

На правах рукописи

Пахомов Юрий Дмитриевич

**ПОЛУЧЕНИЕ, ДЕТЕКЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА
НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК БАКТЕРИЙ**

03.02.03 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении “Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова” Российской академии медицинских наук.

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор,

Блинкова Лариса Петровна

Федеральное государственное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Российской академии медицинских наук, заведующий лабораторией микробиологических питательных сред

доктор биологических наук,

старший научный сотрудник,

Стоянова Лидия Григорьевна

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра микробиологии, старший научный сотрудник

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,

Ушакова Нина Александровна

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова» Российской академии наук зав. лабораторией инновационных технологий

кандидат биологических наук,

Загустина Наталья Алексеевна

Федеральное государственное учреждение науки «Институт биохимии им. А.Н. Баха» Российской академии наук, старший научный сотрудник лаборатории инженерной энзимологии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ

Защита состоится «26» ноября 2013 г. в 15-30 на заседании диссертационного совета Д 501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, ауд. М-1.

Тел. 8 (495) 939-54-83, эл. почта: npiskunkova@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Автореферат разослан «25» октября 2013

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Пискункова Н.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Известно, что в неблагоприятных условиях естественной или искусственной среды обитания неспорообразующие микроорганизмы подвергаются стрессу (трофический, температурный, окислительный и другие виды стресса), результатом которого является образование клетками некультивируемых форм (Oliver J.D. 1995; 2010; Эль-Регистан Г.И. и др., 2006, Ganesan B. et al., 2007; Lahtinen S.J. et al., 2008; Романова Ю.М., 2010; Hoefman S. et al., 2012; Ушакова Н. А. и др., 2012). При этом возникает необходимость максимального замедления метаболизма для экономии ресурсов, что обеспечивает переживание неблагоприятного периода. Также причиной потери способности к образованию колоний может быть длительное нахождение в олиготрофных условиях, что приводит к замедлению метаболизма и появлению высокоаффинных транспортных белков для лучшего поглощения скудных субстратов (Albertson H.N. et al., 2005). При попадании на богатые среды в такой клетке после индукции метаболизма происходит накопление питательных веществ в концентрациях, которые нарушают жизнедеятельность голодавшего микроорганизма. Это явление описано в литературе под термином «субстрат–ускоренная гибель клеток» (Postgate J.R., Hunter J.R. 1964, Strange R.E., Dark F.A. 1965, Mulyukin A.L. et al., 2009). При этом клетки, выходя из пролиферативного цикла, сохраняют потенциальную возможность вернуться к активному росту и размножению. За таким состоянием обратимой потери культивируемости закрепился термин «жизнеспособное, но некультивируемое» (viable but non culturable – VBNC) (Oliver J.D. 1995; 2005; 2010). Выявление микроорганизмов, находящихся в некультивируемом состоянии (НС) в окружающей среде, организме человека и животных, в пищевых продуктах и др. является важным направлением микробиологических исследований. Некоторые микроорганизмы образуют некультивируемые формы (НФ) только под воздействием специфического комплекса стрессов. Каждый из них или последовательное их действие обуславливает принципиально другие результаты (Chen S.Y. et al., 2008, Lai C.J. et al., 2009). Некультивируемые клетки (НК) сохраняют низкий уровень метаболизма и АТФ, в них синтезируются белки устойчивости к различным видам стресса. НК приобретают повышенную устойчивость к условиям внешней среды, лекарственным средствам и др. Многие виды в НС сохраняют активность факторов вирулентности. При изучении различных микроорганизмов следует также учитывать, что возможность образования НФ и скорость этого процесса зависят от штамма. Такие данные опубликованы в отношении *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis* и др. (Tholozan J.L. et al., 1999, Asakura H., et al., 2008, Ganesan B. et al., 2007). Например, для *E. coli* показано, что, в зависимости от условий выделения и культивирования, микроорганизм может приобретать или терять способность к переходу в НС (Asakura H., et al., 2008). Наличие у микроорганизмов НК объясняет трудности при поиске и выделении возбудителей во время вспышек инфекционных заболеваний человека и животных с использованием культуральных методик (del Mar Lleó M. et al., 2000). Аналогичные затруднения возникают при оценке микробной загрязнённости объектов окружающей среды

и пищевых продуктов. Кроме того, изучение условий образования некультивируемых форм промышленных микроорганизмов поможет лучше понять процессы созревания ферментированных продуктов питания (Ganesan B. et al., 2007, Lahtinen S.J. et al., 2008). Живые, но некультивируемые клетки, могут существенно уменьшать количественные показатели жизнеспособности бактериальных клеток. Поэтому вопрос изучения перехода в НС под действием различных стрессовых факторов патогенных, сапротрофных и пробиотических микроорганизмов в препаратах, активность которых связана с живыми бактериями (вакцины, пробиотики, музейные, заквасочные, посевные культуры, БАДы и др.) является актуальным. Новая информация о НФ имеет также теоретическую значимость.

Цель работы

Целью исследования является выявление особенностей образования, детекции и восстановления некультивируемых клеток, малоизученных и неизученных у микроорганизмов разных таксономических групп.

Задачи исследования

1. Изучение динамики жизнеспособности и образования некультивируемых форм условно патогенных и сапротрофных микроорганизмов в условиях лимита по азоту и дисбаланса азот/углерод. **2.** Получение некультивируемых клеток *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* и характеристика бактериоцинопродуцирующей активности лактококков в условиях трофического стресса. **3.** Выявление некультивируемых форм в лиофилизированных препаратах пробиотиков. **4.** Поиск факторов для восстановления некультивируемых клеток в вегетативное состояние.

Научная новизна работы

Экспериментально получены некультивируемые формы у выбранных малоизученных и неизученных по формированию некультивируемых клеток условно патогенных, сапротрофных и пробиотических микроорганизмов в условиях трофического стресса, и исследована динамика жизнеспособности и колониеобразующей активности культур при длительной инкубации. Показана сукцессионная смена периодов размножения и отмирания с формированием некультивируемых форм в течение одного года инкубации. Впервые показано влияние комплекса метаболитов лактококков, содержащихся в культуральной жидкости, на образование некультивируемых клеток. Впервые проведены исследования по определению содержания бактериоцина в культуральной жидкости лактококков, перешедших в некультивируемое состояние, и оценена продуктивность штаммов, отличающаяся от уровня образования низина в оптимальных условиях. Впервые обнаружены некультивируемые формы в лиофилизированных препаратах пробиотиков. Охарактеризован уровень жизнеспособности клеток в пробиотических препаратах различных производителей с разными сроками годности (до 30 лет после окончания срока годности). Произведён сравнительный анализ оценки жизнеспособности бактерий с использованием люминесцентной микроскопии и проточной цитометрии, показавший высокую степень корреляции результатов. Осуществлён поиск факторов, способствующих переходу некультивируемых клеток микроорганизмов в вегетатив-

ное состояние, среди которых наиболее эффективным оказался кровезаменитель Аминопептид.

Практическая значимость исследования

Разработана методика получения некультивируемых клеток лактококков в условиях углеводного голодания. На модели лиофилизированных пробиотических препаратов апробирована методика количественного определения некультивируемых клеток в биологических препаратах, содержащих живые бактерии (вакцины, пробиотики, БАДы, посевные культуры, музейные штаммы), клиническом материале, пищевых продуктах, объектах окружающей среды. Высокий уровень жизнеспособности бактерий, выявленный в препаратах пробиотиков, в том числе, хранившихся с превышением срока годности до 30 лет, которые содержали некультивируемые клетки, может служить основанием для производителей к рассмотрению вопроса об увеличении сроков годности препаратов, содержащих лиофильно высушенные живые бактерии. Сравнение двух экспресс-методов учёта живых и мёртвых клеток микроорганизмов: люминесцентной микроскопии и проточной цитометрии показало равноценность их применения. Минимальная среда, разработанная для создания форм покоя у *Azospirillum brasilense*, пригодна для экспериментального получения некультивируемых клеток условно патогенных и сапротрофных микроорганизмов, а среда Элликера, рекомендуемая для выращивания лактобацилл, может использоваться для выращивания бифидобактерий.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Получены некультивируемые формы условно патогенных, сапротрофных бактерий, лактококков, а также охарактеризована динамика их образования. **2.** Изучена продуктивность биосинтеза низина клетками лактококков, перешедшими в НК, в условиях трофического стресса. **3.** Обнаружены некультивируемые формы микроорганизмов в лиофилизированных препаратах пробиотиков с различными сроками хранения, от разных производителей. Осуществлен сравнительный анализ эффективности использования люминесцентной микроскопии и проточной цитометрии для оценки жизнеспособности лиофилизированных клеток. **4.** Проведен поиск факторов с целью восстановления некультивируемых микроорганизмов в вегетативное состояние. Наиболее эффективным оказался Аминопептид.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях: Всероссийская научная конференция «Проблемы современной эпидемиологии. Перспективные средства и методы лабораторной диагностики и профилактики актуальных инфекций». Санкт-Петербург, 19-20 ноября 2009г; Всероссийский симпозиум с международным участием «Современные проблемы физиологии экологии и биотехнологии микроорганизмов». Москва, 24 декабря 2009г; Международная конференция «Биотехнология: экология крупных городов». Москва, 15-17 марта 2010г; Всероссийская научно-практическая конференция «Вакцинология-2010», Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней». Москва, 9-10 ноября 2010г; Всероссийский симпозиум с международным уча-

ствием «Биологически активные вещества микроорганизмов. Прошлое, настоящее, будущее». Москва, Макс-Пресс, МГУ, 27-29 января 2011г; Международная конференция «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, 21-25 марта 2011г; Международная научно-практическая конференция «Фармацевтические и медицинские биотехнологии». Москва, 20-22 марта 2012г; IV Всероссийский конгресс по инфекционным болезням. Москва, 26-28 марта 2012г; X съезд ВНПОЭМП «Итоги и перспективы эпидемиологического благополучия населения РФ». Москва, 12-13 апреля 2012г; Международная конференция «Биология – наука XXI века». Москва, 24 мая 2012г; 3 съезд микологов России. Москва, 9-12 октября 2012г; VII Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, 19-22 марта 2013г; International Yakult Symposium. London, Great Britain, April 22-23, 2013г; Functional Food Conference at Kyoto University. Kyoto, Japan, May 11-12, 2013г; World Forum for Nutrition Research Conference «Mediterranean Foods on Health and Disease». Reus, Spain, May 20-21, 2013г; Proceedings of 5th Congress of European Microbiologists – FEMS, Leipzig, Germany, July 21-25, 2013г

Апробация диссертации состоялась 25 сентября 2013г. на научной конференции отдела микробиологии ФГБУ «НИИВС имени И.И. Мечникова» РАМН

Публикации

По результатам работы опубликовано 25 печатные работы, в том числе 8 в рецензируемых, рекомендованных ВАК журналах и в международной печати, а также 17 тезисов в изданиях российских и зарубежных конференций.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 4 глав результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, содержащего 179 источников из которых 58 отечественных и 121 зарубежных. Работа выполнена на 142 страницах машинописного текста и иллюстрирована 16 таблицами и 14 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Материалы. В опытах по получению некультивируемых форм микроорганизмов использованы малоизученные по формированию НК бактериальные штаммы из коллекции лаборатории микробиологических питательных сред: *Enterobacter aerogenes* ГИСК 418; *Klebsiella pneumoniae* 1954; *Proteus vulgaris* НХ 19222; *Alcaligenes faecalis* 415 (Блинкова Л.П. и др., 1994), а бактериоцинопродуцирующие штаммы *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* МГУ, 729 и F-116 из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета МГУ (Стоянова и др., 2006). Для количественного определения низина использован индикаторный штамм *Bacillus coagulans* 429 из той же коллекции. При поиске некультивируемых форм в лиофилизированных пробиотических препаратах и сравнении методов проточной цитометрии и люминесцентной микроскопии использовано 27 коммерческих серий сухих пробиотических препаратов, содержащих *Escherichia coli*, бифидобактерии, лактобациллы и энтерококки с различными сроками изготовления.

Методы

Получение некультивируемых клеток микроорганизмов. Штаммы условно патогенных и сапротрофных микроорганизмов выращивали на синтетической среде в течение 24 часов при 37°C. Затем этой культурой инокулировали флаконы с той же средой, имевшей 5-кратное уменьшение источника азота (Mulyukin A.L. et al., 2009). Объём инокулята составлял 10 об%. Популяции инкубировали 24 часа при той же температуре, затем при комнатной температуре в течение 1 года. Некультивируемые формы 3-х штаммов *L. lactis* ssp. *lactis* получали на минимальной синтетической среде (Ganesan B. et al., 2007), которую засеивали 5 об% отмытых или не отмытых физиологическим раствором клеток. Полученные популяции лактококков инкубировали при 30°C в течение года.

Определение количественных характеристик микроорганизмов в изучаемых образцах. Количество КОЕ/мл определяли путём посева десятикратных разведений исходных образцов на плотные и полужидкие питательные среды с последующим подсчётом выросших колоний. Общую численность клеток в 1 мл образца подсчитывали в камерах Горяева или Тома. Соотношение числа живых и мёртвых клеток определяли после окрашивания образцов набором люминесцентных красителей Live/Dead® (Baclight™) на люминесцентном микроскопе Opton (Zeiss, Германия). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре КФК-3 при длине волны 450 или 540 нм и рабочем расстоянии между гранями кювет 3 или 5 мм. Для сравнения использовали метод проточной цитометрии: цитометр Cytomics 500, Coulter Beckman при длинах волн 510-550 нм для живых и 603-623 нм для мёртвых бактерий (Steen H.B., 2000).

Определение бактериоциносинтизирующей активности лактококков. Бактериоцин экстрагировали из культуральной жидкости смесью ацетон: уксусная кислота: вода (4:1:5) при 55°C в течение 90 мин. Затем разводили фосфатным буфером в 10 раз. Планшеты заливали диффузионной средой для титрования низина (бактериоцина) с индикаторным микроорганизмом *Bacillus coagulans* 429 и пробивали лунки (d=6 мм). В лунки вносили 100±20 мкл полученных растворов проб и разведений стандарта – коммерческого препарата низина «Nisaplin» (фирма «Aplin & Barrett, Ltd», Великобритания). После 24 часов инкубации измеряли диаметр зон задержки роста тест-культуры и рассчитывали концентрацию низина в международных единицах (МЕ/мл).

Восстановление некультивируемых клеток. Для реактивации использовали добавки к плотным, жидким и полужидким средам. Факторы, не разрушающиеся при автоклавировании, вносили в среду при приготовлении. Вещества, которые могли потерять свои свойства при автоклавировании, вносили после стерилизации среды, перед розливом в пробирки или чашки Петри. Условно патогенные и сапротрофные микроорганизмы восстанавливали на питательном агаре, разведённом в 5 раз с добавлением 20 основных аминокислот по 0,05г/л. В качестве добавок для восстановления лактококков использовали кровезаменитель Аминопептид; концентрированную в 10 раз инактивированную кипячением (1 час) суточную биомассу гомологичного штамма лактококка; инактивированную кипячением (1 час) суточную культуру лактококка;

набор из 7 аминокислот. Для восстановления пробиотических клеток использовали кривозаменитель Аминопептид.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программы Microsoft Excel 2007 с использованием параметрических критериев (t-критерий Фишера-Стьюдента, уровень достоверности $p < 0,05$; предел колебаний средней арифметической $M \pm I_{95}$) и методов корреляционного анализа различий (коэффициент корреляции r).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение некультивируемых клеток условно патогенных и сапротрофных микроорганизмов

В качестве основного стрессового воздействия на бактерии нами был выбран трофический фактор: выращивание на безбелковой синтетической среде с лимитированием по содержанию азота, испытанной другими авторами с целью образования цистоподобных покоящихся клеток у *Azospirillum brasilense* (Mulyukin A.L. et al., 2009). Параметры инкубации культур (температура, аэрация, величина рН и др.), в основном, соответствовали естественным условиям обитания изученных микроорганизмов.

Нами показано, что к седьмому месяцу инкубации уровень жизнеспособности всех культур, кроме *A. faecalis* 415 (78% живых клеток при общей численности в пределах 1×10^8 клеток/мл и величине КОЕ/мл 1×10^3), снизился до уровня, не выявляемого с помощью люминесцентного микроскопа, то есть численность живых клеток составляла не более 1% от их общего числа. Следовательно, количество НК было на уровне 99%.

Что касается колониеобразующих свойств, то *E. aerogenes* ГИСК 418 в этот период времени полностью потерял способность образовывать колонии. Для *P. vulgaris* НХ 19222 и *K. pneumoniae* 1954 значения КОЕ/мл составили $2,85 \pm 0,31 \times 10^6$ и $2,2 \pm 0,24 \times 10^6$. Эти величины соответствовали общему количеству живых клеток в 1 мл культуры.

После 1 года наблюдений (рис. 1, табл.1) жизнеспособность у этих микроорганизмов составила $10^3 - 10^6$ КОЕ/мл. Общее число клеток, подсчитанное в камере Горяева, составило $10^7 - 10^8$ клеток/мл, а численность живых – от 66,4 до 99,6% от общего числа клеток. Наиболее жизнеспособной к этому сроку оказалась культура *E. aerogenes*, тогда как *A. faecalis* имел 68,6% живых клеток. Количество полученных нами некультивируемых клеток к 12 месяцам инкубации составляло от 97,1% для *K. pneumoniae* 1954, до более чем 99,99% для *P. vulgaris* НХ 19222 (см. табл. 1). Таким образом, показано, что клетки изученных условно патогенных и сапротрофных микроорганизмов, находясь длительное время в условиях трофического стресса, переходят в некультивируемое состояние. При этом часть некультивируемых клеток может спонтанно восстанавливать способность к делению, вероятно, за счёт высвобождающихся из разрушенных клеток стимулирующих факторов.

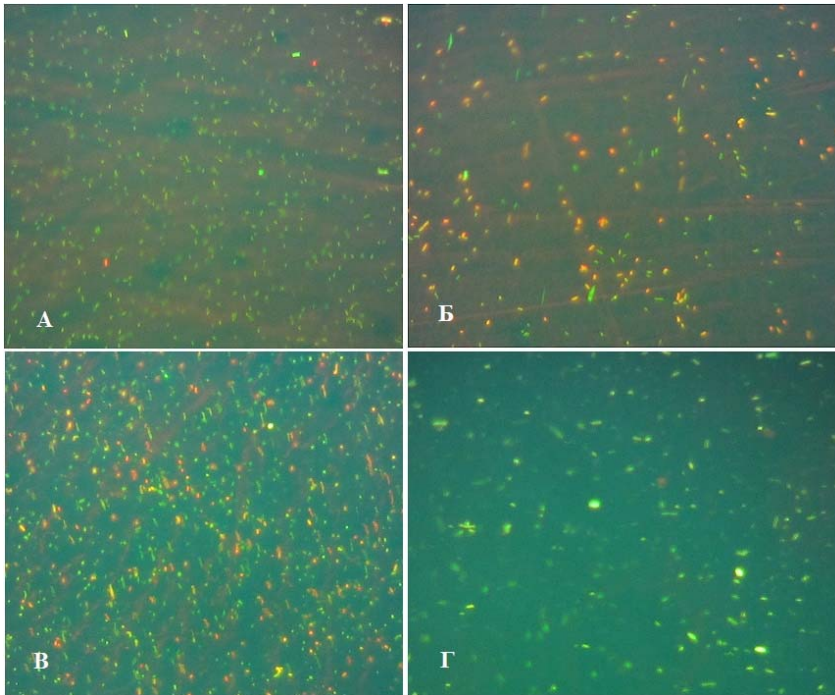


Рисунок 1. Живые (зелёные) и мёртвые (красные) клетки исследованных микроорганизмов после 1 года инкубации, окрашенные набором Live/Dead.

А) *E. aerogenes* ГИСК 418,
 Б) *K. pneumoniae* 1954,
 В) *A. faecalis* 415,
 Г) *P. vulgaris* HX 19222.

Следует отметить, что динамика жизнеспособности культур характеризовалась сукцессионной сменой популяций микроорганизмов, выражавшейся в чередующихся периодах отмирания большей части популяции и следовавшего за этим роста. Вероятно, в культуре, находившейся в постстационарной фазе, появлялись клетки, которые в результате мутации или геномной перестройки получали преимущество перед остальными и оказывались способными к активному росту и размножению с использованием отмерших клеток в качестве питательного субстрата, образуя сменяющие друг друга субпопуляции. Подобная динамика подробно описана для *E. coli* (Finkel S.E., 2006). Смена периодов размножения и отмирания также может быть связана с появлением в культуре различных диссоциативных вариантов, получающих преимущество в условиях, когда большая часть популяции отмирает (Милько Е.С., Егоров Н.С., 1991).

Таблица 1

Сохранение жизнеспособности изученных микроорганизмов после 1 года инкубации.

Микроорганизм	Максимальное значение КОЕ/мл (срок инкубации.)	Параметры после 12 месяцев инкубации			
		КОЕ/мл	общее число клеток/мл	% живых клеток	% клеток, формирующих колонии
<i>Proteus vulgaris</i> HX 19222	$4,77 \pm 0,52 \times 10^8$ (2 суток)	$2,10 \pm 0,23 \times 10^3$	$5,80 \pm 0,64 \times 10^7$	99,4	0,0036
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1954	$3,89 \pm 0,26 \times 10^8$ (2 суток)	$5,42 \pm 0,6 \times 10^6$	$2,76 \pm 0,3 \times 10^8$	66,4	2,9
<i>Enterobacter aerogenes</i> ГИСК 418	$4,9 \pm 0,54 \times 10^8$ (7 суток)	$2,15 \pm 0,24 \times 10^6$	$2,58 \pm 0,25 \times 10^8$	99,6	0,84
<i>Alcaligenes faecalis</i> 415	$7,1 \pm 0,78 \times 10^7$ (1 месяц)	$5,09 \pm 0,56 \times 10^5$	$1,10 \pm 0,12 \times 10^8$	68,6	0,67

В экспериментах было подтверждено наше предположение, что среду для получения форм покоя у *Azospirillum brasilense* можно использовать для перехода других родов микроорганизмов в НС.

Получение некультивируемых форм *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*

Для получения НФ лактококков была выбрана среда, создающая при длительной инкубации условия углеводного голодания (Ganesan B., 2007). Отмечены различия между популяциями, полученными из отмытого и не отмытого инокулята. Последние перешли в фазу активного роста и размножения в первые сутки инкубации и увеличили свою численность до $1,45 - 1,55 \times 10^9$ клеток/мл (рис. 2). Наибольшая скорость роста и размножения отмечена в первые часы после инокуляции. Такая разница, по-видимому, связана с внесением вместе с неотмытым инокулятом продуктов жизнедеятельности микробных клеток, которые выступают в роли стимуляторов роста. В дальнейшем численность клеток значительно не изменялась. Для популяции лактококка, штамм МГУ, полученной из отмытого инокулята, отмечена фенотипическая диссоциация, выражавшаяся в появлении микроколоний. Микроколониальная субпопуляция перешла в фазу активного роста и размножения и достигла максимума $5,15 \pm 0,57 \times 10^9$ клеток/мл (см. рис.2). Клетки популяций, которые прошли стадию роста и размножения на использованной трофически скудной среде, уменьшились в размерах по сравнению с клетками в инокуляте и параллельными популяциями с отсутствием роста. Количество жизнеспособных клеток в популяциях, прошедших стадию активного роста и размножения, снижалось, тогда как те, для которых не отмечено увеличение численности популяции, сохраняли жизнеспособность, выявленную с помощью люминесцентного микроскопа, близкую к 100%, в течение всего эксперимента. Исключение составила популяция гибридного штамма F-116 (неотмытый инокулят). Её жизнеспособность также сохранялась близкой к 100% в течение 10 месяцев (см. рис. 2). Наименьшую сохранность жизнеспособности имела популяция штамма МГУ (отмытый инокулят): доля живых клеток составила к 10 месяцам 38,1%, а к году инкубации – 54,23%. Образование НФ всех штаммов зафиксировано в течение первых суток инкубации. Для популяций, полученных из неотмытого инокулята, этот процесс протекал параллельно росту. Через 24 часа культивирования 60 – 80% клеток не создавали колонии на плотной питательной среде. К 5 дню инкубации в условиях углеводного голодания 82,1 – 99,6% клеток, в зависимости от штамма и условий эксперимента, не формировали колоний. Дальнейшее снижение колониеобразующей активности зависело от штамма и условий эксперимента. Популяции, полученные из неотмытого инокулята, переходили в НС быстрее и в большей степени, чем параллельные культуры. Вероятно, клетки, использовавшие ресурсы среды на рост и размножение, оказались более чувствительны к стрессу углеводного голодания. Микроколониальная субпопуляция *L. lactis*, штамм МГУ, полностью перешла в НС к 3 месяцам инкубации. В этот период разница между высеваемостью и общей численностью живых клеток составляла 5-6 порядков в зависимости от популяции. В ходе дальнейшего эксперимента значения КОЕ/мл оставались в тех же пределах.

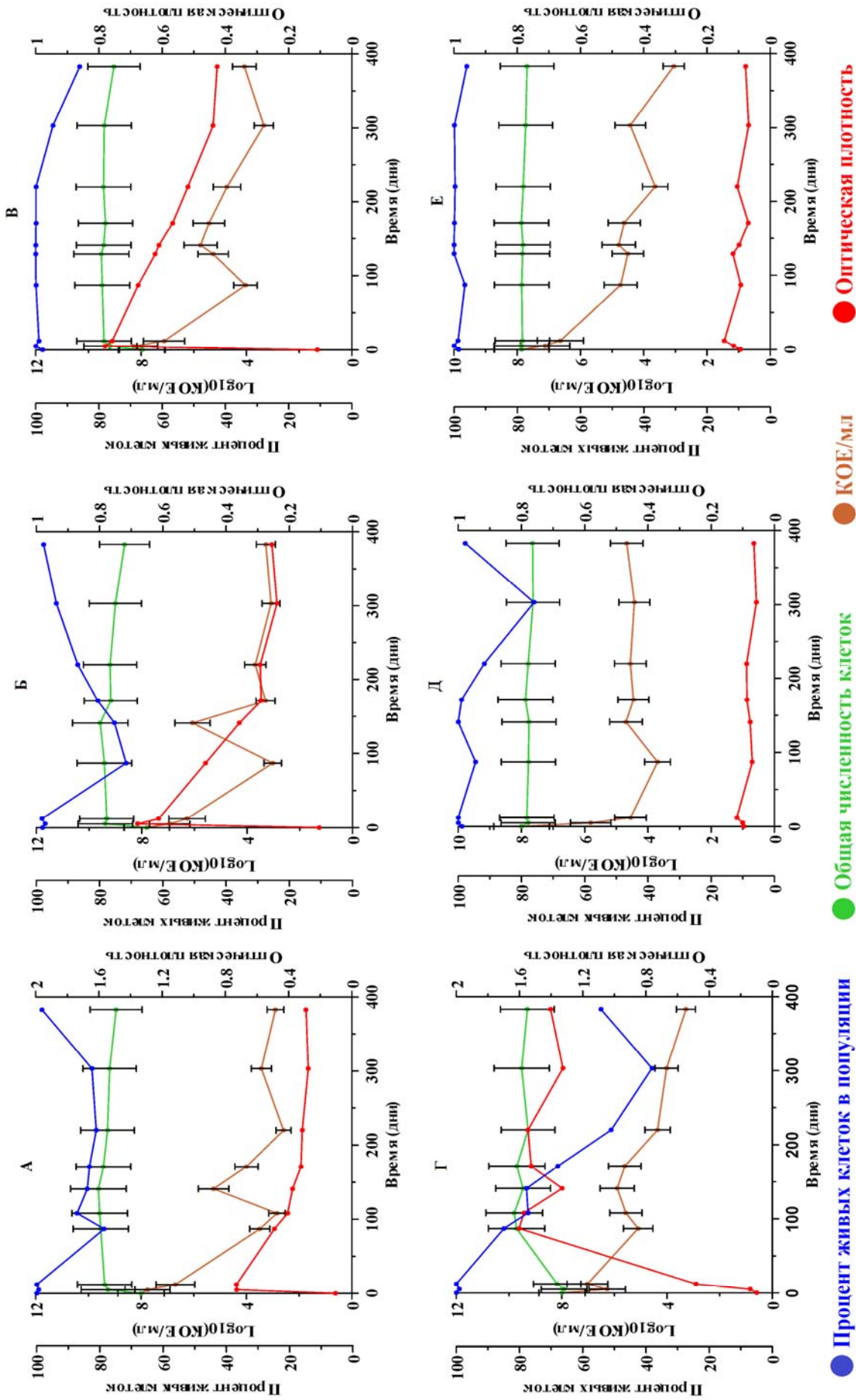


Рисунок 2. Характеристика показателей жизнедеятельности популяций штаммов *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. А, Б, В – популяции штаммов МГУ, 729 и F-116 соответственно, полученные из неотмытого инокулята; Г, Д, Е, - популяции, полученные из отмытого инокулята.

В течение всего срока эксперимента наблюдали снижение оптической плотности популяций, что, вероятно, свидетельствует об уменьшении размеров клеток при переходе в НС. Это наиболее заметно для бактерий штамма 729, полученных из неотмытого инокулята, которые к 7 месяцам инкубации стали плохо различимы при микроскопировании (рис. 3). Кроме того, клетки данной культуры плохо прокрашивались ДНК-тропными люминесцентными красителями, что, по-видимому связано конденсацией нуклеоида.

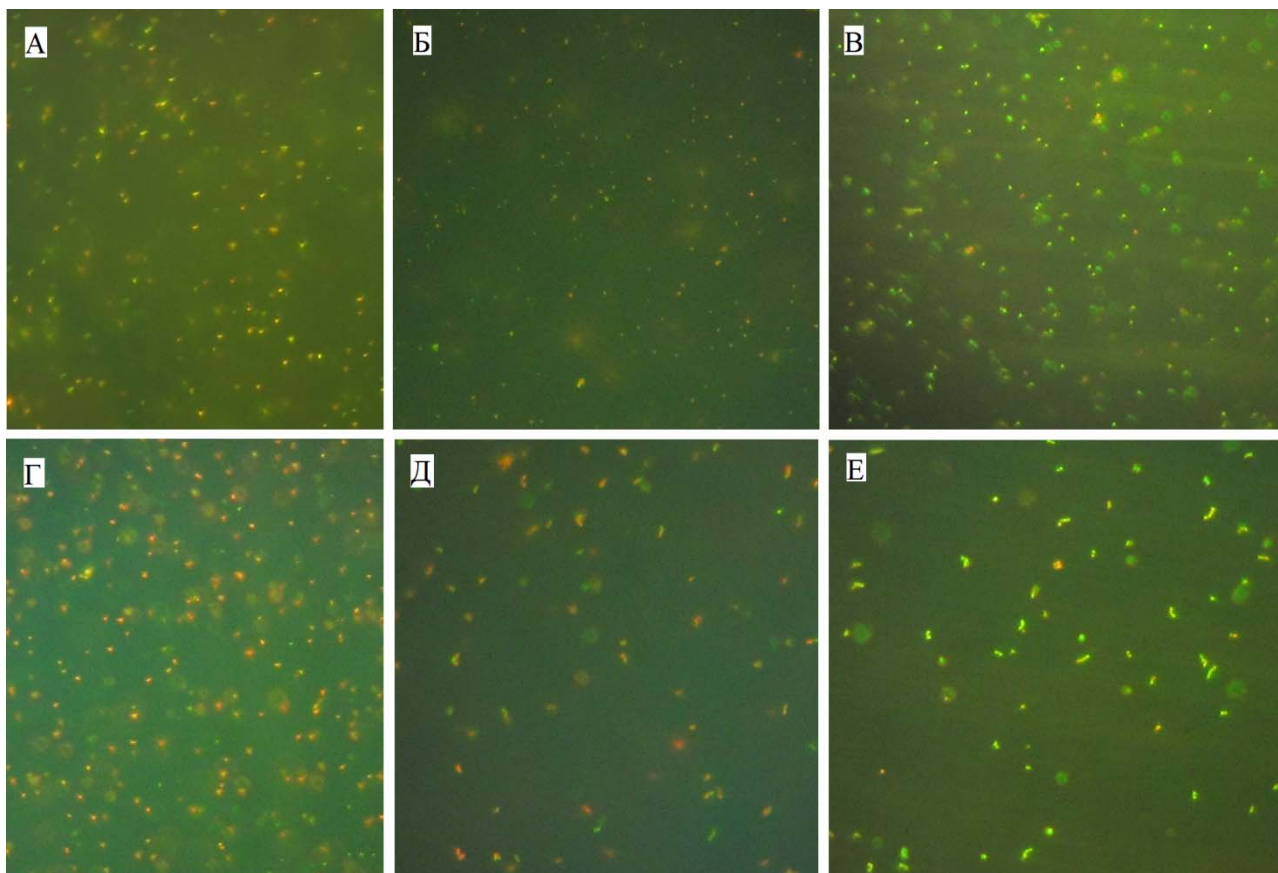


Рисунок 3. Живые и мёртвые клетки *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, штаммы МГУ, 729 и F-116, после 10 месяцев инкубации. А, Б, В – популяции, полученные из неотмытого инокулята. Г, Д, Е – из отмытого инокулята.

Низинпродуцирующая активность популяции лактококков в условиях стресса

Эксперименты показали, что бактериоцин синтезировался в первые сутки после инокуляции в каждой из популяций. При этом штаммовых различий в конечных концентрациях бактериоцина в 1 мл культуральной жидкости (2450 – 3000МЕ/мл) не выявлено. В дальнейшем его концентрация менялась незначительно (табл. 2 - 4). Активность низина в культуральной жидкости разных популяций была приведена к одному показателю – удельной активности (МЕ/10⁹ клеток/мл). Пересчёт выявил, что популяции, полученные из отмытого инокулята, имеют большую удельную продуктивность, чем популяции, полученные из неотмытого инокулята. Разница показателей в первые сутки составила 20-40 раз, а в дальнейшем уровень различия колебался в пределах от 10 до 78 раз, в зависимости от срока наблюдения и популяции лактококка. Можно предположить, что здесь проявилась разница стратегий выживания двух вариантов по-

пуляций. Те культуры, которые были получены из неотмытого инокулята, использовали ресурсы среды для роста и размножения, а полученные из отмытых клеток оказались более чувствительны к стрессу и перешли в режим переживания неблагоприятных условий.

В этом случае усиленная продукция низина может быть рассмотрена как защитная реакция для сохранения конкурентного преимущества ослабленной популяции, находившейся в некультивируемом состоянии.

Особенностью постепенно затухающего биосинтеза низина в условиях трофического стресса для всех штаммов при использовании отмытого инокулята явилось наличие трёх количественных максимумов удельной активности. Для штамма МГУ – это 2 и 7 сутки, а также 1 год, для штаммов 729 и F-116 – 2 и 10 сутки и 1 год.

Некоторое количество низина, являющегося пептидом, состоящим из 28-34 аминокислотных остатков (Hirst A., 1981; Стоянова Л.Г. и др., 2012) может разрушаться в процессе инкубации или потребляться клетками в качестве питательного субстрата. Однако продолжавшийся биосинтез низина поддерживал концентрации на исходном уровне в течение всего срока наблюдения.

Таблица 2

Динамика активности низина в популяциях *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, штамм МГУ, в условиях трофического стресса.

Срок наблюдения	Общее количество клеток/мл	Активность низина (МЕ/мл)	Удельная активность низина (МЕ/10 ⁹ клеток/мл)	Кратность различия в удельной активности		
					штамм МГУ (неотмытый инокулят)	
					штамм МГУ (отмытый инокулят)	
1 сутки	1,45±0,16×10 ⁹	3000	2069	25,1		
	4,72±0,52×10 ⁷	2450	51906			
2 суток	1,56±0,17×10 ⁹	3250	2083	35,3		
	3,40±0,37×10 ⁷	2500	73529			
3 суток	1,43±0,16×10 ⁹	3000	2097	27,1		
	4,40±0,48×10 ⁷	2500	56818			
7 суток	1,77±0,19×10 ⁹	2700	1525	41,7		
	4,40±0,48×10 ⁷	2800	63636			
10 суток	2,08±0,23×10 ⁹	2750	1322	35,1		
	5,28±0,58×10 ⁷	2450	46402			
3 месяца	3,40±0,37×10 ⁹	2700	794	1/1,52		
	5,15±0,57×10 ⁹	2700	524			
4,5 месяца	4,17±0,46×10 ⁹	2000	480	1,63		
	2,90±0,32×10 ⁹	2270	783			
1 год	8,84±0,97×10 ⁸	2750	3111	1/2,26		
	2,00±0,22×10 ⁹	2750	1375			

Таблица 3

Динамика активности низина в популяциях *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, штамм 729, в условиях трофического стресса.

Срок наблюдения	Общее количество клеток/мл	Активность низина (МЕ/мл)	Удельная активность низина (МЕ/10 ⁹ клеток/мл)	Кратность различия в удельной активности
	штамм 729 (неотмытый инокулят)			
	штамм 729 (отмытый инокулят)			
1 сутки	1,55±0,17×10 ⁹	2800	1806	21,2
	6,60±0,73×10 ⁷	2450	38281	
2 суток	1,66±0,18×10 ⁹	3250	1626	41,3
	3,72±0,41×10 ⁷	2500	67204	
3 суток	1,60±0,41×10 ⁹	2450	1531	26,6
	6,60±0,73×10 ⁷	2700	40909	
7 суток	1,64±0,18×10 ⁹	2750	1676	22,9
	7,04±0,77×10 ⁷	2700	38352	
10 суток	1,97±0,22×10 ⁹	3000	1523	37,7
	4,88±0,54×10 ⁷	2800	57377	
3 месяца	2,61±0,29×10 ⁹	1332	510	78,2
	6,02±0,66×10 ⁷	2400	39867	
4,5 месяца	3,76±0,41×10 ⁹	985	262	77,1
	5,77±0,63×10 ⁷	1166	20207	
1 год	4,44±0,49×10 ⁸	2450	5518	10
	4,44±0,49×10 ⁷	2450	55180	

Таблица 4

Динамика активности низина в популяциях *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, штамм F-116, в условиях трофического стресса.

Срок наблюдения	Общее количество клеток/мл	Активность низина (МЕ/мл)	Удельная активность низина (МЕ/10 ⁹ клеток/мл)	Кратность различия в удельной активности
	штамм F-116 (неотмытый инокулят)			
	штамм F-116 (отмытый инокулят)			
1 сутки	1,50±0,17×10 ⁹	2450	1633	41,8
	4,32±0,48×10 ⁷	2950	68287	
2 суток	1,43±0,15×10 ⁹	2450	1713	55,4
	3,16±0,35×10 ⁷	3000	94936	
3 суток	1,07±0,12×10 ⁹	3250	3037	28,1
	3,28±0,36×10 ⁷	2800	85365	
7 суток	1,24±0,14×10 ⁹	2950	2379	26,7
	4,72±0,52×10 ⁷	3000	63559	
10 суток	1,31±0,14×10 ⁹	2450	1870	36,8
	3,56±0,39×10 ⁷	2450	68820	
3 месяца	2,98±0,33×10 ⁹	2250	755	40,5
	7,20±0,79×10 ⁷	2200	30556	
4,5 месяца	2,62±0,29×10 ⁹	2080	784	46,6
	6,60±0,73×10 ⁷	2320	35152	
1 год	1,06±0,12×10 ⁹	2800	2641	18,9
	4,92±0,54×10 ⁷	2450	49796	

Как отмечено ранее, в условиях стресса, вероятно, синтезируется определённая (защитная) концентрация низина. Для природных штаммов лактококка МГУ и 729 активность низина при углеводном голодании была выше, чем при оптимальных условиях роста, а для гибридного высокопродуктивного штамма F-116 – ниже и близка к значениям у природных штаммов.

Изучение жизнеспособности пробиотических бактерий в коммерческих препаратах

Проанализировано 27 образцов лиофильно высушенных пробиотических препаратов от разных производителей и с разными сроками хранения, с превышением срока годности и без него.

Для образцов, содержащих *E. coli*, изучение зависимости между сроками хранения после истечения срока годности, количеством жизнеспособных клеток, выявляемых с помощью люминесцентной микроскопии, и количеством НК выявило индивидуальные особенности препаратов. Колибактерин, хранившийся в течение 30 лет после истечения срока годности, содержал 52,2% жизнеспособных клеток, из которых 99,73% не формировали колоний. В то же время препарат, хранившийся 3 года после окончания срока годности, содержал 91,30% живых клеток и 4,13% некультивируемых (табл. 5).

Характерной особенностью бифидобактерий была задержка появления колоний. Нормальные колонии развивались в среде через 4-7 суток. Не отмечено чёткой зависимости между сроками хранения, жизнеспособностью и высеваемостью. Так, препарат Бифиформ (2 года хранения после истечения срока годности) содержал 100% живых клеток, а препарат Бифидумбактерин 563 (1 год до окончания срока годности) – 95,45% живых клеток; при этом оба препарата обнаружили 100% высеваемость (табл. 6).

Таблица 5

Изучение лиофилизированных промышленных препаратов Колибактерина (КВ) с различными сроками хранения.

Образец Колибактерина	Показатели			
	общее количество клеток в камере Горяева (клеток/мл)	% живых клеток	КОЕ/мл	% живых клеток, <u>не</u> образующих колонии
КВ 575–2 11.82 3 дозы	$2,11 \pm 0,23 \times 10^{10}$	52,2	$2,89 \pm 0,32 \times 10^7$	99,73
КВ 170/3 06.01 3 дозы	$3,11 \pm 0,34 \times 10^{10}$	86,7	$5,55 \pm 0,61 \times 10^9$	79,5
КВ 40–3 03.08 5 доз	$1,21 \pm 0,13 \times 10^{10}$	90,3	$1,58 \pm 0,17 \times 10^9$	85,5
КВ 240–3 07.09 5 доз	$1,44 \pm 0,15 \times 10^{10}$	88,2	$1 \pm 0,11 \times 10^{10}$	21,3
КВ 270–3 07.09 5 доз	$1,32 \pm 0,14 \times 10^{10}$	91,3	$1,16 \pm 0,13 \times 10^{10}$	4,13

Таблица 6
Изучение лиофилизированных промышленных препаратов пробиотиков, содержащих бифидобактерии (ВВ – Бифидумбактерин, ВФС – Бификол, ВФГ - Бифиформ), с разными сроками хранения.

№ п/п	Условное обозначение препарата, срок годности.	Общее число клеток в камере Тома (Горяева)	КОЕ/мл		% живых клеток в популяции	Общая численность живых клеток	Оптическая плотность	% живых клеток, <u>не</u> образующих колонии	
			48 ч	72 ч				48 ч	72 ч
1	ВФС 03.08	$5,96 \pm 0,66 \times 10^8$	$\frac{1 \pm 0,11 \times 10^8}{(B.bifidum)}$ $1,25 \pm 0,13 \times 10^7$ (E.coli)	Не определяли	70,3	$4,19 \pm 0,46 \times 10^8$	$0,409 \pm 0,0007$	83,22	0
2	ВФГ 11.10	$4,64 \pm 0,51 \times 10^7$	$\frac{4,4 \pm 0,48 \times 10^7}{(B.bifidum)}$ $9,2 \pm 1,01 \times 10^6$ (E.faecium)	$\frac{5,4 \pm 0,59 \times 10^7}{(B.bifidum)}$ $9,6 \pm 1,05 \times 10^6$ (E.faecium)	100	$4,64 \pm 0,51 \times 10^7$	-	5,17	0
3	ВВ 735 01.08	$6,8 \pm 0,75 \times 10^7$	$1,31 \pm 0,14 \times 10^6$	$3,75 \pm 0,41 \times 10^6$	56,96	$3,87 \pm 0,43 \times 10^7$	$\pm 0,000$	98,07	$\frac{94,4}{9}$
4	ВВ 11001 03.08	$5,32 \pm 0,58 \times 10^7$	$1,53 \pm 0,17 \times 10^4$	$7,39 \pm 0,81 \times 10^4$	98,01	$5,21 \pm 0,56 \times 10^7$	-	99,97	$\frac{99,8}{6}$
5	ВВ 442 10.12	$2,92 \pm 0,32 \times 10^7$	$3,41 \pm 0,37 \times 10^6$	$7,78 \pm 0,86 \times 10^6$	70,73	$2,06 \pm 0,23 \times 10^7$	$0,951 \pm 0,002$	83,45	$\frac{62,2}{3}$
6	ВВ 563 01.13	$6,76 \pm 0,74 \times 10^7$	$1,7 \pm 0,19 \times 10^5$	$2,27 \pm 0,25 \times 10^8$	95,45	$6,45 \pm 0,71 \times 10^7$	$0,42 \pm 0,02$	99,74	0

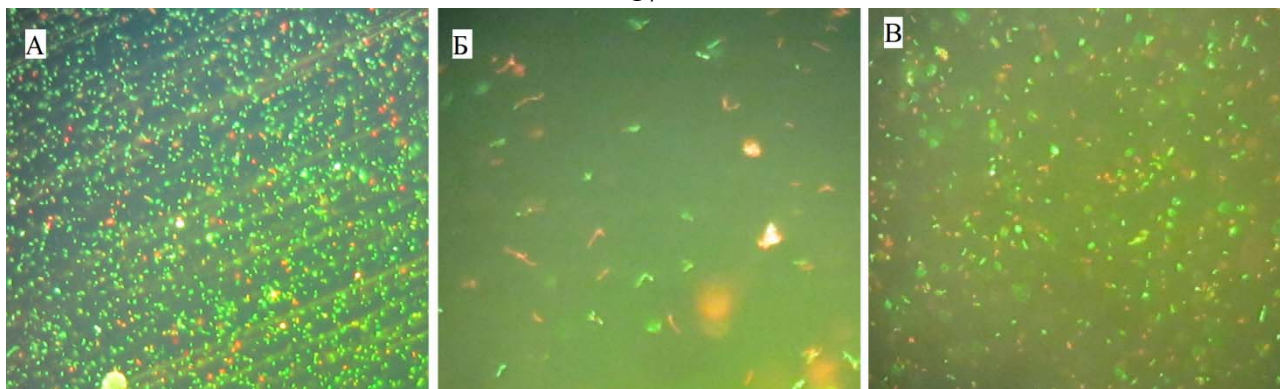


Рисунок 4. Живые (зелёные) и мёртвые (красные) клетки лиофилизированных препаратов. **А** – Колибактерин; **Б** – Бифидумбактерин; **В** – Лактобактерин.

Наибольший процент НК отмечен для препаратов, содержащих лактобациллы. Содержание НК в них было более 58% вне зависимости от срока годности препарата (в том числе непросроченные образцы) (табл. 7). Однако жизнеспособность большинства препаратов была высокой: более 99% для непросроченных препаратов (исключение Аципол – 24,64% живых) и не менее 72% для просроченных (до 6 лет) препаратов (исключение Ацилакт – 24,61% живых клеток).

Наши данные свидетельствуют о том, что важным фактором, влияющим на количество НК, являются особенности технологии производства. Это влияние на сохранность колониеобразующей способности показано для лакто- и бифидобактерий, а также для *E. coli* с 30-летним превышением срока годности препарата.

Сравнительный анализ определения жизнеспособности клеток в пробиотических препаратах методами люминесцентной микроскопии и проточной цитометрии.

При сравнении двух экспресс-методов для оценки численности жизнеспособных клеток выявлена высокая корреляция результатов ($r=0,824$). Для большинства образцов разница показателей, полученных разными методами не превышала 5% а для некоторых образцов была в пределах 1-1,5% ($p>0,05$). Это позволяет рекомендовать оба метода для быстрой и точной оценки жизнеспособности различных образцов (табл. 8).

Таблица 7

Изучение образцов лиофилизированных промышленных препаратов лактобацилл (LB - Лактобактерин, AL – Ацилакт, AP - Аципол) с различными сроками хранения.

№ п/п	Условное обозначение препарата, (срок годности)	Общее число клеток в камере Тома (Горяева)	КОЕ/мл	% живых клеток в популяции	Общая численность живых клеток	Оптическая плотность	% живых клеток, <u>не</u> образующих колонии
1	LB 493 (01.13)	$2,07 \pm 0,23 \times 10^9$	$4,06 \pm 0,44 \times 10^8$	100	$2,07 \pm 0,23 \times 10^9$	$3,60 \pm 0,07$	80,39
2	LB 531 (03.13)	$1,04 \pm 0,11 \times 10^9$	$3,21 \pm 0,35 \times 10^8$	99,9	$1,04 \pm 0,11 \times 10^9$	$3,08 \pm 0,02$	69,13
3	LB 532 (03.13)	$1,38 \pm 0,15 \times 10^9$	$5,27 \pm 0,58 \times 10^8$	92,89	$1,28 \pm 0,14 \times 10^9$	$3,45 \pm 0,04$	58,83
4	LB 533 (03.13)	$1,56 \pm 0,17 \times 10^9$	$3,95 \pm 0,43 \times 10^8$	99,32	$1,55 \pm 0,17 \times 10^9$	$4,70 \pm 0,03$	74,51
5	LB 04 (08.06)	$9,14 \pm 1,0 \times 10^9$	$8,04 \pm 0,88 \times 10^8$	86,88	$7,92 \pm 0,87 \times 10^9$	$8,72 \pm 0,02$	89,85
6	LB 05 (08,06)	$1,2 \pm 0,13 \times 10^{10}$	$2,65 \pm 0,29 \times 10^8$	72,4	$8,69 \pm 0,95 \times 10^9$	$13,03 \pm 0,05$	96,95
7	LB 800-2 (03.10)	$3,33 \pm 0,36 \times 10^9$	$1,12 \pm 0,12 \times 10^8$	92,04	$3,06 \pm 0,23 \times 10^9$	$3,44 \pm 0,04$	96,34
8	AL 80(10.06)	$4,82 \pm 0,53 \times 10^8$	$2,34 \pm 0,26 \times 10^6$	23,76	$1,15 \pm 0,33 \times 10^8$	$6,11 \pm 0,02$	97,96
9	AP 11 (02.14)	$5,3 \pm 0,58 \times 10^7$	$1,04 \pm 0,11 \times 10^6$	24,61	$1,3 \pm 0,14 \times 10^7$	$10,11 \pm 0,1$	92,00

Таблица 8

Сравнительный анализ методов определения количества живых и мертвых клеток в пробиотиках: проточной цитометрии и люминесценции

№ п/п	Препарат	Проточная цитометрия					Люминесцентная микроскопия	
		% живых клеток	% мертвых клеток	% отмирающих клеток	бесцветные клетки	∑ % мертвых клеток*	% живых клеток	% мертвых клеток
1	BB 442	86,0	4,4	1,8	7,8	14,0	77,22	22,78
2	BB 451	55,0	37,0	5,9	2,1	45,0	53,7	46,3
3	BB 563	84,9	4,5	0,8	9,8	15,1	83,33	16,67
4	BB 200209	77,8	7,4	1,0	13,8	22,2	82,17	17,83
5	BB 552	82,5	3,1	1,7	12,7	17,5	77,35	22,65
6	BB 735	79,7	9,7	1,3	9,3	20,3	69,69	30,31
7	LB 50-3	67,7	27,2	1,8	3,3	32,3	67,71	32,29
8	LB 556	65,8	30,6	1,6	2,0	34,2	66,47	33,53
9	LB 493	84,5	13,8	0,2	1,5	15,5	99,99	0,01
10	LB 800	78,9	16,9	0,4	3,8	21,1	92,04	7,96
11	KB 170-2	49,6	37,5	12,4	0,5	50,4	49,52	50,48
12	KB 270-3	88,5	7,0	1,5	3,1	11,6	86,83	13,17
13	KB 575-2	84,8	10,4	4,0	0,8	15,2	77,3	22,7
14	KB 40-3	67,5	27,6	3,8	1,1	32,5	75,9	24,1
15	AL 80	57,9	2,6	7,0	32,5	42,1	22,6	77,4
16	AP 11	33,1	63,5	1,4	2,0	66,9	24,61	75,39

Поиск факторов, способствующих переходу некультивируемых клеток в вегетативное состояние.

Для вывода из НС условно патогенных и сапротрофных микроорганизмов был использован питательный агар, разведенный в 5 раз, с добавлением 20 основных аминокислот по 0,05 г/л каждой. Данные условия оказались эффективны только для *Proteus vulgaris*. Его высеваемость увеличилась на 2 порядка с $2,10 \pm 0,23 \times 10^3$ до $2,50 \pm 0,28 \times 10^5$ ($p < 0,05$).

При подборе факторов для пробуждения НК *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* значительного увеличения численности культивируемых клеток добиться не удалось. Однако для популяции штамма МГУ, полученной из отмытого инокулята, отмечено увеличение количества КОЕ/мл в 3,75 раза при добавлении к полужидкой среде 0,5% концентрированной инактивированной биомассы того же штамма и в 2,65 раза при добавлении 1% той же биомассы в плотную среду (1/3 в этом случае составляли микроколонии).

Для реактивации НК пробиотиков использован кровезаменитель Аминопептид в концентрации 10%, который оказался наиболее эффективным. Так для бифидобактерий наблюдали увеличение количества КОЕ/мл в 2,56 раза, а для *E. coli* – 6,45 раза.

Помимо этого, для *E. coli* наблюдали значительное увеличение количества КОЕ/мл при инкубации десятикратных разведений образцов в физиологическом растворе в течение 24-72 часов. В разведениях, в которых при первичном высеве присутствовали единичные колонии, после инкубации вырастали

газонные культуры. Такое увеличение количества культивируемых бактерий невозможно получить с низкими исходными концентрациями КОЕ/мл. Возрастание численности колониеобразующих клеток можно объяснить восстановлением регидратированных НФ после снятия у них осмотического стресса в условиях последовательных разведений физиологическим раствором.

ВЫВОДЫ

1. В условиях лимита по источнику азота и дисбаланса азот/углерод в среде получены некультивируемые клетки условно патогенных и сапротрофных микроорганизмов.
2. Впервые при углеводном голодании исследованы особенности образования некультивируемых форм *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Показано влияние комплекса метаболитов гомологичного штамма, вносимого в среду инкубации с инокулятом, на выживание популяций лактококков перед длительной инкубацией.
3. Впервые изучена динамика синтеза низина лактококками в некультивируемой форме, обнаружены 3 пика его максимальной удельной активности. При стрессе у природных штаммов МГУ и 729 активность низина была выше, чем в оптимальных условиях, а у гибридного штамма F-116 – ниже.
4. Впервые в лиофилизированных пробиотических препаратах, содержащих *E. coli*, *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp., выявлены жизнеспособные некультивируемые клетки. Установлен высокий уровень сохранения жизнеспособности бактерий при значительном (до 30 лет) превышении срока годности пробиотика.
5. Проведён поиск факторов, способствующих переходу микроорганизмов из некультивируемого в вегетативное состояние, наиболее эффективным из которых для бифидобактерий и *E. coli* оказался кровезаменитель Аминопептид.
6. Показаны новые возможности применения двух сред: минимальной среды для создания некультивируемого состояния *Azospirillum brasilense*, успешно использованной нами для получения некультивируемых клеток условно патогенных микроорганизмов и сапротрофов, а также среды Элликера, предназначенной для лактобацилл и применённой для выращивания бифидобактерий.
7. Показана высокая степень корреляции ($r=0,824$) результатов при оценке жизнеспособности микроорганизмов с использованием экспресс-методов: люминесцентной микроскопии и проточной цитометрии.

Список работ опубликованных по теме диссертации.

В рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, опубликовано 8 работ по материалам диссертации:

1. Свойства некультивируемых и покоящихся форм микроорганизмов / Л.П. Блинкова, **Ю.Д. Пахомов**, Л.Г. Стоянова // Иммунопатология, аллергология, инфектология – 2010 – № 3 – С. 67–76.
2. Роль некультивируемых форм неспорообразующих микроорганизмов в поддержании гомеостаза популяции / **Ю.Д. Пахомов**, Л.П. Блинкова, Л.Г. Стоянова // Иммунопатология, аллергология, инфектология – 2010 – № 4 – С. 57–66.
3. Experimental approach to the induction of nonculturable state of *Lactococcus lactis* / **Yu.D. Pakhomov**, S.K. Belus, L.P. Blinkova, L.G. Stoyanova, E.A. Ustyugova // Biochemistry and Biotechnology: Research and Development. Nova Science Publishers, Inc., New York – 2012 – chapter 7 – P. 45–50.
4. Жизнеспособность условно патогенных и сапротрофных микроорганизмов в условиях стресса / **Ю.Д. Пахомов**, Блинкова Л.П., О.В. Никифорова // Вода: химия и экология – 2012 г. – №12 – С. 75–79.
5. Express assessment of cell viability in biological preparations / L.P. Blinkova, **Yu.D. Pakhomov**, O.V. Nikiforova, M.L. Altshuler // Apple Academic Press. Chemistry and Physics of Modern Materials – 2013 – chapter 34 – P. 521–524.
6. Длительный мониторинг жизнеспособности и образования некультивируемых форм *Lactococcus lactis* / **Ю.Д. Пахомов**, Л.П. Блинкова, О.В. Дмитриева, Л.Г. Стоянова // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии – 2013 – №. 3 – С. 92–96.
7. Обнаружение некультивируемых форм бактерий в лиофилизированных препаратах пробиотиков / **Ю.Д. Пахомов**, О.В. Дмитриева // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии – 2013 – №. 3 – С. 83-88.
8. Express assessment of cell viability in biological preparations / L.P. Blinkova, **Yu.D. Pakhomov**, O.V. Nikiforova, M.L. Altshuler // Apple Academic Press. Chemical Process in Liquid and Solid Phases – 2013 – chapter 21 – P. 1–4.

Тезисы конференций:

1. Значение некультивируемого состояния микроорганизмов для диагностики инфекций / **Ю.Д. Пахомов**, Л.П. Блинкова, Л.Г. Стоянова // Тезисы Всероссийской научной конференции «Проблемы современной эпидемиологии. Перспективные средства и методы лабораторной диагностики профилактики актуальных инфекций» – Санкт–Петербург – 19–20 ноября 2009 – С. 106–107.
2. Некультивируемые формы микроорганизмов и их значение / Л.Г. Стоянова, **Ю.Д. Пахомов**, Л.П. Блинкова // Материалы всероссийского симпозиума с международным участием «Современные проблемы физиологии

- экологии и биотехнологии микроорганизмов» – Москва – Макс–пресс –24 декабря 2009 – С. 177
3. Биологическое значение некультивируемых микроорганизмов / **Ю.Д. Пахомов**, Л.Г. Стоянова, Л.П. Блинкова // Международная конференция «Биотехнология: экология крупных городов» – Москва – 15–17 марта 2010 – С. 433–434.
 4. Поиск стимуляторов для восстановления некультивируемых форм микроорганизмов / **Ю.Д. Пахомов**, Л.П. Блинкова, Т.П. Шмыгалёва. Материалы Всероссийской научно–практической конференции «Вакцинология–2010. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней» – Москва – 9–10 ноября 2010г. – С. 93.
 5. Антагонистическая и антиоксидантная активность молочнокислых бактерий, выделенных из курунги / Л.Г. Стоянова, О.В. Максимова, А.В. Брюханов, **Ю.Д. Пахомов**, Л.П. Блинкова // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Биологически активные вещества микроорганизмов. Прошлое, настоящее, будущее» – Макс–Пресс – Москва, – МГУ – 27–29 января 2011г. – С. 115.
 6. Экспериментальный подход к получению некультивируемых клеток *L. lactis* / **Ю.Д. Пахомов**, С.К. Белусь, Л.П. Блинкова, Л.Г. Стоянова, Е.А. Устюгова // Материалы Международной конференции «Биотехнология: состояние и перспективы развития» – Москва – 21–25 марта 2011 – ч. 2 – С.51–52.
 7. Экспресс–метод оценки жизнеспособности в биологических препаратах / Л.П. Блинкова, **Ю.Д. Пахомов**, О.В. Никифорова, М.Л. Альтшулер и др. // Материалы Международной научно–практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии». – Москва – 20–22 марта 2012 – С. 391–392.
 8. Быстрая детекция микроорганизмов в исследуемых образцах / **Ю.Д. Пахомов**, О.В. Никифорова, Л.П. Блинкова // Материалы IV Всероссийского конгресса по инфекционным болезням – Москва – 26–28 марта 2012 – С. 294.
 9. Влияние трофического стресса на жизнеспособность бактерий / **Ю.Д. Пахомов**, Л.П. Блинкова, М.Л. Альтшулер, О.В. Никифорова // Материалы X съезда ВНПОЭМП «Итоги и перспективы эпидемиологического благополучия населения РФ» – Москва 12–13 апреля 2012 – «Инфекция и иммунитет» – 2012 – т. 2 – № 1–2 – С. 311.
 10. Антибиотики и некультивируемые формы бактерий / **Ю.Д. Пахомов**, Л.П. Блинкова, Л.Г. Стоянова, М.Л. Альтшулер, Т.П. Шмыгалёва, О.В. Никифорова // Материалы Международной конференции «Биология – наука XXI века» – Москва – 24 мая 2012 – С. 685–686.
 11. Бактериоцины клинических штаммов – перспективный источник антибактериальных препаратов / Л.П. Блинкова, Л.Г. Стоянова, Е.С. Горбатко, **Ю.Д. Пахомов**, Е.В. Зайцева, Е.А. Устюгова, О.В. Максимова // Матери-

- алы Международной конференции «Биология – наука XXI века» – 24 мая 2012 – С. 333.
12. Взаимодействие некультивируемых форм лактококков–продуцентов низина и метаболически активных грибов / Л.П. Блинкова, **Ю.Д. Пахомов**, Л.Г. Стоянова, О.В. Никифорова, М.Л. Альтшулер, Т.П. Шмыгалёва, Е.А. Устюгова // Тезисы 3 съезда микологов России – Москва – 9–12 октября – 2012 – «Современная микология в России» – С. 143.
 13. Сравнительная оценка жизнеспособности клеток пробиотических штаммов при определении методом люминесценции и проточной цитометрии / Р.В. Желанкин, Л.П. Блинкова, **Ю.Д. Пахомов**, О.В. Дмитриева, Э.А. Ахматов // Материалы VII Московского международного конгресса "Биотехнология: состояние и перспективы развития" – Москва – 19–22 – марта 2013 – часть 2 – С. 81–82.
 14. Bacteriocin–synthesizing activity of *Lactococcus lactis* cells in condition of the trophic stress and in VBNC–form. / **Yu.D. Pakhomov**, L.P. Blinkova, L.G. Stoyanova, R.V. Zhelankin, O. V. Dmitrieva // Proceedings of International Yakult Symposium – London, Great Britain – April 22–23 2013 – P. 67.
 15. Blinkova L.P., Nonculturable Bacteria in Lyophilized Non Spore–Forming Probiotics / L.P. Blinkova **Yu.D. Pakhomov**, O.V. Dmitrieva, M.L. Altshuler // Functional Food Conference at Kyoto University – Kyoto, Japan – May 11–12 2013 – P. 79–80.
 16. Nonculturable Forms of *Lactococcus lactis* / **Yu.D. Pakhomov**, Blinkova L.P., Stoyanova L.G., Dmitrieva O.V. // World Forum for Nutrition Research Conference “Mediterranean Foods on Health and Disease” – Reus, Spain – May 20–21 2013. In “Annals of Nutrition & Metabolism” – 2013 – № 62 (suppl 2) – P. 22.
 17. Identification of lactic acid bacteria isolated from kurunga on the base of nucleotide sequence analysis of specific genes / L.G. Stoyanova, T.D. Sultimova, M.V. Napalkova, A.B. Svetsov, **Yu.D. Pakhomov**, L.P. Blinkova, M.B. Nurishev, A.I. Netrusov // Proceedings of 5th Congress of European Microbiologists – FEMS – Leipzig, Germany – July 21–25 2013 – abstr. 2921.