

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE
CITOMETRÍA DE FLUJO AL CONTROL
DE UN CULTIVO INICIADOR DE
Lactobacillus casei EN LA INDUSTRIA
LÁCTEA”**

PROYECTO FIN DE MASTER

POR

CLAUDIA CAMPOS LISTE

JULIO, 2012



AGRADECIMIENTOS

Grandes retos como este proyecto siempre son un desafío y sirven para crecer profesional y personalmente. Es difícil plasmar en unas líneas la gratitud por el apoyo recibido en estos meses de duro trabajo sin olvidarse de mencionar a alguien, pero me gustaría agradecer especialmente a una serie de personas:

A mi familia y seres queridos, que aunque a veces es complicado explicarles a que me dedico y porqué lo hago, siempre me apoyan en mis decisiones y creen en mí.

A mis compañeros del máster, por ser tan grandes, por los buenos y malos momentos vividos a lo largo del curso, por ser un equipo a pesar de provenir de disciplinas y lugares tan diferentes.

A mi tutora Mónica, por volcarse en transmitirme la importancia del trabajo ordenado y recibirme siempre con una sonrisa, además de leer pacientemente este manuscrito.

Al departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, por permitirme usar sus instalaciones sin restricciones y a todos los compañeros del laboratorio por interesarse en mis progresos a lo largo de esta corta, pero intensa aventura.

A todos aquellos profesores y profesionales del sector que me han transmitido su sabiduría a lo largo de estos años y me han permitido trabajar en sus instalaciones (y los que vendrán) un pedacito de cada uno de ellos ha servido para formarme como profesional y sobre todo como persona.

A Ana Salas y Magdalena Choda del Área de Citometría, Servicio Científico-Técnico, Universidad de Oviedo; por su enorme paciencia conmigo y ayudarme en esta introducción a la citometría de flujo, sin ellas esta empresa no habría llegado a buen puerto.

Quizá alguien se me escape, pero sé que sabrá disculparme por no mencionarlo, gracias a todos ellos.

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

RESUMEN

El empleo de la tecnología de los cultivos iniciadores es muy importante en la industria láctea. Se debe por tanto asegurar que el desarrollo del fermento se realice en las mejores condiciones y que, en el momento de su inoculación en el fermentador presente unas condiciones óptimas de actividad metabólica. Para que los procesos fermentativos se desarrollen satisfactoriamente es interesante estudiar previamente la viabilidad del cultivo iniciador y analizar cómo evolucionan sus distintos estados fisiológicos, con el fin de poder determinar el momento más adecuado para inocular.

Está documentada la existencia de distintos estados fisiológicos en una población bacteriana, que pueden variar con el tiempo, de manera que en un cultivo puro de microorganismos existe heterogeneidad, con un porcentaje de la población que tiene actividad metabólica pero no capacidad de crecimiento reproductivo. Los métodos clásicos suponen una infraestimación del contenido de microorganismos metabólicamente activos. Sin embargo, estos estudios de viabilidad se siguen realizando hoy día por métodos tradicionales, basándose en la capacidad o no de formar colonias en medio de cultivo sintético o en el aumento de la medida de turbidez en medio líquido. Las técnicas clásicas tienen la desventaja de que la obtención de resultados se prolonga en el tiempo y presentan limitaciones en cuanto a sensibilidad y representatividad.

La industria alimentaria precisa soluciones rápidas, robustas y de alta sensibilidad para determinar la viabilidad microbiana, que permitan hacer un seguimiento rápido de los procesos de desarrollo de los cultivos iniciadores y de la fermentación, teniendo la posibilidad de modificar las condiciones en el curso del proceso, para actuar sobre problemas de bajos rendimientos o paradas fermentativas. Esto permitiría optimizar las condiciones y aumentar el rendimiento del proceso productivo.

La citometría de flujo se perfila como una técnica emergente de largo alcance para el estudio de los estados fisiológicos presentes en poblaciones microbianas. Permite realizar un monitoreo rápido de los estados individuales de los microorganismos durante las fermentaciones. Al analizar un alto número de eventos en cada análisis en tiempos cortos, la representatividad de la muestra es muy alta. El proceso de preparación de las muestras es rápido y requiere pequeños volúmenes. Por ello en este trabajo se plantea su aplicación para el control y la optimización del desarrollo de un cultivo iniciador típico de

RESUMEN

la industria láctea, evitando laboriosos pre-tratamientos de las muestras que podrían alterar los resultados obtenidos.

ABSTRACT

ABSTRACT

The use of starter cultures in the food industry is widespread. For fermentation processes take their course successfully a previous study of the viability of the microorganisms to be used is interesting in order to be in optimum metabolic conditions, ensuring the process will run its course while the environmental conditions are kept appropriate. However, viability studies are often performed by traditional microbiological methods, based on the ability or not to form colonies in semi-synthetic culture medium or by measuring their turbidity in liquid medium. It is well documented the existence of different physiological states, in a heterogeneous microbial population. In microbial cultures, a percentage of the population shows metabolic activity but is not capable of division and therefore cannot form colonies, so that the classical methods imply an underestimation of the content of metabolically active microorganisms. Moreover, these conventional techniques have the great disadvantage that the outcome is markedly prolonged in time and have many limitations in sensitivity and representativeness. The food industry requires quick, robust and high sensitivity for studies of microbial viability having the ability to modify the conditions in a timely manner if necessary, avoiding malfunction problems in bioprocesses or stop or sluggish fermentations that would have worked in good conditions and can increase the performance of the production process.

Flow cytometry, with increasing popularity in recent years, is emerging as a high throughput technique to study the physiological states present in a microbial population. It allows rapid monitoring of individual metabolic states during microbial fermentations. By analyzing a high number of events in each sample, the representativeness is very high and time analysis is low. The preparation of samples for flow cytometry is not laborious, and does not require a large volume of sample for analysis. Therefore, this study presents its application for monitoring and optimizing the development of a starter culture of the dairy industry, avoiding tedious pre-treatments of samples that could alter the results.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	9
OBJETIVOS	13
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS.....	14
2.1. Bacterias ácido lácticas: características generales.....	15
2.1.1.El género <i>Lactobacillus sp.</i>	16
2.1.2. <i>Lb. casei</i>	16
2.2.Empleo de cultivos iniciadores en la industria láctea	17
2.3.Estudio de la viabilidad en cultivos bacterianos	18
2.4.Control <i>at-line</i> de bioprocesos	23
2.5.Fundamentos citometría de flujo	25
2.5.1. Fluorescencia	27
2.5.2 Fluorocromos para citometría de flujo	30
2.5.3. Separación celular.....	32
3. METODOLOGÍA UTILIZADA	34
3.1. MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	35
3.1.1. Condiciones de fermentación	35
3.1.2. Determinación de la absorbancia en medio líquido.....	35
3.1.3. Toma de muestras.....	36
3.2. DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE CITOMETRÍA DE FLUJO	36
3.2.1 Protocolo de tinción de las muestras para citometría de flujo.....	36
3.2.2. Preparación de las muestras control para los protocolos de tinción dual	38
3.2.3. Condiciones de adquisición de los datos	39
3.2.4. Análisis de los datos	40
3.2.5. Análisis por FACS (separación celular activada por fluorescencia)	41
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.1. UTILIZACIÓN DE LOS CONTROLES	44
4.2. Separación celular activada por fluorescencia (FACS)	70
4.3. Microscopía	74
4.4. Proceso fermentativo	74
4.4.1. Estados fisiológicos a lo largo del proceso fermentativo	77

4.4.2. Identificación de las distintas subpoblaciones durante el proceso.....	78
4.4.3. Evolución de las distintas subpoblaciones durante el proceso.....	88
5. CONCLUSIONES.....	92
6. BIBLIOGRAFÍA.....	93
7. ANEXOS	102
7.1.LISTA DE FIGURAS.....	104
7.2.LISTA DE TABLAS	107

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La industria de alimentos y bebidas es una de las más importantes dentro del sector alimentario. Con el 16,38% del total de la producción industrial, es el primer sector de la industria manufacturera en España. Supuso en el año 2010 una producción bruta de 81.369 millones de euros, ocupando el quinto puesto por ventas en la Unión Europea y el segundo en cuanto a creación de empleo.

Dentro del sector lácteo español hay unas 1.695 empresas, de las cuales sólo 6 transforman el 47,6% del total de la producción, por lo que este sector está muy centralizado en grandes empresas. Dentro de este sector operan algunas de las mayores firmas del sector alimentario español y tras el sector cárnico es el de mayor producción del país (fuente: Federación Española de Industrias de Alimentos y Bebidas; FIAB).

El consumo de lácteos por persona y año se sitúa en casi 40 kg, los alimentos lácteos tienen un peso importante en la dieta actual. El consumo de bebidas lácteas fermentadas ha aumentado significativamente en los últimos años, se estima un consumo de este tipo de bebidas superior a 2 kg por habitante al año (fuente: Federación Española de Industrias Lácteas, FENIL)

El empleo de microorganismos como agentes transformadores de la materia prima convierte al producto final en un producto de valor añadido respecto a la materia de partida. La tecnología de los cultivos iniciadores se basa en la aplicación de fermentos constituidos por microorganismos conocidos, lo que supone un avance frente al uso tradicional de la microbiota presente originalmente en el alimento, a modo de fermentación espontánea, ya que de esta manera el proceso fermentativo es controlado y se obtienen producciones estables y uniformes. Así llega a los consumidores un producto de composición constante y de calidad a lo largo del año. En los procesos de fermentación industrial se utilizan cepas de microorganismos conocidos, que deben dar un buen rendimiento y aportar características organolépticas deseables al alimento. En ocasiones los fermentos industriales están formados por una sola cepa o especie, pero también se comercializan cultivos mixtos. Dentro de los fermentos empleados en las fermentaciones alimentarias, el grupo de las bacterias lácticas es uno de los más empleados y comercializados a nivel industrial.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son un grupo heterogéneo de microorganismos no relacionados taxonómicamente entre sí pero que se agrupan al ser frecuentes en alimentos lácteos y que tienen en común la formación de ácido láctico como principal componente, resultado de su metabolismo fermentativo. Dentro de este grupo, el género *Lactobacillus sp.* es de uso frecuente en la fabricación de derivados lácteos, pero también en cárnicos y vegetales fermentados.

El monitoreo del bioproceso a lo largo del transcurso de la fermentación es fundamental, de tal forma que permite corregir problemas por paradas fermentativas o baja velocidad de la fermentación. Una mayor información y un mejor conocimiento del curso del proceso permitirían corregir los problemas por incorrecta mezcla, agotamiento de sustrato, etc. que pueden llegar a ocasionar importantes pérdidas económicas y hacen que la producción no sea homogénea en cuanto a su calidad. El estudio de la viabilidad de los fermentos antes de iniciar el proceso fermentativo a escala industrial es muy importante, ya que en ocasiones éstos se inoculan o se almacenan en condiciones no adecuadas que afectan a su estado metabólico. El control de los estados fisiológicos de los cultivos iniciadores en los procesos de fermentación industrial puede suponer una mejora en el proceso fermentativo reduciendo considerablemente la fase de aclimatación al medio y mejorando el rendimiento del proceso.

Los métodos microbiológicos clásicos se basan en el crecimiento de los microorganismos en medios de cultivo semi-sintéticos, que aportan las necesidades nutritivas para su crecimiento, con condiciones de aireación y temperatura óptimas para su pleno desarrollo. Tradicionalmente se entendía que una célula estaba viva cuando era capaz de multiplicarse en las condiciones adecuadas tras un cierto periodo de incubación y ocasionar turbidez en el medio o formar colonias en medio de cultivo sólido. Las técnicas basadas en formación de colonias en medio sintético son tediosas, limitantes, y la obtención de resultados se prolonga mucho en el tiempo, pudiendo llegar a extenderse varios días, lo que impide o dificulta la toma de decisiones en el curso del proceso industrial.

Las nuevas tecnologías que permiten actualmente el estudio de las poblaciones microbianas a nivel de célula individual han demostrado que existen estados fisiológicos intermedios, más allá de la visión simplista tradicional de la ley del todo o nada (si una célula no es capaz de reproducirse, está muerta) y que hay un porcentaje de

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

la población, que en ocasiones puede ser mayoritario, que no es capaz de multiplicarse y formar colonias, pero que sin embargo tiene capacidad metabólica y puede intervenir en los procesos fermentativos. La citometría de flujo es un sistema de detección automatizado, que permite analizar un alto número de eventos (células) en un tiempo muy breve, lo cual hace que la medida sea altamente representativa frente a otras técnicas ópticas basadas en tinción con colorantes donde llegar a tal volumen de células supondría horas de trabajo. Además, en estas últimas, es el usuario el que ha de identificar las células y su estado fisiológico, lo que implica alta variabilidad en la medida dependiendo del manipulador.

La combinación de la citometría de flujo con la utilización de fluorocromos permite realizar un análisis multiparamétrico de las muestras. Esta técnica permite monitorizar en tiempo casi real y con alto grado de representatividad los estados fisiológicos individuales de las células durante las fermentaciones microbianas, permitiendo hacer una clasificación funcional de las células basada en su actividad metabólica, la integridad de la membrana u otros parámetros celulares.

La bibliografía científica que ha estudiado fermentaciones lácteas por citometría de flujo, que aún es escasa, o bien los trabajos que abordan el recuento de bacterias en leche, recomiendan un pre-tratamiento de clarificación antes del análisis. Se han descrito pasos previos de clarificación de la leche antes de la tinción de las muestras con ácidos diluidos, soluciones comerciales clarificadoras constituidas por detergentes para reducir las partículas de la leche (Bunthof y col. 2002) o tratamientos con enzimas como la savinasa y la proteinasa k para evitar los glóbulos de grasa y proteínas (Gunasekera y col. 1999). Este tipo de tratamientos lisa las células somáticas y provocan la floculación de las micelas de grasa de la leche, pero también pueden dañar a las células de interés, de manera que el estudio de la viabilidad celular y de los estados fisiológicos de la población se puede ver afectado por la realización de la clarificación de la leche. En este trabajo se propone la optimización de un protocolo de citometría de flujo para estudiar los distintos estados fisiológicos durante el desarrollo de un cultivo iniciador en leche durante el transcurso de la fermentación, que nos permita analizar la heterogeneidad de la población y determinar el momento óptimo para inocular el fermentador, evitando realizar pre-tratamientos laboriosos de las muestras que además pudieran afectar sus estados fisiológicos, alterando los resultados obtenidos.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Además, se plantea en este trabajo la aplicación de la técnica de separación celular activada por fluorescencia (FACS), para recuperar las células con las propiedades deseadas. La separación física de las distintas subpoblaciones permitirá verificar sus patrones de tinción y la idoneidad del protocolo desarrollado.

Considerando los aspectos anteriores, en este trabajo se plantean los siguientes

OBJETIVOS

1. Poner a punto un protocolo de citometría de flujo para cultivos de *Lactobacillus casei* crecidos en medio semi-sintético, en el modo de análisis, por tinción dual con las combinaciones de fluorocromos de interés: carboxifluoresceína (CFDA), yoduro de propidio (IP) y BOX (Bis-Oxonol)
2. Verificar la adecuación de la tinción sobre muestras sin pre-tratamiento de clarificación, de cultivos crecidos en leche durante el transcurso de la fermentación ácido-láctica y su correcto análisis por citometría de flujo, utilizando los mismos colorantes seleccionados.
3. Utilizar la técnica de FACS para separar físicamente las distintas subpoblaciones del cultivo iniciador y verificar el patrón de tinción de las células.
4. Estudiar la heterogeneidad de los diversos estados fisiológicos durante el desarrollo de cultivos de *Lb. casei* en leche, a lo largo del proceso de fermentación, para identificar el momento más adecuado para su inoculación en el fermentador en base a su actividad metabólica.

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2.1. Bacterias ácido lácticas: características generales

Entre los microorganismos utilizados en la industria alimentaria como herramienta biotecnológica, destaca el grupo de las bacterias lácticas (BAL). Las bacterias del ácido láctico forman un grupo muy heterogéneo de microorganismos que comprende varios géneros, aunque taxonómicamente no sean similares entre sí. Tienen en común la formación de ácido láctico como producto final de su metabolismo y generalmente tienen complejos requerimientos nutricionales ya que carecen de muchas capacidades biosintéticas; por ello son generalmente abundantes sólo en las comunidades donde estos requisitos puedan ser proporcionados como vegetales, carne, leche y materia en descomposición. Se encuentran asimismo en la cavidad oral y el tracto intestinal de mamíferos y algunas especies forman parte de la microbiota vaginal habitual.

Las bacterias ácido lácticas son bacterias Gram positivas, inmóviles y no esporuladas, que dan lugar a ácido láctico como principal (heterofermentativas) o único producto de su metabolismo fermentativo (homofermentativas). Estos dos procesos se diferencian principalmente porque el primer grupo tiene un solo tipo de producto fermentativo, el ácido láctico, mientras que el segundo grupo da otros productos como etanol y CO₂. Su metabolismo se lleva a cabo en una atmósfera microaerofílica, aunque son aerotolerantes (pueden crecer en presencia de O₂ a pesar de que no pueden utilizarlo como aceptor final de electrones)

En los productos lácteos, estas bacterias desencadenan un proceso por el cual transforma la lactosa en ácido láctico. A medida que el ácido se acumula, la estructura de las proteínas de la leche va modificándose (van cuajando), y lo mismo ocurre con la textura del producto. Dependiendo del tipo de BAL y de otras variables tecnológicas, como la temperatura del proceso, la composición de la leche, aditivos etc. varían las cualidades particulares de los distintos productos resultantes.

El ácido láctico que se forma en este proceso fermentativo es un fuerte esterilizador, inhibe el desarrollo de microorganismos patógenos, proporciona al alimento fermentado unas características organolépticas concretas y lo convierte en un alimento de valor añadido con respecto a la materia prima de partida.

CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2.1.1. El género *Lactobacillus sp.*

Normalmente, los miembros del género *Lactobacillus sp.* resisten mejor las condiciones de acidez que las restantes bacterias del ácido láctico: son resistentes a pH cercanos a 4,0 – 3,6; esta propiedad les permite seguir creciendo durante las fermentaciones lácticas naturales, cuando el pH ha disminuido tanto que otras BAL no pueden crecer. Por consiguiente, los lactobacilos pueden llevar a cabo las últimas fases de la mayoría de las fermentaciones ácido lácticas.

2.1.2. *Lb. casei*

Lb. casei es una especie heterofermentativa facultativa, que en general se comporta como homofermentativa. Es habitualmente la especie dominante de bacterias ácido lácticas presentes en la maduración de algunos tipos de queso manera natural y se emplea como fermento en numerosas fermentaciones alimentarias de diversa índole (cárnicos, lácteos, vegetales, etc.)

Las bacterias lácticas son útiles en la Industria alimentaria, no sólo por su habilidad para acidificar y conservar los alimentos del deterioro, sino por su contribución a las propiedades organolépticas de los productos fermentados.

Además del beneficio tecnológico, las bacterias pueden tener propiedades beneficiosas para la salud, actuando como probióticos de la flora intestinal. Los probióticos son aquellos microorganismos vivos que, al ser agregados como suplemento en la dieta, afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino (Wohlgemuth y col. 2010) Para ser considerados como tal, deben ser capaces de sobrevivir al paso por el tracto digestivo y ser capaces de proliferar en el intestino (Bertazzoni Minelli y col. 2004, Maragkoudakis y col. 2006). Por ello se añaden este tipo de cepas a alimentos de base láctea, ya que, por ejemplo, los fermentos que se emplean en la elaboración de los yogures no sobreviven el paso por el tracto digestivo ni colonizan el intestino y no pueden proveer ningún beneficio para la salud. Algunas cepas de *Lb. casei* se añaden a leches fermentadas comerciales debido a su papel como microorganismos probióticos.

Otra de las aplicaciones de *Lb. casei* es su empleo como fermento para la revalorización de subproductos lácteos, como es el caso del suero lácteo. Este subproducto se genera durante la elaboración artesanal e industrial del queso y

CONSIDERACIONES TEÓRICAS

representa entre el 85-95% del volumen de la leche. Se producen aproximadamente 145 millones de toneladas de suero lácteo al año; esto supone un importante problema medioambiental, ya que al ser rico en nutrientes, presenta elevados valores de DBO y DQO y es preciso su adecuado procesamiento en Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) lo que encarece el tratamiento del residuo. El ácido láctico obtenido de la fermentación del lactosuero puede emplearse como conservante alimentario (Serna Cock y col. 2005, Panesar y col. 2007), permitiendo reducir la producción de este tipo de residuos de alta carga contaminante y reutilizándolo con fines alimentarios.

2.2. Empleo de cultivos iniciadores en la industria láctea

En la elaboración de numerosos alimentos fermentados se emplean cultivos iniciadores o *starters*. Su función principal es la de fermentar la lactosa, transformándola en ácido láctico, lo cual baja el pH y modifica las proteínas de la leche haciendo coagular la caseína. Los aminoácidos presentes en la leche no son suficientes para favorecer el crecimiento hasta una biomasa elevada y por ello las caseínas de la leche se convierten en la primera fuente de nitrógeno proteico al agotarse el nitrógeno no proteico en el ambiente.

Se añaden cultivos de cepas que se conoce que tienen un buen rendimiento y dan lugar a un producto final de buena calidad, pudiendo ser de una única especie o de varias especies diferentes. Cepas de *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Streptococcus sp.* entre otras, se emplean de manera habitual en la industria láctea.

El empleo de cultivos *starter* está muy extendido, ya que la fermentación ocurre de manera más controlada que empleando la flora microbiana original en la materia prima de partida. Al encontrarse únicamente los microorganismos de interés en el bioproceso, no tienen competencia con otros tipos microbianos y se desarrollan a pleno rendimiento. Son además más resistentes a las infecciones por fagos, unos de los grandes problemas de la industria láctea, ya que al lisar los microorganismos, la fermentación se detiene. Se obtienen además productos más homogéneos y se evitan pérdidas económicas por pérdidas de tiempo y materia prima.

Las cepas del *starter* se seleccionan por su alta capacidad de fermentación y la formación de aromas característicos, además de su resistencia durante el proceso de conservación y el mantenimiento en iniciadores mixtos. Los cultivos utilizados para fermentaciones alimentarias también contribuyen con reacciones secundarias que

CONSIDERACIONES TEÓRICAS

producen sabor y textura, que es la responsable de la diferencia entre productos de distintas marcas, y por lo tanto contribuye significativamente al valor del producto.

Los *Lactobacillus sp.* no solo realizan la fermentación ácido-láctica, sino que además poseen sistemas proteolíticos y lipolíticos que producen compuestos como el diacetilo y el acetaldehído que dan aroma y aspecto diferente al producto final, aumentando su valor en el mercado.

Se emplea *Lb. casei* como cultivo aromatizante en el proceso de maduración de quesos de pasta blanda, dura y semidura, como el Emmental y Edam. También se emplean fermentos de *Lb. casei* en algunas leches fermentadas comerciales y en complementos alimenticios por su papel probiótico de la flora intestinal.

2.3. Estudio de la viabilidad en cultivos bacterianos

El estudio de la viabilidad de las células en un cultivo de microorganismos es un método rutinario habitual en un laboratorio de microbiología. Tradicionalmente se consideraba que una célula era viable cuando era capaz de dividirse y formar colonias al sembrarla en una placa Petri u ocasionar turbidez al inocularla en un caldo de cultivo apropiado. Por oposición a esto, de forma habitual se venía considerando como no viable o muerta si esto no ocurría.

Considerar que cada colonia se forma a partir de una única célula supone un margen de error muy elevado y por ello se considera que cada colonia se origina a partir de una unidad formadora de colonia (UFC) que no ha de ser necesariamente una única célula. Por otro lado, el límite de detección en este tipo de técnicas clásicas es un aspecto a considerar, que va ligado a la dilución original de la muestra sembrada en el medio de cultivo y al volumen de muestra sembrado. Algunas cepas con importantes efectos sobre la salud humana presentaban muchas dificultades para su aislamiento en condiciones de laboratorio al tener requerimientos nutricionales muy complejos o incluso desconocidos hasta fechas recientes (*Campylobacter sp.*, *Helicobacter sp.*, etc.) Asimismo, las colonias crecidas en la placa puede que no sean lo suficientemente grandes como para detectarlas a simple vista o bajo la lupa, o que la turbidez en el caldo de cultivo sea difícilmente apreciable.

Una célula puede quedar dañada por niveles subletales de calor, radiación, ácidos o agentes de limpieza, esto hace que sean menos resistentes a los agentes selectivos de los medios de cultivo o que se vean aumentados sus requerimientos para permitir el

CONSIDERACIONES TEÓRICAS

funcionamiento de los mecanismos de reparación celular. Cuando esto ocurre, se ve aumentada la fase de adaptación y pueden perder la habilidad de formar colonias en medio selectivo. De manera que el aislamiento de microorganismos en medio de cultivo sintético tiene muchas limitaciones y el crecimiento no se desarrolla de la misma manera que en ambientes heterogéneos como son los alimentos, con lo cual no se puede asumir un comportamiento mimético.

Hoy en día es sabido que los microorganismos presentan estados fisiológicos intermedios en el intervalo desde la plena viabilidad hasta la muerte celular y que en ocasiones el tránsito hacia la muerte puede revertirse si las condiciones ambientales vuelven a ser las óptimas, de manera que el concepto de viabilidad basado la acepción tradicional de la capacidad o no de crecimiento en un medio de cultivo definido se considera demasiado simplista (Fig. 1). Incluso se plantea que estos estados metabólicos intermedios sean una estrategia de supervivencia bacteriana frente a condiciones ambientales adversas, entrando en estados de criptobiosis de manera similar a los que presentan algunos microorganismos esporulados (Mukamolova y col. 2003)

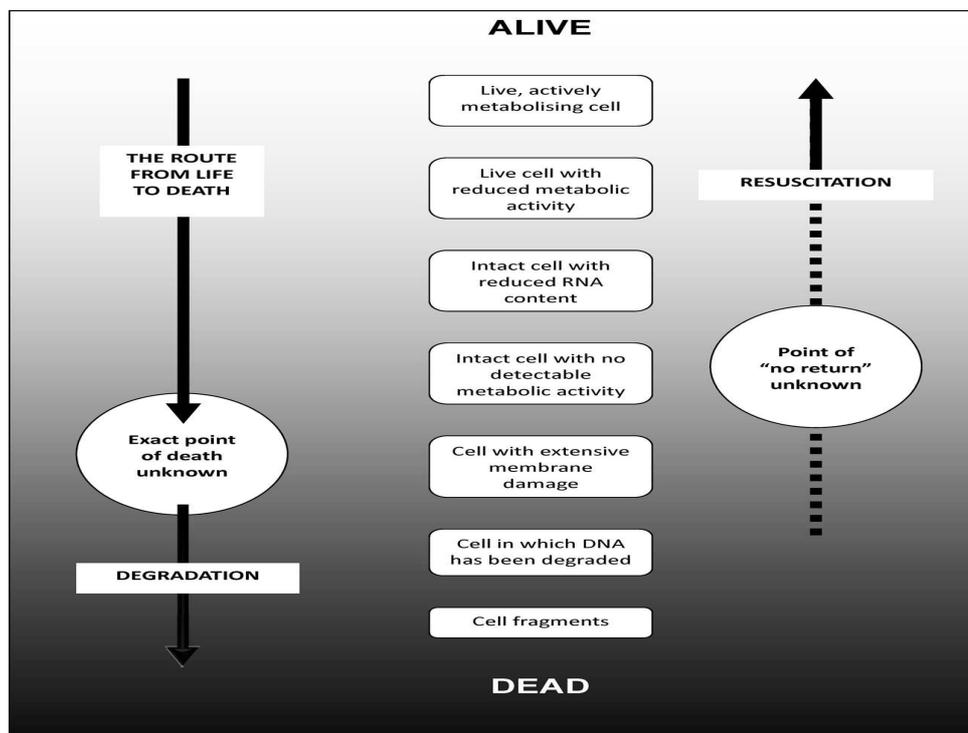


Figura 1. Transición de la célula desde la plena actividad hasta la muerte. (tomado de Davey 2011)

CONSIDERACIONES TEÓRICAS

Existen numerosos estudios científicos que tratan de poner de manifiesto la capacidad de “resucitar” de microorganismos no cultivables, volviendo a ser capaces de multiplicarse en medio de cultivo definido. Sin embargo, no siempre se asegura las condiciones adecuadas para reducir al máximo posible la proporción de células plenamente viables en la población y cabe la posibilidad de que ese crecimiento que se toma en consideración sea debido a células plenamente viables que persisten en el cultivo de partida (Kell y col. 1998). Si parece que esto sea factible en la resucitación de *Micrococcus luteus* por presencia de un factor que producen las células viables de esta especie (Kaprelyants y col. 1994), en *Vibrio cholerae* (Way y col. 1996), *Campylobacter jejuni* (Bowill y col. 1997) y *Vibrio vulnificus* (Whitesides y col. 1997)

Se ha acuñado el término de viables pero no cultivables (VBNC) (Fig. 2) para aquellos microorganismos que a pesar de no poder cultivarse en medio de cultivo sintético, continúan exhibiendo signos de actividad metabólica, y por tanto viabilidad, pero no pueden ser recuperados por técnicas de recuperación de viabilidad tradicionales (como un pre-enriquecimiento en medio de cultivo altamente nutritivo) aunque otros autores (Kell y col. 1998) proponen emplear término de células activas pero no cultivables (ABNC). Este fenómeno suele ocurrir cuando las células se encuentran en condiciones adversas y pueden permanecer en este estado durante periodos largos de tiempo (Oliver 2005) Se ha descrito este fenómeno en multitud de patógenos de transmisión alimentaria como *Listeria monocytogenes* (Besnard y col. 2002), *Salmonella typhimurium* (Caro y col. 1999), *Vibrio cholerae* (Colwell y col. 1996), entre otros, pudiendo constatarse como algunos conservan su potencial patogenicidad y su capacidad de alterar los alimentos. Asimismo, se ha puesto de manifiesto la presencia de células viables no cultivables tras el tratamiento habitual de pasteurización de la leche, poniendo de manifiesto la expresión génica de las mismas (Gunasekera y col. 2000) o tras el tratamiento de cloración del agua (Oliver y col. 2005).

El crecimiento microbiano, el indicio más considerado en la viabilidad de la célula, requiere actividad metabólica e integridad de membrana. En ocasiones, este crecimiento no puede ponerse de manifiesto porque la célula tiene dañado su material genético, tiene un largo ciclo de división, tiene requerimientos de nutrientes muy estrictos, etc., pero a pesar de ello, mantiene su actividad metabólica (Nebe von-Caron y col. 1998)

Las células intactas están delimitadas por una membrana citoplasmática íntegra que les permite comunicarse selectivamente con el medio que las rodea, dentro de las

CONSIDERACIONES TEÓRICAS

mismas algunas serán metabólicamente activas y otras no lo serán; y de entre las metabólicamente activas, algunas tienen capacidad de división celular (Nebe von-Caron y col. 2000)

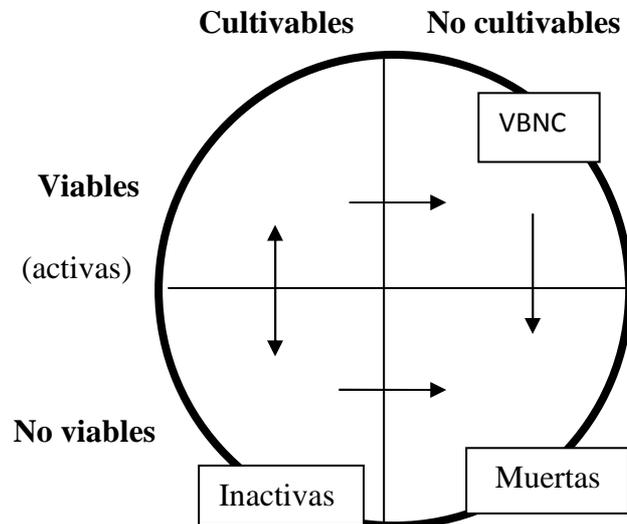


Figura 2. Diferentes estados fisiológicos en un cultivo microbiano (basado en Kell y col. 1998)

Pueden agruparse los estados metabólicos dentro de un cultivo microbiano de la siguiente manera:

- Células intactas, que pueden ser metabólicamente activas, mostrando o no crecimiento reproductivo
- Células despolarizadas incapaces de mantener el potencial de membrana, con la membrana intacta, pero que puede ser recuperado temporalmente
- Células muertas con la membrana permeabilizada y despolarizada

Cuando una célula se estresa por falta de fuente de energía, los sistemas de transporte activo cesan, la membrana citoplasmática se despolariza y ocurre una permeabilización de la misma, indicando muerte celular (Hewitt y col. 2001) Se ha documentado que células permeabilizadas podrían tener una mayor tasa de producción de ácido láctico en los procesos fermentativos (Oliver y col. 1988) lo cual podría frenar el proceso de fermentación.

Para poner de manifiesto estos diferentes estados metabólicos, se emplean una serie de parámetros que permiten relacionar alguna característica observable con el estado de la célula (Tabla 1).

CONSIDERACIONES TEÓRICAS

Estudio de funcionalidad celular				
Criterio	División celular	Actividad metabólica	Integridad de membrana	Permeabilidad de membrana
Métodos de detección	Conteo celular	Actividad enzimática	Permeabilidad selectiva de la membrana	Entrada indiscriminada de colorantes intracelulares
	Formación de colonias	Potencial de membrana		

Tabla 1. Algunos de los criterios y métodos de detección de la funcionalidad celular (basado en Nebe-von Caron y col. 1998)

La presencia de VBNC es importante, no sólo desde el punto de vista de que puede suponer un problema de salud pública, si no que estas células pueden intervenir en los procesos fermentativos (Quirós y col. 2009). Esto hace que puedan modificar las condiciones de los mismos, afectar al proceso, contribuir a que el alimento se altere e incluso intercambiar genes con otros microorganismos cercanos, aspecto a considerar si se trabaja con cepas modificadas genéticamente.

El estrés por presencia de ácido es importante en las bacterias del ácido láctico, ya que el crecimiento exponencial y la transición a fase estacionaria va acompañada de su producción, que acidifica el medio, detiene la multiplicación de las células y lleva a la muerte celular (inhibición por producto) Esta situación puede llevar a ese estado de VBNC y a la larga, a la muerte de los microorganismos. También se ha podido cuantificar la contribución de la subpoblación de BAL en estado VBNC al proceso fermentativo (Quirós y col. 2009), estimando que la subpoblación VBNC puede llegar a ser mayoritaria en la población total (del 70% al 90%) y que la velocidad específica de consumo de sustrato de dicha subpoblación fue aproximadamente la mitad de la correspondiente a la subpoblación viable (mostrando crecimiento reproductivo junto con actividad metabólica)

2.4. Control *at-line* de bioprocesos

Cuando los procesos fermentativos se llevan a cabo en biorreactores a gran escala, existen gradientes de concentración del sustrato y de oxígeno si la mezcla no se realiza adecuadamente. Por este motivo, la composición del microambiente de las células no será el mismo para todas ellas, tendremos una población heterogénea con subpoblaciones en diferente estado fisiológico. En el transcurso de cualquier bioproceso es esencial la monitorización de la proliferación celular y la viabilidad. Las determinaciones de la concentración de biomasa son cruciales en la toma de decisiones durante el control del proceso. Esto requiere métodos analíticos modernos para lograr un rápido seguimiento del estado metabólico y la actividad de las células en el biorreactor, incluyendo la posibilidad de actuar sobre el proceso si fuera necesario.

Los métodos de microbiología clásica basados en densidad óptica, peso seco o conteo de colonias dan una indicación de crecimiento asociado a división celular, pero no sobre el estado fisiológico de los microorganismos. Además, los resultados de los mismos requieren un tiempo relativamente prolongado y puede que en caso de existir algún problema en la fermentación ya no se pueda solucionar. Las técnicas microbiológicas clásicas de aislamiento en medio de cultivo son tediosas y se requieren tiempos de incubación, de manera que la obtención de resultados se demora en el tiempo pudiendo llegar incluso a varios días. La microscopía de fluorescencia no se extiende tanto en el tiempo, pero al no realizarse de manera automática requiere un mayor manejo y entrenamiento del usuario para discriminar lo que está observando en la muestra. Además, no permite realizar análisis multiparamétricos y al manejar un número menor de eventos, la representatividad de la muestra es menor. Otras técnicas como la tecnología NIRS (Espectroscopía en el Infrarrojo Cercano) se han propuesto para la monitorización de la biomasa en las fermentaciones industriales (Alison y col. 2002, Crowley y col. 2005) pero esta metodología no discrimina los diferentes estados fisiológicos en el cultivo, aunque permite obtener información *on-line* a tiempo real.

La mayoría de los modelos matemáticos utilizados para estimar la evolución de la biomasa a lo largo de la fermentación se basan en una población de microorganismos homogénea desde el punto de vista fisiológico y de su capacidad de división (Hewitt y col. 2001) aunque en los últimos tiempos estos modelos han evolucionado e incluyen los distintos estados fisiológicos en la población (Quirós y col. 2007, 2009)

CONSIDERACIONES TEÓRICAS

El crecimiento celular, ciclo celular y los estudios de viabilidad en citometría de flujo se realizan habitualmente para investigar el efecto de las diferentes estrategias en bioprocesos y tratar de maximizar la eficiencia de los mismos (Laplace y col. 1993, Rieseberg y col. 2001, Lopes da Silva y col. 2004, Herrero y col. 2006). A través de la utilización de mezclas de fluorocromos en citometría de flujo en condiciones casi a tiempo real, *at-line*, se ha puesto de manifiesto la reducción de la viabilidad al final de los procesos fermentativos por el agotamiento de los nutrientes en el medio (Hewitt y col. 1999 y 2001, Reis y col. 2004) o por defectos en la oxigenación en el biorreactor (Hewitt y col. 1998).

Uno de los primeros controles que ha de realizarse a un cultivo *starter* es la evaluación del número de microorganismos viables y el estado de metabólico de los mismos. Las condiciones de almacenamiento, antes de su empleo, pueden afectar la viabilidad del fermento y por ello también al transcurso del proceso fermentativo. La citometría de flujo se perfila como una herramienta de interés para ese propósito (Laplace y col. 1993, Bunthof y col. 2001 y 2002)

El acoplamiento de la citometría de flujo al estudio de la fermentación permite un significativo aumento de la productividad del proceso; acoplándolo a una estrategia de control del proceso basada en la adición de fuente de energía dependiente del número de células con bajo potencial de membrana (subpoblación de células despolarizadas con la capacidad de repolarizar su membrana en presencia de fuente de energía suficiente) permitirá reducir el número de células que no contribuyen al proceso en la medida esperada (Hewitt y col. 1999, Nebe von- Caron y col. 2000) y por consiguiente, a aumentar la productividad global del mismo y evitar un desenlace no deseado. La obtención de resultados de la citometría de flujo es a tiempo casi real y permite solucionar a tiempo cualquier inconveniente que pudiera surgir en el discurrir del bioproceso, permitiendo asimismo, poner de manifiesto los distintos estados metabólicos en la población microbiana y obteniendo resultados con alto grado de representatividad. Ya se comercializan equipos de citometría de flujo especializados en busca de cumplir este propósito y muy probablemente esta tecnología se irá extendiendo en las industrias alimentarias al ser equipos de manejo sencillo.

Otras posibles aplicaciones de la técnica de CMF para la industria alimentaria sería la detección de patógenos en alimentos como *Listeria monocytogenes* (Ikeda y col. 2009) o cepas patógenas de *Escherichia coli* (Yamaguchi y col. 2003), recuentos de

CONSIDERACIONES TEÓRICAS

microorganismos indicadores de calidad alimentaria (Gunasekera y col. 2000, Holm y col. 2004, Flint y col. 2006, Ramsahoi y col. 2011), detección de microorganismos alterantes (Gunasekera y col. 2003), el estudio de cepas con potencial probiótico (Ben Amor y col. 2002, Bunthof y col. 2002) o el estudio de la viabilidad de los fermentos antes de su utilización (Laplace- Builhé y col. 1993, Bunthof y col. 2002)

Las ventajas del empleo de la citometría de flujo incluyen la objetividad, elevada sensibilidad y velocidad de análisis, posibilidad de realizar mediciones simultáneas sobre una sola célula y la capacidad de separación celular en los citómetros separadores o *sorters*. Se analizan grandes números de células individuales y esto aumenta la representatividad de las muestras estudiadas y la precisión de las medidas. Las desventajas y limitaciones son los costes de instrumentación, la necesidad de disponer de células disgregadas en medio líquido, la susceptibilidad de cada tipo de microorganismo a la tinción con los fluorocromos, y las posibles interferencias con otros componentes de las muestras. Por eso, para poner a punto cualquier método de análisis por citometría de flujo, es indispensable establecer los controles adecuados puesto que la interpretación y validación de los resultados obtenidos pueden ser muy complejos.

2.5. Fundamentos citometría de flujo

La citometría de flujo (FCM) es una técnica de análisis celular multiparamétrico que permite medir las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células conforme se las hace pasar a través de un haz de láser focalizado. El citómetro de flujo está constituido por un sistema fluídico en el que el líquido donde está resuspendida la muestra se hace pasar por el centro de un caudal de líquido isotónico que a gran velocidad y en condiciones de flujo laminar es obligado a pasar a través del orificio estrecho de un embudo. La diferencia de presión entre ambos líquidos permite regular el caudal de la muestra y con ello se evita el paso simultáneo de más de una célula.

Al atravesar el rayo de luz, las células interaccionan con este causando dispersión de la misma (Fig. 3). Basándose en la difracción de la luz en sentido frontal, se puede evaluar el tamaño de las células que pasan (*Forward Scatter*) y al medir la reflexión de

CONSIDERACIONES TEÓRICAS

la luz de en ángulo de 90°, se evalúa la granularidad o complejidad de estas (*Side Scatter*).

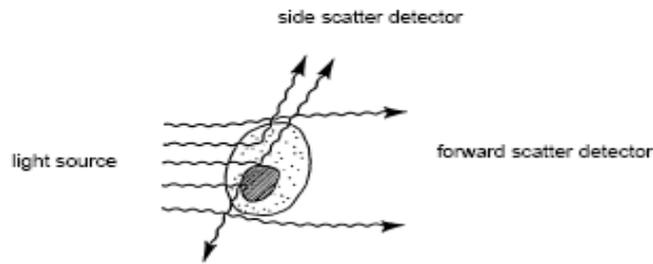


Figura 3. Representación del concepto de Side Scatter y Forward Scatter

Además, si previamente al análisis se realiza una tinción de las células con una molécula fluorescente, un anticuerpo conjugado a un fluorocromo u oligonucleóticos marcados de la misma manera, se pueden evaluar otro tipo de parámetros como estado fisiológico de las células (Nebe von-Caron y col. 1998, Hewitt y col. 2000, Amor y col. 2002, Herrero y col. 2006), identificar y enumerar subpoblaciones celulares (Bunthof y col. 2002), detección específica de un determinado grupo taxonómico (Donnelly y col. 1986, Ueckert y col. 1995, Seo y col. 1998) etc. El uso de moléculas fluorescentes distintas permite analizar la presencia de varios marcadores de manera simultánea. Es posible combinar a la vez dos o tres colorantes fluorescentes siempre que emitan en diferente longitud de onda y el citómetro sea capaz de excitarlos a la vez y discriminar los fotones emitidos por ellos. Asimismo los fluorocromos debe ser seleccionados de tal manera que el solapamiento entre ellos sea el menor posible.

Los aparatos de citometría de flujo pueden hacer análisis multiparamétrico, simultáneo y en un corto periodo de tiempo; se pueden combinar las medidas de distintos parámetros medidos sobre la misma célula y relacionarlos.

Los conocidos como separadores o *sorters* pueden también purificar poblaciones de características determinadas en distintas fracciones finales a la vez que realizan el conteo del número de células presentes en la muestra, permitiendo separar y recuperar físicamente la subpoblación de interés del resto de células de la muestra (Davey y col. 1996, Nebe von-Caron y col. 1998 y 2000, Amor y col. 2002, Mattanovich y col. 2006)

En resumen, el citómetro de flujo detecta como las células interactúan con un rayo láser en términos de cómo la célula:

CONSIDERACIONES TEÓRICAS

- desvía la luz incidente (parámetros FS y SS)
- emite fluorescencia: parámetros FL1 (verde), FL2 (naranja), FL3 (rojo), FL4 (rojo) el número total de detectores depende del citómetro en cuestión.

Tubos fotomultiplicadores detectan tanto la luz desviada y las emisiones fluorescentes y convierten la luz dispersa en señales eléctricas que son interpretadas por el software de adquisición de datos del citómetro de flujo (Fig. 4).

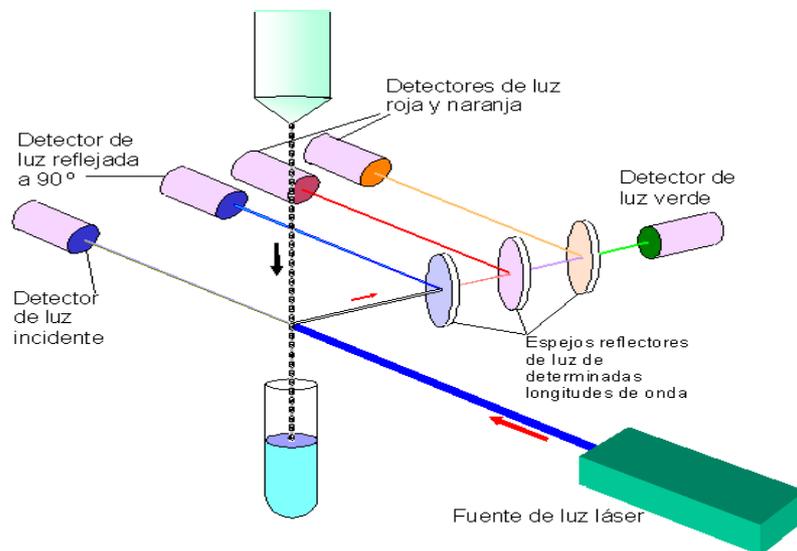


Figura 4. Esquema de un citómetro de flujo

2.5.1. Fluorescencia

La fluorescencia identifica a las sustancias que son capaces de absorber energía en forma de radiaciones electromagnéticas y luego emitir parte de esa energía en forma de radiación electromagnética de distinta longitud de onda. Las sustancias que son capaces de emitir luz al ser excitadas por diferentes tipos de radiación se denominan fluorocromos o fluoróforos. La energía total emitida en forma de luz es siempre menor a la energía total absorbida por el fluorocromo y la diferencia entre ambas es disipada

CONSIDERACIONES TEÓRICAS

en forma de calor. Es posible obtener una amplia variedad de colores por fluorescencia, dependiendo de la longitud de onda que emita el compuesto fluorescente.

El mecanismo de fluorescencia (Fig. 5) es el resultado de un proceso en tres etapas:

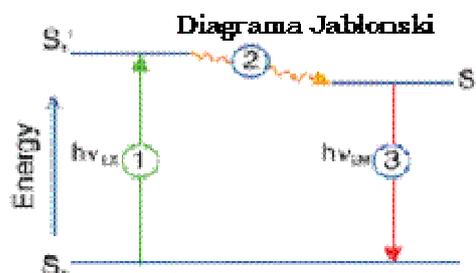


Figura 5. Mecanismo de fluorescencia (Diagrama de Jablonski)

1: Excitación: se entrega un fotón de energía por una fuente externa a un fluorocromo que absorbe, pasando a un estado electrónico excitado S_1'

2: Duración del estado excitado: por un período de tiempo finito, sufre cambios conformacionales y puede interactuar con su ambiente molecular. Consecuencias: La energía de S_1' es parcialmente disipada produciendo un estado excitado relajado desde el que se emite la fluorescencia; no todas las moléculas inicialmente excitadas del estado 1 vuelven al estado S_0 por fluorescencia, existen otros procesos.

3: Emisión de fluorescencia: un fotón se emite, lo que permite el retorno del fluorocromo al nivel S_0 . A causa de la disipación de energía durante el estado excitado, la energía de este fotón es menor.

A la hora de seleccionar los fluorocromos, han de tenerse en cuenta una serie de consideraciones:

- Los valores de absorción y emisión del fluorocromo deben ser adecuados para el citómetro que se vaya a emplear
- Para una intensidad satisfactoria de fluorescencia han de utilizarse como excitadoras radiaciones de longitud de onda correspondientes a los máximos de absorción del fluorocromo
- La detección de autofluorescencia puede ser minimizada por la selección de filtros adecuados

CONSIDERACIONES TEÓRICAS

- En muestras biológicas el fluorocromo está en solución y puede interactuar con otras moléculas; como consecuencia de esta interacción se puede producir una pérdida de emisión fluorescente.

- La longitud de onda de la emisión fotónica no es rigurosamente exacta sino que sigue una distribución de gauss centrada sobre la longitud de emisión media. Por tanto, cuando detectamos a la vez dos fluorescencias es muy posible que además de ser detectada la longitud de onda emitida por un fluorocromo con una alta intensidad, también sea detectada en otra longitud de onda de otro fluorocromo, aunque con menor intensidad. Este solapamiento se puede reducir, en gran manera, filtrando la luz con lo que el rango de longitud de onda que puede pasar a través del filtro es más estrecho. Pese al filtrado, existen fotones emitidos por un fluorocromo que atraviesan el filtro donde se había recogido la emisión del otro, haciendo que sea imposible saber que fluorocromo ha emitido esos fotones y se produce un solapamiento en los espectros de emisión. Los solapamientos son inevitables, aunque se dispone de estrategias para compensar el error, ha de seleccionarse una combinación de fluorocromos apropiada para reducir al mínimo la zona de solapamiento.

Los resultados pueden ser presentados a manera de histogramas o bien mediante citogramas. Se establece un *gate* o región para que el citómetro discrimine sólo aquellos eventos que entran dentro del campo de interés (Fig. 6)

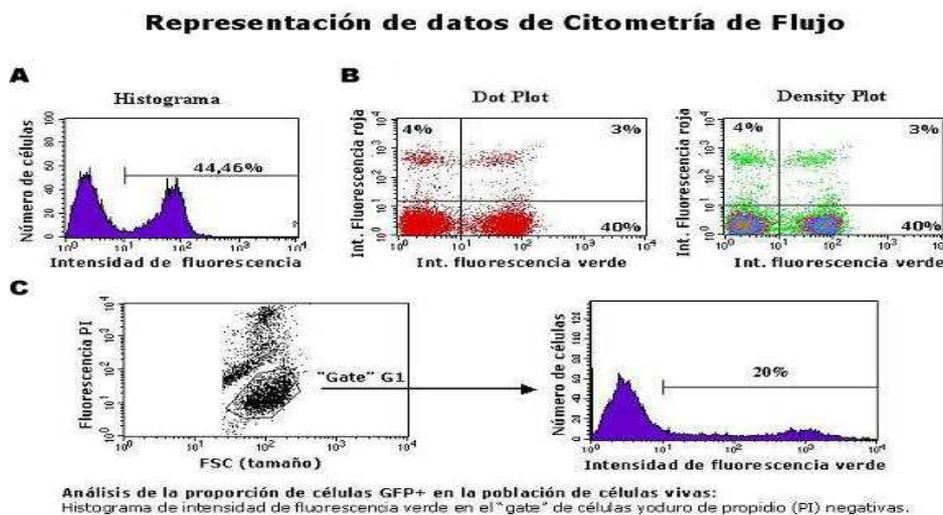


Figura 6. Representación de datos de Citometría de Flujo (tomado de Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Servicio de Citometría de flujo)

CONSIDERACIONES TEÓRICAS

Al realizar citometría de flujo con microorganismos, el tamaño celular es muy pequeño y por eso se debe fijar de forma precisa a la hora de fijar el umbral (threshold) que permita distinguir las células de interés con el ruido de fondo ya que es probable que alguna partícula presente en nuestra muestra pueda ser de tamaño similar a donde fijamos el umbral. Se establece un *gate* o región para que el citómetro discrimine sólo aquellos eventos que entran dentro del campo de interés. El citómetro de flujo detecta eventos, de manera que debe reducirse lo máximo posible la posibilidad de que los eventos que detecta no sean células individuales, sino partículas o agregados celulares tomando las precauciones pertinentes.

2.5.2 Fluorocromos para citometría de flujo

Los fluorocromos ofrecen un método sensible para obtener información acerca de la estructura, función y vitalidad de las células.

Hay dos modos de uso:

I. Fluorocromos que se unen no covalentemente a estructuras celulares: Son fluorocromos que debido a su especial composición molecular se unen a determinados componentes celulares: marcadores del contenido en ADN y ARN, del potencial de membrana, marcadores que diferencian compartimentos con distinto pH, etc.

II. Marcadores fluorescentes que son sensibles al microambiente que les rodea: Ciertos fluorocromos pueden ser empleados para estimar las propiedades del ambiente en el que se encuentran, puesto que varían su espectro de absorción o emisión en función de las características del microambiente que les rodea. Se emplean para la determinación de diversos estados funcionales celulares: pH, calcio, potencial red-ox, actividad enzimática, polaridad y viscosidad/fluidez.

Existen multitud de tipos de fluorocromos en el mercado, pero ha de seleccionarse aquella combinación de los mismos que mejor se ajuste a cada aplicación y que sean adecuados para el citómetro de flujo del que se dispone (Tabla 2).

CONSIDERACIONES TEÓRICAS

Fluorocromo	Función celular medida
Bis- Oxonol (BOX)	Se acumula intracelularmente en células despolarizadas
Bromuro de etidio	Unión a ácidos nucleicos
Diacetato de carboxifluoresceína (CFDA)	Actividad enzimática, integridad de membrana
Rodamina	Potencial de membrana
SYTOX Green	Unión a ácidos nucleicos
Yoduro de propidio (IP)	Unión a ácidos nucleicos

Tabla 2. Algunas pruebas fluorescentes usadas para estudiar la viabilidad bacteriana por CFM (basado en Porter 1999)

Una membrana intacta polarizada y sistemas de transporte activo son fundamentales para una célula plenamente funcional.

Algunos fluorocromos pueden atravesar la membrana plasmática de células intactas y ponen de manifiesto integridad de la membrana; si además son metabolizados por la célula, dando lugar a un compuesto fluorescente que se pueda observar por citometría de flujo, microscopía de fluorescencia o similares, se puede poner de manifiesto que la célula es activa metabólicamente. Tal es el caso por ejemplo del diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) que es hidrolizado por esterasas del citoplasma celular, dando lugar a un compuesto fluorescente, de color verde, la carboxifluoresceína (CF), que se puede observar por las técnicas descritas anteriormente (Bunthof y col. 2002, Amor y col. 2002, Ananta y col. 2004)

Por otro lado, otros fluorocromos no pueden atravesar la membrana celular porque los sistemas de transporte activo de la misma lo expulsan, de manera que si el gradiente de protones que se genera por dichos sistemas de transporte activo se ha perdido (y la célula está por tanto, despolarizada) estas moléculas entran en la citosol y se acumulan en el interior uniéndose a componentes del citosol. Un ejemplo de este tipo de fluorocromos es el Bis-Oxonol o BOX (Nebe von- Caron y col. 1998, Hewitt y col. 2001) que se une a componentes ricos en lípidos del interior celular, emitiendo fluorescencia verde.

El yoduro de propidio es un agente intercalante, se une ácidos nucleicos, tanto ADN como ARN y emite fluorescencia roja al unirse a estas moléculas, pero no puede atravesar la membrana celular, de manera que pone de manifiesto células con su

CONSIDERACIONES TEÓRICAS

membrana comprometida y por ello, presumiblemente muertas. (Gunasekera y col. 2000, Amor y col. 2002, Ananta y col. 2004)

2.5.3. Separación celular

Se conoce como *sorters* o separadores a aquellos citómetros de flujo que permiten separar físicamente distintas subpoblaciones en la muestra.

La técnica conocida como *Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)* o separación celular activada por fluorescencia, se basa en la separación de distintas subpoblaciones celulares según el tipo de fluorescencia que emitan. Cuando una partícula dispersa en el sistema fluídico pasa a través del rayo de luz, se mide la luz dispersada y la fluorescencia y el sistema decide separar o no esa partícula en base al criterio fijado previamente por el usuario. Después de que la partícula de interés pasa el láser, se le aplica una carga eléctrica positiva o negativa en el instante después de que la gota se forme. La gota pasa a través de un espacio entre dos placas deflectoras cargadas con polaridad opuesta a las cargas aplicadas (las gotas cargadas positivamente, se orientarán hacia la placa con carga negativa y viceversa). Finalmente, se recogen las células de interés en un tubo colector estéril, una placa microtiter, placa de Petri, portaobjetos o similares para los análisis posteriores pertinentes (Fig. 7). La vibración de la boquilla a través de la cual pasa la muestra, usando un cristal piezoeléctrico o un transductor electromagnético provoca la formación de gotas (que idealmente contienen una única célula) Al emplear este sistema, la frecuencia de la formación de las mismas es más estable y no tiene grandes variaciones en el tiempo y el espacio.

El citómetro separador es capaz de clasificar partículas (con carga positiva, negativa o neutra) después del análisis citométrico y tiene el potencial de producir muestras enriquecidas en las células objetivo.

CONSIDERACIONES TEÓRICAS

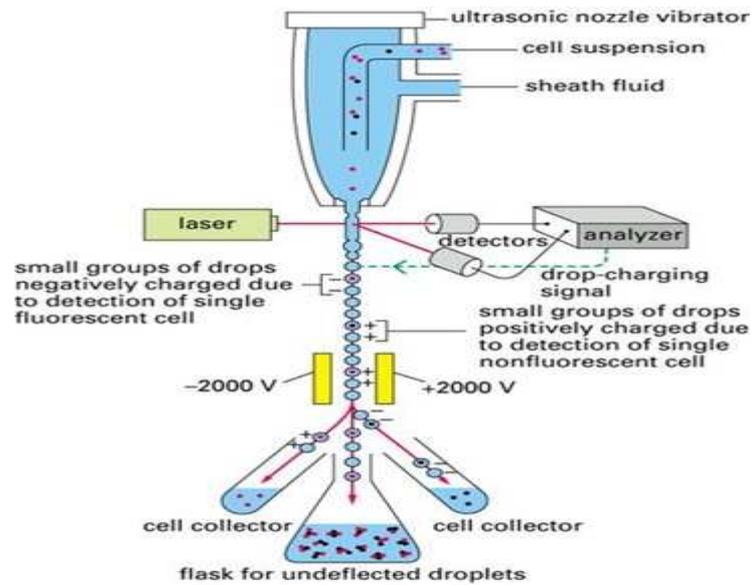


Figure 8-2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Figura 7. Esquema de un citómetro separador (tomado de B. Alberts y col. 2002. *Molecular Biology of the Cell*)

3. METODOLOGÍA UTILIZADA

3.1. MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Para los experimentos de fermentación se utilizó la cepa *Lb. casei* ATCC 393. Esta cepa se mantuvo congelada en glicerol como crioprotector (20% v/v) a -20 °C. Para reactivarla, se cultivó en medio semi-sintético de Man-Rogosa- Sharpe (MRS) (Biokar Diagnostics) bajo condiciones microaerófilas (sin agitación) a 30°C durante 12 horas, y posteriormente, se procedió al aislamiento de colonias en medio sólido MRS (incubación a 30°C 44-48 horas).

3.1.1. Condiciones de fermentación

Para la fermentación ácido-láctica, se utilizó leche desnatada comercial UHT. Como pre-inóculo, se utilizó un volumen del cultivo en MRS, que se centrifugó, descartando el sobrenadante. Se utilizaron botellas de 500 mL, conteniendo 350 mL de medio medio de fermentación, que se inoculó en condiciones de esterilidad a D.O_{600 nm} de 10⁷ UFC/mL. Los ensayos de fermentación se realizaron en estático a 30°C, y alternativamente, a baja agitación (100 rpm) para favorecer las condiciones de mezcla. Todas las fermentaciones se realizaron por duplicado, en experimentos independientes. La precipitación de la biomasa y coágulos de caseína y favorecer la transferencia de materia durante el bioproceso. Desde el punto de vista de la aireación no se tomó ninguna medida especial, ya que aunque la bacteria sea microaerófila, tolera el oxígeno. Se realizó el proceso fermentativo por cuadruplicado.

3.1.2. Determinación de la absorbancia en medio líquido

La evolución de la biomasa en medio líquido se determinó siguiendo la densidad óptica (D.O.) a 600 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu, UV 1203) frente a un blanco (el mismo medio, solución salina estéril al 0,7% (p/v), pero sin células). Los datos obtenidos se convirtieron en UFC/mL utilizando la curva de calibrado correspondiente, obtenida previamente en nuestro laboratorio. Para *Lb. casei* se había determinado previamente que una unidad de D. O. equivale a 3 x 10⁷ UFC/mL).

METODOLOGÍA UTILIZADA

3.1.3. Toma de muestras

A lo largo de las fermentaciones, se tomaron muestras de 5 mL en condiciones de esterilidad, a distintos tiempos. En cada tiempo, se midió el pH del medio y la biomasa por medida de la densidad óptica para el seguimiento del proceso de fermentación.

En el caso de las fermentaciones en estático, la toma de muestra se realizó sin homogeneizar previamente el medio, con lo cual la medida correspondió exclusivamente a la biomasa en suspensión en el medio de fermentación. Cuando las fermentaciones se realizaron con agitación, se procedió a resuspender bien las células en el medio previamente a la toma de muestra, para conseguir una muestra homogénea que permitiese determinar la biomasa total.

3.2. DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE CITOMETRÍA DE FLUJO

3.2.1 Protocolo de tinción de las muestras para citometría de flujo

Se tomaron alícuotas de 1 mL de las muestras, correspondientes tanto a cultivos puros de la bacteria láctica en medio semi-sintético como a las fermentaciones en leche, realizándose tres lavados por centrifugación (13.000g, 5 min), descartando el sobrenadante. Los lavados de las muestras se hicieron en PBS (tampón fosfato salino) 10 mM (1.42g Na_2HPO_4 y 7.8 g NaCl por litro; pH 7.4) filtrado membrana de 0.22 μm de diámetro de poro, y posteriormente esterilizado en autoclave. Se prepararon diluciones 1:10, para la medida de densidad óptica. Se ajustó la concentración de células en las muestras a un determinado valor correspondiente a $2-3 \times 10^6$ UFC/mL, en un volumen final de 500 μL en PBS 10 mM.

Previamente al análisis en el citómetro, y con el fin de obtener suspensiones celulares homogéneas y disgregar las cadenas que tiende a formar la cepa de *Lb. casei* en cultivo, se dio un pulso a las muestras en un baño de ultrasonidos (Selecta, Barcelona) durante 5-6 s. Este tratamiento de disgregación celular por ultrasonidos se había optimizado previamente (Herrero y col, 2006).

METODOLOGÍA UTILIZADA

Se realizó la tinción con tres fluorocromos diferentes, en dos ensayos de tinción dual. Las principales propiedades de los fluorocromos utilizados se muestran en la Tabla 3.

- Bis-oxonol (BOX, Molecular probes Inc.): a partir del preparado comercial líquido se preparó una disolución stock a concentración 1 mM en PBS 10 mM, que se conservó a -20°C de la que se obtuvo una disolución de trabajo a concentración 25µM en PBS 10mM que se empleó para el marcaje de las células, que se conservó a 4°C . Se añadieron 15,5 µL a cada muestra de 500 µL. Las muestras se incubaron 15 minutos a 30°C. Este fluorocromo tiene un máximo de excitación de 488 nm y de emisión de 530 nm.

- Diacetato de carboxifluoresceína (CFDA, Molecular probes Inc.): A partir del stock en polvo, se preparó una disolución a concentración 1 mM en PBS 10 mM, que se mantuvo a -20 °C. A partir de la misma se preparó una solución de trabajo 10 µM en PBS 10 mM, que se mantuvo a 4°C y se utilizó tras 24 h. Se añadieron 5 µL a cada muestra de 500 µL. Las condiciones de incubación fueron 15 minutos a 30°C. Este colorante presenta un máximo de excitación de 492 nm y máximo de emisión a 517 nm.

- Yoduro de propidio (IP): Se empleó como disolución de trabajo alícuotas del stock proporcionado por el fabricante (1mg/mL en agua destilada estéril, conservado en oscuridad a 4°C) y se añadió 2,5 µL a cada muestra de 500 µL (concentración para la tinción 0,2 mg/mL). Las muestras se incubaron 30 minutos a 30°C. Este fluorocromo tiene un máximo excitación 535 nm y máximo emisión 617 nm.

METODOLOGÍA UTILIZADA

Fluorocromo	Funcionamiento	Pone de manifiesto	Fluorescencia
CFDA	Entra por difusión pasiva a la célula, esterasas citoplasmáticas hidrolizan los grupos acetato dando en un compuesto fluorescente	Actividad enzimática, integridad de membrana	Verde (FL1)
BOX	Entra en las células despolarizadas y muertas y se une a componentes internos del citoplasma	Membrana celular despolarizada	Verde (FL1)
IP	Unión a ácidos nucleicos	Muerte celular	Rojo (FL4)

Tabla 3. Fluorocromos empleados para el marcaje de las células

Todas las incubaciones de los fluorocromos se realizaron en estufa a 30 °C en oscuridad.

3.2.2. Preparación de las muestras control para los protocolos de tinción dual

Se realizaron una serie de controles para desarrollar y optimizar los protocolos multiparamétricos de tinción dual CFDA/IP y BOX/IP.

Para fijar el umbral del ruido de fondo (*threshold*), se utilizaron como control muestras de PBS sin células, conteniendo los colorantes en las mismas condiciones de trabajo. Como controles de actividad metabólica (CFDA⁺) se utilizaron cultivos del microorganismo correspondientes a la fase exponencial de crecimiento (tras 18-24 horas de incubación a 30°C en caldo MRS). Se realizó asimismo un control de muerte celular (IP⁺), aplicando un tratamiento térmico a las muestras de 90 °C durante 30 minutos, que inmediatamente se mantuvieron en hielo (como mínimo durante 3 min antes de la tinción). También se prepararon mezclas de los dos tipos de controles, en proporción 1:1, conteniendo células en crecimiento exponencial y células tras el tratamiento térmico.

METODOLOGÍA UTILIZADA

Como control de las muestras en la tinción con BOX, que se basa en la despolarización de la membrana plasmática, se añadió a cultivos en fase exponencial de crecimiento un ionóforo (carbonilcianida m-clorofenilhidrazona, CCCP). Este ionóforo anula el potencial de membrana por destrucción del gradiente de protones que existe en la misma, provocando la despolarización de la célula.

Para preparar el ionóforo (CCCP) (Molecular probes Inc.) se partió de una solución stock de 1mM en dimetilo sulfóxido (DMSO), ensayándose varias concentraciones para lograr una despolarización significativa de las células, lo cual se logró empleando una solución stock 0.75 mM en PBS 10 mM. Las muestras se incubaron 30 min en oscuridad. Posteriormente se realizó un lavado para eliminar los restos de ionóforo y se resuspendió al volumen original en 500 μ L en PBS 10 mM.

3.2.3. Condiciones de adquisición de los datos

Una vez concluido el periodo de incubación, las muestras se analizaron inmediatamente en el citómetro de flujo Cytomics FC 500 (Beckman Coulter) (Fig. 8) con una fuente de excitación de 488 nm procedente de un láser de Argón y otra de 633 nm procedente de un láser de He-Ne. Se empleó FL1 (525 nm) como detector para la fluorescencia verde y FL4 (675 nm) para la fluorescencia roja, con menor necesidad de compensación por un inferior solapamiento de la señal entre los distintos fluorocromos.

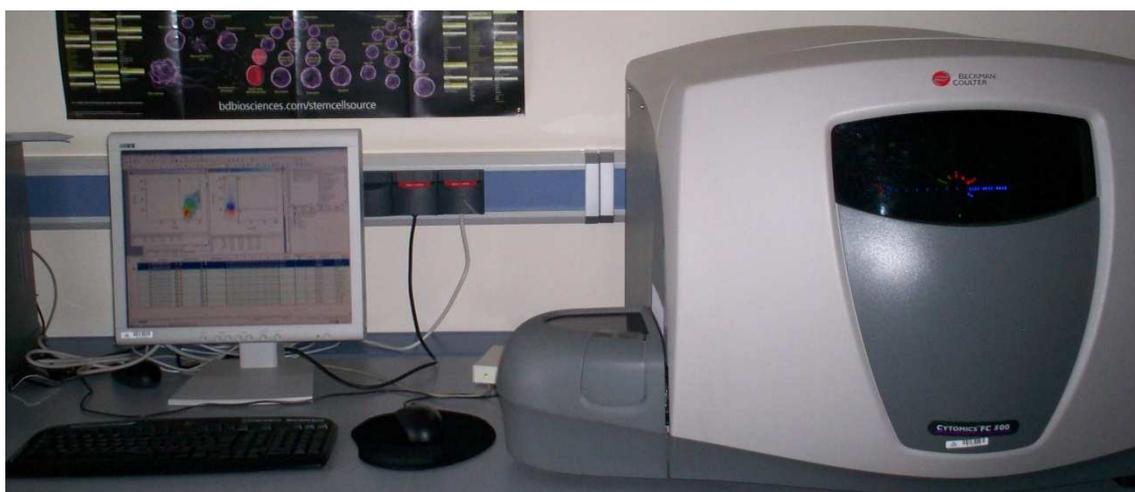


Figura 8. Citómetro de flujo Cytomics FC 500 (Beckman Coulter) (Área de Citometría, Servicios Científico Técnico Universidad de Oviedo)

METODOLOGÍA UTILIZADA

Se estableció una región o ventana (*gate*) para discriminar el ruido de fondo de la zona de interés donde se localizan las células en su mayoría, basándose en el tamaño celular (FS, Forward Scatter) y la emisión de fluorescencia. Todos los análisis se realizaron a baja velocidad y se emplearon velocidades de adquisición correspondientes a 500-800 eventos por s. (condición de parada para 50.000 eventos o 5 minutos), alcanzando siempre en todo caso un mínimo de total eventos de 20.000 en la ventana de interés, requiriéndose un mínimo de 3.000 eventos para obtener datos estadísticamente significativos. Los parámetros se expresaron en escala logarítmica en forma de histogramas y citogramas.

3.2.4. Análisis de los datos

Se empleó el programa de análisis de datos Summit 5.0 (Dako Colorado Ink.) Este programa permite realizar los ajustes necesarios en los datos obtenidos tras la adquisición en el citómetro (Fig. 9).

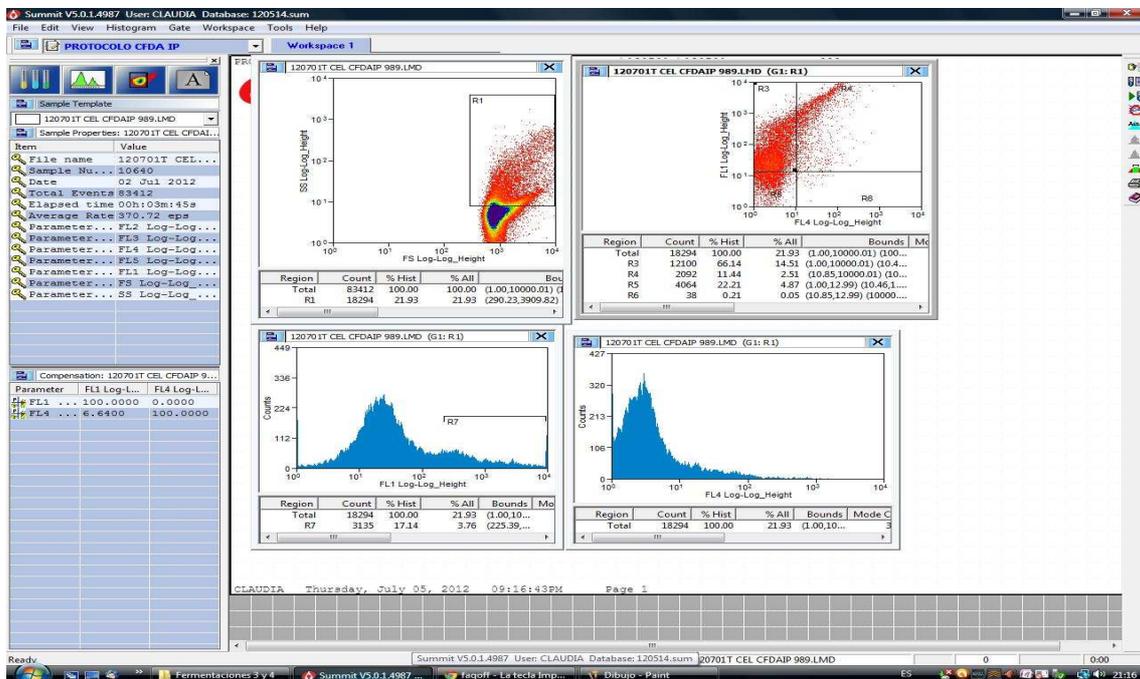


Figura 9. Programa análisis de datos Summit 5.0 (Dako Colorado Ink.)

METODOLOGÍA UTILIZADA

3.2.5. Análisis por FACS (separación celular activada por fluorescencia)

Se empleó para la separación celular el citómetro de flujo FACStar plus (Beckton Dickinson) equipado con tres láser: diodo violeta 405nm, láser de estado sólido azul 488nm y láser diodo rojo 635nm (Fig. 10).

La separación se realizó simultáneamente en tubos estériles con caldo MRS, placas de agar MRS y también sobre portaobjetos para contrastar los resultados por microscopía de fluorescencia. Las células se analizaron a velocidad de flujo menor de 500 eventos/s, previo a la separación. Se separaron las cuatro subpoblaciones observadas en los citogramas obtenidos tras la tinción con dos fluorocromos simultáneamente.

En el caso de los tubos, se añadió una alícuota a cada uno, correspondiendo a unos 2.000 eventos, para verificar el crecimiento celular tras 30 horas de incubación a 30°C, por medida de turbidez en medio líquido. En las placas de medio sólido se realizaron diluciones de 50, 20, 10, 5, 2 y 1 célula por gota respectivamente, haciendo un duplicado de cada dilución en una misma fila, en una matriz de 96 gotas (6 diluciones x 2 x 8 columnas) en toda la superficie de la placa Petri. Se empleó con este fin el accesorio del citómetro empleado para placas microtiter de 96 pocillos con un adaptador específico para placas Petri. Tras 24-48 horas de incubación a 30°C, se valoró la aparición o no de colonias en la superficie del agar. Los portaobjetos se cubrieron rápidamente con un cubreobjetos y se visualizaron lo más rápido posible en un microscopio de fluorescencia para evitar el secado de la muestra.



*Figura 10. Citómetro de flujo separador MoFlo XDP (Beckton Dickinson)
(Área de Citometría, Servicios Científico Técnicos Universidad de Oviedo)*

3.3. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Las muestras tras la separación celular (*sorting*) se observaron en un microscopio óptico automatizado (Fig. 11) que permite observar tanto fluorescencia como transmisión (Olympus BX 61) acoplado a un procesador de imágenes (Olympus CAST2) para confirmar la correcta separación de los diferentes marcajes y verificar los patrones de tinción en cada caso.



Figura 11. Microscopio automático Olympus BX 61 (Microscopía Fotónica y Proceso de Imágenes Servicio Científico Técnico, Universidad de Oviedo).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. UTILIZACIÓN DE LOS CONTROLES

Previamente al análisis de las muestras fue preciso establecer una serie de controles que permitieron optimizar los protocolos de adquisición.

El marcaje con fluorocromos y el tamaño celular (FS) permitió distinguir las células del ruido de fondo y establecer un valor umbral de detección en el citómetro de flujo. Existen numerosas publicaciones en las que se emplean estos fluorocromos (CFDA, BOX e IP) para poner de manifiesto la heterogeneidad fisiológica en cultivos bacterianos (Nebe von-Caron y col. 1998, Hewitt y col. 2001, Amor y col. 2002, Bunthof y col. 2002, Lopes da Silva y col. 2004, Herrero y col. 2006, etc)

En esta fase previa, se utilizaron como controles i) cultivos en fase exponencial de crecimiento en medio semi-sintético tras 18-22 horas de incubación a 30°C, ii) células sometidas a tratamiento térmico a 90°C durante 30 minutos (como control de muerte celular) iii) mezclas en proporción 1:1 de ambos tipos para confirmar la correcta tinción de los fluorocromos y la separación e identificación de las diferentes subpoblaciones, sobre muestras conocidas y iv) muestras de leche inoculadas con el microorganismo tras 18-22 horas de incubación a 30°C

i) Cultivos en fase exponencial de crecimiento

Primeramente, se realizó un protocolo de tinción basado en dos fluorocromos: CFDA e IP, que permitió distinguir células metabólicamente activas y células con la membrana dañada. Inicialmente se utilizaron de forma individual sobre las mismas muestras.

Al encontrarse en condiciones óptimas de actividad metabólica, se observó un fuerte marcaje con CFDA (97,2% del total de eventos) (Fig. 12) La organización en cuadrantes de los citogramas permitió distinguir las cuatro subpoblaciones posibles:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- a) **R5**, corresponde con aquellos eventos que no se han marcado con ninguno de los fluorocromos
- b) **R3**, correspondiente a células que emiten fluorescencia verde (CFDA⁺), indicativo de actividad metabólica.
- c) **R4**, correspondiente a la subpoblación doblemente marcada (CFDA⁺ IP⁺) con fluorescencia verde (CFDA) y roja (IP)
- d) **R6**, subpoblación que emite fluorescencia roja (IP⁺) Este marcaje permite poner de manifiesto células con su membrana severamente comprometida y por tanto, consideradas como muertas.

Todos los datos se representan en escala logarítmica.

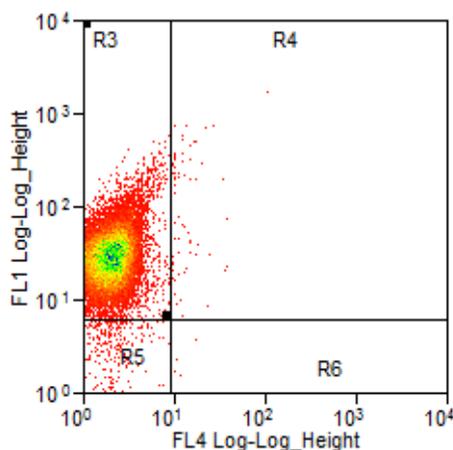


Figura 12. Citograma cultivo en crecimiento exponencial marcado con CFDA

El histograma de FL1 (fluorescencia verde, debida a CFDA) mostró dicha fluorescencia, mientras que en FL4 (fluorescencia roja, debida a IP) no se adquirió fluorescencia. (Fig.13) (Nótese que el eje de ordenadas no tiene la misma escala en todos los histogramas)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

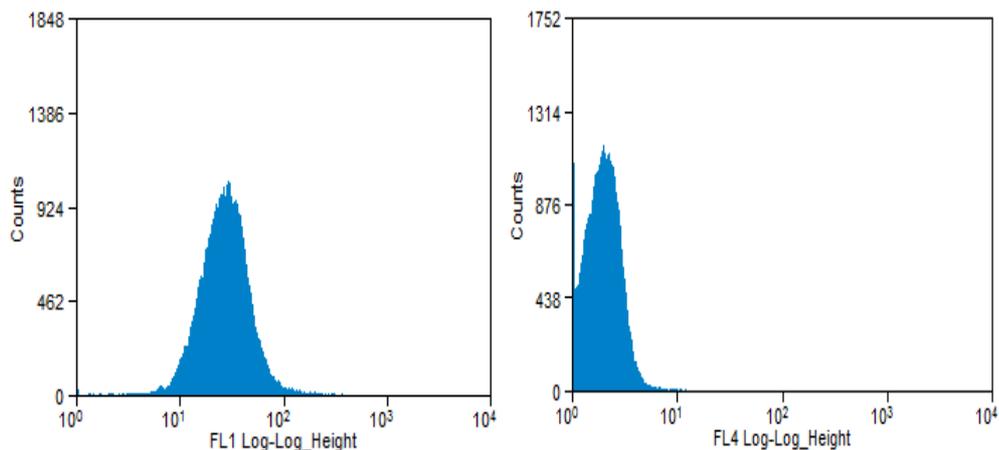


Figura 13. Histogramas FL1 y FL4 para cultivo en crecimiento exponencial marcado con CFDA

En el marcaje con IP, no se observó apenas fluorescencia roja (2,24% IP positivas del total de eventos) (Fig.14), lo cual era esperable, al tratarse de un cultivo en fase exponencial de crecimiento, la mayoría de las células deberían encontrarse metabólicamente activas. La distribución de las subpoblaciones en cuadrantes es igual que en la figura anterior.

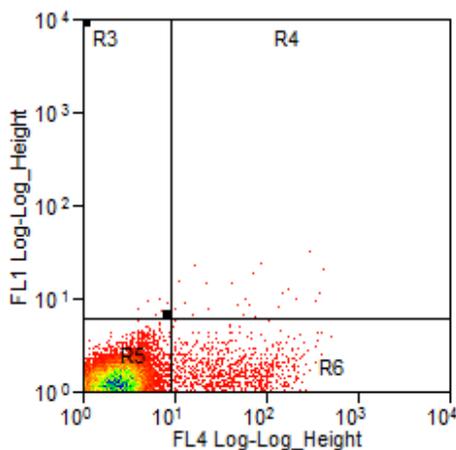


Figura 14. Citograma del cultivo en crecimiento exponencial marcado con IP

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los histogramas correspondientes a ambos detectores (Fig. 15) también pusieron de manifiesto el reducido número de eventos marcado con fluorescencia roja debido a IP (FL4)

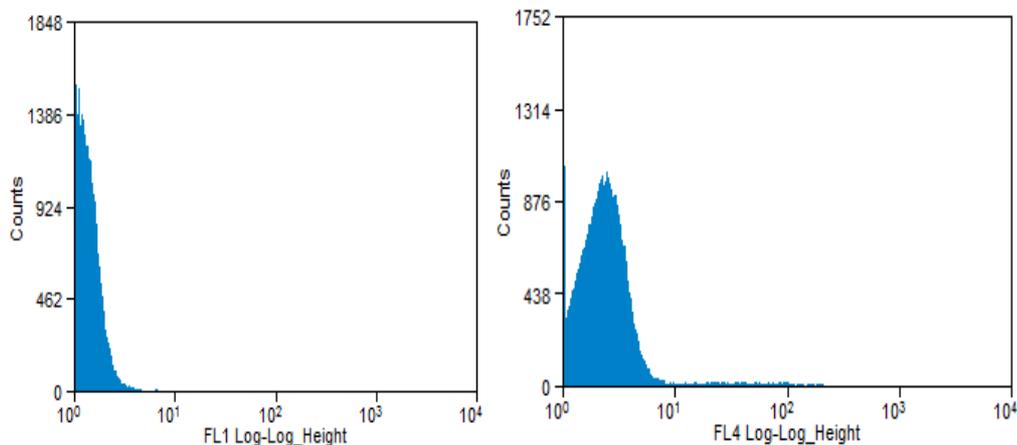


Figura 15. Histogramas fluorescencia roja y verde, cultivo en crecimiento exponencial marcado con IP

En el cultivo en fase exponencial se tiñó con CFDA e IP simultáneamente, la mayoría de las células estaban en condiciones óptimas de actividad enzimática y por eso el porcentaje de fluorescencia debido al marcaje con CFDA fue muy elevado y apenas se observó marcaje con IP (CFDA⁺ e IP⁺; 1,94% del total de eventos) (Fig.16)

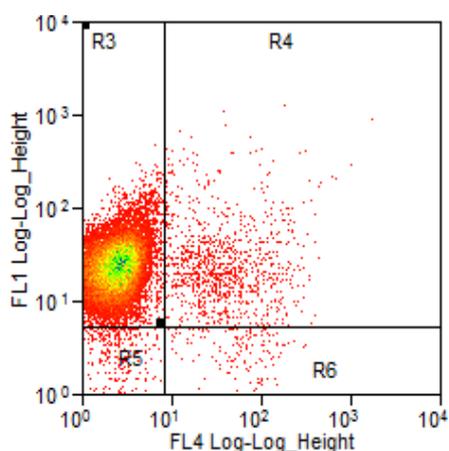


Figura 16. Citograma doble marcaje CFDA e IP, cultivo en fase exponencial

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los histogramas pusieron de manifiesto lo que ya se observó en las tinciones individuales, alta proporción de células metabólicamente activas (FL1) y proporciones muy bajas del resto de subpoblaciones (Fig. 17)

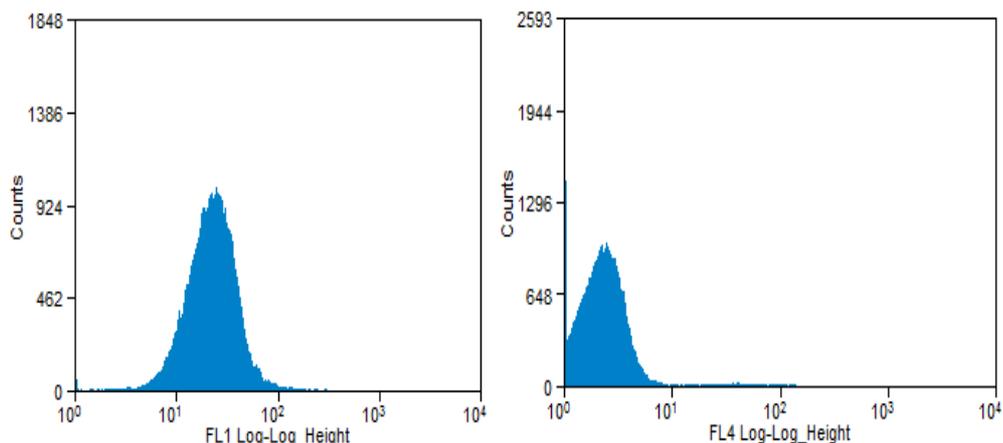


Figura 17. Cultivo en crecimiento exponencial marcado con CFDA e IP

Se realizó también un marcaje dual con BOX e IP para discernir células con la membrana despolarizada y células con la membrana comprometida (muertas). La despolarización de la membrana es un estado reversible que acontece cuando la célula se estresa energéticamente y que en condiciones ambientales favorables puede revertir en un alto porcentaje de casos (Hewitt y col. 2001).

Para poner de manifiesto que efectivamente el marcaje con BOX se debía a despolarización de la membrana, se añadió un ionóforo (CCCP) a cultivos en fase exponencial de crecimiento con el fin de provocar la despolarización de las células al anular el potencial de membrana por destrucción del gradiente de protones (Wu y col. 1999, Novo y col. 2000, Amor y col. 2002). En este caso (Fig.18), la ventana R7 del citograma representa la subpoblación de células con la membrana despolarizada (BOX⁺); R3 las células doble positivas (BOX⁺ e IP⁺) y R2 refleja fluorescencia roja (IP⁺). Los eventos sin marcar se encuentran en la parte inferior izquierda.

La separación de las subpoblaciones facilitó estableciendo las diferentes subpoblaciones en ventanas con forma de polígono, en vez de organizándolas en cuadrantes como en el caso anterior. Esta misma representación se empleó para la

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

adquisición en el citómetro y el análisis de los datos en cada ocasión que se realizó la tinción con BOX/IP.

Como se esperaba, cuando no se añadió el ionóforo a cultivos en fase exponencial, el marcaje con BOX no fue significativo, correspondiendo con el 0,35% del total de eventos (Fig. 18)

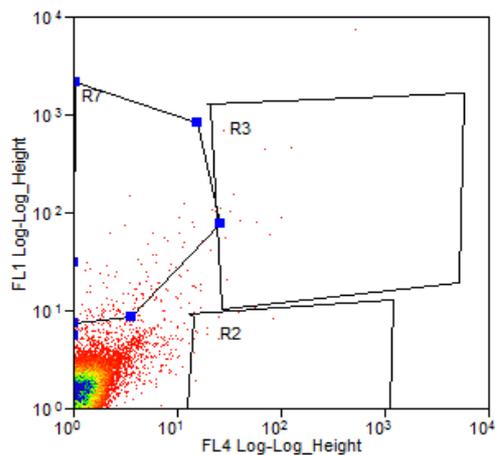


Figura 18. Cultivo en crecimiento exponencial marcado con BOX sin ionóforo

En los histogramas no hubo un aumento de fluorescencia verde, ni tampoco roja (Fig. 19) Al tratarse de un cultivo en fase exponencial de crecimiento, la mayoría de la población se encuentra en condiciones fisiológicas de actividad metabólica, con membranas intactas y polarizadas.

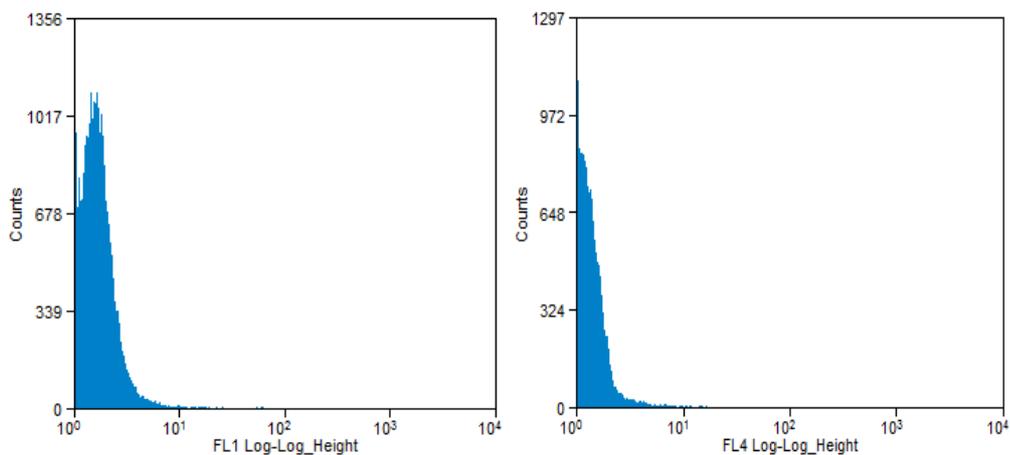


Figura 19. Citograma e histograma del cultivo en crecimiento exponencial al que no se le añade ionóforo CCCP

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuando se hizo el tratamiento con un ionóforo a un cultivo en el mismo estado, se apreció como el porcentaje de células con su membrana despolarizada (6,91% BOX positivas) es superior a las células sin ionóforo (Fig. 20), poniendo de manifiesto que el marcaje con BOX se debe a despolarización de la membrana. El ionóforo destruye el gradiente de protones que existe en la membrana plasmática, causando la despolarización de la célula. Cuando esto ocurre, los sistemas de transporte activo de la célula no funcionan y no pueden expulsar el fluorocromo (BOX)

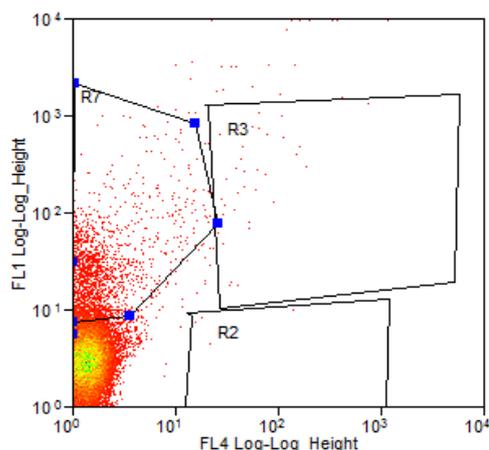


Figura 20. Citograma cultivo en crecimiento exponencial marcado con BOX, al que se añadió ionóforo (CCCP)

En los histogramas también se puso de manifiesto un aumento de la fluorescencia verde en FL1 (ventana R4) debido a la tinción con BOX (fig. 21)

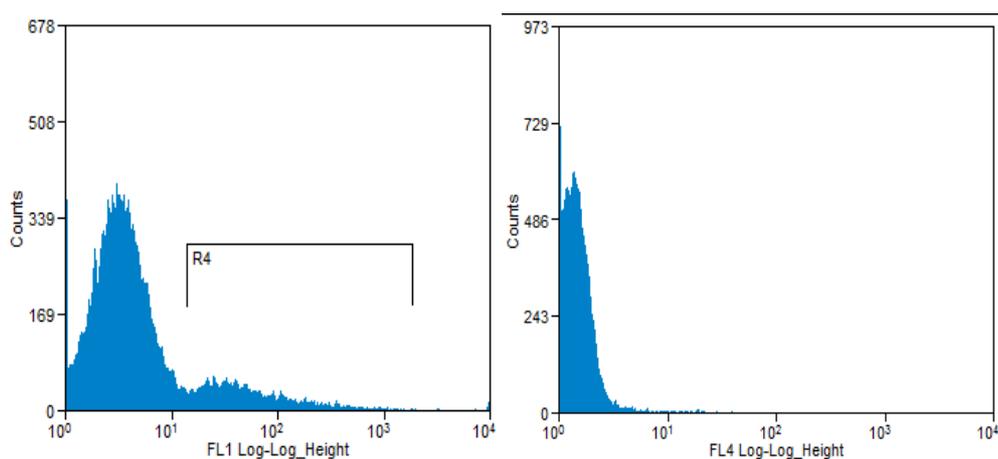


Figura 21. Cultivo en crecimiento exponencial al que se añade ionóforo y marcaje con BOX

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se repitió de nuevo la tinción con IP para esta nueva ventana y se obtuvo un resultado similar al obtenido en los citogramas organizados en cuadrantes (IP positivas correspondientes al 2,27 % del total de eventos)

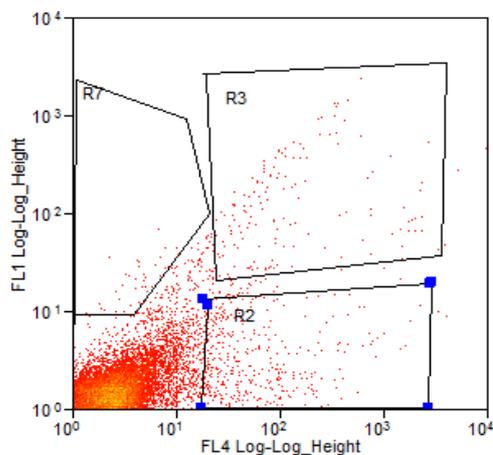


Figura 22. Citograma cultivo crecimiento exponencial con IP

Los histogramas de ambos detectores reflejaron la misma situación, con ligero aumento de fluorescencia roja en FL4 (Fig. 23)

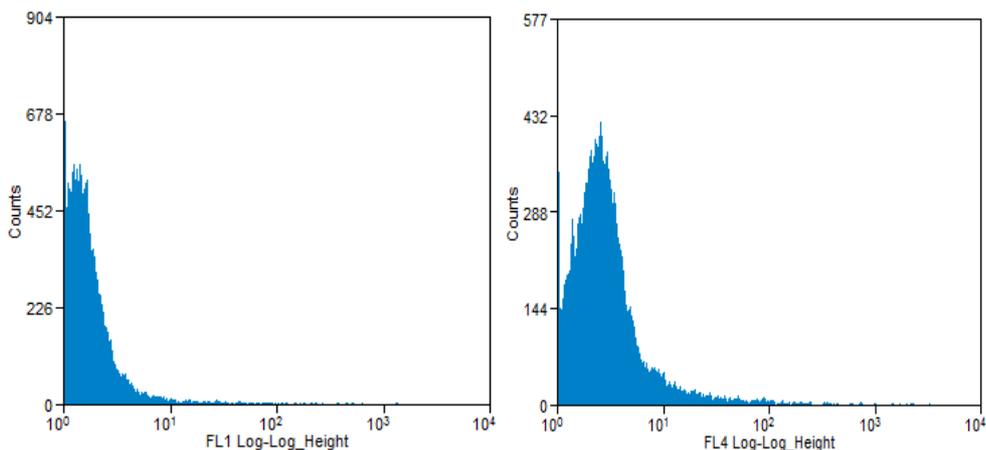


Figura 23. Histogramas cultivo crecimiento exponencial con IP

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tinción dual de BOX e IP se obtuvo un porcentaje bajo de BOX⁺ IP⁺ (2,18% del total), algo esperable en un cultivo en condiciones metabólicas óptimas (Fig.24) Como también se observó en los histogramas (Fig.25)

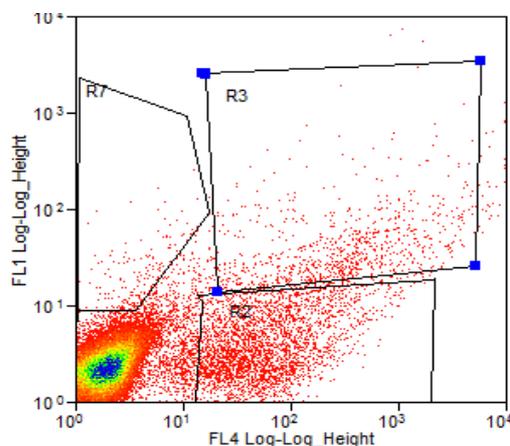


Figura 24. Cultivo en fase exponencial doble marcaje con BOX e IP

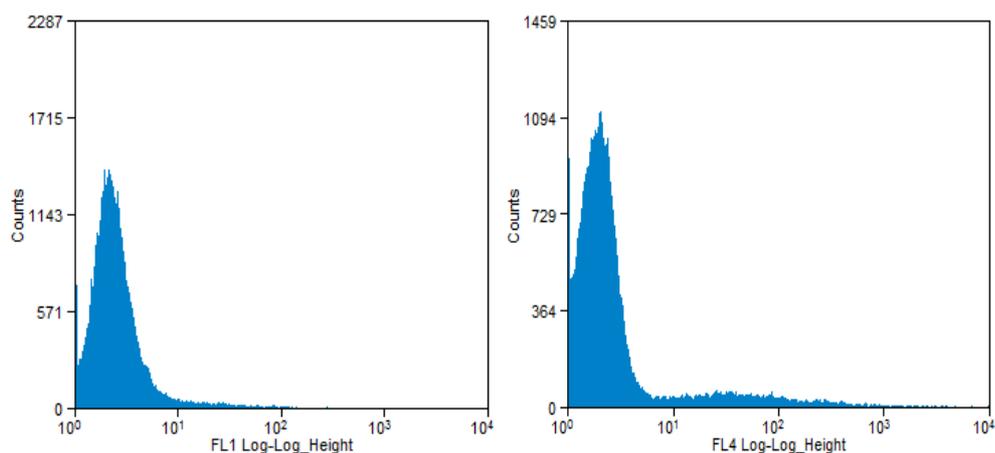


Figura 25. Histogramas doble marcaje BOX e IP cultivo en crecimiento exponencial

ii) Control de muerte celular:

Se empleó como control de muerte celular un cultivo con células en fase de crecimiento exponencial al que se aplica un tratamiento térmico, esto hace que la mayoría de la población la constituyan células muertas, con la membrana comprometida. La organización de los cuadrantes es la misma que en los ejemplos anteriores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el marcaje con CFDA se observó como apenas había fluorescencia verde (CFDA positivas 1,82% del total), la mayoría de la población no se marcó con el fluorocromo (Fig. 26). Está documentada la existencia de cierta actividad esterasa residual en las células (Jepras y col. 1995, Ananta y col. 2004, Paparella y col. 2007) de manera que ese pequeño porcentaje de marcaje podría atribuirse a ese fenómeno.

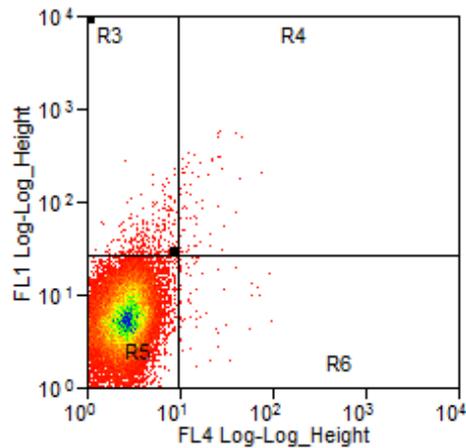


Figura 26. Control de muerte celular marcado CFDA

En los histogramas (Fig. 27) se pudo apreciar el mismo patrón de marcaje

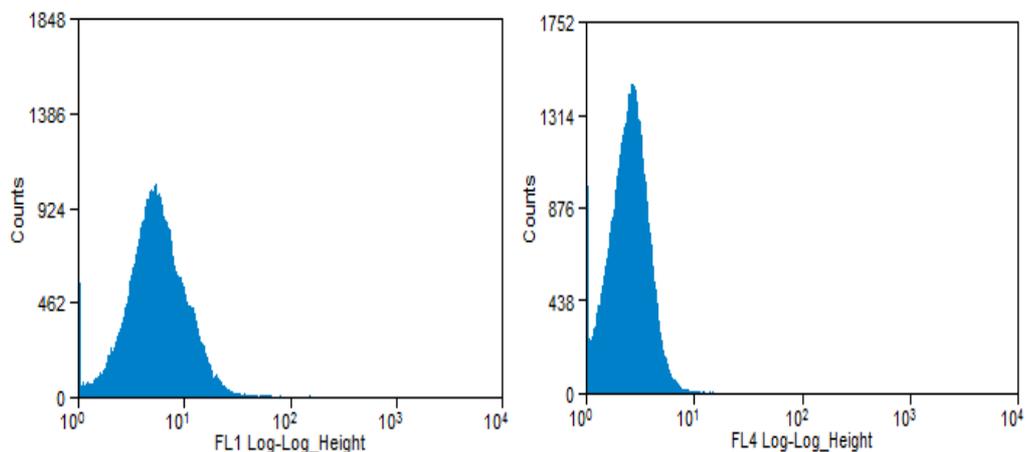


Figura 27. Histogramas del control de muerte celular marcado con CFDA

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tinción con IP, la mayoría de la población se marcó con el fluorocromo (96,15%), como cabía esperar (Fig. 28). El tratamiento térmico fue efectivo al causar la muerte de la mayoría de la población.

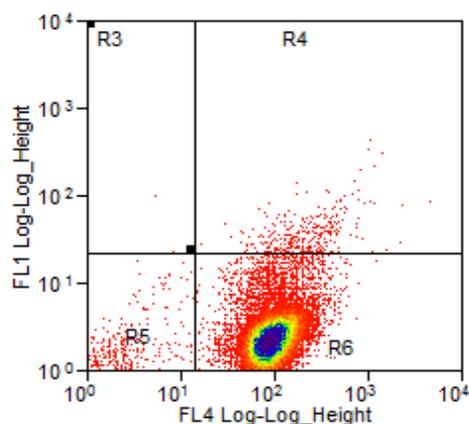


Figura 28. Control de muerte celular marcado con IP

Lo mismo se apreció en los histogramas, en FL4 se observó un pico de fluorescencia roja (Fig. 29) correspondiente al IP.

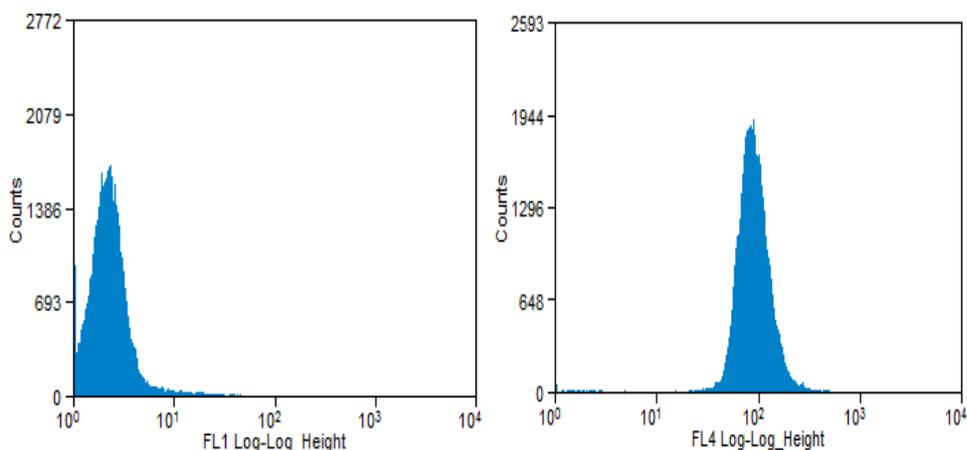


Figura 29. Cultivo en fase exponencial al que se le aplica un tratamiento térmico (control de muerte celular) marcado con IP

La tinción dual CFDA e IP, de nuevo arrojó resultados similares a los marcajes con los fluorocromos individualmente. La mayoría de la población se marcó únicamente con IP (Fig. 30) y únicamente un 2,26% de los eventos correspondieron a la subpoblación doblemente positivas para CFDA e IP.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

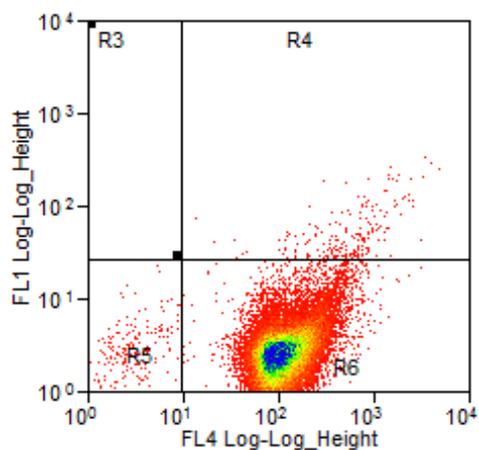


Figura 30. Control de muerte celular doblemente marcado con CFDA e IP

En los histogramas se observó un pico de fluorescencia roja en FL4, debido al marcaje con IP (Fig.31)

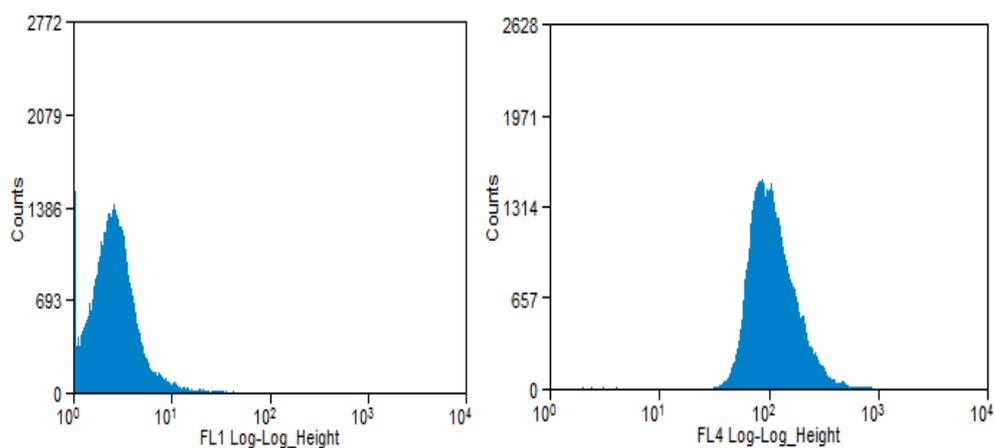


Figura 31. Histogramas control de muerte celular doblemente marcado CFDA e IP

La tinción con BOX de los controles de muerte térmica ilustró un porcentaje mayoritario de la población (93,35%) con la membrana despolarizada (Fig. 32)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

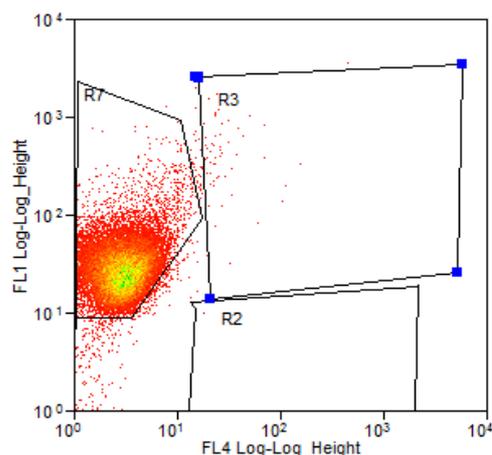


Figura 32. Control de muerte celular marcado con BOX

En el histograma correspondiente a FL1 (fluorescencia verde) puede verse el incremento de dicha fluorescencia debido al BOX (Fig. 33, izquierda)

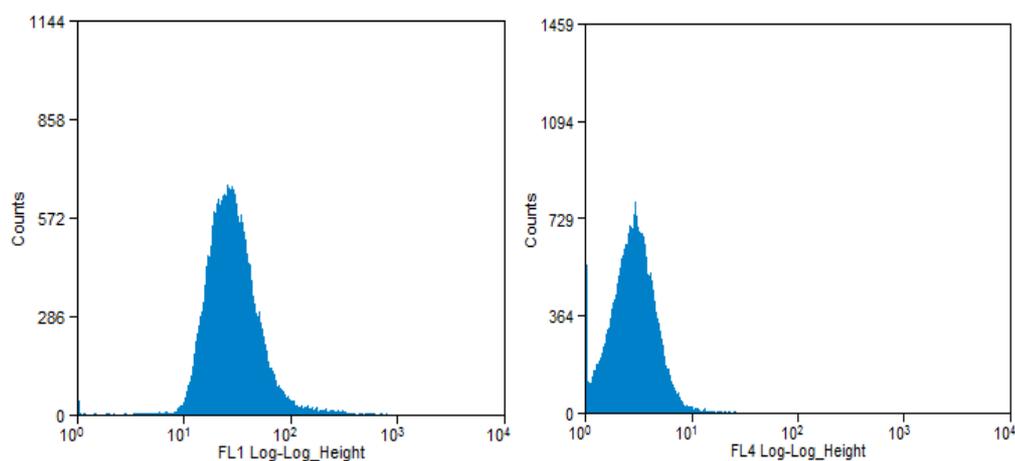


Figura 33. Histogramas control de muerte celular marcados con BOX

El empleo de IP en los controles de muerte celular sirvió para confirmar que este fluorocromo pone de manifiesto células con su membrana dañada, al entrar pasivamente al interior de la misma y unirse al ADN. Un 95,3% de la población fue IP positiva (Fig. 34).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

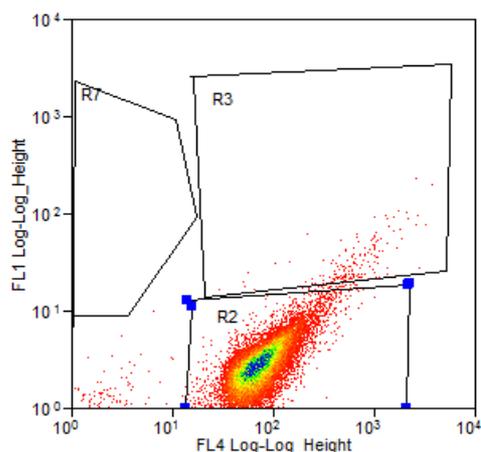


Figura 34. Control de muerte celular marcado con IP

En el histograma del detector FL4 pudo verse el aumento de fluorescencia roja debido al IP (Fig. 35).

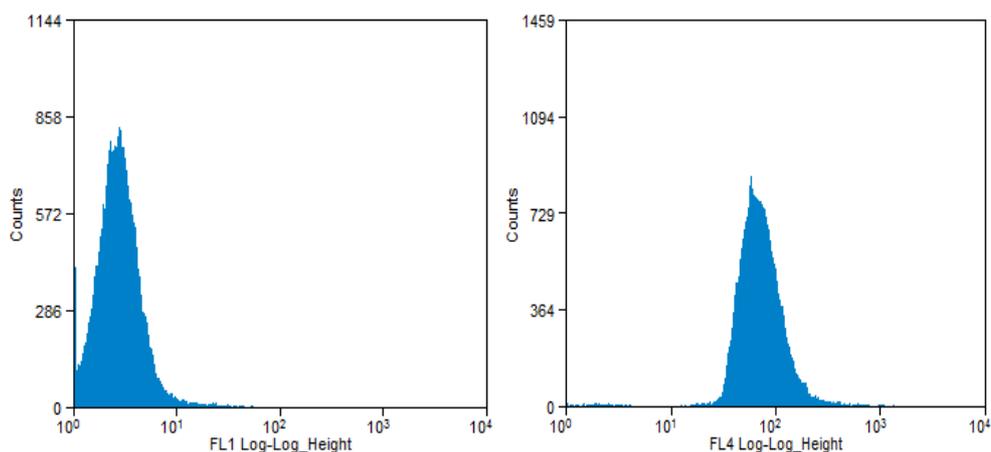


Figura 35. Histogramas control de muerte celular marcado con IP

iii) Mezclas vivas-muertas en la misma proporción

Se realizaron también mezclas (1:1) correspondientes a controles de bacterias vivas-muertas para verificar que en poblaciones fisiológicamente heterogéneas la tinción con dos fluorocromos simultáneamente permite separare identificar als diferentes subpoblaciones.

El marcaje con CFDA puso de manifiesto como aproximadamente la mitad de la población se tiñó (células metabólicamente activas, 55,19% del total) y el porcentaje restante no se tiñó (células presumiblemente muertas) (Fig. 36)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

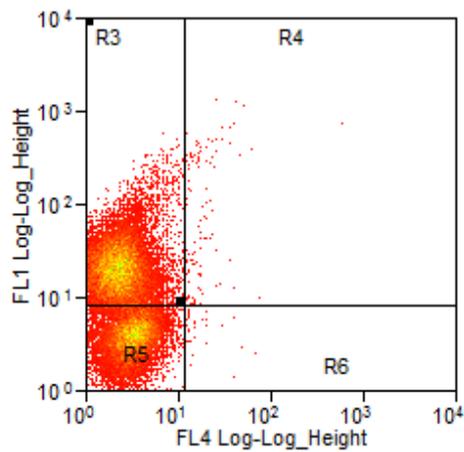


Figura 36. Mezcla células en crecimiento exponencial y células sometidas a tratamiento térmico en la misma proporción marcada con CFDA

Los histogramas también permitieron apreciar dos subpoblaciones en FL1, una sin marcar y otra marcada con CFDA (ventana R2) (Fig. 37, izquierda)

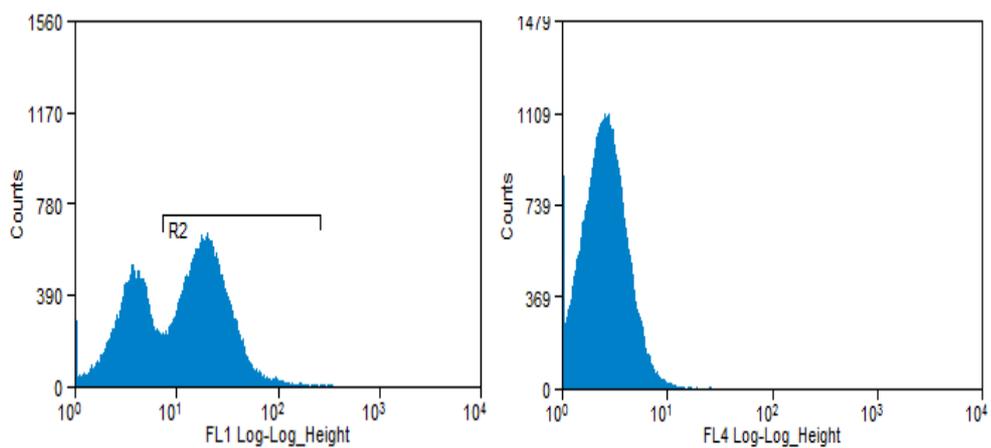


Figura 37. Histogramas mezcla marcada con CFDA

Al marcar con IP una mezcla equivalente a la anterior, se apreció como una parte de la población (59,04% del total de eventos) se marcó con IP mientras el resto no se marcó con dicho fluorocromo. (Fig. 38).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

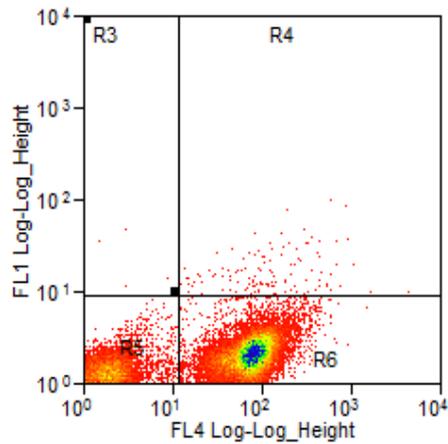


Figura 38. Mezcla células vivas y muertas marcada con IP

Los histogramas permitieron comprobar la presencia en FL4 de dos subpoblaciones: una sin marcar y otra marcada con IP (ventana R2) (Fig. 39)

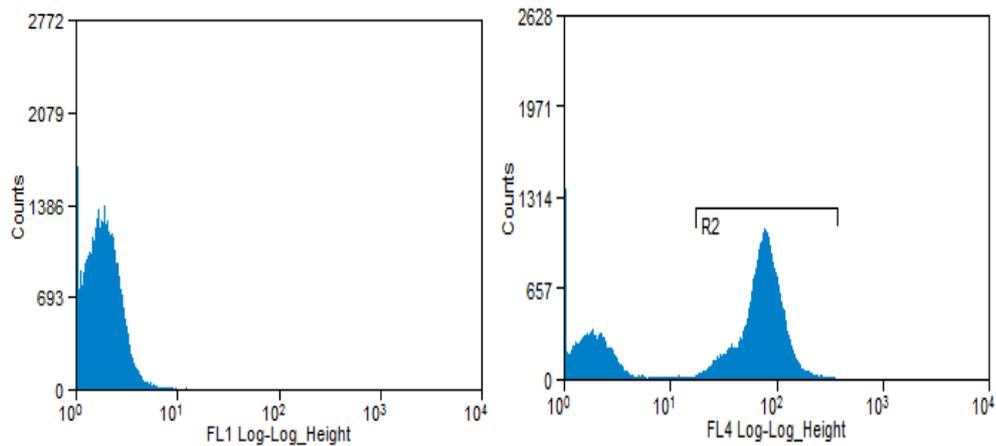


Figura 39. Mezcla marcada con IP

La doble tinción con CFDA e IP permitió distinguir entre cuatro subpoblaciones en la muestra: marcadas con CFDA (R3; 31,30% del total de eventos), doblemente marcadas con CFDA e IP (R4; 27,97% del total), sin teñir (R5) y marcadas únicamente con IP (R6; 24,20%) (Fig. 40).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

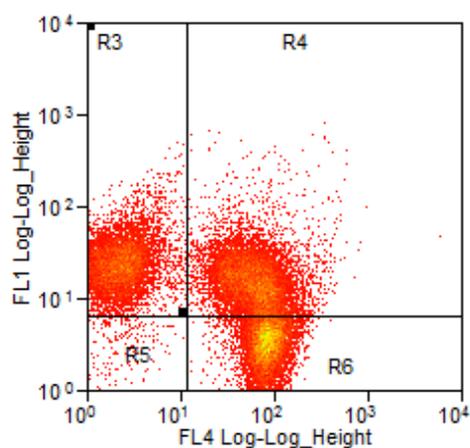


Figura 40. Mezcla 1:1 células en crecimiento exponencial y células con tratamiento térmico y doblemente marcadas con CFDA e IP.

Los histogramas permitieron discernir entre células no marcadas y marcadas con CFDA (ventana R2) o con IP (ventana R7) (Fig. 41).

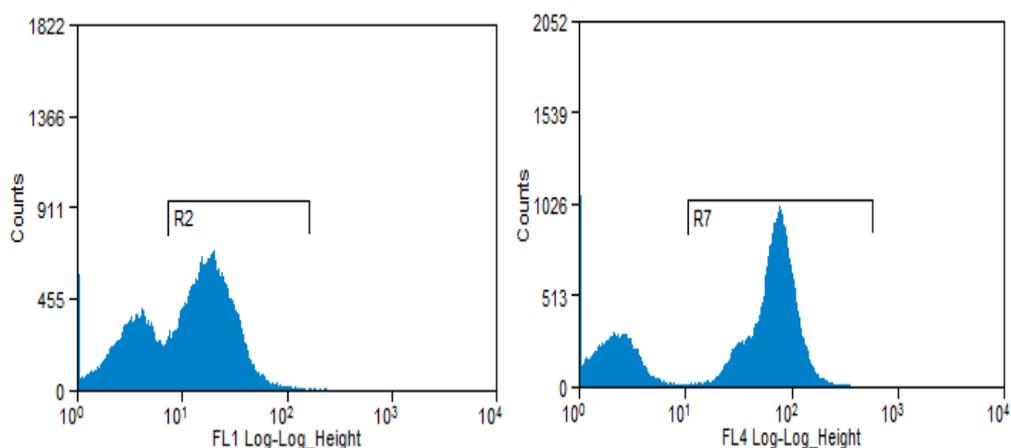


Figura 41. Histogramas mezclas en igual proporción células en crecimiento exponencial y células con tratamiento térmico

También se estudió el marcaje con BOX en las mezclas, para poner de manifiesto la despolarización de la membrana. En el citograma se apreciaron dos subpoblaciones, marcadas con BOX (R7; 67,8% del total) y no marcadas (Fig. 42).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

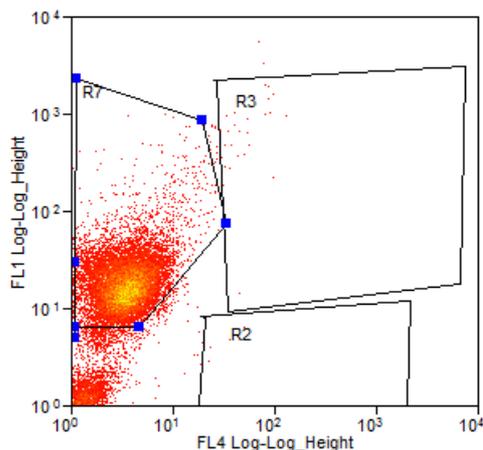


Figura 42. Mezcla 1:1 células en crecimiento exponencial y células sometidas al tratamiento térmico marcadas con BOX

Los histogramas permitieron detectar la presencia en FL1 de un porcentaje de la población marcado con BOX (ventana R3) y otra subpoblación no marcada. Sin embargo, en FL4 no se apreció aumento de fluorescencia roja, como cabía esperar ya que no se habían marcado con IP (Fig. 43)

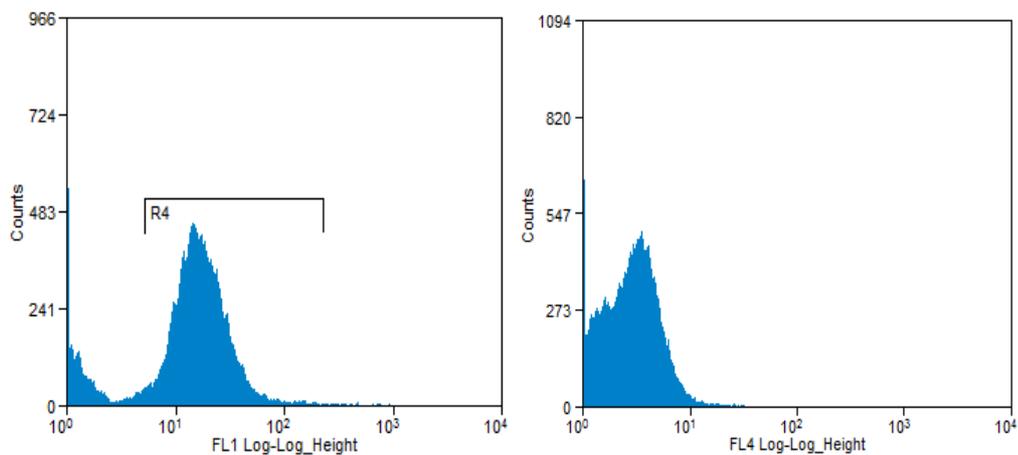


Figura 43. Histogramas mezcla 1:1 marcada con BOX

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el caso del marcaje con IP, los resultados de la adquisición, pusieron de relieve la presencia de una parte de la población sin marcar y otra marcada con IP (ventana R2; 54,3% del total) (Fig. 44)

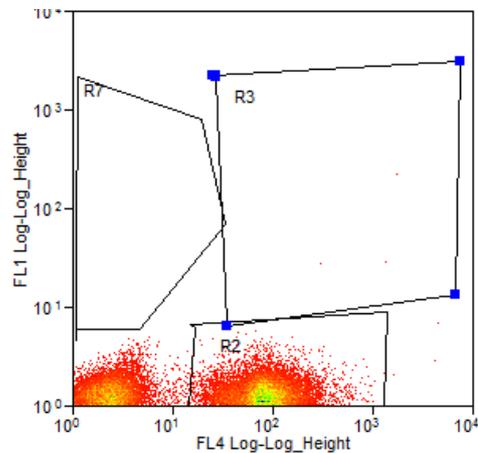


Figura 44. Mezcla vivas- muertas marcada con IP

El histograma en FL4 también permitió ver esta diferenciación (fig. 45, derecha) La ventana R4 muestra la parte de la población marcada con IP

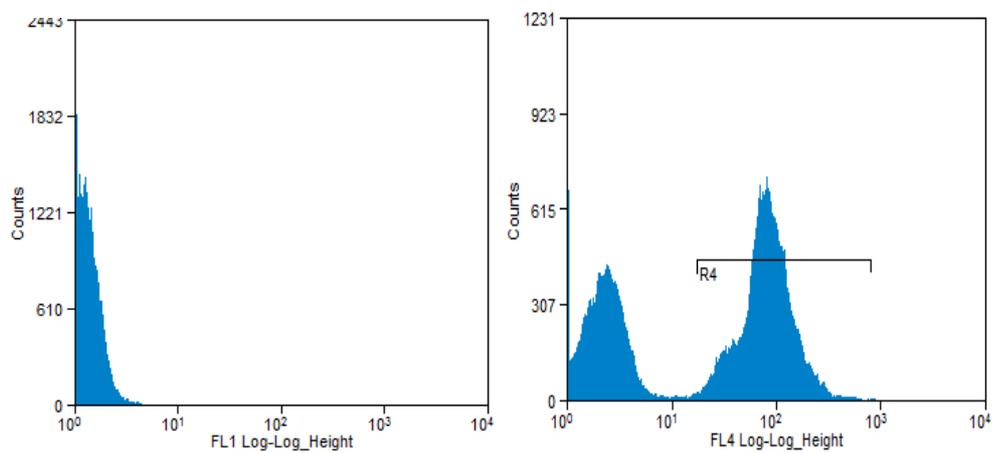


Figura 45. Histogramas correspondientes a la mezcla 1:1 marcada con IP

En el citograma de la mezcla marcada con BOX e IP (fig. 46) se pueden observar cuatro subpoblaciones, siendo las más numerosas la correspondiente a las células sin marcaje, formada por las células en crecimiento exponencial y las células doblemente marcadas con BOX e IP, constituida por células presumiblemente muertas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

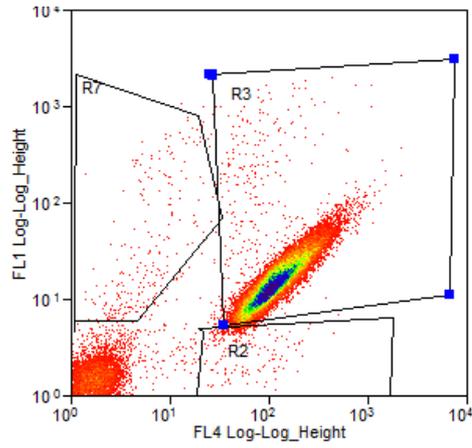


Figura 46. Citograma mezcla marcada con BOX e IP

Los histogramas ponen de manifiesto la presencia de cuatro subpoblaciones: sin marcar con BOX, despolarizadas (ventana R5 en FL1) marcadas con IP (ventana R4 en FL4) y sin marcar con IP (Fig. 47)

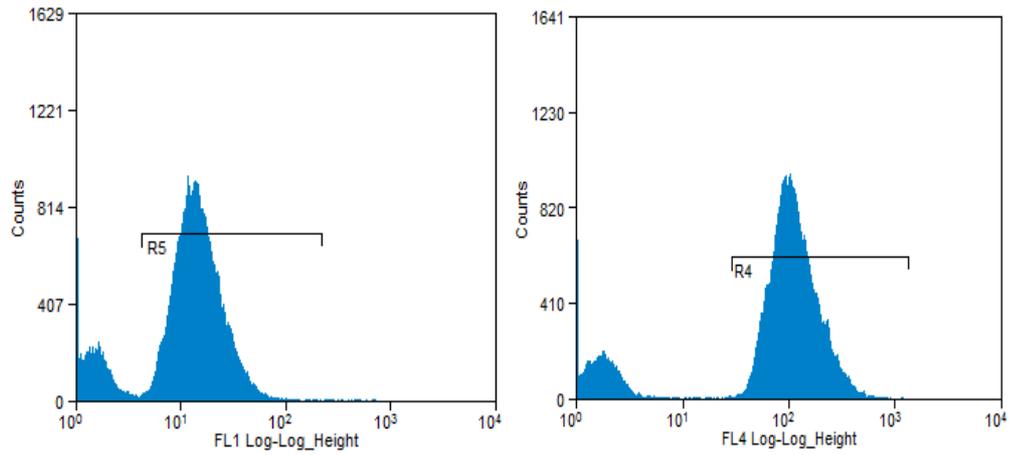


Figura 47. Mezcla 1:1 marcada con BOX e IP

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

iv) Controles de cultivos en leche:

En este caso, las fueron procesadas de la misma forma que los controles de cultivos crecidos en MRS. Se comprobó que el marcaje con CFDA permitió poner de manifiesto las células metabólicamente activas de la población. En el citograma se observó, de manera similar a los controles en crecimiento exponencial en MRS, un alto número de eventos (87,21% del total) en el cuadrante R3 (Fig. 48) correspondiente a las células CFDA⁺

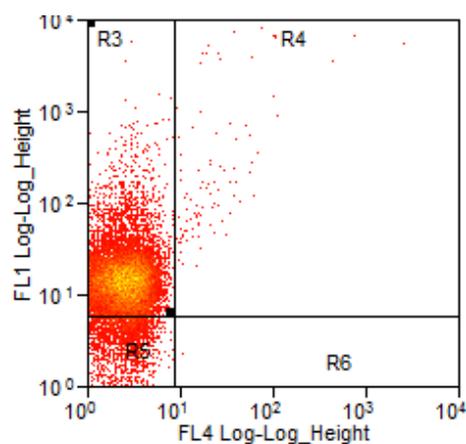


Figura 48. Citograma de cultivo de fase exponencial de crecimiento en leche marcado con CFDA

En los histogramas, en FL1 se vio un aumento de fluorescencia verde debido al marcaje con CFDA, mientras en FL4 no se apreciaron cambios (Fig. 49)

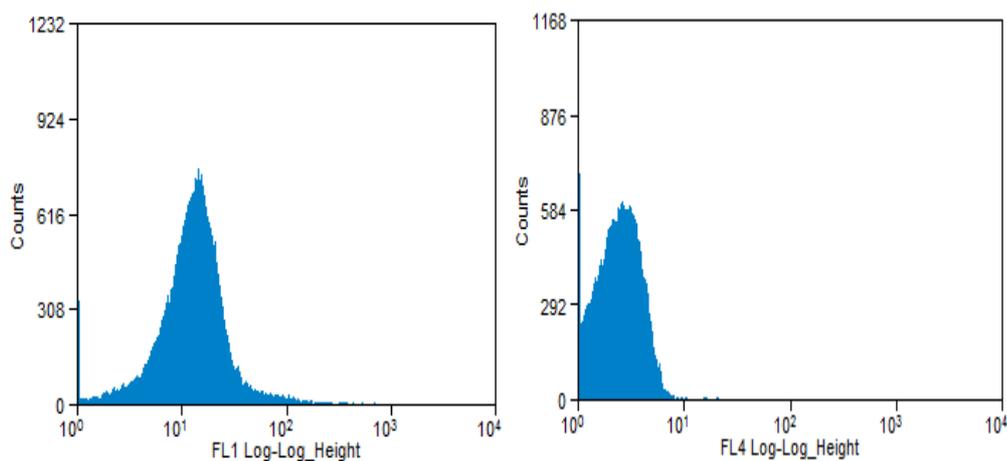


Figura 49. Histogramas fluorescencia verde (FL1) y roja (FL4) control crecimiento en leche marcado con CFDA

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con IP y de nuevo de manera similar a los controles realizados en crecimiento en medio de cultivo MRS, el porcentaje marcado en rojo fue bajo, (R6; 3,12%) al tratarse de un cultivo en fase de crecimiento exponencial (Fig. 50)

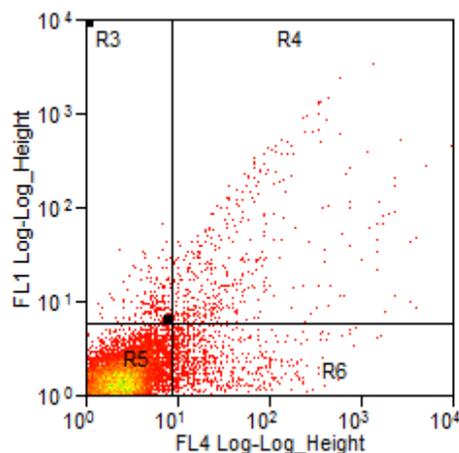


Figura 50. Cultivo en leche marcado con IP

Los histogramas llevaron a la misma conclusión, no se apreció ningún aumento significativo de fluorescencia ni en FL1 ni en FL4 (Fig. 51)

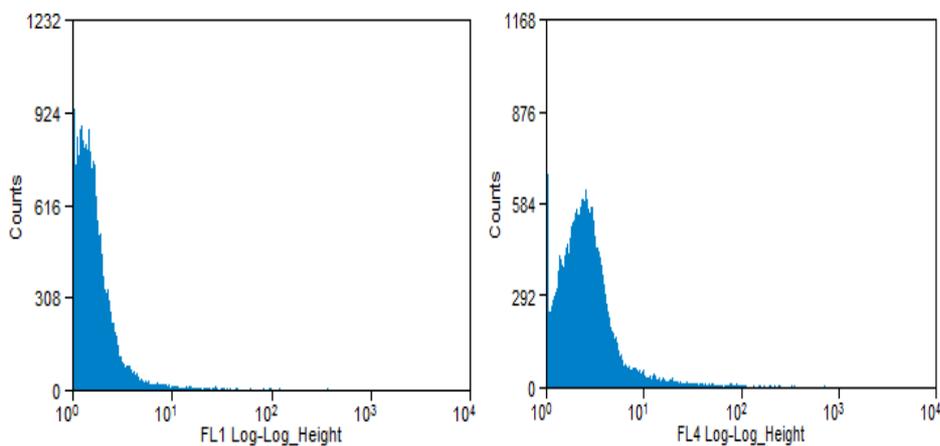


Figura 51. Histogramas células cultivadas en leche y marcadas con IP

El doble marcaje CFDA e IP (Fig. 52) puso en relieve un patrón de marcaje similar al de los fluorocromos individualmente. La subpoblación mayoritaria es la marcada con CFDA (89%) y por tanto, metabólicamente activa (R3) La población doblemente marcada (R4) supuso sólo el 0,74% del total.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

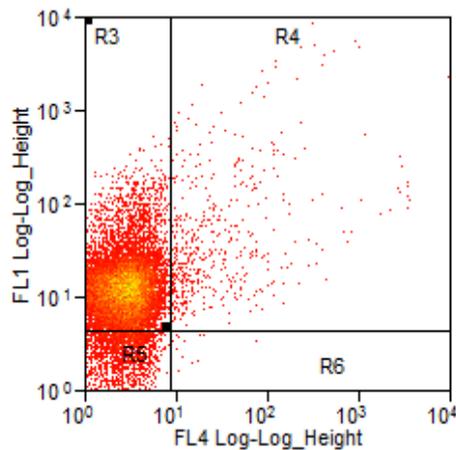


Figura 52. Cultivo crecimiento en leche doblemente marcado con CFDA e IP

Los histogramas apuntaron en la misma dirección, se apreció un aumento de fluorescencia verde, debido al CFDA (FL1) mientras la roja debida al IP apenas sufrió cambios (FL4) (Fig. 53)

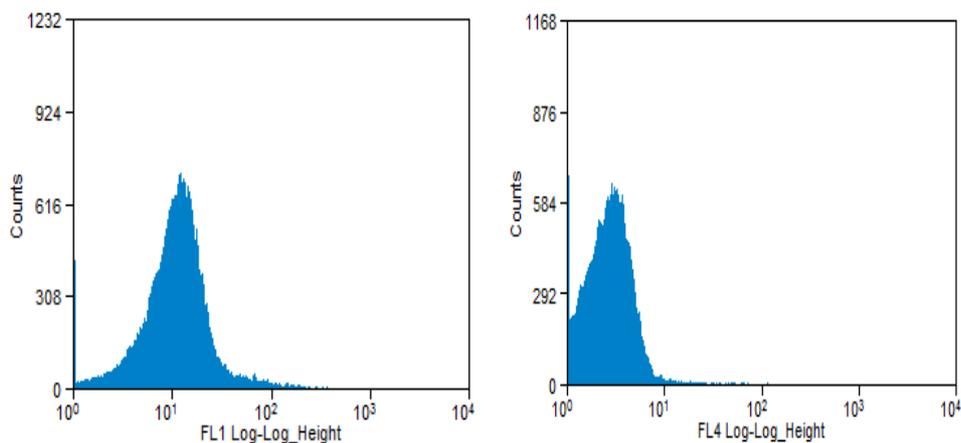


Figura 53. Histogramas cultivo en leche doblemente marcado (CFDA e IP)

El marcaje con BOX (Fig. 54) indicó un porcentaje de células despolarizadas bajo (ventana R7; 6,51%), aunque ligeramente superior al presentado en los cultivos en medio semi-sintético. Esto era esperable, ya que los medios de cultivo artificiales proporcionan todos los nutrientes necesarios para el crecimiento; esto hace que la fase de aclimatación a un medio de crecimiento diferente como es la leche sea más prolongada y cause cierto estrés energético a las células, provocando la despolarización de las mismas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

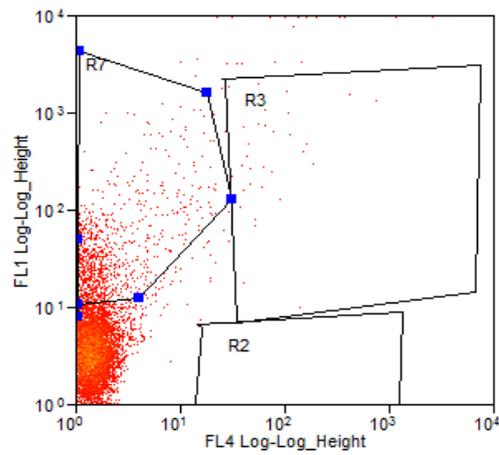


Figura 54. Crecimiento en leche y marcaje con BOX

En el histograma de FL1 (Fig. 55) también se apreció esa pequeña proporción de células despolarizadas (ventana R4) mientras no se observaron cambios en FL4.

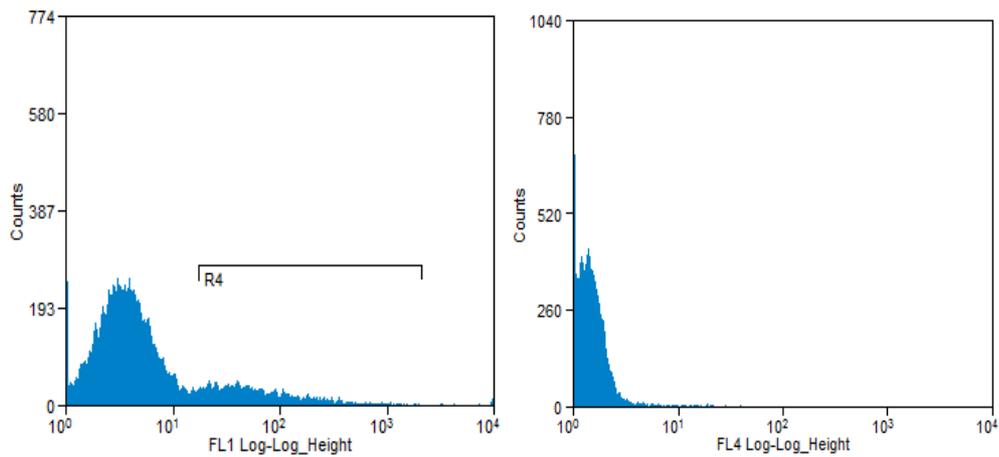


Figura 55. Histogramas crecimiento en leche y marcaje con BOX

En el marcaje con IP, se apreció un porcentaje bajo de células marcadas con IP (ventana R2; 1,42%) (Fig. 56)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

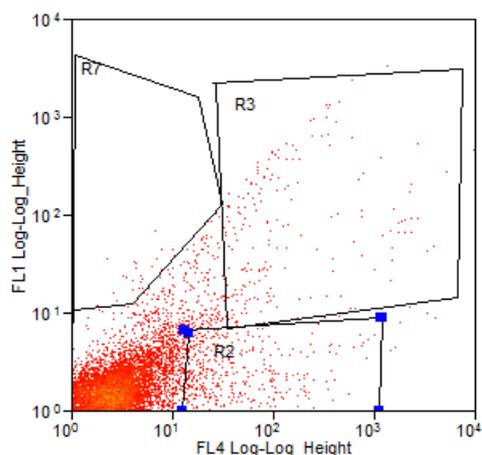


Figura 56. Crecimiento en leche marcado con IP

El histograma en FL4 permitió observar el mismo patrón de marcaje (Fig. 57)

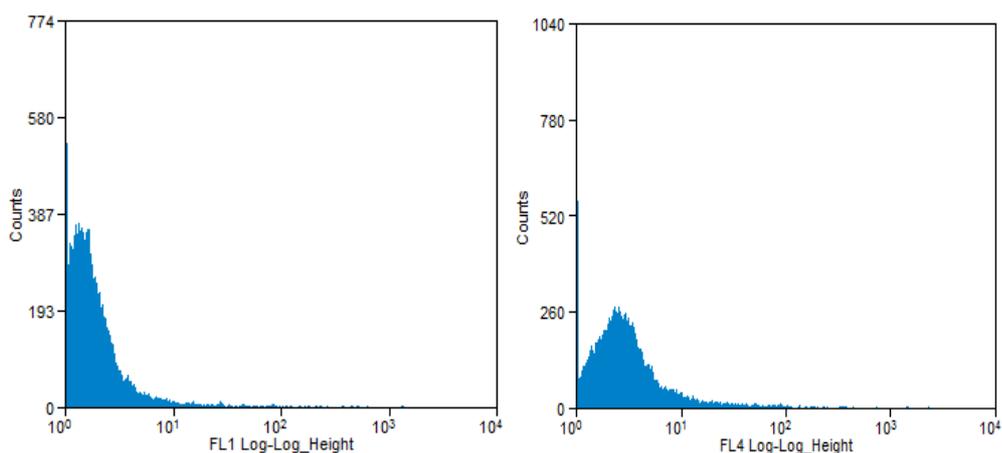


Figura 57. Histogramas crecimiento en leche marcaje con IP

El marcaje simultáneo con BOX e IP (Fig. 58) permitió distinguir las cuatro subpoblaciones, siendo mayoritaria la que no se marcó, de manera que la población que tiene su membrana comprometida fue minoritaria. Las doblemente positivas BOX e IP supusieron únicamente el 1,94% del total de eventos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

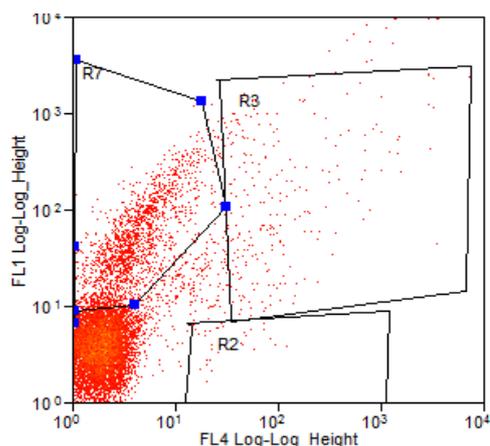


Figura 58. Distribución de las diferentes subpoblaciones en el crecimiento en leche, marcaje simultáneo con BOX e IP

Esta distribución del conjunto de la población fue muy similar al obtenido en los controles en medio de cultivo semi-sintético. Los histogramas (Fig. 59) también mostraron la misma distribución.

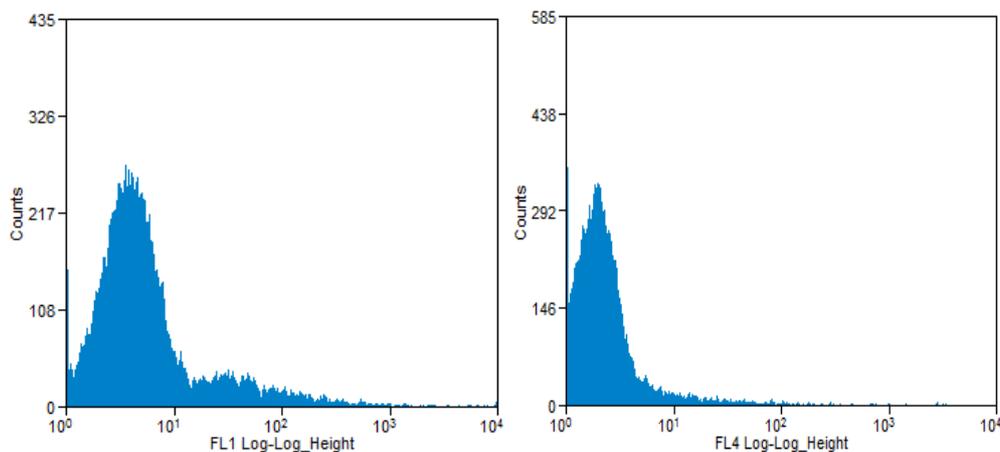


Figura 59. Histogramas crecimiento en leche, marcaje con BOX e IP

Como se señaló, los controles en leche se comportaron en cuanto a patrón de marcaje fluorescente de manera similar a los controles realizados con cultivo en medio de cultivo semi-sintético. El funcionamiento del sistema fluídico del citómetro no se vio afectado, de manera que obviar los pretratamientos de clarificación de la leche publicados en otros trabajos (Gunasekera y col. 2000, Bunthof y col. 2001 y 2002) no

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

trajo mayores problemas en la consecución de la labor experimental de este trabajo, dentro del propósito del mismo.

Al manejar un número tan elevado de eventos (50.000 eventos en cada adquisición) la representatividad de las muestras fue muy elevada.

4.2. Separación celular activada por fluorescencia (FACS)

Se ensayó esta técnica para separar las cuatro subpoblaciones obtenidas con las tinciones duales con los fluorocromos seleccionados, y verificar sus estados fisiológicos, como su capacidad o no de crecer en medio de cultivo semi-sintético.

Se seleccionó para la separación en placas Petri el modo *purify*, que permite discriminar mejor a la hora de realizar la separación: al formarse las gotas por la vibración de la boquilla en el equipo, el láser las atraviesa y detecta si la célula está marcada por uno u otro fluorocromo o ambos. La célula debe encontrarse en el centro de la gota, y una vez detecta una gota adecuada, selecciona justo la siguiente para comenzar la separación. En caso de duda con respecto al marcaje de la gota o si la célula no se encuentra en el centro de la misma, el citómetro la desecha. Este modo de operación del aparato requiere mayor cantidad de muestra, ya que la mayoría va a ser descartada durante el análisis, pero ofrece una alta fiabilidad a la hora de discriminar eventos con distinta fluorescencia.

Para la separación, se establecieron una serie de ventanas en el citograma de fluorescencia verde frente a fluorescencia roja, dentro de las ventanas correspondientes a cada subpoblación, para que dentro de dichas áreas seleccionara los eventos marcados con determinado fluorocromo, con ambos o con ninguno. Se separaron las regiones de una en una y se dispuso el resultado de cada separación en una placa Petri diferente.

El análisis FACS se realizó primeramente en placa Petri. En el citograma (Fig. 60, izq.) se observaron las cuatro subpoblaciones, obteniéndose porcentajes de IP positivas (R1; 4,58%); BOX positivas (24,58%), doble positivas BOX e IP (16,36%) y eventos sin marcar el 56,30%.

Al observar las placas, tras 72 horas de incubación a 30°C se comprobó la correcta separación de las colonias formadas (Fig. 60, derecha)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

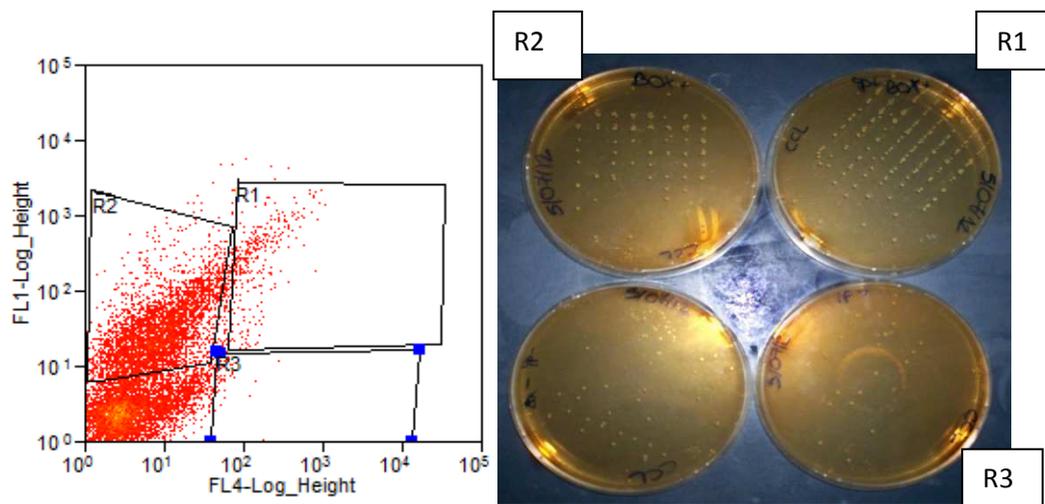


Figura 60. Citograma de la muestra que se separó e imagen de las placas procedentes de FACS

Se pudo apreciar como en las placas correspondientes a BOX positivas y las doble positivas para ambos fluorocromos, la matriz y el número de colonias era muy similar. Está demostrado que células bacterianas inicialmente despolarizadas pueden volver a repolarizarse e incluso formar colonias (Kaprelyants y col. 1993) esto pareció concordar con la capacidad observada de células marcadas con BOX (despolarizadas) tras el FACS de formar colonias en el medio de cultivo empleado (parte superior izquierda Fig. 60)

Se observaron algunas colonias también en la placa correspondiente las IP positivas, aunque en baja proporción, cuando no era esperables que tuviesen capacidad de recuperación y crecimiento (Amor y col. 2002). Este hecho podría explicarse por la presencia de algunas células no teñidas, como se observa en parte superior izquierda de la ventana R3 de la figura del citograma (Fig. 60).

En el caso de doblemente negativas (BOX negativas e IP negativas) no hubo tantas colonias como las esperadas, ya que en esa ventana deberían encontrarse las células en condiciones óptimas de actividad metabólica. Estaba descrito previamente que la técnica FACS puede llegar a ocasionar daños a las células durante el proceso de separación y siembra en la placa de cultivo, pudiendo afectar por tanto a su viabilidad y disminuyendo su capacidad de recuperación en el medio de crecimiento (Porter y col. 1993, Bunthof y col. 2001, Amor y col. 2002). Esto podría explicar la baja formación de colonias respecto a los resultados esperados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se repitió la separación, con el mismo procedimiento anterior (Fig. 61) realizando además la separación también en tubos conteniendo medio líquido MRS.

Los resultados de esta nueva separación de las cuatro subpoblaciones en placas Petri arrojaron resultados muy similares a la anterior, aunque en esta ocasión no se separó la subpoblación IP^+ (R3) al no haber eventos en dicha región.

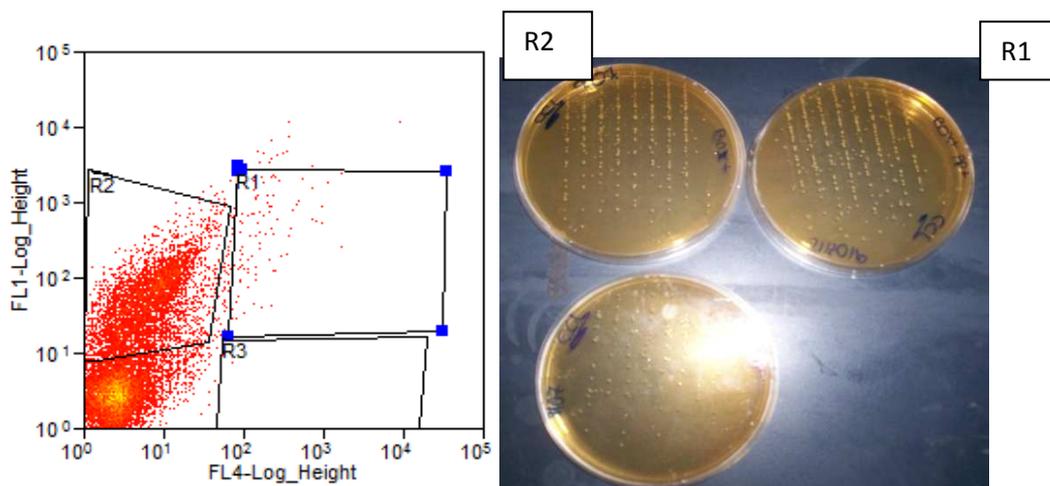


Figura 61. Citograma de la muestra que se separó e imagen de las placas procedentes de FACS

Se separaron asimismo las subpoblaciones en el doble marcaje CFDA/IP, de nuevo no se encontraron eventos dentro de la subpoblación IP^+ por tanto no se pudo separar dicha subpoblación. Los resultados en placa fueron muy similares a la separación realizada con BOX e IP. (Fig. 61)

Para la separación en tubos se usó el modo normal del *sorter*, el cual tiene menor poder de discriminación, separándose en cada tubo 2000 eventos, lo que requería menor cantidad de muestra y el porcentaje de error no era muy significativo.

Los tubos de FACS permitieron cuantificar la capacidad de crecimiento tras la separación en medio MRS. Junto con los tubos donde se recogieron las subpoblaciones separadas, se incluyó un tubo como control (Fig.62) con caldo de cultivo pero sin microorganismos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

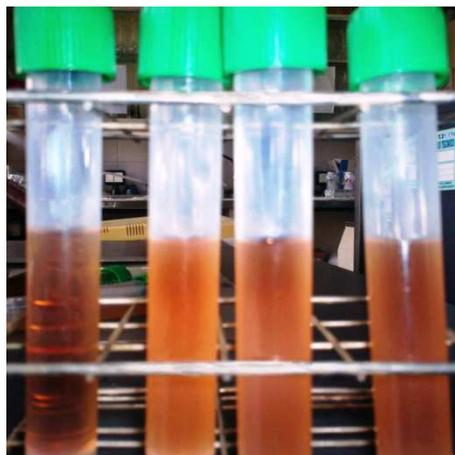


Figura 62. Tubos caldo MRS tras FACS y 30 horas de incubación. De izquierda a derecha: tubo control, el tubo conteniendo la subpoblación separada correspondiente a la región CFDA positiva, a la región CFDA e IP positivas, y a la región BOX positiva respectivamente.

Todos los tubos presentaron turbidez tras 30 horas de incubación a 30°C (a excepción del control, IP⁺ y BOX⁺IP⁺), siendo la turbidez mayor en el correspondiente a la subpoblación CFDA positiva. Cuando se repitió el mismo procedimiento con cultivos de *Lb. casei* en las mismas condiciones pero sin el *sorting*, a las 18 horas de incubación ya había turbidez aparente en el medio líquido, sin embargo, en las muestras obtenidas de la separación, la turbidez no fue patente hasta las 30 horas. Esto podría apuntar a la posible pérdida de viabilidad tras FACS que se comentó anteriormente, haciendo que las células precisen tiempos más largos de recuperación antes de ser capaces de dividirse en medio líquido.

Para confirmar que no hubo contaminación en los tubos tras la separación, ya que la misma no se realizó en condiciones estrictas de esterilidad debido a la mínima pero necesaria manipulación del equipo, se sembró una alícuota de los mismos cultivos en placas de agar MRS, que se incubaron 48 horas a 30°C, como control. Las colonias obtenidas tras este periodo presentaron únicamente la morfología típica del género *Lactobacillus sp*, sin observarse en ningún caso colonias con distintas morfologías.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3. Microscopía

Para confirmar que la separación había sido correcta, se realizó de manera simultánea a la separación en placas y tubos una separación de 2.000 eventos que fueron recogidos en portaobjetos. Las muestras obtenidas en el portaobjetos se observaron inmediatamente en el microscopio de fluorescencia, para evitar en la medida de lo posible que dichas muestras se secaran, pero a pesar de ello, no fue posible observar todas las preparaciones.

La muestra marcada simultáneamente con BOX/IP si se pudo observar al microscopio de fluorescencia y se confirmó que las células presentes habían incorporado simultáneamente ambos colorantes, tanto BOX (fluorescencia verde) como IP (fluorescencia roja) simultáneamente (Fig. 63).



Figura 63. Imagen al microscopio de fluorescencia de las células procedentes de la separación celular de las células doblemente marcadas con BOX e IP. En la parte superior aparece una célula marcada con ambos fluorocromos.

4.4. Proceso fermentativo

La fermentación ácido-láctica se realizó en matraces conteniendo un volumen de 350 mL de leche desnatada UHT comercial, a 30° C. En un primer momento, se realizó por duplicado la fermentación en condiciones estáticas, sin agitación, tomando para el muestreo únicamente la biomasa en suspensión. Alternativamente se repitió la fermentación, también por duplicado, en las mismas condiciones pero bajo condiciones de ligera agitación (100 rpm), para favorecer las condiciones de mezcla y comprobar su

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

influencia en el proceso aunque el metabolismo fermentativo de las bacterias lácticas no requiere aireación al ser microarófilas, sin que el oxígeno resulte tóxico.

A lo largo del proceso fermentativo se observó junto con el crecimiento de la biomasa un descenso del pH (Fig. 64 y Fig. 65), debido a la producción asociada de ácido láctico. La curva de crecimiento a lo largo del tiempo se obtuvo midiendo la densidad óptica a 600 nm obtenida en el transcurso del bioproceso (Fig. 66). Los descensos de pH de durante el muestreo fueron más pronunciados cuando la fermentación se realizó con agitación, lo que indicó unas mejores condiciones del proceso. En ambos casos, se mantuvo la misma temperatura de incubación y el nivel de inoculación fue el mismo, correspondiendo a 10^7 UFC/mL.

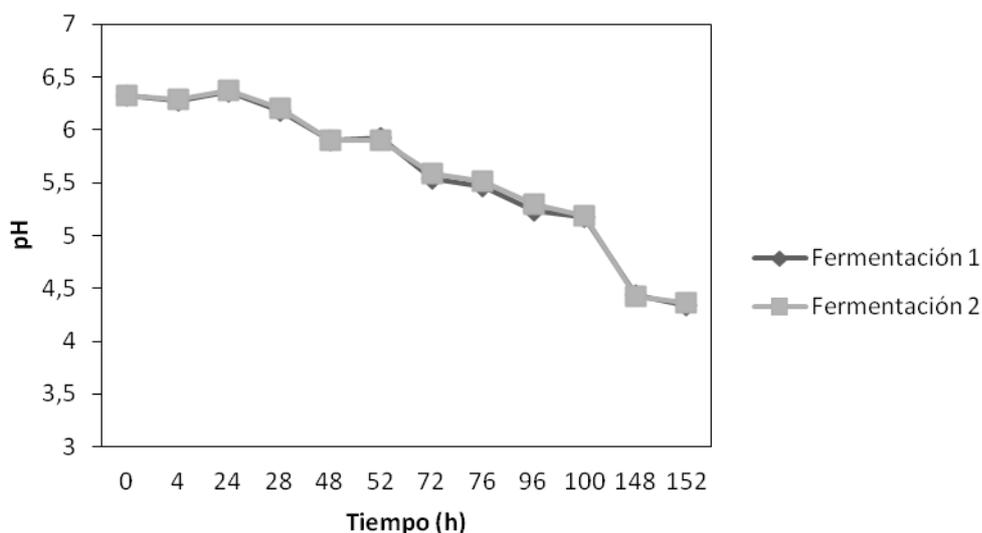


Figura 64. Variación de la medida de pH a lo largo del transcurso del proceso fermentativo (sin agitación). En la gráfica se muestran los valores correspondientes a cada uno de los experimento por duplicado (fermentación 1 y 2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

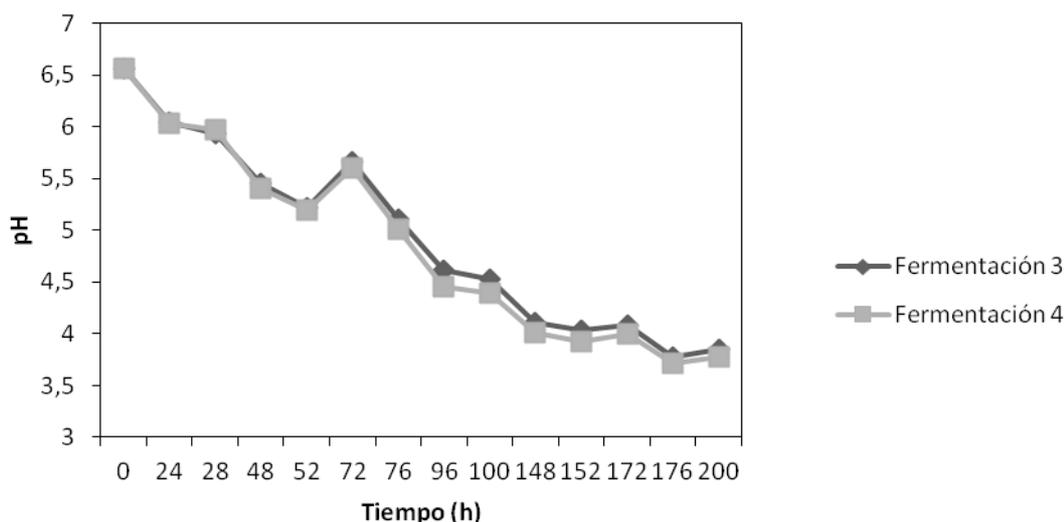


Figura 65. Variación de la medida de pH a lo largo del transcurso del proceso fermentativo (con agitación). Se muestran los resultados del mismo experimento por duplicado (fermentación 3 y 4).

Comparando ambas gráficas de variación de pH, se pudo observar cómo la disminución del pH fue menor cuando no hubo agitación. Por esta razón, a partir de este momento, se todos los experimentos realizaron con agitación. La agitación favorece el intercambio de materia y por ello, la acidificación ocurre en menor tiempo. El seguimiento de la biomasa en las fermentaciones en estático mostró oscilaciones importantes entre los duplicados, ya que, al considerar únicamente la biomasa en suspensión, la toma de muestra fue poco homogénea, y los resultados fueron poco representativos.

Se hizo un seguimiento de la D.O. en los experimentos por duplicado de las fermentaciones con agitación (Fig. 66) mostró la evolución de la biomasa a lo largo del tiempo. Se observó un aumento de la biomasa hasta las 100-148 horas, momento en que se estabilizó, entrando en fase estacionaria. La misma conclusión se pudo comprobar mediante el seguimiento del pH (Fig. 64) donde se vio también la estabilización a las 100-148 horas, indicando el final del proceso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

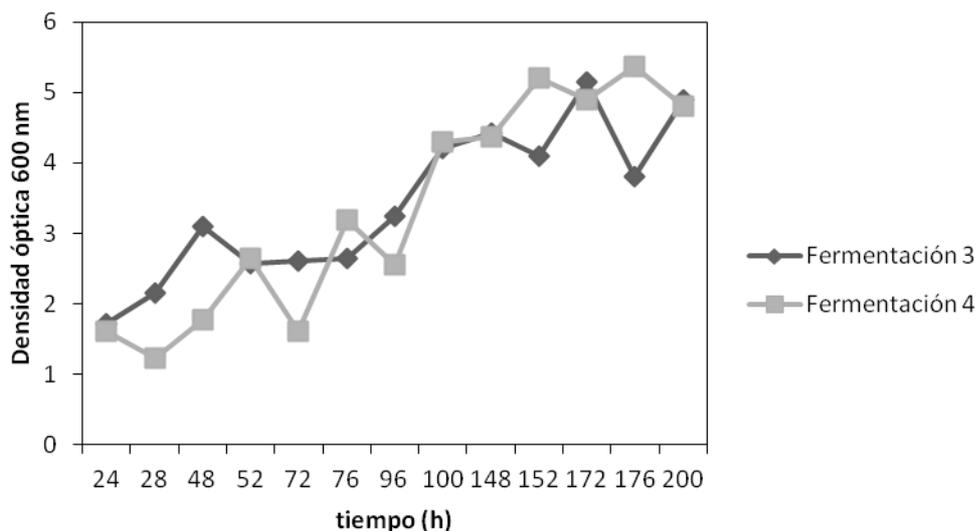


Figura 66. Curva de evolución de la DO a lo largo de la fermentación (con agitación) con *Lb. casei*.

4.4.1. Estados fisiológicos a lo largo del proceso fermentativo

En paralelo, en cada toma de muestra, se aplicó la técnica de citometría de flujo para identificar y estudiar la evolución de los diferentes estados fisiológicos del cultivo iniciador presentes a lo largo del proceso.

Otros trabajos publicados habían aplicado distintos tratamientos clarificadores a la leche antes del análisis por citometría de flujo (Gunasekera y col. 2000, Bunthof y col. 2001 y 2002, Yamaguchi y col. 2003) para reducir la posible interferencia de partículas procedentes de la leche que pudieran afectar a la representatividad de los resultados o incluso comprometer el funcionamiento del sistema fluídico del citómetro. Este tipo de tratamientos se realizan con enzimas y/o ácidos diluidos, que pueden dañar las células, de manera que este paso previo podría alterar los resultados obtenidos en la citometría de flujo, siendo precisamente el objeto de este trabajo el estudio y seguimiento de los estados fisiológicos del cultivo iniciador durante el proceso de fermentación.

Una vez comprobado que el protocolo desarrollado se podía aplicar tanto a controles de *Lb. casei* crecidos en medio líquido MRS como en leche desnatada directamente y que la fluorescencia emitida por las partículas procedentes de la leche no era significativa, como ya habían observado Bunthof y col. (2002), sin que se detectaran

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

interferencias ni variaciones en los resultados esperados, no se aplicó ningún pre-tratamiento de clarificación. Se pudo comprobar que el protocolo de tratamiento de las muestras desarrollado en este trabajo para el análisis por citometría de flujo permitía omitir un pre-tratamiento previo de clarificación de la leche, sin afectar a la tinción, adquisición o análisis de las muestras, ni al funcionamiento del citómetro. Por el contrario, el protocolo de procesamiento y tinción de las muestras para su análisis por citometría de flujo puesto a punto en este trabajo pudo ser aplicado durante el desarrollo del cultivo iniciador, sin interferencias con los componentes de la leche ni con los cambios en el medio de fermentación (cambios de densidad y textura) producidos durante el proceso.

Por tanto, las muestras tomadas durante el proceso de la fermentación recibieron el mismo tratamiento que los controles realizados previamente en medio de cultivo semisintético para poner a punto los protocolos de adquisición. Los protocolos de adquisición y análisis definidos con los controles, el valor umbral, las ventanas o *gates* y la compensación fueron los mismos para las muestras de cultivos crecidos en medio líquido semi-sintético, en leche y las muestras obtenidas a lo largo de la fermentación.

4.4.2. Identificación de las distintas subpoblaciones durante el proceso

En el primer día del proceso fermentativo, la proporción de la población marcada con CFDA no fue muy elevada (74,01% aproximadamente) (Fig, 67). Asimismo, en este momento, la concentración celular se mantuvo todavía por debajo de 2 unidades de D.O) (Fig. 66)

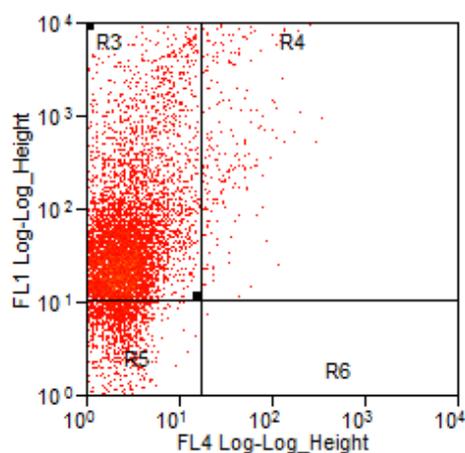


Figura 67. Muestra de la fermentación en el primer día marcada con CFDA

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el caso del IP, el porcentaje de células marcadas no fue excesivamente alto (5,15%), lo cual concuerda con una población al inicio de un proceso de fermentación (Fig. 69).

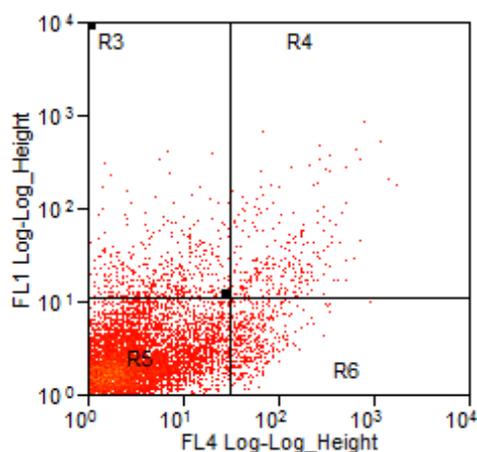


Figura 69. Primer día de la fermentación marcado con IP

Con ambos fluorocromos a la vez, CFDA e IP, se pudieron identificar dos subpoblaciones, correspondientes a células con la actividad metabólica y a células doblemente teñidas, dañadas (*damaged cells*) pero que mantenían actividad enzimática. Como cabía esperar, en el primer día de la fermentación la proporción de células metabólicamente activas (R3) fue superior al de células dañadas (R4) (Fig. 70)

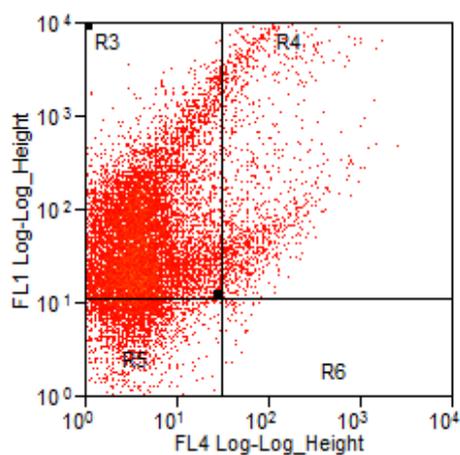


Figura 70. Primer día de la fermentación, marcaje con CFDA e IP

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los histogramas obtenidos para ambos detectores se muestran en la Fig. 71.

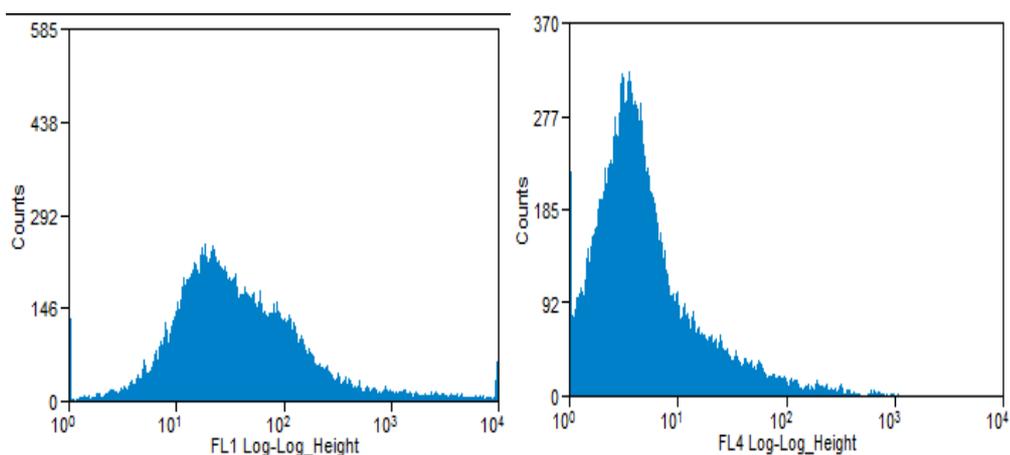


Figura 71. Histogramas primer día de la fermentación, marcaje con CFDA e IP

En el caso del BOX, se encontró un valor que fue algo más alto de lo que se obtuvo en los días posteriores (R7; 9,31% del total de eventos). Esto puede ser debido a una fase de aclimatación al cambio de condiciones ambientales, tras la inoculación, que ocasiona que los microorganismos se estresen provocando que se despolarice su membrana.

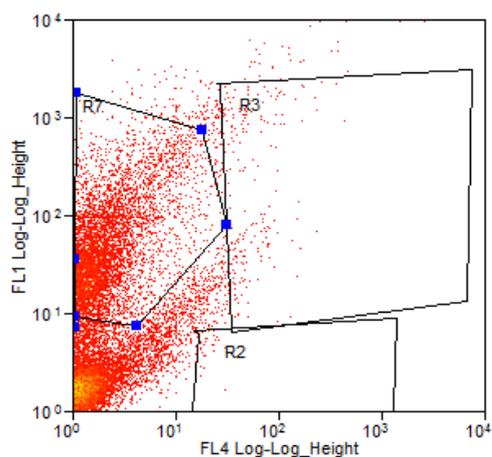


Figura 72. Primer día de la fermentación, marcaje con BOX

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el caso del IP, como se esperaba, el porcentaje de células positivas no fue elevado (R3; 3,15%) (Fig. 73)

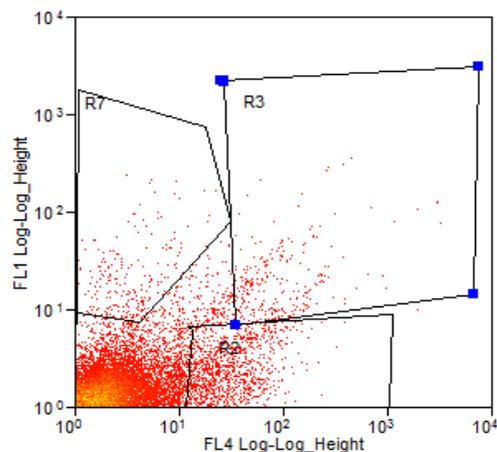


Figura 73. Primer día fermentación, tinción con IP

El doble marcaje con BOX e IP permitió distinguir e identificar las cuatro subpoblaciones posibles (Fig. 74). La región R7 corresponde a las células despolarizadas (12,05%), en R3 las doblemente marcadas (BOX e IP positivas) y en R2 las IP positivas (2,24%)

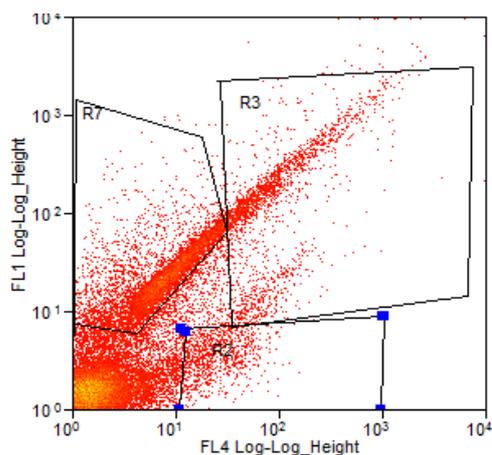


Figura 74. Citograma primer día fermentación con BOX e IP

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

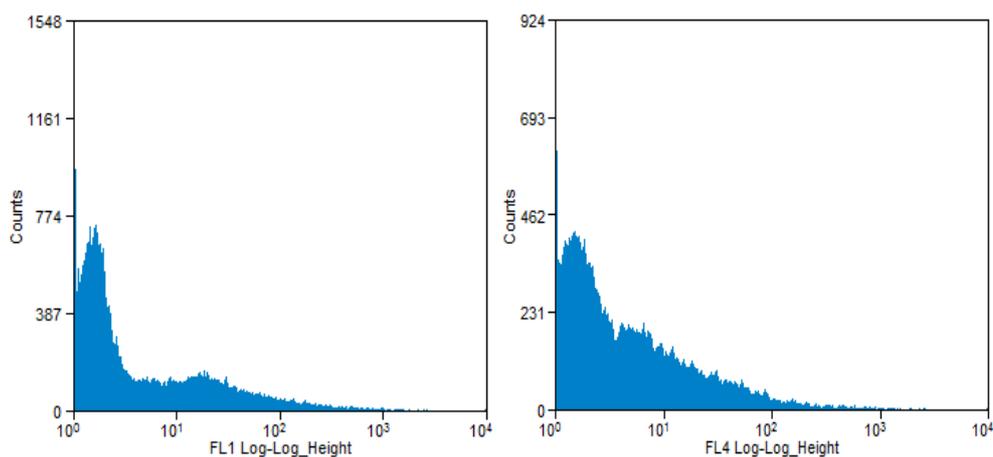


Figura 75. Histogramas primer día de la fermentación, marcaje con BOX e IP

A las 148 horas desde el inicio de la fermentación, se produce la estabilización de pH y DO. Al analizar en ese momento de la fermentación por CMF con CFDA, la mayoría de la población resultó ser metabólicamente activa (R3; 95,73 %) (Fig. 76) como vino ocurriendo desde que se inició la fermentación.

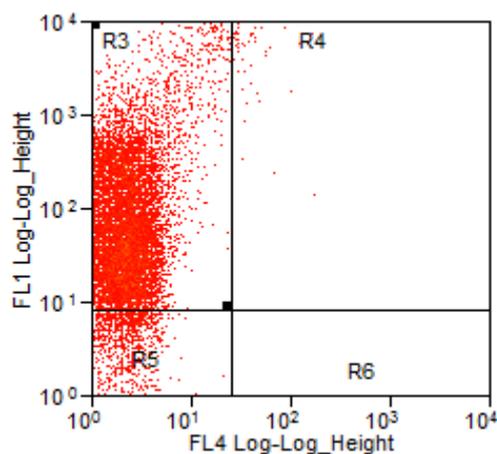


Figura 76. Citograma muestra marcada con CFDA tras 148 horas de fermentación

Con IP, el porcentaje de fluorescencia roja se mantuvo similar a días anteriores (IP positivas, R6; 6,20 %) (Fig. 77)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

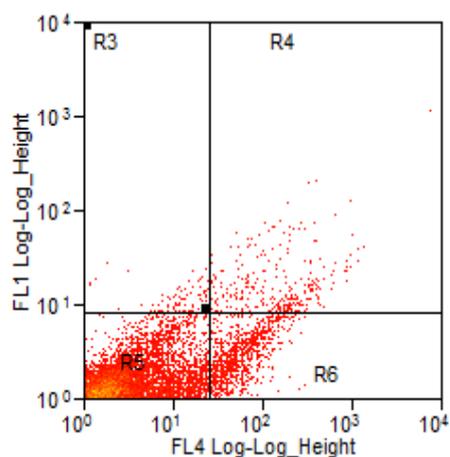


Figura 77. Citograma muestra marcada con IP tras 148 horas de fermentación

Con marcaje dual con CFDA e IP se observaron resultados concordantes con los marcajes individuales (Fig. 78), la mayoría de la población se encontraba metabólicamente activa (CFDA positivas) R4 representando las células doblemente positivas (2,46 % del total).

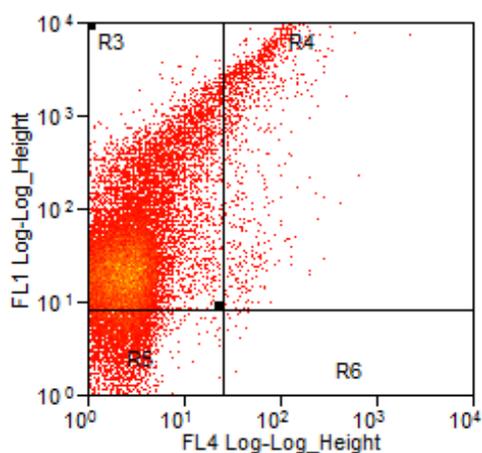


Figura 78. Citograma muestra marcada con CFDA e IP tras 148 horas de fermentación

Cuando las muestras se tiñeron con BOX, se observó un aumento progresivo del porcentaje de BOX positivas (R7) (10,79%) (Fig. 79)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

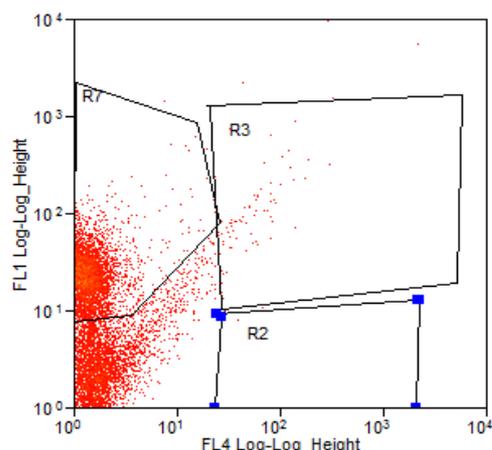


Figura 79. Citograma muestra marcada con BOX tras 148 horas de fermentación

El doble marcaje con BOX e IP reveló una subpoblación doblemente teñida, BOX+ e IP+ en R3 del 2,27% (Fig. 80). Se observó de nuevo un alto porcentaje de la subpoblación de células BOX positivas en la región R7.

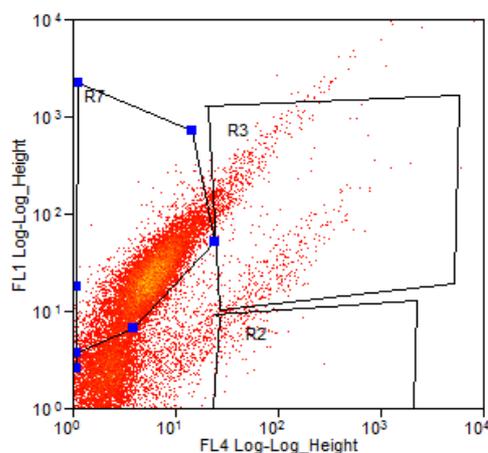


Figura 80. Citograma muestra marcada con BOX e IP tras 148 horas de fermentación

En el último día de la fermentación, una vez estabilizado el pH, el porcentaje de la subpoblación CFDA positivas se redujo considerablemente (R3; 51,49%) lo cual concuerda con la transición hacia la fase correspondiente a la inhibición celular por producto con pérdida de la actividad metabólica (Fig. 81) El agotamiento de nutrientes y el bajo pH, causa un descenso de la actividad metabólica y la viabilidad de las células.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

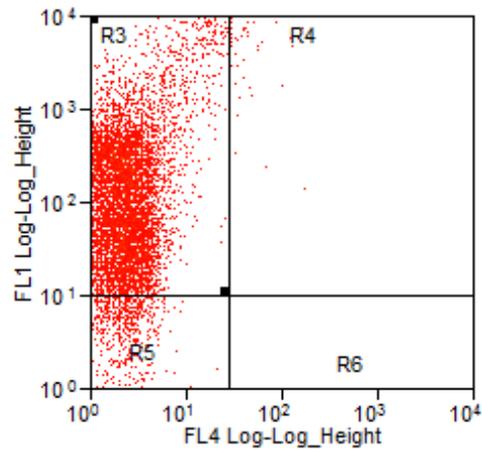


Figura 81. Citograma muestra marcada con CFDA tras 172 horas de fermentación (último día)

En concordancia con lo anterior, se vio asimismo un aumento en el marcaje por IP, aunque no muy significativo (Fig. 82) en la región R6, que correspondió con un 10,90% de la población.

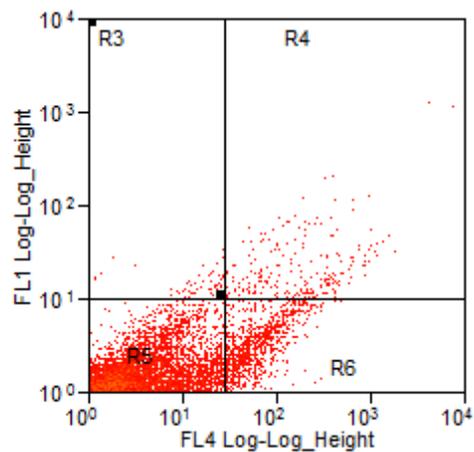


Figura 82. Citograma muestra marcada con IP tras 172 horas de fermentación (último día)

La tinción dual con CFDA e IP, como cabía esperar, reveló una subpoblación de células que incorporaban ambos colorantes, en la región R4, que fue más alto que todos los días previos analizados (Fig.83, Tabla 4).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

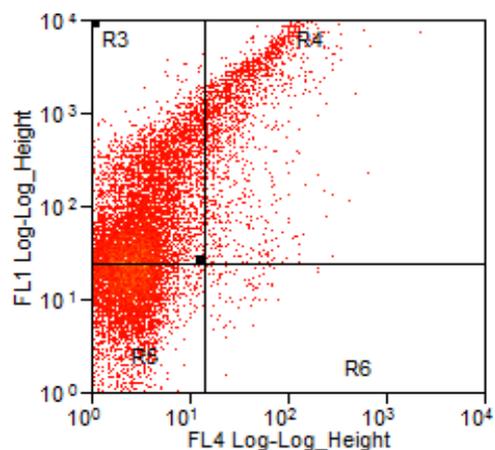


Figura 83. Citograma muestra marcada con CFDA e IP tras 172 horas de fermentación (último día)

El BOX siguió aumentando desde el inicio de la fase estacionaria (Fig. 84), el último día se obtuvo el valor más alto de BOX positivas (R7; 36,12%).

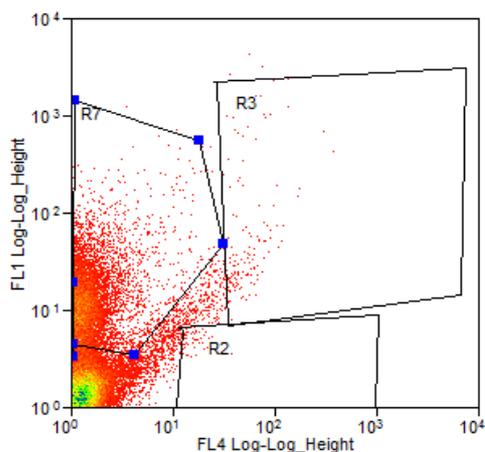


Figura 84. Citograma muestra marcada con BOX tras 172 horas de fermentación (último día)

En cuanto a la subpoblación teñida con IP, se pudo observar un ligero aumento respecto a días anteriores (Fig. 85, Tabla 4)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

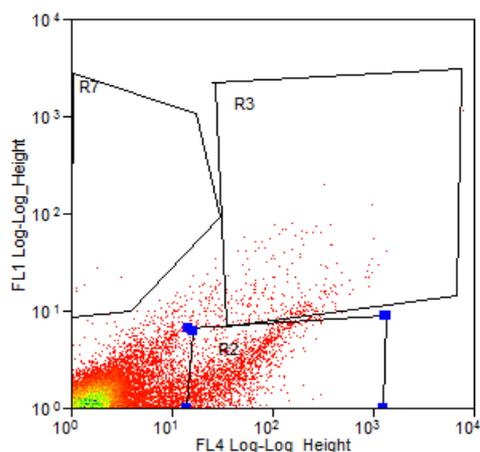


Figura 85. Citograma muestra marcada con IP tras 172 horas de fermentación (último día)

En el último día del proceso, la tinción doble con BOX e IP puso de nuevo de relieve como el porcentaje de células despolarizadas aumentó significativamente, debido al progresivo agotamiento de los nutrientes en el medio y la acumulación de ácido en el medio, como producto de inhibición (Fig. 86). En el histograma se refleja la presencia de dos subpoblaciones mayoritarias claramente diferenciadas, una marcada con BOX (R7), correspondiente a las células despolarizadas y otra que no se ha marcado con ninguno de los dos fluorocromos. El porcentaje de células marcadas con IP y doblemente marcadas es superior a días anteriores, pero dicho aumento no es muy elevado como se comprobó en la tinción con cada fluorocromo de manera individual.

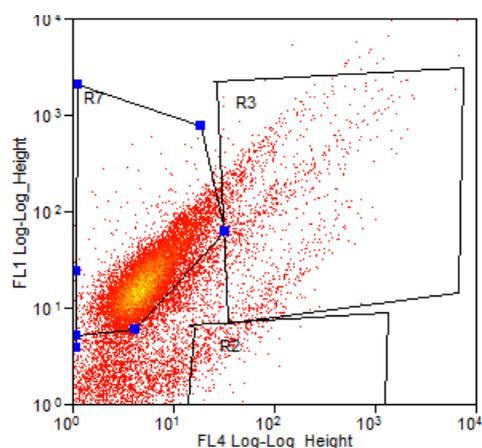


Figura 86. Citograma muestra marcada con BOX e IP tras 172 horas de fermentación (último día)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.3. Evolución de las subpoblaciones celulares durante el proceso

En la Tabla 4 se recogen los resultados obtenidos a lo largo de todo el proceso de fermentación. En ocasiones, se pudo apreciar que la suma de todos los porcentajes no fue ligeramente superior al 100%, esto puede ser debido a que se emplearon dos protocolos de tinción distintos, en análisis diferentes sobre dos muestras independientes.

HORAS	% marcadas CFDA	% marcadas IP	% marcadas CFDA + IP	% marcadas BOX	% marcadas BOX + IP
24	74,01	5,15	2,85	9,31	1,63
28	62,53	1,66	0,81	12,91	1,94
48	80,62	1,87	1,02	3,80	7,30
52	64,58	5,77	2,09	5,97	5,55
72	75,37	6,29	2,59	4,50	1,55
76	65,87	5,41	1,77	6,30	2,44
96	75,52	3,28	1,19	4,50	1,55
100	89,27	5,89	4,80	3,75	2,14
148	91,73	6,20	2,46	10,79	2,27
152	88,33	1,20	7,03	16,58	2,39
172	51,49	10,90	7,40	36,12	4,78

Tabla 4. Resultados FCM durante la fermentación láctica (con agitación)

El seguimiento de los cambios de pH, densidad óptica y las diferentes subpoblaciones permite explicar la evolución del estado fisiológico de las células presentes en la leche a lo largo del bioproceso. La evolución del pH a lo largo de la fermentación permite hacer una estimación de la evolución la concentración de ácido láctico en el medio relacionándose con la actividad metabólica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Haciendo una valoración global del proceso y comparando los resultados presentados de la evolución de la biomasa (Fig. 66), la variación de pH (Fig.65) y la Tabla 4 se realizaron una serie de observaciones que se pasan a discutir. El agotamiento de los nutrientes, el descenso del pH y el propio ácido láctico que ejerce un efecto inhibitorio sobre *Lb. casei* explican la evolución con el tiempo de las distintas subpoblaciones.

En las primeras de la fermentación (24 y 28 horas desde el inicio) se observaron valores de fluorescencia verde debidos a tinción con BOX superiores a los valores en los periodos de tiempo inmediatamente siguientes. Esto se pudo corresponder con una fase de aclimatación al medio del inóculo. El cambio de condiciones ambientales, produce cierto estrés metabólico a los microorganismos, ocasionando un aumento en la despolarización celular y por consiguiente, el marcaje con BOX aumentó.

A partir de las 48 horas desde el inicio del proceso, se corresponde con la fase exponencial de crecimiento (Fig. 66) y la proporción de células despolarizadas (BOX positivas) se vió reducida (Tabla 4), coincidiendo con un cambio brusco de pH en ese momento (Fig. 65) que indica un buen desarrollo del proceso.

La curva se estabiliza en cuanto a DO y pH (pH medio de 3,82), entrando en fase estacionaria. A las 148 del inicio del proceso, se obtiene el mayor valor de células metabólicamente activas (CFDA⁺). A partir de las 148, 152 y 172 horas (fase estacionaria), el porcentaje de células BOX positivas fue aumentando progresivamente hasta llegar a un valor superior al 35% de la población y la proporción de células IP positivas más elevado se dio precisamente en el punto correspondiente a las 172 horas desde el inicio de la fermentación (10,90% del total de la población). Este patrón de marcaje concuerda con los bajos valores de pH en el medio, al efecto inhibitorio que ejerce el ácido láctico y al agotamiento de los nutrientes, ya que se ha realizado la fermentación de manera discontinua. Cuando las células sufren estrés por falta de energía, los sistemas de transporte activo se interrumpen y esto ocasiona la despolarización de la membrana (Hewitt y col. 2001). Esta despolarización de la membrana indica descenso de la actividad metabólica, pero no muerte celular (Nebe von-Caron y col. 2000) y no es hasta las fases finales de la fermentación cuando la fluorescencia roja debido a IP aumentó significativamente. Es interesante destacar que se pudo comprobar que el porcentaje de células muertas al final del proceso fue menor

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

que el porcentaje de células despolarizadas (10,90% frente a 36,12%), de forma que la inhiación del proceso se refleja en un aumento de la subpoblación de células con la membrana despolarizada (BOX+) en vez de células muertas (IP+) ya que las BAL son muy resistentes a pH muy bajos.

A partir de los resultados obtenidos, el mejor momento para inocular el cultivo iniciador en el fermentador sería a las 148 horas tras el inicio del proceso, aunque no se corresponda con el máximo valor de DO, ya que corresponde con la mayor subpoblación de células metabólicamente activas, que empieza a disminuir a partir de ese momento.

Se ha puesto de manifiesto que tanto los protocolos de tinción de las muestras y como los de adquisición se han podido aplicar sobre todas las muestras, de cultivos en medio semi-sintético y en leche desnatada, pudiendo emplearse esta metodología para el control a tiempo casi real de un bioproceso. La monitorización de las fermentaciones industriales por citometría de flujo facilita un mejor control del proceso, permitiendo la toma de decisiones en el curso del mismo. A la vista de los resultados obtenidos se podría proponer esta técnica como método rutinario de análisis y acoplarlo a una estrategia de control basada en el seguimiento de las subpoblaciones de los distintos estados fisiológicos identificados durante el proceso. El análisis del porcentaje de las subpoblaciones de células metabólicamente activas y que presentan despolarización de membrana son claves a la hora de decidir el momento de inocular el fermentador con el *starter*. De esta manera, se reduciría la duración del proceso, y el estado fisiológico del cultivo iniciador para conducir el fermentador podría ser optimizado.

5. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La realización de este proyecto ha permitido llegar a las conclusiones que se indican a continuación:

1. Fue posible evitar un pretratamiento de clarificación a la leche, ya que con el protocolo de procesamiento y tinción de las muestras desarrollado en este trabajo, el análisis por citometría de flujo de muestras crecidas en leche no causó problemas en el funcionamiento del citómetro ni afectó a los resultados obtenidos, como se comprobó tras comparar los controles en leche con los controles en medio de cultivo semi-sintético líquido.
2. La combinación de fluorocromos ensayada (tinciones duales CFDA/IP y BOX/IP) y las separaciones por la técnica FACS permitió identificar diferentes estados fisiológicos a lo largo de la fermentación ácido-láctica.
3. Con el primer protocolo de tinción CFDA/IP, se pudieron identificar durante el proceso tres subpoblaciones simultáneamente: una subpoblación de células metabólicamente activas (CFDA+), otra de células dañadas que incorporaban ambos colorantes pero mantenían la actividad metabólica (CFDA+IP+), y una subpoblación constituida por células muertas (IP+).
4. Con el segundo de tinción dual BOX/IP se identificaron en las muestras de la fermentación: una subpoblación de células con la membrana despolarizada (BOX+IP-) que podía recuperarse y mostrar crecimiento, otra subpoblación que incorporaba ambos colorantes (BOX+IP+), y una última subpoblación correspondiente a células muertas (IP+).
5. Los protocolos de análisis por citometría de flujo puestos a punto en este trabajo se aplicaron a la optimización del desarrollo de un cultivo iniciador de *Lb. casei* en leche. Los resultados obtenidos mostraron que el mejor momento para inocular el *starter* en el fermentador sería a las 148 horas desde el inicio del proceso, momento que correspondió con la mayor proporción de células en estado metabólicamente activo, acortando así la duración del proceso y evitando el aumento de las subpoblaciones de células despolarizadas y muertas observadas a tiempos finales.

6. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* 4ª edición. Garland Publishing, New York & London

Ananta E., Heinz V. y Knorr D. (2004) Assessment of high pressure induced damage on *Lactobacillus rhamnosus* GG by flow cytometry. *Food Microbiology* 21: 567-577

Arnold S.A. , Gaensakoo R., Harvey L.M. y McNeil B. (2002) Use of at-line and in-situ near-infrared spectroscopy to monitor biomass in an industrial fed-batch *Escherichia coli* process. *Biotechnol. and Bioengineering* 80 (4), 405–413

Attfield P.V., Kletsas S., Veal D.A. , van Rooijen R. y Bell P.J.L. (2000) Use of flow cytometry to monitor cell damage and predict fermentation activity of dried yeast. *Appl. Microbiol.* 89:207-214

Bertazzoni Minelli E., Benini A., Marzotto M., Sbarbati A., Ruzzenente O., Ferrario R., Hendriks H. y Dellaglio F. (2004) Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. *Internat. Dairy J.* 14: 723-773

Besnard V., Federighi M., Cappelletti J.M. (2000) Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in *Listeria monocytogenes* *Letters in Applied Microbiol.* 31: (1) 77–81

Bovill R.A. y Mackey B.M. (1997) Resuscitation of ‘nonculturable’ cells from aged cultures of *Campylobacter jejuni*. *Microbiol. UK* 143: 1575–1581

Budde B.B. y Rasch M. (2001) A comparative study on the use of flow cytometry and colony forming units for assessment of the antibacterial effect of bacteriocins. *Internat. J. of Food Microbiol.* 63: 65–72

Bunthof C.J., Bloemen K., Breeuwer P., Rombouts F.M. y Abee T. (2001) Flow Cytometric Assesment of Viability of Lactic Acid Bacteria. *Applied Environ. Microbiol.* 67(5): 2326-2335

BIBLIOGRAFÍA

Bunthof C.J., van Schalkwijk S., Meijer W., Abee T. y Hugenholtz J. (2001) Fluorescent Method for Monitoring Cheese Starter Permeabilization and Lysis. *Appl Environ Microbiol.* 67(9): 4264–4271

Bunthof C.J. y Abee T. (2002) Development of a Flow Cytometric Method to Analyze Subpopulations of Bacteria in Probiotic Products and Dairy Starters *Appl. Environ. Microbiol.* 68:(6) 2934-2942

Caro A., Got P., Lesne J., Binard S., Baleux B. (1999) Viability and Virulence of Experimentally Stressed Nonculturable *Salmonella typhimurium*. *Appl Environ Microbiol.* 1999 July; 65(7): 3229–3232.

Collwel R.R., Brayton P.R., Grimes D.J., Roszak D.B., Huq S.A. y Palmer M. (1985) Viable but Non-Culturable *Vibrio cholerae* and Related Pathogens in the Environment: Implications for Release of Genetically Engineered Microorganisms. *Nature Biotechnology* 3: 817 - 820

Comas-Riu J. y Rius N. (2009) Flow cytometry applications in the food industry. *J. of Industrial Microbiol. & Biotechnol.* 36(8): 999-1011

Crowley J., Arnold A., Wood N., Harvey L.M. y McNeil B. (2005) Monitoring a high cell density recombinant *Pichia pastoris* fed-batch bioprocess using transmission and reflectance near infrared spectroscopy. *Enzyme and Microbial Technol.* 36: 621–628

Davey H.M. y Kell D. B. (1996) Flow Cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analysis. *Microbiol. reviews* 60: 641-696

Davey H.M. y Winson M.K. (2003) Using Flow Cytometry to Quantify Microbial Heterogeneity. *Curr. Issues Mol. Biol.* 5: 9-15

Davey H.M. (2011) Life, Death, and In-Between: Meanings and Methods in Microbiology *Appl. Environ. Microbiol.* 77: (16) 5571-5576

BIBLIOGRAFÍA

Díaz M., Herrero M., García L.A. y Quirós C. (2010) Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Bioch. Engineering J.* 48:(3) 385-407

Flint S., Drocourt J.L., Walker K., Stevenson B., Dwyer M., Clarke I. y McGill D. (2006) A rapid, two-hour method for the enumeration of total viable bacteria in samples from commercial milk powder and whey protein concentrate powder manufacturing plants. *Internat. Dairy J.* 16: 379-384

Fouchet P., Jayat C., Héchard Y., Ratinaud M.H. y Frelat G. (1993) Recent advances of flow cytometry in fundamental and applied microbiology. *Biol. of the Cell*, 78: 95-109

García-Almendárez B.E., Cann I.K.O., Martín Guerrero-Legarreta I. y Regalado C. (2008) Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control* 19: 670-680

Gunasekera T.S., Attfield P.V. y Veal D.A. (2000) A Flow Cytometry Method for Rapid Detection and Enumeration of Total Bacteria in Milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1228–1232

Gunasekera T.S., Sorensen A., Attfield P.V., Sorensen S.J. y Veal D.A. (2002) Inducible Gene Expression by Nonculturable Bacteria in Milk after Pasteurization. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1988–1993

Gunasekera T.S., Veal D.A. y Attfield P.V. (2003) Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbiological and somatic cell analyses of milk. *Internat. J. of Food Microbiol.* 85: 269-279

Ibrahim S.E., Petersen T.W., Choe J. y van den Engh G. (2003) High- speed cell sorting: fundamentals and recent advances. *Current Opinion in Biotech.* 14: 5-12

Kaprelyants A.S. y Kell D.B. (1993) Dormancy in stationary-phase cultures of *Micrococcus luteus*: flow cytometry analysis of starvation and resuscitation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3187-3196

BIBLIOGRAFÍA

Kaprelyants A.S., Mukamolova G.V., Davey H.M. y Kell D.B. (1996) Quantitative Analysis of the Physiological Heterogeneity within Starved Cultures of *Micrococcus luteus* by Flow Cytometry and Cell Sorting. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1311-1316

Kell D.B., Kaprelyants A.S., Weichart D.H., Harwood C.R. y Barer M.R. (1998) Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Leeuwenhoek* 73:169-187

Herrero M., Quirós C., García L.A. y Díaz M. (2006) Use of Flow Cytometry To Follow the Physiological States of Microorganisms in Cider Fermentation Processes. *Appl. and Environ. Microbiol.* 72(10): 6725-6733

Hewitt C.J., Boon L.A., McFarlane C.M. y Nienow A.W. (1998) The use of flow cytometry to study the impact of fluid mechanical stress on *Escherichia coli* W3110 during continuous cultivation in an agitated bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 59(5): 612–620

Hewitt C.J., Nebe-Von Caron G., Nienow A.N. y McFarlane C.M. (1999) The use of multi-parameter flow cytometry to compare the physiological response of *Escherichia coli* W3110 to glucose limitation during batch, fed-batch and continuous culture cultivations. *J. of Biotechnol.* 75: 251–264

Hewitt C.J. y Nebe von-Caron G. (2001) An Industrial Application of Multiparameter Flow Cytometry: Assesment of Cell Physiological State and Its Application to the Study of Microbial Fermentations. *Cytometry* 44:179-187

Hewitt C.J. y Nebe-Von-Caron G. (2004) The Application of Multi-Parameter Flow Cytometry to Monitor Individual Microbial Cell Physiological State . *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 89: 197-223

Holm C., Mathiasen T. y Jespersen L. (2004) A flow cytometric technique for quantification and differentiation of bacteria in bulk tank milk. *J. of Applied Microbiol.* 97: 935–941

BIBLIOGRAFÍA

Ikeda M., Yamaguchi N. y Nasu M. (2009) Rapid On-chip flow Cytometric Detection of *Listeria monocytogenes* in Milk. *J. of Health Science* 55(5): 851-856

Jepras R.I., Carter J., Pearson S.C., Paul F.E. y Wilkinson M.J. (1995) Development of a Robust Flow Cytometric Assay for Determining Numbers of Viable Bacteria. *App. Environ. Microbiol.* 61(7): 2696-2701

Laplace-Builhé C., Hahne K., Hunger W., Tirilly Y. y Drocourt J.L. (1993) Application of flow cytometry to rapid microbial analysis in food and drinks industries. *Biol. Cell* 78: 123-128

Lopes da Silva T., Reis A., Hewitt C. y Roseiro J.C. (2004) Citometria de fluxo – Funcionalidade celular on- line em bioprocessos. *Boletim de Biotecnologia Sociedade portuguesa de Biotecnologia* 77: 32-40

Maragkoudakis P.A., Zoumpoulou G., Miaris C., Kalantzopoulos G., Pot B. y Tsakalidou E. (2006) Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Internat. Dairy J.* 16: 189-199

Mattanovich D. y Borth N. (2006) Applications of cell sorting in biotechnology. *Microbial Cell Factories*, 5:12

Mukamolova G.V., Kaprelyants A.S., Kell D.B. y Young M. (2003) Adoption of the transiently non-culturable state - a bacterial survival strategy? 47: 65–129 *Advances in Microbial Physiol.*

Nebe-von Caron G. y Badley R.A. (1995) Viability assessment of bacteria in mixed populations using flow cytometry. *J. Microsc.* 179:55-66

Nebe-von Caron G., Stephens P.J. y Badley R.A. (1998) Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting. *J. of Applied Microbiol.* 84:988-998

BIBLIOGRAFÍA

Nebe-von Caron G., Stephens P.J., Hewitt C.J., Powell J.R. y Badley R.A. (2000) Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *J. of Microbiological Methods* 42: 97–114

Novo D.J., Perlmutter N.G., Hunt R.H. y Saphiro H.M. (2000) Multiparameter flow cytometry analysis of antibiotic effects on membrane potencial, membrane permeability and bacterial countis of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. *Agents and Chemoter* 44: 827-833

Panesar P.S., Kennedy J.F, Gandhi D.N. y Bunko K. (2007) Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry* 105: 1-14

Porter J. (1999) Flow cytometry and cell sorting. En **Edwars**, *Environmental Monitoring of Bacteria*. Capítulo 5, ed. Humana Press

Quirós C., Herrero M., García L.A. y Díaz M. (2007) Application of Flow Cytometry to Segregated Kinetic Modeling Based on the Physiological States of Microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(12): 3993–4000

Quirós C., Herrero M., García L-A., y Díaz M. (2009) Quantitative Approach to Determining the Contribution of Viable-but-Nonculturable Subpopulations to Malolactic Fermentation Processes. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 2977–2981

Ramsahoi L., Gao A., Fabri M. y Odumeru J.A. (2011) Assessment of the application of an automated electronic milk analyzer for the enumeration of total bacteria in raw goat milk *J. Dairy Sci.* 94 :3279–3287

Reis A., Lopes da Silva T., Kent C.A., Kosseva M., Roseiro J.C. y Hewitt C.J. (2005) Monitoring population dynamics of the thermophilic *Bacillus licheniformis* CCMI 1034 in batch and continuous cultures using multi-parameter flow cytometry. *Journal of Biotechnology* 115: (2), 26 199–210

Rieseberg M., Kasper C., Reardon K.F. y Scheper T. (2001) Flow cytometry in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 350–360

BIBLIOGRAFÍA

Saphiro H.M. (2003) Practical Flow Cytometry 4ª edición ed. Wiley-Liss Inc. New York N.Y.

Seo K.H., Brackett R.E., y Frank J.F. (1998) Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef, apple juice and milk. Int. J. Food Microbiol. 44: 115-123

Sierra D., Sánchez A., Contreras A., Luengo C., Corrales J.C., de la Fe C., Guirao I., Morales C.T. y Gonzalo C. (2009) Short communication: Effect of storage and preservation on total bacterial counts determined by automated flow cytometry in bulk tank goat milk. J. Dairy Sci. 92 :4841–4845

Sampedro A. de los Toyos J.R., y Martínez Nistal A. (1995) Técnicas de fluorescencia en microscopía y citometría. III, Citometría de flujo 189-208. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Oviedo.

Oliver G., Giori G.S. y de Valdez G.M. (1988) Cheese industry development and research in Argentina. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 26: 225-241

Oliver J.D. (2005) The Viable but Non culturable State in Bacteria. The Journal of Microbiol. 43: 93-100

Oliver J. D. (2005) Viable but nonculturable bacteria in food environments. En P.M. Fratamico and A.K. Bhunia (eds.), Food Borne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology. Horizon Scientific Press, Norfolk, U.K.

Ueckert J., Breeuwer P., Abee T., Stephens P., Nebe von-Caron G. y Steeg P.F. (1995) Flow cytometry applications in physiological study and detection of foodborne microorganisms. Int. J. Food Microbiol. 28: 317-326

Wai S. N., Moriya T., Kondo K., Misumi H. y Amako K. (1996) Resuscitation of *Vibrio cholerae* O1 strain tsi 4 from a viable but nonculturable state by heat shock. FEMS Microbiol. Lett. 136: 187–191

Whitesides M. D. y Oliver J.D. (1997) Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1002–1005

BIBLIOGRAFÍA

Wohlgemuth S., Loh G. y Blau M. (2009) Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. *Int. J. of Medical Microbiol.* 300: 3-10

Yamaguchi N., Sasada M., Yamanaka M. y Nasu M. (2003) Rapid Detection of Respiring *Escherichia coli* O157:H7 in Apple Juice, Milk, and Ground Beef by Flow Cytometry. *Cytometry* 54 A: 27-35

7. ANEXOS

7.1. LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	19
Figura 2.....	21
Figura 3.....	26
Figura 4.....	27
Figura 5.....	28
Figura 6.....	29
Figura 7.....	33
Figura 8.....	39
Figura 9.....	40
Figura 10.....	41
Figura 11.....	42
Figura 12.....	46
Figura 13.....	46
Figura 14.....	46
Figura 15.....	48
Figura 16.....	47
Figura 17.....	48
Figura 18.....	49
Figura 19.....	50
Figura 20.....	50
Figura 21.....	50
Figura 22.....	51
Figura 23.....	51
Figura 24.....	52
Figura 25.....	52
Figura 26.....	53
Figura 27.....	54
Figura 28.....	55
Figura 29.....	55
Figura 30.....	56
Figura 31.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 32.....	56
Figura 33.....	56
Figura 34.....	57
Figura 35.....	57
Figura 36.....	58
Figura 37.....	58
Figura 38.....	59
Figura 39.....	59
Figura 40.....	60
Figura 41.....	60
Figura 42.....	61
Figura 43.....	61
Figura 44.....	62
Figura 45.....	62
Figura 46.....	63
Figura 47.....	63
Figura 48.....	64
Figura 49.....	64
Figura 50.....	66
Figura 51.....	65
Figura 52.....	67
Figura 53.....	66
Figura 54.....	67
Figura 55.....	67
Figura 56.....	68
Figura 57.....	68
Figura 58.....	69
Figura 59.....	69
Figura 60.....	71
Figura 61.....	72
Figura 62.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 63.....	74
Figura 64.....	75
Figura 65.....	76
Figura 66.....	77
Figura 67.....	78
Figura 68.....	78
Figura 69.....	79
Figura 70.....	79
Figura 71.....	80
Figura 72.....	80
Figura 73.....	81
Figura 74.....	81
Figura 75.....	82
Figura 76.....	82
Figura 77.....	83
Figura 78.....	83
Figura 79.....	84
Figura 80.....	84
Figura 81.....	85
Figura 82.....	85
Figura 83.....	86
Figura 84.....	86
Figura 85.....	87
Figura 86.....	87

7.2. LISTA DE TABLAS

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Algunos de los criterios y métodos de detección de la funcionalidad celular.....	22
Tabla 2. Algunas pruebas fluorescentes usadas para estudiar la viabilidad bacteriana por CMF	31
Tabla 3. Fluorocromos empleados.....	38
Tabla 4. Resultados de CMF durante la fermentación.....	102

