

Detección de *Brettanomyces bruxellensis* mediante medidas de impedancia con sensores basados en microelectrodos interdigitados

I. Tubia Antillera¹, J. Paredes Puente², E. Pérez Lorenzo¹, S. Arana Alonso¹

¹ CEIT-ik4 y Tecnun (Universidad de Navarra), San Sebastián, España, {itubia, eperez, sarana}@ceit.es

² Tecnun (Universidad de Navarra), San Sebastián, España, jparedes@tecnun.es

Resumen

Brettanomyces es considerada una de las levaduras contaminantes más relevantes en la producción de bebidas alcohólicas, especialmente en el vino y la sidra. Durante la fase de fermentación y almacenamiento, estas levaduras pueden causar cambios químicos en las características del producto, generando importantes pérdidas económicas. Este trabajo presenta un método de monitorización basado en impedancia con sensores de microelectrodos interdigitados. Para ello, se han testado diferentes condiciones de los medios de cultivos dentro de biorreactores (en estático y en agitación) para evaluar el crecimiento de las *Brettanomyces*. Los resultados muestran una respuesta más rápida y un aumento de la variación relativa de la impedancia bajo la condición de agitación debido a la formación de biocapas sobre la superficie de los sensores.

1. Introducción

La elaboración del vino y la sidra son procesos complejos, que implican el control de muchos parámetros a lo largo de las distintas etapas de la producción. Además de la calidad original de la materia prima utilizada en el proceso, es fundamental el control de las condiciones físico-químicas y microbiológicas para lograr la mejor calidad del producto final. Durante el período de almacenamiento o envejecimiento en bodega, el producto puede verse alterado por la aparición de levaduras contaminantes, generando cambios en las propiedades organolépticas de los productos. Uno de los principales problemas de este fenómeno, es el desconocimiento de los mecanismos por los cuales estas levaduras comienzan su actividad. Por lo tanto, todavía no es posible controlar su aparición en el interior de las bodegas y los depósitos.

Una de las principales levaduras contaminantes en el vino y la sidra es *Brettanomyces*, capaz de generar cambios en el aroma y en el sabor que muchos expertos los describen como corral, ahumado, cheso o incluso sudor de caballo [1]. Este cambio tan característico es causado principalmente por la generación de fenoles volátiles, como 4-etilfenol y 4-etilguaiacol. Las levaduras transforman los ácidos hidroxycinámicos, constituyentes naturales de la uva y la manzana, en estos fenoles volátiles durante el período de almacenamiento y envejecimiento, lo que conlleva a pérdidas económicas significativas para los productores. Además, son capaces de sobrevivir durante largos períodos de tiempo y soportar los procesos de saneamiento aplicados regularmente en las bodegas. Esto

se debe a su capacidad para adherirse y formar biocapas (comunidades microbianas de células adheridas a la superficie incrustadas en una matriz polimérica extracelular).

A día de hoy, para la detección de estas levaduras se emplean tanto métodos directos como indirectos. Entre los métodos directos, se encuentran las técnicas basadas en la identificación microbiológica como el conteo en placa [2]. Son altamente empleadas por su bajo coste, pero a su vez, posee numerosas desventajas como los largos períodos de incubación, los falsos positivos o la contaminación de las placas. Por otra parte, se encuentran las técnicas basadas en análisis molecular, que cuenta con numerosas ventajas frente a las técnicas anteriores. Su principal inconveniente es su elevado coste, lo que hace que estas técnicas sean de difícil acceso para pequeñas bodegas. Las técnicas indirectas se basan en el análisis y cuantificación de los productos metabólicos producidos empleando cromatografía de gases. Se trata de una técnica tardía, ya que las alteraciones suceden una vez que la concentración de levaduras ya es demasiado alta.

Como resultado de estas dificultades para su detección, la mayoría de las bodegas se han esforzado en implementar métodos profilácticos en todas sus bodegas de manera generalizada. El tratamiento con sulfitos es el más utilizado para evitar la proliferación de las levaduras.

En los últimos años, los métodos basados en la espectroscopía de impedancia se han utilizado como una herramienta eficaz para la detección *in situ* de microorganismos [3]. Esta técnica se basa en la medición de cambios impedimétricos del medio causados por la presencia de microorganismos debido al crecimiento sobre la superficie del sensor (formando biocapas), o a cambios químicos del medio causados por su actividad metabólica.

El objetivo de este trabajo consiste en proporcionar evidencias experimentales de la aplicación de la impedancia para la detección de *Brettanomyces* bajo diferentes condiciones (estático y agitación) en cultivos selectivos. Para ello, se han utilizado sensores basados en IDE, ya que ofrecen una respuesta precisa en un espacio limitado [4]. Además, se ha realizado un estudio de circuitos equivalentes que ha permitido evaluar todos los efectos que afectan a las medidas de impedancia de forma aislada.

2. Materiales y métodos

2.1. Sustancias químicas y reactivos

Los productos químicos y reactivos empleados han sido: etanol 99,5% (ref: 161086.1211, Panreac), caldo de extracto de malta No. 1 (ref: 02-111-500, Scharlab), cristal violeta (ref: HT90132, Sigma-Aldrich), agua destilada (Mili-Q, Millipore) y cicloheximida 95 % (Ref: 357420010, Acros).

El medio de cultivo se ha preparado para el crecimiento selectivo de *Brettanomyces* y simulando las condiciones de barrica. Se ha empleado caldo de extracto de malta enriquecido con cicloheximida (20 mg/l) y etanol (6 %).

2.2. Levadura y protocolo de cultivo

La levadura empleada es *Brettanomyces bruxellensis*, proporcionada por Guserbiot S.L. (Vitoria-Gasteiz, España). Para el crecimiento y la monitorización de esta levadura, se han empleado biorreactores de 1 L a 18 °C, replicando las condiciones de envejecimiento del vino [5]. La infección se ha realizado con 10^2 UFC/mL, de acuerdo con el nivel mínimo de *Brettanomyces* que podría causar alteraciones en la calidad de los productos. La población crítica para producir niveles detectables de los compuestos contaminantes es de 10^3 UFC/ml [6].

2.3. Diseño del biosensor y setup experimental

El biosensor se ha diseñado y fabricado mediante técnicas de microtecnología en sala limpia. El sensor contiene un depósito de película delgada de oro de 250 nm de espesor mediante pulverización catódica sobre obleas de silicio de 3". La anchura de los sensores es de 7,5 mm, la longitud es de 14 mm y la superficie sensible es un círculo de 6 mm de diámetro. Los microelectrodos tienen una anchura de 20 μ m y una separación de 30 μ m. Una vez fabricados, los sensores se han limpiado con acetona y etanol consecutivamente en un baño ultrasónico durante 5 minutos. A continuación, se han soldado las conexiones y se ha aplicado una resina epoxi (ARALDIT Ceys) para aislar las conexiones eléctricas.

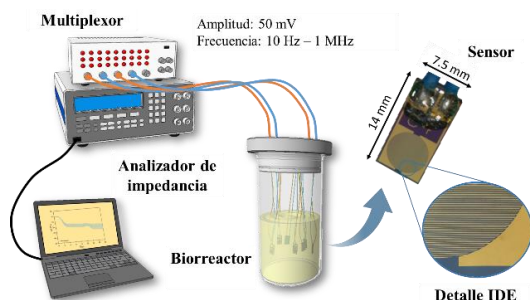


Figura 1. Setup y biosensor empleados durante los ensayos.

Se han empleado cuatro biorreactores cada uno equipado con ocho biosensores para los experimentos: dos controles y dos infectados con *Brettanomyces* (en estático y en agitación).

2.4. Medidas impedimétricas

Para la realización de las medidas, se ha empleado un analizador de impedancia Solartron 1260 (Solartron Analytical) conectado a un sistema multiplexor de 24

canales independientes. Cada biosensor ha realizado una medida cada hora durante 16 días, con un barrido en frecuencia (10 Hz - 1 MHz) aplicándole 50 mV (DC).

2.5. Análisis de microscopía

Para evaluar la formación de biocapas sobre la superficie del sensor se ha empleado microscopía. Para ello, se ha retirado un sensor cada 5 días de cada biorreactor. Las levaduras se han fijado al biosensor con metanol y han sido teñidas con cristal violeta durante 5 minutos. Se ha empleado un microscopio óptico Zeiss Observer D1.

2.6. Circuitos equivalentes

Las mediciones impedimétricas se han evaluado mediante circuitos equivalentes, donde cada efecto biológico se representa con distintos componentes eléctricos [7]. Por lo tanto, se han podido aislar efectos de forma individual, como la generación de biocapa, las variaciones químicas e iónicas, el metabolismo, etc.

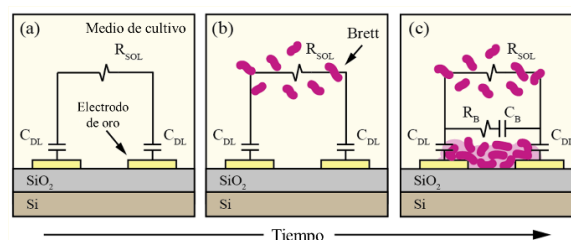


Figura 2. Circuito equivalente propuesto para el estudio del crecimiento de *Brettanomyces* sobre el sensor.

C_{DL} es la capacitancia de doble capa que representa la interacción de los iones del medio con los electrodos en la interfaz; R_{SOL} es la resistencia del medio (concentración iónica y composición química del medio, afectada por la actividad metabólica de las levaduras). C_B y R_B son la capacitancia y la resistencia, respectivamente, asociadas a la formación de biocapa unida a la superficie del biosensor. La expresión matemática del modelo de la impedancia es:

$$Z = \frac{2}{C_{DL}\omega j} + \frac{R_{SOL}(R_B + \frac{1}{C_B\omega j})}{R_{SOL} + R_B + \frac{1}{C_B\omega j}}$$

El modelo se ha evaluado en el dominio de la frecuencia realizando un *fitting* sobre los valores experimentales. Para ello, se ha empleado MATLAB R2014b con un método de mínimos cuadrados no lineal con el algoritmo *Trust-Region* y una robustez *Bisquare* (R^2 ha sido 0.999).

3. Resultados y discusión

3.1. Monitorización del crecimiento

El crecimiento de *Brettanomyces bruxellensis* provoca un cambio en la impedancia de los medios proporcional al aumento de levaduras. La Figura 3-a y 3-b muestran la evolución de la concentración de las levaduras y de la magnitud de la impedancia a 10 Hz (mayores cambios de impedancia) para los cuatro biorreactores: dos controles y dos infectados, uno en estático y otro en agitación. Las curvas muestran los valores medios de la impedancia relativa de los sensores, en los que se incluyen las barras de desviación estándar sobre cada curva.

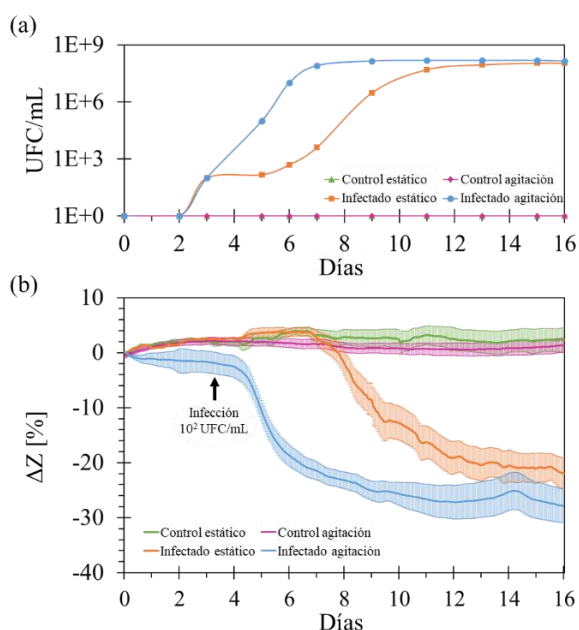


Figura 3. (a) UFC/ml de *Brettanomyces* a lo largo de los experimentos. (b) Impedancia relativa de los distintos biorreactores.

Para ambos controles, las concentraciones han permanecido constantes a cero a lo largo de los 16 días de ensayo (**Figura 3-a**). En cambio, los reactores infectados han sufrido un aumento de la concentración de células durante los experimentos. La cinética de crecimiento ha sido diferente para cada condición: la condición de agitación ha permitido una rápida proliferación y un metabolismo acelerado debido a la difusión de nutrientes de manera homogénea y a la oxigenación de los medios. En estas condiciones, la concentración máxima (UFC/mL) se muestra en el octavo día, con un crecimiento exponencial tras de infectar el bioreactor. Por el contrario, bajo las condiciones estáticas, el crecimiento de las levaduras es más lento, llegando a una concentración máxima en el día 11. Para ambas condiciones, después del crecimiento exponencial, *Brettanomyces* ha llegado a una fase estacionaria, manteniendo su concentración en torno a 10^8 UFC/mL (**Figura 3-a**).

En las medidas de impedancia, los controles se han mantenido constantes a lo largo del experimento (**Figura 3-b**). En cambio, los biorreactores infectados han mostrado variaciones notorias debido al desarrollo de las levaduras (actividad metabólica y formación de biocapa). La curva correspondiente a la condición de agitación presenta un tiempo de detección rápido, 1 día después de la infección (en comparación con la condición estática que cambió 3 días después). Esto se debe a que la condición de agitación promueve la unión celular sobre la superficie de los sensores y la formación de biocapas [8]. Por el contrario, en condiciones estáticas, las levaduras tienden a depositarse en el fondo del reactor. En este caso, la difusión de nutrientes es limitada, y, por lo tanto, los cambios en los medios son más lentos, afectando a la cinética de crecimiento y al metabolismo [9]. Bajo condiciones de agitación han sido necesarios 9 días tras la infección para alcanzar la variación máxima de la impedancia (30 %);

mientras que, para las condiciones en estático, el valor ha sido de 22 % después de 12 días (**Figura 3-b**).

3.2. Análisis de microscopía

La **Figura 4** muestra fotografías de los sensores extraídos de los biorreactores durante los ensayos. Se puede observar un aumento en el número de levaduras adheridas a la superficie del sensor, generando biocapas según van pasando los días. En el caso de agitación, la biocapa producida sobre la superficie de los sensores ha sido significativamente mayor, lo que confirma la cinética más rápida de la formación de biocapa. Además, se ha realizado una cuantificación de *Brettanomyces* unidas al biosensor al final de los experimentos. En la condición estática, la concentración ha sido de $5,4 \cdot 10^1$ CFU/cm². Mientras que, en agitación, ha sido mayor, alcanzando una concentración de $8,8 \cdot 10^5$ UFC/cm².

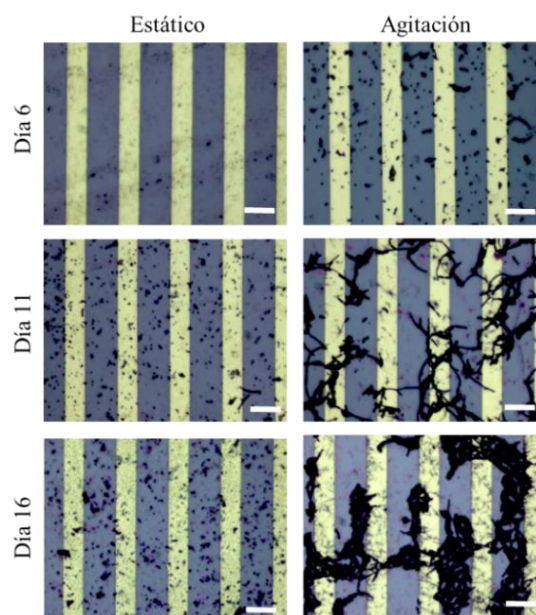


Figura 4. Fotografías de los sensores en distintas condiciones a lo largo de los ensayos (barra de escala: 30 μ m).

3.3. Espectroscopía de impedancia

La frecuencia de la señal aplicada a los electrodos es uno de los parámetros más importantes que afecta a la respuesta de los biosensores. La **Figura 5** presenta una comparación de la variación relativa máxima de la magnitud de impedancia (día 12 para agitación y día 15 para estático) a diferentes frecuencias (de 10 Hz a 1 MHz).

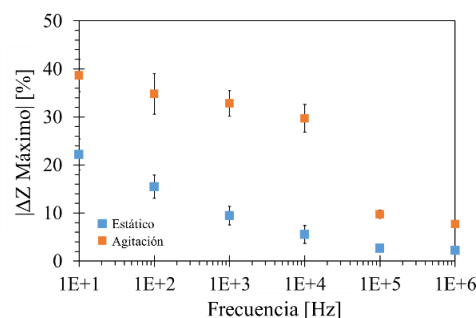


Figura 5. Variación de impedancia relativa máxima para diferentes frecuencias en condiciones en estático y agitación.

En ambas condiciones el rango de frecuencia más bajo (10 Hz) ha proporcionado una mayor sensibilidad para la detección de *Brettanomyces*, disminuyendo a medida que aumenta la frecuencia [10]. Además, la condición de agitación es mayor para todas las frecuencias mostradas.

3.4. Análisis de circuitos equivalentes

En el modelo eléctrico, se han aislado comportamientos específicos con los datos experimentales. La **Figura 6-a** y **6-b** muestran los resultados del ajuste del modelo óptimo sobre el rango de frecuencia para ambas condiciones experimentales. En ambos casos, el modelo propuesto presenta un buen ajuste. Las **Figura 6-c** y **6-d** representan la evolución de los componentes eléctricos equivalentes del modelo (R_{SOL} , R_B , C_B y C_{DL}) calculados a partir de los datos experimentales en estático y agitación. El comportamiento de los componentes coincide con los gráficos de la **Figura 3**.

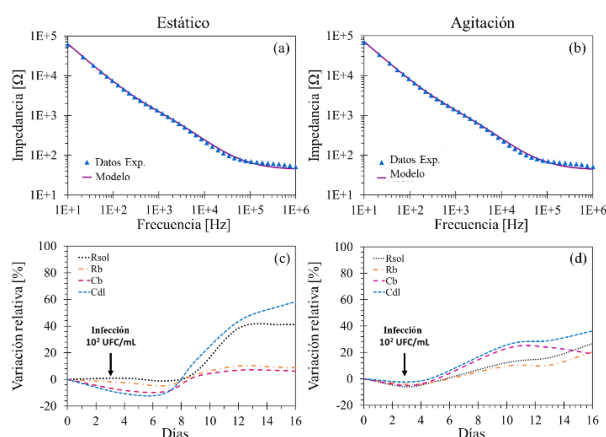


Figura 6. (a, b) Simulación de la magnitud de impedancia representada para el modelo óptimo propuesto. (c, d) Valores de los elementos del modelo eléctrico durante el ensayo.

En la **Figura 7-c**, R_B y C_B muestran un cambio bajo debido al bajo desarrollo de la biocapa sobre los sensores. En cambio, R_{SOL} muestra un aumento debido a la repercusión metabólica en el medio. En la **Figura 7-d** R_B y C_B cambian significativamente. R_B aumenta continuamente, mientras que C_B alcanza un máximo (día 11) y disminuye lentamente, probablemente debido a un cambio en el biofilm y en el metabolismo de sus levaduras. En este caso, R_{SOL} también muestra un aumento continuo a lo largo de los ensayos. Finalmente, en ambos casos, C_{DL} tiene un aumento moderado con el tiempo. Esto puede deberse a la relación de la superficie del biosensor con la muestra, en términos de comportamiento iónico y a la formación de biocapa.

4. Conclusiones

Se ha logrado monitorizar el crecimiento de *Brettanomyces bruxellensis* mediante espectroscopía de impedancia utilizando sensores basados en microelectrodos interdigitados (IDE) en un medio de cultivo selectivo. Se ha obtenido una mayor sensibilidad para el rango de frecuencias bajas (10 - 100 Hz).

En cuanto a las condiciones de medida, en el caso de agitación, la respuesta ha sido más rápida y mayor

comparando con estático (aumento del 8 %). Esto se debe a que se favorece el crecimiento de biocapas sobre la superficie del sensor y a un metabolismo más acelerado.

En el análisis de los parámetros eléctricos del circuito equivalente (R_{SOL} , R_B , C_B y C_{DL}) se ha confirmado también que las condiciones de agitación promueven la formación de biocapas sobre la superficie de los sensores. En cambio, en las condiciones estáticas, los cambios se deben principalmente a la actividad metabólica.

Finalmente, los resultados demuestran el potencial de esta tecnología para la realización de diagnóstico rápido, la inocuidad de los alimentos y la mejora de su calidad.

Agradecimientos

Agradecer a Guserbiot SL por las muestras y al Gobierno Vasco por la subvención de esta tesis doctoral.

Referencias

- [1] S. Benito, Identifying yeasts belonging to the *Brettanomyces*/*Dekkera* genera through the use of selective-differential media, *African J. Microbiol. Res.* 6 (2012) 6348–6357. doi:10.5897/AJMR12.440.
- [2] N. Rodrigues, G. Gonçalves, S. Pereira-Da-Silva, M. Malfeito-Ferreira, V. Loureiro, Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera*/*Brettanomyces*, *J. Appl. Microbiol.* 90 (2001) 588–599. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01275.x.
- [3] L. Yang, R. Bashir, Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria, *Biotechnol. Adv.* 26 (2008) 135–150. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.10.003.
- [4] N. Couniot, D. Flandre, L.A. Francis, A. Afzal, Signal-to-noise ratio optimization for detecting bacteria with interdigitated microelectrodes, *Sensors Actuators, B Chem.* 189 (2013) 43–51. doi:10.1016/j.snb.2012.12.008.
- [5] A. Barata, J. Caldeira, R. Botelho, D. Pagliara, M. Malfeito-Ferreira, V. Loureiro, Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide, *Int. J. Food Microbiol.* 121 (2008) 201–207. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.020.
- [6] I. Hernández, F. Barbero, *Brettanomyces bruxellensis* en la bodega, *VinoTeq.* 3 (2007) 18.
- [7] Z. Li, Y. Fu, W. Fang, Y. Li, Electrochemical Impedance Immunosensor Based on Self-Assembled Monolayers for Rapid Detection of *Escherichia coli* O157:H7 with Signal Amplification Using Lectin, *Sensors.* 15 (2015) 19212–19224. doi:10.3390/s150819212.
- [8] J. Paredes, S. Becerro, S. Arana, Label-free interdigitated microelectrode based biosensors for bacterial biofilm growth monitoring using Petri dishes, *100* (2014) 77–83.
- [9] H. Ben-Yoav, A. Freeman, M. Sternheim, Y. Shacham-Diamand, An electrochemical impedance model for integrated bacterial biofilms, *Electrochim. Acta.* 56 (2011) 7780–7786. doi:10.1016/j.electacta.2010.12.025.
- [10] L. Yang, Y. Li, C.L. Griffis, M.G. Johnson, Interdigitated microelectrode (IME) impedance sensor for the detection of viable *Salmonella typhimurium*, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2004) 1139–1147. doi:10.1016/j.bios.2003.10.009.