



## ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA: UN MÉTODO RÁPIDO Y EFICIENTE PARA EL MONITOREO DEL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus acidophilus*

### IMPEDANCE SPECTROSCOPY: AN EFFICIENT AND FAST METHOD TO PROBE THE GROWING OF *Lactobacillus acidophilus*

M. Villa-García<sup>1\*</sup>, R. Pedroza-Islas<sup>2</sup>, E. San Martín-Martínez<sup>1</sup> y M. Aguilar-Frutis<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del IPN, Legaria 694, Col. Irrigación, Del. Miguel Hidalgo, C.P. 11500, México D.F., México.

<sup>2</sup>Universidad Iberoamericana, Prol. Paseo de la Reforma 880, Lomas de Santa Fe, México D.F., C.P. 01219, México D.F., México.

Recibido 4 de Octubre de 2012; Aceptado 28 de Febrero de 2013

#### Resumen

Una comparación entre la técnica de espectroscopia de impedancia eléctrica (EIE) y la técnica tradicional de conteo en placa fue realizada para estudiar el crecimiento del *Lactobacillus acidophilus* (La). Se encontró que, tras la inoculación, y después de 0.8 h, el crecimiento microbiano fue registrado por medio de la EIE, inferida a través del parámetro  $\lambda$ . En contraste, con la técnica de conteo en placa, el mismo parámetro se estimó en 6.8 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 Boltzmann. Usando la técnica de espectroscopia de impedancia eléctrica, la resistencia del medio resultó la más eficiente para la estimación de los parámetros del crecimiento de *Lactobacillus acidophilus*.

*Palabras clave:* espectroscopia de impedancia, curva de crecimiento microbiológico, *Lactobacillus acidophilus*.

#### Abstract

In this work, a comparison between Impedance Spectroscopy (IS) and Plate Counting to probe the growth of *Lactobacillus acidophilus* (La) was done. It was found that after inoculation, and after 0.8 h, the microbial growth was noticed by IS, inferred by the  $\lambda$  parameter. In contrast, by means of the Plate Counting method, the growth was noticed after 6.8 h. The experimental data obtained by IS were first fitted by an RC series circuit, and then, the curves generated were modeled by the well-known growing models of Gompertz and Boltzmann. When using the IS technique, it was found that the resistance of the medium was a better parameter to describe the growing process of La.

*Keywords:* impedance spectroscopy, microbiology growing curves, *Lactobacillus acidophilus*.

## 1 Introducción

Recientemente el uso de microorganismos probióticos, como *Lactobacillus acidophilus*, en productos alimenticios ha sido destacable por sus efectos benéficos a la salud (Shah y Ravula, 2000; Domínguez-Bello y Blaser, 2008). La detección y cuantificación de su viabilidad es de suma importancia

desde la activación del cultivo liofilizado, así como durante su procesamiento, almacenamiento y hasta la adición en un producto final, de tal manera de poderlo utilizar eficientemente y en la fase de crecimiento que la aplicación demande. Por ello, se requieren métodos rápidos y confiables para determinar concentraciones totales viables (Whalker y col., 2005).

\*Autor para la correspondencia. E-mail: maty.vg@yahoo.com.mx  
Tel. 5729 6000, ext. 67755, Fax 53-95-41-47

Las técnicas convencionales como conteo en placa, reducción de colorantes, y métodos espectrofotométricos, etc., son eficaces para detectar y determinar la viabilidad de las células, sin embargo, requieren de tiempos prolongados de revelación (24-48 h), así como de la preparación de gran cantidad de material estéril (Grossi y col., 2008). Ante esto, se ha innovado en métodos que proveen respuestas rápidas y confiables con fundamento en efectos físicos (corriente eléctrica, respuesta acústica, bio-luminiscencia, resonancia magnética nuclear, métodos ópticos, piezoelectricidad, etc.) (Grossi y col., 2008; Fehrenbach y col., 1992). De entre ellos, la EIE consiste en la aplicación de una señal eléctrica para medir la impedancia o resistencia de un sistema que puede ser un material sólido (Macdonald, 1987), o un sistema biológico (Grossi y col., 2008; Ferreira y col., 2005; Aroom y col., 2009). En este último caso, la técnica ha derivado en el nombre de Impedancia Microbiológica (IM). En muchos de los casos para un sistema biológico, la respuesta de la señal eléctrica surge como consecuencia del metabolismo de nutrientes durante la actividad microbiana, por ejemplo. Experimentalmente, la determinación de la impedancia se obtiene al medir la componente real y compleja que aparece entre un par de electrodos sumergidos en una celda conteniendo un caldo de cultivo o un sistema biológico (Felice y Valentinuzzi, 1999). La IM resulta ser en la mayoría de los casos un mejor transductor de las variaciones del medio, comparado con algunos de los métodos tradicionales. Recientemente esta técnica se está usando en aplicaciones específicas en la industria alimentaria como “biosensor” para una rápida detección, identificación, cuantificación y monitoreo de contenidos bacterianos (patógenos o benéficos), (Arora y col., 2011; Ramírez y col., 2009), así como para una estimación de curvas de crecimiento de microorganismos (Yang y col., 2003; Felice y col., 1999), tales como bacterias ácido-lácticas (Curda y Plocková, 1995), coliformes (Eden y Eden, 1984; Felice y Valentinuzzi, 1999; Cady y col., 1978), pseudomonas (Hause y col., 1981), y salmonela (Yang y col., 2003). De esta manera la IM se viene adoptando como técnica estándar de control de calidad en productos alimenticios (carne, vegetales, vinos, lácteos, pescados, leche en polvo y helados), farmacéuticos y cosméticos (Grossi y col., 2008; Walker y col., 2005), así como para determinar compuestos específicos y contaminantes químicos (Arora y col., 2011). La técnica ha tenido gran impacto y ha sido aceptada como método

de cribado para detectar salmonella en alimentos y como método definitivo para enterobacterias, coliformes y listeria (Gibson y col., 1992; Arora y col., 2011). Sin duda la técnica es promisoriosa y aunque estudios informan su aplicación en diferentes bacterias, específicamente para *L. acidophilus* hasta donde se tiene conocimiento en la literatura explorada, ha sido escasamente estudiada por esta técnica. En este trabajo, se empleó la espectroscopia de impedancia eléctrica para monitorear el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en medio de cultivo puro; por medio de las respuestas eléctricas originadas se establecieron parámetros de crecimiento los cuales fueron validados por medio de un modelo matemático. En los resultados obtenidos se encontró que, tras la inoculación, el crecimiento fue registrado en tiempos tempranos por la EIE, a diferencia de lo detectado por el conteo en placa. Cuando se usó la EIE, el parámetro  $\lambda$  fue encontrado a las 0.8 h, mientras que por conteo en placa resultó hasta las 6.8 h. Mediante la EIE, la respuesta del sistema fue bien ajustada por un circuito R-C en serie, en donde la resistencia del medio resultó más eficiente para la generación de la curva de crecimiento y mediante la aplicación del modelo de crecimiento de Gompertz fue posible establecer los parámetros que determinan el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus*.

## 2 Métodos

### 2.1 Materiales

Un cultivo puro liofilizado de *Lactobacillus acidophilus* (Florafit NCFM, Danisco Mexicana, S.A. de C.V. México) fue empleado en este trabajo. Adicionalmente, caldo y agar De Man Rogosa Sharpe (Difco<sup>TM</sup> Lactobacilli MRS broth y Difco<sup>TM</sup> Lactobacilli MRS agar, Difco, EUA) fueron adquiridos como medio de crecimiento de la bacteria probiótica.

### 2.2 Acondicionamiento y cultivo de *Lactobacillus acidophilus*

El cultivo puro liofilizado se inoculó en el caldo MRS y se mantuvo a 37 °C por 24 h en condiciones anaerobias. Finalizando el tiempo de activación, una alícuota se sembró en placas de agar MRS, consecutivamente se realizó un aislamiento y las células se suspendieron en caldo MRS, esta suspensión se incubó a 37 °C por 15 h y se transfirió

a un Quimióstato (Multigen Fermenter F-2000, EUA), manteniéndose a 37 °C, con agitación constante de 70 rpm, en condiciones anaerobias.

### 2.3 Medición de la impedancia

Las mediciones de impedancia para monitorear el crecimiento de *La* se realizaron en tiempos subsiguientes a la preparación, tomando 15 ml de muestra en ciertos tiempos cubriendo desde la etapa inicial y hasta aproximadamente 12 horas posteriores. Las lecturas fueron codificadas como LI-x, donde LI indica “lectura de impedancia” y x, el número. La celda utilizada se presenta en la Fig. 1(a), la cual consta de 2 electrodos de acero inoxidable (Dentaurum) de 10 cm de longitud y con diámetro de 0.9 mm y una separación entre ellos de 1 cm. Los electrodos se sumergieron 1 cm en la solución (caldo de cultivo con bacterias inoculadas). Se utilizó un analizador de impedancia (analizador de respuesta en frecuencia) de la marca Solartron (Solartron Analytical, United Kingdom), cubriendo una frecuencia de entre 0.01 Hz y 1MHz. A modo de no inducir respuestas no lineales en el sistema, una señal de voltaje alterno con una amplitud de 20 mV (menor al voltaje térmico), fue aplicada entre los extremos de los electrodos de acero inoxidable (Macdonald, 1987). El analizador se acopló a una computadora personal por medio de una interfaz GPIB (Bus de interfaz de propósito general), la cual cuenta con el programa Zplot, que se emplea para realizar las mediciones de manera automatizada desde la PC. Adicionalmente, con el programa Zview se visualizó el conjunto de mediciones de impedancia a través del valor absoluto de la impedancia en función de la frecuencia y permitió, mediante el empleo de circuitos equivalentes, extraer los valores de la resistencia y capacitancia del sistema. En este caso, para modelar la respuesta de impedancia, un circuito R-C en serie fue utilizado, Fig. 1(b). Este tipo de circuitos ha sido ya propuesto para el análisis de sistemas equivalentes (Felice y Valentinuzzi, 1999). 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.

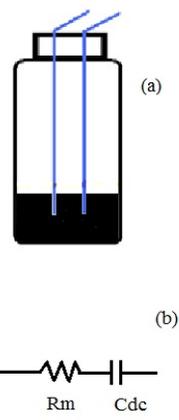


Fig. 1. Celda electroquímica de cultivo (a), Circuito equivalente simplificado de dos electrodos de la celda: Rm- Resistencia del medio; Cdc- Capacitancia de la doble capa (b).

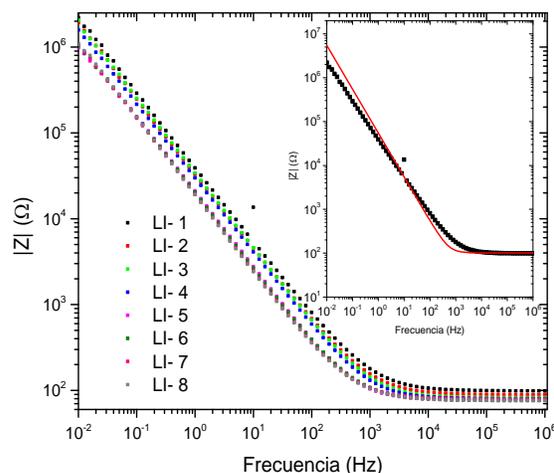


Fig. 2. Gráficos del valor absoluto de la impedancia en función de la frecuencia al monitorear el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus*. El recuadro muestra la medición de LI - 1 y ajuste con un circuito RC.

## 3 Resultados y discusión

La Fig. 2 y su recuadro muestran el comportamiento característico del valor absoluto de la impedancia en función de la frecuencia para las muestras analizadas. En este caso, en el recuadro se presenta el gráfico de LI-1, junto con su mejor ajuste. La Fig. 2 muestra el comportamiento de todas las muestras analizadas. Se puede apreciar en ellas que la impedancia total decrece con el incremento de la frecuencia; desde un valor de  $\sim 2 \times 10^6 \Omega$  a 0.01 Hz y hasta  $\sim 100 \Omega$ , a 10

kHz. Tras aumentar la frecuencia por arriba de 10 kHz, y hasta aproximadamente 1 MHz, el valor absoluto de la impedancia resultó prácticamente independiente de la frecuencia, debido a que posee un comportamiento resistivo influenciado por el aumento de actividad de los iones (Ramírez y col., 2009). La Fig. 2 permite comparar también el comportamiento de cada una de las muestras estudiadas, medidas desde el tiempo de inicio de la activación (LI-1, al tiempo cero) hasta un tiempo de 12.19 h (LI-8). Se puede apreciar, por los valores en las ordenadas, que existe un corrimiento hacia menores valores del valor absoluto de la impedancia ( $|Z|$ ), conforme se avanza en el tiempo de toma de mediciones. Este comportamiento es equiparable a lo reportado por Yang y col., (2003), al detectar la viabilidad de *Salmonella typhimurium*. En nuestro caso, es probable que el comportamiento observado pueda ser atribuido a que tras la activación exista una cantidad baja de células que producen un número reducido de productos metabólicos e iones, pero que a medida que el tiempo transcurre, existe un aumento en la cantidad de bacterias originando el efecto de ir desplazando la curva hacia menores valores de  $|Z|$  (Felice y col., 1999; Yang y col., 2003). Con el propósito de cuantificar los corrimientos de cada una de estas curvas experimentales, fueron ajustadas por medio de un circuito equivalente, consistente de una combinación en serie de una resistencia, denominada la resistencia del medio ( $R_m$ ) y una capacitancia, denominada la capacitancia de doble capa ( $C_{dc}$ ), según se describió en la Fig. 1(b). Se nombra capacitancia de doble capa debido a que esta surge en la interfase electrodo-solución. La carga en la solución se compone de un exceso de cationes o iones en la vecindad de la superficie del electrodo, mientras que sobre este último un exceso o deficiencia de electrones reside sobre su superficie. Con base en el análisis del circuito, el valor absoluto de la impedancia se puede escribir como  $|Z| = \sqrt{R_m^2 + (2\pi f C_{dc})^{-2}}$ . De esta ecuación se puede inferir que para valores de frecuencia bajos ( $f \rightarrow 0$ ), la impedancia del capacitor  $1/2\pi f C_{dc}$ , es quien domina en el valor absoluto de la impedancia total. Por otro lado, a altas frecuencias ( $f \rightarrow \infty$ ), es la resistencia del medio la que predomina, es decir, la impedancia del capacitor resulta en un valor bajo comparado con la impedancia del resistor ( $R_m$ ). De esta forma, la capacitancia de doble capa ( $C_{dc}$ ) es la que predomina para frecuencias por debajo de  $\sim 10$  kHz, y la resistencia del medio es predominante a frecuencias por arriba de ésta. Más aún, se puede apreciar que la resistencia  $R_m$  resulta independiente de la frecuencia. Así, los valores altos de frecuencia pueden ser empleados para extraer la

información del medio en cuestión y los valores bajos pueden emplearse para extraer la impedancia de la doble capa (Hause y col., 1981; Felice y Valentinuzzi, 1999; Ramírez y col., 2009; Yang y col., 2003) Para el presente estudio, ambos modos o regiones de trabajo fueron utilizados para explicar la naturaleza de las soluciones en relación al crecimiento microbiano. La forma de proceder se realizó con base en ajustar un circuito equivalente a cada una de las curvas de la Fig. 2, por ejemplo, la curva en rojo en el recuadro muestra el mejor ajuste logrado a la muestra LI-1. El ajuste fue a partir de un análisis de regresión por medio de mínimos cuadrados. En este caso, fue considerado el rango completo de frecuencias, desde 0.01 Hz y hasta 1 MHz. De este análisis se obtienen los mejores valores de la resistencia  $R_m$  y de la capacitancia  $C_{dc}$ . De las muestras analizadas y como fueron descritas en los detalles experimentales, se tiene la Tabla 1 de valores de resistencia del medio ( $R_m$ ) y capacitancia de doble capa ( $C_{dc}$ ). En la tabla se listan los resultados de la impedancia y los tiempos de medición. El primer dato corresponde a la medida tras haber inoculado la bacteria probiótica, es decir, la colección de datos inició inmediatamente después de la adición de células en el medio. Mediciones adicionales se llevaron a cabo en los tiempos establecidos en la misma Tabla 1 y hasta un valor de 12.19 h donde prácticamente, ya no se tuvo variación apreciable de la resistencia del medio. La Fig. 3 y su recuadro representan el porcentaje de cambio en la resistencia del medio y el porcentaje de cambio en la capacitancia, respectivamente, definidos como  $M(\%) = (Z_{M0} - Z_M) \times 100/Z_{M0}$ , donde  $Z_{M0}(\Omega)$  es la impedancia del medio y  $Z_M(\Omega)$  es el valor de la impedancia del medio a un determinado tiempo. La Fig. 3 muestra que el porcentaje de cambio en la impedancia (resistencia del medio) es inmediatamente registrado tras la adición de la bacteria al medio de cultivo puro. La figura muestra además un comportamiento típico del crecimiento bacteriano, presentándose una fase de latencia, seguido de una fase exponencial, para finalmente llegar a una fase estacionaria, en donde ya no existe un mayor crecimiento y/o multiplicación (Zwietering y col., 1992; Yates y Smotzer, 2007). El comportamiento de la curva y las señales de impedancia son similares a lo reportado por Curda y Plocková, (1994) quienes también cultivaron *L. acidophilus* en un medio enriquecido (leche y miel). Es de resaltar que si bien existe similitud, las fases se detectaron en tiempos tardíos en el medio enriquecido, sugiriendo que en sustratos complejos la actividad es

Tabla 1. Monitoreo del crecimiento de *Lactobacillus acidophilus*: capacitancia, resistencia y unidades formadoras de colonia (UFC).

Lectura (nomenclatura)	Tiempo (h)	$R_m$ ( $\Omega$ )	Capacitancia ( $\mu$ F)	$M_{Rm}$ (%)	$M_{Cdl}$ (%)	N (UFC)	$N/N_0$	$\log N/N_0$
LI - 1	0	102.5 $\pm$ 4.6	2.54 $\pm$ 0.11	0	0	(2.25 $\pm$ 0.15) $\times 10^9$	1	0
LI - 2	1.29	95.5 $\pm$ 4.0	3.27 $\pm$ 0.14	6.8	-28.7	—	—	—
LI - 3	1.79	87.4 $\pm$ 3.4	3.26 $\pm$ 0.13	14.7	-28.3	—	—	—
LI - 4	2.82	83.8 $\pm$ 3.3	3.70 $\pm$ 0.14	18.2	-45.7	(3.08 $\pm$ 0.05) $\times 10^9$	1.4	0.14
LI - 5	6.81	79.8 $\pm$ 2.6	5.72 $\pm$ 0.19	22.1	-125.2	(2.96 $\pm$ 0.11) $\times 10^{10}$	13.2	1.12
LI - 6	8.57	81.2 $\pm$ 2.8	5.89 $\pm$ 0.20	20.8	-131.9	(1.54 $\pm$ 0.14) $\times 10^{11}$	68.4	1.83
LI - 7	10.81	84.1 $\pm$ 2.7	6.39 $\pm$ 0.21	17.9	-151.6	(6.54 $\pm$ 0.11) $\times 10^{12}$	2906.7	3.46
LI - 8	12.19	81.9 $\pm$ 2.6	6.47 $\pm$ 0.21	20.1	-154.7	(9.44 $\pm$ 0.17) $\times 10^{12}$	4195.5	3.62

LI: Lectura de impedancia

Tabla 2. Comparación del análisis de la técnica de impedancia y conteo en placa en base al mejor modelo de crecimiento y estimación de  $\lambda$  y  $\mu_m$ .

Técnica	$\lambda$ (h)	$\mu_m$ (1/h)	Modelo	Estimación del ajuste ( $R^2$ )
Impedancia eléctrica	0.8 $\pm$ 0.2	14.8 $\pm$ 3.9	Gompertz	0.98
Conteo en placa	6.8 $\pm$ 0.8	1.0 $\pm$ 0.2	Boltzmann	0.99

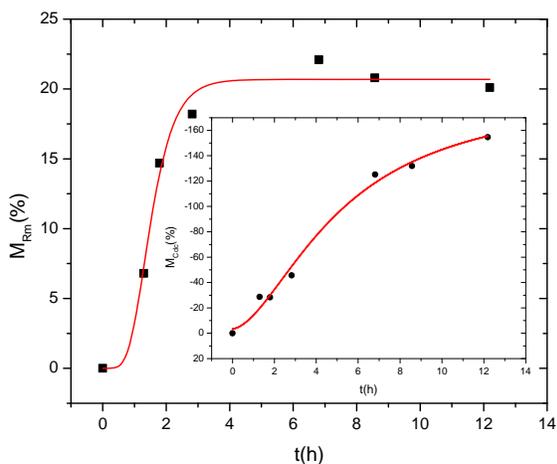


Fig. 3. Porcentaje de cambio en la resistencia del medio y porcentaje de cambio en la capacitancia (recuadro) en función del tiempo de la bacteria ácido láctica.

más lenta que en sustratos puros (Mayorga y col., 2012). Desde el aspecto analítico, el comportamiento de crecimiento puede ser ajustado a un modelo matemático de crecimiento. De entre ellos, el modelo de Gompertz es el que mejor puede describir al grupo de datos mostrados en la misma figura. El modelo viene descrito por la relación matemática siguiente:

$y = \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{\mu_m e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}$  (Zwietering y col., 1990). A partir de este modelo de crecimiento es posible extraer los parámetros fundamentales que establecen y determinan el crecimiento: la velocidad de crecimiento máximo ( $\mu_m$ ), que se define como la tangente en el punto de inflexión (en este caso realizada a la línea continua que representa el ajuste),  $\lambda$  que es el tiempo de retardo, y se define como el intercepto de esta tangente sobre el eje horizontal y, que se refiere a la asíntota y expresa el valor máximo alcanzado (Perni y col., 2005; Zwietering y col., 1992). Este último parámetro en nuestro caso se atribuye al porcentaje de cambio en la resistencia del medio. Con base en el análisis de la curva del modelo de Gompertz propuesta a los datos experimentales, se pueden determinar los parámetros del crecimiento que se muestran en la Tabla 2. El error porcentual para estos parámetros resultan en promedio por debajo del 10% y la estimación  $R^2$  del ajuste resulta también aceptable (0.98). El valor de  $\lambda$  resultó en un valor de 0.8 h, mientras que la rapidez máxima de crecimiento es del orden de 14.8 %/h y el valor asíntótico, de 20.69 %. Este análisis muestra una temprana detección del crecimiento bacteriano, situación que por otras técnicas no se logra de esta manera. En el recuadro de la Fig. 3, puede observarse que el porcentaje de cambio en la capacitancia no es tan dramático como lo es para el caso de la

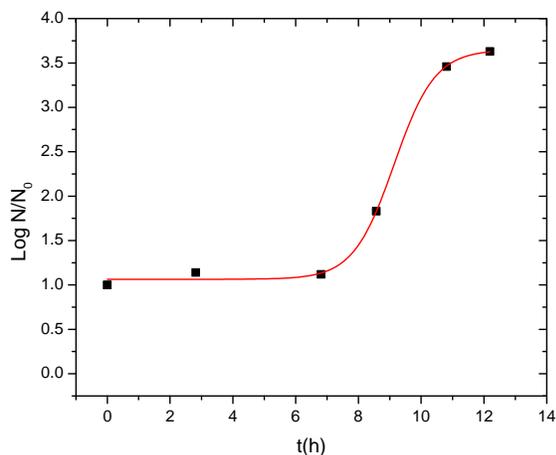


Fig. 4. Curva de crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* por medio de la técnica de conteo en placa y su ajuste usando el modelo de Boltzmann.

impedancia del medio, probablemente por fenómenos electro-cinéticos en la superficie de los electrodos; específicamente la bacteria puede estar adsorbida en el electrodo y actuar como aislante restringiendo el flujo de corriente, reportando de esta manera un aumento en la resistencia, este comportamiento es similar a lo reportado por Yang y col., (2008) al monitorear bacterias putrefactivas. Para poder comparar los tiempos en que se registran los cambios en el medio de cultivo por la EIE, se realizó el análisis por medio de conteo en placa. La Fig. 4 muestra este análisis valorando el gráfico del  $\log UFC$  en función del tiempo. De igual manera, es posible establecer un comportamiento típico de crecimiento bacteriano en tal gráfica. El mejor ajuste, tomando como modelo matemático la ecuación de Boltzmann ( $y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x - x_0}{\Delta x}}}$ ), (donde  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $x_0$  y  $\Delta x$  representan un valor inicial, un valor final, el centro y una constante de tiempo, respectivamente), teniendo un valor de  $R^2 = 0.99$ , sobre el obtenido para el modelo de Gompertz ( $R^2 = 0.98$ ), describió la forma más adecuada de la cinética. A partir de un análisis semejante para la estimación de los parámetros de crecimiento de la curva generada en la Fig. 4, se determinaron también los parámetros del crecimiento y se listan en la misma tabla 2. La obtención de estos resultados permiten establecer que existen diferencias notables entre la curva del porcentaje de cambio de impedancia y el conteo en placa. Se verifica que la impedancia reporta tiempos más tempranos de crecimiento. Esta observación ha sido descrita por Felice y col., (1999) para otros sistemas. Con respecto al parámetro  $\lambda$ , la

curva originada por conteo en placa presentó un valor tardío en 6.8 h, mientras, como ya había sido dicho, este valor determinado cuando se emplea la EIE fue del orden de 0.8 h. Este último valor es equiparable a lo reportado por Dalgaard y Koutsoumanis, (2001), al monitorear el crecimiento de la bacteria *Brochorthrix thermosphacta* en medio líquido. Es notable apreciar la detección del crecimiento bacteriano en los tiempos tempranos por la EIE, probablemente por la mayor difusión de solutos y gas en el medio, causando que el metabolismo de las células sea más rápido (Gervais y Molin, 2003). Este comportamiento es similar al reportado por Flores y col., (2011), al cultivar *Aspergillus niger* en un medio de cultivo líquido con hexadecano. Por otra parte, el comportamiento tardío del conteo en placa puede aludirse a que el medio (agar) participa como una matriz sólida donde la difusión de nutrientes es más lenta, repercutiendo en un crecimiento celular más tardío (Gervais y Molin, 2003), lo cual puede verificarse por las velocidades máximas de crecimiento (Tabla 2). Esto ha sido estudiado también por Inch y Trinci (1987), quienes encontraron que una disminución en la actividad de agua en un medio sólido disminuye el crecimiento y esporulación de *Paecilomyces farinosus*, por otra parte González y col., (2011), también reportan que en medios sólidos se obtiene una menor producción de naringinasa por *Aspergillus niger*. Adicionalmente, es importante recalcar que las medidas de impedancia sugieren ser más representativas del crecimiento bacteriano, pues en el reactor-quimiostato se tiene una distribución homogénea de microorganismos, nutrientes y metabolitos, situación que en el conteo en placa puedan encontrarse de manera heterogénea, pudiendo esto explicar también el tiempo tardío en su detección (Gervais y Molin, 2003).

## Conclusiones

La espectroscopia de impedancia eléctrica fue utilizada para monitorear el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus*. Se encontró que, tras la inoculación, el crecimiento microbiano fue registrado en tiempos tempranos, en comparación con el conteo en placa. El parámetro  $\lambda$ , que describe el inicio del crecimiento, fue determinado en 0.8 h, de acuerdo al ajuste de los resultados experimentales y a su ajuste a través del modelo de Gompertz. En contraparte, por la técnica de conteo en placa este parámetro resultó hasta las 6.8 h. Mediante la EIE, la respuesta del sistema fue bien ajustada por un circuito RC en serie, en donde la

resistencia del medio resultó más eficiente para la estimación de los parámetros del crecimiento que el valor de la capacitancia del sistema. De esta forma, la EIE resultó más eficaz para la detección temprana del crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en un medio de cultivo puro comparada con la técnica tradicional de conteo en placa.

## Nomenclatura

$A$	asíntota
$C_{dc}$	capacitancia de la doble capa, Farad
$EIE$	espectroscopia de impedancia eléctrica
$IM$	impedancia microbiológica
$La$	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
$M$ (%)	porcentaje de cambio en la resistencia del medio
$M_{Cal}$	porcentaje de capacitancia del medio
$M_{Rm}$	porcentaje de resistencia del medio
$MRS$	de Man Rogosa Sharpe
$N$	no. de bacterias
$N_0$	no. de bacterias en tiempo cero
$RC$	resistivo-capacitivo
$R_m$	resistencia del medio, Ohms
$R_s$	resistencia, Ohms
$UFC$	unidades formadoras de colonias
$Z_M$	impedancia medida del medio a un determinado tiempo.

### Símbolos griegos

$\lambda$	fase lag, tiempo de retardo, h
$\mu_m$	máxima velocidad de crecimiento

## Agradecimientos

M. Villa-García agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-México) la beca otorgada durante los estudios de posgrado dentro del programa en Tecnología Avanzada en CICATA-Legaria, del Instituto Politécnico Nacional. Igualmente, se agradece a la SIP-IPN el apoyo PIFI a través de los proyectos: 2013-0153, 2012-1458, 2011-1101, 2010-1556 y 2009-1158. El apoyo recibido por el Ing. Abel Tinoco Dávila en las pruebas microbiológicas es también reconocido.

## Referencias

- Aroom, K.R., Harting, M.T., Cox Jr., C.S., Radharkrishnan, R.S., Smith, C. y Gill, B.S. (2009). Bioimpedance Analysis: A Guide to Simple Design and Implementation. *Journal of Surgical Research* 153, 23-30.
- Arora, P., Sindhu, A., Dilbaghi, N. y Chaudhury, A. (2011). Review: Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens. *Biosensors and Bioelectronics* 28, 1-12.
- Cady, P., Dufour, S.W., Shaw, J. y Kraeger, J. (1978). Electrical impedance measurements: Rapid method for detecting and monitoring microorganism. *Journal of Clinical Microbiology* 3, 265-272.
- Curda, L. y Plocková, M. (1995). Impedance measurement of growth of lactic acid bacteria in dairy culture with honey addition. *International Dairy Journal* 5, 727-733.
- Dalgaard, P. y Koutsoumanis, K. (2001). Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimates from absorbance and viable count data by different mathematical models. *Journal of Microbiological Methods* 43, 183-196.
- Domínguez-Bello, M.G. y Blaser, M.J. (2008). Do you have a probiotic in your future? *Microbes and Infections* 1, 1-5.
- Eden, G. y Eden, R. (1984). Enumeration of microorganisms by their dynamic ac conductance patterns. *IEEE Transaction on Biomedical Engineering* 2, 193-198.
- Fehrenbach, R., Comberbarch, M. y Petre, J.O. (1992). On-line biomass monitoring by capacitance measurement. *Journal of Biotechnology* 23, 303-314.
- Felice, C.J. y Valentinuzzi, M.E. (1999). Medium and interface components in impedance Microbiology. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 12, 1483- 1487.
- Felice, C.J., Madrid, R.E., Olivera, J.M., Rotger, V.I. y Valentinuzzi, M.E. (1999). Impedance microbiology: quantification of bacterial content in milk by means of capacitance growth curves. *Journal of Microbiological Methods* 35, 37-42.
- Ferreira, A.P., Vieira, L.M., Cardoso, J.P. y Menezes, J.C. (2005). Evaluation of a new anular capacitance probe for biomass monitoring in industrial pilot-scale fermentations. *Journal of Biotechnology* 116, 403-409.

- Flores-Flores, T.C., Gutiérrez-Rojas, M., Revah, E. y Favela-Torres, E. (2011). Comparative study for oxygenases produced by *Aspergillus niger*, ATCC 9642, in solid-state and submerged fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10, 189-207.
- Gervais, P. y Molin, P. (2003). The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13, 85-101.
- Gibson, D.M., Coombs, P. y Pimbley, D.W. (1992). Automated conductance method for the detection of salmonella in food: collaborative study. *Journal of the AOAC International* 75, 293-302.
- González-Vázquez, R., Azaola-Espinosa, A., Osorio-Revilla, G., Gallardo-Velázquez, T., Cruz-Victoria, T., Arana-Erassquin, R. y Rivera-Espinoza, Y. (2011). The effect of different carbon sources and salts in the production of naringinase by *Aspergillus niger* ATCC1015. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10, 1-8.
- Grossi, M., Lanzoni, M., Pompei, A., Lazzarini, R., Matteuzzi, D. y Riccò, B. (2008). Detection of microbial concentration in ice-cream using the impedance technique. *Biosensors and Bioelectronics* 23, 1616-1623.
- Hause, L.L., Komorowski, R.A. y Gayon, F. (1981). Electrode and electrolyte impedance in the detection of bacterial growth. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 5, 403-409.
- Inch, J.M. y Trinci, A.P.J. (1987). Effects of water activity on growth and sporulation of *Paecilomyces farinosus* in liquid and solid media. *Journal of General Microbiology* 133, 247-252.
- Perni, S., Andrew, P.W. y Shama, G. (2005). Estimating the maximum growth rate from microbial growth curves: definition is everything. *Food Microbiology* 22, 491-495.
- Ramírez, N., Regueiro, A., Arias, O. y Contreras, R. (2009). Electrochemical impedance spectroscopy: an effective tool for rapid microbiologic diagnosis. *Biotecnología Aplicada* 26, 65-71.
- Macdonald, J. R. (1987). *Impedance Spectroscopy: Emphasizing Solid Materials and Systems*. John Wiley & Sons, New York.
- Mayorga-Reyes, L., Calderón-Garza, E., Gutiérrez-Nava, A., González-Cervantes, R., Azaola-Espinosa, A. y Barranco-Florido, E. (2012). Characterization and expression of the chitinase *chit II* gene from *Lecanicillium lecanii* in solid-state fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11, 97-104.
- Shah, N.P. y Ravula, R.R. (2000). Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy dessert. *Journal of Dairy Technology* 3, 139-144.
- Walker, K., Ripandelli, N. y Flint, S. (2005). Rapid enumeration of *Bifidobacterium lactis* in milk powders using impedance. *International Dairy Journal* 15, 183-188.
- 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.
- Yates, G.T. y Smotzer. (2007). On the lag phase and initial decline of microbial growth curves. *Journal of Theoretical Biology* 244, 511-517.
- Zwietering, M.H., Rombouts, F.M. y Van't Riet, K. (1992). Comparison of definitions of the lag phase and the exponential phase in bacterial growth. *Journal of Applied Bacteriology* 72, 139-145.