

Citometria de fluxo - Funcionalidade celular on-line em bioprocessos

Teresa Lopes da Silva¹, Alberto Reis¹, Christopher Hewitt² e José Carlos Roseiro¹

¹ Instituto Nacional e Engenharia e Tecnologia Industrial - Departamento de Biotecnologia, Estrada do Paço do Lumiar, 1649-038, Lisboa Codex - Portugal, E-mail: teresa.lopesilva@ineti.pt

² Biochemical Engineering - School of Engineering (Chemical Engineering), The University of Birmingham, Edgbaston, B15 2TT, UK.

Introdução

A necessidade de se obter informação no decorrer dos bioprocessos, tem contribuído para o aparecimento e utilização de uma grande diversidade de técnicas e ferramentas concebidas para o efeito. Os dados obtidos não só têm permitido aprofundar o conhecimento dos processos, como também o desenvolvimento de novas estratégias.

Um citómetro de fluxo é um sistema constituído por 5 elementos: fonte(s) de radiação, (lâmpada de mercúrio ou laser), uma câmara de fluxo, unidades de filtros ópticos para selecção de um intervalo de comprimento de onda específico a partir duma gama espectral mais vasta, fotodíodos ou fotomultiplicadores para a detecção sensível e processamento dos sinais com interesse e uma unidade que processa os dados recolhidos (Figura 1). A suspensão celular é injectada e atravessa a câmara onde se dá a passagem célula a célula através do feixe de radiação, perpendicular ao fluxo. A passagem individual das células é obtida através da focagem hidrodinâmica do fluxo de amostra, sendo esta injectada no seio de uma solução salina (sheath fluid) que também atravessa a câmara (Figura 2).

A diferença de velocidades entre os dois fluidos faz com que o fluxo se processe em regime laminar. A velocidade de escoamento da solução de revestimento (sheath fluid) é superior à da amostra, e ajustável, o que permite reduzir e controlar a espessura da solução da amostra de forma a que possa passar uma célula de cada vez. Desta forma, podem detectar-se até 10000 células (eventos) por segundo.

O feixe de radiação de excitação ao interceptar a partícula (célula) na câmara, sofre dispersão quer na direcção frontal (forward scattering), quer lateral (side scattering). A radiação assim dispersa é detectada directamente por fotodíodos (dispersão frontal) ou pode ser desviada a 90° por lentes, espelhos dicróicos e filtros ópticos e focada em fotomultiplicadores. A combinação destes tipos de radiação dispersa revela informações importantes tais como a dimensão celular, a granularidade/complexidade e a morfologia. Compostos intracelulares com fluorescência intrínseca (ex: clorofilas, ficobiliproteínas, NAD(P)H, etc.) ou passíveis de se ligarem a corantes fluorescentes (fluorocromos), permitem a diferenciação selectiva de subpopulações com base na combinação de vários fluorocromos. A fluorescência destes compostos é também detectada por fotomultiplica-

dores, através de um sistema de lentes, espelhos dicróicos e filtros ópticos.

Os citómetros actuais mais sofisticados podem possuir até 16 detectores em simultâneo (radiação dispersa e fluorescente), o que permite analisar múltiplas possibilidades de características celulares e/ou componentes celulares de um elevado número de células de forma individual (Rieseberg et al., 2001). Esta versatilidade designa-se por análise multiparamétrica.

Côrte-Real et al. (2002) publicaram um extenso artigo de divulgação sobre a citologia analítica (citometria de fluxo) em estudos de leveduras.

A presente publicação abordará a mesma técnica, mas aplicada a estudos de organismos procarióticos (bactérias), em bioprocessos.

1. Detecção e contagem de Microrganismos

Classicamente a viabilidade em bactérias é definida pela capacidade destas formarem colónias em meios de cultura sólidos ou de proliferarem em meios de cultura líquidos. Estes ensaios são morosos, principalmente se o organismo em estudo apresenta uma baixa taxa de crescimento, reflectindo-se em longos tempos de incubação (horas ou dias). Por outro lado, estes sistemas de detecção da viabilidade celular estão dependentes do crescimento das bactérias em ambientes artificiais. Este facto limita a interpretação dos resultados obtidos por estes métodos, uma vez que a escolha de um meio de cultura inadequado pode resultar numa contagem de colónias imprecisa. Além disso, algumas células crescem apenas em condições anaeróbias, outras em condições aeróbias e, outras em ambas as condições. Portanto, a contagem realmente representativa de todos os microrganismos de uma determinada população apenas poderá ser feita através de métodos ópticos.

Devido ao coeficiente de variação (erro estatístico) associado à contagem ($n^{0.5}$), é necessário examinar mais de 100 eventos para se obter um coeficiente de variação inferior a 10%. Com 1000 eventos, este coeficiente atinge 3% e acima de 5000, é inferior a 1%. Por este motivo, e também devido

à rapidez da análise, a Citometria de Fluxo é preferível à Citometria de Imagem, a menos que seja necessária informação espacial das células.

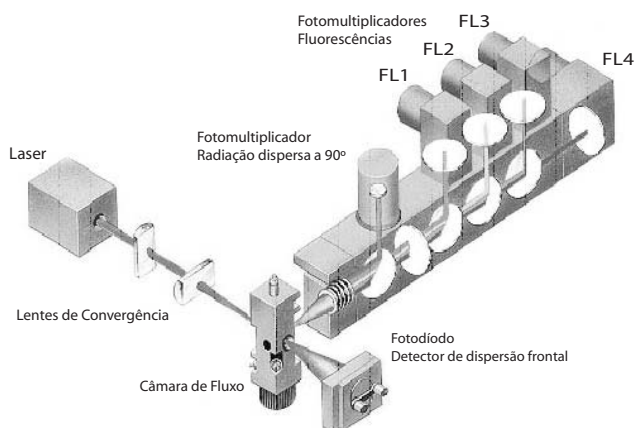


Figura 1 - Configuração de um citômetro de fluxo (BD Biosciences/Enzifarma)

Há vários métodos de contagem de células. O mais utilizado – o método de contagem racionométrico – é baseado na adição de uma determinada concentração de partículas de referência (esferas que emitem fluorescência) à amostra. O volume da amostra analisado pode ser determinado a partir do número de esferas contadas enquanto a amostra está a passar no citômetro; a contagem das células é então determinada dividindo o número de células contadas por este volume. A utilização do método racionométrico permite corrigir tempos mortos e variações de fluxo que eventualmente possam ocorrer num equipamento que funcione com diferenças de pressão no processamento da amostra. A maioria dos fabricantes de citômetros de fluxo produz esferas de contagem de concentração conhecida para o

seu equipamento, pelo que este método, pela sua rapidez e simplicidade, se tornou vastamente utilizado (Application note, BD Biosciences). Acresce que a região delineada pelas esferas nos gráficos de radiação dispersa pode ser utilizada como controlo de alinhamento do laser on-line.

A contagem precisa e rigorosa de células exige suspensões de células individuais, não agregadas. Os agregados de células quando inoculados em meio sólido, dão origem a uma única colónia, ou a um único evento no citómetro. Por exemplo, se uma célula num triplete é positiva para um marcador de morte celular, todo o agregado celular será contabilizado como uma célula morta, mas as outras duas células viáveis irão produzir uma colónia, quando inoculadas em placas de agar. Situações como esta introduzem um erro significativo na contagem de células por citometria de fluxo.

Os agregados de células podem ser dispersos através de métodos químicos ou mecânicos. Os métodos mecânicos têm uma vasta aplicação, mas podem surgir problemas quando aplicados a microrganismos filamentosos ou leveduras. O tratamento com ultra-sons é o método mais adequado na desagregação de células, mas é importante otimizar os níveis de energia a utilizar, bem como os tempos de aplicação desses níveis, e garantir que essas condições sejam aplicadas de forma reprodutível (Nebe-von-Caron et al., 2000).

2. O conceito de viabilidade celular do ponto de vista da Citometria de Fluxo

A informação que se pode retirar dos ensaios de viabilidade¹ sobre os estados fisiológicos das células é limitada a dois níveis extremos de actividade metabólica: o saudável, presente em células viáveis com capacidade para se dividirem, e o correspondente à morte celular. Contudo, a sensibilidade dos microrganismos ao ambiente em que se desenvolvem põe em causa a informação obtida através dos ensaios de viabilidade, pois células que se encontrem num estado fisiológico intermédio entre o metabolicamente activo e a morte celular podem não ser contabilizadas. A vantagem da citometria de fluxo em analisar células individualmente consiste na detecção de uma variedade de estados fisiológicos celulares intermédios que realmente existem numa determinada população, descobrindo assim uma heterogeneidade nunca antes revelada (Nebe-von Caron et al., 1995, 2000). Além disso, os dados obtidos através das técnicas da microbiologia clássica são relativos à cultura como um todo, ou seja, uma amostra representativa da cultura microbiana apresenta um único valor, referente à média dos valores de um determinado parâmetro, de todas as células. Contudo, numa população microbiana, as células não se encontram todas no mesmo estado metabólico e fisiológico, pelo que

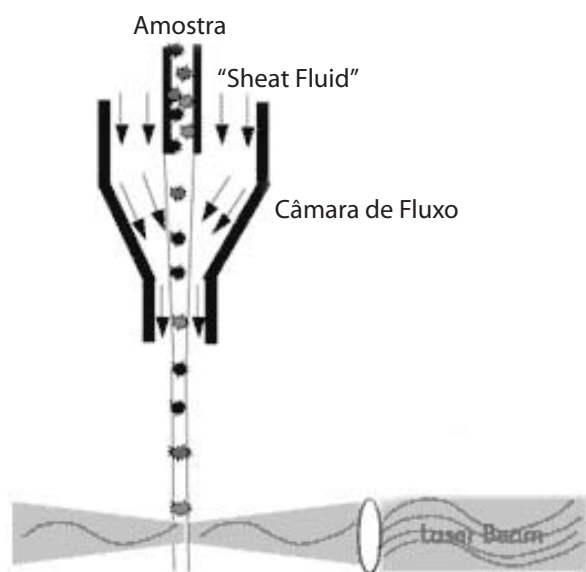


Figura 2 - (Adaptação de slide disponível em Berkeley University/Flow Cytometry Facility, ver endereço da internet nas Referências). Representação esquemática de uma câmara de fluxo. A passagem individual das células (eventos) é conseguida por focagem hidrodinâmica do fluxo de amostra no seio de uma solução salina (sheat fluid).

¹ Diluições seriadas da amostra e posterior inoculação das diluições correspondentes a concentrações adequadas de microrganismo, de modo a obter-se um número de colónias contáveis em placas de Petri.

Tabela 1. Classificação da funcionalidade celular baseada na actividade metabólica da célula (Nebe-von-Caron et al., 2000)

Estado Fisiológico	Propriedade Observada	Fluorocromo
Células Saudáveis	a) Membranas citoplasmáticas intactas polarizadas b) Presença do sistema de transporte activo	Carbocianinas (Corante Lipofílico catiónico) DiO
Células "Vitais"	a) Ausência do sistema de transporte activo que exclui o BE	Brometo de Etídeo (BE)
Células Intactas	a) Ausência de transporte activo que exclui o BE b) Membrana citoplasmática despolarizada	Brometo de Etídeo (BE) Bis-oxonol (BOX) DiO
Células Mortas	a) Ausência do sistema de transporte activo que exclui o BE b) Membrana citoplasmática despolarizada permeabilizada	Brometo de Etídeo (BE) Bis-oxonol (BOX) Iodeto de Propídio

se torna necessário detectar e descrever as várias subpopulações de forma diferenciada. A citometria de fluxo permite a avaliação da heterogeneidade de culturas microbianas, à escala da célula individual, não ignorando outras ferramentas importantes tais como a microscopia de varrimento confocal e a análise de imagem (Porter et al., 1996). Desta forma, dados "discretos" representando subpopulações diferentes podem fornecer uma "imagem" mais detalhada e real da complexidade e heterogeneidade que ocorre num determinado bioprocessos (Porter et al., 1996; Rieseberg et al., 2001). Por estes motivos, esta técnica tem tido cada vez mais impacto na comunidade científica.

A combinação de vários fluorocromos em citometria de fluxo permite a diferenciação de diferentes subpopulações numa determinada população, correspondentes a diferentes níveis de funcionalidade das células. Esta diferenciação levou à introdução do termo "viável, mas não culturável", aplicado a células que não estando metabolicamente activas, também não estão mortas e, evidentemente, não são reveladas através dos ensaios de viabilidade celular. A utilização de critérios do funcionamento celular tais como o potencial da membrana citoplasmática e a integridade da mesma, os quais serão descritos adiante em detalhe, permitem caracterizar estes estados metabólicos (Nebe-von Caron et al. 2000).

As células de bactérias saudáveis são delimitadas por uma membrana citoplasmática que lhes permite comunicar selectivamente com o ambiente que as rodeia. Os sistemas de transporte activo geram um gradiente electroquímico que é fundamental para o perfeito funcionamento de uma célula saudável. O corante fluorescente brometo de etídeo (BE) consegue atravessar uma membrana polarizada, mas só se liga às cadeias do ADN quando a célula não possui um sistema de transporte activo não específico protão/antiporte. Este sistema quando se encontra activo, expulsa este fluorocromo da célula (Midgley, 1987). O iodeto de propídio (IP) também se liga às cadeias do ADN, mas não consegue atravessar uma membrana citoplasmática saudável. Bis-oxonol é um corante lipofílico e aniónico que acumula intracelularmente desde que a célula se encontre despolarizada, como se verá adiante. A utilização da mistura destes corantes permite a diferenciação dos seguintes estados metabólicos funcionais: células saudáveis (com

capacidade para se dividirem), "vitais", intactas e permeabilizadas (Tabela 1). Pensa-se que quando uma célula se encontra sob stresse, alguns dos sistemas de transporte activo são afectados (células "vitais"), seguindo-se a despolarização da membrana citoplasmática (células intactas) e, mais tarde, a sua permeabilização (mortas). Células sem a membrana citoplasmática intacta não conseguem manter ou gerar o gradiente de potencial electroquímico que origina o potencial de membrana.

Além disso, a sua estrutura interna, não estando protegida por uma membrana citoplasmática intacta, encontra-se livremente exposta ao meio ambiente, pelo que estas células acabarão por se decompor. Todas estas etapas conduzem à morte celular (Nebe-von-Caron e Badley, 1995, Hewitt e Nebe-Von-Caron, 2001).

É assim possível diferenciar o estado fisiológico de uma célula individual, para além do clássico e estrito conceito de viabilidade, baseado no funcionamento de alguns sistemas de transporte activo, ou na presença ou ausência da membrana citoplasmática intacta e polarizada. A capacidade das células "vitais" e intactas de se dividirem pode ser demonstrada em separado, através da técnica "cell sorting" (Hewitt et al., 1999a, Nebe-von-Caron et al., 2000).

A citometria de fluxo surge assim como uma técnica consistente e fiável na detecção das verdadeiras percentagens de células viáveis e mortas, numa determinada população de microrganismos e, por vezes, em situações em que a microbiologia clássica não consegue dar qualquer resposta. A detecção de actividade metabólica, reveladora de crescimento associado à divisão celular é de fácil execução, mas pode haver metabolismo mesmo na ausência de crescimento, e que produza efeitos indesejáveis tais como a degradação de alimentos, a acumulação de toxinas ou a transferência de genes. Em caso de lesões, dormência (estado fisiológico intermédio entre a morte e o metabolicamente activo) ou privação extrema de nutrientes nas células, a actividade metabólica pode não ser facilmente detectável. Nestas circunstâncias, é possível determinar a integridade da membrana através da retenção ou exclusão de corantes.

2.1 Estimativa do potencial de membrana

O potencial de membrana é o parâmetro de viabilidade actividade metabólica mais utilizado em citometria de fluxo aplicada a microrganismos. É gerado pela diferença de concentrações de iões no interior e no exterior da membrana citoplasmática e, como componente do gradiente electroquímico, está intimamente relacionado com a formação de ATP na célula (Shapiro, 2000)

Em bactérias metabolicamente activas com membranas citoplasmáticas intactas, a diferença de potencial $\Delta\psi$, situa-se geralmente entre -100 e -200 mV, encontrando-se o interior da membrana carregado negativamente. A despolarização da membrana ocorre quando o valor de $\Delta\psi$ se desloca para valores menos negativos, portanto, mais próximos de zero e, a hiperpolarização ocorre quando a alteração dos valores de $\Delta\psi$ se dá na direcção oposta, ou seja, para valores mais negativos. O valor de $\Delta\psi$ é nulo quando a membrana apresenta danos estruturais tais que permite a livre passagem de iões, o que pode suceder quando a célula sofre, por exemplo, um tratamento térmico, ou um tratamento com antibióticos da família das beta-lactamas, entre outros. O tratamento das células com ionóforos, tais como a cianina carbonil m-clorofenilhidrazona (CCCp), também anula o potencial de membrana, por destruição do gradiente de prótons que existe na membrana citoplasmática (Novo et al., 1999, 2000; Wu et al., 1995), denominado, por isso, protonóforo.

O potencial de membrana pode ser medido directamente através de microelectrodos, mas esta técnica torna-se tanto mais difícil de aplicar quanto menor for o tamanho da célula. A medição de $\Delta\psi$ através da citometria de fluxo é normalmente realizada utilizando corantes lipofílicos de distribuição/partição. Estes, devido à sua natureza lipofílica, conseguem atravessar facilmente a membrana e ali acumulam de acordo com a sua carga. Assim, o gradiente de concentração de um catião lipofílico C^+ através de uma membrana citoplasmática intacta é determinado pela diferença de potencial transmembranar, de acordo com a lei de Nernst:

$$[C^+]_i/[C^+]_o = e^{(-F\Delta\psi/RT)}$$

Onde $[C^+]_i$ corresponde à concentração de iões de C^+ no interior da membrana, $[C^+]_o$ é a concentração de iões de C^+ no exterior da membrana, $\Delta\psi$ o potencial de membrana, R a constante dos gases, T a temperatura em graus Kelvin e F a constante de Faraday. Uma vez atingido o equilíbrio entre as células e o catião do corante, este irá acumular-se no interior da membrana se esta estiver polarizada (ou hiperpolarizada), pois nesta situação o interior daquela encontra-se carregado negativamente, favorecendo a interacção electrostática entre essas cargas negativas e as cargas positivas do corante (Figura 3 a). Quando a célula se encontra despolarizada, ocorre precisamente o mecanismo

inverso: o potencial da membrana diminui (deslocando-se, portanto, para valores menos negativos), levando a que haja uma menor distribuição de cargas negativas no interior da membrana e, nestas circunstâncias, o corante terá tendência para acumular no exterior da membrana, onde haverá uma menor distribuição de cargas positivas (Figura 3 b). Todo este processo ocorre de forma inversa quando se está perante a interacção entre um corante lipofílico aniónico e a membrana, devido às interacções electrostáticas que se estabelecem entre o anião C^- e a distribuição de cargas no interior da membrana.

Estes fluorocromos são denominados sondas de resposta lenta (demoram entre poucos segundos a vários minutos até atingirem o equilíbrio na partição) e são adequados para medir variações de potencial de membrana em células. Existem outros fluorocromos, designados de resposta rápida, adequados para respostas de variação de potencial mais rápidas que ocorrem em nervos e músculos (Haugland, 2002)

A emissão de fluorescência só ocorre significativamente quando o corante se encontra acumulado no interior da membrana. O sinal emitido depende de alterações que ocorram nos locais de ligação entre a membrana o corante, bem como do volume da célula. Com o objectivo de elimi-

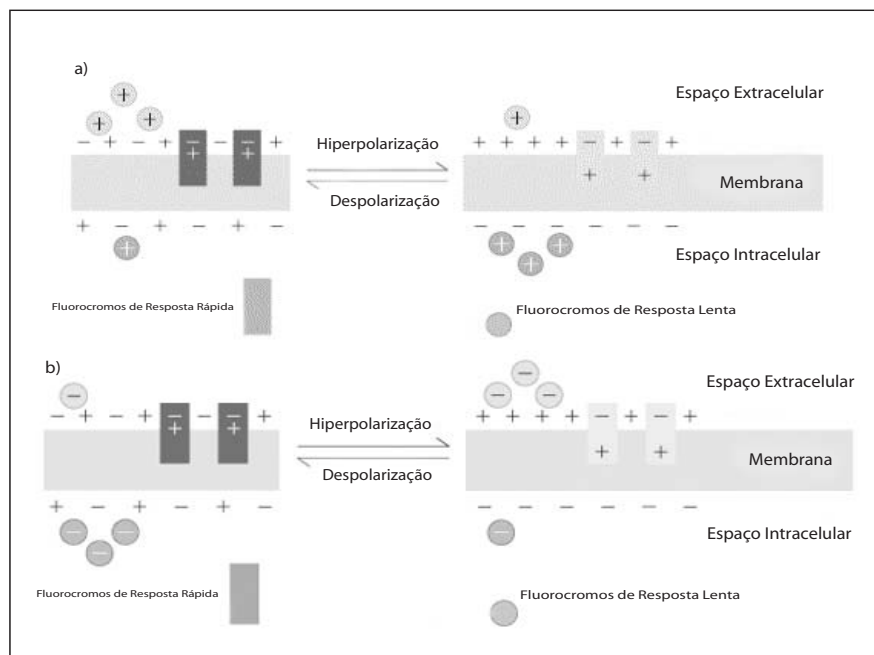


Figura 3 - (Adaptação de Haugland, 2002) Mecanismo da resposta dos fluorocromos sensíveis ao potencial de membrana dos microrganismos. Os fluorocromos (sondas) de resposta lenta são aniões ou catiões lipofílicos que são translocados através da membrana por um mecanismo electroforético. As alterações de fluorescência derivam da resposta da sonda ao campo eléctrico que se estabelece no interior e no exterior da membrana. Os fluorocromos de resposta rápida são adequados a respostas de variações de potencial muito rápidas, como as que ocorrem em células de músculos.

(a) - Mecanismo de resposta de uma sonda catiónica de potencial de membrana, de resposta lenta. Uma vez atingido o equilíbrio entre as células e o catião, este acumula-se no interior da membrana se esta estiver polarizada ou hiperpolarizada, pois nesta situação, o interior daquela encontra-se carregado mais negativamente.

(b) - Mecanismo de resposta de uma sonda aniónica de potencial de membrana, de resposta lenta. Uma vez atingido o equilíbrio entre as células e o anião, este acumula-se no interior da membrana se esta estiver despolarizada, pois nesta situação, o interior daquela encontra-se carregado menos negativamente.

nar esta dependência, que é fonte de erro da determinação de $\Delta\psi$, têm sido realizadas medições ratiométricas de potencial de membrana, por serem praticamente independentes do volume celular (Novo et al, 1999). Na tabela 2 encontram-se alguns dos corantes utilizados na determinação do potencial de membrana.

2.2 Avaliação da integridade da membrana

A integridade da membrana pode ser detectada por retenção ou exclusão dos corantes. No método de retenção do corante, as células são incubadas com um substrato não fluorescente, o qual é clivado por enzimas intracelulares, resultando da acção enzimática um produto fluorescente que é retido nas células apenas quando a membrana citoplasmática está intacta. Este método poderá não ser rigoroso devido a uma eventual perda de actividade enzimática, ao transporte ineficiente do substrato não fluorescente, e à expulsão do corante através do sistema de bombas de efluxo.

Tabela 2. A notação de Sims (DiY_{n+1})(2_{m+1}) permite descrever a estrutura das cianinas simétricas, pela qual Y pode ser substituído por O (oxi-oxonóis), S (tio-oxonóis), I (indo-oxonóis); n é o número de grupos CH_2 e m o número de grupos $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}-$

Família	Grupo	Corante	Referências
Aniónicos	Bis-oxonol	DIBAC ₃ (3) DiSBAC ₃ (3) DiBAC ₅ (5)	Suller and Lloyd, 1999
Catiónicos	Rodamina	Rh 123	Diaper e Edwards, 1994
	Carbocianinas	DiOC ₃ (3) DiOC ₆ (3) DiOC ₇ (3) DiIC ₅ (5)	Novo et al, 1999 Novo et al, 1999 Monfort et al, 1996 Novo et al, 1999

TO-PRO-3, um corante de excitação no vermelho, considerado por vários autores como marcador de exclusão de corantes, pode corar células intactas, tal como o brometo de etídio (Nebe-von-Caron, et al, 2000). A exclusão do iodeto de propídio é assim o método de eleição e o mais utilizado na detecção da integridade da membrana, pois evita problemas associados à actividade enzimática do corante. Portanto, devem ser tomadas precauções na interpretação da retenção e exclusão dos corantes. A melhor forma de entender o mecanismo da exclusão dos corantes é a utilização de corantes em misturas. A próxima secção descreverá duas aplicações de misturas de corantes fluorescentes em bactérias (uma gram-negativa e uma gram-positiva), e, nalguns casos, os cuidados que devem ser tomados na interpretação dos resultados.

2.3 Marcação com mistura de fluorocromos

1. Células de *Escherichia coli* W3110 (bactéria gram-negativa) coradas com a mistura BOX+BE+IP

A figura 4 mostra a utilização de uma combinação de três corantes fluorescentes: o ácido bis-(1,3-dibutilbarbitúrico),

BOX ou Bis-oxonol, para detectar o potencial de membrana, o brometo de etídio (BE) para detectar células cujo sistema de transporte que exclui este corante se encontra afectado e o iodeto de propídio (IP) para detecção da integridade da membrana. Esta mistura foi utilizada em células de *E. coli* W3110 em fase de crescimento exponencial, que foram aquecidas a 60°C, durante 30 segundos. É sabido que este tratamento térmico induz nesta bactéria não só a perda do potencial da membrana citoplasmática como também a permeabilização da mesma (Nebe-von-Caron e Badley, 1995; Boswell et al., 1998, Hewitt et al., 1998, 1999b). A fluorescência emitida pelas células de *E. coli* coradas com a mistura BOX+BE+IP (Figura 4 a) permitiu diferenciar 4 subpopulações, correspondentes a (A) células saudáveis, não coradas; (B) células "vitais", sem o sistema de transporte activo que exclui o BE e, são, portanto, coradas por este corante; (C), células intactas, sem o sistema de transporte activo que exclui o BE, mas com potencial de membrana, coradas por EB/BOX; e (D) células mortas com as membranas citoplasmáticas permeabilizadas, coradas por EB/BOX/PI.

Outros organismos testados (*Citrobacter* sp., *Actinobacter* sp., *Pseudomonas* sp., e *Bacillus* sp.) revelaram resultados semelhantes. No entanto, a exclusão dos corantes não foi verificada em todas as espécies. Quando células de *Rhodococcus* sp., foram tratadas e coradas da mesma forma com a mistura BOX+BE+IP, apenas três populações foram diferenciadas (Figura 4 b). Quando estes resultados foram comparados com os resultados obtidos pela *E. coli*, verificou-se que a população composta por células saudáveis (Figura 4 a, população A) não estava presente e que todas as células de *Rhodococcus* sp. foram coradas pelo BE. Neste caso, as células deste microrganismo. podem ter perdido o sistema de transporte activo não específico prótão/antiporte, que é requerido para excluir o BE das células.

2. Células de *Bacillus licheniformis* CCM1² 1034 (bactéria gram-positiva) coradas com a mistura DiOC₆(3)+IP

A mistura de DiOC₆(3) e PI pode também ser utilizada para diferenciar células metabolicamente activas, células com as membranas citoplasmáticas despolarizadas e células com membranas citoplasmáticas permeabilizadas. A utilização do DiOC₆(3) na diferenciação de bactérias gram-positivas com alterações do potencial de membrana é preferível a outros tipos de corantes, pois estas células, quando se encontram em fase exponencial, geram um potencial de membrana tal que excluem os corantes aniónicos, tal como o Bis-oxonol, não permitindo a diferenciação destas células (Hewitt e Nebe-von-caron, 2004).

A Figura 5 mostra a diminuição da intensidade da fluorescência do DiOC₆(3) em células de *Bacillus licheniformis* CCM1 1034 recolhidas em estado estacionário ($D=0,27 \text{ h}^{-1}$), incubadas durante 10 minutos com CCCP,

²Coleção de Culturas de Microrganismos Industriais, localizada no Laboratório de Microbiologia Industrial, Departamento de Biotecnologia, Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial.

comprovando que a emissão de fluorescência deste corante é mais intensa quando as células estão metabolicamente activas, com as membranas citoplasmáticas polarizadas. Este comportamento foi igualmente observado em células de *Staphylococcus aureus*, quando tratadas com gramicidina, outro ionóforo também utilizado na redução do potencial de membrana (Diaper et al., 1992), e em células de outra estirpe de *Staphylococcus aureus* tratadas com CCCP, mas coradas com DiOC₂(3) (Novo et al., 1999).

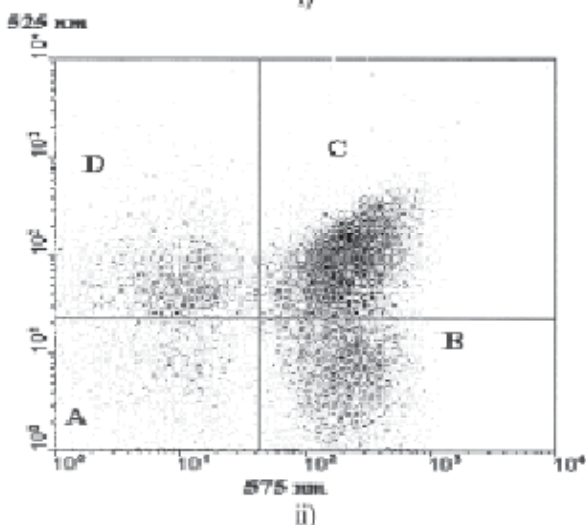
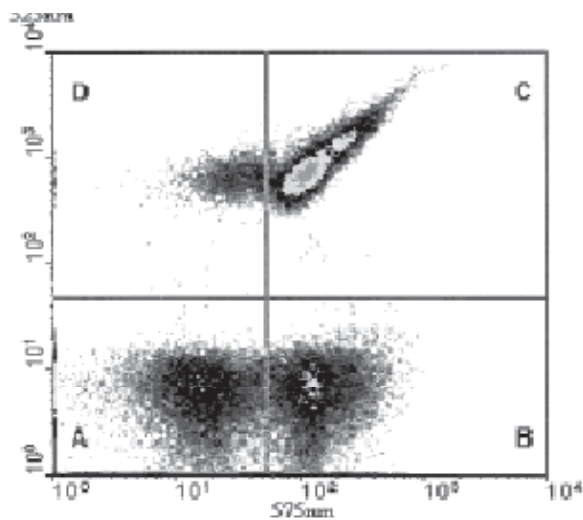


Figura 4 - (Retirada de Hewitt e Nebe-Von-Caron, 2001) (a) Fluorescência emitida por células de *E. coli* 3110 em fase exponencial, submetidas a um tratamento térmico (60°C durante 30 s), coradas com a mistura brometo de etídio + bis-oxonol + iodeto de propídio (BEP) e (b) fluorescência emitida por células de *Rhodococcus* sp. coradas com a mesma mistura. Quatro subpopulações foram diferenciadas, correspondentes a (A) células saudáveis, não coradas; (B) células "vitalis", sem o sistema de transporte activo que exclui o BE e, são, portanto, coradas por este corante; (C), células intactas, sem o sistema de transporte activo que exclui o BE, mas com potencial de membrana, coradas por EB/BOX; e (D) células mortas com as membranas citoplasmáticas permeabilizadas, coradas por EB/BOX/PI. As medições no citómetro de fluxo foram realizadas num Coulter Epics Elite com excitação a 488 nm, proveniente de um laser de argon (15 mW). As fluorescências do IP, BE e BOX foram medidas a 635, 575 e 525 nm, respectivamente. Devido à elevada sobreposição dos espectros de emissão do BE e do IP, o sistema foi compensado de forma a eliminar a fluorescência emitida pelo IP no detector de emissão de fluorescência do BE.

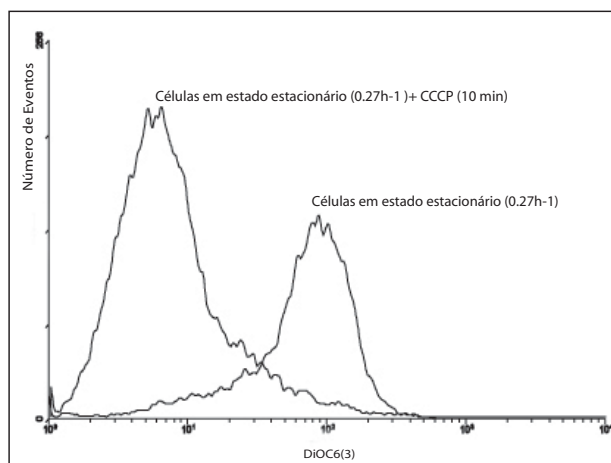


Figura 5 - (Retirada de Reis et al., 2004) Efeito da adição de cianina carbonil m-clorofenilhidrazona (CCCP) no potencial de membrana de células de *Bacillus licheniformis* CCMI 1034, em estado estacionário ($D=0,27 h^{-1}$), quando coradas com DiOC₆(3).

A Figura 6 a) mostra o gráfico de densidades correspondente a células de *Bacillus licheniformis* CCMI 1034 quando submetidas a um tratamento térmico a 100°C, durante 10 minutos, e posteriormente coradas com uma mistura de DiOC₆(3) +PI. É possível diferenciar duas subpopulações (B) e (D), que correspondem respectivamente a células com membranas polarizadas (B), que não são coradas por nenhum dos corantes e, uma outra sub-população (D), composta por células coradas por ambos os fluorocromos. A interpretação desta última sub-população, baseada na coloração destas células por ambos os corantes, levaria a concluir que estas células possuem membranas polarizadas (coradas pelo DiOC₆(3)), mas permeabilizadas (coradas pelo IP), o que é contraditório. Mason et al., 1995, observaram que células de *E. coli*, quando submetidas ao mesmo tratamento térmico e coradas com DiOC₆(3), apresentavam uma fluorescência superior às células saudáveis (possuidoras de membranas citoplasmáticas polarizadas). Teoricamente, células que são coradas por este composto possuem membranas polarizadas, pelo que a fluorescência do DiOC₆(3) emitida por células submetidas ao tratamento térmico (que induz a despolarização e permeabilização da membrana) deveria ser baixa ou ausente. Os autores explicaram esta discrepância baseando-se no carácter lipofílico do DiOC₆(3). A estrutura das cadeias dos fosfolípidos das membranas citoplasmáticas das células, quando expostas a elevadas temperaturas colapsa, ficando as regiões hidrofóbicas da membrana expostas e acessíveis ao DiOC₆(3) que irá ligar-se a esses centros, devido à sua elevada afinidade por aquelas regiões. Nesta situação, a emissão da fluorescência do DiOC₆(3) detectada em células mortas não é dependente do potencial de membrana, mas sim da afinidade daquele composto pelas regiões hidrofóbicas da membrana expostas.

Células recolhidas de uma cultura contínua em estado estacionário à taxa de diluição de 0.27 h⁻¹ ($\mu_{max} > 1h^{-1}$), quando coradas com a mistura de DiOC₆(3) e PI apresentam o gráfico de densidades mostrado na figura 6 b), onde é pos-

sível diferenciar quatro subpopulações, correspondentes a células polarizadas (A), coradas pelo DiOC₆(3); células despolarizadas (B), não coradas; células despolarizadas e permeabilizadas (C), coradas pelo PI; e células despolarizadas e permeabilizadas com a membrana citoplasmática danificada (possivelmente células “fantasmas”), coradas pelo DiOC₆(3) e PI.

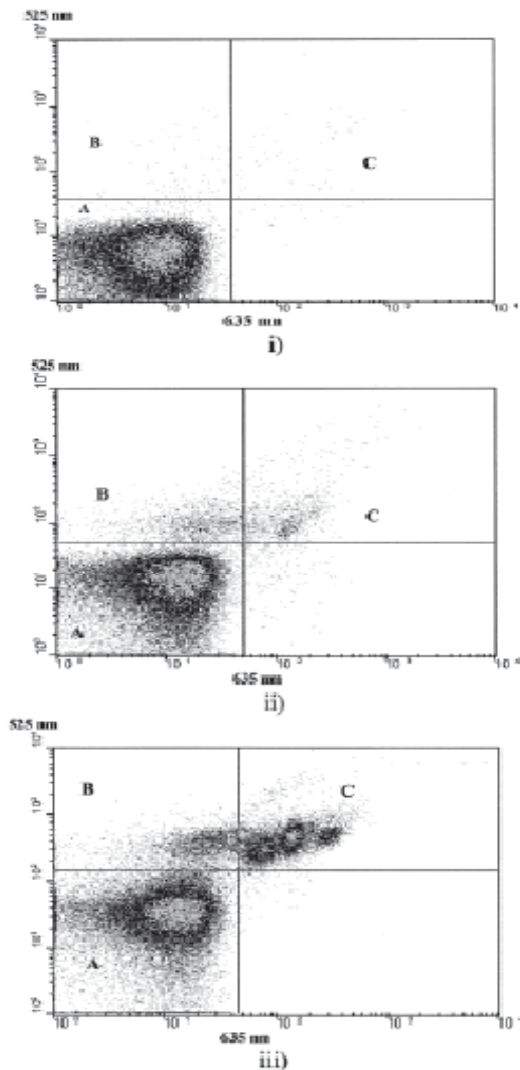


Figura 6 - (Retirada de Reis et al., 2004) (a) Células de *Bacillus licheniformis* CCM1 1034 submetidas a um tratamento térmico (banho de água a 100°, durante 10 minutos), coradas com a mistura de DiOC₆(3)+IP. Duas subpopulações foram diferenciadas, correspondentes a (B) células com a membrana citoplasmática despolarizada, não coradas por nenhum dos corantes; e (D) células com a membrana citoplasmática permeabilizada, coradas por ambos os corantes DiOC₆(3)+IP. (b) Células de *Bacillus licheniformis* CCM1 1034 em estado estacionário (D=0.27 h⁻¹), coradas com a mistura DiOC₆(3)+IP. Quatro subpopulações foram diferenciadas, correspondentes a (A) células saudáveis, coradas pelo DiOC₆(3); (B) células com a membrana citoplasmática despolarizada, não coradas; (C) células com a membrana despolarizada e permeabilizada, coradas pelo IP; e (D) células com a membrana citoplasmática despolarizada, permeabilizada e danificada. As medições no citómetro de fluxo foram realizadas num Coulter Epics Elite com excitação a 488 nm, proveniente de um laser de argon (15 mW). As fluorescências do IP e do DiOC₆(3) foram medidas a 635 e 525 nm, respectivamente.

A existência de células “fantasmas” foi posteriormente confirmada pela análise destas quatro subpopulações por microscopia de transmissão electrónica. A Figura 7 mostra uma secção de uma amostra de células de *Bacillus licheniformis* CCM1 1034, quando privadas de nutrientes, por um período de três horas. Foi possível identificar dois tipos distintos de células: umas com estruturas do tipo “célula fantasma”, com pouco ou nenhum material citoplasmático no interior do envelope da célula, que contrastam com células consideradas “normais”, cujo conteúdo citoplasmático no interior de célula se apresenta denso. Pensa-se que as estruturas que perderam o conteúdo celular se encontram num estado avançado de lise celular, podendo ser responsáveis pela intensa fluorescência do DiOC₆(3), conforme se observou em células submetidas ao tratamento térmico a 100 °C. É assim suposto que a sub-população (D) corresponde a células com um elevado grau de lesão nas suas membranas, equiparado aos danos que ocorrem na membrana citoplasmática quando é sujeita a um tratamento térmico drástico (100°C, durante 10 minutos).

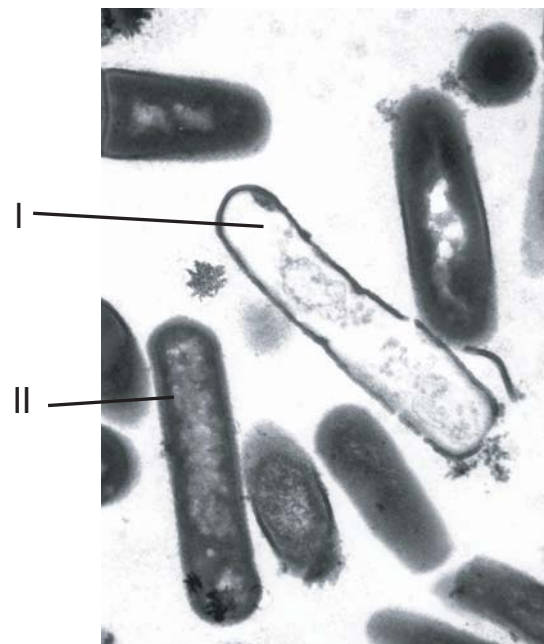


Figura 7 - (Retirada de Reis et al., 2004) Fotografia de transmissão electrónica (x 25000) de células do *Bacillus licheniformis* CCM1 1034 em carência de nutrientes por um período de 3 horas. É possível visualizar “células fantasma” que apresentam um reduzido conteúdo material citoplasmático no interior do envelope da célula. Estas estruturas (I), contrastam com as estruturas do tipo II, relativas a células “normais”, cujo conteúdo citoplasmático é denso.

Com base na explicação destas quatro subpopulações, foi então sugerida a seguinte dinâmica entre elas: Quando as células saudáveis (sub-população A) são submetidas a um determinado tipo de stresse, alguns dos seus sistemas de transporte activo poderão ser afectados, o que induz a despolarização da membrana citoplasmática (sub-população B). Este estado metabólico poderá evoluir para a permeabilização da membrana, indicando morte celular (sub-população C) e, mais tarde, a membrana poderá colapsar (sub-população D). Porém, ensaios posteriores

confirmaram que as células com membranas despolarizadas que compõem a sub-população (B), em presença de uma fonte fresca de energia, conseguem repolarizar as suas membranas, evoluindo para a sub-população (A), composta por células saudáveis (Reis et al., 2004, submetido para publicação).

3. Citometria de Fluxo on-line nos processos biotecnológicos, num futuro próximo

No decurso de qualquer bioprocessos, é essencial a monitorização da proliferação celular, bem como da viabilidade. As informações da concentração de biomassa são cruciais na tomada de decisões, durante o controlo do processo. Estas informações podem permitir a recolha do produto na concentração adequada, de forma a obterem-se produtividades máximas, ou ainda a activação de sistemas indutíveis no tempo correcto, de modo a otimizar-se a eficiência global do processo. A existência de uma fracção significativa de células mortas ou dormentes durante qualquer parte da evolução do bioprocessos reflectir-se-á negativamente no rendimento global do processo, uma vez que estas células não contribuem para a formação do produto. Portanto, é importante a obtenção de informação rigorosa e precisa sobre os estados fisiológicos das células presentes numa determinada população. Tal como foi referido atrás, a marcação com misturas de corantes permite obter esta informação com um elevado grau de precisão num intervalo de tempo reduzido e com tempo de resposta quase em tempo real, mostrando numerosas vantagens relativamente aos métodos tradicionalmente utilizados na determinação da viabilidade celular.

As técnicas de microbiologia clássica utilizadas para monitorizar a proliferação e a viabilidade celular apresentam vários inconvenientes. Como já foi referido, a densidade óptica, o peso seco e a contagem manual de colónias dão uma indicação do crescimento associado à divisão celular, mas não dão qualquer informação sobre o estado fisiológico das células. Além disso, os resultados da evolução da concentração da biomassa (peso seco) de uma determinada fermentação só estão disponíveis após um período de tempo relativamente prolongado, na maioria dos casos demasiado tarde para se poder fazer qualquer alteração no controlo do processo. Por outro lado, este tipo de medições realizados nas fases iniciais das fermentações, quando as concentrações de biomassa são geralmente baixas, é impreciso, pois tem associado um elevado erro experimental. Acresce que as leituras de densidade óptica raramente dão conta de alterações na dimensão das células. Por seu lado, a contagem manual de células é morosa e, em termos estatísticos, assenta no princípio de uma distribuição igualitária na câmara de contagem, uma situação altamente improvável.

Do ponto de vista da microbiologia clássica, uma célula é considerada viável quando se comprova o seu crescimento

associado à divisão celular. O método das viabilidades tem por base a diluição da amostra e posterior inoculação em meios não selectivos, pelo que é necessário esperar pelo menos 12 horas até se obterem resultados, mais uma vez demasiado tarde para se poderem fazer alterações durante o controlo de processo. É importante realçar uma vez mais que estados fisiológicos em que as células se encontrem sob stresse ou danificadas, correspondentes a células “viáveis mas não cultiváveis”, não são detectados por estes métodos. As técnicas de coloração utilizadas em microscopia também sofrem das mesmas limitações da contagem manual de células.

Os modelos matemáticos utilizados para prever a evolução da biomassa ao longo de uma fermentação são muitas vezes imprecisos porque assentam no pressuposto de que uma determinada população de bactérias é homogénea do ponto de vista fisiológico e da sua capacidade de divisão celular, o que, como se viu atrás, não corresponde à realidade.

A presença de uma elevada percentagem de células permeabilizadas, consideradas mortas, terá um impacto negativo na síntese de qualquer produto desejado ou na degradação de agentes poluentes. Daí que a monitorização da concentração do produto, da biomassa, dos nutrientes e de outros substratos deva ser acompanhada pela monitorização do desenvolvimento das subpopulações de uma cultura microbiana, no decorrer do processo.

Hewitt et al. (1999b), através da utilização da técnica de misturas de corantes fluorescentes em citometria de fluxo at-line, demonstraram que ocorria uma redução de 20% na viabilidade de células de *E.coli* na última fase da fermentação em regime semi-contínuo, devido à severa limitação de carbono que se verificou nas últimas etapas da fermentação (Figura 8).

As análises que fornecem informações sobre a evolução do bioprocessos, quando realizadas on-line (o equipamento está em contacto directo com a cultura através de uma sonda, por exemplo), terão um acréscimo benefício relativamente aos métodos de monitorização at-line e off-line, uma vez que permitirão obter informação no tempo real da fermentação, e a tempo de se tomarem decisões na estratégia do processo (Alison et al, 2002).

A montagem da Citometria de Fluxo “on-line” em unidades de fermentação garantirá, num futuro próximo, um significativo aumento da produtividade do processo. Este sistema, em associação com uma estratégia do controlo do processo baseada na adição de uma fonte de energia que seja dependente do número de células com um baixo potencial de membrana (subpopulação de células com as membranas despolarizadas que é capaz de evoluir para a repolarização da membrana em presença de uma fonte fresca de energia, conforme se viu atrás) permitirá reduzir o número de células que não contribuam para a síntese do produto desejado, e, por conseguinte, aumentar a produtividade global do processo (Nebe-von-Caron et al., 2000).

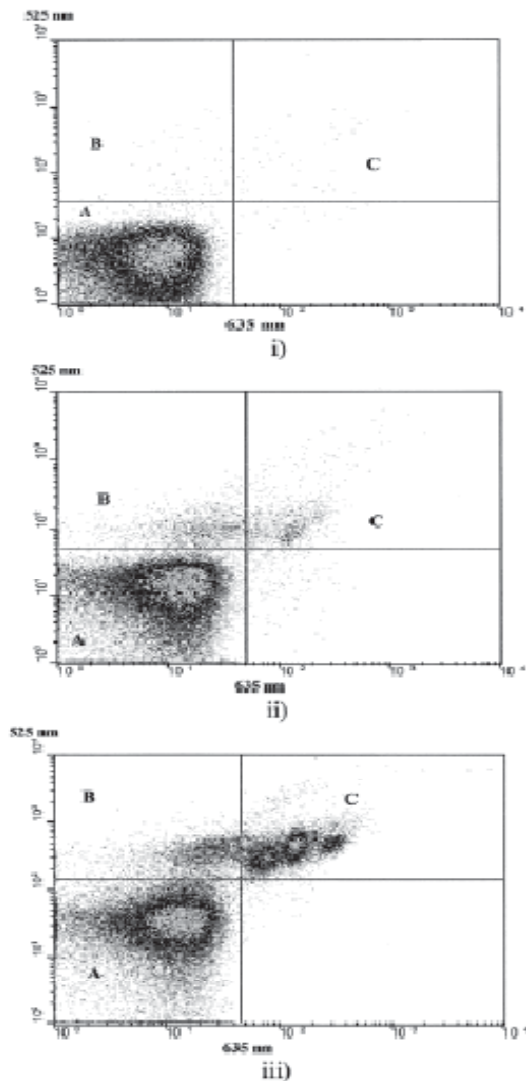


Figura 8 - (Retirada de Hewitt et al., 1999b) Células de *E. coli* W3110 colhidas 5 h (a), 16 h (b) e 36 h (c) após o início de uma fermentação de alta densidade, em regime semi-contínuo, coradas com a mistura de BOX+IP. Três subpopulações foram diferenciadas, correspondentes a (A) células saudáveis, não coradas; células sem potencial de membrana (B), coradas com BOX; e (C) células com membranas despolarizadas, coradas pelo BOX e pelo IP.

Agradecimentos

O trabalho realizado pelos autores na Universidade de Birmingham (Reino Unido) foi financiado pelo projecto Europeu do Quinto Programa quadro (QLK3-1999-0004) "Enhanced, Intelligent Processing of Food and Related Wastes using Thermophilic Populations". Teresa Lopes da Silva e Alberto Reis agradecem à Fundação para a Ciência e a Tecnologia o apoio financeiro através das bolsas de Doutoramento BD/5453/2001 e Pós-Doutoramento BPD/8039/2002, respectivamente.

Referências Bibliográficas

Alison, S., Gaensakoo, R., Harvey, L.M. and Mcneil, B., 2002. Use of at-line and in-situ near-infrared spectroscopy to monitor biomass in an industrial fed-batch *Escherichia coli* process. *Biotechnol. Bioeng.*, 80, 4, 405-413.

Boswell, C.D., Hewitt, C.J., Macaskie, L.E., 1998. An application of bacterial flow cytometry: Evaluation of toxic effects of four heavy metals on *Acinetobacter* sp. with potential for bioremediation of contaminated wastewaters. *Biotechnol. Lett.*, 20, 857-863.

Côrte-Real, M., Sansonetty, F., Ludovico, P., Prudêncio, C., Rodrigues, F., Fortuna, M., Sousa M.J., Teixeira da Silva, M., Leão, C., 2002. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. *Boletim de Biotecnologia*, 71, 19-33.

Deer, D., Porter, J., Edwards, C. and Pickup, R., 1996. Evaluation of the suitability of bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol (DiBAC4(3)) for the flow cytometry assessment of bacterial viability. *FEMS Microbiol. Lett.*, 130, 165-169.

Diaper, J.P., Tither, K. and Edwards, C., 1992. Rapid assessment of bacterial viability by flow cytometry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 268-272.

Haugland, R.P., 2002. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, Molecular Probes 9th Edition, ISBN 0-9710636-1-3, 966 pp

Hercher, M., Mueller, W., Shapiro, H.M., 1979. Detection and Discrimination of Individual Viruses by Flow Cytometry, *J. Histochem. and Cytochem.*, 27(1), 350-352.

Hewitt, C.J., Boon, L.A., McFarlane, C.M., Nienow, A.W., 1998. The use of flow cytometry to study the impact of fluid mechanical stress on *E. coli* during continuous cultivation in an agitated bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, 59, 612-620.

Hewitt, C.J., Nebe-Von-Caron, G., and Nienow, A.W., 1999a. Use of multi-staining flow cytometry to characterize the physiological state of *Escherichia coli* W3110 in high cell density fed-batch cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 63, 705-711.

Hewitt, C.J., Nebe-Von-Varon, G., Nienow, A.W., and McFarlane, C., 1999b. The use of multi-parameter flow cytometry to compare the physiological responses of *Escherichia coli* W3110 to glucose limitation during batch, fed-batch and continuous culture cultivations. *J. Biotechnol.*, 75, 251-264.

Hewitt C. J. and Nebe-von-Caron, G. 2001. An industrial application of multi-parameter flow cytometry: Assessment of cell physiological state and its application to the study of microbial fermentations. *Cytometry*, 44, 179-187.

Hewitt C. J. and Nebe-von-Caron G., 2004. The Application of Multi-Parameter Flow Cytometry to Monitor Individual Microbial Cell Physiological State. In: Enfors SO, ed. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Special volume 'Physiological Stress Responses in Bioprocesses'. Springer (em impressão)

Mason, D.J., Lopéz-Amorós, R., Allman, R., Stark, J.M. and Lloyd, D., 1995. The ability of membrane potential dyes and calcafluor white to distinguish between viable and non viable bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 78, 309-315.

Midgley, M., 1987. An efflux system for cationic dyes and related compounds in *E. coli*. *Microbiol. Sci.*, 4, 125-128.

Monfort, P. and Baleux, B., 1996. Cell cycle characteristics and changes in membrane potential during growth of *Escherichia coli* as determined by cyanine fluorescent dye and flow cytometry. *J. Microbiol. Methods*, 25, 79-86.

Nebe-von-Caron, G. and Badley, R.A., 1995. Viability assessment of bacteria in mixed populations using flow cytometry. *J. Microsc.*, 179, 55-66.

Nebe-von-Caron, G., Stephens, P.J., Hewitt, C.J., Powell, J.R. and Badley, R.A., 2000. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *J. Microbiol. Methods*, 42, 97-114

Novo, D., Perlmutter, N.G., Hunt, R.H., and Shapiro, H.M., 1999. Accurate flow cytometry membrane potential measurement in bacteria using diethylloxycarbocyanine and ratiometric technique. *Cytometry*, 35, 55-63.

Novo, D., Perlmutter, N.G., Hunt, R.H., and Shapiro, H.M., 2000. Multiparameter flow cytometry analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability and bacterial counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 44, 827-833.

Pore, R.S., 1994. Antibiotic susceptibility testing by flow cytometry. *J. Antimicrob. Chemother.*, 34, 613-627.

Porter, J., Deere, D., Pickup, R., Edwards, C. 1996. *Fluorescent Probes and Flow Cytometry: New Insights Into Environmental Bacteriology*. *Cytometry*, 23:91-96.

Reis, A., Lopes da Silva, T., Kent, C.A., Kosseva, M., Roseiro, J.C. e Hewitt, C.J., 2004. Monitoring populations dynamics of thermophilic *Bacillus licheniformis* CCMI 1034 in continuous cultures using multi-parameter flow cytometry. (submetido para publicação).

Rieseberg, M., Kasper, C., Reardon, K.F., Scheper, T. 2001. Flow cytometry in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 350-260.

Shapiro, H.M., 2000. Membrane potential estimation by flow cytometry. *Methods*, 21, 271-279.

Suller, M.T.E., Lloyd, D., 1999. Fluorescence monitoring of antibiotic-induced bacterial damage using flow cytometry. *Cytometry*, 35, 235-241.

Wu, Q., Knowles, R., Niven, D.F., 1995. Effect of ionophores on denitrification in *Flexibacter canadensis*. *Can. J. Microbiol.*, 41, 227-234.