



EFECTO DEL ÁCIDO GÁLICO Y LA DILUCIÓN DEL MEDIO EN MICROCULTIVOS DE BACTERIAS LÁCTICAS: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

¹Oswaldo Guzmán-López, ¹Octavio Loera-Corral, ²Alberto Castillo-Morales, ¹Gerardo Saucedo-Castañeda

¹Depto. de Biotecnología, CBS, UAM-I; ²Depto. de Matemáticas, CBI, UAM-I.

Av. San Rafael Atlixco, No. 186, CP 09340, Iztapalapa, México, D.F., Fax (55) 5804-6554, saucedo@xanum.uam.mx

Palabras clave: Análisis estadístico, bacterias lácticas, ácido gálico, dilución del medio, microcultivo

Introducción. Existen bacterias lácticas que crecen en presencia de ácido gálico y lo degradan en medios convencionales (1,2). Por otra parte, una práctica común en estudios microbianos es realizar diluciones sucesivas. El empleo de enfoques estadísticos adecuados evita que los datos se acumulen en las diluciones elevadas permitiendo un análisis sin sesgos. Estas técnicas pueden ayudar a explicar efectos particulares como el del presente estudio.

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la concentración de ácido gálico y la dilución del medio MRS sobre el crecimiento de bacterias lácticas en microcultivos.

Metodología. Se empleó una cepa de *Lactobacillus plantarum* (L-08) en microcultivo con placas de 96 pozos. Se utilizó medio MRS modificado (3 g/l de glucosa + nutrientes originales). Se estudió el inverso del factor dilución del medio MRS modificado (X_1), es decir, 1, (1/2), (1/4), (1/8), (1/16) y (1/32) y la concentración de ácido gálico (X_2): 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 y 0.3125 g/l. Los resultados fueron distribuidos uniformemente en la zona de estudio mediante transformaciones logarítmicas:

$$(X_1): -\log_2(X_1) \text{ y } (X_2): -\log_2([X_2]/10)$$

Así las variables transformadas tomaron valores de 0 a 5. El crecimiento celular se cuantificó por densidad óptica (DO) a 595 nm, con un lector de microplacas (Ultra Microplate Reader ELX808₁₀ de Biotek Instruments). Se tuvieron los controles de crecimiento y de esterilidad correspondientes. La DO se determinó por duplicado a las 0, 2, 4, 5, 6 y 7.5 horas. Se hicieron regresiones multilíneas de la forma:

$$DO = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1 X_2 - \beta_4 X_1^2 + \beta_5 X_2^2$$

El tiempo fue considerado realizando regresiones multilíneas de la forma:

$$DO = \alpha_0 + \alpha_1 t + \alpha_2 t^2 + \alpha_3 t^3$$

Los análisis de varianza de las regresiones se realizaron para cada una de las 36 condiciones y tiempos estudiados ($P < 0.05$) empleando el programa Excel[®].

Resultados y discusión. Se aplicó la metodología de superficie de respuesta para cada tiempo y se encontró un comportamiento similar a partir de las 4 h y hasta el fin del cultivo (Figura 1). El máximo valor de DO se encontró a las 7.5 h, en el cuadrante delimitado por un factor de dilución de 1 a 1/2 ($0 \leq X_1 \leq 1$) y una concentración de ácido gálico de 1 a 10 g/l ($0 \leq X_2 \leq 5$), como se aprecia en la Figura 1.

Los datos de crecimiento se ajustaron a ecuaciones empíricas multilíneas ($P < 0.05$) (Fig. 2).

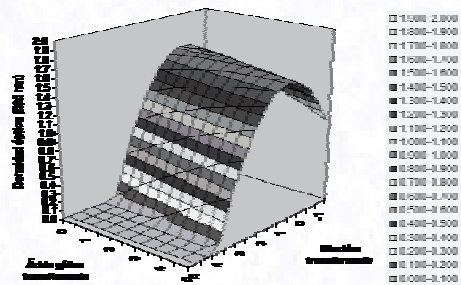


Figura 1. Efecto de la concentración de ácido gálico y la dilución del medio en el crecimiento de *L. plantarum* a 7.5 h de cultivo.

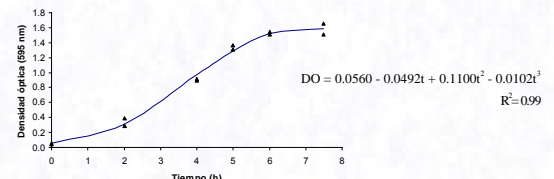


Figura 2. Crecimiento de *L. plantarum* (Dilución, 50% ácido gálico, 2.5 g/l).

La Tabla 1 presenta los valores R^2 de cada regresión en las condiciones ensayadas. Este análisis permitió descartar objetivamente las zonas de estudio con mayor incertidumbre (diluciones elevadas y R^2 bajas) y seleccionar las de mayor crecimiento ($0 \leq X_1 \leq 1$ y $0 \leq X_2 \leq 5$) con un error experimental bajo (R^2 altas).

Tabla 1. Valores R^2 de las regresiones de $DO = f(\text{tiempo})$.

Dilución transformada $X_1 = -\log_2(X_1)$	$X_2 = -\log_2([X_2]/10)$, Acido Gálico transformado					
	0	1	2	3	4	5
0	0.93	0.97	0.98	0.98	0.99	0.99
1	0.88	0.92	0.99	0.99	0.98	0.99
2	0.80	0.96	0.99	0.99	0.99	0.99
3	0.76	0.84	0.99	0.99	0.99	0.99
4	0.73	0.75	0.96	0.99	0.99	0.99
5	0.92	0.82	0.88	0.99	0.98	0.99

■ Zona de mayor crecimiento
■ 0.90 < R^2 ≤ 1
□ 0.70 < R^2 ≤ 0.90

Conclusiones. La metodología propuesta es una herramienta objetiva para descartar zonas de alto error experimental y seleccionar las condiciones de mayor crecimiento microbiano.

Agradecimiento. SAGARPA-2005-Proyecto 12182.

Bibliografía.

- Contreras, M. (2000). Selección y estudio cinético de cepas lácticas degradadoras de ácido gálico. Tesis de Maestría. UAM-I.
- De Man, J.C., Rogosa, M. y Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of *lactobacilli*. *J. Appl. Bacter.* 23: 130-13.
- Montgomery, D.C. (1991). Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica. México, D.F.