

Criopreservação de isolados de feijoeiro e caupi coletados em regiões do Mato Grosso do Sul

MOURA, F.M.¹; DELAMUTA, J.R.M.¹; CHUEIRE, L.M.O.²; RIBEIRO, R.A.²; NOGUEIRA, M.A.³, HUNGRIA, M.³

¹CNPq, Londrina, PR, fernanda.moura@colaborador.embrapa.br; ²Embrapa Soja, Laboratório de Biotecnologia do Solo; ³Pesquisador, Embrapa Soja.

Introdução

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) é uma leguminosa de grande expressividade econômica e social, representando a principal fonte de proteínas para a população brasileira de baixa renda. A exemplo de outras leguminosas possui a capacidade de formar associações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio, também conhecidas como diazotróficas ou rizóbios, resultando em estruturas especializadas nas raízes, os nódulos. Nesses órgãos ocorre a transformação do N₂ atmosférico em amônia, que de imediato passa a íons amônio, que serão distribuídos para a planta e incorporados em componentes nitrogenados (Hungria et al., 1997, 2007).

As coleções de culturas de microrganismos têm como intuito conservá-los e preservá-los, através de técnicas já estabelecidas para cada grupo, a fim de garantir sua sobrevivência, estabilidade e pureza por um longo período de tempo, conservando características genéticas e propriedades morfofisiológicas. Nas coleções, os microrganismos estarão disponíveis, para fins experimentais, trabalhos de rotinas laboratoriais, estudos comparativos, entre outros (Romeiro, 1996).

Um método eficiente de conservação se dá pela criopreservação, que consiste em preservar a célula por armazenamento em temperaturas ultra baixas (-80°C e -150°C). À medida que a temperatura se aproxima de 0°C, a atividade metabólica celular é reduzida. Sendo assim, a criopreservação interrompe a atividade celular, mas permite que suas funções sejam retomadas após o descongelamento (Barbas; Mascarenhas, 2009).

Para que não ocorra a morte da célula devido à baixa temperatura submetida, são utilizados protetores celulares, sendo o glicerol amplamente utilizado como agente crioprotetor, auxiliando a mitigar os efeitos do choque térmico,

pela redução dos estresses físicos e químicos resultantes do congelamento e degelo das células (Lima, 2011). O objetivo deste trabalho foi verificar a pureza de bactérias isoladas de nódulos de feijoeiro coletado em diversos locais do Mato Grosso do Sul, a fim de armazená-las pelo método de criopreservação.

Material e Métodos

As estirpes foram isoladas pelo pesquisador Dr. Fábio Martins Mercante e pertencem à Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Agropecuária Oeste (CCMAO) (Dourados, MS), totalizando cerca de 1260 isolados. Essas bactérias foram isoladas de nódulos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) e feijão caupi (*Vigna unguiculata*) oriundos de diversos locais no Mato Grosso do Sul. As estirpes estavam armazenadas em tubos contendo o meio de cultura YMA modificado (*yeast, manitol, agar, extrato de levedura, manitol e ágar*) (Hungria; Araujo, 1994) e cobertas com vaselina líquida esterilizada.

Até o presente momento, a caracterização morfofisiológica foi realizada em 444 estirpes, observando-se o tamanho e forma das colônias, textura, produção e consistência da massa de crescimento em YMA contendo o corante vermelho Congo (VG). O crescimento foi realizado em estufa BOD a 28°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), sendo que a manifestação de crescimento foi de 2 a 4 dias. As estirpes que exibiram algum tipo de contaminante ou não cresceram foram eliminadas. Algumas estirpes precisaram ser repicadas novamente no meio YMA contendo VC, para confirmar sua pureza (Hungria; Araujo, 1994).

As estirpes autenticadas como puras foram armazenadas em criotubos de 2 mL contendo o meio YM líquido e 30% de glicerol, com três cópias mantidas em ultra freezer -80°C. Assim, elas estão aptas para adentrarem na “Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Soja: Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas”, no Laboratório de Biotecnologia do Solo (Londrina, PR).

Resultados e Discussão

Das 444 estirpes, 212 foram criopreservadas e 232 eliminadas, seja pela falta de crescimento, ou por apresentarem algum tipo de contaminação. Esse número elevado de estirpes eliminadas pode ser resultado do tempo de armazenamento das mesmas, em torno de 12 anos, em temperatura ambiente. O trabalho está no início, restando cerca de 800 estirpes para serem avaliadas. A seguir, as estirpes que foram armazenadas a -80°C serão preparadas para a criopreservação a -150°C e, também, por liofilização. O trabalho continuará com as remanescentes 800 estirpes da coleção inicial.

Visando o estabelecimento de um sistema reconhecido de qualidade da Coleção de Culturas da Embrapa Soja, a metodologia de criopreservação do Laboratório de Biotecnologia do Solo já possui um Procedimento Operacional Padrão (POP) estabelecido, sendo a viabilidade das estirpes verificada por amostragem a cada dois anos; até o presente momento, as bactérias armazenadas há vários anos e analisadas continuam viáveis. Abreu e Tutunji (2004) analisaram 1500 amostras de espécies bacterianas e fúngicas armazenadas em microtubos a 20°C , e observaram que, de um modo geral, os microrganismos apresentaram boa recuperação proporcionada pelo agente crioprotetor glicerol (10%); contudo, sempre há células que são mais sensíveis e não sobrevivem ao ultracongelamento, ou a longos períodos de armazenamento. No caso da Coleção da Embrapa Soja, resultados positivos estão sendo conseguidos com glicerol a 30%.

Conclusão

A criopreservação é um método eficiente para conservação e preservação de microrganismos e, quando os procedimentos são aplicados adequadamente, mantém a viabilidade após o descongelamento. No caso de bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas, a criopreservação a -80°C com 30% de glicerol como crioprotetor tem-se apresentado como uma alternativa viável.

Agradecimento

O trabalho foi parcialmente financiado pelo Projeto INCT- Microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas Visando à Sustentabilidade Agrícola e à Responsabilidade ambiental – MPCPAgro - (CNPq 465133/2014-4, Fundação Araucária-STI, CAPES).

Referências

ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, DF, v. 2, n. 2, p. 236-251, 2004.

BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell Tissue Bank**, v. 10, p. 49-62, 2009.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1994 p 156-160. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 46).

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80 p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ARAUJO, R. S. Fixação biológica do N₂ na cultura do feijoeiro. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Biologia dos solos de Cerrados**. Planaltina, DF: EMBRAPA-CPAC, 1997. p. 187-294.

LIMA, D. T. **Efeito crioprotetor de lactose e glicose em células fúngicas imobilizadas em alginato de sódio como método de preservação de culturas**. 2011. 120 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Médica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

ROMEIRO, R. S. **Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1996. 11 p. Mimeografado.