

# WHITE PAPER CITOMETRIA



## Citometria a flusso per l'analisi di microrganismi (lieviti, batteri, ecc.)

### Introduzione:

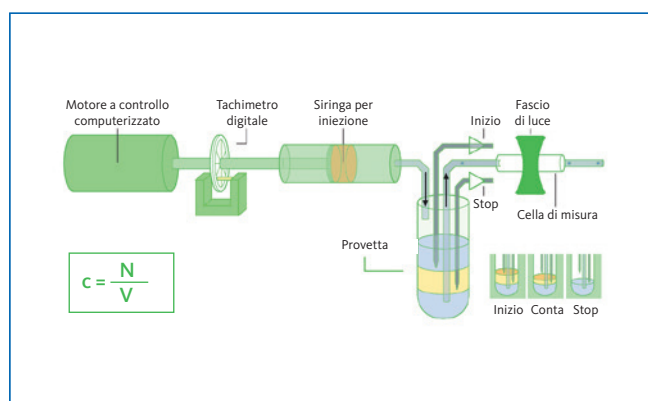
Diffusamente impiegata in applicazioni di diagnostica e ricerca medica, la citometria a flusso offre anche soluzioni per la conta e l'analisi di flora microscopica come ad esempio lieviti, microrganismi marini, batteri, spore, ecc.

### Principio del metodo:

I parametri rilevati tramite citometria a flusso sono in grado di fornire informazioni sulle dimensioni, la granularità e le emissioni di fluorescenza, sia intrinseche (autofluorescenza) sia estrinseche (fluorescenza dovuta all'aggiunta di sonde o di anticorpi coniugati con fluorocromi).

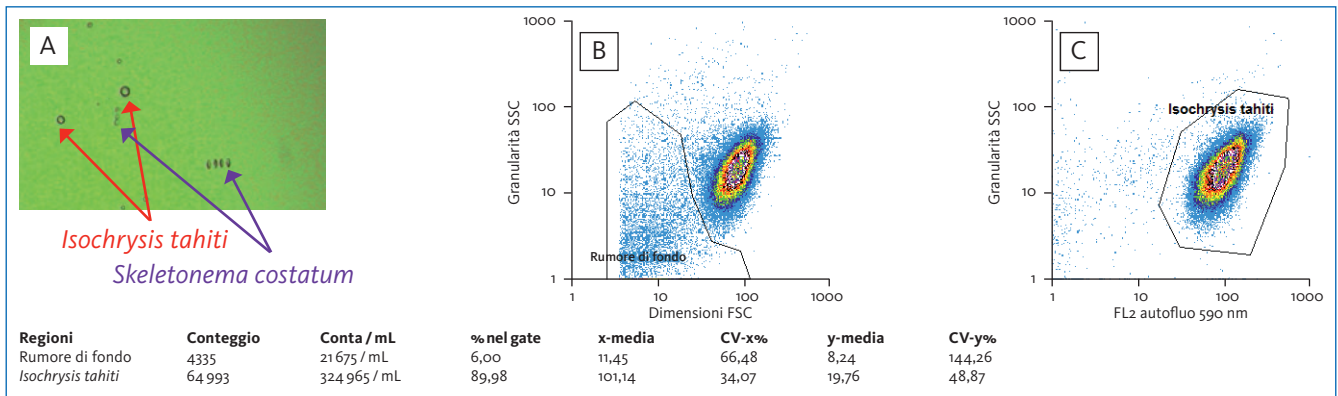
### Conta di microrganismi:

Il sistema di conteggio meccanico volumetrico Sysmex Partec tramite elettrodi si conferma il metodo di conta più semplice e accurato (figura 1).



**Figura 1:** Principio di conteggio meccanico volumetrico Sysmex Partec tramite elettrodi.

Nell'esempio seguente, è possibile visualizzare la conta delle microalghe per la regione *Isochrysis tahiti* (figura 2).



**Figura 2A:** Immagine di microalghe *Isochrysis tahiti* e *Skeletonema costatum* al microscopio CyScope®, con ingrandimento 400 x.

**Figura 2B:** Citogramma da cui si evidenzia il rapporto tra dimensioni e granularità; la citometria a flusso mostra una popolazione al di fuori del rumore di fondo.

**Figura 2C:** Citogramma da cui si evidenzia il rapporto tra granularità e fluorescenza emessa tra 565 e 615 nm. La regione *Isochrysis tahiti* permette il conteggio delle microalghe: 324.965 microalghe/mL.

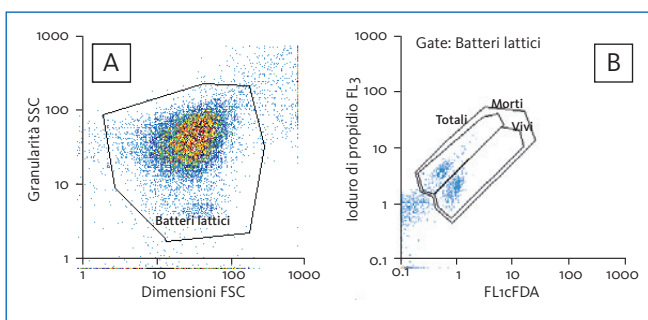
### Quantificazione dei batteri lattici:

La conta dei batteri lattici è essenziale al fine della valutazione della qualità dei lieviti e dei prodotti lattiero-caseari fermentati. I campioni di batteri vengono preparati e, se necessario, diluiti con una soluzione salina peptonata o un tampone di colorazione.

Questi campioni di batteri possono derivare da prodotti lattiero-caseari fermentati, da colture liofilizzate o da colture congelate a -20°C, che richiederanno successivamente fasi di risospensione o scongelamento.

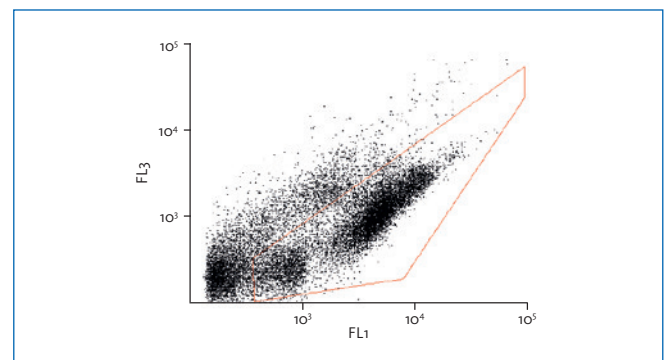
L'utilizzo di un protocollo di doppia colorazione fluorescente permette di evidenziare il numero di batteri vivi e morti contemporaneamente presenti in un campione e di determinare il loro rapporto (figure 3A e 3B).

Il campione viene diluito per ottenere una concentrazione massima da  $1 \times 10^5$  a  $5 \times 10^5$  cellule/mL; di seguito viene colorato con una sonda fluorescente, che si intercala tra i doppi filamenti degli acidi nucleici (figure 4 e 5).

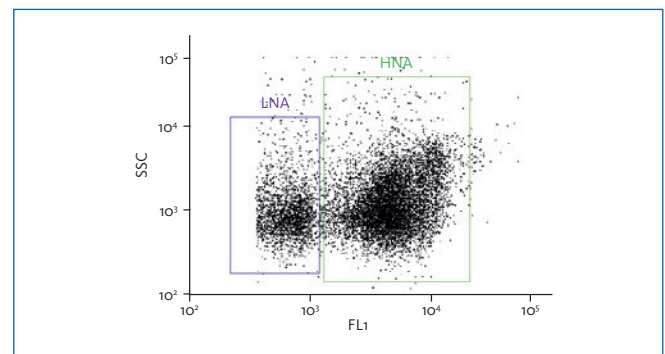


**Figura 3A:** Citogramma che mostra il rapporto tra dimensioni e granularità dei batteri lattici.

**Figura 3B:** Citogramma che mostra la colorazione di vitalità (cFDA: FL1) rispetto alla colorazione di mortalità (ioduro di propidio: FL3) dei batteri lattici (protocollo di doppia colorazione).



**Figura 4:** Campione di acqua potabile colorata con SYBR® Green: citogramma che mostra la fluorescenza verde (SYBR® Green, FL1) rispetto alla fluorescenza rossa (ioduro di propidio, FL3). I batteri sono inclusi nel gate poligonale rosso. I segnali al di sopra e a sinistra di questa regione si riferiscono, rispettivamente, alle particelle colorate con PI e alle particelle non colorate.



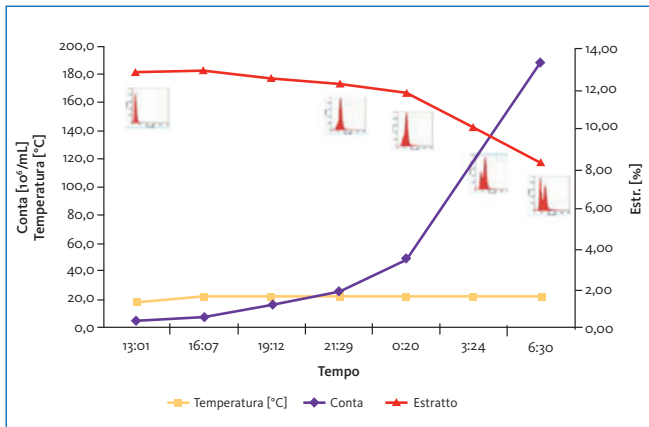
**Figura 5:** Lo stesso campione di acqua potabile colorata con SYBR® Green: citogramma che mostra la fluorescenza verde (FL1) rispetto alla granularità (SSC). I batteri, i cui cromosomi e plasmidi vengono colorati con SYBR® Green fluorescente, evidenziano tipicamente quantità diverse di DNA. I batteri «LNA» nella regione blu contengono una quantità limitata di DNA, mentre i batteri «HNA» nella regione verde contengono una quantità maggiore di DNA.

### Analisi della qualità dell'acqua:

La tecnologia impiegata nei citometri Sysmex Partec è stata appositamente sviluppata per superare le limitazioni a cui sono tradizionalmente soggetti i normali citometri creando un formato compatto, trasportabile e di facile utilizzo.

## Analisi dei lieviti. Soluzioni YeastControl™:

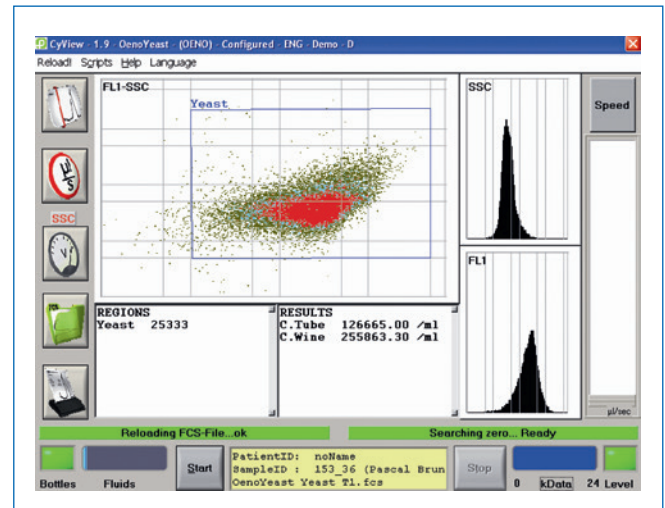
Sysmex Partec offre una gamma di soluzioni YeastControl™ per il monitoraggio dei processi di fermentazione biotecnologica. Questi reagenti sono pronti e facili da utilizzare, consentendo così di ottenere risultati rapidi e diretti: proliferazione, cinetica della crescita e altri parametri fisiologici per l'enologia e la produzione della birra, monitoraggio delle colture cellulari e ottimizzazione dei metodi di produzione (figura 6).



**Figura 6:** Cinetica del conteggio cellulare (curva blu) rispetto alla percentuale del grado di estratto (curva rossa) per l'ottimizzazione del metodo di fermentazione nella produzione di birra a temperatura costante (curva gialla). I citogrammi sovrapposti mostrano i profili di distribuzione dei cicli cellulari per mezzo della citometria a flusso.

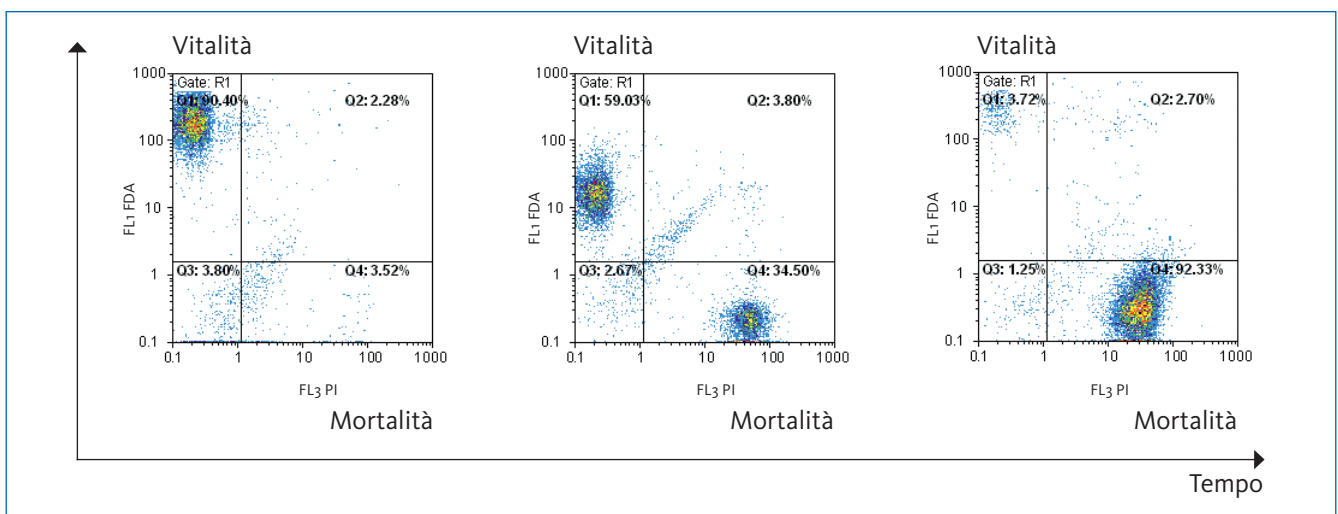
## Monitoraggio della fermentazione in enologia. OenoYeast™:

Sysmex Partec propone la soluzione OenoYeast™ per il monitoraggio dei lieviti autoctoni dei mosti bianchi e rosati, dei lieviti di tiraggio per i vini frizzanti, della vitalità dei lieviti in corso di fermentazione e per la valutazione della presenza di lieviti quali *Brettanomyces bruxellensis* che compromette la qualità ed il sapore del vino (figura 8).



**Figura 8:** Conta di lieviti vivi mediante citometro Oenolyser® con utilizzo del kit OenoYeast™. La regione blu permette di quantificare la popolazione dei lieviti vivi riportata nei risultati in termini di concentrazione.

In particolare le soluzioni YeastControl™ permettono di effettuare le seguenti analisi: ciclo cellulare, vitalità (figura 7), contenuto di glicogeno, di trealosio, di lipidi neutri e di proteinasi e processi di invecchiamento.



**Figura 7:** Analisi della vitalità dei lieviti *Saccharomyces cerevisiae* mediante kit YeastControl™. Il quadrante Q1 quantifica la popolazione dei lieviti vivi; il quadrante Q4 quantifica i lieviti morti. Da sinistra a destra, la vitalità dei lieviti diminuisce nel corso del tempo, con conseguente aumento della mortalità.

## Colorazione specifica di microrganismi:

Lo studio delle popolazioni di cellule del sangue mediante citometria a flusso prevede l'utilizzo di coloranti specifici, come anticorpi diretti contro svariati epitopi per la caratterizzazione delle diverse popolazioni cellulari. Questo metodo di marcatura sta iniziando a trovare impiego anche per l'individuazione e la caratterizzazione di microrganismi.

## Altre misurazioni tramite citometria a flusso: pH intracellulare e potenziale di membrana

Il pH intracellulare (pHi) è facilmente misurabile mediante sonde la cui fluorescenza dipende dal pH. Una cellula microbica attiva deve mantenere un pHi costante durante l'intero corso della sua crescita. Questa misura rende pertanto possibile caratterizzare lo stato fisiologico delle cellule nel corso dei processi di fermentazione.

Il potenziale transmembrana determina gli scambi tra la cellula e l'ambiente esterno. L'analisi di questo potenziale rende possibile la caratterizzazione dello stato cellulare della popolazione batterica. Può essere eseguita facilmente mediante citometria a flusso con sonde anioniche e cationiche fluorescenti.

## Vitalità

La vitalità è un parametro che caratterizza le prestazioni metaboliche di una popolazione microbica. Viene tradizionalmente stimata tramite la velocità di crescita e la produzione di metabolita. Può inoltre essere effettuata tramite misurazione indiretta basata sull'espulsione energia-dipendente di un fluorocromo.

## Fluidità della membrana

La fluidità della membrana dei microorganismi può essere misurata tramite polarizzazione di fluorescenza dopo colorazione con DPH (difenilesatriene). È pertanto possibile seguire l'evoluzione della fluidità della membrana nel corso della coltura, correlata alle modifiche della composizione a livello di acidi grassi della membrana. La fluidità può essere misurata in modo molto più semplice e rapido di quanto non sia possibile fare per gli acidi grassi della membrana. Il vantaggio della citometria rispetto al metodo di riferimento nella spettrofluorimetria consiste nella capacità di differenziare la misurazione della fluidità nelle cellule vitali e morte utilizzando un metodo di colorazione tripla per vitalità/mortalità/fluidità.

## Ringraziamenti:

Desideriamo ringraziare la Prof.ssa Marielle BOUIX (AgroParisTech UMR GMPA BP101 78850 THIVERVAL GRIGNON) per la consulenza fornita.

## Bibliografia

- [1] Bouix M & Ghorbal S. (2012) : Rapid enumeration of *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation by flow cytometry., *Journal of Applied Microbiology* 114(4) : 1075 – 81.
- [2] El Arbi A, Ghorbal S, Delacroix-Buchet A, Bouix M. (2011) : Assessment of the dynamics of the physiological states of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11 during growth by flow cytometry. *Journal of Applied Microbiology* 111 : 1205 – 1211.
- [3] Grégori G, Denis M, Lefèvre D, Becker B. (2002) : A flow cytometric approach to assess phytoplankton respiration. *Methods Cells Sci.* 24(1–3) : 99–106.
- [4] Hammes F, Berney M, Wang Y, Vital M, Köster O, Egli T. (2008) : Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes., *Water Res.* 42(1–2) : 269–277.
- [5] Hutter K-J, Eipel H.E. (1978) : DNA determination of yeast by flow cytometry, *FEMS Microbiology Letters* 3 : 35 – 38.
- [6] Rault A, Béal C, Ghorbal S, Ogier JC, Bouix M. (2007) : Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology* 55 : 35–43.
- [7] Rault A, Bouix M, Béal C. (2008) : Dynamic analysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 physiological characteristics during fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81 : 559 – 570.



Filiale: Sysmex Partec Italia s.r.l.

Via Cesare Battisti 1/B, 20854 Veduggio al Lambro (MB), Italia · info.italia@sysmex-partec.com

Produttore: Sysmex Partec GmbH

Am Flugplatz 13, 02828 Görlitz, Germany · Telefono +49 3581 8746-0 · Fax +49 3581 8746-70 · info@sysmex-partec.com · [www.sysmex-partec.com](http://www.sysmex-partec.com)

Sysmex Corporation

1-5-1 Wakinohama-Kaigandori, Chuo-ku, Kobe 651-0073, Japan · Telefono +81 78 265-0500 · Fax +81 78 265-0524 · [www.sysmex.co.jp](http://www.sysmex.co.jp)

Tutti gli indirizzi delle filiali di Sysmex Partec nel sito web [www.sysmex-partec.com](http://www.sysmex-partec.com)

© Copyright 2016 – Sysmex Europe GmbH