

## Werkgroep Fytobacteriologie

Verslag van de bijeenkomst op 3 september 2015

Jan van der Wolf &  
Leo van Overbeek

Wageningen UR

### Dead or alive

Het thema van deze werkgroepbijeenkomst 'dead or alive' was al tijdens een eerder werkgroep-overleg gekozen. Het kunnen onderscheiden van dode en levende bacteriën is belangrijk, zowel voor pathogene bacteriën als voor 'beneficials', maar het onderscheid is vaak moeilijk te maken.

Clint van Melis van de WU-leerstoelgroep Levensmiddelenmicrobiologie gaf op uitnodiging een overzicht over het nut van *flow cytometrie* en 'cell sorting' voor levend/dood-bepalingen voor bacteriën die een rol spelen in voedselveiligheid en scheiding van fysiologisch verschillende cel fracties. Door de bacteriën te merken met specifieke fluorescerende kleurstoffen kunnen dode van levende cellen onderscheiden worden. Als voorbeeld noemde Clint *Bacillus cereus* die als voedselpathogeen in diverse producten kan voorkomen. Milde conservering, bijvoorbeeld door pH-verlaging leidt tot stress in de endosporen van het pathogeen, waardoor de uniformiteit van kieming verloren gaat. Verbeterde methoden om onderscheid te kunnen maken tussen levende, gestreste en dode sporen zouden uitkomst bieden om effecten van milde conservering op uitgroei van voedselpathogenen te kunnen voorspellen.

Bart Geraats van Bayer Crop Science deed onderzoek naar het onderscheid tussen actieve en niet-actieve vormen van het *Cucumber Green Mottle Mosaic Virus* (CGMMV) in komkommerzaden na hittebehandeling op basis van virus-RNA-sequenties die hitte-gevoelig zijn. Het onderzoek sloot naadloos aan bij onderzoek naar RNA-afbraak bij bacteriën: onderscheid maken van enkele actieve deeltjes tegen een zeer grote achtergrond van inactieve vormen bleek ingewikkeld. Roland Willmann van Syngenta liet zien dat dode en levende vormen van *Acidovorax citruli* in komkommerzad onderscheiden kunnen worden met behulp van real-time-PCR na toepassing van combinaties van een propidium monoazide (PMA) of een Dnase I-behandeling met verrijking. Behandelingen van de monsters met PMA of Dnase I resulteerde in eliminatie van het DNA in dode cellen, waardoor alleen levende cellen werden aangetoond.

Theo van der Lee en Jan van der Wolf, beiden van Wageningen UR pasten PMA (in combinatie met



Taqman) en op RNA gebaseerde technieken toe om onderscheid te maken tussen dode en levende cellen van *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* en *Dickeya* en *Pectobacterium*-soorten. Verbeterde technieken leverde in alle gevallen hogere  $\Delta Ct$  waarden op; het verschil in Ct-waarden tussen dode en levende cellen in de TaqMan assays.

### Tussen leven en dood

Uit discussies werd duidelijk dat onderscheid tussen dode en levende vormen van pathogenen met name belangrijk is voor de zaadindustrie waar zaden worden behandeld met warm water. Validatie van nieuwe methoden is gewenst en ook zal er aandacht moeten komen voor 'tussenvormen' tussen levend en dood zoals vaak wordt aangetoond na levend/ dood kleuring. Veel is nog onduidelijk over deze tussenvormen. Zijn deze cellen stervende, maar bezitten ze nog een mogelijkheid om terug te keren naar virulente vormen? Het antwoord op deze vraag is niet eenvoudig te geven en zal afhangen van de bacteriesoort en omstandigheid waarin de bacterie zich bevindt. Het geeft aan dat het onderwerp 'levend/ dood' nog belangrijk genoeg is om er aandacht aan te blijven besteden.