

# Impiego dell'elettroforesi capillare per la caratterizzazione di microrganismi: l'analisi di ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*

Fabiana Crispo<sup>a</sup>, Angela Capece<sup>b</sup>, Rosaria Vaccaro<sup>a</sup>, Rosanna Ciriello<sup>a</sup>, Antonio Guerrieri<sup>a</sup>, Patrizia Romano<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Chimica, Università degli Studi della Basilicata, via dell'Ateneo Lucano 10, 85100 Potenza

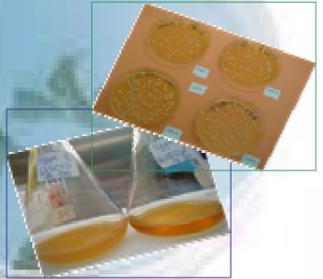
(antonio.guerrieri@unibas.it)

<sup>b</sup> Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-forestali, Università degli Studi della Basilicata, via dell'Ateneo Lucano 10, 85100 Potenza

(patrizia.romano@unibas.it)

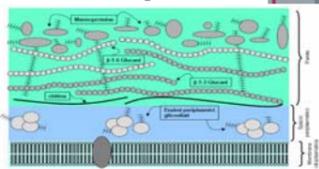
## INTRODUZIONE

Moltissimi microrganismi, quali lieviti e batteri, sono ampiamente utilizzati nel campo della ricerca e nell'industria, ma ad oggi le tecniche di routine utilizzate in microbiologia per la caratterizzazione, l'identificazione e la quantificazione di specie microbiche sono per lo più elaborate, costose e richiedono tempi di analisi relativamente lunghi. L'**elettroforesi capillare**, invece, appare alquanto promettente per analisi microbiologiche in quanto consente di separare, in modo rapido e con elevata efficienza, non solo molecole ma anche particelle colloidali e cellule [1-4].



Le cellule di *Saccharomyces cerevisiae* sono dotate di una parete esterna, i cui costituenti principali sono glucosano e mannano, alle cui catene sono associate varie proteine, e in piccole quantità chitina, lipidi e fosfolipidi. La ionizzazione dei gruppi carbossilati e dei gruppi amminici delle mannoproteine, in particolari condizioni ambientali, e la presenza di gruppi fosfato nella parete cellulare, conferiscono una carica netta superficiale alle cellule [2] che consente l'impiego dell'elettroforesi capillare come metodologia separativa in campo microbiologico.

pI *S.cerevisiae*  
5.2-6.4 [5]



## CONDIZIONI SPERIMENTALI

### Materiali

Sono stati impiegati un ceppo di laboratorio di *S. cerevisiae* denominato TYPE 2 (Sigma Aldrich) e un ceppo selvaggio della stessa specie, denominato 4LBI3, isolato da uve aglianico della zona del Vulture-Melfese (Basilicata). Il lievito è stato inoculato in un terreno liquido YPD (1% estratto di lievito, 2% peptone, 2% glucosio) e incubato in termostato a 26° C. Come tampone di corsa è stato utilizzato il buffer TBE (Tris 4.5 mM, acido boricico 4.5 mM, EDTA 0.1 mM, diluito 1:8 [4]) a pH 8.4, la cui viscosità è stata modificata aggiungendo il polimero *polietilene ossido* (PEO 0.0125%) [6].

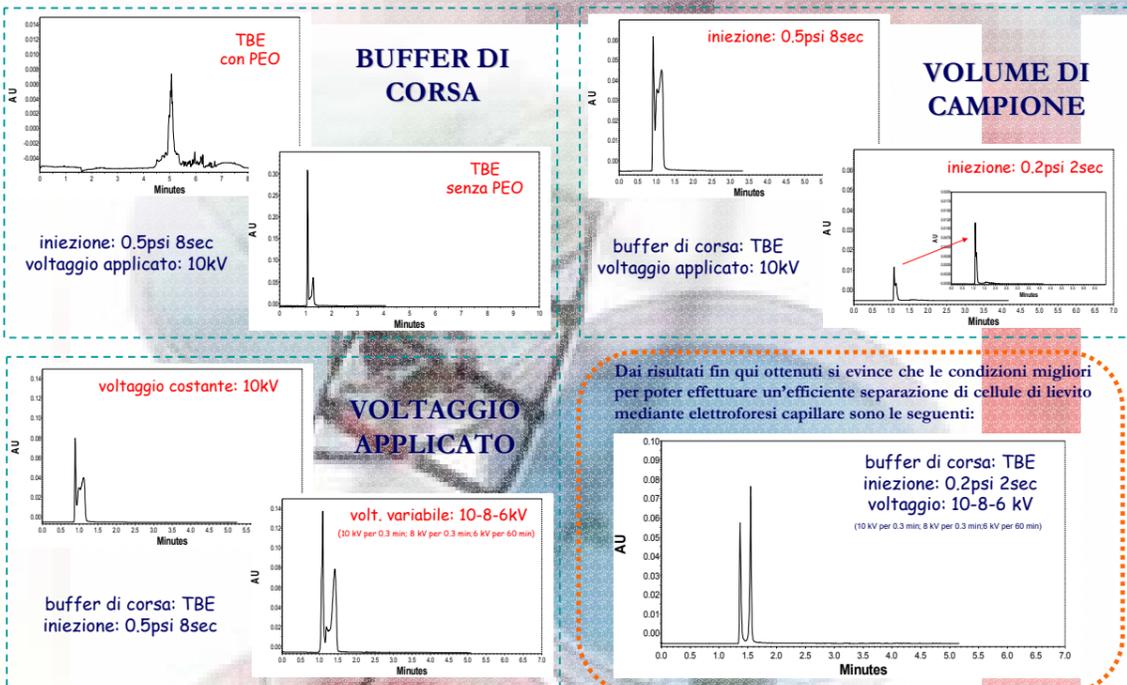
### Strumentazione

Le analisi elettroforetiche sono state eseguite con lo strumento Capillary Electrophoresis System della BECKMAN COULTER, gestito dal software 32 Karat, e sono state condotte in un capillare di silice fusa con un diametro interno di 100 µm, una lunghezza totale di 31,5 cm e una lunghezza effettiva di 21 cm. È stato impiegato un rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi (DIODE ARRAY DETECTOR) P/ACE MDQ, per la rivelazione on-line del campione alla lunghezza d'onda di 214 nm. Il campione è introdotto nel capillare per iniezione idrodinamica.



## OTTIMIZZAZIONE delle CONDIZIONI ELETTROFORETICHE di SEPARAZIONE

Per poter separare in modo accurato *Saccharomyces cerevisiae* mediante elettroforesi capillare, è stato necessario innanzitutto ottimizzare una serie di parametri elettroforetici quali la composizione del tampone di corsa, il volume di campione da introdurre nel capillare e l'intensità del campo elettrico da applicare durante la separazione elettroforetica. A tale scopo sono state condotte una serie di analisi variando la viscosità del buffer di corsa mediante l'aggiunta di PEO. Modificando la pressione applicata al capillare e il tempo di applicazione di tale pressione, è stato possibile modulare, invece, il volume di campione introdotto nel capillare per valutare il volume ottimale di campionamento. Infine sono state eseguite corse elettroforetiche a diversi voltaggi, sia costanti sia variabili nel tempo, per migliorare la risoluzione della separazione.

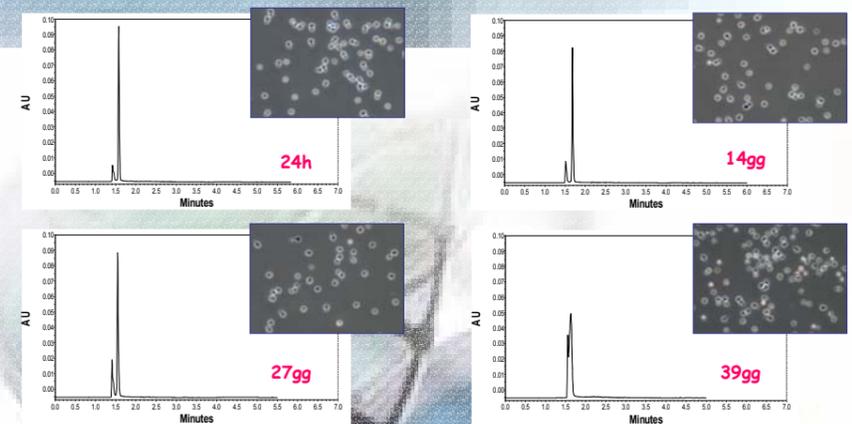


Dai risultati fin qui ottenuti si evince che le condizioni migliori per poter effettuare un'efficiente separazione di cellule di lievito mediante elettroforesi capillare sono le seguenti:

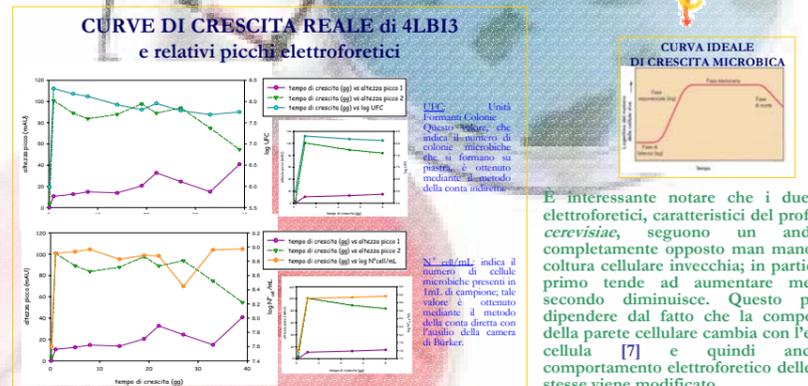
buffer di corsa: TBE  
iniezione: 0.2psi 2sec  
voltage: 10-8-6 kV  
(10 kV per 0.3 min; 8 kV per 0.3 min; 6 kV per 60 min)

## CRESCITA MICROBICA

Dagli studi effettuati su diversi ceppi di *S.cerevisiae*, è emersa un'interessante e innovativa applicazione dell'elettroforesi capillare. Oltre a rappresentare una valida alternativa alle tradizionali tecniche per l'identificazione dei microrganismi, questa particolare metodica elettroforetica consente anche di monitorare l'andamento della crescita di una popolazione microbica. Infatti i profili elettroforetici, ottenuti con campioni analizzati a vari tempi di crescita, cambiano notevolmente con la fase di crescita della popolazione cellulare in esame.



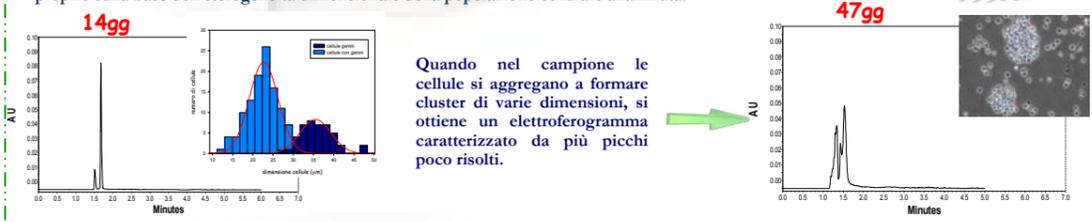
Le altezze dei picchi elettroforetici variano man mano che la coltura cellulare "invecchia". Questo fenomeno si può spiegare se si considera che nel campione esaminato c'è una certa eterogeneità cellulare: cellule vive, cellule morte, gemme, etc. Si può quindi pensare che il profilo elettroforetico possa indicare in quale fase della crescita microbica si trova la popolazione cellulare oggetto d'esame. Riportando in grafico le altezze dei picchi elettroforetici in funzione del tempo di crescita, si ottiene una curva molto simile alla curva di crescita ideale.



È interessante notare che i due picchi elettroforetici, caratteristici del profilo di *S. cerevisiae*, seguono un andamento completamente opposto man mano che la coltura cellulare invecchia; in particolare il primo tende ad aumentare mentre il secondo diminuisce. Questo potrebbe dipendere dal fatto che la composizione della parete cellulare cambia con l'età della cellula [7] e quindi anche il comportamento elettroforetico delle cellule stesse viene modificato.

## ETEROGENEITÀ DIMENSIONALE DEL CAMPIONE

Per ciascun campione esaminato, sono state acquisite delle immagini al microscopio ottico e, tramite un particolare software, è stato possibile misurare le dimensioni delle cellule visualizzate nelle immagini acquisite. Per ciascun campione esaminato sono stati realizzati gli istogrammi relativi alla distribuzione delle dimensioni cellulari, che sono stati poi interpolati con curve gaussiane. È sorprendente notare la significativa somiglianza tra i profili elettroforetici e i grafici della distribuzione dimensionale delle cellule; la ricorrente presenza di più picchi elettroforetici nei grafici potrebbe quindi essere spiegata proprio sulla base dell'eterogeneità dimensionale della popolazione cellulare analizzata.



Quando nel campione le cellule si aggregano a formare cluster di varie dimensioni, si ottiene un elettroferogramma caratterizzato da più picchi poco risolti.

## CONCLUSIONI

I risultati fino ad ora ottenuti hanno dimostrato la validità dell'elettroforesi capillare per la separazione e caratterizzazione di microrganismi, in particolare lieviti, e la sua utilità come mezzo di ricerca e valutazione di alcuni parametri importanti, quali la dinamica di crescita della popolazione cellulare oggetto di studio. La tecnica è risultata essere semplice, rapida ed efficace nel separare cellule di ceppi differenti di *Saccharomyces cerevisiae*: bastano pochi minuti per ottenere i profili elettroforetici caratteristici dei saccharomyceti, il campione non deve subire particolari pretrattamenti, se non un ciclo di lavaggio con il tampone di corsa per eliminare eventuali tracce di interferenti, e ciò riduce notevolmente i costi e i tempi di analisi. Poter monitorare la crescita di un microrganismo è un'opportunità di grande interesse per una serie di motivi. Innanzitutto è possibile conoscere le caratteristiche adattative di un particolare microrganismo, ossia la sua capacità di crescere su particolari terreni (selettivi, complessi, etc), e valutarne di conseguenza le potenzialità in particolari condizioni ambientali. In secondo luogo, conoscere in modo accurato in quale fase della crescita si trova una popolazione cellulare, consente di operare nelle migliori condizioni possibili di analisi, riducendo tempi e costi e incrementando le rese e quindi i profitti. La ricerca in questo campo potrebbe consentire, in futuro, di utilizzare l'elettroforesi capillare per rintracciare e quantificare anche altre specie microbiche in matrici biologiche o per costruire veri e propri modelli di crescita di differenti microrganismi da mettere a disposizione per gruppi di ricerca e aziende al fine di facilitarne il lavoro.

### BIBLIOGRAFIA

- Radko S.P., Chrambach A., *Electrophoresis*, 23, 1957 (2002).
- Rodriguez M.A., Armstrong D.W., *J. of Chromatography B*, 800, 7 (2004).
- Armstrong D.W., Girod L.H., Rodriguez M.A., et al., *Analytical Chemistry*, 74, 5523 (2002).
- Armstrong D.W., Schulte G., Schneiderheinze J.M., Wiestenberg D.J., *Analytical Chemistry*, 71, 5465 (1999).
- Shen Y., Berger S.J., and Smith R.D., *Analytical Chemistry*, 72, 4603 (2000).
- Girod M., Armstrong D.W., *Electrophoresis*, 23, 2048 (2002).
- Odani T., Shimma Y., Wang X., Jigami Y., *FEBS Letters*, 420, 186 (2007).