РЕЗОЛЮЦИИ OIV-OENO 713A-2025

ПОДСЧЕТ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК В ВИНОГРАДНОМ СУСЛЕ И ВИНЕ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

ГЕНЕРАЛЬНАЯ АССАМБЛЕЯ,

ПРИНИМАЯ ВО ВНИМАНИЕ, что в целях эффективного управления спиртовым брожением и вторичным брожением игристых вин необходимы быстрые и точные методы определения количества и физиологического состояния популяции винных дрожжей;

ПРИНИМАЯ ВО ВНИМАНИЕ, что в настоящее время большая часть утвержденных OIV методов микробиологического анализа основана на подсчете колоний в чашках Петри — методе надежном и эффективном, однако требующем продолжительной инкубации, что в ряде случаев неприемлемо в связи с высокой скоростью процесса брожения;

ПРИНИМАЯ ВО ВНИМАНИЕ, что в настоящее время метод проточной цитометрии широко применяется в различных секторах сельскохозяйственной, пищевой и биотехнологической промышленности, что данный метод многократно продемонстрировал свою надежность и что на рынке имеется множество соответствующих технологических решений для различных производств;

ПРИНИМАЕТ РЕШЕНИЕ об утверждении следующего микробиологического метода анализа виноградного сусла и вина и включении его в Сборник международных методов анализа и оценки вин и сусел:

ПОДСЧЕТ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК В ВИНОГРАДНОМ СУСЛЕ И ВИНЕ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Метод [OIV-MA-[соответствующий номер]]

Метод IV типа

1. Подсчет дрожжевых клеток в виноградном сусле и вине методом проточной цитометрии

Сертификат соответствия Кишинёв, 20 июня 2025

Генеральный директор OIV

Секретарь Генеральной Ассамблеи

Джон БАРКЕР

© OIV 2025

2. Сфера применения

Метод предназначен для определения количества жизнеспособных, подвергшихся стрессу (с проницаемой мембраной) и мертвых дрожжевых клеток.

Этот метод, в котором используется двойное мечение, не позволяет определять количество жизнеспособных метаболически неактивных клеток (с непроницаемой мембраной).

Настоящий метод предназначен для анализа вина, виноградного сусла, виноградного сусла в процессе спиртового брожения и вторичного брожения.

Пределы количественного определения зависят от характеристик используемого оборудования и метода подготовки проб.

3. Определения

ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ. Проточная цитометрия – это метод, который позволяет с минимальными затратами времени осуществлять анализ отдельных клеток в жидкой среде по ряду параметров. В проточном цитометре в качестве источников света используют лазеры, создающие рассеянные и флуоресцентные световые сигналы, которые регистрируют детекторы, такие как фотодиоды или фотоэлектронные умножители. Эти сигналы преобразуются в электрические импульсы, анализ которых осуществляет компьютер. Совокупность клеток можно дифференцировать и/или охарактеризовать на основе их флуоресцентных или светорассеивающих характеристик.

ПРЯМОЕ (МАЛОУГЛОВОЕ) СВЕТОРАССЕЯНИЕ (FSC). Сигнал, возникающий при рассеянии света частицей (клеткой). Обычно он регистрируется под углом 180° к направлению света и может быть напрямую связан с размером частиц.

БОКОВОЕ СВЕТОРАССЕЯНИЕ (SSC). Сигнал, возникающий при рассеянии света частицей (клеткой). Обычно он регистрируется под углом 90° к направлению света и может быть непосредственно связан со структурной сложностью частиц.

КАНАЛ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ (FLX). Сигналы, возникающие за счет флуоресцентного излучения флуорохромов подходящих цветов, связанных с частицами. Излучаемые волны различной длины разделяют с помощью оптических фильтров и как правило, нумеруют их последовательно (FL1, FL2 и т.д.).

КОМПЕНСАЦИЯ. Процесс коррекции избыточной флуоресценции путем вычитания сигнала данного флуоресцентного красителя на всех детекторах, кроме предназначенного для измерения этого красителя. Обычно применяется

Сертификат соответствия Кишинёв, 20 июня 2025
Генеральный директор OIV
Секретарь Генеральной Ассамблеи
Джон БАРКЕР

© OIV 2025

на каналах FL2 или FL3 для устранения вклада флуоресцентного красителя, имеющего максимум пика излучения на канале FL1.

ВОЛЮМЕТРИЧЕСКИЙ ПОДСЧЕТ. Подсчет числа событий (клеток) в фиксированном объеме образца, который обычно осуществляется с помощью двух электродов, расположенных на разных уровнях в кювете с образцом. Допускается использование некоторых альтернативных решений, например, волюметрического насоса.

СОБЫТИЕ. Событие – это регистрация отдельной частицы, проходящей через лазерный луч (лучи) прибора. Каждое событие соответствует набору измерений различных оптических и физических свойств этой частицы. В задачи оператора входит показать, что событие связано с одиночной клеткой, путем проверки отсутствия скоплений клеток (дублетов, триплетов и т. д.).

4. Принцип метода

Клеточную суспензию, полученную путем подходящего десятикратного разбавления образца, анализируют методом проточной цитометрии в режиме волюметрического подсчета после мечения флуоресцентными красителями, позволяющими различать клетки, обладающие ферментативной активностью (живые), и клетки с разрушенной цитоплазматической мембраной (мертвые). Кроме того, в некоторых случаях можно выделить 3-ю субпопуляцию клеток, обладающих метаболической активностью, но с измененной проницаемостью клеточной мембраны, эта субпопуляция включает подвергшиеся стрессу, но жизнеспособные клетки.

Предложенный здесь метод является стандартным методом, в котором используют один синий лазер и 2 флуоресцентных красителя. Существуют и более сложные методы с использованием многолазерных цитометров и большего количества меток.

В данном методе используют 2 типа флуоресцентных красителей:

- Йодистый пропидий (PI) – это интеркалирующий краситель для нуклеиновых кислот (ДНК или РНК). Он проникает только в клетки с проницаемой плазматической мембраной. Принято считать, что это главным образом мертвые клетки или клетки, испытывающие мембранный стресс (например, под действием этанола). Пик возбуждения этого красителя находится между 520 и 550 нм, а максимум флуоресценции – между 610 и 630 нм. Таким образом, клетки, обозначаемые PI(−), считаются жизнеспособными, а PI(+) –

Сертификат соответствия Кишинёв, 20 июня 2025
Генеральный директор OIV
Секретарь Генеральной Ассамблеи
Джон БАРКЕР

© OIV 2025

мертвыми или имеющими проницаемую плазматическую мембрану.

- 5(6)-Карбоксифлуоресцеин диацетат (cFDA). Это субстрат эстеразы, способный проникать в клетку и используемый для оценки метаболической (эстеразной) активности. При гидролизе этого ацетоксиметилового эфира внутриклеточными эстеразами образуется карбоксифлуоресцеин, пик возбуждения которого составляет 498 нм, а максимум эмиссии флуоресценции – 516 нм. Спектр его излучения расположен в диапазоне, достигающем 650 нм, поэтому может потребоваться компенсация на других каналах (FL2). Таким образом, клетки, обозначаемые cFDA(+), считаются метаболически активными (обладающими эстеразной активностью), а клетки cFDA(−) – метаболически неактивными.

Таблица 1. Краткое описание интерпретации на основе флуоресцентных сигналов

Квадрант	**PI(−)**	**PI(+)**
cFDA(−)	Невозможно интерпретировать в данном методе	Мертвые
cFDA(+)	Жизнеспособные и активные	Активные клетки с измененной плазматической мембраной, проницаемой для PI (клетки, испытывающие стресс)

Примечание 1. Популяция клеток PI(−) характеризуется целостностью мембраны, а у клеток cFDA(−) не проявляется метаболическая активность.

Примечание 2. Этот метод не позволяет отделить сигнал клеток от возможного фонового шума. Поэтому квадрант PI(−), cFDA(−) невозможно интерпретировать.

5. Реагенты и материалы

Стеклянная лабораторная посуда общего назначения, кюветы для проточной цитометрии и проточная жидкость (если требуется для работы прибора).

Пробирки (16×160 мм или аналогичные), содержащие 9 мл фосфатного буферного раствора (PBS) (pH 7,4), профильтрованного через фильтр с размером пор 0,2 мкм.

5(6)-Карбоксифлуоресцеин диацетат (порошок) (cFDA; номер CAS 124387-19-5).

Сертификат соответствия Кишинёв, 20 июня 2025
Генеральный директор OIV
Секретарь Генеральной Ассамблеи
Джон БАРКЕР

© OIV 2025

Йодистый пропидий (порошок) 95 % (PI; номер CAS 25535-16-4).

Диметилсульфоксид, чистый, жидкость (ДМСО; номер CAS 67-68-5).

Чистая культура *S. cerevisiae* (например, штамм ATCC 9763) с номинальной концентрацией 10^5 кл/мл.

Водный раствор NaCl с концентрацией 8,5 г/л, стерилизованный фильтрованием или автоклавированием.

Раствор cFDA в ДМСО или ацетоне, 0,1 мг/мл.

Раствор PI в ДМСО или водный, 1 мг/мл.

Примечание 1. Для разбавления флуоресцентных красителей используют ДМСО. Кроме того, для этого можно использовать ацетон. Однако оказалось, что при использовании смеси ацетона с ДМСО на цитометре происходит усиление фонового шума, поэтому рекомендуется использовать только ДМСО.

6. Оборудование

Проточный цитометр с лазером с длиной волны 488 нм (50 мВт) и оптическими каналами FSC, SSC, FL1 (530 нм), FL2 (630 нм) и FL3 (670 нм).

Мешалка Vortex.

Стеклянная лабораторная посуда.

Лабораторный фильтр 0,2 мкм для стерилизации (предпочтительно изготовленный из ацетата целлюлозы, который ограничивает фоновый шум).

Планшет для проточной цитометрии.

Микропипетки объемом 1 и 0,2 мл со стерильными наконечниками.

Аналитические весы с точностью ± 0,01 г.

Лабораторная центрифуга.

Примечание. Соблюдение стерильности не обязательно, однако рекомендуется поддерживать высокий уровень гигиены, а также использовать стерильное оборудование и реагенты.

7. Отбор образца (Подготовка пробы)

Пробы вина и сусла исследуют методом OIV-MA-AS4-01 «Microbiological Analysis of Wines and Musts - Detection, Differentiation and Counting of Micro-organisms» («Микробиологический анализ вина и сусла – обнаружение, идентификация и подсчет микроорганизмов»), описанным в Сборнике международных методов анализа и оценки вин и сусел (Резолюция OIV/OENO 206/2010).

Сертификат соответствия Кишинёв, 20 июня 2025
Генеральный директор OIV
Секретарь Генеральной Ассамблеи
Джон БАРКЕР

© OIV 2025

Перед отбором образца или пробы для анализа весь объем вина перемешивают, чтобы обеспечить равномерное распределение клеток в вине.

8. Методика

Поскольку анализ методом проточной цитометрии происходит достаточно быстро и на современном оборудовании обычно занимает не более трех минут, риск загрязнения образца при манипуляциях вне вытяжного шкафа с ламинарным потоком и в ходе регистрации показаний является незначительным. Однако необходимо поддерживать высокий уровень гигиены, а также использовать стерильное оборудование и реагенты.

Данная методика приводится в качестве примера. В лаборатории могут быть внесены изменения. При использовании метода проточной цитометрии требуется постоянный подбор разбавления образца в зависимости от используемого оборудования и микробной нагрузки анализируемых продуктов.

ПОДГОТОВКА ПРОТОЧНОГО ЦИТОМЕТРА К РАБОТЕ

Включить электропитание проточного цитометра и промыть его во избежание искажения результатов анализа. Установить логарифмическую шкалу для представления данных на каналах детекции FSC, SSC, FL1 (детекция при 530 нм) и FL2 (детекция при 630 нм) и FL3 (детекция при 670 нм).

Цитометр следует считать готовым к работе после регистрации отсутствия событий, способных препятствовать детекции сигнала образца на канале FSC в ходе анализа образца, содержащего только проточную жидкость.

Выполнить анализ чистой культуры *S. cerevisiae*, при необходимости отрегулировать напряжение каналов FSC и SSC так, чтобы пик сигнала обоих каналов FSC и SSC хорошо отделялся от фонового шума. Если в проточном цитометре предусмотрена такая возможность, устранить вклад фонового шума можно путем изменения порогового значения параметра FSC. Построить точечный график сигналов FSC и SSC и отметить на нем область, содержащую сигналы от дрожжевых клеток, установив таким образом специфическую область определения (рис. 1).

ОКРАШИВАНИЕ ПРОБ

Вино или сусло, подготовка пробы для популяции дрожжей > 10^2 кл/мл

Образец разбавляют раствором NaCl в соотношении 1/10 – 1/100 (или больше) в зависимости от характеристик используемого оборудования и микробной нагрузки.

Сертификат соответствия Кишинёв, 20 июня 2025
Генеральный директор OIV
Секретарь Генеральной Ассамблеи
Джон БАРКЕР

© OIV 2025

Помещают 980 мкл разбавленного образца в кювету для цитометрии в соответствии с техническими характеристиками прибора.

Проводят окрашивание, например, 10 мкл раствора cFDA и 10 мкл раствора PI в 980 мкл разбавленного вина или сусло.

Инкубируют в течение примерно 10 минут при комнатной температуре, в темноте.

По окончании инкубации пробу перемешивают и считывают показания проточного цитометра в режиме волюметрического подсчета.

Вино или сусло, подготовка пробы для популяции дрожжей < 10^2 кл/мл (например, вино в упаковке)

Центрифугируют 50 мл образца при 4500 об/мин в течение примерно 8 мин.

Отбрасывают надосадочную жидкость и собирают осадок.

Для этого осадок суспендируют, например, в 10 мл раствора NaCl.

Проводят окрашивание, например, 10 мкл раствора cFDA и 10 мкл раствора PI в 980 мкл ещё раз разбавленного осадочного вина.

Инкубируют в течение примерно 10 минут при комнатной температуре, в темноте.

По окончании инкубации пробу перемешивают и считывают показания проточного цитометра в режиме волюметрического подсчета.

Примечание 1. Конечная концентрация cFDA в меченом образце составляет 2 – 5 мг/л. Конечная концентрация PI в меченом образце составляет 3 – 10 мг/л.

Примечание 2. Порядок внесения флуоресцентных красителей не имеет значения. Их можно вносить одновременно в раствор, содержащий два флуоресцентных красителя.

Примечание 3. Окраска обычно остается стабильной в течение 1 часа и более.

АНАЛИЗ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Выполняют анализ пробы, настроив цитометр таким образом, чтобы популяция дрожжей попала в область определения, установленную ранее с использованием чистой культуры *S. cerevisiae*.

Регулируют напряжение на каналах FL1 и FL2 для лучшего разделения пика излучения пробы и фонового шума (автофлуоресценции). Поскольку канал FL2 также может регистрировать спектр излучения диацетата флуоресцеина, для исключения обусловленной этим погрешности компенсацию прибора настраивают таким образом, чтобы из показаний канала FL2 вычитались показания канала FL1. При необходимости вместо канала FL2 используют канал

Сертификат соответствия Кишинёв, 20 июня 2025
Генеральный директор OIV
Секретарь Генеральной Ассамблеи
Джон БАРКЕР

© OIV 2025

FL3, что позволяет лучше различать флуоресцентные сигналы, относящиеся к живым (FL1) и мертвым (FL2 или FL3) клеткам. Выполняют волюметрический подсчет присутствующих в пробе клеток. Наносят показания каналов FL1 и FL2 (или FL3) на точечный график для лучшего наглядного представления различий между этими группами клеток (рис. 2). События, зарегистрированные каналом FL1 и расположенные в области определения клеток дрожжей, отмеченной на точечном графике FSC/SSC, учитывают как живые клетки. События, зарегистрированные каналом FL2 (или FL3) и расположенные в области определения популяции дрожжей, отмеченной на точечном графике FSC/SSC, учитывают как мертвые клетки. Совокупность событий, которые регистрируют как положительный сигнал оба канала (FL1 и FL2 или FL3), после соответствующей компенсации сигналов живых и мертвых клеток, учитывают как жизнеспособные клетки, испытывающие стресс.

9. Выполнение расчетов

После завершения волюметрического подсчета рассчитывают количество живых, мертвых и поврежденных клеток на единицу объема или массы образца, исходя из объема введенной в цитометр пробы с учетом произведенных десятикратных разбавлений. Поскольку выполняется прямой подсчет клеток, результат может быть выражен в количестве клеток на миллилитр (кл/мл) или грамм (кл/г) образца при условии контроля отсутствия дуплетов и триплетов.

Библиография

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.
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 – Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям.
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.

Сертификат соответствия Кишинёв, 20 июня 2025
Генеральный директор OIV
Секретарь Генеральной Ассамблеи
Джон БАРКЕР

© OIV 2025

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.

Рисунок 1. Точечный график FSC / SSC, на котором показана область определения совокупности событий, соответствующих клеткам S. cerevisiae (YEAST), присутствующим в образце в концентрации 10^5 *кл/мл.*

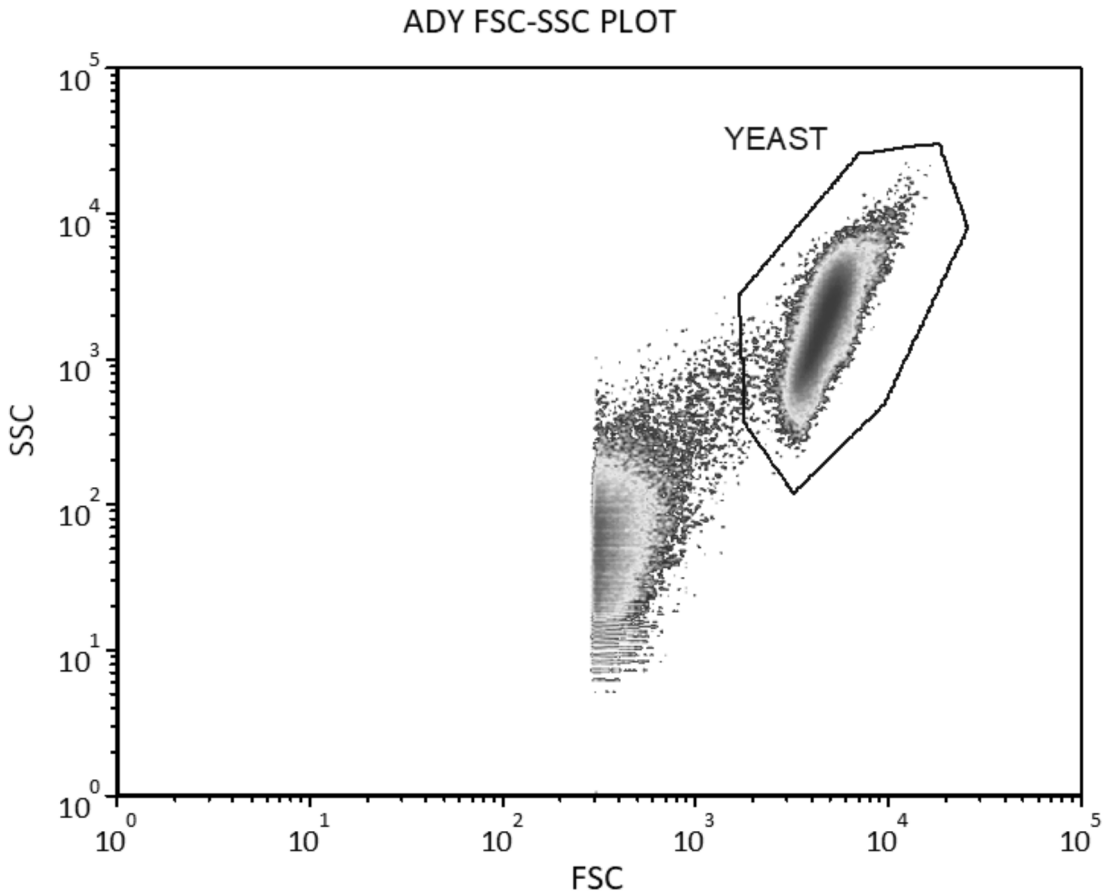
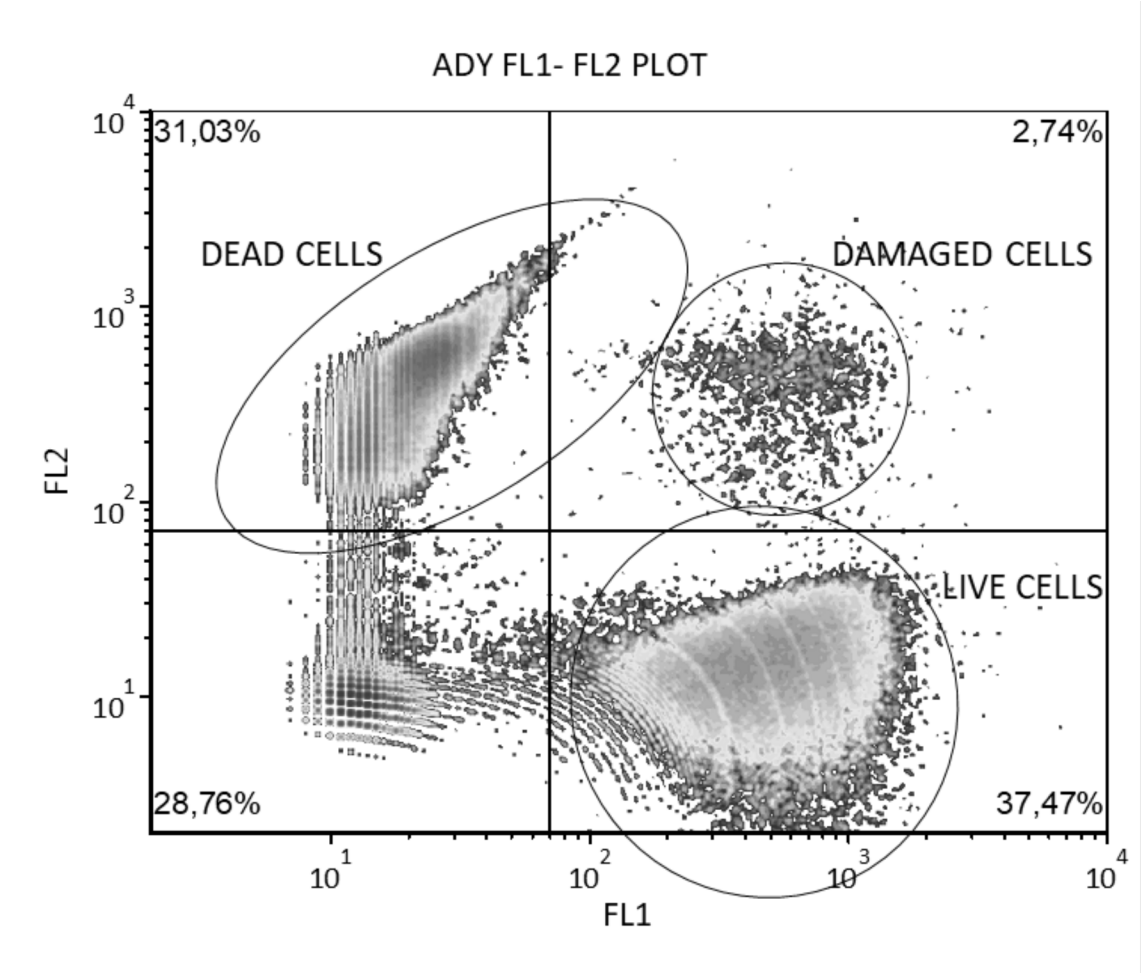


Рисунок 2. Точечный график FL1 (530 нм) / FL2 (630 нм), на котором показаны области определения совокупностей событий, соответствующих живым (LIVE CELLS), мертвым (DEAD CELLS) и испытывающим стресс, но жизнеспособным (DAMAGED CELLS) клеткам S. cerevisiae.

© OIV 2025



Сертификат соответствия Кишинёв, 20 июня 2025
Генеральный директор OIV
Секретарь Генеральной Ассамблеи
Джон БАРКЕР

© OIV 2025