

Manual de Gestão da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF)



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Documentos 153

Manual de Gestão da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF)

Christiane Abreu de Oliveira Paiva
Maycon Campos Oliveira
Ivanildo Evódio Marriel
Francisco Adriano de Souza
Fernando Hercos Valicente
Luciano Viana Cota

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

Home page: www.cnpms.embrapa.br

E-mail: cnpms.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Dagma Dionísia da Silva, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro, Monica Matoso Campanha, Maria Marta Pastina, Rosângela Lacerda de Castro e Antonio Claudio da Silva Barros

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto(s) da capa: Montagem de Maycon Campos Oliveira (fotos acervo da Embrapa Milho e Sorgo)

1ª edição

1ª impressão (2013): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Milho e Sorgo

Manual de gestão da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF) /

Christiane Abreu de Oliveira Paiva ... [et al.] – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2013.

41 p. : il. -- (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 153).

1. Microrganismo. 2. Recurso microbiano. 3. Biodiversidade. I. Paiva, Christiane Abreu de Oliveira. II. Série.

CDD 579 (21. ed.)

© Embrapa 2013

Autores

Christiane Abreu de Oliveira Paiva

Engenheira Agrônoma, Doutora em Biologia Vegetal,
Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo
christiane.paiva@embrapa.br

Maycon Campos Oliveira

Bioquímico, Mestre em Microbiologia Agrícola, Ana-
lista da Embrapa Milho e Sorgo
maycon.oliveira@embrapa.br

Ivanildo Evodio Marriel

Agrônomo, Doutor em Agronomia, Pesquisador da
Embrapa Milho e Sorgo
ivanildo.marriel@embrapa.br

Francisco Adriano de Souza

Engenheiro Agrônomo, Doutor em Ecologia Mole-
cular Microbiana, Pesquisador da Embrapa Milho e
Sorgo
francisco.adriano@embrapa.br

Fernando Hercos Valicente

Agrônomo, Doutor em Entomologia (Genética Mole-
cular), Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo
fernando.valicente@embrapa.br

Luciano Viana Cota

Agrônomo, Doutor em Agronomia (Fitopatologia),
Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo
luciano.cota@embrapa.br

Apresentação

Por causa da grande importância dos recursos microbianos, em 2012, foi instituída a Coleção de Referência da Embrapa Milho e Sorgo, junto à Rede de Recursos Genéticos Microbianos da Embrapa. O foco principal desta coleção é a prospecção da biodiversidade, com a manutenção de seu acervo e organização da informação, garantindo a conservação dos recursos biológicos nacionais, visando sua aplicação em pesquisa, no agronegócio e em outros setores produtivos relacionados.

Este “Manual de Gestão da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos (CMMF)” descreve o sistema de gestão implementado e documentado pela CMMF, o sistema de qualidade e segurança, os processos operacionais e técnicos da manutenção e preservação dos acessos pertencentes ao banco de germoplasma microbiano e a estrutura organizacional e da documentação.

Antonio Alvaro Corsetti Purcino
Chefe-Geral
Embrapa Milho e Sorgo

Sumário

Introdução	6
Gestão da CMMF	9
Organograma	9
Equipe	9
Matriz de Competência.....	10
Segurança e Sistema da Qualidade	13
Operacionalização da CMMF	14
Coleta de Amostras.....	14
Isolamento	14
Identificação e Caracterização.....	17
Caracterização Fenotípica.....	17
Caracterização Genotípica.....	26
Preservação de Microrganismos	28
Métodos Metabolicamente Ativos.....	28
Métodos Metabolicamente Inativos	29
Manutenção da Coleção	31
Armazenamento dos Dados da Coleção	32
Transferência de Material Genético.....	33
Documentação e Registros da CMMF	35
Estrutura da Documentação.....	35
Documentação	37
Referências	39
Anexo	42
Classificação dos microrganismos de acordo com o risco biológico	42

Manual de Gestão da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF)

Christiane Abreu de Oliveira Paiva

Maycon Campos Oliveira

Ivanildo Evódio Marriel

Francisco Adriano de Souza

Fernando Hercos Valicente

Luciano Viana Cota

Introdução

A conservação de recursos genéticos microbianos, assim como a pesquisa com esses organismos, constitui práticas indispensáveis ao desenvolvimento científico e tecnológico do setor agropecuário. Os microrganismos desempenham papel importante na sustentabilidade da agricultura, e as regiões tropicais são provavelmente aquelas que constituem a mais rica fonte de novas espécies.

Por causa da grande importância destes recursos microbianos, em 2009, foi criada a Rede de Recursos Genéticos Microbianos da Embrapa, com o intuito de promover a integração das coleções de microrganismos das diferentes Unidades da Embrapa e instituições parceiras. A Rede abrange 15 coleções de culturas que contam com, aproximadamente, 33.000 isolados de microrganismos conservados.

A Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos (CMMF) constitui uma dos conjuntos da Rede de Recursos

Genéticos Microbianos da Embrapa. A CMMF é uma coleção institucional que preserva em torno de 11.000 linhagens de microrganismos, obtidas principalmente por meio de coletas realizadas em diferentes regiões do Brasil.

A CMMF foi iniciada em 1991 e tem como objetivos coletar, caracterizar, preservar e prospectar microrganismos de interesse agrícola, incluindo bactérias diazotróficas associativas isoladas de milho, sorgo e milheto, fungos micorrízicos arbusculares, microrganismos fitopatogênicos, estirpes de bactérias com potencial no controle biológico de insetos-praga (*Bacillus thuringiensis*) e de doenças de milho e sorgo e microrganismos promotores do crescimento de planta, como os biossolubilizadores de nutrientes (fósforo e potássio).

A coleção encontra-se em fase de implantação de um acervo central, sendo atualmente distribuída em quatro subcoleções de trabalho da Embrapa Milho e Sorgo e sob a responsabilidade de um pesquisador, em cada laboratório, como descrito a seguir:

Subcoleção de bactérias entomopatogênicas (CBE): composta por isolados de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Está localizada no Laboratório de Controle Biológico sob a curadoria do pesquisador Fernando H. Valicente, e é composta por 4.600 linhagens, conservadas a -20 °C e -80 °C.

Subcoleção de microrganismos diazotróficos e promotores de crescimento (CMPC): composta por solubilizadores de fósforo e potássio e diazotróficos fixadores de nitrogênio, microrganismos produtores de fitormônios e antagonistas de fitopatógenos, microrganismos endofíticos. Está localizada no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Solos, sob a responsabilidade

dos pesquisadores Ivanildo Evódio Marriel e Christiane Abreu de Oliveira Paiva. A coleção possui cerca de 3.800 isolados, sendo: 2.000 acessos de diazotróficos; 100 de leveduras endofíticas de sorgo sacarino; 400 de fungos endofíticos de milho e sorgo; 960 de microrganismos solubilizadores de fosfato; 100 de microrganismos solubilizadores de potássio; 240 de microrganismos antagonistas. A grande maioria dos acessos está conservada em ágar inclinado sob óleo esterilizado e cerca de 100, conservados a -80 °C.

Subcoleção de fitopatógenos de milho e sorgo (CFMS): localizada no Laboratório de Fitopatologia, sob a responsabilidade do pesquisador Luciano Viana Cota. A coleção possui 3.967 isolados, preservados em óleo mineral, liofilizado ou a -80 °C.

Subcoleção de fungos micorrízicos arbusculares (CFM): localizada no Laboratório de Ecologia Molecular Microbiana, sob a responsabilidade do pesquisador Francisco Adriano de Souza. A coleção possui 47 estirpes pertencentes a 29 espécies distintas, preservadas em solo estéril e a -80 °C.

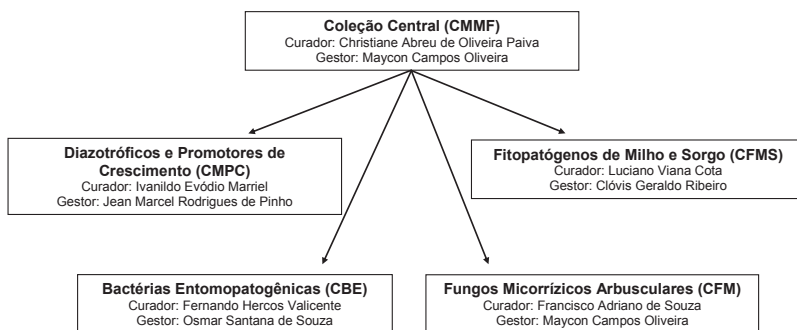
A CMMF fornece material para que os pesquisadores das diversas áreas façam estudos relacionados à variabilidade de populações de patógenos, estudos de taxonomia e filogenia de microrganismos, desenvolvimento de novos biopesticidas, e busca de estirpes mais eficientes nos processos de fixação biológica do nitrogênio e na promoção do crescimento de plantas visando a sua utilização em inoculantes microbianos. Além disso, coleções de microrganismos, como a CMMF, representam uma fonte importante de genes e substâncias com grande potencial biotecnológico. Assim, a preservação adequada desses micror-

ganismos é de grande interesse para instituições de pesquisa, o agronegócio e também para o meio ambiente.

Este manual tem como objetivo integrar e coordenar as atividades desenvolvidas pela CMMF.

Gestão da CMMF

Organograma



Equipe

Curador de CMMF

- Dr(a). Christiane Abreu de Oliveira Paiva

Gestor da CMMF

- Ms. Maycon Campos Oliveira

Pesquisadores

- Dr(a). Christiane Abreu de Oliveira Paiva

- Dr(a). Dagma Dionísia da Silva
- Dr(a). Eliane Aparecida Gomes
- Dr. Fernando Hercos Valicente
- Dr. Francisco Adriano de Souza
- Dr. Ivanildo Evódio Marriel
- Dr. Luciano Viana Cota
- Dr. Rodrigo Veras da Costa

Analistas

- Ms. Jean Marcel Rodrigues de Pinho
- Ms. Maycon Campos Oliveira
- Dr. Uiraci Gomes de Paula Lana

Técnicos

- Clóvis Geraldo Ribeiro
- Osmar Santana de Souza

Matriz de Competência

A coordenação das atividades da CMMF é exercida pelo curador da coleção. O curador deve ser um pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, sendo seu substituto outro pesquisador da Unidade. As responsabilidades e autoridades de gestor da qualidade são assumidas por um dos técnicos (analistas ou técnicos) da CMMF, sendo seu substituto outro técnico ou analista.

Ao curador e gestor da CMMF competem:

- Adequar as atividades da coleção ao arcabouço legal vigente em observância da legislação municipal, estadual, federal e internacional, tais como acesso, coleta, remessa, transporte e destinação de material biológico;
- Zelar pela manutenção do acervo de forma que a coleção seja usada com finalidades de ensino, pesquisa, serviço, divulgação e difusão;
- Notificar as instâncias institucionais competentes nas situações de risco premente do acervo;
- Adequar a coleção à gestão da qualidade;
- Empreender esforços para obtenção de recursos internos e externos com objetivo de incrementar, preservar e desenvolver o acervo;
- Analisar pedidos de depósito e fornecimento de amostras;
- Avaliar resultados de identificação molecular de microrganismos;
- Manter registros, onde aplicável, para demonstrar a conformidade com os requisitos do sistema de gestão da qualidade e sua efetiva operação;
- Atualizar-se com relação às técnicas de gerenciamento de coleções e de procedimentos laboratoriais, bem como em relação às normas e legislações vigentes para o segmento;

- Garantir a capacitação continuada de sua equipe;
- Efetuar a validação de métodos, quando necessário;
- Definir e supervisionar as competências e atribuições do quadro de analistas, técnicos e estagiários, eventualmente designados para a coleção;
- Planejar os recursos necessários ao exercício de sua função (materiais de consumo, materiais permanentes, equipamentos e recursos humanos).

Ao gestor da CMMF competem:

- Seguir os procedimentos e métodos;
- Cumprir os requisitos do sistema de gestão da qualidade;
- Receber amostras para depósito, realizar o depósito e fornecer amostras preparadas;
- Avaliar as condições da amostra, e, em caso de anormalidade, registrar e informar ao curador;
- Controlar e zelar pelos equipamentos/instrumentos de medição sob sua responsabilidade ou uso;
- Informar ao curador qualquer anormalidade ou não conformidade no processo;
- Participar de treinamentos quando necessário;

- Manter inventário atualizado do acervo que compõe a coleção, conferindo dinamismo e visibilidade por meio de sua informatização;
- Manter registros sobre os processos de intercâmbio (doações, empréstimos, permutas e vendas) de material biológico, incluindo os termos de transferência de material, termos de responsabilidade para transporte de material, assim como outros previstos pela legislação vigente;
- Inserir, na base de dados, informações sobre as linhagens preservadas na coleção. Atualizar uma vez por semestre os dados da coleção no portal da Rede Microbiana, quando disponíveis;
- Manter cada linhagem preservada em pelo menos dois métodos de conservação de longo prazo.

Segurança e Sistema da Qualidade

O sistema da qualidade será organizado conforme requisitos da norma de BPL (Boas Práticas de Laboratório), para laboratório de pesquisa.

Todas as operações em laboratórios da CMMF serão conduzidas com normas de segurança e de boas práticas de laboratório, seguindo metodologias padrões que assegurem a qualidade do serviço realizado e obedecendo à legislação ambiental quanto ao descarte de qualquer material.

Operacionalização da CMMF

Coleta de Amostras

As coletas de amostras são realizadas pelos grupos de pesquisa específicos (Fitopatologia, Controle Biológico, Ecologia Microbiana e Microbiologia do Solo) em ambientes que favoreçam a obtenção dos microrganismos de interesse.

A expedição para a coleta deve ser planejada com antecedência. Questões sobre autorização para coleta em determinada área segundo a legislação vigente, equipe que realizará a coleta, material a ser levado, acondicionamento do material coletado, dados sobre a coleta e a recepção no laboratório são definidas antecipadamente à coleta.

As informações mínimas referentes a cada amostra coletada deverão incluir: data, local (com as coordenadas geográficas – latitude, longitude, elevação), tipo de amostra coletada (ex.: tecido vegetal, solo, água, etc.), responsável pela coleta e características do local onde foi realizada a coleta.

A coleta é uma ação crucial para o isolamento de grupos de microrganismos de interesse. Coletas realizadas de forma inadequada ou a falta de informações sobre a área onde esta foi realizada podem comprometer todo o trabalho posterior.

Isolamento

As atividades de isolamento deverão ser realizadas nos laboratórios de pesquisas de acordo com metodologias específicas de cada grupo de microrganismos de interesse.

Para o isolamento de diferentes espécies de *B. thuringiensis* pode-se utilizar a metodologia recomendada por Valicente e Barreto (2003). As amostras preparadas a partir de solo, planta, água ou insetos mortos são submetidas a um choque térmico que mata as células vegetativas da maioria das bactérias, favorecendo o isolamento dos esporos de Bt, os quais se mantêm viáveis após o processo.

Fungos micorrízicos arbusculares, FMAs, podem ser isolados diretamente de solo coletado no campo ou de substrato de vasos de culturas-armadilha estabelecidas a partir de solo, raízes ou plantas coletadas em campo (BRUNDRETT et al., 1995; SOUZA, 2000). Os esporos de FMAs são extraídos da amostra por peneiramento úmido (GERDEMANN; NICOLSON, 1963), seguido de uma centrifugação em água, descarte do sobrenadante e posterior centrifugação em solução de sacarose 45 a 60% dependendo da amostra. Posteriormente, realizam-se procedimentos de lavagem e seleção dos esporos.

Para o isolamento de bactérias diazotróficas, as amostras são separadas em solo da rizosfera, raízes, parte aérea e seiva, no caso de endofíticos, e processadas de acordo com a metodologia descrita por Döbereiner et al. (1995). De acordo com Döbereiner et al. (1995), alguns meios de cultivo foram desenvolvidos como semiespecíficos, sem nitrogênio, para determinados gêneros de bactérias diazotróficas. Por exemplo, espécies de *Azospirillum* spp são isoladas em meio Nfb (nitrogen free biotin-based) semissólido, onde essas bactérias, por causa da sua característica de aerotaxia, deslocam-se para a região do meio de cultura onde a taxa de difusão de O₂ esteja favorável à síntese e atividade da enzima nitrogenase, responsável pela redução do nitrogênio molecular da atmosfera a amônio (DÖBEREINER et al., 1995).

Microrganismos cultiváveis solubilizadores de nutrientes (fósforo ou potássio) ou promotores do crescimento de plantas podem ser isolados a partir de diluições seriadas de amostras de solo utilizando meios seletivos apropriados (HUNGRIA; SILVA, 2011; MELLO et al., 2011; FIGUEIREDO et al., 2010; NAUTIYAL, 1999).

Os microrganismos endofíticos são isolados de seiva, raízes e folhas de genótipos de milho e sorgo cultivados em sistema de manejo convencional e plantio direto. As folhas, o colmo e as raízes são lavados em água corrente e em seguida desinfestadas superficialmente. No caso da seiva, o colmo é cortado nos entrenós e ela é retirada por sucção a vácuo (pressão ativa). Coloca-se 1 mL de seiva no tubo falcon de 15 mL contendo 9 mL de solução salina (85%). Deixa-se agitar por 30 minutos em homogeneizador. Em seguida retira-se 1 mL para as diluições seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁴ que são realizadas. Em folhas e raízes, para o isolamento de fungos filamentosos, estas são desinfestadas superficialmente e cortadas assepticamente em pequenos fragmentos (5-7 mm) que são transferidos para placas de Petri (100 mm) contendo meio BDA. Para isolamento de bactérias endofíticas, amostras de 10 g das raízes e das folhas desinfestadas são trituradas em areia estéril com 90 mL de solução salina (0,85% de NaCl) e, então, diluições seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁷ são realizadas. De cada uma das diluições, alíquotas de 100 microlitros são plaqueadas em meio BDA ou TSA 5% suplementado com antifúngicos para inibição do crescimento fúngico visando o isolamento de bactérias. As placas são incubadas a 25-28 °C por um período de até 15 dias.

Para o isolamento de fungos fitopatogênicos a partir de material vegetal (folhas, raízes, colmo, etc) pode-se utilizar as metodolo-

gias recomendadas por Mello et al. (2011). O tecido vegetal doente deve ser cortado em pedaços, que são tratados em solução de álcool (70%), hipoclorito de sódio (NaOCl a 2%) e lavados em água destilada esterilizada, para inviabilizar os organismos presentes na superfície, e transferidos para placas com meio de cultura. Como uma colônia pode conter mais de um fungo, é necessário realizar a purificação monospórica para a obtenção de uma cultura pura (DHINGRA; SINCLAIR, 1981; MELLO et al., 2011).

Identificação e Caracterização

Caracterizar significa atribuir características, que podem ser fenotípicas ou genotípicas. As características fenotípicas podem sofrer alterações com o meio ambiente, já as características genotípicas são estáveis e não sofrem alterações com o ambiente. A caracterização é uma ferramenta importante para a identificação das bactérias, fungos e vírus.

Caracterização Fenotípica

À caracterização fenotípica compreendem as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas dos microrganismos, além de suas aplicações biotecnológicas. Para os microrganismos fitopatogênicos é realizada avaliação das características relacionadas a patogenicidade e virulência.

A caracterização morfológica de bactérias inclui tanto as características celulares (forma, formação de endósporo, flagelos, tipo de parede celular, etc.) quanto de colônias (cor, dimensão, forma, etc.). Para a caracterização morfológica da colônia, as bactérias devem ser estriadas em um

meio de cultura e a morfologia das colônias isoladas pode ser avaliada de acordo com a Figura 1 (HUNGRIA; SILVA, 2011).

A caracterização morfológica de fungos é principalmente baseada nas suas estruturas reprodutivas. O “Dictionary of the Fungi” descreve todos os organismos tradicionalmente estudados pelos micologistas, constituindo-se, assim, a principal referência internacional para todos aqueles que trabalham com fungos. Esta classificação é baseada nas fases sexuadas (teleomórficas). A classificação com base no anamorfo (fase assexuada) é aceita quando esta fase não está conectada com uma fase sexuada (teleomorfo desconhecido ou de difícil obtenção). Já a caracterização de FMAs é feita principalmente com base nas características morfológicas de seus esporos e mais recentemente por caracterização molecular (SOUZA et al., 2005).

As características fisiológicas e bioquímicas dos microrganismos incluem informações de cultivo e adaptabilidade, como o crescimento em diferentes temperaturas, valores de pH, concentrações de sal e açúcares, condições atmosféricas, crescimento na presença de vários substratos, atividades enzimáticas, metabolização de compostos variados, composição de lipídeos, etc.

A descrição morfofisiológica das bactérias da CMMF deve ser registrada em um formulário, como exemplificado no Quadro 1.

No Quadro 2 é apresentado um roteiro para a caracterização morfológica de esporos de fungos micorrízicos arbusculares. E no Quadro 3, um roteiro para a caracterização de fungos em geral.

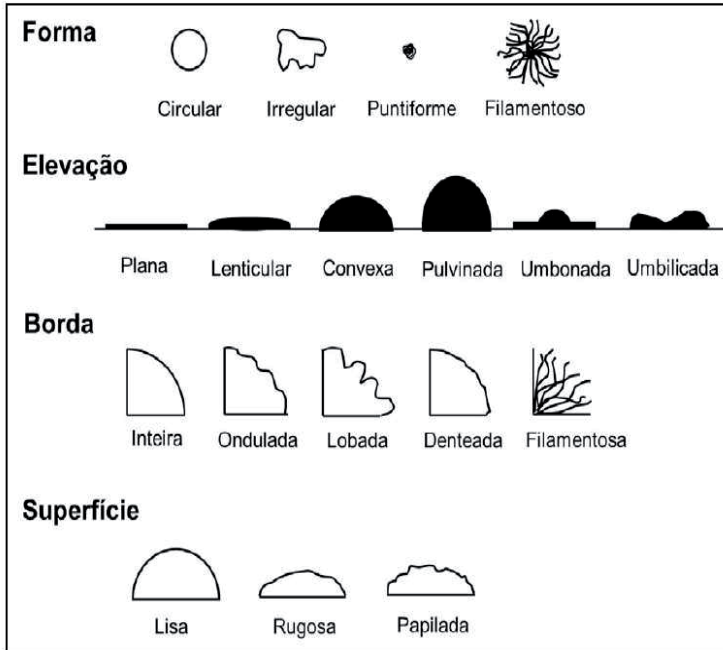


Figura 1. Caracterização da morfologia de colônias de bactérias.
Fonte: Hungria e Silva (2011)

Quadro 1. Formulário de avaliação morfofisiológica das bactérias da CMMF. Adaptado de Hungria e Silva (2011).

Ensaio: () Recebimento () Periódico () Outro _____
Identificação na CMMF:
Código: _____ Registro: _____
Identificação na subcoleção:
Código: _____ Registro: _____
Caracterização morfológica da colônia
Responsável pela caracterização _____
Meio de cultura _____ Temperatura de incubação _____
Tempo de incubação (dias) _____ Data _____
1. Forma da colônia:
() Circular () Irregular () Puntiforme () Filamentoso
2. Elevação da colônia:
() Plana () Lenticular () Convexa () Pulvinada () Umbonada () Umbilicada
3. Borda da colônia:
() Inteira () Ondulada () Lobada () Denteada () Filamentosa
4. Superfície da colônia:
() Lisa () Rugosa () Papilada
5. Produção de muco:
() Escassa () Pouca () Moderada () Abundante
6. Consistência da massa de crescimento:
() Seca () Aquosa () Gomosa () Viscosa () Butírica (creme) (elástica) (manteiga)
7. Detalhes ópticos:
() Transparente () Translúcido () Opaco Cor _____

Cont. Quadro 1.

8. Outras informações:		
Coloração de Gram		
<input type="checkbox"/> gram-positiva <input type="checkbox"/> gram-negativa <input type="checkbox"/> Não testada		
Responsável: _____ Data _____		
Formação de película em meio NFb semissólido?		
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não testado		
Tempo para a visualização da película em meio NFb semissólido		
<input type="checkbox"/> 1 Dia <input type="checkbox"/> 2 Dias <input type="checkbox"/> 3 Dias <input type="checkbox"/> 4 Dias <input type="checkbox"/> Outro _____		
Responsável: _____ Data _____		
Formação de halo de solubilização de fosfato em meio sólido?		
Meio Nautyal:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
<input type="checkbox"/> Não testado		
Meio Fitato:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
<input type="checkbox"/> Não testado		
Meio Pikovskaya:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
<input type="checkbox"/> Não testado		
Solubilização de fosfato em meio líquido?		
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não testado		
P-solubilizado (µg/mL)	Tempo	Meio
Responsável: _____ Data _____		

Cont. Quadro 1.

Formação de endósporo?			
() Sim	() Não	() Não avaliado	
Formação de cristal?			
() Sim	() Não	() Não avaliado	
Morfologia do cristal			
() Bipiramidal	() Oval/Esférico	() Irregular/Amórfico	
() Retangular	() Composto ^a : _____		
() Cúbico	() Incerto ^b : _____		
^a Mais de um tipo morfológico de cristal em um único cristal (Ex. cristal oval fixado em um retangular)			
^b Mais de um tipo morfológico de cristal em um único isolado			
Responsável: _____		Data _____	
Patogenicidade			
Entomopatogênico:	() Sim	() Não	() Não testado
Fitopatogênico:	() Sim	() Não	() Não testado
Patogênico (Animais):	() Sim	() Não	() Não testado
Hospedeiro(s): _____			

Responsável: _____		Data _____	

Quadro 2. Formulário de caracterização morfológica de esporos de FMA. Adaptado de Schenck e Perez (1990)

Ensaio: () Recebimento () Periódico () Outro _____
Identificação na CMMF: Código: _____ Registro: _____
Identificação na subcoleção: Código: _____ Registro: _____
Caracterização morfológica de esporos de FMA
Responsável pela caracterização _____
Identificação da lâmina _____ Data _____
Identificação provisória da espécie _____
I. Observações sobre esporos intactos
1. Cor dos esporos: 1) Em água _____ 2) Em montante _____ Resina utilizada: () PVLG () PVLG + Melzer () Outra _____
2. Forma e diâmetro dos esporos: () Esporo globular: Diâmetro: Mínimo _____ µm Médio _____ µm Máximo _____ µm () Esporo irregular: Comprimento: Mínimo _____ µm Médio _____ µm Máximo _____ µm Largura: Mínima _____ µm Média _____ µm Máxima _____ µm
3. Espessura da parede do esporo: _____ µm
4. Hifa de sustentação presente? () Sim () Não Se não, vá para E 1) Hifa do sáculo esporífero (<i>sporiferous saccule</i>) presente? () Sim () Não 2) Célula bulbo suspensora (<i>sporogenous cell</i>) presente? () Sim () Não 3) Hifa glomóide presente? () Sim () Não
5. Conteúdo do esporo:

Cont. Quadro 2.

<input type="checkbox"/> Globular <input type="checkbox"/> Reticular <input type="checkbox"/> Granular <input type="checkbox"/> Outro _____		
6. Esporo com manto ou outras hifas de superfície:		
<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Se não, vá para G
1) Largura das hifas:	_____ μm	
2) Cor das hifas:	_____	
3) Hifas sinuosas?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
7. Esporos formados dentro da raiz? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
8. Células auxiliares presentes?		
<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Se não, vá para I
Tipo de célula auxiliar:		
<input type="checkbox"/> Nodosa	<input type="checkbox"/> Digitada	<input type="checkbox"/> Coraloide
<input type="checkbox"/> Equinulada	<input type="checkbox"/> Espinhosa	<input type="checkbox"/> Pigmentada
Se pigmentada, indicar a cor _____		
9. Esporocarpo presente?		
<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Se não, vá para J
1) Diâmetro do esporocarpo:	_____	
2) Perídio presente?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Se sim, indicar a cor _____
10. Comentários adicionais _____ _____ _____		
11. Determinar o gênero de seu espécime		
Gênero _____ Vá para 1 , 2 ou 3		
1. Para Gigasporoides ou Scutellosporoides:		
a) Dimensões da célula bulbo suspensora (<i>sporogenous cell</i>):		
Largura _____ μm	Comprimento _____ μm	
b) Hifa de sustentação bulbosa septada?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
c) Presença de ornamentação na superfície do esporo?		
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Descrição _____	

Cont. Quadro 2.

d) Presença de escudo de germinação? Sim Não

2. Para Acaulosporoides ou Entrophosporoides:

a) Presença de hifa do sáculo esporífero (*sporiferous saccule*)?

Sim Não Se não, vá para **II**

b) Hifa do sáculo esporífero colapsada? Sim Não Se sim, vá para **II**

c) Dimensões da hifa do sáculo esporífero:

Diâmetro _____ μm ou Largura _____ μm e Comprimento _____ μm

d) Descrição do conteúdo da hifa do sáculo esporífero (cor, aparência, textura, etc):

e) Comprimento da hifa entre o esporo e o sáculo esporífero: _____ μm

f) Diâmetro da hifa no ponto de anexo ao esporo: _____ μm

g) Diâmetro do poro/cicatriz do esporo no ponto de anexo: _____ μm

h) Presença de cicatriz?

Sim Não Se sim, indicar o número presente (1 ou 2) _____

3. Para Glomoides ou Sclerocystis:

a) Poro ocluído? Sim Não

b) Diâmetro do poro: _____ μm

c) Presença de um septo no poro? Sim Não Se não, vá para **d)**

Septo saliente? Sim Não

d) Largura da hifa adjacente à parede do esporo: _____ μm

e) Número de anexos por esporo: _____

f) Parede externa da hifa contínua com a parede externa do esporo?

Sim Não

g) Tipo de anexo (verificar todos que se aplicam):

Reto Recurvado Em forma de funil

Ramificado Septado Constringido

Inchado Outro _____

Cont. Quadro 2.

II. Observações sobre esporos quebrados	
A. Número de grupos de parede na parede do esporo: _____	
B. Largura de cada grupo de parede:	
A = _____ μm	B = _____ μm
C = _____ μm	D = _____ μm
C. Número de paredes dentro de cada grupo:	
A = _____	B = _____
C = _____	D = _____
D. Tipo(s) de parede dentro de cada grupo:	
A = Amorfa	Grupo de parede A = _____
C = Coriácea	B = _____
CH = Chanfranulada	C = _____
E = Evanescente (efêmera)	D = _____
L = Laminada	E = _____
M = Membranosa	
P = Perídio	
U = Unitária	
X = Expansiva	
G = Germinativa	
Paredes ornamentadas ou frisadas são indicadas com as letras (o) ou (f), respectivamente, subscritas sob o tipo de parede.	
Paredes difíceis de visualizar são marcadas com um asterisco (*), sobrescrito sobre o tipo de parede.	
E. Reação da parede ao reagente de () Melzer () Outro _____	
Indicar se positivo (+) ou negativo (-) para cada grupo de parede. Se possível, indicar também a cor da parede e o tipo de parede afetada.	
A = _____	
B = _____	
C = _____	
D = _____	
E = _____	

Cont. Quadro 2.

F. Utilizando as informações da seção II, construa um muronimo e um murograma que descreva a morfologia da parede do esporo.

G. Comentários adicionais: _____

Quadro 3. Formulário de avaliação morfofisiológica de fungos da CMMF

Ensaio: <input type="checkbox"/> Recebimento <input type="checkbox"/> Periódico <input type="checkbox"/> Outro _____	
Identificação na CMMF:	
Código: _____	Registro: _____
Identificação na subcoleção:	
Código: _____	Registro: _____
Caracterização morfológica da colônia	
Responsável pela caracterização _____	
Meio de cultura _____	Temperatura de incubação _____
Diâmetro da colônia _____	pH do meio _____
Fotoperíodo _____	
Tempo de incubação (dias) _____	Data _____
1. Micélio (aspecto macroscópico):	
<input type="checkbox"/> leveduriforme <input type="checkbox"/> micélio rasteiro (plano) <input type="checkbox"/> micélio fofo (aéreo)	
2. Forma da colônia:	
<input type="checkbox"/> Circular <input type="checkbox"/> Irregular <input type="checkbox"/> Puntiforme <input type="checkbox"/> Filamentoso	
3. Borda da colônia:	
<input type="checkbox"/> Inteira <input type="checkbox"/> Ondulada <input type="checkbox"/> Lobada <input type="checkbox"/> Denteada <input type="checkbox"/> Filamentosa	
4. Superfície da colônia:	
<input type="checkbox"/> Lisa <input type="checkbox"/> Rugosa <input type="checkbox"/> Cerebriforme <input type="checkbox"/> Coriácea	
<input type="checkbox"/> Algodonosa <input type="checkbox"/> Mucoide <input type="checkbox"/> Cremosa <input type="checkbox"/> Concêntrica	
<input type="checkbox"/> Opaca <input type="checkbox"/> Aveludada <input type="checkbox"/> Brilhante <input type="checkbox"/> Pulverulenta	
<input type="checkbox"/> com sulcos <input type="checkbox"/> com protuberância	
5. Elevação da colônia:	
<input type="checkbox"/> Plana <input type="checkbox"/> Lenticular <input type="checkbox"/> Convexa	
<input type="checkbox"/> Pulvinada <input type="checkbox"/> Umbonada <input type="checkbox"/> Umbilicada	
6. Consistência da massa de crescimento:	
<input type="checkbox"/> Seca <input type="checkbox"/> Úmida <input type="checkbox"/> Gomosa (creme) <input type="checkbox"/> Viscosa (elástica)	
7. Cor da colônia: _____	
8. Presença de pigmento (reverso da colônia - verso da placa):	

9. Outras informações:	

Caracterização Genotípica

Os métodos genotípicos são aqueles direcionados para moléculas de DNA ou RNA. Atualmente, estes métodos dominam os estudos da taxonomia moderna de microrganismos e são baseados principalmente na amplificação e no sequenciamento do DNA ribossomal (rDNA).

A análise de genes ribossomais, entretanto, não consegue diferenciar estirpes. Desse modo, outros métodos genéticos de fingerprinting devem ser utilizados para o controle de qualidade dos microrganismos, tanto na rotina de manutenção das coleções de culturas quanto na etapa de distribuição das estirpes.

O fingerprinting de DNA pode basear-se na restrição do genoma total ou em amplificações específicas do genoma bacteriano por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction). Dentre as diversas técnicas de fingerprinting podem ser citadas: polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism); polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism); DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA) e amplificações com primers relacionados a regiões repetidas e conservadas do genoma, conhecidas por rep-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) e Box-PCR (BOX-A1R-based repetitive extragenic palindromic-PCR), DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). A combinação das informações fenotípicas e genotípicas é importante e necessária para uma descrição e classificação precisa dos microrganismos da CMMF (Tabela 1).

Tabela 1. Metodologias para a caracterização dos microrganismos da CMMF.

Microrganismo	Caracterização fenotípica	Caracterização genotípica	Referências
<i>B. thuringiensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Caracterização morfológica da célula (formação de endosporo e cristal) • Caracterização entomopatogênica (bioensaios) • Caracterização das toxinas (perfil proteico das estirpes) 	<ul style="list-style-type: none"> • Amplificação e sequenciamento do gene 16S rDNA • Amplificação e sequenciamento dos genes <i>Cry</i>, <i>Vip</i> e <i>Cyt</i> 	<p>Praca et al. (2011) Valicente et al. (2010)</p>
FMA's	<ul style="list-style-type: none"> • Caracterização morfológica dos esporos (cor, tamanho, forma, ontogênese, características das paredes como estrutura, disposição, estruturas de germinação e hifas de sustentação) • Caracterização morfológica da simbiose (arbusculos, vesículas) 	<ul style="list-style-type: none"> • Amplificação e sequenciamento de seqüências Barcode • <i>Fingerprinting</i> por DGGE 	<p>Stockinger et al. (2010) Souza et al. (2004) Souza (2005)</p>
Fungos fitopatogênicos	<ul style="list-style-type: none"> • Caracterização morfológica (estruturas reprodutivas) • Caracterização fisiológica (patogenicidade, virulência e condições de cultivo) 	<ul style="list-style-type: none"> • Amplificação e sequenciamento das regiões variáveis, ITS1 e ITS2, do rDNA 	<p>Mello et al. (2011)</p>
Bactérias promotoras do crescimento vegetal	<ul style="list-style-type: none"> • Caracterização morfológica da célula (forma, tamanho, organização e mobilidade) • Caracterização morfológica da colônia (coloração, consistência, produção de goma, elevação, forma, borda, superfície e detalhe óptico) • Caracterização fisiológica (temperatura, osmolaridade e pH ótimo para o crescimento) • Caracterização bioquímica (testes bioquímicos, atividade de redução de acetileno, capacidade de solubilizar fosfatos, produção de enzimas e hormônios de crescimento, atividade antagonista a patógenos) 	<ul style="list-style-type: none"> • Amplificação e sequenciamento do gene 16S rDNA • <i>Fingerprinting</i> por REP⁺, ERIC⁻, e BOX-PCR • Amplificação e sequenciamento dos genes <i>nifH</i> e <i>nifD</i> • Amplificação e sequenciamento dos genes de solubilização e mineralização de P 	<p>Dobereiner et al. (1995) Hungria e Silva (2011) Videira et al. (2007)</p>

Preservação de Microrganismos

O cultivo e a caracterização dos microrganismos por si só não são suficientes sem técnicas de conservação que não alterem a morfologia, fisiologia e genética das linhagens. A preservação cuidadosa dos microrganismos é imprescindível para suas aplicações futuras na pesquisa, na indústria e no ensino.

Vários métodos são utilizados para a preservação de microrganismos. Em geral, cada método de preservação pode ser classificado em dois grupos: métodos metabolicamente ativos e métodos metabolicamente inativos.

Métodos Metabolicamente Ativos

- Subcultivos contínuos: consistem na manutenção da cultura em meio adequado com transferências a intervalos regulares;
- Armazenamento sob óleo: consiste na adição de óleo mineral às culturas estabelecidas em meio de cultivo inclinado. O óleo evita a desidratação e reduz a atividade metabólica por meio da redução da disponibilidade de oxigênio.

As culturas permanecem metabolicamente ativas nestes métodos e por isso necessitam ser mantidas em baixa temperatura durante o período de preservação. A manutenção de linhagens por métodos metabolicamente ativos só é recomendada para conservação por curtos períodos, até que outros métodos sejam aplicados, ou para coleções de trabalho (DAY; STACEY, 2007; MARTIN, 1964; SONI, 2007).

Métodos Metabolicamente Inativos

A água constitui um solvente universal para a ocorrência das atividades bioquímicas dentro da célula, o que permite que o metabolismo continue e sustente todos os processos da vida. Portanto, métodos metabolicamente inativos para a preservação de microrganismos envolvem necessariamente a imobilização (criopreservação) e/ou redução (desidratação) do conteúdo de água das amostras armazenadas (DAY; STACEY, 2007; MORGAN et al., 2006; PRAKASH et al., 2012).

- Criopreservação: consiste na preservação dos materiais biológicos a temperaturas muito baixas, geralmente $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (nitrogênio líquido). Baixas temperaturas protegem o DNA e as proteínas contra danos e desnaturação e diminuem o movimento da água celular. Consequentemente, as atividades bioquímicas e fisiológicas das células são essencialmente interrompidas e as células se mantêm protegidas por longos períodos. A preservação de células a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ não é recomendada para longos períodos de preservação. A preservação a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ é adequada, mas a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ é considerada ideal porque mudanças por causa de mutações no DNA são reduzidas ao mínimo nesta temperatura (DAY; STACEY, 2007; MARTIN, 1964; PRAKASH et al., 2012).

- Liofilização (Freeze-drying): trata-se também de uma técnica de preservação em longo prazo, que consiste na dessecação do material congelado, sob vácuo, através da sublimação. Os frascos são selados a vácuo, resultando em um produto anidro, que pode ser armazenado em temperatura ambiente ou em geladeira.

- Secagem sem congelamento prévio (Drying): consiste também na redução do conteúdo de água da amostra e pode ser obtida

por diferentes metodologias (secagem líquida, secagem em areia, solo, sílica gel ou papel).

Os diferentes microrganismos requerem, frequentemente, métodos específicos de preservação a fim de que sejam assegurados viabilidade, armazenamento, pureza e estabilidade genética. Por medidas de segurança e para minimizar a possibilidade de perda de linhagens, cada cultura deve ser mantida por pelo menos dois métodos distintos. É recomendável que pelo menos um dos métodos utilizados seja a criopreservação (ultracongelamento) ou a liofilização, pois para muitas linhagens esses métodos apresentam menos riscos de alterações genéticas, além de garantirem a preservação por longo período de tempo.

Na criopreservação e na liofilização as células são submetidas a temperaturas muito baixas que promovem a formação de cristais de gelo, tanto no meio extracelular, quanto no interior das células. O congelamento de amostras sem a adição de agentes crioprotetores pode levar ao desequilíbrio osmótico e a danos mecânicos, causando rompimento de organelas, perda da integridade da membrana e morte celular. A efetividade de um agente crioprotetor depende de várias propriedades: (1) o composto deve ser altamente solúvel em água, mesmo em baixas temperaturas; (2) deve ser capaz de penetrar nas células; e (3) deve ter baixa toxicidade que possibilite sua utilização em altas concentrações. Glicerol (10-15%) e dimetil sulfoxido (DMSO 5%) são frequentemente usados na criopreservação de microrganismos, e ambos têm capacidade de penetração celular. Na temperatura fisiológica, o glicerol funciona bem, mas em baixa temperatura, ele não penetra muito bem na célula e, conseqüentemente, fornece menos proteção. O DMSO tem melhor poder de penetração que o glicerol, mas por causa de

efeitos tóxicos em altas concentrações, seu uso é limitado (DAY; STACEY, 2007; PRAKASH et al., 2012).

A liofilização também exerce estresse sobre as células durante o processo de dessecação sob vácuo, e por isso alguns microrganismos não a suportam. Embora a técnica de liofilização esteja bem estabelecida, pesquisas para a otimização de agentes lioprotetores ainda são necessárias para certos microrganismos. Alguns dos lioprotetores mais usados incluem: leite em pó, soro, trealose, glicerol, betaína, sacarose, glicose, lactose e polímeros tais como polietilenoglicol (PEG) e dextrana (MARTIN, 1964; MORGAN et al., 2006; PRAKASH et al., 2012).

Ambos os métodos, criopreservação e liofilização, possuem vantagens e desvantagens, e a resposta à preservação varia com a espécie. Mesmo diferentes linhagens de uma mesma espécie podem apresentar respostas diferentes ao mesmo método de preservação. A viabilidade e longevidade dos microrganismos preservados dependerão de alguns fatores críticos: (1) composição dos meios de suspensão e reidratação; (2) tipos de crioprotetores utilizados; (3) taxa de congelamento e descongelamento; (4) estágio de crescimento da cultura; (5) tamanho, tipo, conteúdo de lipídeos, conteúdo de água, e densidade celular inicial (DAY; STACEY, 2007; PRAKASH et al., 2012).

Manutenção da Coleção

Os microrganismos da CMMF devem ser preservados por pelo menos dois métodos de preservação (sendo um deles criopreservação ou liofilização) e com repetições. Após a criopreservação e/ou a liofilização de um lote, deve-se checar a viabilidade das células, para garantir que não houve morte celular durante

o processo de preservação. Deve-se também checar a viabilidade das linhagens ao longo do tempo, o que deve ser realizado por amostragem de cada lote (pelo menos uma vez por ano e com no mínimo 1% das linhagens, de forma aleatória). Além da viabilidade, também devem ser checadadas a autenticidade (características fenotípicas e genotípicas) e a presença de possíveis contaminantes.

Armazenamento dos Dados da Coleção

Os dados de cada linhagem da CMMF devem ser armazenados em planilhas (Quadro 1, 2, 3 e 4) e em base de dados da própria coleção, além da base de dados INFOMICRO, que é utilizada por todas as coleções da Rede de Coleções de Microrganismos da Embrapa.

Para cada linhagem devem ser fornecidas as seguintes informações: código de identificação na coleção, código original no isolamento ou em outra coleção ou subcoleção, local de isolamento, substrato ou hospedeiro de isolamento, nome da pessoa responsável pelo isolamento, nome do responsável pelo depósito, nome do responsável pela identificação, procedimento para preservação, número de cópias preservadas, meio de cultivo apropriado, características de crescimento, propriedades morfofisiológicas das colônias e caracterizações genotípicas disponíveis, grupo de risco, disponibilidade para distribuição. As informações deverão estar computadorizadas, com cópias de segurança e, quando possível, disponibilizadas via homepage institucional. Informações sobre a manutenção de cada estirpe também deverão ser digitalizadas, como checagem da viabilidade e autenticidade.

Transferência de Material Genético

Toda transferência de material genético da CMMF deve ser feita com base na legislação vigente. Atualmente, somente são efetuadas remessas entre instituições de pesquisa nas áreas biológicas e afins, sediadas no Brasil, conforme a Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001, o Decreto nº 3.945, de 28 de setembro de 2001, alterado pelo Decreto nº 4.946, de 31 de dezembro de 2003, e a Resolução nº 20, de 29 de junho de 2006, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético. Para isso, são firmados termos de transferência de material (TTM) genético entre as instituições que estão intercambiando as linhagens.

Quadro 4. Formulário de identificação de linhagens da CMMF

Identificação na CMMF:	
Código: _____	Registro: _____
Identificação na subcoleção ou em outra coleção:	
Código: _____	Registro: _____
Subcoleção ou coleção de origem:	
<input type="checkbox"/> CFMS - Subcoleção Fitopatógenos de Milho e Sorgo <input type="checkbox"/> CMPC - Subcoleção Microrganismos Promotores de Crescimento e Diazotróficos <input type="checkbox"/> CBE - Subcoleção Bactérias Entomopatogênicas <input type="checkbox"/> CFM - Subcoleção Fungos Micorrízicos Arbusculares <input type="checkbox"/> Outra: _____	
Tipo de microrganismo:	
<input type="checkbox"/> Fungo filamentoso	<input type="checkbox"/> Bactéria
<input type="checkbox"/> Micorriza	<input type="checkbox"/> Actinomiceto
<input type="checkbox"/> Levedura	
Importância funcional:	
<input type="checkbox"/> Fitopatógeno	<input type="checkbox"/> Fixador de Nitrogênio
<input type="checkbox"/> Entomopatogênico	<input type="checkbox"/> Solubilizador de Fósforo
<input type="checkbox"/> Simbiose com plantas	<input type="checkbox"/> Promotor de crescimento vegetal
<input type="checkbox"/> Outro: _____	
Identificação taxonômica:	
Gênero: _____	Espécie: _____
Subespécie: _____	Patovar/Raça: _____
Sequência do DNA ribossomal:	

Dados do Depósito	
Nome do depositante: _____	
E-mail do depositante: _____	
Endereço do depositante: _____	

Nome do depositário: _____	
Data do depósito: _____	

Cont. Quadro 4.

Dados do Isolamento	
Responsável pelo isolamento: _____	
Laboratório ou instituição de origem: _____	
Data do isolamento: _____	
Referências bibliográficas sobre a linhagem:	

Dados da Coleta	
Tipo de amostra coletada:	
() Tecido vegetal	() Água
() Solo	() Outra _____
Data: _____	Local: _____
Município: _____	Estado: _____
País: _____	Altitude: _____
Latitude: _____	Longitude: _____
Responsável pela coleta: _____	
Outras informações:	

Documentação e Registros da CMMF

Estrutura da Documentação

Os demais documentos que devem compor o sistema de gestão da CMMF são:

a) Procedimentos da Gestão da Qualidade: documentos elaborados para a CMMF que forneçam diretrizes gerais abrangentes para controle e realização de atividades, especificando o que deve ser feito, por quem, quando, onde e como. Podem ter um ou mais formulários associados (chamados de FC – formulários da coleção).

b) Procedimentos Operacionais Padrão (POPs): são procedimentos técnicos elaborados para a CMMF que descrevem como conduzir métodos analíticos, testes e atividades, em detalhes suficientes para entendimento e execução, especificando como devem ser realizados, por quem, onde, quando e em que condições ambientais. Podem ter um ou mais formulários associados.

c) Procedimentos da Qualidade: utilizados na unidade, elaborados para atender a ISO 9001. Podem ter um ou mais formulários associados.

d) Documentos Externos: todo documento fornecido ou adquirido externamente, utilizado como base para realização de ensaios, implantação do sistema de gestão da qualidade, tais como: normas da ABNT, RDC da Anvisa, Portarias do Inmetro, Normas (NIE-CGCRE, NIT-DICLA) e Documentos Orientativos da Qualidade (DOQ) do Inmetro, legislação pertinente, documentos do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), etc.

e) Formulários: documentos onde serão efetuados os registros.

f) Registros: documentos que fornecem evidências da realização das atividades, permitindo que se possa ter uma linha de audi-

toria para verificação da implantação, manutenção e melhoria do sistema de gestão da qualidade, incluindo dados brutos, dados de ensaios, condições ambientais, etc.

Documentação

Os documentos internos que serão utilizados na CMMF, alguns em fase de elaboração, encontram-se relacionados abaixo, com breve descrição de seu conteúdo:

PGQ.01 – Controle de documentos

Define as autoridades para aprovação e emissão de documentos, a forma de seu controle e distribuição, a manutenção de documentos em meio eletrônico, os documentos obsoletos e as regras de elaboração de documentos.

PGQ.02 – Controle de registros

Trata da identificação, controle, proteção e disposição dos registros.

PGQ.03 – Controle de equipamentos

Trata do cadastramento e controle da calibração dos equipamentos.

PGQ.04 – Pessoal

Orienta quanto ao planejamento e realização de treinamentos, quanto ao conteúdo das matrizes de competência, quanto à supervisão e signatários autorizados.

PGQ.05 – Entrada e fornecimento de amostras

Estabelece os procedimentos e critérios referentes à entrada e ao fornecimento de amostras da CMMF.

Procedimentos operacionais padrão (POPs), alguns exemplos:

POPTEC 01 – Isolamento e conservação de Azospirillum sp

POPTEC 02 – Isolamento e conservação de solubilizadores P

POPTEC 03 – Isolamento de fungos fitopatogênicos

POPTEC 04 – Cultivo e conservação de Bacillus thuringiensis

POPTEC 05 – Mutiplicação de fungos fitopatogênicos em casa de vegetação

POPTEC 06 – Extração de esporos de FMA

POPTEC 07 – Extração de DNA de esporos de FMA

POPTEC 08 – Identificação molecular de FMA

POPTEC 09 – Caracterização fenotípica de Fitopatógenos

POPTEC 10 – Caracterização fenotípica de promotores crescimento em geral

POPTEC 11 – Caracterização fenotípica de Bacillus thuringiensis

POPTEC 12 – Criopreservação

POPTEC 13 – Liofilização

POPTEC 14 – Preservação em óleo

POP PS 01 – Preparo do meio de cultura NFb

POP PS 02 – Preparo do meio de cultura Batata Malato

POP PS 03 – Preparo do meio de cultura Nautyal

POP PS 04 – Preparo do meio de cultura LB + sais

POP PS 05 – Preparo do meio de cultura Aveia

Referências

BRUNDRETT, M.; BOUGHER, N.; DELL, B.; GRAVE, T.; MALAJCZUK, N. **Working with mycorrhizas in forestry and agriculture**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 1995. 374 p. (Monograph, 32).

DAY, J. G.; STACEY, G. **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. 2nd ed. Totowa: Humana Press, 2007. 347 p. (Methods in Molecular Biology, 368).

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995. 60 p.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. Florida: CRC Press, 1981. 434 p.

FIGUEIREDO, M. do V. B.; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. de P.; SANTOS, C. E. de R. e S.; STAMFORD, N. P. (Ed.). **Biotechnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Recife: Instituto Agrônômico de Pernambuco, 2010. 761 p. il.

GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal Endogone extracted from soil by wet sieving and decanting.

Transactions of the British Mycological Society, v. 46, p. 235-244, 1963.

HUNGRIA, M.; SILVA, K. da. **Manual de curadores de germoplasma – micro-organismos: rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. 21 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 333; Embrapa Soja. Documentos, 332).

MARTIN, S. M. Conservation of microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 18, p. 1-16, 1964.

MELLO, S. C. M. de; REIS, A.; SILVA, J. B. T. da. **Manual de curadores de germoplasma – micro-organismos: fungos filamentosos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. 25 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 335; Embrapa Hortaliças. Documentos, 134).

MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. Preservation of micro-organisms by drying; a review. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 183-193, 2006.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 170, p. 265-270, 1999.

PRACA, L. B.; MARTINS, E. S.; SILVA, F. A. da; PONTES, R. G. M. S. de. **Manual de curadores de germoplasma – micro-organismos: bactérias de invertebrados**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. 22 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 332).

PRAKASH, O.; NIMONKAR, Y.; SHOUCHE, Y.S. Practice and prospects of microbial preservation. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 339, n. 1, p. 1-9, 2012.

SCHENCK, N. C.; PEREZ, Y. **Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi**. Gainesville: University of Florida, 1990. 245 p.

SONI, S. K. **Microbes**: a source of energy for 21st century. New Delhi: New India Publishing Agency, 2007. 574 p.

SOUZA, F. A. de. **Banco ativo de Glomales da Embrapa Agrobiologia**: catalogação e introdução de novos isolados desde 1995. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 40 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 123).

SOUZA, F. A. de. **Identificação molecular e caracterização da diversidade de espécies de fungos micorrízicos arbusculares do gênero gigaspora por PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 51 p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 6).

SOUZA, F. A.; KOWALCHUK, G. A.; LEEFLANG, P.; VAN VENN, J. A.; SMIT, E. PCR-denaturing gradient gel electrophoresis profiling of inter- and intra-species 18S rRNA gene sequence heterogeneity is an accurate and sensitive method to assess species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus Gigaspora. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 1413-1424, 2004.

SOUZA, F. A.; DECLERCK, S.; SMIT, E.; KOWALCHUK, G. A. Morphological, ontogenetic and molecular characterization of *Scutellospora reticulata* (Glomeromycota). **Mycological Research**, New York, v. 109, n. 6, p. 697-706, jun. 2005.

STOCKINGER, H.; KRÜGER, M.; SCHÜSSLER, A. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Oxford, v. 187, p. 461-474, 2010.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32 n. 4, p. 639-644, Oct./Dec. 2003.

VALICENTE, F. H.; PICOLI, E. A. de T.; VASCONCELOS, M. J. V. de; CARNEIRO, N. P.; CARNEIRO, A. A.; GUIMARAES, C. T.; LANA, U. G. Molecular characterization and distribution of *Bacillus thuringiensis* cry1 genes from Brazilian strains effective against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Biological Control**, San Diego, v. 53, p. 360-366, 2010.

VIDEIRA, S. S.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; BALDANI, V. L. D. **Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 74 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 234).

Anexo

Classificação dos Microrganismos de acordo com o Risco Biológico

A Organização Mundial de Saúde classifica os microrganismos em quatro grupos de acordo com o risco biológico:

- **Classe de risco 1 (baixo risco individual e para a coletividade):** inclui os agentes biológicos conhecidos por não causarem doenças em pessoas ou animais adultos saudáveis. Exemplo: *Lactobacillus* sp.
- **Classe de risco 2 (moderado risco individual e limitado risco para a comunidade):** inclui os agentes biológicos que provocam infecções no homem ou nos animais, cujo potencial de propagação na comunidade e de disseminação no meio ambiente é limitado, e para os quais existem medidas terapêuticas e profiláticas eficazes. Exemplo: *Schistosoma mansoni*.

- **Classe de risco 3 (alto risco individual e moderado risco para a comunidade):** inclui os agentes biológicos que possuem capacidade de transmissão por via respiratória e que causam patologias humanas ou animais, potencialmente letais, para as quais existem usualmente medidas de tratamento e/ou de prevenção. Representam risco se disseminados na comunidade e no meio ambiente, podendo se propagar de pessoa a pessoa. Exemplo: *Bacillus anthracis*.
- **Classe de risco 4 (alto risco individual e para a comunidade):** inclui os agentes biológicos com grande poder de transmissibilidade por via respiratória ou de transmissão desconhecida. Até o momento não há nenhuma medida profilática ou terapêutica eficaz contra infecções ocasionadas por estes. Causam doenças humanas e animais de alta gravidade, com alta capacidade de disseminação na comunidade e no meio ambiente. Esta classe inclui principalmente os vírus. Exemplo: Vírus Ebola.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



CGPE-10730