

La Colección Española de Cultivos Tipo: ampliando servicios y traspasando fronteras

R. AZNAR^{1,2}, A. ZUZUARREGUI¹, L. LÓPEZ-OCAÑA¹, M.C. MACIÁN¹ AND J.M. LÓPEZ-CORONADO¹

¹Colección Española de Cultivos Tipo. Universitat de València, C/ Catedrático Agustín Escardino, 9 46980 Paterna, España

²Departamento de Microbiología y Ecología. Universitat de València, Av. Dr. Moliner, 50 46100 Burjassot, España

✉ raznar@cect.org

JUNIO 2021

N.º 71

Los inicios de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) se remontan a 1960 cuando el Prof. J.R. Villanueva comenzó a recoger y mantener cepas microbianas que ponía a disposición de los microbiólogos españoles para sus actividades investigadoras. Fue acuñada como "Colección Española de Cultivos Tipo" por la Sociedad Española de Microbiología, y está representada en su Junta Directiva. Después de varios traslados por diferentes centros y universidades, la colección llegó a la Universitat de València (UV) en 1980 acompañando al Prof. Federico Uruburu, su primer director. Desde 1991 es un servicio de la UV, lo que garantiza su sostenibilidad a largo plazo, condición indispensable para adquirir el estatus de IDA (Autoridad Internacional de Depósito de microorganismos para fines de patentes según el tratado de Budapest). Desde 1992 la CECT actúa como IDA en España dando así cumplimiento a la petición recibida del Ministerio de Industria para aceptar depósitos de bacterias, arqueas, hongos filamentosos, levaduras y plásmidos (necesario para la solicitud de patentes y para suministrar muestras de acuerdo al tratado de Budapest), ofreciendo este servicio a usuarios nacionales e internacionales.

A lo largo de los años la CECT ha ido progresivamente ampliando el número de cepas y el catálogo de servicios, adoptando buenas prácticas en sus procedimientos, implantando normas de calidad, como la certificación ISO 9001 desde 2004, y siguiendo las directrices establecidas por la OCDE para Centros de Recursos Biológicos (BRC).

En la actualidad la CECT es un Centro de Recursos Biológicos Microbianos (mBRC) de amplio espectro que actúa como repositorio y proveedor de bacterias, arqueas, levaduras y hongos filamentosos. Está ubicada en el Parque Científico de la UV en Paterna (Valencia), un ecosistema de



Figura 1. Cámara refrigerada en la que se conserva la colección de cepas liofilizadas.

innovación en el que la CECT interactúa con empresas biotecnológicas, que fomenta la transferencia de conocimiento entre el sector público y el privado, promueve el desarrollo tecnológico y facilita la aplicación comercial de soluciones de base microbiana.

La CECT tiene como objetivo apoyar al mundo académico, a los laboratorios agroalimentarios y sanitarios y a la bioindustria en las actividades de docencia, control de calidad e investigación, desarrollo e innovación, proporcionando material de referencia microbiano de calidad controlada, así como servicios relacionados con la conservación, identificación y caracterización de microorganismos. En los últimos años se suministran alrededor de 4000 cepas por año (aproximadamente 500 al extranjero), en diferentes formatos y presentaciones, fundamentalmente lío-

filos; se gestionan anualmente alrededor de 60 depósitos de patente y 40 restringidos; y se identifican más de 500 cepas por año. Este último servicio es el que está teniendo un mayor crecimiento en los últimos años, pasando de 150-200 cepas por año en 2015-2018 a más de 500 en 2019 y 2020, principalmente debido a la adquisición por parte de la CECT de un equipo MALDI-TOF MS. La oferta de estos servicios se completa con cursos de formación, en dos modalidades: el Certificado Universitario de Conservación y Control de Cepas Microbianas y los cursos a media, ambos de carácter semipresencial. El certificado es un título oficial que tiene lugar una vez al año, generalmente en marzo, y abarca el manejo de cepas en el laboratorio, desde su activación, cultivo, autenticación y conservación a aspectos legales relacionados con el trabajo con microorganismos. Los cursos a medida están diri-

Figura 2. Identificación mediante perfiles MALDI-TOF MS.



gidos fundamentalmente a empresas que prefieren profundizar en determinados aspectos y/o trabajar con grupos concretos de microorganismos. Además, la CECT colabora en la formación de alumnos del Ciclo Formativo de Grado Superior y también recibe alumnos universitarios que realizan prácticas en empresa y trabajos de fin de grado y de máster. A parte de la oferta formativa, se asesora a los usuarios en el manejo de las cepas que nos solicitan, en los aspectos legales relacionados con su utilización y/o transporte, y en cualquier duda que tengan en relación con los servicios prestados.

El equipo de técnicos de la CECT, en contacto directo con las administraciones con competencias en el manejo de microorganismos, trabaja para dar respuesta a las demandas de los usuarios, por ejemplo 1) gestionando el permiso para trabajar, enviar y recibir fitopatógenos (regulados por el reglamento (UE) 2016/2031), como *Xylella fastidiosa*; 2) tramitando los registros necesarios para la exportación fuera de la UE de muestras biológicas, de cepas de origen animal y de cepas listadas como material de defensa y doble uso; y 3) mejorando la información ofrecida en las fichas de las cepas para facilitar el cumplimiento con el Protocolo de Nagoya. Además, disponemos en la actualidad de un amplio y diverso catálogo tanto de cepas (<https://links.uv.es/cect2/catalogue>) como de servicios microbiológicos (https://links.uv.es/cect2/Identificacion_Caracterizacion), de los que se describen a continuación las últimas novedades:

Como repositorio, la CECT actualmente mantiene alrededor de 8000 cepas públi-



Figura 3. Determinación de perfiles de ácidos grasos (FAME).

cas, que se incrementa con unos 200 nuevos depósitos cada año y que corresponden en su mayoría a cepas representativas de nuevas especies. El catálogo incluye la mayoría de las cepas de referencia WDCM/ISO; cepas taxonómicamente relevantes (cepas tipo), que cubren más de 3000 especies; así como cepas orientadas a la industria (vitivinícola, láctea, de biofertilizantes....) de España y del resto del mundo. Los taxones con mayor representación son bacterias del orden *Lactobacillales*, familias *Vibrionaceae* y *Rhodobacteraceae* y géneros *Streptomyces*; hongos filamentosos de las

familias *Aspergillaceae*, *Trichocomaceae*, *Glomerellaceae*, *Hypocreaceae* y *Nectriaceae*, y levaduras de la familia *Saccharomycetaceae*. Además, cuenta con representantes de géneros y especies difíciles de encontrar en otras colecciones de cultivo, como cepas delicadas (*Frankia*) y recalcitrantes (*Planctomycetes*), arqueas halófilas, cepas españolas de *Xylella* y cepas patógenas de plantas *Oomycota* de los géneros *Pythium* y *Phytophthora*.

Desde 2019 el catálogo incluye la cepa de Mengovirus (cepa vMCO mutante no viru-



Figura 4. Servidores donde se mantienen los datos asociados a las cepas.



Figura 5. Conservación en nitrógeno líquido.

lento = CECT 100000), que se utiliza como control positivo en los análisis de detección de virus siguiendo la norma UNE-EN ISO 15216-1:2017. Actualmente, se está poniendo a punto el procedimiento para la conservación de fagos, que permitirá aceptar este tipo de microorganismos en la colección.

Otro tipo de depósitos públicos que se han iniciado recientemente son las colecciones de cepas de investigación depositadas como "bulk deposit", lo que permite referenciarlas en publicaciones científicas. Se trata de grupos de cepas procedentes de proyectos de prospección y que se mantienen congeladas a -80°C .

Así mismo, se trabaja continuamente en la búsqueda de nuevas aproximaciones de cultivo y conservación para poder aceptar depósitos de nuevos linajes procariontas aplicando la culturómica y los nuevos enfoques de cultivo. La descripción de nuevos taxones raros y delicados es un gran reto para los investigadores, ya que estos organismos requieren protocolos adaptados para su mantenimiento,

y el Comité Internacional de Sistemática de Procariontas obliga a que las cepas tipo sean depositadas en al menos dos colecciones de cultivo de diferentes países. La CECT conserva algunos de estos especímenes como *Haloferax massiliensis* CECT 9307^T, la primera arquea halófila descrita como miembro de la microbiota intestinal; y *Lacipirellula parvula* CECT 9826^T, un nuevo linaje de *Planctomycetes* de ambientes pobres en oxígeno, entre otros.

También se ha puesto a punto recientemente el cultivo y la conservación de los hongos micorrícicos arbusculares (HMA), lo que permite aceptar el depósito en la colección de estos microorganismos biotecnológicamente relevantes. Los dos procedimientos utilizados para ello son i) la siembra en "cultivo trampa" de *Trifolium repens* como biorreactor en un sustrato estéril y ii) el sistema *in vitro* utilizando raíces de zanahoria (*Daucus carota* L.) transformadas con ADN-T con la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* CECT 478, como hospedadores para obtener el cultivo axénico.

Como mBRC la CECT realiza acciones para promover y valorizar las cepas públicas de la colección, complementando la información disponible, en la medida de lo posible. Así, se ha determinado la toxigenicidad de unas 100 cepas de *Escherichia coli* y se están secuenciando los genomas de muchas cepas mediante proyectos de investigación. En este sentido, la CECT está colaborando en la elaboración del Catálogo Global de Microorganismos GCM 2.0 (WDCM) y de la Enciclopedia Genómica de Bacterias y Arqueas (GEBA) VI: Genómica Funcional de Cepas Tipo (JGI), mediante la selección y suministro de cepas para la secuenciación de sus genomas. En la ficha del catálogo público de 1311 cepas aparece actualmente el número de acceso a su secuencia genómica y se espera incrementar ese número en los próximos años. La secuenciación de genomas también se ofrece como servicio de caracterización de cepas y son cada vez más los usuarios que lo solicitan.

En cuanto a la identificación por métodos moleculares, desde diciembre de 2018 la CECT dispone de un equipo Microflex™ LT



Figura 6. Manejo de cultivos anaerobios.

MALDI-TOF de Bruker financiado con una ayuda de la Generalitat Valenciana para la adquisición de Infraestructura Científica (Ref. IDIFEDER/2018/054), actuación cofinanciada por la Unión Europea a través del Programa Operativo del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) de la Comunidad Valenciana 2014-2020. Este equipo permite agilizar la autenticación de las cepas en los procesos de control de calidad y, al mismo tiempo, ampliar la base de datos de perfiles MALDI-TOF MS asociada al equipo, lo que redundará en beneficio de los otros servicios ofrecidos. Así mismo, en el marco del proyecto “Desarrollo de una biblioteca de perfiles MALDI-TOF para la identificación de cepas bacterianas presentes en aguas de consumo” (DRINKING WATER LIBRARY, Ref. RTC-2015-4496-2) financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), la CECT ha contribuido al desarrollo de una biblioteca de perfiles MALDI-TOF MS para la identificación de cepas bacterianas presentes en el agua potable (DRINKING WATER LIBRARY), ampliando la base de datos con los perfiles MALDI-TOF MS de estas bacterias y revelando que un tercio de los perfiles no coincidentes corresponden a nuevos taxones. Las cepas representantes de dichos nuevos taxones son actualmente objeto de estudio para su posterior caracterización y descripción.

Entre los servicios informáticos, además del catálogo de cepas, la CECT mantiene una aplicación en línea para la identificación rápida de levaduras, basada en los RFLP de la región ITS (www.yeast-id.org),

desarrollada en colaboración con el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA-CSIC). Así mismo, ha desarrollado y mantiene la aplicación StrainsApp (strainsapp.redesmi.es/), un sistema personalizable para la gestión de las bases de datos de cepas de colecciones de cultivo, que puede incluir arqueas, bacterias, hongos filamentosos, levaduras, microalgas, y virus animales y vegetales, además de bacteriófagos. También mantiene la web MicroBioSpain (www.microbiospain.org), como soporte de la Red Española de Microorganismos (REDESMI).

Además de las funciones propias de un mBRC, la CECT como colección pública española lidera otras actuaciones en pro de la conservación sostenible de la biodiversidad microbiana, consolidando su posicionamiento a nivel nacional e internacional. A nivel nacional la CECT lidera la Red Española de Microorganismos “REDESMI”, trabajando en colaboración con los microbiólogos españoles que mantienen colecciones de investigación integradas en su conjunto por más de 90.000 cepas de arqueas, bacterias, levaduras, hongos filamentosos, virus y microalgas. Esta actuación surgió de la necesidad de localizar y publicitar dichas colecciones para promover y facilitar la explotación de esta biodiversidad microbiana. REDESMI ha sido financiada por el INIA con el proyecto “Conservación sostenible de recursos microbianos españoles bajo estándares de calidad mediante una aproximación integradora y potenciando su visibilidad” (Ref. RMP2015-00001-00-00) dentro de la

convocatoria de Acciones Complementarias Tipo D “Apoyo a la conservación de los recursos genéticos de interés agroalimentario, en la modalidad de actividades permanentes”, financiado actualmente por la Agencia Estatal de Investigación-MCIU. Complementando esta actuación, la CECT lidera la Red de Excelencia “MicroBioSpain, integración de la red española de microorganismos “REDESMI” en la Infraestructura Europea de Investigación “Microbial Resource Research Infrastructure, MIRRI”, iniciativa financiada por MINECO (Ref. CGL2016-81969-REDT). Ambos proyectos han facilitado la interacción entre los investigadores, presentado las actividades y los avances científicos y tecnológicos de los diferentes centros integrantes, contando con la participación de representantes de diferentes empresas biotecnológicas interesadas en la posibilidad de explotación de recursos microbianos. Como punto de conexión con la bioindustria, se ha desarrollado la aplicación web StrainsApp, que permite la consulta pública on-line de las cepas inventariadas en REDESMI (<https://www.microbiospain.org/servicios-cepas/>), visibilizando y facilitando el acceso a estos recursos microbianos con potencial biotecnológico. MicroBioSpain ha sido el germen para la constitución del nodo español de MIRRI.

A nivel europeo, la CECT es socio fundador de la Infraestructura de Investigación de Recursos Microbianos (MIRRI, www.mirri.org), una iniciativa europea con la misión de servir a las comunidades de las biociencias y la bioindustria facilitando el



Figura 7. Personal técnico en las tareas de rutina para el mantenimiento de la colección.



Figura 8. Estrechado de liófilos.

acceso, a través de una plataforma única de alto rendimiento, denominada “Collaborative Work Environment, CWE”, a la más amplia gama de microorganismos de alta calidad, sus derivados, los datos asociados y los servicios, con un enfoque especial en los dominios de Salud & Alimentación, Agroalimentación y Medio Ambiente & Energía. MIRRI es el resultado de muchos años de colaboración de las Colecciones Europeas de Cultivos a través de la Organización Europea de Colecciones de Cultivos (ECCO, www.eccosite.org), que ha facilitado su participación en pro-

yectos internacionales dedicados a la conservación de la diversidad microbiana y su proyección como soporte de la biotecnología (MINE, Microbial Information Network Europe; EMbaRC, European Consortium of Microbial Resources Centres, www.embarc.eu; GBRCN, Global BRC Network, www.gbrcn.org). Once años después de su concepción en 2010, se espera que MIRRI se constituya como entidad jurídica ERIC durante 2021, impulsando la prestación de servicios a las comunidades interesadas y apoyando la participación de los socios de MIRRI en otros proyectos europeos, por

ejemplo, EOSC-Life “Providing an open collaborative space for digital biology in Europe” (H2020-INFRAEOSC-2018-2 RIA GA N° 824087; www.eosc-life.eu) y IS_MIRRI21 “Implementation and Sustainability of Microbial Resource Research Infrastructure for 21st Century” (H2020-INFRADEV-2019-2 RIA GA N° 871129; ismirri21.mirri.org). La CECT participa en ambos proyectos liderando la implementación de la RI MIRRI a través del diseño y la puesta en marcha de la plataforma informática que canalizará el funcionamiento de la infraestructura de investigación. El CWE de MIRRI está actualmente alojado en el centro de datos de la UV y se está desarrollando con el apoyo del proyecto IS_MIRRI21 dirigido por el personal de la CECT. Se alojará y mantendrá en el mismo lugar tras la constitución del ERIC, bajo la supervisión de la Unidad Central de Coordinación de MIRRI-ERIC, compartida por Portugal (Universidade do Minho, Braga) y España (Universitat de València, Paterna).

Por último, la CECT mantiene estrechas relaciones con otras colecciones de cultivo de América Latina y del Sudeste Asiático. Algunas de estas colecciones también han expresado su interés en participar en MIRRI, creando una oportunidad única para constituir una amplia comunidad de proveedores de recursos microbianos y expertos para apoyar desafíos globales como los Objetivos de Desarrollo Sostenible de las Naciones Unidas (UNSDGs, www.un.org/sustainabledevelopment/).

Imágenes: Copyright Fundació Parc Científic Universitat de València