

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ БАКТЕРИЙ КАК СТРАТЕГИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ И ОБЪЕКТ СОВРЕМЕННЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ (ОБЗОР)

DOI: 10.17691/stm2019.11.2.22

УДК 579.8

Поступила 25.05.2018 г.



Б.Г. Андрюков, д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии¹;
профессор департамента фундаментальных наук²;

Л.М. Сомова, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии¹;

Е.В. Матосова, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии¹;

И.Н. Ляпун, к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии¹

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, ул. Сельская, 1, Владивосток, 690087;

²Дальневосточный федеральный университет, ул. Суханова, 8, Владивосток, 690950

Приспособление (адаптация) к непрерывно меняющимся условиям среды обитания — одно из важнейших свойств микроорганизмов. Особенно эффективной формой адаптации является фенотипическая пластичность. Эта способность позволяет одинаковым по генотипу бактериям в ответ на воздействия внешней среды создавать различные фенотипы. Такая изменчивость не является наследуемой, однако имеет ключевое значение в сохранении популяции бактерий и лежит в основе стратегий развития их резистентности к антибиотикам. Изучение форм и механизмов фенотипической пластичности, обеспечивающих устойчивость микроорганизмов к традиционной антибиотикотерапии, — ведущее направление создания современных антимикробных технологий. В настоящем обзоре рассмотрена фенотипическая пластичность как стратегия выживания и способ формирования антибиотикорезистентности у dormantных (устойчивых) клеточных форм бактерий. Показано, что исследование фенотипических вариантов адаптационных стратегий бактерий (L-форм; жизнеспособных, но некультивируемых бактерий; клеток-персистеров) открывает широкие перспективы для разработки новых антимикробных технологий вследствие их лекарственной устойчивости.

Ключевые слова: адаптация бактерий; среда обитания; фенотипическая пластичность; L-формы; жизнеспособные, но некультивируемые бактерии; VBNC; клетки-персистеры; современные антимикробные технологии.

Как цитировать: Andryukov B.G., Somova L.M., Matosova E.V., Lyapun I.N. Phenotypic plasticity as a strategy of bacterial resistance and an object of advanced antimicrobial technologies (review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2019; 11(2): 164–182, <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.2.22>

English

Phenotypic Plasticity as a Strategy of Bacterial Resistance and an Object of Advanced Antimicrobial Technologies (Review)

B.G. Andryukov, MD, DSc, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology¹; Professor,
Department of Fundamental Sciences²;

L.M. Somova, MD, DSc, Professor, Chief Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology¹;

E.V. Matosova, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology¹;

I.N. Lyapun, PhD, Researcher, Laboratory of Molecular Microbiology¹

¹Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, 1 Selskaya St., Vladivostok, 690087, Russia;

²Far Eastern Federal University, 8 Sukhanova St., Vladivostok, Russia

Adaptation to continuously changing habitat is one of the most important characteristics of microorganisms. A particularly effective form of adaptation is called phenotypic plasticity. This ability allows bacteria with a stable genotype to create different phenotypes in response to environmental changes. Such variability is not inheritable but is crucial for maintaining this specific bacterial population and, even more,

Для контактов: Андрюков Борис Георгиевич, e-mail: andryukov_bg@mail.ru

for developing resistance to antibiotics. Studying the phenotypic plasticity, which underlies the resistance of microorganisms to traditional antibiotic therapy, is a key area of the current antimicrobial technologies. In this review, phenotypic plasticity is considered to be a strategy of bacterial survival and a mechanism for developing antibiotic resistance in dormant (resistant) cellular forms of bacteria. We suggest that studying the phenotypic variants of bacteria (L-forms; viable but nonculturable bacteria; persister cells) will result in the development of novel effective antimicrobial technologies.

Key words: bacteria adaptation; habitat; phenotypic plasticity; L-forms; viable but nonculturable bacteria; VBNC; persister cells; advanced antimicrobial technologies.

Введение

Бактериальные инфекции являются основной причиной заболеваемости и смертности. Во всех странах независимо от уровня экономического развития наблюдается рост инфекционной патологии, для которой характерно латентное, затяжное и хроническое течение [1, 2]. Увеличивается частота инфекций, ассоциированных с условно-патогенной флорой и связанных с госпитальным заражением пациентов. Нередко традиционная антибиотикотерапия оказывается бессильной перед прогрессирующей лекарственной устойчивостью микроорганизмов, которая названа ВОЗ в числе глобальных проблем современного здравоохранения [3].

Открытие новых или улучшение существующих антибиотиков становится все более длительным и сложным процессом, в ряде случаев экономически нерентабельным. Для разработки инновационных направлений антибактериальной стратегии необходимы оригинальные подходы. Один из таких подходов связан с изучением фенотипической пластичности бактерий, лежащей в основе их адаптационных стратегий и антибиотикорезистентности.

Достижения молекулярной биологии и генетики начала XXI в. расширили представления об адаптационных механизмах возбудителей заболеваний, а также их регуляции, формах существования, патогенетической и эпидемиологической роли в инфекционном процессе [4–6]. Широкое и бесконтрольное использование антибактериальных препаратов в течение последних десятилетий без учета специфического ответа микроорганизмов привело к закату эры антибиотиков и обусловило потребность в поиске альтернативных противомикробных терапевтических стратегий вследствие лекарственной устойчивости бактерий [3, 7].

Условия окружающей среды постоянно меняются, и, чтобы сохранить жизнеспособность и возможность адаптации, многие бактерии выработали различные механизмы переключения в метаболически неактивное состояние [1, 4, 5]. Наиболее изученным видом клеточного покоя является споруляция, которая характерна для спорообразующих бактерий [2]. Однако в последние годы в связи с прогрессирующим снижением эффективности традиционной антибиотикотерапии при инфекционной патологии предметом научных ис-

следований становятся устойчивые клеточные формы неспорообразующих бактерий [1, 2, 4].

Среди основных причин формирования антибиотикорезистентности и распространения хронических инфекций выделяют способность возбудителей к наследуемой фенотипической гетероморфности, созданию устойчивых (дормантных) клеточных форм, которые не всегда соответствуют общепринятым таксономическим критериям классификации бактерий. Такие морфологически и физиологически атипичные клетки находятся в состоянии метаболического и репродуктивного покоя, благодаря чему оказываются недоступными для рутинных методов микробиологической диагностики и нечувствительными к действию большинства антибактериальных средств [6, 8–10].

С точки зрения современных представлений популяция бактерий рассматривается в виде гетероморфного свободно развивающегося в определенной экосистеме сообщества микроорганизмов одного вида, потенциально способных к неограниченному накоплению своей биомассы [6, 11, 12]. Эти бактериальные сообщества проявляют адаптационные механизмы для противостояния непрерывно меняющимся условиям обитания, что находит свое отражение в формировании фенотипической изменчивости морфологии бактериальных клеточных форм [9, 10].

Благодаря электронной микроскопии удалось установить неоднородность морфологической структуры гомогенных микробных популяций, которые представляют собой единую систему взаимосвязанных клеточных форм с различной ультраструктурой и организацией, обеспечивающей сохранение жизнеспособности в изменяющихся условиях окружающей среды. Проведенные исследования позволили сделать вывод о перманентной адаптации бактериальных клеток, заключающейся в их полиморфной пластичности, что свидетельствует о высокой функциональной лабильности микроорганизмов [5, 9, 10, 13, 14].

Многолетнее изучение ультраструктурных изменений бактерий с использованием методов электронной микроскопии и исследование полиморфизма периодических культур грамотрицательной *Yersinia pseudotuberculosis* и грамположительной *Listeria monocytogenes* при разных температурных и трофических режимах, проведенное одним из авторов настоящего обзора Л.М. Сомовой [15], позволило заключить, что фенотипическая морфологическая трансформация у

бактерий протекает единообразно и является универсальным механизмом адаптации к различным неблагоприятным факторам среды обитания. На основании полученных результатов сделан вывод о необходимости систематизации ультраструктурных изменений патогенных бактерий с этих позиций.

Всплеск научного интереса к образованию дормантных форм связан с открытием в конце XX в. токсин-антитоксिनных систем (ТАС), которые рассматриваются в качестве возможного общего механизма генетической регуляции образования дормантных клеточных форм бактерий [1, 2]. Кроме того, с каждым годом острее становится проблема появления лекарственно-устойчивых форм бактерий [16–20].

В настоящем обзоре рассмотрена фенотипическая пластичность в качестве стратегии выживания и способность формирования антибиотикорезистентности у дормантных (устойчивых) клеточных форм бактерий.

Дормантные (устойчивые) клеточные формы, персистенция бактерий

Одним из главных критериев жизнеспособности бактериальной клетки является координированное воспроизведение всех клеточных компонентов и структур в процессе культивирования. Открытие в прошлом веке у микроорганизмов анабиотических персистентных форм клеточного существования расширило традиционные представления о механизмах выживаемости прокариот [9, 10, 21, 22].

Формирование устойчивых клеточных форм бактерий осуществляется постоянно в ответ на влияние на их жизнедеятельность неблагоприятных факторов, в том числе применения антибиотиков. Биологическая целесообразность появления таких клеточных генераций микроорганизмов связана с необходимостью сохранения популяции. Согласно современным данным [9, 10, 23], значительная часть хронических и госпитальных инфекций, аутоиммунных, лимфопролиферативных и неопластических заболеваний ассоциирована с возникновением атипичных бактериальных клеток, устойчивых к традиционным антибактериальным средствам и успешно уклоняющихся от воздействия врожденных механизмов иммунной защиты.

Характерной особенностью дормантных клеточных форм является не только фенотипическая гетероморфность, но и отсутствие роста на обычных питательных средах, что затрудняет выявление этих форм и бактериологическую диагностику. В течение десятилетий дормантные клеточные формы находили в микроскопических препаратах, однако большинство из них игнорировалось или трактовалось в качестве артефактов [9, 13, 24, 25].

Фенотипические адаптационные изменения бактерий вследствие неблагоприятных флуктуаций химико-физических параметров среды обитания не сводятся только к морфологическим изменениям, а затрагивают и функциональные перестройки клеток. Субпопуляции

атипичных клеточных форм отличаются сниженными темпами роста и метаболической активности, но при наступлении оптимальных условий они приобретают способность к быстрому восстановлению (реверсии) своих исходных патогенных характеристик. Поэтому устойчивость к антибактериальным препаратам у аберрантных клеточных форм связана с формированием временной (фенотипической) резистентности — после реверсии восстанавливается чувствительность к антибиотикам [9, 13, 14, 24].

С этих позиций бактериальная популяция может рассматриваться как динамическая саморегулирующаяся, постоянно изменяющаяся гетероморфная и полифункциональная многоклеточная система, обладающая высоким адаптационным потенциалом, направленным на сохранение вида [9, 25, 26].

Широкое использование антибактериальных препаратов существенно изменило клиническое течение некоторых инфекций и в ряде случаев искажило результаты микробиологического анализа [26–29]. Это обусловило необходимость проведения исследований, направленных на выявление и изучение роли метаболических изменений и атипичных морфологических характеристик микроорганизмов в патогенезе инфекционного процесса [24, 27, 29].

Проявлениями фенотипической морфологической пластичности у неспорообразующих микроорганизмов стали открытые в XX в. устойчивые к традиционной антибиотикотерапии клеточные формы: L-формы (L-трансформация, cell wall deficient bacteria, CWD) [30]; жизнеспособные, но некультивируемые бактерии (viable but notculturable, VBNC) [31]; клетки-персистеры (от англ. persister — стойкий) [32], объединенные термином «клеточная персистенция бактерий» [33–35].

С позиций имеющихся в настоящее время знаний достаточно сложно определить грань между двумя физиологическими состояниями бактерий — клеточным покоем нереплицирующихся бактерий и клеточной персистенцией — более широким по значению термином, включающим в себя различные физиологические состояния бактерий, одним из которых является уникальная биология L-формы.

L-форма (L-трансформация) бактерий. L-формы (бактерии с дефектом клеточной стенки) известны микробиологам уже давно. В 1970–80-е гг. эта морфологическая трансформация микроорганизмов активно изучалась во всем мире. Всплеск научного интереса к L-формам в последнее десятилетие связан с появлением новых молекулярно-генетических методов исследований, а также нарастающей глобальной тревогой по поводу обострения проблемы устойчивости бактерий к антимикробным препаратам [36–38].

Помимо определения роли в развитии затяжных и хронических инфекций у человека и животных, приоритетом современных научных исследований является обнаружение и изучение механизмов устойчивости L-форм бактерий, циркулирующих в крови, а также

потенциальной угрозы для организма — неуправляемой колонизации морфологически атипичными микробными клетками, в том числе после проведения профилактических вакцинаций населения [39–43]. Сама парадигма существования L-форм ставит под сомнение правомерность существующих понятий и некоторых классических положений клинической микробиологии [39–41, 43].

Одно из таких положений связано с ключевым значением клеточной стенки (КС) бактерий для их жизнедеятельности и, в частности, ее роли в бинарном делении. Наличие внешней мембраны у КС послужило основанием для традиционного разделения бактерий на грамположительные (двухслойные) и грамотрицательные (трехслойные). Опорным компонентом КС, считающимся специфическим для бактерий (за исключением *Tenericutes* и наиболее известных представителей этого типа бактерий — микоплазм с природным отсутствием КС), является биополимерный слой. У грамположительных бактерий этот слой более утолщенный, состоит из пептидогликана — сетки, сшитой из гликановых нитей и пептидных мостиков [40, 44, 45].

Помимо активного участия в делении эта эластичная клеточная структура определяет форму бактерий, обеспечивая поддержание внутриклеточного давления. Пептидогликановый слой, входящий в состав бактериальной КС, является важной мишенью для блокирующих ее синтез групп антибиотиков, таких как β-лактамы, гликопептиды и липопептиды. Фрагменты КС распознаются врожденными иммунными рецепторами, вызывая мощный защитный ответ организма на инфекцию [27, 38, 45, 46].

Многие из бактерий при неблагоприятных условиях способны перейти в состояние, характеризующееся утратой пептидогликанового слоя и отсутствием (дефицитом) КС, называемое L-формой, которое признано крайней формой жизни и одним из инструментов выживания [28, 39, 40]. В качестве трансформирующих факторов могут выступать антибиотики (чаще всего пенициллин), антимикробные агенты организма (в первую очередь лизоцим), другие биологически активные вещества организма (например, ферменты, иммуноглобулины, факторы иммунной системы), а также некоторые физико-химические стрессоры (кислоты, щелочи, ультрафиолетовое излучение) [14, 27, 44, 45, 47].

Отсутствие КС позволяет L-формам бактерий эффективно уклоняться от действия недавно открытых эндогенных белков распознавания пептидогликана (peptidoglycan recognition proteins, PGRP), представляющих собой семейство из четырех эволюционно-консервативных антибактериальных эффекторов врожденной иммунной системы [48].

Название «L-форма» предложено в 1935 г. E. Klieneberger-Nobel в честь лондонского Института имени Дж. Листера (Lister Institute of Preventive Medicine), в котором она в то время изучала микоплазмы [30]. В ходе исследования было обнаружено,

что временная потеря КС является распространенной адаптационной стратегией к неблагоприятным условиям обитания у большинства грамположительных и грамотрицательных бактерий. Такая стратегия также способствует сохранению вида, а облигатное обитание внутри организма-хозяина обеспечивает бактериям контролируемые осмотические условия существования [36, 46, 49, 50].

Впоследствии термин «L-форма» стали использовать при характеристике особого типа бактериальных клеток, выделенных от людей, животных и растений, лишенных жесткой КС и обладающих возможностью переключения между двумя морфологическими формами — классической и гетероморфной [14]. После открытия L-форм появились сходные по смыслу понятия: L-фаза (L-фазовые бактерии), L-варианты, L-организмы, формы с дефектом клеточной стенки, CWD-формы и другие [1, 26, 51–54]. Широкое разнообразие описаний и характеристик этих клеточных форм, а также этапов их формирования вызвало некоторую терминологическую неопределенность [1, 5, 7].

В настоящее время в мировой литературе наиболее часто употребляется термин CWD-бактерии, охватывающий сферо- и протопласты (неспособные к делению) и собственно L-формы (способные к делению бесконечно). При этом выделяют фенотипические варианты бактерий с обратимыми (нестабильная L-форма) и необратимыми (стабильная L-форма) изменениями в организации КС [5, 14]. Необратимые изменения обусловлены мутациями в геноме.

Уникальная морфология L-форм бактерий, механизмы их формирования и этиопатогенетическая роль в возникновении хронических инфекций в течение длительного времени были объектами многочисленных научных исследований [6, 8, 34].

Стабильные L-формы стали полезной моделью для изучения пролиферации бактериальных клеток и основных биологических функций мембран, способности CWD вызывать хронические инфекции [8, 34]. Нестабильные L-формы активно используют для исследования молекулярных механизмов их формирования и выживания бактерий в условиях организма [8, 34, 36, 49].

Основные этапы и типы морфологической трансформации L-форм и L-подобных форм в бактериальных популяциях описаны достаточно подробно. Предприняты попытки классифицировать и систематизировать многочисленные ультраструктурные изменения клеток и их функциональные признаки на примере уже изученных трансформаций микроорганизмов, дефектных по КС [21, 27, 28]. В основу этих систематизаций в первую очередь заложены морфологические признаки (степень целостности клеточной мембраны), а также способность CWD-форм к репродукции и реверсии бактериальных клеток, в том числе в специальных условиях культивирования [4, 5, 14, 45].

L-формы бактерий не растут на обычных питательных субстратах, а культивируются на богатых сыво-

роткой элективных средах, содержащих ингибиторы КС (антибиотики), осмопротекторы (глюкозу, хлорид натрия) и стимуляторы роста (магний, цинк). Они не окрашиваются по Граму, не агглютинируются антисыворотками и не лизируются фагами [27, 28].

Бактерии с традиционным строением КС размножаются путем бинарного деления, опосредованного ключевым участием цитоскелетных белков MreB и FtsZ, являющихся функциональными аналогами соответственно актина и тубулина [14, 21, 28, 38, 55].

Пролиферация CWD-бактерий происходит с помощью иного механизма. Известно, что изменение физических параметров среды обитания бактерий вызывает преобразование биофизических свойств их цитоплазматических мембран, которые зависят от качественных и количественных характеристик липидного бислоя — содержания ненасыщенных, полиненасыщенных жирных кислот, длины ацильной цепи и ее разветвленности [56, 57]. Исследования, проведенные R. Mercier с соавт. [46], позволили установить ведущую роль высокой текучести цитоплазматических мембран в размножении L-форм. Мутантные бактериальные клетки с пониженной мембранной текучестью, находясь в состоянии L-трансформации, могут увеличиваться в размерах, но неспособны к заключительной фазе пролиферации (разрыву мембраны), необходимой для генерации дочерних клеток [14, 28, 46].

Таким образом, на современной модели пролиферации L-форм бактериальных клеток можно проследить эволюцию развития ранних форм клеточной жизни на Земле путем реконструкции ключевых этапов примитивного механизма их деления до появления КС с инкапсуляцией нуклеиновых кислот и продуктов репликации, а также горизонтальным переносом генов [36, 49].

Образовавшиеся в результате пролиферации колонии L-форм представляют собой гетероморфную популяцию, состоящую из больших тел, нитевидных и трубчатых структур, элементарных телец и шаровидных клеток разного размера с неровной и прерывающейся цитоплазматической мембраной и вакуолизированной цитоплазмой (рис. 1). В процессе последующего развития происходит морфологическая трансформация бактериальных элементов, снижение их вирулентности, замедление метаболического и энергетического обмена, позволяющие им выживать внутри организма и в дальнейшем восстанавливать исходную вирулентность при реверсии *in vivo* [14, 28, 36, 46].

В последние годы повышенное внимание уделяется исследованию взаимодействия стабильных L-форм бактерий с фагоцитами крови — иммунокомпетентными клетками, захватывающими чужеродные частицы, в том числе бактерии и вирусы. Так, болгарские ученые с применением современных методов молекулярно-генетических исследований выделили CWD-формы *Mycobacterium bovis* в 141 пробе периферической крови людей после проведенного вакци-

нирования для профилактики туберкулеза [39, 41, 43]. Полиморфность популяций и этапность трансформации обнаруженных элементов оказались типичными для L-форм, что дало основание авторам сделать вывод о способности CWD-клеток не только выживать, но и размножаться в клетках крови, будучи неопознанными вследствие геномных и морфологических трансформаций [40, 41, 43].

С момента открытия L-форм у возбудителей инфекционных заболеваний получены доказательства возможности их длительного существования в организме и этиологической связи этих форм с широким спектром инфекционных заболеваний [1, 8, 34, 58]. Большинство исследований было сосредоточено на роли бактерий CWD в развитии персистентных и рецидивирующих хронических инфекций мочевыводящих путей, сердечно-сосудистой и центральной нервной систем, для которых характерно чередование ремиссий и клинических обострений (туберкулез, пиелонефриты, септические эндокардиты, склеродермия, бруцеллез) [2, 10, 14, 59]. Описаны случаи идиопатических хронических воспалительных, коллагеновых, лимфопролиферативных, нефроурологических (включая интерстициальный нефрит и простатит) и неопластических заболеваний, ассоциированных с L-формами [1, 8, 9, 39, 60].

Так, например, J. Han с соавт. [61] показали, что возбудитель сепсиса и пневмонии — метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* — помимо своей природной генотипической устойчивости к антибиотикам способен формировать L-формы.

Наиболее частые локализации инфекционных процессов органов мочевого выделения имеют физиологическую основу. Она связана с особенностями мозгового вещества почки, в котором юкстамедуллярные нефроны создают необходимое для образования конечной мочи высокое осмотическое давление. Оно является благоприятным условием для существования антибиотикорезистентных L-форм бактериальных клеток и развития персистирующих и вялотекущих инфекций. Кроме того, у пациентов с бактериальными инфекциями мочевого пузыря и почек осмолярность мочи часто выше, чем у здоровых людей, особенно при сопутствующих нарушениях углеводного обмена [38, 46, 59].

Вопрос о сохранении исходной вирулентности у бактерий в стадии L-трансформации остается дискуссионным. Однако даже при уменьшении вирулентности CWD могут создать резервуар патогенов, скрытых от иммунной системы и резистентных к антибиотикам [13, 24]. Клетки с дефектом КС, в отличие от клеток-персистеров, не теряют способности размножаться и восстанавливать популяцию вирулентных бактерий внутри макрофагов [39, 40].

Несмотря на потенциальную клиническую важность CWD-клеток и многолетние исследования, в настоящее время мало известно о молекулярных механизмах образования и выживания этих морфологически

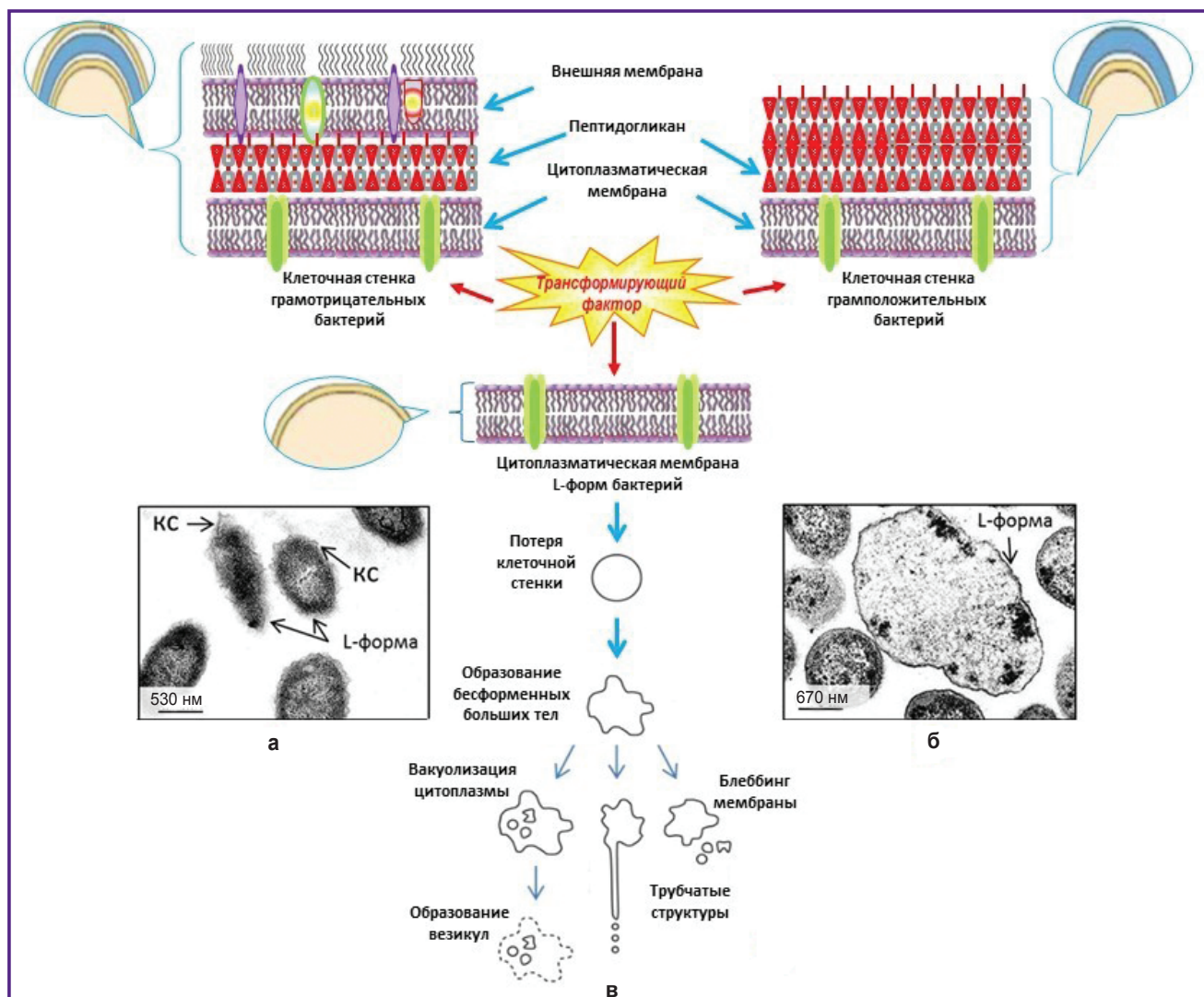


Рис. 1. Формирование и пролиферация L-форм бактерий

Образование L-форм в результате утраты пептидогликанового слоя: *а* — периодическая культура (*Y. pseudotuberculosis*, штамм Н-2781), фосфатно-солевой буфер, 37°C, L-форма бактерий — сферопласты; *б* — периодическая культура (*Y. pseudotuberculosis*, штамм Н-2781), фосфатно-солевой буфер, 6–8°C, L-форма бактерий — протопласты; *а, б* — трансмиссионная электронная микроскопия JEM-100 S (JEOL, Япония). Трехслойная клеточная стенка (КС) грамотрицательных и двухслойная — грамположительных бактерий под воздействием трансформирующего фактора теряют пептидогликановый слой; *в* — различные структурные элементы репродукции L-форм: больших тел, нитевидных и трубчатых структур, элементарных телец и шаровидных клеток разного размера, с неровной и прерывающейся цитоплазматической мембраной и вакуолизированной цитоплазмой. Рисунок авторов; фото Л.М. Сомовой

аберрантных форм [28, 38]. Результаты недавних исследований показали, что L-формы *L. monocytogenes* не только морфологически отличаются от материнских клеток, но и имеют обратимые функциональные изменения на генетическом и молекулярном уровнях [58].

У. Kawai с соавт. [27] обнаружили, что для L-трансформации *Bacillus subtilis* достаточно двух типов генетических мутаций, одна из функций которых препятствует увеличению активных форм кислорода, образующихся при производстве бактериальной энергии. Авторы сделали вывод, что формирование

бактериальных клеток с CWD ограничивается присутствием свободных радикалов и, следовательно, прием антиоксидантов может стимулировать фенотипическое образование L-форм как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий и стать фактором риска развития и рецидивирования инфекций. Мутация гена *ispA* (2-го типа) стабилизирует структурные элементы пролиферации L-форм, предотвращая их лизинг.

В отличие от других устойчивых бактериальных форм, CWD остаются жизнеспособными и могут про-

должны размножаться в присутствии антимикробных средств. После окончания лечения эти клетки могут вернуться к исходному морфологическому состоянию и восстановить популяцию вирулентных бактерий, вызвав рецидив [8, 21, 38].

Благодаря плеоморфности и высокой пластичности клеток CWD-бактерии проникают в физиологические ниши организма, недоступные для материнских бактерий, и сохраняются в них. Резистентность L-форм возбудителей инфекций к традиционной антибиотикотерапии, а также их способность к реверсии в исходную бактериальную форму становятся проблемой не только в плане развития персистирующих и затяжных инфекций, но и лечения пациентов пожилого возраста или лиц с ослабленным иммунитетом [5, 21, 38].

Таким образом, изучение молекулярно-генетических механизмов формирования L-форм бактерий позволяет говорить о них как о наиболее сложной стратегии бактериальной резистентности к антибиотикам [22, 29]. Вызывает беспокойство, что эта форма сохранения жизнеспособности — свойство практически всех известных патогенных бактерий, и пока мы имеем лишь фрагментарное понимание о взаимодействии L-форм с организмом человека.

L-формы бактерий как объект современных технологий. Несмотря на длительную историю выявления и изучения L-форм, их случайное обнаружение в крови чаще всего рассматривается как артефакт, не имеющий диагностического значения [62]. Отсутствие убедительных доказательств этиологической связи инфекционных заболеваний с L-формами бактерий, обнаруженными в клиническом материале, связано с трудностями культивирования и идентификации этих клеточных форм, сопряженными с их фенотипической морфологической пластичностью.

Одна из актуальных проблем, на решение которой направлены современные технологии изучения L-форм, — исследование возможности их существования в крови человека и принадлежности CWD-клеток разных видов бактерий к нормальной микрофлоре крови. Особый интерес вызывает познание биологического значения этого феномена, а также разработка новых микробиологических методов выделения некультивируемых форм из крови.

В 2015 г. N. Markova и соавт. [40] предложили инновационную методику многоэтапного выделения L-форм из крови человека с последующей морфологической идентификацией при помощи световой микроскопии (метод «слепого пассажа») [40]. Обнаружение микробных ДНК и электронно-микроскопическая визуализация L-клеток свидетельствуют о том, что они являются как минимум нередкими сочленами и микрофлоры крови [41]. Сообщения о длительной персистенции L-форм бактерий на поверхности или внутри макрофагов [63], эритроцитов [42, 43] и тромбоцитов [64] послужили почвой для рождения гипотез об их потенциальном значении в возможности индукции инфекционных заболеваний у людей [41, 65, 66].

Подтверждение этих гипотез связано с обнаружением L-форм *Bacillus* и *Micrococcus* в крови здоровых людей и недавно выявленной способности их передачи по вертикали через плацентарный барьер [42].

К L-формам близко примыкают другие устойчивые формы бактерий — клетки-персистеры и жизнеспособные, но некультивируемые микроорганизмы. Эти клеточные формы также образуются в ответ на неблагоприятные условия среды обитания и представляют собой фенотипические морфофизиологические варианты адаптационных стратегий бактерий.

Клетки-персистеры. Эффект персистенции бактериальных клеток открыт в середине прошлого века G.L. Hobby и соавт. [32], которые сообщили о выживании небольшой части популяции *S. aureus* после полной стерилизации культуры пенициллином. Позднее эта часть бактериальной популяции получила название клеток-персистеров («бездействующие, неделящиеся варианты») [67]. Установлено, что ингибирование роста культуры *S. aureus* путем снижения температуры инкубации, удаления питательных веществ или добавления борной кислоты увеличивает популяцию клеток-персистеров [32, 68].

Феномен персистенции бактерий был подробно изучен [1, 69–74]. В частности, известно, что клетки-персистеры обычно составляют лишь небольшую часть бактериальной популяции. В штаммах *E. coli* дикого типа их частота в планктонных культурах — не более одной на миллион клеток [72, 75, 76]. Однако в биопленках, сложных многоклеточных бактериальных сообществах, которые обладают высокой устойчивостью к антибиотикам и ответственны за более чем 80% инфекций человека, их частота существенно возрастает — от одной до ста бактерий на миллион [72, 77, 78].

Механизм формирования временной антибиотикорезистентности клеток-персистеров связан с репликативным и метаболическим покоем бактерий [1, 67, 73, 74]. Механизм действия большинства антибиотиков направлен на подавление жизненно важных внутриклеточных процессов метаболически активных и растущих клеток, от физиологического состояния которых зависит эффективность препаратов. С этих позиций персистенция — это возникновение спонтанных и временно устойчивых к антибиотикам фенотипических клеточных вариантов в изогенных бактериальных популяциях [67, 75–78].

Присутствие клеток-персистеров в бактериальной культуре имеет и возрастающее патогенетическое значение в качестве этиологического фактора групп хронических, а также нозокомиальных инфекций, в том числе связанных с возбудителями сапронозов (гноино-септические инфекции, пневмонии, кишечные инфекции, столбняк, газовая гангрена и др.) [74, 79, 80].

В современной литературе под клетками-персистерами понимают покоящиеся и нерегулярные субпопуляции, присутствующие в растущей бактериальной культуре, которые устойчивы к нескольким антибиоти-

кам, антисептикам и дезинфектантам [29, 67, 77, 79, 81]. Принципиальным их отличием от антибиотикорезистентных бактерий-мутантов является то, что популяция клеток-персистеров не способна к делению, а их толерантный фенотип сохраняется только в состоянии покоя и, следовательно, не наследуется [60, 76–78].

Казалось бы, механизм фенотипической антибиотикорезистентности клеток-персистеров связан исключительно с состоянием метаболического и репликативного покоя. Однако недавние исследования показали физиологическую неоднородность фракции клеток-персистеров в популяции и разную степень устойчивости к различным антибиотикам [68, 69, 72, 82]. Экспериментальное селективное ингибирование репликации бактерий вызывает резистентность к антибиотикам только тогда, когда оно сопровождается активным ответом клеток на стресс [83]. Другие работы [68, 73, 84] свидетельствуют, что подавление только метаболической активности бактериальных клеток не препятствует гибели 99% популяции от антибактериальных средств.

В исследованиях N.Q. Valaban с соавт. [60], E. Maisonneuve с соавт. [85] и Van den Bergh с соавт. [86] показано, что фенотипическая популяция единичных (до 1%) клеток-персистеров присутствует в большинстве бактериальных культур, находящихся

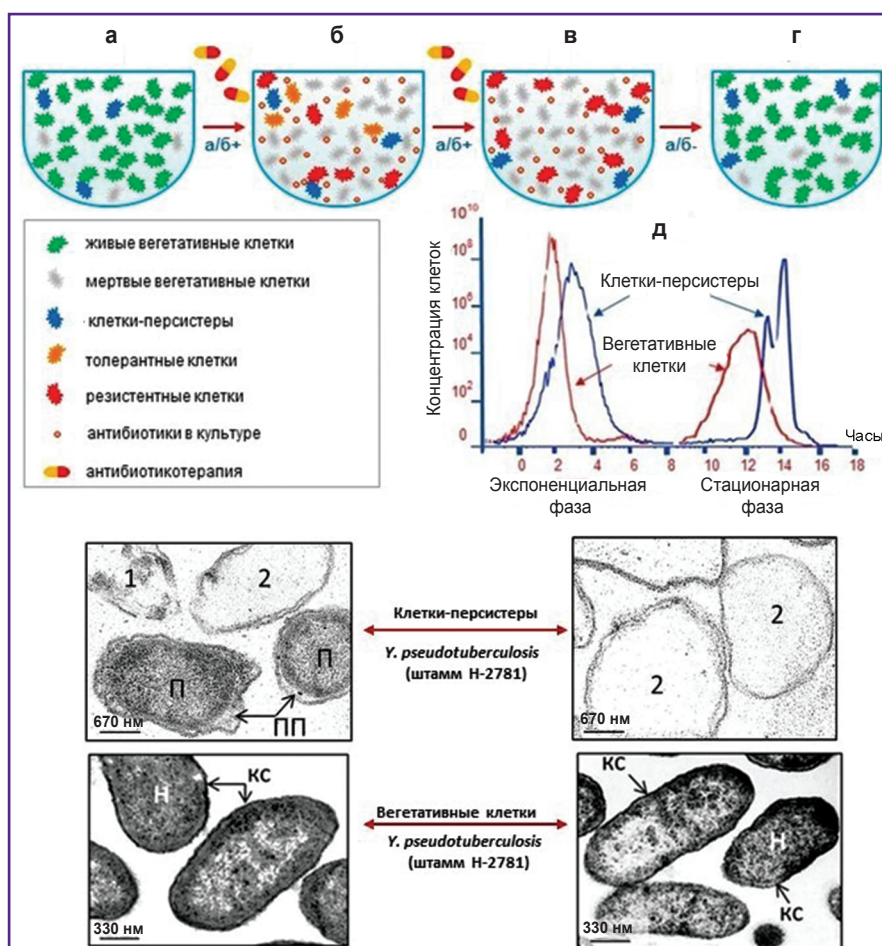
в стационарной фазе роста и при отсутствии влияния на них антибиотиков и стресса. В процессе жизнедеятельности вегетативные (активные) бактериальные клетки популяций могут трансформироваться в персистерный фенотип и обратно, при этом скорость этих реверсий ориентирована на фазы роста и условия среды обитания (рис. 2).

Таким образом, индукция образования клеток-персистеров не связана исключительно с влиянием антибактериальных средств. Присутствие этих клеток защищает популяцию от гибели при внезапной и массивной антибиотикотерапии, что дает конкурентное преимущество микроорганизмам в периодически изменяющихся условиях среды обитания [73, 83, 87, 88].

Ключевыми регуляторами стресс-устойчивости бактерий являются сигнальные внутриклеточные нуклеотиды — (p)ppGpp: гуанозинтетрафосфат (ppGpp) и гуанозинпентафосфат (pppGpp) [90–92]. Эти вторичные молекулы, внутриклеточная концентрация которых увеличивается при воздействии раздражителей окружающей среды, функционируют в качестве одного из основных медиаторов «строгого отклика» [90, 93]. Они перепрограммируют многие процессы, включая контроль экспрессии генов, участвующих в биосинтезе аминокислот, регуляции бактериальной вирулентности, сохранении жизнеспособности клеток, устойчивости к

Рис. 2. Клетки-персистеры в популяции вегетативных клеток при антибиотикотерапии:

а — до начала лечения; б и в — период антибиотикотерапии; г — восстановление популяции после окончания лечения; д — скорость роста вегетативных клеток и персистеров в экспоненциальную и стационарную фазы пролиферации. На фото — периодическая культура (*Y. pseudotuberculosis*, штамм Н-2781): 1 — переходная форма; 2 — клетки с пустым цитозолем; П — клетка-персистер; ПП — периплазматическое пространство; КС — клеточная стенка. Трансмиссионная электронная микроскопия JEM-100 S (JEOL, Япония). Рисунок авторов; фото Л.М. Сомовой



антибиотикам; формирование клеток-персистеров путем связывания и модуляции активности нескольких мишеней: РНК-полимеразы, лизиндекарбоксилазы, примазы и других [91, 92, 94]. В свою очередь синтез и модуляция внутриклеточной концентрации нуклеотида (p)ppGpp регулируются цитоплазматическим суперсемейством ферментов RelA/SpotT, представляющим собой отдельный класс (p)ppGpp-синтаз, активность которых реагирует на недостаток аминокислот [92, 95].

За десятилетия изучения (p)ppGpp понимание физиологической роли этих нуклеотидов эволюционировало от концепции «строгого отклика» до важнейшей сигнальной функции — участия в регуляции скорости роста бактерий и метаболической активности клеток, а также связи с генетическими локусами TAC [90, 92, 96]. В формировании персистенции бактерий эти локусы имеют решающее значение. Для ее понимания необходимо более детально остановиться на структуре и функции TAC.

Клетки-персистеры и токсин-антитоксиновые системы. Системы локусов, кодирующих пары токсинов и антитоксинов, впервые выявлены в 80-х годах прошлого века Т. Ogura и S. Hiraga (1983) на мини-F-плазмиде как важные генетические элементы, ответственные за поддержание ее стабильности в дочерних клетках [97].

Открытие существования TAC в 2004 г. было связано с клеточной персистентностью, что послужило мощным стимулом для активизации исследований этих уникальных белковых структур. Оказалось, что TAC в значительной степени обеспечивают устойчивость клеток-персистеров к разрушительным эффектам антибиотиков [16, 19].

Эти генетические модули обычно содержат два гена, кодирующих стабильный токсин и нестабильный антитоксин, чувствительный к деградации клеточными протеазами. Установлено, что TAC принимают активное участие в образовании биопленок, а также в формировании у патогенных бактерий множественной лекарственной устойчивости и вирулентности [17, 20, 98].

В нормальных условиях токсин и антитоксин находятся в связанном состоянии, образуя нетоксичный комплекс [18, 99, 100, 101]. Однако в условиях стресса, вызванного воздействием неблагоприятных условий окружающей среды, антитоксины деградируют либо АТФ-зависимой Lon-протеазой [100], либо сериновыми бактериальными протеазными системами ClpXP [19, 100, 102] и ClpAP [99, 100, 103]. Это приводит к резкому снижению как скорости трансляции, так и репликации, а также к прекращению роста клеток из-за цитотоксического эффекта освобожденного токсина и многократного увеличения резистентности к антибиотикам. Исследования показали, что модули TAC широко распространены и среди бактериальных хромосом. В зависимости от генетической организации, характера антитоксина и механизма его взаимодействия с токсином выделяют шесть типов модулей TAC (I–VI) [98, 103].

Во всех типах TAC токсины представляют собой белки, тогда как антитоксины — молекулы РНК (I и III типы) или пептиды (II, IV–VI типы). Наиболее изученными являются модули I и II типов. Токсины I типа TAC — это небольшие гидрофобные пептиды, которые вызывают потерю электрического мембранного потенциала клетки и останавливают рост бактерий. Антитоксин подавляет активность белка токсина путем связывания мРНК [17, 19, 98, 104].

Чаще всего встречаются модули TAC II типа. Токсины этого типа ингибируют репликацию клетки, подавляя активность ДНК-гиразы (ДНК-топоизомеразы II), но большинство из них функционируют как ингибиторы трансляции, обладая активностью эндорибонуклеазы (катализируют деградацию РНК) или инактивируя глутамил-тРНК-синтетазу (GltX) [19, 98, 105]. Антитоксины этого типа — белки — блокируют токсин путем его прямого связывания [105].

На ведущую роль TAC II типа в формировании феномена персистенции указывает тот факт, что первый открытый ген устойчивости бактерий *hipA* [18] ответственен за кодирование одноименного токсина в локусе гена *hipBA* TAC II типа [106]. Кроме того, в клетках-персистерах модельных диких штаммов *E. coli* выявлена индукция сверхэкспрессии некоторых токсинов II типа в генах *relE* (генетический локус *relBE*), *mazF* (локус *mazEF*), *dinJ* (локус *dinJ-yafQ*) и *mqsR* (локус *mqsQR*) [19, 20, 107].

На тех же моделях обнаружена аналогичная сверхэкспрессия токсинов TAC I типа *tisB* (локус *tisB-istR*) и *hokB* (локус *hokB-sokB*) при антибиотикотерапии, связанная с высокими уровнями (p)ppGpp, что вызывает деполяризацию клеточной мембраны и резкое снижение метаболической активности, индукцию образования устойчивых клеток-персистеров [19, 92, 105, 108].

Установлено, что в микробной клетке под действием токсинов подавляются ключевые клеточные процессы, такие как репликация ДНК и трансляция белка. Это ингибирование приводит к быстрой остановке роста и резкому снижению метаболической активности бактерий, формированию частичной или полной резистентности к антибиотикам [16, 20, 102]. Например, освобождение токсина RelE из модуля *RelE-RelB* ведет к увеличению устойчивости к ванкомицину в 10 000 раз [101], токсина YafQ — в 2400 раз к цефазолину и тобрамицину [103], а токсин TisB придает устойчивость клеткам-персистерам к ампициллину, ципрофлоксацину и стрептомицину [10, 98].

Клетки-персистеры как объект современных технологий. Снижение эффективности современных противомикробных средств требует изучения механизмов появления резистентности у множественно лекарственно-устойчивых штаммов микроорганизмов, а также активизации разработки новых стратегий создания противомикробных средств для борьбы с инфекциями, поиска принципиально иных антибактериальных внутриклеточных мишеней для этиотропной терапии

[64, 108, 109]. Одно из ключевых направлений такого поиска связано с изучением роли (p)ppGpp и TAC в физиологии бактерий и формировании устойчивых клеточных форм [91, 95, 110].

Перспективным представляется селективное ингибирование синтеза (p)ppGpp, что имеет решающее значение для формирования клеточной персистенции. В недавних исследованиях J. Beljantseva с соавт. [93] и K. Syal с соавт. [94] показана возможность блокирования синтеза нуклеотидов (p)ppGpp путем связывания активности RelA/SpoT синтетическими аналогами-ингибиторами синтеза (p)ppGpp. Так, с помощью синтетического вещества Relacin (впервые предложенного для этих целей в 2012 г. [111]) удалось модулировать метаболическую активность и лекарственную устойчивость микобактерий [94].

В последнее десятилетие рассматривается возможность использования TAC в качестве антибактериальных мишеней. Предложен ряд инновационных стратегий [17, 20, 107]. Одна из них связана с разрушением комплекса TAC с последующей прямой активацией освободившегося токсина или ингибированием образования комплекса. Это достигается путем введения биомолекул для связывания с антитоксином [16, 17, 92, 110]. Другая стратегия направлена на активацию клеточных протеолитических ферментов (гидролаз), вызывающих деградацию лабильного белка-антитоксина комплекса TAC путем расщепления пептидной связи между аминокислотами, в результате чего происходит высвобождение токсина [16, 92]. Еще один путь связан с прямой активацией освободившегося токсина после ингибирования транскрипции промотора оперона TAC [17, 110]. Оставшийся без пополнения, короткоживущий антитоксин вскоре деградирует, а свободный токсин инактивирует соответствующие мишени в бактериальных клетках. Три упомянутые стратегии используют модули TAC типа II, которые обнаруживаются у большого количества бактерий [98, 102, 104].

Наконец, возможно фармацевтическое ингибирование трансляции антитоксинов [95, 103, 105]. Антисмысловая РНК комплементарно связывается с антиоксиновой мРНК, что ингибирует трансляцию антитоксинов и высвобождение токсина. Такой подход может быть применен ко всем типам модулей TAC.

Таким образом, в основе перечисленных стратегий лежит высвобождение свободного токсина, инактивирующего в дальнейшем внутриклеточные мишени бактериальных клеток, что в итоге вызывает их гибель.

Казалось бы, препараты, содержащие биомолекулы токсина, — реальные кандидаты на роль терапевтического средства для пополнения антимикробного арсенала при формировании у бактерий множественной антибиотикорезистентности. Однако клинические испытания биомолекулярных препаратов выявили серьезные препятствия для их практического использования: отсутствие лекарственных форм для орального применения и высокую стоимость препаратов

[95, 111]. Кроме того, остаются нерешенными вопросы целевой доставки токсинов в места обитания патогенных бактерий в организме без вредного воздействия на эукариотические клетки и нормальную микробиоту человека [92, 98, 111].

И, наконец, еще одна, более сложная стратегия предусматривает инфицирование патогенов бактериофагами, которые содержат рекомбинантные нуклеиновые кислоты, включающие ген, кодирующий биосинтез токсина: РНК или ДНК интегрируются в лизогенный цикл генома патогенной бактерии, продуцируемые рекомбинантные токсины вызывают гибель бактериальных клеток [106]. К настоящему времени получены рекомбинантные нуклеиновые кислоты с различными генами, кодирующими синтез токсинов многих известных модулей TAC. Однако использование бактериофагов по-прежнему ограничено из-за их высокой специфичности к определенным микроорганизмам [106, 110, 112].

Существует опасение, что искусственная активация токсинов до умеренного уровня может вызвать образование персистирующих или спящих клеток, которые приводят к хронизации инфекционного процесса. В этой связи разрабатывается другая стратегия, которая «разбудит» персистирующую бактериальную клетку, что сделает ее чувствительной к антибиотикам [20, 109, 113].

Учитывая отсутствие генетических модулей TAC у млекопитающих, в том числе и у человека, новые технологические стратегии могут быть направлены на создание эффективных и высокоспецифических биохимических модуляторов токсин-антитоксिनных взаимодействий. Одна из возможных причин несостоятельности этих антимикробных стратегий — высокая распространенность TAC в геноме нормальной микробиоты, находящейся в симбиозе с человеческим организмом. Это обуславливает потребность в создании препаратов, нацеленных на несколько микробных систем, в том числе пробиотического действия.

Следующая особенность этой терапевтической стратегии заключается в том, что недостаточно просто инактивировать антитоксины для активации токсинов, действие последних необходимо в дальнейшем блокировать другими препаратами [108, 112]. Тем не менее стимулирование фундаментальных исследований TAC в патогенных бактериях может дать ценную информацию для создания новых антибактериальных альтернатив.

Таким образом, современные разработки направлены прежде всего на преодоление антибиотикорезистентности dormantных клеточных форм бактерий. С этой же проблемой связано формирование еще одной формы клеточной персистенции — жизнеспособных, но некультивируемых клеток (VBNC).

Жизнеспособные, но некультивируемые клетки. Для точного определения количества бактерий и оценки их жизнеспособности используют метод культивирования, который является одним из базовых

инструментов исследования в микробиологии [1, 2].

В 1982 г. H.-S. Xu с соавт. [31] обнаружили, что клетки *Escherichia coli* и *Vibrio cholerae* при наступлении неблагоприятных условий существования могут входить в особое физиологическое состояние, которое авторы назвали жизнеспособным, но некультивируемым — viable but nonculturable (VBNC).

Дальнейшие исследования [113–116] позволили установить, что состояние VBNC у бактерий характеризуется временной утратой способности этих клеточных форм образовывать колонии на плотных питательных средах в условиях постоянного экзогенного воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды (голодание, гипоксия, изменение гидротермического режима и pH, повышение солености, антимикробные препараты, дезинфектанты). При этом важно, что многие виды бактерий сохраняют свой пролиферативный потенциал и обладают способностью к реверсии из состояния VBNC в культивируемое состояние при прекращении действия стрессора и предварительной активации в жидкой среде [114, 115–118].

Полученные в последние десятилетия [119] данные подтверждают гипотезу, высказанную в конце XX в., о том, что VBNC-состояние представляет собой еще одну адаптационную стратегию выживания неспорообразующих бактерий в субоптимальных условиях окружающей среды [120, 121]. В научной литературе эти устойчивые клеточные формы бактерий встречаются под различными альтернативными названиями: некультивируемые клетки [114, 116, 122], условно жизнеспособные экологические клетки (conditionally viable environmental cells, CVEC) [1, 120], активные, но некультивируемые клетки (active but nonculturable cells, ABNC) [1], спящие (дремлющие) клетки [1, 2, 123].

В отличие от вегетативных форм бактерий VBNC-клетки теряют способность культивироваться на питательных средах и формировать колонии, сохраняя при этом признаки жизнеспособности: интактная клеточная мембрана, неповрежденный геном, продолжающаяся транскрипция генов и продукция мРНК, сохранившиеся плазмиды, метаболическая активность, дыхание с выделением необходимой энергии, потребление питательных веществ [119, 123, 124].

Несмотря на то что бактерии, находящиеся в VBNC-состоянии, обладают рядом идентичных характеристик со своими культивируемыми предшественниками, их физиологические и молекулярные свойства существенно отличаются. Это связано с морфологией клетки: ее размером (уменьшение и, соответственно, изменение отношения площади поверхности к объему) и формой (у большинства VBNC-бактерий преобладают кокковидные варианты) [118, 122]. Кроме того, VBNC-клетки содержат иное количество белков, жирных кислот и пептидогликанов в клеточной стенке. Для них характерны дифференциальная экспрессия белков наружной мембраны, значительное увеличение содержания ненасыщенных жирных кислот, а

также соотношения гексадекановой, гексадеценовой и октадекановой кислот. Эти изменения направлены на повышение способности бактерий, находящихся в некультивируемом состоянии, противостоять внешним механическим повреждениям [114, 121, 123].

Бактерии в некультивируемом состоянии имеют более низкий уровень метаболизма, сниженную активность макромолекулярного синтеза и метаболизма по сравнению с культивируемыми предшественниками, особенно находящимися в экспоненциальной фазе роста [115, 117]. Энергией VBNC-клетки в основном обеспечиваются за счет аминокислот с разветвленной углеродной цепью [123, 124]. По сравнению с культивируемыми клетками они обладают большей физической и химической стойкостью (к высокой температуре, ультразвуковому воздействию, pH, солености, этанолу, хлорсодержащим препаратам, тяжелым металлам, окислительному и осмотическому стрессу), а также повышенной резистентностью к антибиотикам [115, 116, 118, 125].

Кроме того, VBNC-клетки имеют замедленную скорость адгезии (и, соответственно, биопленкообразования) и сниженную экспрессию генов вирулентности по сравнению со своими культивируемыми аналогами, при этом сохраняя потенциальную способность вызывать тяжелые инфекции в случае быстрой реверсии в вегетативные клеточные формы при наступлении благоприятных условий [117, 119, 121, 126]. Поэтому переоценка отрицательных результатов рутинных бактериологических исследований клинического материала и санитарно-гигиенических проб может представлять серьезную угрозу для последующего инфицирования [119, 127].

Механизм формирования VBNC в популяции бактериальных клеток большинство авторов [116, 120, 128] в течение длительного времени объясняли стохастической изменчивостью их свойств, определяемых генами (в первую очередь, экспрессией гена *groS*, кодирующего белок RpoS, одного из основных регуляторов стрессорной устойчивости, управляемых сигнальной молекулой (p)rrpGpp), а также окружающей средой и случайным шумом, присутствие которого неизбежно на всех уровнях биологической организации, начиная с молекулярного.

Отношение к некультивируемым вариантам бактерий менялось по мере накопления знаний о них. Некоторые авторы рассматривали VBNC-клетки в качестве дегенеративных форм, предшествующих гибели бактерий и не вызывающих инфекционные заболевания, несмотря на сохранение ими вирулентных свойств [114, 123]. Позднее клиническое значение некультивируемых форм было подтверждено многочисленными исследованиями [113, 117, 127–129]. За последние десятилетия некультивируемые клеточные формы были обнаружены у более 100 видов бактерий, относящихся к 40 родам, из которых более 60 видов являются патогенными или условно-патогенными для человека и животных [119, 121, 124, 130].

Среди бактерий, у которых обнаружено состояние VBNC, присутствуют возбудители сапронозов — чумы, псевдотуберкулеза, кишечного иерсиниоза, листериоза, холеры, туляремии, легионеллеза. Показано, что сохранение этих патогенных бактерий в объектах окружающей среды в межэпидемический период (сапрофитическая фаза) в некультивируемой форме поддерживало очаг эпидемиологического напряжения. Возбудители VBNC не могут инициировать инфекционный процесс, однако их вирулентность после попадания в организм человека или животного (наступления паразитической фазы) восстанавливается, что приводит к возникновению случаев спорадической или эпидемической заболеваемости, в том числе зоокомиального и пищевого происхождения (рис. 3) [114, 121, 125].

К настоящему времени получено довольно много убедительных доказательств, что VBNC-клетки, как и клетки-персистеры, являются эффективными клеточными стратегиями выживания бактерий в неблагоприятных условиях роста. Накоплены многочисленные сведения о регуляторной, морфологической и функциональной близости феноменов

клеток-персистеров и VBNC-бактерий [подробнее см. 119, 122, 125].

На основании сходства условий возникновения, морфологических признаков и молекулярно-генетических механизмов этих устойчивых форм некоторые авторы [114, 116, 127] ставят между ними знак равенства, считая различия между «персистерами» и VBNC-клетками искусственными и не имеющими принципиального значения. В работе М. Аугаретян и соавт. [131] на основании единого молекулярно-генетического механизма регуляции эти физиологические состояния бактерий были объединены в модель «континуума покоя», а J.-S. Kim с соавт. [132] в своем исследовании показали, что VBNC и клетки-персистеры являются идентичными состояниями бактерий, находящихся в стрессе.

Однако большинство исследований указывает на различие, которое было многократно подтверждено экспериментально. Оно связано с неспособностью VBNC-клеток быстро восстанавливать параметры роста после прекращения действия стрессора (требуется до 24 ч и более). Клетки-персистеры после завершения антибиотикотерапии гораздо быстрее рекультивируются *in vitro* на твердых питательных

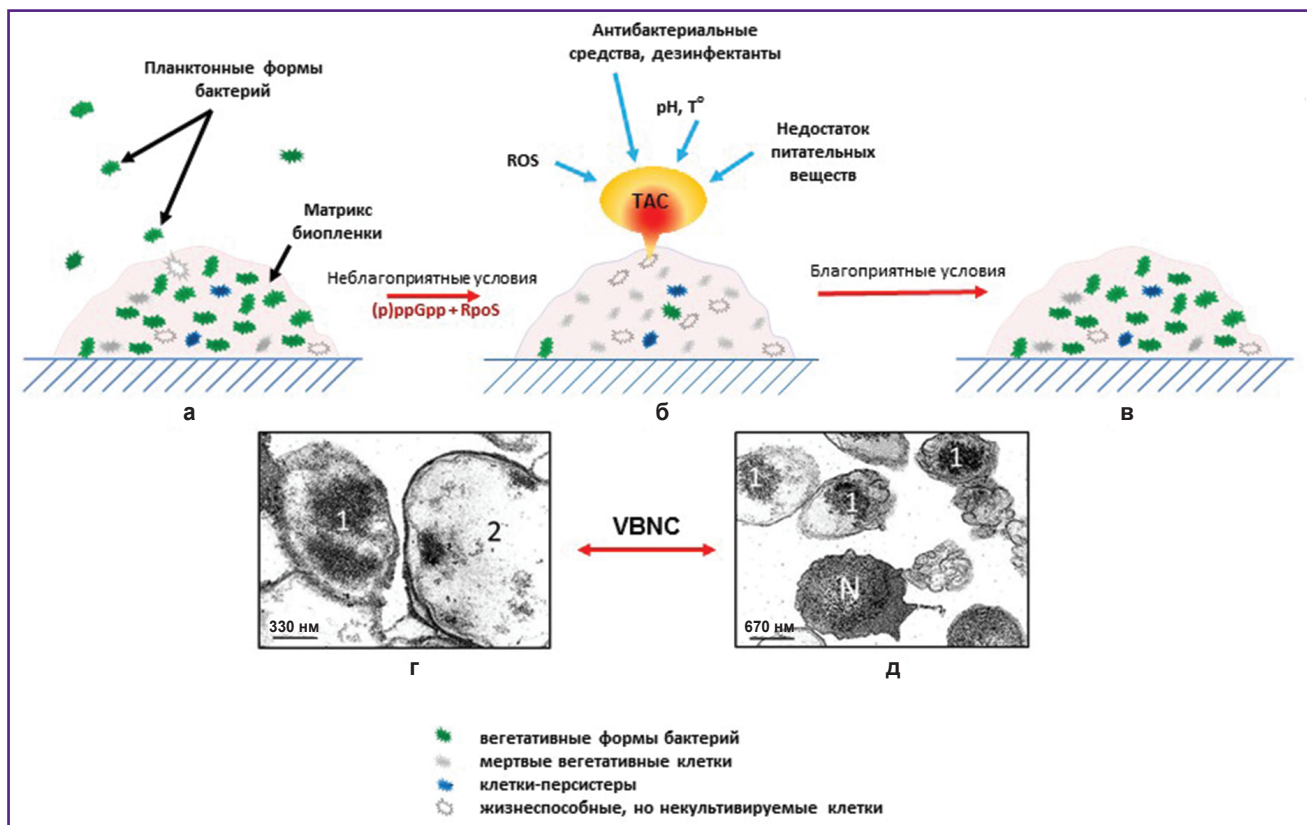


Рис. 3. Формирование и пролиферация жизнеспособных, но некультивируемых (VBNC) форм бактерий: а — образование биопленки при нормальных условиях; б — неблагоприятные условия, формирование VBNC; в — восстановление популяции после наступления благоприятных условий. ТАС — токсин-антитоксинавая система; ROS — активные формы кислорода. На фото: г, д — периодическая культура (*Y. pseudotuberculosis*, штамм Н-2781), питательный бульон, 37°C; 1 — переходная форма VBNC; 2 — клетки с пустым цитозолем; N — нормальная клетка. Трансмиссионная электронная микроскопия JEM-100 S (JEOL, Япония). Рисунок авторов; фото Л.М. Сомовой

средах. Особенно это касается клеток, находившихся перед наступлением состояния персистенции в фазе экспоненциального роста, у которых реверсия начинается в течение 1–2 ч после прекращения антибиотикотерапии (см. рис. 2, б) [88, 132, 133].

Кроме того, в отличие от субпопуляции клеток-персистеров с их фенотипической резистентностью к антибиотикам, бактерии, находящиеся в состоянии VBNC, проявляют толерантность к целому ряду химических и физических факторов, включая широкий спектр антимикробных средств, применяемых для лечения пациентов и проведения дезинфекции, что обуславливает их высокую значимость как агентов внутригоспитальных инфекций. При морфологическом сходстве этих состояний время начала роста после снятия стресса является основным патогномичным признаком, позволяющим отличить VBNC от клеток-персистеров [89, 91, 132, 134].

Вместе с тем существует мнение [135], что накоплению VBNC-клеток предшествует наличие в популяции небольшого числа клеток-персистеров, которые являются переходной формой их трансформации в VBNC-состояние.

Жизнеспособные, но некультивируемые клетки как объект современных технологий. Полученные за последние десятилетия данные о молекулярных механизмах формирования некультивируемых бактерий и их физиологии обострили научный и практический интерес к VBNC. Это стимулировало активные действия по дальнейшему изучению такого клеточного феномена персистенции бактерий и созданию методов его обнаружения.

Новые знания и стратегии изучения некультивируемых форм легли в основу создания современных технологий, направленных на микробиологическое выявление и морфологическую идентификацию VBNC-форм бактериальных клеток; поиск условий и методов их рекультивирования («реанимации») и создание методов ингибирования образования этих дормантных форм [128–130, 131–133, 135–138].

Уже отмечалось, что патогенные бактерии, находящиеся в состоянии VBNC, не высеваются из биоматериала на обычных диагностических питательных средах. Следовательно, большая часть микробного разнообразия не может быть культивирована с помощью традиционных методов, поэтому остается неидентифицированной. Выявление этих форм бактерий строится на сравнении количества жизнеспособных клеток с количеством культивируемых клеток в образце. Как правило, для этого используют обычный метод подсчета клеток. Если количество культивируемых клеток снижается, а численность жизнеспособных бактерий остается высокой, делается вывод о присутствии в образце VBNC-форм [121, 124, 126, 134].

Второй важный шаг для идентификации VBNC-клеток — характеристика жизнеспособности бактерий. Радиоизотопные способы клеточного анализа, основанные на включении в бактерии радиоактивных

предшественников (метод Д. Кеннела); оценка протеолитической активности и кислотообразования [1, 2]; цитохимические методы с солями тетразолия для оценки генерации АТФ и систем транспорта электронов — все они не потеряли своего значения [1, 121, 124].

Однако в XXI в. для выявления дормантных клеточных форм предпочтение отдается методам прижизненной визуализации и дифференциальному суправитальному окрашиванию бактерий, специально разработанным для микробиологических исследований. Системы Life Technologies и LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (ThermoFisher Scientific, США) с флюоресцентными зондами являются достаточно распространенными инструментами для исследования метаболической активности и мониторинга жизнеспособности бактерий, основанными на анализе целостности клеточной мембраны [130, 136, 137]. Принцип метода дифференциальной окраски, используемый при этом, базируется на суправитальном выявлении вегетативных и дормантных клеточных форм, а также мертвых бактерий и может применяться для прямой флюоресцентной микроскопии, количественных анализов с помощью флюоресцентного микропланшетного ридера и проточного цитометра (флюориметра) [132, 138].

При отрицательных результатах микробиологических исследований наличие VBNC-клеток выявляется с помощью молекулярно-генетических тест-систем [136, 137] или матрично-активированной лазерной десорбционно-ионизационной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-ToF/MS) [138, 139].

Применив указанные методы, М. Аугаретян с соавт. [129, 131, 133] показали, что в 14–27% случаев инфицирования патогены в виде VBNC-форм оказались нераспознанными при традиционном микробиологическом анализе, а их присутствие определено только с помощью ПЦР. Выявлено количественное увеличение субпопуляции некультивируемых форм бактериальных клеток в биопленках, что также повышает роль новых методов при обнаружении бактериальных инфекций человека. Это способствует осмыслению молекулярных механизмов, лежащих в основе феномена персистенции и его регуляции (см. рис. 3) [94, 95, 104, 140, 141].

Познание механизмов индукции состояния VBNC и выходов из него имеет решающее значение для управления процессом формирования и реанимации некультивируемых клеточных форм. Y. Liu и соавт. [142] определили, что хлорированная водопроводная вода вызывает индукцию VBNC у 90% *Escherichia coli* O157:H7 в течение 15 мин (в отличие от речной воды, в которой образование некультивируемых форм происходит в течение 14 недель и лишь у 14% кишечных палочек). Аналогичная индукционная эффективность выявлена при комбинации голодания с низким осмотическим давлением, тогда как только голодание не вызывает формирования некультивируемых клеток до 1,5 лет наблюдения. У 10-месячных VBNC-клеток,

индуцированных хлорированной водой, подтверждена жизнеспособность и способность к реанимации аутоиндукторами AI-2, продуцируемыми *E. coli* O157:H7 в сывороточной питательной среде. Дальнейшие исследования показали, что реанимации клеток *E. coli* способствует добавление в питательную среду аминокислот, таких как метионин, глутамин, треонин, серин и аспарагин, а также пирувата (глутамата) натрия [142], Tween 20 или каталазы [143].

Прорывом в изучении VBNC-бактерий является открытие в среде культивирования *Micrococcus luteus* фактора (resuscitation promoting factor, Rpf), стимулирующего реанимацию dormantных форм микроорганизмов. Этот фактор представляет собой семейство термолабильных белков с молекулярной массой 16–19 кДа и высокой муралитической активностью, которые в пиколярных концентрациях могут индуцировать деление и рост VBNC-клеток путем ремоделирования клеточной оболочки бактерий (гидролиз пептидогликана) [144–146].

В современной медицине актуальность использования белков Rpf связывается с переходом латентной хронической формы туберкулезной инфекции в активный туберкулез. Поэтому ингибирование активации фактора, стимулирующего реанимацию *Mycobacterium tuberculosis* (например, с помощью моноклональных антител или нитрофенилтиоцианатных соединений), является привлекательной стратегией для борьбы с реактивацией латентного туберкулеза [147, 148].

Заключение

Прошло несколько десятилетий со времени открытия существования разнообразных форм бактериальной персистенции у неспорообразующих бактерий. За это время достигнут значительный прогресс в понимании сущности, биологической роли и механизмов формирования dormantных клеточных форм.

В природе многие микроорганизмы живут в нестабильных условиях и постоянно испытывают влияние внешних субоптимальных факторов среды обитания. Фенотипическая морфологическая и физиологическая пластичность бактерий, связанная с состоянием покоя, характеризуется низкой метаболической и репродуктивной активностью. Она является распространенным общим, а иногда доминирующим ответом на стрессоры среды обитания бактерий, находящихся под контролем молекулярно-генетических регуляторов. В то же время формирование dormantных форм у неспорообразующих бактерий — важный фактор сохранения их жизнеспособности и вирулентности, устойчивости к антимикробным препаратам и способ хронизации инфекций в организме хозяина.

Исследование механизмов формирования устойчивых клеточных форм и развития антибиотикорезистентности бактерий имеет не только фундаментальное значение, но и открывает широкие перспективы

для разработки принципиально новых антимикробных технологий. Высокая скорость приобретения патогенными бактериями множественной лекарственной устойчивости определяет актуальность и необходимость развития этого направления инновационных исследований.

Развитие современных технологий, связанных с достижениями генетики и молекулярной биологии, поможет выявить dormantные формы бактерий и создать эффективные стратегии для борьбы с ними и, следовательно, с латентными хроническими инфекциями. С другой стороны, изучение фенотипической пластичности бактерий актуально в качестве объекта исследования межклеточного взаимодействия микроорганизмов для поддержания микробного разнообразия, структуры и функции микробных сообществ природных экосистем и биоценозов.

Финансирование исследования. Работа выполнена при поддержке Комплексной программы фундаментальных исследований Дальневосточного отделения РАН «Дальний Восток», проект №18-5-099.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Kaufmann S.H.E. *Basiswissen Immunologie*. Springer Berlin Heidelberg; 2014, <https://doi.org/10.1007/978-3-642-40325-5>.
2. Todd I., Spickett G., Fairclough L. *Lecture notes: immunology*. Wiley-Blackwell; 2015.
3. WHO. *Antimicrobial resistance*. 2015. URL: <https://www.who.int>.
4. Errington J. L-form bacteria, cell walls and the origins of life. *Open Biol* 2013; 3(1): 120143–120143, <https://doi.org/10.1098/rsob.120143>.
5. Errington J. Cell wall-deficient, L-form bacteria in the 21st century: a personal perspective. *Biochem Soc Trans* 2017; 45(2): 287–295, <https://doi.org/10.1042/bst20160435>.
6. Domingue G.J. Demystifying pleomorphic forms in persistence and expression of disease: are they bacteria, and is peptidoglycan the solution? *Discov Med* 2010; 10(52): 234–246.
7. Ferrer M., Méndez-García C., Rojo D., Barbas C., Moya A. Antibiotic use and microbiome function. *Biochem Pharmacol* 2017; 134: 114–126, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.007>.
8. Domingue G.J., Woody H.B. Bacterial persistence and expression of disease. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(2): 320–344, <https://doi.org/10.1128/cmr.10.2.320>.
9. Van Teeseling M.C.F., de Pedro M.A., Cava F. Determinants of bacterial morphology: from fundamentals to possibilities for antimicrobial targeting. *Front Microbiol* 2017; 8, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01264>.
10. Kysela D.T., Randich A.M., Caccamo P.D., Brun Y.V. Diversity takes shape: understanding the mechanistic and adaptive basis of bacterial morphology. *PLoS Biol* 2016; 14(10): e1002565, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002565>.
11. Dörr T., Davis B.M., Waldor M.K. Endopeptidase-mediated beta lactam tolerance. *PLoS Pathog* 2015; 11(4): e1004850, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004850>.

12. Dziarski R., Gupta D. How innate immunity proteins kill bacteria and why they are not prone to resistance. *Curr Genet* 2017; 64(1): 125–129, <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0737-0>.
13. Sassine J., Xu M., Sidiq K.R., Emmins R., Errington J., Daniel R.A. Functional redundancy of division specific penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 2017; 106(2): 304–318, <https://doi.org/10.1111/mmi.13765>.
14. Errington J., Mickiewicz K., Kawai Y., Wu L.J. L-form bacteria, chronic diseases and the origins of life. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2016; 371(1707): 20150494, <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0494>.
15. Сомова Л.М., Бузолева Л.С., Плехова Н.Г. Ультраструктура патогенных бактерий в разных экологических условиях. Владивосток: Медицина ДВ; 2009; 200 с. Somova L.M., Buzoleva L.S., Plekhova N.G. *Ul'trastruktura patogennykh bakteriy v raznykh ekologicheskikh usloviyakh* [Ultrastructure of pathogenic bacteria in different environmental conditions]. Vladivostok: Meditsina DV; 2009; 200 p.
16. Kędzierska B., Hayes F. Emerging roles of toxin-antitoxin modules in bacterial pathogenesis. *Molecules* 2016; 21(6): 790, <https://doi.org/10.3390/molecules21060790>.
17. Lee K.-Y., Lee B.-J. Structure, biology, and therapeutic application of toxin-antitoxin systems in pathogenic bacteria. *Toxins* 2016; 8(10): 305, <https://doi.org/10.3390/toxins8100305>.
18. Hayes F. Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science* 2003; 301(5639): 1496–1499, <https://doi.org/10.1126/science.1088157>.
19. Brown B.L., Grigoriu S., Kim Y., Arruda J.M., Davenport A., Wood T.K., Peti W., Page R. Three dimensional structure of the MqsR:MqsA complex: a novel TA pair comprised of a toxin homologous to RelE and an antitoxin with unique properties. *PLoS Pathog* 2009; 5(12): e1000706, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000706>.
20. Chan W.T., Balsa D., Espinosa M. One cannot rule them all: are bacterial toxins-antitoxins druggable? *FEMS Microbiol Rev* 2015; 39(4): 522–540, <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv002>.
21. Kawai Y., Mercier R., Errington J. Bacterial cell morphogenesis does not require a preexisting template structure. *Curr Biol* 2014; 24(8): 863–867, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.02.053>.
22. Harms A., Maisonneuve E., Gerdes K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science* 2016; 354(6318): aaf4268, <https://doi.org/10.1126/science.aaf4268>.
23. Randich A.M., Brun Y.V. Molecular mechanisms for the evolution of bacterial morphologies and growth modes. *Front Microbiol* 2015; 6: 580, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00580>.
24. Ragland S.A., Criss A.K. From bacterial killing to immune modulation: recent insights into the functions of lysozyme. *PLoS Pathog* 2017; 13(9): e1006512, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006512>.
25. Aguilar B., Ghaffarizadeh A., Johnson C.D., Podgorski G.J., Shmulevich I., Flann N.S. Cell death as a trigger for morphogenesis. *PLoS One* 2018; 13(3): e0191089, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191089>.
26. Тимаков В.Д., Каган Г.Я. L-форма бактерий и семейство Mycoplasmataceae в патологии. М: Медицина; 1973; 392 с. Timakov V.D., Kagan G.Ya. *L-forma bakteriy i semeystvo Mycoplasmataceae v patologii* [L-form bacteria and the Mycoplasmataceae family in pathology]. Moscow: Meditsina; 1973; 392 p.
27. Kawai Y., Mercier R., Wu L.J., Domínguez-Cuevas P., Oshima T., Errington J. Cell growth of wall-free L-form bacteria is limited by oxidative damage. *Curr Biol* 2015; 25(12): 1613–1618, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.031>.
28. Kawai Y., Mickiewicz K., Errington J. Lysozyme counteracts β -lactam antibiotics by promoting the emergence of L-form bacteria. *Cell* 2018; 172(5): 1038–1049.e10, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.021>.
29. Fisher R.A., Gollan B., Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol* 2017; 15(8): 453–464, <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.42>.
30. Klieneberger E. The natural occurrence of pleuropneumonia-like organism in apparent symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and other bacteria. *J Pathol Bacteriol* 1935; 40(1): 93–105, <https://doi.org/10.1002/path.1700400108>.
31. 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. *Microb Ecol* 1982; 8(4): 313–323, <https://doi.org/10.1007/bf02010671>.
32. Hobby G.L., Meyer K., Chaffee E. Observations on the mechanism of action of penicillin. *Exp Biol Med* 1942; 50(2): 281–285, <https://doi.org/10.3181/00379727-50-13773>.
33. Casadesús J. Bacterial L-forms require peptidoglycan synthesis for cell division. *BioEssays* 2007; 29(12): 1189–1191, <https://doi.org/10.1002/bies.20680>.
34. Allan E.J., Hoischen C., Gumpert J. Bacterial L-forms. *Adv Appl Microbiol* 2009; 1–39, [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(09\)01201-5](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(09)01201-5).
35. McLaughlin R.W., Vali H., Lau P.C., Palfree R.G., De Ciccio A., Sirois M., Ahmad D., Villemur R., Desrosiers M., Chan E.C. Are there naturally occurring pleomorphic bacteria in the blood of healthy humans? *J Clin Microbiol* 2002; 40(12): 4771–4775, <https://doi.org/10.1128/jcm.40.12.4771-4775.2002>.
36. Briers Y., Walde P., Schuppler M., Loessner M.J. How did bacterial ancestors reproduce? Lessons from L-form cells and giant lipid vesicles: multiplication similarities between lipid vesicles and L-form bacteria. *BioEssays* 2012; 34(12): 1078–1084, <https://doi.org/10.1002/bies.201200080>.
37. Domínguez-Cuevas P., Mercier R., Leaver M., Kawai Y., Errington J. The rod to L-form transition of *Bacillus subtilis* is limited by a requirement for the protoplast to escape from the cell wall sacculus. *Mol Microbiol* 2011; 83(1): 52–66, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07920.x>.
38. Mercier R., Kawai Y., Errington J. General principles for the formation and proliferation of a wall-free (L-form) state in bacteria. *eLife* 2014; 3, <https://doi.org/10.7554/elife.04629>.
39. Markova N., Slavchev G., Michailova L., Jourdanova M. Survival of *Escherichia coli* under lethal heat stress by L-form conversion. *Int J Biol Sci* 2010; 6(4): 303–315, <https://doi.org/10.7150/ijbs.6.303>.
40. Markova N., Slavchev G., Michailova L. Presence of mycobacterial L-forms in human blood: challenge of BCG vaccination. *Hum Vaccin Immunother* 2015; 11(5): 1192–1200, <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1016682>.
41. Markova N., Slavchev G., Djerov L., Nikolov A., Dimova T. Mycobacterial L-forms are found in cord blood: a potential vertical transmission of BCG from vaccinated mothers. *Hum Vaccin Immunother* 2016; 12(10): 2565–2571, <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1193658>.

42. Markova N.D. L-form bacteria cohabitants in human blood: significance for health and diseases. *Discov Med* 2017; 23(128): 305–313.
43. Slavchev G., Michailova L., Markova N. L-form transformation phenomenon in Mycobacterium tuberculosis associated with drug tolerance to ethambutol. *Int J Mycobacteriol* 2016; 5(4): 454–459, <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2016.06.011>.
44. Lovering A.L., Safadi S.S., Strynadka N.C.J. Structural perspective of peptidoglycan biosynthesis and assembly. *Annu Rev Biochem* 2012; 81(1): 451–478, <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061809-112742>.
45. Emami K., Guyet A., Kawai Y., Devi J., Wu L.J., Allenby N., Daniel R.A., Errington J. RodA as the missing glycosyltransferase in Bacillus subtilis and antibiotic discovery for the peptidoglycan polymerase pathway. *Nat Microbiol* 2017; 2(3), <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.253>.
46. Mercier R., Domínguez-Cuevas P., Errington J. Crucial role for membrane fluidity in proliferation of primitive cells. *Cell Rep* 2012; 1(5): 417–423, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.03.008>.
47. Kashyap D.R., Rompca A., Gaballa A., Helmann J.D., Chan J., Chang C.J., Hozo I., Gupta D., Dziarski R. Peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by inducing oxidative, thiol, and metal stress. *PLoS Pathog* 2014; 10(7): e1004280, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004280>.
48. Liu C., Xu Z., Gupta D., Dziarski R. Peptidoglycan recognition proteins. *J Biol Chem* 2001; 276(37): 34686–34694, <https://doi.org/10.1074/jbc.m105566200>.
49. Budin I., Szostak J.W. Expanding roles for diverse physical phenomena during the origin of life. *Annu Rev Biophys* 2010; 39(1): 245–263, <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.050708.133753>.
50. Kawai Y., Mickiewicz K., Errington J. Lysozyme counteracts β -lactam antibiotics by promoting the emergence of L-form bacteria. *Cell* 2018; 172(5): 1038–1049, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.021>.
51. Justice S.S., Hunstad D.A., Cegelski L., Hultgren S.J. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6(2): 162–168, <https://doi.org/10.1038/nrmicro1820>.
52. Asnani P.J., Gill K. Biological properties of L-forms and their parent bacteria. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* 1980; 27(2): 131–134.
53. Ferguson C.M.J., Booth N.A., Allan E.J. An ELISA for the detection of Bacillus subtilis L-form bacteria confirms their symbiosis in strawberry. *Lett Appl Microbiol* 2000; 31(5): 390–394, <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00834.x>.
54. Tedeschi G.G., Amici D., Sprovieri G., Vecchi A. Staphylococcus epidermidis in the circulating blood of normal and thrombocytopenic human subjects: immunological data. *Experientia* 1976; 32(12): 1600–1602, <https://doi.org/10.1007/bf01924475>.
55. Seel W., Flegler A., Zunabovic-Pichler M., Lipski A. Increased isoprenoid quinone concentration modulates membrane fluidity in Listeria monocytogenes at low growth temperatures. *J Bacteriol* 2018; 200(13): e00148-18, <https://doi.org/10.1128/jb.00148-18>.
56. Chintalapati S., Kiran M.D., Shivaji S. Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation. *Cell Mol Biol* 2004; 50(5): 631–642.
57. Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Тимченко Н.Ф. Жирные кислоты как объект исследования температурных адаптационных стратегий микроорганизмов-психрофилов. *Здоровье. Медицинская экология. Наука* 2015; 3(61): 43–49.
58. Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Тимченко Н.Ф. Fatty acid as an object of research of temperature adaptation strategies psychrophiles. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka* 2015; 3(61): 43–49.
59. Studer P., Staubli T., Wieser N., Wolf P., Schuppler M., Loessner M.J. Proliferation of Listeria monocytogenes L-form cells by formation of internal and external vesicles. *Nat Commun* 2016; 7(1), <https://doi.org/10.1038/ncomms13631>.
60. Bigger J. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet* 1944; 244(6320): 497–500, [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(00\)74210-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)74210-3).
61. Balaban N.Q. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 2004; 305(5690): 1622–1625, <https://doi.org/10.1126/science.1099390>.
62. Han J., Shi W., Xu X., Wang S., Zhang S., He L., Sun X., Zhang Y. Conditions and mutations affecting Staphylococcus aureus L-form formation. *Microbiology* 2015; 161(1): 57–66, <https://doi.org/10.1099/mic.0.082354-0>.
63. Onwuamaegbu M., Belcher R., Soare C. Cell wall-deficient bacteria as a cause of infections: a review of the clinical significance. *J Int Med Res* 2005; 33(1): 1–20, <https://doi.org/10.1177/147323000503300101>.
64. Beaman B.L., Scates S.M. Role of L-forms of Nocardia caviae in the development of chronic mycetomas in normal and immunodeficient murine models. *Infect Immun* 1981; 33(3): 893–907.
65. Gupta R.S. Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2011; 100(2): 171–182, <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9616-8>.
66. Bertaux F., Marguerat S., Shahrezaei V. Division rate, cell size and proteome allocation: impact on gene expression noise and implications for the dynamics of genetic circuits. *R Soc Open Sci* 2018; 5(3): 172234, <https://doi.org/10.1098/rsos.172234>.
67. Glover W.A., Yang Y., Zhang Y. Insights into the molecular basis of L-form formation and survival in Escherichia coli. *PLoS One* 2009; 4(10): e7316, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007316>.
68. Dhar N., McKinney J.D. Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. *Curr Opin Microbiol* 2007; 10(1): 30–38, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.12.007>.
69. Allison K.R., Brynildsen M.P., Collins J.J. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature* 2011; 473(7346): 216–220, <https://doi.org/10.1038/nature10069>.
70. Barth V.C., Rodrigues B.Á., Bonatto G.D., Gallo S.W., Pagnussatti V.E., Ferreira C.A.S., de Oliveira S.D. Heterogeneous persister cells formation in Acinetobacter baumannii. *PLoS One* 2013; 8(12): e84361, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084361>.
71. Day T. Interpreting phenotypic antibiotic tolerance and persister cells as evolution via epigenetic inheritance. *Mol Ecol* 2016; 25(8): 1869–1882, <https://doi.org/10.1111/mec.13603>.
72. Amato S.M., Brynildsen M.P. Persister heterogeneity arising from a single metabolic stress. *Curr Biol* 2015; 25(16): 2090–2098, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.034>.
73. Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol* 2010; 64(1): 357–372, <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>.

73. Levin B.R., Concepción-Acevedo J., Udekwi K.I. Persistence: a copacetic and parsimonious hypothesis for the existence of non-inherited resistance to antibiotics. *Curr Opin Microbiol* 2014; 21: 18–21, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.06.016>.
74. Orman M.A., Brynildsen M.P. Inhibition of stationary phase respiration impairs persister formation in *E. coli*. *Nat Commun* 2015; 6(1), <https://doi.org/10.1038/ncomms8983>.
75. Patra P., Klumpp S. Population dynamics of bacterial persistence. *PLoS One* 2013; 8(5): e62814, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062814>.
76. Kwan B.W., Chowdhury N., Wood T.K. Combatting bacterial infections by killing persister cells with mitomycin C. *Environ Microbiol* 2015; 17(11): 4406–4414, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12873>.
77. Chowdhury N., Wood T.L., Martínez-Vázquez M., García-Contreras R., Wood T.K. DNA-crosslinker cisplatin eradicates bacterial persister cells. *Biotechnol Bioeng* 2016; 113(9): 1984–1992, <https://doi.org/10.1002/bit.25963>.
78. Lock R.L., Harry E.J. Cell-division inhibitors: new insights for future antibiotics. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7(4): 324–38, <https://doi.org/10.1038/nrd2510>.
79. Белов А.Б., Кузин А.А. Сапронозные инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи: проблемные вопросы теории эпидемиологии. *Пермский медицинский журнал* 2017; 34(4): 94–102. Belov A.B., Kuzin A.A. Health care-associated sapronous infections: problematic questions of epidemiological theory. *Permskiy meditsinskiy zhurnal* 2017; 34(4): 94–102.
80. Nemeth J., Oesch G., Kuster S.P. Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70(2): 382–395, <https://doi.org/10.1093/jac/dku379>.
81. McShan A.C., De Guzman R.N. The bacterial type III secretion system as a target for developing new antibiotics. *Chem Biol Drug Des* 2014; 85(1): 30–42, <https://doi.org/10.1111/cbdd.12422>.
82. Spellberg B., Guidos R., Gilbert D., Bradley J., Boucher H.W., Scheld W.M., Bartlett J.G., Edwards J. Jr.; Infectious Diseases Society of America. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008; 46(2): 155–164, <https://doi.org/10.1086/524891>.
83. Kint C.I., Verstraeten N., Fauvart M., Michiels J. New-found fundamentals of bacterial persistence. *Trends Microbiol* 2012; 20(12): 577–585, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.08.009>.
84. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12(5): 371–387, <https://doi.org/10.1038/nrd3975>.
85. Maisonneuve E., Gerdes K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell* 2014; 157(3): 539–548, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.050>.
86. Van den Bergh B., Michiels J.E., Fauvart M., Michiels J. Should we develop screens for multi-drug antibiotic tolerance? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2016; 14(7): 613–616, <https://doi.org/10.1080/14787210.2016.1194754>.
87. Lewis K., Shan Y. Persister awakening. *Mol Cell* 2016; 63(1): 3–4, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.025>.
88. Amato S.M., Fazen C.H., Henry T.C., Mok W.W.K., Orman M.A., Sandvik E.L., Volzing K.G., Brynildsen M.P. The role of metabolism in bacterial persistence. *Front Microbiol* 2014; 5, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00070>.
89. Michiels J.E., Van den Bergh B., Verstraeten N., Michiels J. Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence. *Drug Resist Updat* 2016; 29: 76–89, <https://doi.org/10.1016/j.drup.2016.10.002>.
90. Wood T.K. Combatting bacterial persister cells. *Biotechnol Bioeng* 2015; 113(3): 476–483, <https://doi.org/10.1002/bit.25721>.
91. Maisonneuve E., Castro-Camargo M., Gerdes K. (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell* 2013; 154(5): 1140–1150, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.048>.
92. Manav M.C., Beljantseva J., Bojer M.S., Tenson T., Ingmer H., Haurlyiuk V., Brodersen D.E. Structural basis for (p)ppGpp synthesis by the *Staphylococcus aureus* small alarmone synthetase RelP. *J Biol Chem* 2018; 293(9): 3254–3264, <https://doi.org/10.1074/jbc.ra117.001374>.
93. Beljantseva J., Kudrin P., Jimmy S., Ehn M., Pohl R., Varik V., Tozawa Y., Shingler V., Tenson T., Rejman D., Haurlyiuk V. Molecular mutagenesis of ppGpp: turning a RelA activator into an inhibitor. *Sci Rep* 2017; 7(1): 41839, <https://doi.org/10.1038/srep41839>.
94. Syal K., Flentie K., Bhardwaj N., Maiti K., Jayaraman N., Stallings C.L., Chatterji D. Synthetic (p)ppGpp analogue is an inhibitor of stringent response in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61(6): e00443-17, <https://doi.org/10.1128/aac.00443-17>.
95. Geiger T., Goerke C., Fritz M., Schäfer T., Ohlsen K., Liebeke M., Lalk M., Wolz C. Role of the (p)ppGpp synthase RSH, a RelA/SpoT homolog, in stringent response and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2010; 78(5): 1873–1883, <https://doi.org/10.1128/iai.01439-09>.
96. Haurlyiuk V., Atkinson G.C., Murakami K.S., Tenson T., Gerdes K. Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat Rev Microbiol* 2015; 13(5): 298–309, <https://doi.org/10.1038/nrmicro3448>.
97. Ogura T., Hiraga S. Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80(15): 4784–4788, <https://doi.org/10.1073/pnas.80.15.4784>.
98. Page R., Peti W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nat Chem Biol* 2016; 12(4): 208–214, <https://doi.org/10.1038/nchembio.2044>.
99. Aizenman E., Engelberg-Kulka H., Glaser G. An *Escherichia coli* chromosomal “addiction module” regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(12): 6059–6063, <https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.6059>.
100. Christensen S.K., Maenhaut-Michel G., Mine N., Gottesman S., Gerdes K., Van Melderen L. Overproduction of the Lon protease triggers inhibition of translation in *Escherichia coli*: involvement of the yefM-yoeB toxin-antitoxin system. *Mol Microbiol* 2004; 51(6): 1705–1717, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03941.x>.
101. Van Melderen L., Saavedra De Bast M. Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS Genetics* 2009; 5(3): e1000437, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000437>.
102. Wen Y., Behiels E., Devreese B. Toxin-antitoxin systems: their role in persistence, biofilm formation, and pathogenicity. *Pathog Dis* 2014; 70(3): 240–249, <https://doi.org/10.1111/2049-632x.12145>.

- 103.** Van Melder L. Toxin–antitoxin systems: why so many, what for? *Curr Opin Microbiol* 2010; 13(6): 781–785, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.10.006>.
- 104.** Thakur Z., Dharra R., Saini V., Kumar A., Mehta P.K. Insights from the protein-protein interaction network analysis of Mycobacterium tuberculosis toxinantitoxin systems. *Bioinformation* 2017; 13(11): 380–387, <https://doi.org/10.6026/97320630013380>.
- 105.** Ghafourian S., Raftari M., Sadeghifard N., Sekawi Z. Toxin-antitoxin systems: classification, biological function and application in biotechnology. *Curr Issues Mol Biol* 2014, 16: 9–14, <https://doi.org/10.21775/cimb.016.009>.
- 106.** Hayes F., Kędzierska B. Regulating toxin-antitoxin expression: controlled detonation of intracellular molecular timebombs. *Toxins* 2014; 6(1): 337–358, <https://doi.org/10.3390/toxins6010337>.
- 107.** Maleki A., Ghafourian S., Pakzad I., Badakhsh B., Sadeghifard N. mazE antitoxin of toxin antitoxin system and fbpA as reliable targets to eradication of Neisseria meningitidis. *Curr Pharm Des* 2018; 24(11): 1204–1210, <https://doi.org/10.2174/1381612824666171213094730>.
- 108.** Jaén-Luchoro D., Aliaga-Lozano F., Gomila R.M., Gomila M., Salvà-Serra F., Lalucat J., Bennasar-Figueras A. First insights into a type II toxin-antitoxin system from the clinical isolate Mycobacterium sp. MHSD3, similar to epsilon/zeta systems. *PLoS One* 2017; 12(12): e0189459, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189459>.
- 109.** Wood T.K. Strategies for combating persister cell and biofilm infections. *Microb Biotechnol* 2017; 10(5): 1054–1056, <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12774>.
- 110.** Cui P., Xu T., Zhang W.H., Zhang Y. Molecular mechanisms of bacterial persistence and phenotypic antibiotic resistance. *Yi Chuan* 2016; 38(10): 859–871.
- 111.** Wexselblatt E., Oppenheimer-Shaanan Y., Kaspy I., London N., Schueler-Furman O., Yavin E., Glaser G., Katzhendler J., Ben-Yehuda S. Relacin, a novel antibacterial agent targeting the stringent response. *PLoS Pathog* 2012; 8(9): e1002925, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002925>.
- 112.** Kim J.S., Chowdhury N., Yamasaki R., Wood T.K. Viable but non-culturable and persistence describe the same bacterial stress state. *Environ Microbiol* 2018; 20(6): 2038–2048, <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14075>.
- 113.** Winther K.S., Roghanian M., Gerdes K. Activation of the stringent response by loading of RelA-tRNA complexes at the ribosomal A-site. *Mol Cell* 2018; 70(1): 95–105.e4, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.033>.
- 114.** Сомов Г.П., Бузолева Л.С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды. Владивосток: ОАО «Полиграфкомбинат»; 2004; 168 с. Somov G.P., Buzoleva L.S. *Adaptatsiya patogennykh bakteriy k abioticheskim faktoram okruzhayushchey sredy* [Adaptation of pathogenic bacteria to abiotic environmental factors]. Vladivostok: ОАО «Poligrafkombinat»; 2004; 168 p.
- 115.** Oliver J.D. The viable but non-culturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 133(3): 203–208, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07885.x>.
- 116.** Oliver J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2010; 34(4): 415–425, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x>.
- 117.** Day A.P., Oliver J.D. Changes in membrane fatty acid composition during entry of *Vibrio vulnificus* into the viable but nonculturable state. *J Microbiol* 2004; 42(2): 69–73.
- 118.** Xiao X., Tian C., Yu Y., Wu H. Detection of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 using propidium monoazide treatments and qPCR. *Can J Microbiol* 2013; 59(3): 157–163, <https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0577>.
- 119.** Nowakowska J., Oliver J.D. Resistance to environmental stresses by *Vibrio vulnificus* in the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiol Ecol* 2013; 84(1): 213–222, <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12052>.
- 120.** Троицкая В.В., Четина Е.В., Аляпкина Ю.С., Литвин В.Ю., Гинсбург А.Л. Некультивируемые формы *Yersinia pseudotuberculosis* в почвах природного очага псевдотуберкулеза. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 1996; 5: 13–15. Troitskaia V.V., Chetina E.V., Aliapkina I.S., Litvin V.Yu., Gintsburg A.L. Non-culturable forms of *Yersinia pseudotuberculosis* in the soils of a natural focus of pseudotuberculosis. *Zhurnal mikrobiologii i immunobiologii* 1996; 5: 13–15.
- 121.** Литвин В.Ю., Гинсбург А.Л., Пушкарева В.И., Романова Ю.М., Боев Б.В. Эпидемиологические аспекты экологии бактерий. М: Фармус-принт; 1998; 229 с. Litvin V.Yu., Gintsburg A.L., Pushkareva V.I., Romanova Yu.M., Boev B.V. *Epidemiologicheskie aspekty ekologii bakteriy* [Epidemiological aspects of the ecology of bacteria]. Moscow: Farmus-print; 1998; 229 p.
- 122.** Barer M.R., Gribbon L.T., Harwood C.R., Nwoguh C.E. The viable but non-culturable hypothesis and medical bacteriology. *Rev Med Microbiol* 1993; 4(4): 183–191, <https://doi.org/10.1097/00013542-199310000-00001>.
- 123.** Rivers B., Steck T.R. Viable but nonculturable uropathogenic bacteria are present in the mouse urinary tract following urinary tract infection and antibiotic therapy. *Urological Research* 2001; 29(1): 60–66, <https://doi.org/10.1007/s002400000151>.
- 124.** Baffone W., Citterio B., Vittoria E., Casaroli A., Campana R., Falzano L., Donelli G. Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. *Int J Food Microbiol* 2003; 89(1): 31–39, [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00102-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00102-8).
- 125.** Pienaar J.A., Singh A., Barnard T.G. The viable but non-culturable state in pathogenic *Escherichia coli*: a general review. *Afr J Lab Med* 2016; 5(1): 368, <https://doi.org/10.4102/ajlm.v5i1.368>.
- 126.** Bamford R.A., Smith A., Metz J., Glover G., Titball R.W., Pagliara S. Investigating the physiology of viable but non-culturable bacteria by microfluidics and time-lapse microscopy. *BMC Biol* 2017; 15(1): 121, <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0465-4>.
- 127.** Potgieter M., Bester J., Kell D.B., Pretorius E. The dormant blood microbiome in chronic, inflammatory diseases. *FEMS Microbiol Rev* 2015; 39(4): 567–591, <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv013>.
- 128.** Del Mar Lleò M., Benedetti D., Tafi M.C., Signoretto C., Canepari P. Inhibition of the resuscitation from the viable but non-culturable state in *Enterococcus faecalis*. *Environ Microbiol* 2007; 9(9): 2313–2320, <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01345.x>.
- 129.** Ayrapetyan M., Williams T.C., Oliver J.D. Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria. *Trends Microbiol* 2015; 23(1): 7–13, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.09.004>.
- 130.** Li L., Mendis N., Trigui H., Oliver J.D., Faucher S.P.

- The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol* 2014; 5: 258, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00258>.
- 131.** Ayrapetyan M., Williams T.C., Baxter R., Oliver J.D. Viable but nonculturable and persister cells coexist stochastically and are induced by human serum. *Infect Immun* 2015; 83(11): 4194–4203, <https://doi.org/10.1128/iai.00404-15>.
- 132.** Kim J.-S., Wood T.K. Tolerant, growing cells from nutrient shifts are not persister cells. *mBio* 2017; 8(2): e00354-17, <https://doi.org/10.1128/mbio.00354-17>.
- 133.** Ayrapetyan M., Williams T.C., Oliver J.D. Interspecific quorum sensing mediates the resuscitation of viable but nonculturable vibrios. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80(8): 2478–2483, <https://doi.org/10.1128/aem.00080-14>.
- 134.** Zhao X., Zhong J., Wei C., Lin C.-W., Ding T. Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens. *Front Microbiol* 2017; 8: 580, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00580>.
- 135.** Orman M.A., Brynildsen M.P. Establishment of a method to rapidly assay bacterial persister metabolism. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(9): 4398–4409, <https://doi.org/10.1128/aac.00372-13>.
- 136.** Dietersdorfer E., Kirschner A., Schrammel B., Ohradanova-Repic A., Stockinger H., Sommer R., Walochnik J., Cervero-Aragó S. Starved viable but non-culturable (VBNC) Legionella strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages. *Water Res* 2018; 141: 428–438, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.01.058>.
- 137.** Wang X., Wood T.K. Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(16): 5577–5583, <https://doi.org/10.1128/aem.05068-11>.
- 138.** Ramamurthy T., Ghosh A., Pazhani G.P., Shinoda S. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. *Front Public Health* 2014; 2: 103, <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00103>.
- 139.** Kuehl B., Marten S.-M., Bischoff Y., Brenner-Weiß G., Obst U. MALDI-ToF mass spectrometry-multivariate data analysis as a tool for classification of reactivation and non-culturable states of bacteria. *Anal Bioanal Chem* 2011; 401(5): 1593–1600, <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5227-5>.
- 140.** Su X., Zhang S., Mei R., Zhang Y., Hashmi M.Z., Liu J., Lin H., Ding L., Sun F. Resuscitation of viable but non-culturable bacteria to enhance the cellulose-degrading capability of bacterial community in composting. *Microb Biotechnol* 2018; 11(3): 527–536, <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13256>.
- 141.** Majeed M., Majeed S., Nagabhusanam K., Punnapuzha A., Philip S., Mundkur L. Rapid assessment of viable but non-culturable Bacillus coagulans MTCC 5856 in commercial formulations using Flow cytometry. *PLoS One* 2018; 13(2): e0192836, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192836>.
- 142.** Liu Y., Wang C., Tyrrell G., Hrudehy S.E., Li X.-F. Induction of Escherichia coli O157:H7 into the viable but non-culturable state by chloraminated water and river water, and subsequent resuscitation. *Environ Microbiol Rep* 2009; 1(2): 155–161, <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00024.x>.
- 143.** Pinto D., Almeida V., Almeida Santos M., Chambel L. Resuscitation of Escherichia coli VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli. *J Appl Microbiol* 2011; 110(6): 1601–1611, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05016.x>.
- 144.** Zeng B., Zhao G., Cao X., Yang Z., Wang C., Hou L. Formation and resuscitation of viable but nonculturable Salmonella typhi. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 1–7, <https://doi.org/10.1155/2013/907170>.
- 145.** 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. *Mol Microbiol* 2006; 59(1): 84–98, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04930.x>.
- 146.** Lennon J.T., Jones S.E. Microbial seed banks: the ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9(2): 119–130, <https://doi.org/10.1038/nrmicro2504>.
- 147.** Harms A., Fino C., Sørensen M.A., Semsey S., Gerdes K. Prophages and growth dynamics confound experimental results with antibiotic-tolerant persister cells. *mBio* 2017; 8(6): e01964-17, <https://doi.org/10.1128/mbio.01964-17>.
- 148.** Nikitushkin V.D., Demina G.R., Kaprelyants A.S. Rpf proteins are the factors of reactivation of the dormant forms of actinobacteria. *Biochemistry (Mosc)* 2016; 81(13): 1719–1734, <https://doi.org/10.1134/s0006297916130095>.