

УДК 57.083.13:579.243.13+579.22+57.017

ДЛИТЕЛЬНОЕ ВЫЖИВАНИЕ *ENTEROCOCCUS FAECIUM* В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ СТАБИЛИЗАЦИИ И ИММОБИЛИЗАЦИИ КЛЕТОК

© 2024 г. О. А. Галуза^{a, b, *}, Г. И. Эль-Регистан^a, Т. А. Канапацкий^a, Ю. А. Николаев^a

^a Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071, Россия

^b Bavar+ JSC, Moscow, 127206, Russia

*e-mail: olesya_galuza@mail.ru

Поступила в редакцию 19.04.2024 г.

После доработки 20.05.2024 г.

Принята к публикации 21.05.2024 г.

Молочнокислые бактерии (МКБ) играют важную роль в биотехнологиях и биомедицине. Их важнейшим недостатком является быстрое отмирание культур и препаратов при хранении. Изучение способов повышения длительности выживания молочнокислых бактерий в различных условиях является актуальной научно-прикладной задачей и составило цель настоящей работы. Объектом была молочнокислая бактерия *Enterococcus faecium*. Было показано, что в стареющих планктонных культурах бактерии быстро теряют жизнеспособность (численность жизнеспособных клеток за 1 мес. снижается на 2–4 порядка). Цикл развития популяции *E. faecium* в этих условиях завершается образованием цистоподобных покоящихся клеток двух типов: L-форм и гипометаболических клеток. Применение химических стабилизаторов, гуминовых веществ (типичных компонентов почв), повышает численность выживающих клеток в 2–3 раза. При поверхностной иммобилизации (адсорбции) на органо-силанольных или неорганических носителях (органосилан, кремнезем) численность выживающих в условиях голодания клеток повышается в 1.25–3 раза. Наиболее эффективным подходом была иммобилизация клеток в силанольно-гуматные гели (повышение численности выживающих клеток до 35 раз относительно контроля). Полученные данные раскрывают механизмы и формы выживания МКБ в природных условиях (состояние гипометаболизма, наличие специализированных форм покоя), а также могут быть использованы для разработки способов длительного хранения МКБ в их биопрепаратах.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, *Enterococcus faecium*, формы выживания, иммобилизация бактерий, жизнеспособность бактерий, биопрепараты

DOI: 10.31857/S0026365624050096

Одна из характеристик живых систем — это периодичность их развития. У микроорганизмов развитие их популяций как вида, а на более высоком уровне — развитие микробных сообществ, также осуществляется периодически. Одной из стадий цикла развития микробных популяций в условиях, не благоприятствующих росту, является стадия их выживания, сопряженная с метаболическим покоем клеток. Особое внимание уделяется изучению покоя патогенных и симбионтных бактерий, к которым относятся молочнокислые бактерии (МКБ), чья роль в симбиозе с человеком хорошо освещена (Lyte, 2013; Oleskin et al., 2014; Oleskin, Shenderov, 2020; Олескин и соавт., 2020). Такое внимание к формам покоя бактерий обусловлено их ролью в персистенции патогенных и условно-патогенных бактерий как формах носительства и причине

рецидивов инфекционных заболеваний, а также очевидным значением для сохранения жизнеспособных клеток в биотехнологиях и сферах деятельности человека, связанных с микроорганизмами. При использовании биокатализаторов акцент делается на получении препаратов не на основе покоящихся форм, а напротив, клеток, длительно обладающих высокой функциональной активностью, иммобилизованных тем или иным способом (Ефременко, 2018; Radosavljević et al., 2022). Такого рода препараты нуждаются в наличии (или постоянном поступлении) источников питания для поддержания жизнеспособности и метаболической активности иммобилизованных клеток (Ефременко, 2018).

Одной из перспективных основ для биопрепаратов являются формы покоя (ПФ), покоящиеся

клетки цистоподобного типа (ЦПК) (Бухарин и соавт., 2005; Эль-Регистан и соавт., 2006; Мулюкин и соавт., 2009). ЦПК образуются на завершающей стадии развития периодических культур грамотрицательных бактерий (а также – и грамположительных в условиях репрессии спорообразования). Численность ЦПК, как правило, невелика (от 0.01 до 1%) и соответствует численности клеток-персистеров (Balaban et al., 2004, 2019). Покоящиеся формы типа ЦПК были описаны и у молочнокислых бактерий (Голод и соавт., 2009; Лойко и соавт., 2014; Эль-Регистан и соавт., 2023).

Ранее было установлено положительное влияние гуминовых веществ на длительное выживание планктонных культур углеводородокисляющих бактерий (Nikolaev et al., 2020; Николаев и соавт., 2019, 2020) и их иммобилизованные клетки в силанольно-гуматных гелях (Николаев и соавт., 2021; Nikolaev et al., 2021). Эти подходы не были испытаны для стабилизации культур МКБ в ходе длительного хранения.

Целью настоящей работы было исследовать эффективность различных приемов длительного хранения молочнокислой бактерии *Enterococcus faecium*: (1) в виде планктонных культур, (2) в планктонных популяциях, иммобилизованных на поверхности гелей или в силанольно-гуматные гели, (3) в планктонных популяциях в присутствии гуматов, (4) в популяциях, выращенных в присутствии гелевых сорбентов.

Интерес к этому объекту вызван тем, что он входит в состав пробиотических продуктов, а также может быть пробиотиком кормового назначения (Azzaz et al., 2022).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. В работе была использована бактерия *Enterococcus faecium* M3185 из коллекции UNIQEM Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН.

Условия культивирования. Бактерии культивировали в жидких и на плотных средах: MRS (“Conda Pronadisa”, Испания) и LB (лизогенный бульон Луриа-Бертани, “VWR Chemicals”, США), обезжиренном молоке (сухое молоко, “Уфа-молоко”, РФ). Бактерии выращивали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл среды на орбитальной качалке (120 об./мин), а также в пенициллиновых флаконах объемом 10 мл с 2 мл среды на орбитальном шейкере Biosan PSU-20i (“BioSan”, Латвия) (150 об./мин) при температуре 28°. Инокулятом служили стационарные культуры, выращенные в колбах, как описано выше, в течение 24 ч (до стационарной фазы).

Численность жизнеспособных клеток бактерий определяли микрометодом (Pious et al., 2015) по числу колониеобразующих единиц (КОЕ),

высевая аликвоты (5 мкл) десятичных разведений бактериальных культур на плотную среду LB (1.5% агара) и подсчитывая количество выросших колоний на 1, 3, 5 и 7 сут инкубации (Нетрусов и соавт., 2005).

Определение метаболической активности. О метаболической активности (гетероферментативном молочнокислом брожении) бактерий судили по интенсивности выделения ими CO₂. Аликвоты бактериальной суспензии (400 мкл) вносили в герметически закрытый флакон объемом 40 мл с 4 мл солевого фона среды MRS (pH 5.5–5.0) и инкубировали на орбитальном шейкере Biosan, PSU-200 (“Biosan”, Латвия) при температуре 28° в течение 24 ч. После стабилизации уровня CO₂ в газовой фазе (через 1–2 ч после введения пробы) вносили раствор глюкозы (400 мл до концентрации 0.8%) и инкубировали 24 ч. Периодически отбирали шприцем пробы газовой фазы и определяли в них количество выделенного CO₂ хроматографически (Кристалл 5000, “Хроматэк”, РФ). По количеству выделенного CO₂ судили о метаболической активности (брожении) клеток в условиях наличия субстрата, глюкозы. Метаболическая активность клеток энтерококков была использована как косвенный показатель количества жизнеспособных клеток и глубины их покоя.

Способы пролонгирования жизнеспособности клеток *E. faecium*. Для стабилизации клеток энтерококков использовали четыре разных подхода: 1) к клеткам, выращенным в жидкой среде до стационарной фазы, добавляли химические стабилизаторы – гуматы (табл. 1); 2) клетки стационарной фазы иммобилизовали поверхностно на сорбентах (табл. 2); 3) клетки стационарной фазы иммобилизовали в силанольно-гуматные гели; 4) клетки выращивали в жидкой культуре в присутствии гелей (табл. 3). В последнем случае имело место микро-гетерофазное культивирование, поскольку в среде присутствовали две фазы – жидкая и твердая, но при этом реологические свойства жидкости позволяли выращивать культуру как жидкую, т.е. в колбах на качалке. Контроль выживаемости клеток осуществляли путем определения численности КОЕ/мл и метаболической активности клеток, как описано выше.

Применение химических стабилизаторов. В бактериальные культуры стационарной фазы роста, выращенные в колбах, как описано выше, и разлитые в пробирки Хангейта (объемом 20 мл по 5 мл), вносили водные растворы гуматов (табл. 1) до конечной концентрации 0.15 или 0.5 г/л. Образцы хранили в статических условиях при комнатной температуре в течение нескольких месяцев, периодически отбирая пробы для определения численности жизнеспособных клеток (КОЕ/мл).

Иммобилизация выращенных клеток с использованием гелей. В работе использовали три типа гелей на основе кремниевых соединений. Для

Таблица 1. Характеристика гуминовых веществ, использованных для стабилизации клеток *E. faecium*

Наименование	Характеристика, источник
Гумат Сахалинский (“Биомир 2000”, Москва, РФ)	Раствор 5% щелочной вытяжки из леонардита
Лигногумат (ООО “НПО РЭТ”, Санкт-Петербург, РФ)	Растворимый порошок, полусинтетического происхождения. Лигносульфонат
Гуматы Техноэкспорт (ТПК “Техноэкспорт”, Украина)	Растворимый порошок с содержанием не менее 70% гуминовых солей, полученных из бурого угля
Паохумус (Powhumus WSG) (“Humintech Ltd”, Германия)	Растворимый порошок гумата калия, произведенный по технологии мокрой щелочной экстракции из леонардита
Иркутские гуматы (Humate +7) (“АгроТехГУМАТ”, Иркутск, РФ)	Растворимый порошок гумата калия и натрия, получаемый из бурого угля
Фульвокислоты (Fulvital WSP 80) (“Humintech Ltd”, Германия)	Растворимый порошок; источник – подземные воды

Таблица 2. Характеристика гелей, использованных для стабилизации клеток *E. faecium*, предварительно выращенных в жидкой культуре

Наименование	Характеристика	Концентрация, г/л
Энтеросгель (ООО “ТНК Силма”, Москва, РФ)	Гелеобразная суспензия полигидрата полиметилсилоксана	70
Полисорб МП (АО “Полисорб”, Копейск, РФ)	Гелеобразная суспензия из диоксида кремния	50 или 40
Силанольно-гуматный гель (Лабораторное получение)	Гель, состоящий из гуматов Паохумус или Байкал и органо-силанольного полимера	17 или 24

Таблица 3. Характеристика сорбентов, использованных для стабилизации клеток *E. faecium*, в ходе гетерофазного культивирования

Наименование	Характеристика	Концентрация, г/л
Энтеросгель (ООО “ТНК Силма”)	Пористая глобулярная структура полиметилсилоксана полигидрата (кремнийорганическое соединение), размер частиц не более 300 мкм	4
Полисорб МП (АО “Полисорб”)	Мелкодисперсный диоксид кремния, размер частиц до 90 мкм	3.3

поверхностной иммобилизации использовали полиметилсилоксан (Энтеросгель) и высокодисперсный кремнезем (Полисорб), для иммобилизации в матрицу геля использовали силанольно-гуматный гель (табл. 2). Для иммобилизации на поверхность гелей клетки стационарной фазы роста смешивали со свежеприготовленным гелем (1 : 1, об./об.; концентрация гелей – см. табл. 2), разливали по пробиркам типа Фалькон (15 мл) или Эппендорф (2 мл) и оставляли до застывания геля, затем хранили в течение нескольких месяцев, периодически определяли численность жизнеспособных клеток (КОЕ/мл).

Полиметилсилоксана полигидрат представлен в виде гелеобразующей матрицы, которая имеет глобулярное строение и состоит из ансамбля глобул. Глобулы, связываясь между собой силоксановыми

связями, формируют поры в виде пространства между ними, заполненные водой. Частицы препарата, как правило, образуют непрерывную сеть в суспензии. Эти частицы можно рассматривать как двумерные листы. Глобулы метилкремниевой кислоты имеют размеры до 300 мкм (Маркелов и соавт., 2008).

Высокодисперсный кремнезем – коллоидный диоксид кремния с химической формулой SiO₂. При попадании в воду присоединяет к себе гидроксильные группы и формирует сложную пространственную структуру. Частицы диоксида кремния имеют размеры до 90 мкм (Маркелов и соавт., 2008).

Иммобилизация клеток бактерий в силанольно-гуматные гели. Силанольно-гуматные гели получали при использовании двух видов гуматов Паохумус (Powhumus WSG) (“Humintech”, Германия)

и Байкал (“АгроТехГумат”, РФ) и органосилана 3-аминопропилтриэтоксисилана (АПТЭС) (“АГМ-9”, ООО “Пента 91”, Россия) по разработанной ранее методике (Volikov et al., 2016) с модификацией (Nikolaev et al., 2021; Николаев и соавт., 2021). К 10 мл 10% раствора гумата при интенсивном перемешивании добавляли 250 или 350 мкл АПТЭС; полученный раствор титровали 10% раствором уксусной кислоты до значений pH 6–7, затем вносили 5 мл культуры энтерококка стационарной фазы роста, не переставая перемешивать. Полученную смесь разливали по 1 мл в конические пробирки Эппендорф объемом 2 мл. В течение 1–2 ч при комнатной температуре происходило желирование смеси. Гель сохранял свои свойства в течение нескольких месяцев, при добавлении воды и интенсивном перемешивании растворялся с высвобождением бактериальных клеток, что обуславливало возможность определения их жизнеспособности (КОЕ/мл), как описано выше.

Микроскопические наблюдения. Для оценки степени адгезии клеток бактерий на различных поверхностях и их авто-агрегирования применяли люминесцентную микроскопию на световом эпифлуоресцентном микроскопе Axio Imager D1 (“Carl Zeiss Microscopy GmbH”, Германия) с фазово-контрастным объективом, а также с использованием флуоресцентного красителя акридиновый оранжевый (“Molecular probes”, США). Использование красителя было необходимо для повышения контрастности изображений.

Электронно-микроскопические исследования. Биомассу бактерий фиксировали 1.5% раствором глутарового альдегида в 0.05 М какодилатном буфере (pH 7.2) при температуре 4° в течение 1 ч, затем трижды отмывали тем же буфером и фиксировали 1% раствором оксида осмия (OsO₄) в 0.05 М какодилатном буфере. После обезвоживания в серии спиртов материал заключали в эпоксидную смолу Epon 812. Затем готовили ультратонкие срезы на микротоме ЛКВ-III (Швеция), срезы контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу при 20° в течение 4–5 мин. Готовые срезы просматривали в микроскопе JEM 1400 (“JEOL”, Япония) при ускоряющем напряжении 120 кВ.

Определение терморезистентности клеток бактерий. О количестве терморезистентных клеток бактерий судили по доле выживших клеток после прогревания аликвот (500 мкл) бактериальных суспензий при температуре 70° в течение 15 мин в пластиковых пробирках типа Эппендорф на термошейкере TS-100 (“Biosan”, Латвия) с последующим высевом на плотную питательную среду для определения численности выживших клеток (КОЕ/мл).

Исследование диссоциации бактериальных популяций. Индекс диссоциации бактериальной популяции определяли как долю (%) выросших на агаризованной среде колоний определенного фенотипа к общему числу колоний. Признаками,

характеризующими фенотип, были цвет, консистенция и размер колоний.

Образование покоящихся форм бактерий. Покоящиеся формы (ПФ) бактерий получали при длительном хранении в статическом режиме планктонных культур. Культуры *E. faecium*, выращенные до стационарной фазы роста, хранили в течение 6 мес. в условиях разного доступа кислорода: (1) в колбах с ватными пробками (максимальный доступ кислорода под малым слоем жидкости); (2) в пробирках Хангейта с ватными пробками (ограниченный доступ кислорода в более высоком столбе жидкости); (3) в пробирках Хангейта с пластмассовыми крышками с резиновой прокладкой (без доступа кислорода). Об образовании ПФ судили по сохранению ими жизнеспособности (образованию колоний на плотных средах); более высокой терморезистентности; отсутствию метаболической активности (на основе выделения CO₂); а также по особенностям их ультраструктурной организации. Эти признаки считаются необходимыми признаками форм покоя (Бухарин и соавт., 2005).

Статистическая обработка данных. Все исследования выполнены в двух биологических повторностях, по три параллельных эксперимента (технические повторности) в каждом. При расчетах определяли среднее арифметическое и стандартное отклонение для $p < 0.05$ с использованием программы Microsoft Excel 2016. Различия между вариантами считали значимыми, если они превышали стандартное отклонение, обычно не превышающее 30%. На рисунках представлены данные типичных экспериментов, в таблицах – средние значения параметров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При культивировании энтерококка в молоке или жидкой среде LB в колбах объемом 250 мл с 50 мл среды в условиях аэрации на роторной качалке, стационарная фаза наступала через 24 ч, максимальный урожай составлял 10⁹ КОЕ/мл. В последующих экспериментах в качестве инокулята использовали стационарные культуры *E. faecium*, выращенные в колбах с перемешиванием в течение 24 ч.

Кривая отмирания популяции *E. faecium*, выращенной на молоке, типичный вид которой представлен на рис. 1, состояла из трех участков.

До 4 сут численность КОЕ не менялась, что соответствует стационарной фазе; в период от 4 до 14 сут скорость отмирания была максимальной, что отражает фазу отмирания обычных стационарных клеток; затем скорость отмирания уменьшалась, образуя “плато” – длительную фазу медленного отмирания, характерную для отмирания субпопуляции клеток-персистеров (Balaban et al., 2004, 2019). Доля выживающих клеток составляла 0.001–1%, что соответствует численности клеток-персистеров,

образующихся в стационарных культурах бактерий (Balaban et al., 2004) и созревающих в культурах возрастом несколько месяцев в ЦПК (Мулюкин и соавт., 2009, 2014).

Сравнение эффективности различных способов пролонгированного хранения E. faecium

Для пролонгированного сохранения жизнеспособности (КОЕ/мл) молочнокислых бактерий *E. faecium* были использованы способы, аналогичные факторам естественной среды обитания МКБ: (1) действие химических стабилизаторов – гуматов при их внесении в стационарные культуры *E. faecium*; (2) иммобилизацию клеток стационарной культуры на поверхность частиц геля; (3) иммобилизацию клеток стационарной культуры в гели различного состава; (4) иммобилизацию клеток на носителях, внесенных вместе с инокулятом и последующим глубинным гетерофазным культивированием.

Полученные препараты хранили в “провокационных условиях”, т.е. при комнатной температуре и доступе кислорода в статическом режиме в течение 6 мес., периодически определяя титр жизнеспособных клеток (КОЕ/мл).

Влияние гуминовых веществ на выживаемость клеток *E. faecium*. Гуминовые вещества содержат остатки фенольных соединений, в том числе и алкилрезорцинов, которые обладают активностью факторов межклеточной коммуникации микроорганизмов и проявляют антистрессовую

и антиоксидантную активность (Kozubek et al., 2001; Николаев и соавт., 2006; Эль-Регистан и соавт., 2006; Sampietro et al., 2013). Внесение ГВ в культуры углеводородокисляющих бактерий (УОБ) стационарной фазы роста способствовало кратному увеличению числа выживающих клеток при их длительном хранении до 4 мес. (Nikolaev et al., 2019). Основываясь на этих результатах, было исследовано выживание клеток энтерококка в присутствии 6 видов гуминовых веществ, различных по составу и происхождению (табл. 1), при их внесении в концентрациях 0.15 и 0.5 г/л в стационарные культуры энтерококка с последующим хранением в течение 1 мес.

Существенное, более чем на 50%, увеличение численности КОЕ наблюдали в присутствии 0.15 г/л Паохумуса и Фульвокислот (рис. 2). Другие гуматы оказывали на титр КОЕ минимальный или отрицательный эффект (рис. 2). Увеличение концентрации ГВ до 0.5 г/л снижало защитный эффект Паохумуса и Фульвокислот и не изменяло эффекта для других ГВ (данные не приводятся).

Таким образом, протекторный эффект ГВ относительно МКБ зависит как от вида гумата, так и от концентрации, аналогично тому, как это было описано для углеводородокисляющих бактерий (УОБ) (Николаев и соавт., 2019, 2020; Nikolaev et al., 2020). При этом защитное влияние гуматов на выживание энтерококка существенно ниже, чем на выживание углеводородокисляющих бактерий, где количество выживших клеток повышалось до 10 раз. Относительно УОБ максимальное защитное действие также оказывал гумат Паохумус.

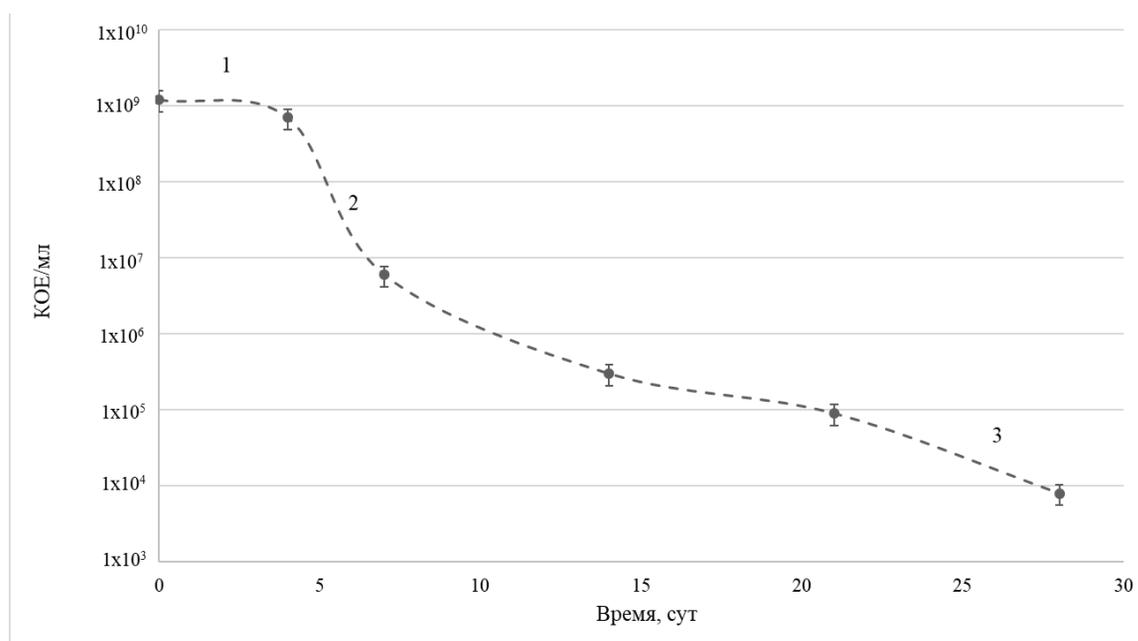


Рис. 1. Динамика изменения численности жизнеспособных клеток *E. faecium* в популяции, выращенной в обезжиренном молоке, при хранении в статических условиях с доступом кислорода воздуха в течение 1 мес. Цифрами отмечены фазы отмирания: 1 – стационарная, 2 – быстрого отмирания, 3 – плато.

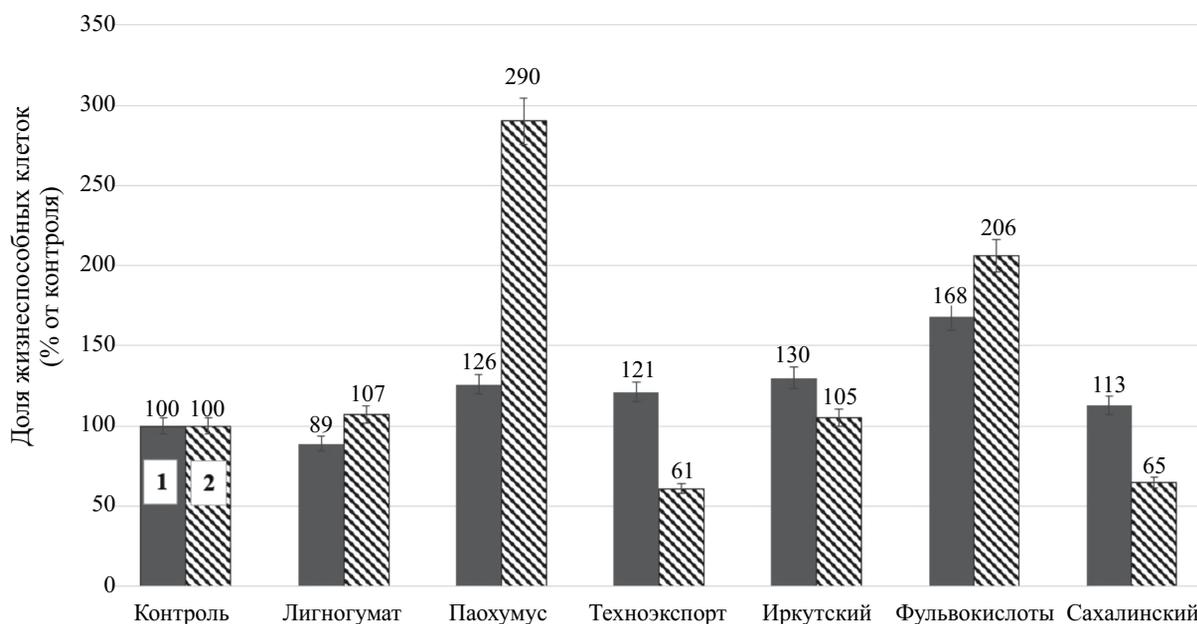


Рис. 2. Доля (% от контроля) выживших клеток *E. faecium*, хранившихся в течение 1 мес. в контрольном (без добавления ГВ) и опытных вариантах с внесением ГВ в концентрации 0.5 г/л (столбец отмечен цифрой 1) и 0.15 г/л (столбец отмечен цифрой 2).

На выживаемость клеток большее влияние оказывали не концентрации вносимых гуматов, 0.15 или 0.5 г/л, а условия хранения образцов — с или без доступа кислорода воздуха (рис. 3).

При внесении гуматов Паохумус и Фульвокислоты в концентрации 0.15 г/л и хранении образцов без доступа кислорода воздуха, было отмечено превышение контрольных значений на 26 и 68% соответственно. При хранении с доступом кислорода воздуха доля выживших клеток в этих вариантах возрастала до 290 и 206% от контроля соответственно.

Причина максимального стрессопротекторного действия со стороны гуматов, а именно Паохумус и Фульвокислоты, очевидно, связана с особенностями их химического состава. Так, эти ГВ характеризовались максимальным содержанием углерода алкильных звеньев (остатков алканов) и минимальным содержанием ароматического углерода, замещенного гетероатомами (гетероциклических соединений) (Nikolaev et al., 2020).

Все препараты с ГВ характеризовались снижением метаболической активности клеток относительно контроля (рис. 3), что свойственно формам выживания бактерий, сохраняющим лишь минимальный уровень метаболизма (Бухарин и соавт., 2005; Fleischmann et al., 2021; Wainwright et al., 2021).

Однако, если бы все клетки были аналогичны аметаболическим цистоподобным покоящимся клеткам, можно было ожидать полного отсутствия метаболической активности. Поскольку этого не наблюдали, можно заключить, что не все клетки

перешли в состояние полного метаболического покоя, а находятся в состоянии гипометаболизма.

Таким образом, на выживание клеток энтерококка при их хранении в течение 1 мес. положительно влияли: внесение в стационарные культуры препаратов гуматов Паохумус и Фульвокислоты, а также хранение культур с доступом кислорода воздуха.

Положительное влияние кислорода на МКБ, обладающие броидильным метаболизмом, т.е. не нуждающиеся в кислороде, связано с тем, что МКБ способны к аэробному дыханию в присутствии гемов в окружающей среде, что повышает их метаболическую активность (Condon, 1987; Maresca et al., 2018; Брюханов и соавт., 2022). Авторы работы Gaudu et al. (2002) предсказали, что выживание лактококков в присутствии экзогенных гемов должно быть выше в аэробных условиях, что мы и наблюдали в нашей работе.

Выживание клеток *E. faecium* при их иммобилизации на/в органические и неорганические гели.

Еще один вариант существования микроорганизмов в природе — их развитие на поверхности или в органических и неорганических гелях. Бактериальные клетки, в адсорбированном на твердых носителях состоянии и иммобилизованные в гели, при постоянном поступлении источников питания длительно сохраняют жизнеспособность и метаболическую активность (Ефременко и соавт., 2018). О выживании иммобилизованных в гелях бактерий в отсутствие источников питания информации нет, хотя такие ситуации в природе естественны.

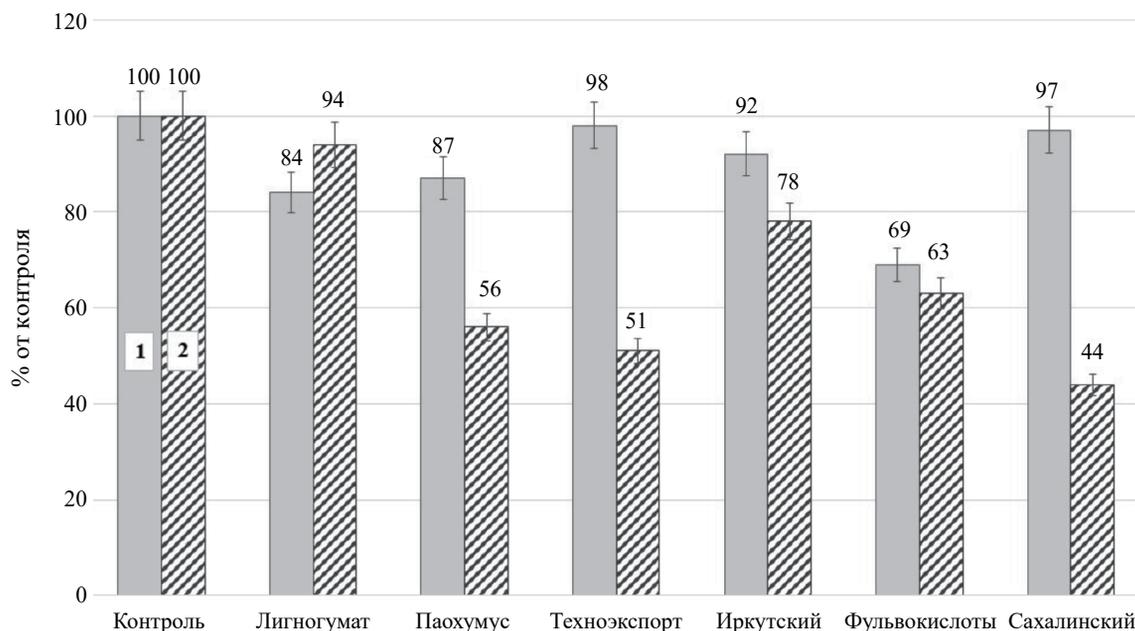


Рис. 3. Доля (% от контроля) выживших клеток *E. faecium*, хранившихся в течение 1 мес. в контрольном (без добавления ГВ) и опытных вариантах с внесением ГВ в концентрации 0.15 г/л и при хранении с ограничением доступа (столбец отмечен цифрой 1) и без ограничения доступа кислорода воздуха (столбец отмечен цифрой 2).

Иммобилизация на поверхность гелей из органосилана и кремнезема. В наших экспериментах культуру *E. faecium*, выращенную в молоке до стационарной фазы роста, смешивали с гелями разной природы – из органосилана (Энтеросгель) и кремнезема (Полисорб) в соотношении 1 : 1, как описано выше (Материалы и методы исследования) и затем хранили в течение 1 мес.

Суспензии гелей состояли из частиц размером 30–300 мкм, что определено с использованием люминесцентного микроскопа (рис. 4).

Люминесцентная микроскопия образцов показала, что клетки бактерий располагались на поверхностях гелевых частиц (рис. 4). За время хранения в контроле (планктонная культура) численность выживших клеток снизилась до 2.5×10^7 КОЕ/мл, что составило 0.8% от исходной численности жизнеспособных клеток стационарной культуры (3×10^9 КОЕ/мл). В опытных вариантах – при хранении в гелях, титр КОЕ был достоверно выше: в вариантах с Полисорбом (50 г/л) – 1×10^8 КОЕ/мл, в варианте с Энтеросгелем – 6×10^7 КОЕ/мл (рис. 5), т.е. в 3 и 1.25 раза выше, чем в контроле, соответственно.

Иммобилизация в силанольно-гуматные гели. АПТЭС является основным гелеобразователем в силанольно-гуматных гелях; чем выше его концентрация, тем тверже гель (Volikov et al., 2016). При исходной концентрации 25 мкл/мл (что соответствует 1.7% в окончательном препарате геля) гель имел полужидкую сметанообразную

консистенцию, при 35 мкл/мл (2.3% в окончательном препарате) гель имел консистенцию мягкой силиконовой резины. В обоих случаях клетки располагались в толще геля достаточно равномерно, макроскопических неравномерностей в геле не наблюдали (рис. 4).

Через 1 мес. хранения численность выживших клеток в контроле (планктонная культура) снизилась до 2×10^6 КОЕ/мл (что составляет 0.87% от исходного титра 2.3×10^8 КОЕ/мл), тогда как в опытных вариантах она была в 2–7 раз выше для гелей на основе гумата Байкал и в 10–35 раз выше для гелей на основе Паохумуса (рис. 6). Таким образом, гель на основе Паохумуса был более эффективен, чем на основе гумата Байкал. При этом плотность гелей сказывалась по-разному на выживании бактерий: Паохумус более эффективен в мягком состоянии, Байкал – в более плотном.

Уровень метаболической активности клеток на эндогенном (остаточном) субстрате в стабилизированных культурах был в 20 раз выше, чем в контрольном варианте (табл. 4), что указывает на наличие более высокого метаболизма.

При этом в образцах с ГВ Байкал активность была выше, чем в образцах с ГВ Паохумус (0.13 и 0.1% $\text{CO}_2/\text{ч}$ соответственно) (табл. 4), что объясняется более глубоким метаболическим покоем клеток, хранящихся в СГГ с ГВ Паохумус. Эффект более медленной реактивации глубоко покоящихся клеток неоднократно отмечался ранее, в том числе в нашей предыдущей статье при анализе

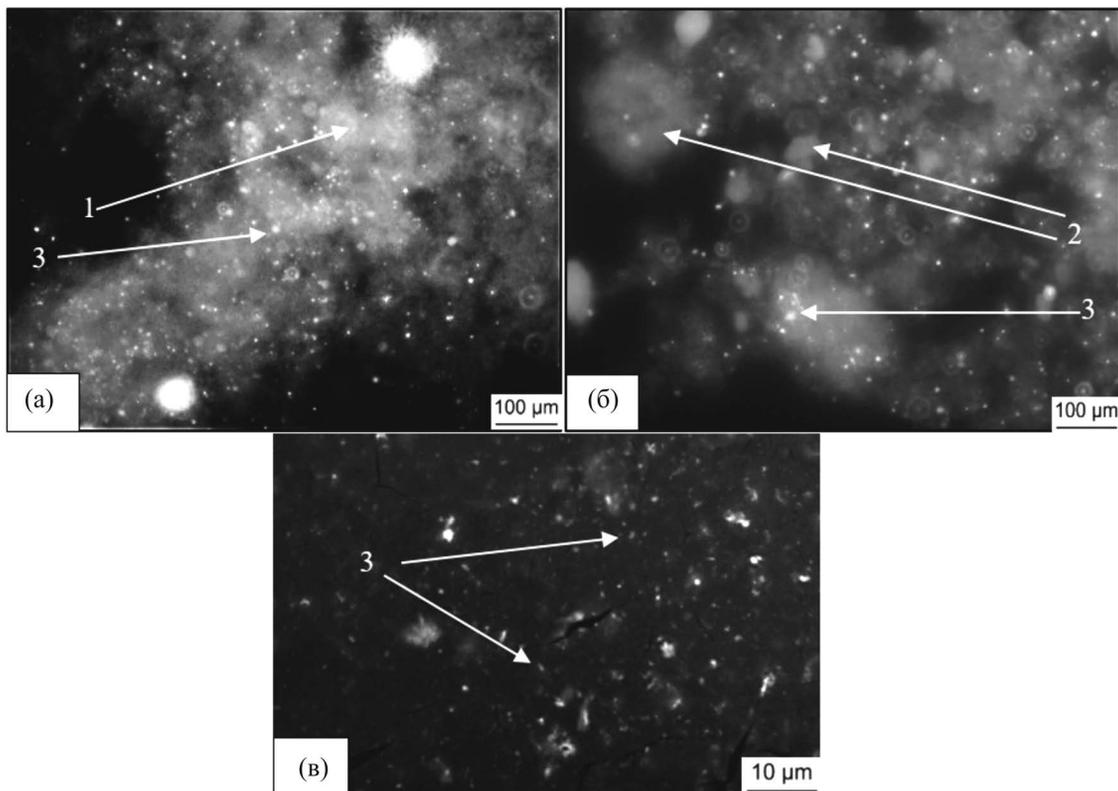


Рис. 4. Клетки *E. faecium*, сорбированные на поверхностях гелевых частиц или в геле: а – препарат Энтеросгель; б – препарат Полисорб; в – СГГ на основе гумата Паохумус. 1 – Частицы полиметилсилоксана полигидрата; 2 – частицы мелкодисперсного кремнезема (Полисорб); 3 – сорбированные клетки *E. faecium*. Люминесцентная микроскопия.

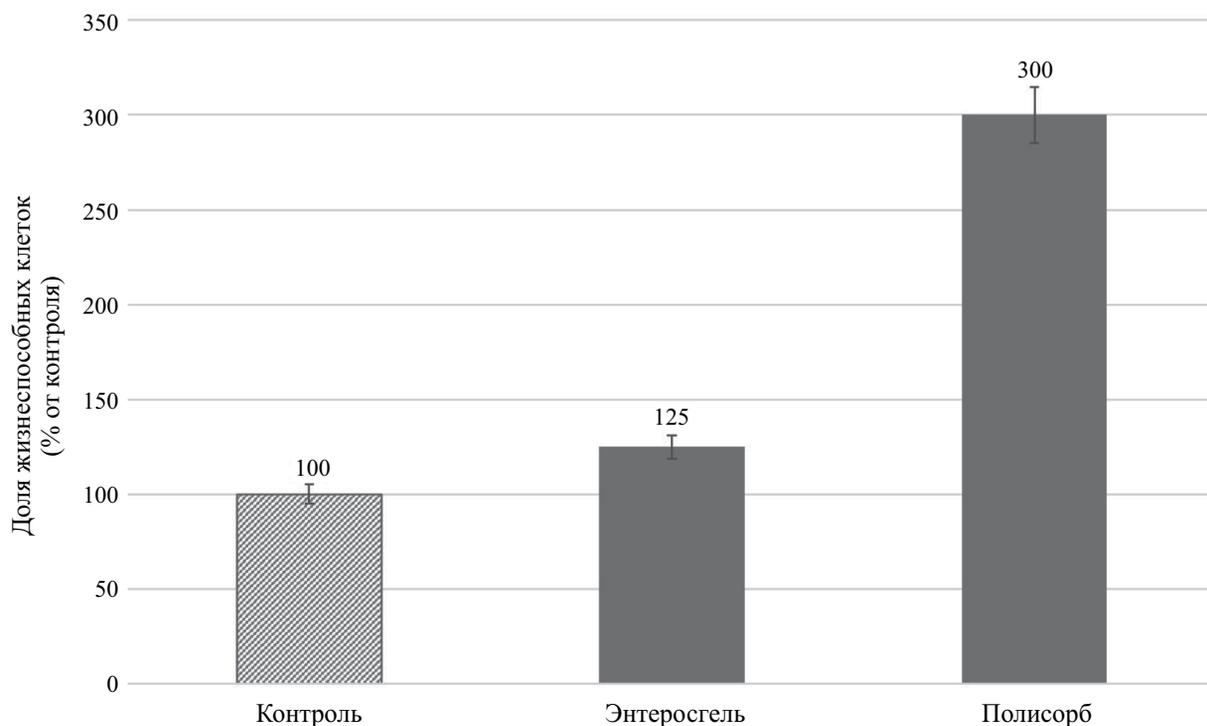


Рис. 5. Доля (% от контроля) выживших клеток популяции *E. faecium*, выращенных в молоке, при хранении в течение месяца в контрольном (без добавления стабилизаторов) и опытных вариантах с внесением стабилизаторов.

прорастании ПФ другой МКБ – *E. durans* (Николаев и соавт., 2022).

Выживание клеток *E. faecium* после гетерофазного выращивания с гелевыми сорбентами. Наиболее распространенным в природе способом существования микроорганизмов является их развитие в виде биопленок. Эта способность свойственна всем микроорганизмам, в том числе молочнокислым бактериям (Mgomi et al., 2023). В наших экспериментах проверяли степень выживания клеток *E. faecium*, выросших при их гетерофазном глубинном культивировании в молоке в режиме принудительного перемешивания в присутствии различных сорбентов (табл. 2) до стационарной фазы роста и затем хранящихся в течение 1 мес. в статических условиях с и без доступа воздуха.

Природа сорбентов не оказывала влияния на максимальную численность выросших стационарных культур; во всех вариантах опытов она составила $\sim 10^9$ КОЕ/мл. Динамика отмирания популяций также была схожа. Однако в вариантах с внесением Энтеростегля через 1 мес. хранения

выживало больше клеток, чем в вариантах роста с Полисорбом и в контроле. При этом в условиях ограничения доступа кислорода воздуха выживало 125% от контроля, а в условиях доступа воздуха $\sim 400\%$ (5×10^7 КОЕ/мл) от контроля (1.15×10^7 КОЕ/мл) (рис. 7).

Таким образом, как и в вариантах длительной инкубации планктонных культур с внесением гуматов, доступность кислорода воздуха при хранении адсорбированных популяций *E. faecium* играет положительную роль в сохранении жизнеспособности клеток энтерококка.

Отметим, что гетерофазное культивирование известно в биотехнологии как способ получения микробной биомассы в качестве целевого продукта. При этом численность микробных клеток на единицу объема не увеличивается, что было также подтверждено в настоящем исследовании, где этот показатель составлял в стационарной фазе культур *E. faecium* в присутствии разных сорбентов около 10^9 кл./мл. Однако выживаемость

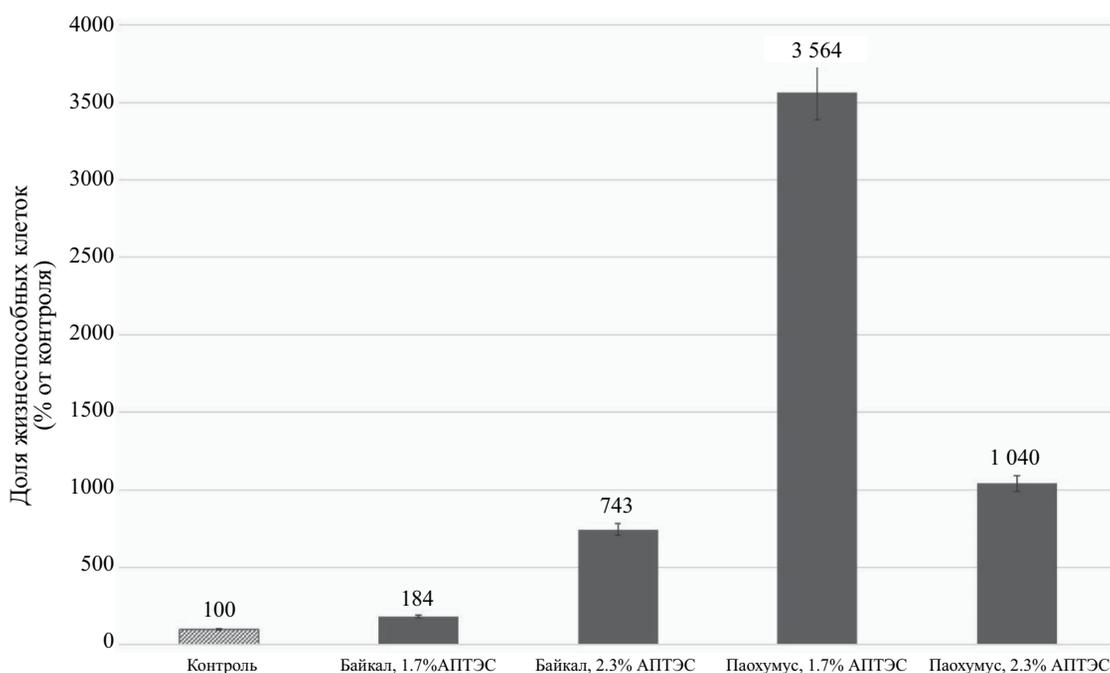


Рис. 6. Доля (% от контроля) выживших клеток *E. faecium*, выращенных в молоке, при хранении в течение 1 мес. в контрольном (планктонная культура) и опытных вариантах в СГГ.

Таблица 4. Уровни метаболической активности клеток (брожения) на эндогенном субстрате после 1 мес. хранения, ‰ CO₂/ч

Стационарная культура	Контроль (стационарная культура, 1 мес.)	Байкал, 1.7% АПТЭС	Байкал, 2.3% АПТЭС	Паохумус, 1.7% АПТЭС	Паохумус, 2.3% АПТЭС
0.24 ± 0.005	0.005 ± 0.005	0.12 ± 0.005	0.14 ± 0.005	0.1 ± 0.005	0.1 ± 0.005

клеток через 1 мес. хранения популяций, выросших в присутствии сорбентов, была выше, чем в контроле до 4 раз и зависела от природы сорбента и условий хранения. Выращивание МКБ на сорбентах может быть перспективно для получения более стабильных препаратов.

Таким образом, испытанные способы повышения жизнеспособности клеток молочнокислой бактерии *E. faecium* при длительном хранении показали разную эффективность (табл. 5). Умеренное кратное возрастание титра КОЕ наблюдали при использовании гуматов и гелей на основе кремния. В последнем случае не было существенной разницы между внесением гелей в культуру клеток или выращиванием клеток в их присутствии. Наилучший эффект был при иммобилизации клеток стационарной фазы в СГГ (в 35 раз выше, чем в контроле).

Таким образом, как и в случае углеводородокисляющих бактерий (Nikolaev et al., 2021; Николаев и соавт., 2021), наилучший результат получен путем иммобилизации клеток в гели, а не на поверхность сорбентов. Были исследованы причины длительного выживания клеток *E. faecium* в жидких культурах.

Образование длительно выживающих покоящихся форм *E. faecium* при пролонгированном хранении их планктонных культур

Известно, что МКБ образуют ПФ разных типов при длительном хранении их культур (Голод и соавт., 2009; Лойко и соавт., 2014) – толстостенные и тонкостенные ЦПК и L-формы. Для объекта настоящего исследования, *E. faecium*, образование ПФ ранее не было показано.

При длительном хранении при комнатной температуре в стационарном режиме (до 6 мес.) планктонных культур *E. faecium*, выросших в обезжиренном молоке и среде LB до стационарной фазы роста, обнаружены признаки, необходимые и достаточные для заключения о наличии покоящихся форм (Chambliss, Vary, 1978; Эль-Регистан и соавт., 2006) (табл. 6). В таких культурах, полученных в естественном цикле развития культуры, сохранялся высокий титр жизнеспособных клеток в неростовых условиях (голодание) – доли и единицы %; клетки обладали стрессоустойчивостью (терморезистентностью) и характерными свойствами ультраструктурной организации

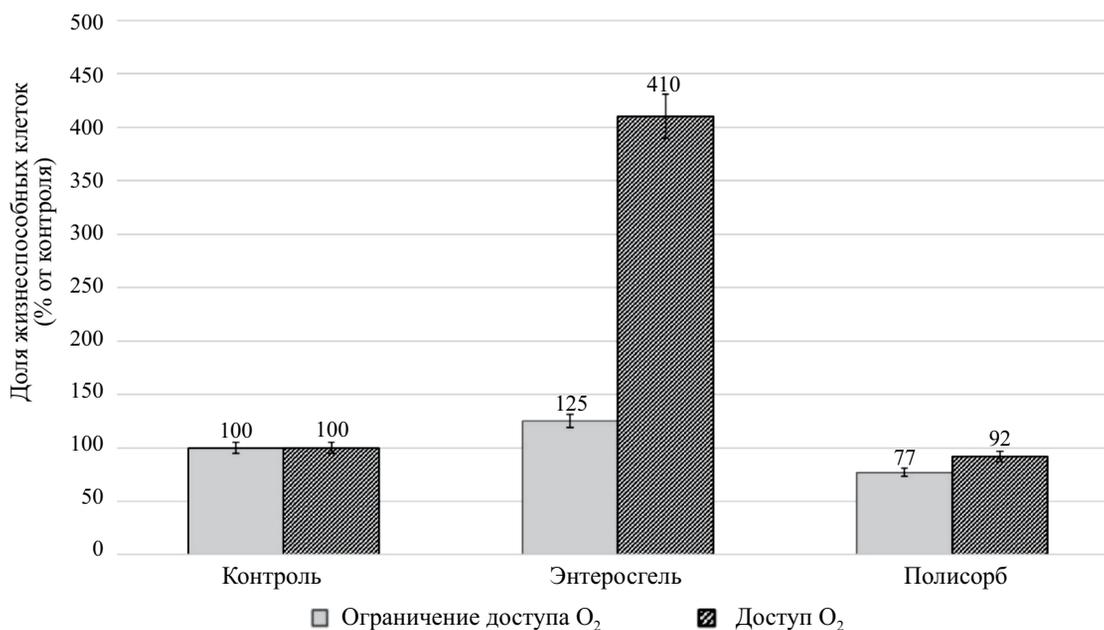


Рис. 7. Доля (% от контроля) выживших клеток популяции *E. faecium*, выросшей при гетерофазном культивировании с внесением сорбентов и последующем хранении в течение 1 мес. в разных условиях доступа кислорода: с ограничением доступа кислорода (столбцы со сплошной заливкой) и с доступом кислорода (столбцы со штриховкой).

Таблица 5. Повышение количества жизнеспособных клеток молочнокислых бактерий *E. faecium*, выращенных на молоке, после 1 мес. хранения, при использовании разных подходов, относительно контроля, крат

Гуматы	Сорбенты, гели	Иммобилизация в СГГ	Гетерофазное выращивание с гелями
2–3	1.25–3	35	1.25–4

(рис. 8); отсутствием экспериментально определяемого метаболизма (фиксируемого по отсутствию выделения CO₂).

Количество сохранивших жизнеспособность клеток. Было показано, что количество сохранивших жизнеспособность клеток зависело от среды роста бактерий (табл. 6). Титр выживших клеток был выше в культурах, выращенных в среде LB (до 13%), чем в молоке (не более 3.6%), в неразбавленном молоке было минимальное количество ПФ (не более 0.3%), что коррелирует с содержанием доступных питательных веществ, сахаров и аминокислот, в этих субстратах. Во всех длительно хранившихся культурах интенсивность выделения CO₂ была до 80 раз ниже, чем в контрольной культуре. Если бы все выжившие клетки *E. faecium* были представлены аметаболическими ЦПК, то выделения CO₂ не наблюдали бы. Следовательно, какая-то часть выживающих клеток метаболически активна, что подтверждено электронно-микроскопическими исследованиями – по наличию ультраструктурных особенностей, свойственных активным клеткам. Зависимость количества выживающих клеток от количества питательных веществ свидетельствует о нахождении выживающих клеток (или их части) в метаболически активном состоянии.

Количество образовавшихся форм покоя не зависело от условий хранения бактериальных культур – с или без доступа кислорода.

Доля терморезистентных клеток в хранящихся суспензиях была на порядок выше, чем в культуре вегетативных клеток (1–2 и 0.04% соответственно; табл. 6). Высокая терморезистентность свидетельствует о наличии покоящихся форм типа ЦПК.

Ультраструктурная организация длительно выживающих клеток *E. faecium*, выросших в молоке или на среде LB и хранившихся в неростовых условиях в течение 6 мес., отличалась от ультраструктурной организации вегетативных клеток и имела ярко выраженный полиморфизм. При этом полиморфизм выживающих клеток не зависел от среды роста хранившихся популяций – молоко или LB. По этой причине на рис. 8 приведены фото клеток, выращенных на молоке (рис. 8а, 8б) и хранившихся 6 мес. (рис. 8в–8ж) (для клеток, выращенных на среде LB, данные аналогичны и не представлены).

Стационарная культура состояла из однотипных клеток размером 1–1.5 мкм, электронно-плотных, часть из которых не завершила деление, окруженных тонкой экзополисахаридной капсулой; зона нуклеоида визуализируется слабо. В 6-мес. популяциях преобладали лизированные клетки (“чехлы”) (рис. 8в), среди оставшихся интактными клеток были клетки типа ЦПК двух типов (рис. 8д, 8е), клетки, аналогичные клеткам стационарной фазы (рис. 8г), а также L-формы (рис. 8ж). Численность лизированных клеток составляла 70–90%, численность покоящихся форм типа ЦПК – около 15% и L-форм – 1–3%.

Выживающие формы типа ЦПК были представлены клетками двух типов, различающихся структурой клеточной стенки: I тип – утолщенной в 1.5 раза относительно стенки вегетативных клеток (60–70 нм) (рис. 8г, 8д) или II тип – существенно более толстой (140 нм) и многослойной (рис. 8 е), с более плотной цитоплазмой. Аналогичные покоящиеся формы типа ЦПК были описаны ранее (Мулюкин и соавт., 2009; Соляникова и соавт.,

Таблица 6. Количество и характеристики покоящихся форм *E. faecium*, выращенных на молоке или среде LB и хранившихся 6 мес. в различных условиях

Вариант	Показатели		
	КОЕ, % (от 100% КОЕ в стационарной фазе)	Терморезистентность, % (от 100% КОЕ до прогрева)	Выделение CO ₂ , %/ч
Среда LB			
Стационарная фаза, 1 сут	100	0.04	0.025 ± 0.005
Колба	2–3	1.33	0.0006 ± 0.005
Пробирка Хангейта с доступом O ₂	13	1.71	0.0023 ± 0.005
Пробирка Хангейта без O ₂	2–5	2.2	0.0007 ± 0.005
Молоко			
Колба	3.6	1.0	0.0003 ± 0.005
Пробирка Хангейта с O ₂	3.4	0.8	0.0025 ± 0.005
Пробирка Хангейта без O ₂	3.28	1.2	0.0013 ± 0.005
Молоко, разбавленное в 10 раз			
Колба хранение	0.13	0.75	0.0008 ± 0.005
Пробирка Хангейта с O ₂	0.2	1.0	0.0008 ± 0.005
Пробирка Хангейта без O ₂	0.32	0.8	0.0009 ± 0.005

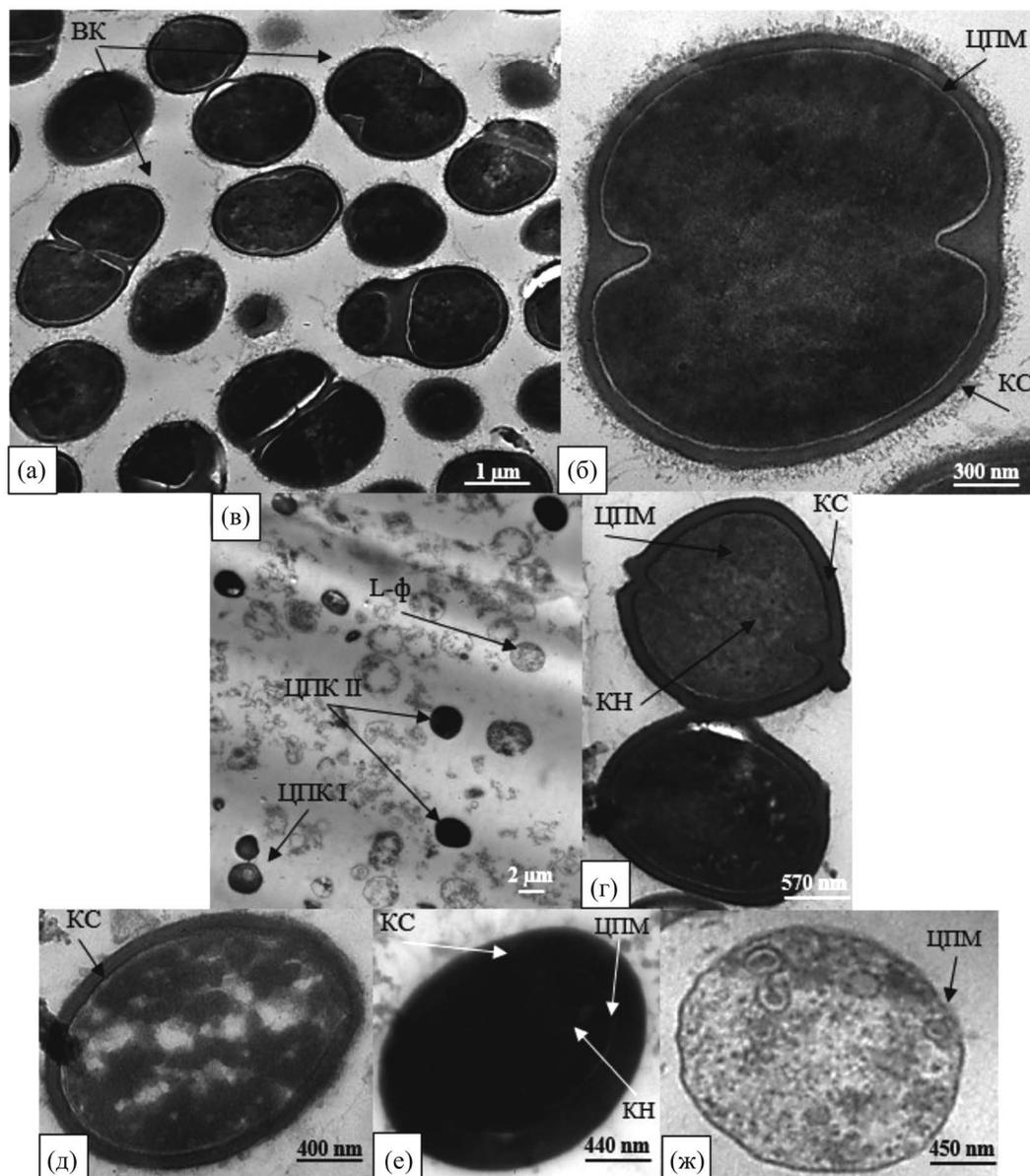


Рис. 8. Электронно-микроскопические снимки тонких срезов клеток *E. faecium*, выращенных на молоке до стационарной фазы роста (а, б) и хранившихся 6 мес. в статическом режиме (в–ж). Обозначения: ВК – ультраструктура вегетативных клеток (а, б); ЦПК I типа с утолщенной клеточной стенкой (КС); ЦПК II типа с толстой многослойной КС и плотной цитоплазмой, компактизованным нуклеоидом (КН); L-ф – L-форма клеток без КС (в); ЦПМ – цитоплазматическая мембрана (б, г, ж).

2017). У родственного микроорганизма, *E. durans*, были обнаружены только ЦПК I типа и L-формы (Эль-Регистан и соавт., 2023).

Таким образом, по сумме признаков длительно выживающие в неростовых условиях клетки *E. faecium* могут быть отнесены к покоящимся формам микроорганизмов. Длительное выживание L-форм молочнокислых бактерий показано впервые в нашей предыдущей публикации (Эль-Регистан и соавт., 2023).

Диссоциативная фенотипическая изменчивость *E. faecium*

Важным признаком ЦПК, отличающим их от других типов ПФ (эндо- и экзоспор, акинет и др.), является изменение (расширение) диссоциативного спектра популяций, вырастающих из ЦПК в новом цикле развития, что было многократно отмечено ранее (Ivshina et al., 2015; Соляникова и соавт., 2017). Эта особенность ЦПК

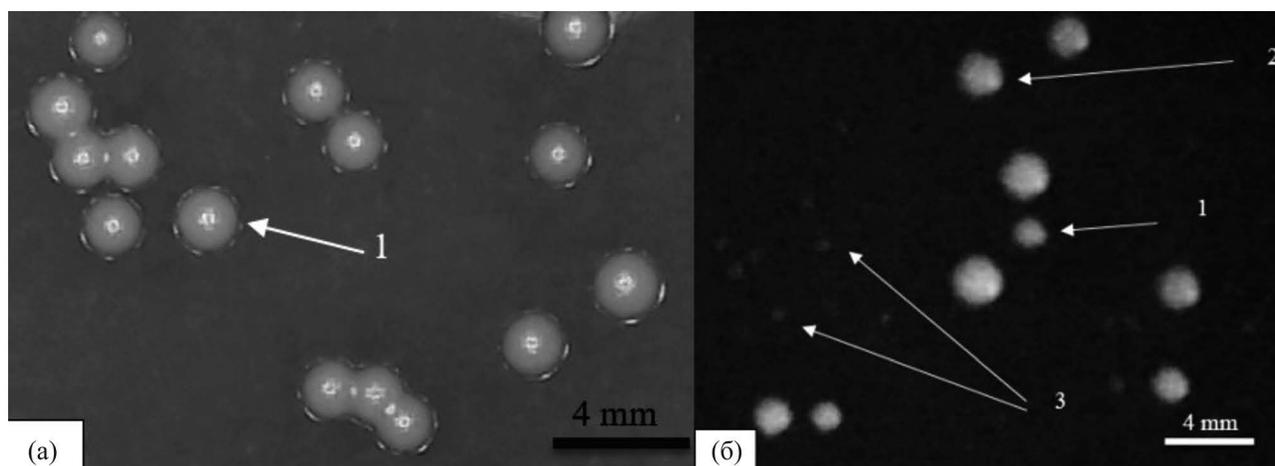


Рис. 9. Колонии диссоциантов *E. faecium* в популяции, полученной из клеток, выращенных в обезжиренном молоке в течение 24 ч (а) и хранившихся в течение 6 месяцев (б). 1 – Колонии доминантного S-морфотипа с размерами до 2 мм; 2 – колонии Sb-морфотипа с размерами 2–3 мм; 3 – колонии S_m-морфотипа с размерами менее 1 мм, полупрозрачные. Световая микроскопия.

E. faecium была проверена, результаты представлены на рис. 9.

При расसेве на плотные среды аликвот планктонных культур *E. faecium*, выросших в молоке до стационарной фазы, они выросли популяцией клеток доминантного S-типа (98%) (рис. 9а). На агаризованной среде их колонии имели круглую форму; диаметр 1.5–2 мм, поверхность гладкая, края ровные, цвет белесо-серый, края непрозрачные с выпуклой сердцевинкой. При рассеве на агаризованной среде популяции, хранившейся в течение 6 мес., ее диссоциативный спектр резко менялся (рис. 9б): колонии S-морфотипа составляли не более 15%. 60–70% выросшей популяции было представлено колониями S_m-типа, характеризующихся диаметром 0.3–0.5 мм, с гладкой поверхностью, ровными краями, плотной консистенции, полупрозрачными, с выпуклым профилем, блестящими, серого цвета (рис. 9б). Около 25% колоний были представлены самыми крупными колониями Sb-типа (похожих на колонии S-типа, но диаметром 2–3 мм). Очевидно, что максимальной скоростью роста характеризовался морфотип Sb-типа, а минимальной – S_m-типа.

Таким образом, естественными способами длительного выживания МКБ в разных условиях являются:

- образование покоящихся цистоподобных клеток, что доказано приведенными выше результатами исследований;

- нахождение в состоянии биопленок, что пока не является строго доказанным и составит предмет наших дальнейших исследований, но хорошо согласуется с мнением других авторов (Zur et al., 2016);

- нахождение в состоянии гипометаболизма, отличном от состояния покоя и от состояния активного метаболизма растущих клеток. Это состояние мало исследовано и также составит предмет нашего изучения.

Кроме того, экзогенное добавление веществ с антиоксидантным действием (гуматов) или дающих бактериям возможность окислительного метаболизма, одновременно, антиоксидантной защиты (гема), также существенно (в разы) повышает выживаемость МКБ при хранении.

Наибольший практический интерес представляет обнаруженный способ хранения МКБ при их иммобилизации в силанольно-гуматные гели, дающий максимальный эффект.

Изучению свойств и морфотипов клеток МКБ, длительно выживающих в силанольно-гуминовых гелях, будут посвящены наши следующие исследования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 24-24-20062 и, частично, госзадания Минобрнауки РФ для ФИЦ Биотехнологии РАН (зарплата Т.А. Канапацкого и Г.И. Эль-Регистан).

БЛАГОДАРНОСТИ

Электронно-микроскопические исследования выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования ФИЦ Биотехнологии РАН «Коллекция уникальных и экстремофильных микроорганизмов».

различных физиологических групп биотехнологического назначения UNIQEM”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Брюханов А.Л., Климко А.И., Нетрусов А.И. Антиоксидантные свойства молочнокислых бактерий // Микробиология. 2022. Т. 91. С. 519–536.
- Bryukhanov A. L., Klimko A. I., Netrusov A. I. Antioxidant properties of lactic acid bacteria // Microbiology (Moscow). 2022. V. 91. P. 463–478.
- Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005. 367 с.
- Голод Н.А., Лойко Н.Г., Мулюкин А.Л., Нейматов А.Л., Воробьева Л.И., Сузина Н.Е., Шаненко Е.Ф., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Адаптация молочнокислых бактерий к неблагоприятным для роста условиям // Микробиология. 2009. Т. 78. С. 317–327.
- Golod N. A., Loiko N. G., Mulyukin A. L., Gal'chenko V. F., El-Registan G. I., Neimatov A. L., Vorobjeva L. I., Suzina N. E., Shanenko E. F. Adaptation of lactic acid bacteria to unfavorable growth conditions // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 280–289.
- Иммобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы. Под ред. Е.Н. Ефременко. М.: РИОР, 2018. 499 с.
- Лойко Н.Г., Краснова М.А., Пичугина Т.В., Гриневич А.И., Ганина В.И., Козлова А.Н., Николаев Ю.А., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Изменение диссоциативного спектра популяций молочнокислых бактерий при воздействии антибиотиков // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 284–294.
- Loiko N. G., Krasnova M. A., Pichugina T. V., Grinevich A. I., Ganina V. I., Kozlova A. N., Nikolaev Yu. A., Gal'chenko V. F., El'-Registan G. I. Changes in the phase variant spectra in the populations of lactic acid bacteria under antibiotic treatment // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 195–204.
- Маркелов Д.А., Ницак В.Н., Геращенко И.И. Сравнительное изучение адсорбционной активности медицинских сорбентов // Химико-фармацевтический журнал. 2008. Т. 42. № 7. С. 30–33.
- Мулюкин А.Л., Сузина Н.Е., Мельников В.Г., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Состояние покоя и фенотипическая вариабельность у *Staphylococcus aureus* и *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 15–27.
- Mulyukin A. L., Suzina N. E., Mel'nikov V. G., Gal'chenko V. F., El'-Registan G. I. dormant state and phenotypic variability of *Staphylococcus aureus* and *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 149–159.
- Мулюкин А.Л., Сузина Н.Е., Погорелова А.Ю., Антонюк Л.П., Дуда В.И., Эль-Регистан Г.И. Разнообразие морфотипов покоящихся клеток и условия их образования у *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2009. Т. 78. № 1. С. 42–52.
- Mulyukin A. L., Pogorelova A. Yu., El-Registan G. I., Suzina N. E., Duda V. I., Antonyuk L. P. Diverse morphological types of dormant cells and conditions for their formation in *Azospirillum brasilense* // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 33–41.
- Николаев Ю.А., Борзенков И.А., Демкина Е.В., Лойко Н.Г., Канапацкий Т.А., Перминова И.В., Хрентугова А.Н., Григорьева Н.В., Близнац И.В., Манучарова Н.А., Сорокин В.В., Коваленко М.А., Эль-Регистан Г.И. Новые биоконструктивные материалы, включающие углеводородокисляющие микроорганизмы, и их потенциал для деградации нефтепродуктов // Микробиология. 2021. Т. 90. № 6. С. 692–705.
- Nikolaev Yu. A., Borzenkov I. A., Demkina E. V., Loiko N. G., Kanapatskii T. A., Perminova I. V., Khreptugova A. N., Grigor'eva N. V., Bliznets I. V., Manucharova N. A., Sorokin V. V., Kovalenko M. A., El'-Registan G. I. New biocomposite materials based on hydrocarbon-oxidizing microorganisms and their potential for oil products degradation // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 731–742.
- Николаев Ю.А., Демкина Е.В., Перминова И.В., Лойко Н.Г., Борзенков И.А., Иванова А.Е., Константинов А.И., Эль-Регистан Г.И. Роль гуминовых веществ в пролонгировании жизнеспособности клеток углеводородокисляющих бактерий // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 725–729.
- Nikolaev Yu. A., Demkina E. V., Loiko N. G., Borzenkov I. A., Ivanova A. E., El'-Registan G. I., Perminova I. V., Konstantinov A. I. Role of humic compounds in viability prolongation of the cells of hydrocarbon-oxidizing bacteria // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 764–768.
- Николаев Ю.А., Лойко Н.Г., Демкина Е.В., Атрошчик Е.А., Константинов А.И., Перминова И.В., Эль-Регистан Г.И. Функциональная активность гуминовых веществ в пролонгировании выживания популяции углеводородокисляющей бактерии *Acinetobacter junii* // Микробиология. 2020. Т. 89. С. 74–87.
- Nikolaev Yu. A., Loiko N. G., Demkina E. V., El'-Registan G. I., Konstantinov A. I., Perminova I. V., Atroshchik E. A. Functional activity of humic substances in survival prolongation of populations

- of hydrocarbon-oxidizing bacteria *Acinetobacter junii* // Microbiology (Moscow). 2020. V. 89. P. 74–85.
- Николаев Ю.А., Мулюкин А.Л., Степаненко И.Ю., Эль-Регистан Г.И. Ауторегуляция стрессового ответа микроорганизмов // Микробиология. 2006. Т. 75. № 4. С. 489–496.
- Nikolaev Yu. A., Mulyukin A. L., Stepanenko I. Yu., El'-Registan G. I. Autoregulation of stress response in microorganisms // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 420–426.
- Олескин А.В., Шендеров Б.А., Роговский В.С. Социальность микроорганизмов и взаимоотношения в системе микробиота–хозяин: роль нейромедиаторов. М.: Изд-во МГУ, 2020. 286 с.
- Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Под ред. Нетрусова А.И. М.: Издательский центр “Академия”, 2005. 608 с.
- Соляникова И.П., Сузина Н.Е., Егозарьян Н.С., Полищева В.Н., Мулюкин А.Л., Егорова Д.О., Эль-Регистан Г.И., Головлева Л.А. Особенности структурно-функциональных перестроек клеток актинобактерий BN52 при переходе от вегетативного роста в состояние покоя и при прорастании покоящихся форм // Микробиология. 2017. Т. 86. № 4. С. 463–475.
- Solyanikova I.P., Suzina N.E., Egozarjan N.S., Polivtseva V.N., Mulyukin A.L., Egorova D.O., El'-Registan G.I., Golovleva L.A. Structural and functional rearrangements in the cells of actinobacteria *Microbacterium foliorum* BN52 during transition from vegetative growth to a dormant state and during germination of dormant forms // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 476–486.
- Эль-Регистан Г.И., Земскова О.В., Галуза О.А., Уланова Р.В., Ильичева Е.А., Ганнесен А.В., Николаев Ю.А. Влияние гормонов и биогенных аминов на рост и выживание *Enterococcus durans* // Микробиология. 2023. Т. 92. № 4. С. 376–395.
- El'-Registan G.I., Zemskova O.V., Galuza O.A., Ulanova R.V., Il'icheva E.A., Gannesen A.V., Nikolaev Yu.A. Effect of hormones and biogenic amines on growth and survival of *Enterococcus durans* // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. P. 517–533.
- Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А., Сузина Н.Е., Гальченко В.Ф., Дуда В.И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 446–456.
- El-Registan G.I., Mulyukin A.L., Nikolaev Yu.A., Suzina N.E., Gal'chenko V.F., Duda V.I. Adaptogenic functions of extracellular autoregulators of microorganisms // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 380–389.
- Azzaz H.H., Kholif A.E., Murad H.A., Vargas-Bello-Pérez E.A. Newly developed strain of *Enterococcus faecium* isolated from fresh dairy products to be used as a probiotic in lactating Holstein cows // Front. Vet. Sci. 2022. V. 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.989606>
- Balaban N., Merrin I., Chait R., Kowalik L., Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch // Science. 2004. V. 305. P. 1622–1625.
- Balaban N.Q., Helaine S., Lewis K., Ackermann M., Aldridge B., Andersson D.I., Brynildsen M.P., Buchmann D., Camilli A., Collins J.J. et al. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence // Nat. Rev. Microbiol. 2019. V. 17. P. 441–448.
- Condon S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen // FEMS Microbiol. Lett. 1987. V. 46. P. 269–280.
- Fleischmann S., Robben C., Alter T., Rossmann P., Mester P. How to evaluate non-growing cells – current strategies for determining antimicrobial resistance of VBNC // Bacteria. Antibiotics. 2021. V. 10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics/10020115>
- Gaudu P., Vido K., Cesselin B., Kulakauskas S., Tremblay J., Rezaiki L., Lamberret G., Sourice S., Duwat P., Gruss A. Respiration capacity and consequences in *Lactococcus lactis* // Antonie van Leeuwenhoek. 2002. V. 82. P. 263–269.
- Ivshina I.B., Mukhutdinova A.N., Tyumina H.A., Vikhareva H.V., Suzina N.E., El'-Registan G.I., Mulyukin A.L. Drotaverine hydrochloride degradation using cyst-like dormant cells of *Rhodococcus ruber* // Curr. Microbiol. 2015. V. 70. P. 307–314.
- Kozubek A., Zarnowski R., Stasiuk M., Gubernator J. Natural amphiphilic phenols as bioactive compounds // Cell. Mol. Biol. Lett. 2001. V. 6. P. 351–355.
- Lyte M. Microbial endocrinology and nutrition: a perspective on new mechanisms by which diet can influence gut-to-brain-communication // PharmaNutrition. 2013. V. 1. P. 35–39.
- Maresca D., Zotta T., Mauriello G. Adaptation to aerobic environment of *Lactobacillus johnsonii/gasseri* strains // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 157. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00157>
- Mgomi F.C., Yang Y.R., Cheng G., Yang Z.Q. Lactic acid bacteria biofilms and their antimicrobial potential against pathogenic microorganisms // Biofilm. 2023. V. 5. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2023.100118>
- Nikolaev Y., Borzenkov I., Demkina E., Loiko N., Kanapatsky T., Perminova I., Volikov A., Khreptugova A., Bliznetc I., Grigoreva N., El-Registan G. Immobilization of cells of hydrocarbon-oxidizing bacteria for petroleum bioremediation using new materials // Int. J. Environ. Res. 2021. V. 15. P. 971–984.
- Nikolaev Y.A., Demkina E.V., Borzenkov I.A., Ivanova A.E., Kanapatsky T.A., Konstantinov A.I., Volikov A.B., Perminova I.V., El-Registan G.I. Role of the structure of humic substances in increasing bacterial survival // J. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 5. № 4. <https://doi.org/10.23880/OAJMB-16000174>
- Oleskin A.V., Shenderov B.A. Microbial communication and microbiota-host interactivity. neurophysiological, biotechnological, and biopolitical implications // Nova Science Publishers. 2020. <https://doi.org/10.52305/EGCB8622>
- Oleskin A.V., Zhilenkova O.G., Shenderov B.A., Amerhanova A.M., Kudrin V.S., Klodt P.M. Lactic-acid bacteria supplement fermented dairy products

- with human behavior-modifying neuroactive compounds // *J. Pharm. Nutr. Sci.* 2014. V. 4. P. 199–206.
- Pious T., Aparna S., Reshmi U., Mubashar M., Sadiq P. Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast CFU enumeration and single colony isolation from diverse samples // *Biotechnol. Rep. (Amst.)*. 2015. V. 8. P. 45–55.
- Radosavljević M., Lević S., Pejin J., Mojović L., Nedović V. Encapsulation technology of lactic acid bacteria in food fermentation // *Lactic acid bacteria in food biotechnology: innovations and functional aspects* / Eds. Ray R.C., Paramithiotis S., de Carvalho Azevedo V.A., Montet D. Amsterdam: Elsevier, 2022. V. 17. P. 319–347.
- Salminen S., Wright V., Ouwehand A. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects // *Brazil. J. Pharm. Sci.* 2004. V. 42. P. 473–474.
- Sampietro D., Belizán M.E. M., Apud G.R., Juárez J.H., Vattuone M., Catalan C. Alkylresorcinols: chemical properties, methods of analysis and potential uses in food, industry and plant protection // *Natural antioxidants and biocides from wild medicinal plants* / Eds. Cespedes C.L. CAB International, 2013. P. 148–166.
- Spores VII: Papers Presented at the Seventh International Spore Conference Madison, Wisconsin, 5–8 October 1977 / Eds. Chambliss G., Vary J.C. Washington: Amer. Soc. Microbiol., 1978. 354 p.
- Volikov A., Ponomarenko S., Gutsche A., Nirschl H., Hatfield K., Perminova I. Targeted design of waterbased humic substances-silsesquioxane soft materials for nature-inspired remedial // *RSC Adv.* 2016. V. 6. P. 48222–48230.
- Wainwright J., Hobbs G., Nakouti I. Persister cells: formation, resuscitation and combative therapies // *Arch. Microbiol.* 2021. V. 203. P. 5899–5906.
- Zur J., Wojcieszynska D., Guzik U. Metabolic responses of bacterial cells to immobilization // *Molecules.* 2016. V. 21. P. 958–973.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Long-Term Survival of *Enterococcus faecium* under Different Conditions of Cell Stabilization and Immobilization

O. A. Galuza^{1,2,*}, G. I. El-Registan¹, T. A. Kanapatski¹, Yu. A. Nikolaev¹

¹*Institute of Microbiology named after S.N. Vinogradsky, Federal Research Center of Biotechnology RAS, Moscow, 119071, Russia*

²*Bavar+ JSC, Moscow, 127206, Russia*

*e-mail: olesya_galuza@mail.ru

Abstract. Lactic acid bacteria (LAB) play an important role in biotechnology and biomedicine. Their most important disadvantage is the rapid death of crops and preparations during storage. Studying ways to increase the survival time of lactic acid bacteria under various conditions is an urgent scientific and applied task and was the goal of this work. The object was the lactic acid bacterium *Enterococcus faecium*. It has been shown that in aging planktonic cultures, bacteria quickly lose viability (the number of viable cells decreases by 2–4 orders of magnitude in 1 month). The development cycle of the *E. faecium* population under these conditions ends with the formation of cyst-like resting cells of two types: L-forms and hypometabolic cells. The use of chemical stabilizers, humic substances (typical soil components), and increases the number of surviving cells by 2–3 times. With surface immobilization (adsorption) on organosilanol or inorganic carriers (organosilane, silica), the number of cells surviving under starvation conditions increases by 1.25–3 times. The most effective approach was the immobilization of cells in silanol-humate gels (increasing the number of surviving cells up to 35 times relative to the control). The data obtained reveal the mechanisms and forms of survival of LAB in natural conditions (state of hypometabolism, the presence of specialized forms of dormancy), and can also be used to develop methods for long-term storage of LAB in their biological products.

Keywords: lactic acid bacteria, *Enterococcus faecium*, survival forms, bacterial immobilization, bacterial viability, biological products