

MAGDALENA A. OLSZEWSKA, ALEKSANDRA KOCOT, MONIKA GRYN,  
LUCJA ŁANIEWSKA-TROKENHEIM

## ODPOWIEDŹ KOMÓREK *LACTOBACILLUS BREVIS* NA STRES OSMOTYCZNY ZBADANA METODĄ CYTOMETRII PRZEPLYWOWEJ

### Streszczenie

Pałeczki fermentacji mlekowej mogą wytrzymywać efekty stresu osmotycznego w naturalnym środowisku bytowania, jak również w procesie produkcji żywności. Złożoność zmian zachodzących w komórkach w wyniku działania tego stresu stwarza potrzebę poszerzenia wiedzy dotyczącej jego wpływu na stan fizjologiczny pałeczek *Lactobacillus*. Celem pracy było określenie wpływu chlorku sodu w zakresie 0,5 ÷ 2,5 % na fizjologię komórek szczepu *Lactobacillus brevis*, które wyizolowano z żywności. Zastosowano cytometrię wielobarwną i dobrano barwienie CFDA/PI (diocyan karboksylfluoresceiny/jodek propidyny) do oznaczenia aktywności esterolitycznej i spójności błon cytoplazmatycznych komórek. Na podstawie analizy cytometrycznej wyodrębniono cztery grupy komórek o określonych parametrach: 1 – CFDA<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>, 2 – CFDA<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>, 3 – CFDA<sup>-</sup>PI<sup>+</sup>, 4 – CFDA<sup>-</sup>PI<sup>-</sup>, których udział zależał od dodatku chlorku sodu w badanych próbkach. Zaobserwowano zwiększony udział komórek w grupie 1. i zmniejszony – w grupie 4. w badanych próbkach, świadczące o wzroście udziału komórek z uszkodzeniami w błonach cytoplazmatycznych i obniżeniu udziału komórek aktywnych. Na podstawie wyników metody płytkowej dowiedziono, że część populacji *Lb. brevis* straciła tzw. hodowalność w środowisku o największym stężeniu chlorku sodu – 2,5 %. Stwierdzono, że szczep *Lb. brevis* wykazał znaczną tolerancję na działanie chlorku sodu w badanym zakresie i wiedza z tego zakresu może być przydatna w badaniach skринingowych nad przydatnością pałeczek *Lactobacillus* w przemyśle.

**Słowa kluczowe:** *Lactobacillus brevis*, stres osmotyczny, cytometria przepływowa, tolerancja na działanie NaCl

### Wprowadzenie

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* zastosowane w przemysłowych procesach produkcyjnych napotykają na stresy środowiskowe, które mogą występować samodzielnie

---

*Dr M. A. Olszewska, mgr A. Kocot, mgr M. Gryn, 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*

lub w sprzężeniu z innymi czynnikami stresotwórczymi. Pałeczki fermentacji mlekowej uruchamiają różne mechanizmy odpowiedzi na stresse środowiskowe. Ich zdolność do znoszenia efektów stresu środowiskowego jest zróżnicowana, warunkuje przeżywalność, aktywność metaboliczną i przydatność technologiczną tych bakterii. Wiedza z tego zakresu może być zatem przydatna w pracach skринingowych nad użytecznością *Lactobacillus* spp. w przemyśle.

Jednym z czynników stresowych, który występuje w przemysłowych procesach produkcyjnych, a jednocześnie warunkuje prawidłowe funkcjonowanie pałeczek, jest ciśnienie osmotyczne środowiska [15]. Środowisko hiperosmotyczne powoduje wyciek wody na zewnątrz komórki bakteryjnej, doprowadzając do utraty turgoru [6]. Jednym z mechanizmów ochrony pałeczek przed negatywnym efektem stresu osmotycznego jest stałe utrzymywanie stosunkowo wysokiego stężenia jonów potasu [15]. Dowiedziono, że *Lactobacillus acidophilus* wykazuje przeżywalność na poziomie 46 % po 2-godzinnej inkubacji w środowisku o stężeniu 18 % NaCl [9]. *Lactobacillus alimentarius* wykazał większą przeżywalność, ale w subletalnych stężeniach soli (2 % NaCl przez 1 h) i jednocześnie zwiększoną tolerancję na sole żółci, kwas cytrynowy i kwas glukonowy, po wcześniejszej inkubacji w środowisku hiperosmotycznym [10]. Ocenia się, że szkodliwość skutków szoku osmotycznego wywołanego obecnością soli jest większa niż w obecności sacharydów. Wynika to z tego, że pałeczki mają zdolność regulowania wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego stężenia sacharydów, tj. laktozy i sacharozy, poprzez aktywne pobieranie sacharydów ze środowiska [6]. W środowisku z dodatkiem soli zaobserwowano natomiast, że może dochodzić do zjawiska poboru substancji osmoaktywnych, tj. glicyny, betainy i karnityny przez ułatwioną dyfuzję (tzw. system QacT). Taki mechanizm wykryto u *Lactobacillus plantarum*, ochronny efekt substancji osmoaktywnych powodował zwiększenie przeżywalności w wyższych stężeniach soli [7]. Po przeniesieniu szczepu do środowiska hipoosmotycznego dochodziło z kolei do szybkiego wypływu glicyny i betainy z komórek przez machanozależne kanały białkowe – system nie w pełni jeszcze poznany [8]. Badania odpowiedzi pałeczek fermentacji mlekowej na stres osmotyczny choć obszerne, wciąż są niewystarczające, wiele aspektów wymaga jeszcze poznania. Złożoność zmian zachodzących na poziomie komórkowym pod wpływem stresu osmotycznego stwarza potrzebę rozszerzenia wiedzy z tego zakresu. Kluczowy w takich badaniach jest dobór odpowiedniego narzędzia analitycznego. W badaniach odpowiedzi komórek na stres osmotyczny przydatna może być cytometria przepływowa. Metoda łączy w sobie czułość technologii fluorescencyjnej z analizą pojedynczych komórek. Przy zastosowaniu cytometrii wielobarwnej komórki pobierają różne barwniki fluorescencyjne, dzięki czemu można je odróżnić od siebie na podstawie barwy, wynikającej z emitowania widma o różnej długości fali. Rezultatem jest wykres kropkowy zabarwionych komórek, z których każda związana jest z inną barwą fluorochromu. Na podstawie ilości emitowanego

światła każdej barwy można zidentyfikować komórki różniące się aktywnością fizjologiczną [12].

Celem pracy było określenie wpływu chlorku sodu w zakresie 0,5 ÷ 2,5 % na aktywność fizjologiczną komórek szczepu *Lactobacillus brevis*, który wyizolowano z żywności.

### Material i metody badań

Zastosowano metodę barwienia fluorescencyjnego CFDA/PI (dioctan karboksyfluoresceiny-jodek propidyny) wraz z cytometrią przepływową oraz mikroskopią epifluorescencyjną. Barwienie CFDA/PI dobrano w celu oznaczenia aktywności esterolitycznej komórek oraz występowania uszkodzeń w ich błonach cytoplazmatycznych. Badania wpływu stresu osmotycznego rozszerzono o określenie zdolności *Lactobacillus brevis* do wzrostu na podłożach hodowlanych pod wpływem stresu z zastosowaniem posiewów płytkowych. Badania aktywności fizjologicznej uzupełniono o analizę subpopulacji komórek po dostarczeniu komórkom glukozy i wcześniejszym działaniu czynnika stresowego, w celu porównania efektów tego zabiegu z oddziaływaniem samego stresu osmotycznego.

W badaniach użyto szczepu *Lactobacillus brevis*, który wyizolowano z kiszonej kapusty. Po ocenie cech morfologiczno-fizjologicznych szczepu, jego przynależność gatunkową do *Lb. brevis* potwierdzono fluorescencyjną hybrydyzacją *in situ* (FISH) z użyciem wyszukanych w bazie danych probeBase sond oligonukleotydowych 16S RNA: sondy dla *Eubacteria* Eub338 GCT GCC TCC CGT AGG AGT, sondy nonsensownej Non338 ACT CCT ACG GGA GGC AGC, sondy dla rodzaju *Lactobacillus* Lab158 GGT ATT AGC AYC TGT TTC CA oraz sondy dla gatunku *Lactobacillus brevis* Lbrev CAT TCA ACG GAA GCT CGT TC.

Hodowlę szczepu *Lb. brevis* w pożywce MRS (Merck) przenoszono do probówek typu eppendorf, odwirowywano (3 min, 13 000 × g, MPW 65 R) i zawieszano w pożywce MRS z dodatkiem NaCl (POCH) o określonym stężeniu [%]: 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 tak, aby uzyskać wielkość populacji rzędu  $\sim 10^8$  komórek w badanych próbkach. Próbę kontrolną stanowiła taka sama objętość hodowli zawieszona w pożywce MRS bez dodatku chlorku sodu. Wszystkie próbki inkubowano w temp. 30 °C przez 30 min, a następnie odwirowywano (3 min, 13 000 × g) i zawieszano w buforze PBS (0,1 M, pH 7,8). Do oznaczeń fluorescencyjnych próbki barwiono najpierw 50 μM CFDA (dioctan karboksyfluoresceiny, Biochemika Fluka), inkubowano w temp. 37 °C przez 30 min w ciemności, następnie 30 μM PI (jodek propidyny, Biochemika Fluka) przez 10 min w łaźni lodowej, również w ciemności [17]. Przygotowane w ten sposób próbki poddawano analizie cytometrycznej z użyciem cytometru przepływowego MoFlo™ (XDP – Beckman Coulter), wyposażonego w laser argonowy 488 nm oraz w odpowiednie detektory fluorescencji: zielony (FL1) i czerwony (FL4). Przetworzenie sygna-

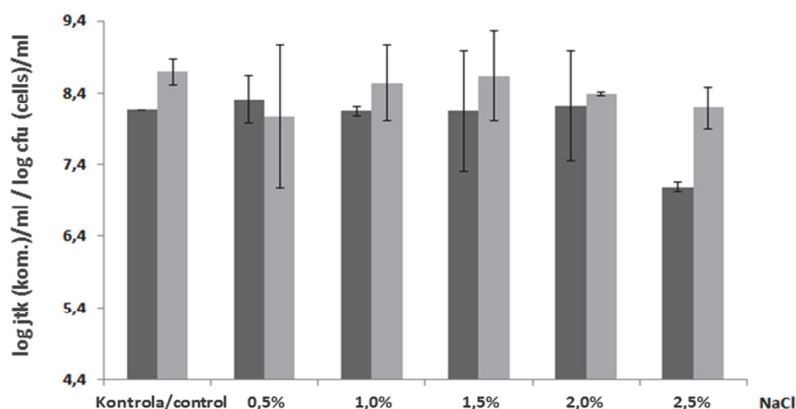
łu fluorescencyjnego na sygnał elektroniczny i obróbka z użyciem oprogramowania Summit Software 5.2 umożliwiło ilustrację wyników w postaci wykresów kropkowych. Pola ograniczone ramką na wykresach kropkowych pozwoliły na podział populacji komórek na subpopulacje i oszacowanie ich udziału procentowego. Ten sam materiał posłużył do przygotowania preparatów do oznaczeń mikroskopowych. W tym celu próbki filtrowano, używając czarnych filtrów poliwęglanowych typu: 0,2  $\mu\text{m}$ ,  $\varnothing$  13 mm i aparatu filtracyjnego (Millipore). Do przygotowania preparatów mikroskopowych stosowano olejek niefluoryzujący BackLight™ Mounting Oil (Molecular Probes). Analizę preparatów mikroskopowych wykonywano w mikroskopie epifluorescencyjnym (Olympus BX51) zaopatrzonym we właściwe zestawy filtrów (U-MNB2: 470  $\div$  490 nm; U-MNG2: 530  $\div$  550 nm) i kamerę Digital Colour XC10 (Olympus). Uzyskane obrazy analizowano w programie cellSens Dimension wersja 1.5 (Olympus). Komórki zliczano z 10 obrazów mikroskopowych każdej badanej próbki i wyliczano logarytm komórek na mililitr (log kom./ml). Ponadto wykonywano posiewy powierzchniowe z odpowiednich rozcieńczeń próbek na podłoże MRS-agar (Merck). Inkubację prowadzono w temp. 30 °C przez 48 h, w warunkach beztlenowych (Anaerocult® C, Merck). Liczono kolonie i określano logarytm jednostek tworzących kolonie na mililitr (log jtk/ml). Te same próbki, po działaniu chlorku sodu w zakresie 0,5  $\div$  2,5 %, poddawano następnie inkubacji z glukozą w stężeniu 20 mM w temp. 30 °C przez 30 min i poddawano powtórnej analizie cytometrycznej.

Zależność statystyczną między przeżywalnością *Lb. brevis* i stresem osmotycznych analizowano testem Kruskala-Wallisa na poziomie istotności  $p = 0,05$ , przy użyciu programu Statistica wersja 10 (StatSoft).

## Wyniki i dyskusja

Średnie liczby bakterii *Lb. brevis* oznaczone dwiema metodami – płytkową i barwienia fluorescencyjnego CFDA – były zbliżone w próbkach: od kontrolnych do zawierających 2-procentowy dodatek NaCl (rys. 1). Największe różnice między dwiema metodami zaobserwowano w próbkach zawierających 2,5 % NaCl. Na podstawie liczby *Lb. brevis* oznaczonej metodą płytkową zaobserwowano, że przeżywalność szczepu zmniejszyła się w środowisku o największym stężeniu chlorku sodu (2,5 %) o  $\log N/N' \sim -1,0$  (gdzie  $N$  to liczebność populacji oznaczona w próbkach z 2,5-procentowym NaCl, a  $N'$  to liczebność populacji oznaczona w próbkach kontrolnych). Na tej podstawie można przypuszczać, że część komórek poddanych stresowi 2,5-procentowego NaCl straciła tzw. hodowalność, zachowując aktywność esterolityczną. Ten stan nazywany jest stanem uśpienia lub VBNC (ang. *viable but nonculturable*), czyli żywe, ale nienadające się do hodowli [11]. Pomimo znacznego poziomu stresu osmotycznego wywołanego 2,5-procentowym dodatkiem NaCl, obniżenie przeżywalności, w odniesieniu do tzw. hodowalności populacji, o jeden rząd logarytmiczny (rys. 1) nie było

statystycznie istotne ( $p = 0,5494$ ). Ta obserwacja pozwoliła stwierdzić, że szczep *Lb. brevis* wykazał znaczną tolerancję na działanie NaCl w badanym zakresie, co może czynić go przydatnym w przemysłowych procesach produkcyjnych o zwiększonym udziale soli.



Rys. 1. Liczba bakterii *Lactobacillus brevis* wyizolowanych z kiszzonej kapusty w próbkach kontrolnych oraz poddanych działaniu chlorku sodu w zakresie 0,5 ÷ 2,5 %, oznaczona metodą płytkową (■) oraz barwienia fluorescencyjnego CFDA (▒)

Fig. 1. Count of *Lactobacillus brevis* bacteria isolated from fermented cabbage in control samples and in samples treated with sodium chloride ranging from 0.5% to 2.5%, assayed using plate (■) and CFDA fluorescent staining methods (▒)

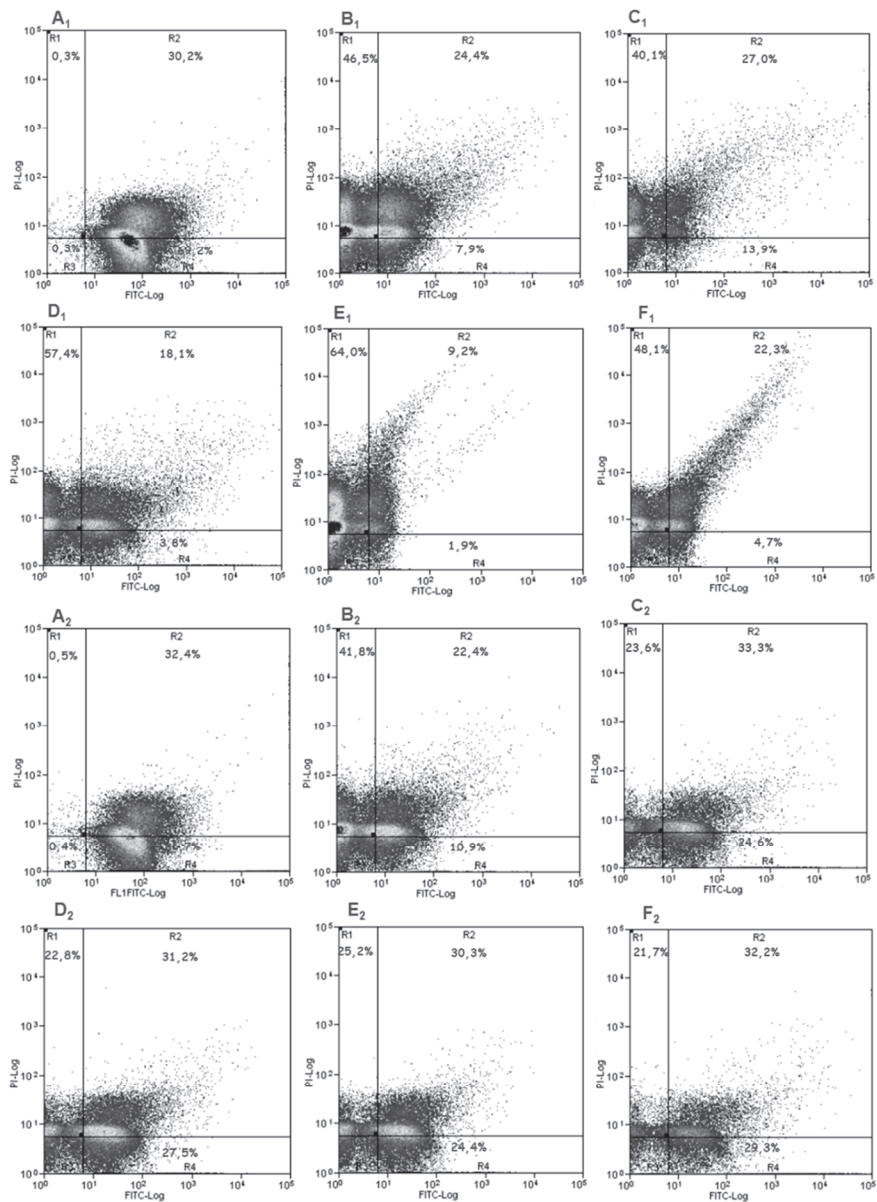
Badania stresu osmotycznego na przeżywalność szczepu *Lactobacillus rhamnosus*, wywołanego sacharozą w zakresie 0,1 ÷ 1,5 M, z użyciem metody płytkowej i technologii fluorescencyjnej podjęli także Sunny-Roberts i wsp. [17]. Autorzy wykazali, że część populacji straciła zdolność wzrostu na podłożach o znacznie zwiększonej osmolalności. W zależności od drobnoustroju, czynnikami obniżającymi tzw. hodowalność mogą być m.in. nieodpowiednia temperatura, kwasowość i osmolalność środowiska, niedobór składników pokarmowych [12]. Obniżenie tzw. hodowalności może być efektem stresów środowiskowych, więc zbadanie tego zjawiska wśród bakterii w różnych warunkach wymaga doboru odpowiedniego narzędzia analitycznego. Przydatność cytometrii przepływowej w badaniach wpływu stresów środowiskowych na przeżywalność bakterii wykazało wielu badaczy [2, 3, 4, 5, 13, 14].

Aby poznać zmiany aktywności fizjologicznej komórek szczepu *Lactobacillus brevis* wyizolowanego z żywności, próbki bez dodatku chlorku sodu i z jego dodatkiem, w zakresie od 0,5 ÷ 2,5 %, poddano analizie cytometrycznej. Do analizy cytometrycznej dobrano barwienie CFDA/PI (dioctan karboksylfluoresceiny/jodek propidyny)

w celu oznaczenia aktywności esterolitycznej i spójności błon cytoplazmatycznych komórek. Identyfikacja aktywności esterolitycznej polegała na przenikaniu prefluorochromu CFDA do wnętrza komórki, hydrolizy grupy dwuoctanowej przez esterazę i powstaniu karboksylfluoresceiny, która, gromadząc się we wnętrzu komórki, nadaje jej zieloną fluorescencję [13]. Komórki barwione PI to z kolei komórki fluoryzujące na czerwono, w wyniku przedostania się fluorochromu do wnętrza komórki i interkalacji jej DNA. Jodek propidyny o dużej masie cząsteczkowej może przedostawać się tylko przez uszkodzoną błonę cytoplazmatyczną, co pozwala uznać go za wskaźnik komórek uszkodzonych [12]. Na rys. 2. przedstawiono cytometryczne wykresy kropkowe przebadanych próbek z procentowym udziałem subpopulacji komórek, które analizowano bezpośrednio po działaniu czynnika stresowego oraz następującej po nim inkubacji z glukozą. Analiza cytometryczna pozwoliła wyodrębnić cztery subpopulacje komórek o następujących parametrach: CFDA<sup>-</sup>PI<sup>+</sup> – komórki niewykazujące aktywności esterolitycznej z przerwana ciągłością błony cytoplazmatycznej (ramka 1), CFDA<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> – komórki wykazujące aktywność esterolityczną i z uszkodzeniami w błonach (ramka 2), CFDA<sup>-</sup>PI<sup>-</sup> – komórki nieaktywne esterolitycznie lub po aktywnym wypompowaniu barwnika i z zachowaną ciągłością błon (ramka 3), CFDA<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> – komórki, które wykazują aktywność esterolityczną i spójność błon cytoplazmatycznych (ramka 4).

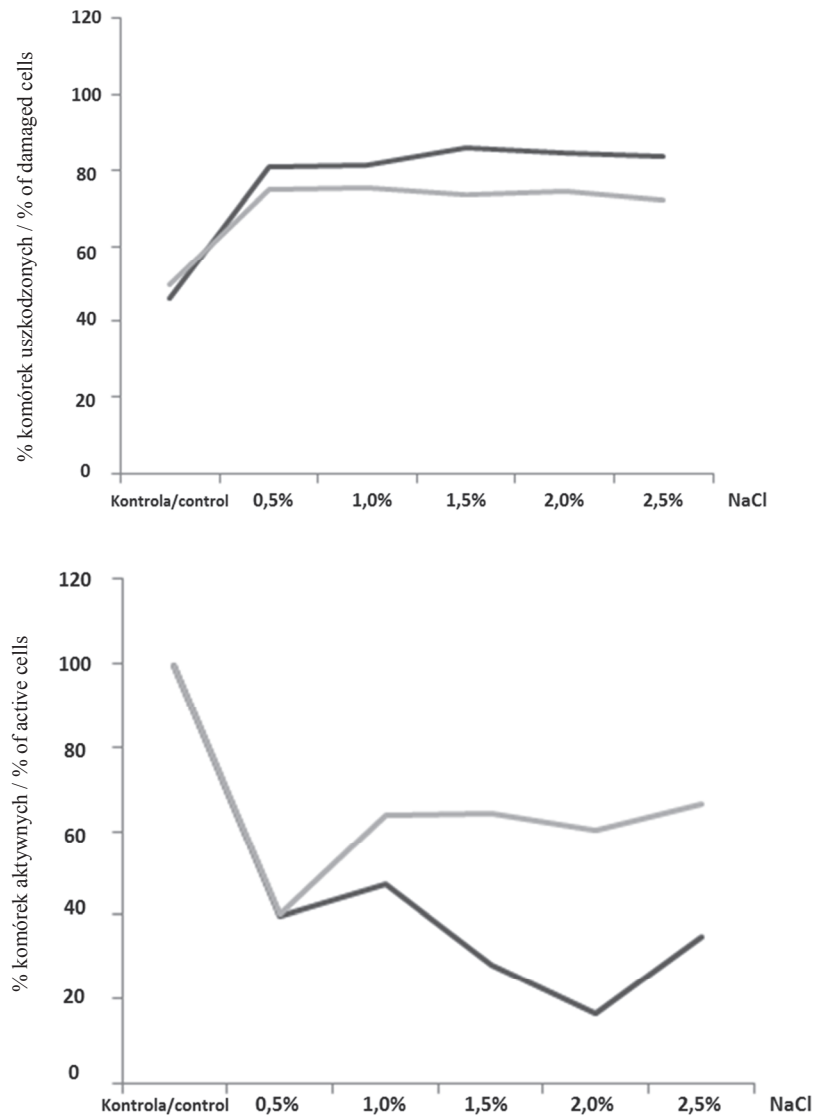
W próbkach kontrolnych, bez dodatku NaCl, wykazano przede wszystkim występowanie komórek o aktywności esterolitycznej, gdyż sumarycznie ponad 99 % populacji wystąpiła w ramce 4. oraz w ramce 2., niezależnie od etapu, po którym wykonano analizę (rys. 2 A<sub>1-2</sub>). Próbkę z dodatkiem NaCl w zakresie 0,5 ÷ 2,5 % wykazywały odmienny stan fizjologiczny populacji. Znaczna część populacji (40 ÷ 60 %) to komórki po lizie błon cytoplazmatycznych z ramki 1., przy jednoczesnym zmniejszeniu udziału komórek aktywnych z ramki 4. oraz 2. i zwiększeniu udziału komórek w ramce 3. (rys. 2 B<sub>1-F<sub>1</sub></sub>). Inkubacja z glukozą zmieniła proporcje subpopulacji w próbkach poddanych działaniu NaCl w zakresie 1,0 ÷ 2,5 %. Próbkę z dodatkiem NaCl w ilości [%]: 1,0, 1,5, 2,0 i 2,5 po inkubacji z glukozą cechowały się mniejszym udziałem komórek w ramce 1. oraz zwiększonym udziałem komórek w ramce 2. i ramce 4. (rys. 2 C<sub>2-F<sub>2</sub></sub>) w porównaniu ze stanem przed dostarczeniem komórkom glukozy.

Wykresy przedstawiające udział komórek z uszkodzeniami (z ramki 1. i 2.) i z aktywnością esterolityczną (z ramki 2. i 4.) – rys. 3 – pozwalają stwierdzić, że udział komórek z uszkodzeniami był stosunkowo stały w próbkach z dodatkiem chlorku sodu, niezależnie od jego stężenia i etapu poddanego analizie. Świadczyć to może o nieodwracalności zjawiska lizy błon cytoplazmatycznych lub/i interkalacji DNA jodkiem propidyny wywołanym wpływem NaCl. Tendencje udziału komórek wykazujących aktywność w próbkach w zakresie 1,0 ÷ 2,5 % NaCl po inkubacji z glukozą różniły się od próbek przed inkubacją. Na tej podstawie można przypuszczać, że część populacji



Rys. 2. Cytometryczne wykresy kropkowe z próbek kontrolnych (A), próbek z dodatkiem 0,5 % NaCl (B), 1,0 % NaCl (C), 1,5 % NaCl (D), 2,0 % NaCl (E) i 2,5 % NaCl (F) po określonych etapach badawczych (bezpośrednio po działaniu stresu osmotycznego –<sub>1</sub> i następnie po inkubacji z glukozą –<sub>2</sub>)

Fig. 2. Cytometris scatter-plots ref. to: (A) control samples, (B) samples with addition of 0.5 % NaCl, (C) 1.0 % NaCl, (D) 1.5 % NaCl, (E) 2.0 % NaCl, and (F) 2.5 % NaCl after specific research stages (immediately after osmotic stress action –<sub>1</sub> and, next, after incubation with glucose –<sub>2</sub>)



Rys. 3. Zmiany udziału komórek uszkodzonych (górny) oraz aktywnych (dolny) po określonych etapach badawczych (bezpośrednio po działaniu stresu osmotycznego — i następnie po inkubacji z glukozą —)

Fig. 3. Changes among percent contents of damaged (up) and active (down) cells after specific research stages (immediately after osmotic stress action — and, next, after incubation with glucose —)



odzyskała aktywność esterolityczną po przywróconym dostępie do źródła węgla, stymulując aktywność metaboliczną. Liżę błon cytoplazmatycznych pałeczek w wyniku stresu osmotycznego pod wpływem trehalozy, ale nie pod wpływem sacharozy, potwierdzają Sunny-Roberts i wsp. [16, 17, 18]. Stres szczepu *Lb. rhamnosus* wywołany sacharozą nie zmienił istotnie aktywności metabolicznej komórek, w przeciwieństwie do trehalozy, której zwiększenie stężenia powodowało zmniejszenie udziału komórek aktywnych esterolitycznie na rzecz komórek z uszkodzeniami w błonach. Inne badania, spójności błony cytoplazmatycznej *Lb. rhamnosus* pod wpływem ultradźwięków wykazały, że czynnik ten nie wywołał w błonach prawie żadnych uszkodzeń [1].

Porównania te potwierdzają, że zdolność pałeczek *Lactobacillus* do znoszenia efektów stresu środowiskowego są różnicowane i gatunkowo zależne. Coraz więcej wiadomo o zachowaniu się pałeczek w środowisku hiperosmotycznym, ale wiele aspektów jest jeszcze niezbadanych i niewyjaśnionych. Złożoność zmian zachodzących na poziomie komórkowym pod wpływem różnych czynników osmotycznych stwarza potrzebę dalszego rozszerzenia badań z tego zakresu.

### Wnioski

1. Na podstawie porównania wyników oznaczeń fluorescencyjnych z wynikami metody płytkowej stwierdzono, że część populacji *Lactobacillus brevis* straciła tzw. hodowalność w środowisku o największym stężeniu chlorku sodu, tj. 2,5 %. Jednocześnie wykazano znaczną tolerancję *Lb. brevis* na działanie chlorku sodu w zakresie poniżej tego stężenia.
2. Metodą cytometrii wielobarwnej wykazano wzrost udziału komórek *Lb. brevis* z uszkodzeniami w błonach cytoplazmatycznych i zmniejszenie udziału komórek aktywnych esterolitycznie pod wpływem stresu osmotycznego. Zaobserwowano, że część populacji komórek *Lb. brevis* odzyskiwała aktywność esterolityczną w obecności glukozy, po ustąpieniu stresu osmotycznego. Wiedza z tego zakresu przyczynić się może do wyboru odpowiednich szczepów w konkretnych procesach biotechnologicznych.
3. Stres osmotyczny wywołany chlorkiem sodu uruchamia mechanizmy odpowiedzi pałeczek, które determinują ich funkcjonowanie, uwarunkowane zmianami w aktywności metabolicznej i spójności błon cytoplazmatycznych.

*Pracę zaprezentowano podczas V Sympozjum Naukowego nt. „Probiotyki w żywności” Kiry k. Zakopanego, 23 - 25.04.2014 r.*

### Literatura

- [1] Ananta E., Voigt D., Zenker M., Heinz V., Knorr D.: Cellular injuries upon exposure of *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* to high-intensity ultrasound. *J. Appl. Microbiol.*, 2005, **99**, 271-278.
- [2] Ben Amor K., Breeuwer P., Verbaarschot P., Rombouts F.M., Akkermans A.D.L., De Vos W.M., Abee T.: Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead Bifidobacterium cells during bile salt stress. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**, 5209-5216.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] De Angelis M., Gobetti M.: Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics*, 2004, **4**, 106-22.
- [7] Glaasker E., Heuberger E.H., Konings W.N., Poolman B.: Mechanism of osmotic activation of the quaternary ammonium compound transporter (QacT) of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.*, 1998, **180**, 5540-5546.
- [8] Glaasker E., Konings W.N., Poolman B.: Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.*, 1996, **178**, 575-582.
- [9] Kim W.S., Perl L., Park J.H., Tandianus J.E., Dunn N.W.: Assessment of stress response of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Curr. Microbiol.*, 2001, **43**, 346-350.
- [10] Lemay M.J., Rodrigue N., Gariépy C., Saucier L.: Adaptation of *Lactobacillus alimentarius* to environmental stresses. *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, **55**, 249-253.
- [11] Oliver J.D.: The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.*, 2005, **43**, 93-100.
- [12] Olszewska M., Łaniewska-Trokenheim Ł.: Metody fluorescencyjnego barwienia komórek w badaniach stanu fizjologicznego bakterii. *Post. Mikrobiol.*, 2013, **52**, 409-418.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Sadowska J., Grajek W.: Odpowiedź komórkowa bakterii kwasu mlekowego na stresy środowiskowe. *Biotechnologia*, 2009, **87**, 115-132.
- [16] Sunny-Roberts E.O., Ananta E., Knorr D.: Flow cytometry assessment of *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) response to non-electrolytes stress. *Nut. Food Sci.*, 2007, **37**, 184-200.
- [17] Sunny-Roberts E.O., Knorr D.: Evaluation of the response of *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 to sucrose-induced osmotic stress. *Food Microbiol.*, 2008, **25**, 183-189.
- [18] Sunny-Roberts E.O., Knorr D.: Physiological analysis of *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800: Adaptive response to osmotic stress induced by trehalose. *B. Food J.*, 2007, **109**, 735-748.

### RESPONSE OF *LACTOBACILLUS BREVIS* CELLS TO OSMOTIC STRESS RESEARCHED BY FLOW CYTOMETRY

#### Summary

Lactic acid rod-shaped bacteria stand the effects of osmotic stress in natural living environments as well as in food production process. The complexity of changes occurring in cells as a result of osmotic stress creates the need for extending the knowledge of its effect on the physiological condition of rod-

shaped *Lactobacillus* bacteria. The objective of the study was to determine the effect of sodium chloride ranging from 0.5 to 2.5 % on the physiology of cells of *Lactobacillus brevis* strain isolated from food. A flow cytometry was applied and a fluorescent staining CFDA / PI (carboxyfluorescein diacetate / propidium iodide) was chosen to determine the metabolic activity and integrity of cytoplasmic membranes of cells. Based on the cytometric analysis, four groups were identified of cells with particular parameters: 1: CFDA<sup>-</sup>PI<sup>+</sup>; 2: CFDA<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>; 3: CFDA<sup>-</sup>PI<sup>-</sup>; and 4: CFDA<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>, and their percent content depended on the sodium chloride added to the samples analyzed. In the samples studied, it was found that the content of cells in group 1 increased and in group 4 decreased; this was evidence of the increase in the percent content of cells with damages in cytoplasmic membranes and of the decrease in the percent content of active cells. Based on the plate count results, it was proved that part of the *L. brevis* population lost culturability in the environment with the highest concentration of sodium chloride: 2.5 %. Furthermore, it was found that the *L. brevis* strain showed a considerable tolerance to the action of sodium chloride within the range studied and the knowledge in this area might be useful to research the suitability of *Lactobacillus* strains for industrial processes using screening methods.

**Key words:** *Lactobacillus brevis*, osmotic stress, flow cytometry, tolerance to NaCl action ☒