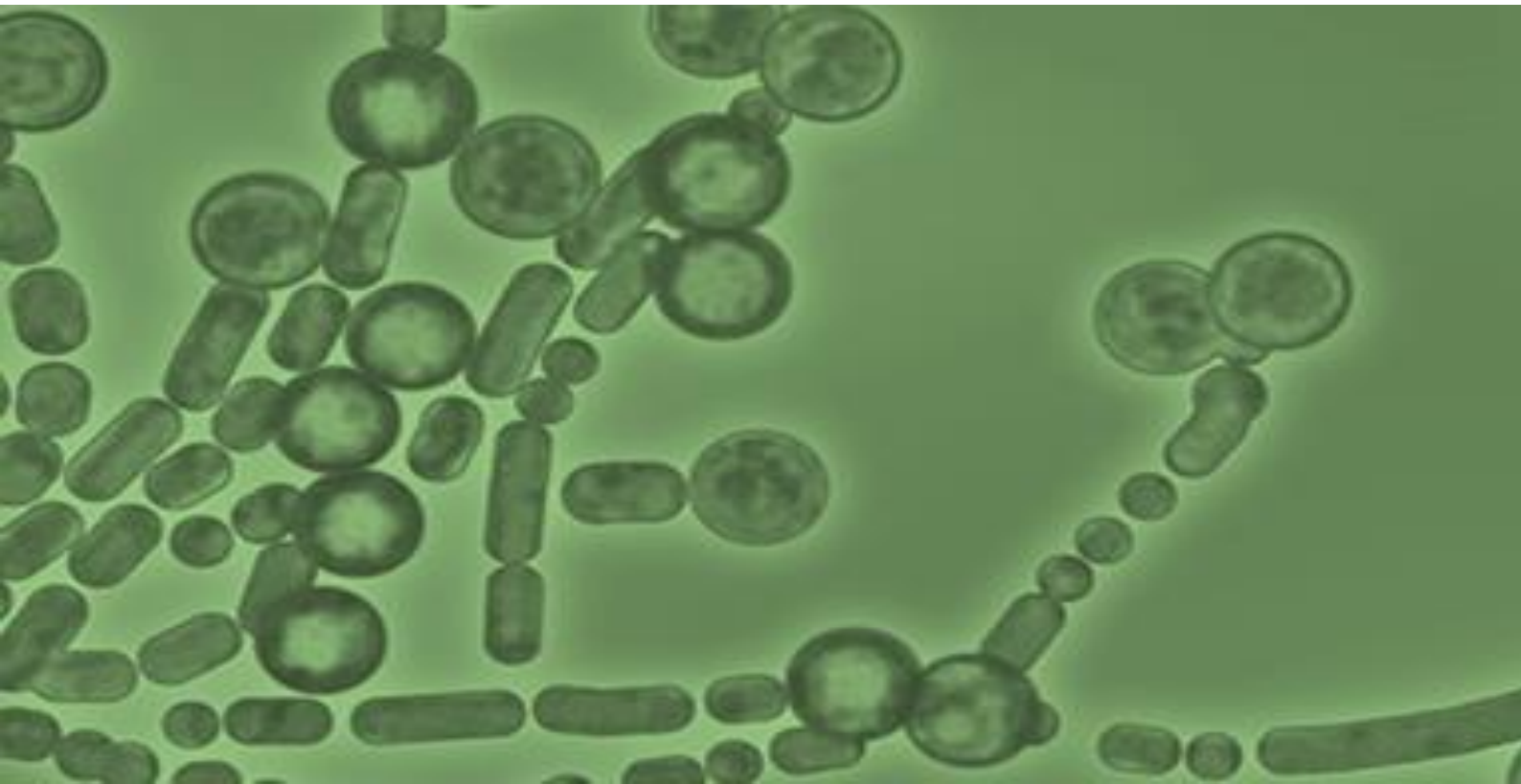


LA CITOMETRÍA APLICADA A LA MICROBIOLOGÍA



Pilotaje de la fermentación alcohólica
Métodos de seguimiento en rutina

Métabolismo de las levaduras

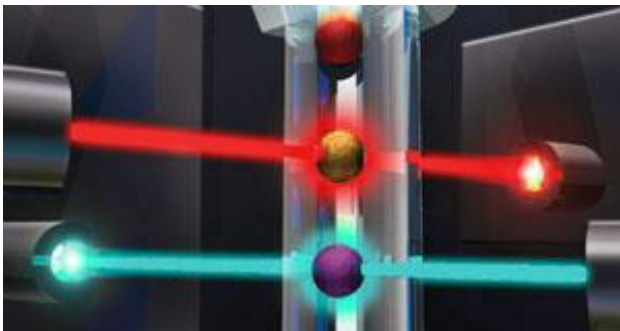
Podríamos definir el metabolismo como el conjunto de reacciones que permiten a los organismos conseguir las moléculas y la energía necesarias para su desarrollo, crecimiento y multiplicación. En las levaduras existen 2 tipos de metabolismo: la respiración y la fermentación.

El primero es más eficiente y produce más biomasa y el segundo genera ciertos subproductos que pueden ser interesantes para la industria, por ejemplo el alcohol.

En ambos casos, para llevar a cabo un proceso de producción es necesaria una herramienta que permita contabilizar los microorganismos, diferenciar los que están vivos de los que están muertos, medir la carga energética y la adaptación al medio. Esta herramienta también debe permitir diferenciar las poblaciones de interés de manera específica.

La citometría en flujo

La citometría en flujo es una técnica de medición que consiste en colocar una por una las células previamente teñidas o marcadas delante de un láser. De esta forma se miden la talla, la estructura y los parámetros de fluorescencia propios a la célula (auto-fluorescencia) o a los marcadores.



Esquema de los principios del flujo de células en un citómetro

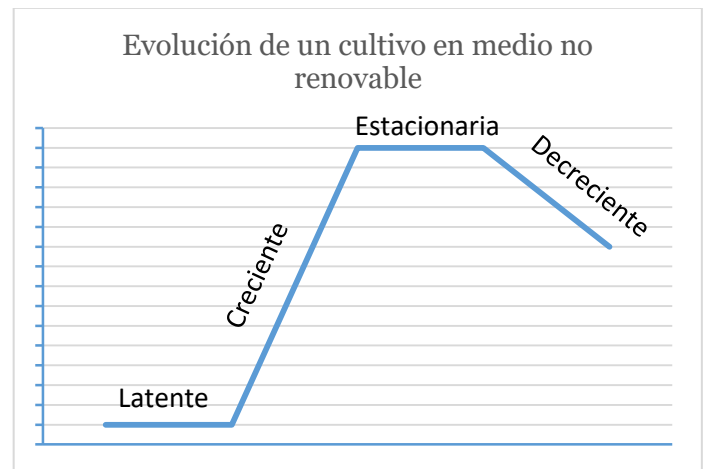
El interés de esta técnica reside en la posibilidad de realizar simultáneamente un conteo, determinar más o menos específicamente la identidad y medir los parámetros fisiológicos de las células, proporcionándonos información sobre el estado de las células. Todo esto en pocos minutos y para miles de células.

Las bacterias en la vinificación.

Entre todas las bacterias presentes en la fruta, solamente las bacterias acéticas y lácticas sobreviven en el moho de fermentación y en el vino. Algunas de ellas participan en la vinificación, no obstante muchas otras contaminan y alteran el producto. En las sidras, menos alcoholizadas y con pH menos ácido también pueden desarrollarse otras especies como las *Zymomonas* que son particularmente destructivas. Estas bacterias tienen la particularidad de haber sobrevivido a la competición con otras levaduras y a la transformación del medio. También pueden haber sido añadidas por el viticultor para desencadenar la fermentación maloláctica.

Adaptación al medio.

El crecimiento de los microorganismos pasa por varias fases durante la adaptación al medio en el que se encuentran y en función de los cambios que aportan.



Observamos inicialmente una fase de latencia que corresponde a la adaptación de la célula a su nuevo entorno.

En la segunda fase se produce la inicialización y crecimiento exponencial, esta suele ser breve si el medio no se renueva.

La tercera fase es estacionaria ya que el medio empieza a carecer de elementos nutritivos de base y por la presencia de toxicidad (debida al etanol, factor killer...)

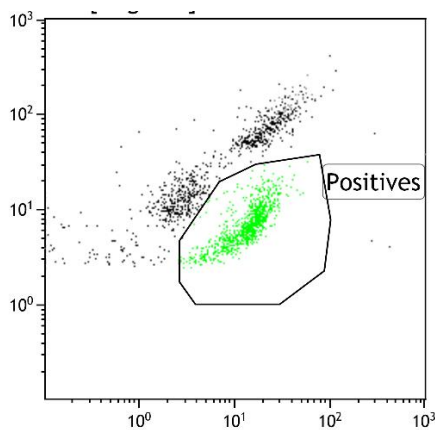
En la última fase disminuye el número de microorganismos ya que mueren sin ser reemplazados.

renovados. Esta fase no siempre ocurre. Algunos microorganismos pueden entrar en una forma de resistencia con una actividad metabólica mínima y una reducción de tamaño. Un ejemplo es *Brettanomyces*, en el vino y en la sidra, pueden entrar en fase viable no cultivable, reducir su tamaño a 1 μm (pasando a través de filtros) y quedarse en este estado durante años antes de reiniciar su actividad.

Recuento.

En análisis microbiológico sobre placa petri se acostumbra a contar en « Colony Forming Unit » para un volumen dado y para una caja petri dada. Esta unidad de medida no tiene en cuenta que sólo las células vivas capaces de desarrollarse sobre gelosa serán contabilizadas en el momento del cultivo bacteriológico.

En citometría se cuentan todas las células. Los valores se expresan en número de células por unidad de volumen. Considerando que la talla de las levaduras y de las bacterias varía, recomendamos utilizar el dispositivo de recuento directo (volumétrico) en vez de utilizar las micropartículas de conteo que pueden acabar en el seno de las poblaciones estudiadas y contribuir al ruido de fondo de una matriz compleja.



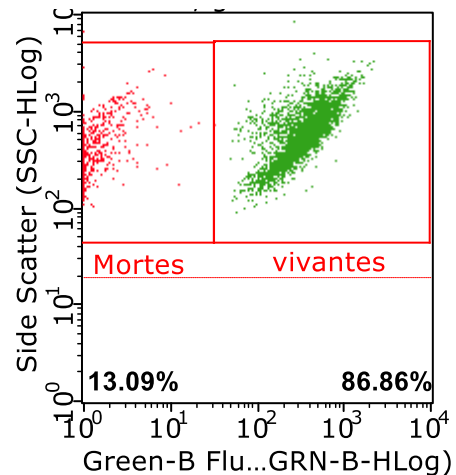
Ejemplo de recuento específico de levaduras en una población mixta.

Además, se recomienda utilizar un colorante para diferenciar las células del ruido de fondo.

El recuento en citometría de flujo es más efectivo que el recuento microscópico ya que el número de sucesos contados aumenta la fiabilidad estadística de las poblaciones contadas y por su velocidad de conteo.

Viabilidad.

La viabilidad de las levaduras varía con el tiempo pero también con el procesado del medio. Por ejemplo, la liofilización puede impactar en mayor o menor medida la viabilidad de las levaduras. La presencia de alcohol proveniente de la fermentación puede ser tóxica en menor o mayor medida en función de la cepa de una levadura dada.



Ejemplo de medida de la viabilidad de un fondo de barrica de *Saccharomyces* mediante LEVIA Test.

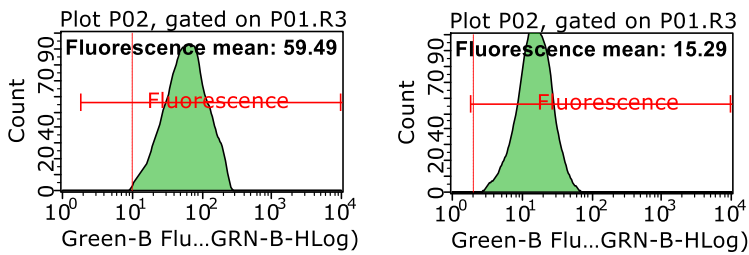
La viabilidad se puede medir de dos formas : con un colorante que marca todas las células y otro que marca sólo las células muertas (Kits del tipo TVO) o con otro más específico para las levaduras (kit LEVIA Test). Este último detecta la actividad enzimática de las levaduras (específica de cada levadura) y su capacidad de mantener un pH intracelular cercano a la neutralidad en medio ácido.

Cabe subrayar que en el caso de análisis con vino tinto, la doble coloración entre células vivas y muertas se ve afectada por la presencia de tanino que tiñe las células y aumenta su autofluorescencia.

Vitalidad

Es importante diferenciar la viabilidad de la vitalidad. La viabilidad nos indica si la célula está viva. La vitalidad es una medida de su capacidad a desarrollarse y producir activamente moléculas de interés. Disponemos de un método simple para medir la vitalidad de las células utilizando el kit LEVIA Test, basado en el principio de excreción

activa de un colorante fluorescente (que varía con la energía de la célula). Se trata de medir el promedio de fluorescencia en un tiempo dado y hacer la misma medida 15 minutos más tarde.



Ejemplo de medida de la vitalidad de un cultivo de levaduras medida por excreción de fluorescencia utilizado LEVIA test (fluorescencia inicial-fluorescencia final)/fluorescencia inicial

Una vitalidad del orden de 80% es característica de una célula muy activa. Asimismo se suele observar una reducción de este parámetro en la fase estacionaria y en mayor medida en la fase de decrecimiento en la que el cociente puede llegar a ser negativo reflejando una débil actividad residual que no permite a la levadura marcarse totalmente en la primera muestra.

A la hora de utilizar un cultivo de levaduras se puede usar la medida de viabilidad para reducir drásticamente la fase de latencia.

Identificación específica

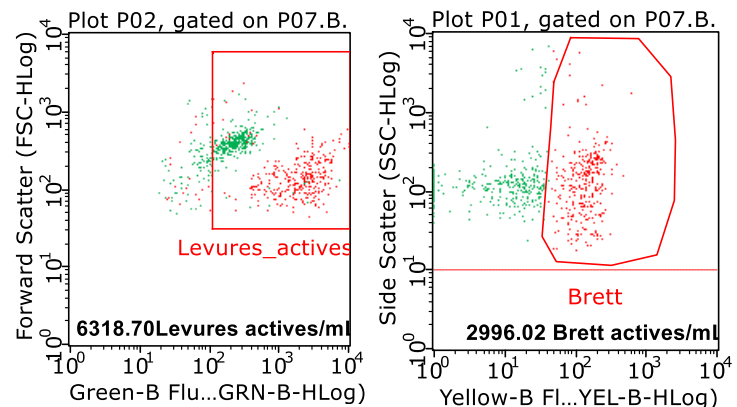
El método utilizado para identificar específicamente un tipo de bacteria se basa en una sonda genética y el principio de FISH. Esta técnica es larga y poco adaptada a la rutina de diagnósticos. Si además necesitamos correlacionar los datos fisiológicos y la identificación específica se debe trabajar con la totalidad de las moléculas. Si este es el caso es preferible usar una técnica inmunológica.

Estas técnicas se basan en el uso de un anticuerpo que reconoce específicamente una población de levaduras entre el conjunto de células presentes.

En el marco de la vinificación, la detección de levaduras contaminantes, por ejemplo *Brettanomyces* permite prevenir una alteración de las propiedades organolépticas de un vino o una sidra. En este caso nos interesa el número de *Brettanomyces* activos que puede ser detectado mediante BRETTA TEST.

En tal caso, será necesario realizar un test que mida el recuento de la actividad enzimática (viabilidad y/o vitalidad) y un marcaje específico para distinguir levaduras contaminantes de otras levaduras presentes. Los test microbiológicos clásicos suelen dar una respuesta en un plazo de 5 a 10 días. El lector puede imaginar la evolución del vino durante este periodo en caso de contaminación.

Asimismo, el mismo test en citometría se realiza en una hora. Se trata de una herramienta ideal para hacer un seguimiento de la producción en tiempo real.



Ejemplo de recuento específico de levaduras *Brettanomyces* viables y activas en una población mixta mediante BRETTA TEST.

Bibliografía

Lonvaud-Funel A, Renouf V, Strehaiano P ; Microbiologie du vin ; Editions TEC &Doc, Paris, Lavoisier

Carter E A, Paul F E and Hunter P A.; Flow Cytometry in Microbiology. D. Lloyd, London, Springer verlag.

Bouix M & Leveau JY; Rapid assessment of yeast viability and yeast vitality during alcoholic fermentation; *Journal of the Institute of Brewing*, Vol 107, 4; (2001)

Steensels J & al ; *Brettanomyces* yeasts—from spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *Int J Food Microbiol* 206:24–38; (2015)

Novak J & al. ; Monitoring of Brewing Yeast Propagation Under Aerobic and Anaerobic Conditions Employing Flow Cytometry ; *J. Inst. Brew.* 113(3) ; (2007)