

MAGDALENA OLSZEWSKA, ŁUCJA ŁANIEWSKA-TROKENHEIM

ODPOWIEDŹ BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ NA STRES - STADIUM VBNC

Streszczenie

Stadium VBNC (ang. *viable but nonculturable*) oznacza populację żywych komórek bakteryjnych, niewykazującą wzrostu na podłożach mikrobiologicznych. Stan ten wśród bakterii fermentacji mlekowej mogą wywołać: zmienne warunki temperaturowe, obniżone pH środowiska, obecność soli żółci i innych substancji bakteriostatycznych. Populacji zachowującej stadium VBNC nie może badać tradycyjnymi metodami z uwagi na ograniczające kryterium, jakim jest zdolność wzrostu bakterii na podłożach soft mikrobiologicznych. Stosowanie technik, które służą badaniu różnych anatomicznych lub/i fizjologicznych parametrów komórek, niezależnie od ich zdolności do wzrostu na podłożach hodowlanych, jest uzasadnione w aspekcie oceny bakterii fermentacji mlekowej pod względem przydatności, funkcjonalności i bezpieczeństwa.

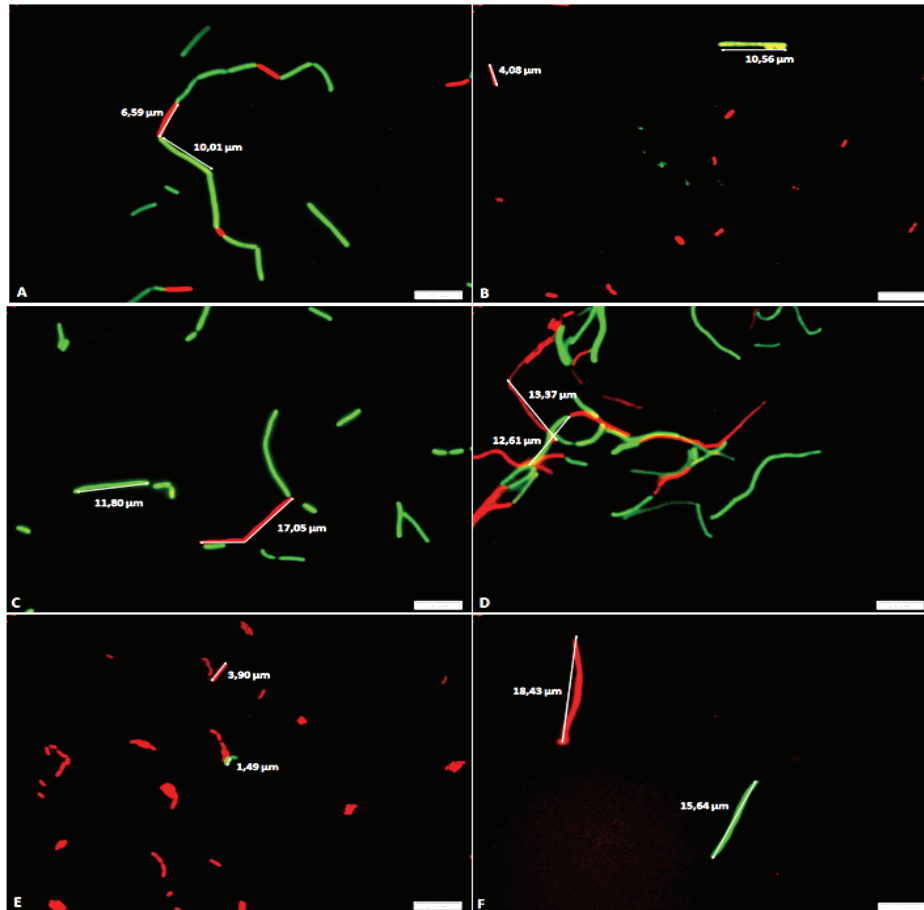
Słowa kluczowe: stadium VBNC, bakterie fermentacji mlekowej, czynniki stresowe, techniki badania stadium VBNC

Wprowadzenie

Od momentu pojawienia się w latach 80. XX w. pierwszych doniesień o istnieniu stadium VBNC (ang. *viable but nonculturable*) bakterii, sukcesywnie wzrasta liczba odkrywanych drobnoustrojów o zdolności przechodzenia w ten stan i czynników mogących ten stan wywołać. Stadium VBNC komórek cechuje brak zdolności wzrostu na podłożach mikrobiologicznych mimo wykazywania aktywności fizjologicznej i metabolicznej [20, 23]. Znaczenie bakterii patogennych i niepatogennych przechodzących w fazę VBNC skupia uwagę naukowców z dziedziny medycyny, biorekultywacji gleby oraz w technologii żywności. Występowanie tego zjawiska zaobserwowano wśród takich drobnoustrojów, jak: *Burkholderia* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus*

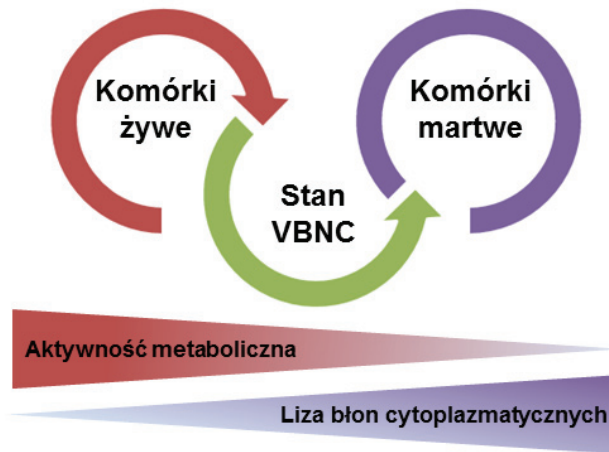
Dr M. Olszewska, prof. dr hab. Ł. Łaniewska-Trokenheim, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydz. Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn

spp., *Streptococcus* spp., *Micrococcus* spp, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. *Vibrio* spp. i in. [19]. Komórki w stadium VBNC wykazują obniżoną aktywność fizjologiczną i metaboliczną. Następuje synteza białek i modyfikacja ich składu na korzyść tzw. białek głodowych (ang. *starvation proteins*) i szoku termicznego (tzw. chaperonów), które zwiększają oporność na niekorzystne warunki. Dochodzi do utraty spójności błony cytoplazmatycznej, która powoli ulega pęknięciom, jak i podlega zmianom składu kwasów tłuszczowych. W celu podtrzymania potencjału membranowego obserwuje się też obniżenie transportu aktywnego i aktywności respiracyjnej. Komórki w stanie VBNC mogą mieć zmienione kształty, może dochodzić do ich miniaturyzacji, znacznego wydłużenia lub przechodzenia w formę kulistą (rys. 1). Kierunek zmian jest niejednoznaczny, zależy indywidualnie od szczepu i rodzaju czynnika stresującego, który te zmiany wywołuje [23]. Można oczekiwać, że np. niezadowolający stan fizjologiczny komórek bakteryjnych będzie się przejawiał zanikiem zjadliwości drobnoustrojów chorobotwórczych. Jednak wyniki badań zdają się tego nie potwierdzać – *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Legionella* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* to liczna grupa drobnoustrojów zachowujących zdolność infekcji w stanie VBNC [23]. Wśród warunków zasadniczo wpływających na zmianę statusu należy wymienić: czynniki chemiczne (różnego typu substancje bakteriostatyczne), fizyczne (wysoka i niska temperatura, zmiany pH), ciśnienie osmotyczne, natlenianie, głodzenie [12, 20]. Ocena stanu fizjologicznego drobnoustrojów w warunkach nieprzychylnych staje się wówczas wyzwaniem z uwagi na trudności z doбором odpowiednich metod analitycznych. Zahamowanie procesów rozmnażania pod wpływem niekorzystnych czynników ogranicza możliwości zastosowania standardowych metod polegających na określeniu zdolności do wzrostu populacji i tworzenia kolonii na podłożach mikrobiologicznych. W celu oznaczenia populacji w stanie VBNC uzasadnione jest poszukiwanie alternatywnych technik, które odwołują się do aktywności metabolicznej lub integralności struktur komórkowych. Typowy proces różnicowania się komórek VBNC przebiega według schematu zmniejszania się liczby bakterii hodowlanych przy stabilnie utrzymującej się populacji komórek wykazujących aktywność enzymatyczną i spójność struktur wewnątrzkomórkowych [19]. Zdolność powrotu bakterii VBNC do formy wegetatywnej zależy od stopnia intensywności zmian postępujących w komórce oraz od długości okresu przebywania w takim stanie, gdyż przekroczenie pewnej granicy może doprowadzić do rozpadu komórki zamiast do jej reaktywacji (rys. 2). Właściwość ta jest jednak bardzo indywidualna, bakterie mogą wracać do pełnej aktywności po różnym okresie, np. po rocznym zachowaniu stanu VBNC, jak stwierdzono u *Pseudomonas fluorescens* [19].



Rys. 1. Morfologia komórek *Lactobacillus* spp. w preparatach barwionych techniką fluorescencyjną żywe/martwe (zielone/czerwone): A – pałeczki *L. brevis* w środowisku o pH 4; B – pałeczki *L. brevis* w środowisku z dodatkiem 0,25 % soli żółci; C – pałeczki *L. plantarum* podczas inkubacji w temp. 4 °C; D - pałeczki *L. brevis* podczas inkubacji w temp. 37 °C; E – pałeczki *L. brevis* w środowisku z dodatkiem rifampicyny; F – pałeczki *L. plantarum* w środowisku z dodatkiem ampicyliny [opracowanie własne].

Fig. 1. Cell morphology of *Lactobacillus* spp. in fluorescence micrographs stained using live/dead technique (green/red) A - *L. brevis* in the environment of pH of 4; B - *L. brevis* in the environment with 0.25 % of bile salts added ; C - *L. plantarum* during cultivation at 4 °C; D - *L. brevis* during cultivation at 37 °C; E - *L. brevis* in the environment with rifampicin added; F - *L. plantarum* in the environment with ampicillin added [the authors' own study].



Rys. 2. Subpopulacje bakterii o odmiennym stanie fizjologicznym [opracowanie własne].

Fig. 2. Bacterial subpopulations exhibiting different physiological status [authors' own study].

Bakterie fermentacji mlekowej

Bakterie fermentacji mlekowej – LAB (ang. *lactic acid bacteria*) stanowią zespół drobnoustrojów roślin zielonych, obumarłych szczątków roślinnych oraz komensalną w przewodzie pokarmowym i błonach śluzowych ludzi i zwierząt. Odgrywają ważną rolę w prawidłowym przebiegu procesów fermentacyjnych wielu produktów i wpływają na ich właściwości sensoryczne i żywieniowe. Obok wymienionych cech zwłaszcza pałeczki z rodzaju *Lactobacillus* wywierają pozytywny wpływ na zdrowie człowieka, jako składnik współczesnej żywności funkcjonalnej. Popyt na te produkty związany jest głównie ze zmianą stylu życia społeczeństwa preferującego połączenie aspektu terapeutycznego oraz wygody. Z tego względu bakterie fermentacji mlekowej muszą spełniać wymagania dotyczące takich cech, jak: zdolność kolonizacji w przewodzie pokarmowym, zdolność przeżywania w środowisku o niskim pH oraz wysokim stężeniu soli żółci, dobra przeżywalność w trakcie procesów technologicznych oraz podczas przechowywania, antagonizm w stosunku do drobnoustrojów chorobotwórczych, udokumentowane właściwości prozdrowotne [3, 4]. Bakterie potencjalnie probiotyczne powinny być kontrolowane ze względu na bezpieczeństwo ich stosowania, w tym celu określa się m.in. oporność na antybiotyki i brak toksycznych metabolitów [3]. Wszystkie kryteria przydatności, funkcjonalności i bezpieczeństwa zawsze ocenia się indywidualnie wobec stosowanego szczepu.

Wybrane czynniki wpływające na przeżywalność LAB

Sole żółci i pH

Jednym z ważniejszych kryteriów jest oporność szczepów na kwas żołądkowy i żółć, która determinuje zdolność utrzymania żywotności w przewodzie pokarmowym na poziomie pozwalającym wykazywać korzystny wpływ na organizm gospodarza [4]. Pierwszą barierą, jaką bakterie probiotyczne powinny pokonać, jest niskie pH żołądka, spowodowane wydzielaniem przez komórki gruczołowe błony śluzowej kwasu solnego. Skrajnie niekorzystne środowisko ma stwarzać pierwszą barierę obronną przed bakteriami patogennymi pochodzącymi z żywności, jednocześnie nie wpływając na procesy trawienne w żołądku, którego enzymy wykazują optimum aktywności w tych warunkach. Drugą przeszkodą są sole żółci, produkowane w wątrobie z cholesterolu i wydzielane do dwunastnicy w celu emulsyfikacji lipidów [13]. W badaniach nad funkcjonalnością bakterii fermentacji mlekowej wymagana jest dokładna ocena ich przeżywalności i aktywności w warunkach niskiego pH i zmiennej koncentracji soli żółci.

W przewodzie pokarmowym człowieka stężenie soli żółci jest zmienne, ale nieprzekraczające 2 %. Oddziaływanie soli żółci na bakterie występujące w przewodzie pokarmowym może wywoływać obniżenie aktywności metabolicznej, reorganizację budowy ściany komórkowej oraz zmianę profilu lipidowego błony cytoplazmatycznej komórek. Skoniugowane sole żółci, które są wydzielane do dwunastnicy, mogą podlegać dekonjugacji z udziałem hydrolazy soli żółci - BSH (ang. *bile salts hydrolase*) przez drobnoustroje zasiedlające jelita [4]. BSH katalizuje hydrolizę sprzężonych z tauryną lub glicyną soli żółci do wolnych kwasów żółciowych i aminokwasów, obniżając ich zdolności emulgujące [30]. Przypuszcza się, że hydroliza soli kwasów żółciowych jest reakcją obronną przed toksycznym działaniem soli na komórki LAB. Stwierdzono, że aktywność BSH bakterii fermentacji mlekowej jest nie tylko cechą szczepozależną, ale również powiązaną z pochodzeniem szczepu – najczęściej wykrywana jest wśród szczepów pochodzenia jelitowego [30]. Aktywność BSH szczepów nie przesądza jednoznacznie o formie zachowania się komórek poddawanych stresowi soli żółci. Wyniki badań wskazują, że wolne kwasy żółciowe uwalniane przez BSH są dużo bardziej toksyczne niż ich formy skoniugowane i wykazują efekt inaktywujący komórki bakteryjne przy stężeniu 0,5 % i niższym [4]. Wobec tego szczepy LAB mogą wykazywać wrażliwość w środowisku żółci, mimo wykazywania aktywności BSH.

Bunthof i wsp. [4] zbadali oporność szczepów LAB (*Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus helveticus*) na zmiany pH i zdekoniugowane sole żółci. Wykazano, że małe stężenie soli żółci (0,05 %) nie wpłynęło na przeżywalność badanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej. Zwiększenie stężenia tych soli do 0,1 % wpłynęło istotnie na zmniejszenie przeżywalności komórek, a w zakresie 0,25 -

1 % soli przeżywalność ta była jeszcze mniejsza. Ben Amor i wsp. [2], badając szczepy *Bifidobacterium*, wykazali, że wraz ze zwiększaniem dodatku soli żółci od 0; 0,05; 0,1 0,2 do 0,25 % populacja komórek żywych zmniejszała się odpowiednio do poziomu: 92, 67, 38, 4 i 3 %.

Według Bunthofa i wsp. [4] analiza tolerancji szczepów na niskie pH nie wykazała różnic między szczepami. Cechowała je oporność na pH w zakresie 3 - 6 jednostek. Jednak w środowisku o pH 2 ich przeżywalność zmniejszyła się do minimum. Papadimitriou i wsp. [22] zbadali, że szczep z gatunku *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* zachowywał bardzo wysoką żywotność w środowisku o pH 4, ale w pH 3 liczba komórek istotnie zmniejszyła się. Można przypuszczać, że krytyczna wartość pH warunkująca dobrą żywotność bakterii fermentacji mlekowej mieści się w przedziale 3,5 - 3. Należy podkreślić, że LAB fermentując cukry do kwasu mlekowego i kwasu octowego, stale zmuszane są – podczas cyklu życiowego – do uruchamiania mechanizmów obronnych przed uszkadzającym wpływem powstających kwasów. Największą rolę przypisuje się działaniu pomp protonowych F_1F_0 -ATPaza oraz systemów: deiminazy argininy ADI (ang. *arginine deiminase*), dekarboksylazy glutaminianu GAD (ang. *glutamate decarboxylase*) i zdolności do wytwarzania chaperonów. System GAD wymusza ruch jonów glutaminianu do wnętrza komórki, ich dekarboksylację i w rezultacie usuwanie jonów γ -aminomaślanu GABA (ang. *γ gamma-aminobutyrate*). Proces może dotyczyć także pobierania jabłczanu, jego dekarboksylacji i wydzielenia mleczanu przez komórki. Cykle dekarboksylacyjne połączone z antyportem tworzą siłę protonomotoryczną PMF (ang. *proton motive force*), która napędza syntezę ATP przez F_1F_0 -ATPazę. Ostatecznie dekarboksylacja i zużywanie protonów H^+ na ATP podwyższa pH komórki. Zwiększona tolerancja komórek na obniżające się pH może być także wynikiem produkcji NH_3 (system ADI), który łącząc się z protonami obecnymi w cytoplazmie tworzy NH_4^+ i podwyższa wewnątrzkomórkowe pH [5].

Temperatura

Określenie wpływu fizjologicznych czynników, tj. zdolności wzrostu i przeżywania w różnych warunkach temperaturowych, jest ważnym kryterium przydatności szczepów LAB. Poznanie ich odpowiedzi na niekorzystne warunki temperaturowe jest zadaniem wymagającym rozpatrzenia wielu czynników mogących modulować zachowanie bakterii. Z tego względu badania wpływu różnych temperatur inkubacji na przeżywalność komórek powinno rozszerzać się o badania zdolności adaptacyjnych do umiarkowanego stresu, który może zwiększać oporność na bardziej niekorzystne warunki oraz o badania molekularne zmian w profilu produkowanych białek.

Oporność bakterii gramodatnich na niskie temperatury jest większa niż na temperatury wysokie. Ponadto, wykazują one większą oporność na niskie temperatury niż bakterie gramujemne [27]. Wpływ wysokich temperatur na rozwój mezofilnych pał-

czek z rodzaju *Lactobacillus* jest niekorzystny. Temperatura rzędu 40 - 45 °C powoduje zahamowanie ich wzrostu. Dodatkowo, nieprawidłowo sfałdowane białka, ich agregacja, destabilizacja rybosomów i RNA oraz modyfikacje w profilu białkowo-lipidowym błon cytoplazmatycznych są najczęstszymi zmianami zachodzącymi w komórkach [7]. Komórki bakterii fermentacji mlekowej produkują białka HSPs (ang. *heat shock proteins*), które stanowią grupę białek ubikwitynowych o funkcji chaperonów oraz proteaz, chroniących przed błędami w procesie fałdowania białek lub degradujących nieprawidłowo złożone białka [15]. Podwyższona temperatura może indukować wytwarzanie różnych rodzajów białek, np. u *Lactobacillus plantarum*: chaperonów DnaK i GroEL, czynników indukcyjnych, białek rybosomowych: L1, L11, L31, S6, białek wiążących się z DNA: II HlbA oraz białek szoku zimna CspC (ang. *cold shock protein C*) [6]. Różnorodność produkowanych białek świadczy o kompleksowości procesów wpływających na fizjologię komórki, czyli aktywności chaperonów, stabilności i aktywności DNA/rybosomów, które prowadzą do reorganizacji pełnionych przez komórki funkcji. Jak wykazały badania przeprowadzone przez De Angelis i wsp. [6], oddziaływanie temperatury wyższej od optymalnej na wzrost *Lactobacillus plantarum* ujawniać się może skróceniem lag-fazy i znacznie mniejszym przyrostem populacji komórek. Niska temperatura wpływa natomiast najczęściej na spowalnianie procesów biologicznych komórek bakterii fermentacji mlekowej [29]. Po obniżeniu temperatury inkubacji z optymalnej do 16, 8 i 4 °C nie obserwuje się lag-fazy, rozwój i zamieranie populacji znacznie wydłuża się w czasie, a komórki przeżywają przez długi okres. Wykazano, że przeżywalność komórek szczepu *Lactococcus lactis* inkubowanego w 4 °C przez 28 dni była znacznie wydłużona w porównaniu z inkubacją w temp. 30 °C. Co więcej, przeżywalność *L. lactis* podczas zamrażania z wcześniejszą preinkubacją w temp. 10 °C zwiększyła się o 25 - 37 % w porównaniu z zamrażaniem bez tego zabiegu adaptacyjnego [27]. Obniżenie temperatury inkubacji indukuje procesy adaptacyjne w komórkach LAB, polegające na zahamowaniu albo obniżeniu syntezy większości białek i uruchomieniu wytwarzania białek szoku zimna CSPs (ang. *cold shock proteins*) oraz tzw. białek CIPs (ang. *cold-induced proteins*). Dochodzi do zmniejszenia płynności membran komórkowych, aktywności transkrypcyjnej i translacyjnej, efektywności procesów fałdowania białek i funkcjonalności rybosomów [15]. Mayo i wsp. [17] zidentyfikowali dwa geny zlokalizowane w różnych regionach genomu *L. plantarum*: *cspL* i *cspP*. Geny te kodują 66-aminokwasowe polipeptydy, bardzo zbliżone do siebie i do rodziny białek CSPs. *CspP* podlega transkrypcji do pojedynczego produktu mRNA, natomiast *CspL* do dwóch, w wyniku czego na etapie adaptacji do niskiej temperatury trzy białka produkowane są w zwiększonych ilościach. Derzelle i wsp. [9] dowiedli na podstawie krzywej Arrheniusa, że zakres wzrostu pałeczek *L. plantarum* dzieli się na następujące obszary: 1 – poniżej 13 °C, który cechuje wytwarzanie CSPs; 2 – między 13 a 27 °C, w którym energia aktywacji jest

stała (27 °C – temperatura optymalna); 3 – powyżej 27 °C, związany z produkcją HSPs. Dodatkowo podczas inkubacji w temp. 8 °C wykryto białka CSPs, które scharakteryzowano jako czynniki warunkujące kriotolerancję komórek: CspL przypisano rolę w łagodzeniu skutków obniżenia tempa namnażania i adaptacji do temperatur nieznacznie niższych od optymalnych. CspC przypisuje się związek z procesami adaptacyjnymi i regeneracyjnymi komórek, natomiast nadprodukcja CspP może wspomagać żywotność komórek podczas chłodniczego przechowywania. Bakterie fermentacji mlekowej są zatem zdolne do wzrostu po obniżeniu temperatury inkubacji o 15 i więcej °C, choć w wolniejszym tempie.

Oporność na antybiotyki

Bakterie fermentacji mlekowej wykazują oporność na antybiotyki. Jest ona w wielu przypadkach wrodzona i nieulegająca transmisji. Jednak wśród wielu szczepów LAB wykryto plazmidowe geny oporności mogące ulegać przenoszeniu, co ma wpływ na aspekt bezpieczeństwa stosowania szczepów LAB w żywności. Jedną z ważniejszych przesłanek eliminujących takie szczepy jako probiotyczne jest transmisja genów oporności na elementach ruchomych do komórek bakterii patogennych lub potencjalnie patogennych. Ze strony szczepów z wrodzoną opornością na antybiotyki zagrożenie to jest niewielkie. Co więcej, naturalna antybiotykooporność LAB może odnosić pozytywny skutek u osób poddawanych kuracjom przeciwdrobnoustrojowym przez przeciwdziałanie znacznemu wyjąłowieniu przewodu pokarmowego [3].

Większość gatunków z rodzaju: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* wykazuje wrodzoną oporność na metronidazol, sulfonamidy, trimetoprym. Bakterie fermentacji mlekowej wykazują wrażliwość na antybiotyki działające jako inhibitory syntezy ściany komórkowej lub inhibitory β -laktamaz (piperacylina, tazobaktam) oraz znacznie mniejszą wrażliwość na cefalosporyny [1]. W literaturze podawane są dowody świadczące o oporności LAB na β -laktamy. Lavanya i wsp. [14] przebadali probiotyczne szczepy *Lactobacillus* i stwierdzili, że były odporne na penicylinę i ampicylinę. Głównym mechanizmem oporności pałeczek fermentacji mlekowej na antybiotyki jest nieprzepuszczalność ściany komórkowej, wynikająca z braku funkcjonalnych cytochromów łańcucha transportu elektronów. Współdziałanie różnych niespecyficznych mechanizmów, tj. białek transportowych (tzw. pompy MDR – ang. *multidrug resistance*) w błonie cytoplazmatycznej oraz zmodyfikowane w różnym stopniu systemy autolityczne komórek mogą powodować różnice w oporności [1]. Dowiedziono, że większość gatunków z rodzaju *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* wykazuje wysoką oporność na glikopeptydy. Występowanie oporności bakterii fermentacji mlekowej na wankomycynę budzi szczególne obawy z powodu potencjału transmisyjnego oporności tego antybiotyku – określanego mianem ostatniej szansy – w stosunku do innych bakterii. Opor-

ność na wankomycynę jest jednak związana z występowaniem w warstwie peptydoglikanu D-Ala-D-mleczanu, zamiast D-Ala-D-dipeptydu. Oporność ta w konsekwencji wynika z braku docelowych receptorów dla antybiotyku i jest cechą wrodzoną, niezwiązaną z plazmidami *vanA* i *vanB*, ulegającymi transmisji wśród paciorkowców *Enterococcus* [8]. Wiele bakterii fermentacji mlekowej wykazuje wrażliwość na antybiotyki hamujące syntezę RNA (np. rifampicyna) oraz białek (tj. chloramfenikol, erytromycyna, tetracyklina). W komórkach LAB mogą znajdować się plazmidowe geny oporności, ulegające przenoszeniu, jak zostało to udokumentowane w przypadku niektórych szczepów z rodzaju *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* poprzez identyfikację genów: *cat* (chloramfenikol), *erm* (erytromycyna), *tet* (tetracyklina) [1]. Co więcej, Lavanya i wsp. [14] wskazali na rifampicinooporność szczepów *Lactobacillus*. Oznaczyli tę cechę jako wrodzoną, nieplazmidową i ostatecznie uznali przebadane szczepy probiotyczne (*Lactobacillus pentosum* L08, *Lactobacillus jungurthi* L10, *Lactobacillus reuteri* L16, *Lactobacillus fermentum* L18, *Lactobacillus plantarum* L29, *Lactobacillus brevis* L43, *Lactobacillus casei* L47) za bezpieczne dla człowieka. Bakterie fermentacji mlekowej wykazują stosunkową oporność lub oporność na aminoglikozydy (neomycyna, kanamycyna, streptomycyna, gentamycyna) i jest to cecha wrodzona, która wynika z budowy ściany komórkowej oraz nieprzepuszczalności błony połączonej z usuwaniem substancji antybiotycznej na zewnątrz komórki [1].

Wyniki badań potwierdzają, że wrażliwość bakterii fermentacji mlekowej na antybiotyki jest cechą szczepozależną, dlatego też każdorazowo powinno się wymagać testowania szczepów LAB w kierunku poznania ich profili antybiotykoodporności. Bardzo istotnym zagadnieniem staje się więc ujednoczenie procedury oznaczania oporności LAB. Nie ma standardowej metodyki określającej kryteria oznaczania i interpretacji antybiotykoodporności bakterii fermentacji mlekowej [3]. Niedawno Instytut Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych CLSI (ang. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) zaliczył pałeczki *Lactobacillus* do grupy „bakterii rzadko izolowanych i wymagających”, sugerując stosowanie metody MIC na podłożu Mueller-Hinton z krwią końską, np. zamiast metody dyfuzyjno-krażkowej [3]. Bunthof i wsp. [4] zaproponowali fluorescencyjną technikę żywe/martwe jako metodę skринingu oporności bakterii na różnego rodzaju substancje przeciwdrobnoustrojowe, w tym antybiotyki. Do rutynowego badania LAB w kierunku oporności na antybiotyki konieczne jest ujednoczenie procedur, jako nadrzędnego kryterium bezpieczeństwa stosowania LAB w żywności. Dodatkowo testy tego rodzaju powinny zostać uzupełnione o określenie mechanizmów oporności, potwierdzających brak horyzontalnego transferu genów. Jak podaje Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności – EFSA (ang. *European Food Safety Authority*) szczepy z wrodzoną opornością lub opornością nabytą w wyniku mutacji genów chromosomowych kwalifikują się do grupy niskiego ryzyka transferu genów i nie wyklucza się ich stosowania w żywności [10]. Według EFSA wprowadze-

nie badań profili antybiotykooporności i mechanizmów transmisyjnych jako rutynowych potrzebne jest w celu nadania statusu QPS (ang. *Qualified Presumption of Safety*) szczepom stosowanym przemysłowo, w tym probiotycznym. Antybiotyki, jako przykład czynników stresujących, mogą również stymulować wśród bakterii przejście do stanu VBNC. Wówczas osiągnięcie stanu niehodowalności jest formą przetrwania bakterii w stresującym środowisku, kosztem rozmnażania i innych procesów życiowych, jak i może stać się zagrożeniem dla zdrowia człowieka. Należy uwzględnić możliwość przenoszenia oporności na antybiotyki z bakterii w stadium VBNC do bakterii patogennych. Szczególnie niepokojące jest występowanie zjawiska większej oporności na antybiotyki komórek VBNC niż ich form wegetatywnych [23], zatem należałoby także rozważyć potrzebę badania stanu VBNC bakterii fermentacji mlekowej w aspekcie bezpieczeństwa.

Stadium VBNC bakterii fermentacji mlekowej a techniki służące jego badaniu

Celowość stosowania alternatywnych technik w badaniach zmian stanu fizjologicznego bakterii fermentacji mlekowej znajduje uzasadnienie w kontekście występowania przyczyn wpływających na niedoszacowanie liczby bakterii oznaczanych stosowaną rutynowo w analityce metodą hodowlaną. Ryzyko niedoszacowania wynika z możliwości występowania komórek LAB w skupieniach, łańcuszkach i w konsekwencji w pojedynczej kolonii z pojedynczej komórki. Innym powodem niedokładności mogą być trudności z doбором podłoża hodowlanego oraz warunków inkubacji, wynikające z wysokich wymagań odżywczych i środowiskowych bakterii fermentacji mlekowej i z niepewności ich optymalizacji dla gatunku, a nawet szczepu. Należy również uwzględnić występowanie w populacji komórek niezdolnych do wzrostu na podłożach hodowlanych, czyli w stadium VBNC [25, 28, 29]. Zmiana stanu fizjologicznego LAB indukowana przez stres komórkowy objawia się najszybciej zahamowaniem procesów rozmnażania. Badanie tego rodzaju odpowiedzi uzasadnia stosowanie np. fluorescencyjnych technik, które pozwalają dokładnie ocenić stan populacji, z podziałem na subpopulacje [24, 29]. Zastosowanie fluorescencyjnych technik umożliwia badanie fizjologii komórek bakterii pod względem różnych cech strukturalnych i funkcjonalnych [12]. Stosowanie różnych barwników fluorescencyjnych umożliwia m.in. badanie stabilizacji błon cytoplazmatycznych, genomu, pH wewnątrzkomórkowego, aktywności enzymatycznej czy elektrochemicznego potencjału membranowego komórek bakterii [22, 25].

Stan VBNC bakterii fermentacji mlekowej dotyczy zarówno komórek poddawanych działaniu stresowych czynników środowiskowych, jak również stanowiących mikroflorę produktów i szczepionek starterowych przechowywanych długoterminowo. Populacja komórek LAB w stanie VBNC może być efektem działania szoku temperaturowego, głodu wywołanego brakiem lub wyczerpaniem się składników odżywczych,

jak też obecnością różnych substancji bakteriostatycznych (najczęściej kwasy, sole żółci) [4, 11, 16, 18, 22]. Gatti i wsp. [11] przeprowadzili analizę mikrobiologiczną szczepionek mleczarskich z użyciem metod LIVE/DEAD BacLight[®] oraz płytkowej. Zaobserwowano, że liczba komórek LAB oznaczona metodą fluorescencyjną była większa w porównaniu z liczbą bakterii pozyskaną metodą hodowlaną. Na tej postawie zdefiniowano subletalny stan fizjologiczny komórek, które charakteryzowały się utratą zdolności do podziałów i spójnością błon cytoplazmatycznych. Te obserwacje zbieżne są także z innymi wynikami badań. Moreno i wsp. [18], analizując przeżywalność probiotycznych szczepów LAB w produktach fermentowanych metodą hodowlaną, uzyskali mniejszą liczbę komórek w porównaniu z metodą barwienia fluorescencyjnego SYTO9[®]/PI (ang. *propidium iodine*). Różnice zależały od szczepu i rodzaju produktu. Rault i wsp. [25], w celu oceny użyteczności parametrycznego barwienia CFDA/PI (ang. *carboxyfluorescein diacetate/propidium iodine*), w badaniach przeżywalności szczepów *Lactobacillus delbrueckii*, podczas głęboko mrożonego przechowywania wyraźnie wskazują na zalety tej techniki, która okazała się pomocna w wyróżnieniu subpopulacji komórek żywych, martwych i uszkodzonych w wyniku panujących warunków. Quirós i wsp. [24], stosując metody łączonego barwienia ChemChromeV6[®] z PI oraz CFU (ang. *colony forming unit*), przedstawili wiarygodny podział populacji na trzy podpopulacje, podkreślając znaczny udział komórek w VBNC podczas hodowli *Lactobacillus hilgardii* Lc2. Sunny-Roberts i Knorr [28] badali probiotyczny szczep *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 poddany zmianom ciśnienia osmotycznego, wykazując jego tolerancję na te zmiany i nieznaczną utratę wzrostu na podłożach mikrobiologicznych, dzięki porównaniu wyników uzyskanych barwieniem CFDA i metodą hodowlaną. Rault i wsp. [26] wykazali różnice pod względem liczby komórek *L. bulgaricus* CFL1 pomiędzy tymi z uszkodzeniami membran, zachowującymi aktywność enzymatyczną, potencjał membranowy, wewnątrzkomórkowe pH i zdolność wzrostu na podłożach, stosując odpowiednio: PI, CFDA, DIBAC₄(3) (ang. *Bis-(1,3-dibutylobarbituric acid (trimethionine oxonol)*), ester bursztynianu CFDA oraz metodę płytkową w trakcie procesu fermentacyjnego. Łaniewska-Trokenheim i wsp. [16] zastosowali wewnątrzkomórkowy znacznik esteraz oraz metodą hodowlaną w badaniach wzrostu i zamierania populacji szczepów *Lactobacillus* spp. w mleku. Stwierdzili w populacji powiększanie się liczby osobników niezdolnych do wzrostu na pożywce hodowlanej wraz z czasem trwania hodowli. Olszewska i wsp. [21] wykazali rozbieżności między liczbami komórek szczepu *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* B100.6 w maśle, oznaczonymi techniką LIVE/DEAD[®] i metodą hodowlaną, wskazujące na stan VBNC części populacji podczas 4-tygodniowego przechowywania w temp. 6 °C. Podkreślono zaletę metody LIVE/DEAD[®], która sprawdziła się do śledzenia zmian udziału populacji żywej i martwej pałeczek *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*. Warmińska-Radyko i wsp. [29] zastosowali tę samą metodę barwienia do określenia prze-

żywalności szczepów *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* C62, *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* C75, *L. lactis* ssp. *cremoris* C83 w mleku z dodatkiem NaCl i w temp. 10 °C. Po porównaniu liczby paciorkowców otrzymanych z fluorescencji i metody hodowlanej stwierdzono, że badane szczepy mogą przechodzić w stan VBNC w efekcie panujących warunków. Bunthof i wsp. [4], zastosowali fluorescencyjne metody różnicujące żywe i martwe komórki w badaniach wpływu czynników fizykochemicznych na przeżywalność LAB. Na podstawie wyników stwierdzono, że np. dodatek soli żółci w stężeniu 0,1 % według wskazań metody fluorescencyjnej obniżał liczbę komórek w zależności od szczepu o 10 - 50 %, według metody płytkowej o 60 - 70 %, co pozwala domniemywać, że populacja wyłania się w stanie VBNC. Papadimitriou i wsp. [22], stosując połączenie metod fluorescencji i posiewów płytkowych, precyzyjnie określili wrażliwość szczepu *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* na działanie kwasów i przedstawili podział populacji tego szczepu z wyróżnieniem stanu niehodowalności. Zastosowanie techniki FISH (ang. *fluorescence in situ hybridization*) w detekcji i śledzeniu zmian aktywności fizjologicznej bakterii fermentacji mlekowej również dostarcza interesujących obserwacji. Jej potencjał, jako metody kontroli stanu fizjologicznego LAB, jest obecnie weryfikowany. Technika FISH pozwala odpowiednio zaprojektować sondy oligonukleotydowe rRNA. Metody fluorescencyjne stanowią zatem cenną alternatywę, ponieważ przyjmują jako kryterium detekcji komórek inne wyznaczniki żywotności niż rozmnażanie. Zestawienie różnych technik uwzględniających odmienne wskaźniki stanu fizjologicznego komórek może stać się atutem w analizach wielowymiarowości populacji oraz wzbogacić wiedzę o fizjologii bakterii fermentacji mlekowej.

Podsumowanie

Wiele gałęzi przemysłu spożywczego wykorzystuje działalność wyselekcjonowanych drobnoustrojów. Szerokie zastosowanie, zwłaszcza w produkcji żywności fermentowanej, znajdują bakterie fermentacji mlekowej, które uznaje się za niezmiernie ważne dla zdrowia człowieka. Rozszerzenie zakresu zastosowania wskazanych w powyższej pracy metod o badania odpowiedzi LAB na stres pozwala przeprowadzić kompleksową analizę wrażliwości bakterii na czynniki niekorzystne, wynikające z kryteriów stawianym bakteriom przeznaczonym do zastosowania przemysłowego i probiotycznego.

Literatura

- [1] Ammor M.S., Belén Flórez A., Mayo B.: Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.*, 2007, **24**, 559-570.

- [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** (11), 5209-5216.
- [3] Bernardeau M., Vernoux J.P., Henri-Dubernet S., Guéguen M.: Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.*, 2008, **126**, 278-285.
- [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** (5), 2326-2335.
- [5] Cotter P.D., Hill C.: Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microb. Mol. Biol. Rev.*, 2003, **67** (3), 429-453.
- [6] De Angelis M., Di Cagno R., Huet C., Crecchio C., Fox P.F., Gobbetti M.: Heat shock response in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, **70** (3), 1336-1346.
- [7] De Angelis M., Gobbetti M.: Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics*, 2004, **4**, 106-122.
- [8] DeLisle S., Perl T.M.: Vancomycin-resistant enterococci: a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. *Chest*, 2003, **123**, 504S-518S.
- [9] Derzelle S., Hallet B., Ferain T., Delcour J., Hols P.: Improved adaptation to cold-shock, stationary-phase, and freezing stresses in *Lactobacillus plantarum* overproducing cold-shock proteins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69** (7), 4285-4290.
- [10] EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ): Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2011 update). *EFSA J.* 201, 9 (12), 2497, p. 82.
- [11] Gatti M., Bernini V., Lazzi C., Neviani E.: Fluorescence microscopy for studying the viability of micro-organisms in natural whey starters. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2006, 338-343.
- [12] Joux F., Lebaron F.: Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes Infection*, 2000, **2**, 1523-1535.
- [13] Kraszewska J., Wzorek W., Sztando E.: Wybrane właściwości probiotyczne szczepów *Lactobacillus plantarum* i możliwości ich wykorzystania w produkcji bioaktywnych napojów słodowych. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 2005, **4** (1), 27-38.
- [14] Lavanya B., Sowmiya S., Balaji S., Muthuvelan B.: Plasmid profiling and curing of *Lactobacillus* strains isolated from fermented milk for probiotic applications. *Adv. J. Food Sci. Tech.*, 2011, **3** (2), 95-101.
- [15] Lorca G.L., De Valdez G.F.: *Lactobacillus* stress responses. *Lactobacillus Molecular Biology: From Genomics to Probiotics*, 2009, pp. 117-137.
- [16] Łaniewska-Trokenheim Ł., Olszewska M., Mikš-Krajnik M., Zadernowska A.: Patterns of survival and volatile metabolites of selected *Lactobacillus* strains in long-term incubation in milk. *J. Microbiol.*, 2010, **48** (4), 445-451.
- [17] Mayo B., Derzelle S., Fernández M., Léonard C., Ferain T., Hols P., Suárez J.E., Delcour J.: Cloning and characterization of cspL and cspP, two cold-inducible genes from *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.*, 1997, **179** (9), 3039-3042.
- [18] 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. Technol.*, 2006, **41**, 275-280.
- [19] Oliver J.D.: The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.*, 2005, **43**, 93-100.
- [20] Olszewska M., Łaniewska-Trokenheim Ł.: Badania stanu „niehodowalności” komórek bakterii fermentacji mlekowej w niesprzyjających warunkach rozwoju. *Med. Wet.*, 2011, **67** (2), 105-109.
- [21] Olszewska M., Staniewski B., Łaniewska-Trokenheim Ł.: Cell viability of *Bifidobacterium lactis* strain in long-term storage butter assessed with the plate count and fluorescence techniques. *Czech J. Food Sci.*, 2012, **30** (5), 421-428.

- [22] 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.
- [23] Paszyńska-Wesołowska I., Bartoszcze M.: Bakterie w stadium VBNC – zagrożenie dla zdrowia człowieka. *Med. Wet.*, 2009, **65** (4), 228-231.
- [24] Quirós C., Herrero M., Garcia L.A., Diaz M.: Application of flow cytometry to segregated kinetic modeling based on the physiological states of microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73** (12), 3993-4000.
- [25] 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.
- [26] Rault A., Bouix M., Béal C.: Fermentation pH influences the physiological-state dynamics of *Lactobacillus bulgaricus* CFL1 during pH-controlled culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, **75** (13), 4374-4381.
- [27] Sanders J.W., Venema G., Kok J.: Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *Microbiol. Rev.*, 1999, **23**, 483-501.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] Ziarno M.: Znaczenie aktywności hydrolazy soli żółci u bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. *Biotechnologia*, 2005, **2** (69), 183-195.

RESPONSES OF LACTIC ACID BACTERIA TO STRESS – VBNC STATE

S u m m a r y

A VBNC state (viable but nonculturable) is referred to the population of living bacterial cells that are nonculturable in culture media. This state of lactic acid bacteria can be caused by: variable temperature conditions, a decreased pH value of the environment, or the presence of bile salts and other bacteriostatic agents. A population to retain a VBNC state cannot be analysed using traditional methods because of a limiting criterion, which is the culturability of bacteria on soft microbiological media. The application of the techniques, which analyse different anatomical and/or physiological parameters of cells regardless of their ability to grow on culture media, is justified when assessing lactic acid bacteria in terms of usability, functionality, and safety.

Key words: VBNC state, lactic acid bacteria, stress-inducing factors, techniques for VBNC state analysis

