

MAGDALENA A. OLSZEWSKA, ALEKSANDRA M. KOCOT, IWONA MOTUK,
LUCJA ŁANIEWSKA-TROKENHEIM

**METODA BARWIENIA FLUORESCENCYJNEGO LIVE/DEAD
BACLIGHT™ W BADANIACH STANU FIZJOLOGICZNEGO
LACTOBACILLUS SPP.**

Streszczenie

W niektórych gałęziach przemysłu bakterie *Lactobacillus* spp. mogą być niepożądane i odpowiedzialne za wady produktów, np. w browarnictwie czy winiarstwie. Ich obecność w środowisku przemysłowym jest wynikiem przystosowania się do niekorzystnych warunków, choć nie wszystkie mechanizmy są w pełni poznane. Celem podjętych badań była ocena stanu fizjologicznego komórek *Lactobacillus* spp. poddanych działaniu stresu wywołanego środkami dezynfekcyjnymi. Analizę przeprowadzono za pomocą barwienia fluorescencyjnego LIVE/DEAD BacLight™, które pozwoliło określić żywotność komórek na podstawie ciągłości błon cytoplazmatycznych oraz metodą posiewów płytkowych do oznaczenia liczby bakterii tworzących kolonie. Różnica między żywotnością a hodowalnością bakterii wykazała obecności komórek w stanie niehodowalności VBNC (ang. *viable but nonculturable*). Tego rodzaju obserwacje wskazują na potrzebę szerszego zglebienia fizjologii *Lactobacillus* spp. w odpowiedzi na stropy środowiskowe. Badania z tego zakresu mogą być również istotne dla kontroli mikrobiologicznej środowiska przemysłowego.

Słowa kluczowe: *Lactobacillus* spp., stan fizjologiczny, stan VBNC, barwienie fluorescencyjne, posiewy płytkowe

Wprowadzenie

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* znajdują zastosowanie w przemyśle spożywczym oraz farmaceutycznym ze względu na pożądane właściwości technologiczne i funkcjonalne [5]. Niekiedy mogą być jednak odpowiedzialne za wady produktów np. w browarnictwie czy winiarstwie. Pałeczki fermentacji mlekowej prowadzące fermentację

Dr M. A. Olszewska, mgr A. M. Kocot, mgr I. Motuk, prof. dr hab. Ł. Łaniewska-Trokenheim, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydz. Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn. Kontakt: magdalena.olszewska@uwm.edu.pl

tację piwa mogą prowadzić do jego zmętnienia i występowania obcych posmaków [17]. Lista wyizolowanych i zidentyfikowanych gatunków *Lactobacillus* powodujących wady pochodzenia mikrobiologicznego piwa jest coraz dłuższa i obejmuje: *L. brevis*, *L. brevisimilis*, *L. lindneri*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. corynefermis*, *L. malefermentans*, *L. parabuchneri*, *L. plantarum*, *L. backii*, *L. collinoides*, *L. rossie* [19]. Produkcja kwasu mlekowego i kwasów lotnych przez bakterie fermentacji mlekowej w winie może prowadzić do utraty jego klarowności, zmiany zapachu kojarzącego się z zapachem kiszzonej kapusty, zsiadłego mleka lub tzw. smaku słodko-kwaśnego. [2]. Przyczyną wad wina może być też niekontrolowana fermentacja małowalowa, a w przypadku dużej zawartości glukozy i fruktozy – niepożądane zakwaszenie. Heterofermentatywne szczepy *Lactobacillus* mogą redukować fruktozę do mannitolu, co powoduje nieprzyjemny zapach i smak [17]. Niekorzystną cechą bakterii fermentacji mlekowej może być wytwarzanie toksycznych dla człowieka amin biogenych, np. histaminy. Ryzyko kontaminacji mikrobiologicznej prowadzące do zepsucia produktu związane jest z wieloma aspektami technicznymi i procesowymi produkcji. Najważniejsze zależą od układu linii produkcyjnej i sposobu pasteryzacji [19]. Równie istotna jest skuteczność procesów mycia i dezynfekcji mających na celu usunięcie drobnoustrojów z przestrzeni produkcyjnych, choć nie wolno pomijać coraz częściej zgłaszanego problemu narastania oporności i tolerancji bakterii na stosowane zabiegi dezynfekcyjne [6]. Ważna jest także właściwa kontrola jakości mikrobiologicznej i bezpieczeństwa produktu [1]. W celu zabezpieczenia produktu w procesie wytwórczym należy stosować odpowiednio dobrane procedury, reagować dostatecznie szybko na niepożądane zmiany a także wprowadzać innowacje w zwalczaniu i zapobieganiu kontaminacji.

Celem pracy było oznaczenie oporności *Lactobacillus* spp. na środki dezynfekcyjne na bazie aktywnego chloru oraz czwartorzędowych związków amoniowych, najczęściej stosowane w przemyśle spożywczym oraz ocena stanu fizjologicznego komórek pod wpływem zastosowanych środków.

Materialy i metody badań

Do zrealizowania celu pracy zastosowano klasyczną metodę płytkową i metodę barwienia fluorescencyjnego LIVE/DEAD BacLight™. Badano zatem oporność bakterii *Lactobacillus* spp. na środki dezynfekcyjne oraz określano stan fizjologiczny komórek w obecności środków dezynfekcyjnych, aby opisać stan niehodowalności określaną jako VBNC (ang. *viable but nonculturable*).

Organizacja doświadczenia polegała na oznaczeniu minimalnego stężenia hamującego (MIC – ang. *minimal inhibitory concentration*) środków dezynfekcyjnych Pursept (Merz) i Medicarine (Ecolab) w stosunku do szczepów *Lactobacillus* spp.: *L. plantarum* 1a, *L. plantarum* 4a, *L. plantarum* 6a, *L. plantarum* 7a, *L. plantarum* 8a, *L.*

plantarum 1c, *L. plantarum* 6b, *L. curvatus* 17b, *L. curvatus* 23b. Medicarine to środek, który zawiera aktywny chlor (dichloroizocyjanuran sodu, NaDCC), natomiast Pursept jest preparatem na bazie czwartorzędowych związków amoniowych, który zawiera przede wszystkim chlorek didecyldimetyloamoniowy (DDAC). Sporządzano szereg rozcieńczeń środków dezynfekcyjnych w zakresie $2,0 \div 0,06$ % poprzez dodanie do probówek odpowiednich ilości pożywki MRS (Merck) oraz danego środka. Do każdej tak przygotowanej próbki dodawano po 100 μ l hodowli badanego szczepu. Następnie prowadzono inkubację w temp. 30 °C przez 24 h. Po tym czasie sprawdzano, w których próbkach hodowle rozwinęły się (wizualna obserwacja zmętnienia). Najniższe stężenie środka, przy którym bakterie nie rozwijały się (brak zmętnienia) wyznaczało minimalne stężenia hamujące – MIC. Jako odnośnik prowadzono równocześnie hodowle kontrolne, bez dodatku środków dezynfekcyjnych. Następnie badano przeżywalność i zamieranie populacji *Lactobacillus* spp. podczas 6-dniowych hodowli bez dodatku Medicarine oraz Pursept i z ich udziałem w stężeniach MIC. Wykonywano analizy ilościowe z użyciem metody fluorescencyjnego barwienia LIVE/DEAD[®] oraz posiewów płytkowych. Hodowle zaszczepiano *Lactobacillus* spp. w ilości około 7 jednostek logarytmicznych.

Odpowiednie rozcieńczenie każdej hodowli barwiono zestawem LIVE/DEAD[®] (BacLight[™] Bacterial Viability Kit, Molecular Probes). Jest to zestaw dwóch barwników – SYTO[®]9 oraz jodku propidyny – PI (ang. *propidium iodide*). SYTO[®]9 o małej masie cząsteczkowej przenika do wnętrza komórki przez spójne błony cytoplazmatyczne, a PI o dużej masie cząsteczkowej przenika tylko do tych z uszkodzeniami w błonach. Zastosowanie zestawu LIVE/DEAD[®] umożliwia zatem zróżnicowanie populacji bakterii na komórki żywe i komórki martwe pod względem różnic w ciągłości błon cytoplazmatycznych [13]. Próbkę barwiono zgodnie ze wskazaniem producenta i inkubowano przez 30 min w temp. 37 °C bez dostępu światła. Następnie próbki filtrowano przy użyciu czarnych filtrów poliwęglanowych o parametrach: 0,2 μ m, \varnothing 13 mm i aparat filtracyjny (Millipore). Przy sporządzaniu preparatów mikroskopowych stosowano olejek niefluoryzujący BackLight[™] Mounting Oil (Molecular Probes). Do czasu analizy mikroskopowej preparaty przechowywano w stanie zamrożenia (temp. -20 °C). Mikroskop epifluorescencyjny (Olympus BX51) zaopatrzony we właściwe zestawy filtrów (U-MNB2: 470 \div 490 nm; U-MNG2: 530 \div 550 nm) oraz kamerę Digital Colour XC10 (Olympus) używano do analizy preparatów mikroskopowych. Do analizy obrazu stosowano program cellSens Dimension wersja 1.5 (Olympus). Komórki zliczano z 20 obrazów mikroskopowych każdej badanej próbki, wyliczano log komórek na mililitr (log kom./ml) i uśrednione wyniki przedstawiano na wykresach. W celu oznaczenia liczby bakterii metodą płytkową wykonywano posiewy powierzchniowe z odpowiedniego rozcieńczenia na podłoże MRS-agar (Merck), w dwóch powtórzeniach z każdej badanej próbki. Inkubację prowadzono w temp.

30 °C przez 72 h w warunkach beztlenowych (Anaerocult®C, Merck). Określano log jtk/ml i uśrednione wyniki przedstawiano w postaci wykresów.

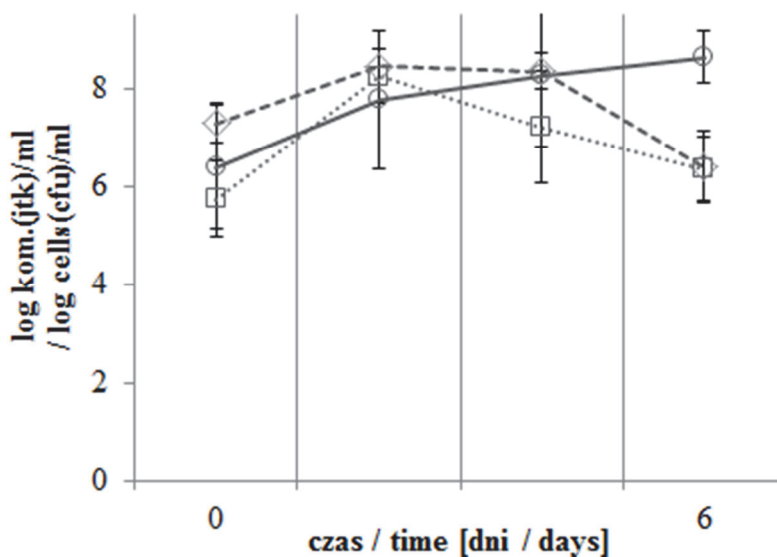
W celu ustalenia czy wielkość populacji *Lactobacillus* spp. zmieniła się statystycznie istotnie w czasie hodowli bez środków dezynfekcyjnych i z ich dodatkiem zastosowano analizę wariancji Anova z powtarzaniem pomiarów lub analizę wariancji Anova dla rang Friedmana. W celu rozstrzygnięcia, czy wyniki liczby komórek *Lactobacillus* spp. otrzymane dwiema metodami (LIVE® oraz metoda płytkowa) różnią się statystycznie istotnie od siebie zastosowano test U Mann-Whitneya. Weryfikację statystyczną prowadzono na poziomie istotności $p = 0,05$. Obliczenia statystyczne wykonywano w programie Statistica, wersja 10 (StatSoft).

Wyniki i dyskusja

W zależności od zastosowanego preparatu dezynfekcyjnego (i szczepu, na który oddziałuje) można obserwować odmienny ich wpływ na hodowlę bakteryjną, dlatego też wartości MIC obu preparatów wynosiły $0,06 \div 0,25$ %. Metoda MIC posłużyła oznaczeniu oporności szczepów *Lactobacillus* na środki dezynfekcyjne, jednak nie dostarczyła wiedzy o zmianach stanu fizjologicznego komórek bakteryjnych, zachodzących pod wpływem tych środków. Na podstawie badań opisanych w literaturze, w których zastosowano metodę MIC, wykazano, że np. spośród 320 szczepów bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych ze środowiska przemysłu spożywczego 1,5 % było opornych, a 17,5 % wykazało tolerancję na środek na bazie czwartorzędowych związków amoniowych – chlorek benzalkoniowy (BC). Dowiedziono, że nie kryje się za tym obecność genów *qac* (ang. *quaternary ammonium compounds*) [6, 16]. W innych badaniach, w których sprawdzano MIC dwutlenku chloru w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, wykazano, że wartości MIC w przypadku *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus fermentum* były wyższe niż *Bacillus subtilis* czy *Leuconostoc mesenteroides* (odpowiednio [ppm]: 125, 75, 10, 50) [7]. Aby dokładniej poznać odpowiedź i stan fizjologiczny komórek *Lactobacillus* spp. na środki dezynfekcyjne w badaniach własnych przeprowadzono analizę z barwieniem SYTO®9/PI i posiewami na podłoże stałe hodowli *Lactobacillus* spp. z dodatkiem środków o wartości MIC i porównano z hodowlą kontrolną.

Wykres liczby bakterii *Lactobacillus* spp. w hodowli kontrolnej bez dodatku środków dezynfekcyjnych przedstawiono na rys. 1. Przyrost populacji *Lactobacillus* spp., który nastąpił w pierwszych dniach hodowli, oznaczono zarówno metodą fluorescencyjnego barwienia – LIVE®, jak i metodą płytkową; maksymalna liczba wyniosła około 8 log komórek/ml [log jtk/ml]. W tym samym czasie obserwowano wzrost liczby komórek martwych – DEAD®, ich liczba zwiększała się istotnie ($p = 0,001$) do ostatniego dnia hodowli. Obumieranie populacji *Lactobacillus* spp. zaobserwowano metodą fluorescencyjnego barwienia – LIVE® i metodą płytkową. Liczba komórek w ostatnim

dniu hodowli obniżyła się istotnie ($p < 0,001$) do poziomu około 6 jednostek logarytmicznych. Liczby komórek żywych – LIVE[®] i komórek hodowalnych – oznaczonych metodą płytkową w ostatnim dniu hodowli nie różniły się statystycznie istotnie ($p = 0,880$). Przeciwniej obserwacji dokonano podczas porównania liczby komórek w hodowlach z dodatkiem środków dezynfekcyjnych.

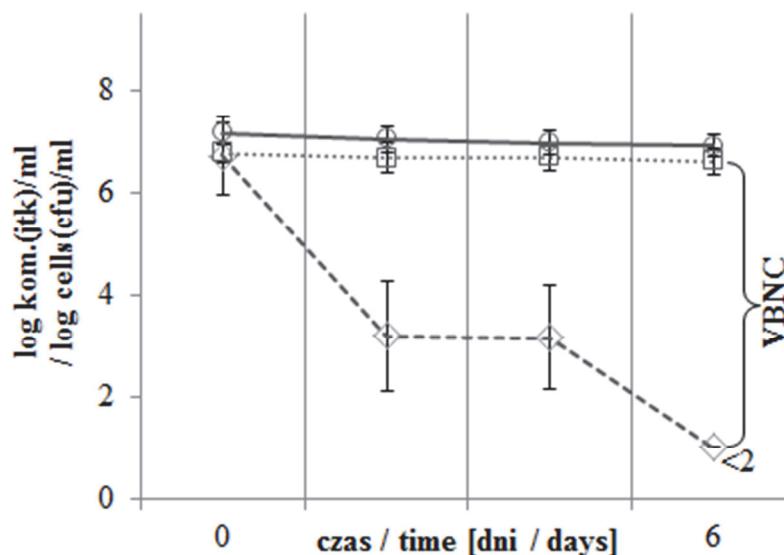


Rys. 1. Liczba *Lactobacillus* spp. podczas 6-dniowej hodowli bez dodatku dezynfektantów oznaczona dwiema metodami analizy ilościowej (barwienie: \square LIVE[®], \circ DEAD[®]; płytkowa: \square LIVE[®], \circ DEAD[®])

Fig. 1. *Lactobacillus* spp. counts estimated while growing bacteria for 6 days without disinfectants added and using 2 methods of quantitative analysis (staining: \square LIVE[®], \circ DEAD[®]; plating: \square LIVE[®], \circ DEAD[®])

Liczby komórek *Lactobacillus* spp. w hodowli z dodatkiem preparatu Medicarine oznaczone dwiema metodami – LIVE[®] i płytkową początkowo były zbliżone (rys. 2). Kolejne dni hodowli pozwoliły zaobserwować różnice pod względem liczby komórek *Lactobacillus* spp. oznaczone metodą fluorescencyjnego barwienia – LIVE[®] i metodą płytkową. Liczba komórek hodowalnych w metodzie płytkowej obniżyła się wprawdzie do poziomu około 3 log jtk/ml i w końcu < 2 log jtk/ml. Zmiana ta była statystycznie istotna ($p = 0,009$). W tym samym okresie liczba komórek żywych – LIVE[®] była stała i nie zmieniła się istotnie ($p = 0,056$). Różnica między metodami LIVE[®] i płytkową pod względem liczby *Lactobacillus* spp. w badanym okresie była znacząca (około 6 logarytmów) i istotna ($p < 0,001$). Na podstawie przedstawionych różnic stwierdzono,

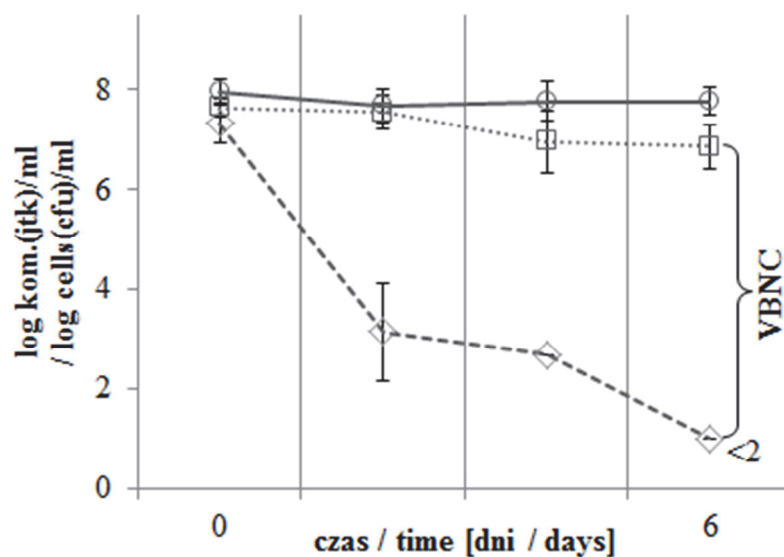
że komórki zachowały swoją żywotność, ale przeszły do stanu niehodowalnego, VBNC, gdyż nie wykazały wzrostu na podłożach.



Rys. 2. Liczba *Lactobacillus* spp. podczas 6-dniowej hodowli z dodatkiem środka Medicaraine oznaczona dwiema metodami analizy ilościowej (barwienie: \square LIVE®, \circ DEAD®, płytka: \diamond)

Fig. 2. *Lactobacillus* spp. counts estimated while growing bacteria for 6 days with Medicaraine agent added and using 2 methods of quantitative analysis (staining: \square LIVE®, \circ DEAD®, plating: \diamond)

Wykres przeżywalności i zamierania populacji *Lactobacillus* spp. w środowisku ze środkiem Pursept przedstawiono na rys. 3. Podobnie jak w hodowlach z preparatem Medicaraine liczby *Lactobacillus* spp. oznaczone dwiema metodami – LIVE® i płytkową były początkowo zbliżone. Różnice pod względem liczby *Lactobacillus* spp. zaobserwowano od pierwszego dnia hodowli, w którym liczby komórek oznaczone metodą LIVE® i płytkową różniły się ($p < 0,001$) o ok. 4 jednostki logarytmiczne i więcej w kolejnych dniach. Ostatecznie populacja *Lactobacillus* spp. nie wykazała wzrostu na podłożach. Liczba komórek żywych – LIVE® pozostała przez dłuższy czas stała, a pod koniec hodowli zmniejszyła się ($p < 0,001$) o 0,8 cyklu logarytmicznego. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że komórki zachowały swoją żywotność, na co wskazują wyniki liczby komórek żywych – LIVE®, a które sugerują stan VBNC komórek.



Rys. 3. Liczba *Lactobacillus* spp. podczas 6-dniowej hodowli z dodatkiem środka Pursept oznaczona dwiema metodami analizy ilościowej (barwienie: $\cdots\square\cdots$ LIVE[®], $\text{---}\circ\text{---}$ DEAD[®]; płytka: $\text{---}\diamond\text{---}$).

Fig. 3. *Lactobacillus* spp. counts estimated while growing bacteria for 6 days with Pursept agent added and using 2 methods of quantitative analysis (staining: $\cdots\square\cdots$ LIVE[®], $\text{---}\circ\text{---}$ DEAD[®]; plating: $\text{---}\diamond\text{---}$).

Zastosowane w badaniach metody analizy ilościowej pozwoliły zaobserwować różnice fizjologii populacji *Lactobacillus* spp. w hodowlach ze środkami dezynfekcyjnymi. Uzyskane wyniki dowodzą, że komórki *Lactobacillus* spp. mogą przystosowywać się do niekorzystnych warunków. Stan zmian fizjologicznych został opisany wśród bakterii nieprzetrwalnikujących jako VBNC, czyli stan żywotności przy zaniechaniu hodowalności, bez wzrostu na podłożu mikrobiologicznym [3, 11, 14]. W tych badaniach żywotność odniesiono do spójności błon cytoplazmatycznych komórek *Lactobacillus* spp., która była wcześniej oceniana np. w produktach mleczarskich podczas przechowywania [14, 18], ale nie po ekspozycji na środki dezynfekcyjne. Zachowanie spójności błony cytoplazmatycznej przesądza o utrzymaniu potencjału błony – w kontekście funkcjonalności niezwykle istotne np. w syntezie ATP czy transporcie. Jednak intensywność prowadzonych procesów oraz białka biorące w nich udział mogą podlegać zmianom. Odkryto, że bakterie w stanie VBNC mają znacznie obniżony poziom aktywności metabolicznej, produkowane są inne niż zwykle białka, a istniejące podlegają modyfikacjom składu [11, 15]. Tego rodzaju doniesienia stwarzają potrzebę rozszerzenia zakresu wiedzy odnośnie do fizjologii bakterii oraz zastosowania alternatywnych technik badawczych. Metody cytologiczne tj. zastosowana metoda barwienia

fluorescencyjnego okazują się pomocne w takich badaniach. Odpowiednio dobrane barwniki fluorescencyjne mogą dostarczyć informacji na temat zmian w spójności i potencjale błon cytoplazmatycznych, wewnątrzkomórkowej aktywności enzymatycznej, aktywności biosyntetycznej, uszkodzeniu genomu komórki [8, 9, 10, 13, 18]. Poznanie zakresu tych zmian w komórkach pozwoli zrozumieć ich zachowanie w środowisku przemysłowym, szerzej przeanalizować procesy mycia i dezynfekcji oraz kontrolę samego produktu. Wpływ komórek VBNC na jakość żywności, ocena ryzyka zepsucia produktu w efekcie kontaminacji komórkami VBNC, określenie ich krytycznego poziomu zanieczyszczenia czy możliwości powrotu do stanu pełnej aktywności w trakcie procesu wytwórczego to zagadnienia wymagające wyjaśnienia. Ponadto zastosowanie cytologicznej analizy ilościowej może wspomóc laboratoria przemysłowe w kontroli mikrobiologicznej produktów. Dotyczy to zwłaszcza piwa czy wina, których łatwość przefiltrowania usprawnia procedurę badawczą. Szybka analiza umożliwi wczesne wykrycie zanieczyszczenia mikrobiologicznego. Aspekt ten jest bardzo ważny w kontekście wykrywania *Lactobacillus* spp., gdyż potwierdzenie obecności *Lactobacillus* spp. z użyciem klasycznych metod hodowlanych trwa co najmniej kilka dni. W odniesieniu do rentowności linii produkcyjnych, których często nie można poddać kwarantannie, wczesne wykrycie kontaminacji jest utrudnione. W niektórych przypadkach jest to wręcz niemożliwe – jeśli kontaminacja jest spowodowana komórkami niedającymi wzrostu na podłożach mikrobiologicznych. Fluorescencyjne metody barwienia mogą być alternatywą, a dodatkowe zastosowanie sond oligonukleotydowych, specyficznych dla gatunków *Lactobacillus* (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* – FISH), może usprawnić identyfikację pałeczek [1, 4, 12].

Wnioski

1. Porównanie wyników otrzymanych z zastosowaniem dwóch metod analizy pozwoliło uzyskać obraz stanu fizjologicznego komórek *Lactobacillus* spp. w hodowlach ze środkami dezynfekcyjnymi. Wynika z nich, że duża część populacji komórek *Lactobacillus* spp. zachowuje żywotność po działaniu środków dezynfekcyjnych, ale przechodzi do stanu VBNC, czyli niehodowlanego, ale ich błony cytoplazmatyczne pozostają spójne.
2. Metoda barwienia fluorescencyjnego LIVE/DEAD BacLight™ umożliwia oszacowanie udziału komórek żywych i martwych w hodowlach *Lactobacillus* spp.

Praca została zaprezentowana na IV Symposium Naukowym nt. „Probiotyki w żywności”, Kiry k. Zakopanego, 24 - 25.04.2013 r.

Literatura

- [1] 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.
- [2] Bonin S.: Zakażenia mikrobiologiczne podczas produkcji wina. *Agro Przemysł*, 2005, **1**, 26-28.
- [3] Dahm H., Strzelczyk E.: Żyjące, lecz nie dające się hodować bakterie. *Post. Mikrobiol.*, 2004, **43 (3)**, 251-265.
- [4] Garia-Hernández J., Moreno Y., Amorocho C.M., Hernández M.: A combination of direct viable count and fluorescence *in situ* hybridization for specific enumeration of viable *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Lett. Appl. Microb.*, 2011, **54**, 247-254.
- [5] Jach M., Łoś R., Maj M., Malm A.: Probiotyki – aspekty funkcjonalne i technologiczne. *Post. Mikrobiol.*, 2013, **52 (2)**, 161-170.
- [6] Langsrud S., Sidhu M.S., Heir E., Holck A.L.: Bacterial disinfectant resistance – a challenge for the food industry. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2003, **51**, 282-290.
- [7] Meneghin S.P., Reis F.C., De Almeida P.G., Ceccato-Antonini S.R.: Chlorine dioxide against bacteria and yeasts from the alcoholic fermentation. *Braz. J. Microbiol.*, 2008, **39**, 337-343.
- [8] Meyer P., Dworkin J.: Applications of fluorescence microscopy to single bacterial cells. *Res. Microbiol.*, 2007, **158**, 187-194.
- [9] Mikš M., Warmińska-Radyko I.: Wybrane techniki fluorescencyjne w badaniach stanu fizjologicznego i przeżywalności komórek bakteryjnych w żywności. *Med. Weter.*, 2008, **64**, 623-628.
- [10] 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.
- [11] Oliver J.D.: The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.*, 2005, **43**, 93-100.
- [12] Olszewska M.: Metody biologii molekularnej w mikrobiologii żywności. *Przem. Spoż.*, 2013, **67 (2)**, 10-14.
- [13] Olszewska M., Łaniewska-Trokenheim Ł.: Badania stanu „niehodowalności” komórek bakterii fermentacji mlekowej w niesprzyjających warunkach rozwoju. *Med. Weter.*, 2011, **67 (2)**, 105-109.
- [14] Olszewska M., Łaniewska-Trokenheim Ł.: Odpowiedź bakterii fermentacji mlekowej na stres – stadium VBNC. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2013, **5 (90)**, 15-28.
- [15] Paszyńska-Wesołowska I., Bartoszcze M.: Bakterie w stadium VBNC – zagrożenie dla zdrowia człowieka. *Med. Weter.*, 2009, **65 (4)**, 228-231.
- [16] Sidhu, M., Langsrud, S., Holck, A.: Disinfectant and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from food industry. *Microbial Drug Resistance*, 2001, **7**, 73-83.
- [17] Varnam A.: *Lactobacillus*: occurrence and significance in non-dairy foods. *Microbiology Today*, 2002, **29**, 13-17.
- [18] 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.
- [19] Żyrek E.: Zagrożenia mikrobiologiczne przy „aseptycznym” rozlewie piwa. *Agro Przemysł*, 2008, **6**, 23-28.

FLUORESCENT STAINING METHOD WITH USE OF LIVE/DEAD BACLIGHT™ KIT IN STUDIES ON PHYSIOLOGICAL STATE OF *LACTOBACILLUS* SPP**S u m m a r y**

In some industries, *Lactobacillus* spp. may be undesirable and responsible for defects in food products as, e.g., in the brewing or wine-making industries. Their occurrence in the food processing environment results from their adaptation to adverse conditions; however, not all of the mechanisms have been fully identified. The objective of the research study was to evaluate the physiological state of *Lactobacillus* spp. cells exposed to disinfectants-induced stress. The analysis was performed using a fluorescent staining method with a LIVE/DEAD BacLight™ kit so as to make it possible to determine the viability of cells based on the integrity of cytoplasmic membrane, as well as a culture plating method to estimate the count of colony-forming bacteria. The difference between the viable and culturable cell counts proved the occurrence of VBNC (viable but non-culturable) cells. These observations indicate that there is a need to better explore the physiology of *Lactobacillus* spp. cells responding to environmental stresses. The studies in this domain may also be significant for microbiological control of the food processing environment.

Key words: *Lactobacillus* spp., physiological state, VBNC state, fluorescent staining, culture plating ☒