



DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DIELECTRICA Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Allan F. Sánchez-Ortiz¹, Enrique J. Herrera-López¹, Melchor Arellano¹, Jesús Cervantes¹, Anne C. Gschaedler-Mathis¹,
¹Biotecnología Industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.,
Guadalajara, Jalisco C.P. 44270; agchaedler@ciatej.mx

Palabras clave: *X. dendrorhous*, viabilidad celular, espectroscopia dieléctrica, microscopía de fluorescencia.

Introducción. El monitoreo y control de bioprocesos ha cobrado vital importancia en los últimos años debido a los estrictos controles de calidad en la producción de metabolitos a nivel industrial [1]. En un bioproceso generalmente se mide en línea variables como el pH, O₂ disuelto, temperatura, ORP, etc, que sólo permiten sacar conclusiones sobre el estado fisicoquímico del cultivo microbiano. Sin embargo, es de vital importancia monitorear la viabilidad de los microorganismos. En el presente trabajo se exploró la posibilidad de determinar, por medio de espectroscopía dieléctrica y microscopía de fluorescencia la viabilidad celular de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

Metodología.

Se utilizó la cepa mutante sobreproductora de astaxantina, denominada 25-2, de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Se emplearon matraces de 250 mL, los cuales contenían 50 mL de un medio químicamente definido. Fueron inoculados con 10% del volumen total y se incubaron a una temperatura de 20 °C y una velocidad de agitación de 250 rpm. La fermentación duró 5 días. Se empleó la sonda de espectroscopía dieléctrica FOGALE[®] nanotech. El procedimiento experimental y el principio de medición se describen en el trabajo realizado en [2]. Se usó el marcador de fluorescencia FUN-1[®] de Life Technologies[®]. Se utilizó el procedimiento experimental para la tinción de las células y el principio de medición descrito en [3]. La preparación de células marcadas se visualizó en un microscopio Leica[®] DMRA2, con fluorescencia.

Resultados. En la Figura 1 se puede observar la evolución de la viabilidad celular detectada por espectroscopía dieléctrica. Es posible apreciar que la permitividad inició con valores negativos, debido a la baja concentración de células en el cultivo. Conforme avanzó la fermentación, la permitividad se incrementó debido a la gran cantidad de células con capacidad de polarizarse. No obstante, a partir de las 54 horas los valores en la permitividad comenzaron a descender, alcanzando incluso valores negativos, lo anterior indica que las células en el cultivo perdieron la capacidad de polarizarse y, por lo tanto, la viabilidad celular disminuyó.

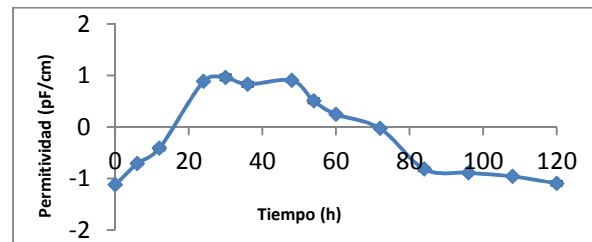


Fig. 1. Cinética de viabilidad registrada mediante espectroscopía dieléctrica

En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos con microscopía de fluorescencia. Se puede notar que al comienzo de la fermentación tuvo un 50% de células metabólicamente activas (viables). Conforme avanzó el tiempo, el porcentaje de células viables aumentó hasta llegar a valores mayores al 75%. Sin embargo, una vez que el cultivo llegó a su fase estacionaria el porcentaje comenzó a decrecer e incluso, a partir de las 72 horas, dicho porcentaje alcanzó valores de 0%, lo cual indica la pérdida total de la viabilidad del cultivo celular.

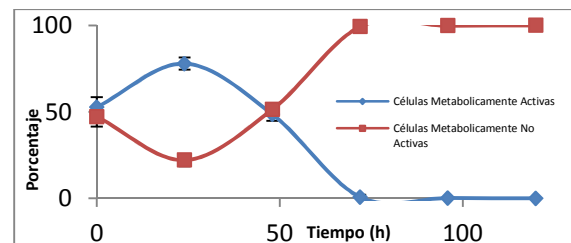


Fig. 2. Cinética de viabilidad registrada mediante microscopía de fluorescencia

Conclusión. El empleo de espectroscopía dieléctrica y microscopía de fluorescencia podrían ser utilizados para determinar la viabilidad celular de la levadura *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

Agradecimiento. A CONACYT por el apoyo otorgado al proyecto Bilateral ANR-CONACYT 162712.

Bibliografía

1. Alford J.S., *Bioprocess control: advances and challenges*. Computers & Chemical Engineering, 2006. 30: p. 1464-1475.
2. Tibayrenc P., Preziosi-Belloy L. and Ghommidh C., *On-line monitoring of dielectrical properties of yeast cells during a stress-model alcoholic fermentation*. Process Biochemistry, 2011. 46: p. 193-201.
3. Millard P.J., Roth B.L., Thi H.P., Yue S.T. and Haugland R.P., *Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeast*. Applied and Environmental Microbiology, 1997. 63(7): p. 2897-2905.