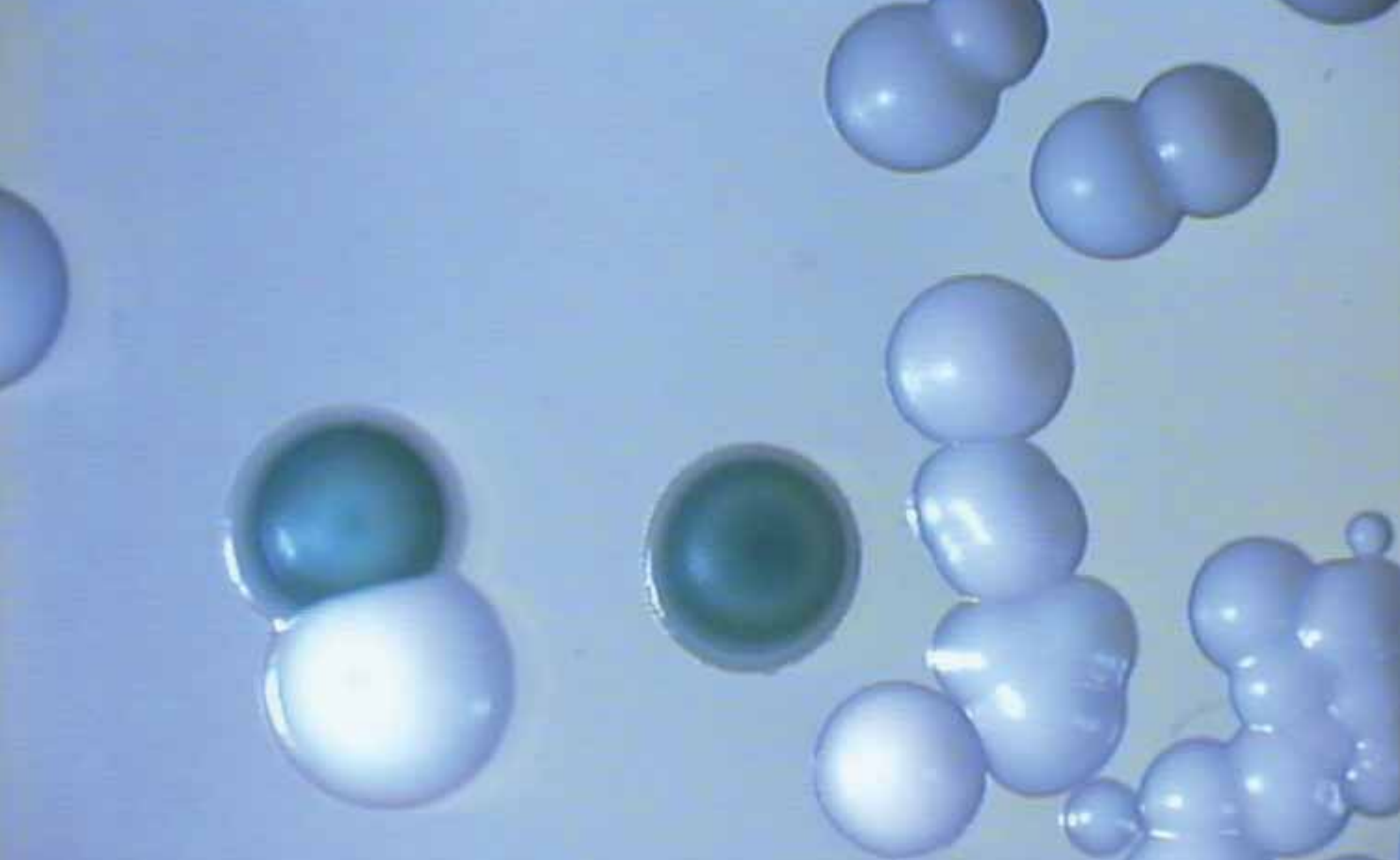




# Microorganismos de origen sidrero, recursos genéticos microbianos, al servicio de la biotecnología (I)

ROSA PANDO BEDRIÑANA. Área de Tecnología de los Alimentos. [rpando@serida.org](mailto:rpando@serida.org)

MARÍA TERESA VALDERAS HERRERO. Área de Tecnología de los Alimentos. [maitev@serida.org](mailto:maitev@serida.org)

BELÉN SUÁREZ VALLÉS. Jefa del Área de Tecnología de los Alimentos. [mbsuarez@serida.org](mailto:mbsuarez@serida.org)

Los microorganismos son el grupo de seres vivos menos conocido y con una gran potencialidad para el sector agroalimentario. Desde tiempos remotos han sido empleados como materiales esenciales de trabajo en la obtención de antibióticos, vitaminas y aminoácidos, en la elaboración de alimentos (pan, queso, leche, bebidas y licores) y en la fabricación de solventes y reactivos, entre otras aplicaciones.

La importancia de conocer y conservar la biodiversidad microbiana, y el creciente uso de microorganismos en la biotecnología, han contribuido a reconocer el valor que tienen las Colecciones de Cultivos Microbianos en la preservación *ex-situ* de los recursos genéticos. El manejo y conservación de una colección de microorganismos son tareas exigentes, que requieren de conocimientos no sólo de los propios microorganismos, sino

también de sus condiciones de crecimiento y preservación, de sus propiedades y posibles aplicaciones.

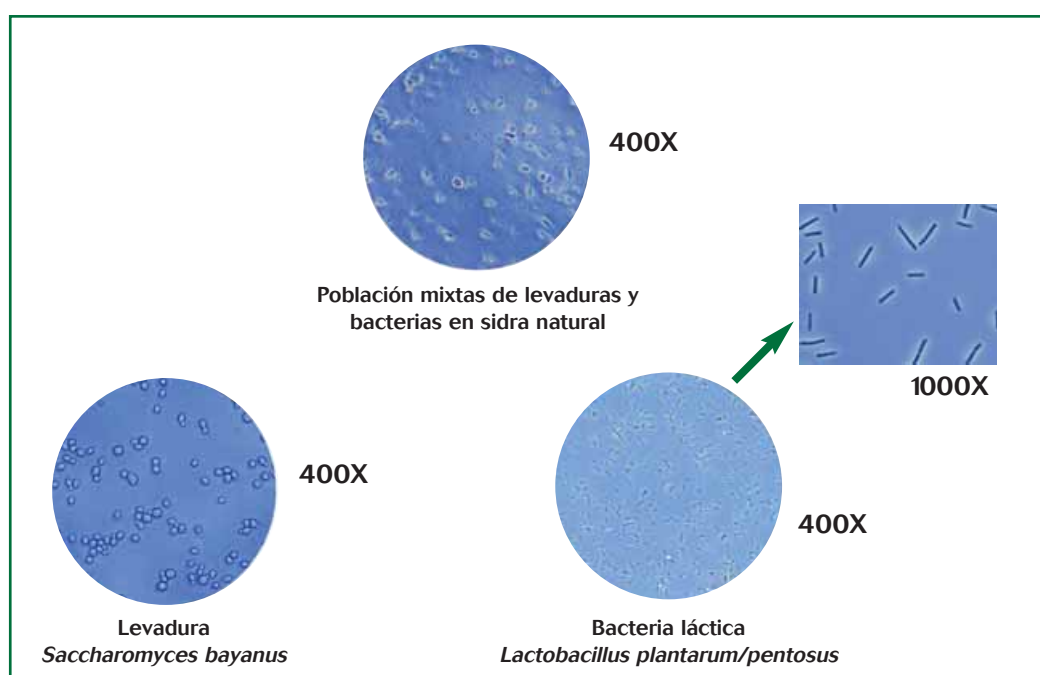
Para realizar una conservación de microorganismos, en primer lugar debe disponerse de cultivos microbianos puros y, en segundo lugar, de herramientas que aseguren su correcta preservación.

Un cultivo puro es aquél en el que todos los microorganismos provienen de una célula (Figura 1). Para su obtención el microorganismo tiene que aislarse de su nicho ecológico en el que, generalmente, se encuentra formando parte de poblaciones mixtas. Durante este proceso, se debe proporcionar a los microorganismos las condiciones físicas y nutritivas adecuadas que permitan la obtención de colonias aisladas en medios de cultivos sólidos. Por su parte, la conservación de cultivos se debe hacer asegurando su pureza, viabilidad y estabilidad genética. Es decir, hay que evitar que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación, la tasa de supervivencia de las células debe ser alta y éstas tienen que permanecer genéticamente estables.

No existe un método universal para mantener los recursos microbianos. Durante décadas la conservación de cepas se realizó con refrigeración en cultivo

activo mediante transferencia periódica. Sin embargo, este procedimiento ya no es considerado una práctica estándar para la mayoría de los microorganismos, debido al elevado riesgo de que se produzcan cambios genéticos durante el almacenamiento. Con el fin de minimizar estos cambios, se desarrollaron metodologías basadas en la conservación de microorganismos en un estado metabólicamente inactivo, siendo las más utilizadas la congelación y la liofilización. La congelación consiste en preservar los microorganismos, a temperaturas inferiores a cero grados centígrados, mediante la paralización del metabolismo celular por disminución del agua disponible. Mientras que la liofilización, se fundamenta en la deshidratación de las células mediante desecación por congelación a través de vacío. Son estos dos últimos métodos los considerados como más idóneos para la conservación de recursos microbianos a largo plazo.

El Área de Tecnología de Alimentos del SERIDA inició la conservación *ex situ* de recursos microbianos de origen sidrero en la década de los 80. El trabajo comenzó con una prospección de microorganismos en ocho lagares asturianos. Dada la importancia que tiene la elaboración de sidra en Asturias se priorizó la conservación de microorganismos autóctonos.



→  
**Figura 1.**-Observaciones microscópicas de sidra natural y cultivos puros de microorganismos.



|                    | Prospecciones | Servicio de Análisis | Total |
|--------------------|---------------|----------------------|-------|
| Levaduras          | 900           | 324                  | 1.224 |
| Bacterias lácticas | 480           | 1.201                | 1.681 |

tonos responsables de las principales transformaciones que se producen durante la elaboración de sidra: la fermentación alcohólica (levaduras) y la transformación maloláctica (bacterias lácticas). También, se puso énfasis en que los aislados fueran representativos de las zonas geográficas con mayor producción de sidra en Asturias. Fruto de este trabajo fue el inicio de la Colección de Cultivos Autóctonos del SERIDA, constituida por 23 cepas de levaduras y 22 de bacterias lácticas.

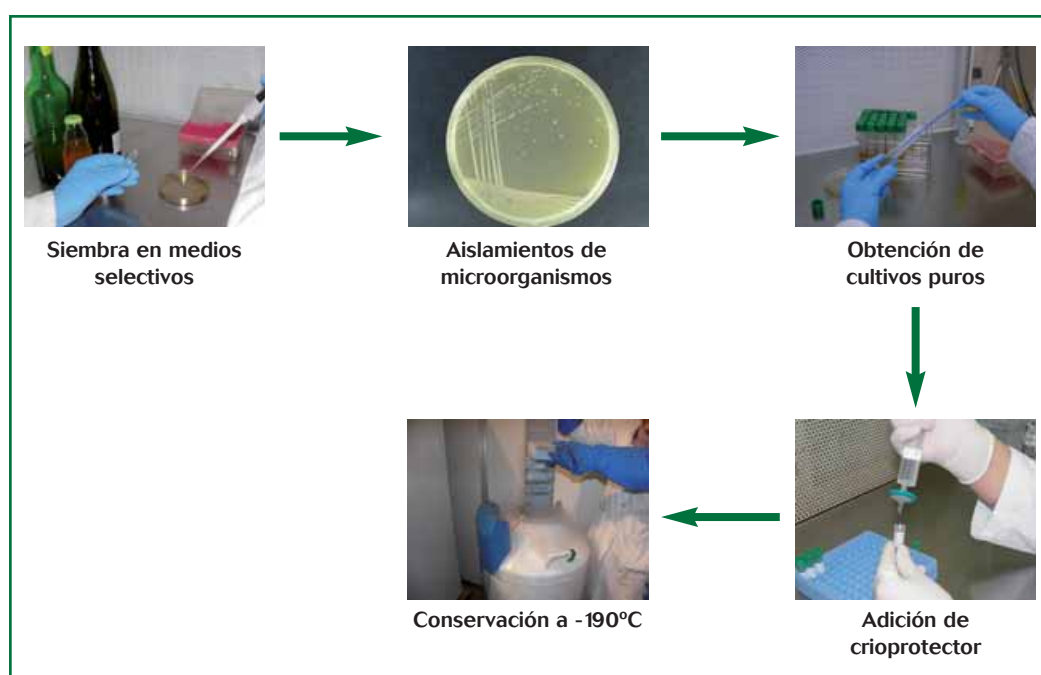
El número de microorganismos conservados se ha incrementado a lo largo de estos años, bien con entradas provenientes de nuevas prospecciones en lagares del concejo de Villaviciosa y/o de aislamientos realizados en muestras del Servicio de Análisis externo ofertado por el SERIDA. En la actualidad, la Colección está constituida por más de 2900 microorganismos autóctonos (Tabla 1).

En el laboratorio de microbiología del Área de Tecnología de Alimentos se lleva

a cabo la conservación de estos recursos microbianos (Figura 2). El proceso comienza con la siembra de la muestra en medios de cultivos selectivos que facilitan el crecimiento de forma individualizada de los grupos microbianos: levaduras/hongos y bacterias lácticas. La selectividad de los medios utilizados está aportada tanto por el uso de antibióticos como por las diferentes condiciones de crecimiento (Tabla 2). Una vez que se dispone de colonias aisladas, y antes de proceder a su conservación, se comprueba su pureza mediante siembra por agotamiento en los mismos medios de cultivo. Cuando se observa una total homogeneidad de colonias, se obtiene un cultivo puro a partir de una colonia.

Las células se hacen crecer hasta el final de la fase logarítmica, en los medios descritos preparados como caldos, posteriormente se separan del medio por centrifugación y se resuspenden en un agente crioprotector (Tabla 3). La conservación se realiza por congelación de los cultivos, enfriando estos a razón de unos 10°C por

←  
**Tabla 1.**-Origen y número de microorganismos sidreros conservados en el Área de Tecnología de los Alimentos del SERIDA.



←  
**Figura 2.**-Conservación de recursos microbianos de origen sidrero mediante congelación.





**Tabla 2.**-Composición de los medios de cultivo y condiciones de crecimiento utilizados para el crecimiento de microorganismos de origen sidrero.

| Grupo microbiano   | Medio de cultivo | Composición                                                                                                                                                                                                                                                    | Condiciones de crecimiento |
|--------------------|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Levaduras/hongos   | WL Nutrient Agar | Medio comercial (Laboratorios Microkit S.L.) suplementado con 0,0025% de penicilina G y 0,01% de estreptomicina (pH=5,5)                                                                                                                                       | Aerobiosis, 30°C, 2 días   |
| Bacterias lácticas | ZMA              | Zumo de manzana (d=1.020 g/l) suplementado con 0,4% de extracto de levadura, 0,1% de peptona, 0,1% de triptona, 0,05% de fosfato triamónico, 0,05% de fosfato disódico, 0,05% de fosfato bipotásico, 0,1% de Tween 80, 0,005% de pimaricina y 3% agar (pH=4,8) | Anaerobiosis, 30°C, 5 días |



**Tabla 3.**-Composición de los agentes crioprotectores utilizados en la conservación de los recursos genéticos sidreros.

| Grupo microbiano   | Crioprotector                      |
|--------------------|------------------------------------|
| Levaduras          | 15% glicerol<br>15% glucosa        |
| Bacterias lácticas | 20% glicerol<br>1% ácido glutámico |

minuto hasta alcanzar los -80°C. Los distintos crioprotectores utilizados tienen como función minimizar los daños de las células, durante la congelación, favoreciendo la vitrificación del agua y evitando la formación de cristales de hielo. De forma rutinaria, y para minimizar la probabilidad de perder aislados, se conservan dos copias de cada microorganismo almacenadas a -80°C (arcón congelador) y a -190°C (nitrógeno líquido).

Cuando se necesita recuperar los microorganismos, se descongelan en condiciones controladas (37°C/20 minutos) y se inoculan en los correspondientes medios de cultivo para revitalizar o rejuvenecer las células. Posteriormente y antes de su uso se realizan controles de viabilidad, pureza y autenticidad de los microorganismos mediante: recuento de viables, observaciones microscópicas, siembras por agotamiento y comprobación de propiedades y características con respecto al microorganismo original.

Con el mantenimiento y la incorporación de nuevos recursos genéticos mi-

crobianos en la Colección de Cultivos Autóctonos del SERIDA se pretende: conservar la biodiversidad de los recursos microbianos sidreros, conocer la ecología microbiana de las elaboraciones de sidra, y disponer de material para realizar investigaciones que permitan ahondar en el conocimiento de las características de las diferentes cepas para poder utilizarlas en beneficio de la industria y, en último caso, de los consumidores que demandan productos innovadores, seguros y de calidad contrastada.

## Agradecimientos

La conservación y caracterización de microorganismos de origen sidrero se ha realizado con ayuda de los proyectos RM2006-00008, RM2009-00005 y RTA2009-00111 financiados por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y PC04-24 financiado por la Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT). ■