



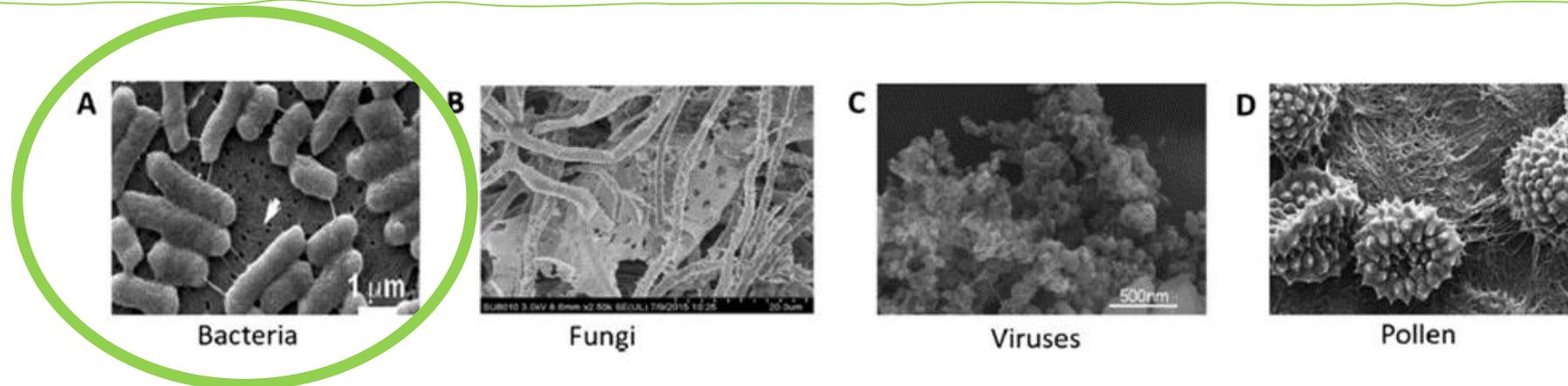
ChAMBRe e lo studio del bioaerosol: approccio metodologico per l'analisi qualitativa e quantitativa della vitalità batterica

**Elena Gatta¹, Elena Abd El^{1,2}, Marco Brunoldi^{1,2}, Muhammad Irfan^{1,2},
Tommaso Isolabella^{1,2}, Dario Massabò^{1,2}, Federico Mazzei^{1,2},
Franco Parodi², Paolo Prati^{1,2}, Virginia Vernocchi²**

¹ Università degli studi di Genova, Dipartimento di Fisica, Genova, ² Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, Sezione di Genova, Genova

IL NOSTRO GOAL : STUDIARE LA VITALITÀ BATTERICA SIMULANDO DIVERSE CONDIZIONI ATMOSFERICHE

- ✓ Studiare quantitativamente la relazione dose-effetto tra vitalità batterica e concentrazione in atmosfera di inquinanti
- ✓ Sviluppare ed implementare una procedura sperimentale che garantisca una sensibilità sufficiente per apprezzare variazioni di vitalità da adottare per studi sistematici



Immagini al microscopio elettronico di alcune componenti del Bioaerosol

ChAMBRé

Chamber for **A**erosol **M**odelling and **B**io-aerosol **R**esearch



- Volume $\approx 2.2 \text{ m}^3$
- Acciaio inossidabile
- L'unica camera italiana dedicata allo studio del bio-aerosol



*Massabò et al., (2018)
Atmos. Meas. Tech., 11, 5885-5900*



Esposizione del bioaerosol a diverse condizioni atmosferiche STEP 3

Produzione del bioaerosol STEP 2

Preparazione batteri da nebulizzare STEP 1

Selezione dei batteri → Crescita batterica

P. fluorescens
B. Subtilis
E. coli



Conta batterica

- CFU/ml
- Automatica
- LIVE/DEAD

Iniezione



NEBULIZZATORE SLAG



Determinazione dei batteri presenti nell'aria

Monitoraggio in tempo reale del bioaerosol



CONTATORE DI PARTICELLE WIBS

Raccolta batteri



COLLETTORE ANDERSEN

Incubazione batteri



Determinazione della frazione vitale batterica



Determinazione della frazione batterica aerodispersa CFU/cm³ raccolte STEP 4

VIABILITY ≠ VITALITY

Viability = La vitalità è definita come «percentuale di cellule vive in un'intera popolazione».

Vitality = «capacità fisiologica di una cellula metabolicamente attiva»

Kwolek-Mirek M. and Zadrag-Tecza R. «Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells» FEMS, 2014 doi: 10.1111/1567-1364.12202

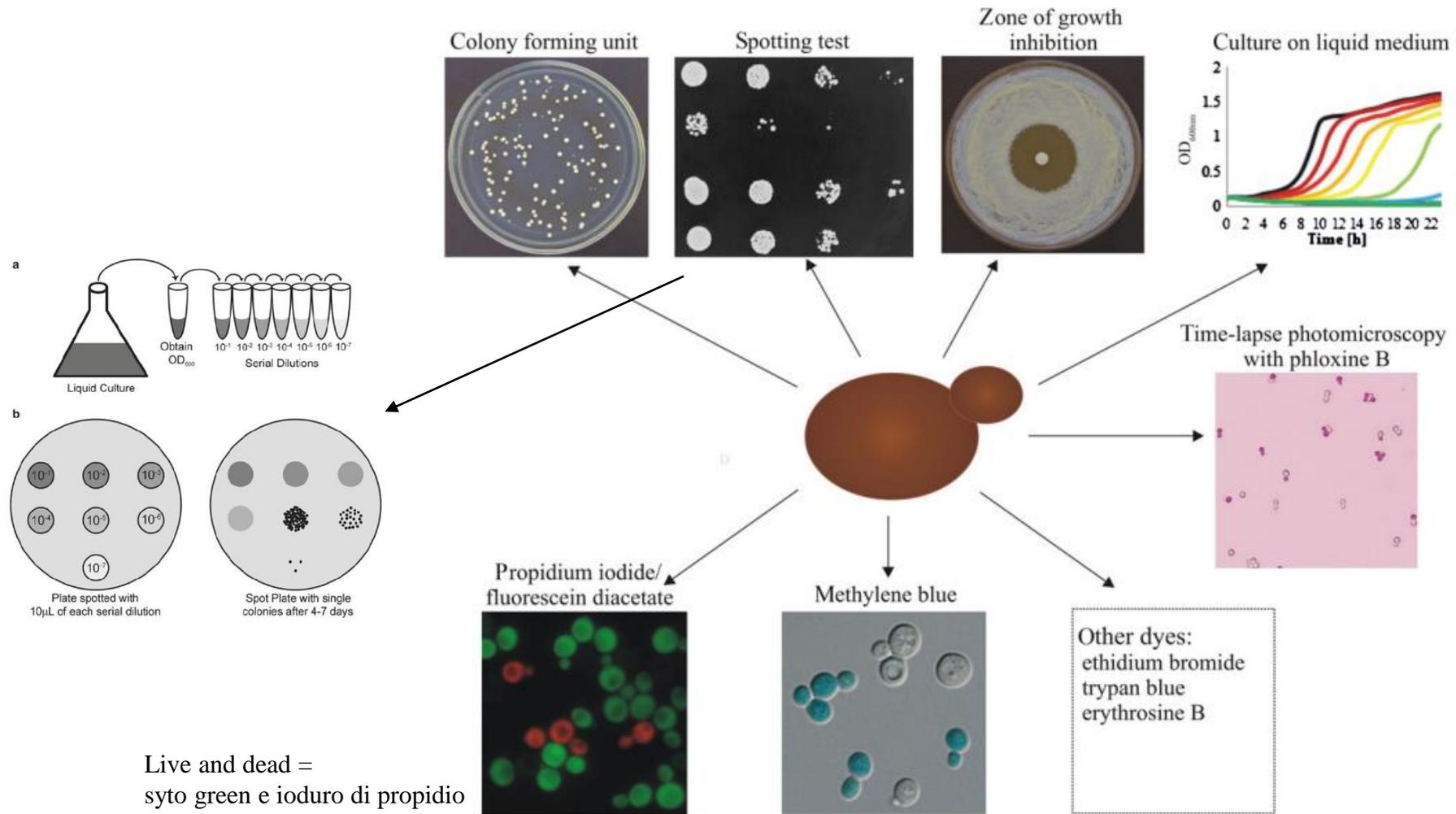
La definizione di vitalità nei microrganismi è legata alla loro capacità di moltiplicarsi.

Ma solleva una serie di domande:

- **Dopo quanto tempo si può definire morto un organismo?**
- **A quali condizioni di crescita si applica la definizione?**
- **Un organismo capace di metabolismo, ma carente nella capacità di replicarsi, è considerato vivo o morto?**

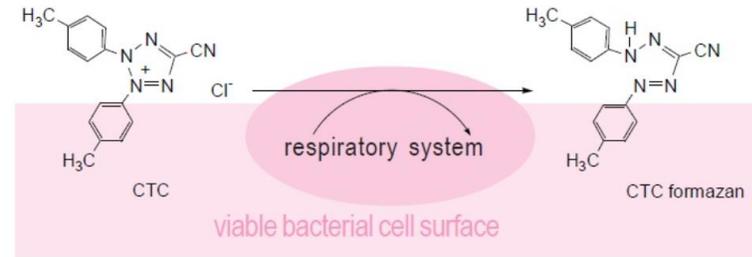
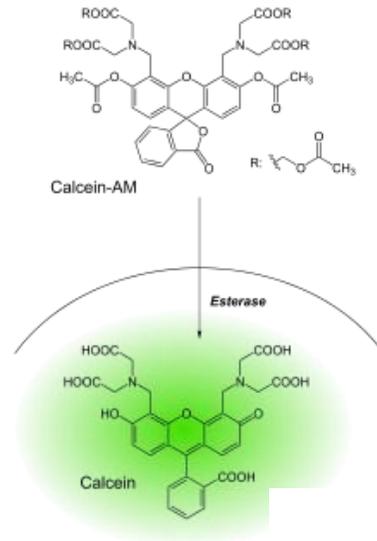
Elisabeth B. et al «Microalgae culture quality indicators: a review» Crit rev biotechnol.2021 Jun;41(4):457-473. doi: 10.1080/07388551.2020.1854672.

METODI PER VALUTARE LA «CELL VIABILITY»



METODI PER VALUTARE LA «CELL VITALITY»

Metabolic activity



Eccitazione = 488 nm
Emissione = 630 nm

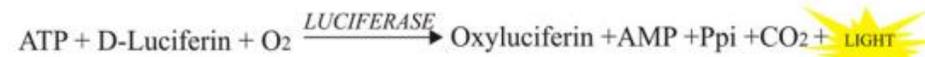
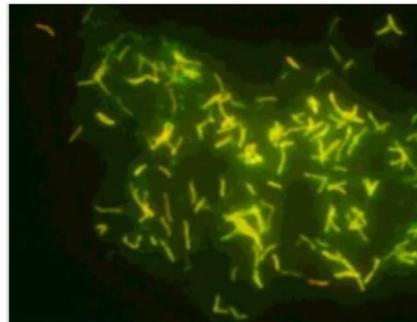
Enzyme activity



membrane potential

ATP content

Rhodamine Staining



VBNC = STRATEGIA DI SOPRAVVIVENZA

I batteri possono entrare in questo stato dormiente e non sono in grado di dividersi a causa di:

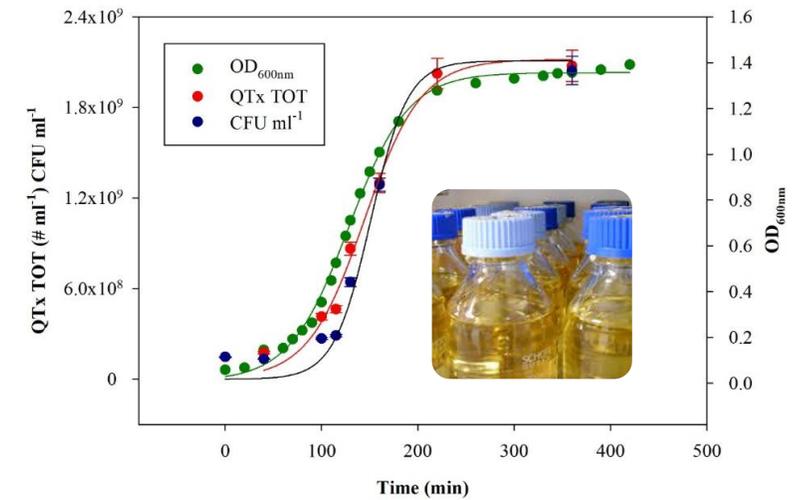
- **mancanza di specifici nutrienti nel mezzo di coltura**
- **improprie condizioni di incubazione**
- **bassa temperatura, variazioni di salinità, anossia, pH**
- **alta concentrazione di antibiotici**

Per valutare i VBNC sono accettati questi tre criteri:

colturabilità, attività metabolica, integrità della parete/membrana cellulare batterica

Preparazione batteri da nebulizzare **STEP 1**

- Crescita batterica in brodo TSB o NB
- Raggiungimento della fase esponenziale: $OD(600nm) \approx 0.5$
- Centrifugazione e risospensione in soluzione fisiologica



Lo scopo è iniettare il maggior numero di cellule vitali possibili!

Caratterizzazione dell'inoculo batterico tramite tre metodi:



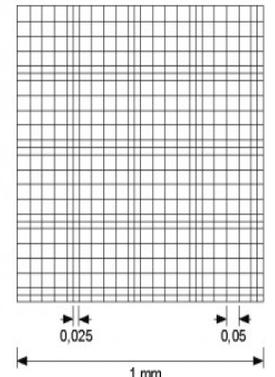
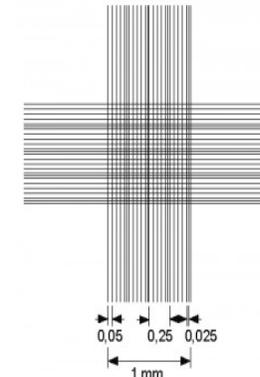
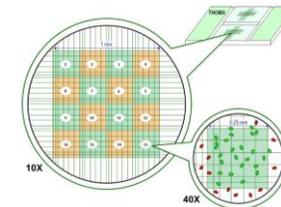
**1) Conta automatica
(Quantom Tx Cell counter)**

syto green e calceina AM
vitality



**2) Conta CFU/ml
= n colonie * fattore diluizione**

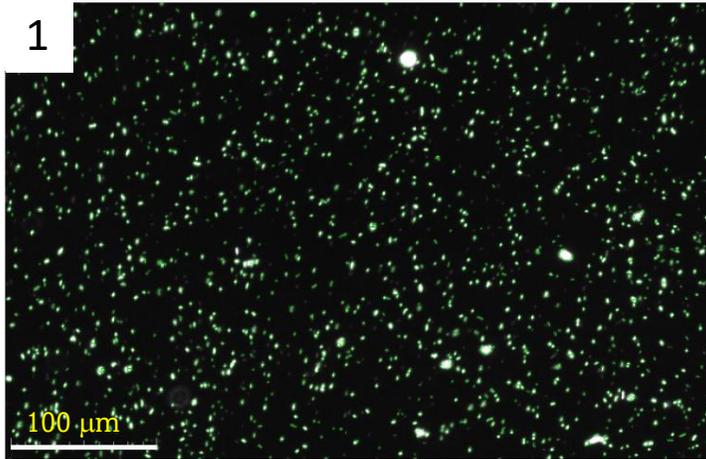
viability



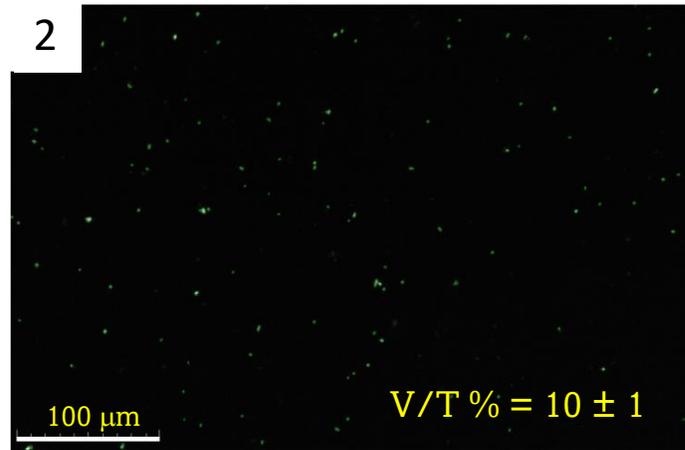
**3) Conta live and dead con
Camera di Thoma**

syto green e ioduro di propidio
viability

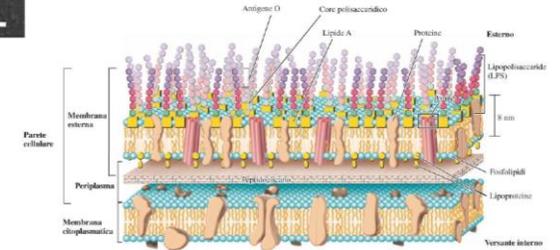
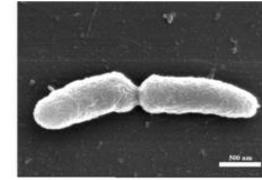
RISULTATI QUANTOM TX – SONDA TOTALE E VITALE A OD=0.5



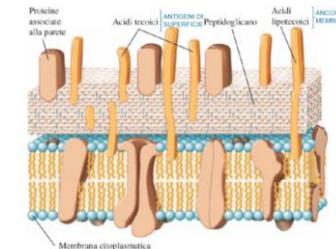
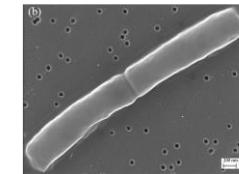
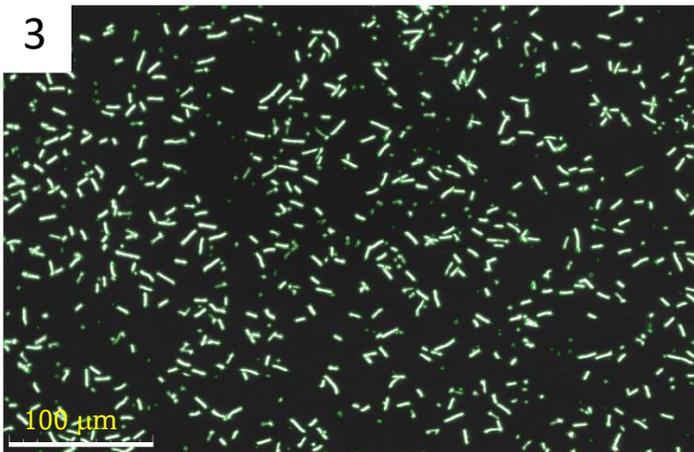
Sonda totale = Syto green



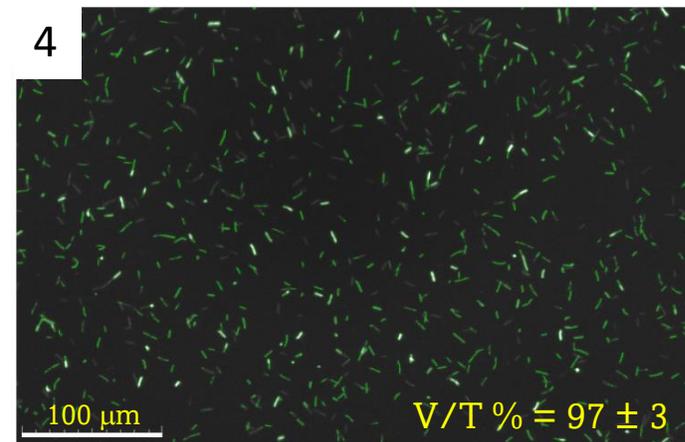
Sonda vitale = calceina AM



Gram negativo,
Pseudomonas fluorescens 2.5 μm



Gram positivo,
Bacillus subtilis 6.7 μm



CRITICITA' DELLA CALCEINA AM

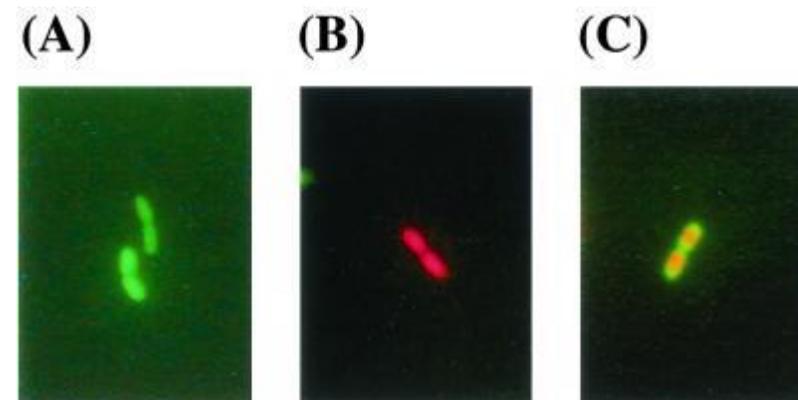
La CAM ha difficoltà a penetrare la parete dei batteri GRAM negativi → intensità di fluorescenza minore ed a una sottostima della conta delle cellule vitali

- Tempi incubazione più lunghi
- Concentrazioni più elevate

→ La CAM può essere utilizzata come indicatore per rilevare i batteri vivi

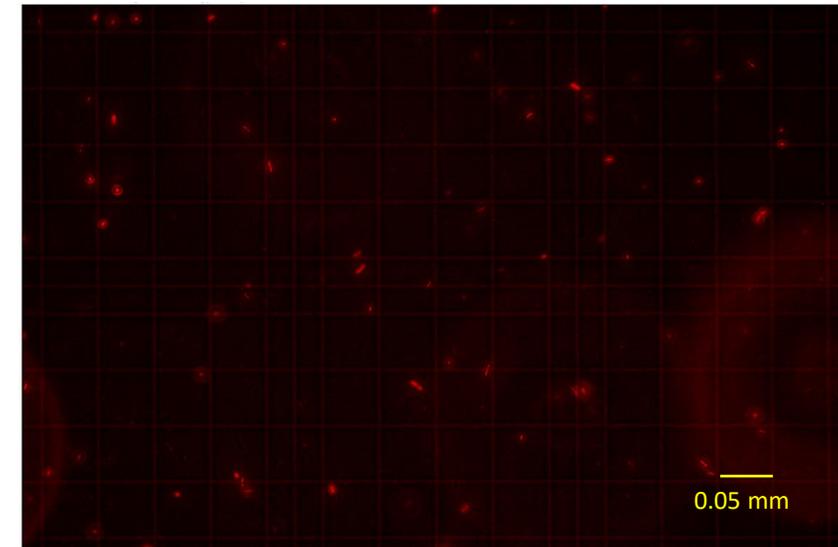
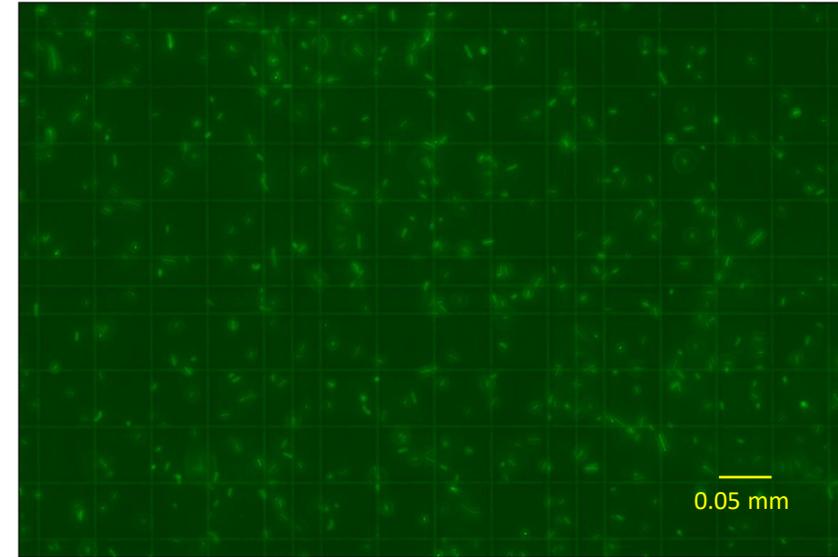
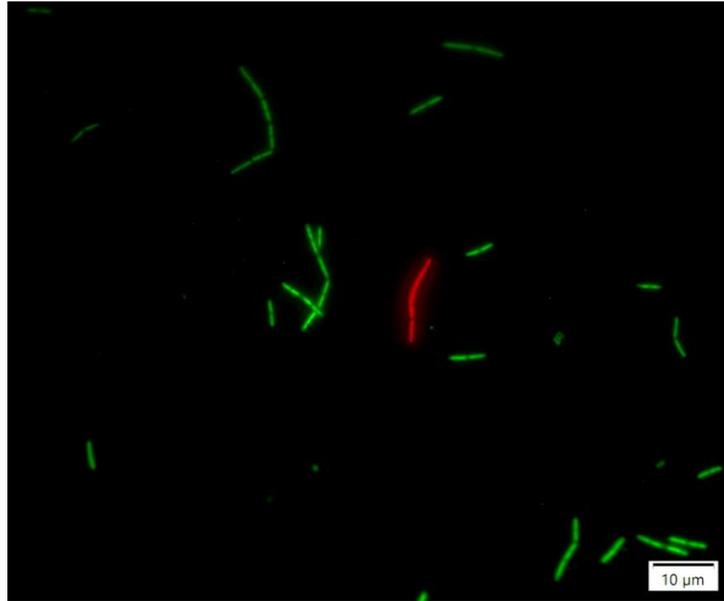
→ Non può essere utilizzata per rilevare le cellule vive di tutti i batteri gram-negativi

→ La scelta del colorante utilizzato dipende dal ceppo batterico in studio



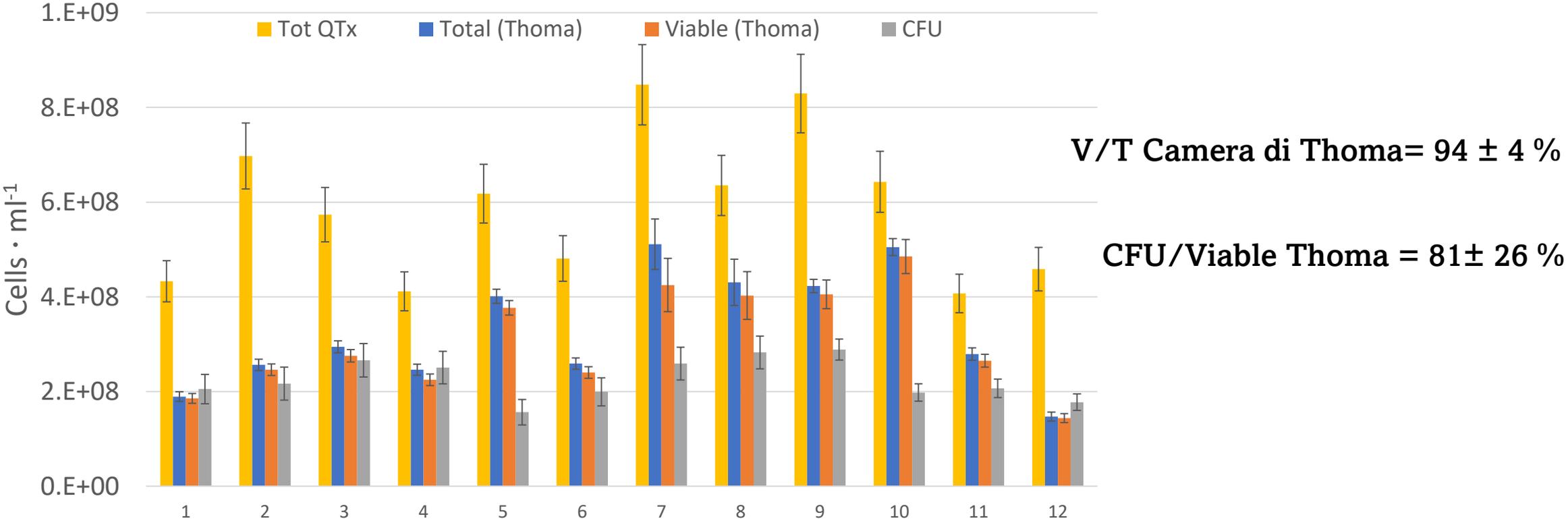
Fluorescence micrographs of *C. testosteroni* TK102 after staining with CAM and PI. Live (A), dead (B), and permeabilized cells (C) fluoresced green, red, and both green and red, respectively.

RISULTATI MICROSCOPIA IN FLUORESCENZA LIVE/DEAD A OD=0.5



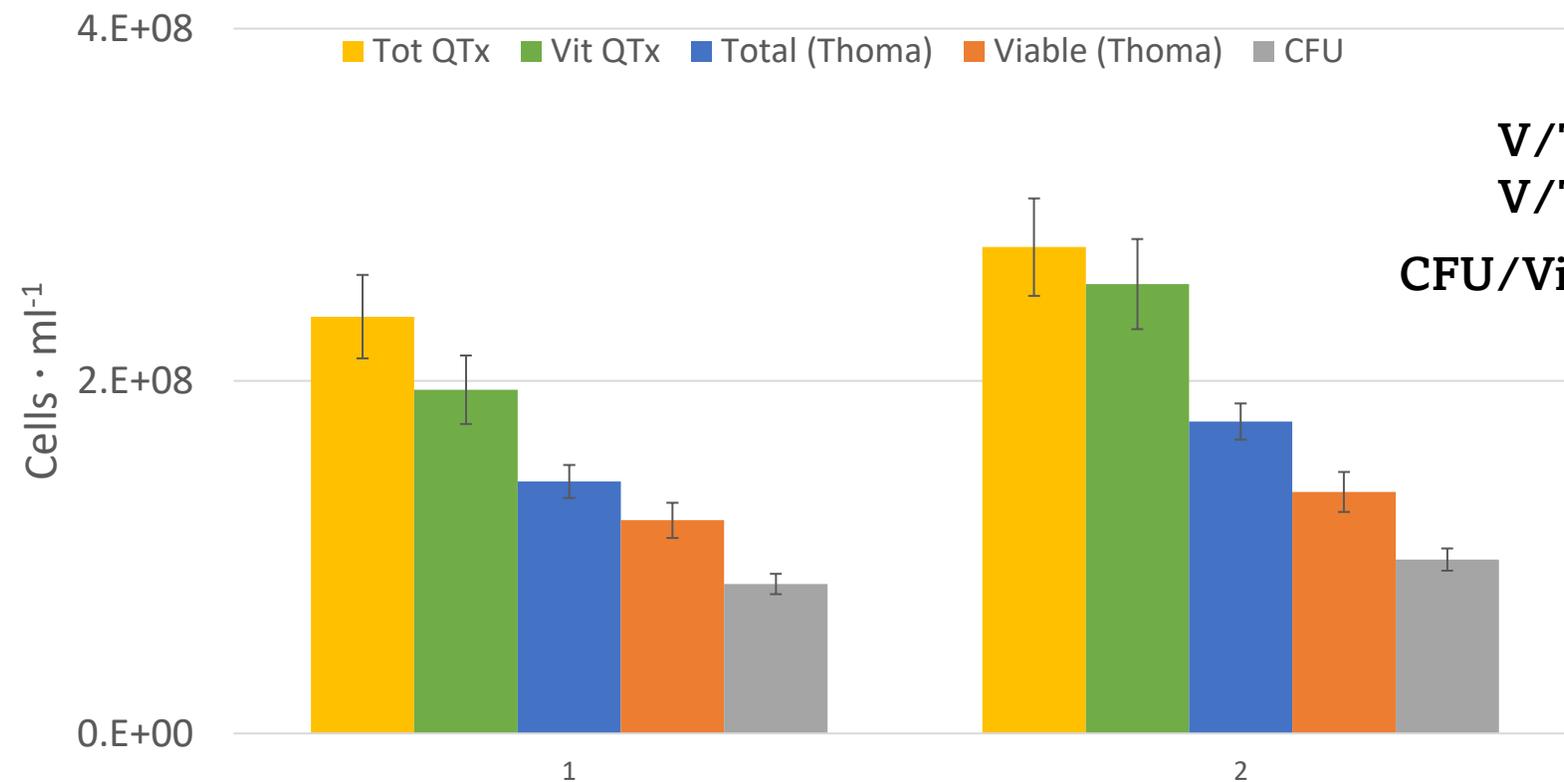
3.34 μM SYTO 9 (0.1% DMSO in soluz. fisiologica)
20 μM Ioduro di propidio (0.1% DMSO in soluz.fisiologica)

RISULTATI P.FLUORESCENS PRE-INIEZIONE IN ChAMBRa



$p \leq 0.0001$ Totali camera di Thoma vs Totali Quantum TX

RISULTATI PRELIMINARI B.SUBTILIS PRE-INIEZIONE IN ChAMBR_e



V/T (Quantom TX) = $(87 \pm 7) \%$

V/T (camera di Thoma) = $(81 \pm 6) \%$

CFU/Viable camera di Thoma = $71 \pm 1 \%$

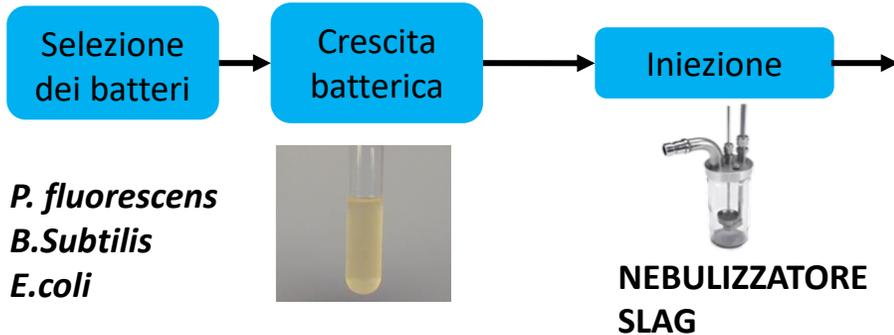
CONCLUSIONI

- I test di vitality e viability sono riproducibili e affidabili ma la loro scelta è dipendente dal ceppo in esame
- Il Quantom TX è utilizzabile come primo approccio come indicatore della quantità di cellule batteriche totali e vitali ma non può essere usato per tutte le colture
 - la capacità della Calceina AM di rilevare cellule batteriche vive in letteratura è stata segnalata come limitata per alcuni gram negativi
- Il rapporto tra il live and dead e il metodo di coltura su piastra sono un ottimo indicatore per calcolare le VBNC
- La fase di caratterizzazione dell'inoculo per-iniezione è stata validata

ESPERIMENTI FUTURI...

Produzione del bioaerosol STEP 2

Preparazione batteri da nebulizzare STEP 1



- Conta batterica
- CFU/ml
 - Automatica
 - LIVE/DEAD



Esposizione del bioaerosol a diverse condizioni atmosferiche **STEP 3**

Determinazione dei batteri presenti nell'aria

Monitoraggio in tempo reale del bioaerosol



CONTATORE DI PARTICELLE WIBS

Raccolta batteri



COLLETTORE ANDERSEN

Incubazione batteri



Determinazione della frazione vitale batterica



Determinazione della frazione batterica aerodispersa CFU/cm³ raccolte **STEP 4**

- **Elena Abd El**
- **Vincenzo Ariola**
- **Marco Brunoldi**
- **Muhammad Irfan**
- **Tommaso Isolabella**
- **Dario Massabò**
- **Federico Mazzei**
- **Franco Parodi**
- **Paolo Prati**
- **Virginia Vernocchi**

