RESOLUCIÓN OIV-OENO 713B-2025

RECUENTO DE CÉLULAS DE LEVADURAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO EN CULTIVOS DE LEVADURAS

LA ASAMBLEA GENERAL,

CONSIDERANDO que los productores de cultivos microbianos iniciadores de uso enológico y las bodegas necesitan información oportuna y precisa sobre la calidad de los cultivos de levaduras de uso enológico,

CONSIDERANDO que actualmente la mayoría de los métodos de análisis microbiológico de la OIV se basan en el recuento en placas de Petri, una técnica robusta y eficaz, pero que requiere periodos largos de incubación, a veces incompatibles con la rapidez de los procesos de fermentación,

CONSIDERANDO que la citometría de flujo es hoy en día una técnica analítica ampliamente extendida en diferentes sectores de la industria biotecnológica y agroalimentaria, que su robustez y fiabilidad están ampliamente demostradas y que en el mercado existen numerosas soluciones tecnológicas adecuadas para diferentes contextos de producción,

DECIDE adoptar el siguiente método de análisis microbiológico de cultivos de levaduras, e incorporarlo a la parte II del Codex Enológico Internacional:

RECUENTO DE CÉLULAS DE LEVADURAS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO EN CULTIVOS DE LEVADURAS

1. Recuento de células de levaduras mediante citometría de flujo en cultivos de levaduras

2. Ámbito de aplicación

Método para cuantificar las células de levaduras viables, alteradas (membranas permeables) y muertas en cultivos de levaduras de uso enológico, según la definición de la OIV.

Este método, en el que se utilizan dos marcadores, no permite cuantificar las células viables sin actividad metabólica (membranas impermeables).

El método es adecuado para analizar preparados de levaduras seleccionadas (LSA y

Certificado conforme Chișinău, 20 de junio de 2025
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
John BARKER

© OIV 2025

masas madres).

Los límites de cuantificación dependen de la eficacia del equipo y del método de preparación de la muestra.

3. Definiciones

CITOMETRÍA DE FLUJO: La citometría de flujo es una técnica rápida de análisis multiparamétrico de células individuales en solución. Los citómetros de flujo están equipados con fuentes de luz láser, para producir señales de dispersión y de fluorescencia, y fotodiodos o tubos fotomultiplicadores, para detectarlas. Dichas señales se convierten en señales electrónicas y se analizan en un ordenador. Las poblaciones de células se distinguen y caracterizan según su fluorescencia o dispersión lumínica.

DISPERSIÓN FRONTAL DE LA LUZ (FSC, del inglés *forward scatter*): Señal debida a la dispersión de la luz por la partícula (célula). Por convención, se mide en un ángulo de 180° respecto de la fuente de luz; es directamente proporcional al tamaño de la partícula.

DISPERSIÓN LATERAL DE LA LUZ (SSC, del inglés *side scatter*): Señal debida a la dispersión de la luz por la partícula (célula). Por convención, se mide en un ángulo de 90° respecto de la fuente de luz; es proporcional a la complejidad estructural de las partículas.

CANALES DE FLUORESCENCIA (FLx): Señales de diversos colores debidas a la emisión de fluorescencia por los fluorocromos incorporados a las partículas. Las distintas longitudes de onda se separan por medio de filtros ópticos y, por convención, se numeran correlativamente (FL1, FL2, etc.).

COMPENSACIÓN: Proceso de corrección de la superposición de la fluorescencia. Se elimina la señal de un determinado fluorocromo en todos los detectores, excepto en el correspondiente a su color. Suele aplicarse a los canales FL2 y FL3 para eliminar la señal debida al fluorocromo cuyo máximo de emisión se sitúa en el canal FL1.

RECUENTO VOLUMÉTRICO: Medida del número de eventos (células) en un determinado volumen de muestra. Suele medirse mediante dos electrodos situados a distinto nivel en la cubeta que contiene la muestra. Pueden emplearse soluciones alternativas, por ej. una bomba volumétrica.

EVENTO: Detección de una partícula individual al atravesar el haz o haces de láser del equipo. Cada evento se corresponde con una serie de mediciones de distintas propiedades ópticas y físicas de dicha partícula. Los operadores deben garantizar que cada evento corresponda a una célula individual. Para ello, han de comprobar que no

Certificado conforme Chișinău, 20 de junio de 2025
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
John BARKER

© OIV 2025

haya agregados celulares (dobletes, tripletes, etc.).

4. Fundamento

Se analiza mediante citometría de flujo en modo volumétrico una suspensión celular, obtenida por dilución decimal apropiada de la muestra. El marcaje con colorantes fluorescentes permite diferenciar entre células con actividad enzimática (vivas) y células con membrana citoplasmática rota (muertas). En algunos casos también es posible diferenciar una tercera subpoblación de células. Se trata de células que presentan actividad metabólica, pero cuya membrana plasmática presenta una alteración de la permeabilidad. Suele considerarse que esta subpoblación se compone de células alteradas pero vivas.

El método propuesto es un método general, con un láser azul y dos fluorocromos. Existen métodos más avanzados, con citómetros multiláser y marcaje múltiple.

En este método se utilizan dos tipos de fluorocromos:

- Yoduro de propidio (YP): Es un agente intercalante. Se une a los ácidos nucleicos (ADN y ARN). Solo entra en las células con membrana plasmática permeable. Se considera que se trata principalmente de células muertas o células cuya membrana está alterada (por ejemplo, debido a la acción del etanol). El máximo de excitación se sitúa entre los 520 nm y los 550 nm; el máximo de emisión de fluorescencia, entre los 610 nm y los 630 nm. Se considera que las células YP(−) son células viables, y que las células YP(+) son células muertas o con membrana plasmática permeable.
- Diacetato de 5(6)-carboxifluoresceína (DACF). Se trata de un sustrato de la esterasa que entra en las células y se utiliza como indicador de la actividad metabólica (esterásica). La hidrólisis de este éster acetoximetílico por las esterasas citoplásmicas produce carboxifluoresceína, con un máximo de excitación a 498 nm y un máximo de emisión de fluorescencia a 516 nm. Su espectro de emisión llega a los 650 nm, por lo que puede ser necesario aplicar compensación en otros canales (FL2). Se considera que las células DACF(+) son células con actividad metabólica (estereásica), y que las células DACF(−) son células sin actividad metabólica.

Tabla 1. Resumen de la interpretación de la respuesta a los fluorocromos

Certificado conforme Chișinău, 20 de junio de 2025
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
John BARKER

© OIV 2025

Cuadrante	**YP(−)**	**YP(+)**
DACF(−)	No interpretable	Muertas
DACF(+)	Viables y activas	Células activas con membrana plasmática alterada, permeable al YP (células alteradas)

Nota 1: Se define una población de células YP(−), con membrana plasmática íntegra, y DACF(−), con actividad metabólica indetectable.

Nota 2: Este método no permite distinguir las células del eventual ruido de fondo. El cuadrante YP(−) DACF(−) no se puede interpretar.

5. Reactivos y materiales

Material de vidrio de laboratorio de uso habitual, cubetas para citometría de flujo y líquido de arrastre, cuando lo requiera el equipo.

Tubos de ensayo (16□×□160□mm o similares) con 9□mL de tampón fosfato salino (PBS) filtrado con un filtro con un tamaño de poro de 0,2□µm (pH 7,4).

Diacetato de 5(6)-carboxifluoresceína (polvo) (DACF, CAS 124387-19-5).

Yoduro de propidio (polvo) 95□% (YP, CAS 25535-16-4).

Dimetilsulfóxido puro (líquido) (DMSO, CAS 67-68-5).

Cultivo puro de *S. cerevisiae* (p. ej., cepa ATCC 9763) con una concentración nominal de 10^5 células/Ml.

Solución acuosa de NaCl 8,5□g/L, esterilizada por filtración o en autoclave.

Solución de DACF en DMSO o acetona (0,1□mg/mL).

Solución de YP en DMSO o solución acuosa (1□mg/mL).

Nota 1: Los fluorocromos se diluyen en DMSO. También se puede utilizar acetona. No obstante, parece que la mezcla de acetona y DMSO produce más ruido de fondo en el citómetro, por lo que se recomienda utilizar solo DMSO.

6. Equipo

Citómetro de flujo equipado con una fuente de láser de 488□nm (50□mW) y parámetros ópticos FSC, SSC, FL1 (530□nm), FL2 (630□nm) y FL3 (670□nm).

Agitador vorticial.

Certificado conforme Chișinău, 20 de junio de 2025
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
John BARKER

© OIV 2025

Material de vidrio de laboratorio.

Filtro esterilizante de 0,2 µm (preferiblemente de acetato de celulosa, ya que reduce el ruido de fondo).

Placa de citometría de flujo.

Micropipetas de 1 mL y 0,2 mL con puntas estériles.

Balanza analítica con una resolución de ±0,01 g.

Centrífuga de laboratorio.

Nota: No es imprescindible trabajar en condiciones de esterilidad. No obstante, se recomienda extremar la higiene y utilizar equipos y reactivos estériles.

7. Preparación de las muestras

La muestra de cultivo de levaduras deberá tomarse y transportarse al laboratorio de forma adecuada. Deberá ser representativa de la masa original.

Será suficiente para el análisis disponer de 50 g de una muestra con las características descritas en la monografía COEI-1-SACCHA, "Levaduras seleccionadas *Saccharomyces* spp." y conservada según las indicaciones del fabricante.

8. Procedimiento

El análisis por citometría de flujo es inmediato (menos de 3 min en un citómetro moderno), por lo que el riesgo de contaminación por manipulación de la muestra fuera de la campana de flujo laminar o durante la lectura citométrica es bajo. No obstante, se recomienda extremar la higiene y utilizar equipos y reactivos estériles.

El procedimiento siguiente se indica a modo de ejemplo. Los laboratorios pueden introducir cambios. La citometría de flujo es una técnica que exige adaptar continuamente las diluciones en función del equipo y de la carga microbiana de los productos que se analicen.

PUESTA A PUNTO DEL CITÓMETRO DE FLUJO

Encender el citómetro de flujo y realizar un lavado para evitar interferencias en el análisis. Configurar los canales de adquisición FSC, SSC, FL1 (adquisición a 530 nm), FL2 (adquisición a 630 nm) y FL3 (adquisición a 670 nm) en una escala logarítmica.

Se puede considerar que el citómetro de flujo está listo para el análisis cuando no se detecta la presencia de eventos que puedan interferir en la adquisición en el canal FSC durante la lectura de una muestra que contenga únicamente líquido de arrastre.

Realizar la lectura de un cultivo puro de *S. cerevisiae*, ajustando, si fuera necesario, los

Certificado conforme Chișinău, 20 de junio de 2025
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
John BARKER

© OIV 2025

voltajes de los canales FSC y SSC para que el pico de la señal en ambos canales se distinga bien del ruido de fondo. Si el citómetro de flujo lo permite, puede eliminarse la señal del ruido de fondo optimizando el umbral del parámetro FSC. Elaborar un gráfico de puntos integrando las señales FSC y SSC, localizar la región que contiene la población de células de levaduras y seleccionarla mediante una ventana de adquisición específica (figura 1).

TINCIÓN DE LA MUESTRA

En el caso de cultivos de levaduras seleccionadas, proceder a la rehidratación y dilución según lo dispuesto en la Resolución OIV-OENO 632-2021.

Hacer una dilución decimal de la muestra de levaduras rehidratadas de entre 10^{-3} y 10^{-4} (dependiendo de las características del equipo) con solución de NaCl.

Proceder al marcaje. Por ejemplo, añadir 10□µL de solución de DACF y 10□µL de solución de YP a 980□µL de vino diluido.

Incubar unos 10 min a temperatura ambiente y en la oscuridad.

Tras la incubación, homogeneizar y proceder a la lectura de la muestra, previa configuración del citómetro de flujo en modo de lectura volumétrica.

Nota 1: La concentración final de DACF de la muestra marcada está entre 2□mg/L y 5□mg/L, aproximadamente. La concentración final de YP de la muestra marcada está entre 3□mg/L y 10□mg/L, aproximadamente.

Nota 2: El orden de los fluorocromos carece de importancia. Pueden aplicarse a la vez en una misma solución que contenga ambos.

Nota 3: Por lo general, el marcaje es estable durante una hora o incluso más.

ANÁLISIS CITOFLUORIMÉTRICO

Leer la muestra con la precaución de ajustar la configuración del equipo para que la población de levaduras se encuentre dentro de la ventana de adquisición determinada previamente con el cultivo puro de *S. cerevisiae*.

Ajustar los voltajes de los canales FL1 y FL2 para distinguir mejor el pico de emisión de la muestra respecto del ruido de fondo (autofluorescencia). Para evitar anomalías debidas al espectro de emisión del DAF, que podría interferir también con el canal FL2, ajustar como corresponda la compensación del equipo para restar a FL2 la contribución de FL1. Si procede, puede utilizarse el canal FL3 en lugar del canal FL2 para una mejor discriminación de las señales de fluorescencia asociadas a células vivas (FL1) y células muertas (FL2 o FL3). Realizar el recuento volumétrico de las células presentes en la muestra. Integrar en un gráfico de puntos los canales FL1 y FL2 (o FL3) para visualizar mejor la separación de las poblaciones celulares (figura 2). Considerar como células vivas los eventos recogidos en el canal FL1 y procedentes de la ventana

Certificado conforme Chișinău, 20 de junio de 2025
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
John BARKER

© OIV 2025

de adquisición que contiene la población de levaduras, localizada por medio del gráfico de puntos de los parámetros físicos FSC y SSC. Considerar como células muertas los eventos recogidos en el canal FL2 (o FL3) y procedentes de la ventana de adquisición que contiene la población de levaduras, localizada por medio del gráfico de puntos de los parámetros físicos FSC y SSC. Considerar como células alteradas pero viables los eventos positivos en ambos canales (FL1 y FL2 o FL3) tras aplicar la debida compensación de las señales.

9. Cálculo

Una vez finalizado el recuento volumétrico, tomar nota del número de células vivas, muertas y dañadas por unidad de volumen o de peso, en función del volumen muestreado por el citómetro de flujo, teniendo en cuenta las diluciones decimales realizadas. Dado que se trata de un recuento celular directo, el resultado se puede expresar en "células/g", siempre comprobando la ausencia de dobletes y tripletes.

Bibliografía

1. Longin, C.; Petitgonnet, C.; Guilloux-Benatier, M.; Rousseaux, S., y Alexandre, H: "Application of flow cytometry to wine microorganisms", *Food Microbiology*, 2017, vol. 62, pp. 221-231. Disponible en: doi:10.1016/j.fm.2016.10.023.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): *CLSI H62: Validation of Assays Performed by Flow Cytometry*, 1.ª ed., 2022, ISBN: 978-1-68440-129-1.
3. ISO 7218:2007 amd1:2013 - *Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico.*
4. Kwolek-Mirek, M., y Zadrag-Tecza, R.: "Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells", *FEMS Yeast Research*, 2014, vol. 14, pp. 1068-1079. Disponible en: doi:10.1111/1567-1364.12202.
5. Guzzon, R., y Larcher, R.: "The application of flow cytometry in microbiological monitoring during winemaking: two case studies", *Annals of Microbiology*, 2015, vol. 65, pp. 1865-1878. Disponible en: doi:10.1007/s13213-014-1025-6.

Figura 1. Gráfico de puntos FSC/SSC con la ventana de adquisición de la población de eventos correspondientes a las células de S. cerevisiae (YEAST) presentes en una muestra con una concentración de 10^5 *células/mL.*

Certificado conforme Chișinău, 20 de junio de 2025
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
John BARKER

© OIV 2025

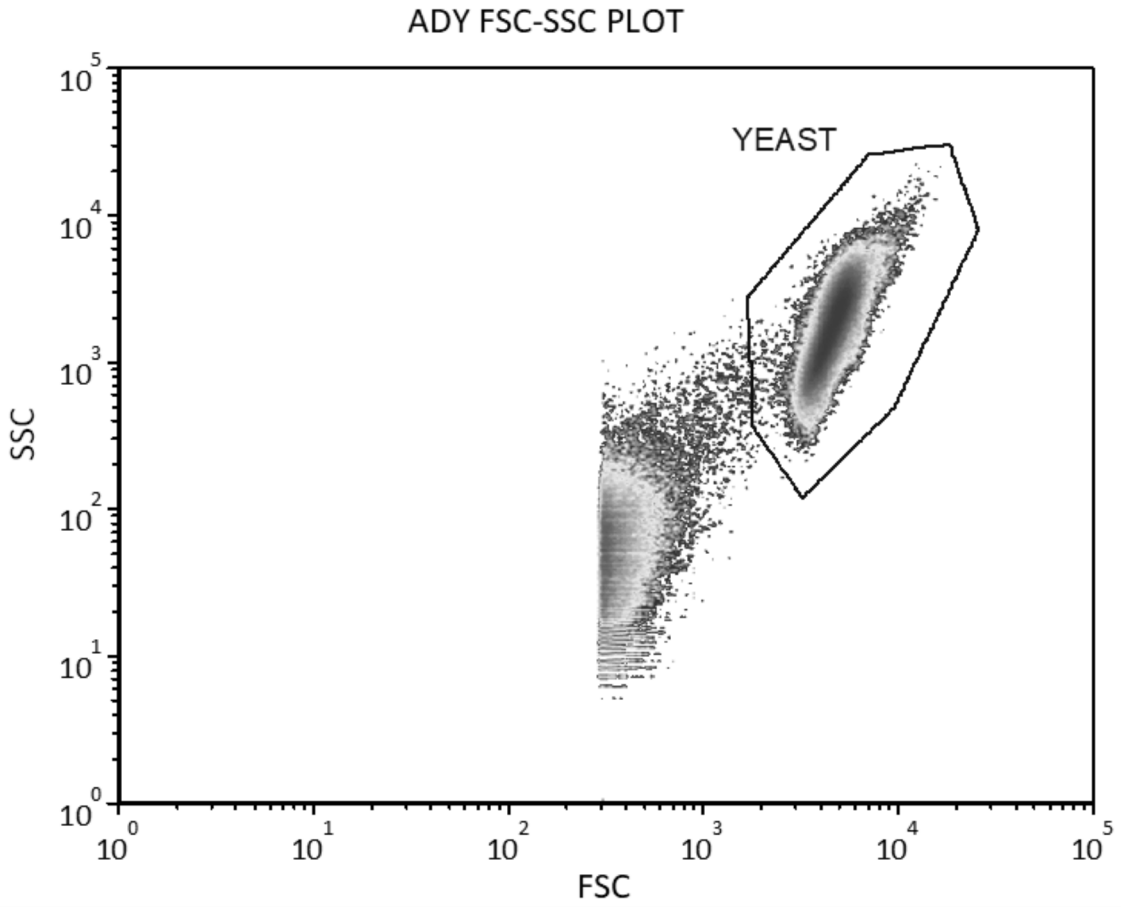
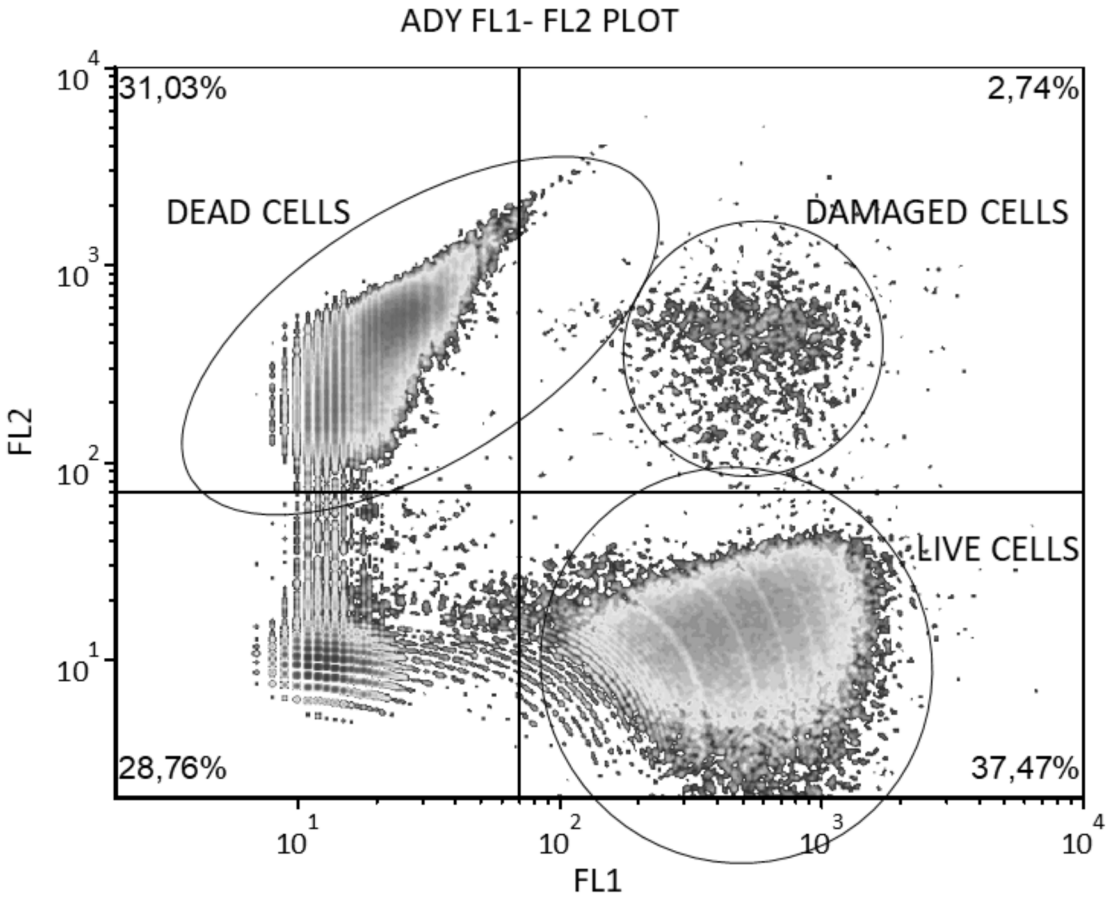


Figura 2. Gráfico de puntos FL1 (530□nm)/FL2 (630□nm) con las ventanas de adquisición que contienen la población de eventos correspondientes a las células de S. cerevisiae vivas (LIVE), muertas (DEAD) y alteradas pero viables (DAMAGED).

Certificado conforme Chișinău, 20 de junio de 2025
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
John BARKER

© OIV 2025



Certificado conforme Chișinău, 20 de junio de 2025
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
John BARKER

© OIV 2025