

УДК :579.61: 616 – 078

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ БАКТЕРИЙ С АКЦЕНТОМ НА ФЕНОМЕНЕ НЕКУЛЬТУРАБЕЛЬНОСТИ

Юдин И.П.

Институт микробиологии и иммунологии
им. И.И. Мечникова АМН Украины

В медицинской и санитарной микробиологии одной из основных стратегий является получение достоверной информации о наличии патогенных бактерий в исследуемом материале и последующая оценка возможной угрозы здоровью человека и общества. В эру классической микробиологии культуральные методы доказали свою эффективность, что проявилось, в частности, возможностью контролировать инфекции с высоким эпидемическим потенциалом. Тем не менее, точность этих методов недостаточна для индикации бактериальных патогенов в современном их понимании. Появление новых технологий привлекает внимание к роли окружающей среды в эволюции инфекционных болезней, в частности, к влиянию природных и антропогенных факторов на их эпидемиологию. Научный интерес к экологической микробиологии вызывается также проблемой растущей устойчивости к антибиотикам среди патогенов, появлением новых инфекционных болезней, потенциальной угрозой биологического терроризма, а также проблемой эпидемиологической безопасности, связанной с возможностью выхода генетически измененных микроорганизмов в биосферу.

Современное понимание патогенности микроорганизмов. Уже на начальных этапах развития микробиологии и учения об инфекционных болезнях возникла практическая необходимость разработки критериев, позволяющих дифференцировать их как нозологические формы. Впервые такие критерии, впоследствии ставшие известными как "триада Генле - Коха", были сформулированы 24 марта 1882 г. в докладе "Uber Tuberkulose" на заседании Берлинского физиологического общества. Кох утверждал, что для доказательства неслучайного (причинного) характера связи микроорганизма и болезни необходимо показать, что: (1) микроорганизм обнаруживается в каждом отдельном случае конкретной болезни при соответствующих патологических изменениях и клинической картине; (2) микроорганизм не выявляется при других болезнях; (3) при введении здоровому человеку или животному микроорганизма, выделенного от больного и полученного в чистой культуре, развивается типичная картина болезни.

С современных позиций вышесказанное лишь в определенной мере относится к случаям классических (манифестных) инфекций. Это противоречит, по крайней мере, в пунктах 2 и 3 а) феномену бактерионосительства, б) патологическим состояниям макроорганизма, причиной которых являются микробы-комменсалы, с) фактам существования болезней, счи-

тавшихся ранее неинфекционными. Например, язва желудка, вызывается *Helicobacter pylori*, распространенность которого в человеческой популяции до 40% [1], но типичная картина заболевания развивается лишь у некоторой части носителей. В целом, концепция патогенности того или иного микроорганизма теперь все более связывается со степенью повреждения, которую он наносит макроорганизму [2].

Традиционная систематика микроорганизмов была пересмотрена благодаря развившимся молекулярно-генетическим технологиям и последовавшей за этим появлением филогенетической классификации [3]. Полное секвенирование геномов микроорганизмов предоставляет важную информацию для объяснения природы патогенности. Хотя патогенность, в общем, редкий признак (если рассматривать количество известных в той или иной степени вирулентных микроорганизмов по сравнению со всеми существующими видами), имеется достаточное число патогенных *Bacteria* и *Eucarya*. Есть также сообщения о причастности *Archaea* к патогенезу периодонтальных инфекций [4]. В связи с тем, что метаногенные *Archaea* со-существуют и близко взаимодействуют с анаэробными бактериями в некоторых эпитопах организма (например, толстой кишке или зубном налете), они могут участвовать в смешанных анаэробных инфекциях [5]. Секвенирование и анализ геномных последовательностей продолжается, и в будущем может выясниться, что существует множество фундаментальных взаимосвязей между комменсалами и патогенами. В частности, при изучении патогенности на метагеномном уровне выясняется, что в инфекционном процессе принимает участие широкая ассоциация бактериальных видов, большинство из которых не восстанавливаются в культуре [6].

Некультурабельное состояние и некультурабельные микроорганизмы. Для контроля современных бактериальных инфекций, наряду с установлением признаков вирулентности, становится все более актуальным точный количественный анализ жизнеспособных бактерий в исследуемом материале. Достоверная оценка жизнеспособности микроорганизмов способом культивирования сталкивается со многими известными проблемами, в том числе и такими существенными, как отсутствие селективных условий для выделения, предел обнаружения, невозможность разделить бактериальные скопления и биопленки. Культивирование бактерий *in vitro* - это попытка моделирования условий их существования в многообразных природных биотопах. В силу того, что практически невозможно точно воссоздать эти условия, рост бактерий в искусственной среде, в общем, показатель, сильно зависимый от человеческого фактора.

Значительный вклад в возросший интерес к проблеме определения жизнеспособности патогенных бактерий внес феномен, известный давно как "*great plate count anomaly*" (большая аномалия подсчета чашечным методом) [7], суть которого в том, что большая часть бактериальных клеток в пробах из окружающей среды не дает рост в лабораторных условиях. Например, только 0,01-0,1% бактерий культурабельны

в образцах морской воды при использовании стандартных методов [8].

С развитием молекулярных методов и геномики стало ясно, что отчасти вышеуказанное явление объясняется наличием в природных экосистемах огромного генетического микробного разнообразия, несистематизированного и нераспознанного методами *ex situ* [9]. Около 10^7 видов (!) бактерий содержит один грамм почвы, из которых только от 1 до 10 %, как полагают, являются культивируемыми [10]. Согласно современным представлениям, большая часть биологического видового разнообразия прокариот (свыше 99%) не систематизирована, в силу нашей неспособности их культивировать *in vitro* [11]. Теперь это общепризнано и экспериментально доказано, что в каждом случае культивирования разное, иногда довольно значительное, число бактерий будет находиться в экологически обусловленном *жизнеспособном, но некультурабельном состоянии* (ЖНС) [9, 12, 13, 14]. И, хотя большинство работ посвящено изучению ЖНС копитроффов, не требовательных к среде бактерий, их анализ указывает на то, что в основе некультурабельности лежат те же закономерности (история роста, экология и стресс), что и в случае нераспознанных микроорганизмов. В смысловом контексте термина – это даже не биологическое свойство микроорганизма, а, скорее, субъективная оценка исследователем объекта исследования. С другой стороны – это вполне объективная «оценка» микроорганизмами наших возможностей [13].

Со времени появления в научной литературе [15] и до настоящего времени терминология "*viable but nonculturable*" (VBNC) – "*жизнеспособный, но некультурабельный*" (ЖН) приобрела некоторое количество смысловых интерпретаций. Например, в русскоязычной литературе давно распространен неточный перевод "*некультивируемый*", что однозначно подразумевает полный отказ роста в культуре, а выпавшее для краткости "*жизнеспособный*" придает терминологии некоторый мистический смысл. Однако нельзя отрицать, что природа способна культивировать эти микроорганизмы. Здесь и далее используется

термин "*некультурабельный*", подразумевая "*жизнеспособный*" потенциально, но при других условиях.

Наличие у бактерий ЖНС [12, 16] было обосновано фактом обнаружения в пробах из окружающей среды большого числа микробных клеток, демонстрирующих дыхательную активность [17] и реагирующих на субстрат [8], но не проявляющих видимого роста в культуре. Позже была определена концепция ЖНС, как *состояния бактериальной клетки, которая проявляет метаболическую активность (определяемую прямыми микроскопическими методами), но не способна подвергаться непрерывному клеточному делению, требующемуся для определения роста в среде, обычно поддерживающей рост такой клетки* [18]. Для медицинской и санитарной микробиологии важно то, что отказ роста происходит при работе стандартизованными методами. Следовательно, при лабораторных исследованиях имеется опасность недооценки количества жизнеспособных микроорганизмов и получения ложноотрицательных результатов.

Факторы индукции ЖНС. На сегодняшний день накоплено большое количество экспериментальных данных о факторах, приводящих бактерии к ЖНС. Разнообразие этих факторов – очевидное доказательство того, что некультурабельность как явление – скорее правило, чем исключение. В большинстве экспериментальных работ для получения некультурабельных бактериальных клеток используется сочетание голодания и сниженной температуры инкубации водной суспензии бактерий, выращенных при стандартных для данного микроорганизма условиях. Под "стандартными" следует понимать условия, оптимальные для культивирования данного микроорганизма и традиционно используемые в большинстве мировых лабораторий. Эта модель получения ЖНС считается классической, начиная с работ Colwell с коллегами [15].

Изменение условий окружающей среды вызывает у бактерий, как биологических объектов, состояние стресса – ответ на эти изменения [19]. Исследования по индукции ЖНС широко проводятся с начала 80-х на различных микроорганизмах (табл. 1).

Таблица 1. Факторы, инициирующие переход бактерий в жизнеспособное некультурабельное состояние

Факторы индукции ЖНС	Микроорганизмы	Источник информации
1	2	3
Голодание (олиготрофия) + температура (понижение)	<i>Campylobacter jejuni</i> <i>Helicobacter pylori</i> <i>Legionella pneumophila</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Escherichia coli</i> , <i>Vibrio cholerae</i> <i>Vibrio vulnificus</i> <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Vibrio cholerae</i>	Rollins [20] Nilsson [21] Hussong [22] Islam [23] Xu [15] Oliver [24] Chan [25] Соколенко [26]
Температура (пастеризация)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas putida</i>	Gunasekera [27]
Излучение: световое ультрафиолетовое	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Escherichia coli</i>	Besnard [28] Pommepuy [29] Villarino [30]
Высушивание	<i>Yersinia pestis</i> <i>Serratia marcescens</i>	Rose [31] Heidelberg [32]

1	2	3
Гидростатическое давление	<i>Listeria monocytogenes</i>	Ritz [33]
pH	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Kim [34]
Осмотический стресс	<i>Escherichia coli</i> <i>Campylobacter jejuni</i>	Makino [35] Hald [36]
Аэрация	<i>Campylobacter jejuni</i>	Rollins [20]
Медь	<i>Escherichia coli</i>	Grey [37]
Хлор	<i>Escherichia coli</i>	Rockabrand [38] Dukan [39]

Факторы, способные вызвать стресс у бактерий и повлиять на бактериальную культурабельность так же многочисленны, как многообразны экологические условия, с которыми сталкивается бактериальная клетка в природе. Стрессовые факторы окружающей среды, влияющие на культурабельность, общепризнано считаются индукторами ЖНС бактерий.

Температура, как мера интенсивности энергии любой системы, оказывает доминирующее действие на все биологические процессы. Достаточно сказать, что эндотермные животные получили эволюционное преимущество в виде постоянной температуры тела, освободив тем самым значительную часть генома для приобретения других полезных функций, например, развития нервной системы. Но у эктотермов, к которым относятся прокариоты, для поддержания необходимого метаболизма при различных температурных условиях существуют механизмы включения-выключения дополнительных ферментов [40]. Бактерии, при выведении из теплокровного организма, в котором температура поддерживается в пределах 37-39 °С, попадают в окружающую среду (почву, воду), где температура значительно ниже. Перепад ее для бактерий может составлять до 30-35 °С. Ферменты, представленные только одной формой, не смогли бы осуществлять катализ при таких изменениях диапазона температур, и жизнь не смогла бы продолжаться. Во избежание этого природа дала возможность эктотермным организмам синтезировать несколько форм ферментов, сходных по функции, но отличающихся молекулярной массой и приспособленностью к различным температурам. Синтез этих форм может кодироваться разными генными локусами, это так называемые изоферменты. Изоферменты, которые способны работать при различных температурах сред обитания, получили название «холодовые» и «тепловые» [41].

Вышеописанный механизм индукции ЖНС исследован нами у *Escherichia coli* [42]. Результаты тестирования основных биологических свойств некультурабельной *E. coli* демонстрировали изменения фенотипа испытуемого штамма по сравнению с его исходным фенотипом. Высеваемость при 37 °С, выражаемая в колониеобразующих единицах (КОЕ), после 2 мес. инкубации в изолированных микрокосмах снижается, а после 9 мес. вся испытуемая популяция становится некультурабельной при использовании стандартной процедуры посева. Однако, часть популяции бактерий до 16 месяцев продолжала фор-

мировать колонии при более низких температурах (от 15 до 23 °С). Восстановление исходных свойств испытуемого штамма происходило в течение 5-6 пересевов на питательный агар с инкубацией при комнатной температуре.

Выполненное исследование доказывает возможность длительного пребывания бактерий *E. coli* в некультурабельном состоянии (НС) с сохранением жизнеспособности. Изменения морфологии и биохимических показателей свидетельствует об обратимых перестройках в метаболических процессах, доминирующими сигналами к которым явились голодание и изменение температуры. Один из важных выводов, которые можно сделать, учитывая вышесказанное – это то, что пробы, взятые из окружающей среды, могут содержать бактерии в ЖНС, в том числе и патогенные.

Используя методы посева, подсчет общего числа микробных клеток и прямой подсчет жизнеспособных бактерий, Oliver с соавт. [24] исследовали переход клеток *Vibrio vulnificus*, помещенных в естественные эстуариевые (устья рек) воды, в течение зимних и летних месяцев. Клетки, инокулированные в мембранные диффузионные камеры, вступали в ЖНС состояние в январе и феврале, когда температура воды была низкой (в среднем <15 °С). Напротив, когда клетки в состоянии ЖНС были помещены в те же условия в более теплое время с августа до ноября (что составляет среднюю водную температуру приблизительно 21 °С), бактерии подвергались быстрой (обычно, в пределах 24 ч) реверсии в культурабельное состояние. Эти результаты были независимы от того, были ли клетки в логарифмической или стационарной фазе и обладали ли они капсулой или нет. Неспособность выделить *V. vulnificus* из холодной воды эстуариев объясняется вступлением клеток в ЖНС, а восстановление бактерий происходит из-за повышения температуры.

Механизм индукции ЖНС в природных популяциях патогенных бактерий, зависящий от климата, был недавно показан на примере *V. cholerae* [43]. Согласно сообщениям из различных географических областей вспышки холеры происходят, главным образом, в течение летних месяцев. Штаммы *V. cholerae* были выделены из проб воды, собранных на реках и эстуариях в течение эпидемических периодов. Однако, микроорганизм не выделяется в культуре из окружающей среды в течение межэпидемических периодов, хотя, *V. cholerae* и обнаруживается в пробах при использовании иммунофлюоресцентных методов и ПЦР. Вероятно, что в ответ на изменение условий ок-

ружающей среды (повышение температуры и последующий сдвиг в метаболизме) бактериальная популяция спорадически трансформируется, становясь культурабельной и патогенной.

Ассоциация *V. cholerae* с зоопланктоном, как оказалось, - ключевой фактор к разгадке природы эпидемий холеры. *V. cholerae* постоянно обнаруживается в зоопланктоне в эндемичных областях. Океанские течения перемещают планктон, и *V. cholerae* может транспортироваться в ассоциации с планктоном в олиготрофной морской воде, пребывая в ЖНС (или оставаясь культурабельным), на протяжении многих месяцев на тысячи километров, в зависимости от течений и времен года. При помощи того же механизма патоген может сохраняться в пределах данной географии продолжительное время. Этим объясняется новое появление холеры после многих лет кажущегося отсутствия. Является ли *V. cholerae* компонентом комменсальной флоры, или симбионтом определенного вида планктона – выяснено не было [44]. Подобным образом зоопланктон может служить резервуаром для энтерококков, персистирующих в озерной и морской воде в ЖНС [45].

При всем желании упорядочить и систематизировать причинные факторы, вызывающие этот важный биологический феномен, мы имеем ситуацию, когда существует несколько одновременно действующих неоднородных факторов. В случае ЖНС бактериальных патогенов очевидно, что *in vitro* к этому состоянию приводят такие факторы, которые, являясь по определению абиотическими, все же могут быть произведены биологическими объектами. Это, например, pH, рО₂, осмотическая нагрузка, и даже присутствие природных антисептиков, таких, как Н₂О₂, или хлора (см. выше).

Механизмы бактерицидного действия хлорноватистой кислоты, использующейся активированными нейтрофилами как один из существенных компонентов внутриклеточного "окислительного взрыва" давно известны [46, 47]. Если предположить, что эволюционно такие природные дезинфектанты "применяются", по крайней мере, со времени появления у *Eucarya* клеточного иммунитета, то и механизмы защиты от их повреждающего действия у бактерий также достаточно древние.

Дезинфекция хлорактивными средствами остается важным звеном в системе противоэпидемических мероприятий в силу эффективности, доступности и минимального влияния на биосферу. С появлением новых подходов в микробиологии (концепция некультурабельности) научная ценность изучения действия данных биоцидов на патогенные бактерии возрастает.

К примеру, после подвергания *Escherichia coli* гипохлористой кислоте (НОС1) формируется три субпопуляции бактерий: а) культурабельные, которые способны формировать колонии на твердой среде; б) жизнеспособные, но некультурабельные, не формирующие колонии, но все еще показывающие дыхательную, или метаболическую активность, поддающуюся обнаружению прямыми методами жизне-

способности (обнаружение дегидрогеназ тетразолиевыми методами); и с) мертвые бактерии [39].

Иммунофлюоресцентный метод использовался для исследования бактериального роста в процессе дезинфекции сточных вод [38]. Количественные уровни трех консервативных цитозольных белков (DnaK, Dps, и Fis) определяли, используя конъюгированные с флюорохромом специфические антитела к энтеробактериям. Результаты показали, что хлорирование было не в состоянии уничтожить бактерии группы кишечной палочки, а скорее индуцировало питательное голодание и обратимое некультурабельное состояние. Авторы предположили, что стандартные методы анализа, использующие обнаружение только культурабельных клеток энтеробактерий, вероятно, недооценивают фекальное загрязнение сточных вод.

Методы исследования ЖНС бактерий. В отличие от культуральных методов, где информативно достоверен лишь популяционный уровень, методология исследования ЖНС использует анализ на уровне отдельных клеток. Цель этих исследований – показать гетерогенность бактериальной популяции по признаку жизнеспособности ее отдельных особей.

Концепция жизнеспособности микроорганизмов – давно дискутируемый вопрос, так как нет единого метода, который анализировал бы все физиологические характеристики отдельной бактерии в определенный момент ее жизни. И, хотя методы определения количества бактерий посевом используются как стандартные для вышеупомянутой цели, это лишь показывает, сколько клеток могло реплицироваться при определенных ростовых условиях в определенный момент времени. На самом деле, это позволяет определять жизнеспособность ретроспективно, ведь нет явного доказательства, что неразделившаяся бактериальная клетка – признак того, что эта клетка была мертва во время осуществления выборки [48]. Способность к размножению могла быть подавлена или блокирована в некоторых типах клеток, или ограничена некоторыми условиями окружающей среды. Существенные неудобства стандартных методов посева - часто длительное время инкубации для формирования поддающихся учету колоний, недооценка количества жизнеспособных клеток, вызванная тем, что бактерии *in vivo* существуют, как правило, в виде биопленок, формируют цепи или агрегаты из клеток. Кроме того, как подчеркивалось выше, бактериальные клетки, подвергнутые стрессу, могут войти в НС, все еще сохраняя жизнеспособность. В силу перечисленных причин, альтернативой методам культивирования является прямое количественное определение жизнеспособности отдельных бактериальных клеток. Для этого используются высокочувствительные методы флюоресценции.

Флюоресцентные методы (в настоящее время - в комбинации с проточной цитометрией) давно использовались для оценки жизнеспособности микроорганизмов и являются мощным инструментом для анализа микробных популяций на уровне отдельных клеток [49, 50]. Для визуализации специфических (целевых) биомолекул, являющимися маркерами клеточной жизнеспособности, используется свойство некоторых

гетероциклических углеводов испускать фотоны при переходе из возбужденного состояния, которое достигается облучением исследуемого материала источником света в коротковолновой области спектра. Полученная флуоресцирующая молекула носит название флуорофор. Свет флуоресценции испускается на более низком энергетическом уровне (с большей длиной волны), чем свет возбуждения. Это различие в длинах волн возбуждения и эмиссии получило название "сдвиг Стокса" [49]. Величина сдвига Стокса важна для обеспечения спектрального разделения сигналов от более чем одного флуорофора в пробе, или, когда клетки имеют сильный аутофлуоресцентный фон [49, 51]. Для получения флуорофора со специфическими свойствами (его спектры возбуждения и эмиссии, молярный коэффициент меры поглощения света, квантовый выход, светостойкость) в качестве так называемых флуоресцентных красок используются флуорохромы. Флуорохромы – специфические красители, связывающиеся с различными компонентами бактериальной клетки (целевыми биомолекулами). Это дает отчетливое свечение определенного цвета в ультрафиолетовой области спектра. В современной литературе термин флуорохром все чаще приравнивается к флуорофору [51], что теоретически неверно, но, по сути, практически большая часть коммерческих красителей – уже сформированные флуорофоры.

Маркерами жизнеспособности в бактериальной клетке могут быть ее структурные и функциональные элементы, такие, как мембрана и мембранная проходимость, протеины (ферменты) и их активность, рибосомы, нуклеоид и их функциональность.

Мембранная целостность – наиболее популярный у цитобиологов маркер жизнеспособности, который имеет не меньшую ценность также и в микробиологии [49, 52, 53]. В этом случае используется свойство некоторых флуорохромов проникать выборочно только через поврежденные мембраны клеток, окрашивая внутриклеточные структуры в соответствующий цвет. Проникновение нуклеоидных красителей (например, йодид пропидия, или бромид этидия) внутрь клетки происходит только при поврежденной клеточной мембране, при этом нуклеиновые кислоты дают эмиссию флуоресценции красного цвета. Это свойство используется для выявления жизнеспособных бактерий в гетерогенных популяциях, для чего применяется дополнительная окраска красителем Syto. Именно на этой основе работает LIVE/DEAD (живой/мертвый) краситель BacLight (BL) (каталог № L-7012; Molecular Probes Inc.) – смесь красок, отличающая жизнеспособные бактериальные клетки от мертвых. Краситель содержит два окрашивающих нуклеоид компонента. Зеленый низкомолекулярный флуорохром (Syto 9) может проникать через неповрежденные плазматические мембраны, в то время как высокомолекулярный красный флуорохром (йодид пропидия) проникает только через поврежденные мембраны. Клетки бактерий, проинкубированные в присутствии этих красок одновременно, будут флуоресцировать зеленым, (жизнеспособные) или крас-

ным (мертвые), в зависимости от их жизнеспособности [54].

Изменения морфологии и мембранной целостности клеток *Campylobacter coli* в течение роста демонстрировались при помощи вышеупомянутой двойной окраски. В данном случае бактерии спиралевидной формы имели неповрежденные мембраны (зеленая флуоресценция), а коккоидной – поврежденные (красная флуоресценция). В то же время булабовидные, клетки переходной фазы, флуоресцировали гетерогенно. При этом хлорированная питьевая вода воздействовала на жизнеспособность, но не морфологию клеток *C. coli* [55].

Мембранный потенциал – доказанный показатель жизнеспособности бактериальных клеток [51]. Плазматическая мембрана живой клетки обычно имеет трансмембранный потенциал около 70 милливольт (отрицательный внутри клетки) как следствие градиентов концентрации K^+ , Na^+ и Cl^- , которые поддерживаются активными транспортными процессами. Наиболее широко используемые красители, разработанные для оценки мембранного потенциала клетки, – это родамин 123 и оксонол. К примеру, жизнеспособность *A. salmonicida* была определена проточной цитометрией с катионным флуорохромом родамин 123, который поступает и сохраняется в клетках с мембранным потенциалом. В стерильной воде озера клетки бактерий вступали в НС, сохраняя жизнеспособность после 7 дней, а к 21 дню, когда число культуральных бактерий снизилось до необнаруживаемого уровня, в популяции оставалось около 37% клеток, сохранивших мембранный потенциал [56]. Оксонол использовался для измерения чувствительности некоторых бактерий к антибиотикам. Вообще, контроль эффективности антибактериальных средств с использованием измерений мембранного потенциала желательно использовать еще и по той причине, что многие биоциды не повреждают мембрану бактерий и определить жизнеспособность по признаку мембранной целостности часто невозможно.

Метаболическая активность может служить достаточно надежным критерием жизнеспособности микробной клетки [57]. Процесс клеточного деления возможен только при нормально функционирующем метаболизме, т. е. при осуществлении многих ферментативных реакций. Наиболее часто используются методы, в основе которых лежит способность солей тетразолия специфически реагировать с НАДН и НАДФН, компонентами дыхательной цепи микроорганизмов. В реакциях с участием различных НАД-зависимых дегидрогеназных ферментов происходит восстановление солей тетразолия в интенсивно окрашенные формазаны, сигнализируя таким образом, что клетка метаболически активна.

Флуорохромы, вызывающие подобные реакции иногда называют флуорогенными субстратами. Эстеразные субстраты, такие, как флуоресцеин диацетат (FDA), карбоксифлуоресцеин диацетат (cFDA) и кальцеин АМ используются, как нефлуоресцентные предшественники, которые проникают внутрь клетки. Флуоресцентные продукты, образующиеся в реакциях с участием внутриклеточных эстераз, положительно

заряжены, и они сохраняются в клетке при условии, что мембрана не повреждена. Таким образом, данные методы показывают как ферментативную активность, так и мембранную целостность [58].

Флюоресцентные зонды для оценки жизнеспособности в комбинации с проточной цитометрией (FCM, flow cytometry) – современный высокотехнологичный метод для анализа бактериальных популяций на уровне отдельной клетки. Эти методы позволяют одновременное измерение различных физических и биохимических параметров и, как следствие, дают реальную информацию о физиологической гетерогенности микрофлоры. Кроме того, FCM способна физически отделять отсортированные клетки для дальнейшего молекулярного и физиологического анализа (для этого используются цитометры-сортеры). Например, при помощи проточной цитометрии оценивалась жизнеспособность *Bifidobacterium lactis* и *Bifidobacterium adolescentis*, подвергая их стрессу солями желчи. Как индикаторы бактериальной жизнеспособности использовались флюорохромы carboxyfluorescein diacetate (cFDA), propidium iodide (PI), и oxonol [DiBAC4(3)], для контроля эстеразной активности, мембранной целостности и мембранного потенциала, соответственно. Когда клетки были одновременно окрашены с cFDA и PI, проточная цитометрия и сортировка клетки показали значительную физиологическую гетерогенность этой популяции бифидобактерий. Три субпопуляции были идентифицированы в соответствии с их дифференциальным поглощением зондов: cF-окрашенные, cF-PI-окрашенные и PI-окрашенные, представляя, соответственно, жизнеспособные, поврежденные и мертвые клетки. Дальнейшая сортировка и восстановление (реверсия) показали, что существенная фракция cF-PI-окрашенной субпопуляции (40 %) могла возобновить рост на чашках с агаром [48].

В течение последних десятилетий были развиты быстрые и точные методы индикации патогенов, основанные на ПЦР. Методы ПЦР - амплификации специфических генов [59] и полиморфный анализ ДНК [60] применялись для обнаружения ЖНС *V. vulnificus*, но оба метода показали сомнительную чувствительность. Главное неудобство таких методов - то, что они также могут амплифицировать ДНК мертвых микроорганизмов [61]. В таком случае, обнаружение ДНК патогенов можно рассматривать как ложноположительный результат, ведь в образцах из окружающей среды всегда присутствуют мертвые клетки, или свободная ДНК. Это особенно важно, к примеру, для методов, использующихся для контроля дезинфекции: о ее эффективности информацию могут дать только жизнеспособные патогенные микроорганизмы (культурабельные и некультурабельные). Геномика – высокочувствительный, информативный и универсальный подход, но эти методы на сегодняшний день являются, прежде всего, идентификационными и, в лучшем случае, обеспечивают количественный учет жизнеспособности.

В настоящее время перспективным подходом считается комбинация молекулярных и флюоресцентных методов исследования. В этом случае моле-

кулярная метка дополняется флюоресцентными маркерами жизнеспособности. Используя такие интегрированные подходы, можно идентифицировать некультурабельную фазу патогенов, для которой мы в настоящее время не знаем условий роста, или они могут иметь облигатные синтрофические связи, существующие в экологической среде хозяина, либо во внешней среде. Филогенетический анализ данных проб позволит классифицировать новые или нераспознанные патогены. Эта информация, в свою очередь, даст возможность определять их группу и свойства, после чего можно будет обосновывать методы для культивирования патогена или моделирования его роста [62].

Методы восстановления культурабельности. Концептуально важной задачей для доказательства того, что ЖНС бактерий все же существует, является их реверсия, или восстановление роста в культуре (resuscitation, что буквально означает возвращение к жизни). Такие попытки были предприняты давно, однако сопоставимых результатов недостаточно, чтобы выделить закономерности восстановления из ЖНС. Например, в начале 1950-ых сообщалось, что термически и химически инактивированные клетки *E. coli* могли быть "оживлены" при помощи метаболитов цикла Кребса [63]. Но впоследствии, как показали несколько других групп исследователей, это могло произойти из-за присутствия оставшихся культурабельных бактерий в некультурабельных суспензиях клеток [64]. Для оппонентов теории ЖНС присутствие некоторого уровня остаточных культурабельных клеток, которые растут и делятся в ответ на добавленные питательные вещества, стало основным доказательством для ее опровержения [65, 66].

Тем не менее, невозможно игнорировать множество работ, в которых приведены, иногда довольно изящные, примеры восстановления бактерий из ЖНС. Современные работы показывают, что такое восстановление базируется, прежде всего, на роли микроэкологии, где наиболее важными факторами являются синтрофические связи типа микроб-микроб, хозяин-микроб, а также чувство кворума в микробной среде. В этих взаимодействиях основную роль играют сигнальные молекулы. Действительно, доказано, что растущие клетки *Micrococcus luteus* выделяют фактор, стимулирующий восстановление и рост покоящихся клеток этого же микроорганизма. Фактор возвращения к жизни, resuscitation-promoting factor (Rpf) - белок, который на пикомолярных концентрациях увеличивает число жизнеспособных клеток некультурабельного *M. luteus*, по крайней мере, 100-кратно и может стимулировать рост культурабельных клеток. Rpf также стимулирует рост некоторых других Gr+ микроорганизмов, включая патогенные микобактерии [67].

Kaerberlein с соавт. [68] разработали диффузные камеры, позволяющие получить рост в культуре ранее некультурабельных видов микроорганизмов, моделируя условия их естественной окружающей среды. Колонии нескольких представителей морских микроорганизмов были выделены в чистой культуре. Эти бактерии не росли на искусственных средах и формировали колонии только в присутствии других микроорганизмов. Изоляты MSC1 и MSC2 легко росли

в камерах в чистой культуре, но их рост на чашках Петри происходил только в кокультуре. Образцы колоний на чашках Петри, казалось, показывают взаимозависимость: MSC1 формируют более плотные, выступающие колонии, находящиеся на более плоских колониях MSC2.

Факторы восстановления могут заключаться и непосредственно в отмене неблагоприятных воздействий стресса, как, например, показано для микроорганизмов, подвергнутых воздействию гамма-лучей [69].

Среди физических факторов наиболее часто к реверсии *in vitro* приводит повышение температуры с 0,5-6 °С до 20-22 °С или до 37 °С, кратковременный прогрев до 45 – 60 °С. Быстрое увеличение КОЕ в микрокосмах рассматривается как подтверждение реверсии, а не возобновление роста нескольких выживших клеток [70]. Повышение температуры (56 ± 0,5 °С в течение 15 сек.) в триптонно-соевом бульоне, с последующей инокуляцией на триптонно-соевый агар восстанавливало некультурабельные, индуцированные низкой температурой *S. enterica* серовар *Typhimurium* [71].

ЖНС и вирулентность. В ходе исследований, проводившихся для доказательства того, что некультурабельные бактерии сохраняют свой патогенный потенциал, также однозначных результатов не получено. В некоторых ранних и более поздних работах исследователи получали восстановление жизнеспособности и вирулентности:

- При инокуляции VBNC клеток *V. cholerae* в лигированные подвздошные петли кроликов наблюдались позитивные реакции (т. е. энтеропатогенность) во всех образцах. Из просвета кишки высеивались культурабельные клетки *V. cholerae* [72].

- Вирулентность индуцированной хлором некультурабельной *Y. enterocolitica* у перорально инокулированных мышей была подобна вирулентности культуры контроля, однако некультурабельные клетки, индуцированные медью, показали низкую вирулентность, которая была частично восстановлена пероральным введением бикарбоната натрия перед инокуляцией этих клеток. Нейтрализация кислотности желудочного сока не имела никакого эффекта на вирулентность контрольной или обработанной хлором *Y. enterocolitica* [73].

- Восстановленные в развивающихся куриных эмбрионах жизнеспособные, но некультурабельные клетки *C. jejuni* сохранили вирулентные детерминанты и способность к адгезии с HeLa клетками [74].

- Индуцированные инкубацией при 5°С VBNC клетки *V. vulnificus* (<0,1 КОЕ/мл) были приготовлены так, что, в то время как их плотность составляла 105 клеток, культурабельность была <0.04 КОЕ/мл. Инокулированные этой суспензией мыши погибли. Культурабельные клетки *V. vulnificus* были обнаружены в крови и брюшной полости животных [75].

Тем не менее, множество работ указывает на значительное снижение и утрату вирулентности бактерий, восстановленных из НС:

- Сохранение патогенности жизнеспособных, но некультурабельных клеток *Salmonella typhimurium*, экс-

периментально подвергнутых стрессу УФ облучением и морской водой, было исследовано в соответствии с их уровнем жизнеспособности. Патогенность, протестированная на мышинной модели, была утрачена одновременно с культурабельностью, тогда как жизнеспособность клеток оставалась неизменной, что определялось дыхательной активностью, мембраной, цитоплазматической и геномной целостностью [76].

- Некультурабельные клетки *Salmonella enterica*, серовар *Typhimurium*, индуцированные голоданием по углероду и азоту в присутствии хлорамфеникола вводили перорально и интраперитонеально более 300 самкам мышей. Ни инфекция, ни колонизация кишечника мышей не были обнаружены, при том, что активные но некультурабельные клетки, как было определено методом прямого подсчета жизнеспособности, присутствовали в посевном материале [77].

- У *E. coli* O157:H7 (штаммы ATCC 43895 и FO46) было индуцировано ЖНС двумя путями: в стерильной, дистиллированной, деионизированной воде и после обработки хлором. Ни "реанимирование" *in vitro*, ни пассаж через желудочно-кишечный тракт мышей, не имел никакого эффекта на восстановление некультурабельных *E. coli*, что было обосновано анализом фекальных проб. Мышинные почки анализировались на присутствие Shiga токсина, однако различия в цитотоксичности к Vero клеткам от почечных тканей мышей, получающих некультурабельные клетки, и мышей контроля не были значительны, что означало бы потерю вирулентности [78].

Заключение. Прогресс последних десятилетий в области инструментальных и информационных технологий, повлекший за собой пересмотр некоторых теоретических постулатов микробиологии и называемый некоторыми авторами "тихой революцией" [79], диктует нам необходимость применения более скрупулезных подходов в современной медицинской и санитарной микробиологии. Одним из таких подходов является методология исследования ЖНС бактерий.

Многочисленные свидетельства доказывают высокий приоритет проблемы ЖНС. Сохранение патогенных микроорганизмов в окружающей среде и связанные с этим возвращающиеся инфекции, появление новых и малоизученных инфекций, возможность случайной контаминации биосферы генетически измененными микроорганизмами – вот лишь некоторые эпидемиологические аспекты данной проблемы. Суперстерильность необходима в таких сферах деятельности, например, как трансплантология, производство лечебных препаратов, космическая медицина. Для дезинфектологии и отраслей медицины, где применяется антибиотикотерапия, эта проблема важна в связи с адаптацией патогенов к известным и новым биоцидам. Эта неизбежно возникающая устойчивость сопровождается присутствием бактерий, переходящих в ЖНС с последующей возможностью восстановления.

Это значит, что для эффективного контроля заболеваний, имеющих микробную этиологию, и мониторинга возбудителей инфекционных заболеваний в окружающей среде необходим дифференцированный подход с применением различных методологий, в том

числе основанных на прямом определении жизнеспособности патогенных бактерий.

Литература.

1. Lorber B., Are all diseases infectious? // Annals of Internal Medicine. - 1996. - Vol. 125. - P. 844-851.
2. Casadevall A., Pirofski L. Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease // Infect. Immun. - 2000 - Vol.68. - P. 6511-6518.
3. Woese C., Kandler O., Wheelis M. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya // Proc. Natl Acad. Sci. USA. - 1990. - Vol. 87. - P. 4576-4579.
4. Vianna M., Conrads G., Gomes B., Horz H. Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections // Journal of Clinical Microbiology. - 2006. - Vol. 44. - P. 1274-1282.
5. Eckburg P., Lepp P., Relman D. Archaea and their potential role in human disease. Infect. Immun. - 2003. - Vol. 71. - P. 591-596
6. Kolenbrander P. Communication among oral bacteria. // Microbiology and Molecular Biology Reviews. - 2002. - Vol. 66 - P. 486-505.
7. Staley J., Konopka A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. // Annu. Rev. Microbiol. - 1985. - Vol. 39. - P. 321-346.
8. Kogure K., Simidu U., Taga N. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria // Can. J. Microbiol. - 1979. - V. 25. - P. 415-420.
9. Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation // Microbiol. Rev. - 1995. - V. 59. - P. 143-169.
10. Nalin R., Ranjard L., Nazaret S., Simonet P.W. La biologie moléculaire en écologie microbienne du sol: application à l'analyse de la structure des communautés bactériennes // Bull. Soc. Fr. Microbiol. - 1998. - Vol. 13. - P 21-26.
11. Relman D. A. The search for unrecognized pathogens // Science. - 1999. - Vol. 284. - P 1308-1310.
12. Colwell R. R. Bacterial death revisited // Nonculturable microorganisms in the environment / - Ed. D. J. Grimes. - Washington, D.C.. ASM Press, 2000. - p. 325-342.
13. Головлев Е.Л. Другое состояние неспорулирующих бактерий // Микробиология. - 1998. - № 6. - С. 725-735.
14. Волянський. Ю. Л. Некультурабельний стан аспорогенних бактерій: теоретичні аспекти проблеми та її практична значущість // Інфекційні хвороби. - 2004. - № 1. - С. 5-9.
15. Xu H, Roberts N., Singleton F., Attwell R., Grimes D., Colwell R. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in estuarine and marine environment // Microb. Ecol. - 1982. - Vol. 8. - P. 313-323.
16. Roszak D., Colwell R. Survival strategies of bacteria in the natural environment // Microbiol. Rev. - 1987. - Vol. 51. - P. 365-379.
17. Zimmermann R., Iturriaga R., Becker-Birck J. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration // Appl. Environ. Microbiol. - 1978. - Vol. 36. - P. 926-935. Oliver J. D. Formation of viable but nonculturable cells // Starvation in bacteria / Ed. S. Kjelleberg. - New York, N.Y.. Plenum Press, 1993. - p. 239-271.
18. Баснакьян И. А. Стресс у бактерий. - М.: Медицина, 2003. - 136 с.
19. Rollins D., Colwell R. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment // Appl. Environ. Microbiol. - 1986. - Vol. 52. - P. 531-538.
20. Nilsson H., Blom J., Abu-Al-Soud W., Ljungh A., Andersen L., Wadstrom T. Effect of cold starvation, acid stress, and nutrients on metabolic activity of *Helicobacter pylori* // Appl. Environ. Microbiol. - 2002. - Vol. 68. - P. 11-19.
21. Hussong D., Colwell R., O'Brien M., Weiss E., Pearson A., Weimer R., Burge W. Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media // Biotechnology. - 1987. - Vol. 5 - P. 947-950.
22. Islam M., Hasan M., Miah M., Sur G., Felsenstein A., Venkatesan M., Sack R., Albert M. The use of polymerase chain reaction and the fluorescent-antibody method for detecting viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* type 1 in laboratory microcosms // Appl. Environ. Microbiol. - 1993. - Vol. 59. - P. 536-540.
23. Oliver J., Hite F., McDougald D., Andon N., Simpson L. Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment // Appl. Environ. Microbiol. - 1995. - Vol. 61. - P. 2624-2630.
24. Chan K. F., Le Tran H., Kanenaka R. Y., Kathariou, S. Survival of clinical and poultry-derived isolates of *Campylobacter jejuni* at a low temperature (4{degrees}C) // Appl. Environ. Microbiol. - 2001. - Vol. 67. - P. 4186-4191.
25. Соколенко А. В., Каграманов В. С., Асеева Л. Е., Бурша О. С. и соавт.. Морфология и ферментативная активность некультивированных форм холерных вибрионов // Журн. микробиол. - 2002. - № 5. - С. 15-21.
26. Gunasekera T. S., Sorensen A., Attfield P., Sorensen S., Veal D. Inducible gene expression by nonculturable bacteria in milk after pasteurization // Appl. Environ. Microbiol. - 2002. - Vol. 68 - P. 1988-1993.
27. Besnard V., Federighi M., Declercq E., Jugiau F., Cappelier J.-M. Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes* // Vet. Res. - 2002. - Vol. 33 - P. 359-370.
28. Pommepuy M., Butin M., Derrien A., Gourmelon M., Colwell R. R., Cormier M. Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight // Appl. Environ. Microbiol. - 1996. - Vol. 62. - P. 4621-4626.
29. Villarino A., Marie-Noëlle R., Grimont P., Bouvet O. Are UV-induced nonculturable *Escherichia coli* K-12 cells alive or dead? // Eur. J. Biochem. - 2003. - Vol. 270. - P. 2689-2695.

30. Rose L., Donlan R., Banerjee S., Arduino M. Survival of *Yersinia pestis* on environmental surfaces // Appl. Environ. Microbiol. - 2003. - Vol. 69. - P. 2166-2171.
31. Heidelberg J., Shahamat M., Levin M., Rahman I., Stelma G., Grim C., Colwell R. R. Effect of aerosolization on culturability and viability of gram-negative bacteria // Appl. Environ. Microbiol. - 1997. - Vol. 63. - P. 3585-3588.
32. Ritz M., Tholozan J. L., Fedeeighi M., Pilet M. F. Morphological and physiological characterization of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure // Appl. Environ. Microbiol. - 2001. - Vol. 67. - P. 2240-2247.
33. Kim D. S., Thomas S., Fogler H. S. Effect of pH and trace minerals on long-term starvation of *Leuconostoc mesenteroides* // Appl. Environ. Microbiol. - 2000. - Vol. 66. - P. 976-981.
34. Makino S., Kii T., Asakura H., Shirahata T., Ikeda T., Takeshi K., Itoh K. Does enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 enter the viable but nonculturable state in salted salmon roe? // Appl. Environ. Microbiol. - 2000. - Vol. 66. - P. 5536-5539.
35. Hald B., Knudsen K., Lind P., Madsen M. Study of the infectivity of saline-stored *Campylobacter jejuni* for day-old chicks // Appl. Environ. Microbiol. - 2001. - Vol. 67. - P. 2388-2392.
36. Grey B. E., Steck T. R. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection // Appl. Environ. Microbiol. - 2001. - Vol. 67. - P. 3866-3872.
37. Rockabrand D., Austin T., Kaiser R., Blum P. Bacterial growth state distinguished by single-cell protein profiling: does chlorination kill coliforms in municipal effluent? // Appl. Environ. Microbiol. - 1999. - Vol. 65. - P. 4181-4188.
38. Dukan S., Levi Y., Touati D. Recovery of culturability of an HOCl-stressed population of *Escherichia coli* after incubation in phosphate buffer: resuscitation or regrowth? // Appl. Environ. Microbiol. - 1997. - Vol. 63. - P. 4204-4209.
39. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. - М.: Мир, 1977. - 378 с.
40. Сомов Г.П., Варвашевич Т.Н., Тимченко Н.Ф. Психрофильность патогенных бактерий. - Новосибирск: Наука, 1991. - 204 с.
41. Юдін І.П. Фенотипічні особливості некультуральної фракції *Escherichia coli* ATCC 25922 // Інфекційні хвороби. - 2005. - № 2. - С. 70-73.
42. Binsztein N., Costagliola M. C., Pichel M., Jurquiza V., Ramirez F. C., Akselman R., Vacchino M., Huq A., Colwell R. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina // Appl. Environ. Microbiol. - 2004. - Vol. 70. - P. 7481-7486.
43. Colwell R. R. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm // Science. - 1996. - Vol. 274. - P. 2025-2031.
44. Signoretto C., Burlacchini G., Lleo M., Pruzzo C., Zampini M., Pane L., Franzini G., Canepari P. Adhesion of *Enterococcus faecalis* in the nonculturable state to plankton is the main mechanism responsible for persistence of this bacterium in both lake and seawater // Appl. Environ. Microbiol. - 2004. - Vol. 70. - P. 6892-6896.
45. Albrich J. M., McCarthy C. A., Hurst J. K. Biological re-activity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocytic myeloperoxidase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1981. - Vol. 78. - P. 210-214.
46. Schraufstatter I U, Browne K., Harris A., Hyslop P. A., Jackson J. H., Quehenberger O., Cochrane C. G. Mechanisms of hypochlorite injury of target cells // J Clin Invest. - 1990. - Vol. 85(2). - P. 554-562.
47. Amor K. B., 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. - Vol. 68. - P. 5209-5216.
48. Davey H.M., Kell D.B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses // Microbiological Reviews. - 1996. - Vol. 60. - P. 641-696.
49. Shapiro H. M. Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques // J. Microbiol. Methods. - 2000. - Vol. 42. - P. 3-16.
50. Haughland R. P. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. - Eugene, Oreg.: Molecular Probes, Inc., 2002. - 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).
51. Brehm-Stecher B. F., Johnson E. A. Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications // Microbiol Mol Biol Rev - 2004. - Vol. 68. - P. 538-559.
52. Rudi K., Moen B., Dromtorp S., Holck A. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples // Appl. Environ. Microbiol. - 2005. - Vol. 71. - P. 1018-1024.
53. Walsh S., Lappin-Scott H. M., Stockdale H., Herbert B. N. An assessment of the metabolic activity of starved and vegetative bacteria using two redox dyes // J. Microbiol. Methods. - 1995. - Vol. 24. - P. 1-9.
54. Alonso J. L., Mascellaro S., Moreno Y., Ferrus M. A., Hernandez J. Double-staining method for differentiation of morphological changes and membrane integrity of *Campylobacter coli* cells // Appl. Environ. Microbiol. - 2002. - Vol. 68. - P. 5151-5154.
55. Morgan J. A. W., Rhodes G., Pickup R. W. Survival of nonculturable *Aeromonas salmonicida* in lake water // Appl. Environ. Microbiol. - 1993. - Vol. 59. - P. 874-880.
56. Луста К. А., Фихте Б. А. Методы диагностики живых клеток по их метаболической активности // Методы определения жизнеспособности микроорганизмов /Под ред. В. К. Ерошина. - Пушино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1990. - С. 53-76.
57. Bunthof C. J., Bloemen K., Breeuwer P., Rombouts F. M., Abee T. Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria // Appl. Environ. Microbiol. - 2001. - Vol. 67. - P. 2326-2335.
58. Brauns L. A., Hudson M. C., Oliver J. D. Use of the polymerase chain reaction in detection of culturable and nonculturable *Vibrio vulnificus* cells // Appl. Environ. Microbiol. - 1991. - Vol. 57. - P. 2651-2655.
59. Warner J. M., Oliver J. D. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of starved and viable but nonculturable *Vibrio vulnificus* cells // Appl. Environ. Microbiol. - 1998. - Vol. 64. - P. 3025-3028.

60. Josephson K. L., Gerba C. P., Pepper I. L. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1993. - Vol. 59. - P. 3513-3515.
61. Strauss E. J., Falkow S. Microbial pathogenesis: genomics and beyond // *Science.* - 1997. - Vol. 276. - P. 707-712.
62. Heinmets F., Taylor W.W., Lehman J.J. The use of metabolites in the restoration of the viability of heat and chemically inactivated *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* - 1954. - Vol. 67. - P. 5-12.
63. Chambers C.W., Tabak H.H., Kabler P.W. Effect of Krebs cycle metabolites on the viability of *Escherichia coli* treated with heat and chlorine // *J. Bacteriol.* - 1957. - Vol. 73. - P. 77-84.
64. Bogosian G., Bourneuf E. V. A matter of bacterial life and death // *EMBO Reports.* -2001. - Vol. 2. - P. 770 - 774.
65. Bogosian G., Morris P.J.L., O'Neil J.P. A mixed culture recovery method indicates that enteric bacteria do not enter the viable but nonculturable state // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1998. - Vol. 64. - P. 1736-1742.
66. Mukamolova G. V., Kaprelyants A. S., Young D. I., Young M., Kell D. B. A bacterial cytokine // *Proc Natl Acad Sci USA* - 1998a. - Vol. 95. - P. 8916-8921.
67. Kaerberlein T., Lewis K., Epstein S. S. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment // *Science.* - 2002. - Vol. 296. - P. 1127-1129.
68. Pitzo B.J., Amy P.S., Rudin M. Resuscitation of microorganisms after gamma irradiation // *Radiat. Res.* - 1999. - Vol. 152 (1). - P. 71-75.
69. Wai S.N., Moriya T., Kondo K. et al. Resuscitation of *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 from viable but nonculturable state by heart shock // *FEMS Microbiol. Lett.* - 1996. - Vol. 136(2). - P. 187-189.
70. Gupte A. R., de Rezende C. L. E., Joseph S. W. Induction and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2003. - Vol. 69. - P. 6669-6675.
71. Colwell R. R., Brayton P. R., Grimes D. J., Roszak D. B., Huq S. A., Palmer L. M. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms // *Bio/Technology.* - 1985. - Vol. 3. - P. 817-820.
72. Singh A., McFeters G. A. Survival and virulence of copper- and chlorine-stressed *Yersinia enterocolitica* in experimentally infected mice // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1987. - Vol. 53- P. 1768-1774.
73. Cappelier J. M., Minet J., Magras C., Colwell R. R., Federighi M. Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to HeLa cells after resuscitation // *Appl Environ Microbiol* - 1999a. - Vol. 53- P. 5154-5157.
74. Oliver J.D., Bockian R. In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus* // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1995. - Vol. 61. - P. 2620-2623.
75. Caro A., Got P., Lesne J., Binard S., Baleux B. Viability and virulence of experimentally stressed nonculturable *Salmonella typhimurium* // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1999. - Vol. 65- P. 3229-3232.
76. Smith R. J., Newton A. T., Harwood C. R., Barer M. R. Active but nonculturable cells of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium do not infect or colonize mice // *Microbiology.* - 2002. - Vol. 148. - P. 2717-2726.
77. Kolling G. L., Matthews K. R. Examination of recovery in vitro and in vivo of nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 // *Appl Environ Microbiol.* - 2001. - Vol. 67. - P. 3928-3933.
78. Kellenberger E. Exploring the unknown: the silent revolution of microbiology // *EMBO Rep.* - 2001. - Vol. 2(1). - P. 5 - 7.

УДК :579.61: 616 – 078

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ БАКТЕРИЙ С АКЦЕНТОМ НА ФЕНОМЕНЕ НЕКУЛЬТУРАБЕЛЬНОСТИ
Юдин И.П.

Рассмотрены проблемы определения жизнеспособности бактерий, с учетом возможности их выживания в некультурабельном состоянии. Традиционно, начиная с возникновения микробиологии как науки, методы культивирования были и, по большому счету, остаются "золотым стандартом" для бактериологов. Однако, претензии к точности и достоверности при обнаружении патогенных бактерий, определению их жизнеспособности в настоящее время значительно возросли.

Ключевые слова: жизнеспособность, жизнеспособное, но некультурабельное состояние (ЖНС), некультурабельный, флюоресценция.

УДК :579.61: 616 – 078

СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО ОЦІНКИ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ БАКТЕРІЙ З АКЦЕНТОМ НА ФЕНОМЕНІ НЕКУЛЬТУРАБЕЛЬНОСТІ
Юдін І.П.

Розглянуто проблеми визначення життєздатності бактерій, з урахуванням можливості їхнього існування в некультурабельному стані. Традиційно, починаючи з виникнення микробиології як науки, методи культивування були й, по великому рахунку, залишаються "золотим стандартом" для бактеріологів. Однак, вимоги до точності й вірогідності при виявленні патогенних бактерій, визначенню їхньої життєздатності в наш час значно зросли.

Ключові слова: життєздатність, життєздатний, але некультурабельний стан (ЖНС), некультурабельний, флюоресценція.

UDC :579.61: 616 – 078

MODERN APPROACHES TO VIABILITY ASSESSMENT OF BACTERIA WITH ACCENT ON NONCULTURABILITY PHENOMENON
Yudin I.P.

Problems of bacteria viability determination were considered from the point of view of opportunity of them surviving in a nonculturable state. Traditionally, since appear-

ance of microbiology as sciences, methods of cultivation were and, by and large, remain "the gold standard" for bacteriologists. However, demands to accuracy and reliability at detection of pathogenic bacteriums, to determination of their viability now have considerably increased.

Key words: viability, viable but nonculturable (VBNC), nonculturable, fluorescence.