

ЭКОЛОГИЯ

(БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ)

Естественные науки. 2025. № 3 (20). С. 45–62.

Yestestvennye nauki = Natural Sciences. 2024; 3 (20): 45–62 (In Russ.)

Научная статья

УДК 633.11:631.5

doi 10.54398/2500-2805.2025.20.3.005

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ ФОРМ БАКТЕРИЙ

Хаффарессас Ясин[✉], Василенко Олег Викторович¹

¹Пущинский государственный естественно-научный институт — филиал Университета РОСБИОТЕХ, г. Пущино, Россия
yacinechabani@yandex.ru[✉]

Аннотация. С момента своего открытия в 1982 г. клетки VBNC (Viable But Non Culturable) характеризовались потерей способности к росту на агаре. Рост бактерии на питательном агаре зависит от физиологических и биохимических характеристик её рода или вида. Каждый род бактерий имеет свои особенности и требования к культивированию. Внешние условия и стрессовые факторы могут влиять на физиологическое состояние клеток. Мёртвые клетки нельзя культивировать из-за отсутствия метаболической активности. Однако бактерии, которые нельзя культивировать, не обязательно мертвые. Бактерии под влиянием стресса или неблагоприятных условий могут выжить (образовать споры или переключиться на некультивируемое состояние).

Ключевые слова: VBNC, Благоприятные и неблагоприятные условия, метаболическая активность, ОТ-ПЦР

Для цитирования: Хаффарессас Я., Василенко О. В. Экологическая характеристика и методы исследования некультивируемых форм бактерий // Естественные науки. 2025. № 3 (20). С. 45–62. <https://doi.org/10.54398/2500-2805.2025.20.3.005>.

ECOLOGICAL CHARACTERISTICS AND METHODS OF STUDYING UNCULTIVATED FORMS OF BACTERIA

Haffaressas Yasin[✉], Vasilenko Oleg V.

Pushchino State Natural Science Institute — Branch of the Rosbiotech University, Pushchino, Russia
yacinechabani@yandex.ru[✉]

Abstract. Since its discovery in 1982, the VBNC cells (Viable But Non Culturable) are characterized by a loss of cultivability on agar, cultivable character of a bacterium depends on physiological characteristics and biochemical of its genus or its species. Each bacterial genus has

its peculiarities and nutritional requirements for growth. External conditions and stress factors can influence the physiological state of cells. Dead cells, without metabolic activity, cannot be cultured. However a non culturable bacterium is not necessarily dead. Bacteria subjected to stress or unfavorable conditions, they can survive (form spores or switch to a non culturable state: the viable but non culturable state -VBNC-).

Keywords: VBNC, Favorable and unfavorable conditions, Metabolic activity, RT-PCR.

For citation: Haffaressas Ya., Vasilenko O. V. Ecological characteristics and methods of studying uncultivated forms of bacteria. *Yestestvennye nauki = Natural Sciences*. 2025; 3 (20): 45–62. <https://doi.org/10.54398/2500-2805.2025.20.3.005> (In Russ.).

1. Концепция (теория) самозарождения. Концепция или теория самозарождения существует несколько десятков веков. Эту теорию защищал философ Аристотель. Считалось, что живые организмы родились из разлагающихся растений и животных, благодаря загадочной жизненной силе. После открытия А. ван Левенгуком анималкул эта теория была подтверждена, в частности, экспериментами Дж. Нидхема в 1745 г., который продемонстрировал рост микроорганизмов в колбах, содержащих вареное мясо или кукурузу. Эти бульоны нагревали перед тем, как внести их в колбы. Затем Л. Спалланцани продемонстрировал, что флаконы Нидхема не являются герметичными. Он закрыл флаконы перед нагреванием, и роста не наблюдалось. Итак, учёные поняли, что микроорганизмы происходят из воздуха. Закрытие колб предотвращало проникновение кислорода, необходимого для жизни. Идея спонтанного зарождения оставалась глубоко укоренившейся в умах людей до 1861 г. Этим вопросом продолжал заниматься Л. Пастер, сторонник биогенеза. Он показал, что ни один микроорганизм не растёт в закрытой и стерилизованной колбе, содержащей органические вещества. Поэтому спонтанного зарождения не существует. Он утверждал, что «появление жизни в неживом растворе происходит из-за загрязнения воздуха микроорганизмами». Этот предположение принесло ему премию Академии наук в 1862 г. Благодаря эксперименту Л. Пастера микробиология стала самостоятельной наукой, когда стало возможным получать чистые культуры благодаря разработке агаровых (твёрдых) питательных сред и чашек Петри. Кроме того, благодаря производству микроскопов более мощных, чем первые лупы.

Прямая связь между бактериями и болезнями была продемонстрирована немецким врачом Робертом Кохом (1843–1910) при изучении туберкулёза и его возбудителя *Mycobacterium tuberculosis*. Чтобы подтвердить эту связь, необходимо было проверить несколько критериев, собранных под названием «Постулаты Коха»:

1. Микроорганизм должен присутствовать у всех больных и отсутствовать у здоровых.
2. Микроорганизм необходимо изолировать и культивировать в чистой культуре.
3. Выделенными чистыми культурами необходимо вызвать заболевание путём экспериментальной инокуляции.

4. Тот же самый микроорганизм должен быть снова изолирован от экспериментальных пациентов.

Одновременно и впоследствии достижения других известных учёных в данной области:

- Дж. Тиндалль (1877): открытие спор, их термостойкость и развитие тиндаллизации;
- С. Н. Виноградский (1856–1953): работа с нитрифициирующими, азотфиксирующими, серными бактериями и бактериальным разложением целлюлозы в почвах;
- М. В. Бейеринк (1851–1931): изучение азотфиксирующих симбиотических бактерий.

2. Место микроорганизмов в живом мире. Со времени их открытия А. ван Левенгуком, место бактерий в живом мире сильно изменилось. Шведский ботаник К. Линней (1735) разработал первую классификацию, разделив живые организмы на два царства – Plantae и Animalia. В 1857 г. К. Негели предложил отнести бактерии и грибы к Царству растений.

Согласно классификации Э. Геккеля (1866), живой мир делится на три царства: Царство животных, Царство растений и Царство протистов, которое объединяет водоросли, простейшие, грибы и бактерии.

Различие между эукариотическими и прокариотическими клетками. Благодаря изобретению электронного микроскопа Э. Шаттон противопоставил два типа клеток (1937): эукариотическую (ядро окружено мембраной, в клетке содержатся клеточные органеллы) и прокариотическую (ядро без мембранны, очень простая организация клетки). В 1938 г. Г. Коупленд отдельил Царство бактерий от Царства протистов. Систематику прокариот усовершенствовал Р. Станье в 1961 г.

Р. Дж. Э. Мюррей, продолжая дело Э. Шаттона, создал свою классификацию (1968), разделив делит живой мир на два царства – эукариот и прокариот. Р. Дж. Э. Мюррей выделил четыре отдела, описанные в руководстве Берджи (“Bergey's Manual”): Gracilicutes – грамотрицательные бактерии; Firmicutes – грамположительные бактерии; Tenericutes – бактерии, лишённые клеточной стенки; отдел Mendosicutes – архебактерии.

Классификация пяти царств Р. Х. Уиттакера (1969) описывает четыре эукариотических царства (животные, растения, грибы и простейшие), а прокариоты объединяются в царство бактерий. Несмотря на то, что классификации Э. Шаттона и Р. Х. Уиттакера значительно разнились, однако существовали одновременно в течение длительного времени.

Развитие методов молекулярной биологии позволило охарактеризовать гены, кодирующие рибосомные РНК (рРНК). Сравнивая множество наборов 16S рРНК, принадлежащих различным живым организмам, К. Вёзе смог разделить живые организмы на три домена (1978): домен бактерий, домен архей и домен эукариот (животные, растения, грибы и простейшие). Так родилась геномная классификация.

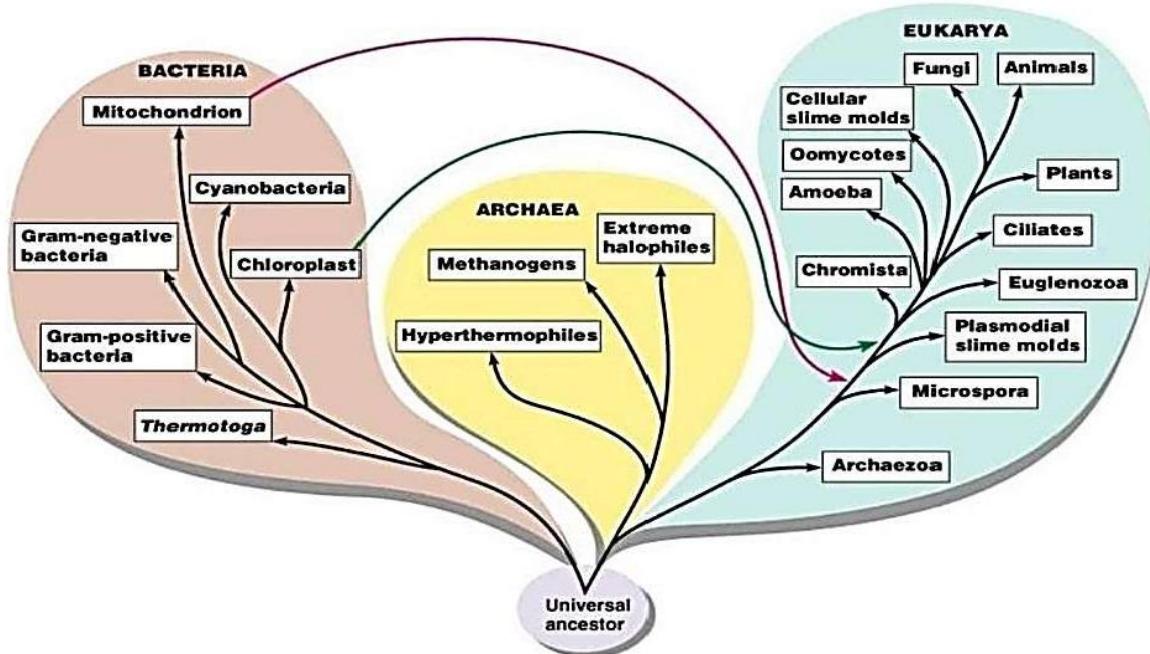


Рисунок 1 – Универсальное филогенетическое дерево (по К. Вёзе, 1977)

3. Роль бактерий в биогеохимических циклах. Простые элементы, участвующие в строении всего живого, существуют на поверхности земли только в ограниченных количествах. Составляющие мертвых организмов должны быть переработаны. Микроорганизмы играют жизненно важную роль в этом процессе переработки.

Углеродный цикл – это основной состав живых существ. Сапрофитные микроорганизмы разрушают органическое вещество мёртвых растений и животных. Автотрофные микроорганизмы фиксируют CO_2 . Но это явление незначительно по сравнению с фотосинтетической активностью в количественном отношении.

Азотный цикл зависит от активности бактерий. Он необходим для синтеза аминокислот, нуклеиновых кислот и аминосахаров. Наша атмосфера на 78 % состоит из азота. Азот в форме аммиака может ассимилироваться многими организмами, будучи включённым в виде аминогруппы. Другие бактерии используют нитраты в качестве источника азота. Разложение органического вещества сапрофитами высвобождает аммиак (дезаминирование аминокислот). Часть аммиака используется непосредственно в качестве источника азота. Другая часть окисляется до нитрита (NO_2^-), затем до нитрата (NO_3^-) хемотрофными бактериями во время нитрификации. Другие бактерии могут фиксировать азот из атмосферы и производить АТФ в отсутствие кислорода. Нитрат восстанавливается до нитрита. Некоторые бактерии восстанавливают нитриты до молекулярного азота (денитрификация). Эти потери компенсируются азотфиксирующими бактериями благодаря ферменту нитрогеназе. Азотфиксирующими являются *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Nostoc*, *Anabaena*, цианобактерии.

Круговорот серы. Сера входит в состав двух аминокислот – цистеина и метионина, СоA. Зелёные растения и некоторые бактерии могут усваивать серу в форме сульфата, но для этого сульфат необходимо восстановить в процессе сульфатредукции. В природе существуют микроорганизмы, которые непосредственно ассимилируют сульфиды, образующиеся в больших количествах в анаэробной водной среде, путём восстановления сульфатов. Эти сульфиды, в свою очередь, окисляются хемилитотрофами, такими как *Thiobacillus*, а также зелёными и пурпурными сернистыми фотосинтезирующими бактериями.

Фосфорный цикл. Фосфор важен для синтеза нуклеиновых кислот, фосфолипидов. Фосфор часто является самым ограничивающим фактором для роста организмов. Фосфор можно получить только при распаде породы, содержащей фосфат. В почве содержится как органический, так и неорганический фосфор. Органическое вещество перерабатывается микроорганизмами.

Цикл железа. Он заключается в окислении двухвалентного железа до трехвалентного (от Fe^{2+} до Fe^{3+}) в аэробных условиях и при нейтральной реакции среды (*Thiobacillus ferrooxidans*). При анаэробиозе ион двухвалентного железа накапливается в процессе дыхания железа, в котором используется ион трёхвалентного железа как акцептор электронов (*Geobacter*). Наконец, магнитотактические бактерии превращают железо в магнетит (Fe_3O_4), который накапливается в цитоплазме. Магнетит чувствителен к магнитным полям и может использоваться бактериями для миграции через водоёмы и болота в места, более богатые кислородом.

4. Характеристики некультивируемых и нежизнеспособных форм бактерий. Мёртвые бактерии, не культивируемые и нежизнеспособные, не имеют метаболической активности, у них отсутствует обмен между цитозолем и внешним миром. Поскольку обновления мембранных липидов больше не происходит, плазматическая мембрана мёртвых клеток обычно изменяется. Некоторые факторы могут привести к гибели бактерии или лизису клеток: осмотический шок, термическая обработка, действие сурфактанта или влияние pH. Во время роста в культуральной среде гибель бактерий в значительной степени происходит во время четвертой фазы (фаза, при которой запас питательных веществ исчерпывается и бактерии погибают)⁴.

Рост бактериальной культуры можно разделить на несколько этапов (рис. 2). Первая фаза, называемая латентным периодом, – это период адаптации бактериальных клеток к среде, в которой они находятся. Вторая фаза – экспоненциальный рост: клетки быстро делятся и колонизируют среду; на этом этапе в бактериальной популяции гораздо больше живых, чем мёртвых клеток. В конце экспоненциальной фазы рост замедляется, затем начинается стационарная фаза. Бактериальная популяция остаётся стабильной, бактерии используют компоненты среды для синтеза вторичных метаболитов. На этом этапе среда меняется, метаболиты, выделяемые бактериями,

⁴ Первая фаза роста называется лаг-фазой, вторая – логарифмической, или экспоненциальной фазой, третья фаза – стационарная, четвёртая – финальная (фаза гибели).

/накапливаются, количество мёртвых клеток увеличивается. После продолжительной стационарной фазы бактерии погибают либо потому, что они больше не могут обеспечивать свой метаболизм, либо из-за токсичности определённых метаболитов, которые они секретируют. Клеточная мембрана, а также бактериальная стенка могут быть повреждены, тогда происходит лизис клеток [25].

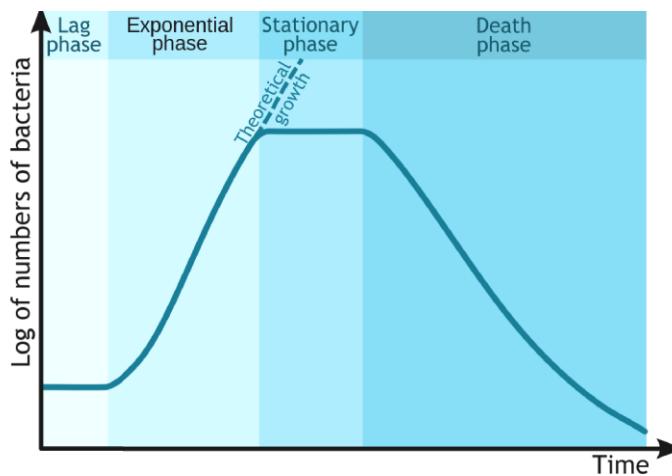


Рисунок 2 – Кривая роста бактериальной популяции

Характеристики жизнеспособных некультивируемых форм бактерий (VBNC). Первая статья, описывающая и демонстрирующая существование жизнеспособных некультивируемых форм на микробах *Escherichia coli* и *Vibrio cholerae*, датируется 1982 г. [40]. С тех пор список изучаемых и описанных микроорганизмов в жизнеспособном некультивируемом состоянии увеличился (табл. 1).

Таблица 1 – Жизнеспособные некультивируемые формы бактерий

<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>S. flexneri</i>
<i>Aquaspirillum sp.</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>S. sonnei</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>B. pseudomallei</i>	<i>M. luteus</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>M. varians</i>	<i>Tenacibaculum sp.</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
<i>C. lari</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>V. campbellii</i>
<i>Cytophaga allerginae</i>	<i>Pasteurella piscida</i>	<i>V. cholerae</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>V. fischeri</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>V. harveyi</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>P. putida</i>	<i>V. mimicus</i>
<i>E. hirae</i>	<i>P. syringae</i>	<i>V. natriegens</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
<i>Escherichia coli</i> (including EHEC)	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>V. proteolytica</i>
<i>Francisella tularensis</i>	<i>R. meliloti</i>	<i>V. shiloi</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	<i>V. vulnificus</i> (types 1&2)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. typhi</i>	
<i>K. planticola</i>	<i>S. typhimurium</i>	

Бактерия может находиться в жизнеспособном некультивируемом состоянии, но потерять способность к размножению на обычной культуральной среде. Её метаболическая активность может быть продемонстрирована присутствием мРНК с продолжительностью жизни менее 1 мин [41]. Эти бактерии могут восстановить свою «культивируемость» — феномен, называемый «реанимацией (resuscitation) [21]. Переход бактерии в состояние VBNC — это стратегия, которая позволяет клеткам выживать в неблагоприятных условиях, т. е. обратимое состояние, подобное споруляции грамположительных бактерий, таких как *Bacillus* или *Clostridium*. Такие VBNC обладают особыми и часто разными характеристиками у разных видов. Имеется несколько работ, в которых описаны характеристики микроорганизмов в состоянии VBNC. Исследование, проведенное на *Campylobacter jejuni*, показало, что жизнеспособная некультивируемая клетка сохраняет уровень АТФ, сравнимый с культивируемой клеткой [4]. Однако у *C. jejuni* были продемонстрированы некоторые физиологические изменения: падение внутриклеточного pH и концентрации ионов калия (K^+) [33]. В дополнение к метаболическим и физиологическим характеристикам, жизнеспособные некультивируемые бактерии имеют морфологические и структурные отличия от культивируемых форм. Значительное повышение механической устойчивости бактериальной стенки было показано на *Enterococcus faecalis* [16]. Это можно объяснить изменениями структуры стенки: в частности, наличием муропептидных полимеров более двух степеней (тримеры, тетramerы, пентамеры и др.).

VBNC клетки и их значение. Многие виды бактерий входят в состояние VBNC при воздействии стрессовых условий, таких как отсутствие питательных веществ и низкие температуры [5; 10]. Это позволяет предположить о долгосрочной адаптивной стратегии выживаемости бактерий в неблагоприятных условиях окружающей среды [11]. Данная гипотеза подтверждается некоторыми характеристиками клеток VBNC, включая большую устойчивость к экзогенным стрессам, долговременную выживаемость после стресса и способность к реанимации. Например, клетки VBNC *V. parahaemolyticus* более устойчивы к кислотности, что позволяет им выживать в неблагоприятной окружающей среде при низком pH [39]. VBNC-клетки *V. fluvialis* становятся жизнеспособными после шести лет дефицита питательных веществ, т. е. можно предположить, что бактерии в состоянии VBNC могут оставаться живыми в течение длительного времени даже при постоянном стрессе [1]. Что ещё более важно, многие виды обладают способностью переходить из состояния VBNC в состояние культивирования после снятия стресса [2; 29]. Доказательства, представленные выше, подтверждают гипотезу о том, что состояние VBNC — это форма жизни в состоянии покоя, которая позволяет организму ждать соответствующих условий для восстановления [16; 17]. Другая гипотеза предполагает, что состояние VBNC является переходной стадией дегенерации бактериальной популяции, ведущей к гибели клеток

[20; 34]. Тем не менее доказательств в поддержку второй гипотезы не так много, поэтому первое является общепринятым.

Способность перейти в состояние VBNC может быть полезным для бактерий, но представляет риск для здоровья человека. Если присутствуют клетки VBNC, общее количество жизнеспособных бактерий в образце будет недооценено методом подсчёта КОЕ (колониеобразующая единица). Что ещё хуже, если все бактерии в образце находятся в состоянии VBNC, образец можно считать стерильным из-за отсутствия роста бактерий при обнаружении классическими методами. Риски возникают из-за того, что патогенные бактерии могут быть авирулентными в состоянии VBNC, но проявляют свою вирулентность после восстановления [10]. Это свойство клеток VBNC может приводить к латентному периоду и, как следствие, к рецидиву заболевания у пациентов, которые считаются излечёнными [23; 28]. Поэтому крайне важно понимать, какие виды патогенов человека могут переходить в состояние VBNC, и применять надёжные методы обнаружения для количественного определения точной популяции жизнеспособных клеток, включая культивируемые клетки и VBNC. Помимо этого, для эффективного предотвращения бактериальных инфекций и их лечения необходимо определение условий, которые могут побудить бактерии к переходу в состояние VBNC, и лежащих в основе механизмов, а также понимание условий и механизмов восстановления.

Факторы, вызывающие гибель клеток. Многие факторы могут привести к гибели клеток, естественной или вызванной факторами окружающей среды: высокие температуры, используемые для стерилизации или пастеризации, осмотический шок, органические растворители и поверхностно-активные вещества, высокая концентрация соли, слишком кислая или слишком щелочная реакция среды, отсутствие субстратов, необходимых для выживания, длительное хранение при низких температурах, ферменты, антибиотики.

Индукция некультивируемого жизнеспособного состояния.

У каждого вида бактерий есть стратегии защиты от внешних стрессов: образование спор, выработка определённых белков при тепловом стрессе (например, белки теплового шока – heat shock proteins), переход в некультивируемое состояние или даже адаптация метаболизма к внешним условиям. Бактериальные клетки переходят в состояние VBNC при воздействии таких стрессов, как низкие или высокие температуры, колебания осмотического давления, дефицит питательных веществ, окислительный стресс, вызванный избытком кислорода и его активных производных, обезвоживание, длительное воздействие естественного света [3; 22]. Эти же факторы могут быть смертельными. Эффект каждого из них зависит, в частности, от продолжительности и степени воздействия. Природные условия, в которых обитают бактерии, часто не оптимальны для роста и способствуют появлению форм VBNC. Например, первые бактерии в состоянии VBNC, изученные N. S. Xu et al. в 1982 г. были *Escherichia coli* и *Vibrio cholerae*, выделенные из морской и устьевой воды (относительно холодная вода (+15 °C) и высокая солёность

(в среднем 35 г/л солей для морской воды)) [40]. В продуктах питания человека, бактерии также подвергаются серьёзным испытаниям: длительное хранение при +4 °C, солёные или копчёные продукты, консерванты или даже пастеризация. Все эти воздействия могут предотвратить размножение бактерий, но также вызывают присутствие форм VBNC.

Экспериментальная индукция некультивируемого жизнеспособного состояния. Многие исследования проводятся на бактериальных формах VBNC, для чего необходимо иметь возможность искусственно индуцировать переход бактерий в состояние VBNC. Большинство исследований проводится на формах, вызванных дефицитом питательных веществ. Для этого бактерии хранят в изотонических растворах, лишенных питательных веществ, или в искусственной морской воде. Эта обработка может сопровождаться инкубацией при низкой температуре [37]. Во всех случаях необходимо проверить жизнеспособность клеток, содержащихся в бактериальных образцах.

Жизнеспособные бактерии, которые не могут быть культивируемыми в окружающей среде. По данным J. T. Staley et al., более 99 % видов, присутствующих в окружающей среде, будут находиться в состоянии VBNC [30]. Некоторые исследования были выполнены на различных средах, таких как осадок сточных вод [12] или на почвах (бурые земли) [35].

Действительно, некоторые исследования показывают, что сохранение форм VBNC в нескольких объектах окружающей среды, естественно загрязненных жизнеспособной и культивируемой флорой, невозможно [6; 18]. В случае, когда стрессированные микробы находятся в состоянии VBNC, конкурируя с многочисленной не斯特рессированной флорой, их шансы на выживание сильно снижаются.

5. Методы исследования некультивируемых бактерий

Анализ методом флуориметрии. Несколько методов поиска и подсчёта жизнеспособных бактерий основаны на флуориметрии. Этот метод требует использования системы эпифлуоресцентной микроскопии. Принцип этой микроскопии состоит в возбуждении флуорохрома на заданной длине волны, чтобы можно было наблюдать излучаемый сигнал. Обработка полученного изображения может осуществляться с помощью компьютерной системы, подключенной к CCD-камере (Charge Coupled Device — фотографический датчик на основе устройства с зарядовой связью).

Двойное окрашивание СTC / DAPI позволяет подсчитывать и различать мёртвые и живые клетки. СTC (5-суано-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) — это краситель, используемый для подсчёта жизнеспособных клеток. После восстановления СTC до нерастворимого СTC-формазана испускает красную флуоресценцию (после возбуждения на 450 нм испускается красной флуоресценции на 630 нм). Уменьшение СTC клетками является признаком клеточного дыхания и означает, что метаболизм активен [12; 14].

Окрашивание DAPI (4'-6 diamino 2 phenyl indole) позволяет подсчитывать все клетки. Этот флуорофор специфически связывается с ДНК и излучает синюю флуоресценцию с максимальной эмиссией при 456 нм (возбуждение

при 372 нм, светло-фиолетовый). Окрашивание можно проводить одновременно или по отдельности на двух образцах.

Анализ молекулярной биологии с помощью RT-PCR. Использование инструментов молекулярной биологии позволило изучать бактерии в жизнеспособном некультивируемом состоянии. Приведём инструменты, позволяющие обнаруживать бактерии VBNC. *Полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой* (RT-PCR) — метод, используемый для обнаружения VBNC. Мишенями этой реакции являются мРНК, транскрибуемые из генов потенциально указывающих на жизнеспособности клеток. В исследовании S. Yaron и K. R. Matthews сравнивается эффективность RT-PCR на мРНК различных генов-мишеней [41]. В этом исследовании транскрипция генов rfbE, fliC, stx1, stx2, mobA, eaeA, hly и гена, кодирующего РНК 16S, ищется с помощью RT-PCR на культурах *E. coli* O157: H7 на разных стадиях развития рост. Этот эксперимент позволяет показать, что гены rfbE, stx1 и ген, кодирующий РНК 16S, транскрибируются на протяжении всего роста.

Второй эксперимент проводится на жизнеспособных некультивируемых клетках; проводят амплификацию всех генов с помощью ПЦР, а также амплификацию мРНК с помощью RT-PCR. Все гены амплифицируются с помощью ПЦР, тогда как RT-PCR позволяет амплифицировать только гены 16S РНК, stx1, rfbE и mobA. Это означает, что несмотря на присутствие всех генов в жизнеспособных некультивируемых клетках, транскрибируются только гены 16S РНК, stx1, rfbE и mobA.

Данный метод делает эти гены предпочтительными мишениями для поиска *E. coli* 0157: H7 с помощью RT-PCR. Однако авторы поднимают проблему чувствительности метода, указывая, что требуется присутствие от $5 \cdot 10^5$ до 10^7 КОЕ в зависимости от целевого гена, чтобы получить амплификацию транскриптов с помощью RT-PCR; здесь 10^4 КОЕ необходимы для амплификации генов с помощью стандартной ПЦР.

6. Реанимация (resuscitation) — самая простая форма возврата к выращиванию, происходит при благоприятных условиях для роста. Воздействия благоприятной температуры может быть достаточно, чтобы поднять состояние VBNC [37]. Однако этот случай не является обобщённым, многие ростки требуют особых условий для возникновения состояния VBNC. Такие условия зависят от исследуемых микробов, поэтому необходимо иметь дело с примерами исследований на конкретных микродах.

Некоторые исследования показывают эффект антиоксидантов (anti-ROS — anti-Réactive Oxygen Species). Клетки в некультивируемом состоянии имеют пониженный метаболизм, некоторые гены не экспрессируются. В своём исследовании I. Kong et al. предположили, что *Vibrio vulnificus* теряет способность восстанавливать H_2O_2 из-за отсутствия синтеза каталазы. ROS, которые больше не разлагаются, становятся токсичными и смертельными для клеток, культивируемых на богатой среде [15]. Явление тем более верно для агаризованной среды, где эти токсические агенты не могут диффундировать, как в случае культуры в жидкой среде. Гипотеза подтверждается

с помощью мутанта, лишённого активности каталазы (oxyR-). Последний не способен образовывать колонии на среде НІА; он восстанавливает эту способность, когда в среду добавляют каталазу или пируват натрия (антиоксидант) [15]. Другое исследование показало эффект ферриоксамина Е, молекулы сидерофоров, позволяющей импортировать железо в клетку. Железо снижает производство ROS, следовательно, уменьшает повреждение клеток этими молекулами. Использование ферриоксамина Е позволило получить большое количество реанимированных клеток в жидкой культуре [27].

Случай *Legionella pneumophila* изучили M. Steinert et al.: этот микроб, патогенный для человека, также является паразитом некоторых простейших [31]. В своём исследовании команда описывает возвращение *L. pneumophila* к культивируемому состоянию после контакта с *Acanthamoeba castellanii* — простейшим животным-хозяином *Legionella* [31]. Хозяин позволяет микробам размножаться, но также переносится в окружающую среду; транспортируется в среду с более благоприятными условиями. Возврат к культивируемому состоянию *L. pneumophila* также возможен после инкубации в оплодотворённых яичных желтках [13]. Этот результат был также воспроизведён на других видах: *Campylobacter jejuni* [8], *Listeria monocytogenes* [7] и *Salmonella enterica* [9].

Rpf и Sps белки. Исследование, проведённое на *Micrococcus luteus*, позволило продемонстрировать влияние жизнеспособных и культивируемых форм на некультивируемые клетки в той же среде. Формы VBNC *M. luteus* вновь обретают способность делиться в присутствии культивируемых клеток этой бактерии [36]. Эта «передача» культивируемого признака индуцируется присутствием белков, называемых Resuscitation Promoting Factor (Rpf), — это пептидогликангидролаза, секрецируемая *M. luteus* в культивируемом состоянии. Этот белок обладает литической активностью по отношению к компонентам бактериальной стенки и, в частности, к муропептидам [19; 32]. Такие белки также были обнаружены у других видов, большинство из которых имеют общий домен («домен Rpf») и аналогичную активность. Исследования, проведённые на каждом из белков, секрецируемых разными видами бактерий, позволили разделить их на разные группы. Семейство белков Rpf включает несколько подсемейств: RpfA, RpfB, RpfC, RpfD, RpfE, Shorts RpfS, белки LysM, а также группу белков SceA и SceD, обнаруженных в *Staphylococcus*, причём последние являются наиболее удаленными от других групп белки Rpf [26].

Исследование на *Salmonella typhimurium* также показало существование белка Rpf-типа, позволяющего вернуться в культивируемое состояние [24]. Однако белки Rpf — не единственные, которые влияют на способность бактерий делиться. Семейство белков Sps (Stationary phase survival) было обнаружено в Firmicutes. Эти белки обладают литической активностью в отношении пептидогликана бактериальных стенок, аналогичной активности белков Rpf. Семейство белков Sps также подразделяется на группы А, В, С, Д и Е;

каждая из этих групп включает белки, имеющие домен Sps. Белки MltA (Membrane-bound lytic transglycosylase A), присутствующие в Clostridium, а также белка, происходящего из профага *Bacillus subtilis*, также имеют домен Sps [26].

Заключение. Состояние VBNC является одновременно важным инструментом для выживания бактерий и опасным аспектом патогенных бактерий для хозяина. Знания о состоянии VBNC получены в результате исследований множества бактерий и подчёркивают сложность этого адаптационного механизма. Что кажется очевидным, так это то, что индукция и реанимация состояния VBNC сильно варьируется среди видов бактерий. Способность избегать состояний, которые приводят к реанимации, или разработка лекарств, вызывающих реанимацию во время антибиотикотерапии, может иметь большое влияние на последствия состояния VBNC при хронических инфекционных заболеваниях.

Трудности, возникающие при выращивании всех бактерий, присутствующих в окружающей среде и в нашей пище, усложняют анализ этих микробов. Вот почему были разработаны различные методы, позволяющие обнаруживать и подсчитывать все жизнеспособные бактерии. Эти методы основаны на демонстрации характеристик жизнеспособного состояния: ферментативной или метаболической активности и клеточного дыхания, состояния мембран, производство нуклеиновых кислот (РНК). Большинство этих методов могут обнаруживать жизнеспособные клетки, но не могут идентифицировать или изолировать их. За исключением RT-PCR которая позволяет проводить поиск по видам.

Список литературы

1. Amel, B. K.-N. Survival of *Vibrio fluvialis* in seawater under starvation conditions / B. K.-N. Amel, B. Amine, B. Amina // Microbiology Research. 2008. — Vol. 163. — P. 323–328. — doi 10.1016/j.micres.2006.06.006.
2. Bates, T. C. The viable but nonculturable state of kanagawa positive and negative strains of *Vibrio parahaemolyticus* / T. C. Bates, J. D. Oliver // Journal of Microbiology. — 2004. — Vol. 42. — P. 74–79.
3. Besnard, V. Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes* / V. Besnard, M. Federighi, E. Declercq, F. Juglau, J. M. Cappelier // Sciences. — 2002. — Vol. 33. — P. 359–370.
4. Beumer, R. R. *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells / R. R. Beumer, J. de Vries, F. M. Rombouts // International Journal of Food Microbiology. — 1992. — Vol. 15. — P. 153–163.
5. Biosca, E. G. Effect of low temperature on starvation-survival of the eel pathogen *Vibrio vulnificus* biotype 2 / E. G. Biosca, C. Amaro, E. Marco-Noales, J. D. Oliver // Applied and Environmental Microbiology. — 1996. — Vol. 62. — P. 450–455.
6. Bogosian, G. Death of the *Escherichia coli* K12 strain W3110 in soil and water / G. Bogosian, L. E. Sammons, P. J. L. Morris, J. P. O'Neil, M. A. Heitkamp, D. B. Weber // Applied and Environmental Microbiology. — 1996. — Vol. 62. — P. 4114–4120.
7. Cappelier, J. M. Avirulent viable but non culturable cells of *Listeria monocytogenes* need the presence of an embryo to be recovered in egg yolk and regain virulence after recovery /

J. M. Cappelier, V. Besnard, S. M. Roche, P. Velge, M. Federighi // Sciences. — 2007. — Vol. 38. — P. 573–583.

8. Cappelier, J. M. Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to HeLa cells after resuscitation / J. M. Cappelier, J. Minet, C. Magras, R. R. Colwell, M. Federighi // Applied and Environmental Microbiology. — 1999. — Vol. 65. — P. 5154–5157.

9. Dhiab, A. Recovery in embryonated chicken eggs of viable but nonculturable *Salmonella* / A. Dhiab, A. Bakhrouf // Journal of Food, Agriculture and Environment. — 2004. — Vol. 2 (2). — P. 104–107.

10. Du, M. Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* isolate / M. Du, J. Chen, X. Zhang, A. Li, Y. Li, Y. Wang // Applied and Environmental Microbiology. — 2007. — Vol. 73. — P. 1349–1354. — doi 10.1128/AEM.02243-06.

11. Ducret, A. Characterization and resuscitation of ‘non-culturable’ cells of *Legionella pneumophila* / A. Ducret, M. Chabalier, S. Dukan // BMC Microbiology. — 2014. — Vol. 14. — P. 3. — doi 10.1186/1471-2180-14-3.

12. Garrec, N. Behaviour of *Listeria monocytogenes* Scott A and a wild strain in different sewage sludge matrices : evaluation of culturability and viability and determination of potential virulence in a mice bioassay / N. Garrec, V. Besnard, C. Magras, A. M. Pourcher, M. Federighi // Revue de Médecine Vétérinaire. — 2005. — Vol. 156, iss. 3. — P. 148–154.

13. Hussong, D. Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture agar media / D. Hussong, R. R. Colwell, M. O’Brien, E. Weiss, A. D. Pearson, R. M. Weimer, W. D. Burge // Bio/technology. — 1987. — Vol. 5. — P. 947–950.

14. Joux F. P. Lebaron. Ecological implications of an improved Direct Viable Count method for aquatic bacteria / Joux F. P. Lebaron // Applied and Environmental Microbiology. — 1997. — Vol. 63. — P. 3643–3647.

15. Kong, I. Role of catalase and *oxyR* in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus* / I. Kong, T. C. Bates, A. Hülsmann, H. Hassan, B. E. Smith, J. D. Oliver // FEMS Microbiology Ecology. — 2004. — Vol. 50. — P. 133–142.

16. Lleò, M. M. Inhibition of the resuscitation from the viable but non-culturable state in *Enterococcus faecalis* / M. M. Lleò, D. Benedetti, M. C. Tafi, C. Signoretto, P. Canepari // Applied and Environmental Microbiology. — 2007a. — Vol. 9. — P. 2313–2320. — doi 10.1111/j.1462-2920.2007.01345.x.

17. Lleò, M. M. Adhesion to medical device materials and biofilm formation capability of some species of enterococci in different physiological states / M. M. Lleò, B. Bonato, M. C. Tafi, G. Caburlotto, D. Benedetti, P. Canepari // FEMS Microbiology Letters. — 2007b. — 274, 232–237. — doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00836.x.

18. Marsher, F. The viable-but-nonculturable state induced by abiotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 does not promote strain persistence in soil / F. Marsher, C. Hase, Y. Moënne-Loccoz, G. Défago // Applied and Environmental Microbiology. — 2000. — Vol. 66. — P. 1662–1667.

19. Mukamolova, G. V. Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation / G. V. Mukamolova, A. G. Murzin, E. G. Salina, G. R. Demina, D. B. Kell, A. S. Kaprelyants, M. Young // Molecular Microbiology. — 2006. — Vol. 59 (1). — P. 84–98.

20. Nyström, T. Nonculturable bacteria: programmed survival forms or cells at death's door? T. Nyström // Bioessays. — 2003. — Vol. 25. — P. 204–211. — doi: 10.1002/bies.10233.

21. Oliver, J. D. Viable but non culturable bacteria in food environments / J. D. Oliver // Foodborne pathogens: Microbiology and Molecular Biology / P. M. Fratamico, A. K. Bhunia, J. L. Smith. — Boca Raton : CRC Press LLC, 2005. — P. 99–112.

22. Oliver, J. D. The viable but nonculturable state in bacteria/ J. D. Oliver // Journal of Microbiology. — 2004. — Vol. 43. — P. 93–100.
23. Pai, S. R. Identification of viable and non-viable *Mycobacterium tuberculosis* in mouse organs by directed RT-PCR for antigen 85B mRNA / S. R. Pai, J. K. Actor, E. Sepulveda, R. L. Jr. Hunter, C. Jagannath // Microbial Pathogenesis. — 2000. — Vol. 28. — P. 335–342. — doi 10.1006/mpat.2000.0353.
24. Panutdaporn, N. Resuscitation of the viable but non-culturable state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation-promoting factor derived from *Salmonella Typhimurium* strain LT2 / N. Panutdaporn, K. Kawamoto, H. Asakura, S.-I. Makino // International Journal of Food Microbiology. — 2006. — Vol. 106. — P. 241–247.
25. Prescott, M. Lansing. Microbiologie / Prescott, M. Lansing ; ed. De Boeck. — 2^{eme} ed. — Paris, 2003. — 1137 p.
26. Ravagnani, A. C. L. A novel Firmicute protein family related to actinobacterial resuscitation-promoting factors by non orthologous domain displacement / A. C. L. Ravagnani, M. Young Finan // BMC Genomics. — 2005. — Vol. 6. — P. 39.
27. Reissbrodt, R. Resuscitation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and enterohemorrhagic *Escherichia coli* from the viable but nonculturable state by heat-stable enterobacterial autoinducer / R. Reissbrodt, I. Rienaecker, J. M. Romanova, P. P. E. Freestone, R. D. Haigh, M. Lyte et al. // Applied and Environmental Microbiology. — 2002. — Vol. 68. — P. 4788–4794. — doi: 10.1128/AEM.68.10.4788-4794.2002.
28. Rivers, B. Viable but nonculturable uropathogenic bacteria are present in the mouse urinary tract following urinary tract infection and antibiotic therapy / B. Rivers, T. R. Steck // Urology Research. — 2001. — Vol. 29. — P. 60–66. — doi: 10.1007/s002400000151.
29. Roszak, D. B. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems / D. B. Roszak, D. J. Grimes, R. R. Colwell // Canadian Journal of Microbiology. — 1984. — Vol. 30. — P. 334–338. — doi: 10.1139/m84-049.
30. Staley, J. T. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats / J. T. Staley, A. Konopka // Annual Review of Microbiology. — 1985. — Vol. 39. — P. 321–346.
31. Steinert, M. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii* / M. Steinert, L. Emödy, R. Amann, J. Rghacker // Applied and Environmental Microbiology. — 1997. — Vol. 63. — P. 2047–2053.
32. Telkov, M. V. Protein of the Rpf (resuscitation promoting factor) family are peptidoglycan hydrolases / M. V. Telkov, G. R. Demina, S. A. Voloshin, E. G. Salina, T. V. Dudik, T. N. Stekhanova, G. V. Mukamolova, K. A. Kazaryan, A. V. Goncharenko, M. Young, A. S. Kaprelyants // Biochemistry. — 2005. — Vol. 71. — P. 414–422.
33. Tholozan, J. L. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells / J. L. Tholozan, J. M. Cappelier, J. P. Tissier, G. Delattre, M. Federighi // Applied and Environmental Microbiology. — 1999. — Vol. 65. — P. 1110–1116.
34. Thomas, C. Culturability, injury and morphological dynamics of thermophilic *Campylobacter* spp. within a laboratory-based aquatic model system // C. Thomas, D. Hill, M. Mabey // Journal of Applied Microbiology. — 2002. — Vol. 92. — P. 433–442. — doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01550.x.
35. Turpin, P. E. Viable but nonculturable salmonellas in soil / P. E. Turpin, K. A. Maycroft, C. L. Rowlands, E. M. H. Wellington // Journal of Applied Microbiology. — 1993. — Vol. 74. — P. 421–427.
36. Votyakova, T. V. Influence of viable cells on resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended stationary phase : the population effect /

T. V. Votyakova, A. S. Kaprelyants, D. B. Kell // Applied and Environmental Microbiology. — 1994. — Vol. 60. — P. 3284–3291.

37. Whitesides, M. D. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state / M. D. Whitesides, J. D. Oliver // Applied and Environmental Microbiology. — 1996. — Vol. 63. — P. 1002–1005.

38. Woese, C. R. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms / C. R. Woese, G. E. Fox // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 1977. — Vol. 74. — P. 5088–5090.

39. Wong, H.-C. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses / H.-C. Wong, P. Wang // Journal of Applied Microbiology. — 2004. — Vol. 96. — P. 359–366. — doi: 10.1046/j.1365-2672.2004.02166.x.

40. Xu, H. S. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment / H. S. Xu, N. Roberts, F. L. Singleton, R. W. Attwell, D. J. Grimes, R. R. Colwell // Mirobial Ecology. — 1982. — Vol. 8. — P. 313–323.

41. Yaron, S. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157:H7: investigation of specific target genes / S. Yaron, K. R. Matthews // Journal of Applied Microbiology. — 2002. — Vol. 92. — P. 633–640.

References

1. Amel, B. K.-N., Amine, B., Amina, B. Survival of *Vibrio fluvialis* in seawater under starvation conditions. *Microbiology Research*. 2008; 163: 323–328. doi: 10.1016/j.micres.2006.06.006.
2. Bates, T. C., Oliver, J. D. The viable but nonculturable state of kanagawa positive and negative strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Microbiology*. 2004; 42: 74–79.
3. Besnard V., Federighi, M., Declercq, E., Juglau, F., Cappelier, J. M. Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Sciences*. 2002; 33: 359–370.
4. Beumer, R. R., Vries, J. de, Rombouts, F. M. *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. *International Journal of Food Microbiology*. 1992; 15: 153–163.
5. Biosca, E. G., Amaro, C., Marco-Noales, E., Oliver, J. D. Effect of low temperature on starvation-survival of the eel pathogen *Vibrio vulnificus* biotype 2. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996; 62: 450–455.
6. Bogosian G., Sammons, L. E., Morris, P. J. L., O’Neil, J. P., Heitkamp, M. A., Weber, D. B. Death of the *Escherichia coli* K12 strain W3110 in soil and water. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996; 62: 4114–4120.
7. Cappelier, J. M., Besnard, V., Roche, S. M., Velge, P., Federighi, M. Avirulent viable but non culturable cells of *Listeria monocytogenes* need the presence of an embryo to be recovered in egg yolk and regain virulence after recovery. *Sciences*. 2007; 38: 573–583.
8. Cappelier, J. M., Minet, J., Magras, C., Colwell, R. R., Federighi, M. Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to HeLa cells after resuscitation. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999; 65: 5154–5157.
9. Dhiaf A., Bakhrouf, A. Recovery in embryonated chicken eggs of viable but nonculturable *Salmonella*. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 2004; 2 (2): 104–107.
10. Du, M., Chen, J., Zhang, X., Li, A., Li, Y., Wang, Y. Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* isolate. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007; 73: 1349–1354. doi: 10.1128/AEM.02243-06.

11. Ducret, A., Chabalier, M., Dukan, S. Characterization and resuscitation of ‘non-culturable’ cells of *Legionella pneumophila*. *BMC Microbiology*. 2014; 14: 3. doi: 10.1186/1471-2180-14-3.
12. Garrec N., Besnard, V., Magras, C., Pourcher, A. M., Federighi, M. Behaviour of *Listeria monocytogenes* Scott A and a wild strain in different sewage sludge matrices : evaluation of culturability and viability and determination of potential virulence in a mice bioassay. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 2005; 156 (3): 148–154.
13. Hussong, D., Colwell, R. R., O’Brien, M., Weiss, E., Pearson, A. D., Weimer, R. M., Burge, W. D. Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture agar media. *Bio/technology*. 1987; 5: 947–950.
14. Joux F. P. Lebaron. Ecological implications of an improved Direct Viable Count method for aquatic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997; 63: 3643–3647.
15. Kong, I., Bates, T. C., Hülsmann, A., Hassan, H., Smith, B. E., Oliver, J. D. Role of catalase and *oxyR* in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiology Ecology*. 2004; 50: 133–142.
16. Lleò, M. M., Benedetti, D., Tafi, M. C., Signoretto, C., Canepari, P. Inhibition of the resuscitation from the viable but non-culturable state in *Enterococcus faecalis*. *Environmental Microbiology*. 2007a; 9: 2313–2320. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01345.x.
17. Lleò, M. M., Bonato, B., Tafi, M. C., Caburlotto, G., Benedetti, D., Canepari, P. Adhesion to medical device materials and biofilm formation capability of some species of enterococci in different physiological states. *FEMS Microbiology Letters*. 2007b; 274: 232–237. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00836.x.
18. Marsher F., Hase, C., Moënne-Loccoz, Y., Défago, G. The viable-but-nonculturable state induced by abiotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 does not promote strain persistence in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000; 66: 1662–1667.
19. Mukamolova, G. V., Murzin, A. G., Salina, E. G., Demina, G. R., Kell, D. B., Kaprelyants, A. S., Young, M. Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation. *Molecular Microbiology*. 2006; 59 (1): 84–98.
20. Nyström, T. Nonculturable bacteria: programmed survival forms or cells at death's door? *Bioessays*. 2003; 25: 204–211. doi: 10.1002/bies.10233.
21. Oliver, J. D. Viable but non culturable bacteria in food environments. *Foodborne pathogens: Microbiology and Molecular Biology*. Ed. by P. M. Fratamico, A. K. Bhunia, J. L. Smith. Boca Raton: CRC Press LLC; 2005: 99–112.
22. Oliver, J. D. The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology*. 2004; 43: 93–100.
23. Pai, S. R., Actor, J. K., Sepulveda, E., Hunter, R. L. Jr., Jagannath, C. Identification of viable and non-viable *Mycobacterium tuberculosis* in mouse organs by directed RT-PCR for antigen 85B mRNA. *Microbial Pathogenesis*. 2000; 28: 335–342. doi: 10.1006/mpat.2000.0353.
24. Panutdaporn N., Kawamoto, K., Asakura, H., Makino, S.-I. Resuscitation of the viable but non-culturable state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation-promoting factor derived from *Salmonella Typhimurium* strain LT2. *International Journal of Food Microbiology*. 2006; 106: 241–247.
25. Prescott, M. Lansing. *Microbiologie*. Ed. by De Boeck. 2^{eme} ed. Paris; 2003: 1137 p.
26. Ravagnani, A. C. L. Finan, M. Young. A novel Firmicute protein family related to actinobacterial resuscitation-promoting factors by non orthologous domain displacement. *BMC Genomics*. 2005; 6: 39.
27. Reissbrodt, R., Rienaecker, I., Romanova, J. M., Freestone, P. P. E., Haigh, R. D., Lyte, M., et al. Resuscitation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and

enterohemorrhagic *Escherichia coli* from the viable but nonculturable state by heat-stable enterobacterial autoinducer. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002; 68: 4788–4794. doi: 10.1128/AEM.68.10.4788-4794.2002.

28. Rivers, B., Steck, T. R. Viable but nonculturable uropathogenic bacteria are present in the mouse urinary tract following urinary tract infection and antibiotic therapy. *Urology Research*. 2001; 29: 60–66. doi: 10.1007/s002400000151.

29. Roszak, D. B., Grimes, D. J., Colwell, R. R. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Canadian Journal of Microbiology*. 1984; 30: 334–338. doi: 10.1139/m84-049.

30. Staley, J. T., Konopka, A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology*. 1985; 39: 321–346.

31. Steinert, M., Emödy, L., Amann, R., Rghacker, J. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997; 63: 2047–2053.

32. Telkov, M. V., Demina, G. R., Voloshin, S. A., Salina, E. G., Dudik, T. V., Stekhanova, T. N., Mukamolova, G. V., Kazaryan, K. A., Goncharenko, A. V., Young, M., Kaprelyants, A. S. Protein of the Rpf (resuscitation promoting factor) family are peptidoglycan hydrolases. *Biochemistry*. 2005; 71: 414–422.

33. Tholozan, J. L., Cappelier, J. M., Tissier, J. P., Delattre, G., Federighi, M. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999; 65: 1110–1116.

34. Thomas, C., Hill, D., Mabey, M. Culturability, injury and morphological dynamics of thermophilic *Campylobacter* spp. within a laboratory-based aquatic model system. *Journal of Applied Microbiology*. 2002; 92: 433–442. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01550.x.

35. Turpin, P. E., Maycroft, K. A., Rowlands, C. L., Wellington, E. M. H. Viable but nonculturable salmonellas in soil. *Journal of Applied Microbiology*. 1993; 74: 421–427.

36. Votyakova, T. V., Kaprelyants, A. S., Kell, D. B. Influence of viable cells on resuscitation of dormant cells in *Micrococcus luteus* cultures held in an extended stationary phase : the population effect. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994; 60: 3284–3291.

37. Whitesides, M. D., Oliver, J. D. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996; 63: 1002–1005.

38. Woese, C. R., Fox, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977; 74: 5088–5090.

39. Wong, H.-C., Wang, P. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *Journal of Applied Microbiology*. 2004; 96: 359–366. doi: 10.1046/j.1365-2672.2004.02166.x.

40. Xu, H. S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J., Colwell, R. R. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology*. 1982; 8: 313–323.

41. Yaron, S., Matthews, K. R. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157:H7: investigation of specific target genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002; 68: 633–640.

Информация об авторах

Хаффарессас Я. — магистерская степень в области микробиологии и вирусологии, старший биолог;

Василенко О. В. — кандидат биологических наук, сотрудник.

Information about the authors

Khaffaressas Ya. — Magister degree in Microbiology and Virology, Senior Biologist;
Vasilenko O. V. — candidate of biological sciences, employee.

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в публикации.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution of the authors

All authors have made equivalent contributions to publications.

The authors declare that there is no conflict of interest.

Статья поступила в редакцию 16.05.2025; одобрена после рецензирования 26.06.2025; принята к публикации 04.07.2025.

The article was submitted 16.05.2025; approved after reviewing 26.06.2025; accepted for publication 04.07.2025.