



Evaluación de crioprotectores y temperaturas de recuperación en la conservación a largo plazo de Bacterias Ácido Lácticas.

Araceli González*, Rosana Alcocer y Marcela Zamudio .Av. Juárez No.421 Cd. Industrial C.P. 97288 Apdo. Postal 26
Suc. Las Fuentes Mérida, Yucatán, México. Fax (01999) 9 46 09 94. argonbur@tunku.uady.mx

Palabras claves: crioprotectores, liofilización, Nitrógeno líquido, bacterias ácido lácticas

Introducción. El estudio de poblaciones bacterianas en el medio ambiente requiere frecuentemente de la conservación de cepas aisladas por un largo periodo de tiempo. Los métodos de conservación a largo plazo mantienen viables las células por 10 años o más. En este tipo de conservación se utilizan sustancias crioprotectoras que evitan la muerte de las células conservadas a bajas temperaturas. Cada especie responde de distinta manera a estos crioprotectores originando diferentes efectos sobre los organismos al aplicar las mismas metodologías (1).

En estudios previos se han aislado e identificado cepas nativas de suelos y alimentos del estado de Yucatán. En este trabajo se evaluó el efecto de dos crioprotectores y diferentes temperaturas de recuperación en la conservación de cepas de bacterias ácido lácticas utilizando nitrógeno líquido (NL) y liofilización como métodos de conservación a largo plazo.

Materiales y métodos. Se evaluaron bacterias ácido lácticas de tres diferentes géneros: *Lactobacillus fermentum* (ATM5), *Lactococcus garvieae* (D4) y *Weissella cibaria* (H1B) aisladas en proyectos previos. Las cepas se recuperaron en medio MRS a 30 °C y 150 rpm durante 24 h. Los cultivos se estabilizaron en las mismas condiciones de crecimiento durante 24 h. Se utilizaron glicerol y dimetil sulfóxido (DMSO) al 10% como crioprotectores usando leche descremada reconstituida como diluyente. Los cultivos se conservaron tanto en NL como por liofilización. La recuperación se llevó a cabo a 4, 25 y 37 °C. En el caso de la liofilización, se utilizó un medio rehidratante (1). Se determinó el crecimiento celular antes y después de cada método de conservación por medio del método de la gota (2). Se calculó el porcentaje de sobrevivencia de cada tipo de microorganismo para ambos métodos de conservación.

Resultados y discusión. En la conservación con NL el glicerol presentó mayor efecto protector en los tres microorganismos evaluados (Cuadros 1, 2 y 3). En el caso de la liofilización, para ATM5 y H1B también el glicerol presentó mayor % de sobrevivencia; el DMSO funcionó mejor para la cepa D4.

Cuadro 1. Sobrevivencia (%) de *Lb. fermentum* (ATM5)

Crioprotector	Nitrógeno líquido			Liofilización		
	Recuperación			Recuperación		
	4°C	25°C	37°C	4°C	25°C	37°C
Glicerol	8.1 ± 0.8	23.1 ± 1.4	2.2 ± 0.2	39.2 ± 0.4	62.8 ± 4.9	75.3 ± 1.2
DMSO	≤ 1	8.35 ± 1.2	6.68 ± 0.2	≤ 1	≤ 1	≤ 1

Cuadro 2. Sobrevivencia (%) de *Lc. garvieae* (D4)

Crioprotector	Nitrógeno líquido			Liofilización		
	Recuperación			Recuperación		
	4°C	25°C	37°C	4°C	25°C	37°C
Glicerol	3.6 ± 0.2	54.2 ± 1.6	4.8 ± 0.4	4.6 ± 1.3	4.2 ± 1.1	≤ 1
DMSO	7.1 ± 1.4	10.6 ± 3.0	11.9 ± 2.9	36.5 ± 4.5	18.4 ± 5.8	26.5 ± 1.1

Cuadro 3. Sobrevivencia (%) de *W. cibaria* (H1B)

Crioprotector	Nitrógeno líquido			Liofilización		
	Recuperación			Recuperación		
	4°C	25°C	37°C	4°C	25°C	37°C
Glicerol	67.8 ± 5.5	48.3 ± 8.3	3.2 ± 0.5	3.3 ± 0.03	2.9 ± 0.1	6.9 ± 0.1
DMSO	4.6 ± 0.6	2.3 ± 0.1	≤ 1	4.9 ± 0.1	≤ 1	≤ 1

El glicerol se ha utilizado en varios estudios para criopreservación de material biológico y el efecto protector se atribuye a su estructura química que le confiere la propiedad de reducir la cantidad de hielo que se produce al someter a las células a bajas temperaturas y evita el incremento de la concentración iónica.

Dentro de cada método de conservación, se observa que la temperatura de recuperación ejerce un efecto importante en el % de sobrevivencia de cada cepa evaluada. Este estudio confirma que el crioprotector y la temperatura de recuperación son específicos para cada tipo de microorganismo y para cada método de conservación seleccionado.

Conclusiones. El glicerol resultó el mejor crioprotector para la conservación en NL. Los mayores % de sobrevivencia para *Lb. fermentum* y *Lc. garvieae* se obtuvieron recuperando las células a 25 °C mientras que para *W. cibaria* la mejor temperatura de recuperación fue 4°C.

En el caso de la liofilización, para *Lb. fermentum* y *W. cibaria* el glicerol y 37°C resultó el procedimiento más adecuado para su recuperación. Para *Lc. garvieae* el DMSO resultó el crioprotector más adecuado y 4°C la mejor temperatura de recuperación.

Bibliografía.

- Valdéz, G.F., Giori, G.S., Ruiz, A.P., Oliver, G. (1985). Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried lactic acid bacteria. American Soc. for Mic. Vol. (49):413-415
- Miles A.A. and Misra S.S. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hygiene*. Vol (38): 732-49.