

BANCO DE GERMOPLASMA DE MICROORGANISMOS DE CAPRINOS E OVINOS **(Germoplasm bank of microorganisms from goat and sheep)**

Francisco Selmo F. Alves¹, Maria Rosalba M. das Neves², Raymundo Rizaldo Pinheiro¹, Francisca Geovânia C. de Sousa³, Rafaele A. dos Santos³

RESUMO

A habilidade em preservar uma variedade de microorganismo tornou-se possível, após estudos de manutenção de material biológico para a permuta de culturas, troca de informações e comparações entre cepas isoladas em diferentes regiões. Desta maneira, a manutenção de culturas e a coleção de microorganismos passou a ser uma referência para pesquisas, estudos de forma em geral e produção de fármacos. O laboratório de Bacteriologia da Embrapa Caprinos, em Sobral, Ceará vem organizando e mantendo culturas de microorganismos isolados e identificados de casos clínicos e enfermidades de caprinos e ovinos. Foram coletadas, identificadas e semeadas em meios de cultura apropriados, 128 amostras de casos clínicos. Os microorganismos isolados foram identificados através de análises bacteriológica e bioquímica. Todas as cepas foram preservadas em meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI)/glicerol e conservadas sob temperatura de -20°C. Dentre os microorganismos encontrados citam-se: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Rhodococcus equi*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Archanobacterium pyogenes*, *Pasteurella* spp., *Actinobacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp. A formação de um banco de microorganismos causadores de doenças de caprinos e ovinos é necessário para o estudo de cepas existentes na região com a finalidade de pesquisas, avaliações genômica e proteômica, e produção de vacinas específicas.

Palavras-chave: bactérias, conservação, cultura, isolamento, manutenção.

ABSTRACT

The ability to preserving a variety of microorganisms became possible, after studying biological material for maintenance, exchange of cultures, information and comparisons

¹Pesquisador da Embrapa Caprinos. E-mail: selmo@cnpq.embrapa.br Estrada Sobral-Groairas, Km 4, Sobral, CE, 62 011-970.

²Graduanda do Curso de Zootecnia da Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA e Bolsista do PIBIC/ CNPq.

³Graduanda do Curso de Biologia da Universidade Estadual Vale do Acaraú; Estagiárias da Embrapa Caprinos.

between isolated strains. In this way, the maintenance of cultures and the collection of microorganisms in general started to be for reference studies, production of medicine and research. The bacteriology laboratory at Embrapa, National Goat Research Center is organizing and keeping cultures from microorganisms isolated from goat and sheep clinical cases and diseases. A total of 128 samples of clinical cases had been collected, identified and streaked in a appropriate culture medium. The microorganisms isolated were identified by bacteriological and biochemistry analysis. The strains were preserved in glycerol/Brain Heart Infusion (BHI) culture and conserved under temperature of -20° C. Amongst the microorganisms found, it is cited: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Rhodococcus equi*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Archanobacterium pyogenes*, *Pasteurella* spp., *Actinobacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp. and *Pseudomonas* spp. The microorganisms bank formation from goat and sheep causing illness is necessary to study strains from the region with the purpose to develop research in genomics and proteomics and production of specific vaccines.

Keywords: bacteria, conservation, culture, isolation, maintenance.

INTRODUÇÃO

A conservação de recursos genéticos microbianos constitui prática ao desenvolvimento de insumos, fármacos, vacinas, troca de material biológico e ações científica e tecnológica em diversas áreas, farmacêutica, agropecuária, na indústria em geral e de alimentos (Mendonça-Hagler, 2001).

Os microorganismos isolados de casos clínicos e enfermidades de caprinos e ovinos compreendem aqueles que prejudicam a produção, causam prejuízos econômicos aos produtores, doenças ao homem, e alguns desses interferem na qualidade e inocuidade dos produtos derivados desses animais (Alves & Pinheiro, 2006).

As atividades de coleção de culturas geram um grande volume de informações que precisam ser registradas, sistematicamente. O estabelecimento de um banco de dados serve para o gerenciamento das informações sobre as cepas estocadas. A seleção dos métodos de preservação deve permitir o máximo de sobrevivência e de estabilidade das amostras, permitindo o estoque adequado, processos de manutenção testados, verificando a viabilidade das cepas estocadas (Kirsop, 1991).

O presente trabalho tem como objetivo formar um banco de microorganismos causadores de problemas e enfermidades em diferentes sistemas de produção de caprinos e ovinos, através da manutenção de cepas isoladas e identificadas. Não existe

disponibilizado um banco de germoplasma isolados de microorganismos de caprinos e ovinos, o que dificulta estudos futuros.

MATERIAL E MÉTODOS

As 128 amostras foram coletadas de casos clínicos e subclínicos de caprinos e ovinos, na Embrapa Caprinos e fazendas da região do semi-árido nordestino. A coleta das amostras foi realizada seguindo os procedimentos veterinários, catalogada e identificado caso a caso, armazenada em condições de refrigeração, isopor e gelo. Em seguida, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Bacteriologia, da Embrapa Caprinos para isolamento e identificação do agente.

As amostras identificadas no laboratório foram semeadas em meios específicos de Agar Sangue e MacConkey. E foram incubadas a 37^oC por 72 horas. As amostras que cresceram seguiram para identificação através de análises bacteriológicas, morfologia das colônias, coloração de Gram e bioquímica. As amostras sem crescimento observado foram semeadas novamente, seguindo a mesma metodologia.

Os microorganismos após identificados, foram catalogados e as culturas semeadas em tubos contendo Agar Sangue inclinado, em sangue de carneiro e em Infusão de Cérebro e Coração (BHI) contendo Glicerol (1:1). As culturas foram preservadas e mantidas em freezer a -20^oC. A manipulação foi realizada tendo o cuidado para evitar o risco de contaminação. Algumas amostras passaram pelo processo de liofilização, método que mantém a viabilidade da maioria dos organismos por muitos anos sem requerer cuidados posteriores; não requer cuidados para a estocagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os microorganismos encontrados até o momento provenientes de casos clínicos e das enfermidades de caprinos e ovinos mais encontrados na região, foram: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Rhodococcus equi*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Achanobacterium pyogenes*, *Pasteurella* spp., *Actinobacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Haemophilus* spp., *Archanobacterium bovis*.

Staphylococcus spp., são espécies que crescem bem em meios comuns de laboratório, porém o agar sangue é geralmente o indicado (Carter,1986). São cocos gram-positivos que ocorrem isolados, em pares ou aglomerados irregularmente. Estes desdobram a glicose anaerobicamente; são imóveis, geralmente catalase positiva e oxidase negativa.

A reconstituição e multiplicação das cepas mantidas no Banco de Germoplasma foram feitas em meio líquido, sendo realizado o controle de qualidade através de provas de esterilidade e de viabilidade das cepas.

Streptococcus spp. são exigentes sob o ponto de vista de seu cultivo. Possuem células esféricas ou ovais, cocos, ocorrendo em pares ou em cadeias, sendo Gram positivo. São anaeróbias facultativas, alguns necessitam de CO₂ para o crescimento, outros podem ser anaeróbicos estreitos. Seu metabolismo é fermentativo, catalase e oxidase negativos (Hardie, 1986).

Rhodococcus equi são cocobacilos Gram-positivos, imóveis, de forma variada coccóide a ovulada. Algumas cepas podem ser ligeiramente ácidos-resistentes. Pode ser isolado ou mantido em agar sangue comum ou infusão de cérebro e coração. Produz colônias mucosas com uma discreta pigmentação rosada. A redução de nitratos e urease é característica para a sua identificação.

Corynebacterium pseudotuberculosis são bacilos curtos, de 1 a 3 micron de comprimento, Gram-positivo e imóveis. Crescem em meio comum. A *Corynebacterium pseudotuberculosis* em conjunto com a *Rhodococcus equi* intensifica a hemólise dos eritrócitos, em placas contendo agar sangue, fenômeno este análogo ao CAMP teste. Por outro lado, *Corynebacterium pseudotuberculosis* inibe a produção de hemólise de *Staphylococcus aureus*, fenômeno denominado de CAMP teste inverso.

Archanobacterium pyogenes é um bacilo Gram-positivo delgado, encurvado e pontiagudo e, às vezes, em forma cocóide. Diferencia-se no entanto das outras espécies do gênero *Corynebacterium* por ser catalase negativa e pela composição de sua parede celular, estando relacionada com *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Pasteurella spp., são bactérias Gram-negativas, imóveis, anaeróbicas facultativas, cocobacilos curtos, catalase e oxidase positiva. De acordo com o Manual de Bergey (Krieg e Holt, 1984) possui as seguintes espécies: *Pasteurella multocida*, *Pasteurella heamolytica*, *Pasteurela pneumotropica*, *Pastereulla ureae*, *Pasteurella aerogenes* e *Pasteurella gallinarum*.

Actinobacillus spp., são Gram-negativas, imóveis, ovóides, que medem 0,4 x 1,0 micrômetros, ocasionalmente produzem filamentos. Este gênero apresenta reação positiva para as seguintes provas; oxidase; glicose; lactose; maltose; xilose; urease e nitrato.

Pseudomonas spp., são bacilos Gram-negativos, encapsulados, móveis e oxidase positiva. Não possuem grandes exigências culturais e crescem em meios de cultivo

simples. As colônias são geralmente planas, rugosas, de bordo irregular, com brilho metálico e de odor típico, aminoacetofenona.

Haemophilus spp., caracterizam-se por serem cocobacilos Gram-negativos, imóveis, desenvolvimento é dependente de fatores de crescimento. Formam cápsulas, que determinam a morfologia da colônia. Para o crescimento em meio de cultura, algumas espécies necessitam de um dos dois tipos dos seguintes fatores de crescimento: Fator V (NAD- nicotinamida adenina di-nucleotídio); e Fator X (Hemina).

CONCLUSÃO

A manutenção de banco de germoplasma de microorganismo de caprinos e ovinos é de fundamental importância. Servirá para estudos de caracterização, classificação de proteínas envolvidas com a resposta imunológica e produção de vacinas específicas para estas espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, F.S.F.; PINHEIRO, R.R. Potencial de Transmissão de Enfermidades pela Carne, Leite e Derivados de Caprinos e Ovinos. I Simpósio de Higiene e Sanidade Animal em Ovinocaprinocultura. Universidade Estadual do Ceará, p.1-17, 2006.

CARTER, G.R. Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology. Philadelphia, USA: Lea & Febiger, p.261, 1986.

HARDIE, J.M. Genus *Streptococcus* Rosenbland 1884, 22. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland. p.1043-1071, v.2, 1986.

KIRSOP B.E.; DOYKE A. Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells: A Manual of Laboratory Methods. Second Edition, 1991.

MENDONÇA-HAGLER L.C.S. Biodiversidade e biossegurança. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, v. 18, p.16-22, 2001.