



Особенности изменений спектров жирных кислот бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в процессе формирования устойчивых (дормантных) клеточных форм

Андрюков Б.Г.[✉], Сомова Л.М., Ляпун И.Н., Бынина М.П., Матосова Е.В.

ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова», 690087, Владивосток, Россия

Введение. С появлением парадигмы гетерогенности популяции бактерий возросло внимание к фенотипу дормантных (дремлющих) клеток, активная генерация которых происходит при неблагоприятных условиях среды обитания микроорганизмов. Эти клетки характеризуются метаболическим и репродуктивным покоем, а также резистентностью к антибиотикам. Однако при наступлении благоприятных для них условий обитания они способны вновь прорасти и вызывать обострение инфекционных заболеваний. С этими фенотипами патогенных бактерий связывают угрожающее снижение эффективности антимикробной терапии, рост уровня заболеваемости персистирующими, хроническими и госпитальными инфекциями. С учетом ключевой роли в адаптации бактерий жирных кислот (ЖК) **целью** исследования было выявление специфических особенностей изменений ЖК-состава грамотрицательных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в процессе их многолетнего хранения в экстремальных условиях и формирования дормантных (некультивируемых) субпопуляций клеточных форм.

Материалы и методы. Для исследования использовали статические культуры эталонных штаммов: *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella enterica* Typhimurium и *Escherichia coli*, хранившиеся под вазелиновым маслом при 4–8°C в течение 5–10 лет. Дормантные клеточные формы получали путем удаления масляного слоя и сбора микробной массы. Ультраструктурные признаки дормантных клеточных форм были подтверждены трансмиссионной электронной микроскопией. Жизнеспособность дормантных клеток оценивали молекулярно-генетическим методом. Отсутствие репродуктивной активности дормантных форм проверяли путем многократных посевов на LB-бульон, среды Эндо и Серова и инкубации при 4–6, 22–24 и 37°C. Получение метиловых эфиров общих ЖК проводили по методике, утвержденной Европейским комитетом по стандартизации и рекомендованной Sherlock MIS-протоколом. Анализ метиловых эфиров ЖК осуществляли методом газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией. После предварительной гомогенизации микробных масс бактерий липиды экстрагировали, спектры ЖК получали методом электронного удара при 70 эВ.

Результаты. Доказано, что в экстремальных условиях (низкая температура, недостаток питательных веществ, гипоксия) в популяции *E. coli*, *Y. pseudotuberculosis* и *S. Typhimurium* формируется фенотипическая некультивируемая генерация дормантных клеток. Сравнительный анализ изменений ЖК-спектра в дормантном фенотипе выявил определенные особенности по сравнению с вегетативными клетками, связанные со снижением индекса ненасыщенности и доминированием длинноцепочечных насыщенных ЖК (C14–C18).

Выводы. Биологическое значение выявленных трансформаций связано, по-видимому, с особой ролью этих фракций ЖК в обратимом формировании дремлющего (некультивируемого) клеточного фенотипа и как альтернативного источника углеводов в метаболически неактивном состоянии, а также в их последующей реверсии в вегетативные клетки при наступлении благоприятных условий существования.

Ключевые слова: *Escherichia coli*; *Yersinia pseudotuberculosis*; *Salmonella Typhimurium*; дормантные (некультивируемые) клетки; жирные кислоты; резистентность; антибиотики.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках госзадания по теме НИР № 0545-2019-0007 «Молекулярные механизмы образования устойчивых некультивируемых форм бактерий».

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Ляпун И.Н., Бынина М.П., Матосова Е.В. Особенности изменений спектров жирных кислот бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в процессе формирования устойчивых (дормантных) клеточных форм. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(5): 401–412.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-2>

Features of changes in spectra of fatty acids of the bacteria of the *Enterobacteriaceae* family in the process of forming stable (dormant) cell forms

Boris G. Andryukov[✉], Larisa M. Somova, Irina N. Lyapun, Marina P. Bynina, Ekaterina V. Matosova

Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia

Introduction. With the advent of the paradigm of heterogeneity of the bacterial population, attention has been drawn to the phenotype of dormant cells, the active generation of which occurs when adverse environmental conditions of microorganisms appear. These cells are characterized by metabolic and reproductive dormancy, as well as antibiotic resistance. However, upon the occurrence of favorable living conditions, they are able to germinate again and cause an exacerbation of infectious diseases. In recent years, a threatening decrease in the effectiveness of antimicrobial therapy and an increase in the incidence of persistent, chronic and hospital infections have been associated with these phenotypes of pathogenic bacteria. Given the key role of fatty acid (FA) in the adaptation of bacteria, the aim of this study was to identify the specific features of changes in the fatty acid composition of gram-negative bacteria from the *Enterobacteriaceae* family during their long-term storage under extreme conditions and the formation of dormant (uncultured) subpopulations of cell forms.

Materials and methods. Static cultures of following reference strains were used in the study: *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella enterica* Typhimurium, and *Escherichia coli*, stored under vaseline oil at 4–8°C for 5–10 years. Dormant cell forms were obtained by removing the oil layer and collecting the microbial mass. The ultrastructural features of the dormant cell forms were confirmed by transmission electron microscopy. The viability of dormant cells was assessed by a molecular genetic method. The lack of reproductive activity of dormant forms was checked by repeated inoculations on LB broth, Endo and Serov media and incubation at 4–6°C, 22–24°C, and 37°C. Methyl esters of total FAs were obtained according to the procedure approved by the European Committee for Standardization and recommended by the Sherlock MIS protocol. Analysis of fatty acid methyl esters was carried out by gas chromatography in combination with mass spectrometry. After preliminary homogenization of the bacterial masses, lipids were extracted, and FA spectra were obtained by electron impact at 70 eV.

Results. It was demonstrated that phenotypic uncultured generation of dormant cells is formed under extreme conditions (low temperature, nutrient deficiency, hypoxia) in populations of *E. coli*, *Y. pseudotuberculosis* and *S. Typhimurium*. A comparative analysis of changes in the fatty acid spectrum in the dormant phenotype revealed certain features compared to vegetative cells associated with a decrease in the unsaturation index and the dominance of long-chain saturated FAs (C14–C18).

Conclusion. The biological significance of the observed transformations is apparently associated with the special role of these FA fractions in the reversible formation of dormant (uncultivated) cell phenotype and as an alternative source of carbohydrates in a metabolically inactive state, as well as their subsequent reversal to vegetative cells upon favorable living conditions.

Keywords: *Escherichia coli*; *Yersinia pseudotuberculosis*; *Salmonella Typhimurium*; dormant (uncultured) cells; fatty acids; resistance; antibiotics.

Acknowledgments. The work was carried out within the framework of the state assignment on the subject of research work No. 0545-2019-0007 "Molecular mechanisms of the formation of stable uncultivated forms of bacteria."

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Andryukov B.G., Somova L.M., Lyapun I.N., Bynina M.P., Matosova E.V. Features of changes in spectra of fatty acids of the bacteria of the *Enterobacteriaceae* family in the process of forming stable (dormant) cell forms. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(5): 401–412. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-2>

Received 10 March 2020
Accepted 7 June 2020

Введение

Для сохранения жизнеспособности в условиях длительного воздействия низких температур, недостатка кислорода и питательных веществ патогенные бактерии формируют фенотипическую генерацию dormantных (устойчивых) клеточных форм. Они характеризуются резким замедлением (прекращением) метаболизма и отсутствием репродукции

на обычных питательных средах. Однако при наступлении благоприятных для них условий обитания они способны вновь прорасти и вызывать инфекционные заболевания [1, 2].

Внимание к dormantным (от англ. «dormant» — спящие) клеткам возросло в последние десятилетия в связи с активным изучением сообществ микроорганизмов мерзлотных почв Аркти-

ки. По современным представлениям, эти анабиотические клеточные фенотипы патогенных бактерий обладают высокой резистентностью ко всем антимикробным средствам и являются одной из причин возникновения госпитальных и хронических форм инфекций, в том числе ассоциированных с патогенными бактериями семейства *Enterobacteriaceae* [3, 4].

Данная таксономическая группа включает в себя важные с медицинской точки зрения виды энтеробактерий, в числе которых *Salmonella* spp., *Escherichia coli* и *Yersinia* spp., имеющие отличительные особенности и высокую клиническую значимость. Они представляют собой грамотрицательные, не образующие спор, факультативно анаэробные микроорганизмы, местом обитания которых являются внешняя среда и желудочно-кишечный тракт человека [1, 3].

В ходе исследований стратегий адаптации энтеробактерий к экстремальным условиям среды обитания выявлена ведущая роль изменений внутриклеточного спектра насыщенных (нЖК), моноеновых (моноЖК), полиненасыщенных (полиЖК) жирных кислот и их циклических изомеров (цисЖК) в жизнеобеспечении бактерий [2, 5–7]. Возможно, эти же механизмы лежат в основе формирования дормантного клеточного фенотипа в результате трансформации макромолекулярного состава и вязкоупругих характеристик энтеробактерий в процессе обратимого перехода в устойчивое и некультивируемое состояние.

Данные литературы свидетельствуют о сложности исследования дормантных фенотипов бактерий из-за трудностей создания лабораторных моделей этих анабиотических клеточных генераций в условиях длительного низкотемпературного культивирования, а также многолетнего трофического и кислородного истощения [2, 3, 8].

Цель настоящего исследования заключалась в выявлении специфических особенностей изменения жирнокислотного состава грамотрицательных бактерий из семейства *Enterobacteriaceae* в процессе их многолетнего хранения в экстремальных условиях и формирования дормантных (некультивируемых) субпопуляций клеточных форм.

Материалы и методы

Для исследования использовали статические культуры эталонных штаммов бактерий из коллекции НИИЭМ имени Г.П. Сомова: *Yersinia pseudotuberculosis* 512 серовара I-b, *Salmonella enterica* серовара Typhimurium 25902 и *Escherichia coli*, ATCC M17. Высев бактерий проводили уколом в столбик с полужидким агаром. Посевы инкубировали 24 ч при 37°C. При наличии роста пробирки заливали стерильным вазелиновым маслом, закрывали резиновыми пробками и хранили при 4–8°C в со-

ответствии с МУ 2.1.4.1057-01¹. В таком состоянии культуры находились в течение 5–10 лет (с 2010 г.). Дормантные клеточные формы получали путем удаления масляного слоя и сбора микробной массы. Клетки промывали стерильным физиологическим раствором с последующим центрифугированием.

Ультраструктурные признаки дормантных клеточных форм были подтверждены при трансмиссионной электронной микроскопии [8–11]. Образцы бактерий для электронной микроскопии отбирали путем центрифугирования культуральных сред в течение 20 мин при 1800 об/мин. Полученные бактериальные суспензии фиксировали при 20–22°C в течение 1 ч фиксатором Ито [12].

Отмытые от фиксатора суспензии дополнительно фиксировали 1% раствором OsO₄ в течение 18 ч. Далее клетки обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации и последовательно проводили через смесь абсолютного этанола с акриловой смолой («Sigma Aldrich») в соотношении 2:1, 1:1. Заливку проводили чистой акриловой смолой с катализатором при 60°C в течение 48 ч.

Серийные ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме «LKB-V», контрастировали насыщенным раствором уранилацетата на 8% забуференном формалине и щелочным 0,02 М раствором цитрата свинца («Serva»). Срезы толщиной около 80 нм изучали при помощи трансмиссивного электронного микроскопа «JEM-100 S» («Jeol») при ускоряющем напряжении 80 кВ. Микрофото съемку проводили на фотопластинки ПФП-01 Т (ОАО «Компания Славич»). Фотопластинки обрабатывали в проявителе Д-19 в течение 5 мин при 20°C и фиксировали в водном растворе тиосульфата натрия 20 мин.

Анализ жизнеспособности персистирующих бактерий в исследованных изолятах проводили с помощью современной модификации метода ПЦР — viability PCR [11]. Метод основан на предварительной обработке исследуемых биообразцов специальными интеркалирующими нуклеиновые кислоты красителями, которые проникают через поврежденные мембраны клеток, связываются с ДНК и разрушают ее при последующей фотоактивации, а амплифицируется только ДНК из клеток с неповрежденными мембранами. В качестве интеркалирующего агента использовали бромистый этидий («Serva») [11, 12].

Амплификации ДНК *Salmonella* и *E. coli* проводили с использованием набора реагентов АмплиСенс® ОКИ скрин-FL (ООО «Компания Хеликон») с гибридационно-флуоресцентной детекцией («Интерлабсервис»). Для выявления ДНК

¹ Методические указания МУ 2.1.4.1057-01: Процедура ведения эталонных бактериальных культур (утв. 06.07.2001).

Y. pseudotuberculosis применяли «ScreenMix-HS» («Евроген») с идентификацией специфического гена цитотоксического некротизирующего фактора *cnfY*, который был амплифицирован в присутствии Taq-полимеразы с помощью праймеров 5'-GCAGGTGGGAGCAACAAGAT-3' и 3'-ACGGCGAACTTGATAATTGCTT-5'.

Тестирование проводили в соответствии с прилагаемыми инструкциями на биомассах персистирующих изолятов соответствующих микроорганизмов, полученных, как указано выше. ПЦР проводили в термоциклере «Терцик» («ДНК-технология») по следующей программе: денатурация 1 цикл 95°C — 2 мин 30 с, затем отжиг 25 циклов: 95°C — 40 с, 56°C — 30 с, 72°C — 2 мин и синтез 1 цикл 72°C — 7 мин 40 с. Полученные ампликоны анализировали методом горизонтального электрофореза в 1% геле агарозы, содержащем бромистый этидий. Электрофорез продуктов ПЦР вели в 1% агарозном геле («Serva Electrophoresis GmbH») и в трис-боратном буфере. Гели окрашивали в бромистом этидии и фотографировали в ультрафиолетовом свете в системе гель-документирования «Bio-Rad XR» («Bio-Rad Laboratories Inc.»). В качестве маркера молекулярного веса использовали «PCR Markers» («Promega Corp.»).

Отсутствие репродуктивной активности дормантов проверяли путем многократных посевов на LB-бульон, среды Эндо и Серова и инкубации при 4–6, 22–24 и 37°C.

Вегетативные клетки исследованных штаммов энтеробактерий получали при периодическом культивировании в жидкой питательной среде (LB-бульон, ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) после 3–4 пассажей и инкубации в течение 7 сут при 37°C. Тестовые свойства культур проверяли в соответствии с МУ 2.1.4.1057-01. Перед дальнейшим этапом — гомогенизацией и экстракцией липидов — исследуемые культуры бактерий выдерживали в течение 48 ч при 4–6°C. Образцы 2-суточных культур обрабатывали сразу после отбора, клетки смывали стерильным физиологическим раствором с последующим центрифугированием.

Получение метиловых эфиров общих ЖК проводили по методике, утвержденной Европейским комитетом по стандартизации (CEN, 2003 г.) и рекомендованной Sherlock MIS-протоколом (редакция 2012 г.) [10]. Анализ метиловых эфиров ЖК осуществляли методом газовой хроматографии (ISO 5508:1990) в сочетании с масс-спектрометрией [9, 10]. При невозможности немедленного анализа их консервировали в органических растворителях или замораживали при –5°C [10]. Пробы промывали, центрифугировали, супернатант сливали, а осадок высушивали и подвергали кислотному метанолизу в 2,5 М HCl в метаноле. Безводный раствор HCl в метаноле готовили по методу [9]. Метанолиз прово-

дили в 0,5 мл реактива на 2–10 мг сухого остатка в течение 2 ч при 70°C [9, 10].

Исследовали по 6 проб каждого изолята изучаемых бактерий. После предварительной гомогенизации микробные пробы подвергались стандартной методике экстракции по Фолчу в модификации [13] с последующей переэтерификацией извлеченных ЖК в метиловые эфиры. В соответствии с описанной методикой каждый образец трижды экстрагировали смесью хлороформа и метанола (1:1) двукратным объемом экстрагирующей смеси по отношению к объему пробы. ЖК анализировали на хроматографе «Shimadzu GC-2010» с использованием капиллярной кварцевой колонки (30 м × 0,25 мм) с фазой «Supelcowax 10»; идентифицировали по данным газо-жидкостной масс-спектрометрии на приборе «Shimadzu GCMS QP5050A», используя два типа колонок: «Supelcowax 10» (при 210°C) и «MDN-5S» (в градиенте температуры 200–300°C со скоростью 2°C/мин). Все спектры получали методом электронного удара при 70 эВ. Все исследуемые изоляты бактерий были экстрагированы шестикратно для оценки воспроизводимости.

Для статистического анализа количественных данных был применен пакет программ «Statistica 6.1» («Statsoft Inc.») с использованием методов описательной статистики и непараметрических критериев (ANOVA). Количественные данные представлены в виде среднего арифметического значения и среднего квадратического отклонения при оценке данных естественного разброса. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез был равен 0,05. Для изучения колебаний относительных значений мажорных фракций ЖК вычисляли коэффициент вариации (CV).

Результаты

При проведении электронной трансмиссионной микроскопии в клеточных субпопуляциях энтеробактерий в условиях длительного низкотемпературного культивирования, а также многолетнего трофического и кислородного истощения выявлены признаки субтотального замещения вегетативных клеток дормантными клеточными формами. Это подтверждает выявление специфических ультраструктурных признаков бактерий, находящихся в покоящемся (некультивируемом) состоянии: клетки протопластного или сферопластного типов с пустым цитозолем, увеличенным периплазматическим пространством, нарушенной слоистостью клеточной стенки и целостностью цитоплазматической мембраны. Полученные признаки соответствовали ранее описанной ультраструктурной организации покоящихся (некультивируемых) клеток [8–10]. Аналогичные электронно-микроскопические исследования вегетативных культур выявили типичные морфологические признаки энтеробактерий (рис. 1).

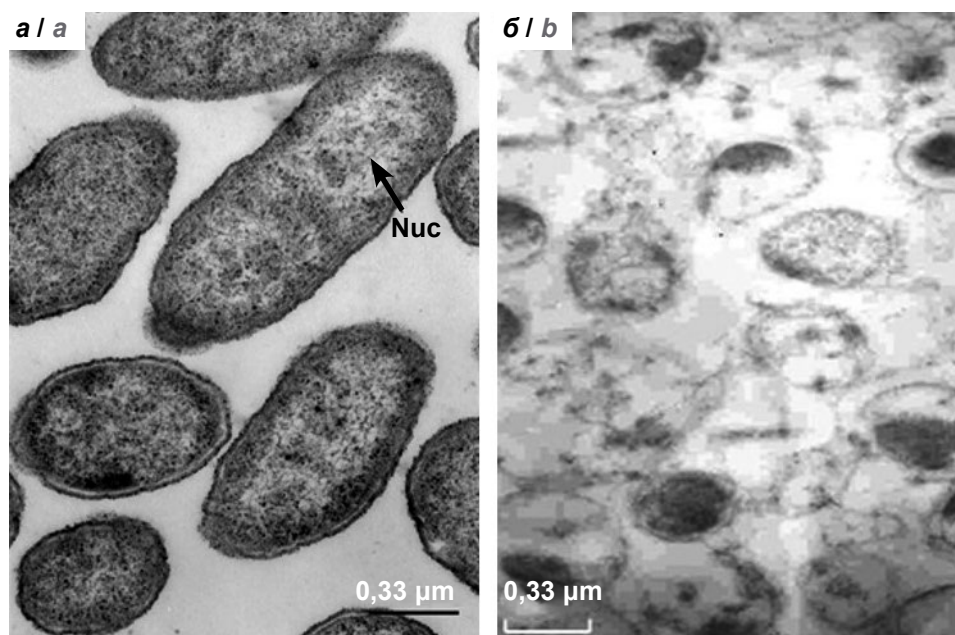


Рис. 1. Субтотальное замещение вегетативных клеток dormantными клеточными формами (а); ультраструктурные признаки dormantных некультивируемых клеточных форм (б) в статической культуре *Y. pseudotuberculosis*, штамм 512-1 серовариант I-b (9 лет, полужидкий агар, 4–8°C).

Трансмиссионная электронная микроскопия, × 15 000 (фото Л.М. Сомовой).

Fig. 1. Subtotal replacement of vegetative cells with dormant cell forms (a); ultrastructural signs of dormant uncultivated cell forms (b) in a static culture of *Y. pseudotuberculosis*, strain 512-1 serovariant I-b (9 years old, semi-liquid agar, 4–8°C).

Transmission electron microscopy, × 15,000 (photo by L.M. Somova).

Сравнительный анализ полученных спектров ЖК у вегетативных и dormantных клеточных форм выявил достаточно стабильные липидные профили у всех исследуемых энтеробактерий. Оценка относительных значений CV мажорных фракций ЖК вегетативных культур и dormantных клеточных форм исследуемых штаммов энтеробактерий (в сумме составлявших более 90%) показала, что они не превышают 10%. Эти показатели свидетельствуют о слабой колеблемости признака, а средние линейные отклонения в совокупности

варьировали от $8,80 \pm 1,63\%$ до $9,33 \pm 0,66\%$ для *Y. pseudotuberculosis*, от $8,24 \pm 1,54\%$ до $8,51 \pm 1,26\%$ для *S. Typhimurium* и от $8,26 \pm 1,49\%$ до $8,53 \pm 1,37\%$ для *E. coli*.

В экстрактах вегетативных и dormantных бактерий выявлены и идентифицированы метиловые эфиры ЖК, содержащие 12–18 атомов углерода. Полученные спектры содержали до 20 фракций кислот, которые анализировали и сравнивали по 11 мажорным пикам (типичная хроматограмма показана на **рис. 2**). Большинство минорных пиков не были

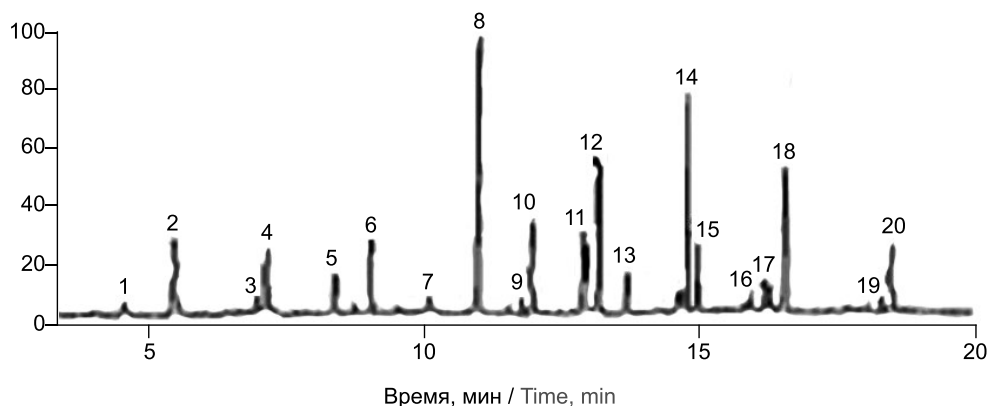


Рис. 2. Газовая хроматограмма метиловых эфиров ЖК из вегетативных клеток *S. Typhimurium*, штамм 25902.

Номерами обозначены пики ЖК, числовые значения мажорных пиков приведены в табл. 1.

Fig. 2. Gas chromatogram of FA methyl esters from vegetative cells of *S. Typhimurium*, strain 25902.

The numbers indicate the FA peaks, the numerical values of the major peaks are given in Table 1.

идентифицированы как метиловые эфиры ЖК и не анализировались.

ЖК, элюирующие ранее, чем C12, а также гидроксикислоты в исследование не включали из-за плохой воспроизводимости относительных площадей пиков.

Мажорные фракции выявленных ЖК у вегетативных клеток исследуемых штаммов (табл. 1) были представлены длинноцепочечными кислотами (C14–C18) с преобладанием C16:0 (пальмитиновой), C16:1 ω 7 (пальмитолеиновой), C17:1 (маргаринолеиновой), C18:1 ω 9 (олеиновой) и C18:1 ω 7 (цис-вакценовой). Вклад этих фракций в общий спектр у разных штаммов исследованных бактерий был разным, однако их суммарное содержание было статистически значимо выше совокупности других ЖК ($p < 0,05$).

Ранее в ряде работ [5–7] проводили анализ спектров ЖК из бактерий, принадлежащих к семейству *Enterobacteriaceae*, профили основных кислот которых были аналогичны полученным в настоя-

щем исследовании. Преобладание в спектрах указанных ЖК является стабильным и патогномичным признаком для энтеробактерий [14, 15].

Установлено статистически значимое ($p < 0,01$) преобладание в спектрах ЖК у исследованных штаммов насыщенной гексадекановой кислоты (C16:0), содержание которой варьировало в пределах 28–33%, что, по данным литературы, является патогномичным признаком энтеробактерий [14–17]. Расчетный индекс насыщенности ЖК [14, 16] вегетативных клеток составил от 0,53 (*S. Typhimurium*) до 0,97 (*Y. pseudotuberculosis*), что соответствует данным литературы [14–17]. Общая совокупность фракций нЖК (C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0) в спектрах вегетативных клеток составила более 50% (табл. 1).

Полученные результаты соответствуют выводам отечественных и зарубежных исследователей о высокой консервативности спектра ЖК у бактерий, который является их таксономической харак-

Таблица 1. Мажорные фракции ЖК вегетативных клеточных форм исследованных грамотрицательных бактерий
Table 1. Major fractions of fatty acids of vegetative cell forms of the studied gram-negative bacteria

№ проб Number of sample	ЖК (мажорные фракции), % Fatty acids (major fractions), %										
	C12:0	C14:0	C14:1	C15:0	C16:0	C16:1 ω 7	C17:1	C18:0	C18:1 ω 9	C18:1 ω 7	C18:2 ω 6
<i>E. coli</i> , ATCC M17 ИН / Unsaturation index = 0,61											
1	1,04	2,91	0,26	0,31	33,72	11,97	11,28	6,48	14,29	7,18	5,38
2	1,01	2,89	0,33	0,24	32,97	11,97	12,00	6,40	13,80	6,92	5,12
...6	1,11	3,01	0,30	0,21	33,19	12,77	12,31	5,39	14,19	7,24	5,22
<i>M</i> \pm <i>m</i>	1,05 \pm 0,44	2,93 \pm 0,71	0,30 \pm 0,07	0,27 \pm 0,06	33,39 \pm 0,64	12,34 \pm 0,67	12,09 \pm 0,54	6,26 \pm 0,55	14,19 \pm 0,81	7,11 \pm 0,70	5,23 \pm 0,66
CV, %	6,85	9,18	6,29	6,30	9,68	8,48	9,47	8,78	9,97	8,21	7,69
<i>S. Typhimurium</i> , 25902 ИН / Unsaturation index = 0,53											
1	3,40	3,45	0,14	0,11	30,53	10,96	9,91	12,04	11,01	11,10	3,98
2	3,82	2,99	0,10	0,05	30,37	11,82	10,13	11,39	12,10	11,28	5,01
...6	2,81	3,76	0,11	0,10	31,28	11,90	10,13	11,40	11,19	10,99	3,57
<i>M</i> \pm <i>m</i>	3,34 \pm 0,43	3,40 \pm 0,46	0,11 \pm 0,03	0,11 \pm 0,04	30,73 \pm 0,81	11,56 \pm 0,84	10,05 \pm 0,64	11,24 \pm 0,75	11,61 \pm 0,81	11,12 \pm 0,65	4,18 \pm 0,72
CV, %	8,99	7,79	6,41	6,39	9,91	9,30	9,74	9,43	9,70	8,72	7,18
<i>Y. pseudotuberculosis</i> , 512, I-b ИН / Unsaturation index = 0,97											
1	2,97	2,50	0,20	0,22	28,12	10,26	9,82	10,87	13,01	8,84	4,98
2	3,02	2,28	0,24	0,14	28,16	10,35	9,67	11,10	12,88	9,06	3,88
...6	3,01	2,48	0,20	0,22	27,99	10,52	9,35	10,91	13,00	8,99	4,56
<i>M</i> \pm <i>m</i>	3,00 \pm 0,45	2,42 \pm 0,24	0,24 \pm 0,08	0,19 \pm 0,07	28,08 \pm 0,72	10,37 \pm 0,59	9,61 \pm 0,49	10,96 \pm 0,44	12,93 \pm 0,77	8,96 \pm 0,55	4,47 \pm 0,69
CV, %	9,50	9,00	6,88	6,92	9,18	9,68	9,38	8,75	9,98	8,89	8,58

Примечание. ИН — индекс ненасыщенности.

теристикой [15–17]. Анализ ЖК-состава вегетативных популяций показал отсутствие статистически значимых различий в содержании отдельных фракций ЖК.

Качественный и количественный составы ЖК dormantных клеточных форм энтеробактерий, находящихся при 6–8°C в стационарном режиме, претерпевают существенные изменения. В исследованных изолятах, по сравнению с исходными значениями, существенно выросло относительное содержание среднецепочечных ЖК с числом атомов углерода 8–12 ($p < 0,05$) и сохранилось значительное количество насыщенных длинноцепочечных кислот (C14–C18). При этом ИН ЖК (отношение ненасыщенных жирных кислот к насыщенным) у dormantных форм снизился по сравнению с вегетативными клетками этих же бактерий (табл. 2).

При анализе изменений качественного состава ЖК в процессе обратимого перехода вегетативных клеток в dormantные клеточные формы исследуемых грамотрицательных бактерий была выявлена статистически значимая тенденция снижения относительного количества моноЖК у некультивируемых клеток. Кроме того, у dormantных форм по сравнению с вегетативными клетками было выявлено существенное снижение полиЖК, особенно выраженное у *S. Typhimurium* ($p < 0,02$), а также цисЖК (табл. 3).

Обсуждение

ЖК являются важными компонентами клеточных мембран бактерий, а их профили уникальны и предоставляют важную информацию для систематики микроорганизмов. Активность ферментов,

Таблица 2. Мажорные фракции ЖК dormantных клеточных форм исследованных грамотрицательных бактерий
Table 2. Major fractions of fatty acids of dormant cell forms of the studied gram-negative bacteria

№ проб Number of sample	ЖК (мажорные фракции), % Fatty acids (major fractions), %										
	C12:0	C14:0	C14:1	C15:0	C16:0	C16:1ω7	C17:1	C18:0	C18:1ω9	C18:1ω7	C18:2ω6
<i>E. coli</i> , ATCC M17											
ИН / Unsaturation index = 0,51											
1	4,82	5,71	5,21	4,83	27,32	9,01	6,91	6,02	14,31	6,28	3,61
2	5,22	5,92	4,91	5,01	25,38	8,98	7,11	6,11	15,76	6,22	3,71
...6	5,07	6,06	5,09	5,04	26,58	8,89	7,25	5,87	14,82	6,22	3,91
<i>M ± m</i>	5,05 ± 0,84	5,89 ± 0,71	5,07 ± 0,94	4,95 ± 0,81	26,42 ± 0,94	8,96 ± 0,18	7,09 ± 0,94	6,26 ± 0,82	14,96 ± 0,61	6,24 ± 0,38	3,74 ± 0,17
<i>p</i>	< 0,02	< 0,02	< 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05	< 0,05	> 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05
CV, %	7,98	7,52	9,52	8,89	9,62	7,54	9,47	9,78	8,97	7,20	7,28
<i>S. Typhimurium</i> , 25902											
ИН / Unsaturation index = 0,42											
1	3,81	2,68	2,41	3,57	28,03	10,02	8,71	8,52	11,85	8,37	2,22
2	4,21	3,41	3,03	3,46	29,07	10,14	9,02	9,08	11,32	7,89	2,12
...6	4,02	3,12	3,02	3,09	28,48	10,00	9,42	8,49	11,48	8,42	2,06
<i>M ± m</i>	4,02 ± 0,64	3,07 ± 0,71	3,15 ± 0,51	3,37 ± 0,44	28,53 ± 0,81	10,08 ± 0,61	9,05 ± 0,81	9,06 ± 0,71	11,55 ± 0,71	8,22 ± 0,80	2,14 ± 0,64
<i>p</i>	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
CV, %	9,12	9,13	7,12	7,23	9,31	7,21	9,62	7,62	7,26	9,82	7,15
<i>Y. pseudotuberculosis</i> , 512, I-b											
ИН / Unsaturation index = 0,37											
1	4,22	5,62	2,91	2,90	29,42	8,10	8,32	6,86	10,78	5,34	3,01
2	4,32	4,81	3,01	2,97	30,11	9,01	9,00	7,06	11,89	5,11	4,13
...6	5,19	5,22	3,00	2,82	29,92	8,02	8,95	6,97	11,76	6,08	4,32
<i>M ± m</i>	5,58 ± 0,44	5,19 ± 0,78	2,97 ± 0,77	2,90 ± 0,67	29,82 ± 0,68	8,37 ± 0,51	8,76 ± 0,63	6,97 ± 0,51	11,54 ± 0,47	5,51 ± 0,61	3,82 ± 0,71
<i>p</i>	< 0,05	< 0,05	< 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
CV, %	9,12	9,06	9,50	8,00	9,18	9,64	9,32	9,71	9,98	9,68	9,52

Примечание. *p* — уровень значимости различий по сравнению с вегетативными клеточными формами энтеробактерий (табл. 1).
Note. *p* — level of significance of differences from vegetative cell forms of *Enterobacteria* (Table 1).

Таблица 3. Изменения качественного состава ЖК в процессе обратимого перехода вегетативных клеток в dormantные клеточные формы грамотрицательных бактерий (%)

Table 3. Changes in the qualitative composition of fatty acids during the reversible transition of vegetative cells to dormant cell forms of gram-negative bacteria (%)

Энтеробактерии Enterobacteria	нЖК Saturated FA		моноЖК Monounsaturated FA		полиЖК Polyunsaturated FA		цисЖК cisFA	
	вегетативные vegetative	дормантные dormant	вегетативные vegetative	дормантные dormant	вегетативные vegetative	дормантные dormant	вегетативные vegetative	дормантные dormant
<i>E. coli</i>	42,85	43,52	46,84	42,32*	5,23	3,74	35,87	33,90
<i>S. Typhimurium</i>	45,48	44,03	44,45	42,05*	4,18	2,14**	38,47	31,99*
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	41,65	44,88	42,11	37,15*	4,47	3,82	36,73	29,24*

Примечание. * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$ по сравнению с вегетативными клеточными формами.
Note. * $p < 0,05$, ** $p < 0,02$ relative to vegetative bacteria cells.

участвующих в синтезе ЖК, определяется изменяющимися факторами окружающей среды. В связи с этим в различных условиях существования бактерий меняются относительное содержание ЖК, длина их цепей и насыщенность.

Газовая хроматография уже более полувека служит одним из наиболее стандартизированных методов анализа ЖК, являясь чувствительным, точным и воспроизводимым методом [13–15, 17–19]. С помощью этого аналитического инструмента изучен ЖК-спектр у большинства микроорганизмов, определены маркеры отдельных родов и видов бактерий [14, 17].

Это относится к представителям семейства *Enterobacteriaceae*, используемым в настоящем исследовании, у которых состав ЖК, по данным ранее проведенных исследований, отличается высокой однородностью (средний коэффициент Bousfield составляет от 0,89 у *Y. pseudotuberculosis* до 0,78 у *E. coli*) [16, 19].

Однако ряд исследователей справедливо отмечают зависимость полученных результатов газохроматографических спектров от условий экспериментов [14–16, 18]. Поэтому для оптимизации стабильности и получения воспроизводимых результатов мы проводили экстракцию в стандартных условиях, насколько это позволяли условия исследования. Известно, что спектр ЖК у бактерий зависит от фазы роста, возраста культур и температуры культивирования, влияющей на физическое состояние и текучесть мембраны [13–15, 17, 18]. Поэтому для нивелирования воздействия влияющих факторов перед экстракцией метиловых эфиров ЖК авторы инкубировали вегетативные пробы в течение 2 сут при 6–8°C в стационарной фазе роста.

Это исследование представляет собой первый анализ спектра ЖК у dormantных клеточных форм бактерий, полученных на лабораторной модели в условиях длительного воздействия экстремальных

факторов. Бактериальное восприятие различных сигналов окружающей среды приводит к фенотипическим трансформациям метаболизма и репродукции, а также переключает транскрипционный аппарат многочисленных регуляторных систем [20, 21]. Аналогичные процессы также протекают в энтеробактериях, которые содержат значительный набор регуляторов транскрипции, хорошо известных как сигма-факторы, реагирующие на стрессы [21], в том числе на гипоксию, дефицит питательных веществ и низкую температуру [22, 23].

В ходе эксперимента одновременно решались несколько задач, связанных с исследованием жизнеспособности некультивируемых клеточных форм, оценкой методов их реверсии и сохранением вирулентных свойств патогенных бактерий. Кроме того, в ходе эксперимента анализировали микромеханические свойства клеточной мембраны и макромолекулярной структуры одиночных dormantных клеток с использованием методов молекулярной микробиологии (неопубликованные данные).

Одна из задач этого исследования — проверка гипотезы о значении ЖК при адаптационных трансформациях патогенных бактерий в условиях длительного и экстремального по значениям воздействия неблагоприятных условий существования (низкая температура, дефицит питательных веществ и гипоксия). Моделируя условия эксперимента, авторы исходили из того, что некультивируемые бактерии в состоянии покоя используют механизмы сохранения жизнеспособности, сталкиваясь с низкой температурой природных экосистем, а также неблагоприятными условиями микроокружения внутри организма-хозяина, включая гипоксию и недостаток питательных веществ [21–23].

Во время исследования было сосредоточено внимание на ЖК как на критическом и потенциально ограниченном ресурсе, который является гидрофобным структурным компонентом клеточной

стенки грамотрицательных бактерий и их важнейшим энергетическим субстратом [20, 24, 25].

Поскольку синтез липидов у бактерий обычно зависит от внешних источников [26, 27], которые в настоящем эксперименте при формировании dormantных форм были перекрыты, основное внимание было сосредоточено на спектре ЖК.

В последние годы на моделях *E. coli* были установлены молекулярно-генетические механизмы формирования dormantных клеточных форм [28]. Выявлено, что большинство из них нацелены на ингибирование ключевых внутриклеточных звеньев метаболизма и репродукции — синтеза белков и репликации нуклеиновых кислот при активном участии вторичных мессенджеров-индукторов [26, 28].

К последним относят внутриклеточные нуклеотидные молекулы-алармоны (p)ppGpp (гуанозин пентафосфат и гуанозин тетрафосфат). Они играют ключевую роль в ответе бактериальной клетки на внешние раздражители, выполняют функцию одного из основных медиаторов «строгого контроля» и регулятора активности метаболизма [28].

Вероятно, неповрежденный липидный метаболизм у некультивируемых бактерий является важным фактором, который необходимо учитывать при изучении не только dormantного клеточного фенотипа бактерий, но и механизмов их последующей реверсии в вегетативные формы. Сравнительный анализ спектров ЖК показал, что у некультивируемого клеточного фенотипа доминировали длинноцепочечные кислоты, которые в условиях ингибирования белкового синтеза индуцировали формирование dormantных поколений бактерий и их свойства (повышение лекарственной толерантности и низкую метаболическую активность). Отчасти это предположение подтверждают результаты исследований зарубежных авторов [23, 26, 27].

Например, в недавней работе P. Del Portillo и соавт. (2019) установили изменение липидного метаболизма *Mycobacterium tuberculosis* при адаптации к условиям гипоксии. Основным источником углеводов бактерий в условиях недостатка кислорода становятся длинноцепочечные ЖК. Тем самым авторы подтвердили ключевую роль гипоксии в формировании персистирующих клеточных форм *M. tuberculosis*. Установлено, что в экстремальных условиях длинноцепочечные ЖК используются бактериями в качестве основного источника углеводов [24]. Этот же алармический путь метаболизма важен не только при гипоксии, но и при низкотемпературной адаптации, в условиях дефицита питательных веществ [25, 26].

Токсин-антитоксинарные системы *M. tuberculosis*, экспрессия которых регулируется сигналами из окружающей среды, являются актуальными для формирования персистенции бактерий и их выжи-

вания в условиях гипоксии. В частности, промоторы *sigE* и *sigB* выступали как факторы транскрипции, избирательно стимулируя экспрессию целевых генов, кодирующих длинноцепочечные ЖК [24].

A. Battesti (2006) на модели *E. coli* было показано, что при реакции бактерий на стресс, связанный с длительным голоданием, при участии длинноцепочечных нЖК происходит активация синтеза (p)ppGpp. В качестве кофактора при этом выступает ацильный белок-носитель (ACP), который может ингибировать рост клеток и индуцировать их переход в дремлющее (некультивируемое) состояние [27].

В ходе аналогичных исследований J.E. Cronan с соавт. (2009) установили, что структурная пластичность ACP и его ацитилированной формы проявляется в инициации синтеза ЖК у бактерий при стрессе как в отношении их насыщенности (снижение относительного количества моноЖК и полиЖК), так и длины ацильной цепи (укорочение) в условиях ингибирования активности ферментов при голодании бактерий [28].

Проведенный нами сравнительный анализ спектров ЖК при обратимом формировании dormantных клеточных форм и у вегетативных клеток энтеробактерий показал, что выводы о связи регуляции синтеза ЖК с формированием некультивируемого фенотипа у бактерий, сделанные на модели *E. coli* [27], справедливы и для других представителей семейства *Enterobacteriaceae*. При этом мы сделали предположение об исключительной важности роли длинноцепочечных нЖК как основного источника углеводов не только в формировании dormantных клеток, но и при их реверсии в вегетативные клетки при наступлении благоприятных условий.

Таким образом, в результате длительного хранения (до 10 лет) *E. coli*, *Y. pseudotuberculosis* и *S. Typhimurium* в экстремальных условиях (низкая температура, недостаток питательных веществ, гипоксия) в популяции формируется фенотипическая некультивируемая генерация dormantных клеток [25, 29, 30]. Сравнительный анализ изменений ЖК-спектра в dormantном фенотипе выявил определенные особенности по сравнению с вегетативными клетками, связанные со снижением ИН и доминированием длинноцепочечных нЖК (C14–C18). Биологическое значение выявленных трансформаций у dormantных бактерий связано, по-видимому, с усилением роли этих фракций ЖК в обратимом формировании дремлющего (некультивируемого) клеточного фенотипа при появлении неблагоприятных условий обитания, а также в создании источника углеводов в метаболически неактивном состоянии и в процессе их последующей реверсии в вегетативные клетки при наступлении благоприятных условий существования.

ЛИТЕРАТУРА

- Miyaue S., Suzuki E., Komiyama Y., Kondo Y., Morikawa M., Maeda S. Bacterial memory of persisters: bacterial persister cells can retain their phenotype for days or weeks after withdrawal from colony-biofilm culture. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 1396. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01396>
- Hice S.A., Santoscoy M.C., Soupir M.L., Cademartiri R. Distinguishing between metabolically active and dormant bacteria on paper. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018; 102(1): 367–75. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8604-y>
- Bublitz D.C., Wright P.C., Wright P.C., Bodager J.R., Rasambainarivo F.T., Bliska J.B., et al. Epidemiology of pathogenic Enterobacteria in humans, livestock, and peridomestic rodents in rural Madagascar. *PLoS One.* 2014; 9(7): e101456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101456>
- WHO. Antimicrobial resistance; 2015. Available at: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/>
- Barák I., Muchová K. The role of lipid domains in bacterial cell processes. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14(2): 4050–65. <https://doi.org/10.3390/ijms14024050>
- Schennink A., Heck J.M., Bovenhuis H., Visker M.H., van Valenberg H.J., van Arendonk J.A. Milk fatty acid unsaturation: genetic parameters and effects of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) and acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1). *J. Dairy Sci.* 2008; 91(5): 2135–43. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0825>
- Yao J., Rock C.O. Exogenous fatty acid metabolism in bacteria. *Biochimie.* 2017; 141: 30–9. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.06.015>
- Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Матосова Е.В., Ляпун И.Н. фенотипическая пластичность бактерий как стратегия резистентности и объект современных антимикробных технологий (обзор). *Современные технологии в медицине.* 2019; 11(2): 164–82. <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.2.22>
- Ichihara K., Fukubayashi Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *J. Lipid Res.* 2010; 51(3): 635–40. <https://doi.org/10.1194/jlr.D001065>
- Sherlock. Microbial Identification System. V. 6.2. MIS Operating Manual. Newark: Sandy Dr.; 2012.
- Cangelosi G.A., Meschke J.S. Dead or alive: molecular assessment of microbial viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014; 80(19): 5884–91. <https://doi.org/10.1128/aem.01763-14>
- Soejima T., Iida K., Qin T., Tani H., Seki M., Takade A., et al. Photoactivated ethidium monoazide directly cleaves bacterial DNA and is applied to PCR for discrimination of live and dead bacteria. *Microbiol. Immunol.* 2007; 51(8): 763–75. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2007.tb03966.x>
- Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959; 37(8): 911–17. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Li Y., Wu S., Wang L., Li Y., Shi F., Wang X. Differentiation of bacteria using fatty acid profiles from gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* 2010; 90(8): 1380–3. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3931>
- Tan Y., Wu M., Liu H., Dong X., Guo Z., Song Z., et al. Cellular fatty acids as chemical markers for differentiation of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2010; 50(1): 104–11. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02762.x>
- Viarengo G., Sciarra M.I., Salazar M.O., Kieffer P.M., Furlán R.L., García Vescovi E. Unsaturated long chain free fatty acids are input signals of the *Salmonella enterica* PhoP/PhoQ regulatory system. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(31): 22346–58. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.472829>
- Janßen H.J., Steinbüchel A. Fatty acid synthesis in *Escherichia coli* and its applications towards the production of fatty acid based biofuels. *Biotechnol. Biofuels.* 2014; 7(1): 7. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-7>
- Huang C.B., Alimova Y., Myers T.M., Ebersole J.L. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Arch. Oral. Biol.* 2011; 56(7): 650–4. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011>
- Matsumoto K., Kusaka J., Nishibori A., Hara H. Lipid domains in bacterial membranes. *Mol. Microbiol.* 2006; 61(5): 1110–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05317.x>
- Bousfield I.J., Smith G.L., Dando T.R., Hobbs G. Numerical analysis of total fatty acid profiles in the identification of coryneform, nocardioform and some other bacteria. *Microbiology.* 1983; 129(2): 375–94. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-2-375>
- 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: 1264. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01264>
- Paget M.S. Bacterial sigma factors and anti-sigma factors: structure, function and distribution. *Biomolecules.* 2015; 5(3): 1245–65. <https://doi.org/10.3390/biom5031245>
- Shen G., Li X. The multifaceted role of hypoxia-inducible factor 1 (HIF1) in lipid metabolism, hypoxia and human diseases. <https://doi.org/10.5772/65340> Available at: <https://www.intechopen.com/books/hypoxia-and-human-diseases/the-multifaceted-role-of-hypoxia-inducible-factor-1-hif1-in-lipid-metabolism>
- Del Portillo P., García-Morales L., Menéndez M.C., Anzola J.M., Rodríguez J.G., Helguera-Repetto A.C., et al. Hypoxia is not a main stress when *Mycobacterium tuberculosis* is in a dormancy-like long-chain fatty acid environment. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2019; 8: 449. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00449>
- Mocali S., Chiellini C., Fabiani A., Decuzzi S., de Pascale D., Parrilli E., et al. Ecology of cold environments: new insights of bacterial metabolic adaptation through an integrated genomic-phenomic approach. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 839. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00876-4>
- Hassan N., Anesio A.M., Rafiq M., Holtvoeth J., Bull I., Halcem A., et al. Temperature driven membrane lipid adaptation in glacial psychrophilic bacteria. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 824. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00824>
- Battesti A., Bouveret E. Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Mol. Microbiol.* 2006; 62(4): 1048–63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05442.x>
- Cronan J.E., Thomas J. Bacterial fatty acid synthesis and its relationships with polyketide synthetic pathways. *Methods Enzymol.* 2009; 459: 395–33. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04617-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04617-5)
- Jöers A., Vind K., Hernández S.B., Maruste R., Pereira M., Brauer A., et al. Muropeptides stimulate growth resumption from stationary phase in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 18043. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54646-5>
- Burkert A., Douglas T.A., Waldrop M.P., Mackelprang R. Changes in the active, dead, and dormant microbial community structure across a Pleistocene permafrost chronosequence. *Appl. Environ. Microbiol.* 2019; 85(7): e02646-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02646-18>

REFERENCES

- Miyaue S., Suzuki E., Komiyama Y., Kondo Y., Morikawa M., Maeda S. Bacterial memory of persisters: bacterial persister cells can retain their phenotype for days or weeks after withdrawal from colony-biofilm culture. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 1396. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01396>
- Hice S.A., Santoscoy M.C., Soupir M.L., Cademartiri R. Distinguishing between metabolically active and dormant bacteria on paper. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018; 102(1): 367–75. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8604-y>

3. Bublitz D.C., Wright P.C., Wright P.C., Bodager J.R., Rasambainarivo F.T., Bliska J.B., et al. Epidemiology of pathogenic Enterobacteria in humans, livestock, and peridomestic rodents in rural Madagascar. *PLoS One*. 2014; 9(7): e101456. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101456>
4. WHO. Antimicrobial resistance; 2015. Available at: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/>
5. Barák I., Muchová K. The role of lipid domains in bacterial cell processes. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14(2): 4050–65. <https://doi.org/10.3390/ijms14024050>
6. Schennink A., Heck J.M., Bovenhuis H., Visser M.H., van Valenberg H.J., van Arendonk J.A. Milk fatty acid unsaturation: genetic parameters and effects of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) and acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1). *J. Dairy Sci.* 2008; 91(5): 2135–43. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0825>
7. Yao J., Rock C.O. Exogenous fatty acid metabolism in bacteria. *Biochimie*. 2017; 141: 30–9. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.06.015>
8. 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 tekhnologii v meditsine*. 2019; 11(2): 164–82. <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.2.22>
9. Ichihara K., Fukubayashi Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *J. Lipid Res.* 2010; 51(3): 635–40. <https://doi.org/10.1194/jlr.D001065>
10. Sherlock. Microbial Identification System. V. 6.2. MIS Operating Manual. Newark: Sandy Dr.; 2012.
11. Cangelosi G.A., Meschke J.S. Dead or alive: molecular assessment of microbial viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014; 80(19): 5884–91. <https://doi.org/10.1128/aem.01763-14>
12. Soejima T., Iida K., Qin T., Taniai H., Seki M., Takade A., et al. Photoactivated ethidium monoazide directly cleaves bacterial DNA and is applied to PCR for discrimination of live and dead bacteria. *Microbiol. Immunol.* 2007; 51(8): 763–75. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2007.tb03966.x>
13. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959; 37(8): 911–17. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
14. Li Y., Wu S., Wang L., Li Y., Shi F., Wang X. Differentiation of bacteria using fatty acid profiles from gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* 2010; 90(8): 1380–3. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3931>
15. Tan Y., Wu M., Liu H., Dong X., Guo Z., Song Z., et al. Cellular fatty acids as chemical markers for differentiation of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2010; 50(1): 104–11. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02762.x>
16. Viarengo G., Sciarra M.I., Salazar M.O., Kieffer P.M., Furlán R.L., García Vescovi E. Unsaturated long chain free fatty acids are input signals of the *Salmonella enterica* PhoP/PhoQ regulatory system. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(31): 22346–58. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.472829>
17. Janßen H.J., Steinbüchel A. Fatty acid synthesis in *Escherichia coli* and its applications towards the production of fatty acid based biofuels. *Biotechnol. Biofuels*. 2014; 7(1): 7. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-7>
18. Huang C.B., Alimova Y., Myers T.M., Ebersole J.L. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Arch. Oral Biol.* 2011; 56(7): 650–4. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011>
19. Matsumoto K., Kusaka J., Nishibori A., Hara H. Lipid domains in bacterial membranes. *Mol. Microbiol.* 2006; 61(5): 1110–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05317.x>
20. Bousfield I.J., Smith G.L., Dando T.R., Hobbs G. Numerical analysis of total fatty acid profiles in the identification of coryneform, nocardioform and some other bacteria. *Microbiology*. 1983; 129(2): 375–94. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-2-375>
21. 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: 1264. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01264>
22. Paget M.S. Bacterial sigma factors and anti-sigma factors: structure, function and distribution. *Biomolecules*. 2015; 5(3): 1245–65. <https://doi.org/10.3390/biom5031245>
23. Shen G., Li X. The multifaceted role of hypoxia-inducible factor 1 (HIF1) in lipid metabolism, hypoxia and human diseases. <https://doi.org/10.5772/65340> Available at: <https://www.intechopen.com/books/hypoxia-and-human-diseases/the-multifaceted-role-of-hypoxia-inducible-factor-1-hif1-in-lipid-metabolism>
24. Del Portillo P., García-Morales L., Menéndez M.C., Anzola J.M., Rodríguez J.G., Helguera-Repetto A.C., et al. Hypoxia is not a main stress when *Mycobacterium tuberculosis* is in a dormancy-like long-chain fatty acid environment. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2019; 8: 449. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00449>
25. Mocali S., Chiellini C., Fabiani A., Decuzzi S., de Pascale D., Parrilli E., et al. Ecology of cold environments: new insights of bacterial metabolic adaptation through an integrated genomic-phenomic approach. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 839. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00876-4>
26. Hassan N., Anesio A.M., Rafiq M., Holtvoeth J., Bull I., Halceem A., et al. Temperature driven membrane lipid adaptation in glacial psychrophilic bacteria. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 824. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00824>
27. Battesti A., Bouveret E. Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Mol. Microbiol.* 2006; 62(4): 1048–63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05442.x>
28. Cronan J.E., Thomas J. Bacterial fatty acid synthesis and its relationships with polyketide synthetic pathways. *Methods Enzymol.* 2009; 459: 395–33. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04617-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04617-5)
29. Jöers A., Vind K., Hernández S.B., Maruste R., Pereira M., Brauer A., et al. Muropeptides stimulate growth resumption from stationary phase in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 18043. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54646-5>
30. Burkert A., Douglas T.A., Waldrop M.P., Mackelprang R. Changes in the active, dead, and dormant microbial community structure across a Pleistocene permafrost chronosequence. *Appl. Environ. Microbiol.* 2019; 85(7): e02646-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02646-18>

Информация об авторах

Андрюков Борис Георгиевич[✉] — д.м.н., в.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, 690087, Владивосток, Россия. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4456-808X>. E-mail: andrukov_bg@mail.ru

Сомова Лариса Михайловна — д.м.н., г.н.с. лаб. клеточной биологии и гистопатологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, 690087, Владивосток, Россия.

Information about the authors

Boris G. Andryukov[✉] — D. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia. ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-4456-808X>. E-mail: andrukov_bg@mail.ru

Larisa M. Somova — D. Sci. (Med.), main researcher, Laboratory of cell biology and histopathology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2023-1503>.

E-mail: l_somova@mail.ru

Ляпун Ирина Николаевна — к.б.н., н.с. лаб. молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, 690087, Владивосток, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>.

E-mail: irina-lyapun@list.ru

Бынина Марина Павловна — м.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, 690087, Владивосток, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8255-328X>.

E-mail: marina.bynina@mail.ru

Матосова Екатерина Владимировна — м.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, 690087, Владивосток, Россия.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9968-3347>.

E-mail: e_matosova@mail.ru

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2023-1503>.

E-mail: l_somova@mail.ru

Irina N. Lyapun — Cand. Sci. (Biol.), researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>.

E-mail: irina-lyapun@list.ru

Marina P. Bynina — junior researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8255-328X>.

E-mail: marina.bynina@mail.ru

Ekaterina V. Matosova — junior researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 690087, Vladivostok, Russia.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9968-3347>.

E-mail: e_matosova@mail.ru

Contribution: the authors contributed equally to this article.