

NEWS AND VIEWS

Colección de cultivos microbianos CIBE (CCM-CIBE): Una colección para la investigación

Microbial Culture Collection from CIBE (CCM-CIBE): A collection for research

María Gabriela Maridueña-Zavala, Adela Quevedo, Karla Aguaguña, Lissette Serrano, Daynet Sosa [DOI. 10.21931/RB/2021.06.01.32](https://doi.org/10.21931/RB/2021.06.01.32)

Resumen: Los microorganismos han sido fuente de importantes innovaciones industriales y su preservación ha contribuido al desarrollo de investigaciones. Sin embargo, en el Ecuador son pocas las iniciativas que buscan conservar microorganismos con potencial biotecnológico. La Colección de cultivos microbianos CCM-CIBE busca proteger la biodiversidad del Ecuador y contribuir a su estudio a través de la identificación, la conservación y la distribución de microorganismos. En nuestra colección empleamos métodos de conservación a largo plazo como conservación en agua, conservación en aceite mineral, crioconservación y liofilización. Así mismo, la CCM-CIBE cuenta con capacidades para brindar servicios de tenencia de microorganismos y recibir depósitos públicos o privados, garantizados a través de controles de viabilidad y seguridad de las cepas, así como de la información relacionada con cada microorganismo. Actualmente la colección cuenta con hongos, levaduras y bacterias patógenos de cultivos agrícolas, controladores biológicos, microorganismos presentes en procesos de fermentación que buscan fomentar el estudio de nuestra biodiversidad y contribuir a la mejora de procesos del sector agrícola, industria farmacéutica y de alimentos.

Palabras clave: Conservación, Ecuador, bacterias, hongos, levaduras.

Abstract: Microorganisms have been a source of critical industrial innovations, and their preservation has contributed to the development of research worldwide. However, there are only a few initiatives that seek to preserve microorganisms with biotechnological potential in Ecuador. The collection of microbial cultures CCM-CIBE seeks to protect Ecuador's biodiversity and contribute to its study by identifying, conserving, and distributing microorganisms. In our collection, we employ long-term conservation methods such as preservation in water, preservation in mineral oil, cryopreservation, and lyophilization. Likewise, the CCM-CIBE can provide services for the storage of microorganisms and receive public or private microbial deposits, guaranteed through viability and security controls of the strains and the information related to each microorganism. The collection contains fungi, yeasts, and pathogenic bacteria from crops, biological controllers, microorganisms present in fermentation processes, all of which seek to promote the study of our micro biodiversity and contribute to the improvement of agricultural processes, pharmaceutical, and food industries.

Key words: Conservation, Ecuador, bacteria, fungi, yeasts.

Introducción

El estudio de los microorganismos como potenciales instrumentos para solucionar problemas actuales en diversas áreas ha ido incrementándose con el pasar de los años. En la actualidad, el uso de microorganismos benéficos ha permitido mejorar procesos industriales, farmacéuticos, agrícolas y mineros, muchos de los cuales buscan biotecnologías respetuosas con el medio ambiente¹. Temas como el biodescubrimiento y la bioprospección han permitido un acceso a la bioactividad existente en la naturaleza, y desarrollos tecnológicos como la metagenómica han permitido también la rápida identificación y estudio de microorganismos.

Los microorganismos de interés biotecnológico pueden ser conservados en centros especializados para su posterior uso. A nivel mundial la creación de colecciones de cultivos de microorganismos son considerados puntos clave para la conservación de la biodiversidad y han contribuido substancialmente con investigaciones científicas y desarrollos tecnológicos². Colecciones de microorganismos como la MCC-India³, la Red de Colecciones de Cultivos en Chile⁴, la Red de Colecciones de Cultivos de los Estados Unidos (USCCN)⁵, alrededor de 17 colecciones de cultivos en México⁶, la Colección de Microorganismos Coordinada en Bélgica BCCM (<http://bccm.belspo.be>), la Colección de cultivos del CABI en Holanda

(<https://www.cabi.org/Services/>, CBS (<http://www.westerdijk-institute.nl/collections/>), entre otras, conservan cepas de bacterias, hongos, arqueas y levaduras de más de 60 años de antigüedad, manteniendo sus características funcionales.

Sin embargo, en el Ecuador las iniciativas para conservar microorganismos provenientes de nuestros ambientes biodiversos son aún muy escasos. De ahí la importancia de potenciar la colección de cultivos microbianos CCM-CIBE y las actividades de biodescubrimiento que se realizan en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) y demás entidades del Ecuador para el fomento de la investigación basada en la caracterización de microorganismos con potencial biotecnológico⁷⁻⁹. La CCM-CIBE se estableció en la ESPOL en el 2017 con los siguientes objetivos:

- Conservar la microdiversidad aislada producto de colectas, muestreos, y demás actividades de investigación.
- Brindar servicios de aislamiento, identificación y caracterización de microorganismos.
- Ofrecer servicios de depósito de microorganismos utilizando metodologías estandarizadas.
- Propiciar investigaciones sobre los usos o aplicaciones potenciales de los microorganismos conservados y sus productos.

Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Guayaquil, Ecuador.

*Autor de correspondencia: gmaridue@espol.edu.ec

Creación de una colección de utilidad biotecnológica: CCM-CIBE

En la última década, El Centro de Investigaciones Biotecnológicas-CIBE de la ESPOL, ha realizado investigaciones asociadas al control fitosanitario de plantaciones¹⁰⁻¹², a la identificación de agentes causante de enfermedades en cultivos^{13,14}, a la sensibilidad de microorganismos a productos químicos u orgánicos¹⁵⁻¹⁷, a la bioprospección de suelos antárticos^{18,19}, a la obtención de metabolitos secundarios como bioestimulantes o fertilizantes de origen natural^{20,21} entre otras actividades encaminadas a contribuir con el desarrollo de la agroindustria. Como resultado de estas actividades, se obtuvieron un gran número de aislados microbianos de interés biotecnológico. Así, la CCM-CIBE se estableció en el 2017 a fin de mantener las bacterias, arqueas¹², hongos y levaduras^{14,17,22-24} caracterizadas como parte de las investigaciones del CIBE (figura 1). Hasta la fecha, la CCM-CIBE ha logrado conservar mediante técnicas de corto y largo plazo alrededor de 1720 cepas de microorganismos, incluyendo 900 hongos, 700 bacterias y 120 levaduras colectados en distintas zonas del país (figura 2). El CCM-CIBE consta entre los centros de colecciones de Latinoamérica de la WFCC (World Federation of Culture Collection) http://www.wfcc.info/ccinfo/collection/by_id/1151).

Además de la experiencia en la preservación, caracterización e identificación de microorganismos, la CCM-CIBE cuenta con un cuarto de conservación en frío, laboratorios de bioseguridad nivel 1 y 2, equipos de ultracongelación, equipos de liofilización y demás materiales para el control de la conservación.

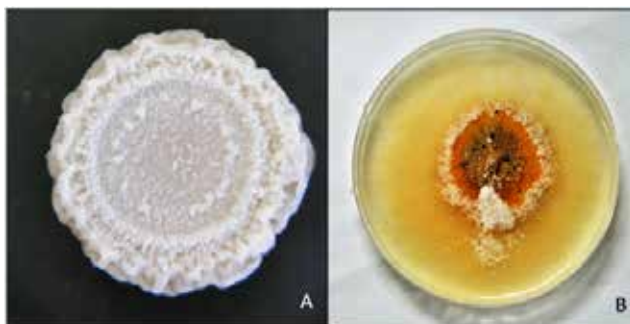


Figura 1. Colonias de microorganismos correspondientes a *Bacillus* sp. (A) y *Colletotrichum* sp. (B) que forman parte de la colección.

Identificación y caracterización de cepas microbianas

El CCM-CIBE fundamenta sus actividades de conservación en los "Lineamientos sobre buenas prácticas de biocustodia" y los "Guidelines for the Establishment and Operation of Collections of Cultures of Microorganisms" de la OECD²⁵. Así, la selección del método para la conservación se basa en el tipo de microorganismo, por lo que la identificación y caracterización de estos es el primer paso previo a su preservación. Para identificar un microorganismo, se toman en cuenta aspectos morfológicos como texturas, patrones de crecimiento, margen de las colonias, coloración del microorganismo²⁶, además de características bioquímicas, fisiológicas y particularidades sobre su crecimiento como nutrientes como fuentes de carbono y nitrógeno, etc²⁷. La identificación molecular se realiza mediante la extracción de ADN y técnicas de PCR (Polimerase chain reaction) utilizando primers específicos para posteriormente realizar una secuenciación Sanger en laboratorios especializados²⁸. La información obtenida nos ayuda a conocer los diferentes cambios que pueden sufrir los microorganismos en dependencia del método de conservación utilizado²⁹.

Conservación a largo plazo

Los métodos empleados por la CCM-CIBE se basan en el uso de aceite mineral, crioconservación, conservación en agua y liofilización (figura 3) con la finalidad de mantener la viabilidad, pureza, autenticidad y propiedades de los microorganismos durante todo el tiempo de conservación.

La conservación utilizando agua o aceite mineral se aplica generalmente a hongos. Para esto el micelio o conidios obtenidos a partir de cultivos puros, crecen en tubos con medio cultivo y una vez que se alcanza la esporulación del microorganismo se introduce aceite mineral, en el caso de conservación en agua esta técnica es ampliamente utilizada en hongos en la que secciones de micelio son conservados en tubos de 2ml con agua. Para ambos métodos los tubos se almacenan en cuartos fríos o a temperatura ambiente³⁰. Estas técnicas han permitido la conservación de hongos por periodos de 60 años o más.

La crioconservación y liofilización se aplica generalmente para bacterias y levaduras utilizando agentes crioprotectores como glicerol o proteínas lácteas, respectivamente^{31,32}.

La OECD también sugiere implementar medidas de bioseguridad y del aseguramiento de la colección para evitar fugas de microorganismos o contaminaciones que arriesguen la pureza de la colección. Por último, se recomienda utilizar protocolos estándares para la recuperación de las cepas y efectuar controles de calidad para los procedimientos. Así la CCM-CIBE, cuenta con instalaciones de nivel 2 de bioseguridad con acceso restringido y registros de entrada y salida de material biológico. Además, la viabilidad de los aislados conservados se verifica mediante cultivos en placa al menos una vez al año.

Depósito y base de datos

La CCM-CIBE recibe depósitos y realiza tenencia de microorganismos para terceros. El depósito y tenencia de microorganismos se puede realizar de forma pública o privada, dependiendo si el depositante desea o no mantener la confidencialidad de los microorganismos conservados (figura 4). Las actividades de depósito se identifican en tres fases como: recepción de la muestra, identificación de la muestra y depósito (conservación) de la muestra. Para ambos servicios se debe llenar los formularios en línea alojados en la página web del CIBE (www.cibe.espol.edu.ec), en el caso de un depósito se debe confirmar la autenticidad de la cepa previo a ser conservada y en el caso de solicitud de cepa se puede acceder al catálogo de microorganismos que posee información como la procedencia, cultivar y código asignado del CIBE. Los procedimientos de envíos, de reactivación del material microbiológico estarán disponibles en la web y en caso de requerir más información se puede comunicar al correo ccmcibe@espol.edu.ec.

Toda la información de los microorganismos será gestionada en la base de datos CIBEX que es una multiplataforma exclusivamente diseñada para la gestión de la CCM-CIBE, que nos permite generar alertas para tiempos de reactivación, de conservación, estadísticas de la colección que facilita su manejo.

Una vez realizado el depósito, la CCM-CIBE garantizará su viabilidad y el cumplimiento de las buenas normas de conservación de microorganismos.

Control de Calidad

Los controles de calidad son procedimientos que se llevan cabo a fin de mantener cepas viables, similar a la original y puras. La CCM-CIBE incorpora a su metodología controles de calidad, basados en los trabajos del Rol de Centro de colecciones³³, en tres puntos: Al recibir el material original, después de la preservación del primer lote de muestras, después de cada

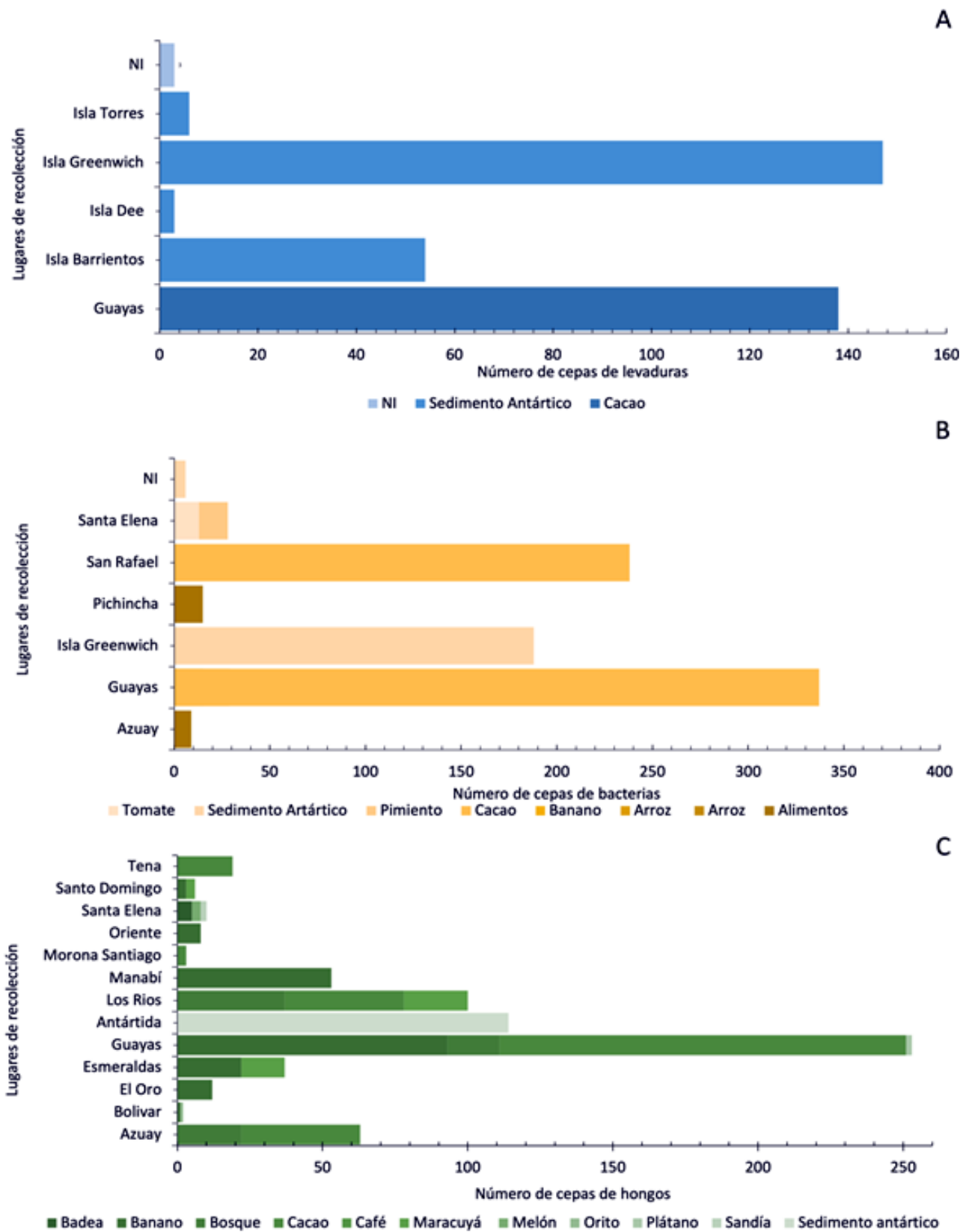


Figura 2. Colección de cultivos de levaduras (A) bacterias (B) y hongos (C) por cultivos y lugar de colecta.

nueva conservación subsecuente del lote. Para esto, se cultiva el microorganismo y se observa su pureza, así como también sus características a macro y microscópicas. Si es necesario se

verificará nuevamente la identidad de los aislados mediante la secuenciación de una región específica del ADN.



Figura 3. Colección de microorganismos conservados en aceite mineral (A) y Crioconservación (B).

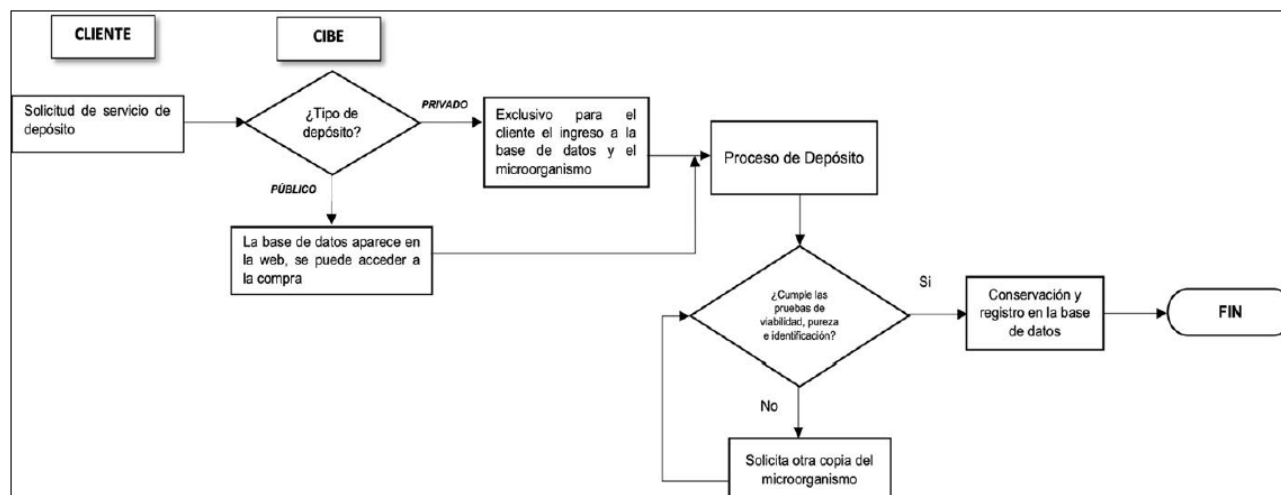


Figura 4. Flujo de depósito del material a conservar.

Conclusiones

Los más de 1700 aislados conservados en La CCM-CIBE representan una de las primeras iniciativas para la preservación de la diversidad microbiana en el Ecuador. El potencial biotecnológico de cada aislado debe aún ser evaluado a fin de identificar aplicaciones que beneficien a la sociedad.

Referencias bibliográficas

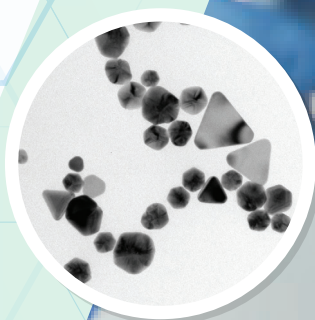
1. Reen FJ, Gutiérrez-Barranquero JA, O'Gara F. Mining Microbial Signals for Enhanced Biodiscovery of Secondary Metabolites. In: Humana Press, New York, NY; 2017:287-300. doi:10.1007/978-1-4939-6691-2_19
2. Oecd. OECD Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres. Vol 2.; 2007.
3. Bálint M, Schmidt PA, Sharma R, Thines M, Schmitt I. An Illumina metabarcoding pipeline for fungi. Ecol Evol. 2014. doi:10.1002/ece3.1107
4. Santos C, Durán P, Tortela G, et al. The Chilean Network of Microbial Culture Collections: Establishment and Operation. 2016;31(2):44-50. doi:10.22370/bolmicol.2016.32.2.
5. Boundy-Mills K, Hess M, Bennett AR, et al. The United States Culture Collection Network (USCCN): Enhancing microbial genomics research through living microbe culture collections. Appl Environ Microbiol. 2015;81(17):5671-5674. doi:10.1128/AEM.01176-15
6. Gutierrez-Jimenez, Javier; Luna- Cazáres, Lorena Mercedes; Mendoza-Orozco, Mónica Ivonne; Diaz-Marina, Jesús; Burguete-Gutierrez, Julio cesar; Feliciano- Guzman JM. Artículo original Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. Rev la Soc Venez Microbiol. 2015:95-102.
7. Sosa D, Quevedo A, Espinoza F, Pérez-martinez S, Malosso E, Castañeda-ruiz RF. *Coronosporidium ecuadorianum*. 2019;134(March):111-117.
8. Magdama F, Sosa D, Espinoza F, Serrano L, Malosso E. gen. nov., typified by. 2020;135(September):501-512.
9. Serrano L, Sosa D, Magdama F, et al. *Neomyrmecridium asymmetricum*. 2020;135(March):151-165.
10. Galarza L, Akagi Y, Takao K, Sun C. Characterization of *Trichoderma* species isolated in Ecuador and their antagonistic activities against phytopathogenic fungi from Ecuador and Japan. 2015:201-210. doi:10.1007/s10327-015-0587-x

11. Villavicencio-vásquez M, Espinoza-lozano RF, Pérez-martínez S, Del DS. biotecnología foliar endophyte fungi as candidate for bio-control against *Moniliophthora* spp. OF *Theobroma cacao* (Malvaceae) IN ECUADOR Hongos endófitos foliares como candidatos a biocontroladores contra *Moniliophthora* spp. de *Theobroma cacao* (Malvaceae). 035(3):235-241.
12. Cevallos-Cevallos JM, Gysel L, Maridueña-Zavala MG, Molina-Miranda MJ. Time-Related Changes in Volatile Compounds during Fermentation of Bulk and Fine-Flavor Cocoa (*Theobroma cacao*) Beans. *J Food Qual.* 2018;2018. doi:10.1155/2018/1758381
13. Magdama F, Monserrate-Maggi L, Serrano L, Sosa D, Geiser DM, Jiménez-Gasco M del M. Comparative analysis uncovers the limitations of current molecular detection methods for *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4 strains. *PLoS One.* 2019;14(9):e0222727. doi:10.1371/journal.pone.0222727
14. Maridueña-Zavala MG, Villavicencio-Vásquez ME, Cevallos-Cevallos JM, Peralta EL. Molecular and morphological characterization of *Moniliophthora roreri* isolates from cacao in Ecuador. *Can J Plant Pathol.* 2016;38(4). doi:10.1080/07060661.2016.1261372
15. Chávez, T., Chong, P., Ruiz, O., Peralta L. Análisis Genético de la Resistencia a Triazoles en Asilados de *Mycosphaerella fijiensis* para Poblaciones de Ecuador. 1973;4202.
16. Chong P, Platen HR Von. Diversidad Genética de Poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Provenientes de Haciendas Bananeras con Manejo Orgánico y Convencional Resumen. *Rev tecnológica ESPOL.* 2007;20(1):215-222.
17. Maridueña-Zavala MG, Freire-Peñaherrera A, Cevallos-Cevallos JM, Peralta EL. GC-MS metabolite profiling of *Phytophthora infestans* resistant to metalaxyl. *Eur J Plant Pathol.* 2017;1-12. doi:10.1007/s10658-017-1204-y
18. Calle P, Alvarado O, Monserrate L, Manuel J, Calle N, José J. Mercury accumulation in sediments and seabird feathers from the Antarctic Peninsula. *Mar Pollut Bull.* 2015;91(2):410-417. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.10.009
19. Yarzabal LA, Monserrate L, Buela L, Chica E. Antarctic *Pseudomonas* spp. promote wheat germination and growth at low temperatures. *Polar Biol.* 2018;41(11):2343-2354. doi:10.1007/s00300-018-2374-6
20. Manzano PI, Miranda M, Abreu-payrol J, Silva M, Sterner O. Pentacyclic triterpenoids with antimicrobial activity from the leaves of *Vernonanthura patens* (Asteraceae). 2013;25(7):539-543. doi:10.9755/ejfa.v25i7.15989
21. Chóez-Guaranda I, García J, Sánchez C, Pesantes C, Flores J, Manzano P. Identification of lupeol produced by *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. leaf callus culture. *Nat Prod Res.* 2019;0(0):1-5. doi:10.1080/14786419.2019.1636239
22. Gabriela Mariduena Zavala M, Ling Er H, Goss EM, Yi Wang N, Dewdney M, van Bruggen AH. Genetic variation among *Phyllosticta* strains isolated from citrus in Florida that are pathogenic or nonpathogenic to citrus. *Trop Plant Pathol.* 39(392):119-128. www.sbfito.com.br.
23. Maridueña G, Jiménez M, Peralta E. Actualización de la Micobiota Patogénica del Cacao " arriba " (*Theobroma cacao*) presente en la Costa Ecuatoriana. *Rev Tecnológica ESPOL – RTE.* 2010;23(1):21-26.
24. Sosa D, Galindo-Castro I, Diez N, Bernal C. Two-dimensional gel electrophoresis to identify arcelins from *Phaseolus vulgaris* with inmuno-proteomic analysis. *Agron Colomb.* 2019;36(2):114-119. doi:10.15446/agron.colomb.v36n2.67694
25. Smith D, Ryan M. Implementing best practices and validation of cryopreservation techniques for microorganisms. *Sci World J.* 2012;2012. doi:10.1100/2012/805659
26. Khattab S, Abdel-Hadi A, Abo-Dahab N, Atta O. Isolation, Characterization, and Identification of Yeasts Associated with Foods from Assiut City, Egypt. *Br Microbiol Res J.* 2016;13(1):1-10. doi:10.9734/bmrj/2016/24170
27. Tsegaye Z, Gizaw B, Genene T. Isolation, Identification and Characterization of Yeast Species from Kocho and Bulla Collected from Gedeo Zone, South Nation Nationality People Regional States. 2016;2016:37-44.
28. Pietrowski GAM, Bittencourt JVM, Brandão LR, Rosa CA, Alberti A, Nogueira A. Identification and selection of non-Saccharomyces strains isolate from Brazilian apple must. *Cienc Rural.* 2018;48(5):18-21. doi:10.1590/0103-8478cr20170886
29. Desmeth P, Officer IC. World Federation for Culture Collections Guidelines for the Establishment and Operation of Collections of Cultures of. 2010:1-19.
30. de Capriles CH, Mata S, Middelveen M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia.* 1989;106(2):73-79. doi:10.1007/BF00437084
31. Homolka L, Lisá L, Kubátová A, Váňová M, Janderová B, Nerud F. Cryopreservation of filamentous micromycetes and yeasts using perlite. *Folia Microbiol (Praha).* 2007;52(2):153-157. doi:10.1007/BF02932154
32. Singh SK, Baghela A. Cryopreservation of Microorganisms. *Mod Tools Tech to Understand Microbes.* 2017:321-333.
33. Janssens D, Arahal DR, Bizet C, Garay E. The role of public biological resource centers in providing a basic infrastructure for microbial research. *Res Microbiol.* 2010;161(6):422-429. doi:10.1016/j.resmic.2010.03.009

Received: 10 enero 2021

Accepted: 10 febrero 2021

La salud del futuro: Nanomedicina



**Aplicación de nanopartículas en
Medicina, Veterinaria, Cultivo Vegetal,
Agricultura y Acuicultura**



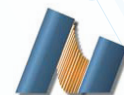
INTERNATIONAL
BIONANOTECHNOLOGY
NETWORK



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



www.redinternacionaldebionanotecnologia.org  /Red-Internacional-de-Bionanotecnología

<http://bionn.org/>  letyens@outlook.com  52-(646)-1366446