

Изучение динамики перехода в некультивируемое состояние антибиотикоустойчивых клеток *Escherichia coli*

*Ю. Д. ПАХОМОВ¹, Л. П. БЛИНКОВА¹, А. М. АБДУЛЛАЕВА², Р. К. ВАЛИТОВА¹

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

² Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия

Study of Transitional Dynamics Towards the Non-Culturable State of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Cells

*YURY D. PAKHOMOV¹, LARISA P. BLINKOVA¹,
ASIAT M. ABDULLAEVA², RUMIYA K. VALITOVA¹

¹ I. I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

² Moscow State University of Food Production, Moscow, Russia

Резюме

Актуальность. Известно, что в ответ на присутствие антибиотиков бактерии вырабатывают устойчивость к их действию и стремятся сохранить её на длительный срок. Кроме того, микробы могут сохранять жизнеспособность, переходя в некультивируемое состояние, не выявляемое микробиологическими методами. Это состояние популяции характеризуется устойчивостью клеток к разным стрессам, в том числе к воздействию антибиотиков. **Цель.** Изучить параметры процесса перехода в некультивируемое состояние у клеток *Escherichia coli* M-17, устойчивых к антибиотикам.

Материал и методы. Резистентные клетки *E. coli* M17 получали культивированием исходной популяции в средах с повышающимися концентрациями ампициллина (до 50 мкг/мл). Из чувствительного и резистентного субштаммов готовили посевные культуры, из которых клетки переносили в гипертоническую, «голодную» среду — искусственную морскую воду. Полученные популяции инкубировали в течение длительного времени, периодически отбирая пробы для оценки параметров жизнеспособности.

Результаты. В опытах по длительной инкубации чувствительной и резистентной популяций *E. coli* M-17 обнаружено, что ампициллинорезистентный субштамм исследуемой культуры переходил в некультивируемое состояние достоверно быстрее и количественно больше, чем его чувствительный вариант. Присутствие антибиотика в посевной культуре (R2) увеличивало сроки перехода устойчивых бактерий в жизнеспособное некультивируемое состояние до уровня >90% по сравнению с посевной культурой без антибиотика (R1). В среде без антибиотика популяция R1 в начале стрессового воздействия массово (до 77,7%) переходила в жизнеспособные некультивируемые клетки. При наблюдении отмечены периоды отмирания клеток, которые становились субстратом для живой части популяции и могли приводить к вторичному росту бактерий или частичному восстановлению dormantных клеток.

Заключение. Клетки, резистентные к антибиотикам, быстрее переходили в некультивируемое состояние по сравнению с чувствительными клетками исследованного штамма. Добавление антибиотика в среду для получения посевной культуры замедляло переход клеток в некультивируемое состояние.

Ключевые слова: жизнеспособные некультивируемые клетки (ЖНК); *Escherichia coli*; антибиотик; чувствительность; резистентность; ампициллин

Для цитирования: Пахомов Ю. Д., Блинкова Л. П., Абдуллаева А. М., Валитова Р. К. Изучение динамики перехода в некультивируемое состояние антибиотикоустойчивых клеток *Escherichia coli*. *Антибиотики и химиотер.* 2022; 67: 9–10: 11–17. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-11-17>.

Abstract

Background. It is known that bacteria develop resistance to antibiotics in response to their presence and tend to maintain it for a long time. In addition, microbes can remain viable by passing into an uncultivated state that is not detected by microbiological methods. This state of the population is characterized by cell resistance to various stresses, including the effects of antibiotics.

Aim. To study the parameters of transition into an uncultivated state in *E. coli* M-17 cells resistant to an antibiotic.

Material and methods. Resistant *E. coli* M-17 cells were obtained by culturing the initial population in media with increasing concentrations of ampicillin (up to 50 µg/mL). Seed cultures were prepared from sensitive and resistant substrains, from which the cells were transferred to a hyperosmotic, «starvation» medium — artificial sea water. The resulting populations were incubated for a long time, samples were periodically taken to conduct the assessment of viability parameters.

Results. The experiments on long-term incubation of sensitive and resistant populations of *E. coli* M-17 showed that ampicillin-resistant substrain of the studied culture transitioned into an uncultivated state significantly faster and quantitatively

higher than its sensitive variant. The presence of the antibiotic in the inoculum increased the time for the transition of resistant R2 bacteria to a viable uncultivated state to a level of >90% compared to R1. The R1 population at the beginning of the stress exposure massively (up to 77.7%) transitioned into viable but non-culturable cells (VBNCs) in the medium without an antibiotic in a similar seed culture. Periods of cell death were noted during the observation, with those cells becoming a substrate for the living part of the population and could lead to secondary growth of bacteria or partial restoration of dormant cells.

Conclusion. Cells resistant to the antibiotic quickly transitioned into the non-culturable state compared to sensitive cells of the studied strain. The addition of an antibiotic to the medium for obtaining a seed culture slowed down the transition of cells to an uncultivated state.

Keywords: *viable but non-culturable cells (VBNC); Escherichia coli; antibiotic; sensitivity; resistance; ampicillin*

For citation: Pakhomov Yu. D., Blinkova L. P., Abdullaeva A. M., Valitova R. K. Study of transitional dynamics towards the non-culturable state of antibiotic-resistant *Escherichia coli* cells. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2022; 67: 9–10: 11–17. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-9-10-11-17>.

Введение

По информации Всемирной организации здравоохранения, устойчивость бактерий к антибиотикам представляет собой постоянную угрозу для здоровья человека и общественной безопасности, которая снижает эффективность борьбы с лекарственно-резистентными инфекциями [1]. По оценкам учёных, до 2020 г. инфекции, вызванные антибиотикорезистентными микроорганизмами, приводили к смерти 700 000 человек во всём мире [2]. Заболевания, которые вызывают возбудители, устойчивые к антибиотикам, вследствие этого становится всё сложнее лечить, а уровень смертности увеличивается, особенно от бактериальных инфекций, вызванных микроорганизмами с множественной лекарственной устойчивостью [3, 4]. Предполагается, что к 2050 г. бактериальная устойчивость к антибиотикам будет вызывать около 10 млн смертей во всём мире в год, и превысит количество летальных случаев, связанных с раком [5].

В соответствии с этой тенденцией роста смертности ВОЗ и Центры по контролю и профилактике заболеваний США полагают, что устойчивость к антибиотикам может обусловить глобальный кризис в здравоохранении, поскольку распространённые заболевания, как например, диарея бактериальной этиологии, могут переходить в тяжёлые состояния [6]. Антибиотики оказали существенное влияние на сохранение здоровья человеческой популяции, но их постоянное применение создаёт экономические проблемы [7]. Так, как только патоген подвергается воздействию новых лекарственных соединений, он начинает адаптироваться, разрабатывая способы противодействия их атаке. Следовательно, продолжительность применения антибиотика и потенциальный доход фармацевтических компаний снижаются [7].

Вероятно, целесообразно тратить значительно больше времени и усилий на поиск способов предотвращения дальнейшего распространения антибиотикоустойчивости, механизм формиро-

вания которой разнообразен [8]. Поэтому изучение поведения популяций антибиотикоустойчивых микробов, переходящих в состояние жизнеспособных некультивируемых клеток (ЖНК), представляет научный интерес.

В последние годы появились сообщения, что бактериальный покой является вероятным путём приобретения и сохранения спорными бактериями резистентности к антибиотикам [9, 10]. Жизнеспособные, но некультивируемые клетки микроорганизмов исследователи считают типичным спящим состоянием части популяций. Переход в состояние ЖНК считается важной стратегической реакцией для выживаемости бактерий в ответ на стрессы окружающей среды. В этом состоянии бактерии не могут расти на обычных питательных средах, но они остаются жизнеспособными и могут восстанавливать культивируемость при благоприятных условиях [11–17]. В связи с этим у специалистов возникли сомнения по поводу того, могут ли обычные и новые технологии дезинфекции полностью устранить патогены, поскольку из-за характерной для ЖНК устойчивости бактерий они не могут быть полностью уничтожены традиционными методами обеззараживания. Это приводит к возникновению у бактерий потенциального риска обмена генами резистентности к антибиотикам. После пребывания микроорганизма в состоянии ЖНК, индуцированного у бактерий, устойчивых к антибиотикам, и восстановления у клеток пролиферации может происходить горизонтальный перенос генов при определённых условиях [15].

Показано, что возможность и скорость перехода в некультивируемое состояние зависят от свойств штамма [16, 17], также на эти процессы влияют условия предынкубации культуры [18] микроорганизма, в том числе в средах, содержащих высокие дозы антибиотиков [19].

Цель работы — изучение влияния предсуществующей у бактериальных клеток антибиотикорезистентности на динамику процесса образования жизнеспособных некультивируемых клеток *Escherichia coli*.

Таблица 1. Показатели жизнеспособности клеток популяции *E.coli* M17 (исходный штамм S1), чувствительных к ампициллину

Table 1. Cell viability of the *E.coli* M17 population (original strain S1) sensitive to ampicillin

Срок инкубации (сут)	Характеристика популяции <i>E.coli</i> M17 (S1)				Количество ЖНК, %
	Общее количество клеток $\times 10^7/\text{мл}$, $X \pm m$	10^7 КОЕ/мл, $X \pm m$	Количество клеток с Live/Dead (%)		
			живые	мёртвые	
0	12,4 \pm 1,36	1,6 \pm 0,18	100	0	87,1
6	3,25 \pm 0,36	1,76 \pm 0,19	100	0	45,8
13	3,59 \pm 0,36	13,1 \pm 3,24	100	0	0
20	3,8 \pm 0,27	2,63 \pm 0,29	100	0	30,8
27	3,05 \pm 0,34	1,83 \pm 0,20	100	0	40,0
48	2,67 \pm 0,29	1,89 \pm 0,21	100	0	29,2
55	1,19 \pm 0,13	2,06 \pm 0,23	100	0	0
69	1,06 \pm 0,12	2,25 \pm 0,25	74,0	26,0	0
90	1,33 \pm 0,15	1,63 \pm 0,18	100	0	0
97	0,893 \pm 0,098	0,659 \pm 0,072	91,0	9,0	18,9
104	2,72 \pm 0,3	3,6 \pm 0,4	81,0	19,0	0
111	3,130 \pm 0,344	2,75 \pm 0,303	73,0	27,0	0
132	3,35 \pm 0,37	0,335 \pm 0,037	58,9	41,1	83,0
139	2,75 \pm 0,30	0,0189 \pm 0,0013	70,0	30,0	99,0
146	2,55 \pm 0,28	0,0966 \pm 0,011	100	0	96,2
153	2,2 \pm 0,24	0,0918 \pm 0,01	56,0	44,0	92,5
223	2,18 \pm 0,24	0,22 \pm 0,0242	52,8	47,2	80,9
238	2,66 \pm 0,29	0,207 \pm 0,023	100	0	92,2
252	1,38 \pm 0,15	0,092 \pm 0,01	69,0	31,0	90,3
259	2,81 \pm 0,31	0,183 \pm 0,02	23,9	66,1	72,7
273	0,61 \pm 0,067	0,158 \pm 0,017	54,0	46,0	52

Материал и методы

В работе использован штамм *E.coli* M-17. Для создания антибиотикорезистентности у *E.coli* M-17 популяцию культивировали на 1,5% питательном агаре в среде со ступенчато повышающейся концентрацией (2,5; 5; 10; 25 и 50 мг/мл) ампициллина (ОАО «Синтез»). Устойчивые к ампициллину бактериальные клетки, выросшие на чашке с 50 мкг/мл, использовали для выращивания посевной культуры и для дальнейшего получения ЖНК. При изучении особенностей формирования ЖНК в опытах с отсутствием «давления антибиотического стресса» посевную культуру с ранее полученными антибиотикоустойчивыми бактериями выращивали без ампициллина (субпопуляция R1) или готовили с 25 мкг ампициллина (субпопуляция R2). В экспериментах с антибиотикорезистентными бактериями антибиотикочувствительные клетки исходного штамма (S1 и S2) являлись контролем.

При получении посевных культур клетки выращивали в питательном бульоне в течение 18 ч, затем их концентрировали центрифугированием при 10000 об/мин в течение 8 мин. Сливали супернатант, отмывали и ресуспендировали клетки в физиологическом растворе. Затем их переносили во флаконы с искусственной безбелковой и безуглеводной морской водой, создавая стрессовые условия (осмотический и трофический стрессы). Инкубацию проводили при комнатной температуре в течение длительного срока (6 и 9 мес.).

Периодически отбирали пробы для определения общей численности клеток, высеваемости бактерий по числу колониеобразующих единиц (КОЕ/мл), количества живых и мёртвых клеток, процента ЖНК. Общее число клеток подсчитывали в счётной камере Горяева. Число КОЕ/мл определяли в чашках с 1,5% питательным агаром, а долю живых и мёртвых клеток в популяции определяли в люминесцентном микроскопе после окрашивания набором ДНК-тропных красителей Live/DeadTM (США). Для этого клетки концентрировали центрифугированием (10 мин при 13000 об/мин) до значений 10^8 клеток/мл, затем к 100 мкл полученного концентрата при-

ливали 3,0 мкл рабочего раствора красителя (рабочий раствор готовили путём десятикратного разведения дистиллированной водой смеси красителей, селективно окрашивающих живые и мёртвые клетки). Полученный препарат инкубировали в темноте в течение 15 мин, затем просматривали в люминесцентном микроскопе Opton при увеличении $\times 320$. Поля зрения фотографировали, архивировали на компьютере и подсчитывали число зелёных (живых) и красных (мёртвых) клеток, затем определяли их процентное соотношение. На основании совокупности всех данных определяли количество ЖНК. Статистическую обработку результатов выполняли с использованием параметрических критериев (определение \bar{X} , s, m) для уровня достоверности $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Наблюдения за популяциями клеток *E.coli* M17 в состоянии ЖНК, находившихся в условиях стресса, были проведены нами в течение продолжительного периода и отличавшихся такими ключевыми свойствами культур, как антибиотикорезистентность и антибиотикочувствительность. В экспериментах изучали динамику параметров жизнеспособности, культивируемости и перехода в некультивируемое состояние у клеток *E.coli* M17 ампициллинорезистентных субштаммов (R1 и R2) и ампициллиночувствительных (S1 и S2).

В табл. 1 и 2 представлены средние значения динамического изменения количественных показателей общего числа бактерий (антибиотикочувствительных и антибиотикорезистентных к 50 мкг/мл ампициллина), численности выросших на питательном агаре колониеобразующих единиц в 1 мл популяции *E.coli* M-17, а также живых,

Таблица 2. Показатели жизнеспособности клеток популяции *E.coli* M17 (субштамм R1), резистентных к 50 мкг/мл ампициллина

Table 2. Cell viability of *E.coli* M17 (substrain R1) resistant to 50 µg/ml ampicillin

Срок инкубации (сут)	Характеристика популяции <i>E.coli</i> M17 (S1)				Количество ЖНК, %
	Общее количество клеток $\times 10^7$ /мл, $X \pm m$	10^7 КОЕ/мл, $X \pm m$	Количество клеток с Live/Dead (%)		
			живые	мёртвые	
0	54,8±6,03	12,2±1,34	100	0	77,7
6	42,4±4,66	28,5±3,14	100	0	32,8
13	49,2±5,41	13,3±1,46	100	0	73,0
20	48±5,28	2,98±0,33	100	0	93,8
27	36±3,96	2,3±0,25	79,0	21,0	91,9
48	8,47±0,93	2,68±0,29	83,0	17,0	61,9
55	5,12±0,56	2,37±0,26	100	0	53,7
62	5,98±0,66	1,44±0,16	50,0	50,0	51,8
69	1,36±0,15	1,37±0,15	92,0	8,0	0
90	4,61±0,57	0,41±0,045	100	0	91,1
97	7,23±0,79	0,734±0,0807	79,0	21,0	87,1
104	6,14±0,67	0,859±0,0944	89,0	11,0	84,3
111	6,81±0,75	0,172±0,019	73,4	24,6	96,6
132	6,24±0,69	0,326±0,0359	58,8	41,2	91,1
139	9,04±1,00	0,0275±0,0030	85,0	15,0	99,6
146	7,91±0,87	0,0266±0,0029	88,0	12,0	99,6
153	6,24±0,69	0,039±0,00429	66,0	34,0	99,1
230	3,74±0,41	0,17±0,0187	93,0	7,0	95,1
238	6,77±0,74	0,122±0,013	100	0	98,2
252	5,33±0,59	0,166±0,018	83,8	16,2	96,3
259	9,59±1,05	0,248±0,027	62,7	37,3	95,9
273	8,55±0,94	0,405±0,045	80,6	19,4	94,1

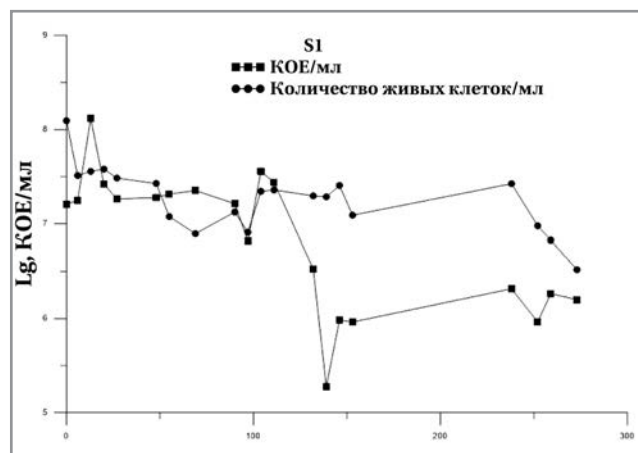


Рис. 1. Показатели общего количества клеток и КОЕ/мл *E.coli* M17, чувствительной к ампициллину (исходный штамм S1)

Fig. 1. Indicators of the total number of cells and CFU/ml of *E.coli* M17, sensitive to ampicillin (original strain S1)

мёртвых и жизнеспособных, но некультивируемых бактерий.

Как следует из табл. 1, средняя численность общего количества ампициллиночувствительных бактерий с первоначального показателя $(12,4 \pm 1,36) \times 10^7$ кл/мл к 273-му дню (9 мес.) наблюдения от начала экспериментов статистически значимо ($p < 0,05$) снизилось до $(0,61 \pm 0,067) \times 10^7$ /мл,

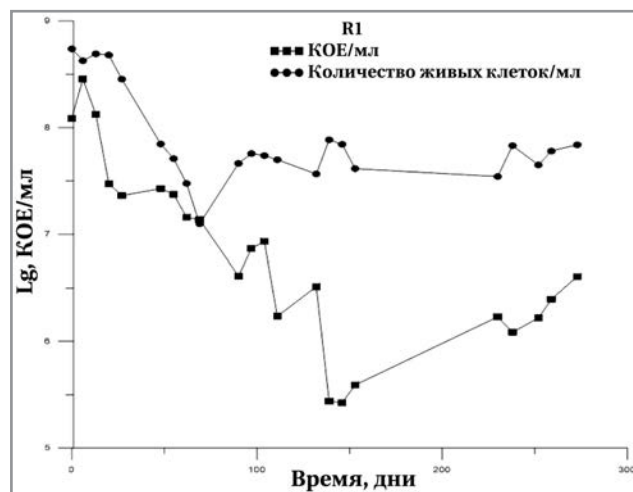


Рис. 2. Показатели общего количества клеток и КОЕ/мл *E.coli* M17, устойчивой к 50 мкг/мл ампициллина (субштамм R1)

Fig. 2. Indicators of the total number of cells and CFU/ml of *E.coli* M17, resistant to 50 µg / ml of ampicillin (sub-strain R1)

т. е. в 20,3 раза. Исходное количество КОЕ/мл к последнему дню наблюдения уменьшилось на 1 порядок. Флуктуационные изменения изученных показателей для популяций S1 и R1 в течение 9 мес. хорошо видны на рис. 1 и 2. Гибель микроорганизмов, которые становились питательным субстратом для оставшихся живых клеток приводила к крат-

Таблица 3. Показатели жизнеспособности клеток популяции штамма *E.coli* M17 (исходный штамм S2, чувствительный к ампициллину)

Table 3. Cell viability of the *E.coli* M17 population (original strain S2 sensitive to ampicillin)

Срок инкубации (сут)	Характеристика популяции <i>E.coli</i> M17 (R2)				Количество ЖНК, %
	Общее количество клеток $\times 10^7/\text{мл}$, $X \pm m$	10^7 КОЕ/мл, $X \pm m$	Количество клеток с Live/Dead (%)		
			живые	мёртвые	
0	2,85±0,31	4±0,44	100	0	0
6	2,66±0,29	9,38±1,03	100	0	0
13	2,49±0,27	1,64±0,18	100	0	34,1
20	2,53±0,28	2,12±0,23	100	0	16,2
41	3,87±0,43	1,75±0,19	72,0	28,0	37,2
48	0,38±0,041	1,41±0,16	79,0	21,0	0
62	1,01±0,11	0,589±0,065	61,0	39,0	4,39
83	2,00±0,22	0,68±0,075	57,0	43,0	40,4
90	1,03±0,11	0,81±0,089	43,0	57,0	0
97	1,64±0,18	1,91±0,21	76,0	24,0	0
104	2,64±0,29	1,38±0,15	37,7	62,7	0
132	1,94±0,21	0,272±0,023	65,0	35,0	78,4
139	1,07±0,12	0,0744±0,0082	53,0	47,0	86,9
146	1,49±0,16	0,0883±0,0097	27,0	73,0	79,3
223	1,73±0,19	0,0544±0,00598	51,4	48,6	93,9
231	1,59±0,17	0,0248±0,0027	100	0	98,44
245	2,37±0,26	0,026±0,0029	41,5	58,5	97,35
252	2,87±0,32	0,031±0,0034	50,0	50,0	78,39

ковременному подъёму уровня микробов. Амплитуда таких колебаний постоянно сокращалась. Это отражалось на процентном показателе ЖНК бактерий, который увеличивался от 0 до 99%.

Определение тех же показателей у антибиотикорезистентного субштамма R1 в аналогичные сроки выявило меньший уровень различий ($p < 0,05$) между точкой 0 и 9 мес. (с $54,8 \pm 6,03 \times 10^7$ кл/мл до $(8,55 \pm 0,94) \times 10^7$ кл/мл, т. е. в 6,4 раза (табл. 2, рис. 2). Численность КОЕ/мл в этот интервал времени понизилась в 30 раз ($p < 0,05$). Сравнение указанных показателей для культур *E.coli* M-17 S1 и R1 показало, что процент образовавшихся ЖНК в популяции ампициллиночувствительного штамма S1 постоянно варьировал до 4,5 мес. (132 сут), после чего реверсии ЖНК клеток к культурабельности не наблюдали. Величина присутствовавших в этой S1-популяции ЖНК составляла 52–99%, тогда как для ампициллинорезистентных бактерий R1 устойчивое образование ЖНК в значительных количествах установлено через 2 нед. (13 сут) от начала эксперимента с колебаниями в статистически незначимых ($p > 0,05$) пределах (73; 93,8; 91,9; 61,9; 53,7% и т. д.).

Показано, что при высевах популяций R1 и R2 на чашки с питательным агаром, в которые был добавлен ампициллин в дозе 50 мкг/мл не выявлено статистически достоверных различий ($p > 0,05$) в количестве КОЕ/мл, по сравнению с высевам этих популяций на среду без антибиотика (рис. 3, 4). Из этого следует, что в период наблюдений за переходом клеток *E.coli* M17 в состоянии ЖНК признак резистентности к антибиотикам не терялся со временем. Вероятно, ранний переход

антибиотикорезистентных эшерихий в некультивируемое состояние с момента начала опыта, может быть связан с генетически регулируемой памятью на перенесённый антибиотический стресс («антибиотическое давление») [13]. Клетки в такой ситуации, видимо, вырабатывали механизм быстрого перехода в ЖНК, т. е. бактерии в присутствии антибиотика стремились сохранить такой приобретённый уровень резистентности через переход в ЖНК. Это, вероятно, позволит им успешно адаптироваться и повысить показатель антибиотикорезистентности в условиях более высокой концентрации вещества.

Следует также рассмотреть результаты, полученные в связи с особенностью выращивания посевной культуры, которое осуществляли без добавления антибиотика в среду (S1 и S2). Эксперименты, проведённые с теми же культурами *E.coli* M17 (обозначение S2 и R2) и посевной культурой, которую выращивали в питательном бульоне с антибиотиком, выявили однотипную стратегию формирования ЖНК у ампициллиночувствительных (S1 и S2). Так, стабильное образование ЖНК (табл. 1, 3) у антибиотикочувствительного штамма S2 начиналось так же, как у S1, с 132 суток. У популяции R2 (табл. 3, 4) стабильный уровень ЖНК появился раньше, чем у S2 (с 83 сут, а не со 132 сут, т. е. опережение почти на 2 мес.). По-видимому, «полезное» для возбудителя свойство устойчивости к губительным концентрациям антибиотика, которое также выявляется к любым стрессам благодаря механизму перехода в ЖНК, микроорганизмы стремятся сохранить.

Таблица 4. Показатели жизнеспособности клеток популяции *E.coli* M17 (субштамм R2, устойчивый к 50 мкг/мл ампициллина)

Table 4. Cell viability of the *E.coli* M17 population (R2 substrain resistant to 50 µg/ml ampicillin)

Срок инкубации (сут)	Характеристика популяции <i>E.coli</i> M17 (R2)				Количество ЖНК, %
	Общее количество клеток ×10 ⁷ /мл, <i>X±m</i>	10 ⁷ КОЕ/мл, <i>X±m</i>	Количество клеток с Live/Dead (%)		
			живые	мёртвые	
0	3,05±0,34	6,54±0,72	38,0	62,0	0
6	3,93±0,43	1,28±0,14	100	0	67,4
13	3,96±0,44	2,9±0,32	90,0	10,0	18,6
20	2,79±0,31	3±0,33	75,0	25,0	0
48	1,65±0,18	2,26±0,25	80,0	20,0	0
62	1,57±0,17	1,29±0,14	60,0	40,0	0
83	1±0,11	0,515±0,057	57,0	43,0	9,64
90	1,38±0,15	0,599±0.066	100	0	56,59
104	1,95±0,21	0,781±0,086	45,6	54,4	12,2
125	3,03±0,33	0,433±0,048	64,5	35,5	77,8
132	2,73±0,30	0,211±0,023	67,0	33,0	88,5
139	2,61±0,28	0,124±0,014	77,0	23,0	93,8
146	0,907±0,01	0,115±0,013	60,0	40,0	78,9
223	3,27±0,36	0,318±0,035	70,0	30,0	86,1
230	2,62±0,29	0,201±0,022	100	0	92,3
244	4,6±0,51	0,238±0,026	74,4	25,6	93,04
252	4,31±0,47	0,194±0,021	55,8	44,2	91,9

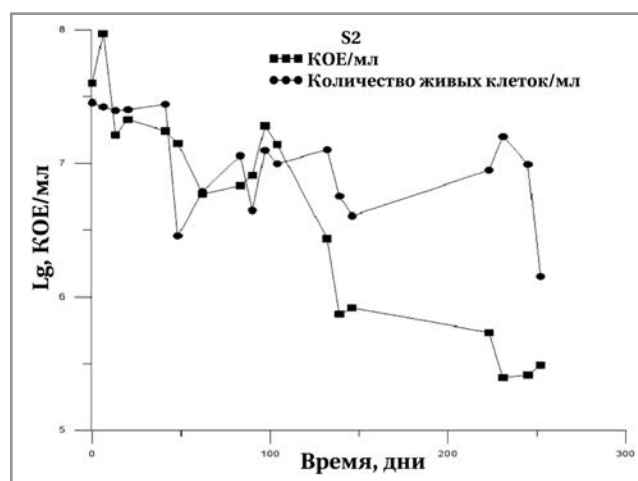


Рис. 3. Показатели общего количества клеток и КОЕ/мл *E.coli* M17, чувствительной к ампициллину (исходный штамм S2)

Fig. 3. Indicators of the total number of cells and CFU/ml of *E.coli* M17, sensitive to ampicillin (original strain S2)

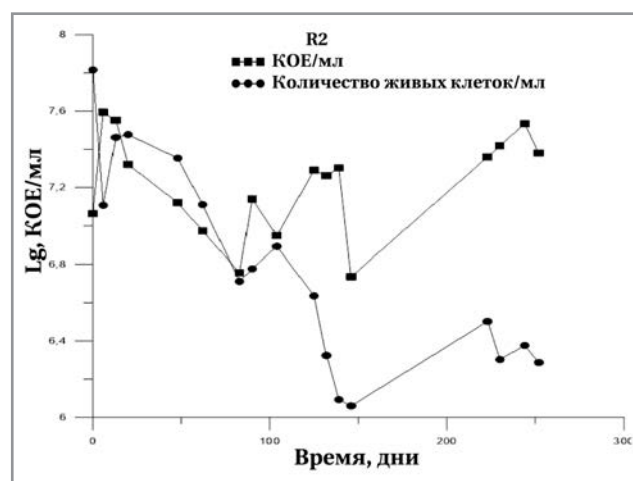


Рис. 4. Показатели общего количества клеток и КОЕ/мл *E.coli* M17, резистентной к 50 мкг/мл ампициллина (субштамм R2)

Fig. 4. Indicators of the total number of cells and CFU/ml of *E.coli* M17, resistant to 50 µg/ml of ampicillin (sub-strain R2)

Закключение

Нами показано, что устойчивые к ампициллину клетки (R1 и R2) быстрее и более сбалансированно, чем чувствительные (S1 и S2), достигали максимальных показателей образования ЖНК под воздействием осмотического и трофического стрессов при выращивании посевной культуры

без антибиотика. Присутствие антибиотика в посевной культуре увеличивало сроки перехода в жизнеспособное некультивируемое состояние устойчивых бактерий R2 по сравнению с R1 без антибиотика до уровня выше 90%. В среде без антибиотика в аналогичной посевной культуре популяция R1 в начале стрессового воздействия массово (до 77,7%) переходила в ЖНК.

Литература/References

1. WHO. Lack of new antibiotics threatens global efforts to contain drug-resistant infections. World Health Organization, 2020.
2. Cai Y., Jianying L., Guiying L., Keung P., An W. T. Formation mechanisms of viable but nonculturable bacteria through induction by light-based disinfection and their antibiotic resistance gene transfer risk: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2021. <https://doi.org/10.1080/10643389.2021.1932397>.
3. Chang P. H., Juhrend B., Olson T. M., Marrs C. F., Wigginton K. R. Degradation of extracellular antibiotic resistance genes with UV254 treatment. *Environmental Science & Technology*, 2017; 51 (11): 6185–6192. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01120>
4. Prestinaci F., Pezzotti P., Pantosti A. Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health*, 2015; 109 (7): 309–318. doi: 10.1179/2047773215Y.0000000030.
5. Band V. I., Hufnagel D. A., Jaggavarapu S., Sherman E. X., Wozniak J. E., Satola S. W. et al. Antibiotic combinations that exploit heteroresistance to multiple drugs effectively control infection. *Nat Microbiol*, 2019; 4 (10): 1627–1635. doi: 10.1038/s41564-019-0480-z.
6. Liu, Y.-Y. Wang Y., Walsh T. R., Yi L.-X., Zhang R., Spencer J. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*, 2016; 16 (2): 161–168. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
7. McKenna M. The antibiotic paradox: Why companies can't afford to create life-saving drugs. *Nature*, 2020; 584 (7821): 338–341. doi: 10.1038/d41586-020-02418-x.
8. Peterson E. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Front microbiol*, 2018; 9: 2928. doi: 10.3389/fmicb.2018.02928. eCollection 2018.
9. Reineke K., Mathys A. Endospore inactivation by emerging technologies: A review of target structures and inactivation mechanisms. *Ann Rev Food Sci Technol*, 2020; 11 (1): 255–274. doi: 10.1146/annurev-food-032519-051632.
10. Wormer L., Hoshino T., Bowles M. W., Viehweger B., Adhikari R. R., Xiao N. Microbial dormancy in the marine subsurface: Global endospore abundance and response to burial. *Sci Adv*, 2019; 5 (2): eaav1024. doi: 10.1126/sciadv.aav1024.
11. Pakhomov Yu. D., Blinkova L. P., Dmitrieva O. V., Berdyugina O. S., Skorlupkina N. N. Factors for conversion of nonculturable probiotic bacteria into active state. *Journal of Nature Science and Sustainable Technology*, 2016; 10 (1): 147–153.
12. Pakhomov Yu. D., Blinkova L. P., Abdullaeva A. M., Valitova R. K., Karachina T. A. Induction and resuscitation of viable but nonculturable bacteria from different taxonomic groups. *Gorteria Journal*, 2020; 34 (4): 229–235.
13. Bodor A., Bounedjoum N., Vincze G. E., Kis A. E., Laczi K., Bende G. et al. Challenges of unculturable bacteria: Environmental perspectives. *Reviews in Environmental Science and BioTechnology*, 2020; 19 (1): 1–22. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09522-4>.
14. 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 (1): 149–183. doi: 10.1111/1541-4337.12513.
15. Fu Y., Jia Y., Fan J., Yu C., Shen C. Induction of *Escherichia coli* O157: H7 into a viable but non-culturable state by high temperature and its resuscitation. *Environ Microbiol Rep*, 2020; 12 (5): 568–577. doi: 10.1111/1758-2229.12877.
16. 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): 277–284.
17. Карачина Т.А., Блинкова Л.П., Абдуллаева А.М., Валитова Р.К., Пахомов Ю.Д. Действие фагов на бактерии в некультивируемом состоянии. Проблемы медицинской микологии. 2021; 23 (2): 85–86. [Karachina T. A., Blinkova L. P., Abdullaeva A. M., Valitova R. K., Pakhomov Yu. D. Effects of phages on bacteria in nonculturable state. *Problemy Meditsinskoi Mikologii*, 2021; 23 (2): 85–86. (in Russian)]
18. Skorlupkina N., Blinkova L., Pakhomov Yu., Piyadina A., Chistaykova D. Formation and reversion of VBNC cells of *Salmonella* Typhimurium preincubated in different substrates. *International Journal of Current Research and Review*, 2017; 9 (9): 20–25.
19. Ayrapetyan M., Williams T., Oliver J. D. Relationship between the viable but nonculturable state and antibiotic persister cells. *J Bacteriol*, 2018; 200 (20): e00249–18. doi: 10.1128/JB.00249-18.

Информация об авторах

Пахомов Юрий Дмитриевич — к. б. н., старший научный сотрудник Федерального Государственного Научного Учреждения Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия

Блинкова Лариса Петровна — д. б. н., профессор, заведующий лабораторией микробиологических питательных сред Федерального Государственного Научного Учреждения Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия

Абдуллаева Асият Мухтаровна — д. б. н., профессор кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы Московского Государственного университета пищевых производств, Москва, Россия

Валитова Румия Камилевна — младший научный сотрудник Федерального Государственного Научного Учреждения Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва, Россия

About the authors

Yury D. Pakhomov — PhD in biology, senior researcher at FSBSI I. I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Larisa P. Blinkova — D.Sc. in biology, professor, head of the laboratory of microbiological nutrient media at FSBSI I. I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Asiat M. Abdullaeva — D.Sc. in biology, professor of the chair of veterinary examination at Moscow State University of Food Industry, Moscow, Russia

Rumiya K. Valitova — junior researcher at FSBSI I. I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia