

МИКРОБИОЛОГИЯ



<https://elibrary.ru/gwxdm>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ 2026

Блинкова Л.П.¹, Миронов А.Ю.^{2, 4}, Колбецкая Е.А.^{1, 3}, Абдуллаева А.М.³,
Валитова Р.К.^{1, 3}, Пахомов Ю.Д.¹

РАЗРАБОТКА И ОБОСНОВАНИЕ ПОДХОДОВ К КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫМИ ФОРМАМИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ И СТАФИЛОКОККОВ

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», 105064, Москва, Россия;

²ФБОУ Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского
Роспотребнадзора», 125212, Москва, Россия;

³ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет», 125080, Москва, Россия;

⁴Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий
ФМБА России, 115682, Москва, Россия

Цель – разработка подходов к клинической лабораторной диагностике инфекций, вызываемых некультивируемыми формами энтеробактерий и стафилококков на основе изучения закономерностей и сроков их перехода в некультивируемое состояние.

Материал и методы. Изучена динамика ключевых показателей в монопопуляциях и смеси энтеробактерий (*E. coli* M17, *S. Typhimurium* 79) и *S. aureus* 209P, перешедших в некультивируемое состояние (НС) в условиях четырёхмесячной инкубации при трофическом и осмотическом стрессах.

Результаты. Статистически обработанные величины общего микробного числа (ОМЧ/мл) бактерий, КОЕ/мл, количества живых и мертвых клеток, процента жизнеспособных некультивируемых клеток (ЖНК) свидетельствует, что численность ЖНК зависит от индивидуальных особенностей микроорганизмов и от пролиферативной активности посевных культур. Быстрее в НС перешедила *S. Typhimurium* 79. При высеивании из консорциума бактерий наиболее эффективной при реверсии *S. Typhimurium* 79 и *E. coli* M17 из НС в активную форму была среда Эндо по сравнению со средой Плоскирева и висмут-сульфатным агаром для сальмонелл. Вероятно, что *S. aureus* 209P после длительного стресса в ассоциации с сальмонеллой и антагонистически активным пробиотическим штаммом *E. coli* M17 оказался низкоконкурентным или нереверсировавшим при высеивании на неоптимальный для ЖНК стафилококка маннитол-солевой агар, поскольку рост стафилококка на нем отсутствовал уже через 7 суток стресса.

Заключение. Сведения по динамике численности ЖНК микроорганизмов имеют практическое значение для клинической лабораторной диагностике инфекций, вызываемых некультивируемыми формами энтеробактерий и стафилококков, поскольку возможно получение ложных результатов из-за ЖНК при снижении или отсутствии роста с аналитом, высевенным на неоптимальную для выхода из НС дифференциально-диагностическую питательную среду.

Ключевые слова: жизнеспособные некультивируемые клетки; стресс; энтеробактерии; стафилококк; ключевые показатели; ложные результаты

Для цитирования: Блинкова Л.П., Миронов А.Ю., Колбецкая Е.А., Абдуллаева А.М., Валитова Р.К., Пахомов Ю.Д. Разработка и обоснование подходов к клинической лабораторной диагностике инфекций, вызываемых некультивируемыми формами энтеробактерий и стафилококков. Клиническая лабораторная диагностика. 71(1): 38-44.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2026-71-1-38-44>

EDN: GWXDMT

Для корреспонденции: Блинкова Лариса Петровна, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. микробиологических питательных сред; e-mail: b.larus@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.08.2025

Принята к печати 16.12.2025

Опубликовано 25.12.2025

Blinkova L.P.¹, Mironov A.Yu.^{2, 4}, Kolbetskaya E.A.^{1, 3}, Abdullaeva A.M.³, Valitova R.K.^{1, 3}, Pahomov Yu.D.¹

DEVELOPMENT AND SUBSTANTIATION OF APPROACHES TO CLINICAL LABORATORY DIAGNOSIS OF INFECTIONS CAUSED BY UNCULTIVATED FORMS OF ENTEROBACTERIA AND STAPHYLOCOCCI

¹Federal State Budgetary Scientific Institution I. I. Mechnikov Research Institution of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia;

²G.N. Gabrichesky Moscow research institution for epidemiology and microbiology by Rosпотребnadzor, 125212, Moscow, Russia;

³Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Russian Biotechnology University», 125080, Moscow, Russia;

⁴State Budgetary Institution Federal Scientific and Clinical Center FMBA, 115682, Moscow, Russia

The aim was to develop approaches to clinical laboratory diagnostics of infections caused by uncultivated forms of enterobacteria and

staphylococci based on the study of the patterns and timing of their transition to an uncultivated state.

Material and methods. The dynamics of key parameters in monopopulations and a mixture of enterobacteria (*E. coli* M17 and *S. Typhimurium* 79) and *Staphylococcus* (*S. aureus* 209P) that became nonculturable state (NCS) under conditions of 4-month incubation under trophic and osmotic stress were studied.

Results. Statistically processed values of the total microbial count (TMC/ml) of bacteria, CFU/ml, the number of live and dead cells, the percentage of viable nonculturable cells (VBNC) indicate that the number of VBNC depended on the individual characteristics of the microbes and the proliferative activity of the seed cultures. *S. Typhimurium* 79 converted to the NCS most rapidly. When seeded from a bacterial consortium, Endo medium was most effective in reverting *S. Typhimurium* 79 and *E. coli* M17 from the NCS to the active form compared to Ploskirev medium, as well as bismuth sulfate agar for *Salmonella*. It is likely, that *S. aureus* 209P after prolonged stress in association with *Salmonella* and the antagonistically active probiotic strain *E. coli* M17 turned out to be low-competitive or did not revert when seeded on mannitol salt agar, which is not optimal for *Staphylococcus* VBNC, since *Staphylococcus* growth on it was already absent after 7 days of stress.

Conclusion. Information on the dynamics of the number of VBNC microbes is of practical importance for clinical laboratory diagnosis of infections caused by uncultivated forms of enterobacteria and staphylococci, since it is possible to obtain false results due to the presence of a VBNC with a decrease or absence of growth with the studied material, which is sown on a differential diagnostic medium that is not optimal for exiting the NCS.

Key words: viable nonculturable cells; stress; enterobacteria; staphylococcus; key indicators; false results

For citation: Blinkova L.P., Mironov A.Yu., Kolbetskaya E.A., Abdullaeva A.M., Valitova R.K., Pakhomov Yu.D. Development and substantiation of approaches to clinical laboratory diagnosis of infections caused by uncultivated forms of enterobacteria and staphylococci. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2026; 71(1): 38-44 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2026-71-1-38-44>

EDN: GWXDMT

For correspondence: Larisa P. Blinkova, Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Microbiological Nutrient Media; e-mail: b.larus@mail.ru

Information about authors:

Blinkova L.P.,	https://orcid.org/0000-0003-0271-5934 ;
Mironov A.Yu.,	https://orcid.org/0000-0002-8544-5230 ;
Kolbetskaya E.A.,	https://orcid.org/0000-0001-6825-2173 ;
Abdullaeva A.M.,	https://orcid.org/0000-0003-1900-2121 ;
Valitova R.K.,	https://orcid.org/0000-0003-2032-8655 ;
Pakhomov Yu.D.,	https://orcid.org/0000-0002-6260-2731 .

Conflict of interests. The authors declare the absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The work was performed within the framework of the sectoral program.

Received 29.08.2025

Accepted 16.12.2025

Published 25.12.2025

ВВЕДЕНИЕ

Одной из форм адаптивных реакций микроорганизмов в неблагоприятных условиях является переход в некультивируемое состояние (НС) с сохранением жизнеспособности структурно неповрежденных клеток при сниженном метаболизме и возможности реверсии к полноценной физиологической активности. Называемые жизнеспособными некультивируемыми клетками (ЖНК, *viable but nonculturable*, VBNC), эти формы при стрессе не размножаются и не формируют колоний на коммерческих питательных средах [1–9]. Культуральный метод не позволяет выявить микроорганизмы, колонизирующие объекты окружающей среды, продукты питания, живые вакцины, probiotiki, музейные культуры, анализ от живых организмов, включая человека, и другие [10–16]. С этой целью используют специфические приемы: дифференциальную окраску живых клеток и мертвых клеток; молекулярно-генетические (ПЦР и ее модификации); проточную цитометрию и др. [2, 3, 9, 10, 17–19]. Переход в НС происходит под воздействием факторов, способных вызывать у клеток стресс, даже находящихся в биопленке (пищевая старвация, избыток или недостаток кислорода, солей, лиофилизация, дезинфекция, излучение и др.) [2, 3, 9, 12, 13, 20–23] с включением

генной регуляции и образованием специфических белков [24–28]. ЖНК способны сохранять свою вирулентность, делающую патогенные микроорганизмы при реверсии эпидемически опасными, особенно в НС в местах природного обитания [3, 29, 30]. При попадании ЖНК в пищевое сырье и продукты, невыявленные, вышедшие из дормантного (спящего) состояния ЖНК, могут вызывать заболевания [3, 9, 10]. В организме человека и животных ЖНК, имеющие повышенную устойчивость к антимикробным препаратам (АМП) и реверсирующие, способствуют переходу заболевания в хроническую форму. Изучение ключевых показателей (общее микробное число клеток в 1 мл – ОМЧ/мл, КОЕ/мл, процент в популяции живых и мертвых клеток, ЖНК) и динамики формирования дормантности, поможет избежать получения ложных результатов культурального исследования на дифференциально-диагностических питательных средах, изменить тактику лечения больных с учетом появления лекарственно-устойчивых ЖНК микроорганизмов.

ЦЕЛЬ – разработка подходов к клинической лабораторной диагностике инфекций, вызываемых некультивируемыми формами энтеробактерий и стафилококков на основе изучения законо-

мерностей и сроков их перехода в некультивируемое состояние.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Определение численности живых размножающихся бактерий и их ЖНК выполнено на базе лаборатории микробиологических питательных сред ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. Использованы штаммы из лабораторной коллекции (*E.coli* M17, *S. Typhimurium* 79, *S. aureus* 209Р) с использованием отечественных питательных сред (ФБУН ГНЦ ПМБ., г. Оболенск): питательный агар (ПА), питательный бульон (ПБ), среда Эндо, среда Плоскирева, висмут-сульфитный агар, маннитол-солевой агар (HiMedia). Длительный трофический и осмотический стресс (до 4-х месяцев) создан путем инкубации микроорганизмов в условиях комнатной температуры во флаконах объемом 500 мл, наполовину заполненных безбелковым, безуглеводным раствором с повышенным содержанием NaCl (3 %). Флаконы укупоривали резиновыми пробками с дыхательными трубками со стерильной ватой. Посевным материалом являлись ночные бульонные культуры, дважды пассированные в ПБ и сконцентрированные до 10^7 клеток/мл после центрифugирования 8 мин при 10 тыс. об/мин. С целью оценки популяции на содержание ЖНК произведен отбор проб из флаконов через определенные промежутки времени. ОМЧ/мл определяли под микроскопом «Микмед» (Россия) в камере Горяева (ув. $\times 400$), КОЕ/мл – на чашках с 1,5 % ПА, на среде Эндо, среде Плоскирева, висмут-сульфитном и маннитол-солевом агаре. Доля живых и мертвых клеток в популяции устанавливали под люминесцентным микроскопом Opton (Германия), увеличение ($\times 320$) после окрашивания проб с помощью набора Live/Dead™ (США): живые клетки микроорганизмов приобретают зеленый цвет, мертвые – красный. По совокупным данным (ОМЧ/мл, КОЕ/мл, живых и мертвых клеток) подсчитан процент ЖНК в популяции. Данные по 6 образцам обработаны статистически для уровня $p < 0,05$ с вычислением средней арифметической (\bar{x}), ее ошибки (m), доверительного интервала колебания величины средней арифметической (I_{95}).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении образцов после стресса, данные получены для трёх монокультур и для их смеси (табл. 1–5).

Клетки *E.coli* M17, находившиеся первоначально на 98 % в пролиферативной форме, переходили в состояние ЖНК с 7 суток стресса ($36,40 \pm 4,0$ %). Хотя снижение ОЧК/мл ста-

Таблица 1
 Показатели жизнеспособности популяции *E.coli* M17 при стрессе

Срок инкубации, сутки	Характеристика популяции <i>E.coli</i> M17 в 3 % растворе NaCl				Число ЖНК, % $\bar{x} \pm m$ I_{95}	
	ОМЧ $\times 10^7$ /мл $\bar{x} \pm m$ I_{95}	КОЕ/мл $\times 10^7$ $\bar{x} \pm m$ I_{95}	Среднее число клеток с Live/Dead, %			
			живые	мёртвые		
0	$2,89 \pm 0,32$ (2,11–3,67)	$7,41 \pm 0,81$ (5,43–9,39)	98	2	0	
7	$2,88 \pm 0,31$ (2,12–3,64)	$1,74 \pm 0,19$ (1,27–2,21)	95	5	$36,40 \pm 4,00$ (26,6–46,2)	
15	$2,88 \pm 0,31$ (2,12–3,64)	$0,43 \pm 0,04$ (0,33–0,53)	94	6	$84,11 \pm 9,25$ (61,45–106,77)	
21	$2,56 \pm 0,28$ (1,87–3,25)	$0,35 \pm 0,03$ (0,276–0,424)	91	9	$84,97 \pm 9,34$ (62,09–107,85)	
28	$1,52 \pm 0,16$ (1,13–1,91)	$0,12 \pm 0,01$ (0,096–0,145)	97	3	$91,86 \pm 10,10$ (67,11–116,61)	
42	$1,95 \pm 0,21$ (1,44–2,46)	$0,34 \pm 0,03$ (0,266–0,414)	93	7	$81,25 \pm 8,93$ (59,37–103,13)	
49	$1,82 \pm 0,20$ (1,33–2,31)	$0,74 \pm 0,08$ (0,544–0,936)	97	3	$58,08 \pm 6,38$ (42,45–73,71)	
91	$4,80 \pm 0,52$ (3,53–6,07)	$0,86 \pm 0,09$ (0,64–1,08)	25	75	$28,33 \pm 3,11$ (20,71–35,95)	
98	$3,21 \pm 0,35$ (2,35–4,07)	$0,56 \pm 0,06$ (0,413–0,707)	17	83	0	
104	$4,39 \pm 0,48$ (3,21–5,57)	$0,20 \pm 0,02$ (0,151–0,249)	22	78	$79,29 \pm 8,72$ (57,93–100,65)	
120	$4,64 \pm 0,51$ (3,39–5,89)	$0,17 \pm 0,01$ (0,146–0,195)	33	67	$88,89 \pm 9,77$ (64,95–112,83)	

Таблица 2
 Показатели жизнеспособности популяции *S.Typhimurium* 79 при стрессе

Срок инкубации, сутки	Характеристика популяции <i>S. Typhimurium</i> 79 в 3 % растворе NaCl				Число ЖНК, % $\bar{x} \pm m$ I_{95}	
	ОМЧ $\times 10^7$ /мл $\bar{x} \pm m$ I_{95}	КОЕ/мл $\times 10^7$ $\bar{x} \pm m$ I_{95}	Среднее число клеток после Live/Dead, %			
			живые	мёртвые		
0	$2,40 \pm 0,26$ (1,76–3,04)	$8,05 \pm 0,88$ (5,89–10,21)	99	1	0	
7	$4,00 \pm 0,44$ (2,92–5,08)	$0,60 \pm 0,06$ (0,45–0,75)	98	2	$84,69 \pm 9,31$ (61,88–107,5)	
15	$3,84 \pm 0,42$ (2,81–4,87)	$0,56 \pm 0,06$ (0,41–0,71)	96	4	$84,80 \pm 9,32$ (61,97–107,63)	
21	$3,20 \pm 0,35$ (2,34–4,06)	$0,77 \pm 0,08$ (0,574–0,966)	97	3	$75,19 \pm 8,27$ (54,93–95,45)	
28	$1,84 \pm 0,20$ (1,35–2,33)	$0,28 \pm 0,03$ (0,206–0,354)	91	9	$83,27 \pm 9,16$ (60,83–105,71)	
42	$2,11 \pm 0,23$ (1,55–2,67)	$0,11 \pm 0,02$ (0,061–0,159)	95	5	$94,51 \pm 10,39$ $94,51 \pm 25,46$ (69,05–119,97)	
49	$2,20 \pm 0,24$ (1,61–2,79)	$0,08 \pm 0,009$ (0,058–0,102)	94	6	$96,13 \pm 10,57$ (70,23–122,03)	
91	$2,40 \pm 0,26$ (1,76–3,04)	$0,11 \pm 0,01$ (0,085–0,135)	85	15	$94,60 \pm 10,40$ (69,12–120,08)	
98	$1,91 \pm 0,21$ (1,40–2,42)	$0,12 \pm 0,01$ (0,095–0,145)	97	3	$93,52 \pm 10,28$ (68,33–118,71)	
104	$2,91 \pm 0,32$ (2,13–3,69)	$0,20 \pm 0,02$ (0,151–0,249)	96	4	$92,84 \pm 10,21$ (67,83–117,85)	
120	$3,20 \pm 0,35$ (2,34–4,06)	$0,12 \pm 0,01$ (0,095–0,145)	96	4	$96,09 \pm 10,57$ (70,19–121,99)	

тистически незначительно (снижение на 0,35 % в сравнении с 0 сутками), величина КОЕ/мл на 7 сутки достоверно снизилась в 4,25 раза. К 15 суткам показатель ЖНК достиг $84,11 \pm 9,25\%$. К 28 суткам уровень ЖНК повысился до $91,86 \pm 10,1\%$ при минимальном ОМЧ/мл: снижение в 1,9 раза или же на 52 % от начального числа клеток. В течение 2-го месяца инкубации количество ЖНК снизилось до $58,08 \pm 6,38\%$ к 49 сут, к 91 суткам выявлено продолжавшееся снижение показателя ЖНК до $28,33 \pm 3,11\%$. ОМЧ/мл увеличилось в 1,7 раза, величина КОЕ/мл снизилась в 8,6 раза по сравнению с исходным. Этому соответствует резко возросшее число мертвых клеток. На 98 сутки показатель ЖНК минимальный (0 %), что, вероятно, связано с начавшейся ранее гибелю большей части популяции (до 75 %). В этот период после окраски Live/Dead™ количество живых клеток в популяции составило в среднем 22 %, показатель ОМЧ/мл статистически сравнялся с начальным. Величина КОЕ/мл после значительного падения за две первые недели инкубации варьировала, но не превышала 1×10^7 . К концу эксперимента отмечено размножение клеток (возросло число живых клеток и ЖНК). После резкого снижения, повышение численности живых клеток к 120 суткам, вероятно, возникло за счёт выделения питательных веществ из разрушенных бактерий с последующим размножением микроорганизмов. Показатель КОЕ/мл не повышался из-за перехода клеток в НС. Сравнения динамики изменения показателей жизнеспособности ауксотрофа *E.coli* AB1157 и прототрофа *E.coli* M17 в других опытах [9], с этими данными (см. табл. 1) свидетельствует, что их характеристики зависят от особенностей биологии штаммов и от истории культивирования популяций, обеспечивающих посевной культуре высокую пролиферативную активность без содержания ЖНК.

S. Typhimurium 79 в статистически однозначной с *E.coli* исходной концентрацией имела другой алгоритм перехода клеток популяции в ЖНК. Показатель ЖНК у *S. Typhimurium* 79 на 7-е сутки имел высокое значение $84,69 \pm 9,31\%$ при начальном значении 0 % как у *E.coli* (табл. 1) и повысился к окончанию опыта. Устойчиво высокое содержание ЖНК в популяции (более 90 %) наблюдалось после 42 суток. Через 7 суток отмечено увеличение ОЧК/мл в 1,6 раза, но число КОЕ/мл резко снизилось (в 13,4 раза или на 92,54 %). На 49 и 120-е сутки отмечены максимальные уровни ЖНК со статистически несущественными колебаниями в промежуточные сроки. На 49 сутки число КОЕ/мл на минимальном уровне: снижение произошло более чем в 100 раз в сравнении с 0 сутками. ОМЧ/мл на 49 сутки незначительно уменьшилось по сравнению с исходным показателем (снижение на 8,3 %), к концу эксперимента почти соответствовало 0 часам. Средний показатель живых бактерий за 120 суток наблюдения не опускался ниже 85 % при максимальном количестве мертвых, что может указывать на значительный потенциал устойчивости сальмонелл при стрессе, возможно, за счет быстрого перехода в состояние ЖНК большей части

Таблица 3
 Жизнеспособность популяции *S.aureus* 209Р при стрессе

Срок инкубации, сутки	Характеристика популяции <i>S.aureus</i> 209Р в 3 % растворе NaCl				Число ЖНК, % $\bar{X} \pm m$ I_{95}	
	ОМЧ $\times 10^7$ /мл $\bar{X} \pm m$ I_{95}	КОЕ/мл $\times 10^7$ $\bar{X} \pm m$ I_{95}	Среднее число клеток после Live/Dead, %			
			живые	мёртвые		
0	$5,12 \pm 0,56$ (3,75–6,49)	$11,60 \pm 1,27$ (8,49–14,71)	99	1	0	
7	$3,76 \pm 0,41$ (2,76–4,76)	$2,77 \pm 0,30$ (2,03–3,51)	99	1	$25,58 \pm 2,81$ (18,7–32,46)	
15	$4,40 \pm 0,48$ (3,22–5,58)	$1,79 \pm 0,19$ (1,32–2,26)	98	2	$58,48 \pm 6,43$ (42,72–74,24)	
21	$3,04 \pm 0,33$ (2,23–3,85)	$2,29 \pm 0,25$ (1,68–2,9)	96	4	$21,53 \pm 2,36$ (15,75–27,31)	
28	$4,96 \pm 0,54$ (3,64–6,28)	$1,40 \pm 0,15$ (1,03–1,77)	88	12	$67,92 \pm 7,47$ (49,62–86,22)	
42	$5,66 \pm 0,62$ (4,14–7,18)	$0,79 \pm 0,08$ (0,594–0,986)	88	12	$84,13 \pm 9,25$ (61,47–106,79)	
49	$2,86 \pm 0,32$ (2,08–3,64)	$0,47 \pm 0,05$ (0,347–0,593)	87	13	$81,11 \pm 8,92$ $81,11 \pm 21,85$ (59,26–102,96)	
91	$3,90 \pm 0,42$ (2,87–4,93)	$0,38 \pm 0,04$ (0,282–0,478)	82	18	$88,11 \pm 9,69$ (64,37–111,85)	
98	$1,81 \pm 0,19$ (1,34–2,28)	$0,25 \pm 0,02$ (0,201–0,299)	89	11	$84,48 \pm 9,29$ (61,72–107,24)	
104	$3,02 \pm 0,3$ (2,285–3,755)	$0,24 \pm 0,02$ (0,191–0,289)	71	29	$87,74 \pm 9,65$ (64,1–111,38)	
120	$4,68 \pm 0,51$ (3,43–5,93)	$0,20 \pm 0,02$ (0,151–0,249)	68	32	$93,71 \pm 10,30$ (68,47–118,95)	

Таблица 4
 Показатели смешанной популяции из трёх изученных культур при стрессе

Срок инкубации, сутки	Показатели для смеси штаммов в 3 % растворе NaCl				Число ЖНК, % $\bar{X} \pm m$ I_{95}	
	ОМЧ $\times 10^7$ /мл $\bar{X} \pm m$ I_{95}	КОЕ/мл $\times 10^7$ $\bar{X} \pm m$ I_{95}	Среднее число клеток после Live/Dead, %			
			живые	мертвые		
0	$3,36 \pm 0,36$ (2,48–4,24)	$0,80 \pm 0,08$ (0,604–0,996)	99	1	$75,94 \pm 8,35$ (55,48–96,4)	
7	$4,32 \pm 0,47$ (3,17–5,47)	$3,59 \pm 0,39$ (2,63–4,55)	97	3	$14,32 \pm 1,57$ (10,47–18,17)	
15	$3,44 \pm 0,37$ (2,53–4,35)	$1,73 \pm 0,20$ (1,24–2,22)	97	3	$48,15 \pm 5,29$ (35,19–61,11)	
21	$3,05 \pm 0,34$ (2,22–3,88)	$1,97 \pm 0,21$ (1,46–2,48)	96	4	$32,71 \pm 3,59$ (23,91–41,51)	
28	$3,36 \pm 0,36$ (2,48–4,24)	$0,75 \pm 0,08$ (0,554–0,946)	84	16	$73,42 \pm 8,07$ (53,65–93,19)	
42	$2,68 \pm 0,29$ (1,97–3,39)	$0,12 \pm 0,01$ (0,095–0,145)	90	10	$95,02 \pm 10,45$ (69,42–120,62)	
49	$2,85 \pm 0,31$ (2,09–3,61)	$0,09 \pm 0,01$ (0,065–0,115)	96	4	$96,71 \pm 10,63$ (70,67–122,75)	
91	$3,48 \pm 0,38$ (2,55–4,41)	$0,47 \pm 0,05$ (0,347–0,593)	79	21	$82,90 \pm 9,11$ (60,58–105,22)	
98	$1,33 \pm 0,14$ (0,99–1,67)	$0,21 \pm 0,02$ (0,161–0,259)	77	23	$79,47 \pm 8,74$ (58,06–100,88)	
104	$2,91 \pm 0,32$ (2,13–3,69)	$0,04 \pm 0,005$ (0,028–0,052)	78	22	$98,23 \pm 10,80$ (71,77–124,69)	
120	$5,04 \pm 0,55$ (3,66–6,42)	$0,08 \pm 0,009$ (0,058–0,102)	79	21	$97,99 \pm 10,77$ (71,6–124,38)	

популяции и такой же массовой реверсии.

Для *S.aureus* 209Р в отличие от *E.coli*, переход в состояние ЖНК после 28 суток стресса происходил без резких колебаний. Уровень более 80 % ЖНК в культуре наблюдали только, спустя почти 1,5 месяца после начала инкубации. Число ЖНК у *S.aureus* на 7 сутки составило $25,58 \pm 2,8\%$, при этом отмечено снижение ОМЧ/мл и КОЕ/мл в 1,4 и 4,2 раза (или на 26,56 % и 76 %), соответственно. В первый месяц результаты исследования имели варьирующие значения. После 28 суток процент ЖНК начал стабильно повышаться до завершения наблюдения и имел один из самых высоких показателей. На 91 сутки отмечено незначительное снижение ОМЧ (в 1,3 раза) с более существенным падением уровня КОЕ/мл (в 30,5 раза, по сравнению с исходными значениями). К 98 суткам уменьшение ОМЧ/мл и КОЕ/мл продолжалось. К 104 суткам ОМЧ/мл увеличилось вместе с ЖНК при низкой численности КОЕ/мл. К 120 суткам инкубации по отношению к минимуму в 98 суток ОМЧ/мл повысилось в 2,05 раза, что свидетельствует о размножении клеток, при этом показатель КОЕ/мл продолжал снижаться. Количество живых клеток с 98 до 120 суток понизилось более чем на 20 %. Показатель ЖНК стабильно возрастал, и к 120 суткам инкубации в популяции содержалось более 93 % ЖНК. Данные по динамике изменений даже равнозначных начальных показателей, характеризующих жизнеспособность популяций в условиях длительного трофического и осмотического стресса трёх разных родов микроорганизмов, подтвердили существующее мнение [11] не только о родовых, видовых, но и штаммовых различиях в свойствах ЖНК.

Впервые изучен вопрос о динамике перехода каждого вида микроорганизмов в составе консорциума с совместной инкубацией при трофическом и осмотическом стрессе. Монокультуры смешивали в следующем соотношении: энтеробактерии (*E.coli* M17 – штамм-антагонист и *S.Typhimurium* 79) были по ОМЧ/мл количественно равноценными, *S.aureus* 209Р (тест-штамм из-за своей высокой природной чувствительности) присутствовал с ОЧК/мл почти в 2 раза больше (табл. 1–4). Результаты представлены в таблице 4.

Как следует из табл. 4, в смеси 0 суток отмечено высокое число ЖНК исходной популяции, т.е. высокий уровень неспособности растя на питательной среде, с чем логично связано низкое совокупное первоначальное значение КОЕ/мл. Это может быть следствием, как начинающегося стресса усиленного конкурентным воздействием бактерий, способствующим переходу в ЖНК, так и доминированием дормантных клеток в посевной культуре (предыстория), что отразилось на исходной культурируемости в этот срок. Через 7 суток совместной инкубации показатели ОМЧ/мл и КОЕ/мл стали соответственно близкими к максимально установленным в опыте, свидетельствую-

щем о размножении культур после адаптации к стрессу. Уровень КОЕ/мл через 15 сут инкубации смеси культур с активным ростом снижался. К 104 суткам зафиксировано минимальное число КОЕ/мл, составившее 5 % от начального или 1 % от максимального показателя на 7 сутки. Второй наименьший показатель КОЕ/мл (120 сут) отмечен после некоторого роста культурируемых клеток. ОМЧ/мл не имело статистически значимых колебаний в течение первых трёх месяцев, после чего наблюдалось скачкообразное изменение значений. К 120 суткам инкубации отмечен рост ОМЧ/мл до максимального с повышением более чем в 3,5 раза в сравнении с минимумом в 98 суток. Совокупное количество ЖНК, начиная с 7-х суток, стало постепенно возрастать со статистически незначительными вариациями на 91–98 сут, что можно объяснить не только индивидуальными особенностями разных бактериальных популяций при переходе в НС, но и размножением в этот период некоторых культур (см. статистически значимый подъем числа КОЕ/мл). В период 104–120 суток наблюдался скачок ОМЧ/мл и процента ЖНК при низкой культурируемости клеток в популяции. Доминирующее влияние отдельных культур на параметры в смешанной популяции представлено в табл. 5.

По данным табл. 5 отметим, что, начиная с 49 суток в смешанной культуре отсутствуют колонии *S.aureus* 209Р, которые не выявлены при высеивании смеси культур на дифференциально-диагностические среды.

Высев на дифференциально-диагностические среды показал, какие культуры в смеси находились в вегетативном состоянии или реверсируют. Инкубация бактерий в виде консорциума соответствует природным условиям, следовательно, на них воздействует трофический стресс и антагонизм одновременно. В смеси культур наименее конкурентоспособным оказался *S.aureus* 209Р, поскольку после первого месяца стресса его роста на селективном маннитол-солевом агаре не отмечено (см. табл. 5). Видимо, учитывая незначительное число мертвых клеток и (см. табл. 3) стабильно высокий процент ЖНК с 42 суток, бактерии перешли в НС. Колонии *E.coli* M17 и *S.Typhimurium* 79 выявлены только на среде Эндо и

Таблица 5

Смеси *E.coli* M17, *S.Typhimurium* 79, *S.aureus* 209Р после инкубации при стрессе с использованием дифференциально-диагностических сред

Срок инкубации, сутки	Характеристика популяции смеси с 3% NaCl, КОЕ/мл ($\bar{x} \pm m$)			
	Среда Эндо (<i>E.coli</i> ; <i>S.Typhimurium</i>)	Среда Плоскирева (<i>E.coli</i> ; <i>S.Typhimurium</i>)	Висмут-сульфитный агар <i>S.Typhimurium</i>	Агар маннит-солевой (<i>S.aureus</i>)
0	$1,90 \pm 0,20 \times 10^7$ (смесь трёх культур)	$0,13 \pm 0,01 \times 10^7$	$0,03 \pm 0,003 \times 10^7$	$\leq 1 \times 10^3$
7	$1,80 \pm 0,19 \times 10^7$ (<i>E.coli</i> M17)	$0,60 \pm 0,06 \times 10^7$ (<i>S.Typhimurium</i> 79)	-	$\leq 1 \times 10^3$
15	$2,37 \pm 0,26 \times 10^7$ (<i>E.coli</i> M17)	-	-	$\leq 1 \times 10^3$
21	$2,57 \pm 0,28 \times 10^7$ (<i>E.coli</i> M17)	-	-	$\leq 1 \times 10^2$
28	$0,77 \pm 0,08 \times 10^7$ (<i>E.coli</i> M17)	$0,16 \pm 0,02 \times 10^7$ (<i>S.Typhimurium</i> 79)	-	$\leq 1 \times 10^2$
49	$0,25 \pm 0,02 \times 10^7$ (<i>E.coli</i> M17)	-	-	$\leq 1 \times 10^1$
91	$9,2 \pm 1,01 \times 10^3$ (<i>E.coli</i> M17)	-	-	$\leq 1 \times 10^1$
98	$1,00 \pm 0,11 \times 10^4$ (<i>E.coli</i> M17)	$9,16 \pm 1,01 \times 10^5$ (<i>S.Typhimurium</i> 79)	-	$\leq 1 \times 10^1$
120	$6 \pm 0,67 \times 10^2$ (<i>E.coli</i> M17)	$1,7 \pm 0,18 \times 10^3$ (<i>S.Typhimurium</i> 79)	-	$0,2 \times 10^1$

висмут-сульфитном агаре, но не на среде Плоскирева. Они представлены в смеси на 98–120 сут инкубации в разных соотношениях, хотя их исходные штаммы использованы в аналогичных пропорциях. *S. Typhimurium* 79 в смеси после 98 суток и до конца эксперимента преобладала (различия в 120 сут составляли почти трёхкратную величину). На основании характерного роста и количественных показателей на дифференциально-диагностических средах висмут-сульфитный агар для реверсии *S. Typhimurium* 79 менее эффективен, чем среда Эндо. По числу КОЕ/мл на висмут-сульфитном агаре наблюдали рост 0,1 % клеток с *S. Typhimurium* в сравнении со средой Эндо. При исследовании трёх штаммов в монокультурах (см. табл. 1–3) быстрее в НС перешла *S. Typhimurium* 79: выявлена высокая выживаемость клеток сальмонеллы (97 и 96 % живых окрашенных клеток к 98–120 суткам инкубации при стрессе).

После 120 суток инкубации *S. aureus* 209Р имел средний уровень жизнеспособности клеток (63–68 %) при высоком уровне ЖНК (91,1–93,71 %). Пробиотический штамм *E. coli* M17 показал скачкообразные величины ЖНК и малое число живых клеток (25 %) после 49 суток инкубации. Возможно, в трофически голодных и осмотически стрессовых условиях в смеси трёх культур *S. aureus* 209Р не является конкурентоспособным по ростовой активности. На дифференциально-диагностической среде он не рос уже через 7 сут стресса, в то время как колонии *E. coli* M17 появлялись даже спустя 120 сут, но в меньших количествах, чем *S. Typhimurium* 79. Возможно, что для ЖНК *S. aureus* после длительного стресса маннитол-солевой агар – не оптимальная питательная среда для реверсии.

В смеси культур, длительно инкубированных при стрессе, наиболее благоприятные условия для последующей реверсии ЖНК возникали у энтеробактерий. *S. Typhimurium* 79 по всем полученным показателям, видимо, является более приспособленной к длительному сосуществованию в ассоциациях при стрессовых условиях, по сравнению с другими видами микроорганизмов. Учитывая основные характеристики выбранных штаммов, этот практически важный факт целесообразно изучить в дальнейшем с другими штаммами бактерий, имеющими существенные различия в культуральных и метаболических свойствах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение ключевых показателей (ОМЧ/мл, КОЕ/мл, число живых и мертвых клеток, процент ЖНК) в монопопуляциях *E. coli* M17, *S. Typhimurium* 79, *S. aureus* 209Р и в смеси после пребывания в условиях длительного стресса показало, что изменения величин зависят не только от индивидуальных особенностей культур, но и от предыстории культивирования микроорганизмов, в частности, от уровня пролиферативной активности посевной культуры, отражающихся на исходных характеристиках популяций, а затем на всех последующих. При высеивании на дифференциально-диагностические среды смесей ЖНК *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. aureus*, более эффективной для роста энтеробактерий после выхода из НС является среда Эндо, по сравнению со средой Плоскирева и висмут-сульфитным агаром, что имеет важное практическое значение в клинической лабораторной диагностике инфекций, вызываемых некульти-

вируемыми формами энтеробактерий и стафилококков, поскольку на среде Эндо, видимо, происходит более активная реверсия ЖНК в пролиферативную форму, что может снизить число ложноотрицательных анализов на наличие энтеробактерий в анализе.



ЛИТЕРАТУРА (П. 1, 5-8, 10-14, 16-28, 30 С. REFERENCES)

2. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина; 2005.
3. Соколенко А.В., Миронов А.Ю. Некультивируемые формы холерных вибрионов: парадигма функциональной дифференциации патогенных бактерий. Ростов-на-Дону, Азов: АзовПечать; 2013. ISBN 978-5-4382-0122-9.
4. Романова Ю.М., Горячев С.Н. Современный взгляд на экологию бактерий: некультивируемые формы, персисторы, биопленки. М.: АР-Консалт; 2017.
9. Абдуллаева А.М., Блинкова Л.П., Пахомов Ю.Д., Валирова Р.К. Микробиологические принципы работы с жизнеспособными некультивируемыми микроорганизмами. М.: Издательский дом «Научная библиотека»; 2023. DOI: 10.36871.978-5-907672-64-2. ISBN 978-5-907672-64-2.
15. Абдуллаева А.М., Блинкова Л.П., Уша Б.В., Валирова Р.К., Пахомов Ю.Д., Митрофанова Д.Б. Детекция жизнеспособных некультивируемых клеток микроорганизмов в курином фарше. Detection of viable non-culturable microbial cells in minced chicken. *Health, Food & Biotechnology*. 2019; 1(4). 26-38. DOI: 10.36107/hfb.2019.i4.s281.
29. Пахомов Ю.Д., Блинкова Л.П. Биоопасность жизнеспособных некультивируемых микроорганизмов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019; 96(3): 83-91.



REFERENCES

1. Xu H.S., Roberts N., Singleton F.L. Attwell R., Grimes D.J., Colwel R. R. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.* 1982; 8: 313-23.
2. Bukharin O.V., Gintsburg A.L., Romanova Yu.M., El'-Registan G.I. Mechanisms of bacterial survival [Mekhanizmy vyzhivaniya bakteriy]. Moscow: Meditsina; 2005. (in Russian)
3. Sokolenco A.V., Mironov A.Yu. Uncultivated forms of cholera vibrios: a paradigm of functional differentiation of pathogenic bacteria [Nekul'tiviruemye formy kholernykh vibriionov: paradigma funktsional'noy differentsiatsii patogennykh bakteriy]. Rostov-na-Donu, Azov: AzovPechat'; 2013. ISBN 978-5-4382-0122-0. (in Russian)
4. Romanova Yu.M., Goryachev S.N. Modern view on the ecology of bacteria: uncultivated forms, persisters, biofilms [Sovremennyye vzglyad na ekologiyu bakteriy: nekul'tiviruemye formy, persistory, bioplenki]. Moscow: AR-Konsalt; 2017. (in Russian)
5. Skorlupkina N., Blinkova L., Pakhomov Yu., Piyadina A., Chistyakova D. Formation and reversion of VBNC cells of *Salmonella Typhimurium* preincubated in different substrates. *International Journal of Current Research and Review*. 2017; 09(09), 5: 20-5. DOI: 10.7324/UCRR.2017.992025.
6. Mukamolova G.V., Yanopolskaya N.D., Kell D.B., Kaprelyants A.S. On resuscitation from the dormant state of *Micrococcus luteus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2018; 73: 237-43. DOI: 10.1023/A:1000881918216.
7. Dong K., Pan H., Yang D., Rao L., Zhao L., Wang Y., et al. Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2020; 19: 149-83. DOI: 10.1111/1541-4337.12513.
8. Zhang X.-H., Ahmad W., Zhu X.Y., Chen J., Austin B. Viable but Nonculturable bacteria and their resuscitation: Implications for cultivating uncultured marine microorganisms. *Mar. LifeSci Tekhnol.* 2021; 3: 189-203, doi: 10.1007/s42995-020-00041-3.
9. Abdullaeva A.M., Blinkova L.P., Pakhomov Yu.D., Valitova R.K. Microbiological principles of work with viable non-culturable microor-

- ganisms [Mikrobiologicheskie printsipy raboty s zhiznesposobnymi nekul'tiviruemymi mikroorganizmami]. Moscow: Izdatel'skiy dom «Nauchnaya biblioteka»; 2023. DOI: 10.36871.978-5-907672-64-2. ISBN 978-5-907672-64-2. (in Russian)
10. Asakura H., Makino S.-I., Takagi T Passage in mice causes a change in the ability of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg to survive NaCl osmotic stress: resuscitation from the viable but non-culturable state. *FEMS Microbiol. Lett.* 2002; 212 (1): 87-93.
 11. Masuda Y., Tajima K., Ezura Y. Resuscitation of *Tenacibaculum* sp., the causative bacterium of spotting disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* from viable but non-culturable state. *Fisheries Science.* 2004; 70(2): 277-84.
 12. Bech-Terkilsen S., Westman I.O., Swingers J.H., Siegumfeldt H. Oenococcus oeni, a species born and moulded in wine: a critical review of the stress impacts of wine and the physiological responses. *Australian Journal of Grape and Wine Research.* 2020; 26: 188-206.

- DOI: 10.1111/ajgw.12436.
13. Blinkova L.P., Martirosyan D., Pakhomov Yu. D., Dmitrieva O.V., Vaughan R., Altshuler M. Nonculturable forms of bacteria in lyophilized probiotic preparations. *Functional Foods in Health and Disease.* 2014; 4 (2): 66-76.
 14. Zhao X., Zhong J., Wei C., Lin C.-W., Ding T. Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens. *Front. Microbiol.* 2017; 8(580): 1-32. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00580.
 15. Abdullaeva A.M., Blinkova L.P., Usha B.V., Valitova R.K., Pakhomov Yu.D., Mitrofanova D.B. Detection of viable non-culturable microbial cells in minced chicken. *Health, Food & Biotechnology.* 2019; 1(4): 26-38. DOI: 10.36107/hfb.2019.i4.s281. (in Russian)
 16. Zhang J., Yang H., Li J., Hu J., Lin G., Tan B.K., Lin S. Current perspectives on viable but non-culturable foodborne pathogenic bacteria. *A Review. Foods.* 2023; 12: Article 1179. DOI: 10.3390/foods12061179.
 17. Kibbee R.J., Ormeci B. Development of a sensitive and false-positive free PMA-qPCR viability assay to quantify VBNC *Escherichia coli* and evaluate disinfection performance in wastewater effluent. *Journal of Microbiological Methods.* 2017; 132: 139-47. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.12.004.
 18. Daranas N., Bonaterra A., Francés J., Cabrefiga J., Montesinos E., Badosa E. Monitoring viable cells of the biological control agent *Lactobacillus plantarum* PM411 in aerial plant surfaces by means of a strain-specific viability quantitative PCRmethod. *Appl. Environ. Microbiol.* 2018; 84: e00107-18. DOI: 10.1128/AEM.00107-18.
 19. Majeed M., Majed S., Nagabhushanam K., Punnapuzha, A., Philip S., Mundkur L. Rapid assessment of viable but non-culturable *Bacillus coagulans* MTCC 5856 in commercial formulations using low cytometry. *PLoS ONE.* 2018; 13: e0192836, DOI:10.1371/journal.pone.0192836.
 20. Pasquarelli S., Zandri G., Vignaroli C., Vuotto C./. Donelli G/. Biavasko F. Antibiotic pressure can induce the viable but non-culturable state in *Staphylococcus aureus* growing in biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013; 68 (8): 1812-7.
 21. Aliver-Daza J.J., Garcia-Barco A., Osorio-Vargas P., Gutierrez-Zapal H.M., Anabria J., Rengifo -Herrera J.A. Resistance and induction of viable but non culturable states (VBNC) during inactivation of *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* by addition of H₂O₂ to natural well water under simulated solar irradiation. *Water Res.* 2021; 188: Article 116499.
 22. Xia K., Han C., Xu J., Liang X. Toxin-antitoxin HicAB regulates the formation of persister cells responsible for the acid stress resistance in *Acetobacter pasteurianus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2021; 105: 725-39. DOI: 10.1007/s00253-020-11078-w.
 23. Chengsong Y., Chenian C., Mingbao F., Ranwen O., Xin Y. Emerging contaminants in the water environment: Disinfection-induced viable but nonculturable waterborne pathogens. *Journal of Hazardous Materials.* 2024; 461: Article 132666.
 24. Boaretti M., Del Mar Lieo M., Bonato B., Signoretto C., Canepari P. Involment of rpoS in the survival of *Escherichia coli* in the viable but non-culturable state. *Environ. Microbiol.* 2003; 5: 986-96. DOI: 10.1046/j.1462-2920.2003.00497.x.
 25. Asakura H., Ishiwa A., Arakawa E., Makino S., Okada Y., Yamamoto S., Igimi S. Gene expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress induced Viable but Non-culturable (VBNC) state. *Environ. Microbiol.* 2007; 9: 869-79. DOI:10.1111/1462-2920.2006.01206.x.
 26. Hung W., Jane W.N., Wong H. Association of a D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase gene with the formation of aberrantly shaped cells during the infection of Viable but Nonculturable *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79: 7305-12. DOI:10.1128/AEM.01723-13.
 27. Ayrapetyan M., Williams T.C., Oliver J.D. Interspecific quorum sensing mediates the resuscitation of viable but nonculturable vibrios. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014; 80 (8): 2478-83.
 28. Liu J., Li L., Li B., Peters B.M., Deng Y., Xu Z., Shirtliff M.E. Transcriptomic analyses on the formation of the viable putative non- culturable state of beer spoilage *Lactobacillus acetotolerans*. *Sci. Rep.* 2016; 6: 36753. DOI: 10.1038/srep36753.
 29. Pakhomov Yu.D., Blinkova L.P. Biohazard of viable uncultivated microorganisms. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2019; 96(3): 83-91. (in Russian)
 30. Fakruddin Md., Mannan K.S.B., Andrews S. Viable but nonculturable bacteria food and public health perspective. *ISRN Microbiol.* 2013; 703813. DOI:10.1155/2013/703813.



Спокойствие в каждой капсule

Успокаивает

Улучшает сон

Снимает
напряжение



Покупайте
на маркетплейсах

АО «ЭКОЛАБ»
142530, Московская обл., г. Электрогорск, ул. Буденного, д. 1
ИНН 5035025076 ОГРН 1035007106958

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНАЯ ДОБАВКА.
НЕ ЯВЛЯЕТСЯ ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВОМ