

ВЛИЯНИЕ ГОРМОНОВ И БИОГЕННЫХ АМИНОВ НА РОСТ И ВЫЖИВАНИЕ *ENTEROCOCCUS DURANS*

© 2023 г. Г. И. Эль-Регистан^а, О. В. Земскова^а, О. А. Галуза^а, Р. В. Уланова^а, Е. А. Ильичева^а, А. В. Ганнесен^а, Ю. А. Николаев^а, *

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

*e-mail: nikolaevya@mail.ru

Поступила в редакцию 23.03.2023 г.

После доработки 25.03.2023 г.

Принята к публикации 26.03.2023 г.

Молочнокислые бактерии (МКБ) являются важной составляющей микробиома человека. Они могут синтезировать и реагировать на сигналы гуморальной системы регуляции человека (гормоны, нейромедиаторы), однако феноменология и механизмы отклика МКБ на эти медиаторы исследованы недостаточно. В работе показано, что эстроген замедляет рост и развитие *E. durans*, норадреналин, эстроген, мозговой натрийуретический пептид дозозависимо продлевают стационарную фазу роста культуры. Сердечный натрийуретический пептид и эстроген стимулируют развитие биопленок культуры *E. durans*, что отмечено впервые. Частота образования персистеров зависит от типа роста бактерий – планктонного или биопленочного, и более выражена при биопленочном росте. Адреналин и норадреналин дозозависимо стимулировали, а остальные гормоны ингибировали образование персистеров в жидких культурах МКБ. В биопленках действие на образование персистеров имело иной характер: натрийуретические пептиды дозозависимо стимулировали образование персистеров, существенного ингибирования не оказывал ни один из гормонов. Клетки-персистеры *E. durans* через несколько месяцев инкубации созревали в термотолерантные анабиотические формы покоя, характеризующиеся типичными ультраструктурными особенностями. Впервые показано, что популяция покоящихся форм *E. durans* включает формы, различающиеся глубиной покоя, в том числе жизнеспособные, но некультивируемые формы.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, *Enterococcus durans*, биогенные амины, натрийуретические пептиды, эстроген, рост, формы выживания

DOI: 10.31857/S0026365623600116, EDN: RLAEIM

Молочнокислые бактерии (МКБ) являются одной из наиболее широко изучаемых групп микроорганизмов в связи с их доминирующим положением среди бактерий – симбионтов растений, животных и человека. Постоянный интерес к МКБ, обусловленный их практической значимостью в медицине, нутрициологии, биотехнологии, является причиной поиска их новых физиологических характеристик. Обнаружение способности МКБ микробиома человека синтезировать биогенные амины, структурно идентичные нейромедиаторам человека, послужило основанием для развития нового научного направления – микробной эндокринологии, изучающей роль нейромедиаторов в контроле развития функционирования и двунаправленной коммуникации МКБ микробиома человека и организма хозяина (Lyte, 2010, 2013). Функции микробных биогенных аминов у свободноживущих МКБ неясны, в основном изучается их влияние на рост бактери-

альных культур *in vitro* (Олескин и соавт., 1998, 2016, 2020).

Следует отметить, что в природных экосистемах периоды роста микробных популяций (культур) всегда сменяются периодами выживания в неростовых условиях, существенно более длительными, чем периоды роста. В смене этих стратегий развития микробных популяций ключевую роль играет изменение окружающих условий с благоприятствующих росту на неблагоприятные. На популяционном уровне смену стратегий развития контролируют внеклеточные, плотностные регуляторы, представленные аутоиндукторами QS-систем, алкилрезорцинами т.д. (Fuqua et al., 1994; Эль-Регистан и соавт., 2006; Олескин и соавт., 2020). О влиянии биогенных аминов на развитие популяций МКБ в наступающих неростовых условиях информации нет, хотя сам тип действия биогенных аминов, как коммуникативных сигнальных метаболитов, предполагает их возможное участие в процессах выживания микро-

организмов. Отметим также, что гормональные метаболиты иной химической природы потенциально также могут участвовать в регуляции развития микробной компоненты организма хозяина.

Стратегия выживания микробной популяции, как своеобразного многоклеточного организма (*Bacteria as Multicellular Organisms*, 1997), реализуется как генетическая программа стационарной фазы, где происходит экспрессия новых регулонов, изменяется тип метаболизма клеток, они переходят в состояние пролиферативного покоя. В этом состоянии клетки приобретают свойства стрессоустойчивости, что сопряжено, в том числе, с изменениями качественного состава липидов и структурного состояния мембран (Strahi et al., 2017), а также образованием биокристаллического нуклеоида (Dadinova et al., 2019). Если неростовые условия окружающей среды сохраняются, цикл развития бактериальной популяции завершается образованием анабиотических метаболически покоящихся форм (ПФ), длительно (месяцы–годы–миллионы лет) сохраняющих жизнеспособность, т.е. способных при наступлении благоприятных условий прорасти и воспроизвести родительскую популяцию (Эль-Регистан и соавт., 2006).

У спорообразующих бактерий покоящиеся формы представлены эндоспорами, экзоспорами, конидиями и др., а у неспорообразующих бактерий, к которым относится подавляющее большинство патогенных бактерий, а также МКБ – цитостоподобными покоящимися клетками (ЦПК) (Мулюкин и соавт., 2009, 2014; Погорелова и соавт., 2009; Голод и соавт., 2009). Другой формой покоя являются жизнеспособные некультивируемые клетки (ЖНК) (Colwell et al., 1985; Kell et al., 1998; Ayrapetyan et al., 2015, 2018), требующие для реверсии к росту специальных процедур (Karpelyants et al., 1994).

Открытие в середине XX века феномена персистенции патогенных бактерий в организме хозяина и клеток-персистеров (П), выживающих при летальных воздействиях антибиотиков (Bigger, 1944), а также последующее широкое изучение этого феномена (Balaban et al., 2004; Lewis, 2010) позволили существенно пересмотреть представление об адаптивных механизмах выживания микроорганизмов. Персистеры – это клетки малочисленной (~1%) субпопуляции, образующиеся в результате цитодифференцировки, не- или крайне медленно делящиеся, выживающие в присутствии биоцидных доз антибиотиков, при наступлении благоприятных условий восстанавливающие способность к делению и воспроизводящие родительскую популяцию (Balaban et al., 2004; Lewis, 2010; van der Bergh, 2017; Chebotar et al., 2021). Биологической функцией П является сохранение популяции в случае внезапно наступивших не-

благоприятных условий окружающей среды. На частоту образования П влияют стрессовые условия: дефицит питания, окислительный стресс, гипоксия, повышение концентрации плотностных регуляторов и др. (van der Bergh, 2017; Kaldalu et al., 2020).

Исследование образования П и ПФ у бактерий *Pseudomonas aeruginosa* PA01 и *Escherichia coli* K12 позволили сформулировать гипотезу о персистерах как предшественниках ПФ, в которых завершены молекулярно-генетические процессы цитодифференцировки, но не завершены процессы приобретения анабиотического состояния (Мулюкин и соавт., 2015; Лойко и соавт., 2015).

Подавляющее большинство исследований П выполнено на (условно)патогенных бактериях, персистирующих в организме человека (хозяина), однако формы выживания молочнокислых бактерий, как самой обширной группы симбионтов, не изучались, равно как и влияние на их образование биогенных аминов и гормонов человека. Вместе с тем вопросы периодичности развития и выживания МКБ-симбионтов человека в условиях нормы и при стрессорных воздействиях, в том числе антибиотиков, являются базовыми для “регуляции функционирования микробиоты, участвующей прямо или опосредованно во всех физиологических функциях, метаболических, поведенческих и сигнальных реакциях организма-хозяина, человека” (Олескин и соавт., 2020).

Исходя из изложенного, целью настоящего исследования было изучить влияние биогенных аминов и гормонов неаминной природы на развитие популяций молочнокислых бактерий *Enterococcus durans*, образование форм их выживания: клеток-персистеров и анабиотических покоящихся форм.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования – молочнокислая бактерия *Enterococcus durans* из коллекции культур UNIQEM Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН.

Способы культивирования. Бактерии культивировали в жидких и на плотных средах MRS (“Conda Pronadisa”, Испания) и LB (бульон Луриа-Бертани, США). Для получения инокулята 1 петлю бактерий, поверхностно растущих на агаризованной среде (1.5% агара) перенесли в пенициллиновые флаконы (30 мл) с 5 мл среды и культивировали в течение ночи на шейкере Biosan PSU-20i (“Biosan”, Латвия), (150 об./мин) при температуре 27°C.

Поверхностные культуры выращивали на плотной питательной среде LB (22 г агара/л) в чашках Петри (92 × 16 мм). Чашки засеивали 5 мкл инокулята – ночной жидкой микробной культу-

ры и инкубировали в термостате суховоздушном ТС 1/80 СПУ (Россия) при 34°C в течение 24 ч.

Планктонные культуры выращивали двумя способами: традиционным в колбах, а также в планшетном культиваторе. Инокулят в количестве 2–5% вносили в жидкую среду MRS (50 мл в конической колбе объемом 250 мл). Засеянные культуры инкубировали в течение 1 сут при температуре 28°C на роторной качалке (100 об./мин) (“Проинтех-Био”, Россия). В динамике периодического роста определяли оптическую плотность (ОП) культур (спектрофотометр Jenway 7315; $\lambda = 540$ нм; $l = 1$ см).

При культивировании бактерий в 96-луночных полистироловых плоскодонных иммунологических планшетах (“NUNC”) в лунки планшета вносили по 200 мкл питательной среды MRS и инокулят (0.1–1% об./об.), инкубировали при 34°C в культиваторе-спектрофотометре “BioRad xMark” (США) в течение 24–72 ч, измеряя ОП культур при $\lambda = 540$ нм. По полученным данным определяли параметры периодического роста жидких культур, удельную скорость роста, скорость отмирания, время генерации, урожай. В последнем варианте также определяли наличие биопленки (БП) и ее количество после перехода культур в стационарную фазу роста. Количество БП определяли как разницу суммарной ОП жидкой фазы БП после удаления жидкости, представляли в процентном соотношении (O’Toole, 2011).

Получение биопленок на стекловолоконных фильтрах. Для получения биопленок на фильтровальную бумагу из стекловолокна (GF/F Whatman) нарезали на квадраты размером 2 × 2 см, стерилизовали при 1 атм. и стерильно накладывали на поверхность плотной питательной среды LB в чашках Петри (5 мл среды). На каждый фильтр наносили по 20 мкл (9.6×10^6 КОЕ/мл) стационарной планктонной культуры бактерий. Чашки Петри инкубировали в термостате при 34°C в течение 24 ч. После завершения инкубации фильтры переносили в пробирки типа Фалькон (50 мл) с 10 мл физиологического раствора и стерильными стеклянными шариками и обрабатывали на гомогенизаторе (Bio Vortex V-1 plus; “Biosan”, Латвия) в импульсном режиме. Из полученной суспензии (10 мл) готовили 10-кратные разведения в физиологическом растворе и высевали по 25 мкл на чашках Петри с плотной питательной средой LB. Чашки с посевами инкубировали 48 ч при 34°C, после чего определяли число КОЕ, рассчитывая на 1 мл суспензии.

Полученные после разрушения фильтров суспензии клеток использовали для определения в них количества персистеров.

Численность жизнеспособных клеток (колониеобразующих единиц, КОЕ) определяли микроме-

тодом, высевая аликвоты десятичных разведений культур объемом 5 мкл на плотную среду LB.

Микроскопические исследования. Морфологию клеток бактерий изучали в световом микроскопе (“Leitz Wetzlar Orthoplan”, Германия) с фазовым конденсором в светлом поле, используя препараты “раздавленной капли”.

Электронная просвечивающая микроскопия. Для изучения ультраструктурной организации клеток использовали электронный просвечивающий микроскоп (Jeol Jem-1400, “Jeol”, Япония, ускоряющее напряжение 120 кВ, инструментальное увеличение от 10000 до 35000 раз). Осажденные клетки культур разного возраста фиксировали в 1.5% растворе глутарового альдегида в 0.05 M какодиалатном буфере (pH 7.2) при 4°C в течение 1 ч, трижды отмывали в том же буфере и дополнительно фиксировали в 1% растворе OsO₄ в 0.05 M какодиалатном буфере (pH 7.2) в течение 3 ч при 20°C. После обезвоживания материал заключали в эпоксидную смолу Epon 812. Ультратонкие срезы контрастировали в течение 30 мин в 3% растворе уранилацетата в 70% этаноле и докрашивали цитратом свинца по Рейнольдсу при 20°C в течение 4–5 мин.

Терморезистентность покоящихся и вегетативных клеток бактерий определяли как долю выживших клеток (КОЕ/мл) после прогревания аликвоты (500 мкл) бактериальной культуры при температуре 60°C в течение 30 мин (условия подбирали в предварительных опытах) в пластиковых пробирках типа Эппендорф на термошейкере (TS-100 Biosan).

Получение покоящихся форм (ПФ) бактерий. ПФ получали в культурах, развивающихся в: (а) жидкой среде MRS; (б) MRS, разбавленный в 6 раз; (в) MRS с уменьшенным в 6 раз содержанием фосфора; (г) молоке; (д) молоке, разбавленном в 3 и 10 раз, в колбах объемом 250 мл с 50 мл среды при температуре 33°C на шейкере до стационарной фазы роста. Выросшие культуры хранили в статическом режиме при температуре 20–25°C в течение 3–8 мес. в условиях, различающихся по доступу кислорода и плотности образующегося клеточного осадка: (а) в колбах объемом 250 мл (50 мл культуры) с ватной пробкой в условиях доступа кислорода; (б) в пробирках Хангейта (16 мл) с ватной пробкой при доступе кислорода; (в) в пробирках Хангейта (16 мл) с крышечкой и септой без свободного доступа кислорода.

Определение численности персистеров. Численность П в стационарных культурах энтерококков определяли как долю (%) клеток, выживающих после обработки культуры антибиотиками (Balaban et al., 2019) или лизирующим раствором на основе лизоцима и детергента SDS (Canas-Duarte et al., 2014). Предварительно определили чувствительность энтерококков к антибиотикам и выбрали

наиболее эффективный – ампициллин в концентрации 10 мг/мл.

Определение численности персистеров в стационарных планктонных культурах бактерий при их селекции лизирующим раствором. Аликвоту стационарной (21–22 ч) планктонной культуры (предварительно разведенной средой LB (1 : 100) объемом 1 мл переносили в пробирку типа Эппендорф (объемом 2 мл), добавляли 10 мкл додецилсульфата натрия (0.01% в конечном объеме) и раствор лизоцима (2000 ед./г, “Applichem”). В контрольные варианты лизирующую смесь не добавляли. Пробирки с опытными и контрольными вариантами инкубировали в течение 24 ч на термостатной установке TS-100 (“Biosan”, Латвия) при 34°C 800 об./мин. Аликвоты отбирали периодически в течение 24 ч, определяли в них число жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) и строили кривые отмирания клеток.

Определение численности персистеров в стационарных планктонных культурах бактерий при их селекции антибиотиком. Аликвоту культуры стационарной фазы роста, предварительно разведенной средой LB (1 : 100) объемом 1 мл, переносили в пробирку типа Эппендорф (объемом 2 мл), добавляли 100 мкл раствора ампициллина в дозе 10 МИК (10 мг/мл). В контрольные варианты антибиотик не вносили. Флаконы инкубировали в течение 3 ч в термостате при 34°C, после чего из всех флаконов отбирали аликвоты, отмывали однократно от антибиотика физраствором при центрифугировании (3000 g, 5 мин), удаляли надосадочную жидкость и добавляли свежую среду до исходного объема. Затем в течение 6 ч отбирали аликвоты, делали десятичные разведения, высевали на чашки Петри с агаризированной средой LB микрометодом для определения титра КОЕ, как описано выше, и строили кривые отмирания клеток.

Определение численности персистеров в биопленках при их селекции антибиотиком. Биопленочные культуры (24 ч) на стекловолоконных фильтрах разрушали, как описано выше, и получали 10 мл суспензии. Отбирали 10 мкл суспензии, разбавляли 1 : 100 стерильной средой LB в пробирке типа Эппендорф объемом 2 мл. Далее в опытные варианты добавляли антибиотик ампициллин в дозе 10 мг/мл и инкубировали пробирки в течение 3 ч при 34°C на термостатной установке. В контрольные варианты антибиотик не добавляли. После инкубации микробные культуры в пробирках центрифугировали (5000 g, 5 мин), надосадочную жидкость удаляли, осадок промывали 3 раза стерильной средой LB, ресуспендировали в ней до исходного объема (1 мл). Из полученной суспензии готовили 10-кратные разведения в физиологическом растворе, высевали на чашки Петри для определения КОЕ/мл, как описано выше, и строили кривые отмирания клеток.

Кривые отмирания ординарных клеток для определения частоты образования П строили по показателям численности КОЕ/мл в отбираемых пробах при 5 повторностях в каждой пробе и отборе проб из 3-х параллельных пробирок. Частоту образования П определяли на “плато” – постоянной численности КОЕ/мл в течение не менее 3 ч на кривых отмирания культур (Kaldalu et al., 2016). Долю (%) персистеров рассчитывали, как отношение КОЕ/мл на плато к числу КОЕ/мл в исходной культуре до внесения антибиотика (100%).

Определение влияния гормонов на частоту образования персистеров в планктонной культуре бактерий. В пенициллиновые флаконы объемом 40 мл с 5 мл среды MRS вносили инокулят – стационарную культуру *E. durans*, (2% об./об.), затем вносили гормоны: адреналин, норадреналин, предсердный натрийуретический пептид (ANP), мозговые натрийуретические пептиды типов В (BNP) и С (CNP), а также женский половой гормон эстроген, в физиологических концентрациях (25 мкл) и в десятикратных (250 мкл) концентрациях (на 5 мл среды), мг/мл: адреналин – 9.0×10^{-7} ; норадреналин – 6.0×10^{-7} ; ANP – 2.0×10^{-8} ; BNP – 2.5×10^{-8} ; CNP – 6.0×10^{-9} ; эстроген – 6.0×10^{-8} . В контрольные варианты гормоны не вносили. Через 21–22 ч инкубации в стандартных условиях из всех вариантов отбирали две аликвоты: одну разбавляли в пропорции 1 : 100 в пенициллиновом флаконе стерильной средой MRS и определяли численность персистеров, как описано выше; из второй делали десятичные разведения и определяли численность КОЕ/мл микрометодом. Для определения численности персистеров в культуре опытных вариантов, разбавленные средой MRS в 100 раз, вносили антибиотик – ампициллин в количестве 10 МИК (10 мг/мл).

Определение влияния гормонов на частоту образования персистеров в биопленочных культурах бактерий. Стекловолоконные фильтры, полученные как описано выше, стерильно накладывали на поверхность плотной питательной среды LB в чашках Петри (5 мл среды). В опытных вариантах в незастывшую среду LB вносили испытуемые гормоны в физиологической (25 мкл) и десятикратной (250 мкл) концентрациях (на 5 мл среды). В контрольных вариантах в среду вносили соответствующее количество растворителя испытуемых веществ. На каждый фильтр наносили по 20 мкл стационарной (21–22 ч) планктонной культуры исследуемого микроорганизма. Чашки инкубировали в термостате при 34°C в течение 24 ч. После завершения инкубации фильтры с выросшей биопленкой гомогенизировали в 10 мл физиологического раствора, как описано выше. Из полученных суспензий готовили 10-кратные разведения в физиологическом растворе для: (а) опреде-

ления численности жизнеспособных клеток в контрольных (без гормонов) и опытных (с гормонами) вариантах, как описано выше; (б) определения численности П в опытных (с гормонами) и контрольных (без гормонов) вариантах, как описано выше.

Определение метаболической активности вегетативных клеток и покоящихся форм бактерий. Метаболическую активность бактериальных культур оценивали по интенсивности выделения CO_2 в герметично закрытых флаконах ($V = 30$ мл), содержащих 4 мл солевой среды MRS (буфер) и 400 мкл культуры до (эндогенное дыхание) и после (экзогенно стимулированное дыхание) внесения глюкозы (10% раствор, 400 мкл). Концентрацию CO_2 определяли на газовом хроматографе Кристалл-5000 (“Хроматэк”, Россия) и выражали в % $\text{CO}_2/\text{ч}$. Отбор воздушной пробы производили медицинским шприцем объемом 0.6 мл с герметичной насадкой для устранения улетучивания воздушной пробы.

Статистическая обработка экспериментальных данных. Все исследования были выполнены в 2–5 биологических повторах при 3 параллельных опытах. Данные экспериментов обрабатывали с помощью программы Microsoft Excel-2007 и дополнительных надстроек. При расчете титра КОЕ определяли среднее арифметическое и стандартное отклонение для $p < 0.05$. Различия между вариантами считали значимыми, если они превышали стандартное отклонение, рассчитываемое для каждой пары контроль–опыт, и обычно не превышающее 30%. На рисунках представлены данные типичных экспериментов, в таблицах – средние значения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние гормонов на развитие планктонных периодических культур E. durans

При глубинном периодическом культивировании *E. durans* в колбах в жидкой среде MRS на роторной качалке (120 об./мин) цикл развития культуры включал: экспоненциальную фазу (до 5 ч роста), фазу линейного роста (5–20 ч роста), стационарную фазу, которая наступала через 21–22 ч роста. Показатели роста: удельная скорость роста – 0.32 ч^{-1} ; в экспоненциальной фазе роста максимальная удельная скорость роста – 0.68 ч^{-1} , время удвоения – 0.7 ч (около 42 мин); урожай – 9×10^8 КОЕ/мл.

При глубинном росте *E. durans* в 96-луночном планшете в жидкой среде MRS, температуре 30–33°C в течение 72 ч экспоненциальная фаза длилась около 5.5 ч при скорости роста 0.2 ч^{-1} и времени удвоения около 3 ч; фаза линейного роста – 5.5 ч, стационарная фаза – 49 ч, далее следовала

фаза отмирания. Максимальная оптическая плотность ОП = 2.3 ($\lambda = 540 \text{ нм}$; $l = 1 \text{ см}$). При этом около 30% ОП составила ОП биопленки, образующейся на дне лунок планшета.

При сравнении этих способов глубинного культивирования можно заключить, что при росте в планшете при меньшем массообмене и большем количестве инокулята культуры в два раза быстрее переходят в стационарную фазу. При планшетном культивировании энтерококков было зафиксировано наличие хорошо развитой биопленки, что свидетельствует о способности молочнокислых бактерий переходить от планктонного роста к биопленочному.

Влияние гормонов на рост и развитие E. durans при планшетном культивировании

При внесении гормонов вместе с инокулятом *лаг-фаза* не была зафиксирована ни в одном из вариантов. Экспоненциальная фаза роста (рис. 1а) дольше всего длилась в вариантах с десятикратной дозой эстрогена (10ф) (7 ч), что в 1.5 раза больше контрольного варианта и варианта с физиологической концентрацией адреналина (6 ч), а меньше всего – в вариантах с добавлением физиологической концентрации BNP (3.5 ч), что на 1.5 ч меньше, чем в контроле.

Удельная скорость роста *E. durans* в контрольных вариантах составляла 0.22 ч^{-1} (рис. 1б). Наименьшая удельная скорость роста была отмечена в вариантах с 10ф CNP и эстрогена (соответственно 0.12 и 0.14 ч^{-1}), что в 2 и 1.5 раза меньше, чем в контрольных вариантах. Во всех остальных вариантах достоверно стимулирующего или подавляющего рост действия гормонов не обнаружено.

Время генерации (рис. 1в) (удвоения) клеток в контрольном варианте составило 3 ч, максимальным этот показатель был в варианте с 10ф эстрогена – 7 ч, а также (5 ч) физиологической концентрацией норадреналина и (4.5 ч) CNP.

Урожай культуры (рис. 1г) *E. durans* в контроле, без добавления гормонов, соответствовал ОП = 2.3. Ингибирующее действие было зафиксировано в вариантах с физиологической концентрацией эстрогена – ОП = 2.098 (90% от контроля), а также с 10ф эстрогена – ОП = 1.880, и CNP – ОП = 1.989 (81 и 86% от контроля соответственно).

Таким образом, снижение удельной скорости роста (μ) прямо коррелировало с увеличением времени генерации и снижением урожая в вариантах действия: физиологических концентраций эстрогена, CNP и ANP и 10ф эстрогена и CNP.

Как было отмечено выше, в условиях роста в планшетном культиваторе-спектрофотометре контрольные культуры *E. durans* переходят в стационарную фазу через 10 ч роста. Большинство опытных

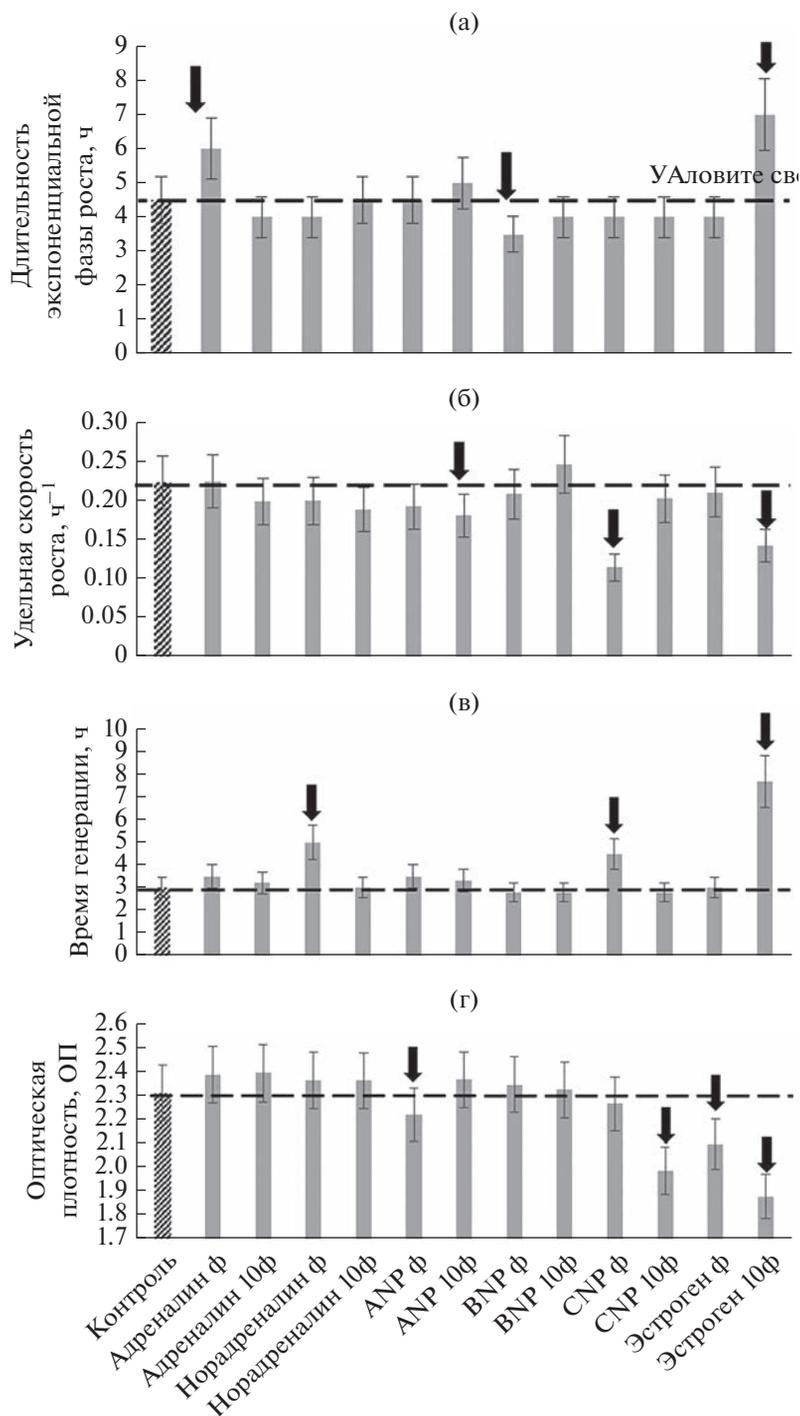


Рис. 1. Влияние гормонов на развитие планктонных периодических культур *E. durans* в планшетном культивирователе-спектрофотометре: (а) продолжительность фазы экспоненциальной фазы роста (ч); (б) удельная скорость роста (ч⁻¹); (в) время генерации (ч); (г) урожай (ОП); (д) время выхода на стационарную фазу (ч роста); (е) начало автолиза (ч роста); (ж) доля образовавшейся биопленки через 72 ч роста (% ОП). Стрелками отмечены достоверные результаты влияния гормонов, внесенных вместе с инокулятом, на показатели роста и развития культур. Обозначения: ф – физиологическая концентрация гормона; 10ф – десятикратная. * Варианты на рис. 1е, где фаза автолиза наступает позже 72 ч роста.

вариантов (рис. 1а) показали такие же результаты, кроме пролонгирования роста при физиологических концентрациях ANP (17 ч) и норадреналина

(16 ч), а также его десятикратной концентрации (15.5 ч). Пролонгирование времени роста было отмечено также в вариантах с десятикратной до-

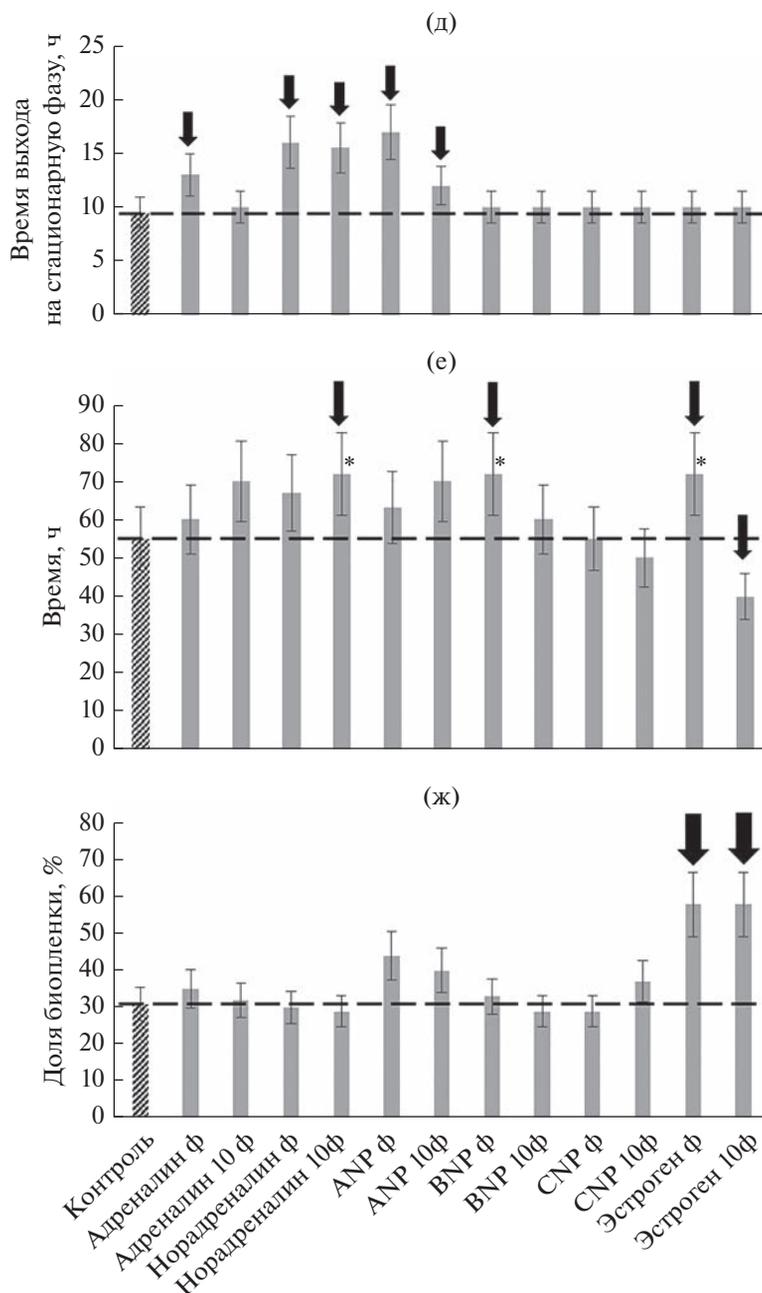


Рис. 1. Окончание.

зой ANP (12 ч) и физиологической концентрацией адреналина (13 ч) (рис. 1д).

Отмирание культур – фаза автолиза клеток (рис. 1е), в контрольном варианте началось на 55 ч роста. В опытных вариантах быстрее всего начало автолиза отмечалось при 10ф эстрогена (через 40 ч), а позже всего – в вариантах с десятикратной концентрации норадреналина и ANP, а также с физиологическими концентрациями BNP и эстрогена, что, возможно, свидетельствует

об их способности стабилизировать клетки и замедлять процесс их автолитического разрушения.

Таким образом, в десятикратной физиологической дозе эстроген замедляет и ингибирует рост и развитие культур *E. durans*. Гормоны норадреналин (десятикратная концентрация), эстроген (физиологическая концентрация), BNP (физиологическая концентрация) продлевают стационарную фазу роста культуры.

В табл. 1 обобщены экспериментальные данные, полученные в этом разделе исследования;

Таблица 1. Действие гормонов на ростовые характеристики *E. durans* при планшетном культивировании

Варианты	Длительность экспоненциальной фазы, ч	Время выхода на стационар, ч	Начало фаз		Удельная скорость роста, ч ⁻¹	Время генерации, ч	ОП
			замедления роста, ч	автолиза, ч			
Контроль	4.5	9.5	4.5	55	0.2245	3.0	2.313
Адреналин ф	6.0*	13.0*	5.0	60	0.2263	3.5	2.388
Адреналин 10ф	4.0	10.0	4.0	70*	0.1998	3.2	2.395*
Норадреналин ф	4.0	16.0*	5.0	67*	0.2006	5.0*	2.366
Норадреналин 10ф	4.5	15.5*	5.0	>72*	<i>0.1897</i>	3.0	2.364
ANP ф	4.5	17.0	5.0	63*	0.1937	3.5	2.222
ANP 10ф	5.0	12.0	4.0	70*	<i>0.1817</i>	3.3	2.368
BNP ф	3.5**	10.0	3.5**	>72*	0.2094	2.8	2.347
BNP 10ф	4.0	10.0	4.0	60	0.2470*	2.8	2.325
CNP ф	4.0	10.0	4.0	55	<i>0.1151</i>	4.5*	2.267*
CNP 10ф	4.0	10.0	3.5	50	0.204	2.8	<i>1.989</i>
Эстроген ф	4.0	10.0	5.0	>72*	0.2117	3.0	<i>2.098</i>
Эстроген 10ф	7.0*	10.0	8.0*	40	<i>0.1433</i>	7.7	<i>1.88</i>

* Значения больше, чем в контроле.

** Значения меньше, чем в контроле.

полужирным шрифтом отмечено подавление или стимуляция роста и развития культуры.

Важным свойством, на которое влияли гормоны, было развитие биопленок на дне и стенках лунок, что определяли при дифференцированном измерении оптической плотности культур в лунках через 72 ч роста. В контрольных вариантах доля биопленки составляла 30–31%. В опытных вариантах доля биопленок колебалась в пределах контрольных значений, кроме вариантов с десятикратной концентрацией CNP и эстрогена, где доля биопленки составляла 58–60%, что практически в два раза превышало контрольный уровень (рис. 1ж).

Стимулирующее влияние десятикратных физиологических концентраций гормонов CNP и эстрогена на развитие биопленки планшетных планктонных культур МКБ (*E. durans*) отмечено впервые.

Влияние гормонов на частоту образования персистеров в стационарных культурах E. durans

При наступлении неблагоприятных для роста условий бактериальные популяции реализуют стратегию выживания, включающую два генетически детерминированных события: переход в стационарную фазу и образование персистеров. Влияние гормонов на частоту образования персистеров определяли при их селекции ампициллином (0.25 мг/мл) в двух экспериментальных схе-

мах, соответствующих основным типам роста бактерий – в планктонной культуре (в пенициллиновых флаконах) и биопленке (на стекловолоконных фильтрах) при внесении гормонов вместе с инокулятом. Результаты влияния гормонов в их физиологических (ф) и 10ф концентрациях на рост планктонных культур энтерококков в пенициллиновых флаконах показали небольшое, но достоверное ингибирование роста (на 20–30% от контрольного варианта) (рис. 2а). Гормоны ингибировали также образование П во всех вариантах, кроме внесения адреналина и норадреналина в физиологических концентрациях (рис. 2б, табл. 2).

Однако действие гормонов на образование П в биопленочных культурах энтерококков имело противоположный характер. Биопленочные культуры развивались на стекловолоконных фильтрах при инокуляции 20 мкл стационарной планктонной культуры *E. durans* (9.6×10^6 КОЕ/мл). Через 24 ч численность клеток в контрольных вариантах достигала 4.68×10^8 КОЕ/мл. В опытных вариантах при внесении гормонов вместе с инокулятом общая численность биопленочных клеток существенно возрастала (рис. 3а). Наибольший титр клеток был в вариантах с внесением: ф и 10ф эстрогена и норадреналина, а также физиологической концентрации ANP.

Клетки-персистеры 24 ч контрольных и опытных биопленочных культур селектировали ампициллином (10 мг/мл). Шесть гормонов в физиологической и десятикратной концентрациях вно-

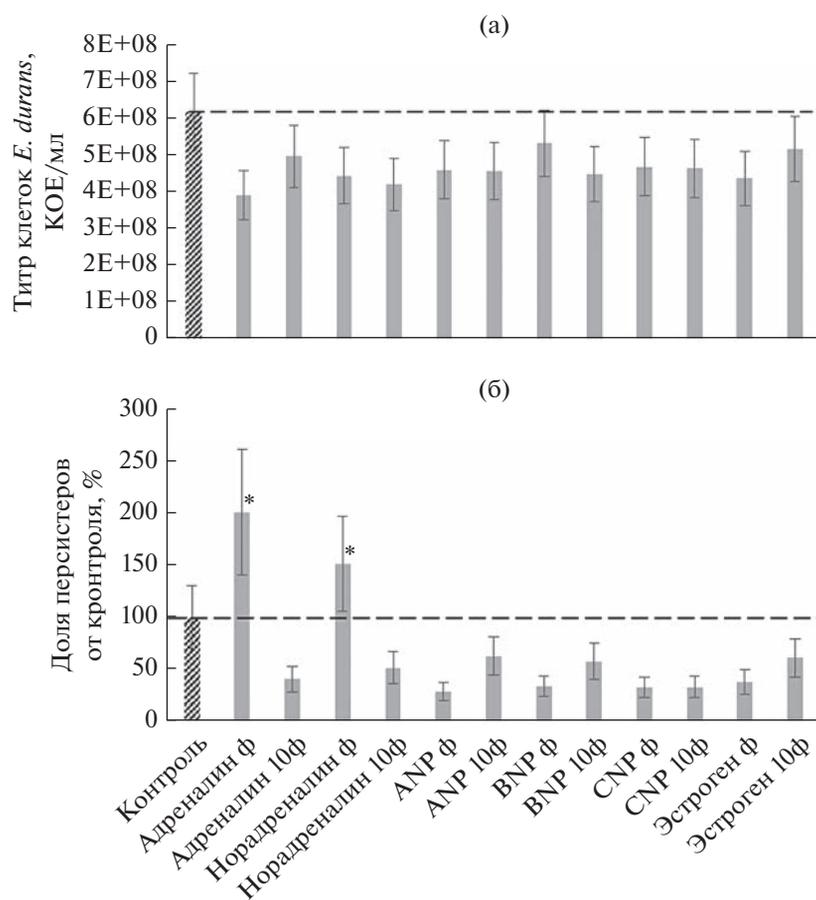


Рис. 2. Влияние гормонов на: (а) численность клеток в культурах стационарной фазы роста (КОЕ/мл); (б) долю (%) персистеров в стационарных культурах *E. durans*, при инкубации в пенициллиновых флаконах. * Отличие от контроля больше 30%.

силы вместе с инокулятом. На рис. 3б и в табл. 2 суммированы данные о доле П в опытных и контрольных вариантах, выраженные в процентах от контроля (без гормонов, 100%). Наиболее значимая стимуляция образования П имела место в вариантах с внесением десятикратной дозы гормонов ANP и CNP (в 2 и в 2.5 раза), а также BNP в физиологической концентрации (практически в 2 раза), менее сильный эффект — в вариантах с физиологическими дозами адреналина и ANP и с десятикратной дозой норадреналина (стимуляция на 50%). В вариантах с использованием физиологической концентрации норадреналина и десятикратной концентрации BNP наблюдалось слабое ингибирующее действие на образование П (рис. 3б).

Таким образом, частота образования П (%) самым существенным образом зависит от типа роста бактерий — планктонного или биопленочного, и в разы более выражена при биопленочном росте (табл. 2).

Покоящиеся анабиотические формы *E. durans*

Покоящиеся формы (ПФ) *E. durans* получали при длительной инкубации (3 мес.) бактериальных культур, выросших в полноценной лимитированной по источникам питания среде MRS, что, как было показано ранее, стимулирует образование клеток-персистеров (van der Berg et al., 2017) и созревающих из них ПФ (Мулюкин и соавт., 2009, 2014; Голод и соавт., 2009; Погорелова и соавт., 2009). О наличии ПФ судили по сумме необходимых свойств длительно выживающих клеток (Бухарин и соавт., 2005).

Сохранение жизнеспособности клеток. Титр клеток *E. durans* в планктонных периодических культурах *E. durans* стационарной фазы роста был приблизительно одинаков при развитии бактерий в средах разного состава: (1) MRS; (2) MRS, со в 6 раз меньшей концентрацией фосфора; (3) MRS разбавленной (1 : 6) (табл. 3). Выросшие культуры были оставлены на длительное инкубирование (хранение) (3 мес.) в статическом режиме при комнатной температуре при разных условиях: (1) в колбах, где они выросли, с ватными

Таблица 2. Доля (%) персистеров *E. durans* в планктонных и биопленочных культурах при селекции персистеров ампициллином

Варианты	% персистеров от общего титра клеток	
	планктонная культура	биопленочная культура
Контроль	0.28	0.42
Адреналин ф	0.56	0.57
Адреналин 10ф	0.11	0.46
Норадреналин ф	0.42	0.34
Норадреналин 10ф	0.14	0.58
ANP ф	0.08	0.60
ANP 10ф	0.18	0.93
BNP ф	0.09	0.72
BNP 10ф	0.16	0.32
CNP ф	0.09	0.55
CNP 10ф	0.09	1.12
Эстроген ф	0.11	0.50
Эстроген 10ф	0.17	0.50

пробками, (2) в пробирках Хангейта с ватными пробками, где образовался высокий столб суспензии и обеспечивался доступ кислорода воздуха; (3) в пробирках Хангейта с крышкой и септой, где доступ кислорода воздуха исключался. Через 3 мес. хранения культур энтерококков, хранившихся в разных условиях, численность выживших клеток (КОЕ/мл) в них существенно различалась и снизилась на 3–6 порядков с 10^8 до 10^2 – 10^5 КОЕ/мл (табл. 3). Наибольшая доля ПФ, прорастающих в стандартных условиях, была в варианте роста *E. durans* в среде MRS с лимитом фосфора при хранении в колбе (0.03% от исходного титра, рис. 4), наименьшая доля – в варианте хранения в пробирках Хангейта с крышкой и септой без до-

ступа кислорода при лимите P (0.0003% от исходного титра).

Таким образом, образованию покоящихся форм *E. durans* и сохранению их жизнеспособности при длительном хранении (3 мес.) способствуют лимит фосфора в среде и доступ кислорода воздуха при хранении. Отсутствие кислорода при длительном хранении культур снижает их способность к прорастанию в стандартных условиях без дополнительных процедур.

Следующей характеристикой ПФ является крайне низкая или экспериментально не выявляемая метаболическая активность, что в наших экспериментах определяли по уровню дыхания (выделению CO_2). В суспензиях ПФ возрастом 3 мес., отмытых от среды хранения и ресуспендированных в среде MRS без глюкозы, эндогенное дыхание практически отсутствовало, но при внесении экзогенного источника энергии – глюкозы, сразу восстанавливалось и составило около 0.1% CO_2 через 5 мин. Эта быстрая реверсия дыхания отражает выход ПФ (или части популяции ПФ) из состояния покоя – их ресукциацию. Аналогичный эффект ресукциации был отмечен при реактивации покоящихся некультивируемых клеток *Mycobacterium tuberculosis* при их перенесении в свежую среду (Salina et al., 2019).

Ультраструктурная организация покоящихся форм. При микроскопировании в фазовом контрасте образцов 3 мес. культур *E. durans* во всех вариантах хранения были визуализированы рефрактерные клетки на фоне лизированных клеток, “чехлов” (рис. 5а). Отметим, что рефрактерность, как визуальный признак обезвоженных клеток, характерна для анабиотических ПФ (Эль-Регистан и соавт., 2006).

При сравнении ультраструктурной организации вегетативных клеток стационарной фазы роста (рис. 5б) и интактных 3-месячных клеток (рис. 5в–5д) *E. durans* были выявлены структурные особенности покоящихся форм.

Таблица 3. Численность жизнеспособных ПФ (КОЕ/мл) *E. durans*, выращенных в разных условиях, через 3 мес. инкубации в статическом режиме в сравнении с контролем

Среда роста	Титр жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) в вариантах хранения		
	колба с ватной пробкой	Хангейт с ватной пробкой	Хангейт с крышкой и септой
MRS, контроль		9.8×10^8	
MRS, разбавл. в 6 раз, контроль	2.0×10^4	2.0×10^4	2.0×10^4
MRS, в 6 раз меньше P, контроль	1.0×10^4	4.0×10^3	2.0×10^3
	2.0×10^5	8.0×10^8	
		4.6×10^3	4.8×10^2

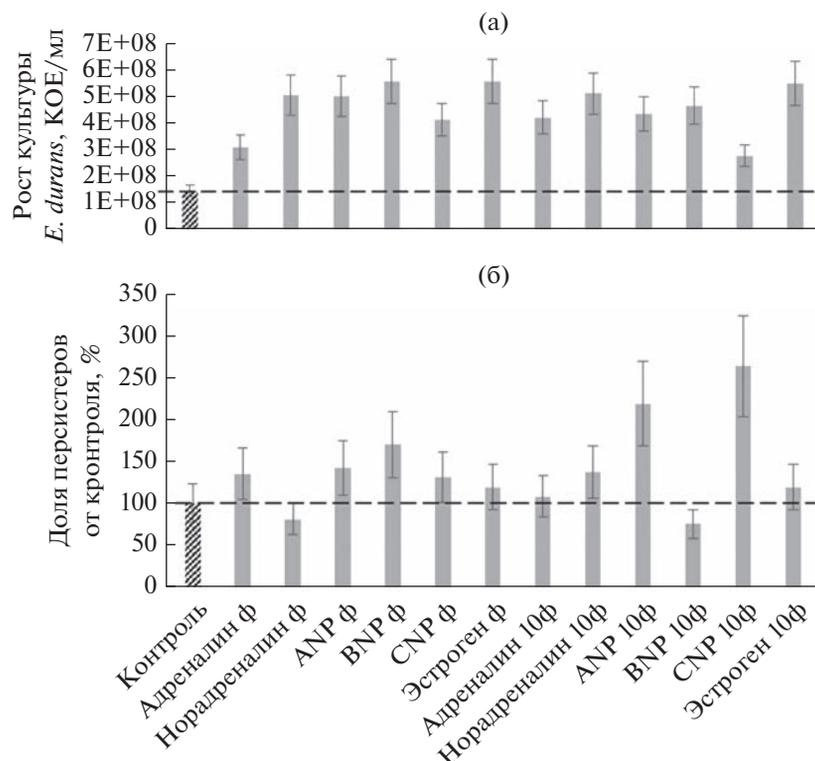


Рис. 3. Влияние гормонов на: (а) общую численность клеток в биопленках (КОЕ/мл); (б) долю (%) персистеров в 24-ч биопленочных культурах.

Популяция выживающих ПФ (3 мес.), полученных в полноценной среде MRS, в варианте хранения в колбе была представлена 2 типами интактных клеток с различной ультраструктурной организацией (рис. 5в–5д), отличающейся от организации стационарных клеток (рис. 5б).

Выживающие клетки первого (I) типа имели ультраструктуру, типичную для цистоподобных покоящихся клеток (ЦКП) неспорообразующих бактерий, многократно описанную нами ранее (Мулюкин и соавт., 2009, 2014). Для них были характерны утолщенная клеточная стенка и биокристаллический нуклеоид, неравномерно компактизованный во всем объеме клетки (рис. 5в, 5г). Выживающие клетки второго типа (II) были представлены L-формами, имеющими такое же тонкое строение, как и ПФ I типа, но лишенные клеточной стенки (рис. 5д). На ультраструктурную организацию выживающих ПФ *E. durans* не влияли условия образования и длительного хранения ПФ. В варианте хранения (3 мес.) культур в пробирках типа Хангейт с крышкой и септой также были обнаружены два типа клеток: толсто-стенные ПФ (рис. 5г) и L-формы, лишенные клеточной стенки (рис. 5д). Отметим, что по сравнению с другими грамположительными бактериями субпопуляции покоящихся МКБ содержали существенно большую долю L-форм.

Терморезистентность покоящихся форм. Еще одним детерминирующим признаком ПФ является их терморезистентность, как принятый в спорологии показатель их стрессоустойчивости, более высокой, чем у вегетативных клеток. При определении терморезистентности клеток энтерококков, выживающих в течение 3 мес. в различных условиях инкубации, были получены парадоксальные результаты (табл. 4).

Термообработке подвергали: (1) клетки культур стационарной фазы роста как вариант сравнения (контроль) и (2) покоящиеся формы, образовавшиеся в культурах, выращенных в модифицированной среде MRS и длительно (3 мес.) хранящиеся в разных условиях (опытные варианты) (табл. 4). До прогревания численность выживших клеток в разных вариантах хранения существенно варьировала от 5.0×10^2 до 2.0×10^5 КОЕ/мл, что было отмечено выше. После термообработки (60°C , 30 мин) численность КОЕ-образующих клеток во всех вариантах хранения резко возросла – на 200–30000% (табл. 4) и стала примерно одинаковой (10^4 – 10^5 КОЕ/мл).

Наиболее выраженное увеличение численности КОЕ после прогрева наблюдали: (1) в вариантах хранения *E. durans* в пробирках типа Хангейт с крышкой и септой; (2) для культур, выращенных в среде MRS, разбавленной 1 : 6 или с лимитом

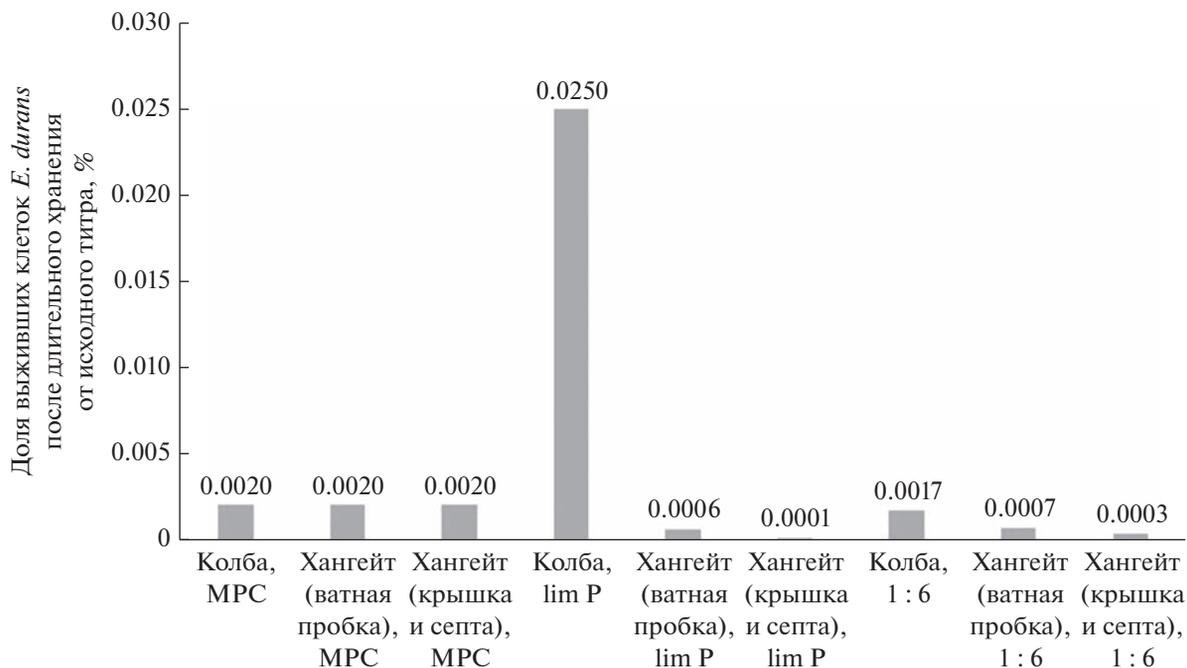


Рис. 4. Доля КОЕ (%) в популяциях ПФ *E. durans*, хранившихся 3 мес. в разных условиях.

фосфора. Обнаруженный эффект был аналогичен известному эффекту активации эндоспор бацилл прогреванием (Krawczyk et al., 2017) и объясняется требованием введения в систему дополнительной свободной энергии для реверсии метаболических процессов у глубоко покоящихся и трудно прорастающих ПФ. Отмеченное увеличение численности прорастающих сохранивших жизнеспособность ПФ энтерококков типа ЦПК можно считать доказательством, во-первых, их глубокого покоя, во-вторых, – высокой терморезистентности, в-третьих – гетерогенности субпопуляции покоящихся форм по глубине покоя.

Таким образом, по совокупности свойств: (1) образованию в цикле развития бактериальных культур, (2) особенностям ультраструктурной организации, (3) отсутствию метаболической активности, (4) терморезистентности – выживающие клетки I типа в длительно хранящихся культурах *E. durans* можно отнести к анабиотическим ПФ типа ЦПК. Отметим, что терморезистентность L-форм была ранее описана для *E. coli* в работах Markova et al. (2010), ее механизмы требуют специального исследования.

Диссоциативная изменчивость *E. durans*

Ранее было установлено, что при прорастании ПФ бактерий разных таксонов, они вырастали на плотных средах колониями, различающимися морфологическими и физиолого-биохимическими признаками (Мулюкин и соавт., 2014; Лойко и

соавт., 2014). Доминантный колониально-морфологический тип, характерный для клеток планктонных культур *E. durans*, был представлен круглыми колониями S-типа бледно-желтого цвета, маслянистой консистенции, с гладкой, блестящей поверхностью, легко снимающимися с агара (рис. 6а).

Популяция, вырастающая на MRS-агаре при посеве ПФ, хранившихся в течение 3 мес., резко отличалась от колоний доминантного фенотипа. Она была представлена колониями мукоидного типа, прозрачными, слизистой консистенции, сливающимися друг с другом и утопленными в экзоматериале (рис. 6б). Этот фенотип был неустойчив, при последующем пересеве в стандартных условиях он ревертировал к доминантному фенотипу.

Таким образом, *E. durans* реализует свою адаптивную способность развиваться в разных условиях в виде различных колониально-морфологических фенотипов. Доминирующий морфотип преобладал в растущих в стандартных условиях культурах, слизистый морфотип реализовывался после длительного хранения ПФ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Основным теоретическим результатом проведенных исследований является доказательство регуляторного влияния гормонов человека (различной химической природы) не только на рост микробных популяций (на модели *E. durans*), но также на их адаптационный потенциал – разви-

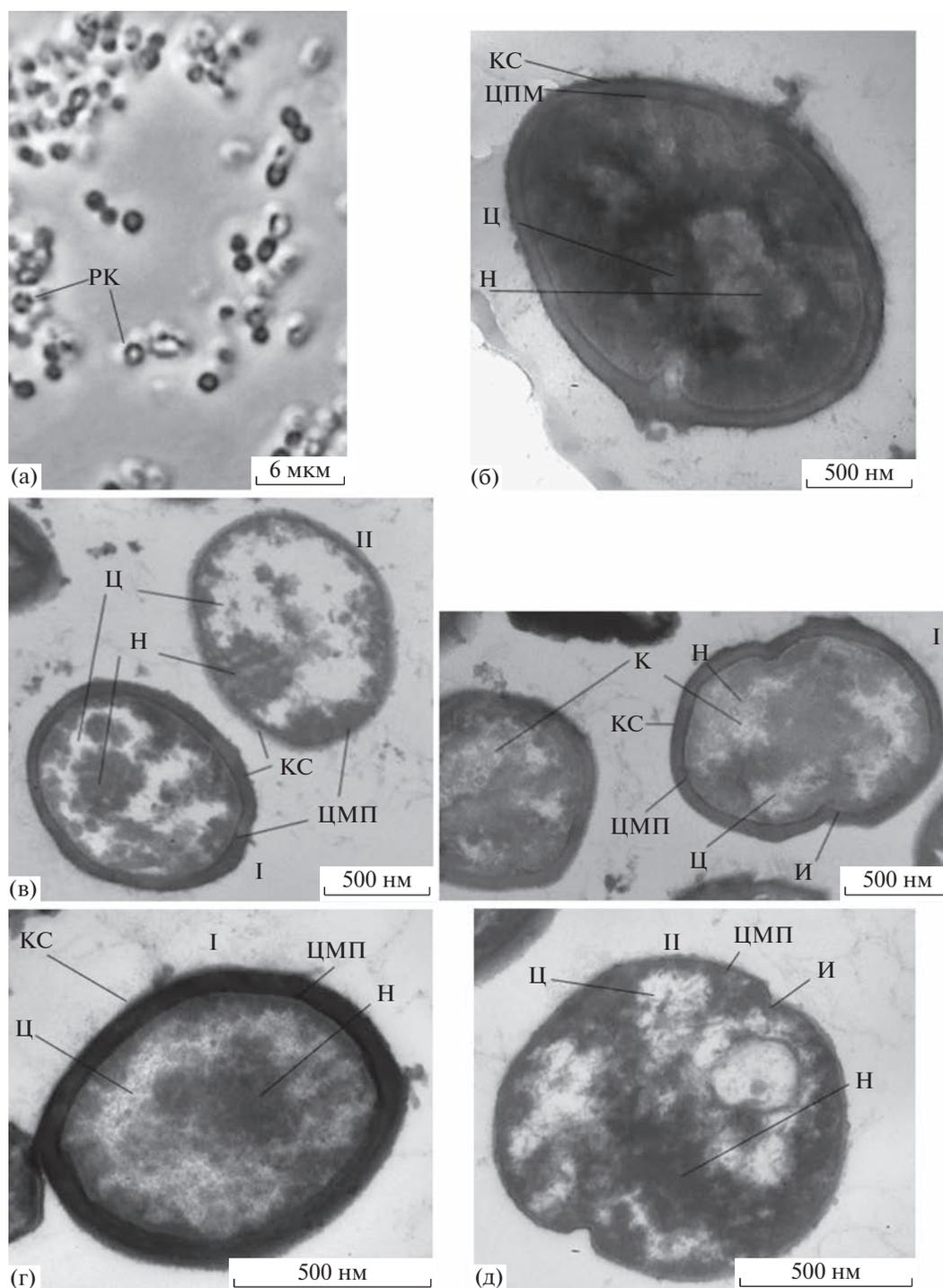


Рис. 5. Фазово-контрастные (а) и электронно-микроскопические (б–д) снимки клеток *E. durans*: (а, б) стационарной фазы роста (среда MRS); (в) хранившихся 3 мес. в колбе (среда MRS); (г, д) хранившихся 3 мес. в пробирках Хангейта (среда MRS). Обозначения: I – ПФ первого типа; II – L-формы; КС – клеточная стенка; ЦПМ – цитоплазматическая мембрана; Н – нуклеоид; Ц – цитоплазма; РК – рефрактерные клетки.

тие форм их выживания в стрессовых и неблагоприятствующих росту условиях.

Наиболее важными и новыми из полученных результатов можно считать следующие. (1) Присутствие гормонов человека различной химиче-

ской природы в среде роста бактерий как единственный переменный фактор при стандартных условиях культивирования (тип роста, состав среды, температура) влияет как на ростовые характеристики развивающихся популяций, так и часто-

Таблица 4. Показатели термоустойчивости ПФ *E. durans*, образовавшихся и хранившихся 3 мес. в разных условиях; прогревание при 60°C в течение 30 мин

Вариант хранения		Титр клеток, КОЕ/мл			Доля (%) терморезистентных клеток		
		№ варианта	до прогрева	после прогрева 60°C 30 мин	от КОЕ до прогрева*	от КОЕ в колбе до прогрева (влияние хранения)**	от КОЕ в колбе после прогрева (влияние процесса)***
1	2	3	4	5	6	7	8
Контроль (стационарная культура)		I	5.1×10^8	1.6×10^5	0.03		
MRS	Колба	II	2.0×10^4	1.0×10^5	500	100	500
	Хангейт с ватной пробкой	III	2.0×10^4	1.0×10^5	500	100	500
	Хангейт с крышечкой и септой	IV	2.0×10^4	1.0×10^5	500	100	500
MRS, в 6 раз меньше фосфора	Колба	V	2.0×10^5	4.0×10^4	20	100	20
	Хангейт с ватной пробкой	VI	4.6×10^3	6.0×10^4	1304	2.3	30
	Хангейт с крышечкой и септой	VII	4.8×10^2	1.2×10^5	25000	0.24	0.6
MRS разбавленная 1 : 6	Колба	VIII	1.0×10^4	2.0×10^4	200	100	200
	Хангейт с ватной пробкой	IX	4.0×10^3	2.0×10^4	500	40	200
	Хангейт с крышечкой и септой	X	2.0×10^3	6.0×10^5	30000	20	6000

* Доля (%) КОЕ-образующих клеток в каждом варианте хранения после прогревания (5) от числа КОЕ в каждом варианте хранения (I–X) до прогревания (4) – 100%.

** Доля (%) КОЕ-образующих клеток в каждом варианте хранения до прогревания (4) от числа в колбе до прогревания (4): II, V, VIII – 100%.

*** Доля (%) КОЕ-образующих клеток в каждом варианте хранения после прогревания (5) от числа КОЕ в колбе до прогревания (4): II, V, VIII – 100%.

ту образования антибиотикотолерантных клеток-персистеров. При этом вектор и степень влияния гормонов существенно зависят от типа роста бактерий (планктонный или биопленочный) и массообмена (уровня аэрации). (2) При длительной инкубации (3 мес.) популяций *E. durans* в неростовых условиях, в них формируется малочисленная субпопуляция анабиотических клеток, обладающих всеми признаками анабиотических покоящихся форм (ПФ). (3) Численность жизнеспособных ПФ (КОЕ-образующих) зависит от состава среды роста популяций, в которой они образуются, и условий их длительной инкубации (3 мес.). (4) Популяции ПФ гетерогенны по глубине покоя, что отражается на

их способности к образованию колоний на свежей среде. Эта способность может быть (на порядок) повышена путем тепловой активации ПФ, индуцирующей их прорастание. Отклик ПФ на прогревание зависит от исходной среды роста популяции, в которой образуются ПФ и условий длительной инкубации (3 мес.), то есть условий созревания ПФ. (5) Присутствие гормонов (например, ANP) в среде роста бактерий влияет на фенотипические характеристики образующихся персистеров, изменяя в новом цикле их развития на свежей среде диссоциативный фенотипический спектр вырастающей популяции.

Влияние гормонов на рост *E. durans*. В настоящее время широко изучается и доказана регуляторная роль катехоламинов, синтезируемых микроорганизмами и человеком, во взаимодействиях как между ними, так и между микробными клетками, что влияет на поведение микробной популяции (Олескин и соавт., 2020). В настоящей работе были расширены спектр гормонов, действующих на развитие бактериальной популяции, а также условия роста бактерий: планктонный, различающийся массообменом (планшетный или в пенициллиновых флаконах) и биопленочный на стекловолоконных фильтрах.

Оказалось, что влияние гормонов на рост и развитие бактериальных популяций зависит не только от их химической структуры и концентрации, но и от условий роста популяции. Так, при росте бактерий в пенициллиновых флаконах все гормоны ингибировали рост популяции (рис. 2а), тогда как при биопленочном, напротив, стимулировали рост биопленок (рис. 3а). При планшетном росте гормоны существенно (~ в 2 раза) стимулировали развитие придонных биопленок, доля (%) которых доходила до 50–60% от общей массы клеток (рис. 1ж). Регуляторное действие биогенных аминов на биопленкообразование в планктонных культурах бактерий отмечалось ранее (Lute, 2014; Олескин и соавт., 2020), действие эстрогена и натрийуретических пептидов отмечено впервые.

Анализ кривых роста планшетных культур энтерококка выявил различия в регуляторном действии гормонов (табл. 1). Так, стимулирующий эффект адреналина (ф) был обусловлен удлинением фаз экспоненциального и линейного роста при незначительном увеличении удельной скорости роста, тогда как действие ВНФ (10ф), напротив, — увеличением удельной скорости роста при такой же продолжительности фаз роста, как и в контроле. Увеличение ингибирующего эффекта эстрогена (10ф) по сравнению с его действием в более низкой концентрации (ф) коррелировало со снижением удельной скорости роста и увеличением времени генерации. Полученные результаты предполагают перспективность дальнейших исследований в этом направлении и, прежде всего, изучение механизмов действия гормонов на бактериальные клетки и межклеточные взаимодействия.

Влияние гормонов на образование клеток-персистеров. Сопряженно с влиянием на рост бактериальных популяций, применяемые гормоны влияли на такую их адаптивную характеристику, как частота образования персистеров. Отметим, что сохранение популяции как представителя вида и компоненты микробного сообщества (в том числе микробиома человека) зависит не столько от успешности ее развития и экспансии простран-

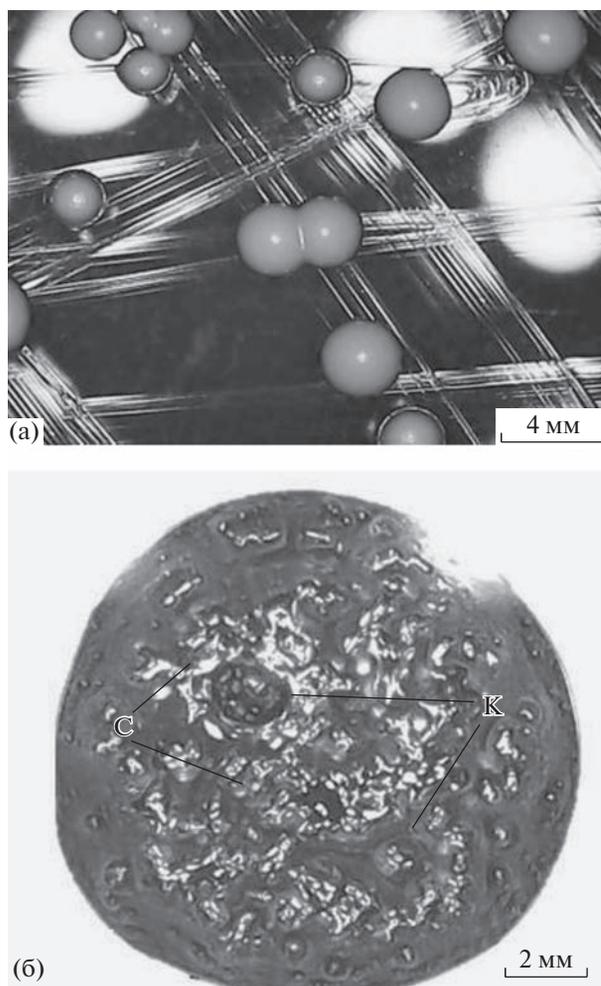


Рис. 6. Морфология колоний *E. durans*, развивающихся на МРС-агаре при посеве: (а) клетками планктонной культуры экспоненциальной или стационарной фаз развития; (б) покоящимися формами 3 мес. хранения в среде МРС в колбе. Обозначения: К — колонии, С — слизь.

ства, сколько от выживания в периодически наступающих неблагоприятных для роста условиях. На первом этапе эту функцию выполняет малочисленная субпопуляция П, преимущественно I типа, образующихся в стационарной фазе в результате цитодифференцировки и фенотипического перехода ординарных клеток в фенотип толерантности к летальным дозам повреждающих воздействий — антибиотиков, ионов тяжелых металлов и др. (Balaban et al., 2004). Численность выживающих П патогенных бактерий определяет уровень бактерионосительства и риски рецидивов хронических заболеваний. Для молочнокислых бактерий — симбионтов человека, образование П является способом их выживания при антибиотикотерапии и сохранения таксономического состава микробиома. О влиянии гормонов на этот тип выживающих клеток информации нет. К механизмам образования П

относят: развитие строгого ответа на наступившее голодание (старвацию) вследствие истощения источников питания (энергии); индукцию SOS-ответа, активацию RecA, вследствие повреждения ДНК; развитие стресса и активацию RelA и SpoT, что приводит к синтезу алармона (p)ppGpp и нарушению баланса токсин–анти-токсин в TA модулях с преобладанием токсина (van der Bergh et al., 2017; Svenningsen et al., 2019; Kaldalu et al., 2020; Wainwright et al., 2021; Wiradiputra et al., 2022; Kaushik et al., 2022).

Сам факт преимущественного образования П в стационарной фазе роста культур сопряжен не только с истощением источников питания, но также с повышением концентрации в среде внеклеточных алармонов, таких как факторы межклеточной коммуникации системы кворум-сенсинг QS (Maisonneuve, Gerdes, 2014) или плотностные регуляторы типа алкилрезорцинов (Эль-Регистан и соавт., 2006; Лойко и соавт., 2015, 2017). Полученные нами результаты позволяют отнести к регуляторам образования П также гормональные соединения различной химической природы, действие которых, возможно, опосредовано их влиянием на рост популяции. Так, при планктонном росте в пенициллиновых флаконах в присутствии гормонов, все они минимизировали в разной степени и рост культур (рис. 2а), и образование П (рис. 2б) (кроме адреналина – ф, нор-адреналина – ф). При развитии популяции на стекловолоконных фильтрах в виде биопленок все гормоны, напротив, стимулировали как рост энтерококков (рис. 3а), так и образование П (рис. 3б).

Таким образом, обнаружена корреляция между стимулирующим/ингибирующим действием гормонов на рост бактериальных популяций и образованием в них персистеров (табл. 2). При этом количественной корреляции между стимулирующим/ингибирующим действием определенного гормона на рост образованием П не обнаружено (рис. 2а, 2б; рис. 3а, 3б).

Отметим, что гормоны применялись нами в крайне низких физиологических концентрациях и, следовательно, могли функционировать только как регуляторные соединения. Проведенный анализ результатов позволяет сделать следующие выводы. Отсутствие прямой корреляции между действием гормонов на рост как умножение численности клеток популяций и частоту образования в них П позволяет говорить о разных механизмах действия гормонов на эти процессы и необходимости исследования этих механизмов, а также обосновывает постановку задачи изучения (и возможной коррекции) гормонального статуса человека как фактора его влияния на персистенцию в организме хозяина симбионтных и патогенных бактерий. Так как, согласно литературным данным, биогенные амины (нейромедиато-

ры) по-разному влияют на рост бактерий разного таксономического статуса, необходимо расширение исследований действия гормонов человека различной химической природы на персистерообразование симбиотических и патогенных бактерий. Достоверно показаны различия между действием гормонов на образование П в планктонных и биопленочных культурах бактерий. Так как в организме человека (равно как и в природных экотопах) преобладает биопленочный фенотип роста симбионтных бактерий, как консументов, так и патогенов, представляется целесообразным (необходимым) расширить изучение условий образования П, включив модели биопленочного роста бактерий.

Формы длительного выживания *E. durans*. Какова дальнейшая судьба П в неблагоприятствующих условиях при пролонгированной инкубации периодических культур бактерий? По этому вопросу не существует единого мнения. Одни исследователи предлагают модель “континуума покоя”, в которой П преобразуются в “более крепко спящие” жизнеспособные некультивируемые клетки (ЖНК) (Augarsetyan et al., 2015). Другие полагают, что персистеры и ЖНК представляют две фазы покоя, имеющие много общих черт (Kim et al., 2018), при этом механизм образования ЖНК, в отличие от персистеров, неясен. Авторы настоящей статьи на основании многолетнего изучения анабиотических покоящихся форм (цистоподобных покоящихся клеток, ЦПК), как форм выживания (месяцы–годы–миллионы лет) неспорообразующих бактерий, выдвинули гипотезу о персистерях как предшественниках анабиотических ПФ, в которых прошла стадия цитодифференцировки, но не завершены процессы созревания и развития анабиотического состояния. Рассмотрим с этих позиций полученные результаты.

В культурах *E. durans*, развивавшихся как в полноценной, так и дефицитных средах, и затем инкубируемых в течение 3 мес., были обнаружены покоящиеся формы типа ЦПК, которые обладали всеми необходимыми характеристиками покоящихся форм: жизнеспособностью (КОЕ-способностью) (табл. 3); отсутствием дыхания с возможностью его реверсии; особенностями структурной организации (рис. 5) и, наконец, терморезистентностью (табл. 4) как показателем их высокой стрессоустойчивости. Численность жизнеспособных ПФ варьировала от 4.8×10^2 до 2.0×10^5 КОЕ/мл в зависимости от условий хранения образцов и на этом этапе определения числа КОЕ была наименьшей в пробах, хранившихся в отсутствие кислорода воздуха (пробирки Хангейта с крышкой и септой) (табл. 4). Однако, при определении терморезистентности длительно выживающих клеток по численности КОЕ после прогревания образцов (60°C , 30 мин), в этих вариантах обнаружилось наибольшее число выживших КОЕ-образующих клеток – до

10^5 кл./мл, то есть их численность возросла на 25000–30000% от численности до прогревания (табл. 4). Отметим, что численность колониеобразующих клеток после прогрева во всех вариантах соответствует численности термоустойчивых клеток в стационарной культуре, то есть численности персистеров, обладающих этим свойством. По формальным признакам эти восстановившиеся способности образовывать колонии после хранения клетки могли быть отнесены к ЖНК, то есть они были некультивируемы до нагревания. Однако мы считаем, что описанный эффект температурной активации длительно выживающих форм можно объяснить явлением гетерогенности популяции анабиотических ПФ по показателю терморезистентности. Гетерогенность покоящихся форм этого типа хорошо известна для эндоспор бацилл и кластридий как показатель глубины покоя, то есть способности к прорастанию без или с применением процедур активации. В наших предыдущих исследованиях цистоподобных ПФ бактерий разных таксонов такая гетерогенность ПФ по степени их терморезистентности была многократно описана как конститутивное свойство покоящихся популяций (Мулюкин и соавт., 2009; Погорелова и соавт., 2009; Голод и соавт., 2009).

Отсюда возникает следующий вопрос: можно ли и следует ли длительно выживающие клетки, не способные образовывать колонии без предварительной активации, например, прогревания (то есть нарушения структурной организации цитоплазматической мембраны ПФ), относить к категории ЖНК? ЖНК – это тема для отдельного теоретического анализа, где прежде всего “необходимо договориться” о четком определении ЖНК как клеток с временным отсутствием способности образовывать колонии в стандартных условиях на плотных средах, отличающихся от покоящихся форм бактерий. В этой статье отметим следующее.

(1) ЖНК, (а) обнаруженные в эстуарных водах и описанные Colwell (1985); (б) ЖНК, обнаруженные и описанные в длительно инкубируемых проточных культурах *Micrococcus luteus* с крайне низкой скоростью протока (Mukamolova et al., 1995); и (в) ЖНК, описанные в этой статье – это три совершенно различных фенотипа. Их объединяет только признак необходимости специальных процедур для восстановления способности образовывать колонии. И только по этому одному признаку они попадают в одну категорию выживающих клеток – жизнеспособных, но не культивируемых.

(2) Почему способность образовывать колонии является определяющим признаком ЖНК? А если длительно выживающие клетки ревертируют к делению в глубинной культуре (метод НВЧК – наиболее вероятного числа клеток) – к чему их

отнести? Можно согласиться с мнением, что длительно выживающие клетки, ревертирующие к делению только в глубинной культуре, – это ЖНК, а дающие колонии на плотной среде – это покоящиеся формы (Шлеева и соавт., 2010), хотя эта точка зрения противоречит постулату, согласно которому неспособность бактерий образовывать колонии – это признак мертвых клеток (Song, Wood, 2021; Vaquero, Levin, 2021). Последнее определение кажется нам неверным.

(3) Разделяя концепцию “континуума покоя” (Ayrapetyan et al., 2015) мы полагаем, что образовавшиеся в стационарной культуре бактерий (*E. durans*) персистеры I типа (а также II типа) в процессе дальнейшей длительной инкубации (хранения) (1 мес. и более) претерпевают изменения, у разных клеток в разной степени, направленные на углубление покоя, что обуславливает гетерогенность субпопуляции П, в том числе по способности прорасти на плотных средах. Это состояние некультивируемости может быть промежуточным. Оно завершается после витрификации цитоплазмы персистеров и их перехода в состояние анабиоза, то есть образованием ПФ. При этом гетерогенность (суб)популяции персистеров, включая приобретение части из них (всеми) состояния некультивируемости, сохраняется в популяции образовавшихся ПФ. Она выражается в различном уровне терморезистентности ПФ и гетерогенности (суб)популяции ПФ по чувствительности к индукции прорастания, то есть по признаку скорости их реверсии к метаболической активности, что неоднократно отмечалось для всех типов покоящихся форм микроорганизмов и является одним из важных признаков адаптивного потенциала микробных популяций.

БЛАГОДАРНОСТИ

Электронно-микроскопические исследования выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования ФИЦ Биотехнологии РАН “Коллекция микроорганизмов UNIQEM”.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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., Neimatov A.L., Vorobjeva L.I., Suzina N.E., Shanenko E.F., Gal'chenko V.F., El-Registan G.I. Adaptation of lactic acid bacteria to unfavorable growth conditions // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 280–289.
- Лойко Н.Г., Козлова А.Н., Николаев Ю.А., Гапонов А.М., Тутельян А.В., Эль-Регистан Г.И. Влияние стресса на образование антибиотикотолерантных клеток *Escherichia coli* // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 512–528.
- Loiko N.G., Kozlova A.N., Nikolaev Y.A., Gaponov A.M., Tutel'yan A.V., El'-Registan G.I. Effect of stress on emergence of antibiotic-tolerant *Escherichia coli* cells // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 595–609.
- Лойко Н.Г., Краснова М.А., Пичугина Т.В., Гриневиц 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. № 3. 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.
- 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. № 1. 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., Антоныук 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.
- Олескин А.В., Кировская Т.А., Ботвинко И.В., Лысак Л.В. Действие серотонина (5-окситриптамина) на рост и дифференциацию микроорганизмов // Микробиология. 1998. Т. 67. С. 306–311.
- Oleskin A.V., Kirovskaya T.A., Botvinko I.V., Lysak L.V. Effects of serotonin (5-hydroxytryptamine) on the growth and differentiation of microorganisms // Microbiology (Moscow). 1998. V. 67. P. 251–257.
- 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.
- Oleskin A.V., El'-Registan G.I., Shenderov B.A. Межмикробные химические взаимодействия и диалог микробиота–хозяин: роль нейромедиаторов // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 3–25.
- Oleskin A.V., El'-Registan G.I., Shenderov B.A. Role of neuromediators in the functioning of the human microbiota: “business talks” among microorganisms and the microbiota-host dialogue // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 1–22.
- Погорелова А.Ю., Мулюкин А.Л., Антоныук Л.П., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Фенотипическая вариабельность у *Azospirillum brasilense* штаммов Sp7 и Sp245: сопряженность с состоянием покоя и свойства диссоциантов // Микробиология. 2009. Т. 78. С. 618–628.
- Pogorelova A.Y., Mulyukin A.L., Galchenko V.F., El'-Registan G.I., Antonyuk L.P. Phenotypic variability in *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245: association with dormancy and characteristics of the variants // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 559–568.
- Шлеева М.О., Салина Е.Г., Капрельянтс А.С. Покоящиеся формы микобактерий // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 3–15.
- Shleeva M.O., Salina E.G., Kaprelyants A.S. Dormant forms of mycobacteria // Microbiology (Moscow). 2010. V. 79. P. 1–12.
- 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., Gal'chenko V.F., Suzina N.E., Duda V.I. Adaptogenic functions of extracellular autoregulators of microorganisms // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 380–389.
- Ayrapetyan M., Williams T., Oliver J.D. Relationship between the viable but nonculturable state and antibiotic persister cells // J. Bacteriol. 2018. V. 200. Art. e00249-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00249-18>
- Ayrapetyan M., Williams T.C., Oliver J.D. Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria // Trends Microbiol. 2015. V. 23. P. 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.09.004>
- Bacteria as Multicellular Organisms // Eds. Shapiro J.A., Dworkin M. Oxford University Press, 1997. 480 p.
- 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., Bumann 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. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0196-3>

- Baquero F., Levin B.R.* Proximate and ultimate causes of the bactericidal action of antibiotics // *Nat. Rev. Microbiol.* 2021. V. 19. P. 123–132.
<https://doi.org/10.1038/s41579-020-00443-1>
- Bigger J.W.* Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation // *Lancet.* 1944. V. 244. P. 497–500.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)74210-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)74210-3)
- Canas-Duarte S.J., Restrepo S., Pedraza J.M.* Novel protocol for persister cells isolation // *PLoS One.* 2014. V. 9. Art. e88660.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088660>
- Chebotar I.V., Emelyanova M.A., Bocharova J.A., Mayansky N.A., Kopantseva E.E., Mikhailovich V.M.* The classification of bacterial survival strategies in the presence of antimicrobials // *Microb. Pathog.* 2021. V. 155. Art. 104901.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104901>
- Colwell R.R., Brayton P.R., Grimes D.J., Roszak D.B., Huq S.A., Palmer L.M.* Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms // *Nat. Biotechnol.* 1985. V. 3. P. 817–820.
<https://doi.org/10.1038/nbt0985-817>
- Dadinova L.A., Chesnokov Y.M., Kamyshinsky R.A., Orlov I.A., Petoukhov M.V., Mozhaev A.A., Soshinskaya E. Yu., Lazarev V.N., Manuvera V.A., Orekhov A.S., Vasiliev A.L., Shlykova E.V.* Protective Dps-DNA co-crystallization in stressed cells: an *in vitro* structural study by small-angle X-ray scattering and cryo-electron tomography // *FEBS Lett.* 2019. V. 593. P. 1360–1371.
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.13439>
- Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P.* Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators // *J. Bacteriol.* 1994. V. 176. P. 269–275.
- Kaldalu N., Hauryliuk V., Turnbull K.J., La Mensa A., Putrinš M., Tenson T.* *In vitro* studies of persister cells // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2020. V. 84. Art. e00070-20.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00070-20>
- Kaldalu N., Joers A., Ingelman H., Tenson T.* A general method for measuring persister levels in *Escherichia coli* cultures // *Methods Mol. Biol.* 2016. V. 1333. P. 29–42.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2854-5_3
- Kaprelyants A.S., Mukamolova G.V., Kell D.B.* Estimation of dormant *Micrococcus luteus* cells by penicillin lysis and by resuscitation in cellfree spent medium at high dilution // *FEMS Microbiol. Lett.* 1994. V. 115. P. 347–352.
- Kaushik V., Sharma S., Tiwari M., Tiwari V.* Antipersister strategies against stress induced bacterial persistence // *Microb. Pathog.* 2022. V. 164. Art. 105423.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105423>
- Kell D.B., Kaprelyants A.S., Weichart D.H., Harwood C.R., Barer M.R.* Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues // *Antonie van Leeuwenhoek.* 1998. V. 73. P. 169–187.
<https://doi.org/10.1023/A:1000664013047>
- Kim J.S., Chowdhury N., Yamasaki R., Wood T.K.* Viable but non-culturable and persistence describe the same bacterial stress state // *Environ. Microbiol.* 2018. V. 20. P. 2038–2048.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.14075>
- Krawczyk A.O., de Jong A., Omony J., Holsappel S., Wells-Bennik M.H.J., Kuipers O.P., Eijlander R.T.* Spore heat activation requirements and germination responses correlate with sequences of germinant receptors and with the presence of a specific *spoVA2mob* operon in foodborne strains of *Bacillus subtilis* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2017. V. 83.
<https://doi.org/10.1128/AEM.03122-16>
- Lewis K.* Persister cells // *Annu. Rev. Microbiol.* 2010. V. 64. P. 357–372.
- 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.
- Lyte M.* The effect of stress on microbial growth // *Anim. Health Res. Rev.* 2014. V. 15. P. 172–174.
<https://doi.org/10.1017/S146625231400019X>
- Lyte M.* The microbial organ in the gut as a driver of homeostasis and disease // *Med. Hypotheses.* 2010. V. 74. P. 634–638.
- Maisonneuve E., Gerdes K.* Molecular mechanisms underlying bacterial persisters // *Cell.* 2014. V. 157. P. 539–548.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.050>
- Markova N., Slavchev G., Michailova L., Jourdanova M.* Survival of *Escherichia coli* under lethal heat stress by L-form conversion // *Int. J. Biol. Sci.* 2010. V. 6. P. 303–315.
<https://doi.org/10.7150/ijbs.6.303>
- Mukamolova G.V., Kaprelyants A.S., Kell D.B.* Secretion of an antibacterial factor during resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended stationary phase // *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1995. V. 67. P. 289–295.
- O'Toole G.A.* Microtiter dish biofilm formation assay // *J. Visual. Exper.* 2011. V. 47. P. 2437.
- Salina E.G., Grigorov A.S., Bychenko O.S., Skvortsova Y.V., Mamedov I.Z., Azhikina T.L., Kaprelyants A.S.* Resuscitation of dormant “non-culturable” *Mycobacterium tuberculosis* is characterized by immediate transcriptional burst // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2019. V. 9. P. 272.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00272>
- Song S., Wood T.K.* “Viable but non-culturable cells” are dead // *Environ. Microbiol.* 2021. V. 23. P. 2335–2338.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.15463>
- Strahl H., Errington J.* Bacterial membranes: structure, domains, and function // *Annu. Rev. Microbiol.* 2017. V. 71. P. 519–538.
- Svenningsen M.S., Veress A., Harms A., Mitarai N., Semsey S.* Birth and resuscitation of (p)ppGpp induced antibiotic tolerant persister cells // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. Art. 6056.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-42403-7>
- Van den Bergh B., Fauvart M., Michiels J.* Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters // *FEMS Microbiol. Rev.* 2017. V. 41. P. 219–251.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fux001>
- Wainwright J., Hobbs G., Nakouti I.* Persister cells: formation, resuscitation and combative therapies // *Arch. Microbiol.* 2021. V. 203. P. 5899–5906.
<https://doi.org/10.1007/s00203-021-02585-z>
- Wiradiputra M.R.D., Khuntayaporn P., Thirapanmethee K., Chomnawang M.T.* Toxin-antitoxin systems: a key role on persister formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium // *Infect. Drug Resist.* 2022. V. 15. P. 5813–5829.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S378157>

Effect of Hormones and Biogenic Amines on Growth and Survival of *Enterococcus durans*

G. I. El'-Registan¹, O. V. Zemskova¹, O. A. Galuza¹, R. V. Ulanova¹, E. A. Il'icheva¹,
A. V. Gannesen¹, and Yu. A. Nikolaev¹, *

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences,
Moscow, 119071 Russia

*e-mail: nikolaevya@mail.ru

Received March 23, 2023; revised March 25, 2023; accepted March 26, 2023

Abstract—Lactic acid bacteria (LAB) are important components of the human microbiome. While they are capable both of synthesis and response to the signals of the human humoral regulatory system (hormones and neuromediators), the phenomenology and mechanisms of the LAB response to these mediators are insufficiently studied. This work showed estrogen to hinder the growth and development of *E. durans*, while norepinephrine, estrogen, and the brain natriuretic peptide caused dose-dependent extension of the stationary growth phase. This is the first report on stimulation of *E. durans* biofilm formation by the atrial natriuretic peptide and estrogen. The frequency of persister formation depended on the type of bacterial growth (planktonic or biofilm one) and was higher in the case of biofilm growth. Epinephrine and norepinephrine exhibited dose-dependent stimulation of persister formation in planktonic LAB cultures, while other tested hormones inhibited it. The effect on persister formation in biofilms was different: natriuretic peptides exhibited dose-dependent stimulation of persister formation, and none of the hormones inhibited it significantly. After several months of incubation, *E. durans* persister cells matured to anaaaaaaabiotic dormant forms with the typical ultrastructural features. The population of *E. durans* dormant forms was first shown to contain the form with different dormancy depth, including the viable uncultured ones.

Keywords: lactic acid bacteria, *Enterococcus durans*, biogenic amines, natriuretic peptides, estrogen, growth, survival forms