



REPORTE DE INVESTIGACIÓN

*Comparación de la resistencia a ácido acético y
acetato de cepas de Candida guilliermondii*

M.B Lorena Pedraza Segura y M.C. Karina Maldonado Ruiz Esparza

Lorena Pedraza Segura
lorena.pedraza@ibero.mx

INTRODUCCIÓN

En respuesta a los requerimientos presentados por la oficina de patentes de Chile, se planteó desarrollar experimentos que dieran evidencia de la resistencia de la levadura *Candida guilliermondii* No. de acceso CMCNRG-0032, con la que se desarrolló el proceso de producción de xilitol presentado en la solicitud de patente de la Universidad Iberoamericana, comparándola con otras cepas de la misma especie, ya que en la literatura especializada se reportan diferentes concentraciones de ácido acético y/o acetato a los que la levadura puede crecer. Frecuentemente se habla de ácido acético en el medio, pero al ajustar el pH inicial a valores mayores al pKa de dicho ácido se tiene en realidad la sal de este, acetato de sodio o potasio, dependiendo de la base con la que se haga el ajuste.

El objetivo de estos experimentos es la comparación de la resistencia o sensibilidad de distintas cepas de *C. guilliermondii* a la presencia de ácido acético en un medio de cultivo complejo, basado en glucosa y fuentes de nitrógeno complejas.

METODOLOGÍA

Microorganismos

Se utilizaron las siguientes cepas de *C. guilliermondii*:

- *C. guilliermondii* No. de acceso CMCNRG-0032 (UIA)
- *C. guilliermondii* ATCC 6220 (American Type Culture Collection)
- *C. guilliermondii* NRRL Y-2076 (ARS Culture Collection)

Las dos últimas cepas pertenecen a dos diferentes cepario y no están relacionadas entre sí, es decir, no son la misma cepa perteneciente a dos ceparios.

Medios de cultivo y soluciones:

Medio YPD líquido (g/L): Glucosa 20; peptona de caseína 20; extracto de levadura 10.

Medio YPD sólido (g/L): Glucosa 20; peptona de caseína 20; extracto de levadura 10, agar bacteriológico 20.

Solución salina: 9 g/L de cloruro de sodio.

Solución de acetato de sodio: 38.5 g/L de acetato de sodio.

Ácido acético concentrado (99%).

Experimentación

La experimentación se inició con la reactivación de las cepas, dado que se encontraban liofilizadas. Una vez que se logró que crecieran en medio YPD líquido se pasaron a YPD agar para su uso a corto y mediano plazo.

La prueba de resistencia al ácido acético se llevó a cabo en dos etapas: en medio sólido (YPD agar) y en medio líquido (YPD) con adición de distintas concentraciones del ácido o acetato (0.5, 1.0, 2.0,

4.0, 8.0 y 10 g/L) teniendo como control el medio sin modificar. Las figuras 1 y 2 presentan la metodología seguida para el medio sólido.

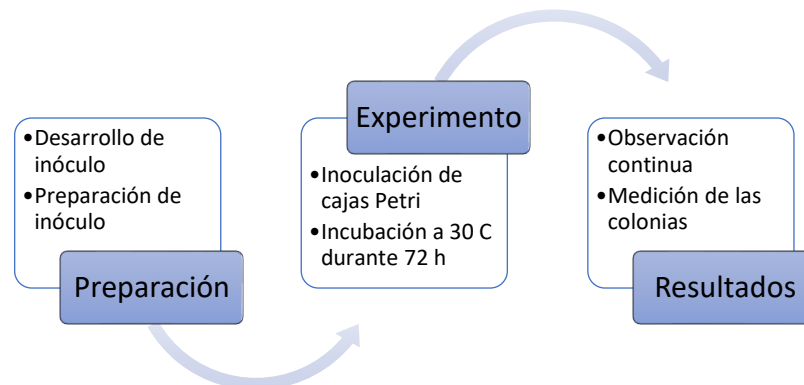


Figura 1: metodología para el experimento en medio sólido.

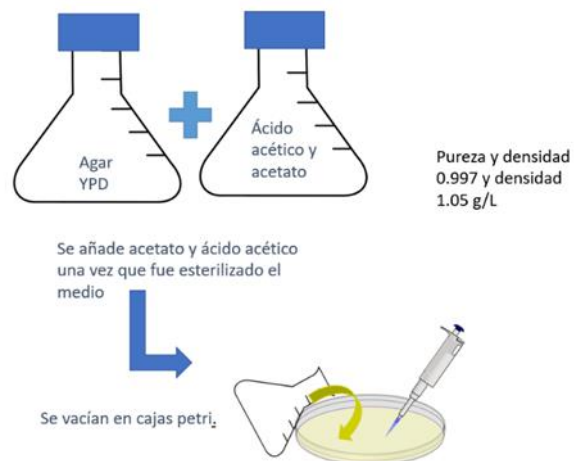


Figura 2: Preparación de las cajas Petri

Para preparar el inóculo el procedimiento es el siguiente:

- Esterilizar matraces Erlenmeyer de 125 mL.
- Preparar medio YPD líquido (sin agar).
- Colocar en los matraces 25 mL del medio YPD.
- Inocular con una asada de la cepa a probar cada matraz.
- Incubar durante 20 horas
- Medir densidad óptica (DO).

Una vez medida la DO se realiza el procedimiento para pruebas de inhibición el cual consiste en:

- Medir la DO
- Diluir el inóculo con solución salina para obtener una DO de 0.2

- Colocar 20 μL del inóculo en las cajas, para cada caja son dos gotas de 20 μL dejando espacio suficiente para evitar que se toquen las colonias
- Incubar a 30°C
- Observar las colonias cada 24 horas, tomar fotografías y medir su diámetro si es necesario (figura 3).

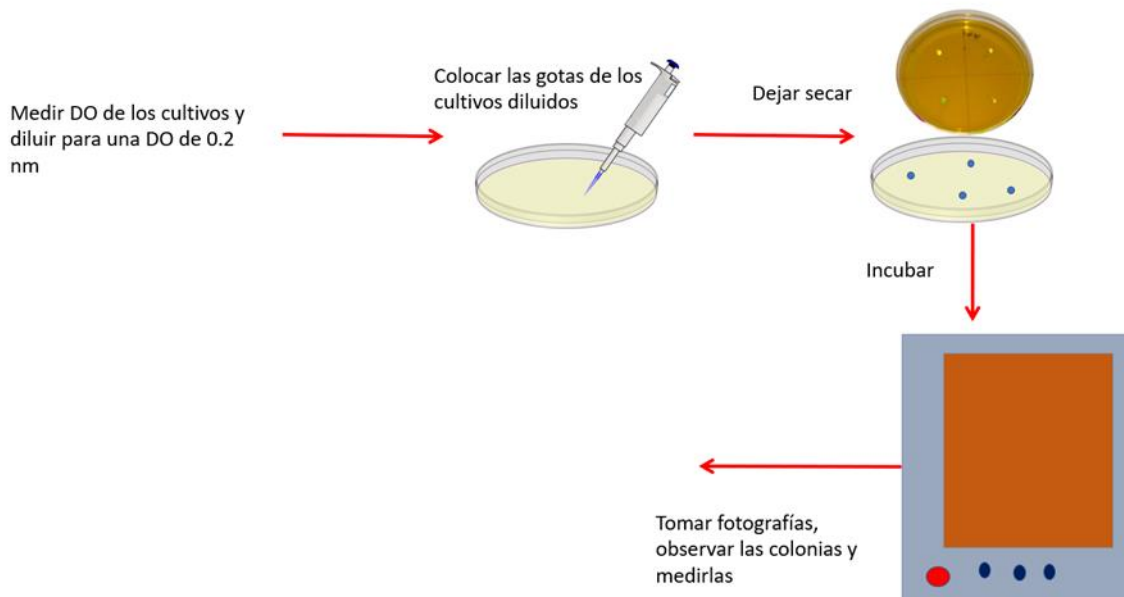


Figura 3: Desarrollo de las pruebas de resistencia a acetato y ácido acético.

Para las pruebas en medio líquido el inóculo y los medios de cultivo se preparan de la misma forma, excepto que se omite el agar. En este caso se utilizó un equipo Bioscreen C, para obtener las curvas de crecimiento de las cepas a diferentes concentraciones de acetato, incubando a 30 C y con agitación media. La DO se midió cada hora, hasta que los cultivos entraron en fase estacionaria o de desaceleración, como se muestra en la figura 4. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se trabajó con los datos para obtener las gráficas correspondientes, así como los valores de velocidad de crecimiento, los que se presentan más adelante.

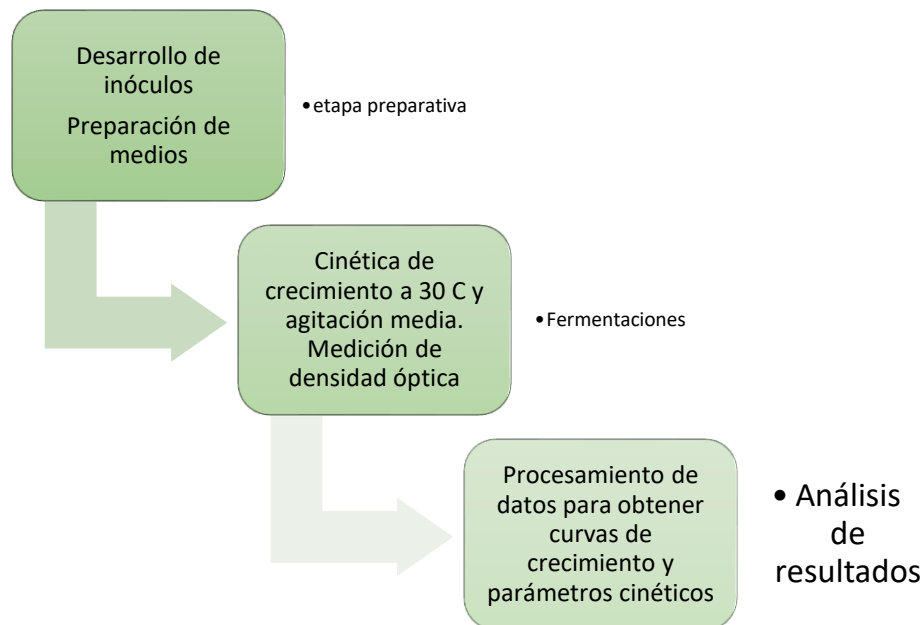


Figura 5: metodología para el experimento en medio líquido.

RESULTADOS:

A) MEDIO SÓLIDO

El crecimiento en cajas se registró a lo largo de 72 horas, dado que la levadura se estresa con concentraciones altas de acetato de sodio y puede presentar una fase lag prolongada, con lo que el desarrollo colonial toma diferentes tiempos. En la Tabla 1 se presenta el promedio de las mediciones del diámetro de las colonias en milímetros, a 48 horas de incubación; no se registró variación posteriormente.

Tabla 1: Diámetro promedio de las colonias a 48 horas de incubación.

Cepa	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	10.0
UIA	12	14.3	13.7	11	10.5	8.5
ATCC 6220	--	11.0	11.0	8.0	--	--
NRRL Y-2076	12	11.5	10.5	10	8.5	8.5

Además del diámetro de la colonia se observa la morfología, ya que irregularidades o cambios en la misma indican que el organismo está estresado, lo que no es deseable porque el desempeño en procesos fermentativos puede verse afectado de varias formas, como en la prolongación de la fase lag o en la modificación de la velocidad de crecimiento. En la figura 6 se observan cambios coloniales de la cepa UIA en concentraciones de 8 y 10 g/L de acetato.

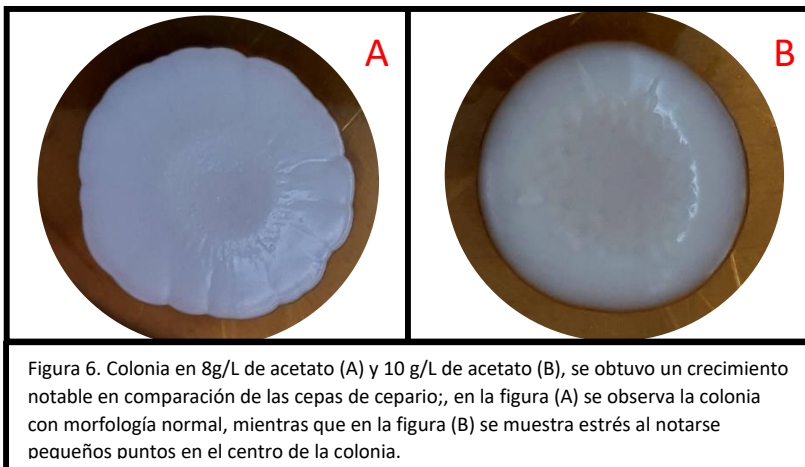


Figura 6: Morfología colonial de *C. guilliermondii* (Cepa UIA) bajo condiciones de estrés por acetato.

Dado que se también se menciona al ácido acético como inhibidor del crecimiento de esta levadura se probó en concentraciones de 3 y 6 g/L, sin ajustar pH. Las concentraciones superiores son inhibitorias no solamente por el ácido en sí, sino porque el pH baja a valores en los que muchas levaduras, entre ellas varias del género *Candida*, no pueden desarrollarse.

En la figura 7 se presentan las diferencias coloniales a 48 horas de incubación, en la concentración de 3 g/L de ácido acético, con evidencia de mayores diferencias en cuanto a la resistencia al estrés. En el mismo periodo el desarrollo en 6 g/L apenas está iniciándose.

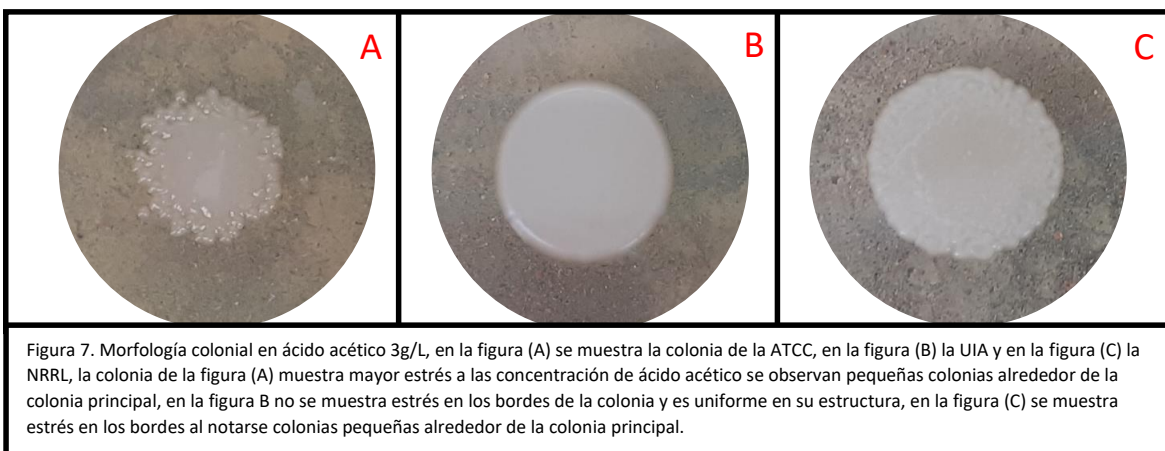


Figura 7: Morfología colonial en presencia de ácido acético.

B) MEDIO LÍQUIDO

En estos experimentos se pudo observar el desarrollo de las diferentes cepas bajo las concentraciones de acetato de sodio señaladas anteriormente, si había diferencia en la tendencia de la curva o en la velocidad de crecimiento. En las figuras 8, 9 y 10 se presentan las curvas de crecimiento de las cepas de *C. guilliermondii* UIA, NRRL Y-2076 y ATCC 6220.

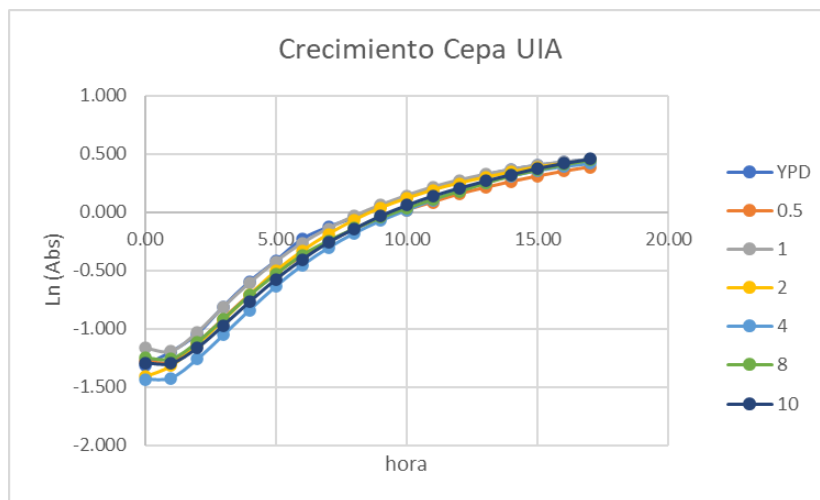


Figura 8. Cinética de crecimiento de *C. guilliermondii* No. de acceso CMCNRG-0032 (UIA) en medio YPD líquido con concentraciones de acetato de sodio 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 y 10 g/L.

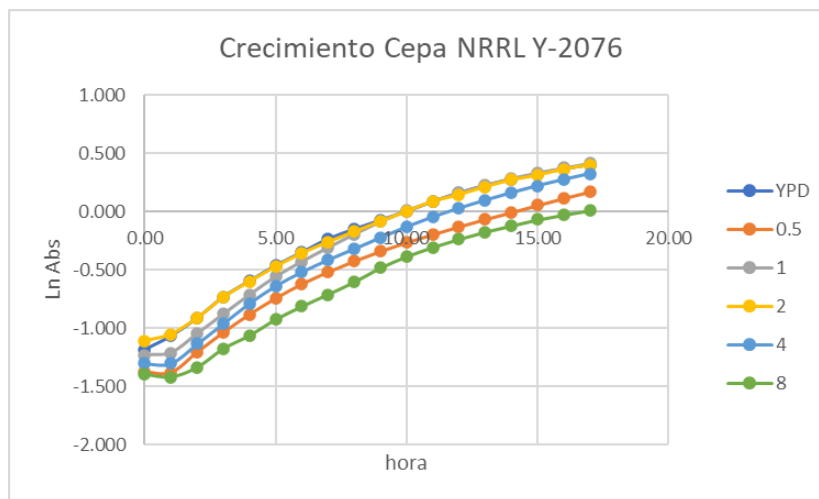
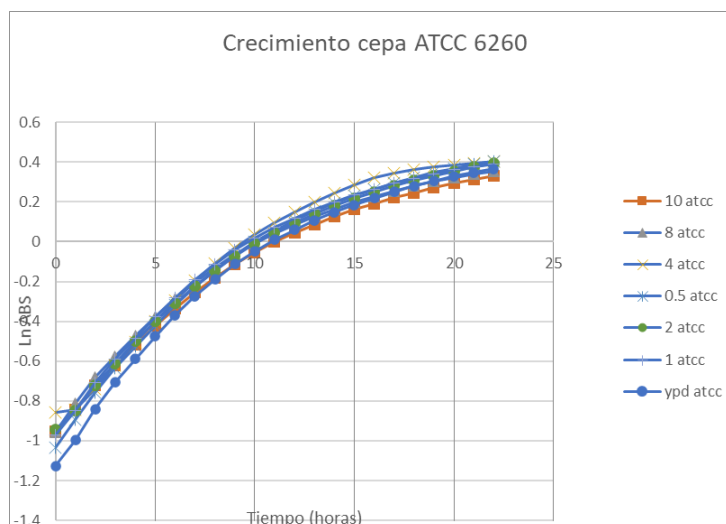


Figura 9. Cinética de crecimiento de *C. guilliermondii* NRRL Y-2076 en medio YPD líquido con concentraciones de acetato de sodio 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0 g/L.



De estos experimentos se obtuvieron las curvas de crecimiento, que muestran la tendencia que sigue la reproducción de las diferentes cepas bajo las condiciones de experimentación, pero también se pudieron calcular parámetros cinéticos como la velocidad específica de crecimiento (μ), la que permite evaluar cuantitativamente el efecto de la adición de acetato de sodio al medio. En la Tabla 2 se presentan los resultados para cada cepa y concentración de acetato.

Tabla 2: Velocidad específica de crecimiento [h^{-1}] de las cepas bajo las diferentes condiciones experimentales

Cepa	0	0.5	1	2	4	8	10
UIA	0.1811	0.1512	0.1543	0.1742	0.1753	0.167	0.1742
NRRL Y-2760	0.1355	0.13	0.1414	0.1215	0.142	0.1198	nd
ATCC 6260	0.118	0.1071	0.1037	0.1020	0.1016	0.0977	0.0939

En este caso es más preciso comparar la variación de la velocidad de crecimiento para cada cepa con las diferentes concentraciones de acetato que entre cepas, porque desde un inicio presentan variaciones en cuanto a este parámetro cinético aún en el medio control (0). Por ejemplo, la cepa UIA tiene una variación de 3.8 % entre el medio control y la concentración mayor de acetato; la cepa NRRL Y-2760 tiene una diferencia de 11.6 % entre el control y los 8.0 g/L de acetato y la ATCC 6260 de 20.4 %. Esto muestra que la cepa UIA tiene más resistencia a la presencia de acetato, pues su velocidad de crecimiento se ve menos afectada. Entre las cepas, a 8.0 g/L se tiene una diferencia de 28 y 41.5 %, siendo el valor mayor del de la levadura CMCNRG-0032 (UIA).

De ambos tipos de experimentos se puede observar que la cepa UIA presenta más resistencia tanto al acetato de sodio como al ácido acético, si bien las cepas con las que se comparó pueden desarrollarse.