

Aplicaciones de la citometría de flujo en microbiología de alimentos

Flow cytometry applications in food microbiology

Pamela Serrano-Valerín ⁽¹⁾, Eugenia Corrales-Aguilar ⁽²⁾, María Laura Arias-Echandi ⁽²⁾,
Carolina Chaves-Ulate ⁽²⁾

⁽¹⁾Microbióloga, Caja Costarricense de Seguro Social

⁽²⁾Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

Artículo recibido el 22/07/2018

Aceptado para su publicación el 07/09/2018

Correspondencia: pamsv25@gmail.com

Resumen

La citometría de flujo es una técnica muy versátil que permite, entre muchas otras aplicaciones, el análisis microbiano. El principio en el que se basa es muy simple, ya que analiza células individuales de una mezcla por medio de la dispersión de la luz o por mediciones de fluorescencia propia o adquirida.

El potencial de esta herramienta analítica ha crecido en los últimos años, lo que ha permitido la consolidación de esta como una técnica rápida, sencilla, suficientemente sensible y de fácil automatización para las crecientes necesidades de la industria alimentaria.

Con el uso de la citometría de flujo, se pueden obtener datos sobre la fisiología, morfología, genética y diversidad de microorganismos presentes en alimentos o superficies. A pesar de lo todo lo anterior, en nuestro país, muy pocos laboratorios utilizan esta técnica en sus análisis de alimentos.

Esta revisión pretende brindar al lector una visión actualizada de los avances de esta técnica y conocer sus múltiples aplicaciones, con el fin de que sea utilizada por aquellos laboratorios en los que se tengan los recursos necesarios para implementarla.

Palabras clave: Microbiología de alimentos, citometría de flujo, alimentos, microorganismos

Abstract

Flow cytometry is a very versatile technique that enables among many other applications, microbial analysis. The principle on which it is based is very simple, because it analyzes individual cells of a mixture by means of the dispersion of light or by own or acquired fluorescence measurements. The potential of this analytical tool has grown in recent years allowing the consolidation of it as a fast, simple, sensitive enough technique and easy automation for the growing needs of the food industry. Using flow cytometry data on physiology, morphology, genetics and diversity of microorganisms in foods or surfaces in contact with them can be obtained. Despite all the above, in our country very few laboratories use this technique in their analysis of food.

This review aims to provide the reader with an updated overview of the progress of this technique and know the multiple applications of the same, in order to be used by those laboratories which have the resources to implement it.

Keywords: Food microbiology, flow cytometry, food, microorganisms

Introducción

Cuando se habla de análisis bacteriológico en alimentos, uno de los problemas más importantes que existen actualmente para estudiar el papel de los microorganismos, es que estos deben ser aislados en cultivos puros.¹ Las técnicas empleadas, normalmente, para conseguir estos cultivos presentan dificultades, ya que los microorganismos no se encuentran distribuidos uniformemente en la matriz, además, los alimentos presentan estructuras físicas muy distintas y existen interacciones de los microorganismos con la flora normal. Adicionalmente, hay que tomar en cuenta que el tiempo de generación de cada microorganismo varía también dependiendo de qué tan permisivo o no sea el alimento para el crecimiento de los microorganismos.²

Ante esta situación, en los últimos años, la comunidad científica ha diseñado métodos para disminuir el tiempo de análisis, tales como los inmunoensayos, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y la citometría de flujo³. Esta última técnica ha tenido especial auge en estudios relacionados con conteo poblacional de células en el área de la hematología, sin embargo, también tiene importantes aplicaciones en otros campos como la microbiología de alimentos.³

El mercado de productos alimenticios es cada vez más competitivo y globalizado, por lo que la comercialización de productos innovadores y que ofrezcan mejores características a sus consumidores es una meta constante. Para alcanzar este logro, es fundamental, entre otras cosas, desarrollar métodos analíticos que permitan detectar en corto tiempo riesgos para la salud pública, a la vez, que es deseable y esperado, reducir el tiempo de análisis para poder liberar productos al mercado nacional o internacional. En este sentido, la citometría viene a aportar interesantes aplicaciones en el área.⁴

Citometría de flujo

La citometría de flujo es un método analítico que permite la detección de características físicas y químicas de partículas y células en una suspensión líquida. Estas determinaciones se llevan a cabo individualmente cuando se hacen pasar las células por un haz de luz,⁵ permitiendo así un análisis cualitativo y cuantitativo de las distribuciones de una o más propiedades específicas de la población de células o partículas que fueron analizadas.⁶

Un citómetro sencillo está formado por varias unidades de operación básicas (Figura 1): la fuente de luz, la celda de flujo, el sistema de fluido hidráulico, varios filtros ópticos para seleccionar longitudes de onda específicas, un grupo de fotodiodos o tubos fotomultiplicadores para detectar las señales de interés y, finalmente, una unidad de procesamiento de datos.⁷

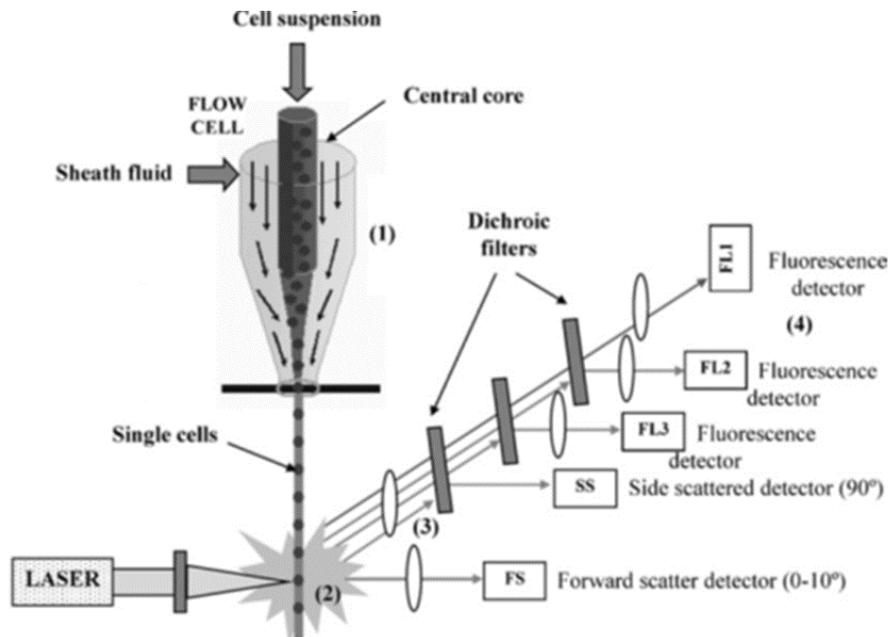


Figura 1. Esquema general de un citómetro de flujo: (1) flujo hidrodinámico que lleva a la formación de una única corriente de partículas, (2) haz de luz que impacta las partículas, (3) filtros y espejos (sistema óptico) que dejan pasar diferentes longitudes de onda, (4) sistema de detección formado por un conjunto de fotodiodos. Tomado de: Díaz y colaboradores 2010.

De manera sencilla, lo que acontece cuando se realiza el análisis en un citómetro es que una célula colocada en el punto de análisis va a dispersar la luz emitida por la fuente, el fotodiodo va a detectar únicamente la luz dispersada con dos ángulos específicos. Este dato, a su vez, generará información de las características morfológicas de la célula mediante dos parámetros: luz dispersa de ángulo pequeño (*forward scatter* [FSC]) que se relaciona con el tamaño de la célula y la luz dispersa de ángulo recto (*side scatter* [SSC]) relacionada con las características de la superficie de la célula y la presencia de material granular en su citoplasma.⁸

Ahora bien, una vez comentado brevemente el fundamento de la técnica, se puede mencionar que la aplicación de la citometría de flujo en el laboratorio de microbiología permite, entre otras cosas, identificar de manera rápida microorganismos de interés, establecer que tan sensible es un microorganismo a determinado medicamento, disminuir tiempos de respuesta y detectar de forma temprana diversos padecimientos como leucemias, por ejemplo.⁴ En el área de microbiología de alimentos, la citometría de flujo ha jugado un papel muy importante ya que en los últimos años se ha desarrollado con buen éxito. Varias son las aplicaciones en este campo,⁹ algunas de ellas, por ejemplo, son la detección de patógenos,¹⁰ la evaluación de la eficacia de la conservación de alimentos bajo diferentes condiciones o el control de las fermentaciones en cerveza, pan y vinos.⁷

Se puede decir que la citometría presenta ventaja sobre las técnicas tradicionales que se utilizan hoy en día en muchos laboratorios. Estas técnicas tradicionales requieren mucho tiempo para el procesamiento, además que únicamente revelan una pequeña proporción de la población real ya que solo pone de manifiesto microorganismos viables y cultivables.¹¹ La citometría, por otro lado, presenta entre sus grandes ventajas un corto tiempo de procesamiento de muestra, alta sensibilidad, gran versatilidad y automatización del proceso¹² y la capacidad de detectar células viables no cultivables, lo cual es muy deseable el área de la bromatología.⁸ Sin embargo, se debe tener en cuenta que las muestras deben llevar procesos físicos de preparación como filtración, centrifugación y decantación previos al análisis con el fin de evitar efectos de matriz y falsos positivos.¹³

Adicional a lo anterior, el hecho de que la detección de microorganismos se pueda realizar en tiempo real en distintas muestras, permite la rápida toma de decisiones de alto impacto económico en las industrias con el fin de mejorar los programas de control de calidad y control de los procesos.⁷

Aplicaciones de la citometría de flujo en microbiología de alimentos y aguas

La detección de microorganismos en los alimentos y en superficies que están en contacto con ellos, es un componente importante en cualquier programa integrado que quiera garantizar la inocuidad de los alimentos.³

Existen, en la actualidad, sistemas de prevención como el HACCP (Análisis de peligros y puntos de control) que han mejorado mucho la inocuidad alimentaria, sin embargo, se deben desarrollar mejores métodos de análisis para que este programa sea totalmente efectivo.¹⁴ Para esto, se han llevado a cabo muchas investigaciones con el fin de reducir el tiempo de ensayo, mediante la utilización de métodos alternativos que detecten microorganismos potencialmente patógenos asociados a los alimentos y también involucrados en el deterioro de estos.³

En esa línea de pensamiento, la industria láctea ha encontrado numerosas utilidades en la citometría de flujo. El control biológico de la leche cruda incluye análisis microbiano y de células somáticas, lo que es esencial para la calidad de la leche y de sus derivados.¹⁵ Gunasekera y colaboradores describieron un método rápido utilizando citometría de flujo para enumerar bacterias totales en leche; ellos obtuvieron una fuerte correlación entre esta técnica y el conteo tradicional en placa o recuento microscópico para *E. coli* y *S. aureus*. La sensibilidad del procedimiento fue de 10^4 bacterias/ml de leche, un número por debajo del

nivel permitido por la legislación de muchos países, lo que indica que la sensibilidad mejora en la detección de bacterias totales en procesos industriales utilizando citometría.¹²

Otra aplicación reportada de la citometría es el análisis bacteriano de los tanques de almacenamiento de productos alimenticios. Este punto, en las industrias que procesan leche, es de suma importancia, ya que la vigilancia de estos tanques es vital para evitar contaminación en los productos finales. La técnica de citometría de flujo permite diferenciar las principales bacterias relacionadas a mala higiene, producción de mastitis y bacterias psicotrofas durante el almacenamiento de la leche. Esta información se logra determinar utilizando diferentes fluorocromos y anticuerpos monoclonales sumamente específicos hacia componentes de dichas bacterias.¹⁶

En la producción de leche en polvo, con la citometría se pueden enumerar el total de bacterias presentes en este producto en un tiempo no mayor de dos horas.¹⁷ Es importante mencionar que no solamente se ha estudiado el análisis de microorganismos en la producción de lácteos de origen bovino, sino también en origen caprino.^{18, 19}

Se reporta también que patógenos de relevancia, a nivel de salud pública, como *Listeria monocytogenes* pueden ser analizados en productos lácteos mediante diferentes mediciones en el contenido de ADN. Esto permite diferenciar este patógeno de otras bacterias como estreptococos o estafilococos.²⁰ En este estudio, se utilizó yoduro de propidio (PI) como tinción fluorescente de ADN y medidas de dispersión frontal para la detección del tamaño y así lograr diferenciar a *L. monocytogenes* de otras bacterias que pueden crecer en la leche y generar competencia. Sin embargo, para mejorar la identificación y resolución de la prueba se enriqueció selectivamente a la bacteria por medio del caldo de enriquecimiento de *Listeria* que contiene ácido nalidíxico, que inhibe el crecimiento de los organismos gram negativos, y clorhidrato de acriflavina, que inhibe muchas bacterias gram positivas, esto para evitar la reacción cruzada con estreptococos y estafilococos.²⁰ La señal fluorescente emitida por el yoduro de propidio (PI) se relaciona con el contenido de ADN de una bacteria dada. Las bacterias poseen un contenido de ADN similar, por lo tanto, el uso de PI permite la separación de las poblaciones microbianas basada en el contenido de ADN. El PI también es útil para excluir los desechos celulares que estarían desprovistos de ácidos nucleicos.²⁰

Otro campo en el cual la citometría de flujo se relaciona con la industria alimentaria y que ha sido de beneficio, es el análisis bacteriano de productos refrigerados, por ejemplo, la detección de toxinas de *Bacillus cereus*, las cuales se asocian a cuadros de intoxicación tipo diarrea o vómito.²¹

Además, otra área de importancia en microbiología de alimentos, y en la que se han realizado estudios mediante la citometría de flujo, es la industria productora de cerveza, probióticos, pan y vino.²² En estas industrias, es de vital importancia realizar un conteo del cultivo iniciador o levaduras antes de la inoculación para un mayor control en la calidad de las fermentaciones. Esto es importante ya que una subinoculación podría llevar a fermentaciones más largas y una sobreinoculación, aunque lleve a una fermentación más rápida, puede dar lugar a cultivos iniciadores o levaduras de viabilidad inferior, lo que da como resultado pérdida de la amargura en productos como la cerveza, problemas en la filtración y un mayor riesgo de lisis de la levadura, entre otros.²³

En el caso de las bacterias ácido lácticas, referidas como probióticos, se ha determinado, mediante recuento en placa, que la dosis terapéutica recomendada es de un mínimo de 10^8 - 10^9 microorganismos vivos.²⁴ Algunos autores afirman que, para que una bacteria confiera funcionalidad como cultivo probiótico, es importante que mantenga su viabilidad en el producto durante su producción, procesamiento y almacenaje.²⁵ El análisis, mediante citometría de flujo de varios productos que contienen probióticos, indica que hay entre 10^9 y 10^{10} microorganismos probióticos, lo cual es más alto que la dosis recomendada, y apoya la idea que esta técnica toma en cuenta las células no cultivables, a diferencia del recuento tradicional en placa.²⁴ Esto es sumamente importante debido a que se ha establecido que bacterias viables, pero no cultivables, pueden contribuir de cierta manera a la fermentación, incluso las bacterias muertas que aún poseen enzimas activas y favorecen el proceso de fermentación o producción de metabolitos productores de sabor u olor.²⁶

La técnica de citometría de flujo podría ser utilizada para otros propósitos en este mismo tema de los probióticos, como por ejemplo, estudiar el efecto del almacenamiento prolongado en productos probióticos, ya que se ha demostrado que la disminución en el número de bacterias depende de factores tales como el pH, la temperatura, el nivel de inóculo y el tipo de producto.^{27, 28}

Otra área en la que se ha aplicado la técnica de citometría de flujo en microbiología de alimentos es en la detección de toxinas como las producidas por los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*.²⁹; por ejemplo, se ha podido determinar la presencia de ocratoxina A en productos como cereales, vino, café, cerveza, frutos secos y productos cárnicos, mediante el uso de la técnica de citometría combinada con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la micotoxina. La sensibilidad de esta técnica permite evitar falsos negativos, convirtiéndola en una muy buena opción para la detección e identificación de micotoxinas en alimentos.³⁰

En esta misma línea de la detección de toxinas, algunos investigadores han utilizado la citometría de flujo para realizar la detección de la enterotoxina estafilocócica B de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche cruda y leche en polvo; han utilizado anticuerpos antitoxinas fluorescentes de membrana.³¹ Este tipo de bacterias están en contacto con piel de animales, por lo que son fácilmente encontradas en alimentos como la leche, huevo, jamón y carne de pollo; por lo tanto, este tipo de investigaciones son muy importantes a nivel de industria alimentaria, ya que se considera que las intoxicaciones por *S. aureus* son relativamente comunes debido a que sus toxinas no se destruyen fácilmente al ser termorresistentes.³¹

Otra área en la que se ha podido aplicar la citometría de flujo es en el monitoreo de las diferentes metodologías empleadas para la conservación de alimentos. Es conocido que, en las últimas décadas, los consumidores cada vez más se inclinan por adquirir productos alimenticios que no solo sean apetitosos, sino también frescos, sanos y mínimamente procesados, por lo que en la actualidad se buscan nuevos métodos que permitan a los alimentos poseer las cualidades antes mencionadas.³²

Por esta razón, se ha estudiado por medio de citometría de flujo la viabilidad de bacterias en los alimentos luego de ser sometidos a procesos de conservación como luz ultravioleta, aumento en la presión y en la temperatura. Estos experimentos han logrado demostrar que, posterior a muchos de estos métodos de conservación, las bacterias son incapaces de crecer

en cultivos, pero sí de transcribir y traducir genes, lo que puede conferir olores y sabores indeseados en los productos almacenados.^{15, 33, 34}

Finalmente, al utilizar la citometría de flujo, se puede determinar la calidad microbiológica del agua, lo cual es importante a nivel de procesos de almacenaje y producción industrial.³⁵

En la microbiología del agua, se puede indicar la calidad microbiológica al estudiar la comunidad microbiana de esta.³⁶ Este proceso se realiza, normalmente, por conteo en placas y medios selectivos para la identificación de organismos patógenos, lo que conlleva a un mayor requerimiento de tiempo y a la discrepancia que se da entre el número de células viables y no cultivables, ya que menos del 1% de las bacterias acuáticas son cultivables.^{35, 37, 38}

Según Egli, el recuento en placa subestima la cantidad de bacterias presentes en al menos dos órdenes de magnitud, ya que solo 1/100 a 1/1000 de las bacterias forman una colonia en la placa.³⁹ Este estudio de aguas pone de manifiesto esta diferencia comparando la técnica de recuento en placa con la citometría de flujo; para esto se analizó el agua en cada paso del tratamiento hasta llegar a ser agua potable y servir de consumo para el ser humano.

En la figura 2, se ejemplifica la diferencia en el conteo de células entre la técnica tradicional en placa y el uso de la técnica de citometría de flujo; además, se observa cómo en todos los pasos, la citometría resulta una mejor técnica para la evaluación.³⁹

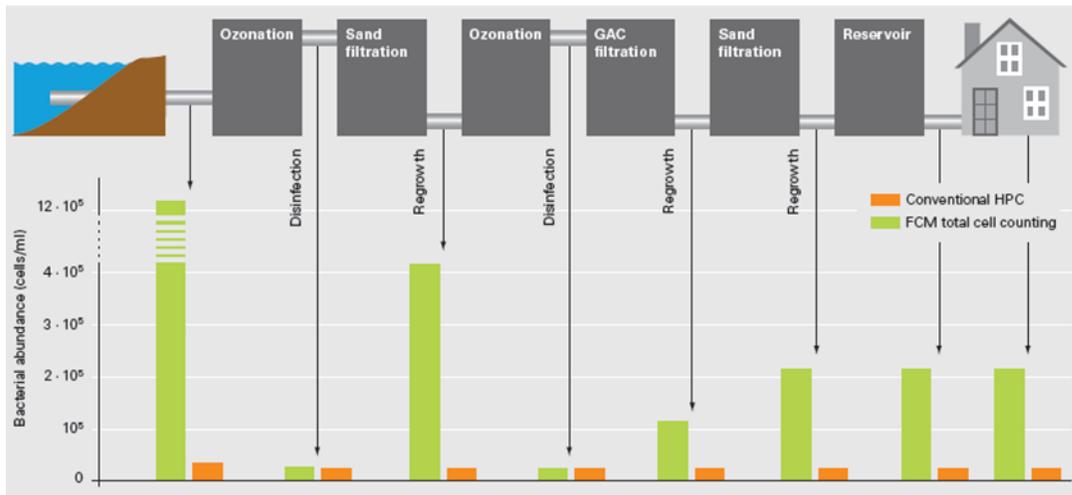


Figura 2. Recuento de células bacterianas en distintas etapas de tratamiento de agua potable mediante recuento en placa y citometría de flujo. Tomado de: Egli *et al*, 2008

Por otro lado, existe la inquietud de identificar un microorganismo mediante características específicas o propias de este (conocido como “huella dactilar”), a partir de una comunidad bacteriana, de manera que se identifiquen correctamente muestras incógnitas a partir de estas.⁴⁰ Así fue como lograron De Roy y colaboradores identificar y clasificar diferentes marcas de agua mediante su composición microbiana; para esto, utilizaron la citometría de flujo con el fin de extraer las características más relevantes de cada marca de agua y así lograr la

identificación de cada una. Posteriormente, se analizaron las mismas marcas, pero de forma incógnita, de manera que se pudieran clasificar según su “huella dactilar” por medio de estadística, con base en pruebas de hipótesis para encontrar diferencias significativas entre ellas.⁴⁰

Otro ejemplo de investigaciones realizadas es el estudio elaborado por Yang y colaboradores; este muestra cómo, por medio de la técnica de citometría de flujo, se puede determinar *E. coli* O157:H7 (patogénica) del resto de *E. coli* DH5 α en una muestra de agua artificialmente contaminada con las cepas anteriormente mencionadas. Los resultados confirman un límite de detección de 1×10^2 bacterias/ml en un minuto luego de una preconcentración de la muestra.⁴¹ Para realizar la determinación en este estudio, se utilizaron anticuerpos monoclonales y fluorocromos específicos dirigidos hacia *E. coli* O157:H7, además de colorantes capaces de atravesar membranas y unirse a los ácidos nucleicos de bacterias en general para lograr realizar una diferenciación.⁴¹ Así, en este trabajo, se pudo diferenciar la *E. coli* O157:H7 de *E. coli* DH5 α , por medio de distintos detectores que permitieron el paso de longitudes de onda adecuadas para cada fluorocromo.⁴¹

Conclusiones

Han sido muchas las investigaciones que se han llevado a cabo que confirman el potencial que tiene la técnica, y son muchos los autores que manifiestan el gran avance a través del tiempo al compararla con otras técnicas ampliamente utilizadas; sin embargo, la citometría de flujo no se encuentra ampliamente utilizada en microbiología de alimentos para la detección de bacterias y toxinas. Muchas de las razones se orientan al costo elevado del procesamiento (desde equipo hasta los reactivos), además de la falta de capacitación o conocimiento de los analistas en el campo sobre esta técnica.

Por otro lado, la técnica en los próximos años brindará nuevas y mejores investigaciones debido a la existencia de nuevos fluorocromos y anticuerpos monoclonales mucho más sensibles que permitirán, en un futuro, la detección de muchos parámetros útiles en la rama de microbiología de alimentos.

Referencias

1. Ray, B y Bhunia, A. (2010) Fundamentos de microbiología de los alimentos. Cuarta edición. México. McGraw-Hill Interamericana editores. 3-7
2. Doyle, M; Beuchat, L and Montville, T. (2001) Food Microbiology. Second edition. United States of America. American Society for Microbiology. 775-778.
3. Jasson, V; Jacxsens, L; Luning, P; Rajkovic A and Uyttendaele, (2010) M. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. Food Microbiology. Vol. 27, 710-730
4. Laguado, J. (2007) Aplicaciones de la citometría de flujo en microbiología, veterinaria y agricultura. Revista MVZ. Córdoba. Vol. 12, N. 2, 1077-1095

5. Barrera, L; Drago, M; Pérez, J; Zamora, A; Gómez, F; Sainz T y Mendoza, F. (2004) Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. Revista Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. México. Vol. 17, N. 1, 42-55.
6. Davey, H. (2002) Flow cytometric techniques for the detection of microorganism. Methods in cell science. Wales, United Kingdom. Vol. 24, 91-97
7. Díaz, M; Herrero, M; García, L and Quirós, C. (2010) Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. Biochemical Engineering Journal. Spain. Vol. 48, 385-407.
8. Subires, A. (2016) Citometria de flujo para detectar bacterias patógenas lesionadas en alimentos. Técnicas de laboratorio. N. 411, 233-238
9. Riu, J and Rius, N. (2009). Flow cytometry applications in the food industry. Journal Industrial Microbiology Biotechnology. Spain. Vol. 36, 999–1011
10. Mc Clelland, R and Pinder, (1994) A. Detection of *Salmonella typhimurum* in Dairy Products with Flow Cytometry and Monoclonal Antibodies. Applied and environmental microbiology. Vol. 60, N. 12, 4255-4262
11. Wilkinson, M. (2016) Flow cytometry in food microbiology: Challenges, opportunities and progress to date. Ireland. Tecnicas de laboratorio. N. 422, 722-728
12. Gunasekera, T; Attfield, P and Veal, D. (2000) A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. Australia. Applied and environmental microbiology. Vol. 66, N. 3, 1228-1232
13. Wilkes, J; Turker, R; Montgomery, J; Cooper, W; Sutherland, J and Buzatu, D. (2012) Reduction of food matrix interference by a combination of sample preparation and multi-dimensional gating techniques to facilitate rapid, high sensitivity analysis for *Escherichia coli* serotype O157 by flow cytometry. United States of America. Food Microbiology. Vol. 30, 281-288.
14. López, G; Martínez, J; Aguado, M and López, V.2 (2012) Microarray Detection and Characterization of Bacterial Foodborne Pathogens. Springer Briefs in Food, Health, and Nutrition. 13-31
15. Gunasekera, T; Sørensen, A; Attfield, P; Sørensen, S and Veal, D. (2002) Inducible Gene Expression by Nonculturable Bacteria in Milk after Pasteurization. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 68, No. 4, 1988-1993
16. Holm, C; Mathiansen, T and Jespensen, L. (2004) A flow cytometric technique for quantification and differentiation of bacteria in bulk tank milk. Journal of Applied Microbiology. Vol. 97, 935-941.
17. Flint, S; Drocourt, J; Walker, K; Stevenson; B; Dwyer, M; Clarke, I and McGill, D. (2006) A rapid, two-hour method for the enumeration of total viable bacteria in samples from commercial milk powder and whey protein concentrate powder manufacturing plants. International Dairy Journal. Vol. 16, 379-384.
18. Ramsahoi, L; Gao, A; Fabri M and Odumeru, J. (2011) Assessment of the application of an automated electronic milk analyzer for the enumeration of total bacteria in raw goat milk. Journal of Dairy Science. Vol. 94, N. 7, 3279-3287
19. Leitner, G; Merin, U; Lavi, Y; Egber, A and Silanikove, N. Aetiology of intramammary infection and its effect on milk composition in goat flocks. Journal Dairy Research. Vol. 74, 186-193

20. Donnelly, C and Baigent, G. (1986) Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in Milk. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 52, N. 4, 689-695
21. Arnesen, L; Fagerlund, A and Granum, P. (2008) From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. Federation of European Microbiological Societies. Vol. 32, 579-606.
22. Boyd, A; Gunasekera, T; Attfield, P; Simic, K; Vincent, S and Veal, D. (2003) A flow-cytometric method for determination of yeast viability and cell number in a brewery. FEMS Yeast Research. Vol. 3, 11-16
23. Cahill, G; Walsh, P; and Donnelly, D. (1999) Improved control of brewery yeast pitching using image analysis. Journal American Society of Brewing Chemists. Vol. 57, 72-78
24. Bunthof, C; and Tjakko, (2002.) A. Development of a Flow Cytometric Method To Analyze Subpopulations of Bacteria in Probiotic Products and Dairy Starters. Applied and environmental microbiology. Vol. 68, N. 6, 2934–2942
25. Gandhi, A and Shan, N. (2015) Effect of salt on cell viability and membrane integrity of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum* as observed by flow cytometry. Food Microbiology. N. 49, 197-202
26. Oliver, G; de Giori, G; and de Valdez, G. (1988) Cheese industry development and research in Argentina. Crit. Critical Reviews in Food Science and Nutrition Vol. 26, 225 - 241.
27. Shah, N. (2000) Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. Journal of Dairy Science. Vol. 83, 894-907.
28. Chen, S; Ferguson, L; Shu, Q; and Garg, S. (2011) The application of flow cytometry to the characterisation of a probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DPC16 and the evaluation of sugar preservatives for its lyophilization. Food Science and Technology. Vol. 44, 1873-1879.
29. Ringot D, Chango A, Schneider YJ, Larondelle Y (2006) Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. Chemistry -Biologic Interaction. Vol. 159, 18-46
30. Aqai, P; Peters, J; Gerssen, A; Haasnoot, W and Nielen, M. (2011) Immunomagnetic microbeads for screening with flow cytometry and identification with nano-liquid chromatography mass spectrometry of ochratoxins in wheat and cereal. Analytical and Bioanalytical Chemistry. Vol. 40, 3085–3096
31. Zendejas, G; Avalos, H y Soto, M. (2014) Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. México. Rev. Biomed. Vol. 25, 129-143
32. Schenk, M; Guerrero, S; and Alzamora, S. (2008) Response of some microorganisms to ultraviolet treatment on fresh-cut pear. Food and Bioprocess Technology. Vol. 1, N. 4, 384-392.
33. Ananta, E.; Heinz, V; and Knorr, D. (2004) Assessment of high pressure induced damage on *Lactobacillus rhamnosus* GG by flow cytometry. Food Microbiology. Vol. 21, N. 5, 567-557
34. Schenk, M; Raffellini, S; Guerrero, S; Blanco, G and Maris, A. (2004) Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* by UV-C light: Study of cell injury by flow cytometry. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie - Food Science and Technology. Vol. 44, 191-198

35. Allen, M; Edberg, S and Reasoner, D. (2004) Heterotrophic plate count bacteria - what is their significance in drinking water? *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 92, 265-274
36. Bartram, J; Cotruvo, J; Exner, M; Fricker, C and Glasmacher, (2003) A. Heterotrophic Plate Counts and Drinking water Safety. IWA Publishing on behalf of the World Health Organization, London.
37. Amann, R; Ludwig, W and Schleifer, K. (1995) Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*. Vol. 59,143-169
38. Dufour, A. 2003 *Assessing Microbial Safety of Drinking Water: Improving Approaches and Methods*, first ed. Published on Behalf of the World Health Organization and the Organisation for Economic Co-operation and Development by IWA Publishing, London.
39. Egli, T. (2008) New methods for assessing the safety of drinking water. *Eawag News* Vol. 65, 20-23
40. De Roy, K; Clement, L; Thas, O; Wang, Y and Boon, N. (2012) Flow cytometry for fast microbial community fingerprinting. *Water research*. Vol. 46, 907-919
41. Yang, L; Wu, L; Zhu, S; Long, Y; Hang, W and Yan, X. (2010) Rapid, Absolute, and Simultaneous Quantification of Specific Pathogenic Strain and Total Bacterial Cells Using an Ultrasensitive Dual-Color Flow Cytometer. *Analytical Chemistry*. Vol. 82, 1109-1116