

Crioconservación de una cepa mutante de micobacteria de interés biotecnológico

Sofía Borrego, Doraida Díaz y Tomás Moreira.

Departamento de Procesos Biotecnológicos, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Apartado Postal 6414, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 25 de marzo del 2000. Aceptado: 21 de octubre del 2001.

Palabras clave: crioconservación, vitrificación, micobacterias, disoluciones vitrificadoras.
Key words: cryopreservation, vitrification, mycobacteria, solutions of vitrification.

RESUMEN. La vitrificación (variante de la crioconservación) resulta ventajosa a escala celular, pues evita parcial o totalmente la cristalización del agua en el medio de congelación. La cepa *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 que biotransforma los esteroides en el precursor esteroide de interés farmacológico androstadiendiona (ADD), se conservó por crioconservación y vitrificación. Los medios de protección para la crioconservación fueron medio caldo nutritivo enriquecido, al cual se le adicionó en un caso, glicerol al 10 % y en el otro, DMSO al 5 %; la cepa fue congelada en dos variantes: a) inmersión directa en N_2 (líquido) (-196 °C) y b) enfriamiento a 1 °C/min hasta -50 °C y después inmersión en N_2 (líquido). Para la vitrificación se emplearon tres disoluciones vitrificadoras que se adicionaron al 50 % del volumen total, pues el otro 50 % fue de caldo nutritivo enriquecido. Ellas fueron: SV2 (20,5 % DMSO, 15,5 % acetamida, 10 % propilenglicol y 6 % PEG de 8 000), SV3 (20 % DMSO, 15 % dimetilformadida y 15 % propilenglicol) y SV4 (25 % glicerol y 25 % propilenglicol). Se emplearon dos regímenes de congelación, a) tratamiento previo de adaptación que consistió en mantener las células en reposo por 20 min en la disolución al 25 % de la concentración final, 40 min al 75 % y 20 min al 85 % para pasar al 100 % de la concentración final de la disolución vitrificadora, b) sin tratamiento previo de adaptación. Además, se comparó la viabilidad en disoluciones de glicerol (10 %), SV2 y SV4 al cabo de 1, 15, 40 y 60 d de conservada la cepa. De las disoluciones crioprotectoras, la mejor fue el glicerol (10 %) en la variante de inmersión directa en N_2 (líquido) que mantuvo una viabilidad del 99 % al cabo de los 2 meses de conservación. De las disoluciones vitrificadoras, la SV2 fue la mejor y no requirió tratamiento previo de adaptación. La capacidad biotransformadora del mutante conservado en glicerol (10 %), SV2 y SV4, no se afectó.

ABSTRACT. Vitrification (cryopreservation method) seems to be promissory, due to the elimination of the deleterious effect of ice crystallization into the cells. The strain *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 acts on the sugar cane phytosterols and transform them into androstadiendione (ADD), an important steroidal precursor for the pharmaceutical industry. It was preserved by traditional cryopreservation protocols: using enriched nutrient broth with addition of 5 % DMSO or 10 % glycerol and freezing by direct immersion in liquid nitrogen or by cooling at 1 °C . min⁻¹ down to -50 °C with subsequent immersion in liquid nitrogen. For vitrification, the solutions SV2 (20.5 % DMSO, 15.5 % acetamide, 10 % propylene glycol, 6 % polyethylene glycol 8 000), SV3 (20 % DMSO, 15 % dimethylformadide, 15 % propylene glycol), SV4 (25 % glycerol, 25 % propylene glycol), were respectively mixed with enriched nutrient broth in a proportion 50 % volume of vitrifying solution to 50 % volume broth to form the final solution. Two vitrification protocols were employed for each solution: a) the cells were adapted for 20 min. in 25 % strength final solution, 40 min. in 75 % strength, 20 min. in 85 % strength and finally in the complete final solution, b) no adaptation, but only immersion in the final solution. In both cases the cells in each final vitrification solution were immersed in liquid nitrogen. It was also compared the viability after 1, 15, 40 and 60 d of frozen storage in 10 % glycerol and in vitrifying solutions containing SV2 and SV4. After 2 months of storage, the solution containing 10 % glycerol with direct immersion in liquid nitrogen retained 99 % of viability while the solution SV2 (without adaptation of the cells), retained 95,3 % of viability. The sterol biotransformation of the mutant preserved in glycerol (10 %), SV2 and SV4 was not affected.

INTRODUCCION

La crioconservación es un método eficaz para conservar microorganismos de interés biotecnológico por períodos prolongados,^{1,2} así como cepas genéticamente modificadas mediante métodos de e recombinante.^{3,4} Por un lado, esta técnica evita la necesidad de pases frecuentes del microorganismo hacia medio fresco, lo cual implica gasto de tiempo, mano de obra y reactivos costosos, así como el riesgo de contaminación y por otro lado, minimiza la posibilidad de variaciones genéticas.

La conservación a temperaturas extremadamente bajas, generalmente -196 °C (N_2 líquido), evita estos inconvenientes y, efectuándose el proceso de congelación-descongelación de forma adecuada, es posible mantener la cepa intacta décadas después de haberse congelado. Los regímenes de enfriamiento y calentamiento, así como el sistema de crioprotectores más eficaces para cada sistema biológico son factores a considerar en la definición de un protocolo de crioconservación.

También se ha empleado el método de la crioconservación por vitrificación, que consiste en evadir parcial o totalmente la cristalización del agua en el medio de congelación, lo cual obviamente es ventajoso a nivel celular.^{5,7} Para esto, se emplean disoluciones relativamente concentradas en solutos que presentan tendencia a la formación vítrea.

La mayoría de las disoluciones de vitrificación que se utilizan, presentan en su composición DMSO unido a la acetamida, así como otros

compuestos con capacidad para bloquear la toxicidad del DMSO. También, se utiliza en estas mezclas, el propilenglicol, por su efecto crioprotector.⁸

Además, se utilizan los denominados crioprotectores extracelulares debido a su efecto estabilizador sobre los componentes macromoleculares de la membrana celular, de ahí que se recomiende el uso de concentraciones de alrededor del 5 % de polietilenglicol (PEG) de PM 6 000 - 8 000, polivinilpirrolidona (PVP), sacarosa y otros.^{5,9,10}

El objetivo de este trabajo fue estudiar las condiciones de criopreservación y vitrificación de la cepa mutante *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683, así como la posible influencia de este tipo de conservación en su capacidad biotransformadora.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismo

Se utilizó la cepa mutante *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 que biotransforma los esteroides en androstadiendiona (ADD).¹¹ A partir de este precursor esteroide, se obtiene por síntesis química, una gran variedad de medicamentos.

Condiciones de cultivo

Las bacterias se propagaron en el medio propuesto por Conner y col.¹² a 30 °C y 200 r/min (zaranda orbital) hasta obtener cultivos que se encontraban a 2/3 de la fase exponencial de crecimiento.

Condiciones de criopreservación

Se realizó una experiencia de criopreservación convencional, en la que se probaron dos crioprotectores, el glicerol¹⁰ 10 % y el DMSO 5 % en dos regímenes de congelación, la inmersión directa en nitrógeno líquido y el enfriamiento lento (1 °C/min) hasta -50 °C previo a la inmersión.

El enfriamiento a 1 °C/min se efectuó en un congelador programable Bicoool BC-111- 80A02 FTS Systems USA.

En la vitrificación por inmersión en nitrógeno líquido, se emplearon tres disoluciones vitrificadoras denominadas SV2, SV3 y SV4 cuya composición fue: SV2 (20,5 % de DMSO, 15,5 % de acetamida, 10 % de propilenglicol y 6 % de PEG de 8 000); SV3 (20 % DMSO, 15 % de dimetilformamida y 15 % de propilenglicol) y SV4 (25 % de glicerol y 25 % de propilenglicol).

Las disoluciones se añadieron al 50 % utilizando como base el medio caldo nutritivo¹² que era donde se

encontraban las células crecidas. Además, se estudiaron dos tratamientos, uno sin adaptación previa de las células a las disoluciones de vitrificación, y otro donde se adaptaron las células poco a poco hasta alcanzar la concentración máxima de las disoluciones en estudio según el protocolo siguiente: 20 min en la disolución al 25 % de la concentración final, 40 min en la disolución al 75 % y 20 min al 85 %, para pasar al 100 % de la concentración final.

La congelación de los microorganismos se realizó en crioviales, donde se dispensaron 0,2 mL de inóculo y 0,2 mL de la disolución crioprotectora de forma tal que se lograra la concentración final deseada.

Por último, se determinó la influencia de las mejores variantes en la viabilidad celular cuando la cepa se conservó por 1, 15, 40 y 60 d en nitrógeno líquido.

En la descongelación o desvitrificación se empleó en todos los casos, un baño de agua a 37 °C.

Determinación de la viabilidad

Se utilizó la prueba reportada por Kratochvílová y Kovacovskál.¹³ Este método constituye una evaluación cualitativa del crecimiento y consiste en utilizar cinco placas Petri con agar nutritivo por cada vial. Las placas se siembran por estrías rectas y cruzadas, realizando por cada placa tres cruzamientos de cinco estrías cada uno, de forma tal que 15 cruzamientos con crecimiento corresponden al 100 % de viabilidad. Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 96 h.

Biotransformación

Para realizar la evaluación de la capacidad biotransformadora de la cepa se empleó el método descrito por Borrego y col.¹¹ y colesterol como sustrato que se preparó de forma semejante a como describen los autores antes mencionados.

La determinación cuantitativa del producto (ADD) de realizó por Cromatografía Líquida de Alta Presión siguiendo la metodología propuesta también por Borrego y colaboradores.¹¹

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por duplicado, y los resultados se analizaron mediante las pruebas ANOVA- 1 y Duncan.¹⁴

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 se observa que la adición de glicerol (10 %) en el medio de cultivo y la inmersión directa

en N₂ (líquido) se obtuvo la mayor viabilidad del microorganismo, mientras que un enfriamiento lento previo a la inmersión es innecesario y quizás inadecuado en este caso.

Aunque la viabilidad de la cepa es menor cuando no se emplea crioprotector y en particular, cuando la inmersión en nitrógeno líquido es directa, esta disminución no es tan marcada en la variante de DMSO (5 %), donde la inmersión directa o un enfriamiento progresivo previo arrojaron resultados similares. El hecho de que la viabilidad no fuese aún más baja al no emplear crioprotector pudiera deberse a que el medio caldo nutritivo enriquecido posee una gran cantidad de aminoácidos y proteínas y meso-inositol, los cuales ejercen un efecto beneficioso en la disminución o reversión del daño por hipotermia en ese sistema, al estabilizar los componentes macromoleculares de la membrana bacteriana, que es el sitio primario en el que se manifiesta el daño. A todo lo anterior debe contribuir la gran cantidad de lípidos que posee en la pared este tipo de bacteria,^{15,16} lo cual le confiere una gran resistencia.

De las disoluciones de vitrificación empleadas para criopreservar la cepa (Tabla 2) las mejores fueron SV2 y SV4, independientemente de que las células se sometían o no al proceso previo de adaptación a la elevada concentración de soluto empleada. Para SV3 la viabilidad fue muy baja, lo cual parece ser debido a la presencia de dimetilformamida al 15 %, compuesto que si bien manifiesta gran tendencia a la vitrificación, puede ejercer un efecto tóxico sobre este microorganismo a esta concentración.

Al comparar las disoluciones vitrificadoras SV2 y SV4 con el glicerol 10 % (Tabla 3), se observó que con este último, prácticamente no se produce pérdida de la viabilidad inicial a los dos meses, mientras que en SV2, aunque se observa una disminución significativa de la misma a los 60 d, aún sigue siendo elevada. El empleo de SV4 proporcionó una viabilidad aceptable, pero inferior a la obtenida con glicerol o SV2, evidenciándose una disminución marcada de ella a partir de los 40 d. Esto puede deberse a un posible efecto tóxico del propilenglicol a esa concentración (25 %) sobre las células, pues esta variante difiere de la que usa el glicerol (10 %), no sólo en que este compuesto está al 25 %, sino también, en que el propilenglicol se encuentra a una concentración mu-

cho más elevada, incluso, que la que contiene la variante SV2.

De estos resultados se desprende que, si bien es factible la criopreservación de esta cepa por vitrificación, en el medio caldo nutritivo enriquecido que contiene además, glicerol al 10 %, se obtiene la mayor viabilidad. Esta variante no sólo es la de mejor resultado, sino que desde el punto de vista económico es más barata que las otras variantes estudiadas.

La cepa después de haber estado conservada en glicerol (10 %), SV2 y SV4 durante 60 d (Tabla 4) no mostró alteración de la capacidad biotransformadora, lo que indica que las disminuciones de la viabilidad no influyen sobre la mutación realizada para fines biotecnológicos.

Tabla 4. Capacidad biotransformadora de la cepa mutante *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 después de haber estado conservada en diferentes disoluciones crioprotectoras al cabo de 60 d.

Variante	Y _{p/s} ± DE (%)
Control*	50,2 ± 3,4
Glicerol (10 %)	49,7 ± 2,2
SV2	50,0 ± 2,8
SV4	48,6 ± 3,6

* Indica que la biotransformación se realizó con un cultivo fresco.

$$Y_{p/s} = \frac{\text{Rendimiento producto}}{\text{sustrato añadido}} = \frac{\text{ADD(mg)}}{\text{Colesterol(mg)}} \cdot 100$$

Tabla 1. Influencia de dos crioprotectores a dos regímenes de congelación sobre la viabilidad de la cepa *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683.

Crioprotector	Viabilidad ± DE (%)	
	ID	-50 ID
Sin crioprotector	82,9 ± 2,1 (d)	92,0 ± 3,0 (bc)
Glicerol al 10 %	100,0 ± 3,0 (a)	95,0 ± 4,6 (b)
DMSO al 5 %	89,7 ± 3,5 (c)	91,8 ± 4,3 (bc)

ID Inmersión directa en N₂ (líquido). -50 ID Enfriamiento a 1 °C/min hasta -50 °C y después inmersión en N₂ (líquido). (b), (bc), (c) y (d) Difieren significativamente de (a) según Duncan (p ≤ 0,05). DE Desviación estándar.

Tabla 2. Efecto de tres disoluciones vitrificadoras y del tratamiento previo de adaptación de las células microbianas sobre la viabilidad de la cepa *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683.

Disoluciones de vitrificación	Viabilidad ± DE (%)	
	TP	S/TP
SV2	100,0 ± 0,0 (a)	100,0 ± 0,0 (a)
SV3	33,0 ± 5,0 (c)	45,0 ± 2,3 (b)
SV4	100,0 ± 0,0 (a)	100,0 ± 0,0 (a)

SV2 20,5 % de DMSO, 15, 5 % de acetamida, 10 % de propilenglicol y 6 % de PEG (8 000). SV3 20 % de DMSO, 15 % de dimetilformamida y 15 % de propilenglicol. SV4 25 % de glicerol y 25 % de propilenglicol. TP Tratamiento previo de adaptación (Materiales y Métodos). S/TP Sin tratamiento previo de adaptación. DE Desviación estándar. (b) y (c) Difieren significativamente de (a) según prueba de Duncan (p ≤ 0,05).

Tabla 3. Influencia de diferentes disoluciones crioprotectoras sobre la viabilidad de la cepa *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 a distintos de tiempo.

Disoluciones crioprotectoras	Viabilidad ± DE (%)			
	1	15	40	60
	(d)			
Glicerol (10 %)	100 ± 0 (a)	100 ± 0 (a)	99,5 ± 1,2 (a)	99,0 ± 1,0 (a)
SV2	100 ± 0 (a)	100 ± 0 (a)	100 ± 0,0 (a)	95,3 ± 2,5 (b)
SV4	100 ± 0 (a)	96,2 ± 3,0 (b)	91,7 ± 1,0 (c)	92,0 ± 2,5 (c)
Sin crioprotector	90,0 ± 3,0 (cd)	88,0 ± 2,0 (d)	87,0 ± 1,5 (d)	87,0 ± 1,0 (d)

(b), (c), (cd) y (d) difieren significativamente de (a) según prueba de Duncan (p ≤ 0,05).

CONCLUSIONES

La cepa mutante *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 puede ser criopreservada en medio caldo nutritivo enriquecido al cual se le adiciona glicerol al 10 % como crioprotector, realizándose la inmersión directa en nitrógeno líquido. Con este método, se garantiza una viabilidad del 99 % a los dos meses de almacenada a -196 °C, variante que se propone por su sencillez y bajo costo.

Igualmente, es factible la criopreservación de esta cepa por vitrificación siempre y cuando las disoluciones que con tal acción se empleen no contengan dimetilformamida (SV2 y SV4). Con estas disoluciones no es necesaria la adaptación previa del cultivo, por tanto, se puede realizar el enfriamiento rápido a partir de la inmersión directa en nitrógeno líquido. No obstante, estas variantes resultan más costosas para trabajos de rutina.

La cepa mutante *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 después de haber estado criopreservada por 60 d en glicerol (10 %) y vitrificada en las disoluciones SV2 y SV4 no pierde la capacidad de biotransformar el colesterol en ADD, por tanto, estas condiciones de preservación no afectan la mutación realizada.

BIBLIOGRAFIA

1. Snell J.J.S. General introduction to maintenance. In: Maintenance of microorganisms, (Kirsop B.E and Snell J.J.S., ed.), Academic Press Inc., UK, 20, 1984.
2. Romo S. and Bécáres E., Preservation of filamentous cyanobacteria cultures (*Pseudanabaena galeata* Böcher and *Geitlerinema amphibium* (Ag. ex Gom) Anagn. under low temperatures. *J. Microbiol. Meth.*, 16, 85, 1992.
3. Sidiyakin T.M. and Golimbet V.E., Viability and genetic stability of the bacterium *Escherichia coli* HB101 with recombinant plasmid during preservation by various methods. *Cryobiology*, 28, 251, 1991.
4. Sosa A.E., Ariosa Y., Rivero T. y Estévez I. Diferencia en la viabilidad y estabi-

- lidad genética de mutantes de *Escherichia coli* criopreservadas mediante un mismo método. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 31, 21, 2000.
5. Fahy G.M., Vittrification of multicellular systems and whole organs. *Cryobiology*, 24, 580, 1987.
 6. Mac Farlane D.R., Physical aspects to vittrification in aqueous solution. *Cryobiology*, 24, 181, 1987.
 7. Fahy G.M., Levy D.I., Ali S.E., Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vittrification solution. *Cryobiology*, 24, 196, 1987.
 8. Fahy G.M., Mac Farlane D.R., Angell C.A., Meryman H.T., Vittrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21, 407, 1984.
 9. Fahy G.M., The relevance of cryoprotectant toxicity of cryobiology. *Cryobiology*, 23, 1, 1986.
 10. Sidiyakina T.M., Khasaeva F.M., Taptikova S.D. and Modyanova L.V., Viability and biochemical activity of bacterium *Arthrobacter crystallopoietes* VKM Ac-1098 after freeze-drying and cryopreservation in various protective media. *Cryo-Letters*, 12, 3, 1991.
 11. Borrego S., Espinosa M.E., Martí E. y Fonseca M., Optimización de un medio de cultivo salino para la producción de ADD a partir de fitosteroides de la caña de azúcar. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 29, 61, 1998.
 12. Conner A.H., Nagaoka M., Rowe J.W. and Perlman D., Microbial conversion of Tall oil to C₁₈ steroids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32, 310, 1976.
 13. Kocková-Kratochvílová A. and Kovazovská R., A contribution to the quantitative evaluation of yeast cultures stored in liquid nitrogen, *Folia Microbiol.*, 31, 367, 1986.
 14. López R., Diseño estadístico de experimentos. Editorial Científico-Técnica, 103-111, La Habana, 1984.
 15. Bendinger B., Rijnaarts H.H.M., Altendorf K. and Zehnder A.J.B., Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3973, 1993.
 16. Jarlier V. and Nikaido H., Micobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.*, 123, 11, 1994.

¿BUSCA PUBLICIDAD?



La Revista CENIC Ciencias Biológicas le puede ayudar eficazmente a difundir su mensaje, así como a viabilizar sus contactos y propiciar intercambios y relaciones futuras con la comunidad científica nacional e internacional y sus instituciones respectivas.

Aproveche esta oportunidad que a módicos precios le ofrece para que su mensaje viaje y llegue con ella, a su círculo especializado de lectores.

TARIFAS (USD)

\$200	\$100	\$70	\$120	\$50	\$150	\$300	\$350
P	1/2P	1/3P	1/3P	1/4P	3/4P	2P	2P
							CENTRALES
\$850				\$500			
CONTRACUBIERTA (cuatricomía)				REVERSO DE CUBIERTA O DE CONTRACUBIERTA (cuatricomía)			

La contratación por un año (tres números) de este servicio, le proporciona como beneficio adicional, un descuento del 15 %.

Dirija su solicitud a:

Editorial CENIC
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.