

CONTROL DE CALIDAD Y PRESERVACIÓN *ex-situ* DE LA BIODIVERSIDAD EN EL CENTRO VENEZOLANO DE COLECCIONES DE MICROORGANISMOS

Rodríguez Lemoine, V.¹

RESUMEN

Se describe al Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM) como una colección de colecciones, dedicada a la preservación *ex situ* de la diversidad de organismos Procariotas y Eucariotas unicelulares. Se presenta como una colección abierta, regida por los principios y normas establecidas por el sistema internacional de colecciones de servicio, que se ocupa del aislamiento, identificación, caracterización, preservación, almacenamiento y distribución de cultivos certificados en escala local y regional. Mantiene un Banco de Datos computarizado, y publica periódicamente un catálogo periódico en versión impresa y digital. Actualmente, posee un inventario de más de dos mil cultivos liofilizados de bacterias (especies y variantes genéticas), además de hongos filamentosos y levaduriformes, bacteriófagos, plásmidos y vectores de clonación de interés para el estudio de la Biología de Microorganismos y de sus aplicaciones en diversos campos de la actividad académica o de la agro-industria. En este trabajo se examinan las normas y procedimientos seguidos para garantizar la pureza y viabilidad de los cultivos representativos de la biodiversidad y se describe brevemente el programa de control de calidad sobre todos los procesos que van desde la incorporación de un cultivo hasta su entrega a los usuarios.

PALABRAS CLAVE: Colecciones cultivos, control calidad, microorganismos, bacterias, hongos, levaduras.

SUMMARY

QUALITY CONTROL AND *ex-situ* PRESERVATION OF BIODIVERSITY AT THE VENEZUELAN CENTER FOR CULTURE COLLECTIONS

The Venezuelan Center for Culture Collections (CVCM) is described as a system formed by many Venezuelan collections. It is considered an open collection devoted to the *ex situ* preservation of biodiversity in Prokaryota and Eukaryota (unicellular), working on the norms and principles established by the international system of culture collections. It is involved on the isolation, identification, characterization, preservation and distribution of microbial cultures. A data system, CVCMdata, is maintained and hard and digital catalogues are periodically published. Currently, more than 2.000 cultures of bacterial species and genetic variants are freeze drying preserved. A complementary collection of bacteriophages, plasmids, and cloning vectors is also included. Services are given to support academic research on Microbial Biology, and their applications to industrial activities. In this paper, procedures to ensure optimal viability, storage, purity and distribution of the cultures are examined, and the quality control program applied on the processes from incorporation to distribution of microbial cultures is revised.

KEY WORDS: culture collections, quality control, microorganisms, bacteria, fungus, yeast.

¹Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos. Instituto de Biología Experimental. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales Caracas 1041A. Venezuela. E-mail: vrodriguez@cantv.net

INTRODUCCIÓN

En su más amplia acepción el término biodiversidad incluye a todas las formas de vida presentes en el universo, a los ecosistemas que integran, y a los procesos de biotransformación que acompañan. En concordancia con esta definición, para el estudio y la preservación de la biodiversidad, se han identificado tres niveles o jerarquías operacionales: genético (variantes genéticas), organismo (taxones) y ecológico (ecosistemas) (Hawksworth, 1996). En el caso específico de los microorganismos -con frecuencia ignorados en los programas internacionales para el estudio y conservación de la biodiversidad- deben considerarse con igual énfasis a Procaryota (dominios Bacteria y Archaea) y a Eucaryota unicelulares (protozoarios, algas, hongos filamentosos y levaduriformes), además de los plásmidos, virus y otros elementos genéticos asociados (Rodríguez Lemoine, 1996, 1998; Stackebrandt, 1994). La importancia de su estudio radica en que son componentes esenciales de la biodiversidad y de la formación y el mantenimiento del equilibrio de la biosfera terrestre. Sin su presencia no es posible imaginar la evolución de la vida hacia formas más complejas, y éstas no podrían subsistir en ausencia de los microorganismos (Mooney, 1995). Aunque forman un universo vasto y diverso, capaz de ocupar todos los nichos donde la vida es termodinámicamente posible, lo cierto es que conocemos una parte muy pequeña del número y de la diversidad de bacterias y hongos que habitan nuestro planeta, y sólo una fracción está adecuadamente registrada y preservada *ex situ* en el sistema internacional de colecciones de cultivos (Hawksworth & Colwell, 1992; Mooney, 1995; Sugawara and Kirsop, 1994).

En las últimas décadas hemos sido testigos del interés de las naciones más desarrolladas en los estudios sobre la diversidad microbiana, considerado como el más grande reservorio de genes, por su inmenso valor industrial y múltiples aplicaciones. En paralelo, en el caso de los países en desarrollo, podemos reconocer la presencia de un mayor grado de conciencia sobre el valor intrínseco y potencial de la biodiversidad, y el interés por los centros de colecciones como instituciones clave para el estudio y la protección de la biodiversidad (Kapur & Kumar Jain, 2004).

En este trabajo presentamos una breve revisión sobre la preservación *ex situ* de la biodiversidad y las medidas de control de calidad aplicadas en una colección de servicio de tamaño mediano, tomando como punto de referencia el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (Rodríguez Lemoine, 1992; Rodríguez Lemoine & Vitelli-Flores, 2000; Rodríguez Lemoine *et al.*, 2005a; Rodríguez Lemoine *et al.*, 2005b).

RESULTADOS Y DISCUSION

De la organización de la colección, sus fines y objetivos

El Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM) fue creado en 1991, bajo el patrocinio del Programa Nuevas Tecnologías, financiado por el Banco Interamericano de Desarrollo, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y la Universidad Central de Venezuela, con el propósito de establecer las bases para crear una colección nacional de servicio moderna, capaz de responder adecuada y oportunamente a la demanda local de cultivos puros, y de los servicios asociados a estas actividades. En 1996 el CVCM se transformó en Laboratorio Nacional de Servicio para dar respuesta a la demanda creciente del sector público y el privado, y para contribuir al reto global para la preservación *ex situ* de la diversidad microbiana.

El CVCM fue originalmente concebido como una colección de colecciones, formada por la asociación voluntaria de colecciones privadas y especializadas, y de pequeñas colecciones locales de servicio, integradas en un sistema de nodos que conservan su independencia académica y administrativa. En 1998, habiendo cumplido con los requisitos y exigencias, fue incorporado a la *World Federation for Culture Collections* en condición de Miembro Afiliado (*World Directory of Collections of Cultures of Microorganisms*) bajo el número WFCC815. En los años siguientes participó activamente en la creación de la *Federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivos* (FELACC) de la cual es Miembro Fundador.

En cumplimiento de sus actividades el CVCM mantiene un Banco de Datos computarizado, con un registro sobre las características más relevantes de los cultivos preservados en sus colecciones. Periódicamente edita y distribuye un catálogo impreso. En el 2005 inició la publicación de una versión electrónica del catálogo, el cual podrá ser consultado en línea a comienzos del 2006. La información correspondiente a los géneros de bacterias más representativos de la colección está incorporada en el *World Data Center for Microorganisms* (WDCM), y puede ser consultada en la página WFCC MIRCEN URL.

<http://wdcm.riken.go.jp>

La figura 1 muestra la evolución del CVCM, en relación a la incorporación de cultivos en las colecciones y nodos de servicio, principales fuentes de financiamiento, y la edición periódica de catálogos.

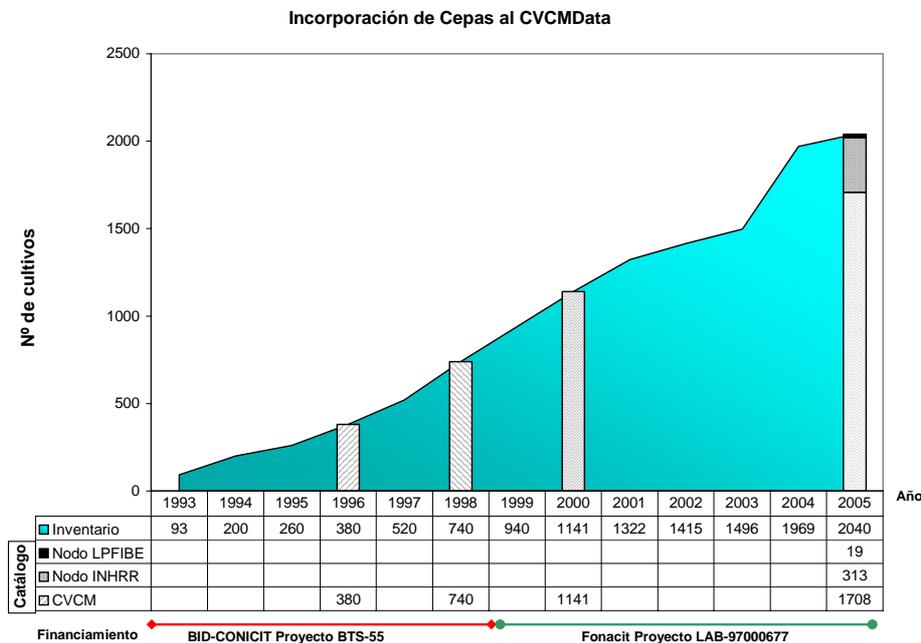


Figura 1. Evolución del CVCMD y sus colecciones .

Las barras representan el número de cultivos puros de bacterias (especies, sub-especies, y variantes genéticas) preservados e incorporados en el Banco de Datos, CVCMDdata, e incluidos en los catálogos respectivos. Año del inventario: número de cultivos preservados; catálogo: número de cultivos incorporados al catálogo; Nodo CVCMD-INHRR: colecciones del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel; Nodo CVCMD-LPFIBE: colección del Laboratorio de Procesos Fermentativos del Instituto de Biología Experimental.

Preservación *ex situ* de la Biodiversidad

El CVCMD está organizado como una colección abierta que propicia la incorporación gradual y selectiva de cultivos de microorganismos representativos de la diversidad microbiana de la región, a los fines de estudio y de aplicación en actividades para el control de enfermedades, la producción de bienes y servicios en beneficio del hombre, y el mantenimiento del equilibrio de la vida en la naturaleza. En conjunto, el CVCMD alberga una muestra amplia, aunque todavía pequeña, de la diversidad microbiana de la región. Además de los cultivos provenientes de colecciones locales especializadas, incorporadas a través de Nodos de Servicio, y de aquellos provenientes de colecciones internacionales de servicio construidas a lo largo de muchos años, se incluyen aislados autóctonos seleccionados de muestras procedentes de ambientes naturales o intervenidos, hospitales y de la actividad de la industria petrolera, agrícola, farmacéutica, y de alimentos y bebidas. En la quinta edición del catálogo, correspondiente al 2005, están descritos más de 2.000 cultivos, preservados por el método de liofilización.

Control de calidad en colecciones de cultivos

El primer aspecto a considerar sobre el control de calidad, entendido como calidad total de un proceso que va desde el ingreso de un cultivo hasta la entrega a la institución solicitante, es que esta actividad no puede ser considerada como un privilegio de las grandes colecciones internacionales de servicio, dotadas de sofisticadas instalaciones y cuantiosos recursos financieros. En el caso del CVCMD mantenemos y aplicamos el principio universal de que el control de calidad -dentro de los límites de la racionalidad y de la disponibilidad de recursos humanos y apoyo económico- debe asumirse como una condición esencial y una exigencia mínima para garantizar el funcionamiento óptimo de una colección de cultivos con independencia de su tamaño, fines y propósitos. Las colecciones académicas especializadas, así como las de pequeño formato relacionadas con la actividad académica o industrial, son tan importantes como las grandes colecciones internacionales de servicio. No sólo porque brindan invaluables servicios a su comunidad en su propio me-

dio, sino por valor intrínseco de su patrimonio. Frecuentemente contienen cultivos no representados en otras colecciones, y contribuyen a la preservación de la biodiversidad en escala global. Cuando una institución toma la iniciativa de crear una colección de cultivos, asume la responsabilidad de garantizar el estricto cumplimiento de las normas internacionales que rigen la materia. En el caso del CVCM, desde sus inicios, acogimos este principio y aplicamos rigurosamente las normas propuestas por la WFCC para el establecimiento y la operatividad de las colecciones de cultivos (WWCC Standards Committee, 1990).

Para garantizar la pureza y viabilidad de los cultivos, el registro y el procesamiento de la información, así como el manejo y la distribución local e internacional de cultivos, el CVCM mantiene un estricto programa de control de calidad sobre cada una de sus actividades (Leardini & Rodríguez Lemoine, 2004). Los aspectos considerados en el control de calidad son los siguientes:

- a. Pureza del cultivo;
- b. Identificación y caracterización bajo estándares internacionales;
- c. Caracterización de funciones relevantes;
- d. Registro de la información. Banco de Datos y catálogo;
- e. Empleo de métodos de preservación específicos para géneros o especies;
- f. Condiciones de almacenamiento;
- g. Distribución de cultivos

Cada una de las etapas de la cadena de control de calidad se realiza en ambientes de uso restringido, acondicionados especialmente para los fines propuestos, y manejado por personal técnicamente capacitado y debidamente autorizado. En todos los casos hay supervisión del Director Científico del Director Adjunto. En el caso del CVCM, por tratarse de una colección abierta que incorpora en forma selectiva y permanente cultivos de microorganismos representativos de la biodiversidad de ecosistemas naturales o intervenidos, se cuenta con la participación de investigadores especialistas ad honorem que actúan como curadores de los cultivos a ser incorporados.

Incorporación de cultivos. El ingreso de un cultivo tiene como requisito previo la garantía de pureza, datos sobre la procedencia de la muestra, y su identificación y caracterización de acuerdo a estándares internacionales, y a la capacidad técnica del grupo de curadores. En el caso de aislados originales se verifican los datos de la identificación empleando métodos tradicionales o semi-automatizados, y en casos especiales técnicas de Biología Molecular.

Registro de información. Cada cultivo que ingresa, aislado original o duplicado de otra colección, recibe un número correlativo de ingreso al sistema de información y registro CMCVdata, con la siguiente información mínima: nombre científico, sinónimos, número o denominación asignados en origen o en otras colecciones, condiciones del cultivo, referencias bibliográficas, historia, características genéticas, fenotipo, presencia y propiedades de plásmidos, transposones, otras propiedades o datos de interés.

Preservación. Para cada grupo de microorganismos se seleccionan las condiciones óptimas de crecimiento previo a la preservación. Los métodos más usados para bacterias son: subcultivos seriados, liofilización, y bajas temperaturas. En todos los casos, los cultivos preservados son identificados con etiquetas autoadhesivas. En el caso de liofilizados, la identificación está incluida dentro del recipiente que lo contiene, y éstos están rotulados en la parte exterior del mismo recipiente.

Almacenamiento. De cada cultivo se preparan entre 5 y 10 viales (dependiendo de la demanda potencial), y se seleccionan las condiciones óptimas de almacenamiento de acuerdo a la experiencia de los curadores. De cada lote registrado, se examina un vial antes y después del almacenamiento, y se determina la pureza y viabilidad del cultivo. La frecuencia depende del cultivo.

Distribución. Los cultivos son enviados a los solicitantes bajo condiciones de seguridad para su transporte, o entregados directamente en el CVCM. Se mantiene un registro actualizado de las planillas originales de las solicitudes y de las comunicaciones firmadas por los solicitantes, así como un inventario computarizado de las órdenes procesadas. Se establece como condición de entrega de un cultivo que el o los solicitantes, y las instituciones que representan, asumen la responsabilidad sobre el manejo, almacenamiento, pérdida, y posible uso indebido de los cultivos entregados.

Periódicamente se realiza una evaluación sobre los resultados de la aplicación de las normas de control de calidad empleada en cada etapa del proceso, y se proponen y corrigen las fallas que pudiesen presentarse durante su aplicación y seguimiento.

Considerando que las colecciones de cultivos son bancos de genes (no siempre conocidos) que están preservados en organismos complejos, se debe mantener una clasificación rigurosa sobre el nivel de peligrosidad potencial que entrañan cuando no son usados bajo estrictas normas de seguridad. De allí que en el concepto global de control de calidad deberían considerarse los aspectos éticos sobre el manejo y uso de los microorganismos en beneficio del hombre, y sus relaciones con el ecosistema.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Fondo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (FONACIT) Proyecto LAB 97000677, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, y el Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

BIBLIOGRAFÍA

- HAWKSWORTH, D.L. 1996. Microbial collections as a tool in Biodiversity and Biosystematics research. In: Culture collection to improve quality of life. Sanson *et al.* (Eds.) ISBN 90 70351 33 1 cl.
- HAWKSWORTH, D.L. & COLWELL, R.R. 1992. Biodiversity amongst microorganisms and its relevance. *Biodiversity and Conservation* 1:219-345.
- KAPUR, M. & KUMAR JAIN, R. 2004. Microbial diversity: exploring the unexplored. *World Federation Culture Collections News Letters* 39:11-18.
- LEARDINI, N.A. & RODRIGUEZ LEMOINE, V. 2004. Control de calidad de colecciones de microorganismos. En: Taller sobre Colecciones de Microorganismo y creación de la Federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivos (FELACC). Congreso Latinoamericano de Microbiología. Buenos Aires, Argentina.
- MOONEY, H.A. 1995. Biodiversity and ecosystem functioning: ecosystem analysis. In: *Global Biodiversity Assessment*. Heywood eds. Pp. 333-452. Cambridge University Press.
- RODRIGUEZ LEMOINE, V. 1992. Banco de plásmidos, bacterias, bacteriófagos y vectores de clonación de interés en Biotecnología de Avanzada. *Avances en Genética* 35-34.
- RODRIGUEZ LEMOINE, V. 1996. Venezuelan Center for Culture Collections (CVCM). A new institution devoted to the preservation of microbial diversity. In: *Culture Collections to Improve the Quality of Life*. Sanson *et al.* (Eds.) ISBN 90-70351-33-1 224-225
- RODRIGUEZ LEMOINE, V. 1998. Microbial Resource Centers and sustainable development. What is going in Venezuela. In: *Workshop on Microbial Resources Centers and Sustainable Development*. Maryland, United States.
- RODRIGUEZ LEMOINE, V. & VITELLI-FLORES, J. 2000. The Venezuelan Center for Culture Collections. National Laboratory for preservation of biodiversity. ECCO 2000 Institute Pasteur. Paris, France.
- RODRIGUEZ LEMOINE, V.; VITELLI-FLORES, J. & ALONSO, G. 2005. Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos, una colección de colecciones dedicada a la preservación *ex situ* de la diversidad microbiana. *Memorias Instituto Biología Experimental* 4:77-80.
- RODRIGUEZ LEMOINE, V., VITELLI-FLORES, J. & FLORES, I. 2005. Catálogo CVCM 2005 (Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos). 5a Edición. (Versión electrónica).
- STACKEBRANDT, E. 1994. The uncertainties of microbial diversity. In: *The Biodiversity of Microorganisms and the Role of Microbial Resource Centres*. WFCC ISBN 92 91029 041 9.
- SUGAWARA, H. & KIRSOP, B. 1994. The WFCC World Data Center on Microorganisms and Global Statistics on Microbial Resource Centres. In: *The Biodiversity of Microorganisms and the Role of Microbial Resource Centres*. Kirsop *et al.* (Eds.) ISBN 92 91029 041 9
- WWCC STANDARDS COMMITTEE. 1990. Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms.