CRIOPRESERVACIÓN DEL PROTOZOO RUMINAL *ENTODINIUM CAUDATUM*: EFECTO DE LA RAMPA DE DESCENSO DE TEMPERATURA

G. de la Fuente, M. Fondevila y J. A. Cebrián[1]

Depto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, y
[1] Depto. de Bioquímica y Biología Molecular y Celular
Universidad de Zaragoza. Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza.

INTRODUCCIÓN

A pesar de que la presencia de protozoos en el rumen se conoce desde 1843, el estudio de su metabolismo y la valoración de su papel en los procesos de digestión ruminal se ven limitados por las dificultades que presenta su cultivo (Williams y Coleman 1992). El mantenimiento *in vitro* de los protozoos requiere su alimentación diaria con pequeñas cantidades de sustrato, lo que lo hace muy laborioso. Por otra parte, son muy sensibles a la refrigeración y se rompen en un proceso de congelación convencional (de la Fuente y col., 2002). El establecimiento de las condiciones óptimas de congelación de protozoos ruminales es complejo, y existe muy escasa documentación al respecto (Marcin y col. 1992; Kisidayova, 1996; Nsabimana y col. 2002). En este trabajo se desarrolla un método de criopreservación del protozoo ruminal *Entodinium caudatum*, haciendo hincapié en el ritmo de descenso de la temperatura de refrigeración y congelación durante el proceso.

MATERIAL Y MÉTODOS

El monocultivo de *E. caudatum* se obtuvo a partir de una o dos células de una muestra de liquido ruminal ovino, capturadas empleando una pipeta capilar mediante observación en microscopio. Las células se cultivaron en anaerobiosis en tubos con 10 ml de medio M (Dehority 1997). Los cultivos fueron alimentados diariamente con 0.1 ml de una suspensión de 1.5 % maiz y 1.0 % alfalfa molidos a 1 mm. Dos veces por semana se transfirieron 5 ml de cultivo a otro tubo con 5 ml de medio fresco con una pipeta de boca ancha. Dado que los protozoos necesitan bacterias vivas para sobrevivir, las condiciones de esterilidad se limitaron a evitar la contaminación protozoaria. Todas las manipulaciones de los cultivos se realizaron bajo corriente de CO_2. El cultivo se mantuvo estabilizado durante unas 4 semanas antes de iniciar el experimento.

Se centrifugaron (300 x g, 5 min) 10 ml de cultivo de *E. caudatum*, descartándose 9 ml del sobrenadante. El residuo se dividió en alícuotas de 100 µl distribuidas en 8 tubos eppendorf, a los que se añadieron 100 µl de una mezcla de conservación preparada a base de leche en polvo y yema de huevo, incluyendo también glicerol. Las muestras se llevaron a 5 ºC, y tras 10 min se añadieron 4 dosis de 25 µl de una solución de glicerol a intervalos de 6 min para favorecer la entrada del glicerol en las células. Tras 30 min, se distribuyeron en pajuelas de 250 µl selladas con alcohol de polivinilo y se congelaron a –80 ºC. Para descongelar, las pajuelas se sumergieron individualmente en un baño de agua a 38 ºC durante 4 ó 5 segundos.

Se establecieron dos rampas de descenso de temperatura, de 1 y 4 °C por minuto, hasta alcanzar los 5 °C. Se emplearon 3 muestras del mismo cultivo para cada rampa, determinándose la viabilidad celular al inicio (38 °C) y al alcanzar los 15 y 5 °C. Además, tres pajuelas de cada rampa de refrigeración se descongelaron tras 72 h y se determinó la viabilidad y el número de células por pajuela.

La viabilidad de las células del cultivo, estimada en función de la integridad de membrana, se verificó mediante tinción de fluorescencia, añadiendo a 250 µl de cultivo una mezcla constituida por 5 µl de formaldehído, 5 µl of ioduro de propidio y 5 µl de diacetato de carboxifluoresceína e incubando a 37 °C durante 15 minutos (adaptación del método de Harrison y Vickers, 1990). La proporción de células viables (membrana intacta, teñidas en verde) y no viables (membrana dañada, núcleo rojo) en muestras duplicadas de 15 µl se determinó visualmente en un microscopio de fluorescencia a 100 aumentos. La concentración de protozoos en las pajuelas tras su descongelación se determinó mediante recuento de células en microscopio óptico a 100x aumentos, a partir de 150 µl de la muestra teñida para fluorescencia, a la que se añadieron 200 µl de formaldehído 18 %, una gota de verde brillante y 1 ml de glicerol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La proporción de células viables en función de la rampa de descenso de temperatura se presenta en la Figura 1. La viabilidad descendió de forma lineal con la temperatura entre 38 y 5 °C ($p = 0.001$). Sin embargo, no hubo diferencias entre 5 °C y las muestras que se congelaron a –80 °C ($p > 0.05$), alcanzándose proporciones de células viables del 50 % después de la congelación. No se registraron diferencias significativas entre rampas de descenso de temperatura, ni en la interacción rampa x temperatura ($p > 0.05$). La misma comparación entre resultados se obtuvo al corregir los valores de viabilidad en función de la proporción de células viables a 38 °C. En un experimento anterior, el descenso de temperatura de 38 hasta -20 °C sin modificar las condiciones del medio redujo la proporción de células viables de 83 a 25 % (de la Fuente y col., 2002), lo que demuestra la necesidad del tratamiento previo a la congelación. Trabajos de otros autores refieren tasas de recuperación de células de 8 % para *E. caudatum* (Marcin y col., 1992) y entre 43 y 80 % para los grandes entodiniomorfos (Kisidayova, 1996).

En cualquier caso, el recuento celular de las muestras descongeladas muestra una concentración de *E. caudatum* de 1062 (± 643) y 832 (± 368) células por pajuela para las rampas de 1 y 4 °C por minuto, lo que, asumiendo las proporciones de viabilidad observadas, supondrían 534 y 419 células viables por pajuela, lo que parece garantizar el mantenimiento del cultivo tras su descongelación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Dehority B.A. 1997. Generation times of *Epidinium caudatum* and *Entodinium caudatum* determined *in vitro* by transferring at various time intervals. J. Anim. Sci. 76: 1189-1196.

de la Fuente G., Fondevila M. y Cebrián J.A. 2002. Viability of *Entodinium caudatum* cultures, estimated by fluorescence microscopy. Reprod. Nutr. Dev. 42: S78-S79.

Harrison R.A.P. y Vickers S.E. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 88: 343-352.
Kisidayova S. 1996. The cryopreservation of some large ciliate entodiniomorphid protozoa taken from the rumen. Lett. Appl. Microbiol. 23: 389-392.
Marcin A., Kisidayova S., Fejes J., Zelenak I. y Kmet V. 1992. A simple technique for cryopreservation of the rumen protozoon *Entodinium caudatum*. Cryo-lett. 13: 175-182
Nsabimana E., Kisidayova S., Macheboeuf D. y Jouany J.P. 2002. Cryopreservation of rumen protozoa: creation of a European bank of cryopreserved ciliates. Repr. Nutr. Develop. 42: S75-S76.
Williams A.G. y Coleman G.S. (eds.) 1992. Methods used for the separation and cultivation of rumen protozoa. En: The rumen protoza, Brock-Springer Series in Contemporary Bioscience, Springer-Verlag, Nueva York.

Figura 1: Viabilidad (proporción de células con membrana íntegra) de *E. caudatum* en función de la rampa de descenso de temperatura (e.s.m. = 5,89).

