

Badania stanu „niehodowalności” komórek bakterii fermentacji mlekowej w niesprzyjających warunkach rozwoju

MAGDALENA OLSZEWSKA, ŁUCJA ŁANIEWSKA-TROKENHEIM

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

Olszewska M., Łaniewska-Trokenheim Ł.

Study of the nonculturable state of lactic acid bacteria cells under adverse growth conditions

Summary

The reason for undertaking the research concerning the physiological state of lactic acid bacteria is closely associated with applications of these microorganisms in the food industry. An increased demand referring to microbiological analysis has been affected by the intensification of research assessing the physiological state of microorganisms in unfavorable for them conditions. In technological processes as well as in natural habitats microorganisms can encounter a variety of adverse conditions, arising from the influence of physical and chemical factors such as extremes in temperature, pH or presence of bacteriostatic agents. Therefore, the determination of the viability of bacteria may be challenging due to difficulties in the selection of suitable enumeration methods. The use of conventional methods that rely on the replication and colony formation on growth media is hindered by the decreased reproductive capacity of cells under detrimental conditions. As a result, alternative techniques which do not focus on cell proliferation, but on the metabolic activity or cell structure integrity are being favored. Approaches performing direct detection of different physiological parameters of microbes are connected with the application of modern fluorescence techniques, and in consequence with progress in microbiological research.

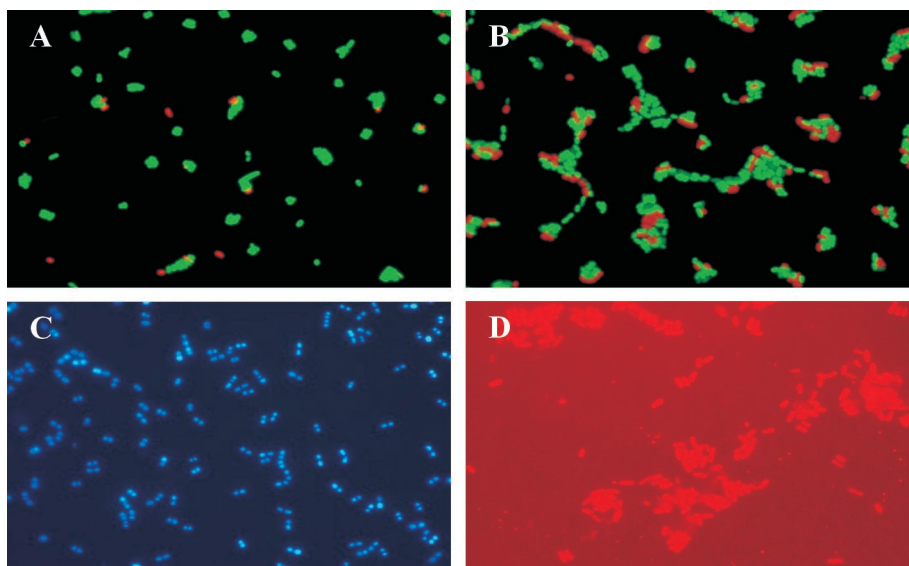
Keywords: lactic acid bacteria, physiological state, fluorescence techniques

Bakterie fermentacji mlekowej (Lactic Acid Bacteria – LAB) znajdują szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym. Ze względu na to, iż naturalnym środowiskiem występowania bakterii fermentacji mlekowej jest mleko, rośliny, a także układ pokarmowy i błony śluzowe człowieka i zwierząt, już od czasów starożytnych były powiązane z procesami fermentacji żywności, głównie w celu jej utrwalenia. W Polsce duże znaczenie odgrywa proces fermentacji mleka, kapusty, ogórków oraz sałatek i soków warzywnych. Bakterie te stosowane są również w produkcji kiszonek paszowych. Główną funkcją LAB jest zwiększanie wartości odżywczej, strawności oraz przyswajalności składników mineralnych fermentowanej żywności. W miarę rozwoju techniki i wiedzy są one stosowane również przy produkcji fermentowanej żywności o znaczeniu probiotycznym oraz w przygotowaniu preparatów farmaceutycznych. Nadanie produktom, obok właściwości odżywczych, także terapeutycznych i profilaktycznych, wiąże się ze specyficznymi cechami, jakimi powinny charakteryzować się szczepy bakterii fermentacji mlekowej. Ważną technologiczną cechą selekcyjną jest odporność LAB na niesprzyjające warunki.

Zarówno procesy przemysłowe, jak i środowisko przewodu pokarmowego stwarzają niekorzystne warunki do rozwoju tych drobnoustrojów. Na bakterie fermentacji mlekowej oddziałują zmieniające się czynniki fizyczne i chemiczne, do których można zaliczyć np. temperaturę, pH środowiska, obecność substancji bakteriostatycznych (9-11, 22). Biorąc powyższe pod uwagę, zastosowanie fluorescencyjnych technik umożliwia prowadzenie precyzyjnych badań, a tym samym dokładne określenie stanu fizjologicznego i przeżywania komórek bakteryjnych, opierające się na detekcji różnych wyznaczników ich aktywności (8, 19, 23). Zainteresowanie technikami fluorescencyjnymi skupia się wokół nadrzędnego celu, jakim jest doskonalenie metod analizy ilościowej różnego rodzaju produktów. Stosowana szeroko w oznaczeniach liczebności komórek bakterii konwencjonalna metoda płytkowa opiera się na zdolności komórek do namnażania i tworzenia kolonii na podłożu stałym. Metody fluorescencyjne, w zależności od zastosowanej techniki znakowania, umożliwiają ocenę przeżywalności bakterii na podstawie innych cech niż rozmnażanie, i, co się z tym wiąże, na wyodrębnienie więcej niż dwóch

stanów fizjologicznych komórek w populacji. Komórki żywe, aktywne metabolicznie, mogą stracić zdolność do wzrostu na podłożach hodowlanych i ten stan uśpienia części populacji może występować zwłaszcza wtedy, gdy komórki poddawane są działaniu czynników niekorzystnych (20, 32). Zastosowanie technik fluorescencyjnych w poznawaniu fizjologii drobnoustrojów staje się wobec powyższego niezbędnym narzędziem w analizie mikrobiologicznej, dzięki którym możliwe jest śledzenie subtelnych zmian w dynamice namnażania i obumierania drobnoustrojów na poziomie pojedynczych komórek (19, 32).

Na istnienie komórek w stadium VBNC (viable but non-culturable) lub ABNC (active but non-culturable), czyli przechodzenia bakterii w niekorzystnych warunkach bytowania w stan uśpienia, wskazali po raz pierwszy Roszak i wsp. w 1984 r. (29). Termin VBNC opisuje komórki w „niezadowalającym” stanie fizjologicznym, co oznacza, że komórki są żywe, ale nie dzielą się, w wyniku czego nie wykazują zdolności do wzrostu i tworzenia kolonii na podłożach hodowlanych (19, 27). Ocena stanu fizjologicznego określonej mikroflory staje się wyzwaniem w momencie, gdy dochodzi do zahamowania procesów rozmnażania pod działaniem różnorodnych stresorów, takich jak: temperatura, zmiana ciśnienia osmotycznego, natlenianie, obniżone pH, obecność soli żółciowych, niedobór składników odżywczych (4, 5, 11, 16). Stwierdza się, że komórki w stadium VBNC wykazują fizjologiczne oznaki życia i pewną aktywność metaboliczną, w związku z czym metody identyfikacji w stanie VBNC powinny opierać się na detekcji różnych oznak aktywności lub integralności struktur komórkowych (19). W ostatnich dwóch dekadach notowane jest wzrastające zapotrzebowanie na rozwój bezpośrednich metod *in situ*, oceniających stan fizjologiczny populacji drobnoustrojów w czasie rzeczywistym i pod względem innych cech niż zdolność do podziałów komórkowych (18, 22, 25). Kombinacja technik opierających się na różnych podejściach do oceny stanu fizjologicznego komórek staje się wtedy niewątpliwie cennym narzędziem w weryfikacji niedoszacowania jednej techniki względem drugiej. Liczebności komórek bakteryjnych szacowane różnymi metodami analizy ilościowej mogą być ze sobą porównywane, w celu oceny ich przydatności w badaniach statusu fizjologicznego mikroflory produktów. Różnica między liczbą komórek, jaką można wykryć np. bezpośrednią metodą *in situ* a tradycyjną metodą hodowlaną może być kontrolowana i analizowana, jed-



Ryc. 1. Obrazy preparatów mikroskopowych komórek bakterii fermentacji mlekowej z mikroskopu epifluorescencyjnego wykonane 4 technikami fluorescencyjnymi. (A) pałeczki *Lactobacillus* sp. barwione przy użyciu testu LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit; (B) pałeczki *Lactobacillus plantarum* barwione zestawem fluorochromów CFDA/PI; (C) paciorkowce *Lactococcus* sp. barwione fluorochromem DAPI; (D) pałeczki *Lactobacillus plantarum* po fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* z zastosowaniem sondy 16S rRNA Lplan (17) znakowanej CY3 (zdjęcia własne).

nak wyznaczenie granicy między komórkami żywymi, hodowlanymi a niehodowlanymi oraz obumarłymi jest zagadnieniem trudnym i wymaga gromadzenia precyzyjnych wyników analizy. W tego rodzaju badaniach wymagane są zarówno konwencjonalne metody płytkowe, ale i precyzyjne metody bezpośredniego zliczania komórek, do których należą techniki fluorescencyjne (20, 23). Liczebność komórek szacowana metodami fluorescencyjnymi może być oceniana np. przez: integralność membran komórkowych, aktywność enzymatyczną, oddychanie, potencjał membranowy, wewnątrzkomórkowe pH. Ważne są wszystkie te właściwości, które pozwalają stwierdzić zachowywanie funkcji życiowych komórki (5, 6, 8).

Współczesne metody analizy mikrobiologicznej wykorzystujące znaczniki fluorescencyjne

W zależności od wybranej metody znakowania fluorescencyjnego komórek wyróżniamy rozmaite grupy fluorochromów. Jedną z grup barwników fluorescencyjnych są fluorochromy kationowe (np. rodamina 123) oraz anionowe (np. DiBAC₄(3) – BOX), których warunkiem pojawienia się sygnału jest zachowywanie przez komórkę potencjału elektrochemicznego membrany. Jako że systemy warunkujące zachowywanie potencjału odgrywają istotną rolę w tak ważnych procesach metabolicznych, jak: synteza ATP, aktywny transport, regulacja wewnątrzkomórkowego pH, potencjał elektrochemiczny błony staje się trafnym celem w określaniu utrzymywania przez komórkę aktywności (8). Innym rozwiązaniem jest zastosowanie prefluorochromów biorących udział w detekcji aktywności enzymatycznej. Dobrym przykładem są substan-

cje, które w formie utlenionej nie fluoryzują, natomiast po zredukowaniu przez określone enzymy przekształcone są we fluoryzujące związki. Takim prefluorochromem jest związek tetrazolowy CTC (5 cyano-2,3-ditotyl tetrazolium chloride), redukowany pod wpływem dehydrogenaz do barwnych formazanów (CTF), które precypitują wewnątrz komórki (6). Większe zainteresowanie w określaniu aktywności enzymatycznej budzą prefluorochromy do identyfikacji aktywności esterolitycznej. Substrat prefluorochromowy dyfunduje przez membranę i jest rozszczepiany przez niespecyficzną esterazę, która uwalnia fluoryzujący produkt zachowywany we wnętrzu komórki ze sprawną błoną komórkową. W tego rodzaju reakcjach biorą udział: dwuocian fluoresceiny i jego pochodne, jako substraty oraz fluoresceina i jej pochodne, jako fluoryzujące produkty. Jak się ocenia, pochodne fluorochromów dają lepszy sygnał fluoryzujący. Dotyczy to np. dwuocjanu karboksylfluoresceiny (carboxyfluorescein diacetate – CFDA) przekształcanego do karboksylfluoresceiny (carboxyfluorescein – CF), która jako związek hydrofilowy zatrzymywana jest bardziej skutecznie w cytozolu komórki niż jej odpowiednik – fluoresceina (25).

Inną grupą barwników są fluorochromy interkalujące z DNA. Zaliczamy tutaj DAPI (4,6-diamidino-2-phenyl-indol) wykorzystywany do oznaczania całkowitej liczby bakterii, wiążący się z dsDNA. Rejestrowanie sygnału fluoryzującego jest wynikiem specyficznego łączenia się DAPI z nieuszkodzonym nukleoidem komórek, ale także niespecyficznego wiązania z innymi strukturami, co sprawia, że wszystkie wyznakowane komórki w próbce to zarówno komórki aktywne, jak też martwe oraz tzw. „ghost cells” (6, 18). Kolejną metodą jest oznaczanie udziału komórek żywych i martwych różnicowanych na zasadzie penetrowania określonego barwnika nukleinowego przez sprawną oraz uszkodzoną błonę komórkową (15). Test Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit zawiera zestaw dwóch fluorochromów: SYTO9 oraz jodku propidyny (propidium iodide – PI), które pozwalają na wyznakowanie komórek pod względem integralności membrany. SYTO9 jest fluorochromem o zdolności penetracji przez zarówno zintegrowaną, jak i uszkodzoną błonę, natomiast jodek propidyny może przedostawać się tylko przez zniszczoną membranę i w ten sposób otrzymuje się kompresowany obraz ukazujący komórki żywe i martwe (3). Alternatywnie, dobrym indykatorem komórek martwych w populacji może być inny barwnik nukleinowy, określany skrótem TOTO-1, o pełnej nazwie: 1-(4,4,7,7-tetramethyl-4,7-diazaundecamethylene)-bis-4-[3-methyl-2,3-dihydro(benzo-1,3-oxazole)-2-methylidene]-1-(3-trimethylammoniumpropyl)-pyridinium tetraiodide. Zastosowanie tego barwnika jest częściej preferowane od PI, szczególnie w połączeniu z cytometrią przepływową, ze względu na bardziej odpowiednie parametry widma wzbudzenia i emisji oraz jego masę molekularną (10).

Obiecującą metodą badania stanu fizjologicznego drobnoustrojów jest technika fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (fluorescence *in situ* hybridisation – FISH) polegająca na hybrydyzacji sekwencji rRNA komórek sondą oligonukleotydową znakowaną fluorescencyjnie do identyfikacji i oznaczania ilościowego komórek bakteryjnych. Dobór sond oligonukleotydowych 16S/23S rRNA na poziomie rodzajów, a nawet gatunków bakterii czyni technikę FISH wysoce specyficzną i precyzyjną względem ocenianej populacji drobnoustrojów (1, 14, 23, 30, 31). Technika FISH opiera się na detekcji rRNA komórek. Do czynników wpływających na pozytywny sygnał wizualizacji w technice FISH zalicza się: liczbę docelowych cząsteczek rRNA obecnych w komórce, dostępność sondy dla rRNA, intensywność fluorescencji hybrydowanej sondy. Przydatność techniki FISH w ocenie przeżywalności zależy od rozpadu rRNA po śmierci komórek. Rozpad rRNA zależy natomiast od poziomu RNazy w i w otoczeniu komórki oraz od integralności membran komórkowych i stopnia ich permeabilizacji. Mimo złożoności procesów warunkujących wiarygodną ocenę utrzymywania funkcji życiowych przez komórki techniką FISH, celowość jej użycia jest bardziej uzasadniona w porównaniu z technikami opierającymi się na detekcji DNA np. real-time PCR, ze względu na krótszy półokres rozpadu rRNA niż DNA (20).

Badania stanu fizjologicznego i przeżywalności komórek bakterii fermentacji mlekowej z zastosowaniem technik fluorescencyjnych

Wyniki badań wskazują, że stan uśpienia części populacji może występować wśród mikroflory poddawanej działaniu czynników stresowych, mikroflory produktów probiotycznych, szczepionek starterowych oraz długoterminowo przechowywanych produktów (9-11, 15, 20, 21, 28, 32). Idąc w tym kierunku, Bunthof i Abee (9) zajmowali się ustaleniem przydatności barwników fluorescencyjnych, a dokładniej takich fluorochromów, jak: CFDA oraz TOTO-1 do szybkiego oznaczania udziału komórek żywych i martwych kultur starterowych do produkcji serów w zakwasie macierzystym i roboczym oraz wchodzących w skład produktów probiotycznych. Stwierdzono, że liczba komórek oznaczona barwieniem CF nie koreluje z liczbą bakterii uzyskaną metodą płytkową i jest od niej wyższa. Badacze określają uśpiony stan fizjologiczny populacji jako subletalny, co można rozumieć jako utratę zdolności do podziałów, lecz przy zachowaniu zintegrowanej błony komórkowej i aktywności metabolicznej. Tego rodzaju spostrzeżenia zgadzają się także z innymi doniesieniami. Gatti i wsp. (15), badając różne szczepy bakterii fermentacji mlekowej wchodzące w skład szczepionek mleczarskich, oznaczali ich liczebności i określili większą liczbę żywych komórek, stosując zestaw fluorochromów LIVE/DEAD BacLight niż konwencjonalną metodą płytkową. Moreno i wsp. (24) badali przeżywalność bakterii fermentacji mle-

kowej, w tym szczepów probiotycznych, w wybranych produktach mleczarskich. Wykazano około 10 razy mniejszą liczebność drobnoustrojów, wykorzystując posiewy płytkowe niż metodą mikroskopową z zastosowaniem barwników SYTO9 – jodek propidyny. Auty i wsp. (2) również prezentują wyniki świadczące o mniejszej liczebności komórek pałeczek probiotycznych oznaczanej metodą płytkową względem bezpośredniej metody *in situ*. Collado i wsp. (13) stwierdzają, że liczba LAB z rodzaju *Bifidobacterium* poddanych działaniu soku żołądkowego, oznaczona metodą hodowlaną, zawsze była mniejsza od liczebności oznaczonej SYTO9-PI. W innych pracach Bunthof i wsp., zastosowali zestawy barwników CF/PI (11), a także CF/TOTO-1 w połączeniu z cytometrią przepływową (10) do określania udziału komórek żywych i martwych w hodowlach licznych szczepów bakterii fermentacji mlekowej. Metody te pozwalały na szybkie badanie fizjologii i przeżywania komórek na podstawie różnic w liczebności populacji przed i po działaniu niekorzystnych czynników: wysokiej temperatury, soli żółciowych lub kwasów. Papadimitriou i wsp. (26) na podstawie zastosowania cytometrii przepływowej połączonej z fluorescencyjnym znakowaniem komórek CFDA/PI w hodowli LAB z rodzaju *Streptococcus*, poddanej działaniu niskiego pH, wyodrębnili trzy grupy komórek charakteryzujących się odmiennym stanem fizjologicznym: żywe, martwe oraz tzw. „uszkodzone”, które zdefiniowano jako niehodowlalne z zachowaną aktywnością metaboliczną. Łaniewska-Trokenheim i wsp. (22) wykazali różnice pomiędzy liczbami komórek potencjalnie probiotycznych szczepów *Lactobacillus acidophilus*, oznaczanymi prefluorochromem CFDA oraz metodą płytkową podczas długotrwałej hodowli na mleku. Zwrócono uwagę na powiększanie się różnicy między tymi oznaczeniami wraz z czasem prowadzenia hodowli, sugerując stan uśpienia, czyli utratę przez komórki zdolności do podziałów, przy wykazywaniu aktywności esteraż wewnątrzkomórkowych w późnej fazie stacjonarnej rozwoju populacji. Warmińska-Radyko i wsp. (32), badając wzrost populacji szczepów z rodzaju *Lactococcus* sp. w mleku z zastosowaniem testu LIVE/DEAD, na podstawie rozbieżności w porównaniu z oznaczeniami otrzymanymi metodą płytkową, wnioskują, że komórki mogą przechodzić w tzw. stan niehodowlalności, który jest uzależniony indywidualnie od szczepu, czasu prowadzenia hodowli oraz niekorzystnych warunków, których działaniu poddawane są badane populacje paciorkowców.

Możliwość zastosowania techniki FISH w badaniach żywności budzi duże nadzieje w ocenie stanu fizjologicznego bakterii fermentacji mlekowej. Sondy oligonukleotydowe rRNA dla bakterii fermentacji mlekowej mogą być wykorzystywane zarówno do ich identyfikacji, śledzenia zmian liczebności populacji podczas procesów fermentacyjnych oraz detekcji LAB powodujących wady produktów, np. wina (7). W za-

leżności od wymaganego poziomu detekcji (rodzaj, gatunek) różne regiony genomu mogą być brane pod uwagę jako potencjalny cel hybrydyzacji. Sekwencja 16S oraz 23S rRNA zawiera zarówno konserwatywne regiony powszechne dla wszystkich *eubacteria*, jak i wysoce zmienne, specyficzne dla określonego gatunku. Trudnością w aplikacji techniki FISH na poziomie gatunkowym może być dobór odpowiednich sond, gdyż nie jest wskazane ich stosowanie w blisko spokrewnionych gatunkach LAB, ze względu na duży poziom podobieństwa sekwencji rRNA, np. *L. plantarum* i *L. pentosus* czy *L. paraplantarum* (12). Przydatność FISH jako metody do monitorowania dynamiki rozwoju LAB w żywności jest ciągle badana i weryfikowana. Lahtinen i wsp. (20) badali przeżywalność pałeczek z rodzaju *Bifidobacterium* w długoterminowo przechowywanym napoju owsianym z użyciem 4 metod analizy ilościowej. Odnosili wyniki uzyskane metodą płytkową do wyników 3 technik biologii molekularnej, w tym FISH. Wskazując na liczne zalety aplikacyjne fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* w żywności, wykazali statystycznie istotne różnice w liczebnościach uzyskanych w porównaniu z metodą hodowlaną, stwierdzając przydatność tej techniki w oznaczaniu całkowitej liczby bakterii.

Zwiększone wymagania odnoszące się do analityki mikrobiologicznej spowodowane są m.in. zintensyfikowaniem badań oceniających stan fizjologiczny drobnoustrojów w niekorzystnych dla nich warunkach. Metoda płytkowa o statusie tzw. złotego standardu jest najczęściej stosowana w ilościowej analizie mikrobiologicznej, która pozwala na określenie liczby komórek wykazujących zdolność do rozmnażania i tworzenia kolonii. Wyzwaniem w zastosowaniu tej metody staje się zahamowanie procesów rozmnażania, wynikające np. z poddania komórek działaniu czynników szkodliwych. Alternatywą w stosunku do tradycyjnie stosowanej metody płytkowej jest znakowanie składnikiem fluorescencyjnym, umożliwiające szybkie wykrycie, liczenie i identyfikację drobnoustrojów. Uzasadnione jest dobieranie technik, które odnoszą się np. do aktywności metabolicznej komórek lub stabilizacji struktur komórkowych. Precyzyjne monitorowanie zmian dynamiki rozwoju i obumierania populacji drobnoustrojów przemysłowego zastosowania wymaga badań modelowych oraz alternatywnych technik, oceniających stan fizjologiczny drobnoustrojów w sposób wielowymiarowy (różnorodny, zróżnicowany), czyli odwołujących się do różnych wyznaczników funkcjonalności komórek jednocześnie.

Piśmiennictwo

1. Amann R. I., Zarda B., Stahl D. A., Schleifer K.-H.: Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992, 58, 3007-3011.
2. Auty M. A. E., Gardiner G. E., McBready S. J., O'Sullivan E. O., Mulvihill D. M., Collins J. K., Fitzgerald G. F., Stanton C., Ross R. P. M.: Direct in situ viability assessment of bacteria in probiotic dairy products using viability staining in conjunction with confocal scanning laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 420-425.

3. Baena-Ruano S., Jimenez-Ot C., Santos-Duenas I., Cantero-Moreno D., Barja F., Garcia-Garcia I.: Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process. *Process Biochemistry* 2006, 41, 1160-1164.
4. Barer M. R., Harwood C. R.: Bacterial viability and culturability. *Adv. Microb. Physiol.* 1999, 41, 93-137.
5. 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-747S.
6. Biggerstaff J., Le Puil M., Weidow B., Prater J., Glass K., Radosevich M., White D.: New methodology for viability testing in environmental samples. *Mol. Cell. Probes* 2006, 20, 141-146.
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. Breeuwand P., Abee T.: Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *Int. J. Food Microbiol.* 2000, 55, 193-200.
9. Bunthof C., Abee T.: Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 2934-2942.
10. Bunthof C., Bloemen K., Breeuwer P., Rombouts F., Abee T.: Flow cytometric assessment of viability of Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 2326-2335.
11. Bunthof C., Braak S., Breeuwer P., Rombouts F., Abee T.: Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 3681-3689.
12. Coeuret V., Dubernet S., Bernardeau M., Gueguen M., Vernoux J. P.: Isolation, characterization and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait* 2003, 83, 269-306.
13. Collado M. C., Moreno Y., Hernandez E., Cobo J. M., Hernandez M.: In vitro viability of *Bifidobacterium* strains isolated from commercial dairy products exposed to human gastrointestinal conditions. *Food Sci. Tech. Int.* 2005, 11, 307-314.
14. De Vries M. C., Vaughan E. E., Kleerebezem M., de Vos W. M.: Optimising single cell activity assessment of *Lactobacillus plantarum* by fluorescent in situ hybridisation as affected by growth. *J. Microbiol. Meth.* 2004, 59, 109-115.
15. 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.
16. Guchte M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S., Maguin E.: Stress responses in lactic acid bacteria. *Anton. Leeuw.* 2002, 82, 187-216.
17. Hensiek R., Krupp G., Stackerbrandt E.: Development of diagnostic oligonucleotide probes for four *Lactobacillus* species occurring in the intestinal tract. *Syst. Appl. Microbiol.* 1992, 15, 123-128.
18. Hermida M., Taboada M., Menendes S., Rodriguez-Otero J. L.: Semi-automated direct epifluorescent filter technique for total bacterial count in raw milk. *J. AOAC Int.* 2000, 83, 1345-1348.
19. Joux F., Lebaron F.: Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes Infection* 2000, 2, 1523-1535.
20. Lahtinen S., Gueimonde M., Ouwehand A., Reinikainen J., Salminen S.: Comparison of methods to enumerate probiotic bifidobacteria in a fermented food product. *Food Microbiol.* 2006, 23, 571-577.
21. Lahtinen S., Gueimonde M., Ouwehand A., Reinikainen J., Salminen S.: Probiotic bacteria may become dormant during storage. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 1662-1663.
22. Łaniewska-Trokanheim Ł., Olszewska M., Mikš-Krajnik M., Zadernowska A.: Patterns of survival and volatile metabolites of selected *Lactobacillus* strains in long-term incubation in milk. *J. Microbiol.* 2010, 48, 445-451.
23. Mikš M., Warmińska-Radyko I.: Wybrane techniki fluorescencyjne w badaniach stanu fizjologicznego i przeżywalności komórek bakteryjnych w żywności. *Medycyna Wet.* 2008, 64, 623-628.
24. Moreno Y., Collado M., Ferrus M., Cobo J., 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. Tech.* 2006, 41, 275-280.
25. Morono Y., Takano S., Miyana K., Tanji Y., Unno & Katsutoshi H.: Application of glutaraldehyde for the staining of esterase-active cells with carboxyfluorescein diacetate. *Biotechnol. Lett.* 2004, 26, 379-383.
26. Papadimitriou K., Pratsinis H., Nebe-Von-Caron G., Kletsas D., Tsakalidou E.: Rapid assessment of the physiological status of *Streptococcus macedonicus* by flow cytometry and fluorescence probes. *Int. J. Food Microbiol.* 2006, 111, 197-205.
27. Paszyńska-Wesołowska I., Bartoszcze M.: Bakterie w stadium VBNC – zagrożenie dla zdrowia człowieka. *Medycyna Wet.* 2009, 65, 228-231.
28. Rault A., Beal C., Ghorbal S., Ogier J.-C., Bouix M.: Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology* 2007, 55, 35-43.
29. Roszak D. B., Grimes D. J., Colwell R. R.: Viable but non-recoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic system. *Can. J. Microbiol.* 1984, 30, 334-338.
30. Vogel R., Bocker G., Stolz P., Ehrmann M., Fanta D., Ludwig W., Pot B., Kersters K., Schleifer K. H., Hammes W.: Identification of lactobacilli from sourdough and description of *Lactobacillus pontis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994, 44, 223-239.
31. Wallner G., Amann R., Beisker W.: Optimizing fluorescent in situ hybridisation with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 1993, 14, 136-143.
32. Warmińska-Radyko I., Olszewska M., Mikš-Krajnik M.: Effect of temperature and sodium chloride on the growth and metabolism of *Lactococcus* strains in long-term incubation of milk. *Milchwissenschaft* 2010, 65, 32-35.

Adres autora: mgr Magdalena Olszewska, Pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn;
e-mail: magdalena.olszewska@uwm.edu.pl