

Espectroscopia de impedancia eléctrica, una herramienta para aplicaciones biotecnológicas con *Lactobacillus casei* ATCC 393

Electrical impedance spectroscopy, a tool for biotechnological applications with *Lactobacillus casei* ATCC 393

Luz Mary Montes-Ramírez*, Luis Fernando Mejía-Gutiérrez**, Julio César Caicedo-Eraso***

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v22n2.78171

RESUMEN

La aplicación de espectroscopia de impedancia eléctrica (EIE), es una técnica que se utiliza para monitorear, detectar y cuantificar microorganismos de interés biotecnológico, con la medición de parámetros eléctricos de respuesta rápida de un medio inoculado a temperatura y agitación constante mediante electrodos sumergidos. Realizando una comparación del modelo de crecimiento y el recuento en placa con los parámetros eléctricos de respuesta, se puede dar una correlación para romper la barrera tecnológica entre la microbiología clásica y los métodos rápidos de detección. La comparación de ambas técnicas fue realizada para determinar el máximo crecimiento de *Lactobacillus casei* (*L. casei*) ATCC 393. Se encontró que tras la inoculación, después de 24 h en condiciones microaerófilas (37 °C), el máximo crecimiento microbiano fue registrado por medio de la EIE, mediante los parámetros $|Z|$ (29,1057) y $\text{Deg}-\text{Deg}_0$ (24,555°). En contraste con la técnica de conteo en placa, el crecimiento máximo se estimó a las 9 h. Los datos experimentales obtenidos mediante la EIE fueron ajustados por un circuito RC en serie, posteriormente, las curvas generadas fueron ajustadas a los modelos de crecimiento de Gompertz y Boltzman. Usando la técnica de EIE, la impedancia del medio resultó el parámetro más eficiente para la estimación del pico máximo exponencial de crecimiento de *L. casei*. Se demostró que la EIE constituye una alternativa para la detección rápida de la concentración microbiana en procesos de producción de biomasa para la elaboración de productos alimenticios probióticos.

Palabras clave: espectroscopia de impedancia eléctrica (EIE), crecimiento exponencial, recuento en placa, *Lactobacillus casei*.

ABSTRACT

The application of electrical impedance spectroscopy (EIS) is a technique used to monitor, detect and quantify microorganisms of biotechnological interest, with the measurement of electrical parameters of rapid response of a medium inoculated at temperature and constant agitation by submerged electrodes. By making a comparison of the growth model and the plate count with the electrical response parameters, a correlation can be made to break the technological barrier between classical microbiology and rapid

* Bacterióloga; Esp. Ciencia y Tecnología de Alimentos; Esp. Gestión de proyectos de Desarrollo Agroindustrial; MSc. Ciencia y Tecnología de Alimentos. Investigador GruCalPro (Grupo de Investigación Calidad y productividad). Departamento de Ing de Alimentos, Facultad de Ingeniería, Universidad de Caldas, Calle 65 #26-10, Manizales, Colombia.

** Ing Químico; Esp. Ciencia y Tecnología de Alimentos; MSc. Ciencia y Tecnología de Alimentos. investigador GruCalPro (Grupo de Investigación Calidad y productividad). Departamento de Ing de Alimentos, Facultad de Ingeniería, Universidad de Caldas, Calle 65 #26-10, Manizales, Colombia.

*** Ing. Electrónico; Esp. Telecomunicaciones; Esp. Gerencia Educativa; PhD. Ciencias Biomédicas. Director investigador GruCalPro. Investigador GITIR. Departamento de Sistemas e Informática, Facultad de Ingeniería, Universidad de Caldas, Calle 65 #26-10, Manizales, Colombia. julioc.caicedo@ucaldas.edu.co.

detection methods. The comparison of both techniques was performed to determine the maximum growth of *Lactobacillus casei* (*L. casei*) ATCC 393. It was found that after inoculation, after 24 h under microaerophilic conditions (37 °C), the maximum microbial growth was recorded by medium of the EIE, using the parameters $|Z|$ (29,1057) and Deg-Deg_0 (24,555°). In contrast to the plate count technique, maximum growth was estimated at 9 h. The experimental data obtained through the EIE were adjusted by a series RC circuit; later, the generated curves were adjusted to the growth models of Gompertz and Boltzman. Using the EIE technique, the impedance of the medium was the most efficient parameter for the estimation of the maximum exponential growth peak of *L. casei*. It was demonstrated that the EIE constitutes an alternative for the rapid detection of the microbial concentration in biomass production processes for the elaboration of probiotic food products.

Key words: Electrical impedance spectroscopy (EIS), exponential growth, plate count, *Lactobacillus casei*.

Recibido: octubre 3 de 2019 **Aprobado:** noviembre 15 de 2020

INTRODUCCIÓN

La supervisión de procesos biológicos busca la disminución de tiempo, los costos de proceso y de producción, así como mejorar la exactitud en términos de concentración de biomasa en tiempo real. El proceso de crecimiento de *L. casei* ATCC 393 es de gran importancia, ya que la caracterización de éstos y la medición de su velocidad de crecimiento en sus diferentes etapas, permite tener el control en los procesos de fermentación ácido láctica. Dado que el método de medición directa por conteo en placa, además de costoso y dispendioso, impide la cuantificación de la biomasa y monitorización en tiempo real, se busca que la aplicación de un método indirecto como la técnica de medición de la bioimpedancia eléctrica disminuya significativamente el tiempo y los costos del proceso (Ivora, 2002). La bioimpedancia eléctrica define dos métodos de aplicación en microbiología: la microbiología de impedancia (MI) y la espectroscopia de impedancia eléctrica (EIE). En MI se monitorea, mediante dos electrodos de metal sumergidos en un medio de cultivo inoculado, los cambios de conductancia del medio o de capacidad de interface, a una frecuencia fija, durante el tiempo de actividad metabólica y crecimiento de los microorganismos presentes (Felice *et al.*, 1988). La EIE mide las propiedades dieléctricas del medio en función de la frecuencia, principalmente en la zona de relajación β , donde se da la carga y descarga de la capacidad de la membrana celular de microorganismos vivos o células viables. Estas determinaciones se basan en el comportamiento eléctrico de la membrana celular, ante el paso de una corriente alterna a través de ella en cada célula viva o reactancia capacitiva. Las aplicaciones de la técnica de MI y EIE en la monitorización de microorganismos, ha permitido correlacionar con aceptable precisión según el modelo de circuito equivalente apropiado (figura 1), parámetros como la magnitud de la impedancia eléctrica, el ángulo de fase, resistencia, capacitancia e inductancia a diferentes frecuencias y voltajes con las características de diferentes medios y tejidos.

El *L. casei* tiene gran importancia comercial por sus productos metabólicos secundarios (Escobar, 2008) y por su efecto benéfico para la salud como promotores del crecimiento (Rosmini *et al.*, 2004), como probiótico o microorganismo vivo que actúa sobre bacterias patógenas Gram-negativas en el tubo digestivo, por competición de nutrientes y por secreción de bacteriocinas. El *L. casei* se encuentra de forma natural en vegetales fermentados, leche, carne, intestino, boca y ambiente (Collins *et al.*, 1989), ha sido estudiado *in vivo* e *in vitro* y utilizado en procesos de fermentación a partir de varios sustratos (Sumano y Ocampo, 2006), para la producción de biomasa (Montes, 2013) y otras aplicaciones ya que permite analizar las propiedades eléctricas de materiales, biológicos, al inducir señales eléctricas alternas a diferentes frecuencias y medir las señales de respuesta. Se ha utilizado para determinar la madurez en frutos, identificar adulteraciones en productos cárnicos y lácteos, determinar propiedades físico-químicas en todo tipo de matrices alimentarias, incluso para cuantificar microorganismos presentes en alimentos y en superficies de trabajo. Esta técnica es segura, no invasiva, rápida, portátil, de bajo costo y fácil de usar, lo que la convierte en un método con un gran potencial para ser usado en la industria de alimentos, con el fin de monitorear y controlar los procesos de calidad (Caicedo-Eraso *et al.*, 2020).

Por su importancia comercial y para cerrar la brecha tecnológica entre la microbiología clásica y las técnicas de detección rápida, el objetivo principal del presente trabajo fue monitorear en tiempo real, muestras líquidas (caldo de cultivo inoculado) para determinar y comparar la cinética de crecimiento de *L. casei* ATCC 393, por las técnicas de conteo en placa y EIE en un sistema de crecimiento cerrado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se describe el material y equipo experimental usado, se detalla cómo se realiza la cinética de crecimiento microbiano mediante la cuantificación de la técnica de re-

cuento en placa de células y EIE. Posteriormente, se explica la obtención de los datos experimentales mediante la EIE ajustados a los modelos matemáticos de crecimiento de Gompertz y Boltzman (1825) descritos por Kirkwood (2015). Adicionalmente se explica el diseño experimental y el análisis estadístico.

Cinética de crecimiento microbiano

Como material biológico se utilizó una cepa probiótica de *L. casei* ATCC 393 en presentación liofilizada y conservada en crioviales con glicerol al 1%.

La cepa de *L. casei* ATCC 393 liofilizada fue reactivada al ser pre-inoculada en 50 mL de caldo MRS (Scharlau, S.L España) e incubada a 37 °C en condiciones microaerófilas durante 48 horas. Posteriormente, este pre-inóculo fue transferido a 500 mL de caldo MRS para dar inicio al estudio cinético de crecimiento durante 24 horas.

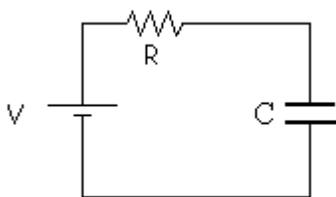


Figura 1. Circuito RC.

La cinética de crecimiento se desarrolló en un bioreactor con los 500 mL de caldo MRS bajo condiciones anaeróbicas, agitación lenta (50 rpm) y temperatura constante de 37°C durante 24 horas. Fue monitoreada a partir del tiempo cero (adición del inóculo) en periodos de 1 hora mediante EIE y recuento en placa. Cada estudio cinético se realizó por triplicado.

Recuento en placa

Se realizó el recuento de células partiendo de diluciones seriadas de 1,0 mL de caldo inoculado, en 9,0 mL de agua de peptona tamponada al 0,1 % p/v (pH 7,2±2)

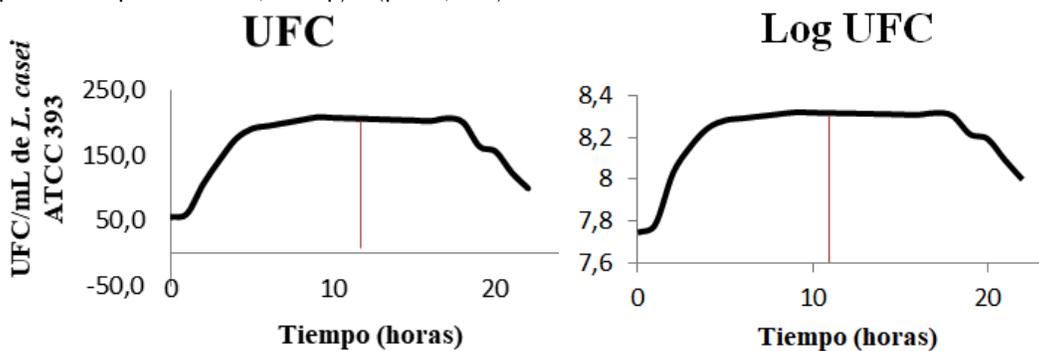


Figura 2. Curva de crecimiento de *L. casei* ATCC 393 por la técnica de conteo en placa.

homogeneizado en vórtex (Boeco V1 Plus, Alemania). Un volumen de 100 µL de dilución fue sembrado en superficie sobre medio MRS con azul de anilina (0,1 %) e incubado en condiciones microaerófilas a 37 °C por 48 horas. Los recuentos fueron realizados por duplicado y expresados como UFC/mL.

EIE

Para las mediciones de EIE se utilizó un impedanciómetro (3522-50 LCR Hitester, HIOKI, Japón, 2006). Las mediciones de impedancia para monitorear el crecimiento de *L. casei* se realizaron tomando 35 mL de muestra cada hora desde el tiempo cero hasta las 24 horas posteriores. Las lecturas realizadas fueron: impedancia ($|Z|$), ángulo de fase (Deg), reactancia capacitiva (X_c), capacitancia (C_s , C_p) y resistencia en serie y en paralelo (R_s , R_p), en un rango de frecuencias de 1 hasta 1000 KHz. Para la medición se utilizaron 2 electrodos de acero inoxidable (Dentaureum) de 3,5 cm de longitud, con diámetro de 0,9 mm y una separación entre ellos de 2 cm. Los electrodos se sumergen a 2,5 cm de la superficie de la solución (caldo de cultivo con *L. casei* ATCC 393 inoculadas). Se utilizó un analizador de respuesta en frecuencia (Hioki, Japón) cubriendo un rango de frecuencia de 1 hasta 1000 KHz. A modo de no inducir respuestas no lineales en el sistema, una señal de voltaje alterno de amplitud de 20 mV (menor al voltaje térmico), fue aplicada entre los extremos de los electrodos de acero inoxidable (MacDonald, 1992). El analizador se acopló a un computador por medio de una interfaz RS-232 (9593-01, Hioki Corporation, Japón), la cual cuenta con el respectivo programa para adquisición de datos LCR Sample Program (Ver 4.03E, Hioki Corporation, Japón).

Mediante un ajuste por mínimos cuadrados y con los datos experimentales de impedancia, para cada muestra, se obtuvieron los mejores valores para la resistencia y capacitancia del sistema. Adicionalmente, con los datos experimentales se construyó la curva de crecimiento, la cual fue ajustada por medio de un modelo de crecimiento de donde fueron extraídos los parámetros del crecimiento.

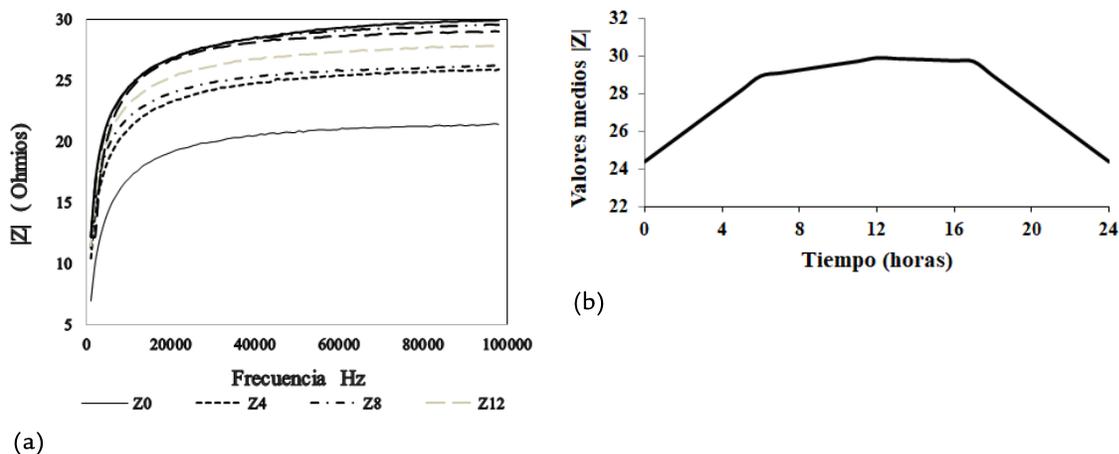


Figura 3. Valores de los parámetros $|Z|$ a) contra la frecuencia en el tiempo y b) Valores medios de $|Z|$ vs Tiempo.

Resultados y discusión

Mediante la técnica de recuento en placa (figura 2), se presenta la fase exponencial o de máximo crecimiento de *L. casei* a las 9 horas ($4,30 \times 10^{10}$ UFC/mL) durante una cinética de crecimiento de 24 horas. En esta fase el microorganismo mostró su velocidad máxima de crecimiento otorgado por su máximo consumo de nutrientes. Entre las 9 y 18 horas entra a una fase estacionaria o de agotamiento de nutrientes, donde quedan probablemente sustancias de desecho liberadas durante la fase exponencial, lo que hace que el medio sea inhóspito para la continuidad del crecimiento microbiano. Desde las 18 hasta las 24 horas se observa un decremento de la población bacteriana en concordancia con lo reportado por Bikandi (2014) y Jurado (2014). Se observa que las tendencias de crecimiento son similares a las que presenta el incremento de $|Z|$, y la forma opuesta del comportamiento del ángulo de fase.

La figura 3a muestra el comportamiento característico del valor absoluto medio de la impedancia en función de la frecuencia en función del tiempo para las muestras analizadas y la figura 3b muestra los valores medios a las frecuencias características durante las 24 horas. La impedancia total crece con el incremento de la frecuencia (figura 3a) y con el aumento de la población de microorganismos, desde $6,2 \Omega$ hasta $29,91 \Omega$. En la figura 3b se observa que la impedancia media tiene un comportamiento de crecimiento similar al de la población bacteriana de las 0 a las 16 horas. De la hora 16 hasta la hora 24, la impedancia media decrece en el tiempo, siguiendo el mismo comportamiento que el decrecimiento de la población bacteriana. Este comportamiento es atribuible a la mayor cantidad de productos metabólicos, así como al aumento en la cantidad de biomasa con comportamiento capacitivo conforme con Yang *et al.*, (2003).

Con base en el circuito RC (figura 1), propuesto como circuito equivalente de elementos distribuidos, se espera que a frecuencias cercanas a cero la mayor contribución a la impedancia sea capacitiva y a altas frecuencias sea resistiva, dado que sobre los electrodos se forman capas iónicas de carga eléctrica alternativamente opuesta. Estas capas se mantienen en equilibrio estacionario con la composición química del medio. Pequeñas modificaciones en el mismo, producidas por el metabolismo microbiano, inducen la redistribución de las capas, y una modificación de la impedancia del electrodo. La figura 4 muestra que existe un decremento en el ángulo de fase con la frecuencia y la figura 5 muestra el comportamiento en el tiempo a las frecuencias características, con un incremento rápido desde la hora 0 y hasta la hora 4 pero a partir de ésta se mantiene constante hasta la hora 21 donde vuelve a descender lentamente, lo que indica un comportamiento tipo capacitivo que se evidencia por el decrecimiento en la reactancia capacitiva como se observa en la figura 6. El cambio es notorio por encima de 40 Hz, límite de la zona de relajación beta. El comportamiento de las figuras de los parámetros eléctricos se atribuye a la existencia de una cantidad mayor de microorganismos viables o con células íntegras, en concordancia con los resultados de Bragós *et al.* (2006), el valor inicial de éste depende de la cantidad de microorganismos existentes en el medio de cultivo en el momento de inicio.

El comportamiento de la cinética de crecimiento según conteo en placa (figura 2), según el modelo de Gompertz, ecuación 1 (Kirkwood, 2015) y según el modelo de Boltzmann, ecuación 2 (Kirkwood, 2015), se muestran en la tabla 1, siendo el modelo de Gompertz, el que mejor predice el comportamiento. La tabla 2 muestra los valores medios de las capacitancias en faradios (F) y resistencias en ohmios (Ω) a las frecuencias características.

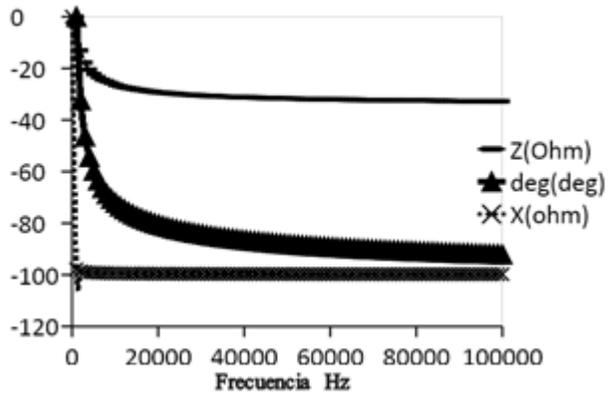


Figura 4. Parámetros eléctricos (Impedancia Z, Ángulo de fase deg y Reactancia X) versus frecuencia.

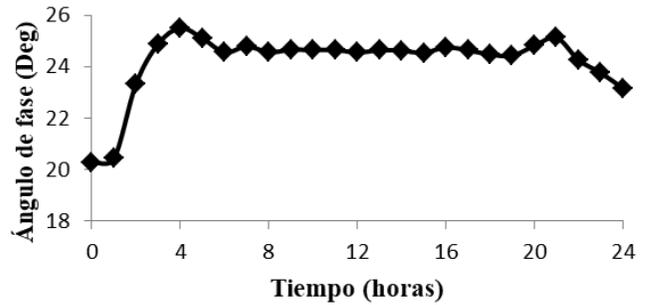


Figura 5. Valores medios del ángulo de fase en función del tiempo.

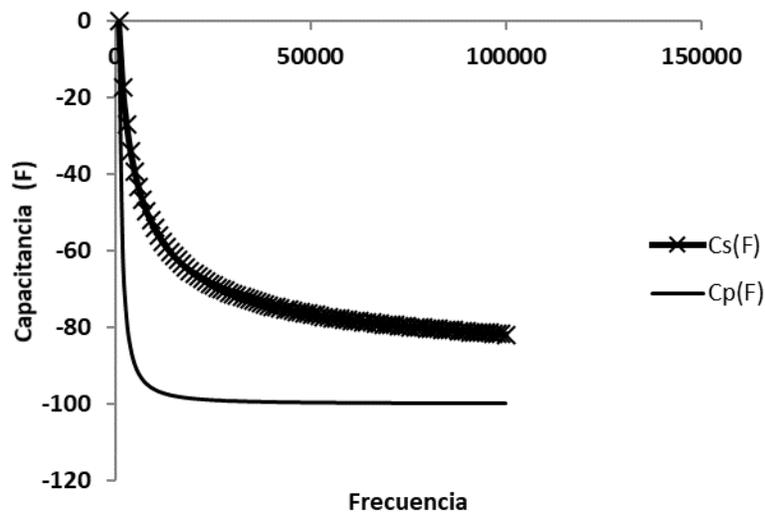


Figura 6. Comportamiento capacitivo a diferentes frecuencias. Cs: capacitancia en serie, Cp: capacitancia en paralelo.

Tabla 1. Comparación del comportamiento cinético de crecimiento de *L. casei* ATCC 393.

Modelo	Pendiente	Intercepto	r ²
Recuento placa	9	5	0,99
Gompertz	7	24	0,99
Boltzmann	0,157	1,58	0,96

$$y = \exp\{-\exp[\mu m / A (\lambda - t) + 1]\} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde μm representa crecimiento máximo y es la pendiente de la tangente en el punto de inflexión; λ es el tiempo de retardo, y se define como el intercepto de esta tangente sobre el eje horizontal y.

$$y = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 + e^{-(x - X_0) / \Delta X}) \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde A_1 , A_2 , X_0 y ΔX representan un valor inicial, un valor final, el centro y una constante de tiempo, respectivamente.

Para los datos obtenidos de la EIE e igualmente del modelo, el tiempo de la fase de retardo es de 0 a 6 h; la fase de crecimiento exponencial desde la hora 6 hasta la hora 9, fase con tendencia estacionaria hasta la hora 17 y descenso desde la hora 17 hasta la hora 24.

Tabla 2. Valores medios de los parámetros eléctricos en el tiempo.

Tiempo (Hora)	Cs (F)	Cp (F)	Rs (Ω)	Rp (Ω)
0	$1,65 \times 10^{-6}$	$3,21 \times 10^{-8}$	$7,50 \times 10^2$	750,54
2	$1,66 \times 10^{-6}$	$3,22 \times 10^{-8}$	$7,50 \times 10^2$	$7,51 \times 10^2$
4	$1,49 \times 10^{-6}$	$2,86 \times 10^{-8}$	$6,24 \times 10^2$	$6,25 \times 10^2$
6	$1,65 \times 10^{-6}$	$3,13 \times 10^{-8}$	$6,26 \times 10^2$	$6,26 \times 10^2$
8	$1,78 \times 10^{-6}$	$3,21 \times 10^{-8}$	$6,06 \times 10^2$	$6,07 \times 10^2$
12	$1,59 \times 10^{-6}$	$3,02 \times 10^{-8}$	$4,77 \times 10^2$	$4,77 \times 10^2$
14	$1,91 \times 10^{-6}$	$2,65 \times 10^{-8}$	$7,20 \times 10^2$	$7,21 \times 10^2$
16	$1,77 \times 10^{-6}$	$2,70 \times 10^{-8}$	$8,66 \times 10^2$	$8,67 \times 10^2$
18	$1,86 \times 10^{-6}$	$2,90 \times 10^{-8}$	$8,72 \times 10^2$	$8,72 \times 10^2$
20	$1,74 \times 10^{-6}$	$2,87 \times 10^{-8}$	$4,57 \times 10^2$	$4,57 \times 10^2$
22	$1,35 \times 10^{-6}$	$2,21 \times 10^{-8}$	$8,29 \times 10^2$	$8,30 \times 10^2$
24	$1,62 \times 10^{-6}$	$2,83 \times 10^{-8}$	$4,62 \times 10^2$	$4,63 \times 10^2$

CONCLUSIONES

La espectroscopia de impedancia eléctrica fue utilizada para monitorear el crecimiento de *L. casei* ATCC 393; los valores de la tasa de cambio de impedancia máxima ($|Z|$ máx.) permiten el uso del método de la EIE y el parámetro de impedancia para realizar la evaluación de forma más fácil y rápida.

El crecimiento microbiano puede ser registrado y valorado en corto tiempo con el apoyo del modelo de Gom-

pertz con gran exactitud y aproximación, dado el valor del parámetro de correlación. Las zonas de acondicionamiento y crecimiento rápido determinadas según el modelo de Gompertz, al igual que los puntos de inflexión corresponden con los hallados por recuento en placa. Se considera más ajustado el aporte de la resistencia que el de la capacitancia, dada la interacción electrodo-medio, por lo cual se puede estrechar el rango de frecuencias hasta la zona de relajación beta.

Se ha demostrado que EIE es una herramienta de gran relevancia para el sector biotecnológico, no sólo para agilizar la detección cuantitativa de la máxima concentración de biomasa para una mejor estandarización de formulaciones en la producción de matrices alimentarias funcionales, sino también como un elemento más para el control de calidad de este tipo de productos alimenticios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bikandi, J. (2014). *Cinética de la fase exponencial de la curva de crecimiento microbiano*. Departamento de inmunología, microbiología y parasitología. Universidad del País Vasco.
- Bragós R., Sarro E., Fontova A., Soley A, Cairó J., Bayés-Genís A., Rosell J. (2006). Four versus two-electrode measurement strategies for cell growing and differentiation monitoring using electrical impedance spectroscopy. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.*, 1: 2106-2109.
- Caicedo-Eraso, J. C., Díaz-Arango, F. O., & Osorio-Alturo, A. (2019). Espectroscopia de impedancia eléctrica aplicada al control de la calidad en la industria alimentaria. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 21(1), e951.
- Collins, M., Phillips, B., Zanoni, P. (1989). Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 39(2): 105-108.
- Escobar, A. (2008). *Comportamiento poblacional de Lactobacillus casei en un medio a base de suero de leche*. Trabajo de Grado, Programa de Biología. Universidad de Nariño. Colombia.
- Felice CJ., Clavin OE., Gallo B del V., Armayor MR., Spinelli JC., Valentinuzzi ME. (1988). Impedancimetric bacterial detection: theoretical and experimental aspects. *Medical Progress Through Technology*, 14: 25-33.

- Ivora A. (2002). *Bioimpedance monitoring for physicians: an overview*. Centre Nacional de Microelectrónica, Biomedical Applications Group.
- Jurado-Gómez H., Calpa-Yamá F., Chaspuengal-Tulcán A. (2014). Determinación de parámetros cinéticos de *Lactobacillus casei* en dos medios probióticos. *Veterinaria y Zootecnia*, 8(2): 15-35.
- Kirkwood T. (2015). Deciphering death: a commentary on Gompertz (1825) "On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies". *Phil. Trans. R. Soc. B*, 370: 20140379.
- Macdonald J. (1992). Introduction: short history of Impedance spectroscopy. *Annals of Biomedical Engineering*, 20: 289-305.
- Montes Ramírez L. M. (2013). Efecto de la microencapsulación con agentes prebióticos sobre la viabilidad de microorganismos probióticos (*Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9469). Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia.
- Rosmini M. R., Sequeira G. J., Guerrero Legarreta I., Martí L. E., Dalla Santina R., Frizzo L., Bonazza J.C. (2004). Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 3(2): 181-191.
- Sumano H., Ocampo L. (2006). *Farmacología Veterinaria*. 3ª edición. McGraw-Hill. Madrid, España.
- Yang L., Ruan C. y Li Y. (2003). Detection of viable *Salmonella typhimurium* by impedance measurement of electrode capacitance and medium resistance. *Biosensors and Bioelectronics* 19: 495-502.