

Wybrane techniki fluorescencyjne w badaniach stanu fizjologicznego i przeżywania komórek bakteryjnych w żywności

MARTA HANNA MIKŠ, IWONA WARMIŃSKA-RADYKO

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności Wydziału Nauki o Żywności UWM, pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn

Mikš M. H., Warmińska-Radyko I.

Selected fluorescent techniques in the research of the physiological state and viability of bacteria cells in food

Summary

Modern fluorescent techniques and the possibilities of their application in food research are presented. Fluorescent dyes, fluorophores, are applied to the physiological state and viability research at the level of the single bacteria cell. DNA intercalators such as diamidino-2-phenylindole (DAPI) are frequently used for the enumeration of the bacteria population in food and plasma membrane integrity determination. Fluorogenic substrates allow the detection of the activity of the intercellular enzymes: esterases and dehydrogenases. The commercial set of fluorescent dyes LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes Inc) provides a simple assay for discriminating viable, metabolically active bacteria cells from injured and dead bacteria cells. The technique of fluorescent in situ hybridization (FISH) with the use of 16S rRNA or 23S rRNA-targeted fluorescent labelled oligonucleotide probes seems to be a promising tool for contemporary food microbiology. It can be used for the detection and identification of pathogenic bacteria in food or bacteria used in food production, such as lactic and propionic acid bacteria.

Keywords: fluorescent dyes, Live/Dead Bacterial Viability Kit, FISH

Techniki fluorescencyjne z powodzeniem stosowane są w badaniach mikroflory środowisk naturalnych. Zastosowanie tych technik w badaniach żywności jest w stadium początkowym. Wymaga dopracowania metod wstępnego przygotowania próbek polegających na elucacji komórek z matrycy produktu spożywczego bez ingerencji w ich stan fizjologiczny. Badanie przeżywania i stanu fizjologicznego mikroorganizmów stosowanych w przemyśle spożywczym jest kluczowe z punktu widzenia szeroko rozumianej kontroli jakości.

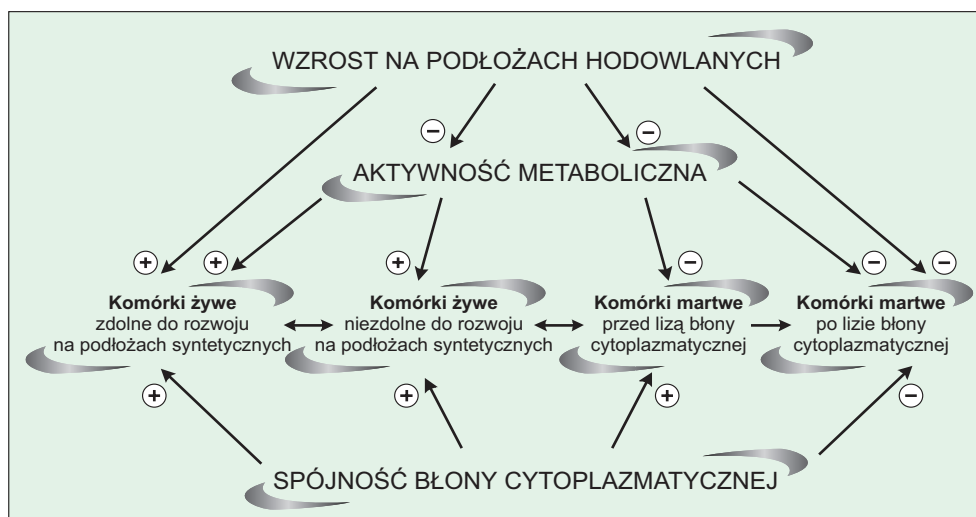
Prowadzenie procesu produkcji żywności fermentowanej sprowadza się do ciągłego sterowania aktywnością mikroorganizmów. Narzędziami są parametry procesu, jak: temperatura, czas, ciśnienie, poziom tlenu oraz aktywność wody. Pozwalają na namnażanie kultur starterowych, ukierunkowanie ich metabolizmu lub inaktywację podczas obróbki termicznej. Parametry te determinują stan fizjologiczny mikroflory oraz jej przeżywalność na poszczególnych etapach produkcji. Zatem wpływają na wydajność produkcji, skuteczność utrwalania termicznego produktu czy jakość produktu.

Badania stanu fizjologicznego komórek bakterii

Komórka bakteryjna znajdująca się w naturalnym środowisku zmuszona jest do ciągłej adaptacji do nowych,

zmieniających się warunków bytowania. Istotnym wskaźnikiem oceny stanu fizjologicznego i aktywności metabolicznej komórki bakterii jest jej błona cytoplazmatyczna. Stanowi ona naturalną barierę, selektywnie pobierającą substraty z otoczenia i wydalającą produkty metabolizmu komórki. Woda, gazy rozpuszczalne w wodzie jak CO₂, tlen i cząsteczki rozpuszczalne w tłuszczach przenikają przez błonę cytoplazmatyczną na drodze dyfuzji (transport pasywny). Jony rozpuszczalne w wodzie, przechodzą przez niewielkie pory o średnicy mniejszej niż 0,8 nm, natomiast pozostałe substancje wnikają do komórki na drodze transportu aktywnego. W błonie cytoplazmatycznej zlokalizowane są enzymy szlaków energetycznych komórki bakteryjnej. W zachyłkach błony – mezosomach – zachodzą reakcje łańcucha przenoszenia elektronów, syntezy i hydrolizy ATP. Mezosomy również pełnią funkcję w replikacji DNA nukleoidu i tworzeniu przegrody podczas podziału komórki. Dlatego też zachowanie nieuszkodzonej, spolaryzowanej błony cytoplazmatycznej umożliwiające sprawne jej funkcjonowanie jest nieodzownym warunkiem utrzymania aktywności metabolicznej komórki bakteryjnej (3).

Badania dotyczące zdolności przeżywania bakterii w różnych środowiskach pozwoliły wyodrębnić cztery grupy komórek charakteryzujących się odmiennym sta-



Ryc. 1. Podział komórek bakteryjnych w oparciu o ich aktywność fizjologiczną (13)

nem fizjologicznym (13). Najbardziej aktywną metabolicznie grupę określono jako bakterie żywe – zdolne do rozwoju na podłożach laboratoryjnych. Bakterie takie w określonych warunkach, np. w procesie pasteryzacji mleka (18), mogą przejść w tzw. odwracalny stan anabiozy, w którym, pozostając żywymi, nie zdolne są do wzrostu na podłożach syntetycznych (VBNC, viable but non-culturable). Komórki w stanie VBNC charakteryzuje bardzo niski poziom aktywności metabolicznej, karłowacieją, wykazują zaburzenia w transporcie błonowym, ale po resuscytacji odzyskują zdolność wzrostu na podłożach hodowlanych (28). Badania mikroflory oligotroficznych i mezotroficznych środowisk wodnych wykazały, że zaledwie około 0,001-0,3% ogółu tworzących ją komórek bakterii wykazuje zdolność wzrostu na podłożach laboratoryjnych (2). Kolejną grupę stanowią bakterie martwe, nie wykazujące aktywności metabolicznej, o nieuszkodzonej błonie cytoplazmatycznej, natomiast ostatnią – komórki martwe po lizie błony cytoplazmatycznej (3, 21, 25). Wobec przedstawionego podziału tradycyjne płytkowe metody badania przeżywalności bakterii nie są wystarczające. Już samo wyznaczenie wyraźnej granicy pomiędzy stanami komórki określanymi jako „żywa” i „martwa” wymaga, obok metod płytkowych, zastosowania nowych, bardzo dokładnych technik, takich jak mikroskopia epifluorescencyjna czy cytometria przepływowa. Techniki te są użytecznym narzędziem badania liczebności i fizjologii populacji bakterii, ponieważ pozwalają oznaczać różne parametry fizyczne i biochemiczne, dostarczając informacji o ich fizjologicznej heterogeniczności (6).

Badania takie wymagają zastosowania specyficznych barwników fluorescencyjnych – fluoroforów. Są to substancje selektywnie absorbujące i emitujące światło o określonej długości fali. Po wnikięciu do komórki bakteryjnej wzbudzony barwnik emituje światło, którego kolor zależy od właściwości fluoroforu, np. fluoresceina emituje światło zielone, rodamina – czerwone; Cy5 – podczerwone, Cy3 – żółte, DAPI – niebieskie. Barwniki fluorescencyjne pozwalają na wizualizację w mikroskopie epifluorescencyjnym komórek bakterii, ich struktur oraz innych molekuł pozostających w otoczeniu mikroorganizmu. Oferują szczególnie szeroki wachlarz zasto-

sowań w badaniach stanu fizjologicznego komórki, m.in. w badaniach potencjału i ciągłości błony cytoplazmatycznej. Można również oznaczyć aktywność enzymów wewnątrzkomórkowych, pH wewnątrzkomórkowe oraz liczebność komórek poprzez związanie barwnika z DNA komórki (3, 21, 25).

Stan fizjologiczny komórki bakteryjnej zależy od aktywności jej enzymów. Stosując techniki fluorescencyjne można oznaczyć aktywność niektórych enzymów, wykorzystując substraty fluorogeniczne, tzw. pre-fluorofory, które po wnikięciu do komórki bakteryjnej pod

wpływem działania enzymów wewnątrzkomórkowych przekształcają się w emitujące światło – fluorofory. Dotychczas stosuje się jedynie badania aktywności enzymów z grupy dehydrogenaz i esteraz w celu określenia stanu fizjologicznego komórek bakteryjnych.

Aktywność dehydrogenaz oznaczyć można na podstawie redukcji soli tetrazolowej przez enzymy łańcucha oddechowego zlokalizowane w błonie cytoplazmatycznej komórki. Bezbarwny prefluorofor – chlorek 5-cyano-2,3-ditotylo tetrazolowy (CTC) podczas przenikania przez błonę cytoplazmatyczną, ulega przekształceniu w fluoryzujący na czerwono formazan jako wynik aktywności kompleksu enzymatycznego. Zdolność redukcji CTC w komórkach jest więc kryterium podziału bakterii na żywe i martwe (9).

Aktywność esteraz oznacza się na podstawie zdolności komórki do akumulacji barwnika fluoresceiny, która następuje jedynie w komórkach o nienaruszonej błonie cytoplazmatycznej oraz wykazujących aktywność enzymatyczną esteraz (10). Dioctan fluoresceiny (FDA) jest prekursorem – prefluoroforem, który po wnikięciu do komórki bakterii zostaje przekształcony w wyniku hydrolizy do fluoroforu – fluoresceiny. Niepożądanym zjawiskiem jest niekontrolowany wyciek barwnika z komórki. Stwierdzono, że stosując pochodną fluoresceiny (FDA) – dioctan karboksyfluoresceiny (CFDA), można uzyskać dokładniejsze wyniki. Związek ten w wyniku reakcji hydrolizy z udziałem niespecyficznych esteraz uwalnia karboksyfluoresceinę, która posiada ujemne ładunki, przez co lepiej utrzymuje się we wnętrzu komórki (19, 24). Precyzja tej metody zależy od budowy ściany komórkowej, np. u bakterii Gram-ujemnych ogranicza ona przenikalność makromolekuł i substancji hydrofobowych do wnętrza komórki. W celu zwiększenia przenikalności dioctanu karboksyfluoresceiny (CFDA) stosuje się wstępną permeabilizację błon biologicznych roztworem EDTA lub glutaraldehydem (20, 27). Stwierdzono, że wyciek karboksyfluoresceiny z komórek bakterii *Escherichia coli* znacznie utrudnił rozróżnienie komórek żywych i martwych, nawet przy zastosowaniu cytometrii przepływowej (20).

Nowoczesną metodą oznaczania liczby komórek drobnoustrojów są instrumentalne techniki fluorescencyjne

wykorzystujące barwniki, z których najczęściej stosowanym jest fluorofor diamidino-2-fenylindol (DAPI) (19). Barwnik ten selektywnie wiąże się na zasadzie interkalacji z parami zasad adenina-tymina DNA komórki bakterii. W mikroskopie epifluorescencyjnym DAPI jest wzbudzany światłem ultrafioletowym, dzięki czemu uzyskujemy wizualizację genomowego DNA. Niebieska fluorescencja barwnika DAPI umożliwia jednocześnie zastosowanie innych barwników np. w celu uwidocznienia struktur komórkowych – ponieważ ich emisje nie pokrywają się (21). Fluorofor DAPI wybarwia komórki o nieuszkodzonych błonach biologicznych, jak również komórki z uszkodzonymi błonami, np. po wstępnej permeabilizacji. Przykładem innych barwników wiążących się specyficznie z DNA komórki, zwanych interkalatorami DNA, są: jodek propidyny (IP), bromek etydyny (EB), PO-PRO-3 oraz SYTOX Green. Są one powszechnie stosowane do badania spójności błony cytoplazmatycznej bakterii, ponieważ przenikają jedynie przez uszkodzone błony biologiczne komórek (9).

Na podstawie zaobserwowanych różnic w przenikalności fluoroforów przez błony o zróżnicowanej strukturze (uszkodzonej lub nieuszkodzonej) opracowano technikę szybkiego oznaczania komórek żywych i martwych. W tym celu stosuje się zestaw barwników fluorescencyjnych SYTO[®]9 i IP znanych pod nazwą LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit (Molecular Probes Inc). Różnica zabarwienia komórek martwych i żywych jest następstwem uszkodzenia struktury ich błony cytoplazmatycznej. Zielony fluorochrom SYTO[®]9 o niskiej masie cząsteczkowej (~ 10 Da) może z powodzeniem penetrować przez nieuszkodzoną błonę cytoplazmatyczną komórki, podczas gdy czerwony fluorochrom IP o wyższej masie cząsteczkowej (668 Da) przenika jedynie przez uszkodzenia w ciągłości błony (19, 26). Badania porównawcze zdolności przeżywania bakterii z wykorzystaniem innych zestawów barwników fluorescencyjnych, np. CTC/DAPI, CTC/SYTO[®]9 (8), FDA/EB, FDA/IP, CFDA/IP (13, 24) potwierdziły wysoką efektywność barwienia zestawem komercyjnym LIVE/DEAD[®] BacLight[™].

Zastosowanie techniki LIVE/DEAD[®] BacLight[™] pozwala na szybką ocenę stanu fizjologicznego komórek bakterierynych wyelutowanych np. z: serów dojrzewających, mleka i fermentowanych produktów mleczarskich (10, 17, 22, 26). Technika ta znalazła zastosowanie w badaniu jakości probiotycznych produktów niemlecznych i farmaceutycznych oraz w oznaczaniu liczby żywych komórek różnych gatunków pałeczek rodzaju *Lactobacillus*: *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus reuteri* (24). Barwniki LIVE/DEAD[®] BacLight[™] wykorzystano do badania przeżywalności bakterii fermentacji octowej na różnych etapach produkcji octu (4) oraz do oznaczenia liczby bakterii przechodzących w stan VBNC w mleku po procesie pasteryzacji (18).

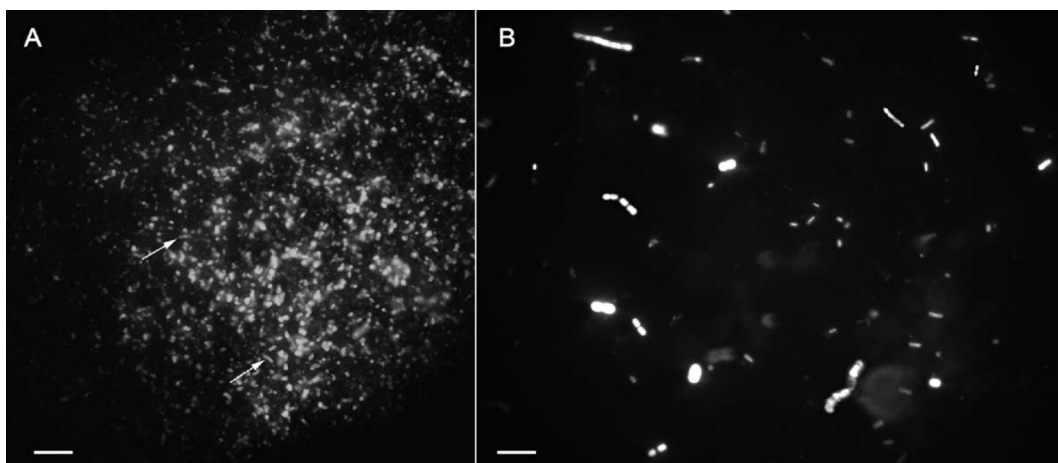
Lahtinen i wsp. (22) porównali wyniki oznaczania liczby probiotycznych bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* w żywności uzyskane klasyczną metodą płytkową do uzyskanych metodami cytologicznymi, tj.: LIVE/DEAD[®] BacLight[™], FISH oraz real-time PCR. Wyniki sugerują,

Tab. 1. Charakterystyka wybranych barwników fluorescencyjnych omówionych w tekście (19, 21)

Skrót	Nazwa barwnika	Absorpcja (nm)	Emisja (nm)	Masa cząsteczkowa (Da)
Aktywność dehydrogenaz (substrat fluorogeniczny – prefluorochrom)				
CTC	5-cyjano-2,3-ditotylo chlorek tetrazolowy	450	580-660	332
Aktywność esteraz (substrat fluorogeniczny – prefluorochrom)				
FDA	diocetan fluoresceiny	473	514	416
CFDA	diocetan karboksylfluoresceiny	492	512	460
Wyciek barwnika				
EB	bromek etydyny	518	605	394
Spójność błony cytoplazmatycznej / barwniki specyficznie wiążące DNA komórki				
SYTO [®] 9	–	–	–	~ 10
IP	jodek propidyny	535	617	668
Sytox Green	–	502	523	600
PO-PRO-3	–	539	567	605
DAPI	4',6-diamidyno-2'-fenyloindol dichlorowodorek	340	488	350

że real-time PCR oraz FISH mogą z powodzeniem być stosowane do oznaczania ogólnej liczby mikroorganizmów. Zastrzeżenia budzi nie dość precyzyjna ocena tymi metodami komórek żywych i martwych. Przypuszcza się, że martwe komórki mogą zawierać resztkowe ilości rRNA, wystarczające jednak do ich wizualizacji po związaniu ze znakowaną sondą molekularną. Szybszą i niewątpliwie lepszą metodą badania przeżywania bakterii okazało się barwienie LIVE/DEAD[®] BacLight[™], wykorzystujące ocenę stanu błony cytoplazmatycznej. Stwierdzono, że liczba komórek określona tą techniką jest o 0,7 log większa w porównaniu do wyników uzyskanych metodą płytkową, co sugeruje, że część komórek w populacji utraciła zdolność wzrostu na podłożach syntetycznych. Podobne relacje obserwowano również badając przeżywanie bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, *Streptococcus* oraz *Bifidobacterium* w przechowywanych fermentowanych napojach mlecznych (26). Opracowano również szybką metodę badania zdolności przeżywania komórek bakterii *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas fluorescens* w mleku UHT z zastosowaniem barwienia SYTO[®]9/IP oraz CTC/OXN (bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol) (18). Zestaw barwników CTC/OXN umożliwił rozróżnienie w hodowli bakterii *Pseudomonas fluorescens* dwóch subpopulacji, charakteryzujących się odmiennym potencjałem błony cytoplazmatycznej.

Barwienie z zastosowaniem LIVE/DEAD[®] BacLight[™] może stać się nieocenionym narzędziem w badaniach wpływu niektórych czynników na zdolność rozwoju komórek bakterii w różnych środowiskach. Tą techniką można ocenić zdolność przeżycia bakterii w warunkach przewodu pokarmowego, jak również w produktach spożywczych.



Ryc. 2. Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego preparatu przygotowanego techniką FISH z zastosowaniem sondy oligonukleotydu 16S rRNA S-D-Bact-0338-a-A-18. (A) na powierzchni mikroskrawków sera Silton, strzałka wskazuje pałeczki, 5 Am; (B) w zawieszynie bakteryjnej z sera Silton w PBS, 3 Am (15)

Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH, fluorescence in situ hybridization)

W piśmiennictwie istnieje dotychczas ograniczona liczba informacji na temat zastosowania techniki FISH do badań żywności (7, 14, 15, 29), podczas gdy znajduje ona szerokie zastosowanie w mikrobiologii środowiska, histopatologii, histoimmunologii, cytogenetyce. Pierwotnie została ona rozwinięta do identyfikacji i oznaczania liczby komórek bakteryjnych w środowiskach ekosystemów wodnych (32), osadach, ryzosferze i glebie. W przeciwieństwie do metod barwienia fluorescencyjnego pozwala na określenie bioróżnorodności mikroflory w wybranych niszach ekologicznych (33).

Technika FISH polega na hybrydyzacji sekwencji rRNA unieruchomionych komórek sondą oligonukleotydową 16S rRNA znakowaną fluorescencyjnie. Sondy molekularne specyficznie wiążą się z rRNA w rybosomach komórek docelowych, identyfikując je na różnych pozio-

mach taksonomicznych. Celem sondy jest rybosomalny rRNA, ponieważ jego zawartość w komórce jest nieporównywalnie większa niż w z genach rRNA zlokalizowanych w chromosomie bakteryjnym, co czyni tę technikę bardziej czułą. Ze względu na zakres specyficzności sondy wyróżnia się sondy: uniwersalne, np. EUB338, specyficzne dla domeny *Bacteria* z wyjątkiem rzędu *Planctomycetales*, nonsensowne, np. NON388 do wykrywania niespecyficznego wiązania sondy oraz sondy specyficzne, np. dla wybranych klas mikroorganizmów (32).

W wielu ośrodkach naukowych prowadzone są również ciągle poszukiwania nowych sond oligonukleotydowych i sprawdzanie ich specyficzności względem określonych rodzajów, a nawet gatunków bakterii, w tym również bakterii fermentacji mlekowej (7, 16, 23). Technika FISH może być stosowana do badania stanu fizjologicznego komórek, oznaczania liczby oraz identyfikacji bakterii. Metodą FISH z zastosowaniem fluorescencyjnie znakowanych sond oligonukleotydowych 16S rRNA oznacza się liczbę tylko fizjologicznie aktywnych komórek, ponieważ okres półtrwania rRNA jest krótszy niż DNA, co czyni rRNA potencjalnie lepszym wskaźnikiem ich aktywności. W rybosomach szybko rosnących komórek znajduje się liczba kopii rRNA, zwykle ponad 1000, co wystarcza do indukcji sygnału świetlnego po związaniu wyznakowanej sondy (1). Po śmierci komórki następuje rozpad rRNA, a jego szybkość zależy, między innymi, od koncentracji enzymów – RNaz, a także od ciągłości

błony cytoplazmatycznej (22). Komórki wolno rosnące lub metabolicznie nieaktywne, zawierające niewielką liczbę kopii rybosomów, emitują światło o słabym natężeniu. Nowe, czulsze modyfikacje techniki FISH powodują amplifikację sygnału (TSA-FISH znany również jako CARD-FISH) stając się użytecznym narzędziem w rękach współczesnej mikrobiologii (33). Sondy oligonukleotydowe 16S rRNA znakowane fluoroforami o różnicowanej masie cząsteczkowej (np. peroksydazą chrzanową – 44 kDa, fluoresceiną – 330 kDa) pozwalają na wizualną ocenę stopnia permeabilizacji ściany komórkowej na zasadzie różnicy w przenikaniu barwników do wnętrza komórki.

Do identyfikacji bakterii fermentacji mlekowej w winie zastosowano równoczesną hybrydyzację *in situ* dwoma sondami molekularnymi, sondą LU2 znakowaną fluoresceiną oraz Lplan znakowaną rodaminą, oznaczając odpowiednio: *Lactobacillus*

Tab. 2. Zestawienie sond oligonukleotydowych specyficznych dla bakterii fermentacji mlekowej stosowanych w technice FISH z uwzględnieniem sondy uniwersalnej i niespecyficznej (6, 7, 16, 23)

Sonda	Specyficzność/ wiązanie docelowe (pozycja)	Sekwencja (5'→3')
EUB338	Bakteryjny 16S rRNA (338-355)	GCTGCCTCCGTAGGAGT
NON338	Niespecyficzne wiązanie	ACTCCTACGGGAGGCAGC
LU2	<i>Leuconostoc</i> sp. (221-242)	GATCCATCTCTAGGTGACGCCG
Lplan	<i>Lactobacillus plantarum</i> (66-85)	CCAATCAATACCAGGAGTTCG
CREM62	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (62-80)	CCAATCTTCATCGCTCAA
LAC62	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (62-80)	CCAACCTTCAGCGCTCAA
LEUC1026	<i>Leuconostoc</i> sp. (1026-1043)	CACCTTTGTCTCCGAAGAG
Lab158	Bakterie fermentacji mlekowej	GGTATTAGCA(C/T)CTGTTTCCA
LbpV3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CCGTCAATACCTGAACAG
LAC722	Bakterie fermentacji mlekowej	YCACCGCTACACATGRAGTTCCACT
Lplan447	<i>Lactobacillus plantarum</i> (447-465)	CTCTCAGATATGTTCTTC
Strc493	<i>Lactococcus-Streptococcus</i> (493-512)	GTTAGCCGTCCCTTTCTGG

plantarum oraz *Leuconostoc mesenteroides* (7). W badaniach mezofilnych kultur starterowych zaprojektowano trzy nowe sondy oligonukleotydowe pozwalające na wizualizację bakterii *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* – sondą CREM62, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* oraz *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* dv. *diacetylactis* – sondą LAC62, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* i *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* – sondą LEUC1026. W Japonii Sakai i wsp. zastosowali technikę FISH do identyfikacji bakterii fermentacji mleko-wej rozwijających się w spontanicznie fermentowanych odpadach organicznych z gospodarstwa domowego (31). Zaprojektowano dwie sondy specyficzne dla grup bakterii: pierwsza LAC722(L) – specyficzna dla rodzajów: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* i *Weissella* oraz druga Lplan477 – specyficzna dla gatunku *Lactobacillus plantarum* i pokrewnych np. *Lactobacillus pentosus* (31). Sonda LAC722(L) została następnie wykorzystana do monitorowania dynamiki rozwoju mikroflory towarzyszącej w procesie fermentacji odpadów organicznych, użytych jako substrat w produkcji kwasu poli-L-mleko-wego przez szczep *Bacillus coagulans* NBRC 12583 (30).

Interesującym zastosowaniem techniki FISH jest wizualizacja komórek bakterii z użyciem sondy niespecyficznej EUB338 bezpośrednio na mikroskrawkach sera dojrzewającego (14, 15). Pozwala ona pozyskać wiele istotnych informacji o rozwoju i rozmieszczeniu bakterii w strukturach matrycy żywności fermentowanej o stałej konsystencji.

Instrumentalne techniki fluorescencyjne w połączeniu z nowoczesnymi fluoroforami, substratami fluorogenicznymi oraz z sondami molekularnymi 16S rRNA wnoszą nieograniczony potencjał analityczny w dziedzinie mikrobiologii żywności. Wydaje się, że poznanie bioróżnorodności mikroflory serów dojrzewających, kiszzonek lub fermentowanych napojów mlecznych, jest tylko kwestią czasu. Techniki molekularne umożliwią również selektywny monitoring przeżywania określonych szczepów probiotycznych w produktach mlecznych oraz w przewodzie pokarmowym człowieka. Pozwolą również ocenić wpływ poszczególnych rodzajów bakterii na tworzenie charakterystycznego smaku i zapachu żywności fermentowanej. Opracowanie szybkich metod analizy mikrobiologicznej żywności z zastosowaniem fluorescencji znacznie skróci czas i koszty prowadzenia analiz.

Piśmiennictwo

1. Amann R., Glocker F.-O., Neef A.: Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. FEMS Microbiol. Rev. 1997, 20, 191-200.
2. Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K.-H.: Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 1995, 59, 143-169.
3. Baatout S., De Boever P., Mergeay M.: Physiological changes induced in four bacterial strains following oxidative stress. Appl. Biochem. Microbiol. 2006, 42, 369-377.
4. Baena-Ruano S., Jimenez-Ot C., Santos-Duenas I. M., Pantero-Moreno D., Barja F., Garcia-Garcia I.: Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process. Process Biochem. 2006, 41, 1160-1164.
5. Baudart J., Olaizola A., Coallier J., Gauthier V., Laurent P.: Assessment of a new technique combining a viability test, whole-cell hybridization and laser-scanning cytometry for the direct counting of viable Enterobacteriaceae cells in drinking water. FEMS Microbiol. Lett. 2005, 243, 405-409.
6. Ben Amor K., Vaughan E. E., de Vos W. M.: Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. J. Nutr. 2007, 137, 741S-750S.
7. Blasco L., Ferrer S., Pardo I.: Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for in situ identification of wine lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 2003, 225, 115-123.
8. Boulou L., Prevost M., Barbeau B., Coallier J., Desjardins R.: LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. J. Microbiol. Methods 1999, 37, 77-86.
9. Breeuwer P., Abee T.: Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. Int. J. Food Microbiol. 2000, 55, 193-200.
10. Bunthof C. J., Bloemen K., Breeuwer P., Rombouts F. M., Abee T.: Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 2001, 67, 2326-2335.
11. Bunthof C. J., van den Braak S., Breeuwer P., Rombouts F. M., Abee T.: Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 1999, 65, 3681-3689.
12. Bunthof C. J., van Schalkwijk S., Meijer W., Abee T., Hugenholtz J.: Fluorescent method for monitoring cheese starter permeabilization and lysis. Appl. Environ. Microbiol. 2001, 67, 4264-4271.
13. Decker E. M.: The ability of direct fluorescence-based, two-colour assays to detect different physiological states of oral streptococci. Lett. Appl. Microbiol. 2001, 33, 188-192.
14. Ercolini D., Hill P. J., Dodd C. E. R.: Bacterial community structure and location in Stilton cheese. Appl. Environ. Microbiol. 2003, 69, 3540-3548.
15. Ercolini D., Hill P. J., Dodd C. E. R.: Development of a fluorescence in situ hybridization method for cheese using a 16S rRNA probe. J. Microbiol. Methods 2003, 52, 267-271.
16. Friedrich U., Lenke J.: Improved enumeration of lactic acid bacteria in mesophilic dairy starter cultures by using multiplex quantitative real-time PCR and flow cytometry-fluorescence in situ hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 2006, 72, 4163-4171.
17. Gatti M., Bernini V., Lazzi C., Neviani E.: Fluorescence microscopy for studying the viability of micro-organisms in natural whey starters. Lett. Appl. Microbiol. 2006, 42, 338-343.
18. Gunasekera T. S., Sorensen A., Attfield P. V., Sorensen S. J., Veal D. A.: Inducible gene expression by nonculturable bacteria in milk after pasteurization. Appl. Environ. Microbiol. 2002, 68, 1988-1993.
19. Haugland R. P.: The Handbook: A guide to fluorescent probes and labeling technologies. Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA 2005, 704-732.
20. Hoefel D., Grooby W. L., Monis P. T., Andrews S., Saint C. P.: A comparative study of carboxyfluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester as indicators of bacterial activity. J. Microbiol. Methods 2003, 52, 379-388.
21. Joux F., Lebaron P.: Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. Microb. Infection, 2000, 2, 1523-1535.
22. Lahtinen S. J., Gueimonde M., Ouwehand A. C., Reinikainen J. P., Salminen S. J.: Comparison of four methods to enumerate probiotic bifidobacteria in a fermented food product. Food Microbiol. 2006, 23, 571-577.
23. Matte-Tailliez O., Quenee P., Cibik R., van Opstal J., Dessevre F., Firmesse O., Tailliez P.: Detection and identification of lactic acid bacteria in milk and industrial starter culture with fluorescently labeled rRNA-target peptide nucleic acid probes. Lait 2001, 81, 237-248.
24. Maukonen J., Alakomi H. L., Nohynek L., Hallamaa K., Leppämäki S., Mättö J., Saarela M.: Suitability of the fluorescent techniques for the enumeration of probiotic bacteria in commercial non-dairy drinks and in pharmaceutical products. Food Res. Int. 2006, 39, 22-32.
25. McFeters G. A., Yu F. P., Pyle B. H., Stewart P. S.: Physiological assessment of bacteria using fluorochromes. J. Microbiol. Methods 1995, 21, 1-13.
26. Moreno Y., Collado M. C., Ferrus M. A., Cobo J. M., Hernandez E., Hernandez M.: Viability assessment of lactic acid bacteria in commercial dairy products stored at 4°C using LIVE/DEAD® BacLight™ staining and conventional plate counts. Int. J. Food Sci. Technol. 2006, 41, 275-280.
27. Morono Y., Takano S., Miyazawa K., Tanji Y., Unno H., Hori K.: Application of glutaraldehyde for the staining of esterase-active cells with carboxyfluorescein diacetate. Biotechn. Lett. 2004, 26, 379-383.
28. Oliver J. D.: The viable but nonculturable state in bacteria. J. Microbiology. 2005, 43, 93-100.
29. Ootsubo M., Shimizu T., Tanaka R., Sawabe T., Tajima K., Ezura Y.: Seven-hour fluorescence in situ hybridization technique for enumeration of Enterobacteriaceae in food and environmental water sample. J. Appl. Microbiol. 2003, 95, 1182-1190.
30. Sakai K., Ezaki Y.: Open L-lactic acid fermentation of food refuse using thermophilic *Bacillus coagulans* and fluorescence in situ hybridization analysis of microflora. J. Biosci. Bioeng. 2006, 101, 457-463.
31. Sakai K., Mori M., Fujii A., Iwami Y., Chukenirotte E., Shirai Y.: Fluorescent in situ hybridization analysis of open lactic acid fermentation of kitchen refuse using rRNA-targeted oligonucleotide probes. J. Biosci. Bioeng. 2004, 98, 48-56.
32. Skowrońska A., Zmysłowska I.: Współczesne metody identyfikacji bakterii stosowane w ekologii mikroorganizmów wodnych – fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH). Post. Mikrobiol. 2006, 45, 183-193.
33. Zwirgmaier K.: Fluorescence in situ hybridization (FISH) – the next generation. FEMS Microbiol. Lett. 2005, 246, 151-158.

Adres autora: mgr inż. Marta Hanna Mikš, pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn; e-mail: marta.miks@uwm.edu.pl