RESOLUTION OIV-OENO 713B-2025

ZÄHLUNG VON HEFEZELLEN MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE IN HEFEKULTUREN

DIE GENERALVERSAMMLUNG,

IN DER ERWÄGUNG, dass Hersteller von mikrobiellen Starterkulturen für die Kellerwirtschaft und Weinkellereien rechtzeitig genaue Informationen über die Qualität der Hefekulturen benötigen,

IN DER ERWÄGUNG, dass die meisten mikrobiologischen Analysemethoden der OIV derzeit auf Petrischalen-Zählungen beruhen, einer robusten und wirksamen Technik, die jedoch lange Inkubationszeiten erfordert, die manchmal mit den schnellen Gärungsprozessen nicht vereinbar sind,

IN DER ERWÄGUNG, dass die Durchflusszytometrie in verschiedenen Bereichen der Biotechnologie und der Nahrungsmittelindustrie heute eine weit verbreitete Analysetechnik ist, ihre Robustheit und Zuverlässigkeit hinreichend nachgewiesen ist und zahlreiche technologische Lösungen, die sich für unterschiedliche Produktionsumgebungen eignen, auf dem Markt verfügbar sind,

BESCHLIESST, folgende mikrobiologische Analysemethode für Hefekulturen anzunehmen und in Teil II des Internationalen Önologischen Kodex zu veröffentlichen,

ZÄHLUNG VON HEFEZELLEN MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE IN HEFEKULTUREN

1. ZÄHLUNG VON HEFEZELLEN MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE IN HEFEKULTUREN

2. Anwendungsgebiet

Die Methode dient der quantitativen Bestimmung lebensfähiger, gestresster (permeable Membranen) und abgestorbener Hefezellen in Hefekulturen für die Kellerwirtschaft gemäß er Definition der OIV.

Diese Methode mit Doppelkennzeichnung ermöglicht nicht die quantitative Bestimmung von lebensfähigen, metabolisch inaktiven Zellen (undurchlässige

Beglaubigte Ausführung Chișinău, 20. Juni 2025
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
John BARKER

© OIV 2025

Membranen, VMI).

Die Methode kann für die Analyse von Präparaten ausgewählter Hefen (LSA und Sauerteige) angewendet werden.

Die Bestimmungsgrenzen hängen von der Leistungsfähigkeit der verwendeten Geräte und der Methode der Probenvorbereitung ab.

3. Definitionen

DURCHFLUSSZYTOMETRIE: Die Durchflusszytometrie ist eine Technologie, die eine schnelle und multiparametrische Analyse einzelner Zellen in Lösung ermöglicht. Durchflusszytometer nutzen Laser als Lichtquellen, um sowohl Streu- als auch Fluoreszenz-Lichtsignale zu erzeugen, die von Detektoren wie Photodioden oder Photomultiplier-Röhren erfasst werden. Diese Signale werden in elektronische Signale umgewandelt, die von einem Computer ausgewertet werden. Zellpopulationen können anhand ihrer Fluoreszenz- oder Lichtstreueigenschaften differenziert und/oder charakterisiert werden.

Vorwärtsstreuung (FSC): Signal, das durch die Streuung des Lichts an einem Partikel (Zelle) erzeugt wird. Es wird üblicherweise im Winkel von 180° zur Lichtquelle aufgezeichnet und kann direkt mit der Partikelgröße in Beziehung gesetzt werden.

Seitwärtsstreuung (SSC): Signal, das durch die Streuung des Lichts an einem Partikel (Zelle) erzeugt wird. Es wird üblicherweise im Winkel von 90° zur Lichtquelle aufgezeichnet und kann direkt mit der strukturellen Komplexität der Partikel in Beziehung gesetzt werden.

Fluoreszenzkanal (FLx): Signale, die durch Fluoreszenzemission aufgrund der Partikel-assoziierten Fluorochrome mittels geeigneter Farben erzeugt werden. Die verschiedenen Wellenlängen der Emission werden durch optische Filter getrennt und vereinbarungsgemäß fortlaufend nummeriert (FL1, FL2, usw.).

KOMPENSATION: Korrektur des Fluoreszenz-Spillover, bei der das Signal eines bestimmten Fluorochroms von allen Detektoren beseitigt wird, mit Ausnahme des Detektors, der für die Messung des Farbstoffs verwendet wird. In der Regel erfolgt dies an den Kanälen FL2 oder FL3, um den Beitrag des Fluorochroms zu eliminieren, dessen Emissionspeak im Kanal FL1 liegt.

Volumetrische Zählung: Messung der Anzahl von Ereignissen (Zellen) in einem festgelegten Probenvolumen, die in der Regel durch zwei Elektroden erfolgt, die in unterschiedlicher Höher in der Probenküvette angebracht sind. Es kann auch eine volumetrische Pumpe verwendet werden.

EREIGNIS: Ein Ereignis ist definiert als die Erkennung eines einzelnen Partikels, das

Beglaubigte Ausführung Chișinău, 20. Juni 2025
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
John BARKER

© OIV 2025

den Laserstrahl/die Laserstrahlen des Geräts durchläuft. Jedes Ereignis entspricht einer Reihe von Messungen verschiedener optischer und physikalischer Eigenschaften dieses Partikels. Es obliegt dem Anwender nachzuweisen, dass ein Ereignis einer einzelnen Zelle zuzuordnen ist, indem überprüft wird, dass keine verklumpten Zellen (Dubletten, Tripletten usw.) vorhanden sind.

4. Prinzip

Eine durch eine geeignete Dezimalverdünnung der Probe gewonnene Zellsuspension wird nach Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen, die eine Unterscheidung zwischen Zellen mit Enzymaktivität (lebende Zellen) und Zellen mit geschädigter Zytoplasmamembran (tote Zellen) ermöglichen, mittels volumetrischer Durchflusszytometrie analysiert. In einigen Fällen ist es auch möglich, eine dritte Unterpopulation von Zellen zu identifizieren, die eine Stoffwechselaktivität, aber eine veränderte Permeabilität der Zellmembran aufweisen; bei dieser Unterpopulation handelt es sich im Allgemeinen um gestresste, aber lebensfähige Zellen.

Bei der vorliegenden Methode handelt es sich um ein allgemeines Verfahren, bei dem ein einzelner blauer Laser und 2 Fluorochrome verwendet werden. Es können auch komplexere Methoden angewendet werden, bei denen Zytometer mit mehreren Lasern und mehrere Markierungen verwendet werden.

Bei dieser Methode werden 2 Arten von Fluorochromen verwendet:

- Propidiumiodid (PI): es handelt sich um ein Interkalationsmittel für Nukleinsäuren (DNA oder RNA). Es dringt nur in Zellen mit permeablen Plasmamembranen ein. Man geht davon aus, dass es sich dabei in erster Linie um tote Zellen oder solche mit Membranstress (z.B. unter dem Einfluss von Ethanol) handelt. Der Anregungspeak liegt zwischen 520 und 550 nm, das Maximum der emittierten Fluoreszenz zwischen 610 nm und 630 nm. Zellen, die mit PI(-) markiert sind, gelten daher als lebensfähig und PI(+)-Zellen als tote Zellen oder Zellen, die permeable Plasmamembranen aufweisen.
- 5(6)-Carboxyfluorescein-Diacetat(cFDA): Es handelt sich um ein zelldurchlässiges Esterase-Substrat, das als Messfühler für die Stoffwechselaktivität (Esterase) dient. Bei der Hydrolyse durch intrazelluläre Esterasen entsteht aus Acetoxymethylester Carboxyfluorescein mit einem Anregungspeak bei 498 nm und einer maximalen Fluoreszenzemission bei 516 nm. Sein Emissionsspektrum reicht bis 650 nm, was möglicherweise eine Kompensation auf anderen Kanälen erfordert (FL2). Zellen, die mit cFDA(+) markiert sind, gelten daher als

Beglaubigte Ausführung Chișinău, 20. Juni 2025
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
John BARKER

© OIV 2025

metabolisch (Esterase) aktiv und cFDA(-)-Zellen als metabolisch inaktiv.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Auswertungen anhand der Fluorochrom-Reaktionen

Quadrant	**PI(-)**	**PI(+)**
cFDA(-)	Mit dieser Methode nicht auswertbar	Tote Zellen
cFDA(+)	Lebensfähige und aktive Zellen	Aktive Zellen mit veränderter Plasmamembran, die für PI durchlässig ist (gestresste Zellen)

Anmerkung 1: Es wird eine Population von PI(-)-Zellen definiert, die die Unversehrtheit der Membranen widerspiegelt, und von cFDA(-)-Zellen, die eine nicht nachweisbare Stoffwechselaktivität anzeigen.

Anmerkung 2: Bei dieser Methode werden die Zellen nicht von möglichem Hintergrundrauschen abgegrenzt. Der PI(-)-Quadrant, cFDA(-), ist daher nicht auswertbar.

5. Reagenzien und Materialien

Laborglasgeräte, Durchflusszytometrie-Küvetten und Treibmedium, sofern für das Gerät erforderlich;

Reagenzgläser (16 x 160 mm oder ähnlich) mit 9 mL phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), filtriert durch ein 0,2 µm-Filter (pH 7,4);

5(6)-Carboxyfluorescein-Diacetat (Pulver) (cFDA; CAS 124387-19-5);

Propidiumiodid, (Pulver) 95 % (PI; CAS 25535-16-4);

Dimethylsulfoxid in reiner flüssiger Form (DMSO; CAS 67-68-5);

Reinkultur von S. cerevisiae (z.B. Stamm ATCC 9763) mit einer Nennkonzentration von 105 Zellen/mL;

NaCl-Lösung 8,5 g/L in Wasser, sterilisiert durch Filtration oder Autoklavieren

cFDA-Lösung in DMSO oder Aceton (0,1 mg/mL)

PI-Lösung in DMSO oder wässriger Lösung, 1 mg/mL

Anmerkung 1: Die Verdünnung der Fluorochrome erfolgt in DMSO. Sie kann auch in Aceton vorgenommen werden. Da durch das Aceton/DMSO-Gemisch offenbar

Beglaubigte Ausführung Chișinău, 20. Juni 2025
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
John BARKER

© OIV 2025

stärkeres Hintergrundrauschen erzeugt wird, wird empfohlen, nur DMSO zu verwenden.

6. Geräte

Durchflusszytometer mit Laser 488 nm (50 mW) und den optischen Parametern FSC, SSC, FL1 (530 nm), FL2 (630 nm) und FL3 (670 nm)

Vortex-Schüttler

Laborglasgeräte

Sterilfilter, 0,2 µm (vorzugsweise aus Zellacetat zur Begrenzung des Hintergrundrauschens)

Platte für die Durchflusszytometrie

1 mL und 0,2 mL-Mikropipetten mit sterilen Spitzen

Analysewaage mit einer Genauigkeit von ± 0,01 g

Laborzentrifuge

Anmerkung: Sterilität ist nicht unbedingt erforderlich, es wird jedoch empfohlen, ein hohes Maß an Hygiene einzuhalten und sterile Geräte und Reagenzien zu verwenden.

7. Probenahme (Vorbereitung der Probe)

Die Probe der zu analysierenden Hefekultur muss vorschriftsmäßig entnommen und zum Labor befördert werden und für die Gesamtmasse repräsentativ sein.

Bei ausgewählten Hefekulturen, die die in der Monographie COEI-1-SACCHA „Ausgewählte *Saccharomyces*-Hefen“ beschriebenen Merkmale aufweisen und gemäß den Anweisungen des Herstellers gelagert werden, sind 50 g Probe für die Analyse ausreichend.

8. Durchführung

Die Analyse mittels Durchflusszytometrie wird unverzüglich durchgeführt, mit modernen Geräten dauert sie in der Regel weniger als 3 Minuten. Das Risiko einer Kontamination durch die Handhabung der Proben außerhalb der Laminar-Flow-Haube oder während der zytometrischen Analyse ist gering. Es muss jedoch ein hohes Maß an Hygiene gewährleistet sein und es sind sterile Geräte und Reagenzien zu verwenden.

Das angegebene Verfahren dient als Beispiel. Abweichungen können vom Labor vorgenommen werden. Die Durchflusszytometrie erfordert eine ständige Anpassung

Beglaubigte Ausführung Chișinău, 20. Juni 2025
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
John BARKER

© OIV 2025

der Verdünnungen an die verwendeten Geräte und die mikrobiologische Belastung der analysierten Produkte.

EINSTELLUNG DES DURCHFLUSSZYTOMETERS

Das Durchflusszytometer einschalten und das Gerät spülen, um Interferenzen zu vermeiden. Die Kanäle FSC, SSC, FL1 (Erfassung bei 530 nm), FL2 (Erfassung bei 630 nm) und FL3 (Erfassung bei 670 nm) auf logarithmische Skala einstellen.

Das Durchflusszytometer ist betriebsbereit, wenn bei der Messung einer Probe, die nur Treibmedien enthält, keine Ereignisse erkennbar sind, die mit der Erfassung der Probe im FSC-Kanal interferieren können.

Die Messung einer Reinkultur von S. *cerevisiae* durchführen, wobei darauf zu achten ist, dass die Spannungen der Kanäle FSC und SSC ggf. so eingestellt werden, dass die Signalspitze in beiden FSC/SSC-Kanälen gut vom Hintergrundrauschen getrennt wird. Sofern die Durchflusszytometrie es ermöglicht, kann der Beitrag des Hintergrundrauschens durch Veränderung des Schwellenwerts des FSC-Parameters eliminiert werden. Es wird ein Dotplot erstellt, indem die FSC- und SSC-Signale integriert werden, die Region, die die Population von Hefezellen enthält, ermittelt wird und ein Gate gesetzt wird (Abbildung 1).

FÄRBUNG DER PROBE

Bei ausgewählten Hefekulturen ist eine Rehydratation und Verdünnung gemäß der Resolution 632-2021 der OIV-OENO vorzunehmen.

Für die Probe der rehydrierten Hefe ist je nach Leistung der verwendeten Geräte eine Dezimalverdünnung (10^3 – 10^4) in NaCl-Lösung vorzunehmen;

die Markierung vornehmen, z.B. mit 10 µl cFDA-Lösung und 10 µl PI-Lösung in 980 µl verdünntem Wein;

die Probe ca. zehn Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren;

nach Abschluss der Inkubation die Probe ablesen, nachdem das Durchflusszytometer auf volumetrische Messung eingestellt wurde.

Anmerkung 1: Die Endkonzentration von cFDA in der gekennzeichneten Probe beträgt zwischen 2 und 5 mg/L. Die Endkonzentration von IP in der gekennzeichneten Probe beträgt zwischen 3 und 10 mg/L.

Anmerkung 2: Die Reihenfolge des Beitrags der Fluorochrome ist nicht von Bedeutung. Sie können gleichzeitig in eine Lösung mit beiden Fluorochromen eingebracht werden.

Anmerkung 3: Die Markierung ist in der Regel mindestens 1 Stunde stabil.

DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE

Beglaubigte Ausführung Chișinău, 20. Juni 2025
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
John BARKER

© OIV 2025

Die Probe wird abgelesen, wobei darauf zu achten ist, dass die Geräteeinstellungen so angepasst werden, dass die Hefepopulation innerhalb des Gates liegt, das zuvor mit der Reinkultur von S. *cerevisiae* ermittelt wurde. Die Spannungen der Kanäle FL1 und FL2 sind anzupassen, um den Emissionspeak der Probe vom Hintergrundrauschen (Autofluoreszenz) besser zu trennen. Um Aberrationen aufgrund des Emissionsspektrums des FDA zu vermeiden, die auch den FL2-Kanal beeinträchtigen können, muss die Kompensation des Geräts entsprechend angepasst werden, um den Beitrag von FL1 von FL2 zu subtrahieren. Gegebenenfalls wird der Kanal FL3 anstelle des Kanals FL2 verwendet, um eine bessere Unterscheidung der Fluoreszenzsignale von lebenden (FL1) und toten (FL2 oder FL3) Zellen zu ermöglichen.

Es wird eine volumetrische Zählung der in der Probe vorhandenen Zellen durchgeführt. Die Kanäle FL1 und FL2 (oder FL3) werden im Dotplot dargestellt, um die Trennung der beiden Zellpopulationen besser sichtbar zu machen (Abbildung 2). Als lebende Zellen gelten die Ereignisse, die im FL1-Kanal erfasst werden und aus dem Gate mit der Hefepopulation stammen, die im Dotplot der physikalischen Parameter FSC und SSC identifiziert wird. Als tote Zellen werden die Ereignisse betrachtet, die im Kanal FL2 (oder FL3) erfasst werden und aus dem Gate mit der Hefepopulation stammen, die im Dotplot der physikalischen Parameter FSC und SSC identifiziert wird. Als gestresste, aber lebensfähige Zellen ist die Population von Ereignissen zu betrachten, die nach entsprechender Kompensation der Signale auf beiden Kanälen (FL1 und FL2 oder FL3) positiv bleiben.

9. Berechnung

Nach Abschluss der volumetrischen Zählung ist die Anzahl der gezählten lebenden, toten und geschädigten Zellen entsprechend dem vom Durchflusszytometer entnommenen Volumen und unter Berücksichtigung der vorgenommenen Dezimalverdünnungen in Volumen- oder Gewichtseinheiten anzugeben. Da es sich um eine direkte Zellzählung handelt, kann das Ergebnis je nach physikalischem Zustand und Dichte der Ausgangsprobe als „Zellen/g“ ausgedrückt werden, wobei zu prüfen ist, ob keine Dubletten oder Tripletten vorhanden sind.

Literatur

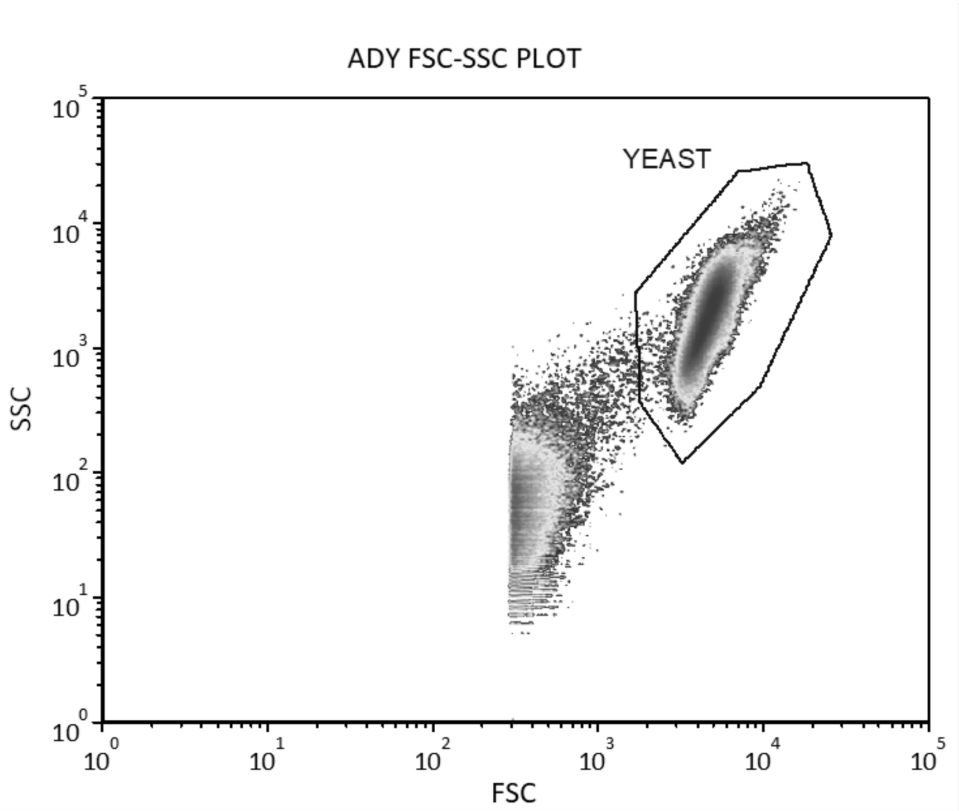
1. C. Longin, C. Petitgonnet, M. Guilloux-Benatier, S. Rousseaux, H. Alexandre. 2017. Application of flow cytometry to wine microorganisms. Food Microbiology. 62, 221-231. DOI: 10.1016/j.fm.2016.10.023.

Beglaubigte Ausführung Chișinău, 20. Juni 2025
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
John BARKER

© OIV 2025

2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2022. CLSI H62. Validation of Assays Performed by Flow Cytometry, 1st Edition. ISBN: 978-1-68440-129-1.
3. ISO 7218:2007 amd1:2013 – Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
4. M. Kwolek-Mirek, R. Zadrag-Tecza. 2014. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. FEMS Yeast Research. 14 1068–1079. DOI: 10.1111-1567-1364.12202.
5. R. Guzzon, R. Larcher. 2015. The application of flow cytometry in microbiological monitoring during winemaking: two case studies. Annals of Microbiology. 65 1865–1878. DOI: 10.1007/s13213-014-1025-6.

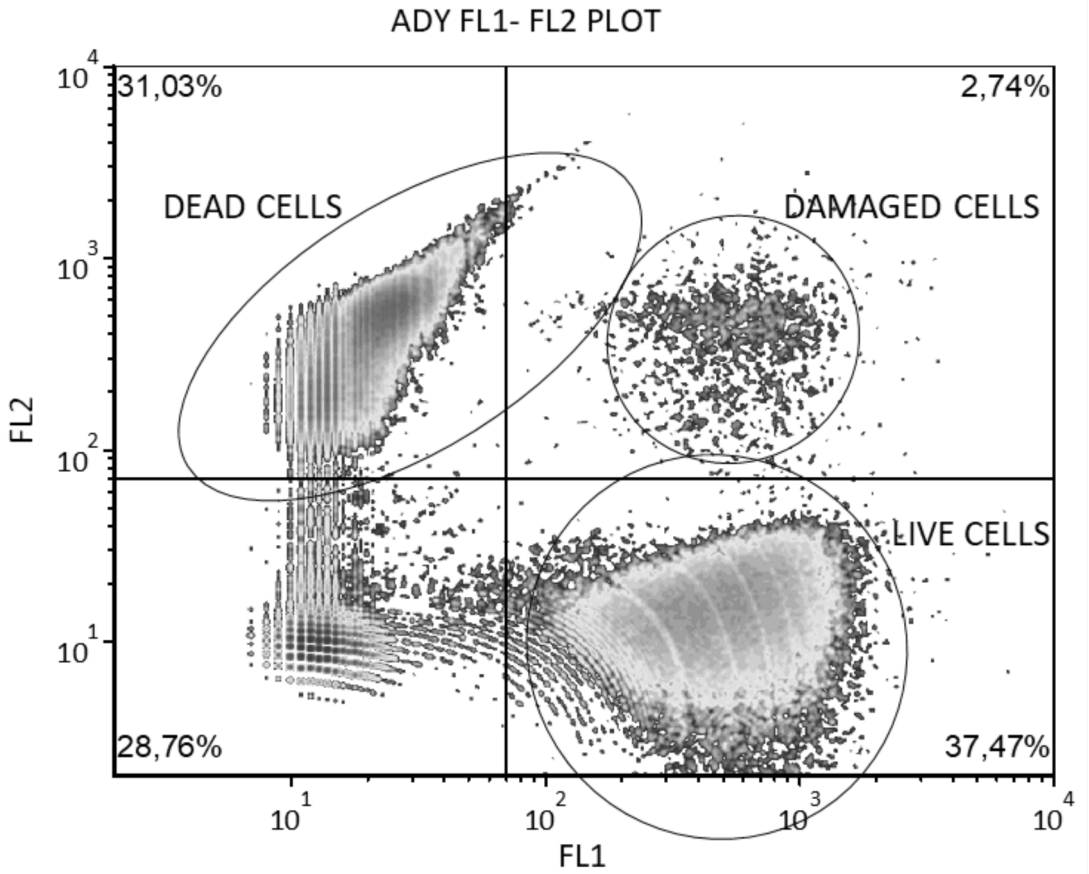
Abbildung 1: Das FSC-SSC-Dotplot zeigt das Gate mit Ereignissen, die der Population von S. cerevisiae (Hefe)-Zellen in einer Prrobe mit einer Konzentration von 10^5 Zellen/ml entsprechen



Beglaubigte Ausführung Chișinău, 20. Juni 2025
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
John BARKER

© OIV 2025

Abbildung 2: Dotplot FL1 (530 nm)-FL2 (630 nm) zeigt die Gates mit Ereignissen, die der Population von lebenden (LIVE), toten (DEAD) und beschädigten (DAMAGED) S. cerevisiae-Zellen entsprechen.



Beglaubigte Ausführung Chișinău, 20. Juni 2025
Der Generaldirektor der OIV
Sekretär der Generalversammlung
John BARKER

© OIV 2025