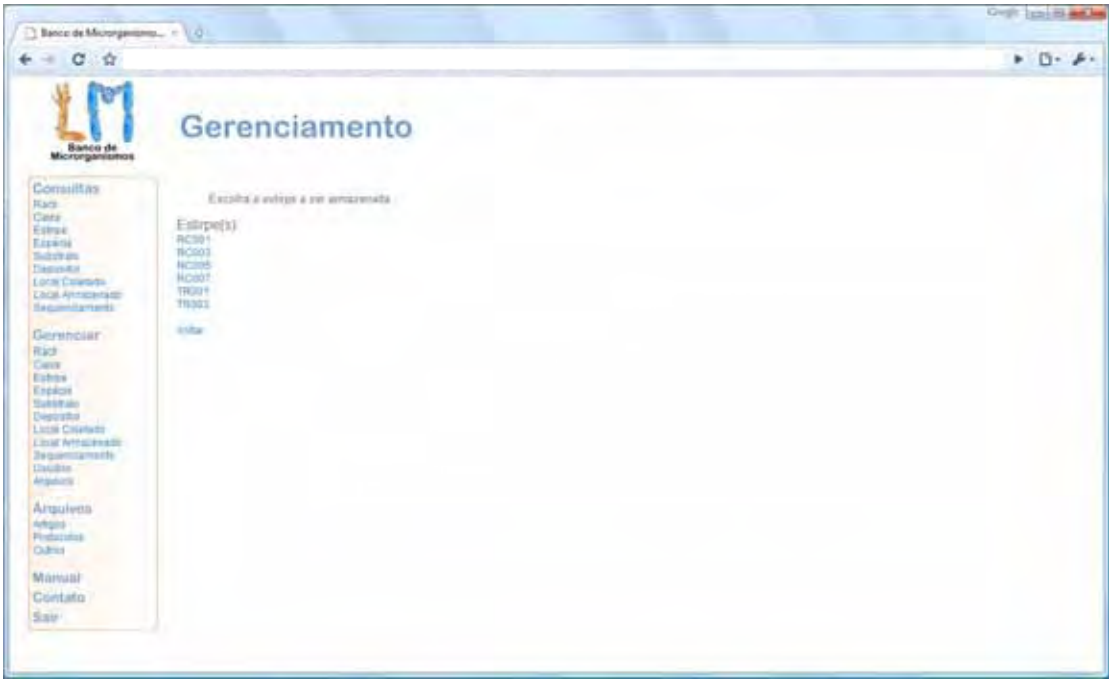


Figura 36 – Estocar estirpe: selecionar estirpe

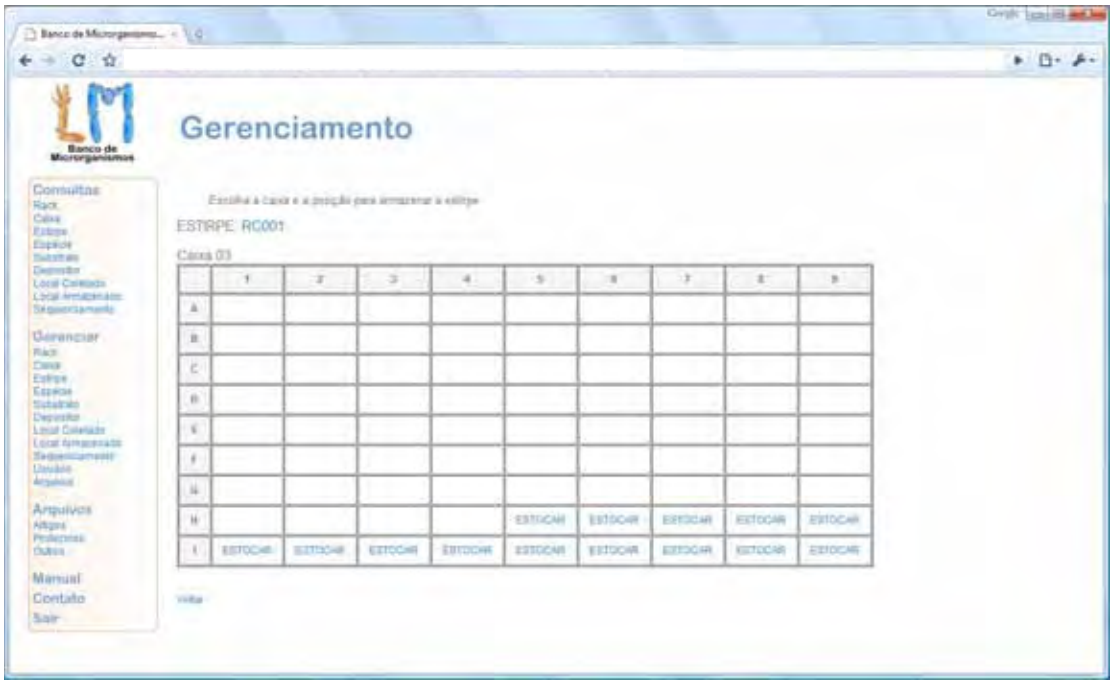


Figura 37 – Estocar estirpe mostrando os locais vazios na(s) caixas(s)

4.2.3.3. Retirar

Para retirar uma estirpe da caixa, é necessário escolher o Depositor (figura 38), depois escolher a estirpe a ser retirada, e então clicar no botão “RETIRAR” (figura 39). Ela não será apagada do Banco, só sairá da caixa. Ela então voltará para a lista das estirpes não armazenadas (figura 36) e poderá depois ser armazenada em outra posição ou até em outra caixa.

Figura 38 – Retirar estirpe: selecionar o depositor

Figura 39 – Retirar estirpe: selecionar a estirpe

4.2.3.4. Modificar

Nessa seção é possível modificar os dados das estirpes, caso tenha colocado algum dado errado, ou esquecido de colocar algum dado, ou se o estudo avançou e agora possui mais informações. Deve-se escolher o Depositor (figura 40), depois escolher a estirpe a ser modificada (figura 41). É possível modificar os dados já colocados na ficha da parte de criar a estirpe (figura 42) ou então inserir mais dados nas seções Mais Informações, Testes Fisiológicos e Fotos.

Figura 40 – Modificar estirpe: selecionar o depositor

Figura 41 – Modificar Estirpe: selecionar a estirpe

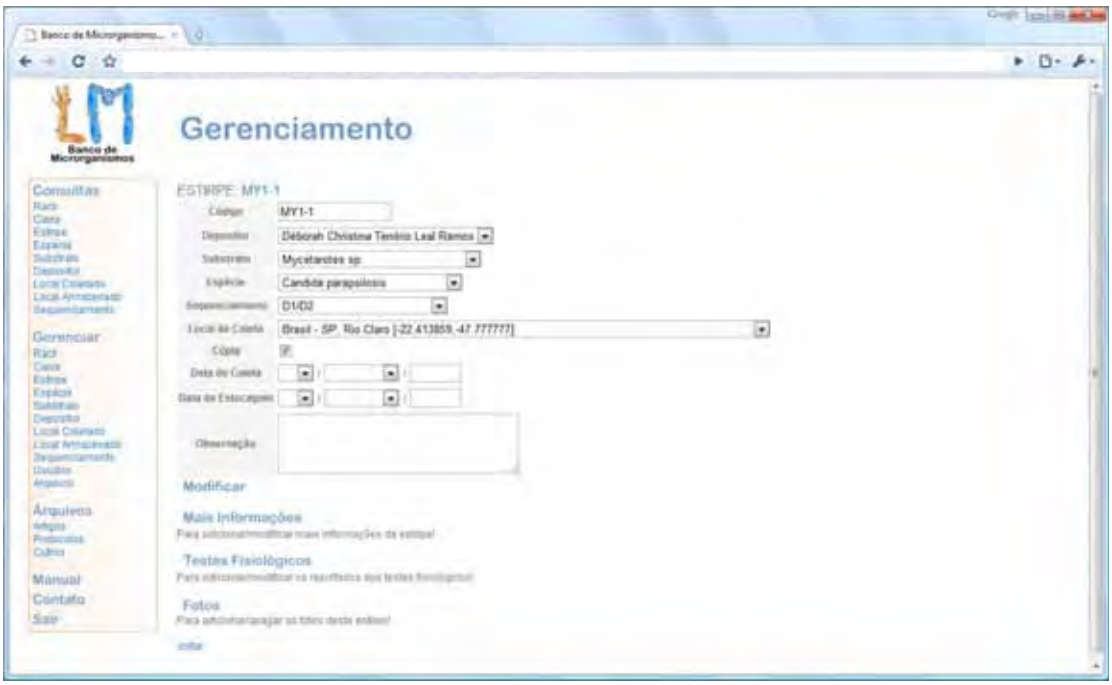


Figura 42 – Modificar Estirpe: ficha com os dados que podem ser alterados ou adicionados

4.2.3.4.1. Mais Informações

Nessa seção existem diversas fichas (figura 43) que podem ser preenchidas com os seguintes dados:

- Características: com uma breve descrição de características macroscópicas e microscópicas da estirpe;

- Identificação: Presuntiva e Final;

- Isolamento/Estocagem: Técnica de Isolamento, Meio de Manutenção, Técnica de Preservação, Temperatura Ótima e Data de Estocagem;

- Observações Adicionais

- Sequenciamento: Tipo de Região, a Sequência em formato FASTA, o código de acesso no BLAST e a similaridade obtida;

- Referências: Referências Bibliográficas, Publicações e Número em Outras Coleções

Figura 43 – Ficha Mais Informações

4.2.3.4.2. Testes Fisiológicos

Nesta seção, os pesquisadores podem colocar os resultados dos testes fisiológicos realizados durante o estudo (figura 44). Todos os testes devem estar previamente cadastrados no Banco.

Figura 44 – Ficha Testes Fisiológicos

4.2.3.4.3. Fotos

Nesta seção, os pesquisadores podem colocar fotos obtidas durante o estudo (figura 45). Para isso, deve-se escolher o arquivo no computador e colocar uma legenda. Para modificar a legenda, deve-se selecionar a foto na lista abaixo da figura Modificar. Para apagar uma foto, é necessário selecionar a caixa dizendo “Estou ciente que vou apagar a foto permanentemente!” e depois selecionar a foto.

Figura 45 – Inserir Fotos da estirpe

4.2.3.5. Apagar

Para apagar uma estirpe, deve-se escolher o Depositor (figura 46), selecionar a caixa dizendo “Estou ciente que vou apagar a estirpe permanentemente!” e então escolher a estirpe a ser apagada na lista (figura 47).

Figura 46 – Apagar Estirpe: escolher o depositor

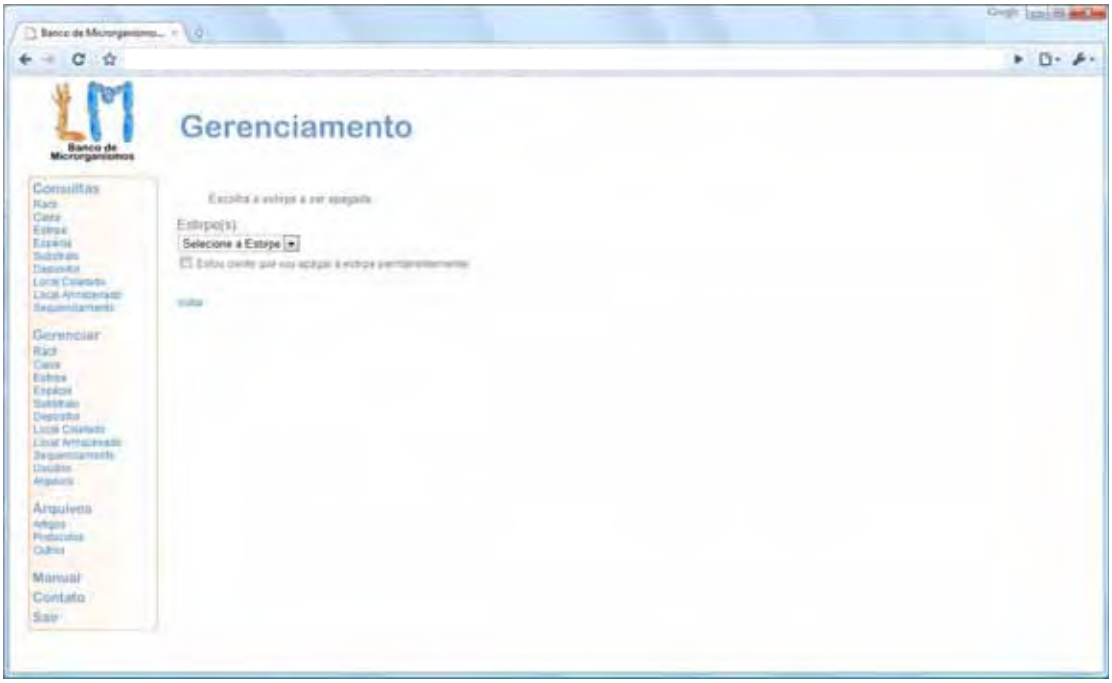


Figura 47 – Apagar Estirpe: escolher a estirpe

4.2.4. Gerenciar Espécie

Nesta seção é possível inserir, modificar e apagar espécies (figura 48). Na parte de modificar a espécie (figura 49), é possível clicar na imagem “Mais Informações” para preencher uma ficha de classificação (com Reino, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie) e escrever informações sobre a biologia da espécie (figura 50). Na parte de apagar, apenas as espécies que não estão associadas a estirpes podem ser apagadas.

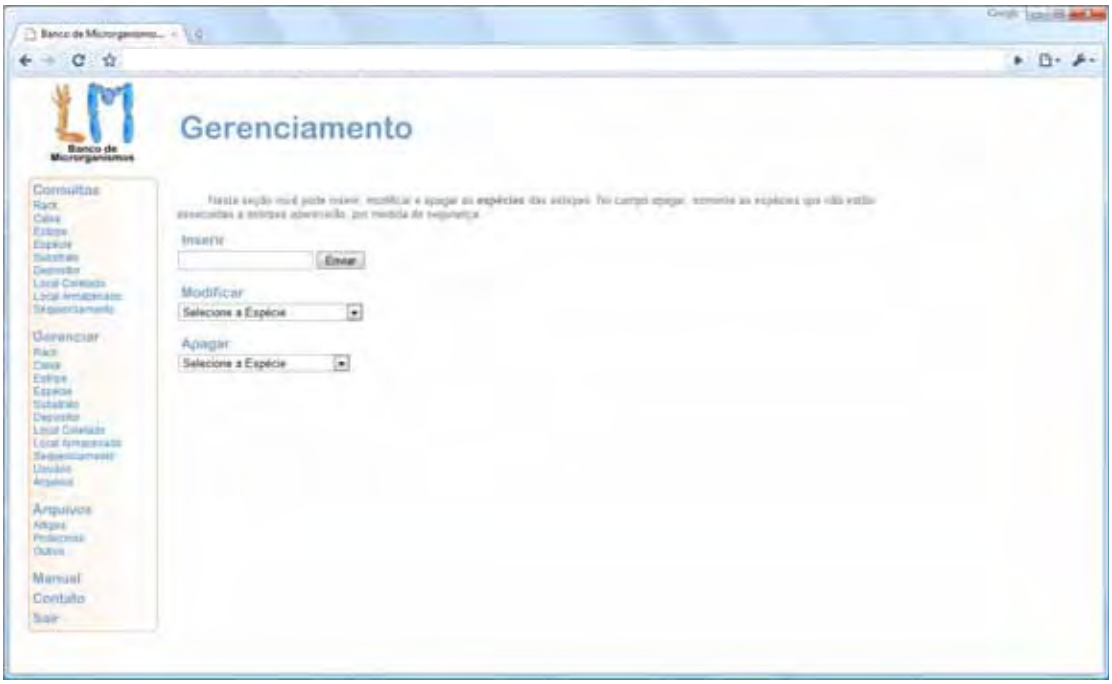


Figura 48 – Gerenciar Espécie mostrando mostrando as operações possíveis (Inserir, Modificar e Apagar)

Figura 49 – Modificar Espécie mostrando que ela pode ser alterada

Figura 50 – Ficha de Classificação da espécie e dados da Biologia da Espécie

4.2.5. Gerenciar Substrato

Nesta seção é possível inserir, modificar e apagar substratos (figura 51). Apenas os substratos que não estão associadas a estirpes podem ser apagados.

Figura 51 – Gerenciar Substrato mostrando mostrando as operações possíveis (Inserir, Modificar e Apagar)

4.2.6. Gerenciar Depositor

Nesta seção é possível inserir, modificar e apagar depositores (figura 52). Apenas os depositores que não estão associados a estirpes podem ser apagados.

Figura 52 – Gerenciar Depositor mostrando mostrando as operações possíveis (Inserir, Modificar e Apagar)

4.2.7. Gerenciar Local Coletado

Nesta seção é possível inserir, modificar e apagar os locais coletados (figura 53). Para inserir os dados, deve-se digitar o local coletado (por exemplo o nome de um parque ou de uma fazenda, quando existir – se não, pode ser deixado em branco), a cidade, o estado, o país e o GPS. Para preencher os dados de GPS, ao clicar no botão “preencher”, uma nova janela abrirá e o pesquisador deve preencher os dados (figura 54). Na parte apagar, somente os locais que não estão associados a estirpes podem ser apagados.

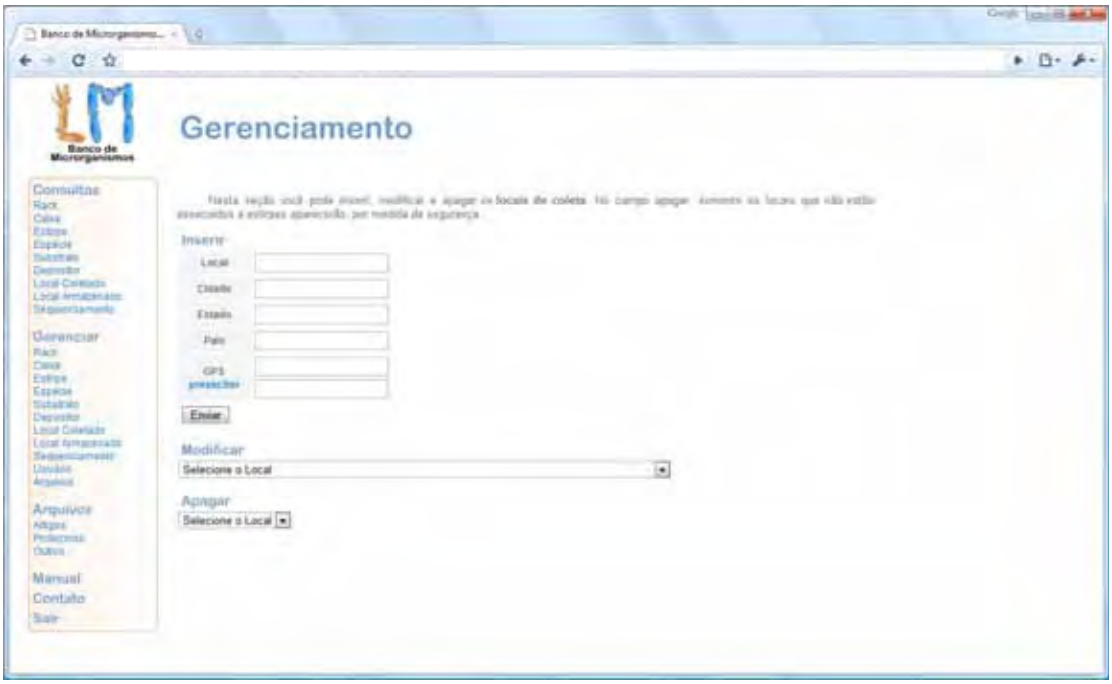


Figura 53 – Gerenciar Locais de Coleta mostrando mostrando as operações possíveis (Inserir, Modificar e Apagar)

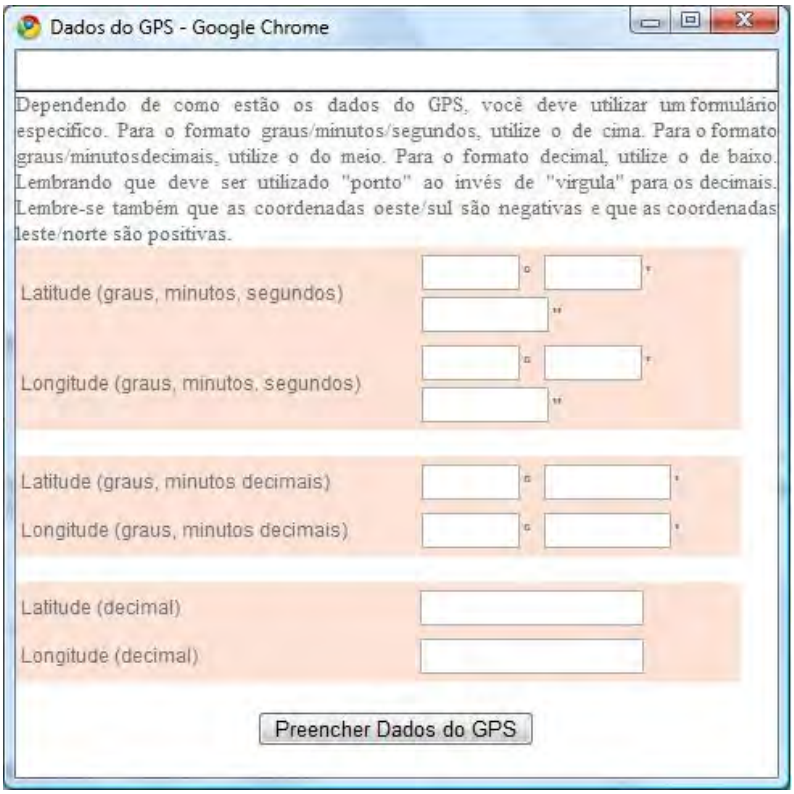


Figura 54 – Janela para preencher os dados de GPS

4.2.8. Gerenciar Local Armazenado

Nesta seção é possível inserir, modificar e apagar os locais de armazenamento (figura 55), ou seja, o ultrafreezer em que as racks se encontram. Apenas os locais que não estão associados a racks podem ser apagados.

Figura 55 – Gerenciar Local Armazenado mostrando mostrando as operações possíveis (Inserir, Modificar e Apagar)

4.2.9. Gerenciar Sequenciamento

Nesta seção é possível inserir, modificar e apagar os tipos de sequenciamentos (figura 56). Apenas os tipos que não estão associados a estirpes podem ser apagados.

Figura 56 – Gerenciar Sequenciamento mostrando mostrando as operações possíveis (Inserir, Modificar e Apagar)

4.2.10. Gerenciar Usuário

Nesta seção é possível inserir, modificar e apagar usuários (figura 57). Deve-se escolher um nome de usuário, uma senha e depois confirmar essa senha. É possível também alterar a senha escolhendo o usuário na lista abaixo da figura Modificar, e é necessário digitar a senha atual, escolher uma senha nova e confirmar essa senha (figura 58). Na parte apagar, somente os usuários que não estão associados a estirpes poderão ser apagados.

Figura 57 – Gerenciar Usuários mostrando mostrando as operações possíveis (Inserir, Modificar e Apagar)

Figura 58 – Gerenciar Usuários mostrando os dados que devem ser alterados

4.2.11. Gerenciar Arquivos

Nesta seção é possível inserir e apagar arquivos (figura 59). Para inserir, é necessário escolher o tipo (artigo, protocolo ou outro), procurar arquivo no computador, digitar o nome e colocar uma descrição do arquivo. Para apagar, é necessário selecionar a caixa “Estou ciente que vou apagar o arquivo permanentemente!” e então selecionar o arquivo na lista.

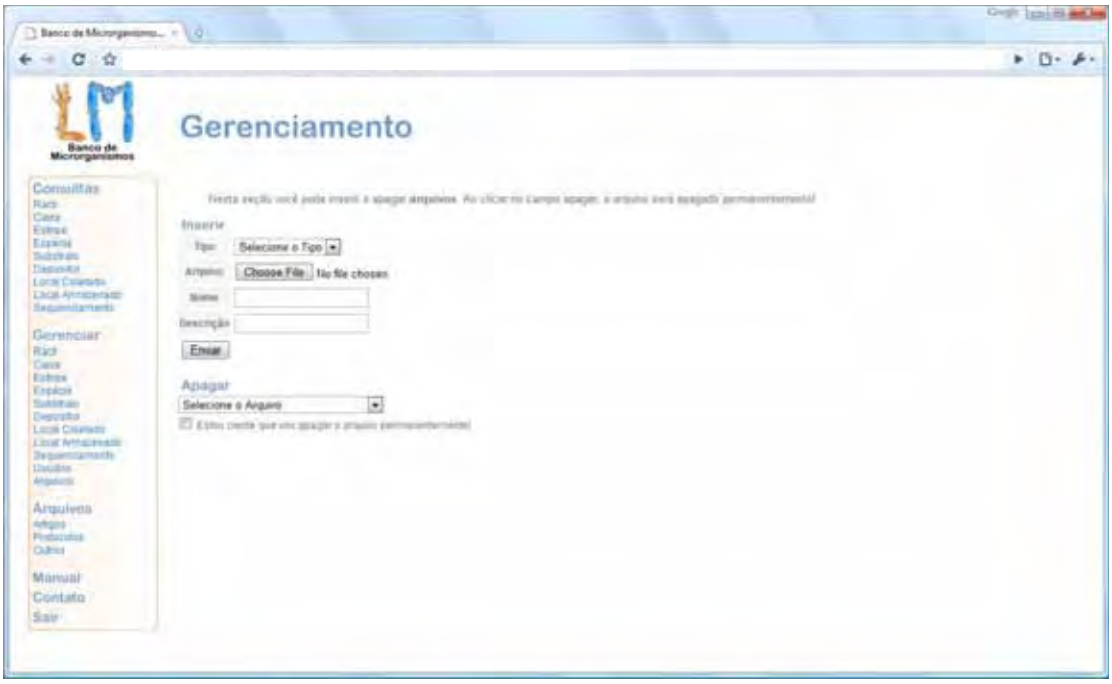


Figura 59 – Gerenciar Arquivos mostrando mostrando as operações possíveis (Inserir e Apagar)

4.3. Seção de Arquivos

Esta seção é protegida por senha, ou seja, apenas os usuários cadastrados no Banco de Microrganismos têm acesso. O objetivo dessa seção é funcionar como um pequeno banco em que os alunos de graduação, pós graduação e orientador podem depositar artigos (figura 60) de importância para o laboratório (com assuntos relevantes aos estudos realizados no Laboratório de Microbiologia, artigos publicados por usuários do laboratório etc); protocolos (figura 61) utilizados durante

os estudos realizados no laboratório; e outros (figura 62) arquivos de importância para o Laboratório.

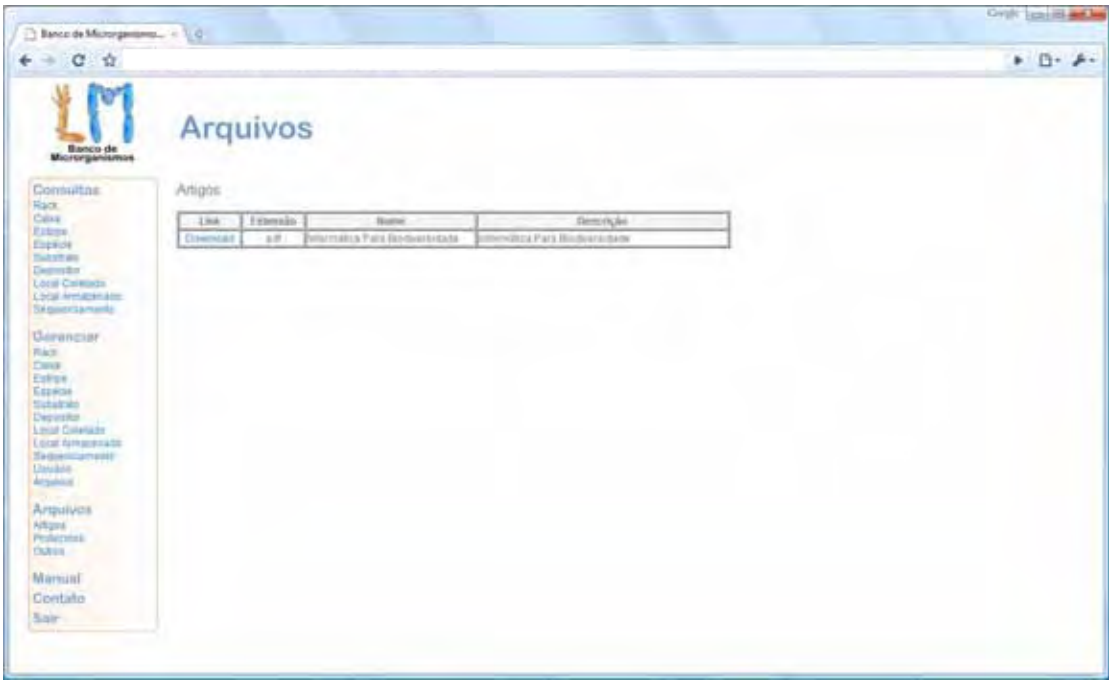


Figura 60 – Seção de Arquivos: Artigos

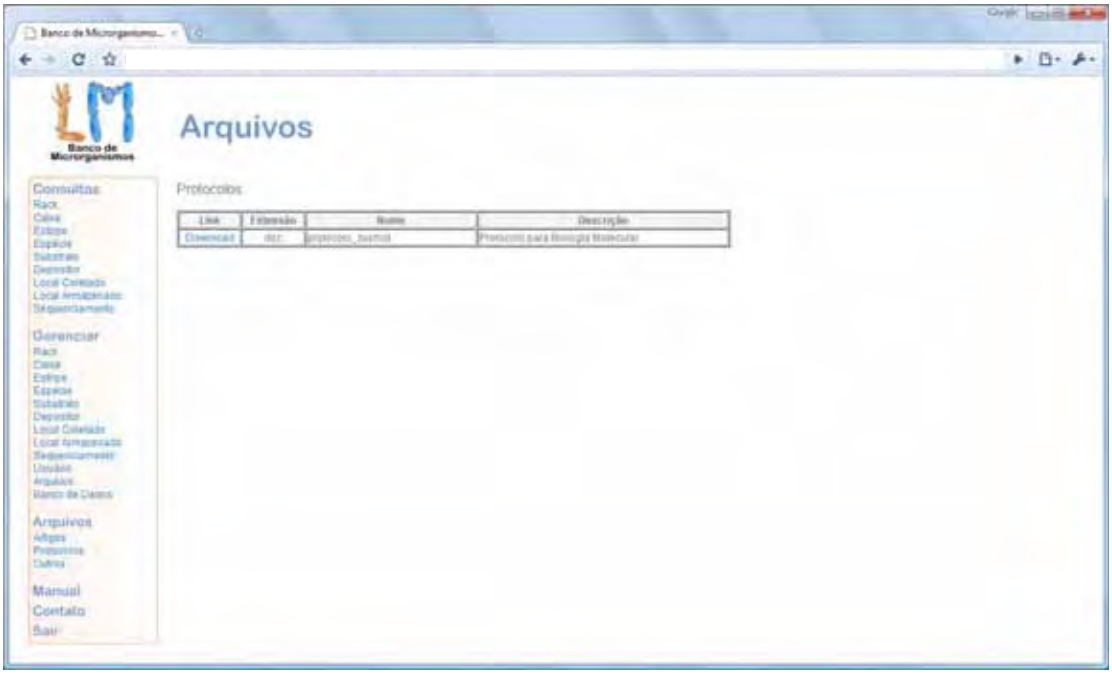


Figura 61 – Seção de Arquivos: Protocolos

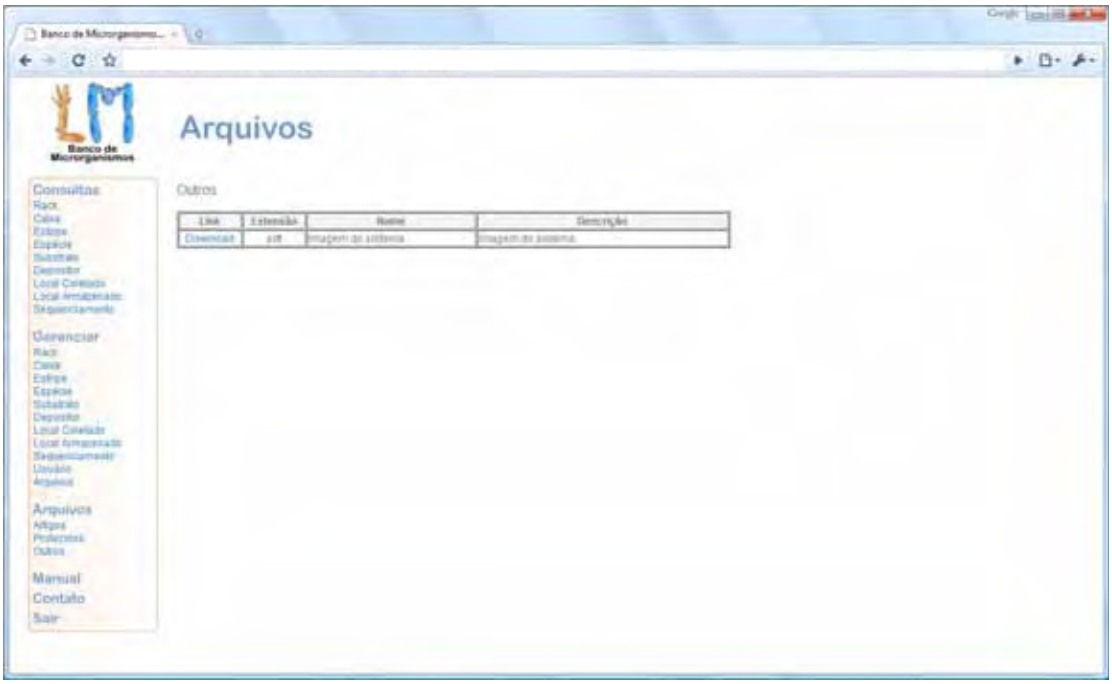


Figura 62 – Seção de Arquivos: Outros

Após estruturado todo esse Banco, aproximadamente 1700 estirpes estudadas no laboratório já foram incorporadas no Banco de Microrganismos. Para algumas estirpes que já estão estocadas há mais tempo foi difícil encontrar todas as informações necessárias para os registros, como a posição GPS, por exemplo. Entretanto, o levantamento desses registros ainda deverá ser feito para cadastrá-las no Banco, pois é muito importante que ele fique completo com todos os dados das estirpes.

4. DISCUSSÃO

Ao longo dos anos, alunos de graduação e pós-graduação isolaram microrganismos do ambiente e fizeram caracterizações mais detalhadas. As atividades de rotina e pesquisa aplicadas às linhagens resultam em uma quantidade significativa de informações. A identificação microbiológica decorre, inicialmente, de provas bioquímicas, mas o uso de técnicas de biologia molecular, no futuro, pode enriquecer o conhecimento a esse respeito, além de possibilitar a solução de problemas de classificação, relacionados à caracterização e à definição de novos táxons, em diversos grupos de microrganismos (ABREU; TUTUNJI, 2004).

O material biológico representa um novo insumo tanto no ambiente da pesquisa e desenvolvimento quanto nos processos produtivos, cujo tratamento requer a implementação de um sistema que permita assegurar, para todos os efeitos, que um dado material biológico mantenha as características nele identificadas ou a ele atribuídas. Neste contexto, as coleções biológicas são essenciais para o suporte ao desenvolvimento da biotecnologia, provendo insumos, material biológico certificado e informações associadas (OLIVEIRA et al, 2006). As estirpes devem estar puras para serem estocadas e o acesso deve ser fácil para que outros pesquisadores possam utilizar esse material. Isso deve estar então organizado em uma Coleção de Culturas.

Coleções de Culturas são centros de conservação de recursos genéticos. Têm como função incorporar continuamente aos seus acervos organismos relevantes para estudos científicos e aplicações tecnológicas, visando a torná-los disponíveis para usuários interessados (CANHOS, 1996). Uma coleção de culturas não é uma mera “colecionadora” de linhagens. Coleções de Cultuas são centros de excelência, agindo como unidades de conservação *ex situ*, mantendo e estudando um *pool* genético para as gerações futuras, oferecendo serviços fundamentais para a comunidade científica e tecnológica (ABREU; TUTUNJI, 2004). Assim, é de grande importância transformar a coleção que existe no Laboratório de Microbiologia do CEIS (que não estava organizada nem catalogada num único sistema) em uma

coleção de culturas organizada e que seja de fácil acesso para todos que necessitarem dessas estirpes.

Coleções de culturas contribuem para o desenvolvimento científico e tecnológico, através da realização de atividades especializadas de serviço e suporte científico em microbiologia básica e aplicada, incluindo a preservação *ex situ* de germoplasma microbiano; caracterização taxonômica e identificação de isolados; organização e disseminação de informações de cunho científico e tecnológico (CANHOS et al, 1996). Assim, a preservação dessas estirpes microbianas, enquanto ainda é possível recuperá-las do meio em que vivem, é estratégica para o desenvolvimento biotecnológico de nosso país no século XXI.

Para controlar todos os processos que envolvem o congelamento de culturas, é necessário que haja adequada documentação que indique, para cada amostra, a metodologia de congelament/preservação adotada, a localização e identificação do material estocado e a data do congelamento. Outros dados importantes são: o código da amostra congelada, as provas de identificação e responsável, meios de armazenamento e também, a origem de cada amostra (ABREU; TUTUNJI, 2004). Segundo Lima (2007), o nível de informatização das coleções e a sua capacidade de gerarem catálogos electrónicos é muito importante.

É fundamental que culturas puras e autenticadas estejam prontamente disponíveis (em coleções *ex situ*) para o desenvolvimento de projetos tecnológicos, além de uma gama de conhecimentos associados, como procedimentos de isolamento, cultivo e manutenção dos organismos, bem como preservação de longo termo do material e suas características de interesse (CANHOS et al, 1996). O material biológico preservado por métodos adequados em coleções de culturas tem uma ampla gama de aplicações nas áreas de saúde, agropecuária, indústria e meio ambiente (CANHOS et al, 2006). Com esse projeto, conseguimos organizar e catalogar aproximadamente 1700 dos microrganismos estudados no laboratório, e estes econtram-se preservados em ultrafreezer (em criotubos com glicerol 15% e pérolas de vidro). Os dados de local de armazenamento, como o nome do ultrafreezer, a rack e a caixa também encontram-se depositados no Banco de Microrganismos, para facilitar a localização das estirpes necessárias para estudos futuros.

5. CONCLUSÕES

O Banco de Microrganismos resultou numa interface bem didática, com textos em todas as páginas indicando o que pode ser feito em cada seção. Além disso, existe também um link “Manual” que pode ser baixado pelos usuários e seguido para a utilização do Banco.

As informações agora estão mais organizadas. O Laboratório de Microbiologia do CEIS é muito dinâmico, e a permanência de alunos (graduação e pós-graduação), pela própria natureza dos mesmos não pode ser prolongada. Assim, o material biológico estudado e as informações a ele referentes obtidos numa determinada etapa por um pesquisador específico precisa ser preservada, pois o material pode ser importante em outros estudos futuros.

A inclusão das informações pode ser feita de forma rápida no Banco de Microrganismos e assim as novas estirpes obtidas nos vários estudos em desenvolvimento são facilmente inseridas de modo contínuo. Foram feitas palestras com os usuários do Laboratório para que todos aprendessem a utilizar o Banco de Microrganismos.

Além das vantagens proporcionadas dentro do próprio laboratório, esse projeto contribuiu também com a comunidade científica, pois outros pesquisadores tem se valido do acervo solicitando estirpes com características específicas, as quais podem ser agora mais facilmente localizadas e recuperadas.

6. REFERÊNCIAS

- ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. (2004) Implantação e Manutenção da Coleção de Culturas de Microrganismos do UniCEUB. **Universitas Ciências e Saúde**. vol. 02 n. 02 – p. 236-25.

- ALTSCHUL S. F.; MADDEN T. L.; SCHÄFFER A. A.; ZHANG J.; ZHANG Z.; MILLER W.; LIPMAN D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucl Acid Res** 25:3389-3402.

- BLACKMORE, A. (1996) Bacteria on Ice. **Lab Repot**.

- BRASIL. (2002) Sistema de Avaliação da Conformidade de Material Biológico. **Ministério da Ciência e Tecnologia**. Brasília, SENAI/DN. p. 102.

- BULL, A.T.; GOODFELLOW, M. & SLATER, J.H. (1992) Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annual Review of Microbiology** 46:219-252.

- CANHOS, V.P. (1990) The impact of computers on culture collections. In: Sly, L.I.; Iijima, T. & Kirsop, B. (eds). 100 years of culture collections. **Osaka: Institute for Fermentation**. p. 20-29.

- CANHOS, V.P. (1993) Software tools and databases for bacterial systematics and their dissemination via global networks. **Antonie van Leewenhoek** 64:205-229.

- CANHOS, V. P. (1996) Coleções de Microrganismos. In: V. P. Canhos; D. A. L. Canhos. (Org.). Infraestrutura Científica e Tecnológica do trabalho: Biodiversidade: Perspectivas e Oportunidades Tecnológicas. **Fundação Tropical "André Tosello"**, (http://www.bdt.org.br/bdt/paper/padctbio/cap/2/5/)

- CANHOS, V. P. (1999) Umino C, Manfio GP. “Coleções de Culturas de Microrganismos”. In: Brito MCW, Joly CA (eds.). Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento no final do século XX. **Volume 7: Infra-estrutura de Conservação in situ e *ex situ***. São Paulo: Fapesp; p. 81-101 (disponível em http://www.biota.org.br).

- CANHOS, V. P. (2003) Informática para biodiversidade: padrões, protocolos e ferramentas. **Ciência e Cultura (SBPC)**, São Paulo, v. 55, n. 02, p. 45-47, 2003

- CANHOS, V. P. (2004), Vazoller RF. A importância das coleções biológicas, (disponível em http://www.comciencia.br/reportagens/framereport.htm).

- CANHOS, V.P.; VAZOLLER, R. F.; FRANCO, B. D. G. M.; SOUZA, R. D. F. (2006) Diretrizes e estratégias para a melhoria das coleções microbiológicas brasileiras, tendo como meta a implantação e consolidação da Rede Brasileira de Centros de Recursos Biológicos no horizonte de 10 anos.

- GADANHO, M.; SAMPAIO, J. P. (2005) Occurence and Diversity of Yeasts in the Mid-Atlantic Ridge Hydrothermal Fields Near the Azores Archipelago. **Microbial Ecology.** p. 2829-516.

- GenBank – http://www.ncbi.nlm.nih.gov

- GUEDES, A. C.; GOEDERT, C. O.; BUSTAMANTE, P. G.; MOREIRA, J. R. A.; MARIANTE, A. S.; WALTER, B. M. T.; BRANDÃO, C. R. F.; PROENÇA, C. E. B.; MUNHOZ, C. B. R.; MAGALHÃES, C.; SILVA, G. P.; COLLI, G. R.; BRANCHETTI, L.; MENDES, M. S.; VEIGA, R.; MENDONÇA, R. C.; SILVA, S. R.; CAVALCANTI, T. B.; PEREIRA, T. S. (2004) Estratatégia Nacional de Diversidade Biológica. Conservação *ex situ*.

- HALL, TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acid Symposium Series** 41:95-98.

- KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26 S) rDNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, 73:331-371.

- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. (1998) Definition, classification and nomenclature of yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. The yeasts – A Taxonomic Study. 4th ed., **Amsterdam: Elsevier Science B**., cap 1, 1:5.

- LIMA, N. (2007) Centros de Recursos Biológicos: novos desafios para as coleções de culturas. **Congresso Brasileiro de Micologia**.

- LIMA, N. (2008) Os Centros de Recursos Biológicos Como Suporte do Futuro da Biotecnologia de da Bioeconomia. **Anais do Congresso Brasileiro de Agrobioenergia & Simpósio Internacional de Biocombustível**.

- MARTINS, V. G.; BACCI, M. Jr. (2004) Métodos Moleculares e Computacionais Aplicados à Sistemática e Evolução, Ed. UNESP, Rio Claro, SP. Vol I, p. 7-9.

- MySQL Book – http://www.kitebird.com/mysql-book/

- O`DONNEL, K. (1993) *Fusarium* and its near relatives. In REYNOLDS D. R.; TAYLOR J. W.: The fungal holomorph: mitotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. Wallingford: **CAB international**, p. 225-233.

- OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTTINATTI-GARBOGGINI, F. (2006) Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. Construindo a História dos Produtos Naturais #7. **Revista MultiCiência**.

- PHP Book – http://www.computer-books.us/php_0004.php

- PHP.NET – http://www.php.net

- SAMPAIO, J. P.; GADANHO, M.; SANTOS, S.; DUARTE, F. L.; PAIS, C.; FONSECA, A.; FELL, J. W. (2001) Polyphasic taxonomy of basidiomycetous yeasts

geno *Rhodosporidium: Rhodosporidiumkratodhvilovae* and related anamorphic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v. 51:687-697.

- Sistema de Informação de Coleções de Interesse Biotecnológico (Sicol) (disponível em http://sicol.cria.org.br).

- SIMONE, F. P. (1998) Cryopreservation Manual. **Nalge Nunc International Coorp**.

- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T.J. (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid Research**. v. 22, p. 4673-4680.

- TIEDJE, J.M. (1994) Microbial diversity: of value to whom? **ASM News** 60:524-525.

- W3Schools – http://www.w3schools.com

_____

Luíza Martinez Perdigueiro

Aluna

_____

Fernando Carlos Pagnocca

Orientador