

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 851**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**C12Q 1/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06742438 .2**  
96 Fecha de presentación: **29.05.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1891436**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.02.2008**

54 Título: **Cuantificación de la viabilidad de bacterias del ácido láctico usando citometría de flujo**

30 Prioridad:  
**27.05.2005 DK 200500777**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.11.2012**

73 Titular/es:  
**CHR. HANSEN A/S (100.0%)**  
**BÖGE ALLÉ 10-12**  
**2970 HØRSBOLM, DK**

72 Inventor/es:  
**WORM, JACOB;**  
**STAVNSBJERG, RIKKE y**  
**MØLLGAARD, HENRIK**

74 Agente/Representante:  
**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 389 851 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Cuantificación de la viabilidad de bacterias del ácido láctico usando citometría de flujo

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención pertenece a un método de cuantificación del número de células de bacterias del ácido láctico viables (LAB) en una muestra.

10 **Antecedentes de la invención**

[0002] Bacterias que fermentan azúcares con la producción de ácidos en particular ácido láctico como un componente metabólico mayor han sido conocidas por mucho tiempo. Tales bacterias se pueden encontrar en la leche o productos lácteos, plantas vivas o en descomposición pero también en el intestino del hombre y animales. Generalmente, estas bacterias han sido referidas como "bacterias del ácido láctico". Bacterias del ácido láctico (LAB) designan un grupo más bien heterólogo de bacterias anaeróbicas o microaerofílicas gram positivas no móviles, que fermentan azúcar con la producción de ácidos incluyendo ácido láctico y comprenden por ejemplo, los géneros *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Durante siglos, cultivos iniciadores de siglos de bacterias del ácido láctico han sido usados en la producción de productos alimentarios y de alimentos para animales incluyendo la mayoría de productos lácteos y hoy en día las bacterias del ácido láctico son esenciales en la producción de todos los productos lácteos fermentados tales como yogur, queso y mantequilla. Además las bacterias del ácido láctico son muy usadas en la industria de procesamiento de la carne, en la industria de fabricación de vino, en la industria de fabricación de zumo al igual que varias otras industrias. La publicación de una gran cantidad de informes documentando que varias bacterias lácticas afectan beneficiosamente al bienestar de los seres humanos y/o animales han atraído incluso más interés para este grupo de bacterias. En particular, se ha encontrado que cepas específicas de *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* son capaces de colonizar la mucosa intestinal y de asistir en el mantenimiento del bienestar de los huéspedes. Microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud en el huésped, se denominan como organismos probióticos, o probióticos (FAO / WHO 2002).

[0003] El uso como cultivo iniciador y como probióticos implican que las LAB sean expuestas a varias condiciones de tensión que pueden afectar a su viabilidad. Ambos cultivos iniciadores y probióticos son por cuestiones prácticas frecuentemente proporcionados en una forma liofilizada. Es bien conocido en la técnica que el número de células viables de bacterias del ácido láctico es significativamente reducido durante el proceso de liofilización. Como las actividades metabólicas que caracterizan las células vivas son esenciales para el uso como cultivos iniciadores y como probióticos, el contenido de las células vivas debería ser establecido para cada lote de un cultivo iniciador o una composición probiótica. Además, también es bien conocido que el número de células vivas se reduce durante el almacenamiento. Así, para asegurar que los productos proporcionan células vivas suficientes el tiempo de conservación de los productos debería ser controlado controlando la cantidad de células vivas en las pruebas rápidas a intervalos regulares.

[0004] De forma convencional, el contenido de células viables ha sido realizado por la determinación de unidades formadoras de colonias (CFU) por la técnica de conteo sobre placa, en la que se sigue la formación de colonias visibles en un medio de crecimiento de agar apropiado.

[0005] Células vivas se caracterizan por un gradiente potencial eléctrico con el citosol siendo eléctrico negativo con respecto al entorno exterior. El mantenimiento del potencial de membrana requiere un metabolismo de energía activa en células eucariotas al igual que en células bacterianas. Como el gasto de energía metabólica se requiere para mantener potenciales, el potencial a través de la membrana de una célula deteriorada o moribunda se disminuye en magnitud. En bacterias el potencial de membrana se disminuye o se pierde minutos después de la eliminación de fuentes de energía. El potencial de la membrana también disminuye o se pierde si la membrana celular bacteriana se rompe o se daña de otra manera por medios químicos o físicos (Shapiro; (1990) ASM news 56,584-588). Así, el nivel del potencial de membrana es un indicador altamente sensible no sólo de la integridad de membrana sino del estado general fisiológico de la célula bacteriana individual.

[0006] Novo et al. (1999) describen un ensayo para determinar el potencial de membrana para células bacterianas individuales. Basan su ensayo en el tinte fluorescente de yoduro de 3,3'-dietiloxacarbocianina (DiOC2(3); DiOC). DiOC es lipofílico, pero también positivamente cargado. El tinte tiñe las bacterias con fluorescencia verde, que refleja supuestamente la distribución de tinte por los lípidos en la membrana y constelaciones hidrofóbicas de la célula. La generación de energía celular conduce a un gradiente electroquímico a través de la membrana. El potencial eléctrico (interno negativo) cambia la distribución de DiOC por medio de una electroforesis hacia adentro. Como se discute por Novo et al. (1999) la acumulación de tinte probablemente conduce a la formación de agregados de tinte en las partes acuosas del citosol que resultan en un cambio a rojo en la emisión de fluorescencia del tinte que es indicativo de células con un potencial de membrana "normal".

[0007] La citometría de flujo (FCM) es una técnica rápida para análisis de células individuales. En FCM, se analizan células individuales a índices de 100 a 1000 por s ya que se soportan dentro de un fluido de flujo rápido que pasa una fuente de luz láser típicamente el dispersador de luz en ángulo frontal (FSC), dispersador de luz en ángulo lateral (SSC), y la fluorescencia de células individuales a longitudes de onda seleccionadas son medidas.

[0008] Varias sondas diferentes fluorescentes han sido desarrolladas para la evaluación de la viabilidad usando técnicas de FCM. La bibliografía proporciona ejemplos del uso de sondas fluorescentes para controlar varios parámetros fisiológicos tales como el contenido de ADN, actividad enzimática, respiración, potencial de membrana, pH intracelular, e integridad de la membrana a nivel de la célula individual (Bunthof, 2001 y Ben Amor, 2002). Particularmente, se ha utilizado ampliamente en ensayos de viabilidad que se basan en la detección de la integridad de membrana. Recientemente, no obstante, fue proporcionado que las determinaciones de CFU no parecen estar relacionadas con los resultados obtenidos con el test de viabilidad basado en la integridad de la membrana celular durante el almacenamiento de *Bifidobacteria* (Lathinen, 2005). Como se proporciona en el ejemplo 1 hemos observado resultados similares con células de *Lactobacillus* durante el almacenamiento.

[0009] Para concluir, la determinación de CFU es el método de referencia estándar para la prueba de viabilidad usada para la industria láctea. Desafortunadamente, la determinación de unidades formadoras de colonias es un ensayo más bien lento y de trabajo muy intensivo que ha demostrado ser muy difícil de automatizar. Así, hay una necesidad persistente de métodos que permiten una cuantificación rápida y fiable de células viables y que se puede correlacionar con el número de CFU.

### Resumen de la invención

[0010] El problema subyacente a la presente invención fue proporcionar un método rápido y fiable de cuantificación de la cantidad de LAB vivas en una muestra. Fue deseado que el método de cuantificación del número de células bacterianas del ácido láctico (LAB) viables en una muestra fuera suficientemente "resiliente" a variaciones en los tiempos de ensayo que es una característica de cribado de alto rendimiento.

[0011] Para obtener un protocolo de evaluación de la viabilidad de alto rendimiento eficaz hemos inventado un método basado en FCM de cuantificación de la viabilidad de LAB que fácilmente se puede enlazar a un robot de manipulación de líquidos y por tanto automatizado. No obstante, para obtener un rendimiento satisfactorio las distintas fases en el procedimiento deben ser realizados secuencialmente, el resultado siendo que el tiempo de proceso de una muestra individual se aproxima a una hora, durante el cual el número de células viables en una muestra desafortunadamente no es constante.

[0012] La presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que el potencial de membrana celular de células LAB es muy sensible a las condiciones reales bajo las cuales las células se tiñen y se mantienen hasta que el análisis de FCM real es realizado, y ésta puede ser la razón por la que los métodos conocidos no funcionan debidamente. Como se muestra en los ejemplos 2 y 3 la composición de la mezcla de coloración real es de gran importancia para la resiliencia del ensayo. La "resiliencia" del método analítico se refiere al grado de reproducibilidad de resultados de la prueba obtenidos por el análisis de las mismas muestras (o similares) bajo una variedad de condiciones de prueba normales, tales como en diferentes laboratorios, analistas diferentes, instrumentos diferentes, cantidades diferentes de reactivos, diferentes tiempos transcurridos de ensayo, temperaturas de ensayo diferentes, días diferentes, etc.

[0013] Así, ha resultado sorprendentemente que cuando se mantienen las células bajo condiciones en las que el potencial de membrana celular se mantiene sustancialmente constante durante la cuantificación de FCM, es posible proporcionar un método para evaluar la viabilidad de alto rendimiento. Es, no obstante, previsto que la invención nueva se puede usar en otros métodos de evaluación de viabilidad donde una prueba fiable y rápida es deseada.

[0014] De acuerdo con esto, la invención proporciona un método de cuantificación del número de células bacterianas de ácido láctico (LAB) viables en una muestra que es lo bastante "resiliente" a variaciones en los tiempos de ensayo que es una característica de automatización según la reivindicación 1. El método comprende las fases de:

- (1) mezclar dichas células LAB con un tinte, que se asocia con células de LAB individuales y que es indicativo del potencial de la membrana celular de dichas células individuales y un medio de crecimiento complejo en una concentración que en 2% a 10% de la concentración recomendada cuando se usa como un medio de crecimiento para LABs;
- (2) incubar las células bajo condiciones en las que células viables retienen dicho potencial de membrana celular mientras que su crecimiento es inhibido,
- (3) detectar una propiedad óptica de la composición de tinte asociada a dichas células individuales; y
- (4) cuantificar el número de células viables en la muestra.

### Descripción detallada

[0015] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método de cuantificación del número de células de bacterias del ácido láctico (LAB) viables en una muestra según la reivindicación 1 que incluye las fases de:

1: mezclar dichas células LAB con un tinte, que se asocia con células de LAB individuales y que es indicativo del potencial de membrana celular de dichas células individuales y un medio de crecimiento complejo en una concentración que en 2% a 10% de la concentración recomendada cuando se usa como un medio de crecimiento para LABs;

5 2: incubar bajo condiciones donde las células viables retienen dicho potencial de membrana celular mientras su crecimiento es inhibido;

3: detectar una propiedad óptica de la composición de tinte asociada a dichas células individuales; y

4: cuantificar el número de células viables en la muestra.

10 [0016] La propiedad óptica de la composición de tinte puede ser detectada usando cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Un microfluorómetro se puede utilizar para medir la fluorescencia, pero la medición se realiza más rápida y precisamente usando un citómetro de flujo. La metodología de citometría de flujo y selección celular es descrita por P.K. Horan y L.L. Wheelless, Jr. en Science, Vol. 198, páginas 149-157 (1977). Citómetros de flujo que emplean fuentes de luz láser de iones de argón son bien adecuados para las presentes mediciones. Tales instrumentos se venden por diferentes fabricantes, y son capaces de seleccionar automáticamente células basándose en diferentes criterios, por ejemplo, intensidad fluorescente, tamaño celular, longitud de onda de fluorescencia, y longitud de onda o intensidad de absorción.

20 [0017] La composición de tinte que se mezcla con células LAB en la fase (1) pueden comprender cualquier tinte adecuado conocido en la técnica. Adicionalmente, se ha descubierto por el presente inventor que es altamente ventajoso si la composición de tinte comprende además un medio de crecimiento complejo diluido. Medios de crecimiento complejos son bien conocidos por los expertos en la técnica y un medio adecuado es MRS (de Man et al. 1960). El propósito de añadir un medio de crecimiento diluido a la composición de tinte es de mantener (retener) un potencial de membrana en las células sin ninguna proliferación significativa de las células, es decir el crecimiento activo de las células se inhibe y para obtener un grado de resiliencia de las células como se ha descrito anteriormente. Obviamente, el grado de dilución depende del tipo de LAB, los medios, condiciones de incubación etc. Típicamente, los medios de crecimiento serán diluidos hasta una concentración final en el intervalo de 2-10% (vol/vol), incluyendo un intervalo de 2-5% (vol/vol). De manera interesante, los presentes ejemplos muestran que una dilución debajo de 1% (vol/vol) no sostiene un potencial de membrana estable. Así, una dilución adecuada del medio de crecimiento es una dilución para una concentración final de al menos 2%, tal dilución hasta una concentración final de 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5% o incluso 6% (vol/vol).

[0018] Se prevé que el medio de crecimiento diluido y el tinte puede ser mezclado/contactado con las células bien en una fase o en dos fases. Por consiguiente, la aplicación se refiere a un método de cuantificación del número de células de bacterias del ácido láctico (LAB) viables en una muestra que incluye las fases de:

35 1: contactar dichas células LAB (o la muestra) con i) un tinte que se asocia con células de LAB individuales y que es indicativo del potencial de membrana celular de dichas células individuales, y ii) y una composición que hace que las células viables retengan dicho potencial de membrana celular mientras su crecimiento es inhibido, y/o

40 2: contactar dichas células LAB (o la muestra) con una composición de tinte que hace que las células viables retengan dicho potencial de membrana celular mientras su crecimiento es inhibido, dicha composición comprendiendo un tinte que se asocia con células de LAB individuales y que es indicativo del potencial de membrana celular de dichas células individuales;

2: incubar las células;

3: detectar una propiedad óptica del tinte asociada a dichas células individuales; y

45 4: cuantificar el número de células viables.

[0019] Puede ser provechoso añadir un carbohidrato tal como por ejemplo glucosa a la composición de tinte que comprende un medio de crecimiento diluido. El carbohidrato se puede adicionar en una concentración que esté en el intervalo de 0,5-10%, tal como en el intervalo de 1 - 10% incluyendo un intervalo de 2-5% vol/vol (concentración final).

[0020] Otra condición que influencia la resiliencia de las células tal y como se define aquí es la temperatura durante las fases de mezcla e incubación. La temperatura aplicada se puede seleccionar con respecto a la temperatura de crecimiento óptima de las células de LAB específicas. Típicamente, la temperatura aplicada es inferior a la temperatura óptima para el crecimiento. Una temperatura adecuada es al menos 10°C inferior a la temperatura de crecimiento óptima de las células de bacterias del ácido láctico.

[0021] En el presente contexto, la expresión "bacterias del ácido láctico" designa un grupo de bacterias Gram positivas, catalasa negativas, anaeróbicas o microaerófilas no móviles que fermentan azúcar con la producción de ácidos que incluyen ácido láctico como el ácido predominantemente producido, ácido acético, ácido fórmico y ácido propiónico. Las bacterias del ácido láctico más útiles industrialmente se encuentran entre especies de *Lactococcus*, especies de *Streptococcus*, especies de *Enterococcus*, especies de *Lactobacillus*, especies de *Leuconostoc*, especies de *Pediococcus* y especies de *Bifidobacterium*.

[0022] Comúnmente, cepas de bacterias del ácido láctico son generalmente divididas en organismos mesofílicos con temperaturas de crecimiento óptimas a aproximadamente 30°C y organismos termofílicos con temperaturas de

crecimiento óptimas en el intervalo de aproximadamente 40 a aproximadamente 45°C. Organismos típicos pertenecientes al grupo mesofílico incluyen *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis subesp. cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides subesp. cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis subesp. lactis biovar. diacetylactis*, *Lactobacillus casei subesp. casei* y *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*. Especies bacterianas termofílicas de ácido láctico incluyen como ejemplos *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus delbrueckii subesp. lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii subesp. bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus*.

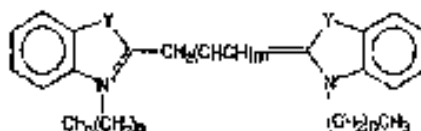
[0023] Así, temperaturas de crecimiento óptimas para el ácido láctico bacteriano se encuentran dentro de un intervalo de temperatura amplio tal como en un intervalo de 15°C a 50 °C. Una temperatura adecuada para el uso en el presente método se selecciona en el intervalo entre 0°C a 40°C, tal como en un intervalo de 10 °C a 25°C, incluyendo un intervalo entre 15 °C a 20°C. Como se ilustra en los ejemplos aquí la temperatura aplicada en el presente método es una temperatura de 20-21 °C cuando el organismo es una LAB termofílica tal como aquellas usadas en los ejemplos.

[0024] Como se ha mencionado precedentemente es una característica esencial del presente método que las células viables para ser cuantificadas retengan (mantengan) su potencial de membrana celular durante un significativo periodo temporal, es decir un periodo temporal que permita la manipulación y detección óptica de un gran número de muestras. Típicamente, el potencial de membrana se mantiene al menos 10 minutos, tal como al menos 20 minutos, tal como al menos 40 minutos, tal como al menos 50 minutos. El potencial de membrana se puede retener al menos 1 hora, tal como al menos 1,5 horas, tal como al menos 2 horas o incluso al menos 3 horas.

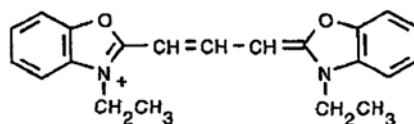
[0025] La LAB para ser cuantificada respecto a la viabilidad según el presente método se puede proporcionar en cualquier forma conocida en la técnica. Cultivos de LAB vendidos comercialmente se pueden proporcionar en una forma liofilizada. Cuando las células LAB son liofilizadas, o preparadas de otra manera para el almacenamiento, puede ser provechoso aplicar una fase de rehidratación y/o una fase de activación previa a la fase de mezcla (1) como se ha descrito anteriormente. La rehidratación se puede realizar en cualquier medio acuoso adecuado tal como por ejemplo agua, medio de crecimiento, una solución tamponada etc. Las células pueden ser además sometidas a una fase de activación, tal activación se realiza típicamente sometiendo las células a condiciones que preparan las células para el crecimiento activo. Una activación adecuada comprende incubación de las células en un medio de crecimiento complejo. Si la fase de activación comprende incubación en un medio de crecimiento complejo, es claro para el experto en la materia que antes de la cuantificación la muestra conteniendo la LAB debería bien ser diluida para mantener la concentración del componente de medio de crecimiento tan bajo que el crecimiento bacteriano no sea sostenido, o bien las células LAB deberían ser aisladas por ejemplo por centrifugado o filtración.

[0026] Tintes adecuados para el uso en el presente método incluyen pero de forma no limitativa un tinte de cianina "simétrico" y un tinte seleccionado del grupo de colorantes con las fórmulas:

a)



donde Y designa O, S, o un grupo C(X)Z (donde X y Z independientemente designan hidrógeno o C1-C10 alquilo); m y n independientemente designan un número entero entre 0 y 10, y b)



1<sup>-</sup>

[0027] También se describe una composición utilizable para teñir células de bacterias lácticas, dicha composición comprende:

a) un tinte; y

b) componentes que hacen que las células viables retengan (o retengan sustancialmente) su potencial de membrana celular mientras su crecimiento es inhibido (o sustancialmente inhibido).

[0028] Es actualmente preferido que el tinte se asocie con la célula bacteriana, así siendo indicativo del potencial de membrana celular. La composición puede comprender células bacterianas, ejemplos en tales composiciones son:

[0029] Una composición que comprende:

- a) células de LAB;
- b) un tinte que se asocia con células de LAB individuales y que es indicativo del potencial de membrana celular de dichas células individuales; y
- c) componentes que hacen que las células viables retengan (o retengan sustancialmente) dicho potencial de membrana celular mientras su crecimiento es inhibido (o sustancialmente inhibido).

[0030] Una composición que comprende:

- a) células de LAB;
- b) un tinte que se asocia con células de LAB individuales y que es indicativo del potencial de membrana celular de dichas células individuales; y
- c) componentes que hacen que las células viables retengan (o retengan sustancialmente) dicho potencial de membrana celular mientras su crecimiento es inhibido (o sustancialmente inhibido), dichos componentes siendo un extracto de levadura, un extracto de carne bovina, una peptona, una triptona o similar, tal como en una concentración de 0.05% a 0.25% (sustancia seca), y/o dichos componentes siendo los componentes de un medio utilizable para el crecimiento de células de LAB (tal como MRS o MRS-CM), pero en una concentración de 2% a 10% de la concentración en comparación a cuando se usan los componentes para la preparación de un medio de crecimiento.

[0031] El tinte puede ser un tinte tal como se ha definido anteriormente, o un tinte seleccionado del grupo que consiste en: un tinte como se define en la reivindicación 12; un tinte como se define en la reivindicación 13; un tinte como se define por Sims et al (1974); un tinte como se define por Novo et al (1999).

[0032] La composición comprende componentes que son capaces de sostener la viabilidad celular, pero no son capaces de sostener el crecimiento celular. Así, la composición puede contener componentes del grupo que consiste en:

- a) medios de crecimiento con extracto de levadura; extracto de carne bovina; triptona; caldo MRS; y/o peptona;
- b) caldo MRS; o MRS-CM.

[0033] Cuando la composición comprende células de bacterias, tales células son preferiblemente seleccionadas de las células definidas más arriba.

[0034] Además, la aplicación se refiere a una composición que es obtenible por un método comprendiendo las fases siguientes:

- 1: diluir un medio utilizable para crecimiento de células de LAB 10 a 50 veces, por ejemplo con un tampón o agua;
- 2: añadir tinte al medio diluido; y
- 3: añadir células de LAB al medio diluido.

[0035] Ejemplos de medios de crecimiento, tintes y células de LAB han sido anteriormente descritos. La composición puede contener otros ingredientes, tales como un carbohidrato o una sal mineral.

[0036] También se describe un aparato que consiste en un detector (tal como un instrumento de citometría de flujo, por ejemplo fluorescencia de detección) operativamente conectado a un contenedor que comprende una composición de la aplicación.

[0037] Una forma de realización interesante de la invención se refiere a un método de cuantificación del número de células de bacterias del ácido láctico (LAB) viables (p. ej. en una muestra) según la reivindicación 1 que incluye las fases de:

1: preparar una composición que comprende:

- a) las células de LAB;
  - b) un tinte que se asocia con células de LAB individuales y que es indicativo del potencial de membrana celular de dichas células individuales;
  - c) un medio de crecimiento complejo en una concentración que es de 2% a 10% de la concentración recomendada cuando se usa como un medio de crecimiento para LABs,
- 2: incubar las células;
  - 3: detectar una propiedad óptica del tinte asociada a dichas células individuales; y
  - 4: cuantificar el número de células viables.

[0038] Mediante el término "componentes que hacen que las células viables retengan (o retengan sustancialmente) dicho potencial de membrana mientras que su crecimiento es inhibido (o sustancialmente inhibido)" debería ser entendido componentes que son capaces de sostener la viabilidad celular, pero no sostienen un crecimiento celular (significante). Los componentes en 1c) pueden ser los componentes de un medio de crecimiento complejo tal como se define aquí, preferiblemente en una concentración que es de 2% a 10% (calculado del conjunto de la composición) de la concentración recomendada cuando se usa un medio de crecimiento para LABs. Significa que la

composición se puede basar en por ejemplo un medio de crecimiento MRS diluido de 5 a 50 veces, o 10 a 50, tal como con un tampón (p. ej. PBS) o agua.

[0039] Otras formas de realización interesantes del método de la invención son:

- 5 - un método donde la composición o composición de tinte en la fase (1) comprende un medio de crecimiento, tal como un medio de crecimiento complejo y/o diluido; especialmente donde el medio de crecimiento contiene extracto de levadura; extracto de carne bovina; triptona; peptona; o caldo de MRS.
- 10 - un método donde la composición de tinte comprende un medio de crecimiento a una concentración que es 2-10% vol/vol (concentración final), preferiblemente 3-10, o
- 10 - un método donde la incubación en la fase (2) se realiza a una temperatura, que es al menos 10°C inferior a la temperatura de crecimiento óptimo de las células de bacterias del ácido láctico, tal como a aproximadamente 10 °C; aproximadamente 20°C; aproximadamente 25 °C, o en el intervalo de 10°C a 25 °C;
- 15 - un método donde la detección en la fase (3) se realiza por citometría de flujo, por ejemplo por medición de la fluorescencia;
- 15 - un método donde las células de bacterias del ácido láctico son células de bacterias del ácido láctico termofílicas;
- un método donde las células viables retienen su potencial de membrana celular durante mínimo 1 hora;
- un método donde la composición de tinte comprende además glucosa a una concentración que es 0,5-10%, preferiblemente 1 - 10% y más preferido 2-5% vol/vol (concentración final);
- 20 - un método donde la muestra de células de LAB es una composición que comprende células de LAB liofilizadas;
- 20 - un método donde el método comprende además las fases de:
- a) rehidratación de dichas células en un medio acuoso; y
- b) activación de dichas células por incubación en un medio de crecimiento complejo, antes de la mezcla en la fase (1); y
- 25 un método donde la composición de tinte comprende un tinte de cianina (preferiblemente un tinte de cianina "simétrico"), tal como un tinte lipolítico con una carga positiva deslocalizada, comprendiendo dos anillos heterocíclicos (preferiblemente idénticos) unidos por un puente de polimetina, por ejemplo un tinte como se describe por Sims et al (1974) o Novo et al (1999). Un tinte específico puede ser DiOC como se describe en este caso, o DiOC2(3); DiOC1(3); DiOC4(3); DiIC5(3); DiIC6(5); DiSC3(5); DiBAC4(3); DiIC1(5); DiOC6(3); DiIC1(3); DiSC6(5) como se define por Novo et al (1999)

30 [0040] Una vez descritos en general el aspecto y características del presente método, la invención será ahora descrita usando ejemplos específicos y figuras. Las figuras y ejemplos además ilustran varias características y ventajas de la invención, pero no se destinan a limitar el ámbito de la invención.

### 35 Leyendas para figuras

[0041]

40 Figura 1. Comparación de número de células viables de la cepa LA-5 de *L. acidophilus* después de almacenamiento acelerado en bolsas de aluminio herméticas durante 0-3 semanas a 30°C como se determinó por un ensayo de integridad de membrana FCM y determinación de unidades formadoras de colonias (CFU) por la técnica de conteo sobre placa.

45 Figura 2. Número de células viables de cepa LA-5 de *L. acidophilus* después almacenamiento acelerado en bolsas de aluminio herméticas durante 3 semanas a 30°C (control: -50°C). Una desviación típica del medio es indicada por barras ascendentes (conteos en membrana intactas) o barras hacia abajo (CFU).

50 Figura 3. La fracción de células en una muestra de células de la cepa LA-5 de *L. acidophilus* con un potencial de membrana que indica viabilidad teñida y mantenida en la mezcla de tinte que comprende 1,4 o 10% MRS durante 5 a 140 minutos.

55 Figura 4. Correspondencia entre conteos celulares que expresan células que expresan potencial de membrana (evento activo /g producto) contra los conteos de CFU tradicionales. La línea indica una ración 1:1. El coeficiente de correlación ( $r^2$ ) es 0.79. Barras indican  $\pm 1$  desviación típica de análisis de réplica.

Figura 5. Supervivencia de la cepa LA-5 de *Lactobacillus acidophilus* durante la prueba de estabilidad de almacenamiento acelerado. Las barras indican  $\pm 1$  desviación típica.

60 Figura 6. Ocho muestras analizadas reiteradamente con intervalos de aprox. 10 minutos.

Figura 7. Linealidad entre cantidad de bacterias liofilizadas (FD) aplicadas al ensayo y conteos celulares (eventos). Los datos se incluyen para tres experimentos independientes (Expt. 1 - 3; ver leyendas). El coeficiente de regresión es 0.996.

### 65 Definiciones

[0042] En el presente contexto, el término "retienen sustancialmente" se refiere a que al menos 80% (tal como al menos 90% o al menos 95%) del potencial de membrana celular se retiene durante un periodo de 60 minutos a 20 grados C cuando las células se incuban en la "preparación de mezcla de coloración" tal y como se define aquí, o éste se refiere a que al menos 80% (tal como al menos 90% o al menos 95%) de las células permanecen viables durante un periodo de 60 minutos a 20 grados C cuando las células se incuban en la "preparación mezcla de coloración " tal y como se define aquí.

[0043] El término "sustancialmente inhibido" se refiere a que como mucho el 20% (tal como como mucho 10% o como mucho 5%) de las células se dividen durante un periodo de 60 minutos a 20 grados C cuando las células se incuban en la "preparación de mezcla de coloración " tal y como se define aquí.

[0044] El uso de los términos "un" y "uno" y "el" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se deben interpretar para cubrir el singular y el plural, a menos que se indique lo contrario aquí o se contradiga claramente por el contexto. Los términos, "comprendiendo", "teniendo", "conteniendo" e "incluyendo" deben ser interpretados como términos no limitados (es decir, significado "incluyendo, pero no limitado a,") a menos que se indique lo contrario. La citación de gamas de valores aquí se destina meramente a servir como un método de estenografía para referirse individualmente a cada valor separado que caiga en el intervalo, a menos que se indique lo contrario aquí, y cada valor separado se incorpora en la especificación como si se citara individualmente en la presente. Todos los métodos descritos aquí se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario aquí o se indique de otra manera claramente por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o idioma ejemplar (p. ej., "tal como") proporcionado aquí, se destina meramente a aclarar mejor la invención y no plantea una limitación en el ámbito de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ningún lenguaje en la especificación debería ser interpretado como indicando que cualquier elemento no reivindicado sea esencial para la práctica de la invención.

## EJEMPLOS

Materiales y métodos

### Bacterias y lotes de producción

[0045] Polvos liofilizados fueron usados para las cepas de salud de humana siguientes: LA-5; BB-12 y CRL-431, ver detalles en la tabla 2.2.1a. Nótese que dos productos de LA-5 son usados. Si no se indica lo contrario LA-5 se refiere al material n°. 501084/Lote 2484524.

Tabla 2.2.1a. Datos en cepas bacterianas usadas en el presente trabajo.

Nombre corto	Especies	CHCC	Datos de producción
LA-5	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3777	Mat: 501084 / lote: 2484524
		2169	Mat: 615939 / lote: 2490471
BB-12	<i>Bifidobacterium animalis</i> subesp. <i>lactis</i>	2186	Mat: 615940 / lote: 2480410
CRL-431	<i>Lactobacillus paracasei</i> subesp. <i>paracasei</i>	3136	Mat: 621008 / lote: 2238008

### Medios y reactivos

#### DiOC

[0046] DiOC se prepara por ejemplo, como una materia prima de 1,5 mM en DMSO:

1. Un contenedor apropiado se pesa en una balanza con mg resolución
2. Polvo de DiOC (Nota 1) se aplica y el peso es registrado
3. Disolver todo el polvo en un volumen de DMSO (nota 3) equivalente a 0.69 mg/ml concentración final (1.5 mM)
4. Alicuota, por ejemplo 1 ml a tubos Eppendorf
5. Conservar en oscuridad a aprox. 5°C después del marcado apropiado

[0047] **Nota 1.** DiOC abrevia yoduro de 3,3'-dietiloxacarbocianina (frecuentemente especificado como DiOC<sub>2</sub> (3)). Fórmula molecular: C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; peso molecular: 460.31 Número/nombre de CAS: 905-96-4 /yoduro de 3-etil-2-[3-(3-etil-2(3H)- benzoxazolilideno)-1-propenil]-benzoxazolio. DiOC está provisto por Molecular Probes, Leiden, Países Bajos (Cat.no. D14730).

[0048] **Nota 2.** DiOC absorbe luz y es potencialmente inestable en la luz. No obstante, ninguna pérdida de capacidad de coloración ha sido observada a pesar de ciclos de congelación-descongelación repetidos y almacenamiento indeseado a temperatura ambiente.



[0049] **Nota 3.** DMSO es dimetilsulfóxido (Número de CAS: 67-68-5).

5 [0050] **Nota 4.** Ciertos tubos de plástico reaccionan con DMSO dando una apariencia helada del plástico. No usar tal plástico para la solución madre de DiOC.

[0051] **Nota 5.** DMSO se congela a aprox. 5°C y la solución madre de DiOC mantenida a esta temperatura necesita descongelarse antes del uso.

10 50% glucosa

[0052] Una solución madre de 50% glucosa es preparada, por ejemplo como sigue (ejemplificado para 100 ml):

1. 50 g D(+)-glucosa-monohidrato (PM = 198.17)
2. Añadir 50 g agua desmineralizado
- 15 3. Disolver, por ejemplo ayudado por calentamiento por debajo del punto de ebullición
4. Alícuota, por ejemplo 1 ml a tubos Eppendorf
5. Almacenar congelado

20 Preparación de mezcla de perlas

[0053] La mezcla de perlas está hecha de solución salina tamponada de fosfato (PBS) con adición de Tween 80 y una suspensión de perlas. Las perlas se usan como un estándar interno (StdBeads) en el análisis de citómetro de flujo y Tween 80 impide que las perlas se peguen a las superficies. La mezcla de perlas se prepara en volúmenes relativamente grandes, distribuidos por ejemplo en tubos centrifugadores de 50 ml y almacenados congelados para un uso futuro. La concentración StdBeads se estima precisamente en un análisis separado (ver calibración de mezcla de perlas). Finalmente, la mezcla de perlas es el medio de base para la mezcla de coloración (ver abajo).

1. Preparar una solución de PBS (ver abajo)
2. Añadir 0.5 ml Tween 80 (mat. n°. 500479, 0.05% conc. final) por litro de PBS
3. Pasar la mezcla a través de un filtro de tamaño de poro de 0.2 µm (p. ej. PES 0.2 µm 250 ml unidad de filtración; Nalge-102103-12; VWR)
- 30 4. Añadir 100 µl Fluospheres™ verde amarillentas (F-8827; Molecular Probes, Leiden, Países Bajos) por litro de PBS (conc. final 0.01% y aprox. 4.5E+5 perlas/ml)
5. La preparación de la mezcla de perlas se mantiene mezclada para evitar que las perlas se hundan (p. ej. uso de agitación magnética)
- 35 6. Mientras se agita, la mezcla de perlas se distribuye en cantidades de 50 g por ejemplo a tubos centrifugadores de 50 ml. Líquido se puede transferir por una pipeta apropiada y se estima el peso de la mezcla de perlas en el tubo y se escribe en el tubo
7. La mezcla de perlas es estable durante al menos una semana cuando se almacena refrigerada. El almacenamiento congelado se recomienda para períodos más largos.

40 PBS (solución salina tamponada de fosfato):

[0054]

1. 7,6 g NaCl (PM = 58,44,130 mmol)
- 45 2. 0.4 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O (PM = 137.99,3 mmol)
3. 2.5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O (PM = 358.14,7 mmol)
4. Añadir agua desmineralizado hasta 1000 g
5. Ajustar a pH 6.5 ± 0.1 con NaOH

50 Preparación de mezcla de coloración

[0055] La mezcla de coloración se usa para la coloración de bacterias por fluorescencia y potencial de membrana. Preparar fresca el mismo día del análisis, a menos que se determine un periodo antes del uso. Los ingredientes están descritos arriba y la composición es como sigue:

- 55 1. 50 g mezcla de perlas (ver arriba)
2. Añadir 105 µl de 1.5 mM solución madre de DiOC, si no se da otra instrucción (3 µM de conc. final en la muestra final con una mezcla de 24 partes de mezcla de perlas y 1 parte de bacterias)
3. Añadir 210 µl 50% glucosa (0.2% conc. final p/p)
4. Mezclar íntegramente antes de la distribución en tubos de mezcla de coloración

60 FTV-99

[0056] FTV-99 abrevia la palabra danesa para agua de dilución (DK: "fortyndingsvand") y denota un volumen de 99 ml. FTV-99 se prepara de la siguiente manera:

- 65 1. 15 g triptona (Oxoid L42)
2. 9 g NaCl (Merck n°. 106404)

3. 1.14 g antiespumante 1510 (BDH 63215 preparado como 2% materia prima en el agua desmineralizado)
4. Agua desmineralizado a 1000 g
5. pH ajustado a  $7.0 \pm 0.1$  (25°C) usando  $H_3PO_4$
6. Autoclave a 121°C durante 15 min
7. Estable durante 3 meses

#### MRS

[0057] MRS es un medio general para hacer crecer lactobacilos y otras bacterias del ácido láctico. Actualmente se usa MRS-CM de Difco:

1. 55 g caldo MRS (Difco 288110)
2. 1000 g agua desmineralizado
3. Autoclave a 121°C durante 15 min
4. pH =  $6.5 \pm 0.2$  (25°C) después autoclave

[0058] La receta de MRS original por de Man et al. (1960) es:

1. 10 g Oxoid peptona
2. 10 g Lab-Lemco (Oxoid)
3. 5 g extracto de levadura (Difco u Oxoid)
4. 20 g glucosa
5. 1 ml mono-oleato de polioxietileno sorbitán (Tween 80)
6. 2 g  $K_2HPO_4$
7. 5 g  $CH_3COONa \cdot 3H_2O$
8. 2 g citrato de triamonio
9. 0.2 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
10. 0.05 g  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$
11. 1 litro de agua desmineralizado
12. pH 6.0 a 6.5 después de autoclave (120°C, 15 min)

#### Preparación de la muestra

[0059] En resumen, 1) material celular liofilizado rehidratado bajo agitación durante 10 minutos en FTV (0,9% NaCl enmendado con 1,5% triptona (Oxoid L42) y 0,1% antiespumante 1510 (BDH 63215)) a 25°C. 2) células rehidratadas son luego diluidas en un medio de crecimiento apropiado (en el caso de la mayoría de bacterias de ácido láctico (de Man et al. 1960) MRS es usado. 3) luego se incuban las células en el medio de crecimiento durante 30 min y a la temperatura de crecimiento óptimo de las células (típicamente 37 - 40°C en el caso de LAB termófilas). Esto para asegurar que el metabolismo de energía celular sea activado, pero la multiplicación celular es minimizada. Después de la fase de activación, 4) las células son adicionalmente diluidas con mezcla de coloración típicamente, una parte de células activadas en MRS se mezcla con 24 partes de mezcla de coloración para obtener una concentración final: 130 mM NaCl, 138 mM  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ , 15 mM  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ , 11 mM glucosa, 3 uM de yoduro de dietiloxacarbocianina, 0.05% Tween 80, 0.01% de Fluosferes<sup>TM</sup> verde amarillento (Molecular Probes; Leiden, Países Bajos) y 4% MRS. En ciertos experimentos la concentración de MRS de las mezclas finales se varían como se indica. Finalmente 5) las muestras se colocan a 20-21°C y se analizan por FCM.

#### Citometría de flujo

[0060] Citometría de flujo es realizada usando un instrumento FacsCalibur (Becton Dickinson) en una disposición estándar con un láser de 488 nm, detección de dispersión lateral y hacia adelante, y detectores para fluorescencia roja, amarilla y verde (todo ejecutado como amplificación logarítmica). El medio de flujo usado es Facsflow (Becton Dickinson).

[0061] La lectura del instrumento es calibrada usando las perlas estándares de mezcla de coloración por el método denominado "Trucount".

**EJEMPLO 1: LAS DETERMINACIONES DE CFU NO ESTÁN RELACIONADAS CON LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LA PRUEBA DE VIABILIDAD BASADA EN LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA CELULAR DURANTE EL ALMACENAMIENTO.**

[0062] Lahtinen et al. (2005) encontraron que durante el almacenamiento a 4°C de *Bifidobacterium* spp. los conteos de unidades formadoras de colonias (CFU) se reducen, mientras que la abundancia de células con integridad de membrana intacta permanece constante usando un equipo de viabilidad comercial (LIVE/DEAD BacLight, Molecular Probes). Los autores concluyeron que las bifidobacterias pueden entrar en un estado durmiente durante el almacenamiento en el que las células pierden su capacidad para formar CFU, pero no mueren necesariamente.

[0063] Las conclusiones de Lahtinen se verifican por el trabajo pre-elaborado independientemente en Chr. Hansen A/S por Stavnsbjerg et al. 2003. En resumen, la cepa LA-5 liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* fue expuesta a un

almacenamiento acelerado de tres semanas en bolsas de aluminio herméticas durante 3 semanas a 30°C (control: bolsas de aluminio herméticas durante 3 semanas a -50°C). La viabilidad celular fue estimada por determinación del número de unidades formadoras de colonias (CFU) por la técnica de conteo sobre placa, colocadas en placas en MRS-agar; e incubadas a 30°C (ver sección materiales y métodos) y cuantificación del número de células con integridad de membrana intacta por citometría de flujo. La integridad de membrana intacta fue identificada a partir de la acumulación intracelular del tinte carboxi-fluoresceína y extrusión del tinte yoduro de propidio impermeante a la membrana esencialmente como se describe por Buntof et al. (2001) Appl Environ Microbiol. 67,2326-2335.

[0064] Durante el almacenamiento acelerado a 30°C los conteos de CFU se reducen mientras que la abundancia de células con integridad de membrana intacta permanece constante, ver Figura 1 y Figura 2. Este resultado es similar al resultado proporcionado por Lahtinen et al. (2005) con relación a *Bifidobacterium* spp. y muestra que los conteos de CFU no se relacionan con la prueba de viabilidad basada en la integridad de la membrana celular durante el almacenamiento de bacterias del ácido láctico tales como *Bifidobacteria* y *Lactobacillus*.

#### EJEMPLO 2: LA COMPOSICIÓN DE LA MEZCLA DE COLORACIÓN REAL ES DE GRAN IMPORTANCIA PARA LA RESILIENCIA DEL ENSAYO

[0065] En este experimento se estudió la composición de la mezcla de coloración. El ensayo fue realizado esencialmente como se describe en la sección materiales y métodos. El cultivo analizado fue la cepa LA-5 liofilizada de *Lactobacillus acidophilus*.

[0066] Como se muestra en Figura 3 cuando la mezcla de coloración que comprende 4 o 10% de MRS los conteos de viabilidad son muy resilientes resultando en números casi idénticos de 5 a 140 minutos. No obstante la mezcla de coloración sólo comprende 1% de MRS los conteos de viabilidad son muy dependientes en el tiempo en la mezcla de coloración. Después de 140 minutos menos del 50% del número de células activas son detectadas.

[0067] En experimentos sucesivos se descubrió que la resiliencia óptima se obtuvo cuando la célula que comprendía mezcla de coloración fue mantenida a temperaturas significativamente por debajo de la temperatura de crecimiento óptimo de la célula.

#### EJEMPLO 3: LA VIABILIDAD DETERMINADA POR EL PRESENTE PROTOCOLO ESTÁ BIEN CORRELACIONADA CON CONTEOS DE CFU.

[0068] En este experimento una muestra de cepa LA-5 liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* fue analizada por el método de coloración del potencial de membrana y comparada con los conteos de CFU tradicionales. Dos aplicaciones son ejemplificadas: análisis de producción estándar y análisis de muestras expuestas a test de almacenamiento acelerado.

[0069] Los conteos celulares directos de células de expresión de potencial de membrana se hacen según el ensayo anteriormente descrito con análisis de muestra duplicado. El análisis de CFU procede de la siguiente manera: biomasa liofilizada y rehidratada y diluida en 0.9% NaCl con 1.5% agua de triptona, vertida en agar de MRS derretido a 47°C e incubada 3 días a 37°C hasta conteo de CFU. Dos a seis réplicas independientes fueron hechas.

[0070] Para una producción estándar de la cepa LA-5 de *Lactobacillus acidophilus* hay una significativa correlación positiva entre los dos métodos ( $r^2 = 0,79$   $P < 0,05$ ) y el sesgo está dentro de un factor de dos (Figura 4).

[0071] Estabilidad de almacenamiento acelerado fue evaluada durante 3 semanas de almacenamiento a 30°C en las bolsas de aluminio herméticas (nivel 1; equivalente a "30°C" en Figura 2) y en al aire libre a humedades relativas de bien 15% (nivel 2) o 30% (nivel 3). Las muestras de control se almacenan a -50°C durante 3 semanas.

Como se puede ver en la Figura 5 el número de células viables cuantificadas por conteo de CFU y el método de potencial de membrana de la presente invención se correlacionan magníficamente.

#### EJEMPLO 4: VERIFICACIÓN DE SOLIDEZ EN LA ACTIVACIÓN CELULAR - ANÁLISIS REPETIDOS.

[0072] El método es muy sólido, lo que proporciona una base para mediciones muy precisas de muestras múltiples. En este experimento la reproductibilidad del ensayo se demuestra por comparación de los resultados de nueve experimentos individuales cada uno de los cuales comprende ocho muestras diferentes. Las ocho muestras se tiñen con DiOC<sub>2</sub> (3) durante intervalos entre 10- 15 minutos y 80 minutos. Las mediciones múltiples constituyen un promedio del 84% de células activas con una desviación típica del 1.5%. La desviación típica muy baja para el análisis de muestras diferentemente tratadas es evidencia de que la activación celular se estabiliza por las condiciones de incubación incl. 4% MRS a 20°C. El resultado se indica en la Figura 6 y muestra claramente un grado muy alto de reproductibilidad.

#### EJEMPLO 5: EJEMPLO: VERIFICACIÓN DE SOLIDEZ EN LA ACTIVACIÓN CELULAR - LINEALIDAD DEL ENSAYO.

[0073] Otro ejemplo de los conteos precisos de células activas por la presente invención está provisto por un análisis de la relación de respuesta a la dosis entre cantidad de muestra y conteos de células activas, como se muestra en la figura más abajo. Tres experimentos independientes fueron realizados (Expt. 1-3) y el coeficiente de regresión es  $r^2 = 0.996$  sobre el intervalo entero indicando claramente que el método es resiliente y se puede usar en muestras que comprenden un intervalo amplio de células vivas - ver Figura 7.

## REFERENCIAS

[0074]

Lahtinen SJ, M Gueimonde, AC Ouwehand, JP Reinikainen, SJ Salminen: Probiotic Bacteria May Become Dormant during Storage. *Appl Environ Microbiol*, 71(3): 1662-1663 (2005)

de Man JC, Rogosa M, Sharpe ME (1960): A medium for the cultivation of Lactobacilli. *J Appl. Bacteriol* 23: 130-135

Shapiro, *ASM news* 56, 584-588 (1990).

Shapiro & Nebe-von-Caron (2004) Multiparameter flow cytometry of bacteria. En: *Methods in Molecular Biology: Flow cytometry protocols* (2ª edición). Editor: TS Hawley, RG Hawley. Humana Press Inc., Totowa, NJ

Stavnsbjerg R, Knap I, Worm J (2003). Flow cytometric assessment of membrane damage during freezing, freeze-drying and storage of lactobacillus acidophilus. Poster at conference: *CryoBiomol 2003*, Coimbra 14 - 18, Septiembre 2003.

Bunthof et al.: Flow Cytometric Assesment of Viability of Lactic Acid Bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 67, 2326-2335 (2001).

Novo et al. *Cytometry* 35:55-63 (1999)

Sims et al.: *Biochemistry* 13: 3315-3330 (1974)

P.K. Horan and L.L. Wheeless, Jr. en *Science*, Vol. 198, páginas 149-157 (1977)

Ben Amor et al.: *Appl. Environ Microbiol*. 68,5209-5216 (2002)

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método de cuantificación del número de células de bacterias del ácido láctico viables (LAB) en una muestra que incluye las fases de:
- 1: preparar una composición comprendiendo:  
a) las células de LAB;  
b) un tinte que se asocia con las células de LAB individuales y que es indicativo del potencial de membrana celular de dichas células individuales;  
10 c) un medio de crecimiento complejo en una concentración que es 2% a 20% (calculado del conjunto de composición) de la concentración recomendada cuando se usa como un medio de crecimiento para LABs.;
- 2: incubar bajo condiciones donde las células viables retienen dicho potencial de membrana celular mientras su crecimiento es inhibido;  
3: detectar una propiedad óptica de la composición de tinte asociada a dichas células individuales; y  
15 4: cuantificar el número de células viables en la muestra.
2. Método según la reivindicación 1, donde el medio de crecimiento complejo es MRS.
- 20 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la incubación en la fase (2) se realiza a una temperatura, que es al menos 10°C inferior a la temperatura de crecimiento óptima de las células de bacterias del ácido láctico.
4. Método según la reivindicación 3, donde las bacterias del ácido láctico son organismos mesófilicos con temperaturas de crecimiento óptimas a aproximadamente 30°C.  
25
5. Método según la reivindicación 3, donde las bacterias del ácido láctico son organismos termófilicos con temperaturas de crecimiento óptimas en el intervalo de 40 a 45°C.
- 30 6. Método según la reivindicación 4, donde la incubación en la fase (2) se realiza a una temperatura en el intervalo entre 10°C a 25°C.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la detección en la fase (3) se realiza por citometría de flujo, por ejemplo midiendo la fluorescencia.
- 35 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición de tinte comprende glucosa a una concentración que es 0,5-10%, preferiblemente 1 - 10% y lo más preferido 2-5% vol/vol (concentración final).
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el tinte es DiOC.

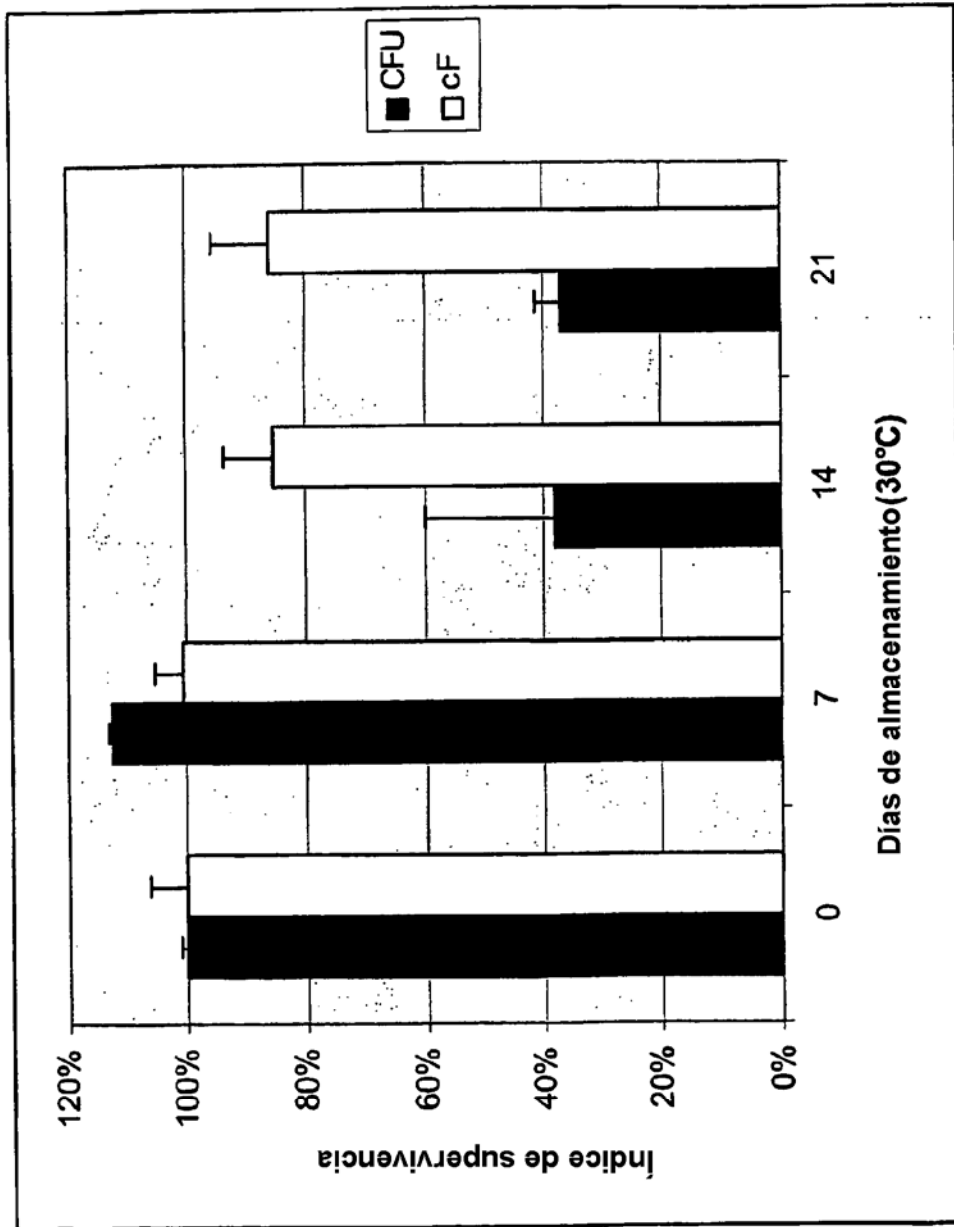


Fig. 1

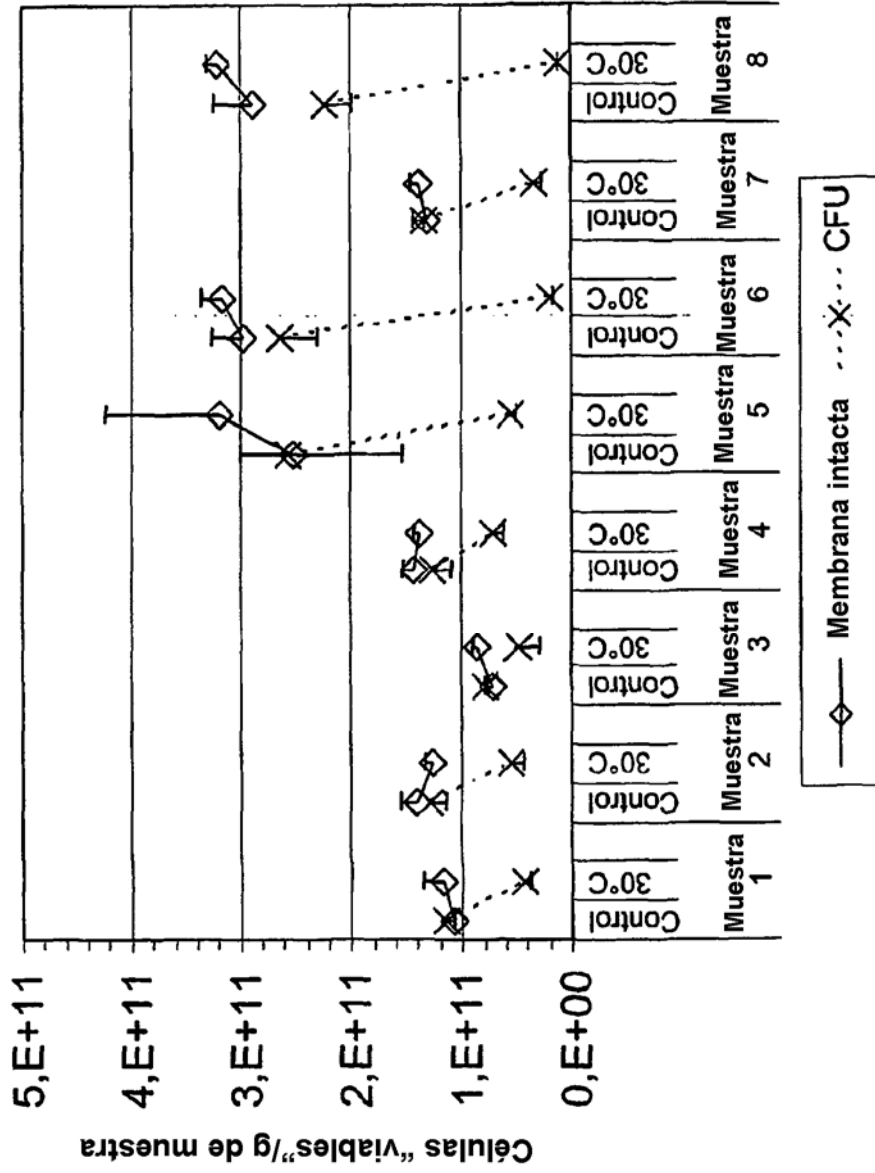


Fig. 2

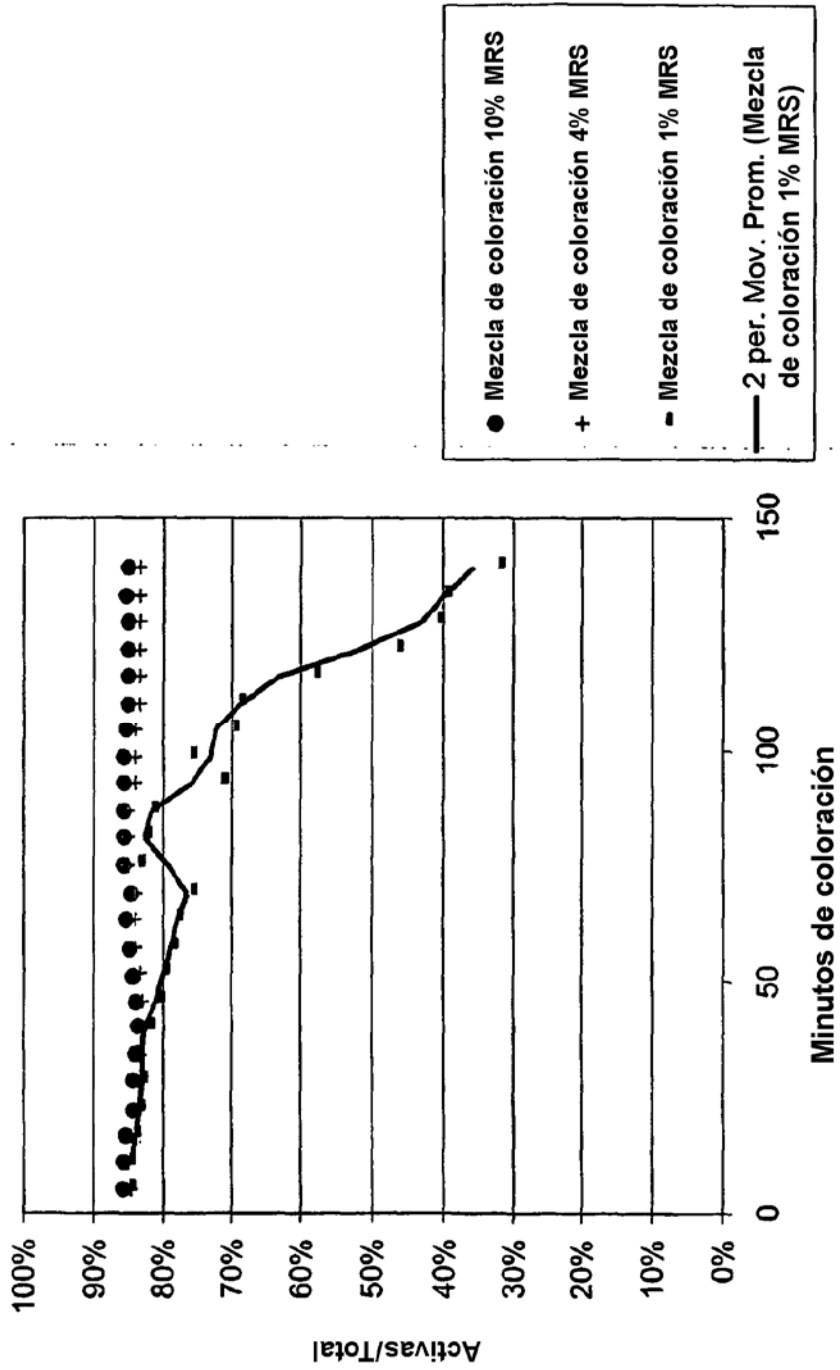


Fig. 3



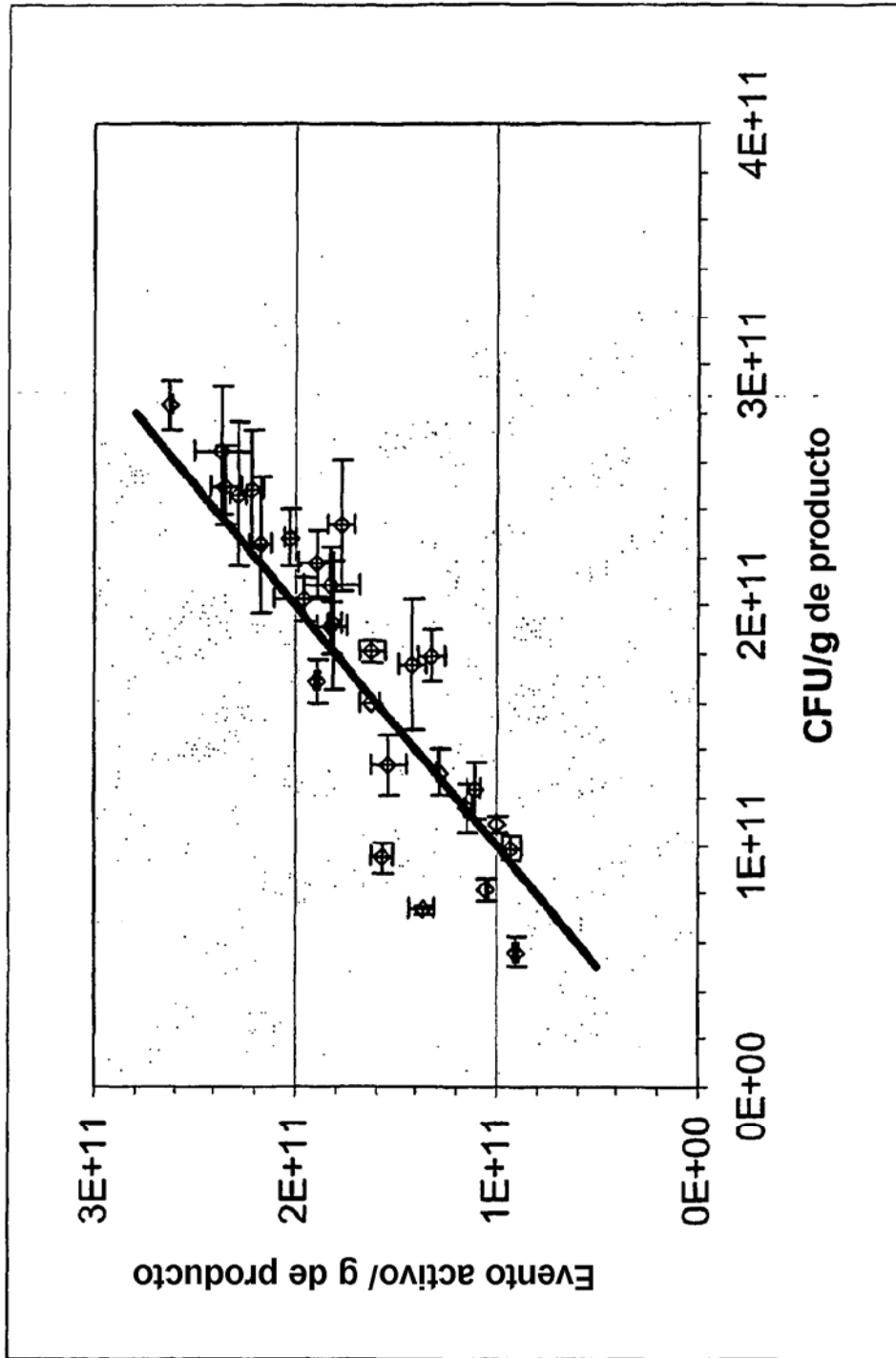
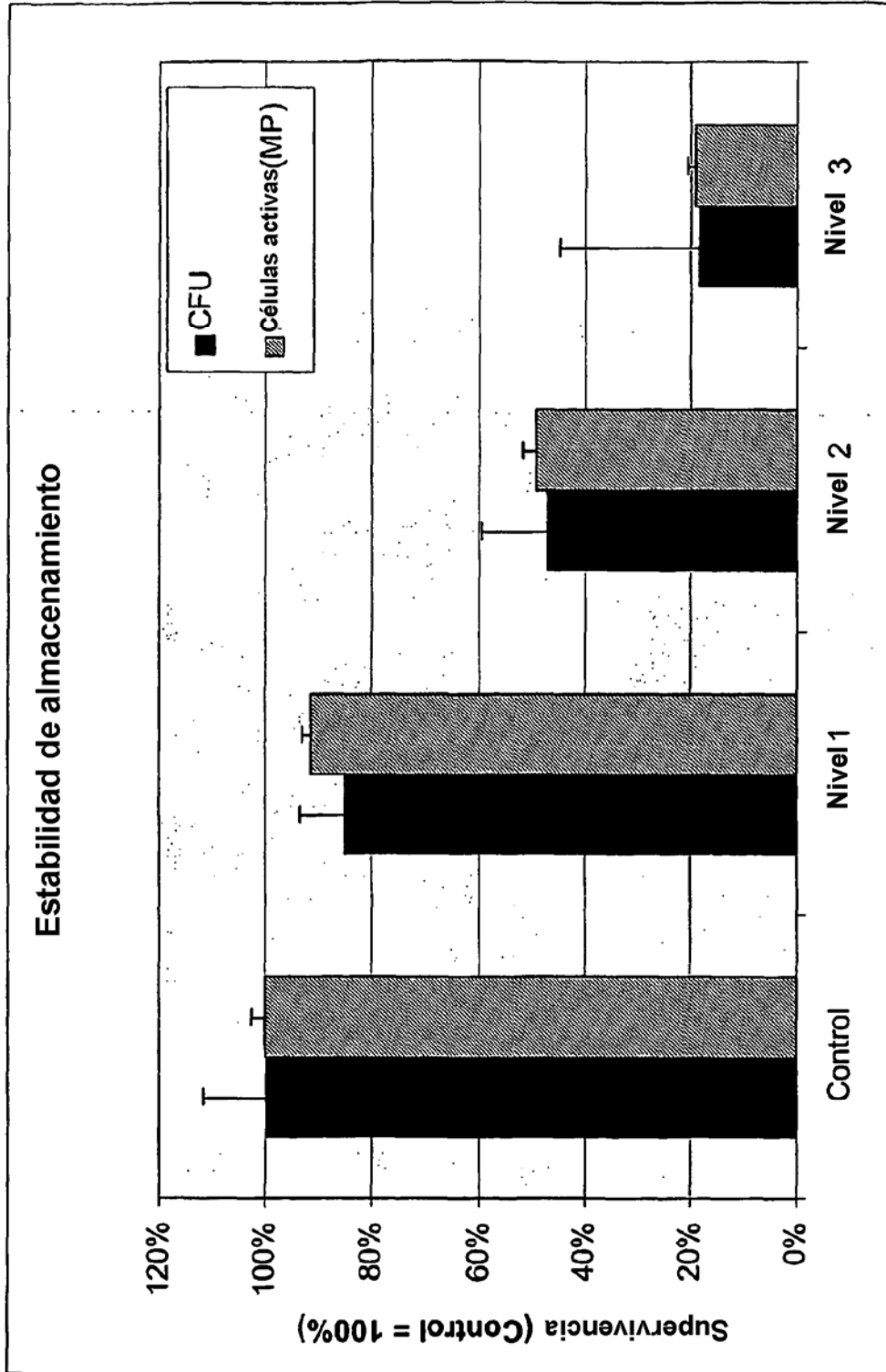


Fig. 4



**Fig. 5**

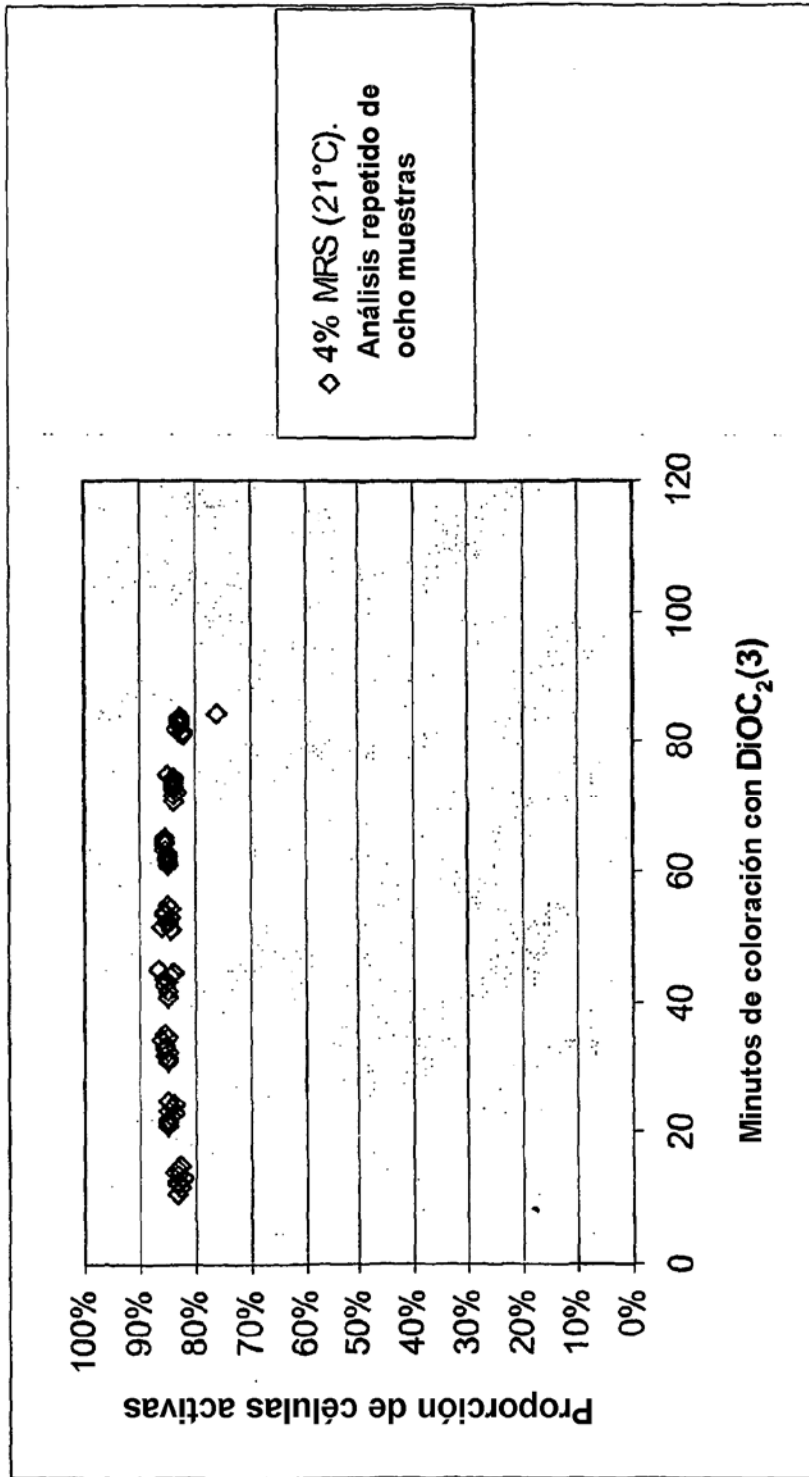


Fig. 6

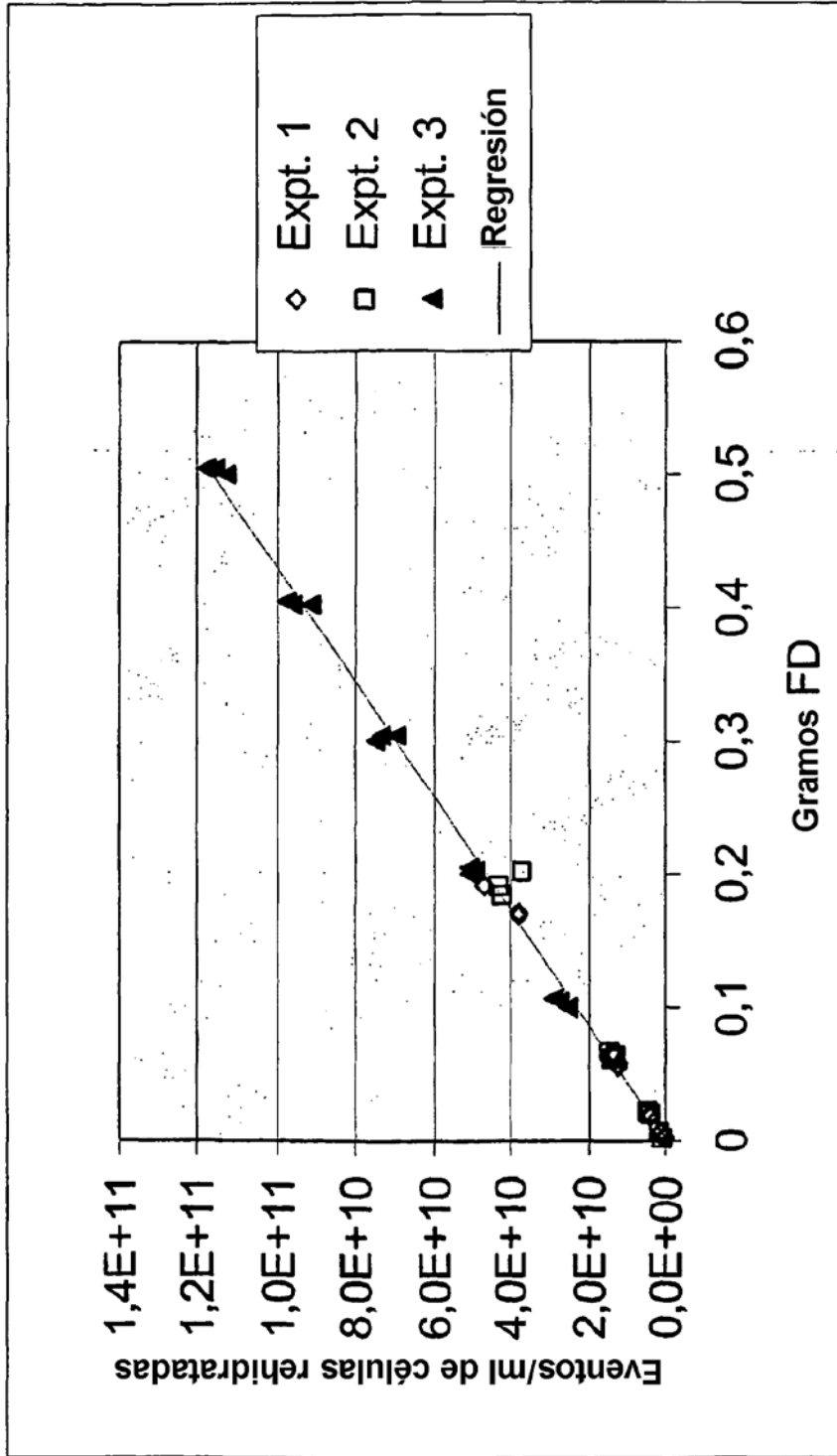


Fig. 7