Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

División Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura en Biología

Informe del Servicio Social

Modalidad: Actividades Relacionadas con la profesión

"Monitoreo de la viabilidad de microorganismos probióticos usados para la administración en animales de experimentación"

Presenta:

Miriam Guadalupe Vázquez García

Matrícula: 2202034868

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

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

Fecha de inicio: 12/06/2023

Fecha de término: 18/12/2023

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 2

OBJETIVOS 3

- OBJETIVO GENERAL 3
- OBJETIVOS PARTICULARES 3

METODOLOGÍA 4

- MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO 4
- ACTIVACIÓN DE LAS CEPAS 4
- OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES DE *B. ANIMALIS* Y *B. PSEUDOCATENULATUM* 4
- CUENTA VIABLE 4
- LIOFILIZACIÓN DE CULTIVOS CON LECHE DESCREMADA COMO CRIOPROTECTOR 5
- VIABILIDAD DE *B. ANIMALIS* Y *B. PSEUDOCATENULATUM* LIOFILIZADOS 6

RESULTADOS 7

- OBTENCIÓN DE CULTIVOS DE *B. ANIMALIS Y B. PSEUDOCATENULATUM* 7
- VIABILIDAD DE *B. ANIMALIS Y B. PSEUDOCATENULATUM* EN LOS CULTIVOS 8
- LIOFILIZACIÓN DE *B. ANIMALIS* Y *B. PSEUDOCATENULATUM* 9
- VIABILIDAD DE LOS LIOFILIZADOS DE *B. ANIMALIS* Y *B. PSEUDOCATENULATUM* A TRAVÉS DEL TIEMPO 10

CONCLUSIONES 12

Introducción

El Servicio Social constituye un aspecto fundamental en la formación académica universitaria y da herramientas fundamentales para entrar al mundo laboral. El presente informe documenta la experiencia de Servicio Social realizada en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (UAM-X), en el departamento de Sistemas Biológicos dentro del laboratorio de Ecología Microbiana, donde se estudia el efecto que tiene el consumo de microorganismos probióticos, particularmente el género *Bifidobacterium*, sobre el metabolismo hepático en modelos experimentales de hepatocarcinogénesis química y modelo de hígado graso no alcohólico administrando dietas altas en grasa, ambos en ratas wistar.

Durante este periodo de Servicio Social, se llevaron a cabo actividades orientadas a la aplicación práctica de los conocimientos adquiridos durante la licenciatura, así como al fortalecimiento de habilidades académicas y profesionales. Por esta razón en este proyecto, se realizaron cinéticas de crecimiento bacteriano de dos especies del género *Bifidobacterium* (*B. animalis* y *B. pseudocatenulatum*), por cuenta viable y densidad óptica. Los cultivos bacterianos se liofilizaron, y se mantuvieron en frascos de vidrio a temperatura ambiente monitoreando su viabilidad durante semanas con el fin de establecer el tiempo que se mantienen viables bajo estas condiciones y así poder administralas a los animales de experimentación teniendo certeza de la concentración administrada.

En este informe, se detallan las actividades realizadas, los logros alcanzados y los desafíos enfrentados durante el Servicio Social en la UAM-X.

Objetivos

Objetivo general

Monitorear la viabilidad de microorganismos probióticos usados para la administración a animales de experimentación.

Objetivos particulares

1. Obtener cultivos de *B. animalis* y *B. pseudocatenulatum* con la mayor concentración de células viables.

2. Liofilizar cultivos de *B. animalis* y *B. pseudocatenulatum* y determinar el tiempo que se mantienen viables.

Metodología

Microorganismos y condiciones de cultivo

Bifidobacterium animalis y Bifidobacterium pseudocatenulatum se cultivaron en medio MRS (Difco), suplementado con HCl-cisteína al 0.05% (MRS-C). El medio se preparó en condiciones anaerobias burbujeando CO_2 para desplazar el oxígeno y los frascos se sellaron herméticamente con tapones de hule y arillo de metal, posteriormente se esterilizaron a una presión de 15 lb/in^2 de por 15 min. Se prepararon frascos con 20 y 80 mL de medio. Para el cultivo sólido, se preparó agar MRS (Difco) suplementado con HCl-cisteína al 0.05% y se vació en cajas de Petri.

Activación de las cepas

1. Se utilizaron alícuotas de ambas cepas conservadas en glicerol a -70 °C.
2. Las células se lavaron 2 veces con medio MRS-C para remover el glicerol.
3. Posteriormente se re-suspendieron con 1.0 ml de medio MRS-C.
4. Se agregó 1 ml de las muestras con las células re-suspendidas a 3 frascos de 20 ml de medio distintos.
5. Se colocaron en la incubadora a 37 ºC con agitación de 180 rpm durante 24 h.

Obtención de suspensiones de *B. animalis* y *B. pseudocatenulatum*

Las células activadas se utilizaron para inocular los frascos con 80 ml de medio a una densidad óptica inicial de 0.5 (DO_i). Se tomó la primera muestra (t_0) y posteriormente los cultivos se incubaron con agitación constante a 180 rpm a 37 ºC. Se tomaron muestras cada 1.5 h para monitorear el crecimiento por espectrofotometría a 600 nm durante las primeras 12 h, posteriormente, las muestras se tomaron a las 24 y 36 h.

Cuenta viable

Para confirmar la viabilidad de las bacterias, se utilizaron las muestras de los tiempos 0, 12, 24 y 36 h, para lo cual se realizaron diluciones decimales seriadas de cada muestra, las diluciones se plaquearon por triplicado en cajas de Petri con medio MRS-C y se incubaron en cámara de anaerobiosis a 37 °C durante 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 de cultivos con leche descremada como crioprotector

Los cultivos obtenidos a las 36 h de incubación, se centrifugaron a 3,000 rpm durante 15 minutos, las células se lavaron 2 veces con agua destilada estéril y posteriormente fueron resuspendidas en 20 mL de leche descremada al 20 % preparada con agua destilada estéril. La suspensión celular se dividió en 3 frascos viales de 40 mL previamente esterilizados, (se tomó una muestra de la suspensión para medir viabilidad antes del proceso de liofilización). Las suspensiones celulares se congelaron en hielo seco y se guardaron en ultracongelador a -70 ºC hasta ser liofilizadas.

Proceso de liofilización

Se utilizó una liofilizadora marca Labconco siguiendo los pasos que se describen a continuación:

1. Ensamblar el equipo colocando la cámara de vacío, y los empaques necesarios previamente engrasados para permitir que se genere el vacío.
2. Verificar que el clip metálico esté bien colocado para asegurar el árbol de liofilización.
3. Asegurarse de que el equipo no contiene agua a través de la manguera de drenaje.
4. Encender el interruptor general de electricidad y posteriormente el del equipo.
5. En el panel del equipo, colocar el modo AUTO lo cual permitirá que la liofilizadora alcance los parámetros establecidos de temperatura y presión (-40 ºC y 0.200 mBar respectivamente).
6. Una vez alcanzados estos parámetros, colocar en las boquillas de la cámara, los frascos viales con las muestras previamente congeladas.
7. Una vez colocadas las muestras, abrir una a una las válvulas de vacío, permitiendo que se reestablezcan los parámetros marcados en el panel antes de abrir la siguiente válvula.
8. Dejar las muestras liofilizando durante máximo 48 horas (revisando constantemente que todo funcione perfectamente).
9. Una vez liofilizadas las muestras, cerrar las válvulas lentamente y con precaución.

10. Quitar los frascos y abrir una de las válvulas para liberar el vacío de la cámara hasta que en el panel se indique. Volver a cerrar la válvula.
11. Apagar el interruptor del equipo y el general.
12. Limpiar y guardar todo.

*NOTA: LAS MUESTRAS SE PUEDEN COLOCAR DIRECTAMENTE EN LAS BOQUILLAS DE LA CÁMARA DE VACÍO, SIN EMBARGO, SE RECOMIENDA COLOCAR ESTOS FRASCOS DENTRO DE UN FRASCO DE LIOFILIZACIÓN.

Viabilidad de *B. animalis* y *B. pseudocatenulatum* liofilizados

Se determinó la viabilidad de los microorganismos liofilizados cada semana, para lo cual se pesaron aproximadamente 0.03 g del polvo, los cuales fueron resuspendidos en 300 µL de solución salina fisiológica estéril, se realizaron diluciones decimales seriadas que se plaquearon por triplicado en cajas Petri con MRS-C y se incubaron en una cámara de anaerobiosis a 37 ºC durante 48 h. Se contó el número de colonias en las diluciones donde se desarrollaron entre 30 y 300 UFC y se realizaron los cálculos para conocer la concentración de células viables en los liofilizados, expresada en [UFC/g].

Resultados

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

Los cultivos se monitorearon determinando la DO a 600 nm (tabla 1). Ambos cultivos se cosecharon a las 36 h de incubación, puesto que, en trabajos previos se determinó que éste es el tiempo donde se obtiene la mayor concentración de células viables. Para comprobarlo, se monitoreó el cultivo midiendo la absorbancia y la viabilidad celular de ambos cultivos.

Tabla 1. Valores de densidad óptica (DO) del crecimiento de *B. animalis y B. pseudocatenulatum* al crecer en medio MRS-C. El experimento se realizó por triplicado.

	B. animalis					***B. pseudocatenulatum***				
Tiempo (h)	**DO_1**	**DO_2**	**DO_3**	**Promedio DO**	**DESVEST**	**DO_1**	**DO_2**	**DO_3**	**Promedio DO**	**DESVEST**
0.0	0.468	0.49	0.61	0.525	0.0773	0.451	0.451	0.483	0.462	0.018
6.0	2.51	3.02	2.81	2.780	0.2563	0.886	0.851	0.909	0.882	0.029
12.0	4.47	4.52	4.4	4.463	0.0603	2.59	2.45	2.59	2.543	0.081
24.0	5.37	4.23	5.08	4.893	0.5925	3.27	3.25	3.12	3.213	0.081
36.0	5.32	5.14	5.37	5.277	0.1210	3.78	3.26	3.24	3.427	0.306

Aunque ambos cultivos iniciaron a una DO aproximada de 0.5, *B. animalis* presentó un crecimiento 1.5 veces mayor que *B. pseudocatenulatum* a las 36 horas de cultivo (figura 1).

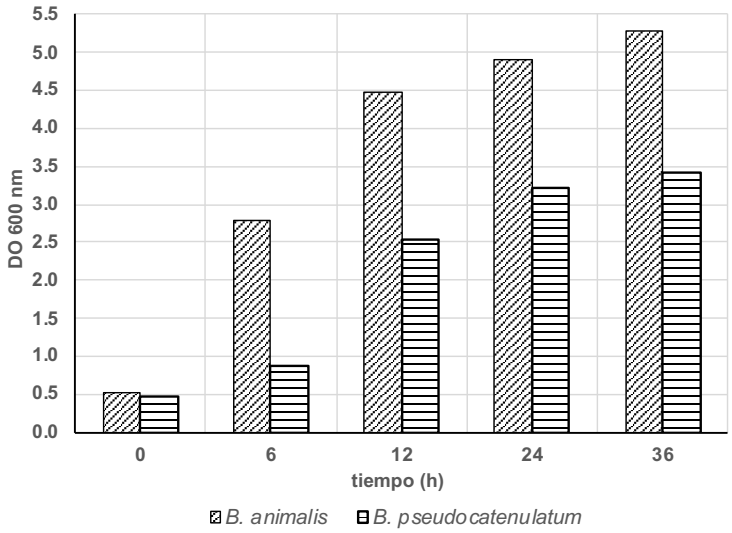

Figura 1. Comparación del crecimiento de *B. animalis* y *B. pseudocatenulatum* a diferentes tiempos, en medio MRS-C.

Viabilidad de *B. animalis y B. pseudocatenulatum* en los cultivos

A las muestras tomadas en los diferentes tiempos de cultivo: 0, 12, 24 y 36 h se les determinó la viabilidad celular. En la figura 2 se observa que, el cultivo de *B. animalis*, tanto por DO como por cuenta viable, se encuentra en fase estacionaria. Un análisis estadístico mostró que no hay diferencia significativa entre el número de bacterias viables de las muestras tomadas a 24 y 36 h, sin embargo, con los datos de DO, si hay diferencia significativa en esos 2 tiempos ($p<0.05$). Los cultivos se detuvieron a las 36 h y las bacterias se recuperaron para ser liofilizadas.

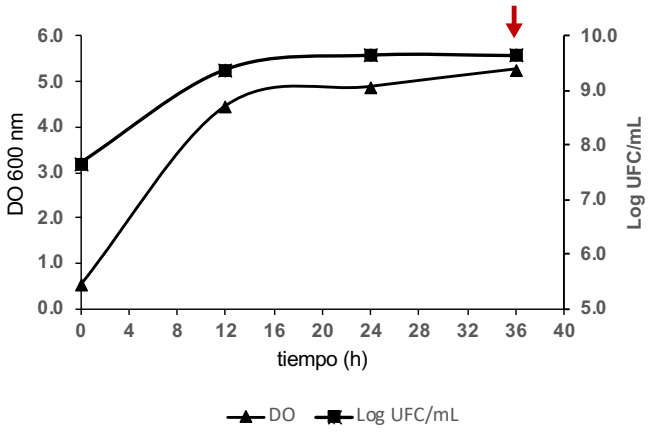

Figura 2. Comparación del crecimiento de *B. animalis* en medio MRS-C, por DO y cuenta viable. La flecha indica el tiempo en el que se cosecharon las células para ser liofilizadas.

Por otro lado, para el cultivo de *B. pseudocatenulatum,* también se determinó la viabilidad en los diferentes tiempos: 0, 12, 24 y 36 h. La figura 3 muestra que por DO no se observa una fase estacionaria, sin embargo, por cuenta viable, a partir de las 12 h ya no hay crecimiento a las 36 h por lo que las bacterias se recuperaron para ser liofilizadas.

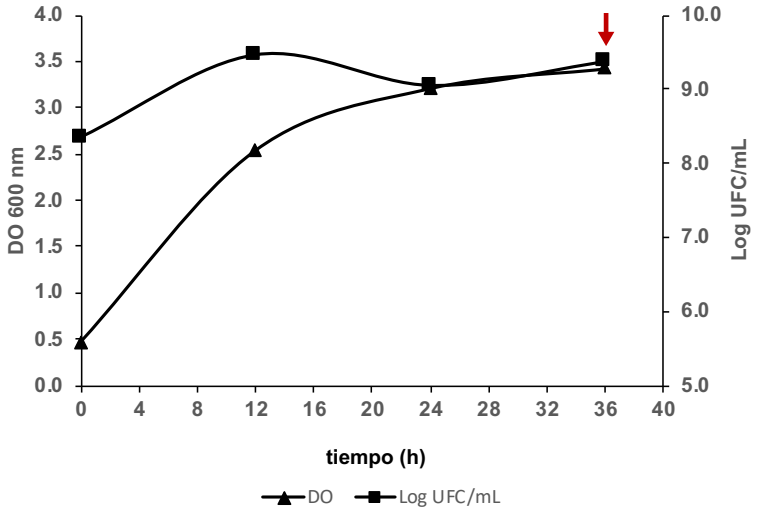

Figura 3. Comparación del crecimiento de *B. pseudocatenulatum* en medio MRS-C, por DO y cuenta viable. La flecha indica el tiempo en el que se cosecharon las células para ser liofilizadas.

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

Los cultivos de *B. animalis* y *B. pseudocatenulatum* se detuvieron a las 36 h, las células se recuperaron por centrifugación para ser liofilizadas, obteniéndose 3.02 g y 3.74 g de cada polvo respectivamente.

Considerando que estas bacterias son anaerobias, se observó que hubo una pérdida de viabilidad alrededor de una orden de magnitud en la preparación de la suspensión celular y otra pérdida de igual magnitud durante el proceso de liofilización para *B. animalis* (Fig. 4).

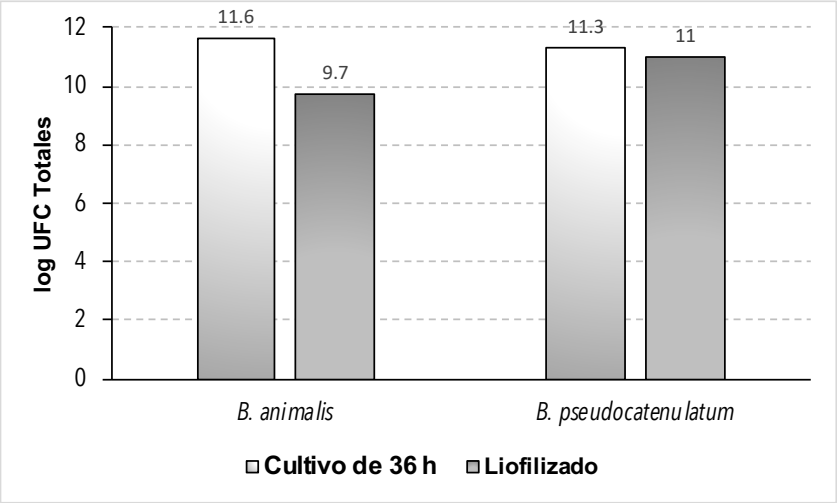

Figura 4. Pérdida de viabilidad celular de *B. animalis* y B. *pseudocatenulatum* expresada en UFC en el cultivo y en el liofilizado. El experimento se realizó por triplicado.

Viabilidad de los liofilizados de *B. animalis* y *B. pseudocatenulatum* a través del tiempo

Una vez liofilizados los microorganismos, los polvos se colocaron en frascos de vidrio y se mantuvieron a temperatura ambiente, midiendo su viabilidad semanalmente, observando que a partir de la semana 10, comienza a haber una pérdida de la viabilidad (Fig. 5 y 6).

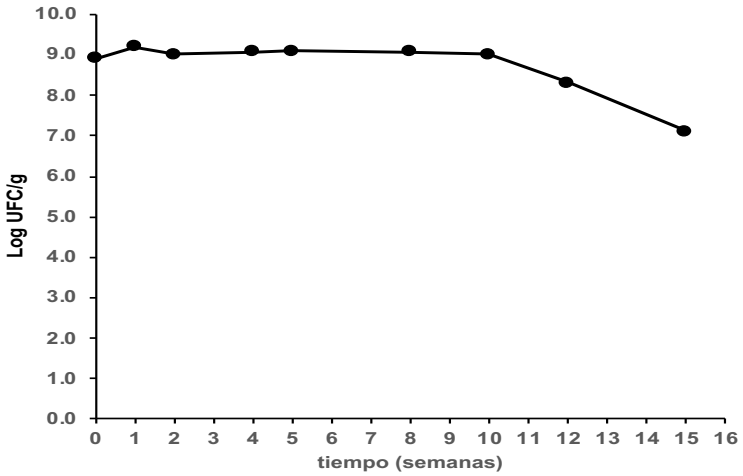

Figura 5. Monitoreo de la viabilidad de *B. animalis* liofilizado con leche descremada a 20%. El experimento se realizó por triplicado.

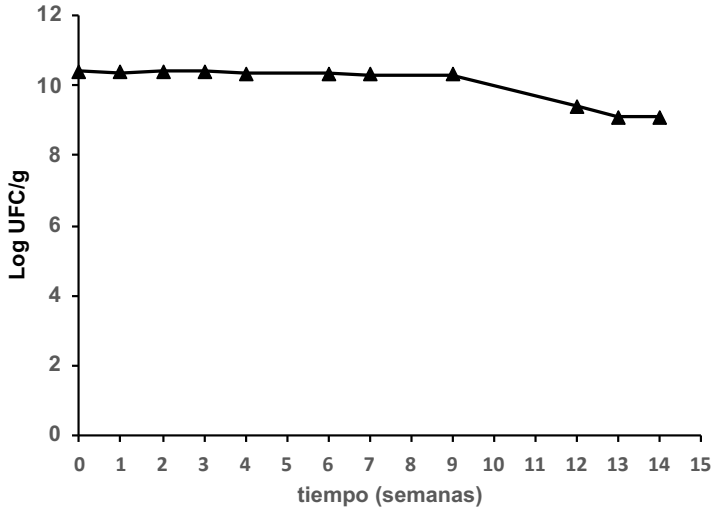

Figura 6. Monitoreo de la viabilidad de *B. pseudocatenulatum* liofilizado con leche descremada a 20%. El experimento se realizó por triplicado.

Conclusiones

Se obtuvieron cultivos de *B. animalis* y *B. pseudocatenulatum* en la fase estacionaria a las 36 horas de incubación con la mayor concentración de células viables.

Se pudo asegurar que los liofilizados de *B. animalis* y *B. pseudocatenulatum* mantienen una concentración de bacterias viables alrededor de 3 meses, después de lo cual comienza una ligera pérdida.

La experiencia de trabajo en el laboratorio de Ecología Microbiana ha sido una invaluable oportunidad que ha enriquecido no solo mi formación académica, sino también mi desarrollo profesional. Las enseñanzas adquiridas y las habilidades desarrolladas durante este tiempo no solo me han proporcionado una sólida base para mi futuro laboral, sino que también han ampliado mi comprensión sobre el fascinante mundo de la microbiología.