

## Персистирующие клетки микроорганизмов – новый взгляд на старую проблему

Н.В. Евдокимова, Т.В. Черненькая

НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва, Россия

В обзоре представлен современный взгляд на персистирующие клетки микроорганизмов – специализированные формы покоящихся клеток, которые формируются в популяциях бактерий и грибов при прекращении их роста. Персистеры присутствуют не только в планктонных популяциях, но и в микробных биопленках. Для персистеров характерна толерантность к широкому кругу антибактериальных препара-

тов, они устойчивы к стрессовым воздействиям. С наличием персистирующих клеток связывают хроническое течение многих заболеваний, не поддающихся стандартным методам лечения. В обзоре обсуждаются возможные методы снижения численности персистеров вплоть до полной их эрадикации.

**Ключевые слова:** персистеры, толерантность, биопленки, рецидивирующие инфекции.

### Persister Microbial Cells: a Novel View on the Old Problem

N.V. Evdokimova, T.V. Tchernenkaya

Research Institute of Emergency Medicine named after N.V. Sklifosovskiy, Moscow, Russia

This review presents a modern view on persister microbial cells, a specific form of latent cells, which is formed in bacterial and fungal populations in stationary phase of growth. Persister cells are found in planktonic populations as well as bacterial biofilms. Persisters are characterized by tolerance to antimicrobial agents and stress resistance. Persister cells are associated with

multiple recurrent medical conditions being refractory to standard treatments. This review also discusses potential measures to reduce or eradicate persister cells population.

**Key words:** persister, antibiotic tolerance, biofilm, recurrent infections.

Персистирующие клетки микроорганизмов образно можно назвать клетками-невидимками. Их значение для клинической практики до недавних пор явно недооценивалось. А между тем, наличие клеток-персистеров ставит вопрос о пересмотре многих методических подходов к диагностике и лечению воспалительных заболеваний, вызванных условно-патогенными бактериями и грибами. Персистирующие клетки микроорганизмов представляют собой стратегический резерв микробной

популяции, реализующийся в крайне неблагоприятных для роста микроорганизмов условиях. В фазе активного роста микробных культур их практически невозможно обнаружить. Образование персистеров можно выявить при замедлении и прекращении роста микробов. Эти клетки толерантны к антибактериальным препаратам, устойчивы к колебаниям температуры, кислотности среды и другим стрессовым воздействиям.

Присутствие персистирующих клеток долго не замечали или полагали, что их вклад в поддержание численности и жизнеспособности микробных популяций, в отличие от резистентных к антибиотикам клеток, незначителен. О существовании пер-

---

Контактный адрес:  
Наталья Витальевна Евдокимова  
Эл. почта: env1111@yandex.ru

систирующих клеток впервые заявил J.W. Bigger в 1941 году [1]. Работая с недавно внедренным в лечебную практику пенициллином, он обнаружил, что пенициллин разрушал не все клетки стафилококков. При добавлении антибиотика суспензия становилась прозрачной, происходил лизис клеток, однако после переноса лизата на агаризованную среду наблюдался рост небольшого числа колоний. Повторная инокуляция клеток из этих колоний на свежую среду и последующая обработка пенициллином не меняли картину – опять наблюдался рост небольшого числа клеток. Если бы способность к росту при высоких концентрациях антибиотика была связана с селекцией резистентных клеток, то после повторной инокуляции они практически все сохраняли бы способность к росту в присутствии антибиотика. Исследователь назвал эти клетки «persisters» (*persist*, англ. – устоять, сохраниться, продолжить существование). Был сделан вывод о неспособности пенициллина воздействовать на все клетки стафилококков. Как показали дальнейшие исследования, часть клеток популяции сохраняла жизнеспособность после обработки и другими антибиотиками.

В последующие годы внимание исследователей сфокусировалось на изучении мутантных штаммов, обладающих резистентностью к антибиотикам. В работах с резистентными штаммами выявляли высокие значения *минимальной подавляющей концентрации* (МПК) антибиотика, исследовали свойства бета-лактамаз, изучали работу высокоэффективных транспортных систем, осуществляющих выведение антибиотиков из микробных клеток [2].

Персистирующие клетки на долгие годы как бы выпали из поля зрения ученых. Спустя 40 лет в 1980-е годы к проблеме *persisters cells* обратился Н.С. Мюед [3–6]. Как генетика его заинтересовали широкие фенотипические вариации в генетически однородных микробных популяциях и возможность образования клеток, обладающих толерантностью к высоким концентрациям антибиотиков. Он попытался получить мутантные штаммы, у которых образуется гораздо большее число персистирующих клеток. Был применен метод накопления, заключавшийся в многократной обработке бактериальной суспензии антибиотиком с последующей «выбраковкой» клонов с высокими значениями МПК. Отбирались клоны с неизменной МПК и большим числом клеток, толерантных к антибиотикам, тепловому шоку, колебаниям pH и другим стрессовым воздействиям. Работа с такими мутантными штаммами позволяла накопить достаточное количество клеток-персистеров. У них были изучены профили экспрессии хромосомных генов,

кодирующих синтез внутриклеточных ингибиторов. Иными словами, была сделана первая попытка увязать фенотипические проявления персистенности с генетическим базисом [7]. Оказалось, что в персистирующих клетках активируются модули (группы генов), обеспечивающие снижение уровня биосинтетической и энергетической активности клеток, что свидетельствовало о переходе клеток в некое покоящееся состояние.

В 90-е годы прошлого столетия на волне возникшего интереса к изучению микробных биопленок вновь вспомнили о персистирующих клетках [8]. Поразительная устойчивость микробных биопленок к воздействию многих антибактериальных препаратов, а также отсутствие в них клеток, обладающих известным арсеналом механизмов резистентности, ставили исследователей в тупик [9, 10]. Наличие матрикса, в который были погружены микробные клетки, затрудняло диффузию антимикробных препаратов, но не отменяло возможность проникновения антибиотиков внутрь биопленок [11, 12]. Отчасти невосприимчивость биопленок к стандартным методам лечения объяснялась их недоступностью для клеток иммунной системы [13]. Появились работы, повторяющие, по сути, первые опыты J.W. Bigger, но с микроорганизмами, образующими биопленки. Эксперименты с воздействием различных доз антибиотиков на клетки *Pseudomonas aeruginosa* из биопленок показали наличие клеток с толерантностью ко всем известным на тот момент антибиотикам [14–16]. Аналогичные данные были получены при изучении популяций *Escherichia coli*. Использование флуоресцентной микроскопии позволило выявить в биопленках, образованных *E. coli*, бледно окрашенные клетки меньшего размера, обладавшие свойствами персистеров [17, 18]. Экспериментально было доказано присутствие персистирующих клеток в биопленках, образованных микобактериями [19] и грибами [20]. Интересно, что персистирующие клетки были обнаружены только в биопленках, но не в планктонных культурах дрожжеподобных грибов [9, 20–22]. При этом в грибных биопленках отсутствовали артроспоры, конидии и другие формы спор, обычно формирующиеся при прекращении роста грибов.

Работы с использованием методов проточной цитометрии, подкрепленные результатами молекулярно-генетических исследований, подтвердили сделанные ранее предположения о том, что персистирующие клетки являются покоящимися формами клеток. Они устойчивы ко многим неблагоприятным факторам внешней среды и значительно отличаются от активно растущих клеток [11, 23–25].

Многие современные микробиологи до сих пор рассматривают толерантность и резистентность как тождественные понятия. Однако толерантностью (или лекарственной индифферентностью), начиная с 1940-х годов, называли повышенную невосприимчивость к антибиотикам не растущих или медленно растущих клеток бактерий [12, 26–28]. В частности, толерантность изучали в экспериментах с воспроизведением инфекционного процесса у животных [29]. Понимание глубинных различий между толерантностью персистирующих клеток и антибиотикорезистентностью мутантных клеток пришло только к 1980-м годам. Большинство антибиотиков действуют на клетки, сохраняющие определенный уровень физиологической активности. Даже если клетка прекращает рост и деление, это не означает отсутствие у нее метаболической активности («траты» на поддержание жизнеспособности могут быть достаточно большими). Антибиотик внутри клетки атакует определенные мишени, активация или подавление которых приводит к синтезу внутриклеточных токсинов, аутолизинам, нарушению биосинтетических реакций, синтезу высокореактивных кислородных радикалов [30–32]. В резистентных клетках механизмы защиты от антибиотика направлены на предотвращение процесса связывания с внутриклеточной мишенью [9]. Мишени (жизненно важные для растущих клеток центры) в толерантных персистирующих клетках «выключены» или заблокированы специфическими белками, т. е. клетки в них, по сути, не нуждаются – их как бы нет [9]. Именно поэтому персистеры устойчивы не только к антибиотикам, но и к солям ряда металлов (хроматам, арсенатам, теллуратам), токсичным для «нормальных» клеток [7, 9].

На практике наличие персистирующих клеток в популяции исследуемого штамма можно обнаружить следующим образом [17, 33]: меняя концентрацию антибиотика и отслеживая динамику жизнеспособных клеток, можно получить ниспадающую кривую с двумя характерными ступенями, образованными активно растущими и персистирующими клетками. Если же обработать суспензию резистентного штамма, то число жизнеспособных клеток не изменяется во времени [9].

Механизмы молекулярно-генетической и физиологической регуляции процессов переключения метаболизма микробных клеток при формировании персистеров пока изучены недостаточно. Неясно, каким образом микробная популяция поддерживает необходимый для ее выживания уровень этих клеток. Данные по генетическим аспектам регуляции образования персистеров многочисленны, но недостаточно систематизированы [7]. Выявлены

как гены, мутации в которых увеличивают число персистеров, так и те гены, которые подавляют процесс их образования [34]. Профиль экспрессии генов подтверждает предположение об их покоящемся состоянии [7]. В персистирующих клетках были обнаружены гены, принадлежащие к так называемой токсин/антитоксин системе [35]. Расположенная в одном опероне пара генов, которые кодируют стабильный токсин и нестабильный антитоксин, регулирует обратимый процесс остановки роста клеток [36, 37]. Именно синтезу внутриклеточных белков-токсинов отводится ведущая роль в поддержании персистирующего состояния [37, 9]. Изучение сложной системы регуляции экспрессии генов показало работу множества механизмов, дублирующих друг друга [7]. Такая многовариантность или избыточность механизмов, по всей видимости, необходима для обеспечения выживания популяции при самом неблагоприятном развитии событий.

Появление новых методов изучения популяций микроорганизмов, таких как проточная цитометрия, позволило изучать физиологическое состояние отдельных клеток. Это привело к пересмотру взгляда на структуру микробных популяций [7]. Упрощенное представление о фенотипической однородности генетически однородной популяции оказалось ложным. Любая микробная популяция (и планктонная, и биопленка) представляет собой сложное сообщество клеток, находящихся в различных физиологических состояниях [38]. Так, в микробных популяциях *S. aureus* были обнаружены так называемые SCVs варианты медленно растущих клеток, образующие маленькие колонии. Эти субпопуляции клеток более устойчивы к действию антибиотиков, но не обладают той степенью толерантности, которая характерна для персистирующих клеток [39]. Механизмы, лежащие в основе изменений фенотипов, относят к «шумам» на уровне экспрессии ключевых регуляторных факторов [24, 40–44]. Данные переключения либо являются реакцией на изменяющиеся условия окружающей среды, либо происходят спонтанно. Было сделано предположение о стохастическом характере переключения клеточного метаболизма при образовании персистирующих клеток [9]. Такой случайный характер образования персистирующих клеток дает возможность популяции микроорганизмов выжить тогда, когда нет времени для адаптации к резко изменившимся условиям внешней среды [44].

Таким образом, несмотря на наличие множества вопросов относительно биологической природы персистирующих клеток, на сегодняшний день

большинство исследователей признают доказанными следующие положения [9, 17, 45, 46]:

1) персистирующие клетки – особая форма специализированных покоящихся клеток, обнаруженных практически у всех изученных микроорганизмов (бактерий и грибов);

2) число персистирующих клеток в популяции диких (не мутантных) штаммов не превышает 1–3%;

3) в фазе активного роста популяций персистеры практически отсутствуют, их число значительно возрастает при замедлении и после прекращения роста (у планктонных культур – в стационарную фазу роста);

4) существует множество независимых путей формирования персистирующих клеток;

5) стрессовые условия (наличие ингибирующих рост веществ, колебание рН, температуры, содержания кислорода и др.) стимулируют образование персистирующих клеток – их число возрастает на 1–2 порядка;

6) в поддержании состояния покоя участвуют специфические гены, кодирующие синтез пептидов, воздействующих на мембраны микробных клеток, снижающие трансмембранный потенциал и уровень АТФ в клетках (TisV токсин и др.).

Обнаружение персистирующих клеток в биопленках позволило рассматривать их клиническую роль в более широком аспекте. С наличием биопленок связывают течение длительно рецидивирующих, хронических инфекционных заболеваний, трудно поддающихся стандартной терапии [47]. К таким заболеваниям относят эндокардиты, заболевания мочевыделительной системы, заболевания зубов, десен и полости рта, а также осложнения, вызванные применением катетеров, протезов, имплантов [8, 48]. Вклад клеток-персистеров в хронизацию инфекционного процесса может быть связан с тем, что они «прячутся» в макрофагах, клетках гранулем, в слизистой желудка, в желчном пузыре [45].

Исходя из факта присутствия клеток-персистеров в биопленках, была предложена модель длительно рецидивирующих инфекций [2]. Применение антибиотика приводит к гибели большей части клеток биопленки. Далее клетки иммунной системы разрушают часть оставшихся активно растущих клеток и часть персистирующих клеток. После снижения концентрации антибиотика оставшиеся персистеры возобновляют рост, и число клеток в популяции быстро восстанавливается [9].

Было показано, что многократное применение антибиотиков приводит к увеличению субпопуляции персистирующих клеток за счет селекции

мутантных штаммов [5, 12, 49]. Селекцией штаммов с повышенным числом персистирующих клеток пытаются объяснить часто наблюдаемую неэффективность терапии высокими дозами антибиотиков при лечении рецидивирующих пневмоний у больных с муковисцидозом. У таких пациентов из нижних дыхательных путей выделяли клетки синегнойной палочки с типичными признаками персистирующих клеток [50].

С другой стороны, существование персистеров на фоне длительной, не поддающейся антибиотикотерапии инфекции создает почву для развития резистентности [7, 9, 22]: наличие клеток-персистеров значительно удлиняет и делает малоэффективной антибиотикотерапию, что приводит к селекции резистентных штаммов. В связи с этим остро встает вопрос о поиске препаратов и разработке режимов их введения, обеспечивающих не столько подавление, сколько полное уничтожение персистеров. Особые трудности возникают при работе с медленно растущими видами микроорганизмов, такими как микобактерии [51].

В основе подходов к решению проблемы полной эрадикации персистеров лежит идея комбинированного воздействия антибиотиков и веществ-ингибиторов, нарушающих систему поддержания покоя в персистирующих клетках [38]. «Активация» персистирующих клеток приведет к потере толерантности к антибактериальным препаратам. Такой ингибитор был получен для мутантного штамма *E. coli* [52]. Его добавление значительно снижало число персистирующих клеток.

Другим интересным подходом является применение пульс-терапии, предложенной еще J.W. Bigger [1]. Идея состояла в том, что в промежутке между введениями антибиотика его концентрация должна была снизиться до уровня, при котором клетки начинали расти. Повторное введение антибиотика уничтожило бы эти проросшие клетки. Испытание такого подхода на клетках *P. aeruginosa* в биопленках было вполне успешным [9]. Проблема заключалась в трудности подбора индивидуального режима введения для каждого пациента, но это, по всей видимости, вопрос времени. Идея пульс-терапии поддерживается и в работах, использующих математическое моделирование процессов образования персистеров в популяции [53]. Расчеты показывают, что возможен подбор такого режима введения антибиотиков, при котором произойдет полная эрадикация микробных клеток.

Таким образом, результаты изучения персистирующих клеток микроорганизмов позволяют говорить об их важности для клинической практики.

Они играют особую роль в развитии хронических инфекционных заболеваний человека, связанных, в первую очередь, с образованием микробных биопленок. Существование персистеров приводит к удлинению сроков лечения микробных инфекций и создает базис для селекции резистентных и полирезистентных штаммов микроорганизмов. Скрытая

угроза со стороны клеток-персистеров состоит в том, что до сих пор не вполне ясны пусковые механизмы, приводящие к их появлению. В ряде европейских стран ведется поиск новых лечебных препаратов, подавляющих образование персистирующих клеток. Этот подход представляется наиболее перспективным.

## Литература

1. Bigger J.W. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent. *Lancet* 1944; 244:497-500.
2. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:999-1007.
3. Moyed H.S., Bertrand K.P. *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol* 1983; 155:768-75.
4. Moyed H.S., Broderick S.H. Molecular cloning and expression of *hipA*, a gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol* 1986; 166:399-403.
5. Black D.S., Kelly A.J., Mardis M.J., Moyed H.S. Structure and organization of *hip*, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *J Bacteriol* 1991; 173:5732-9.
6. Black D.S., Irwin B., Moyed H.S. Autoregulation of *hip*, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *J Bacteriol* 1994; 176:4081-91.
7. Jayaraman R. Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon. *J Biosci* 2008; 33:795-805.
8. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284:1318-22.
9. Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol* 2010; 64:357-72.
10. Walters M.C. 3rd, Roe F., Bugnicourt A., Franklin M.J., Stewart P.S. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:317-23.
11. Mulcahy L.R., Burns J.L., Lory S., Lewis K. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *J Bacteriol* 2010; 192:6191-9.
12. Wolfson J.S., Hooper D.C., McHugh G.L., et al. Mutants of *Escherichia coli* K-12 exhibiting reduced killing by both quinolone and beta-lactam antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:1938-43.
13. Stewart P.S., Costerton J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358:135-8.
14. Brooun A., Liu S., Lewis K. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:640-6.
15. Spoering A.L., Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* 2001; 183:6746-51.
16. Zeller H.J., Voigt W.H. Efficacy of ciprofloxacin in stationary phase bacteria *in vitro*. *Am J Med* 1987; 82:87-90.
17. Keren I., Kaldalu N., Spoering A., et al. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 230:13-8.
18. Shah D., Zhang Z., Rhodursky A., et al. Persisters: a distinct physiological state of *E.coli*. *BMC Microbiology* 2006; 6:53.
19. Barry C.E. 3rd, Boshoff H.I., Dartois V., et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7:845-55.
20. LaFleur M.D., Kumamoto C.A., Lewis K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:3839-46.
21. Al-Dhaheri R.S., Douglas L.J. Absence of amphotericin B-tolerant persister cells in biofilms of some *Candida species*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:1884-7.
22. Lewis K., Spoering A., Kaldalu N., Keren I., Shah D. Persisters: specialized cells responsible for biofilm tolerance to antimicrobial agents. In: Pace J., Rupp M.E., Finch R.G., editors. *Biofilms, infection, and antimicrobial therapy*. Boca Raton, FL: Taylor & Francis.; 2005. p. 241-56.
23. Alix E., Blanc-Potard A. Hydrophobic peptides: novel regulators within bacterial membranes. *Mol Microbiol* 2009; 72:5-11.
24. Avery S.V. Microbial cell individuality and the underlying sources of heterogeneity. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4:577-87.
25. Balaban N. Q., Merrin J., Chait R., et al. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 2004; 305:1622-5.
26. Anderl J.N., Zahller E., Roe F., Stewart P.S. Role of nutrient limitation and stationary phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1251-6.
27. Lee S.W., Foley E.J., Epstein J.A. Mode of action of penicillin I. Bacterial growth and penicillin activity - *Staphylococcus aureus* FDA. *J Bacteriol* 1944; 48:393-9.
28. Truemanen E., Cozens R., Tosch W., et al. The rate of killing of *E. coli* by  $\beta$ -lactam antibiotics is strictly proportional to the bacterial growth. *J Gen Microbiol* 1986; 132:1297-304.
29. Levin B.R., Rozen D.E. Noninherited antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4:556-62.
30. Davis B.D., Chen L.L., Tai P.C. Misread protein creates membrane channels: an essential step in the bactericidal

- action of aminoglycosides. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83:6164-8.
31. Hooper D. Mechanism of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. Clin Infect Dis 2001; 32 (Suppl 1): S9-15.
  32. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., et al. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. Cell 2007; 130:797-810.
  33. Gefen O., Balaban N.Q. The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. FEMS Microbiol Rev 2009; 33:704-17.
  34. Hansen S., Lewis K., Vulic M. The role of global regulators and nucleotide metabolism in antibiotic tolerance in *E. coli*. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52:2718-26.
  35. Gerdes K., Christensen S.K., Lobner-Olesen A. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. Nature Rev Microbiol 2005; 3:371-82.
  36. Christensen S.K., Mikkelsen M., Pedersen K., Gerdes K. RelE, a global inhibitor of translation is activated during nutritional stress. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:14328-33.
  37. Gerdes K. Toxin – antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. J Bacteriol 2000; 182:561-72.
  38. Lechner S., Lewis K., Bertram R. *Staphylococcus aureus* persists tolerant to bactericidal antibiotics. J Mol Microbiol Biotechnol 2012; 22:235-44.
  39. Singh R., Ray P., Das A., Sharma M. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. J Med Microbiol 2009; 58:1067-73.
  40. Jayaraman R. Modulation of allele leakiness and adaptive mutability in *Escherichia coli*. J Genet 2000; 79:55-60.
  41. Kussell E., Kishony R., Balaban N.Q., Leibler S. Bacterial persistence: a model of survival in changing environments. Genetics 2005; 169:1807-14.
  42. Kussell E., Leibler S. Phenotypic diversity, population growth and information in fluctuating environments. Science 2005; 309:2075-8.
  43. Suel G.M., Garcia-Ojalvo J., Lieberman L.M., Elowitz M.B. An excitable gene regulatory circuit induces transient cellular differentiation. Nature 2006; 440:545-50.
  44. Dhar N., McKinney J.D. Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. Curr Opin Microbiol 2007; 10:30-8.
  45. Lewis K. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. Handb Exp Pharmacol 2012; 211:121-33.
  46. Leung V., Leversque C.M. A stress-inducible quorum-sensing peptide mediates the formation of persister cells with noninherited multidrug tolerance. J Bacteriol 2012; 194:2265-74.
  47. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from natural environment to infectious diseases. Nat Rev Microbiol 2004; 2:95-108.
  48. DelPoza J., Patel R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. Clin Pharmacol Ther 2007; 82:204-9.
  49. Dorr T., Vulic M., Lewis K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *E. coli*. PloS Biology 2010; 8(2):1-8.
  50. Periasamy S., Joo H.S., Duong A.C., Bach T.H., et al. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109:1281-6.
  51. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. Nat Rev Microbiol 2007; 5:48-56.
  52. Spoering A.L., Vulic M., Lewis K. GlpD and PlsB participate in persister cell formation in *Escherichia coli*. J Bacteriol 2006; 188:5136-44.
  53. Fu Y., Zhu M., Xing J. Resonant actuation: a strategy against bacterial persistence. Phys Biol 2010; 7:16013.