

xtra

Durchflusszytometrie zur Analyse von Mikroorganismen (Hefen, Bakterien usw.)

Einführung:

Die Durchflusszytometrie ist in der medizinischen Forschung und Diagnostik weit verbreitet und bietet Lösungen zur Messung und detaillierten Analyse von Mikroorganismen, wie beispielsweise Hefen, marinen Mikroorganismen, Bakterien, Sporen usw.

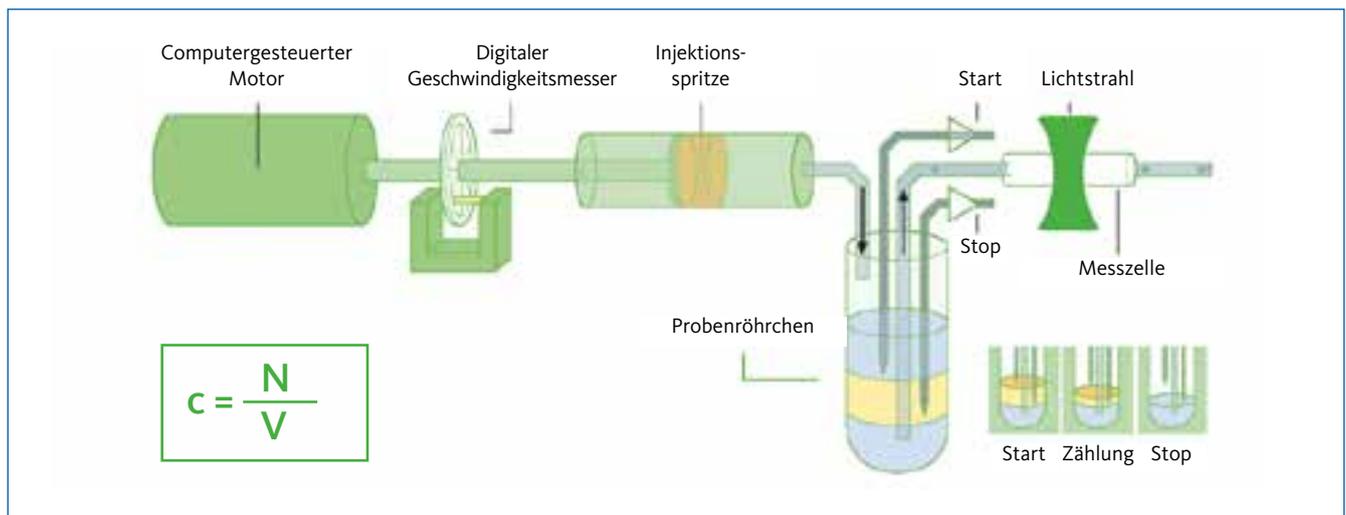


Abbildung 1: Ablaufschema der mit Start-/Stop-Elektroden arbeitenden volumetrischen mechanischen Zählmethode von Sysmex Partec

Verfahrensablauf:

Mit Hilfe der Messparameter von Durchflusszytometern können Angaben über die Größe, die Granularität/Komplexität und verschiedene Fluoreszenzen der zu analysierenden Partikel gemacht werden. Letztere werden entweder intrinsisch (Autofluoreszenz) oder extrinsisch (Fluoreszenz durch Zugabe von Sonden oder Antikörpern, konjugiert mit Fluoreszenzfarbstoffen) markiert.

Zählen der Mikroorganismen:

Das mit Start- und Stop-Elektroden arbeitende volumetrische Messsystem von Sysmex stellt eine einfache und überaus präzise durchflusszytometrische Zählmethode dar (Abbildung 1).

Im folgenden Beispiel kann über das Definieren einer Region (hier: *Isochrysis Tahiti* in Abbildung 2C) die Anzahl der Mikroalgen bestimmt werden (Abbildung 2A bis 2C).

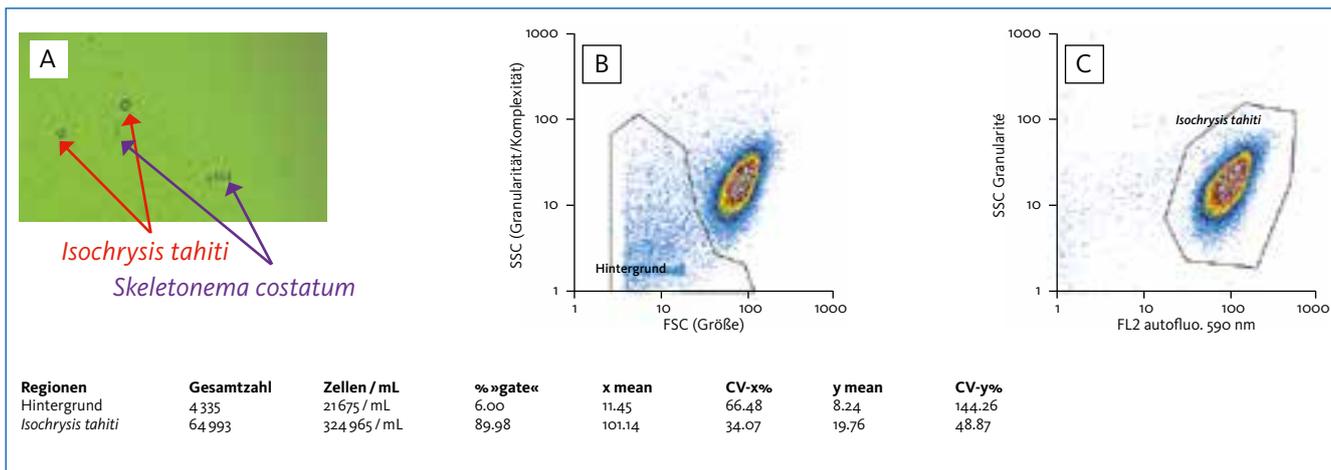


Abbildung 2A: Mikroskopisches Bild von Mikroalgen der Arten *Isochrysis tahiti* und *Skeletonema costatum*, aufgenommen mit dem CyScope®, 400-fache Vergrößerung.

Abbildung 2B: Diagramm (Dot plot), in dem die Größe (FSC) gegen die Granularität/Komplexität (SSC) der Partikel aufgetragen ist. Die Analyse zeigt eine deutlich sichtbare Population oberhalb des Hintergrundrauschens.

Abbildung 2C: In diesem Dot plot ist das Seitwärtsstreulicht (SSC) gegen die emittierte Fluoreszenzintensität (im Bereich 565–615 nm) aufgetragen. In der Region »*Isochrysis tahiti*« finden sich die gleichnamigen Mikroalgen: 324.962 Mikroalgen/mL.

Mengenbestimmung von Milchsäurebakterien:

Die Zählung von Milchsäurebakterien ist entscheidend für den Qualitätsnachweis von fermentierten Milchprodukten. Die Bakterienproben werden aufbereitet und gegebenenfalls mit einer peptonisierten Kochsalzlösung oder Färbepufferlösung verdünnt.

Diese Bakterienproben können aus fermentierten Milchprodukten oder gefriergetrockneten Kulturen bzw. bei -20°C gefrorenen Kulturen gewonnen werden, die folglich erneut suspendiert oder aufgetaut werden müssen.

Mit Hilfe einer 2-Farb-Fluoreszenzfärbung können tote und lebende Bakterien sichtbar gemacht und unterschieden werden (Abbildung 3A und 3B). Hier zu stehen verschiedene Protokolle zur Verfügung.

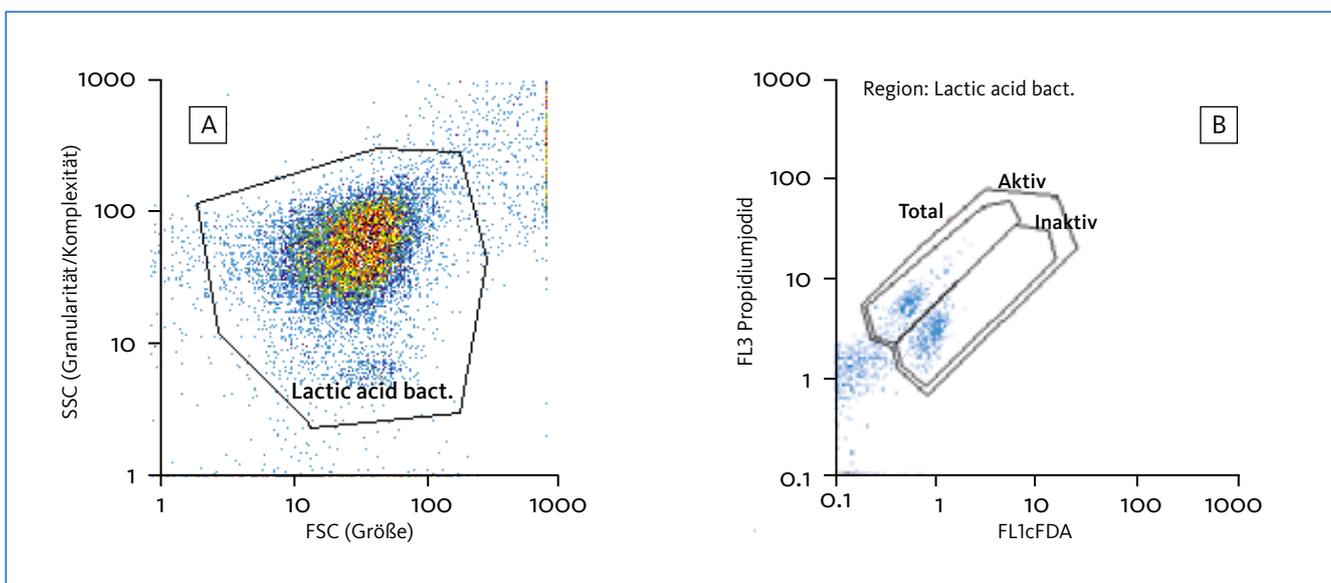


Abbildung 3A: Auftragung der Größe (FSC) von Milchsäurebakterien gegen deren Granularität/Komplexität (SSC)

Abbildung 3B: Viabilitätsfärbung (cFDA: FL1) gegen die Mortalitätsfärbung (Propidiumjodid: FL3) von Milchsäurebakterien

Analyse der Wasserqualität:

Die in Flowzytometern von Sysmex eingesetzte Technologie wurde speziell entwickelt, um die Einschränkungen, denen Standardzytometer gewöhnlich unterliegen, zu beseitigen und ein kompaktes, tragbares und bedienerfreundliches Format zu schaffen.

Die Probe wird auf eine maximale Konzentration von 1×10^5 bis 5×10^5 Zellen/mL verdünnt und dann mit einer Fluoreszenzsonde gefärbt, die zwischen den Doppelsträngen der Nukleinsäuren interkaliert (Abbildung 4 und 5).

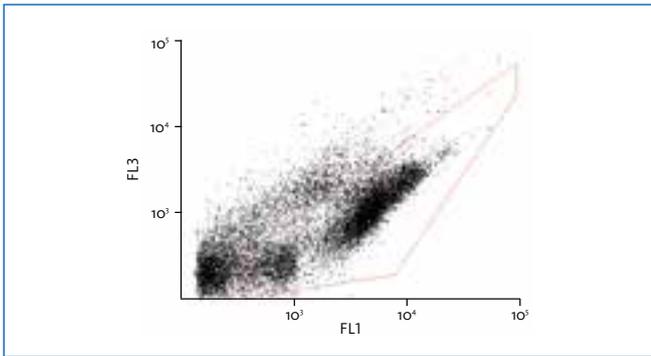


Abbildung 4: Mit SYBR® Green gefärbte Trinkwasserprobe: das Diagramm zeigt die grüne Fluoreszenz (SYBR® Green, FL1) gegenüber der roten Fluoreszenz (Propidiumiodid, FL3). Die im Wasser befindlichen Bakterien sind in dem Bereich der roten Region (polygon) zu finden. Die Signale über und links von diesem Bereich stammen von den ungefärbten Partikeln bzw. den unspezifisch mit SYBR® Green gefärbten Partikeln.

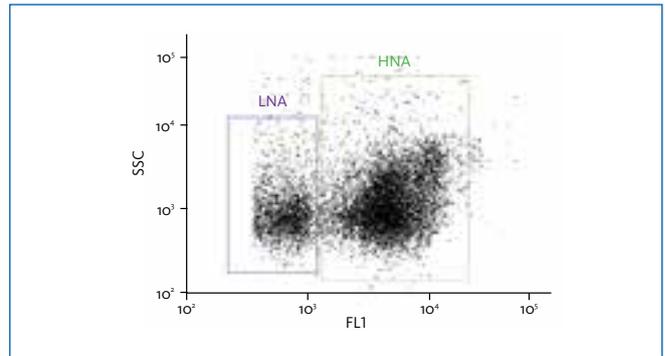


Abbildung 5: Die gleiche mit SYBR® Green gefärbte Trinkwasserprobe: das Diagramm zeigt die grüne Fluoreszenz (FL1) aufgetragen gegen die Granularität (SSC). Die im Wasser befindlichen Bakterien, deren Chromosomen und Plasmide mit SYBR® Green gefärbt sind, zeigen typischerweise unterschiedliche DNA-Mengen. Die »LNA«-Bakterien in der blauen Region enthalten nur wenig DNA, während die »HNA«-Bakterien in der grünen Region mehr DNA enthalten.

Hefeanalyse: YeastControl™- Analysen

Sysmex bietet eine ganze Reihe von YeastControl™-Lösungen zur Überwachung der biotechnologischen Fermentationsprozesse an. Diese gebrauchsfertigen und bedienerfreundlichen Reagenzien liefern schnelle direkte Ergebnisse: Proliferation, Wachstumskinetik und andere in der Brautechnik und Weinerzeugung eingesetzte physiologische Parameter, Zellkulturüberwachung in der Biomedizinforschung und Optimierung von Produktionsverfahren (Abbildung 6).

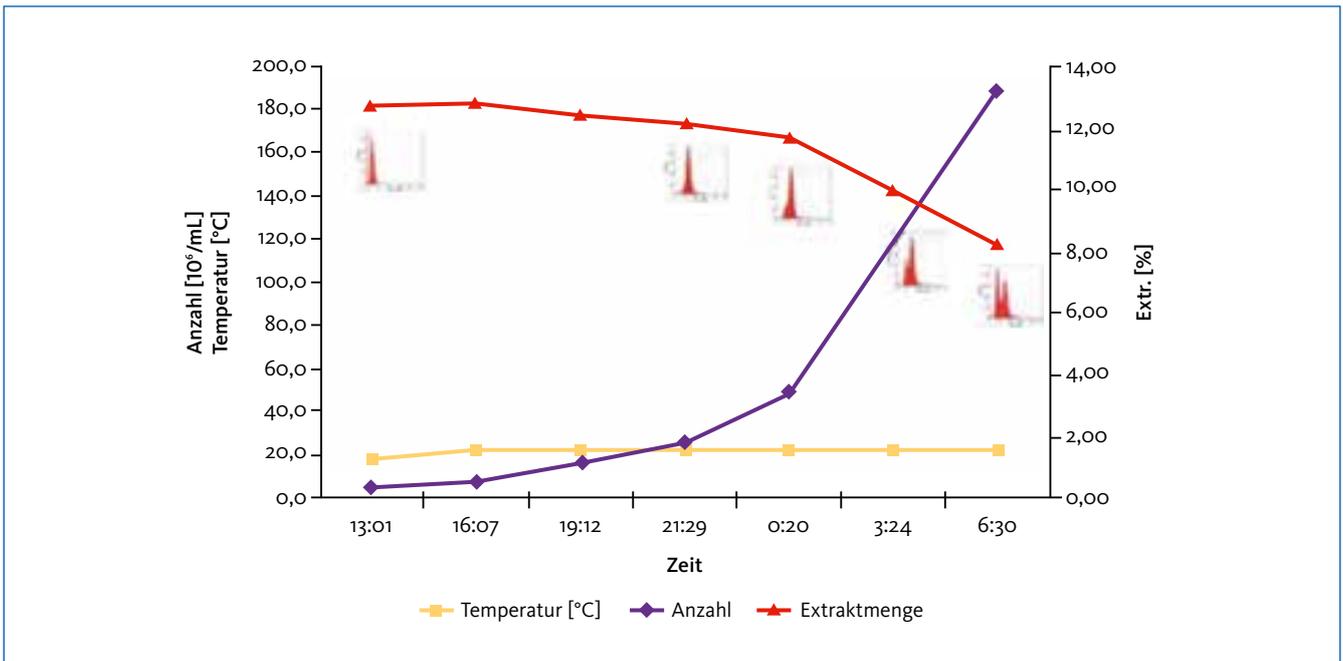


Abbildung 6: Kinetik der Zellzählung (blaue Kurve) im Vergleich zum Prozentanteil der Extraktmenge der Zellen (rote Kurve) für die Optimierung des Fermentationsverfahrens in der Brautechnik bei konstanter Temperatur (gelbe Kurve). Die eingefügten Diagramme zeigen die Verteilungsprofile der Zellzyklen mittels Durchflusszytometrie.

Die YeastControl™ basierenden Reagenzien ermöglichen die Analyse des Zellzyklus, der Viabilität (Abbildung 7), des Glykogengehalts, des Trehalosegehalts, des Neutralfettgehalts, des Proteasegehalts und der Alterung (Narbenbildung der Knospen auf der Oberfläche der Hefen).

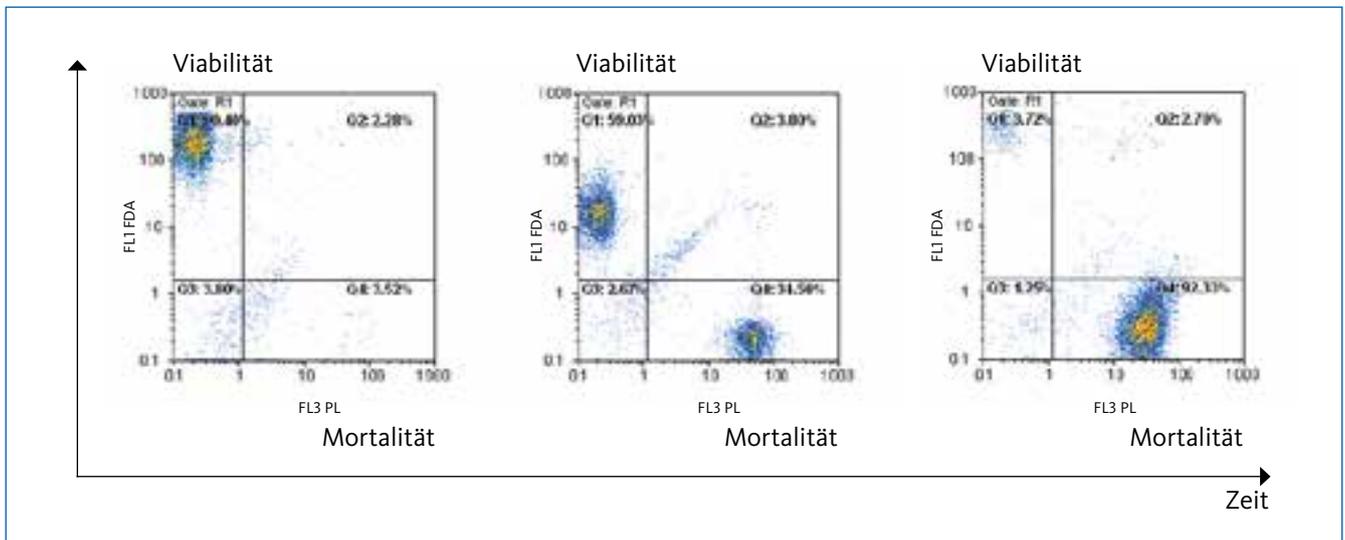


Abbildung 7: Analyse der Viabilität von Hefen der Art *Saccharomyces cerevisiae* mit dem YeastControl™-Kit. Im Quadranten Q1 wird die Menge der lebenden Hefepilze bestimmt, im Quadranten Q4 die der toten Hefepilze. Von links nach rechts wird die Viabilität der Hefepilze im Laufe der Zeit aufgetragen; die Mortalität steigt an.

Überwachung der Fermentation bei der Weinerzeugung: OenoYeast™:

Mit OenoYeast™ bietet Sysmex eine Lösung an, mit der indigene Hefen mit weißen und roséfarbenen Schimmelpilzen, bei Schaumweinen eingesetzte Tirage-Hefen, die Viabilität von Hefen bei langsamer Fermentation und unerwünschte Hefen der Art *Brettanomyces bruxellensis* während der Reifung überwacht werden können (Abbildung 8).

Spezifische Färbung von Mikroorganismen:

Bei der Untersuchung von Blutzellpopulationen mit Hilfe der Durchflusszytometrie werden häufig spezielle Farbstoffe verwendet und Antikörper eingesetzt, die gegen spezifische Epitope gerichtet sind und eine Zellpopulation charakterisieren. Dieses Verfahren findet nun auch langsam Verwendung für den Nachweis von Mikroorganismen in Zellkulturen.

Weitere Analyseparameter: intrazellulärer pH-Wert, Membranpotential sowie Vitalität und Fluidität der Membran:

Intrazellulärer pH-Wert und Membranpotential

Der intrazelluläre pH-Wert (pHi) mit Sonden gemessen werden, deren Fluoreszenz auf den pH-Wert beruht. Im Laufe ihres Wachstums muss eine aktive Mikroorganismenzelle einen konstanten pHi-Wert aufrechterhalten. Durch diese Messung wird es somit möglich, den physiologischen Zustand von Zellen im Laufe der Fermentationsprozesse zu analysieren.

Das Transmembranpotential bestimmt die Austauschvorgänge zwischen der Zelle und der äußeren Umgebung. Die Analyse dieses Potentials ermöglicht die Charakterisierung des Zellzustands der Bakterienkultur. In der Durchflusszytometrie kann diese Analyse auf einfache Art und Weise mit Hilfe von anionischen und kationischen Fluoreszenzsonden durchgeführt werden.

Vitalität

Der Parameter Vitalität kennzeichnet die metabolische Leistung einer Mikroorganismenkultur. Er wird üblicherweise unter Verwendung bestimmter Wachstums- bzw. Metabolitenproduktionsraten analysiert. Mit der Durchflusszytometrie können indirekte Messungen durchgeführt werden, die auf der abhängigen Energieausschüttung eines Fluoreszenzfarbstoffs beruhen, so dass das entsprechende Ergebnis innerhalb von 30 Minuten vorliegt.

Membranfluidität

Die Membranfluidität von Mikroorganismen kann durch Fluoreszenzpolarisierung nach Färben mit DPH (Diphenylhexatrien) gemessen werden. Auf diese Weise kann die Entwicklung der Membranfluidität im Laufe der Kultur in Korrelation zu den Veränderungen in der Zusammensetzung von Membranfettsäuren verfolgt werden. Die Fluidität kann mit der Durchflusszytometrie sehr viel einfacher und schneller gemessen werden, als dies für Membranfettsäuren der Fall ist. Der Vorteil der Durchflusszytometrie im Vergleich zu dem bei der Spektralfluorimetrie eingesetzten Referenzverfahren ist die Möglichkeit, die Messung der Fluidität in lebenden und toten Zellen über eine Dreifach-Färbung (Vitalität, Mortalität, Fluidität) vorzunehmen.

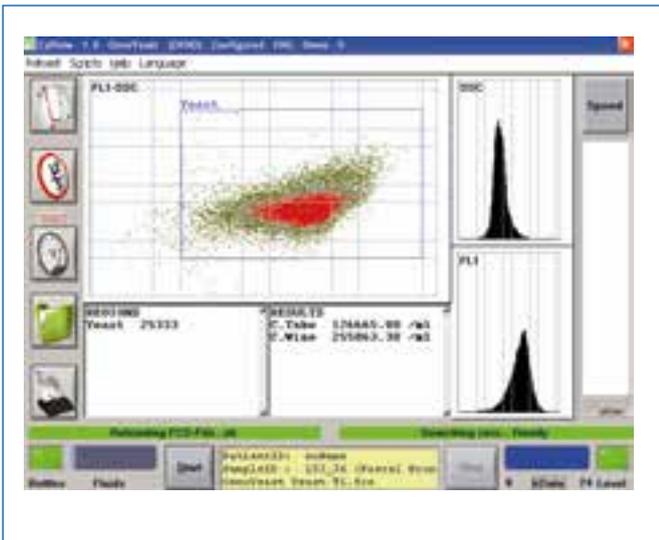


Abbildung 8: Zählen der lebenden Hefepilze mit dem Flowzytometer Oenolyser® und dem OenoYeast™-Kit. Die Region »Yeast« erlaubt die Quantifizierung der lebenden Hefen. Die jeweiligen Konzentrationen sind im Feld »Results« dargestellt.

Danksagungen:

Wir danken Frau Prof. Marielle BOUIX (AgroParisTech UMR GMPA BP101 78850 THIVERVAL GRIGNON) für ihre Unterstützung und ihre Bereitschaft, diesen Beitrag zu überprüfen.

Literatur

- [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.