

METODY FLUORESCENCYJNEGO BARWIENIA KOMÓREK W BADANIACH STANU FIZJOLOGICZNEGO BAKTERII

Magdalena Olszewska^{1*}, Łucja Łaniewska-Trokenheim¹

¹ Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydział Nauki o Żywności, UWM w Olsztynie,
Pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn

Wpłynęło w lipcu 2012 r.

1. Wstęp. 2. Mikroskopia epifluorescencyjna. 3. Cytometria przepływowa. 4. Barwniki fluorescencyjne. 5. Hybrydyzacja DNA, RNA. 6. Zastosowanie metod fluorescencyjnego barwienia komórek. 7. Podsumowanie

Fluorescence-based methods of cell staining in physiological state studies of bacteria

Abstract: Despite the fact that traditional, standardized methods give satisfactory results, in fact, they are nonautomated methods, which are characterized by a long period of time in obtaining results. Progress in microbiological analysis thus requires improvements towards the instrumental and molecular methods. Fluorescence techniques are a combination of both these directions, offering an interesting alternative to the conventional, culturing methods. The article discusses the benefits and limitations of the use of fluorescence-based staining methods. The potential use in diverse microbiological directions was described.

1. Introduction. 2. Epifluorescence microscopy. 3. Flow cytometry. 4. Fluorescent dyes. 5. Hybridization DNA, RNA. 6. Application of fluorescence-based methods of cell staining. 7. Summary

Słowa kluczowe: cytometria przepływowa, mikroskopia epifluorescencyjna, techniki fluorescencyjnego barwienia komórek
Key words: flow cytometry, epifluorescence microscopy, fluorescence-based methods of cell staining

1. Wstęp

Rozwój metod analitycznych wiąże się z wdrożeniem nowocześniejszych rozwiązań, dzięki którym czas oczekiwania na wynik jest krótszy, a wynik bardziej wiarygodny. Wiele z dostępnych dzisiaj rozwiązań wyznacza kierunki, którymi podąża także analityka mikrobiologiczna. Na specjalne zainteresowanie zasługują metody, pozwalające na otrzymanie rzetelnych wyników w czasie zbliżonym do rzeczywistego [2, 12]. Innymi ważnymi kryteriami, które powinny być spełnione podczas postępowania analitycznego, to: powtarzalność wyników, łatwość optymalizacji procedury, wysoka wartość diagnostyczna, np. jednoczesna analiza wielu parametrów komórkowych oraz łatwość i szybkość wykonania. Potrzeba usprawnienia i przyspieszenia postępowania analitycznego wymusza wprowadzenie aparatury i technik komputerowych [6, 40]. Na rynku dostępne są urządzenia do bezpośredniego liczenia komórek bakteryjnych, spełniające ww. kryteria. Przykładem takich rozwiązań są mikroskop epifluorescencyjny oraz cytometr przepływowy, których zasada działania oparta jest na detekcji sygnału fluorescencyjnego. Odkrycie szeregu barwników fluorescencyjnych, tzw. fluorochromów (*flu-*

ochromes) umożliwiło dokładniejszą analizę bakterii na poziomie strukturalnym i funkcjonalnym. Większość tego rodzaju badań polega na znakowaniu komórek wybranym fluorochromem i przeprowadzeniu analizy mikroskopowej lub cytometrycznej.

2. Mikroskopia epifluorescencyjna

Analiza mikroskopowa przeprowadzona po zastosowaniu metody bezpośredniej epifluorescencji – DEFT (*direct epifluorescent filter technique*), umożliwia szybką detekcję i oznaczenie liczby komórek bakteryjnych [38]. Zasada DEFT polega na wykonaniu oznaczenia poprzez filtrację odpowiednio przygotowanej próbki komórek zabarwionych odpowiednim fluorochromem. Komórki można barwić przed filtracją, poprzez dodanie barwnika do zawiesiny komórek lub bezpośrednio po osadzeniu komórek na filtrze [13]. Modyfikacją tej procedury jest zastosowanie specjalistycznych szkiełek ze studzienkami, np. szkiełek HTC[®], na powierzchni których, po naniesieniu i odparowaniu próbki, dochodzi do osadzenia komórek [4]. Fluorescencyjna analiza preparatów mikroskopowych odbywa się w systemie

* Autor korespondencyjny: Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydział Nauki o Żywności, UWM w Olsztynie, Pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn; tel.: +48 89 5233736; fax: +48 89 5234516; e-mail: magdalena.olszewska@uwm.edu.pl

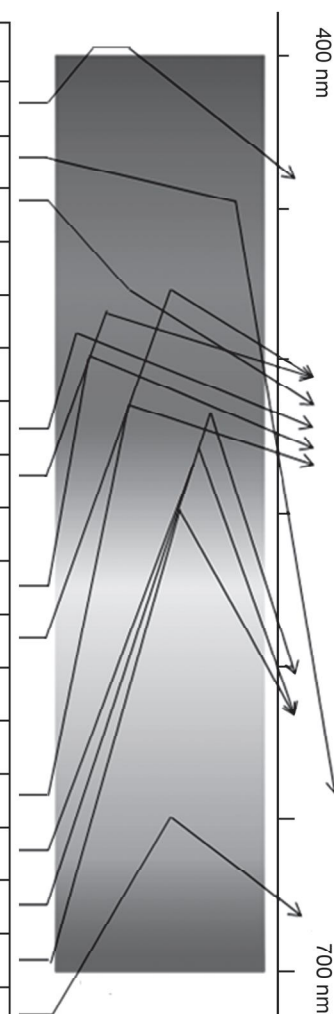
epiluminacji, w którym wiązka wzbudzająca, przechodząc przez obiektyw, kierowana jest na preparat z góry, ulega rozproszeniu, a emitowane przez preparat światło przechodzi z powrotem przez obiektyw. Źródłem światła jest specjalna lampa, rtęciowa lub ksenonowa. Lampa ksenonowa zapewnia ciągle widmo światła, rtęciowa natomiast poszczególne linie widma. Lampa ksenonowa zalecane jest w momencie, gdy spektrum absorpcji wybieranych do oznaczeń barwników nie odpowiada zakresowi światła żarnika rtęciowego [18]. Umieszczony na drodze wiązki pierwotnej filtr przepuszcza światła odpowiadające wzbudzeniu fluorescencji w badanym preparacie. Barwiony fluorochromem preparat selektywnie absorbuje światło i emituje, według zasady Stoccesa, fotony o niższej energii ale wyższej długości fali, co przekłada się na różnice między profilem wzbudzenia i emisji barwnika. Zwierciadło dichroiczne, umieszczone na drodze ścieżki wzbudzenia i emisji, pozwala uzyskać efekt odbicia i skierowania fali wzbudzającej, o krótszej długości, do obiektywu oraz przepuszczenia fali emitującej, o większej długości, do okularu. Obser-

wowana barwa fluorescencji jest dopełnieniem do światła zaabsorbowanego i zależy od właściwości fluorochromu [25]. Wybór fluorochromu zależy natomiast od parametru komórkowego, jaki chcemy zbadać oraz długości i intensywności wzbudzenia lampy dostępnej w mikroskopie. Emitowane jest światło widzialne lub podczerwone. Powszechnie stosowane barwniki emitują światło zielone wzbudzone światłem niebieskim (np. iyotioczjanian fluoresceinz – FITC, fluorescein isothiocyanate), czerwone wzbudzone światłem pomarańczowym (np. cyjanina 5 – Cy5, *cyanine 5*), niebieskie wzbudzone UV poniżej 400 nm (np. 4,6-diamidino-2-fenylindol – DAPI, *4,6-diamidino-2-phenyl-indol*) (Tab. I). Dużym ułatwieniem w wyborze barwników fluorescencyjnych jest tzw. Fluorescence Spectra Viewer, dostępny na stronie internetowej Life Technologies, będący obszernym zestawieniem fluorochromów wraz z ich specyfikacjami. Wyposażenie mikroskopu w kamerę cyfrową i program komputerowy pozwala rejestrować fluoryzujące komórki, przeprowadzić analizę ilościową i ocenić morfologię komórek.

Tabela I

Charakterystyka barwników fluorescencyjnych użytecznych w badaniach stanu fizjologicznego komórek [18, 34]

Kryterium	Fluorochrom	Wzbudzenie (nm)	Emisja (nm)	Wielkość (Da)
Interkalator DNA	DAPI	340	488	350
Aktywność dehydrogenaz	CTC	450	580–660	332
Aktywność esteraz	FDA	473	514	416
	BCECF-AM	482	520	615
	Chem-Chrome	488	520	–
	CFDA	492	517	460
	Kalceina-AM	494	517	995
Elektrochemiczny potencjał membrany	DiOC ₆ (3)	484	501	573
	DiBAC ₄ (3)	493	516	517
	Rh123	507	529	381
Integralność membran	SYTO9	–	–	~10
	SYTO13	488	509	~400
	SytoxGreen	502	523	600
	TOTO-1	514	533	1302,78
	PI	535	617	668
Aktywny transport	EB	518	605	394
Znaczniki DNA i białek	Cy3	512–552	565–615	766
	Cy5	625–650	670	792



3. Cytometria przepływowa

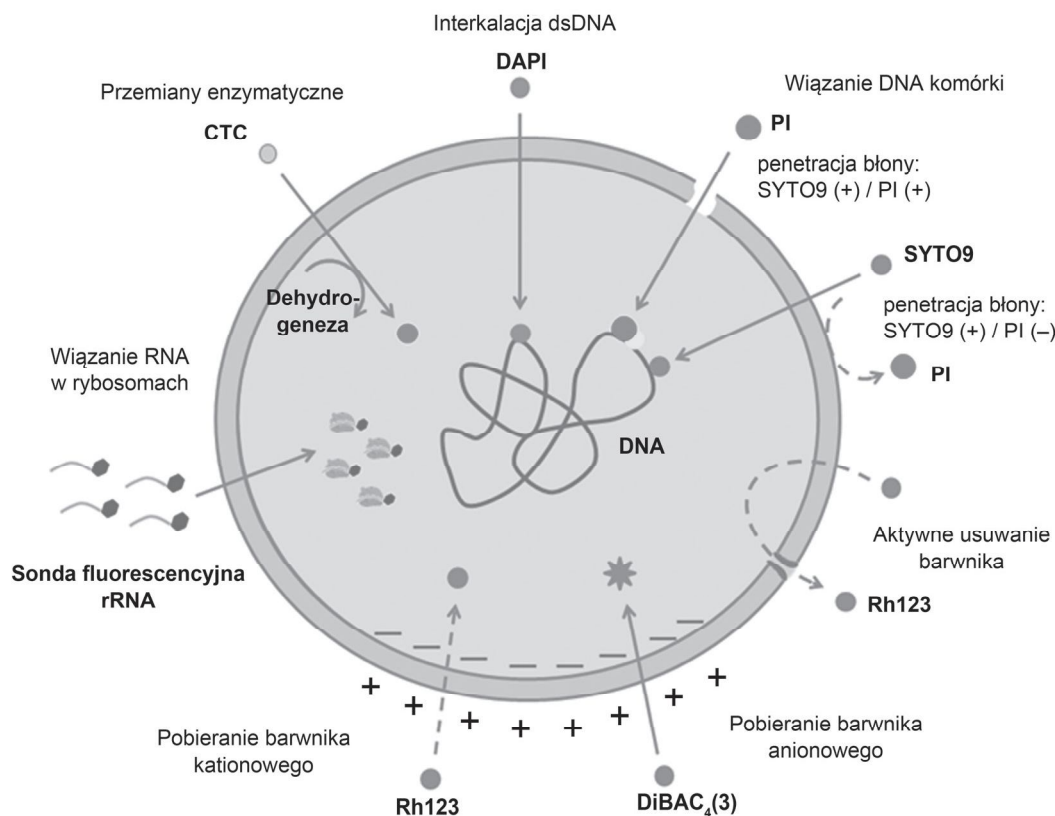
Cytometria przepływowa pozwala na oznaczenie liczby komórek bakteryjnych bezpośrednio w próbce, po połączeniu jej z odpowiednim barwnikiem. Bakterie wychwytyją barwnik, np. prefluorochrom, który pod wpływem enzymów wewnątrzkomórkowych ulega rozszczepieniu, uwalniając cząsteczki zdolne do fluorescencji [13]. Mogą to być także inne fluorochromy, np. barwniki nukleinowe, łączące się z DNA komórki (często stosowany w oznaczeniach cytometrycznych barwnik cyjaninowy – SYBR Green I, *N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene)methyl]-1-phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine*). W zależności od zastosowanej procedury barwienia istotne jest odpowiednie postępowanie w celu jej zoptymalizowania. Źródłem światła w cytometrze jest laser emitujący światło o określonej długości. Cytometria przepływowa pozwala na wieloparametrową analizę poszczególnych komórek, które znajdują się w strumieniu cieczy pompowanej pod niewielkim ciśnieniem do strefy pomiaru. Komórki przepływają pojedynczo przez promień lasera i powodują rozproszenie światła, a detektory rejestrują rozproszenie na komórcę oraz wysyłane przez wzbudzony fluorochrom. Do tego celu służą odpowiednie detektory: detektor przedni – FSC (*forward scatter channel*), do detekcji rozproszenia zgodnie z kierunkiem wiązki, detektor boczny – SSC (*side scatter channel*), do detekcji rozproszenia pod kątem prostym oraz detektory fluorescencji, tzw. kanały FL (*fluorescence channels*), do detekcji światła emitowanego o różnej długości fali, w zależności od użytego fluorochromu. Kanały FL pozwalają na pomiar intensywności fluorescencji wyznakowanych komórek, w zależności od ilości związanych cząsteczek barwnika. Ostatecznie sygnały rejestrowane przez detektory przetwarzane są na sygnał elektroniczny, przesyłany do komputera [32]. Analiza cytometryczna dostarczyć może informacji o strukturalnych i funkcjonalnych parametrach komórek, tj. wielkość, kształt, ziarnistość, a także integralność błon cytoplazmatycznych, aktywność enzymów i in., zależnie od stosowanego w oznaczeniach fluorochromu oraz wyposażenia instrumentu w odpowiednie lasery i detektory FL. Możliwy jest podział komórek na subpopulacje, np. komórki żywe/aktywne, komórki martwe oraz odróżnienie ich od autofluoryzujących cząstek materii [6, 40]. Zaletą tej techniki jest z pewnością szybki i zautomatyzowany pomiar pojedynczych komórek w populacji. Próg detekcji w cytometrii wynosi około 10^2 komórek/ml, czyli jest przynajmniej 10 razy niższy niż w mikroskopii fluorescencyjnej [18]. Pamiętać jednak należy, że cytometr jest „ślepy”, co oznacza, że dostarcza wyników w postaci liczb, zatem ich interpretacja zależy od pewnego doświadczenia oraz odpowiednio zaplanowanego eksperymentu. Często też, wyniki analizy cytometrycz-

nej dobrze jest uzupełnić wynikami innych metod, np. mikroskopii. Zarówno cytometria jak i mikroskopia, łącząc zastosowanie fluorescencji, wzajemnie się uzupełniają i po oba narzędzia diagnozy sięgają coraz częściej.

Metody barwienia komórek na bazie fluorescencji, w połączeniu z analizą mikroskopową lub cytometryczną, pozwalają na wiarygodne określenie przeżywalności komórek, niezależnie od stanu fizjologicznego i zdolności namnażania. Metody te służą ocenie anatomicznych i fizjologicznych parametrów komórek. Sondowane są te właściwości, które pozwalają stwierdzać o utrzymaniu lub utracie spójności struktur komórkowych, przemian energetycznych, zdolności biosyntetycznych [5, 18] (rys. 1).

4. Barwniki fluorescencyjne

Wiedza z zakresu budowy i funkcji komórki pozwoliła opracować różne fluorochromy jako wyznaczniki żywotności komórek bakteryjnych (rys. 1). Informacji na temat żywotności bakterii mogą dostarczyć znaczniki potencjału membranowego – MP (*membrane potential*). Komórka utrzymuje swój elektrochemiczny potencjał błony cytoplazmatycznej poprzez selektywną przepuszczalność jonów oraz aktywność respiracyjną lub hydrolityczną ATP. Komórka usuwa jony H^+ , co skutkuje tym, że wewnętrzna strona błony przyjmuje ładunek ujemny a zewnętrzna dodatni. Funkcje komórki, tj. synteza ATP, transport aktywny substancji oraz ruchliwość komórki są zależne od utrzymania potencjału membranowego, więc znajduje on uzasadnienie w fluorescencyjnej detekcji żywotności bakterii, np. w badaniach uszkodzeń błony pod wpływem różnych substancji bakteriostatycznych [20]. Barwniki MP, w zależności od posiadanego ładunku, dodatniego lub ujemnego, mogą kumulować się odpowiednio w polaryzowanych lub zdepolaryzowanych komórkach. Przykładami barwników kationowych są: rodamina (Rh 23 – *rhodamine 123*) czy karbocyjaniny, np. 3,3'-heksylokarbocyjanian jodowy – $DIOC_6(3)$ (*3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide*), a barwników anionowych: bis(1,3-kwas dibutylobarbiturowy) trimetylo oxonol – $DiBAC_4(3)$ (*bis-(1,3-dibutylobarbituric acid) trimethionine oxonol*), inaczej BOX [18, 30]. Przydatność tych barwników jest różnie oceniana i zależy od skuteczności wstępnej obróbki badanej próbki. Rodzaj zastosowanej permeabilizacji, czyli procedury ułatwiającej wniknięcie barwnika do komórki, jest najważniejszym etapem. Co więcej, w wielu przypadkach wymagane jest kilkukrotne płukania próbki z nadmiaru barwnika w celu zapobiegania fałszywie dodatnim wynikom. Z drugiej strony, taka procedura może wiązać się z odbarwianiem komórek i wpływać na wiarygodność analizy. Ze względu na efektywność barwników anionowych w barwieniu różnych



Rys. 1. Przykłady fluorochromów do wyznaczania stanu fizjologicznego komórek (za zgodą © Elsevier Masson SAS [18])

komórek, od bakterii Gram-dodatnich po Gram-ujemne, te wykazują większy potencjał aplikacyjny w badaniach mikrobiologicznych. Jednak ocena ta nie uwzględnia różnorodnych interakcji, jakie mogą zachodzić między znacznikami o określonym ładunku a składnikami występującymi w badanej próbce [18].

Innym rozwiązaniem jest zastosowanie prekursorów fluorogenicznych, czyli prefluorochromów, będących wskaźnikami aktywności enzymatycznej komórek. Prefluorochrom w formie utlenionej nie fluoryzuje, natomiast po wnikięciu do wnętrza komórki zredukowany jest w barwny związek emitując światło fluorescencji (rys. 1) [5]. Najczęściej stosuje się prefluorochromy, które służą badaniu aktywności dehydrogenaz i esteraz. Detekcja aktywności dehydrogenaz możliwa jest poprzez zastosowanie substratu, chlorku 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazoliowego – CTC (*5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride*), który ulega redukcji do nierozpuszczalnego, fluoryzującego na czerwono formazanu. Pozwala to, w tlenowych i beztlenowych warunkach, na ilościową ocenę metabolicznie aktywnych komórek [3, 26, 30]. CTC stosowany jest w badaniach mikrobiocenozy wodnych i lądowych tj. wody pitne, jeziorne, morskie, a także gleby powierzchniowe, osady i biofilmy [18]. Wzmocnienie sygnału fluorescencyjnego w komórkach barwionych CTC można osiągnąć poprzez utrwalanie prób formaldehydem, paraformaldehydem lub stosowanie substratów: glukozy, bursztynianu [5]. Mimo

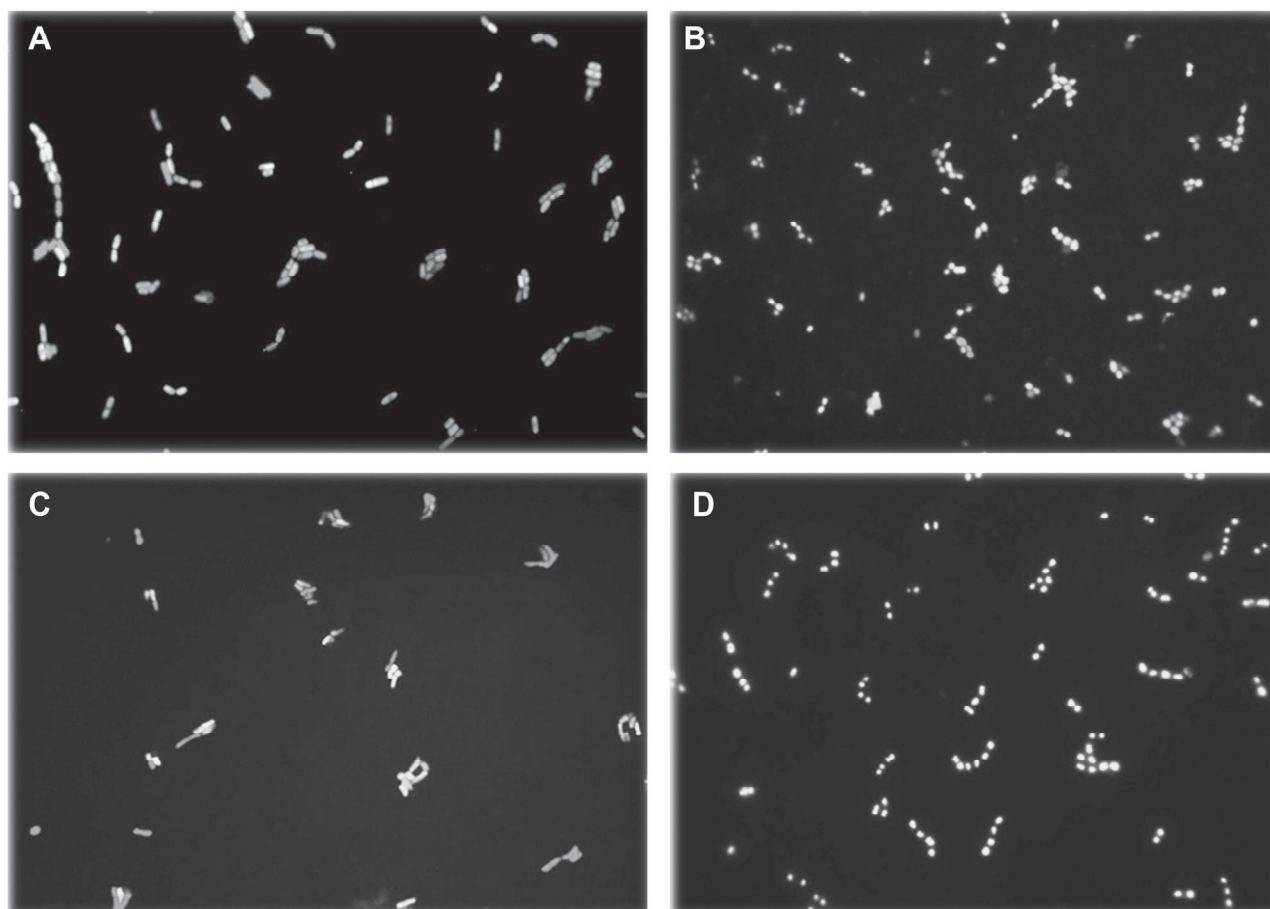
to, częstość stosowania CTC zmniejsza się z powodu toksyczności tego prefluorochromu oraz tworzenia zewnątrzkomórkowych depozytów formazanu i tym samym trudności w określeniu rzeczywistej liczby aktywnych komórek [18]. Identyfikacja aktywności esterolitycznej natomiast, polega na przeniknięciu przez błonę cytoplazmatyczną dwuoctanu fluoresceiny – FDA (*fluorescein diacetate*), hydrolizie grupy dwuoctanowej i powstaniu fluoresceiny, która gromadząc się we wnętrzu komórki ze spójną błoną cytoplazmatyczną emituje zieloną fluorescencję. Reakcję tą katalizuje wewnątrzkomórkowa esteraza, a rezultatem jest detekcja komórek wykazujących aktywność przemian metabolicznych [26, 30]. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że w przypadku barwienia niektórych komórek zastosowanie fluoresceiny może być mniej efektywne, ze względu na zjawisko wycieku fluorochromu do macierzy zewnątrzkomórkowej [10, 27]. Problem utrzymania barwnika można zmniejszyć stosując dwuoctan karboxyfluoresceiny – CFDA (*carboxyfluorescein diacetate*) zredukowany do karboxyfluoresceiny – CF (*carboxyfluorescein*) o charakterze hydrofilowym, która ze względu na ujemny ładunek efektywniej barwi komórki o fizjologicznym pH cytoplazmy [18, 33]. Podobny efekt można osiągnąć przy zastosowaniu estru kalceiny – kalceina-AM (*calcein acetoxymethyl ester*) i estru 2'7'-bis-(2-karboxyetylo)5,6-acetylometylo karboxyfluoresceiny – BCECF-

-AM (2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein acetoxy methyl ester) [17]. Uniknięcie trudności związanych ze słabą retencją barwnika i jego wyciekaniem można także osiągnąć używając rozwiązań typu ChemChrome B[®] i ChemChrome V[®], czyli fluorogenicznych estrów, pochodnych fluoresceiny, przekształczanych przez esterazy do świecących produktów w reakcji odbywającej się w środowisku stosownego buforu. Zwłaszcza ChemChrome V6[®] przypisuje się znaczną skuteczność w barwieniu komórek różnych gatunków bakterii [18]. Z drugiej strony, aktywny proces usuwania substancji fluorescencyjnej z komórki może posłużyć jako istotny wskaźnik żywotności komórek. Kumulacja barwnika, a następnie jego usuwanie przez pompy protonowe, obserwowane dla Rh123, FDA, CFDA czy bromku etydyny – EB (*ethidium bromide*) bez hamowania tego procesu, świadczy o zachodzących procesach hydrolizy ATP i wskazuje na określoną aktywność komórkową [10, 18].

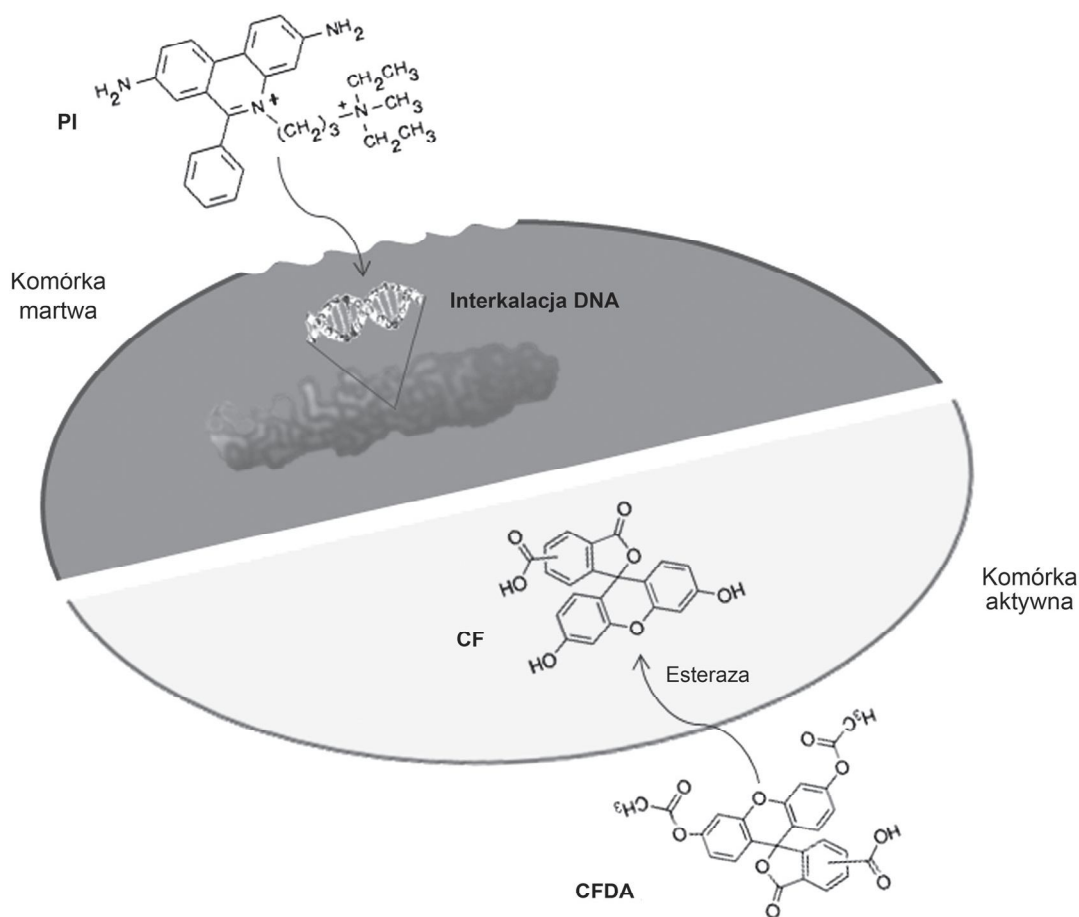
Głębsze poznawanie poziomu zmian żywotności komórek w populacji możliwe jest dzięki zastosowaniu zestawów fluorochromów, umożliwiających zróżnicowanie populacji na komórki żywe/aktywne i komórki martwe (rys. 2). Przykładem takiego zestawu jest LIVE/

DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit, zawierający dwa barwniki – SYTO[®]9 i jodek propidyny – PI (*propidium iodide*). SYTO[®]9, ze względu na niską masę cząsteczkową, penetruje żywe oraz martwe komórki, natomiast PI przenika tylko przez te z uszkodzoną błoną, co w efekcie objawia się zieloną fluorescencją komórek żywych a czerwoną martwych (Tab. I) (rys. 2B) [21, 26, 30]. Stosowanie takiego zestawu, umożliwi dwuparametrową analizę badanych próbek przy odpowiednich filtrach/detektorach, w które wyposażony jest mikroskop epifluorescencyjny/cytometr przepływowy. Oba fluorochromy są przykładami barwników nukleinowych, czyli wiążących się z DNA komórki (rys. 1). Duża koncentracja DNA w komórce oraz wzmocnienie fluorescencji, następujące po jego interkalacji, wpływają na skuteczność przeprowadzonej analizy.

Modyfikacje zestawów mogą zawierać inne przepuszczalne przez błony barwniki, np. SYTO[®]13, o większej przydatności niż SYTO[®]9 w oznaczaniu komórek żywych czy Sytox Green jako odpowiednik barwnika znakującego komórki martwe [18]. Alternatywą może być także propidyny tetra-1-(4,4,7,7-tetrametylo-4,7-diazandekametyleno)-bis-4-[3-metylo-2,3dihydro



Rys. 2. Obrazy preparatów mikroskopowych wykonane różnymi technikami barwienia fluorescencyjnego komórek: A – pałeczki *Lactobacillus brevis* barwione zestawem CFDA/PI; B – paciorkowce *Lactococcus lactis* barwione zestawem LIVE/DEAD[®], C – pałeczki *Propionibacterium freudenreichii* barwione zestawem CFDA/PI, D – paciorkowce *Lactococcus lactis* barwione DAPI



Rys. 3. Mechanizm barwienia CFDA/PI (dwooctan karboksyfluoresceiny/jodek propidyny)

(benzo-1,3-oksazolo)-2-metylidene]-1-(3 trimetyloammonowy propylu) jodek – TOTO-1 (1-(4,4,7,7-tetramethyl-4,7-diazaundecamethylene)-bis-4-[3-methyl-2,3dihydro (benzo1,3-oxazole)-2- methylidene]-1-(3trimethylammoniumpropyl) pyridinium tetraiodide), nukleinowy barwnik komórek martwych, o podwójnie większej masie molekularnej niż PI i wysokim poziomie wzbudzenia fluorescencyjnego (Tab.I) [10]. Próbuje się dobrać w zestawy jeszcze inne markery fluorescencyjne, np. CFDA z PI, w celu rozpoznania komórek aktywnych o zintegrowanych błonach cytoplazmatycznych i komórek martwych z uszkodzeniami w tychże błonach (rys. 3) [1, 31, 33, 34, 37].

Innym sposobem podziału populacji na komórki żywe i martwe jest oznaczenie liczby komórek za pomocą określonego markera żywotności komórek i porównanie z całkowitą liczbą komórek, oznaczoną np. 4,6-diamidino-2-fenylindolem – DAPI (4,6-diamidino-2-phenyl-indol). DAPI łączy się z nukleotidem komórki tworząc kompleks silnie fluorujący w kolorze niebieskim (rys. 1) (Tab.I) [3, 5]. Detekcja fluorescencji stanowi efekt swoistego wiązania się DAPI z nienaruszonym dsDNA. W barwieniu tym interkalatorem należy wziąć pod uwagę długi okres półtrwania kwasów nukleinowych, które pozostają spójne po śmierci komórki.

Wobec tego, uwzględniając także możliwość niespecyficznego wiązania DAPI z innymi strukturami komórkowymi, populacja wybarwiona tym markerem to suma komórek żywych, komórek martwych oraz w małym stopniu tzw. komórek widmo (*ghost cells*) [18, 30]. Duża łatwość barwienia komórek barwnikiem DAPI oraz jednoczesne zastosowanie wybranego wskaźnika żywotności komórek, np. CTC, CFDA pozwala określić udział komórek aktywnych do całkowitej liczby komórek w badanej próbce [29].

5. Hybrydyzacja DNA, RNA

Idea zastosowania sond oligonukleotydowych w hybrydyzacji z genomem komórki to perspektywa rozwoju diagnostyki mikrobiologicznej. Sonda to fragment 20–30 par zasad pojedynczej nici nukleotydowej, która komplementarnie łączy się z pojedynczą nicią docelowego regionu kwasów nukleinowych komórki. Region kwasów nukleinowych stanowi pojedyncza nić cząsteczki DNA lub RNA [12]. Szybko rozwijająca się dziedzina genomiki w kierunku sekwencjonowania rybosomalnego RNA wpłynęła na wzrost stosowania sond oligonukleotydowych rRNA w mikrobiologii [22].

W zależności od wymaganego poziomu detekcji, mogą one służyć docelowo hybrydyzacji z regionem konserwatywnym, charakterystycznym dla rodzaju lub regionem zmiennym, unikalnym dla poszczególnych gatunków [2]. Pomimo że oligonukleotydowe sondy 16S i 23S rRNA, komplementarne do zmiennych regionów, są szeroko stosowane w identyfikacji gatunkowej, to mogą być przyczyną pewnych trudności w różnicowaniu blisko spokrewnionych gatunków o dużym podobieństwie sekwencji rRNA. W takich przypadkach lepiej może się sprawdzać hybrydyzacja DNA/DNA [12]. Zaletą hybrydyzacji z cząsteczkami rRNA jest ich dużo większa ilość w komórce w porównaniu do specyficznych sekwencji DNA, co niewątpliwie wpływa na efektywność i wiarygodność zastosowanej metody [14]. Niezależnie od rodzaju sondowanej cząsteczki rRNA, detekcja szukanej hybrydy w zasadzie opiera się na dwóch kierunkach hybrydyzacji. Pierwszym jest hybrydyzacja dot-blot, drugim hybrydyzacja *in situ*, czyli we właściwym położeniu w spójnych komórkach [2]. Dot-blot, jako technika *ex situ*, polega na ekstrakcji i immobilizacji całego RNA komórek, po czym następuje jego hybrydyzacja i ocena ilości docelowego rRNA. Ponieważ zawartość komórkowego rRNA zależy od fizjologicznej aktywności komórek, bezpośrednie przełożenie jego ilości na liczbę komórek nie jest możliwe [2, 19]. Podejście typu *in situ*, zakładające hybrydyzację w morfologicznie nienaruszonych komórkach, np. fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* – FISH (*fluorescence in situ hybridization*) umożliwia bezpośrednią ocenę liczby komórek w populacji [4]. Zasada FISH polega na hybrydyzacji sekwencji rRNA komórek sondą oligonukleotydową, sprzężoną kowalencyjnie z barwnikiem fluorescencyjnym, najczęściej przy końcu 5' (rys. 1) [26]. Wśród czynników determinujących jej czułość należy wymienić: ilość docelowych cząsteczek rRNA, długość sondy, rodzaj znacznika fluorescencyjnego [19]. W dużym stopniu na czułość tej metody można wpłynąć poprzez dobór znacznika, zwracając uwagę na intensywność fluorescencji i fotostabilność. Powszechnie używane fluorochromy do znakowania sond to: fluoresceina, Texas red (pochodna sulforodaminy 101, *sulforhodamine 101 acid chloride*), rodamina, cyjanina 3 – Cy3 (*cyanine 3*) i cyjanina 5 – Cy5. Zastosowanie Cy3 zapewnia lepszą rozdzielczość i stabilność niż Cy5, Cy5 lepszą niż fluoresceina [35]. Potencjał techniki FISH w szacowaniu fizjologicznej aktywności komórek bakteryjnych zależy od szybkości dekompozycji rRNA po śmierci komórek, na którą wpływ ma poziom enzymów katalizujących rozpad RNA – RNaz oraz stopień permeabilizacji błon cytoplazmatycznych [19, 26, 30]. Krótszy półokres rozpadu, jaki cechuje rRNA w porównaniu z DNA, uzasadnia aplikację tej techniki w kierunku oceny fizjologicznej aktywności komórek. Zakres zastosowania tej techniki może być w ten sposób rozszerzony ponad precyzyjną

identyfikację gatunkową [19]. Rozwijanie techniki FISH ujawnia jej nowe możliwości, np. opracowanie procedur fluorescencyjnego znakowania mRNA czy pre-rRNA, co pozwala na oszacowanie komórek aktywnych w oparciu o ekspresję genów. Poszukiwanie nowych kierunków zastosowania sond oligonukleotydowych warunkuje selektywny rozwój metod hybrydyzacji w wykrywaniu drobnoustrojów z różnych środowisk [18].

6. Zalety i ograniczenia metod fluorescencyjnego barwienia komórek

Metody barwienia fluorescencyjnego komórek znalazły szerokie zastosowanie w badaniach mikrobiologicznych. W literaturze odnajdujemy różne kierunki aplikacyjne tych metod w badaniach środowiskowych, badaniach żywności, badaniach oporności na czynniki stresowe (Tab. II). Większość badaczy podkreśla, że zaletami metod fluorescencyjnego barwienia komórek są: detekcja pojedynczych komórek, analiza wielu parametrów w tym samym czasie, wysoka dokładność, brak konieczności izolacji DNA czy amplifikacji, szybkość wykonania oznaczenia. Mikroskopia fluorescencyjna i cytometria przepływowa są metodami określającymi liczebność komórek bezpośrednio w preparacie mikroskopowym lub w badanej próbce. Pośrednia analiza ilościowa opiera się na metodach hodowlanych, które wymagają doboru odpowiednich pożywek i warunków inkubacji. Wynik tego rodzaju analizy uzależniony jest od zdolności wzrostu komórek bakteryjnych w warunkach *in vitro*. Ograniczeniem dla metod klasycznych są zatem bakterie niedające się hodować *in vitro*, trudne lub bardzo kosztowne w hodowli. Stosowanie bezpośrednich metod barwienia fluorescencyjnego wyklucza etap hodowli bakterii. Niektóre metody barwienia fluorescencyjnego pozwoliły na ujawnienie tych, które nie dają się hodować na podłożach agarowych (pochodzą głównie ze środowisk ubogich np. woda, gleba). Pod względem przeżywania komórek w różnych środowiskach, metody fluorescencyjnego barwienia pozwalają wyróżnić grupy o różnych stanach fizjologicznych. S u n n y - R o b e r t s i w s p . [36, 37] zbadali oporność szczepów *Lactobacillus rhamnosus* na stres osmotyczny. Użyli do tego celu cytometrii przepływowej z barwieniem CFDA/PI, które to połączenie pozwoliło na wyróżnienie czterech grup komórek w populacji: komórek nieaktywnych, po lizie błon cytoplazmatycznych (CF⁻/PI⁺), komórek aktywnych z uszkodzeniami w błonach cytoplazmatycznych (CF⁺/PI⁺), komórek nieaktywnych lub po wypompowaniu barwnika z komórek i o spójnych błonach cytoplazmatycznych (CF⁻/PI⁻), komórek aktywnych i o spójnych błonach (CF⁺/PI⁻) (rys. 4). Wśród tych komórek część straciła zdolność wzrostu na podłożach, inaczej „hodowalność” (*culturability*) w środowisku

Tabela II

Przykłady zastosowań metod barwienia fluorescencyjnego komórek w badaniach mikrobiologicznych

Metoda	Badane drobnoustroje	Celowość badań	Źródło
EFM + FITC, TRITC-ConA, DAPI	Próbki biofilmu: drobnoustroje kłaczków osadu czynnego, <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 17514	Poznanie i porównanie struktury i składu EPS biofilmów poprzez barwienie różnych składników: białka, węglowodany, DNA komórek	[28]
FCM + CFDA/PI	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> VTTE-97800/ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)	Oporność pałeczek fermentacji mlekowej na stres osmotyczny	[36, 37]
FCM + CFDA, kalceina AM/PI	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Przydatność cytometrii przepływowej w ocenie przeżywalności patogenów roślin	[11]
EFM + FISH	<i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp./ <i>Enterococcus</i> , <i>Bacteroides</i> spp., <i>Clostridium histolyticum</i> , <i>Escherichia coli</i>	Przeżywalność poszczególnych drobnoustrojów w mleku dla niemowląt	[7]
EFM + FISH	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp., <i>Oenococcus</i> spp.	Identyfikacja i analiza ilościowa drobnoustrojów występujących w winie	[4]
EFM + FISH	Eubakterie	Ocena różnorodności drobnoustrojów w różnych warstwach sera	[15]
EFM + FISH	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ocena specyficzności sond oligonukleotydowych oraz wykrywanie <i>L. plantarum</i> w oliwkach	[15]
EFM + Rh123/PI	<i>Pasteurella piscicida</i>	Badania przeżywalności patogena ryb w wodzie morskiej	[23]
FCM + CFDA/PI/DiBAC ₄ (3)	<i>Bifidobacterium lactis</i> DSM 10140, <i>Bifidobacterium adolescentis</i> DSM 20083	Badania przeżywalności bakterii probiotycznych w solach żółci	[1]
FCM + CFDA/PI/TOTO-1	<i>Lactococcus</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Enterococcus</i> sp., <i>Pediococcus</i> sp.	Badania przeżywalności bakterii fermentacji mlekowej w solach żółci i niskim pH	[9]
EFM + SYTO9/PI	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> C62, <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> C75, <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> C83	Badanie rozwoju i przeżywalności paciorkowców mlekowych w mleku	[38]
EFM + DAPI/CTC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> VTT E-96726, <i>Pseudomonas fragi</i> VTT E-84200	Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej dezynfektantów wobec pałeczek <i>Pseudomonas</i> w biofilmie	[39]

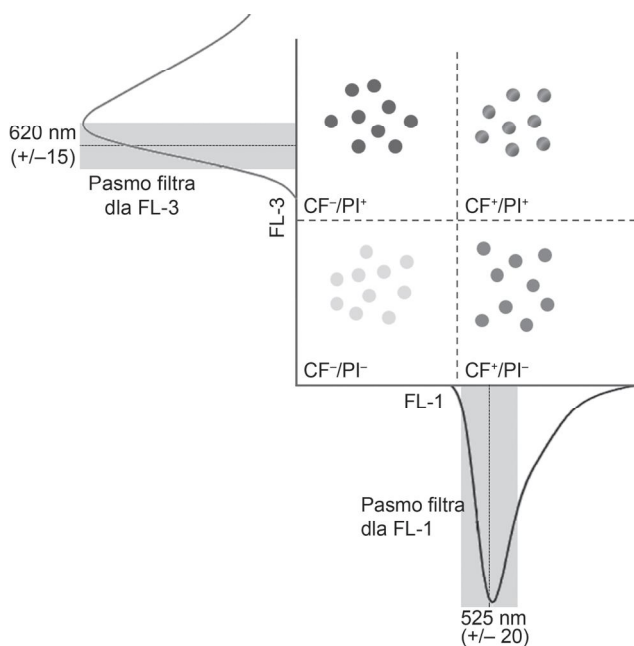
EFM – mikroskopia epifluorescencyjna
 FCM – cytometria przepływowa
 FITC – izotiocyanian fluoresceiny
 TRITC-ConA – izotiocyanian tetrametylorodaminy znakowany konkanawalina A
 DAPI – 4,6-diamidino-2-fenyloindol
 CFDA – dwuoctan karboksylfluoresceiny
 PI – jodek propidyny
 kalceina AM – ester acetylo metylowy kalceiny

FISH – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*
 Rh123 – rodamina
 DiBAC₄(3) – bis(1,3-kwas dibutylobarbiturowy) trimetylo oxonol
 TOTO-1 – propidyny tetra-1-(4,4,7,7-tetrametylo-4,7-diazandekametyleno)-bis-4-[3-metylo-2,3dihydro (benzo-1,3-oksazolo)-2-metylidem]-1-(3 trimetyloamonowy propylu) jodek
 SYTO9 – barwnik nukleinowy SYTO*9
 CTC – chlorek 5-cyjano-2,3-ditolylo tetrazoliowy

o znacznie zwiększonej osmolarności. Na tej podstawie wyróżnić można komórki w stanie VBNC (*viable but nonculturable*), czyli żywe, ale niezdolne do wzrostu na podłożach hodowlanych [26]. W zależności od drobnoustroju, czynnikiem wywołującym przechodzenie w stan VBNC może być np. nieodpowiednia kwasowość i osmolarność środowiska, obniżenie lub podwyższenie temperatury, niedobór składników pokarmowych [18]. Przechodzenie w postać VBNC może być efektem niewielkich zmian określonych warunków na mniej korzystne, wobec czego zbadanie tego zjawiska wśród bakterii w różnych warunkach środowiskowych wymaga doboru odpowiednich narzędzi. Przedstawione metody barwienia fluorescencyjnego komórek wpasowują się

w ten rodzaj badań, gdyż przy ich pomocy można określić obecność i udział komórek niehodowlanych i odróżnić je od komórek martwych.

Porównując fluorescencyjne metody analizy, mikroskopową i cytometryczną, analizy mikroskopowe umożliwiają określenie ograniczonej liczby komórek, a także są bardziej czasochłonne. Pod tym względem badania cytometryczne wykazują pewną przewagę nad badaniami z użyciem mikroskopii. Z uwagi na aspekt pełnej automatyzacji i w rezultacie szybkość otrzymania wyników, cytometria przepływowa pozwala na analizę większej liczby komórek w krótszym czasie. Możliwy jest podział analizowanych populacji na subpopulacje, co sprawia, że ten instrument jest bardziej przydatny



Rys. 4. FL-1/FL-3 plot (na podstawie założeń przedstawionych w pracy Sunny-Roberts i wsp. [35])

w badaniach heterogennej populacji bakterii. Metody fluorescencyjnego barwienia komórek stosowane są powszechnie w analizach prób środowiskowych, np. wody morskiej, których łatwość przygotowania do barwienia fluorescencyjnego wpływa na jego skuteczność i wiarygodność otrzymanych wyników [18]. Należy zwrócić szczególną uwagę na etap wyodrębniania komórek z bardziej złożonych matryc, np. żywności, który wymaga efektywności jak i minimalizacji stopnia uszkodzenia komórek [19]. Odpowiednie przygotowanie próbek, w niektórych przypadkach uwzględnienie etapu utrwalania próbek, gwarantuje otrzymanie cennego narzędzia oceny żywotności różnych drobnoustrojów. Liczne metody barwienia mają coraz większe znaczenie w przemyśle rolno-spożywczym. Metody barwienia mogą być stosowane do kontroli procesów fermentacyjnych, detekcji zanieczyszczeń żywności, oceny skuteczności środków dezynfekcyjnych i wpływu antybiotyków na fizjologię komórek bakterii pochodzących z żywności. Jednak przy ogromnym zróżnicowaniu składu chemicznego środowisk, możliwość interakcji między barwnym znacznikiem a składnikami matrycy może stać się ograniczeniem dla zastosowania omawianych metod. Ma u k o n e n i i wsp. [24] zgłosili trudności z barwieniem komórek bakteryjnych w niemlecznym napoju probiotycznym z użyciem barwnika ChemChrome. Wniosek odnośnie przyczyny takich trudności był związany z rodzajem matrycy, w jakiej znajdowały się komórki, gdyż nie obserwowano już tego problemu po dodaniu tego samego szczepu do innego produktu. Ponieważ ChemChrome, jako pochodna fluoresceiny, może sprawiać trudności z barwieniem komórek ze względu na jego wypompowywanie z wnętrza komórki,

można przypuszczać, że środowisko tego określonego produktu mogło wzmacniać ten proces. Zauważyć warto, że analiza mikrobiologiczna z użyciem barwników ChemChrome oraz zestawu BacLight® pozostałych siedmiu produktów probiotycznych okazała się skuteczna i wiarygodna. Oznaczono również z jej pomocą udział komórek VBNC i wywnioskowano, że przechodzenie w ten stan jest zależne od rodzaju produktu, w jakim znajdują się komórki szczepów probiotycznych. Zaobserwowano, że produkty zawierające związki fenolowe znacznie wpływają na wywoływanie tego stanu wśród badanych szczepów. Na tej podstawie można stwierdzić, że metody fluorescencyjnego barwienia komórek to przydatne narzędzie w badaniach stanu fizjologicznego bakterii. Odpowiednie dobranie barwników oraz opracowanie procedury barwienia dostarczyć może interesujących wyników badań i rozszerzać zakres ich stosowania o nowe kierunki.

7. Podsumowanie

Pomimo, że wyniki uzyskane z wystandaryzowanych metod są często wystarczające, to nie można pominąć faktu, że są nieautomatyzowane i czas oczekiwania na wynik jest długi. W powyższej pracy dokonano przeglądu metod fluorescencyjnego barwienia komórek bakterii, które stanowią atrakcyjną alternatywę dla metod klasycznych, nie tylko z uwagi na aspekt automatyzacji i szybkości wykonania. Metody te opierają się na zastosowaniu różnych markerów stanu fizjologicznego bakterii, w istocie pozwalających na zbadanie większości parametrów aktywności i spójności struktur komórkowych. Przedstawiono najbardziej rozpowszechnione barwniki fluorescencyjne, które można nazwać markerami żywotności komórek, wynikające z ich stosowania korzyści, a także ograniczenia. Wspólnym odniesieniem do wszystkich markerów jest fluorescencja poszukiwanego elementu wewnątrzkomórkowego, a element, jaki ma zostać wykryty determinuje wybór tego właściwego. Zatem odpowiedni dobór znacznika może dostarczyć precyzyjnych danych na temat fizjologii mikroflory różnych środowisk. Metody te są wobec tego odpowiedzią na rosnące wymagania z zakresu analityki mikrobiologicznej.

Piśmiennictwo

1. 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.* **68**, 5209–5216 (2002)
2. Ben Amor K., Vaughan E.E., de Vos W.M.: Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. *J. Nutr.* **137**, 741S–747S (2007)

3. Biggerstaff J., Le Puil M., Weidow B., Prater J., Glass K., Radosevich M., White D.: New methodology for viability testing in environmental samples. *Mol. Cell. Probes*, **20**, 141–146 (2006)
4. Blasco L., Ferrer S., Pardo I.: Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for *in situ* identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **225**, 115–123 (2003)
5. Breeuwand P., Abee T.: Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *Int. J. Food Microbiol.* **55**, 193–200 (2000)
6. Brehm-Stecher B.F., Johnson E.A.: Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications. *Microbiol. Molecular Biol. Rev.* **68**, 538–559 (2004)
7. Brück W.M., Graverholt G., Gibson G.R.: Use of batch culture and a two-stage continuous culture system to study the effect of supplemental K-lactalbumin and glycomacropptide on mixed populations of human gut bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **41**, 231–237 (2002)
8. Bunthof C., Abee T.: Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2934–2942 (2002)
9. Bunthof C., Bloemen K., Breeuwer P., Rombouts F., Abee T.: Flow cytometric assessment of viability of Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2326–2335 (2001)
10. Bunthof C., Braak S., Breeuwer P., Rombouts F., Abee T.: Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3681–3689 (1999)
11. Chitarra L.G., Breeuwer P., Abee T., Bulk R.W.: The use of fluorescent probes to assess viability of the plant pathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by flow cytometry. *Fitopatol. Bras.* **31**, 349–356 (2006)
12. Coeuret V., Dubernet S., Bernardeau M., Gueguen M., Vernoux J.P.: Isolation, characterization and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait*, **83**, 269–306 (2003)
13. Czajkowska D., Witkowska-Gwiazdowska A.: Postęp w analizach mikrobiologicznych żywności. *Przem. Spoż.* **3**, 16–18 (1997)
14. De Vries, M.C., Vaughan, E.E., Kleerebezem, M., de Vos, W.M.: Optimising single cell activity assessment of *Lactobacillus plantarum* by fluorescent *in situ* hybridisation as affected by growth. *J. Microbiol. Met.* **59**, 109–115 (2004)
15. Ercolini D., Hill P.J., Dodd C.E.R.: Development of a fluorescence *in situ* hybridization method for cheese using a 16S rRNA probe. *J. Microbiol. Met.* **52**, 267–271 (2003)
16. Ercolini D., Villani F., Aponte M., Mauriello G.: Fluorescence *in situ* hybridization detection of *Lactobacillus plantarum* group on olives to be used in natural fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **112**, 291–296 (2006)
17. Hiraoka Y., Kimbara K.: Rapid assessment of the physiological status of the polychlorinated biphenyl degrader *Comamonas testosteroni* TK102 by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2031–2035 (2002)
18. Joux F., Lebaron P.: Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and Infection*, **2**, 1523–1535 (2000)
19. Lahtinen S., Gueimonde M., Ouwehand A., Reinikainen J., Salminen S.: Comparison of methods to enumerate probiotic bifidobacteria in a fermented food product. *Food Microbiol.* **23**, 571–577 (2006)
20. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.: *Molecular Cell Biology*. 4th edition. W.H. Freeman, New York, USA, 2000
21. 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.* **48**, 445–451 (2010)
22. Mackiewicz P., Zakrzewska-Czerwińska J., Cebrat S.: Genomika – dziedzina wiedzy XXI wieku. *Biotechnologia*, **3**, 7–21 (2005)
23. Magariños B., Romalde J.L., Cid A., Toranzo A.E.: Viability of starved *Pasteurella piscicida* in seawater monitored by flow cytometry and the effect of antibiotics on its resuscitation. *Let. Appl. Microbiol.* **24**, 122–126 (1997)
24. Maukonen J., Alakomi H.-L., Nohynek L., Hallamaa K., Lepämäki S., Mättö J., Saarela M.: Suitability of the fluorescent techniques for the enumeration of probiotic bacteria in commercial non-dairy drinks and in pharmaceutical products. *Food Res. Int.* **39**, 22–32 (2006)
25. Meyer P., Dworkin J.: Applications of fluorescence microscopy to single bacterial cells. *Res. Microbiol.* **158**, 187–194 (2007)
26. Mikš M., Warmińska-Radyko I.: Wybrane techniki fluorescencyjne w badaniach stanu fizjologicznego i przeżywalności komórek bakteryjnych w żywności. *Medycyna Wet.* **64**, 623–628 (2008)
27. Molenaar D., Bolhuis H., Abee T., Poolman B., Konings W.N.: The efflux of a fluorescent probe is catalyzed by an ATP-driven extrusion system in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **174**, 3118–3124 (1992)
28. Nosyk O., Haseborg E., Metzger U., Frimmel F.H.: A standardized pre-treatment method of biofilm flocs for fluorescence microscopic characterization. *J. Microbiol. Met.* **75**, 449–456 (2008)
29. Oliver J.D.: The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* **43**, 93–100 (2005)
30. Olszewska M., Łaniewska-Trokenheim Ł.: Badania stanu „niehodowalności” komórek bakterii fermentacji mlekowej w niesprzyjających warunkach rozwoju. *Medycyna Wet.* **67**, 105–109 (2011)
31. 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.* **111**, 197–205 (2006)
32. Rahman M.: *Introduction to Flow Cytometry*. Serotec Ltd, Oxford, UK, 2006
33. 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*, **55**, 35–43 (2007)
34. Rault A., Bouix M., Béal C.: Fermentation pH influences the physiological-state dynamics of *Lactobacillus bulgaricus* CFL1 during pH-controlled culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 4374–4381 (2009)
35. Skowrońska A., Zmysłowska I.: Współczesne metody identyfikacji bakterii stosowane w ekologii mikroorganizmów wodnych – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH). *Post. Mikrobiol.* **45**, 183–193 (2006)
36. 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.* **37**, 184–200 (2007)
37. Sunny-Roberts E.O., Knorr D.: Evaluation of the response of *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 to sucrose-induced osmotic stress. *Food Microbiol.* **25**, 183–189 (2008)
38. 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*, **65**, 32–35 (2010)
39. Wirtanen G., Salo S., Helander I.M., Mattila-Sandholm T.: Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. *Colloids Surf. B* **20**, 37–50 (2001)
40. Zaręba T.: Rozwój diagnostyki mikrobiologicznej. *Laboratorium*, **7–8**, 28–32 (2011)