

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК

Обзор

© 2015 Г.Ю. Ломакина, Ю.А. Модестова, Н.Н. Угарова*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119991 Москва; факс: +7(495)939-2660,
электронная почта: nugarova@gmail.com*

Поступила в редакцию 16.01.15

Рассмотрены теоретические аспекты биолюминесцентного метода определения аденозинтрифосфата (АТФ), основанного на использовании люциферин-люциферазной системы светляков, и его применение для детекции жизнеспособности клеток в микробиологии, санитарии, медицине и экологии. Описаны различные подходы к анализу индивидуальных и смешанных культур микроорганизмов, показаны возможности метода для изучения биологических процессов в живых клетках, в том числе некроза, апоптоза, а также для изучения динамики метаболизма.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: биолюминесценция, люцифераза светляков, АТФ, внутриклеточный АТФ, лизис клеток, внеклеточный АТФ, лиофилизированные вакцины.

ОБЩИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО АТФ

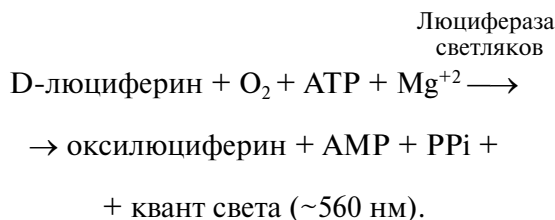
АТФ как показатель жизнеспособности клеток. Аденозинтрифосфат (систематическое название 9-β-D-рибофуранозиладенин-5'-трифосфат, или 9-β-D-рибофуранозил-6-амино-пурин-5'-трифосфат) – нуклеотид, трифосфорный эфир аденозина, который является производным аденина и рибозы (АТФ), служит главным носителем химической энергии в клетках всех живых существ (млекопитающих, микроорганизмов, растений и др.) [1]. При гидролизе АТФ происходит отщепление одной или двух остатков фосфорной кислоты, которое сопровождается выделением энергии. В клетке АТФ передает энергию другим молекулам, гидролизуясь при этом до своих низкоэнергетических аналогов (АДФ и/или АМР), которые в свою очередь вновь получают энергию, присоединяя фосфатные группы и превращаясь в АТФ. Содержание внутриклеточного АТФ является основным индикатором жизнеспособности клеток. При гибели клеток, в первую очередь, прекращается синтез АТФ, в то время как гидролиз АТФ может некоторое время продолжаться, поэтому содержание внутриклеточного АТФ быстро падает вплоть до нулевых значений. Содержание АТФ в жизнеспособных

клетках микроорганизмов достаточно высоко – от 500 до 10 000 мкг на 1 г сухой биомассы [2] или от 10^{-19} до 10^{-15} моль АТФ в одной клетке. Оно может варьировать в зависимости от природы и размера клеток, и энергетического состояния. На любые стрессовые воздействия клетка отвечает изменением содержания внутриклеточного АТФ. В зависимости от условий содержания культуры концентрация внутриклеточного АТФ также может изменяться, однако физиологические изменения, не приводящие к гибели клеток, не превышают 10–50 раз. На примере индивидуальных штаммов микроорганизмов показано, что для суспензии клеток в стандартных условиях содержание внутриклеточного АТФ пропорционально концентрации клеток в суспензии [3]. Таким образом, измеряя концентрацию внутриклеточного АТФ, можно оценить содержание жизнеспособных клеток в образце.

Измерение концентрации АТФ биолюминесцентным методом. Существуют различные методы измерения концентрации АТФ: ферментативные со спектрофотометрической детекцией, радиоактивные, хроматографические и др. Наиболее чувствительным, быстрым и специфичным является метод биолюминесцентной АТФ-метрии. Еще в 1940-е гг. было показано, что в реакции биолюминесценции, катализируемой ферментом – люциферазой светляков, необходимым и обязательным компонентом является АТФ [4].

* Адресат для корреспонденции.

Суммарная реакция в люциферин-люциферазной системе светлячков описывается следующей схемой:



Согласно этой схеме органический субстрат (люциферин) в присутствии АТР и ионов магния быстро окисляется кислородом воздуха до оксильюциферина, при этом образуются пирофосфат (PPi) и АМР. Оксильюциферин первоначально образуется в электронно-возбужденном состоянии, при переходе продукта в основное состояние выделяется квант видимого света. Достоинствами люциферазы светлячков является ее абсолютная специфичность по отношению к АТР и высокий квантовый выход свечения (~0,5 — самый высокий среди известных биолюминесцентных систем) [5].

Для регистрации биолюминесценции используются специальные приборы — люминометры, впервые появившиеся на рынке в 1970-е гг. Первые люминометры были основаны на технологии, разработанной для измерения радиоактивного излучения — жидкостных сцинтилляционных счетчиков [6]. Постепенно был разработан другой подход — в современных приборах для детекции люминесцентного сигнала используется счетчик фотонов в комбинации с высокопроизводительными фотоумножителями (ФЭУ). Важно отметить, что сигнал, регистрируемый люминометром, пропорционален, но не равен числу фотонов, испускаемых образцом. Этот сигнал имеет размерность «относительные люминесцентные единицы» (relative luminescent units, RLU). Его абсолютное значение определяется параметрами конкретного прибора и может быть различным даже для люминометров одной модели [7]. Регистрируемая в относительных единицах (RLU) интенсивность света пропорциональна концентрации АТР в линейном диапазоне 10 фМ — 1 мкМ АТР. Современные люминометры весьма разнообразны и отличаются друг от друга по целому ряду параметров: по чувствительности, по типу (кюветные или планшетные люминометры), по размеру и сложности конструкции (стационарные и портативные), по наличию или отсутствию инжектора (т.е. предназначенные для измерения постоянной (glow) и импульсной (flash) люминесценции) и т.д. В России выпускается портативный люминометр ЛЮМ-1 — высокочувствительный счет-

чик фотонов, который регистрирует интенсивность люминесценции в интервале от 10 до 800 тыс. имп/с, имеет интерфейс для связи с компьютером (рис. 1). По чувствительности и стабильности работы люминометр ЛЮМ-1 не отличается от приборов такого же класса фирмы «Berthold Detection Systems GmbH», Германия.

В продаже начали появляться и универсальные приборы, способные работать в нескольких режимах — регистрировать люминесцентный сигнал, флуоресценцию и абсорбцию. Выбор подходящего прибора для проведения анализа в значительной степени определяет точность получаемых результатов.

Для унификации анализа десятки зарубежных фирм предлагают реагенты для биолюминесцентного определения АТР, так называемые АТР-реагенты. Это лиофилизованные смеси, содержащие все компоненты, необходимые для протекания люциферазной реакции (люциферазу, люциферин, соль магния, компоненты буферного раствора, стабилизаторы), за исключением АТР. Перед использованием лиофилизованные АТР-реагенты реконструируют, добавляя специальный раствор для реконструкции АТР-реагента. В России разработаны АТР-реагенты на основе российской люциферазы *Luciola mingrelica* [8, 9]. В эти реагенты входит мутантная рекомбинантная люцифераза, которая значительно превосходит природную люциферазу по активности и термостабильности [10, 11]. Чувствительность современных биолюминесцентных тест-систем позволяет регистрировать атто-



Рис. 1. Портативный люминометр ЛЮМ-1 («Люмтек», Россия)

молярные количества АТФ в образце и выявлять единичные клетки микроорганизмов [12]. Для количественного измерения внутриклеточного АТФ клетки лизируют для высвобождения АТФ, полученный экстракт вносят в кювету люминометра, добавляют АТФ-реагент и измеряют интенсивность свечения. Чтобы рассчитать точную концентрацию АТФ в образце обычно используется метод контроля с использованием стандартного препарата АТФ (АТФ-контроль) с точно известным количеством лиофилизованного АТФ. АТФ-контроль обычно поставляется вместе с АТФ-реагентом. АТФ-контроль реконструируют экстрагентом, который используется для лизиса клеток в образце, и далее измеряют интенсивность свечения. Метод пропорции позволяет рассчитать концентрацию АТФ в анализируемом образце.

Важным этапом при количественном определении жизнеспособности микробных клеток является построение градуировочной зависимости между концентрацией внутриклеточного АТФ и концентрацией клеток в образце. Для этого используются данные стандартного микробиологического метода посева разведений – классический метод контроля жизнеспособности микробных клеток. С помощью стандартного метода определяют содержание жизнеспособных клеток (КОЕ/мл), а с помощью биолюминесцентного метода содержание АТФ в 1 мл образца. Получают линейные корреляционные зависимости вида $y = a + bx$: (конц. АТФ, моль/мл) = $a + b \times$ (КОЕ/мл), которые затем используют для нахождения величины (КОЕ/мл) по величине (конц. АТФ, моль/мл). Для индивидуальных культур хорошая линейная корреляция между концентрацией АТФ и КОЕ/мл наблюдается в интервале от 10^3 до 10^8 КОЕ/мл (рис. 2).

Биолюминесцентный метод позволяет быстро и количественно определять содержание АТФ, поэтому он нашел применение в различных областях молекулярной биологии, санитарии, медицины, клинической диагностики, пищевой промышленности и экологии и пр. Возможности и особенности использования биолюминесцентного метода для определения уровня жизнеспособных клеток микроорганизмов, рассмотрены ниже.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ АТФ В ИНДИВИДУАЛЬНЫХ КУЛЬТУРАХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Внутриклеточный АТФ недоступен для люциферазы, поскольку фермент не проникает через мембрану внутрь клеток. Для экстракции внутриклеточного АТФ используются реагенты, которые либо увеличивают проницаемость мембран клеток, либо их разрушают. Выбор того или иного лизирующего агента во многом определяется природой анализируемых клеток и задачами конкретного анализа. Экстрагенты, используемые в АТФ-метрии, должны отвечать следующим требованиям: 1) должны быстро экстрагировать АТФ; 2) инактивировать внутриклеточные ферменты, участвующие во взаимопревращениях адениловых нуклеотидов клетки; 3) сохранять неизменным начальный уровень внутриклеточного АТФ в процессе хранения и анализа экстракта; 4) не оказывать ингибирующего действия на люциферазную реакцию в процессе измерения АТФ.

Для экстракции АТФ могут быть использованы соединения разных классов: детергенты и их композиции, сильные кислоты (хлорная, трихлор-

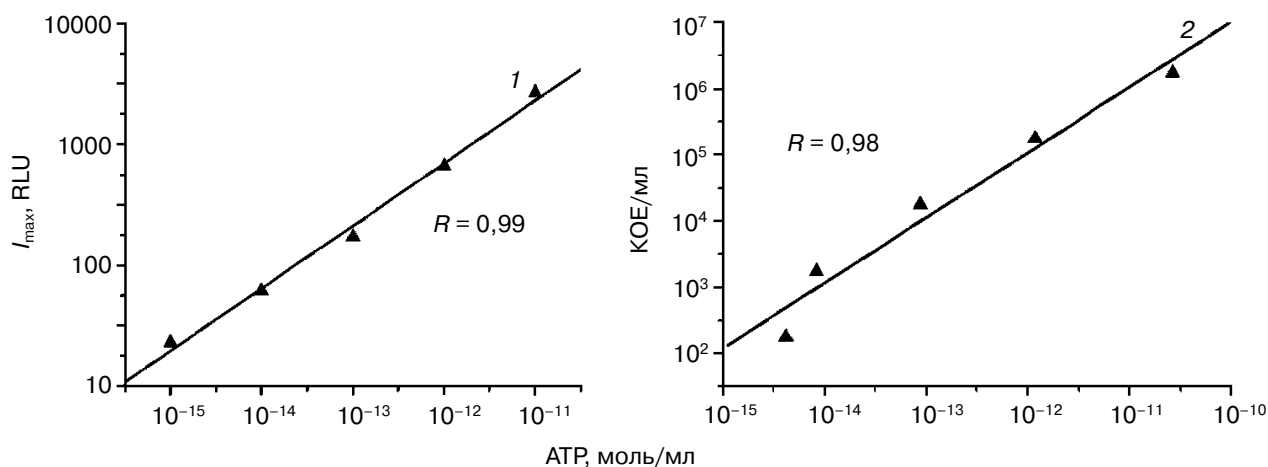


Рис. 2. Корреляция между концентрацией АТФ и интенсивностью биолюминесценции (1) и титром клеток (2) в образце

уксусная), органические растворители (бутанол, хлороформ, диметилсульфоксид и пр.). Использование их упрощает проведение эксперимента и позволяет проводить дифференциальный анализ на основании различной проницаемости и прочности клеточной стенки различных организмов в присутствии экстрагентов. Часто используется сочетание химических методов воздействия и физических: разрушение клеток кратковременным кипячением, под действием ультразвука [13] или постоянного тока [14].

Эффективность экстракции АТР из микроорганизмов, в первую очередь, зависит от природы клеточной стенки. Цитоплазматические мембраны у клеток микроорганизмов имеют сходное строение и легко разрушаются слабыми растворами кислот или ПАВ. Строение клеточной стенки у грамположительных, грамотрицательных бактерий и дрожжей сильно различается, и эти особенности следует учитывать при выборе лизирующего агента. Так, в работе [15] при сравнении эффективности действия экстрагентов различных классов показано, что максимальная чувствительность биоломинесцентного анализа внутриклеточного АТР грамположительных микроорганизмов и клеток дрожжей наблюдалась при использовании детергента 0,1%-ного цетилтриметиламмоний бромида (ЦТАБ). Она была на порядок выше по сравнению с 2,5%-ной трихлоруксусной кислотой (ТХУ) и 90%-ным диметилсульфоксидом (ДМСО). Это связано, в первую очередь с тем, что ЦТАБ быстро и эффективно разрушает клетки, оказывая на люциферазу значительно меньший ингибирующий эффект, чем ТХУ и ДМСО. Однако, для анализа высоких концентраций суспензий грамотрицательных микроорганизмов, таких как *E. coli* и *Pseudomonas* sp. ЦТАБ оказался неприменим, поскольку при его использовании выявлены значительные отклонения от линейности зависимости концентрации АТР от концентрации клеток. Это связано с тем, что грамотрицательные микроорганизмы, в отличие от грамположительных бактерий и дрожжей, обладают значительно более прочной клеточной стенкой, и для ее разрушения требуются более сильные химические агенты. В отличие от ЦТАБ, ДМСО был универсален – мгновенно разрушал клеточные стенки всех исследуемых микроорганизмов и инактивировал все внутриклеточные ферменты. Время экстракции составляло не более 1 мин. Полученные экстракты были стабильны при комнатной температуре в течение нескольких часов, их можно было хранить при 4° в течение нескольких дней и даже недель, в то время как получаемые при помощи ЦТАБ экстракты клеток при хранении были нестабильны. Тем не ме-

нее использование для экстракции АТР детергентов, в том числе ЦТАБ, является самым популярным методом и довольно часто используется в анализе. Так, при разработке одноразового сенсора для оценки бактериальной чистоты поверхности [16] для экстракции АТР, клетки обрабатывали 5 мМ ЦТАБ в течение 2 мин.

В работе [17] для анализа внутриклеточного содержания АТР у 17 штаммов дрожжей (с концентрацией клеточной суспензии 10^5 КОЕ/мл) и 37 штаммов грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов (с концентрацией 10^7 КОЕ/мл), находящихся в стационарной фазе роста, использовали катионный детергент бензалконий хлорид (ВАС), по эффективности действия не уступающий трихлоруксусной кислоте (ТХУ). Показано, что средняя степень экстракции АТР 0,2%-ным раствором ВАС из грамположительных бактерий составляла выше 99,4%, из клеток дрожжей – выше 97%. Для грамотрицательных бактерий эффективность экстракции была значительно ниже (около 81%) по сравнению с экстракцией ТХУ. Особенно низкая экстракция наблюдалась для микроорганизмов *Escherichia*, *Proteus* и *Serratia* (74–80%). Увеличение концентрации ВАС до 0,5% приводило к ингибированию активности люциферазы и значительному возрастанию скорости падения биоломинесцентного сигнала с 5 до 50%/мин. Стопроцентная экстракция АТР из грибных спор достигалась при обработке образца 90%-ным ДМСО в ТАЕ-буфере, pH 7,75 в течение 1 мин при 100° [18]. В качестве сравнения была оценена эффективность экстракции АТР под действием кипящего ТАЕ-буфера без ДМСО (не более 37,7%) и эффективность экстракции АТР 0,1–3%-ным раствором ТХУ (до 23,3%).

Особые условия экстракции необходимы при анализе микобактерий, выделяющихся среди прочих грамположительных бактерий необычным строением клеточной стенки. В клетках этих бактерий плотный слой пептидогликана (отличительная черта грамположительных бактерий) усилен миколовыми кислотами, миколатами и арабиногалактаном, а поверхность их гидрофобизована липидами [19]. В числе оптимальных экстрагентов называют 2%-ный додецилтриметиламмоний бромид в Tris-ЭДТА-буфере (pH 7,75) (100°, 1 мин), в присутствии α -циклодекстрина [20]. Предлагается также подход, сочетающий механическое разрушение клеток (bead beating) и ферментативное воздействие лизоцима (препарат Vactozyme) [21]. В работе [22] показано, что для экстракции АТР из клеток с высоким содержанием белков нежелательно использование таких экстрагентов, как трихлоруксусная кислота (ТХУ), перхлорная кислота

(ПХУ) и этиленгликоль, поскольку их присутствие вызывает денатурацию белков и частичное соосаждение АТФ. В этом случае рекомендуют использовать фенол, насыщенный Tris-ЭДТА, что увеличивает выход АТФ в 14,5 раз по сравнению с 5%-ной ТХУ и в 1000 раз по сравнению с этиленгликолем.

Нивелировать влияние анионных, катионных и амфотерных детергентов на активность люциферазы можно различными способами. Одним из классических методов является использование различных циклодекстринов [7]. Например, для снижения ингибирующего действия 5 мМ ЦТАБ использовали 7,5 мМ β -циклодекстрин [16]. Для связывания бензалконий хлорида (ВАС) после экстракции АТФ из бактериальных клеток использовали липосомы [23]. Добавки диэтиламиноэтил-декстрана увеличивали активность люциферазы в присутствии ТХУ и Тритона X-100 [24]. Используются и генно-инженерные подходы. Так для снижения ингибирующего действия ВАС на люциферин-люциферазную реакцию в работе [17] использовали двойной мутант люциферазы с устойчивостью к этому экстрагенту.

Уровень внутриклеточного АТФ в клетках различных типов неодинаков и зависит от многих факторов. В обзорной статье [25], посвященной вопросам практического применения биолюминесцентных методов анализа, представлены данные из различных источников по содержанию АТФ в клетках бактерий, дрожжей, спор (как бактерий, так и грибов) и актиномицетов. Указывается, что содержание АТФ в бактериальных клетках может различаться на 4–5 порядков. Например, для клеток на стационарной фазе роста [17] содержание внутриклеточного АТФ было в достаточно узком диапазоне для грамотрицательных микроорганизмов ($\sim 10^{-18}$ моль/КОЕ), а для грамположительных, напротив, колебалось в широких пределах – от $0,4 \times 10^{-18}$ до 16×10^{-18} моль/КОЕ, но, в среднем, было на порядок выше по сравнению с грамотрицательными микроорганизмами. Для дрожжевых клеток различных штаммов содержание внутриклеточного АТФ лежало в диапазоне $(0,7–54) \times 10^{-16}$ моль/КОЕ. Содержание АТФ в клетке может быть соотносено с ее размером [26] и объемом [27]. При этом концентрация внутриклеточного АТФ довольно высока и составляет в среднем примерно 1–10 мМ. По данным [28] концентрация АТФ в клетке *E. coli* – не менее 3 мМ и не зависит от скорости деления клеток на логарифмической (mid-log) фазе роста. В 2014 г. группе ученых [29] удалось с помощью генетически кодируемого флуоресцентного АТФ-индикатора QUEEN определить абсолютное содержание АТФ внутри единичных кле-

ток *E. coli*. Оказалось, что даже внутри одной популяции клеток уровень АТФ имеет распределение с положительной асимметрией, и средняя концентрация АТФ в единичной клетке составляет $1,54 \pm 1,22$ мМ. При этом усредненные данные, полученные методами флуоресцентного анализа (QUEEN) и биолюминесцентного анализа АТФ, практически совпали между собой. Кроме того, на примере пяти различных родов морских бактерий показано [30], что существует достаточно хорошая корреляция между содержанием в клетке АТФ и углерода.

Оценка метаболической активности клеток по содержанию внутриклеточного АТФ. Все большее количество исследователей используют биолюминесцентный метод как мощный инструмент для оценки метаболической активности клеток. Пределы детекции бактериальных клеток биолюминесцентным методом могут существенно зависеть от фазы их жизненного цикла. В работе [31] на примере клеток *E. coli* и *S. aureus* показано, что уровень внутриклеточного АТФ меняется в зависимости от фазы роста микроорганизма (lag-фаза, log-фаза, стационарная фаза и клеточная смерть), а в работе [32] был проведен анализ изменения метаболической активности дрожжей *S. cerevisiae* во время роста и при воздействии температуры. В частности, удалось выявить три субпопуляции дрожжей, различным образом реагировавших на воздействие повышенной температуры: живые клетки, мертвые клетки и живые клетки, не способные размножаться (следовательно, не определяемые методом посевов). При этом при повышении температуры уровень АТФ в клетке может возрасти за счет активации метаболических путей, необходимых для противостояния стрессовому воздействию.

В работе [33] метод биолюминесцентного анализа использовали для изучения влияния процесса адгезии клеток на стеклянной поверхности на их метаболическую активность и, следовательно, на уровень внутриклеточного АТФ. Было установлено, что при адгезии клеток *E. coli* и *B. brevis* на поверхности содержание внутриклеточного АТФ в них возрастало в 2–5 раз по сравнению с уровнем, характерным для клеточной суспензии. Данные, полученные в работе [34], указывают на то, что уровень метаболической активности в клетке зависит от свойств адгезирующей поверхности: для ряда клеток адгезия на гидрофобной поверхности приводила к двукратному увеличению содержания внутриклеточного АТФ по сравнению с теми же клетками, адгезированными на гидрофильной поверхности.

Анализ кинетики изменения содержания внутриклеточного АТФ, а также анализ отноше-

ния содержаний АТР/АДР, позволяет изучать различные патологии клетки, в том числе механизмы клеточной гибели – некроза и апоптоза. Пока клетки живы, они пытаются сохранить свой нормальный уровень АТР. При гибели клетки уровень внутриклеточного АТР снижается до нулевых значений, однако скорость гидролиза АТР в клетках различна. При некрозе клеток происходит механическое повреждение цитоплазматической и внутриклеточных мембран, что приводит к разрушению органелл, высвобождению лизосомальных ферментов и выходу содержимого цитоплазмы в межклеточное пространство под воздействием биологических, физических или химических воздействий. Механизмы некроза не требуют затрат энергии, в отличие от апоптоза, когда для протекания процесса клетка старается не только сохранить, но и увеличить уровень АТР в течение нескольких часов для энергетического обеспечения процесса либо гликолизом, либо синтезом митохондриального АТР. Форма клеточной гибели – по пути апоптоза или некроза – во многом определяется внутриклеточной концентрацией NADH и АТР. Авторы использовали биолюминесцентный метод определения внутриклеточного АТР для изучения механизмов клеточной смерти макрофагов человека под воздействием различных штаммов *M. tuberculosis* и показали, что в отличие от неvirulentного штамма H37Ra, в присутствии virulentного штамма H37Rv резко возрастал синтез АТР в инфицированных клетках [35].

Биолюминесцентные методы анализа для оценки цитотоксичности различных препаратов по отношению к бактериальным клеткам. Получена хорошая корреляция биолюминесцентного метода с методом лазерной нефелометрии при определении антибактериальных свойств ряда комплексов циклодекстрина [36]. Для оценки эффективности новых составов химических дезинфектантов и антисептиков используются стандартные методики, утвержденные Европейским комитетом по стандартизации, в частности EN 1276 и EN 13727, описывающие анализ бактериальных суспензий. Эти методики регламентируют проведение эксперимента, который заключается в следующем: биоцидный раствор смешивается с суспензией микроорганизмов в присутствии органического материала (например, бычьего сывороточного альбумина), имитирующего условия, в которых тестируемый раствор должен применяться на практике. Через установленный промежуток времени активность эффектора подавляется, а выживаемость микроорганизмов определяется методом подсчета колоний на питательной среде. В работе

[37] показано, что эти методики могут быть существенно упрощены и оптимизированы путем замены метода подсчета колоний на полуавтоматический биолюминесцентный метод детекции жизнеспособности бактерий. Биолюминесцентный метод использован также для скрининга цитотоксичности лекарственных препаратов по отношению к промастиготам лейшмании (род паразитических протистов) [38]. В работе [39] биолюминесцентный метод использовали для количественной оценки пролиферации другого протиста – *Perkinsus marinus*, паразитирующего на устрицах. В работе [40] биолюминесцентный анализ был использован для оценки эффективности действия оральных антисептиков. В работе [41] проведена валидация биолюминесцентного метода для оценки эффективности воздействия средств для полоскания рта на биопленки, выращенные *in vitro* с использованием микрофлоры полости рта.

Анализ биологических жидкостей на содержание АТР может быть осуществлен без предварительной обработки материала – мутность среды и окрашенность практически не мешают анализу. Так, в работе [42] изучали влияние радиации и ксенобиотиков на изменение содержания внутриклеточного АТР не только в форменных элементах крови (эритроцитов и нейтрофилов), но и в цельной крови, которую разбавляли перед анализом в 10 раз физраствором, используя в качестве экстрагента ДМСО. Динамика изменения и абсолютные значения содержания АТР свидетельствовали об изменении метаболизма. Наблюдаемое повышение уровня АТР в цельной крови и нейтрофилах было статистически достоверным. Интересный подход к использованию биолюминесцентного метода предложен в работе [43]. Для детекции бактериальных клеток и спор авторы использовали метод посевов, модифицированный следующим образом: проводили посев на поверхность фильтра, который помещали на поверхность твердой питательной среды и инкубировали в течение определенного времени, которое зависело от скорости роста клеток данного типа. Далее фильтр переносили в специальное устройство, в котором производилась обработка поверхности фильтра для удаления внеклеточного АТР и последующая экстракция внутриклеточного АТР из колоний бактерий, выросших на фильтре, но еще незаметных невооруженным глазом. Затем поверхность фильтра обрабатывали АТР-реагентом и регистрировали свечение с помощью чувствительной ССД-камеры. Это позволило сократить время, необходимое для роста клеток, а подсчет светящихся колоний оказался возможным до того, как они станут видны глазом.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО АТР В СМЕСИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Метод определения внутриклеточного АТР может быть использован для анализа не только индивидуальных культур, но и их смесей и с успехом заменяет длительный микробиологический анализ в тех областях, где требуется знать общее содержание микроорганизмов. Авторы [26] применили биолюминесцентный метод АТР-метрии для анализа стерильности помещений. Для выявления культивируемых микроорганизмов использовали метод посевов на агаризованную среду TSA с последующим подсчетом колоний, а также определяли среднее содержание внутриклеточного АТР в живой клетке – соотношение АТР/КОЕ. Если образец имеет низкое соотношение АТР/КОЕ, можно ожидать, что в нем присутствуют преимущественно грам-отрицательные микроорганизмы и споры. Если высокое – грамположительные бактерии и дрожжи. Было обнаружено, что большое число образцов не образовывало колоний на питательной среде, однако регистрировался высокий уровень внутриклеточного АТР. Это позволило предположить наличие живых, но некультивируемых микроорганизмов, что и было подтверждено анализом ДНК. Поэтому биолюминесцентная АТР-метрия может быть использована для экспресс-выявления некультивируемых или медленно растущих микроорганизмов. Следует отметить, что, несмотря на огромное разнообразие микроорганизмов в природе, количество культивируемых в лабораторных условиях микроорганизмов достаточно мало. В обзоре [44] приводятся данные об эффективности культивирования бактерий, характерной для различных сред обитания. Как правило, наименьшая эффективность культивирования достигается для бактерий, обитающих в обедненных средах (менее 1%), а наибольшая – для бактерий, среда обитания которых богата питательными веществами (до 58%).

Определение общего микробного числа в воздухе (ОМЧ, КОЕ/м³), в 1 м³ которого может содержаться до 10⁶ клеток аэробных патогенных и непатогенных микроорганизмов – грибов, бактерий, спор и др., имеет большое значение при анализе санитарного состояния воздуха в помещениях различного класса чистоты (согласно ISO 14644-1-99), в том числе в стерильных и чистых помещениях (0–10 КОЕ/м³) в медицинских учреждениях, промышленных объектах и офисах, на пищевых и микробиологических производствах. Длительность традиционно используемого микробиологического метода сос-

тавляет не менее 24 ч. В работе [45] предложен метод полуколичественной оценки ОМЧ воздуха в помещениях с низким содержанием микроорганизмов. Аспирацию воздуха (оптимальная скорость пробоотбора 200 л/мин) проводили на влажную стерильную адсорбирующую поверхность для улавливания аэробных микроорганизмов и инкубировали образцы в питательной среде в течение 3–6 ч до начала логарифмической фазы роста. Хорошо зарекомендовала себя среда Tryptic Soy Broth («Difco-Laboratories», США), а также питательный бульон (ФГУН ГНЦ ПМБ, Россия). Получена хорошая корреляция между биолюминесцентным и микробиологическим методом посевов: трехчасовая инкубация образца при 37° позволила определить 50–100 КОЕ/м³ (класс чистоты 6–7), а пятичасовая – 5–50 КОЕ/м³ (класс чистоты 5, особо чистые помещения). Если общее содержание микроорганизмов составляло ≥500 КОЕ/м³ (класс 9 и выше), то результат анализа получали в течение 5 мин без предварительной инкубации.

В работе [46] была сконструирована установка для автоматического исследования биоаэрозолей, которая включала в себя атомизатор для приготовления биоаэрозолей из суспензий бактериальных клеток, ионизатор воздуха и измерительную часть сложной конструкции, в которой происходило вскрытие клеток под действием ионизованного воздуха, и затем проводилась биолюминесцентная детекция АТР. Авторам удалось автоматизировать эксперимент, уменьшить время детекции примерно до 5 мин и провести определение бактериальных клеток (*E. coli* и *S. epidermidis*) в концентрациях от 173 до 541 КОЕ/м³ без подрачивания.

Адгезия бактериальных клеток на поверхностях различной природы (стекло, металл, пластик и пр.) приводит к образованию биопленок, что создает большие проблемы как в медицинской практике, так и в промышленности. Биолюминесцентный метод анализа позволяет изучать процессы формирования сообщества микроорганизмов в составе биопленок, существования, выживаемости и разрушения под действием различных эффекторов [41, 47–50].

Определение клеток индивидуального микроорганизма на фоне сопутствующей микрофлоры является довольно сложной задачей. При ее решении используются различные подходы. Традиционный путь селективного отбора клеток нужного штамма – это культивирование образца на селективной питательной среде, на которой растут, в основном, клетки анализируемого штамма. Так, например, в работе [51] для определения *coli*-форм в продуктах питания (сыром молоке, мороженом) и смывах образцы молока

инкубировали в селективной питательной среде в течение 6 ч, что позволило выявить в образце 10 КОЕ/мл. Авторы [52] использовали метод иммуно-магнитной сепарации для специфического улавливания *E. coli* O157:H7 антителами, фиксированными на магнитных частицах. Содержание клеток затем определяли по уровню внутриклеточного АТР. Был достигнут предел обнаружения менее 10² КОЕ/мл.

Использование литического бактериофага для быстрого и специфичного лизиса клетки-мишени позволяет достоверно определять 10⁴ КОЕ/мл в присутствии неспецифичной микрофлоры. Концентрирование исходной клеточной суспензии перед детекцией позволяет на порядок улучшить аналитические характеристики метода. Так, положительно-заряженные фильтры из наноалюминиевых волокон с порами диаметром 2 мкм, на поверхности которых был сорбирован фаг T4, позволили количественно определять клетки *E. coli* в присутствии 60-кратного избытка *S. typhimurium* [53]. В работах [54, 55] использован метод селективного фотодинамического разрушения грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов на примере штаммов *E. coli* O157:H7 и *L. monocytogenes*, а также специфично выявить клетки дрожжей в смеси с клетками *E. coli*.

Общее содержание АТР в образце – это удобный критерий оценки гигиенической чистоты объекта, который характеризует остаточное содержание живых и разрушенных бактериальных или соматических клеток. Большое число работ посвящено экспресс-анализу смывов с технологических поверхностей, посуды, оборудования, продуктов питания и пр. Источником АТР являются все клетки – микробные и немикробные (соматические), а также клеточный материал органической природы, например, остатки пищи. Обработка клеток дезинфицирующими агентами приводит к их деструкции и высвобождению АТР. Поэтому этот метод может с успехом применяться для оценки эффективности дезинфицирующих агентов и качества проведения санитарной обработки объекта. Для этих целей создано и широко используется специальное приборное обеспечение, которое на рабочем месте позволяет проводить первичный скрининг гигиенической чистоты помещений в режиме реального времени. Многочисленные фирмы («BioTrace», Новая Зеландия; «HY-LiTE™», «Merck», Германия; «Hygiene International», Германия; «New Horizons Diagnostic Corp.», США; «Berthold Detection Systems GmbH», Германия; «BioThema», Швеция; «Kikkoman Corp.», Япония; «Pierce», США; «Roche Diagnostics Ltd.», Швейцария; «Люмтек», Россия и др.) предлага-

ют различные наборы для анализа, включающие реагенты, расходные материалы и люминометры. Например, фирма «Hygiene International» (Германия) предлагает одноразовые устройства для пробоотбора и измерения общего содержания АТР вместе с портативным люминометром. Метод апробирован на предприятиях пищевой промышленности [56], при проведении мониторинга микробной загрязненности рук и бытовых поверхностей [57], для оценки гигиенического статуса технологических поверхностей в пищеблоках [58], в госпиталях [59]. Метод весьма эффективен при проведении мониторинга чистоты медицинского оборудования в процессе их дезинфекции в режиме реального времени, например, эндоскопов, что позволяет предотвратить распространение кросс-инфекции среди пациентов [60].

Однако в ряде работ отмечается, что при валидации метода на предприятиях и статистической обработке большого массива данных наблюдается низкая корреляция между результатами контрольных микробиологических тестов и биолюминесцентного анализа [56]. *Источником получения заниженных результатов* при определении внутриклеточного АТР могут быть различные факторы: неполное разрушение клеток или неполная экстракция, низкая скорость экстракции, снижение концентрации внутриклеточного АТР при его гидролизе АТРазами в процессе экстракции, ингибирование люциферазной реакции экстрагентами, низкая стабильность биолюминесцентного сигнала, разрушение АТР в процессе хранения экстракта и пр. Особенно важно при разработке метода экстракции АТР для конкретных образцов убедиться в том, что данный метод позволяет получить правильные данные по содержанию внутриклеточного АТР в образце. *Наблюдаемые ложноположительные результаты* связаны, как правило, с высоким уровнем внеклеточного АТР, когда клетки уже разрушены, но не удалены. В этом случае необходимо дифференцировать общее содержание АТР на внеклеточный (разрушенные клетки) и внутриклеточный (живые клетки) АТР.

Определение содержания внеклеточного АТР. Содержание внеклеточного или, так называемого «свободного» АТР в клеточной суспензии обычно на один-два порядка ниже по сравнению с внутриклеточным АТР. Например, в культуре метаболически активных клеток *E. coli* и *Salmonella* [61] содержание внеклеточного АТР составляло не более 5% от суммарного пула АТР и определялось фазой роста клеток. Уровень внеклеточного АТР возрастал во время логарифмической фазы роста и снижался во время стационарной. Исключением стали клетки *Acineto-*

bacter junii AJ4970, для которых отношение количеств внеклеточного к внутриклеточному АТР поднималось выше 0,5. При этом было показано, что бактериальные клетки быстро расходуют избыточный свободный АТР со скоростью ~ 5 мкМ/ч. Искусственное повышение концентрации АТР в питательной среде, по данным авторов [61], увеличивало выживаемость клеток в процессе их длительной инкубации (7 дней).

При внешних стрессовых воздействиях уровень внеклеточного АТР может возрастать весьма значительно за счет выброса внутриклеточного АТР в окружающую среду. По содержанию внеклеточного АТР можно судить о количестве разрушенных клеток, например, при замораживании, в процессе лиофилизации, при неблагоприятных условиях содержания культуры и пр. По соотношению внутри- и внеклеточного АТР можно дифференцировать живые и разрушенные клетки. В работе [62], например, описан метод количественного определения чувствительности бактерий к низину — антибиотику широкого спектра действия, воздействующему на грамположительные бактерии, который широко применяется в качестве консерванта. Под действием низина клетки секретируют во внешнюю среду АТР, ADP и AMP. Используя повышенную чувствительность клеток *Lactococcus cremoris* к этому антибиотику, авторы показали, что концентрация низина может быть определена биолюминесцентным методом по количеству внеклеточного АТР.

Количество внеклеточного АТР, секретируемого целым рядом грамположительных и грамотрицательных бактерий, как показано в работе [34], зависит от природы контактирующей с микроорганизмами поверхности: контакт с неблагоприятной для клеток поверхностью стимулировал повышенный уровень высвобождения АТР, причем для грамотрицательных бактерий уровень внеклеточного АТР был в среднем выше, чем для грамположительных.

Важность удаления внеклеточного АТР. Таким образом, для правильного определения внутриклеточного АТР необходимо сначала удалить внеклеточный АТР и затем экстрагировать внутриклеточный АТР. Для удаления внеклеточного АТР используются два основных метода: 1) фильтрование суспензии клеток через мембранный фильтр, при котором внеклеточный АТР удаляется с фильтратом [63]; 2) ферментативный гидролиз внеклеточного АТР [64]. Выбор того или иного метода удаления внеклеточного АТР определяется особенностями анализируемой суспензии микроорганизмов. Если определяемые концентрации внутриклеточного АТР меньше 1 пМ (при низких концентрациях клеток, например,

для грамотрицательных микроорганизмов это менее 10^2 КОЕ/мл), то используют фильтрацию, что одновременно приводит к концентрированию клеток на фильтре и повышению измеряемой концентрации АТР. При достаточно высоких концентрациях клеток (более 10^4 КОЕ/мл) предпочтительным и экспериментально более удобным является ферментативный гидролиз АТР.

В работе [65] для определения общей микробиологической загрязненности продуктов питания использованы специальные кюветы с фильтрующим дном вместимостью 300 мкл с диаметром пор 0,45 мкм («Filtravette™», «New Horizons Diagnostic Corp.», США). В одной и той же кювете последовательно проводят удаление внеклеточного АТР, концентрирование бактериальных клеток, экстракцию из них АТР и измерение его содержания биолюминесцентным методом. Если образец содержит более 1000 КОЕ/мл (для *E. coli*), то время анализа составляет не более 5–10 мин. Предварительная инкубация образца в течение 6 ч в питательной среде для увеличения метаболического статуса клеток и их деления позволяло выявлять до 1 КОЕ/мл питьевой воды [66]. В работе [67] использован тот же подход для контроля стерильности помещений в медицинских учреждениях. Отсутствие биолюминесцентного сигнала через 6 ч инкубации смывов с различных поверхностей в питательной среде свидетельствовало о стерильности образца. Если через 6 ч инкубации наблюдался положительный биолюминесцентный сигнал, то микробная контаминация образца составляла 1–10 КОЕ/100 см². Микробное загрязнение поверхности свыше 100 КОЕ/100 см² выявлялось без инкубации. Коэффициент корреляции между концентрацией АТР и КОЕ составлял 0,8–0,95. При анализе бактериологической чистоты соевого молока проблема высокого содержания небактериального АТР тоже стоит достаточно остро. Его возможными источниками являются волокна и белки, входящие в состав соевого молока [68]. Предварительная обработка такого молока смесью неионных детергентов [68] и удаление нецелевого АТР позволили использовать биолюминесцентный метод для анализа стерильности продуктов данного типа.

Общая бактериальная обсемененность или количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМА-ФАНМ) является одним из основных показателей санитарного состояния сырого молока, определяет пути дальнейшей переработки молока и влияет на конечную стоимость продукта. Общеизвестный микробиологический метод по ГОСТ 9225-84 позволяет определять КМА-ФАНМ в молоке только через 72 ч инкубирования

ния посевов, поэтому большой практический интерес представляют экспресс-методы оценки качества продукта, в том числе метод биолюминесцентной АТР-метрии продолжительностью 20 мин и пределом обнаружения 1000 КОЕ/мл образца. Для этого образец молока инкубируют со смесью детергента и протеазы для разрушения соматических клеток и белковых мицелл молока. Затем удаляют немикробный АТР фильтрованием через бактериальный фильтр, разрушают бактерии диметилсульфоксидом и измеряют концентрацию внутриклеточного АТР [69] (рис. 3). Например, если концентрация микробного АТР составляет менее 0,6 пмоль/мл, то образец содержит до 50 тыс. КОЕ/мл, если выше 70 пмоль/мл – свыше 4 млн КОЕ/мл.

Комбинированный метод определения спорного заражения продуктов питания предложен в работе [70]. На первой стадии анализа авторы применяли биолюминесцентный метод определения АТР в образце: образец концентрировали, удаляли соматические клетки путем обработки фильтра мягким лизирующим агентом, отделяли соматический и свободный АТР. Для увеличения концентрации внутриклеточного АТР использовали активацию прорастания спор в питательной среде. При получении положительных результатов, указывающих на наличие

бактериального заражения, образцы анализировали с помощью ПЦР в реальном времени, используя краситель SYBR Green, а качестве мишени для ПЦР-анализа – ген спорообразования *spo0A*.

Увеличить чувствительность метода АТР-метрии можно не только концентрированием клеток на бактериальных фильтрах или их подращиванием в подходящей питательной среде. Содержание АТР в клетке связано с содержанием ADP и AMP, образующих систему адениловых нуклеотидов клетки. Существенную роль в поддержании равновесия между ними играет обратимая и практически равновесная реакция, катализируемая ферментом аденилаткиназой:



Авторы [71] предложили после стадии удаления внеклеточного и соматического АТР разрушать собранные на фильтре единичные живые клетки и использовать гибридный белок аденилаткиназа-полифосфаткиназа для превращения эндогенного АТР в присутствии AMP и полифосфата в удвоенное количество ADP и снова в АТР. Метод позволил детектировать 75 КОЕ *S. aureus* в 0,5 мл молока. При этом чувствительность анализа возросла в 10 000 раз и позволила детектировать 10^{-18} М АТР.



Рис. 3. Схема биолюминесцентного определения внутриклеточного АТР в биологическом образце

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК В ВАКЦИНАХ НА ОСНОВЕ ЛИОФИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК МИКОБАКТЕРИЙ

Одной из важных задач современной микробиологии является разработка и оптимизация способов долгосрочного хранения культур микроорганизмов, в частности их лиофилизации. Выживаемость клеток после лиофилизации зависит от целого ряда параметров, таких как состав питательной среды, исходная концентрация клеток, наличие и тип криопротекторов, режим лиофилизации и способ последующей регидратации [72]. Для оптимизации этих параметров необходимы инструменты для быстрой оценки жизнеспособности микробных клеток. Традиционно таким инструментом является метод посева, однако его функцию может взять на себя метод биолюминесцентного анализа, особенно удобный для детекции жизнеспособности медленно растущих организмов. Так, существуют работы, описывающие применение биолюминесцентного анализа для оценки жизнеспособности лиофилизованных БЦЖ вакцин [73, 74].

Основным показателем качества вакцин на основе лиофилизованных клеток микобактерий является жизнеспособность микробных клеток. При использовании стандартного микробиологического метода суспензию реконструированных клеток инокулируют на твердую питательную среду и после инкубации подсчитывают число образовавшихся колоний. Микобактерии относятся к медленно растущим организмам, и период инкубации длится до пяти недель. Кроме того, стандартный метод является чрезвычайно вариабельным, нередко трудно воспроизводимым, поскольку клетки микобактерий склонны к образованию агрегатов. Все это затрудняет процесс производства и тестирования готовых препаратов вакцин. Биолюминесцентный метод обеспечивает высокую чувствительность, скорость, точность и воспроизводимость детекции жизнеспособных клеток вакцины. Именно поэтому уже в 1970-е гг. были опубликованы первые работы по применению биолюминесцентной АТР-метрии для количественного определения микобактерий [75].

Экстракция внутриклеточного АТР. Важной стадией определения внутриклеточного АТР в клетках микобактерий является экстракция АТР. Метод экстракции должен полностью высвободить внутриклеточный АТР в одну стадию и минимально разрушать АТР при экстракции. Из микобактерий достаточно трудно извлекать АТР, поскольку стенки клеток очень прочные, «воскообразные». Многие исследователи уделя-

ли большое внимание проблеме экстракции АТР из клеток микобактерий.

Наиболее распространенным методом экстракции АТР из микобактерий является лизис клеток кипящим Tris-ЭДТА-буфером. После охлаждения лизата концентрацию АТР определяют биолюминесцентным методом. В работе [76] для культуры *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv авторы определили соотношение между концентрацией АТР и КОЕ/мл и установили высокую степень корреляции ($r = 0,993$) для разбавлений одного и того же образца клеток. Когда же они провели аналогичные измерения для восьми различных образцов того же штамма, отобранных после различных периодов инкубации, то получили несколько меньший коэффициент корреляции ($r = 0,846$). Авторы пришли к выводу, что, действительно, рост культуры микобактерий можно детектировать биолюминесцентным методом. Уже через 7 дней роста клеток наблюдался высокий сигнал биолюминесценции, в то время как для стерильной среды сигнал практически отсутствовал.

Авторы работы [77] сравнили три метода экстракции АТР: 1) обработка кипящим Tris-ЭДТА-буфером; 2) обработка горячим хлороформом; 3) обработка бутанолом при комнатной температуре. Для свежей культуры микобактерий БЦЖ (разновидность штамма Moreau) определяли концентрацию АТР биолюминесцентным методом, количество бактерий – по массе влажных клеток, а методом посева разведений через 3–4 недели определяли концентрацию жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) во влажной культуре. Наиболее эффективной оказалась экстракция внутриклеточного АТР н-бутанолом. Этот простой и быстрый метод был использован авторами в дальнейшей работе. Для суспензий, содержащих $(1-50) \times 10^7$ КОЕ/мл, была получена корреляция между концентрацией АТР и КОЕ/мл с коэффициентом корреляции $r = 0,99$. Суспензии клеток после 7, 9 и 12 дней роста были сравнены по содержанию АТР на одну КОЕ/мл. Оказалось, что общее содержание АТР в культуре и количество жизнеспособных клеток были одинаковы для семи- и девятидневной культуры. Для более «старой» культуры (12 и 16 дней) общее содержание АТР и клеток было примерно в 10 раз ниже. Однако содержание АТР в одной клетке мало зависело от возраста культуры и варьировалось в пределах от 2,03 до 2,63 фг АТР на 1 КОЕ. Это составляет примерно $(3,7-4,8) \times 10^{-18}$ моль АТР на одну клетку. Следует отметить, что для разных штаммов микобактерий содержание АТР в одной клетке может несколько различаться, поскольку оно зависит от размеров клетки и ее энергети-

ческого статуса. Хранение суспензии клеток при различных температурах, а также лиофилизация могут приводить к уменьшению содержания внутриклеточного АТР.

В работе [78] авторы расширили список лизирующих агентов. Были использованы следующие экстрагенты: 1) кипящий 0,1 М Tris-ЭДТА-буфер; 2) кипящий 0,1 М Tris-ЭДТА-буфер с добавками детергента – 1, 2 или 4%-ный додецилтриметиламмоний бромид (ДТАБ); 3) 10%-ная трихлоруксусная кислота (ТХУ); 4) 1 М NaOH; 5) диметилсульфоксид. При экстракции к 0,9 мл экстрагента добавляли 0,1 мл суспензии клеток, быстро перемешивали и обрабатывали либо нагреванием при использовании кипящего буфера, либо кратковременной инкубацией при комнатной температуре. Полученные экстракты в течение нескольких часов хранили на льду, а для длительного хранения их замораживали. При измерении АТР использовали внутренний стандарт АТР (раствор АТР с концентрацией 100 нМ). Сравнение экстрагентов показало, что NaOH высвобождает более 90% АТР, но не может быть использован, так как представляет сильную химическую опасность. Другие экстрагенты высвобождали ~50% АТР, и только экстракция при использовании кипящего буфера с добавкой 2%-ного ДТАБ приводила к высвобождению 100% АТР. Однако полученные результаты вызывают некоторое сомнение, поскольку метод экстракции с использованием ТХУ считается классическим для высвобождения внутриклеточного АТР. Кроме того, в работе не приводится корреляции между концентрацией АТР и КОЕ при использовании различных методов экстракции. В работе [79] авторы оптимизировали метод экстракции, описанный в предыдущей статье [78], и показали, что добавки 10%-ного циклодекстрина в АТР-реагент уменьшают ингибирующий эффект ДТАБ на люциферазу.

Наиболее значительной работой по биолюминесцентной АТР-метрии жизнеспособности БЦЖ вакцины является работа датских ученых [80], которые не только описали метод количественного измерения жизнеспособности лиофилизованной БЦЖ вакцины по количеству внутриклеточного АТР, но и провели грамотную валидацию метода. Они использовали производственные образцы лиофилизованной БЦЖ вакцины (штамм 1331 из датской коллекции). Отдельные партии вакцины хранились в течение различного периода времени при различных температурах, чтобы получить образцы с низкой (хранение 28 дней при 37°), средней (хранение при 2–8° в течение 12–18 мес.) и высокой жизнеспособностью (хранение при 2–8° в течение 1–3 мес.). Лيوфилизованную вакцину ресу-

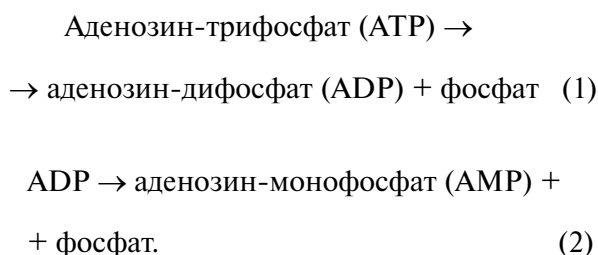
спендировали в физиологическом разбавленном растворе Саутона SSI и добавляли раствор апиразы для удаления внеклеточного АТР. После кратковременной инкубации экстрагировали внутриклеточный АТР кипящим Tris-ЭДТА-буфером и измеряли концентрацию АТР. Параллельно определяли количество КОЕ на ампулу методом посева разведений и строили зависимости содержания АТР на ампулу от величины КОЕ на ампулу.

Для вакцины, которую анализировали непосредственно после реконструкции, уровень АТР оказался очень низким. Так, при изменении от 10^5 до 10^6 КОЕ/мл содержание АТР практически не зависело от величины КОЕ и составляло 2–4 нг на ампулу ($\sim 10^{-18}$ моль АТР на 1 КОЕ). Это объясняется тем, что замораживание и лиофилизация являются большим стрессом для клеток и приводят к резкому снижению их метаболической активности и, следовательно, к снижению уровня внутриклеточного АТР. После реконструкции требуются определенные условия для восстановления метаболической активности клеток. Авторы использовали для этой цели предварительную инкубацию в течение суток при 37° в питательной среде Дубо, содержащей добавки Tween и альбумина. Эта богатая среда восстанавливала метаболическую активность клеток, но при этом рост клеток еще не начинался. После инкубации содержание АТР возрастало в 5–10 раз по сравнению с неинкубированными клетками, а содержание КОЕ оставалось неизменным. Среднее содержание АТР на КОЕ возрастало до $\sim 10^{-17}$ моль. Проведенная авторами валидация показала, что метод достаточно устойчив к небольшим изменениям условий инкубации и экстракции АТР. Для различных образцов одной и той же партии вакцины с высокой жизнеспособностью наблюдалась очень высокая линейная корреляция ($r \geq 0,99$) между содержанием АТР в интервале 1–25 пикомоль АТР на ампулу и величиной КОЕ на ампулу. Для образцов из партий вакцины с различной жизнеспособностью также была получена хорошая корреляция ($r = 0,928$) в интервале содержаний АТР, равных 8–45 нг на ампулу, и величиной КОЕ. Этот интервал содержаний АТР соответствует интервалу жизнеспособных клеток $(0,7–7,6) \times 10^6$ КОЕ на ампулу.

Чаще всего для регенерации лиофилизованных клеток микобактерий используют раствор Саутона SSI [81]. По данным работы [80] для полного восстановления жизнеспособности клеток требовалась еще и дополнительная инкубация в питательной среде в течение суток для получения хорошей корреляции между содержанием АТР и величиной КОЕ. Однако, в рабо-

те [82] авторы показали, что для лиофилизованной вакцины, реконструированной в растворе Саутона, инкубация в течение 30 мин при комнатной температуре восстанавливала жизнеспособность лиофилизованных клеток микобактерий, и наблюдалась удовлетворительная корреляция между концентрацией АТР и величиной КОЕ. Следовательно, инкубация в питательной среде в течение суток не является обязательной, что значительно упрощает процесс предобработки вакцины.

Удаление внеклеточного АТР. При замораживании и лиофилизации клеточной суспензии некоторая часть микробных клеток разрушается. Внутриклеточный АТР при этом переходит в раствор. Кроме того, среды, используемые для производства биомассы, также могут содержать свободный, внеклеточный АТР, поэтому важным этапом предобработки реконструированной вакцины является удаление внеклеточного АТР. В случае вакцины наилучшим методом удаления АТР из раствора является обработка образца раствором фермента апиразы [83]. Обычно используется апираза, выделяемая из клубней картофеля [83]. Реакция, катализируемая апиразой, описывается схемой:



Ни АДР, ни АМФ не являются субстратами люциферазы светляков, поэтому при разрушении АТР до АДР и АМФ свечение, обусловленное присутствием АТР, уменьшается в тысячи раз. Из различных сортов картофеля выделены две различные апиразы: 1) апираза А, у которой активность в реакции (1) в ~10 раз выше, чем в реакции (2); 2) апираза В, у которой, наоборот, активность в реакции (2) в ~10 раз выше, чем в реакции (1).

Для деградации АТР необходимо использовать апиразу А, поскольку именно этот фермент обеспечивает быстрое удаление свободного АТР из суспензии клеток. Следует подчеркнуть, что апираза, как и другие белки, не проникает внутрь клеток и поэтому не влияет на содержание внутриклеточного АТР. По литературным данным десятиминутное инкубирование суспензии клеток в разбавленном растворе апиразы в сотни раз снижает концентрацию внеклеточного АТР [80]. В работе [82] авторы добавляли

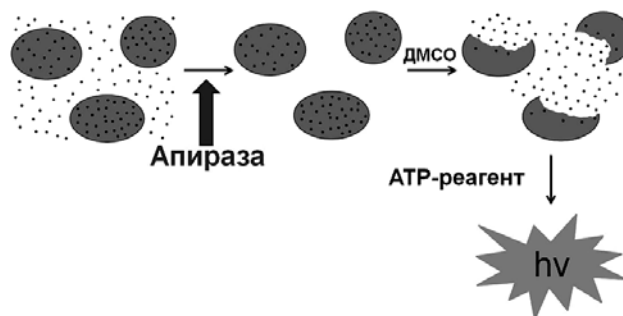


Рис. 4. Схема билюминесцентного анализа БЦЖ вакцины

апиразу в раствор Саутона. В течение реконструкции лиофилизованной вакцины происходило наряду с восстановлением метаболической активности клеток и удаление внеклеточного АТР.

Таким образом, схема анализа гидратированной БЦЖ вакцины выглядит следующим образом: на первой стадии происходит удаление внеклеточного АТР, на второй — экстракция внутриклеточного АТР, а на третьей — определение концентрации внутриклеточного АТР билюминесцентным методом (рис. 4).

Таким образом, в данном обзоре проанализированы литературные данные и собственные работы авторов по билюминесцентному методу определения жизнеспособности клеток и его применению в различных областях микробиологии, санитарии и экологии. Рассмотрены общие характеристики билюминесцентного метода определения внутриклеточного и внеклеточного АТР, методы измерения концентрации АТР, особенности определения внутриклеточного АТР в индивидуальных и смешанных культурах микроорганизмов, проанализирована эффективность экстракции АТР из клеток различными лизирующими агентами. Проведено сравнение содержания внутриклеточного АТР в клетках различных типов. Показано влияние различных факторов на уровень внутриклеточного и внеклеточного АТР. Рассмотрены различные примеры применения билюминесцентной АТР-метрии для контроля качества пищевых продуктов, санитарного состояния в медицинских и особо чистых производственных помещениях, для изучения различных процессов в клеточных системах (некроз и апоптоз клеток, особенности роста и деградации клеток, влияние клеточного стресса на метаболическую активность). Показано преимущество использования билюминесцентного метода для контроля специфической активности вакцин на основе живых лиофилизованных клеток микроорганизмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ленинджер А. (1974) *Биохимия*, Мир, Москва.
2. Угарова Н.Н., Бровко Л.Ю., Трдатян И.Ю., Райнина Е.И. (1987) Биolumинесцентные методы анализа в микробиологии, *Прикладная биохимия и микробиология*, **23**, 14–24.
3. Угарова Н.Н. (1993) Биоаналитические применения люциферазы светлячков, *Прикладная биохимия и микробиология*, **29**, 180–192.
4. McElroy, W.D. (1947) The energy source for bioluminescence in isolated systems, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **33**, 342–348.
5. Ando, Y., Niwa, K., Yamada, N., Enomoto, T., Irie, T., Kubota, H., Ohmiya, Y., and Akiyama, H. (2008) Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pH-sensitive green emission, *Nature Photon.*, **2**, 44–47.
6. Berthold, F., and Tarkkanen, V. (2013) Luminometer development in the last four decades: recollections of two entrepreneurs, *Luminescence*, **28**, 1–6.
7. Lundin, A. (2000) Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites, *Methods Enzymol.*, **305**, 346–370.
8. Угарова Н.Н., Малошенок Л.Г., Мороз Н.А., Ломакина Г.Ю. (2004) Реагент для определения аденозин-5'-трифосфата. Патент РФ № 2268943.
9. Угарова Н.Н., Кокшаров М.И., Ломакина Г.Ю. (2009) Реагент для определения аденозин-5'-трифосфата. Патент РФ № 2420594.
10. Кокшаров М.И., Угарова Н.Н. (2009) Повышение термостабильности люциферазы светлячков *Luciola mingrelica* случайным мутагенезом, *Вестник Московского университета*, Сер. 2, Химия, **50**, 23–28.
11. Koksharov, M.I., and Ugarova, N.N. (2011) Thermostabilization of firefly luciferase by *in vivo* directed evolution, *Prot. Engin. Des. Sel.*, **24**, 835–844.
12. Guardigli, M., Lundin, A., and Roda, A. (2011) in *Chemiluminescence and bioluminescence: past, present and future* (Roda, A., ed.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 143–190.
13. Narsaiah, K., Jha, S.N., Jaiswal, P., Singh, A.K., Gupta, M., and Bhardwaj, R. (2012) Estimation of total bacteria on mango surface by using ATP bioluminescence, *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, **146**, 159–163.
14. Wang, H.-Y., Bhunia, A.K., and Lu, C. (2006). A microfluidic flow-through device for high throughput electrical lysis of bacterial cells based on continuous dc voltage, *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 582–588.
15. Romanova, N.A., Brovko, L.Yu., and Ugarova, N.N. (1997) Comparative assessment of methods of intracellular ATP extraction from different types of microorganisms for bioluminescent determination of microbial cells, *App. Biochem. Microbiol.*, **33**, 306–311.
16. Luo, J., Liu, X., Tian, Q., Yue, W., Zeng, J., Chen, G., and Cai, X. (2009) Disposable bioluminescence-based biosensor for detection of bacterial count in food, *Anal. Biochem.*, **394**, 1–6.
17. Hattori, N., Sakakibara, T., Kajiyama, N., Igarashi, T., Maeda, M., and Murakami, S. (2003) Enhanced microbial biomass assay using mutant luciferase resistant to benzalkonium chloride, *Anal. Biochem.*, **319**, 287–295.
18. Rakotonirainy, M.S., Heraud, C., and Lavedrine, B. (2003) Detection of viable fungal spores contaminant on documents and rapid control of the effectiveness of an ethylene oxide disinfection using ATP assay, *Luminescence*, **18**, 113–121.
19. Hett, E.C., and Rubin, E.J. (2008) Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **72**, 126–156.
20. Hoffner, S., Jimenez-Misas, C., and Lundin, A. (1999) Improved extraction and assay of mycobacterial ATP for rapid drug susceptibility testing, *Luminescence*, **14**, 255–261.
21. Kapoor, R. and Yadav, J.S. (2010) Development of a rapid ATP bioluminescence assay for biocidal susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria, *J. Clin. Microbiol.*, **48**, 3725–3728.
22. Chida, J., Yamane, K., Takei, T., and Kido, H. (2012) An efficient extraction method for quantitation of adenosine triphosphate in mammalian tissues and cells, *Anal. Chim. Acta*, **727**, 8–12.
23. Kamidate, T., Yanashita, K., Tani, H., Ishida, A., and Notani, M. (2006) Firefly bioluminescent assay of ATP in the presence of ATP extractant by using liposomes, *Anal. Chem.*, **78**, 337–342.
24. Ishida, A., Yoshikawa, T., Nakazawa, T., and Kamidate, T. (2002) Enhanced firefly bioluminescence assay of ATP in the presence of ATP extractants by using diethylaminoethyl-dextran, *Anal. Biochem.*, **305**, 236–241.
25. Shama, G., and Malik, D.J. (2013) The uses and abuses of rapid bioluminescence-based ATP assays, *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **216**, 115–125.
26. Venkateswaran, K., Hattori, N., La Duc, M.T., and Kern, R. (2003) ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities, *J. Microbiol. Methods*, **52**, 367–377.
27. Hammes, F., Goldschmidt, F., Vital, M., Wang, Y., and Egli, T. (2010) Measurement and interpretation of microbial adenosine tri-phosphate (ATP) in aquatic environments, *Water Res.*, **44**, 3915–3923.
28. Buckstein, M.H., He, J., and Rubin, H. (2008) Characterization of nucleotide pools as a function of physiological state in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **190**, 718–726.
29. Yaginuma, H., Kawai, S.V., Tabata, K., Tomiyama, K., Kakizuka, A., Komatsuzaki, T., Noji, H., and Imamura, H. (2014) Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging, *Sci. Rep.*, **4**, 6522.
30. Hamilton, R.D., and Holm-Hansen, O. (1967) Adenosine triphosphate content of marine bacteria, *Limnol. Oceanogr.*, **12**, 319–324.
31. Vogel, S.J., Tank, M., and Goodyear, N. (2014) Variation in detection limits between bacterial growth phases and precision of an ATP bioluminescence system, *Lett. Appl. Microbiol.*, **58**, 370–375.
32. Paciello, L., Falco, F.C., Landi, C., and Parascandola, P. (2013) Strengths and weaknesses in the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell viability by ATP-based bioluminescence assay, *Enzyme Microb. Technol.*, **52**, 157–162.
33. Hong, Y. and Brown, D.G. (2009) Variation in bacterial ATP level and proton motive force due to adhesion to a solid surface, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 2346–2353.
34. Ivanova, E.P., Alexeeva, Y.V., Pham, D.K., Wright, J.P., and Nicolau, D.V. (2006) ATP level variations in heterotrophic bacteria during attachment on hydrophilic and hydrophobic surfaces, *Int. Microbiol.*, **9**, 37–46.
35. Jamwal, S., Midha, M.K., Verma, H.N., Basu, A., Rao, K.V., and Manivel, V. (2013) Characterizing virulence-specific perturbations in the mitochondrial function of macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*, *Sci. Rep.*, **3**, 1328.
36. Finger, S., Wiegand, C., Buschmann, H.-J., and Hipler, U.-C. (2013) Antibacterial properties of cyclodextrin-antiseptics-complexes determined by microplate laser nephelometry and ATP bioluminescence assay, *Int. J. Pharm.*, **452**, 188–193.

37. Aragonés, L., Escude, C., Visa, P., Salvi, L., and Moce-Llivina, L. (2012) New insights for rapid evaluation of bactericidal activity: a semi-automated bioluminescent ATP assay, *J. Appl. Microbiol.*, **113**, 114–125.
38. Paloque, L., Vidal, N., Casanova, M., Dumetre, A., Verhaeghe, P., Parzy, D., and Azas, N. (2013) A new, rapid and sensitive bioluminescence assay for drug screening on *Leishmania*, *J. Microbiol. Methods*, **95**, 320–323.
39. Shridhar, S., Hassan, K., Sullivan, D.J., Vasta, G.R., and Fernandez Robledo, J.A. (2013) Quantitative assessment of the proliferation of the protozoan parasite *Perkinsus marinus* using a bioluminescence assay for ATP content, *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.*, **3**, 85–92.
40. Gallez, F., Fadel, M., Scruel, O., Cantraine, F., and Courtois, P. (2000) Salivary biomass assessed by bioluminescence ATP assay related to (bacterial and somatic) cell counts, *Cell Biochem. Funct.*, **18**, 103–108.
41. Sanchez, M.C., Llama-Palacios, A., Marin, M.J., Figuero, E., Leon, R., Blanc, V., Herrera, D., and Sanz, M. (2013) Validation of ATP bioluminescence as a tool to assess antimicrobial effects of mouthrinses in an *in vitro* subgingival-biofilm model, *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.*, **18**, 86–92.
42. Фрунджян В.Г., Романова Н.А., Дементьева Е.И., Бровко Л.Ю., Угарова Н.Н., Новиков К.Н. (1997) Содержание АТФ в нейтрофилах и цельной крови у жителей районов Алтайского края, подвергшихся воздействию ядерных испытаний, *Радиационная биология. Радиэкология*, **37**, 13–19.
43. Chollet, R., Kukuczka, M., Halter, N., Romieux, M., Marc, F., Meder, H., Beguin, V., and Ribault, S. (2008) Rapid detection and enumeration of contaminants by ATP bioluminescence using the Milliflex® rapid microbiology detection and enumeration system, *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.*, **16**, 256–272.
44. Dewi Puspita, I., Kamagata, Y., Tanaka, M., Asano, K., and Nakatsu, C.H. (2012) Are uncultivated bacteria really uncultivable? *Microbes Environ.*, **27**, 356–366.
45. Lomakina, G.Y., and Ugarova, N.N. (2010) Monitoring of the microbial contamination of air by bioluminescent ATP-assay, *Luminescence*, **25**, 192–193.
46. Park, C.W., Park, J.-W., Lee, S.H., and Hwang, J. (2014) Real-time monitoring of bioaerosols via cell-lysis by air ion and ATP bioluminescence detection, *Biosens. Bioelectron.*, **52**, 379–383.
47. Haghghi, F., Mohammadi, S.R., Mohammadi, P., Eskandari, M., and Hosseinkhani, S. (2012) The evaluation of *Candida albicans* biofilms formation on silicone catheter, PVC and glass coated with titanium dioxide nanoparticles by XTT method and ATPase assay, *Bratisl. Lek. Listy*, **113**, 707–711.
48. Kajiyama, S., Tsurumoto, T., Osaki, M., Yanagihara, K., and Shindo, H. (2009) Quantitative analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm on the surface of biomaterial, *J. Orthop. Sci.*, **14**, 769–775.
49. Oulahal-Lagsir, N., Martial-Gros, A., Bonneau, M., and Blum, L.J. (2000) Ultrasonic methodology coupled to ATP bioluminescence for the non-invasive detection of fouling in food processing equipment – validation and application to a dairy factory, *J. Appl. Microbiol.*, **89**, 433–441.
50. Sule, P., Wadhawan, T., Carr, N.J., Horne, S.M., Wolfe, A.J., and Pruss, B.M. (2009) A combination of assays reveals biomass differences in biofilms formed by *Escherichia coli* mutants, *Lett. Appl. Microbiol.*, **49**, 299–304.
51. Romanova, N.A., Froudjian, V.G., and Ugarova, N.N. (1994) in *Bioluminescence and chemiluminescence. Fundamental and applied aspects. Proceedings of the 8th International Symposium* (Campbell, A.K., Kricka, L.J., and Stanley, P.E., eds), John Wiley & Sons, Chichester, pp. 434–437.
52. Hunter, D.M., Leskinen, S.D., Magana, S., Schlemmer, S.M., and Lim, D.V. (2011) Dead-end ultrafiltration concentration and IMS/ATP-bioluminescence detection of *Escherichia coli* O157:H7 in recreational water and produce wash, *J. Microbiol. Methods*, **87**, 338–342.
53. Миних О.А., Бровко Л.Ю., Гриффитс М.У., Угарова Н.Н. (2010) Специфическое определение *E. coli* В при помощи бактериофага Е4, нано-фильтров и АТФ-биолуминесценции, *Вестник Московского университета*, Сер. 2, Химия, № 3, **51**, с. 241–246.
54. Romanova, N.A., Brovko, L.Yu., Moore, L., Pometun, E.V., Savitsky, A.P., and Ugarova, N.N. (2003) Assessment of photodynamic destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by using ATP bioluminescence, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 6393–6398.
55. Романова Н.А., Пометун Е.В., Савицкий А.П., Угарова Н.Н. (2000) Биолуминесцентное определение аденозин-5'-трифосфата, вытекающего из клеток дрожжей при их фотодинамическом повреждении, *Вестник Московского университета*, Химия, **41**, 404–407.
56. Costa, P.D., Andrade, N.J., Brandao, S.C.S., Passos, F.J.V., and Soares, N. de F.F. (2006) ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces, *Brazilian J. Microbiol.*, **37**, 345–349.
57. Larson, E., Aiello, A., Gomez-Duarte, C., Lin, S., Lee, L., Della-Latta, P., and Lindhardt, C. (2003) Bioluminescence ATP monitoring as a surrogate marker for microbial load on hands and surfaces in the home, *Food Microbiol.*, **20**, 735–739.
58. Aycicek, H., Oguz, U., and Karci, K. (2006) Comparison of results of ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing methods for the determination of surface cleanliness at a hospital kitchen, *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **209**, 203–206.
59. Griffith, C.J., Cooper, R.A., Gilmore, J., Davies, C., and Lewis, M. (2000) An evaluation of hospital cleaning regimes and standards, *J. Hosp. Infect.*, **45**, 19–28.
60. Obee, P.C., Griffith, C.J., Cooper, R.A., Cooke, R.P., Bennion, N.E., and Lewis, M. (2005) Real-time monitoring in managing the decontamination of flexible gastrointestinal endoscopes, *Am. J. Infect. Control*, **33**, 202–206.
61. Mempin, R., Tran, H., Chen, C., Gong, H., Kim Ho K., and Lu, S. (2013) Release of extracellular ATP by bacteria during growth, *BMC Microbiol.*, **13**, 301.
62. Valat, C., Champiat, D., N'Guyen, T.T., Loiseau, G., Raimbault, M., and Montet, D. (2003) Use of ATP bioluminescence to determine the bacterial sensitivity threshold to a bacteriocin, *Luminescence*, **18**, 254–258.
63. Trudil, D.P., Tartal, J., and Trudil, C. (2002) in *Bioluminescence and Chemiluminescence: Progress and current applications* (Stanley, P.E., and Kricka, L.J., eds), World Scientific Publishing Co., Singapore, pp. 369–372.
64. Thore, A., Ansehn, S., Lundin, A., and Bergman, S. (1975) Detection of bacteriuria by luciferase assay of adenosine triphosphate, *J. Clin. Microbiol.*, **1**, 1–8.
65. Frundzhyan, V., and Ugarova, N. (2007) Bioluminescent assay of total bacterial contamination of drinking water, *Luminescence*, **22**, 241–244.
66. Froudjian, V.G., Ugarova, N.N., and Trudil, D.P. (2002) in *Bioluminescence and Chemiluminescence. Progress and Current Applications* (Campbell, A.K., Kricka, L.J., and Stanley, P.E., eds), John Wiley and Sons, Chichester, pp. 475–478.
67. Frundzhyan, V.G., Ugarova, N.N., Gabrielyan, N.I., Arefeva, L.I., and Preobrazhenskaya, T.B. (2005) in *13th International Symp. Biolumin. Chemilumin. Prog. Perspect.*

- (Kricka, L.J., and Stanley, P.E., eds), John Wiley and Sons, Chichester, pp. 389–392.
68. Shinozaki, Y., Sato, J., Igarashi, T., Suzuki, S., Nishimoto, K., and Harada, Y. (2013) Evaluation of an improved bioluminescence assay for the detection of bacteria in soy milk, *Biocontrol Sci.*, **18**, 1–7.
 69. Фрунджян В.Г., Угарова Н.Н. (2005) Экспресс-метод определения количества мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМА-ФАНМ) в сыром молоке, *Переработка молока*, **3**, 14–15.
 70. Ratphitagsanti, W., Park, E., Lee, C.S., Amos Wu, R.-Y., and Lee, J. (2012) High-throughput detection of spore contamination in food packages and food powders using tiered approach of ATP bioluminescence and real-time PCR, *LWT – Food Sci. Technol.*, **46**, 341–348.
 71. Satoh, T., Kato, J., Takiguchi, N., Ohtake, H., and Kuroda, A. (2004) ATP amplification for ultrasensitive bioluminescence assay: detection of a single bacterial cell, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1216–1220.
 72. Morgan, C.A., Herman, N., White, P.A., and Vesey, G. (2006) Preservation of micro-organisms by drying; a review, *J. Microbiol. Methods*, **66**, 183–193.
 73. Kolibab, K., Derrick, S.C., Jacobs, W.R., and Morris, S.L. (2012) Characterization of an intracellular ATP assay for evaluating the viability of live attenuated mycobacterial vaccine preparations, *J. Microbiol. Methods*, **90**, 245–249.
 74. Jensen, S.E., Hubrechts, P., Klein, B.M., and Haslov, K.R. (2008) Development and validation of an ATP method for rapid estimation of viable units in lyophilised BCG Danish 1331 vaccine, *Biologicals*, **36**, 308–314.
 75. Crispin, R.G. (1971) Rapid testing of freeze dried BCG vaccine for stability and viability, *Symp. Ser. Immunobiol. Stand.*, **17**, 205–210.
 76. Beckers, B., Lang, H.R., Schimke, D., and Lammers, A. (1985) Evaluation of a bioluminescence assay for rapid antimicrobial susceptibility testing of mycobacteria, *Eur. J. Clin. Microbiol.*, **4**, 556–561.
 77. Janaszek, W., Aleksandrowicz, J., and Sitkiewicz, D. (1987) The use of the firefly bioluminescent reaction for the rapid detection and counting of mycobacterium BCG, *J. Biol. Stand.*, **15**, 11–16.
 78. Hoffner, S.E., Jimenez-Misas, C.A., and Lundin, A. (1994) Improved extraction of mycobacterial ATP. In: *Bioluminescence and Chemiluminescence. Fundamental and Applied Aspects* (Campbell, A.K., Kricka, L.J., and Stanley, P.E., eds), John Wiley and Sons, Chichester, pp. 442–445.
 79. Hoffner, S., Jimenez-Misas, C., and Lundin, A. (1987) Improved extraction and assay of mycobacterial ATP for rapid drug susceptibility testing, *Luminescence*, **14**, 255–261.
 80. Jensen, S.E., Hubrechts, P., Klein, B.M., and Haslov, K.R. (2008) Development and validation of an ATP method for rapid estimation of viable units in lyophilised BCG Danish 1331 vaccine, *Biologicals*, **36**, 308–314.
 81. Deinse, F.V., and Senechal, F. (1950) BCG on Sauton medium. Effect of a long series of subcultures on the morphological and biological properties of BCG cultures, *Bull. World Health Organ.*, **2**, 347–354.
 82. Kolibab, K., Derrick, S.C., Jacobs, W.R., and Morris, S.L. (2012) Characterization of an intracellular ATP assay for evaluating the viability of live attenuated mycobacterial vaccine preparations, *J. Microbiol. Meth.*, **90**, 245–249.
 83. Kettlun, A.M., Uribe, L., Calvo, V., Silva, S., Rivera, J., Mancilla, M., Valenzuela, M.A., and Traverso-Cori, A. (1982) Properties of two apyrases from *Solanum tuberosum*, *Phytochemistry*, **21**, 551–558.

BIOLUMINESCENCE ASSAY FOR CELL VIABILITY

G. Yu. Lomakina, Yu. A. Modestova, N. N. Ugarova

M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry,
Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-2660,
E-mail: nugarova@gmail.com

Received January 16, 2015

In this review, we analyze theoretical aspects of the ATP bioluminescence assay that is based on firefly luciferase catalytic reaction and discuss its application in microbiology, sanitation, medicine, and ecology for the detection of cell viability. We provide an overview of the general principles of the method and discuss each step of the analysis and different sample preparation techniques. We review the approaches required for the analysis of individual and mixed cultures of microorganisms and demonstrate how the bioluminescent ATP assay can be applied in the studies of biological processes in living cells: necrosis and apoptosis, proliferation and degradation, and cell metabolism dynamics.

Key words: bioluminescence, firefly luciferase, intracellular ATP, cell lysis, extracellular ATP, lyophilized vaccine