



Analiza stanu fizjologicznego pojedynczych komórek bakterii za pomocą barwienia fluorescencyjnego

Justyna Sadowska, Włodzimierz Grajek

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,
Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań

Analysis of physiological state of single bacterial cell using fluorescent staining methods

Summary

The paper reviews fluorescent staining techniques allowing to diagnose the physiological state of bacterial cells. Different staining probes and a manner of their use for analysis of cell viability, membrane potential, membrane integrity, intracellular pH, respiratory activity, amount of nucleic acids, and activity of chosen intracellular enzymes are described. Range of examples of fluorescent staining for monitoring of physiological state of bacteria in natural environment and in biotechnological processes are presented.

Key words:

fluorescent staining, bacteria, fluorescein, viability, internal pH, esterase, dehydrogenase, flow cytometry, membrane integrity, DNA staining.

Adres do korespondencji

Justyna Sadowska,
Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności,
Uniwersytet Przyrodniczy,
ul. Wojska Polskiego 48,
60-627 Poznań;
e-mail:
justynasad@gazeta.pl

biotechnologia

4 (87) 102–114 2009

1. Wstęp

W ostatnich latach nastąpił intensywny wzrost zainteresowania szybkimi i precyzyjnymi technikami pozwalającymi na monitorowanie zmian morfologicznych i fizjologicznych komórek mikroorganizmów. Skracają one czas badań i pozwalają na obróbkę komputerową obrazów mikroskopowych. Wśród wielu różnych zastosowań badawczych, techniki wybarwiania fluorescencyjnego są wykorzystywane także do oceny funkcjonalnej mikroorganizmów biorących udział w procesach biotechnologicznych

prowadzonych w skali przemysłowej. W czasie prowadzenia procesu w dużej skali pojawiają się często czynniki stresowe, które zaburzają warunki hodowli i tym samym hamują wzrost komórek i ich prawidłowy metabolizm. Często już niewielkie zmiany w składzie pożywki czy w warunkach fizykochemicznych procesu powodują zdecydowany spadek żywotności stosowanych drobnoustrojów i zahamowanie głównych szlaków metabolicznych. W konsekwencji dochodzi do załamania procesu produkcyjnego i poważnych strat ekonomicznych.

Metodom monitorowania stanu fizjologicznego komórek jest poświęcona bogata literatura naukowa oraz wiele konferencji naukowych. Ogromny potencjał mają metody oparte na wybarwianiu komórek barwnikami fluorescencyjnymi. Większość z nich pozwala na ocenę żywotności i stanu fizjologicznego całych populacji komórek, a część w pojedynczych komórkach.

Tradycyjne techniki oceny przeżywalności populacji mikroorganizmów wykorzystują głównie zdolność komórek do namnażania się na powierzchni pożywek stałych, co wiąże się z długim czasem oczekiwania na pojawienie się kolonii i zależą od szybkości wzrostu drobnoustrojów, rodzaju zastosowanego podłoża oraz warunków inkubacji (1). Ponadto liczenie komórek może być nieprecyzyjne lub wręcz niemożliwe. Dotyczy to mikroorganizmów o silnych właściwościach adhezyjnych tworzących konglomeraty, co powoduje, że agregaty komórek mogą być przypadkowo liczone jako jedna jednostka tworząca kolonie (CFU, ang. *Colony Forming Unit*). Tradycyjne metody nie nadają się do liczenia komórek drobnoustrojów, których nie potrafimy hodować w warunkach laboratoryjnych (VBNC, VNC, ang. *Viable But Non-Cultivable*). Część komórek może być także nieaktywnych, co prowadzi do błędnej interpretacji wyników (2,3). Tymczasem metody barwienia fluorescencyjnego umożliwiają diagnostykę wszystkich komórek bakteryjnych, łącznie z tymi, które nie rosną, ale wykazują cechy żywych komórek, gdyż utrzymują określoną strukturę komórkową i wykazują aktywność metaboliczną (4). Zastosowanie barwienia komórek pozwala na ich badanie *on-line*. Dzięki szybkiej informacji jest możliwa skuteczna interwencja w przebieg procesu biotechnologicznego.

Barwniki fluorescencyjne zawierają głównie wielopierścieniowe związki aromatyczne, mogące absorbować falę o określonej długości, w szczególności w zakresie promieniowania ultrafioletowego (wzbudzenie, absorbcja) oraz emitować światło o mniejszej energii w zakresie widma widzialnego (emisja) (5). Energie emisji fluorochromów mają różną wartość i dlatego widoczne promieniowanie ma barwę od ciemnoczerwonej, po zieloną i niebieską. Dzięki wysokiej selektywności substancje te umożliwiają zbadanie wewnątrz pojedynczej komórki takich parametrów, jak (4-6):

- potencjał błony,
- integralność błony,
- aktywność oddechową,
- zawartość enzymów wewnątrzkomórkowych,
- zawartość kwasów nukleinowych,

- pH wewnątrzkomórkowe,
- aktywność metaboliczną.

Wyznaczenie tych parametrów w odpowiednio dużej liczbie komórek pozwala zdiagnozować stan, w jakim znajduje się dana populacja mikroorganizmów w czasie trwania procesu biotechnologicznego. Zaznaczyć należy, że za pomocą jednego barwnika fluorescencyjnego można wyznaczyć kilka z wymienionych parametrów. Przykładowo utrudniona przenikalność estrowych pochodnych fluoresceiny jest dobrą miarą integralności błon z jednej strony, a z drugiej, że obecność ugrupowania estrowego umożliwia oznaczenie enzymów oddechowych. Kolejnymi przykładami są niektóre barwniki kwasów nukleinowych pozwalające ocenić zarówno integralność błon komórkowych, jak i aktywność oddechową.

Celem przeglądu literaturowego jest przedstawienie stanu wiedzy na temat zastosowania barwienia fluorescencyjnego w ocenie żywotności i aktywności fizjologicznej pojedynczych komórek bakteryjnych i w konsekwencji stanu danej populacji mikroorganizmów.

2. Barwniki fluorescencyjne stosowane do oceny integralności błon komórkowych

Pierwszą powierzchnią kontaktu komórki bakteryjnej ze środowiskiem zewnętrznym (z wyjątkiem *Mycoplasmatales*) jest leżąca na zewnątrz od błony komórkowej sztywna ściana komórkowa, pełniąca funkcje ochronne protoplastu przed liżą osmotyczną i uszkodzeniami. U wielu bakterii, w tym archebakterii, licznych bakterii gramujemnych (*Caulobacter crescentus*, *Aquaspirillum serpent*, *Aeromonas salmonicida*) i niektórych eubakterii gramodatnich (np. *Corynebacterium*, *Bacillus*) poza ścianą komórkową i błoną komórkową występuje dodatkowa warstwa S, zbudowana zwykle z charakterystycznego dla danej bakterii białka (1,7,8).

Jedną z głównych funkcji błon biologicznych jest transport składników odżywczych oraz wydalanie wytwarzanych metabolitów. Zachwianie płynności błon w komórce bakteryjnej (w szczególności błony komórkowej) wiąże się z poważnymi uszkodzeniami komórki, takimi jak utrata selektywnej przepuszczalności, zahamowany transport czy aktywność oddechowa, co bardzo często doprowadza do jej śmierci (4).

U podstawy analizy integralności membranowej leży zdolność barwników fluorescencyjnych do przenikania przez osłony do wnętrza komórki i wybarwienia właściwych dla siebie struktur. Metody pozwalające oznaczyć integralność błony opierają się na złożonych mechanizmach wnikania związków barwiących do wnętrza komórki, zatrzymania ich w komórce, bądź wydalania ich poza komórkę bakterii (6).

Ze względu na wysokie stężenie DNA w komórce bakteryjnej, do większości oznaczeń płynności błon stosuje się barwniki kwasów nukleinowych. Barwniki DNA, takie jak jodek propidyny (PI, ang. *Propidium Iodide*), bromek etydyny (EB, ang. *Ethidium Bromide*),

PO- PRO- 3 oraz SYTOX Green, wybarwiają komórki charakteryzujące się uszkodzeniami w strukturze dwuwarstwowej błony fosfolipidowej, wybarwiając kwasy nukleinowe na charakterystyczny dla siebie, zależny od długości fali, kolor (5,6).

Do najczęściej używanych barwników fluorescencyjnych należą jodek propidyny i bromek etydyny. Charakteryzują się one podobną budową chemiczną, zdolnością do barwienia uszkodzonych komórek na kolor czerwony oraz brakiem możliwości wybarwienia komórek żywych, prowadzących niezachwiany metabolizm. W nienaruszonych mikroorganizmach zostają one wydalone z wnętrza komórki jeszcze przed połączeniem z cząsteczkami kwasów nukleinowych (5).

W bieżącej literaturze naukowej można znaleźć bardzo wiele publikacji, w których autorzy donoszą o stosowaniu jodku propidyny jako barwnika pozwalającego oznaczyć płynność błon drobnoustrojów lub/i żywotność całej populacji bakterii. Znalazł on zastosowanie m.in. w badaniach nad przeżywalnością bakterii *Lactobacillus rhamnosus* hodowanych w warunkach podwyższonego ciśnienia, oraz poddanych stresowi osmotycznemu (9,10), w oznaczaniu przeżywalności bakterii mlekowych po mrożeniu i w trakcie przechowywania (11), podczas kontroli mikrobiologicznej win (12), w badaniach wpływu stresu oksydacyjnego na bakterie *Ralstonia metallidurans*, *Escherichia coli*, *Shewanella oneidensis* i *Deinococcus radiodurans* (13), w barwieniu komórek *Trichomonas vaginalis*, *Pasteurella piscicida* w wodzie rzecznej (14,15), rozróżnieniu komórek żywych od komórek martwych *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas* sp. (16) oraz barwieniu komórek bakterii *Lactococcus lactis* hodowanych w warunkach stresowych (17).

Niektórzy autorzy podważają jednak dokładność metod wybarwiania fluorescencyjnego opartego na przepuszczalności błon jako wskaźnika przeżywalności i żywotności bakterii. Dowiedziono, że pomimo śmierci spowodowanej wysoką temperaturą, komórki bakterii *Escherichia coli* nie akumulowały jodku propidyny (18). Niven i Mulholland (19) wykazali, że duża populacja niezdolnych do życia komórek *Lactococcus lactis* nie barwiła się jodkiem propidyny. Podobne zjawisko obserwowali Bunthof i in. (17), którzy wykazali, że 69% komórek *Lactococcus lactis* inkubowanych w temperaturze 60°C przez 90 sekund nie wybarwiło się po dodaniu barwnika, pomimo że utraciły zdolność do wzrostu na powierzchni płytki.

Ograniczone możliwości zastosowania PI wynikają z niskiego współczynnika ekstynkcji i stosunkowo niskiej fluorescencji tej sondy. Nowe barwniki DNA, takie jak SYTOX-Green, charakteryzujący się wysoką fluorescencją po przyłączeniu do cząsteczki kwasu nukleinowego, mogą stanowić alternatywne rozwiązanie (20). Barwnik ten znalazł zastosowanie w ocenie żywotności wielu gatunków bakterii m. in. *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp. i *Salmonella typhimurium* (21-23).

W celu jednoczesnej identyfikacji żywych i martwych komórek firma Molecular Probes stworzyła zestaw barwników Live/Dead BacLight zawierający dwa barwniki PI oraz SYTO 9, reagujące z kwasami nukleinowymi, lecz różniące się zdolnością do przenikania przez nieuszkodzone błony bakteryjne. Równoczesne zastosowanie obu barwników oraz systemu komputerowej analizy obrazu umożliwia wizualne rozróż-

nienie komórek żywych od komórek martwych (5). Barwnik SYTO 9 znacząco różni komórki bakterii gramujemnych i gramododatnich niezależnie od kondycji, w jakiej znajdują się ich błony komórkowe, tworząc barwne kompleksy koloru zielonego, podczas gdy jodek propidyny wnika wyłącznie do bakterii z uszkodzonymi błonami i barwi je na kolor czerwony.

Według producenta barwnik SYTO-9 powinien przenikać przez błony bakterii i być zatrzymywany wewnątrz komórek jednakże Langsrud i Sundheim (24) wykazali, że 30% testowanych szczepów *Pseudomonas aeruginosa* nie zatrzymuje barwnika. Aby przezwyciężyć ten problem, rozpoczęto równoczesne stosowanie PI wraz z innymi barwnikami przenikającymi przez błony np. SYTO-13 (25,26).

Dla oszacowania liczby komórek bakteryjnych w środowisku wodnym, wielu autorów wykorzystywało zestaw Live/Dead Bac Light w połączeniu z mikroskopią fluorescencyjną i komputerową analizą obrazu lub cytometrią przepływową (25,27, 28). Jednakże po zastosowaniu wymienionego zestawu barwników pewna część komórek bakteryjnych wykazywała kolor pośredni pomiędzy zieloną a czerwoną fluorescencją. Aby uzyskać lepsze rozróżnienie barw Gasol i in. (29) zastosowali metodę polegającą na przepłukaniu filtra z wybarwionymi bakteriami alkoholem izopropylowym, uzyskując tym samym większe zróżnicowanie barw.

3. Barwniki wybarwiający kwasy nukleinowe

Wykrywanie uszkodzeń w łańcuchach kwasów nukleinowych z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych jest często stosowane przy charakterystyce apoptozy komórek eukariotycznych (4). Zastosowanie tych metod w komórkach bakteryjnych w celu oznaczenia żywotności mikroorganizmów może wydawać się niewłaściwe ze względu na utrzymywanie się nieuszkodzonej cząsteczki DNA jeszcze przez pewien czas po śmierci komórek. Ponadto u mikroorganizmów hodowanych w warunkach stresowych mogą występować zmiany w topologii cząsteczki DNA, charakterystyczne dla komórek martwych (30,31). Mimo to, wielu autorów wskazuje na dużą przydatność barwników kwasów nukleinowych jako narzędzi pozwalających na oznaczenie przeżywalności komórek bakteryjnych (5,6,32).

Aktualnie oferowanych jest komercyjnie wiele barwników fluorescencyjnych reagujących z kwasami nukleinowymi, jednak tylko nieliczne wiążą się specyficznie tylko z DNA, a większość z nich jest wrażliwa na skład chemiczny zasad (stosunek A-T/G-C). Barwniki, takie jak DAPI i Hoechst nr 33258 i 33342, wykazują w przybliżeniu stukrotnie wyższą, jasnoniebieską fluorescencję po związaniu się z tripletami A-T w cząsteczce DNA. Chromomycyna A3 i podobna do niej mitramycyna wykazują podwyższoną fluorescencję po przyłączeniu się do sekwencji bogatych w pary G-C. Oba barwniki są pobudzane przez promieniowanie fioletowe i niebieskofioletowe, zaś emitują światło koloru zielonego. Kombinacja barwników Chromomycyny A oraz Hoechst 33258 znalazła zastosowanie w diagnostyce składu chemicznego róż-

nych szczepów bakterii *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* i *Staphylococcus aureus* poddanych działaniu czynników stresowych (33).

Barwniki, takie jak bromek etydyny i jodek propidyny, tworzą barwne kompleksy z dwuniciowym DNA, bądź RNA. Takie same właściwości ma duża grupa asymetrycznych cyjanobarwników kwasów nukleinowych (serie TO-PRO-, TOTO- i SYTO) oraz Pico Green oferowanych przez Molecular Probes. Barwniki te znalazły zastosowanie w oznaczaniu całkowitej liczby kwasów nukleinowych w *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* KT2442, w czynnych biologicznie mikroorganizmach ściekowych oraz w badaniach nad jakością mikrobiologiczną mleka (34-37). Zgodnie z wytycznymi producenta wykorzystanie tych barwników do oznaczenia wyłącznie DNA wymaga wcześniejszego użycia RNAzy. Ze względu na fakt, że bakterie prowadzące niezakłócony metabolizm w swoim składzie chemicznym mają około pięć razy więcej podwójnoniciowego rRNA niż DNA, zastosowanie tych metod jest wciąż problematyczne (38). Inną techniką pozwalającą wybarwić i oznaczyć dwuniciowy rybosomowy RNA jest zastosowanie preparatu pironiny. Kombinacja tego barwnika z DAPI lub Hoechst 33342 umożliwia jednocześnie obserwowanie obu kwasów nukleinowych, pod warunkiem zastosowania podwójnego filtra (38).

Selektywnym barwnikiem fluorescencyjnym tworzącym barwne kompleksy koloru zielonego po przyłączeniu do DNA i czerwonego po przyłączeniu do RNA jest oranż akrydyny. Intensywność jego zabarwienia zależy od koncentracji kwasów nukleinowych. Ten barwnik kationowy przyłącza się do cząsteczki DNA w formie monomeru, zaś z cząsteczkami RNA tworzy kompleks złożony z polimerów barwnika oraz RNA. Znalazł on zastosowanie w badaniach nad bakteriami *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* oraz *Clostridium perfringens* (5,39,40).

Jednym z barwników kwasów nukleinowych stosowanych do określania przeżywalności mikroorganizmów lub oznaczenia liczby DNA jest DAPI. Zmiany wartości fluorescencji po wybarwieniu komórek przez DAPI zostały użyte do oceny wydajności dezynfekcji wody pitnej podchlorynem sodu. Barwnik ten znalazł zastosowanie w ocenie przeżywalności bakterii *Helicobacter pylori* podczas przechowywania w środowisku wodnym (41) i w badaniach wpływu zwiększonego ciśnienia atmosferycznego i temperatury na szybkość wzrostu *Lactococcus lactis* i *Lactobacillus sanfranciscensis* (42). Należy jednak odnotować, że zastosowanie tego barwnika nie zawsze pozwala na wykrycie wszystkich martwych komórek (43).

4. Barwniki pozwalające określić potencjał błonowy

Podczas procesów oddychania i hydrolizy ATP zostaje wytworzony elektrochemiczny potencjał błon komórkowych. Dzięki wybiórczej przepuszczalności błon dla jonów wodoru, sodu, potasu i chloru tworzy się gradient ładunków (ładunek wewnątrz komórki ma ujemną wartość, zaś po zewnętrznej stronie błony – war-

tość dodatnią) biorący udział w podstawowych procesach metabolizmu komórkowego, jak synteza ATP, transport aktywny, regulacja wewnątrzkomórkowego pH i inne (4).

Do pomiaru potencjału błonowego stosuje się barwniki fluorescencyjne, które w zależności od swojego ładunku gromadzą się po spolaryzowanej (barwniki kationowe) lub po depolaryzowanej stronie (barwniki anionowe) błon. Do barwników kationowych zaliczamy m.in. rodaminę i karbocyjany, takie jak: DiOC6(3), DiOC2(3) czy DiSC3(5). Wśród barwników anionowych wymienić należy DiBAC4(3) (5).

Jednym z częściej stosowanych barwników pozwalających określić potencjał błonowy u bakterii jest Rodamina 123 charakteryzująca się zieloną fluorescencją. Pierwsze doniesienia dotyczące stosowania rodaminy jako lipofilnego barwnika kationowego u bakterii datowane są na rok 1984 (44). Stosowanie rodaminy do oznaczania potencjału błonowego bakterii gramujemnych wymaga kilkukrotnego przemywania prób oraz obróbki wstępnej mikroorganizmu, zazwyczaj przez dodatek EDTA, w celu zwiększenia przepuszczalności błony zewnętrznej. Ponadto warunki hodowli, np. zasolenie pożywki, bezpośrednio wpływają na etap obróbki wstępnej (45). Mimo to Kaprelyants i Kell (46) zastosowali rodaminę do podziału populacji *Micrococcus luteus* na komórki żywe, martwe i żywe, lecz nie dające się hodować. McFeters i in. (47) wykorzystali ten barwnik do oceny właściwości fizjologicznych bakterii tworzących biofilmy (47-49), zaś Pacheco i in. (50) zastosowali rodaminę do badania żywotności mikroorganizmów biodegradujących 4-chlorofenol.

Innymi kationowymi barwnikami fluorescencyjnymi, używanymi do oznaczania potencjału błon, są karboksycjany, np. DiOC6(3), których stosowanie nie wymaga obróbki wstępnej próbek. Diaper i in. (45) donoszą o niespecyficznym wiązaniu się karbocyjanów do regionów hydrofobowych w komórce, co przekłada się na fałszywie pozytywne wartości fluorescencji wewnątrz komórki. Potencjał błonowy w komórce bakteryjnej może zostać zdefiniowany za pomocą anionowych oksonoli gromadzących się wewnątrz komórki w rejonach bogatych w związki lipidowe. Konjugacji tej sprzyja niska wartość napięcia błonowego, lub jego chwilowe zniżenie, pozwalająca cząsteczkom barwnika przeniknąć barierę błonową (5). Przykładowym barwnikiem anionowym jest DiBAC4(3), który znalazł zastosowanie w diagnostyce potencjału błonowego u takich bakterii jak *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bacillus licheniformis* CCMI 1034 (51) i *Bifidobacterium animalis* (18,52-55), jak również u licznych mikroorganizmów termofilnych (56).

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie barwnikami fluorescencyjnymi pozwalającymi oznaczyć potencjał błonowy, pomimo że oznaczenia te są często obarczone błędami wynikającymi z etapu obróbki wstępnej (38).

5. Barwniki stosowane do oznaczania aktywności wybranych enzymów

5.1. Aktywność dehydrogenaz

W badaniach aktywności oddechowej wewnątrz komórki bakteryjnej wykorzystuje się sole tetrazolinowe będące akceptorami elektronów. W konsekwencji działalności dehydrogenaz związanych z oddychaniem komórkowym, barwniki tetrazolinowe zostają zredukowane z bezbarwnych kompleksów do jasno świecących związków formazanu. Dzięki temu redukcja soli tetrazolinowych oraz ilość nierozpuszczalnych form formazanu jest bezpośrednim wskaźnikiem aktywności systemu transportu elektronów u mikroorganizmów tlenowych i beztlenowych (57,58).

Jednym z bardziej znanych barwników fluorescencyjnych, pozwalającym oznaczyć enzymatyczną aktywność dehydrogenazy, jest chlorek 5-cyjano-2,3 ditolylo-tetrazolowy (CTC), który w komórkach bakteryjnych jest przekształcany do związków świecących na czerwono (CTF). Ogólnie rzecz biorąc komórki, w których nie zachodzi proces redukcji CTC do CTF, są uważane za komórki martwe. CTC znalazł liczne zastosowania w określaniu liczby oddychających bakterii z rodzaju *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes* i *Pseudomonas fluorescens* w czystych kulturach (59,60), w drobnoustrojach żyjących w środowisku wodnym (61-63), w glebie (64) oraz w produktach spożywczych (65).

Procedura redukcji soli tetrazolowych polega na inkubacji komórek bakteryjnych (od 20 min do kilku godzin) w obecności barwnika fluorescencyjnego oraz formaldehydu, paraformaldehydu lub formaliny, a następnie szybkiego wykonania pomiaru z zastosowaniem mikroskopu fluorescencyjnego lub cytometru przepływowego, ze względu na zanikanie sygnału fluorescencyjnego (66). Istnieje możliwość redukcji związków formazanu poprzez zastosowanie glukozy, bądź pośrednich transporterów elektronów, takich jak siarczany fenazyny (67,68), bądź aktywacji tego związku przez pozakomórkowy fosforan nieorganiczny (68).

Niektóre związki formazanu mogą wydostawać się z wnętrza komórek bakteryjnych tworząc fosforyzujące osady pozakomórkowe. Zastosowanie jonów kobaltu tworzących kompleksy z pozakomórkowymi osadami umożliwi wytlumienie błędnego sygnału (69). Stosowanie CTC ma toksyczny wpływ na bakterie pochodzące z próbek wody pitnej, co doprowadza do błędnego oznaczenia całkowitej liczby komórek żywych (57,62,70,71).

5.2. Aktywność esteraz

Diocyan fluoresceiny (FDA), nie wykazujący własnej fluorescencji, jest zatrzymywany wewnątrz komórek ssaczych i za pomocą esteraz wewnątrzkomórkowych jest przekształcany we fluoresceinę (72). Enzymatyczna aktywność esteraz jest mierzona

za pomocą lipofilnych, nie naładowanych i nie wykazujących fluorescencji substratów, które wewnątrz aktywnych, nieuszkodzonych komórek ulegają przekształceniu do polarnych, fluorescencyjnych produktów, w tym głównie do fluoresceiny i jej pochodnych. Esterazy występują we wszystkich żywych organizmach i mogą dostarczyć informacji o stanie metabolicznym komórki. Jednakże martwe komórki lub komórki z uszkodzonymi błonami po wybarwieniu bardzo szybko pozbywają się barwnika, mimo że występuje w nich szczątkowa aktywność esteraz. W konsekwencji fluorogeniczne substraty esterazowe często znajdują zastosowanie zarówno w ocenie aktywności enzymatycznej, charakterystyce integralności błonowej, jaki i w pomiarach żywotności mikroorganizmów (73).

Pośród substratów pozwalających oznaczyć enzymatyczną aktywność esteraz najslabszą fluorescencję wykazuje FDA, co jest spowodowane słabą retencją związku wewnątrz komórki (74,75). W przeciwieństwie do FDA pochodne tego związku są przekształcane w hydrofilne, mocno fluoryzujące, silnie związane wewnątrz komórek produkty (76). FDA znalazł zastosowanie w oznaczaniu aktywności esterazowej w poddanych działaniu antybiotyków bakteriach *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* (76).

Inną, często stosowaną substancją pozwalającą oznaczyć aktywność enzymów wewnątrzkomórkowych jest CFDA-AM. Pomimo doniesień o zmniejszonej rozpuszczalności tego związku został on wykorzystany w badaniach nad *Staphylococcus aureus* (77).

W badaniach porównawczych oznaczania aktywności esteraz wykazano, że największą skutecznością odznacza się diocetan karboskyfluoresceiny (CFDA) (78). W porównaniu z tym związkiem, FDA i CFDA-AM wypadły o wiele słabiej, gdyż zastosowanie FDA wymagało uwzględnienia niekontrolowanego wycieku barwnika z komórek, zaś użycie CFDA-AM było ograniczone jego słabą rozpuszczalnością. CFDA znalazł zastosowanie w oznaczaniu enzymatycznie aktywnych komórek *Klebsiella pneumoniae* (75) oraz do oznaczania bakterii w oczyszczonej wodzie stosowanej w przemyśle farmaceutycznym (79).

Równoczesne wykorzystanie PI oraz CFDA pozwala na efektywne rozróżnienie komórek żywych od komórek martwych, co dowiedziono w badaniach nad *Lactococcus lactis* (80), oraz w doświadczeniach nad bakteriami *Escherichia coli* O157:H7 (81). Diapir i Edwards (75) prowadzili badania nad równoczesnym barwieniem kilku gatunków bakterii. Dowiedli oni, że ChemChrome B (produkt komercyjny o nieznannej formule) w porównaniu do FDA, CFDA i BCECF-AM, wybarwia największą liczbę gatunków bakterii zarówno gramdodatnich jak i gramujemnych.

Główne ograniczenia w stosowaniu estrów fluorogennych wynikają z utrudnionego wnikania barwnika do komórki i z jego czynnym wydalaniem (17,73) oraz z problemów związanych z barwieniem czystych kultur bakterii, takich jak *Pseudomonas* spp. (82). Większość z tych ograniczeń została przełamana przez zestaw barwiący ChemChrome V6, w skład którego wchodzi barwniki redukujące niespecyficzną fluorescencję oraz bufor minimalizujący wpływ barwnika z komórki (83).

Kolejnym estrem fluorogenicznym jest CFDA/SE. Różni się on od CFDA obecnością grupy estrowej, silnie wiążącą się do wolnych amin. Związek ten znalazł zastosowanie w oznaczaniu żywotności bakterii (84) oraz jest bardzo często wykorzystywany jako indykator zmian pH wewnątrz komórek bakteryjnych (85-87).

Hoefl i in. (73) prowadzili badania porównawcze nad zastosowaniem CFDA oraz CFDA/SE jako substancji pozwalających oznaczyć żywotność mikroorganizmów z gatunków *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Staphylococcus epidermidis*. Udowodnili oni, że większym błędem obarczone są badania z zastosowaniem CFDA/SE, co związane jest z niekontrolowanym wypływem barwnika z nienaruszonych komórek. Podobny wyciek barwnika CFDA z komórek zaobserwowano w badaniach nad bakteriami gramujemnymi *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Escherichia coli* K12 W3110 oraz gramodatnimi *Bacillus subtilis* IAM 1069 i *Staphylococcus aureus* IAM1011. Udowodniono, że zastosowanie aldehydu glutarowego o stężeniu 1g/l przeciwdziała ucieczce barwnika z wnętrza bakterii niezależnie od budowy ścian komórkowych (88). Część związków pozwalających oznaczyć enzymatyczną aktywność esteraz w komórkach jest wykorzystywana do oznaczeń wewnątrzkomórkowego pH (85-97).

6. Barwniki pozwalające oznaczyć pH wewnątrzkomórkowe

Zakres pH środowiska, w którym bakterie mogą funkcjonować, nie jest identyczny dla wszystkich gatunków. Większość bakterii rozwija się najlepiej na podłożach obojętnych lub słabo alkalicznych. Mikroorganizmy, zwane bakteriami kwasolubnymi, preferują podłoże o odczynie kwaśnym. Do nich należą m.in. bakterie fermentacji octowej i mlekowej oraz prawie wszystkie drobnoustroje z rodzaju *Thiobacillus* i *Sulfolobus* mogące rozwijać się nawet przy pH 0,8 (1). Bakterie z gatunków *Bacillus circulans* czy *Natronobacterium gregoryi* należą do grupy mikroorganizmów zasadoлюбnych (alkalofili). Wszystkie wymienione grupy drobnoustrojów, niezależnie od ich preferencji w stosunku do pH pożywki, utrzymują pH wewnątrzkomórkowe w granicach od 6,5 do 9,5 (89). W standardowych warunkach wzrostu dla bakterii acidofilnych i preferujących obojętne środowisko, pH wewnątrzkomórkowe jest z reguły wyższe niż pH środowiska zewnętrznego. Wytwarzający się gradient pH może być wykorzystany jako siła motoryczna dla procesów wymagających dostarczenia energii, takich jak asymilacja aminokwasów i cukrów, rotacja wici czy synteza ATP.

Większość barwników pozwalających oznaczyć pH wewnątrzkomórkowe bazuje na związkach fluoresceiny, np. karboksylfluoresceina (cF), BCECF czy CFDA-SE. Wielu autorów sugeruje, że zmiana pH wewnątrzkomórkowego mikroorganizmów może być wskaźnikiem stanu fizjologicznego komórki (85-87). Przykładowo wykazano, że stres osmotyczny wywiera bezpośredni wpływ na poziom wewnątrzkomórkowego pH bakterii *Listeria monocytogenes* i może być wyznacznikiem ich żywotności (85).

Podobne badania nad żywotnością bakterii *Lactobacillus delbrueckii* hodowanych w warunkach stresowych prowadzili Rechinger i Siegumfeldt (87). Oznacжали oni żywotność organizmów za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej z zastosowaniem CFDA-SE oraz standardowej metody płytkowej. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy wykazali korelację między wartością pH środowiska, wartością pH wewnątrzkomórkowego a zmianami żywotności badanych drobnoustrojów.

Podobną metodykę doświadczeń wykorzystali Hornbeak i in. (90) w badaniach nad żywotnością i stanem fizjologicznym bakterii *Bacillus licheniformis*, szeroko rozpowszechnionych w przemyśle enzymatycznym. Wskazali oni, że połączenie mikroskopii fluorescencyjnej, cytometrii przepływowej z zastosowaniem CFDA-SE i barwnika pozwalającego oznaczyć pH wewnątrzkomórkowe umożliwia diagnozę stanu fizjologicznego, w jakim znajdują się pojedyncze komórki.

7. Podsumowanie

W literaturze opisywanych jest wiele technik, których podstawą są barwniki fluorescencyjne pozwalające zdiagnozować stan fizjologiczny pojedynczych komórek. Zaletami ich stosowania są szybkość i precyzja pomiaru oraz możliwość badań drobnoustrojów nie dających się hodować. Zastosowanie barwników fluorescencyjnych razem z takimi narzędziami badawczymi jak mikroskopia fluorescencyjna czy cytometria przepływowa dostarcza mikrobiologom wielu przydatnych informacji o stanie fizjologicznym, w jakim znajdują się komórki hodowane w różnych środowiskach. Wielu autorów stosuje barwniki fluorescencyjne w oznaczaniu żywotności komórek rozwijających się w różnych pożywkach i w różnych warunkach środowiskowych. Dotychczasowy stan wiedzy nie pozwala na jednoznaczne wytypowanie niezawodnego barwnika fluorescencyjnego pozwalającego oznaczyć żywotność dowolnego mikroorganizmu. Wybór i metodyka zastosowania barwnika musi być ściśle dopasowana do badanego drobnoustroju i oceniona pod względem wydajności barwień. Rozwój technik barwień wielokrotnych, u którego podstaw leży zastosowanie przynajmniej dwóch barwników oznaczających różne markery żywotności komórek umożliwia bardzo dokładną analizę, jednak wymaga rzetelnej walidacji metody.

Literatura

1. Kunicki-Goldfinger W., (2005), *Życie bakterii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
2. Dahm H., Strzelczyk E., (2004), *Post.Mikrobiol.*,43, 251-265.
3. Barer M. R., Harwood C. R., (1999), *Adv. Microb. Physiol.*, 41, 93-137.
4. Shapiro H. M., (2000a), *J. Microbiol. Methods.*, 42, 3-16.
5. Haugland R. P., (2001), *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 8th Edition, Molecular Probes, Eugene, OR, USA.
6. Nebe-von-Caron G., Stephens P. J., Hewitt C. J., Powell J. R., Badley R. A., (2000), *J. Microbiol. Methods.*, 42, 97-114.

7. Singleton P., (2000), *Bakterie w biologii, biotechnologii i medycynie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
8. Schegel H. G., (2003), *Mikrobiologia ogólna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
9. Ananta E., Heinz V., Knorr D., (2004), *Food Microbiol.*, 21, 567-577.
10. Sunny-Roberts E. O., Knorr D., (2008), *Food Microbiol.*, 23, 183-189.
11. Rault A., Beal C., Ghorbal S., Ogier J., Bouix M., (2007), *Cryobiology*, 55, 35-43.
12. Kopke C., Cristavao A., Prata A. M., Silva Periera C., Figueiredo Marques J. J., San Romao M. V., (2000), *Food Microbiol.*, 17., 257-260.
13. Baatout S., Boever P. de., Mergeay M., (2006), *Appl. Biochem. Microbiol.*, 42, 369-377.
14. Magarinos B., Romalde J. L., Cid A., Toranzo A. E., (1997), *Let. Appl. Microbiol.*, 24, 122-126.
15. Yamaguchi N., Nasu M., (1997), *J. Appl. Microbiol.*, 83, 43-52.
16. Williams S. C., Hong Y., Danavall D. C. A., Howard-Jones M. H., Gibson D., Frischer M. E., Verity P. G., (1998), *J. Microbiol. Methods*, 32, 225-236.
17. Bunthof C. J., van den Braak S., Breeuwer P., Rombouts F. M., Abee T., (1999), *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3681-3689.
18. Jepras R. I., Carter J., Pearson S. C., Paul F. E., Wilkinson M. J., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2696-2701.
19. Niven G. W., Mulholland F., (1998), *J. Appl. Microbiol.*, 84, 90-96.
20. Roth B. L., Poot M., Yue S. T., Millard P. J., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2421-2431.
21. Klauth P., Wilhelm R., Klumpp E., Poschen L., Groeneweg J., (2004), *J. Microbiol. Methods*, 59, 189-198.
22. Suller M. T. E., Lloyd D., (1999), *Cytometry*, 35, 235-241.
23. Lebaron P., Catala P., Parthuisot N., (1998), *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2697-2700.
24. Langsrud S., Sundheim G. J., (1996), *Appl. Bacteriol.*, 81, 411-418.
25. Biggerstaff J. P., Puil M., Weidow B. L., Prater J., Glass K., Radosevich M., White D. C., (2006), *Molec. Cell. Probes*, 20, 141-146.
26. Comas J., Vives-Rego J., (1997), *Cytometry*, 29, 58-64.
27. Bonato B., Benedetti D., Canepari P., (2005), *FEMS Microbiol. Ecol.*, 54, 189-196.
28. Wierzechos J., Sancho L. G., Ascaso C., (2004), *FEMS Microbiol. Ecol.*, 50, 143-152.
29. Gasol J. M., Zweifel U. L., Peters F., Furhman J. A., Hagström A., (1999), *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 4475-4483.
30. Joux F., Lebaron P., Troussellier M., (1997a), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2686-2694.
31. Joux F., Lebaron P., Troussellier M., (1997b) *FEMS Microbiol. Ecol.*, 22, 65-76.
32. Li Y., Dick W. A., Tuovinen O. H., (2004), *Biol. Fertil. Soils*, 39, 301-311.
33. Steen H. B., Harald B., (2000), *J. Microbiol. Methods*, 42, 65-74.
34. Takenaka S., Iwaku M., Hoshino E., (2001), *J. Infect. Chomother.*, 7, 87-93.
35. Ziglio G., Andreottola G., Barbesti S., Boschetti G., Bruni L., Foladori P., Villa R., (2002), *Water Res.*, 36, 460-468.
36. Nancharaiah Y. V., Venugoplalan V. P., Wuertz S., Wilderer P. A., Hausner M., (2005), *J. Microbiol. Methods*, 60, 179-187.
37. Gunasekera T. S., Veal D. A., Attfeld P. V., (2003), *Int. J. Food Microbiol.*, 85, 269-279.
38. Shapiro H. M., (2000b), *Methods*, 21, 271-279.
39. Homem-de-Mello P., Mennucci B., Tomasi J., Silva A. B. F., (2007), *Theor. Chem. Acc.*, 118, 305-314.
40. Kumar S., Mittal G. S., (2008), *Biosystem Eng.*, 99, 1-8.
41. Queralt N., Araujo R., (2007), *Microbial Ecol.*, 54, 771-777.
42. Molina-Hoppner A., Sato T., Kato C., Ganzle M. G., Vogel R. F., (2003), *Extremophiles*, 7, 511-516.
43. Saby S., Sibille I., Mathieu L., Paquin J. L., Block J. C., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 1564-1569.
44. Matsuyama T., (1984), *FEMS Microbiol. Lett.*, 21, 153-157.
45. Diaper J. P., Tither K., Edwards C., (1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 268-272.
46. Kaprelyants A. S., Kell D. B., (1992), *J. Appl. Bacteriol.*, 72, 410-422.
47. McFeters G. A., Yu F. P., Pyle B. H., Stewart P. S., (1995), *J. Ind. Microbiol.*, 15, 333-338.
48. Yu F. P., McFeters G. A., (1994a), *J. Microbiol. Methods*, 20, 1-10.

49. Yu F. P., McFeters G. A., (1994b), *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 2462-2466.
50. Pacheco C. C., Alves C. C., Barreiros L., Castro P. M. L., Teixeira P. C. M., (2003), *Biotechnol. Lett.*, 25, 2089-2092.
51. Reis A., Lopes de Silva T., Kent C. A., Kosseva M., Roseiro J. C., Hewitt C. J., (2005), *J. Biotechnol.*, 115, 199-210.
52. Nuding S., Fellermann K., Wehkamp J., Mueller H. A. G., Stange E. F., (2006), *J. Microbiol. Methods*, 65, 335-345.
53. Alakomi H.-L., Matto J., Virkajarvi I., Saarela M., (2005), *J. Microbiol. Methods*, 62, 25-35.
54. Deere D., Porter J., Edwards C., Pickup R., (1995), *FEMS Microbiol. Lett.*, 130, 165-170.
55. Suller M. T. E., Lloyd D., (1999), *Cytometry*, 35, 235-241.
56. Beck P., Huber R., (1997), *FEMS Microbiol. Lett.*, 14, 11-14.
57. Hatzinger P. B., Palmer P., Smith R. L., Penarrieta C. T., Yoshinari T., (2003), *J. Microbiol. Methods*, 52, 47-58.
58. Bartosch S., Mansch R., Knotzsch K., Bock E., (2003), *J. Microbiol. Methods*, 52, 75-84.
59. Bovill R. A., Shallcross J. A., Mackey B. M., (1994), *J. Appl. Bacteriol.*, 77, 353-358.
60. Jørgensen F., Nybroe O., Knfchel S., (1994), *J. Appl. Bacteriol.*, 77, 340-347.
61. Ramalho R., Cunha J., Teixeira P., Gibbs P. A., (2001), *J. Microbiol. Methods*, 44, 97-103.
62. Bartscht K., Cypionka H., Overmann J., (1999), *FEMS Microbiol. Ecol.*, 28, 249-259.
63. Lepeuple A., Giloupe S., Pierlot E., Roubin M., (2004), *Int. J. Food Microbiol.*, 92, 327-332.
64. Richardson R. E., James C. A., Bhupathiraju V. K., Alvarez-Cohen L., (2002), *Biodegradation*, 13, 285-295.
65. Gunasekera T. S., Veal D. A., Attfield P. V., (2003), *Int. J. Food Microbiol.*, 85, 269-279.
66. Lovejoy C., Legendre L., Klein B., Tremblay J. É., Ingram R. G., Therriault J. C., (1996), *Aquat. Microb. Ecol.*, 10, 1-13.
67. Gribbon L. T., Barer M. R., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3379-3384.
68. Smith J. J., McFeters G. A., (1996), *J. Appl. Bacteriol.*, 80, 209-215.
69. Thom S. M., Horobin R. W., Seidler E., Barer M. R., (1993), *J. Appl. Bacteriol.*, 74, 433-443.
70. Ullrich S., Karrasch B., Hoppe H. G., Jeskulke K., Mehrens M., (1996), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4587-4593.
71. Karner M., Fuhman J. A., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 1208-1213.
72. Rotman B., Papermaster B. W., (1966), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 55, 134-141.
73. Hoefl D., Warwick L., Grooby L., Monis P. T., Andrews S., Saint C. P., (2003), *J. Microbiol. Methods*, 52, 379-388.
74. Diaper J. P., Tither K., Edwards C., (1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 268-272.
75. Diaper J. P., Edwards C., (1994), *J. Appl. Bacteriol.*, 77, 221-228.
76. Wanandy S., Brouwer N., Liu Q., Mahon A., Cork S., Karuso P., Vemulpad S., Jamie J., (2005), *J. Microbiol. Methods*, 60, 21-30.
77. Comas J., Vives-Rego J., (1998), *J. Microbiol. Methods*, 32, 45-53.
78. Jepras R. I., Carter J., Pearson S. C., Paul F. E., Wilkinson M. J., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 2696-2701.
79. Kawai M., Yamaguchi N., Nasau M., (1999), *J. Appl. Microbiol.*, 86, 496-504.
80. Bunthof C., VanDen Braak S., Breeuwer P., Rombouts F. M., Abee T., (1999), *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 3681-3689.
81. Tanaka Y., Yamaguchi N., Nasau M., (2000), *J. Appl. Microbiol.*, 88, 228-236.
82. Reynolds D. T., Fricker C. R., (1999), *J. Appl. Microbiol.*, 86, 785-795.
83. Catala P., Parthuisot N., Bernard L., Baudart J., Lemarchand K., Lebaron P., (1999), *FEMS Microbiol. Lett.*, 178, 219-226.
84. Hornbeak T., Nielsen A. K., Dynesen J., Jakobsen M., (2004), *FEMS Microbiol. Lett.*, 236, 145-151.
85. Fang W., Siegmundfeldt H., Budde B. B., Jakobsen M., (2004), *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 3176-3179.
86. Budde B., Jakobsen M., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3586-3591.
87. Rechinger K. B., Siegmundfeldt H., (2002), *Int. J. Food Microbiol.*, 75, 53-60.
88. Miyanaga K., Takano S., Morono Y., Hori K., Unno H., Tanami Y., (2007), *Biochem. Eng. J.*, 37, 56-61.
89. Siegmundfeldt H., Rechinger K. B., Jakobsen M., *Microbiology*, 145, 1703-1709.
90. Hornbeak T., Dynesen J., Jakobsen M., (2002), *FEMS Microbiol. Lett.*, 215, 261-265.