

Analiza cytometryczna w mikrobiologicznych badaniach żywności

MAGDALENA A. OLSZEWSKA, ALEKSANDRA M. KOCOT,
ŁUCJA ŁANIEWSKA-TROKENHEIM

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydział Nauki o Żywności,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn

Otrzymano 30.10.2014

Zaakceptowano 08.12.2014

Olszewska M. A., Kocot A. M., Łaniewska-Trokenheim Ł.
Cytometry in microbiological analysis of food products

Summary

Cytometric analysis allows for the quantitative and qualitative evaluation of microorganisms in food. Apparatus for food analysis is available on the market for use in the food processing industry and increasingly displaces traditional methods. Apart from being a full automated method, an important advantage of cytometric analysis is a multi-parametric assessment of the physiological state of bacterial cells. This paper presents examples of cytometric analysis applications in both solid-phase and flow systems in microbiological studies of food. The viable but nonculturable (VBNC) state of various microorganisms has been distinguished, which can be determined using the cytometric approach.

Keywords: cytometric analysis, flow cytometry, solid-phase cytometry, microorganisms, VBNC state

Analiza cytometryczna żywności pozwala ocenić badaną próbkę pod względem jakościowym i ilościowym występujących w niej drobnoustrojów. Zastosowanie cytometrii w analizie żywności ma wiele zalet w porównaniu do metod tradycyjnych, które wiążą się przede wszystkim z czaso- i pracochłonnością. Cytometria w sposób zautomatyzowany umożliwia analizę pojedynczych komórek w czasie bardzo krótkim od rozpoczęcia pomiaru. Do tego celu

stosuje się barwniki fluorescencyjne, które pozwalają zbadać różne parametry komórkowe drobnoustrojów, zarówno te związane z powierzchnią, rozmiarem, budową wewnątrzkomórkową, jak też z oddziaływaniami pomiędzy cząsteczkami w komórce (16, 28). Możliwa jest także ocena stanu błon biologicznych, potencjału błonowego czy aktywności metabolicznej komórek (tab. 1). Fluorescencję wybarwionych komórek można wzbudzić na dwa sposoby: pośredni lub bezpośredni.

Tab. 1. Barwniki fluorescencyjne stosowane w analizie cytometrycznej (15)

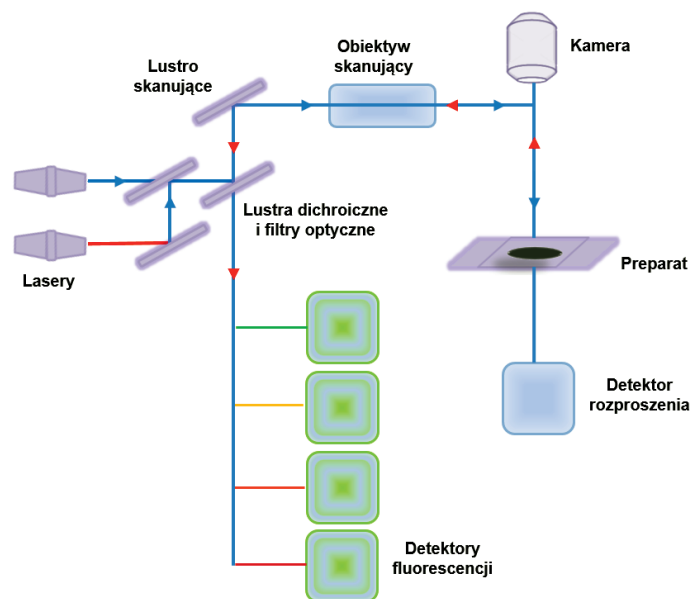
Barwnik/znacznik fluorescencyjny	Specyfikacja
CTC, FDA, CFDA	Prefluorochromy, nie wykazują fluorescencji w formie utlenionej, w komórce aktywnej metabolicznie przechodzą w formę zredukowaną – fluoryzującą
PI, bromek etydyliny, SYTOXgreen, SYTO-9, PO-PRO-3, TOTO-1, SYBR Green I	Barwniki, które przenikają do komórek przez uszkodzone lub spójne błony biologiczne, następuje wzmocnienie fluorescencji po wiązaniu z kwasami nukleinowymi
Rodamina 123, DiBAC ₄ (3)-BOX	Fluorochromy kationowe i anionowe – sygnał fluorescencyjny emitowany jest przez komórki zachowujące potencjał elektrochemiczny błony cytoplazmatycznej
Sondy oligonukleotydowe rRNA znakowane fluorescencyjnie Cy3, Cy5, Texas-Red, fluoresceiną	Specyficzne wiązanie sondy z rRNA aktywnych fizjologicznie komórek i detekcja sygnału dzięki fluorescencji znacznika (tzw. Flow-FISH)
GFP, EGFP	Wklonowanie plazmidów, kodujących białko o właściwościach fluorescencyjnych, które pozwala na detekcję aktywnych komórek

Objaśnienia: CTC – chlorek 5-cyano-2,3-ditolylotetrazoowy; FDA – diocetan fluoresceiny; CFDA – diocetan karboksylfluoresceiny; PI – jodek propidyny; SYTOX green – barwnik kwasów nukleinowych; SYTO-9 – barwnik kwasów nukleinowych; PO-PRO-3 – 3-metylo-2-[3 [1 [3-(trimetyloamonio) propylo] -4 (1 H) -pirydynylideno] -1-propenylo]-dijodek; TOTO-1 – propidyny-1-(4,4,7,7-tetrametylo-4,7-diazandekametyleno)-bis-4-[3-metylo-2,3-dihydro(benzo-1,3-oksazolo-2-metylideno)]-1-(3-trimetyloamonowy propylo) jodek; SYBR Green I – N⁺, N⁺-dimetylo-N-[4-[(E)-(3-metylo-1,3-benzotiazol-2-ylideno) metylo]-1-fenylo-chinolin-1-en-2-ylol]-N-propylo-propano 1,3-diamina; DiBAC₄(3)-BOX – bis(1,3-kwas dibutylobarbiturowy) trimetylo oksonol; Cy3 – cyjanina 3; Cy5 – cyjanina 5; Texas-Red – chlorek sulfonylowy; FISH – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*; (E)GFP – białko zielonej fluorescencji

Bezpośrednia indukcja fluorescencji polega na samorzutnym przyłączeniu cząsteczek fluorochromu do wybranych struktur komórkowych, pośrednia natomiast wymaga obecności dodatkowych elementów, takich jak sondy, przeciwciała czy lektyny, które są związane z fluorochromem (16) (tab. 1). Dzięki takiemu zastosowaniu fluorescencji cytometria umożliwia rozróżnienia komórek żywych i komórek martwych, niezależnie od zdolności proliferacji komórek, jak to jest w tradycyjnych metodach hodowlanych. Podkreślić należy, że brak wzrostu na podłożach hodowlanych, przy zachowaniu aktywności i spójności komórek jest stanem charakteryzującym komórki VBNC (viable but nonculturable), które oznaczyć można tylko za pomocą takich metod, jak cytometria. Oznaczenie komórek w stadium VBNC jest z kolei ważne w produktach, które mogą stwarzać niekorzystne środowisko przeżycia drobnoustrojom, zarówno patogennym, jak i probiotycznym. To sprawia, że cytometria może być dużo dokładniejsza w oznaczaniu drobnoustrojów w żywności niż metody hodowlane.

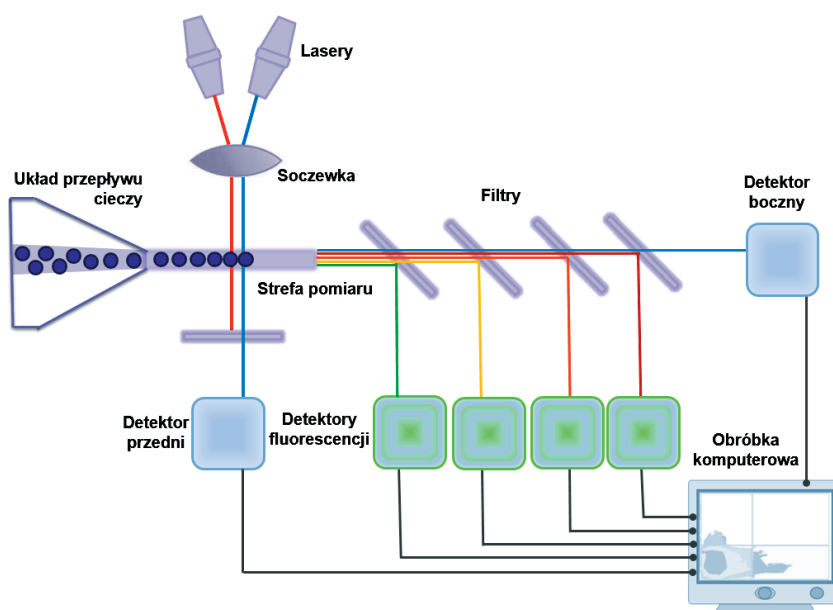
Zasada cytometrii – porównanie systemu stacjonarnego i przepływowego

Cytometria dzieli się na stacjonarną (solid-phase laser cytometry) i przepływową (flow cytometry). W obu zasada pomiaru cytometrycznego jest podobna, ze względu na zastosowanie lasera do wzbudzenia fluorescencji oraz fotopowielaczy do detekcji sygnału świetlnego. Różnica między nimi przede wszystkim polega na tym, że cytometria stacjonarna wymaga filtracji badanej próbki przez membranę, która podlega skanowaniu wiązką promieni laserowych. W cytometrii stacjonarnej system optyczny po przetworzeniu danych pozwala na dokładne odtworzenie lokalizacji obiektów – komórek drobnoustrojów na membranie, a system weryfikacji wyników oparty na obserwacji mikroskopowej pozwala na wizualizację komórek (27) (ryc. 1). Do analizy próbek żywności z użyciem cytometru przepływowego komórki drobnoustrojów pozostają w zawiesinie, czyli jego zastosowanie nie ogranicza się tylko do produktów, które można poddać filtracji. Przygotowanie próbki wymaga sporządzenia roztworu lub zawiesiny i, w zależności od użytego barwnika fluorescencyjnego, często etapu utrwalania próbek (22). Przepływające w aparacie przepływowym komórki przecinają promień lasera, który emituje światło, a emitowana przez laser wiązka ulega rozproszeniu na skutek „zderzenia” z komórkami. Pomiaru rozproszenia w cytometrze dokonują dwa detektory – detektor przedni i detektor boczny. Pierwszy z nich zbiera wiązkę, która nie uległa rozproszeniu lub rozproszyła się pod bardzo małym kątem, drugi z kolei ustawiony jest pod



Ryc. 1. Schemat przedstawiający zasadę działania cytometru stacjonarnego

kątem 90° do przemieszczających się komórek i pozwala na wewnątrzkomórkową analizę obiektów (25, 26). W cytometrze mierzona jest również fluorescencja emitowana przez próbkę. Światło, które wysyła komórka, skupiane jest na filtrach, soczewkach i lustrach dichromatycznych. Układy optyczne rozdzielają różne widma fluorescencji, które następnie przekształcane są na sygnał cyfrowy (24). Wyniki przedstawiane są w postaci jedno- lub dwuwymiarowych histogramów albo wykresów kropkowych (26). Wśród cytometrów przepływowych wyróżnia się aparaty pozwalające na wielopłaszczyznową analizę próbek – analizatory (ryc. 2), coraz częściej używane rutynowo oraz urządzenia umożliwiające odzysk komórek pod względem wybranego parametru – sortery, stosowane głównie w laboratoriach badawczych. Porównanie najważ-



Ryc. 2. Schemat przedstawiający zasadę działania cytometru przepływowego – typ analizatora

Tab. 2. Porównanie charakterystyk cytometrii stacjonarnej i przepływowej

Cytometria przepływowa		Cytometria stacjonarna
W formie suspensji komórek	Analiza próbek	W postaci preparatu mikroskopowego
Nie	Filtracja próbek	Tak
Tak	Ocena wieloparametryczna	Tak
Nie	Wizualizacja i lokalizacja komórek	Tak
Tak	Odzysk komórek	Nie
Kilkadziesiąt tysięcy komórek na sekundę	Szybkość pojedynczej analizy cytometrycznej	Setki komórek na sekundę

niejszych cech cytometrii stacjonarnej i przepływowej zestawiono w tab. 2.

Zastosowanie cytometrii w badaniach mikrobiologicznych żywności jest szerokie i może obejmować kontrolę zanieczyszczeń żywności mikroflorą niepożądaną, szczepionek stosowanych przemysłowo, zarówno składu, jak i stanu fizjologicznego szczepów oraz procesów fermentacyjnych. W zależności od drobnoustrojów, próg detekcji w cytometrii to około sto komórek na mililitr lub gram i, co ważne z uwagi na aspekt automatyzacji, badanie próbek można wykonywać w liczbie kilkudziesięciu na godzinę (16). W przypadku badań jakościowych należy uwzględnić etap wzbogacenia trwający około 24 godzin, w zależności od badanego drobnoustroju.

Cytometria a przemysłowe zastosowanie drobnoustrojów

Cytometrię zastosowano w badaniach ilościowych bakterii fermentacji mlekowej (3, 10-12) (tab. 3). Oceniono m.in. przeżywalność *Lactobacillus* spp. w produktach, które zakwalifikowano jako żywność potencjalnie probiotyczną. Bunthof i Abee (2) zastosowali cytometrię przepływową w badaniach stanu fizjologicznego komórek *Lactobacillus plantarum* WCFS 1 w mleku, zakwasach mleczarskich i produktach probiotycznych. W tym celu użyto następujących barwników: CFDA, TOTO-1 i SYTO-9. Barwnik CFDA pozwolił ocenić aktywność enzymatyczną komórek, gdyż jest markerem aktywności esterolitycznej, TOTO-1 pozwolił określić odsetek populacji komórek martwych, gdyż jest to fluorochrom, który wnika do komórek przez uszkodzone błony cytoplazmatyczne, a SYTO-9 jako fluorochrom kwasów nukleinowych łączy się z nukleoidem wszystkich komórek, tym samym pozwolił określić ogólną liczbę komórek bakteryjnych. Ananta i wsp. (1) zbadali wpływ wysokich ciśnień (w zakresie 100-600 MPa) na stan fizjologiczny probiotycznego szczepu *Lactobacillus rhamnosus* GG. Zastosowali w tym celu barwienie CFDA/PI (diocyan karboksylfluoresceiny/jodek propidyny), które pozwoliło ocenić aktywność esteraz oraz spójność błon cytoplazmatycznych komórek. Stwierdzili, że część populacji utraciła zdolność wzrostu na podłożach hodowlanych, ale nie straciła aktywności metabolicznej, jak wykazała analiza cytometryczna. Ostatecznie stwierdzono, że szczep *Lactobacillus rhamnosus* GG

wykazał dobrą przeżywalność podczas utrwalania żywności z zastosowaniem wysokich ciśnień. Santos Leandro i wsp. (24) określili wpływ liofilizacji na aktywność komórek *Lactococcus lactis* w celu selekcji tych szczepów, które można zastosować jako kulturę starterową do serów. Analizie cytometrycznej poddali szczepy wyizolowane z kiszonek paszowych oraz mleka bawolego. Zastosowano barwienie fluorescencyjne LIVE/DEAD BacLight™, czyli zestaw barwników SYTO®9 oraz jodek propidyny, pozwalające różnicować komórki ze względu na spójność błon cytoplazmatycznych. Zaobserwowano, że komórki *L. lactis* wyizolowane z mleka bawolego wykazały największą aktywność fizjologiczną po procesie liofilizacji, a populacja była jednorodna pod względem spójności struktur komórkowych. Cytometria okazała się wiarygodną metodą kontroli i nadzorowania procesów fermentacyjnych zarówno w mleczarstwie, jak też w winiarstwie, browarnictwie, piekarnictwie (tab. 3).

Cytometria a bezpieczeństwo żywności

Dużo więcej analiz cytometrycznych dotyczy badań drobnoustrojów patogennych: *Salmonella* sp., *Listeria* sp., *Legionella* sp., *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* (tab. 3). Gunasakera i wsp. zbadali obecność *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus* w mleku surowym (11). Próbkę barwiono fluorochromem SYTO BC, który łączył się z kwasami nukleinowymi bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, dzięki czemu odzwierciedlono obraz całkowitej liczny drobnoustrojów występujących w badanych próbkach mleka. Jeszcze inni, stosując analizę cytometryczną, wykryli w próbkach żywności bakterie patogene *Salmonella* sp. (21), *Escherichia coli* O157:H7 (27), *Listeria monocytogenes* (22) (tab. 3). McClelland i Pinder (21) wykryli pałeczki *Salmonella* Typhimurium w mleku i jajach. W tym celu zastosowali przeciwciała monoklonalne wyznakowane fluorochromem FITC (izotiocyjanian fluoresceiny). Yamaguchi i wsp. (29) również analizowali drobnoustroje patogene, oznaczyli ilościowo pałeczki *E. coli* O157:H7 w różnych produktach spożywczych. Zastosowali barwienie CTC do oceny aktywności oddechowej komórek oraz przeciwciała wyznakowane FITC (izotiocyjanian fluoresceiny), co dało właściwy sygnał obecności komórek *E. coli* O157:H7 w analizowanych

Tab. 3. Kierunki zastosowania analizy cytometrycznej w badaniach żywności

Produkt	Drobnoustrój	Cel	Autor
Ser	<i>Lactococcus lactis</i>	Ocena stopnia lizy komórek bakteryjnych na poszczególnych etapach powstawania sera z zastosowaniem barwienia LIVE/DEAD	3
Wino	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Sacchromyces bayanus</i> , <i>Oenococcus oeni</i> , drożdże dzikie	Określenie liczby aktywnych komórek z zastosowaniem barwnika FDA	20
Mleko bawole, kiszonki	<i>Lactococcus lactis</i>	Ocena stanu fizjologicznego komórek drobnoustrojów poddanych procesowi liofilizacji	24
Cydr	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i>	Ocena stanu fizjologicznego drobnoustrojów podczas kolejnych etapów fermentacji z zastosowaniem barwników: DRAQ5, CV6, PI	12
Kultury starterowe, produkty probiotyczne	<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS 1	Ocena aktywności enzymatycznej i integralności błon z zastosowaniem barwników CFDA i TOTO-1	2
	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Leuconostoc</i> spp.	Charakterystyka bakterii fermentacji mlekowej z zastosowaniem metody Flow-FISH	10
Jaja, mleko	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Detekcja pałeczek <i>Salmonella</i> Typhimurium z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych wyznakowanych barwnikiem FITC	21
Sok jabłkowy, mleko, mielona wołowina	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	CTC zastosowany do oceny aktywności oddechowej drobnoustrojów, przeciwciała wyznakowane FITC do wykrycia oznaczanych komórek	29
Olejki eteryczne o działaniu antymikrobiologicznym (cynamon, oregano, tymianek)	<i>Listeria monocytogenes</i>	CFDA/PI, ocena aktywności enzymatycznej oraz integralności membran komórkowych	22
Mleko surowe	<i>Listeria monocytogenes</i>	Dokładne oznaczenie liczebności pałeczek z zastosowaniem Flow-FISH i specyficznej sondy rRNA	13
	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Określenie całkowitej liczby bakterii w mleku po barwieniu fluorochromem SYTO BC, barwienie komórek martwych z zastosowaniem PI	11
	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	Detekcja komórek z użyciem ChemChrome V6 i cytometrii stacjonarnej	5
Tuszki drobiowe	<i>Campylobacter jejuni</i>	Określenie stopnia adhezji drobnoustroju do skóry kurczaka w różnych warunkach mierzona z zastosowaniem barwnika FITC	14
Woda	<i>Campylobacter jejuni</i>	Wykrywanie komórek w stadium VBNC z zastosowaniem barwienia CFDA i cytometrii stacjonarnej	4
	<i>Legionella pneumophila</i>	Ocena liczebności i aktywności fizjologicznej komórek bakteryjnych (SYBR Green® i PI)	17
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	Określenie oporności na różne czynniki (to bramycyna, środek na bazie chloru, nadtlenu wodoru, jony srebra) komórek biofilmu w oparciu o świecenie białka GFP i sortowanie komórek	18
Wanilina	<i>Escherichia coli</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Listeria innocua</i>	Wpływ waniliny na stan fizjologiczny badanych drobnoustrojów z zastosowaniem barwników PI i CFDA-SE	9
Mięso wołowe do hamburgerów	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Specyficzne oznaczenie komórek wyznakowanych przeciwciałami i barwnikiem CTC na membranie	23

Objaśnienia: CFDA-SE – diocjan karboksylfluoresceiny estru sukcyinimidylu; DRAQ5 – 1,5-bis {[2 (dimetyloamino) etylo] amina} -4, 8-dihydroxyanthracene-9,10-dionu; CV6 – Chem Chrome V6; FITC – izotiocyanian fluoresceiny; SYTO BC – barwnik kwasów nukleinowych

próbekach żywności. Paparella i wsp. (22) zajęli się natomiast określeniem wpływu olejków eterycznych (cynamon, oregano, kminek) na stan fizjologiczny *Listeria monocytogenes*. W tym celu zastosowano tradycyjną metodę płytkową oraz analizę cytometryczną. Cytometria przepływowa wraz z barwieniem CFDA i PI pozwoliła na wykazanie hamującego i uszkodzającego wpływu olejków na aktywność oraz strukturę błon cytoplazmatycznych pałeczek. Różnice w liczebności pałeczek uzyskane z zastosowaniem obu metod pozwoliły stwierdzić obecność komórek VBNC. Indukcja tego stanu wynikała z niekorzystnego

środowiska rozwoju wywołanego obecnością olejków eterycznych. Stwierdzić można zatem, że metody oparte na fluorescencji umożliwiają wykrycie komórek VBNC, co jest niemożliwe z zastosowaniem samych metod hodowlanych. Ikeda i wsp. (13) zastosowali z kolei połączenie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* z cytometrią przepływową (tzw. metoda Flow-FISH) w celu detekcji komórek *L. monocytogenes* w mleku. Dobrano specyficzną sondę oligonukleotydową RL-2 o sekwencji 5'-ATAGTTTTATGGGATTAGC-3', która hybrydyzowała tylko z pałeczkami *L. monocytogenes*, mimo występowania w mleku innych drobnoustrojów.

Na podstawie wyników tych badań zgodzić się można, że precyzyjne oznaczenie drobnoustrojów jest pożądanym kierunkiem rozwoju nowoczesnej analizy żywności. Za pomocą cytometrii przepływowej oceniono także stopień adhezji *Campylobacter jejuni* w różnych warunkach do skóry tuszek drobiowych (6) (tab. 3). Wykazano, że w komórkach *C. jejuni* w niesprzyjających warunkach dochodzi do indukcji stadium VBNC. Jak wykazano, niekorzystne warunki dla *C. jejuni* to m.in. środowisko tlenowe. Wraz ze wzrostem zawartości tlenu w środowisku zmniejszała się żywotność tych drobnoustrojów, jednak komórki w stadium VBNC nadal mogły stwarzać realne zagrożenie dla zdrowia konsumenta. Komórki *C. jejuni* wykazały adhezję do skóry mięsa drobiowego, co świadczy o tym, że jest ono dobrym rezerwuarem tego drobnoustroju i stanowi potencjalne zagrożenie dla bezpieczeństwa żywności. Z kolei Cools i wsp. (4) również oznaczyli komórki *C. jejuni* w stanie VBNC, ale z użyciem stacjonarnej cytometrii i barwienia ChemChrome V6. Badania z zastosowaniem cytometru-sortera komórkowego przeprowadzili Kim i wsp. (18). Oznaczyli i odzyskali populację komórek aktywnych oraz VBNC biofilmu pałeczek *Pseudomonas* i stwierdzili, że komórki VBNC są bardziej odporne na antybiotyki i dezynfektanty niż komórki aktywne. Inne badania określały np. wpływ waniliny, stosowanej często jako dodatek do żywności, na stan fizjologiczny komórek *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* i *Listeria innocua* (9) (tab. 3). W tym celu zastosowano barwniki CFDA-SE i PI. Wanilina wykazała właściwości przeciwdrobnoustrojowe w stosunku do wymienionych gatunków bakterii, co przejawiało się obniżeniem aktywności esterolitycznej i zwiększeniem udziału populacji drobnoustrojów z uszkodzonymi błonami cytoplazmatycznymi. Pyle i wsp. (23) użyli cytometrii stacjonarnej w badaniach próbek wołowiny, w celu detekcji *E. coli* O157:H7. Odpowiednie przygotowanie próbek do stacjonarnej analizy cytometrycznej oraz zastosowanie przeciwciał znakowanych FITC i wyznacznika aktywności oddechowej CTC pozwoliło badaczom bardzo precyzyjnie oznaczyć aktywne komórki tego szczepu w próbkach. D'Haese i wsp. (5, 7, 8) wykonali serię badań próbek żywności do szybkiego oznaczenia liczebności drobnoustrojów, np. w mleku. Istotnym zastosowaniem cytometrii stacjonarnej było badanie oporności na antybiotyki. D'Haese i wsp. (6) zaobserwowali, że testowane przez nich antybiotyki wpłynęły na integralność błon pałeczek *E. coli*, hamując znakowanie komórek ChemChrome V6 w stężeniach antybiotyków nawet poniżej MIC (minimum inhibitory concentration) (tab. 3).

Cytometria w rutynowej analizie żywności

Ważnym aspektem analizy cytometrycznej jest to, że jest już stosowana jako rutynowa metoda badań w zakładach przemysłu spożywczego. Uzyskanie

wyników analizy w krótkim czasie pozwala na szybką reakcję w przypadku wykrycia nawet minimalnego zanieczyszczenia żywności. Umożliwia to wczesne wyeliminowanie wadliwego surowca lub zmianę parametrów przebiegu procesu technologicznego. Na rynku dostępne są komercyjne urządzenia służące do automatycznego wykrywania drobnoustrojów w próbkach żywności, są to cytometry typu analizatory, np. D-count® i BactiFlow ALS®. Analizatory pozwalają na badanie różnych produktów, takich jak: mleko, fermentowane produkty mleczne, koncentraty, pulpy, soki owocowe, napoje i woda. Ocena większości tych produktów w kierunku obecności drożdży i pleśni oraz określenia ogólnej liczby drobnoustrojów zostaje znacznie skrócona i nie przekracza około 20 godzin (19).

Analiza cytometryczna stanowi obecnie nieocenioną metodę badań mikrobiologicznych w badaniach naukowych i przetwórstwie żywności. Dzięki zastosowaniu cytometrii możliwe jest bezpośrednie badanie próbek, z pominięciem lub skróceniem okresu inkubacji, co znacznie przyspiesza pozyskanie wyników. Umożliwia to np. szybkie podjęcie działań korekcyjnych w zakładach przemysłu spożywczego, a w konsekwencji wzrasta bezpieczeństwo żywności. Kolejną korzyścią płynącą z zastosowania analizy cytometrycznej jest zmniejszenie pracochłonności oraz ograniczenie zużycia podłoży mikrobiologicznych w porównaniu ze stosowanymi metodami tradycyjnymi. Dodatkowo cytometry mogą wykryć drobnoustroje występujące w niewielkiej ilości w badanych próbkach oraz żywności stanowiącej dla nich środowisko stresogenne, umożliwiając detekcję komórek w stadium VBNC oraz określenie wpływu czynników stresogennych na fizjologię komórek. Szereg korzyści płynących z zastosowania analizy cytometrycznej w badaniach żywności sprawia, że metoda ta cieszy się coraz większym zainteresowaniem wśród naukowców oraz producentów żywności, wypierając metody tradycyjne.

Piśmiennictwo

1. Ananta E., Heinz V., Knorr D.: Assessment of high pressure induced damage on *Lactobacillus rhamnosus* GG by flow cytometry. *Food Microbiol.* 2004, 21, 567-577.
2. Bunthof C. J., Abee T.: Development of a flow cytometric method to analyse subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 2934-2942.
3. Comas-Riu J., Rius N.: Flow cytometry applications in the food industry. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2009, 36, 999-1011.
4. Cools I., D'Haese E., Uyttendaele M., Storms E., Nelis H. J., Debevere J.: Solid phase cytometry as a tool to detect viable but non-culturable cells of *Campylobacter jejuni*. *J. Microbiol. Method.* 2005, 63, 107-114.
5. D'Haese E., Dumon I., Werbrouck H., Dejonghe V., Herman L.: Improved detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *J. Dairy Res.* 2005, 72, 125-128.
6. D'Haese E., Nelis H. J.: Effect of antibiotics on viability staining of *Escherichia coli* in solid phase cytometry. *J. Appl. Microbiol.* 2000, 89, 778-784.
7. D'Haese E., Nelis H. J.: Rapid detection of single cell bacteria as a novel approach in food microbiology. *J. AOAC Internat.* 2002, 85, 979-983.

8. *D'Haese E., Nelis H. J., Reybroeck W.*: Determination of somatic cells in milk by solid phase cytometry. *J. Dairy. Res.* 2001, 68, 9-14.
9. *Fitzgerald D. J., Stratford M., Gasson M. J., Ueckert J., Bos A., Narbad A.*: Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *J. Appl. Microbiol.* 2004, 97, 104-113.
10. *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.
11. *Gunasekera T. S., Atfield P. V., Veal D. A.*: A Flow Cytometry Method for Rapid Detection and Enumeration of Total Bacteria in Milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 1228-1232.
12. *Herrero M., Quirós C., García L. A., Díaz M.*: Use of flow cytometry to follow the physiological states of microorganisms in cider fermentation processes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 6725-6733.
13. *Ikeda M., Yamaguchi N., Nasu M.*: Rapid on-chip flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. *J. Health Sci.* 2009, 55, 851-856.
14. *Jang K. I., Kim M. G., Ha S. D., Kim K. S., Lee K. H., Chung D. H., Kim C. H., Kim K. Y.*: Morphology and adhesion of *Campylobacter jejuni* to chicken skin under varying conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 17, 202-206.
15. *Joux F., Lebaron P.*: Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and Infection* 2002, 2, 1523-1535.
16. *Juzwa W.*: Cytometria przepływowa w nowoczesnej analizie żywności. *Przem. Spoż.* 2011, 65, 41-44.
17. *Keserue H. A., Baumgartner A., Felleisen R., Egli R.*: Rapid detection of total and viable *Legionella pneumophila* in tap water by immunomagnetic separation, double fluorescent staining and flow cytometry. *Microbial Biotechnol.* 2012, 5, 753-763.
18. *Kim J., Hahn J. S., Franklin M. J., Stewart P. S., Yoon J.*: Tolerance of dormant and active cells in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilm to antimicrobial agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009, 63, 129-135.
19. *Kunicka-Styczyńska A.*: Cytometria przepływowa w analizie żywności. *Aktualności Industry* 2014, 16, 7.
20. *Malacrino P., Zapparoli G., Torriani S., Dellaglio F.*: Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *J. Microbiol. Met.* 2001, 45, 127-134.
21. *McClelland R. G., Pinder A. C.*: Detection of *Salmonella typhimurium* in Dairy Products with Flow Cytometry and Monoclonal Antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994, 60, 4255-4262.
22. *Paparella A., Taccogna L., Aguzzi I., Chaves-Lo'pez C., Serio A., Marsilio F., Suzzi G.*: Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 2008, 19, 1174-1182.
23. *Pyle B. H., Broadaway S. C., McFeters G. A.*: Sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food and water by immunomagnetic separation and solid-phase laser cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 1966-1972.
24. *Santos Leandro E. dos, de Moraes C. A.*: Flow cytometry assessment of *Lactococcus lactis* isolates viability after lyophilization. *Int. J. Nutr. Food Sci.* 2014, 3, 391-396.
25. *Sędek Ł., Sonsala A., Szczepański T., Mazur B.*: Techniczne aspekty cytometrii przepływowej. *J. Lab. Diagn.* 2010, 46, 415-420.
26. *Skotny A., Pucińska J.*: Współczesna cytometria przepływowa. *Inż. Biomed.* 2013, 19, 3-11.
27. *Vanhee L. M. E., D'Haese E., Cools I., Nelis H. J., Coenye T.*: Detection and Quantification of Bacteria and Fungi Using Solid-Phase Cytometry, [w:] M. V. Magni (ed.): *Detection of Bacteria, Viruses, Parasites and Fungi*, NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology, DOI 10.1007/978-90-481-8544-3_2, © Springer Science+Business Media B.V., Perugia, Włochy 2010, s. 25-41.
28. *Veal D. A., Deere D., Ferrar B., Piper J., Atfield P. V.*: Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *J. Immunol. Met.* 2000, 243, 191-210.
29. *Yamaguchi N., Sasada M., Yamanaka M., Nasu M.*: Rapid Detection of Respiring *Escherichia coli* O157:H7 in Apple Juice, Milk, and Ground Beef by Flow Cytometry. *Cytometry Part A* 2003, 54A, 27-35.

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