

Liofilización de bacterias y levaduras de interés industrial

Aidín Martínez-Sánchez*, María Teresa Fernández-Santisteban, Gisela González-Pardo, Gisela De Armas-García

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (Icidca).

Via Banca 804 y Carretera Central. San Miguel del Padrón, La Habana, Cuba.

*aidin.martinez@icidca.azcuba.cu

RESUMEN

La colección de cultivos microbianos del Instituto Cubano de Investigación de los Derivados de la Caña de Azúcar (CCICIDCA) depositaria mayoritariamente de cepas autóctonas, está constituida por bacterias, mohos y levaduras de interés industrial. Los microorganismos que en ella se conservan han estado involucrados en el desarrollo de diferentes tecnologías con buenos resultados en diversas ramas de la agroindustria azucarera y de derivados.

Ha almacenado sus microorganismos por más de un método de conservación, entre ellos la liofilización, uno de los más empleados para la conservación de microorganismos debido a sus numerosas ventajas, entre la que resalta un tiempo de supervivencia prolongado. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los resultados de la conservación de las cepas microbianas *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae*, por el método de liofilización durante un periodo de quince años. La viabilidad de los cultivos se determinó a la hora cero, seis meses y 15 años, oscilando entre 1.3×10^8 y 4.6×10^8 a la hora inicial y descendiendo hasta valores entre 1.0×10^5 y 2.4×10^5 , a los 15 años de conservados, demostrando que la conservación por liofilización es un método de gran utilidad en el trabajo de las colecciones de cultivos que se emplean para el control microbiológico.

Palabras clave: colección, cultivos, cepas, microorganismos, liofilización.

ABSTRACT

The collection of microbial cultures of Cuban Research Institute on Sugarcane By-products (CCICIDCA), which is the main reservoir of autochthonous strains, is made up of bacteria, molds and yeasts of industrial interest. The microorganisms that are conserved in it have been involved in the development of different technologies with good results in various branches of the sugar industry and derivatives.

It has preserved its microorganisms by more than one method including the freezer drying. In this work we show the results of the conservation by this method of *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis* and of *Saccharomyces cerevisiae*. The cultures viability was determined to hour zero, six months and 15 years. The viability oscillates between 1.3×10^8 and 4.6×10^8 at the initial time and diminished to values between 1.0×10^5 and 2.4×10^5 , at 15 years of conservation.

Key words: collection, cultures, strains, microorganisms, freezer drying.

INTRODUCCIÓN

El uso de los microorganismos ha sido clave en el enfrentamiento y solución de los graves problemas de la humanidad en la agricultura y la alimentación de los pueblos, en la salud animal y humana, en la búsqueda de nuevas fuentes de energía (1) y

en la conservación del medio ambiente. Ellos son la fuente del material básico para el desarrollo de medicamentos, agentes agroquímicos y biocontrolles, cosméticos y productos industriales (2). Los microorganismos que son aislados desde su ambiente natural son generalmente conservados en colecciones de cultivos.

La necesidad de mantener y disponer de cultivos de calidad impuso la introducción de métodos de conservación de microorganismos que reducen al mínimo la posibilidad de contaminación y garantizan al menos la supervivencia del 70 % de las células por un período determinado de tiempo. La liofilización es el método de elección debido a sus numerosas ventajas, entre las que se puede resaltar la posibilidad de minimizar el riesgo de cambio genético en las células y de mantenerlas viables por 10 años o más. Además es recomendable por la comodidad para el almacenamiento y transporte de las cepas, pues una vez conseguidos los liófilos pueden almacenarse a una temperatura ambiente de 18 a 20 °C o bien de 4 a 6 °C.

El ICIDCA cuenta con un gran número de especies de microorganismos que pertenecen a la CCICIDCA y que han servido para el desarrollo de las investigaciones, desarrollo tecnológico y en la actualidad como apoyo a las transferencias de tecnologías, por tal motivo, surgió la necesidad de evaluar la estrategia de conservación de estos microorganismos a largo plazo. Por estas razones, el objetivo del presente trabajo consistió en evaluar los resultados de la conservación de las cepas microbianas *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae* por el método de liofilización durante los 15 años.

MATERIALES y MÉTODOS

Cepas utilizadas

Las cepas microbianas de este estudio pertenecen a la CCICIDCA: *Lactobacillus acidophilus*: B/103-1-5 y L B-12, *Bacillus subtilis*: B/23-44-9 y B/23-45-10, *Saccharomyces cerevisiae*: L/25-7-12 y L/825-7-23, todas conservadas por el método de liofilización durante un período de 15 años. Se empleó como sustancia lioprotectoras: leche descremada y glicerol al 20 %.

Medios de cultivos y viabilidad

Después de la liofilización, se realizó la recuperación de los microorganismos y los recuentos de UFC/mL por diluciones seriadas hasta 10^{-8} y siembra en superficie en los medios de cultivo MRS líquido y sólido para bacterias lácticas, caldo y agar nutriente para bacterias del género *Bacillus* y YPG líquido y sólido para la levadura. Cada dilución se sembró por triplicado. Se consideró satisfactoria una concentración celular igual o superior a 10^5 UFC/mL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La CCICIDCA surgió como una necesidad de disponer de microorganismos en condiciones adecuadas para su empleo en procesos biotecnológicos; desde su creación hasta la fecha muchos de sus cultivos han sido objeto de estudio en diferentes proyectos de investigación y desarrollo tecnológico, tanto nacionales como en proyectos de colaboraciones internacionales.

La colección está integrada por 183 especímenes de microorganismos (figura 1), distribuidos en 43 cepas de bacterias, 74 cepas de levaduras, 59 cepas de hongos inferiores y 7 cepas de hongos superiores.

Los cultivos más importantes de la CCICIDCA se conservan por más de un método: agua destilada, en glicerol a -20 °C, tierra de jardín estéril y algunos microorganismos se encuentran liofilizados, método de conservación por excelencia para una gran variedad de géneros microbianos (3, 4).

Los resultados del estudio de viabilidad de las cepas de bacterias y levaduras liofilizadas durante 15 años se muestran en la tabla 1. Se puede observar que las UFC/mL al inicio oscilan desde valores de

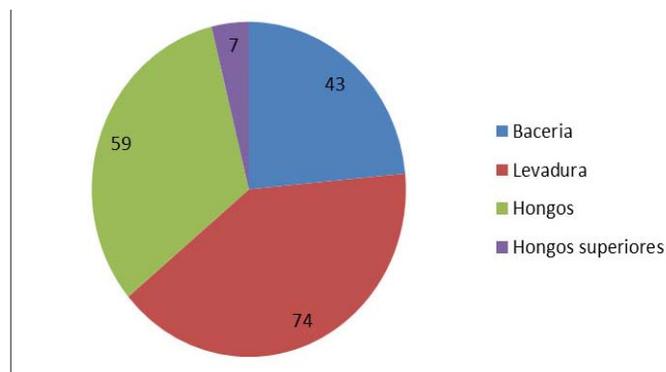


Figura 1. Representación gráfica de los diferentes grupos microbianos que integran la colección de cultivos ICIDCA.

Tabla 1. Viabilidad de los cultivos liofilizados

Cepa	Viabilidad inicial	Viabilidad 6 meses	Viabilidad 15 años
<i>L. acidophilus</i>			
B/103-1-5	$1,30 \times 10^8$	$1,20 \times 10^6$	$1,9 \times 10^5$
L B-12	$4,03 \times 10^8$	$3,3 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$
<i>B. subtilis</i>			
B/23-44-9	$2,31 \times 10^8$	$1,45 \times 10^6$	$2,40 \times 10^5$
B/23-45-10 Nato	$1,83 \times 10^8$	$2,30 \times 10^6$	$2,30 \times 10^5$
<i>S. cerevisiae</i>			
L/25-7-12	$3,4 \times 10^8$	$2,9 \times 10^6$	$1,9 \times 10^5$
L/25-7-23	$4,6 \times 10^8$	$2,5 \times 10^6$	$2,3 \times 10^5$

(1.3 - 4.6) x 10⁸. A los 6 meses hubo una disminución hasta 10⁶ UFC/mL, coincidiendo con la literatura, la cual plantea que la mayor muerte celular ocurre en los primeros seis meses de conservación (4, 5).

Al comprobar la viabilidad a los 15 años de conservados los cultivos, estos habían bajado a valores entre (1,0 – 2,4) x 10⁵ UFC/mL. La literatura refiere que concentraciones celulares iguales o superiores a 10⁵ UFC/mL, es un valor establecido en las especificaciones de calidad de lotes de muestreos para esta técnica (5, 6).

Algunos de estos cultivos se utilizan con buenos resultados en las investigaciones aplicadas a la biotecnología agrícola, obtención de importantes bioproductos con diferentes fines (alimento animal, fitosanitarios, biofertilizantes, entre otros).

CONCLUSIONES

- Los cuatro cultivos de bacterias y los dos de levaduras estudiados mantuvieron una buena viabilidad, después de 15 años de conservación por el método de liofilización al tener una viabilidad por el método de liofilización al tener una viabilidad de entre 1,0x10⁵ UFC/mL y 2,4 x10⁵ UFC/mL.
- El método de liofilización permite el mantenimiento y la conservación de los diferentes géneros de microorganismos en la CCICIDCA, asegurando el desarrollo de los proyectos de investigación y la estabilidad de las producciones biotecnológicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bell, M. Aislamiento y caracterización de levaduras oleaginosas. 2012. Tesis de Diploma. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. Cuba.
 2. Morales, M.; Iglesias, E.; Ortiz, E. Actividad desarrollada por la sección de Colecciones de Cultivos microbianos y otros materiales biológicos de la ATAC. Rev. ATAC. 2007, Vol. 68, No. 2, 42-50. ISSN. 0138-7553.
 3. WORLD FEDERATION FOR CULTURE COLLECTIONS (No. 53)–DECEMBER 2014 <http://www.wfcc.info>
 4. Montes de Oca, N.; *et al.* Establecimiento y desarrollo de la Colección de Cultivos del CENSA. Rev. Salud Anim, 2008, Vol. 30, No. 1, 17-24. ISSN. 02553-570x.
 5. Bagatolli, C. D. Validación de un método alternativo para la conservación de bacterias. Tesis de Grado presentada para Licenciatura en Bromatología. Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Cuyo. 2017. <http://www.fca.uncu.edu.ar>.
 6. Buruet, N.; Sierra, N.; Brito, L. Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en laboratorios Liorad. Rev. CENIC Ciencias Biológica, 2012. Vol. 43, No. 3, 1-4. ISSN. 2221-2450.
-