



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**MEMORIA TRABAJO FIN DE GRADO**

**DETERMINACIÓN DEL SUCCINATO EN  
MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANO  
MEDIANTE FLUOROMETRÍA**

*FACULTAD DE QUÍMICA*

*CURSO 2018-2019*

**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

**AUTOR/A: JAVIER LÓPEZ MEGÍA  
TUTOR/A: OMAR BOUTUREIRA MARTÍN/SONIA FERNANDEZ-VELEDO**

## INDICE

<b>Prefacio .....</b>	<b>3</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>5</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>7</b>
<b>1. Enfermedades Metabólicas .....</b>	<b>7</b>
<b>2. Microbiota .....</b>	<b>8</b>
<b>3. Succinato .....</b>	<b>10</b>
<b>Hipótesis y Objetivos .....</b>	<b>14</b>
<b>Material y Métodos .....</b>	<b>15</b>
<b>Resultados y Discusión .....</b>	<b>20</b>
<b>1. Puesta a punto del método fluorimétrico para la cuantificación de succinato en un medio de cultivo bacteriano.....</b>	<b>20</b>
<b>2. Determinación de succinato en medios de cultivo de bacterias. ....</b>	<b>22</b>
<b>3. Técnicas utilizadas. ....</b>	<b>36</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>38</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>40</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>46</b>

## Prefacio

Este trabajo de fin de grado (TFG) lo he realizado en el grupo de investigación en Diabetes y alteraciones metabólicas asociadas (DIAMET) (<https://www.diamet.org/>), codirigido por la Dra. Sonia Fernández Veledo y el Dr. Joan J. Vendrell Ortega y formado por investigadores tanto básicos como clínicos. El grupo pertenece al Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili (IISPV) y al Hospital Universitario de Tarragona Joan XXIII, está integrado en la red nacional para el estudio de la diabetes (CIBERdem), perteneciente al Instituto de Salud Carlos III. Se trata de un grupo reconocido como “grupo consolidado” por la “Agència de Gestió d’Ajuts Universitaris i de Recerca” (AGAUR) de la Generalitat de Catalunya desde 2009, el cual acumula gran experiencia en la formación de estudiantes de pregrado, postgrado y postdoctorales, tanto en ciencias básicas como clínicas

Como su nombre indica el grupo se centra en el estudio de los desordenes metabólicos asociados a la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y la morbilidad de la obesidad. La hipótesis central del grupo se basa en la disfunción del tejido adiposo como un componente clave en el desarrollo de trastornos metabólicos asociados a la obesidad y no solo como una consecuencia de estas patologías. Actualmente, el grupo se centra en el estudio del papel del succinato en la obesidad y la DM2. El succinato es un metabolito intermediario del ciclo de Krebs que participa en varias vías metabólicas intracelulares. En determinadas situaciones de estrés metabólico como la obesidad y la DM2, los niveles de succinato circulante en sangre provenientes de su acumulación intracelular pueden incrementarse y realizar, a su vez, funciones de señalización extracelular a nivel sistémico a través de la activación de su receptor específico (SUCNR1). En este sentido, el grupo Diamet ha publicado recientemente un estudio en el que se resalta la importancia de la activación en SUCNR1 en fenómenos tales como la inflamación y la respuesta inmune<sup>1</sup>. Otro de los puntos en los que el grupo enfoca sus investigaciones es el de localizar las posibles fuentes de succinato. En concreto, ha identificado a la microbiota bacteriana presente en el intestino como un posible componente regulador de las concentraciones de succinato circulante, ya que han observado una asociación

entre la relació de espècies bacterianes productores-consumidores de succinato y sus niveles en sangre en la obesidad<sup>2</sup>. El objetivo de mi trabajo es establecer una metodología en el tratamiento de muestras que permita aplicar un método fluorimétrico para la determinación de succinato en medios de cultivo. Posteriormente, se aplicará dicho protocolo para determinar el posible consumo o producción de succinato por parte de determinadas especies bacterianas presentes en la microbiota humana.

## Resumen

El succinato es un metabolito del ciclo de Krebs que está implicado en la síntesis del ATP y puede actuar como un sensor del estado metabólico. Niveles altos de succinato se han observado en la obesidad y la diabetes. La obesidad se ha asociado con una disbiosis intestinal. La microbiota se ha propuesto como un posible origen del succinato circulante. El objetivo de este trabajo es caracterizar las bacterias *O.laneus*, *C.leptum* y *P.xylaniphila* como productoras o consumidoras de succinato y establecer una metodología de determinación de succinato en los medios de cultivo por fluorimetría. También se han estudiado las bacterias *A.acidipropionici*, *P.copri* y *C.butyricum* de las que se conoce que son consumidoras o productoras. La metodología utilizada fue eficiente a la hora de determinar la concentración de succinato en los medios de cultivo y se caracterizó *O.laneus* como productora de succinato. *C.leptum* y *P.xylaniphila* no fueron catalogadas.

## Resum

El succinat és un metabòlit del cicle de Krebs que està implicat en la síntesi de l'ATP i pot actuar com un sensor de l'estat metabòlic. Nivells alts de succinat s'han observat en l'obesitat i la diabetis. L'obesitat s'ha associat amb una disbiosi intestinal. La microbiota s'ha proposat com un possible origen del succinato circulant. L'objectiu d'aquest treball és caracteritzar els bacteris *O.laneus*, *C.leptum* i *P.xylaniphila* com a productors o consumidors de succinat i establir una metodologia de determinació de succinat en els medis de cultiu per fluorimetria. També s'han estudiat els bacteris *A.acidipropionici*, *P.copri* i *C.butyricum* els quals són coneguts com consumidors o productors. La metodologia utilitzada va ser eficient a l'hora de determinar la concentració de succinat en els medis de cultiu i es va caracteritzar *O.laneus* com a productor de succinat. *C.leptum* i *P.xylaniphila* no van ser catalogats.

## Abstract

Succinate is a metabolite of the Krebs cycle that is involved in the synthesis of ATP and can act as a sensor of the metabolic state. High levels of succinate have been observed in obesity and diabetes. Obesity has been associated with intestinal dysbiosis. The microbiota has been proposed as a possible source of blood succinate. The aims of this work are to define *O.laneus*, *C.leptum* and *P.xylaniphila* bacteria as producers or consumers of succinate and establish a methodology in order to determine the culture media by fluorometry. *A.acidipropionici*, *P.copri* and *C.butyricum*, examples of consumer or producer of succinate were used as controls. The methodology performed was efficient in determining the concentration of succinate in the culture media and *O.laneus* was characterized as a succinate producer. *C. leptum* and *P.xylaniphila* were not characterized.

## Introducción

### 1. Enfermedades Metabólicas

#### 1.1. Obesidad

La obesidad es una enfermedad producida por la acumulación excesiva de grasa, independientemente de cuál sea su localización<sup>3</sup>. Es uno de los principales problemas de la sociedad actual ya que según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2016 el 39% de las personas adultas del mundo sufrían de sobrepeso y el 13% eran obesas<sup>3</sup>.

La obesidad se caracteriza por una desregulación hormonal y metabólica, cuya etiología y fisiopatología todavía no está bien establecida. Sabemos que el peso corporal está determinado por la interacción de factores genéticos, fisiológicos, psicosociales y ambientales que afectan a la disponibilidad de los alimentos y al gasto energético. Cuando una ingesta calórica es excesiva y no se compensa con un incremento del gasto energético, el exceso de energía se acumula en forma de depósito de grasa<sup>4</sup>.

#### 1.2. Diabetes Mellitus

La diabetes es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por un aumento de los niveles de glucosa en sangre debido a que el páncreas no produce insulina suficiente y/o esta no se utiliza de forma eficaz<sup>5</sup>. La insulina es una hormona producida por las células beta pancreáticas y es responsable de facilitar la utilización de la glucosa por las células del organismo y por lo tanto de regular los niveles de glucemia en sangre. La hiperglucemia se produce como consecuencia una falta de acción de la insulina para utilizar la glucosa de forma adecuada, se acompaña de complicaciones a corto y largo plazo. De forma paralela a la obesidad, la prevalencia de la diabetes se ha incrementado en los últimos años, y según la OMS en 2014 el 8,5% de los adultos sufrían esta enfermedad<sup>6</sup>. Existen dos tipos principales de diabetes, la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2. La diabetes de tipo 1 es aquella en la que existe un déficit absoluto de secreción de insulina, en cambio, en la diabetes tipo 2 existe una dificultad para la acción de la insulina (resistencia a la insulina) y la

cantidad de insulina producida por el páncreas es insuficiente para compensar la resistencia.

## **2. Microbiota**

### **2.1. Microbiota intestinal**

Las bacterias son microorganismos procariotas que existen en la tierra desde hace más de 3500 millones de años y son los organismos más abundantes del planeta. Tienen una gran capacidad de adaptación, siendo capaces de colonizar cualquier hábitat. Fueron descubiertas por Anton van Leeuwenhoek en la década de 1670, pero no fue hasta el siglo XIX cuando fueron relacionadas con enfermedades. En el cuerpo humano residen una gran cantidad de bacterias en la piel y sobre todo en el tracto digestivo. El conjunto de bacterias que residen en el intestino del cuerpo humano se denomina microbiota intestinal. En el tubo digestivo reside un ecosistema bacteriano complejo formado por hasta unos 100 trillones de microorganismo que conforman esta flora, donde conviven aproximadamente 2000 especies de bacterias distintas, de las cuales solo 100 pueden llegar a ser perjudiciales. El colon es el órgano con una mayor cantidad de bacterias, cuenta con el 99% de bacterias donde la mayoría son anaerobias. El microbioma intestinal no solo está formado por bacterias, también virus, y hongos se hallan presentes y todos establecen una relación simbiótica con el huésped<sup>7</sup>.

Los filos de bacterias predominantes en el intestino humano según el Human Microbiome Project Consortium publicado en 2012 son Bacteroidetes, Firmicutes y Actinobacteria/Proteobacteria<sup>8</sup>. Las funciones más importantes de la flora son por un lado nutricionales y metabólicas, ya que son capaces de digerir y fermentar polisacáridos complejos y facilitar la biodisponibilidad de vitaminas<sup>9,10</sup> y por otro lado, ejercen una función protectora, ya que regulan la activación del sistema inmune<sup>11,12</sup>. Por este motivo, la vuelven indispensable para el huésped, siempre y cuando reciba los nutrientes y condiciones óptimas para su desarrollo adecuado. Mientras se mantenga este equilibrio la flora crea una barrera protectora libre de patógenos e impide el desarrollo de patologías gastrointestinales, pero este equilibrio puede verse modificado por el estrés, el consumo excesivo de antiinflamatorios, laxantes, la

quimioterapia o la administración de antibióticos que provocan una disminución considerable de las poblaciones dominantes, facilitando la proliferación de patógenos (citas).

## **2.2. Microbiota, y enfermedades metabólicas**

La microbiota es un nuevo factor implicado en la obesidad y la diabetes<sup>13,14</sup>. Se han propuesto distintos mecanismos por los que la microbiota intestinal podría estar implicada en el metabolismo energético, inmune y en la regulación de la resistencia a la insulina y la saciedad<sup>15,16</sup>. El microbioma intestinal es capaz de extraer energía de nutrientes no digeribles mediante la fermentación de fibra dietética y produciendo ácidos grasos de cadena corta<sup>17</sup>. Los ácidos grasos de cadena corta producidos por las bacterias son propionato, acetato y butirato, que son sustrato para el epitelio del colon, el hígado y tejidos periféricos, pero también son moléculas de señalización que afectan al metabolismo del huésped y son capaces de ejercer funciones reguladoras, modulando la inflamación<sup>15</sup>.

Otros metabolitos relacionados con la microbiota intestinal, como el óxido de trimetil-aminia y sus precursores, colina y L-carnitina también se han asociado a arterosclerosis<sup>18</sup>, resistencia a la insulina, adiposidad y distribución de la grasa, y se han postulado como marcadores de respuesta al tratamiento de la obesidad<sup>19</sup>.

Se ha observado una alteración en la composición de la microbiota en humanos adultos obesos<sup>14</sup>, e incluso se han descrito cambios en grupos específicos de determinadas bacterias, observándose una abundancia relativa de Firmicutes y una disminución de Bacteroidetes<sup>20</sup>. Sin embargo estos hallazgos no han sido reproducidos en otros estudios<sup>16</sup>, y se postula que estas diferencias podrían estar relacionadas con la distinta metodología utilizada en la identificación bacteriana. Estos estudios destacan, la necesidad de identificar las bacterias a nivel de especie y evaluar las distintas funciones metabólicas e inmunológicas en las que están implicadas<sup>15</sup>. En la obesidad y en la diabetes tipo 2 también se ha observado una disminución de la diversidad bacteriana y un disminución del recuento de genes bacterianos<sup>21</sup>. En concreto en la diabetes tipo 2 se observa una disminución de la

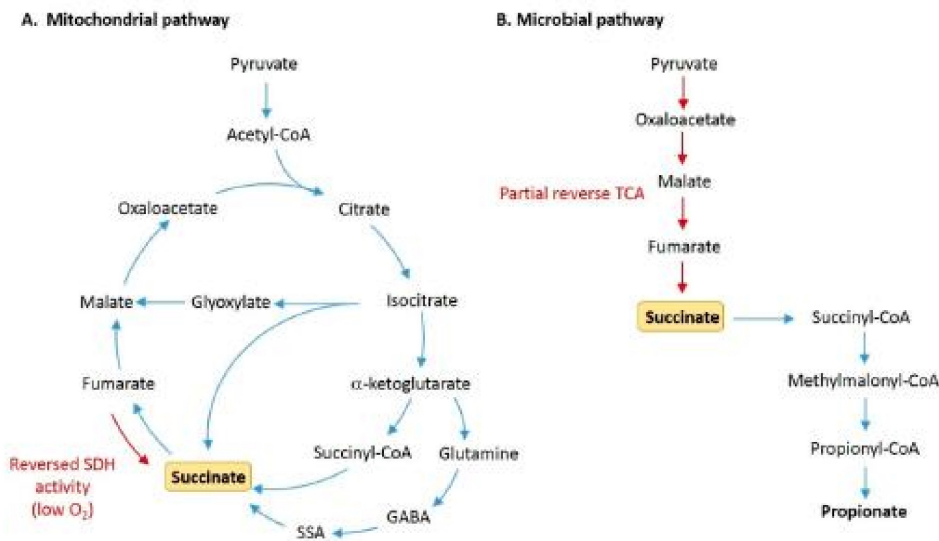
abundancia de bacterias productoras de butirato, un incremento de patógenos oportunistas así como un aumento de las funciones reductoras de sulfatos y resistencia al estrés oxidativo<sup>21</sup>.

### **3. Succinato**

#### **3.1. Descripción y función**

El succinato, un intermediario del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, es un ácido dicarbóxico formado por cuatro carbonos. Se forma a partir de la conversión del succinil Coenzima A, y posteriormente es oxidado a fumarato por acción de la succinato deshidrogenasa (SDH) del complejo 2 de la cadena de transporte de electrones. Por lo tanto, es una molécula implicada en la síntesis de ATP, y puede actuar como un sensor del estado metabólico<sup>22</sup>. A su vez, el succinato también se puede generar a partir de otros metabolitos, como el ácido gamma butírico (GABA) y del “shunt” del glioxalato que es una vía que converge en el ciclo de Krebs.

En situaciones de hipoxia, el succinato se acumula en las mitocondria como resultado de la una inversión de la actividad de la SDH y de la inhibición de la cadena respiratoria<sup>23</sup>. Las cantidades anormalmente elevadas de succinato libre son transportadas al citosol de la célula mediante un translocador de ácidos tricarbóxicos situado en la parte interna de la mitocondria y del canal dependiente del voltaje de aniones en la membrana externa de ésta. Los niveles altos de succinato en el citosol son un buen marcador de hipoxia celular. Además, el succinato también se acumula en tejidos extracelulares en condiciones de inflamación y de estrés<sup>24</sup>.



**Figura 1. Vías implicadas en la producción de succinato en las células y en la microbiota.** **A.** La cadena de los ácidos tricarbóxicos (TAC) en la que el succinato se produce como un metabolito intermediario resultado de la conversión del succinil-CoA, y que después es oxidado a fumarato por acción de la SDH. También puede producirse a partir del semialdehído succínico (SSA) a través de la vía del ácido gamma amino butírico (GABA) y de la vía del glioxilato a partir del isocitrato. **B.** En la fermentación microbiana, el succinato se forma por la inversión parcial de las reacciones del ciclo TCA. El piruvato es carboxilado para formar acetato, que es reducido a malato, fumarato y succinato. El succinato es entonces decarboxilado a propionato.

### 3.2. Succinato en obesidad y diabetes

Se han detectado niveles altos de succinato en pacientes obesos, con enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus tipo 2<sup>2,25</sup>. En este tipo de situaciones el succinato extracelular, se cree, que señala a través del receptor SUCNR1. A través de la unión a este receptor, se ha descrito una acción antilipolítica del succinato, con una inhibición de la liberación de ácidos grasos de los adipocitos<sup>26,27</sup>.

### 3.3. Succinato y Microbiota intestinal.

Las bacterias de la microbiota intestinal son capaces de producir succinato mediante la fermentación anaeróbica de la fibra dietética en el tubo digestivo, la cual es capaz de estimular la gluconeogénesis intestinal, regular la homeostasis energética y regular el apetito<sup>28</sup>. En condiciones normales las concentraciones de succinato en la luz intestinal no suelen ser altas, ya que es rápidamente convertido a

propionato. Pero en situaciones de disbiosis intestinal, en las que se rompe el equilibrio normal de la fermentación, se produce una acumulación de succinato en la luz intestinal, el cual puede ser absorbido y/o actuar localmente de forma autocrina y paracrina. Un trabajo reciente del grupo ha descrito una asociación entre los niveles circulantes de succinato, la obesidad y los cambios en el patrón de la flora microbiana intestinal<sup>2</sup>, lo que sugiere que el succinato producido a nivel intestinal es determinante de las concentraciones plasmáticas circulantes<sup>2</sup>.

Las bacterias preferentemente productoras de succinato en el intestino de los mamíferos son las que pertenecen al filo de Bacteroidetes, pero también algunas familias del filo Firmicutes son importantes productoras<sup>29,30</sup>. Ver tabla 1.

**Tabla 1. Principales Bacterias productoras de succinato como precursor de propionato o como metabolito final\*.**

Filo	Familia	Especies
Bacteroidetes	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides uniformis</i>
		<i>Bacteroides vulgatus</i>
	Prevotellaceae	<i>Prevotella copri*</i>
	Rikenellaceae	<i>Alistipes putredinis</i>
Firmicutes	Veillonellaceae	<i>Dialister invisus</i>
		<i>Dialister succinatiphilus</i>
	Acidaminococcaceae	<i>Phascolarctobacterium succinatutens</i>
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiaceae	<i>Akkermansia muciniphila</i>
Actinobacteria	Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus flavefaciens*</i>

(modificada de Louis P and Flint HJ<sup>30</sup>)

Por otro lado, también se han descrito bacterias preferentemente consumidoras de succinato, como las de la familia Odoribacteraceae y Clostridaceae<sup>2,29,31</sup>

Recientemente, se han descrito nuevas especies de bacterias presentes en la microbiota fecal que han sido implicadas en el metabolismo del succinato, pero que no se conoce bien su actividad. Entre ellas se encuentran *Odoribacter laneus*<sup>2,32</sup>,

*Clostridium leptum* y la *Paraprevotella xylaniphila*<sup>33,34</sup>, las dos primeras del género *Odoribacter* y *Clostridium*, considerados como consumidores de succinato y cuya elevada presencia en la microbiota intestinal se ha asociado en diferentes estudios a un menor riesgo de enfermedad cardiovascular<sup>35,36</sup>. Además *Clostridium leptum* es más abundante en las heces de pacientes con una pérdida mantenida de peso con respecto a los que no la mantienen<sup>37</sup>, pero también ha sido asociado con obesidad<sup>38</sup>. Por el contrario *Paraprevotella xylaniphila* está considerada como productora de succinato<sup>33,34</sup>.

## Hipótesis y Objetivos

### **Creemos que:**

Conocer la capacidad de producir o consumir succinato por las especies bacterianas más prevalentes en la microbiota intestinal es necesario si consideramos que el succinato producido a este nivel tiene repercusión clínica.

Por este motivo, es imprescindible disponer de un método analítico que nos permita determinar las concentraciones de succinato en el medio de cultivo de las bacterias y fenotipar aquellas especies bacterianas más recientemente descritas y que se hallan presentes en la microbiota intestinal de pacientes con obesidad y enfermedades metabólicas.

Dado que estas bacterias se han descrito frecuentemente en la microbiota humana y no están bien caracterizadas en relación a su capacidad de producir y/o consumir succinato, y que podrían ser una potencial diana terapéutica para el tratamiento de la obesidad utilizadas como probióticos, en este trabajo nos propusimos caracterizar a estas bacterias en relación a esta capacidad así como establecer una metodología analítica para la determinación de succinato en el medio de cultivo bacteriano.

### **Objetivos del Estudio**

1. Establecer una metodología en el tratamiento de muestras para la posterior aplicación de un método fluorimétrico para la determinación de succinato en el medio de cultivo de las bacterias

2. Caracterizar nuevas especies bacterianas que se han implicado en el metabolismo del succinato a nivel intestinal.

## Material y Métodos

El trabajo ha sido realizado en el laboratorio del IISPV del Hospital Joan XXIII en el seno del grupo Diamet.

### Diseño Experimental

Consistió en el cultivo de bacterias anaerobias en un medio enriquecido con succinato frente a un medio sin succinato. En tubos falcon de 50 mL (115 x 30 mm) con 20 o 30 mL de medio de cultivo se inocularon las bacterias a estudiar mediante un asa de siembra, manteniendo la esterilidad de la zona de trabajo mediante un mechero Bunsen. Todas las muestras se incubaron en una estufa a 37°C. Durante todo el periodo del estudio, cada 24 horas se recogían 0,5 mL del medio para su posterior estudio y 1 mL para medir la absorbancia.

### Soluciones de succinato

Se prepararon a partir de una solución de succinato de sodio (Sigma-Aldrich) y H<sub>2</sub>O Mili-Q. Se pesó directamente en tubos falcon de 50 mL (115 x 30 mm) mediante una balanza analítica. La esterilización se realizó con una jeringuilla de 10mL y Filtros de jeringa Minisart PES (0,45µm Ø28mm) (OneLab) en una campana de flujo laminar con filtro HEPA.

### Cepas bacterianas

*Odoribacter laneus* (DSM 22474, JCM 16069, YIT 12061), *Clostridium leptum* (DSM 753, ATCC 29065) , *Paraprevotella xylaniphila* (DSM 19681, JCM 14860, YIT 11841) <sup>33,34</sup> · *Clostridium Butyricum* (DSM 10702, ATCC 19398, IAM 14194, IFO 13949, JCM 1391, NBRC 13949, NCIMB 7423, NCTC 7423, VPI 3266), *Prevotella Copri* (DSM 18205, JCM 13464) y *Acidipropionibacterium acidipropionici* (DSM 4900, ATCC 25562) fueron compradas al instituto de Leibniz DSMZ. Todas las bacterias se mantuvieron a temperatura 37°C en condiciones libres de oxígeno y fueron cultivada en condiciones estrictas de anaerobiosis en una cámara anaeróbica.

## **Medios de Cultivo**

Para la realización de todos los trabajos experimentales se utilizaron tanto medios de cultivo líquidos como sólidos. Los medios líquidos utilizados fueron el de extracto de levadura y peptona (PY), el Luria-Bertani (LB) y tioglicolato enriquecido. Los medios sólidos utilizados fueron agar PY, agar LB, agar Columbia y agar Chocolate. Los medios LB y PY se utilizaron tanto como medio líquido como sólido y se elaboraron en el laboratorio. El medio PY fue preparado como lo describió Limoncu et al<sup>39</sup> con alguna modificación:

En 1 L de agua destilada se disolvieron 20g de peptona (2%), 10g de extracto de levadura (1%) y 15 g de agar bacteriano (1,5%). La mezcla fue homogeneizada con un mezclador y se ajustó el pH a 7. A continuación el medio fue autoclavado a 121°C. El medio LB<sup>40</sup> fue preparado del mismo modo, pero modificando la composición en 10g de triptona (1%), 5g de extracto de levadura (0,5%) y 10 g de NaCl (1%) por litro. Para solidificarlo se añadieron 15g de agar bacteriano (1,5%).

El medio de tioglicolato utilizado fue BD Fluid Thioglycollate Medium (FTM) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). También se adquirieron las placas de cultivo agar chocolate, BD Mueller Hinton Chocolate Agar (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) y Agar Columbia, BD BBL Columbia Agar con 5% de sangre de carnero (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)

## **Métodos de cultivo y determinación del crecimiento**

Las diferentes especies se sembraron en agar Columbia y en botellas de hemocultivo anaerobio (BD BACTEC™) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Se utilizó un mechero Bunsen para mantener el área de trabajo estéril en el momento del sembrado. La inoculación se realizó mediante inoculación con jeringuilla en los medios líquidos, y mediante siembra por agotamiento con asa de Kolle en los medios sólidos. Ambos cultivos se mantuvieron en ambiente anaerobio. Para generar el ambiente anaerobio en las placas agar utilizamos 1 jarra de anaerobiosis y dos contenedores en los que introdujimos un sobre generador de CO<sub>2</sub>, 1BD BBL CO<sub>2</sub> generators (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), previo

al cerrado hermético de los mismos. Los medios líquidos y las placas se incubaron a 37°C. El cultivo en medios de hemocultivo se realizó para tener disponibilidad de bacterias en crecimiento para utilizarlas posteriormente en experimentación. Para mantener los cultivos bacterianos en crecimiento se resembraban en placa cada 5-7 días dependiendo del tipo de bacteria.

### **Identificación de bacterias mediante Bruker MicroFlex MALDI-ToF/MS**

La identificación de las bacterias se realizó a partir de cultivos puros sembrados en placas de agar Columbia a 37°C. En primer lugar se inocula una colonia del cultivo en la placa de acero de 96 espacios de muestra (BRUKER Daltonics) de MALDI-ToF y se añade 9,7µL de matriz (solución saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico en 50% de acetonitrilo y 2,5% de trifluoroacético). Se deja secar a temperatura ambiente produciéndose la cristalización. Se introduce la placa en el MALDI-ToF. Automáticamente se realiza el vacío y el análisis. Se puso en marcha el análisis con el programa MicroFlex LT System (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania), se capturó y analizó el espectro mediante MALDI Biotyper automation control y Bruker Biotyper 2.0 software (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Los iones se generaron mediante un láser de N<sub>2</sub>. El anexo 1 incluye una descripción de la técnica.

### **Cuantificación de Succinato mediante Fluorimetría**

Los 0,5 mL de medio recogidos a diario de los tubos falcon se centrifugaban a 12000 rcf durante 5 minutos para separar el sobrenadante del pellet de bacterias y se almacenaba a -20°C para el posterior análisis. En el momento previo a realizar la determinación, la muestra era manipulada a 4°C. El sobrenadante se filtraba mediante el uso de columnas de filtro 3K (Amicon® ultra 0,5 mL centrifugal filters, Merck Darmstadt, Alemania) a 14000 rcf durante 10 minutos. La solución filtrada se diluía 1:50 con agua Mili-Q para eliminar partículas que colorean el medio.

Los niveles de succinato fueron medidos mediante el EnzyChrom™ Succinate Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, CA) en una placa de 96 pocillos (Thermo Scientific™, Fisher Thermo Scientific). El límite de detección es de 2µM y su coeficiente de variación intra- e interensayo de < 3.5 and 6.95%, respectivamente.

En cada pozo de la placa añadíamos 20µL de muestra. A continuación se preparaban los estándares de 0, 12, 24, 40, 60, 80µM a partir de una solución de succinato de 20 mM. Cuando todos los estándares y muestras estaban introducidos en la placa se preparaba el Reactivo fluorométrico. La composición de este reactivo es PEP, Dye Reagent, Cosubstrate, Enzyme mix y Assay Buffer. Se añadían 80µL de reactivo Fluorométrico en cada uno de los pozos ocupados por muestra o estándar y se dejaba incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad (envuelto en papel opaco). Los reactivos del kit reaccionan con el succinato transformándolo en piruvato, y es el piruvato lo realmente detectado. Una vez pasado este tiempo, medimos la fluorimetría con el lector de microplacas multimodo Varioskan LUX (Thermo Scientific™, Fisher Thermo Scientific). La longitud de onda aplicada es 530/585 nm. La recta de calibración se construye restando a los valores del estándar, el blanco. Para calcular la cantidad de succinato presente en los medios se resta la señal del control general (únicamente medio de cultivo). En todas las pruebas tenemos un control de medio. El anexo 1 incluye una descripción de la fluorimetría.

### **Seguimiento del Crecimiento bacteriano**

El crecimiento bacteriano se determinó por recuento celular de células viables y por turbidimetría<sup>41-43</sup>(ver anexo 1). Se realizó diariamente durante el transcurso de cada prueba experimental. De cada medio preparado se recogía un mililitro de muestra y se media la absorbancia a 600nm. Cada día, antes de medir la absorbancia de cada muestra se calibraba con su respectivo control. Se introduce el mL de muestra en cubetas fabricadas para su análisis. Para obtener resultados reales cada vez que se añadía el mL en la cubeta se media automáticamente.

### **Análisis de Resultados**

El estudio del crecimiento bacteriano se realizó en el programa Excel. Se construyeron gráficos de cada una de las bacterias y el cocultivo por separado con las absorbancias medidas durante los días de experimentación.

Los resultados obtenidos de la fluorimetría se traspasaron al excel. Se construyó la recta de calibración del Kit de succinato restando a las señales obtenidas el valor

del blanco. La concentración de succinato se cálculo a partir de la recta de calibración del kit de succinato, extrapolando los valores de la emisión obtenidos a los que previamente se les restaba el blanco/control de medio. Se deshacía la dilución 1:50 y se aplicaba el factor de concentración (140%) en el filtrado para conocer la concentración obtenida.

Los valores de concentración obtenidos a partir de las señales de emisión y su extrapolación se les aplicó la siguiente ecuación:

$$\% = \frac{[Dx] - [D0]}{[D0]} \times 100$$

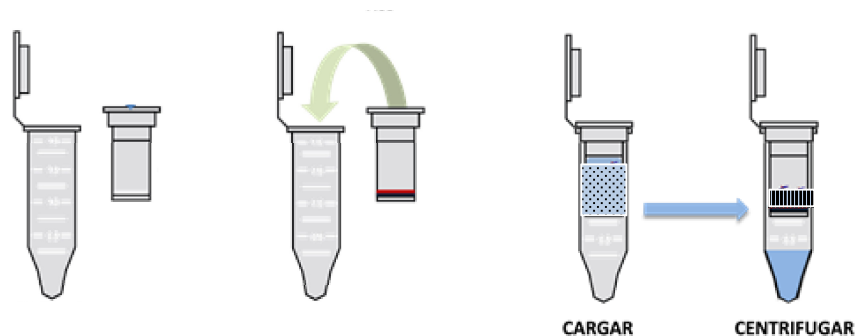
## Resultados y Discusión

### 1. Puesta a punto del método fluorimétrico para la cuantificación de succinato en un medio de cultivo bacteriano.

La determinación de succinato en el medio de cultivo de bacterias es necesaria para una nueva línea de investigación que se desarrolla en el laboratorio, por este motivo comprobar si el succinato podía ser determinado en los medios de cultivo y la puesta a punto de esta técnica es una tarea esencial para su posterior uso en investigaciones relacionadas.

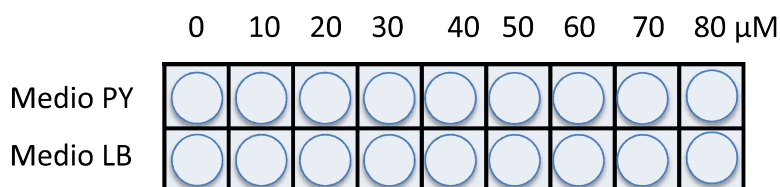
Para ello, inicialmente trabajamos con dos medios líquidos, el medio PY y el medio LB. Los dos son medios que contienen extracto de levadura y triptona (LB) y peptona (PY) como fuente de nitrógeno, que son ingredientes compuestos por péptidos obtenidos a partir de la degradación enzimática de la caseína y proteínas en general por proteasas enzimáticas, tripsinas y pepsinas, respectivamente.

En primer lugar se estableció 300 $\mu$ L como el volumen óptimo de muestra a estudiar para que los resultados obtenidos fueran reproducibles, y 10 minutos como el tiempo de centrifugación de la muestra en la filtración. La fuerza de centrifugación fue la recomendada por la marca, 14.000 rcf. Este sistema se ha utilizado para la determinación de succinato en medios de cultivos celulares<sup>44</sup>, y también de solutos<sup>45</sup>. Observamos que el succinato era filtrado y que podía ser determinado en el sobrenadante, eliminando así una parte de las interferencias (Figura 2)



**Figura 2. Filtrado del medio a través de una columna de centrifugado para la determinación del succinato.**

Con objeto de determinar si el succinato podía ser cuantificado en el medio de cultivo, introdujimos cantidades conocidas de succinato que se disolvieron en los medios PY y LB. En un tubo eppendorf se prepararon las muestras de medio con succinato. (Figura 3). A la hora de preparar las soluciones se tuvo en cuenta que el succinato con el que trabajábamos era succinato de sodio y que al filtrar las soluciones por la columna se concentraban la solución entre 135-145%. Por esa razón se estableció como rango de concentraciones a determinar 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80  $\mu\text{M}$ . Se prepararon las soluciones teniendo en cuenta que el peso molecular era 162,05 en vez de 118,09, y se determinó que las soluciones se concentraban 140% asumiendo un error de  $\pm 5$ .



**Figura 3. Distribución de las muestras con las distintas condiciones de succinato disueltas en el medio**

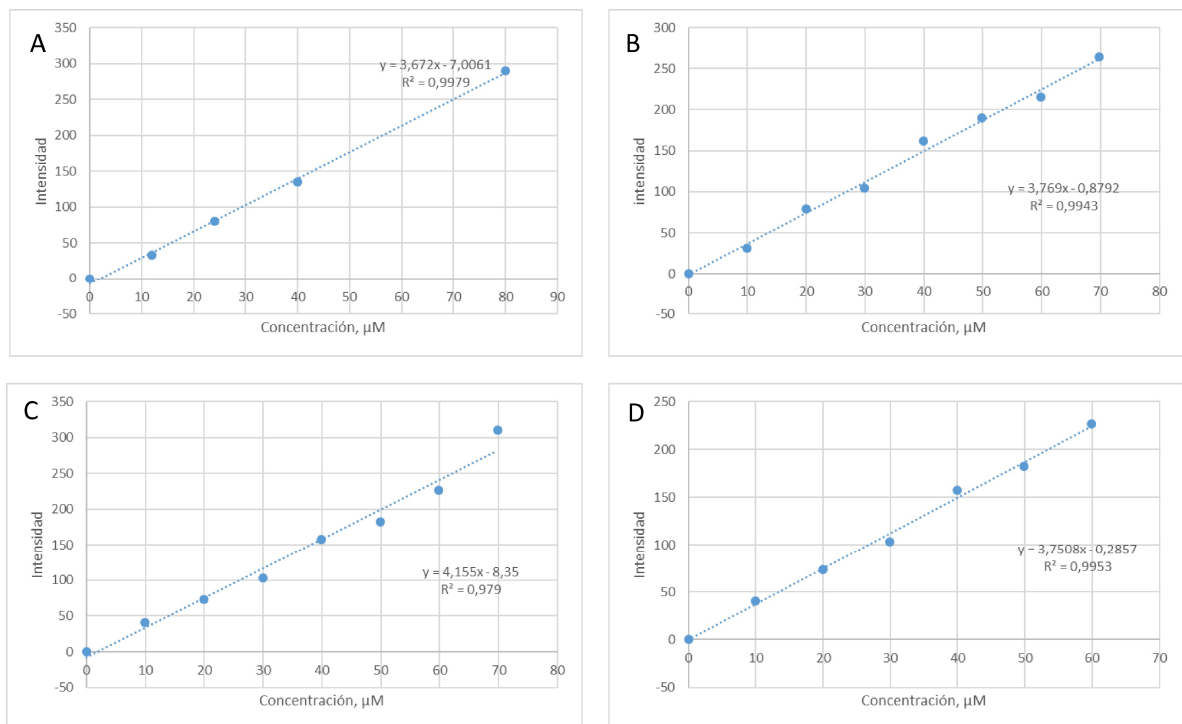
El rango de concentraciones a estudiar abarcó entre 0 y 80  $\mu\text{M}$ . La concentración de 21  $\mu\text{M}$  se realizó por triplicado para observar la reproducibilidad de la técnica. Los resultados obtenidos con ambos medios se muestran en la tabla 2 y en la figura 4.

**Tabla 2. Determinación de succinato en el medio de cultivo.**

Medio	[Inicial] $\mu\text{M}$	x1,4 $\mu\text{M}$	Señal	Señal Control	[Resultante] $\mu\text{M}$	% Error
<b>LB</b>	21	29,4	221,6	116,6	30,50	3,7
	21	29,4	224,9	116,6	31,40	6,8
	21	29,4	222,4	116,6	30,72	4,5
<b>PY</b>	21	29,4	287,7	184,6	29,98	2,0
	21	29,4	288,9	184,6	30,31	3,1
	21	29,4	289,2	184,6	30,39	3,4

LB: medio de cultivo Luria-Bertani; PY: medio de cultivo Petone-Yeast; x1,4: factor de concentración; Señal Control: corresponde al medio 0% succinato.

Los resultados se han obtenido mediante la extrapolación con la ecuación de la recta de calibración del kit de succinato ( $y = 3,67x - 7,01$ ). Se puede observar que los valores obtenidos en ambos medios son ligeramente superiores a la concentración teórica. Posiblemente sea a causa del proceso de filtración. La concentración que se produce no es exactamente de 140%, varía en cada muestra filtrada.



**Figura 4. Rectas de calibración patrón externo y adición patrón de los PY y LB.** A: Recta de patrón externo del kit de succinato; B: Recta de adición patrón del medio LB; C y D: Rectas de adición patrón del medio PY.

## 2. Determinación de succinato en medios de cultivo de bacterias.

Una vez comprobada la fiabilidad del método de determinación de succinato en ambos medios de cultivo, pasamos al segundo objetivo de nuestro trabajo, que consistía en determinar la concentración de succinato de medios de cultivo bacterianos. La determinación en nuestro caso no era necesario que fuese precisa

ya que nuestro objetivo es catalogar las bacterias como productoras o consumidoras, información que se obtendría mediante la comparación entre el control y los medios con bacterias. En el caso de buscar conocer cual es el índice de producción o consumición de cada una de las bacterias deberíamos conocer con mayor precisión la cantidad de bacterias presente en el medio.

Un paso previo a la determinación de succinato en cultivo bacteriano fue la comprobación de que las bacterias eran capaces de crecer en los medios de cultivo a estudiar y cual de ellos podía ser más útil. Para ello se sembraron las bacterias en tubos eppendorf con réplicas de ambos medios. Se dejaron incubar un par de días y se analizó el crecimiento cualitativo mediante la comparación de la densidad óptica a 600 nm inicial respecto a la final.

### 2.1. Prueba 1.

Se prepararon 32 tubos falcons con 30 ml de medio PY, a los que por cuadruplicado se introdujo una muestra de cada una de las cepas a estudio.

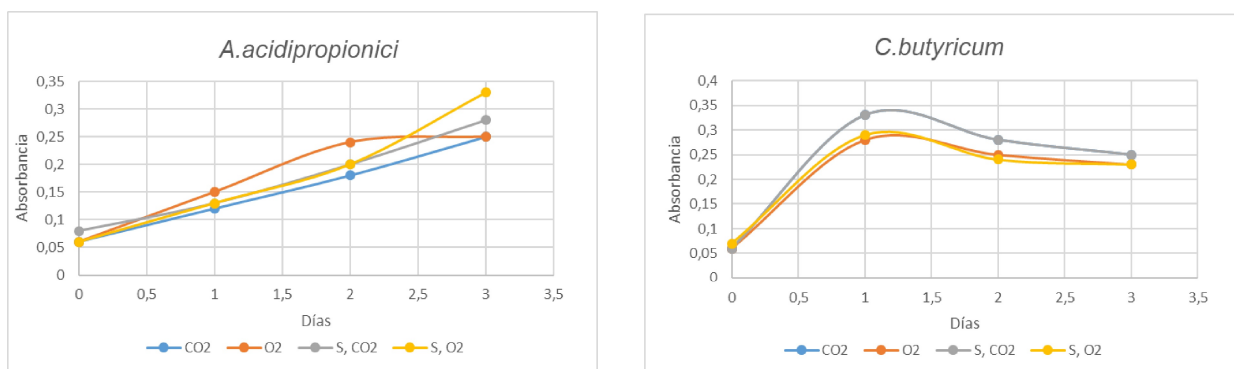
	CO <sub>2</sub> +S <sup>+</sup>	O <sub>2</sub> +S <sup>+</sup>	CO <sub>2</sub> +S <sup>-</sup>	O <sub>2</sub> +S <sup>-</sup>
<i>Odoribacter laneus</i>	●	●	●	●
<i>Clostridium leptum</i>	●	●	●	●
<i>Paraprevotella xylaniphila</i>	●	●	●	●
<i>Clostridium butyricum</i>	●	●	●	●
<i>Prevotella copri</i>	●	●	●	●
<i>Acidipropionibacterium acidipropionici</i>	●	●	●	●
Co-Cultivo <i>Odoribacter laneus</i> y <i>Prevotella copri</i>	●	●	●	●
Control	●	●	●	●

**Figura 5. Distribución de las muestras incluidas en los tubos falcon con las distintas condiciones de succinato disueltas en el medio y según su exposición a anaerobiosis.** CO<sub>2</sub> +S<sup>+</sup>: cultivo en anaerobiosis y en presencia de succinato; O<sub>2</sub> +S<sup>+</sup>: cultivo con exposición a O<sub>2</sub> y en presencia de succinato; CO<sub>2</sub> +S<sup>-</sup>: cultivo en anaerobiosis y en ausencia de succinato; O<sub>2</sub> +S<sup>-</sup>: cultivo con exposición a O<sub>2</sub> y en ausencia de succinato.

De los 8 falcons restantes, en 4 se introdujo un co-cultivo de *O.laneus* y *P.copri* y los restantes no se cultivaron y fueron considerados control de cada una de las variables. Cada uno de los cultivos y los controles fueron sometidos a 4 condiciones experimentales distintas durante 5 días: medio rico en succinato en anaerobiosis ( $\text{CO}_2 + \text{S}^+$ ), medio rico en succinato en aerobiosis ( $\text{O}_2 + \text{S}^+$ ), medio sin succinato en anaerobiosis ( $\text{CO}_2 + \text{S}^-$ ) y medio sin succinato en aerobiosis ( $\text{O}_2 + \text{S}^-$ ). (Figura 5). Con este experimento pretendíamos determinar si las concentraciones de succinato se modificaban en el medio en función de si las bacterias eran productoras o consumidoras de este y según la exposición a anaerobiosis<sup>46</sup>.

### 2.1.1. Crecimiento

Como se puede observar en la Figura 6, de las seis bacterias cultivadas y el co-cultivo solo se observó crecimiento en los cultivos de *A.acidipropionici* y en *C.butyricum*, pero sin observarse diferencias entre las diferentes condiciones experimentales valoradas.



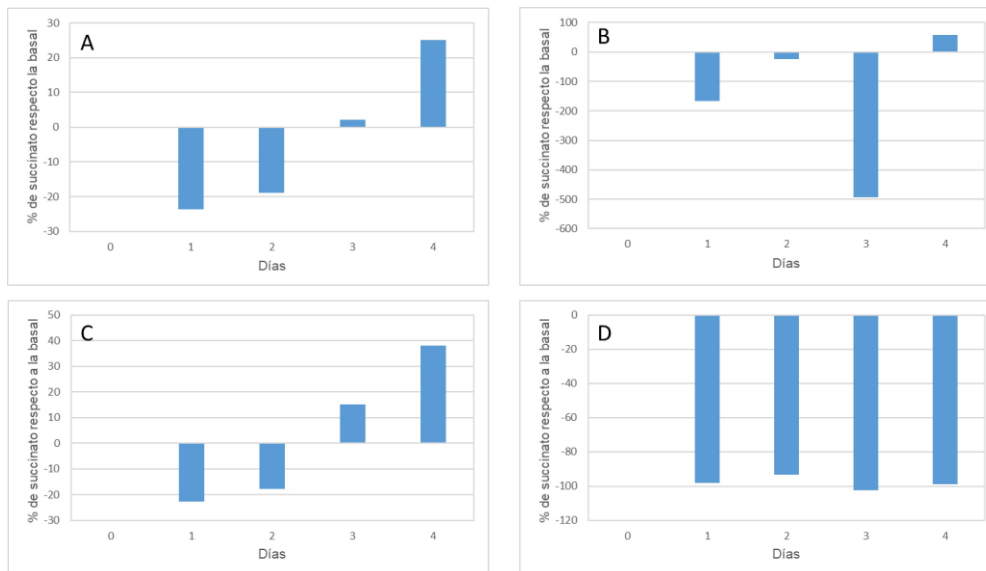
**Figura 6. Curva de crecimiento de *Acidipropionibacterium acidipropionici* y *Clostridium butyricum* según las condiciones experimentales evaluadas.** CO<sub>2</sub>: exposición a anaerobiosis sin succinato; O<sub>2</sub>: exposición aerobia sin succinato; S, CO<sub>2</sub>: exposición anaerobiosis con succinato; S, O<sub>2</sub>: exposición aerobia con succinato

### 2.1. 2. Determinación de succinato

Tampoco observamos diferencias en la concentración de succinato entre las distintas condiciones experimentales estudiadas, a pesar de que el factor anaerobiosis debería ser determinante en la producción de succinato para algunas

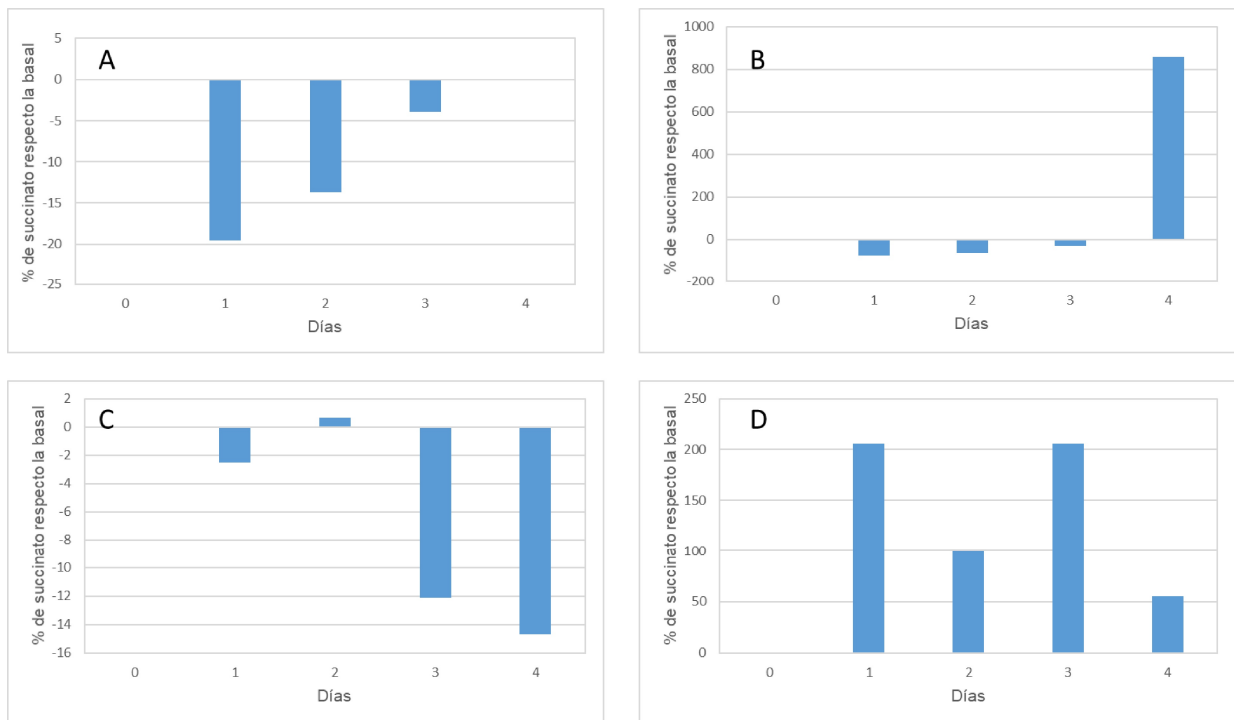
de las bacterias estudiadas, solo observamos crecimiento en 2 cepas de bacterias estudiadas *A.acidipropionici* y *C.butyricum*. No podemos descartar problemas técnicos durante la realización de este primer estudio.

En relación al *A.acidipropionici* aumenta la concentración de succinato en el medio a partir del tercer día en cultivos a los que se había añadido succinato. Los dos primeros días, disminuye la concentración de succinato que puede sugerir consumo. En los medios sin succinato añadido, los niveles oscilan, pero se mantienen por debajo del control inicial. Estos datos están relativizados a la determinación inicial de succinato. (Figura 7)



**Figura 7. Evolución de relativa de los niveles de succinato en los cultivos de *Acidipropionibacterium acidipropionici* según las condiciones experimentales evaluadas.** A: Exposición a anaerobiosis con succinato; B: exposición a anaerobiosis sin succinato; C: O<sub>2</sub>: exposición aerobia con succinato; D: O<sub>2</sub>: exposición aerobia sin succinato.

En relación a *C.butyricum* impresiona de que en presencia de succinato, lo consumen y en ausencia de este, son capaces de producirlo.



















**Figura 8. Evolución de los niveles de succinato en los 4 días estudiados en los cultivos de *Clostridium butyricum* según las condiciones experimentales evaluadas.** A: Exposición a anaerobiosis con succinato; B: exposición a anaerobiosis sin succinato; C: O<sub>2</sub>: exposición aerobia con succinato; D: O<sub>2</sub>: exposición aerobia sin succinato.

Ante estos hallazgos, nos planteamos la posibilidad de errores técnicos en la metodología utilizada, medio inadecuado para el crecimiento y que el tiempo utilizado hubiera sido demasiado corto o la posibilidad de contaminación a través de la vía de exposición a O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, motivo por el cual desarrollamos otro nuevo modelo experimental.

## 2.2. Prueba 2.

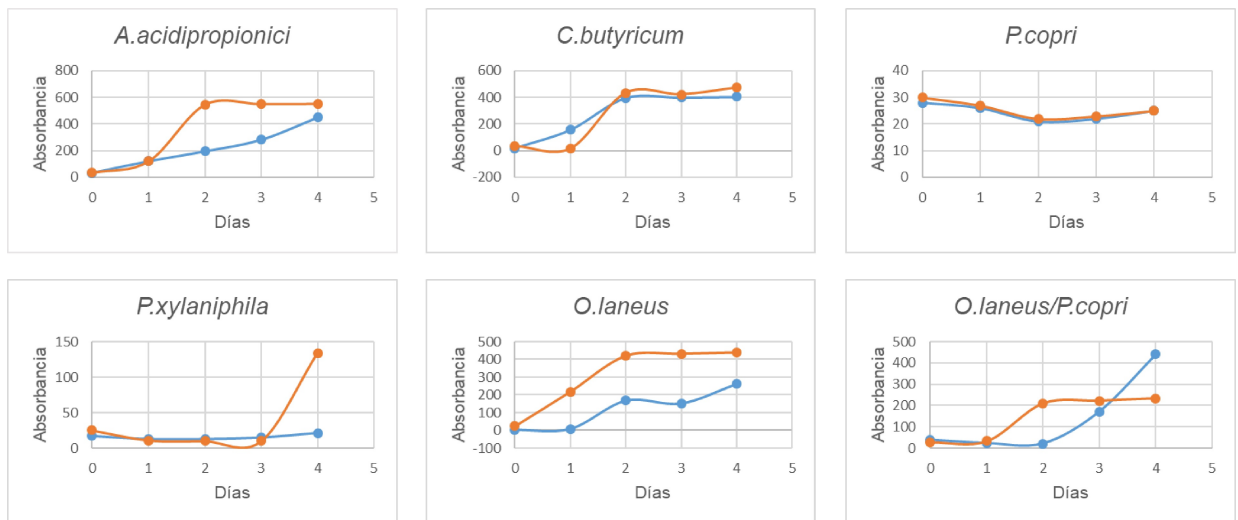
La segunda prueba experimental es semejante a la primera, pero en este modelo se eliminó la condición anaerobiosis/aerobiosis, trabajando únicamente en anaerobiosis. El diseño del experimento consistió en preparar 16 falcons con 30 ml de medio de cultivo PY en los que introdujimos una muestra de cada cepa de bacteria a estudio y del co-cultivo *O.laneus* y *P.copri* por duplicado, y los dos falcons restantes, sin muestra bacteriana fueron considerados control. Las muestras fueron

cultivadas durante 5 días a 37°C. La variable a estudiar fue la presencia y ausencia de succinato. Se trabajó con unas condiciones de concentración de succinato de 0.01%. La figura 9 muestra el diseño del estudio.

	CO <sub>2</sub> +S <sup>+</sup>	CO <sub>2</sub> +S <sup>-</sup>
<i>Odoribacter laneus</i>		
<i>Clostridium leptum</i>		
<i>Paraprevotella xyliniphila</i>		
<i>Clostridium butyricum</i>		
<i>Prevotella copri</i>		
<i>Acidipropionibacterium acidipropionici</i>		
Co-Cultivo <i>Odoribacter laneus</i> y <i>prevotella Copri</i>		
Control		

**Figura 9. Distribución de las muestras incluidas en los tubos falcon según la presencia o no de succinato en el medio.** CO<sub>2</sub> +S<sup>+</sup>: cultivo en anaerobiosis y en presencia de succinato; CO<sub>2</sub> +S<sup>-</sup>: cultivo en anaerobiosis y en ausencia de succinato.

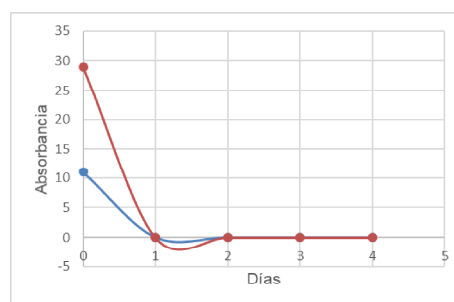
En este caso todas las muestras fueron manipuladas en condiciones estériles en la campana de flujo laminar del laboratorio, que dispone de un filtro HEPA y proporciona un flujo de aire limpio a la zona de trabajo, evitando así la posibilidad de contaminación. También el tiempo de exposición al O<sub>2</sub> de las bacterias fue el mínimo posible. Los resultados del crecimiento bacteriano de las cepas estudiadas excepto *C. leptum*, que no mostró crecimiento, se muestran en la Figura 10.



**Figura 10. Evolución del crecimiento bacteriano de las cepas estudiadas.** En azul (---) crecimiento con succinato y en naranja (---) crecimiento bacteriano sin succinato.

Se puede observar en las gráficas que de las tres bacterias utilizadas como control solo crecen *A. acidipropionici* y *C. butyricum*.

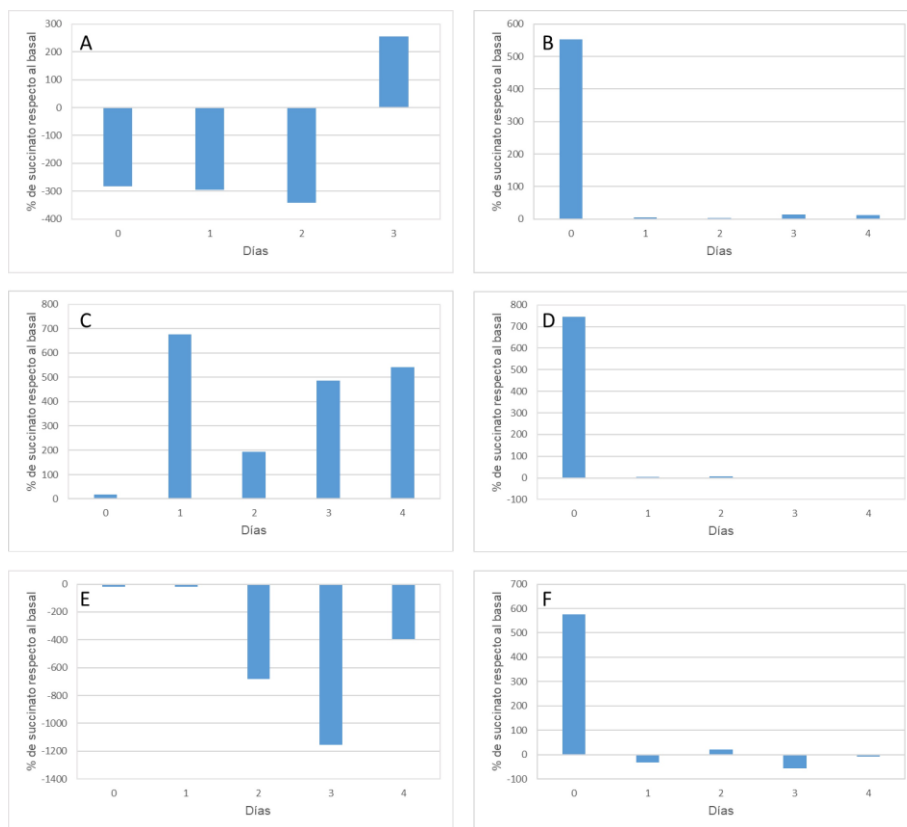
En el caso de *C. leptum*, en vez de crecer, la señal ha decrecido hasta no dar señal alguna. Se puede observar en la figura 11.



**Figura 11. Evolución del crecimiento bacteriano de *Clostridium leptum*.** En azul (---) crecimiento con succinato y en naranja (---) crecimiento bacteriano sin succinato

Como puede observarse, en esta prueba hubo crecimiento en mayor número de las distintas cepas bacterianas. En esta prueba realizamos la determinación de succinato presente en el medio de cultivo de 3 bacterias *Acidipropionibacterium acidipropionici*, *Clostridium butyricum* y *Odoribacter laneus*, que fueron las que

experimentaron crecimiento significativo. En la figura 12 se muestran los resultados de la determinación fluorimétrica de succinato relativizada a la señal basal del día 0.



**Figura 12. Evolución de los niveles de succinato en los medios de cultivo de *Acidipropionibacterium acidipropionici*, *Clostridium butyricum* y *Odoribacter laneus* durante el periodo de estudio.** Cambios en la concentración de succinato con respecto al valor basal del día 0. A: Cultivo *Acidipropionibacterium acidipropionici* sin succinato; B: cultivo *Acidipropionibacterium acidipropionici* con succinato; C cultivo *Clostridium butyricum* sin succinato; D: cultivo *Clostridium butyricum* con succinato; E: cultivo *Acidipropionibacterium acidipropionici* sin succinato; F: cultivo *Odoribacter laneus* con succinato

### 2.3. Prueba 3.

#### 2.3.1. Análisis de las interferencias del medio de Tioglicolato

Ante los datos poco concluyentes de las dos primeras pruebas, decidimos cambiar el tipo de medio de cultivo y utilizar el tioglicolato enriquecido que es un medio muy utilizado para el crecimiento de bacterias anaerobias y que ha sido utilizado para el cultivo de microbiota intestinal<sup>47</sup>. La utilización de este medio

enriquecido ofrece la ventaja de facilitar la proliferación bacteriana, pero por otro lado, al contener una mayor cantidad de compuestos disueltos aumenta la posibilidad de interferencias en el momento de determinar analitos<sup>48</sup>. Por esa razón fue necesario estudiar su capacidad para facilitar el crecimiento de nuestras cepas bacterianas y determinar su proliferación, que pudimos demostrarlo de forma cualitativa mediante la turbidez. Además, comprobamos que la determinación de la concentración de succinato continuaba siendo fiable, a pesar de las posibles interferencias, comprobando si el medio produce efecto matriz. La comprobación del crecimiento bacteriano se realizó sembrando en uno de los tubos cada cepa bacteriana. Se dejó incubar durante dos días y cualitativamente se observó el crecimiento respecto a un tubo control. En esta prueba se realizó la misma comprobación que en los anteriores medios de si detectaría el succinato con fiabilidad. Esta primera comprobación se realizó utilizando la recta del patrón externo, del kit de succinato utilizado. Se disolvió en el medio de tioglicolato una cantidad determinada de succinato para obtener al final una concentración de 0,01% de succinato de sodio. Los resultados reflejan que se puede medir la cantidad de succinato presente en el medio con fiabilidad.

**Tabla 3. Determinación de succinato en el medio de Tioglicolato**

[Inicial] $\mu\text{M}$	x1,4 $\mu\text{M}$	Señal	Rest. blanco	[Extrapolación] $\mu\text{M}$
12,34	17,276	286,587	102,7	17,7
12,34	17,276	285,187	101,3	17,5
12,34	17,276	285,387	101,5	17,5
0	0	184,6	Promedio 183,20	
0	0	183,2		
0	0	183,9		

x1,4: factor de concentración.

El tratamiento de datos se ha realizado a partir de la señal media de los controles. Se puede observar que la concentración que se produce se asemeja a la observada en anteriores análisis. En este caso los cálculos se han realizado a partir de la recta de calibración del kit.

Para comprobar que las interferencias se podían negligir restando el blanco del medio solo se siguió el método de adición patrón. Se prepararon un conjunto de

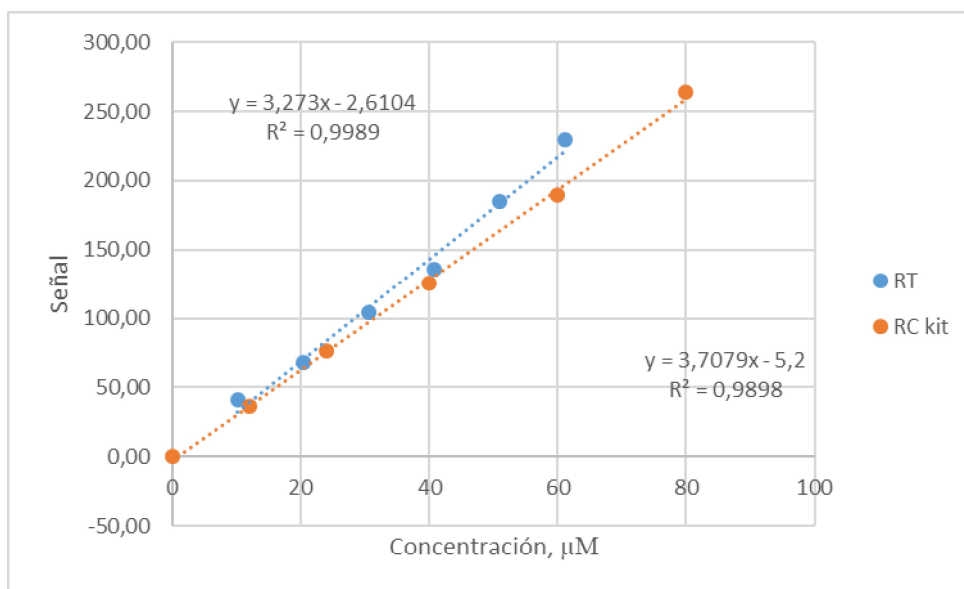
muestras de concentraciones 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80  $\mu\text{M}$  utilizando el succinato de sodio como fuente de succinato y el medio de tioglicolato como diluyente. Además para saber con certeza que el medio, a pesar de ser filtrado, generaba interferencia en la fluorimetría se prepararon tres patrones de la misma concentración pero siguiendo diferente preparación y así obtener tres rectas patrones con las que poder realizar una comparación y saber si se estaba siguiendo la metodología correcta. Se midieron todas a la vez y para que fuese lo más acorde al procedimiento utilizado estuvieron en hielo. La primera prueba era diluir el succinato con medio hasta las concentraciones elegidas y entonces pasar la muestra a través de la columna de filtrado. La segunda prueba consistía en diluir la muestra con medio de tioglicolato hasta una concentración 50 veces superior para diluirla en agua en el momento posterior a la filtración. En la tercera prueba se prepararon las muestras a partir de la solución de medio filtrado, se intento añadir la mínima cantidad de agua con succinato para lograr la concentración buscada sin diluir el medio filtrado que es donde suponemos que presentes las interferencias. Estas pruebas tenían dos objetivos. En primer lugar quería medir el grado de interferencia generada por el medio, en las muestras/patrones que no se diluyeron en agua. En segundo lugar quería observar si la recta patrón construida a partir de alguna de las pruebas tenía semejanza con la del patrón externo. Los resultados fueron los siguientes:

**Tabla 4. Resultados del estudio de las interferencias del medio de tioglicolato.**

[ $\mu\text{M}$ ]	Señal R.E.1	Señal R.E.2	Señal R.E.3	[ $\mu\text{M}$ ]	Señal RCK
0	1215	150,2	1327	80	390,3
10	1283	186,6	1323	60	316,0
20	1340	219,0	1323	40	251,9
30	1283	252,1	1319	24	203,0
40	1313	291,0	1365	12	162,6
50	1336	335,1	1297	0	126,5
60	1364	383,0	1257	recta	$y = 3,273x - 2,61$
70	1334	410,7	1356		
80	1337	490,4	1267		

R.E.1: recta patrón de la prueba 1; R.E.2: recta patrón de la prueba 2; R.E.3: recta patrón de la prueba 3; RCK: recta de calibración del kit.

Como puede observarse, los únicos patrones que cuyos resultados están incluidos en los valores de la recta de calibración del kit son los que siguieron la metodología usada hasta ahora. Debido a las interferencias, los valores de las muestras de 70 y 80  $\mu\text{M}$  sobrepasan los valores máximos de la recta patrón y fueron descartados. Aquellas muestras que no fueron diluidas con agua posteriormente al filtrado tienen una señal mucho mayor que las que si que fueron a pesar de que en un principio deberían tener la misma concentración de succinato. Eso es debido a las interferencias que produce el medio. Como en la segunda prueba se diluyeron los patrones filtrados 1:50 con agua Mili-Q, tanto la concentración de succinato como la de las interferencias disminuyen. De hecho si le restamos el blanco, el de 0 concentración de succinato, en cada una de ellas y construimos la recta de calibración se puede observar que son semejantes y además la concentración resultante es muy similar a la introducida. Aquí se puede observar las dos curvas, la del patrón externo y la de adición de patrón.



**Figura 13. Recta de calibración patrón externo y adición patrón de medio de tioglicolato.** RT: Recta de Tioglicolato; RC Kit: Recta de calibración del Kit.

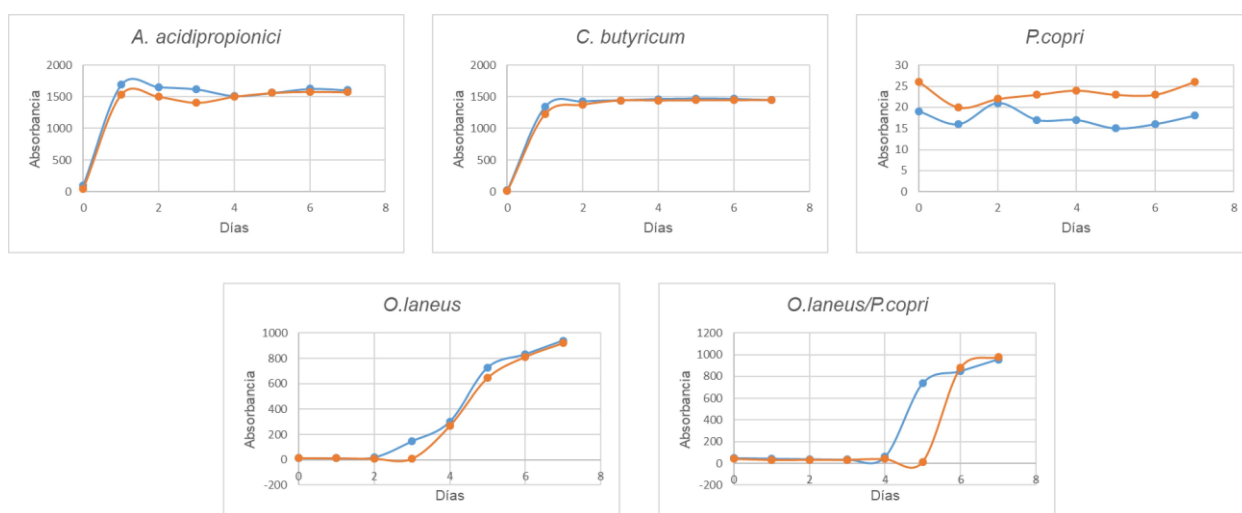
La recta de calibración de los patrones de tioglicolato se construyó hasta la concentración de  $60\mu\text{M}$ . La señal de  $70\mu\text{M}$  está fuera de la recta de calibración del kit por esa razón no se ha añadido. A pesar de que no son del todo paralelas, la

diferencia que hay entre ellas es negligible ya que el objetivo de este proyecto es observar cuales son consumidoras o productoras, y no es medir con precisión la cantidad de succinato producido o consumido por unidad de bacteria. Cabe añadir que la recta de calibración se debe construir sin tener en cuenta la concentración

### 2.3.2. Prueba experimental 3

En esta prueba se realizó en anaerobiosis y en medio reductor, en vez de añadir 30mL de medio de tioglicolato por falcon introdujimos 20mL. Para impedir la contaminación en la preparación de los medios, esta se realizó en la sala de cultivos en un ambiente estéril proporcionado por una campana de flujo laminar con filtro HEPA. Una vez estuvieron preparados se inoculó una muestra de cada cepa bacteriana en un tubo falcon por duplicado. El cocultivo por duplicado y se mantuvieron dos tubos control sin inculo bacteriano. El diseño experimental fue similar al de la prueba dos. Ver figura 9.

En esta prueba se amplió el tiempo de experimentación 3 días más. Se consideró la idea de alargar el tiempo de experimentación porque se observó que a partir del quinto día algunas de las bacterias de difícil crecimiento empezaban a proliferar. Los resultados del crecimiento diario fueron los siguientes. Ver figura 14.

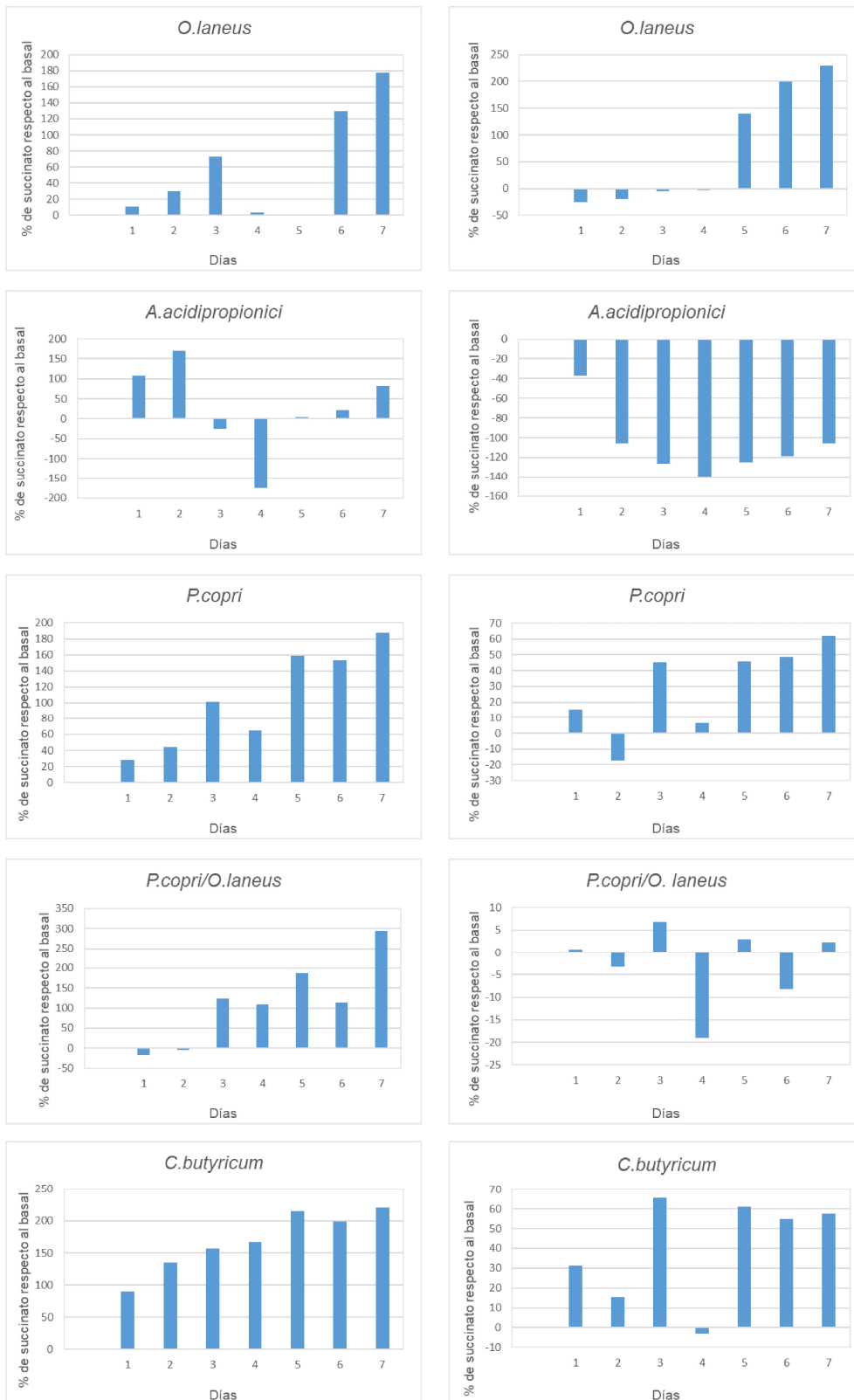


**Figura 14. Evolución del crecimiento bacteriano de las cepas estudiadas.**

En azul (---) crecimiento con succinato y en naranja (---) crecimiento bacteriano sin succinato.

Se puede observar que dos de nuestras bacterias control, *C.butyricum* y *A.acidipropionici*, tienen un crecimiento acelerado en el primer día para posteriormente estabilizarse. Cabe añadir que el factor succinato, en este caso, no parece influir en el crecimiento de ambos controles. En cuanto a *O.laneus*, a pesar de que su crecimiento es más lento que los controles, parece que a partir del séptimo día se estabiliza su crecimiento. En este caso tampoco afecta el factor succinato. La *P.copri* mantiene un crecimiento estable desde el primer día. En cuanto al cocultivo se puede observar que cambia el patrón de crecimiento con respecto al que presentan las bacterias por separado. Las bacterias que no aparecen representadas no han experimentado crecimiento alguno durante este intervalo de tiempo.

En cuanto a la fluorometría, esta vez la realizamos para todas las muestras, porque aunque no se viesen diferencias en el crecimiento de alguna de ellas cualitativamente se podía observar que algunas ( Figura 15).



**Figura 15. Evolución de los niveles de succinato en los 7 días estudiados.**

Columna de la izquierda muestra la concentración de succinato de los cultivos sin succinato añadido al medio. Las de la derecha contiene succinato añadido al medio.

Los gráficos representados en la imagen anterior representan la variación de succinato durante los 7 días de experimentación en comparación con el primer día. En primer lugar, comentaré las bacterias que nos sirvieron de control. *C.butyricum* en ambas condiciones nos produce succinato. El resultado de la muestra del día 4 del medio con succinato es discrepante, no concuerda con los resultados obtenidos el resto de días. En cuanto al *A.acidipropionici*, como era de esperar, consume el succinato del medio. El crecimiento es tan acelerado como la consumición de succinato del medio. En ambas bacterias los resultados obtenidos eran los esperados según la bibliografía<sup>9,29,30</sup>. Finalmente *P.copri* a pesar de que no se observan cambios en la absorbancia, si que objetivamos modificaciones en las concentraciones de succinato. En el medio sin succinato inicial hay un aumento en la concentración. En cambio en el medio con succinato los niveles oscilan, lo que podría sugerir tanto un consumo como una producción.

Del trio de bacterias que buscamos caracterizar, la única de la que podemos extraer algún dato es *O.laneus*. A partir del cuarto día muestra una proliferación, que precede al aumento de succinato en el medio. Cabe la posibilidad de que en un principio consuman succinato pero una vez se han adaptado al medio de cultivo, nuevo hábitat, empiece a utilizar como nutriente el resto de compuestos produciendo succinato.

Finalmente, los resultados del cocultivo sugieren una interacción entre bacterias que de algún modo afecta a su proliferación y a la producción de succinato. En ausencia de succinato se observa que la concentración de este aumenta, sin que podamos establecer cual de las dos especies es la responsable. Por el contrario, en presencia de succinato, las concentraciones oscilan sin poder descartar un consumo y una producción de este en el medio.

### **3. Técnicas utilizadas.**

#### **3.1. Identificación de las bacterias.**

Como ya se ha comentado en el apartado de material y métodos se utilizó un MALDI-ToF/MS. El ARNr -16s permite establecer las relaciones filogenéticas de las bacterias con una gran taxonomía dando lugar al sistema de clasificación vigente y

permitiendo la identificación rápida de las bacterias<sup>49</sup>. También en microbiología clínica se ha utilizado la identificación molecular basada en el ADNr-16s, fundamentalmente para bacterias cuya identificación por otras técnicas sea imposible, difícil o requiere mucho tiempo<sup>50</sup>. Pero su precio es elevado y no está a disposición de la mayoría de laboratorios clínicos. Dado que la biblioteca del MALDI-ToF/MS no disponía de espectros comparativos de 3 de las bacterias objeto de estudio, haber dispuesto de esta técnica hubiera permitido identificar todas de forma clara.

### **3.2. Determinación de succinato**

La determinación del succinato se realizó por fluorimetría por que es técnica sensible, específica y barata. Además en el laboratorio en el que realicé la investigación disponían de la instrumentación necesaria para realizarla. Hay más técnicas analíticas que también permiten la determinación del succinato como HPLC/MS (High Performance Liquid Chromatography/ Mass spectrometry), RMN <sup>1</sup>H (Resonancia Magnética Nuclear) y TLC (cromatografía de capa fina) entre otras. La técnica de cromatografía de capa fina fue utilizada en la década de los 80 para la determinación de ácido succínico en medios de fermentación con un coeficiente de variación del 3,2%<sup>51</sup>. Sin embargo este método actualmente está en desuso. Otra de las técnicas es el HPLC/MS<sup>52</sup>. Esta técnica nos permitiría determinar el succinato con fiabilidad pero con un coste muy elevado. Algo similar pasa con RMN <sup>1</sup>H<sup>53</sup>, la instrumentación y su mantenimiento tienen un coste muy elevado. Por esta razón era importante que el método fluorométrico utilizado fuese útil para la determinación de succinato en los medios de cultivo.

## Conclusions

- El método fluorométrico utilizado permite determinar las concentraciones de succinato en el medio de cultivo.
- Hemos podido confirmar que el *Acidipropionobacterium acidipropionici* es consumidor de succinato y que el *Clostridium butyricum* es productor.
- El estudio del *Odoribacter laneus* en medio de tioglicolato con succinato sugiere que es productor de succinato, pero las otras dos bacterias objeto de estudio, *Paraprevotella xylaniphila* y *Clostridium leptum*, no han podido ser caracterizadas.
- El comportamiento de las bacterias del cocultivo es diferente a cuando se cultivan por separado de forma aislada.

## Conclusions

- El mètode fluoromètric utilitzat permet determinar les concentracions de succinat en el medi de cultiu
- Hem pogut confirmar que *Acidipropionobacterium acidipropionici* és consumidor de succinat i que *Clostridium butyricum* és productor.
- L'estudi del *Odoribacter laneus* en medi de tioglicolat amb succinat suggereix que és productor de succinat, però les altres dos bacteris objecte d'estudi, *Paraprevotella xylaniphila* i *Clostridium leptum*, no han pogut ser caracteritzades.
- El comportamen dels bacteris del cocultiu és diferent a quan es conreen per separat de forma aïllada.

## Conclusions

- The fluorometric method used allows determining the concentrations of succinate in the culture medium.
- We were able to confirm that *Acidipropionobacterium acidipropionici* is a succinate consumer and that *Clostridium butyricum* is a succinate producer.
- *Odoribacter laneus* in the medium of thioglycollate with succinate seems to be a succinate producer, in contrast *Paraprevotella xylaniphila* and *Clostridium leptum* could not be characterized.
- The behavior of the bacteria growth is different when they are cocultivated than when they are grown separately in isolation.

## Referencias

1. Keiran N, Ceperuelo-Mallafré V, Calvo E, et al. SUCNR1 controls an anti-inflammatory program in macrophages to regulate the metabolic response to obesity. *Nat Immunol*. 2019;20(5):581-592. doi:10.1038/s41590-019-0372-7.
2. Serena C, Ceperuelo-Mallafré V, Keiran N, et al. Elevated circulating levels of succinate in human obesity are linked to specific gut microbiota. *ISME J*. 2018;12(7):1642-1657. doi:10.1038/s41396-018-0068-2.
3. World Health Organization. Geneva. Obesity and overweight. *Fact Sheets*. 2018. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Accessed May 25, 2019.
4. González-Muniesa P, Martínez-González M-A, Hu FB, et al. Obesity. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3(1):17034. doi:10.1038/nrdp.2017.34.
5. *Grupo de Estudio de La OMS Sobre Prevención Y Protección de La Diabetes Mellitus (1992 : Ginebra, Switzerland)*.
6. World Health Organization. Diabetes. *Fact Sheets*. 2018. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>. Accessed May 25, 2019.
7. Pédrón T, Nigro G, Sansonetti PJ. From homeostasis to pathology: decrypting microbe–host symbiotic signals in the intestinal crypt. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2016;371(1707):20150500. doi:10.1098/rstb.2015.0500.
8. Consortium THMP, Huttenhower C, Gevers D, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486(7402):207-214. doi:10.1038/nature11234.
9. Flint HJ, Scott KP, Duncan SH, Louis P, Forano E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes*. 2012;3(4):289-306. doi:10.4161/gmic.19897.
10. Kaoutari A El, Armougom F, Gordon JI, Raoult D, Henrissat B. The abundance

- and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(7):497-504. doi:10.1038/nrmicro3050.
11. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell.* 2014;157(1):121-141. doi:10.1016/j.cell.2014.03.011.
  12. Hooper L V, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science.* 2012;336(6086):1268-1273. doi:10.1126/science.1223490.
  13. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006;444(7122):1027-1031. doi:10.1038/nature05414.
  14. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature.* 2013;500(7464):541-546. doi:10.1038/nature12506.
  15. Lee CJ, Sears CL, Maruthur N. Gut microbiome and its role in obesity and insulin resistance. *Ann N Y Acad Sci.* 2019:nyas.14107. doi:10.1111/nyas.14107.
  16. Schwartz A, Taras D, Schäfer K, et al. Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity.* 2010;18(1):190-195. doi:10.1038/oby.2009.167.
  17. Marchesi JR, Adams DH, Fava F, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut.* 2016;65(2):330. doi:10.1136/GUTJNL-2015-309990.
  18. Tang WHW, Wang Z, Levison BS, et al. Intestinal Microbial Metabolism of Phosphatidylcholine and Cardiovascular Risk. *N Engl J Med.* 2013;368(17):1575-1584. doi:10.1056/NEJMoa1109400.
  19. Heianza Y, Sun D, Smith SR, Bray GA, Sacks FM, Qi L. Changes in Gut Microbiota-Related Metabolites and Long-term Successful Weight Loss in Response to Weight-Loss Diets: The POUNDS Lost Trial. *Diabetes Care.* 2018;41(3):413-419. doi:10.2337/dc17-2108.

20. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022-1023. doi:10.1038/4441022a.
21. Qin J, Li Y, Cai Z, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012;490(7418):55-60. doi:10.1038/nature11450.
22. Tretter L, Patocs A, Chinopoulos C. Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2016;1857(8):1086-1101. doi:10.1016/J.BBABIO.2016.03.012.
23. Connors J, Dawe N, Van Limbergen J. The Role of Succinate in the Regulation of Intestinal Inflammation. *Nutrients*. 2018;11(1). doi:10.3390/nu11010025.
24. Mills E, O'Neill LAJ. Succinate: a metabolic signal in inflammation. *Trends Cell Biol*. 2014;24(5):313-320. doi:10.1016/j.tcb.2013.11.008.
25. Wang H, Zhang H, Yao L, et al. Serum metabolic profiling of type 2 diabetes mellitus in Chinese adults using an untargeted GC/TOFMS. *Clin Chim Acta*. 2018;477:39-47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29197503>. Accessed February 13, 2018.
26. McCreath KJ, Espada S, Gálvez BG, et al. Targeted disruption of the SUCNR1 metabolic receptor leads to dichotomous effects on obesity. *Diabetes*. 2015;64(4):1154-1167. doi:10.2337/db14-0346.
27. Regard JB, Sato IT, Coughlin SR. Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression. *Cell*. 2008;135(3):561-571. doi:10.1016/j.cell.2008.08.040.
28. Canfora EE, Meex RCR, Venema K, Blaak EE. Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(5):261-273. doi:10.1038/s41574-019-0156-z.
29. Reichardt N, Duncan SH, Young P, et al. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *ISME J*. 2014;8(6):1323-1335. doi:10.1038/ismej.2014.14.

30. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol.* 2017;19(1):29-41. doi:10.1111/1462-2920.13589.
31. Ferreyra JA, Wu KJ, Hryckowian AJ, Bouley DM, Weimer BC, Sonnenburg JL. Gut Microbiota-Produced Succinate Promotes *C. difficile* Infection after Antibiotic Treatment or Motility Disturbance. *Cell Host Microbe.* 2014;16(6):770-777. doi:10.1016/j.chom.2014.11.003.
32. Nagai F, Morotomi M, Watanabe Y, Sakon H, Tanaka R. *Alistipes indistinctus* sp. nov. and *Odoribacter laneus* sp. nov., common members of the human intestinal microbiota isolated from faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60(6):1296-1302. doi:10.1099/ijs.0.014571-0.
33. Morotomi M, Nagai F, Sakon H, Tanaka R. *Paraprevotella clara* gen. nov., sp. nov. and *Paraprevotella xylaniphila* sp. nov., members of the family "Prevotellaceae" isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2009;59(8):1895-1900. doi:10.1099/ijs.0.008169-0.
34. Watanabe Y, Nagai F, Morotomi M. Characterization of *Phascolarctobacterium succinatutens* sp. nov., an asaccharolytic, succinate-utilizing bacterium isolated from human feces. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(2):511-518. doi:10.1128/AEM.06035-11.
35. Karlsson FH, Fåk F, Nookaew I, et al. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun.* 2012;3:1245. doi:10.1038/ncomms2266.
36. Tang WHW, Kitai T, Hazen SL. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res.* 2017;120(7):1183-1196. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.309715.
37. Louis S, Tappu R-M, Damms-Machado A, Huson DH, Bischoff SC. Characterization of the Gut Microbial Community of Obese Patients Following a Weight-Loss Intervention Using Whole Metagenome Shotgun Sequencing. *PLoS One.* 2016;11(2):e0149564. doi:10.1371/journal.pone.0149564.

38. Chakraborti CK. New-found link between microbiota and obesity. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2015;6(4):110. doi:10.4291/WJGP.V6.I4.110.
39. Limoncu ME, Balcioglu IC, Yereli K, Ozbel Y OA. A new experimental in vitro culture medium for cultivation of Leishmania species. *J Clin Microbiol.* 1997;(35):2430-2431.
40. Sambrook J, Fritsch EF MT. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.; 1989.
41. Dalgaard P, Ross T, Kamperman L, Neumeyer K, McMeekin TA. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *Int J Food Microbiol.* 1994;23(3-4):391-404.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7873339>. Accessed June 4, 2019.
42. Begot C, Desnier I, Daudin JD, Labadie JC, Lebert A. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *J Microbiol Methods.* 1996;25(3):225-232. doi:10.1016/0167-7012(95)00090-9.
43. Presser KA, Ross T, Ratkowsky DA. Modelling the growth limits (growth/no growth interface) of Escherichia coli as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(5):1773-1779. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9572950>. Accessed June 4, 2019.
44. Giorgi-Coll S, Amaral AI, Hutchinson PJA, Kotter MR, Carpenter KLH. Succinate supplementation improves metabolic performance of mixed glial cell cultures with mitochondrial dysfunction. *Sci Rep.* 2017;7(1):1003. doi:10.1038/s41598-017-01149-w.
45. Cole JL, Lary JW, P. Moody T, Laue TM. Analytical Ultracentrifugation: Sedimentation Velocity and Sedimentation Equilibrium. *Methods Cell Biol.* 2008;84:143-179. doi:10.1016/S0091-679X(07)84006-4.
46. Lu S, Eiteman MA, Altman E. Effect of CO<sub>2</sub> on succinate production in dual-phase Escherichia coli fermentations. *J Biotechnol.* 2009;143(3):213-223. doi:10.1016/J.JBIOTECH.2009.07.012.

47. Lagier J-C, Armougom F, Million M, et al. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(12):1185-1193. doi:10.1111/1469-0691.12023.
48. Chandler L. Challenges in Clinical Microbiology Testing. In: *Accurate Results in the Clinical Laboratory.* Elsevier; 2013:315-326. doi:10.1016/B978-0-12-415783-5.00020-7.
49. De Carolis E, Vella A, Vaccaro L, et al. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8(9):1081-1088. doi:10.3855/jidc.3623.
50. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. M del R, Mendoza M del C. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica.* Doyma; 1983. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-identificacion-bacteriana-mediante-secuenciacion-del-13059055>. Accessed June 6, 2019.
51. Sočič H, Gaberc-Porekar V. Micromethod for the quantitative determination of succinic acid in the fermentation media. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.* 1980;9(1):53-58. doi:10.1007/BF00500002.
52. Wilson ID, Plumb R, Granger J, Major H, Williams R, Lenz EM. HPLC-MS-based methods for the study of metabonomics. *J Chromatogr B.* 2005;817(1):67-76. doi:10.1016/J.JCHROMB.2004.07.045.
53. Williams RE, Lenz EM, Evans JA, et al. A combined <sup>1</sup>H NMR and HPLC-MS-based metabonomic study of urine from obese (fa/fa) Zucker and normal Wistar-derived rats. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;38(3):465-471. doi:10.1016/J.JPBA.2005.01.013.

## Anexos

## **Anexo 1.**

### **Descripción de las Técnicas Utilizadas**

Durante el estudio se han utilizado tres técnicas analíticas: el MALDI-ToF/MS, la Turbidimetría y la Fluorimetría.

#### **3.1. MALDI-ToF/MS**

Matrix-assisted laser desorption ionization time of fly mass spectrometry es una técnica de análisis cualitativo que permite la determinación de la estructura de compuestos orgánicos<sup>1</sup>.

La espectrometría de masas es una técnica de análisis cualitativo que ha sido utilizada durante décadas en química. Permite la determinación de la estructura de compuestos orgánicos. En 1975 Anhalt y Fenselau sugirieron el uso de esta herramienta para la identificación bacteriana porque al estudiarlas se observaban diferencias en los espectros según su pertenencia a un género o familia<sup>2</sup>.

MALDI-ToF/MS fue utilizada por primera vez en 1996 para la obtención de espectros de masa de bacterias. La ionización MALDI es una técnica de ionización suave que permite la ionización y vaporización de polímeros y biopolímeros de alto peso molecular con una mínima fragmentación. Los iones generados, en su mayoría, son iones de carga única ( $z=1$ ) que permiten que el ratio de masa y carga ( $m/z$ ) del analito corresponda a su peso molecular.

Este instrumento está compuesto por tres unidades principales. En primer lugar, la fuente de iones, que realiza la ionización y transfiere los iones de la muestra a una fase gas. La segunda, el analizador de masas (ToF), que permite la separación de los iones por su  $m/z$ . En tercer y último lugar un dispositivo de detección que monitoriza los iones separados<sup>3</sup>.

Las muestras se mezclan con la matriz de carácter orgánico preparada a partir de pequeñas moléculas ácidas que poseen una gran absorción óptica en la longitud de onda aplicada por el láser. Para realizar el análisis la muestra se tiene que cristalizar. Una vez introducida la muestra en el instrumento se realiza la ionización. La muestra absorbe la energía incidida produciendo la

desorción y la ionización de los analitos en fase gas. Los iones son acelerados mediante un campo electrostático (20kV) y atraviesan un tubo de vacío hasta llegar al detector. Los iones de menor tamaño viajan más rápido que los mayor tamaño. Entonces, el tiempo de vuelo que necesiten para atravesar el tubo de vacío determinará la  $m/z$  de cada uno de los iones acelerados. Como resultado final se obtiene un espectro de la muestra analizada.

La técnica MALDI-ToF en este trabajo nos permitió la identificación de las bacterias estudiadas. Este instrumento realiza la caracterización de bacterias mediante el estudio de las proteínas ribosomales pertenecientes a cada una de ellas. Estas proteínas son idóneas para realizar la identificación debido a su abundancia, basicidad y hidrofobidad, características que permiten obtener una ionización eficiente.

Para la identificación de las bacterias es necesario tener una biblioteca de datos espectrales amplia con la que comparar, ya que esta técnica realiza la identificación mediante la comparación del espectro obtenido con los de la biblioteca. Una de las limitaciones de esta técnica es la dependencia a la riqueza de espectros y actualización de la biblioteca.

### 3.2. Turbidimetría

La turbidimetría es una técnica que mide la diferencia de intensidad de luz resultante al atravesar una solución con partículas en suspensión. Pertenece al grupo de las técnicas ópticas<sup>4</sup>. Estas técnicas se basan en medir la interacción de la luz sobre la muestra. La luz al atravesar la muestra puede dar lugar a diferentes fenómenos de absorción, fluorescencia y dispersión. La medición de la turbidez se empezó a utilizar para la evaluación de la calidad del agua. Los primeros turbidímetros se desarrollaron en la década de los 60s del siglo pasado. Con el paso del tiempo la tecnología ha ido evolucionando hasta obtener los turbidímetros actuales que son capaces de compensar o eliminar las interferencias generadas por el medio.

La técnica se fundamenta en la relación de la intensidad de la luz incidente y de la luz dispersada por el medio mediante la ley de Lambert-Beer, en donde

la turbidez es proporcional a la concentración de partículas presentes en la solución. Se emite un haz de radiación monocromática con una intensidad inicial sobre la muestra posicionada de forma perpendicular y se detecta la intensidad del haz de luz que ha atravesado la muestra. Ecuación de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot L$$

En mi caso, utilizaré un espectrofotómetro para realizar el análisis del crecimiento bacteriano de los cultivos experimentales mediante la turbidimetría<sup>5,6</sup>. En este caso no se aplicará la ecuación de Lambert-Beer para medir la concentración porque la información que buscamos es observar como progresa el crecimiento bacteriano conforme avanzan los días.

### 3.3. Fluorimetría

La fluorometría es una técnica espectroscópica que se basa en la medición de las emisiones fluorescentes. Pertenece al grupo de técnicas espectroscópicas luminiscentes donde también están la fosforescencia y la quimioluminiscencia.

La Fluorimetría se caracteriza por su gran sensibilidad, especificidad, simpleza y bajo coste en comparación con otro tipo de técnicas cualitativas y cuantitativas<sup>7</sup>. Es una técnica que ha sido utilizada en diferentes campos de la ciencia. La emisión fluorescente medida se produce en el fenómeno de relajación de los electrones que previamente habían sido excitados. La excitación se realiza incidiendo sobre el analito una luz UV o visible. Al absorber la energía incidente se produce una transición de los electrones de mínima energía a un nivel de energía más elevado. En este estado excitado la molécula no es estable, y al relajarse emite energía en forma de UV o visible volviendo al estado de mínima energía<sup>7</sup>.

En la investigación realizada se utiliza la fluorimetría para determinar la concentración de succinato presente en el medio de cultivo. Se tuvo en cuenta que los análisis se realizasen a una misma temperatura. Para la cuantificación de succinato se utilizó un kit de succinato. Este kit convierte mediante una serie de reactivos el succinato en piruvato, seguidamente un reactivo colorante tiñe

el piruvato. Se incuba durante media hora en oscuridad y a temperatura ambiente. La fluorometría se realiza a 530/585nm. La longitud de onda de excitación es de 530nm y la longitud de onda detectada es de 585nm. Las longitudes de onda seleccionadas son las recomendadas por la marca.

## Bibliografía

1. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(3):547-603. doi:10.1128/CMR.00072-12.
2. De Carolis E, Vella A, Vaccaro L, et al. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *J Infect Dev Ctries.* 2014;8(9):1081-1088. doi:10.3855/jidc.3623.
3. Greco V, Piras C, Pieroni L, et al. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical proteomics. *Expert Rev Proteomics.* 2018;15(8):683-696. doi:10.1080/14789450.2018.1505510.
4. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (Cuba) DH-GAT. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas.* Centro Nacional de Investigaciones Científicas; 1986. <https://www.redalyc.org/html/1812/181226886003/>. Accessed June 6, 2019.
5. Dalgaard P, Ross T, Kamperman L, Neumeyer K, McMeekin TA. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *Int J Food Microbiol.* 1994;23(3-4):391-404. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7873339>. Accessed June 4, 2019.
6. Begot C, Desnier I, Daudin JD, Labadie JC, Lebert A. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *J Microbiol Methods.* 1996;25(3):225-232. doi:10.1016/0167-7012(95)00090-9.
7. Krichevsky O, Bonnet G. Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. *Reports Prog Phys.* 2002;65(2):251-297. doi:10.1088/0034-4885/65/2/203.