

MAGDALENA MICHALAK

KLAUDIA GUSTAW

ADAM WAŚKO

MAGDALENA POLAK-BERECKA

Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

ul. Skromna 8, 20-704 Lublin

e-mail: magdalena.michalak@up.lublin.pl

TECHNIKI SŁUŻĄCE BADANIU BAKTERII W STADIUM
VBNC

TECHNIQUES FOR THE STUDY OF BACTERIA IN VBNC STATE

STRESZCZENIE

Powszechnie, hodowla mikroorganizmów odbywa się w warunkach laboratoryjnych. W tym celu, aby uzyskać czyste kultury bakterii zwykle zakłada się hodowlę na podłożach mikrobiologicznych. Istnieją jednak mikroorganizmy, które nie wykazują wzrostu na tego typu podłożach. Tak zwane stadium VBNC (ang. viable but nonculturable) oznacza populację żywych komórek bakteryjnych, które nie są zdolne do wzrostu w warunkach laboratoryjnych. Zjawisko to jest przedmiotem wielu badań i budzi liczne kontrowersje, a mechanizmy jego powstawania nadal nie są w pełni wyjaśnione.

Celem niniejszej pracy jest przeanalizowanie zgromadzonych w literaturze naukowej informacji na temat metod identyfikacji drobnoustrojów w fazie VBNC i sposobów postępowania z nimi w warunkach laboratoryjnych.

SŁOWA KLUCZOWE: stadium VBNC, mikroorganizmy, analizy cytometryczne, lumino-metria, metoda mikrokolonii.

ABSTRACT

Most of the known culture methods of microorganisms are carried out in laboratory conditions. For this purpose, in order to obtain pure bacterial cultures, a culture on microbiological media is usually assumed. However, there are microorganisms that do not show growth on these substrates. The so-called VBNC stage (viable but nonculturable) means a population of viable bacterial cells that are incapable of growing under traditional conditions. This phenomenon is the subject of research and raises numerous controversies, and the mechanisms of its formation are still not fully explained.

The aim of this work is to analyze the information gathered in the scientific literature on the methods of identification of microorganisms and methods of dealing with them in laboratory conditions.

KEY WORDS: VBNC state, microorganisms, cytometric analysis, luminometry, micro-colony method.

—STADIUM VBNC BAKTERII—

STADIUM VBNC to zjawisko, odnoszące się do mikroorganizmów wykazujących funkcje życiowe, jednakże nie dających się hodować w klasycznych warunkach laboratoryjnych. Są to bakterie cechujące się obniżoną aktywnością enzymatyczną, które nie rozmnażają się, a pozostają żywe i posiadają zdolność do hodowli dopiero po reaktywacji. Obecnie znanych jest 85 gatunków bakterii istniejących w stadium VBNC, a spośród nich, 67 to gatunki chorobotwórcze. Szesnaście gatunków bakterii patogennych nie może zarażać ludzi, ale mogą infekować inne organizmy, takie jak rośliny, ryby, czy bezkręgowce morskie (PINTO I IN., 2015). Uważa się, że pomimo, iż komórki VBNC nie są wykrywalne konwencjonalnymi technikami hodowli, są one w stanie wytworzyć nową biomasę i związki odżywcze, a ponadto utrzymują oddychanie, aktywny metabolizm, integralność błony komórkowej i transkrypcję genów w celu wytworzenia specyficznego mRNA. Stan VBNC jest jedynie stanem przejściowym. Mikroorganizmy w momencie braku czynników stresowych, wracają do pełnej funkcjonalności i pojawia się wtedy możliwość ich hodowli w tradycyjnych warunkach laboratoryjnych. Jeśli jednak drobnoustroje zbyt długo przebywają w stanie uśpienia, tracą zdolność do reaktywacji i wskutek zmian, które zachodzą w komórce, dochodzi do ich lizy (OLSZEWSKA I ŁANIEWSKA - TROKENHEIM, 2013; PINTO I IN., 2015).

—METODY IDENTYFIKACJI BAKTERII W STADIUM VBNC—

JAK już wspomniano, bakterie należące do grupy VBNC nie wykazują wzrostu w tradycyjnych hodowlach laboratoryjnych. W związku z tym, metody ich identyfikacji, a także ocena funkcji życiowych w momencie wstrzymania

procesu rozmnażania pod wpływem czynników stresowych, różnią się od standardowych metod laboratoryjnych.

W pierwszym etapie należy rozróżnić komórki VBNC od komórek martwych, uwzględniając fakt, że mikroorganizmy te zachowują pewną aktywność związaną z metabolizmem i ekspresją genów. Dlatego też metody ich identyfikacji powinny koncentrować się głównie na badaniu metabolizmu oraz integralności struktury komórkowej (JOUX I LEBARON, 2000). W tym celu stosowane są między innymi takie strategie jak: metoda mikroskopowa, mikrokolonii, pomiar potencjału membranowego, cytometria przepływowa, zróżnicowane techniki molekularne, pomiar pH we wnętrzu komórek, oznaczanie aktywności specyficznych enzymów, metoda DVC (ang. direct viable count) oraz pomiar ATP. Wymienione metody pozwalają na dokładną analizę zarówno budowy bakterii, jak i jej podstawowych funkcji życiowych. Wraz z rozwojem wiedzy dotyczącej mikroorganizmów VBNC oraz wprowadzaniem nowych technologii w praktyce laboratoryjnej, ilość dostępnych rozwiązań do badania tych mikroorganizmów nieustannie się poszerza (FAKRUDDIN I IN., 2013; ZHAO I IN. 2017).

—METODA MIKROSKOPOWA—

METODA mikroskopowa jest jednym z najprostszych sposobów stosowanych w celu obserwacji zarówno żywotności, jak i kształtu komórek bakteryjnych. Podczas badania mikroorganizmów w stadium VBNC można dostrzec wyraźne zmiany w morfologii bakterii. Przykładowo, bakteria *Campylobacter jejuni* występuje w postaci typowej pałeczki, a w stanie VBNC przybiera formę ziarniaka. Zmiany morfologiczne oraz miniaturyzację komórek w stadium VBNC zauważono również u szczepów *Helicobacter pylori* oraz *Escherichia coli*

(DING I IN., 2017; ZHAO I IN., 2017).

Jedną z metod mikroskopowych jest wykorzystanie mikroskopu jasnego pola oraz kwasu naldyksowego (w stężeniu 20-40 mg/l) używanego w celu zatrzymania podziałów komórkowych. Po ekspozycji na kwas naldyksowy, żywe komórki nadal rosną i stają się wydłużone, zaś komórki nieaktywne metabolicznie nie zmieniają swojego początkowego kształtu i rozmiaru. Obserwacje mikroskopowe pokazują, że żywe komórki będą wydłużone, a komórki VBNC owalne i duże (FAKRUDDIN I IN., 2013).

Do wykrywania organizmów VBNC można wykorzystać mikroskop fluorescencyjny. Najczęściej stosowanymi barwnikami fluorescencyjnymi są: pomarańczowa akrydyna, izotiocyjanian fluoresceiny (FITC), 4,6-diamino-2-fenylindol (DAPI) oraz chlorek indophenyl-nitrofenylo-phenyltetrazoliny (INT) (FAKRUDDIN I IN., 2013). Mechanizm działania tych barwników, a także wywoływany efekt przedstawiono w tabeli 1.

W ostatnich latach opracowano nowy sposób barwienia różnicowego. W metodzie tej wykorzystuje się dwa barwniki kwasów nukleinowych: SYTO9 (zielony w świetle flu-

orescencyjnym) oraz jodek propidyny (komórki barwią się na kolor czerwony). Barwnik SYTO9 wybarwia zarówno żywe, jak i martwe bakterie, podczas gdy jodek propidyny przenika tylko do wnętrza bakterii mających uszkodzone błony komórkowe. Stosując oba barwniki jednocześnie, jodek propidyny zmniejsza fluorescencję SYTO9 w komórkach martwych bakterii z uszkodzonymi błonami. Dochodzi wtedy do powstania czerwonych komórek fluorescencyjnych, podczas gdy żywe bakterie fluoryzują na kolor zielony (FAKRUDDIN I IN., 2013).

— METODA MIKROKOLONII —

WYKRYWANIE drobnoustrojów w stadium VBNC z zastosowaniem techniki mikrokolonii jest zbliżone do standardowych metod hodowli. W ostatnich latach zaczęto używać do hodowli mikrokolonii - filtrów membranowych oraz ciekłych pożywek, które pozwoliły pominąć pojawiający się wcześniej problem limitacji składników odżywczych oraz tlenu. Zwiększyło to także szansę na wytworzenie mikrokolonii przez mikroorganizmy

TABELA 1. Barwniki fluorescencyjne stosowane w wykrywaniu bakterii VBNC (FAKRUDDIN I IN., 2013).

	Pomarańczowa akrydyna	FITC	DAPI	INT
Mechanizm działania	Reakcja barwienia uzależniona od stosunku DNA do białka w komórce	Enzym aktywny w żywej komórce	Barwienie różnicowe	Wytworzenie czerwonego barwnika w wyniku reakcji z enzymem dehydrogenazy
Reakcja	Komórki aktywne metabolicznie są zielone i wolno rosną, zaś komórki rozmnażające się są zabarwione na pomarańczowo	Żywe komórki zabarwiają się na kolor fioletowy bądź niebieski	Żywe komórki są zielone	Żywe komórki są czerwone

osłabione i wykazujące słaby wzrost. Dodatkowo, można stosować pożywki rozcieńczone, co pozwala uniknąć przerastania takich kolonii, a wykorzystanie anaerostatów pozwala na wzrost organizmów w warunkach beztlenowych. Formowanie mikrokolonii wizualizuje się poprzez zastosowanie mikroskopii fluorescencyjnej oraz przy pomocy barwienia komórek. Modyfikacje te pozwalają obniżyć poziom wykrywalności z 10⁶ do 10⁴ komórek/ml. Obecnie łączy się metodę mikrokolonii z wykorzystaniem przeciwciał specyficznych dla bakterii z rodzaju *Pseudomonas* czy *Salmonella*, które znakuje się fluorescencyjnie (TAN I IN., 2013).

ANALIZA

POTENCJAŁU BŁONOWEGO

ELEKTROCHEMICZNY potencjał błonowy powstaje podczas oddychania komórkowego oraz w procesie hydrolizy ATP. Gradient ten zaangażowany jest w podstawowe procesy życiowe i metaboliczne komórki, takie jak synteza ATP, regulacja pH czy transport aktywny. Tworzy się on na skutek wybiórczego przepuszczania przez błonę jonów wodoru, sodu, potasu czy też chloru. W celu pomiaru wartości potencjału błonowego wykorzystuje się barwniki fluorescencyjne posiadające na swojej powierzchni różne ładunki. Barwniki kationowe koncentrują się po spolaryzowanej stronie błony, zaś anionowe po depolaryzowanej. Jednym z najczęściej stosowanych barwników, umożliwiających zbadanie wartości potencjału błonowego u bakterii jest kationowa rodamina 123 charakteryzująca się zieloną fluorescencją. Następną grupą barwników definiujących potencjał błonowy, są barwniki anionowe. Gromadzą się one wewnątrz komórki w miejscach z dużą zawartością związków o charakterze lipidowym. Przykładem jest barwnik DiBAC4(3), który stosuje się w diagnostyce potencjału u bakterii z rodzaju *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus li-*

cheniformis czy *E. coli*, ale również u mikroorganizmów termofilnych (BECK I HUBER, 1997; SHENGHUA I IN. 2015).

– CYTOMETRIA PRZEPEŁYWOWA –

CYTOMETRIA przepływowa jest metodą, która pozwala w bardzo krótkim czasie analizować pojedyncze komórki. Wykorzystuje się w tym celu barwniki fluorescencyjne, które umożliwiają kontrolę parametrów mających związek z rozmiarem, budową wewnątrzkomórkową oraz oddziaływaniem międzycząsteczkowym w komórce. Wzbudzenie fluorescencji w komórkach wybarwionych zachodzi w sposób bezpośredni, jak i pośredni. Bezpośrednia forma indukcji jest to proces, który polega na samorzutnym połączeniu struktur komórkowych oraz fluorochromu. Pośrednia metoda wymaga z kolei stosowania dodatkowo przeciwciał, sond lub lektyny związanych z fluorochromem. Zastosowanie barwników fluorescencyjnych pozwala odróżnić komórki żywe od martwych, nie zwracając przy tym uwagi na zdolność do proliferacji. Wykorzystanie cytometrii przepływowej w badaniach naukowych niesie ze sobą szereg korzyści. Metoda ta jest znacznie dokładniejsza niż konwencjonalne metody hodowlane podczas oznaczania mikroorganizmów. Inną korzyścią płynącą z zastosowania cytometrii jest mniejsza pracochłonność, a także ograniczenie zużycia podłoży hodowlanych. Dodatkowo, cytometry posiadają zdolność do wykrywania śladowych ilości drobnoustrojów w próbce (JUŻWA, 2011; VEAL I IN., 2000; OLSZEWSKA I IN., 2016).

— TECHNIKI MOLEKULARNE —

JEDNĄ z metod molekularnych wykorzystywanych w identyfikacji bakterii VBNC jest zastosowanie sond do hybrydyzacji kwasów nukleinowych. Są one znakowane w

sposób chemiczny lub radioaktywny i wykorzystuje się je do wykrywania komplementarnego DNA bądź RNA (JOSEPHSON I IN., 1993). W testach hybrydacyjnych sondy generują stabilną, dwuniciową strukturę z określonym kwasem nukleinowym w wyniku występowania wiązania wodorowego pomiędzy komplementarnymi zasadami.

Metody opierające się na DNA nie pozwalają odróżnić komórek żywych od martwych, dlatego też wyznaczenie poziomu mRNA jest cennym źródłem wiedzy dotyczącym ekspresji genów oraz żywotności komórek w zróżnicowanych warunkach otoczenia (LLEO I IN., 2000).

Metodą pozwalającą rozróżnić komórki żywe od martwych jest RT-PCR (ang. reverse transcriptase PCR) (PATRONE I IN., 2013; TREVORS 2011). Jest to możliwe, ponieważ metoda ta jest oparta na oznaczaniu mRNA, którego okres półtrwania jest krótszy niż 1 minuta. Matrycowy RNA znajduje się tylko w komórkach aktywnych metabolicznie, więc nie znajdziemy go w warunkach naturalnych po śmierci komórki. W oparciu o tę metodę istnieje możliwość badania zależności pomiędzy komórkami oraz wykrywania organizmów VBNC. Nawet jeśli tradycyjne metody hodowli nie wykrywają obecności konkretnej bakterii VBNC w próbce, ich obecność można wykazać stosując niektóre techniki molekularne. Sondy oligonukleotydowe, które zawierają 18-20 nukleotydów wydają się najbardziej przydatne, z uwagi na to, że hybrydują szybko do specyficznych sekwencji DNA docelowych mikroorganizmów i mogą ujawnić ściśle powiązania mikroorganizmów o podobnych możliwościach funkcjonalnych. Aby w pełni zidentyfikować bakterie wykryte w stadium VBNC wykorzystywane są dodatkowe techniki molekularne (HEIM I IN., 2002). Przykładowo, wykrycie komórek VBNC bezpośrednio w próbkach środowiskowych można wykonać poprzez suszenie kolonii blot, dot-blot oraz southern

blot. Zasada "blot" opiera się na zastosowaniu radioaktywnych lub nie znakowanych radioaktywnie czy też fluorescencyjnie sond. Hybrydyzacja fluorescencyjna *in situ* (FISH) wykrywa pojedyncze komórki bakteryjne, co ma miejsce poprzez selektywne kierowanie sond do regionów rRNA, które składają się ze zmiennych i konserwatywnych regionów nukleotydowych. W zależności od zastosowanej sekwencji sondy rRNA możliwe jest wykrycie wszystkich lub wybranych komórek. Metoda FISH ma jednak mniejszą czułość i nie można z jej wykorzystaniem odróżnić komórek żywych od martwych (JOSEPHSON I IN., 1993; OLSZEWSKA I ŁANIEWSKA-TROKENHEIM 2013).

POMIAR pH

WEWNĄTRZ KOMÓREK

BAKTERIE mogą bytować w środowiskach o różnej wartości pH, jednak większość z nich najlepiej toleruje podłoża o charakterze obojętnym lub lekko alkalicznym. Niezależnie od preferencji wartości pH podłoża bakterii, organizmy te utrzymują wewnątrzkomórkowe pH wynoszące w granicach 6,5 - 9,5. Do oznaczania pH wewnątrz komórki wykorzystuje się barwniki zawierające związki fluoresceiny, np. CFDA-SE. Zmiana wartości pH wewnątrz komórki bakterii może determinować jej stan fizjologiczny.

Przykładem są bakterie należące do gatunku *Listeria monocytogenes*, u których stres osmotyczny decyduje o pH wewnątrz komórki (FANG I IN., 2004). HORNBEAK I IN. (2002) w badaniach prowadzonych nad żywotnością i stanem fizjologicznym bakterii *Bacillus licheniformis*, wykorzystywanych w przemyśle spożywczym, wykazali, iż połączenie cytometrii przepływowej, mikroskopii fluorescencyjnej, a także CFDA-SE i barwnika umożliwiającego oznaczenie pH wewnątrz komórki, pozwala na określenie stanu fizjologicznego pojedynczych komórek.

OZNACZANIE AKTYWNOŚCI SPECYFICZNYCH ENZYMÓW

W celu badania aktywności oddechowej komórki bakteryjnej wykorzystuje się sole tetrazolinowe, będące akceptorami elektronów. W efekcie działania dehydrogenaz barwniki tetrazolinowe z bezbarwnych kompleksów ulegają redukcji do jasno świecących związków formazanu. Redukcja tych soli, a także ilość nierozpuszczalnych związków formazanu stanowi wyznacznik aktywności systemu transportowego elektronów u bakterii, zarówno tlenowych, jak i beztlenowych (HATZINGER I IN., 2003; BARTOSCH I IN., 2003).

Redukcja związków formazanu przebiega z wykorzystaniem glukozy lub innych pośrednich transporterów elektronów, takich jak siarczan fenazy. Może on być także aktywowany fosforanem nieorganicznym znajdującym się poza komórką (SMITH I MCFETERS, 1996). Związki formazanu wytwarzają osady pozakomórkowe, które charakteryzują się fosforescencją. Dochodzi do tego, w momencie wydostania się ich z wnętrza komórek bakteryjnych. Z kolei błędny sygnał tłumaczy się jonami kobaltu, które tworzą kompleksy z osadami pozakomórkowymi (THOM I IN., 1993). Najbardziej powszechnym barwnikiem fluorescencyjnym, pozwalającym oznaczyć aktywność dehydrogenazy jest chlorek 5-cyano-2,3 ditolylotetrazolowy (CTC). Związek ten w żywych komórkach bakterii przekształca się w związki świecące na czerwono (CTF). Proces redukcji soli tetrazolowych rozpoczyna inkubacja komórek bakteryjnych trwająca od 20 min, a nawet do kilku godzin. Odbywa się ona w obecności barwników fluorescencyjnych, a także formaldehydu, paraformaldehydu lub formaliny. Następnie z uwagi na zanikający sygnał fluorescencyjny, szybko wykonuje się pomiar przy użyciu cytometru przepływowego lub mikroskopu fluorescencyjnego (LOVEJOY I IN., 1996).

Kolejną metodą jest oznaczanie aktywności esteraz. Mierzy się ją lipofilnymi, nie posiadającymi ładunku i nie wykazującymi fluorescencji substratami. Wewnątrz aktywnych i nieuszkodzonych komórek ulegają one przekształceniu do produktów, które charakteryzuje polarność i fluorescencja. Enzymy te dostarczają informacji o metabolizmie komórki. Występują one we wszystkich żywych komórkach, a komórki martwe oraz te, które posiadają uszkodzone błony po przeprowadzonym barwieniu szybko tracą barwnik pomimo szczątkowej aktywności esteraz. Fluorogeniczne substraty esteraz mają zastosowanie przy ocenie integralności błon, aktywności enzymatycznej, a także żywotności bakterii (HOEF I IN., 2003). Najślabszą fluorescencję spośród substratów wykazuje dioctan fluoresceiny (FDA). Wynika to ze słabej retencji związku we wnętrzu komórki (DIAPER I IN., 1992; DIAPER I EDWARDS, 1994). FDA jest zatrzymywany w komórkach i w obecności esteraz przekształca się we fluoresceinę (ROTMAN I PAPERMASTER, 1966). W porównaniu do FDA, pochodne tego związku są wysoce fluoryzujące. Dioctan fluoresceiny znalazł zastosowanie przy oznaczaniu aktywności esteraz w bakteriach *E. coli* poddanych działaniu antybiotyków. W badaniach dotyczących oznaczania aktywności esteraz wykazano, że największą skutecznością cechuje się dioctan karbosyfluoresceiny (CFDA) (JEPRAS I IN., 1995). Związek ten stosuje się do oznaczania aktywnych bakterii z rodzaju *Klebsiella pneumoniae* (DIAPER I EDWARDS, 1994), ale również przy oznaczaniu bakterii w wodzie oczyszczonej wykorzystywanej w przemyśle farmaceutycznym (KAWAI I IN., 1999). Jednym z ważniejszych ograniczeń stosowania estrów fluorogennych jest problem barwienia czystych kultur, utrudnione wnikiwanie barwnika do wnętrza komórki oraz jego czynne wydalanie (TEBALDI I IN., 2010).

METODA DVC

BEZPOŚREDNIA metoda DVC to metoda pozwalająca na odróżnianie żywych komórek od bakterii VBNC znajdujących się w wodach naturalnych. Bakterie po trwającej kilka godzin inkubacji w wodzie, są następnie przenoszone do pożywki, zawierającej minimalne ilości substancji pokarmowych oraz kwas nalidyksowy (który jest inhibitorem replikacji DNA bakterii Gram-ujemnych) oraz cyprofloksacynę lub enrofloksacynę (które powodują inhibicję replikacji u bakterii Gram-dodatnich). Komórki wykazujące aktywność metaboliczną w takich warunkach ulegają wydłużeniu. Następnie prowadzi się obserwację mikroskopową w celu odróżnienia komórek (CHAE I SCHRAFT, 2001).

POMIAR ATP

ATP (adenozynotrifosforan) to związek, który możemy znaleźć w każdym żywym organizmie, a także w materiałach biologicznych. Jego ilość mierzona jest w femtogramach, a w przeciętnej komórce zawiera go 10-15 fg. Ilość ATP zależy od typu drobnoustroju i jego stanu fizjologicznego. Bakterie Gram-dodatnie mają 10 razy większą ilość ATP w porównaniu do bakterii Gram-ujemnych, z kolei spory bakteryjne pozbawione są zupełnie tego związku (LINDBACK I IN., 2010).

W celu pomiaru ATP zawartego w komórce stosuje się zjawisko bioluminescencji, polegające na utlenianiu lucyferyny w obecności enzymów. Produkt takiego utleniania będzie charakteryzował się podwyższonym stanem energetycznym. Emisja światła zachodzi w wyniku powrotu kompleksu utlenionej lucyferyny na niższy poziom energetyczny. Intensywność światła jest proporcjonalna do ilości ATP zawartego w komórkach mikroorganizmów. Prawidłowy przebieg procesu charakteryzuje temperatura około 25°C, pH 6,5-8, a także obecność jonów magnezowych (SHA-

MA I MALIK, 2013).

Obecnie bioluminescencja wykorzystywana jest w celu badania mikrobiologicznego wody, w oznaczaniu biomasy, wzrostu mikroorganizmów, w badaniach żywności i leków, a także w medycynie przy ocenie efektywności działania leków i antybiotyków na rozwój oraz wzrost drobnoustrojów. Luminometria w porównaniu do innych technik analitycznych wyróżnia się dużą dokładnością oraz czułością pomiarów, małym kosztem aparatury, a co więcej jest mało pracochłonna. O wyższości tej metody nad innymi metodami hodowlanymi świadczy też fakt, że możliwa jest detekcja nie tylko żywych mikroorganizmów, ale również substancji organicznych, które są bardzo dobrą pożywką do ich wzrostu (PARK I IN., 2014).

Technika luminometrii pozwala zbadać zdolności adhezyjne drobnoustrojów do powierzchni abiotycznych. Mikroorganizmy o właściwościach adhezyjnych są odporne na działanie środków o działaniu dezynfekcyjnym, pod których wpływem mogą przechodzić w stan niezdolności hodowlanej VBNC. Oznacza to, że metoda ta pozwala wykrywać bakterie, których nie da się wykrywać klasycznymi metodami laboratoryjnymi (KRĘGIEL 2011).

PODSUMOWANIE

NIEKORZYSTNE warunki środowiskowe, które prowadzą do zahamowania podstawowych procesów życiowych, takich jak rozmnażanie, czy tworzenie kolonii u bakterii VBNC sprawiają, że nie można ich hodować w tradycyjnych warunkach laboratoryjnych z wykorzystaniem podłoża mikrobiologicznych. W związku z tym mówiąc o metodach hodowlanych mamy do czynienia z szeregiem rozwiązań, dzięki którym możemy badać te mikroorganizmy. Aby oznaczyć określoną populację w stadium VBNC należy poszukiwać technik, odwołujących się do struktur komórkowych bądź aktywności metabolicznej. Należą do

nich między innymi: cytometria przepływowa, metoda mikroskopowa, zróżnicowane techniki molekularne, metoda mikrokolonii, pomiar potencjału membranowego, pomiar pH wewnątrz komórek, oznaczanie aktywności specyficznych enzymów, metoda DVC oraz pomiar ATP. Lista możliwych sposobów identyfikacji, hodowli i badań tego typu bakterii stale rośnie wraz ze zgłębianiem tematu i rozwojem wiedzy na jego temat.

LITERATURA

BARTOSCHS., MANSCHR., KNÖTZSCH K., BOCK E. 2003. CTC staining and counting of actively respiring bacteria in natural stone using confocal laser scanning microscopy. *Journal of Microbiological Methods*. 52, 75-84.

CHAE M.S., SCHRAFT H. 2001. Cell viability of *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Microbiology*. 18, 103-112.

DIAPER J. P., EDWARDS C. 1994. The use of fluorogenic esters to detect viable bacteria by flow cytometry. *Journal of Applied Bacteriology*. 77, 221-228.

DIAPER J. P., TITHER K., EDWARDS C. 1992. Rapid assessment of bacterial viability by flow cytometry. *Applied of Microbiology and Biotechnology*. 38, 268-272.

DING T.A., SUO Y.A., XIANG Q.B., ZHAO X.C., CHEN S.A., YE X.A., LIU D. 2017. Significance of viable but nonculturable *Escherichia coli*: Induction, detection, and control. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27, 417-428.

FAKRUDDIN MD., SHAHNEWAJ K., MANNAN B., ANDREWS S. 2013. Viable but Nonculturable Bacteria: Food Safety and

Public Health Perspective. Hindawi Publishing Corporation ISRN Microbiology. ID 703813.

FANG W., SIEGUMFELDT H., BUDDE B. B., JAKOBSEN M. 2004. Osmotic stress leads to decreased intracellular pH of *Listeria monocytogenes* as determined by fluorescence ratio imaging microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 3176-3179.

HATZINGER P. B., PALMER P., SMITH R., PEÑARRIETA C.T., YOSHINARI T. 2003. Applicability of tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity and viability of groundwater bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 52, 47-58.

HEIM S., LLEÒ M. M., BONATO B., GUZMAN C.A., CANEPARI P. 2002. The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. *Journal of Bacteriology*. 184 (23), 6739-6745.

HOEFL D., WARWICK L., GROOBY L., MONIS P.T., ANDREWS S., SAINT C.P. 2003. A comparative study of carboxyfluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester as indicators of bacterial activity. *Journal of Microbiological Methods*. 52, 379-388.

HORNBEAK T., DYNESEN J., JAKOBSEN M. 2002. Use of fluorescence ratio imaging microscopy and flow cytometry for estimation of cell vitality for *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiology Letters*. 215, 261-265.

JEPRAS R.I., CARTER J., PEARSON S.C., PAUL F.E., WILKINSON M.J. 1995. Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 2696-2701.

- JOSEPHSON K.L., GERBA C.P., PEPPER I.L. 1993. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. 59 (10), 3513–3515.
- JOUX F., LEBARON F. 2000. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes Infection*. 2, 1523–1530.
- JUZWA W. 2011. Cytometria przepływowa w nowoczesnej analizie żywności. *Przemysł Spożywczy*. 65, 41–44.
- KAWAI M., YAMAGUCHI N., NASAU M. 1999. Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process. *Journal of Applied Microbiology*. 86, 496–504.
- KOGURE K., SIMIDU U., TAGA N. 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 25, 415–420.
- KRĘGIEL, D. 2011. Zastosowanie luminometrii w badaniach adhezji drobnoustrojów do powierzchni abiotycznych. *LAB Laboratoria, Aparatura, Badania*. 16, 10–14.
- LINDBÄCK T., ROTTENBERG M.E., ROCHE S.M., RØRVIK L.M. 2010. The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolates from salmon, patients and environment. *Veterinary Research*. 41(1), 1–10.
- LLEÒ M. M., PIEROBON S. TAFI M.C., SIGNORETTO C., CANEPARI P. 2000. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (10), 4564–4567.
- LOVEJOY C., LEGENDRE L., KLEIN B. TREMBLAY J.E., INGRAM R.G., THERIAULT J.C. 1996. Bacterial activity during early winter mixing. *Aquatic Microbial Ecology*. 10, 1–13.
- OLSZEWSKA M. KOCOT A., ŁANIEWSKA-TROKENHEIM Ł. 2016. Analiza cytometryczna w mikrobiologicznych badaniach żywności. *Medycyna Weterynaryjna*. 72 (3), 162–167.
- OLSZEWSKA M., ŁANIEWSKA-TROKENHEIM Ł. 2013. Odpowiedź bakterii fermentacji mlekowej na stres – stadium VBNC. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 5 (90), 15 – 28.
- PARK E., LEE C., BISESI M., LEE J. 2014. Efficiency of peracetic acid in inactivating bacteria, viruses, and spores in water determined with ATP bioluminescence, quantitative PCR, and culture-based methods. *Journal of Water and Health*. 12(1), 13–23.
- PATRONE V., CAMPANA R., VALLORANI L., DOMINICI S., FEDERICI S., CASADEI L., GIOACCHINI A.M., STOCCHI V., BAFFONE W. 2013. CadF expression in *Campylobacter jejuni* strains incubated under low-temperature water microcosm conditions which induce the viable but non-culturable (VBNC) state. *Antoni Van Leeuwenhoek*. 103, 979–988.
- PINTO D., SANTOS M.A., CHAMBEL L. 2015. Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms. *Critical Reviews in Microbiology*. 41, 61–76.

- ROTMAN B., PAPERMASTER B.W. 1966. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proceeding of the National Academy of Science USA*. 55, 134-141.
- SHAMA G., MALIK, D.J. 2013. The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays. *International Journal Of Hygiene and Environmental Health*. 216(2), 115-125.
- SHENGHUA Z., CHENGSONG Y., HUIRONG L., LU L., XIN Y. 2015. UV Disinfection Induces a Vbnc State in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Science and Technology*. 49, 1721-1728.
- SMITH J.J., MCFETERS G.A. 1996. Effects of substrates and phosphate on INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride) and CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Bacteriology*. 80, 209-215.
- TAN S.Y., CHEW S.C., TAN S.Y., GIVSKOV M., YANG L. 2013. Emerging frontiers in detection and control of bacterial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology*. 26, 1-6.
- THOM S.M., HOROBIN R.W., SEIDLER E. BARER M.R. 1993. Factors affecting the selection and use of tetrazolium salts as cytochemical indicators of microbial viability and activity. *Journal of Applied Bacteriology*. 74, 433-443.
- TEBALDI N.D., PETERS J., SOUZA R.M., CHITARRA L.G., VAN DER ZOUWEN P., BERGERVOET J., VAN DER WOLF J. 2010. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in bean seeds by flow cytometry, immunostaining and direct viable counting. *Tropical Plant Pathology*. 35(4), 213-222.
- TREVORS J.T. 2011. Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: gene expression in planktonic and biofilm cells. *Journal of Microbiological Methods*. 86, 266.
- VEAL D.A., DEERE D., FERRARI B., PIPER J., ATTFIELD P.V. 2000. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal of Immunological Methods*. 243, 191-210.
- ZHAO X., ZHONG J., WEI C., LIN C.W., DING T. 2017. Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 8, 580.