



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
“ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)”
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)

Εφαρμογές της Κυτταρομετρίας Ροής στη Μικροβιολογία

Ράβρας Χ. Νικόλαος

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Κωνσταντίνα Γκαρτζονίκα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Μικροβιολογίας

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
“ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ (ΒΒΕ)”
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ (ΜΔΕ)

Εφαρμογές της Κυτταρομετρίας Ροής στη Μικροβιολογία

Ράβρας Χ. Νικόλαος

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Κωνσταντίνα Γκαρτζονίκα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Μικροβιολογίας

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022

« Η έγκριση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32 άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

ΟΝΟΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΦΟΙΤΗΤΗ: Νικόλαος Χ. Ράρρας

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης:

«Εφαρμογές της Κυτταρομετρίας Ροής στη Μικροβιολογία»

Ημερομηνία παρουσίασης: 30/6/2022

Επιβλέπων Καθηγητής:

Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας,

Ιατρικό Τμήμα, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Εξεταστική επιτροπή:

Τσάμης Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικό Τμήμα,

Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μποζίδης Πέτρος, ΕΔΙΠ, Ιατρικό Τμήμα, Σχολή Επιστημών Υγείας,

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Η Διευθύντρια του ΠΜΣ

Βεζυράκη Πατρόνα

Καθηγήτρια Φυσιολογίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας, του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Επιβλέποντες, τους οποίους και ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγησή τους, ήταν: η κ. Κωνσταντίνα Γκαρτζονίκα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, ο κ. Κωνσταντίνος Τσάμης, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας και ο κ. Πέτρος Μποζίδης, ΕΔΙΠ, Εργαστήριο Μικροβιολογίας Τμήματος Ιατρικής.

Απευθύνω ευχαριστίες στον κ. Χαράλαμπο Αγγελίδη, Καθηγητή Γενικής Βιολογίας του τμήματος Ιατρικής και στην κ. Βεζυράκη Πατρώνα, Καθηγήτρια Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής για την δυνατότητα που έδωσαν σ' εμένα και τους συμφοιτητές μου να συμμετάσχουμε σε αυτό το πολύ ενδιαφέρον και παραγωγικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών.

Ευχαριστώ θερμά τον κ. Γεώργιο Βαρθολομάτο, υπεύθυνο του τμήματος Μοριακής Βιολογίας του Αιματολογικού εργαστηρίου του ΠΠΓΝ Ιωαννίνων, για την πολύτιμη βοήθεια και γνώση που μου έχει προσφέρει. Επίσης ευχαριστώ τους περισσότερους από τους συναδέλφους μου στο Αιματολογικό εργαστήριο του ΠΠΓΝ Ιωαννίνων που μοιράστηκαν μαζί μου το βάρος του εγχειρήματος. Θα ήθελα τέλος να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου, που με στήριξε και με παρότρυνε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Ιούνιος 2022

Ράλλας Χ. Νικόλαος

Στον αδερφό μου

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η κυτταρομετρία ροής τις τελευταίες δεκαετίες χάρη στη ραγδαία ανάπτυξη της με νέες τεχνολογίες και μικρότερο κόστος θεωρείται ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο στη διαγνωστική αλλά και ερευνητική διαδικασία. Ήδη σήμερα η χρήση της στην Αιματολογία είναι αξιοσημείωτη για τη διάγνωση αλλά και την πορεία της νόσου – θεραπεία στα αιματολογικά νοσήματα, όμως τα τελευταία χρόνια εμπλέκεται και στον τομέα της Μικροβιολογίας.

Η σκέδαση του φωτός αποκαλύπτει πληροφορίες για τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου ή του ιού, ενώ η εκτίμηση των εκπεμπόμενων χρωματικών συχνοτήτων που εκπέμπονται από τις φθορίζουσες χρωστικές ή τα ειδικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται μπορούν να δώσουν πληροφορίες για το γενετικό υλικό και τα αντιγονικά χαρακτηριστικά των μικροβιακών παραγόντων που αναλύονται. Η πολλαπλή προσέγγιση των μικροβίων φαίνεται πως μπορεί να λύσει βασικά προβλήματα της κλασικής μικροβιολογίας που αφορούν θέματα ταχύτητας της ταυτοποίησης του βακτηρίου ή της βιωσιμότητας του η οποία συνεπάγεται τη δυνητική μολυσματικότητα του κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Επίσης, καθίσταται δυνατή η απομόνωση και μεταφορά συγκεκριμένων πληθυσμών ή ακόμη και μεμονωμένων κυττάρων πράγμα που επιτρέπει την περαιτέρω μελέτη.

Τα παραπάνω έχουν προκαλέσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων ανά τον κόσμο. Έχουν γίνει εξαιρετικά ενδιαφέρουσες μελέτες οι οποίες αφορούν τα τρόφιμα και εφαρμογές που αφορούν την ασφάλεια κατά την παραγωγή και τη διάθεση των προϊόντων από τη βιομηχανία αλλά και το νερό όπου η κυτταρομετρία ροής αποτελεί ένα εξαιρετικό εργαλείο. Συγκεκριμένα η ταχύτητα με την οποία ανιχνεύονται οι αλλαγές στον μικροβιακό πληθυσμό έχει δώσει την ευκαιρία ανάπτυξης τεχνολογίας παρακολούθησης του πόσιμου νερού σε πραγματικό χρόνο η οποία έχει εφαρμογή σε δίκτυα νερού μεγάλων Ευρωπαϊκών πόλεων.

Επιπλέον, η δυνατότητα ταυτοποίησης των βακτηρίων – ιών καθιστά την κυτταρομετρία ροής πολύτιμη για την επεξεργασία αστικών αποβλήτων και την επαναχρησιμοποίηση του νερού, όπως και στην αξιολόγηση των μικροβιακών κοινοτήτων των ποταμών, των θαλάσσιων περιοχών ή του εδάφους. Τέλος μπορεί να συμβάλει στην επιτήρηση των ικτών εστιών με τη χρήση της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα, πράγμα που την καθιστά όπλο κατά της πανδημίας που ταλαιπωρεί την ανθρωπότητα τα τελευταία δύο χρόνια και να χρησιμοποιήσει την τεχνική της μηχανικής μάθησης και της τεχνητής νοημοσύνης σ'αυτή την κατεύθυνση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Γενικές αρχές λειτουργίας της κυτταρομετρίας ροής

1.1	Ιστορική Αναδρομή	1
1.2	Τι είναι το κυτταρόμετρο και η κυτταρομετρία ροής	2
1.3	Είδη ανάλυσης κυτταρομετρίας ροής	6
1.3.1	Ποσοτική και ποιοτική κυτταρομετρία ροής ανοσοφθορισμού	6
1.3.2	Κυτταρομετρία ποσοτικού φθορισμού	7
1.4	Μέρη του οργάνου κυτταρομετρίας ροής	9

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Μικροβιακή κυτταρομετρία: τι είναι και τι μπορεί να γίνει στο άμεσο μέλλον

2.1	Εισαγωγή	18
2.2	Γενικές αρχές προετοιμασίας των βακτηριακών κυττάρων για τις κυτταρομετρικές αναλύσεις	18
2.3	Εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής στη μελέτη των βακτηριακών κυττάρων	27
2.3.1	Χρώση του βακτηριακού DNA και DNA /RNA	29
2.3.2	Μέτρηση της βιωσιμότητας	31
2.3.3	Μέτρηση δυναμικού κυτταρικής μεμβράνης	35
2.3.4	Ενεργότητα ενδοκυτταρικών ενζύμων	37
2.3.5	Ειδική ανίχνευση βακτηριακών ειδών με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων	40

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Η συμβολή της κυτταρομετρίας ροής στη μικροβιολογία των τροφίμων

3.1	Κυτταρομετρία ροής και μικροβιολογία τροφίμων	43
3.2	Περιορισμοί των τεχνικών που βασίζονται στα τρυβλία	44
3.3	Κυτταρομετρία Ροής: Γενικές τεχνικές	46
3.4	Ανάλυση δειγμάτων με την κυτταρομετρία ροής	47
3.5	Χρώσεις χρήσιμες για την κυτταρομετρία ροής στη μικροβιολογία τροφίμων	49
3.6	Ανίχνευση αντισωμάτων και ανάλυση με την κυτταρομετρία ροής	51
3.7	Ανίχνευση βακτηριακών σπορίων	57

3.8	Κυτταρομετρία ροής και βακτήρια γαλακτικού οξέος	59
3.9	Η συμβολή της κυτταρομετρίας διαχωρισμού στη μικροβιολογία τροφίμων	64

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Η Κυτταρομετρία ροής στην ταχεία μικροβιολογική ανάλυση του νερού

4.1	Έλεγχος της ποιότητας του νερού και κυτταρομετρία ροής	70
4.2	Μέτρηση αριθμού βακτηρίων με κυτταρομετρία ροής σε δείγματα νερού	74
4.3	Η συμβολή της αυτοματοποιημένης διαδικτυακής κυτταρομετρίας ροής στη διαχείριση του οικοσυστήματος μικροφυκών	84
4.3.1	Ο ορισμός της πύλης και η οριοθέτηση των μικροφυκών και των προκαρυωτικών κυττάρων	88
4.3.2	Ιομετρία ροής	100

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Συζήτηση: Συμπεράσματα – Προοπτικές	113
Περίληψη – Abstract	124
Πίνακας Αρτικόλεξων	126
Βιβλιογραφία	128



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

Γενικές αρχές λειτουργίας της κυτταρομετρίας ροής

1.1 Ιστορική Αναδρομή

Η ιδέα της συσκευής μέτρησης των κυττάρων έχει τις βάσεις της από τους πρώτους ερευνητές πολλά χρόνια πριν και προέκυψε από την ανάγκη για την σωστή ταξινόμηση των κυττάρων του αίματος. Το έτος 1934 ξεκίνησε η παρατήρηση ερυθροκυττάρων στο μικροσκόπιο και η κυτταρομετρία ροής παρουσιάζεται ως εμπορικό επίτευγμα λίγες δεκαετίες μετά γύρω στο 1972 [<https://kyttarometria.gr/fc.html>]. Μετά την ανακάλυψη της αρχής Coulter (ηλεκτρονική μέτρηση σωματιδίων) το 1953, ο Αμερικανός ερευνητής Mack Fulwyler εφάρμοσε αυτή την αρχή για την ταξινόμηση των κυττάρων το 1965 και οι οπτικές ανιχνεύσεις υιοθετήθηκαν σύντομα σε αναλυτές της κυτταρομετρίας ροής με συστήματα ενεργοποιημένου φθορισμού του κυττάρου (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) από τα τέλη της δεκαετίας του 1960 [Han Yuanyuan, et al, 2016].

Στη συνέχεια παρουσιάζεται με τη σειρά η πορεία της μεθόδου στο πέρασμα του χρόνου:

- 1934, Moldavan: μέτρηση ερυθροκυττάρων σε μικροσκόπιο
- 1945, Reynolds: σύστημα στρωτής ροής (laminar flow)
- 1947, Coulter: πατέντα για μέτρηση κυττάρων (αιμοκυτταρόμετρο)

- 1964, Kamensky: μέτρηση 500 κυττάρων το δευτερόλεπτο ως προς τη σκέδαση του φωτός και την απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας
- 1965, Fulwyler: εισήγαγε τον ηλεκτροστατικό διαχωρισμό κυττάρων (cell sorting)
- 1966, Van Dilla: εισήγαγε τον διαχωρισμό των κυττάρων με βάση την περιεκτικότητα σε DNA
- 1969, Hulett: εισήγαγε τον διαχωρισμό (sorting) των κυττάρων με βάση τον φθορισμό τους
- 1972, BDIS: το πρώτο στην ιστορία μοντέλο κυτταρομετρητή ροής που διατέθηκε για εμπορικούς σκοπούς [<https://repository.edulll.gr/edulll/retrieve/7914/2493>].

1.2 Τι είναι το κυτταρόμετρο και η κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνολογία που επιτρέπει την απαρίθμηση και τον χαρακτηρισμό μικροσωματιδίων και κυττάρων, τα οποία βρίσκονται σε κατάσταση εναιωρήματος. Καθιστά δυνατή την ανάλυση πολλών παραμέτρων ταυτόχρονα και προσδιορίζει τα φυσικά ή χημικά χαρακτηριστικά μεμονωμένων κυττάρων, τα οποία ρέουν μέσω μιας συσκευής οπτικής ανάλυσης και ηλεκτρονικής ανίχνευσης του αποτελέσματος τους [<https://kyttarometria.gr/fc.html>].

Αρχικά, είχε δημιουργηθεί με κύρια χρήση τον κυτταροδιαχωρισμό, στον οποίο οφείλει και το όνομα του το κυτταρόμετρο (FACS). Σήμερα θεωρείται εξαιρετικό διαγνωστικό εργαλείο στην κλινική διάγνωση αλλά ταυτόχρονα κατέχει περίοπτη θέση στα ερευνητικά κέντρα [Βαρθολομάτος, 2007].

Είναι μια πολυπαραγοντική, πολυπαραμετρική τεχνική που μπορεί να παρέχει δεδομένα για μια πληθώρα στοιχείων του κυττάρου ή συστατικών του όπως:

- DNA
- RNA
- Μέγεθος και αριθμός κυττάρων
- Λιπίδια
- Πρωτεΐνες επιφανείας, κυτταροπλασματικές, πυρηνικές
- Διαδικασίες όπως η απόπτωση και η κυτταρική σηματοδότηση
- Η παρουσία παθογόνων παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων αλλά και των ιών [Βαρθολομάτος, 2007].

Ειδικότερα, στον τομέα της Αιματολογίας και της έρευνας η έννοια της κυτταρομετρίας περιλαμβάνει δύο οντότητες αυτή της κυτταρομετρίας ροής (Flow Cytometry, FCM) και της

κυτταρομετρίας ανάλυσης εικόνας (Image Cytometry, IC). Με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής, επιλύθηκε ένα πολύ μεγάλο πρόβλημα που απασχολούσε για χρόνια τους αιματολόγους και τους ερευνητές, δηλαδή ποια από τα αντισώματα αναγνώριζαν ειδικά τα ίδια μόρια και πως θα μπορούσε να τακτοποιηθεί το χάος που δημιουργούνταν με τα χιλιάδες αντισώματα που υπήρχαν ήδη και δεν ήταν ειδικά για κάθε κυτταρικό ανοσοφαινότυπο. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν τα HDLA Workshops, που πήραν το όνομα τους από τον όρο Αντιγόνα Διαφοροποίησης Ανθρώπινων Λευκοκυττάρων (Human Leukocyte Differentiation Antigens, HLDA) όπου ερευνητές, Αιματολόγοι και πολλοί φορείς της υγείας συναντήθηκαν για να ταξινομήσουν το μεγάλο πλήθος των αντισωμάτων σε αυτά που είναι ειδικά και διαγνωστικά για τα ανθρώπινα λευκοκύτταρα [Clark, et al, 2016].

Στο πρώτο Workshop που έγινε στο Παρίσι το 1982, αξιολογήθηκε και συγκρίθηκε μεγάλος αριθμός από αντισώματα που σήμερα είναι στην πρώτη γραμμή για τον κλινικό έλεγχο και αρκετά από αυτά χρησιμοποιούνται στη βασική έρευνα. Η προσέγγιση έγινε από ένα πλήθος εργαστηρίων τα οποία συμμετείχαν στην «τυφλή ανάλυση» των αντισωμάτων σε κλινικά παθολογικά και υγιή δείγματα ανθρώπων. Ως αποτέλεσμα προέκυψε η ανεξάρτητη επικύρωση (validation), τόσο της ειδικότητας των αντισωμάτων, όσο και της χρηστικότητάς τους, υποστηρίζοντας τη χρήση τους με τον πλέον έγκυρο και αντικειμενικό τρόπο στην έρευνα και τη διάγνωση. Τα αντισώματα αυτά χρησιμοποιούνται στον καθορισμό της βέλτιστης θεραπευτικής στρατηγικής και της ανταπόκρισης της στους ασθενείς. Ακολούθησαν στην συνέχεια πολλά HLDA Workshops μέχρι και σήμερα όπου ο αριθμός των αντισωμάτων έχει ξεπεράσει τα τετρακόσια. [Clark, et al, 2016].

Αυτό που συναντάμε πιο συχνά από όλες τις έννοιες στην κυτταρομετρία ροής είναι οι διάφοροι αριθμοί με το χαρακτηριστικό «CD» που χρησιμοποιούνται κάθε ένα από αυτά, για να χαρακτηρίσουν-ταυτοποιήσουν έναν συγκεκριμένο επίτοπο στην επιφάνεια των κυττάρων [Abo Ali, 2017].

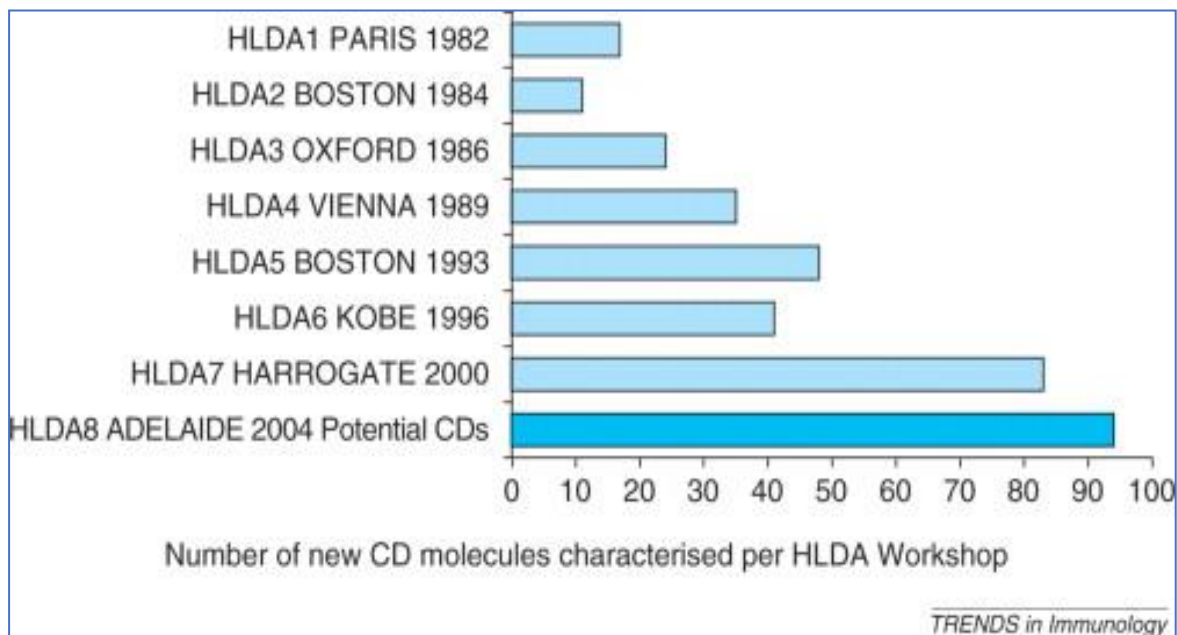
Η ονομασία τους ως CD προέρχεται από τα:

- **Cluster of Differentiation** (Σύμπλεγμα της διαφοροποίησης) ή
- **Cluster of Designation** (Σύμπλεγμα προσδιορισμού) ή
- **Classification Determinant** (Προσδιορισμός ταξινόμησης)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται χρονολογικά η πραγματοποίηση των Workshops και σε κάθε συνάντηση πόσα αντισώματα χαρακτηρίστηκαν αριθμητικά, για να περάσει το αντίστοιχο αντίσωμα στο εμπόριο τελικά με μια κοινή ονομασία. Η αναφορά είναι ενδεικτική και αφορά τα οκτώ πρώτα που έχουν πραγματοποιηθεί κατά τη διάρκεια περίπου είκοσι δύο

ετών, με το πρώτο να έχει λάβει χώρα όπως αναφέρθηκε, το 1982 στο Παρίσι

[[https://www.cell.com/trends/immunology/fulltext/S1471-4906\(03\)00140-6#back-BIB1](https://www.cell.com/trends/immunology/fulltext/S1471-4906(03)00140-6#back-BIB1)].



Πίνακας 1. Χρονική ακολουθία των Workshops και ποια CDs χαρακτηρίστηκαν και πέρασαν στην κλινική πρακτική [[https://www.cell.com/trends/immunology/fulltext/S1471-4906\(03\)00140-6#back-BIB1](https://www.cell.com/trends/immunology/fulltext/S1471-4906(03)00140-6#back-BIB1)].

Στην Ιατρική όταν αναφέρεται το σύμπλεγμα διαφοροποίησης, εννοείται ένας καθαρός επίτοπος στην επιφάνεια του κυττάρου. Το CD που εκφράζει μια πρωτεΐνη είναι γνωστό ότι προέρχεται από το αντίστοιχο γονίδιο που την κωδικοποιεί, άρα τα CDs που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση μιας νόσου έχουν σχέση με την παθοφυσιολογία της και τους μηχανισμούς δράσης της. Εξαίρεση αποτελούν οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και οι πυρηνικές, που δεν χαρακτηρίζονται με το πρόθεμα CD όπως ισχύει για τις επιφανειακές, μιας και είναι χαρακτηριστικές του εκάστοτε κυτταρικού τύπου ή υπότυπου, αλλά με το όνομα του προϊόντος του γονιδίου (πχ Bcl-2, Ki67, Fas) [Βαρθολομάτος,2007].

Αν και ο χαρακτηρισμός τους ως προς την ειδικότητα είναι σαφής, υπάρχουν περιπτώσεις όπως για παράδειγμα η κοινή έκφραση και στους δύο τύπους λεμφωμάτων (Hodgkin και μη Hodgkin), όπου έχουμε ως αποτέλεσμα τη μη σωστή ταυτοποίηση και χαρακτηρισμό των διαφόρων υποτύπων. Με νέες τεχνολογίες πλέον και μετά από μεγάλες κλινικές μελέτες έχει αποσαφηνιστεί επαρκώς και σε μεγάλο βαθμό το ζήτημα αυτό ώστε να υπάρχουν σήμερα ειδικά CD για διάφορους επιτόπους και περιοχές στους κυτταρικούς υποδοχείς και στην κυτταρική μεμβράνη που βοηθούν στην κλινική και ερευνητική πρακτική, ώστε να ταυτοποιείται με αρκετά μεγάλη ακρίβεια η παθολογία του εκάστοτε περιστατικού [Βαρθολομάτος,2007], [<https://kyttarometria.gr/fc.html>].

Η χρήση της κυτταρομετρίας ροής στην Αιματολογία είναι κεντρικής σημασίας γιατί είναι απαραίτητη για τη διάγνωση όλων των αιματολογικών νοσημάτων, ο ρόλος της μάλιστα στις κακοήθειες δεν είναι μόνο διαγνωστικός αλλά και προγνωστικός μέσω της ανίχνευσης της ελάχιστης υπολειπόμενης νόσου στη διάρκεια της θεραπείας. Η ακριβής διάγνωση είναι ο σπουδαιότερος στόχος που επιβάλλεται να επιτευχθεί προκειμένου να επιλεγεί η βέλτιστη θεραπεία στους ασθενείς με οξεία λευχαιμία. Για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα τα κυριότερα διαγνωστικά εργαλεία για την επιβεβαίωση της διάγνωσης και την κατάταξη της οξείας λευχαιμίας ήταν η μορφολογία των λευκών αιμοσφαιρίων και η κυτταροχημεία. Σ' αυτές τις μεθόδους βασιζόταν η κατάταξη FAB (French-American-British Classification, 1976, FAB), η οποία λόγω της υποκειμενικότητας είχε αρκετά φτωχή επαναληψιμότητα μεταξύ των εργαστηρίων [Swerdlow, et al, 2016].

Με την εισαγωγή της κυτταρομετρίας ροής στην ανοσοφαινοτυπική ανάλυση των λευχαιμικών κύτταρων ξεπεράστηκαν τα παραπάνω προβλήματα και σήμερα θεωρείται απαραίτητη στη μελέτη της οξείας και χρόνιας λευχαιμίας, προκειμένου να συμπληρωθούν οι πληροφορίες του απλού μικροσκοπίου και της κυτταροχημείας, με αυτές της κυτταρομετρίας ροής, που επιτρέπει την ταχεία ανάλυση μεγάλου αριθμού κυττάρων, σε μικρά δείγματα, απ' όπου λαμβάνουμε μεγάλη στατιστική ακρίβεια [Harris, et al, 2008; Swerdlow, et al, 2016].

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί μια αντικειμενική και εύκολα αναπαραγώγιμη μέθοδο με την οποία είναι δυνατή η ταυτοποίηση του παθολογικού πληθυσμού και ο προσδιορισμός της κυτταρικής σειράς. Η μελέτη του κυτταρικού κύκλου, η ανάλυση της κλωνικότητας μαζί με τις κυτταρογενετικές και μοριακές μελέτες του παθολογικού πληθυσμού αποτελούν ολοκληρωμένη διαγνωστική προσέγγιση του αιματολογικού νοσήματος, σύμφωνα με τα διεθνή πρωτόκολλα [Πάγκαλης, 2008].

Ένα μεγάλο πλεονέκτημα της κυτταρομετρίας ροής είναι ότι δίνει τη δυνατότητα της ποσοτικής μέτρησης της έκφρασης των αντιγόνων στα αιμοποιητικά κύτταρα και η ταυτοποίηση σύνθετων αντιγονικών συνδυασμών, που σχετίζονται με συγκεκριμένες μοριακές βλάβες και συγκεκριμένη κυτταρική βιολογία. Ο προσδιορισμός της κυτταρικής σειράς των βλαστικών κυττάρων αποτελεί, ακόμη και σήμερα, πρόβλημα σε μερικές περιπτώσεις οξείων λευχαιμιών. Αυτό οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη διασταυρούμενης έκφρασης αντιγόνων διαφορετικής σειράς. Αντιγόνα που σε φυσιολογικά δείγματα, σχετίζονται ή θεωρούνται ειδικά για τα λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικούς φονείς (NK-κύτταρα) όπως είναι τα CD2, CD7, CD16, CD56 ή για τα κύτταρα της μυελικής σειράς τα CD13, CD14, CD15, CD33, CD65 έχουν βρεθεί θετικά σε σημαντικό ποσοστό περιπτώσεων οξείας μυελογενούς και οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας [Βαρθολομάτος, 2007].

Όλα τα προαναφερθέντα τονίζουν την αναγκαιότητα να χρησιμοποιούνται συνδυασμοί από ανοσοφαινοτυπικούς δείκτες, οι οποίοι να σχετίζονται με διάφορες κυτταρικές σειρές, ώστε να τεκμηριωθεί με το καλύτερο δυνατό τρόπο η κυτταρική σειρά των βλαστικών κυττάρων. Απαραίτητη είναι επίσης η χρήση δεικτών με μεγάλη ευαισθησία, που είναι ειδικοί και εκφράζονται πάντα από μια συγκεκριμένη σειρά όπως είναι το CD7 στα T λεμφοκύτταρα ή το CD19 στα B λεμφοκύτταρα, μαζί με δείκτες οι οποίοι είναι περισσότερο ειδικοί, όπως το CD3 για τα T λεμφοκύτταρα ή την μυελοπεροξειδάση (MPO) για την οξεία μυελογενή λευχαιμία. Επιπλέον, είναι αναντικατάστατοι οι δείκτες των προγονικών κυττάρων, όπως είναι το CD34, ώστε να τεκμηριωθεί η αωρότητα των παθολογικών κυττάρων. Τέλος, αφού έχει προσδιοριστεί η κυτταρική σειρά και το στάδιο διαφοροποίησης η ανοσοφαινοτυπική ανάλυση επικεντρώνεται στην κατάταξη σε μικρότερες κλινικά ομοιογενείς υποομάδες, ώστε η τελική απάντηση να είναι η πληρέστερη δυνατή ως προς την παθολογία του κυτταρικού πληθυσμού [Bartholomaeus, 2007].

Σχετικά με τον αριθμό των κυττάρων που συλλέγονται για την ανάλυση κάθε δείκτη είναι από 10.000 έως 15.000 και όταν η ανάλυση αφορά κάποιο συγκεκριμένο υποπληθυσμό όπως όταν ανιχνεύεται η ελαχίστη υπολειπόμενη νόσος (Minimal Residual Disease, MRD), τουλάχιστον 1.000 παθολογικά κύτταρα ανά δείγμα. Για τη σωστή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων τα ευρήματα πρέπει να αφορούν βλαστικά κύτταρα, τα οποία έχουν απομονωθεί από το περιφερικό αίμα ή τον μυελό των οστών. Υπάρχει μια γενική συμφωνία για ένα κατώτερο όριο θετικότητας, δηλαδή ένας δείκτης θεωρείται θετικός όταν εκφράζεται τουλάχιστον στο 20% των κυττάρων που αναλύονται [Bartholomaeus, 2007].

1.3 Είδη ανάλυσης κυτταρομετρίας ροής

1.3.1 Ποσοτική και ποιοτική κυτταρομετρία ροής ανοσοφθορισμού

Η κυτταρομετρία ροής ανοσοφθορισμού αποτελεί το πιο συχνό είδος ανάλυσης στην ερευνητική δραστηριότητα καθώς και στην κλινική προσέγγιση. Με τη χρήση του κατάλληλου αντισώματος είναι δυνατόν να προσδιοριστεί ποιοτικά και ποσοτικά οποιοδήποτε αντιγόνο με την προϋπόθεση να βρίσκεται σε ανιχνεύσιμη ποσότητα στην επιφάνεια ή εντός των κυττάρων. Με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά την εξέταση του δείγματος μπορούν να προκύψουν ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με την προέλευση, το στάδιο διαφοροποίησης, καθώς και τη λειτουργία των κυττάρων. Είναι δυνατή η μέτρηση και διαφόρων αντιγόνων ταυτόχρονα σύμφωνα πάντα με το μοντέλο του κυτταρομετρητή. Στα περισσότερα εργαστήρια συνήθως μετρώνται τρία έως πέντε αντιγόνα

παράλληλα, αλλά με τη χρήση κάποιων περισσότερο εξειδικευμένων κυτταρομετρητών μπορεί να γίνει μέτρηση μέχρι και δεκαεπτά αντιγόνων [Baumgarth, Roederer, 2000].

Προκειμένου να έχουμε την επιθυμητή ακρίβεια των μετρήσεων μεγάλο ρόλο παίζει η κατάλληλη προετοιμασία του δείγματος. Η βέλτιστη σύσταση του επιτυγχάνεται με το να έχουμε μεμονωμένα κύτταρα στο εναιώρημα, με ελάχιστα εάν δεν μπορεί να μην υπάρχουν καθόλου συσσωματώματα και αν είναι δυνατόν χωρίς κυτταρικά θραύσματα. Αν πρόκειται να γίνει σήμανση με επιφανειακά αντιγόνα, τα σημασμένα αντισώματα προστίθενται σε δείγμα κυττάρων που δεν έχουν μονιμοποιηθεί, ενώ εάν πρέπει να γίνει ενδοκυττάρια χρώση, τα κύτταρα πρέπει να μονιμοποιηθούν έτσι ώστε το σημασμένο αντίσωμα να έχει άμεση πρόσβαση στο εσωτερικό του κυττάρου όπου και θα γίνει η σύνδεση με το αντιγόνο-στόχο [Ormerod, 2009].

Συνηθέστερα το δείγμα μετά την επεξεργασία περιέχει σωματίδια, όπως κάποια κυτταρικά θραύσματα, νεκρωμένα κύτταρα, καθώς επίσης πιθανόν να υπάρχουν αιμοπετάλια και ερυθροκύτταρα. Γι' αυτό τον λόγο η ποσοτική μέτρηση των κυτταρικών πληθυσμών στόχων γίνεται δυνατή με τη χρήση οριοθετήσεων (gates). Αρχικά πραγματοποιείται ανάλυση σύμφωνα με τον πρόσθιο και τον πλάγιο σκεδασμό και στη συνέχεια γίνεται επιλογή του πληθυσμού που θα μελετηθεί με οριοθέτηση του σε σχέση με τους υπολοίπους και με αυτόν τον τρόπο οι παράμετροι φθορισμού θα υπολογιστούν μόνο για τον πληθυσμό που έχει επιλεγεί. Έτσι προκύπτουν σαφείς πληροφορίες σχετικά με τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού που αναλύεται, όπως τη λειτουργία του, το στάδιο του κυτταρικού κύκλου και την προέλευση (ποιοτική ανάλυση), καθώς επίσης υπολογίζεται και ο αριθμός των κυττάρων που ανήκουν στην ομάδα που έχει επιλεγεί (ποσοτική ανάλυση) [Πάγκαλης, 2008].

1.3.2 Κυτταρομετρία ποσοτικού φθορισμού

Οι φαινότυποι χρησιμεύουν στην επίτευξη της διαφοροποίησης μεταξύ φυσιολογικών και νεοπλασματικών κυττάρων. Αυτή η διάκριση μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση φθοριοχρωμάτων τα οποία βάσει του φθορισμού τους τα εντοπίζει ο κυτταρομετρητής. Παλιότερα, αυτές οι διαφορές στον φθορισμό παρατηρούνταν με μικροσκόπηση και χαρακτηρίζονταν ως θετικές ή αρνητικές, με τη θετικότητα να αξιολογείται βάση του πόσο ο φθορισμός ήταν ασθενής ή έντονος. Σήμερα η πλήρης κατανόηση των σημάτων φθορισμού επιτρέπει την αξιολόγηση του ασθενούς ή ισχυρού φθορισμού σε πραγματικές τιμές που εκφράζουν την ποσότητα του φθορισμού και κατά συνέπεια την ποσότητα του αντιγόνου που ανιχνεύουμε μέσω της δοκιμασίας. Η μέθοδος η οποία περιγράφεται παραπάνω, ονομάζεται κυτταρομετρία ποσοτικού φθορισμού [Quantitative Fluorescence Cytometry (QFCM)]. Η

μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί ένα διάλυμα αναφοράς που συνήθως περιέχει μικροσφαιρίδια σημασμένα με τη φθορίζουσα ουσία που θεωρείται κατάλληλη ανά περίπτωση. Ανάλογα με το διάλυμα αναφοράς προκύπτει ένα διάγραμμα βαθμονόμησης, βάση του οποίου πραγματοποιείται αντιστοίχιση μέσω της οποίας προκύπτει η ποσότητα της φθορίζουσας ουσίας [Vogt, et al, 2001].

Η ποσότητα του φθοριοχρώματος στα κύτταρα που έχουν επεξεργαστεί με τη χρήση χρωστικής είναι σχετικά μικρή και επομένως είναι αναγκαίο να εκφράζεται η ένταση του φθορισμού στα υπό εξέταση μόρια [Fluorescence Intensity (FI)]. Τα σωστά βαθμονομημένα πρότυπα μικροσωματιδίων για κυτταρομετρία ροής που αναφέραμε παραπάνω, το επιτυγχάνουν καθώς εκφράζουν την ένταση του φθορισμού σε μονάδες που καλούνται μόρια ισοδύναμου διαλυτού φθοριοχρώματος [Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome (MESF)]. Τα ιστογράμματα φθορισμού έχουν βαθμονομηθεί σε τιμές MESF αναλύοντας τα κατάλληλα πρότυπα. Επειδή στο εμπόριο υπάρχει πλήθος επιλογών πρότυπων μικροσφαιριδίων, η επιλογή αυτών γίνεται στην πράξη βάσει της φύσης του δείγματος και των αναγκών της ανάλυσης που εκτελείται [Vogt, et al, 2001].

Η τιμή του MESF εν κατακλείδι αντιπροσωπεύει την ποσότητα των συμπλόκων φθορισμού που έχουν συνδεθεί στο κύτταρο, επειδή όμως αυτά τα σύμπλοκα είναι αντισώματα εναντίον αντιγόνων του κυττάρου, εισάγεται ο όρος ικανότητα δέσμευσης αντισώματος [Antibody Binding Capacity (ABC)] που χρησιμοποιείται για να υποδηλώσει τον αριθμό των συμπλόκων μορίων που έχουν συνδεθεί σε ένα κύτταρο όταν όλοι οι υποδοχείς του έχουν δεσμευθεί. Επομένως, το ABC εκφράζει έναν δείκτη της δέσμευσης του υποδοχέα. Τα μεγέθη που αναφέρθηκαν μεταφράζουν τελικά την ποσοτική ένταση φθορισμού. Τα εργαστηριακά ευρήματα αξιολογούνται σε συνάρτηση με την καμπύλη βαθμονόμησης του προτύπου διαλύματος φθορίζουσας ουσίας που χρησιμοποιείται, καθώς διαφορετικά είδη ερευνητικών τεχνικών και προτύπων δειγμάτων χρησιμοποιούνται για διαφορετικές αναλυτικές προσεγγίσεις [Vogt, et al, 2001].

Οι κλινικές εφαρμογές που απαιτούν τον ποσοτικό προσδιορισμό αντιγόνων αυξάνεται συνεχώς και αφορά την έκφραση ποικίλων αντιγόνων όπως το CD20 στην Β Χρόνια Λεμφοκυτταρική Λευχαιμία ή το CD64 σε φαινόμενα σήψης. Μία άλλη ομάδα αντιγόνων που εκφράζονται σε ετερογενή επίπεδα έντασης φθορισμού είναι τα CD38, CD69, HLA-DR, CD25. Επίσης, η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των CD3 και CD7 έχει διαγνωστική αξία για την Τ-Οξεία Λεμφοβλαστική Λευχαιμία. Όλα τα ανωτέρω περιγράφουν τη δυναμική της κυτταρομετρίας ροής στην Αιματολογία [Orfao, et al, 2006].

1.4 Μέρη του οργάνου κυτταρομετρίας ροής

Οι σύγχρονες συσκευές κυτταρομετρίας ροής έχουν την ικανότητα ανάλυσης χιλιάδων γεγονότων (events) - σωματιδίων ανά δευτερόλεπτο και κάποιες από αυτές έχουν επιπλέον ικανότητα διαχωρισμού αλλά και απομόνωσης σωματιδίων με συγκεκριμένες ιδιότητες που πιθανόν να ενδιαφέρουν διαγνωστικά. Μια συσκευή κυτταρομετρίας ροής μπορεί να παρομοιαστεί με ένα μικροσκόπιο, με τη διαφορά ότι αντί να αποδίδει την εικόνα του κυττάρου, παρέχει δεδομένα για τα κυτταρικά χαρακτηριστικά ενός μεγάλου πληθυσμού κυττάρων σε χρονικό διάστημα μερικών δευτερολέπτων.

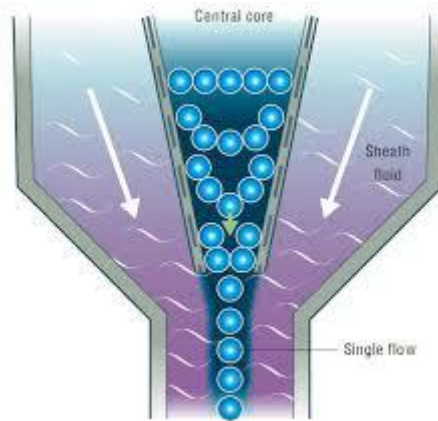
Ένας κυτταρομετρητής ροής αποτελείται από τρία κύρια συστήματα:

- Σύστημα Ροής
- Οπτικό Σύστημα
- Σύστημα ανίχνευσης επεξεργασίας και μετατροπής των χαρακτηριστικών σε ηλεκτρονικό σήμα [Shapiro, 2003].

Τα σύγχρονα όργανα διαθέτουν δύο έως τέσσερα λέιζερ και αντίστοιχους ανιχνευτές φθορισμού (το μέγιστο είναι τέσσερα λέιζερ και εικοσιτέσσερις παράμετροι φθορισμού). Τα περισσότερα λέιζερ και οι ανιχνευτές φθορισμού επιτρέπουν την πολλαπλή σήμανση με τη βοήθεια αντισωμάτων και συνεπώς κάνουν δυνατή την ακριβή ταυτοποίηση των κυτταρικών πληθυσμών, που αποτελεί διαγνωστικό στόχο, βάσει του φαινοτύπου τους. Κάποια όργανα μπορούν ακόμα και να απεικονίσουν μεμονωμένα κύτταρα, έτσι ώστε να προσδιορίζεται η πηγή του σήματος φθορισμού εντός των κυττάρων ή πάνω στην επιφάνειά τους [Givan, 2001].

- Σύστημα Ροής

Πρόκειται για ένα υδραυλικό σύστημα, που εξαναγκάζει τα κύτταρα ή τα σωματίδια να ρέουν το ένα μετά το άλλο μπροστά από μια ακτίνα Laser, απορροφώντας τα από το εναιώρημα εργασίας. Αυτό επιτυγχάνεται με την εισαγωγή του δείγματος στο κέντρο ενός καναλιού στο οποίο ρέει ένα αδρανές υγρό (Sheath Fluid), αυτό με τη σειρά του δημιουργεί ένα περίβλημα, μεταφέρει και τακτοποιεί τα κύτταρα έτσι ώστε να περνούν στη σειρά μπροστά από τη δέσμη του λέιζερ. Το κανάλι είναι κατάλληλα σχεδιασμένο προκειμένου το δείγμα να ρέει κατά μήκος του κεντρικού του άξονα περιβαλλόμενο από το αδρανές υγρό χωρίς να αναμιγνύεται, δηλαδή σαν να βρίσκεται μέσα σε μια θήκη. Το κανάλι τοποθετείται μέσα στον θάλαμο ροής. Εκεί, ανάλογα με τις υδροδυναμικές ρυθμίσεις, επιτυγχάνεται η εστίαση, έτσι ώστε το κύτταρο ή το σωματίδιο να έρχεται σε επαφή με την ακτίνα Laser με προσέγγιση 1 μm , (Εικόνα 1) [Shapiro, 2003].



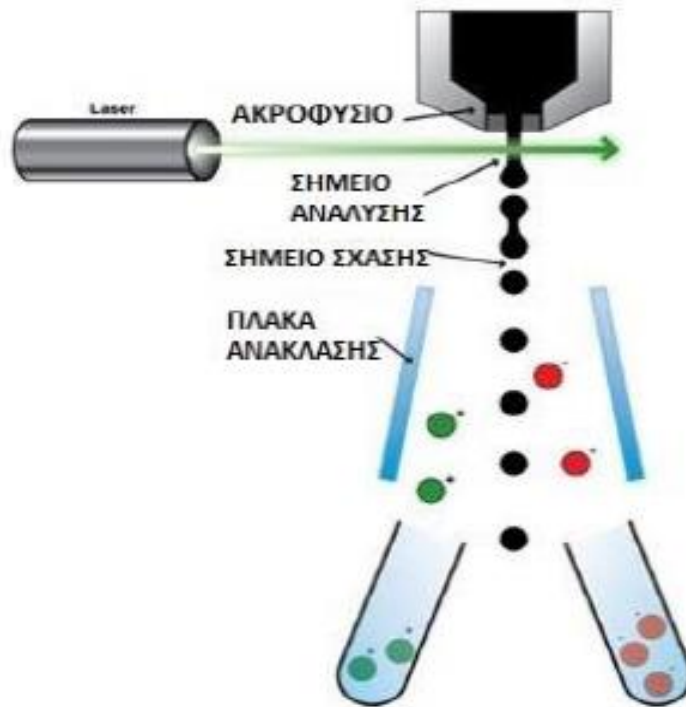
Εικόνα 1. Απεικόνιση του συστήματος ροής [http://www.abdserotec.com/flow-cytometry].

Οι θάλαμοι ροής διακρίνονται σε θαλάμους νηματικής ροής (luminar flow) και σε θαλάμους στροβιλώδους ορίου (turbulent boundary), ανάλογα με την υδροδυναμική τους αρχή. Επίσης, οι θάλαμοι ροής διακρίνονται και σε θαλάμους ανάλυσης (analytical chambers), για κυτταρομετρητές μέτρησης της σκέδασης και του φθορισμού και σε θαλάμους διαλογής (sorting chambers), για αυτούς που διαθέτουν και σύστημα διαλογής κύτταρων ή σωματιδίων από το υγρό εξέτασης [Dominical, et al, 2016].

- **Κυτταροδιαχωριστές**

Πολλοί κυτταρομετρητές μπορούν να λειτουργήσουν και ως κυτταροδιαχωριστές. Διαχωρίζουν δηλαδή κύτταρα συγκεκριμένων χαρακτηριστικών από το δείγμα, τα οποία μπορούν να εξεταστούν με άλλη μέθοδο ή να μελετηθούν κι άλλες παράμετροι. Αυτό γίνεται φορτίζοντας τα κύτταρα αφού περάσουν από το σημείο ανάλυσης και στην συνέχεια με ηλεκτρομαγνητισμό συλλέγονται σε ξεχωριστό θάλαμο ή σε άλλο φιαλίδιο δείγματος [Herzenberg, et al, 2002].

Συγκεκριμένα, το στόμιο από το οποίο βγαίνει το δείγμα μετά τον θάλαμο ροής δονείται με τέτοιο τρόπο ώστε η ροή να διασπάται σε σταγονίδια, που το καθένα περικλείει ένα κύτταρο. Μόλις προσμετρηθεί κύτταρο που πρέπει να απομονωθεί, το σταγονίδιο που το εμπεριέχει φορτίζεται αποκτώντας ηλεκτρικό φορτίο. Αμέσως μετά οι πλάκες ανάκλασης παράγουν ηλεκτρικό πεδίο και απωθούν τα φορτισμένα σταγονίδια ώστε να συλλεχθούν σε ξεχωριστή περιοχή κι απ' την άλλη πλευρά τα μη φορτισμένα συνεχίζουν την πορεία τους (Εικόνα 2). Τελικά ανάλογα με το εάν φορτιστούν θετικά ή αρνητικά, αλλά και το πόσο φορτίο φέρουν τα σταγονίδια, μπορεί να επιτευχθεί διαχωρισμός περισσότερων από δύο κυτταρικών πληθυσμών σε διαφορετικά σωληνάκια [Ibrahim, Engh, 2007].



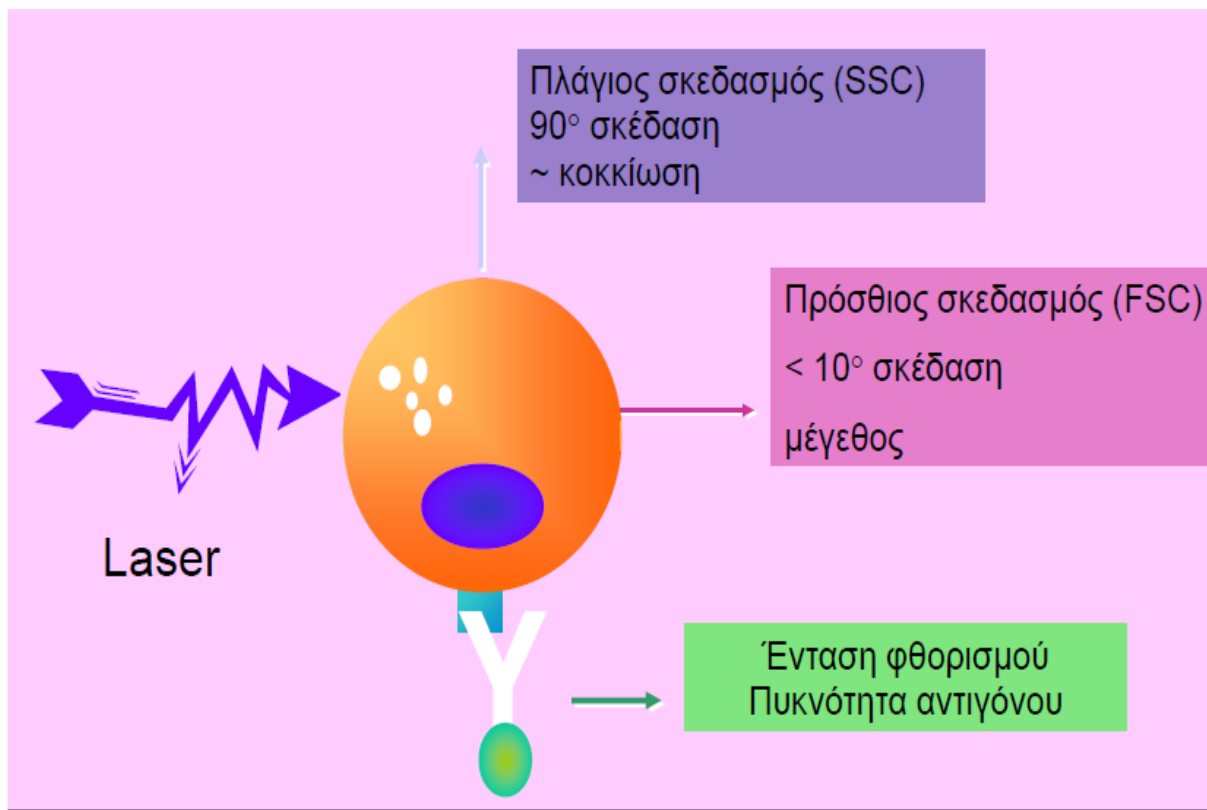
Εικόνα 2. Απλοποιημένη σχηματική αναπαράσταση λειτουργίας κυτταροδιαχωριστή.

[<https://www.abcam.com>].

➤ Οπτικό Σύστημα

Το σύστημα αυτό συλλέγει τα φωτεινά σήματα που εκπέμπονται από τα κύτταρα όταν προσπίπτει πάνω τους η δέσμη φωτός της λυχνίας. Στη συνέχεια αναλύεται η συλλεγόμενη ακτινοβολία, η οποία αντιστοιχεί στη σκέδαση του φωτός και στον εκπεμπόμενο φθορισμό καθορισμένης έντασης με βάση το φθοριόχρωμα [Ibrahim, Engh, 2007].

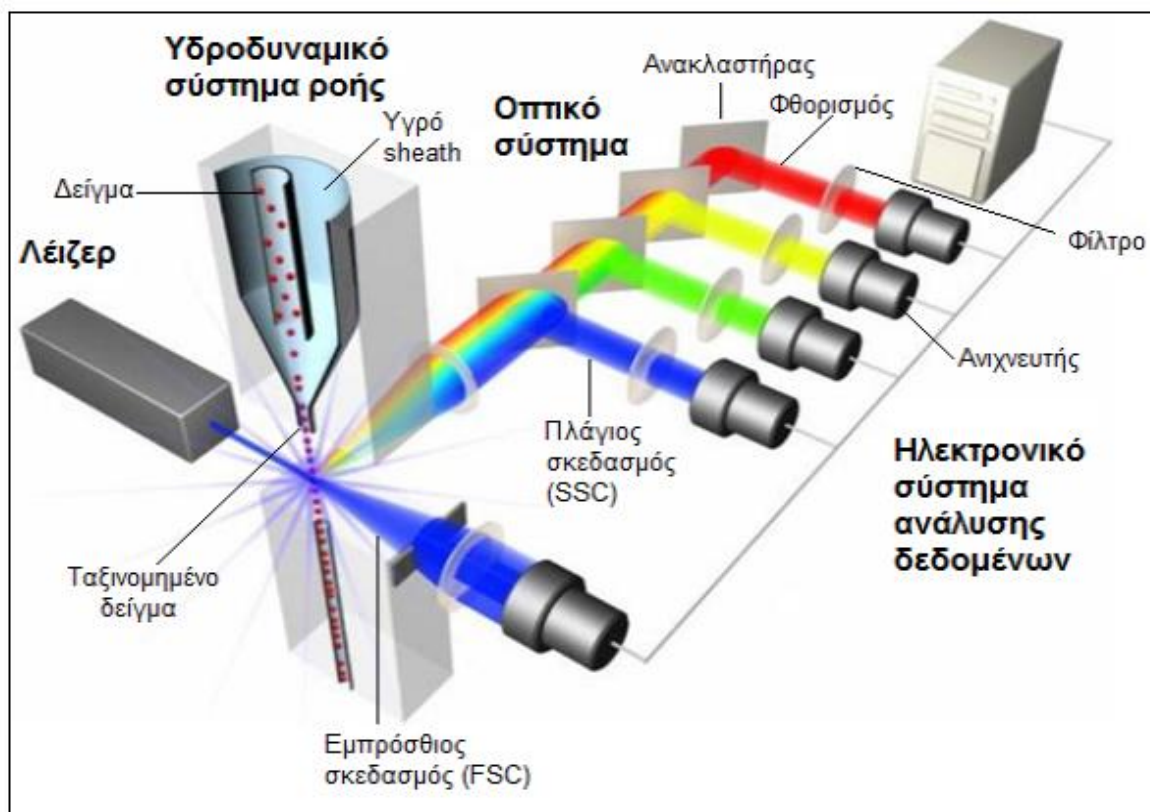
Η σκέδαση του φωτός δημιουργείται όταν το κύτταρο ή το σωματίδιο δέχεται την κάθετη προς τη κατεύθυνση ροής, δέσμη της λυχνίας. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία απορροφάται κατά ένα μέρος από το κύτταρο και κατά το υπόλοιπο σκεδάζεται προς όλες τις κατευθύνσεις. Η ακτινοβολία που σκεδάζεται στην κατεύθυνση της προέκτασης (ευθεία γραμμή) της ακτίνας Laser με γωνία 1-20 μοίρες, ονομάζεται πρόσθια σκεδαζόμενη ακτινοβολία (Forward Light Scatter, FSC) και είναι ανάλογη προς το μέγεθος του κυττάρου ή του σωματιδίου. Η ακτινοβολία που σκεδάζεται σε κατεύθυνση κάθετη προς τον άξονα της ακτίνας Laser, με γωνία 90 μοίρες, ονομάζεται κάθετη ή πλάγια σκεδαζόμενη ακτινοβολία (Right Angle Scatter or Side Scatter, SSC) και είναι ανάλογη προς την κοκκίωση (granularity) του κυττάρου ή των σωματιδίων (εικόνα 3) [Shapiro, Telford, 2009].



Εικόνα 3. Οπτικό σύστημα και κύτταρο – σωματίδιο [https://slideplayer.gr/slide/11177237].

Όταν κατά τη διάρκεια προετοιμασίας του δείγματος τα κύτταρα ή τα σωματίδια σημανθούν με φθορίζουσες ουσίες, όπως είναι η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη - FITC (πράσινο), η τετραμεθυλοροδαμίνη, η R φυκοερυθρίνη PE (κόκκινο), η περιδινούχος χλωροφύλλη A πρωτεΐνη (peridinin chlorophyll) PerCP, Texas Red ή άλλες φθορίζουσες ουσίες προσδεμένες στα μονοκλωνικά αντισώματα, παράγεται φθορισμός. Τα φθοριοχρώματα αυτά διεγείρονται από την προσπίπτουσα ακτινοβολία (διεγείρουσα) και στη συνέχεια εκπέμπουν ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος της διεγείρουσας, το οποίο είναι χαρακτηριστικό για κάθε φθοριόχρωμα [Shapiro, Telford, 2018].

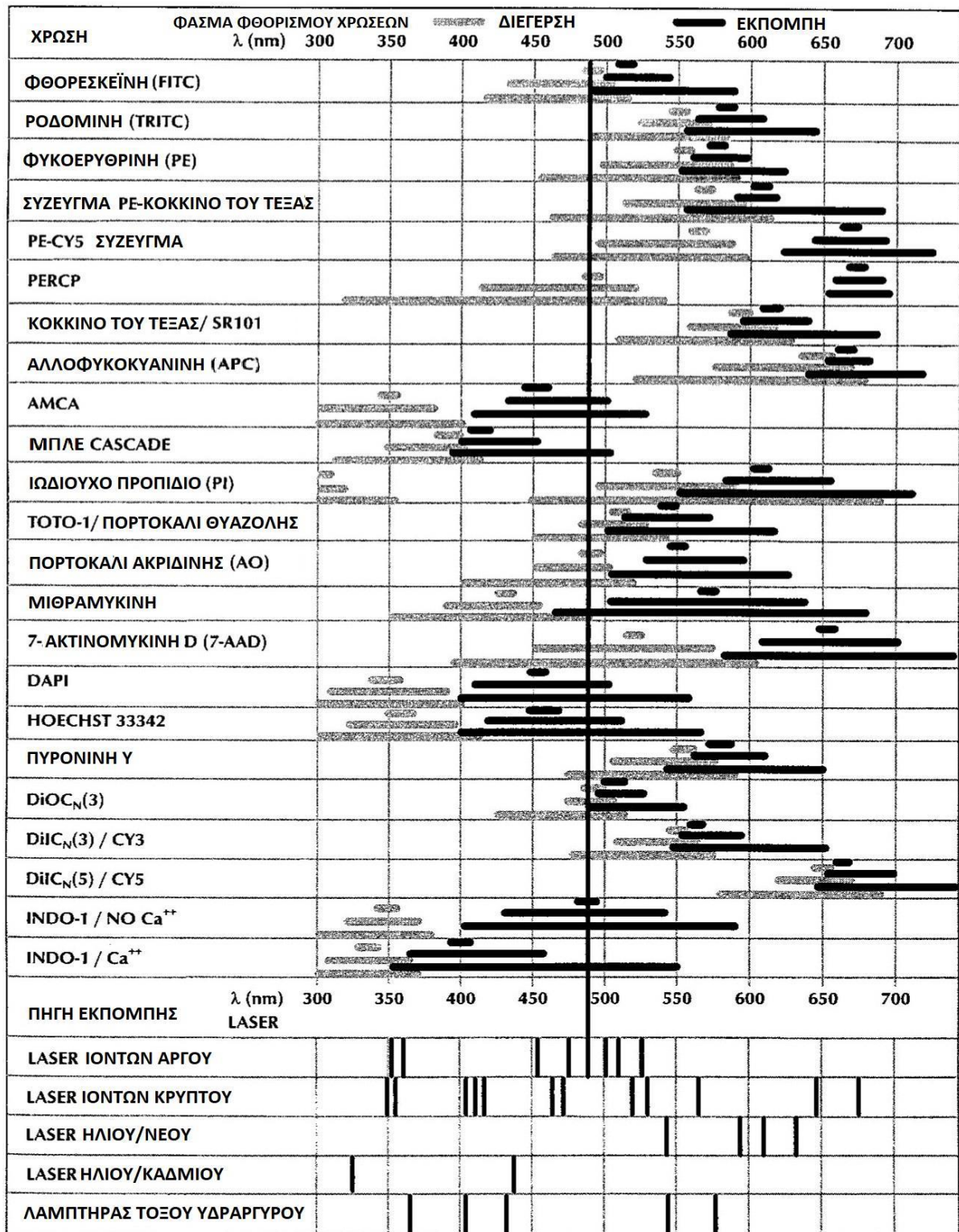
Από τα φθοριοχρώματα που αναφέρθηκαν η FITC παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση και διεγείρεται στα 495 nm ενώ η PE στα 495 και 550 nm. Ακτινοβολία μήκους κύματος 488 nm με λέιζερ αργού διεγείρει και τις δύο χρωστικές και η μεν FITC εκπέμπει μέγιστο φθορισμό FL1 στα 520 nm (πράσινος φθορισμός), η δε PE εκπέμπει μέγιστο φθορισμό FL2 στα 575 nm (κόκκινος φθορισμός). Οι δύο διαφορετικοί φθορισμοί FL1 και FL2 συλλέγονται, αναλύονται και μετρούνται με κατάλληλα συστήματα διχροϊκών κατόπτρων και φίλτρων. Τα διχροϊκά κάτοπτρα είναι τοποθετημένα στην πορεία της φωτεινής δέσμης υπό γωνία 45 μοίρες ενώ τα φίλτρα είναι τοποθετημένα κάθετα (Εικόνα 4) [Givan, 2001].



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση της οπτικής διάταξης ενός κυτταρομετρητή ροής. Απεικονίζεται μία πηγή - Laser ιόντων αργού (488 nm) και επίσης τέσσερις φωτοπολλαπλασιαστές για την ανίχνευση των τεσσάρων φθοριοχρωμάτων (FITC, PE, ECD/PI και PC5/PercP/PC5.5). [<https://www.kyttarometria.gr/fc.html>].

Οι χρωστικές PE, FITC, PerCP μπορούν να συνδεθούν με κατάλληλα μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα που αναγνωρίζουν τις αντιγονικές καθορίζουσες της κυτταρικής ή της ενδοκυττάριας επιφάνειας. Με αυτόν τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα της ανίχνευσης των καθοριζουσών στην επιφάνεια του καθενός από τα μετρούμενα κύτταρα, με αποτέλεσμα τη δυνατότητα χαρακτηρισμού και ταξινόμησης του κάθε κυττάρου σε υποπληθυσμούς, σύμφωνα με τους συνδυασμούς που έχουν σχεδιαστεί. Με την ολοκλήρωση των μετρήσεων των φωτεινών σημάτων σκέδασης και φθορισμού, σε κάθε κύτταρο αντιστοιχεί μια τετράδα τιμών (FSC, SSC, FL1, FL2) η οποία μας δίνει τα δεδομένα για το μέγεθος, την κοκκίωση και τον βαθμό έκφρασης των δύο αντιγονικών καθοριζουσών. Υπάρχει ακόμη το PC5 που εκεί αρχίζει το κόκκινο χρώμα στα 488-665 nm στο κανάλι FL3 και επίσης στο κόκκινο χρώμα το APC (allophycocyanin) εκπέμπει στο FL4 κανάλι. Εκτός από τα φθοριοχρώματα το κυτταρόμετρο περιλαμβάνει και τα lasers. Οι πλέον κοινές πηγές είναι τρεις, η Ultraviolet (UV) εκπέμπει στα 350 nm με χρώμα ιώδες, η Argon εκπέμπει στα 488 nm με χρώμα μπλέ

και η Helium neon (He Ne), που εκπέμπει στα 630 nm με χρώμα κόκκινο (Πίνακας 2) [Givan, 2001].



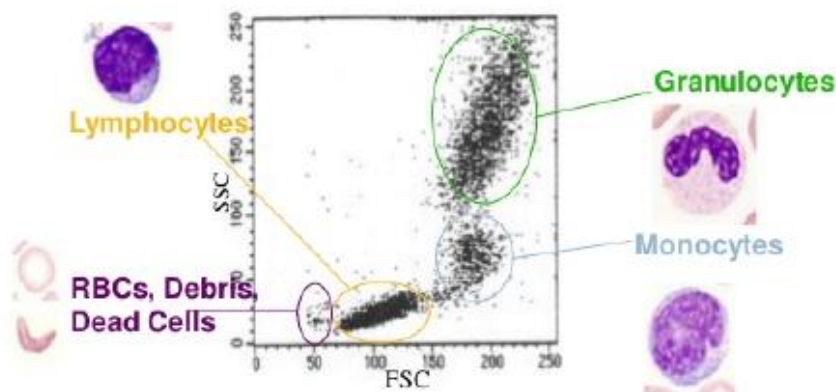
Πίνακας 2. Τα περισσότερο χρησιμοποιούμενα φθοριοχρώματα (απορρόφηση και εκπομπή) – Μήκη κύματος εκπομπής μερικών πηγών laser [Givan, 2001].

- Σύστημα ανίχνευσης επεξεργασίας και μετατροπής των χαρακτηριστικών σε ηλεκτρονικό σήμα

Στους κυτταρομετρητές χρησιμοποιούνται δύο συστήματα ανίχνευσης των φωτεινών δεδομένων που προέρχονται από τη σκέδαση και τον φθορισμό:

- οι φωτοδιόδοι (PIN diodes) και
- οι φωτοπολλαπλασιαστές (photomultiplier tubes, PMTs)

Οι φωτοδιόδοι έχουν ευαισθησία στις μετρήσεις FSC (Forward Light Scatter) και SSC (Side Light Scatter), ενώ παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία στον φθορισμό. Οι φωτοπολλαπλασιαστές αν και μικρότερου φάσματος, διαθέτουν (συγκρινόμενοι με τις PIN) μεγαλύτερη ευαισθησία, όχι μόνο στις μετρήσεις FSC και SSC, αλλά και στον φθορισμό (Εικόνα5). Το παλμικό σήμα που παράγεται μένει στην έξοδο για 15-20 μsec. Κατά τη διάρκεια αυτού του χρονικού διαστήματος, το οποίο λέγεται νεκρός χρόνος, δεν καταγράφονται άλλα σήματα στο σύστημα. Αυτό, έχει ως αποτέλεσμα ο παρατεταμένος χρόνος να επηρεάζει κυρίως τη διαλογή και σε μικρότερο βαθμό την αναλυτική ικανότητα του κυτταρομετρητή [Becton, Dickinson and Company, 2002].



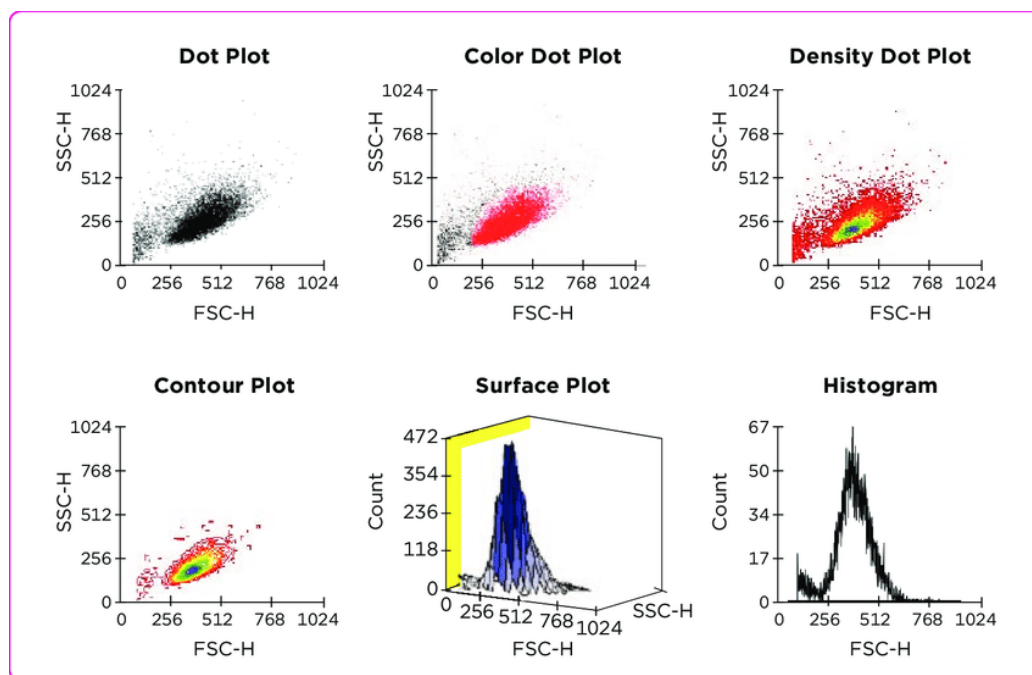
Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση των κυτταρικών πληθυσμών περιφερικού αίματος μετά από τη λύση των ερυθρών, με βάση τα σκεδαστικά χαρακτηριστικά μεγέθους και κοκκίωσης (FSC/SSC). Διακρίνονται οι πληθυσμοί των πολυμορφοπύρηνων, μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων [<https://www.backbonebiology.com/flow-cytometry>].

Το παλμικό σήμα αναλύεται ως προς το ύψος, το πλάτος και την επιφάνεια δίνοντας έτσι πληροφορίες για το μέγεθος, την κοκκίωση και τον φθορισμό των κυττάρων ή σωματιδίων. Η επεξεργασία μπορεί να γίνει είτε γραμμικά, είτε λογαριθμικά μετά από χρήση ενισχυτή (amplifier). Με αυτόν τον τρόπο έχουμε ενίσχυση των ασθενών σημάτων και ταυτόχρονα

περιορισμό των ενδείξεων που αντιστοιχούν στα ισχυρά σήματα. Έτσι, όλες οι τιμές λαμβάνονται στην ίδια κλίμακα. Τα δυαδικά αυτά σήματα μεταβιβάζονται στη μνήμη ηλεκτρονικού υπολογιστή, ώστε να ακολουθήσουν οι ανάλογες επεξεργασίες των δεδομένων (εικόνα 6) [Becton, Dickinson and Company, 2002].

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι παρουσίασης των αποτελεσμάτων όπως φαίνεται στην Εικόνα 6, τα κυτταρογράμματα (Dot Plot), τα οποία σχετίζουν δύο παραμέτρους και χρησιμοποιούνται ευρέως. Άλλοι τρόποι παρουσίασης και επεξεργασίας των αποτελεσμάτων είναι τα εξής διαγράμματα:

- κατανομής συχνοτήτων ή Ιστόγραμμα
- ισοϋψών καμπυλών
- ισομετρικών καμπυλών
- όψης διαμαντιού [Βαρθολομάτος, 2007].

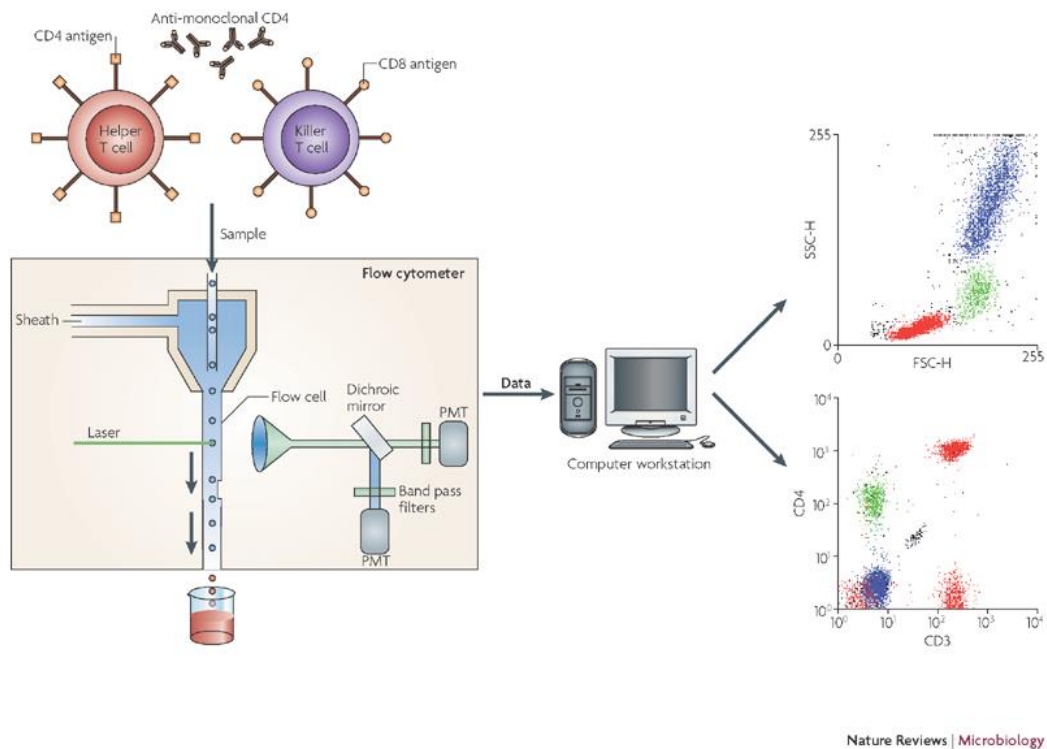


Εικόνα 6. Σχηματική παράσταση των διαφόρων τρόπων παρουσίασης των δεδομένων του κυτταρομετρητή: Ιστογράμματα, Dot Plot, Surface 3D, Density Plot, Contour Plot.

[https://www.researchgate.net/figure/Types-of-data-analysis-plots-SSC-H-side-scatter-histogram-FSC-H-forward-scatter_fig2_283200576].

Τα διαγράμματα αυτά προσφέρουν στον χρήστη τη δυνατότητα εντοπισμού και ανάλυσης ακόμη και του μικρότερου παθολογικού ή μη πληθυσμού. Στη συνέχεια ο βιοεπιστήμονας, χρησιμοποιώντας τα προγράμματα στατιστικής ανάλυσης των δεδομένων και τη δυνατότητα

οριοθέτησης ορισμένων περιοχών στα κυτταρογράμματα (gate – ηλεκτρονικό παράθυρο) έχει τη δυνατότητα να αναλύσει και να εξάγει συμπεράσματα από την οριοθετημένη περιοχή. Η στατική ανάλυση βεβαίως αναφέρεται στον συγκεκριμένο υποπληθυσμό. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται ο «εμπλουτισμός» του εξεταζόμενου δείγματος σε κύτταρα ή σωματίδια [Πάγκαλης, 2008]. Στην εικόνα 7, παρουσιάζεται ανακεφαλαιωμένη η διενέργεια μιας εξέτασης με κυτταρομετρία ροής



Εικόνα 7. Σχηματική παράσταση της διαδικασίας εκτέλεσης και λήψης αποτελέσματος της κυτταρομετρίας ροής [Nature Reviews / Microbiology].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

Μικροβιακή κυτταρομετρία: τι είναι και τι μπορεί να γίνει στο άμεσο μέλλον

2.1 Εισαγωγή

Στη μικροβιολογία έχουν συντελεστεί σημαντικές αλλαγές τις τελευταίες δεκαετίες. Οι παραδοσιακές μέθοδοι βακτηριολογίας και μυκητολογίας απαιτούν αρχικά την απομόνωση του μικροοργανισμού και στη συνέχεια την ταυτοποίησή του με άλλες ειδικές δοκιμές. Στις πιο πολλές περιπτώσεις, το αποτέλεσμα της καλλιέργειας των μικροοργανισμών διατίθεται σε 48 έως 72 ώρες. Επιπρόσθετα η απομόνωση ενός ιού σε κυτταροκαλλιέργειες και η ανίχνευση των ειδικών αντισωμάτων έχει χρησιμοποιηθεί συχνά για να διαγνωστούν πιθανές ιογενείς λοιμώξεις [Weinstein, et al, 2007]. Αυτές οι μέθοδοι είναι πολύ ευαίσθητες και σαφώς καθορισμένες, αλλά ο χρόνος που είναι απαραίτητος για την απομόνωση του παθογόνου ιού είναι αρκετά μεγάλος και εξαρτάται άμεσα από τον χρόνο πολλαπλασιασμού του.

Επίσης, οι ορολογικές δοκιμασίες σε δείγματα ασθενών με λοίμωξη έχουν συχνά περιορισμούς που σχετίζονται με την ειδικότητα και την ευαισθησία. Οι απειλητικές για τη ζωή λοιμώξεις απαιτούν άμεση θεραπεία και συνεπώς απαιτούνται κυρίως ταχείες και ακριβείς διαγνωστικές εξετάσεις και νέες διαδικασίες που να μην απαιτούν καλλιέργεια ή να ανιχνεύουν την παρουσία αντιγόνων του μικροοργανισμού ή την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή. Η εφαρμογή των σύγχρονων τεχνικών της μοριακής βιολογίας, με τη χρήση των ανιχνευτών νουκλεϊκού οξέος, σε συνδυασμό με τεχνικές ενίσχυσης του αποτελέσματος, έχει δώσει εκτός από μεγαλύτερη ειδικότητα και την ταχύτητα που απαιτείται στην τελική διάγνωση [Fouchet, et al, 1993].

Στην οργάνωση των εργαστηρίων μικροβιολογίας δίνεται βαρύτητα πλέον στην αυξημένη χρήση του αυτοματισμού για την ταυτοποίηση, τον έλεγχο της ευαισθησίας στα αντιμικροβιακά καθώς και την ανίχνευση των αντισωμάτων. Ο εξοπλισμός που απαιτείται για όλες αυτές τις προσεγγίσεις είναι ποικίλος, με υψηλό κόστος, τόσο σε όργανα όσο και σε αναλώσιμα υλικά και αντιδραστήρια. Τα τελευταία χρόνια οι μικροβιολογικές τεχνικές συμπληρώνονται όλο και περισσότερο από τεχνολογίες όπως η κυτταρομετρία ροής η οποία στην πράξη αποδεικνύεται ως πολλά υποσχόμενη πρακτική [Fouchet, et al, 1993].

2.2 Γενικές αρχές προετοιμασίας των βακτηριακών κυττάρων για τις κυτταρομετρικές αναλύσεις

Τα τελευταία σαράντα χρόνια η κυτταρομετρία ροής εφαρμόζεται όχι μόνο στον τομέα της Αιματολογίας, αλλά και στη Μικροβιολογία, με καλά αποτελέσματα αλλά και με πολλές δυσκολίες. Ειδικότερα, τα προβλήματα που ανακύπτουν σχετίζονται, εκτός από το θέμα του κόστους, με τη δυσκολία μέτρησης των μικροβίων στη ροή, λόγω του μικρού τους μεγέθους. Αυτό έχει επιφέρει την ανάπτυξη οργάνων που μπορούν να υπερκεράσουν αυτόν τον περιορισμό του κλασικού εξοπλισμού που χρησιμοποιείται για την κυτταρομετρία ροής ρουτίνας σε διαφορετικούς τομείς από τη μικροβιολογία (Εικόνα 8) [Hiom, et al, 2013].



Εικόνα 8. Εξοπλισμός για ταχείες μικροβιολογικές εφαρμογές υψηλής απόδοσης.

Βασικό πλεονέκτημα της κυτταρομετρίας ροής είναι η δυνατότητα μέτρησης βακτηριακών κυττάρων που αδυνατούν να αναπτυχθούν σε στερεά θρεπτικά υλικά, πράγμα πολύ σημαντικό για τα περιβαλλοντικά δείγματα. Έτσι έχουμε συνεχώς περισσότερες εφαρμογές της σε:

- Μικροβιολογική έρευνα
- Βιομηχανία παραγωγής τροφίμων και στη φαρμακευτική βιομηχανία
- Περιβαλλοντικό έλεγχο (υδάτων, εδάφους κτλ.)

Η διαπερατότητα του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος εξαρτάται από διάφορους παράγοντες (θερμοκρασία, συνθήκες stress, φάση ανάπτυξης του κυττάρου, κ.α.), με πιθανές συνέπειες στην ποσότητα της χρωστικής-δείκτη που διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Το κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου βοηθάει στη διατήρηση της μορφής του κυττάρου και το προστατεύει από την ώσμωση, τις τοξικές ουσίες και τις αλλαγές του pH. Συμμετέχει στον μεταβολισμό του βακτηρίου και αποτελεί δίοδο των θρεπτικών ουσιών. Επίσης, συμμετέχει στην κυτταρική διαίρεση και την επικοινωνία με το περιβάλλον που βρίσκεται. Είναι απαραίτητο για την προσκόλληση του βακτηρίου σε επιφάνειες άλλων κυτταρικών

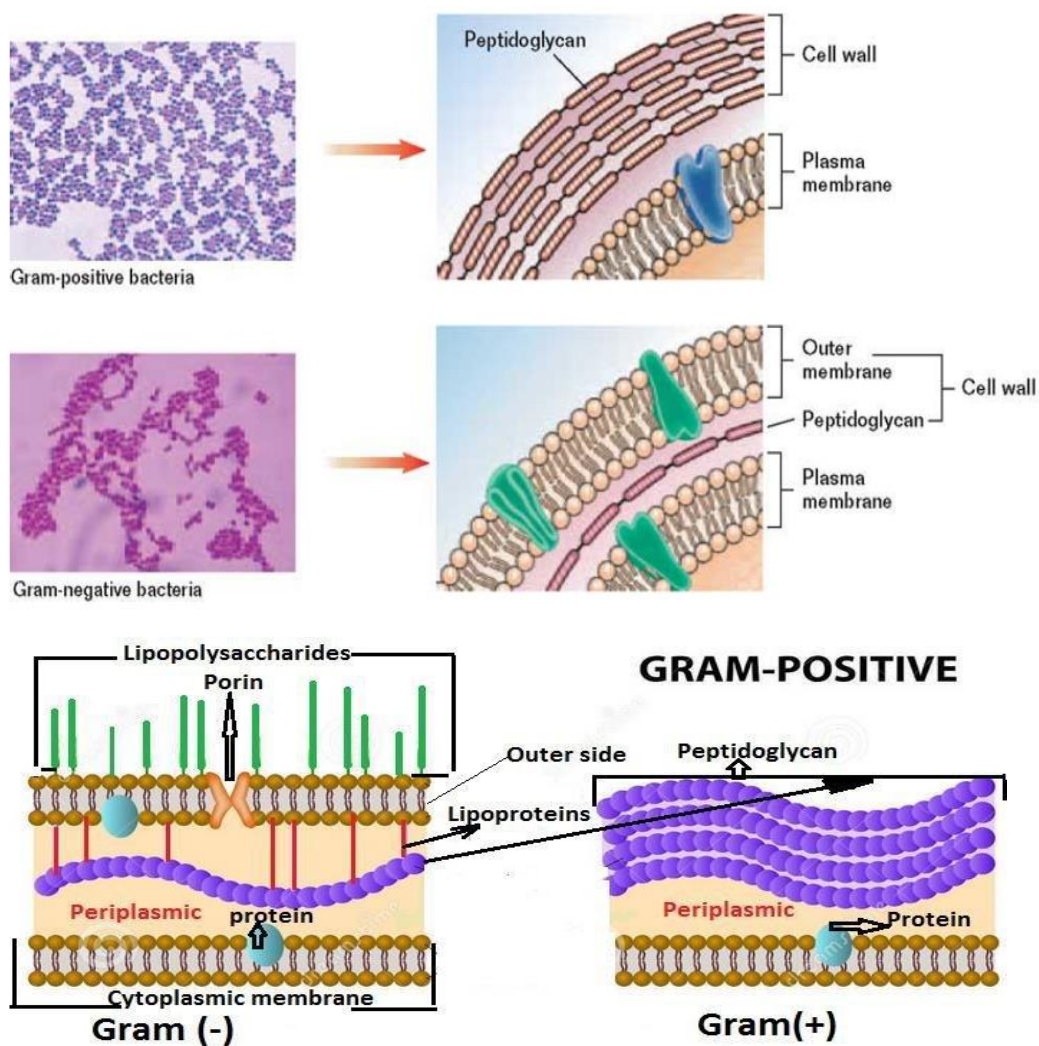
οργανισμών και για την κίνηση του στο σημείο πρόσδεσης με τις βλεφαρίδες και τα μαστίγια. Τέλος έχει συνδεθεί με τη λοιμογονικότητα μέσω των λιποπολυσακχαριτών του στα παθογόνα βακτήρια. Η διαπερατότητα του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος είναι γνωστό ότι επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, ως εκ τούτου η θέρμανση είναι η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον περιορισμό της μικροβιακής αύξησης. Για κάθε μικροοργανισμό υπάρχει ένα ανώτατο όριο θερμοκρασίας ανάπτυξης, ενώ η υπέρβαση αυτού του ορίου επιφέρει σταδιακά το κυτταρικό θάνατο [Greenwood et al, 2010].

Στην Εικόνα 9Α, παρουσιάζεται η διαφορά στη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος ενός βακτηρίου Gram (+) έναντι του βακτηρίου Gram (-). Το κυτταρικό τοίχωμα των Gram (+) βακτηρίων αποτελείται κυρίως από πεπτιδογλυκάνη έως 90% η οποία το καθιστά ισχυρό λόγω του δεσμού των τετραπεπτιδίων. Επιπλέον συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος στα Gram (+) βακτήρια είναι τα τειχοϊκά οξέα (teichoic acid). Τα γλυκοπολυμερή ενσωματωμένα στην πεπτιδογλυκάνη και τα τειχοϊκά οξέα έχουν σημαντικό ρόλο για τα βακτηριακά κύτταρα γιατί είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία του αρνητικού φορτίου, το οποίο είναι απαραίτητο για την κίνηση των πρωτονίων, τα οποία συντελούν στη συνολική ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος. Το γεγονός αυτό είναι σημαντικό για τη διατήρηση του σχήματος του κυττάρου, ιδιαίτερα σε μικροοργανισμούς σε σχήμα ράβδου. Επίσης συμμετέχουν στην κυτταρική διαίρεση αλληλοεπιδρώντας με τον μηχανισμό της βιοσύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης. Αυτά προσδίδουν αντοχή σε δυσμενείς συνθήκες όπως η υψηλή θερμοκρασία, το υψηλό pH ή στην παρουσία β-λακταμικών αντιβιοτικών [Madigan, et al, 2005].

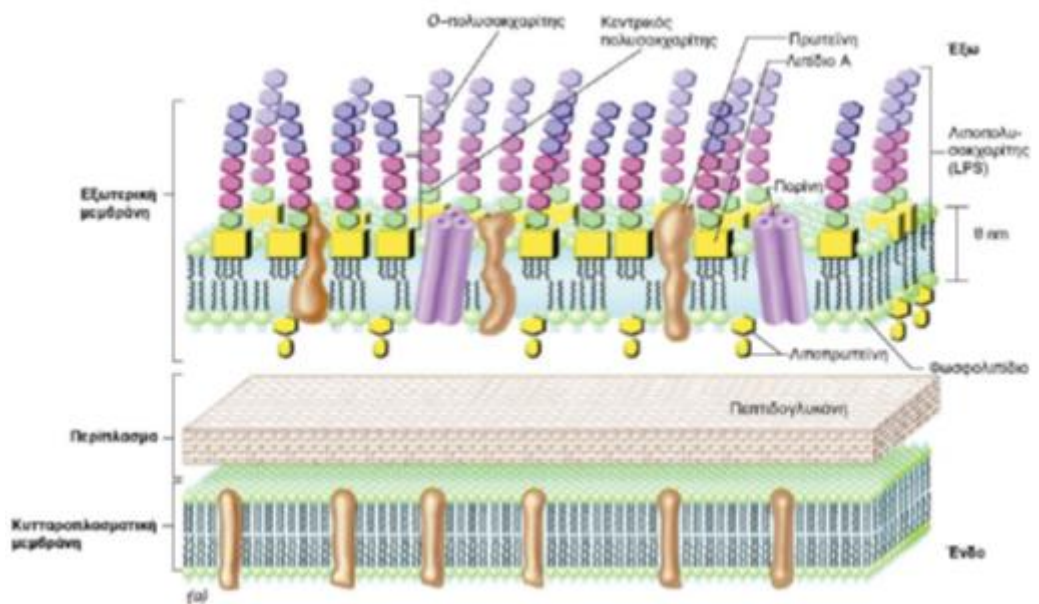
Η διαφορά στη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος είναι υπεύθυνη για την κατηγοριοποίηση με βάση τη χρώση κατά Gram (+/-) των βακτηρίων, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 9Α. Η διαφορά στη χρώση οφείλεται στο ότι η πεπτιδογλυκάνη του τοιχώματος, η οποία στα Gram (+) αποτελεί ένα παχύ στρώμα, εμποδίζει τον αποχρωματισμό και την έκπλυση του συμπλέγματος ιωδίου - κρυσταλλικού ιώδους με συνέπεια να «χρωματίζονται» μπλε. Το κυτταρικό τοίχωμα των Gram (-) βακτηρίων είναι πιο σύνθετο, αποτελείται από ένα λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης, το οποίο αντιπροσωπεύει το 5-10% του πάχους του και δεν περιέχει τειχοϊκά ή λιποτειχοϊκά οξέα. Εξωτερικά της πεπτιδογλυκάνης στα Gram (-) βρίσκεται μια ασύμμετρη διπλοστιβάδα (εξωτερική μεμβράνη) που διαφέρει από οποιαδήποτε άλλη βιολογική μεμβράνη. Περιέχει ένα εσωτερικό πέταλο με φωσφολιπίδια και ένα εξωτερικό πέταλο με λιποπολυσακχαρίτη (LPS). Ακολουθεί ο περιπλασματικός χώρος, που είναι η περιοχή μεταξύ της εξωτερικής μεμβράνης και του κυτταρικού τοιχώματος των Gram (-) βακτηρίων. Ο χώρος αυτός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα

βακτήρια καθώς αποθηκεύει μακρομόρια που είναι απαραίτητα για τον μεταβολισμό και περιέχει πρωτεΐνες που δεσμεύουν αμινοξέα, βιταμίνες, σίδηρο, διαθέτει επίσης και διάφορα ένζυμα όπως πρωτεάσες, φωσφατάσες, λιπάσες, νουκλεάσες και συστατικά του συστήματος μεταφοράς σιδήρου [Madigan, et al, 2005].

Οι πορίνες που βρίσκονται στα Gram (-) βακτήρια είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με τριμερείς υπομονάδες, οι οποίες δημιουργούν διαμεμβρανικές διόδους για να επιτρέπουν τη διάχυση των υδρόφιλων μορίων με μάζα <700 Da. Κάποιες από τις πορίνες είναι μη ειδικές και μεταφέρουν οποιοδήποτε μόριο, ενώ υπάρχουν άλλες μεταφέρουν μόνο ουσίες που αναγνωρίζουν τη θέση δέσμευσής τους (binding site) στο κύτταρο. Οι διαφορές ανάμεσα σε Gram (+) και Gram (-) σε ό,τι αφορά τις χρωστικές σχετίζονται στο γεγονός ότι οι υδρόφοβες χρωστικές εισχωρούν εύκολα στα Gram (+), ενώ οι υδρόφιλες στα Gram (-). Στην Εικόνα 9B, παρουσιάζεται η δομή του κυτταρικού τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηρίων [Madigan, et al, 2005].



Α. Κυτταροπλασματική μεμβράνη και κυτταρικό τοίχωμα Gram (+) και Gram (-) βακτηρίων.



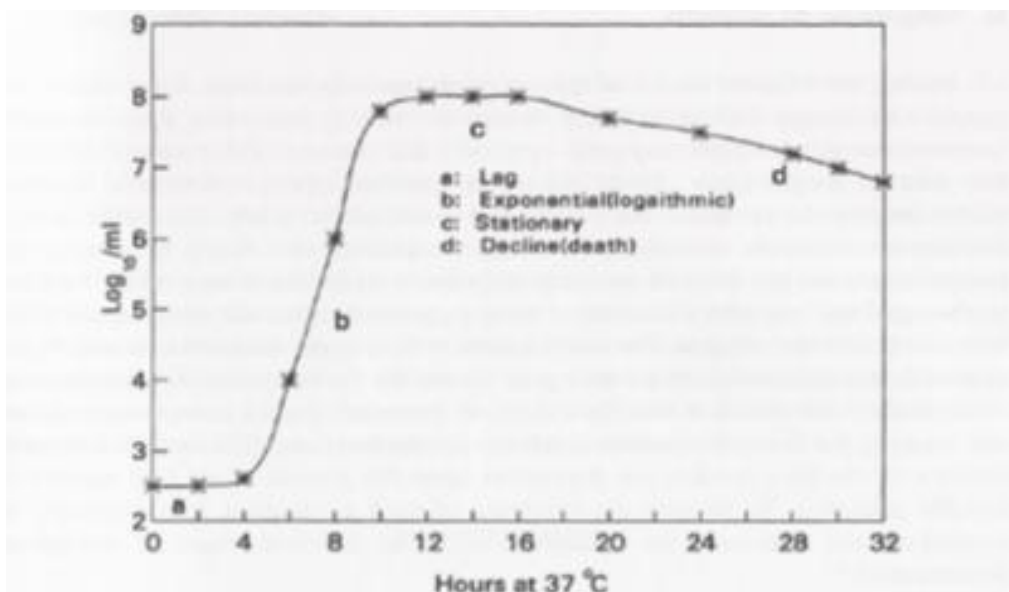
B. Το κυτταρικό τοίχωμα και η κυτταροπλασματική μεμβράνη των Gram (-) βακτηρίων.

Εικόνα 9 Α. Σχηματική απεικόνιση της σύστασης και της χρώσης κατά Gram του τοιχώματος και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των Gram (+) και Gram (-) βακτηρίων. **B.** Κυτταρικό τοίχωμα των Gram (-) βακτηρίων. Αν και συχνά αναφέρεται ως «δεύτερη λιπιδική διπλοστιβάδα», η αρχιτεκτονική της εξωτερικής μεμβράνης διαφέρει σημαντικά από την αντίστοιχη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Η διάταξη στην εξωτερική μεμβράνη περιλαμβάνει λιποπολυσακχαρίτες, λιπίδια, φωσφολιπίδια, πορίνες, και λιποπρωτεΐνες [Madigan, et al, 2005].

Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης είναι η φάση ανάπτυξης του βακτηρίου. Η καμπύλη ανάπτυξης των μικροβίων για να απεικονισθεί γίνεται μέτρηση σε στερεό υπόστρωμα των κυττάρων που αναπτύσσονται με βάση το χρόνο. Το αποτέλεσμα εκφράζεται σε log cfu/g ή cfu/ml, που είναι ο δεκαδικός λογάριθμος των κυττάρων (αποικίες που σχηματίζονται μετά την διασπορά σε στερεό υλικό και καταμετρούνται, cfu - colony forming units) ανά g ή ml. Ο ρυθμός ανάπτυξης είναι η μεταβολή του πληθυσμού των κυττάρων ανά μονάδα χρόνου. Επίσης, ο χρόνος διχοτόμησης ή γενεάς είναι ο χρόνος που απαιτείται για να διπλασιαστεί ο μικροβιακός πληθυσμός και εξαρτάται από το είδος του μικροοργανισμού, και τις περιβαλλοντικές συνθήκες (pH, θερμοκρασία, υγρασία, οξυγόνο, θρεπτικά συστατικά, τοξίνες άλλων μικροβίων, συντηρητικά- απολυμαντικά κτλ) [Paulton, 2010].

Οι φάσεις της καμπύλης ανάπτυξης περιλαμβάνουν τη φάση προσαρμογής (lag phase) που είναι η περίοδος προσαρμογής σε ένα νέο υπόστρωμα, σε νέες περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα κύτταρα αφομοιώνουν θρεπτικά συστατικά και παράγουν τα κατάλληλα ένζυμα και πρωτεΐνες κι ότι άλλο χρειάζονται για να επιβιώσουν στις συγκεκριμένες συνθήκες. Δεν

παρατηρείται αύξηση του αριθμού των κυττάρων. Η επόμενη φάση είναι η λογαριθμική ή εκθετική φάση ανάπτυξης (log or exponential phase) στην οποία τα κύτταρα πλέον αναπτύσσονται και αυξάνονται εκθετικά και γίνεται η κυτταρική διαίρεση. Ακολουθεί η φάση στασιμότητας (stationary phase) στην οποία η μικροβιακή ανάπτυξη επιβραδύνεται και τελικά σταματάει, λόγω της έλλειψης θρεπτικών ουσιών ή λόγω αντίξοων περιβαλλοντικών συνθηκών όπως είναι το pH, το οξυγόνο, η θερμοκρασία και ο μικροβιακός ανταγωνισμός. Και τέλος έχουμε τη φάση θανάτου (death phase), όπου πλέον τα κύτταρα θανατώνονται με αυτόλυση που είναι ο μη αντιστρεπτός προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος [Paulton, 2010].

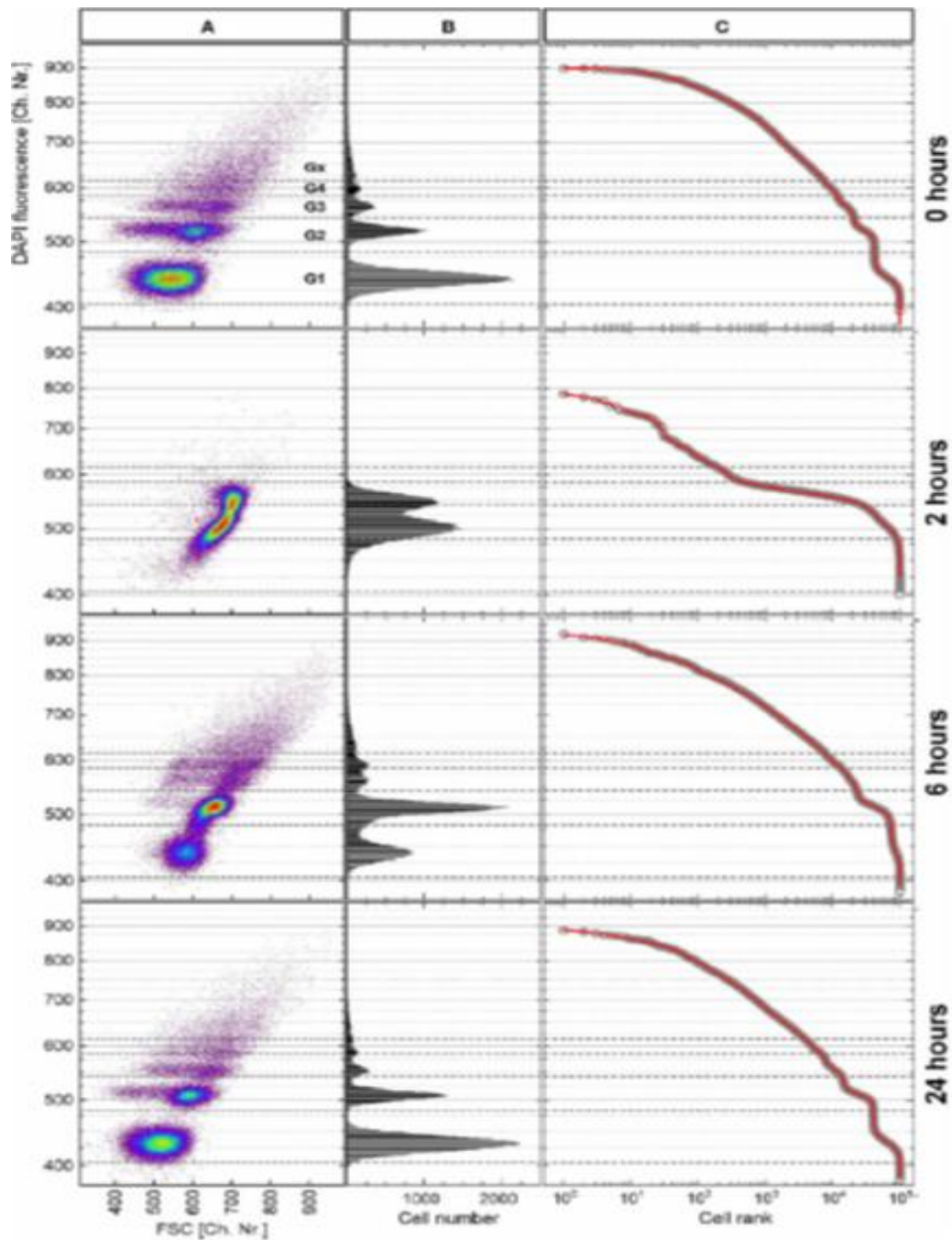


Εικόνα 10. Καμπύλη βακτηριακής ανάπτυξης όπου φαίνονται οι αριθμητικές αλλαγές στον πληθυσμό του *Pediococcus acidilactii* κατά τη διάρκεια επώασης 32 ωρών σε ζωμό στους 37 °C [<https://slideplayer.com/slide/6837636>].

Συμπερασματικά οι δύο προαναφερθείσες παράμετροι, η θερμοκρασία και η φάση ανάπτυξης του βακτηριακού πληθυσμού, είναι κεντρικής σημασίας στην κυτταρομετρική προσέγγιση. Άρα πρέπει να ληφθούν υπόψη οι πιθανές επιπτώσεις στο ποσοστό της χρωστικής που εισέρχεται στο κύτταρο και να τεθούν οι κατάλληλοι περιορισμοί [Shapiro, 2003].

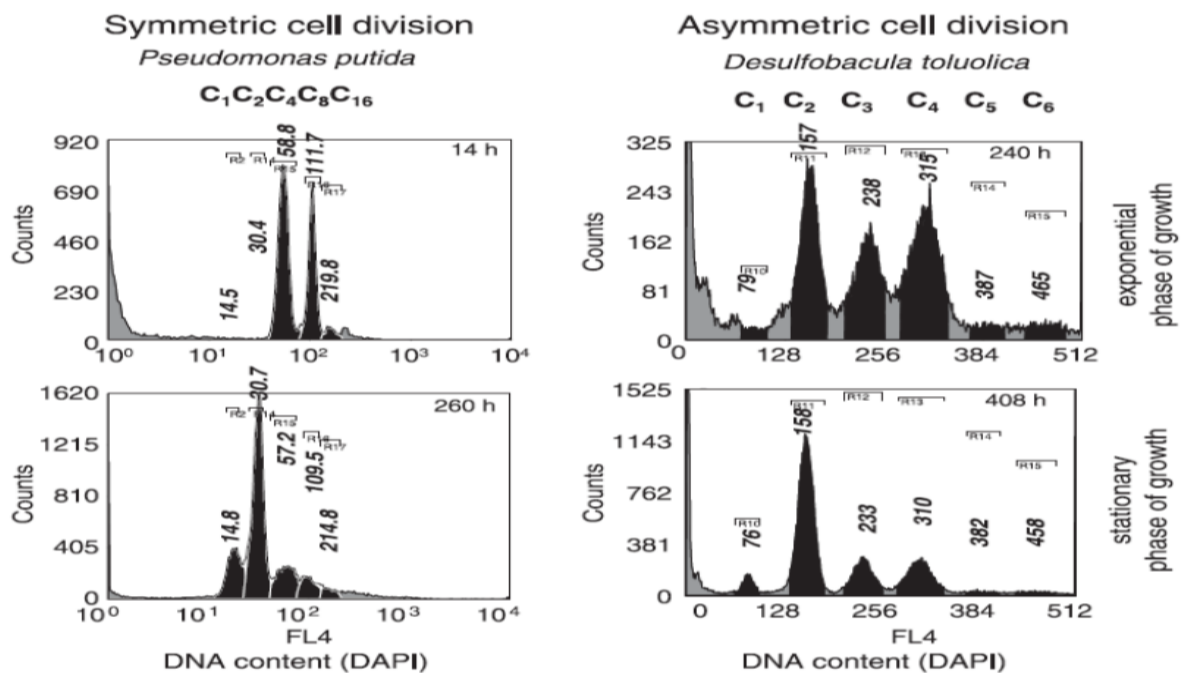
Στην Εικόνα 11 παρουσιάζεται η προσέγγιση που γίνεται με την κυτταρομετρία ροής, της καμπύλης ανάπτυξης του πληθυσμού της *Pseudomonas putida* κατά την επώασή της για 26 ώρες. Η χρώση των κυττάρων γίνεται με τη φθορίζουσα χρωστική DAPI και η κατανομή της

έντασης φθορισμού καθορίζει τα όρια μεταξύ των υποπληθυσμών G1–Gx, που αντιστοιχούν στον αριθμό των χρωμοσωμάτων στα κύτταρα [Calabrese, et al, 2019].



Εικόνα 11. Η δυναμική ετερογένεια του πληθυσμού της *Pseudomonas putida* κατά την ανάπτυξη για 26 ώρες (Dot Plot 0 ώρες = 24 ώρες). (A) Η ένταση του φθορισμού της DAPI (που σχετίζεται με το περιεχόμενο DNA) έναντι πρόσθιου σκεδασμού (FSC - μέγεθος κυττάρων) των δειγμάτων σε 0, 2, 6 και 24 ωρών. (B) Ιστογράμματα κατανομής της έντασης φθορισμού της DAPI που χρησιμεύουν στον καθορισμό των ορίων μεταξύ των υποπληθυσμών G1–Gx και που αντιστοιχούν στον αριθμό των χρωμοσωμάτων στα κύτταρα. (C) Τα κύτταρα ταξινομούνται σύμφωνα με την ένταση φθορισμού τους (ανοιχτοί κύκλοι) με την εφαρμογή υπολογιστικού προγράμματος Zirfian πολλαπλών συστατικών (συμπαγής κόκκινη γραμμή) [Calabrese, et al, 2019].

Είναι σημαντικό το γεγονός της μελέτης του DNA με κυτταρομετρία ροής γιατί αποκαλύπτονται πολλές ιδιότητες από τις κατανομές του υποπληθυσμού των DNAs που αναλύονται κατά την ανάπτυξη ενός βακτηρίου. Τα βακτήρια ανάλογα του είδους στο οποίο ανήκουν επιτελούν την κυτταρική διαίρεση με διάφορους τρόπους. Μέχρι τώρα, διάφοροι τύποι κυτταρικής διαίρεσης έχουν περιγραφεί με διαφορετικές διαδικασίες, μεταξύ των οποίων η κλασική συμμετρική (π.χ. το βακτήριο του εδάφους *P. putida*) και η ασύμμετρη (π.χ. το θαλάσσιο βακτήριο *Desulfobacula toluolica*) (εικόνα 12) [Müller, et al, 2007].



Εικόνα 12. Το στέλεχος *P. putida* KT 2440 καλλιεργήθηκε σε βενζοϊκό οξύ (3 g/l) σε χημειοστάτη. Το *D. Toluolica* αναπτύχθηκε αναερόβια με τολουόλιο ως μοναδική πηγή άνθρακα και ενέργειας, σε ρυθμιστικό μέσο άλατος διττανθρακικών. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης (άνω-ιστογράμματα) και στατική φάση (κάτω-ιστογράμματα) ανάπτυξης. Το *P. putida* δείχνει το τυπικό διάγραμμα συμμετρικής διαίρεσης, ενώ το *D. toluolica* αντιπροσωπεύει την ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση [Müller, et al, 2007].

Τα βακτήρια που πραγματοποιούν συμμετρική κυτταρική διαίρεση θα εμφανίσουν διπλασιασμό στα χρωμοσώματά τους όπως C_n , C_{2n} , C_{4n} κ.τ.λ.. Άλλοι μικροοργανισμοί που διαιρούνται ασύμμετρα, τα μοτίβα εμφάνισης των DNAs τους είναι C_n , C_{2n} , C_{3n} , C_{4n} , C_{5n} κτλ. Η συμμετρική ή η λεγόμενη δυαδική σχέση, είναι ένας ευρέως διαδεδομένος μηχανισμός κυτταρικής διαίρεσης σε πολλά βακτηριακά είδη, όπου κατά τον μηχανισμό αυτό προκύπτουν δύο σχεδόν ισοδύναμα θυγατρικά κύτταρα. Στην περίπτωση της ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης, δημιουργούνται δύο διαφορετικά μορφολογικά θυγατρικά κύτταρα, τα οποία μπορεί να είναι χωρικά απομονωμένα μεταξύ τους στην περιοχή

διαβίωσής τους. Αυτό είναι ευρέως διαδεδομένο, ιδιαίτερα στους θαλάσσιους μικροοργανισμούς, όπως το *D. toluolica* και το *Muricauda ruestringensis*. Το τελευταίο βακτήριο, αν και εμφανίζει συμμετρική κυτταρική διαίρεση υπό βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης, σε συνθήκες stress (οριακής ανάπτυξής τους) δεν δημιουργούνται διπλά ισοδύναμα χρωμοσώματα, αλλά μη διπλά, οπότε τα προκύπτοντα κύτταρα δεν ακολουθούν τον κανόνα C_n, C2_n κατά την αύξηση του πληθυσμού τους [Müller, et al, 2001].

Αυτή η συμπεριφορά μπορεί να είναι ένα εξελικτικό πλεονέκτημα για την προσαρμογή σε περιβάλλον με μη επαρκή θρεπτικά συστατικά όπως το υδάτινο περιβάλλον, όπου τα θυγατρικά κύτταρα είναι σε θέση να βρίσκουν ευκολότερα ενέργεια σε συνθήκες ανάπτυξης. Βακτήρια του εδάφους όπως ο *Streptomyces coelicolor*, πολλαπλασιάζονται χωρίς κυτταρική διαίρεση. Το είδος αυτό δημιουργεί ένα μυκήλιο που αποτελείται από πολυχρωμοσωμικά νημάτια που μοιάζουν με παύλα και τα οποία διαιρούνται συγχρονισμένα κάτω από περιοριστικές συνθήκες και μετατρέπονται σε σπόρια που περιέχουν μόνο ένα χρωμόσωμα [Kelemen, et al, 2001].

Η στρατηγική ορισμένων ειδών για την καταστολή της κυτταρικής διαίρεσης κάτω από συνθήκες εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών, πιθανότατα υπαγορεύεται αφενός από την ανάγκη για ενέργεια και μεταβολίτες και αφετέρου από το χαρακτηριστικό των βακτηρίων να παραμένουν μαζί, εάν επιδεινωθούν οι συνθήκες ανάπτυξης, ώστε να επιβιώσουν ως πληθυσμός. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το αρχαιοβακτήριο *Methanothermobacter thermoautrophicus*, το οποίο βρέθηκε να εμφανίζει σύγχρονη κυτταρική διαίρεση μακρινών νηματίων μετά από περιορισμό θρεπτικών συστατικών προκειμένου να ολοκληρώσει την αναπαραγωγή του [Majernik, et al, 2005].

Έχουν μελετηθεί τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών κατά τις διαδικασίες της αντιγραφής του DNA και της κυτταρικής διαίρεσης και έχει αποδειχθεί για το αρχαιοβακτήριο *Methanocaldococcus jannaschii* ότι περιέχει περίσσεια αντιγράφων χρωμοσωμάτων, τόσο υπό βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης, όσο και υπό αντίξοες. Ο τρόπος της κυτταρικής διαίρεσης που ακολουθεί είναι αυτός της ασύγχρονης έναρξης αναπαραγωγής και η άνιση κατανομή των χρωμοσωμάτων σε θυγατρικά κύτταρα είναι αυτός της C_n, C2_n, C3_n, C4_n, C5_n [Maisnier Patin, et al, 2002].

Έχουν γίνει πολλές επιστημονικές μελέτες σχετικά με τους διαφορετικούς τρόπους οργάνωσης του κυτταρικού κύκλου των αρχαιοβακτηρίων όπου παρουσιάζονται οι διαφορετικοί τύποι ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού, όσον αφορά τον φαινότυπο και το πρότυπο του DNA στα βακτήρια. Τα αρχαία έχουν μεγάλη ποικιλομορφία της αντιγραφής του DNA, των χρωμοσωμάτων και των μηχανισμών διαχωρισμού, μαζί με την κυτταρική

διαίρεσή τους. Για τα στελέχη του *C. crescentus* και του *E. Coli* περιγράφεται ότι στο μητρικό DNA τους υπάρχουν πληροφορίες ώστε όταν τα κύτταρα εισέρχονται σε καταστάσεις «λιμοκτονίας» να τροποποιούν τους τρόπους κυτταρικής διαίρεσης, ώστε ενεργειακά να μπορούν να ολοκληρώσουν τη διαδικασία. Η εξάντληση των θρεπτικών στοιχείων («πείνα») είναι μια συχνή κατάσταση στο περιβάλλον στην οποία εκτίθενται τα βακτήρια. Κάτω από τέτοιες συνθήκες, το DNA μπορεί να καταστραφεί. Σε αυτό το ενδεχόμενο, τα κύτταρα μπορεί να έχουν κατανομή DNA που να είναι μικρότερη από το αρχικό Cn. Μια τέτοια περίπτωση είναι το *Cupriavidus necator*, το οποίο αναπτύχθηκε σε συγκεντρώσεις φαινόλης κάτω του ορίου τοξικότητας. Με πειράματα in vitro προκλήθηκε στο *C. necator* μείωση στο μισό της περιεκτικότητάς του σε χρωμοσώματα της φάσης B και προέκυψαν βακτηριακά κύτταρα που χαρακτηρίστηκαν ως «κύτταρα εκτός κυτταρικού κύκλου» (off cell cycle cells). Αυτά τα αδρανοποιημένα κύτταρα διατήρησαν τον μηχανισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης, ώστε για να εισέλθουν ξανά στον κύκλο ζωής μέσω της έκφρασης των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μηχανισμό της μετάφρασης όπως είναι ο παράγοντας επιμήκυνσης Tu, και η ριβοσωμική πρωτεΐνη S1 [Wiacek, et al, 2006].

Υποθέτεται έτσι ότι πολλά βακτήρια περιέχουν συνήθως περισσότερο από ένα χρωμόσωμα υπό μέτριες συνθήκες ανάπτυξης και αυξομειώνουν το DNA σε ένα λειτουργικό ελάχιστο μόνο υπό συνθήκες πίεσης (stress), εάν δηλαδή χρειάζονται περισσότερη ενέργεια ή μεταβολίτες για να επιβιώσουν. Αυτά τα «off cell cycle» κύτταρα είναι σε θέση να επαναφέρουν τον κυτταρικό κύκλο υπό ευνοϊκότερες συνθήκες ανάπτυξης. Εάν όμως απ' την άλλη πλευρά οι συνθήκες επιδεινωθούν, τα κύτταρα περιέχουν μόνο μέρος της αρχικής περιεκτικότητας σε χρωμοσώματα Cn ή χάνουν εντελώς το DNA τους. Αυτό είναι δυνατόν να φανεί με κυτταρομετρία ροής γιατί είναι εμφανές στις κατανομές του ιστογράμματος DNA, όταν η περιεκτικότητα είναι σε μεγάλο βαθμό κάτω από την Cn/2, που αναπόφευκτα μπορεί να σημαίνει κυτταρικό θάνατο. Τέτοια κύτταρα ή «φαντάσματα» όπως περιγράφονται, είναι παρόντα πολύ συχνά στα θαλάσσια περιβάλλοντα [Müller, et al, 2007].

2.3 Εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής στη μελέτη των βακτηριακών κυττάρων

Η μέτρηση του απόλυτου αριθμού των βακτηρίων είναι από τις κυριότερες εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής, με χρησιμότητα σε ερευνητικό επίπεδο και στη βιομηχανία. Ανευρίσκονται αρκετές μελέτες σχετικά με τη χρήση της στον προσδιορισμό της παρουσίας βακτηρίων, ιών, παρασίτων κ.λπ. σε ένα βιολογικό δείγμα. Για παράδειγμα ο κυτταρομετρητής της Sysmex UF-100 (Εικόνα 13) χρησιμοποιείται για την αυτοματοποίηση

της ανάλυσης ούρων σε επίπεδο ρουτίνας, αλλά και για περιπτώσεις μικροβιουρίας και πιθανών ουρολοιμώξεων.



Εικόνα 13. Μοντέλο κυτταρομετρητή Sysmex UF-100

Το όργανο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση των δυνατοτήτων της κυτταρομετρίας ροής στην ανάλυση του υγρού περιτοναϊκής κάθαρσης και έχουν συγκριθεί τα ληφθέντα δεδομένα της κυτταρομετρίας με δεδομένα από τη βακτηριακή καλλιέργεια με ανάλογα και συγκρίσιμα αποτελέσματα [Penders, et al, 2004].

Η διαθεσιμότητα εργαλείων, όπως η κυτταρομετρία ροής επιτρέπουν τη διενέργεια μετρήσεων σε μεμονωμένα κύτταρα κι έτσι έχει αλλάξει η προσέγγιση των μικροβίων, τόσο στο εργαστήριο, όσο και στο φυσικό περιβάλλον. Είναι γεγονός όμως πως μόνο ένα αρκετά μικρό ποσοστό των μικροοργανισμών έχει εντοπιστεί, και ένα ακόμα μικρότερο έχει χαρακτηριστεί μέσω εργαστηριακής προσέγγισης. Για να γίνει σε βάθος διερεύνηση επιβάλλεται η χρήση μεθόδων, όπως η μικροσκοπία και η κυτταρομετρία ροής με τα κατάλληλα επιλεγμένα φθοριοχρώματα [Alvarez Barrientos, et al, 2000].

Αυτές οι χρωστικές απαιτείται να είναι μη τοξικές για τα βακτήρια, επομένως πρέπει να ελέγχονται προσεκτικά για να επαληθευτεί ότι είναι ασφαλείς και το πώς και πόσο εισέρχονται στα κύτταρα. Επιπλέον πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν η μη δέσμευσή τους σε μεγάλες ποσότητες στις επιφάνειές τους. Μια φθορίζουσα χρωστική έχει την ιδιότητα όταν διεγερθεί από μια πηγή ενέργειας, όπως είναι η ακτινοβολία laser (excitation wavelength), να

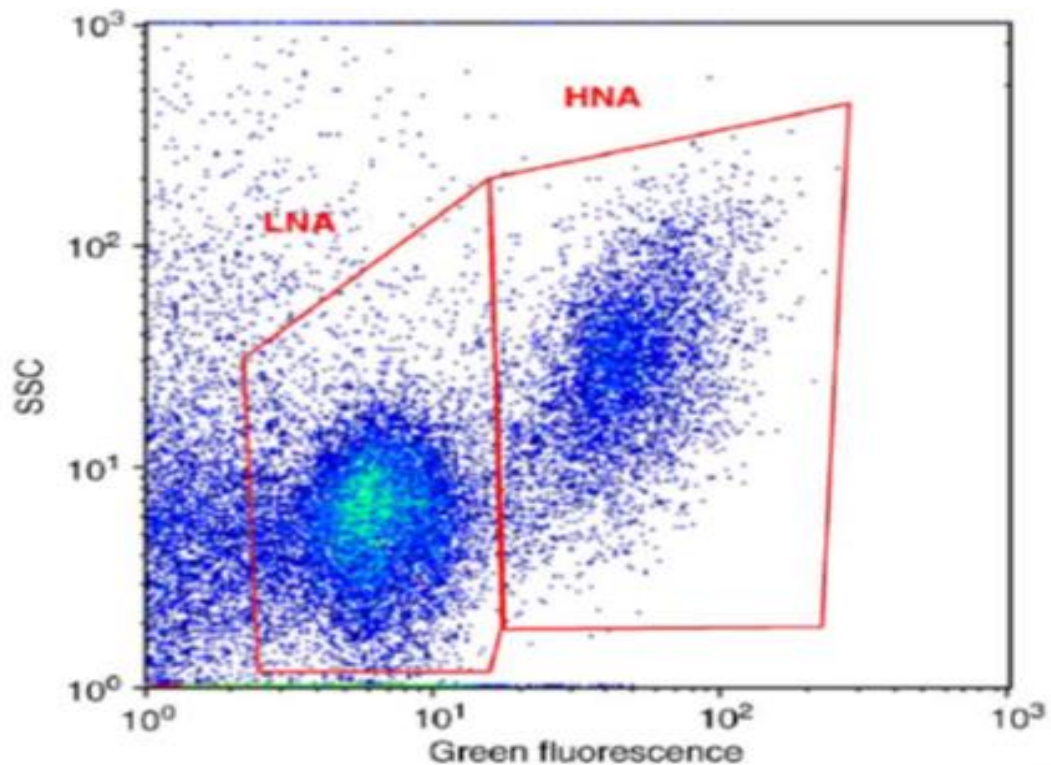
εκπέμπει ενέργεια ως ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος (emission wavelength) από την αρχική. Κάθε φθορίζουσα χρωστική χαρακτηρίζεται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που μπορεί να τη διεγείρει και από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που εκπέμπει. Βέβαια, η εκπεμπόμενη ακτινοβολία κάθε φθορίζουσας χρωστικής έχει ένα φάσμα μήκους κύματος που χαρακτηρίζεται από μία μέγιστη τιμή. Εάν χρησιμοποιηθούν περισσότερες από μία φθορίζουσες χρωστικές είναι δυνατόν να γίνει ταυτόχρονα μέτρηση περισσότερων παραμέτρων. Στην περίπτωση αυτή οι διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές πρέπει να εκπέμπουν φθορισμό σε διαφορετικό μήκος κύματος για να μπορεί να γίνει διάκριση του σήματος που εκπέμπει η κάθε χρωστική [Alvarez Barrientos, et al, 2000].

2.3.1 Χρώση του βακτηριακού DNA και DNA /RNA

Στην περίπτωση που θέλουμε να μετρήσουμε σε βακτηριακά κύτταρα την περιεκτικότητα του DNA και τη βιωσιμότητα, η χρώση γίνεται με φθορίζουσες χρωστικές (SYBR Green I, SYTO™ 9 κ.α.), οι οποίες εισέρχονται σε όλα αδιακρίτως τα κύτταρα. Οι χρωστικές Hoechst, έχουν ισχυρή συγγένεια με το ζεύγος αδενίνη και θυμίνη (A-T) του DNA και χρησιμοποιούνται για την «ποσοτικοποίηση» του DNA με την κυτταρομετρία ροής, ενώ με την χρήση του φθορισμού της Pyronin Y γίνεται επιπλέον εφικτή και η μέτρηση της περιεκτικότητας του RNA [Lebaron, et al, 1998].

Η κυτταρομετρία ροής έχει χρησιμοποιηθεί στη Μικροβιολογία τα τελευταία περίπου τριάντα χρόνια, για τη διάκριση των προκαρυωτικών οργανισμών. Δύο κύριες ομάδες βακτηρίων μπορούν να διαχωριστούν ευκρινώς με την κυτταρομετρία όταν χρωματίζουμε το νουκλεϊκό οξύ, για παράδειγμα με το SYBR Green I. Αυτές οι ομάδες διακρίνονται μεταξύ τους από το χαμηλού νουκλεϊκού οξέος (low nucleic acid, LNA) και υψηλού νουκλεϊκού οξέος (high nucleic acid, HNA) περιεχόμενο βακτηριακό DNA (Εικόνα 14). Η διάκριση των διαφορετικών πληθυσμών γίνεται με βάση τις διαφορές στην ένταση φθορισμού (κατ' επέκταση του περιεχομένου του DNA των κυττάρων) και των σημάτων του κάθετου σκεδασμού (SSC) ενδεικτικό του μεγέθους των κυττάρων [Wang, et al, 2010].

Οι βακτηριακές ομάδες των κυττάρων που έχουν LNA και HNA έχουν ανιχνευθεί χρησιμοποιώντας διάφορες χρωστικές των νουκλεϊνικών τους οξέων, συμπεριλαμβανομένης της 6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλης (DAPI), της SYBR Green I, SYBR Green II και του SYTO 13. Γενικά πιστεύεται ότι τα βακτήρια με HNA αποτελούν το ενεργό μέρος μιας μικροβιακής μεταβολικής ομάδας, ενώ ο ρόλος των βακτηρίων LNA είναι ακόμα ασαφής [Wang, et al, 2010].



Εικόνα 14. Γράφημα κυτταρομετρίας ροής όπου διακρίνονται βακτήρια περιεκτικότητας σε LNA και HNA σε δείγμα φρέσκου πόσιμου νερού. Στα βακτήρια έγινε χρώση με SYBR Green I και η πράσινη ένταση φθορισμού σχεδιάστηκε κατά τον πλάγιο σκεδασμό SSC [Wang, et al, 2010].

Τα περισσότερα μικροβιακά κύτταρα περιέχουν πολλές φορές περισσότερο RNA από DNA, με το μεγαλύτερο μέρος του RNA να είναι ριβοσωμικό (rRNA), το οποίο συχνά ταυτοποιείται με τη χρήση ανιχνευτών αλληλουχίας για rRNA, αντί για χρώση κι απ' αυτό προκύπτει εκτίμηση του αριθμού των ριβοσωμάτων. Οι ανιχνευτές είναι σημαντικοί για την ταυτοποίηση των βακτηρίων δεδομένου ότι μεταλλάξεις σε κάποιες βραχείες αλληλουχίες rRNA μπορούν να βρίσκονται σε όλα τα βακτήρια, ενώ άλλες εμφανίζονται μόνο σε ένα μεμονωμένο στέλεχος ενός συγκεκριμένου είδους [Harkins, Harrigan, 2004].

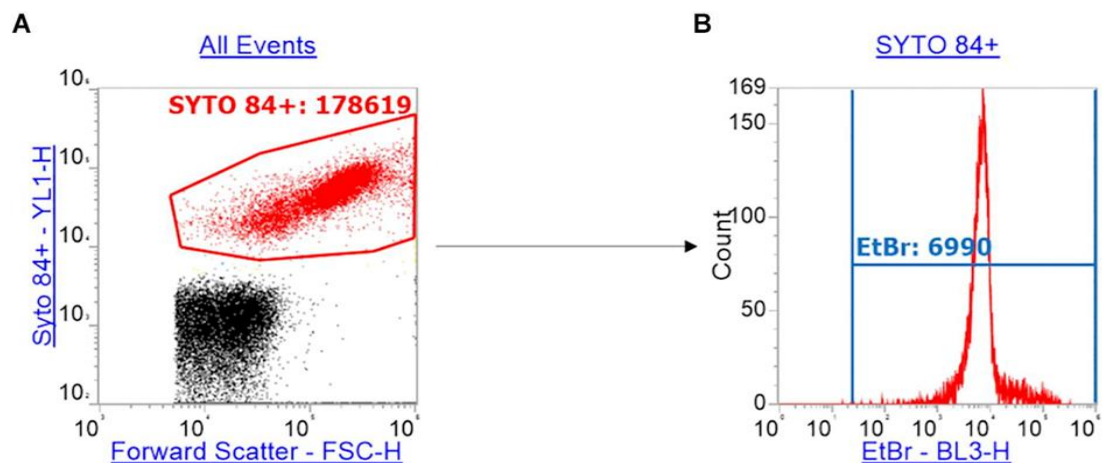
Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μεγάλος αριθμός φθοριζόντων χρωστικών των DNA και RNA. Ωστόσο, σχετικά λίγες από αυτές είναι ειδικές για το DNA και μόνο μια μειοψηφία είναι ευαίσθητες στην αναλογία αδερίνης- θυμίνης / γουανίνης- κυτοσίνης. Οι Hoechst 33258 και 33342, συνδέονται με το DNA και κατά προτίμηση με αλληλουχίες πλούσιες σε αδερίνη-θυμίνη (A-T). Η χρωμομυκίνη, η μιθραμυκίνη και η 7-αμινοακτινομυκίνη D είναι ειδικές για τα ζεύγη γουανίνης-κυτοσίνης (G-C) [Le Gall, et al, 1993]. Οι συνδυασμοί Hoechst και μιθραμυκίνης έχουν χρησιμοποιηθεί σε κυτταρόμετρα ροής με διπλή δέσμη διέγερσης κι έχουν αποδείξει διαφορές στη σύνθεση μεταξύ διαφορετικών βακτηριακών ειδών. Να σημειωθεί ότι η σύνθεση της βάσης των βακτηριακών ειδών κυμαίνεται, από

σχεδόν 20% σε αδενίνη - θυμίνη έως πάνω από 80%. Στον άνθρωπο η αντίστοιχη αναλογία είναι περίπου 60% [Hauser Urfer, et al, 1982; Salcedo Sora, et al, 2021].

2.3.2 Μέτρηση της βιωσιμότητας

Η εξέταση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης είναι ένας δείκτης της βακτηριακής βιωσιμότητας. Φθορίζουσες DNA χρωστικές, όπως το ιωδιούχο προπιδίο - Propidium Iodide (PI), βρωμιούχο αιθίδιο - Ethidium Bromide, (EtBr) και το HI (ιωδιούχο εξίδιο), εισέρχονται μόνο στα νεκρά κύτταρα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας είναι το PI, το οποίο διαθέτει διπλό θετικό φορτίο με αποτέλεσμα να εισέρχεται με δυσκολία στα βακτηριακά κύτταρα. Υπό κανονικές συνθήκες, κύτταρα που προσλαμβάνουν αρκετό PI για να γίνει η χρώση των πυρήνων ή του DNA τους, όσο περισσότερο έντονη είναι η χρώση, τόσο θεωρείται ότι έχουν αρκετά κατεστραμμένη τη μεμβράνη τους, ώστε να είναι ουσιαστικά μη βιώσιμα [Crowley, 2016].

Στη συνέχεια θα αναλύσουμε ένα παράδειγμα της μέτρησης, με κυτταρομετρία ροής, της συσσώρευσης του βρωμιούχου αιθιδίου σε Gram (-) βακτήρια [Whittle, et al, 2019]. Το EtBr φθορίζει όταν συνδέεται με το DNA, κατά συνέπεια το επίπεδο φθορισμού που μετράται αντιστοιχεί ανάλογα με το επίπεδο ενδοκυτταρικής συσσώρευσης. Αυτό το καθιστά ένα ισχυρό εργαλείο για την ανάλυση των επιπτώσεων της συσσώρευσης σε βακτηριακά στελέχη που δεν διαθέτουν αντλίες εκροής (efflux pumps). Οι καλλιέργειες επωάζονται σε ζωμό Luria-Bertani για μία ώρα στους 37°C, αυτές έχουν προκύψει από ολονύκτια καλλιέργεια (4% εμβόλιο υποκαλλιέργειας από ολονύκτια καλλιέργεια). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν από 300 μl καλλιέργειας με φυγοκέντρηση και εναιωρήθηκαν εκ νέου σε 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος αλατούχου φυσιολογικού ορού 1× HEPES (HEPES Buffered Saline, HBS), για να δώσουν έναν αριθμό κυττάρων $\sim 10^6$. Το HBS χρησιμοποιήθηκε καθώς οι χρώσεις SYTO δεν είναι συμβατές με ρυθμιστικά διαλύματα που περιέχουν φωσφορικά, όπως το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate-buffered saline, PBS). Το SYTO™ 84 προστέθηκε σε 500 μl 1×HBS για τελική συγκέντρωση 10 μM, το EtBr προστέθηκε στο ίδιο δείγμα ώστε να δώσει τελική συγκέντρωση 100 μM. Στη συνέχεια προστέθηκαν 100 μL εναιωρήματος βακτηριακών κυττάρων και επωάστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής και η εκπομπή του SYTO™ 84 συλλέχθηκε στο κανάλι YL1-H. Τα δεδομένα οπτικοποιήθηκαν σε διάγραμμα έναντι της διασποράς του πρόσθιου σκεδασμού (FSC-H). (Εικόνα 15) [Whittle, et al, 2019].

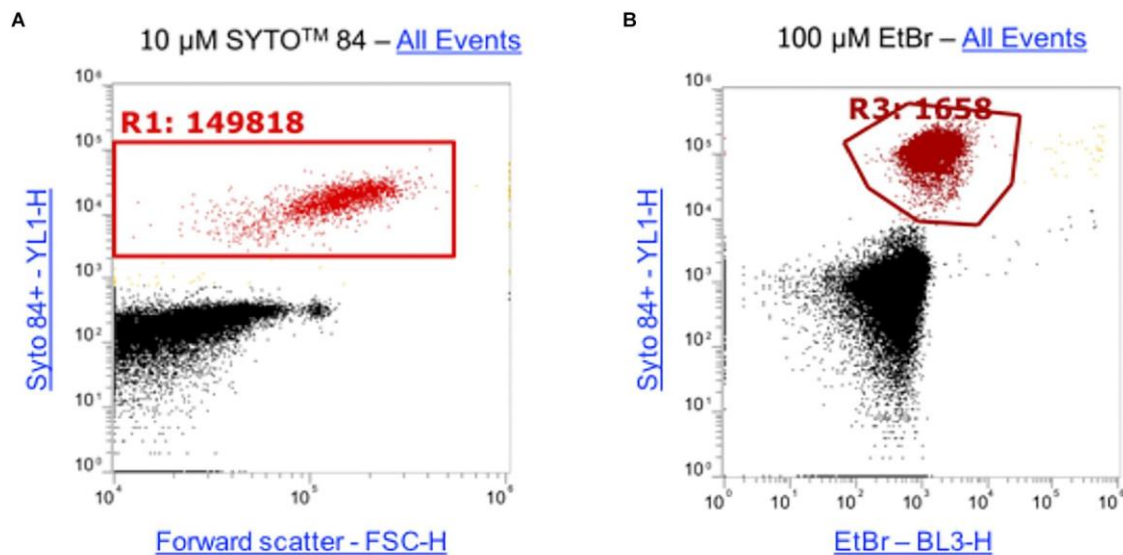


Εικόνα 15. Στρατηγική οριοθέτησης πύλης (gate) για τη μέτρηση της RFU (μονάδες σχετικού φθορισμού) βρωμιούχου αιθιδίου. Στην εικόνα (A) βλέπουμε πώς τα κύτταρα (κόκκινο) διαχωρίστηκαν σαφώς από τα κυτταρικά υπολείμματα (μαύρο), οριοθετώντας τα κύτταρα SYTO™ 84+ (κόκκινο) χρησιμοποιώντας μια γραφική παράσταση της εκπομπής πορτοκαλί φθορισμού YL1-H (φθορισμός SYTO™ 84) έναντι της διασποράς του πρόσθιου σκεδασμού (FSC-H). Στην εικόνα (B) παρουσιάζεται, χρησιμοποιώντας την κόκκινη οριοθέτηση-πύλη του πληθυσμού SYTO™ 84+, ένα ιστόγραμμα φθορισμού βρωμιούχου αιθιδίου ανά κύτταρο χρησιμοποιώντας το κανάλι εκπομπής BL3-H. Η πύλη του βρωμιούχου αιθιδίου δίνει τη X-median (διάμεσο) της έντασης φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου για τη μέτρηση της σχετικής συσσώρευσης [Whittle, et al, 2019].

Η χρωστική SYTO™ 84 χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των κυττάρων από τον θόρυβο που περιλαμβάνει και τα κυτταρικά υπολείμματα και σχεδιάστηκε μια πύλη-παράθυρο (gate) γύρω από τον πληθυσμό SYTO™ 84+ για να διαχωριστούν σαφώς τα κύτταρα (Εικόνα 15A). Στην πύλη του SYTO™ 84+ συγκεντρώθηκαν 10.000 συμβάντα - κύτταρα. Τα «περιφραγμένα» κύτταρα SYTO™ 84+ στη συνέχεια αναλύθηκαν για τον φθορισμό που προκύπτει από τη δέσμευση του EtBr και μετράται η ένταση φθορισμού στο κανάλι BL3-H (Εικόνα 15B). Οι τιμές που ελήφθησαν για τις μονάδες σχετικού φθορισμού (relative fluorescence units, RFU) είναι η διάμεσος X (X-median). Όλες οι κατανομές βασίστηκαν σε έναν και μόνο πληθυσμό [Whittle, et al, 2019].

Κλασικά, η συσσώρευση των υποστρωμάτων, όπως το EtBr, μετράται στο επίπεδο ενός ολόκληρου βακτηριακού πληθυσμού, αλλά η μέθοδος μπορεί να τροποποιηθεί ώστε να είναι δυνατή η μέτρηση της συσσώρευσης σε μεμονωμένα κύτταρα σε έναν μεγάλο πληθυσμό πλήρως χαρακτηρισμένο. Αυτό φυσικά απαιτεί τη βελτιστοποίηση της μεθόδου με in vitro πειράματα, ώστε η παρεμβαλλόμενη χρωστική DNA SYTO™ 84 να είναι δυνατόν να επιτρέπει τη διάκριση των κυττάρων από τον θόρυβο των σωματιδίων (background particulate noise), όπως είναι για παράδειγμα τα κυτταρικά υπολείμματα. Με αυτό τον τρόπο επιλέγεται η εκπομπή του φθορισμού της ώστε να μην επικαλύπτει την εκπομπή από το βρωμιούχο αιθιδίο. Έτσι ελέγχθηκε ένα εύρος συγκεντρώσεων του SYTO™ 84 (0,1 μM, 0,5

μM, 1 μM, 5 μM, 10 μM) προσδιορίζοντας τη βέλτιστη συγκέντρωση για τη χρήση της στην κυτταρομετρία ροής, ώστε να υπάρχει ο καλύτερος διαχωρισμός μεταξύ κυττάρων και υπολειμμάτων και ενός ξεχωριστού πληθυσμού που οπτικοποιείται διακριτά κάθε φορά. Επιπρόσθετα, για τη βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης του βρωμιούχου αιθιδίου, δοκιμάστηκαν στην παραπάνω μελέτη πέντε συγκεντρώσεις (10 μM, 25 μM, 50 μM, 75 μM, 100 μM). Η συγκέντρωση 100 μM βρωμιούχου αιθιδίου για παράδειγμα, έδωσε την υψηλότερη μέση τιμή φθορισμού για το στέλεχος άγριου τύπου *Salmonella Typhimurium* SL1344 που έγινε η χρώση με SYTO™ 84 και τη μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ άγριου τύπου και μεταλλαγμένου ΔacrB. Στην Εικόνα 16 παρουσιάζονται τα κυτταρομετρικά γραφήματα από τις τελικές συγκεντρώσεις για το SYTO™ 84 και για το βρωμιούχο αιθίδιο [Whittle, et al, 2019].

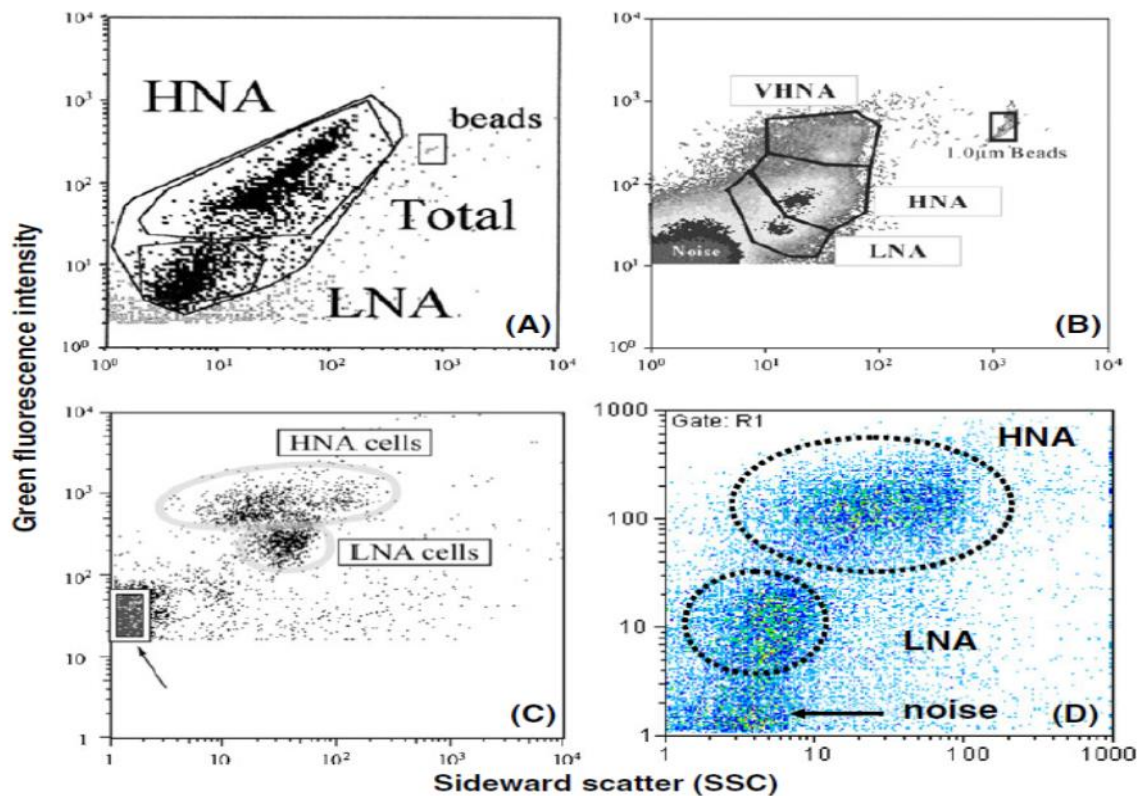


Εικόνα 16. Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις σε SYTO™ 84 και του βρωμιούχου αιθιδίου που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτόν τον προσδιορισμό: (A) Χρησιμοποιήθηκε 10 μM SYTO™ 84 και ένας πληθυσμός οριοθετήθηκε (R1) στο κυτταρογράμμα που προκύπτει από τον πορτοκαλί φθορισμό (YL1-H) που αντιστοιχεί με το SYTO™ 84, έναντι της διασποράς του πρόσθιου σκεδασμού (FSC-H). Η συγκέντρωση αυτή έδωσε τον καλύτερο διαχωρισμό των κυττάρων (κόκκινο) από τα υπολείμματα και τον θόρυβο των σωματιδίων (μαύρο). (B) 100 μM ήταν η βέλτιστη συγκέντρωση του βρωμιούχου αιθιδίου που χρησιμοποιήθηκε όπως φαίνεται μέσω του κυτταρογράμματος του YL1-H (SYTO™ 84) έναντι του BL3-H (βρωμιούχου αιθιδίου) [Whittle, et al, 2019].

Μια πρώτη προσέγγιση για τη βιωσιμότητα είναι η επιλογή της ειδικής χρώσης. Με τον πλάγιο σκεδασμό (SSC) και την ένταση του πράσινου φθορισμού διακρίνουμε τα αποτυπώματα του χαμηλού (LNA) και του υψηλού νουκλεϊκού οξέος (HNA) (Εικόνα 17). Διακρίνονται τέσσερα χαρακτηριστικά παραδείγματα διαφοροποίησης με την

κυτταρομετρική διάκριση, υψηλού (HNA) και χαμηλού νουκλεϊκού οξέος (LNA) από διαφορετικά πειράματα.

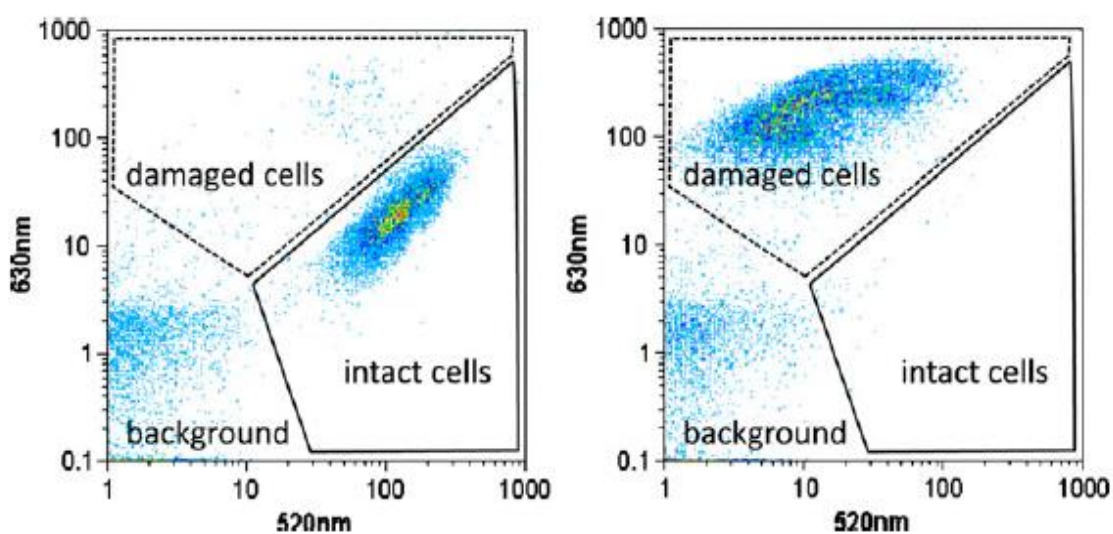
- με μικροβιακή κοινότητα δειγμάτων νερού ποταμού
- με βακτηριοπλαγκτόν σε μεσοτροφική λίμνη με SYBR Green I
- με θαλάσσια βακτήρια με χρώση SYBR Green I
- με δείγμα νερού ποταμού από κοινότητα ιθαγενών, με τη χρώση του βακτηριακού πληθυσμού να γίνεται επίσης με SYBR Green I [Hammes, Egli, 2010].



Εικόνα 17. Τέσσερα παραδείγματα χαμηλού νουκλεϊκού οξέος (LNA), υψηλού νουκλεϊκού οξέος (HNA) και πολύ υψηλού νουκλεϊκού οξέος (VHNA) περιεχόμενο από τέσσερις διαφορετικές έρευνες, όλες βασισμένες στο νουκλεϊκό οξύ με χρώση και ανάλυση του πλάγιου σκεδασμού και της διασποράς του πράσινου φθορισμού: (A) μικροβιακό φορτίο από νερό ποταμού (B) βακτηριοπλαγκτόν από μεσοτροφική λίμνη όπου η χρώση έχει γίνει με SYBR Green I (C) θαλάσσια βακτήρια με χρώση SYBR Green I. (D) βακτηριακό νερό ποταμού από κοινότητα ιθαγενών με χρώση SYBR Green I [Hammes, Egli, 2010].

Οι κυτταρομετρικές μέθοδοι για τη μέτρηση βακτηρίων στο νερό έχουν πολλά πλεονεκτήματα αλλά και περιορισμούς. Παράδειγμα αποτελεί η χλωρίωση και άλλοι οξειδωτικοί - ενεργοί χημικοί παράγοντες, που οξειδώνουν αρχικά τις βακτηριακές μεμβράνες, προκαλώντας έτσι βλάβη στην κυτταρική μεμβράνη. Για τον έλεγχο της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τη χρώση του

ιωδιούχου προπιδίου για να χαρακτηριστεί με σαφήνεια αυτή η συγκεκριμένη μορφή βλάβης (Εικόνα 18). Ωστόσο, η χρήση ακτινοβολίας UV-C, η οποία είναι γνωστό ότι προκαλεί βλάβες στο βακτηριακό DNA δεν θα ανιχνευόταν με αυτόν τον τρόπο. Η προσέγγιση της ανάλυσης της βιωσιμότητας ανεξάρτητα από την καλλιέργεια, έχει δημιουργήσει μεγάλο ενδιαφέρον και επιλογές σχετικά με το πώς ορίζεται η βιωσιμότητα, ποιες είναι οι παράμετροι που τη διέπουν και πως μπορεί να αξιολογηθεί. Αυτή τη στιγμή δεν υπάρχει καμία ειδική χρώση για τη βιωσιμότητα, αλλά είναι εμφανές ότι τουλάχιστον δίνεται η δυνατότητα να περιγραφεί, να χαρακτηριστεί και να κατανοηθεί η κυτταρική συμπεριφορά σε συνθήκες stress [Hammes, Egli, 2010].



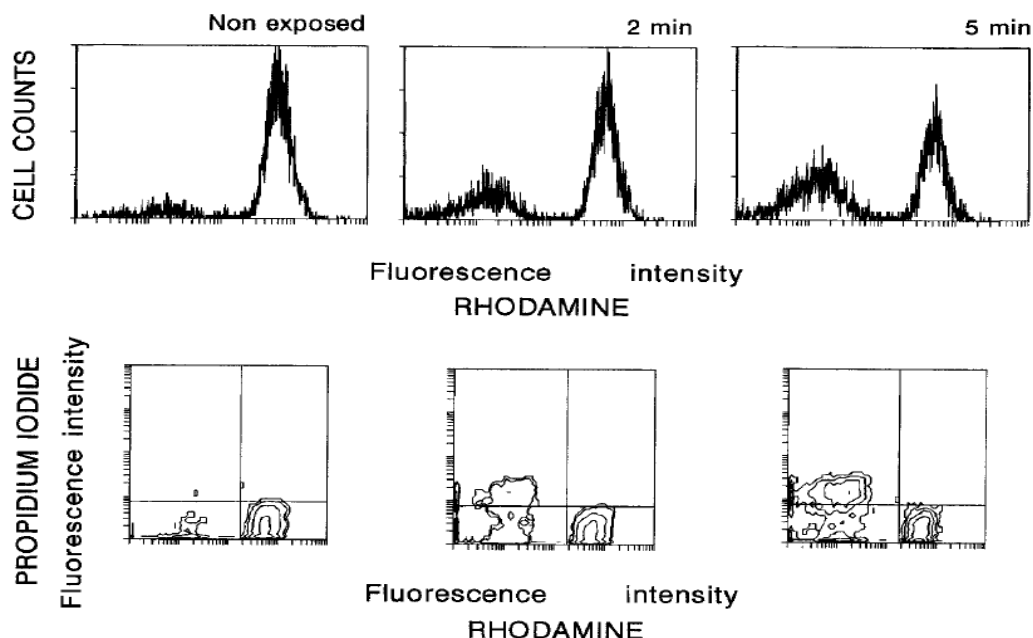
Εικόνα 18. Η πλέον κλασική τεχνική μέτρησης βιωσιμότητας. Η βλάβη της μεμβράνης σε βακτήρια *E.coli* πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) από τη χρήση οξειδίου του χλωρίου γίνεται ορατή με χρώση με SYBR Green I (520nm) και Propidium Iodide (630nm) [Hammes, Egli, 2010].

2.3.3 Μέτρηση δυναμικού κυτταρικής μεμβράνης.

Η διατήρηση του δυναμικού της μεμβράνης έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται εξίσου καλά με οποιαδήποτε κυτταρομετρική παράμετρο για την αναπαραγωγική βιωσιμότητα σε αρκετά βακτηριακά είδη. Το δυναμικό της μεμβράνης επίσης χάνεται σε αδρανή κύτταρα και σπόρια, αλλά αποκαθίσταται πολύ σύντομα μετά την ανάνηψή τους. Για την εκτίμηση του δυναμικού της μεμβράνης μπορούν να χρησιμοποιηθούν φορτισμένες λιπόφιλες χρωστικές όπως οι καρβοκυανίνες, η ροδαμίνη 123 (rhodamine 123) και άλλες. Αυτές οι χρωστικές, οι οποίες μπορούν εύκολα να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη και επομένως να ακολουθήσουν το δυναμικό της σύμφωνα με την εξίσωση Nernst, ονομάζονται ανιχνευτές διανομής [Lopez Amoros, et al, 1995].

Ωστόσο, θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν, ότι η ένταση φθορισμού δεν εξαρτάται μόνο από το δυναμικό της μεμβράνης, αλλά και από τον αριθμό των λιπόφιλων θέσεων δέσμευσης εντός του κυττάρου, τη συγκέντρωση της χρωστικής και από τον αριθμό των θέσεων δέσμευσης στο διάλυμα. Άλλα προβλήματα προκύπτουν από την εξώθηση της ενεργού χρωστικής από το εσωτερικό του βακτηρίου και την ανάγκη να γίνει διαπερατή η εξωτερική κυτταρική μεμβράνη [Lopez Amoros, et al, 1995].

Ο Lopez Amoros και οι συνεργάτες του, για να προσδιορίσουν τον φθορισμό που προκύπτει από τη χρώση με ροδαμίνη (Rh - Rodamine) και οφείλονταν στο δυναμικό της μεμβράνης και όχι σε μη ειδικούς παράγοντες, σχεδίασαν ένα πείραμα όπου τα κύτταρα της *E. coli* εκτέθηκαν στη γραμισιδίνη (gramicidin). Η γραμισιδίνη μπορεί να εκπολώνει τα κύτταρα καθιστώντας τα έτσι διαπερατά σε ιόντα. Στην Εικόνα 19, φαίνεται ότι υπάρχει μείωση στην πρόσληψη της Rh λόγω της μείωσης του δυναμικού της μεμβράνης, επαληθεύοντας, ότι η πρόσληψη εξαρτάται από το δυναμικό της μεμβράνης. Φαίνεται επίσης μια σταδιακή αύξηση στον φθορισμό των κυττάρων με το PI, λόγω της μεγαλύτερης εισόδου της χρωστικής στα κύτταρα. Πειραματικά βλέπουμε επίσης ότι 20 λεπτά έκθεσης σε γραμισιδίνη, μείωσε τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων περισσότερο από 97% [Lopez Amoros, et al, 1997].



Εικόνα 19. Τα ιστογράμματα μονής και διπλής παραμέτρου των κυττάρων της *E. coli* που έχει γίνει χρώση με Rh και PI πριν και μετά την εκπόλωση (2 και 5 λεπτά) με γραμισιδίνη. Σε τρυβλίο όπου μετρήθηκαν τα κύτταρα ήταν $1,6 \times 10^6$ cfu/ml τη στιγμή μηδέν, $9,5 \times 10^5$ cfu/ml και $5,8 \times 10^5$ cfu/ml μετά από 2 και 5 λεπτά έκθεσης σε γραμισιδίνη αντίστοιχα [Lopez Amoros, et al, 1997].

2.3.4 Ενεργότητα ενδοκυτταρικών ενζύμων (εστεράσες)

Οι αντιδράσεις ενζύμου - υποστρώματος συνήθως δεν χρειάζονται ενέργεια για να τελεστούν. Η δραστηριότητα της εστεράσης είναι ίσως ο πιο κοινός τρόπος μέτρησης της μεταβολικής δραστηριότητας. Θεωρείται ενεργειακά ανεξάρτητη καθώς το ένζυμο παραμένει λειτουργικό στα κύτταρα για όσο η μεμβράνη είναι ανέπαφη και έτσι δεν έρχεται σε επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον.



Εικόνα 20. Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης εστεράσης και χρωστικής

[<https://slideplayer.gr/slide/17344584>].

Οι μετρήσεις δραστηριότητας της εστεράσης σε έναν μικροοργανισμό βασίζονται σε ενώσεις που δεν φθορίζουν, αλλά γίνονται φθορίζουσες όταν διασπώνται από το ένζυμο. Επιπλέον, τα μόρια αυξάνουν το φορτίο και την πολικότητα, προκαλώντας κατακράτηση της χρωστικής, κάτι που δείχνει την ακεραιότητα της μεμβράνης. Έχει συγκριθεί ένας αριθμός υποστρωμάτων εστεράσης και έχει αποδειχθεί η δυνατότητα εφαρμογής τους σε αρκετούς οργανισμούς. Εκτός από τις δυσκολίες με την ενσωμάτωση της χρωστικής, προβλήματα προκύπτουν και από την εξώθηση της, όπως αναφέρθηκε παραπάνω ή από την εξάρτηση από το pH των φθορίζοντων σημάτων [Antolinos, et al, 2014].

Οι Xiao Xi, et al, κατέγραψαν μια διαδικασία ελέγχου ταχείας τοξικότητας, η οποία βασίζεται στην αναστολή της δραστηριότητας της εστεράσης στα επιβλαβή μικροφύκη του γλυκού νερού και το στέλεχος που ελέγχθηκε ήταν το *Microcystis aeruginosa* (κυανοβακτήριο) με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής. Ο ρυθμός υδρόλυσης της διοξικής φλουορεσκεΐνης (FDA) από την ενδοκυτταρική εστεράση χρησιμοποιήθηκε για να υποδείξει τη μεταβολική δραστηριότητα των φυκών αυτών. Η πρόσληψη του FDA βελτιστοποιήθηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και ο χρόνος επώασής της, με πειράματα δοσοεξαρτώμενα

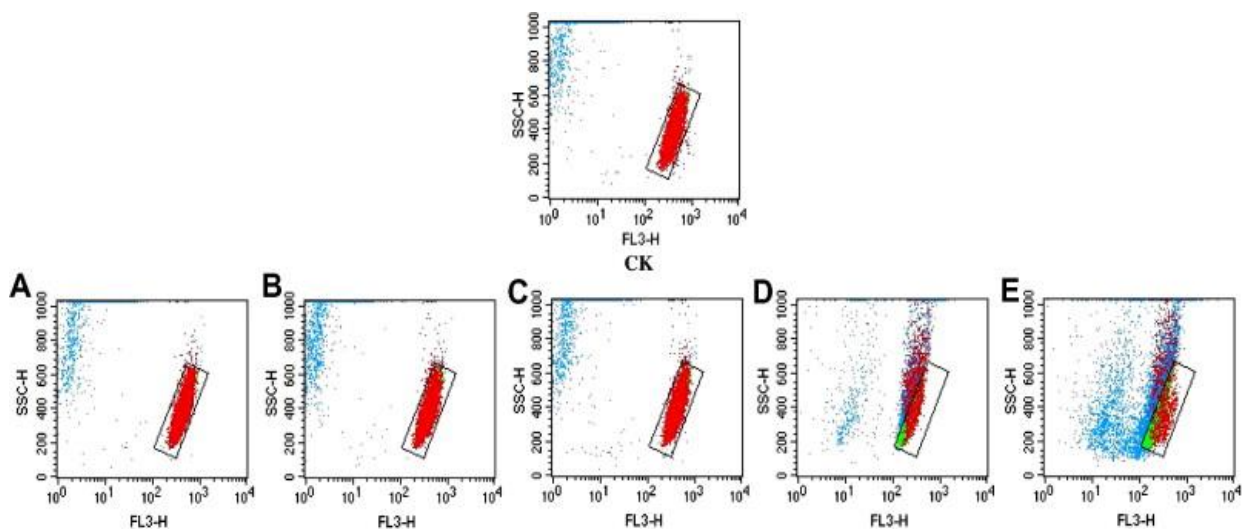
και χρονοεξαρτώμενα. Το ιωδιούχο προπίδιο (PI) χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης. Οι βέλτιστες δόσεις χρώσης FDA/PI ήταν 10 mg/l και 10 μ M αντίστοιχα. Ο καταλληλότερος χρόνος επώασης ήταν 14-21 λεπτά για τη βέλτιστη δόση FDA. Ως αποτέλεσμα προέκυψε μια νέα διαδικασία που βασίζεται σε βέλτιστες δόσεις FDA/PI, που ονομάζεται «κυτταρομετρία ροής καλλιέργειας ολόκληρου φυκιού με ενεργοποίηση φθορισμού», η οποία αναπτύχθηκε για βραχυχρόνια πειράματα και δοκιμές. [Xiao Xi, et al, 2011].

Αυτή η νέα διαδικασία, σύμφωνα με τις συνθήκες, όπως το pH και τις μη καθарές καλλιέργειες, καθιστά δυνατή την παρασκευή των δειγμάτων χωρίς να προκαλεί βλάβες στα μικροφύκη και διαχωρίζει επιλεκτικά τα κύτταρα των φυκών από ξένα σωματίδια με τη χρήση του φθορισμού που προκύπτει. Αυτή η προοπτική χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για την αξιολόγηση της τοξικότητας του χαλκού στο *M. aeruginosa* σε μια βραχυπρόθεσμη έκθεση (36 ώρες). Καθώς αυξάνονταν οι συγκεντρώσεις χαλκού, βρέθηκε ότι η δραστηριότητα της εστεράσης μειώθηκε κατά τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση του χαλκού με αυξημένα θραύσματα της κυτταρικής μεμβράνης. Επιπλέον, η δραστηριότητα της εστεράσης ήταν ένας καλός δείκτης τοξικότητας χαλκού στο *M. aeruginosa*. Επομένως, η νέα διαδικασία που αναπτύχθηκε θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση υποθανατηφόρων τελικών σημείων (sublethal endpoints detection) και έχει τη δυνατότητα να είναι μια γρήγορη και οικονομικά αποδοτική δοκιμασία για την επιλογή μεθόδων ελέγχου του *M. aeruginosa* ή για τη διερεύνηση του μηχανισμού αναστολής της ανάπτυξης του βακτηρίου αυτού [Xiao Xi, et al, 2011].

Αναλυτικά στη μέθοδο της ενεργοποίησης του φθορισμού έναντι της παραδοσιακής μεθόδου της πύλης που αναπτύχθηκε σε αυτή τη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το ιστόγραμμα FL3 για τον καθορισμό των επιπέδων ελέγχου και τον αποκλεισμό των σωματιδίων μη φυκών. Αντίθετα, στις παραδοσιακές μεθόδους με οριοθέτηση της πύλης, τα σωματίδια μη φυκών και των θραυσμάτων των νεκρών κυττάρων αποκλείστηκαν με την πύλη που έγινε με την διασπορά του πλάγιου σκεδασμού SSC-FL3. Καθώς ανιχνεύθηκε ο αυτοφθορισμός της χλωροφύλλης ως κόκκινος φθορισμός στο FL3 τα κύτταρα των φυκών και τα σωματίδια των μη φυκών μπορούσαν να διακριθούν μεταξύ τους με την ενεργοποίηση του φθορισμού. Από τα πειραματικά τους δεδομένα διαπιστώθηκε ότι όταν η διάμετρος των κυττάρων ήταν μικρότερη από 50 μ m ήταν δύσκολο να διακριθούν με τον κάθετο σκεδασμό SSC. Επιπλέον, η μέθοδος ενεργοποίησης του φθορισμού θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί όχι μόνο σε βιοπροσδιορισμούς όπως σε αυτή τη μελέτη, αλλά και στον προσδιορισμό των φυσικών

κοινοτήτων των φυκών με βάση τα χαρακτηριστικά σήματα του φθορισμού τους [Phinney, Cucci, 1989].

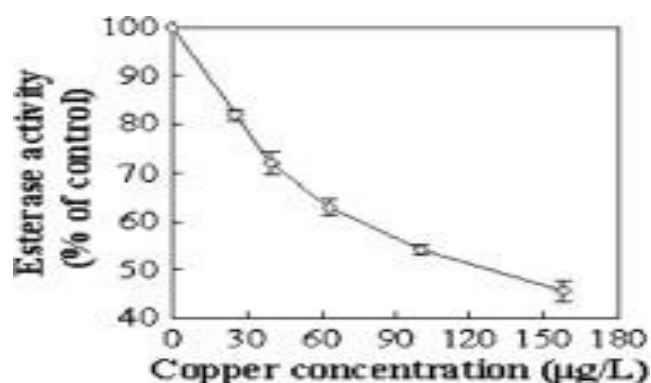
Τα πειράματα των Xiao Xi, et al, αποδεικνύουν με τον πλέον αξιόπιστο τρόπο την ανίχνευση της τοξικότητας του χαλκού σε βραχυπρόθεσμες εκθέσεις. Με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής, η επίδραση του χαλκού στα κύτταρα των φυκών αξιολογήθηκε από την άποψη του ρυθμού της κυτταρικής διαίρεσης, της δραστικότητας εστεράσης και του φθορισμού της χλωροφύλλης - α (Chl a) ταυτόχρονα. Στην Εικόνα 21, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής των κυττάρων του *M. aeruginosa* που έχουν υποστεί βλάβη από τον χαλκό. Όταν αυξήθηκαν οι συγκεντρώσεις του χαλκού (Εικόνα 21 A-E) τα υγιή κύτταρα φυκών στην τετράγωνη περιοχή (πύλη/gate) μειώθηκαν και οι περισσότερες κουκκίδες (dots - δηλαδή θραύσματα κυττάρων φυκών ή νεκρά κύτταρα που είχαν λιγότερο φθορισμό σε χλωροφύλλη) εμφανίστηκαν στην αριστερή περιοχή εκτός της οριοθέτησης του τετραγώνου. Αυτό το αποτέλεσμα έδειξε ότι το *M. aeruginosa* καταστρέφεται καθώς αυξάνονται οι συγκεντρώσεις χαλκού (>25 $\mu\text{g/l}$) [Xiao Xi, et al, 2011].



Εικόνα 21. Κυτταρογράμματα από τα δεδομένα της κυτταρομετρίας ροής των κυττάρων του *M. aeruginosa* μετά από 36ωρη έκθεση σε χαλκό με διασπορά του πλάγιου σκεδασμού (SSC) και το προκύπτοντα φθορισμό στο κανάλι ανίχνευσης FL3 (CK: τυφλό δείγμα ελέγχου (A) 25 $\mu\text{g (Cu)/l}$, (B) 40 $\mu\text{g (Cu)/l}$ (C) 63 $\mu\text{g (Cu)/l}$ (D) 100 $\mu\text{g (Cu)/l}$ και (E) 158 $\mu\text{g (Cu)/l}$). Παρατηρούμε ότι σε αυξανόμενες δόσεις χαλκού επέρχεται καταστροφή των κυττάρων. Το ανωτέρω πείραμα επιβεβαιώθηκε και με τη μέτρηση της δραστικότητας της εστεράσης [Xiao Xi, et al, 2011].

Ομοίως, αυτό ταυτοποιήθηκε και με τη μέτρηση της δραστικότητας της εστεράσης του *M. aeruginosa*, η οποία μειώθηκε κατά τρόπο εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση του χαλκού καθώς η συγκέντρωση του αυξανόταν (Εικόνα 22). Επιπλέον, μια σημαντική αναστολή της

δραστικότητας της εστεράσης στο *M. aeruginosa* ήταν ανιχνεύσιμη μετά από 36ωρη έκθεση σε συγκεντρώσεις χαλκού 63, 100 και 158 $\mu\text{g/l}$ [Xiao Xi, et al, 2011].



Εικόνα 22. Επιδράσεις των συγκεντρώσεων του χαλκού στη δραστικότητα της εστεράσης των κυττάρων του *M. aeruginosa* μετά από έκθεση 36 ωρών [Xiao Xi, et al, 2011].

2.3.5 Ειδική ανίχνευση βακτηριακών ειδών με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων (*Salmonella*, *Legionella*, *Pseudomonas*)

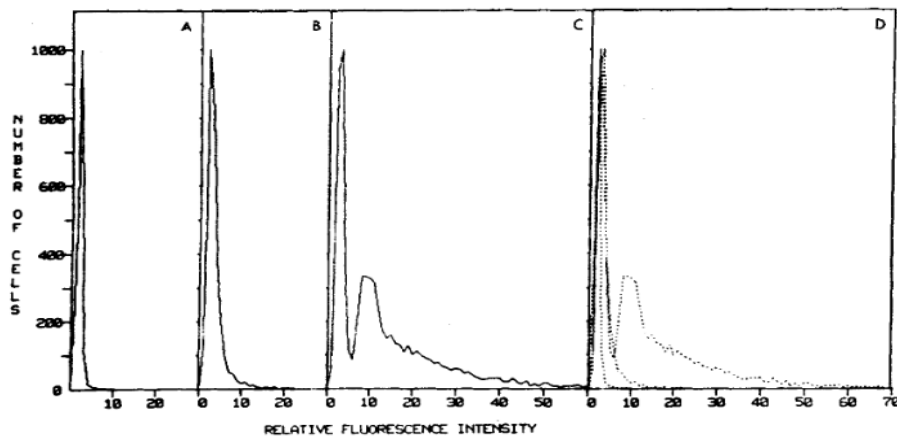
Τα αντισώματα μπορούν να γίνουν φθορίζοντα συνδέοντάς τα ομοιοπολικά με φθορίζουσες οργανικές ενώσεις-χρωστικές, όπως η ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC), η ισοθειοκυανική τετραμεθυλοδαμίνη (TRITC), το Texas Red [Mc Clelland, Pinder, 1994] , οι χρωστικές κυανίνης που αναπτύχθηκαν πρόσφατα, όπως οι ινδοκυανικές χρωστικές, C7Y5Y5 , και πιο πρόσφατα οι χρωστικές ALEXA.

Η FITC είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη χρωστική, επειδή μπορεί να διεγείρεται στα 488 nm ενός λέιζερ αργού, κάνει εύκολα σύζευξη με αντισώματα, λεκτίνες και άλλες ενώσεις, έχει σχετικά υψηλό φθορισμό και είναι υδατοδιαλυτή. Οι μέθοδοι χρώσης μπορούν να χωριστούν σε:

- άμεση χρώση (άμεση σήμανση των βακτηρίων με ειδικά αντισώματα) και
- έμμεση χρώση που αποτελείται από μη φθορίζοντα μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα ακολουθούμενα από φθορίζοντα πολυκλωνικά (δευτερεύοντα) αντισώματα που στρέφονται κατά του μη φθορίζοντος αντισώματος.

Ένα από τα πλεονεκτήματα της έμμεσης χρώσης είναι ότι δεν είναι απαραίτητο να δημιουργηθεί ένα φθορίζον αντίσωμα για κάθε αντιγόνο ενδιαφέροντος. Η άμεση χρώση με σημασμένα με FITC αντισώματα έχει αναφερθεί ότι έχει περιορισμούς, αλλά συνεχώς επέρχονται σημαντικές βελτιώσεις. Η τεχνολογία μαγνητικού διαχωρισμού μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να κάνει τις αναλύσεις ταχύτερες και πιο συγκεκριμένες και να ξεπεράσει την παρουσία μη κυτταρικών σωματιδίων [Mc Clelland, Pinder, 1994].

Παραθέτουμε τα δεδομένα από τους Ingram, et al, η μελέτη των οποίων αφορά τη *Legionella pneumophila* η οποία έχει σημανθεί με ειδικό φθορίζον αντίσωμα. Η ανίχνευση της έγινε σε ένα εναιώρημα οργανισμών μέσω της κυτταρομετρίας ροής. Η παρουσία άλλων μικροοργανισμών στο εναιώρημα δεν παρενέβη στην αναγνώριση της *L. pneumophila* όταν υπήρχε σε συγκεντρώσεις από 10^4 έως 10^5 κύτταρα ανά ml. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η κυτταρομετρία ροής μπορεί να είναι χρήσιμη για την ανίχνευση της *Legionella* σε περιβαλλοντικά δείγματα [Ingram, et al, 1982; Kirschner, 2016]. Στην Εικόνα 23 παρουσιάζεται ένα ιστόγραμμα της έντασης φθορισμού του πληθυσμού της *Legionella pneumophila* με φθοριόχρωμα το FITC [Ingram, et al, 1982].



Εικόνα 23. Οι κατανομές φθορισμού της *Legionella pneumophila*: (A) Έλεγχος απεσταγμένου νερού χωρίς παρουσία μικροοργανισμών ή αντισωμάτων. (B) Εναιώρημα που έχει *L. pneumophila* και με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC) σημασμένη σφαιρίνη κουνελιού. (C) Εναιώρημα *L. pneumophila* με FITC σημασμένη αντι-*Legionella* σφαιρίνη κουνελιού. (D) αλληλοεπικάλυψη των A, B και C. [Ingram, et al, 1982].

Επίσης, οι ερευνητές Donnelly, C.W. και Baigent, G. J. περιγράφουν μια μέθοδο για την ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* στο νωπό γάλα, με ανάλυση η οποία πραγματοποιείται με κυτταρομετρία ροής των βακτηριακών πληθυσμών, όπου η σήμανση φθορισμού έχει γίνει με FITC. Η χρήση του ανοσοφθορισμού σε συνδυασμό με τις μετρήσεις της περιεκτικότητας σε DNA, του οποίου η επισήμανση έχει γίνει με PI, και το μέγεθος με τα σκεδαστικά χαρακτηριστικά του προσπίπτοντος φωτός, επέτρεψε την ταυτοποίηση της *L. monocytogenes* και τη διάκρισή της από τον *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* και τον *Staphylococcus epidermidis*. Επίσης, μια επιπρόσθετη ειδική ανάλυση των πληθυσμών της *L. monocytogenes* επιτεύχθηκε μέσω του επιλεκτικού εμπλουτισμού του νωπού γάλακτος σε εμπλουτιστικό ζωμό. Οι ερευνητές καταλήγουν ότι αυτές οι διαδικασίες επιτρέπουν τον γρήγορο έλεγχο δειγμάτων γάλακτος

και άλλων τροφίμων για τη *L. monocytogenes* και μπορούν να συμπληρώσουν αρκετές από τις ελλείψεις που σχετίζονται με τις συμβατικές διαδικασίες αντισωμάτων φθορισμού των δειγμάτων αυτών [Donnelly, Baigent, 1986].

Applications	Substrate	Dye
Antibiotic susceptibility Metabolic variations	Membrane potential	DIOC6(3)- C ₂₉ H ₃₇ IN ₂ O ₂ Oxonol [DiBAC4(3)]- C ₂₇ H ₄₀ N ₄ O ₆ Rhodamine 123 - C ₂₁ H ₁₇ ClN ₂ O ₃
Metabolic variations	pH	BCECF - C ₂₇ H ₂₀ O ₁₁ SNARF-1- C ₂₄ H ₁₅ NO ₄
Ca ²⁺ mobilization	Ca ²⁺	Indo-1 - C ₃₂ H ₃₁ N ₃ O ₁₂ Fura-2 - C ₂₉ H ₂₇ N ₃ O ₁₄ Fluor-3 - C ₃₆ H ₃₀ Cl ₂ N ₂ O ₁₃
Microbe detection	Proteins	Fluorescein isothiocyanate (FITC) - C ₂₁ H ₁₁ NO ₅ S Texas Red Proteins - C ₃₁ H ₂₉ ClN ₂ O ₆ S ₂ Oregon Green Isothiocyanate - C ₂₁ H ₉ F ₂ NO ₅ S
	Antigens	Antibodies labeled with fluorochemicals
	Nucleotide sequences	Fluorescently labeled oligonucleotides
DNA-R Viability ^a DNA quantification ^b RNA quantification ^c Cell cycle studies ^d	DNA-RNA	SYTOX Green ^{a,b} Propidium Iodide (PI) ^{a,b,d} - C ₂₇ H ₃₄ I ₂ N ₄ Ethidium bromide ^{b,d} - C ₂₁ H ₂₀ N ₃ .Br or C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃ SYTO 13 ^{a,b,d}
	DNA (GC pairs)	Hoechst 33258/33342 ^d C ₂₅ H ₂₇ Cl ₃ N ₆ O/ C ₂₇ H ₂₈ N ₆ O
	DNA	Mithramycin ^d - C ₅₂ H ₇₆ O ₂₄
	RNA	Pyronine Y ^c - C ₁₇ H ₁₉ ClN ₂ O
Cellwall composition Microbe detection	Membrane oligosaccharides	Lectins
Metabolic activity	Enzyme activities	Substrates linked to fluorochemicals
Yeast metabolic state ^e Fungal detection ^f	Lipids	Nile Red ^e - C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₂
	Vacuolar enzyme activity	Fun-1 ^e
	Chitin and other carbohydrate polymers	Calcofluor white ^f

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά φθορίζοντων μορίων που χρησιμοποιούνται στην κυτταρομετρία ροής [Alvarez Barrientos, et al, 2000].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

Η συμβολή της κυτταρομετρίας ροής στη μικροβιολογία των τροφίμων

3.1 Κυτταρομετρία ροής και μικροβιολογία τροφίμων

Η μικροβιολογία είναι ένας ιδιαίτερα δυναμικός και σημαντικός κλάδος έρευνας, ελέγχου ποιότητας και ανάπτυξης προϊόντων στη βιομηχανία των τροφίμων. Σημαντικοί πυλώνες στο πεδίο αυτό:

- η ανίχνευση και η παρακολούθηση των παθογόνων μικροοργανισμών και μικροοργανισμών αλλοίωσης
- η χρήση ευεργετικών μικροοργανισμών για την παραγωγή τροφίμων που προέρχονται από διάφορα είδη ζυμώσεων.

Και για τις δύο προαναφερθείσες κατευθύνσεις, η αρίθμηση και η ταυτοποίηση των βακτηριακών πληθυσμών γίνεται με τη χρήση ποικίλων μεθοδολογιών που περιλαμβάνουν τη μέτρηση των βιώσιμων κυττάρων σε εκλεκτικά και μη εκλεκτικά υλικά, την ανίχνευση ειδικών δεικτών χρησιμοποιώντας την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction PCR) και με τη χρήση αναδύμενων τεχνολογιών, όπως η κυτταρομετρία ροής (FCM) με τις πιο προηγμένες μορφές της, όπως η ταξινόμηση των κυττάρων με ενεργοποιημένο φθορισμό (FACS) και με την κυτταρομετρία απεικόνισης (imaging cytometry) [Alvarez Barrientos, et al, 2000].

Η βιομηχανία τροφίμων δαπανά αρκετά κεφάλαια σήμερα στην έρευνα για την εξάλειψη διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών, κυρίως βακτηρίων που προκαλούν αλλοιώσεις στα προϊόντα τους. Η επίτευξη ειδικών προδιαγραφών για την ασφάλεια των τροφίμων που φτάνουν στους καταναλωτές, απαιτεί από τη βιομηχανία τροφίμων να έχει τα ανάλογα εργαστήρια ελέγχου ποιότητας των προϊόντων αυτών. Αυτή η ανάληψη δράσης έγινε για την πρόληψη πρόκλησης ασθενειών στον άνθρωπο από την κατανάλωση τροφών μολυσμένων με παθογόνα βακτήρια, όπως η *E. coli* 0157:H7 και ο *Staphylococcus aureus* ή τοξινών από μικροοργανισμούς που σχηματίζουν σπόρια, όπως ο *Bacillus cereus*. Όλα τα παραπάνω είδη μπορούν να δημιουργήσουν μια σειρά από νοσηρότητες, από ήπιες έως σοβαρές και πιθανώς απειλητικές για τη ζωή των καταναλωτών [Wilkinson, 2016].

Από την άλλη, μεγάλη κατηγορία τροφίμων προς κατανάλωση προέρχεται από μία ποικιλία ζυμώσεων με την προσθήκη βακτηρίων, όπως οι γαλακτοβάκιλλοι (Lactic acid bacteria, LAB), οι οποίοι κατά τη ζύμωσή τους, σταθεροποιούν τα προϊόντα με οξίνιση και

απελευθέρωση ενζύμων, προσδίδοντας άριστη γεύση, υφή και άρωμα. Η λίστα των προϊόντων που βασίζονται στη δραστηριότητα των γαλακτοβακίλλων είναι εκτενής και περιλαμβάνει τυριά, γιαούρτια, ζυμωμένα γάλατα, διάφορα είδη κρεάτων που έχουν υποστεί ζύμωση, συμπεριλαμβανομένου του σαλαμιού, ζυμωμένα λαχανικά όπως, τουρσί ή ξινολάχανο και ποτά, όπως οίνοι και μύρες που έχουν υποστεί αλκοολική ζύμωση [Carr, et al, 2008].

3.2 Περιορισμοί των τεχνικών που βασίζονται στα τρυβλία

Μέχρι σήμερα, η βιομηχανία τροφίμων, εξακολουθεί συνήθως να χρησιμοποιεί αναλυτικές τεχνικές ποιοτικού ελέγχου, βασιζόμενες στην καλλιέργεια των υπό αραίωση δειγμάτων σε τρυβλία με διάφορα θρεπτικά υλικά και στην καταμέτρηση των αποικιών μετά από επώαση σε καθορισμένες συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας. Στην περίπτωση ορισμένων παθογόνων μικροοργανισμών, όπως ο *S. Aureus*, αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει τον εμβολιασμό - διασπορά σε άγαρ Baird-Parker (Εικόνα 24) και την ταυτοποίηση των τυπικών αποικιών, οι οποίες μπορεί να χρειαστεί έως και 48 ώρες για να εμφανιστούν στο άγαρ. Ο χρόνος αυτός μπορεί να φτάσει έως και 4 - 5 ημέρες πριν από ένα αξιόπιστο αποτέλεσμα, προκειμένου να διεξαχθεί περαιτέρω έλεγχος [Corry, et al, 2003].



Εικόνα 24. *Staphylococcus aureus* σε Baird-Parker άγαρ

[<https://microbeonline.com/baird-parker-agar-principle-preparation-uses/>].

Συνολικά αυτή η μεθοδολογία εξαρτάται από τη διαδικασία της καλλιέργειας, με συνέπεια τα δεδομένα για την ασφάλεια των προϊόντων να παράγονται με χρονική καθυστέρηση, ενώ

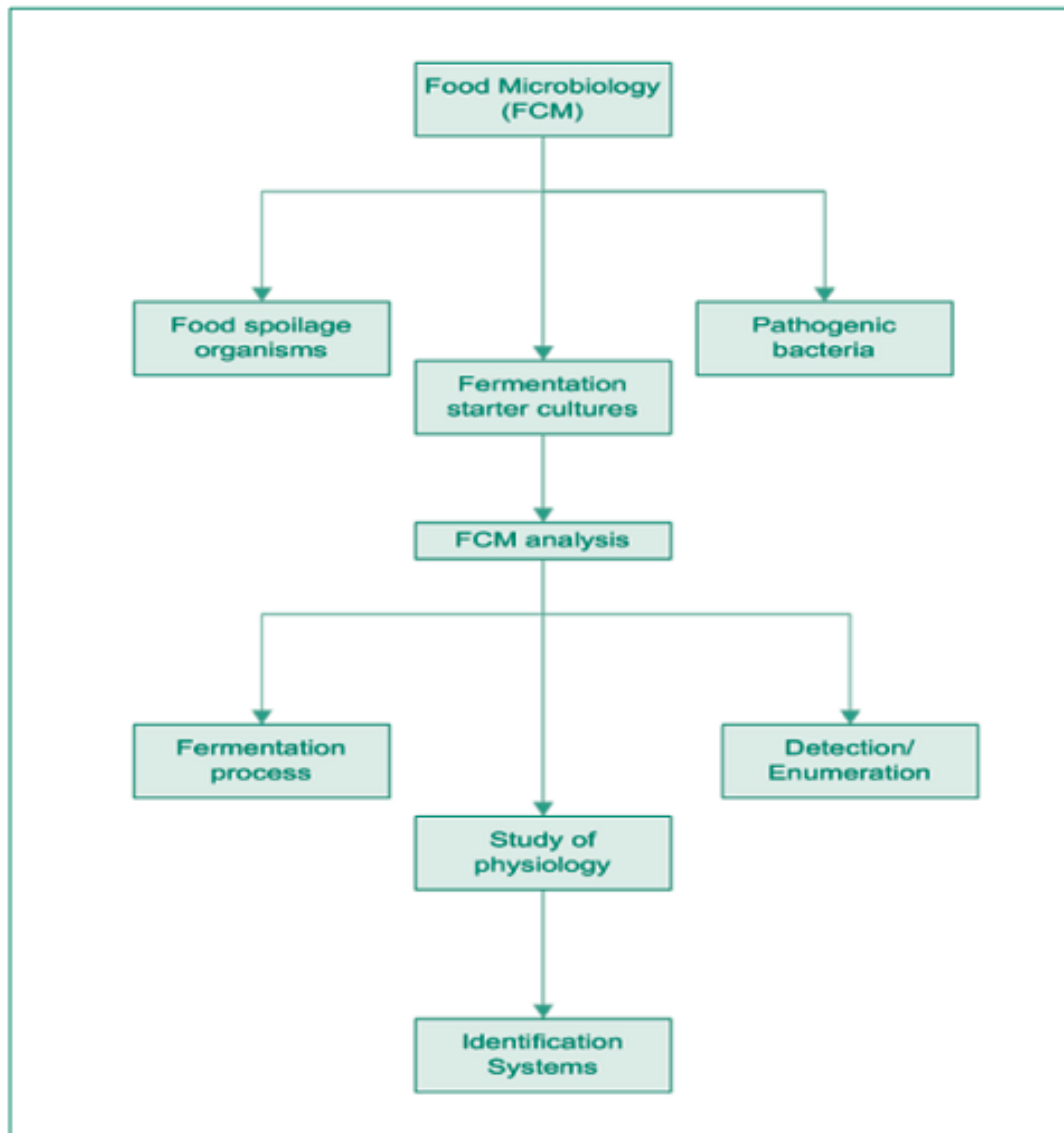
στο μεσοδιάστημα το προϊόν μπορεί να απαιτηθεί να αποθηκευτεί, πριν από την επίτευξη της οριστικής απάντησης από την ανάλυση του με ασφάλεια. Επιπλέον, ο ακρογωνιαίος λίθος αυτής της προσέγγισης είναι η παρουσία ή η απουσία ζωντανών κυττάρων ή εκείνων που μπορούν να αναπτυχθούν υπό εξαιρετικά επιλεκτικές συνθήκες. Αυτό που καθίσταται σαφές στη σύγχρονη μικροβιολογία τροφίμων, είναι ότι τα μικροβιακά κύτταρα, ειδικά σε τρόφιμα που έχουν υποστεί επεξεργασία, είναι παρόντα σε μια πληθώρα «φυσιολογικών» καταστάσεων, όπως βιώσιμα, κατεστραμμένα, διαπερατά και νεκρά με ποικίλες πιθανότητες εμφάνισης, που μπορεί να τις καθιστούν πολλές φορές μη ανιχνεύσιμες με τους συμβατικούς προσδιορισμούς εμβολιασμού σε τρυβλία με θρεπτικά υλικά [Corry, et al, 2003].

Μια αναδύομενη τεχνολογία που μπορεί να προσφέρει στη βιομηχανία τροφίμων, μια νέα προσέγγιση στην ανίχνευση των βακτηρίων από την άποψη της αριθμησης, της ταυτοποίησης και της φυσιολογικής μορφολογίας, είναι η κυτταρομετρία ροής. Όσον αφορά τις μικροβιολογικές εφαρμογές, η κυτταρομετρία ροής περιλαμβάνει την εναιώρηση των βακτηριακών κυττάρων μέσα σε ένα αδρανές υγρό ρεύμα, το οποίο στη συνέχεια εξετάζεται με τη διέλευση από το λέιζερ του κυτταρόμετρου, όπως αυτό περιγράφεται σε προηγούμενη ενότητα. Οι πληροφορίες FSC (πρόσθιος σκεδασμός) και SSC (πλάγιος σκεδασμός) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να εντοπίσουν τα κύτταρα σε ένα προφίλ κυτταρογράφου και να δώσουν πληροφορίες για το μέγεθος και την πολυπλοκότητά των κυττάρων, ενώ οι κυριότερες πληροφορίες για τη φυσιολογία και τη δομή των μεμονωμένων κυττάρων λαμβάνονται από τη χρώση με συγκεκριμένες φθορίζουσες χρωστικές και με τη συλλογή του βαθμού φθορισμού από μία μονή ή πολλαπλή χρώση που εφαρμόζεται κατά την ανάλυση του δείγματος [Comas Riu, Rius, 2009].

Τα κύρια πλεονεκτήματα της κυτταρομετρίας ροής για τη μικροβιολογία τροφίμων είναι:

- οι χρόνοι ταχείας ανάλυσης και η παραγωγή των δεδομένων (1-2 λεπτά)
- ο μεγάλος αριθμός κυττάρων που μπορούν να αναλυθούν ανά δείγμα (10.000 και άνω)
- ο ελάχιστος όγκος δείγματος (από 5 ml)
- η δυνατότητα πολλαπλών διαθέσιμων ταυτόχρονα πληροφοριών, για την εξέταση της κυτταρικής βιωσιμότητας, της δομής ή και του μεταβολισμού (πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής)
- ο μικρότερος χρόνος και χώρος εργασίας συγκριτικά με τις συμβατικές τεχνικές της ανάλυσης σε τρυβλία [Kennedy, Wilkinson, 2017].

Στην Εικόνα 25 περιγράφονται πιθανές εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής στην ανάλυση τροφίμων κυρίως σε ζυμώσεις, ταυτοποίηση και αρίθμηση των βακτηρίων, διαχωρισμό παθογόνων από μη παθογόνα κ.τ.λ. [Doolan, Wilkinson, 2016].



Εικόνα 25. Διάγραμμα που απεικονίζει τις πιθανές εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής στη μικροβιολογία τροφίμων - Ζυμώσεις τροφίμων [Doolan, Wilkinson, 2016].

3.3 Κυτταρομετρία Ροής: Γενικές τεχνικές

Οι αναλύσεις που βασίζονται στη μεθοδολογία της κυτταρομετρίας ροής για τη μελέτη των μικροβιακών κυττάρων σε τρόφιμα εξακολουθούν σήμερα να αντιμετωπίζουν τεχνικές δυσκολίες. Τα κύτταρα πρέπει να ανακτηθούν από τα δείγματα τροφίμων, τα οποία οφείλουν να είναι απαλλαγμένα από παρεμβαλλόμενα σωματίδια "μεγέθους βακτηρίων". Τέτοια σωματίδια είναι τα θραύσματα που λαμβάνονται μετά την ομογενοποίηση και τις συχνές πέψεις που χρησιμοποιούνται για την απελευθέρωση των κυττάρων για τις συμβατικές

αναλύσεις σε τρυβλία. Η χρήση δειγμάτων τροφίμων που περιέχουν σωματίδια, τα οποία μπορεί να παράγουν αυτοφθορισμό, παρεμποδίζουν την ανίχνευση-ταυτοποίηση των βακτηριακών κυττάρων και κατά συνέπεια απαιτούνται εξειδικευμένες διαδικασίες αφαίρεσης των ψευδώς θετικών σημάτων πριν από την ανάλυση με την κυτταρομετρία ροής. Εάν η ανάλυση με την κυτταρομετρία ροής περιλαμβάνει τυποποιημένα δείγματα τροφίμων, όπως έτοιμα παρασκευασμένα φαγητά, τα παραπάνω προβλήματα μπορεί να επιτείνονται από την παρουσία συστατικών που περιέχουν DNA / RNA (π.χ στα αρτύματα τροφίμων), τα οποία θα δεσμεύονται μη ειδικά με τις χρωστικές μελέτης της βιωσιμότητας των κυττάρων με βάση το DNA [Laplace, et al, 1993].

Όσον αφορά τα όρια ανίχνευσης, τα περισσότερα όργανα κυτταρομετρίας σήμερα αποδίδουν με μεγαλύτερη ασφάλεια αποτελέσματα όταν αναλύουν 10^5 - 10^6 κύτταρα ανά δείγμα. Είναι έτσι απαραίτητο να υπάρχει ένας «ικανοποιητικός πληθυσμός κυττάρων» για να πραγματοποιείται μία βέλτιστη ανάλυση. Αυτό σημαίνει ότι, είτε πρέπει τα δείγματα που περιέχουν τα κύτταρα-στόχους να είναι συμπυκνωμένα, είτε να προηγείται ένα στάδιο κατά το οποίο θα επιτυγχάνεται ο εμπλουτισμός του δείγματος για τον συγκεκριμένο πληθυσμό-στόχο που βρίσκεται σε χαμηλό επίπεδο, ώστε να επιτευχθούν ανιχνεύσιμα επίπεδα. Ένα βασικό μειονέκτημα για την ανάλυση των παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα με κυτταρομετρία ροής, είναι η αδυναμία στα περισσότερα από τα είδη των μικροβίων, να επιτευχθεί αναγνώριση ειδική του είδους των παθογόνων παραγόντων, «species-specific pathogen identification». Μια σειρά τεχνικών που βασίζονται στην ανάλυση του DNA, όπως ο φθορίζων in situ υβριδισμός (Fluorescence in situ hybridization, FISH) έχει επιφέρει αλλαγές στην μικροβιολογία των τροφίμων, ειδικά όταν συνδυάζεται με την κυτταρομετρία ροής (Flow-FISH) ή με τη χρήση των μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών αντισωμάτων [Zand, et al, 2021].

3.4 Ανάλυση δειγμάτων με την κυτταρομετρία ροής

Η πρόοδος της κυτταρομετρίας ροής στη μικροβιολογία των τροφίμων αναφαίνεται αφού εφαρμοστεί η τυπική διαδικασία της ανάλυσης και στη συνέχεια η σύγκριση και η αντιπαραβολή των αποτελεσμάτων με τις συμβατικές τεχνικές. Για την απελευθέρωση και την ανάκτηση των κυττάρων από τρόφιμα σε μια ανάλυση με την κυτταρομετρία ροής, πραγματοποιείται διαδικασία με βήματα αρκετά κοινά με αυτά της ανάλυσης σποράς σε τρυβλία. Αυτά περιλαμβάνουν:

- την αραίωση του δείγματος
- την ανάμιξη, απελευθέρωση μέσω της πέψης ή της ομογενοποίησης και

- την τελική παραγωγή του εναιωρήματος των σωματιδίων τροφής και των βακτηριακών κυττάρων.

Στη συνέχεια χρησιμοποιούνται ειδικές διαδικασίες καθαρισμού και άλλες διαδικασίες που χρησιμοποιούνται στις μεθόδους παρασκευής των βακτηριακών δειγμάτων, μέχρι να γίνει η τελική ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής [Dwivedi, Jaykus, 2011].

Επίσης, είναι αποδεκτό, ότι για την κυτταρομετρία ροής απαιτούνται πρόσθετα βήματα προετοιμασίας των δειγμάτων σε σύγκριση με τις τρέχουσες μεθοδολογίες που έχουν εγκριθεί κατά ISO και που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των παθογόνων μικροοργανισμών σε τρυβλίο. Η ανάπτυξη μεθόδων εξελίσσεται για την κυτταρομετρία ροής και θα πρέπει να είναι δυνατή μεσοπρόθεσμα η αναγνώριση συμφωνημένων και επικυρωμένων διαδικασιών για την προετοιμασία του δείγματος και την εκχύλιση των κυττάρων σε διάφορες ομάδες τροφίμων [Wilkinson, 2016].

Η ανάκτηση των κυττάρων μπορεί να περιλαμβάνει μια αρχική φυγοκέντρηση χαμηλής ταχύτητας (3.000 στροφές για 10 λεπτά) για να ληφθούν ως ίζημα τα κύτταρα, ακολουθούμενη από επαναιώρηση του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα και στη συνέχεια διήθηση μέσω διαφόρων μεμβρανών, ώστε να αποκλειστούν τα σωματίδια διαφόρων διαμέτρων, τα οποία μπορεί να επηρεάζουν τη μέτρηση. Τα φίλτρα απομακρύνουν με τις μεμβράνες διαχωρισμού των σωματιδίων που έχουν διάμετρο 15, 10 ή 5 μm τα μη κυτταρικά σωματίδια, ενώ συχνά μπορεί να απαιτείται και ένα τελικό στάδιο φυγοκέντρησης για τη συγκέντρωση των κυττάρων. Το κυτταρικό ίζημα μπορεί στη συνέχεια είτε απ' ευθείας να γίνει η χρώση του, είτε να επισημανθεί με ένα ειδικό αντίσωμα, το οποίο φέρει το φθοριόχρωμα για να ανιχνεύσει έναν ειδικό πληθυσμό. Εάν ο πληθυσμός των κυττάρων-στόχων είναι κάτω από το όριο ευαισθησίας ανίχνευσης του κυτταρομετρητή ή αποτύχει να δώσει ένα σήμα μεγαλύτερης έντασης φθορισμού από τον θόρυβο (κατώφλι ανίχνευσης, background), τότε είναι απαραίτητο να επακολουθήσει ένα περαιτέρω στάδιο εμπλουτισμού, ώστε να καταστεί δυνατή η παρουσία ανιχνεύσιμων επιπέδων κυττάρων για αξιόπιστη ανάλυση και αποτελέσματα [Harkins, Harrigan, 2004].

Μια μέθοδος με ένα μόνο βήμα που χρησιμοποιείται στα εργαστήρια, τόσο για την ανάκτηση όσο και για τη συγκέντρωση των γαλακτοβακίλλων (LAB) από το ημίσκληρο τυρί Cheddar περιλαμβάνει την εκχύλιση τριών ωρών για την λήψη της υδατικής φάσης (χυμός), από 300 gr δείγματος τυριού χρησιμοποιώντας πίεση 320 MPa. Με αυτή τη διαδικασία προκύπτει ένα σχετικά διαυγές διάλυμα, το οποίο στη συνέχεια μπορεί να φυγοκεντρηθεί και να περιέχει από 10^4 - 10^9 κύτταρα/ml. Αυτό το δείγμα είναι εξαιρετικά εύχρηστο και μπορεί να αναλυθεί ταυτόχρονα με την κυτταρομετρία ροής ως προς το προφίλ του, παράλληλα με

τον προσδιορισμό των απελευθερωμένων πεπτιδολυτικών ενζύμων και ως προς τα προϊόντα ωρίμανσης πεπτιδίου - αμινοξέος. Δεδομένου ότι το τυρί Cheddar είναι ημιστερεό και έχει περιεκτικότητα σε υγρασία 38-40%, μπορεί να είναι δυνατόν να εφαρμοστεί αυτή η μεθοδολογία ή ορισμένες τροποποιήσεις της και σε άλλους τύπους τροφίμων, ως πιθανή διαδικασία τέλειας ανάκτησης της συγκέντρωσης των κυττάρων με πιο αξιόπιστα αποτελέσματα [Wilkinson, et al, 1994; Sheehan, et al, 2005; Yanachkina, et al, 2016].

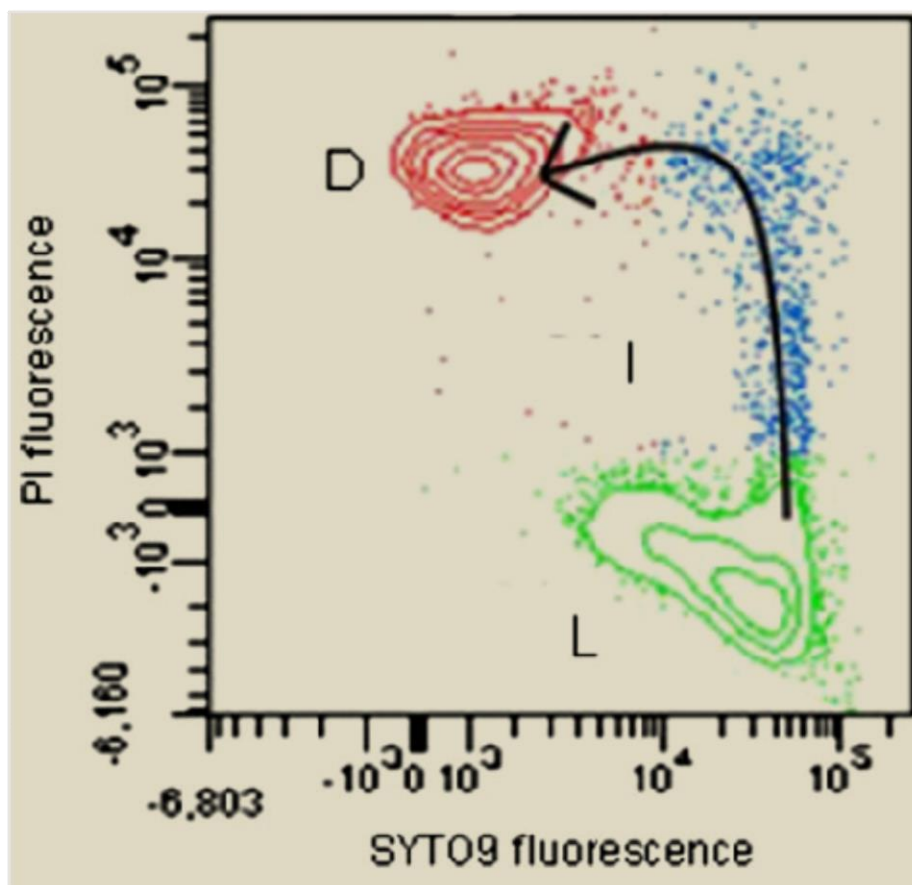
Όσον αφορά τον όγκο του δείγματος, όγκοι από 5-100 μl μπορούν εύκολα να αναλυθούν στο κυτταρόμετρο με βάση τις ρυθμίσεις της ροής του δείγματος, ώστε η κυτταρομετρία ροής να θεωρείται πιο ευέλικτη σε σύγκριση με την καταμέτρηση των αποικιών στα τρυβλία, κατά την οποία παραδοσιακά απαιτείται 1 ml για επίστρωση ανά τρυβλίο [Wilkinson, et al, 1994]. Η αναλυτική ταχύτητα της κυτταρομετρίας ροής είναι εκπληκτική γιατί μπορούν να αναλυθούν δεκάδες χιλιάδες κύτταρα (συμβάντα-cells, events) από τους χρήστες και τα δεδομένα αυτά να ληφθούν εντός 2-3 λεπτών ανά δείγμα. Σε αντίθεση με την κυτταρομετρία ροής, στη συμβατική μέτρηση με τη χρήση τρυβλίων, πρέπει να πραγματοποιηθεί μια σειρά αραιώσεων, να γίνει επίστρωση και στη συνέχεια να επωαστεί και να ακολουθήσει η επιλογή εκείνων των τρυβλίων τα οποία δίνουν από 30-300 αποικίες ανά τρυβλίο, γιατί αυτές αντιπροσωπεύουν στατιστικά έγκυρα δεδομένα, πράγμα που καθιστά τον προσδιορισμό μια ανάλυση χρονοβόρα και με μεγαλύτερο κόστος [Kennedy, Wilkinson, 2017].

3.5 Χρήσιμες χρώσεις για την κυτταρομετρία ροής στη μικροβιολογία τροφίμων

Η μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για τη μικροβιακή ανάλυση βασίζεται στη φθορίζουσα σήμανση των κυττάρων, η οποία μπορεί να περιλαμβάνει, στην απλούστερη περίπτωση, ένα απλό σήμα χαρακτηριστικό για την αρίθμηση ολόκληρου του πληθυσμού ή διάφορους συνδυασμούς σημάτων, όπου αναλύονται πολλαπλά κυτταρικά χαρακτηριστικά συγχρόνως. Ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών σημάτων φθορισμού είναι εμπορικά διαθέσιμα και η επιλογή κάθε φορά πρέπει να γίνεται με βάση τα δεδομένα που απαιτούνται, όπως η μη τοξικότητα για το κύτταρο, η καταλληλότητα για την ανίχνευση από το λέιζερ στο συγκεκριμένο κυτταρόμετρο, καθώς επίσης και με άλλους παράγοντες, όπως είναι η φασματική υπερκάλυψη με άλλα σήματα φθορισμού [Leonard, et al, 2016].

Τα μονήρη σήματα βιωσιμότητας, τα οποία έχουν σχεδιαστεί για να συνδέονται με το DNA-RNA του κυτταρικού πληθυσμού, όπως είναι το SYTO™ 9 ή το Thiazole Orange (TO), επιτρέπουν την γενική εκτίμηση της βακτηριακής εποίκησης. Αυτό πραγματοποιείται με βάση το γεγονός ότι οι χρωστικές αυτές μπορούν να εισέλθουν σε όλα τα κύτταρα και να δεσμευτούν στα νουκλεϊκά οξέα τους, αμφότερων και των ζωντανών κυττάρων που

διαθέτουν άθικτη την κυτταρική τους μεμβράνη και των «τραυματισμένων» ή των νεκρών κυττάρων. Αυτά τα δεδομένα ωστόσο είναι περιορισμένης χρήσης για τον λόγο της μη διάκρισης ζωντανών και νεκρών κυττάρων. Επομένως, η γενική προσέγγιση είναι να χρησιμοποιούνται συνδυασμοί φθοριοχρωμάτων με διαφορετικά σήματα για διαφορετικούς στόχους, για τη μέτρηση των διαφόρων πτυχών της κυτταρικής βιωσιμότητας και του μεταβολισμού των κυττάρων. Ο συνδυασμός σημάτων Live/Dead BacLight (Invitrogen, USA), αποτελείται από το SYTO9 και το PI. Τα δύο διαφορετικά χρώματα - σήματα: πράσινο και κόκκινο φθορίζον φθοριόχρωμα, είναι ο συνδυασμός που είναι πολύ χρήσιμος στον προσδιορισμό της κυτταρικής σύστασης για τη βιωσιμότητα, η οποία βασίζεται στην αρχή της μετατόπισης της πράσινης χρωστικής SYTO™ 9, από κύτταρα με μη κατεστραμμένες μεμβράνες, από την κόκκινη χρωστική PI στα νεκρά κύτταρα (Εικόνα 26) [Vanhauteghem, et al, 2011; De Sousa Guedes, Leite Souza 2021].



Εικόνα 26. Προφίλ της κυτταρομετρίας ροής που προκύπτει από διαφορεική χρώση χρησιμοποιώντας συνδυασμούς SYTO9 / PI. Χαρακτηρίζονται οι υποπληθυσμοί των κυττάρων της *E. Coli*, σε ζώντα (πράσινος πληθυσμός), νεκρά (κόκκινος πληθυσμός) και αποπτωτικά (μπλέ πληθυσμός) [Vanhauteghem, et al, 2011].

Ένα καίριο τεχνικό ζήτημα που πρέπει να επισημανθεί όταν εξετάζουμε τους συνδυασμούς των χρωστικών για τα διαφορετικά μικροβιακά είδη και στελέχη είναι ότι πρέπει να διενεργηθεί ένας προκαταρκτικός έλεγχος για να διασφαλιστεί ότι οι χρωστικές που λαμβάνονται δεν είναι τοξικές για τα κύτταρα στις δόσεις που χρησιμοποιούνται στη συγκεκριμένη ανάλυση. Επομένως, πρέπει να πραγματοποιηθεί ένα παράλληλο πείραμα που να χρησιμοποιεί: τα σήματα της κυτταρομετρίας ροής (μέτρηση βιωσιμότητας) και να διασταυρώνει εκείνα της μέτρησης βιωσιμότητας με την αρίθμηση των αποικιών -κυττάρων σε τρυβλία, ώστε να διαπιστωθεί η συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων και εάν υπάρχει κάποιο βακτηριακό στέλεχος όπου η χρωστική σχετίζεται με την τοξικότητα να απορρίπτεται από την ανάλυση [Valizadeh, et al., 2012].

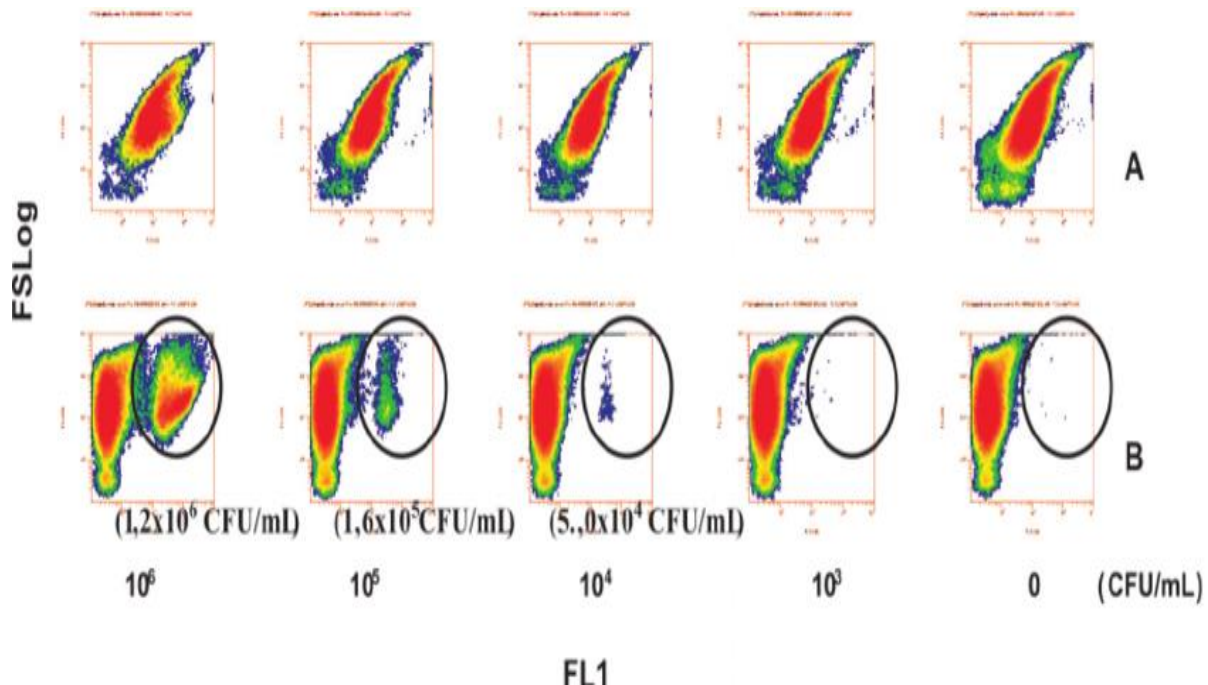
3.6 Ανίχνευση αντισωμάτων και ανάλυση με την κυτταρομετρία ροής

Στην βασική έρευνα οι διαθέσιμοι συνδυασμοί των χρωστικών δεν είναι πάντα ενδεικτικοί της παρουσίας ή της απουσίας συγκεκριμένων βακτηριακών ειδών εντός ενός μικτού πληθυσμού. Στην κατεύθυνση αυτή προσανατολίζεται η χρήση των αντισωμάτων για σήμανση συγκεκριμένων βακτηρίων για την ανίχνευση και ανάλυση με κυτταρομετρία ροής, είτε με απευθείας μέτρηση του φθορισμού, είτε ενισχύοντας το σύμπλοκο αντισώματος-βακτηριακού κυττάρου με ένα δευτερογενές φθορίζον αντίσωμα [Hibi et al, 2006].

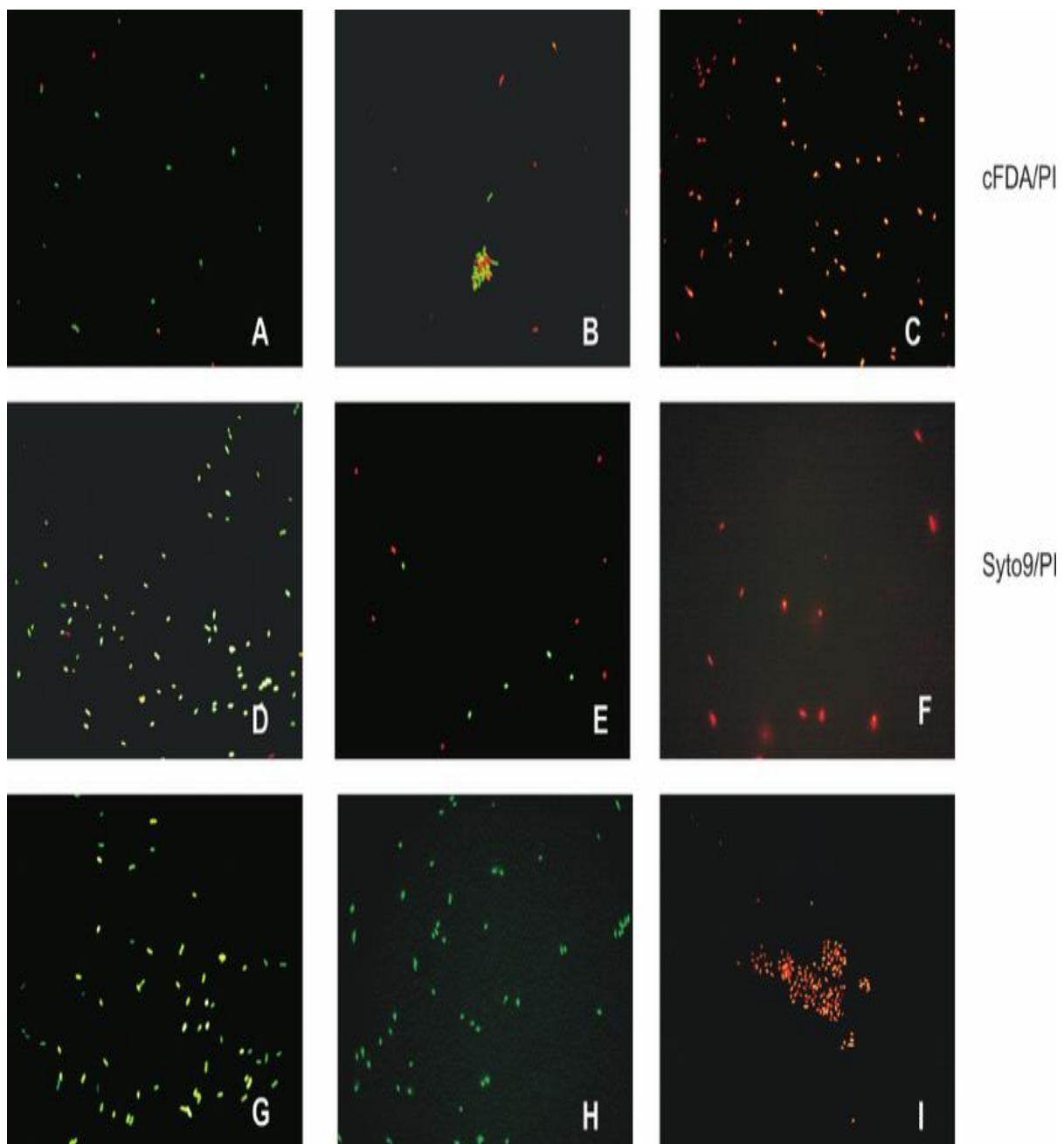
Η εφαρμογή αυτής της τεχνολογίας πραγματοποιείται με τον ανοσομαγνητικό διαχωρισμό (Immuno Magnetic Separation, IMS). Σε αυτή χρησιμοποιούνται μαγνητικά επικαλυμμένα αντισώματα έναντι των κυττάρων-στόχων, τα οποία σημαίνονται ειδικά εντός ενός υγρού δείγματος και στη συνέχεια διαχωρίζονται με την εφαρμογή ενός μαγνητικού πεδίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συγκέντρωση των κυττάρων-στόχων από μια μικτή καλλιέργεια. Ακολούθως, τα κύτταρα αυτά μπορούν να υποβληθούν απευθείας σε ανάλυση και χαρακτηρισμό με τη μεθοδολογία της κυτταρομετρίας ροής. Οι Hibi, et al, ανέφεραν τον διαχωρισμό της *L. monocytogenes* από μικτές καλλιέργειες με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό και στη συνέχεια ανάλυση με κυτταρομετρία ροής σε εύρος 10^4 - 10^8 cfu/ml. Η δέσμευση των αντισωμάτων στην επιφάνεια κυττάρων-στόχων, όπως της *E. coli* 0157: H7 ή της *L. monocytogenes*, απαιτεί περαιτέρω εμπλουτισμό, ώστε οι αριθμοί των κυττάρων να φθάσουν να είναι σε ανιχνεύσιμα επίπεδα χρησιμοποιώντας την κυτταρομετρία ροής με όρια ανίχνευσης από 10^4 cfu/ml και άνω [Hibi, et al, 2006].

Η ερευνητική ομάδα των Tebaldi, et al, μελέτησε την ανίχνευση του *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* (Xap) σε σπόρους φασολιών με ανοσοχρώση και άμεση μέτρηση της βιωσιμότητας με κυτταρομετρία ροής (immuno-FCM). Τα αποτελέσματα αυτής

συγκρίθηκαν με εκείνα που προέκυψαν από το μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού (immunofluorescence microscopy, IF), όπου η επίστρωση της αραιώσης έγινε σε ημι-εκλεκτικό μέσο καλλιέργειας για την ποσοτική ανίχνευση του ίδιου στελέχους (*Xap*) σε εκχυλίσματα σπόρων φασολιών. Οι κυτταρικές συγκεντρώσεις του *Xap* μεταξύ 10^3 - 10^7 cfu/ml προστέθηκαν σε υγρά εκχυλίσματα σπόρων φασολιών και μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση της ανοσο-κυτταρομετρίας ροής για τον διαχωρισμό των ανοσοχρωσθέντων κυττάρων της *Xap* από τα ακατέργαστα εκχυλίσματα των σπόρων, αξιολογήθηκαν και τεκμηριώθηκαν με PCR. Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής ως προς την άμεση μέτρηση της βιωσιμότητας (Direct Viable Counting, DVC) της *Xap* έγινε χρησιμοποιώντας τους συνδυασμούς των χρωστικών του PI και διοξικής καρβοξυ-φλουορεσκεΐνης (carboxy Fluorescein Diacetate, cFDA) ή του PI και SYTO™ 9, καθώς και το συνδυασμό ανοσο-κυτταρομετρίας ροής και PI. Η διασπορά των αραιώσεων σε κατάλληλα τρυβλία μελετήθηκε με μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού και επέτρεψε την ανίχνευση της *Xap* σε εκχυλίσματα σπόρων φασολιών σε εύρος 10^3 - 10^6 cfu/ml, ενώ η μέτρηση με ανοσο-κυτταρομετρία ροής σε εύρος 10^4 - 10^6 cfu/ml (Εικόνα 27 και 28) [Tebaldi, et al, 2010].

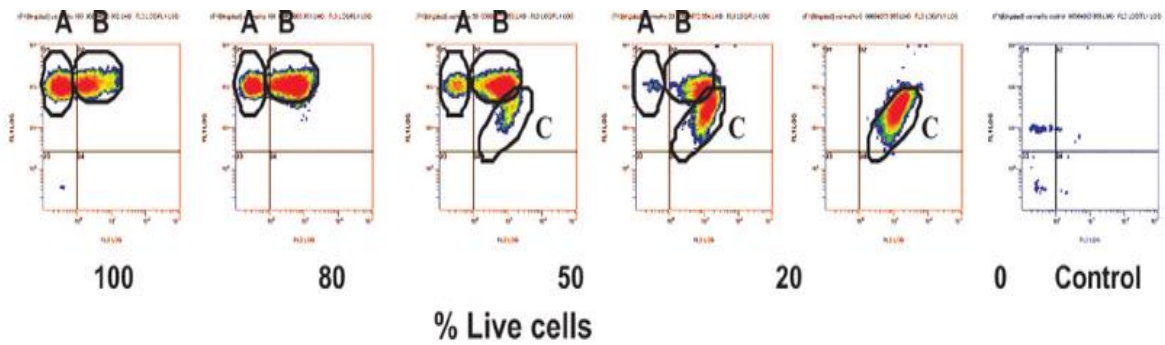


Εικόνα 27. Διαγράμματα πυκνότητας ανοσο-κυτταρομετρίας ροής αραιώσεων (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 cfu/ml) της *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* σε αραιώσεις τεχνητά μολυσμένου εκχυλίσματος σπόρων. Α) Δεν προστέθηκε ανοσος ορός. Β) Προστέθηκε ανοσος ορός. Τα πράσινα φθορίζοντα σωματίδια βρίσκονται στον κύκλο. Στους κύκλους φαίνεται ο αριθμός των φθορίζόντων σωματιδίων (events). FL1 = πράσινος φθορισμός, FS = πρόσθιος σκεδασμός [Tebaldi, et al, 2010].

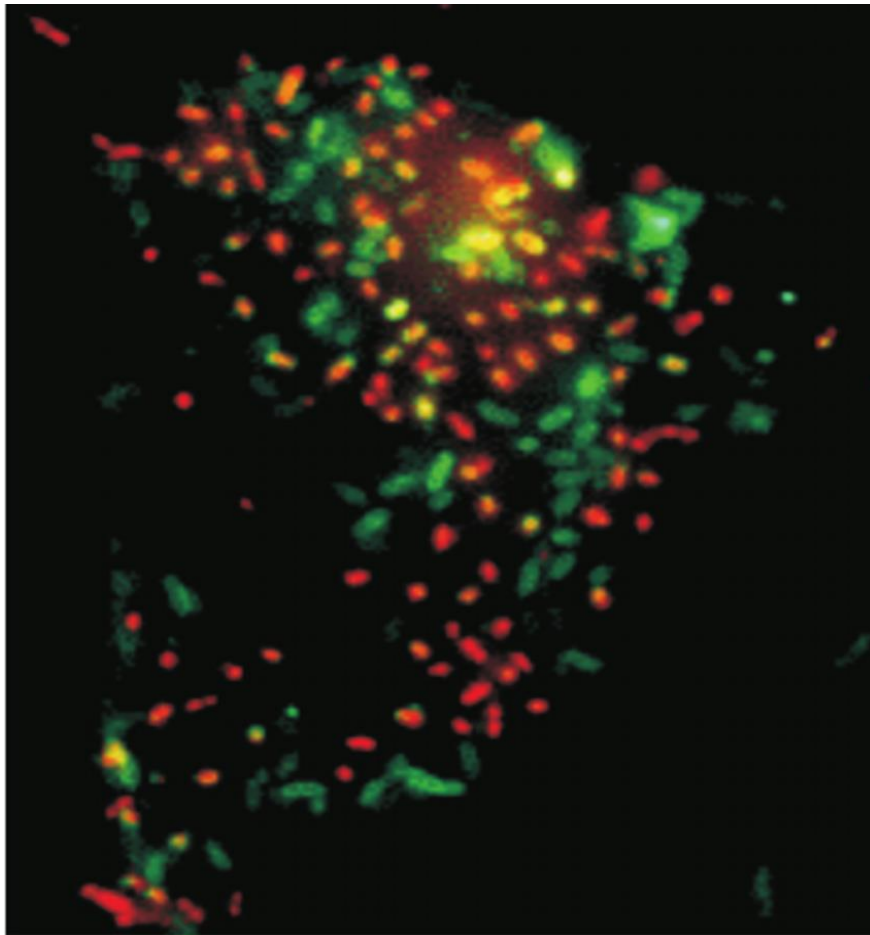


Εικόνα 28. Φωτομικρογραφίες μειγμάτων βιώσιμων και θερμικά νεκρών- αδρανοποιημένων κυττάρων της *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* οι οποίες έχουν υποστεί χρώση με φθορίζουσες χρωστικές. Τα εναιωρήματα περιείχαν 100% (A, D), 50% (B, E) και 0% (C, F) βιώσιμων κυττάρων. Στα κύτταρα έχει γίνει διπλή χρώση με διοξική καρβοξυφθοροσκεΐνη (cFDA) και ιωδιούχο προπίδιο (PI) ή με SYTO™ 9 και PI, αντίστοιχα. Τα κύτταρα που θεωρούνται βιώσιμα χρωματίστηκαν επίσης μόνο με cFDA (G) ή SYTO™ 9 (H) και τα νεκρά κύτταρα μόνο με PI (I) [Tebaldi, et al, 2010].

Οι συγγραφείς αναφέρουν ότι η κυτταρομετρία ροής επέτρεψε τον ποσοτικό προσδιορισμό των βιώσιμων κυττάρων της *Xap* μέσα από πρακτικές μέτρησης της βιωσιμότητας (Εικόνα 29). Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής έγινε με μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού (Εικόνα 30) [Tebaldi, et al, 2010].



Εικόνα 29. Διαγράμματα πυκνότητας: φαίνονται πράσινα φθορίζοντα και κόκκινα φθορίζοντα σωματίδια, μετά από χρώση ζωντανών και νεκρών κυττάρων (σε διάφορα ποσοστά) της *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*, με αντισώματα συζευγμένα με Alexa 488 (πράσινος φθορισμός) και ιωδιούχο προπίδιο (ερυθρός φθορισμός). Α) Πράσινα φθορίζοντα σωματίδια (ζωντανά κύτταρα). Β) Πράσινα και κόκκινα σωματίδια (μικτός πληθυσμός). C) Κόκκινα φθορίζοντα σωματίδια (νεκρά κύτταρα). Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS [Tebaldi, et al, 2010].



Εικόνα 30. Φωτομικρογραφία στην οποία οπτικοποιήθηκαν με μικροσκοπία φθορισμού τα κύτταρα χρησιμοποιώντας μπλε φως για διέγερση των αντίστοιχων χρωστικών. Το δείγμα περιέχει μίγμα 50% ζωντανών και νεκρών κυττάρων, τα οποία ταυτόχρονα έχουν υποστεί χρώση με αντισώματα συζευγμένα με Alexa 488 και με ιωδιούχο προπίδιο. Τα κύτταρα που είναι πράσινα θεωρούνται ζωντανά και τα κόκκινα είναι νεκρά [Tebaldi, et al, 2010].

Οι Wilkes, et al, περιέγραψαν την ανάπτυξη μιας μεθοδολογίας για την ταχεία και ευαίσθητη ανίχνευση του βακτηρίου *E. Coli 0157: H7* σε σπανάκι. Στη μελέτη τους χρησιμοποίησαν πολυκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με την χρωστική FITC έναντι των κυτταρικών ουσιών του παθογόνου μικροοργανισμού σε συνδυασμό με τη χρώση PI για τα νεκρά κύτταρα. Η αρχική πειραματική διαδικασία είναι η ακόλουθη:

- 25g από σπανάκι προστίθεται σε 100 ml καλλιέργειας που περιέχουν 5 ή 50 κύτταρα
- ακολουθεί ένα στάδιο εμπλουτισμού 4 ωρών
- τα υγρά που προστέθηκαν μέσα στο σπανάκι συλλέγονται και χρησιμοποιούνται ως αρχικό δείγμα.

Στη συνέχεια, ακολουθεί φυγοκέντρηση βαθμιαίας κλίμακας, η οποία επιτρέπει τη συγκέντρωση των κυττάρων, που στη συνέχεια απομονώνονται, πλένονται και διηθούνται από φίλτρο 5 mm πριν γίνει η σήμανση με το αντίσωμα και στο τέλος πραγματοποιείται η κυτταρομετρική ανάλυση. Η χρήση ενός εξειδικευμένου κυτταρομέτρου που έχει κυψελίδα ροής ευρείας διατομής με διαχωρισμό 130, αναφέρθηκε από τους συγγραφείς ότι παρουσιάζει καλύτερη ανάλυση των δειγμάτων που περιέχουν σωματίδια τα οποία πιθανόν να μπορούν να παρεμβαίνουν στη βακτηριακή ανάλυση [Wilkes, et al, 2012].

Στην ανάλυση με την κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των βακτηρίων μία σειρά πολυδιάστατων πυλών-παραθύρων (gates), ξεκινώντας από το συνηθισμένο αρχικό διάγραμμα του FSC και του SSC. Στη συνέχεια αποκλείστηκαν τα θετικά νεκρά κύτταρα με τη χρώση PI και έγινε η ανίχνευση των ζωντανών σημασμένων *E. coli 0157: H7* κυττάρων. Η απόδοση αυτής της ποιοτικής δοκιμασίας ελέγχου διαρκεί περίπου 4,5 ώρες, με ένα όριο ανίχνευσης 1 βιώσιμο κύτταρο σε 25 g δείγματος. Ωστόσο, η αδυναμία άμεσης ανίχνευσης χαμηλού αριθμού παθογόνου βακτηρίου χωρίς ένα στάδιο εμπλουτισμού, μαζί με τη σχετικά λεπτομερή παρασκευή του δείγματος, εξακολουθεί να μειονεκτεί έναντι μιας άμεσης δοκιμασίας που απαριθμεί απευθείας, με την κυτταρομετρία ροής, τα παθογόνα κύτταρα στο δείγμα [Wilkes, et al, 2012].

Οι ερευνητές Williams, et al, περιέγραψαν τρία χρόνια αργότερα περαιτέρω εξέλιξη αυτού του τρόπου προσδιορισμού, λαμβάνοντας έγκριση από τον FDA (Level 2 FDA) για την ανίχνευση του βακτηρίου *E. coli 0157: H7* σε ακατέργαστο σπανάκι. Η διαδικασία της επικύρωσης περιελάμβανε την ανάλυση 20 μολυσμένων και 20 μη μολυσμένων δειγμάτων με δύο μεθόδους προσδιορισμού: την FCM και την ποσοτική q-PCR, εγκεκριμένη από τον FDA. Ένα έως τέσσερα βιώσιμα κύτταρα ανά 100 ml ενοφθαλμίστηκαν στα δείγματα του σπανακιού με περίοδο επώασης 17,5 ωρών πριν τη δειγματοληψία ελέγχου. Μεταγενέστερα

στάδια της παρασκευής περιελάμβαναν την προσθήκη του παράγοντα φωτοευαισθησίας, της φλοξίνης B, και επώαση διάρκειας 5 ωρών για να επιτευχθεί η αύξηση του αριθμού των κυττάρων (εμπλουτισμός) ώστε να υπάρχουν ανιχνεύσιμα επίπεδα. Χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα, όπως και στην προηγούμενη μελέτη των ερευνητών και ένα άλλο κυτταρόμετρο, με κυψελίδα ροής ευρείας διαμέτρου, αλλά με μεγαλύτερο στόμιο διαχωρισμού στα 170 nm [Williams, et al, 2015].

Η συνολική απόδοση της μεθόδου με την κυτταρομετρία ροής ήταν πολύ καλύτερη συγκριτικά με την εγκεκριμένη μέθοδο της ποσοτικής PCR. Η ευαισθησία ήταν παρόμοια μεταξύ των δύο μεθόδων στα 2-4 κύτταρα ανά 100 ml, ο χρόνος αποτελέσματος για τη μέθοδο της FCM ήταν περίπου 9 ώρες, ενώ για την ποσοτική PCR ήταν σχεδόν 51 ώρες. Ο αριθμός των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων για την κυτταρομετρία ήταν 4/10, ενώ για την qPCR ήταν 5/10. Αυτή η μελέτη αντιπροσωπεύει πρόοδο προς την κατεύθυνση μιας εμπορικής και διαπιστευμένης ποιοτικής ανοσοανίχνευσης με την κυτταρομετρία ροής για την ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Είναι σημαντικό, ότι παρέχει αξιόπιστα δεδομένα σύμφωνα με τη συγκριτική απόδοση της ανοσο-κυτταρομετρίας ροής με τους διαπιστευμένους προσδιορισμούς, όπως είναι η q-PCR [Williams, et al, 2015].

Επίσης, η μελέτη των Subires, et al, παρουσιάζει τη δυναμική που έχει η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής για συγκεκριμένες ομάδες τροφίμων, όπως οι παρασκευασμένες σαλάτες ζυμαρικών που περιέχουν μια σειρά συστατικών, που μπορεί να δυσκολεύουν την ανάλυση με την κυτταρομετρία ροής. Οι συγγραφείς αναφέρουν μία σχετικά απλή πρακτική για την ανίχνευση του βακτηρίου *E. coli* 0157: H7. Σε αυτή τη μέθοδο, 10^3 - 10^7 cfu / g ζωντανών κυττάρων ενοφθαλμίστηκαν σε μη παστεριωμένες σαλάτες, οι οποίες αποθηκεύτηκαν στους 4 °C για δύο εβδομάδες. Η ανίχνευση του παθογόνου πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντίσωμα συζευγμένο με το φθοριόχρωμα R-φυκοερυθρίνη (R-PE, κίτρινο-πορτοκαλί φθορισμό), ενώ ο διαχωρισμός μεταξύ ζωντανών-νεκρών σημάτων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το σημασμένο σύμπλοκο SYBR GREEN I και PI. Σε αυτή τη μελέτη δεν χρησιμοποιήθηκε το στάδιο εμπλουτισμού, αλλά μια άμεση σήμανση ενός διηθημένου και επαναιωρούμενου κυτταρικού ιζήματος [Subires, et al, 2014].

Οι συσχετίσεις έγιναν με συμβατική σπορά των δειγμάτων σε τρυβλία και ακολούθησε η αρίθμηση των αποικιών που αναπτύχθηκαν. Τα δεδομένα που ανακτήθηκαν δείχνουν ένα όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) της τάξης του 10^5 cfu/ml, που αποδίδεται στην παρεμβολή των σωματιδίων, παρά τα προπαρασκευαστικά στάδια. Καλή συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ της ανάλυσης με κυτταρομετρία ροής και των δεδομένων που προέκυψαν από την

αρίθμηση στα τρυβλία σε μια συγκεκριμένη όμως συγκέντρωση αντισώματος, αποδεικνύοντας έτσι την αναγκαιότητα για μια εκτεταμένη βελτιστοποίηση της μεθόδου. Η πρόσθετη πληροφορία που μπορεί να δώσει η πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής φαίνεται από το συνδυασμό SYBR Green I και του PI, που αποκαλύπτει ότι αρχικά τα περισσότερα κύτταρα είχαν υποστεί βλάβη στη μεμβράνη τους, η οποία φάνηκε ότι ανακτήθηκε τη 14η ημέρα. Αυτή η παρατήρηση δεν μπορεί να γίνει από τη συμβατική μέθοδο των τρυβλίων και μπορεί να μας επιτρέψει να παρακολουθήσουμε καλύτερα την επιβίωση των μικροοργανισμών στα τρόφιμα και να εκτιμήσουμε τις δυνατότητές τους να αποτελέσουν λανθάνουσα απειλή για την ασφάλεια των καταναλωτών [Subires, et al, 2014].

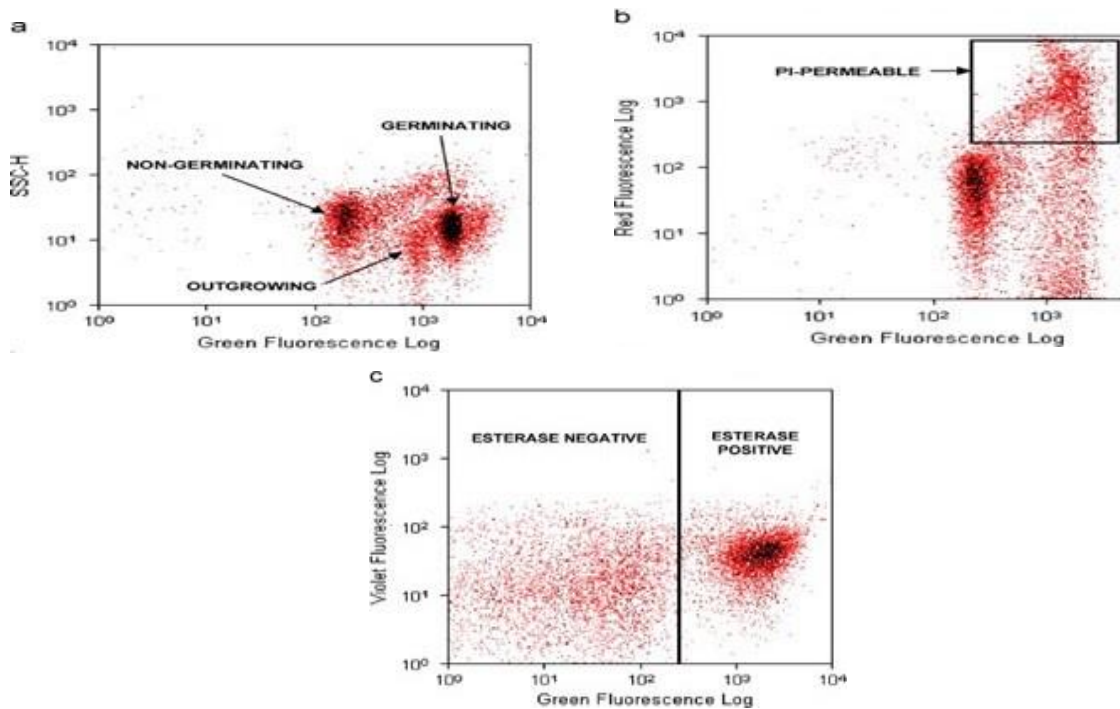
3.7 Ανίχνευση βακτηριακών σπορίων

Τα βακτήρια που σχηματίζουν σπόρους είναι ιδιαίτερα σημαντικό να ανιχνεύονται στη βιομηχανία τροφίμων, ιδιαίτερα του *Bacillus cereus* σε παρασκευασμένα τρόφιμα που προορίζονται για κατανάλωση, όπως είναι του ρυζιού και των δημητριακών. Ο *B. cereus* βρίσκεται στο έδαφος και μπορεί να εισέλθει στην τροφική αλυσίδα σε πολύ πρώιμο στάδιο, όπως κατά τη συγκομιδή των σιτηρών και κατά τη διάρκεια του αρμέγματος στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Επίσης σημαντικό είναι να εξασφαλίζεται η απουσία του εξαιρετικά επικίνδυνου παθογόνου *Clostridium botulinum* στο τελικό προϊόν της κατανάλωσης [Soni, et al, 2016].

Ο έλεγχος για τους σπόρους βακτηρίων σε τρόφιμα περιλαμβάνει συνήθως το στάδιο του εμπλουτισμού και στη συνέχεια παρακολουθείται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε εκλεκτικά μέσα (π.χ. θρεπτικό άγαρ) και ακολουθούν επιβεβαιωτικές τεχνικές, κυρίως με μοριακές μεθόδους ανάλυσης. Ως εκ τούτου, η μεθοδολογία της κυτταρομετρίας ροής διερευνάται ως μια δυνητικά πιθανή μέθοδος για την ανίχνευση και τη μελέτη των σπόρων μετά την ανάπτυξή τους μέσα σε τρόφιμα. Γενικά, η μεθοδολογία της κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για να μελετήσει τους σπόρους, τον τρόπο βλάστησής τους, την ανάπτυξη και επιβίωση των βλαστικών κυττάρων στα μοντέλα των συστημάτων τροφής. Αυτό με τη σειρά του αποτέλεσε τη βάση για τις κυτταρομετρικές και βιοχημικές εκτιμήσεις των επιδράσεων διαφόρων τρόπων επεξεργασίας των τροφίμων στη δημιουργία σπόρων ή στη βλαστική μορφή των κυττάρων [Cronin, Wilkinson, 2007].

Οι ερευνητικές εργασίες των Cronin και Wilkinson (2008), έδειξαν ότι δημιουργήθηκαν αρκετοί ετερογενείς υποπληθυσμοί μετά την έκθεση των ενδοσπόρων του *B. cereus* σε διάφορες θερμοκρασίες, προσομοιωμένες σε αυτές του μαγειρέματος και σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, χρησιμοποιώντας την κυτταρομετρία ροής και συνδυάζοντας τις

χρωστικές SYTO™ 9/PI και cFDA/Hoechst 33342. Στην Εικόνα 31 παρουσιάζεται η ανάλυση των ενδοσπόρων με κυτταρομετρία ροής, όπου η χρώση γίνεται με SYTO™ 9 χρησιμοποιώντας τον πράσινο φθορισμό έναντι του πλάγιου σκεδασμού (SSC), μεθοδολογία που είχε αναπτυχθεί από τους ίδιους ερευνητές προκειμένου να αναγνωρίσουν και να ταυτοποιήσουν τον αριθμό των διακριτών πληθυσμών των ενδοσπορίων του *B. cereus* [Cronin, Wilkinson, 2008].



Εικόνα 31. Κυτταρογράμματα των ενδοσπορίων στο *Bacillus cereus* που αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής. (α) Προφίλ πλάγιου σκεδασμού (SSC-H) έναντι του πράσινου φθορισμού των ενδοσπορίων που χρωματίστηκαν με το SYTO™ 9 για χρονικό διάστημα μιας ώρας. Πειραματικά προσδιορίστηκαν οι πληθυσμοί των βλαστανόντων και των υπεραναπτυσσόμενων ενδοσπορίων. (β) Προφίλ πράσινου φθορισμού έναντι κόκκινου του SYTO™ 9 και των χρωσμένων με PI ενδοσπορίων, στα 70 λεπτά. Στο πλαίσιο παρουσιάζεται έντονη δραστηριότητα στον κόκκινο φθορισμό υποδεικνύοντας ότι είναι διαπερατά από το PI ενδοσπόρια. (γ) Προφίλ φθορισμού πράσινου έναντι ιώδους των ενδοσπορίων που έχουν χρωματιστεί με cFDA και Hoechst 33342. Υποδεικνύοντας τα έντονα πράσινα φθορίζοντα ενδοσπόρια, των οποίων η δράση της εστεράσης έχει διασπάσει την cFDA στην φθορίζουσα CF. (carboxyfluorescein diacetate CFDA = διοξεική καρβοξυφθοροσκεΐνη carboxyfluorescein CF = καρβοξυφθοροσκεΐνη) [Cronin, Wilkinson, 2008].

Μέσω της γραφικής παράστασης των περιοχών γύρω από τα όρια του εκάστοτε διακριτού πληθυσμού κατέστη δυνατό να αριθμηθούν τα βλαστανόντα και αναπτυσσόμενα ενδοσπόρια μέσα σε κάθε δείγμα που αναλύεται (Εικόνα 31a). Οι χρώσεις των ενδοσπορίων με SYTO™ 9 και PI αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας κυτταρογράμματα του πράσινου έναντι κόκκινου

φθορισμού, που επέτρεψε με αυτόν τον τρόπο την αναγνώριση και ποσοτικοποίηση των διαπερατών από το ΡΙ ενδοσπορίων (Εικόνα 31b). Τα ενδοσπόρια που εμφανίζουν ενδοκυτταρική δραστηριότητα εστεράσης ταυτοποιήθηκαν και αριθμήθηκαν χρησιμοποιώντας τα κυτταρογράμματα του πράσινου έναντι του ιώδους φθορισμού, όπου μια διακριτή περιοχή ιδιαίτερα έντονη στον πράσινο φθορισμό, αντιστοιχούσε στα θετικά ενδοσπόρια στην εστεράση (Εικόνα 31c) [Cronin, Wilkinson, 2008].

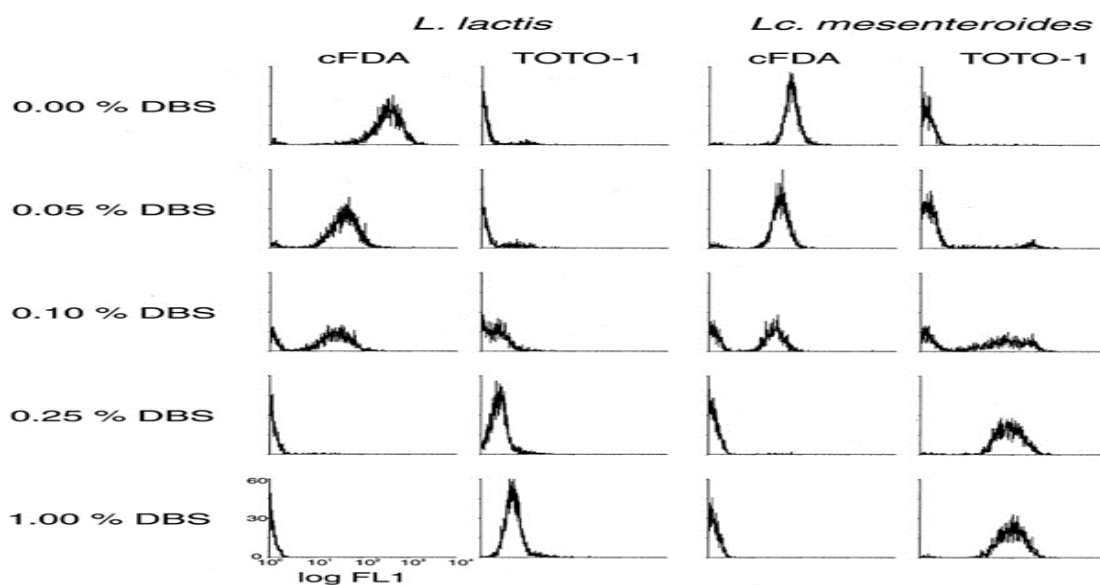
3.8 Κυτταρομετρία ροής και βακτήρια γαλακτικού οξέος

Τα βακτήρια που παράγουν γαλακτικό οξύ (γαλακτοβάκιλλοι, LAB) είναι τα κύρια βακτήρια που χρησιμοποιούνται στη ζύμωση του γάλακτος, των τυριών, γιαουρτιών, κρασιών, κρεάτων και λαχανικών. Είναι βακτήρια που εμβολιάζονται σε υποστρώματα τροφίμων, όπως το τυρί, για την παραγωγή του γαλακτικού οξέος σε μια συγκεκριμένη χρονική περίοδο της παραγωγής. Στη συνέχεια, κατά την ωρίμανση, τα βακτήρια που παράγουν γαλακτικό οξύ γίνονται μη βιώσιμα και απελευθερώνουν τα ένζυμα της ενδοκυτταρικής πεπτιδάσης τους, όπως το Pep X, για να ωριμάσει το τυρί και να δημιουργήσουν την τυπική γεύση για τη συγκεκριμένη ποικιλία. Έχει γίνει γνωστό εδώ και πολλά χρόνια ότι τα LAB, ειδικά οι *Lactococcus lactis subsp. cremoris* ή *Lactococcus lactis subsp. lactis* διαφέρουν σε σχέση με τη βιωσιμότητά τους. Ωστόσο, η σχέση που υπάρχει μεταξύ της χαμηλής βιωσιμότητας, της αυτολύσεως και της απελευθέρωσης του ενζύμου δεν έχει πλήρως διεκρινιστεί και ένα ερώτημα που έχει προκύψει τα τελευταία χρόνια, είναι εάν οι διαφορές στην κυτταρική διαπερατότητα του εκάστοτε στελέχους, επηρεάζει την απελευθέρωση του ενδοκυτταρικού ενζύμου στη δομή των τροφίμων. Παραδοσιακά, η βιωσιμότητα των στελεχών LAB αξιολογείται με τη μείωση του πληθυσμού που ανακτήθηκε σε εκλεκτικά μέσα ανάπτυξης, όπως το θρεπτικό υλικό L-M17. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των σχετιζόμενων με το στέλεχος αυτολυτικών ιδιοτήτων πραγματοποιείται, επί του παρόντος, με τη μέτρηση της δραστηριότητας των απελευθερωμένων ενδοκυτταρικών ενζύμων, ο δείκτης των οποίων είναι τα Pep X και η γαλακτική αφυδρογονάση (Lactate Dehydrogenase, LDH) [Song et al, 2017].

Οι Doolan, et al, έχουν μελετήσει εκτενώς το επιστημονικό πεδίο της εφαρμογής της κυτταρομετρίας και των λακτοβακίλλων (LAB). Επίσης, η εφαρμογή της μεθοδολογίας της κυτταρομετρίας ροής για τα LAB έχει αναφερθεί και από τους Bunthof, et al, οι οποίοι αναφέρουν ότι για τα LAB στελέχη και άλλα είδη, στα οποία έγινε σήμανση με τη χρωστική cFDA, ήταν χρήσιμη για τον προσδιορισμό της τύχης των ζωντανών κυττάρων πριν και μετά τη θερμική επεξεργασία. Ωστόσο, δεν πέτυχαν καλή διάκριση μεταξύ ζωντανών-νεκρών

κυττάρων για τα στελέχη *Lactococcus* χρησιμοποιώντας τη χρωστική cFDA, κάτι που βελτιώθηκε για τα στελέχη του *Lactobacillus*. Με τη χρώση με την ουσία TOTO-1 {1-(4,4,7,7-tetramethyl-4,7-diazaundecamethylene)-bis-4-[3-methyl-2,3dihydro(benzo-1,3-oxazole) -2 methylidene]-1-(3-trimethylammoniumpropyl)-pyridiniumtetraiodide} πέτυχαν καλή διάκριση της βιωσιμότητας για τα LAB στελέχη, που βασίζονται στη δημιουργία ενός πολύ έντονου σήματος φθορισμού για τα νεκρά κύτταρα. Στα ιστογράμματα των Εικόνων 32 και 33 εμφανίζονται οι κατανομές του κυτταρικού πληθυσμού που εξετάζεται μεταξύ των καναλιών και του φθορισμού που προκύπτει σε λογαριθμική κλίμακα. Το ύψος υποδηλώνει τον αριθμό των κυττάρων σε ένα συγκεκριμένο κανάλι φθορισμού [Bunthof, et al, 2001].

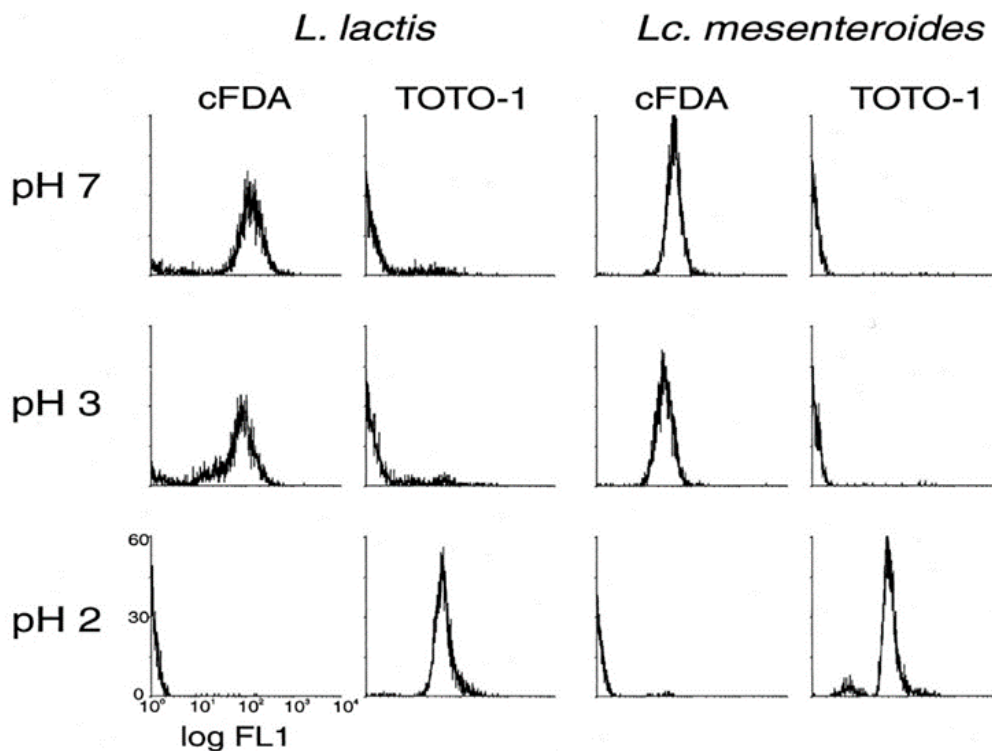
Η έκθεση σε 0,05% χολικά άλατα σχεδόν δεν άλλαξε τον αριθμό των σημασμένων κυττάρων. Ωστόσο, ο μέσος φθορισμός των σημασμένων βακτηρίων με cFDA, ιδιαίτερα ο πληθυσμός του *L. lactis*, ήταν χαμηλότερος, υποδηλώνοντας χαμηλότερη συσσώρευση cFDA, που προκαλείται από μικρή βλάβη στην κυτταρική μεμβράνη. Επίσης παρατηρήθηκε ότι έκθεση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις χολικού άλατος οδήγησαν σε χαμηλότερα κλάσματα σημασμένων με cFDA κυττάρων και υψηλότερα κλάσματα κυττάρων σημασμένων με TOTO-1 (Εικόνα 32). Τα πειραματικά δεδομένα που παρουσιάζονται όταν τα εναιωρήματα των κυττάρων του *Leuconostoc mesenteroides* επιδρούν και με τα δύο cFDA και TOTO-1, παρατηρούμε ότι μοίρασαν τον πληθυσμό εξίσου σε σημασμένους και μη σημασμένους υποπληθυσμούς [Bunthof, et al, 2001].



Εικόνα 32. Ιστογράμματα κυτταρομετρίας ροής του FL1 των κυτταρικών εναιωρημάτων από το *Lactococcus lactis* και το *Leuconostoc mesenteroides* σημασμένα με το cFDA ή με το TOTO-1 μετά από έκθεση σε αποσυζευγμένα χολικά άλατα (Deconjugated Bile Salts, DBS) σε διάφορες συγκεντρώσεις [Bunthof, et al, 2001].

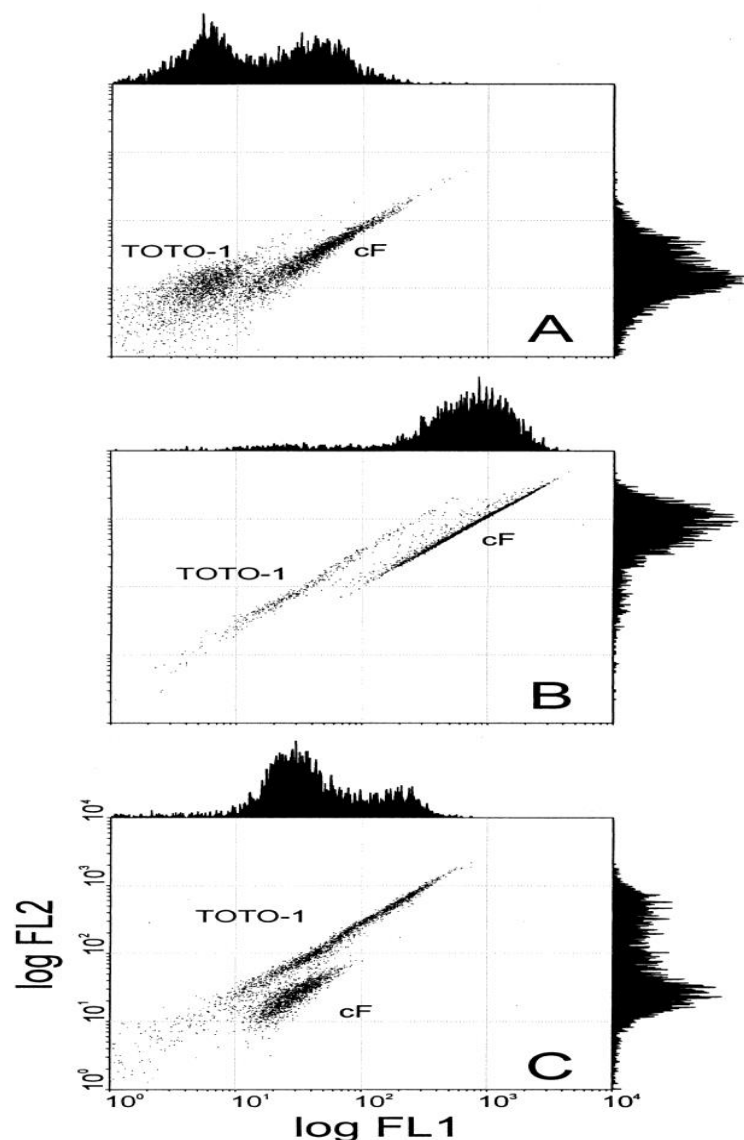
Πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε κυτταρικά εναιωρήματα που εκτέθηκαν σε περιβάλλοντα με διαφορετικό pH, με σήμανση με cFDA και TOTO-1. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με αυτά που προέκυψαν από τον υπολογισμό των αποικιών από δείγματα που εμβολιάστηκαν σε τρυβλία. Τα αποτελέσματα για το *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* και το *Leuconostoc mesenteroides* ήταν παρόμοια [Bunthof, et al, 2001].

Τα αποτελέσματα της χρώσης-σήμανσης με το cFDA ή το TOTO-1 μετά από έκθεση σε διαφορετικά pH (6, 5, 4 ή 3) δεν οδήγησε σε μεταβολή της κατανομής των υποπληθυσμών σε σύγκριση με αυτή σε pH 7. Ωστόσο, μετά από έκθεση σε pH 2, σχεδόν κανένα κύτταρο δεν σημάνθηκε με cFDA, ενώ σχεδόν όλα τα κύτταρα έδωσαν σήμα με το TOTO-1 και για τα δύο είδη βακτηρίων (Εικόνα 33). Αντίστοιχα, η απόδοση στην καλλιέργεια δεν επηρεάστηκε μέχρι το θρεπτικό υλικό να έχει το pH 3, αλλά όταν η καλλιέργεια εκτέθηκε σε pH 2, οδηγήθηκε σε μείωση τουλάχιστον κατά 3 λογαριθμικές μονάδες του αριθμού δεκαδικών αραιώσεων τα οποία μετρούνταν σε τρυβλία. Διαπιστώθηκε έτσι ότι η φθορίζουσα ουσία μπορεί με την κυτταρομετρία ροής να προσδιορίσει την ετερογένεια που προκαλείται από το stress στις καλλιέργειες, λόγω του διαφορετικού pH. Συμπερασματικά, με την κυτταρομετρία μπορούν να διακριθούν διάφοροι υποπληθυσμοί [Bunthof, et al, 2001].



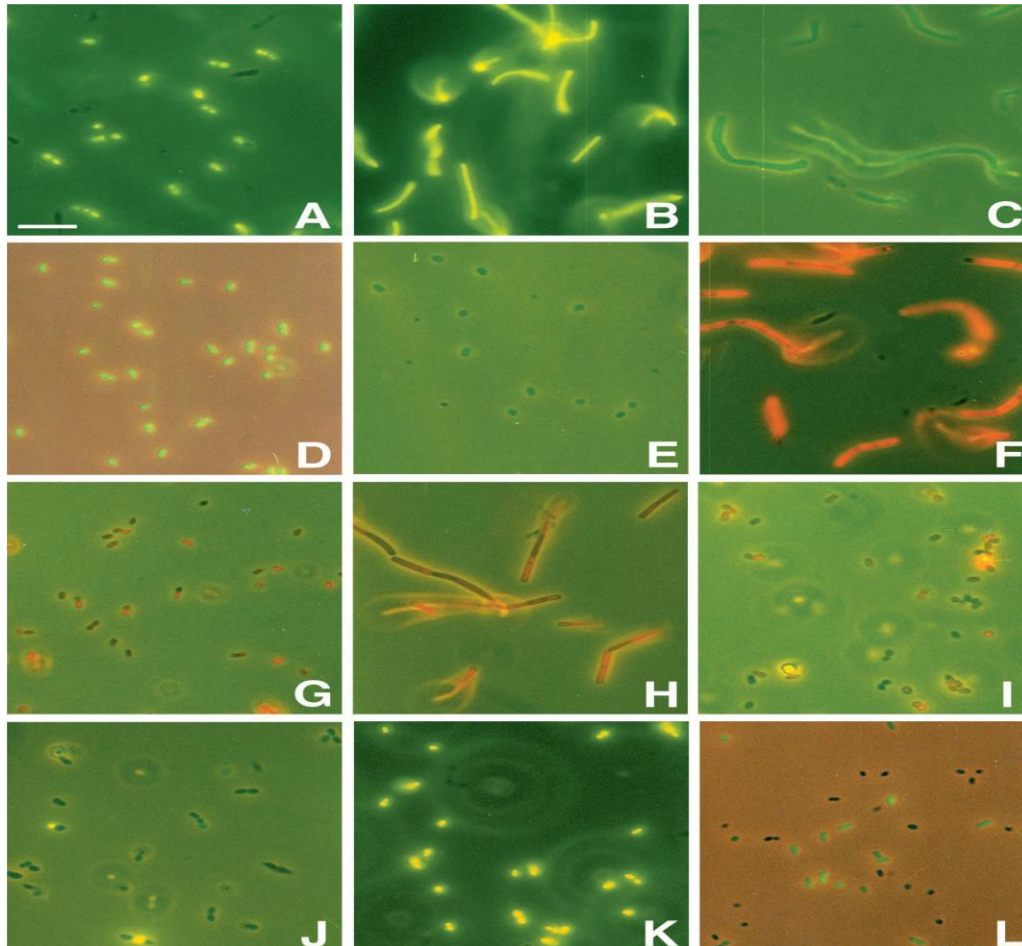
Εικόνα 33. Τα ιστογράμματα της κυτταρομετρίας ροής του FL1 των κυτταρικών εναιωρημάτων από το *Lactococcus lactis* και το *Leuconostoc mesenteroides* σημασμένα με cFDA ή με TOTO-1 μετά από έκθεση σε διαφορετικά pH [Bunthof, et al, 2001].

Είναι πολύ σημαντικό να παρατεθούν και πειράματα διπλής χρώσης σε κυτταρογράμματα δύο δεδομένων με cFDA και TOTO-1. Οι αναλύσεις ζωντανών-νεκρών με δύο ανιχνευτές και διαφορετική χρώση είναι πιθανόν πολύ πρακτικές επειδή η ανίχνευση είναι ευκολότερη, όταν τα κύτταρα είναι «χρωματισμένα». Χρησιμοποιώντας την κυτταρομετρία ροής, οι πληθυσμοί με σήμανση cFDA και TOTO-1 μπορούν να είναι χωροταξικά σε διαφορετικές θέσεις, οι οποίες εμφανίζονται στα διαφορετικά μήκη κύματος που «διαβάζουν» οι ανιχνευτές FL1 και FL2 (Εικόνα 34) [Bunthof, et al, 2001].



Εικόνα 34. Τα διαγράμματα της κυτταρομετρίας ροής FL1 και FL2 του *Lactococcus lactis* (A), *Lactobacillus helveticus* (B) και *Leuconostoc mesenteroides* (C) που εκτέθηκαν σε χολικά άλατα και σημάνθηκαν με τη χρωστική cFDA και TOTO-1. Τα κυτταρικά εναιωρήματα εκτέθηκαν σε χολικά άλατα (0.10%) στους 30 °C για 60 λεπτά. Οι σημασμένοι με cF-labeled και TOTO-1-labeled β υποπληθυσμοί, διαχωρίζονται χωροταξικά στην τέλεια μορφή απεικόνισης τους σε dot plots [Bunthof, et al, 2001].

Η χρώση ζωντανών και νεκρών κυττάρων με cFDA, PI και TOTO-1 μελετήθηκε επίσης δοκιμάζοντας τις χρωστικές σε κύτταρα εκθετικής φάσης που δεν υποβλήθηκαν σε έκθεση σε θερμότητα και κύτταρα που θερμάνθηκαν στους 70°C για 10 λεπτά. Τα δείγματα αναλύθηκαν με FCM. Για οπτική αναφορά, λήφθηκαν μικροφωτογραφίες φθορισμού (Εικόνα 35) [Bunthof, et al, 2001].



Εικόνα 35. Χρώση στελεχών LAB με φθορίζοντες ανιχνευτές. (Α έως Ε). Αξιολόγηση του cFDA ως ανιχνευτής για ζωντανά κύτταρα. *S. salivarius subsp. thermophilus* (Α), *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Β), *Lactobacillus casei* (C), *Leuconostoc mesenteroides* (D) *P. acidilacti* (Ε) της εκθετικής φάσης. Τα εναιωρήματα επωάστηκαν με 50 mM cFDA και πλύθηκαν μία φορά. (F έως Ι). Αξιολόγηση του PI ως χρώση για τα νεκρά κύτταρα. *Lactobacillus delbrueckii* (F) και *E. faecium* (G) σε 70°C θερμικά σκοτωμένα / αδρανοποιημένα κυτταρικά εναιωρήματα και *Lactobacillus helveticus* (H) και *Leuconostoc lactis* (I) κυτταρικά εναιωρήματα εκθετικής φάσης τα οποία επωάστηκαν με 30 mM PI. (J έως K). Αξιολόγηση του TOTO-1 ως χρώση για νεκρά κύτταρα. Κύτταρα εκθετικής φάσης (J) και κύτταρα που σκοτώθηκαν με θερμότητα (70°C) (K) του *S. salivarius subsp. thermophilus* επωάστηκαν με 1 mM TOTO-1. (L). Εφαρμογή της σήμανσης για αξιολόγηση της βιωσιμότητας μετά από στρες που προκλήθηκε με αποσυζευγμένα χολικά άλατα. Ο *Lactococcus lactis* εκτέθηκε σε 0,10% αποσυζευγμένα χολικά άλατα στους 30°C για 60 λεπτά. Αφού έγινε πλύσιμο, το εναιώρημα επωάστηκε με 50 mM cFDA. Όλες οι επωάσεις της σήμανσης έγιναν στους 30°C για 10 λεπτά. [Bunthof, et al, 2001].

Οι Bunthof, Abee, 2002 εφάρμοσαν επιτυχώς τη μεθοδολογία της διπλής χρώσης στην κυτταρομετρία ροής για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των στελεχών LAB, συμπεριλαμβανομένων και των προβιοτικών βακτηρίων στο γάλα και στα εμπορικά προβιοτικά ποτά [Bunthof, Abee, 2002]. Όσον αφορά τον προσδιορισμό των ιδιοτήτων διαπερατότητας των βακτηριακών κυττάρων, που σχετίζονται με το στέλεχος, στα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το τυρί Cheddar, ο συνδυασμός των χρωστικών SYTO™ 9 και PI για τον προσδιορισμό του ποσοστού των ζωντανών-άθικτων, διαπερατών-κατεστραμμένων, άρα και νεκρών υποπληθυσμών, στο τυρί που παρασκευάστηκε με τη χρήση δύο στελεχών *Lactococcus*, απέδειξε την ύπαρξη διαφορετικών ποσοστών των διαπερατών κυττάρων μεταξύ αυτών των στελεχών. Είναι ενδιαφέρον, ότι ένα στέλεχος το οποίο ήταν εξαιρετικά διαπερατό και απελευθέρωνε ενδοκυτταρικό Pep X, κατέστη μη βιώσιμο. Το στέλεχος αυτό ήταν ο *L. lactis* AM2. Το άλλο στέλεχος, ο *L. lactis* HP, ήταν λιγότερο διαπερατό αλλά αυτά τα διαπερατά κύτταρα δεν φαίνεται να απελευθέρωναν ενδοκυτταρικό Pep X σε ουσιαστικό βαθμό, οπότε και τυπικά το τυρί που πρόκυπτε δεν είχε βέλτιστη γέυση και κατ' επέκταση ήταν ακατάλληλο [Sheehan, et al, 2005].

Συνολικά, η μεθοδολογία της κυτταρομετρίας ροής και των LAB μικροοργανισμών, επέτρεψε μια μοναδική διείσδυση σε πτυχές, όπως η απόδοση της καλλιέργειας με οικονομικές συνέπειες και επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Θα πρέπει να επισημανθεί εδώ, ότι ο προσδιορισμός των LAB σε ζυμώσεις καθίσταται λιγότερο δύσκολος συγκριτικά με την ανίχνευση παθογόνων παραγόντων, λόγω του γεγονότος ότι οι πληθυσμοί από τις ζυμώσεις LAB είναι γενικά της τάξεως των 10^6 cfu /ml ή ανά γραμμάριο και άνω. Ως εκ τούτου, τα δείγματα δεν απαιτούν φυγοκέντρωση, όπως για την ανίχνευση των παθογόνων, αλλά συχνά αραιώνονται, για να επιτευχθούν οι σωστές συγκεντρώσεις των κυττάρων, ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί η ανάλυση [Narayana, et al, 2019].

3.9 Η συμβολή της κυτταρομετρίας διαχωρισμού στη μικροβιολογία τροφίμων

Η χρήση της διαλογής των κυττάρων με ενεργοποιημένο φθορισμό (FACS), η οποία γίνεται στα κυτταρόμετρα διαχωρισμού, αντιπροσωπεύει μια υψηλότερη βαθμίδα ανάλυσης με βάση την κυτταρομετρία ροής (FCM-Sorting), με εφαρμογές στη μικροβιολογία τροφίμων. Οι διαλογείς κυττάρων, όπως αναφέρθηκε, είναι τροποποιημένα όργανα κυτταρομετρητών με την ικανότητα δημιουργίας πύλης (gate/παράθυρου), ώστε να μπορεί να επιτευχθεί η «φυσική δειγματοληψία» των κυττάρων ως ένας υποπληθυσμός του ενδιαφέροντός μας (πληθυσμός- στόχος). Αυτή η δυναμική διαχωρισμού προκύπτει από την ικανότητα του διαλογέα κυττάρων να περιβάλλει το κύτταρο του ενδιαφέροντος μέσα σε ένα

«σταγονίδιο», το οποίο στη συνέχεια έχοντας θετικό ή αρνητικό φορτίο εκτρέπεται με τη διέλευσή του μέσω ενός ηλεκτρικού πεδίου υψηλής τάσης (~ 5.000 V). Στη συνέχεια αυτή η σταγόνα μπορεί να εναποτεθεί επάνω σε άγαρ, σε δοκιμαστικό σωλήνα ή σε φρεάτιο μικροτιτλοδοτικής πλάκας για την περαιτέρω ανάλυση [Muller, Nebe von Caron, 2010].

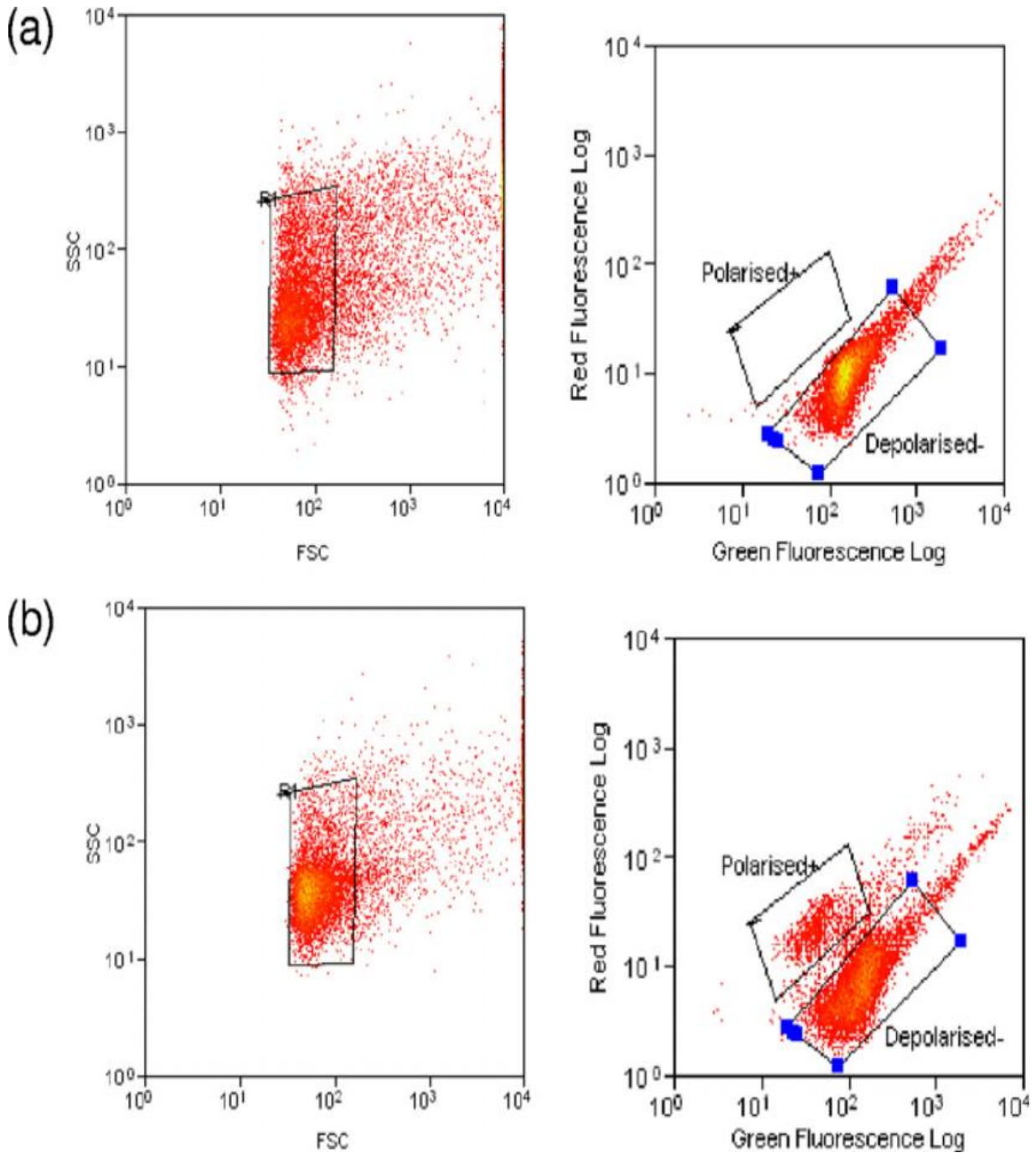
Χρησιμοποιώντας αυτή την τεχνολογία μπορούμε να ανακτήσουμε τα σημασιμένα κύτταρα, τα οποία έχουν εκτεθεί σε διάφορους χρωστικούς παράγοντες, ώστε να προκύψουν συγκεκριμένα κυτταρομετρικά προφίλ που αντανακλούν την ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε διάφορα θρεπτικά μέσα. Επομένως, η διαλογή κυττάρων μπορεί δυνητικά να δίνει απαντήσεις σχετικά με:

- ποια ισοδυναμία έχει η κυτταρομετρία ροής με τη μέτρηση των αποικιών στο άγαρ για τα συγκεκριμένα βακτηριακά είδη;
- αν υπάρχουν ζωντανά - νεκρά κύτταρα μέσα σε έναν πληθυσμό;
- αν μπορεί μια ταχεία ανάλυση διαχωρισμού, με βάση τη διαλογή, να διακρίνει ταυτόχρονα και να επιβεβαιώνει την παρουσία διαφορετικών ειδών μέσα σε ένα δείγμα;
- αν μπορεί να αξιολογεί την επίδραση των παραγόντων stress (θέρμανση, ψύξη, pH κ.λπ.) στην επιβίωση και την ανάκτηση των κυττάρων [Muller, Nebe von Caron, 2010].

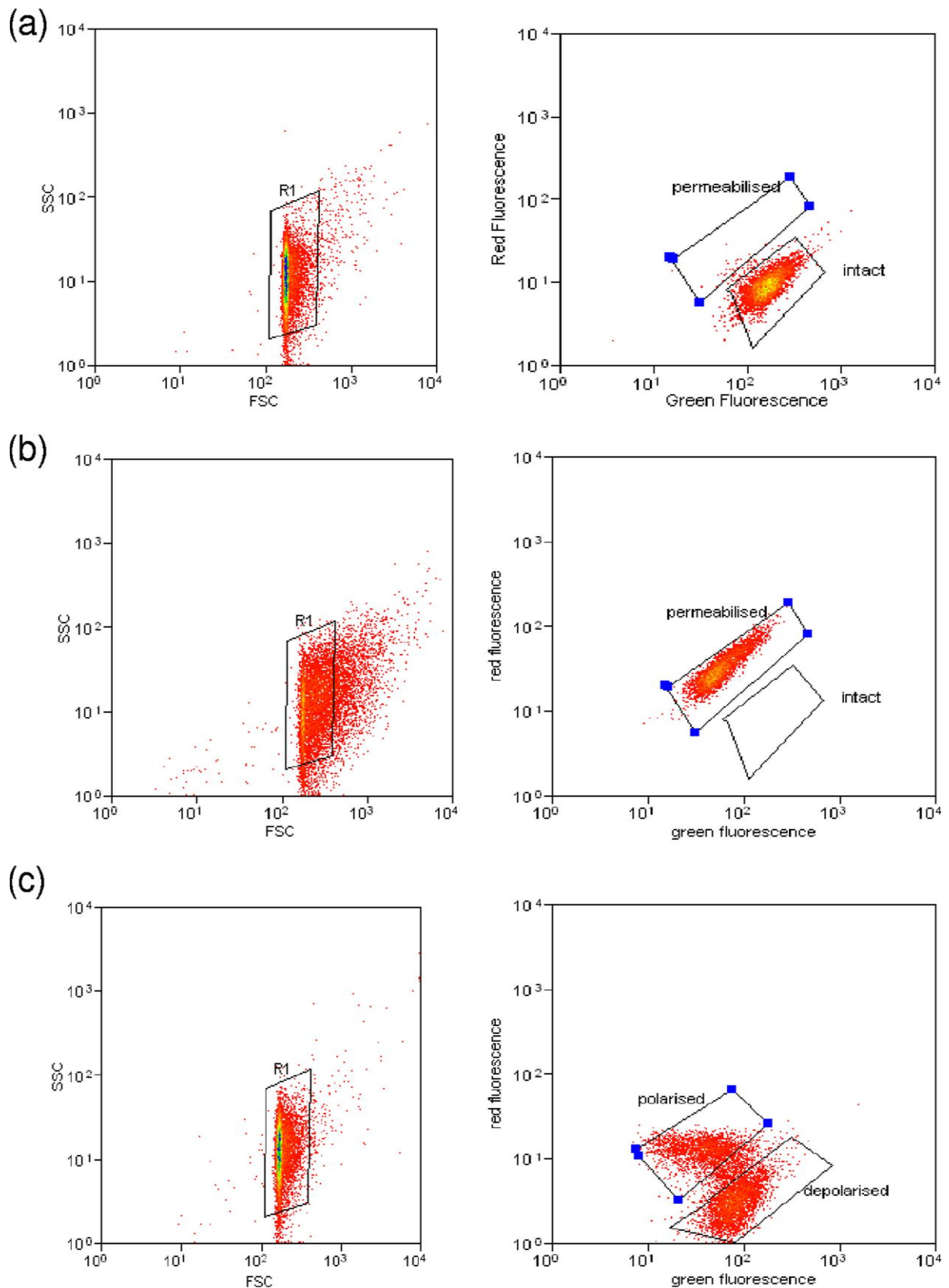
Οι Kennedy, et al, έλεγξαν τις μεταβολές που προέκυπταν στα βακτήρια της *E. coli*, *L. monocytogenes* και *S. aureus*, όταν τα βακτήρια αυτά υποβλήθηκαν στις επιδράσεις διαφόρων στρεσογόνων παραγόντων που αντιμετωπίζουν κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των τροφίμων. Τα στελέχη αναλύθηκαν με την FCM για τη βιωσιμότητα χρησιμοποιώντας τις χρωστικές SYTO™ 9/PI ή για την παρουσία-απουσία του λειτουργικού δυναμικού της μεμβράνης τους με τη λιπόφιλο χρώση DiOC2 [lipophilic carbocyanine dye DiOC2, (3,3-diethyloxycarbocyanine iodide)] [Kennedy, et al, 2011].

Η ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής διεξήχθη με διαγράμματα διασποράς πράσινου έναντι κόκκινου φθορισμού. Στα κυτταρογράμματα αυτά είναι διακριτοί «άθικτοι» ή «διαπερατοί» οι έλεγχοι των υποπληθυσμών που δημιουργήθηκαν για κάθε βακτηριακό είδος (Εικόνες 36-38). Η παρουσία του δυναμικού της μεμβράνης σε επεξεργασμένα κύτταρα με χρώση DiOC2 αναλύθηκε επίσης με διαγράμματα διασποράς του πράσινου έναντι του κόκκινου φθορισμού. Επεξεργασία με CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, CCCP) ή θερμικά αδρανοποιημένα-νεκρά κύτταρα, χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία «πολωμένων» πληθυσμών ελέγχου. Στη συνέχεια, σχεδιάστηκαν ηλεκτρονικές πύλες (gate) με βάση αυτούς τους ελέγχους με υποπληθυσμούς που υπάρχουν σε «πολωμένες» ή «από-

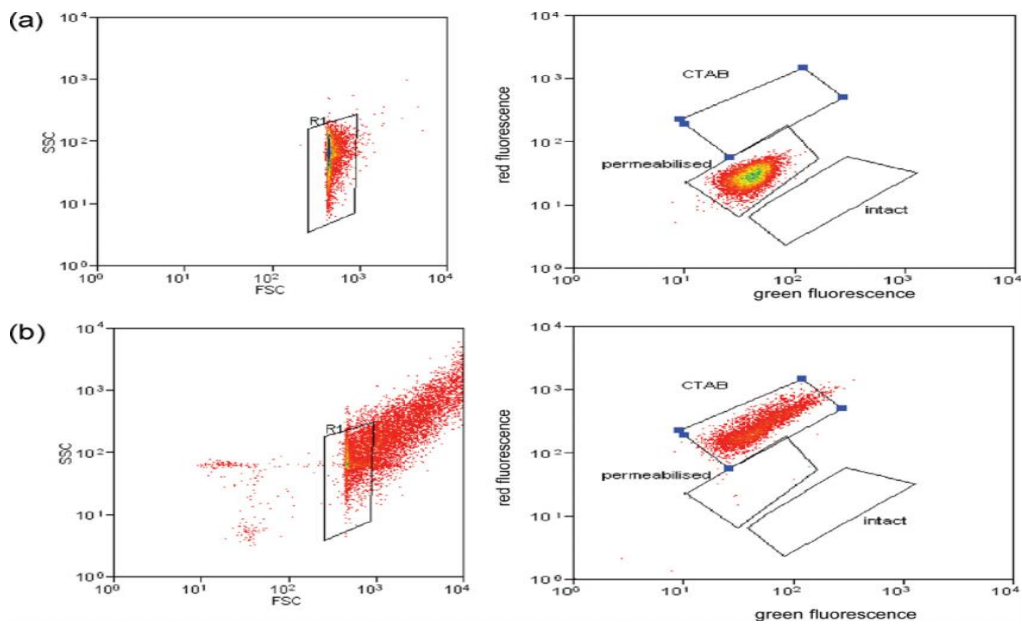
πολωμένες», «μη-πολωμένες» περιοχές και εκφράζονται ως ποσοστό του συνολικού προφίλ των κυττάρων [Kennedy, et al, 2011].



Εικόνα 36. Κυτταρομετρικά προφίλ σε κυτταρόγραμμα Dot Plot κυττάρων *S. aureus* που προέκυψαν με χρώση DIOC2 μετά από θέρμανση 80°C (a) ή θέρμανση στους 60°C (b). Αριστερά είναι τα κυτταρογράμματα με βάση τα σκεδαστικά χαρακτηριστικά FSC vs SSC όπου καθορίζεται ο κυτταρικός πληθυσμός στον οποίο γίνεται ηλεκτρονική περιφραγή ώστε να γίνει η μελέτη της χρώσης με τους διαγραφόμενους πληθυσμούς που θα διαχωριστούν [Kennedy, et al, 2011].

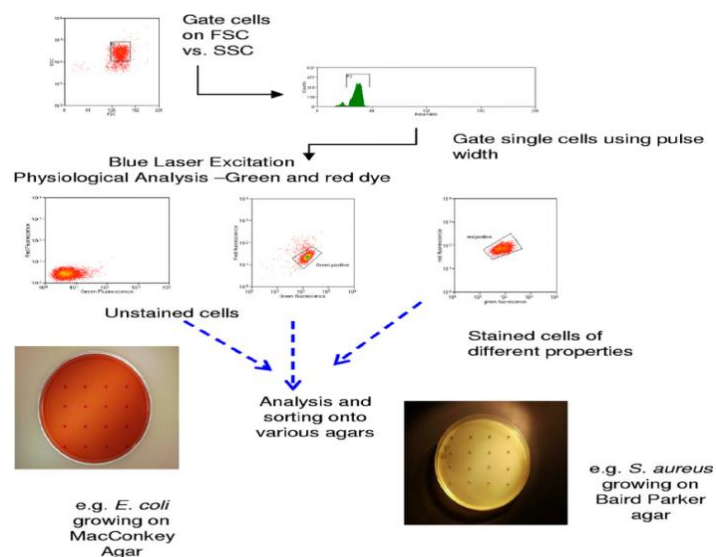


Εικόνα 37 Κυτταρομετρικά προφίλ σε κυτταρόγραμμα Dot Plot των ζωντανών κυττάρων ελέγχου της *L. monocytogenes* στα οποία έγινε χρώση με SYTOTM 9/PI (a), *L. monocytogenes* που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με IPA (isopropyl alcohol) και έγινε χρώση με SYTOTM 9/PI (b), και *L. monocytogenes* που έγινε επεξεργασία με NaCl και κατόπιν πραγματοποιήθηκε χρώση με DiOC2(3) (c) [Kennedy, et al, 2011].



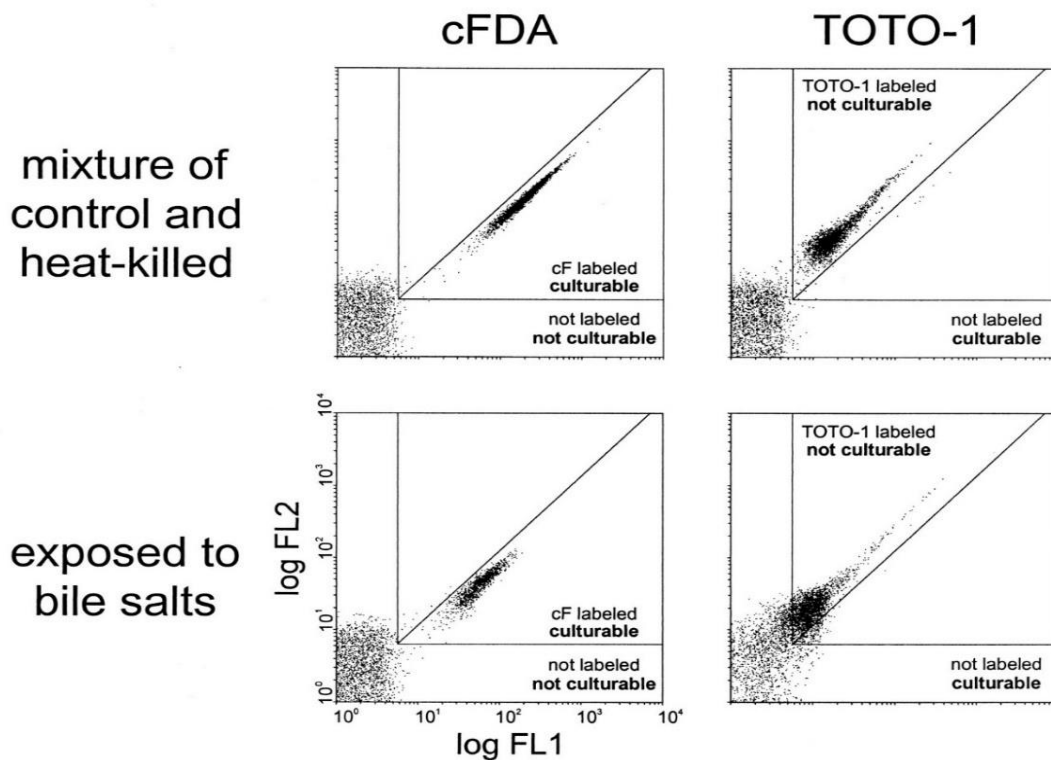
Εικόνα 38. Κυτταρομετρικά προφίλ σε κυτταρόγραμμα Dot Plot των κυττάρων *E. coli* με χρώση PI / Syto 9 μετά από θερμική επεξεργασία > 95°C (a) ή επεξεργασία με 0,5 mM CTAB (b) - Cetyl Trimethyl-Ammonium Bromide (CTAB) [Kennedy, et al, 2011].

Χρησιμοποιώντας τη τεχνική της διαλογής FACS για να διαχωρίσουν διάφορους υποπληθυσμούς, ανέδειξαν ότι τα ιδιαίτερα κατεστραμμένα κύτταρα (όπως τα αναδείκνυαν οι χρώσεις με τα κυτταρομετρικά προφίλ της FCM) διανέμοντάς τα σε στερεά θρεπτικά μέσα, διατηρούσαν την ικανότητά τους να αναπτύσσονται. Παρατηρήθηκαν διαφορετικά ποσοστά ανάκτησης για τα διάφορα παθογόνα βακτήρια, τόσο σε εκλεκτικά, όσο και μη εκλεκτικά υλικά καλλιέργειας και αυτές οι ανακτήσεις επηρεάστηκαν επίσης από ποικίλες συνθήκες stress (Εικόνα 39) [Kennedy, et al, 2011].

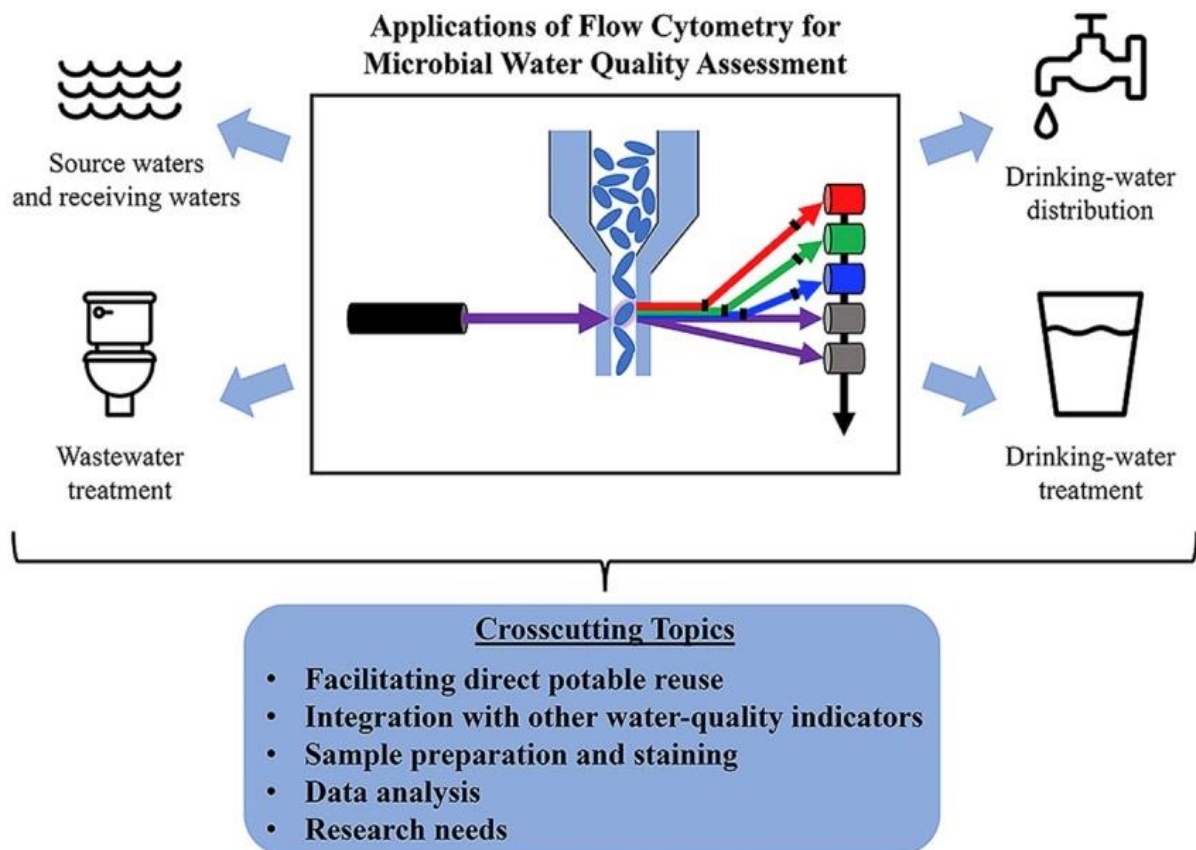


Εικόνα 39. Απεικόνιση της στρατηγικής που εφαρμόζεται για την ανάλυση και τη διαλογή με την κυτταρομετρία ροής που εφαρμόζεται για τη μελέτη των μικροβιακών ειδών [Kennedy, et al, 2011].

Οι Bunthof, et al, παρουσίασαν επίσης δεδομένα για το *L. lactis*, όπου τα κύτταρα σημάνθηκαν με cFDA και TOTO-1 και διαχωρίστηκαν οι υποπληθυσμοί σε σημασμένους και μη σημασμένους σε μίγματα των κυτταρικών εναιωρημάτων που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με 0,10% χολικά άλατα. Η βιωσιμότητα ελέγχθηκε μετά τον διαχωρισμό τους με επίστρωση σε τρυβλία. Όταν έγινε επώαση με το cFDA, παρατηρήθηκε ότι ο διαχωρισμένος υποπληθυσμός με σήμανση cF είχε υψηλά ποσοστά καλλιεργησιμότητας που έφτασε το 80%. Αντίστοιχα, ο μη σημασμένος υποπληθυσμός δεν έδωσε αποικίες (Εικόνα 40). Όταν έγινε επώαση με TOTO-1, ο υποπληθυσμός που σημάνθηκε δεν κατάφερε να αναπτυχθεί, ενώ ο μη σημασμένος υποπληθυσμός καλλιεργήθηκε σε πολύ μεγάλο ποσοστό. Έτσι η δοκιμασία βιωσιμότητας με χρήση cFDA και TOTO-1 έδειξε τα ζωντανά και τα νεκρά βακτήρια, δηλαδή επιτεύχθηκε σαφής εντοπισμός των πληθυσμών που είναι καλλιεργήσιμοι σε συνθήκες stress [Bunthof, et al, 2001].



Εικόνα 40. Συνδυασμένα πειράματα διαλογής (sorting) και διασποράς σε τρυβλία με το *L. lactis* σημασμένα με cFDA- και TOTO-1. Περιοχές μη σημασμένων κυττάρων (δεν έχουν προσλάβει χρωστική), cF-labeled cells και TOTO-1-labeled cells ορίστηκαν χρησιμοποιώντας μίγματα κυττάρων 1:1 από την εκθετική φάση ανάπτυξης και στους 70 °C, θανατώθηκαν - αδρανοποιήθηκαν τα κύτταρα στη συνέχεια επώαστηκαν με cFDA ή TOTO-1. Αυτοί οι κυτταρικοί πληθυσμοί που υπεβλήθησαν σε stress με χολικά άλατα (0.10%) στη συνέχεια διαχωρίστηκαν με τη χρήση των καθορισμένων περιοχών (πόλες - παράθυρα διαλογής). Η καλλιεργησιμότητα των υποπληθυσμών ελέγχθηκε σαφώς με τη μέτρηση των κυττάρων σε τρυβλία [Bunthof, et al, 2001].



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

Η Κυτταρομετρία ροής στην ταχεία μικροβιολογική ανάλυση του πόσιμου νερού.

4.1 Έλεγχος της ποιότητας του νερού και κυτταρομετρία ροής

Ο έλεγχος της ποιότητας του νερού είναι ζωτικής σημασίας για την ανθρώπινη υγεία και τις αλυσίδες εφοδιασμού τροφίμων, καθώς και για τη διανομή καθαρού, πόσιμου νερού. Η μικροβιολογία του υδάτινου περιβάλλοντος έχει εφαρμογές σε πολλούς κλάδους όπως η αλιεία, η επεξεργασία λυμάτων και ο έλεγχος της ρύπανσης. Επίσης, οι υδρόβιοι μικροοργανισμοί παίζουν σημαντικό ρόλο στο περιβάλλον ανακυκλώνοντας τα θρεπτικά συστατικά, καθιστώντας τα ένα κομμάτι της τροφικής αλυσίδας. Επομένως, η παρακολούθηση της παρουσίας και της λειτουργίας αυτών των οργανισμών είναι απαραίτητη για την ανθρώπινη υγεία και την περιβαλλοντική ισορροπία στα οικοσυστήματα. Για παράδειγμα, η αποβολή των αστικών λυμάτων σε μια λίμνη ή σε έναν αβαθή κλειστό κόλπο

μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα της υπερβολικής ανάπτυξης των φυκών, επειδή αυξάνονται τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά από το περιεχόμενο των λυμάτων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την εξάντληση του οξυγόνου στο υδάτινο περιβάλλον, προκαλώντας έτσι τον θάνατο των ψαριών και άλλων οργανισμών που υπάρχουν στο οικοσύστημα. Αυτό το φαινόμενο είναι γνωστό ως ευτροφισμός και δυνητικά μπορεί να προκαλέσει τεράστια περιβαλλοντική καταστροφή [Wang, et al, 2010].

Προκειμένου να καταστεί ασφαλής και αποτελεσματική η επεξεργασία, για τη διανομή και επαναχρησιμοποίηση του νερού, απαιτούνται αξιόπιστες μέθοδοι για τον χαρακτηρισμό και την παρακολούθηση του αριθμού και του είδους των μικροβίων που περιέχονται στο νερό. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα περιορίζονται από τη χαμηλή ευαισθησία τους, τις υψηλές απαιτήσεις σε επεξεργασία και χρόνο, τη μεγάλη επίδραση και τις παρεμβολές από ανασταλτικές ουσίες που υπάρχουν διαλυμένες στο νερό και τις δυσκολίες στη διάκριση μεταξύ βιώσιμων και μη κυττάρων [Wang, et al, 2010].

Η κυτταρομετρία ροής έχει αναδειχθεί τα τελευταία χρόνια ως εναλλακτική προσέγγιση που μπορεί να προσπελάσει πολλές από αυτές τις προκλήσεις, γιατί πλεονεκτεί σε σχέση με άλλες ευρέως χρησιμοποιούμενες αναλυτικές μεθόδους σε τρία βασικά τεχνικά χαρακτηριστικά:

- Στην ταχύτητα επεξεργασίας και λήψης δεδομένων από το δείγμα.
- Στη μεγάλη ικανότητα διαλογής κατά τη λήψη των δεδομένων και στην ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών.
- Στην ικανότητα επιλογής συγκεκριμένων πληθυσμών - υποπληθυσμών ή ακόμη και μεμονωμένων κυττάρων σε καθορισμένη θέση, επιτρέποντας έτσι τη φυσικοχημική, βιολογική ή και μοριακή ανάλυσή τους [Vives Rego, et al, 2000].

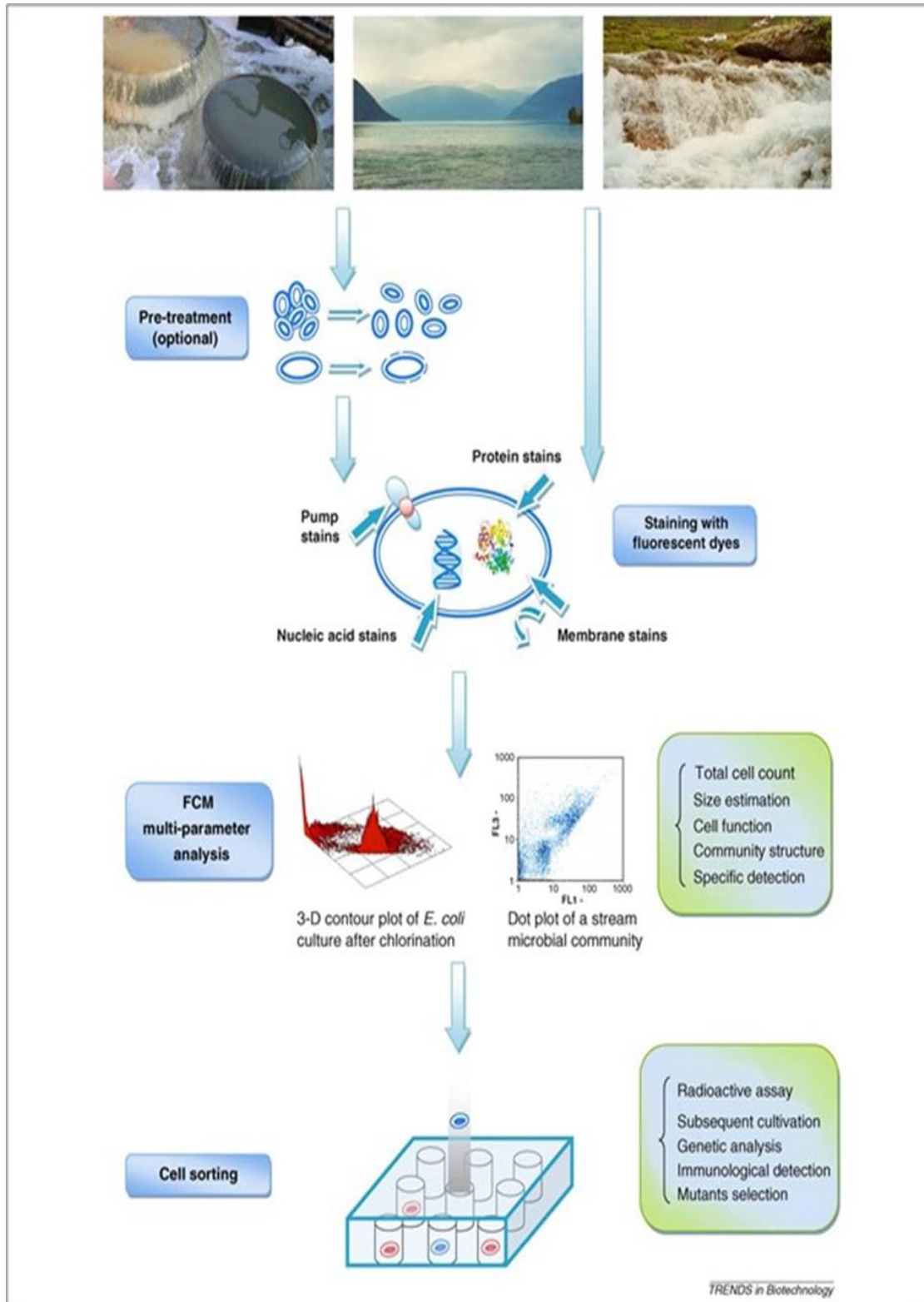
Επομένως, με την κυτταρομετρία ροής, η προετοιμασία του δείγματος είναι ταχύτερη, εξοικονομώντας χρόνο σε μια πολλαπλή ανάλυση, αλλά και σε οικονομικούς πόρους. Ο χρόνος μέτρησης μειώνεται σημαντικά μόλις σε μερικά λεπτά και μπορούν να μετρηθούν πολλά περισσότερα κύτταρα σε σύγκριση με τις άλλες διαθέσιμες μεθόδους. Η κυτταρομετρία ροής μπορεί να συμπεριλάβει στη μέτρηση χιλιάδες κύτταρα σε σύγκριση, για παράδειγμα, με την οπτική μικροσκοπία που μπορεί να μετρήσει μερικές εκατοντάδες στο ίδιο χρονικό διάστημα. Η ανάπτυξη νέων δεικτών φθορισμού και η εισαγωγή νέων κυτταρομετρικών τεχνικών οδηγούν συνεχώς την τεχνολογία σε νέες κατακτήσεις. Τα βακτήρια, οι ιοί, τα φύκη, τα πρωτόζωα και τα νανοσωματίδια που παρίστανται σε υδάτινα περιβάλλοντα μπορούν να ταυτοποιηθούν με ρυθμό και ακρίβεια που δεν είναι δυνατή με άλλες μεθόδους [Safford, Bischel, 2019].

Είναι χαρακτηριστική η περίπτωση της Ελβετίας [Book, Swiss Food], όπου το αρμόδιο Ομοσπονδιακό γραφείο για τη δημόσια υγεία υιοθέτησε το 2012 την κυτταρομετρία ροής, ως μεθοδολογία για τον προσδιορισμό των αναλογιών χαμηλής και υψηλής περιεκτικότητας των νουκλεϊκών οξέων στο πόσιμο νερό (LNA και HNA). Η μέθοδος αυτή συστήνεται για την ανάλυση του νερού πριν τη διανομή του μέσω των οικιακών υδραυλικών εγκαταστάσεων [Safford, Bischel, 2019]. Ανάλογες πρωτοβουλίες για τον έλεγχο του νερού έχουν επίσης υιοθετηθεί από την Ολλανδία και τις Η.Π.Α. και συγκεκριμένα από την πολιτεία της Καλιφόρνια, όπου ισχύουν οι αυστηρότεροι κανόνες σε σχέση με το πόσιμο νερό.

Έχει σημειωθεί ιδιαίτερη ανάπτυξη στις εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής στη μικροβιολογία τα τελευταία δεκαπέντε χρόνια, κυρίως στον τομέα της μικροβιολογίας του υδάτινου περιβάλλοντος. Ένα μεγάλο πλεονέκτημα της κυτταρομετρίας ροής είναι ότι μπορούν να ανιχνευθούν τα μικροβιακά κύτταρα ανεξάρτητα από την καλλιεργησιμότητά τους, ενώ επιπλέον υπάρχει η δυνατότητα κυτταρικής ταξινόμησης, ανάλυσης δηλαδή, σε επίπεδο ενός κυττάρου. Επί του παρόντος όμως, υπάρχει ένα ευρύ φάσμα ερευνητικών εφαρμογών της κυτταρομετρίας ροής, καθώς και εμπορικές εφαρμογές στην υδρόβια μικροβιολογία, συμπεριλαμβανομένων της μελέτης του κυτταρικού κύκλου των βακτηρίων, της μικροβιακής παρακολούθησης σε θαλασσινό και πόσιμο νερό και της αξιολόγησης της ευαισθησίας των βακτηριδίων στα αντιβιοτικά [Hammes, et al, 2008].

Στην εικόνα 41 φαίνεται επίσης και η ευρεία εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής σε έναν μεγάλο αριθμό διαφορετικών στελεχών, όπου διάφοροι τρόποι ιχνηθέτησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίησή τους. Διαφαίνεται ότι η κυτταρομετρία ροής θα βελτιωθεί περαιτέρω με τη συνεχή ανάπτυξη και βελτίωση των ταξινομικών ανιχνευτών-μορίων, σχετικά με τον υβριδισμό των γονιδίων rRNA ή ακόμη και του mRNA και των λειτουργικών ανιχνευτών, οι οποίοι μπορούν να ανιχνεύσουν τη φυσιολογική και μεταβολική κατάσταση των κυττάρων. Αν και η κυτταρομετρία ροής περιορίζεται σε ανάλυση δειγμάτων σε εναιώρημα, άλλα περιβαλλοντικά δείγματα, πλην του νερού, όπως δείγματα εδάφους και ίζημάτων, μπορούν επίσης να υποβληθούν σε επεξεργασία μετά από μια κατάλληλη προ-επεξεργασία, ώστε να λαμβάνεται εναιώρημα σε υγρή φάση, ενώ με χρήση υπερήχων και με κατάλληλα διαλύματα μπορεί να επιτυγχάνεται η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, ώστε να εισέρχονται τα ανιχνευτικά μόρια [Wang, et al, 2010].

Στο κεφάλαιο αυτό θα εστιάσουμε περισσότερο σε χρήσεις της κυτταρομετρίας ροής στην καθημερινή πρακτική, δηλαδή πως εφαρμόζεται ήδη και πως μπορεί να εφαρμοστεί στο άμεσο μέλλον για τη διασφάλιση της ποιότητας του νερού.

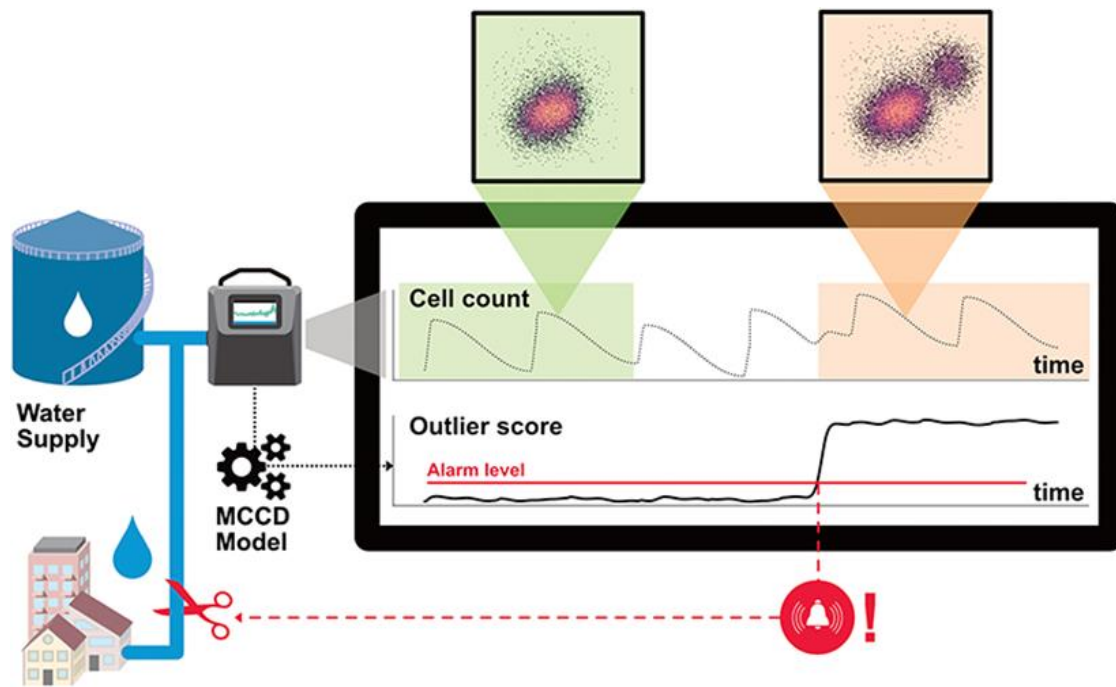


Εικόνα 41. Σχηματική απεικόνιση της ανάλυσης δειγμάτων νερού. Η προετοιμασία μπορεί να περιλαμβάνει αύξηση της διαπερατότητας και εφαρμογή υπερήχων. Τα βακτηριακά κύτταρα μπορούν στη συνέχεια να σημανθούν με χρώσεις ειδικές για ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες, μεμβρανικές πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Στη συνέχεια ακολουθεί διαχωρισμός των κυττάρων με κυτταρομετρία ροής και τα απομονωμένα βακτήρια μπορούν να καλλιεργηθούν και να υποβληθούν σε περαιτέρω δοκιμασίες ανάλογα με τις ανάγκες που θα προκύψουν [Wang, et al, 2010].

4.2 Μέτρηση αριθμού βακτηρίων με κυτταρομετρία ροής σε δείγματα νερού

Ο ποσοτικός προσδιορισμός τόσο των προκαρυωτικών όσο και των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι αναγκαίος για τον χαρακτηρισμό των οικοσυστημάτων και η μέτρηση των μικροοργανισμών είναι χωρίς αμφιβολία η πλέον συχνή και η περισσότερο επιτυχημένη εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής στη μελέτη των υδάτινων μικροβιακών συστημάτων. Η κυτταρομετρία ροής μπορεί να ανιχνεύσει ζυμομύκητες και ιούς και δίνει τη δυνατότητα για την ανάλυση μικτών πληθυσμών βακτηρίων, για τη διάκριση μεταξύ των κατηγοριών του φυτοπλαγκτόν όσον αφορά το μέγεθος, τη φυσιολογική κατάσταση και το περιεχόμενο του DNA. Η αυτοματοποιημένη κυτταρομετρία ροής που είναι προσαρμοσμένη στην επιτήρηση της ποιότητας του νερού σε πραγματικό χρόνο (real time), παρέχει δεδομένα υψηλής ποιότητας και συνεχούς ανάλυσης σχετικά με τις μικροβιακές κοινότητες σε ένα σύστημα νερού. Ο αριθμός των κυττάρων που υπολογίζεται από τις μετρήσεις της κυτταρομετρίας ροής μπορεί να αναγνωρίζει τις απότομες αυξήσεις στον αριθμό των βακτηρίων, οι οποίες μπορεί να προκύπτουν λόγω της ανθρωπογενούς ή της φυσικής δυναμικής του συστήματος ροής που έχει σαν αποτέλεσμα να αποκρύπτονται διαταραχές μικροβιακών πληθυσμών [Vives-Rego, et al, 2000].

Τα κυτταρομετρικά εργαλεία, που χρησιμοποιούνται ως δακτυλικά αποτυπώματα των μικροβιακών φορτίων, τα οποία απορρέουν από τη μελέτη των δειγμάτων διαφόρων περιοχών και περιόδων, μας επιτρέπουν μια λεπτομερή ανάλυση των υδρόβιων μικροβιακών κοινοτήτων και δυνητικά θα μπορούσαν να διακρίνουν τις φυσιολογικές και μη φυσιολογικές αλλαγές της κοινότητας που μελετούμε. Όμως, η συντριπτική πλειοψηφία των διαθέσιμων εργαλείων των κυτταρομετρικών δακτυλικών αποτυπωμάτων, χρησιμοποιεί τους στατιστικούς υπολογισμούς εκτός σύνδεσης, που δεν μπορούν να ανιχνεύσουν άμεσα τις ανωμαλίες σε αυτούς τους πληθυσμούς. Λόγω αυτής της αδυναμίας και για να καλυφθεί το κενό στη μελέτη αυτού του τύπου, αναπτύχθηκε ένα υπολογιστικό μοντέλο, με την ονομασία Microbial Community Change Detection (MCCD), το οποίο μετατρέπει τα χαρακτηριστικά της μικροβιακής κοινότητας σε ένα online σήμα ελέγχου της διαδικασίας (outlier score) το οποίο βρίσκεται κοντά στο μηδέν, εάν η μικροβιακή κοινότητα παραμένει σταθερή και αυξάνεται ανάλογα με τις διακυμάνσεις της. Αυτό το εξαιρετικό εργαλείο (Εικόνα 42), φαίνεται ότι έχει τη δυνατότητα να παρακολουθεί το μικροβιακό φορτίο σε πραγματικό χρόνο, πράγμα που είναι εξαιρετικά χρήσιμο για τον έγκαιρο εντοπισμό μιας πιθανής επιμόλυνσης του νερού και τη διαφύλαξη κατ'επέκταση της δημόσιας υγείας [Sadler, et al, 2020].

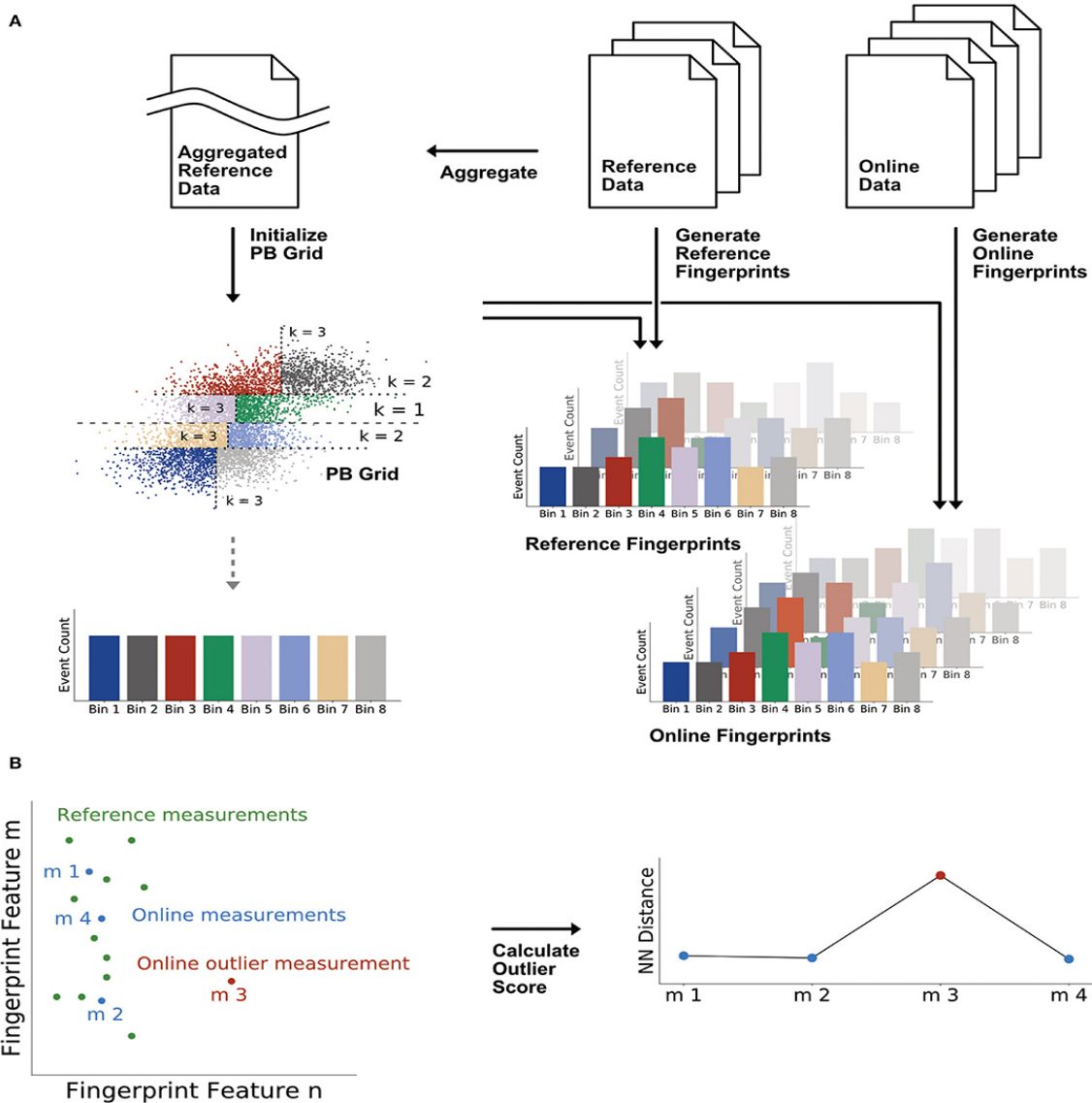


Εικόνα 42. Η διαδικτυακή παρακολούθηση με κυτταρομετρία ροής μιας εγκατάστασης διανομής νερού, η οποία υπόκειται σε καθημερινές σχεδόν διακυμάνσεις και η απεικόνιση της ακραίας βαθμολογίας. Οι βακτηριακές «ανωμαλίες» που διακρίνονται ως ένας επιπλέον πληθυσμός κυττάρων μπορεί εύκολα να φανούν στο κυτταροδιάγραμμα των κουκίδων, αλλά δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των κυττάρων. Το μοντέλο ανίχνευσης των αλλαγών της μικροβιακής κοινότητας (MCCD) ξεπερνά αυτόν τον περιορισμό, συγκρίνοντας την κατανομή συμβάντων των διαδικτυακών μετρήσεων με μια περίοδο αναφοράς και μπορεί έτσι να βοηθήσει στον γρήγορο εντοπισμό μεταβολών [Sadler, et al, 2020].

Η μέθοδος που αναφέρθηκε παραπάνω, υπολογίζει μια ακραία βαθμολογία (outlier score) πραγματοποιώντας μια ανάλυση που χωρίζεται σε δύο κλάδους:

- αρχικά, η ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής που καταγράφει χιλιάδες συμβάντα - βακτήρια, τα οποία μετατρέπονται σε μια αρκετά απλοποιημένη αναπαράσταση δακτυλικών αποτυπωμάτων, χρησιμοποιώντας έναν αλγόριθμο (Probability Binning, PB) [Rogers, Holyst, 2009],
- ακολουθεί ένα δεύτερο βήμα, όπου τα δακτυλικά αποτυπώματα τροφοδοτούνται σε ένα διαδικτυακό μοντέλο που αντιπαραβάλλει τη μέτρηση με ένα σύνολο μετρήσεων που αποτελούν μετρήσεις αναφοράς για υπολογισμό απόστασης από τον πλησιέστερο «γείτονα» [Aggarwal, 2017].

Συμπερασματικά, εάν μια μέτρηση έχει σχετικά όμοιο δακτυλικό αποτύπωμα με μια μέτρηση που υπάρχει στο σύνολο αναφοράς, η ακραία βαθμολογία θα είναι κοντά στο μηδέν. Αν όμως το δακτυλικό αποτύπωμα της υπό εξέταση μέτρησης είναι πολύ διαφορετικό, η απόσταση από την πιο κοντινή μέτρηση του συνόλου αναφοράς θα είναι μεγάλη κι έτσι θα έχουμε μια μεγαλύτερη ακραία βαθμολογία (Εικόνα 43).



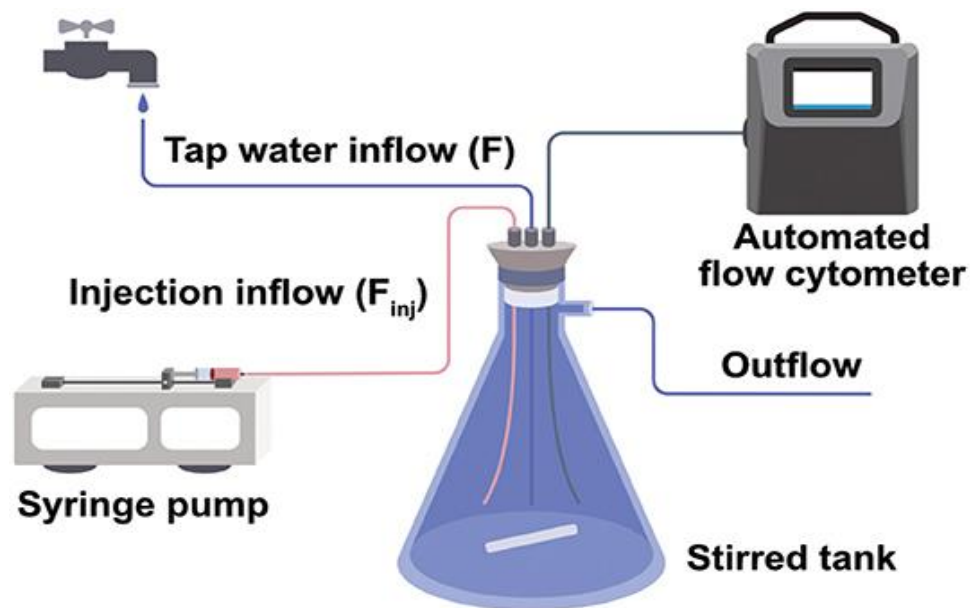
Εικόνα 43. Απεικόνιση του τρόπου λειτουργίας του μοντέλου MCCD που απαρτίζεται από έναν αλγόριθμο δακτυλικών αποτυπωμάτων και από τον αλγόριθμο k -πλησιέστερου «γείτονα»..

(A) Υπολογισμός δακτυλικών αποτυπωμάτων με τον αλγόριθμο Probability Binning (PB). Ένα πλέγμα με ίσο αριθμό συμβάντων υπολογίζεται σε ένα συγκεντρωτικό σύνολο δεδομένων που ομαδοποιεί εκ νέου όλα τα συμβάντα από την περίοδο αναφοράς και εφαρμόζεται στα δεδομένα αναφοράς και σε κάθε επόμενη διαδικτυακή μέτρηση.

(B) Διαδικτυακό μοντέλο με βάση την απόσταση όπου η ακραία βαθμολογία είναι η απόσταση στο χώρο δακτυλικών αποτυπωμάτων από τον πλησιέστερο «γείτονα» - Nearest Neighbor (NN) στο σύνολο αναφοράς [Sadler, et al, 2020].

Εδώ έχει ιδιαίτερη σημασία να αναφερθεί η πειραματική προσέγγιση των Sadler, et al, οι οποίοι προσομοίωσαν την εργαστηριακή επαλήθευση του μοντέλου, χρησιμοποιώντας πραγματικά δεδομένα. Έτσι στο πείραμα που ακολούθησε, το νερό ενός κλειστού συστήματος έρεε συνεχώς μέσα από μια δεξαμενή, χωρητικότητας ενός λίτρου, η οποία αναδευόταν συνεχώς μηχανικά. Στο σύστημα είχε συνδεθεί ένα κυτταρόμετρο ροής, το οποίο

για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα πραγματοποιούσε αυτόματα μετρήσεις κάθε 30 λεπτά (Εικόνα 44) [Sadler, et al, 2020].



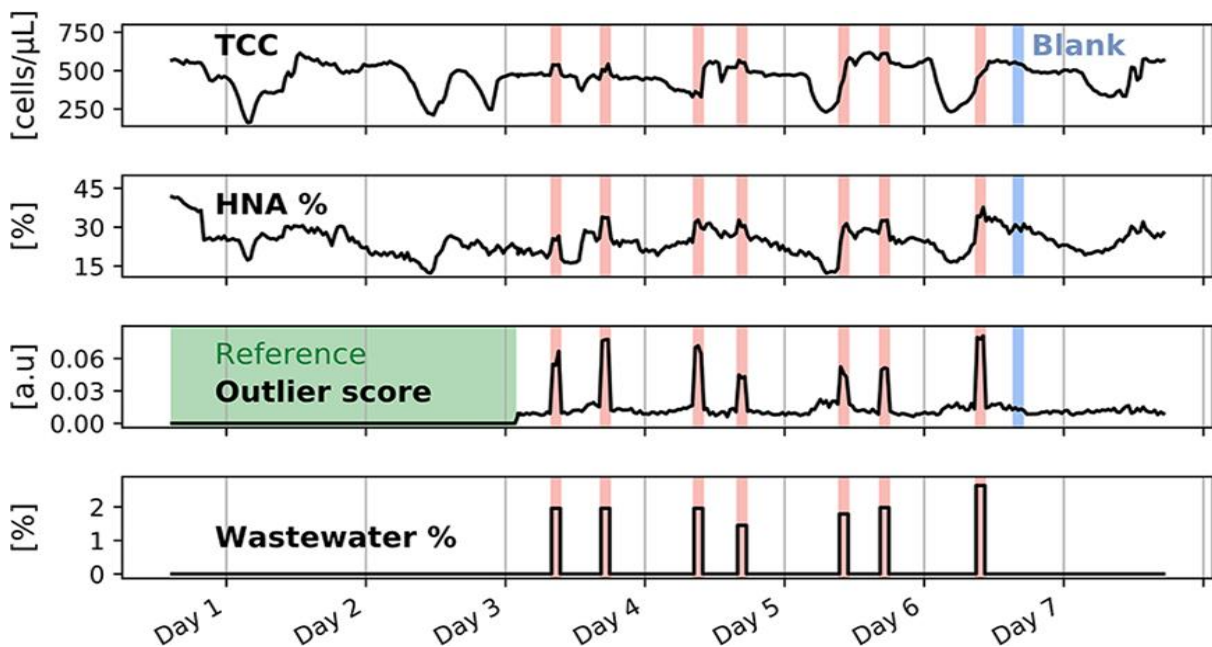
Εικόνα 44. Εγκατάσταση δεξαμενής νερού που προσομοιάνει το πειραματικό μοντέλο. Το νερό της βρύσης ρέει μέσα από μια συνεχώς αναδεδόμενη φιάλη ενός λίτρου, η οποία είναι συνδεδεμένη με ένα κυτταρόμετρο ροής. Ανά διαστήματα διοχετεύονται λύματα για να προκληθούν μικροβιακές επιμολύνσεις [Sadler, et al, 2020].

Η εγκατάσταση λειτούργησε για μία εβδομάδα και πραγματοποιήθηκαν επτά προκλητές επιμολύνσεις του νερού με την προσθήκη αποβλήτων από μια μονάδα επεξεργασίας λυμάτων καθώς και μια έγχυση νερού βρύσης για να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας (blank). Οι πρώτες 2,5 ημέρες ορίστηκαν ως η περίοδος αναφοράς που αντιπροσωπεύει τη φυσιολογική κοινότητα βακτηρίων του νερού της βρύσης και η ακραία βαθμολογία υπολογίστηκε σε κάθε επόμενη μέτρηση. Η ροή έγχυσης λυμάτων ήταν πολύ χαμηλή συγκριτικά με τη ροή του νερού της βρύσης και το ποσοστό των λυμάτων σε όλη τη διάρκεια του πειράματος διατηρήθηκε κάτω από το 3% της ροής του νερού. Δεδομένου ότι τα λύματα είχαν πολύ υψηλότερη συγκέντρωση βακτηρίων, μικροί όγκοι ήταν αρκετοί για να προκαλέσουν αλλαγή στην φυσιολογική κοινότητα των βακτηρίων [Sadler, et al, 2020].

Κατά τη διάρκεια του πειράματος παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση των κυττάρων και το % HNA (ποσοστό υψηλού νουκλεϊκού οξέος), είχαν μεγάλες, ακανόνιστες διακυμάνσεις, με τη συγκέντρωση να κυμαίνεται μεταξύ 200-600 κύτταρα/μl. Αντίθετα, η ακραία βαθμολογία δεν επηρεάστηκε από την προσθήκη του νερού της βρύσης, αλλά υπερέβη σε μεγάλο βαθμό τη βασική της γραμμή κατά τη διάρκεια των επιμολύνσεων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 45.

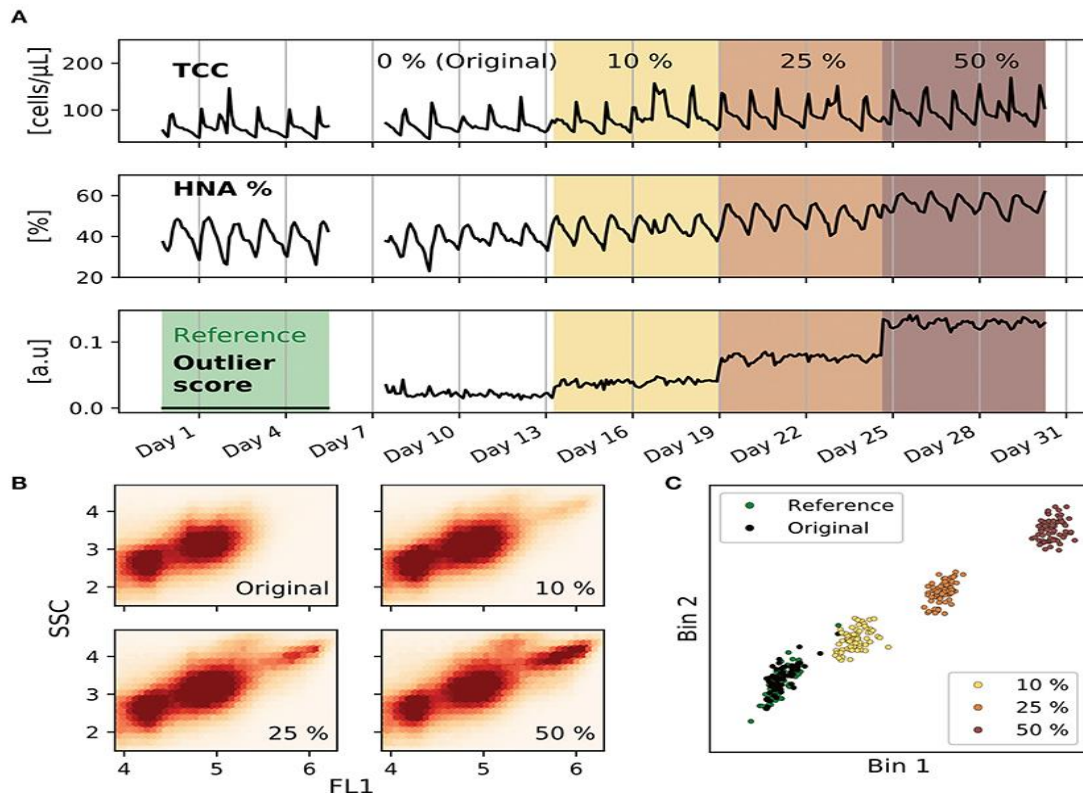
Οι εγχύσεις λυμάτων προκάλεσαν επίσης αυξήσεις στο μικροβιακό φορτίο και στα σήματα του μεγάλου μοριακού βάρους DNA των βακτηρίων, αλλά αυτές ήταν σχετικά μικρές για να προσδιοριστούν με ακρίβεια οι χρόνοι της επιμόλυνσης που προκλήθηκαν.

Έγχυση με το νερό της βρύσης που προερχόταν από την ίδια βρύση, έγινε στο τέλος του πειράματος για να επιβεβαιώσει ότι οι μικροβιακές αλλαγές, προκλήθηκαν από την έγχυση των λυμάτων και όχι από οποιοδήποτε τμήμα που ανήκει στο κλειστό κύκλωμα του νερού της πειραματικής διαδικασίας. Κατά τη διάρκεια αυτής της έγχυσης ελέγχου δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στη συγκέντρωση των μικροοργανισμών και των σημάτων HNA% (ποσοστό υψηλού νουκλεϊκού οξέος), αλλά και καμία μεταβολή στην ακραία βαθμολογία. [Sadler, et al, 2020].



Εικόνα 45. Οι παράμετροι της κυτταρομετρίας ροής: Συνολικός αριθμός κυττάρων, υψηλή περιεκτικότητα βακτηριακού DNA και ακραία βαθμολογία μετά από παρακολούθηση μιας εβδομάδας. Υπάρχει μια περίοδος αναφοράς πάνω από 2,5 ημέρες, η οποία είναι η πράσινη σκιασμένη περιοχή, κατά την οποία αρχικοποιήθηκε το μοντέλο MCCD. Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές διαλείπουσες εκχύσεις λυμάτων, που εμφανίζονται στο γράφημα ως περιοχές με κόκκινη σκιά. Κατά τη διάρκεια των εγχύσεων των λυμάτων, το σήμα της ακραίας βαθμολογίας κορυφώνεται λόγω της μεγάλης αλλαγής στη μικροβιακή συγκέντρωση. Μία έγχυση με νερό της βρύσης πραγματοποιήθηκε στο τέλος της διαδικτυακής περιόδου παρακολούθησης και παρατηρείται στις μπλε σκιασμένες περιοχές. Η έγχυση καθαρού νερού βρύσης δεν επηρέασε την τιμή της ακραίας βαθμολογίας [Sadler, et al, 2020].

Στην παρακάτω Εικόνα (46) παρατίθεται η αρχική αριθμητική προσομοίωση του μοντέλου που επαληθεύτηκε με το πείραμα που περιγράφεται παραπάνω και διαπιστώνεται επακριβώς η ομοιότητα με το εργαστηριακό κομμάτι.



Εικόνα 46. Διαδικασία δοκιμής του μοντέλου με ένα αριθμητικό πείραμα. Τα δεδομένα από μια αρχική ακολουθία (μετρήσεις σε επεξεργασμένο νερό) της κυτταρομετρίας ροής μολύνθηκαν σταδιακά *in-silico* με δεδομένα από παθογόνα βακτήρια.

(A) Η συγκέντρωση των κυττάρων, το ποσοστό υψηλού νουκλεϊκού οξέος (HNA) και η ακραία βαθμολογία παρουσιάζονται για ολόκληρη την ακολουθία. Οι ακολουθίες χωρίστηκαν σε πέντε τμήματα: δεδομένα αναφοράς, αρχικά 0% επιμόλυνση και απότομη αύξηση στο 10, 25 και 50%

(B) Χάρτες πυκνότητας των διαμερισμάτων 2–5 στον χώρο του σήματος της κυτταρομετρίας ροής, που υπολογίζονται σε ένα σύνολο όλων των μετρήσεων στο συγκεκριμένο διαμέρισμα. Με πιο σκούρο χρώμα αντιστοιχεί σε μεγαλύτερη πυκνότητα κυτταρικής επιμόλυνσης.

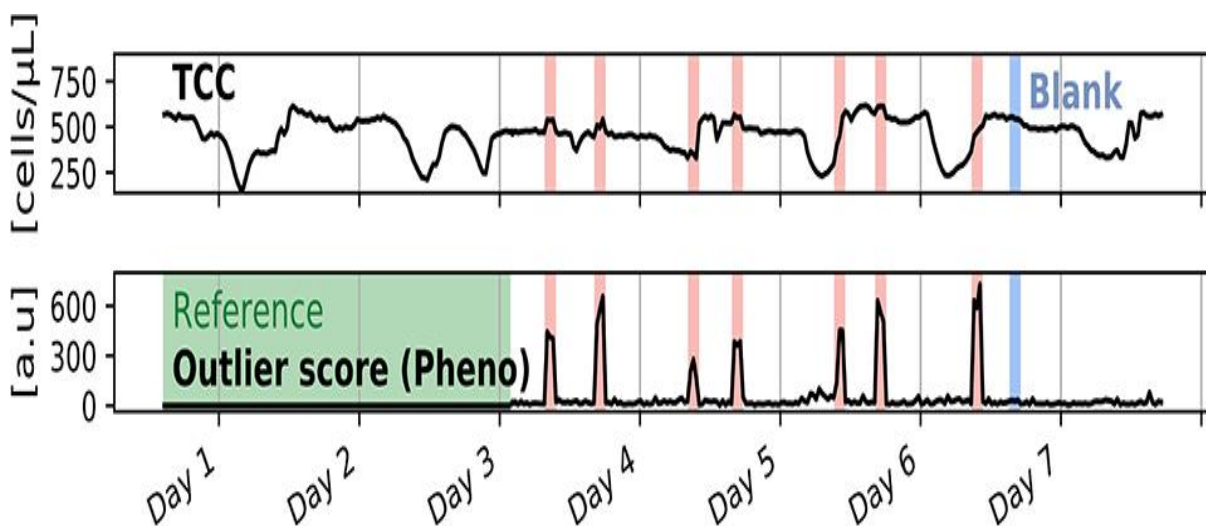
(C) Δισδιάστατη προβολή των δακτυλικών αποτυπωμάτων που υπολογίζεται από τον *Probability Binning* (αλγόριθμο PB). Αυτές οι δύο διαστάσεις αντιστοιχούν στις περιοχές που επιτρέπουν τη μεγαλύτερη διάκριση μεταξύ των αρχικών και των μολυσμένων μετρήσεων. Μία κουκκίδα αντιστοιχεί σε μία μέτρηση που προκύπτει από την κυτταρομετρία ροής και απεικονίζονται όλες οι μετρήσεις από τις εμφανιζόμενες ακολουθίες. Οι αρχικές μετρήσεις (μαύρο) αλληλεπικαλύπτονται με εκείνες από το σύνολο αναφοράς (πράσινο), αλλά οι κουκκίδες μετρήσεων (πορτοκαλί, κόκκινο και σκούρο κόκκινο για το 10, 25 και 50%, αντίστοιχα) απέχουν όλο και περισσότερο από το σύνολο αναφοράς [Sadler, et al, 2020].

Έχει προταθεί η γενίκευση του μοντέλου που έχει περιγραφεί παραπάνω με άλλα χαρακτηριστικά εισόδου για την εξαγωγή της ακραίας βαθμολογίας -βαθμονόμησης, η οποία βασίζεται στον υπολογισμό ενός δακτυλικού αποτυπώματος, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται ως είσοδος στο μοντέλο απόστασης πλησιέστερου «γείτονα». Ωστόσο, αντί να χρησιμοποιηθεί ο αλγόριθμος PB, εξετάστηκαν άλλες μέθοδοι λήψης των δακτυλικών αποτυπωμάτων. Πολλαπλές μέθοδοι υπολογισμού των δακτυλικών αποτυπωμάτων που

αναφέρονται στη βιβλιογραφία είναι σε θέση να μετατρέψουν την κατανομή των σύνθετων συμβάντων - κυττάρων (events) από μια μέτρηση της κυτταρομετρίας ροής σε μια απλούστερη αναπαράσταση [Koch, et al, 2014; Props, et al, 2016; Amalfitano, et al, 2018].

Επιπρόσθετα, επιλέχθηκε η προσέγγιση των Props et al, για τον υπολογισμό των δεικτών της φαινοτυπικής ποικιλομορφίας με το PhenoFlow προκειμένου να ελεγχθεί η εφαρμογή και για τη γενίκευση του διαδικτυακού μοντέλου σε άλλα χαρακτηριστικά εισόδου (<https://github.com/rprops/PhenoFlow>). Ο αλγόριθμος PhenoFlow χαρακτηρίζει την πυκνότητα των κυττάρων σε ένα πλέγμα σε ελάχιστη απόσταση (δακτυλικό αποτύπωμα), από το οποίο προέρχονται μονοδιάστατοι δείκτες διαφοροποίησης Hill (one-dimensional Hill). Αυτοί χρησιμοποιήθηκαν ως χαρακτηριστικά εισόδου στο μοντέλο της απόστασης του πλησιέστερου «γείτονα» (nearest neighbor distance model) [Props, et al, 2016].

Πάνω σε αυτό το μοντέλο κατέγραψαν οι Sadler et al, τα πειραματικά δεδομένα που είχαν συλλέξει από το δικό τους εργαστηριακό πείραμα που αναλύθηκε παραπάνω. Η ακραία βαθμολογία, που υπολογίστηκε με τα χαρακτηριστικά PhenoFlow, προσδιόρισε τις αιχμές εξίσου αξιόπιστα με αυτήν που χρησιμοποιεί τα χαρακτηριστικά PB (Εικόνα 47). Γίνεται αντιληπτό, ότι στο σήμα που προέρχεται από τον αλγόριθμο, υπάρχει μια γραμμική σχέση μεταξύ της ακραίας βαθμολογίας και του ποσοστού των λυμάτων που επιμολύνουν το δείγμα [Sadler, et al, 2020].



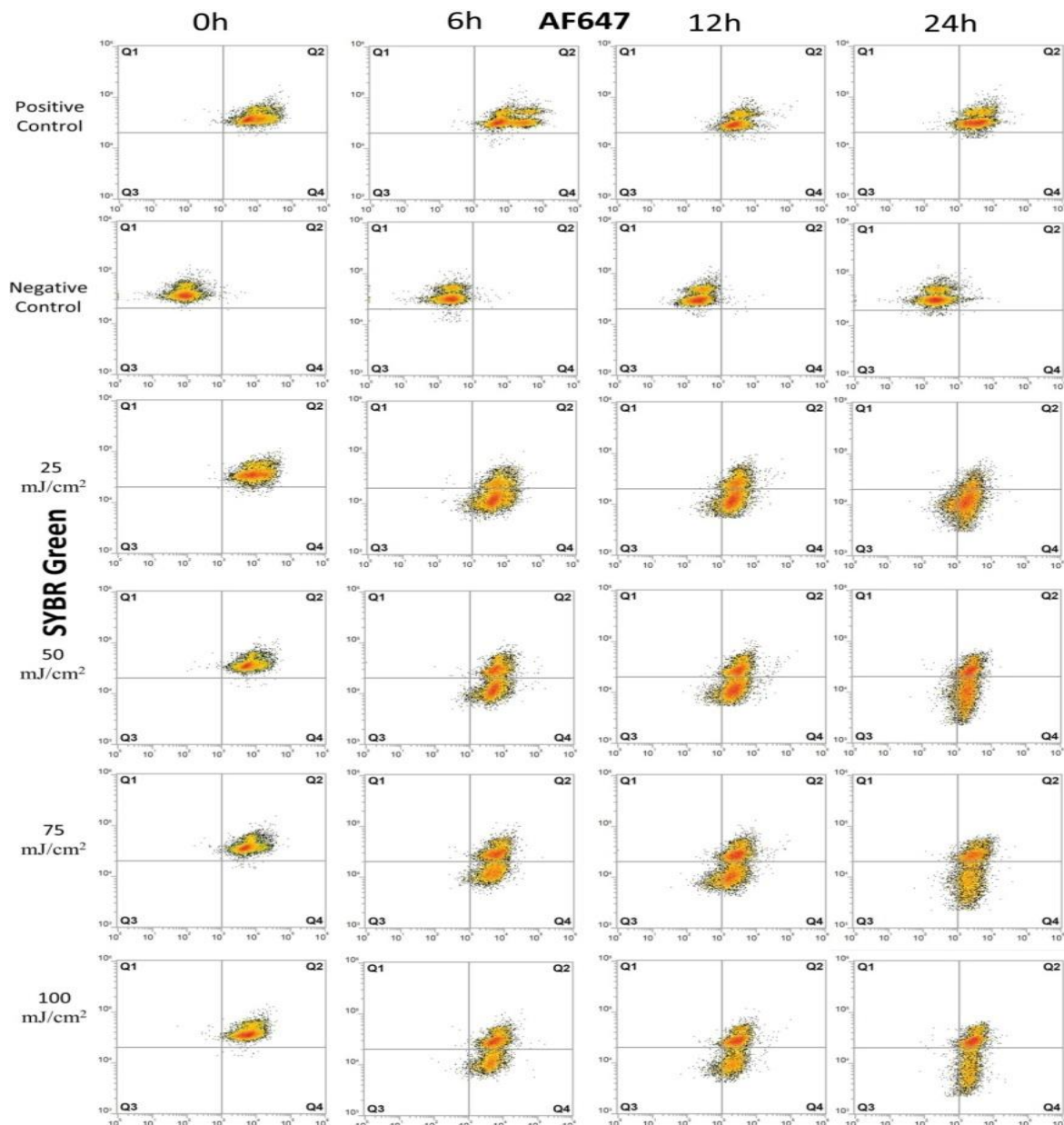
Εικόνα 47. Απεικόνιση της ακραίας βαθμολογίας MCCD, σε δείκτες διαφοροποίησης Hill που προέρχονται από τα δακτυλικά αποτυπώματα από το PhenoFlow και εφαρμόζονται στο πείραμα του προσομοιωμένου συστήματος νερού με επιμολύνσεις λυμάτων. Το σήμα ακραίας βαθμολογίας που υπολογίζεται με τα χαρακτηριστικά PhenoFlow είναι παρόμοιο με το σήμα ακραίας βαθμολογίας που υπολογίζεται μέσω των χαρακτηριστικών PB που φαίνονται στην εικόνα 45 [Sadler, et al, 2020].

Σε μια πρόσφατη εργασία του 2021, η Lindivat και οι συνεργάτες της μελέτησαν τη βιωσιμότητα των βακτηρίων μετά τη διαδικασία απολύμανσης του νερού χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία της βιοορθογωνίας μη κανονικής επισήμανσης αμινοξέων (Bio-Orthogonal Non-Canonical Amino acid Tagging, BONCAT) και την κυτταρομετρία ροής. Η καταγραφή της υπάρχουσας δραστηριότητας της πρωτεϊνοσύνθεσης και της ακεραιότητας του DNA πραγματοποιήθηκε με BONCAT και τη χρήση της χρωστικής SYBR Green. Έγινε μελέτη σε μονοκαλλιέργειες του βακτηρίου *E.coli* και σε φυσικά θαλάσσια δείγματα μετά από ακτινοβολία UV σε δόσεις από 25 έως 200 mJ/cm², όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 48 και μετά από θερμική επεξεργασία στους 55°C και επώαση από 15 έως 45 λεπτά, όπως παρουσιάζεται αναλυτικά στην Εικόνα 49 [Lindivat, et al, 2021].

Η υπερϊώδης ακτινοβολία προκαλεί αποικοδόμηση του DNA του *E. coli* ακολουθούμενη από μείωση της πρωτεϊνοσύνθεσης εντός χρονικής περιόδου 24 ωρών. Η θερμική επεξεργασία επηρεάζει επίσης άμεσα τόσο την ακεραιότητα του DNA, όσο και την πρωτεϊνοσύνθεση. Τα αποτελέσματα αυτά βαίνουν αυξανόμενα με την πάροδο του χρόνου, έχουν δηλαδή οι βλάβες αυτές χρονοεξαρτώμενη βιολογική μεταβολή. Τα αποτελέσματα από τη μέθοδο BONCAT συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα από γνωστές μεθόδους που χρησιμοποιούνται, όπως η μέτρηση αποικιών σε τρυβλία, όπου μετά την πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται αρίθμηση αποικιών που αναπτύσσονται σε στερεό θρεπτικό υλικό και το LIVE/DEAD™ BacLight™, το οποίο βασίζεται στη μέτρηση των κυττάρων, των οποίων η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης υποδηλώνει αν είναι ζωντανά ή όχι. Οι μέθοδοι μέτρησης είχαν κάποιες διαφορές σε σχέση με τα επίπεδα βιωσιμότητας που ανιχνεύθηκαν στα βακτήρια μετά τις διάφορες επιδράσεις των δοσοεξαρτώμενων πειραμάτων της ακτινοβολίας και του θερμικού σοκ για διαφορετικά χρονικά διαστήματα που εφαρμόστηκαν. Τα αποτελέσματα ήταν συμπληρωματικά και ανέδειξαν ότι τα κύτταρα διατήρησαν τη μεταβολική τους δραστηριότητα και την ακεραιότητα της μεμβράνης τους παρά την απώλεια της κυτταρικής τους διαίρεσης [Lindivat, et al, 2021].

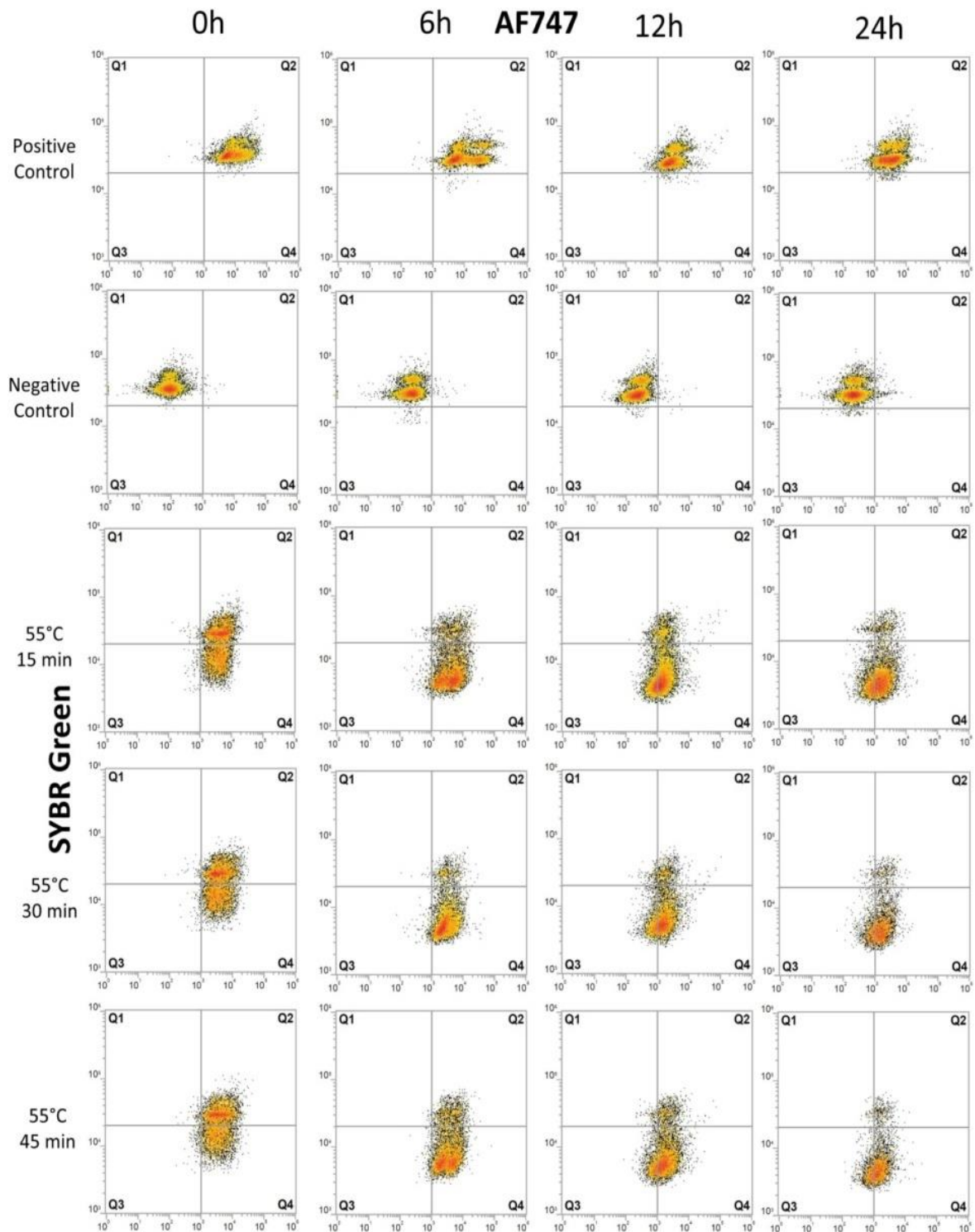
Ομοίως, η ανάλυση της πρωτεϊνικής σύνθεσης σε θαλάσσια βακτήρια με το BONCAT έδειξε μία υπολειμματική δραστηριότητα παρά την αδυναμία ανάπτυξης ή της αναπαραγωγής τους. Οι εσωτερικοί μάρτυρες που παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας διαφορετικά σταθεροποιητικά μέσα, όπως η φορμαλδεΰδη, η ισοπροπανόλη και το οξεικό οξύ, καθώς και η μελέτη σε διαφορετικά βακτηριακά στελέχη αποκάλυψαν ότι το πρωτόκολλο BONCAT εξακολουθούσε να οδηγεί σε κύτταρα ενεργά φαινοτυπικά. Ο λόγος για αυτό το αποτέλεσμα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως και περαιτέρω έρευνες βρίσκονται σε εξέλιξη μέχρι σήμερα προκειμένου να γίνει κατανοητός ο βιολογικός τρόπος επιβίωσης

τους [Lindivat, et al, 2021].



Εικόνα 48. Αποτελέσματα από κυτταρομετρία ροής σε κυτταρογράμματα (dot plots), τα οποία έχουν προκύψει από τα κύτταρα του βακτηρίου *E. coli* που υποβλήθηκαν σε έκθεση σε ακτινοβολία UV. Οι επιδράσεις των δόσεων UV των 25, 50, 75 και 100 mJ/m² στα κύτταρα της *E. coli* παρακολούθηθηκαν σε ότι αφορά την αποικοδόμηση του DNA τους και τη σύνθεση των πρωτεϊνών στους χρόνους 0, 6, 12 και 24 ώρες μετά την ακτινοβολήση. Στα κύτταρα έγινε χρώση με τη χρωστική SYBR Green για την ανίχνευση του DNA και Alexa Fluor 647 για BONCAT. Μεταξύ 5.000 και 10.000 κυττάρων αναλύθηκαν. Τα τεταρτημόρια σχεδιάστηκαν σύμφωνα με τον θετικό και αρνητικό μάρτυρα που ήταν το HPG (*L-homopropargylglycine*), ανάλογο αμινοξέος γλυκίνης και δείκτης μεταβολικής ενεργότητας στα κύτταρα.

Q1: νεκρά κύτταρα, παρουσία άθικτου DNA, αρνητική δραστικότητα BONCAT, Q2: Ζωντανά κύτταρα, παρουσία άθικτου DNA, θετική δραστικότητα BONCAT, Q3: Νεκρά κύτταρα, κατεστραμμένο DNA, αρνητική δραστικότητα BONCAT, Q4: κατεστραμμένα κύτταρα, κατεστραμμένο DNA και θετική δραστηριότητα BONCAT. Τα αποτελέσματα της δοσολογίας UV των 200 mJ/m² δεν περιλαμβάνονται καθώς παρουσιάζουν παρόμοιο μοτίβο με τις χαμηλότερες δόσεις UV [Lindivat, et al, 2021].



Εικόνα 49. Αποτελέσματα από κυτταρομετρία ροής σε κυτταρογράμματα (dot plots), τα οποία έχουν προκύψει από τα κύτταρα του βακτηρίου *E. coli* που επωάστηκαν. Οι επιδράσεις στα κύτταρα από την έκθεση της *E. coli* στους 55°C για 15, 30 και 45 λεπτά παρακολούθηθηκαν σε ότι αφορά την αποικοδόμηση του DNA τους και τη σύνθεση πρωτεϊνών σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα 0, 6, 12 και 24 ώρες μετά την επίδραση της θερμότητας. Τα δείγματα ελέγχου είναι τα ίδια με αυτά που χρησιμοποιούνται και στο πείραμα της UV ακτινοβολίας (Εικόνα 48). Τα κύτταρα σημάνθηκαν με τη χρωστική SYBR Green για την ανίχνευση του DNA και της Alexa Fluor 647 για το BONCAT. Μεταξύ 5.000 και 10.000 κυττάρων αναλύθηκαν. Τα τεταρτημόρια σχεδιάστηκαν όπως και στην Εικόνα 48 [Lindivat, et al, 2021].

Τα αποτελέσματα των ερευνητών δείχνουν ότι το BONCAT και η κυτταρομετρία ροής μπορούν να ανιχνεύσουν, να καταμετρήσουν και να διαφοροποιήσουν τα βακτηριακά κύτταρα μετά από φυσικές επεξεργασίες του νερού, όπως είναι η ακτινοβολία UV και η θέρμανση - βρασμός. Η μέθοδος είναι αξιόπιστη για την αρίθμηση και τη διερεύνηση της βιωσιμότητας των μεμονωμένων κυττάρων και ένα μεγάλο πλεονέκτημα με το BONCAT είναι ότι αναλύονται όλες οι πρωτεΐνες που συντίθενται εντός των κυττάρων, σε σύγκριση με τους προσδιορισμούς που στοχεύουν συγκεκριμένα στοιχεία όπως είναι η ενζυμική δραστηριότητα [Lindivat, et al, 2021].

4.3 Η συμβολή της αυτοματοποιημένης διαδικτυακής κυτταρομετρίας ροής στη διαχείριση του οικοσυστήματος μικροφυκών

Τα μικροφύκη αναδύονται ως ένα βιοτεχνολογικό σύστημα επόμενης γενιάς παραγωγής προϊόντων (next generation biotechnological production system), στους τομείς των φαρμακευτικών σκευασμάτων των βιοκαυσίμων και των τροφίμων. Η σωστή λειτουργία των βιοδιυλιστηρίων μικροφυκών παραμένει ο κύριος στόχος, όπου η επιμόλυνση των καλλιεργειών και η αύξηση των προκαρυωτικών αποτελούν σημεία δυσλειτουργίας του βιοαντιδραστήρα και μοιραία επηρεάζουν τη σταθερότητα, την αναπαραγωγικότητα και κατά συνέπεια την παραγωγικότητα της καλλιέργειας για το τελικό προϊόν. Η αυτοματοποιημένη διαδικτυακή κυτταρομετρία ροής κερδίζει έδαφος ως εργαλείο βελτιστοποίησης όλων των βιοδιαδικασιών, καθώς επιτρέπει την παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο και την αξιολόγηση των εγγενών χαρακτηριστικών των κυττάρων που αναλύονται [Hyka, 2013].

Μέχρι σήμερα, η αυτοματοποιημένη διαδικτυακή κυτταρομετρία ροής δεν έχει εφαρμοστεί σε οικοσυστήματα μικροφυκών, αλλά αποτελεί μια ισχυρή μελλοντική τεχνολογία για τη βελτίωση της πιθανότητας της παραγωγής πρώτης ύλης από τα μικροφύκη, μέσω της άμεσης παρακολούθησης. Μελέτες έχουν θέσει βασικά θεμέλια για την εφαρμογή της αυτοματοποιημένης διαδικτυακής κυτταρομετρίας ροής (online FCM), κάτι που συνεπάγεται εκτεταμένες εφαρμογές και ανάδειξη καινοτομιών που στοχεύουν στη βελτιστοποίηση και την αμεσότητα των βιοδιαδικασιών των μικροφυκών [Hyka, 2013].

Οι μελέτες αυτές δείχνουν ότι μπορεί να συλλέγονται οι εκπομπές του φθορισμού στα κανάλια φθορισμού FL1/FL3, αξιοποιώντας τη χρώση του νουκλεϊκού οξέος και τον αυτοφθορισμό της χλωροφύλλης. Αυτά επιτρέπουν την ταυτόχρονη αξιολόγηση με ποσοτική απόδοση του γενετικού υλικού σχετιζόμενη με την ποικιλομορφία των προκαρυωτικών και της φωτοτροφικής *Chlorella vulgaris* σε μικτές συγκεντρώσεις

στελεχών. Οι ερευνητές παρουσίασαν την αρχή λειτουργίας ενός ρομπότ χρώσης για την αυτοματοποιημένη διαδικτυακή κυτταρομετρία ροής η οποία περιλαμβάνει ένα βήμα δειγματοληψίας από την καλλιέργεια, ακολουθούμενο από επώαση με τη χρωστική και τέλος τη μέτρηση στο κυτταρόμετρο ροής, το οποίο υιοθετήθηκε για την επικύρωση του πρωτοκόλλου χρώσης. Η χρώση του νουκλεϊκού οξέος των προκαρυωτικών πληθυσμών πραγματοποιείται με το SYBR Green I στους 37°C και ακολουθεί επώαση 10 λεπτών [Haber Korn, et al, 2019, 2021].

Το πρωτόκολλο αυτό αποδείχθηκε ότι παρέχει ακριβή και αναπαραγώγιμα ποσοτικά δεδομένα και φαινοτυπικά αποτυπώματα σε προκαρυωτικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της αυτοματοποιημένης διαδικτυακής κυτταρομετρίας ροής και επισημάνθηκε και από άλλους ερευνητές [Besmer, Hammes, 2016; Besmer, et al, 2017; Props, et al, 2018]. Καθώς η μελέτη στόχευε στη δημιουργία ενός πρωτοκόλλου χρώσης για την ταυτόχρονη αξιολόγηση των προκαρυωτικών και των μικροφυκών, διερευνήθηκε και η σκοπιμότητα της εφαρμογής του πρωτοκόλλου χρώσης για την αξιολόγηση του *C. vulgaris*. Έτσι κατέστη δυνατή τελικά η επικύρωση του πρωτοκόλλου χρώσης, το οποίο θα περιγραφεί σε αδρές γραμμές στη συνέχεια.

Σε έξι διακριτά δείγματα του *C. vulgaris* SAG 211-12, έγινε χρώση με SYBR Green I. Κάθε δείγμα μετρήθηκε χειροκίνητα και μεμονωμένα στο κυτταρόμετρο ροής πέντε φορές, εφαρμόζοντας τις ίδιες συνθήκες ρύθμισης του κυτταρομέτρου, αξιολογώντας τα κύτταρα σε χρώση, θερμοκρασίας 37°C, για χρόνο επώασης 5, 8, 10 και 15 λεπτά. Επιπρόσθετα, η επίδραση της θερμοκρασίας χρώσης διερευνήθηκε με τη χρώση των κυττάρων για 10 λεπτά στους 4°C, 37°C και 40°C. Οι αρνητικοί μάρτυρες αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τη χρωστική SYBR Green I μόνο σε φιλτραρισμένο νερό, ακολουθώντας το ίδιο πρωτόκολλο χρώσης [Haber Korn, et al, 2021].

Η στρατηγική της οριοθέτησης για τα μικροφύκη περιελάμβανε αρχικά την αξιολόγηση πρόσφατης καλλιέργειας του *C. vulgaris*. Δείγματα του ίδιου δείγματος *C. vulgaris* αραιώθηκαν με φιλτραρισμένο νερό για να ληφθεί η συγκέντρωση των κυττάρων κάτω από $2,0 \times 10^5$ κύτταρα / ml. Στη συνέχεια, έγινε χρώση στα έξι διακριτά δείγματα στους 37°C για 10 λεπτά με τη χρωστική SYBR Green I στο σκοτάδι και μετρήθηκε εις πενταπλούν [Besmer, et al, 2017b].

Τα δείγματα μετρήθηκαν χειροκίνητα και χωριστά στο κυτταρόμετρο ροής. Η οριοθέτηση των μικροφυκών δημιουργήθηκε με βάση τις εντάσεις φθορισμού του πράσινου στο κανάλι FL1 και του κόκκινου φθορισμού στο κανάλι FL3. Οι πύλες των μικροφυκών επικυρώθηκαν για την εφαρμογή τους σε όλα τα δείγματα που ελήφθησαν σε αυτή τη μελέτη όπως φαίνεται

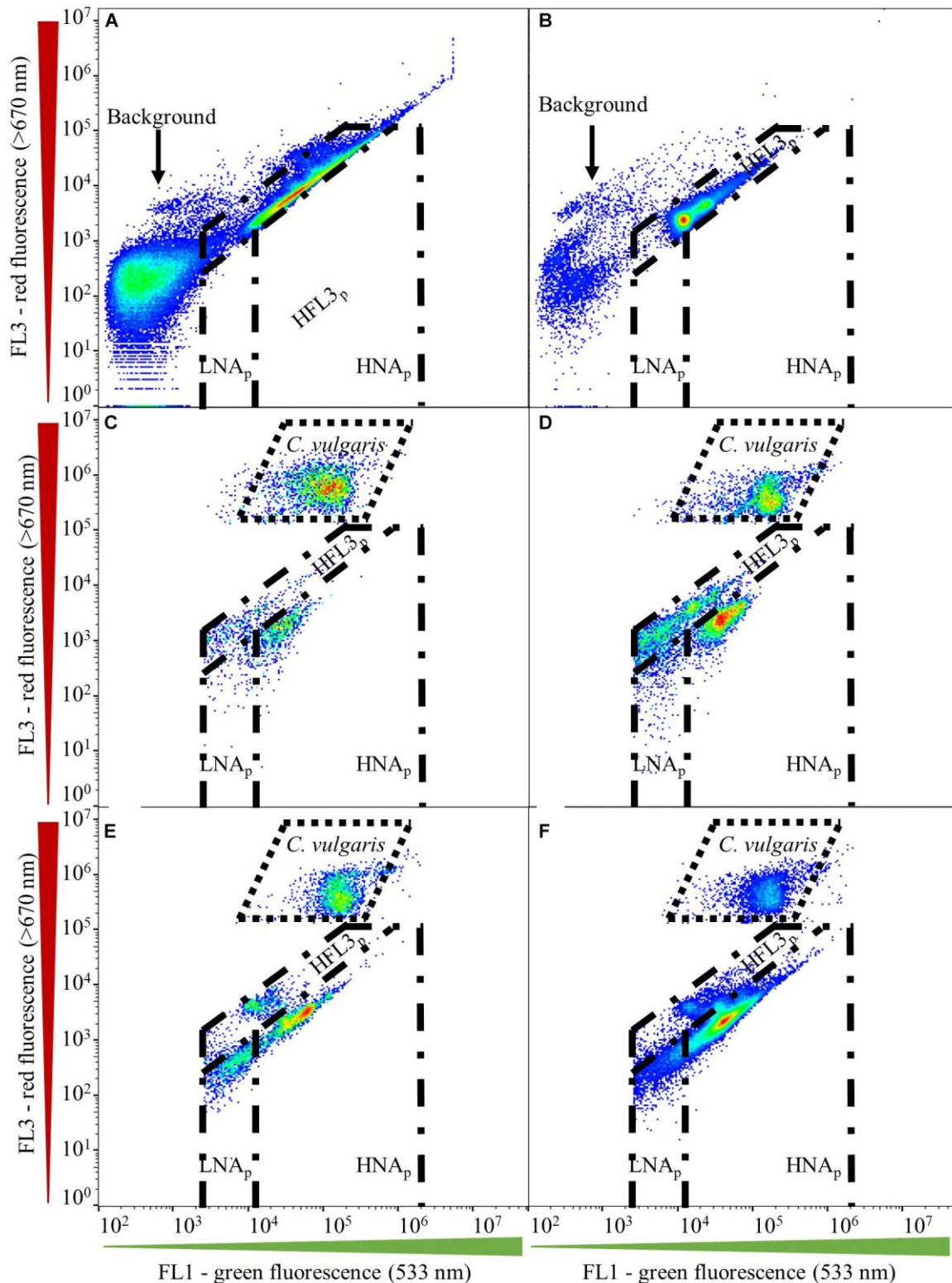
στην Εικόνα 50 (C–F). Οι πύλες για την αξιολόγηση των προκαρυωτικών στη συγκαλλιέργεια με *C. Vulgaris* εφαρμόστηκαν όπως υιοθετήθηκαν αρχικά από τους Perst, et al, περιελάμβαναν τις προκαρυωτικές περιοχές για οργανισμούς που περιέχουν χαμηλής περιεκτικότητας (LNAp) και υψηλής περιεκτικότητας DNA (HNAp), (Εικόνα 50, A–F) [Perst, et al, 2013]. Οι προκαρυωτικές πύλες επικυρώθηκαν για την εφαρμογή τους σε όλα τα δείγματα, αξιολογώντας αρχικά τις προκαρυωτικές καλλιέργειες κι ακολούθως από την εφαρμογή των πυλών, τις συγκαλλιέργειες των προκαρυωτικών με *C. Vulgaris* [Haberkorn, et al, 2021].

Στον πίνακα 4 φαίνονται αναλυτικά οι συνδυασμοί των καλλιεργειών που έγιναν μεταξύ διαφορετικών προκαρυωτικών μικροοργανισμών και του *C. vulgaris* στο πείραμα που περιγράφεται.

	Coculture	Initial cell concentration [cells · μL ⁻¹]		Final cell concentration [cells · μL ⁻¹]	
		<i>C. vulgaris</i>	Prokaryotes	<i>C. vulgaris</i>	Prokaryotes
1	<i>C. vulgaris</i> – <i>Sphingopyxis</i> sp.	46.5	2.4	49.0	37.0
2	<i>C. vulgaris</i> – <i>Tistrella</i> sp.	27.2	2.2	48.0	28.4
3	<i>C. vulgaris</i> – <i>Sphingopyxis</i> sp., <i>Tistrella</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp. I	43.6	2.6	39.1	47.6
4	<i>C. vulgaris</i> – <i>Sphingopyxis</i> sp., <i>Tistrella</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp. II	66.4	126.6	66.7	1002.4
5	<i>C. vulgaris</i> –undefined; spontaneous, fortuitous contamination	45.6	2.2	49.2	39.9

Cocultures were established and assessed as single cocultures (n = 1).

Πίνακας 4. Συνδυασμοί συγκαλλιέργειας του *C. vulgaris* με τα προκαρυωτικά στελέχη των *Sphingopyxis* sp., *Tistrella* sp., και *Pseudomonas* sp. Η αξιολόγηση έγινε με αυτοματοποιημένη διαδικτυακή κντταρομετρία ροής, καθώς και οι αντίστοιχες αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των κνττάρων (cells /μl) [Haberkorn, et al, 2021].



Εικόνα 50. Η στρατηγική οριοθέτησης (πυλών/gates) που καθιερώθηκε χρησιμοποιώντας τα κντταρογράμματα dot plots διπλής πυκνότητας στις εκπομπές φθορισμού των πράσινων (FL1) και κόκκινων (FL3) συμβάντων. Οι πύλες, συμπεριλαμβανομένων των τομέων των μικροφυκών, HNA_p, LNA_p και HFL3_p, εμφανίζονται για (A) axenic *Tistrella* sp., (B) axenic *Sphingoryxis* sp., (C) *Tistrella* sp.– *C. vulgaris* συγκαλλιέργεια, (D) *Sphingoryxis* sp.– *C. vulgaris* συγκαλλιέργεια, και *Sphingoryxis* sp., *Tistrella* sp., *Pseudomonas* sp.–*C. vulgaris* συγκαλλιέργεια εμβολιάστηκαν σε χαμηλότερη (E) και υψηλότερη (F) αρχική προκαρρωτική συγκέντρωση από ότι το *C. vulgaris* [Haberkorn, et al, 2021].

4.3.1 Ο ορισμός της πύλης και η οριοθέτηση των μικροφυκών και των προκαρυωτικών κυττάρων

Η εφαρμογή της πύλης των μικροφυκών με βάση τα φάσματα εκπομπής της χρωστικής SYBR® Green I και του αυτοφθορισμού της χλωροφύλλης παρέχει μια έγκυρη και αναπαραγωγίμη προσέγγιση για την αξιολόγηση του αριθμού των κυττάρων των μικροφυκών σε πρόσφατα δείγματα *C. vulgaris*. Δεν βρέθηκε στη μελέτη αυτή σημαντική διαφορά μεταξύ των συνόλων των δεδομένων που συλλέχθηκαν στα κανάλια FSC/SSC και FL1/FL3 (t test $t = -2.09$, $df = 10$, $P = 0.06$, $n = 30$). Η ποσοτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων αποκάλυψε μια σχετική τυπική απόκλιση του 3,1% και 3,2% των μετρήσεων στα κανάλια FSC/SSC και FL1/FL3, αντίστοιχα, υποδεικνύοντας έτσι τη χαμηλή διακύμανση εντός του δείγματος. Οι μετρήσεις που συλλέχθηκαν στα κανάλια FL1/FL3 αποδείχθηκαν ότι αντιπροσωπεύουν την απόδοση της βιομάζας του *C. vulgaris*, υποδεικνύοντας ότι το πρωτόκολλο χρώσης που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη, με τη χρωστική SYBR® Green I στους 37°C, για χρονικό διάστημα 10 λεπτών και ο μετέπειτα προσδιορισμός του αριθμού αντιπροσώπευαν τον αριθμό των κυττάρων του *C. vulgaris* και την απόδοση της βιομάζας στο βέλτιστο σημείο [Haberkorn, et al, 2019].

Δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στην περιεκτικότητα σε νουκλεϊκό οξύ ή τη χλωροφύλλη των μικροφυκών σε όλες τις συγκαλλιέργειες που αξιολογήθηκαν, κάτι που υποδεικνύεται από την κάλυψη 100% εντός της οριοθέτησης-πύλης που έχει δημιουργηθεί στα κανάλια φθορισμού FL1/FL3. Στο προκαρυωτικό πεδίο της οριοθέτησης, η εκπομπή που συλλέχθηκε στα κανάλια φθορισμού FL1/FL3, αποκάλυψε την παρουσία διαφορετικών συστάδων κυττάρων, όπως παρατηρούμε στην εικόνα 50 (A–F). Οι πύλες για την αξιολόγηση των προκαρυωτικών κυτταρικών πληθυσμών υιοθετήθηκαν αρχικά από τους Perst, et al, όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα. Παρατηρούμε επίσης ότι στις προκαρυωτικές καλλιέργειες που εντοπίζονται στην περιοχή του HNA που προτείνεται από τους Perst, et al, η συγκαλλιέργεια με *C. vulgaris* οδήγησε σε μια μετατόπιση του εντοπισμού των προκαρυωτικών κυττάρων στα κανάλια FL1/FL3 προς χαμηλότερη εκπομπή φθορισμού στα πράσινα κυτταρικά συμβάντα (FL1) και στα κόκκινα (FL3) αντίστοιχα, όπως παρατηρούμε σαφώς στην Εικόνα 50 (A–D) [Haberkorn, et al, 2021].

Επιπλέον, οι προκαρυωτικοί πληθυσμοί των διαφορετικών ειδών κυττάρων που βρίσκονται στη διασταύρωση των αρχικών τομέων διαχωρισμού των LNA και HNA [Perst, et al, 2013], επέτρεψε μια σαφή διάκριση των δύο πληθυσμών όπως φαίνονται στην Εικόνα 50 (E-F). Ως εκ τούτου, οι πύλες των LNA_p και HNA_p για την αξιολόγηση των προκαρυωτικών σε συγκαλλιέργεια με το *C. vulgaris* απαιτούσαν την προσαρμογή της

εκπομπής του πράσινου προς χαμηλότερη τιμή στο κανάλι FL1 και του κόκκινου στο κανάλι FL3 στο φθορίζον φάσμα εκπομπής (κυτταρομετρικά αυτό ορίζεται ως αντιστάθμιση). Για την πλειονότητα των συγκαλλιέργειών, οι μετρήσεις που συλλέχθηκαν στην πύλη LNAp ήταν αμελητέες και πιθανά να συσχετιζόταν και με τη διασπορά των κυττάρων στο θόρυβο (background scattering). Οι συγκαλλιέργειες, όπως αυτές που δημιουργήθηκαν μεταξύ του στελέχους *Sphingopyxis sp.* (Εικόνα 50), στην πύλη D και τριών προκαρυωτικών στελεχών, όπως παρουσιάζονται στις E, F, έδειξαν την παρουσία ενός πρόσθετου προκαρυωτικού πληθυσμού που εξέπεμπε υψηλότερα σήματα στο κανάλι του κόκκινου φθορισμού (FL3), με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας τρίτης πύλης που συμβολίζεται ως HFL3p [Haberkorn, et al, 2021]. Ωστόσο, το σήμα που συλλέχθηκε εντός της πύλης HFL3p δεν ήταν δυνατό να επιβεβαιωθεί για όλες τις συγκαλλιέργειες. Στην πραγματικότητα, οι μετρήσεις που λαμβάνονται εντός της πύλης HFL3p μπορεί να είναι ποσοτικά αμελητέες κατά τη διάρκεια της συγκαλλιέργειας. Ορισμένες μελέτες περιγράφουν ότι αυτά τα σήματα που συλλέγονται στον τομέα HFL3p σχετίζονται με σκέδαση θορύβου. [Hammes, et al, 2008; Perst, et al, 2013].

Η παρουσία του τομέα HFL3p δεν χρησιμοποιείται για την ώρα για τα μικροφύκη και τα προκαρυωτικά στα υδάτινα οικοσυστήματα. Ως εκ τούτου, η συνολική αξιολόγηση της ποικιλομορφίας των προκαρυωτικών κοινοτήτων, συμπεριλαμβανομένων των κλασμάτων HFL3p είναι υποθετική. Έτσι, το κλάσμα HFL3p εξαιρέθηκε από την επακόλουθη ανάλυση της ποικιλομορφίας της κοινότητας. Επίσης, ένα πολύ δυσδιάκριτο σήμα σε εντάσεις φθορισμού χαμηλότερες από εκείνες που προτείνονται για την περιοχή LNAp στο κανάλι φθορισμού του πράσινου, καθώς και σε υψηλότερες εντάσεις φθορισμού στο κανάλι του κόκκινου, συσχετίστηκε με σκέδαση θορύβου και επομένως αποκλείστηκε από περαιτέρω ανάλυση (Εικόνα 50-A, B) [Haberkorn, et al, 2021].

Κλείνοντας το κεφάλαιο αυτό θα περιγραφούν δεδομένα από την εργασία του Thavrin Manickum, 2020, όπου ο συγγραφέας αναφέρει τα πλεονεκτήματα των μετρήσεων με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας και τα αντίστοιχα δεδομένα των ελεγκτικών μηχανισμών σε μια Αφρικανική χώρα. Επισημαίνεται δε ότι η παραγωγή πόσιμου νερού κατάλληλης ποιότητας είναι κρίσιμη σ' αυτές τις περιοχές για τη διασφάλιση της δημόσιας υγείας. Ο οργανισμός Umgeni Water (UW), στο KwaZulu Natal της Νότιας Αφρικής, παρέχει υπηρεσίες για το πόσιμο νερό ύδρευσης και αποχέτευσης σε όλα τα ιδρύματα και τις υπηρεσίες ύδρευσης της περιοχής. Συγκεκριμένα, επεξεργάζεται το ακατέργαστο νερό από τη λεκάνη απορροής, σύμφωνα με τα πρότυπα του πόσιμου νερού που καθορίζονται με βάση τις αρχές του οργανισμού South African National Standard (SANS), ο οποίος είναι

ευθυγραμμισμένος με τις κατευθυντήριες οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization guidelines). Η ποιότητα του νερού αξιολογείται στα κεντρικά εργαστήρια (Head Office Laboratories), τα οποία είναι διαπιστευμένα κατά ISO 17025, 2017, από το Νότιο Αφρικανικό Εθνικό Σύστημα Διαπίστευσης (South-African-National-Accreditation-System,) [<https://www.sanas.co.za/Pages/index.aspx>].

Τα παθογόνα μικρόβια στο νερό και τα λύματα είναι από τα πλέον επικίνδυνα για την υγεία των ανθρώπων. Οι κατάλληλες μέθοδοι δοκιμής για την αξιολόγηση των παθογόνων αυτών μικροοργανισμών είναι απαραίτητες για προστασία της ανθρώπινης υγείας. [Manickum, 2020]. Ένας από τους συνηθισμένους μικροβιολογικούς ελέγχους ποιότητας του νερού είναι η μέθοδος της ετεροτροφικής μέτρησης των αποικιών σε τρυβλία (Heterotrophic Plate Count, HPC), η οποία όμως βασίζεται στην καλλιέργεια των κυττάρων. Μια μεγάλη πρόκληση που αντιμετωπίζει ο τομέας του νερού είναι ο γρήγορος έλεγχος για τα παθογόνα μικρόβια, όπου οι κλασικές μέθοδοι έχουν χαμηλή ευαισθησία και ακρίβεια, καθώς και μεγάλη αναμονή για το αποτέλεσμα (24 ώρες, έως 7 ημέρες). Η κυτταρομετρία ροής είναι μια εναλλακτική προσέγγιση, όπως έχει αναφερθεί από πολλούς ερευνητές [Safford, Bischel, 2019; Coggins, et al, 2020].

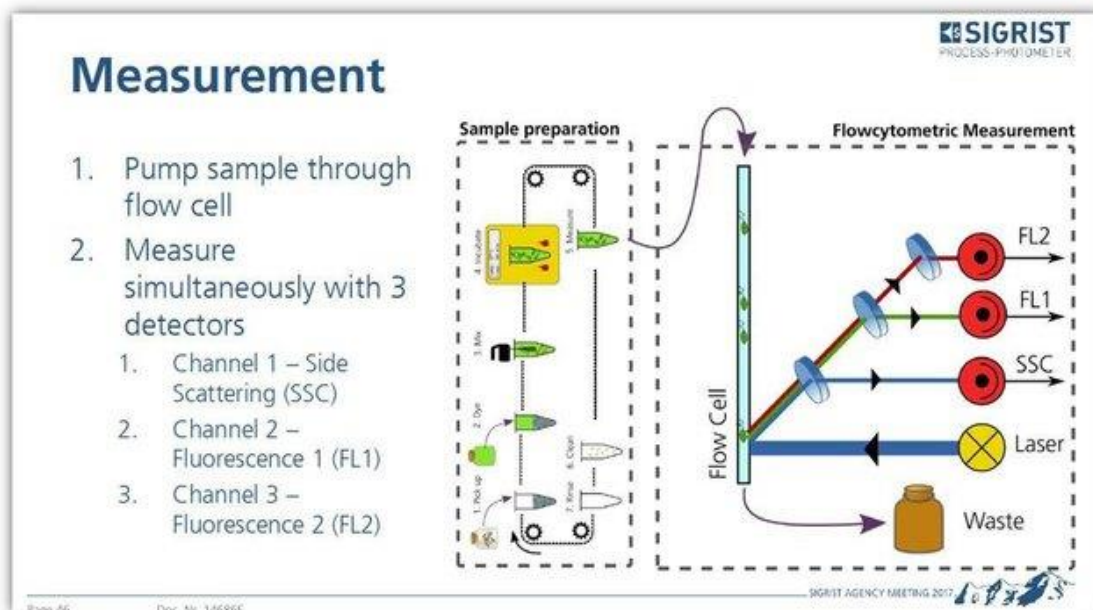
Μέχρι πρόσφατα, όλες οι κυτταρομετρικές μέθοδοι απαιτούσαν χειροκίνητη προετοιμασία των δειγμάτων. Όπως αναφέρει ο Manickum, ερευνητές στο Ελβετικό Ινστιτούτο Έρευνας Νερού ανέπτυξαν ένα γρήγορο πρωτόκολλο, (κάτω από 15 λεπτά/ανάλυση), μικροβιακής ολικής μέτρησης κυττάρων (Total Cell-Counting, TCC) με βάση την κυτταρομετρία ροής (FCM). Η μέθοδος SLMB 333.1 τυποποιήθηκε, επικυρώθηκε και έγινε αποδεκτή στην Ελβετία [Manickum, 2020].

Αποδεικνύεται για πρώτη φορά ότι σε αντίθεση με το HPC, η ολική μέτρηση κυττάρων (TCC) και η κυτταρομετρία ροής επιτρέπουν μια γρήγορη και ρεαλιστική αξιολόγηση της γενικής μικροβιολογικής κατάστασης ενός δείγματος νερού. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται ήδη τακτικά, σε αρκετές Ελβετικές και Ολλανδικές εταιρίες ελέγχου νερών για την παρακολούθηση της απόδοσης των διαδικασιών επεξεργασίας στα δίκτυα διανομής πόσιμου νερού. Έτσι σήμερα υπάρχει και διατίθεται εμπορικά το μικρό, χαμηλού κόστους κυτταρόμετρο, BactoSense [<https://www.bnovate.com/development>], του οίκου SIGRIST [<https://www.photometer.com/en/Home/>] που επιτρέπει την αυτόματη, συνεχή on line παρακολούθηση της ολικής μέτρησης κυττάρων στο νερό, για χρονικό διάστημα 30 λεπτών ή μεγαλύτερο, η οποία επιτυγχάνεται με μια απλή κι εύκολη διαδικασία σύνδεσης στο δίκτυο (Εικόνα 51).



Εικόνα 51. Το κυτταρόμετρο BactoSense - bNovate

Το βασικό χαρακτηριστικό του είναι η αυτοματοποιημένη προετοιμασία των δειγμάτων μέσα στο ίδιο το όργανο, που κάνει το BactoSense μοναδικό για την κυτταρομετρία ροής, με τέτοιο χαρακτηριστικό. Στην Εικόνα 52 παρουσιάζονται σχηματικά τα βασικά βήματα ανάλυσης του BactoSense. Αρχικά, λαμβάνεται το δείγμα και προστίθεται η χρωστική ουσία, η οποία συνήθως είναι το SYBR Green 1 και στη συνέχεια γίνεται ανάμιξη του δείγματος, που κατανέμει ομοιόμορφα τη χρωστική σε όλο το δείγμα και εγγυάται την αναπαραγωγικότητα στα αποτελέσματα. Το δείγμα στη συνέχεια θερμαίνεται στους 37 °C για 10 λεπτά (φάση επώασης), που επιτρέπει στη χρωστική να προσκολληθεί στο DNA. Στη συνέχεια το δείγμα μετράται - αναλύεται με κυτταρομετρία ροής. Το σύστημα καθαρίζεται και ξεπλένεται, εξασφαλίζοντας την απομάκρυνση των απορριμμάτων. Η διαδικασία αυτή δεν επιτρέπει την επιμόλυνση και την επίδραση στις επόμενες μετρήσεις. Η δειγματοληψία μπορεί να είναι on-line με την ταχύτητα ροής να είναι 200-400 ml/min, μέσω της σύνδεσης με το νερό της πηγής που προέρχεται. Στο κυτταρόμετρο χρησιμοποιείται ένα μόνο λέιζερ. Το κανάλι που δίνει τα χαρακτηριστικά του πρόσθιου σκεδασμού (forward scatter fluorescence) δεν είναι ενεργό. Τα δείγματα αναλύονται με την παρακάτω διαδικασία:



Εικόνα 52. Μέτρηση και αρχή ανίχνευσης του BactoSense. [Sigrist]

Η προετοιμασία του δείγματος: Αυτή η αρχική διαδικασία είναι πλήρως αυτοματοποιημένη. Απαιτείται ένας όγκος δείγματος 2 ml, που τοποθετείται σε φιαλίδιο με πλαστικό βιδωτό καπάκι. Από αυτό το δείγμα λαμβάνεται ένα κλάσμα 260 μl και αναλύονται τα 90 μl.

Κασέτες με απαιτούμενα υλικά: Τα απαιτούμενα χημικά και τα απόβλητα προϊόντα περικλείονται μέσα σε ερμητικά σφραγισμένα φυσιγγια που μπορεί να ανακυκλωθούν. Αυτό επιτρέπει τον ασφαλή χειρισμό και την εύκολη διαχείριση των απορριμμάτων. Ανάλογα με την επιθυμητή ανάλυση και το δείγμα, υπάρχει η επιλογή χρήσης μιας από τις δυο κάψουλες (φυσιγγια) ανά πάσα στιγμή, μία για TCC και μία για LDC (Live Dead Count). Ένα πλεονέκτημα της λειτουργίας TCC (κάψουλας) είναι ότι το όργανο μετράει όλα τα μικροβιακά κύτταρα, δείχνει πολύ καλά τον θόρυβο του περιβάλλοντος που αποτυπώνει σε μεγάλο βαθμό την παρεμβολή της ανόργανης και οργανικής ύλης που περιέχονται στο δείγμα. Η κασέτα TCC παρέχει τα υλικά για τη μέτρηση των TCC, HNAC και HNAP. Η τιμή LDC είναι το άθροισμα των τιμών των άθικτων κυττάρων (ICC - intact cells) και των κατεστραμμένων κυττάρων DCC (damaged cells). Η χρήση της κάψουλας LDC δίνει επίσης έναν αριθμό "TCC", αλλά αυτό είναι το άθροισμα των άθικτων και κατεστραμμένων κυττάρων (ICC+DCC), το οποίο δεν είναι ακριβώς το ίδιο με την πραγματική τιμή TCC, όπως προκύπτει από τη χρήση της κασέτας TCC. Το πλεονέκτημα της χρήσης της κάψουλας για τη μέτρηση των LDC είναι η μέτρηση του ακριβή αριθμού των άθικτων κυττάρων, που

είναι κατάλληλο να χρησιμοποιηθεί στην παρακολούθηση της ποιότητας του επεξεργασμένου νερού, αλλά δεν είναι καλό να χρησιμοποιείται όταν για παράδειγμα πρόκειται για έρευνα δικτύου. Η κασέτα LDC μπορεί να δώσει μετρήσεις για όλες τις κυτταρικές καταστάσεις και το ποσοστό των άθικτων κυττάρων (ICP - Intact Cell Percentage).

Η χρώση: Η χρωστική που χρησιμοποιείται είναι το SYBR Green I (SG). Το πράσινο SYBR στο δείγμα συνδέεται με το DNA ενός μικροβιακού κυττάρου και φθορίζει, εκπέμποντας πράσινο φως όταν διεγείρεται από μπλε φως. Το προκύπτον σύμπλοκο χρωστικής και DNA απορροφά στα 497 nm, μπλε φως ($\lambda_{\max} = 497 \text{ nm}$) και εκπέμπει πράσινο φως στα 520 nm ($\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$). Η χρωστική συνδέεται κατά προτίμηση με το δίκλωνο μόριο του DNA, αλλά μπορεί και να συνδεθεί και με το μονόκλωνο (ss) DNA με χαμηλότερη απόδοση.

Η ανάμειξη: Αυτή η διαδικασία είναι αυτοματοποιημένη. Η χρωστική κατανέμεται ομοιόμορφα σε όλο το δείγμα.

Η επώαση: Το δείγμα στη συνέχεια επωάζεται στους 37 °C, για 10 λεπτά. Αυτό είναι επίσης αυτοματοποιημένο και επιτρέπει στη χρωστική να δεσμεύεται στο DNA κάθε μικροβιακού κυττάρου.

Η μέτρηση και η ανίχνευση: Στη συνέχεια, γίνεται μέτρηση του δείγματος και χρησιμοποιείται μία δίοδος λέιζερ που διεγείρει στα 488 nm. Ο φθορισμός μετράται από 3 ανιχνευτές, ταυτόχρονα, σε μήκος κύματος 525 nm για το FL1, στα 715 nm για το FL2 και στα 488 nm για την πλευρική σκέδαση. Το όριο ανίχνευσης είναι από 100-5.000.000 κύτταρα/ml.

Η ανάλυση: Μια οθόνη αφής χρησιμεύει ως δέκτης των δεδομένων για τον χρήστη. Το διάστημα μέτρησης και οι περαιτέρω ρυθμίσεις μπορούν να προγραμματιστούν απλά και γρήγορα.

Η αναφορά - απάντηση: Τα αποτελέσματα είναι διαθέσιμα εντός 20 λεπτών. Η εσωτερική βάση δεδομένων αποθηκεύει μόνιμα όλα τα δεδομένα μέτρησης που μπορούν να ανακτηθούν και να οπτικοποιηθούν. Κάθε μέτρηση δείχνει το χαρακτηριστικό δακτυλικό αποτύπωμα του

δείγματος που αναλύθηκε. Το όργανο διαθέτει εκτεταμένες επιλογές επικοινωνίας και διασύνδεσης:

- Θύρα USB για εξαγωγή δεδομένων,
- Ενσωματωμένη διεπαφή ιστού για τηλεχειρισμό μέσω Ethernet και
- Σύστημα συναγερμού με ρυθμιζόμενη εμβέλεια. Στην περίπτωση ενός συμβάντος μόλυνσης του συστήματος νερού, το BactoSense μπορεί να ενεργοποιήσει αμέσως έναν συναγερμό και να τον μεταδώσει, μέσω τυπικών διεπαφών μετάδοσης, σε μια οθόνη ελέγχου.

Τα απόβλητα: Όλα τα παραγόμενα απόβλητα περικλείονται στη σφραγισμένη κάψουλα, η οποία επιτρέπει τον ασφαλή χειρισμό και την εύκολη απόρριψη.

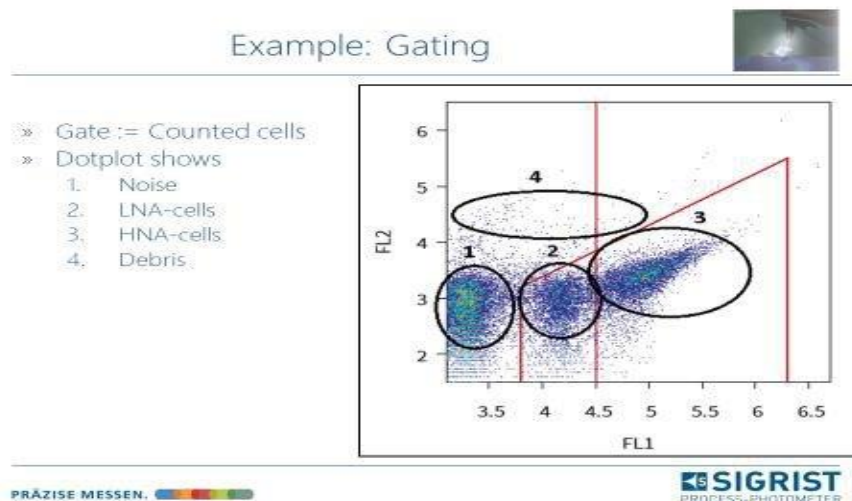
Ο καθαρισμός και η συντήρηση: Ξεπλένεται ο τριχοειδής σωλήνας με ειδικά καθαριστικά διαλύματα, ενώ η ετήσια συντήρηση του οργάνου πραγματοποιείται από εκπρόσωπο της εταιρείας.

Η επαλήθευση της ακρίβειας του οργάνου μπορεί να γίνει από τον χειριστή, ανά πάσα στιγμή, χρησιμοποιώντας σφαιρίδια - κύτταρα αναφοράς. Με την ανάλυση του δείγματος, κάθε κύτταρο - σφαιρίδιο δημιουργεί κορυφές σήματος στα 3 κανάλια: SSC, FL1 και FL2. Οι κορυφές του σήματος των FL1 και FL2 αντιπροσωπεύονται από μία κουκκίδα στο διάγραμμα κουκκίδων (ιστόγραμμα). Τέλος, δημιουργείται ένα κυτταρόγραμμα από την επεξεργασία των δεδομένων (Εικόνα 53).

Η πύλη που περικλείεται από τις κόκκινες γραμμές, είναι τα καταμετρημένα κύτταρα. Το διάγραμμα κουκκίδων δείχνει:

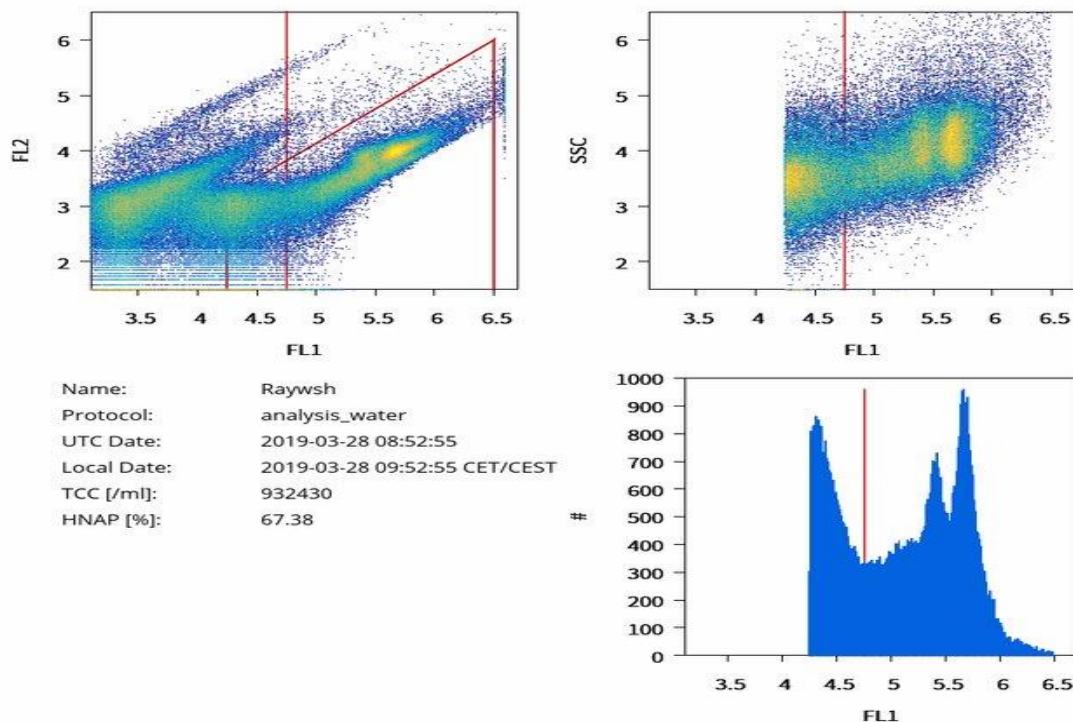
- Θόρυβο
- Κύτταρα LNA
- Κύτταρα HNA
- Θραύσματα

Η τιμή TCC είναι η μέτρηση όλων των σημείων μέσα στην καθορισμένη πύλη. Το LNAC/ml είναι ο αριθμός όλων των σημείων στο διαμέρισμα της «αριστερής» πύλης. Το HNAC/ml είναι ο αριθμός όλων των σημείων στο «δεξιό» διαμέρισμα πύλης. Το HNAP (%) είναι το υψηλό ποσοστό νουκλεϊκού οξέος που υπολογίζεται ως εξής: $\text{HNAC/TCC} \times 100\%$ [Manickum, 2020].

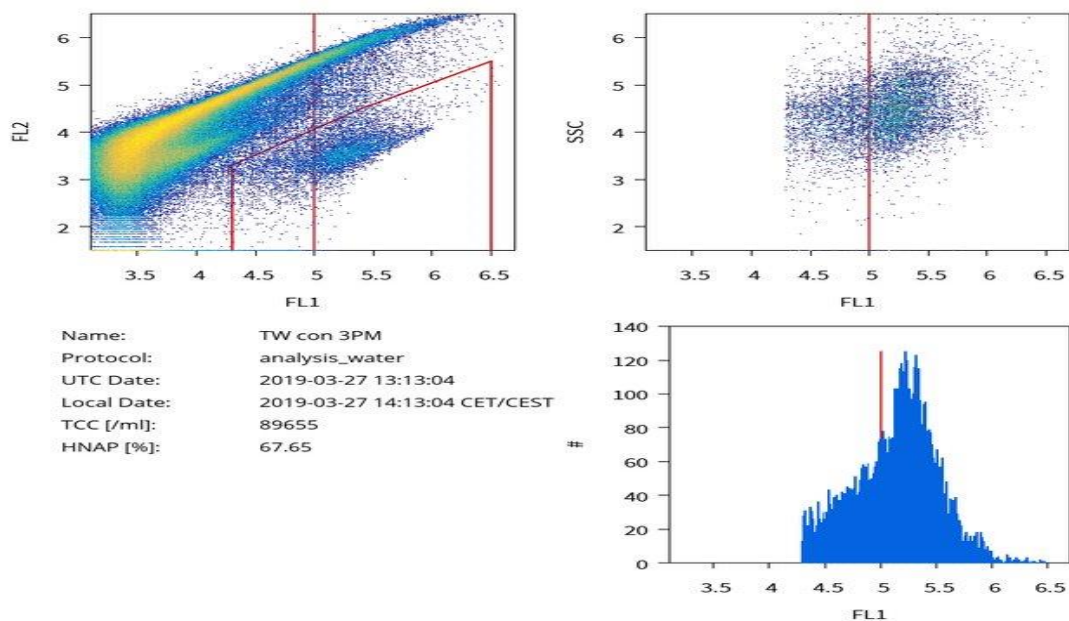


Εικόνα 53. Τοπικό κυτταρογράμμα που λαμβάνεται από το κυτταρόμετρο ροής BactoSense [Sigrist].

Στη συνέχεια παρουσιάζονται δύο κυτταρογράμματα και η ενσωματωμένη απάντηση από το σύστημα ανάλυσης του BactoSense. Στην Εικόνα 54 φαίνεται το κυτταρογράμμα δείγματος ακατέργαστου νερού φράγματος (TCC=932430) πριν από τη διαδικασία επεξεργασίας του νερού, ενώ μετά την επεξεργασία, το TCC έπεσε στα 26459. Η Εικόνα 55 παρουσιάζει το κυτταρογράμμα BactoSense ενός δείγματος νερού βρύσης, στη Νότια Αφρική [Manickum, 2020].



Εικόνα 54. Κυτταρογράμμα της ανάλυσης δείγματος μη επεξεργασμένου νερού με το BactoSense [Manickum, 2020].



Εικόνα 55. Κυτταρόγραμμα της ανάλυσης δείγματος νερού βρύσης χρησιμοποιώντας το BactoSense [Manickum, 2020].

Όλες οι μετρούμενες τιμές συγκρίνονται αρκετά καλά με πρότυπα εύρη τιμών που αναφέρονται από ερευνητές αλλά και με διεθνή δεδομένα [Egli, Kötzsch, 2015]. Αυτά τα δεδομένα καταδεικνύουν την ικανότητα του δακτυλικού αποτυπώματος της κυτταρομετρίας ροής να αναγνωρίζει μικροοργανισμούς σε ένα συγκεκριμένο δείγμα, μέσα σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα, σε αντίθεση με τη μέθοδο δοκιμής HPC και να δίνει επιπρόσθετα αξιόπιστα αποτελέσματα.

Μερικά από τα πλεονεκτήματα της εφαρμογής της κυτταρομετρίας σε δείγματα νερού έναντι της HPC έχουν αναφερθεί σε βάθος χρόνου από αρκετούς ερευνητές σε αντίστοιχες μελέτες, [Wang, et al, 2010; Egli, Kötzsch, 2015; Safford, Bischel 2019] τα οποία ανακεφαλαιώνονται στα ακόλουθα:

Αφθονία: ανιχνεύει σχεδόν όλα ($\pm 99\%$) τα βακτήρια που υπάρχουν στο νερό.

Συνάφεια: παρέχει σημαντικές πληροφορίες της μεταβλητής που λέγεται «βιωσιμότητα» κατά τη διάρκεια των διαφόρων διαδικασιών επεξεργασίας του πόσιμου νερού και τις μικροβιολογικές αλλαγές στην ποιότητα του νερού.

Ταχύτητα ανάλυσης: απαιτεί 1-20 λεπτά ανά δείγμα.

Ελάχιστος απαιτούμενος όγκος δείγματος: από 5 μl.

Διαδικασίες υψηλής ταχύτητας: αναλύει μεγάλο αριθμό κυττάρων ανά δείγμα: 10000-50000 κύτταρα/s.

Χαμηλό όριο ανίχνευσης: 100 κύτταρα/ml.

Εφαρμογή: πολυπαραμετρική ανάλυση.

Αρχή: ανίχνευση ενός κυττάρου. Δεν απαιτείται καλλιέργεια ή ενίσχυση.

Συμβατότητα: με μια ποικιλία μεθόδων χρώσης και επισήμανσης.

Υψηλή ακρίβεια: λιγότερο από 5% σφάλμα οργάνων.

Προετοιμασία δείγματος: δεν απαιτείται απομόνωση DNA.

Αναπαραγωγιμότητα: Οι διεργαστηριακές συγκρίσεις της κυτταρομετρίας ροής (π.χ., Ring Study το 2018, SIGRIST) έχουν RSD < 10%.

Ευελιξία: εκτός από τον συνολικό αριθμό κυττάρων, η κυτταρομετρία ροής μπορεί να παρέχει πληροφορίες και για τη βιωσιμότητα των βακτηρίων και τη βακτηριακή ταυτότητα.

Προστιθέμενη αξία: Τα πολυμεταβλητά δεδομένα της κυτταρομετρίας ροής μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία ενός μοναδικού δακτυλικού αποτυπώματος της βακτηριακής κοινότητας, το οποίο βελτιώνει τον γρήγορο εντοπισμό μικρών αλλαγών σε αυτήν την κοινότητα.

Κόστος: Ανάλογα με το κόστος εργασίας και τα προτιμώμενα όργανα, το κόστος της κυτταρομετρίας ροής είναι ίσο ή μικρότερο από αυτό του HPC για περίπου 15 δείγματα/ημέρα.

Αυτοματισμός: Η κυτταρομετρία ροής προσφέρει εύκολες επιλογές αυτοματισμού (π.χ. BactoSense).

Αποτύπωμα: Απαιτείται λιγότερος χώρος σε σύγκριση με την HPC.

Παροχή αποτελέσματος: Το SLA (Service Level Agreement) είναι τρεις ημέρες για HPC στους 21°C και μια ημέρα για HPC στους 37°C. Με το BactoSense, ένα φυσίγγιο μπορεί να κάνει 1000 δοκιμές. Κάθε δοκιμή διαρκεί ± 20 λεπτά άρα 24 αναλύσεις σε 8 ώρες.

Συμπερασματικά από τη στρατηγική συλλογής και ανάλυσης των δεδομένων από τους [Perst, et al, 2013] η χρήση των ίδιων πυλών με τη μορφή σταθερού προτύπου για να επιτρέπεται η άμεση σύγκριση των δεδομένων από τις διαφορετικές αναλύσεις δειγμάτων είναι μια θεμελιώδης βάση για τη μελλοντική επικύρωση της μεθόδου που προτείνεται, όπως είναι η πρόσφατη αναλυτική επικύρωση του αριθμού των προβιοτικών βακτηρίων με κυτταρομετρία ροής [Michelutti, et al, 2020].

Ακολουθεί μια σειρά συστάσεων [Eaton, et al, 2005; Roudnew, et al, 2012; Manickum, 2020; Abdeldayem, et al, 2022] σ' αυτή την κατεύθυνση που αφορούν τα ακόλουθα:

- Περαιτέρω ολοκληρωμένη επικύρωση της μεθόδου του BactoSense σύμφωνα με τις συνιστώμενες οδηγίες από μεγάλους οργανισμούς (π.χ. ISO/IEC 17025, US EPA, κ.λπ.). Η ακρίβεια θα πρέπει να αξιολογείται επιπλέον χρησιμοποιώντας ένα πρότυπο αναφοράς ή ένα πιστοποιημένο οργανισμό αναφοράς, όπως το NIST (National Institute of Standards and Technology).
- Διερεύνηση της προμήθειας άλλων αυτοματοποιημένων οργάνων κυτταρομετρίας και άλλης τεχνολογίας κυτταρομετρίας ροής και την αξιολόγηση της καταλληλότητάς τους για μικροβιολογικές αναλύσεις ποιότητας νερού, ξεκινώντας με την εφαρμογή τους στην αρίθμηση των βακτηρίων (TCC). Στην πραγματικότητα τρία κύρια σημεία της κυτταρομετρικής προσέγγισης απαιτούν εξέταση και βελτιστοποίηση, όπως η αρχική ρευστότητα (εισαγωγή δείγματος), η οπτική και ανίχνευση (ανιχνευτής) και η επεξεργασία του σήματος και των παλμών (δεδομένα).
- Πρακτική αξιολόγηση του BactoSense ως συμπληρωματικής στις τρέχουσες μικροβιολογικές αναλύσεις, ιδιαίτερα του HPC και η τελική αντικατάστασή του ως στόχος.
- Αξιολόγηση του BactoSense για την παρακολούθηση σημαντικών παθογόνων μικροοργανισμών.
- Αντιμετώπιση των ερευνητικών κενών στην κυτταρομετρία ροής.
- Τυποποίηση και διαπίστευση τρεχουσών και νέων, βελτιστοποιημένων μεθόδων αναλύσεων με την κυτταρομετρία ροής και του εξοπλισμού, για μικροβιολογική παρακολούθηση της ποιότητας του νερού. Η προτινόμενη διαδρομή φαίνεται να είναι

μέσω της US EPA (Environmental Protection Agency) ή της ASTM (American Society for Testing and Material), καθώς η διαπίστευση ISO/IEC 17025 απαιτεί εργαστήρια δοκιμών που να πληρούν να και συμμορφώνονται με τις πλήρεις απαιτήσεις διαχείρισης. Σύμφωνα με την EPA (Environmental Protection Agency) των ΗΠΑ, η μέθοδος που βασίζεται στην κυτταρομετρία ροής δεν είναι επί του παρόντος εγκεκριμένη μέθοδος για τον προσδιορισμό των ετεροτροφικών βακτηρίων. Σύμφωνα με τον ισχύοντα κανονισμό, Κανόνας Επεξεργασίας Επιφανειακών Νερών, η μέθοδος αναφοράς είναι οι Πρότυπες Μέθοδοι 9215B, με χρήση PCA (Plate Count Agar).

- Αλλαγή των ισχυόντων κανονισμών για τη μέτρηση των HPC (Heterotrophic Plate Count) στο πόσιμο νερό: μία πρώτη τυποποίηση έχει επιτευχθεί, θα χρειαστεί όμως να επανεξεταστούν τα τρέχοντα ρυθμιστικά όρια για την HPC (επί του παρόντος <1000 στη Νότια Αφρική και ≤ 500 cfus/ml στις ΗΠΑ). Με βάση την τρέχουσα γραμμή για τις συνολικές μετρήσεις κυττάρων στο πόσιμο νερό, που λαμβάνεται με κυτταρομετρία ροής, αυτό αναμένεται να είναι μέσα στο εύρος: $\pm 1563-1107692$ κύτταρα / ml, ως μέτρο TCC/ml.
- Η αβεβαιότητα της μέτρησης: πρέπει να συμπεριληφθεί και αυτή η παράμετρος στην επικύρωση της μεθόδου και να εξεταστεί από την US EPA και άλλους φορείς τυποποίησης, στα τρέχοντα πρωτόκολλά τους.
- Η διερεύνηση μοριακών χρωστικών για την ανάλυση της πολυπλοκότητας του DNA και την ανίχνευση με ανοσομαγνητικό διαχωρισμό για βελτιωμένη εκλεκτικότητα στην κυτταρομετρία ροής.
- Έλεγχος για τον ιό SARS CoV-2 και μεταλλάξεις του COVID 19: απαιτούνται γρήγορες, ακριβείς εξετάσεις υπό το πρίσμα του κινδύνου της παγκόσμιας πανδημίας και η κυτταρομετρία ροής πρέπει να ληφθεί υπόψη λόγω της ταχύτητας ανάλυσής της.
- Τεχνολογική εξέλιξη ενός ενιαίου οργάνου κυτταρομετρίας ροής που να έχει διπλά κανάλια - ροές δειγμάτων, με μία μόνο κασέτα, που να μπορούν να μετρήσουν τις

βασικές παραμέτρους χωρίς την ανάγκη αλλαγής φυσιγγίων – κάψουλας, όπου το BactoSense μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βάση.

4.3.2 Ιομετρία ροής

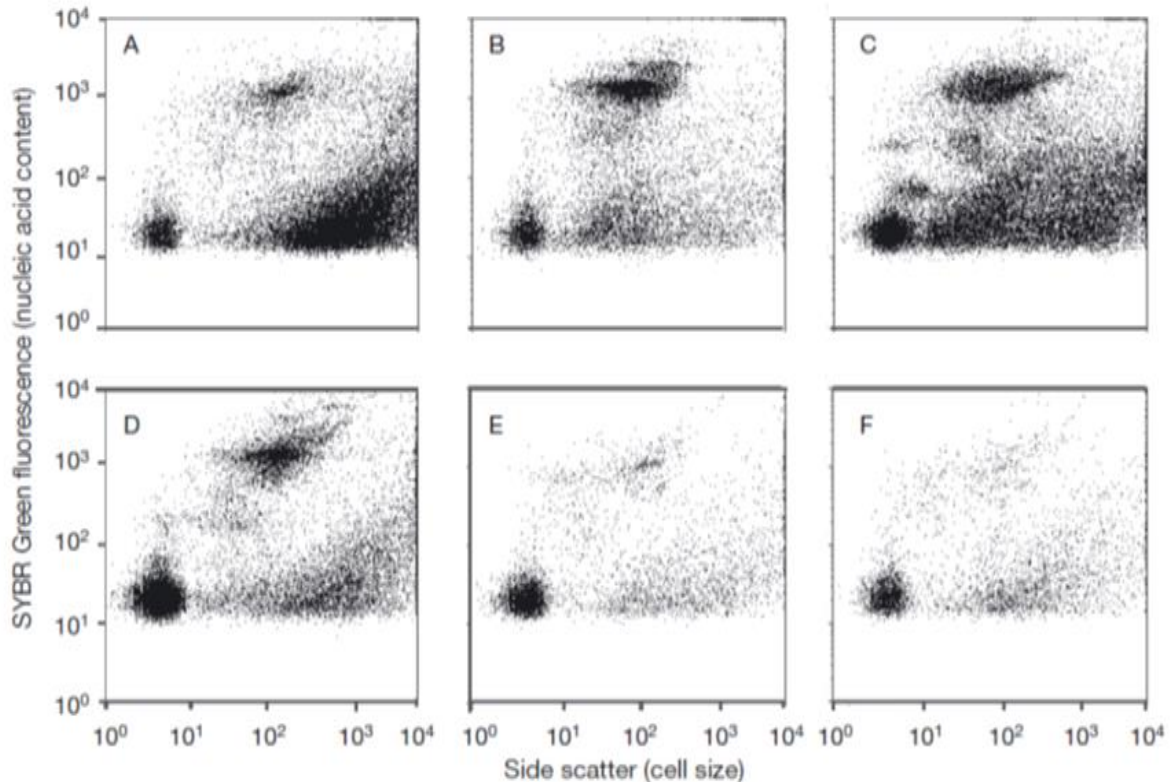
Οι υδατογενείς ιοί είναι η κύρια αιτία ασθενειών στις Ηνωμένες Πολιτείες. Σύμφωνα με το Εθνικό Συμβούλιο Έρευνας, οι ιοί «έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε εφαρμογές επαναχρησιμοποίησης των πόσιμων προϊόντων λόγω του μικρού τους μεγέθους, της αντοχής τους στην απολύμανση και της χαμηλής μολυσματικής τους δόσης». Οι ιοί έχουν παρουσιάσει ιστορικά μια πρόκληση για αξιολόγηση και μελέτη που βασίζεται σε κυτταρομετρία ροής. Τα μικρά σωματίδια τείνουν να παράγουν αδύναμα σήματα διασποράς και φθορισμού που είναι δύσκολο να ανιχνευθούν, ιδιαίτερα σε περιβαλλοντικά δείγματα με χαμηλή πυκνότητα σωματιδίων [Vital, et al, 2007b; Varughese, et al, 2018].

Η ανάπτυξη καλύτερων οργάνων και νέων φθορίζουσών ουσιών έχει συντελέσει στο να ξεπεραστούν αυτοί οι τεχνικοί περιορισμοί και επιτρέπει την πρόοδο στην «ιομετρία ροής» για την αξιολόγηση της ποιότητας του νερού. Ερευνητές χρησιμοποίησαν την κυτταρομετρία ροής για να χαρακτηρίσουν ιούς ή σωματίδια που μοιάζουν με ιούς στα υπόγεια ύδατα [Roudnew, et al, 2012; Roudnew, et al, 2013; Wilhartitz, et al, 2013; Roudnew, et al 2014].

Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 56 και 57), φαίνεται η ταξινόμηση των κυτταρικών υποπληθυσμών και η στατιστική ανάλυση των δεδομένων. Η ομαδοποίηση των κυττάρων που παρατηρείται σε κάθε κυτταρόγραμμα στην Εικόνα 56 οριοθετήθηκαν και ταξινομήθηκαν ως διακριτοί υποπληθυσμοί με βάση τον φθορισμό εκπομπής του SYBR Green που χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης μελέτης της περιεκτικότητας σε νουκλεϊκό οξύ και τον πλάγιο σκεδασμό που χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης για την προσέγγιση του μεγέθους του κυττάρου. Ο πράσινος φθορισμός που εκπέμπει το SYBR και ο πλάγιος σκεδασμός που εκφράζονται στον άξονα ψ και χ αντίστοιχα, ορίστηκαν να εκφράζονται σε λογαριθμική κλίμακα τεσσάρων δεκάδων (4 decade log scales), ώστε να είναι δυνατή η παρουσίαση του μεγέθους και του φθορισμού των βακτηρίων και των ομοιοζόντων με ιούς σωματιδίων (virus-like particles, VLPs), στο ίδιο κυτταρόγραμμα ως προς το μέγεθος και τον εκπεμπόμενο φθορισμό τους στα καταγεγραμμένα συμβάντα μεταξύ τους [Roudnew, et al, 2013].

Για την κανονικοποίηση-ευθυγράμμιση των παραμέτρων της κυτταρομετρικής ανάλυσης σε κάθε δείγμα προστίθενται σφαιρίδια φθορισμού μεγέθους 1 μm, ως πρότυπο για το μέγεθος των κυττάρων και του φθορισμού. Όλα τα βακτήρια μεγέθους <1 μm αριθμήθηκαν, ενώ τα VLPs διακρίνονταν από τα βακτήρια με βάση το σχετικά μικρό μέγεθος των

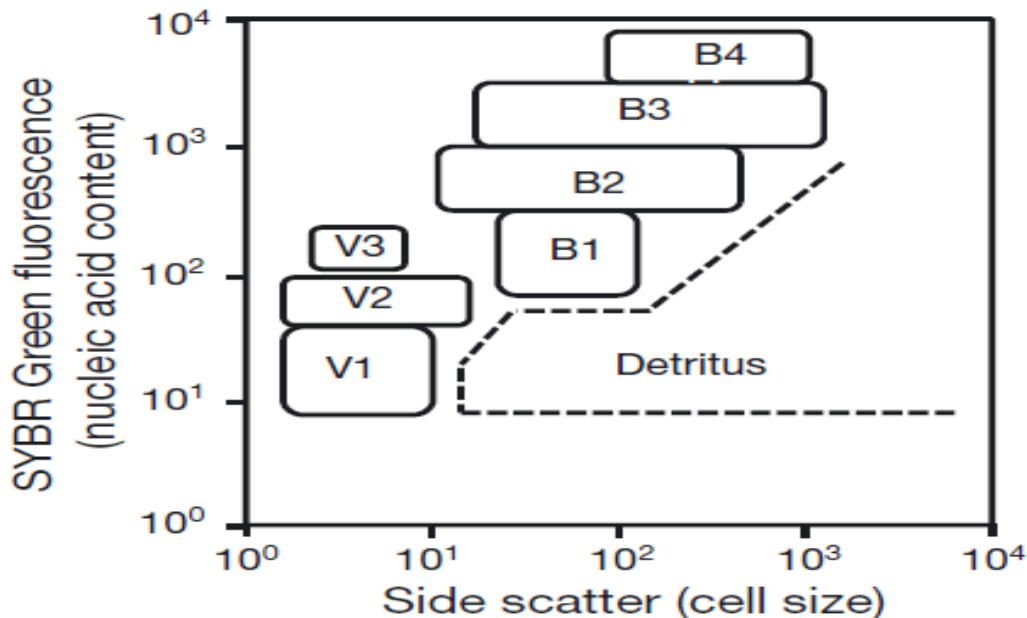
κυττάρων τους και τη μικρότερη περιεκτικότητα τους σε νουκλεϊκό οξύ [Roudnew, et al, 2013].



Εικόνα 56. Δείγματα υπόγειων υδάτων από υδροφόρους ορίζοντες στο Ashbourne, στην Αυστραλία: (A) ο μη περιορισμένος υδροφόρος ορίζοντας, (B) το περιοριστικό στρώμα και (C–F) ο περιορισμένος υδροφόρος ορίζοντας. Η χρωστική SYBR Green βοηθάει στην ποσοτικοποίηση του φθορισμού που εκπέμπεται όταν καθένα σωματίδιο-κύτταρο διεγείρεται από το λέιζερ και αντιπροσωπεύει την περιεκτικότητα σε νουκλεϊκό οξύ κάθε συμβάντος. Ο πλάγιος σκεδασμός (μέγεθος κυττάρου) μετρά την ανάκλαση του λέιζερ και είναι ένας καλός δείκτης για το μέγεθος κυττάρου-σωματιδίου [Roudnew, et al, 2013].

Χρησιμοποιώντας από τα κυτταρογράμματα της Εικόνας 56 την ένταση φθορισμού σε μεμονωμένους πληθυσμούς VLPs και βακτηρίων κατάφεραν να οριοθετήσουν σε μια διακριτή ομαδοποίηση τα κύτταρα-σωματίδια, ώστε να κατασκευαστεί μια σχηματική απεικόνιση που περιλαμβάνει όλους τους παρατηρούμενους υποπληθυσμούς των βακτηρίων και των VLPs και έτσι να επιτρέπεται η ταυτοποίησή τους (Εικόνα 57). Με αυτόν τον τρόπο έγινε εφικτό να μελετηθούν και να συγκριθούν οι υποπληθυσμοί των μικροοργανισμών στα βάθη του υδροφόρου συστήματος. Οι υποπληθυσμοί των VLPs ταξινομήθηκαν από V1 έως V3 και οι υποπληθυσμοί των βακτηρίων ταξινομήθηκαν από B1 έως B4. Με αυτόν τον τρόπο βλέπουν τη διαστρωμάτωση των οικοσυστημάτων στα διάφορα βάθη και χαρτογραφούν την παρουσία ή απουσία των παραπάνω πληθυσμών. Τα αποτελέσματα

μεταξύ των στρωμάτων του υδροφόρου ορίζοντα συγκρίθηκαν χρησιμοποιώντας το Kruskal-Wallis, ένα τεστ-έλεγχο που αναδεικνύει εάν τα δείγματα προέρχονται από το ίδιο στρώμα [Roudnew, et al, 2013].

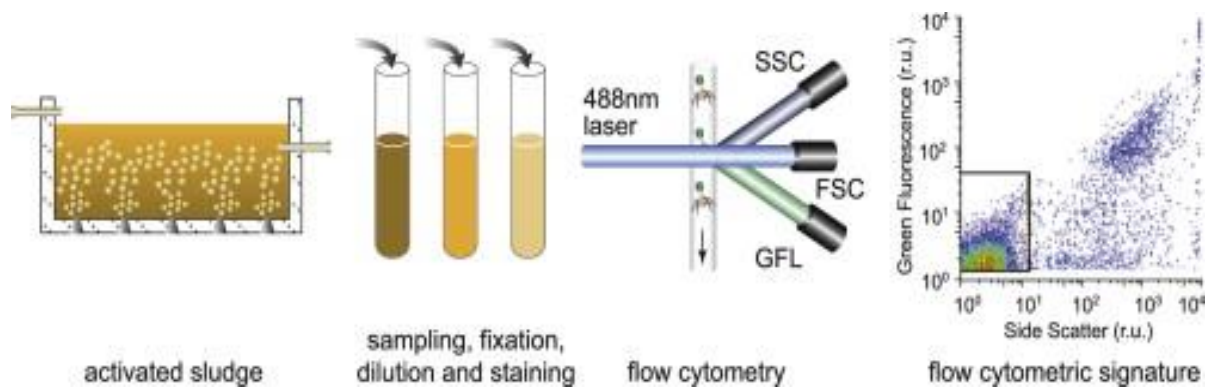


Εικόνα 57. Σχηματική αναπαράσταση των οριοθετήσεων των βακτηριακών υποπληθυσμών (B1 έως B4) και των σωματιδίων που μοιάζουν με τους ιούς (VLPs, V1 έως V3) που παρατηρήθηκαν σε όλο το προφίλ βάθους, στο Ashbourne της Νότιας Αυστραλίας. Το Detritus αντιπροσωπεύει τον θόρυβο, (κομμάτια κυττάρων ή ελεύθερο νουκλεϊκό οξύ) στο σύστημα. Η επεξήγηση των χαρακτηριστικών των αξόνων x και y περιγράφονται αναλυτικά στην εικόνα 56 [Roudnew et al. 2013].

Οι Ma, et al, χρησιμοποίησαν την κυτταρομετρία ροής για να αξιολογήσουν την απομάκρυνση των ιών σε διάφορα στάδια της επεξεργασίας των λυμάτων. Οι ερευνητές καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η κυτταρομετρική ανάλυση μπορεί να ποσοτικοποιήσει βακτήρια και ιούς αποτελώντας έτσι είναι ένα γρήγορο, εύκολο και εύχρηστο εργαλείο για την κατανόηση της μολυσματικής δυναμικής και για την παρακολούθηση της «μικροβιολογικής-ιολογικής ποιότητας» στις διαδικασίες επεξεργασίας των λυμάτων [Ma, et al, 2013].

Οι Brown, et al, εφάρμοσαν με αρκετά μεγάλη επιτυχία την κυτταρομετρία ροής για να ποσοτικοποιήσουν ιούς στην ενεργοποιημένη ιλύ (υγρά απόβλητα). Τα πειραματικά τους δεδομένα τα σύγκριναν με αυτά που προέκυπταν από τις άμεσες μετρήσεις με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (HM) μετάδοσης-εκπομπής. Οι μετρήσεις από το HM ταυτίστηκαν σε μεγάλο βαθμό με τις μετρήσεις της κυτταρομετρίας ροής ($p = <0,05$ και $r^2 = 0,77$), με συγκεντρώσεις και από τις δύο μεθόδους ποσοτικοποίησης συγκρίσιμες σε επίπεδο τάξης

μεγέθους. Πλεονεκτήματα όπως η υψηλή απόδοση της μέτρησης, η ευκολία της προετοιμασίας, η ταχύτητα και η αναπαραγωγικότητα της ανάλυσης καθιστούν την ποσοτικοποίηση με την κυτταρομετρία ροής των ιών σε ενεργοποιημένη ιλύ, ιδανική για χρήση και έρευνα ρουτίνας και επομένως ανεκτίμητη για την αποκάλυψη της πολυπλοκότητας και των πολλαπλών αλληλεπιδράσεων σε τέτοια συστήματα [Brown, et al, 2014]. Στην Εικόνα 58 παρουσιάζεται σχηματικά η διαδικασία παρασκευής και κατόπιν μέτρησης με κυτταρομετρία ροής των δειγμάτων της λάσπης.

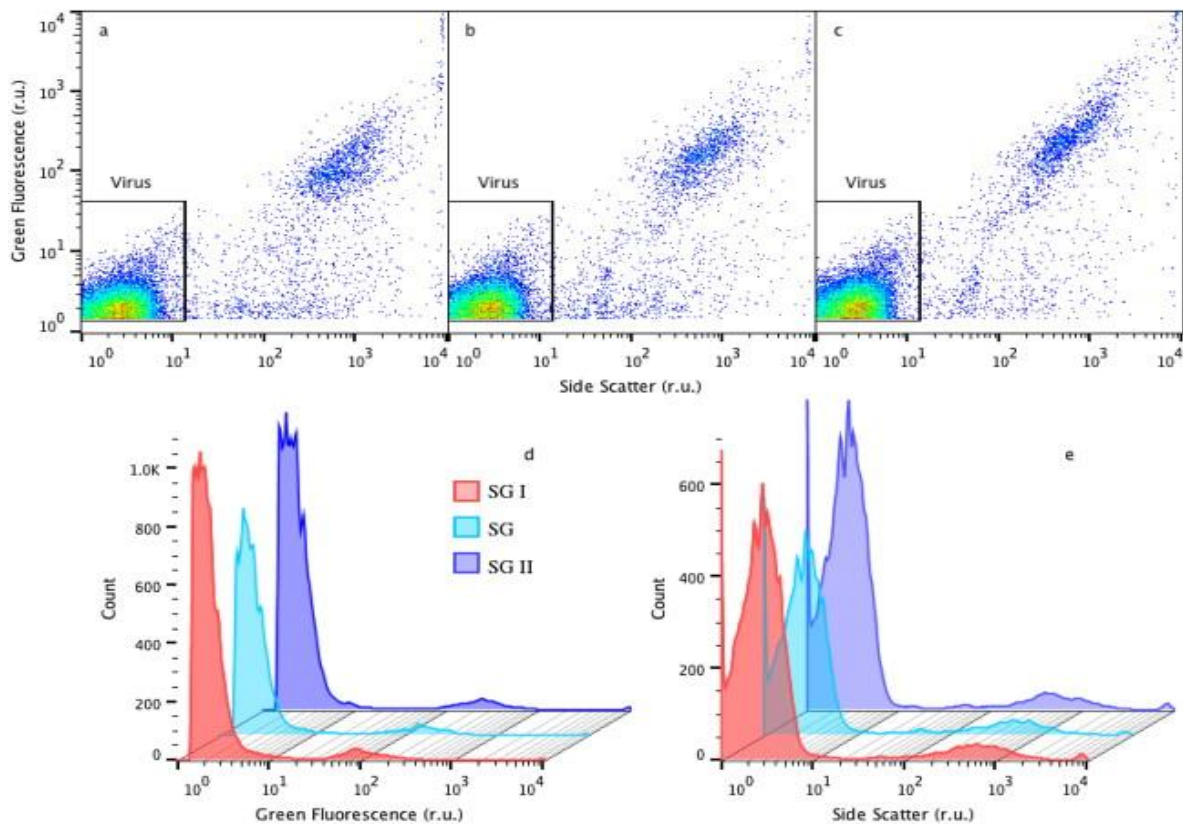


Εικόνα 58. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ανάλυσης των δειγμάτων λάσπης [Brown, et al, 2014].

Δείγματα ενεργοποιημένης λάσπης (AS) συλλέχθηκαν από μονάδα επεξεργασίας οικιακών λυμάτων νιτροποίησης (WWTP) στο Ηνωμένο Βασίλειο. Οι εργαστηριακές διαδικασίες επεξεργασίας και οι αντίστοιχες χρώσεις έγιναν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα αντίστοιχων μελετών, ενώ οι χρωστικές SYBR Green I (SG I), SYBR Green II (SG II) και SYBR Gold (SG), χρησιμοποιήθηκαν για τη χρώση δίκλωνου DNA (dsDNA), μονόκλωνου DNA (ssDNA) και δίκλωνου RNA (dsRNA), μονόκλωνου RNA (ssRNA). Οι χρωστικές αυτές δοκιμάστηκαν ξεχωριστά, για να μετρηθούν συγκεκριμένες κοινότητες ιών και σε συνδυασμό μεταξύ τους, για να επιτευχθεί τελικά ο μεγαλύτερος δυνατός συνολικός αριθμός συνδυασμών σε διάφορες αραιώσεις που τελικά χρησιμοποιήθηκαν [Brown, et al, 2014].

Οι αραιώσεις των δειγμάτων αναλύθηκαν τρεις φορές χρησιμοποιώντας το κυτταρόμετρο ροής FACScan (Becton Dickinson, Καλιφόρνια), το οποίο διαθέτει αερόψυκτο λέιζερ ιόντων αργού 15 mW 488 nm και μια τυπική διάταξη φίλτρου. Το κανάλι ανάλυσης που επιλέχτηκε είναι στον πράσινο φθορισμό. Κιτρινοπράσινα φθορίζοντα μικροσφαιρίδια (FluoSpheres, 1,0 μm, Invitrogen) προστέθηκαν ως εσωτερικός μάρτυρας σε όλα τα δείγματα. Οι μετρήσεις συλλέχθηκαν σε λογαριθμική κλίμακα και ταυτοποιήθηκαν τουλάχιστον πέντε χιλιάδες συμβάντα/δείγμα. Τέλος ακολούθησε η ανάλυση με το πρόγραμμα FlowJo v10.0.7r2 (FlowJo

LLC, Όρεγκον). Τα δεδομένα συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας διαγράμματα κουκίδων GFL κάθετος σκεδασμός και επίσης καθορισμένες πύλες - οριοθετήσεις [Brussaard, et al, 2010], V1, V2 και V3 που αντιστοιχούν σε ιούς διαφορετικής έντασης φθορισμού (συνολικός αριθμός = V1+V2+V3) (Εικόνα 59). Αυτό επέτρεψε τη βέλτιστη διάκριση μεταξύ των κεχρωσμένων ιών και των άλλων μικροβιακών κυττάρων ή του θορύβου του περιβάλλοντος, επομένως δεν χρειαζόταν διήθηση για την αφαίρεση τέτοιων σωματιδίων. Τα τυφλά τέλος, που αποτελούνται από ρυθμιστικό διάλυμα φιλτραρισμένο με φίλτρο 0,2 μm, υποβλήθηκαν σε προεπεξεργασία και αμέσως μετά αναλύθηκαν με πανομοιότυπο τρόπο με τα δείγματα, διευκολύνοντας έτσι περαιτέρω στη διόρθωση του αριθμού των ιών έναντι του θορύβου [Brown, et al, 2014].



Εικόνα 59. Κυτταρογράμματα (a–c) και ιστογράμματα (d–e) των δειγμάτων ενεργοποιημένης λάσπης (AS) μετά από χρώση με SG I (a), SG (b) και SG II (c), όλα σε αραιώσεις $0,5 \times 10^4$. Όλα τα συμβάντα μετρήθηκαν μετά από αραιώση 1/1000. r.u. (relative units) σχετικές μονάδες. Συνολικός αριθμός (ιός) = V1+V2+V3, οι οριοθετήσεις είναι από τους Brussaard, et al, 2010 [Brown, et al, 2014].

Η ερευνητική ομάδα των Li, et al, ανέπτυξε ένα πρωτόκολλο μελέτης για την ανίχνευση των μολυσματικών αδενοϊών σε φυσικά νερά με τη δοκιμασία ταξινόμησης των κυττάρων βασισμένη στον φθορισμό. Η δοκιμασία περιλάμβανε χρώση με σημασμένα με φθορίζουσα χρωστική αντισώματα, ειδικά για τις πρωτεΐνες που εκφράζονται από τους αδενοϊούς, ενώ

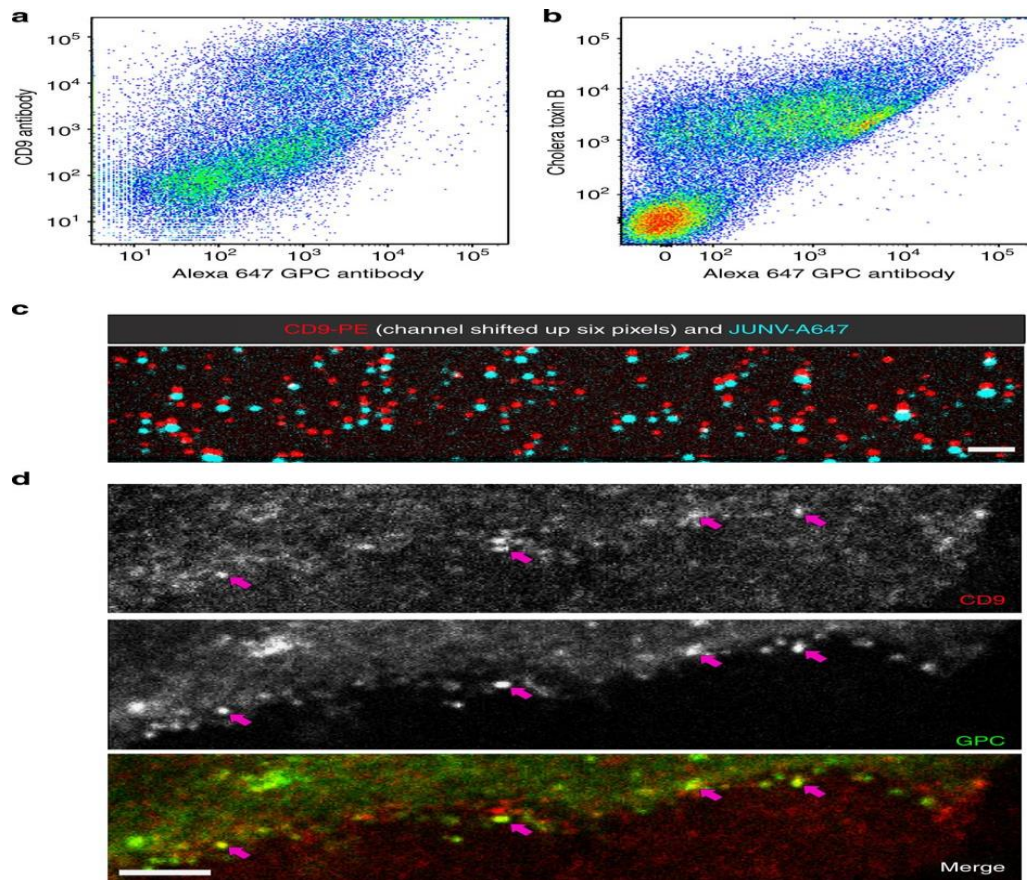
αμέσως μετά ακολουθούσε ανάλυση με κυτταρομετρία ροής για την ταχεία ποσοτικοποίηση. Τα αποτελέσματά της μελέτης αναδεικνύουν ότι η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής είναι ένα εργαλείο ταχείας ποσοτικοποίησης για την ανίχνευση μολυσματικών αδενοϊών σε περιβαλλοντικά δείγματα και επίσης αντιπροσωπεύει μια πολλά υποσχόμενη ανάλυση για την ταχεία περιβαλλοντική παρακολούθηση των μολυσματικών ιών [Li, et al, 2010].

Οι Gaudin, Barteneva έδειξαν ότι η κυτταρομετρία ροής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αξιολογήσει τη μολυσματικότητα του ιού *Junin virus (JUNV)* με βάση έναν συνδυασμό του μεγέθους του ιού και τα επίπεδα της γλυκοπρωτεΐνης που υπάρχουν στο περίβλημα του. Η φύση και η συγκέντρωση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών στην επιφάνεια των ιών είναι βασικές παράμετροι για τον προσδιορισμό της μολυσματικότητάς τους. Ιστορικά, η κατά μέσο όρο μαζική ανάλυση των ιικών σωματιδίων ήταν η κύρια μέθοδος για την ποσοτική διερεύνηση αυτών των παραμέτρων, αν και αυτό παραβλέπει την ετερογένεια εντός των πληθυσμών [Gaudin, Barteneva, 2015].

Στη μελέτη αυτή αναλύθηκαν οι ιδιότητες των σωματιδίων του *JUNV* χρησιμοποιώντας μια ευαίσθητη δοκιμασία «ιομετρίας ροής» και ταξινομήθηκαν τα ιοσωμάτια διατηρώντας παράλληλα τη μολυσματικότητά τους. Αυτή η μέθοδος επέτρεψε το χαρακτηρισμό της σχέσης μεταξύ της μολυσματικότητας, του μεγέθους του ιού και της περιεκτικότητας σε RNA. Επίσης, κατέστη δυνατή η σύγκριση των ιικών σωματιδίων που παράγονται σε κυτταροκαλλιέργειες με Vero κύτταρα με εκείνα από τα φυσιολογικά ανθρώπινα μακροφάγα. Η μελέτη αυτή υπογραμμίζει τις σημαντικές διαφορές στη μολυσματικότητα των σωματιδίων ανάλογα με τη φύση τους, τον τύπο των κυττάρων που προέρχονται και τη σύνθεση της λιπιδικής μεμβράνης. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της εργασίας υποστηρίζουν ότι η ιομετρία ροής είναι ένα ισχυρό και ευέλικτο εργαλείο για τον καθορισμό των προφίλ των σωματιδίων του ιού. Ωστόσο, θα μπορούσε ίσως να θεωρηθεί μειονέκτημα το ότι η προσέγγιση στη μελέτη βασίστηκε σε κυτταρόμετρο ροής προσοσαρμοσμένο με ισχυρό λέιζερ καθώς και ένα ψηφιακό σύστημα εστίασης, προκειμένου να είναι δυνατή η συγκέντρωση της ισχύος της ακτίνας λέιζερ ώστε να αυξηθούν τα σήματα σκεδασμού. Τέτοια εξελιγμένα όργανα μπορεί εντούτοις να είναι μη πρακτικά για ευρεία χρήση [Gaudin, Barteneva, 2015].

Είναι σκόπιμο εδώ να παρουσιάσουμε μια εικόνα στην οποία να περιγράφεται η πολυπαραμετρική κυτταρομετρική προσέγγιση η οποία επιβεβαιώνεται με μικροσκοπία συνπαρατήρησης. Στην Εικόνα 60 παρουσιάζεται η δέσμευση του αντισώματος CD9 στον ιό *JUNV* σε θέσεις εμπλουτισμένες με CD9. Η εικόνα έχει ληφθεί από την ταξινόμηση των

μικρών μολυσματικών σωματιδίων του ιού με βάση την ιομετρία ροής που αποκαλύπτει τα διαφορετικά προφίλ μολυσματικότητας.



Εικόνα 60. Ο ιός JUNV με θέσεις δέσμησης για το αντίσωμα CD9: Στα ιικά σωματίδια του στελέχους του ιού JUNV-A647 έγινε χρώση είτε με το αντίσωμα CD9 συζευγμένο με το φθοριόχρωμα PE (α) είτε με το δείκτη της χολέρας, Τοξίνη B (CTB) συζευγμένο με το FITC (b) αναλύθηκαν με ιομετρία ροής και αποτυπώθηκαν ως κυτταρογράμματα σε συνάρτηση της χρώσης αντισώματος με το φθοριόχρωμα Alexa 647 GPC (Οι ιοί χρησιμοποιούν τη γλυκοπρωτεΐνη GPC του φακέλου τους για την αρχική αναγνώριση του κυτταρικού υποδοχέα τους στην επιφάνεια των κυττάρων-στόχων) (c). Τα σωματίδια JUNV στα οποία έγινε χρώση με το αντίσωμα GPC συζευγμένο με το φθοριόχρωμα Alexa Fluor 647, προσροφήθηκαν σε γυάλινη καλυπτρίδα. Τα δείγματα μονιμοποιήθηκαν με 0,5% BSA (bovine serum albumin) σε PBS για 30 λεπτά, επώαστηκαν με αντίσωμα αντι-CD9 ποντικού συζευγμένο με PE για 30 λεπτά και στη συνέχεια πλύθηκαν 2 φορές σε 0,5% BSA σε PBS. Τα δείγματα μελετήθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία. Η μικροφωτογραφία αντιπροσωπεύει το CD9-PE (κόκκινο) και τον ιό JUNV-A647 (κυανό), το κόκκινο κανάλι μετατοπίστηκε προς τα πάνω για να εκτιμηθεί καλύτερα ο εντοπισμός και των δύο φθοροχρωμάτων. Πάνω από 500 σωματίδια JUNV-A647 μετρήθηκαν και η συσχέτιση Pearson με το CD9-PE αξιολογήθηκε στο $0,77 \pm 0,1$. Μπάρα κλίμακας, 5 μm . (d) Τα κύτταρα Vero που μολύνθηκαν με τον ιό JUNV για 24 ώρες μονιμοποιήθηκαν, έγιναν διαπερατά και έγινε χρώση με το αντίσωμα CD9 συζευγμένο με το φθοριόχρωμα PE και το αντίσωμα GPC-ειδικό GD01 συζευγμένο με το Alexa Fluor 488. Οι εικόνες μελετήθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία και διαπιστώθηκε η πλασματική μεμβράνη ενός μολυσμένου κυττάρου. Οι εικόνες δείχνουν τη χρώση με το CD9 (επάνω πλαίσιο), τη χρώση GPC (μεσαίο πλαίσιο) και την επικάλυψη των δύο καναλιών (κάτω πλαίσιο). Τα ροζ βέλη τονίζουν τα θετικά σημεία GPC, τα οποία πιθανώς αντιστοιχούν σε εκκολλαπτόμενα γεγονότα που είναι εμπλουτισμένα σε το CD9. Μπάρα κλίμακας, 5 μm [Gaudin, Barteneva, 2015].

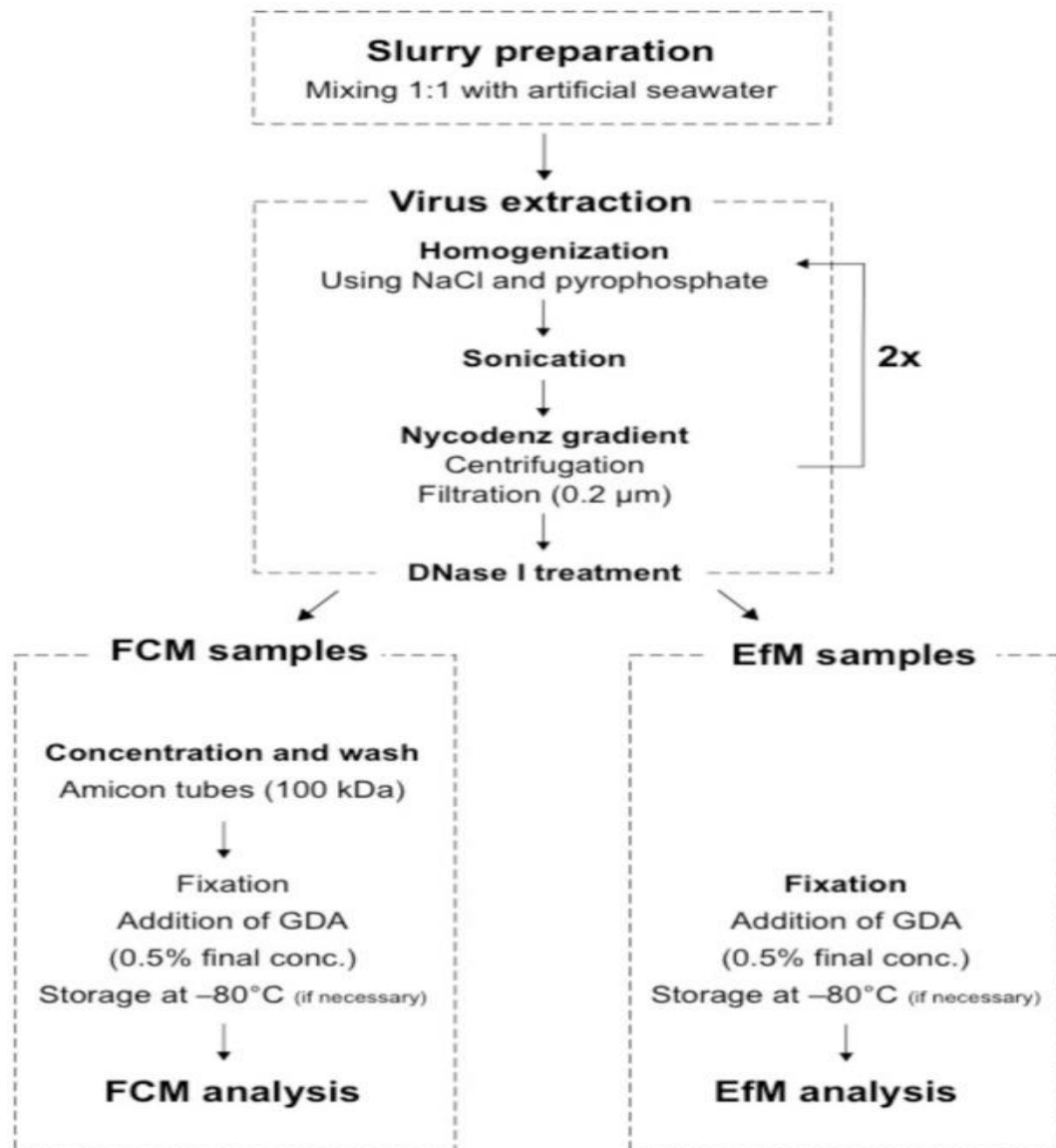
Περαιτέρω μελέτες με βάση τα ανωτέρω δεδομένα θα μπορούσαν να δώσουν πιο προσιτές αναλύσεις της ιογενούς μολυσματικότητας για τα υδατογενή παθογόνα που έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Τέτοιες αναλύσεις θα μπορούσαν να είναι χρήσιμες ως προς τις αξιολογήσεις του μικροβιακού κινδύνου στο πόσιμο νερό. Θα μπορούσαν επίσης να παρέχουν μια πρόσθετη εικόνα για την αποτελεσματικότητα των διαδικασιών απολύμανσης που εφαρμόζονται προκειμένου να γίνει η αδρανοποίηση των ιών, αφού διαφορετικές διαδικασίες απολύμανσης έχει αποδειχθεί ότι έχουν διαφορετικούς μηχανισμούς και αποτελέσματα απενεργοποίησης των ιών, όπως αναφέρουν οι Wigginton, et al, για τις επιπτώσεις των απολυμαντικών στη λειτουργία του ιού και στη δομική του ακεραιότητα [Wigginton, et al, 2012].

Υπάρχει επιπλέον η ανάγκη για την επιβεβαίωση των πιθανών ιικών πληθυσμών που εντοπίστηκαν με την κυτταρομετρία ροής, αν είναι πράγματι ιοί ή βακτηριακά υπολείμματα και άλλα μικρά σωματίδια. Η online κυτταρομετρία ροής έχει αποδειχθεί ότι μπορεί σε πραγματικό χρόνο και αυτοματοποιημένα να ανιχνεύσει υδατογενή βακτηριακά στελέχη, αλλά δεν έχουν γίνει ακόμη μελέτες, ώστε να εφαρμοστεί η διαδικτυακή κυτταρομετρία ροής σε ιούς [Pyre, et al, 2016].

Πρόσφατα οι Heinrichs, et al, παρουσίασαν ένα προηγμένο πρωτόκολλο για την ποσοτικοποίηση των θαλασσινών ιών που εντοπίζονται στα ιζήματα. Οι ιοί είναι εξαιρετικά άφθονοι, με μεγάλη ποικιλία στο θαλάσσιο περιβάλλον. Η κυτταρομετρία ροής βοήθησε στην καλύτερη κατανόηση της επίδρασής τους στη διαμόρφωση των μικροβιακών κοινοτήτων και των βιογεωχημικών κύκλων στην πελαγική ζώνη. Το πρόβλημα που αντιμετωπίζουν οι μελετητές στην ποσοτικοποίηση με κυτταρομετρία ροής των ιών από τα ιζήματα, είναι οι παρεμβολές από τη μήτρα των ιζημάτων [Heinrichs, et. al. 2021].

Η ομάδα της Heinrichs, ανέπτυξε ένα πρωτόκολλο για την αρίθμηση των ιών θαλάσσιων ιζημάτων με κυτταρομετρία ροής, με βάση τον διαχωρισμό των ιών από τα σωματίδια του ιζήματος χρησιμοποιώντας τη βαθμίδα πυκνότητας Nycodenz. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρχε επαρκής αφαίρεση της παρεμβολής του θορύβου για να καταστεί δυνατή η ποσοτικοποίηση με κυτταρομετρία ροής. Εφαρμόζοντας αυτό το νέο πρωτόκολλο σε δείγματα βαθέων υδάτων και παλιρροϊκών επιπέδων, οι ιικές ποικιλίες που αριθμήθηκαν με κυτταρομετρία ροής συσχετίστηκαν θετικά ($R^2=0,899$) με τις μετρήσεις που έγιναν με μικροσκοπία επιφθορισμού (Epifluorescence Microscopy, EfM) σε διάφορες τάξεις μεγέθους από τα θαλάσσια ιζήματα διαφόρων συνθέσεων. Συνολικά, το νέο πρωτόκολλο επιτρέπει τον γρήγορο και ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό των ιών θαλάσσιων ιζημάτων και διευρύνει τις επιλογές για την ταξινόμηση ιών, με στοχευμένη ιοματική (viromics) και την μελέτη της

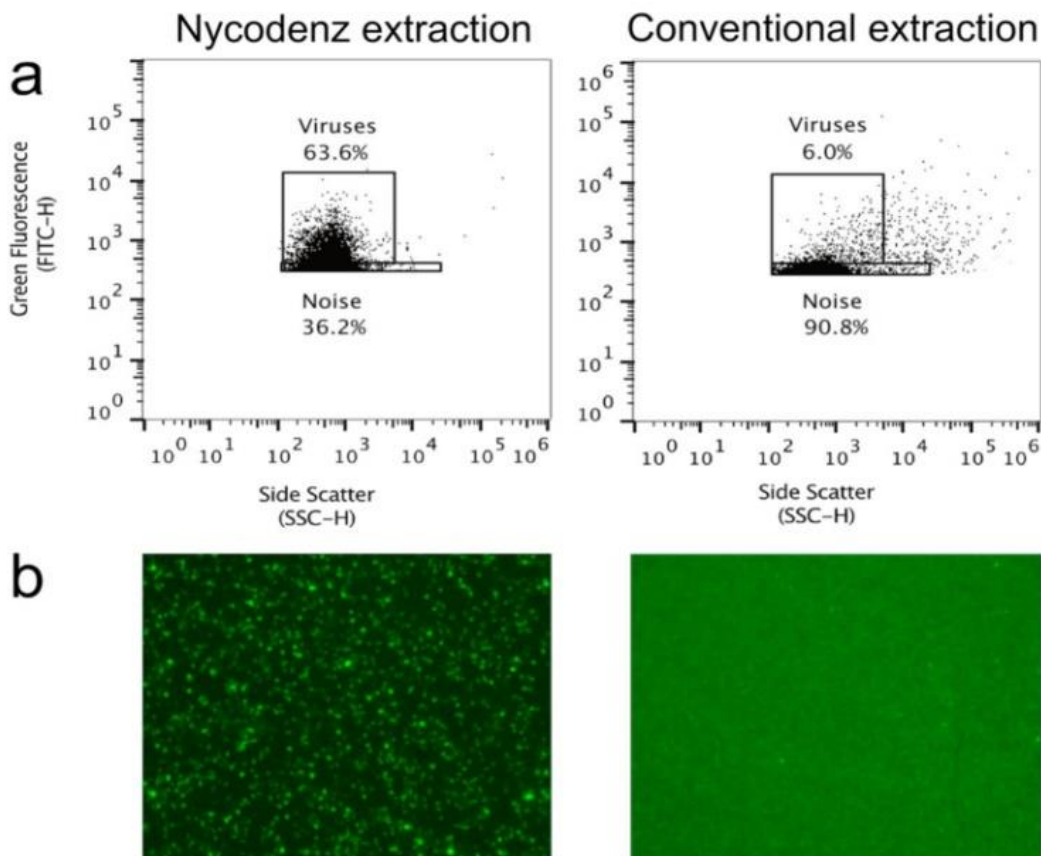
αλληλουχίας ενός ιού. Στην Εικόνα 61 παριστάνεται το σχηματικό διάγραμμα ροής των πρωτοκόλλων για την κυτταρομετρία ροής και τη μικροσκοπία επιφθορισμού που ακολουθήθηκε στην πειραματική διαδικασία [Heinrichs, et. al. 2021].



Εικόνα 61. Σχηματικό διάγραμμα ροής των πρωτοκόλλων για την κυτταρομετρία ροής και τη μικροσκοπία επιφθορισμού [Heinrichs, et al, 2021].

Στην Εικόνα 62 γίνεται σαφές ότι ο αριθμός των ανιχνευόμενων σωματιδίων στην πύλη του ιού του δείγματος που εξήχθη με τον τρόπο απομόνωσης Nycodenz ήταν δύο τάξεις μεγέθους υψηλότερο ($2,2 \times 10^7$ ιικά σωματίδια/ ml) σε σύγκριση με τη συμβατική μέθοδο ($2,3 \times 10^5$ / ml). Το κυτταρόγραμμα ροής της συμβατικής μεθόδου εκχύλισης έδειξε μια επικράτηση από τον θόρυβο. Η μικροσκοπία επιφθορισμού έδειξε επίσης ότι η μέθοδος Nycodenz βελτιώνει το σήμα φθορισμού σε αναλογία με το υπόβαθρο, πιθανότατα εξ' αιτίας

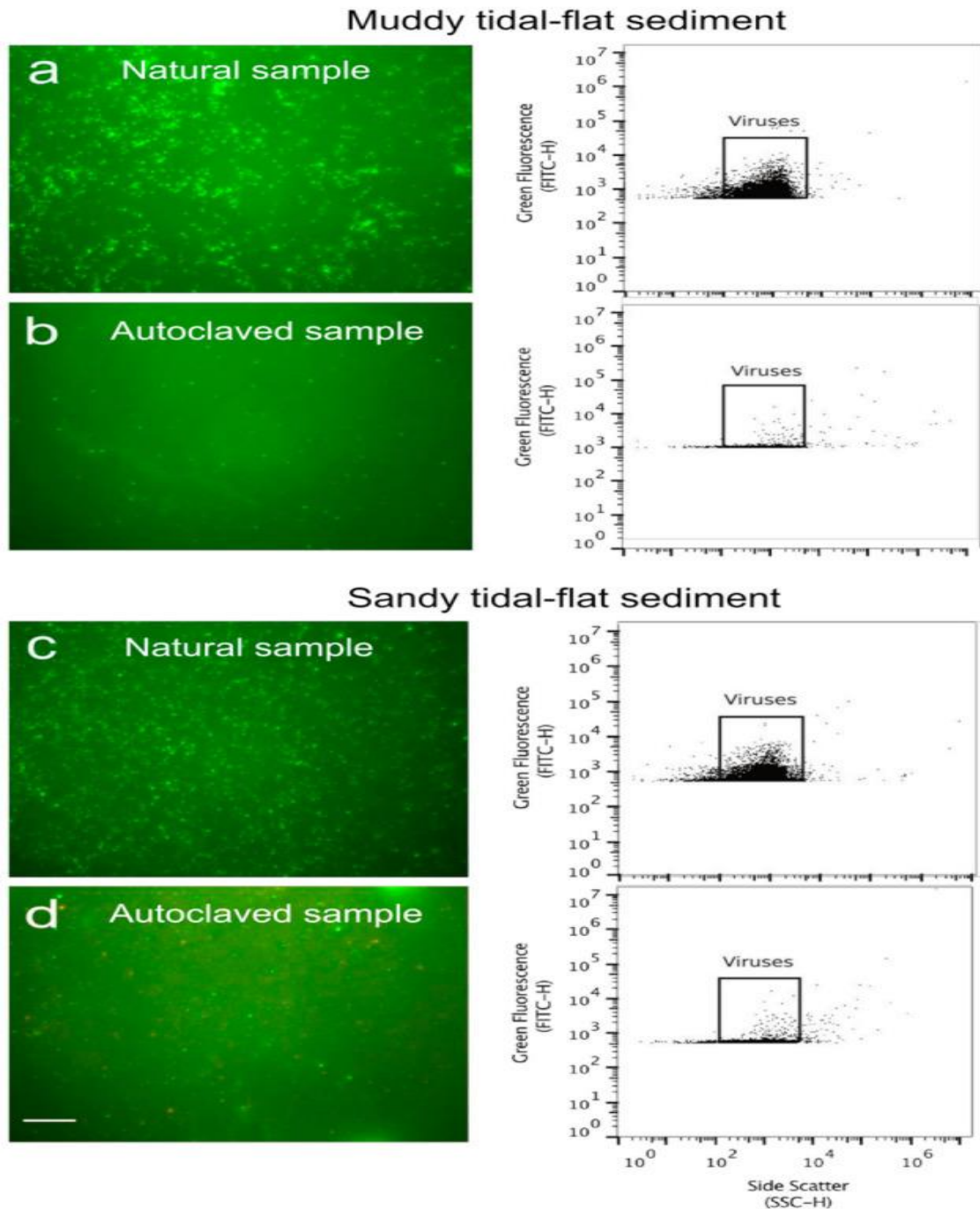
του μεγαλύτερου διαχωρισμού των παρεμβαλλόμενων σωματιδίων [Heinrichs, et al, 2021].



Εικόνα 62. Παραδείγματα κυτταρογραμμιάτων ροής (α) και αντίστοιχων μικρογραφιών από τη μικροσκοπία επιφθορισμού (β), στη χρώση με SYBR Green I τα ιικά σωματίδια παρουσιάζονται με πράσινο χρώμα που εξάγονται από τα ιζήματα με τη μέθοδο Nycodenz (αριστερά) και με τη συμβατική μέθοδο εξαγωγής (δεξιά) [Heinrichs, et al, 2021].

Πριν από την ανάλυση των δειγμάτων, οι πύλες των πληθυσμών των ιών εντός των κυτταρογραμμιάτων καθορίστηκαν με βάση τη σύγκριση των δειγμάτων που περιείχαν πληθυσμούς φυσικών ιών και τους ελέγχους των ιζημάτων μετά από καταστροφή σε αυτόκαυστο. Η οριοθέτηση του πληθυσμού του ιού ήταν κοντά στον εντοπισμό του ορίου του οργάνου για όλα τα δείγματα (Εικόνα 63). Το δείγμα μετά από καταστροφή στο αυτόκαυστο βοηθά ώστε να προσδιοριστεί το επίπεδο του ιζήματος που εξυπηρετεί για να γίνουν οι αποκοπές της πύλης για τον θόρυβο που προέρχεται από τα υπολείμματα του ιζήματος. Κάποια «συντρίμμια» με εύρος το μέγεθος ιών εξακολουθούσαν να ανιχνεύονται ως συμβάντα στις πύλες του ιού, κατά μέσο όρο 1,3% των συμβάντων που εντοπίστηκαν στα αντίστοιχα δείγματα που περιέχουν ιούς. Χρησιμοποιώντας τη μικροσκοπία επιφθορισμού οι ψευδώς θετικές μετρήσεις ήταν κατά μέσο όρο 2,9% των ιικών σωματιδίων που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα που περιέχουν τον πληθυσμό του φυσικού ιού. Τα φίλτρα 0,02 μm MilliQ χρησιμοποιήθηκαν στον τυφλό μάρτυρα (blank control) και δεν ανιχνεύθηκε

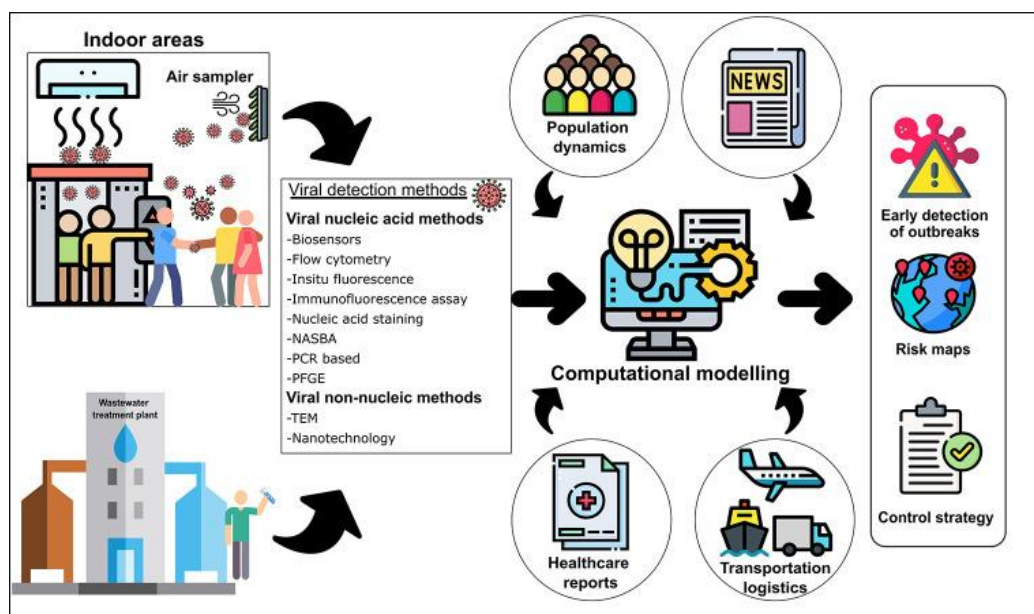
αναγνωρίσιμος πληθυσμός ιών, υποδεικνύοντας έτσι την αξιοπιστία των αντιδραστηρίων και τη διαδικασία εξαγωγής [Heinrichs, et al, 2021].



Εικόνα 63. Μικροφωτογραφίες επιφθορισμού και τα αντίστοιχα κυτταρογράμματα της χρώσης με SYBR Green I, τα ιικά σωματίδια από τα δείγματα που αναλύθηκαν με μικροσκοπία επιφθορισμού (αριστερή στήλη) και με κυτταρομετρία ροής (δεξιά στήλη). Τα δείγματα εξήχθησαν από (a, b) λασπώδη και (c, d) αμμώδη παλιρροϊκά ιζήματα, αυτά που περιέχουν τον πληθυσμό του ιού (a,c) και τα αντίστοιχα σε αυτόκαυστο (b,d). Όλα τα δείγματα παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας την ίδια αραίωση. Η γραμμή κλίμακας δείχνει 200 μm . Τα κυτταρογραφήματα καταγράφηκαν από το κυτταρομετρο ροής Accuri C6. Η πύλη που χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αριθμών του ιού βρίσκεται στο τετράγωνο που παρουσιάζεται μέσα στα κυτταρογράμματα [Heinrichs, et. al. 2021].

Τέλος, στο σημείο αυτό, θα γίνει αναφορά και σχολιασμός σχετικά με την πανδημία του κορωνοϊού 2019 (COVID-19), που αποτελεί μια παγκόσμια πρόκληση που επηρεάζει τη δημόσια υγεία και ασφάλεια. Οι τρέχουσες δυσμενείς επιπτώσεις που προκαλούνται από την πανδημία COVID-19 απαιτούν την εύρεση νέων μεθόδων ανίχνευσης που θα μπορούν να είναι εφαρμόσιμες και σε πιθανές άλλες μελλοντικές ιογενείς επιδημίες.

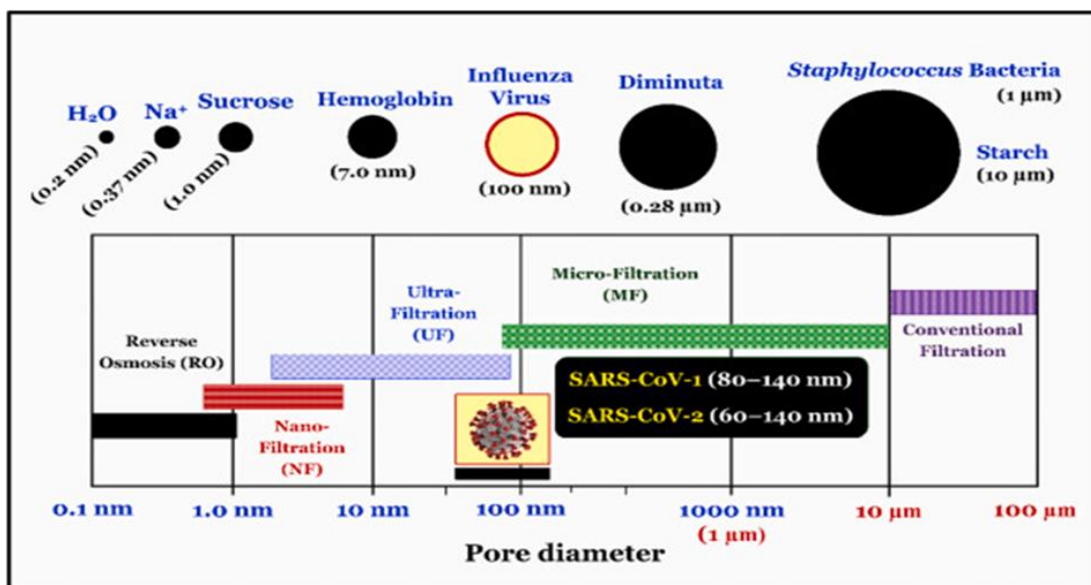
Η βιβλιογραφική ανασκόπηση από τους Abdeldayem, et al, διερευνά τις οδούς μετάδοσης του SARS-CoV-2 στο περιβάλλον και παραθέτει τις τρέχουσες ενημερώσεις σχετικά με την επιτήρηση των ιογενών εστιών χρησιμοποιώντας την επιδημιολογία των λυμάτων, του αέρα και της τεχνητής νοημοσύνης. Η μελέτη προτείνει ένα νέο πλαίσιο που βασίζεται σε ένα σύνολο αλγορίθμων μηχανικής και βαθιάς μάθησης για να παρέχει ένα υποστηρικτικό εργαλείο για τους υπεύθυνους λήψης των αποφάσεων. Το πλαίσιο αξιοποιεί τα διαθέσιμα δεδομένα από αξιόπιστες πηγές για να δημιουργηθούν αποτελεσματικές μέθοδοι και πρωτόκολλα που παρακολουθούν και ανιχνεύουν με ακρίβεια τα δεδομένα των ιών. Το προτεινόμενο πλαίσιο θα μπορούσε να παρέχει έγκαιρη ανίχνευση ιών, προγνωστικούς χάρτες κινδύνου, ευάλωτες περιοχές και εκτίμηση του αριθμού των μολυσμένων πολιτών. Σε αυτή την ανασκόπηση η κυτταρομετρία ροής περιγράφεται με αρκετά πλεονεκτήματα έναντι άλλων τεχνικών και φαίνεται να δεσπόζει στην κορυφή των μεθόδων ανάλυσης που είναι σήμερα στη διάθεση της επιστήμης (Εικόνα 64) [Abdeldayem, et al, 2022].



Εικόνα 64. Εικονογράφημα για την ανίχνευση και επιτήρηση ιογενών εστιών, με εφαρμογή της επιδημιολογίας με βάση τα λύματα (WBE), δειγματοληψία αέρα, και τεχνικές μηχανικής μάθησης [Abdeldayem, et al, 2022].

Η μέτρηση του ιικού φορτίου του SARS-CoV-2 στα δείγματα λυμάτων γίνεται με συνδυασμό χρωστικών ουσιών που φθορίζουν όταν δεσμεύονται στα νουκλεϊκά οξέα και ανιχνεύονται με την κυτταρομετρία ροής. Τα δείγματα των λυμάτων αραιώνονται με τα κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα, γίνεται η χρώση με φθορίζουσα ουσία, όπως το ιωδιούχο προπίδιο, το πορτοκαλί της θειαζόλης, SYBR Green I, SYBR Green II, και SYBR Gold, και στη συνέχεια αναλύονται στο κυτταρόμετρο ροής [Corpuz. et al, 2020].

Τα σωματίδια του ιού SARS-CoV-2, το μέγεθος των οποίων φαίνεται στην Εικόνα 65 [Tran, et al, 2021], εισέρχονται σε μια ροή υπό την επίδραση της υδροδυναμικής προκειμένου να περνούν ένα-ένα. Στη συνέχεια, στα μεμονωμένα σωματίδια επιδρά μια μονοχρωματική δέσμη φωτός, συνήθως από λέιζερ ιόντων αργού. Τέλος, οι αλληλεπιδράσεις κάθε σωματιδίου με την προσπίπτουσα δέσμη λέιζερ παράγουν διασπορές μεγέθους και φθορισμού που μπορούν να συλλεχθούν από ανιχνευτές και να αναλυθούν ως σκεδασμός και ένταση φθορισμού, αντίστοιχα [Corpuz. et al, 2020].



Εικόνα 65. Σύγκριση μεγεθών μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων των κοροναϊών SARS-CoV-1 και SARS-CoV-2 με τις διαμέτρους μεγέθους πόρων των μεμβρανών [Tran, et al, 2021].

Επιπλέον, με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής τα δείγματα των λυμάτων που συλλέγονται μπορούν να βάφονται με φθορίζουσα χρωστική που συνδέεται επιλεκτικά είτε με το DNA ή το RNA. Ως εκ τούτου, η ένταση φθορισμού των συμπλοκών DNA - χρωστικής και RNA - χρωστικής σχετίζεται άμεσα με την περιεκτικότητα DNA-RNA του δείγματος [Adan, et al, 2017].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

Συζήτηση: Συμπεράσματα - Προοπτικές

Ένα ευρύ φάσμα επιστημονικών πεδίων χρησιμοποιεί την κυτταρομετρία ροής τις τελευταίες δεκαετίες χάρη στην ανάπτυξη των υποστηρικτικών νέων τεχνολογιών, που είχαν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή αναλυτών κυτταρομετρίας με μικρότερο κόστος, ώστε η εφαρμογή της τεχνολογίας αυτής να επεκτείνεται σε πολυάριθμες κλινικές και ιατρικά κέντρα, συμπληρώνοντας τα διαγνωστικά αλλά και ερευνητικά πρωτόκολλα, χωρίς όμως να υπολείπεται και η εφαρμογή στον τομέα της Μικροβιολογίας στα τρόφιμα, το πόσιμο νερό και το περιβάλλον.

Η αξιολόγηση της σκέδασης του φωτός αποκαλύπτει πληροφορίες για τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του κυττάρου, ενώ η εκτίμηση των εκπεμπόμενων χρωματικών συχνοτήτων από τις φθορίζουσες χρωστικές ή τα ειδικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται, μπορούν να δώσουν πληροφορίες για το γενετικό υλικό και τα αντιγονικά χαρακτηριστικά των κυττάρων που αναλύονται. Η πολλαπλή προσέγγιση του γενετικού υλικού των μικροβίων, όπως έχει περιγράψει στα κεφάλαια 2 έως 4, μπορεί να ταυτοποιεί σε ομάδες και υποομάδες τα βακτήρια και τους ιούς, όπως έχει επίσης τη δυνατότητα να μελετά και τις φυσιολογικές καταστάσεις που βρίσκονται (π.χ. βιωσιμότητα). Έτσι συνθέτει ένα προφίλ κάθε κυττάρου σύμφωνα με τα ζητούμενα για τη διερεύνηση του εκάστοτε δείγματος. Από την ανάλυση όλων των δεδομένων που έχουν προκύψει από την παρούσα εργασία, συμπεραίνεται ότι η εφαρμογή της κυτταρομετρίας ροής στη Μικροβιολογία δεν απαιτεί κυτταρόμετρο μεγάλων δυνατοτήτων σε παραμέτρους. Αυτό φαίνεται από την ανάλυση των επιστημονικών εργασιών της παρούσης μελέτης, στις οποίες για τα τελικά επιστημονικά δεδομένα δεν αξιολογούνταν πάνω από 3-4 κυτταρομετρικές παράμετροι. Οι παράμετροι αυτοί περιλαμβάνουν τα σκεδαστικά χαρακτηριστικά του πρόσθιου - πλάγιου σκεδασμού και τους φθορισμούς που προκύπτουν από τις αντίστοιχες χρωστικές στα κανάλια FL1, FL2, και σπάνια στα FL3, FL4.

Επομένως, ένα πλεονέκτημα της εφαρμογής των αναλύσεων με κυτταρομετρία ροής στη Μικροβιολογία είναι ότι δεν χρειάζονται κυτταρόμετρα νέας γενιάς 15-20 παραμέτρων και τεράστιου κόστους, αλλά κυτταρόμετρο ενός ή δύο λέιζερ με εύρος διέγερσης τεσσάρων χρωμάτων το μέγιστο, τα οποία έχουν πολύ χαμηλό κόστος. Επίσης, διαπιστώνουμε ότι το κόστος των χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του DNA, RNA, μεταβολιτών κ.τ.λ είναι πολύ μικρό. Το κόστος στις περιπτώσεις χρησιμοποίησης ειδικών

αντισωμάτων για τη διαφοροδιαγνωστική ακρίβεια της ανάλυσης του κυττάρου, είναι λίγο μεγαλύτερο συγκριτικά με τις προηγούμενες εφαρμογές. Διαπιστώθηκε σε όλες τις εργασίες, ότι ο χρόνος ανάλυσης είναι πολύ μικρός έναντι των παραδοσιακών μεθόδων, όπως αυτών που εφαρμόζονται στα τρόφιμα και στο νερό. Έτσι, η κυτταρομετρία ροής αποδεικνύεται ισχυρότατο εργαλείο στη λεπτομερή ανάλυση σύνθετων κυτταρικών μικροβιακών πληθυσμών, σε μικρό χρονικό διάστημα και με χαμηλό κόστος τεχνολογίας και αντιδραστηρίων. Με αυτά τα δεδομένα και με την εμφάνιση, όπως παρατηρούμε στο πίνακα 3, φθοριοχρωμάτων μεγαλύτερης ευαισθησίας, ακρίβειας και ειδικότητας, δεν είναι απαγορευτική η πειραματική μελέτη για δοκιμασίες με ανανεωμένες μικροβιολογικές εφαρμογές σε όλα τα ερευνητικά πεδία της [Givan, 2001].

Από την μελέτη των εργασιών αυτών τα τελευταία χρόνια παρατηρούμε ότι παράλληλα εισάγονται, στη μελέτη των τροφίμων και των υδάτινων δειγμάτων, συστήματα αυτοματοποίησης στη ροή εργασίας και στην καταγραφή των αποτελεσμάτων, αυξάνοντας την ταχύτητα της ανάλυσης και μειώνοντας τον παράγοντα «ανθρώπινου λάθους» μέσω ειδικών δικλείδων ασφαλείας. Σε αρκετές εργασίες της παρούσας μελέτης, έχει αναφερθεί ο όρος της «διαδικτυακής κυτταρομετρίας ροής» με πολλά πλεονεκτήματα. Περιγράφηκαν συστήματα επεξεργασίας στερεών ή υγρών δειγμάτων, τα οποία υφίστανται αυτοματοποιημένη διαδικασία πριν το δείγμα αναλυθεί στο κυτταρόμετρο ροής. Όσο τα αναλυτικά πεδία στα νερά και τρόφιμα αυξάνουν την ασφάλεια για τον ανθρώπινο οργανισμό, τόσο πιο ολοκληρωμένη μπορεί να είναι η μελέτη της χρήσης της κυτταρομετρίας ροής.

Πάνω από 300 περίπου μελέτες ανευρίσκονται μεταξύ 2000-2021, οι οποίες παρουσιάζουν την κυτταρομετρία ροής ως ένα πολύτιμο εργαλείο για τον χαρακτηρισμό της μικροβιακής ποιότητας του νερού. Η μελέτη τους καταδεικνύει την αξία της στην επεξεργασία, τη διανομή και την επαναχρησιμοποίηση νερού (αξιολόγηση των παρεμβάσεων). Η τελευταία είναι μια παγκόσμια πρόκληση σήμερα και γνωστό πρόβλημα για το πλανήτη μας, γι' αυτό απαιτεί αξιόπιστες μεθόδους για τον χαρακτηρισμό και την παρακολούθηση των μικροβίων που μεταδίδονται μέσω του νερού. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα περιορίζονται από τη χαμηλή ευαισθησία, τις υψηλές απαιτήσεις εργασίας και χρόνου εκτέλεσης, την ευαισθησία σε παρεμβολές που γίνονται από χημικές ουσίες που δρουν ως αναστολείς και τις δυσκολίες στη διάκριση μεταξύ των βιώσιμων και μη βιώσιμων κυττάρων.

Όλες αυτές οι προκλήσεις φαίνεται ότι με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής μπορούν να ξεπεραστούν, τόσο στην επεξεργασία και διανομή όσο και στην επαναχρησιμοποίηση του

νερού. Μέσα από αυτές αναδύονται και οι τομείς προτεραιότητας στους οποίους απαιτείται περισσότερη δουλειά για την πλήρη αξιοποίηση του δυναμικού αυτής της προσέγγισης που γίνεται. Ένας από τους τομείς είναι η βελτιστοποίηση των πρωτοκόλλων για την ανάλυση των υδατογενών και η ειδική ανίχνευση των παθογόνων στόχων. Επίσης, διαφαίνεται και η ανάγκη βελτιστοποίησης στην αυτοματοποίηση του χειρισμού και της προετοιμασίας των δειγμάτων για την πραγματοποίηση της κυτταρομετρίας ροής σε πραγματικό χρόνο. Επιβεβλημένη είναι και η ανάπτυξη των υπολογιστικών εργαλείων για να καταστεί ακριβέστερη η ανάλυση των δεδομένων και η βελτίωση των προτύπων για τα όργανα, τις μεθόδους και τις απαιτήσεις υποβολής εκθέσεων ελέγχου. Ο μεγάλος όγκος έρευνας που τεκμηριώνει επιτυχημένες εφαρμογές της κυτταρομετρίας ροής μπορεί εύλογα και ρεαλιστικά να αποδείξει την ευρεία υιοθέτησή της ως μια κατάλληλη μέθοδο για την αξιολόγηση της ποιότητας του νερού, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν απαιτείται περαιτέρω βελτίωση.

Αξιοσημείωτο είναι, όπως προκύπτει από τα αναφερόμενα της μελέτης μας, ότι ο προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων αποτελεί ένα βασικό ερώτημα. Παραδόξως, αυτή η ερώτηση δεν απαντάται πάντα εύκολα και τις τελευταίες δύο δεκαετίες συνεχίζεται μια μόνιμη διαμάχη για αυτό το θέμα. Η κυτταρομετρική προσέγγιση φαίνεται να πλεονεκτεί σε πολλές μελέτες. Η κυτταρομετρία ροής με τις φθορίζουσες χρωστικές που λειτουργούν ως ανιχνευτές, επιτρέπουν τη διαφοροποίηση των σταδίων ανάπτυξης πολύ πέρα από τον κλασικό μικροβιολογικό ορισμό της κυτταρικής ανάπτυξης. Επισημαίνεται βέβαια ότι οι περισσότερες από τις υπάρχουσες τεχνικές για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας ή της κυτταρικής δραστηριότητας έχουν δύο περιορισμούς, την έλλειψη καθολικότητας και τις άτυπες αποκρίσεις, όταν οι αναλύσεις εφαρμόζονται σε περιβαλλοντικά δείγματα νερού ή τροφίμων.

Η κυτταρομετρία ροής έχει επίσης προσφέρει νέες προοπτικές στη μελέτη της επιβίωσης των βακτηρίων στα υδάτινα οικοσυστήματα, ειδικά στην αξιολόγηση της ετερογένειας του πληθυσμού, των αλλαγών του DNA και των παραλλαγών του δυναμικού της κυτταρικής μεμβράνης. Η πραγματική πρόκληση στη μικροβιακή οικολογία είναι ο επιτόπου προσδιορισμός της ετερογένειας των φυσιολογικών καταστάσεων εντός των συγκεκριμένων κυτταρικών πληθυσμών-υποπληθυσμών. Με τη χρήση των ειδικών αντισωμάτων που μπορούν να συνδυαστούν με τους φυσιολογικούς ανιχνευτές και με τη χρήση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης για τη σήμανση των βακτηρίων και την παρακολούθηση της γονιδιακής τους έκφρασης, η κυτταρομετρία ροής φαίνεται να έχει τη δυνατότητα να ταυτοποιήσει και υπό περιβαλλοντικές συνθήκες.

Επίσης, ένας νέος τεχνολογικός εξοπλισμός που βοηθάει στην ταξινόμηση των κυττάρων είναι ο κυτταροδιαχωριστής. Επειδή αυτός είναι ένας σχετικά νέος τομέας εφαρμογών της κυτταρομετρίας ροής, τα όρια διευρύνονται από το τι έχει επιτευχθεί, σε εκείνο που μπορεί να δοκιμαστεί ή να διερευνηθεί με τα υπάρχοντα όργανα και τη βελτιστοποίησή τους, λόγω της μεγάλης προόδου στην τεχνητή νοημοσύνη και τη μηχανική μάθηση. Η ταξινόμηση που γίνεται με τον κυτταροδιαχωριστή μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε για την αξιοποίηση των μεμονωμένων κυττάρων για κλωνοποίηση, είτε για τη συλλογή μεγάλου αριθμού κυττάρων με παρόμοιες ιδιότητες, ως τρόπο εμπλουτισμού του συγκεκριμένου κυτταρικού πληθυσμού που θα μελετηθεί.

Για να έχει αξιοπιστία η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής θα πρέπει να διέπεται από ορισμένους κανόνες ελέγχου των δειγμάτων που αναλύονται, που θα εμπεριέχουν την τυποποίηση, τη βαθμονόμηση, τον έλεγχο και την επικύρωση της μεθόδου [Cunliffe, et al, 2009]. Υπάρχουν μελέτες, οι οποίες περιλαμβάνουν τους βασικούς ορισμούς, την ορολογία, τα υλικά και τις διαδικασίες για την τυποποίηση, τη βαθμονόμηση και τον έλεγχο των οργάνων. Απαιτείται όμως η απόκτηση επαρκών επικυρώσεων για τα δεδομένα που αναφέρονται στη κυτταρική βιολογία και προκύπτουν από τις αναλύσεις του κυτταρομέτρου ροής. Μια επιγραμματική προσέγγιση περιέχει τα ακόλουθα:

- Αρχικά, για να εκτιμηθεί το μέγεθος των κυττάρων σύμφωνα με τα σκεδαστικά χαρακτηριστικά (διασπορά πρόσθιου σκεδασμού, FSC), απαιτούνται κύτταρα γνωστών διαφορετικών μεγεθών ως πρότυπα.
- Επιπρόσθετα, για τη μέτρηση του μεγέθους του περιεχομένου DNA ή RNA, πρέπει να σημειωθεί ότι τα κλασσικά γραφήματα βαθμονόμησης με καθαρό DNA ή RNA είναι ανεπαρκή, λόγω της ιδιαιτερότητας και ποικιλομορφίας των μικροβίων. Έτσι η μελέτη γίνεται μόνο με τη χρήση πολλών τύπων βακτηρίων με γνωστή περιεκτικότητα σε DNA ή RNA που απαρτίζουν τη γενετική τους ταυτότητα.
- Τέλος, κατά την αξιολόγηση γενικών μεταβολικών ή ειδικών ενζυμικών δραστηριοτήτων, πρέπει να χρησιμοποιηθούν κύτταρα με γνωστή δραστηριότητα, ως τελική επικύρωση της εκάστοτε μεθοδολογίας.

Στην περίπτωση εφαρμογών ταξινόμησης, οι απαιτούμενοι έλεγχοι και η επικύρωση πρέπει να περιέχει ελέγχους για βιολογική μόλυνση και για μοριακή μόλυνση. Στην προκειμένη περίπτωση εννοείται η μη πρόσμιξη με γενετικό υλικό από τυχόν εμπεριέχοντα άλλο μικροοργανισμό (επίπεδο κυττάρου) ή με ελεύθερο γενετικό υλικό άλλων μικροοργανισμών του μικροπεριβάλλοντος (επίπεδο DNA-RNA). Μια βασική απαίτηση για τη διαλογή είναι να διαπιστωθεί και να επαληθευτεί η κατάσταση «στειρότητας» και η ευθυγράμμιση του

κυτταρομέτρου. Εάν η διαδικασία διαλογής είναι αρκετά μεγάλη, τα δύο παραπάνω πρέπει να ελέγχονται σε τακτά χρονικά διαστήματα και στο τέλος της διαδικασίας της διαλογής.

Οι βασικές αρχικές απαιτήσεις για τη διαλογή των μικροοργανισμών είναι η προετοιμασία του διαλογέα κυττάρων με τη διαδικασία της αποστείρωσης για την εξάλειψη και τον έλεγχο της μικροβιακής μόλυνσης που εισάγεται στο σύστημα από το υγρό περιποίησης του κυτταρομέτρου και η μείωση του θορύβου από τα μικρά σωματίδια στο υγρό ή στο δείγμα. Ο πλέον ενδεδειγμένος θετικός έλεγχος ευθυγράμμισης που αναφέρεται στη βιβλιογραφία είναι η ταξινόμηση μεμονωμένων κυττάρων που παρασκευάζονται από μια καλλιέργεια σε στατική φάση που έχει προκύψει χρησιμοποιώντας ένα σύστημα κλωνοποίησης, δηλαδή αποικίες προερχόμενες από ένα κύτταρο. Η ανάκτηση θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 98%, και ιδανικά να πλησιάζει το 100% [Houtz, et al, 2014].

Από τη μελέτη προκύπτει ότι αυτό που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στα πρωτόκολλα εφαρμογής της κυτταρομετρίας ροής με πολυπαραμετρική ανάλυση στη Μικροβιολογία, είναι η επιλογή δύο ή περισσότερων ανιχνευτών, με αντίθετα μήκη κύματος για τη μέτρηση των πολλαπλών παραμέτρων. Μήκη κύματος αντίθεσης σημαίνει ότι ο συνδυασμός των μηκών κύματος διέγερσης και εκπομπής να επιτρέπουν τη διάκριση κάθε ανιχνευτή παρουσία των άλλων ανιχνευτών. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η ταυτόχρονη χρήση τουλάχιστον τεσσάρων διαφορετικών χρωστικών ουσιών ή αντισωμάτων, σε συνδυασμό ανοσοφθορισμού και ανιχνευτών νουκλεϊκών οξέων, όπως για παράδειγμα ανιχνευτές rRNA. Οι φυσιολογικοί ή ταξινομικοί ανιχνευτές χρησιμοποιούνται συχνά σε διαδικασίες διπλής χρώσης και περιλαμβάνουν μια χρώση νουκλεϊκού οξέος για τον ποσοτικό προσδιορισμό των συνολικών βακτηρίων. Με τον φθορισμό που προκύπτει από το αντίσωμα για παράδειγμα, διασφαλίζεται ότι αναλύονται μόνο τα φθορίζοντα συμβάντα - κύτταρα που έχουν δεσμεύσει το αντίσωμα και που σχετίζονται με το νουκλεϊκό οξύ.

Ένα άλλο σημαντικό στοιχείο που πρέπει να λαμβάνουμε υπόψη στις αναλύσεις με κυτταρομετρία ροής είναι η ακεραιότητα της μεμβράνης που καταδεικνύει την προστασία των κυτταρικών συστατικών και τη δυνατότητά της να δημιουργεί συνθήκες που παρέχουν την ικανότητα για ζωή (βιωσιμότητα), αλλά δεν εγγυώνται την κυτταρική αναπαραγωγή-πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Τα κύτταρα με κατεστραμμένη μεμβράνη δεν μπορούν να αντέξουν καμία επεξεργασία και συνήθως ταξινομούνται ως νεκρά κύτταρα. Η ύπαρξη μεμβράνης με εκλεκτική διαπερατότητα δείχνει ότι το κυτταρόπλασμα εξακολουθεί να είναι μια ξεχωριστή οντότητα από το περιβάλλον και επομένως έχει τη δυνατότητα να πραγματοποιήσει μεταβολισμό ή πολλαπλασιασμό. Αυτό μπορεί να είναι κρίσιμο σε μελέτες για την αξιολόγηση του κινδύνου, μάλιστα πλησιάζει περισσότερο σε έναν καταλληλότερο

ορισμό της βιωσιμότητας για ιούς οι οποίοι δεν παρουσιάζουν άμεσο πολλαπλασιασμό ή μεταβολισμό. Όλες οι μελέτες αναφέρουν ότι η μέτρηση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης δεν απαιτεί καμία κυτταρική δραστηριότητα, επομένως είναι κατάλληλη για «λιμοκτονούντα», αδρανοποιημένα ή τραυματισμένα κύτταρα που μπορεί να απαιτούν την επανενεργοποίηση για να ανακτήσουν πιο περίπλοκες λειτουργίες.

Η παρουσία του DNA σε όλα τα βακτήρια το καθιστά ιδανικό στόχο χρώσης. Εάν χρησιμοποιηθεί μόνο του, μπορεί να προκαλέσει σύγχυση, καθώς μπορούν επίσης να δημιουργηθούν σήματα από άλλα βιολογικά υπολείμματα και νεκρά κύτταρα. Ο συνδυασμός της χρώσης του DNA με έναν επιπλέον δείκτη, ο οποίος θα ταυτοποιεί επιλεκτικά τη διαπερατή κυτταρική μεμβράνη, είναι μια προσέγγιση που ευρέως χρησιμοποιείται. Τέτοιου είδους συνδυασμοί χρωστικών είναι το ιωδιούχο προπίδιο (PI), που μπορεί να συνδυαστεί με το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) ως υπερζωτική χρώση του DNA, αλλά η φασματική διαφοροποίηση των δύο χρώσεων αυτών απαιτεί προσεκτική πύλη - οριοθέτηση και ελέγχους. Άλλοι πιθανοί συνδυασμοί είναι το DAPI ή το Hoechst 33342 με PI ή το TO-PRO 3 με το PI.

Συμπληρωματικές αναλύσεις για την απουσία του κυτταρικού θανάτου αναφέρουν μελέτες που αφορούν μετρήσεις της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων. Η ανίχνευση βέβαια της μεταβολικής δραστηριότητας είναι λιγότερο ειδική, ως δοκιμασίας, από τη δυνατότητα της ανάπτυξης της κυτταρικής καλλιέργειας. Η ανίχνευση της μεταβολικής δραστηριότητας δεν δικαιολογεί την αναπαραγωγική ανάπτυξη, αυτή η λειτουργική διαδικασία μπορεί να είναι επαρκής για την ανίχνευση των βακτηριακών επιδράσεων, όπως η βιοαποικοδόμηση, ο μετασχηματισμός της οργανικής ύλης ή η συσσώρευση των τοξινών. Σε περιπτώσεις όμως όπως λήθαργος ή συνθήκες ακραίας πείνας, οι μεταβολικές αυτές λειτουργίες μπορεί να είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης. Η μεταβολική δραστηριότητα δεν δικαιολογεί την αναπαραγωγική ανάπτυξη εάν αξιολογηθεί με μεθόδους όπως η δραστηριότητα της εστεράσης, αλλά εάν εκτελείται με μεθόδους εξαρτώμενες από την ενέργεια, όπως το δυναμικό μεμβράνης είναι υψίστης σημασίας και αξιοπιστίας.

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του δυναμικού της μεμβράνης είναι οι φορτισμένες λιπόφιλες χρωστικές, όπως οι καρβοκυανίνες, η ροδαμίνη 123 ή οι οξονόλες. Αυτές οι χρωστικές, οι οποίες μπορούν εύκολα να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη και επομένως να ακολουθήσουν το δυναμικό της σύμφωνα με την εξίσωση Nernst, ονομάζονται ανιχνευτές διανομής. Πρέπει όμως να γνωρίζουμε ότι η ένταση φθορισμού εξαρτάται όχι μόνο από το δυναμικό της μεμβράνης, αλλά και από άλλες παραμέτρους, όπως ο αριθμός των λιπόφιλων θέσεων δέσμευσης εντός του κυττάρου, η συγκέντρωση της

χρωστικής και ο αριθμός των θέσεων δέσμευσης στο διάλυμα. Αν και αυτή η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί καλά σε Gram (+) βακτήρια, είναι περιορισμένης χρήσης για Gram (-). Λόγω έλλειψης κατάλληλων ελέγχων και επικυρώσεων για μεικτούς πληθυσμούς, δεν έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε φυσικές κοινότητες βακτηρίων, εφαρμόστηκε όμως επιτυχώς για τη μελέτη συγκεκριμένων ειδών σε εργαστηριακούς μικρόκοσμους.

Η δραστηριότητα της εστεράσης είναι ίσως η πιο κοινή μορφή μέτρησης της μεταβολικής δραστηριότητας που χρησιμοποιείται και βασίζεται σε μη φθορίζουσες ενώσεις που γίνονται φθορίζουσες όταν διασπώνται από το ένζυμο μέσα στο κύτταρο. Τα μόρια αυτά αυξάνουν το φορτίο τους και την πολικότητα, προκαλώντας κατακράτηση της χρωστικής, κάτι που βεβαιώνει την ακεραιότητα της μεμβράνης. Έχει συγκριθεί ένας αριθμός υποστρωμάτων εστεράσης και η δυνατότητα εφαρμογής τους σε αρκετούς οργανισμούς. Ένα πρόβλημα που πρέπει να αντιμετωπιστεί είναι αυτό της εξώθησης της χρωστικής, η χρήση όμως της διοξικής διχλωροκαρβοξυφθοροσκεΐνης ή της καλσεΐνης-ακετομεθυλεστερά μπορεί να προσπελάσει αυτό το μειονέκτημα [Beem, Segal, 2013].

Από τις μελέτες που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία για τη χρήση της ανοσο-κυτταρομετρίας ροής στον έλεγχο των τροφίμων, φαίνεται ότι έχει σημειωθεί ικανοποιητική πρόοδος κυρίως σε ό,τι αφορά την ανάπτυξη ευαίσθητης και ταχείας ποιοτικής ανίχνευσης συγκεκριμένων παθογόνων μικροοργανισμών σε περιορισμένο εντούτοις φάσμα τροφίμων. Είναι όμως εμφανές ότι η άμεση εξειδίκευση, για κάποια στελέχη παθογόνων βακτηρίων, ευαίσθητων ποσοτικών ανιχνεύσεων της ανοσο-κυτταρομετρίας, μπορεί να είναι εφαρμόσιμη στο απώτερο μέλλον αλλά θα πρέπει να βασίζεται στην ανάπτυξη νέων μεθόδων κυρίως για την ανάκτηση των κυττάρων από τα τρόφιμα σε συγκεντρώσεις που μπορούν να ανιχνευθούν με ειδικά αντισώματα και χρησιμοποιώντας τους κυτταρομετρητές ροής, που έχουν ειδικά προσαρμοσμένη κυψελίδα για μεγαλύτερη ευαισθησία σε χαμηλά όρια ανίχνευσης των συμβάντων.

Από την άποψη της ανάπτυξης άμεσων αναλύσεων που βασίζονται στην κυτταρομετρία ροής για τα σπόρια ή τα φυτικά βλαστικά κύτταρα, υπάρχουν δεδομένα στη βιβλιογραφία ότι λειτουργεί η ανάκτηση των κυττάρων από τα τρόφιμα και είναι δυνατή η ταχεία διαφοροποίηση των σπορίων από τα βλαστικά κύτταρα και φυσικά διατίθενται ευαίσθητοι και ειδικοί ανιχνευτές-αντισωμάτων με πολύ χαμηλό κόστος, με τους οποίους μπορούν να σημαίνονται τα κύτταρα για την ανάλυσή τους με τη μεθοδολογία αυτή. Οι δυνατότητες και οι προκλήσεις που αναδύονται από την κυτταρομετρία ροής, ειδικότερα την ανοσο-κυτταρομετρία για την ανίχνευση των σπορίων-βλαστικών κυττάρων στη βιομηχανία των τροφίμων, αξίζει να ληφθούν σοβαρά υπόψη. Εντούτοις, θα πρέπει να είναι ταχύτερη από τις

μεθόδους που βασίζονται στην ανάπτυξη σε τρυβλία άγαρ, ώστε τα δεδομένα να αποκτώνται μέσα σε ώρες και όχι σε ημέρες που απαιτούνται επί του παρόντος για την ανάπτυξη και αξιολόγηση των τρυβλίων.

Πολύτιμες πληροφορίες έχουν προκύψει από μελέτες οι οποίες έδειξαν τη δυνατότητα επιβίωσης και ανάπτυξης των κατεστραμμένων κυττάρων, την ετερογενή φύση των υποπληθυσμών που δημιουργήθηκαν σε καλλιέργειες μετά από έκθεση σε διαφορετικούς παράγοντες stress, που τελικά καταδεικνύουν τη χρησιμότητα της διαλογής των κυττάρων στην απόκτηση γνώσης ως προς τη φυσιολογία των κυττάρων και την πιθανή παθογένεια που προκύπτει από την παραμονή των κατεστραμμένων κυττάρων μέσα στα τρόφιμα. Η διαλογή των κυττάρων εξακολουθεί να είναι όμως μια δαπανηρή μεθοδολογία και γενικά δεν είναι και τόσο φιλική προς τον χρήστη για εφαρμογές σε ένα εργαστήριο ρουτίνας μικροβιολογικής ανάλυσης ποιότητας τροφίμων. Σήμερα συνεχώς νέοι οικονομικότεροι κυτταρομετρητές-κυτταροδιαχωριστές είναι διαθέσιμοι και μεσοπρόθεσμα θα μπορούσαν να αποτελέσουν εργαλείο ειδικής ανάλυσης των συγκεκριμένων παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα [Kennedy, et al, 2011].

Επανάσταση στην τεχνολογία της κυτταρομετρίας ροής είναι η εισβολή της αυτοματοποιημένης διαδικτυακής κυτταρομετρίας ροής σε συνδυασμό με την ανάλυση των δεδομένων που βασίζονται σε φαινοτυπικά δακτυλικά αποτυπώματα των κυττάρων, που αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την ποσοτική παρακολούθηση της δυναμικής του κυτταρικού πληθυσμού, η οποία σχετίζεται με την ποικιλομορφία του βακτηρίου. Η αξιολόγηση αυτών των ποσοτικών δεδομένων έδειξε ότι οι φάσεις της προκαρυωτικής ανάπτυξης σε τεχνητά και φυσικά οικοσυστήματα χαρακτηρίζονταν από διαφορετικές ταχύτητες ανάπτυξης και διακριτές κορυφές. Η παρακολούθηση του κυτταρικού πληθυσμού που σχετίζεται με την ποικιλομορφία των κυττάρων με βάση τα φαινοτυπικά δακτυλικά αποτυπώματα έδειξε ότι η προκαρυωτική αύξηση σε μικτές καλλιέργειες διέπεται από την κυριαρχία των μεμονωμένων προκαρυωτικών ειδών.

Η αυτοματοποιημένη διαδικτυακή κυτταρομετρία ροής είναι ένα ισχυρό εργαλείο για τη βελτιστοποίηση των βιοδιαδικασιών στα μικροφύκη λόγω της προσαρμοστικότητάς της σε αρκετούς φαινοτυπικούς προσδιορισμούς και της συμβατότητάς της σε διάφορα συστήματα καλλιέργειας. Αυτό καθιστά εφικτή την προώθηση των βιοδιαδικασιών που έχουν σχέση τόσο με τη βιομάζα των μικροφυκών όσο και με την παραγωγή διαφόρων ενώσεων. Άρα η αυτοματοποιημένη διαδικτυακή κυτταρομετρία ροής είναι ένα βιώσιμο εργαλείο με πολλές εφαρμογές σε πολλαπλούς τομείς που βασίζονται στον τομέα της μονοκυτταρικής ανάλυσης και παραγωγής βιοπροϊόντων. Τα προαναφερθέντα για την αυτοματοποιημένη διαδικτυακή

κυτταρομετρία ροής έχουν προκύψει από μελέτες που έχουν γίνει χρησιμοποιώντας πρώτη ύλη από μικροφύκη αξιοποιώντας τις εκπομπές που συλλέγονται στα κανάλια φθορισμού FL1/FL3, που λαμβάνονται με τη χρώση του νουκλεϊκού οξέος και του αυτοφθορισμού της χλωροφύλλης, οπότε επιτρέπει την ταυτόχρονη αξιολόγηση των προκαρυωτών και του *C. vulgaris* σε καλλιέργειες τεχνητά κατασκευασμένες ή φυσικές, σε ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων κυττάρων [Haberkorn, et al, 2021].

Τέλος, η συμβολή όλων αυτών των πλεονεκτημάτων της κυτταρομετρίας ροής στην προστασία της δημόσιας υγείας από παθογόνους παράγοντες είναι κρίσιμη για την παρακολούθηση της επεξεργασίας των λυμάτων σύμφωνα με τα πρότυπα του πόσιμου νερού για την προγραμματισμένη επαναχρησιμοποίησή του. Οι ιοί αποτελούν το κύριο μέλημα, ωστόσο οι στρατηγικές παρακολούθησης σε πραγματικό χρόνο δεν υποστηρίζουν επί του παρόντος την απομάκρυνση των ιών μέσω των διαδικασιών της επαναχρησιμοποίησης. Η κυτταρομετρία ροής επέτρεψε σήμερα να προσεγγίζεται η ταχεία και ευαίσθητη παρακολούθηση των βακτηρίων σε εφαρμογές επεξεργασίας νερού, αλλά οι μέθοδοι για την παρακολούθηση ιών και πρωτοζώων παραμένουν ανώριμες και μεγάλες ερευνητικές ομάδες σκιαγραφούν την προσπέλαση των προβλημάτων στο άμεσο μέλλον.

Επίσης παρουσιάστηκαν οι πρόσφατες εξελίξεις για τον ποσοτικό προσδιορισμό των μικροοργανισμών στο νερό και σχολιάστηκαν οι εξελίξεις της ιομετρίας ροής, καθώς οι μέθοδοι αρίθμησης των ιών δείχνουν πολλά υποσχόμενες για τις εφαρμογές στην επαναχρησιμοποίηση του νερού. Διαφαίνεται ξεκάθαρα ότι κυτταρομετρία ροής θα φέρει επανάσταση στον τρόπο με τον οποίο διεξάγεται η μικροβιακή παρακολούθηση του πόσιμου νερού και στην ανίχνευση των ιών. Φυσικά για να γίνει πραγματικότητα αυτή η υπόθεση, η έρευνα θα πρέπει να συγκρίνει την απόδοση του οργάνου με διαφορετικά μεγέθη σωματιδίων του ιού, των μεταβλητών τύπων του γονιδιώματος, διότι όπως είναι γνωστό οι ιοί διαθέτουν διάφορα είδη νουκλεϊκών οξέων. Η σωστή αξιολόγηση των στικτογραμμάτων του προκύπτοντος φθορισμού χρησιμοποιείται ήδη σε άλλες εφαρμογές με μεγάλη επιτυχία.

Η πρόσφατη μελέτη των Heinrichs, et al, όπου παρουσιάζεται μια μέθοδος διαχωρισμού των ιών από τα δείγματα θαλάσσιων ιζημάτων, θέτει τις βάσεις για την εφαρμογή της μεθόδου, σε ένα ευρύτερο φάσμα ιζημάτων. Τα ιζήματα αυτά μπορεί να προέρχονται από γλυκά νερά, τα νερά των εκβολών ποταμών, από δείγματα εδάφους ακόμη και σε πολύ ευτροφικά ιζήματα. Επίσης, η εργασία των Abdeldayem, et al, επισημαίνει ότι οι ιογενείς εστίες προκαλούν μεγάλη ανησυχία για την ανθρώπινη επιβίωση και η κατανόηση των μέσων μετάδοσής τους και η έγκαιρη ανίχνευσή τους αποτελεί θέμα έρευνας σε διάφορα επίπεδα. Η κυτταρομετρία ροής συμβάλλει στην επιτήρηση των ιικών εστιών με τη χρήση

της επιδημιολογίας και με βάση τα λύματα όπως αναφέρθηκε, χρησιμοποιεί επίσης και την τεχνική της μηχανικής μάθησης και της τεχνητής νοημοσύνης.

Μια αναδύομενη ανησυχία είναι εάν πηγή μόλυνσης για τον άνθρωπο αποτελεί το μολυσμένο νερό με SARS-CoV-2 . Μια πρόσφατη μελέτη επιβεβαίωσε ότι το RNA του SARS-CoV-2 ανιχνεύτηκε στα λύματα εισροής. Το σημαντικό ερώτημα είναι αν μπορεί να επιβιώσει και να μολύνει μετά τη διαδικασία απολύμανσης του πόσιμου νερού. Μέχρι σήμερα, μόνο μια μελέτη επιβεβαίωσε ότι η μολυσματικότητα του SARS-CoV-2 στο νερό για τους ανθρώπους είναι μηδενική με βάση το αποτέλεσμα του τεστ μολυσματικότητας [Mohapatra, et al, 2020]. Ως εκ τούτου, περαιτέρω μελέτες θα πρέπει να επικεντρωθούν στην επιβίωση του SARS-CoV-2 σε νερό και λύματα υπό διαφορετικές συνθήκες, όπως είναι η θερμοκρασία, το pH και το μικροπεριβάλλον του νερού. Έχουν προταθεί συσκευές για την ανίχνευση του SARS-CoV-2 στο νερό, τα πρωτόκολλα και οι κατάλληλες συσκευές θα πρέπει να αναπτυχθούν σύντομα. Όλα αυτά καθιστούν την κυτταρομετρία ροής ένα πολύτιμο εργαλείο στην υδάτινη και περιβαλλοντική Μικροβιολογία καθώς και τη Μικροβιολογία τροφίμων, γιατί συνδυάζει άμεσες και γρήγορες αναλύσεις για τον προσδιορισμό των αριθμών, της κατανομής και του μεγέθους των κυττάρων. Αποδίδει με ακρίβεια πρόσθετες βιοχημικές πληροφορίες και κυρίως τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά μεμονωμένων κυττάρων, αποκαλύπτοντας έτσι την ετερογένεια που υπάρχει σε έναν πληθυσμό ή μια κοινότητα μικροβίων.

Η κυτταρομετρία ροής όπως ήδη έχουμε αναφέρει, παρουσιάζει τρεις μοναδικές τεχνικές ιδιότητες υψηλών δυνατοτήτων για τη μελέτη της μικροβιολογίας των υδάτινων συστημάτων και τροφίμων:

- την τεράστια ταχύτητα που έχει να λαμβάνει και να επεξεργάζεται δεδομένα
- την ικανότητα διαλογής ορισμένων κυτταρομέτρων που ονομάζονται κυτταροδιαχωριστές και η οποία επιτρέπει τη απομόνωση και μεταφορά συγκεκριμένων πληθυσμών ή ακόμη και μεμονωμένων κυττάρων σε καθορισμένη θέση, έτσι ώστε να γίνεται δυνατή η περαιτέρω φυσική, χημική, βιολογική ή ακόμη και η μοριακή ανάλυσή τους.
- τη δυνατότητα λήψης πολυπαραμετρικών δεδομένων υψηλής ταχύτητας, ακρίβειας και ανάλυσης πολυμεταβλητών δεδομένων.

Οι κύριοι περιορισμοί υποδομής της κυτταρομετρίας ροής είναι η ανάγκη για ειδικευμένους και καλά εκπαιδευμένους χειριστές, τα επαρκή συστήματα ψύξης για λέιζερ υψηλής ισχύος που απαιτούνται και οι διαλογείς κυττάρων-κυτταροδιαχωριστές. Η επιλογή και η απόκτηση των βέλτιστων φθοριοχρωμάτων, των μικροοργανισμών ελέγχου και οι

επικυρώσεις για μια συγκεκριμένη εφαρμογή μπορεί να είναι παράμετροι που μερικές φορές είναι δύσκολο να επιτευχθούν, αλλά είναι απολύτως επιβεβλημένοι και αναγκαίοι για μεγαλύτερη ακρίβεια και αξιοπιστία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Κυτταρομετρία ροής είναι μία τεχνολογία που επιτρέπει την αρίθμηση και τον χαρακτηρισμό μικροσωματιδίων και κυττάρων, τα οποία βρίσκονται σε κατάσταση εναιωρήματος. Καθιστά δυνατή την ανάλυση πολλών παραμέτρων ταυτόχρονα και προσδιορίζει τα φυσικά ή χημικά χαρακτηριστικά μεμονωμένων κυττάρων, τα οποία ρέουν διαμέσου μιας συσκευής οπτικής ανάλυσης και ψηφιακής ανίχνευσης.

Το πλεονέκτημα της κυτταρομετρίας είναι η ακριβής και ταχεία μέτρηση κυττάρων, με άμεσες εφαρμογές στην Μικροβιολογία, οι οποίες όταν συνδυαστούν με τον φθορισμό ειδικών χρωστικών και την ανοσο-κυτταρομετρία, μπορούν να δώσουν σαφείς πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό ζωντανών ή νεκρών μικροβίων, τον μεταβολισμό τους, την επίδραση καταστάσεων στρες και επιπρόσθετες πληροφορίες που αφορούν τον κυτταρικό κύκλο. Το σημαντικότερο όλων είναι πως καθίσταται εφικτός ο προσδιορισμός της βιωσιμότητας των βακτηρίων, δυνατότητα που τεκμηριώνει απαντήσεις σε μεγάλα προβλήματα της Μικροβιολογίας.

Υπάρχουν συνολικά εφαρμογές που αφορούν την ασφάλεια των τροφίμων, την καταλληλότητα του πόσιμου νερού με την online κυτταρομετρία ροής με χρήση δακτυλικών αποτυπωμάτων, την επεξεργασία των αστικών λυμάτων και γενικότερα την προστασία του περιβάλλοντος. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι με την ιομετρία ροής είναι εφικτός ο έλεγχος διαφόρων ιών στο περιβάλλον, ώστε και σε πιθανές περιπτώσεις μελλοντικών πανδημιών (όπως της πανδημίας COVID 19), να μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο.

Λέξεις κλειδιά: κυτταρομετρία ροής, φθορίζουσες χρωστικές, βιωσιμότητα κυττάρου, κυτταρομετρικά δακτυλικά αποτυπώματα, ιομετρία ροής.

ABSTRACT

Flow Cytometry is a technology that allows the counting and characterization of molecules and cells that are found in a suspension. It allows the analysis of multiple parameters at once and defines the physical and chemical characteristics of single cells that flow through an optical analysis and digital detection device.

A great advantage of flow cytometry is the precise and rapid cell counting, which has ample use in Microbiology, especially when it is combined with other tests like fluorescent staining and immunocytometry, providing us with exact details about the number of living and/or dead microbes, their metabolism, their response to stress and more information about their cell cycle. The most important fact though is that it allows precise gauging of bacterial cell viability, which substantiate the answers on one of the greatest questions of Microbiology.

There are applications that appertain to food safety, drinking water viability through online flow cytometry fingerprinting, sewage processing and general protection of the environment. Finally, it's worth noting that with the use of flow virometry it is possible to identify viruses in the environment, so that in the event of future pandemics (such as the COVID-19 pandemic), it can be a useful tool.

Key Words: flow cytometry, fluorescent staining, cell viability, flow cytometry fingerprinting, flow virometry.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΩΝ

ABC	Antibody Binding Capacity
AI	Artificial Intelligence
BONCAT	Bio Orthogonal Non Canonical Amino acid Tagging
CD	Cluster of Differentiation Cluster of Designation Classification Determinant
CFU	Colony Forming Units
DCC	Damaged Cells Count
DVC	Direct Viable Counting
FAB	French American British Classification
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCM	Flow Cytometry
FDA	Food and Drug Administration - USA
FI	Fluorescence Intensity
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
FSC	Forward Scatter
HLDA	Human Leukocyte Differentiation Antigens
HPC	Heterotrophic Plate Count
ICC	Intact Cells Count
ICP	Intact Cell Percentage
LAB	Lactic Acid Bacteria
LDC	Live Dead Count

MCCD	Microbial Community Change Detection
MESF	Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome
ML	Machine Learning
MRD	Minimal Residual Disease
NIST	National Institute of Standards and Technology
PB	Probability Binning
PCR	Polymerase Chain Reaction
q-PCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
QFCM	Quantitative Fluorescence Cytometry
RFU	Relative Fluorescence Units
SSC	Side Scatter
TCC	Total Cell Counting
EPA	Environmental Protection Agency
WBE	Wastewater Based Epidemiology

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Βαρθολομάτος Γ. (2007). Κυτταρομετρία Ροής Αρχές και Κλινικο-Ερευνητικές Εφαρμογές της.
2. Πάγκαλης Γ. Α. (2008). Αιματολογία στην Κλινική Πράξη. Π.Χ. Πασχαλίδης. 149-150.
3. Abdeldayem, O. M., Dabbish, A. M., Habashy, M. M., Mostafa, M. K., Elhefnawy, M., Amin, L., Al-Sakkari, E. G, Ragab, A, Rene, E. R. (2022). Viral outbreaks detection and surveillance using wastewater-based epidemiology, viral air sampling, and machine learning techniques: A comprehensive review and outlook. *Science of The Total Environment*, 803, 149834.
4. Abo-Ali F. (2017). Clusters of differentiation. SlideShare. Retrieved June 20, 2022, from <https://www.slideshare.net/drafawzia/clusters-of-differentiation-cds>
5. Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology*, 37(2), 163-176.
6. Aggarwal, C. C. (2017). Time series and multidimensional streaming outlier detection. In *Outlier Analysis* (pp. 273-310). Springer, Cham.
7. Alvarez-Barrientos, A., Arroyo, J., Cantón, R., Nombela, C., & Sánchez-Pérez, M. (2000). Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews*, 13(2), 167-195.
8. Amalfitano, S., Fazi, S., Ejarque, E., Freixa, A., Romaní, A. M., & Butturini, A. (2018). Deconvolution model to resolve cytometric microbial community patterns in flowing waters. *Cytometry Part A*, 93(2), 194-200.
9. Antolinos, V., Esteban, M. D., Ros-Chumillas, M., Huertas, J. P., Periago, P. M., Palop, A., & Fernández, P. S. (2014). Assessment of the of acid shock effect on viability of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* using flow cytometry. *Food research international*, 66, 306-312.
10. Baumgarth, N., & Roederer, M. (2000). A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *Journal of immunological methods*, 243(1-2), 77-97.
11. Becton, Dickinson, and Company. (2002). *Introduction to flow cytometry: A learning guide*. Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes.
12. Beem, E., & Segal, M. S. (2013). Evaluation of stability and sensitivity of cell fluorescent labels when used for cell migration. *Journal of fluorescence*, 23(5), 975-987.

13. Besmer, M. D., & Hammes, F. (2016). Short-term microbial dynamics in a drinking water plant treating groundwater with occasional high microbial loads. *Water Research*, 107, 11-18.
14. Besmer, M. D., Hammes, F., Sigrist, J. A., & Ort, C. (2017a). Evaluating monitoring strategies to detect precipitation-induced microbial contamination events in karstic springs used for drinking water. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2229.
15. Besmer, M. D., Sigrist, J. A., Props, R., Buyschaert, B., Mao, G., Boon, N., & Hammes, F. (2017b). Laboratory-scale simulation and real-time tracking of a microbial contamination event and subsequent shock-chlorination in drinking water. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1900.
16. Brown, M. R., Camézuli, S., Davenport, R. J., Petelenz-Kurdziel, E., Øvreås, L., & Curtis, T. P. (2015). Flow cytometric quantification of viruses in activated sludge. *Water Research*, 68, 414-422.
17. Brussaard, C. P., Payet, J. P., Winter, C., & Weinbauer, M. G. (2010). Quantification of aquatic viruses by flow cytometry. *Manual of Aquatic Viral Ecology*, 11, 102-109.
18. Bunthof C.J. Abee T. (2002). Development of a Flow Cytometric Method to Analyze Subpopulations of Bacteria in Probiotic Products and Dairy Starters. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2934–2942.
19. Bunthof, C. J., Bloemen, K., Breeuwer, P., Rombouts, F. M., & Abee, T. (2001). Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2326-2335.
20. Calabrese, F., Voloshynovska, I., Musat, F., Thullner, M., Schlömann, M., Richnow, H. H., Lambert, J., Muller, S., Wick, L. Y., Musat, N., & Stryhanyuk, H. (2019). Quantitation and comparison of phenotypic heterogeneity among single cells of monoclonal microbial populations. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2814.
21. Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., Thiele, J., & Vardiman, J. W. (2008). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. S. H. Swerdlow (Ed.). Lyon: International agency for research on cancer.
22. Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281-370.
23. Clark, G., Stockinger, H., Balderas, R., van Zelm, M. C., Zola, H., Hart, D., & Engel, P. (2016). Nomenclature of CD molecules from the tenth human leucocyte differentiation antigen workshop. *Clinical & Translational Immunology*, 5(1), e57.

24. Coggins, L. X., Larma, I., Hinchliffe, A., Props, R., & Ghadouani, A. (2020). Flow cytometry for rapid characterisation of microbial community dynamics in waste stabilisation ponds. *Water Research*, 169, 115243.
25. Comas-Riu, J., & Rius, N. (2009). Flow cytometry applications in the food industry. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(8), 999-1011.
26. Corpuz, M. V. A., Buonerba, A., Vigliotta, G., Zarra, T., Ballesteros Jr, F., Campiglia, P., Belgiorno, V., Korshin, G., & Naddeo, V. (2020). Viruses in wastewater: occurrence, abundance, and detection methods. *Science of the Total Environment*, 745, 140910.
27. Corry, J. E., Atabay, H. I., Forsythe, S. J., & Mansfield, L. P. (2003). Culture media for the isolation of *Campylobacters*, *Helicobacters* and *Arcobacters*. In *Progress in Industrial Microbiology* (Vol. 37, pp. 271-316). Elsevier.
28. Cronin, U. P., & Wilkinson, M. G. (2007). The use of flow cytometry to study the germination of *Bacillus cereus* endospores. *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 71(3), 143-153.
29. Cronin, U. P., & Wilkinson, M. G. (2008). *Bacillus cereus* endospores exhibit a heterogeneous response to heat treatment and low-temperature storage. *Food Microbiology*, 25(2), 235-243.
30. Crowley, L. C., Scott, A. P., Marfell, B. J., Boughaba, J. A., Chojnowski, G., & Waterhouse, N. J. (2016). Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(7), pdb-prot087163.
31. Cunliffe, J., Derbyshire, N., Keeler, S., & Coldwell, R. (2009). An approach to the validation of flow cytometry methods. *Pharmaceutical Research*, 26(12), 2551-2557.
32. Dominical, V., Samsel, L., & McCoy Jr, J. P. (2017). Masks in imaging flow cytometry. *Methods*, 112, 9-17.
33. Donnelly, C. W., & Baigent, G. J. (1986). Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(4), 689-695.
34. Doolan, I. A., Wilkinson, M. G., & Hickey, D. K. (2015). The Application of Flow Cytometry to the Study of Lactic Acid Bacteria Fermentations. *Flow Cytometry in Microbiology Technology and Applications*. Caister Academic Press, UK. Ed. MG Wilkinson.
35. Dwivedi, H. P., & Jaykus, L. A. (2011). Detection of pathogens in foods: the current state-of-the-art and future directions. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(1), 40-63.
36. Eaton A.D., Clesceri L.S., Greenberg A.E., (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Heterotrophic Plate Count, 21st ed., 9-37.

37. Egli, T. (2010). Neue Methoden für die Wasseranalytik. GWA: Gas, Wasser, Abwasser, 90(4), 315.
38. Egli, T., & Kötzsch, S. (2015). Flow cytometry for rapid microbiological analysis of drinking water: from science to practice, an unfinished story. Flow Cytometry in Microbiology Technology and Applications. Caister Academic Press, UK. Ed. MG Wilkinson.
39. Federal Office of Public Health. (2012). Method 333.1: Determining the Total Cell Count and Ratios of High and Low Nucleic Acid Content Cells in Freshwater Using Flow Cytometry. Bern, Switzerland.
40. Fouchet, P., Jayat, C., Héchard, Y., Ratinaud, M. H., & Frelat, G. (1993). Recent advances of flow cytometry in fundamental and applied microbiology. Biology of the Cell, 78(1-2), 95-109.
41. Gall, Y. L., Brown, S., Marie, D., Mejjad, M., & Kloareg, B. (1993). Quantification of nuclear DNA and GC content in marine macroalgae by flow cytometry of isolated nuclei. Protoplasma, 173(3), 123-132.
42. Gaudin, R., & Barteneva, N. S. (2015). Sorting of small infectious virus particles by flow virometry reveals distinct infectivity profiles. Nature Communications, 6(1), 1-11.
43. Givan, A. L. (2001). Flow Cytometry: first principles. John Wiley & Sons.
44. Greenwood, D., Slack, R., Peutherer, J., & Barer, M. (2010). Ιατρική Μικροβιολογία. 2, 12-21. Εκδόσεις ΠΧ Πασχαλίδης.
45. Haberkorn, I., Buchmann, L., Hiestand, M., & Mathys, A. (2019). Continuous nanosecond pulsed electric field treatments foster the upstream performance of *Chlorella vulgaris*-based biorefinery concepts. Bioresource Technology, 293, 122029.
46. Haberkorn, I., Off, C. L., Besmer, M. D., Buchmann, L., & Mathys, A. (2021). Automated online flow cytometry advances microalgal ecosystem management as in situ, high-temporal resolution monitoring tool. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 9, 642671.
47. Hammes, F., & Egli, T. (2010). Cytometric methods for measuring bacteria in water: advantages, pitfalls, and applications. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 397(3), 1083-1095.
48. 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 Research, 42(1-2), 269-277.
49. Han, Y., Gu, Y., Zhang, A. C., & Lo, Y. H. (2016). Imaging technologies for flow cytometry. Lab on a Chip, 16(24), 4639-4647.

50. Harkins, K. R., & Harrigan, K. (2004). Labeling of bacterial pathogens for flow cytometric detection and enumeration. *Current Protocols in Cytometry*, 29(1), 11-17.
51. Hauser-Urfer, I., Leemann, U., & Ruch, F. (1982). Cytofluorometric determination of the DNA base content in human chromosomes with quinacrine mustard, Hoechst 33' 258, DAPI, and mithramycin. *Experimental Cell Research*, 142(2), 455-459.
52. Heinrichs, M. E., De Corte, D., Engelen, B., & Pan, D. (2021). An advanced protocol for the quantification of marine sediment viruses via flow cytometry. *Viruses*, 13(1), 102.
53. Herzenberg, L. A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O., Roederer, M., & Herzenberg, L. A. (2002). The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clinical chemistry*, 48(10), 1819-1827.
54. Hibi, K., Abe, A., Ohashi, E., Mitsubayashi, K., Ushio, H., Hayashi, T., Ren, H., & Endo, H. (2006). Combination of immunomagnetic separation with flow cytometry for detection of *Listeria monocytogenes*. *Analytica Chimica Acta*, 573, 158-163.
55. Hiom, S., Denyer, S., Talbot, C., Maillard, J. Y., Spark, P., & Smith, J. (2013). A preliminary investigation into the ability of three rapid microbiological methods to detect microorganisms in hospital intravenous pharmaceuticals. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 67(4), 376-386.
56. Houtz, B., Trotter, J., & Sasaki, D. (2004). Tips on cell preparation for flow cytometric analysis and sorting. *BD FACService Technotes*, 4, 9.
57. Hyka, P., Lickova, S., Přibyl, P., Melzoch, K., & Kovar, K. (2013). Flow cytometry for the development of biotechnological processes with microalgae. *Biotechnology Advances*, 31(1), 2-16.
58. Ibrahim, S. F., & Engh, G. V. D. (2007). Flow cytometry and cell sorting. *Cell Separation*, 19-39.
59. Ingram, M., Cleary, T. J., Price, B. J., Price III, R. L., & Castro, A. (1982). Rapid detection of *Legionella pneumophila* by flow cytometry. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 3(2), 134-137.
60. Kelemen, G. H., Viollier, P. H., Tenor, J., Marri, L., Buttner, M. J., & Thompson, C. J. (2001). A connection between stress and development in the multicellular prokaryote *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Molecular Microbiology*, 40(4), 804-814.
61. Kennedy, D., & Wilkinson, M. G. (2017). Application of flow cytometry to the detection of pathogenic bacteria. *Current Issues in Molecular Biology*, 23(1), 21-38.
62. Kennedy, D., Cronin, U. P., & Wilkinson, M. G. (2011). Responses of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* to simulated food processing treatments,

- determined using fluorescence-activated cell sorting and plate counting. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(13), 4657-4668.
63. Kirschner, A. K. (2016). Determination of viable legionellae in engineered water systems: Do we find what we are looking for? *Water Research*, 93, 276-288.
64. Koch, C., Harnisch, F., Schröder, U., & Müller, S. (2014). Cytometric fingerprints: evaluation of new tools for analyzing microbial community dynamics. *Frontiers in Microbiology*, 5, 273.
65. Laplace-Builhé, C., Hahne, K., Hunger, W., Tirilly, Y., & Drocourt, J. L. (1993). Application of flow cytometry to rapid microbial analysis in food and drinks industries. *Biology of the Cell*, 78(1-2), 123-128.
66. Lebaron, P., Parthuisot, N., & Catala, P. (1998). Comparison of blue nucleic acid dyes for flow cytometric enumeration of bacteria in aquatic systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5), 1725-1730.
67. Léonard, L., Bouarab Chibane, L., Ouled Bouhedda, B., Degraeve, P., & Oulahal, N. (2016). Recent advances on multi-parameter flow cytometry to characterize antimicrobial treatments. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1225, 1-16.
68. Li, D., He, M., & Jiang, S. C. (2010). Detection of infectious adenoviruses in environmental waters by fluorescence-activated cell sorting assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), 1442-1448.
69. Lindivat, M., Bratbak, G., Larsen, A., Hess-Erga, O. K., & Hoell, I. A. (2021). Flow Cytometric Analysis of Bacterial Protein Synthesis: Monitoring Vitality After Water Treatment. *Frontiers in Microbiology*, 3771.
70. López-Amorós, R., Castel, S., Comas-Riu, J., & Vives-Rego, J. (1997). Assessment of *E. coli* and *Salmonella* viability and starvation by confocal laser microscopy and flow cytometry using rhodamine 123, DiBAC4 (3), propidium iodide, and CTC. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 29(4), 298-305.
71. López-Amorós, R., Comas, J., & Vives-Rego, J. (1995). Flow cytometric assessment of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* starvation-survival in seawater using rhodamine 123, propidium iodide, and oxonol. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7), 2521-2526.
72. Ma, L., Mao, G., Liu, J., Yu, H., Gao, G., & Wang, Y. (2013). Rapid quantification of bacteria and viruses in influent, settled water, activated sludge and effluent from a wastewater treatment plant using flow cytometry. *Water Science and Technology*, 68(8), 1763-1769.

73. Madigan M.T., J.M. Martinko, J. Parker. (2005). Βιολογία των Μικροοργανισμών (Τόμος Ι). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
74. Maisnier-Patin, S., Malandrin, L., Birkeland, N. K., & Bernander, R. (2002). Chromosome replication patterns in the hyperthermophilic euryarchaea *Archaeoglobus fulgidus* and *Methanocaldococcus (Methanococcus) jannaschii*. *Molecular Microbiology*, 45(5), 1443-1450.
75. Majerník, A. I., Lundgren, M., McDermott, P., Bernander, R., & Chong, J. P. (2005). DNA content and nucleoid distribution in *Methanothermobacter thermoautotrophicus*. *Journal of Bacteriology*, 187(5), 1856-1858.
76. Manickum, T. (2020). Total Colony Counts (TCC) By Flow Cytometry (FCM) Should Replace the Heterotrophic Plate Count (HPC) Test for Bacteriological Enumeration of Water-Some Recent Developments in Flow Cytometry: A Review., *Hydrology: Current Research*,11(3).
77. McClelland, R. G., & Pinder, A. C. (1994). Detection of low levels of specific *Salmonella* species by fluorescent antibodies and flow cytometry. *Journal of Applied Bacteriology*, 77(4), 440-447.
78. Michelutti, L., Bulfoni, M., & Nencioni, E. (2020). A novel pharmaceutical approach for the analytical validation of probiotic bacterial count by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods*, 170, 105834.
79. Mohapatra, S., Menon, N. G., Mohapatra, G., Pisharody, L., Pattnaik, A., Menon, N. G., Bhukya, P. L., Srivastava, M., Singh, M., Barman, M. K., Gin, K. Y. H., & Mukherji, S. (2021). The novel *SARS-CoV-2* pandemic: Possible environmental transmission, detection, persistence and fate during wastewater and water treatment. *Science of the Total Environment*, 765, 142746.
80. Müller, S. (2007). Modes of cytometric bacterial DNA pattern: a tool for pursuing growth. *Cell Proliferation*, 40(5), 621-639.
81. Müller, S., & Nebe-von-Caron, G. (2010). Functional single-cell analyses: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 554-587.
82. Müller, S., Kiesel, B., & Berthe-Corti, L. (2001). *Muricauda ruestringensis* has an asymmetric cell cycle. *Acta Biotechnologica*, 21(4), 343-357.
83. Narayana, S., Christensen, L., Skov, T., & van den Berg, F. (2019). Mid-infrared spectroscopy and multivariate analysis to characterize *Lactobacillus acidophilus* fermentation processes. *Applied Spectroscopy*, 73(9), 1087-1098.

84. Nebe-von-Caron, G., Stephens, P. J., Hewitt, C. J., Powell, J. R., & Badley, R. A. (2000). Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Microbiological Methods*, 42(1), 97-114.
85. Orfao, A., Lopez, A., Flores, J., Almeida, J., Vidriales, B., Perez, J., Kneba, J., Macintyre, M., Parreira, E., Richards, A., & Van Dongen, J. J. M. (2006). Diagnosis of hematological malignancies: new applications for flow cytometry. *Hematology*, 2, 6-13.
86. Ormerod, M. G. (2008). *Flow Cytometry: A Basic Introduction*. Retrieved November 21, 2021, from <http://flowbook.denovosoftware.com>
87. Paulton, R. J. (1991). The bacterial growth curve. *Journal of Biological Education*, 25(2), 92-94.
88. Penders, J., Fiers, T., Dhondt, A. M., Claeys, G., & Delanghe, J. R. (2004). Automated flow cytometry analysis of peritoneal dialysis fluid. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 19(2), 463-468.
89. Phinney, D. A., & Cucci, T. L. (1989). Flow cytometry and phytoplankton. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 10(5), 511-521.
90. Prest, E. I., Hammes, F., Kötzsch, S., Van Loosdrecht, M. C. M., & Vrouwenvelder, J. S. (2013). Monitoring microbiological changes in drinking water systems using a fast and reproducible flow cytometric method. *Water Research*, 47(19), 7131-7142.
91. Props, R., Monsieurs, P., Mysara, M., Clement, L., & Boon, N. (2016). Measuring the biodiversity of microbial communities by flow cytometry. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11), 1376-1385.
92. Props, R., Rubbens, P., Besmer, M., Buyschaert, B., Sigrist, J., Weilenmann, H., Waegeman, W., Boon, N., & Hammes, F. (2018). Detection of microbial disturbances in a drinking water microbial community through continuous acquisition and advanced analysis of flow cytometry data. *Water Research*, 145, 73-82.
93. Pype, M. L., Lawrence, M. G., Keller, J., & Gernjak, W. (2016). Reverse osmosis integrity monitoring in water reuse: The challenge to verify virus removal—A review. *Water Research*, 98, 384-395.
94. Rogers, W. T., & Holyst, H. A. (2009). FlowFP: A bioconductor package for fingerprinting flow cytometric data. *Advances in bioinformatics*.
95. Roudnew, B., Lavery, T. J., Seymour, J. R., Jeffries, T. C., & Mitchell, J. G. (2014). Variability in bacteria and virus-like particle abundances during purging of unconfined aquifers. *Groundwater*, 52(1), 118-124.

96. Roudnew, B., Lavery, T. J., Seymour, J. R., Smith, R. J., & Mitchell, J. G. (2013). Spatially varying complexity of bacterial and virus-like particle communities within an aquifer system. *Aquatic Microbial Ecology*, 68(3), 259-266.
97. Roudnew, B., Seymour, J. R., Jeffries, T. C., Lavery, T. J., Smith, R. J., & Mitchell, J. G. (2012). Bacterial and virus-like particle abundances in purged and unpurged groundwater depth profiles. *Groundwater Monitoring & Remediation*, 32(4), 72-77.
98. Sadler, M. C., Senouillet, J., Kuenzi, S., Grasso, L., & Watson, D. C. (2020). Computational surveillance of microbial water quality with online flow cytometry. *Frontiers in Water*, 2, 586969.
99. Safford, H. R., & Bischel, H. N. (2019). Flow cytometry applications in water treatment, distribution, and reuse: A review. *Water Research*, 151, 110-133.
100. Salcedo-Sora, J. E., Jindal, S., O'Hagan, S., & Kell, D. B. (2021). A palette of fluorophores that are differentially accumulated by wild-type and mutant strains of *Escherichia coli*: surrogate ligands for profiling bacterial membrane transporters. *Microbiology*, 167(2).
101. Shapiro, H. M. (2003). *Practical flow cytometry*. John Wiley & Sons, 1-60.
102. Shapiro, H. M., & Telford, W. G. (2009). Lasers for flow cytometry. *Current Protocols in Cytometry*, 49(1), 1-9.
103. Shapiro, H. M., & Telford, W. G. (2018). Lasers for flow cytometry: current and future trends. *Current Protocols in Cytometry*, 83(1), 1-9.
104. Sheehan, A., O'loughlin, C., O'Cuinn, G., FitzGerald, R. J., & Wilkinson, M. G. (2005). Cheddar cheese cooking temperature induces differential lactococcal cell permeabilization and autolytic responses as detected by flow cytometry: implications for intracellular enzyme accessibility. *Journal of Applied Microbiology*, 99(5), 1007-1018.
105. Song, A. A. L., In, L. L., Lim, S. H. E., & Rahim, R. A. (2017). A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 1-15.
106. Soni, A., Oey, I., Silcock, P., & Bremer, P. (2016). *Bacillus* spores in the food industry: A review on resistance and response to novel inactivation technologies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 1139-1148.
107. Sousa Guedes, J. P. D., & Souza, E. L. D. (2021). Enumeration of Viable Cells of Bacteria in Food and Water with Flow Cytometry. In *Detection and Enumeration of Bacteria, Yeast, Viruses, and Protozoan in Foods and Freshwater* (pp. 9-16). Humana, New York, NY.
108. Subires, A., Yuste, J., & Capellas, M. (2014). Flow cytometry immunodetection and membrane integrity assessment of *Escherichia coli* O157: H7 in ready-to-eat pasta salad during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*, 168, 47-56.

109. Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G. A., Zelenetz, A. D. & Jaffe, E. S. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 127(20), 2375-2390.
110. Tebaldi, N. D., Peters, J., Souza, R. M., Chitarra, L. G., van der Zouwen, P., Bergervoet, J., & van der Wolf, J. (2010). Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in bean seeds by flow cytometry, immunostaining and direct viable counting. *Tropical Plant Pathology*, 35, 213-222.
111. Tran, H. N., Le, G. T., Nguyen, D. T., Juang, R. S., Rinklebe, J., Bhatnagar, A., Lima, E. C., Iqbal, H. M. N., Sarmah, A. K., & Chao, H. P. (2021). SARS-CoV-2 coronavirus in water and wastewater: A critical review about presence and concern. *Environmental Research*, 193, 110265.
112. Valizadeh, A., Mikaeili, H., Samiei, M., Farkhani, S. M., Zarghami, N., Akbarzadeh, A., & Davaran, S. (2012). Quantum dots: synthesis, bioapplications, and toxicity. *Nanoscale Research Letters*, 7(1), 1-14.
113. Vanhauteghem, D., Janssens, G. P. J., Lauwaerts, A., Sys, S., Boyen, F., Kalmar, I. D., & Meyer, E. (2011). Glycine and its N-methylated analogues cause pH-dependent membrane damage to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Amino Acids*, 43(1), 245-253.
114. Varughese, E. A., Brinkman, N. E., Anneken, E. M., Cashdollar, J. L., Fout, G. S., Furlong, E. T., Kolpin, D. W., Glassmeyer, S. T., & Keely, S. P. (2018). Estimating virus occurrence using Bayesian modeling in multiple drinking water systems of the United States. *Science of the Total Environment*, 619, 1330-1339.
115. Vital, M., Hammes, F., Berney, T., & Egli, M. (2007). Assessing the feasibility of total virus detection with flow cytometry in drinking water. *Deliverable*, 335, 1-6.
116. Vives-Rego, J., Lebaron, P., & Nebe-von Caron, G. (2000). Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 429-448.
117. Vogt, R. F., Schwartz, A., Marti, G. E., Whitfield, W. E., & Omar Henderson, L. (2001). Quantitative fluorescence cytometry. In *Hematologic Malignancies* (pp. 255-273). Humana Press.
118. Wang, Y., Hammes, F., De Roy, K., Verstraete, W., & Boon, N. (2010). Past, present, and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *Trends in Biotechnology*, 28(8), 416-424.

119. Weinstein M.P. (2007). Diagnostic technologies in clinical microbiology, In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J., Landry M.L., Pfaller M.A. Manual of Clinical Microbiology, 9th ed. ASM Press, Washington, D.C., Vol. 1, 173-270.
120. Whittle, E. E., Legood, S. W., Alav, I., Dulyayangkul, P., Overton, T. W., & Blair, J. M. (2019). Flow cytometric analysis of efflux by dye accumulation. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2319.
121. Wiacek, C., Müller, S., & Benndorf, D. (2006). A cytomic approach reveals population heterogeneity of *Cupriavidus necator* in response to harmful phenol concentrations. *Proteomics*, 6(22), 5983-5994.
122. Wigginton, K. R., Pecson, B. M., Sigstam, T., Bosshard, F., & Kohn, T. (2012). Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environmental Science & Technology*, 46(21), 12069-12078.
123. Wilhartitz, I. C., Kirschner, A. K., Brussaard, C. P., Fischer, U. R., Wieltchnig, C., Stadler, H., & Farnleitner, A. H. (2013). Dynamics of natural prokaryotes, viruses, and heterotrophic nanoflagellates in alpine karstic groundwater. *Microbiologyopen*, 2(4), 633-643.
124. Wilkes, J. G., Tucker, R. K., Montgomery, J. A., Cooper, W. M., Sutherland, J. B., & Buzatu, D. A. (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. *Food Microbiology*, 30(1), 281-288.
125. Wilkinson, M. G. (2016). Flow cytometry in food microbiology: Challenges, opportunities, and progress to date. *Tecnicas de Laboratorio*, 417, 722-728.
126. Wilkinson, M. G., Guinee, T. P., O'Callaghan, D. M., & Fox, P. F. (1994). Autolysis and proteolysis in different strains of starter bacteria during Cheddar cheese ripening. *Journal of Dairy Research*, 61(2), 249-262.
127. Williams, A. J., Cooper, W. M., Summage-West, C. V., Sims, L. M., Woodruff, R., Christman, J., Moskal, T. J., Ramsaroop, S., Sutherland, J. B., Alusta, P., Wilkes, J. G., & Buzatu, D. A. (2015). Level 2 validation of a flow cytometric method for detection of *Escherichia coli* O157: H7 in raw spinach. *International Journal of Food Microbiology*, 215, 1-6.
128. Xiao, X., Han, Z. Y., Chen, Y. X., Liang, X. Q., Li, H., & Qian, Y. C. (2011). Optimization of FDA-PI method using flow cytometry to measure metabolic activity of the cyanobacteria, *Microcystis aeruginosa*. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 36(9-11), 424-429.

129. Yanachkina, P., McCarthy, C., Guinee, T., & Wilkinson, M. (2016). Effect of varying the salt and fat content in Cheddar cheese on aspects of the performance of a commercial starter culture preparation during ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 224, 7-15.
130. Zand, E., Froehling, A., Schoenher, C., Zunabovic-Pichler, M., Schlueter, O., & Jaeger, H. (2021). Potential of Flow Cytometric Approaches for Rapid Microbial Detection and Characterization in the Food Industry—A Review. *Foods*, 10(12), 3112.