



Гетерогенность в изогенных популяциях бактерий и современные технологии клеточного фенотипирования

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

НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, Владивосток, Россия

Аннотация

В рамках современной микробиологической парадигмы колонии генетически идентичных микроорганизмов рассматриваются как биосоциальные системы, состоящие из нескольких гетерогенных клональных кластеров клеток (фенотипов бактерий), которые по-разному реагируют на изменения в окружающей среде. За последние десятилетия фенотипическая гетерогенность обнаружена во всех изогенных популяциях патогенных бактерий. Она обеспечивает избирательное преимущество клеточных фенотипов при изменениях физико-химических параметров среды обитания и конкурентном взаимодействии с другими микроорганизмами. Установлено, что данной адаптационной стратегией бактерий управляют разнообразные механизмы вне- и внутриклеточного генеза. Гетерогенность в бактериальных сообществах имеет большое значение для выживания патогенных бактерий в организме-хозяине, прогрессирования и персистенции инфекций, а также снижения эффективности антибиотикотерапии. Современный спектр аналитических инструментов для изучения клеточного фенотипирования представлен как методами оптической визуализации и качественной структурной характеристики одиночных клеток, так и омиксными технологиями количественного анализа и мониторинга молекулярных внутриклеточных процессов. Эти разнообразные инструменты позволяют не только выявлять и модулировать фенотипическую гетерогенность в изогенных популяциях бактерий, но и оценивать функциональную значимость клеточных фенотипов для развития инфекционного процесса. Целью обзора является интеграция современных представлений о гетерогенности в изогенных популяциях бактерий с акцентом на представлении современных аналитических технологий оценки и мониторинга фенотипирования одиночных клеток.

Ключевые слова: бактерии, изогенные популяции, фенотипическая гетерогенность, клеточное фенотипирование, современные технологии, одиночные клетки

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания по теме НИР № 0545-2019-0007 «Молекулярные механизмы образования устойчивых некультивируемых форм бактерий».

Для цитирования: Андрюков Б.Г., Тимченко Н.Ф., Ляпун И.Н., Бынина М.П., Матосова Е.В. Гетерогенность в изогенных популяциях бактерий и современные технологии клеточного фенотипирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2021; 98(1): 73–83. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-33>

Heterogeneity in isogenic bacteria populations and modern technologies of cell phenotyping

Boris G. Andryukov[✉], Nelly F. Timchenko, Irina N. Lyapun, Marina P. Bynina, Ekaterina V. Matosova

Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia

Abstract

In the framework of the modern microbiological paradigm, colonies of genetically identical microorganisms are considered as biosocial systems consisting of several heterogeneous clonal cell clusters (bacterial phenotypes) that respond differently to changes in the environment. Phenotypic heterogeneity was found in recent decades in all isogenic populations of pathogenic bacteria. Such heterogeneity provides a selective advantage of cellular phenotypes with changes in the physicochemical parameters of the environment and competitive interaction with other microorganisms. Heterogeneity in bacterial communities is of great importance for the survival of pathogenic bacteria in the host organism, the progression and persistence of infections, as well as the decrease in the effectiveness of antibiotic therapy. The modern spectrum of analytical tools for studying cellular phenotyping is presented both by optical imaging methods and qualitative structural characteristics of single cells, and by omic technologies of quantitative analysis and monitoring of molecular intracellular processes. These diverse tools make

it possible not only to identify and modulate phenotypic heterogeneity in isogenic bacterial populations, but also to evaluate the functional significance of cellular phenotypes in the development of the infectious process. The aim of the review is the integration of modern concepts of heterogeneity in isogenic bacterial populations, with an emphasis on the presentation of modern analytical technologies for assessing and monitoring phenotypic typing of single cells.

Keywords: *bacteria, isogenic populations, phenotypic heterogeneity, cell phenotyping, modern technologies, single cells*

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

For citation: Andryukov B.G., Timchenko N.F., Lyapun I.N., Bynina M.P., Matosova E.V. Heterogeneity in isogenic bacteria populations and modern technologies of cell phenotyping. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(1):73–83. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-33>

Введение

Бактериальные колонии традиционно рассматривались как клональные популяции идентичных клеток, которые обладают схожими морфологическими, биохимическими и генетическими свойствами и патогномичными признаками для их идентификации. Неслучайно для фундаментальных исследований по классической генетике и физиологии обычно использовали колониальные и периодические культуры бактерий, исходя из предположения о популяционной идентичности всех клеток [1–3].

С позиции современной микробиологической парадигмы колонии микроорганизмов рассматриваются как биосоциальные системы, состоящие из нескольких гетерогенных клональных кластеров клеток (фенотипов бактерий) [1, 3, 4]. В последние десятилетия четко обозначилась тенденция системного подхода в изучении биологических явлений и процессов в бактериях, включая транскриптомику, протеомику и метаболомику одиночных клеток. В связи с этим повысилась актуальность интеграции регуляторных (фенотипических) и мутационных (генетических) адаптационных реакций бактерий на изменившиеся условия окружающей среды, а также комплексного исследования гетерогенности этих трансформаций и их вклада в эволюцию [5, 6].

Для сохранения жизнеспособности отдельных бактерий и всей популяции, обитающих в меняющихся условиях окружающей среды, формирование гетерогенных фенотипов имеет большое значение благодаря расширению спектра используемых адаптационных стратегий [2, 3, 6]. Таким образом, значение фенотипической гетерогенности в изогенных популяциях патогенных бактерий заключается в регуляции экспрессии генов, развитии инфекционного процесса и формировании резистентности к антибиотикам [3, 7].

Однако, несмотря на интенсивные исследования гетерогенности в последние десятилетия, еще остаются вопросы, связанные с раскрытием механизмов, ответственных за формирование диверсификаций в популяциях, а также процессов

их регуляции микробным сообществом [3, 4, 6, 8]. До настоящего времени сохранилось несоответствие между механистическим пониманием гетерогенности и использованием аналитических инструментов для мониторинга и оценки этого явления на уровне отдельных клеток [3, 6, 9, 10].

Целью обзора является интеграция современных концепций гетерогенности в изогенных популяциях бактерий с акцентом на представлении современных аналитических технологий оценки и мониторинга фенотипирования одиночных клеток.

Фенотипическая гетерогенность изогенных популяций бактерий

Гетерогенность (пластичность, диверсификация) в изогенной популяции проявляется в различиях свойств отдельных фенотипов бактериальных клеток. Она может быть представлена би(мульти)модальным распределением морфологических параметров клеток: формы, размера, структуры, скорости роста, активности метаболизма и др. [5, 11]. Различия в фенотипах симпатрических изогенных популяций обычно имеют характер гауссова распределения и изучаются на уровне отдельных клеток [8, 12–14].

Следовательно, основные характеристики видов бактерий, полученные в ходе изучения популяций традиционными микробиологическими или аналитическими методами, носят усредненный характер и не способны в полной мере отобразить величину гетерогенности [6, 7, 14].

Ранее считалось, что единственным источником биологического разнообразия являются генетические мутации, которые опосредуют эволюцию. С позиции современной концепции фенотипической гетерогенности популяции эволюция является результатом естественного отбора, действующего на различные клеточные фенотипы бактерий. Они определяются как жесткой базовой последовательностью генома, так и более пластичными паттернами экспрессии отдельных генов [8, 9, 15–17].

Обоснование такой концепции связано с многочисленными примерами участия фенотипических адаптационных реакций в эпигенетическом насле-

довании и клеточной регуляции репарации ДНК [8, 18], с влиянием на персистенцию бактерий стохастических и детерминированных процессов [9, 15], повышающих потенциал жизнеспособности бактерий и сохранения популяции.

Например, способность бактерий выживать при воздействии антибиотиков без мутации (фенотипическая резистентность) традиционно рассматривается как следствие бактериальной реакции на сигналы окружающей среды [15, 19]. Однако эта устойчивость может возникнуть и в отсутствие внешних раздражителей. Межклеточные флуктуации и стохастические процессы формируют гетерогенность в микробной популяции. Это связано с появлением ненаследуемого клеточного фенотипа устойчивых некультивируемых клеток, которые обладают резистентностью к любому классу антибиотиков и способностью ограничивать эффективность лечения [19].

В отличие от генетической изменчивости, связанной с необратимыми мутациями, фенотипическая гетерогенность является следствием бактериального ответа на случайные модуляции параметров окружающей среды, старение клеток, межклеточное взаимодействие, а также стохастичность («биологический шум») в экспрессии генов.

Взаимодействуя друг с другом, данные причины модулируют диверсификацию ответов в бактериальных субпопуляциях. Специфический ответ клеточного фенотипа может влиять на жизнеспособность или устойчивость культуры при изменившихся условиях окружающей среды. Это может быть исследовано с учетом специфики ответной реакции [6, 7, 20–23].

Динамическое развитие и применение современных аналитических технологий с более высоким пространственно-временным разрешением позволяет маркировать, сортировать и проводить избирательные исследования гетерогенных фенотипов в сочетании с методами анализа одиночных клеток (фенотипированием). Это дает возможность не только обнаружить и модулировать фенотипическую гетерогенность в бактериальных популяциях, но и оценить ее функциональную значимость в развитии инфекционного процесса. Кроме того, полученные сведения помогут обеспечить целевое применение инновационных антимикробных стратегий [20, 21, 23, 24].

Современные аналитические технологии фенотипирования для мониторинга и оценки гетерогенности в популяциях бактерий

Фенотипическая гетерогенность бактериальных популяций является ключевым фактором формирования устойчивости патогенов к антимикробным средствам и возникновения инфекций. Поэто-

му в последние годы использование традиционных методов изучения биологических свойств бактерий, оценивающих их общие популяционные характеристики, устарело [20]. Однако количественная молекулярная характеристика негенетических фенотипов и их типирование в бактериальных популяциях стали возможными относительно недавно, с развитием современных аналитических технологий визуализации и анализа из арсенала микробиологии одиночных клеток [25–27].

С конца XX в. спектр методов, доступных для изучения гетерогенности биологических процессов в одиночных клетках, постоянно расширяется. Примерами хорошо охарактеризованных и изученных бактериальных фенотипов служат дормантные клеточные формы [7, 24], субтипы *Bacillus cereus*, которые являются продуцентами цитотоксина К [28], и подгруппы клеток в культуре *Salmonella typhimurium*, экспрессирующие флагеллин [29].

Развитие аналитических технологий фенотипирования шло параллельно с совершенствованием методов выделения и иммобилизации одиночных клеток для исследования. Сегодня используемые для этого экспериментальные инструменты включают как традиционные приемы (серийные разведения, физическое улавливание) и относительно новые (работа с проточной суспензией, флюоресцентная сортировка), так и современные технологии (применение микрофлюидных устройств, магнитной сепарации) [9, 10, 25].

Совершенствование приёмов мониторинга и оценки фенотипической гетерогенности в бактериальных популяциях шло по пути повышения чувствительности и производительности методов. Эти инструменты позволяли за короткое время исследовать большое количество (десятки тысяч) одиночных клеток и получать количественные результаты, позволяющие установить связь между гетерогенностью популяций и функциональностью фенотипов [9, 30].

Современный спектр аналитических инструментов клеточного фенотипирования представлен методами оптической визуализации, которые позволяют исследовать качественные (структурные) характеристики одиночных клеток, и омиксными технологиями количественного анализа и мониторинга молекулярных внутриклеточных процессов [10, 12, 30].

В общем виде развитие аналитических технологий фенотипирования клеток арсенала SCM шло в четырех направлениях (рисунок):

- биофизическая характеристика клеток;
- оценка экспрессии отдельных генов;
- анализ специфических белков;
- исследование метаболитов.

В 2021 г. будет 45 лет, как Т. Hirschfeld и его коллеги впервые приобрели опыт успешного при-



Современные технологии фенотипирования для мониторинга и оценки гетерогенности бактериальных популяций.

Modern phenotypic technologies for monitoring and evaluating heterogeneity in bacterial populations.

менения количественной оптической визуализации цитоплазматических белковых молекул *Escherichia coli* [12]. Тем самым динамическая природа внутриклеточных молекулярных процессов в различных условиях роста, физиологии и стресса бактерий впервые была подтверждена экспериментально на уровне отдельных клеток, а новая технология и ее авторы оказались у истоков зарождения протеомики [12, 31, 32].

Это исследование явилось ключевым в развитии аналитических технологий количественной оптической визуализации гетерогенности биологических процессов в бактериальной клетке, что стало началом новой эпохи в молекулярной микробиологии [31, 32].

Чаще всего в современных исследованиях для фенотипирования применяются специализированные репортерные штаммы и флуоресцентные красители. Изучение микро- и наноразмерных паттернов одиночных клеток бактерий и мониторинг их функциональности с высоким временным и пространственным разрешением позволяют измерять количество копий мРНК или молекул специфических белков в режиме реального времени [31–33]. Более того, сочетание современных оптических методов с микрофлюидными технологиями дает возможность

получать количественные сведения о биологических процессах, происходящих в отдельных бактериальных клетках в условиях стресса [9, 10, 34].

Так, G. Manina с коллегами [34] для исследования взаимосвязи между скоростью роста *M. tuberculosis* и продукцией рибосом в отдельных клетках сконструировали репортерный штамм со встроенным в локус рибосомальной РНК геном, который кодирует дестабилизированный зеленый флуоресцентный белок. Используя покадровую микроскопию и микрофлюидное устройство, авторы изучили внутриклеточную динамику экспрессии рРНК *in vitro* и *in vivo*. Эти исследования подтвердили возможность формирования высокой гетерогенности бактерий в изогенной популяции под влиянием внешних раздражителей.

За годы использования эти методы успели завоевать популярность среди исследователей, однако необходимость использования зонда для визуализации ограничивает получаемый объем информации по сравнению с инновационными омиксными клеточными технологиями SCM [31, 33, 35–37].

Среди лазерных инструментов из арсенала технологий SCM, чаще всего используемых для оценки клеточных фенотипов в бактериальных популяциях, наибольшую популярность завоевали

проточная цитометрия (ПЦ) и рамановская спектроскопия (РС) комбинационного рассеяния [4, 9, 10, 25, 27, 36].

Принцип работы проточного цитометра основан на обнаружении двух типов свечения: рассеянного и флуоресцентного от одиночной клетки в суспензии. Рассеянное лазерное излучение предоставляет информацию об основных биологических характеристиках клеток (размере, форме, внутриклеточных свойствах, мембранном потенциале). Флуоресценция дает сведения о специфических физиологических свойствах клеточных фенотипов, окрашенных соответствующими комбинациями флуорохромных красителей (содержание ДНК, метаболическая активность, pH, жизнеспособность и др.) [9, 10, 38–40].

Многолетнее использование ПЦ для изучения гетерогенности в микробных популяциях выявило ряд существенных преимуществ метода: экономичность, точность, чувствительность, способность анализировать тысячи клеток за секунду [14, 20, 27]. Этот аналитический инструмент стал незаменимым для изучения фенотипирования небольших по численности клеточных субпопуляций — от оценки изменений функций и метаболической активности до идентификации генов, экспрессируемых в определенных условиях [20, 27, 38].

Несмотря на то что образцы исследуемых культур требуют предварительного посева и выделения, использование ПЦ позволяет получить результаты в реальном времени за относительно короткий срок [14, 38]. Это связано со скоростью оценки внутриклеточных молекулярно-биологических процессов в отдельных клетках в динамических условиях и с высоким разрешением, а также с получением большего разнообразия количественных данных [14, 27, 38].

Однако при использовании ПЦ для фенотипирования популяций были выявлены некоторые ограничения, связанные с неоднозначностью результатов, полученных на разных анализаторах, а также зависимость качества исследований от пробоподготовки [20, 38, 39].

Прогресс в изучении гетерогенности бактериальных популяций достигнут благодаря использованию нескольких технологий, основанных на различных биофизических принципах детекции. Спектр комбинационного рассеяния электромагнитных волн, получаемый при РС, с каждым годом привлекает все большее внимание специалистов различных профилей, в том числе молекулярных микробиологов [27, 36, 37, 40].

Эта высокоинформативная технология позволяет получить информацию о макромолекулярной структуре одиночной бактериальной клетки (белки, нуклеиновые кислоты, липиды и др.) в виде биохимического отпечатка [36, 40], а также оценить ак-

тивность метаболизма и степень жизнеспособности каждого гетерогенного фенотипа [27, 40].

В ходе недавнего исследования С. García-Timermans с бельгийскими коллегами [27] провели сравнительный анализ использования ПЦ и РС для изучения фенотипической гетерогенности в периодических бактериальных культурах *E. coli*. Авторы пришли к выводу, что ПЦ рационально использовать для количественной оценки фенотипической неоднородности на уровне популяции, а РС — для более глубокого анализа гетерогенности отдельных клеток, поскольку эта технология позволяет получить информацию о состоянии их функциональности в связи с макромолекулярной структурой.

Другой лазерный метод — инфракрасная Фурье-спектроскопия (FT-IR) — дает похожую информацию, но в его основе лежит поглощение энергии асимметричными функциональными группами внутриклеточных биомолекул [41] (таблица).

В последние годы при исследовании гетерогенности широкую популярность получили методы одноклеточной транскриптомики (субтранскриптомики), которые предоставляют количественную информацию о фенотипической экспрессии генов. Среди первых исследователей, которые экспериментально доказали связь генотипа с фенотипом на уровне одиночных клеток, были М.В. Elowitz с коллегами. Они показали полезность исследования уровней генных продуктов, РНК-мессенджеров для типирования отдельных клеток [47].

Например, благодаря применению аналитических инструментов из арсенала SCM М.В. Elowitz с коллегами [47] смогли провести важное экспериментальное исследование, в котором была количественно измерена стохастичность экспрессии генов на уровне отдельных клеток *E. coli* и отдельных молекул. В результате получены данные, позволяющие оценить многообразие стратегий, используемых на клеточном уровне для формирования гетерогенности в популяции.

Для проведения современных субтранскриптомных исследований используют технологию дифференциального анализа экспрессии генов, которая была иницирована созданием ДНК-микрочипов, или микрофлюидных устройств [48]. Это позволяет с помощью высокопроизводительных методов секвенирования РНК обнаружить около 85% транскриптома с разделением на три фракции: не зависящую от скорости роста, предназначенную для синтеза белка и для метаболических ферментов [20, 49, 50].

Последующие исследования [4, 9, 10] расширили возможность использования технологий SCM для количественной оценки молекулярных характеристик фенотипических вариаций в популяциях микроорганизмов. Например, в последние годы все большей популярностью для исследования фенотипической гетерогенности бактерий

Примеры использования современных технологий из арсенала SCM для фенотипирования бактериальных популяций
 Examples of using modern technologies from the Single Cell Microbiology (SCM) arsenal for phenotypic of bacterial populations

Технологии SCM SCM technologies	Принцип метода Method's principle	Получаемая информация Information obtained	Источник Source
Трансмиссионная электронная микроскопия Transmission electron microscopy	Получение изображения ультратонкого образца путём пропускания через него пучка электронов ($\lambda = 0,005$ нм) Image acquisition of an ultrathin sample by transmission of an electron beam through it ($\lambda = 0.005$ nm)	Визуализация субклеточных структур одиночных клеток бактерий и их связи с функцией фенотипов Visualization of subcellular structures of single bacterial cells and their relationship with the function of phenotypes	[42]
Атомно-силовая микроскопия Atomic force microscopy	Сканирующий зондовый микроскоп, основанный на ван-дер-ваальсовых взаимодействиях зонда с поверхностью образца Scanning probe microscope based on van der Waals interactions of the probe with the sample surface	Количественная оценка наномеханических свойств поверхности клеточной стенки, адгезии, морфологии, упругости (модуль Юнга) Quantitative assessment of nanomechanical properties of the cell wall surface, adhesion, morphology, elasticity (Young's modulus)	[16]
Флюоресцентная микроскопия Fluorescence microscopy	Визуализация изображения с использованием люминесценции возбуждённых атомов и молекул объектов Image visualization using luminescence of excited atoms and molecules of objects	Картирование микрогетерогенности pH, локальной концентрации ионов, электрического потенциала клетки Mapping of microheterogeneity of pH, local ion concentration, cell electrical potential	[17, 21]
Конфокальная флюоресцентная микроскопия Confocal fluorescence microscopy	Визуализация изображения биологических структур с использованием флуорофоров Imaging of biological structures using fluorophores	Трёхмерная флюоресцентная томография одиночных клеток бактерий 3D-fluorescence tomography of single bacterial cells	[21]
Поверхностный плазмонный резонанс Surface plasmon resonance	Возбуждение поверхностного плазмона на его резонансной частоте внешней электромагнитной волной Excitation of a surface plasmon at its resonant frequency by an external electromagnetic wave	Измерение кинетики связывания взаимодействий лигандов с отдельными клетками; статистический анализ гетерогенности в популяции Measurement of the kinetics of binding of ligand interactions with individual cells; statistical analysis of heterogeneity in a population	[43, 44]
Проточная цитометрия Flow cytometry	Обнаружение рассеянного света и флюоресценции от одиночной клетки Detection of scattered light and fluorescence from a single cell	Основные характеристики клеток и специфические физиологические свойства (pH, метаболизм и др.) The main characteristics of cells and specific physiological properties (pH, metabolism, etc.)	[9, 14, 20, 27, 38, 39]
РС комбинационного рассеяния Raman spectroscopy of Raman scattering	Способность молекул к неупругому (рамановскому) рассеянию монохроматического света The ability of molecules to inelastic (Raman) scattering of monochromatic light	Анализ макромолекулярного состава бактерий в виде биохимического отпечатка одиночной клетки Analysis of the macromolecular composition of bacteria in the form of a biochemical imprint of a single cell	[20, 27, 36, 37, 40]
Инфракрасная Фурье-спектроскопия Fourier transform infrared spectroscopy	Поглощение энергии асимметричными функциональными группами внутриклеточных биомолекул Energy absorption by asymmetric functional groups of intracellular biomolecules	Создание метаболических отпечатков бактерий до уровня подвида. Выявление тонких изменений в биохимических фенотипах бактерий Creating metabolic imprints of bacteria to the level of a subspecies. Identification of subtle changes in the biochemical phenotypes of bacteria	[41]
Флюоресцентное разведение Fluorescence dilution	Разбавление предварительно сформированного пула флюоресцентного белка после остановки его индукции Dilution of a preformed pool of fluorescent protein after stopping its induction	Изучение динамики внутриклеточной репликации бактерий на уровне отдельных клеток Studying the dynamics of intracellular bacterial replication at the level of individual cells	[19]
Магнитно-резонансная спектроскопия с высоким разрешением High-resolution magnetic resonance spectroscopy	Атомы ^1H обладают квантовым свойством вращения, генерируя радиочастотные сигналы. При использовании мощного магнитного поля возникают спектры высокого разрешения ^1H atoms have a quantum property of rotation, generating radio frequency signals. When using a powerful magnetic field, high-resolution spectra appear	Ассоциации между метаболитами и клеточными процессами в живых одиночных клетках бактерий. Дает количественную характеристику метаболического профиля клеток и их поверхностных структур при физиологическом состоянии и стрессе Associations between metabolites and cellular processes in living single bacterial cells. Gives a quantitative description of the metabolic profile of cells and their surface structures under physiological condition and stress	[45, 46]

пользуются спектроскопия поверхностного плазмонного резонанса (СПР) и ее разновидность — поверхностная плазмонно-резонансная микроскопия (ППРМ) [43, 44, 46].

Эти неинвазивные аналитические технологии не вызывают цитоллиз и позволяют проводить протеомный анализ на уровне отдельных клеток: сортировку и обнаружение отдельных белков [26, 48]. Кроме того, благодаря возможности визуализировать отдельные субклеточные объекты нано- и микрометрового масштаба и при этом сохранять исходное состояние целевого анализата, сегодня ППРМ стала универсальной сенсорной платформой для изучения кинетики биомолекулярного связывания [43, 44].

СПР — поверхностно-чувствительный метод без меток, который можно использовать для определения показателя преломления материала на тонкой металлической поверхности [43, 44, 46]. Он основан на колебании свободных электронов, индуцированной электромагнитной волной на границе раздела металл–диэлектрик. Эти электронные колебания генерируют поверхностные электромагнитные волны (так называемые плазмонные поляритоны), распространяющиеся и экспоненциально затухающие на границе раздела сред. СПР используют для исследования связывания олигонуклеотидов ДНК или белков по изменению угла минимальной отражательной способности [43, 46].

К. Syal с коллегами [43] продемонстрировали возможности метода плазмонной визуализации на примере исследования изогенной популяции *E. coli* O157:H7. Авторами была показана возможность получения в реальном времени кинетических констант связывания одиночных живых клеток бактерий со специфическими антителами IgG и количественного определения гетерогенности в микробной популяции.

Таким образом, современный спектр используемых аналитических технологий для мониторинга и оценки гетерогенности популяций бактерий достаточно многообразен и продолжает непрерывно совершенствоваться. Выбор методов зависит от поставленных целей и решаемых задач. Однако широкий выбор используемых аналитических инструментов для фенотипирования бактериальных популяций наводит на мысль о наличии методологической проблемы — отсутствия стандартизированного подхода при изучении этого важного биологического явления [4, 10].

В последние годы наблюдается увеличение количества исследований, направленных на изучение этапов формирования клеточных фенотипов в окружающей среде. Однако роль микробной гетерогенности в патогенезе и механизмах, лежащих в основе адаптации патогенов к среде организма-хозяина, пока редко рассматривается с использованием одноклеточных подходов в реальном времени.

Заключение

Фенотипическая гетерогенность в генетически идентичной популяции патогенных бактерий имеет решающее значение для адаптации микроорганизмов в период инфекционного процесса и развития их устойчивости к антибиотикам. Изучение и мониторинг формирования диверсификаций в изогенных популяциях патогенных бактерий, помимо фундаментальных знаний о механизмах, лежащих в основе этого биологического феномена, предоставляет значимую информацию об этой важной и недооцененной стратегии вирулентности [51–53].

Традиционные схемы лечения, основанные на широком использовании антибиотиков, оказываются все менее эффективными для лечения хронических и персистирующих инфекций. Изучение механизмов формирования клеточных фенотипов в популяциях конкретных видов и штаммов патогенных микроорганизмов имеет значение и для современной ориентации медицины на персонализированное лечение [54, 55].

Современные аналитические технологии, используемые для изучения динамики молекулярных трансформаций на уровнях как одиночных клеток, так и всей бактериальной популяции, становятся все более информативными и чувствительными. Например, в основе недавно разработанной технологии Persister-FACSeq лежит комбинированный метод флюоресцентной сортировки и секвенирования нового поколения. Это позволяет изучать механизм возникновения устойчивости к антибиотикам у некультивируемых клеток-персистеров в популяции *E. coli* путем изучения экспрессии генов и синтеза специфического белка [54].

Полученные за последние годы знания о фенотипической гетерогенности в бактериальных популяциях пока недостаточны для управления сообществами микроорганизмов. Возможно, более широкое применение омиксных технологий типирования расширит понимание молекулярно-биологических процессов на уровне отдельных клеток и даст возможность прогнозирования и контроля влияния устойчивых фенотипов патогенных бактерий на развитие инфекций, их вирулентность и резистентность к антимикробной терапии.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Oleskin A.V., Botvinko I.V., Tsavkelova E.A. Colonial organization and intercellular communication in microorganisms. *Microbiology (Mikrobiologiya)*. 2000; 69(3): 249–65. <https://doi.org/10.1007/BF02756730>
2. Магданова Л.А., Голясная Н.В. Гетерогенность как адаптивное свойство бактериальной популяции. *Микробиология*. 2013; 82(1): 3–13. <https://doi.org/10.7868/S0026365613010072>
3. Sánchez-Romero M.A., Casadesús J. Contribution of phenotypic heterogeneity to adaptive antibiotic resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111(1): 355–60. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316084111>

4. Heyse J., Buyschaert B., Props R., Rubbens P., Skirtach A.G., Waegeman W., et al. Coculturing bacteria leads to reduced phenotypic heterogeneities. *Appl. Environ. Microbiol.* 2019; 85(8): e02814–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02814-18>
5. Jeanson S., Flourey J., Gagnaire V., Lortal S., Thierry A. Bacterial colonies in solid media and foods: a review on their growth and interactions with the micro-environment. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 1284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01284>
6. Ryall B., Eydallin G., Ferenci T. Culture history and population heterogeneity as determinants of bacterial adaptation: the adaptomics of a single environmental transition. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012; 76(3): 597–25. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05028-11>
7. Dhar N., McKinney J.D. Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007; 10(1): 30–8. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2006.12.007>
8. Ackermann M. A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13(8): 497–08. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3491>
9. Davis K.M., Isberg R.R. Defining heterogeneity within bacterial populations via single cell approaches. *Bioessays.* 2016; 38(8): 782–90. <https://doi.org/10.1002/bies.201500121>
10. González-Cabaleiro R., Mitchell A.M., Smith W., Wipat A., Ofiteru I.D. Heterogeneity in pure microbial systems: experimental measurements and modeling. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 1813. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01813>
11. Tsimring L.S. Noise in biology. *Reports. Prog. Phys.* 2014; 77(2): 26601. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw273>
12. Li G.W., Xie X.S. Central dogma at the single-molecule level in living cells. *Nature.* 2011; 475(7356): 308–15. <https://doi.org/10.1038/nature10315>
13. Govers S.K., Adam A., Blockeel H., Aertsen A. Rapid phenotypic individualization of bacterial sister cells. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08660-0>
14. Heins A.L., Johanson T., Han S., Lundin L., Carlquist M., Gerney K.V., et al. A quantitative flow cytometry to understand population heterogeneity in response to changes in substrate availability in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* chemostats. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019; 7: 187. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00187>
15. Lewis K. Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010; 64: 357–72. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>
16. Dorobantu L.S., Bhattacharjee S., Foght J.M., Gray M.R. Atomic force microscopy measurement of heterogeneity in bacterial surface hydrophobicity. *Langmuir.* 2008; 24(9): 4944–51. <https://doi.org/10.1021/la7035295>
17. Cao H., Kuipers O.P. Influence of global gene regulatory networks on single cell heterogeneity of green fluorescent protein production in *Bacillus subtilis*. *Microb. Cell. Fact.* 2018; 17(1): 134. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0985-9>
18. Stracy M., Uphoff S., Garza de Leon F., Kapanidis A.N. In vivo single-molecule imaging of bacterial DNA replication, transcription, and repair. *FEBS Lett.* 2014; 588(19): 3585–94. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.026>
19. Helaine S., Cheverson A.M., Watson K.G., Faure L.M., Matthews S.A., Holden D.W. Internalization of *Salmonella* by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science.* 2014; 343(6167): 204–08. <https://doi.org/10.1126/science.1244705>
20. Ambriz-Avina V., Contreras-Garduno J.A., Pedraza-Reyes M. Applications of flow cytometry to characterize bacterial physiological responses. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: 461941. <https://doi.org/10.1155/2014/461941>
21. Burdikova Z., Svindrych Z., Pala J., Hickey C.D., Wilkinson M.G., Panek J., et al. Measurement of pH micro-heterogeneity in natural cheese matrices by fluorescence lifetime imaging. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 183. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00183>
22. Han Y., Zhang F. Heterogeneity coordinates bacterial multi-gene expression in single cells. *PLoS Comput. Biol.* 2020; 16(1): e1007643. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007643>
23. Casadesús J., Low D.A. Programmed heterogeneity: epigenetic mechanisms in bacteria. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(20): 13929–35. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.472274>
24. 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. <http://doi.org/10.17691/stm2019.11.2.22>
25. Brehm-Stecher B.F., Johnson E.A. Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004; 68(3): 538–59. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.538-559.2004>
26. Fritzsche F.S., Dusny C., Frick O., Schmid A. Single-cell analysis in biotechnology, systems biology, and biocatalysis. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2012; 3: 129–55. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-062011-081056>
27. García-Timmermans C., Rubbens P., Heyse J., Kerckhof F.M., Props R., Skirtach A.G., et al. Discriminating bacterial phenotypes at the population and single-cell level: a comparison of flow cytometry and raman spectroscopy fingerprinting. *Cytometry A.* 2020; 97(7): 713–26. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23952>
28. Ceuppens S., Boon N., Uyttendaele M. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2013; 84(3): 433–50. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12110>
29. Stewart M.K., Cummings L.A., Johnson M.L., Berezow A.B., Cookson B.T. Regulation of phenotypic heterogeneity permits *Salmonella* evasion of the host caspase-1 inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011; 108(51): 20742–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108963108>
30. Heins A.L., Weuster-Botz D. Population heterogeneity in microbial bioprocesses: origin, analysis, mechanisms, and future perspectives. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2018; 41(7): 889–16. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1922-3>
31. Xie X.S., Choi P.J., Li G.W., Lee N.K., Lia G. Single-molecule approach to molecular biology in living bacterial cells. *Annu. Rev. Biophys.* 2008; 37: 417–44. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.092607.174640>
32. Hinterdorfer P., Garcia-Parajo M.F., Dufrène Y.F. Single-molecule imaging of cell surfaces using near-field nanoscopy. *Acc. Chem. Res.* 2012; 45(3): 327–36. <https://doi.org/10.1021/ar2001167>
33. Skinner S.O., Sepúlveda L.A., Xu H., Golding I. Measuring mRNA copy number in individual *Escherichia coli* cells using single-molecule fluorescent *in situ* hybridization. *Nat. Protoc.* 2013; 8(6): 1100–13. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.066>
34. Manina G., Dhar N., McKinney J.D. Stress and host immunity amplify *Mycobacterium tuberculosis* phenotypic heterogeneity and induce nongrowing metabolically active forms. *Cell. Host. Microbe.* 2015; 17(1): 32–46. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.11.016>
35. Arbel-Goren R., Shapira Y., Stavans J. Method for labeling transcripts in individual *Escherichia coli* cells for single-molecule fluorescence *in situ* hybridization experiments. *J. Vis. Exp.* 2017; (130): 56600. <https://doi.org/10.3791/56600>
36. Read D.S., Woodcock D.J., Strachan N.J.C., Forbes K.J., Colles F.M., Maiden M.C.J., et al. Evidence for phenotypic plasticity among multihost *Campylobacter jejuni* and *C. coli* lineages, obtained using ribosomal multilocus sequence typing and Raman spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(3): 965–73. <https://doi.org/10.1128/AEM.02521-12>
37. van de Vossen J., Tervahauta H., Maquelin K., Blokker-Koopmans C.H.W., Uytewaal-Aarts M., van der Kooij D., et al. Identification of bacteria in drinking water with Raman.

ОБЗОРЫ

- Anal. Methods*. 2013; 5(11): 2679–87.
<https://doi.org/10.1039/c3ay40289d>
38. Davey H.M. Prospects for the automation of analysis and interpretation of flow cytometric data. *Cytometry A*. 2010; 77(1): 3–5. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20835>
39. Davey H.M. Flow cytometric techniques for the detection of microorganisms. *Methods. Cell. Sci.* 2002; 24(1-3): 91–7. <https://doi.org/10.1023/A:1024106317540>
40. Андрюков Б.Г., Карпенко А.А., Матосова Е.В., Ляпун И.Н. Рамановская спектроскопия — современная диагностическая технология для изучения и индикации возбудителей инфекций (обзор). *Современные технологии в медицине*. 2019; 11(4): 161–74. <http://doi.org/10.17691/stm2019.11.4.19>
41. Wharfe E.S., Jarvis R.M., Winder C.L., Whiteley A.S., Goodacre R. Fourier transform infrared spectroscopy as a metabolite fingerprinting tool for monitoring the phenotypic changes in complex bacterial communities capable of degrading phenol. *Environ. Microbiol.* 2010; 12(12): 3253–63. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02300.x>
42. Shukla S., Bajpai V.K. Visual demonstration of transmission electron microscopy for intracellular observation of a single bacterial cell. *Bangladesh J. Pharmacol.* 2017; 12(1): 23–7. <https://doi.org/10.3329/bjp.v12i1.31390>
43. Syal K., Wang W., Shan X., Wang S., Chen H.Y., Tao N. Plasmonic imaging of protein interactions with single bacterial cells. *Biosens. Bioelectron.* 2015; 63: 131–7. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.06.069>
44. Peterson A.W., Halter M., Tona A., Plant A.L., Elliott J.T. Mass measurements of focal adhesions in single cells using high resolution surface plasmon resonance microscopy. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.* 2018; 10509: 1050905. <https://doi.org/10.1117/12.2290776>
45. Righi V., Constantinou C., Kesarwani M., Rahme L.G., Tzika A.A. Effects of a small, volatile bacterial molecule on *Pseudomonas aeruginosa* bacteria using whole cell high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy and genomics. *Int. J. Mol. Med.* 2018; 42(4): 2129–36. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3760>
46. Zhou X.L., Yang Y., Wang S., Liu X.W. Surface plasmon resonance microscopy: from single molecule sensing to single cell imaging. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2020; 59(5): 1776–85. <https://doi.org/10.1002/anie.201908806>
47. Elowitz M.B., Levine A.J., Siggia E.D., Swain P.S. Stochastic gene expression in a single cell. *Science*. 2002; 297(5584): 1183–6. <https://doi.org/10.1126/science.1070919>
48. Liu Y., Singh A.K. Microfluidic platforms for single cell protein analysis. *J. Lab. Autom.* 2013; 18(6): 446–54. <https://doi.org/10.1177/22110-68213-494389>
49. Cho S., Cho Y., Lee S., Kim J., Yum H., Kim S.C., et al. Current challenges in bacterial transcriptomics. *Genomics. Inform.* 2013; 11(2): 76–82. <https://doi.org/10.5808/GI.2013.11.2.76>
50. Shahrezaei V., Marguerat S. Connecting growth with gene expression: of noise and numbers. *Curr. Opin. Microbiol.* 2015; 25: 127–35. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.012>
51. Schröter L., Dersch P. Phenotypic diversification of microbial pathogens – cooperating and preparing for the future. *J. Mol. Biol.* 2019; 431(23): 4645–55. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.06.024>
52. Weigel W.A., Dersch P. Phenotypic heterogeneity: a bacterial virulence strategy. *Microbes Infect.* 2018; 20(9-10): 570–7. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.008>
53. Mortier J., Tadesse W., Govers S.K., Aertsen A. Stress-induced protein aggregates shape population heterogeneity in bacteria. *Curr. Genet.* 2019; 65(4): 865–9. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-00947-1>
54. Henry T.C., Brynildsen M.P. Development of Persister-FACSeq: a method to massively parallelize quantification of persister physiology and its heterogeneity. *Sci. Rep.* 2016; 6: 25100. <https://doi.org/10.1038/srep25100>
55. Binder D., Drepper T., Jaeger K.E., Delvigne F., Wiechert W., Kohlheyer D., et al. Homogenizing bacterial cell factories: analysis and engineering of phenotypic heterogeneity. *Metab. Eng.* 2017; 42: 145–56. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.06.009>

REFERENCES

- Oleskin A.V., Botvinko I.V., Tsavkelova E.A. Colonial organization and intercellular communication in microorganisms. *Microbiology (Mikrobiologiya)*. 2000; 69(3): 249–65. <https://doi.org/10.1007/BF02756730>
- Magdanova L.A., Golyasnaya N.V. Heterogeneity as an adaptive trait of microbial populations. *Microbiology (Mikrobiologiya)*. 2013; 82(1): 1–10. <https://doi.org/10.1134/S0026261713010074>
- Sánchez-Romero M.A., Casadesús J. Contribution of phenotypic heterogeneity to adaptive antibiotic resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111(1): 355–60. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316084111>
- Heyse J., Buyschaert B., Props R., Rubbens P., Skirtach A.G., Waegeman W., et al. Coculturing bacteria leads to reduced phenotypic heterogeneities. *Appl. Environ. Microbiol.* 2019; 85(8): e02814–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02814-18>
- Jeanson S., Flourey J., Gagnaire V., Lortal S., Thierry A. Bacterial colonies in solid media and foods: a review on their growth and interactions with the micro-environment. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 1284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01284>
- Ryall B., Eydallin G., Ferenci T. Culture history and population heterogeneity as determinants of bacterial adaptation: the adaptomics of a single environmental transition. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012; 76(3): 597–25. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05028-11>
- Dhar N., McKinney J.D. Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007; 10(1): 30–8. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2006.12.007>
- Ackermann M. A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13(8): 497–08. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3491>
- Davis K.M., Isberg R.R. Defining heterogeneity within bacterial populations via single cell approaches. *Bioessays*. 2016; 38(8): 782–90. <https://doi.org/10.1002/bies.201500121>
- González-Cabaleiro R., Mitchell A.M., Smith W., Wipat A., Ofiteru I.D. Heterogeneity in pure microbial systems: experimental measurements and modeling. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 1813. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01813>
- Tsimring L.S. Noise in biology. *Reports. Prog. Phys.* 2014; 77(2): 26601. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw273>
- Li G.W., Xie X.S. Central dogma at the single-molecule level in living cells. *Nature*. 2011; 475(7356): 308–15. <https://doi.org/10.1038/nature10315>
- Govers S.K., Adam A., Blockeel H., Aertsen A. Rapid phenotypic individualization of bacterial sister cells. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08660-0>
- Heins A.L., Johanson T., Han S., Lundin L., Carlquist M., Gerney K.V., et al. A quantitative flow cytometry to understand population heterogeneity in response to changes in substrate availability in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* chemostats. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019; 7: 187. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00187>
- Lewis K. Persister cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 2010; 64: 357–72. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>
- Dorobantu L.S., Bhattacharjee S., Foght J.M., Gray M.R. Atomic force microscopy measurement of heterogeneity in bacterial surface hydrophobicity. *Langmuir*. 2008; 24(9): 4944–51. <https://doi.org/10.1021/la7035295>
- Cao H., Kuipers O.P. Influence of global gene regulatory networks on single cell heterogeneity of green fluorescent protein

- production in *Bacillus subtilis*. *Microb. Cell. Fact.* 2018; 17(1): 134. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0985-9>
18. Stracy M., Uphoff S., Garza de Leon F., Kapanidis A.N. In vivo single-molecule imaging of bacterial DNA replication, transcription, and repair. *FEBS Lett.* 2014; 588(19): 3585–94. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.026>
 19. Helaine S., Cheverton A.M., Watson K.G., Faure L.M., Matthews S.A., Holden D.W. Internalization of *Salmonella* by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science.* 2014; 343(6167): 204–08. <https://doi.org/10.1126/science.1244705>
 20. Ambriz-Avina V., Contreras-Garduno J.A., Pedraza-Reyes M. Applications of flow cytometry to characterize bacterial physiological responses. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: 461941. <https://doi.org/10.1155/2014/461941>
 21. Burdikova Z., Svindrych Z., Pala J., Hickey C.D., Wilkinson M.G., Panek J., et al. Measurement of pH micro-heterogeneity in natural cheese matrices by fluorescence lifetime imaging. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 183. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00183>
 22. Han Y., Zhang F. Heterogeneity coordinates bacterial multi-gene expression in single cells. *PLoS Comput. Biol.* 2020; 16(1): e1007643. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007643>
 23. Casadesús J., Low D.A. Programmed heterogeneity: epigenetic mechanisms in bacteria. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(20): 13929–35. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.472274>
 24. 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. <http://doi.org/10.17691/stm2019.11.2.22> (in Russian)
 25. Brehm-Stecher B.F., Johnson E.A. Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004; 68(3): 538–59. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.538-559.2004>
 26. Fritzsche F.S., Dusny C., Frick O., Schmid A. Single-cell analysis in biotechnology, systems biology, and biocatalysis. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2012; 3: 129–55. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-062011-081056>
 27. García-Timmermans C., Rubbens P., Heyse J., Kerckhof F.M., Props R., Skirtach A.G., et al. Discriminating bacterial phenotypes at the population and single-cell level: a comparison of flow cytometry and raman spectroscopy fingerprinting. *Cytometry A.* 2020; 97(7): 713–26. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23952>
 28. Ceuppens S., Boon N., Uyttendaele M. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2013; 84(3): 433–50. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12110>
 29. Stewart M.K., Cummings L.A., Johnson M.L., Berezow A.B., Cookson B.T. Regulation of phenotypic heterogeneity permits *Salmonella* evasion of the host caspase-1 inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011; 108(51): 20742–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108963108>
 30. Heins A.L., Weuster-Botz D. Population heterogeneity in microbial bioprocesses: origin, analysis, mechanisms, and future perspectives. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2018; 41(7): 889–16. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1922-3>
 31. Xie X.S., Choi P.J., Li G.W., Lee N.K., Lia G. Single-molecule approach to molecular biology in living bacterial cells. *Annu. Rev. Biophys.* 2008; 37: 417–44. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.092607.174640>
 32. Hinterdorfer P., Garcia-Parajo M.F., Dufrene Y.F. Single-molecule imaging of cell surfaces using near-field nanoscopy. *Acc. Chem. Res.* 2012; 45(3): 327–36. <https://doi.org/10.1021/ar2001167>
 33. Skinner S.O., Sepúlveda L.A., Xu H., Golding I. Measuring mRNA copy number in individual *Escherichia coli* cells using single-molecule fluorescent in situ hybridization. *Nat. Protoc.* 2013; 8(6): 1100–13. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.066>
 34. Manina G., Dhar N., McKinney J.D. Stress and host immunity amplify *Mycobacterium tuberculosis* phenotypic heterogeneity and induce nongrowing metabolically active forms. *Cell. Host. Microbe.* 2015; 17(1): 32–46. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.11.016>
 35. Arbel-Goren R., Shapira Y., Stavans J. Method for labeling transcripts in individual *Escherichia coli* cells for single-molecule fluorescence *in situ* hybridization experiments. *J. Vis. Exp.* 2017; (130): 56600. <https://doi.org/10.3791/56600>
 36. Read D.S., Woodcock D.J., Strachan N.J.C., Forbes K.J., Colles F.M., Maiden M.C.J., et al. Evidence for phenotypic plasticity among multihost *Campylobacter jejuni* and *C. coli* lineages, obtained using ribosomal multilocus sequence typing and Raman spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(3): 965–73. <https://doi.org/10.1128/AEM.02521-12>
 37. van de Vossen J., Tervahauta H., Maquelin K., Blokker-Koopmans C.H.W., Uytewaal-Aarts M., van der Kooij D., et al. Identification of bacteria in drinking water with Raman. *Anal. Methods.* 2013; 5(11): 2679–87. <https://doi.org/10.1039/c3ay40289d>
 38. Davey H.M. Prospects for the automation of analysis and interpretation of flow cytometric data. *Cytometry A.* 2010; 77(1): 3–5. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20835>
 39. Davey H.M. Flow cytometric techniques for the detection of microorganisms. *Methods. Cell. Sci.* 2002; 24(1-3): 91–7. <https://doi.org/10.1023/A:1024106317540>
 40. Andryukov B.G., Karpenko A.A., Matosova E.V., Lyapun I.N. Raman spectroscopy – modern diagnostic technology for study and indication of infectious agents (review). *Sovremennye tekhnologii v meditsine.* 2019; 11(4): 161–74. <http://doi.org/10.17691/stm2019.11.4.19> (in Russian)
 41. Wharfe E.S., Jarvis R.M., Winder C.L., Whiteley A.S., Goodacre R. Fourier transform infrared spectroscopy as a metabolite fingerprinting tool for monitoring the phenotypic changes in complex bacterial communities capable of degrading phenol. *Environ. Microbiol.* 2010; 12(12): 3253–63. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02300.x>
 42. Shukla S., Bajpai V.K. Visual demonstration of transmission electron microscopy for intracellular observation of a single bacterial cell. *Bangladesh J. Pharmacol.* 2017; 12(1): 23–7. <https://doi.org/10.3329/bjp.v12i1.31390>
 43. Syal K., Wang W., Shan X., Wang S., Chen H.Y., Tao N. Plasmonic imaging of protein interactions with single bacterial cells. *Biosens. Bioelectron.* 2015; 63: 131–7. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.06.069>
 44. Peterson A.W., Halter M., Tona A., Plant A.L., Elliott J.T. Mass measurements of focal adhesions in single cells using high resolution surface plasmon resonance microscopy. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.* 2018; 10509: 1050905. <https://doi.org/10.1117/12.2290776>
 45. Righi V., Constantinou C., Kesarwani M., Rahme L.G., Tzika A.A. Effects of a small, volatile bacterial molecule on *Pseudomonas aeruginosa* bacteria using whole cell high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy and genomics. *Int. J. Mol. Med.* 2018; 42(4): 2129–36. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3760>
 46. Zhou X.L., Yang Y., Wang S., Liu X.W. Surface plasmon resonance microscopy: from single molecule sensing to single cell imaging. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2020; 59(5): 1776–85. <https://doi.org/10.1002/anie.201908806>
 47. Elowitz M.B., Levine A.J., Siggia E.D., Swain P.S. Stochastic gene expression in a single cell. *Science.* 2002; 297(5584): 1183–6. <https://doi.org/10.1126/science.1070919>
 48. Liu Y., Singh A.K. Microfluidic platforms for single cell protein analysis. *J. Lab. Autom.* 2013; 18(6): 446–54. <https://doi.org/10.1177/22110-68213-494389>

ОБЗОРЫ

49. Cho S., Cho Y., Lee S., Kim J., Yum H., Kim S.C., et al. Current challenges in bacterial transcriptomics. *Genomics. Inform.* 2013; 11(2): 76–82. <https://doi.org/10.5808/GI.2013.11.2.76>
50. Shahrezaei V., Marguerat S. Connecting growth with gene expression: of noise and numbers. *Curr. Opin. Microbiol.* 2015; 25: 127–35. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.05.012>
51. Schröter L., Dersch P. Phenotypic diversification of microbial pathogens – cooperating and preparing for the future. *J. Mol. Biol.* 2019; 431(23): 4645–55. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.06.024>
52. Weigel W.A., Dersch P. Phenotypic heterogeneity: a bacterial virulence strategy. *Microbes Infect.* 2018; 20(9-10): 570–7. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.008>
53. Mortier J., Tadesse W., Govers S.K., Aertsen A. Stress-induced protein aggregates shape population heterogeneity in bacteria. *Curr. Genet.* 2019; 65(4): 865–9. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-00947-1>
54. Henry T.C., Brynildsen M.P. Development of Persister-FACSeq: a method to massively parallelize quantification of persister physiology and its heterogeneity. *Sci. Rep.* 2016; 6: 25100. <https://doi.org/10.1038/srep25100>
55. Binder D., Drepper T., Jaeger K.E., Delvigne F., Wiechert W., Kohlheyer D., et al. Homogenizing bacterial cell factories: analysis and engineering of phenotypic heterogeneity. *Metab. Eng.* 2017; 42: 145–56. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.06.009>

Информация об авторах

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

Тимченко Нелли Фёдоровна — д.м.н., в.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6051-292X>

Ляпун Ирина Николаевна — к.б.н., с.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>

Бынина Марина Павловна — м.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8255-328X>

Матосова Екатерина Владимировна — м.н.с. лаб. молекулярной микробиологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9968-3347>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

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

Статья поступила в редакцию 30.04.2020;
принята к публикации 07.07.2020; опубликована 25.02.2021.

Information about the authors

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

Nelly F. Timchenko — D. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6051-292X>

Irina N. Lyapun — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5290-3864>

Marina P. Bynina — junior researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8255-328X>

Ekaterina V. Matosova — junior researcher, Laboratory of molecular microbiology, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9968-3347>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

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

The article was submitted 30.04.2020;
accepted for publication 07.07.2020; published 25.02.2021.