

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL**



**COLECÇÕES DE CULTURAS MICROBIANAS COMO**  
**CENTROS DE RECURSOS BIOLÓGICOS: DESAFIOS E**  
**OPORTUNIDADES**

**Cláudia Andreia Serrano Carvalho**

**MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA**  
**2012**

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL**



**COLECÇÕES DE CULTURAS MICROBIANAS COMO  
CENTROS DE RECURSOS BIOLÓGICOS: DESAFIOS E  
OPORTUNIDADES**

Dissertação orientada pelos Professores Doutores  
Álvaro Fonseca (Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de  
Lisboa)

Rogério Tenreiro (Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa)

**Cláudia Andreia Serrano Carvalho**

**MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA**

**2012**



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



COLECÇÕES DE CULTURAS MICROBIANAS COMO  
CENTROS DE RECURSOS BIOLÓGICOS: DESAFIOS E  
OPORTUNIDADES

**Cláudia Andreia Serrano Carvalho**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**2012**

Esta dissertação foi realizada na Coleção Portuguesa de Culturas de Leveduras (PYCC) no Centro de Recursos Microbiológicos (CREM) sob a orientação directa do Prof. Doutor Álvaro Fonseca no âmbito do *Mestrado em Microbiologia Aplicada* da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

O Prof. Doutor Rogério Tenreiro foi o orientador interno designado no âmbito do *Mestrado em Microbiologia Aplicada* da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

## **AGRADECIMENTOS**

Quero deixar o meu agradecimento ao Professor Álvaro Fonseca por me ter acolhido na PYCC, pela sua orientação e sugestões e principalmente pela sua paciência.

Ao Professor Rogério Tenreiro por ter aceite a orientação interna desta tese e por me ter aceite no mestrado.

Quero deixar um agradecimento especial ao Dr. Andrey Yurkov que de uma forma desinteressada, se disponibilizou a ajudar-me, pela simpatia, e pelos momentos de cafés disponibilizados.

Um agradecimento muito especial ao Marco Guerreiro pela simpatia, que se disponibilizou a ajudar-me e com quem partilhei momentos de grande companheirismo. Fica a amizade que perdurará por muito e muito tempo.

Aos meus colegas do CREM e do DCV pela amizade e companheirismo.

Aos meus pais pelo incentivo constante e pela paciência pela filha mais nova. A toda a minha família.

Ao Tiago pela luz que trouxeste à minha vida.

## RESUMO

Em pouco mais de 100 anos as colecções de culturas (CC) estabeleceram-se como infraestruturas fundamentais de apoio a actividades de I&D nas áreas das ciências da vida e da biotecnologia. A sua importância na conservação da diversidade biológica e de recursos genéticos de enorme valor para o desenvolvimento científico e tecnológico tem vindo a ser reconhecida por governos e instituições internacionais. Ao longo do século XX diferentes tipos de CC foram estabelecidas um pouco por todo o mundo, inclusive em Portugal: a Colecção Portuguesa de Culturas de Leveduras (PYCC) foi estabelecida em 1952. O papel tradicional destas colecções foi o de providenciar acesso a culturas autenticadas e informação sobre as suas características, preservação e cultivo à comunidade científica. Nos anos recentes, outros serviços têm sido adjudicados às CC tais como o fornecimento de culturas para controlo de qualidade e/ou o depósito de culturas para efeitos de patente. Por outro lado, no plano actual de desenvolvimento económico têm surgido vários constrangimentos ao nível financeiro, que podem por em causa a subsistência das CC.

É neste contexto, que em 2001 a Organização para Cooperação e o Desenvolvimento Económico (OECD) lança o conceito de Centros de Recursos Biológicos (BRCs), de forma a providenciar padrões de qualidade exigidos pela comunidade internacional de cientistas e da indústria no fornecimento de informação e de materiais biológicos e garantir a sobrevivência das colecções. De facto, são muitas as colecções de serviço que têm evoluído para BRCs em resposta ao desenvolvimento em várias áreas que vão da biologia molecular à bioinformática. Nos anos mais recentes tem sido reconhecida a importância da cooperação internacional entre os vários BRCs com o objectivo de agregar valor às colecções, incluindo os seus materiais, serviços, conhecimentos e competências, de forma a garantir a sua auto sustentabilidade. Um dos projectos de cooperação europeia mais recente é o MIRRI (*Microbial Resource Research Infrastructure*) como o objectivo de providenciar às CC europeias as ferramentas que lhes permitam evoluir para BRCs.

Uma análise comparativa das principais CC europeias que mantêm fungos mostrou que a maioria preserva diferentes tipos de organismos e apenas 6 são colecções especializadas. A mesma análise revelou que o tipo de financiamento determina decisivamente a quantidade de pessoal adstrito às colecções e o número e tipo de serviços que são oferecidos.

Nos últimos anos a PYCC passou por profundas alterações começando pela constituição de uma Comissão de Acompanhamento e publicação do regulamento da colecção. Um dos aspectos mais importantes daquela reestruturação foi a digitalização de toda a informação sobre as suas estirpes numa base de dados e posterior publicação do catálogo *online* e *website*. Actualmente a PYCC contém um conjunto de estirpes de leveduras muito

diversificadas (cerca de 3000) em que 28% são estirpes isoladas em Portugal e cerca de 46% são estirpes exclusivas. Com vista à obtenção da certificação da colecção foi realizado um estudo comparativo entre a PYCC e as colecções congéneres, concluindo-se que as características que mais contribuem para o desenvolvimento actual da PYCC são investigação em métodos de cultura, investigação em métodos de preservação, investigação na biodiversidade, controlo da pureza das culturas e oferta de outros serviços. Estas características contribuem para que a certificação da PYCC. Para que isto se verifique uma série de procedimentos terão de ser seguidos com base nas recomendações da OECD, nomeadamente a implementação de um Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ). O posterior desenvolvimento da PYCC em BRC depara com alguns constrangimentos ao nível financeiro e logístico que decorrem dos regulamentos da instituição de acolhimento. Contudo o facto de a PYCC ser actualmente a única colecção portuguesa de leveduras com um catálogo *online* e uma base de dados muito completa, constitui uma mais-valia para o seu desenvolvimento num BRC, o que poderá vir acontecer em associação com outras colecções portuguesas no âmbito do projecto MIRRI.

## ABSTRACT

In just over 100 years the culture collections (CC) have established themselves as key infrastructure to support R&D in the areas of life sciences and biotechnology. Its importance in the conservation of biological diversity and genetic resources of enormous value to the scientific and technological development has been recognized by governments and international institutions. Throughout the XX century several types of CC were established all over the world including Portugal: the Portuguese Yeast Culture Collection (PYCC) was established in 1952. The traditional role of the collections was to provide access to authentic cultures and information about its preservation and cultivation to the scientific community. In recent years, other services have been awarded to CC such as the provision of cultures for quality control and/or deposit of cultures for patent purposes. Moreover, in the current plan of economic development several constraints have emerged, which may jeopardize the livelihoods of CC.

In this context, in 2001, the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) launched the concept of Biological Resource Centers (BRC's) in order to provide the scientific and industrial world with access to properly maintained cultivable biological material and regarded information in associated databases in order to assure the survival of the collections. Indeed there has been several services collections that have evolved into BRC's in response of the molecular biology and bio-informatics development. In the more recent years it has been recognized that high quality services must be provided and international linkages established between several BRC's with the goal to add value to the collections, including the materials, services, knowledge and competences as a way to ensure the sustainability of the collections. One of the most recent European project is MIRRI (*Microbial Resource Research Infrastructure*) with the objective to provide European CCs the tools that allow them to develop into BRCs.

A comparative analysis of the major European fungi collections showed that most of them preserves different kind of microorganisms and only 6 of them are specialized. The same analysis reveals that the type of financing decisively determines the amount of personnel attached to the collections and the number of services that are offered.

In the final years PYCC has been through some changes, starting with the formation of a Steering Committee and publication of the regulations. One of the first steps was to digitalized all the information of the strains existing in the collection on an associated database followed by the online publication of the catalogue and own website. Nowadays PYCC contains a set of yeast strains very diversified (about 3000), 28% are isolated in Portugal and 46% are exclusive to PYCC. A comparative study was made between PYCC and other similar collections to see

what steps PYCC should implement in order to obtain certification. The characteristics that contribute to the presently development of PYCC are the investigation in culture methods, investigation in preservation methods, investigation in biodiversity, control of the cultures purity and existence of other services. These characteristics contribute in order to PYCC in obtaining certification. For this to happen a number of procedures have to be followed based on the recommendations of the OECD including the implementation of a Quality Management System (QMS). The subsequent development of PYCC into BRC has a number of constrains mainly on a financial level and regulations of the institution to which PYCC belongs. However the fact that PYCC is currently the only Portuguese collection of yeasts strains with an online catalog and a very complete and searchable database allows the development of PYCC into BRC with other Portuguese collections under the MIRRI project.



# ÍNDICE

## I – Colecções de Culturas Microbianas e Centros de Recursos Biológicos

### 1 – Colecções de Culturas Microbianas

1.1 Breve historial e caracterização da missão das Colecções de Culturas Microbianas e das suas actividades .....	1
1.2 Tipologia das colecções de culturas microbianas.....	2
1.3 Evolução dos métodos de conservação .....	4
1.4 Evolução dos métodos de identificação e caracterização de culturas microbianas .....	8
1.5 Gestão da informação associada às colecções de culturas .....	11
1.6 Diversidade de actividades e serviços prestados pelas colecções de culturas .....	12
1.7 Papel das colecções de culturas e a sua intervenção na definição de políticas científicas, regulamentares e técnicas .....	14

### 2 – Levantamento de iniciativas e directivas internacionais sobre colecções de culturas

2.1 Conceito de Centros de Recursos Biológicos e programa MIRCEN da UNESCO .....	17
2.2 Transição das Colecções de Culturas para Centros de Recursos Biológicos .....	18
2.3 Convenção sobre a Diversidade Biológica (CBD) .....	21
2.4 Federações internacionais de colecções de culturas: WFCC e ECCO .....	23
2.5 Relatórios e iniciativas da OECD .....	24
2.6 Projectos de cooperação internacionais: GBRCN e EMbaRC .....	26
2.7 Projectos futuros: MIRRI .....	27

### 3 - O panorama europeu das colecções de culturas microbianas, com ênfase nas colecções de fungos: tipologias e desenvolvimento recentes; estudo comparativo ....

28

## II – Caso de estudo: Colecção Portuguesa de Culturas de Leveduras (PYCC)

### 1 – Breve historial da PYCC e caracterização da sua missão e das suas actividades .....

32

### 2 – Estudo comparativo com colecções congéneres, nacionais e internacionais .....

34

3 – Perspectivas de desenvolvimento futuro da PYCC	
3.1 Diversificação de serviços e actividades .....	36
3.2 Medidas com vista à acreditação/certificação da PYCC .....	39
3.3 Evolução para BRC ou integração em rede nacional de BRCs? .....	43
3.4 Constrangimentos e desafios na implementação das medidas propostas .....	44
Referências Bibliográficas .....	45
Anexos .....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática da região do DNA ribossómico dos fungos e da maioria dos eucariontes .....	10
<b>Figura 2:</b> Percentagem de microrganismos acumulativa existente em cada colecção de cultura europeias escolhida para o estudo comparativo .....	30
<b>Figura 3:</b> Sumário das relações entre as características (variáveis) e as colecções (amostras) europeias avaliadas. A rosa as colecções certificadas .....	31
<b>Figura 4:</b> Distribuição das estirpes da PYCC de acordo com a proveniência geográfica (a) e a nível de substracto de isolamento (b) .....	33
<b>Figura 5:</b> Sumário das relações entre as amostras (colecções) à direita e as variáveis à esquerda das colecções de culturas congéneres nacionais e internacionais da PYCC. A rosa as colecções certificadas .....	35
<b>Figura 6:</b> Árvore filogenética baseada nos domínios D1/D2 do gene LSU rRNA, representando as 80 estirpes basidiomicetas que entraram no projecto LUSOEXTRACT. As cores representam estirpes que foram sequenciadas durante o projecto. Verde: estirpes cuja sequenciação confirmou a espécie. Vermelho: estirpes re-identificadas .....	38
<b>Figura 7:</b> Árvore filogenética baseada nos domínios D1/D2 do gene LSU rRNA, representando as 68 estirpes de ascomicetas que entraram no projecto LUSOEXTRACT. As cores representam estirpes que foram sequenciadas durante o projecto. Verde. Estirpes cuja sequenciação confirmou a espécie. Vermelho: estirpes re-identificadas .....	39
<b>Figura 8:</b> Proposta de fluxograma de depósito de culturas microbianas evidenciando as etapas de controle de qualidade (em vermelho) seguindo as recomendações da OECD (2007) e da WFCC (2010) .....	42

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Distribuição das colecções de culturas microbianas por continentes (adaptado de Smith, 2003, como dados actuais da WDCM) .....	2
<b>Tabela 2:</b> Tipo de suporte financeiro e o número de colecções existentes (dados actuais da WDCM) .....	3
<b>Tabela 3:</b> Características das várias técnicas de preservação de microrganismos (adaptado de Ryan & Smith, 2004) .....	7
<b>Tabela 4:</b> Tipo de serviços disponibilizados pelas colecções de microrganismos no mundo (dados da WDCM) .....	14
<b>Tabela 5:</b> Colecções europeias que operam sob um sistema de certificação ou acreditação independente (adaptado de Smith & Ryan, 2012) .....	20
<b>Tabela 6:</b> Exemplos de federações, consórcios e colaborações entre BRCs (adaptado de Janssens <i>et. al.</i> , 2010) .....	26
<b>Tabela 7:</b> Peso das contribuições e <i>eigenvalues</i> nos primeiros seis eixos para o total das amostras .....	30
<b>Tabela 8:</b> Peso das contribuições e <i>eigenvalues</i> nos primeiros três eixos para o total das amostras .....	34
<b>Tabela A1:</b> Lista das colecções de culturas de fungos existentes na Europa e Portugal escolhidas para o estudo comparativo e as características correspondentes (dados obtidos a partir da WDCM). A rosa representa as colecções que estão certificadas .....	48
<b>Tabela A2:</b> Lista das características (variáveis) e sua codificação escolhidas para a comparação entre as colecções europeias .....	50
<b>Tabela A3:</b> Lista das características (variáveis) e a sua codificação escolhidas para a comparação entre a PYCC e as colecções nacionais e europeias congéneres .....	51

## **LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS**

ATCC - American Type Culture Collection

BRC – Biological Resource Centers

CABRI – Commons Access to Biological Resources

CBD – Convention of Biological Diversity

CBS - Centraalbureau voor Schimmelcultures

CSTP – Committee for Science and Technology Policy

DSMZ –Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

EBRCN - European Biological Resource Centre Network

ECCO – European Culture Collections Organisation

EMbaRC – European Consortium of Microbial Resource Centre

GBIF – Global Biodiversity Information Facility

GBIF.PT – Infraestrutura Portuguesa de Informação da Diversidade Biológica

GBRCN – Global Biological Resource Center Network

IDA – International Depository Authority

IUBS – International Union of Biological Sciences

MCL – Microbial Commons Language

MIRRI – Microbial Resource Research Infrastructure

MOSAICC – Microorganisms Sustainable Use and Access Regulation International Code of Conduct

MTA – Material Transfer Agreement

MUCL - Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain

OECD – Organization for Economic Co-operation and Development

PIC – Prior Informed Consent

PYCC – Portuguese Yeast Culture Collection

RPCCM – Rede Portuguesa de Coleções de Culturas Microbianas

SGQ – Sistema de Gestão da Qualidade

UKNCC – United Kingdom National Culture Collection

WDCM – World Data Center for Microorganisms

WFCC – World Federation of Culture Collections

# I - Coleções de Culturas Microbianas e Centros de Recursos Biológicos

## 1 Coleções de Culturas Microbianas

### 1.1 Breve historial e caracterização da missão das Coleções de Culturas Microbianas e das suas actividades

O estabelecimento de depósitos de material biológico e o desenvolvimento de técnicas para a sua preservação e manutenção têm correspondido ao interesse crescente na investigação em ciências da vida de uma forma geral, e em particular devido ao grande potencial biotecnológico que se pode obter a partir dos materiais biológicos. A disponibilidade e qualidade do material biológico contribuem decisivamente para a qualidade da investigação. É neste âmbito que surgem as colecções de culturas (Halluin, 1996).

As colecções de culturas são infraestruturas de apoio a uma grande variedade de trabalho biológico. A sua função primária é de obter, manter e distribuir culturas biológicas para ensino, investigação, ensaios de controlo, biotecnologia, etc. São ainda um meio de preservação da diversidade biológica *ex situ*. As primeiras colecções de culturas foram as de estirpes celulares microbianas e originaram-se quando a escola de Koch introduziu o conceito de culturas puras em bacteriologia. A primeira colecção de serviço estruturada com a finalidade de fornecer culturas puras para estudos comparativos e identificação de bactérias foi a colecção criada pelo Dr. Frantisek Král na Universidade Alemã de Praga, provavelmente em 1890, destinada a conservar e distribuir microrganismos para o diagnóstico, ensino, investigação e indústria. Král publicou o primeiro catálogo de estirpes em 1900, com organização alfabética e temática das espécies, correspondeu-se com os microbiólogos de renome da época a quem solicitava o depósito de estirpes com algum interesse na “Král’she Sammlung vom Mikroorganismen” a fim de as conservar e tornar acessíveis a outros, assim como realizou exposições onde se podiam apreciar não só o aspecto macroscópico das colónias formadas em meio sólido, como fotografias que revelavam a morfologia microscópica dos microrganismos (Spencer-Martins, 1994; Uruburu, 2003).

Nas quatro primeiras décadas do século XX, outras colecções de serviço foram estabelecidas na Europa, Estados Unidos e Japão com a finalidade básica de fornecer material de referência para estudos de taxonomia. Como exemplo temos a “Mycothèque de l’Université Catholique de Louvain” (MUCL), Louvain-la-Neuve, Bélgica, fundada em 1904, a “Centraalbureau voor Schimmelcultures” (CBS) em Utrecht, Holanda, fundada em 1906 e a “American Type Culture Collection” (ATCC) que foi fundada em Washington em 1925 e se encontra localizada actualmente em Manassas, Virgínia. Estas colecções passaram por um

processo contínuo de evolução visando atender à procura de material biológico decorrente dos avanços da microbiologia industrial (década de 1960), biotecnologia (década de 1980) e biologia molecular (década de 1990 até à actualidade). Nos cerca de 120 anos de existência de colecções de cultura não existem dados que indiquem com certeza o número de colecções fundadas, mantidas e/ou desaparecidas. No Centro Mundial de Dados de Microorganismos (WDCM – *World Data Center for Microorganisms* [www.wfcc.info/ccinfo/statistics/](http://www.wfcc.info/ccinfo/statistics/)) tem registadas cerca de 625 colecções de culturas, distribuídas por 71 países (ver Tabela 1).. Este número, no entanto, não reflete a luta continua que a grande maioria das colecções (listadas ou não) têm para obtenção de fundos, a quantidade e/ou diversidade de investigação realizada pelas colecções, assim como a falta de apoio das instituições de acolhimento ou países. Apenas 4 colecções de culturas portuguesas se encontram registadas na WDCM (Stackebrandt, 2010; Uruburu, 2003).

**Tabela 1:** Distribuição das colecções de culturas microbianas por continentes (adaptado de Smith, 2003; com dados actuais da WDCM).

Continente	Número de colecções	Número de estirpes	Percentagem do nº total de estirpes
África	11	15 266	0,8
Ásia	215	767 233	38,1
Europa	210	682 506	33,8
América	147	461 402	22,9
Oceânia	42	89 257	4,4
Total	625	2 015 664	100

O valor das colecções de culturas reside na qualidade e abrangência das suas culturas, na informação existente sobre as estirpes e na capacidade de atenderem à procura gerada por programas de inovação tecnológica, actividades de produção biotecnológica, programas de qualidade e competitividade industrial e de apoio às actividades de investigação básica e aplicada no sector académico.

## 1.2 Tipologia das colecções de culturas microbianas

As colecções de culturas podem ser classificadas em três categorias, nomeadamente, colecções privadas, especializadas e públicas. As colecções de culturas privadas são as que se constituíram com o objectivo de servir a instituição em que se localizam, como por exemplo as que estão associadas a determinadas empresas ou indústrias. As colecções de culturas especializadas desenvolveram-se em resultado dos interesses de investigação específicos de um determinado investigador, sendo as que contêm, geralmente, informação muito rica e especializada mas também as que comportam maior risco de desaparecer ou porque o investigador passou a ter interesses diferentes ou porque se reformou ou mudou de emprego.

As colecções de culturas públicas são aquelas que têm como função primária a distribuição de culturas e a prestação de serviços de utilidade pública (Spencer-Martins, 1994; Mahilum-Tapay, 2009; Gransalke, 2010).

As colecções públicas e privadas poderão ser igualmente consideradas como colecções de serviço, quando para além da principal função de agir como depósito de microrganismos também fornecem serviços de identificação ou distribuição de estirpes. Certas colecções vocacionadas para a prestação de serviços estão igualmente acreditadas para funcionar como depósito de estirpes protegidas por patentes (Kirsop, 1984; Spencer-Martins, 1994).

O tipo de colecção de cultura vai determinar o tipo de financiamento que a colecção pode obter ou projectos a que poderá candidatar-se. De acordo com a WDCM (<http://www.wfcc.info/ccinfo/statistics/>) (Tabela 2) existem essencialmente cinco tipos de apoios financeiros. Como se pode verificar o maior número de colecções existentes são as financiadas pelo governo ou pelas universidades, sendo que a maioria são colecções de serviço, enquanto que as apoiadas de forma privada são apenas 35. É de apontar que a indústria tem o menor número de colecções inscritas na WDCM, mas este número não é de admirar pois a maioria das empresas industriais preferem manter as estirpes importantes em colecções de serviço que forneçam serviços de “Safe-deposit” ou de depósitos de patentes (ver secção 1.6). O custo operacional de uma colecção de serviço é em parte coberto pelos serviços de consultadoria, desenvolvimento de projectos e venda de culturas. Entretanto, o elevado custo das actividades de rotina e curadoria, tais como autenticação, preservação, controle de qualidade e documentação de propriedades das culturas, raramente são cobertos pela venda de serviços. Torna-se, então, necessário que haja um outro apoio financeiro nomeadamente através de recursos públicos. Por exemplo, no ano 2010-2011, a CBS teve cerca 58% do seu orçamento proveniente da Academia Real Holandesa para as Artes e Ciências (KNAW – *Royal Dutch Academy of Arts and Sciences*) e cerca de 42% proveniente de fontes externas em que se incluem projectos, venda de estirpes, depósito de estirpes, serviços de identificação, cursos, etc (CBS, 2011).

**Tabela 2:** Tipo de apoio financeiro e o número de colecções existentes (dados actuais da WDCM).

<b>Tipo de apoio financeiro</b>	<b>Número de colecções</b>
Governamentais	245
Universidades	233
Semi-governamentais	59
Privadas	35
Indústria	17
Não identificadas	36



### 1.3 Evolução dos métodos de conservação

Conservação vem do latim *conservatione* e significa acto de conservar, de manter intacto ou não deixar deteriorar, preservação. Ao longo dos anos, as colecções de culturas, principalmente as colecções de serviço, têm investigado os vários métodos de conservação de microrganismos, uma vez que têm um compromisso na preservação de culturas e a sua experiência é de grande importância para a comunidade científica em geral. Os desenvolvimentos de técnicas de conservação são importantes para que as características dos microrganismos permaneçam inalteráveis ao longo do tempo, mantendo a sua viabilidade. Os microrganismos incluem uma variedade de espécies, tanto de procariontes como de eucariontes, apresentando um desafio no que toca à sua preservação (Spencer-Martins, 1994; Hasegawa, 1996).

A conservação de microrganismos depende de alguns factores de forma a retardar o crescimento, tais como o método de cultivo, a temperatura, a composição, pH e arejamento do meio. A idade, a condição fisiológica e a concentração da cultura no momento da conservação também são de grande importância (Snell, 1984).

A composição do meio de cultura afecta a resistência celular. Geralmente recomenda-se um meio pobre em nutrientes para evitar o crescimento acelerado e geração de mutantes indesejáveis e normalmente o meio de cultura pobre é um sinal para direccionar o metabolismo da célula para armazenar energia. No entanto, em alguns casos o meio de cultivo rico é recomendado por causa da percentagem de células viáveis ser maior em relação ao meio pobre. Os meios de cultivo que conduzam à acumulação de proteínas, carboidratos e lípidos podem também aumentar a resistência das células ao tratamento por liofilização. Um factor importante em algumas técnicas de conservação é a actividade da água do meio extracelular. A actividade da água afecta directamente o crescimento dos microrganismos. A resistência da célula durante a conservação pode depender da acidez do meio de cultivo. É bem conhecido que o pH do meio de cultivo influencia a propagação celular: há um pH óptimo para cada estirpe e o crescimento das células pode ser inibido se este factor não for adequado (Smith *et. al.*, 2001).

A temperatura a que os microrganismos são armazenados também influencia a eficácia do método escolhido. Baixas temperaturas são usadas para retardar as reacções químicas, a acção das enzimas, e atrasar ou inibir o crescimento dos microrganismos indesejáveis. O congelamento evita a contaminação da maior parte dos microrganismos (Smith *et. al.*, 2001).

A resistência de conservação pode depender das condições de arejamento durante o cultivo. Por exemplo, as estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas em condições aeróbias são mais resistentes em choque hipo e hipertónico (Smith *et. al.*, 2001).

Para a conservação de uma cultura é importante conhecer a idade da cultura para se obter uma alta viabilidade de recuperação das células. Alguns dados indicam o início da fase estacionária de crescimento como a fase ideal de recolha das células para a preservação. Dados confirmam que os microrganismos são mais resistentes ao congelamento ou desidratação no fim do crescimento exponencial ou no início da fase estacionária (Smith *et. al.*, 2001).

As propriedades e características internas das células podem ser influenciadas pelo processo de conservação. Diferentes grupos de microrganismos apresentam diferentes resistências à preservação. As culturas produtoras de esporos possuem melhores resultados de viabilidade em todos os métodos de conservação; isto deve-se às pequenas quantidades de água presente nos esporos, uma forma de preservação natural. Os microrganismos que não esporulem não possuem a mesma capacidade de sobrevivência. Sabe-se que os procariontes são mais resistentes que os eucariontes, bem como as bactérias Gram positivas mais resistentes que as Gram negativas (Smith *et. al.*, 2001).

O sucesso da conservação dependerá do método usado, da natureza dos microrganismos e do período de conservação. A grande diferença entre a resistência de cada cultura e os resultados obtidos durante a reactivação das células impede a determinação de um procedimento padrão de conservação aplicável a todos os microrganismos (Smith *et. al.*, 2001). Existe uma multiplicidade de métodos de preservação de culturas descritos na literatura, mas nenhum método pode ou deve ser considerado infalível. Embora se tenha demonstrado que as reacções dos microrganismos aos diferentes métodos desenvolvidos variam até entre estirpes da mesma espécie, os métodos hoje mais generalizados são os que permitem uma maior capacidade de sobrevivência e uniformidade de características e propriedades (fisiologia, metabolitos secundários, enzimas, genoma, etc.), e que permitem longos períodos de armazenamento (Ryan & Smith, 2004). A Tabela 3 apresenta um resumo dos métodos de conservação mais utilizados, vantagens e desvantagens e quais os organismos a que se aplicam. Nas grandes colecções de serviço a liofilização e a criopreservação (em congelador mecânico ou azoto líquido) são os métodos de preservação preferencialmente escolhidos (Ryan & Smith, 2004).

Métodos básicos como a sub-cultura contínua, preservação em água, óleo, areia ou solo, e em sílica gel podem ser adequados na ausência de alternativas. Apesar destes métodos serem inicialmente rentáveis a curto prazo e relativamente simples, comportam riscos, nomeadamente o elevado risco de contaminação e deriva genética das estirpes a longo prazo.

A sub-cultura é um dos métodos mais antigos, e ainda muito utilizado, e consiste na transferência periódica da cultura para um meio fresco. O método de preservação em água

consiste num bloco de agar contendo células adicionado a água estéril ou solução salina (no caso de microrganismos sensíveis a baixas pressões osmótica de soluções hipotónicas) e conservado a baixas temperaturas ou temperatura ambiente. A preservação em óleo consiste na aplicação de uma camada de óleo mineral estéril sobre uma cultura de microrganismos em meio sólido ou líquido, que irá limitar a quantidade de oxigénio disponível e causando uma diminuição no crescimento e no metabolismo do microrganismo. A preservação em areia, solo ou em sílica gel, consiste basicamente na inoculação do microrganismo em areia, solo ou sílica gel estéril e posterior secagem (Smith *et. al.*, 2001).

A liofilização é um método que envolve o congelamento rápido da cultura seguido da sua posterior secagem por sublimação do gelo com pressão reduzida, originando que as culturas permaneçam num estado inactivo e de baixa humidade para menos de 5%, sendo necessário a adição de um crioprotector. O material líquido é congelado em ampolas que são ligadas a uma bomba de vácuo acoplada a um sistema colector de vapor de água. Após a liofilização as ampolas são guardadas à temperatura ambiente ou entre 4-6°C. Este método é o escolhido principalmente para os fungos conidiogénicos, no entanto, não é o ideal para culturas que não esporulem. Em contrapartida, este método permite atingir um tempo de armazenamento entre 20-50 anos e as ampolas podem ser enviadas directamente aos clientes sem ser necessário revitalizar os organismos, diminuindo os portes de envio e danos ao organismo durante o transporte (Ryan & Smith, 2004; Kurtzman *et. al.*, 2011).

A secagem líquida, “*L-Drying*” ou “*Liquid Drying*” é um processo semelhante à liofilização, com a excepção de que as células e a solução criopreservante são apenas secas e não sujeitas a uma congelação prévia. Este método é utilizado em algumas colecções de serviço para preservar bactérias (Morgan *et. al.*, 2006; Smith & Ryan, 2012).

Apesar da eficácia das duas técnicas descritas previamente (liofilização e secagem líquida) estas têm uma baixa taxa de sobrevivência, em particular quando aplicadas a fungos filamentosos. A criopreservação surge então como um método que permite uma conservação longa, e é aplicável a quase todos os tipos de microrganismos, sendo preciso apenas alguns ajustes aos protocolos, e é utilizada pela grande maioria das CC no mundo desenvolvido. Algumas CC utilizam a criopreservação em congelador mecânico de baixas temperaturas, entre -80°C e -150°C, mas a grande maioria utiliza o azoto líquido. De qualquer forma, independentemente do método de criopreservação, é necessário a existência de uma solução crioprotectora, nomeadamente glicerol (Kurtzman *et. al.*, 2011; Smith & Ryan, 2012).

Outras técnicas de criopreservação menos conhecidas são a vitrificação e a criopreservação por encapsulamento que apresentam um elevado potencial para preservar microrganismos recalcitrantes, no entanto, são técnicas demoradas e caras. No caso dos

patogénios obrigatórios ou microrganismos mutualistas a preservação em conjunto com o seu substrato de isolamento ou hospedeiro tem sido estudada (Smith & Ryan, 2012).

**Tabela 3:** Características das várias técnicas de preservação de microrganismos (adaptado de Ryan & Smith, 2004).

<b>Método de preservação</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>	<b>Organismos</b>	<b>Tempo de armazenagem</b>
Sub-cultura	Rentável a curto prazo, método simples	Curto período de tempo de sub-cultura Risco de contaminação e deriva genética	Bactérias (incluindo Actinomicetas), Fungos filamentosos, Leveduras, Protozoários	2 Semanas a 1 ano
Preservação em água	Rentável a curto prazo, método simples	Deterioração da cultura; risco de contaminação e deriva genética	Fungos filamentosos, Leveduras	Até 2 anos
Preservação em óleo	Rentável a curto prazo, método simples	Deterioração da cultura; risco de contaminação e deriva genética	Fungos filamentosos, Leveduras	Até 10 anos
Preservação em areia ou solo	Rentável a curto prazo, método simples	Degeneração da cultura se a humidade for alta; risco de deriva genética	Actinomicetas, Fungos filamentosos	Até 10 anos
Preservação em sílica gel	Rentável, método simples	Toxicidade do gel de sílica	Fungos filamentosos, Leveduras	Até 25 anos
Liofilização	Facilidade e longo tempo de armazenamento; distribuição por ampolas	Método complexo, demorado e caro; não adequado a fungos que não esporulam	Bactérias (incluindo Actinomicetas), Fungos filamentosos, Leveduras, Protozoários	Até 50 anos
Secagem líquida ("Liquid Drying")	Não existe congelamento das células	Equipamento caro	Bactérias	Até 10 anos
Criopreservação (congelador mecânico)	Métodos simples; deterioração de estirpes reduzida	Equipamento caro; necessário fornecimento de electricidade; alguns criopreservantes podem ser tóxicos	Bactérias (incluindo Actinomicetas), Fungos filamentosos, Leveduras, Protozoários	Até 40 anos
Criopreservação (azoto líquido)	Optimização do método para diferentes microrganismos; deterioração de estirpes reduzida	Equipamento caro; necessário controlo de temperatura e de azoto líquido; alguns criopreservantes podem ser tóxicos	Bactérias (incluindo Actinomicetas), Fungos filamentosos, Leveduras, Protozoários	Potencialmente ilimitado

Independentemente do método de preservação escolhido pelas colecções de culturas existe um critério que deve ser observado e colocado em prática pelo pessoal adstrito à colecção que consiste na verificação da viabilidade, pureza e identidade da cultura imediatamente após a preservação de cada estirpe microbiana (Smith & Ryan, 2012).

#### **1.4 Evolução dos métodos de identificação e caracterização de culturas microbianas**

As colecções de culturas devem dominar as técnicas disponíveis para caracterizar, identificar e autenticar as estirpes microbianas. É importante aceder às propriedades e características dos microrganismos para que possam ser utilizados não só na investigação mas também na indústria. Várias técnicas e metodologias de identificação e caracterização de microrganismos são originárias de várias disciplinas biológicas como bioquímica, bacteriologia, micologia e ecologia, de forma a providenciar dados morfológicos, fisiológicos e bioquímicos sobre as diferentes estirpes. Tal informação não só providencia dados sobre estas características como também propriedades dos microrganismos que podem ter importância industrial ou farmacológica (Vaughan-Martini, 2003; Smith *et. al.*, 2008).

O uso de microscopia óptica já permite verificar a pureza das culturas e por vezes distinguir entre grupos de organismos, como por exemplo, nas leveduras em que existe uma diferença na estrutura da parede celular entre ascomicetas e basidomicetas que pode ser confirmada com a utilização de um simples teste de DBB (Vaughan-Martini, 2003).

A taxonomia agrupa organismos relacionados filogeneticamente dentro do mesmo *taxon*, utilizando caracteres informativos ao nível genético em conjunto com os testes convencionais. Os métodos moleculares são cada vez mais utilizados para a identificação de espécies com difícil visualização de características micromorfológicas, como os esporos. Além disso, são uma ferramenta indispensável na análise filogenética dos microrganismos (Kurtzman & Robnett, 1998). A principal vantagem dos métodos moleculares é de serem rápidos, reprodutíveis e acessíveis e, actualmente, a grande maioria das CC tem laboratórios ou acesso a equipamento que permita a utilização destas novas metodologias de identificação molecular (Spencer-Martins, 1994; Pincus *et. al.*, 2007; Smith *et. al.*, 2008).

Muitas das novas técnicas de identificação molecular requerem a obtenção de DNA purificado, que tem de ser extraído das células com a mínima disrupção mecânica do ácido nucleico. Os procedimentos mais comuns passam por provocar a lise das células (através de uma solução de lise) seguida de uma purificação e conservação do DNA numa solução tampão apropriada. “Kits” comerciais e simples encontram-se disponíveis podendo ser utilizados para a extração de DNA humano, animal, bacteriano e fúngico. No entanto, existem alguns fungos filamentosos e plantas cujo DNA é mais difícil de obter devido à natureza das suas paredes

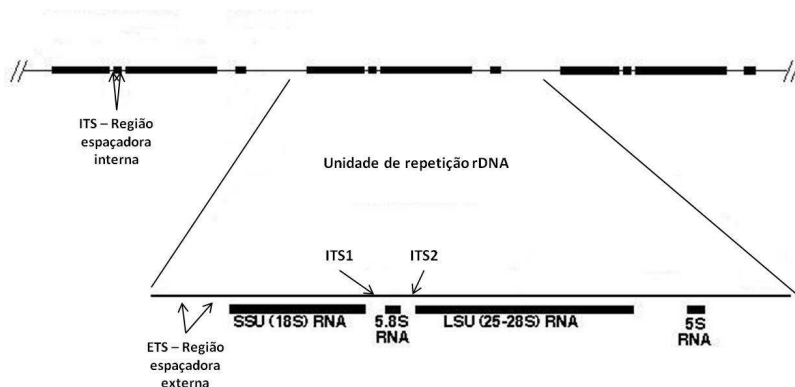
celulares, sendo necessário outras metodologias e/ou protocolos de extração de DNA (Smith *et. al.*, 2008).

Os primeiros métodos moleculares a serem utilizados para a comparação de espécies de microrganismos foram a determinação do conteúdo molar em guanina e citosina (%mol G+C) do DNA genómico e a cinética de reassociação DNA-DNA. A correlação entre a temperatura de desnaturação e a composição do DNA baseia-se no conhecimento de que se estabelecem três ligações de hidrogénio entre as bases de guanina e citosina, enquanto que apenas duas ligações do mesmo tipo são estabelecidas entre a timina e adenina. Uma maior percentagem das primeiras confere maior estabilidade à dupla cadeia e a desnaturação do DNA ocorre a temperaturas mais elevadas. No caso das leveduras, as ascomicetas apresentam genomas com valores de % G+C entre 27 e 50 %, enquanto que as basidiomicetas têm um conteúdo molar em GC que varia entre 50-70%. Considera-se que estirpes pertencentes a uma mesma espécie não divergem em mais do que 2,0-2,5% na %mol G+C (Kurtzman *et. al.*, 2011). No entanto, como a composição em bases não reflecte a sequência nucleotídica do DNA, estirpes com percentagens molares idênticas podem pertencer a espécies diferentes. Composições semelhantes requerem experiências posteriores de reassociação DNA-DNA para determinação da conspecificidade.

As experiências de reassociação DNA-DNA permitiram avaliar a complementaridade global das sequências nucleotídicas do DNA genómico de duas estirpes de leveduras diferentes. A determinação do grau de complementaridade envolve a desnaturação térmica do DNA das amostras e a comparação cinética da renaturação do DNA de cada uma das estirpes e da sua mistura em partes iguais. Estirpes com valores superiores a 70-80% de complementaridade DNA-DNA eram consideradas pertencentes à mesma espécie. Pelo contrário, eram consideradas estirpes de espécies diferentes quando a complementaridade era inferior a 20-30%. Os valores intermédios, entre 30-70% tinham de ser analisados conjuntamente com outras características, podendo corresponder a variedades duma mesma espécie. Deve, no entanto, assinalar-se que existem algumas, embora raras, excepções a estas regras. A determinação do grau de reassociação DNA-DNA revelou que algumas estirpes fenotipicamente distintas correspondiam, de facto, a uma mesma espécie e vice-versa, i.e., que certas estirpes fenotipicamente indistinguíveis representavam espécies diferentes (Kurtzman *et. al.*, 2011).

Nos eucariontes, os genes do RNA ribossómico (rRNA) estão organizados numa unidade de DNA ribossómico (rDNA) que se repete sequencialmente, podendo ocorrer em várias dezenas de cópias por genoma haploide (Fig. 1). A unidade genómica do rDNA possui as seguintes regiões na disposição 5'-3': a região espaçadora externa (ETS), o gene do rRNA 18S

(SSU), a região espaçadora interna (ITS1), o gene do rRNA 5,8S, uma segunda região espaçadora interna (ITS2) e o gene do rRNA 26S (LSU). Este último apresenta sequências menos conservadas em relação aos genes 18S e 5,8S, sendo a região de escolha para estudos de filogenia de espécies e grupos taxonômicos mais relacionados. A região D1/D2 do rDNA 26S tem sido utilizada para diferenciar quase todas as espécies de leveduras estudadas (Kurtzman & Robnett, 1998). Porém, a sequenciação desta região não é capaz de diferenciar todas as espécies de leveduras de afinidade basidiomiceta, sendo necessário a sequenciação conjunta da região ITS (Fell *et. al.*, 2000; Vaughan-Martini, 2003; Pincus, *et. al.*, 2007).



**Figura 1:** Representação esquemática da região do DNA ribossômico dos fungos e maioria dos eucariontes.

A utilização de rDNA na identificação molecular tem uma série de vantagens: (i) os ribossomas estão presentes em todos os organismos; (ii) são estruturas homólogas do ponto de vista funcional e evolutivo; (iii) parecem partilhar uma origem evolutiva comum, pois, apesar de serem muito conservados, revelam diferentes níveis de evolução, podendo funcionar como relógios moleculares; (iv) os genes do rRNA parecem não variar entre os indivíduos contemporâneos, reflectindo somente as relações evolutivas entre os organismos; (v) a totalidade de mais de 6.000 nucleótidos contidos nas sequências de rDNA (26S, 18S, 5.8S e 5S) é suficientemente elevada para resolver filogenias e fazer a respectiva análise estatística; (vi) a utilização de “primers”, para amplificação por PCR, permite o acesso a qualquer zona da unidade de rDNA, simplificando, deste modo, o estudo de um grande número de amostras; e (vii) a existência de bases de dados públicas de rDNA (por exemplo, GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) permite a comparação de sequências de muitos e diversos organismos (Kurtzman *et. al.*, 2011).

O uso de “Multi Locus Sequence Typing” (MLST) tem sido também aplicado para o entendimento da biodiversidade e evolução dos microrganismos, em particular dos fungos. Esta metodologia baseia-se na sequenciação e análise de fragmentos de genes conservados (geralmente “housekeeping genes”), espaçados ao longo do genoma microbiano de pelo

menos 100kb. A grande vantagem desta técnica é que a diferença entre estirpes é indexada directamente nas sequências de DNA. Como estes genes evoluem muito lentamente, tornam-se ideais para estudos de epidemiologia e identificação.

Recentemente, com a introdução de métodos baseados em espectrometria de massa, uma nova metodologia MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight mass spectrometry*) foi introduzida na sistemática. MALDI-TOF combina a vantagem de uma tecnologia de baixo custo com a ionização de proteínas (entre 2 000 a 20 000 Da) de elevada resolução. Actualmente, esta metodologia já é amplamente usada na classificação e identificação de microrganismos com aplicação em diagnóstico clínico, investigação taxonómica ou em controlo de qualidade alimentar (Smith *et. al.*, 2008).

### **1.5 Gestão da informação associada às colecções de culturas**

Um grande volume de informações sobre diferentes microrganismos é gerado em função das actividades de rotina e investigação com as estirpes das colecções de culturas. A informação gerada pode ser referente às características genotípicas e fenotípicas dos microrganismos, aplicações industriais, caracteres taxonómicos, resposta a diferentes métodos de preservação e processos de pedidos de patentes. Existe uma tendência crescente de informatização desses dados.

Sistemas eficientes de documentação e registo (tanto em meio impresso quanto na forma electrónica) do material depositado devem ser adoptados, incluindo a elaboração de formulários (ou fichas) de depósitos os quais devem ser previamente preenchidos pelo depositante. As informações requeridas nestes formulários variam entre as colecções. Entretanto, dados mínimos para a documentação e registo de estirpes devem ser exigidos, tais como: nome do organismo; número da estirpe; número em outras colecções; histórico; tipo de organismo; restrições; condições de crescimento; dados de isolamento (data, nome e localidade); dados taxonómicos (características morfológicas e fisiológicas); referências bibliográficas; nome do depositante (meta-informação). Sistemas informatizados de gestão sobre as estirpes permitem o rastreio rápido de informações associadas e a estruturação de catálogos *on-line*, com actualização periódica. Alguns sistemas de informação permitem incorporar ao registo das estirpes dados diversificados, tais como: fotografias, sequências de DNA, procedimentos padrão para formulação de meios e reagentes, propriedades específicas, aplicações potenciais, entre outros (Robert *et. al.*, 2006).

Na última década tornaram-se acessíveis bases de dados digitais com as informações sobre as estirpes e, actualmente, a maioria das colecções de culturas têm catálogos disponíveis “online” através de aplicações da “web”, em vez da versão impressa. O nível de detalhe



contido no catálogo depende da própria colecção, mas a informação detalhada é um incentivo a que os investigadores e indústria adquiram culturas dessas colecções (Verslype *et. al.*, 2010).

Nos últimos anos tem sido feito um imenso esforço por parte da maioria das colecções em tornar a sua meta-informação disponível à comunidade científica em formatos “user-friendly” e padronizada, permitindo a ligação entre as colecções. Algumas tentativas de tornar esta informação padronizada e acessível foram realizadas no passado mas falharam na obtenção de uma infraestrutura que permitisse o processamento electrónico. Apesar de relativamente recente, a StrainInfo (<http://www.straininfo.net>) é uma plataforma digital que se está a tornar referência ao nível da informação e meta-informação dos microrganismos ao nível da estirpe. Esta plataforma integra informação de várias colecções de culturas e BRCs (ver próximo capítulo), assim como informação sobre as colecções e respectivas culturas. A StrainInfo utiliza a linguagem microbiana comum (MCL – *Microbial Common Language*), desenvolvida para permitir a troca de informação entre as várias bases de dados microbianas. Como resultado disso, a designação das estirpes, a informação histórica do depósito das estirpes nas várias colecções, as características de crescimento, o genoma, e publicações relevantes sobre a estirpe microbiana, são visualizados pelo utilizador de forma a integrarem as várias colecções e centros de recursos. Este sistema apresenta um potencial de evolução elevado, podendo tornar-se uma rede informática global em que os dados microbiológicos sejam directamente utilizados na investigação científica, por exemplo, em estudos de comparação genómica (Verslype *et. al.*, 2010; Dijkshoorn *et. al.*, 2010).

### **1.6 Diversidade de actividades e serviços prestados pelas colecções de culturas**

As colecções de culturas tradicionalmente têm prestado serviços de apoio à comunidade académica, assim como a sectores da indústria que necessitam de serviços de microbiologia. A gama dos serviços especializados oferecidos tem aumentado nos últimos anos devido à crescente procura por parte dos utilizadores. Para além das três actividades básicas das colecções (depósito, manutenção e distribuição), estas disponibilizam uma série de outros serviços também descritos a seguir.

- Depósito: colecções de culturas são centros de conservação de recursos genéticos. Têm como função incorporar continuamente organismos relevantes para estudos científicos e aplicações tecnológicas, e torná-los disponíveis para os clientes interessados. Um dos serviços que a grande maioria das colecções de serviço disponibiliza, e que tem um interesse particular para a indústria, é o fornecimento de serviços “safe-deposit”. Algumas colecções têm a possibilidade de manter estirpes de importância industrial em condições óptimas, só sendo permitido o acesso às mesmas ao depositante. Isto permite, por exemplo, que a indústria

mantenha o “trade secret”, ou seja, tenha uma cópia das estirpes com interesse industrial numa colecção de culturas e que apenas o depositante tenha acesso a essas estirpes, sem necessitar de patentear o microrganismo em questão (Kirsop, 1984; Boundy-Mills, 2012).

- **Preservação e manutenção:** as culturas microbianas são preservadas e mantidas pelas colecções de culturas de forma a garantir a sua sobrevivência, estabilidade e pureza durante períodos prolongados de tempo, empregando métodos de preservação adequados (Kirsop, 1984).
- **Distribuição:** as colecções de culturas de serviço têm como função a distribuição de culturas para os interessados capacitados para a sua utilização.
- **Serviços de identificação:** a preservação e a manutenção de microrganismos requer um conhecimento preciso das estirpes depositadas na colecção. Assim, muitas colecções possuem pessoal qualificado e oferecem serviços de identificação. A realização deste tipo de serviço por uma colecção pode ser mais eficiente e economicamente vantajosa para o cliente, além de possibilitar interações técnicas e científicas entre a colecção e os seus utilizadores provenientes de instituições de investigação e/ou sector industrial (Spencer-Martins, 1994; Boundy-Mills, 2012).
- **Informação:** as actividades de rotina e investigação com estirpes microbianas resultam numa quantidade significativa de informação de natureza científica e tecnológica. Essa informação, quando não for de carácter confidencial, deve estar organizada de forma coerente e ser disponibilizada aos utilizadores, sendo tão importante como a estirpe. A disponibilização de dados de caracterização taxonómica e tecnológica de estirpes de uma colecção favorece e facilita a busca de organismos para aplicações específicas, bem como contribui para o conhecimento sobre os próprios organismos.
- **Depósito de patentes:** as colecções de culturas podem actuar como centros depositários de culturas-patentes ou envolvidas em processos de patentes. O patenteamento de processos que envolvem a utilização de estirpes microbianas, ou mesmo estirpes de organismos geneticamente modificados (OGM), tem crescido muito nos últimos anos (Boundy-Mills, 2012).
- **Formação de pessoal:** as colecções de culturas desempenham um papel importante em programas de formação, principalmente em áreas como preservação, manutenção, taxonomia e identificação de microrganismos.
- **Investigação:** as colecções de culturas realizam investigação de interesse específico, por exemplo em métodos de preservação, manutenção de culturas e taxonomia. Muitas colecções realizam projectos com outras instituições ou empresas do sector biotecnológico para

pesquisa de estirpes microbianas para aplicações específicas em processos industriais (Spencer-Martins, 1994).

- Consultadoria: devido à natureza das suas actividades, as colecções de culturas tendem a concentrar especialistas em taxonomia e biologia de diversos grupos de microrganismos sendo muitas vezes chamados a dar pareceres.

De acordo com a WDCM ([www.wfcc.info/ccinfo/statistics/](http://www.wfcc.info/ccinfo/statistics/)) são vários os serviços fornecidos pelas CC (Tabela 4). Como se pode observar o depósito (inclusive patentes) e distribuição de estirpes são dos serviços mais importantes das colecções de culturas. No entanto, nos últimos anos, têm aumentado os serviços de identificação de estirpes por parte das colecções, assim como, serviços de consultadoria a empresas de biotecnologia, de produção alimentar, farmacêuticas e governamentais, até à definição de políticas científicas e legislativas.

**Tabela 4:** Tipo de serviços disponibilizados pelas colecções de microrganismos no mundo (dados da WDCM).

Tipo de serviços	Número de Colecções
Depósito de estirpes	270
Depósito de patentes	90
Distribuição	288
Identificação	308
Formação de pessoal	261
Consultadoria	270

As colecções de culturas não são, portanto, meros “repositórios” e arquivos de estirpes, são por excelência centros de conservação de culturas *ex situ*, mantendo e estudando um *pool* genético para usufruto de gerações futuras, e oferecem serviços fundamentais para a comunidade científica e industrial do país. É ainda de salientar que muitas revistas de índole científica exigem que os materiais biológicos descritos em publicações estejam depositados em colecções de culturas e estejam acessíveis à comunidade científica (Boundy-Mills, 2012).

### **1.7 Papel das colecções de culturas e a sua intervenção na definição de políticas científicas, regulamentares e técnicas**

Os microrganismos podem contribuir com soluções para os problemas da sociedade em geral e têm um papel importante no desenvolvimento sustentável uma vez que a biodiversidade microbiana, na maior parte inexplorada, poderá gerar um valor económico através do conhecimento de como as espécies se regulam umas às outras, e na extração de compostos activos com interesse biotecnológico e farmacêutico. (Smith, 2003; Spencer-Martins, 1994). Nos últimos anos tem existido um aumento do uso de organismos geneticamente modificados em variadíssimas utilizações e de utilização de compostos activos

provenientes dos variados recursos biológicos na indústria alimentar e/ou farmacêutica, que levantaram questões éticas (por exemplo, uso de material genético humano e necessidade de confidencialidade e consentimento) que têm de ser regulamentados pelos decisores políticos. As colecções de culturas surgem, então, como uma fonte importante de conhecimento no desenvolvimento e implementação de políticas, uma vez que esse conhecimento tem um elevado potencial industrial, económico, biotecnológico e farmacêutico (OECD, 2007).

As colecções de culturas activas encontram-se numa posição privilegiada, especialmente com a experiência que detêm em técnicas de taxonomia molecular, para participarem na avaliação *in situ* e manutenção *ex situ* dos recursos genéticos, de que dependem futuras aplicações em saúde, agricultura, produção alimentar, biotecnologia, farmacologia, etc. (Spencer-Martins, 1994). As colecções providenciam, assim, experiência e conhecimentos que permitem aos governos formular políticas sobre recursos biológicos e assegurar informação e segurança ao público, podendo servir como interface entre os governos e a indústria e o público em geral, ajudando, inclusive, os governos e público a desenvolver regulamentos e directivas sobre boas práticas do uso seguro e ético dos recursos biológicos (OECD, 2007).

Nos países em desenvolvimento, as colecções de culturas não têm merecido a devida atenção de formuladores de políticas para biotecnologia, agências de financiamento e órgãos governamentais. Geralmente as colecções são consideradas subprodutos da investigação, em especial da investigação básica, e as suas actividades e manutenção são consideradas atribuições e responsabilidades dos próprios investigadores. Nesses países, o governo e grande parte do sector empresarial privado ignoram a importância dessas colecções como infraestruturas relevantes para a inovação tecnológica e para a competitividade industrial. Em contraponto, colecções de culturas e bancos genómicos são considerados peças fundamentais em programas de bioprospecção e desenvolvimento em empresas que actuam no sector da biotecnologia em países industrializados. Cabe às colecções o papel de ajudar os governos dos países com uma biodiversidade rica compreender o imenso potencial natural e sustentável que detêm

A consolidação das principais colecções internacionais como infraestruturas para a prestação de serviços ocorreu nas últimas décadas do século XX. O mesmo não ocorreu com as colecções de países em desenvolvimento, principalmente em função da ausência de políticas adequadas para o sector e da falta de procura industrial qualificada. Na década de 1990, mudanças de cariz político, regulatório e tecnológico afectaram de forma profunda a operação de colecções de serviço de interesse biotecnológico, criando novos desafios que devem ser superados. Entre eles destaca-se a necessidade de desenvolvimento de capacidade institucional (infraestrutura e recursos humanos) para atender às novas regras estabelecidas

na Convenção sobre Diversidade Biológica. Mudanças na legislação internacional referente às questões de bioética, bioterrorismo e segurança biológica, resultaram na imposição de medidas muito restritivas no acesso a material biológico patogénico. Essas restrições incluem o acesso a material de referência, fundamental para o controle epidemiológico de doenças infecciosas, controle de pragas agrícolas e testes de qualidade de produtos industrializados. Esse tipo de restrições podem, no entanto, trazer mais valias aos países em desenvolvimento, uma vez que se tiverem uma política protecionista podem proteger a sua biodiversidade e as colecções de culturas tornam-se as infraestruturas ideais para conservarem e protegerem essa biodiversidade.

A Grã-Bretanha foi um dos primeiros países a reconhecer a necessidade de uma política nacional para a conservação de culturas microbianas. A Rede Britânica de Colecções de Culturas de Microrganismos originou-se de uma conferência de especialistas realizada em 1947, na qual se decidiu pelo estabelecimento, com recursos do governo, de um sistema descentralizado de colecções sediadas em diferentes instituições actuantes em áreas diversas da microbiologia básica e aplicada, composta por 9 colecções de serviço. Em 1996, e no seguimento da estratégia do governo para as colecções microbianas foi criado o UKNCC (*United Kingdom National Culture Collection*) com o objectivo de coordenar as actividades, investigação e *marketing* das colecções nacionais britânicas. Em resultado da experiência e conhecimento proveniente das colecções britânicas, em 2001 a UKNCC publicou um manual de gestão e procedimentos para as colecções de culturas (Smith *et. al.*, 2001).

Em Portugal, em resposta ao relatório da OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) sobre os Centros de Recursos Biológicos de 2001 (OECD, 2001), foi realizado um primeiro relatório, entregue ao Ministério de Ciência e Tecnologia, sobre o estado das colecções de microrganismos na tentativa de estabelecer uma rede nacional de Colecções de Culturas de Microrganismos que conduzisse à criação de um BRC nacional (Lima & Spencer-Martins, 2001). Em 2006 foi proposto a criação de uma Rede Portuguesa de Colecções de Culturas Microbianas (RPCCM) com os seguintes objectivos (Lima *et. al.*, 2006): (i) melhorar o desempenho na conservação dos recursos biológicos em Portugal; (ii) atingir níveis de qualidade com padrões reconhecidos nacional e internacionalmente; (iii) informatizar dados e serviços; (iv) criação da RPCCM; (v) criação do catálogo nacional virtual de culturas microbianas; (vi) criação de um portal único de acesso ao catálogo virtual da RPCCM; (vii) criação de mecanismos de transferência de material e de protecção da propriedade intelectual; (viii) implementação dos princípios de segurança para salvaguarda do material; (ix) implementação de uma cultura científica nacional que permita garantir o depósito dos novos isolamentos microbianos na RPCCM; (x) participação nas iniciativas e organizações

internacionais relevantes; (xi) auxiliar a criação de uma entidade independente para acreditação/certificação dos BRCs nacionais. Contudo não existem dados de que esta iniciativa tenha sido bem sucedida, o que poderá vir a acontecer com a implementação do MIRRI (ver ponto 2.6).

## **2 Levantamentos de iniciativas e directivas internacionais sobre colecções de culturas**

### **2.1 Conceito de Centros de Recursos Biológicos e programa MIRCEN da UNESCO**

O conceito de Centros de Recursos Biológicos (BRC – *Biological Resource Centres*) foi lançado nos fins dos anos 40 do século XX pela UNESCO-MIRCEN. Em 1974 o Programa para o ambiente das Nações Unidas (UNEP – *United Nations Environmental Program*) estabeleceu o consórcio MIRCEN (*Microbial Resources Centres*) com o objectivo de preservar e explorar a diversidade microbiana e tecnologia resultante, e torná-las acessíveis aos países em vias de desenvolvimento, assim como apoiar as actividades de investigação e desenvolvimento nas áreas da microbiologia ambiental e biotecnologia.

A relevância dos BRC tem vindo a consolidar-se com o aumento da percepção política e pública da importância dos recursos biológicos e genéticos. A OECD considera “recursos biológicos” como o conjunto de organismos vivos, células, genes e informação a eles associada, que, por sua vez, são os materiais utilizados na investigação e desenvolvimento das ciências naturais e no avanço da biotecnologia e saúde (OECD, 2001).

O acesso aos recursos biológicos requer a existência de centros de depósito e distribuição, nomeadamente BRCs. Considerando a tremenda evolução da biotecnologia e bioeconomia na década de 90 do século passado, em 1998, o Japão tomou a iniciativa de propor à OECD os BRCs como elementos chave da infraestrutura científica e tecnológica para as ciências da vida e biotecnologia, responsáveis pela preservação e distribuição dos materiais biológicos e informação e em 1999 a OECD estabeleceu um grupo de trabalho (Fase 1: 1999-2001) para discutir os desafios e as oportunidades associadas ao estabelecimento de uma Rede Global de BRCs, a ser consolidada a partir das colecções de serviço credenciadas. Como resultado deste esforço, em Fevereiro de 1999, realizou-se em Tóquio um *workshop* da OECD dedicado aos BRCs. Passados 2 anos, em 2001 a OECD publica o relatório “*Biological Resources Centres – Underpinning the Future of Life Sciences and Biotechnology*”, que define o conceito de BRC e recomenda o estabelecimento de uma Rede Global de BRCs (OECD, 2001; Lima, 2007).

De acordo com a definição da OECD, os BRCs são “uma parte essencial das infraestruturas de sustentação das ciências da vida e da biotecnologia. Consistem em prestadores de serviços e repositórios de células vivas, genomas de organismos e informação relacionada com a hereditariedade e funções dos sistemas biológicos. Os BRCs contêm colecções de culturas de organismos (microrganismos, células de plantas, animais e humanas), as suas partes replicativas (genomas, plasmídeos, vírus e cDNAs) e ainda organismos não cultiváveis, células e tecidos, assim como bases de dados contendo informações moleculares, fisiológicas e estruturais relevantes para estas colecções e a bioinformática associada” (OECD, 2001). Muitas das funções dos BRCs são transversais às próprias colecções de culturas (ver capítulos anteriores) com a diferença de que os BRCs devem obedecer a padrões de qualidade internacionais, assim como serem centros de conservação dos recursos biológicos, tal como enfatizado pela Convenção sobre a Diversidade Biológica (CBD). Outra diferença é que os BRCs podem servir como repositório de microrganismos com o propósito de procedimentos de patentes.

Entre as funções e serviços prestados pelos BRCs destacam-se (i) Centros de Recursos Genéticos para a conservação e arquivo da diversidade biológica e variabilidade genética, fornecimento de culturas para a biotecnologia, distribuição de material de referência para controle de qualidade, selecção de material biológico para uso industrial, aplicações das culturas em diversas áreas da saúde, agricultura, meio ambiente e educação; (ii) Centros de Informação para organização e disponibilização de dados taxonómicos e tecnológicos sobre o material biológico, disponibilização da informação sobre as culturas para o ensino, investigação e biotecnologia; (iii) Centros de Formação sobre a preservação do material biológico, a bioinformática e informática, a biodiversidade, biosistemática e taxonomia; (iv) Centros de Serviços Especializados com capacidade de realizar caracterização taxonómica do material biológico, controle e testes de qualidade, e depósito de material biológico para fins de patente.

## **2.2 Transição das Colecções de Culturas para Centros de Recursos Biológicos**

A definição da estratégia de implementação da Rede Global de BRCs foi objecto de estudo de um novo grupo de trabalho estabelecido no âmbito do Programa de Biotecnologia da OECD (Fase 2: 2002-2004). Nesta segunda fase da iniciativa da OECD os esforços foram concentrados na discussão e definição de critérios de acreditação de acordo com normas internacionalmente aceites, critérios de qualidade e padrões de operação dos BRCs e na abordagem de questões associadas à biossegurança e harmonização da legislação (OECD, 2004). Na reunião de ministros de Ciência e Tecnologia da OECD, realizada em Janeiro de 2004,

o Comité de Políticas em Ciência e Tecnologia (*Committe for Science and Technology Policy – CSTP*) ressaltou que o desenvolvimento da biotecnologia será um elemento crítico no crescimento económico sustentável indicando que a Rede Global de BRCs deverá ser um componente fundamental na infraestrutura necessária para o desenvolvimento da bioeconomia. O CSTP recomendou que a OECD empenhasse esforços visando o desenvolvimento de uma Rede Global de BRCs, incluindo a harmonização de padrões para a interoperabilidade entre sistemas de informações, adopção de medidas de segurança adequadas, orientação na gestão da arquitectura institucional e no financiamento, entre outras medidas até ao final de 2006 (OECD, 2004). Em resultado desta recomendação a OECD lança em 2007 o guia de boas práticas para os BRCs (*OECD Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres*) com o intuito de fornecer, não só aos BRCs mas também às colecções de serviço que queiram transitar para BRCs, sugestões para uma boa gestão da qualidade (OECD, 2007).

O material biológico certificado é um recurso de alto valor agregado presente em inúmeros produtos dos mais diversos sectores da economia. Logo no primeiro relatório da OECD sobre definição dos BRCs, esta aponta inequivocamente para a necessidade do reforço e modificações das colecções de culturas, no sentido destas estarem à altura das necessidades do século XXI, aderindo a sistemas de qualidade definidos internacionalmente, e aumentando o seu perfil público de modo a serem reconhecidas como Centros de Recursos Biológicos pelas autoridades do país de origem (Smith & Ryan, 2001; Lima, 2007). Considerando que a definição de recurso (fonte ou possibilidade de ajuda) transmite uma mensagem positiva, em contraste com “cultura” que não faz qualquer declaração de valor, torna-se importante que as colecções, as instituições em que estão sediadas e projectos em que estão envolvidas, reconsiderem e reinterpretem os seus objectivos numa linguagem actual; o erro em não fazê-lo poderá colocar a sua sobrevivência em risco (Hawksworth, 2004).

A implementação de um Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) é fundamental para garantir a padronização do processo, minimizar erros e produzir resultados fiáveis visando a satisfação do cliente. Dessa forma, a Colecção de Cultura e/ou BRC que tiver um SGQ implementado e mantido consegue a redução de desperdício, aumento da produtividade, maior motivação dos funcionários, maior satisfação dos clientes, maior controle da administração e, conseqüentemente, um maior nível de organização interna. Para o desenvolvimento de um SGQ é importante escolher as regras correctas para aplicação pois existem normas específicas para cada caso. A qualidade não depende só do esforço e do trabalho de cada um. Para garantir a qualidade, é preciso seguir um conjunto de requisitos, definidos em normas.



Apesar de já existirem algumas directivas para um bom funcionamento e política de qualidade para as colecções de culturas, nomeadamente “WFCC *Guidelines for the establishment and operation of collections of microorganisms*” (<http://www.wfcc.info/guidelines/>) o sistema de qualidade da UKNCC (<http://www.ukncc.co.uk/>) e as normas do CABRI (<http://www.cabri.org/>), algumas colecções optaram pela implementação do sistema internacional ISO, nomeadamente ISO 17025 ou as séries ISO 9000 ou ISO 9001 (Smith & Ryan, 2012) (Tabela 5).

**Tabela 5:** Colecções europeias que operam sob um sistema de certificação ou acreditação independente (adaptado de Smith & Ryan, 2012).

<b>Colecção</b>	<b>Sistema</b>
<b>CABI-CAB</b> International Genetic Resource Colelction, UK	Parte do ISO 17025
<b>CBS</b> – Centraalbureau voor Schimmelcultures, Holanda	ISO 9000:2000
<b>CECT</b> – Coleccion Espanola de Cultivos Tipos, Espanha	ISO 9000:2000
<b>DSMZ</b> – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen un Zellkuturen, Alemanha	ISO 9000:2000
<b>MUCL</b> – Mycology, University Louvain la Neuve, Bélgica	ISO 9000:2000
<b>MUM</b> – Micoteca da Universidade do Minho, Portugal	ISO 9001:2008
<b>NCYC</b> – National Collection of Yeast Cultures, UK	ISO 9000:2000

A ISO 17025 - Requerimentos gerais para Laboratórios de Ensaio e Calibração - é uma norma padrão usada para a padronização de testes para laboratórios de ensaio e calibração. Há muitos aspectos comuns com a norma padrão ISO 9000, porém a ISO 17025 não é apenas uma certificação, serve para comprovar que um laboratório executa as suas actividades com precisão, garantindo que o resultado final seja de alta qualidade (IPAC, 2010). As séries ISO 9000 e ISO 9001 são conjuntos de requisitos que são aplicados no processo de funcionamento das colecções e/ou instituições. Em Portugal a Norma NP EN ISO 9000:2000 estabelece os fundamentos de sistemas de qualidade e especifica a terminologia que lhe é aplicável; a Norma NP ISO 9001:2008 especifica os requisitos de um sistema de qualidade a utilizar sempre que a organização tem necessidade de demonstrar a sua capacidade para fornecer produtos ou serviços que satisfaçam tanto os requisitos dos seus clientes como dos regulamentos aplicáveis e tenha em vista o aumento da satisfação dos clientes.

Se uma colecção fornecer material biológico não-conforme (material contaminado ou identificado incorrectamente, por exemplo), pode prejudicar seriamente os seus clientes. Os clientes esperam receber culturas puras e autenticadas para assegurar as características dos seus produtos. Para garantir a rastreabilidade das estirpes fornecidas e a segurança e a confiabilidade no fornecimento dessas estirpes é necessário que sejam implementadas normas específicas de qualidade.

### 2.3 Convenção sobre a Diversidade Biológica (CBD)

Os microrganismos têm sido reconhecidos como fazendo parte da biodiversidade global, sendo inclusive fundamentais para a sobrevivência e sustentabilidade das plantas e animais. Os produtos resultantes da actividade microbiana, refinados e purificados pela biotecnologia, permitem o acesso a recursos que apesar de difícil quantificação *in situ* podem tornar-se economicamente viáveis. É esta incerteza sobre o valor dos microrganismos que levou a que fossem incluídos na Convenção sobre a Diversidade Biológica (CBD – *Convention on Biological Diversity*) mas a não estarem presentes nos primeiros estádios da implementação da mesma por parte dos governos (Kirsop, 1996). A CBD é um tratado internacional assinado durante a Cimeira da Terra que decorreu no Rio de Janeiro, Brasil, entre 3 e 14 de Junho de 1992 e, entrou em vigor a 29 de Dezembro de 1993, sendo visto como documento chave no desenvolvimento sustentável. A CBD foi ratificada por 188 Estados, incluindo Portugal (Decreto-Lei nº 21/93 de 29 de Junho) onde entrou formalmente em vigor no Dia Mundial da Floresta (21 de Março de 1994) (Lima, 2007).

Pela primeira vez, foi reconhecido internacionalmente pela CBD, que a conservação da diversidade biológica é “uma preocupação para a humanidade” e deve ser parte integral no processo de desenvolvimento. A CBD compreende três grandes objectivos (Artigo 1): (i) conservação da diversidade biológica (biodiversidade); (ii) uso sustentável dos seus componentes; (iii) partilha dos benefícios provenientes dos recursos genéticos (Smith, 2003; Lima, 2007). O acordo cobre os três níveis da diversidade biológica (Artigo 2), os ecossistemas, espécies e recursos genéticos. O Artigo 2º da convenção define uma série de conceitos, inclusive recursos genéticos, como “material genético de valor potencial”, sendo que considera o material genético como “material de origem animal, de plantas ou de microrganismos ou de outra origem desde que contenha partes funcionais hereditárias”. Outro conceito é o de conservação *ex situ* que é definido como “conservação de componentes da diversidade biológica fora do seu habitat natural” e conservação *in situ* como “conservação de ecossistemas e habitats naturais assim como, manutenção e recuperação de espécies viáveis no seu ambiente natural e no caso de espécies cultiváveis domesticadas no ambiente onde desenvolveram as suas propriedades distintas” (UN, 1992; Glowka, 1996).

Uma das características da convenção é que faz a ligação entre os esforços de conservação tradicionais com o potencial económico do uso sustentável dos recursos biológicos. Estabelece princípios para a repartição equitativa dos benefícios da utilização dos recursos genéticos, nomeadamente os destinados a uso comercial. É importante referir que a CBD é juridicamente vinculativa, ou seja, os países (“Partes”) que aderirem à convenção são obrigados, judicialmente, a aplicar as disposições (Glowka, 1996). A CBD assume o princípio de

que os Estados têm o direito soberano de explorar os seus próprios recursos segundo as suas políticas ambientais, e a responsabilidade de assegurar que actividades sob a sua jurisdição, ou controlo, não causem dano ao meio ambiente de outros Estados ou de áreas além dos limites da jurisdição nacional (Artigo 3) (UN, 1992). A CBD recomenda monitorização e identificação da biodiversidade (Artigo 7) e o estabelecimento de locais para conservação *ex situ*, ou seja, a criação de CC e/ou centros de recursos biológicos (Artigo 9). Assim a CBD passa a ser a grande dinamizadora na formação e manutenção de CC (Artigo 12), reconhecendo os direitos de soberania dos estados sobre os seus recursos naturais, assim como a autoridade de legislar sobre esses recursos (Artigo 17) (UN, 1992; Smith, 2003; Lima, 2007). Para a observância e aplicação da CBD criou-se a Conferência das Partes (COP), o Órgão Subsidiário para Aconselhamento Científico Técnico e Tecnológico (SBSTTA), os grupos de trabalho (WG) e o órgão financeiro (GEF).

Torna-se, então, necessário determinar se a soberania ou os direitos de propriedade dos microrganismos são cobertos pela legislação do país de onde foram amostrados e/ou isolados e, se assim for, obter o Consentimento Prévio Informado (PIC- *Prior Informed Consent*) das autoridades competentes. Os termos de acessibilidade do material biológico devem ser negociados entre as partes interessadas e documentados no PIC e/ou num Acordo de Transferência de Material (MTA – *Material Transfer Agreement*). A maioria dos BRCs pede ao depositante do material biológico a obtenção de PIC pelo material isolado uma vez que este pode afectar as condições no fornecimento de culturas por parte dos BRCs. Uma das iniciativas mais abrangentes na implementação da CBD ao nível microbiano foi o código de conduta MOSAICC (*Microorganisms Sustainable Use and Access Regulation International Code of Conduct*) ([www.belspo.be/bccm/mosaicc](http://www.belspo.be/bccm/mosaicc)), elaborado para facilitar o acesso a recursos genéticos microbianos e apoiar os parceiros a realizarem os acordos necessários aquando da transferência de material biológico entre os vários BRCs através de um MTA ou PIC (Smith, 2003; Janssens *et. al.*, 2010).

A CBD abrange outras iniciativas importantes para a conservação da biodiversidade e requisitos que devem ser assegurados pelos BRCs, tal como a Iniciativa Global da Taxonomia (*Global Taxonomy Initiative* [www.cdb.int/gti/](http://www.cdb.int/gti/)) que salienta a importância da nomenclatura correcta dos organismos na conservação e uso sustentável da diversidade; o Protocolo de Cartagena para a Bio-segurança (*Cartagena Protocol on Biosafety* [www.cd.int/biosafety/](http://www.cd.int/biosafety/)) que é um acordo suplementar da CBD, que entrou em vigor a 11 de Setembro de 2003 e que aborda o desenvolvimento e transferência de tecnologia, partilha de benefícios e as questões relativas à biossegurança; e Acesso e Partilha de Benefícios (*Access and Benefit Sharing* [www.cdb.int/abs/](http://www.cdb.int/abs/)) que reporta ao terceiro objectivo da CBD em que as partes devem partilhar

os conhecimentos e tecnologias provenientes da partilha da biodiversidade (Janssens *et. al.*, 2010).

#### **2.4 Federações internacionais de colecções de culturas: WFCC e ECCO**

A WFCC (*World Federation for Culture Collections*) foi fundada em 1963 e é uma comissão multidisciplinar da IUBS (*International Union of Biological Sciences*). Actualmente a WFCC possui mais de 500 membros incluindo colecções de culturas em mais de 60 países. A WFCC organiza reuniões plenárias a cada quatro anos e “workshops” e cursos pelo menos uma vez por ano. Uma das actividades principais da WFCC é promover a troca de informação sobre taxonomia microbiana e colecções microbianas entre as colecções microbianas tradicionais, desempenhando um papel importante no desenvolvimento das normas científicas destinadas a melhorar a qualidade e funções dessas colecções, assim como na procura de apoio financeiro para essas funções. Neste âmbito a WFCC publicou em 2010 um Guia para o Estabelecimento e Operação de Colecções de Culturas de Microrganismos com o objectivo de implementar as normas da OECD para os BRCs e CC (ver capítulo 2.4) e providenciar um documento que possa ajudar as CC (WFCC, 2010).

Como parte dos esforços de promover o apoio às colecções de culturas, a WFCC, em colaboração com a UNEP/UNESCO, desenvolveu uma base de dados internacional sobre colecções de culturas, o WFCC-WDCM (*WFCC-MIRCEN World Data Centre for Microorganisms*), mantida pelo Instituto Nacional de Genética (NIG – *National Institute of Genetics*) no Japão e que constitui um importante recurso de informação (Lima, 2007).

Um dos papéis mais importante desempenhado pela WFCC foi o apoio na criação e implementação do Tratado de Budapeste sobre o Reconhecimento Internacional de Depósito de Microrganismos para Efeitos do Procedimento em Matéria de Patentes. Este tratado internacional, assinado em Budapeste, Hungria, em 28 de Abril de 1977, tem a finalidade de atender à exigência legal da existência e pedidos de patentes que utilizam microrganismos. A partir deste tratado cada país criou as Autoridade Internacionais de Depósito (IDA – *International Depository Authority*) com a finalidade de facilitar os custos e requisitos necessários para o depósito de um microrganismo com utilizações patenteadas nos países de interesse comercial para o depositante.

Já a nível europeu, as colecções de culturas europeias começaram a colaborar desde 1982, com o estabelecimento da ECCCO (*European Culture Collection Curators Organisation*) pelos Coordenadores e Curadores das colecções de serviço, com o propósito de discutir a política comum, troca de tecnologias e projectos comuns. Com a abertura da organização a outros membros das colecções e microbiólogos, a organização mudou o seu nome para ECCO

(*European Culture Collection Organisation*) (<http://www.eccosite.org>). Actualmente a organização contém cerca de 65 membros incluindo 57 colecções que contém cerca de 350 000 estirpes microbianas (Lima, 2007).

Nos últimos anos tem havido uma serie de projectos comuns entre os membros da ECCO, nomeadamente o projecto EBRCN (*European Biological Resource Centre Network*), que segue as linhas do projecto do catálogo electrónico CABRI, e visa estabelecer normas operacionais para o funcionamento dos centros de recursos biológicos europeus em colaboração com a iniciativa para os BRCs da OECD e a WFCC (Smith, 2003).

## **2.5 Relatórios e iniciativas da OECD**

Em 1995, o Forum Megaciência da OECD propôs a discussão do tema *Biodiversity Informatics* em que foi identificado o problema do tratamento informático da informação da diversidade biológica e surgiu a recomendação da criação do GBIF (*Global Biodiversity Information Facility*). A GBIF tem como missão: (a) tornar disponível de forma livre e geral, via Internet, os dados mundiais de Diversidade Biológica para benefício da ciência e da sociedade; (b) implementar mundialmente uma rede de nós baseada numa arquitectura de distribuição de dados e de *software* aberto; (c) respeitar uma política intelectual reconhecendo os direitos sobre os dados. Em 2006 foi criado um grupo de trabalho português com o objectivo de criar a Infraestrutura Portuguesa de Informação da Diversidade Biológica (GBIF.PT) com a missão de facilitar o acesso da informação sobre a diversidade biológica em Portugal, nomeadamente a contida nas colecções biológicas e inventários de campo.

O relatório de 2001 "*Biological Resources Centres – Underpinning the Future of Life Sciences and Biotechnology*" aparece 19 anos após o primeiro relatório da OECD sobre a biotecnologia de 1982 "*Biotechnology – Tendências e Perspectivas Internacionais*" (*Biotechnology – International Trends and Perspectives*) numa fase em que os especialistas e decisores políticos ainda estavam a tentar descortinar esta nova tecnologia (biotecnologia) e a sua relevância (OECD, 2001).

A aplicação dos recursos naturais às várias áreas da indústria biotecnológica originou em 2004 o relatório: "*Biotechnology para o Crescimento e Desenvolvimento Sustentável*" (*Biotechnology for sustainable Growth and Development*) que realça a importância das ciências naturais e da biotecnologia na obtenção de produtos que poderão ter interesse nas várias áreas da indústria biotecnológica, nomeadamente farmacologia, agricultura, ambiente ou produção de energia (OECD, 2004).

Em consequência das recomendações da OECD para a formação dos BRCs, novas considerações tiveram que ser estudadas, nomeadamente no diz respeito às normas de boas

práticas e à bio-segurança dos BRCs. O documento da OECD sobre Boas Práticas dos BRCs (OECD, 2007) proporciona uma harmonização das políticas, processos e procedimentos das colecções, nomeadamente: (1) requisitos processuais; (ii) procedimentos no que diz respeito ao manuseamento, autenticação, preservação e distribuição dos organismos; (iii) registo, validação e acesso a dados; (iv) cumprimento das regras nacionais e internacionais, assim como regulações e legislações; (v) auditoria e procedimentos de avaliação.

O documento está dividido em duas partes: a Parte 1 apresenta a justificativa e o desenvolvimento que levou à realização do projecto e a Parte 2 apresenta as boas práticas, estando dividida em: Directivas de Boas Práticas para todos os BRC, Directivas de Boas Práticas em Biossegurança para os BRCs, Directivas de Boas Práticas para o Domínio dos Microrganismos e Directivas de Boas Práticas para o Material Derivado de Humanos. Ainda na Parte 2, existe um item que apresenta as questões relacionadas com a certificação nacional dos BRCs e um item referente à avaliação dos custos para a implementação das Directivas da OECD. Essas Directivas devem ser seguidas para atingir as boas práticas em aquisição, manutenção e fornecimento de material biológico e para assegurar um material biológico de alto padrão e autêntico. Além disso, a implementação destas Directivas garante a obtenção de um banco de dados fiável em diferentes laboratórios e contribui para a protecção da saúde da equipa, do público e do meio ambiente (OECD, 2007).

Entre as principais recomendações citadas no guia de boas práticas para os BRCs destaca-se: (i) adequação da estrutura física e dos equipamentos utilizados para a preservação das culturas; (ii) utilização dos equipamentos de protecção individual no manuseamento dos microrganismos; (iii) adopção de procedimentos operacionais padrão na preparação de reagentes e meios de cultura; (iv) fluxograma de recepção e manuseamento dos isolados; (v) emprego de métodos de preservação a longo prazo, considerando-se que estes devem garantir a viabilidade elevada e recuperação da cultura preservada; (vi) monitorização para prevenir a contaminação e garantir a autenticidade da cultura, através de testes bioquímicos, fisiológicos e/ou moleculares; (vii) validação dos procedimentos para garantir a fiabilidade e reprodutibilidade dos métodos. No capítulo relativo especificamente à preservação dos fungos, o guia recomenda a utilização de pelo menos dois métodos, sendo um deles obrigatoriamente a liofilização ou a criopreservação (azoto líquido ou abaixo dos  $-80^{\circ}\text{C}$ ), uma vez que para a maioria dos microrganismos, estes são os melhores métodos para a manutenção da estabilidade genética (OECD, 2007).

Mais recentemente, a aplicação biotecnológica à produção de bio-energia deu origem ao relatório da OECD: “A Bioeconomia até 2030: criação de uma agenda política” (*The Bioeconomy to 2030: designing a policy agenda*) que realça o potencial económico das ciências

biológicas em termos de produtos e serviços. É expectável que até 2030 os produtos provenientes da biotecnologia e da bio-energia constituam cerca de um terço da produção industrial, sendo que os microrganismos constituem uma fonte rica de matéria prima para a biotecnologia e constituem uma base de apoio transversal às várias áreas de desenvolvimento biotecnológico (Arundel & Sawaya, 2009).

## 2.6 Projectos de cooperação internacionais: GBRCN e EMbaRC

Projectos de cooperação internacionais são essenciais para melhorar o fornecimento e acessibilidade do material biológico e informação global. Para que as ligações entre os vários BRCs sejam bem sucedidas, tem de existir uma implementação da tecnologia que permita a combinação e coordenação dos catálogos e bases de dados dos diferentes centros de recursos (OECD, 2007).

Existem exemplos de cooperação e/ou consórcios entre os diferentes BRCs, quer a nível internacional, nacional ou regional, que têm funcionado há décadas (Tabela 6), enquanto que outros projectos de cooperação têm sido formados mais recentemente como o GBRCN ou o EMbaRC (Janssens *et. al.*, 2010).

**Tabela 6:** Exemplos de federações, consórcios e colaborações entre BRCs (adaptado de Janssens *et. al.*, 2010).

Nome (acrónimo)	Web site	Âmbito	Ano de fundação	Número de colecções
United Kingdom National Culture Collection (UKNCC)	<a href="http://www.ukncc.co.uk/">http://www.ukncc.co.uk/</a>	Nacional (UK)	1947	10
World Federation for Culture Collections (WFCC)	<a href="http://www.wfcc.info/">http://www.wfcc.info/</a>	Global	1970	561
European Culture Collections Organisation (ECCO)	<a href="http://www.eccosite.org/">http://www.eccosite.org/</a>	Regional (Europa)	1981	61
Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)	<a href="http://bccm.belspo.be/">http://bccm.belspo.be/</a>	Nacional (Bélgica)	1983	4
European Consortium of Microbial Resource Centre (EMbaRC)	<a href="http://www.embarc.eu/">http://www.embarc.eu/</a>	Regional (Europa)	2009	10
Global Biological Resource Center Network (GBRCN)	<a href="http://www.gbrcn.org/">http://www.gbrcn.org/</a>	Global	2001	17
Microbial Resource Research Infrastructure (MIRRI)	<a href="http://www.mirri.org/">http://www.mirri.org/</a>	Regional (Europa)	2008	16

Actualmente, um pequeno grupo de CC europeias bem estabelecidas encontram-se a trabalhar num projecto em conjunto com a União Europeia, o Consórcio Europeu de Centros de Recursos Microbianos (EMbaRC) lançado a 1 de Fevereiro de 2009, e que visa a melhorar, coordenar e validar a entrega e troca de culturas das colecções a investigadores europeus e internacionais, assim como investigação e formação conjuntas, assegurando a consistência da

qualidade das CC europeias, tendo o cuidado de seguir as directivas da OECD (2007) na implementação de boas práticas, ferramentas e padrões de qualidade (Janssens *et. al.*, 2010; Stackebrandt, 2010).

Ao nível da investigação, o EMbaRC pretende acrescentar valor às CC desenvolvendo o melhoramento de técnicas de conservação de culturas e de DNA, bem como novas metodologias de identificação de espécies, e aumentar a ligação entre a indústria e os recursos naturais. Outro dos objectivos deste projecto é realizar uma coordenação entre os vários centros de recursos microbianos europeus, utilizando as tecnologias informáticas, de forma a aceder aos microrganismos autenticados e validar os dados associados a cada cultura. O EMbaRC é o projecto regional a nível europeu que visa aplicar as normas de um outro projecto a nível global, a Rede de Coordenação Global dos Centros de Recursos Biológicos (GBRCN) (Janssens *et. al.*, 2010).

O GBRCN surgiu após a recomendação do secretariado da OECD (2001) para coordenar a informação dos microrganismos presentes nos BRCs e encontra-se sedado em Braunschweig, Alemanha (suportado pelo Ministério Federal Alemão de Investigação e Educação), tendo sido iniciado em Novembro de 2008. O GBRCN junta 17 parceiros de 15 países (Janssens *et. al.*, 2010).

Entre este dois projectos, GBRCN e EMbaRC, existem várias ligações e sinergias. De facto, alguns parceiros são comuns a ambos os projectos e alguns membros chave fazem igualmente parte da ECCO e da WFCC. Contudo existem algumas diferenças, nomeadamente ao nível geográfico (o primeiro é global e o segundo é regional), tipo de actividades e financiamento. Enquanto o GBRCN recebe o seu financiamento pelo secretariado da OECD e o seu foco de actividades é ao nível da coordenação, o EMbaRC além da coordenação, recebe financiamento de várias partes, nomeadamente, investigação, acesso a dados e serviços (Janssens *et. al.*, 2010).

## **2.7 Projectos futuros: MIRRI**

A Infraestrutura de Investigação dos Recursos Microbianos (MIRRI – *Microbial Resource Research Infrastructure*) é um projecto europeu que visa juntar as colecções europeias microbianas e foi incluído no Plano de Trabalho do Fórum Estratégico Europeu para as Infraestruturas de Investigação (ESFRI – *European Strategy Forum on Research Infrastructures*), sendo apoiado pelo Secretariado do GBRCN e coordenado pela colecção DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*) sedado em Braunschweig, Alemanha.

A cooperação internacional é a forma como as CC e os BRCs têm de inovar. MIRRI é um projecto que visa a que as colecções de culturas e os BRCs funcionem com estrito



cumprimento das legislações internacionais e nacionais, numa parceria entre cientistas e indústria de forma a transferir recursos e providenciar serviços que permitam que as colecções de culturas possam inovar e tornar-se mais auto-sustentáveis. MIRRI vai integrar serviços e recursos com o objectivo de realizar a ponte entre as organizações e disponibilizar soluções inovadoras na utilização dos microrganismos existentes nas colecções. O projecto dará coerência e homogeneidade na aplicação das normas de qualidade, assim como pretende utilizar a experiência e recursos das colecções de culturas para resolver problemas e direccioná-los para resultados específicos nomeadamente: (i) uma maior abrangência dos recursos biológicos e dos serviços prestados pelas colecções; (ii) uma abordagem coordenada para a aquisição de organismos, a experiência de lidar com eles e o fornecimento de mecanismo para garantir a implementação de guias de boas práticas; (iii) criação de uma plataforma para a taxonomia microbiana; (iv) enfrentar os principais obstáculos presentes na investigação; (v) estabelecer infraestruturas e recursos nos países ricos em diversidade microbiana mas que não tenham colecções de culturas nem BRCs; (vi) criar ligações entre bases de dados informáticas; (vii) estabelecer procedimentos operacionais comuns de forma a facilitar o acesso seguro e legal aos recursos microbianos; (viii) estabelecer ligações entre as políticas governamentais e as necessidades científicas; (ix) estabelecer mecanismos de ligações com países que não têm BRCs; (x) aumentar a eficiência e reduzir desperdício e; (xi) melhorar a transparência.

A fase de preparação do MIRRI foi iniciada este ano (2012) e prevê-se que entre 2014 e 2017 seja a fase de construção e que a fase operacional comece em 2014, estando focada na estrutura da coordenação das CC, incluindo as questões financeiras que poderão trazer valor acrescentado, nomeadamente a prestação de serviços e distribuição de organismos.

### **3 O panorama europeu das colecções de culturas microbianas, com ênfase nas colecções de fungos; estudo comparativo**

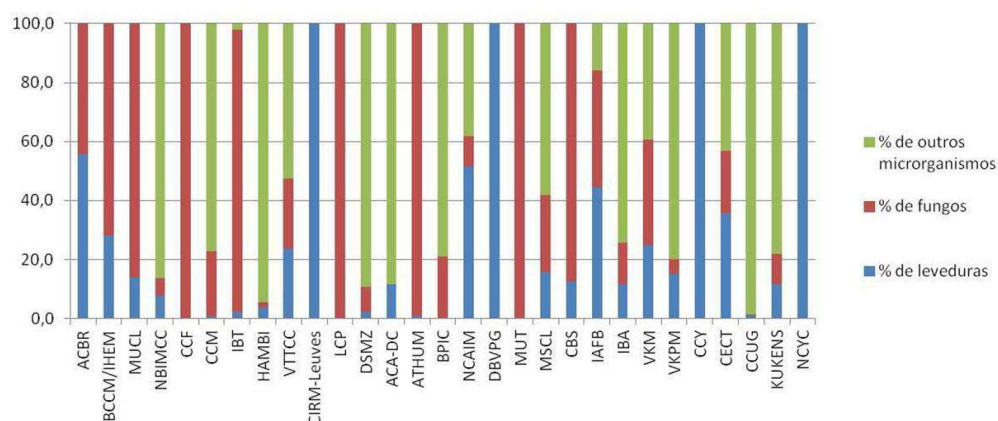
De acordo com os dados da WDCM existem cerca de 210 colecções de culturas microbianas na Europa. Dessas, cerca de 68 mantêm estirpes de fungos e/ou leveduras. Com vista a verificar a tipologia das colecções e quais as que de um modo geral se encontram certificadas foi realizado um estudo comparativo. O processo de escolha das colecções a incluir nesta comparação baseou-se em três pontos: (i) colecções que contenham no seu conjunto de microrganismos fungos e/ou leveduras; (ii) colecções ou BRCs que façam parte da ECCO e/ou sejam parceiros no projecto MIRRI e/ou colaboradores do MIRRI; e (iii) colecções com os dados

da WDCM actualizados e disponíveis (foram estes os dados utilizados na análise). Em anexo é apresentada uma tabela resumo (Tabela A1) com as colecções utilizadas na análise. As características (variáveis) das colecções seleccionadas para a análise comparativa tiveram por base as recomendações da OECD para o funcionamento dos BRCs no domínio dos microrganismos (OECD, 2007). Na análise comparativa foram considerados as características das colecções presentes na WDCM e foi construída uma matriz com as variáveis presentes na Tabela A2 do anexo.

Numa primeira fase procedeu-se à avaliação das colecções europeias excluindo Portugal de acordo com o número de estirpes existentes na colecção. Como se pode observar na Figura 2, a grande maioria das colecções de culturas europeias são constituídas por mais de que um tipo de organismos havendo 6 colecções especializadas num único tipo de organismos, nomeadamente 4 colecções de leveduras (CIRM-Levures, DBVPG, CCY e NCYC) e duas colecções de fungos filamentosos (LCP e MUT) sugerindo que a maioria das colecções europeias se formou pela junção de uma série de linhas de investigação e poucas se formaram com apenas uma linha de investigação. No entanto, há que ter em conta que o número de culturas e as linhas de investigação existentes em cada colecção depende da missão histórica da colecção. Por exemplo, uma das missões da CBS é ser o repositório europeu de estirpes de leveduras e fungos filamentosos, em particular das estirpes tipo, enquanto que a DBVPG tem a sua investigação maioritariamente em leveduras enológicas e a NCYC em leveduras fermentativas para produção de bebidas.

Observando o número de estirpes existentes em cada colecção e o número de pessoas que trabalham directamente com a colecção, verifica-se que as que têm financiamento governamental são as que em média apresentam um maior número de pessoas envolvidas entre investigadores, curadores, técnicos especializados e administrativos (Tabela A1). Apesar da DSMZ ter uma percentagem maior de estirpes que não são fungos (Figura 2), esta colecção é a colecção europeia de referência no que diz respeito às bactérias. Contudo nos últimos tempos tem sido empreendido um esforço em aumentar as linhas de investigação em fungos filamentosos e leveduras (A. Yurkov, comunicação pessoal)

Com o objectivo de testar as características (variáveis) que contribuem com mais diferenças entre as características das diferentes colecções foi realizada uma análise em componentes principais (PCA) usando o *software* NTSYSpc (versão 2.20d; *Exeter Software, Setauket, Y, USA*). Foram consideradas 53 características das colecções divididas em 9 grandes características, nomeadamente o tipo de financiamento, o pessoal adstricto às colecções, as linhas de investigação, as técnicas de preservação, o controlo de culturas, tipo de serviços, formação, consultadoria e outros serviços.



**Figura 2:** Percentagem de microrganismos acumulativa existente em cada colecção de cultura europeias escolhida para o estudo comparativo.

A análise multivariada das características das colecções mostra que a PCA1 explica apenas 12,5% da variação (Tabela 7) ou seja 83,5% da informação original não foi considerada. A contribuição do segundo componente foi de 10,31% e contribuição acumulada da PCA1 e PCA2 aumenta até 22,81%. Isto significa que o gráfico de dispersão entre PCA1 e PCA2 cobre apenas cerca de 22,81% dos dados originais. Quanto mais componente é usado, mais a contribuição dos dados originais é considerada e mais próximo se aproxima dos 100%. Contudo verifica-se que existe demasiada variabilidade entre as colecções europeias com os três primeiros eixos considerarem apenas 31,68% das variabilidade e apenas a partir da PCA6 se observa uma contribuição cumulativa das variáveis superiores a 50%, o que indica que existe demasiada variabilidade entre as colecções europeias.

**Tabela 7:** Peso das contribuições e *eigenvalues* nos primeiros seis eixos para o total das amostras

	PCA 1	PCA 2	PCA 3	PCA 4	PCA 5	PCA 6
<b>Contribuição</b>	12,5%	10,31%	12,5%	7,98%	6,10%	5,95%
<b>Contribuição acumulativa</b>	12,5%	22,81%	31,68%	39,66%	45,75%	51,7%
<b>Eigenvalue</b>	6,63	5,46	4,7	4,23	3,22	3,15

A análise por PCA indica que para a PCA1 (Figura 3a e 3c) as variáveis que mais contribuem são: investigação em métodos de cultura (V16), investigação em métodos de preservação (V17), criopreservação em azoto líquido (V23), depósito de patentes (V37), formação em métodos de cultura (V38) formação em métodos de preservação (V39) e consultadoria em depósito de patentes (V47). Na PCA2 (Figura 3a) as características que mais contribuem para a variabilidade entre as colecções são: a preservação de culturas por sílica-gel (V26), preservação em solo (V27), o controlo da pureza das culturas (V33), formação e consultadoria em microbiologia industrial (V44 e V50) e existência de outros serviços (V52). Finalmente na PCA3 (Figura 3c) as características que mais contribuem são: a criopreservação (V22), liofilização (V24), preservação em água (V28), controlo por microscopia (V30), controlo

da viabilidade das culturas (V31), controlo por identificação das culturas (V32), formação em taxonomia (V41) e consultadoria em microbiologia industrial (V50).

Nos gráficos de dispersão das colecções (Figura 3b e 3d) verifica-se que com a excepção da colecção grega ATHUM, todas as colecções europeias são influenciadas maioritariamente pelas variáveis que se encontram localizadas na componente negativa da PCA1 (Figura 3a). De igual forma são as características localizadas na componente negativa da PCA2 (Figura 3a) que vai influenciar a posição das colecções (Figura 3b).



**Figura 3:** Sumário das relações entre as características (variáveis) e as colecções (amostras) europeias avaliadas. A rosa as colecções que são certificadas.

## **II Caso de estudo: Colecção Portuguesa de Culturas de Leveduras (PYCC)**

### **1. Breve historial da PYCC e caracterização da sua missão e das suas actividades**

A Colecção Portuguesa de Culturas de Leveduras (PYCC – *Portuguese Yeast Culture Collection*) foi iniciada em 1952 pelo Prof. Nicolau van Uden quando trabalhava no Laboratório de Micologia da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Em 1966 a colecção foi transferida para o Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC) ganhando o acrónimo IGC. Foi instalada no Laboratório de Microbiologia sob a direcção continuada do Prof. van Uden, onde serviu de apoio à investigação realizada no Laboratório de Microbiologia do IGC, nomeadamente: (i) estudos taxonómicos com descrição de numerosas espécies novas e tratamentos monográficos de géneros; (ii) estudos ecológicos, doenças humanas e animais, flora intestinal de aves e mamíferos domésticos e selvagens, habitats marinhos e de água doce; (iii) estudos bioquímicos e biofísicos envolvendo leveduras de potencial importância industrial.

Com o falecimento do Prof. Nicolau van Uden (1991), a Prof.<sup>a</sup> Isabel Spencer-Martins assumiu a coordenação da colecção até 2008. Em 1996 a colecção foi transferida para Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL) como parte da Secção Autónoma de Biotecnologia, ganhando um novo acrónimo, PYCC. Em 1998 integrou a nova unidade de investigação, Centro de Recursos Microbiológicos (CREM), e em 2007 o Departamento de Ciências da Vida. Em 2009, com o falecimento da Prof.<sup>a</sup> Isabel Spencer-Martins, o Prof. Álvaro Fonseca assumiu a coordenação da PYCC. A PYCC está filiada na ECCO e na WFCC com o número WDCM 595.

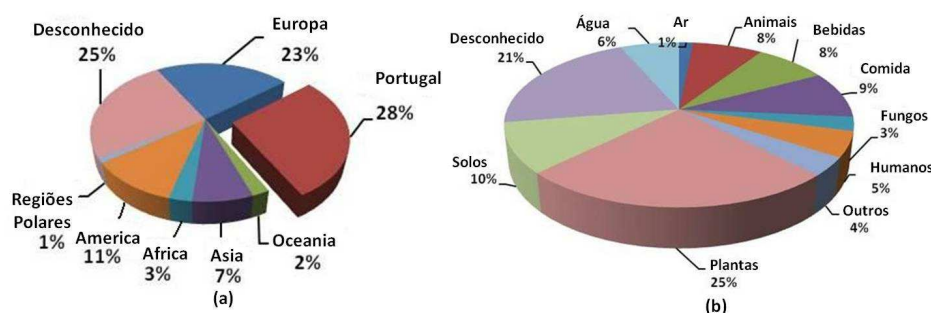
Em Outubro de 2009 foi constituída uma Comissão de Acompanhamento da PYCC e aprovado o regulamento da PYCC. A PYCC tem como missão atender às necessidades da comunidade científica e industrial, portuguesa e internacional, actuando como uma infraestrutura dedicada à distribuição, armazenamento, preservação, caracterização e identificação de leveduras, assim como prestar apoio à investigação realizada no CREM sobre identificação, classificação, manutenção e ecologia das leveduras. A PYCC oferece serviços de consultadoria técnico-científica, desenvolvimento de projectos, identificação e manutenção de leveduras.

De acordo com o regulamento interno da PYCC os seus objectivos são: (i) preservação de culturas puras de leveduras; (ii) depósito e fornecimento de culturas de leveduras; (iii) identificação e caracterização das culturas preservadas; (iv) catalogação em suporte informático da informação disponível sobre as culturas; (v) disponibilização e difusão da informação sobre culturas da PYCC; (vi) fornecimento de serviços de identificação de

leveduras; (vii) integração ou associação a um centro de recursos biológicos nacional; (viii) realização de acções de formação e desenvolvimento de actividades de I&D em sistemática, ecologia e manutenção de leveduras e (ix) certificação da PYCC de acordo com as linhas de orientação definidas pelas organizações de colecções de culturas internacionais.

Como resposta aos objectivos propostos no regulamento e visando à obtenção de uma gestão eficiente das leveduras depositadas na PYCC, em 2010 foi adquirido um sistema informatizado de gestão de bases de dados biológicos, BioloMICS, que permite armazenar, analisar, gerir e publicar informação sobre quaisquer dados biológicos tais como morfologia, fisiologia, bioquímica, dados moleculares, bibliografia, taxonomia, ecologia, que permitiu a publicação *online* do *website* e do catálogo da PYCC (<http://pycc.bio-aware.com>).

Actualmente a PYCC mantém cerca de 3000 estirpes de leveduras e fungos leveduriformes, em que cerca de 1600 são espécies ascomicetas e 1300 espécies basidiomicetas. Cerca de 1400 estirpes são únicas da PYCC enquanto 1500 das estirpes existentes na PYCC também se encontram depositadas noutras colecções internacionais. Cerca de 28% (843/2941) das estirpes foram isoladas no território nacional de Portugal e 23% (676/2941) provenientes da Europa (Figura 4a). No que diz respeito ao substrato de isolamento, as estirpes da PYCC apresentam origens de isolamento muito diversificadas (Figura 4b) com a maior percentagem de estirpes, cerca de 25% (725/2941) isoladas a partir de substrato de natureza vegetal.



**Figura 4:** Distribuição das estirpes da PYCC de acordo com a proveniência geográfica (a) e a nível de substrato de isolamento (b).

A PYCC oferece à comunidade científica e industrial um conjunto de leveduras muito diversificadas filogeneticamente para aplicações em investigação, indústria e ensino. As leveduras de acesso público encontram-se limitadas ao grupo de risco 1 (Classificação do Conselho Europeu, Directiva 93/88/ECC), e de forma restrita leveduras do grupo de risco 2. Organismos geneticamente modificados são aceites desde que se enquadrem nestes dois grupos de risco.

## 2 Estudo comparativo com colecções congéneres, nacionais e internacionais

Uma vez que a PYCC se encontra inscrita na ECCO e WFCC, foram escolhidas colecções portuguesas que mantêm estirpes fúngicas para termos de comparação (CCMI, MEAN e MUM) nacionais, a CBS devido ao facto de ser a colecção de cultura europeia de referência em leveduras e fungos filamentosos e 4 colecções europeias de culturas especializadas em leveduras (CIRM-Levures, DBVPG, CCY e NCYC). Estas colecções foram escolhidas para o estudo comparativo com a PYCC uma vez que se pode obter dados sobre as características das colecções na WDCM (Tabela A1). As características (variáveis) que entraram na análise encontram-se na Tabela A3 do anexo. Com objectivo de testar as características que contribuem com as diferenças existentes nas colecções foi realizada uma análise multivariada por Componentes Principais (PCA) utilizando o suplemento o *software* NTSYSpc (versão 2.20d; Exeter Software, Setauket, Y, USA).

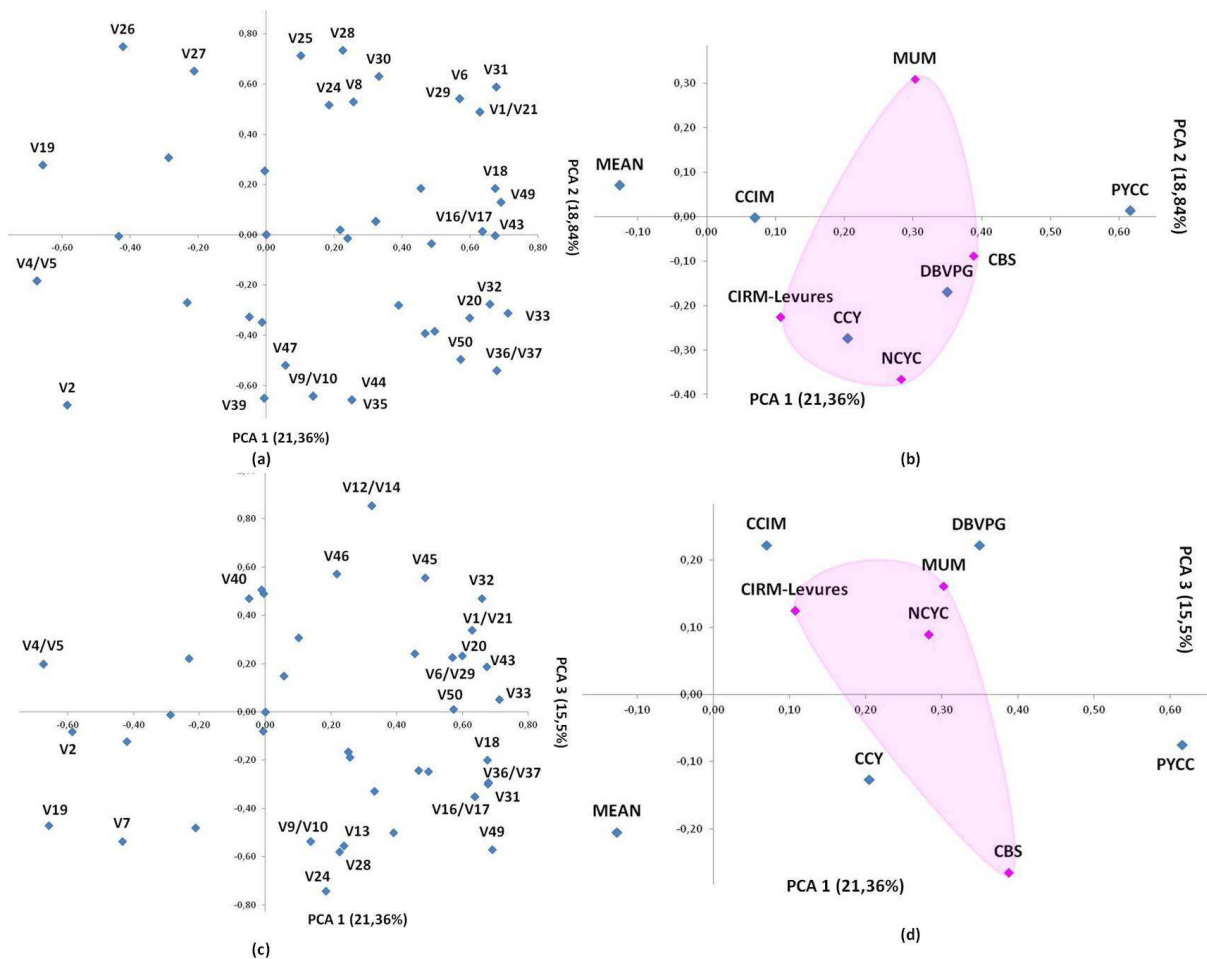
A análise multivariada das características das colecções mostra que a PCA1 explica para 21,36% (Tabela 8) dos dados originais na variação, PCA 2 explica para 18,84% da contribuição e PCA3 para 15,5% da contribuição. Isto significa que o gráfico de dispersão das colecções entre PCA1 e PCA2 (Fig. 5b) cobre cerca de 62% dos dados originais, PCA1 e PCA3 (fig. 5d) cobre para cerca de 52% e PCA2 e PCA3 (Fig. 5f) cobre cerca de 44% dos dados originais.

**Tabela 8:** Peso das contribuições e *eigenvalues* nos primeiros três eixos para o total das amostras

	PCA 1	PCA 2	PCA 3
<b>Contribuição</b>	21,36%	18,84%	15,5%
<b>Contribuição acumulada</b>	21,36%	40,2%	55,7%
<b>Eigenvalue</b>	10,68	9,42	5,93

As características (variáveis) que mais contribuem para a diferença entre as colecções congéneres da PYCC na componente PCA1 (Figura 5a e b) são o tipo de financiamento (V1 e V2), a existência de curadores, investigadores e técnicos de investigação (V4, V5 e V6), investigação em métodos de cultura (V16), investigação em métodos de preservação (V17), investigação em biodiversidade (V18), investigação em agricultura (V19), investigação em fisiologia (V20), criopreservação (V21), controlo das culturas por viabilidade (V31), controlo das culturas por identificação (V32), controlo das culturas por verificação da pureza (V33), formação em métodos de preservação (V37), consultadoria em preservação (V43), existência de outros serviços (V49) e existência de *safe-deposit* (50). Na componente PCA2 (Figura 5a) as variáveis que mais contribuem para a diferença entre as colecções são: financiamento governamental (V2), existência de técnicos de investigação (V6) e administrativos (V8), investigação em sistemática (V9), investigação em taxonomia (V10), preservação por sub-cultura (V24), preservação por sílica-gel (V25), preservação em água (V26), preservação em

óleo (V27), controlo de culturas (V28, V29, V30, V31), oferta de depósito de patentes (V35), formação em métodos de cultura (V36), formação em métodos de preservação (V37), formação em taxonomia (V39), consultadoria em depósito de patentes (V44) e consultadoria em microbiologia industrial (V47). Na componente PCA3 (Figura 5c) as características que contribuem para a variabilidade entre as colecções são: existência de especialistas em informática (V7), investigação em sistemática (V9), investigação em taxonomia (V10), investigação em microbiologia aplicada (V12), investigação em microbiologia médica (V13), investigação em microbiologia industrial (V14), preservação por sub-cultura (V24), controlo de culturas por microscopia (V28), formação em manutenção e controlo de qualidade de uma colecção (V40), consultadoria em identificação de microrganismos (V45), consultadoria em regulação de microrganismos (V46) e existência de outros serviços (V50).



**Figura 5:** Sumário das relações entre as amostras (colecções) à direita e as variáveis à esquerda das colecções de culturas congéneres nacionais e internacionais da PYCC. A rosa as colecções certificadas.

Nos gráficos de dispersão das colecções (Figura 5b e 5d) observa-se que a PYCC é influenciada pelas características localizadas nos eixos positivos da PCA1 (Figura 5a e 5c), pelas



características localizadas no eixo positivo da PCA2 (Figura 5a) e pelas características localizadas no eixo negativo da PCA3 (Figura 5c). Conclui-se que as principais características que contribuem para a posição da PYCC nos gráficos de dispersão são: investigação em métodos de cultura (V16), investigação em métodos de preservação (V17), investigação em biodiversidade (V18), controlo da pureza das culturas (V31) e oferta de outros serviços (V49).

### **3. Perspectivas de desenvolvimento futuro da PYCC**

#### **3.1 Diversificação de serviços e actividades**

Nos últimos três anos a PYCC tem diversificado os serviços e actividades oferecidos. Com a obtenção de um sistema informatizado de bases de dados, um catálogo *online* foi produzido, assim como um *website* onde os clientes podem realizar uma pesquisa no catálogo *online* e podem requisitar as estirpes. O *website* permite igualmente realizar uma procura por sequências na base de dados, em que as sequências disponíveis na base de dados são actualizadas de forma periódica, de dois em dois meses. Este serviço de pesquisa de sequências não é restringido ao *website* da PYCC. Desde Maio de 2012 a PYCC encontra-se ligada ao Mycobank ([www.mycobank.org](http://www.mycobank.org)) que é uma base de dados *online* sobre fungos gerida pela CBS, podendo ser realizado uma pesquisa de sequências neste *website* e obter resultados de estirpes da PYCC. O próximo passo é associar as estirpes existentes na PYCC à *StrainInfo*.

Além do serviço básico de depósito na colecção, a PYCC tem um serviço de “safe-deposit”. Este tipo de depósito é de interesse pois pode ser utilizado pela indústria. No *website* pode-se encontrar as condições para este tipo de serviço. Em desenvolvimento encontra-se uma metodologia de depósito de estirpes *online*. Basicamente, o cliente que quiser depositar estirpes de leveduras na colecção solicita um depósito à PYCC e preenche o formulário com as características mínimas da estirpe (espécie, substrato de isolamento, origem, etc) e tipo de depósito (normal ou “safe-deposit”). Após a verificação do enquadramento do depósito na colecção é enviado um nº PYCC ao cliente.

Uma vez que a PYCC tem acesso a infraestruturas de sequenciação, nomeadamente à empresa StabVida, um dos novos serviços é a identificação molecular de estirpes de leveduras por sequenciação do domínio D1/D2 do gene LSU do DNA ribossómico e da região ITS do DNA ribossómico. Posteriormente, e a pedido do cliente, estas estirpes poderão dar entrada na colecção.

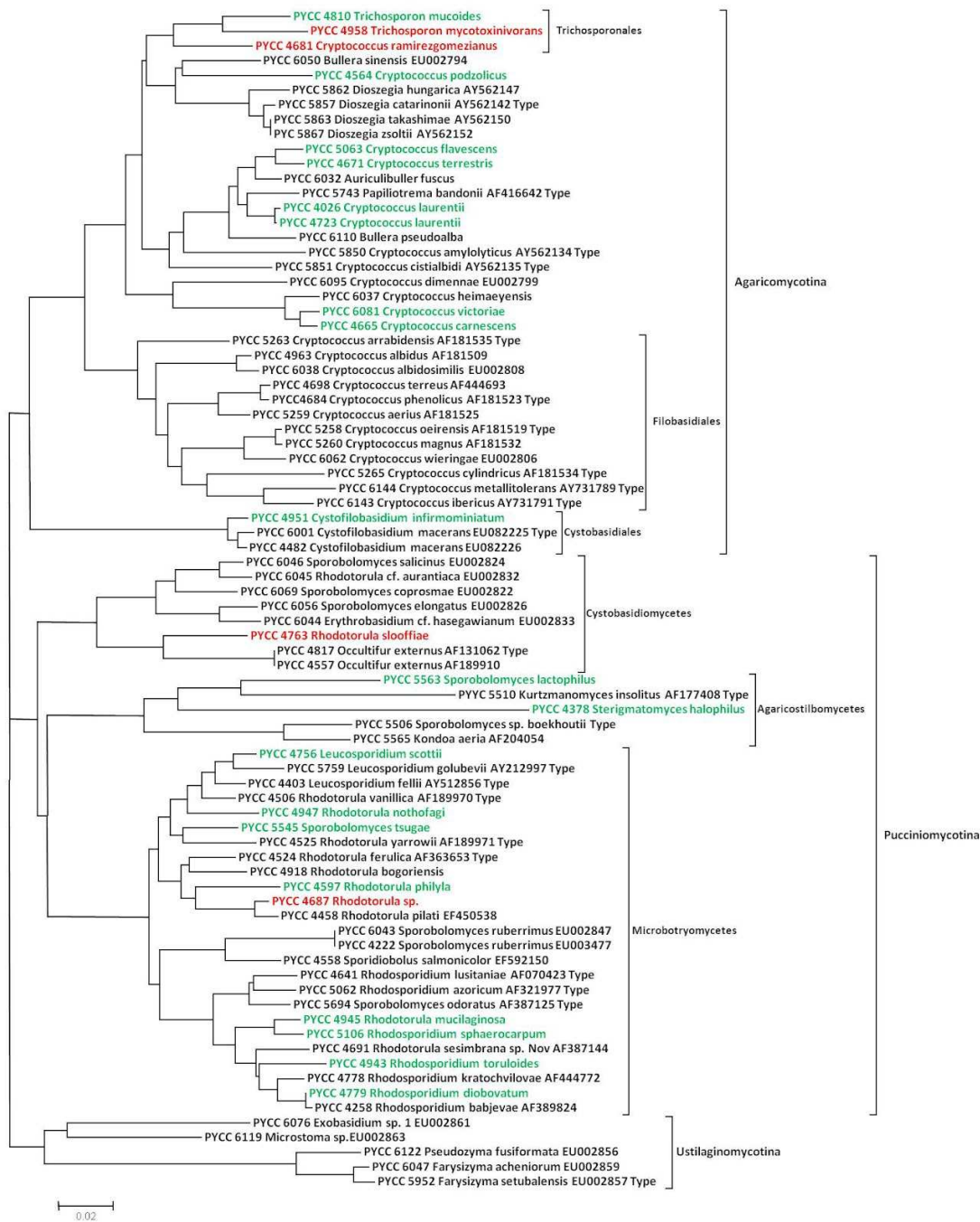
Além do serviço de identificação molecular, a PYCC oferece também serviços de caracterização das estirpes, nomeadamente caracterização morfológica e fisiológica. Nos

últimos meses a PYCC tem desenvolvido a caracterização fisiológica em microplacas, com resultados promissores. Um dos objectivos proposto para os próximos anos é de realizar testes fisiológicos às estirpes ainda não caracterizadas fisiologicamente.

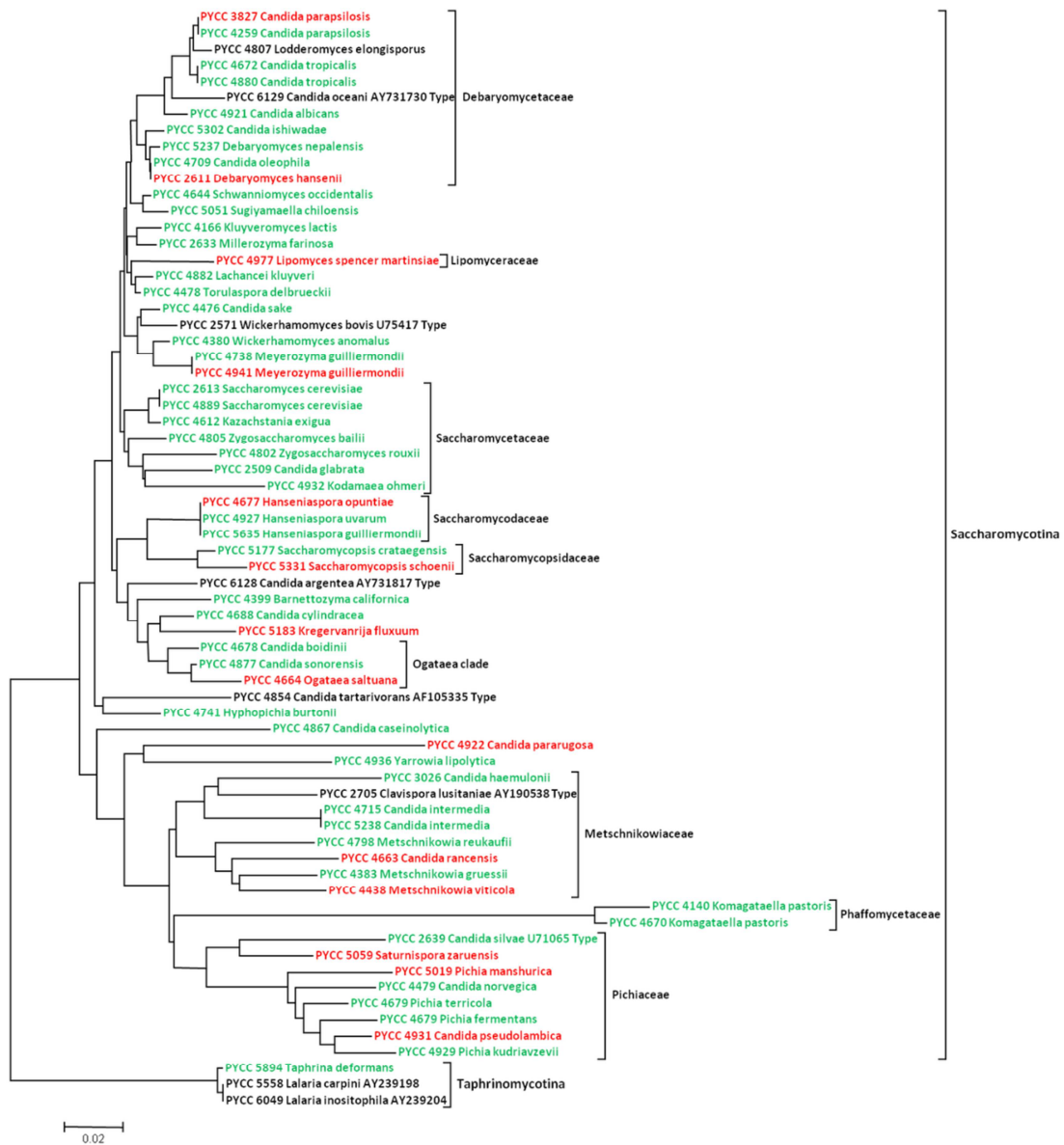
Nos dois últimos anos a PYCC encontra-se envolvida em alguns projectos. O projecto LUSOEXTRACT (QREN – SI I&DT: Projectonº 13107) em colaboração com a empresa de biotecnologia BioAlvo e outros centros de investigação nacionais, tendo como objectivo criar uma biblioteca de extractos naturais provenientes de ecossistemas únicos Portugueses. A PYCC contribuiu com a selecção de 150 estirpes provenientes de ambientes com diferentes características em Portugal, subsequente obtenção de biomassa e re-identificação molecular por análise do domínio D1/D2 do LSU rRNA. Das cerca de 80 estirpes basidiomicetas que entraram no projecto 28 foram sujeitas a re-identificação molecular (Figura 6), verificando-se que 3 estirpes não corresponderam às espécies atribuídas com base nos dados fenotípicos e 25 estirpes corresponderam às espécies inicialmente atribuídas. Em contrapartida, das cerca de 68 estirpes de ascomicetas que entraram no projecto, foram sujeitas a re-identificação molecular 60 estirpes (Figura 7), em que resultou 14 estirpes que não correspondiam às espécies atribuídas com base nos dados fenotípicos e 54 correspondências. Isto indica que no universo de 88 estirpes tendo como base de identificação os métodos clássicos cerca de 19% (17/88) verificaram-se como estando incorrectamente identificadas.

Um outro projecto em que a PYCC contribuiu no último ano foi: “Uma nova abordagem molecular na pesquisa do modo de reprodução e da estrutura populacional em leveduras basidiomicetas afins de *Cryptococcus neoformans*” (PTDC/BIA-MIC/113051/2009). Entre outros objectivos deste projecto, esteve incluído a identificação molecular de estirpes pertencentes à espécie *Cryptococcus laurentii* uma espécie muito heterogénea. Em cerca de 46 estirpes de *C. laurentii* da colecção identificadas previamente por dados morfológicos e fisiológicos, verifica-se a re-identificação de 26 estirpes pertencentes a diferentes espécies.

Por análise destes dois projectos, é expectável que entre 19 a 30% das estirpes presentes na colecção estejam mal identificadas em particular estirpes ascomicetas ou estirpes pertencentes a grupos muito heterogéneos. A participação da PYCC em projectos de investigação é muito vantajoso pois permitem autenticar as estirpes presentes na colecção.



**Figura 6:** Árvore filogenética baseada nos domínios D1/D2 do gene LSU rRNA, representando as 80 estirpes basidiomicetas que entraram no projecto LUSOEXTRACT. As cores representam estirpes que foram sequenciadas durante o projecto. Verde: estirpes cuja sequenciação confirmou a espécie. Vermelho: estirpes re-identificadas.



**Figura 7:** Árvore filogenética baseada nos domínios D1/D2 do gene LSU rRNA, representando as 68 estirpes de ascomicetas que entraram no projecto LUSOEXTRACT. As cores representam estirpes que foram sequenciadas durante o projecto. Verde. Estirpes cuja sequenciação confirmou a espécie. Vermelho: estirpes re-identificadas.

### 3.2 Medidas com vista à acreditação/certificação da PYCC

De acordo com o Instituto Português de Acreditação (IPAC) a Certificação consiste em demonstrar a conformidade das características de um produto, serviço ou sistema face a um documento de referência preciso que estabeleça e quantifique os parâmetros que devem ser verificados. O processo de certificação de uma instituição consiste na concepção, criação, implementação e certificação de um Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ). A Acreditação é o reconhecimento da competência técnica para exercer as actividades de avaliação da conformidade. A acreditação diferencia-se da certificação por não só exigir um sistema da

qualidade, mas ainda requerer a necessária competência técnica para garantir confiança nos resultados e produtos das actividades acreditadas.

No que diz respeito a laboratórios que basicamente oferecem serviços, tais como análises clínicas, além de serem importante serem certificados, é também importante serem acreditados, pois a competência técnica é de extrema importância. Mas no caso das CC podem ser apenas certificadas pois uma das formas de provarem que as suas culturas são autenticadas é serem certificadas, pois acrescenta valor. Para certificar uma CC é necessário implementar um SGQ com o objectivo de assegurar o fornecimento de produtos e serviços que vão de encontro às expectativas dos clientes, que incrementem a sua satisfação e potencie a melhoria contínua do desempenho da organização.

As Normas ISO têm constituído o padrão que o mercado mundial reconhece como referência. No caso do Instituto Português da Qualidade a Norma de referência é a Norma NP EN ISO 9001:2008 “Sistemas de Gestão da Qualidade – Requisitos”. A Norma está dividida em oito capítulos: (1) Objectivos e campo de aplicação; (2) Referências normativas; (3) Termos e definições; (4) Sistema de Gestão da Qualidade; (5) Responsabilidade da gestão; (6) Gestão de recursos; (7) Realização do produto; (8) Medição, análise e melhoria. Para que a PYCC possa alcançar boas práticas em relação à gestão, aquisição, manutenção, fornecimento de estirpes e serviços oferecidos deverão ser seguidas uma série de orientações nomeadamente as recomendações da OECD - *Best Practice Guidelines for Biological Resources Centres* (OECD, 2007) e o Guia da WFCC para o estabelecimento e Operação de CC de Microrganismos (WFCC, 2010) tendo como base a orientação da formação de um SGQ de acordo com a ISO 9001:2008 que serão apresentados em seguida.

**Objectivos:** em primeiro lugar os objectivos a curto prazo (1, 3, e 5 anos) devem ser definidos, incluindo uma estimativa do número de novas estirpes que se espera adquirir (em termos monetários) neste período de tempo e as programações para a implementação dos novos procedimentos e eventuais equipamentos e aumento de instalações. Além disso deve ser estabelecido o número de estirpes a serem mantidas a longo prazo tendo em consideração os objectivos da colecção, a capacidade de armazenamento e os recursos humanos e financeiros.

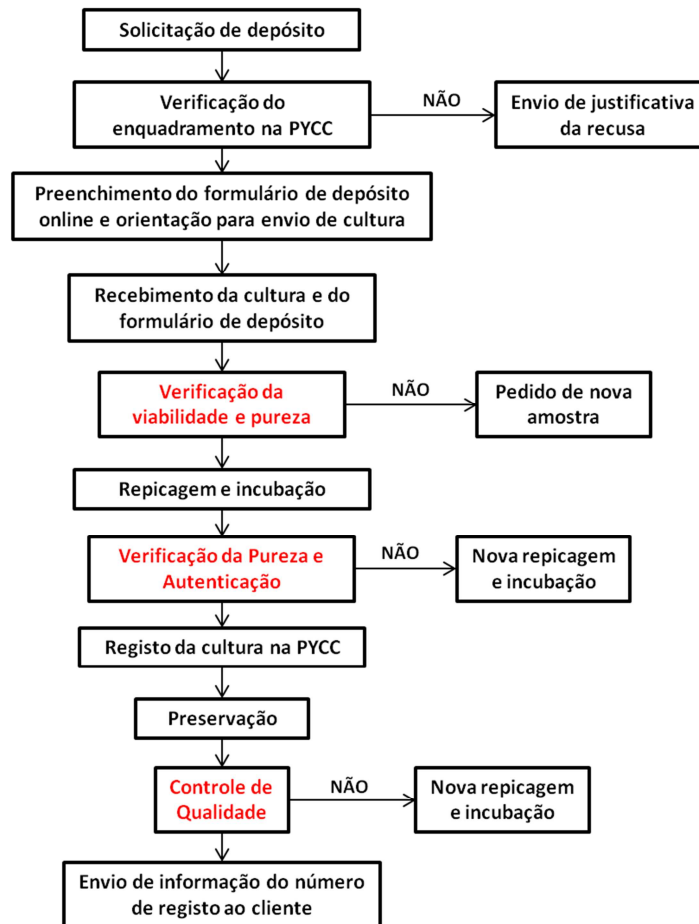
**Preservação:** por medida de segurança e para minimizar a possibilidade de perda de estirpes é recomendável que cada estirpe seja mantida por pelo menos dois métodos distintos, nomeadamente criopreservação (actualmente utilizado) e liofilização, pois estes métodos apresentam menos riscos de alterações genéticas além de garantirem a preservação por um longo período de tempo. Actualmente a PYCC encontra-se a duplicar as estirpes da colecção

com o objectivo de ter um *back-up* em local distinto e separado, evitando os riscos de perda de importantes recursos genéticos.

**Procedimento de depósito e autenticação de estirpes:** as solicitações de depósito devem ser submetidas a uma análise prévia para verificação de enquadramento na colecção e de acordo com os níveis de biossegurança. Como parte dos procedimentos de depósito, deve ser fornecido um formulário que deve ser preenchido pelo depositante com os dados mínimos sobre a(s) estirpe(s) a depositar, nomeadamente nome de organismo, histórico, substrato e local de origem, restrições, condições de crescimento, referências bibliográficas, nome, endereço e assinatura do depositante. Após a recepção da estirpe a PYCC deverá proceder à verificação da viabilidade e pureza assim como confirmar a identificação e certificar-se que as descrições da espécie estão de acordo com as publicadas. De seguida a PYCC deverá proceder à autenticação da estirpe e após preservação realizar um controlo de qualidade para verificação da viabilidade da estirpe (Figura 8). Todo o material que chega à colecção deverá ser tratado como potencialmente perigoso, até que a sua identificação ou autenticação seja confirmada. É recomendável que todo o material não autenticado seja manipulado de acordo com as especificações para o nível de risco biológico 2.

**Distribuição de estirpes:** todos os pedidos devem ser formalizados e documentados (em formato digital ou em papel), com uma explicação breve da utilização pretendida e assinados por um profissional qualificado e autorizado a manipular a estirpe requerida. A PYCC deverá manter os registos dos clientes que receberam as estirpes incluindo a identificação da estirpe enviada, método e data do envio, nome e endereço da pessoa a quem o material foi enviado caso haja algum tipo de problema ou necessidade de fornecimento de informações adicionais. Quanto ao envio da estirpe em si, os regulamentos de envio incluindo a embalagem e rotulagem devem ser seguidos e em casos específicos de restrições de entrada em algum país de estirpes patogénicas ou potencialmente patogénicas para animais, humanos e/ou plantas, a solicitação da estirpe deverá incluir uma declaração assinada pelo solicitante assumindo os riscos e as responsabilidades associadas ao recebimento, manipulação, armazenamento e uso das estirpes em questão.

**Equipamentos e reagentes:** de forma a assegurar que as estirpes sejam apenas manipuladas pelo pessoal adstrito à PYCC é aconselhável que a PYCC tenha o seu próprio equipamento tais como estufas, frigorífico, câmara de fluxo laminar, etc. Este tipo de equipamento tem de ser igualmente controlado de forma periódica de forma a diminuir os riscos de contaminação. É também de importância que os reagentes utilizados na preparação dos meios estejam igualmente controlados e que sejam utilizados apenas na colecção.



**Figura 8:** Proposta de fluxograma de depósito de culturas microbianas evidenciando as etapas de controlo de qualidade (em vermelho) seguindo as recomendações da OECD (2007) e da WFCC (2010).

**Publicidade:** de forma a assegurar uma ampla visibilidade da colecção e os serviços oferecidos pela PYCC através da preparação de panfletos, participação em *workshops*, congressos e/ou reuniões científicas, publicação de artigos e colaboração com outras instituições. No *website* da PYCC já podem ser consultadas informações sobre o catálogo disponível e alguns serviços, assim como preços.

**Outros serviços:** além do serviço de identificação taxonómica oferecido pela PYCC é de interesse oferecer serviços de consultadoria não só pelo pessoal adstrito à colecção mas também pelo pessoal da instituição associada. Se a colecção evoluir de forma a oferecer serviços de depósito para fins de patentes, estes devem ser operados de acordo com os procedimentos estabelecidos no tratado de Budapeste.

**Documentação e informatização:** os registos com as características de cada estirpe devem ser mantidos quer de forma digital, quer em papel e por questões de segurança, é recomendável que os registos digitais sejam duplicados ou cópias destes registos sejam mantidos em locais separados. É de igual importância que o pessoal adstrito à colecção esteja familiarizado com a operação do sistema.

**Investigação:** programas de investigação devem fazer parte das actividades da colecção e devidamente publicitados.

**Padrões de segurança e de qualidade:** os aspectos de segurança referentes a todas as operações realizadas na colecção necessitam de ser cuidadosamente controlados quer por auditorias internas, quer por auditorias externas e devem igualmente seguir os regulamentos nacionais e da instituição de acolhimento no que diz respeito à segurança, saúde e boas práticas de laboratório. As estirpes de origem desconhecida ou de potencial risco biológico devem ser manipuladas em câmaras de fluxo laminar.

**Conformidade com as leis nacionais e internacionais:** para as estirpes distribuídas a PYCC deverá seguir em conformidade com as diversas legislações e regulamentos que controlem estas matérias, nomeadamente a IATA.

De acordo com a CBD, a PYCC deverá requerer que os colectores das estirpes possuam o consentimento prévio do país no qual eles realizaram a colecta e um documento de transferência de material deverá ser requerido da mesma forma que existe um MTA para a distribuição de estirpes.

### **3.3 Evolução para BRC ou integração em rede nacional de BRCs?**

Como foi dito anteriormente a OECD recomenda a evolução das colecções de culturas para BRCs (OECD, 2007). A transformação de colecções de serviço em BRCs depende da definição de uma política de Estado, que assegure a capacitação contínua de centros credenciados e a consolidação de um sistema de informação que assegure a integração dos esforços. Isto só será possível através de adopção de uma estratégia que garanta o apoio de longo prazo aos centros componentes da rede, associado a um mecanismo de avaliação de qualidade e desempenho. Actualmente, existe no cenário internacional um conjunto de ameaças concretas ao trânsito de material biológico e, portanto, a devida preservação e fornecimento de material biológico certificado por Colecções de Serviço e/ou BRCs é de grande relevância para o desenvolvimento tecnológico.

Nos últimos anos a PYCC tem realizado uma série de mudanças para se adaptar não só às directivas da OECD mas também às recomendações da WFCC, nomeadamente a publicação de um catálogo *online*, desenvolvimento de novos procedimentos de requisição de estirpes (requisição *online*) com vista ao desenvolvimento de um Sistema de Gestão da Qualidade e posterior obtenção da Certificação.

Como foi dito anteriormente já havia sido realizada uma tentativa de formação de um BRC nacional (Lima *et al.*, 2006) mas essa tentativa não seguiu para a frente. Devido às restrições financeiras governamentais actualmente existentes no país e com um futuro



próximo de austeridade, o apoio governamental que poderia advir na criação de um BRC nacional ou de uma rede nacional de BRCs é pouco provável. Tendo esta restrição em vista, a forma como as colecções de culturas em Portugal podem evoluir para BRC será realizando elas próprias essa evolução, com a obtenção de financiamento externo como por exemplo o Projecto MIRRI. De facto, actualmente, a PYCC colabora no MIRRI e a MUM é a colecção portuguesa que é parceiro activo no MIRRI. Uma vez que a própria Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) tem demonstrado interesse neste projecto será interessante desenvolver uma cooperação entre a PYCC, MUM e FCT com vista à formação de um BRC nacional com o apoio do MIRRI.

Outra alternativa passa pela formação de um BRC próprio em conjunto com investigadores do CREM especialistas em leveduras, fungos e bactérias. Alguns destes investigadores já mantêm colecções de culturas próprias e existe a intenção da criação de uma colecção de bactérias (A. Yurkov, comunicação pessoal). Considerando a experiência que a PYCC tem na gestão de bases de dados informáticas, assim como na intenção da implementação de um SGQ, será interessante evoluir a PYCC em conjunto com os outros investigadores do CREM para uma BRC própria, podendo igualmente obter financiamento e apoio do MIRRI.

### **3.4 Constrangimentos e desafios na implementação das medidas propostas**

Os maiores constrangimentos na implementação das medidas propostas são os de origem financeira. A forma mais eficaz de implementação de um SGQ é seguindo a Norma NP EN ISO 9001:2008 “Sistemas de Gestão da Qualidade – Requisitos”, uma vez que é reconhecida internacionalmente. Contudo a implementação desta norma ISO requer uma série de procedimentos que devem ser seguidos, nomeadamente concepção, planeamento e implementação do Sistema em si. Estes factores são influenciáveis por várias variáveis como a dimensão da colecção, os processos empregues e os funcionários.

O principal constrangimento na implementação de um SGQ é no aspecto das instalações e equipamentos. Uma vez que a PYCC está inserida no CREM partilha muitas instalações, equipamentos e reagentes com os restantes investigadores do CREM. Tendo em atenção que o espaço físico suplementar em si é difícil de obter e que existe o interesse no desenvolvimento das colecções privadas dos investigadores do CREM em colecções de serviço, é aconselhável que o CREM seja certificado por inteiro. Contudo existem restrições nessa possibilidade uma vez que a certificação de um centro de investigação existente numa universidade deverá ter em conta os regulamentos da universidade em si na implementação desse Sistema de Gestão da Qualidade.

Independentemente dos constrangimentos na implementação de um SGQ, algumas metodologias já podem ser implementadas na PYCC, nomeadamente no que diz respeito aos procedimentos e documentos. Se não se puder concretizar a implementação do SGQ pela norma ISO 9001:2008, as recomendações da OECD e da WFCC para o bom funcionamento dos BRCs e Coleções de Culturas deverão ser seguidas.

Actualmente, em Portugal, apenas uma colecção se encontra certificada com um SGQ implementado a MUM. Uma vez que a MUM é maioritariamente uma colecção de fungos filamentosos será de interesse da PYCC igualmente implementar um SGQ e obtenção posterior da Certificação.

### **Referências Bibliográficas:**

- Arundel, A. & Sawaya, D. (2009) The Bioeconomy to 2030: Designing a Policy Agenda. *Reports of the Organisation for Economic Co-Operation and Development*.
- Boundy-Mills, K. (2012) Yeast culture collections of the world: meeting the needs of industrial researchers. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **39**: 673-680.
- CBS-KNAW (2011) CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre – Progress Report 2010-2011.
- Dijkshoorn, L., Vos, P.D. & Dedeurwaerdere, T. (2010) Understanding patterns of use and scientific opportunities in the emerging global microbial commons. *Research in Microbiology* **16**: 407-413.
- Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, À., Scorzetti, G. & Statzell-Tallman, A. (2000) Biodiversity and systematic of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **50**: 1351-1371.
- Glowka, L. (1996) The Convention on Biological Diversity and Microbial Diversity: Issues of Interest to Microbial Scientist and Microbial Culture Collections. *Biopolicy Journal*. **1**: Paper 2.
- Gransalke, K. (2010) The Downside of Upside – Financial crisis of databases and biological resources centers. *Lab Times* **2**: 16-20.
- Halluin, A.P. (1996) The Biological Deposition Requirement. In: Hunter-Cevera, J. & Belt, A. (eds) *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. Academic Press, London, pp 1-13.
- Hasegawa, T. (1996) History and Evolution of Culture Maintenance and Preservation Techniques. In: Hunter-Cevera, J. & Belt, A. (eds) *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. Academic Press, London, pp. 15-28.
- Hawksworth, D.L. (2004) Fungal diversity and its implication for genetic resource collections. *Studies in Mycology* **50**: 1422-1432.
- IPAC (2010) Guia para a Aplicação da NP EN ISO/IEC 17025. *Instituto Português de Acreditação*. OGC001 210-03-30.

- Janssens, D., Arahall, D.R., Bizer, C. & Garay, E. (2010) The role of public biological resource centers in providing a basic infrastructure for microbial research. *Research in Microbiology*. **161**: 422-429.
- Kirsop, B.E. (1984) Service Collections: their Functions. In: Kirsop, B.E. & Snell, J.J.S. (eds) *Maintenance of Microorganisms – A Manual of Laboratory Methods*. Academic Press London, pp. 5-10.
- Kirsop, B.E. (1996) The Convention on Biological Diversity: some implications for microbiology and microbial culture collections. *Journal of Industrial Microbiology*. **17**: 505-511.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. & Boekhout, T. (2011) Gene Sequence Analysis and other DNA-Based Methods for Yeast Species Recognition. In Kurtzman, C.P., Fell, J.W. & Boekhout, T. (eds) *The Yeasts a Taxonomic Study* ( 5<sup>th</sup> ed). Elsevier, Amsterdam, pp 137-144.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. & Robert, V. (2011) Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W & Boekhout, T. (eds) *The Yeasts a Taxonomic Study* ( 5<sup>th</sup> ed). Elsevier, Amsterdam, pp 87-110.
- Kurtzman, c.P. & Robnett, C.J. (1998) Identification os ascomycetous yeasts drom analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antoinie van Leewenhoek* **73**: 331-371.
- Lima, N. (2007) Centros de Recursos Biológicos: novos desafios para as colecções de culturas. In: Nunes, M.L. & Bandarra, N.M. (eds) *Micologia, avanços no conhecimento: actas do Congresso Brasileiro de Micologia*. Universitária da UFPE, Recife, pp. 173-180.
- Lima, N. & Spencer-Martins, I. (2001) Inquérito às Colecções de Microrganismos em Portugal. *Documento de trabalho*.
- Lima, N., Spencer-Martins, I., Roseiro, J.C & Costa, M. (2006) Rede Portuguesa de Colecções de Culturas Microbianas (RPCCM) – Proposta de Criação. *Documento de trabalho*.
- Mahilum-Tapy, L.M. (2009) The Importance of Microbial Culture Collection and Gene Banks in Biotechnology. In: Doelle, H.W, Rokem, J.S & Berovic, M. (2009) *Biotechnology*. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS).
- Morgan, C.A, Herman, N., White, P.A. & Vesey, G. (2006) Preservation of micro-organisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods*. **66**: 183-193.
- OECD (2001) Biological Resource Centres: Underpinning the Future of Life Sciences and Biotechnology. *Reports of the Organisation for Economic Co-operation and Development*. <http://www.oecd.org/>
- OECD (2004) Biotechnology for Sustainable Growth and Development. *Reports of the Organisation for Economic Co-operation and Development*.
- OECD (2007) OECD Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres. *Reports of the Organisation for Economic Co-operation and Development*.
- Pincus, D.H., Orensa, S. & Chatellier, S. (2007) Yeast identification – past, present, and future methods. *Medical Mycology* **45**: 2, 97-121.
- Robert, V., Stalpers, J., Boekhout, T., Tan, S.H. (2006) Yeast Biodiversity and Culture Collections. In: Rosa, C.A. & Péter, G. (eds) *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer, Germany, pp 31-44.
- Ryan, M.J. & Smith, D. (2004) Fungal genetic resource centres and the genomic challenge. *Mycology Research*. **108**: 1351-1362.

- Smith, D., Clayton, S., Ryan, M., Day, J. & Green, P. (2001) Preservation methodology. In: Smith, D, Ryan, M.J & Day, J.G (eds) *The UK National Culture Collection (UKNCC) Biological Resource: Properties, Maintenance and Management*. The UK National Culture Collection (UKNCC).
- Smith, D. (2003) Culture collections over the world. *International Microbiology*. **6**: 95-100.
- Smith, D. & Ryan, M.J. (2001) Culture collections in the twenty-first century. *Biologist* **48**: 125-128.
- Smith, D. & Ryan, M.J. (2012) Implementing Best Practices and Validation of Cryopreservation Techniques for Microorganisms. *The Scientific World Journal* **2012**: 1-9.
- Smith, D, Ryan, M.J & Day, J.G (2001) The UK National Culture Collection (UKNCC) Biological Resource: Properties, Maintenance and Management. *The UK National Culture Collection (UKNCC)*.
- Smith, D., Ryan, M.J. & Stackerbrandt, E. (2008) The *ex situ* conservation of microorganisms: aiming at a certified quality management. In: Doelle, H.W. & DaSilva, E.J. (eds) *Biotechnology*. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS).
- Snell, J.J.S. (1984). General Introduction to Maintenance Methods. In Kirsop, B.E. & Snell, J.J.S. (eds) *Maintenance of Microorganisms – A Manual of Laboratory Methods*. Academic Press, London, pp 11-22.
- Spencer-Martins, I (1994) Coleções de Culturas de Microorganismos: nos Bastidores da Biotecnologia. *Boletim de Biotecnologia* **47**: 33-37.
- Stackerbrandt, E. (2010) Diversification and focusing: strategies of microbial culture collections. *Trends in Microbiology* **18**: 283-287.
- United Nations (1992) Convention on Biological Diversity. *United Nations Environmental Programme*, Nairobi.
- Uruburu, F. (2003) History and services of cultures collections. *International Microbiology*. **6**: 101-103.
- Vaughan-Martini, A. (2003) Reflections on the classification of yeasts for different end-users in biotechnology, ecology, and medicine. *International Microbiology*. **6**: 175-182.
- Verslyppe, B., Kottmann, R., De Smer, W., De Baets, B., De Vos, P. & Dawyndt, P. (2010). Microbiological Common Language (MCL): a standard for electronic information exchange in the Microbiological commons. *Research in Microbiology* **161**: 439-445.
- WFCC (2010) World Federation for Culture Collections Guidelines: for the Establishment and Operation of Collections of Cultures of Microorganisms. *WFCC Executive Board*.

**Anexos:****Tabela A1:** Lista das colecções de culturas de fungos existentes na Europa e em Portugal escolhidas para estudo comparativo e as características correspondentes (dados obtidos a partir da WDCM). A rosa representa as colecções que estão certificadas

<b>Acrónimos</b>	<b>Nome</b>	<b>País</b>	<b>Leveduras</b>	<b>Outros Fungos</b>	<b>Outros Organismos</b>
ACBR	Austrian Centre of Biological Resources and Applied Microbiology	Áustria	2500	2000	
<b>BCCM/IHEM</b>	Scientific Institution of Public Health, Louis Pasteurs	Bélgica	3453	8829	
<b>BCCM/MUCL</b>	Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain	Bélgica	2200	13500	
NBIMCC	National Bank for Industrial Microorganisms and Cell Cultures	Bulgária	2200	13500	
CCF	Culture Collection of Fungi, Charles University	República Checa		1800	
CCM	Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University	República Checa	22	750	2600
IBT	Mycology Group, Technical University of Denmark	Dinamarca	500	22000	500
HAMBI	HAMBI Culture Collection	Finlândia	66	35	1712
VTTCC	VTT Culture Collection	Finlândia	1400	1400	3100
<b>CIRM-Levures</b>	Centre International de Ressources Microbiennes – Levures	França	1800		
LCP	Museum National d'Histoire Naturelle, Laboratoire de Cryptogamie	França		4000	
<b>DSMZ</b>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	Alemanha	500	2000	20580
ACA-DC	Greek Coordinated Collections of Microorganisms	Grécia	81		622
ATHUM	Culture Collection of Fungi, University of Athens	Grécia	6	600	
BPIC	Collections of Phytopathogenic Fungi and Bacteria, Benaki Phytopathological Institute	Grécia		412	1556

NCAIM	National Collection of Agriculture and Industrial Microorganisms	Hungria	1540	310	1140
DBVPG	Industrial Yeast Collection	Itália	5200		
MUT	Mycotheca Universitatis Taurinensis	Itália		2832	
MSCL	Microbial Strain Collection of Latvia	Latvia	108	182	402
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures	Holanda	9000	63000	
IBA	Collection of Microorganisms Producing Antibiotics	Polónia	82	100	526
IAFB	Collection of Industrial Microorganisms	Polónia	520	460	185
VKM	All-Russian Collection of Microorganisms	Rússia	2300	3355	3662
VKPM	Russian National Collection of Industrial Microorganisms	Rússia	2300	750	12200
CCY	Culture Collection of Yeasts	Eslováquia	3800		
<b>CECT</b>	Collection Española de Cultivos Tipo	Espanha	2500	1500	3022
CCUG	Culture Collection, University of Goteborg	Suécia	400	100	40000
KUKENS	Centre for Research and Application of Culture Collection of Microorganisms	Turquia	150	135	1010
<b>NCYC</b>	National Collection of Yeast Cultures	Inglaterra	3000		
CCMI	Culture Collection of Industrial Microorganisms (INETI)	Portugal	200	278	460
MEAN	Micoteca da Estação Agronómica Nacional	Portugal		350	
<b>MUM</b>	Micoteca da Universidade do Minho	Portugal		396	
PYCC	Portuguese Yeast Culture Collection	Portugal		2950	

**Tabela A2:** Lista das características (variáveis) e sua codificação escolhidas para a comparação entre as colecções europeias

Características		Codificação
<b>Financiamento</b>	Universitário	V1
	Governamental	V2
<b>Pessoal</b>	Coordenador	V3
	Curador	V4
	Investigadores	V5
	Técnicos de Investigação	V6
	Especialista em informática	V7
	Administrativos e Assistentes	V8
<b>Investigação</b>	Sistemática	V9
	Taxonomia	V10
	Biologia Molecular	V11
	Microbiologia Aplicada	V12
	Microbiologia Médica	V13
	Microbiologia industrial e alimentar	V14
	Ecologia	V15
	Métodos de cultura	V16
	Métodos de preservação	V17
	Biodiversidade	V18
	Veterinária e Agricultura	V19
Fisiologia	V20	
Biotechnology	V21	
<b>Técnicas de preservação</b>	Criopreservação (congelador)	V22
	Criopreservação (N2)	V23
	Liofilização	V24
	Sub-cultura	V25
	Sílica gel	V26
	Solo	V27

	Água	V28
	Óleo	V29
<b>Controlo de culturas</b>	Microscopia	V30
	Viabilidade	V31
	Identificação	V32
	Pureza	V33
<b>Serviços</b>	Depósito de estirpes	V34
	Distribuição de estirpes	V35
	Identificação de estirpes	V36
	Depósito de Patentes	V37
<b>Formação</b>	Métodos de cultura	V38
	Métodos de preservação	V39
	Sistemática	V40
	Taxonomia	V41
	Manutenção e controlo de qualidade	V42
	Diversidade microbiana	V43
	Microbiologia industrial	V44
	Ecologia molecular	V45
<b>Consultadoria</b>	Preservação	V46
	Depósito de patentes	V47
	Identificação	V48
	Regulação e quarentena de envio de organismos	V49
	Microbiologia industrial	V50
	Taxonomia molecular	V51
<b>Outros serviços</b>	Outros serviços	V52
	<i>Safe-deposit</i>	V53

**Tabela A3:** Lista das características (variáveis) e sua codificação escolhidas para a comparação entre a PYCC e colecções nacionais e europeias congéneres.

Colecções		Codificação
<b>Financiamento</b>	Universitário	V1
	Governamental	V2
<b>Pessoal</b>	Coordenador	V3
	Curador	V4
	Investigadores	V5
	Técnicos de Investigação	V6
	Especialista em informática	V7
	Administrativos e Assistentes	V8
<b>Investigação</b>	Sistemática	V9
	Taxonomia	V10
	Biologia Molecular	V11
	Microbiologia Aplicada	V12
	Microbiologia Médica	V13
	Microbiologia industrial e alimentar	V14
	Ecologia geral	V15
	Métodos de cultura	V16
	Métodos de preservação	V17
	Biodiversidade	V18
	Veterinária e Agricultura	V19
Fisiologia	V20	
<b>Técnicas de preservação</b>	Criopreservação (congelador)	V21
	Criopreservação (N2)	V22
	Liofilização	V23
	Sub-cultura	V24
	Sílica gel	V25

	Água	V26
	Óleo	V27
<b>Controlo de culturas</b>	Microscopia	V28
	Viabilidade	V29
	Identificação	V30
	Pureza	V31
<b>Serviços</b>	Depósito de estirpes	V32
	Distribuição de estirpes	V33
	Identificação de estirpes	V34
	Depósito de Patentes	V35
<b>Formação</b>	Métodos de cultura	V36
	Métodos de preservação	V37
	Sistemática	V38
	Taxonomia	V39
	Manutenção e controlo de qualidade	V40
	Diversidade microbiana	V41
	Ecologia molecular	V42
<b>Consultadoria</b>	Preservação	V43
	Depósito de patentes	V44
	Identificação	V45
	Regulação e quarentena de envio de organismos	V46
	Microbiologia industrial	V47
	Taxonomia molecular	V48
<b>Outros serviços</b>	Outros serviços	V49
	Safe-deposit	V50



