

<https://doi.org/10.29296/25419218-2019-08-01>

© Коллектив авторов, 2019
УДК 615.076.7

Применение методов флюоресцентного окрашивания для определения микроорганизмов в фармацевтическом анализе

О.В. Гунар, Н.Г. Сахно, М.В. Рощина

Научный центр экспертизы средств медицинского применения

Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Гунар Ольга Викторовна – начальник лаборатории микробиологии Научного центра экспертизы средств медицинского применения (НЦЭСМП). Тел.: +7 (916) 342-89-01. E-mail: gunar@expmed.ru. <https://orcid.org/0000-0002-4825-8356>

Сахно Надежда Геннадьевна – главный эксперт лаборатории микробиологии НЦЭСМП, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (916) 561-52-94. E-mail: nadine87@inbox.ru. <https://orcid.org/0000-0003-1773-7423>

Рощина Марина Владимировна – эксперт 1 категории лаборатории микробиологии НЦЭСМП, кандидат фармацевтических наук. Тел.: +7 (915) 484-00-23. E-mail: m.roshchina@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-5966-5822>

РЕЗЮМЕ

Стандартные методы обнаружения и количественного определения бактерий и грибов из лекарственных средств (ЛС) не подходят для быстрой оценки (менее 24 ч) и выделения поврежденных или находящихся в некультивируемом состоянии микроорганизмов. Рассмотрены альтернативные методы прямого определения микробных клеток в образце при помощи флюоресцентного окрашивания, ключевого этапа, например таких современных технологий, как микроскопия, проточная и твердофазная цитометрия, не имеющих в настоящее время широкого применения в практике фармацевтического анализа из-за методических сложностей. Описаны широко используемые в научно-исследовательских и практических целях различные флюорохромы, особенности и ограничения их применения, проведен обзор физиологических и таксономических флюоресцентных красителей. Подчеркиваются значимость и перспективность флюоресцентного окрашивания исследуемых образцов в сочетании с современными развивающимися технологиями, делается вывод о том, что применение различных флюорофоров на практике требует тщательного подбора условий, разработки и валидации методик проведения анализа.

Ключевые слова: фармацевтический анализ, определение микроорганизмов, флюоресцентное окрашивание, флюорохром.

Для цитирования: Гунар О.В., Сахно Н.Г., Рощина М.В. Применение методов флюоресцентного окрашивания для определения микроорганизмов в фармацевтическом анализе. Фармация, 2019; 68 (8): 5–9. <https://doi.org/10.29296/25419218-2019-08-01>

USE OF FLUORESCENCE STAINING TECHNIQUE FOR IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS IN PHARMACEUTICAL ANALYSIS

O.V. Gunar, N.G. Sakhno, M.V. Roshchina

Research Center for Examination of Medical Products, Ministry of Health of the Russian Federation; 8, Petrovsky Boulevard, Build. 2, Moscow 127051, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Gunar Olga – Head of Laboratory of Microbiology of Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Doctor of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +7 (916) 342-89-01. E-mail: gunar@expmed.ru. <https://orcid.org/0000-0002-4825-8356>

Sakhno Nadezhda – Chief expert of Laboratory of Microbiology of Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, PhD. Tel.: +7 (916) 561-52-94. E-mail: nadine87@inbox.ru. <https://orcid.org/0000-0003-1773-7423>

Roshchina Marina – 1-st category Expert of Laboratory of Microbiology of Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, PhD. Tel.: +7 (915) 484-00-23. E-mail: m.roshchina@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-5966-5822>

SUMMARY

Standard techniques for the detection and quantification of bacteria and fungi from drugs are not adequate for rapid (less than 24 hours) assessment of injured or uncultivated microorganisms and for their isolation. The paper considers alternative methods for the direct determination of microbial cells in a sample, by using fluorescence staining at the key stage, for example, up-to-date technologies, such as microscopy and flow and solid-phase cytometry, which have not currently found a wide utility in the practice of pharmaceutical analysis due to methodological problems. It describes different fluorochromes widely used for scientific and practical purposes, the specific features and limitations of their application and gives a review of physiological and taxonomic fluorescent dyes. Emphasis is placed on the importance and prospects of fluorescence staining of samples under study in combination with current developing

technologies; it is concluded that the application of different fluorophores requires careful selection of conditions and development and validation of procedures for analysis in practice.

Key words: pharmaceutical analysis; identification of microorganisms; fluorescence staining; fluorochrome.

For citation: Gunar O.V., Sakhno N.G., Roshchina M.V. Use of fluorescence staining technique for identification of microorganisms in pharmaceutical analysis. *Farmatsiya (Pharmacy)*, 2019; 68 (8): 5–9. <https://doi.org/10.29296/25419218-2019-08-01>

Эталонным методом выделения и количественного определения жизнеспособных микроорганизмов из лекарственных средств (ЛС) является посев на питательные среды. Недостаток данного способа – его продолжительность: для получения результата может потребоваться инкубация в течение 72 ч и более. В некоторых случаях такая продолжительность неприемлема. Для обеспечения более быстрой оценки количества «жизнеспособных» микробных клеток в образце разработаны альтернативные методы прямого определения, которые подразумевают обнаружение и подсчет флуоресцентно окрашенных микробных клеток. При этом наличие роста на питательной среде не требуется. Данный подход незаменим для выделения жизнеспособных, но поврежденных, прихотливых, находящихся в неактивном или некультивируемом состоянии микроорганизмов. К таким методикам относятся проточная и твердофазная цитометрия (цитофлуориметрия), эпифлуоресцентная микроскопия и др. [1–3]

Метод проточной цитометрии предназначен для качественного и количественного определения микроорганизмов в образцах ЛС, воды и др. Он позволяет фиксировать изменения в морфологии клеток, их жизнеспособности, физиологической и метаболической активности. Данный метод позволяет проводить экспрессное изучение свойств отдельных клеток микроорганизмов даже в несинхронной культуре, т.е. в случае, когда члены популяции находятся в разных фазах роста [2]. Практическое применение данной технологии перспективно при определении эффективности противомикробных препаратов (антибиотиков, антимикотиков) [1–7]. Методом твердофазной цитометрии можно выявлять и учитывать количество единичных клеток. Кроме того, он применяется в фармацевтической промышленности для анализа воды и других фильтрующихся жидкостей, а также образцов микробиологического мониторинга [3, 8].

Несмотря на значительные успехи в разработке и экспериментальном изучении методов проточной и твердофазной цитометрии, в настоящее время они не нашли широкого применения в

практике фармацевтического анализа. Этому препятствуют методические и экономические трудности и др. [8]. Кроме того, оценка, проверка и реализация альтернативных микробиологических методов, как правило, представляет собой дорогостоящий и трудоемкий процесс [9].

Одной из систем, сочетающих в себе традиционный метод мембранной фильтрации и флуоресцентное окрашивание микроколоний микроорганизмов, является «Milliflex® Quantum» («Merck», Германия). Данная технология разработана для быстрого количественного определения микроорганизмов в образцах, физико-химические свойства которых позволяют проводить испытание методом мембранной фильтрации.

Временной диапазон определения тестштаммов микроорганизмов методом флуоресцентного окрашивания зависит от вида определяемого микроорганизма и составляет 12–24 ч [10]. Время обнаружения изолятов, выделенных из ЛС или производственной среды, может существенно отличаться от представленных результатов [11].

Ключевой этап описанных технологий – окрашивание микроорганизмов, позволяющее производить учет жизнеспособных клеток независимо от их физиологического статуса и стадии клеточного цикла (учитываются вегетативные клетки, споры, покоящиеся и супрессированные). Для обработки объектов, не обладающих природной способностью люминесцировать, используют флуорохромы (флуорофоры), которые способны расходовать часть энергии поглощенного света на флуоресценцию – излучение света определенной длины волны при возвращении из возбужденного состояния в стабильное. При этом испускаемый свет отличается от поглощенного длиной волны и интенсивностью. В соответствии с правилом Стокса, длина волны испускаемого света больше, чем длина поглощаемого, поскольку при поглощении часть энергии рассеивается в виде тепла, а излучение света большей длины волны требует меньше энергии. Каждый флуорохром характеризуется очень специфическим спектром поглощения и испускания, который определяют путем изме-

рения относительной интенсивности флюоресценции при определенной длине волны. Применение подходящего источника света и фильтров для различения коротковолнового возбуждения и длинноволнового излучения обеспечивает высокоселективные условия для визуализации отдельной флюоресцентной молекулы с низким уровнем интерференции [12–14].

Флюорохромы представляют собой красители (аурамин, корифосфин и др.), пигменты и их производные (хлорофилл, порфирины), а также некоторые алкалоиды (берберин) и др. К настоящему времени синтезирован широкий спектр соединений, обеспечивающих флюоресценцию от ближнего ультрафиолета до 500 нм. Цвет флюоресценции малых органических красителей может значительно различаться. Характеристиками красителя можно управлять, изменяя природу функциональных групп, присоединенных к флюорофору [14]. Перечень красителей, предназначенных для идентификации биомолекул, тканей и клеток, а также динамического определения изменений, происходящих в клетке (рН, Ca^{2+} , содержание кислорода и др.), непрерывно расширяется [15–18].

Новое поколение флюорохромов, обладающих определенными преимуществами по сравнению с такими традиционными органическими флюоресцентными красителями, как флюоресцеин, родамин и их производные, а также флюоресцентными белками (фикоэритрином, зеленым флюоресцентным белком и др.), представляют собой неорганические флюоресцентные нанокристаллы или квантовые точки [16–19]. Их применение в иммуногистохимии и проточной цитометрии обусловлено существенными преимуществами по сравнению с органическими флюорохромами. Они поглощают свет в широком диапазоне – от ближнего ультрафиолета до дальней красной области, тогда как их спектр испускания сравнительно узок и определяется размером частиц. В связи с этим различные нанокристаллы (например, частицы селенида кадмия), возбуждаемые волнами одной и той же длины, флюоресцируют в диапазоне от голубой до ближней инфракрасной области. Квантовые точки намного более фотостабильны, чем низкомолекулярные органические флюорохромы, что дает возможность длительного наблюдения за флюоресцентной меткой в живых клетках и тканях. Однако, несмотря на это, реальная нестабильность флюоресценции делает их малопригодными для количественных измерений [20].

Квантовые точки представляют собой перспективный класс соединений, однако их практическое применение в настоящее время затруднено по ряду причин: из-за отсутствия стандартизации, что вызывает значительную вариабельность размера, состава и характеристик; сравнительно небольшой панели коммерчески доступных квантовых точек; преципитации конъюгатов в водных растворах; высокой стоимости по сравнению с органическими флюорохромами и др. [18].

Различают несколько видов окрашивания: неспецифическое, которое обеспечивается эндоферментами, универсальными для всех микроорганизмов, и специфическое, позволяющее окрашивать отдельные виды микроорганизмов. Это обеспечивается за счет использования специфических эндоферментов, ДНК-последовательностей, антител и др.

Среди наиболее часто применяемых флюорохромов выделяются: флюоресцеин изотиоцианат (FITC), фикоэритрин (PE, RD1), перидинин-хлорофилл протеин (Per-CP), алофикоцианин (APC), а также tandemные красители (фикоэритрины Cy5 и Cy7) [21].

Для цитометрических исследований используют этидиум бромид, пропидиум йодид, нильский красный, тинопал CBS-X, родамин 123 и др. [22]. Для проведения флюоресцентной микроскопии могут быть использованы такие соединения, как 4',6-диамино-2-фенилиндол (DAPI), акридиновый оранжевый, а также такие окислительно-восстановительные красители, в частности 5-циано-2,3-дитолилтетразолиум хлорид (CTC).

Краситель Chem Chrome V6 (ранее ChemChrome B или V3) содержит карбокси-ФДА, производное флюоресцеина диацетата (ФДА), нефлюоресцирующее соединение, которое диссоциирует с образованием интенсивно зеленого флюоресцирующего вещества (карбоксифлюоресцеин). В сочетании с соответствующим буфером (Chem Sol B12) это соединение сохраняется только в клетках с неповрежденной цитоплазматической мембраной. Так как краситель вытекает из мертвых клеток из-за их повреждения мембран, окрашивания не происходит. Таким образом, Chem Chrome V6 выполняет функцию индикатора ферментативной активности и целостности клеточных мембран [22].

Флюоресцентные красители подразделяются на физиологические и таксономические [17]. Физиологические красители связываются с определенными молекулами в клетке или являются маркерами метаболической активности (напри-

мер, активности ферментов и мембранного потенциала). Подобные пробы неспецифические, т.е. их действие не зависит от вида микроорганизма. В зависимости от того, обладает ли флюорохром способностью проникать через клеточную мембрану, он будет окрашивать жизнеспособные и мертвые клетки или только мертвые клетки. К так называемым «витальным» красителям, позволяющим различить «живые» и «мертвые» клетки, относится, например, акридиновый оранжевый. Разделение основывается на том, что в нежизнеспособных клетках нуклеиновые кислоты, которые составляют основную мишень акридинового оранжевого, быстро деградируют. «Живые» клетки становятся зелеными, в то время как «мертвые» клетки окрашиваются в красный или оранжевый цвет.

В случае экспоненциально растущих культур, как правило, наблюдается корреляция между количеством жизнеспособных клеток и значением, полученным путем прямого подсчета с помощью акридинового оранжевого. Еще один недостаток этих типов красителей заключается в том, что они обычно вводятся в клетки, зафиксированные формальдегидом или глутаральдегидом. Поэтому используемые фиксаторы могут оказывать влияние на результат исследования.

Другие флюоресцентные красители, например пропидиум йодид или этидиум бромид, в норме элиминируют из живых микроорганизмов с неповрежденными цитоплазматическими мембранами, а их поглощение часто используется для индикации гибели клеток.

J.P. Diaper и C. Edwards [23] применяли проточную цитометрию для определения жизнеспособных микроорганизмов различными красителями: производными флюоресцеина диацетата (ФДА) (карбокси-ФДА, ацетоксиметилловые эфиры 2,7-бис-(2-карбокситил)-5(6)-карбоксифлюоресцеина и кальцеина), а также Chem Chrome В. Ни один из красителей не оказался универсальным, однако было установлено, что Chem Chrome В окрашивает наиболее широкий диапазон как грамположительных, так и грамотрицательных видов, в то время как производные ФДА в большей степени подходят для окраски грамположительных бактерий.

P. Vreeuweg et al. показали, что ФДА, а также 5- и 6-карбокси-ФДА обладают способностью проникать в дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae*. Было выявлено, что накопление флюоресцеина наиболее вероятно связано с активностью эстераз, поскольку скорость перемещения ФДА была

выше, чем скорость гидролиза. Напротив, аккумуляция карбоксифлюоресцеина ограничена более медленным перемещением карбокси-ФДА через клеточную оболочку. При этом наблюдалось элиминирование карбоксифлюоресцеина жизнеспособных клеток [24].

Согласно некоторым данным, флюоресцеин может быть извлечен (или вытекать в случае незначительного повреждения мембраны) из бактериальных клеток, сохраняющих жизнеспособность. Следует отметить, что проницаемость клеток может быть достигнута искусственно, например путем добавления органического растворителя, нарушающего барьерные свойства мембраны. Так, например, 10М раствор этилендиамин-тетраацетата-5 (ЭДТА) связывает ионы кальция и магния и тем самым разрушает структуру мембранных белков [25]. Напротив, процедура извлечения может приводить к тому, что неповрежденная клетка становится непроницаемой к красителю, который на самом деле обладает способностью проникать через нее [22].

G. Von Nebe-Caron и R.A. Badley различают репродуктивные клетки, жизнеспособные клетки (метаболически активные), неповрежденные клетки (сохраняющие целостность мембраны) и мертвые клетки, дискриминация которых хорошо проиллюстрирована методом проточной цитометрии с помощью разнообразных «коктейлей» красителей [25].

К селективным физиологическим красителям относится также флюоресцеин- β -D-диглюкуронид, субстрат для выявления фермента β -глюкуронидазы, позволяющий обнаруживать бактерии *Escherichia coli*. Таксономические красители, такие как антитела и нуклеиновые кислоты или пептиды нуклеиновой кислоты, избирательно окрашивают специфические клетки путем ассоциации с антигенами или ДНК/РНК. Соответствующие подходы определяются как иммунофлюоресценция и флюоресцентная *in-situ* гибридизация (FISH). Основным недостатком этих способов окрашивания – низкая интенсивность флюоресценции, что приводит к получению ложноотрицательных результатов. Величина сигнала может быть увеличена путем двойной маркировки антител, процедуры, в которой первично и вторично антитела окрашиваются флюоресцеина изотиоцианатом. Поскольку оба сигнала являются аддитивными, интенсивность флюоресценции будет заметно увеличена. Такой подход применяется для селективного выделения грибов [3].

Таким образом, флуоресцентное окрашивание различных образцов в сочетании с развивающимися технологиями весьма перспективно. Практическое применение различных флуорофоров для конкретных целей требует тщательного подбора условий, разработки и валидации методики проведения анализа.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Литература/References

1. Балалаева И.В. Проточная цитофлуориметрия. Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2014; 75. [Balalaeva I.V. Flow cytofluorimetry. Nizhny Novgorod: Nizhny Novgorod State University, 2014; 75 (in Russian)].
2. Suller M.T.E., Stark J.M., Lloyd D. A flow cytometric study of antibiotic-induced damage and evaluation as a rapid antibiotic susceptibility test for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1997; 40 (1): 77–83. <https://doi.org/10.1093/jac/40.1.77>
3. Vanhee L., Nelis H., Coenye T. Detection and quantification of viable airborne bacteria and fungi using solid-phase cytometry. *Nature Protocols*, 2009; 4: 224–31. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.228>
4. Ramani R., Ramani A., Wong S.J. Rapid flow cytometric susceptibility testing of *Candida albicans*. *Journal of clinical microbiology*, 1997; 35 (9): 2320–4.
5. Rudensky B., Broidie E., Yinnon A.M. et al. Rapid flow-cytometric susceptibility testing of *Candida* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005; 55 (1): 106–109. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh492>
6. Chaturvedi V., Ramani R., Pfaller M.A. Collaborative study of the NCCLS and flow cytometry methods for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans*. *Journal of clinical microbiology*, 2004; 42 (5): 2249–51. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.5.2249-2251.2004>
7. Gauthier C., St-Pierre Y., Villemur R. Rapid antimicrobial susceptibility testing of urinary tract isolates and samples by flow cytometry. *Journal of Medical Microbiology*, 2002; 51 (3): 192–200. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-3-192>
8. Van Belkum A., Dunne W.M. Next-generation antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013; 51 (7): 2018–24. <https://doi.org/10.1128/JCM.00313-13>
9. Riley B. Rapid Microbiology Methods in the Pharmaceutical Industry. American pharmaceutical review, 2006 [Electronic resource]. Access mode: <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-articles/113094-Rapid-Microbiology-Methods-in-the-Pharmaceutical-Industry>
10. Гунар О.В., Сахно Н.Г. Количественное определение микроорганизмов-контаминантов лекарственных средств с использованием системы «Milliflex® quantum». *Фармация*, 2019; 68 (3): 5–11. [Gunar O.V., Sakhno N.G. Quantitative detection of microbial contaminants of drugs, by using the «Milliflex® quantum system». *Farmatsiya*, 2019. 68 (3): 5–11. <https://doi.org/10.29296/25419218-2019-03-01> (in Russian)].
11. Gordon O., Goverde M., Staerk A., Roesti D. Validation of Milliflex® Quantum for Bioburden Testing of Pharmaceutical Products. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 2017; 71 (3): 206–24. <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2016.007450>
12. Сайфитдинова А.Ф. Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов. СПб.: 2011; 110. [Saifitdinova A.F. Two-dimensional fluorescence microscopy for the analysis of biological samples. SPb.: 2011; 110 (in Russian)].
13. Jeppe L. Nielsen, Robert J. Seviour, Per H. Nielsen Chapter 7. Microscopy. *Experimental methods in wastewater treatment*, 1st ed., ed. M C M van Loosdrecht; Per Halkjær Nielsen; Carlos Manuel López Vázquez; Damir Brdjanovic. London : IWA Publishing, 2016; 263–84.
14. Lavis L.D., Raines R.T. Bright Ideas for Chemical Biology. *ACS Chemical Biology* 3 – 2008; 3: 142–55. <https://doi.org/10.1021/cb700248m>
15. Hong S.D., Dhong H.J., Chung S.K. et al. Hematoxylin and eosin staining for detecting biofilms: practical and cost-effective methods for predicting worse outcomes after endoscopic sinus surgery. *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology*, 2014; 7:1 93–197. <https://doi.org/10.3342/ceo.2014.7.3.193>
16. Дивянин Н.Н. Получение и исследование флуорофоров для создания «флуоресцентного языка». М.: 2017. [Divyanin N.N. Obtaining and researching fluorophores to create a «fluorescent language». Moscow, 2017 (in Russian)].
17. Нетрусов А.И., Бонч-Осмоловская Е.А., Горленко В.М. и др. (Под ред. А.И. Нетрусова). Экология микроорганизмов. М.: Академия, 2004; 272. [Netrusov A.I., Bonch-Osmolovskaya E.A., Gorlenko V.M. et al. (by ed. A.I. Netrusov). *Ecology of microorganisms*. Moscow: Academy, 2004; 272 (in Russian)].
18. Воробьев И.А., Рафаловская-Орловская Е.П., Гладких А.А. Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы в микроскопии и цитометрии. *Цитология*, 2011; 53 (5): 392–403. [Vorobiev I.A., Rafalovskaya-Orlovskaya E.P., Gladkikh A.A. Fluorescent semiconductor nanocrystals in microscopy and cytometry. *Cytologiya*, 2011; 53 (5): 392–403 (in Russian)].
19. Олейников В.А., Суханова А.В., Набиев И.Р. Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы в биологии и медицине. *Российские нанотехнологии*, 2007; 2 (1–2): 160–73. [Oleinikov V.A., Sukhanova A.V., Nabiev I.R. Fluorescent semiconductor nanocrystals in biology and medicine. *Rossiyskie nanotexnologii*, 2007; 2 (1–2): 160–73 (in Russian)].
20. Lee S.F., Osborne M.A. Brightening, blinking, bluing and bleaching in the life of a quantum dot: friend or foe? *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2009; 10 (13): 2174–91. DOI: 10.1002/cphc.200900200
21. Залесский В.Н. Молекулярная диагностика: лазерная сканирующая и проточная цитометрия в исследовании апоптоза. *Украинский медицинский журнал «Часопис»*, 2010; 4 (78): 27–31. [Zalesky V.N. Molecular diagnostics: laser scanning and flow cytometry in the study of apoptosis. *Ukrainian Medical Journal «Chasopis»*, 2010; 4 (78): 27–31 (in Ukrainian)].
22. Davey H.M., Kell D.B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiological reviews*, 1996; 60 (4): 641–96.
23. Diaper J.P., Edwards C. The use of fluorogenic esters to direct viable bacteria by flow cytometry. *Journal of Applied Bacteriology*, 1994; 77: 221–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb03067>
24. Breeuwer P., Drocourt J.L., Bunschoten N. et al. Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995; 61(4): 1614–9.
25. Von Nebe-Caron G., Badley R.A. Viability assessment of bacteria in mixed populations using flow cytometry. 1995; 179 (1): 55–66. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1995.tb03612>

Поступила 25 сентября 2019 г.

Received 25 September 2019

Принята к публикации 28 октября 2019 г.

Accepted 28 October 2019