

División Ciencias Biológicas y de la Salud
Licenciatura en Biología

Informe del servicio social

Modalidad: Actividades Relacionadas con la profesión

“Estandarización en las condiciones de preparación
de microorganismos probióticos para su correcta conservación a largo plazo”

Mariana Palomino Moreno
Matrícula: 2202042002

Fecha de inicio: 12/06/2023 **fecha de conclusión:** 18/12/23

Lugar de realización: **Laboratorio** Ecología Microbiana - **Departamento:** Sistemas Biológicos.
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Responsable del proyecto:



Dra. Ma. Angélica Gutiérrez Nava
No. Económico: 34568
Departamento de Sistemas Biológicos
UAM-Xochimilco

Asesor Interno:



Dr. Jordan Kyril Golubov Figueroa
No. Económico: 28799
Departamento el Hombre y su Ambiente
UAM-Xochimilco

INDICE

I. INTRODUCCION	4
II. OBJETIVO	5
III. ACTIVIDADES REALIZADAS	6
ACTIVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS.....	6
CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO	6
CUENTA VIABLE POR GOTEIO.....	6
LIOFILIZACIÓN	7
IV. RESULTADOS.....	8
CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>B. ANIMALIS</i>.....	8
CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>B. PSEUDOCATENULATUM</i>.....	10
LIOFILIZACIÓN DE CULTIVOS DE <i>B. ANIMALIS</i> Y <i>B. PSEUDOCATENULATUM</i>	12
V. CONCLUSIONES.....	13
VI. BIBLIOGRAFIA	14

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al laboratorio de Ecología Microbiana por brindarme la oportunidad de realizar mi Servicio Social y en especial a la Dra. Angelica Gutiérrez por abrirnos las puertas de su laboratorio, brindarnos su apoyo y poner nuestra disposición su amplio conocimiento y experiencia en el área de la microbiología.

I. INTRODUCCION

En el laboratorio de Ecología Microbiana del Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM Xochimilco, se llevan a cabo actividades que permiten comprender los procesos de prevención de enfermedades hepáticas mediante la suplementación de probióticos en la dieta de animales de experimentación en 2 modelos experimentales: hepatocarcinogénesis química y un modelo de hígado graso no alcohólico. En las enfermedades de hígado, las alteraciones en la microbiota intestinal y los mecanismos de respuesta inflamatoria, desempeñan un papel importante en la progresión de las enfermedades y el desarrollo de complicaciones. Los probióticos, debido a su capacidad para modular el microbiota, la permeabilidad y la respuesta inmunológica, pueden ser eficaces en el tratamiento de las enfermedades hepáticas y en su prevención.

Existen varias técnicas de preservación, siendo la congelación y la liofilización los dos métodos de conservación a largo plazo más utilizados. Para mejorar la supervivencia de las células conservadas por liofilización, comúnmente se agregan agentes protectores (crioprotectores) para minimizar las lesiones por congelación y sequedad. La tolerancia de las células a este tipo de estrés depende en gran medida de la naturaleza de los aditivos crioprotectores. Actualmente la leche descremada se ha utilizado como un vehículo eficaz y económico.

La conservación de estos microorganismos es nuestro interés fundamental, primero, porque se debe preservar su pureza genética sin pérdida de sus propiedades benéficas y segundo, para lograr que el cultivo pueda mantenerse con una concentración de microorganismos vivos para asegurar una correcta administración a los animales de experimentación asegurando que tanto la viabilidad como la pureza de los microorganismos sean mantenidas durante mucho tiempo. Las bifidobacterias son los probióticos que han sido el blanco de estos estudios, por ser microorganismos anaerobios, son más susceptibles a disminuir su viabilidad en presencia de oxígeno por lo que se dificulta aún más mantenerlos intactos hasta antes de ser administrados a los animales de experimentación.

Por lo que en este proyecto se planteó, optimizar las condiciones de cultivo para obtener la mayor concentración de bacterias vivas y posteriormente cometerlas a un proceso de liofilización, con el fin de mantenerlos viables durante al menos, el tiempo que dure el ensayo *in vivo*, y así poder asegurar la administración diaria de una misma concentración de microorganismos vivos a las ratas de experimentación.

II. OBJETIVO

General

- Estandarizar las condiciones de preparación de microorganismos probióticos para su conservación a largo plazo.

Particulares

- Establecer el tiempo de cultivo necesario para obtener la mayor concentración de microorganismos viables, por medio de cinéticas de crecimiento bacteriano.
- Obtener liofilizados de bacterias probióticas para la administración en animales de experimentación.

III. ACTIVIDADES REALIZADAS

Activación de los microorganismos

- Se utilizaron *B. animalis* y *B. pseudocatenulatum* JCLA3 conservadas en 20% glicerol a -70 °C, se descongelaron y centrifugaron para eliminar el glicerol, se lavaron 2 veces con solución salina fisiológica 0.85% (SSF). Una vez lavadas, las células se inocularon en 20 mL de caldo MRS-C y se incubaron durante 24 h a 37 °C con agitación orbital a una velocidad de 180 rpm. Los cultivos se observaron en microscopio previa tinción de Gram.

Cinética de crecimiento bacteriano

- Para realizar la cinética de crecimiento de cada microorganismo, las bacterias fueron inoculadas en 80 mL de caldo MRS-C a una DO inicial de 0.5 y se incubaron a las condiciones antes mencionadas. A partir del tiempo cero (t_0), se tomaron muestras de 1 mL cada 1.5 horas para leer su densidad óptica en un espectrofotómetro a 600 nm. Se cuantificó la concentración de bacterias en los tiempos 0, 12, 24, 36 y 48 h por la técnica de cuenta viable por goteo.

Cuenta viable por goteo

De cada muestra tomada durante las cinéticas de crecimiento, se realizaron diluciones decimales seriadas en microtubos estériles de 1.5 mL los cuales contenían las diluciones: $[10^{-1}]$, $[10^{-2}]$, $[10^{-3}]$, $[10^{-4}]$, $[10^{-5}]$, $[10^{-6}]$, $[10^{-7}]$. Para tal efecto, se colocaron 900 μ L SSF, agregando a la primera dilución 100 μ L del cultivo a analizar y a partir del cual se realizaron las diluciones decimales seriadas hasta el tubo $[10^{-n}]$. Entre cada dilución se agitó vigorosamente en vortex.

Se colocaron por triplicado 3 μ L de cada una de las diluciones en una caja de Petri con agar MRS-C. Se rotularon con fecha y nombre y se incubaron en cámara de anaerobiosis o jarra Gaspak® con sobre generador de anaerobiosis, a 37 °C durante al menos 48 h.

Se contó el número de colonias en las diluciones donde se desarrollaron entre 30 y 300 UFC y se procedió a realizar los cálculos para conocer la concentración de bacterias en los cultivos, expresada en [UFC/mL].

Liofilización

Una vez que se fijaron las condiciones y se determinó el tiempo de la curva de crecimiento en el que se obtiene la mayor cantidad de bacterias viables, se prepararon cultivos de 80 mL de cada cepa y se incubaron hasta el tiempo determinado. Se recuperaron las células por centrifugación y se resuspendieron en 40 mL de crioprotector que consistió en una suspensión de leche descremada al 20 %. Las muestras se colocaron en frascos viales de 40 mL y se congelaron en hielo seco, girando el frasco de manera horizontal sobre el hielo para congelar sobre las paredes del frasco y asegurar una mejor liofilización. Una vez congeladas correctamente, los viales se coloraron en un ultracongelador a -70 °C hasta ser liofilizados.

Se utilizó una liofilizadora marca Labconco modelo 7753022. Las muestras se sacaron del ultracongelador una a una y se colocaron en el equipo cuidando de que no se descongelaran. El equipo se programó con condiciones estándar y se siguieron las instrucciones del fabricante.

A los liofilizados obtenidos de *B. animalis* y *B. pseudocatenulatum* JCLA3 se les determinó la viabilidad celular y se calculó el rendimiento.

IV. RESULTADOS

Cinética de crecimiento de *B. animalis*

Los cultivos se inocularon a un a DO inicial de aproximadamente 0.5, y el crecimiento se monitoreó cada 1.5 h obteniendo los datos que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Datos de las absorbancias (DO) obtenidas a 600 nm del cultivo de *B. animalis*. El experimento se realizó por triplicado.

Toma de muestra	tiempo (h)	Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3	Promedio
		DO	DO	DO	
8:00	0	0.47	0.49	0.61	0.52
9:30	1.5	0.55	0.56	0.62	0.58
11:00	3	0.87	0.88	0.93	0.89
12:30	4.5	2.35	2.15	0.93	1.81
14:00	6	2.51	3.02	2.81	2.78
15:30	7.5	4.60	3.21	3.07	3.63
17:00	9	3.87	4.38	4.00	4.08
18:30	10.5	4.10	4.18	4.04	4.11
20:00	12	4.47	4.52	4.40	4.46
8:00	24	5.37	4.23	5.08	4.89
20:00	36	5.32	5.14	5.37	5.28
8:00	48	5.67	5.35	5.00	5.34

Para observar mejor el perfil del crecimiento de *B. animalis*, los datos se graficaron, donde se puede observar una fase lag muy pequeña, una fase de crecimiento logarítmico a partir de las 1.5 h hasta las 12 h con una DO máxima promedio de 5.34, a partir de ahí, la velocidad de crecimiento disminuye y se observa el inicio de una fase estacionaria a partir de las 36 h (Fig. 1).

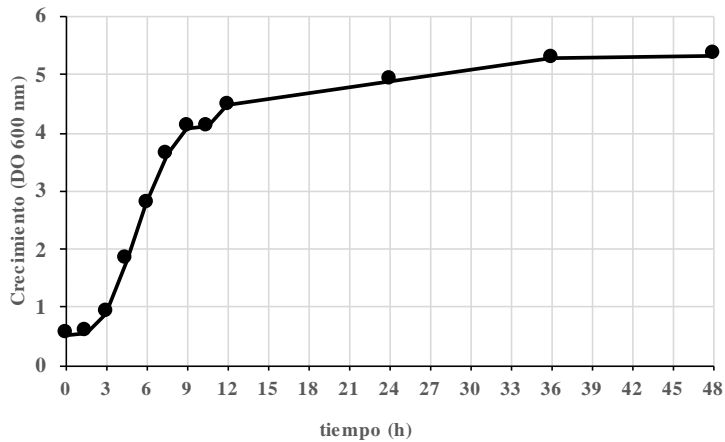


Figura 1. Cinética de crecimiento de *B. animalis* en medio MRS-C. El experimento se realizó por triplicado.

A las muestras tomadas en los tiempos de cultivo: 0, 12, 24, 36 y 48 h se les determinó la viabilidad celular. En la figura 2 se observa que, la fase estacionaria comienza a partir de las 12 h y a partir de las 36 h *B. animalis* entra en una fase de muerte. Este resultado nos indica que entre las 24 y 36 horas tenemos un cultivo de *B. animalis* viable con la máxima densidad celular. Para este trabajo, se utilizó un cultivo de 36 h para ser liofilizadas.

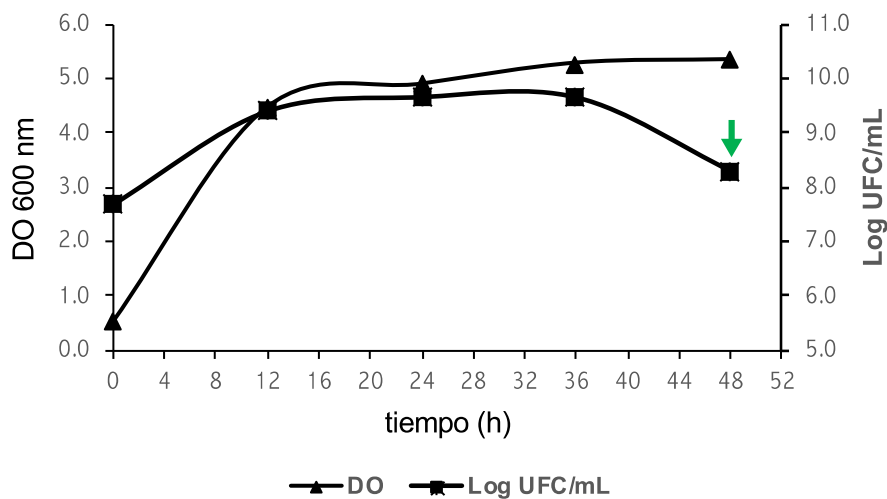


Figura 2. Crecimiento de *B. animalis* en medio MRS-C, determinado por DO y cuenta viable. La flecha indica el tiempo en el que se encuentra en fase de muerte.

Cinética de crecimiento de *B. pseudocatenulatum*

B. pseudocatenulatum se inoculó a un a DO inicial de aproximadamente 0.5, y el crecimiento se monitoreó cada 1.5 h obteniendo los datos que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Datos de las absorbancias (DO) obtenidas a 600 nm del cultivo de *B. pseudocatenulatum*. El experimento se realizó por triplicado.

Toma de muestra	tiempo (h)	Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3	Promedio
		DO	DO	DO	
8:00	0	0.45	0.45	0.48	0.46
9:30	1.5	0.43	0.42	0.47	0.44
11:00	3	0.49	0.52	0.57	0.53
12:30	4.5	0.68	0.69	0.75	0.71
14:00	6	0.89	0.85	0.91	0.88
15:30	7.5	1.89	1.67	1.70	1.75
17:00	9	2.06	1.92	1.89	1.96
18:30	10.5	2.13	2.23	2.42	2.26
20:00	12	2.59	2.45	2.59	2.54
8:00	24	3.27	3.25	3.12	3.21
20:00	36	3.78	3.26	3.24	3.43
8:00	48	3.13	3.44	3.13	3.23

Para observar mejor el perfil del crecimiento de *B. pseudocatenulatum*, los datos se graficaron, donde se puede observar una fase lag muy pequeña, una fase de crecimiento logarítmico a partir de las 1.5 h hasta las 24 h, con varias velocidades de crecimiento. A partir de ahí, se observa el inicio de una fase estacionaria (Fig. 3).

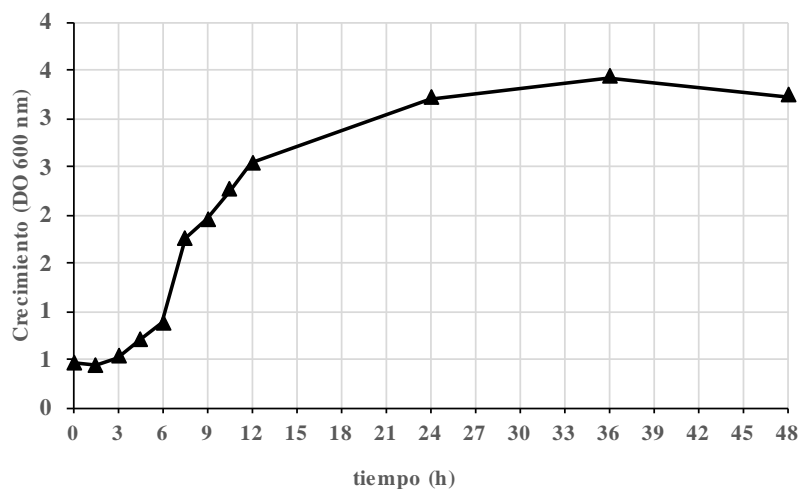


Figura 3. Cinética de crecimiento de *B. pseudocatenulatum* en medio MRS-C. Se observa el inicio de una fase estacionaria a partir de las 24 h. El experimento se realizó por triplicado.

A las muestras tomadas en los tiempos de cultivo: 0, 12, 24, 36 y 48 h se les determinó la viabilidad celular. En la figura 4 se observa que a partir del tiempo 12 h, inicia la fase estacionaria de *B. pseudocatenulatum* al crecer en medio MRS-C, sin embargo, en este caso no se observa una fase de muerte. Estos resultados nos indican que entre las 24 y 48 horas tenemos un cultivo de *B. pseudocatenulatum* viable con la máxima densidad celular. Para este trabajo, se utilizaron para ambas cepas, cultivos de 36 h para ser liofilizadas.

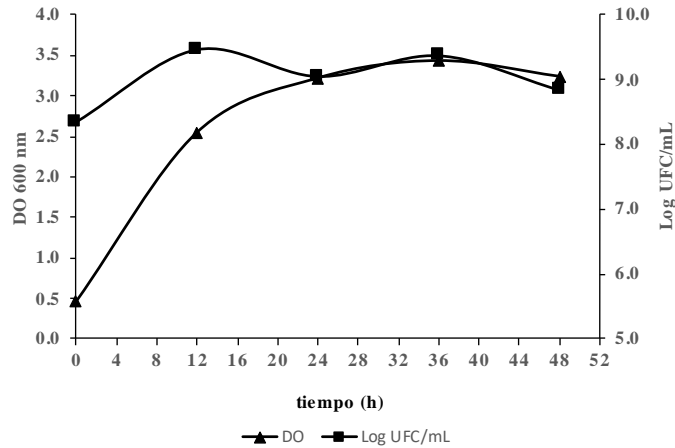


Figura 4. Crecimiento de *B. pseudocatenulatum* en medio MRS-C, determinado por DO y cuenta viable.

Liofilización de cultivos de *B. animalis* y *B. pseudocatenulatum*

Se midió la viabilidad de los microorganismos liofilizados (tabla 3), se observó que hay una ligera pérdida de viabilidad durante el proceso. Estas bacterias pueden utilizarse de esta forma para administrar a los animales de experimentación en los modelos utilizados en el laboratorio, sin embargo se recomienda enriquecer la cantidad de bacterias a liofilizar en el mismo volumen de crioprotector, en caso de que se quiera administrar una cantidad mayor de bacterias.

Tabla 3. Viabilidad de *B. animalis* y *B. pseudocatenulatum* antes y después del proceso de liofilización.

Cultivo de 36 h	<i>B. animalis</i>		<i>B. pseudocatenulatum</i>	
	UFC/mL	Log UFC/mL	UFC/mL	Log UFC/mL
	4.51E+09	9.65	2.31E+09	9.36
X 80 mL	UFC totales	Log UFC	UFC totales	Log UFC
	3.61E+11	11.56	1.85E+11	11.27
Liofilizado	UFC/g	Log UFC/g	UFC/g	Log UFC/g
	1.67E+09	9.22	2.51E+10	10.40
X g totales	UFC totales	Log UFC	UFC totales	Log UFC
	5.32E+09	9.73	9.38E+10	10.97
Peso del liofilizado (g)	3.02		3.74	

V. CONCLUSIONES

Con este proyecto de servicio social se logró estandarizar el tiempo indicado para obtener un cultivo con una alta concentración celular de bacterias viables de *B. animalis* y *B. pseudocatenulatum*.

La leche descremada utilizada como crioprotector es una opción viable y económica para liofilizar microorganismos probióticos.

El método de liofilización permite la conservación de los microorganismos *B. animalis* y *B. pseudocatenulatum* sin pérdida de viabilidad durante por lo menos 2 meses y medio.

VI. BIBLIOGRAFIA.

Soriano German; Sánchez Elisabet; Guarner Carlos. Probióticos en las enfermedades hepáticas. *Nutr Hosp.* 2013; 28(3):558-563.

Reyes-Castillo, P.A.;González-Vázquez, R.;Torres-Maravilla, E.;
Bautista-Hernández, J.I.;Zúñiga-León, E.; Leyte-Lugo, M.;Mateos-Sánchez, L.; Mendoza-Pérez,
F.; Gutiérrez-Nava, M.A.;Reyes-Pavón, D.; et al. *Bifidobacterium longum* LBUX23 Isolated from
Feces of a Newborn; Potential Probiotic Properties and Genomic Characterization.
Microorganisms 2023, 11, 1648.