

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología – Microbiología

Efecto de agentes lioprotectores sobre la
supervivencia de un cultivo bacteriano
en el proceso de liofilización.

TESIS

Presentada por:

Bach. Diana Galeska Farfan Pajuelo

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

TACNA – PERÚ

2023

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 384

En la ciudad de Tacna, a través de la plataforma Google Meet, de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; siendo las 20:00 horas del día 09 de enero de 2023. Estando presente el jurado calificador nominado por Resolución de Facultad N° 10427-2023-FACI-UN/JBG, conformado por los siguientes docentes:


MSc. Luis LLoja Lozano	Presidente
Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina	Secretario
MSc. Angela Choque Miranda	Miembro

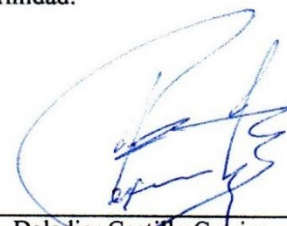
Acto seguido, se dio lectura a la resolución correspondiente, y del mismo modo se dio lectura al Artículo 22 del Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.


A continuación, el Presidente del Jurado instó a la Bachiller: Diana Galeska Farfan Pajuelo, a exponer la tesis titulada: Efecto de agentes lioprotectores sobre la supervivencia de un cultivo bacteriano en el proceso de liofilización.

Siendo las 21:30 horas, el tesista concluye su exposición, luego se procedió a la formulación de las preguntas por parte de los miembros del jurado calificador. Terminado este proceso se invitó a que los miembros del jurado emitan su calificación de acuerdo a reglamento. El promedio de la calificación dio el siguiente resultado. Aprobado (por unanimidad), con el calificativo de BUENO, con nota 16, de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Ciencias.

Siendo las 21:45 horas, se dio por concluido el acto de sustentación de la tesis, firmando los siguientes miembros del jurado calificador, en señal de conformidad.


MSc. Luis LLoja Lozano
Presidente


Dr. Daladier Castillo Cotrina
Secretario


MSc. Angela Choque Miranda
Miembro

NOMBRE DEL TRABAJO

Efecto de agentes lioprotectores sobre la supervivencia de un cultivo bacteriano en el proceso de l

AUTOR

César Julio Cáceda Quiroz

RECUENTO DE PALABRAS

12971 Words

RECUENTO DE CARACTERES

73621 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

88 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

7.6MB

FECHA DE ENTREGA

Jan 18, 2023 10:23 AM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Jan 18, 2023 10:24 AM GMT-5

● **4% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos

- 4% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 2% Base de datos de trabajos entregados
- 0% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● **Excluir del Reporte de Similitud**

- Material bibliográfico
- Material citado
- Bloques de texto excluidos manualmente
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 11 palabras)



DR. CÉSAR JULIO CACEDA QUIROZ
BIOLOGO - MICROBIOLOGO
C.F.P. 1990

Resumen

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a Dios, a mi familia, a Diana del futuro y a todas aquellas personas cercanas a mí que fueron un apoyo constante durante estos años en la universidad.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por estar conmigo en este largo camino y permitirme superar los distintos retos que he afrontado.

A la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, por haberme dado la oportunidad de crecer como persona, estudiante y profesional; a través de sus docentes y programas.

A mi asesor, el Dr. César Julio Cáceda Quiroz, por confiar en mí y darme la oportunidad de desarrollar el trabajo de tesis en el Laboratorio de Biorremediación de la Facultad de Ciencias, por su asesoría y dirección; siendo como un padre en este largo camino.

A mi co asesora la Mgr. Milena Carpio Mamani, por su apoyo, orientación, paciencia, confianza y creer en mis capacidades como estudiante y profesional; considerándola como una madre en este largo camino que he recorrido junto a ella.

A las investigadoras y amigas Blga. Gisela July Maraza y la Blga. Dina Mayumi Chachaque por sus consejos, paciencia, tolerancia, confiabilidad y guía durante el desarrollo del trabajo y su apoyo frente a la realización del mismo.

A mis compañeros y futuros colegas Mgr. Gabriela Fora y Mgr. Jhon Centeno por sus consejos y guía durante el desarrollo del trabajo.

A mi familia, a mi madre Ana Pajuelo, a mi padre Francys Farfan y hermano Anselmo Farfan, por su guía, consejos y ánimos en el desarrollo del trabajo.

A quienes considero mis mejores amigos Luz Alavi y Diego Vizcarra por sus ánimos y apoyo emocional.

Pido disculpas por aquellos que no mencioné, pues sus aportes también fueron de importancia para el éxito de este trabajo.

CONTENIDO

ACTA DE SUSTENTACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
CONTENIDO	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II	7
MARCO TEÓRICO.....	7
CAPÍTULO III.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS	25
CAPÍTULO IV.....	35
RESULTADOS.....	35
CAPÍTULO V	57
DISCUSIÓN	57
CONCLUSIONES	62
RECOMENDACIONES.....	63

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
ANEXOS	76

ÍNDICE DE TABLAS

Principales lioprotectores utilizadas para la conservación.....	12
Pruebas bioquímicas para la cepa PBG0001.....	37
Comparación de los resultados del análisis BLAST del ARN16S	39
Valores de absorbancia (OD 600) y su transformación logarítmica	40
Valores de UFC/ml contados en el tiempo	42
Valores de absorbancia a 600 nm y de UFC/ml para obtener la fase logarítmica en la curva de crecimiento de <i>Bacillus</i> sp.....	44
ANOVA de un solo factor para los tratamientos (lioprotectores).....	47
Valores de supervivencia de <i>Bacillus</i> sp. (cepa PBG0001) utilizando distintos lioprotectores.....	48
Valores de supervivencia de <i>Bacillus</i> sp. (cepa PBG0001) utilizando distintos lioprotectores durante el almacenamiento.....	51
Valores de la supervivencia transformada, de <i>Bacillus</i> sp. (cepa PBG0001) durante el almacenamiento utilizando manitol al 2,5 % y 10 %.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Diseño genérico del proceso de liofilización.	9
Tinción Gram	35
Tinción de endosporas para la cepa PBG0001.....	36
Cinética del logaritmo natural (ln) de la absorbancia (OD 600) vs tiempo (horas)	41
Curva de crecimiento según las unidades formadoras de colonias (UFC/ml) vs tiempo (horas)	43
Curva de calibración UFC/ml vs Absorbancia (OD 600) para <i>Bacillus</i> sp. PBG0001.	45
Porcentaje de supervivencia de <i>Bacillus</i> sp. (cepa PBG0001) tras el proceso de liofilización.	49
Porcentaje de supervivencia durante el almacenamiento.....	53
Morfología del pastel observada de suspensiones bacterianas liofilizadas.....	55
Distribución de morfologías de pastel por lioprotectores	55

RESUMEN

La liofilización es un método de conservación a largo plazo, donde sus tasas de supervivencia dependen del lioprotector y del microorganismo a trabajar. Los lioprotectores manitol, glucosa y lactosa en distintas concentraciones, fueron probados para mejorar la supervivencia del cultivo bacteriano, identificada como *Bacillus* sp. PBG0001, a fin de determinar quién presente un mejor efecto sobre la supervivencia. Los resultados indicaron que el efecto del agente lioprotector sobre la supervivencia bacteriana, es variable tras el proceso de liofilización y su almacenamiento; concluyendo que glucosa 1 % es el mejor lioprotector, con tasas de supervivencia de $96,30 \pm (1,72) \%$, las cuales se mantuvieron constantes en los 76 días analizados. Además de caracterizar la apariencia de los productos liofilizados, indicando que manitol permite una elegante apariencia (intacto). Este estudio proporciona una base teórica para la optimización del proceso para posibilidades comerciales y desarrollo de formulaciones.

Palabras claves: Liofilización; supervivencia bacteriana; manitol; glucosa; lactosa y *Bacillus* sp.

ABSTRACT

Freeze-drying is a long-term conservation method, where its survival rates depend on the lyoprotectant and the microorganism to work with. The lyoprotectants mannitol, glucose, and lactose in different concentrations were tested to improve the survival of the bacterial culture, identified as *Bacillus* sp. PBG0001, in order to determine who has a better effect on survival. The results indicated that the effect of the lyoprotective agent on bacterial survival is variable after the lyophilization process and its storage; concluding that 1% glucose is the best lyoprotectant, with survival rates of $96,30 \pm (1,72) \%$, which remained constant in the 76 days analyzed. In addition to characterizing the appearance of lyophilized products, indicating that mannitol allows an elegant (intact) appearance. This study provides a theoretical basis for process optimization for commercial possibilities and formulation development.

Keywords: lyophilization; bacterial survival; mannitol; glucose; lactose and *Bacillus* sp.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El incremento en el conocimiento de la diversidad cultivable ha llevado a la ciencia microbiológica a incrementar su interés en la preservación de especies microbianas en condiciones puras y homogéneas, asegurando estabilidad para su posterior estudio y utilización, con el fin de evitar cambios en los rasgos morfológicos, fisiológicos y genéticos. Debido a que los métodos de conservación apropiados pueden mantener una alta tasa de supervivencia y estabilidad genética de las cepas microbianas patógenas durante mucho tiempo (Prakash et al., 2013; Guo et al., 2020). Es por eso que la liofilización es uno de los métodos más rentables en comparación de la criopreservación, que permiten conservar al microorganismo, evitando gastos en el almacenamiento, pérdida de muestras por falta de energía; además de minimizar al máximo el riesgo de cambio genético en las células y mantenerlas viables por 10 años a más (Morgan & Vesey, 2009; Burguet et al., 2014; Merivaara et al., 2021). Este método permite eliminar la mayor parte del agua por tres fases: Fase de congelación, fase de secado primario (sublimación) y por último la fase de secado secundario (desorción) (Peiren et al., 2016; Barley, 2021). En el proceso de liofilización inevitablemente se reduce la actividad y función celular (Guang et al., 2020) debido a que las células biológicas experimentan dos tipos de estrés ambiental; la congelación y el secado, provocando daños inevitables, como daño mecánico, daño por efecto de solución, cambios en la integridad de la

membrana (Guangqiang et al., 2019), desnaturalización de proteínas, alteración del equilibrio dinámico del pH, descomposición de ácidos grasos de la membrana celular (Zhang et al., 2020), formación de cristales hielo intracelular - extracelular (Ávila et al., 2015). Estos daños celulares pueden conducir a la pérdida de actividades funcionales o pérdida de la viabilidad (Zhang et al., 2020; Wolkers & Oldenhof, 2021).

Para evitar la pérdida de viabilidad se viene investigando la forma de mejorar los procesos de liofilización, en el que contempla el uso de diferentes lioprotectores, evaluando los mecanismos de daño, las condiciones de liofilización y optimización de parámetros (temperatura, presión y tiempo). Entre estos, los lioprotectores son considerados los más importantes, afectando la viabilidad de las células durante la liofilización (Shu et al., 2018; Zhang et al., 2020; Barley, 2021); reduciendo el daño celular durante el proceso y la rehidratación, además de mantener su actividad fisiológica y almacenar la estabilidad durante la conservación a largo plazo (Zhang et al., 2020).

Dado que no existe un lioprotector universal para todas las cepas bacterianas (Burguet et al., 2014), y la efectividad de los lioprotectores varía en función del microorganismo a conservar (Ávila et al., 2015), es necesario determinar el porcentaje de supervivencia de cada microorganismo (Burguet et al., 2014).

1.1.Planteamiento del problema

Los métodos de conservación microbiana que se han utilizado a lo largo de la historia, se pueden clasificar según el tiempo en que permanecen viables las células conservadas, que son los métodos de conservación a corto plazo (resiembra periódica), mediano (conservación en perlas de agar, recubrimiento con aceite de cultivos inclinado, uso de gel de sílice y otros soportes estériles) y largo plazo (criopreservación y liofilización) (Weng et al., 2005; Prakash et al., 2013;). Dentro de estas, la liofilización, ha sido ampliamente considerada durante décadas como una técnica adecuada para preservar los microorganismos (Bellali et al., 2020), siendo preferida en la industria alimentaria, farmacéutica, en bebidas, en la fabricación de agentes de biocontrol y clínica (Morgan et al., 2006), permitiendo conservar las células microbianas durante décadas (más de 10 años) (Morgan & Vesey, 2009); aunque los procesos de liofilización son muy utilizados, es necesario evaluar los agentes lioprotectores y medios de suspensión adecuados, debido a que no están establecidos y es propio para cada microorganismo (Prakash et al., 2013).

En el proceso de liofilización, inevitablemente se reduce la actividad y función celular, produciendo daño celular que puede conducir a la pérdida de actividades funcionales o pérdida de la viabilidad (Wang et al., 2020; Zhang et al., 2020; Wolkers & Oldenhof, 2021). En este sentido es necesario conservar a los microorganismos, con el objetivo de mantener y disponer cultivos de calidad a largo, mediano y corto plazo; garantizando una supervivencia del 70 % de las

células, minimizando al máximo el riesgo de cambio genético y el riesgo de contaminación (Weng et al., 2005; Burguet et al., 2014).

Por lo tanto, para garantizar la supervivencia bacteriana en los procesos de liofilización es necesario mejorar los procesos utilizando lioprotectores adecuados como manitol, glucosa, lactosa, xilitol, trehalosa, galactosa en un rango de 1 - 10 % (Zhan et al., 2012; Abadias et al., 2014; Han et al., 2018). Siendo las técnicas de conservación un desafío sin resolver para los microbiólogos debido a limitaciones técnicas y fisiológicas (Prakash et al., 2020). Por ello, se propone la siguiente interrogante:

¿Cuál de los agentes lioprotectores manitol, glucosa y lactosa a diferentes concentraciones tienen un mejor efecto sobre la supervivencia de un cultivo de *Bacillus* sp. (cepa PBG0001), en el proceso de liofilización?

1.2.Hipótesis

Manitol tiene un mejor efecto sobre la supervivencia del cultivo de *Bacillus* sp. (cepa PBG0001) en el proceso de la liofilización.

1.3.Justificación

La conservación microbiana es necesaria para mantener los cultivos microbianos a corto, mediano y largo plazo; además de su importancia en la biotecnológica, industria alimentaria, farmacéutica, en bebidas, industria láctea, uso en la fabricación de agentes de biocontrol y clínica, siendo importante garantizar

una viabilidad superior al 70 %; su pureza (sin contaminación) y estabilidad genética de los cultivos, minimizando así la ocurrencia de los eventos genéticos (Weng et al., 2005; Schwab et al., 2007). La liofilización es descrita como una técnica a largo plazo, que evita gastos en almacenamiento, minimiza el riesgo de cambio genético en las células y mantiene viables a las bacterias por 10 años a más (Morgan & Vesey, 2009; Burguet et al., 2014). Esta tecnología es uno de los métodos más utilizados para almacenar colecciones de cultivos microbianos, como: Células eucariotas, bacterias (a excepción de *Helicobacter pylori* y *Clostridium botulinum*, debido a las dificultades para obtener un crecimiento adecuado antes del secado), virus y proteínas funcionales (Miyamoto et al., 2008; Zhang et al., 2020).

Sin embargo, esta metodología varía según la especie bacteriana que se desee conservar, el agente lioprotector y el medio de suspensión adecuado (Prakash et al., 2013; Burguet et al., 2014), ya que la eficacia de los lioprotectores varía en función del microorganismo a conservar (Ávila et al., 2015), por ello se debe estudiar la supervivencia a la liofilización para cada microorganismo en concreto (Burguet et al., 2014),

Este estudio proporciona una base teórica para mejorar el proceso de liofilización que contempla la preservación de microorganismo, garantizando el posible desarrollo industrial y biotecnológico.

1.4.Objetivos

1.4.1. Objetivo general

- Determinar el agente lioprotector que permite mayor supervivencia bacteriana, en el proceso de liofilización, para *Bacillus* sp. (cepa PBG0001).

1.4.2. Objetivos específicos

- Determinar la cinética del crecimiento y analizar secuencias de ADN para identificar molecularmente a *Bacillus* sp. (cepa PBG0001).
- Determinar el mejor agente lioprotector, evaluando el porcentaje de supervivencia de *Bacillus* sp. (cepa PBG0001) tras el proceso de liofilización y durante el almacenamiento.
- Determinar la variación en la morfología del pastel después del proceso de liofilización.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1.Liofilización

La liofilización es un método controlable de deshidratación de productos lábiles por desecación al vacío (Adams, 2007), cuyo principio básico es la interrupción del crecimiento microbiano, donde prevalece la viabilidad y estabilidad genética del cultivo por un periodo prolongado (Morgan & Vesey, 2009; Santelices & Castro, 2016).

Algunas de las ventajas importantes de la liofilización son los porcentajes de viabilidad (mayores al 70 %), las cuales no presentan pérdidas significativas incluso cuando se mantienen a temperatura ambiente, además de fácil cultivo y sobrevivencia al secado (Navarro & Romero, 2012).

Es por ello que este proceso se usa frecuentemente para la conservación y almacenamiento de microorganismos para uso industrial (Otero et al., 2007), colecciones de cultivos, fabricación de probióticos, bioconservadores, agentes biocontrol y la producción de cultivos iniciadores para procesos alimentarios (Morgan & Vesey, 2009).

2.1.1. Historia de la liofilización

La liofilización es un proceso que ocurre en la naturaleza, en condiciones extremas como baja temperatura, con suministro de energía, y un ambiente extremadamente seco. Reportándose su empleo desde siglos anteriores (XV). En

Perú los Incas, utilizaban este efecto para conservar alimentos como “chuño” y “charqui” (Santelices & Castro, 2016; Fissore et al., 2020), a pesar de su utilización en los alimentos, este conocimiento fue ignorado hasta 1955, donde reapareció como una técnica de conservación de alimentos, que actualmente se sigue empleando por reconocidos chefs o para la elaboración de comida para astronautas (Fissore et al., 2020).

En 1900 - 1920 la liofilización empezó a conocerse en los países occidentales del mundo, y finalmente se logró establecer como una técnica de conservación; pero fue hasta la Segunda Guerra Mundial que la liofilización fue usada para uso industrial (producción de plasma seco en tiempos de guerra) (Santelices & Castro, 2016; Fissore et al., 2020; Wolkers & Oldenhof, 2021).

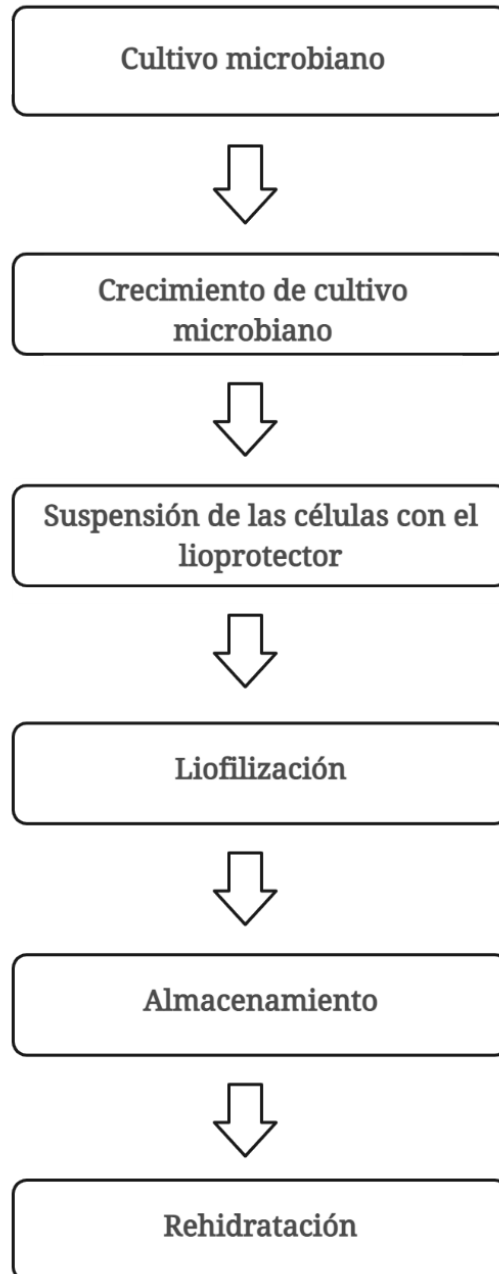
Actualmente, muchas empresas emplean la liofilización para conservar distintos productos farmacéuticos, alimenticios y biológicos (Fissore et al., 2020; Wolkers & Oldenhof, 2021).

2.1.2. Etapas de la liofilización

El proceso de liofilización es un proceso de múltiples etapas, que tiene ciertas fases genéricas para todas las metodologías; que consta del cultivo de microorganismos, crecimiento de cultivo microbiano, suspensión de las células con el lioprotector, congelado de las muestras, sublimación, desorción, almacenamiento y rehidratación (Morgan et al., 2006; Grauer et al., 2015) (Figura 1).

Figura 1

Diseño genérico del proceso de liofilización.



Nota. Adaptado de Morgan et al. (2006). Grauer et al. (2015).

- ***Tipo de microorganismo***

El tipo de microorganismo es un factor crucial durante el proceso de liofilización, reportándose una gran diferencia entre bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Durante el proceso de desecación y rehidratación, las paredes celulares de las bacterias Gram negativas tienen mayor tendencia a romperse por su delgada capa de peptidoglicano a comparación de las bacterias Gram positivas, que poseen una capa de peptidoglicano muy gruesa (alrededor del 90 % de su estructura) (Palmfeldt et al., 2003; Miyamoto et al., 2008; Ávila et al., 2015). Entre las especies de bacterias Gram positivas, aquellas con polisacáridos extracelulares o ácidos teicoicos mostraron tasas de supervivencia más bajas que otras especies (Miyamoto et al., 2008).

Del mismo modo, las esporas son más resistentes a liofilización que las células vegetativas (esporas de *Bacillus*, presentan tasas de supervivencia del 95 %) (Zhan et al., 2012) y los microorganismos exigentes muestran la menor resistencia a la liofilización (Morgan & Vesey, 2009).

- ***Fase de crecimiento y concentración celular***

La fase de crecimiento adecuada para el proceso de liofilización, depende en gran medida del organismo, pero habitualmente se da en la fase estacionaria, donde las bacterias se ven enfrentados a distintos cambios como la falta de carbono y el agotamiento de las fuentes de alimento disponibles. Desencadenando

respuestas de estrés, permitiendo la supervivencia de la población (promoviendo así; una amplia gama de proteínas de estrés), preparándola para proteger las células en condiciones adversas, como desecación, hiperosmolaridad, fluctuaciones de pH y temperatura (Palmfeldt et al., 2003; Morgan et al., 2006; Morgan & Vesey, 2009; Castañeda, 2015).

La concentración celular óptima para la liofilización se define teóricamente que debe ser mayor a 10^7 - 10^8 células ml^{-1} (Palmfeldt et al., 2003; Barragán & Lesmes, 2009; Santelices & Castro, 2016), pero se ha demostrado que cuanto mayor sea la concentración celular inicial, más tiempo sobrevivirán las células viables dentro de la muestra liofilizada (Morgan et al., 2006); debido a que la mayoría de las células mueren durante el almacenamiento a largo plazo (Barragán & Lesmes, 2009).

- ***Mecanismo de protección- Lioprotectores***

Los lioprotectores son medios que permiten conservar las células en el proceso de liofilización (Adams, 2007), protegiéndolos durante la congelación, el secado y almacenamiento (Navarro & Romero, 2012; Peiren et al., 2016). Los lioprotectores deben ser elegidos a base de determinación experimental (Adams, 2007), ya que la efectividad de los lioprotectores variarán de acuerdo al microorganismo a preservar (Ávila et al., 2015).

Existen muchos lioprotectores, los cuales se pueden clasificar de distintas formas, por su mecanismo de protección (Wolkers & Oldenhof, 2021):

Tabla 1*Principales lioprotectores utilizadas para la conservación*

Mecanismo Protector	Grupo	Ejemplo
Sustitución del Agua	Disacáridos	Sacarosa, maltosa, lactosa, trehalosa
	Azúcares	Rafinosa, glucosa, fructuosa, galactosa
	Polioles	Manitol, sorbitol, inositol
Estado vítreo	Monosacáridos	Glucosa, fructosa, galactosa
	Disacáridos	Sacarosa, maltosa, lactosa, trehalosa
	Azúcares	Rafinosa, Penta isomaltosa, maltotriosa
	Polioles	Glicerol, sorbitol, manitol, inositol, xilitol
	Polisacáridos	Maltodextrina, inulina, FOS, GOS

Nota. Principales lioprotectores utilizadas para la conservación a largo plazo de las bacterias, asociados a sus mecanismos de protección. FOS (Fructooligosacáridos), GOS (Galactooligosacáridos). Recuperado de Wolkers & Oldenhof (2021).

Existen distintas teorías que tratan de explicar los mecanismos de protección de los lioprotectores.

Sustitución de agua: Un estabilizador que puede formar enlaces de hidrógeno con proteínas y grupos de cabeza polar de fosfolípidos de membrana y actuar como sustituto de agua cuando esta se elimina durante la desorción del agua

descongelada (disacáridos, por ejemplo) (Fissore et al., 2020; Wolkers & Oldenhof, 2021). De esta forma, las células no pasan de su estado de cristal líquido a la fase de gel y mantienen su estructura celular intacta, lo cual posibilita que la membrana no sufra rupturas durante el proceso de liofilización y/o rehidratación (Ávila et al., 2015). De esta manera se logra hidratar las estructuras biológicas, como proteínas y membranas (Huang et al., 2006).

Estado vítreo: Este estado permite mayor protección durante el secado por congelación. La formación de un estado vítreo induce una viscosidad suficiente dentro y alrededor de la célula para detener la movilidad molecular al mínimo (Morgan et al., 2006); aumentando la estabilidad de las proteínas al retardar su desnaturalización y su despliegue (Fissore et al., 2020). Además, puede retener los productos de desechos liberados por las células dentro de la estructura vítrea antes de la congelación, lo que significa que no se dejan concentrar e iniciar cambios electroquímicos irreversibles en la membrana plasmática durante el almacenamiento (Morgan et al., 2006).

Atrapamiento de agua: Los excipientes pueden formar una jaula alrededor de la proteína que atrapa y lentifica las moléculas de agua. Permitiendo mantener un alto nivel de hidratación y dificulta los movimientos de las proteínas que pueden conducir a la desnaturalización (Fissore et al., 2020).

- ***Congelación inicial***

La congelación puede definirse como la conversión abrupta de una solución o suspensión en una mezcla de hielo. En el que se puede reconocer dos etapas durante el cual, el agua se nuclea inicialmente (cambiando de estado), seguido por el crecimiento de los cristales de hielo que impregnan la fase de soluto, dando como resultado una mezcla de hielo y concentrado de soluto (Adams, 2007; Merivaara et al., 2021; Wolkers & Oldenhof, 2021).

Este paso inmoviliza los componentes de la solución, evitando la formación de espuma cuando se aplica el vacío; reduce la desnaturalización térmica del producto e induce una estructura de cristal de hielo específica en la masa congelada, que facilita el secado por la migración de vapor en el pastel (Wolkers & Oldenhof, 2021); para ello los cristales de hielo deben ser grandes, anchos y contiguos, extendiéndose desde la base del producto hacia la superficie (Adams, 2007).

El tiempo de duración de este paso va a sujetarse de la cantidad, naturaleza del producto y concentración; y de su resultado va a depender que el producto liofilizado conserve sus propiedades originales y que su rehidratación sea rápida (Navarro & Romero, 2012).

La congelación es el principal paso crítico para mantener la viabilidad bacteriana durante la liofilización. Donde, primero se forma hielo en el medio extracelular debido a una mayor concentración de soluto en las células que en el

medio extracelular; debido a la formación de hielo extracelular se aumenta la concentración de solutos extracelulares, lo que da como resultado un gradiente osmótico entre la célula y el medio extracelular. Esta diferencia en la presión osmótica hace que el agua salga de la célula y la deshidrate (Bodzen et al., 2021).

- ***Sublimación o desecación primaria***

El primer paso del ciclo de secado se define como secado primario y representa la etapa en la que el hielo, que constituye entre el 70 – 95 % del contenido de agua del producto, se convierte en vapor de agua (Del Carmen, 2016; Wolkers & Oldenhof, 2021).

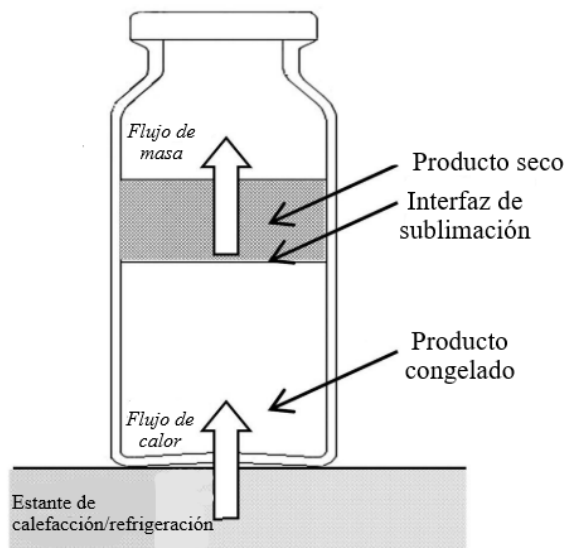
Para dicha transformación de estado se requiere energía en forma de calor (debido a que la sublimación es un proceso endotérmico) (Fissore et al., 2020), esta debe transportarse a través de la muestra hasta la interfaz, lo que requiere una diferencia de temperatura (normalmente denominada gradiente de temperatura) entre la fuente de calor y la interfaz. La entrada de energía debe controlarse para que la cantidad de vapor producido pueda eliminarse lo suficientemente rápido para evitar condiciones que contribuyan a la ruptura estructural (colapso), especialmente en la interfaz de sublimación (Perry, 1995).

Una vez que se ha formado el vapor en la interfase, debe transportarse lejos de la muestra. La eliminación de vapor requiere transporte de masa y necesita una diferencia de presión, generalmente denominada gradiente de presión, entre la interfaz y la superficie del condensador refrigerado (Perry, 1995).

Por lo que es esencial bajar la presión parcial del agua por debajo del punto triple (aprox. 800 mBar a 0 °C), para asegurar la conversión directa del hielo en vapor de agua y evitar que la muestra se derrita (Adams, 2007). Al disminuir la presión de la cámara veremos aumentar la tasa de sublimación, reduciendo la concentración gas/vapor sobre la muestra y brindando una resistencia mínima a las moléculas de agua que migran del producto (Wolkers & Oldenhof, 2021).

Figura 2

Etapa de secado primario



Nota. Etapa de secado primario de un proceso de liofilización en viales.

Adaptado de Fissore et al. (2020).

La sublimación está sujeta a parámetros como temperatura, presión y tiempo, que pueden ser modificados desde el equipo de liofilización, pero hay que considerar que la modificación independiente, puede traer consecuencias sobre los

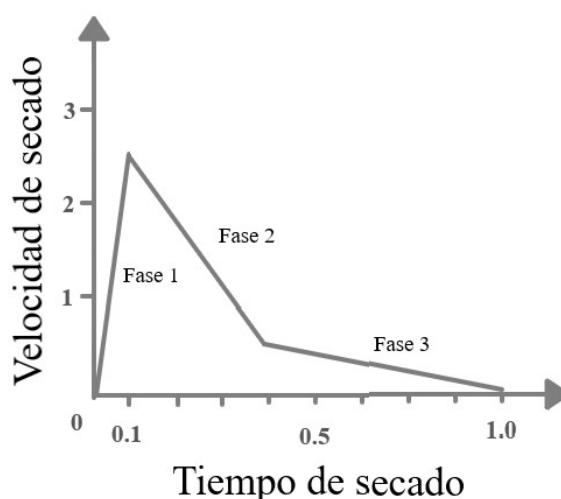
otros parámetros, por lo que se puede decir que están íntimamente relacionados (Navarro & Romero, 2012).

Por efecto, cuando la temperatura de secado primario del producto es demasiado alta; es decir, por encima de la temperatura de colapso T_c (cambio drástico de temperatura), el producto poroso puede colapsar. Los productos colapsados liofilizados parecen encogidos o derretidos y contienen más agua residual, lo que lleva a un período prolongado de rehidratación y posible pérdida de funcionalidad (Peiren et al., 2016).

La tasa de sublimación durante el proceso no es constante, por lo que se observan tres fases, donde se distinguen una curva según el tiempo de secado (*Figura 2*). Fase 1: Llamada etapa conductiva. Inicialmente, por el calentamiento de la muestra, la velocidad de sublimación crece rápidamente hasta llegar a un máximo, donde se lleva a cabo la mayor parte de remoción de agua. Fase 2: Primera etapa difusiva. Muestra un descenso importante de la velocidad de sublimación debido a la formación de una capa porosa de material seco que opone resistencia creciente al flujo de calor y al vapor a medida que procede el secado Fase 3: Segunda etapa difusiva. La velocidad de sublimación continúa decreciendo de forma que se aproxima a cero. Esto debido a que el calor necesario para retirar el agua ligada es más alto que el calor de sublimación (Orrego, 2003).

Figura 3

Curva de velocidad de sublimación.



Nota. Reproducido de Orrego (2003).

- ***Desorción o desecación secundaria***

El secado secundario comienza una vez que toda el agua congelada se ha sublimado y solo queda agua ligada (agua descongelada residual atrapada en la matriz vítrea) (Morgan et al., 2006; Peiren et al., 2016). Esta es mucho menos eficiente con tiempos de secado que representan del 30 al 40 % del tiempo total del proceso, pero solo eliminan 5 – 10 % de la humedad total de la muestra (Adams, 2007; Wolkers & Oldenhof, 2021). La mayoría de las bacterias no sería estructural o químicamente estables, a menos que la mayor parte de esta agua unida se elimine durante la liofilización (Perry, 1995). Este paso logra que la humedad final llegue

hasta valores menores al de 1 - 2 % (Navarro & Romero, 2012; Pérez & Vargas, 2014).

El producto liofilizado generalmente será muy higroscópico si se decide exponer el producto seco a las condiciones atmosféricas, lo que dará como resultado la reabsorción de la humedad atmosférica en el producto. Tanto el agua como el aire dañan un producto seco, provocando cambios degradativos que dan como resultado una estabilidad deficiente; por lo tanto, es prudente tapar el producto dentro del liofilizador antes de retirarlo (Adams, 2007; Wolkers & Oldenhof, 2021).

El taponado en vacío total (baja presión) proporciona las condiciones ideales para garantizar la estabilidad del producto porque los gases atmosféricos reactivos se reducen al mínimo (Wolkers & Oldenhof, 2021).

- ***Almacenamiento***

El método de almacenamiento y el empaque en el que se almacenan los viales influirán en la vida útil de cualquier producto seco; la mayoría de los productos que se echan a perder, deben evitar; oxígeno, humedad, luz, contaminación microbiana y temperaturas elevadas (Morgan et al., 2006; Santelices & Castro, 2016).

- ***Rehidratación***

La rehidratación de los microorganismos liofilizados es el último paso crítico para la reactivación de las células después del secado (Morgan et al., 2006), existiendo una gran variedad posible, mostrando resultados variables, jugando un

papel importante, promoviendo la reparación de las células dañadas al proporcionar nutrientes adicionales y componentes esenciales requeridas por las células lesionadas. La temperatura de rehidratación también podría influir la recuperación celular después de la liofilización en un rango de 18 a 25 °C, sin embargo, se recomienda temperaturas más altas (mayores a 30 °C) para células más grandes (Morgan & Vesey, 2009).

2.2.Secuenciamento

El ADN es una de las moléculas más importantes para la vida (Márquez et al., 2014), las cuales están compuestas por nucleótidos unidos por medio de enlaces fosfodiéster entre los carbonos de las posiciones 3' y 5' de dos residuos de azúcares adyacentes (López et al., 2021).

Cada nucleótido, está formado por un azúcar (desoxirribosa), una base nitrogenada que puede ser adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G) y un grupo fosfato; el orden de estos nucleótidos es lo que se denomina secuencia (Márquez et al., 2014), por lo que el secuenciamento es entendida como la determinación del orden de los nucleótidos de una cadena de ADN (Jauk, 2019) (Peña et al., 2013).

2.2.1. Historia de la secuenciación

Luego de que Watson, Crick y Franklin descubrieran la estructura del ADN en 1953, se hizo muchos intentos por secuenciar el ADN; y no fue hasta 1965 que Robert Holley secuenció el primer ARNt de alanina de *Saccharomyces cerevisiae*,

por el que fue galardonado con el Premio Nobel en 1986. En 1972, Walter Fiers fue el primero en secuenciar el ADN de un gen completo (el gen que codifica la proteína de la capa del bacteriófago MS2) utilizando ARN para digerir el ARN del virus y aislar oligonucleótidos, y luego separándolos a través de electroforesis/cromatografía. En paralelo al logro de Fiers, Frederick Sanger, siguió trabajando en un método alternativo de secuenciación de ADN y en 1977, desarrolló el primer método de secuenciación de ADN que utilizaba fragmentos parcialmente digeridos radiomarcados llamado “método de terminación de cadena”, quien fue galardonado con el Premio Nobel por su trabajo en 1980. También en 1977, Maxam y Gilbert introdujeron un método para la secuenciación del ADN que se basaba en la modificación química del ADN, haciendo uso de sustancias químicas que rompen la secuencia de ADN en bases específicas (Heather & Chain, 2016; Gupta & Gupta, 2020; Tamseel & Andreas, 2020).

En 1987, Leroy Hood y Michael Hunkapiller que trabajaban en Applied Biosystems, Inc. (ABI) tuvieron éxito en la automatización del proceso de secuenciación de Sanger, etiquetando los fragmentos con colorantes fluorescentes, además que la adquisición y el análisis de datos fueron posibles en computadora. En 1996, Mostafa Ronaghi, Mathias Uhlen y Pål Nyren introdujeron una nueva técnica de secuenciación de ADN llamada pirosecuenciación (basada en la medición de la luminiscencia generada como resultado de la síntesis de pirofosfato durante la secuenciación) (Tamseel & Andreas, 2020).

En 1998, Shankar Balasubramanian y David Klenerman, fundadores de Solexa, desarrollaron un nuevo método de secuenciación por síntesis que utiliza colorantes fluorescentes (Tamseel & Andreas, 2020).

En el 2005, Jonathan Rothberg y sus colegas implementaron la tecnología de pirosecuenciación en un sistema automatizado, el sistema 454 (Tamseel & Andreas, 2020).

En 2007, Illumina adquirió la compañía Solexa, proponiéndose proporcionar la tecnología NGS (Next Generation Sequencing), que es actualmente la más utilizada (Tamseel & Andreas, 2020).

2.2.2. Plataforma Illumina (Solexa®)

Existen distintas plataformas de secuenciación que permiten obtener la secuenciación del genoma completo, destacando las plataformas Illumina (López et al., 2021).

Dicha plataforma utiliza distintos secuenciadores (MiSeq, NextSeq y HiSeq 4000), donde el flujo de trabajo de secuenciación se puede dividir en cuatro procesos independientes: Preparación de librerías, generación de grupos, secuenciación y análisis de datos (López et al., 2021; Illumina, 2022).

La preparación de librerías incluye pasos, donde el ADN se cuantifica para conocer la aportación genética, se fragmenta añadiéndose adaptadores, para finalmente cuantificar las librerías finales. Todas las librerías presentan una estructura general, ya que presentan adaptadores colocados en ambos extremos de

los fragmentos. Para generar grupos (las librerías deben disponer de las regiones de unión P5 y P7, que interactúan con los oligonucleótidos en la superficie de la celda de flujo); multiplexado (las librerías deben tener un índice único o una secuencia de códigos de barras para mezclar muestras) y secuenciación (las librerías deben disponer de regiones de unión para que los cebadores de secuenciación activen las opciones de lectura 1 y 2) (Illumina, 2022).

Generación de grupos es la segunda etapa en este proceso, esta se produce en la celda de flujo (portaobjeto de vidrio con canales o carriles de fluidica, donde se produce la química de secuenciación), cada instrumento de secuenciación utiliza una celda de flujo única; celda de flujo aleatoria (HiSeq 2500, Miseq y MiniSeq) y celda de flujo de trama (HiSeq 3000/4000/X, NovaSeq y iSeq 100). La generación de grupos es el proceso por el cual cada fragmento de una librería se clona en miles de copias idénticas. Para ello, las librerías hibridan en la celda flujo, con una superficie revestida con oligonucleótidos, luego se amplifican; donde las moléculas de una sola cadena se giran e hibridan en los cebadores adyacentes para formar un puente, es así donde una polimerasa sintetiza la cadena inversa y se repite este proceso de amplificación varias veces. Por último, para preparar las cadenas para la secuenciación, se produce la linealización. Se debe tener en cuenta que una generación de grupos optimizada de celdas de flujo determina la calidad y el rendimiento general de los datos; es por ello que para lograr una densidad de grupos

óptima, se debe realizar la cuantificación de librerías antes de llevar a cabo la secuenciación (Illumina, 2022).

La tecnología de secuenciación de Illumina se denomina secuenciación por síntesis (SBS), donde los reactivos de secuenciación, incluidos los nucleótidos marcados con fluorescencia, se añaden a la cadena de ADN. El secuenciador MiSeq presenta un proceso químico de cuatro canales, donde se emplea cuatro colorantes fluorescentes (uno para cada base) y cuatro imágenes por ciclo de secuenciación (Illumina, 2022).

El análisis de datos en Illumina consta de tres procesos: Análisis principal, secundario y visualización de datos (Illumina, 2022).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Material biológico

Para la ejecución de la presente tesis, se utilizó un microorganismo Gram positivo con forma de bacilo, la cual fue aislada a partir de una muestra de suelo del pasivo ambiental ubicado en Palca, el cual mostró una alta resistencia al cianuro. Esta bacteria forma parte de la Colección de Cepas del Laboratorio del Proyecto de Biorremediación de la Facultad de Ciencias con código PBG0001 y del cual se realizó cultivos bacterianos con los que se trabajó.

3.1.2. Reactivos

- Manitol
- Glucosa
- Lactosa
- Lugol
- Alcohol Acetona
- Cristal Violeta
- Safranina
- Agar Nutritivo (AN)
- Agar Luria - Bertani (ALB)
- Caldo tripticasa soya (CTS)
- Agua peptonada
- Aceite de inmersión para microscopio
- Plate Count Agar (PCA)
- Kit de Reactivos Qubit
- Buffer TBE 10X
- Agarosa
- *Safe green*
- Ladder 1 kb y 600 pb
- Agua PCR
- Kit innuPREP Bacteria ADN (para extracción de ADN)
- Kit Illumina DNA Prep (para preparación de librerías)
- Kit de índice
- Etanol absoluto

3.1.3. Equipos

- Autoclave
- Microcentrífuga
- Liofilizador
- Ultrafreezer
- Sistema de electroforesis
- Termociclador
- Incubadora
- Estufa
- Cámara de bioseguridad
- Microscopio óptico
- Micropipetas
- Balanza analítica

- Vortex
- Frezeer 5°C
- Lector de Microplacas
- Equipo de Miseq
- Equipo Qubit

3.1.4. Material de vidrio y otros

- Matraces Erlenmeyer de 125, 250, 500 y 1000 ml
- Microtubos eppendorf de 1,5 ml
- Vasos precipitados de 100, 250 y 500 ml
- Probeta de 100 y 250 ml
- Tubos de ensayo con tapas rosca de 10 ml y 15 ml
- Puntas de 0,1-1,0 μ l
- Puntas de 1-20 μ l
- Puntas de 10 -200 μ l
- Puntas de 1000 μ l
- Gradillas para tubos de 15 ml
- Papel aluminio
- Tijeras
- Cinta Masking tape
- Parafilm
- Algodón
- Espátulas
- Alcohol
- Dispensadores
- Marcadores negros
- Guantes de nitrilo de Talla S
- Guantes de látex de Talla S
- Tubos Falcon de 50 ml
- Soporte magnético
- Jeringas de 1 y 5 ml
- Filtros Millipore de 0,25 μ m
- Pinzas metálicas
- Viales de 10 ml especiales para liofilizador
- Filtros giratorios
- Placa de 96 pocillos de PCR

- Tira de tubos de PCR
- Placas MIDI PCR

3.2. Diseño de la investigación

Experimental

3.3. Métodos

3.3.1. Reactivación de la cepa bacteriana

La reactivación de la cepa bacteriana PBG0001 se realizó sembrándose en caldo tripticasa soya (CTS) para posteriormente incubarse a 35 °C por 18 horas, luego se realizó una siembra en agar nutritivo (AN) a 35 °C durante 24 horas y de esta forma fue utilizada (Burguet, Sierra, et al., 2014) modificado.

3.3.2. Caracterización microscópica de Bacillus sp. (cepa PBG0001)

La cepa bacteriana PBG0001 reactivada, fue caracterizada microscópicamente, efectuándose la tinción Gram, y coloración de esporas, registrando su coloración y morfología por observación en el microscopio óptico utilizando aceite de inmersión con aumento de 1000X.

Además, se realizó algunas pruebas bioquímicas para la cepa bacteriana PBG0001, como: Citrato, Nitrato, Prueba SIM, Prueba Voges- Proskauer (VP), Prueba Rojo de Metilo (RM), observación de colonias rizoides, degradación del almidón, Catalasa, Oxidasa, prueba Oxidación- Fermentación (O/F), siguiendo la metodología descrita por Bergey's Manual of Systematic of Bacteriology (Whitman, 2010).

3.3.3. Análisis de la secuencia de ADN para la identificación molecular de Bacillus sp. (cepa PBG0001) y cinética del crecimiento microbiano

- **Análisis de la secuencia de ADN**

Para la identificación molecular de la cepa bacteriana PBG0001, se realizó la extracción de ADN mediante Kit innuPREP Bacteria ADN (Analytik Jena AG, 2018). Posteriormente el ADN se cuantificó utilizando un espectrofotómetro lector de microplaca EPOCH, Qubit (método de colorante fluorescente) y la calidad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, con la finalidad de que no exista algún contaminante que interfiera en la posterior preparación de librerías. Se realizó la preparación de estas según la metodología descrita por Illumina DNA Prep: Reference Guide (Illumina, 2020), luego se realizó la cuantificación y calidad del ADN utilizando Qubit, por electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Se normalizaron y agruparon las librerías para secuenciación multiplexada en un secuenciador MiSeq, utilizando el formato de ejecución de 150 pb de extremo pareado.

El análisis del genoma bacteriano se realizó utilizando programas bioinformáticos, para la evaluación del control de la calidad de secuencia (FastQC), trimado y recorte de los adaptadores (TRIMOMATIC), ensamblaje (Spades), anotación (Prokka) y control de calidad del ensamblado (Quast) (Anexo 1).

- **Cinética del crecimiento (Han et al., 2018)**

La cepa bacteriana PBG0001, fue cultivada en agar nutritivo (AN) a 35 °C durante 12 horas, luego se inoculó en 150 ml de caldo tripticasa soya (CTS) al 2 %

de inóculo (10^7 células/ml, valor que fue obtenido por absorbancia) y se incubó a 30 °C, en incubadora con rotación (150 rpm/min) durante 12 horas.

El valor de OD (600 nm) se midió cada 1 hora con un lector de microplacas (Lector de microplacas-EPOCH- BioTek), agregándose 200 µl de CTS a tres pocillos (en placa para medir la absorbancia) como control y 200 µl del medio con la bacteria a otros tres pocillos. Las unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias se contaron esparciendo 1000 µl de muestra diluida en medio de Agar Plate Count (PCA) y enumeraron las colonias formadas (UFC/ml) después de la incubación durante 24 h a 35 °C (Anexo 2).

Estas dos lecturas, el OD y el recuento en placa se hicieron para obtener la curva de la cinética de crecimiento de la cepa en estudio, y establecer sus etapas.

3.4. Porcentaje de supervivencia de *Bacillus* sp. (cepa PBG0001) luego del proceso de liofilización y durante el almacenamiento

Los distintos agentes lioprotectores utilizados fueron disueltos en agua destilada en los siguientes porcentajes (p/p):

- Manitol 2,5 %, 5 % y 10 %
- Glucosa 1 %, 5 % y 10 %
- Lactosa 5 %; 7,5 % y 10 %

Todas las suspensiones de lioprotectores fueron esterilizadas con filtros para jeringa Millipore Express* PES *Membrane Filter Unit* de 0,22 µm antes de su uso (Zayed & Roos, 2004; Ávila et al., 2015; Peiren et al., 2016).

3.4.1. Porcentaje de supervivencia de Bacillus sp. (cepa PBG0001) luego del proceso de liofilización

Para evaluar la supervivencia bacteriana durante el proceso de liofilización, se diferenciaron 3 etapas (Anexo 3):

- **Primera etapa (Ávila et al., 2015)**

De la cepa bacteriana PBG0001, se extrajo una asada, sembrándose en CTS, e incubó hasta que ingresó a su fase estacionaria (a partir de la séptima hora, valor determinado por la cinética de crecimiento) a una temperatura de 30 °C a 150 rpm. Una vez desarrollado la cepa bacteriana PBG0001, se procedió a separar la biomasa del medio; tomando 1,5 ml de muestra en un tubo Eppendorf de la misma capacidad, y se centrifugó a 12 000 rpm, a una temperatura de 4 °C, durante 12 minutos.

El pellet recogido de la centrifugación, se suspendió por segunda vez en 1,5 ml del CTS y se centrifugó nuevamente.

Al retirar el sobrenadante se obtuvo la biomasa concentrada; este se suspendió en 3 ml de lioprotector a evaluar en viales (preparándose 21 viales por cada lioprotector).

A esta biomasa se hizo una lectura de la absorbancia (OD 600) para conocer la concentración de células, la carga microbiana fue corroborada con un recuento en placa, la cual fluctuó entre 10^7 - 10^{11} UFC/ml (la cual varió dependiendo del lioprotector).

Los viales fueron llevados a la ultra congeladora (a -80 °C), por 2 días (Ampatzoglou et al., 2010; Ávila et al., 2015), para iniciar la primera etapa del proceso de la liofilización, que es la congelación.

- ***Segunda etapa***

Los viales congelados con los respectivos lioprotectores fueron llevados al liofilizador LABCONCO (4,5 litros, -84°C), abriéndolos sin retirar el tapón del vial y dejando una abertura que permita el flujo del agua hacia el colector. Dejándose que los viales se liofilizarán por 24 horas (a una presión de 0,000 mBar y temperatura de -80 °C), luego se retiraron y almacenaron a una temperatura de 4°C en oscuridad (Peiren et al., 2016).

- **Tercera etapa (Supervivencia)**

Después del proceso de liofilización (día 0), se abrió algunos viales y se reconstituyeron con 3 ml de CTS; dejando que las células se reconstituyan fisiológicamente por 24 horas a 35 °C; realizándose diluciones seriadas desde 10⁻¹ a 10⁻¹⁰, para posteriormente ser sembradas en el medio PCA por duplicado. Los experimentos se repitieron tres veces para cada lioprotector (Peiren et al., 2016).

Este autor indica que la supervivencia se expresa con la siguiente fórmula:

$$\text{Supervivencia (\%)} = \frac{\text{Log10 (UFC/ml) después de la liofilización}}{\text{Log10 (UFC/ml) antes de la liofilización}} \times 100$$

3.4.2. Porcentaje de supervivencia de Bacillus sp. (cepa PBG0001) durante el almacenamiento

Los viales con la muestra liofilizada para cada lioprotector, fueron extraídas de almacenamiento cada 19 días (durante 76 días) a 4 °C, y luego se siguieron los pasos descritos en el punto 2.4.1.

3.5. Morfología del pastel después del proceso de liofilización

Para la evaluación del aspecto físico del pastel (estructura proveniente luego del proceso de liofilización), se tuvo en cuenta cuatro clasificaciones, según Peiren, et al. (2016):

- Intacto: Sin contracción de la torta.
- Poroso: Agujeros grandes en la torta sin contracción.
- Colapso parcial: Contracción de la torta a lo largo de todo su perímetro, pero la altura de la torta no se ve afectada.
- Colapso: Contracción a lo largo del perímetro de la torta, así como la altura de la torta con o sin derretimiento.

3.6. Análisis estadístico

3.6.1. Cinética del crecimiento microbiano

Se aplicaron pruebas para verificar la normalidad de los datos con las pruebas de Shapiro – Wilks, y la Prueba de Lilliefors (Kolmogorov - Smirnov); y la prueba de Levene para analizar la igualdad de varianzas (Homocedasticidad), luego de estas pruebas se realizó la regresión lineal con la finalidad de crear un

modelo (ecuación de la recta) y se comprobó si realmente nuestras variables tienen una correlación lineal con el Coeficiente de Correlación de Pearson.

3.6.2. Porcentajes de supervivencia después del proceso de liofilización y durante el almacenamiento

Se aplicaron pruebas para verificar la normalidad de los datos con las pruebas de Shapiro - Wilks y la Prueba de Lilliefors (Kolmogorov - Smirnov); y la prueba de Levene para analizar la igualdad de varianzas (Homocedasticidad), estas pruebas sirvieron para cumplir los supuestos requeridos para realizar el ANOVA.

Los datos que presentaron los dos supuestos (Homocedasticidad y Normalidad), se les aplicó la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA de una vía) con un test a posteriori de Dunnett, con un valor de significancia de 0,05; para los porcentajes de supervivencia después del proceso de liofilización. Mientras que para los porcentajes de supervivencia durante el almacenamiento se utilizó la prueba de Fisher.

En aquellos casos en la que no se cumplieron estos supuestos, se realizaron transformaciones de los datos por Johnson (para su normalización), luego se aplicó la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA de una vía) con un test a posteriori de Fisher, con un valor de significancia de 0,05.

Todas las pruebas se realizaron utilizando el programa RStudio versión 4.1.2.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

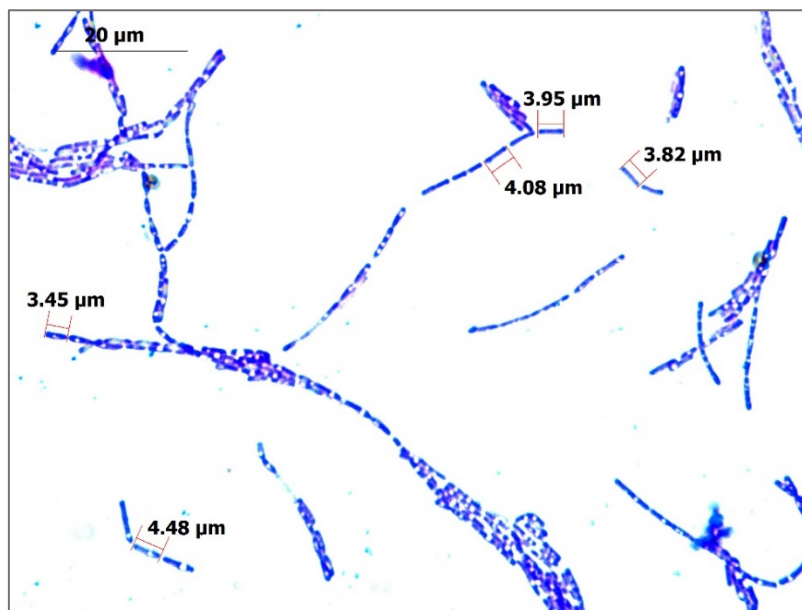
4.1. Reactivación de *Bacillus* sp. (cepa PBG0001) y su caracterización microscópica

La reactivación de la cepa bacteriana PBG0001 se realizó sembrándose en el medio CTS, para posteriormente incubarse a 35 °C por 18 horas, luego se realizó una siembra en PCA a 35 °C durante 24 horas y de esta forma fue utilizada.

Las colonias bacterianas fueron observadas al microscopio de luz a 100X para observar sus características tintoriales (Figura 4 y Figura 5).

Figura 4

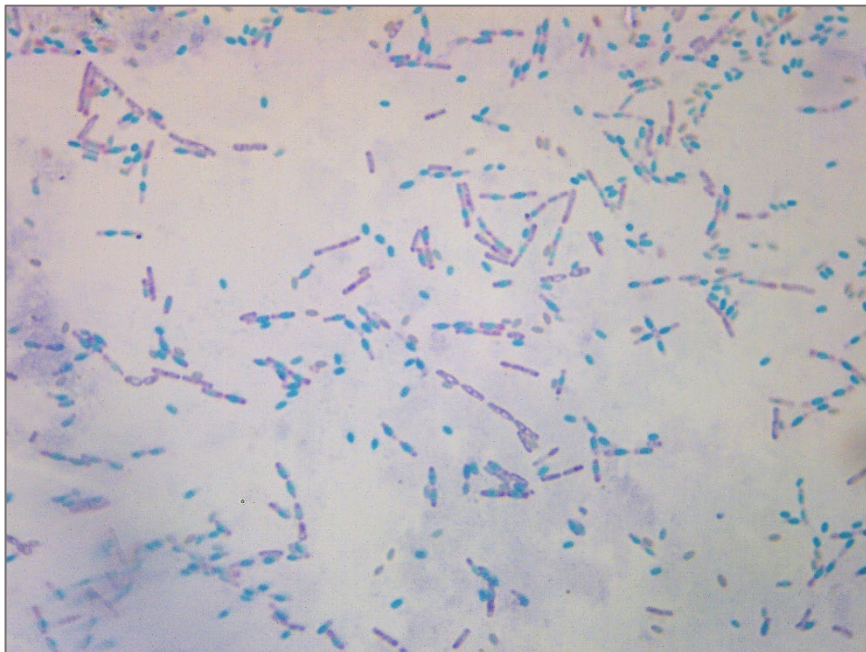
Tinción Gram de la colonia coloreada



En la Figura 4 se puede observar la morfología de la cepa PBG0001, observada con el aumento de 100 X.

Figura 5

Tinción de endosporas para la cepa PBG0001



En la Figura 5 se puede observar esporas de *Bacillus* sp., con el aumento de 100 X.

Tabla 2

Pruebas bioquímicas para la cepa PBG0001

Pruebas bioquímicas	PBG0001
Citrato	-
Nitrato	+
Sulfuro	-
SIM Movilidad	+
Indol	-
VP	-
MR	+
Colonias rizoides	-
Degradación del almidón	+
Catalasa	+
Oxidasa	-
Manitol	O/F
O/F Arabinosa	-/-
Glucosa	-/-

Nota. Prueba Voges - Proskauer (VP). Prueba Rojo de Metilo (RM). Prueba Oxidación - Fermentación (O/F). Bergey's Manual of Systematic of Bacteriology (Whitman, 2010)

Las pruebas realizadas a la cepa PBG0001, según el Manual de Bergey's Manual of Systematic of Bacteriology (2010), podría ser *Bacillus* sp.

4.2. Análisis de la secuencia de ADN para la identificación molecular de *Bacillus* sp. (cepa PBG0001) y velocidad del crecimiento microbiano

4.2.1. Análisis de la secuencia de ADN para la identificación molecular de *Bacillus* sp. (cepa PBG0001)

Para el ensamblaje de *nov*o se realizó en una Workstation, obteniéndose un total de lecturas de secuencias de 518 181, con longitudes de secuencia de 91 - 142 pb, con un porcentaje de GC de 35 % y se realizó la identificación del gen ARNr 16S con el programa BLAST (Tabla 3).

Tabla 3*Comparación de los resultados del análisis BLAST del ARN16S*

Identidad	Cobertura de consulta	Identidad	pb	N° acceso
<i>Bacillus thuringiensis</i>	100 %	100,00 %	5281841	CP054568.1
<i>Bacillus cereus</i>	100 %	100,00 %	5413450	CP053931.1
<i>Bacillus cereus</i>	100 %	100,00 %	5342923	CP053965.1
<i>Bacillus thuringiensis</i>	100 %	100,00 %	5256259	CP053981.1
<i>Bacillus anthracis</i>	100 %	100,00 %	5231857	CP031642.1
<i>Bacillus cereus</i>	100 %	100,00 %	5231857	CP090940.1
<i>Bacillus cereus</i>	100 %	100,00 %	5182254	CP053656.2
<i>Bacillus cereus</i>	100 %	99,94 %	5229506	CP018935.1
<i>Bacillus cereus</i>	100 %	99,94 %	5243376	CP018933.1

Según el BLAST realizado a nivel del gen ARNr 16S, la cepa bacteriana PBG0001 corresponde al género *Bacillus*, presumiblemente especies bacterianas como: *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* y *Bacillus thuringiensis*, debido a su alto nivel de cobertura e identidad.

Debido a sus altos porcentajes de cobertura e identidad de las especies bacterianas antes descrita, a nivel de ARNr 16S, se realizó una comparación a nivel de genoma completo, utilizándose un genoma de referencia perteneciente a *Bacillus cereus* FS2 de la NCBI CP090940.1, obteniéndose una fracción genómica del

90,692 %; concluyendo que esta bacteria pertenece al grupo de *Bacillus cereus sensu lato* (*Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* y *Bacillus thuringiensis*).

Donde la fracción genómica es un valor estadístico que indica la calidad del ensamblado; mientras la fracción genómica sea mayor del 90 %, podemos indicar que nuestro ensamblado ha sido correcto.

4.2.2. Cinética de crecimiento microbiano

Los resultados cinéticos de la absorbancia para *Bacillus* sp. (cepa PBG0001) en el tiempo, se muestran en la siguiente Tabla 4.

Tabla 4

Valores de absorbancia (OD 600) y su transformación logarítmica

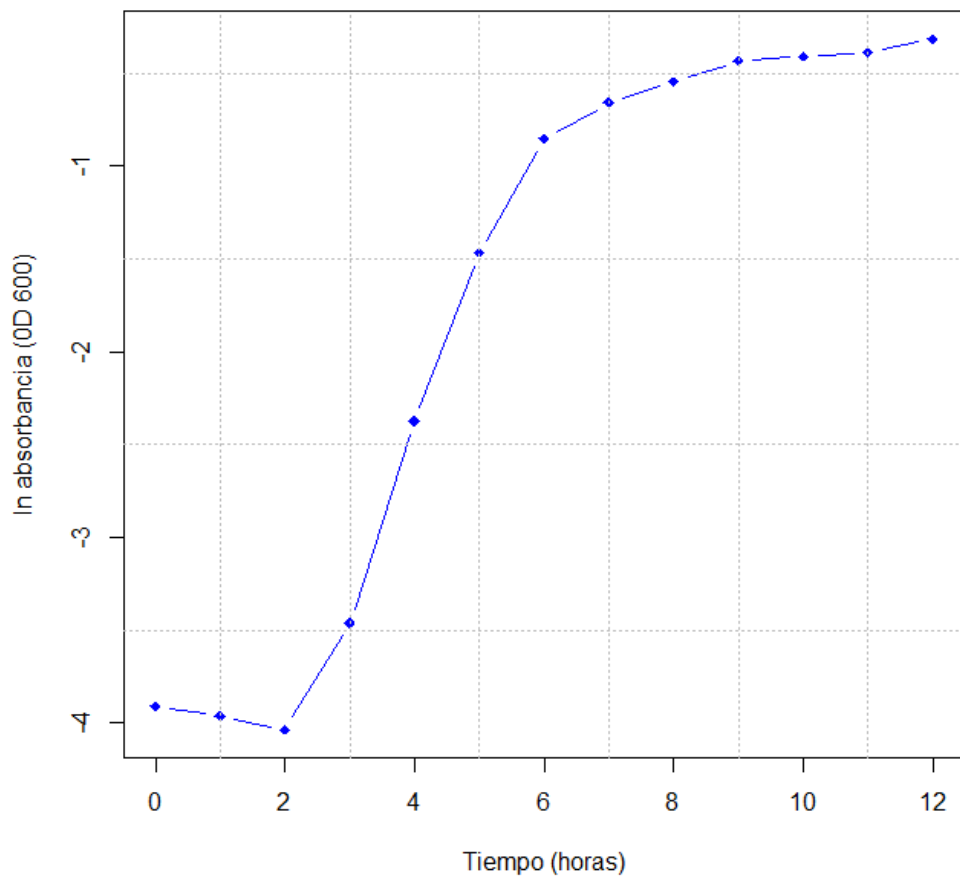
Tiempo (horas)	Absorbancia (OD 600)	ln absorbancia (OD 600)
0	0,020	-3,91202301
1	0,019	-3,9633163
2	0,018	-4,03607565
3	0,031	-3,46307279
4	0,093	-2,37515579
5	0,231	-1,46678161
6	0,426	-0,85331593
7	0,518	-0,65842374
8	0,578	-0,54760488
9	0,647	-0,43592432
10	0,664	-0,40997526
11	0,676	-0,39106923
12	0,729	-0,3156244

Nota. Valores de absorbancia leídos en el tiempo (h) durante 12 horas para la cepa bacteriana y su transformación logarítmica. Ln (logaritmo natural).

Se realizó la transformación logarítmica de la absorbancia (OD 600), con el fin de determinar las fases de la curva de crecimiento de *Bacillus* sp. PBG0001 (Figura 7).

Figura 7

Cinética del logaritmo natural (ln) de la absorbancia (OD 600) vs tiempo (horas)



La Figura 7, permite observar que el cultivo bacteriano se mantuvo en su fase de latencia hasta la segunda hora y a partir de esta, hasta la séptima hora se

observó su fase *log*, donde las células alcanzaron el crecimiento máximo, para luego entrar a la fase estacionaria temprana.

Los recuentos bacterianos, expresados como unidades formadoras de colonias (UFC/ml) para *Bacillus* sp. PBG0001 se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5

Valores de UFC/ml contados en el tiempo

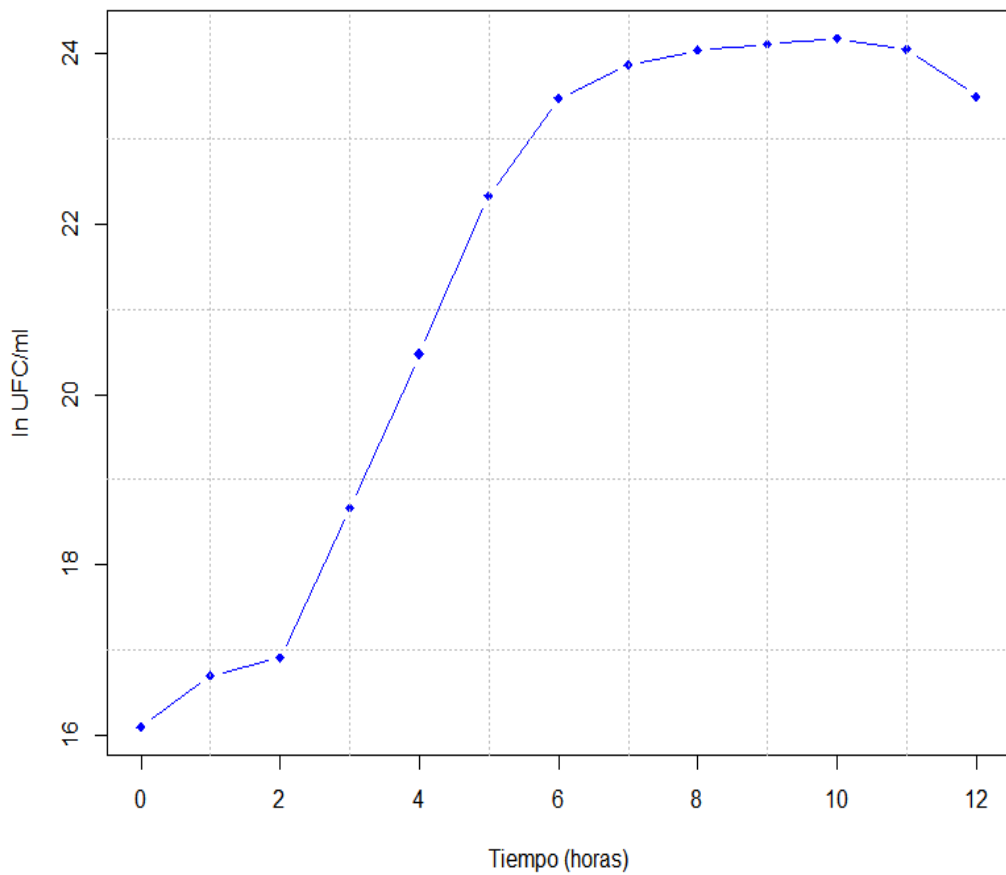
Tiempo (horas)	UFC/ml	ln-UFC/ml
0	9,75E+06	16,09277784
1	1,79E+07	16,70031127
2	2,19E+07	16,90199719
3	1,28E+08	18,66754082
4	7,80E+08	20,47480448
5	5,00E+09	22,33270375
6	1,58E+10	23,48327578
7	2,32E+10	23,86526062
8	2,78E+10	24,04830186
9	2,98E+10	24,11693495
10	3,18E+10	24,18115856
11	2,81E+10	24,05725447
12	1,61E+10	23,50208511

Nota. Valores de unidades formadores de colonias (UFC/ml) contados en el tiempo (h) durante 12 horas para el cultivo bacteriano y su transformación logarítmica.

Se realizó la transformación logarítmica de las unidades formadoras de colonias (UFC/ml), con el fin de determinar las fases del crecimiento bacteriano, especialmente la fase *log* en su curva de crecimiento (Figura 8).

Figura 8

Curva de crecimiento según las unidades formadoras de colonias (UFC/ml) vs tiempo (horas)



Nota. Logaritmo natural (ln). Valores obtenidos de la Tabla 5.

En la Figura 8 se observa que *Bacillus* sp. (cepa PBG0001) tuvo un crecimiento acelerado (fase logarítmica) entre las horas 3 y 7, mostrando una fase de latencia muy corta de dos horas y una fase de desaceleración a partir de la séptima hora.

La fase logarítmica de *Bacillus* sp. (cepa PBG0001), se obtuvo mediante los datos de absorbancia (OD 600) y los datos de UFC/ml, tal como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5

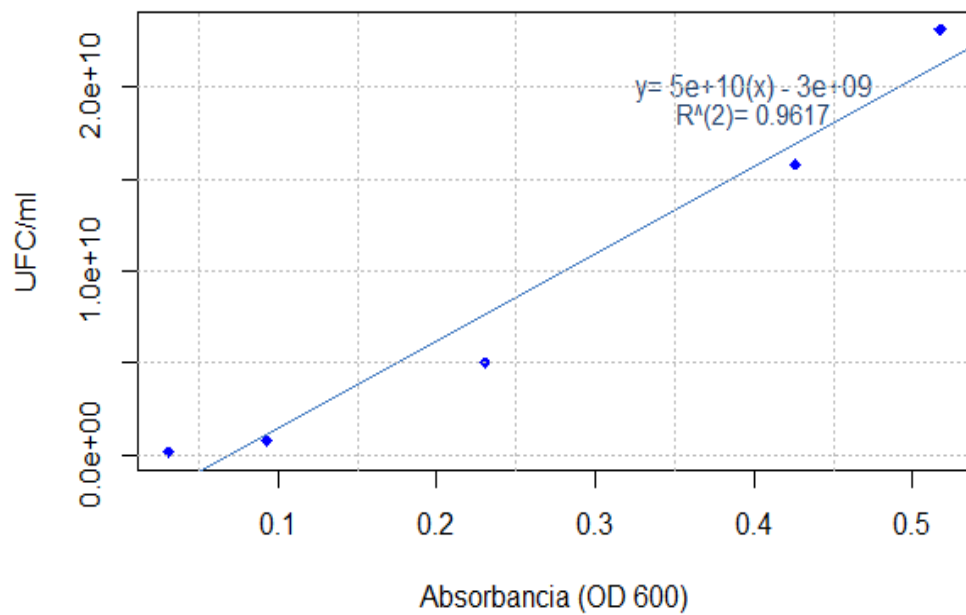
Valores de absorbancia a 600 nm y de UFC/ml para obtener la fase logarítmica en la curva de crecimiento de Bacillus sp.

Tiempo (horas)	Absorbancia (OD 600)	UFC/ml
3	0,031	1,28E+08
4	0,093	7,80E+08
5	0,231	5,00E+09
6	0,426	1,58E+10
7	0,518	2,32E+10

La curva de calibración para *Bacillus* sp. se muestra en la Figura 9.

Figura 9

Curva de calibración UFC/ml vs Absorbancia (OD 600) para Bacillus sp. PBG0001.



Según el RStudio, la ecuación de la recta de mejor ajuste es:

$$Y_{\text{UFC/ml}} = 4,7e + 10 (X_{\text{abs}}) - 3,3e + 09$$

Bacillus sp. (cepa PBG0001) en el cultivo en Erlenmeyer, tuvo una velocidad específica de crecimiento de $1,34 \text{ h}^{-1}$. Este modelo predictivo fue altamente significativo con un p-value de $< 0,001$ con 95 % de confianza.

4.3. Determinación del porcentaje de supervivencia de *Bacillus* sp. (cepa PBG0001) luego del proceso de liofilización y durante el almacenamiento

4.3.1. Determinación del porcentaje de supervivencia de *Bacillus* sp. (cepa PBG0001)

Para medir el efecto de los agentes lioprotectores en la supervivencia bacteriana, se evaluó el porcentaje de supervivencia después de la liofilización. Utilizando tres distintos lioprotectores (glucosa, manitol y lactosa) a diferentes concentraciones, donde cada uno de los ensayos se realizó por triplicado. Después del análisis de ANOVA, se observó que existe diferencias significativas ($p < 0,05$); entre los porcentajes de supervivencia en los distintos tratamientos.

En la Tabla 6 están representados los grados de libertad (G. L.), el valor de F y el valor p, para el ANOVA de un solo factor, concluyendo que existe diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0,001$).

Tabla 6

ANOVA de un solo factor para los tratamientos (lioprotectores)

Fuente	G.L.	S.C. Ajust.	M.C. Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	9	2 378,9	264,32	15,10	0,000
Error	20	350,2	17,51		
Total	29	2 729,0			

Nota. Análisis de Varianza (ANOVA). Cuadrados medios ajustados (M.C. Ajust.) Suma de cuadrados ajustados (S.C. Ajust.)

Posteriormente se realizó la prueba de Dunnett para determinar si existe diferencias significativas entre el porcentaje de supervivencia bacteriana expuestas a distintos tratamientos, en comparación al control.

Los resultados del porcentaje de supervivencia bacteriana, después del proceso de liofilización, se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

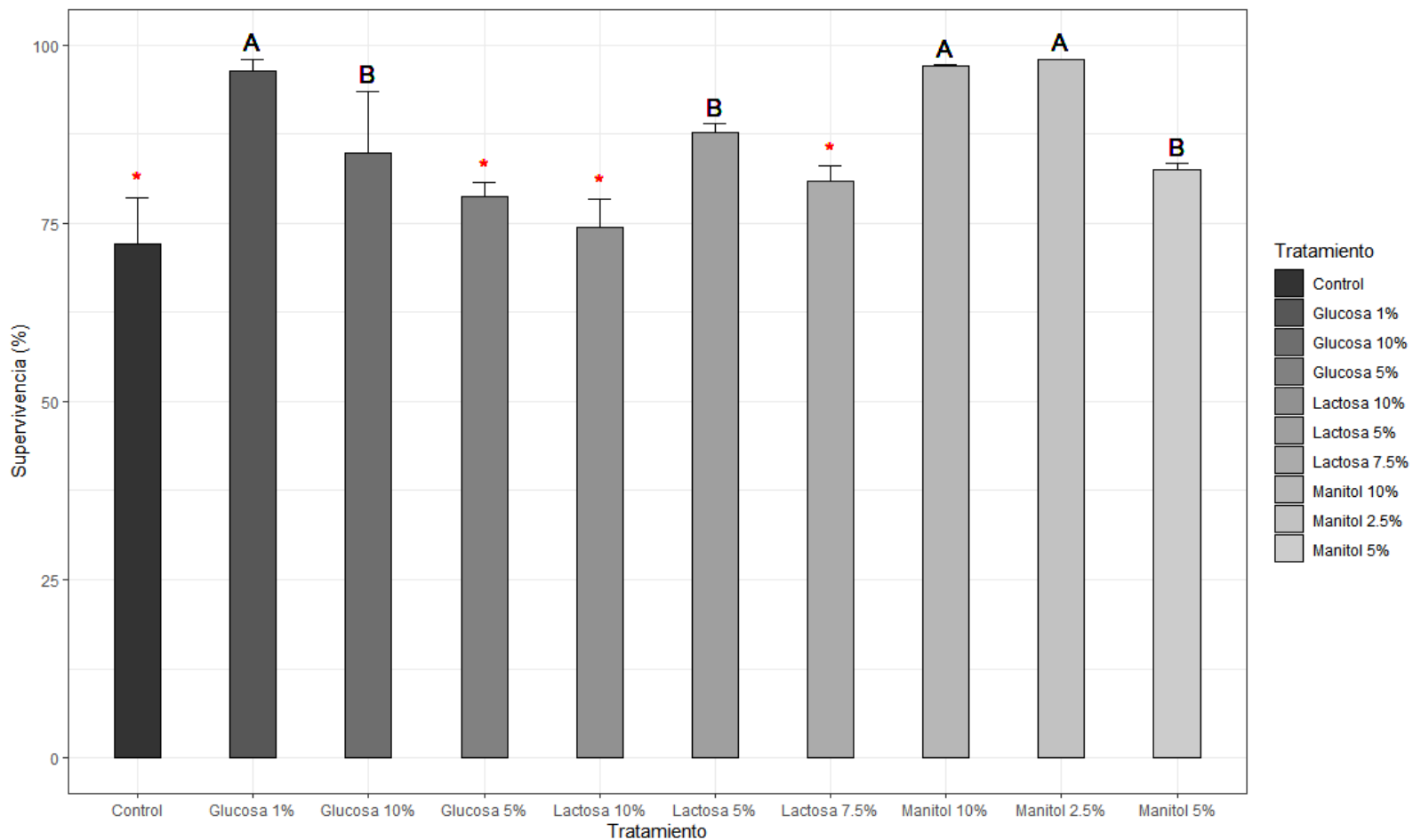
Valores de supervivencia de Bacillus sp. (cepa PBG0001) utilizando distintos lioprotectores

Tratamiento	N	Supervivencia (%)	Concentración celular inicial (UFC/ml)
Control	3	72,16 ± (6,36) *	1,63E+11
Glucosa 1 %	3	96,30 ± (1,72) _A	8,00E+07
Glucosa 10 %	3	84,82 ± (8,72) _B	7,20E+10
Glucosa 5 %	3	78,64 ± (2,05) *	1,09E+11
Lactosa 10 %	3	74,40 ± (4,00) *	1,63E+11
Lactosa 5 %	3	87,72 ± (1,26) _B	2,05E+08
Lactosa 7,5 %	3	80,80 ± (2,18) *	3,05E+09
Manitol 10 %	3	97,12 ± (0,03) _A	1,77E+10
Manitol 2,5 %	3	98,02 ± (5,31) _A	1,69E+10
Manitol 5 %	3	82,43 ± (0,93) _B	2,30E+10

Nota. Valores de supervivencia (%) bacteriana y sus desviaciones estándar, después del proceso de liofilización, considerando la concentración celular inicial. Las medias en la misma columna etiquetadas con “*”, no son significativamente diferentes a la media del grupo control ($p < 0,05$) según la prueba de Dunnett (de acuerdo al RStudio). Mientras que las medias que presentan la letra “A”, mostraron las mejores tasas de supervivencia.

Figura 10

Porcentaje de supervivencia de Bacillus sp. (cepa PBG0001) tras el proceso de liofilización.



Nota. Las barras etiquetadas con “*”, no son significativamente diferentes a la barra de control según las pruebas de Dunnett.

Mientras que las barras que presenten la letra “A”, presentaron las mejores tasas de supervivencia a diferencia de los otros lioprotectores. La letra “B”, representan porcentaje de supervivencia menores que letra “A”

La Figura 10 muestra los porcentajes de supervivencia de *Bacillus* sp. (cepa PBG0001) tras del proceso de liofilización con las diferentes formulaciones del lioprotectores. Donde la mejor tasa de supervivencia se observó cuando se usó el lioprotector manitol a una concentración del 2,5 % con porcentajes de supervivencia de 98,02 %, seguido de manitol 10 % con un porcentaje de supervivencia de 97,12 % y por último glucosa 1 % con un porcentaje de supervivencia de 96,30 %. La tasa de supervivencia del grupo control sin ningún protector fue de 72,16 %.

Los lioprotectores: lactosa al 7,5 % y al 10 %, así como la glucosa al 5 %, no presentaron diferencia significativa con el grupo control (Tabla 7).

4.3.2. Determinación del porcentaje de supervivencia durante el almacenamiento

Se evaluó el porcentaje de supervivencia durante el almacenamiento (0, 19, 38, 57 y 76 días) y se demostró que no existen diferencias significativas según ANOVA de una vía ($p > 0,05$) entre las tasas de supervivencia para cada una de las formulaciones de los lioprotectores descrita en la Tabla 8.

Tabla 8

Valores de supervivencia de Bacillus sp. (cepa PBG0001) utilizando distintos lioprotectores durante el almacenamiento

Tratamiento	N	Supervivencia (%)				
		0 día	19 días	38 días	57 días	76 días
Control	3	72,16 ± (6,36) a	79,60 ± (8,45) a	82,68 ± (9,92) a	67,51 ± (7,03) a	78,95 ± (6,72) a
Glucosa 1 %	3	96,30 ± (1,72) a	100,74 ± (5,36) a	98,32 ± (0,23) a	99,72 ± (1,71) a	99,97 ± (1,87) a
Glucosa 10 %	3	84,82 ± (8,72) b	74,15 ± (1,41) b	74,63 ± (2,44) b	74,49 ± (3,75) b	82,58 ± (2,13) b
Glucosa 5 %	3	78,64 ± (2,05) c	73,30 ± (2,25) c	69,51 ± (0,29) c	72,20 ± (1,38) c	73,96 ± (1,46) c
Lactosa 10 %	3	74,40 ± (4,00) a	79,79 ± (4,00) a	74,72 ± (0,26) a	76,47 ± (4,19) a	79,29 ± (3,47) a
Lactosa 5 %	3	87,72 ± (1,26) B	90,75 ± (1,98) B	98,05 ± (2,53) A	97,61 ± (2,04) A	97,02 ± (3,46) A
Lactosa 7,5 %	3	80,80 ± (2,18) C	83,78 ± (2,72) BC	80,09 ± (2,73) B	86,30 ± (0,73) AB	89,55 ± (4,81) A
Manitol 5 %	3	82,43 ± (0,93) A	82,43 ± (0,93) A	82,10 ± (3,47) A	77,75 ± (1,34) B	77,26 ± (0,86) B

Nota. Valores de supervivencia (%) bacteriana durante su almacenamiento y sus desviaciones estándar. Las medias en la misma fila que no compartan la misma letra, son significativamente diferentes, según las pruebas de Fisher. N (número de repeticiones)

Para el lioprotector manitol en dos de sus concentraciones (10 % y 2,5 %), los datos no presentaron una distribución normal; debido a ello, se decidió realizar la transformación de Johnson para luego realizar un ANOVA. Donde se demostró que existen diferencias significativas entre la supervivencia durante el tiempo en almacenamiento respectivamente (Tabla 9).

Tabla 9

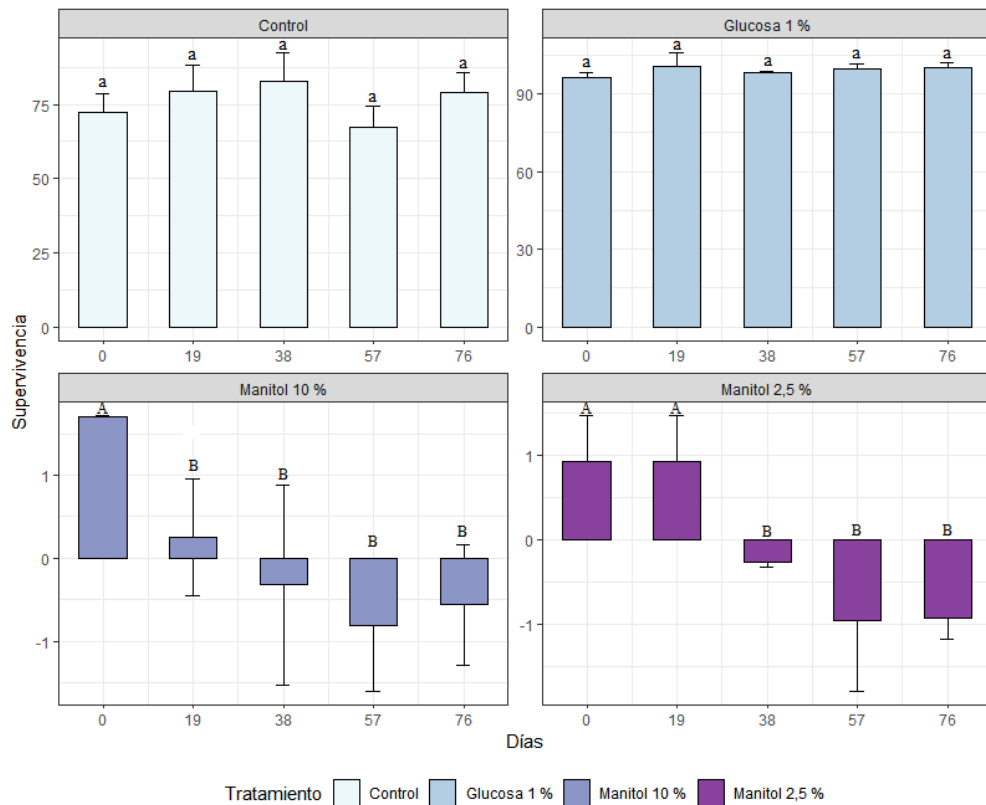
Valores de la supervivencia transformada, de Bacillus sp. (cepa PBG0001) durante el almacenamiento utilizando manitol al 2,5 % y 10 %.

Supervivencia	N	Manitol 2,5 %	Manitol 10 %
0 día	3	0,91 ± (0,55) _A	1,71 ± (0,001) _A
19 días	3	0,91 ± (0,55) _A	0,25 ± (0,70) _B
38 días	3	-0,27 ± (0,06) _B	-0,32 ± (1,20) _B
57 días	3	-0,97 ± (0,83) _B	-0,80 ± (0,79) _B
76 días	3	-0,93 ± (0,25) _B	-0,56 ± (0,72) _B

Nota. Valores de supervivencia durante su almacenamiento transformada por Johnson y sus desviaciones estándar. Las medias en la misma columna que no compartan la misma letra, son significativamente diferentes, según las pruebas de Fisher. N (número de repeticiones).

Figura 11

Porcentaje de supervivencia durante el almacenamiento de los mejores lioprotectores y el control



Nota. Porcentaje de supervivencia de *Bacillus sp.* (cepa PBG0001) durante el almacenamiento para los mejores lioprotectores y el control. Las barras del mismo color que compartan la misma letra, no presentan diferencias significativas según la prueba de Fisher.

En la Figura 11, se observó que durante el almacenamiento (días) las muestras liofilizadas con el lioprotector de glucosa al 1 % y el control, no

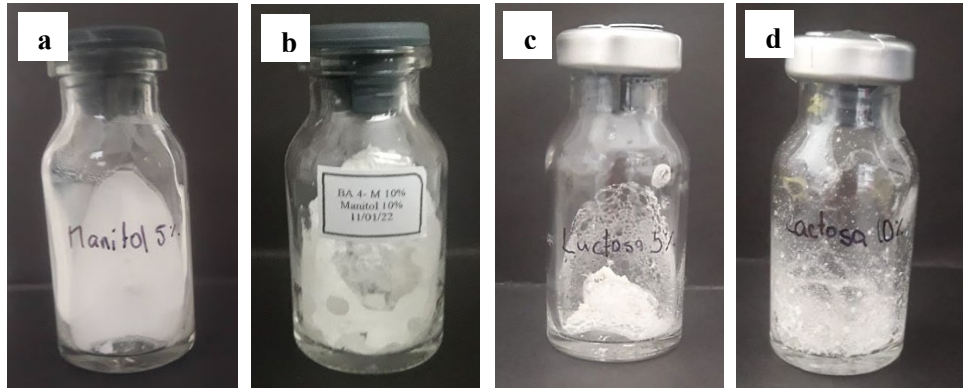
presentaron variaciones significativas en la supervivencia bacteriana al término de los 76 días. Además, se observa que para manitol 2,5 %, no muestra una variación significativa en los primeros 19 días, luego disminuyó significativamente hasta el día 38 y se mantuvo significativamente constante hasta el día 76. En el caso de manitol 10 % se presentó una disminución significativa en el día 19, y se mantuvo significativamente constante hasta el día 76.

4.4.Morfología del pastel después del proceso de liofilización

Para investigar la morfología del pastel tras el proceso de liofilización, usando tres distintos lioprotectores a diferentes concentraciones, se siguió la metodología descrita en el punto 2.5. Considerándose los parámetros de aspecto tras el proceso de la liofilización (Figura 16): (a) intacto (sin contracción del pastel), (b) poroso, (c) colapso parcial (contracción del pastel a lo largo de todo su perímetro, pero la altura del pastel no se ve afectada), y (d) colapso (contracción a lo largo del perímetro del pastel, así como la altura del pastel), se obtuvieron los resultados observados en las Figuras 16 y 17:

Figura 12

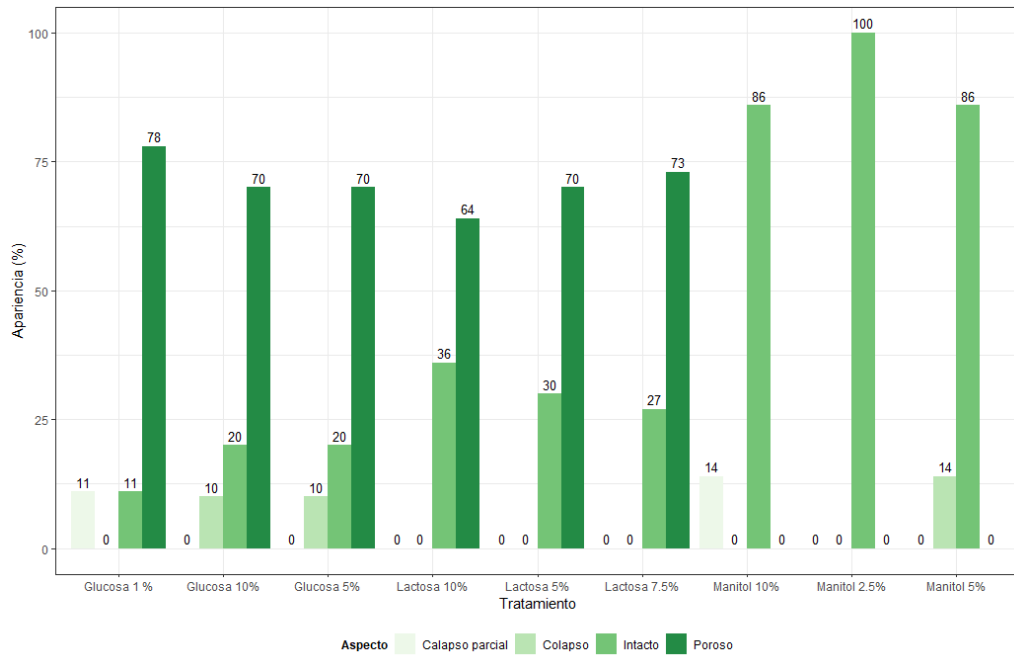
Morfología del pastel observada de suspensiones bacterianas liofilizadas.



Nota. a) Intacto, b) Poroso, c) Colapso parcial y d) Colapso.

Figura 13

Distribución de morfologías de pastel por lioprotectores



El porcentaje de apariencia en la morfología del pastel en las diferentes concentraciones por lioprotector, muestra que el manitol, independientemente del porcentaje utilizado, presentó entre 86 -100 % el aspecto intacto entre sus concentraciones, mientras que, en glucosa, independientemente del porcentaje utilizado, predominó el aspecto poroso, con porcentajes de 70 -78 %, y por último en lactosa predominó el aspecto poroso en porcentajes que varió entre 64 -70 %.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

El proceso de liofilización es un método físico, que es utilizado para la conservación y almacenamiento de microorganismos en la industria alimentaria, farmacéutica, uso en la fabricación de agentes de biocontrol y clínica. (Morgan et al., 2006; Otero et al., 2007).

La cepa PBG0001 según el ensamblaje de *novo* y los análisis bioinformáticos pertenece al género *Bacillus*, específicamente al grupo de *Bacillus cereus sensu lato* (*Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* y *Bacillus thuringiensis*), que son bacterias muy relacionadas genéticamente, haciendo difícil la identificación bacteriana a nivel de especie, debido a que comparten secuencias del gen ARNr 16S casi igual (92-100 % de similitud) (Pereira et al., 2020). Aunque se hizo una comparación a nivel de genoma completo con el genoma de referencia *Bacillus cereus* FS2 de la base de datos de NCBI CP090940.1., se ha descrito que la similitud de *B. cereus* es filogenéticamente indistinguible de varias especies descritas como *B. anthracis* y *B. thuringiensis* (Gene, 2021).

Al evaluar el crecimiento bacteriano de *Bacillus* sp. (cepa PBG0001), se observó que llegó a la fase estacionaria en aproximadamente 7 horas y luego del proceso de liofilización se obtuvieron porcentajes de supervivencia mayores al 72,16 %, en todos los tratamientos analizados. Asimismo, el porcentaje de supervivencia durante el almacenamiento (76 días evaluados) fueron mayores al

67,51 %. Es importante conocer el tiempo en que la bacteria llega a su fase estacionaria ya que, según Zhang et al. (2020), esto permitiría una mejor supervivencia durante la liofilización. Atribuyéndose al hecho de que las células en la fase estacionaria tienen características morfológicas y fisiológicas estabilizantes, (Zhang et al., 2020) durante el agotamiento de las fuentes de carbono y de alimentos (Morgan et al., 2006); generando respuestas de supervivencia como disminución del volumen celular, compactación del nucleoide (Morgan & Vesey, 2009), variaciones en la composición de la membrana y en estructura de la pared celular (Schwab et al., 2007; Shamekhi et al., 2012), preparándola para proteger las células en condiciones adversas, como desecación, hiperosmolaridad, fluctuaciones de pH y temperatura (Morgan et al., 2006; Morgan & Vesey, 2009).

La concentración microbiana inicial para liofilización fue en promedio $6,05 \times 10^{10}$ UFC/ml, que se encontraban en fase estacionaria; Palmfeldt et al. (2003), en su investigación recomienda que la concentración inicial para la liofilización debería estar entre 10^7 - 10^{11} UFC/ml, ya que permite mayores tasas de supervivencia y una distribución apropiada del lioprotector en el espacio intracelular (Morgan & Vesey, 2009; Zhang et al., 2020). Esto fue corroborado en el presente estudio, ya que se obtuvo porcentajes de supervivencia mayores al 74,40 %.

Las diferencias exhibidas en la supervivencia después del proceso de liofilización indican que ciertos lioprotectores son más efectivos que otros en la protección de *Bacillus* sp. (cepa PBG0001). El manitol al 2,5 % fue el mejor

lioprotector tras el proceso de liofilización, se obtuvo el 98,02 % de supervivencia, seguido de manitol al 10 % (97,12 %) y glucosa al 1 % (96,30 %). El efecto protector del manitol se atribuye a su capacidad para formar estructuras cristalinas que proporcionarían protección a las proteínas funcionales de la célula (Cayra et al., 2017), además de brindar resistencia mecánica (Merivaara et al., 2021) y reemplazar el agua extraída de lípidos de membrana (Morgan & Vesey, 2009). La glucosa, proporcionaría el remplazo de agua con enlaces de H en las bicapa lipídicas de la membrana bacteriana (Morgan & Vesey, 2009), además de formar matrices de vidrio amorfo, que detienen la movilidad molecular al mínimo dentro y alrededor de la célula (Morgan et al., 2006; Castañeda, 2015).

Es necesario resaltar la tasa de supervivencia del grupo control, después del proceso de liofilización ($72,16 \pm 6,36$ %), el cual no presentó diferencias significativas durante los 76 días de almacenamiento. Este porcentaje de supervivencia se deberían específicamente a que *Bacillus* sp. (cepa PBG0001) es una bacteria esporulada, que la hizo más resistente a la liofilización en comparación a las tasas de supervivencia de otros autores que utilizaron bacterias no esporuladas, como: Shu et al. (2018), utilizando *Lactobacillus acidophilus* obtuvo en su grupo control, un 36,6 % de supervivencia; mientras que Basholli et al. (2014), encontró 15,8 % de supervivencia para *Bifidobacterium infantis*, y Zayed & Roos (2004), obtuvieron un 4 % de porcentaje de supervivencia cuando utilizó *Lactobacillus salivarius*. A esto se sumaría el efecto del medio de rehidratación utilizado (CTS),

un medio de rehidratación complejo, que tendría la capacidad para reparar las células dañadas (Costa et al., 2000).

Las tasas de supervivencia durante el almacenamiento para manitol (2,5 % y 10 %), disminuyeron significativamente durante los 76 días evaluados; posiblemente debido a la formación de cristales estables que romperían las membranas celulares (Rockinger et al., 2021); además de no proporcionar una estabilidad adecuada en las bicapas de la membrana (Kumar et al., 2017); y desestabilizar algunas proteínas (Merabishvili et al., 2013), al no mantener la formación de vidrios amorfos durante el almacenamiento (Rockinger et al., 2021). Sin embargo, para el monosacárido glucosa 1 %, su tasa de supervivencia se mantuvo constante durante el almacenamiento, atribuyéndose a la capacidad del monosacárido para formar una matriz de vidrio amorfo (Morgan et al., 2006), que conserva los desechos producidos por las células antes de la congelación y durante el almacenamiento evitando cambios electroquímicos irreversibles en la membrana (Morgan & Vesey, 2009; Castañeda, 2015).

El porcentaje de apariencia en la morfología del pastel, muestra que el lioprotector manitol permite observar el aspecto intacto entre un 86 - 100 % después del proceso de liofilización, estos resultados se deberían a que este alcohol de azúcar proporciona resistencia mecánica, dándole “la elegancia” de la torta liofilizada (Merivaara et al., 2021). Aunque los lioprotectores glucosa y lactosa son también utilizados como agente de carga (es decir, proporcionando una estructura adecuada

a la torta) (Baheti et al., 2010), se observa en los resultados que la glucosa y la lactosa, presentaron mayores porcentajes de aspecto poroso ($> 60\%$). A nivel industrial estos resultados serían descartados por su aspecto, pero según Patel et al. (2017) dicho aspecto (aspecto poroso) no indicaría un impacto negativo en la estabilidad de las proteínas.

Por lo tanto, para *Bacillus* sp. (cepa PBG0001) se determinó que el mejor agente lioprotector que permite mayor supervivencia bacteriana, en el proceso de liofilización, fue glucosa 1 %, con tasas de supervivencia de $96,30 \pm (1,72)\%$, las cuales se mantuvieron constantes en los 76 días analizados.

CONCLUSIONES

- Se identificó el cultivo bacteriano con el que se trabajó como *Bacillus* sp. (cepa PBG0001), utilizando distintos programas bioinformáticos, además se determinó la cinética del crecimiento bacteriano.
- Se evaluó el porcentaje de supervivencia del cultivo bacteriano después del proceso de liofilización y durante el almacenamiento; concluyendo que el mejor agente lioprotector durante el proceso de liofilización, fue glucosa 1 %, permitiendo el incremento significativo en el porcentaje de supervivencia ($96,30 \pm 1,72$ %), manteniéndose constante durante los 76 días analizados.
- Se determinó la variación en la morfología del pastel después del proceso de liofilización según el lioprotector; donde el lioprotector manitol presentó entre 86 - 100 % el aspecto intacto entre sus concentraciones, la glucosa mostró una predominancia del aspecto poroso con porcentajes de 70 -78 %, y por último la lactosa presentó un aspecto poroso en un rango de porcentajes entre de 64 -70 %.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda identificar la cepa estudiada análisis pangenómicos, o a nivel de genes.
- Se recomienda hacer estudios utilizando otros lioprotectores en función a la bacteria a trabajar.
- En base a los resultados, se recomienda realizar más investigaciones para la optimización de combinaciones de lioprotectores, con el fin de disminuir el número mínimo de experimentos.
- Optimizar la concentración inicial de la bacteria cuando se usa estos lioprotectores (manitol, lactosa y glucosa) con el fin de mejorar los porcentajes de supervivencia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadias, M., Benabarre, A., Teixidó, N., Usall, J., & Viñas, I. (2014). Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*, *65*, 173–182.
- Adams, G. (2007). The principles of freeze-drying. In J. G. Day & G. N. Stacey (Eds.), *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Second Edi, Vol. 368, Issue 2, pp. 15–38). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2_2
- Ampatzoglou, A., Schurr, B., Deepika, G., Baipong, S., & Charalampopoulos, D. (2010). Influence of fermentation on the acid tolerance and freeze drying survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Biochemical Engineering Journal*, *52*(1), 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.07.005>
- Analytik Jena AG. (2018). *Instructions for Use Life Science Kits & Assays innuPREP Bacteria DNA Kit*. www.analytik-jena.com
- Ávila, L., Naranjo, J., & Higuera, J. (2015). Viabilidad de levaduras y bacterias conservadas por liofilización: efecto de agentes lioprotectores. *Vector*, *10*, 7–13.
- Baheti, A., Kumar, L., & Bansal, A. (2010). Excipients used in lyophilization of small molecules. *Journal of Excipients and Food Chemicals*, *1*(1), 41–54.
- Barley, J. (2021). *Basic Principles Of Freeze-Drying*. https://sp-lineofsight.com/uploads/PDF_Files/Tech Note - Basic Principles of Freeze-Drying.pdf

- Barragán, D., & Lesmes, A. (2009). *Comparacion de dos metodos de conservación, liofilización y microsecado sobre tres especies bacterianas: Elección del mejor metodo.* [Pontificia Universidad Javeriana].
<http://dx.doi.org/10.1007/s11270-016-3076-8>
<http://dx.doi.org/10.1080/02772248.2015.1031668>
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.073>
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.027>
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.022>
- Basholli, M., Mueller, M., Salar, S., Unger, F. M., & Viernstein, H. (2014). Effect of lyoprotectants on β -glucosidase activity and viability of *Bifidobacterium infantis* after freeze-drying and storage in milk and low pH juices. *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 276–282.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.011>
- Bellali, S., Bou, J., Fontanini, A., Raoult, D., & Lagier, J. (2020). A new protectant medium preserving bacterial viability after freeze drying. *Microbiological Research*, 236(March), 19–21. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126454>
- Bodzen, A., Jossier, A., Dupont, S., Mousset, P. Y., Beney, L., Lafay, S., & Gervais, P. (2021). Design of a new lyoprotectant increasing freeze-dried *Lactobacillus* strain survival to long-term storage. *BMC Biotechnology*, 21(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1186/s12896-021-00726-2>
- Burguet, N., Sierra, N., & Acosta, M. (2014). Evaluación de una formulación para la conservación de cepas de *Pseudomona aeruginosa*. *Revista CENIC*.

Ciencias Biológicas, 45(1), 51–56.

Burguet, N., Trimiño, J., & Sierra, N. (2014). Evaluación del cultivo liofilizado de *Candida albicans* utilizado en esquemas de certificaciones de calidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 321–329.

Castañeda, A. (2015). *Pruebas de viabilidad a cinco cepas bacterianas criopreservadas y estudio para la liofilización de las mismas, evaluando tres compuestos protectores, pertenecientes al Banco Genético Del Laboratorio De Microbiología De La Facultad Del Medio Ambiente Y Rec.* Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

Cayra, E., Dávila, J., Villalta, J., & Rosales, Y. (2017). Evaluation of the stability and viability of two probiotic strains microencapsulated by fluidized bed. *Informacion Tecnologica*, 28(6), 35–44.
<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85038625851&doi=10.4067%2FS0718-07642017000600005&partnerID=40&md5=3a785cbbad272d48d98aa6884dc2a230>

Costa, E., Usall, J., Teixidó, N., Garcia, N., & Viñas, I. (2000). Effect of protective agents rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 89(5), 793–800. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01182.x>

- Del Carmen, Y. (2016). *Prefactibilidad para implementar la técnica de liofilización de la cepa Kocuria rhizophilia ATCC 9341 utilizada en el control microbiológico de antibióticos CNDR-MINSA central Managua*. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.
- Fissore, D., Pisano, R., & Barresi, A. (2020). *Freeze drying of pharmaceutical products* (D. Fissore, R. Pisano, & A. Barresi (eds.)). CRC Press Taylor & Francis Group.
- Gene, M. (2021). *Whole-Genome Sequencing Approach to Characterize the Population Structure of Bacillus cereus at a Human Milk Whole-Genome Sequencing Approach to Characterize the*. University of Toronto.
- Grauer, A., Grunberg, K., & Zardo, S. (2015). Puesta a punto de un protocolo de liofilización para la creación de bancos bacterianos [Universidad ORT Uruguay]. In *Facultad de Ingeniería*. <https://bibliotecas.ort.edu.uy/bibid/81392/file/1920>
- Guo, N., Wei, Q., & Xu, Y. (2020). Optimization of cryopreservation of pathogenic microbial strains. *Journal of Biosafety and Biosecurity*, 2(2), 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.jobb.2020.11.003>
- Gupta, A. K., & Gupta, U. D. (2020). Next generation sequencing and its applications. In *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation*. INC. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00018-5>
- Han, L., Pu, T., Wang, X., Liu, B., Wang, Y., Feng, J., & Zhang, X. (2018).

- Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Bacillus amyloliquefaciens* B1408 based on response surface methodology. *Cryobiology*, 81, 101–106.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.02.003>
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
- Huang, L., Lu, Z., Yuan, Y., Lü, F., & Bie, X. (2006). Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* based on response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 55–61.
<https://doi.org/10.1007/s10295-005-0041-8>
- Illumina. (2020). Illumina DNA Prep: Reference Guide. In Illumina (Ed.), *Illumina* (Issue June). https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/illumina_prep/illumina-dna-prep-reference-guide-1000000025416-09.pdf
- Illumina. (2022). *Secuenciación: tecnología de Illumina.pdf*.
https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/courses/sequencing-illumina-technology-wbt-esp/story_html5.html?iframe
- Jauk, F. (2019). Secuenciación masiva paralela (NGS): conceptos básicos y

aplicaciones. *Hematología*, 23, 21–23.
[http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol23/n2_educacional/2-ROL DE NGS EN PATOLOGIA MIELOIDE-jauk-n23-ext.pdf](http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol23/n2_educacional/2-ROL_DE_NGS_EN_PATOLOGIA_MIELOIDE-jauk-n23-ext.pdf)

Kumar, K., Mallik, S., & Sarkar, K. (2017). Role of freeze-drying in the presence of mannitol on the echogenicity of echogenic liposomes. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 142(6), 3670–3676.
<https://doi.org/10.1121/1.5017607>

López, C., González, F., Tomás, M., & Oliver, A. (2021). Aplicaciones de las técnicas de secuenciación masiva en la Microbiología Clínica. In E. Cercenado Mansilla & R. Cantón Moreno (Eds.), *Procedimientos en Microbiología Clínica*.

Márquez, L., Serrato, A., & Cerritos, R. (2014). Secuenciación de fragmentos de ADN. In *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (pp. 231–249).
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/secuenciacion.pdf>

Merabishvili, M., Vervaet, C., Pirnay, J. P., de Vos, D., Verbeken, G., Mast, J., Chanishvili, N., & Vanechoutte, M. (2013). Stability of *Staphylococcus aureus* Phage ISP after Freeze-Drying (Lyophilization). *PLoS ONE*, 8(7), 1–7.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068797>

Merivaara, A., Zini, J., Koivunotko, E., Valkonen, S., Korhonen, O., Fernandes, F. M., & Yliperttula, M. (2021). Preservation of biomaterials and cells by freeze-

- drying: Change of paradigm. *Journal of Controlled Release*, 336(March), 480–498. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.06.042>
- Miyamoto, Y., Sukenobe, J., Imaizumi, T., & Nakahara, T. (2008). Survival of freeze-dried bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9–24.
- Morgan, C., Herman, N., White, P., & Vesey, G. (2006). Preservation of microorganisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods*, 66(2), 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>
- Morgan, C., & Vesey, G. (2009). Freeze-Drying of Microorganisms. *Encyclopedia of Microbiology*, 162–173. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00114-0>
- Navarro, L., & Romero, I. (2012). *Liofilización de la Cepa Kocuria rhizophilia ATCC 9341 utilizada en pruebas de Potencia del Antibiótico Eritromicina CNDR- MINSA Central Managua*. Universidad Nacional Autónoma de Managua.
- Orrego, C. (2003). Procesamiento De Alimentos. In L. A. Rodríguez (Ed.), *Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales* (Primera Ed, Issue 1).
- Otero, M., Espeche, M., & Nader-Macías, M. (2007). Optimization of the freeze-drying media and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* for veterinarian probiotic applications. *Process Biochemistry*, 42(10), 1406–1411. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.07.008>

- Palmfeldt, J., Rådström, P., & Hahn, B. (2003). Optimisation of initial cell concentration enhances freeze-drying tolerance of *Pseudomonas chlororaphis*. *Cryobiology*, *47*(1), 21–29. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00065-8)
- Patel, S., Nail, S., Pikal, M., Geidobler, R., Winter, G., Hawe, A., Davagnino, J., & Rambhatla Gupta, S. (2017). Lyophilized Drug Product Cake Appearance: What Is Acceptable? *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *106*(7), 1706–1721. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.03.014>
- Peiren, J., Hellemans, A., & De Vos, P. (2016). Impact of the freeze-drying process on product appearance, residual moisture content, viability, and batch uniformity of freeze-dried bacterial cultures safeguarded at culture collections. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(14), 6239–6249. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7359-1>
- Peña, J. M., Gregorio, O., & Barrera, B. (2013). Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. *Educacion Química*, *24*(2), 237–246. [https://doi.org/10.1016/s0187-893x\(13\)72468-6](https://doi.org/10.1016/s0187-893x(13)72468-6)
- Pereira, P. P., Torres Tejerizo, G. A., Fernandez, M., Blanch, A. R., Gonzalez, P. S., & Agostini, E. (2020). Polyphasic characterization and identification of the bioremediation agent *Bacillus* sp. SFC 500-1E. *Genomics*, *112*(6), 4525–4535. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.08.008>
- Pérez, E., & Vargas, M. (2014). *Preservación de Streptococcus pyogenes mediante*

líoofilización utilizando leche descremada al 1% como agente crioprotector.

Universidad de Sonora.

Perry, S. (1995). Freeze-Drying and cryopreservation of bacteria. In J. G. Day & M. R. McLellan (Eds.), *Methods in Molecular Biology* (First Edit, Vol. 38, pp. 21–30).

Prakash, O., Nimonkar, Y., & Desai, D. (2020). A recent overview of microbes and microbiome preservation. *Indian Journal of Microbiology*, 60(3), 297–309. <https://doi.org/10.1007/s12088-020-00880-9>

Prakash, O., Nimonkar, Y., & Shouche, Y. S. (2013). Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiology Letters*, 339(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12034>

Rockinger, U., Funk, M., & Winter, G. (2021). Current Approaches of Preservation of Cells During (freeze-) Drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110(8), 2873–2893. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.04.018>

Santelices, C., & Castro, J. (2016). Preservación de microorganismos por liofilización. *Boletín INIA N° 428*, 93–115. <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/123456789/67166/NR42412.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Schwab, C., Vogel, R., & Gänzle, M. (2007). Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying. *Cryobiology*, 55(2), 108–114.

<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2007.06.004>

Shamekhi, F., Shuhaimi, M., Ariff, A., & Yazid, A. (2012). Optimization of a cryoprotective medium for infant formula probiotic applications using response surface methodology. *Annals of Microbiology*, 62(3), 911–921.

<https://doi.org/10.1007/s13213-011-0328-0>

Shu, G., Wang, Z., Chen, L., Wan, H., & Chen, H. (2018). Characterization of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* in goat milk powder and tablet: Optimization of the composite cryoprotectants and evaluation of storage stability at different temperature. *LWT - Food Science and Technology*, 90(2018), 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.013>

Tamseel, F., & Andreas, E. (2020). *Un viaje a través de la historia de la secuenciación del ADN*. <https://the-dna-universe.com/2020/11/02/a-journey-through-the-history-of-dna-sequencing/>

Wang, Guang, Pu, J., Yu, X., Xia, Y., & Ai, L. (2020). Influence of freezing temperature before freeze-drying on the viability of various *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, 103(4), 3066–3075. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17685>

Wang, Guangqiang, Yu, X., Lu, Z., Yang, Y., Xia, Y., Lai, P. F. H., & Ai, L. (2019). Optimal combination of multiple cryoprotectants and freezing-thawing conditions for high lactobacilli survival rate during freezing and frozen storage. *LWT - Food Science and Technology*, 99(September 2018), 217–223.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.065>

Weng, Z., Díaz, O., & Álvarez, I. (2005). Conservación de microorganismos: ¿qué debemos conocer? *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 43(3), 2–5.

Whitman, W. (2010). *Bergey's Manual of Systematic of Bacteriology* (N. Krieg, J. Staley, D. Brown, B. Hedlund, B. Paster, N. Ward, W. Ludwig, & W. Whitman (eds.); Second Edi). https://doi.org/10.5005/jp/books/12721_22

Wolkers, W., & Oldenhof, H. (2021). Cryopreservation and Freeze- Drying Protocols. In W. Wolkers & H. Oldenhof (Eds.), *Methods in Molecular Biology* (Fourth Edi, Vol. 2180). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1_18

Zayed, G., & Roos, Y. H. (2004). Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process Biochemistry*, 39(9), 1081–1086. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00222-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00222-X)

Zhan, Y., Xu, Q., Yang, M. M., Yang, H. T., Liu, H. X., Wang, Y. P., & Guo, J. H. (2012). Screening of freeze-dried protective agents for the formulation of biocontrol strains, *Bacillus cereus* AR156, *Burkholderia vietnamiensis* B418 and *Pantoea agglomerans* 2Re40. *Letters in Applied Microbiology*, 54(1), 10–17. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03165.x>

Zhang, Z., Yu, Y., Wang, Y., Wei, X., Liao, M., Rong, X., & Chen, J. (2020). Development of a new protocol for freeze-drying preservation of

Pseudoalteromonas nigrifaciens and its protective effect on other marine bacteria. *Electronic Journal of Biotechnology*, 44, 1–5.
<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.12.006>

ANEXOS

Anexo 1

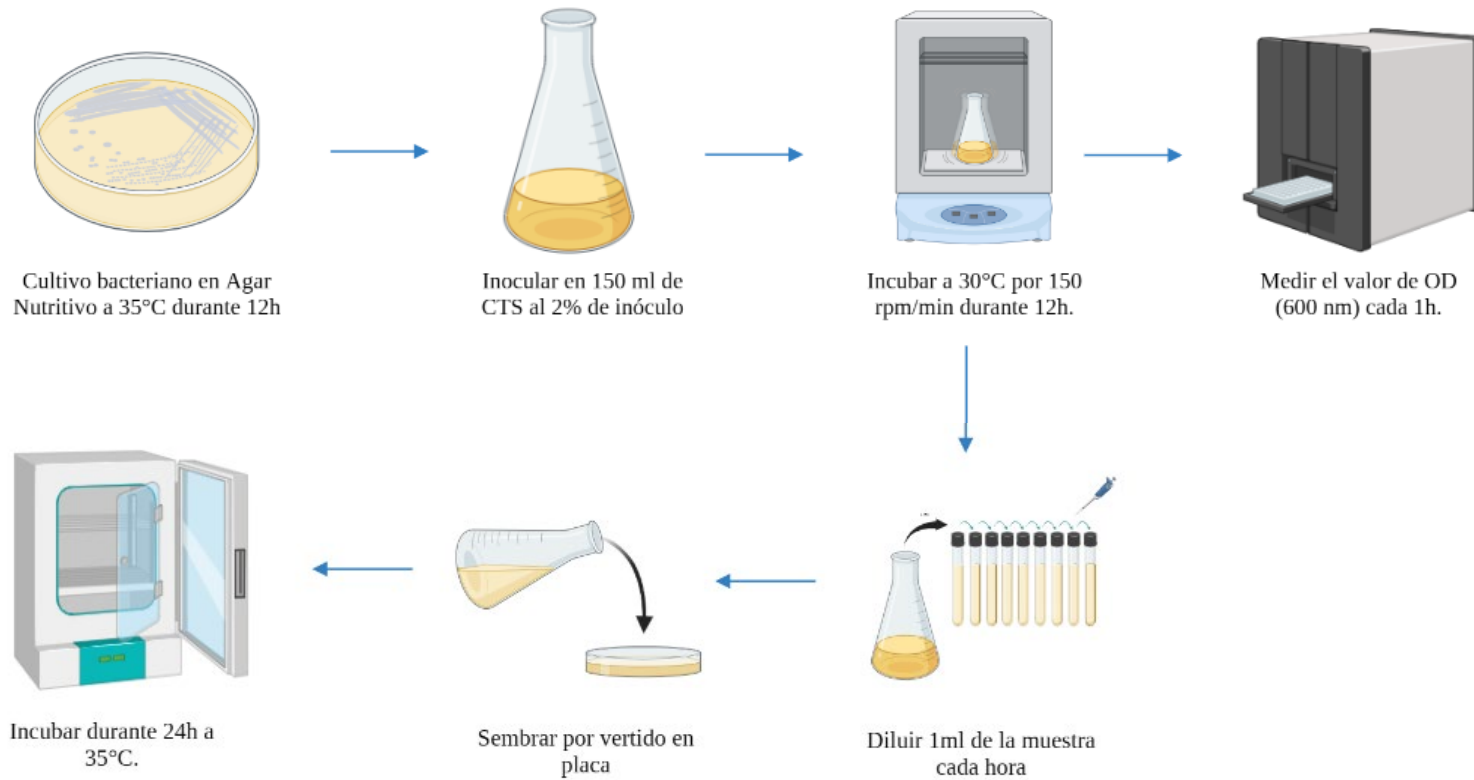
Protocolo de análisis de la secuencia de ADN para la identificación molecular del cultivo bacteriano



Nota. Creado con BioRender

Anexo 2

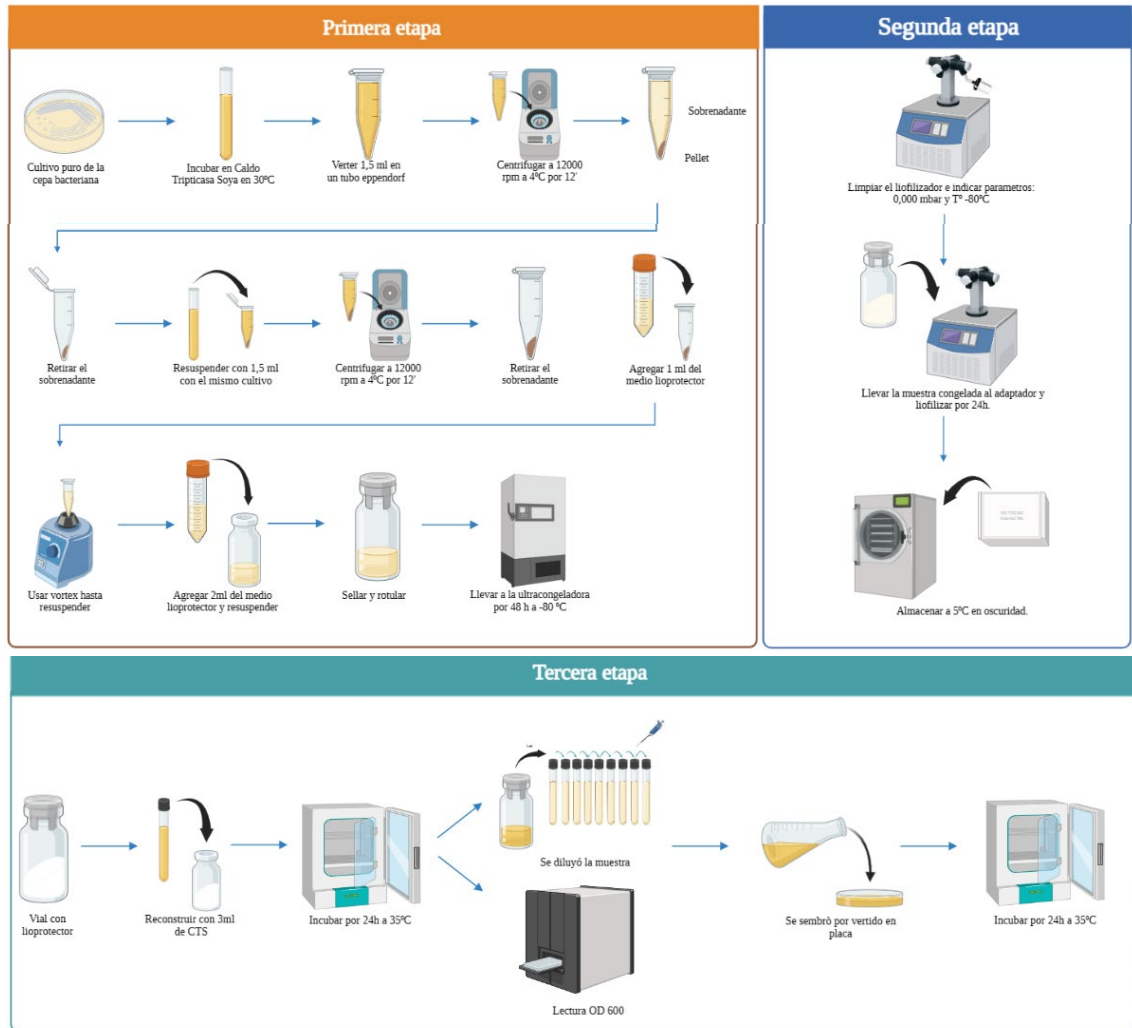
Protocolo de cinética del crecimiento



Nota. Creado con BioRender

Anexo 3

Protocolo de liofilización



Nota. Creado con BioRender