

УДК 579.24+57.042

МЕХАНИЗМЫ ВЫЖИВАНИЯ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ В СИЛАНЛЬНО-ГУМАТНЫХ ГЕЛЯХ С ОРГАНИЧЕСКИМИ КИСЛОТАМИ

© 2025 г. О. А. Галуза^{a, b, *}, Г. И. Эль-Регистан^a, А. В. Вишнякова^a, Ю. А. Николаев^a

^aИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071, Россия

^bООО “Бавар+”, Москва, 127206, Россия

*e-mail: olesya_galuza@mail.ru

Поступила в редакцию 18.07.2024 г.

После доработки 09.09.2024 г.

Принята к публикации 10.09.2024 г.

Выживание бактерий в неблагоприятных для роста условиях является одной из фундаментальных проблем микробиологии. Прикладной аспект этой проблемы — длительное сохранение клетками бактерий жизнеспособности, имеет особое значение для хранения молочнокислых бактерий в связи с биотехнологической значимостью этой группы микроорганизмов и их высокими скоростями отмирания при длительном хранении. Целью настоящего исследования было изучение длительного выживания молочнокислых бактерий разных физиологических групп (гетероферментативного *Enterococcus faecium* M3185 и гомоферментативной *Lactobacillus paracasei* AK 508) в силанольно-гуматных гелях (СГГ), включающих различные органические кислоты, используемые как титранты при получении СГГ (яблочную, молочную, уксусную, аскорбиновую, лимонную). Помещение клеток в СГГ с органическими кислотами приводило к существенному повышению титра жизнеспособных клеток относительно контроля при длительном хранении (до 200 раз) и зависело от культуры бактерий, использованной кислоты и срока хранения (до 5 мес.). Экспериментально доказанными причинами длительного выживания бактерий в СГГ являются: 1) нахождение большей части клеток в состоянии гипометаболизма и потребление ими органических кислот, что доказывается снижением их концентрации при хранении, а также выделением CO₂ в случае *E. faecium* (при этом уровень метаболизма понижен относительно растущих клеток в 1000 раз); 2) отсутствие массового автолиза клеток, что, предположительно, обусловлено “разобщенностью” клеток в геле и невозможностью создания достаточных концентраций ауторегуляторов и ферментов автолиза; 3) нахождение части клеток в состоянии покоя, в виде стрессоустойчивых цистоподобных клеток. Также есть основания полагать, что при переносе в гель формируется альтернативный (био пленочный) фенотип, обладающий повышенной стрессоустойчивостью. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности иммобилизации клеток молочнокислых бактерий в СГГ с органическими кислотами для длительного хранения.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus paracasei*, иммобилизация бактерий, биопрепараты, силанольно-гуматный гель, формы и механизмы выживания

DOI: 10.31857/S0026365625010026

Молочнокислые бактерии (МКБ) существуют в различных природных экологических нишах, входят в состав микробиома желудочно-кишечного тракта животных и человека, образуют симбиоз с растениями, интенсивно используются при промышленном производстве кисломолочных продуктов, пробиотических добавок и различных биопрепаратов (Khalisanni, 2011), применяются в пищевой промышленности (при получении кисломолочных продуктов и продуктов брожения, в хлебопечении, при изготовлении

колбас, при консервировании фруктов и овощей) (Salminen et al., 2004). Препараты на основе МКБ являются эффективными биоудобрениями, биостимуляторами, средствами биологической борьбы с инфекциями, вызываемыми грибковыми и бактериальными фитопатогенами. В качестве удобрений препараты на основе МКБ улучшают доступность питательных веществ из компоста и другого органического материала. В качестве биостимуляторов МКБ улучшают рост растений или прорастание семян, а также уменьшают

воздействие различных абиотических стрессов (Lamont et al., 2017).

Существенным недостатком препаратов, содержащих живые клетки МКБ, является высокая скорость гибели клеток в процессе хранения без принятия особых мер (Shin et al., 2000; Ng et al., 2011). Самые эффективные способы стабилизации препаратов МКБ (понимаемой как длительное поддержание высокого титра жизнеспособных клеток) — их лиофилизация или глубокое замораживание (Morgan et al., 2006; Aydin, Denek, 2024). Однако эти способы являются дорогостоящими, поэтому актуальной остается разработка недорогих и эффективных способов стабилизации биопрепаратов на основе живых культур микроорганизмов. Одним из способов сохранения биопрепаратов бактерий является иммобилизация клеток в гели различного состава (Linko et al., 2006; Mitropoulou et al., 2013; Ефременко, 2018).

В наших предыдущих исследованиях было показано, что эффективным способом длительного (до года) хранения углеводородокисляющих бактерий (УОБ) (Николаев и соавт., 2021; Nikolaev et al., 2021a) и молочнокислых бактерий (МКБ) (Galuza et al., 2023) является их иммобилизация в силанольно-гуматные гели (СГГ). В этих работах был использован стандартный метод получения гелей (Volikov et al., 2016; Воликов и соавт., 2018) с некоторыми модификациями (Николаев и соавт., 2021; Nikolaev et al., 2021a). Одним из ключевых моментов в получении СГГ является нейтрализация щелочного водного раствора органосилана до физиологических значений pH (~7). В исходной методике для получения СГГ, применяемого в качестве сорбента в грунтах, использовали соляную кислоту. При приготовлении СГГ с целью иммобилизации в него живых углеводородокисляющих бактерий мы стали использовать уксусную кислоту, конечное содержание которой составляло 1–1.5 г/л (Николаев и соавт., 2021; Nikolaev et al., 2021b). При формировании СГГ образуется этанол в количестве 1.5–2.5 г/л. При длительной инкубации УОБ, заключенных в такой СГГ, наблюдали снижение концентрации ацетата и этанола (Nikolaev et al., 2023). Было сделано предположение, что этанол и ацетат используются в качестве источников энергии для поддержания жизнеспособности иммобилизованных клеток углеводородокисляющих бактерий. Следовательно, при использовании различных органических кислот, как титрантов при формировании геля, можно варьировать (оптимизировать) источники энергии для поддержания жизнеспособности иммобилизованных в СГГ бактерий с разным типом метаболизма. Такой принцип был опробован на молочнокислых бактериях, и в предварительных исследованиях было показано, что иммобилизация молочнокислых бактерий в СГГ приводит к повышению титра жизнеспособных клеток

относительно нестабилизированного контроля (Galuza et al., 2023).

Целью настоящего исследования было изучение выживания молочнокислых бактерий (с различными типами брожения: гомо- и гетероферментативным) в СГГ, полученных с использованием различных органических кислот, и исследование форм и механизмов выживания в этих условиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе были использованы бактерии *Enterococcus faecium* M3185 и *Lactobacillus paracasei* AK 508 из коллекции UNIQEM Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального исследовательского центра “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук.

Условия культивирования. Бактерии культивировали в жидкой и на плотной среде LB (лизогенный бульон Луриа–Бертани, “Sigma-Aldrich”, США). Бактерии выращивали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл среды на орбитальной качалке (120 об./мин) при температуре 28°C до стационарной фазы роста (24 ч). Стационарные культуры использовали для иммобилизации в силанольно-гуматные гели.

Иммобилизация клеток в силанольно-гуматные гели. Силанольно-гуматные гели получали с использованием гумата Фульвигрейн Классик (“РодАгро”, Россия) и органосилана (3-аминопропил)триэтоксисилана (АПТЭС) (“Лента 91”, Россия) по разработанной ранее методике (Воликов и соавт., 2018) с модификациями (Николаев и соавт., 2021; Nikolaev et al., 2021a; Galuza et al., 2023). К 10 мл 10% стерильного раствора гумата при интенсивном перемешивании добавляли 350 мкл АПТЭС. Полученный раствор титровали до значений pH 6.5–7.0 растворами кислот: уксусной (10%), соляной (3.7%), аскорбиновой (20%), яблочной (10%), молочной (10%) или лимонной (10%) в количестве 1.4–5.4 мл в зависимости от кислоты. Затем, не переставая перемешивать, вносили 5 мл стационарной культуры МКБ. Полученную смесь разливали по 1 мл в пробирки типа Эппендорф объемом 2 мл. В течение 5–6 ч при комнатной температуре происходило застывание (желирование) смеси. Важным свойством геля было то, что при добавлении к гелю половинного или большего объема воды и интенсивном перемешивании гель ожижался, т.е. переходил из твердого в жидкое состояние с освобождением бактериальных клеток, что давало возможность определения точного количества жизнеспособных микроорганизмов.

Определение численности жизнеспособных клеток бактерий проводили микрометодом (Pious et al.,

2015), высевая аликвоты (5 мкл) десятичных разведений проб на плотную среду LB (1.5% агар-агара) и подсчитывая число выросших колоний на вторые сутки инкубирования чашек Петри при температуре 37°C (Нетрусов и соавт., 2005).

Метаболическая активность. О метаболической активности бактерий судили: (1) для лактобацилл — по убыли органических кислот в среде инкубирования, (2) для энтерококка — по убыли органических кислот и выделению клетками CO_2 .

Выделение клетками CO_2 определяли хроматографически. Анализ газовой фазы проводили на газовом хроматографе Кристалл 5000.2 (“Хроматэк”, РФ) с детектором GC-FID (пламенно-ионизационный) и сорбентами NaX и HayeSep N 80/100 (“Хроматэк”, Россия). Длина колонки составляла 3 м, внутренний диаметр — 2 мм, температура колонки — 40°C, температура детектора и испарителя — 200°C, расход водорода — 25 мл/мин, расход воздуха — 250 мл/мин, газа-носителя (аргона) — 25 мл/мин.

Образец СГГ, содержащий бактерии (5 мл), вносили в герметически закрытый флакон ($V = 40$ мл) и инкубировали при температуре 28°C в течение 60 сут в статических условиях. Периодически отбирали шприцем пробы газовой фазы (1 мл) и определяли в них количество CO_2 хроматографически. Количество CO_2 выражали в объемных %. Увеличение количества CO_2 отражало наличие и интенсивность метаболической активности энтерококков, осуществляющих гетероферментативное молочнокислое брожение. Скорость метаболизма выражали в мг CO_2 , образуемого одним миллиардом клеток за 1 час (мг CO_2 /ч/1 млрд. клеток), используя экспериментальные данные настоящей работы. Аналогично определяли скорость метаболизма растущих на среде LB энтерококков (в контрольном эксперименте). Образование CO_2 проходило только в результате реакций брожения, но не дыхательной активности, т.к. *E. faecium* не способен к дыханию (Pedersen et al., 2012).

Терморезистентность клеток определяли по сохранению ими колониеобразующей способности после прогревания при 70°C в течение 15 мин для *E. faecium* и при 60°C в течение 10 мин для *L. paracasei*. Прогрев осуществляли в пробирках типа Эппендорф на термошейкере TS-100 (“Biosan”, Латвия). Долю терморезистентных клеток выражали в % по отношению к 100% жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) до прогревания.

Концентрации органических кислот, используемых при приготовлении СГГ, определяли с помощью системы капиллярного электрофореза нового поколения с автосемплером Капель-205 (“Люмэкс”, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Электрофорез проводили в необработанных капиллярах из плавленого кварца длиной 60 см (эффективная длина 50 см) и внутренним диаметром 75 мкм. Капилляр выдерживали при 20°C,

приложенное напряжение составляло — 17 кВ для кислот. Детектирование проводили при 254 нм. Для анализа использовался фоновый электролит на основе бензимидазола и винной кислоты с добавкой краун-эфира 18-краун-6. Сигнал детектора обрабатывали при помощи программного обеспечения Эльфоран. Использовали реактивы класса чистоты не ниже ч.д.а. Все растворы готовили с применением деионизованной воды, полученной при помощи системы очистки воды Milli-Q Academic (“Millipore”, Франция).

Пробоподготовку для анализа концентраций органических кислот проводили по следующей методике: к образцу геля (1 мл) добавляли равное количество деионизованной воды (1 мл), смесь интенсивно перемешивали, центрифугировали 20 мин в пробирках типа Фалькон объемом 15 мл при 4900 об./мин на центрифуге Medifuge (“Thermo FS”, Россия). Затем отбирали надосадочную жидкость (1 мл) и добавляли ацетон (2 мл), перемешивали и оставляли на 1 ч при комнатной температуре для формирования осадка полимера. Далее раствор центрифугировали 20 мин в пробирках типа Фалькон объемом 15 мл при 4900 об./мин на центрифуге Medifuge (“Thermo FS”, Россия). На анализ отбирали 400 мкл надосадочной жидкости.

К 400 мкл пробы каждого образца добавляли в качестве контроля (внутреннего стандарта) 50 мкл щавелевой и 50 мкл лимонной кислоты до конечной концентрации 200 мкг/мл каждой. Концентрации кислот рассчитывали по площади пиков соответствующих кислот в стандартном растворе, приготовленном в 66% ацетоне. Конечная концентрация каждой кислоты в стандартном растворе составляла 200 мкг/мл.

Для анализа брали пробы образцов СГГ с органическими кислотами (яблочная, уксусная, аскорбиновая и молочная). Уменьшение концентрации кислоты в геле отражало наличие и интенсивность метаболической активности иммобилизованных клеток.

Ультраструктурная организация клеток была исследована с применением трансмиссионной электронной микроскопии ультратонких срезов.

Образцы гелей помещали в 2.5% раствор глутарового альдегида в какодилатном буфере (0.05 М раствор какодилата натрия, pH 7.0–7.5) и выдерживали в течение 24 ч при 4°C; затем трижды промывали тем же буферным раствором в течение 5 мин и фиксировали в растворе OsO_4 (1% OsO_4 и 0.7% раствор рутениевого красного в какодилатном буфере) в течение 1.5 ч при 4°C. После фиксации образцы заключали в 2% агар-агар и последовательно выдерживали в 3% растворе уранилацетата в 30% этиловом спирте в течение 4 ч, далее в 70% этаноле в течение 12 ч при 4°C. Материал обезвоживали в 96% этиловом спирте (2 раза по 15 мин), затем в абсолютном ацетоне (3 раза по 10 мин). Образцы

пропитывали смолой ЭПОН-812 (Epoxy Embedding Medium Эпон® 812, “Sigma-Aldrich”, США): выдерживали в смеси смола–ацетон в соотношении 1 : 1 в течение 1 ч, затем в смеси смола–ацетон в соотношении 2 : 1 в течение 1 ч. Полученный материал заливали в желатиновые капсулы и проводили полимеризацию при температуре 37°C в течение 24 ч и далее при 60°C в течение 24 ч. Ультратонкие срезы получали на микротоме ЛКВ-III (“ЛКВ”, Швеция) и контрастировали в водном растворе 3% уранилацетата (30 мин), затем в водном растворе 4% цитрата свинца по Рейнольдсу (30 мин).

Полученные препараты анализировали с помощью электронного микроскопа JEM 1400 (“JEOL”, Япония) при ускоряющем напряжении 120 кВ и рабочем увеличении 5000–800000. Фотодокументирование материалов проводили с помощью цифровой системы вывода оптических изображений Morada G2.

О наличии покоящихся форм судили по присутствию в образцах клеток, имеющих характерные признаки – утолщенную клеточную стенку, электронно-плотную цитоплазму (Голод и соавт., 2009; Мулюкин и соавт., 2009, 2014; Лойко и соавт., 2014; Соляникова и соавт., 2017).

Статистическая обработка данных. Все исследования выполнены в трех биологических повторностях с двумя параллельными экспериментами в каждой (технические повторности). При определении титра КОЕ определяли количество выросших колоний в 5–7 микрокаплях для каждого разведения.

Для массивов полученных данных определяли среднее арифметическое и экспериментальную ошибку (функция “среднее отклонение экспериментальных значений от среднего”) с использованием программы Microsoft Office Excel 2007. Различия между вариантами считали значимыми, если они превышали экспериментальную ошибку, обычно менее 20% для экспериментов по определению КОЕ, 5% для экспериментов по определению концентраций кислот и 1.5% для экспериментов по определению CO₂. На рисунках представлены данные типичных экспериментов, в таблицах – средние арифметические значения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследований был проведен скрининг влияния органических кислот, используемых как титранты при получении СГГ, на выживание клеток МКБ, заключенных в гели. Результаты представлены на рис. 1 и в табл. 1 и 2.

Выживание клеток в СГГ в провокационных условиях (на свету при комнатной температуре) при использовании органических кислот различалось

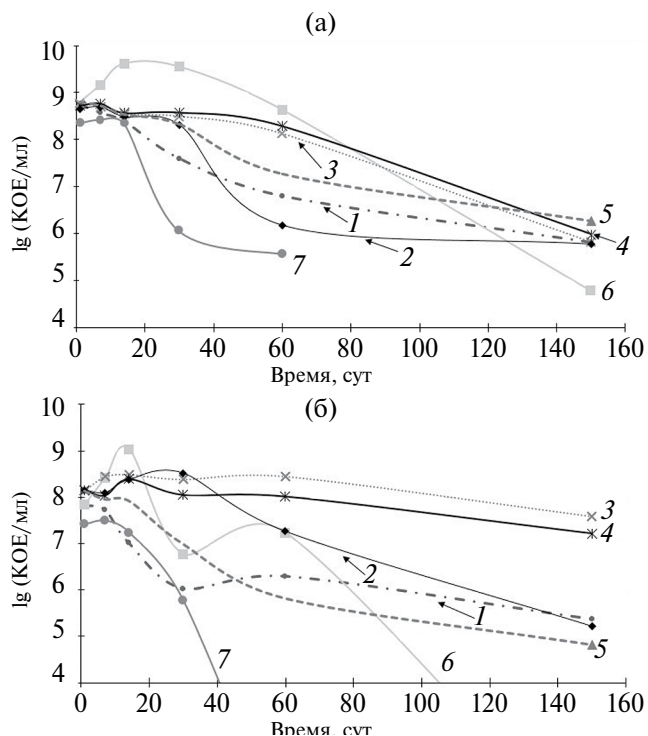


Рис. 1. Динамика изменения численности жизнеспособных клеток *E. faecium* (а) и *L. paracasei* (б), иммобилизованных в СГГ с различными кислотами. Цифрами обозначены: 1 – контрольная, нестабилизированная культура, хранившаяся в жидкой среде LB; 2 – культура, иммобилизованная в СГГ с лимонной кислотой; 3 – культура, иммобилизованная в СГГ с яблочной кислотой; 4 – культура, иммобилизованная в СГГ с молочной кислотой; 5 – культура, иммобилизованная в СГГ с уксусной кислотой; 6 – культура, иммобилизованная в СГГ с аскорбиновой кислотой; 7 – культура, иммобилизованная в СГГ с соляной кислотой.

на разных сроках хранения СГГ (до 5 мес.) для обеих бактерий: *E. faecium* (рис. 1а, табл. 1) и *L. paracasei* (рис. 1б, табл. 2). Для *E. faecium* лучшие результаты были получены в вариантах с аскорбиновой, яблочной и молочной кислотами (табл. 1). При хранении в течение 30–60 сут количество жизнеспособных клеток в присутствии этих кислот было выше, чем в контроле, в 10–80 раз. При длительном хранении (5 мес.) различия между контролем и опытом нивелировались. Существенного повышения выживаемости в СГГ относительно контроля при длительном хранении не наблюдали при использовании уксусной, лимонной и соляной кислот. В случае использования этих кислот наблюдали достоверное превышение титра КОЕ относительно контроля до 5 раз только в течение 2–4 нед. инкубации, после чего разница с контролем нивелировалась. При использовании аскорбиновой кислоты наблюдали возрастание титра КОЕ

Таблица 1. Доля жизнеспособных клеток *E. faecium* (%), иммобилизованных в СГГ с различными кислотами, в ходе инкубации при комнатных условиях

Образец	Длительность инкубации, сут					
	1	7	14	30	60	150
Контроль	100.0	66.7	43.7	7.1	1.1	0.1
Аскорбиновая кислота	100.0	234.0	669.9	573.8	69.6	0.01
Яблочная кислота	100.0	84.8	57.9	53.0	22.8	0.1
Молочная кислота	100.0	111.4	70.0	71.6	37.0	0.2
Лимонная кислота	100.0	108.0	66.7	44.9	0.3	0.1
Уксусная кислота	100.0	83.0	54.0	33.5	2.9	0.3
Соляная кислота	100.0	117.9	100.0	0.5	0.5	Н.д.

Таблица 2. Доля жизнеспособных клеток *L. paracasei* (%), иммобилизованных в СГГ с различными кислотами, в ходе инкубации при комнатных условиях

Образец	Длительность инкубации, сут					
	1	7	14	30	60	150
Контроль	100.0	80.0	14.8	1.6	0.9	0.4
Аскорбиновая кислота	100.0	367.2	1517.2	8.4	24.5	0.0
Яблочная кислота	100.0	199.1	221.5	173.4	201.3	82.0
Молочная кислота	100.0	78.4	175.9	79.7	74.1	35.3
Лимонная кислота	100.0	86.6	165.3	228.0	12.7	0.3
Уксусная кислота	100.0	66.5	62.0	7.2	0.5	0.2
Соляная кислота	100.0	120.0	67.0	2.3	0.0	0.0

через 4 нед. инкубации в 6.7 раза, что соответствует примерно 2–3 клеточным делениям.

Существенный рост в присутствии аскорбиновой кислоты титра КОЕ обеих культур в течение первых 14 сут и наименьший титр КОЕ после 5 мес. хранения указывают, что клетки МКБ в течение двух недель были в состоянии активного роста, не формировали покоящихся клеток (или формировали их в незначительном количестве).

Примерно одинаковое количество клеток на конец опыта (5 мес.) во всех вариантах (кроме аскорбиновой кислоты) свидетельствует о примерно одинаковом количестве форм покоя.

Для *L. paracasei* (рис. 16, табл. 2) в вариантах использования яблочной и молочной кислот титр жизнеспособных клеток слабо изменялся на протяжении всего срока хранения (5 мес.) и был стабильно выше, чем в контроле (до 200 раз). В присутствии аскорбиновой кислоты в течение двух недель, как и для энтерококка, наблюдали рост культуры (титр КОЕ возрастал в 16 раз, что соответствует четырем поколениям), после чего количество клеток быстро падало до уровня, ниже точности определения КОЕ к пятому месяцу хранения. В присутствии лимонной кислоты титр КОЕ был выше контрольного до 140 раз в течение двух месяцев. В присутствии

уксусной и соляной кислот лактобациллы выживали лишь незначительно лучше (до четырех раз), чем в контроле в течение одного месяца.

Достоверное превышение титра КОЕ в культурах обеих МКБ, иммобилизованных в гели, над контролем во всех вариантах в течение первых двух недель свидетельствует о важности перехода клеток в гелевое окружение. Этот эффект хорошо выражен даже в варианте с соляной кислотой, то есть в отсутствие дополнительного питания (МКБ этанол не метаболизируют).

Выживание в СГГ зависело от видовой принадлежности бактерий и было более успешным для *L. paracasei*. Так, в присутствии яблочной и молочной кислот титр жизнеспособных клеток лактобацилл составлял не ниже 80% от исходного титра в течение пяти месяцев эксперимента, а титр энтерококков к концу этого же срока инкубации во всех опытах не превышал 0.2%.

Таким образом, для обеих бактерий при среднесрочном хранении (2 мес.) предпочтительным было использование яблочной, молочной и аскорбиновой кислот, а для хранения лактобацилл в течение пяти месяцев — яблочной и молочной кислот.

Экспериментально определяемое снижение численности КОЕ в пятимесячных гелях объясняется

возможным переходом хранящихся клеток в покоее состояние, выход из которого требует специальных процедур реанимации, которые в настоящей работе не проводили. Подобное мы наблюдали в старых культурах *Enterococcus durans*, когда для активации покоящихся клеток энтерококка требовалось их нагревание (Эль-Регистан и соавт., 2023).

Причиной лучшей выживаемости *L. paracasei* при хранении в течение 5 мес. может быть способность этой бактерии (но не энтерококка) к окислительному метаболизму. Показано, что МКБ, обладающие способностью к дыханию, демонстрируют улучшенную выживаемость при длительных инкубациях в условиях, позволяющих дышать, и наличии гема (Gaudu et al., 2002; Pedersen et al., 2012). В наших условиях бактерии хранились в условиях доступа воздуха, а наличие гема обусловлено использованием дрожжевого автолизата (Hertgard et al., 2008).

Поскольку в динамике хранения обеих бактерий в СГГ был обнаружен их вторичный рост, особенно выраженный для аскорбиновой кислоты для обеих культур, а в случае лактобацилл — также и для яблочной, молочной и лимонной кислот, то в следующем блоке экспериментов была исследована динамика убыли органических кислот, внесенных в гели в качестве титрантов, для проверки гипотезы об их потреблении бактериями. Опыты были поставлены лишь с некоторыми кислотами, наилучшими для поддержания жизнеспособности бактерий.

При хранении клеток *E. faecium* в СГГ с молочной кислотой обнаружена ее убыль за 30 сут на 3.5% с параллельным накоплением уксусной кислоты до 1.5% (табл. 3).

В опытах с хранением *L. paracasei* в СГГ с яблочной кислотой отмечено ее выраженное потребление — убыль на ~35% от внесенного количества уже на 14 сут хранения, что свидетельствует о ее активном метаболизме (табл. 4) с параллельным накоплением уксусной и молочной кислот и согласуется с данными об увеличении численности бактерий в этом варианте хранения (рис. 1).

При хранении *E. faecium* в СГГ с аскорбиновой кислотой отмечено активное потребление кислоты (табл. 5), сопровождающееся повышением в геле концентрации молочной кислоты (до 4.9 г/л).

Полученные данные согласуются с литературными данными о метаболизме органических кислот молочнокислыми бактериями. Энтерококки способны к росту на аскорбате с образованием лактата, формиата, этанола (Mehmeti et al., 2013), а также на цитрате с образованием ацетата, формиата, лактата и этанола (Leblanc, 2006; Ramsey et al., 2014). При росте МКБ на малате образуется лактат (Radler, Brihl, 1984; Zaunmüller et al., 2006).

Поддержание метаболической активности за счет потребления органических кислот иммобилизованными в гелях клетками МКБ было

Таблица 3. Изменение концентраций молочной и уксусной кислот (г/л) при хранении *E. faecium* в СГГ с молочной кислотой

Время инкубации	Молочная кислота	Уксусная кислота
Исходно (0 сут)	13.59*	0.00
1 сут	13.54	0.46
14 сут	11.78	0.88
30 сут	11.50	1.50

*Расчетные данные.

Таблица 4. Динамика концентраций яблочной, молочной и уксусной кислот (г/л) при хранении *L. paracasei* в СГГ с яблочной кислотой

Время инкубации	Яблочная кислота	Уксусная кислота	Молочная кислота
Исходно (0 сут)	15.93*	0.00	0.00
1 сут	15.22	0.00	0.00
14 сут	10.54	3.34	3.59
30 сут	9.79	4.00	4.30

*Расчетные данные.

Таблица 5. Динамика концентраций аскорбиновой и молочной кислот (г/л) при хранении *E. faecium* в СГГ с аскорбиновой кислотой

Время инкубации	Аскорбиновая кислота	Молочная кислота	Уксусная кислота
Исходно (0 сут)	8.58	0	0
1 сут	8.14	1.66	2.31
14 сут	2.82	1.82	3.16
30 сут	2.21	2.61	1.40

*Расчетные данные.

подтверждено данными об образовании CO_2 в хранящихся образцах *E. faecium*.

На рис. 2 представлена динамика накопления CO_2 в хранящихся 50 сут планктонных культурах *E. faecium* и образцах в СГГ с использованием в качестве титрантов молочной, аскорбиновой и уксусной кислот. В качестве контроля был использован гель, приготовленный с внесением соляной кислоты. Наиболее интенсивное образование CO_2 отмечено *E. faecium* в гелях с молочной и аскорбиновой кислотами, наименее интенсивное, практически отсутствие — в гелях с уксусной и соляной кислотами.

Выделение CO_2 в контрольном варианте, жидкой стационарной культуре, разбавленной в 3 раза, без добавления кислот, составляет около 10%

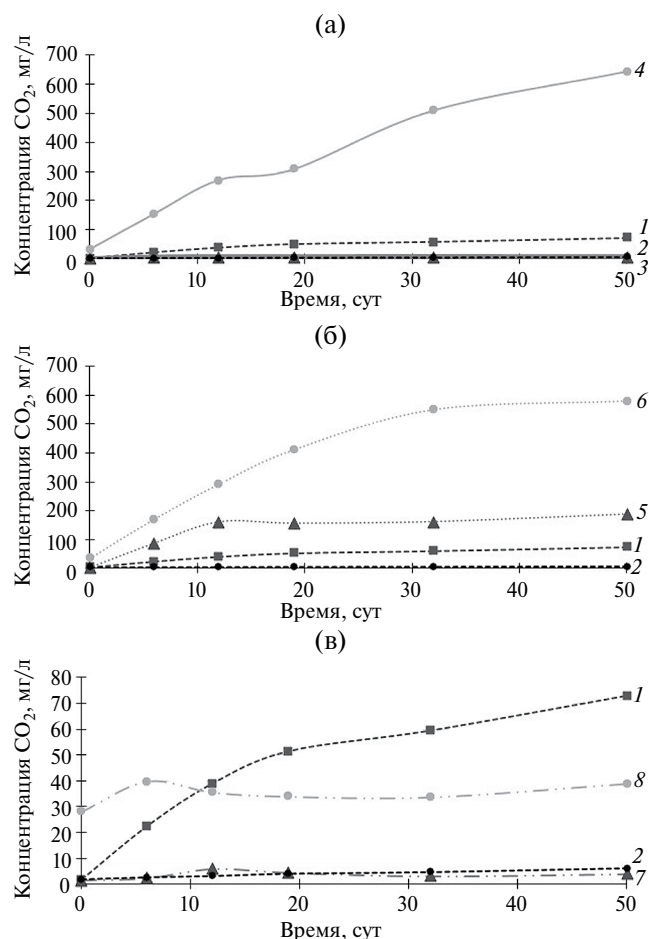


Рис. 2. Динамика накопления CO_2 клетками *E. faecium* с добавлением: а — молочной кислоты; б — аскорбиновой кислоты; в — уксусной кислоты. Цифрами обозначены: 1 — контрольная, нестабилизированная культура, хранившаяся в жидкой среде LB; 2 — культура, иммобилизованная в СГГ с соляной кислотой; 3 — нестабилизированная культура, хранившаяся в жидкой среде LB с добавлением молочной кислоты; 4 — культура, иммобилизованная в СГГ с молочной кислотой; 5 — нестабилизированная культура, хранившаяся в жидкой среде LB с добавлением аскорбиновой кислоты; 6 — культура, иммобилизованная в СГГ с аскорбиновой кислотой; 7 — нестабилизированная культура, хранившаяся в жидкой среде LB с добавлением уксусной кислоты; 8 — культура, иммобилизованная в СГГ с уксусной кислотой.

от культур в СГГ (по скорости и массе выделившегося CO_2) и обусловлено метаболизмом не полностью потребленных компонентов среды LB.

Прекращение метаболизма (выделения CO_2) на 30-е сут культурой с аскорбиновой кислотой четко коррелирует с началом отмирания культуры энтерококка (рис. 1). Аналогичная корреляция наблюдается и для молочной кислоты — продолжение метаболизма и отсутствие падения КОЕ в течение 50 сут.

Интересно отметить, что клетки жидкой (контрольной) культуры энтерококка были способны к потреблению аскорбата в течение 12 сут, после чего накопление CO_2 прекратилось, в отличие от культуры в СГГ, потреблявшей этот субстрат в течение 32 сут. Это подтверждает важность гелевого окружения для поддержания метаболизма иммобилизованных клеток.

Представляло интерес также сравнить скорости метаболизма энтерококка на разных этапах жизненного цикла его популяции в ряду: фаза экспоненциального роста на среде LB → стационарная фаза на среде LB → культура в СГГ в присутствии различных источников питания (рис. 3).

При росте на жидкой среде LB скорость выделения CO_2 составляет 60–30 мг CO_2 /ч/1 млрд. клеток (с тенденцией к снижению), после перехода в стационарную фазу роста скорость метаболизма снижается до 0.003 мг CO_2 /ч/1 млрд. клеток (в 10000 раз) (табл. 6).

Интенсивность выделения CO_2 культурой энтерококка в СГГ с добавлением лактата и аскорбата в течение первого месяца инкубации составляет 0.03 мг CO_2 /ч/1 млрд. клеток, что в 1000 раз ниже, чем при экспоненциальном росте на среде LB, но в 10 раз выше, чем на стационарной фазе. Соответственно, состояние популяции энтерококка в СГГ можно охарактеризовать как гипометаболическое, что было постулировано ранее (Nikolaev et al., 2023). Важно отметить, что в этом гипометаболическом состоянии клетки или не размножаются (во второй половине инкубации в СГГ, когда наблюдается снижение титра КОЕ), или делятся со скоростью в 100 раз ниже, чем при росте на жидкой среде LB; в период роста числа КОЕ — время удвоения *E. faecium* при росте на среде LB составляет 2 ч, а при размножении в СГГ — 200 ч. Эти данные согласуются с результатами работы (Zotta et al., 2014), где показано, что медленно растущая культура МКБ *L. plantarum* обладала повышенной стрессоустойчивостью.

Добавление аскорбата (но не лактата) к жидкой стационарной культуре лактококков повышает скорость выделения CO_2 в 10 раз (табл. 6), однако метаболизм прекращался через 10–20 сут (рис. 2), чего не наблюдали в СГГ, что является еще одним свидетельством влияния гелевого окружения на метаболизм клеток.

При сбалансированном росте процессы получения энергии (катаболизма) и накопления биомассы клеток (анаболизма) тесно сопряжены энергетически (генерация и потребление энергии соответственно) для микроорганизмов всех физиологических групп. При снижении уровня метаболизма на 3 порядка и отсутствии роста (или снижении его скорости в 200 раз) очевидно, что весь субстрат расходуется в процессах катаболизма. Снижение уровня метаболизма на несколько порядков согласуется

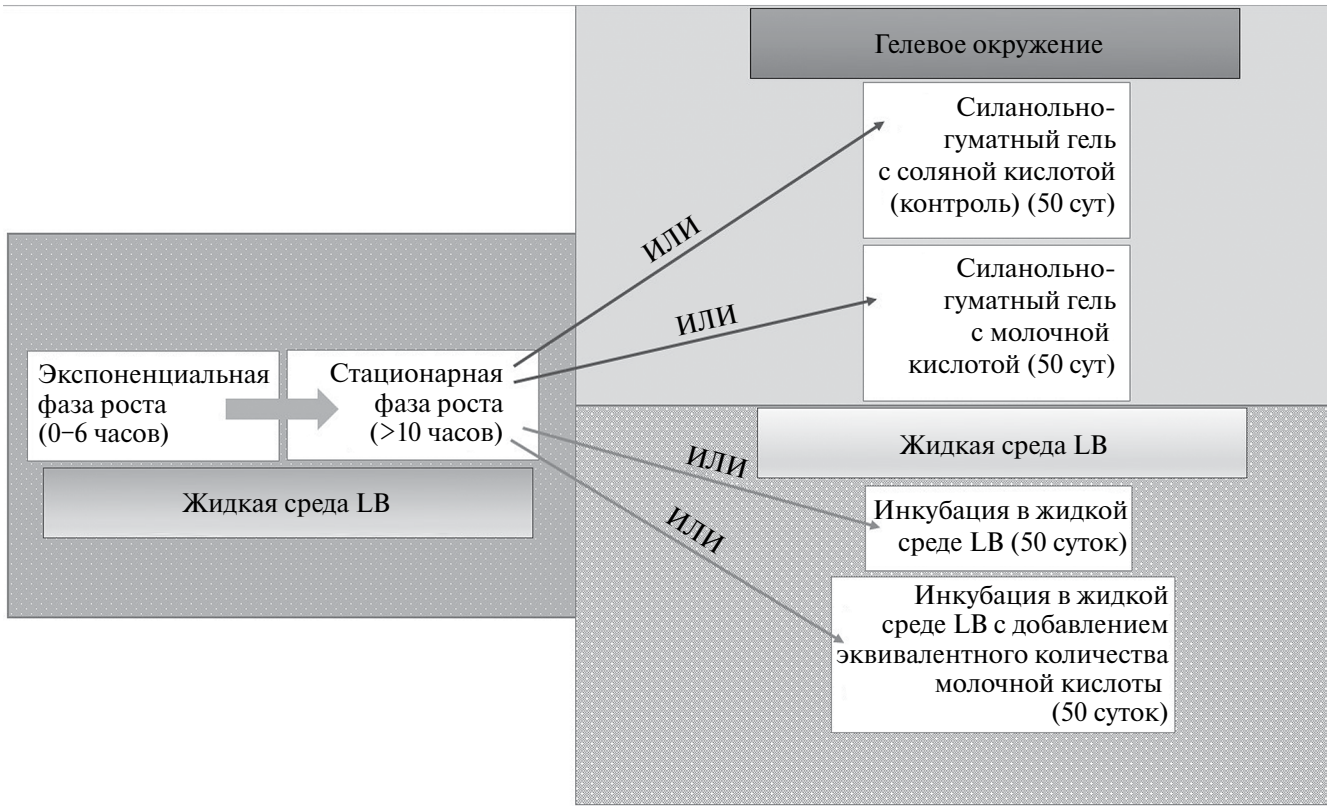


Рис. 3. Схема жизненного цикла *E. faecium* в различных условиях в присутствии различных источников питания.

Таблица 6. Скорости выделения CO₂ культурой *E. faecium* (мг CO₂/ч/1 млрд. клеток) на разных стадиях роста на среде LB и в разных условиях последующей инкубации

Условия роста и инкубации	LB					СГГ		
	Фаза жизненного цикла					1 мес.		
	Экспонен- циальная фаза	Стационарная фаза	1 мес. в среде роста	1 мес. в среде роста + лактат	1 мес. в среде роста + аскорбат	+ Лактат	+ Аскорбат	+ Соляная или уксусная кислота
Скорость метаболизма	60–30	0.003	0.003	0.0025	0.035	0.03	0.03	0

с данными о том, что базовая (минимально возможная) энергия поддержания на 3–4 порядка ниже, чем энергия, вырабатываемая клеткой при оптимальных условиях роста (Kempes et al., 2017). При этом важно учитывать, что происходит именно снижение метаболизма, а не смена его типа, как могло бы быть при переключении с дыхательного на броидильный тип обмена, т.к. *E. faecium* не способен к дыхательному обмену веществ (Pedersen et al., 2012).

Для стабильного метаболизма и выживания бактерий баланс окисленных и восстановленных метаболитов играет ключевую роль (Green, Paget, 2004; Mendes Ferreira, Mendes-Faia, 2020). В ответ

на редокс дисбаланс инициируются новые метаболические пути, например, включаются механизмы сброса излишков энергии (футильные циклы и др.) (Russel, Cook, 1995).

Такое кардинальное изменение физиологии и скорости размножения свидетельствует о смене стратегии жизни с г на К, подобно тому, как это было постулировано для углеводородокисляющих бактерий (Nikolaev et al., 2023).

Для подтверждения выводов о метаболизме органических кислот в хранящихся образцах были определены показатели pH в динамике хранения гелей (рис. 4). Для *E. faecium* (рис. 4а) было отмечено закисление среды на 30–60 сут хранения

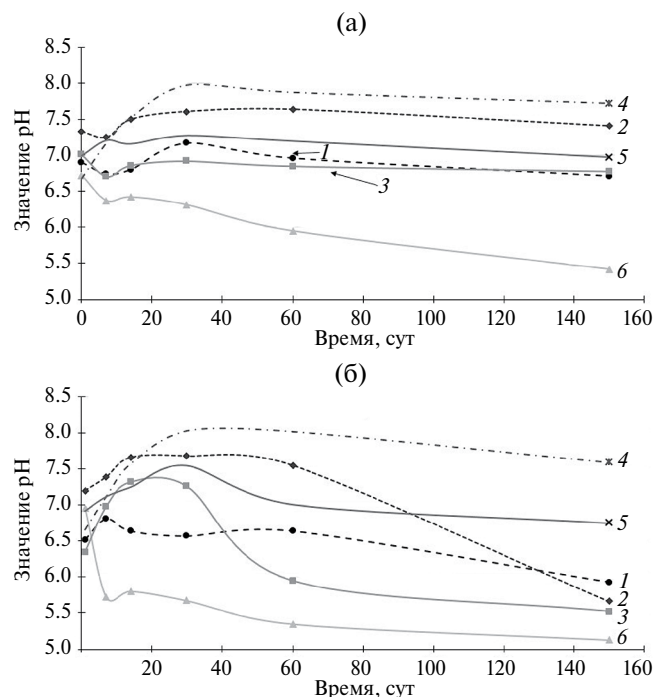


Рис. 4. Динамика изменения pH при хранении культур *E. faecium* (а) и *L. paracasei* (б), иммобилизованных в СГГ с различными кислотами. Цифрами обозначены: 1 – контрольная, нестабилизированная культура, хранявшаяся в жидкой среде LB; 2 – культура, иммобилизованная в СГГ с молочной кислотой; 3 – культура, иммобилизованная в СГГ с яблочной кислотой; 4 – культура, иммобилизованная в СГГ с лимонной кислотой; 5 – культура, иммобилизованная в СГГ с уксусной кислотой; 6 – культура, иммобилизованная в СГГ с аскорбиновой кислотой.

бактерий в образцах СГГ с аскорбиновой кислотой, и защелачивание – в образцах с лимонной кислотой. В остальных вариантах pH среды значительно не менялся.

Для *L. paracasei* так же, как и для энтерококка, отмечено закисление среды в вариантах использования аскорбиновой кислоты и защелачивание среды при использовании лимонной кислоты (рис. 4б).

Закисление среды происходит, когда из слабой кислоты образуется более сильная, из аскорбиновой – молочная, с pK_a соответственно 4.10 и 3.86. Если же при утилизации кислоты происходит снижение количества карбоксильных групп (декарбоксилирование), то pH не снижается, как это описано для яблочно-молочной ферментации, где двухосновная кислота превращается в моноосновную (Zaunmüller et al., 2006). В нашем случае повышение pH наблюдали для лимонной и молочной кислот, которые подвергаются декарбоксилированию с превращением соответственно в ацетат (Ramsey et al., 2014) и уксусную кислоту (табл. 3).

Результаты, полученные для обеих бактерий, позволяют сделать вывод о влиянии изменения pH в хранящихся образцах СГГ на уровень выживания в них клеток бактерий: в вариантах закисления гелей при хранении МКБ отмечен более высокий уровень длительно выживающих бактерий, что согласуется с ацидофильностью МКБ. Зашелачивание, наоборот, способствует быстрому отмиранию МКБ.

Влияние pH на выживаемость бактерий может объясняться тем, что в условиях недостатка источников питания (N, P) интактность клеток определяется отсутствием автолиза, в развитии которого участвуют автолизины, состоящие из нескольких групп гидролитических ферментов, мурамидаз, ацетил-глюкозаминидаз, эндопептидаз и др. (Ren et al., 2022). Очевидно, низкие значения pH неблагоприятны для активности автолизина МКБ, автолиз ингибирован, что позволяет сделать вывод о необходимости использования в качестве титрантов тех кислот, при которых происходит закисление среды.

Ранее была показана обратная связь скорости роста и плотности биомассы с одной стороны, со скоростью автолиза МКБ с другой (Amrane et al., 1998; Pang et al., 2017). При низкой плотности биомассы автолиз отсутствовал, при высокой – был очень быстрым и массовым. Это согласуется с нашим предположением о причине отсутствия автолиза: низкая плотность клеток и невозможность их оседания (и, соответственно, концентрирования) тормозит или предотвращает автолиз.

Известно, что эндогенным фактором, индуцирующим автолитические процессы разрушения клеток, является критическое повышение в среде бактериальной культуры индукторов автолиза – ненасыщенных жирных кислот (Эль-Регистан и соавт., 1983; Светличный и соавт., 1986; Бухарин и соавт., 2005). Одновременно с накоплением ненасыщенных жирных кислот в сгущенных культурах или бактериальных осадках повышается концентрация аутоиндукторов анабиоза, под действием которых оставшиеся интактными нелизированные клетки приобретают состояние метаболического покоя (Эль-Регистан и соавт., 1983; Светличный и соавт., 1986; Мулюкин и соавт., 1996а, 1996б). Поэтому в сгущенных бактериальных осадках интенсифицируются процессы как автолиза ординарных вегетативных клеток, так и созревания анабиотических покоящихся форм (Мулюкин и соавт., 1996б; Бухарин и соавт., 2005; Мулюкин и соавт., 2009). В наших экспериментах с СГГ подобные условия практически не создавались за счет невозможности осаждения или сближения клеток, что препятствовало массовому автолизу и образованию покоящихся форм. Дополнительной причиной снижения концентрации факторов автолиза были высокие сорбционные свойства СГГ, изначально

созданного именно как эффективный сорбент (Volikov et al., 2016; Воликов и соавт., 2018).

Подтверждение того, что длительное выживание бактерий в СГГ обусловлено не только наличием дополнительного субстрата, но и образованием нового стрессоустойчивого фенотипа, вызванного нахождением клеток в геле, было получено в следующих экспериментах.

Планктонные культуры бактерий стационарной фазы роста (контроль) разбавляли стерильной водой в 3 раза, чтобы довести численность титра КОЕ до значений этого показателя в СГГ. После этого добавляли нейтрализованные органические кислоты в концентрации, эквивалентной концентрации каждой кислоты в СГГ (см. Материалы и методы исследования), и инкубировали в течение 30 сут, а затем определяли численность выживших клеток. Как следует из данных, представленных на рис. 5,

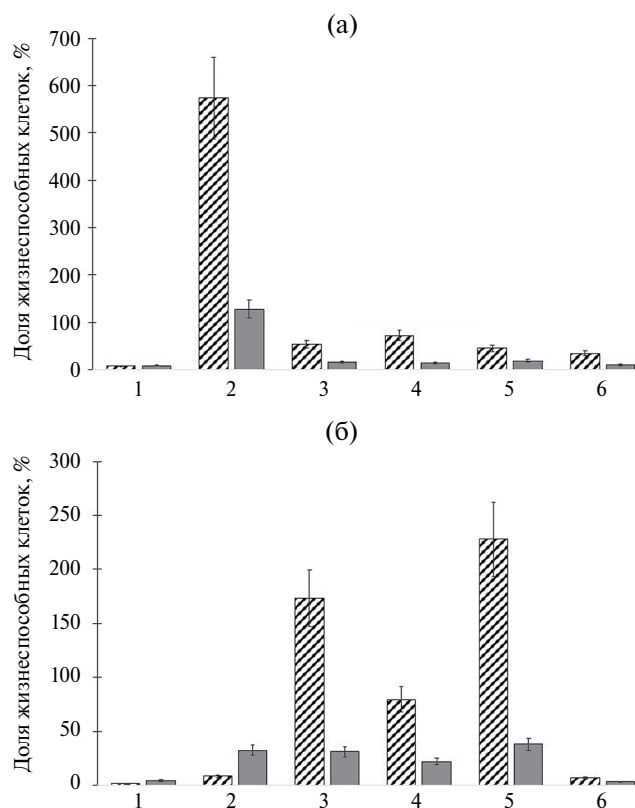


Рис. 5. Доля (% от контроля) жизнеспособных клеток популяции *E. faecium* (а) и *L. paracasei* (б) в контрольном (без добавления кислот) и опытных вариантах с внесением органических кислот – в СГГ (столбцы со штриховкой) и среду роста бактерий LB (столбцы со сплошной заливкой), хранившиеся 30 сут. Цифрами обозначены: 1 – контроль; 2 – образцы с добавлением аскорбиновой кислоты; 3 – образцы с добавлением яблочной кислоты; 4 – образцы с добавлением молочной кислоты; 5 – образцы с добавлением лимонной кислоты; 6 – образцы с добавлением уксусной кислоты.

для обеих планктонных культур во всех вариантах наблюдалось отмирание клеток, однако численность выживающих клеток во всех вариантах опытов несколько выше, чем в контроле без добавления кислот для обоих штаммов МКБ.

Наихудшие результаты были в вариантах с уксусной кислотой. В присутствии аскорбата культура энтерококка сохраняла титр КОЕ на исходном уровне, что согласуется с повышенным уровнем метаболизма в присутствии этой кислоты в течение 30 сут (рис. 2).

Морфотипы выживания молочнокислых бактерий в СГГ были определены при электронномикроскопическом исследовании их ультраструктурной организации.

На рис. 6 приведены микрофотографии клеток планктонной культуры *E. faecium*, а на рис. 7 – иммобилизованных клеток в СГГ.

После инкубирования в течение 24 ч в жидкой питательной среде LB они имели типичное для стационарных клеток строение, характеризовались равномерно-электронно-плотной цитоплазмой, наличием типичной клеточной стенки грамположительного типа (рис. 6а). Через 1 мес. хранения клеток в жидкой среде LB часть из них автолизировалась (рис. 6б, 6в); часть находилась в процессе автолиза, часть клеток имели высокоплотную цитоплазму и утолщенную клеточную стенку, что свойственно покоящимся формам (ПФ) (рис. 6в).

Через 1 мес. хранения культур энтерококка, иммобилизованных в СГГ с аскорбиновой, молочной

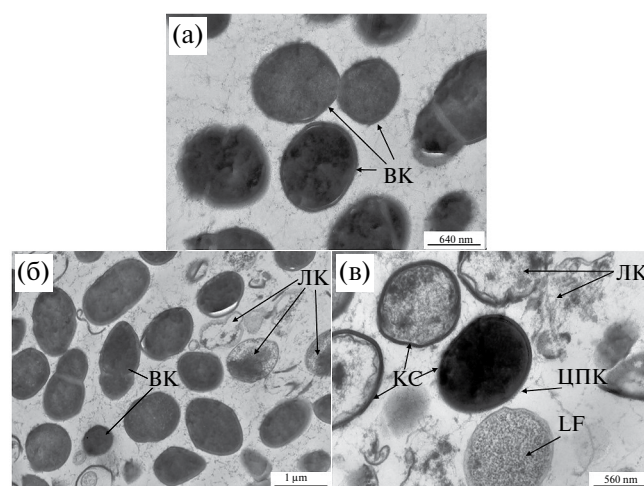


Рис. 6. Микрофотографии (просвечивающая электронная микроскопия) клеток *E. faecium*: а – клетки стационарной фазы роста в жидкой среде LB; б – клетки, выращенные в среде LB, после 30 сут хранения в той же среде, общий вид; в – то же, что и б, укрупненно. Обозначения: ВК – вегетативные клетки; ЛК – лизированные клетки; ЦПК – цистоподобная покоящаяся клетка; ЛФ – L-форма.

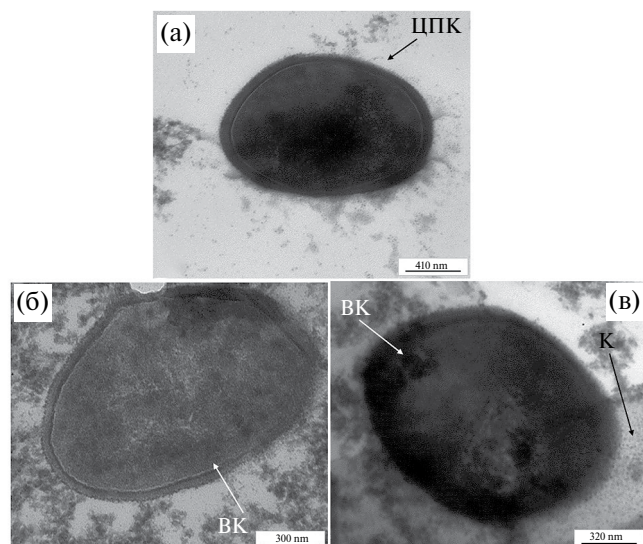


Рис. 7. Микрофотографии (просвечивающая электронная микроскопия) клеток *E. faecium*, хранившихся в течение 1 мес. в СГГ: а – с аскорбиновой кислотой, укрупненно; б – с молочной кислотой; в – с уксусной кислотой. Обозначения: ВК – вегетативная клетка; ЦПК – цистоподобная покаяющаяся клетка; К – капсула.

или уксусной кислотой (рис. 7), в геле были видны сохранившие интактность клетки, расположенные по отдельности. Некоторые из них окружены чехлом (капсулой) не полисахаридной природы (т.к. материал капсулы не окрашивается красителем на углеводы – рутением красным) (рис. 7в). Ультраструктура части выживших клеток сходна со структурой вегетативных клеток стационарной фазы роста (рис. 7б, 7в), часть из них соответствовала формам покоя (рис. 7а). Лизированных клеток не было обнаружено.

Аналогичные закономерности отмечены при анализе ультраструктурных изменений стационарных и хранящихся 1 мес. клеток планктонной культуры *L. paracasei* (контроль) (рис. 8).

В контрольной культуре возраста 1 мес. обнаруживаются редкие интактные клетки с хорошо организованной электронно-плотной цитоплазмой и утолщенной клеточной стенкой, что свойственно покаявшимся формам бактерий (рис. 8б, 8в). После 1 мес. хранения в СГГ с яблочной или уксусной кислотой некоторые клетки лактобацилл были окружены слабо выраженной неокрашенной капсулой (рис. 9). Часть клеток по ультраструктуре были схожи со стационарными клетками, а часть соответствовала толстостенным покаявшимся клеткам. Лизированных клеток не выявлено.

Отсутствие автолизированных и наличие интактных клеток, близких по ультраструктуре метаболически активным, совокупно с данными о сохранении метаболической активности,

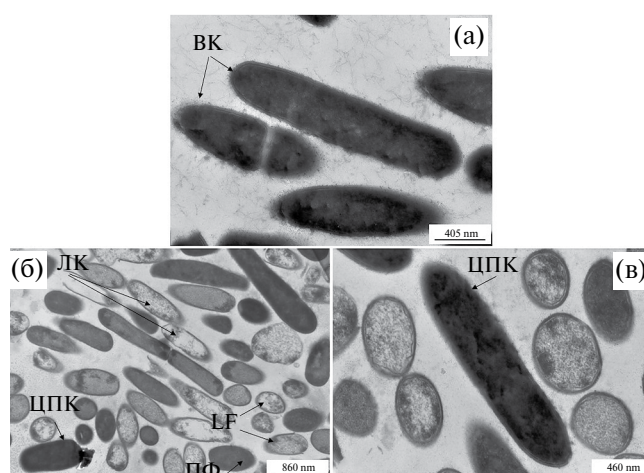


Рис. 8. Микрофотографии (просвечивающая электронная микроскопия) клеток *L. paracasei*: а – клетки стационарной фазы роста в жидкой среде LB; б – клетки, выращенные в среде LB, после 30 сут хранения в той же среде, общий вид; в – то же, что и б, укрупненно. Обозначения: СК – стационарные клетки; ЛК – лизированные клетки; ЦПК – цистоподобная покаяющаяся клетка; ЛФ – L-форма.

предполагают, что основной формой длительного выживания МКБ в СГГ являются клетки нового фенотипа, характеризующиеся гипометаболизмом. Этот фенотип альтернативен доминантному и образуется в результате переноса в СГГ клеток исходного фенотипа.

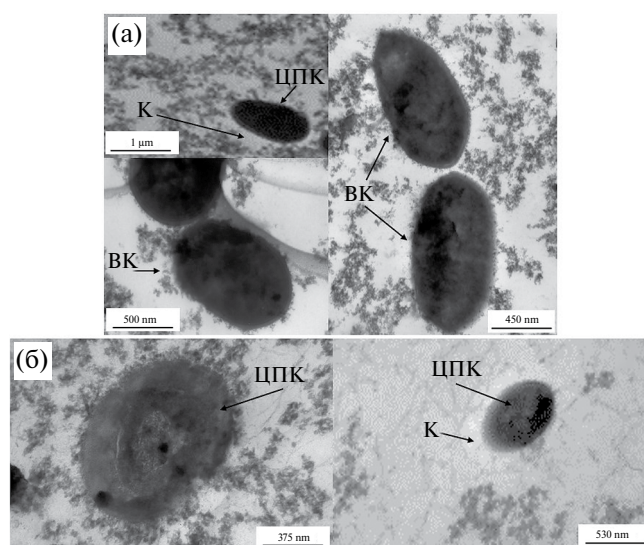


Рис. 9. Микрофотографии (просвечивающая электронная микроскопия) клеток *L. paracasei*, хранившихся в течение 1 мес. в СГГ: а – с яблочной кислотой; б – с уксусной кислотой. Обозначения: ВК – стационарная клетка; ЦПК – цистоподобная покаяющаяся клетка; К – капсула.

Одной из важнейших характеристик форм покоя является их повышенная (относительно вегетативных клеток) терморезистентность. Содержание терморезистентных клеток в культурах *E. faecium* и *L. paracasei* стационарной фазы роста находилось на уровне 0.8%, а через 3 мес. инкубации — на уровне 3%, что соответствовало численности длительно выживающих покоящихся клеток цистоподобного типа, отмеченной нами ранее для бактерий разных таксонов, в том числе — для МКБ (Мулюкин и соавт., 1996б; Голод и соавт., 2009). Возрастание титра терморезистентных клеток в контрольном варианте отражает увеличение количества покоящихся клеток.

Помещение клеток обеих культур в гель с содержанием разных кислот повышало количество терморезистентных клеток в 2–12 раз с первого дня инкубации, что указывает на их переход в физиологическое состояние с повышенной терморезистентностью (табл. 7).

Это наблюдение согласуется с ранее сделанным предположением, что при иммобилизации в гель клетки переходят в биопленочный фенотип

с повышенной стрессоустойчивостью (Zur et al., 2016; Nikolaev et al., 2023). Наблюдаемое развитие терморезистентности при переносе клеток жидкой культуры в гель не может быть результатом образования ЦПК, т.к. образование специализированных покоящихся форм — длительный процесс, занимающий несколько недель (Эль-Регистан и соавт., 1983; Светличный и соавт., 1986; Мулюкин и соавт., 1996а, 1996б; Бухарин и соавт., 2005; Мулюкин и соавт., 2009). В вариантах хранения культур в СГГ в течение 3 мес., как правило, не происходило повышения доли терморезистентных клеток, что хорошо согласуется с нахождением основной части популяции в метаболически активном состоянии. В двух случаях наблюдали повышение доли терморезистентных клеток — в присутствии уксусной и аскорбиновой кислот. В первом случае добавленный субстрат был неметаболизируемым, а во втором — самым быстро утилизируемым; в обоих случаях, очевидно, клетки в отсутствие источников углерода сформировали покоящиеся формы, что подтверждено электронно-микроскопическими исследованиями.

Таблица 7. Доля терморезистентных клеток (%) *E. faecium* и *L. paracasei* (% по отношению к 100% жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) до прогревания) на 1 и 90 сут инкубирования

Образец	Время, сут	КОЕ/мл до прогрева	КОЕ/мл после прогрева	Доля терморезистентных клеток (%)
<i>E. faecium</i>				
Контроль (в среде LB)	1	3.82×10^8	3.06×10^6	0.8
	90	3.92×10^6	1.20×10^5	3.06
СГГ с аскорбиновой кислотой	1	7.86×10^7	3.86×10^6	4.91
	90	2.94×10^4	0	0
СГГ с молочной кислотой	1	2.00×10^8	4.06×10^6	2.03
	90	3.44×10^6	8.40×10^4	2.44
СГГ с уксусной кислотой	1	8.74×10^7	4.50×10^6	5.15
	90	2.46×10^6	4.26×10^4	1.73
СГГ с соляной кислотой	1	5.68×10^7	3.40×10^6	5.99
	90	1.14×10^6	2.14×10^4	1.88
<i>L. paracasei</i>				
Контроль (в среде LB)	1	1.58×10^7	1.22×10^5	0.77
	90	6.08×10^5	1.84×10^4	3.03
СГГ с аскорбиновой кислотой	1	2.36×10^7	1.80×10^5	0.76
	90	2.60×10^6	6.12×10^4	2.35
СГГ с яблочной кислотой	1	1.62×10^7	1.50×10^6	9.26
	90	4.42×10^7	7.20×10^5	1.63
СГГ с уксусной кислотой	1	1.90×10^7	3.38×10^5	1.78
	90	3.46×10^4	4.00×10^3	11.56
СГГ с соляной кислотой	1	1.08×10^7	1.14×10^5	1.06
	90	3.20×10^3	0	0

Таким образом, на основе полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1) Впервые доказана целесообразность использования органических кислот как титрантов при приготовлении СГГ с целью длительного хранения в них клеток МКБ;

2) Эффективность органических кислот, определяемая по уровню выживания молочнокислых бактерий в СГГ, варьировала в зависимости от вида бактерии, сроков хранения и типа кислоты. При среднесрочном хранении наилучшие результаты были получены при использовании аскорбиновой, яблочной и молочной кислот; при длительном хранении – при использовании аскорбиновой кислоты;

3) Высокая выживаемость молочнокислых бактерий в СГГ обусловлена:

а) потреблением органических кислот как источника энергии, используемого для поддержания жизнеспособности клеток МКБ;

б) закислением среды в ходе хранения бактерий;

в) наличием покоящихся клеток.

4) Длительно выживающие в СГГ бактерии представлены смешанной популяцией метаболически активных клеток альтернативного фенотипа, образовавшегося в результате переноса в СГГ клеток исходного фенотипа, а также анабиотических клеток доминантного фенотипа, засеянных в СГГ, сформировавшихся в ходе инкубации в геле;

5) Разрозненное одиночное распределение клеток, иммобилизованных в матрице геля, препятствует повышению концентрации внеклеточных ауторегуляторов автолиза и индукторов перехода в анабиоз до критически высокого уровня, в противоположность тому, как это имеет место в планктонных или биопленочных культурах;

6) Выживание расположенных поодиночке клеток МКБ в матрице геля, видимо, индуцирует их переход в биопленочный фенотип без дальнейшего развития собственно биопленки, чему препятствует жесткая матрица геля, что будет проведено в наших дальнейших исследованиях.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 24-24-20062).

БЛАГОДАРНОСТИ

Электронно-микроскопические исследования выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования ФИЦ Биотехнологии РАН “Коллекция микроорганизмов UNIQEM”, часть материалов для исследования предоставлена ООО “Бавар+”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005. 367 с.
- Воликов А.Б. Синтез, свойства и применение силанольных производных гуминовых веществ для минимизации последствий загрязнения окружающей среды. Автореферат дис. ... канд. хим. наук. 03.02.08. М.: МГУ имени М.В. Ломоносова, 2018. 157 с.
- Голод Н.А., Лойко Н.Г., Мулюкин А.Л., Нейматов А.Л., Воробьева Л.И., Сузина Н.Е., Шаненко Е.Ф., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Адаптация молочнокислых бактерий к неблагоприятным для роста условиям // Микробиология. 2009. Т. 78. С. 317–327.
- Golod N.A., Loiko N.G., Mulyukin A.L., Gal'chenko V.F., El-Registan G.I., Neiyamatov A.L., Vorobjeva L.I., Suzina N.E., Shanenko E.F. Adaptation of lactic acid bacteria to unfavorable growth conditions // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 280–289.
- Иммобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы. Под ред. Ефременко Е.Н. М.: РИОР, 2018. 499 с.
- Лойко Н.Г., Краснова М.А., Пичугина Т.В., Гриневич А.И., Ганина В.И., Козлова А.Н., Николаев Ю.А., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Изменение диссоциативного спектра популяций молочнокислых бактерий при воздействии антибиотиков // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 284–294.
- Loiko N.G., Krasnova M.A., Pichugina T.V., Grinevich A.I., Ganina V.I., Kozlova A.N., Nikolaev Yu.A., Gal'chenko V.F., El'-Registan G.I. Changes in the phase variant spectra in the populations of lactic acid bacteria under antibiotic treatment // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 195–204.
- Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Капрельянц А.С., Эль-Регистан Г.И. Обнаружение и изучение динамики накопления ауторегуляторного фактора d_1 в культуральной жидкости и клетках *Micrococcus luteus* // Микробиология. 1996а. Т. 65. № 1. С. 20–25.
- Mulyukin A.L., Kozlova A.N., Kaprel'yants A.S., El'-Registan G.I. The d_1 autoregulatory factor

- in *Micrococcus luteus* cells and culture liquid: detection and accumulation dynamics // Microbiology (Moscow). 1996a. V. 65. P. 15–20.
- Мулюкин А.Л., Луста К.А., Грязнова М.Н., Бабусенко Е.С., Козлова А.Н., Дужа М.В., Дуда В.И., Эль-Регистан Г.И. Образование покоящихся форм *Bacillus cereus* и *Micrococcus luteus* // Микробиология. 1996b. Т. 65. С. 782–789.
- Mulyukin A. L., Lusta K. A., Gryaznova M. N., Kozlova A. N., Duzha M. V., Duda V. I., El'-Registan G. I. Formation of resting cells by *Bacillus cereus* and *Micrococcus luteus* // Microbiology (Moscow). 1996b. V. 65. P. 683–689.
- Мулюкин А.Л., Сузина Н.Е., Мельников В.Г., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Состояние покоя и фенотипическая вариабельность у *Staphylococcus aureus* и *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* // Микробиология. 2014. Т. 83. С. 15–27.
- Mulyukin A. L., Suzina N. E., Mel'nikov V. G., Gal'chenko V. F., El'-Registan G. I. Dormant state and phenotypic variability of *Staphylococcus aureus* and *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* // Microbiology (Moscow). 2014. V. 83. P. 149–159.
- Мулюкин А.Л., Сузина Н.Е., Погорелова А.Ю., Антонюк Л.П., Дуда В.И., Эль-Регистан Г.И. Разнообразие морфотипов покоящихся клеток и условия их образования у *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2009. Т. 78. № 1. С. 42–52.
- Mulyukin A. L., Pogorelova A. Yu., El'-Registan G. I., Suzina N. E., Duda V. I., Antonyuk L. P. Diverse morphological types of dormant cells and conditions for their formation in *Azospirillum brasilense* // Microbiology (Moscow). 2009. V. 78. P. 33–41.
- Николаев Ю.А., Борзенков И.А., Демкина Е.В., Лойко Н.Г., Канапатский Т.А., Перминова И.В., Хрептугова А.Н., Григорьева Н.В., Близнац И.В., Манучарова Н.А., Сорокин В.В., Коваленко М.А., Эль-Регистан Г.И. Новые биоконкомпозитные материалы, включающие углеводородокисляющие микроорганизмы, и их потенциал для деградации нефтепродуктов // Микробиология. 2021. Т. 90. № 6. С. 692–705.
- Nikolaev Yu. A., Borzenkov I. A., Demkina E. V., Loiko N. G., Kanapatskii T. A., Perminova I. V., Khreptugova A. N., Grigor'eva N. V., Bliznets I. V., Manucharova N. A., Sorokin V. V., Kovalenko M. A., El'-Registan G. I. New biocomposite materials based on hydrocarbon-oxidizing microorganisms and their potential for oil products degradation // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 731–742.
- Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Под ред. Нетрусова А.И. М.: Издательский центр "Академия", 2005. 608 с.
- Светличный В.А., Романова А.К., Эль-Регистан Г.И. Изучение количественного содержания мембраноактивных ауторегуляторов при литоавтотрофном росте *Pseudomonas carboxydoflava* // Микробиология. 1986. Т. 55. С. 55–59.
- Соляникова И.П., Сузина Н.Е., Егозарьян Н.С., Полищев В.Н., Мулюкин А.Л., Егорова Д.О., Эль-Регистан Г.И., Головлева Л.А. Особенности структурно-функциональных перестроек клеток актинобактерий BN52 при переходе от вегетативного роста в состояние покоя и при прорастании покоящихся форм // Микробиология. 2017. Т. 86. № 4. С. 463–475.
- Solyanikova I. P., Suzina N. E., Egozarjan N. S., Polivtseva V. N., Golovleva L. A., Mulyukin A. L., El'-Registan G. I., Egorova D. O. Structural and functional rearrangements in the cells of actinobacteria *Microbacterium foliorum* BN52 during transition from vegetative growth to a dormant state and during germination of dormant forms // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 476–486.
- Эль-Регистан Г.И., Дуда В.И., Светличный В.А., Козлова А.Н., Тупицева И.В. Динамика ауторегуляторных факторов в периодических культурах *Pseudomonas carboxydoflava* и *Bacillus cereus* // Микробиология. 1983. Т. 52. № 2. С. 238–243.
- Эль-Регистан Г.И., Земскова О.В., Галуза О.А., Уланова Р.В., Ильичева Е.А., Ганнесен А.В., Николаев Ю.А. Влияние гормонов и биогенных аминов на рост и выживание *Enterococcus durans* // Микробиология. 2023. Т. 92. № 4. С. 376–395.
- El'-Registan G. I., Zemskova O. V., Galuza O. A., Ulanova R. V., Il'icheva E. A., Gannesen A. V., Nikolaev Yu. A. Effect of hormones and biogenic amines on growth and survival of *Enterococcus durans* // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. P. 517–533.
- Amrane A., Prigent Y. Influence of yeast extract concentration on batch cultures of *Lactobacillus helveticus*: growth and production coupling // World J. Microbiol. Biotechnol. V. 14. P. 529–534.
- Aydin S. S., Denek N. Determination of lactic acid bacterial numbers of lyophilized or frozen natural lactic acid bacterial liquids prepared with different methods and stored for different times // Kocatepe Veter. J. 2024. V. 17. P. 29–41.
- Galuza O. A., Kovina N. E., Korotkov N. A., Nikolaev Y., El'-Registan G. Long-term survival of bacteria in gels // Microbiology (Moscow). 2023. V. 92. Suppl. 1. P. S17–S21.
- Gaudu P., Vido K., Cesselin B., Kulakauskas S., Tremblay J., Rezaiki L., Lamberret G., Sourice S., Duwat P., Gruss A. // Respiration capacity and consequences in *Lactococcus lactis* / Eds. Siezen R. J., Kok J., Abbe T., Schasfsma G. Dordrecht: Springer, 2002. V. 82. P. 263–269.
- Green J., Paget M. S. Bacterial redox sensors // Nature Rev. Microbiol. 2004. V. 2. P. 954–966.
- Herrgard M. J., Swainston N., Dobson P., Dunn W. B., Arga K. Y., Arvas M., Bluthgen N., Borger S., Costenoble R., Heinemann M., Hucka M., Le Novère N., Li P., Liebermeister W., Mo M. L., Oliveira A. P., Petranovic D., Pettifer S., Simeonidis E., Smallbone K., Spasic I., Weichart D., Brent R., Broomhead D. S., Westerhoff H. V.,

- Kirdar B., Penttilä M., Klipp E., Palsson B.O., Sauer U., Oliver S.G., Mendes P., Nielsen J., Kell D.B. A consensus yeast metabolic network reconstruction obtained from a community approach to systems biology // *Nature Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 1155–1160.
- Kempes C.P., van Bodegom P.M., Wolpert D., Libby E., Amend J., Hoehler T. Drivers of bacterial maintenance and minimal energy requirements // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 31. P. 8–18.
- Khalisanni K. An overview of lactic acid bacteria // *Int. J. Biosci.* 2011. V. 1. № 3. P. 1–13.
- Lamont J., Wilkins O., Bywater-Ekegård M., Smith D. From yogurt to yield: potential applications of lactic acid bacteria in plant production // *Soil Biol. Biochem.* 2017. V. 111. P. 1–9.
- Leblanc D.J. // *Enterococcus* / Eds. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. N.Y.: Springer, 2006. P. 175–204.
- Linko P., Stenroos S.L., Linko Y.Y., Koistinen T., Harju M., Heikonen M. Applications of immobilized lactic acid bacteria // *Ann. NY Acad. Sci.* 2006. V. 434. P. 406–417.
- Mehmeti I., Solheim M., Nes I.F., Holo H. *Enterococcus faecalis* grows on ascorbic acid // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. P. 4756–4758.
- Mendes Ferreira A., Mendes-Faia A. The role of yeasts and lactic acid bacteria on the metabolism of organic acids during winemaking // *Foods.* 2020. V. 9. P. 1231–1250.
- Mitropoulou G., Nedovic V., Goyal A., Kourkoutas Y. Immobilization technologies in probiotic food production // *J. Nutrit. Metab.* 2013. № 5. P. 1–15. <https://doi.org/10.1155/2013/716861>
- Morgan C.A., Herman N., White P.A., Vesey G. Preservation of microorganisms by drying: a review // *J. Microbiol. Meth.* 2006. V. 66. P. 183–193.
- Ng E.W., Yeung M., Tong P.S. Effects of yogurt starter cultures on the survival of *Lactobacillus acidophilus* // *Int. J. Food Microbiol.* 2011. V. 145. P. 169–175.
- Nikolaev Y.A., Demkina E.V., Ilicheva E.A., Kanapatskiy T.A., Borzenkov I.A., Ivanova A.E., Tikhonova E.N., Sokolova D.S., Ruzhitsky A.O., El-Registan G.I. Ways of Long-term survival of hydrocarbon-oxidizing bacteria in a new biocomposite material – silanol-humate gel // *Microorganisms.* 2023. V. 11. P. 1133–1152.
- Pang X., Zhang S., Lu J., Liu L., Ma C., Yang Y., Ti P., Gao W., Lv J. Identification and functional validation of autolysis-associated genes in *Lactobacillus bulgaricus* ATCC BAA-365 // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 1367. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01367>
- Pedersen M.B., Gaudu P., Lechardeur D., Petit M.A., Gruss A. Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses in biotechnology // *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2012. V. 3. P. 37–58.
- Pious T., Aparna S., Reshmi U., Mubashar M., Sadiq P. Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast CFU enumeration and single colony isolation from diverse samples // *Biotechnol. Rep.* 2015. V. 8. P. 45–55.
- Radler F., Brihl K. The metabolism of several carboxylic acids by lactic acid bacteria // *Z Lebensm Unters Forsch.* 1984. V. 179. P. 228–231.
- Ramsey M., Hartke A., Huycke M. The physiology and metabolism of Enterococci // *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection* / Eds. Gilmore M., Clewell D.B., Ike Y., Shankar N. / Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014. P. 1–55.
- Ren K., Wang Q., Hu M., Chen Y., Xing R., You J., Xu M., Zhang X., Rao Z. Research progress on the effect of autolysis to *Bacillus subtilis* fermentation bioprocess // *Fermentation.* 2022. V. 8. P. 685–701.
- Russell J.B., Cook G.M. Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions // *Microbiol. Rev.* 1995. V. 59. P. 48–62.
- Salminen S., Wright V., Ouwehand A. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects // *Braz. J. Pharm. Sci.* 2004. V. 42. P. 473–474.
- Shin H.J., Lee J., Pestka J., Ustunol Z.P. Viability of bifidobacteria in commercial dairy products during refrigerated storage // *J. Food Protect.* 2000. V. 63. P. 327–331.
- Volikov A., Ponomarenko S., Gutsche A., Nirschl H., Hatfield K., Perminova I. Targeted design of water-based humic substances-silsesquioxane soft materials for nature-inspired remedial // *RSC Adv.* 2016. V. 6. P. 48222–48230.
- Zaunmüller T., Eichert M., Richter H., Uden G. Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 72. P. 421–429.
- Zotta T., Ianniello R.G., Guidone A., Parente E., Ricciardi A. Selection of mutants tolerant of oxidative stress from respiratory cultures of *Lactobacillus plantarum* C17 // *J. Appl. Microbiol.* 2014. V. 116. P. 632–643.
- Zur J., Wojcieszynska D., Guzik U. Metabolic responses of bacterial cells to immobilization // *Molecules.* 2016. V. 21. P. 958–973.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Mechanisms of Survival of Lactic Acid Bacteria in Silanol-Humate Gels with Organic Acids

O. A. Galuza^{1, 2, *}, G. I. El-Registan¹, A. V. Vishnyakova¹, Yu. A. Nikolaev¹

¹*S. N. Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology"
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071, Russia*

²*ООО "Bavar+", Moscow, 127206, Russia*

**e-mail: olesya_galuza@mail.ru*

Abstract. Bacterial survival under unfavorable growth conditions is one of the fundamental problems of microbiology. The applied aspect of this problem – long-term preservation of bacterial cell viability – is of particular importance for storage of lactic acid bacteria due to the biotechnological significance of this group of microorganisms and their high rates of death during long-term storage. The aim of this study was to investigate the long-term survival of lactic acid bacteria of different physiological groups (heterofermentative *Enterococcus faecium* M3185 and homofermentative *Lactobacillus paracasei* AK 508) in silanol-humate gels (SHG) containing various organic acids used as titrants in obtaining SHG (malic, lactic, acetic, ascorbic, citric). Placing cells in CHG with organic acids resulted in a significant increase in the titer of viable cells relative to the control during long-term storage (up to 200 times) and depended on the bacterial culture, the acid used and the storage period (up to 5 months). The experimentally proven reasons for the long-term survival of bacteria in CHG are: 1) most of the cells are in a state of hypometabolism and consume organic acids, which is evidenced by a decrease in their concentration during storage, as well as by the release of CO₂ in the case of *E. faecium* (in this case, the metabolic rate is 1000 times lower than that of growing cells); 2) the absence of mass autolysis of cells, which is presumably due to the "disunity" of the cells in the gel and the impossibility of creating sufficient concentrations of autoregulators and autolysis enzymes; 3) some of the cells are in a state of rest, in the form of stress-resistant cyst-like cells. There is also reason to believe that when transferred to a gel, an alternative (biofilm) phenotype is formed, which has increased stress resistance. The results obtained indicate the feasibility of immobilizing lactic acid bacteria cells in SGG with organic acids for long-term storage.

Keywords: lactic acid bacteria, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus paracasei*, bacterial immobilization, bio-preparations, silanol-humate gel, forms and survival mechanisms