



Università degli Studi di Messina

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE**

*Corso di Dottorato di Ricerca in Scienze Veterinarie XXXVIII Ciclo*

*Coordinatore: Prof.ssa Cristina Cravana*

*Curriculum: Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare*

---

# Fenomeni di “persistenza” microbica e potenziale impatto sulla sicurezza alimentare

Tesi dottorale di:

Dr.ssa Giorgia SORRENTINO

Tutor:

Prof. Alessandro GIUFFRIDA

*Percorso dottorale sviluppato con il sostegno finanziario di NextGenerationEU:*

Missione 4, Componente 2, Investimento 3.3, CUP J94D22000750009

Borsa MUR - DM 352/2022 Codice: DOT1314842



---

*Settore Scientifico Disciplinare MVET-02/B*

*Esame Finale 2026*

**Indice**

<b>Premessa</b> .....	3
<b>Introduzione al fenomeno della persistenza batterica</b> .....	4
<b>Capitolo 1. Strategie di sopravvivenza dei batteri</b> .....	6
1.1. La crescita e i meccanismi di difesa batterici .....	6
1.2. Resistenza .....	8
1.3. Tolleranza.....	9
1.4. Persistenza.....	10
1.4.1. <i>Panoramica storica</i> .....	11
1.4.2. <i>Caratteristiche delle cellule persister e loro differenze rispetto ai batteri resistenti e “tolleranti”</i> .....	13
1.4.3. <i>Metodi per la rilevazione delle cellule persister</i> .....	17
1.4.4. <i>Meccanismi molecolari della formazione e della sopravvivenza dei persister</i> .....	21
<b>Scopo della tesi</b> .....	40
<b>Capitolo 2. Induzione della persistenza a seguito di stress osmotico e valutazione stocastica delle modificazioni della dinamica di crescita</b> .....	40
2.1. Premessa e scopo della ricerca .....	41
2.2. Materiali e Metodi .....	43
2.3. Risultati .....	49
2.4. Discussione e considerazioni finali.....	52
<b>Capitolo 3. Induzione della persistenza mediante stress osmotico e valutazione dell’incremento della termoresistenza in vitro e in vivo</b> .....	57
3.1. Premessa e scopo delle attività di ricerca.....	57
3.2. Materiali e metodi.....	59
3.2.1. <i>Preparazione del ceppo batterico</i> .....	59
3.2.2. <i>Valutazione della fase di latenza mediante il software ScanLag</i> .....	59
3.2.3. <i>Valutazione della resistenza termica di L. monocytogenes ATCC 7644 in vitro</i> .....	61
3.2.4. <i>Valutazione della resistenza termica di L. monocytogenes ATCC 7644 in salsicce di suino cotte sperimentalmente contaminate</i> .....	62
3.2.5. <i>Analisi dei dati</i> .....	64
3.3. Risultati, discussione e conclusioni .....	65
3.3.1. <i>Distribuzioni della fase di latenza di L. monocytogenes</i> .....	65
3.3.2. <i>Curve di inattivazione di L. monocytogenes durante il ciclo di trattamento in vitro</i> .....	68
3.3.3. <i>Curve di inattivazione di L. monocytogenes durante il ciclo di cottura di salsicce sperimentalmente contaminate</i> .....	69
<b>Conclusioni</b> .....	74
<b>Bibliografia</b> .....	77

**Premessa**

I meccanismi di adattamento all'ambiente da parte dei microrganismi ha sempre destato notevole interesse da parte di numerosissimi ricercatori, in diversi ambiti della biologia e della medicina. Anche l'ambito della sicurezza alimentare è fortemente interessato a tali argomenti, dal momento che tutte le attività di valutazione e gestione delle questioni legate alle malattie alimentari trasmesse dagli alimenti in cui sono coinvolti i microrganismi devono tenere in considerazione tali strategie grazie alle quali, spesso, diversi microrganismi riescono ad eludere i convenzionali sistemi di bonifica messi in atto, ad esempio, dalle industrie alimentari.

In questo triennio di attività di ricerca è stato preso in considerazione uno di tali meccanismi: la persistenza. In questa tesi verrà, pertanto, affrontato lo stato dell'arte su tale argomento (capitolo 1) e successivamente verranno descritte alcune attività di ricerca inerenti alla persistenza di *Listeria monocytogenes*, culminate in alcuni articoli scientifici che hanno riguardato, in particolare, l'induzione della persistenza a seguito di stress osmotico e la valutazione stocastica delle modificazioni della dinamica di crescita (Capitolo 2). Nel capitolo 3, invece, vengono descritte altre ricerche inerenti alle relazioni tra stress osmotico, persistenza e acquisizione di termoresistenza.

## **Introduzione al fenomeno della persistenza batterica**

La persistenza batterica rappresenta uno stato fenotipico di dormienza che negli ultimi anni ha suscitato crescente interesse nella comunità scientifica. I cosiddetti batteri persister costituiscono una frazione minoritaria di una popolazione microbica capace di sopravvivere più a lungo rispetto alla maggior parte delle cellule quando esposta a condizioni battericide (Kaplan et al., 2021). La presenza di questa sottopopolazione si riflette tipicamente in una curva di inattivazione bifasica, indicativa dell'esistenza di due gruppi cellulari caratterizzati da diversa suscettibilità allo stesso trattamento: una componente predominante rapidamente inattivata e una quota più ridotta dotata di maggiore tolleranza (Balaban et al., 2019).

Quando vengono trasferite in un ambiente nutritivo favorevole, tali cellule mantengono la capacità di riattivare il metabolismo e riprendere la proliferazione. Tuttavia, il loro adattamento alle nuove condizioni risulta più lento, determinando un prolungamento della fase di latenza (Balaban et al., 2004; Brauner et al., 2016; Nalbone et al., 2024). In questo contesto, l'analisi della variabilità dei tempi di lag a livello di singola cellula rappresenta un approccio utile per stimare la quota di batteri caratterizzati da questo particolare stato fisiologico (Levin-Reisman et al., 2010; Levin-Reisman et al., 2014).

Gran parte delle conoscenze relative a questo fenomeno deriva da studi condotti nell'ambito delle terapie antibiotiche, nei quali la presenza di persister è stata associata al fallimento di alcuni trattamenti, pur in assenza di mutazioni genetiche responsabili di resistenza (Balaban et al., 2019; Brauner et al., 2016; Huemer et al., 2020). La loro comparsa all'interno di una coltura batterica è generalmente attribuita a processi stocastici che possono essere favoriti da condizioni di stress ambientale. Tali condizioni attivano una serie di risposte adattative non ereditarie che aumentano la capacità di sopravvivenza a esposizioni successive ad agenti battericidi (Ayrapetyan et al., 2018). Tra i meccanismi proposti rientra la sovraespressione di sistemi tossina-antitossina, in grado di modulare l'attività metabolica cellulare e favorire l'ingresso in uno stato reversibile di quiescenza (Balaban et al., 2019; Curtis et al., 2017; Fisher et al., 2017).

La persistenza non dovrebbe tuttavia essere interpretata come un semplice passaggio binario tra stati metabolici attivi e inattivi. Al contrario, essa emerge da un processo dinamico influenzato dall'interazione tra fattori deterministici e fluttuazioni casuali che caratterizzano i sistemi biologici complessi. In questo quadro, il ruolo delle variazioni casuali dei parametri intrinseci ed estrinseci, comunemente indicate come "rumore", è stato ampiamente investigato per comprendere la dinamica e la stabilità delle comunità microbiche (Spagnolo et al., 2015; Spagnolo et al., 2022). Più recentemente, l'impiego di modelli stocastici è stato proposto anche nello studio dei microrganismi associati agli alimenti, con l'obiettivo di descrivere la complessità delle interazioni tra variabilità ambientale e comportamento delle cellule (Ciofu et al., 2022; Giarratana et al., 2022). Nonostante questi progressi, il contributo del cosiddetto "rumore intrinseco" nella generazione dello stato di persistenza rimane ancora poco chiarito.

Un elemento particolarmente rilevante di questa strategia di sopravvivenza è la capacità di eludere interventi normalmente efficaci nell'inattivare la maggior parte della popolazione microbica (Defraigne et al., 2018). Numerosi studi hanno evidenziato che tali cellule possono tollerare concentrazioni elevate di agenti antimicrobici e sopravvivere a condizioni ambientali estreme, tra cui valori critici di pH, elevata pressione osmotica e trattamenti termici (Manina et al., 2015; Nalbone et al., 2023). Questa tolleranza sembra essere legata a modificazioni metaboliche e strutturali reversibili che non comportano cambiamenti genetici permanenti, ma che possono determinare fenomeni di cross-protezione nei confronti di differenti fattori di inattivazione (Dewachter et al., 2019; Harms et al., 2016). Nonostante l'ampia documentazione disponibile nel contesto clinico, le implicazioni della persistenza batterica nel settore della sicurezza alimentare sono state finora poco esplorate (Eisenreich et al., 2022). Le tecnologie di conservazione comunemente impiegate nell'industria alimentare, tra cui refrigerazione, congelamento, salatura, essiccazione e acidificazione, potrebbero infatti rappresentare fonti di stress capaci di favorire l'emergere di sottopopolazioni tolleranti. Tali cellule batteriche potrebbero sopravvivere a successive fasi di inattivazione, come i trattamenti termici, e successivamente riprendere la crescita durante la distribuzione e la conservazione dei prodotti. In linea con questa ipotesi, nel nostro recente studio in vitro è stato osservato

che una frazione di *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 caratterizzata da un prolungamento della fase di latenza mostrava una maggiore capacità di sopravvivere a un trattamento termico di 51 °C (Nalbone et al., 2023). Questo risultato suggerisce che l'estensione del periodo di adattamento (fase di lag) possa rappresentare un indicatore fenotipico della presenza di cellule in stato di persistenza dotate di maggiore tolleranza al calore. Alla luce di queste considerazioni, un ulteriore studio effettuato durante l'attività di ricerca, si è posto di valutare se lo stress osmotico, indotto da differenti concentrazioni di sale, potesse favorire la formazione di cellule in stato di persistenza in un ceppo di *Listeria monocytogenes*. Inoltre, l'indagine mirava a verificare se tali forme cellulari potessero essere in grado di sopravvivere più a lungo durante il trattamento termico applicato nel ciclo di cottura di salsicce di suino (würstel) sperimentalmente contaminate. Per approfondire le dinamiche del fenomeno, la persistenza è stata inoltre analizzata anche da una prospettiva quantitativa mediante l'impiego di modelli di microbiologia predittiva comunemente utilizzati per descrivere le curve di crescita delle popolazioni batteriche in ambito alimentare.

## **Capitolo 1. Strategie di sopravvivenza dei batteri**

### ***1.1. La crescita e i meccanismi di difesa batterici***

Analogamente ad altri sistemi biologici, i batteri, in presenza di condizioni ambientali favorevoli, sono in grado di crescere e moltiplicarsi utilizzando i nutrienti disponibili come fonte di energia. Nonostante l'ampia diversità tra le specie batteriche, ciascuna con specifiche esigenze fisiologiche e nutrizionali, il processo di crescita microbica segue un andamento generale comune, descritto dalla cosiddetta "curva di crescita", applicabile all'insieme delle popolazioni batteriche. Tale curva si suddivide in quattro fasi distinte: i) fase di latenza (lag phase), ii) fase di crescita esponenziale o logaritmica (log phase), iii) fase stazionaria e iv) fase di declino o morte cellulare (Francois et al., 2005).

La durata e le caratteristiche di ciascuna fase dipendono strettamente sia dal ceppo microbico sia dalle condizioni ambientali, tra cui la disponibilità di nutrienti, la temperatura, il pH e la presenza di acqua libera necessaria per le attività metaboliche. La

fase di latenza rappresenta un periodo di adattamento in cui le cellule, pur non dividendosi immediatamente, aumentano di dimensione e attivano la sintesi dei componenti essenziali per la crescita e la sopravvivenza (Aryani et al., 2015). La sua durata è tanto maggiore quanto più marcata è la differenza tra il nuovo ambiente e quello di origine. Una volta completato questo adattamento, i batteri entrano nella fase esponenziale, caratterizzata da un rapido aumento della popolazione secondo una progressione geometrica. Tale fase si mantiene finché le risorse nutritive risultano disponibili e i metaboliti tossici prodotti non raggiungono livelli critici. Il progressivo esaurimento dei nutrienti e l'accumulo di prodotti di scarto determinano un rallentamento della crescita e la morte di una parte della popolazione, segnando il passaggio alla fase stazionaria (Levin & Rozen, 2006). In questa fase si stabilisce un equilibrio dinamico tra cellule in divisione e cellule che muoiono. Quando la mortalità supera la capacità replicativa, la popolazione entra nella fase di declino.

Lo studio delle curve di crescita ha permesso lo sviluppo di modelli matematici in grado di prevedere il comportamento dei microrganismi in differenti condizioni, in particolare negli alimenti sottoposti a processi di trasformazione e conservazione. La capacità di prevedere l'evoluzione delle popolazioni microbiche rappresenta un elemento fondamentale per la sicurezza alimentare, consentendo alle industrie di garantire elevati standard di qualità e salubrità (Baranyi et al., 1994). In presenza di condizioni ambientali sfavorevoli, i batteri sono in grado di attivare risposte adattative volte ad aumentare la loro resistenza agli stress esterni (Blessington et al., 2013). Tali risposte non riguardano esclusivamente la sopravvivenza, ma possono anche influenzare la virulenza dei patogeni, incrementandone la capacità infettiva nei confronti dell'ospite (Yousef et al., 2003). In generale, lo sviluppo di meccanismi di resistenza è più frequentemente associato a esposizioni a stress sub-letali piuttosto che a trattamenti letali.

In questo contesto, l'adozione crescente di tecnologie di lavorazione blande, legata alla domanda di alimenti minimamente processati, può rappresentare una fonte di stress sub-letale per i microrganismi presenti negli alimenti. Tali condizioni possono indurre risposte adattative che aumentano la resistenza dei batteri a successivi trattamenti di bonifica, come quelli termici, fondamentali per garantire la sicurezza alimentare.

Componenti cellulari essenziali, tra cui proteine, acidi nucleici, parete e membrana cellulare, possono subire danni in seguito all'esposizione a fattori stressanti; tuttavia, i batteri sono in grado di attivare diversi meccanismi difensivi. Questi possono manifestarsi a livello genotipico, attraverso modificazioni ereditarie del DNA, oppure a livello fenotipico, mediante cambiamenti nella composizione della membrana, della parete cellulare o nell'attività enzimatica (Mancuso et al., 2021).

Nel corso del tempo sono stati identificati numerosi sistemi di difesa adottati dai batteri per sopravvivere in ambienti ostili. Tra i più noti vi è la resistenza agli antibiotici, spesso associata alla trasmissione ereditaria di geni specifici all'interno della popolazione (Hobby et al., 1942). Accanto a questo meccanismo, sono stati descritti fenomeni altrettanto rilevanti ma non necessariamente legati a modificazioni genetiche stabili, noti come "tolleranza" e "persistenza" (Balaban et al., 2019; Kester & Fortune, 2014). Il primo a osservare tali comportamenti fu Bigger, il quale evidenziò come una piccola frazione della popolazione batterica fosse in grado di sopravvivere più a lungo a trattamenti antibiotici normalmente efficaci; questa sottopopolazione venne successivamente definita "persisters" (Bigger et al., 1944).

### ***1.2. Resistenza***

Una popolazione batterica è definita resistente quando può crescere e moltiplicarsi nonostante l'esposizione a concentrazioni elevate di un antibiotico, indipendentemente dalla durata del trattamento. Il grado di resistenza viene generalmente misurato tramite la concentrazione minima inibente (MIC, Minimum Inhibitory Concentration) (Blair et al., 2015; Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021). Una popolazione batterica è considerata più resistente di un'altra quando necessita di dosi più elevate dello stesso antibiotico per ottenere un effetto battericida comparabile.

La resistenza batterica rappresenta oggi una delle principali sfide per la sanità pubblica, poiché l'uso eccessivo o improprio degli antibiotici ha favorito la selezione di ceppi sempre più difficili da trattare, riducendo l'efficacia delle terapie disponibili (Ackermann, 2015; Nataro et al., 2000). La determinazione della MIC permette di

identificare la minima concentrazione di antibiotico necessaria a inibire la crescita di un microrganismo specifico, costituendo uno strumento essenziale in ambito clinico per la scelta del trattamento più appropriato (Radzikowski et al., 2017).

### ***1.3. Tolleranza***

La tolleranza batterica si manifesta quando i microrganismi, pur esposti temporaneamente a concentrazioni di antibiotici superiori alla MIC, riescono a sopravvivere grazie a specifici meccanismi molecolari, sia ereditabili sia non ereditabili (Handwerger & Tomasz, 1985). In questa condizione, i batteri modulano il loro metabolismo rallentando o sospendendo alcuni processi cellulari essenziali, senza che il valore della MIC subisca modifiche. Di conseguenza, la MIC non è un indicatore affidabile della tolleranza (Brauner et al., 2016).

Si riconoscono due principali forme di tolleranza:

1. *Tolleranza associata a un rallentamento della crescita*: in questo caso, l'efficacia degli antibiotici diminuisce poiché la loro azione dipende dalla crescita attiva dei batteri, durante la quale i bersagli cellulari sono espressi (De Steenwinkel et al., 2010; Mascio et al., 2007). I ceppi a metabolismo lento presentano una crescita esponenziale rallentata, ritardando la formazione dei bersagli degli antibiotici.
2. *Tolleranza legata a un prolungamento della fase di latenza*: si verifica quando cellule precedentemente esposte a stress sub-letali vengono trasferite in condizioni favorevoli. Prima di riprendere la crescita, le cellule devono riparare i danni subiti, allungando così la fase di latenza. La durata di questa fase è proporzionale all'entità dello stress precedente (Brauner et al., 2016).

La tolleranza non ereditabile permette ai batteri di sopravvivere a un'ampia gamma di antibiotici, mentre la resistenza, essendo geneticamente acquisita, è generalmente specifica per un determinato antibiotico o per composti strutturalmente correlati (Lewis, 2007; Wolfson et al., 1990). La tolleranza può essere sia ereditabile sia non ereditabile: nel primo caso determina un prolungamento stabile dei tempi di replicazione, nel secondo è legata a condizioni ambientali sfavorevoli (Madar et al., 2013; Brauner et al.,

2016). Un esempio tipico è la fase stazionaria, durante la quale la carenza di nutrienti e lo stress ambientale inducono risposte adattative che aumentano la sopravvivenza della popolazione (Rodriguez-Romo et al., 2005).

Secondo la letteratura, la tolleranza può essere misurata tramite parametri come il rapporto MBC/MIC e il tempo minimo di inattivazione (MDK), che quantifica il tempo necessario affinché un'alta concentrazione di antibiotico uccida una popolazione batterica (Kester & Fortune, 2014; Muller et al., 2004; Levin-Reisman et al., 2014).

#### ***1.4. Persistenza***

I persister sono batteri non proliferanti o a crescita lenta in grado di sopravvivere a condizioni di stress, come l'esposizione ad antibiotici, specie reattive dell'ossigeno, pH acido o carenza di nutrienti. Una volta rimosso lo stress, queste cellule possono riprendere la crescita pur rimanendo sensibili allo stesso stimolo (Zhang, 2014). Grazie alla loro tolleranza agli antibiotici e al conseguente rischio di fallimento terapeutico, i persister rivestono un ruolo clinico rilevante in numerosi patogeni.

Negli ultimi trent'anni, i ricercatori hanno compiuto notevoli progressi nella comprensione dei meccanismi molecolari alla base della persistenza batterica (Balaban et al., 2004; Shah et al., 2006) e hanno sviluppato metodi specifici per l'isolamento e l'analisi dei persister. Tuttavia, le revisioni pubblicate nell'ultimo decennio presentano alcune limitazioni: alcune coprono un arco temporale troppo ampio e non includono gli sviluppi più recenti (Lewis, 2010; Zhang, 2014), mentre altre non forniscono un quadro completo di tutti gli aspetti della persistenza batterica (Fisher et al., 2017; Maisonneuve & Gerdes, 2014; Harms et al., 2016).

Ad esempio, Fisher et al. hanno sintetizzato la correlazione tra batteri persister e malattie cliniche, concentrandosi sui meccanismi di persistenza legati a moduli tossina-antitossina, risposta stringente, comunicazione batterica, efflusso di farmaci e altri processi cellulari (Fisher et al., 2017; Maisonneuve & Gerdes, 2014; Harms et al., 2016).

### 1.4.1. *Panoramica storica*

I persister furono identificati per la prima volta oltre ottant'anni fa e risultano strettamente associati alle infezioni croniche persistenti. Nel 1942, Gladys Hobby osservò per la prima volta il fenomeno della persistenza batterica durante esperimenti condotti con l'antibiotico penicillina: il farmaco era in grado di eliminare circa il 99% dei batteri, tra cui pneumococchi, streptococchi emolitici e stafilococchi, mentre una piccola frazione della popolazione batterica, pari a circa l'1%, sopravviveva al trattamento (Hobby et al., 1942). Nel 1944, Joseph Bigger approfondì lo studio di questo fenomeno negli stafilococchi e introdusse il termine "persister" per indicare quel ristretto sottogruppo di cellule batteriche dormienti e non proliferanti capaci di sopravvivere all'azione della penicillina. Bigger propose inoltre un approccio terapeutico basato sulla somministrazione intermittente dell'antibiotico, alternando fasi di trattamento e sospensione, con l'obiettivo di colpire i batteri una volta usciti dallo stato di persistenza (Bigger, 1944). Nonostante la rilevanza della scoperta, il fenomeno dei persister ricevette inizialmente un'attenzione limitata, principalmente a causa della scarsa comprensione dei meccanismi biologici che lo determinano. Nei tre decenni successivi furono condotti numerosi studi volti a chiarire le caratteristiche delle cellule persister e il loro potenziale ruolo clinico (Tuomanen et al., 1986). Nel 1970, Alexandre Tomasz descrisse un'ulteriore forma di persistenza osservando un nuovo tipo di mutante pneumococcico che, pur presentando tempi di generazione normali ed essendo sensibile all'inibizione della crescita indotta dalla penicillina quanto il ceppo parentale wild-type, mostrava una perdita di vitalità molto lenta e non andava incontro a lisi durante l'esposizione all'antibiotico (Tomasz et al., 1970). Per distinguere questo fenomeno dalla persistenza precedentemente descritta, considerata una forma di tolleranza fisiologica o fenotipica, furono introdotti i termini "tolleranza agli antibiotici" e "tolleranza genotipica" per indicare questa diversa modalità di risposta batterica alla terapia antibiotica.

Nel 1974, Gary Best identificò il primo isolato clinico di *Staphylococcus aureus* genotipicamente tollerante (ceppo Evans), che presentava la stessa concentrazione minima inibente (MIC) di oxacillina rispetto ad altri ceppi, ma era in grado di sopravvivere a concentrazioni elevate dell'antibiotico (Best et al., 1974). Due anni più

tardi, Mayhall e colleghi riportarono un'elevata prevalenza di persister, pari a circa il 55%, tra gli isolati clinici di stafilococchi (Mayhall et al., 1976). Nel 1977, Diane Horne e Alexander Tomasz osservarono una risposta tollerante anche in *Streptococcus sanguis* (Horne & Tomasz, 1977). In quegli anni divenne progressivamente evidente che la persistenza batterica, distinta dalle forme classiche di resistenza alla penicillina precedentemente descritte, rappresentava un fenomeno diffuso e clinicamente rilevante (Sabath et al., 1977).

Negli anni successivi furono segnalati numerosi casi di fallimento terapeutico associati a oltre venti specie batteriche tolleranti in pazienti affetti da infezioni (Traub, 1981; Holloway et al., 1980; Glauser et al., 1983; Holloway & Dankert, 1982; Krogstad & Pargwette, 1980; Kaye, 1982; Savitch et al., 1978; Moellering et al., 1972; Gordon et al., 1972). Tuttavia, mancavano ancora prove sperimentali dirette che dimostrassero l'impatto della tolleranza agli antibiotici sull'esito del trattamento delle infezioni nell'uomo. Nel 1983, Brennan e Durack dimostrarono una chiara correlazione tra il grado di tolleranza di *S. sanguis* e l'efficacia della terapia in un modello di endocardite nel coniglio: i batteri tolleranti mostravano una sopravvivenza significativamente maggiore rispetto ai ceppi non tolleranti dopo cinque giorni di trattamento antibiotico (Brennan & Durack, 1983). Nello stesso anno, Harris Moyed identificò in *Escherichia coli* un mutante denominato hipA, caratterizzato da una maggiore capacità di formare persister senza variazioni della MIC, suggerendo il coinvolgimento di specifici geni nella regolazione della persistenza batterica (Moyed & Bertrand, 1983). Questi studi pionieristici contribuirono in modo significativo ad ampliare la comprensione dei batteri persister e dei meccanismi alla base della persistenza batterica. Tra gli anni Novanta e i primi anni Duemila, la diffusione sempre più ampia di dispositivi medici impiantabili, come stent cardiaci e cateteri urinari a permanenza, insieme all'aumento dei pazienti immunocompromessi (ad esempio a causa della chemioterapia oncologica o dell'infezione da HIV), determinò un significativo incremento delle infezioni croniche persistenti, comprese quelle associate alla formazione di biofilm (Davidson et al., 2019; Allon, 2005). Nel 2000, Kim Lewis stabilì un importante collegamento tra la persistenza batterica e le infezioni da biofilm studiando *Pseudomonas aeruginosa* (Costerton et al.,

1999; Spoering & Lewis, 2001). Successivamente fu dimostrato che i biofilm contengono cellule persister, che sono state in seguito riconosciute come uno dei principali fattori responsabili della difficoltà nel trattamento delle infezioni associate ai biofilm, delle frequenti recidive dopo la terapia e della persistenza di numerose infezioni croniche (Lewis, 2010; Høiby et al., 2015). A partire da queste evidenze, lo studio dei persister e delle infezioni persistenti ha suscitato un crescente interesse da parte della comunità scientifica internazionale (Fisher et al., 2017; Harms et al., 2016; Balaban et al., 2019; Yan & Bassler, 2019; Wilmaerts et al., 2019; Wood, 2016; Huemer et al., 2020; Lewis, 2005). Tuttavia, fino a tempi relativamente recenti non erano disponibili farmaci specificamente in grado di eliminare i batteri persister e di eradicare le infezioni associate ai biofilm. Un esempio emblematico dell'importanza dei persister durante l'infezione e della necessità di terapie mirate contro queste cellule è rappresentato dalla tubercolosi. In questo contesto, la pirazinamide (PZA), l'unico farmaco con attività anti-persister, svolge un ruolo fondamentale nel ridurre la durata della terapia antitubercolare e nel diminuire i tassi di recidiva della malattia (Zhang et al., 2012; Zhang & Mitchison, 2003).

#### *1.4.2. Caratteristiche delle cellule persister e loro differenze rispetto ai batteri resistenti e "tolleranti"*

I persister mostrano eterogeneità fenotipica, che comprende diversità metabolica, variazioni nei livelli di persistenza e differenze nelle dimensioni delle colonie. **Diversità metabolica** - All'interno delle comunità batteriche, i microrganismi possono trovarsi in diversi stati metabolici, che includono condizioni di quiescenza metabolica o di attività metabolica ridotta. Di conseguenza, le cellule persister non sono uniformi, ma presentano differenti livelli di capacità di persistenza. Balaban e colleghi hanno proposto una classificazione dei persister distinguendo due principali tipologie: i persister di tipo I e i persister di tipo II. I persister di tipo I sono cellule non proliferanti, caratterizzate da uno stato metabolicamente inattivo e indotte da fattori ambientali esterni; un esempio è rappresentato dai batteri coltivati in terreno liquido fino alla fase stazionaria in condizioni in vitro. I persister di tipo II, invece, sono cellule a crescita lenta e con metabolismo ridotto che si formano spontaneamente, indipendentemente da stimoli

ambientali esterni. A differenza dei persister di tipo I, questi batteri continuano a dividersi e proliferare lentamente e possono successivamente ritornare allo stato batterico normale (Balaban et al., 2004). Tuttavia, l'eterogeneità metabolica delle cellule persister è in realtà molto più complessa rispetto alla semplice distinzione tra persister di tipo I e di tipo II. Anche all'interno di ciascuna di queste categorie, infatti, i batteri possono presentare stati metabolici differenti. Inoltre, lo stato metabolico dei persister non è statico, ma può variare in risposta ai cambiamenti delle condizioni ambientali

***Variazione nel livello di persistenza*** - È stato ipotizzato che all'interno di un continuum dei persister esista una gerarchia di livelli di persistenza, in cui alcune cellule possiedono una capacità di sopravvivenza particolarmente elevata, definita *persistenza profonda* (deep persistence), mentre altre mostrano una capacità più limitata, definita *persistenza superficiale* (shallow persistence) (Zhang, 2014; Ma et al., 2010; Pu et al., 2019).

Studi condotti su microrganismi dormienti, come *Vibrio cholerae* (Xu et al., 1982; Debnath & Miyoshi, 2021; Ayibieke et al., 2023), *Legionella pneumophila* (Cervero-Aragó et al., 2019; Ducret et al., 2014; Dietersdorfer et al., 2018; Whiley et al., 2017; Albana et al., 2014; Epalle et al., 2015) e *Mycobacterium tuberculosis* (Sun & Zhang, 1999; Pai et al., 2000), hanno evidenziato che i persister con livelli di persistenza più profondi possono trovarsi in uno stato vitali ma non coltivabili (VBNC) (Ayrapetyan et al., 2018). Queste cellule, pur non essendo rilevabili mediante colture standard, possono essere rianimate e riprendere la crescita in condizioni appropriate, ad esempio in terreni condizionati o in co-coltura con cellule ospiti (Senoh et al., 2010; Kim et al., 2018; Mishra et al., 2011). Questo comportamento non rientra nella definizione convenzionale di persister, evidenziando una complessità maggiore di quanto precedentemente considerato (Zhang, 2014).

***Differenze nelle dimensioni delle colonie*** - L'eterogeneità delle popolazioni batteriche si riflette spesso nella comparsa di varianti a piccola colonia (SCV, small colony variants), osservate in diversi batteri, tra cui *M. tuberculosis* (Park et al., 2024), *Staphylococcus aureus* (Zhou et al., 2022; Liu et al., 2023; Tsujino et al., 2024; Lee et al., 2023) ed *Escherichia coli* (Gil-Gil et al., 2023; Noaman et al., 2023). Queste varianti si caratterizzano per dimensioni di colonia significativamente ridotte (circa 5–10 volte

inferiori rispetto alle colonie standard) e per un tasso di crescita più lento rispetto al ceppo parentale. Le SCV sono associate a una maggiore tolleranza agli antibiotici e a una maggiore capacità di persistenza (Kahl et al., 2016; Proctor et al., 2006; Loss et al., 2019) e rappresentano una sottopopolazione di persister con una fase di latenza prolungata (Vulin et al., 2018). La frequenza delle SCV all'interno di una popolazione batterica aumenta in seguito a stress ambientali, come pH acido (Leimer et al., 2016) o la presenza di specie reattive dell'ossigeno (Painter et al., 2015).

Per rappresentare più accuratamente l'eterogeneità dei persister, è stato proposto il modello Yin-Yang, in cui "Yin" corrisponde ai persister e "Yang" ai batteri in crescita o metabolicamente attivi. Questi due stati non sono indipendenti, ma possono interconvertirsi dinamicamente (Zhang, 2014). La formazione e la sopravvivenza dei persister dipendono da diversi fattori, tra cui:

1. *Fase di crescita batterica*: la percentuale di persister è maggiore nella fase stazionaria rispetto alla fase logaritmica. Studi su *E. coli* in vitro hanno mostrato che i persister sono scarsi nelle fasi iniziali della crescita logaritmica, aumentano rapidamente nelle fasi finali e raggiungono circa l'1% nella fase stazionaria (Li et al., 2018; Keren et al., 2004, 2011; Lewis, 2007).
2. *Condizioni ambientali*: nutrienti disponibili, pH e composizione dei gas possono modulare la formazione dei persister. La limitazione degli amminoacidi rallenta la crescita e attiva risposte allo stress, come l'inibizione dei target dei farmaci mediata da ppGpp, rendendo inefficaci i battericidi. Tuttavia, la tolleranza indotta da carenze nutrizionali è generalmente più breve rispetto a quella osservata in fase stazionaria (Fung et al., 2010). Anche H<sub>2</sub>S e NO possono aumentare la tolleranza agli antibiotici tramite meccanismi antiossidanti (Shatalin et al., 2011; Gusarov et al., 2009).
3. *Esposizione agli antibiotici*: tipo, concentrazione e durata dell'esposizione influenzano il numero e il grado di persistenza. Farmaci che riducono l'attività metabolica, come chinoloni e macrolidi, favoriscono l'ingresso dei batteri nello stato persister (Cui et al., 2018). Inoltre, specie diverse dello stesso antibiotico possono produrre numeri diversi di persister, e i meccanismi molecolari alla base

della persistenza variano a seconda del farmaco (Li et al., 2018; Nierman et al., 2015; Wu et al., 2015).

I persister si distinguono dai batteri resistenti: pur mostrando tolleranza multidrug (MDT), la loro resistenza è fenotipica e non deriva da mutazioni genetiche. La concentrazione minima inibente (MIC) rimane invariata o addirittura diminuisce, a differenza dei batteri resistenti. Tuttavia, persister e batteri resistenti non sono completamente separati: i persister possono favorire mutazioni che generano resistenza e sono stati identificati anche all'interno di popolazioni resistenti (Wiegand et al., 2008; Brauner et al., 2016). Oltre ai persister e ai batteri resistenti, esistono i cosiddetti batteri tolleranti, definiti come cellule capaci di sopravvivere all'esposizione antibiotica. Poiché persister e batteri tolleranti condividono caratteristiche fenotipiche, come metabolismo ridotto o bassi livelli di ATP, i due concetti sono spesso confusi (Balaban et al., 2013; Kester & Fortune, 2014; Meylan et al., 2018). Balaban et al. (2019) hanno distinto la tolleranza dalla persistenza sulla base della penetranza: la persistenza riguarda una sottopopolazione (<1%) capace di sopravvivere agli antibiotici, mentre la tolleranza riguarda l'intera popolazione. Altri studi hanno suggerito differenziazioni basate sulla crescita individuale: i batteri tolleranti sono a crescita lenta o non proliferanti, mentre i persister sono esclusivamente non proliferanti (Ronneau et al., 2021). Tuttavia, questo approccio non coglie l'eterogeneità dei persister, che include sia cellule non proliferanti (tipo I) sia a crescita lenta (tipo II) (Balaban et al., 2004). La persistenza può quindi essere considerata una forma di tolleranza fenotipica non genetica, anche se mutazioni in geni specifici, come *hipA*, contribuiscono alla formazione dei persister (Moyed & Bertrand, 1983). In definitiva, la distinzione tra persister e batteri tolleranti rimane in gran parte sfumata: i "batteri tolleranti" possono essere interpretati come persister superficiali (shallow persisters) all'interno del continuum eterogeneo dei persister, come suggerito dal modello Yin-Yang (Zhang, 2014). Storicamente, la confusione tra tolleranza e persistenza risale agli anni '70, quando la "tolleranza genotipica" fu erroneamente considerata indipendente dalla persistenza. Oggi si riconosce che sia la tolleranza fenotipica sia quella genotipica contribuiscono al fenomeno clinico della persistenza batterica, e che i persister, i batteri tolleranti e i batteri resistenti possono coesistere e

inter-convertirsi dinamicamente durante le infezioni, in linea con la traiettoria evolutiva dalla persistenza alla tolleranza e infine alla resistenza (Weigel & Dersch, 2018; Zhou et al., 2023).

#### *1.4.3. Metodi per la rilevazione delle cellule persister*

**Saggio time-kill** - La persistenza batterica indica la capacità dei batteri di sopravvivere all'esposizione a farmaci battericidi letali o a condizioni di stress. Maggiore è questa capacità di sopravvivenza, maggiore è il livello di persistenza. Il metodo classico per identificare i persister è il saggio time-kill, già utilizzato da Hobby e Bigger negli studi pionieristici del 1942 e del 1944 (Hobby et al., 1942; Bigger, 1944). Questo saggio consiste nell'esporre i batteri a una dose letale di antibiotico o a uno stress specifico e nel quantificare successivamente i batteri vitali residui mediante il conteggio delle unità formanti colonia (CFU) in diversi intervalli temporali durante l'esposizione. La capacità di persistenza viene quindi stimata in base al numero di cellule sopravvissute.

Nonostante la sua diffusione, il saggio time-kill presenta alcune limitazioni. Pur essendo noto che la persistenza si manifesta come una ridotta velocità di uccisione, il metodo non fornisce criteri per distinguere se le cellule sopravvissute siano effettivamente persister e non differenzia tra persister superficiali e profondi. Inoltre, il saggio non è in grado di rilevare persister in stato VBNC (vitali ma non coltivabili), come evidenziato negli studi più recenti (Zhang, 2014).

**Durata minima per uccidere il 99% o il 99,99% dei batteri (MDK99/MDK99.99)** - La scuola accademica guidata da Nathalie Balaban sostiene che tolleranza e persistenza siano concetti distinti. Nel 2017, Balaban e colleghi hanno introdotto la metrica MDK99 per quantificare la tolleranza batterica agli antibiotici (Brauner et al., 2017). Successivamente, nel 2019, è stata proposta la metrica MDK99.99 per valutare la capacità di persistenza delle cellule batteriche (Balaban et al., 2019). Questi approcci cercano di superare la principale limitazione del saggio time-kill, cioè l'assenza di criteri specifici, rendendo le metriche MDK un metodo promettente per rilevare le cellule persister. In

pratica, MDK99 e MDK99.99 rappresentano rispettivamente il tempo necessario per uccidere il 99% e il 99,99% dei batteri esposti a un antibiotico, suggerendo due livelli di persistenza batterica e implicando che tolleranza e persistenza differiscano più per grado che per natura.

Teoricamente, entrambe le metriche possono essere calcolate da una curva time-kill. Tuttavia, nella pratica, l'applicazione di questo approccio si è rivelata complessa. Ad esempio, studi su *E. coli* esposto a levofloxacinina hanno mostrato che la curva di uccisione nel tempo non segue un andamento matematico regolare, rendendo difficile determinare con precisione MDK99 o MDK99.99. Spesso è stato possibile stimare solo un intervallo approssimativo basato sui punti temporali disponibili, ad esempio tra 2 e 3 giorni o ore. Questo limite è stato evidenziato in studi su isolati clinici di *M. tuberculosis*, in cui MDK99 è stato utilizzato per confrontare la tolleranza agli antibiotici, ma non esistono esempi sperimentali pubblicati in cui MDK99.99 sia stato calcolato con precisione (Vijay et al., 2021). Di conseguenza, l'uso pratico dei saggi MDK richiede ulteriori validazioni sperimentali

**“ScanLag” e “ColTapp”** - Già nel 2010, Nathalie Balaban e colleghi hanno sviluppato il metodo ScanLag per *E. coli*, che consente di monitorare la distribuzione bidimensionale del tempo di latenza e della crescita di ciascuna colonia su piastre di agar (Levin-Reisman et al., 2010; Levin-Reisman et al., 2014). Successivamente, Annelies Zinkernagel ha adattato questo approccio per *S. aureus*, creando ColTapp, specifico per l'analisi dei tempi di latenza delle colonie (Bar et al., 2020).

Sia ScanLag sia ColTapp identificano i persister batterici in base ai tempi di latenza e alle dimensioni delle colonie, poiché le cellule persister tendono a mostrare tempi di latenza prolungati e colonie più piccole (Vulin et al., 2018). A differenza del saggio time-kill o del metodo MDK99.99, che forniscono misurazioni a livello di popolazione, questi approcci permettono di osservare le singole cellule persister all'interno di una popolazione batterica, superando le limitazioni dei metodi tradizionali nel riflettere l'eterogeneità fenotipica.

Inoltre, dispositivi microfluidici sono stati impiegati per rilevare singole cellule persister mediante microscopia time-lapse, offrendo ulteriori strumenti per studiare la variabilità e il comportamento dei persister a livello individuale (Balaban et al., 2004).

***Tolerance disk test (TDtest)*** - Studi in vitro hanno dimostrato che la persistenza batterica può essere indotta da fattori ambientali esterni. È importante sottolineare che la persistenza può verificarsi anche nei pazienti, contribuendo potenzialmente al fallimento del trattamento. Per questo motivo, oltre alla valutazione della suscettibilità agli antibiotici, risulta fondamentale rilevare la persistenza batterica in ambito clinico per identificare regimi terapeutici più efficaci. Il saggio di diffusione su disco di Kirby-Bauer è ampiamente utilizzato per valutare la resistenza batterica agli antibiotici, ma non è adatto a identificare i batteri persister. Nel 2016, Balaban e colleghi hanno sviluppato una versione modificata del test, chiamata Tolerance Disk (TD) test, progettata specificamente per rilevare i livelli di persistenza (Gefen et al., 2017).

Il TDtest si articola in due fasi:

1. ***Diffusione dell'antibiotico***: un disco contenente l'antibiotico viene posizionato sulla piastra di agar, formando una zona di inibizione attorno al disco dove i batteri sensibili non crescono.
2. ***Ricrescita dei batteri sopravvissuti***: il disco antibiotico viene sostituito con un disco di glucosio, che favorisce la crescita dei batteri sopravvissuti, permettendo di rilevare le cellule persister.

Sebbene il TDtest presenti vantaggi per l'uso clinico di routine come semplicità, basso costo e capacità di rilevare diversi livelli di persistenza, ha alcune limitazioni. Non consente di determinare la frequenza esatta delle cellule persister e si limita a rilevare la persistenza indotta dagli antibiotici, senza poter individuare celle persister stimulate da altri fattori di stress. Affrontare queste limitazioni sarà fondamentale nelle ricerche future per aumentare l'utilità del TDtest in ambito clinico.

***Replica plating tolerance isolation system (REPTIS)*** - Ispirandosi al TDtest, nel 2019 Matsuo e colleghi hanno sviluppato un sistema basato sulla replica plating chiamato REPTIS, progettato non solo per isolare le cellule tolleranti, ma anche per quantificarne la frequenza all'interno di una popolazione batterica (Matsuo et al., 2019).

Il metodo REPTIS si articola in due fasi principali:

1. *Esposizione all'antibiotico*: i batteri vengono incubati su una piastra madre contenente antibiotici per 72 ore.
2. *Replica e ricrescita*: le colonie che non sono cresciute sulla piastra madre, a causa della presenza dell'antibiotico, vengono trasferite su una piastra replica priva di antibiotici per ulteriori 72 ore di incubazione. La ricrescita di queste colonie indica la presenza di cellule persister.

Analogamente al TDtest, il metodo REPTIS ha potenziale applicativo in ambito clinico, ma presenta alcune limitazioni. In particolare, non consente di rilevare la persistenza indotta (triggered persistence) da specifici fattori di stress. Ulteriori studi saranno quindi necessari per sviluppare approcci in grado di identificare e caratterizzare in modo efficace le cellule persister in diverse condizioni stressanti nel contesto clinico.

Per i persister nello stato **VBNC** (vitali ma non coltivabili), è possibile utilizzare metodi non colturali per valutare la vitalità batterica. Questi batteri possiedono una membrana cellulare integra e possono essere analizzati con saggi di vitalità come LIVE/DEAD™ (Oliver, 2010; Wideman et al., 2021). Anche la RT-PCR rappresenta un approccio valido per il rilevamento dei VBNC, selezionando geni marker specifici o regioni geniche associate alla specie batterica di interesse. Ad esempio: l'mRNA dei geni del lipopolisaccaride rfbE e della flagellina fliC è stato utilizzato per rilevare lo stato VBNC di *E. coli* O157:H7 (Yaron & Matthews, 2002); il gene VCA0656, correlato alla proteina aminoimidazole riboside kinase, è stato impiegato come marker per *Vibrio cholerae* (Casasola-Rodríguez et al., 2018); mentre i geni housekeeping 16S-23S rDNA e rpoS si sono dimostrati efficaci per valutare la vitalità di *Vibrio parahaemolyticus* (Coutard et al., 2005). Oltre alla RT-PCR, la PCR digitale a gocce (ddPCR) rappresenta un'alternativa efficace per la quantificazione dei geni a singola copia, dimostrandosi più sensibile e precisa rispetto alla qPCR tradizionale (Zhao et al., 2021). In sintesi, i metodi di rilevazione dei persister sono progettati in base alle caratteristiche specifiche delle cellule e ciascuno presenta vantaggi e limitazioni. Ad esempio, il TDtest offre un grande potenziale per l'applicazione clinica grazie alla sua capacità di valutare diversi livelli di tolleranza, mentre approcci come il saggio time-kill, MDK99.99 e REPTIS risultano più

laboriosi, limitandone l'uso routinario. Metodi come ScanLag e ColTapp permettono di analizzare l'eterogeneità delle cellule persister a livello di singola colonia, ma richiedono attrezzature specializzate e personale qualificato. Pertanto, è ancora necessario sviluppare strumenti più completi, flessibili e facilmente applicabili per favorire il rilevamento routinario dei persister in contesti clinici.

#### *1.4.4. Meccanismi molecolari della formazione e della sopravvivenza dei persister.*

Lo studio dei meccanismi molecolari alla base della formazione e della sopravvivenza dei persister è complesso, a causa delle loro caratteristiche intrinseche, quali eterogeneità, natura relativa, transitorietà e numero ridotto. Attualmente, esistono principalmente due approcci per identificare i geni associati alla persistenza:

1. *Screening di librerie geniche:* Questo approccio utilizza librerie di knockout di singoli geni, librerie di sovraespressione o librerie di inserzione di trasposoni (Hu & Coates, 2005; Molina-Quiroz et al., 2016; Hansen et al., 2008; Girgis et al., 2012; Cameron et al., 2018; Baba et al., 2006). In prima istanza, si individuano batteri con capacità di persistenza ridotta o aumentata, quindi si conferma il gene coinvolto tramite PCR e sequenziamento. I geni identificati fino ad oggi includono fattori regolatori globali come *phoU* (Li & Zhang, 2007), *dksA*, *dnaK*, *hupAB* (Hansen et al., 2008) e *ihfAB* (Nicolau & Lewis, 2022), nonché geni legati al metabolismo energetico come *sucB* e *ubiF* (Ma et al., 2010). Questi dati suggeriscono che la persistenza batterica non dipenda da un singolo gene o da una singola via metabolica.
2. *Selezione dei persister per analisi trascrittomica:* Un metodo consiste nel trattare i batteri con antibiotici battericidi, come i beta-lattamici, uccidendo le cellule metabolicamente attive e sottoponendo i persister rimanenti al sequenziamento del trascrittoma (Keren et al., 2004; Keren et al., 2011). Tuttavia, la lisi dei batteri circostanti modifica l'ambiente dei persister, influenzandone l'espressione genica. Un'alternativa più raffinata prevede l'uso di batteri fluorescenti contenenti GFP degradabile sotto il controllo di un promotore ribosomiale: tramite

citofluorimetria o selezione con biglie magnetiche, si isolano le cellule con fluorescenza bassa (indicativa di bassa attività di traduzione, quindi persister) per l'analisi trascrittomico (Shah et al., 2006; Shan et al., 2017). Anche questo approccio ha limitazioni, poiché il trasferimento in un nuovo mezzo può indurre la ripresa metabolica, riducendo temporaneamente la capacità di persistenza.

Il sequenziamento trascrittomico ha evidenziato geni down-regolati correlati alla biosintesi (atpA, fdxC) e geni up-regolati legati a sistemi di tossina-antitossina (relBE, mazEF, dinJ, yafQ, ygiU) (Keren et al., 2011; Lewis, 2010). Studi più recenti hanno utilizzato l'evoluzione in laboratorio e il sequenziamento genomico completo per identificare nuovi geni della persistenza, come atl (autolisina bifunzionale) (Chung et al., 2018), nuoAHJKLMN (NADH/ubichinone ossidoreduttasi transmembrana) (Van den Bergh et al., 2022), gadC (sistema di resistenza agli acidi di *E. coli*) e oppB (componenti di membrana integrali) (Van den Bergh et al., 2016).

La maggior parte dei dati deriva dallo studio di *E. coli*, *S. aureus* e *M. tuberculosis*, ma i meccanismi di formazione dei persister mostrano un certo grado di conservazione tra specie diverse, suggerendo fenomeni di evoluzione convergente (Zhang, 2014). Inoltre, diversi stati di persister dello stesso batterio come, persister della fase stazionaria, SCV, batteri in forma L, VBNC o persister del biofilm, condividono geni e vie metaboliche simili e spesso sovrapposti (Zhang, 2014; Glover et al., 2009; Ayrapetyan et al., 2015; Bollen et al., 2021). Molti geni e meccanismi coesistono nella stessa cellula persister, con ruoli additivi o ridondanti.

Di seguito verranno descritti i principali geni e le vie metaboliche associate alla persistenza batterica.

### *Moduli tossina-antitossina (moduli TA)*

I moduli tossina-antitossina (TA) sono costituiti da coppie di geni che codificano rispettivamente una tossina e la sua antitossina e sono ampiamente distribuiti sia nei plasmidi sia nei genomi di batteri e archei (Hayes & Van Melderen, 2011; Unterholzner et al., 2013; Kedzierska & Hayes, 2016). Le tossine sono generalmente proteine stabili che interferiscono con processi cellulari essenziali, come la replicazione del DNA o la

traduzione proteica. Le antitossine, invece, possono essere proteine instabili oppure RNA e hanno la funzione di neutralizzare l'attività della tossina. In condizioni di stress, i batteri possono attivare le tossine attraverso la degradazione delle antitossine (Harms et al., 2018). I moduli TA vengono classificati in base alla natura dell'antitossina e al meccanismo attraverso cui essa inibisce la tossina. Tra i sistemi più studiati nel contesto della formazione delle cellule persister vi sono i moduli di tipo I e di tipo II (Page & Peti, 2016; Singh et al., 2021; Gerdes & Maisonneuve, 2012; Ronneau & Helaine, 2019).

Il primo gene associato al fenomeno della persistenza è stato *hipA*, che codifica per la tossina HipA e forma, insieme all'antitossina HipB, il modulo HipBA. Tuttavia, il suo ruolo nella persistenza non è stato ancora completamente chiarito. È stato proposto che la tossina HipA agisca fosforilando il sito attivo della glutamil-tRNA sintetasi (GltX), determinandone l'inattivazione (Germain et al., 2013). Questo processo porta all'accumulo di tRNA non caricati nel sito A del ribosoma, attivando la sintesi di (p)ppGpp mediata da RelA e favorendo così un elevato livello di persistenza (Germain et al., 2013). Studi successivi hanno suggerito che la persistenza indotta da HipA possa dipendere non solo da (p)ppGpp, ma anche da altri fattori, tra cui moduli TA che codificano 10 mRNasi, il polifosfato e la proteasi Lon (Germain et al., 2015). Tuttavia, quattro anni dopo la pubblicazione di questo lavoro, gli autori hanno riconosciuto che il contributo attribuito al polifosfato era in realtà un artefatto sperimentale dovuto a una lisogenizzazione involontaria con un batteriofago (Germain et al., 2019). Di conseguenza, il legame tra polifosfato e il sistema HipBA nella formazione dei persister non è più considerato valido. Più recentemente è stato dimostrato che HipA può promuovere la persistenza non solo attraverso GltX, ma anche tramite altri bersagli cellulari, tra cui l'aminoacil-tRNA sintetasi TrpS (Huang et al., 2020), il regolatore negativo dell'inizio della replicazione SeqA, il fattore trascrizionale RcsB e la proteina ribosomiale della subunità 30S RpsI (Semanjski et al., 2018). Oltre a *hipBA*, diversi altri moduli TA sono stati associati alla formazione delle cellule persister. Tra questi vi sono *relBE* (tossina RelE) (Singh et al., 2010; Korch et al., 2015), *mazEF* (tossina MazF) (Tripathi et al., 2014), *dinJ-yafQ* (tossina YafQ) (Hu et al., 2015; Harrison et al., 2009), *mqsRA* (tossina MqsR) (Sun et al., 2017; Kwan et al., 2015), *ccdAB* (tossina CcdB) (Tripathi et al., 2012), *tisAB*

(tossina TisB) (Wagner & Unoson, 2012; Dörr et al., 2010; Su et al., 2022), yefM-yoeB (tossina YoeB) (Ma et al., 2021) e tacAT (tossina TacT) (Cheverton et al., 2016), oltre ad altri sistemi descritti in letteratura (Fasani & Savageau, 2013; Paul et al., 2019; Wiradiputra et al., 2022; Curtis et al., 2017). La maggior parte di questi appartiene ai moduli TA di tipo II, tra cui hipBA, relBE, mazEF, dinJ-yafQ, tacAT e yefM-yoeB (Curtis et al., 2017; Holden & Errington, 2018; Goormaghtigh et al., 2018), mentre gli altri rientrano nei moduli TA di tipo I. L'attivazione dei moduli TA porta spesso all'accumulo di tossine libere, che possono determinare un'inibizione batteriostatica della crescita e favorire la tolleranza agli antibiotici (Verstraeten et al., 2015; Maisonneuve et al., 2011). Tuttavia, i meccanismi di attivazione dei sistemi TA di tipo I e di tipo II sono differenti. Nei moduli di tipo II, le antitossine sono proteine che vengono generalmente degradate dalle proteasi ClpP o Lon in risposta alla segnalazione mediata da (p)ppGpp (Tripathi et al., 2014; Holden & Errington, 2018; Goormaghtigh et al., 2018; Maisonneuve et al., 2013; Donegan et al., 2010). Nei moduli TA di tipo I, invece, le antitossine sono RNA antisenso e la loro attivazione è regolata dalla risposta SOS e dalla segnalazione di (p)ppGpp (Dörr et al., 2010; Verstraeten et al., 2015). Le tossine di tipo II promuovono l'ingresso dei batteri nello stato di persistenza attraverso diversi meccanismi (Fernández de Henestrosa et al., 2000; McKenzie et al., 2003; Courcelle et al., 2001; Motiejūnaitė et al., 2007). In particolare, esse agiscono principalmente come inibitori della replicazione e della traduzione (Winther et al., 2016). Alcune tossine interferiscono con la DNA girasi, determinando l'inibizione della replicazione del DNA (ad esempio HipA). Altre funzionano come endonucleasi dell'mRNA, sia ribosoma-dipendenti (come la famiglia RelE) sia ribosoma-indipendenti (come la famiglia MazF) (Page & Peti, 2016; Gerdes & Maisonneuve, 2012), interrompendo così il processo di traduzione. Inoltre, alcune tossine di tipo II, tra cui HipA (Germain et al., 2013) e TacT (Cheverton et al., 2016; Rycroft et al., 2018; Yashiro et al., 2021), possono rispettivamente inattivare la glutamyl-tRNA sintetasi (GltX) o acetilare il tRNA. Le tossine di tipo I, invece, sono generalmente piccole proteine, come TisB e HokB, che si inseriscono nella membrana batterica formando pori e causando la perdita della forza proton-motrice (PMF) e della produzione di ATP (Berghoff et al., 2017). L'attivazione dei moduli TA e il conseguente accumulo di

tossine sono quindi stati collegati alla formazione delle cellule persister (Keren et al., 2011; Vazquez-Laslop et al., 2006; Walter et al., 2015), uno stato fisiologico in cui una sottopopolazione batterica entra in una condizione dormiente e mostra una maggiore tolleranza agli antibiotici e ad altri stress (Shah et al., 2006).

Diversi studi hanno dimostrato che la sovraespressione dei geni delle tossine può aumentare la persistenza batterica (Keren et al., 2004; Correia et al., 2006; Kaspary et al., 2013; Schumacher et al., 2009). Tuttavia, l'eliminazione di singoli moduli TA non sembra influenzare significativamente i livelli di persister, mentre la delezione simultanea di 10 o più moduli TA determina una riduzione della tolleranza agli antibiotici (Maisonneuve et al., 2011; Shan et al., 2015). Questo fenomeno può essere spiegato dalla notevole abbondanza e ridondanza dei sistemi TA nei batteri. Ad esempio, *Escherichia coli* possiede almeno 15 moduli TA, mentre *Mycobacterium tuberculosis* ne presenta almeno 80, molti dei quali risultano altamente espressi in condizioni di stress. In questi casi, la perdita di un singolo gene può essere compensata da altri sistemi TA, mentre l'eliminazione simultanea di più moduli porta a una riduzione della persistenza batterica (Tsilibaris et al., 2007). Proprio a causa di questa ridondanza, lo sviluppo di nuovi farmaci anti-persister diretti contro i sistemi TA rappresenta una sfida. Tuttavia, studi recenti hanno dimostrato che l'inibizione della tossina HipA può interferire con la formazione delle cellule persister (Li et al., 2016), suggerendo che l'interferenza con i moduli tossina-antitossina potrebbe avere potenziali applicazioni terapeutiche nel trattamento delle infezioni batteriche. È inoltre importante sottolineare che alcuni batteri, come *Borrelia burgdorferi* e *Staphylococcus aureus*, presentano cellule persister, ma *B. burgdorferi* non possiede moduli TA e, nel caso di *S. aureus*, tali moduli non sembrano svolgere un ruolo nella persistenza (Feng et al., 2015). Questo suggerisce che i sistemi TA non rappresentino il principale determinante della persistenza batterica, nonostante siano stati tra i primi sistemi identificati come coinvolti in questo fenomeno (Moyed & Bertrand, 1983). Pertanto, sono necessari ulteriori studi per chiarire con precisione il ruolo dei diversi moduli TA nelle varie forme di persistenza batterica.

*Metabolismo e regolazione metabolica*

Il metabolismo energetico svolge un ruolo fondamentale nella formazione delle cellule persister. Poiché i persister si trovano in uno stato dormiente, i loro processi metabolici risultano notevolmente rallentati o addirittura arrestati (Di Pietro et al., 2013). Di conseguenza, diversi geni coinvolti nel metabolismo cellulare sono stati associati alla formazione di queste cellule. Tra questi vi sono *sucB*, che codifica la subunità E2 del complesso dell' $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi (Ma et al., 2010), e *sucC* e *sucD*, che codificano la succinil-CoA sintetasi (Shan et al., 2015), enzimi appartenenti al ciclo dell'acido tricarbossilico (TCA). All'interno del ciclo TCA, sia il complesso dell' $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi sia la succinil-CoA sintetasi svolgono funzioni cruciali nel metabolismo cellulare, in particolare nella produzione di energia. L' $\alpha$ -chetoglutarato deidrogenasi catalizza la conversione dell' $\alpha$ -chetoglutarato in succinil-CoA ( $2\text{-ossoglutarato} + \text{NAD}^+ + \text{CoA-SH} \rightarrow \text{succinil-CoA} + \text{NADH} + \text{H}^+ + \text{CO}_2$ ), mentre la succinil-CoA sintetasi converte il succinil-CoA in succinato e CoA ( $\text{succinil-CoA} + \text{GDP} + \text{Pi} \rightarrow \text{succinato} + \text{GTP} + \text{CoA}$ ). Studi hanno dimostrato che l'interruzione dei geni *sucB*, *sucC* e *sucD*, responsabili degli enzimi che catalizzano la conversione dall' $\alpha$ -chetoglutarato al succinato, comporta una riduzione dei livelli di persistenza batterica (Ma et al., 2010; Shan et al., 2015). Al contrario, la disattivazione del gene *acnB*, che codifica l'aconitasi coinvolta nella conversione del citrato in isocitrato, è stata associata a un aumento della capacità di persistenza (Shan et al., 2015).

Anche le variazioni nell'attività della catena respiratoria influenzano i livelli di persister. In questo sistema, l'ubichinone accetta due elettroni e due protoni dal citosol formando ubichinolo, svolgendo così un ruolo essenziale nella produzione di ATP e nel mantenimento del potenziale di membrana. Il gene *ubiF* è fondamentale per la biosintesi aerobica dell'ubichinone (Kwon et al., 2000). È stato osservato che un ceppo knockout di *ubiF* risulta più sensibile agli antibiotici e presenta livelli ridotti di persistenza rispetto al ceppo wild-type (Ma et al., 2010; Martini et al., 2022).

La respirazione aerobica batterica è strettamente legata all'attività del NADH. L'inattivazione delle NADH deidrogenasi I (*nuoI*) e II (*ndh*) riduce la quantità di NAD ossidato ( $\text{NAD}^+$ ) e la forza proton-motrice (PMF). Questa condizione ostacola l'ingresso

nelle cellule degli aminoglicosidi carichi positivamente, riducendone l'effetto battericida e favorendo quindi la sopravvivenza dei batteri, aumentando la capacità di persistenza (Allison et al., 2011). Inoltre, quando *Staphylococcus aureus* entra nella fase stazionaria, il livello intracellulare di ATP diminuisce, causando una riduzione dell'attività di bersagli antibiotici ATP-dipendenti come DNA girasi, DNA topoisomerasi e RNA polimerasi. In queste condizioni i batteri mantengono soltanto funzioni fisiologiche minime, con un conseguente aumento della capacità di persistenza (Conlon et al., 2016). Pertanto, anche la concentrazione intracellulare di ATP rappresenta un fattore determinante nella formazione dei persister. Un ulteriore aspetto coinvolto nella persistenza riguarda il metabolismo del glicerolo-3-fosfato in *Escherichia coli*. In questo processo, la glicerolo chinasi GlpK catalizza la conversione del glicerolo in glicerolo-3-fosfato (G3P); la G3P acetiltransferasi PlsB catalizza la prima fase della sintesi dei fosfolipidi (G3P → 1-acil-G3P); mentre la G3P deidrogenasi GlpD converte G3P in diidrossiacetone fosfato (DHAP) in condizioni aerobiche. È stato dimostrato che la sovraespressione di GlpD aumenta la tolleranza di *E. coli* agli antibiotici ampicillina e ofloxacina, mentre un mutante con delezione del gene *glpD* mostra una riduzione dei persister nella fase stazionaria (Spoering et al., 2006). Il mutante *plsB* presenta una capacità di persistenza da 100 a 1000 volte inferiore rispetto al ceppo wild-type; tuttavia, nei persister i livelli di mRNA di *plsB* non risultano diversi da quelli dei batteri metabolicamente attivi (Spoering et al., 2006). Questo suggerisce che *plsB* possa essere coinvolto nel processo di ingresso nello stato di persistenza, ma non nel mantenimento di tale stato. La glicerolo chinasi GlpK, che consente l'ingresso del glicerolo nel metabolismo glucidico attraverso la formazione di G3P, è stata anch'essa associata alla formazione di persister, alla comparsa di batteri in forma L e alla formazione di biofilm in *Staphylococcus aureus* (Han et al., 2015). Inoltre, studi recenti hanno evidenziato che il gene *glpK* in *Mycobacterium tuberculosis* è collegato alla tolleranza ai farmaci antitubercolari (Safi et al., 2019), rafforzando l'ipotesi di un ruolo di GlpK nella formazione dei persister e nella risposta allo stress. Un ulteriore enzima coinvolto nel metabolismo energetico è la decarbossilasi dell'aspartato, codificata dal gene *panD*, che catalizza la conversione della L-aspartato in β-alanina. Questo enzima rappresenta un passaggio chiave nel

metabolismo del pantotenato e nella sintesi dell'acetil-CoA, processi essenziali per il metabolismo energetico e per la sintesi degli acidi grassi. Diversi studi hanno indicato che la decarbossilasi PanD costituisce un bersaglio della pirazinamide (PZA), suggerendo che questo antibiotico possa eliminare i persister inibendo PanD e compromettendo la sintesi dell'acetil-CoA e il metabolismo energetico (Shi et al., 2014; Zhang et al., 2013; Sun et al., 2020). Infine, nel caso di *Mycobacterium tuberculosis*, anche il fattore di trascrizione prpR, che regola l'operone prpDC coinvolto nel metabolismo energetico, è stato associato alla persistenza (Hicks et al., 2018). Le proteine codificate dai geni prpD e prpC catalizzano le prime due reazioni del ciclo del metilcitrato (MCC), che converte il propionil-CoA in piruvato, mentre prpR ne regola l'espressione. Di conseguenza, mutazioni nel gene prpR possono alterare il metabolismo energetico e influenzare la capacità di persistenza di *M. tuberculosis*.

*Trans-traduzione e sistemi di degradazione proteica.* La trans-traduzione è un processo presente nella maggior parte dei batteri e svolge un ruolo fondamentale nel recupero dei ribosomi bloccati durante la traduzione e nell'eliminazione di proteine potenzialmente tossiche generate da mRNA difettosi (Keiler, 2008; Kurita et al., 2007; Shpanchenko et al., 2010; Campos-Silva et al., 2021). Questo meccanismo è particolarmente importante per la sopravvivenza batterica in condizioni di stress (Thibonnier et al., 2008; Muto et al., 2000). Alcuni studi hanno dimostrato che uno dei meccanismi d'azione della pirazinamide (PZA), un farmaco attivo contro le cellule persister, consiste nell'inibizione della trans-traduzione e dei processi di degradazione proteica attraverso il legame con la proteina ribosomiale batterica S1 (RpsA). Questo risultato suggerisce che tali processi siano coinvolti nella formazione e nel mantenimento dello stato di persistenza (Shi et al., 2011). A supporto di questa ipotesi, studi successivi condotti su mutanti di *Escherichia coli* con difetti nei componenti della trans-traduzione *ssrA* e *smpB* hanno mostrato una significativa riduzione della capacità di persistenza nei confronti di diversi antibiotici e condizioni di stress (Li et al., 2013). Questi dati confermano l'importanza della trans-traduzione e della degradazione proteica nella fisiologia delle cellule persister.

Un altro sistema chiave coinvolto nella risposta allo stress batterico è il sistema proteasico Clp, che svolge un ruolo essenziale nella sopravvivenza in condizioni ambientali sfavorevoli (Meyer & Baker, 2011; Illigmann et al., 2021; Ju et al., 2021). In questo contesto, le proteine danneggiate vengono riconosciute come substrati e degradate, mentre numerosi regolatori della risposta allo stress sono controllati tramite proteolisi mediata da Clp (Frees et al., 2007). Il complesso proteasico Clp funzionale è costituito da una Clp-ATPasi esamerica, che utilizza ATP per l'attività di unfolding e traslocazione delle proteine, associata al core proteolitico ClpP a struttura cilindrica. Nei batteri sono presenti diverse Clp-ATPasi, tra cui ClpC, ClpX, ClpA e ClpE, tutte in grado di interagire con il core proteolitico ClpP (Frees et al., 2007; Olivares et al., 2016).

Mutazioni nei geni *clpC* o *clpP* sono state associate sia alla resistenza alla PZA in *Mycobacterium tuberculosis* (Zhang et al., 2017; Modlin et al., 2021) sia alla formazione di persisters in *Staphylococcus aureus* (Springer et al., 2016; Tian et al., 2019), evidenziando il ruolo della degradazione proteica nella persistenza batterica. Inoltre, la riduzione dei livelli di ATP rappresenta un fattore chiave che favorisce la formazione di aggregati proteici; il grado di aggregazione proteica è stato proposto come indicatore della profondità dello stato dormiente (Pu et al., 2019). Il sistema DnaK–ClpB contribuisce alla disaggregazione e alla degradazione di tali aggregati, e alterazioni nella funzione di questi geni influenzano la capacità dei persisters di uscire dallo stato dormiente (Pu et al., 2019). Questi risultati rafforzano ulteriormente il legame tra sistemi di degradazione proteica e persistenza batterica. Un altro elemento rilevante è rappresentato dall'antibiotico acildepsipeptidico ADEP4, che attiva la proteasi ClpP inducendo un'attività proteolitica non specifica e la conseguente degradazione di oltre 400 proteine cellulari. Tra queste sono state identificate diverse proteine ribosomiali, tra cui S21, L9 e S1, il fattore di riciclo ribosomiale, oltre alla proteina FtsZ e a numerose proteine coinvolte in processi metabolici fondamentali, come il metabolismo delle purine, la glicolisi e la biosintesi degli aminoacil-tRNA (Conlon et al., 2013). ClpP svolge inoltre un ruolo cruciale nella regolazione proteolitica dei livelli cellulari delle antitossine MazE e RelB nei sistemi tossina–antitossina di tipo II di *Streptococcus mutans* (Donegan et al., 2010; Tian et al., 2019; Karimaei et al., 2024), suggerendo che questa proteasi partecipi anche alla

degradazione delle antitossine. Tale meccanismo potrebbe rappresentare una delle modalità attraverso cui ClpP contribuisce alla formazione delle cellule persister.

È stato inoltre dimostrato che la combinazione di ADEP4 con rifampicina è in grado di eliminare completamente le cellule persister presenti nei biofilm di *Staphylococcus aureus*, sia in vitro sia in vivo (Conlon et al., 2013). Gli effetti anti-persister della PZA, che agisce su ClpC1, insieme a quelli di ADEP4, che bersaglia ClpP, indicano che la via della degradazione proteica rappresenta un promettente bersaglio terapeutico per lo sviluppo di nuovi farmaci anti-persister (Moreno-Cinos et al., 2015).

*Metabolismo delle purine e degli amminoacidi e regolatori metabolici.* Il metabolismo delle purine e degli amminoacidi svolge un ruolo fondamentale nella formazione e nella sopravvivenza delle cellule batteriche persister. Le purine sono componenti essenziali di molecole chiave come DNA, RNA e ATP e partecipano a numerosi processi cellulari. Alterazioni nel metabolismo delle purine sono state associate alla formazione di cellule persister in diversi batteri, tra cui *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Aeromonas veronii* e *Vibrio splendidus* (Kwan et al., 2013; Le et al., 2021; Li et al., 2023). Analogamente, è stato dimostrato che le purine sono determinanti per la persistenza di *Enterococcus faecalis* in vivo, ad esempio nelle infezioni del tratto urinario e nelle infezioni delle ferite (Zhao et al., 2021). Attraverso lo screening di librerie di mutanti genetici, è stato osservato che diversi geni coinvolti nel metabolismo delle purine, tra cui *purB*, *purM* e *purN*, partecipano alla persistenza di *S. aureus* in risposta ad antibiotici e condizioni di stress (Raivio & Silhavy, 1997; Richard & Foster, 2007). Inoltre, analisi di microarray condotte su ceppi persistenti di *S. aureus* meticillino-resistente (MRSA) hanno mostrato una maggiore trascrizione di numerosi geni della via metabolica delle purine, tra cui *purF*, *purM* e *purN*, rispetto alle cellule non persistenti (Kwan et al., 2013). Il coinvolgimento del metabolismo delle purine nella persistenza batterica è legato a diversi meccanismi cellulari, tra cui il metabolismo energetico, la formazione di aggregati proteici (aggregati) e i sistemi di efflusso intracellulare (Li et al., 2023). Una riduzione dell'attività di questa via metabolica è stata infatti associata a una diminuzione della produzione di ATP, con conseguente riduzione dell'attività di bersagli antibiotici ATP-

dipendenti (Shan et al., 2017; Conlon et al., 2016; Niu et al., 2023). Inoltre, la riduzione del metabolismo delle purine è stata collegata alla formazione di aggresomi proteici e alla diminuzione del potenziale di membrana (Li et al., 2023). Quest'ultima condizione comporta una minore accumulazione intracellulare di antibiotici rispetto alle cellule metabolicamente attive, favorendo la sopravvivenza batterica durante il trattamento antimicrobico (Yee et al., 2019). Anche alcuni nucleosidi purinici, come adenosina, guanosina e inosina, sembrano svolgere un ruolo nella modulazione della persistenza batterica (Yan et al., 2021; Goode et al., 2021). In particolare, adenosina e guanosina sono state in grado di ripristinare la sensibilità delle cellule persister di *V. splendidus* alla tetraciclina (Yan et al., 2021). L'inosina, invece, è stata associata a un aumento della permeabilità di membrana attraverso l'induzione dell'espressione della porina OmpF (Biase & Pennacchietti, 2012). Questo processo avviene tramite l'attivazione della chinasi sensoriale CpxA, che porta alla defosforilazione del sistema CpxRP e alla successiva induzione della trascrizione di *ompF* (Foster, 2004), aumentando così l'ingresso delle molecole antimicrobiche nella cellula. Complessivamente, questi dati suggeriscono che il metabolismo delle purine sia inversamente correlato alla formazione delle cellule persister. Anche il metabolismo degli amminoacidi contribuisce in modo significativo alla crescita e alla sopravvivenza batterica, inclusa la persistenza. Nei batteri persistenti, tale metabolismo può subire modificazioni per consentire l'adattamento a condizioni ambientali stressanti. In particolare, sono stati osservati cambiamenti nei sistemi di trasporto degli amminoacidi che permettono ai batteri di acquisirli più efficientemente dall'ambiente circostante (Biase et al., 1999; Welsh, 2000; Lindgren et al., 2014).

Tra gli amminoacidi maggiormente coinvolti nei meccanismi di persistenza spiccano il glutammato e l'arginina. Il glutammato è centrale in numerosi processi metabolici batterici. Il trasportatore GadC, ad esempio, è stato inizialmente identificato come regolatore della tolleranza agli acidi in *Escherichia coli* (Biase et al., 1999). Diversi geni correlati al metabolismo e al trasporto del glutammato, tra cui *gltT*, *gadC*, *gltS*, *gltP* e *gltI*, sono stati associati alla persistenza batterica (Welsh, 2000; Lindgren et al., 2014). La delezione di alcuni di questi geni (*gltS*, *gltP* e *gltI*) ha comportato una riduzione della tolleranza a vari tipi di stress, come antibiotici, pH acido, iperosmosi e temperature

elevate, sia in *E. coli* sia in ceppi uropatogeni della stessa specie (Welsh, 2000). Inoltre, il regolatore globale Fis è stato associato alla formazione di cellule persister in *Salmonella typhi*, dove reprime l'espressione dei geni coinvolti nel trasporto del glutammato (Wortham et al., 2007). È stato anche osservato che cellule di *E. coli* tolleranti agli antibiotici aumentano l'espressione della glutammato decarbossilasi GadA per contrastare l'acidificazione intracellulare (Steed & Wanner, 1993), evidenziando ulteriormente il ruolo del glutammato nella persistenza batterica.

Il glutammato può favorire la tolleranza a antibiotici e stress attraverso diversi meccanismi. In primo luogo, il sistema di resistenza agli acidi dipendente dal glutammato rappresenta uno dei principali sistemi di difesa batterici in ambienti a basso pH (Namugenyi et al., 2017; Foster, 2004; Biase et al., 1999). In secondo luogo, il glutammato e il suo derivato GABA possono agire come soluti compatibili, stabilizzando enzimi e strutture cellulari e proteggendo le cellule da stress ambientali quali alte temperature, cicli di congelamento-scongelo e disidratazione (Welsh, 2000). Infine, la glutammato deidrogenasi catalizza la conversione del glutammato in  $\alpha$ -cheto-glutarato, permettendo l'ingresso di questo metabolita nel ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) e contribuendo così al metabolismo energetico cellulare (Lindgren et al., 2014).

Oltre al glutammato, anche l'arginina è stata implicata nei meccanismi di persistenza batterica. Studi di screening genetico condotti sul ceppo clinicamente rilevante USA300 hanno evidenziato l'importanza del gene *argJ* nella formazione dei persister, nella sopravvivenza e nella virulenza in modelli animali come topi e *Caenorhabditis elegans* (Yee et al., 2020; Richard & Foster, 2007; Lindgren et al., 2014). Mutazioni nel sito attivo della proteina ArgJ determinano infatti un difetto nella formazione dei persister, che può essere ripristinato mediante complementazione genetica o supplementazione di arginina nel mutante *argJ* (Yee et al., 2020). Inoltre, analisi RT-PCR quantitative hanno mostrato un aumento dell'espressione dei geni dell'operone *arg* in condizioni di stress farmacologico e durante la fase stazionaria di crescita. Sebbene il ruolo della biosintesi dell'arginina nella persistenza sia stato dimostrato, i meccanismi molecolari alla base di questo fenomeno non sono ancora completamente chiariti. Una possibile spiegazione è che prodotti derivati dal metabolismo dell'arginina, come l'ammoniaca, possano

neutralizzare i radicali idrossilici generati dall'azione degli antibiotici e contribuire alla neutralizzazione dell'ambiente acido (Lindgren et al., 2014). Inoltre, molecole come l'ornitina e le poliamine sono state associate a un miglioramento della fitness cellulare e della resistenza alle specie reattive dell'ossigeno (Wortham et al., 2007). Infine, anche i regolatori metabolici globali sono strettamente associati alla formazione delle cellule persister. Tra questi, il gene *phoU*, localizzato nell'operone *pstSCAB* del sistema di trasporto del fosfato, agisce come regolatore negativo del metabolismo del fosfato in *E. coli* (Steed & Wanner, 1993). Lo screening di librerie di mutanti con trasposone ha mostrato che il mutante *phoU* presenta un marcato difetto di persistenza nei confronti di diversi antibiotici e condizioni di stress, come carenza nutrizionale, temperature elevate e acidità. Questo mutante presenta inoltre una maggiore attività metabolica rispetto al ceppo parentale, caratterizzata da un'elevata espressione di geni coinvolti nel metabolismo energetico, nel metabolismo del fosfato e nella sintesi dei flagelli (Li & Zhang, 2007). Questi risultati suggeriscono che PhoU agisca come regolatore globale negativo, favorendo la formazione delle cellule persister attraverso la riduzione dell'attività metabolica batterica. Il suo ruolo nella persistenza è stato confermato anche in altre specie batteriche, tra cui *Mycobacterium tuberculosis*, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. In *M. tuberculosis*, ad esempio, la mutazione della proteina PhoY, omologa di PhoU, riduce significativamente la persistenza sia in vitro sia in vivo (Shi & Zhang, 2010; Namugenyi et al., 2017). In *S. aureus*, invece, la mutazione di *phoU* determina l'up-regolazione di geni coinvolti nel metabolismo del carbonio e del piruvato e la down-regolazione di geni di virulenza (Shang et al., 2020), rafforzando l'ipotesi che PhoU agisca come regolatore globale della persistenza batterica. Oltre a PhoU, anche altri regolatori globali partecipano alla regolazione della persistenza batterica. Studi condotti su *E. coli* hanno mostrato che il knockout del gene dell'Integration Host Factor (*ihf*) determina un aumento dei livelli intracellulari di ATP e una riduzione della persistenza (Nicolau & Lewis, 2022). Analogamente, l'analisi di diversi regolatori trascrizionali globali tra cui ArcA, Cra, CRP, DksA, FNR, Lrp e RpoS, ha evidenziato un ruolo centrale del sistema cAMP/CRP nella formazione delle cellule persister (Mok et al., 2015). Più recentemente, è stato dimostrato che anche la proteina legante l'RNA ProQ contribuisce alla formazione

dei persister in *Salmonella*, attivando processi cellulari ad alto consumo energetico (Rizvanovic et al., 2022).

### *Risposte allo stress mediate da SOS e dal fattore sigma RpoS*

La risposta SOS viene attivata in seguito a danni al DNA e consente la riparazione del materiale genetico, aumentando così la sopravvivenza cellulare (Baharoglu & Mazel, 2014). Questo sistema è regolato principalmente da due proteine: il repressore trascrizionale LexA e l'attivatore RecA, che lega il DNA. La rimozione del gene *recA* comporta una significativa riduzione della persistenza di *E. coli* nei confronti della ciprofloxacina, mentre non influisce sulla tolleranza a penicillina e gentamicina. Ciò si spiega con il fatto che i chinoloni inducono rotture del DNA batterico, attivando la risposta SOS e i relativi geni di riparazione (Drlica et al., 2008).

Questo fenomeno evidenzia come batteri esposti a differenti antibiotici possano attivare specifici set genetici coinvolti nella formazione delle cellule persister. Studi di screening su librerie di knockout genici hanno infatti mostrato che mutazioni in altri geni associati alla risposta SOS, come *recC*, *ruvA* e *uvrD*, compromettono la capacità di persistenza anche in presenza di rifampicina e tetraciclina (Cui et al., 2018). Inoltre, l'attivazione della risposta SOS aumenta la frequenza delle small colony variants (SCV), una particolare forma di persister, in *Staphylococcus aureus* (Vestergaard et al., 2015). Nel complesso, questi risultati indicano che la risposta SOS e i meccanismi di riparazione del DNA sono strettamente coinvolti sia nella formazione sia nella sopravvivenza delle cellule persister. Oltre al ruolo nella riparazione del DNA, la risposta SOS attiva anche moduli tossina-antitossina (TA), come il sistema di tipo I TisB/IstR (Dörr et al., 2010). In questo contesto, l'induzione di *tisB* porta alla formazione di canali ionici nella membrana plasmatica, con conseguente riduzione della forza proton-motrice e della produzione di ATP, favorendo così lo stato di persistenza (Berghoff et al., 2017; Podlesek & Žgur Bertok, 2020). La risposta SOS può inoltre incrementare l'espressione di proteine coinvolte nell'adesione, come quelle leganti la fibronectina, promuovendo l'interazione con le cellule ospiti e accelerando la formazione di biofilm (Dörr et al., 2009). Questo contribuisce a migliorare la sopravvivenza batterica in condizioni ambientali avverse. Un

ulteriore effetto rilevante è la promozione del trasferimento genico orizzontale, osservata ad esempio in *Vibrio cholerae*, che può portare a un aumento della resistenza agli antibiotici (Beaber et al., 2004). Parallelamente, la risposta mediata da RpoS ( $\sigma^S$ ) viene indotta da diversi tipi di stress generali, tra cui carenza di nutrienti, variazioni estreme di pH, temperatura e stress ossidativo, ed è associata alla sopravvivenza batterica, in particolare durante la fase stazionaria (Stewart et al., 2015; Murakami et al., 2005). Tuttavia, il ruolo specifico di RpoS nella formazione dei persister rimane ancora poco chiaro. Alcuni studi suggeriscono che la risposta SOS aumenti la tolleranza agli antibiotici in *Pseudomonas aeruginosa* (Murakami et al., 2005) ed *E. coli* (Pribis et al., 2019), mentre altri evidenziano che la delezione di *rpoS* può addirittura incrementare la persistenza, ad esempio attraverso la sovraregolazione della tossina MqsR. Inoltre, è stato dimostrato che alcune antitossine, come DinJ e MqsA, possono reprimere l'espressione di *rpoS*, suggerendo un'interazione complessa tra la risposta allo stress mediata da RpoS e i sistemi tossina-antitossina nel controllo della persistenza batterica (Hong et al., 2012). Tuttavia, risultati più recenti indicano che RpoS potrebbe avere un impatto limitato sulla persistenza agli antibiotici in *E. coli* (Valencia et al., 2024). Di conseguenza, sono necessari ulteriori studi per chiarire il ruolo effettivo di questo fattore e risolvere le discrepanze presenti in letteratura.

### *Comunicazione cellulare*

I batteri possiedono sofisticati sistemi di adattamento che consentono loro di sopravvivere a condizioni ambientali avverse e all'azione degli antibiotici. Tra questi, il *quorum sensing* (QS) e la *risposta stringente* mediata da (p)ppGpp rappresentano due meccanismi chiave coinvolti nella regolazione della formazione delle cellule persister, spesso interconnessi con altri circuiti cellulari (Castillo-Juarez et al., 2015). Il quorum sensing è un sistema di comunicazione cellulare basato su segnali chimici che permette ai batteri di coordinare comportamenti collettivi e di generare eterogeneità fenotipica all'interno della popolazione (Bassler & Losick, 2006; Papenfort & Bassler, 2016). Numerosi patogeni, tra cui *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Vibrio cholerae*, utilizzano il QS per modulare l'espressione di fattori di

virulenza e altre funzioni adattative (Moker et al., 2010). È stato dimostrato che molecole segnale come la piocianina e l'acil-omoserina lattone (AHL) 3-OC12-HSL aumentano significativamente la formazione di persistenter in *P. aeruginosa*, mentre il peptide stimolante la competenza (CSP) svolge un ruolo analogo in *Streptococcus mutans* (Leung & Levesque, 2012). Studi successivi hanno confermato il coinvolgimento del QS nella persistenza anche in *Escherichia coli* (Vega et al., 2012; Lee & Lee, 2010), e patogeni come *V. cholerae* (Jubair et al., 2012), *S. aureus* (Xu et al., 2017), e altri (Castillo-Juarez et al., 2015; Trastoy et al., 2018). Il contributo del quorum sensing alla formazione dei persistenter sembra essere legato, almeno in parte, alla regolazione di sistemi di secrezione (come T3SS e T6SS) e alla produzione di tossine (Ruwandeeepika et al., 2015; Li et al., 2016; Zheng et al., 2010). Tuttavia, i meccanismi molecolari precisi rimangono ancora da chiarire. In *E. coli*, diversi sistemi QS includono LuxR, LuxS, gli autoinduttori AI-2 e AI-3 e una via di segnalazione mediata dall'indolo, una molecola particolarmente rilevante per la persistenza batterica (Castillo-Juarez et al., 2015). L'indolo è in grado di essere percepito in modo eterogeneo dalle cellule, attivando risposte allo stress ossidativo e allo shock da fago attraverso componenti di membrana e periplasmatici (Vega et al., 2012). Questo porta all'induzione di geni come *oxyR* e *pspBC* e alla formazione di una sottopopolazione di cellule persistenter. Inoltre, l'indolo è stato associato a un aumento della tolleranza agli antibiotici, anche in *Salmonella typhimurium* (Vega et al., 2013), e alla sovraespressione di pompe di efflusso multidrug in *E. coli* (Hirakawa et al., 2005; Lee et al., 2010). Tali osservazioni evidenziano un'interazione complessa tra quorum sensing, specie reattive dell'ossigeno (ROS) e sistemi di efflusso. Nonostante ciò, gli effetti dell'indolo non sono univoci: in alcune condizioni può ridurre la tolleranza agli antibiotici o modulare in modo variabile l'efficacia degli aminoglicosidi (Sun et al., 2020). In altri casi, è stato osservato che può persino invertire la resistenza agli antibiotici (Wang et al., 2019; Han et al., 2017). Queste evidenze sottolineano la complessità delle interazioni tra segnali QS, persistenza e resistenza, rendendo necessari ulteriori studi per chiarirne i meccanismi.

Parallelamente, la risposta stringente rappresenta un'altra strategia fondamentale con cui i batteri rispondono a condizioni di stress nutrizionale, come la carenza di amminoacidi

o la limitazione di carbonio, azoto e fosfato (Potrykus & Cashel, 2008; Jain et al., 2006). In questo contesto, la molecola segnale (p)ppGpp agisce come un allarme intracellulare, capace di rilevare lo stress e di attivare una riprogrammazione globale delle attività cellulari. In *E. coli*, la sintesi di (p)ppGpp è regolata dalle proteine RelA e SpoT, attivate rispettivamente da carenza di amminoacidi e da altre limitazioni nutrizionali o ambientali. L'aumento dei livelli di (p)ppGpp comporta una modulazione di processi fondamentali come replicazione, trascrizione e traduzione, favorendo l'ingresso in uno stato di dormienza (Harms et al., 2016; Cabello et al., 2017). Numerosi studi hanno dimostrato che l'assenza di (p)ppGpp compromette significativamente la capacità di formare e mantenere cellule persister, mentre una sua attivazione parziale può conferire tolleranza multidrug, come osservato in *Staphylococcus aureus* (Mechold et al., 2013). Un modello rilevante propone che (p)ppGpp promuova la formazione dei persister attraverso la regolazione della funzione ribosomiale. In condizioni di stress, questa molecola, insieme al cAMP, induce l'espressione di fattori come RaiA e RMF, che inattivano i ribosomi trasformando le forme attive (70S) in complessi inattivi (100S) (Wood & Song, 2020). La conseguente riduzione della sintesi proteica favorisce uno stato metabolico dormiente, caratteristico delle cellule persister. È stato infatti osservato che l'inattivazione dei ribosomi può aumentare drasticamente la formazione di persister durante la fase esponenziale. Infine, (p)ppGpp è stato associato anche all'attivazione dei sistemi tossina-antitossina (TA), suggerendo un possibile collegamento tra questi moduli e la regolazione della persistenza (Fung et al., 2010; Nguyen et al., 2011; Riesenber et al., 1982; Zhou et al., 2008; Park et al., 2011; Primm et al., 2000; Betts et al., 2002; Stallings et al., 2009). Tuttavia, questo aspetto rimane ancora oggetto di dibattito e richiede ulteriori conferme sperimentali. Nel complesso, il quorum sensing e la risposta stringente rappresentano due meccanismi coinvolti nella regolazione della persistenza batterica. La loro interazione con altri sistemi cellulari, come le risposte allo stress ossidativo, i sistemi di efflusso e i moduli tossina-antitossina, evidenzia la natura altamente complessa e multifattoriale di questo fenomeno, sottolineando la necessità di ulteriori studi per una comprensione completa dei meccanismi coinvolti.

*Modificazioni epigenetiche, degradazione dell'RNA e piccoli RNA non codificanti.*

In *Escherichia coli* uropatogeno (UPEC), è stato dimostrato che la delezione del gene *dam* ( $\Delta dam$ ), che codifica per la DNA adenina metiltransferasi, determina una marcata riduzione della capacità di formare cellule persister (Xu et al., 2021). Al contrario, la delezione del gene *dcm* ( $\Delta dcm$ ), responsabile della metilazione della citosina, non produce effetti apprezzabili. Questo indica che la metilazione dell'adenina, ma non quella della citosina, è un fattore chiave nei processi di formazione e/o sopravvivenza dei persister. Il ruolo di Dam sembra essere legato alla sua capacità di modulare l'espressione di numerosi geni coinvolti in funzioni essenziali, tra cui la motilità cellulare, la riparazione del DNA e altri pathway adattativi (Xu et al., 2021). Più in generale, in condizioni di stress, lo stato di metilazione del DNA contribuisce a rimodellare i profili globali di espressione genica, favorendo l'ingresso dei batteri in uno stato di dormienza. Durante la successiva ripresa metabolica, alcune di queste modificazioni epigenetiche possono persistere in una sottopopolazione cellulare, fungendo da "memoria" ereditabile che orienta le risposte adattative future e aumenta la probabilità di formazione o sopravvivenza dei persister nel tempo (Riber & Hansen, 2021).

Anche le modificazioni dell'RNA giocano un ruolo rilevante. In particolare, la metilazione del nucleotide G37 del tRNA (in posizione N1 della guanosina 37) (Cook & Wright, 2022) nei batteri Gram-negativi contribuisce al mantenimento dell'integrità della struttura a doppia membrana dell'involucro cellulare, una caratteristica strettamente associata alla tolleranza e alla persistenza agli antibiotici. Questa struttura è inoltre cruciale per il recupero delle cellule dalla dormienza, suggerendo che la metilazione del tRNA sia coinvolta sia nella formazione sia nella riattivazione dei persister (Kwon & Bakhoun, 2020).

Ulteriori evidenze indicano che anche altre modificazioni post-trascrizionali del tRNA influenzano la persistenza (Cheverton et al., 2016). L'acetiltransferasi TacT, ad esempio, inibisce la traduzione proteica modificando i tRNA e impedendo la formazione dei legami peptidici, promuovendo così uno stato metabolico inattivo tipico dei persister. In parallelo, l'accumulo di tRNA deacilati può indurre la persistenza in modo indipendente dalla risposta stringente, evidenziando l'esistenza di vie alternative di regolazione (Wood

et al., 2021). Anche il metabolismo dell'RNA contribuisce a questo fenomeno. La polinucleotide fosforilasi (PNPasi), componente del degradosoma insieme a RNasi E, elicasi RhlB ed enolasi, regola la formazione dei persisters attraverso il controllo del sistema cAMP/CRP, noto per il suo ruolo centrale nel metabolismo batterico (Wu et al., 2023). Inoltre, piccoli RNA non codificanti (sRNA), come RyhB, sono stati identificati come ulteriori regolatori della persistenza (Zhang et al., 2018). Nel complesso, queste osservazioni evidenziano come le modificazioni epigenetiche del DNA e le regolazioni post-trascrizionali dell'RNA costituiscano livelli fondamentali di controllo nella formazione e nel mantenimento delle cellule persisters, aprendo nuove prospettive per lo sviluppo di strategie terapeutiche mirate contro le infezioni persistenti.

## Scopo della tesi

La persistenza batterica rappresenta uno stato di dormienza fenotipica caratterizzato dalla capacità di una sottopopolazione microbica, definita *persisters*, di sopravvivere a trattamenti battericidi normalmente efficaci, pur mantenendo competenze metaboliche in grado di consentire la ripresa della replicazione una volta ristabilite condizioni ambientali favorevoli (Kaplan et al., 2021; Balaban et al., 2019). Sebbene la maggior parte delle conoscenze disponibili riguardi la persistenza indotta da antibiotici, vi è crescente interesse verso il ruolo di stress ambientali tipici della produzione e conservazione alimentare, come lo stress osmotico, nella modulazione della formazione di cellule persistenti e nella loro resistenza a trattamenti termici e chimici.

La presente ricerca si propone di affrontare, in una prospettiva multidisciplinare, il fenomeno della persistenza batterica in *Listeria monocytogenes*, un patogeno di rilevanza alimentare, con l'obiettivo di chiarire i meccanismi attraverso cui stress sub-letali possono indurre la formazione di *persisters*, alterando la dinamica di crescita e aumentando la resistenza ai trattamenti di sanificazione. In particolare, la tesi si propone di fornire una visione integrata dei fattori che regolano la formazione e la sopravvivenza dei *persisters* in contesti alimentari, combinando evidenze sperimentali, conoscenze teoriche e modellistica predittiva, al fine di contribuire allo sviluppo di strategie più efficaci per il controllo di patogeni resilienti nei sistemi di produzione alimentare.

## **Capitolo 2. Induzione della persistenza a seguito di stress osmotico e valutazione stocastica delle modificazioni della dinamica di crescita**

In questo capitolo viene descritta una prima attività di ricerca effettuata nel contesto dell'attività dottorale, che ha portato alla pubblicazione dell'articolo "A stochastic approach for modelling the in-vitro effect of osmotic stress on growth dynamics and persistent cell formation in *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 413, 110586. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110586>". Si riporta, qui di seguito, una sintesi dell'attività e le relative considerazioni e conclusioni.

## **2.1. Premessa e scopo della ricerca**

Come detto nel precedente capitolo, la **persistenza batterica** è uno degli stati di dormienza che ha suscitato grande interesse da parte della comunità scientifica. I batteri persistenti (o *persisters*) possono essere definiti come una sottopopolazione microbica che, esposta a un trattamento battericida, viene uccisa più lentamente rispetto al resto della popolazione di cui fa parte (Kaplan et al., 2021). A questo riguardo, il segno distintivo dei batteri persistenti è la **curva di uccisione bifasica**, un'indicazione che, all'interno di una popolazione microbica, vi sono due sottopopolazioni inattivate a velocità differenti (Balaban et al., 2019). Quando vengono trasferite in un terreno fresco, le cellule persistenti possiedono ancora le competenze metaboliche per riprendere la replicazione attiva, sebbene impieghino più tempo a adattarsi alle nuove condizioni, rimanendo più a lungo nella fase lag (Balaban et al., 2004; Brauner et al., 2016). Pertanto, esplorare la distribuzione dei tempi di lag a livello di singola cellula può consentire di determinare la frazione di cellule persistenti in una popolazione batterica (Levin-Reisman et al., 2014).

I batteri persistenti hanno origine in modo stocastico in una popolazione batterica in risposta a stress ambientali oppure spontaneamente, in assenza di segnali esterni, a seguito della sovraespressione di geni che codificano specifici sistemi tossina-antitossina che sembrano svolgere un ruolo chiave nella diminuzione del metabolismo microbico (Balaban et al., 2019; Curtis et al., 2017; Fisher et al., 2017). Questo fenomeno non dovrebbe essere inteso come un interruttore on/off, bensì come un processo concertato tra tutte le cellule della popolazione che evolve dinamicamente e stocasticamente nel tempo (Ayrapetyan et al., 2018). La natura stocastica di diversi fenomeni biologici è stata ampiamente esplorata poiché è ben riconosciuto che i sistemi naturali sono un tipico esempio di sistemi aperti in cui il continuo verificarsi di forze deterministiche e stocastiche influenza la dinamica della popolazione (Spagnolo et al., 2022). In particolare, le fluttuazioni casuali di parametri intrinseci o estrinseci, definite come “rumore”, sono state studiate al fine di comprendere la stabilità dei sistemi ecologici che mostrano la presenza di fenomeni controintuitivi (Spagnolo et al., 2015). L'applicazione di modelli predittivi stocastici è stata recentemente proposta ai sistemi microbici alimentari per

comprendere la complessità delle interazioni tra le fluttuazioni dei parametri ambientali e il comportamento batterico (Ciofu et al., 2022; Giarratana et al., 2022). Tuttavia, il ruolo del “rumore intrinseco” nella formazione della persistenza microbica appare ancora un campo inesplorato.

Ciò che preoccupa maggiormente delle cellule persistenti è la loro capacità di eludere trattamenti battericidi che normalmente sono in grado di inattivarle (Defraigne et al., 2018). Esistono evidenze che i batteri persistenti possano tollerare alte dosi di farmaci battericidi e possano sopravvivere a livelli letali di pH, condizioni osmotiche e trattamenti termici (Manina et al., 2015; Nalbone et al., 2023). Questa maggiore resistenza sembra essere correlata a risposte adattative che coinvolgono cambiamenti metabolici e strutturali non ereditabili che inducono cross-protezione contro differenti trattamenti battericidi (Dewachter et al., 2019; Harms et al., 2016).

In questo contesto, i batteri persistenti destano preoccupazione anche per la sicurezza alimentare poiché le tecniche di conservazione più comuni (refrigerazione, congelamento, salatura, essiccazione, ecc.) possono agire come fattori di stress che innescano la formazione di batteri persistenti in grado di sopravvivere a successivi trattamenti battericidi e crescere successivamente negli alimenti durante la conservazione. A tal riguardo, nel nostro recente studio, abbiamo osservato che *Listeria monocytogenes* cresciuta in brodo con aggiunta del 6% di NaCl sopravviveva più a lungo quando esposta a trattamento termico a 51 °C a causa della formazione di cellule persistenti caratterizzate da una fase lag più lunga (Nalbone et al., 2023). La maggiore resistenza termica osservata dopo la crescita in ambiente salino suggeriva la formazione di una sottopopolazione di cellule persistenti piuttosto che di cellule stressate che, invece, sarebbero risultate più sensibili al trattamento termico battericida.

I batteri persistenti sono stati studiati per decenni per la loro capacità di sopravvivere ai trattamenti antibiotici, mentre mancano studi sulla loro formazione negli alimenti e sul potenziale impatto sulla loro sicurezza (Eisenreich et al., 2022).

Questo studio mira a indagare una possibile relazione tra l'esposizione a differenti concentrazioni di sale (stress osmotico) e la quantità di cellule persistenti indotte in un ceppo di *L. monocytogenes*. Inoltre, per fornire ulteriori approfondimenti sulle

dinamiche della persistenza, descriviamo questo fenomeno da una prospettiva matematica attraverso modelli di microbiologia predittiva comunemente utilizzati per riprodurre le curve di crescita delle popolazioni batteriche in ambito alimentare.

## **2.2. Materiali e Metodi**

**Preparazione del ceppo batterico** - Per il presente studio è stato testato il ceppo *L. monocytogenes* ATCC 7644. *L. monocytogenes* è stato scelto come modello batterico per la sua rilevanza nella sicurezza alimentare, in quanto è ubiquitario e in grado di resistere a varie condizioni ambientali avverse, causando spesso infezioni gravi con elevati tassi di ospedalizzazione e mortalità (Tuytschaever et al., 2023).

Il ceppo è stato conservato congelato presso la collezione microbica del “Food Microbiology Laboratory” del Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Messina (Messina, Italia) in colture in brodo precedentemente preparate in brodo triptone soia estratto di lievito (TSYEB; Biolife, Milano, Italia) con aggiunta del 15% di glicerolo (Merck, Darmstadt, Germania). Uno degli stock congelati è stato scongelato a temperatura ambiente e seminato con un’ansa sterile su agar triptone soia estratto di lievito (TSYEA; Biolife, Milano, Italia) incubato a 37 °C per 24 ore. Una singola colonia cresciuta su TSYEA è stata quindi trasferita con un’ansa sterile in 50 mL di TSYEB e incubata overnight a 37 °C. La coltura overnight è stata diluita dieci volte in acqua peptonata salina (SPW; Merck, Darmstadt, Germania) per ottenere una concentrazione finale di  $\sim 10^4$  CFU/mL. Quest’ultima diluizione è stata utilizzata per preparare 4 diverse colture in brodo, tutte in un volume di 50 mL e a una concentrazione di  $\sim 10^3$  CFU/mL: i) una coltura controllo in TSYEB (coltura controllo), ii) una coltura in TSYEB con aggiunta del 2% di NaCl (Merck, Darmstadt, Germania) (coltura con 2% NaCl), iii) una coltura in TSYEB con aggiunta del 4% di NaCl (coltura con 4% NaCl), iv) una coltura in TSYEB con aggiunta del 6% di NaCl (coltura con 6% NaCl). Le concentrazioni di sale scelte consentivano la crescita del batterio e, sulla base di studi precedenti, erano sufficientemente elevate da indurre risposte adattative e formazione di persisters in *L. monocytogenes* (Al-Nabulsi et al., 2015; Bucur et al., 2018; Nalbhone et al. 2023). L’uso di diverse concentrazioni saline ha permesso di valutare eventuali correlazioni tra la

quantità di sale e il numero di cellule persistenti generate. Le colture in brodo sono state quindi incubate in agitazione a 37 °C fino al raggiungimento della fase stazionaria di crescita ( $\sim 10^7 - 10^8$  CFU/mL). Le colture in brodo così ottenute sono state utilizzate per gli esperimenti descritti nei paragrafi successivi.

La concentrazione batterica di ciascuna coltura in brodo è stata determinata con l'ausilio di uno spettrofotometro (Biorad, Hercules, California, USA) utilizzando una lunghezza d'onda di 600 nm. Curve di calibrazione della densità ottica in funzione della concentrazione batterica erano state precedentemente costruite per seguire la crescita del ceppo in ciascun brodo.

**Esperimento 1: Valutazione della durata della fase lag mediante il software ScanLag** - In questo primo esperimento, la possibilità che il sale induca la formazione di cellule persistenti in *L. monocytogenes* ATCC 7644 è stata investigata in vitro esplorando la durata della fase lag a livello di singole colonie del ceppo cresciuto su agar utilizzando il software "ScanLag".

ScanLag è un software open-source implementato da Levin-Reisman et al. (2010) che è stato utilizzato con successo per studiare la frazione di persistenza di differenti ceppi batterici sulla base dei tempi di comparsa delle colonie su terreni solidi. ScanLag utilizza scanner da ufficio per registrare automaticamente la crescita delle colonie su piastre di agar e valutare la distribuzione di frequenza dei tempi di comparsa (fase lag) tramite analisi automatizzata delle immagini.

Il protocollo analitico utilizzato nel presente studio è stato ispirato a Levin-Reisman and Balaban (2016) e opportunamente modificato. Le colture in brodo in fase stazionaria precedentemente preparate (vedi sottosezione 2.1) sono state diluite dieci volte in TSYEB per ottenere una concentrazione finale di  $\sim 10^3$  CFU/mL. Per ciascuna coltura in brodo, 100  $\mu$ L sono stati inoculati in piastre Petri ( $\varnothing$  90 mm) di Listeria Agar secondo Ottaviani e Agosti (ALOA; Biolife, Milano, Italia). Uno scanner da ufficio (Epson-XP305, Suwa, Giappone) collegato a un laptop è stato allestito all'interno di un incubatore (IC 150-R, Argo Lab, Carpi, Italia) impostato a 37 °C. Le piastre sono state posizionate capovolte sopra lo scanner su un supporto in plastica appositamente costruito. Carta assorbente

bianca sterile è stata posta tra coperchi e piastre per prevenire la caduta di condensa sull'agar (File Supplementare 1).

Tramite il software ScanningManager (v. 2016) implementato da Levin-Reisman and Balaban (2016), lo scanner è stato configurato in modo che le piastre venissero automaticamente scansionate ogni 20 min. per 4 giorni. Le immagini delle piastre sono state acquisite a una risoluzione di 300 dpi e convertite in scala di grigi utilizzando Photoshop (v. 2020; Adobe, California, USA). Le immagini di ciascuna piastra sono state elaborate tramite specifici script sviluppati su Matlab (R2022b; Mathworks, Massachusetts, USA) da Levin-Reisman et al. (2010). Gli script hanno permesso di determinare il tempo di comparsa (fase lag) di ciascuna singola colonia cresciuta sulle piastre ALOA. Le colonie sono state rilevate dagli script quando la loro dimensione nelle immagini raggiungeva la soglia di 10 pixel. Sono state analizzate solo piastre con non più di 200 colonie, poiché un numero maggiore può influenzare la comparsa tardiva; inoltre, le colonie cresciute in cluster sono state escluse e non processate (Levin-Reisman et al., 2010). Il numero totale di colonie analizzate per ciascuna coltura in brodo è risultato dall'analisi di più piastre.

I tempi di comparsa delle colonie della coltura controllo sono stati adattati a una distribuzione Gaussiana e sono stati calcolati media e deviazione standard. Per determinare il numero di cellule persistenti formate a seguito dell'esposizione al sale, è stato determinato il numero di colonie di ciascuna coltura salina i cui tempi di comparsa erano pari a tre deviazioni standard sopra la media della coltura controllo (valore soglia). Questo valore soglia è stato determinato e validato da Levin-Reisman and Balaban (2016).

### **Esperimento 2: Modellizzazione dell'effetto dell'esposizione al sale sulla crescita di *L. monocytogenes*; Effetto del sale sulle curve di crescita di *L. monocytogenes* ATCC 7644-**

In questo secondo esperimento, è stato valutato in vitro se l'esposizione e la crescita in brodo con aggiunta di NaCl influenzassero la curva di crescita di *L. monocytogenes* ATCC 7644 quando trasferita in un terreno fresco senza sale.

In dettaglio, le stesse colture in brodo in fase stazionaria utilizzate per l'esperimento 1 (vedi sottosezione 2.2) sono state diluite dieci volte in TSYEB per ottenere una

concentrazione finale di  $\sim 10^3$  CFU/mL e incubate a 22 °C. Le diluizioni decimali in TSYEB hanno garantito una significativa diminuzione della concentrazione salina, tale che tutte e quattro le colture in brodo (controllo, 2%- , 4%- e 6% NaCl) si trovassero nelle stesse condizioni di crescita.

Le colture in brodo sono state campionate in triplicato a intervalli di tempo prestabiliti, seminate su TSYEA dopo opportune diluizioni dieci volte in SPW e incubate a 37 °C per 48 ore prima della conta delle colonie. Le conte di *L. monocytogenes* sono state convertite in valori Log<sub>10</sub> e riportate in funzione del tempo per costruire le curve di crescita. Il campionamento è stato effettuato fino al raggiungimento della fase stazionaria. Per ciascuna concentrazione di sale testata sono state eseguite tre repliche delle curve di crescita del ceppo.

Ad ogni campionamento, almeno 10 colonie selezionate casualmente da ciascuna coltura in brodo sono state testate mediante tecnologia MALDI-TOF per confermarne l'identità ed escludere contaminazioni. In dettaglio, è stato utilizzato uno spettrometro di massa Vitek Axima Assurance (bioMérieux, Florence, Italia) impostato come segue: modalità lineare positiva, frequenza laser 50 Hz, tensione di accelerazione 20 kV e tempo di ritardo di estrazione 200 ns. Gli spettri di massa sono stati rilevati in un intervallo tra 2000 e 20000 Da. Lo spettro di ciascuna colonia è stato confrontato con un database di spettri batterici di riferimento utilizzando il software SARAMIS (versione database V4.12, anno software 2013, bioMérieux, Florence, Italia) ottenendo così l'identificazione a livello di genere e specie. Solo le identificazioni con una corrispondenza di almeno il 70% sono state considerate affidabili.

Le curve di crescita osservate per ciascuna coltura sono state riprodotte mediante un modello matematico predittivo. L'obiettivo era comprendere se la curva di crescita della popolazione batterica potesse essere riprodotta modellizzando l'allungamento della fase lag della sottopopolazione persistente, considerando il potenziale impatto che il comportamento di queste cellule può avere sulla dinamica di crescita dell'intera popolazione.

Il modello predittivo si basava sull'uso di un modello primario rappresentato da un insieme di equazioni differenziali e di un modello secondario che consente di ottenere la

velocità massima di crescita in funzione dei parametri ambientali. In dettaglio, il modello primario era il modello di Baranyi & Roberts (1994), che consentiva di riprodurre l'andamento sigmoide delle curve di crescita osservate. Questo modello primario è rappresentato dalle seguenti equazioni differenziali (Eq. A1, Eq. A2):

$$\frac{dN}{dt} = \mu_{max} N(t) \frac{Q}{1+Q} \left( 1 - \frac{N(t)}{N_{max}} \right) \quad [\text{Eq. A1}]$$

$$\frac{dQ}{dt} = \mu_{max} \cdot Q \quad [\text{Eq. A2}]$$

Dove N è la concentrazione (Log CFU/mL) di *L. monocytogenes* al tempo t;  $\mu_{max}$  è la velocità massima di crescita (h<sup>-1</sup>) di *L. monocytogenes*; N<sub>max</sub> è la densità massima di popolazione (Log<sub>10</sub> CFU/mL) della popolazione microbica; Q rappresenta lo stato fisiologico della popolazione e influenza la durata della fase lag (Baranyi & Roberts, 1994).

Il modello predittivo proposto da Le Marc et al. (2002) è stato utilizzato come modello secondario per determinare il valore di  $\mu_{max}$  in funzione dei parametri ambientali di crescita, quali temperatura di incubazione (22 °C), pH (6.9) e aw (0.995) della coltura in brodo (vedi sottosezione 2.3.1). Il valore di N<sub>max</sub> è stato impostato allo stesso livello raggiunto dalla coltura controllo (Log 9 CFU/ml) per ciascuna simulazione.

Il valore iniziale di Q (Q<sub>0</sub>) che consentiva di calcolare la durata della fase lag, secondo Eq. B, è stato determinato adattando le curve di crescita predette a quelle osservate (vedi sottosezione 2.3.1) tramite la risoluzione numerica delle equazioni Eq. A1 ed Eq. A2 utilizzando Excel (v. 2021, Microsoft Corporation).

$$\text{Lag phase} = Ln \cdot [Q / 1 + Q] / \mu_{max} \text{ (Eq. B)}$$

Il miglior livello di concordanza tra le curve predette e quelle osservate è stato valutato utilizzando il Root Mean Squared Error (RMSE). Questo approccio ha consentito di riprodurre il fenomeno della persistenza come un'estensione del tempo medio della fase lag dell'intera popolazione dovuta al ritardo della sottopopolazione persistente.

Per simulare la natura stocastica del fenomeno della persistenza, il modello è stato risolto introducendo un termine stocastico, cioè una sorgente di “rumore” (Spagnolo et al., 2015), che mima la variabilità della durata della fase lag dovuta alla presenza della sottopopolazione persistente. Il termine stocastico era rappresentato dal  $Q_0$  (calcolato come descritto sopra) e la sua deviazione standard rappresenta la sorgente di rumore. Il livello appropriato di rumore è stato individuato per ciascuna risoluzione stocastica consistente in 1000 iterazioni, valutando il livello di concordanza di adattamento tra curve predette e osservate tramite il valore di RMSE.

La distribuzione normale dei tempi di comparsa delle colonie delle colture controllo e saline è stata testata utilizzando il test omnibus di D'Agostino-Pearson e qualsiasi differenza significativa tra i tempi di comparsa delle colonie di ciascun gruppo è stata valutata utilizzando il test non parametrico di Mann-Whitney. Il livello critico di significatività ( $p$ ) è stato fissato al 5% (0.05) e il test è stato eseguito a due code utilizzando il software Graph Pad Prism 9.1.1 (San Diego, California, USA). È stata effettuata un'analisi di regressione lineare semplice per valutare eventuali correlazioni tra il numero di cellule persistenti formate e le concentrazioni di sale utilizzate.

La risoluzione numerica del modello primario è stata eseguita utilizzando la funzione “SOLVER” di Excel.

Le 1000 iterazioni dell'approccio stocastico sono state eseguite utilizzando la funzione “NORM.INV” di Excel, che restituisce l'inversa della distribuzione cumulativa normale per una media e una deviazione standard specificate (nel nostro caso, media e deviazione standard dei valori di  $Q$  determinati tramite tecniche di fitting). Questa funzione è stata associata alla funzione “RANDOM” per ottenere 1000 iterazioni.

Excel è stato inoltre utilizzato per eseguire statistiche descrittive, analisi di regressione lineare e calcoli dell'RMSE.

### 2.3. Risultati

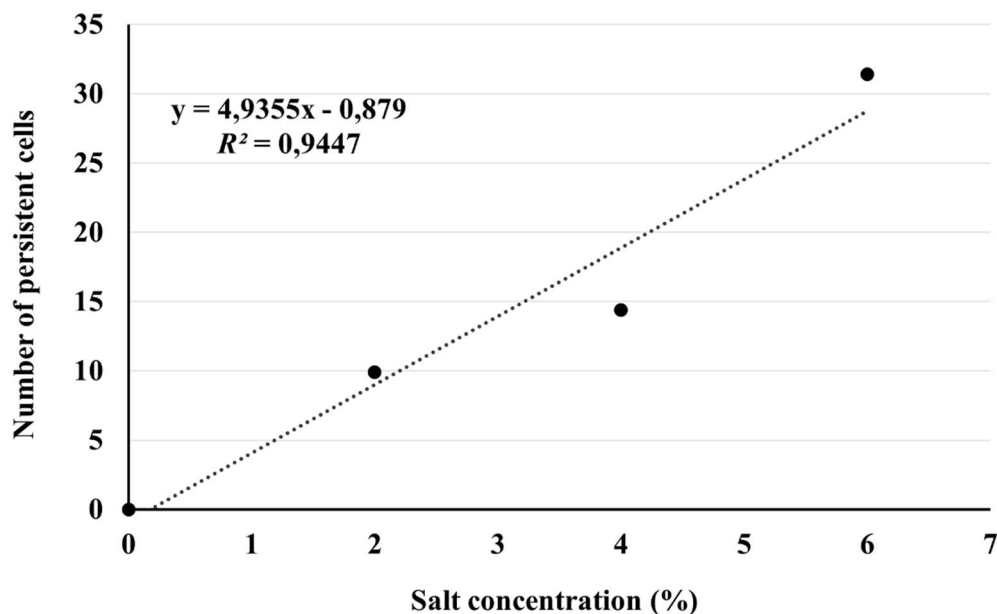
**Esperimento 1: Valutazione della durata della fase lag mediante il software ScanLag** - Il tempo medio di comparsa, gli intervalli di tempo e il numero di colonie analizzate per ciascuna coltura sono stati riassunti nella Tabella 2.3.1.

**Tabella 2.3.1:** tempo medio di comparsa, gli intervalli di tempo e il numero di colonie analizzate per ciascuna coltura

Condizioni	N. colonie analizzate	Tempo medio di comparsa in ore	Range tempo
Controllo	156	23.29 ± 2.25	20.70 - 31.70
2% NaCl	101	26.73 ± 1.93	21.03 - 31.70
4% NaCl	104	26.97 ± 1.98	22.70 - 32.70
6% NaCl	293	29.22 ± 4.37	21.03 - 54.03

Il valore soglia stabilito per la coltura controllo era 30.02 ore. Confrontando i tempi di comparsa delle colonie delle colture con 2%-, 4%- e 6% NaCl con il valore soglia, il numero di potenziali batteri persistenti generati era: 10 colonie (9.90%) per la coltura con 2% NaCl, 15 colonie (14.41%) per la coltura con 4% NaCl e 92 colonie (31.40%) per la coltura con 6% NaCl.

I risultati dell'analisi di regressione lineare semplice hanno mostrato un buon livello di correlazione tra il numero di cellule persistenti generate e le concentrazioni di sale, restituendo un valore di R<sup>2</sup> pari a 0.9447 (Figura 2.3.1).



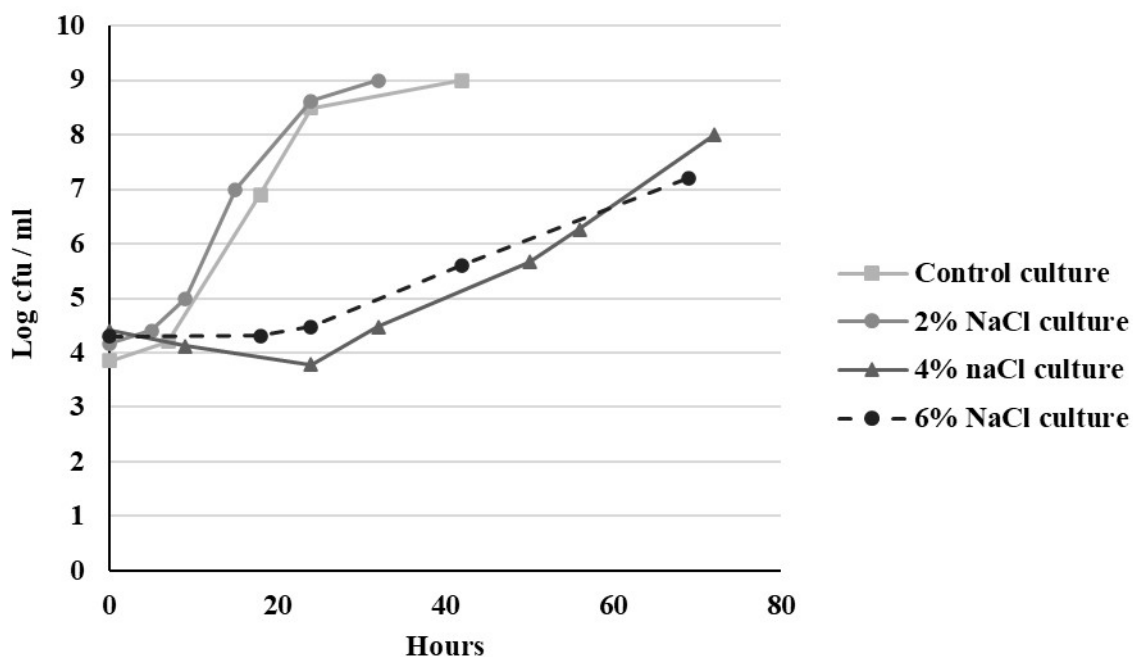
**Figura 2.3.1**

I risultati dell'analisi statistica hanno mostrato differenze significative tra i tempi di comparsa delle colonie delle diverse colture. Complessivamente, il tempo medio di comparsa delle colture saline era significativamente più lungo rispetto a quello della coltura controllo (coltura 2% NaCl:  $p < 0.0001$ ;  $U = 1958$ ; coltura 4% NaCl:  $p < 0.0001$ ;  $U = 1823$ ; coltura 6% NaCl:  $p < 0.0001$ ;  $U = 3579$ ).

Il tempo medio di comparsa della coltura con 6% NaCl era significativamente più lungo sia rispetto alla coltura con 2% NaCl ( $p < 0.0001$ ;  $U = 8319$ ) sia rispetto alla coltura con 4% NaCl ( $p < 0.0001$ ;  $U = 8685$ ), mentre non è stata rilevata alcuna differenza tra la coltura con 2% NaCl e quella con 4% NaCl ( $p = 0.1489$ ;  $U = 4674$ ).

Tutte le colonie testate mediante tecnologia MALDI-TOF sono state confermate come *L. monocytogenes*.

**Esperimento 2: Modellizzazione dell'effetto dell'esposizione al sale sulla crescita di *L. monocytogenes*** - Le curve di crescita delle colture controllo, 2%-, 4%- e 6% NaCl, successivamente poste nelle stesse condizioni ambientali in un terreno fresco senza aggiunta di sale, sono mostrate in Figura 2.3.2.



**Figura 2.3.2**

Da un lato, le curve di crescita delle colture controllo e 2% NaCl hanno mostrato un andamento simile, entrambe caratterizzate da una fase lag più breve e da un tempo più breve per raggiungere la concentrazione massima rispetto alle colture 4%- e 6% NaCl. Dall'altro lato, la coltura 4% NaCl era caratterizzata da una fase lag più lunga rispetto alla coltura 6% NaCl e in entrambe le colture la concentrazione massima era inferiore rispetto alle colture controllo e 2% NaCl.

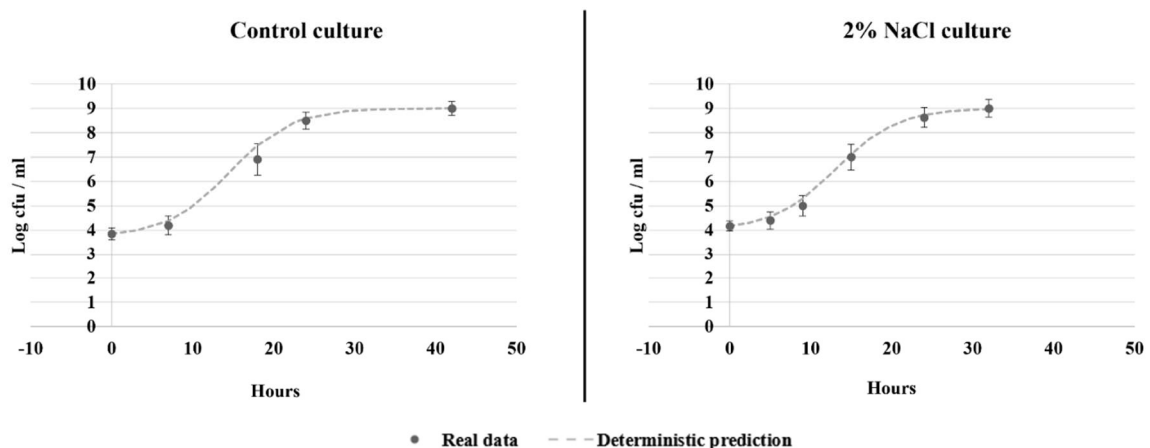
Il valore di  $\mu_{max}$  ottenuto dal modello secondario di Le Marc et al. (2002), basato sui parametri ambientali di crescita, era 0.260. La Tabella 2.3.2. mostra i migliori valori di  $Q$  per ciascuna coltura e la relativa durata della fase lag.

**Table 2.3.2.** Migliore Valori di  $Q$  calcolati con il fitting per ogni coltura e relativa durata della lag-fase (in ore).

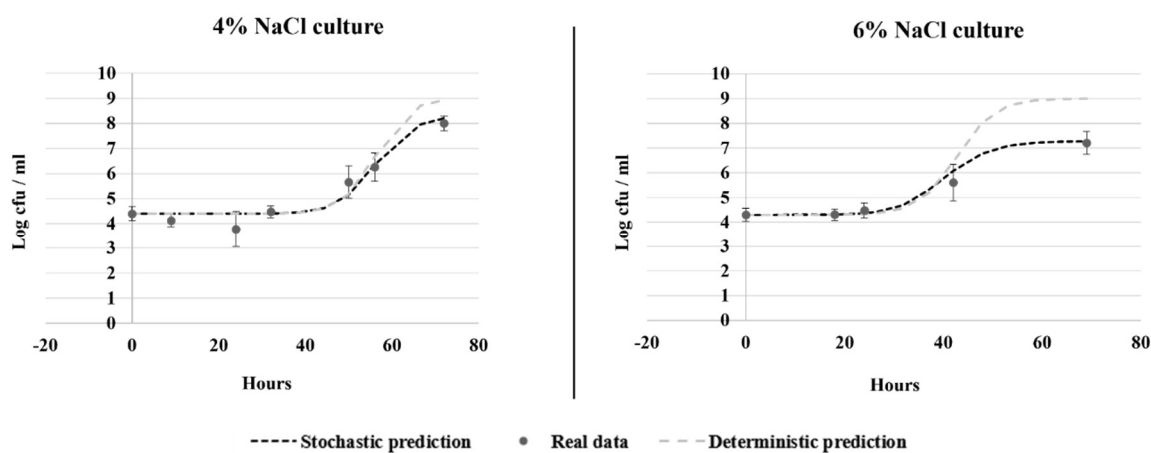
Condizioni <sup>1</sup>	$Q$ value	Lag phase duration
Control	0.055404	11.33473
2% NaCl	0.075015	10.24001
4% NaCl	0.000001	53.17912
6% NaCl	0.000033	39.70612

<sup>1</sup>Colture in tryptone soy yeast extract broth con differenti quantità di sale e successivamente diluite in brodo per equalizzare la concentrazione di sale prima di incubare.

La Figura 2.3.3 mostra le curve di crescita predittive delle colture controllo e 2% NaCl ottenute utilizzando la risoluzione deterministica del modello, mentre in Figura 2.3.4 sono riportate le curve di crescita predittive ottenute utilizzando gli approcci deterministico e stocastico delle colture 4%- e 6% NaCl.



**Figura 2.3.3**

**Figura 2.3.4**

La Tabella 2.3.3 mostra i valori di RMSE ottenuti confrontando i dati delle risoluzioni predittive con quelli delle curve di crescita reali.

**Table 2.3.3.** RMSE values obtained by comparing data of the predictive resolutions with those of the real growth curves.

Condizioni	Approccio predittivo	
	Deterministico	Stocastico
Controllo	0.0518	0.0518
2% NaCl	0.0696	0.0696
4% NaCl	0.4837	0.3371
6% NaCl	0.8952	0.1504

<sup>1</sup>Culture in tryptone soy yeast extract broth con differenti quantità di sale e successivamente diluite in brodo per equalizzare la concentrazione di sale prima di incubare.

La valutazione grafica della Figura 3 e i valori di RMSE hanno consentito di affermare che per le colture controllo e 2% NaCl l'approccio deterministico era sufficiente a predire con elevata concordanza i dati osservati, mentre per le colture 4%- e 6% NaCl (Figura 4) l'approccio stocastico ha mostrato un migliore adattamento ai dati osservati.

#### **2.4. Discussione e considerazioni finali**

I risultati del presente studio mostrano come la crescita di *L. monocytogenes* ATCC 7644 in brodo con aggiunta di NaCl (stress osmotico) possa innescare la formazione di cellule persistenti il cui numero dipende dalle concentrazioni di sale del terreno. Questi risultati sono stati determinati mediante l'utilizzo del software ScanLag, che ha consentito di esplorare la distribuzione della fase lag del ceppo a livello di singola colonia.

In uno studio precedente, abbiamo già dimostrato utilizzando ScanLag come l'aggiunta del 6% di NaCl nella coltura in brodo possa indurre un aumento della durata della fase

lag in una sottopopolazione di *L. monocytogenes* 7644 (Nalbone et al., 2023). Nel presente studio, abbiamo osservato nello stesso ceppo che il numero di cellule persistenti caratterizzate da una fase lag più lunga aumentava coerentemente con le concentrazioni di sale.

Vari fattori possono influenzare la durata della fase lag di una popolazione batterica e produrre un rapporto completo che includa tutti questi fattori è un compito complesso. Da un lato, la durata della fase lag può essere condizionata da fattori estrinseci che influenzano la quantità di lavoro richiesta alle cellule per riprendere la replicazione attiva e da fattori intrinseci legati a caratteristiche metaboliche interspecifiche (Bertrand, 2019). A questo riguardo, l'uso di un singolo ceppo nel presente studio potrebbe non catturare l'intero spettro della variabilità biologica, poiché ceppi diversi possono rispondere in modo differente in condizioni uguali (Aalto-Araneda et al., 2020). Dall'altro lato, altri Autori hanno dimostrato che anche la "storia" di una popolazione batterica influenza significativamente la sua crescita (Fang et al., 2021). I batteri che sperimentano stress attivano diversi percorsi metabolici che coinvolgono l'espressione di geni specifici e l'attivazione di strutture cellulari che consentono loro di sopravvivere, adattarsi e crescere nuovamente una volta che le condizioni ambientali lo permettono (Storz & Hengge, 2010). L'intensità dello stress potrebbe influenzare la complessità delle risposte adattative, incidendo sulla capacità e sul tempo richiesto per adattarsi e crescere nelle nuove condizioni. Al contrario, alcune ricerche indicano che le risposte adattative dei batteri allo stress possono essere non lineari, essendo regolate da meccanismi stocastici (Mortazavi et al, 2014; Bucur et al., 2018; Georgalis et al., 2023). Ciò spiegherebbe perché, nel presente studio, le colture cresciute in brodo con aggiunta del 4% di NaCl hanno avuto una fase lag più lunga rispetto a quelle cresciute al 6% di NaCl. Il sale nel terreno riduce l'acqua libera disponibile per i batteri per il loro sostentamento, influenzando l'equilibrio osmotico tra spazio intra- ed extracellulare (Duché et al., 2002; Bae et al., 2012). Quando esposti a stress osmotico, i batteri accumulano soluti osmoprotettori che mantengono l'osmolarità citoplasmatica in omeostasi (van Kessel et al., 2015). In risposta ad alte concentrazioni saline, *L. monocytogenes* accumula osmolitici, come carnitina e trimetilglicina, al fine di ridurre la pressione osmotica e la

perdita di acqua (Duché et al., 2002). Oltre a mantenere sotto controllo il turgore cellulare, gli osmolitici stabilizzano anche la struttura degli enzimi e quindi la loro funzione durante la risposta allo stress (Lippert & Galinski, 1992). Questi meccanismi sono mediati da un aumento dell'espressione genica che codifica specifiche proteine di trasporto degli osmolitici come gli operoni opuCABCD, gbuABC e il betL (Bae et al., 2012; Cacace et al., 2010; Chan et al., 2007).

In queste condizioni, le espressioni genetiche coinvolte nella sintesi proteica di altri processi metabolici possono essere sopprese, consentendo alla popolazione di affrontare lo stress nel miglior modo possibile (Bucur et al., 2018). Ciò potrebbe spiegare perché alcuni autori hanno osservato una riduzione del tasso di crescita in ceppi di *L. monocytogenes* esposti a stress osmotico. A tal riguardo, Vasseur et al. (1999) hanno osservato una fase lag più lunga e una diminuzione del tasso di crescita in cinque ceppi wild di *L. monocytogenes* cresciuti in brodo addizionato con 40, 62.5 e 80 g/L di NaCl. Più recentemente, Shah & Bergholz (2020) hanno riportato un aumento significativo della fase lag e del tempo di duplicazione in sei ceppi di *L. monocytogenes* cresciuti in brodo con aggiunta del 6% di NaCl. Al contrario, altre ricerche hanno indicato che il tasso di crescita di cellule precedentemente esposte a stress rimaneva costante indipendentemente dal tipo specifico di stress applicato (Sibanda & Buys, 2017).

Nel presente studio, il ceppo cresciuto al 4% e al 6%, una volta trasferito nel terreno fresco senza sale, ha mostrato una riduzione della concentrazione massima e un aumento del tempo richiesto per raggiungerla che, apparentemente, potrebbe essere correlato a una diminuzione del tasso di crescita.

Tuttavia, i risultati del secondo esperimento hanno mostrato che la presenza di cellule persistenti nella coda della fase lag influenza significativamente la dinamica di crescita dell'intera popolazione. In dettaglio, la fase lag più lunga delle cellule persistenti determina un allungamento della fase lag media dell'intera popolazione, che impiega più tempo a raggiungere la concentrazione massima non a causa di una riduzione del tasso di crescita.

Infatti, l'approccio predittivo proposto ha consentito di riprodurre con buona concordanza le curve di crescita reali modellizzando solo quei parametri che condizionano la durata della fase lag, come il valore di  $Q$ .

Inoltre, considerando la natura casuale del fenomeno della persistenza, i risultati del presente studio hanno dimostrato come l'uso di un approccio stocastico alla risoluzione del modello predittivo fosse più performante rispetto a quello deterministico, soprattutto a concentrazioni saline più elevate (4% e 6% NaCl).

La maggior parte dei modelli predittivi proposti per descrivere il fenomeno della persistenza sono modelli di inattivazione microbica che mirano a predire la sopravvivenza della frazione persistente in una popolazione esposta a trattamenti battericidi (Balaban et al., 2019; Gutiérrez-Cacciabue & Rajal, 2022; Pennell et al., 2008). In effetti, la capacità di sopravvivere a trattamenti battericidi rappresenta la principale preoccupazione legata ai persisters e, nel campo alimentare, vi sono ancora poche evidenze su come questo fenomeno possa influenzare la sicurezza del prodotto. Nel nostro precedente studio, abbiamo osservato che *L. monocytogenes* cresciuta in brodo con aggiunta del 6% di NaCl mostrava una maggiore resistenza termica, probabilmente a causa della cross-protezione indotta dalle risposte adattative successive all'esposizione al sale (Bergholz et al., 2012; Nalbhone et al., 2023). In questo contesto, è certamente auspicabile sviluppare modelli che consentano di predire le curve di inattivazione di popolazioni batteriche in cui sono presenti cellule persistenti. Altri modelli sono stati proposti anche per caratterizzare il tasso di commutazione da cellula batterica non-persistenter a cellula persistenter (Munther et al., 2020). Entrambi questi ultimi approcci modellizzano separatamente l'andamento di due sottopopolazioni, una più piccola rappresentata dalle cellule persistenti e una più grande costituita dal resto della popolazione, unendole in un singolo modello predittivo.

L'approccio adottato nel presente studio affronta il fenomeno da una prospettiva differente attraverso la risoluzione di un modello predittivo che riproduce la curva di crescita della popolazione batterica tenendo conto della formazione di batteri persistenti in seguito a una precedente esposizione a stress. Inoltre, l'approccio stocastico qui proposto è in linea con le più aggiornate tecniche di valutazione del rischio che

richiedono sempre più un approccio probabilistico per la gestione dei pericoli microbiologici (De Vrieze et al., 2020).

Concludendo, i risultati del presente studio hanno evidenziato come l'esposizione a stress osmotico possa determinare un'estensione significativa della fase lag in alcune cellule di un ceppo di *L. monocytogenes*, che potrebbe essere considerata una sottopopolazione persistente. Abbiamo osservato che il comportamento di queste cellule influenzava significativamente la dinamica di crescita dell'intera popolazione; pertanto, abbiamo proposto un approccio predittivo che consente di riprodurre la curva di crescita della popolazione tenendo conto della presenza di cellule persistenti. Studi futuri dovrebbero includere diversi ceppi di *L. monocytogenes* per catturare la diversità intraspecifica in risposta allo stress, nonché testare altre condizioni ambientali post-trattamento che possono influenzare significativamente la crescita batterica. La persistenza è attualmente una strategia di difesa batterica trascurata nel settore alimentare, ma non si può escludere che i vari stress a cui i batteri sono esposti lungo la catena produttiva possano innescarne la formazione, sollevando preoccupazioni per la sicurezza del prodotto.

### **Capitolo 3. Induzione della persistenza mediante stress osmotico e valutazione dell'incremento della termoresistenza in vitro e in vivo**

In questo capitolo viene descritta la seconda attività di ricerca effettuata nel contesto dell'attività dottorale, che ha portato alla pubblicazione degli articoli “*Effects of osmotic stress on Listeria monocytogenes ATCC 7644: Persistent cells and heat resistance. Italian Journal of Food Safety, 12(1), 10880. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2023.10880>*” e “*Heat resistance of Listeria monocytogenes persistent cells following osmotic stress in cooked pork sausages. International Journal of Food Science & Technology, 59(10), 7478–7486. <https://doi.org/10.1111/ijfs.17497>*”. Si riporta, qui di seguito, una sintesi dell'attività e le relative considerazioni e conclusioni.

#### **3.1. Premessa e scopo delle attività di ricerca**

Ad oggi, la maggior parte delle conoscenze riguardanti la persistenza batterica riguarda il campo degli antibiotici (Balaban et al., 2019; Brauner et al., 2016). Esiste un consistente corpo di evidenze che indica una relazione tra il fallimento di alcuni trattamenti antibiotici e la formazione di un sottogruppo di cellule, chiamate persisters, capaci di sopravvivere a trattamenti battericidi normalmente in grado di inattivarle (Huemer et al., 2020). La maggior parte delle cellule persistenti generate all'interno di una popolazione batterica si forma in risposta a stressori ambientali che innescano una cascata di risposte adattative non ereditarie, portando a una maggiore resistenza a successivi trattamenti battericidi (Ayrapetyan et al., 2018). A tal riguardo, i batteri persistenti sono anche definiti come una sottopopolazione microbica che, esposta a un trattamento battericida, viene uccisa più lentamente rispetto al resto della popolazione di cui fa parte (Kaplan et al., 2021). Ciò determina una curva di uccisione bifasica, un segno che, all'interno di una popolazione microbica, esiste una sottopopolazione maggiore più sensibile al trattamento battericida e una popolazione più piccola più resistente (Balaban et al., 2019). Una volta trasferite in un terreno fresco, le cellule persistenti possiedono ancora le competenze metaboliche per riprendere la replicazione attiva, sebbene impieghino più tempo a adattarsi alle nuove condizioni, rimanendo nella coda della fase di latenza (Nalbone et al., 2024). In questo senso, esplorare la durata della fase di latenza

a livello di singole cellule consente di determinare la frazione di persistenza della popolazione batterica (Levin-Reisman et al., 2010).

L'impatto che questa strategia di difesa può avere sulla sicurezza alimentare è stato a lungo trascurato. Non si può escludere che le tecniche di conservazione comunemente utilizzate nella produzione alimentare, come la refrigerazione, la salatura, l'essiccazione o l'acidificazione, agiscano come stressori inducendo la formazione di cellule persistenti capaci di resistere a comuni trattamenti battericidi, come il calore, e di crescere successivamente negli alimenti durante la commercializzazione (Eisenreich et al., 2022; Nalbone et al., 2024). A tal riguardo, potremmo ipotizzare che il fenomeno della persistenza sia coinvolto in alcuni recenti casi di listeriosi come quello verificatosi in Italia nel 2022, che ha causato 3 decessi e 66 infezioni (RASFF, 2022). Il focolaio è stato associato al consumo di salsicce di suino cotte (würstel) la cui produzione prevede un primo ciclo di cottura e un trattamento di pastorizzazione post-confezionamento che dovrebbe garantire l'inattivazione delle forme vegetative dei patogeni. Le Autorità competenti hanno ipotizzato una contaminazione ambientale post-cottura seguita da una pastorizzazione post-confezionamento insufficiente. Sebbene i würstel non siano un alimento pronto al consumo, l'abitudine di consumarli crudi o poco cotti ha portato all'insorgenza delle infezioni. Analogamente, i persister potrebbero essere coinvolti nel focolaio di listeriosi verificatosi nell'agosto 2019 in Andalusia, Spagna, in cui 222 casi di infezione, tre decessi e sei aborti spontanei sono stati associati al consumo di prodotti suini sottoposti a trattamento termico pre- e post-confezionamento (WHO, 2019). Alla luce delle considerazioni finora svolte, non si può escludere che in entrambi i focolai la contaminazione fosse correlata a cellule persistenti con una maggiore resistenza termica. A tal riguardo, nel nostro recente studio in vitro, abbiamo osservato come una sottopopolazione di *L. monocytogenes* ATCC 7644 che rimane nella coda della fase di latenza abbia resistito più a lungo a un trattamento termico a 51 °C (Nalbone et al., 2023). Su questo sfondo, il presente studio mira a valutare se lo stress osmotico (sale) induca la formazione di cellule persistenti in un ceppo di *L. monocytogenes* capace di resistere più a lungo al trattamento termico durante un ciclo di cottura di salsicce di suino (würstel) sperimentalmente contaminate.

### ***3.2. Materiali e metodi***

#### ***3.2.1. Preparazione del ceppo batterico***

Un ceppo di *L. monocytogenes* ATCC 7644, conservato congelato a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Tryptone Soy Yeast Extract Broth (TSYEB; Biolife, Milano, Italia) supplementato con il 15% di glicerolo (Merck, Darmstadt, Germania), è stato strisciato su una piastra di Tryptone Soy Yeast Extract Agar (TSYEA; Biolife, Milano, Italia) e incubato overnight a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Una singola colonia della coltura overnight è stata trasferita in 50 mL di TSYEB e incubata overnight a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Successivamente, la coltura è stata diluita in serie decimale in acqua peptonata salina (SPW; Merck, Darmstadt, Germania) fino a una concentrazione finale di  $\sim 10^4$  CFU/mL. Quest'ultima diluizione ha rappresentato la sospensione di partenza per la preparazione di due colture in brodo distinte, entrambe preparate in un volume finale di 50 mL e a una concentrazione di  $\sim 10^3$  CFU/mL; nello specifico: una coltura di controllo in TSYEB (CTL-culture) e una coltura in TSYEB supplementato con 6% NaCl (NaCl-culture) (Merck, Darmstadt, Germania).

Le colture in brodo sono state successivamente incubate sotto agitazione continua a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  fino al raggiungimento della fase stazionaria di crescita ( $\sim 10^7$ – $10^8$  CFU/mL) e utilizzate per le analisi in vitro e per le contaminazioni sperimentali degli alimenti descritte nei paragrafi successivi. Per determinare la concentrazione batterica in ciascuna coltura in brodo, è stata condotta un'analisi spettrofotometrica (Biorad, Hercules, California, USA) utilizzando una lunghezza d'onda di 600 nm. Curve di calibrazione che correlavano la densità ottica alla concentrazione batterica erano state precedentemente costruite per seguire la crescita del ceppo in ciascun mezzo in brodo (Levin-Reisman & Balaban, 2016).

#### ***3.2.2. Valutazione della fase di latenza mediante il software ScanLag***

La frazione di cellule persistenti indotta dallo stress osmotico nel ceppo *L. monocytogenes* ATCC 7644 è stata esplorata attraverso la valutazione della durata della fase di latenza a livello di singole colonie cresciute su un mezzo solido utilizzando il software ScanLag. ScanLag è un software open-source sviluppato da Levin-Reisman et al.

(2010), utilizzato con successo per determinare la frazione persistente di una popolazione batterica attraverso l'analisi del tempo di comparsa (fase di latenza) di singole colonie cresciute su terreni solidi. Il software consente di acquisire automaticamente immagini di piastre di agar tramite comuni scanner da ufficio e le analizza mediante un software di analisi automatizzata delle immagini per determinare il tempo di comparsa di ciascuna singola colonia nel mezzo.

La sperimentazione è stata condotta utilizzando lo stesso protocollo analitico adottato nel nostro precedente studio (Nalbone et al., 2024), che era ispirato al set-up sperimentale proposto da Levin-Reisman e Balaban (2016), opportunamente modificato.

In dettaglio, una volta raggiunta la fase stazionaria di crescita, le colture CTL e NaCl sono state diluite in serie decimale in TSYEB fino a ottenere una concentrazione di  $\sim 10^3$  CFU/mL. Un inoculo di 100  $\mu$ L di ciascuna coltura in brodo è stato seminato su piastre di Petri ( $\varnothing$  90 mm) di Listeria Agar secondo Ottaviani e Agosti (ALOA; Biolife, Milano, Italia) e poi distribuito sulla superficie con una spatola sterile a forma di L.

Sei piastre alla volta sono state posizionate su un supporto in plastica appositamente costruito sopra uno scanner da ufficio (Epson-XP305, Suwa, Giappone) collegato a un computer portatile collocato all'interno di un incubatore (IC 150-R, Argo Lab, Carpi, Italia) impostato a 37 °C. Carta assorbente bianca sterile è stata collocata tra i coperchi e il fondo delle piastre per impedire che la condensa cadesse sull'agar. Utilizzando il software ScanningManager sviluppato da Levin-Reisman e Balaban (2016), lo scanner è stato impostato per acquisire automaticamente un'immagine delle piastre ogni 20 min per 4 giorni. Le piastre sono state scansionate con una risoluzione di 600 dpi e trasformate in scala di grigi usando Photoshop (versione 2020; Adobe, California, USA). Successivamente, specifici script progettati sul software Matlab (versione R2023b; Mathworks, Massachusetts, USA) da Levin-Reisman et al. (2010) sono stati impiegati per elaborare le immagini di ciascuna piastra e determinare il tempo di comparsa (fase di latenza) di ciascuna singola colonia cresciuta sul mezzo. Gli script rilevavano le colonie quando la loro dimensione nelle immagini raggiungeva la soglia di 10 pixel. Le piastre con più di 200 colonie non sono state analizzate, poiché un numero più elevato avrebbe potuto influenzare la comparsa delle colonie più tardive; inoltre, non sono state elaborate

le colonie cresciute in cluster così come quelle vicine ai bordi delle piastre (Levin-Reisman et al., 2010). Il numero totale di colonie esaminate per ciascuna coltura in brodo è risultato dall'analisi di più piastre (almeno 6 piastre).

I tempi di comparsa delle colonie della coltura CTL sono stati modellizzati rispetto a una distribuzione gaussiana e sono state calcolate la media e la deviazione standard. Il numero di cellule persistenti indotte dallo stress osmotico è stato determinato enumerando il numero di colonie nella coltura NaCl il cui tempo di comparsa era di tre deviazioni standard oltre la media della coltura CTL (valore soglia) secondo Levin-Reisman e Balaban (2016).

### *3.2.3. Valutazione della resistenza termica di *L. monocytogenes* ATCC 7644 in vitro*

Le stesse colture di controllo e con sale al 6% in fase stazionaria di cui sopra sono state sottoposte a un trattamento termico per 24 h utilizzando un bagno termostatico (WB22; Argo Lab, Carpi, Italia) impostato a 51 °C. La temperatura del trattamento termico è stata scelta poiché consentiva di seguire al meglio l'inattivazione microbica sulla base del protocollo analitico adottato nel presente studio. Temperature più basse o più elevate avrebbero inattivato il microrganismo rispettivamente troppo lentamente o troppo rapidamente.

Ciascuna coltura in brodo, dopo opportuna diluizione per riequilibrare la concentrazione di sale, è stata inoculata in tre provette sterili da 20 ml contenenti 9 ml di TSYEB preriscaldato nel bagno termostatico, in modo che il volume finale in ciascuna provetta fosse di 10 ml a una concentrazione di  $\sim 10^7$  CFU/ml. Un'ulteriore provetta è stata preparata con brodo non contaminato ed è stata utilizzata per monitorare la temperatura mediante un termometro a sonda (Checktemp Electronic Thermometer, Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA).

La prova è iniziata immediatamente dopo l'inoculo delle colture di controllo e con sale, poiché la diminuzione di temperatura osservata nella provetta non contaminata a seguito dell'inoculo poteva essere considerata trascurabile ( $\pm 0,3$  °C). Le colture in brodo sono state campionate a intervalli di tempo prestabiliti (circa ogni ora e mezza), seminate su

piastre di TSYEA dopo opportune diluizioni decimali in SPW e incubate a 37 °C per 48 ore prima della enumerazione delle cellule. Tutte le piastre sono state inoculate con 100 µl di sospensione batterica, ad eccezione dei time point in cui erano previste basse concentrazioni di batteri vitali, per i quali è stato seminato 1 ml.

#### *3.2.4. Valutazione della resistenza termica di *L. monocytogenes* ATCC 7644 in salsicce di suino cotte sperimentalmente contaminate*

##### **Preparazione e contaminazione sperimentale di salsicce di suino cotte**

In questo secondo esperimento, è stato valutato se la crescita di *L. monocytogenes* ATCC 7644 in un ambiente salino potesse indurre una maggiore resistenza termica del ceppo dovuta alla formazione di cellule persistenti. Ciò è stato valutato in alimento contaminando sperimentalmente salsicce di suino cotte fatte in casa (würstel) preparate secondo Trevisani et al. (2023).

Carne e grasso provenienti da una spalla di suino reperita in un impianto locale di lavorazione carni a Messina sono stati posti all'interno di un cutter (Mainca, Barcellona, Spagna) e addizionati con un additivo commerciale pronto all'uso (Morgan, Firenze, Italia) contenente nitrito, glutammato monosodico, sale e polifosfati, seguendo le istruzioni del produttore per la concentrazione. Sono stati aggiunti anche contenitori di ghiaccio al 4% per mantenere la temperatura durante la triturazione. Carne e grasso sono stati ridotti in una fine emulsione, che è stata analizzata per la ricerca di *L. monocytogenes* per escluderne la presenza prima della contaminazione sperimentale. Successivamente, l'emulsione è stata divisa in due aliquote: un controllo contaminato sperimentalmente con la coltura CTL e un'altra aliquota contaminata sperimentalmente con la coltura NaCL. Le colture in brodo utilizzate per le contaminazioni sperimentali sono state preparate come descritto nel paragrafo 2.1. Le contaminazioni sperimentali sono state eseguite in modo che in ciascuna aliquota la concentrazione del ceppo fosse  $\sim 10^4$  CFU/g. Le contaminazioni sono state effettuate all'interno del cutter per garantire una distribuzione delle colture in brodo il più uniforme possibile in ciascuna emulsione. Successivamente, ciascuna aliquota contaminata è stata analizzata in triplicato per la

conta di *L. monocytogenes* secondo il protocollo descritto di seguito (vedi paragrafo 2.3.2.) al fine di determinare la concentrazione iniziale del ceppo prima della cottura. Le emulsioni contaminate sono state quindi insaccate in un budello di collagene ( $\varnothing$  35 mm) utilizzando un'insacatrice manuale. Il budello è stato legato manualmente a intervalli regolari con spago edibile formando salsicce di lunghezza relativamente standard ( $\sim$ 20 cm). Le salsicce sono state separate manualmente con un coltello e quindi appese su telai collocati all'interno di un forno industriale (Eller, Bolzano, Italia) preriscaldato a  $\sim$ 39 °C. Il ciclo di cottura prevedeva un trattamento a 65 °C al cuore del prodotto per una durata di 11 min. Le salsicce contaminate con colture CTL e quelle contaminate con colture NaCL sono state cotte separatamente in due momenti differenti. La temperatura di cottura è stata monitorata utilizzando un termometro a sonda fornito con il forno e inserito in una salsiccia selezionata casualmente. Una volta che il termometro ha registrato una temperatura di 60 °C, le salsicce sono state raccolte e analizzate in triplicato per la conta di *L. monocytogenes* (vedi paragrafo 2.3.3.) per valutare un'eventuale diminuzione iniziale della concentrazione batterica correlata alla fase di riscaldamento del forno. Una volta che la temperatura rilevata dal termometro ha raggiunto 65 °C, sono state campionate tre salsicce ogni due min fino alla fine del ciclo di cottura (un totale di 4 time point e 12 salsicce). La temperatura all'interno delle salsicce è stata monitorata durante l'intero ciclo di cottura mediante data logger a bottone (DS1921G-F5, iBottons, Damwâld, Paesi Bassi) collocati all'interno degli ultimi campioni raccolti.

Una volta raccolte, le salsicce sono state poste in sacchetti di plastica, immerse in acqua fredda e ghiaccio per arrestare la cottura e immediatamente analizzate per la conta di *L. monocytogenes*.

Le salsicce cotte contaminate sono state analizzate per la conta di *L. monocoytogens* secondo ISO 11290-2:2017. Il budello è stato rimosso con pinze e forbici sterili e il ripieno è stato tagliato in piccoli pezzi e omogeneizzato. Una porzione di 25 g per ciascun campione è stata diluita con SPW in rapporto 1:9 p/v e omogeneizzata mediante stomacher per 60 s a 230 rpm. Dopo opportune diluizioni decimali, 1 mL di inoculo di ciascun campione è stato seminato su 3 piastre ( $\varnothing$  90 mm) di ALOA incubate a 37 °C e

dopo  $48 \pm 2$  h le colonie tipiche sono state enumerate. Per ciascun time point, colonie selezionate casualmente sono state successivamente analizzate mediante tecnologia MALDI-TOF MS per confermarne la specie ed escludere contaminazioni durante l'analisi. In dettaglio, l'analisi MALDI-TOF MS è stata eseguita utilizzando uno spettrometro di massa Vitek MS Axima Assurance (bioMerieux, Firenze, Italia) impostato in modalità lineare positiva, con una frequenza del laser di 50 Hz, una tensione di accelerazione di 20 kV e un tempo di ritardo di estrazione di 200 ns. L'intervallo di massa degli spettri è stato impostato per rilevare da 2000 a 20000 Da. Il MALDI-TOF ha generato uno spettro MS unico per ciascuna colonia testata, che è stato confrontato con un database di spettri di riferimento batterici utilizzando il software SARAMIS (Spectral ARchive and Microbial Identification System – Database versione V4.12 – anno software 2013, bioMerieux, Firenze, Italia). Solo le identificazioni con una corrispondenza del 70% sono considerate affidabili.

### *3.2.5. Analisi dei dati*

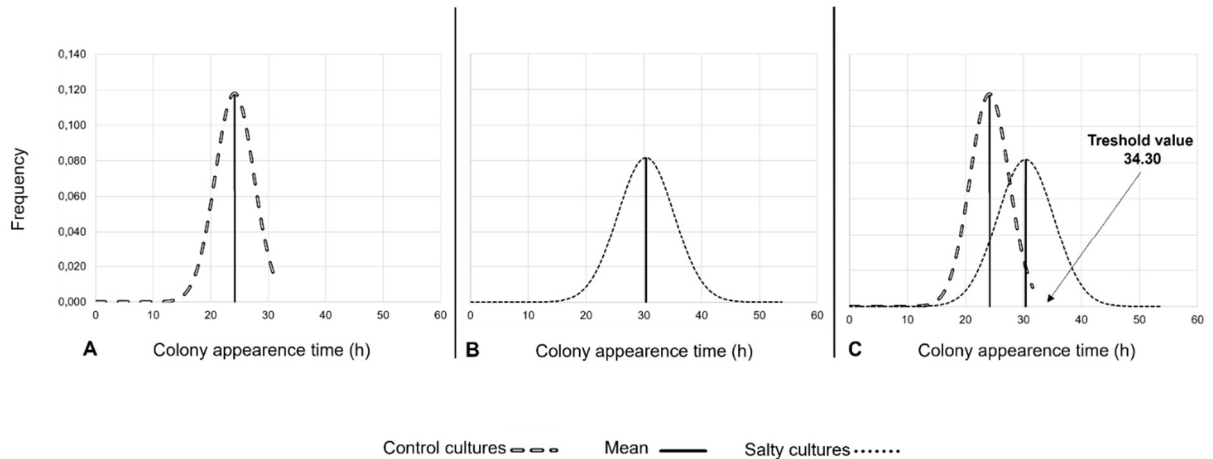
La distribuzione normale dei tempi di comparsa delle colonie delle colture CTL e NaCl su piastre ALOA è stata testata utilizzando il test omnibus di D'Agostino-Pearson e i tempi medi di comparsa sono stati confrontati mediante il test non parametrico di Mann-Whitney. Il livello critico di significatività (p) è stato fissato al 5% (0,05) e il test è stato eseguito a due code utilizzando il software Graph Pad Prism 9.1.1 (San Diego, California, USA).

Le conte di *L. monocytogenes* sopravvissute durante l'intero ciclo di cottura sono state convertite in Log10 e tracciate rispetto al tempo per costruire curve di inattivazione per entrambe le colture CTL e NaCl. Queste curve di inattivazione termica sono state studiate utilizzando tecniche di fitting testando diversi modelli predittivi lineari e non lineari di inattivazione microbica mediante il plug-in GinaFit (Geeraerd et al., 2005) di Microsoft Excel (versione 2019). Ciascuna valutazione predittiva è stata confrontata con i valori osservati e la bontà di ciascun modello rispetto ai dati reali è stata stabilita calcolando l'errore quadratico medio (RMSE).

### 3.3. Risultati, discussione e conclusioni

#### 3.3.1. Distribuzioni della fase di latenza di *L. monocytogenes*

Le distribuzioni gaussiane dei tempi di comparsa delle colonie delle colture CTL e NaCl sono state riportate graficamente in Figura 3.3.1.



**Figura 3.3.1:** Distribuzione dei tempi di latenza a livello di singola colonia di *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 coltivata in brodo senza (A) e con aggiunta del 6% di NaCl (B), determinata mediante il software ScanLag. Il numero di cellule persistenti indotte dallo stress osmotico è stato determinato enumerando il numero di colonie nella coltura con NaCl il cui tempo di comparsa era superiore di tre deviazioni standard rispetto alla media della coltura di controllo (CTL) (valore soglia), secondo Levin-Reisman e Balaban (2016) (C).

Per quanto riguarda le colture CTL, sono state analizzate 287 colonie ed è stato calcolato un tempo medio di comparsa di  $24,16 \pm 3,38$  h entro un intervallo di 20,70 e 31,70 h. Per quanto riguarda le colture NaCl, sono state processate 348 colonie ed è stato calcolato un tempo medio di comparsa di  $30,37 \pm 4,88$  h entro un intervallo di 21,03 e 54,03 h. È stata osservata una differenza significativa tra i tempi medi di comparsa delle due colture in brodo, con una fase di latenza significativamente più lunga nelle colture NaCl rispetto alla coltura CTL ( $p < 0,0001$ ,  $U = 14166$ ).

Il valore soglia stabilito per la coltura CTL era 34,30 h e il numero di colonie persistenti indotte dallo stress osmotico era 27 (7,76%), con un tempo medio di comparsa di  $37,22 \pm 4,13$  h entro un intervallo di 34,07 e 54,03 h.

Nel nostro precedente studio (Nalbone et al., 2023), abbiamo già confrontato la durata della fase di latenza di *L. monocytogenes* ATCC 7644 cresciuto in TSYEB e in TSYEB con un'ulteriore aggiunta di 6% NaCl utilizzando il software ScanLag e, come osservato anche

in questo lavoro, la fase di latenza era significativamente più lunga quando i batteri crescevano in TSYEB con aggiunta di NaCl. Di particolare preoccupazione è il tempo di comparsa di 4 colonie ~54 h dopo l'inoculo nelle piastre ALOA, considerando che il tempo di incubazione dopo la semina a 37 °C richiesto da ISO 11290-2:2017 per la conta di *L. monocytogenes* negli alimenti è  $48 \pm 2$  h. Risultati simili sono stati ottenuti da Bannenberg et al. (2021), che hanno osservato come la variabilità nella durata della latenza dei ceppi di *L. monocytogenes* in brodo di arricchimento Half Fraser dopo stress influenzi l'efficacia di rilevazione usando il metodo ISO 11290-1:2017.

Sono molti i fattori che influenzano il comportamento individuale della latenza e non è facile fornire una spiegazione accurata dei meccanismi coinvolti nell'eterogeneità del tempo di latenza. Studi sull'esposizione a diversi stress hanno contribuito significativamente a comprendere i meccanismi adottati dai batteri per uscire dalla fase di latenza e riprendere la replicazione attiva (Bertrand et al., 2019). Ad esempio, è ben noto che le dinamiche di crescita dopo esposizione a stress possono variare notevolmente tra diversi tipi molecolari dello stesso ceppo (Rolfe et al., 2012). In questa prospettiva, l'utilizzo di un singolo ceppo per il presente studio potrebbe non riuscire a includere l'intero spettro della variabilità biologica e i risultati qui osservati dovrebbero essere riconsiderati per ceppi di *L. monocytogenes* diversi da ATCC 7644. Altri studi hanno evidenziato come i batteri preadattati allo stress mostrino un periodo di latenza più breve quando incontrano lo stesso stress in un nuovo mezzo rispetto a batteri non preadattati (Marmion et al., 2022). A tal riguardo, Belessi et al. (2011) hanno osservato come il periodo di latenza di *L. monocytogenes* C5 (sierotipo 4b) in brodi con diverse concentrazioni di sale (da 0,5 a 10,5% NaCl) fosse più breve quando i ceppi testati erano precedentemente esposti a condizioni osmotiche estreme che ne arrestavano la crescita ( $a_w$  0,90). Da un lato, anche l'entità dello stress potrebbe influenzare la complessità delle risposte adattative condizionando la capacità di adattarsi e crescere nelle nuove condizioni. Dall'altro lato, esistono evidenze che le risposte adattative dei batteri allo stress possano essere non lineari, essendo regolate da meccanismi stocastici (Mortazavi et al., 2014; Bucur et al., 2018; Georgalis et al., 2023). Ciò spiegherebbe perché nel nostro precedente studio (Nalbone et al., 2024) abbiamo osservato che non vi erano differenze

nella fase di latenza della stessa popolazione precedentemente cresciuta in brodo con aggiunta di 2% e 4% di NaCl, mentre essa si allungava significativamente se esposta a 6% di NaCl, suggerendo un “effetto soglia” piuttosto che una correlazione lineare positiva tra il numero di persister generati e la concentrazione di sale.

I risultati di questi studi suggeriscono che la durata della fase di latenza è fortemente influenzata dalle caratteristiche intrinseche del ceppo, dalla storia della coltura inoculata e dalla differenza tra il vecchio e il nuovo ambiente (Bertrand et al., 2019).

Numerosi studi hanno esplorato le risposte adattative di *L. monocytogenes* al sale. L'effetto principale del sale è ridurre la quantità di acqua libera disponibile nel mezzo, perturbando l'omeostasi tra l'ambiente interno ed esterno della cellula (Gunde-Cimerman et al., 2018). Quando l'osmolarità dell'ambiente aumenta, vengono sintetizzate diverse proteine sia specifiche contro lo stress osmotico, come trasportatori di osmoliti e regolatori strutturali della membrana cellulare e del citoplasma, sia proteine della risposta generale allo stress (Bae et al., 2012). Wiktorczyk-Kapischke et al. (2021) riportano che, in risposta all'osmolarità, *L. monocytogenes* prima accumula K<sup>+</sup> e glutammato e poi accumula osmoliti compatibili (ad es., carnitina, glicina betaina, prolina e trimetilglicina) che agiscono come osmoprotettori. Queste piccole molecole organiche sono indispensabili per mantenere il turgore cellulare riducendo la perdita di acqua e riequilibrando la pressione osmotica, nonché per stabilizzare la struttura e la funzione degli enzimi in condizioni di stress (Materike & Okoh, 2020).

La resilienza delle cellule in risposta allo stress all'interno della stessa popolazione può non essere sempre la stessa: alcune cellule possono adattarsi rapidamente mentre altre possono essere danneggiate e impiegare più tempo per uscire dalla fase di latenza una volta trasferite in un terreno fresco (Bertrand, 2019). Su questo sfondo, non si può escludere che le colonie con una latenza più lunga qui rilevate da ScanLag siano cellule lesionate piuttosto che cellule persistenti, che analogamente richiedono anch'esse più tempo per adattarsi a nuove condizioni (Rolfe et al., 2012). Inoltre, studi condotti su diversi ceppi di *L. monocytogenes* hanno evidenziato come la presenza di cellule lesionate determini un aumento generale del tempo di latenza dell'intera popolazione, con una maggiore dispersione del tempo necessario alle cellule per avviare la replicazione

attiva (Dupont & Augustin, 2009; Pin & Baranyi, 2008), proprio come osservato nel presente studio.

Tuttavia, se da un lato la presenza di cellule lesionate nella coda della fase di latenza non può essere esclusa, dall'altro la formazione di cellule persistenti è ugualmente probabile, soprattutto alla luce dei risultati ottenuti nei trattamenti termici in vitro e in situ.

### 3.3.2. Curve di inattivazione di *L. monocytogenes* durante il ciclo di trattamento in vitro

Le curve di inattivazione termica sia delle colture di controllo sia di quelle con sale sono state adattate utilizzando diversi modelli lineari e non lineari di sopravvivenza microbica e i risultati sono riportati rispettivamente nella Tabella 3.2.1. Complessivamente, le migliori correlazioni sono state ottenute con il modello log-lineare con "spalla" e "coda" (Geeraerd et al., 2000) per la coltura con sale (Figura 3.3.2a), mentre il modello log-lineare con "spalla" (non mostrato in tabella) (Geeraerd et al., 2000) è risultato quello che meglio rappresentava la curva di inattivazione della coltura di controllo (Figura 3.3.2b).

**Tabella 1.** Risultati dei parametri di inattivazione (espressi come valore  $\pm$  errore standard) e dell'analisi statistica ottenuti adattando le conte di *L. monocytogenes* della coltura con sale dopo il trattamento termico mediante diversi modelli lineari e non lineari di sopravvivenza microbica disponibili su GInaFit (v. 1.6).

		Modelli di sopravvivenza			
		Regressione Log-Lineare		Bifasica	
		Semplice	Con "spalla" e "coda"	Semplice	Con "spalla" e "coda"
6% NaCl	Log ( $N_0$ ) <sup>1</sup>	5,66 $\pm$ 0,63	6,61 $\pm$ 0,49	7,02 $\pm$ 0,46	6,57 $\pm$ 0,54
	Lunghezza spalla <sup>2</sup>	NA	1,45 $\pm$ 1,06	NA	1,45 $\pm$ 1,21
	$K1_{max}$ <sup>3</sup>	0,73 $\pm$ 0,15	1,82 $\pm$ 0,31	1,55 $\pm$ 0,26	1,78 $\pm$ 0,38
	$K2_{max}$ <sup>4</sup>	NA	NA	0,11 $\pm$ 0,22	0,03 $\pm$ 0,21
	Log ( $N_{res}$ ) <sup>5</sup>	NA	0,67 $\pm$ 0,36	NA	NA
	4D reduction (D) <sup>2,6</sup>	$\pm$ 12,8	$\pm$ 6,60	$\pm$ 6	$\pm$ 6,8
	RMSE	1,4319	0,6018	0,7061	0,6533
	$R^2$	0,6928	0,9566	0,9402	0,9552
	0% NaCl	Log ( $N_0$ ) <sup>1</sup>	7,47 $\pm$ 0,10	ND	ND
Lunghezza spalla <sup>2</sup>		NA	ND	ND	ND
$K1_{max}$ <sup>3</sup>		1,64 $\pm$ 0,05	ND	ND	ND
$K2_{max}$ <sup>4</sup>		NA	ND	ND	ND
Log ( $N_{res}$ ) <sup>5</sup>		NA	ND	ND	ND
4D reduction (D) <sup>2,6</sup>		$\pm$ 5,68	ND	ND	ND
RMSE		0,1645	ND	ND	ND
$R^2$		0,9936	ND	ND	ND

<sup>1</sup> $N_0$ : concentrazione iniziale dell'inoculo

<sup>2</sup> Tempo in minuti

<sup>3</sup> $K1_{max}$ : Tasso di inattivazione della maggiore subpopolazione più sensibile al trattamento termico (Log CFU/g/minute)

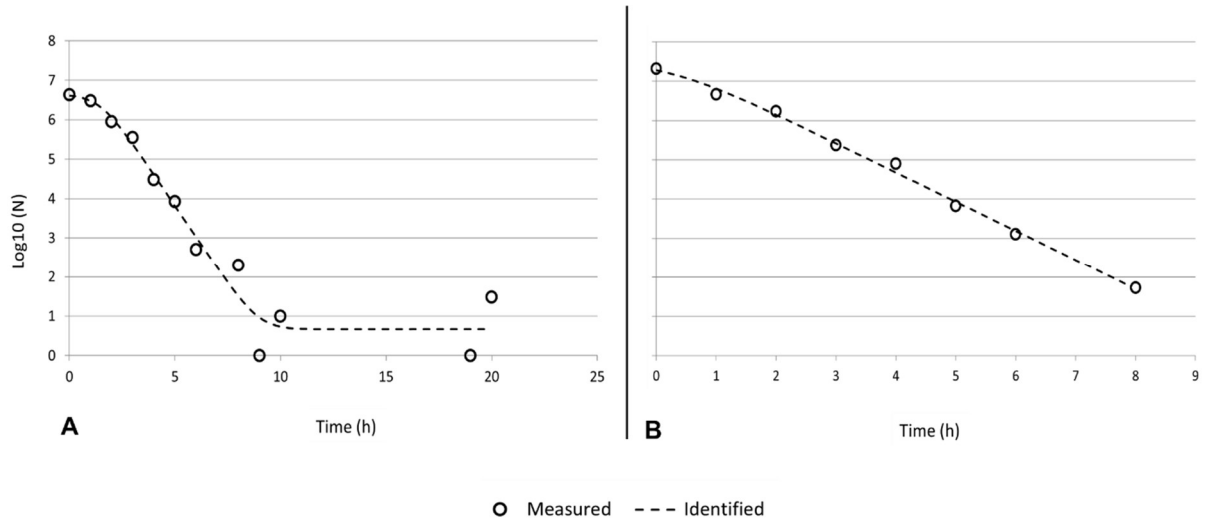
<sup>4</sup> $K2_{max}$ : Tasso di inattivazione della minore subpopolazione più sensibile al trattamento termico (Log CFU/g/minute).

<sup>5</sup> $N_{res}$ : frazione di cellule residue dopo la stabilizzazione alla fine del decremento.

<sup>6</sup> $4D$ : tempo necessario per 4 Log reduction di  $N_0$

NA: non applicabile.

ND: non determinabile. Il software non ha restituito alcun valore.



**Fig. 3.3.2.** Curve di inattivazione termica delle colture con sale (A) e di controllo (B). Il grafico mostra i valori delle cariche misurate durante il trattamento termico (51 °C) e la linea di tendenza individuata adattando i valori di carica delle colture con sale con un modello log-lineare con “spalla” e “coda” e i valori di carica delle colture di controllo con un modello log-lineare con “spalla”. I test di adattamento sono stati eseguiti su GInaFit (v. 1.6).

### 3.3.3. Curve di inattivazione di *L. monocytogenes* durante il ciclo di cottura di salsicce sperimentalmente contaminate

La Tabella 3.3.1. mostra i risultati dei parametri e dell’analisi statistica ottenuti adattando i valori delle conte delle colture CTL e NaCl a diversi modelli predittivi di sopravvivenza microbica proposti dal software GInaFit. I modelli log-lineari, soprattutto quelli semplici, sono stati quelli che meglio si adattavano all’andamento della curva di inattivazione termica delle colture CTL (RMSE = 0,2821), confermando che essa era sostanzialmente lineare. Invece, la migliore correlazione per le colture NaCl è stata ottenuta con il modello log-lineare con spalla e coda e con il modello bifasico con spalla, per i quali è stato ottenuto lo stesso valore di RMSE (0,2248). La presenza di una spalla indicherebbe una resistenza iniziale al trattamento termico (Albert & Mafart, 2005), mentre la presenza di una coda suggerirebbe la presenza di una sottopopolazione minore più

resistente al trattamento termico (Geeraerd et al., 2005). Il tasso massimo di inattivazione ( $k_{max}$ ) determinato per la coltura CTL ( $1,39 \pm 0,12$  Log CFU/g/minuto) era in media superiore a quello della coltura NaCl ( $1,03 \pm 0,68$  Log CFU/g/minuto), suggerendo una complessiva maggiore resistenza al calore di *L. monocytogenes* cresciuto in TSYEB con aggiunta di 6% NaCl.

**Tabella 3.3.1.** Risultati dei parametri e dell'analisi statistica ottenuti adattando i valori delle conte delle colture CTL e NaCl a diversi modelli predittivi di sopravvivenza microbica proposti dal software GInaFit

		Modelli di sopravvivenza			
		Regressione Log-Linear		Bifasica	
		Semplice	Con "spalla" e "coda"	Semplice	Con "spalla" e "coda"
0% NaCl	Log ( $N_0$ ) <sup>1</sup>	4.62 ± 0.26	4.44 ± 0.28	4.48 ± 0.62	4.48 ± ND
	Lunghezza spalla <sup>2</sup>	NA	1.03 ± 1.10	NA	2.11 ± ND
	$K1_{max}$ <sup>3</sup>	1.55 ± 0.10	1.25 ± 0.25	1.13 ± 0.26	1.57 ± ND
	$K2_{max}$ <sup>4</sup>	NA	NA	0.00 ± 3.29	0.00 ± ND
	Log ( $N_{res}$ ) <sup>5</sup>	NA	-9.89 ± 0.22	NA	NA
	4D reduction (D) <sup>2,6</sup>	± 8.19 (2.04)	± 8.46 (2.11)	± 8.36 (2.09)	± 8.25 (2.06)
	RMSE	0.2821	0.2841	0.4945	ND
	$R^2$	0.9853	0.9837	0.9728	0.9766
6% NaCl	Log ( $N_0$ ) <sup>1</sup>	5.48 ± 0.89	4.78 ± 1.20	5.48 ± 1.59	4.48 ± 1.06
	Lunghezza spalla <sup>2</sup>	NA	4.78 ± 1.11	NA	4.11 ± 1.09
	$K1_{max}$ <sup>3</sup>	0.90 ± 0.28	1.55 ± 0.99	0.90 ± ND	1.39 ± 0.12
	$K2_{max}$ <sup>4</sup>	NA	NA	0.90 ± ND	1.03 ± 0.68
	Log ( $N_{res}$ ) <sup>5</sup>	NA	-10.14 ± 1.38	NA	NA
	4D reduction (D) <sup>2,6</sup>	± 10.34 (2.58)	± 10.78 (2.69)	± 10.34 (2.58)	± 10.78 (2.69)
	RMSE	1.5140	0.2248	1.7563	0.2248
	$R^2$	0.7035	0.9818	0.7776	0.9818

<sup>1</sup> $N_0$ : concentrazione iniziale dell'inoculo

<sup>2</sup> Tempo in minuti

<sup>3</sup> $K1_{max}$ : Tasso di inattivazione della maggiore subpopolazione più sensibile al trattamento termico (Log CFU/g/minuto)

<sup>4</sup> $K2_{max}$ : Tasso di inattivazione della minore subpopolazione più sensibile al trattamento termico (Log CFU/g/minuto).

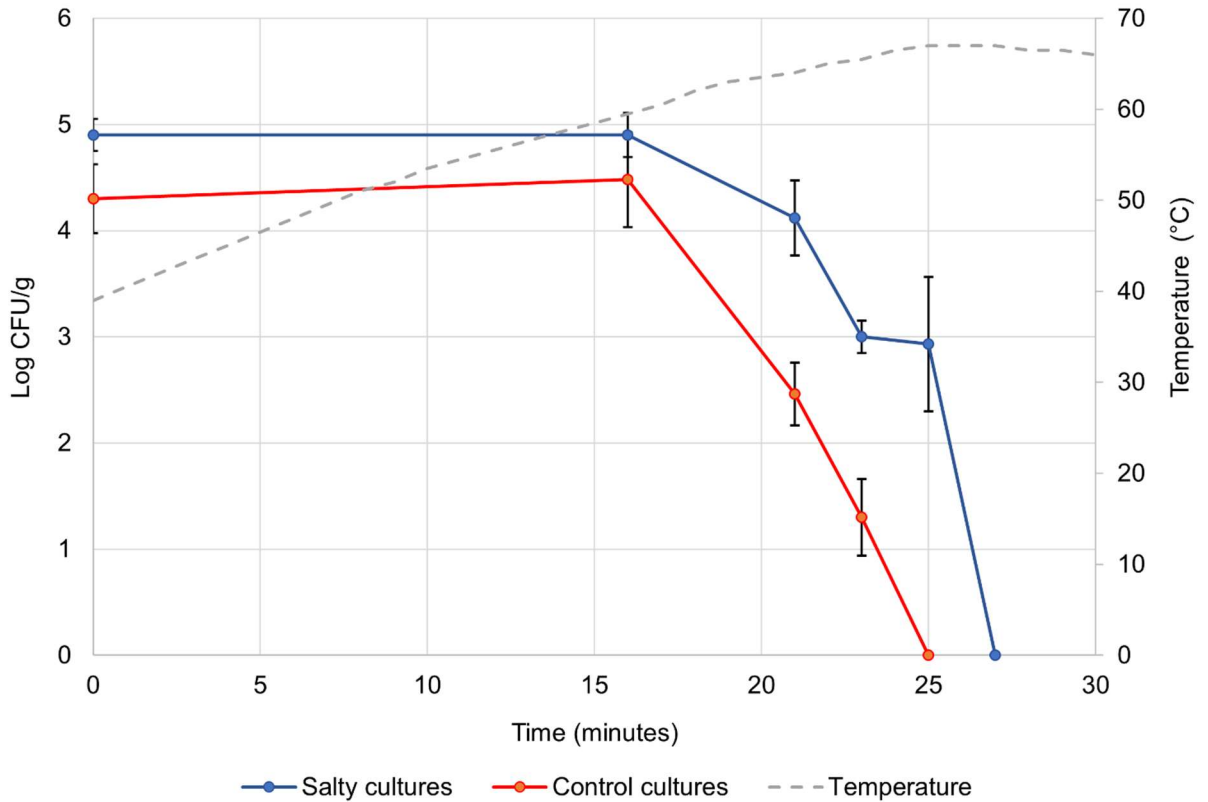
<sup>5</sup> $N_{res}$ : frazione di cellule residue dopo la stabilizzazione alla fine del decremento.

<sup>6</sup>4D: tempo necessario per 4 Log reduction di  $N_0$

NA: non applicabile.

ND: non determinabile. Il software non ha restituito alcun valore.

Le curve di inattivazione delle colture CTL e NaCl sono mostrate in Figura 3.3.3.



**Figura 3.3.3.** Curve di inattivazione di *L. monocytogenes* nelle salsicce, per le colture provenienti da pretrattamento con sale (blu) o controllo (rossa)

La coltura CTL è stata completamente inattivata dopo 9 min di cottura mentre, allo stesso time point, la concentrazione delle colture NaCl era  $2,93 \pm 0,63$  Log CFU/g, confermando la presenza di una coda nella curva di inattivazione e il suo andamento bifasico.

La maggiore resistenza termica di una sottopopolazione minore nella coltura NaCl è stata evidenziata anche dai risultati del Kmax ottenuti con il modello bifasico con spalla. A tal riguardo, il tasso di inattivazione della sottopopolazione maggiore era in media di 0,37 Log CFU/g/minuto più rapido rispetto a quello della sottopopolazione minore.

I risultati del presente studio confermano l'andamento di inattivazione osservato nel nostro precedente studio, in cui *L. monocytogenes* ATCC 7644 cresciuto in TSYEB e in TSYEB con un'ulteriore aggiunta di 6% NaCl è stato esposto a un trattamento termico in vitro a 51 °C. Le curve di inattivazione batterica che riproducevano meglio gli andamenti dei dati reali osservati nelle colture CTL e NaCl erano, rispettivamente, lineare e bifasica. I meccanismi di risposta allo stress osmotico forniscono interessanti spunti per comprendere le ragioni della resistenza termica della coltura NaCl. Numerose evidenze

suggeriscono che le risposte adattative innescate dall'esposizione allo stress di *L. monocytogenes* non solo influenzano le sue dinamiche di crescita, ma conferiscono anche una protezione crociata verso altri stressori (Wiktorczyk-Kapischke et al., 2021). Lee et al. (2016) hanno riportato che l'esposizione in vitro a 1%, 2% e 4% NaCl aumentava la resistenza termica contro un trattamento a 60 °C in 6 diversi ceppi di *L. monocytogenes*. La risposta allo stress osmotico comporta anche l'espressione di geni che codificano proteine da shock termico, come DnaK, ClpC ATPase, ClpP serine prosthesis e Ctc protein, solitamente espresse quando *L. monocytogenes* è esposto a un trattamento termico sub-letale (Wiktorczyk-Kapischke et al., 2021). Nel contesto del presente studio, il sale potrebbe essere considerato uno stressore che induce una protezione crociata contro il calore nella coltura NaCl, che resiste più a lungo al ciclo di cottura, come evidenziato anche dal tasso di inattivazione più basso ( $K_{max} = 1,39 \pm 0,12 \text{ Log CFU/g/minuto}$ ) rispetto alla coltura CTL ( $K_{max} = 1,55 \pm 0,10 \text{ Log CFU/g/minuto}$ ).

Potremmo ipotizzare che l'eterogeneità tra le cellule all'interno di una popolazione batterica spieghi perché alcune cellule, che potrebbero essere definite persistenti, siano generalmente ancora più resistenti al calore. Secondo Bertrand (2019), le differenze fenotipiche tra cellule geneticamente identiche, come differenze individuali nella tolleranza allo stress e nella durata della latenza, possono essere considerate una strategia di difesa della popolazione. In un ambiente imprevedibile, la varianza nelle dinamiche di crescita e nella risposta allo stress all'interno di una popolazione batterica esposta a un insulto battericida può favorire la sopravvivenza di un sottogruppo di cellule in grado di riprendere la crescita una volta che le condizioni migliorano. Ad esempio, una quota di cellule in una popolazione può essere in grado di replicare più rapidamente di altre che, invece, sono generalmente più tolleranti agli insulti esterni grazie alla loro maggiore adattabilità (Geisel et al., 2011).

Concludendo, la persistenza batterica attraverso un tasso di crescita rallentato potrebbe minacciare seriamente la sicurezza alimentare; tuttavia, la sua rilevanza nel settore alimentare ancora oggi rimane sottostimata. Il presente studio ha evidenziato come *L. monocytogenes* sia potenzialmente capace di adottare questa strategia di difesa in seguito all'esposizione a stress osmotico, che ha indotto una maggiore resistenza termica. *L.*

*monocytogenes* nei würstel potrebbe essere correlato non solo a una contaminazione superficiale post-cottura, ma anche durante la preparazione dell'emulsione con ceppi termoresistenti. Considerando i casi di listeriosi associati al consumo di würstel (salsicce di suino) (RASFF, 2022) e i risultati del presente studio, una corretta pastorizzazione post-confezionamento rappresenta il punto critico di controllo per gestire il rischio *L. monocytogenes*. La formazione di cellule persistenti è stata suggerita dall'osservazione dei loro due tratti distintivi: la fase di latenza più lunga e la presenza di una coda nella curva di inattivazione termica. La persistenza batterica attraverso un tasso di crescita rallentato potrebbe minacciare seriamente la sicurezza alimentare; tuttavia, la sua rilevanza nel settore alimentare ancora oggi rimane sottostimata. Pertanto, ulteriori studi sulla persistenza in relazione alla produzione alimentare sono certamente auspicabili.

## Conclusioni

Il fenomeno della persistenza microbica rappresenta oggi una delle principali sfide concettuali e operative nell'ambito della microbiologia applicata alla sicurezza alimentare. Nel corso di questo lavoro di dottorato, tale fenomeno è stato analizzato in modo sistematico, integrando una revisione critica della letteratura con attività sperimentali mirate allo studio di *Listeria monocytogenes*, microrganismo di rilevanza primaria per la sanità pubblica veterinaria e per l'industria alimentare.

L'analisi dello stato dell'arte ha evidenziato come la persistenza non possa essere interpretata come un semplice corollario della resistenza antibiotica, bensì come una strategia adattativa distinta, prevalentemente fenotipica, caratterizzata dalla presenza di sottopopolazioni cellulari metabolicamente eterogenee e transitorie. In questo contesto, il superamento della tradizionale dicotomia resistenza/sensibilità emerge come un passaggio fondamentale per comprendere le dinamiche di sopravvivenza microbica in ambienti sottoposti a stress tecnologici e ambientali. La persistenza, così come descritta nel modello concettuale "Yin-Yang", appare infatti come un continuum dinamico di stati fisiologici che consente alle popolazioni batteriche di modulare la propria risposta in funzione delle condizioni esterne.

Le attività sperimentali condotte hanno fornito un contributo originale alla comprensione dei meccanismi di induzione della persistenza in *L. monocytogenes* a seguito di stress osmotico. In particolare, l'analisi stocastica delle distribuzioni della fase di latenza a livello di singola colonia ha permesso di evidenziare un significativo allungamento dei tempi di adattamento in una frazione della popolazione batterica esposta a elevate concentrazioni di NaCl. Tale risultato conferma che lo stress osmotico non agisce esclusivamente come fattore selettivo, ma può fungere da vero e proprio trigger fisiologico per l'ingresso delle cellule in uno stato persistenter, incrementando l'eterogeneità fenotipica della popolazione.

L'impiego di strumenti innovativi quali il software ScanLag ha consentito di superare i limiti delle analisi condotte esclusivamente a livello di popolazione, rendendo possibile la quantificazione indiretta delle cellule persistenter attraverso l'osservazione delle code di distribuzione dei tempi di comparsa delle colonie. Questo approccio metodologico si è

rivelato particolarmente efficace nel dimostrare come la persistenza possa essere indotta in modo prevedibile da condizioni sub-letali frequentemente riscontrabili nei processi di trasformazione e conservazione degli alimenti.

Un ulteriore elemento di rilevanza emerso da questo lavoro riguarda la relazione tra persistenza e termoresistenza. I risultati ottenuti sia in vitro sia nel modello alimentare rappresentato da salsicce di suino sperimentalmente contaminate hanno mostrato come le popolazioni di *L. monocytogenes* precedentemente esposte a stress osmotico presentino curve di inattivazione termica significativamente diverse rispetto ai controlli. In particolare, la presenza di spalle (“shoulder”) e code (“tail”) più pronunciate nelle curve di sopravvivenza suggerisce che la persistenza possa contribuire a una ridotta efficacia dei trattamenti termici tradizionali, aumentando la probabilità di sopravvivenza di una frazione della popolazione microbica.

Questi risultati assumono un’importanza cruciale nell’ambito della sicurezza alimentare, poiché mettono in discussione l’assunto secondo cui il rispetto dei parametri tempo-temperatura comunemente adottati sia sempre sufficiente a garantire l’eliminazione dei patogeni. La presenza di cellule persister termotolleranti implica infatti un rischio residuo che potrebbe non essere adeguatamente intercettato dai modelli predittivi classici, basati su cinetiche di inattivazione omogenee. In tale prospettiva, l’integrazione del concetto di persistenza nei modelli di valutazione del rischio microbiologico appare non solo auspicabile, ma necessaria.

Dal punto di vista applicativo, i risultati di questa tesi suggeriscono la necessità di riconsiderare l’impatto cumulativo degli stress sub-letali lungo la filiera produttiva. Condizioni quali elevata salinità, refrigerazione, modifiche del pH o trattamenti tecnologici blandi, sebbene adottate per migliorare la qualità e la shelf-life degli alimenti, possono paradossalmente favorire l’emergere di sottopopolazioni persistenti, più difficili da eliminare con i successivi interventi di bonifica. Questo aspetto risulta particolarmente critico per alimenti pronti al consumo, nei quali *L. monocytogenes* rappresenta uno dei principali pericoli microbiologici.

In conclusione, il presente lavoro contribuisce ad ampliare le conoscenze sui fenomeni di persistenza microbica, evidenziandone il ruolo potenziale nella sopravvivenza di *L.*

*monocytogenes* a stress tecnologici rilevanti per l'industria alimentare. Le evidenze sperimentali ottenute supportano l'ipotesi che la persistenza non sia un evento raro o marginale, ma una componente strutturale dell'ecologia microbica, capace di influenzare in modo significativo l'efficacia delle strategie di controllo.

Alla luce di quanto emerso, future linee di ricerca dovrebbero concentrarsi sull'integrazione dei parametri di persistenza nei modelli di microbiologia predittiva, sullo sviluppo di metodi rapidi per l'identificazione delle sottopopolazioni persister e sulla valutazione combinata di stress multipli lungo la filiera alimentare. Solo attraverso un approccio multidisciplinare e sistemico sarà possibile tradurre le conoscenze acquisite in strumenti concreti di prevenzione e gestione del rischio, contribuendo al miglioramento della sicurezza alimentare e della tutela della salute pubblica.

## Bibliografia

1. Ackermann M., A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.*, 13(8), 497-508, 2015.
2. Adams, K. N., et al. (2011). Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism. *Cell*, 145, 39–53.
3. Al Mamun, A. A., Lombardo, M. J., Shee, C., Lisewski, A. M., Gonzalez, C., Lin, D., Nehring, R. B., Saint-Ruf, C., Gibson, J. L., Frisch, R. L., Lichtarge, O., Hastings, P. J., & Rosenberg, S. M. (2012). Identity and function of a large gene network underlying mutagenic repair of DNA breaks. *Science*, 338, 1344–1348. <https://doi.org/10.1126/science.1226683>
4. Al-Bana, B. H., Haddad, M. T., & Garduño, R. A. (2014). Stationary phase and mature infectious forms of *Legionella pneumophila* produce distinct viable but nonculturable cells. *Environmental Microbiology*, 16, 382–395. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12208>
5. Albert, I. & Mafart, P. (2005). A modified Weibull model for bacterial inactivation. *International Journal of Food Microbiology*, 100, 197–211.
6. Ali, L., et al. (2017). Molecular mechanism of quorum sensing in *Enterococcus faecalis*: Its role in virulence and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 960.
7. Allison, K. R., Brynildsen, M. P., & Collins, J. J. (2011). Heterogeneous bacterial persisters and engineering approaches to eliminate them. *Current Opinion in Microbiology*, 14, 593–598.
8. Allison, K. R., Brynildsen, M. P., & Collins, J. J. (2011). Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature*, 473, 216–220. <https://doi.org/10.1038/nature10069>
9. Allon, M. (2005). Saving infected catheters: Why and how. *Blood Purification*, 23, 23–28. <https://doi.org/10.1159/000082013>
10. AlMatar, M., Albarri, O., Makky, E. A., & Koksai, F. (2021). Efflux pump inhibitors: New updates. *Pharmaceutical Reports*, 73, 1–16.
11. Al-Nabulsi, A.A., Osaili, T.M., Shaker, R.R., Olaimat, A.N., Jaradat, Z.W., Elabedeen, N.A. Z., et al., 2015. Effects of osmotic pressure, acid, or cold stresses on antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 46, 154–160.
12. ARYANI D. C. et al., Quantifying variability on thermal resistance of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, 193, 130-138, 2015.
13. Ayibieke, A., Nishiyama, A., Senoh, M., & Hamabata, T. (2023). Gene expression analysis during the conversion from a viable but nonculturable to culturable state in *Vibrio cholerae*. *Gene*, 863, 147289. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147289>
14. Ayrapetyan, M., Williams, T. C., Baxter, R., & Oliver, J. D. (2015). Viable but nonculturable and persister cells coexist stochastically and are induced by human serum. *Infection and Immunity*, 83, 4194–4203. <https://doi.org/10.1128/IAI.00404-15>
15. Ayrapetyan, M., Williams, T., & Oliver, J. D. (2018). Relationship between the viable but nonculturable state and antibiotic persister cells. *Journal of Bacteriology*, 200, e00249-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00249-18>
16. Baba, T., et al. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2, 2006.0008. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
17. Bae, D., Liu, C., Zhang, T., Jones, M., Peterson, S.N. & Wang, C. (2012). Global gene expression of *Listeria monocytogenes* to salt stress. *Journal of Food Protection*, 75, 906–912.
18. Bahar, A. A., et al. (2015). Synthetic dendrimeric peptide active against biofilm and persister cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 8125–8135.
19. Baharoglu, Z., & Mazel, D. (2014). SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiology Reviews*, 38, 1126–1145. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12077>
20. Balaban, N. Q., et al. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*, 305, 1622–1625. <https://doi.org/10.1126/science.1099390>
21. Balaban, N. Q., et al. (2019). Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 441–448. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0196-3>
22. Balaban, N. Q., Gerdes, K., Lewis, K., & McKinney, J. D. (2013). A problem of persistence: Still more questions than answers? *Nature Reviews Microbiology*, 11, 587–591. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3076>

23. Bar, J., et al. (2020). Efficient microbial colony growth dynamics quantification with ColTapp, an automated image analysis application. *Scientific Reports*, 10, 16084. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73038-3>
24. BARANYI J. & ROBERTS T. A., A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.*, 23(3-4), 277-294,1994.
25. Bassler, B. L., & Losick, R. (2006). Bacterially speaking. *Cell*, 125, 237–246.
26. Beaber, J. W., Hochhut, B., & Waldor, M. K. (2004). SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, 427, 72–74. <https://doi.org/10.1038/nature02241>
27. Berghoff, B. A., Hoekzema, M., Aulbach, L., & Wagner, E. G. H. (2017). Two regulatory RNA elements affect TisB-dependent depolarization and persister formation. *Molecular Microbiology*, 103, 1020–1033. <https://doi.org/10.1111/mmi.13601>
28. Bergholz, T.M., Bowen, B., Wiedmann, M., Boor, K.J., 2012. *Listeria monocytogenes* shows temperature-dependent and-independent responses to salt stress, including responses that induce cross-protection against other stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (8), 2602–2612.
29. Bertrand, R.L. (2019). Lag-phase is a dynamic, organized, adaptive, and evolvable period that prepares bacteria for cell division. *Journal of Bacteriology*, 201,10–1128.
30. Bertrand, R.L. (2019). Lag-phase is a dynamic, organized, adaptive, and evolvable period that prepares bacteria for cell division. *Journal of Bacteriology*, 201,10–1128.
31. Best, G. K., Best, N. H., & Koval, A. V. (1974). Evidence for participation of autolysins in bactericidal action of oxacillin on *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 6, 825–830. <https://doi.org/10.1128/AAC.6.6.825>
32. Betts, J. C., et al. (2002). Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Molecular Microbiology*, 43, 717–731.
33. Biase, D. D., Tramonti, A., Bossa, F., & Visca, P. (1999). The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: Role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system. *Molecular Microbiology*, 32, 1198–1211. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01428.x>
34. Biase, D., & Pennacchietti, E. (2012). Glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in orally acquired bacteria: Function, distribution and biomedical implications of the gadBC operon. *Molecular Microbiology*, 86, 770–786. <https://doi.org/10.1111/mmi.12020>
35. Bigger, J. W. (1944). Treatment of staphylococcal infections with penicillin. *The Lancet*, 244, 497–500. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)87445-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)87445-7)
36. BLAIR J. et al., Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.*, 13(1), 42-51, 2015.
37. BLESSINGTON T. et al., Survival of foodborne pathogens on inshell walnuts. *Int. J. Food Microbiol* 166:341–348, 2013.
38. Bollen, C., Dewachter, L., & Michiels, J. (2021). Protein aggregation as a bacterial strategy to survive antibiotic treatment. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 669664. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.669664>
39. Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., & Balaban, N. Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 320–330. <https://doi.org/10.1038/nrmi-cro.2016.34>
40. Brauner, A., Shores, N., Fridman, O., & Balaban, N. Q. (2017). An experimental framework for quantifying bacterial tolerance. *Biophysical Journal*, 112, 2664–2671. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.05.014>
41. Brennan, R. O., & Durack, D. T. (1983). Therapeutic significance of penicillin tolerance in experimental streptococcal endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 23, 273–277. <https://doi.org/10.1128/AAC.23.2.273>
42. Bryson, D., Hettle, A. G., Boraston, A. B., & Hobbs, J. K. (2020). Clinical mutations that partially activate the stringent response confer multidrug tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64, e02103-19.
43. Bucur, F.I., Grigore-Gurgu, L., Crauwels, P., Riedel, C.U. & Nico lau, A.I. (2018). Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered in food and food processing environments. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2700.
44. Bucur, F.I., Grigore-Gurgu, L., Crauwels, P., Riedel, C.U., Nicolau, A.I., 2018. Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered in food and food processing environments. *Front. Microbiol.* 9, 2700. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02700>.

45. Bucur, F.I., Grigore-Gurgu, L., Crauwels, P., Riedel, C.U., Nicolau, A.I., 2018. Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered
46. Bucur, F.I., Grigore-Gurgu, L., Crauwels, P., Riedel, C.U., Nicolau, A.I., 2018. Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered in food and food processing environments. *Front. Microbiol.* 9, 2700.
47. Cabello, F. C., Godfrey, H. P., Bugrysheva, J. V., & Newman, S. A. (2017). Sleeper cells: The stringent response and persistence in the *Borrelia* (Borrelia) burgdorferi enzootic cycle. *Environmental Microbiology*, 19, 3846–3862.
48. Cacace, G., Mazzeo, M.F., Sorrentino, A., Spada, V., Malorni, A., Siciliano, R.A., 2010. Proteomics for the elucidation of cold adaptation mechanisms in *Listeria monocytogenes*. *J. Proteome* 73, 2021–2030. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.011>.
49. Cameron, D. R., et al. (2018). A genetic determinant of persister cell formation in bacterial pathogens. *Journal of Bacteriology*, 200, e00303-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00303-18>
50. Campos-Silva, R., et al. (2021). Trans-translation is an appealing target for the development of new antimicrobial compounds. *Microorganisms*, 10, 3. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010003>
51. Casasola-Rodríguez, B., et al. (2018). Detection of VBNC *Vibrio cholerae* by RT–real-time PCR based on differential gene expression analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 365, fny026. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny026>
52. Castillo-Juarez, I., et al. (2015). Role of quorum sensing in bacterial infections. *World Journal of Clinical Cases*, 3, 575–598.
53. Cervero-Aragó, S., et al. (2019). Viability and infectivity of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* strains induced at high temperatures. *Water Research*, 158, 268–279. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.04.032>
54. Chan, Y.C., Raengpradub, S., Boor, K.J., Wiedmann, M., 2007. Microarraybased characterization of the *Listeria monocytogenes* cold regulon in log- and stationary- phase cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6484–6498.
55. Chen, X., et al. (2011). Control of bacterial persister cells by Trp/Arg-containing antimicrobial peptides. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 4878–4885.
56. Cheverton, A. M., et al. (2016). A *Salmonella* toxin promotes persister formation through acetylation of tRNA. *Molecular Cell*, 63, 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.002>
57. Chung, M., et al. (2018). Phenotypic signatures and genetic determinants of oxacillin tolerance in a laboratory mutant of *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE*, 13, e0199707. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199707>
58. Conlon, B. P., et al. (2016). Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. *Nature Microbiology*, 1, 16051. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.51>
59. Conlon, B. P., Nakayasu, E. S., Fleck, L. E., LaFleur, M. D., Isabella, V. M., Coleman, K., Leonard, S. N., Smith, R. D., Adkins, J. N., & Lewis, K. (2013). Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. *Nature*, 503, 365–370. <https://doi.org/10.1038/nature12790>
60. Conlon, B. P., Rowe, S. E., Gandt, A. B., Nuxoll, A. S., Donegan, N. P., Zalis, E. A., Clair, G., Adkins, J. N., Cheung, A. L., & Lewis, K. (2016). Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. *Nature Microbiology*, 1, 16051. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.51>
61. Cook, M. A., & Wright, G. D. (2022). The past, present, and future of antibiotics. *Science Translational Medicine*, 14, eabo7793. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.eabo7793>
62. Correia, F. F., et al. (2006). Kinase activity of overexpressed HipA is required for growth arrest and multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 188, 8360–8367. <https://doi.org/10.1128/JB.01016-06>
63. Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
64. Courcelle, J., Khodursky, A., Peter, B., Brown, P. O., & Hanawalt, P. C. (2001). Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics*, 158, 41–64.
65. Coutard, F., Pommepuy, M., Loaec, S., & Hervio-Heath, D. (2005). mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability and potential virulence in a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 951–961. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02530.x>

66. Cui, P., et al. (2016). Disruption of membrane by colistin kills uropathogenic *Escherichia coli* persisters and enhances killing of other antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60, 6867–6871. <https://doi.org/10.1128/AAC.01304-16>
67. Cui, P., et al. (2018). Identification of genes involved in bacteriostatic antibiotic-induced persister formation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 413. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00413>
68. Curtis, T. D., Takeuchi, I., Gram, L., & Knudsen, G. M. (2017). The influence of the toxin/antitoxin *mazEF* on growth and survival of *Listeria monocytogenes* under stress. *Toxins*, 9, 31. <https://doi.org/10.3390/toxins9010031>
69. Dan, J. M., et al. (2023). Development of host immune response to bacteriophage in a lung transplant recipient on adjunctive phage therapy for a multidrug-resistant pneumonia. *Journal of Infectious Diseases*, 227, 311–316.
70. Davidson, D. J., Spratt, D., & Liddle, A. D. (2019). Implant materials and prosthetic joint infection: The battle with the biofilm. *EFORT Open Reviews*, 4, 633–639. <https://doi.org/10.1302/2058-5241.4.180095>
71. De Soir, S., et al. (2024). Exploiting phage-antibiotic synergies to disrupt *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms in the context of orthopedic infections. *Microbiology Spectrum*, 12, e03219-23.
72. DE STEENWINKEL J. E. et al., Time-kill kinetics of anti-tuberculosis drugs, and emergence of resistance, in relation to metabolic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 65(12), 2582-2589, 2010.
73. Debnath, A., & Miyoshi, S.-I. (2021). The impact of protease during recovery from viable but non-culturable (VBNC) state in *Vibrio cholerae*. *Microorganisms*, 9, 2628. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122628>
74. Di Pietro, M., Filardo, S., De Santis, F., & Sessa, R. (2013). New insights into *Chlamydiae* persistence: An energy metabolism strategy? *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 26, 525–528. <https://doi.org/10.1177/039463201302600220>
75. Dietersdorfer, E., et al. (2018). Starved viable but non-culturable (VBNC) *Legionella* strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages. *Water Research*, 141, 428–438. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.05.007>
76. Ding, Y. H., et al. (2023). Role of efflux pumps, their inhibitors, and regulators in colistin resistance. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1207441.
77. Donegan, N. P., Thompson, E. T., Fu, Z., & Cheung, A. L. (2010). Proteolytic regulation of toxin-antitoxin systems by ClpPC in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 192, 1416–1422. <https://doi.org/10.1128/JB.01318-09>
78. Drlica, K., Malik, M., Kerns, R. J., & Zhao, X. (2008). Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 385–392. <https://doi.org/10.1128/AAC.01031-07>
79. Du Toit, A. (2016). Bacterial physiology: Persisters are under the pump. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 332–333.
80. Du, D., et al. (2018). Multidrug efflux pumps: Structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 523–539.
81. Ducret, A., Chabalier, M., & Dukan, S. (2014). Characterization and resuscitation of nonculturable cells of *Legionella pneumophila*. *BMC Microbiology*, 14, 3. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-3>
82. Dupont, C. & Augustin, J.C. (2009). Influence of stress on single-cell lag time and growth probability for *Listeria monocytogenes* in half Fraser broth. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 3069–3076.
83. Durfee, T., et al. (2008). Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 190, 1084–1096.
84. Eisenreich, W., Rudel, T., Heesemann, J. & Goebel, W. (2022). Link between antibiotic persistence and antibiotic resistance in bacterial pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 900848.
85. Eisenreich, W., Rudel, T., Heesemann, J., Goebel, W., 2022. Link between antibiotic persistence and antibiotic resistance in bacterial pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12, 900848
86. Epalle, T., et al. (2015). Viable but not culturable forms of *Legionella pneumophila* generated after heat shock treatment are infectious for macrophage-like and alveolar epithelial cells after resuscitation on *Acanthamoeba polyphaga*. *Microbial Ecology*, 69, 215–224. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0489-4>
87. Fang, T., Wu, Y., Xie, Y., Sun, L., Qin, X., Liu, Y., et al., 2021. Inactivation and subsequent growth kinetics of *Listeria monocytogenes* after various mild bactericidal treatments. *Front. Microbiol.* 12, 646735

88. Fasani, R. A., & Savageau, M. A. (2013). Molecular mechanisms of multiple toxin–antitoxin systems are coordinated to govern the persister phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, E2528–E2537. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301023110>
89. Feng, J., Auwaerter, P. G., & Zhang, Y. (2015). Drug combinations against *Borrelia burgdorferi* persists in vitro: Eradication achieved by using daptomycin, cefoperazone, and doxycycline. *PLoS ONE*, 10, e0117207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117207>
90. Feng, J., et al. (2014). Identification of novel activity against *Borrelia burgdorferi* persists using an FDA-approved drug library. *Emerging Microbes & Infections*, 3, e49. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.49>
91. Feng, J., et al. (2016). A drug combination screen identifies drugs active against amoxicillin-induced round bodies of in vitro *Borrelia burgdorferi* persists from an FDA drug library. *Frontiers in Microbiology*, 7, 743. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00743>
92. Feng, J., et al. (2016). Eradication of biofilm-like microcolony structures of *Borrelia burgdorferi* by daunomycin and daptomycin but not mitomycin C in combination with doxycycline and cefuroxime. *Frontiers in Microbiology*, 7, 62. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00062>
93. Feng, J., et al. (2017). Selective essential oils from spice or culinary herbs have high activity against stationary phase and biofilm *Borrelia burgdorferi*. *Frontiers in Medicine*, 4, 169.
94. Feng, J., et al. (2019). Stationary phase persister/biofilm microcolony of *Borrelia burgdorferi* causes more severe disease in a mouse model of Lyme arthritis: Implications for understanding persistence, post-treatment Lyme disease syndrome (PTLDS), and treatment failure. *Discovery Medicine*, 27, 125–138.
95. Feng, J., Leone, J., Schweig, S., & Zhang, Y. (2020). Evaluation of natural and botanical medicines for activity against growing and non-growing forms of *Borrelia burgdorferi*. *Frontiers in Medicine*, 7, 6. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00006>
96. Feng, J., Shi, W., Zhang, S., & Zhang, Y. (2015). Identification of new compounds with high activity against stationary phase *Borrelia burgdorferi* from the NCI compound collection. *Emerging Microbes & Infections*, 4, e31.
97. Feng, J., Shi, W., Zhang, S., & Zhang, Y. (2015). Persister mechanisms in *Borrelia burgdorferi*: Implications for improved intervention. *Emerging Microbes & Infections*, 4, e51. <https://doi.org/10.1038/emi.2015.51>
98. Feng, J., Zhang, S., Shi, W. L., & Zhang, Y. (2017). Activity of sulfa drugs and their combinations against stationary phase *Borrelia burgdorferi* in vitro. *Antibiotics*, 6, 10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics6010010>
99. Feng, J., Zhang, S., Shi, W., & Zhang, Y. (2016). Ceftriaxone pulse dosing fails to eradicate biofilm-like microcolony *Borrelia burgdorferi* persists which are sterilized by daptomycin/doxycycline/cefuroxime without pulse dosing. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1744. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01744>
100. Fernández de Henestrosa, A. R., et al. (2000). Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 35, 1560–1572. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01802.x>
101. Fisher, R. A., Gollan, B., & Helaine, S. (2017). Persistent bacterial infections and persister cells. *Nature Reviews Microbiology*, 15, 453–464. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.42>
102. Foster, J. W. (2004). *Escherichia coli* acid resistance: Tales of an amateur acidophile. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 898–907. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1021>
103. FRANCOIS K. et al., Modelling the individual cell lag phase: effect of temperature and pH on the individual cell lag distribution of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, 100(1-3), 41-53, 2005.
104. Frees, D., Savijoki, K., Varmanen, P., & Ingmer, H. (2007). Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 63, 1285–1295. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05598.x>
105. Fung, D. K., Chan, E. W., Chin, M. L., & Chan, R. C. (2010). Delineation of a bacterial starvation stress response network which can mediate antibiotic tolerance development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 1082–1093. <https://doi.org/10.1128/AAC.01237-09>
106. Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P. & Van Impe, J.F. (2005). GIna FiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*, 102,95–105.
107. Gefen, O., & Balaban, N. Q. (2009). The importance of being persistent: Heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. *FEMS Microbiology Reviews*, 33, 704–717.

108. Gefen, O., Chekol, B., Strahilevitz, J., & Balaban, N. Q. (2017). TDtest: Easy detection of bacterial tolerance and persistence in clinical isolates by a modified disk-diffusion assay. *Scientific Reports*, 7, 41284. <https://doi.org/10.1038/srep41284>
109. Geisel, N., Vilar, J.M. & Rubi, J.M. (2011). Optimal resting-growth strategies of microbial populations in fluctuating environments. *PLoS One*, 6, e18622.
110. Georgalis, L., Yeak, K.Y.C., Tsimpou, C., Fernandez, P.S., Wells Bennik, M. & Garre, A. (2023). Disentangling the contributions of initial heterogeneities and dynamic stress adaptation to nonlinearities in bacterial survival curves. *Food Research International*, 173, 113385.
111. Gerdes, K., & Maisonneuve, E. (2012). Bacterial persistence and toxin-antitoxin loci. *Annual Review of Microbiology*, 66, 103–123. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150159>
112. Gerdes, K., & Semsey, S. (2016). Microbiology: Pumping persisters. *Nature*, 534, 41–42.
113. Germain, E., Castro-Roa, D., Zenkin, N., & Gerdes, K. (2013). Molecular mechanism of bacterial persistence by HipA. *Molecular Cell*, 52, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.045>
114. Germain, E., Roghanian, M., Gerdes, K., & Maisonneuve, E. (2015). Stochastic induction of persister cells by HipA through (p)ppGpp-mediated activation of mRNA endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 5171–5176. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423536112>
115. Germain, E., Roghanian, M., Gerdes, K., & Maisonneuve, E. (2019). Stochastic induction of persister cells by HipA through (p)ppGpp-mediated activation of mRNA endonucleases (Retraction). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116, 11077. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905013116>
116. Giarratana, F., Nalbone, L., Ziino, G., Donato, G., Marotta, S.M., Lamberta, F., et al., 2022. Temperature fluctuations along food supply chain: a dynamic and stochastic predictive approach to establish the best temperature value in challenge tests for *Listeria monocytogenes*. *Ital. J. Food Saf.* 11 (1)
117. Gil-Gil, T., et al. (2023). The evolution of heteroresistance via small colony variants in *Escherichia coli* following long-term exposure to bacteriostatic antibiotics. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.01.10.523471>
118. Girgis, H. S., Harris, K., & Tavazoie, S. (2012). Large mutational target size for rapid emergence of bacterial persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 12740–12745. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205126109>
119. Glauser, M. P., Bernard, J. P., Moreillon, P., & Francioli, P. (1983). Successful single-dose amoxicillin prophylaxis against experimental streptococcal endocarditis: Evidence for two mechanisms of protection. *The Journal of Infectious Diseases*, 147, 568–575. <https://doi.org/10.1093/infdis/147.3.568>
120. Glover, W. A., Yang, Y., & Zhang, Y. (2009). Insights into the molecular basis of L-form formation and survival in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 4, e7316. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007316>
121. Goode, O., et al. (2021). Persister *Escherichia coli* cells have a lower intracellular pH than susceptible cells but maintain their pH in response to antibiotic treatment. *mBio*, 12, e00909-21. <https://doi.org/10.1128/mbio.00909-21>
122. Goormaghtigh, F., et al. (2018). Reassessing the role of type II toxin-antitoxin systems in formation of *Escherichia coli* type II persister cells. *mBio*, 9, e00640-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00640-18>
123. Gordon, R. C., Barrett, F. F., & Clark, D. J. (1972). Influence of several antibiotics, singly and in combination, on the growth of *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Pediatrics*, 80, 667–670. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(72\)80260-9](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(72)80260-9)
124. Gunde-Cimerman, N., Plemenitas, A. & Oren, A. (2018). Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiology Reviews*, 42, 353–375.
125. Gusarov, I., Shatalin, K., Starodubtseva, M., & Nudler, E. (2009). Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. *Science*, 325, 1380–1384. <https://doi.org/10.1126/science.1175439>
126. Han, J., et al. (2015). Conditions and mutations affecting *Staphylococcus aureus* L-form formation. *Microbiology*, 161, 57–66. <https://doi.org/10.1099/mic.0.083444-0>
127. Han, T. H., et al. (2011). Environmental factors affecting indole production in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*, 162, 108–116.
128. Han, Y., et al. (2017). Indole-induced reversion of intrinsic multiantibiotic resistance in *Lysobacter enzymogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83, e00995-17.

129. HANDWERGER, S. & TOMASZ A., Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Rev. Infect. Dis.*, 368-386,1985.
130. Hansen, S., Lewis, K., & Vulić, M. (2008). Role of global regulators and nucleotide metabolism in antibiotic tolerance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 2718–2726. <https://doi.org/10.1128/AAC.00144-08>
131. Harms, A., Brodersen, D. E., Mitarai, N., & Gerdes, K. (2018). Toxins, targets, and triggers: An overview of toxin–antitoxin biology. *Molecular Cell*, 70, 768–784. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.003>
132. Harms, A., Maisonneuve, E., & Gerdes, K. (2016). Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science*, 354, aaf4268. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4268>
133. Harrison, J. J., et al. (2009). The chromosomal toxin gene *yafQ* is a determinant of multidrug tolerance for *Escherichia coli* growing in a biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 2253–2258. <https://doi.org/10.1128/AAC.01338-08>
134. Haurlyliuk, V., et al. (2015). Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 13, 298–309.
135. Hayes, F., & Van Melderen, L. (2011). Toxins–antitoxins: Diversity, evolution and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 46, 386–408. <https://doi.org/10.3109/10409238.2011.600437>
136. Helaine, S., et al. (2014). Internalization of *Salmonella* by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science*, 343, 204–208.
137. Hengge, R. (2011). Stationary-phase gene regulation in *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*, 4.
138. Hicks, N. D., et al. (2018). Clinically prevalent mutations in *Mycobacterium tuberculosis* alter propionate metabolism and mediate multidrug tolerance. *Nature Microbiology*, 3, 1032–1042. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0218-3>
139. Hirakawa, H., et al. (2005). Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 55, 1113–1126.
140. Hobby, G. L., Meyer, K., & Chaffee, E. (1942). Observations on the mechanism of action of penicillin. *Experimental Biology and Medicine*, 50, 5. <https://doi.org/10.3181/00379727-50-13729>
141. Holden, D. W., & Errington, J. (2018). Type II toxin–antitoxin systems and persister cells. *mBio*, 9, e01574–18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01574-18>
142. Holloway, Y., & Dankert, J. (1982). Penicillin tolerance in nutritionally variant streptococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 22, 1073–1075. <https://doi.org/10.1128/AAC.22.6.1073>
143. Holloway, Y., Dankert, J., & Hess, J. (1980). Penicillin tolerance and bacterial endocarditis. *The Lancet*, 315(8175), 589. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(80\)92221-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(80)92221-5)
144. Hong, S. H., et al. (2012). Bacterial persistence increases as environmental fitness decreases. *Microbial Biotechnology*, 5, 509–522.
145. Horne, D., & Tomasz, A. (1977). Tolerant response of *Streptococcus sanguis* to beta-lactams and other cell wall inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 11, 888–896. <https://doi.org/10.1128/AAC.11.5.888>
146. Hu, Y., & Coates, A. R. (2013). Enhancement by novel anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* compound HT61 of the activity of neomycin, gentamicin, mupirocin and chlorhexidine: In vitro and in vivo studies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68, 374–384.
147. Hu, Y., & Coates, A. R. M. (2005). Transposon mutagenesis identifies genes which control antimicrobial drug tolerance in stationary-phase *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 243, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.11.041>
148. Hu, Y., Benedik, M. J., & Wood, T. K. (2012). Antitoxin DinJ influences the general stress response through transcript stabilizer CspE. *Environmental Microbiology*, 14, 669–679.
149. Hu, Y., et al. (2015). Toxin YafQ increases persister cell formation by reducing indole signalling. *Environmental Microbiology*, 17, 1275–1285. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12598>
150. Hu, Y., et al. (2019). Bedaquiline kills persistent *Mycobacterium tuberculosis* with no disease relapse: An in vivo model of a potential cure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74, 1627–1633.
151. Hu, Y., Shamaei-Tousi, A., Liu, Y., & Coates, A. (2010). A new approach for the discovery of antibiotics by targeting non-multiplying bacteria: A novel topical antibiotic for staphylococcal infections. *PLoS ONE*, 5, e11818.

152. Huang, C. Y., et al. (2020). hipBA toxin–antitoxin systems mediate persistence in *Caulobacter crescentus*. *Scientific Reports*, 10, 2865. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59767-9>
153. Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Brugger, S. D., & Zinkernagel, A. S. (2020). Antibiotic resistance and persistence: Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Reports*, 21, e51034. <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>
154. Illigmann, A., et al. (2021). Contribution of the Clp protease to bacterial survival and mitochondrial homeostasis. *Microbial Physiology*, 31, 260–279. <https://doi.org/10.1159/000515570>
155. Jain, V., Kumar, M., & Chatterji, D. (2006). ppGpp: Stringent response and survival. *Journal of Microbiology*, 44, 1–10.
156. Ju, Y., et al. (2021). Recent advances in Clp protease modulation to address virulence, resistance and persistence of MRSA infection. *Drug Discovery Today*, 26, 2190–2197. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.05.017>
157. Jubair, M., Morris, J. G., Jr., & Ali, A. (2012). Survival of *Vibrio cholerae* in nutrient-poor environments is associated with a novel “persister” phenotype. *PLoS ONE*, 7, e45187.
158. Kahl, B. C., Becker, K., & Löffler, B. (2016). Clinical significance and pathogenesis of staphylococcal small colony variants in persistent infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 29, 401–427. <https://doi.org/10.1128/CMR.00069-15>
159. Kaplan, Y., et al. (2021). Observation of universal ageing dynamics in antibiotic persistence. *Nature*, 600, 290–294. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04130-z>
160. Karimaei, S., Aghamir, S. M. K., & Pourmand, M. R. (2024). Comparative analysis of gene expression involved in type II toxin–antitoxin systems in *Staphylococcus aureus* following persister cell formation. *Molecular Biology Reports*, 51, 324. <https://doi.org/10.1007/s11033-024-09263-3>
161. Kaspy, I., et al. (2013). HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA synthetase. *Nature Communications*, 4, 3001. <https://doi.org/10.1038/ncomms4001>
162. Kawai, Y., et al. (2018). AldB controls persister formation in *Escherichia coli* depending on environmental stress. *Microbiology and Immunology*, 62, 299–309. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12593>
163. Kaye, D. (1982). Enterococci: Biologic and epidemiologic characteristics and in vitro susceptibility. *Archives of Internal Medicine*, 142, 2006–2009. <https://doi.org/10.1001/archinte.1982.00340220124023>
164. Kedzierska, B., & Hayes, F. (2016). Emerging roles of toxin–antitoxin modules in bacterial pathogenesis. *Molecules*, 21, 790. <https://doi.org/10.3390/molecules21060790>
165. Keiler, K. C. (2008). Biology of trans-translation. *Annual Review of Microbiology*, 62, 133–151. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162948>
166. Keren, I., et al. (2004). Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiology Letters*, 230, 13–18. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00856-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00856-5)
167. Keren, I., et al. (2004). Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 186, 8172–8180. <https://doi.org/10.1128/JB.186.24.8172-8180.2004>
168. Keren, I., Minami, S., Rubin, E., & Lewis, K. (2011). Characterization and transcriptome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* persisters. *mBio*, 2, e00100-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00100-11>
169. Kester, J. C., & Fortune, S. M. (2014). Persisters and beyond: Mechanisms of phenotypic drug resistance and drug tolerance in bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49, 91–101. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.869543>
170. Kim, J. S., Chowdhury, N., Yamasaki, R., & Wood, T. K. (2018). Viable but non-culturable and persistence describe the same bacterial stress state. *Environmental Microbiology*, 20, 2038–2048. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14119>
171. Kim, J. S., et al. (2011). Selective killing of bacterial persisters by a single chemical compound without affecting normal antibiotic-sensitive cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55, 5380–5383.
172. Kim, W., et al. (2015). Identification of an antimicrobial agent effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* persisters using a fluorescence-based screening strategy. *PLoS ONE*, 10, e0127640.
173. Kim, W., et al. (2016). NH125 kills methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* persisters by lipid bilayer disruption. *Future Medicinal Chemistry*, 8, 257–269.
174. Kim, W., et al. (2018). A new class of synthetic retinoid antibiotics effective against bacterial persisters. *Nature*, 556, 103–107.

175. Kim, W., et al. (2018). Discovery and optimization of nTZDpa as an antibiotic effective against bacterial persisters. *ACS Infectious Diseases*, 4, 1540–1545.
176. Kim, W., et al. (2020). The neutrally charged diarylurea compound PQ401 kills antibiotic-resistant and antibiotic-tolerant *Staphylococcus aureus*. *mBio*, 11, e01140-20.
177. Korch, S. B., Malhotra, V., Contreras, H., & Clark-Curtiss, J. E. (2015). The *Mycobacterium tuberculosis* relBE toxin–antitoxin genes are stress-responsive modules that regulate growth through translation inhibition. *Journal of Microbiology*, 53, 783–795. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-5461-0>
178. KOWALSKA-KROCHMAL B. & DUDEK-WICHER R., The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens*, 10(2), 165, 2021.
179. Krogstad, D. J., & Pargwette, A. R. (1980). Defective killing of enterococci: A common property of antimicrobial agents acting on the cell wall. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 17, 965–968. <https://doi.org/10.1128/AAC.17.6.965>
180. Kumar, S., et al. (2023). Dynamics of efflux pumps in antimicrobial resistance, persistence, and community living of *Vibrionaceae*. *Archives of Microbiology*, 206, 7.
181. Kurita, D., et al. (2007). Molecular mechanism of trans-translation. *Nucleic Acids Symposium Series*, 51, 43–44. <https://doi.org/10.1093/nass/nrm022>
182. Kwan, B. W., Chowdhury, N., & Wood, T. K. (2015). Combatting bacterial infections by killing persister cells with mitomycin C. *Environmental Microbiology*, 17, 4406–4414.
183. Kwan, B. W., et al. (2015). Phosphodiesterase DosP increases persistence by reducing cAMP, which reduces the signal indole. *Biotechnology and Bioengineering*, 112, 588–600.
184. Kwan, B. W., et al. (2015). The MqsR/MqsA toxin–antitoxin system protects *Escherichia coli* during bile acid stress. *Environmental Microbiology*, 17, 3168–3181. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12769>
185. Kwan, B. W., Valenta, J. A., Benedik, M. J., & Wood, T. K. (2013). Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 1468–1473. <https://doi.org/10.1128/AAC.02135-12>
186. Kwon, J., & Bakhoun, S. F. (2020). The cytosolic DNA-sensing cGAS-STING pathway in cancer. *Cancer Discovery*, 10, 26–39.
187. Kwon, O., Kotsakis, A., & Meganathan, R. (2000). Ubiquinone (coenzyme Q) biosynthesis in *Escherichia coli*: Identification of the *ubiF* gene. *FEMS Microbiology Letters*, 186, 157–161. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09105.x>
188. Lamut, A., Peterlin Mašič, L., Kikelj, D., & Tomašič, T. (2019). Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria. *Medicinal Research Reviews*, 39, 2460–2504.
189. Le, D., et al. (2021). Active efflux leads to heterogeneous dissipation of proton motive force by protonophores in bacteria. *mBio*, 12, e00676-21. <https://doi.org/10.1128/mbio.00676-21>
190. Lee, H. H., Molla, M. N., Cantor, C. R., & Collins, J. J. (2010). Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature*, 467, 82–85.
191. Lee, J. H., & Lee, J. (2010). Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 426–444.
192. Lee, J., et al. (2023). The bacteriology of diabetic foot ulcers and infections and incidence of *Staphylococcus aureus* small colony variants. *Journal of Medical Microbiology*, 72, 001716. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001716>
193. Leimer, N., et al. (2016). Nonstable *Staphylococcus aureus* small-colony variants are induced by low pH and sensitized to antimicrobial therapy by phagolysosomal alkalinization. *Journal of Infectious Diseases*, 213, 305–313. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv392>
194. Leung, V., & Levesque, C. M. (2012). A stress-inducible quorum-sensing peptide mediates the formation of persister cells with noninherited multidrug tolerance. *Journal of Bacteriology*, 194, 2265–2274.
195. Levin, B. R., & Rozen, D. E. (2006). Non-inherited antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 556–562. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1445>
196. Levin, B. R., Concepcion-Acevedo, J., & Udekwi, K. I. (2014). Persistence: A copacetic and parsimonious hypothesis for the existence of non-inherited resistance to antibiotics. *Current Opinion in Microbiology*, 21, 18–21. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.06.012>

197. Levin-Reisman, I., Balaban, N.Q., 2016. Quantitative measurements of type I and type II persisters using ScanLag. In: Michiels, J., Fauvart, M. (Eds.), *Bacterial Persistence, Methods in Molecular Biology*, vol. 1333. Humana Press, New York, NY, pp. 75–81.
198. Levin-Reisman, I., et al. (2010). Automated imaging with ScanLag reveals previously undetectable bacterial growth phenotypes. *Nature Methods*, 7, 737–739. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1492>
199. Levin-Reisman, I., Fridman, O., & Balaban, N. Q. (2014). ScanLag: High-throughput quantification of colony growth and lag time. *Journal of Visualized Experiments*, 89, e51456. <https://doi.org/10.3791/51456>
200. Levin-Reisman, I., Ronin, I., Gefen, O., Braniss, I., Shoshitaishvili, N., & Balaban, N. Q. (2017). Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science*, 355, 826–830. <https://doi.org/10.1126/science.aaj2191>
201. Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 999–1007. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001>
202. Lewis, K. (2005). Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Moscow)*, 70, 267–274. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0111-6>
203. Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 48–56. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1557>
204. Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annual Review of Microbiology*, 64, 357–372. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>
205. Li, J., et al. (2013). Trans-translation mediates tolerance to multiple antibiotics and stresses in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68, 2477–2481. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt231>
206. Li, M., et al. (2016). HigB of *Pseudomonas aeruginosa* enhances killing of phagocytes by up-regulating the type III secretion system in ciprofloxacin-induced persister cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6, 125.
207. Li, T., et al. (2016). Novel inhibitors of toxin HipA reduce multidrug-tolerant persisters. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 7, 449–453. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.6b00010>
208. Li, X., et al. (2023). Metabolomics methods in understanding and sensitizing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* to meropenem. *ACS Infectious Diseases*, 10, 184–195. <https://doi.org/10.1021/acsinfectdis.3c00116>
209. Li, Y., & Zhang, Y. (2007). PhoU is a persistence switch involved in persister formation and tolerance to multiple antibiotics and stresses in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 2092–2099. <https://doi.org/10.1128/AAC.00052-07>
210. Li, Y., et al. (2018). Survival of bactericidal antibiotic treatment by tolerant persister cells of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Medical Microbiology*, 67, 273–281. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000673>
211. Li, Y., Liang, W., & Li, C. (2023). Exogenous adenosine and/or guanosine enhances tetracycline sensitivity of persister cells. *Microbiological Research*, 270, 127321. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127321>
212. Lindgren, J. K., et al. (2014). Arginine deiminase in *Staphylococcus epidermidis* functions to augment biofilm maturation through pH homeostasis. *Journal of Bacteriology*, 196, 2277–2289. <https://doi.org/10.1128/JB.01607-13>
213. Lindgren, J. K., Thomas, V. C., Olson, M. E., Chaudhari, S. S., Nuxoll, A. S., Schaeffer, C. R., Lindgren, K. E., Jones, J., Zimmerman, M. C., Dunman, P. M., & Kielian, T. (2014). Arginine deiminase in *Staphylococcus epidermidis* functions to augment biofilm maturation through pH homeostasis. *Journal of Bacteriology*, 196, 2277–2289. <https://doi.org/10.1128/JB.01607-13>
214. Lippert, K., Galinski, E.A., 1992. Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 61–65.
215. Liu, J., et al. (2019). Mutations in efflux pump Rv1258c (Tap) cause resistance to pyrazinamide, isoniazid, and streptomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 216. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00216>
216. Liu, J., et al. (2020). Effect of tolerance on the evolution of antibiotic resistance under drug combinations. *Science*, 367, 200–204.
217. Liu, S., et al. (2017). Variable persister gene interactions with (p)ppGpp for persister formation in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1795. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01795>

218. Liu, S., et al. (2023). Unravelling staphylococcal small-colony variants in cardiac implantable electronic device infections: Clinical characteristics, management, and genomic insights. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1321626. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1321626>
219. Loss, G., et al. (2019). Staphylococcus aureus small colony variants (SCVs): News from a chronic prosthetic joint infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 363. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00363>
220. Lu, T. K., & Collins, J. J. (2009). Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 4629–4634.
221. Lv, B., et al. (2022). Mechanosensitive channels mediate hypoionic shock-induced aminoglycoside potentiation against bacterial persisters by enhancing antibiotic uptake. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66, e01125-21.
222. Ma, C., et al. (2010). Energy production genes *sucB* and *ubiF* are involved in persister survival and tolerance to multiple antibiotics and stresses in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 303, 33–40. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01846.x>
223. Ma, D., et al. (2021). *Edwardsiella piscicida* YefM–YoeB: A type II toxin–antitoxin system that is related to antibiotic resistance, biofilm formation, serum survival, and host infection. *Frontiers in Microbiology*, 12, 646299. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.646299>
224. Ma, X., et al. (2023). Local regulator *AcrR* regulates persister formation by repression of *AcrAB* efflux pump during exponential growth in *Aeromonas veronii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 67, e0096922.
225. MADAR D. et al., Promoter activity dynamics in the lag phase of *Escherichia coli*. *BMC Syst. Biol.*, 7(1), 1-13, 2013.
226. Maisonneuve, E., & Gerdes, K. (2014). Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell*, 157, 539–548. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.050>
227. Maisonneuve, E., Castro-Camargo, M., & Gerdes, K. (2013). (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin–antitoxin activity. *Cell*, 154, 1140–1150. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.048>
228. Maisonneuve, E., Shakespeare, L. J., Jørgensen, M. G., & Gerdes, K. (2011). Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 13206–13211. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100186108>
229. Manandhar, S., et al. (2022). High level of persister frequency in clinical staphylococcal isolates. *BMC Microbiology*, 22, 109. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02521-4>
230. MANCUSO G. et al., Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. *Pathogens*, 10(10), 1310, 2021.
231. Marmion, M., Macori, G., Ferone, M., Whyte, P. & Scannell, A.G.M. (2022). Survive and thrive: control mechanisms that facilitate bacterial adaptation to survive manufacturing-related stress. *International Journal of Food Microbiology*, 368, 109612.
232. Martini, C. L., et al. (2021). Cellular growth arrest and efflux pumps are associated with antibiotic persisters in *Streptococcus pyogenes* induced in biofilm-like environments. *Frontiers in Microbiology*, 12, 716628.
233. Martini, M. C., et al. (2022). *ubiF* is involved in acid stress tolerance and symbiotic competitiveness in *Rhizobium favelukesii* LPU83. *Brazilian Journal of Microbiology*, 53, 1633–1643. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00768-1>
234. MASCIÒ C. T. et al., Bactericidal action of daptomycin against stationary-phase and nondividing *Staphylococcus aureus* cells. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51(12), 4255–4260, 2007.
235. Matereke, L.T. & Okoh, A.I. (2020). *Listeria monocytogenes* virulence, antimicrobial resistance and environmental persistence: a review. *Pathogens*, 9, 528.
236. Matsuo, M., et al. (2019). Genetic and transcriptomic analyses of ciprofloxacin-tolerant *Staphylococcus aureus* isolated by the replica plating tolerance isolation system (REPTIS). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63, e02019-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.02019-18>
237. Mayhall, C. G., Medoff, G., & Marr, J. J. (1976). Variation in the susceptibility of strains of *Staphylococcus aureus* to oxacillin, cephalothin, and gentamicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 10, 707–712. <https://doi.org/10.1128/AAC.10.4.707>
238. McKenzie, G. J., Magner, D. B., Lee, P. L., & Rosenberg, S. M. (2003). The *dinB* operon and spontaneous mutation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 185, 3972–3977. <https://doi.org/10.1128/JB.185.13.3972-3977.2003>

239. Mechold, U., et al. (2013). Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 41, 6175–6189.
240. Meyer, A. S., & Baker, T. A. (2011). Proteolysis in the *Escherichia coli* heat shock response: A player at many levels. *Current Opinion in Microbiology*, 14, 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.03.001>
241. Meylan, S., Andrews, I. W., & Collins, J. J. (2018). Targeting antibiotic tolerance, pathogen by pathogen. *Cell*, 172, 1228–1238. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.037>
242. Meylan, S., et al. (2017). Carbon sources tune antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* via tricarboxylic acid cycle control. *Cell Chemical Biology*, 24, 195–206.
243. Mishra, A., Taneja, N., & Sharma, M. (2011). Demonstration of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in fresh water environment of India using ciprofloxacin DFA-DVC method. *Letters in Applied Microbiology*, 53, 124–126. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03078.x>
244. Modlin, S. J., et al. (2021). Atypical genetic basis of pyrazinamide resistance in monoresistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65, e01916-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.01916-20>
245. Moellering, R. C., Jr., et al. (1972). Antibiotic synergism against *Listeria monocytogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1, 30–34. <https://doi.org/10.1128/AAC.1.1.30>
246. Mok, W. W. K., Orman, M. A., & Brynildsen, M. P. (2015). Impacts of global transcriptional regulators on persister metabolism. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59, 2713–2719. <https://doi.org/10.1128/AAC.04917-14>
247. Moker, N., Dean, C. R., & Tao, J. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. *Journal of Bacteriology*, 192, 1946–1955.
248. Molina-Quiroz, R. C., Lazinski, D. W., Camilli, A., & Levy, S. B. (2016). Transposon sequencing analysis unveils novel genes involved in the generation of persister cells in uropathogenic *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60, 6907–6910. <https://doi.org/10.1128/AAC.01343-16>
249. Moreno-Cinos, C., et al. (2015). ClpP protease, a promising antimicrobial target. *Antibiotics*, 4, 627–642. <https://doi.org/10.3390/antibiotics4040627>
250. Mortazavi, S.M.J., Motamedifar, M., Namdari, G., Taheri, M., Mortazavi, A.R. & Shokrpour, N. (2014). Non-linear adaptive phenomena which decrease the risk of infection after pre-exposure to radiofrequency radiation. *Dose-Response*, 12, 233–245.
251. Motiejūnaitė, R., Armalyte, J., Markuckas, A., & Sužiedėlienė, E. (2007). *Escherichia coli* *dinJ*-*yafQ* genes act as a toxin-antitoxin module. *FEMS Microbiology Letters*, 268, 112–119. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00578.x>
252. Moyed, H. S., & Bertrand, K. P. (1983). *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *Journal of Bacteriology*, 155, 768–775. <https://doi.org/10.1128/jb.155.2.768-775.1983>
253. Munther, D.S., Carter, M.Q., Aldric, C.V., Ivanek, R., Brandl, M.T., 2020. Formation of *Escherichia coli* O157:H7 persister cells in the lettuce phyllosphere and application of differential equation models to predict their prevalence on lettuce plants in the field. *Appl. Environ. Microbiol.* 86 (2), e01602–e01619. <https://doi.org/10.1128/AEM.01602-19>.
254. Murakami, K., et al. (2005). Role for *rpoS* gene of *Pseudomonas aeruginosa* in antibiotic tolerance. *FEMS Microbiology Letters*, 242, 161–167.
255. Muto, A., et al. (2000). Requirement of transfer-messenger RNA for the growth of *Bacillus subtilis* under stresses. *Genes to Cells*, 5, 627–635. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2000.00356.x>
256. NALBONE L. et al., Effects of osmotic stress on *Listeria monocytogenes* ATCC 7644: persistent cells and heat resistance. *Ital J Food Saf.*;12(1):10880, Mar 8, 2023.
257. Nalbone, L., Forgia, S., Ziino, G., Sorrentino, G., Giarratana, F. & Giuffrida, A. (2024). A stochastic approach for modelling the in vitro effect of osmotic stress on growth dynamics and persistent cell formation in *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 413, 110586.
258. Namugenyi, S. B., Aagesen, A. M., Elliott, S. R., & Tischler, A. D. (2017). *Mycobacterium tuberculosis* PhoY proteins promote persister formation by mediating Pst/SenX3–RegX3 phosphate sensing. *mBio*, 8, e00494-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00494-17>
259. NATARO J. P. et al., "Persistent bacterial infections: commensalism gone awry or adaptive niche?". *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, 3-10, 2000.

260. Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer, K., McKay, G., Siehnel, R., Schafhauser, J., Wang, Y., Britigan, B. E., & Singh, P. K. (2011). Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science*, 334, 982–986. <https://doi.org/10.1126/science.1211037>
261. Nicolau, S. E., & Lewis, K. (2022). The role of integration host factor in *Escherichia coli* persister formation. *mBio*, 13, e03420-21. <https://doi.org/10.1128/mbio.03420-21>
262. Nierman, W. C., Yu, Y., & Losada, L. (2015). The in vitro antibiotic-tolerant persister population in *Burkholderia pseudomallei* is altered by environmental factors. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1338. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01338>
263. Niu, H., et al. (2015). A clinical drug library screen identifies tosylloxacin as being highly active against *Staphylococcus aureus* persisters. *Antibiotics*, 4, 329–336. <https://doi.org/10.3390/antibiotics4030329>
264. Niu, H., et al. (2015). Identification of anti-persister activity against uropathogenic *Escherichia coli* from a clinical drug library. *Antibiotics*, 4, 179–187. <https://doi.org/10.3390/antibiotics4020179>
265. Niu, H., et al. (2023). Glutamate transporters GltS, GltP and GltI are involved in *Escherichia coli* tolerance in vitro and pathogenicity in mouse urinary tract infections. *Microorganisms*, 11, 1173. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051173>
266. Noaman, K. A., et al. (2023). The transmutation of *Escherichia coli* ATCC 25922 to small colony variants (SCVs) as a result of exposure to gentamicin. *Journal of Infection and Public Health*, 16, 1821–1829. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.09.012>
267. Nolivos, S., et al. (2019). Role of AcrAB-TolC multidrug efflux pump in drug-resistance acquisition by plasmid transfer. *Science*, 364, 778–782.
268. Olivares, A. O., Baker, T. A., & Sauer, R. T. (2016). Mechanistic insights into bacterial AAA+ proteases and protein-remodelling machines. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 33–44. <https://doi.org/10.1038/nrmiicro.2015.4>
269. Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 415–425. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x>
270. Page, R., & Peti, W. (2016). Toxin–antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nature Chemical Biology*, 12, 208–214. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2044>
271. Pai, S. R., et al. (2000). Identification of viable and non-viable *Mycobacterium tuberculosis* in mouse organs by directed RT-PCR for antigen 85B mRNA. *Microbial Pathogenesis*, 28, 335–342. <https://doi.org/10.1006/mpat.2000.0353>
272. Painter, K. L., et al. (2015). *Staphylococcus aureus* adapts to oxidative stress by producing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-resistant small-colony variants via the SOS response. *Infection and Immunity*, 83, 1830–1844. <https://doi.org/10.1128/IAI.03016-14>
273. Pan, J., Bahar, A. A., Syed, H., & Ren, D. (2012). Reverting antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 persister cells by (Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-methylfuran-2(5H)-one. *PLoS ONE*, 7, e45778.
274. Pan, J., et al. (2013). (Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-methylfuran-2(5H)-one sensitizes *Escherichia coli* persister cells to antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 9145–9154.
275. Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 576–588.
276. Park, H. E., et al. (2024). Bigger problems from smaller colonies: Emergence of antibiotic-tolerant small colony variants of *Mycobacterium avium* complex in MAC pulmonary disease patients. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 23, 25. <https://doi.org/10.1186/s12941-024-00659-2>
277. Park, S. A., Ko, A., & Lee, N. G. (2011). Stimulation of growth of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori* by atmospheric levels of oxygen under high carbon dioxide tension. *BMC Microbiology*, 11, 96.
278. Patel, H., Buchad, H., & Gajjar, D. (2022). *Pseudomonas aeruginosa* persister cell formation upon antibiotic exposure in planktonic and biofilm state. *Scientific Reports*, 12, 16151. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20368-6>
279. Paul, P., Sahu, B. R., & Suar, M. (2019). Plausible role of bacterial toxin–antitoxin system in persister cell formation and elimination. *Molecular Oral Microbiology*, 34, 97–107. <https://doi.org/10.1111/omi.12249>
280. Pennell, K.G., Aronson, A.I., Blatchley III, E.R., 2008. Phenotypic persistence and external shielding ultraviolet radiation inactivation kinetic model. *J. Appl. Microbiol.* 104 (4), 1192–1202. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03645.x>

281. Piddock, L. J. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps—not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 629–636.
282. Pin, C. & Baranyi, J. (2008). Single-cell and population lag times as a function of cell age. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2534–2536.
283. Podlesek, Z., & Žgur Bertok, D. (2020). The DNA damage inducible SOS response is a key player in the generation of bacterial persister cells and population-wide tolerance. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1785. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01785>
284. Potrykus, K., & Cashel, M. (2008). (p)ppGpp: Still magical? *Annual Review of Microbiology*, 62, 35–51.
285. Pribis, J. P., et al. (2019). Gamblers: An antibiotic-induced evolvable cell subpopulation differentiated by reactive-oxygen-induced general stress response. *Molecular Cell*, 74, 785–800.e7.
286. Primm, T. P., et al. (2000). The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *Journal of Bacteriology*, 182, 4889–4898.
287. Proctor, R. A., et al. (2006). Small colony variants: A pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 295–305. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1384>
288. Pu, Y., et al. (2016). Enhanced efflux activity facilitates drug tolerance in dormant bacterial cells. *Molecular Cell*, 62, 284–294.
289. Pu, Y., et al. (2019). ATP-dependent dynamic protein aggregation regulates bacterial dormancy depth critical for antibiotic tolerance. *Molecular Cell*, 73, 143–156.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.10.022>
290. Pu, Y., Ke, Y., & Bai, F. (2017). Active efflux in dormant bacterial cells: New insights into antibiotic persistence. *Drug Resistance Updates*, 30, 7–14.
291. Pumbwe, L., Chang, A., Smith, R. L., & Wexler, H. M. (2007). BmeRABC5 is a multidrug efflux system that can confer metronidazole resistance in *Bacteroides fragilis*. *Microbial Drug Resistance*, 13, 96–101.
292. RADZIKOWSKI J. L. et al., Bacterial persistence from a system-level perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 46, 98–105, 2017.
293. Rahman, T., Yarnall, B., & Doyle, D. A. (2017). Efflux drug transporters at the forefront of antimicrobial resistance. *European Biophysics Journal*, 46, 647–653.
294. Raivio, T. L., & Silhavy, T. J. (1997). Transduction of envelope stress in *Escherichia coli* by the Cpx two-component system. *Journal of Bacteriology*, 179, 7724–7733. <https://doi.org/10.1128/jb.179.24.7724-7733.1997>
295. Riber, L., & Hansen, L. H. (2021). Epigenetic memories: The hidden drivers of bacterial persistence? *Trends in Microbiology*, 29, 190–194.
296. Richard, H., & Foster, J. W. (2007). Sodium regulates *Escherichia coli* acid resistance, and influences GadX- and GadW-dependent activation of gadE. *Microbiology*, 153, 3154–3161. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/006981-0>
297. Riesenber, D., Erdei, S., Kondorosi, E., & Kari, C. (1982). Positive involvement of ppGpp in derepression of the nif operon in *Klebsiella pneumoniae*. *Molecular and General Genetics*, 185, 198–204.
298. Rizvanovic, A., Madrzak, J., Vidojevic, A., Jovanovic, M., & Zgur-Bertok, D. (2022). The RNA-binding protein ProQ promotes antibiotic persistence in *Salmonella*. *mBio*, 13, e02891-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.02891-22>
299. RODRIGUEZ-ROMO L. et al., Crossprotective effects of bacterial stress. In GRIFFITHS M. (a cura di), *Understanding Pathogen Behaviour*, Crc, 128-151, 2005.
300. Ronneau, S., & Helaine, S. (2019). Clarifying the link between toxin–antitoxin modules and bacterial persistence. *Journal of Molecular Biology*, 431, 3462–3471. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.06.018>
301. Ronneau, S., Hill, P. W., & Helaine, S. (2021). Antibiotic persistence and tolerance: Not just one and the same. *Current Opinion in Microbiology*, 64, 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.09.005>
302. Ruwandepika, H. A., Karunasagar, I., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2015). Expression and quorum sensing regulation of type III secretion system genes of *Vibrio harveyi* during infection of gnotobiotic brine shrimp. *PLoS ONE*, 10, e0143935.
303. Rycroft, J. A., et al. (2018). Activity of acetyltransferase toxins involved in *Salmonella* persister formation during macrophage infection. *Nature Communications*, 9, 1993. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04396-5>
304. Sabath, L. D., et al. (1977). A new type of penicillin resistance of *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, 309(8007), 443–447. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(77\)91973-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(77)91973-4)

305. Safi, H., et al. (2019). Phase variation in *Mycobacterium tuberculosis* glpK produces transiently heritable drug tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116, 19665–19674. <https://doi.org/10.1073/pnas.1907630116>
306. Savitch, C. B., Barry, A. L., & Hoeprich, P. D. (1978). Infective endocarditis caused by *Streptococcus bovis* resistant to the lethal effect of penicillin G. *Archives of Internal Medicine*, 138, 931–934. <https://doi.org/10.1001/archinte.1978.03630300055017>
307. Schumacher, M. A., et al. (2009). Molecular mechanisms of HipA-mediated multidrug tolerance and its neutralization by HipB. *Science*, 323, 396–401. <https://doi.org/10.1126/science.1163806>
308. Semanjski, M., et al. (2018). The kinases HipA and HipA7 phosphorylate different substrate pools in *Escherichia coli* to promote multidrug tolerance. *Science Signaling*, 11, eaat5750. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aat5750>
309. Senoh, M., et al. (2010). Conversion of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* to the culturable state by coculture with eukaryotic cells. *Microbiology and Immunology*, 54, 502–507. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00257.x>
310. Shah, D., et al. (2006). Persisters: A distinct physiological state of *Escherichia coli*. *BMC Microbiology*, 6, 53. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-53>
311. Shan, Y., et al. (2015). Genetic basis of persister tolerance to aminoglycosides in *Escherichia coli*. *mBio*, 6, e00078-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00078-15>
312. Shan, Y., et al. (2017). ATP-dependent persister formation in *Escherichia coli*. *mBio*, 8, e02267-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.02267-16>
313. Shang, Y., Wang, H., Zhang, J., Zhang, M., & Jiang, B. (2020). *Staphylococcus aureus* PhoU homologs regulate persister formation and virulence. *Frontiers in Microbiology*, 11, 865. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00865>
314. Shatalin, K., Shatalina, E., Mironov, A., & Nudler, E. (2011). H<sub>2</sub>S: A universal defense against antibiotics in bacteria. *Science*, 334, 986–990. <https://doi.org/10.1126/science.1209855>
315. Shi, W., & Zhang, Y. (2010). PhoY2 but not PhoY1 is the PhoU homologue involved in persisters in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 1237–1242. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq104>
316. Shi, W., et al. (2011). Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 333, 1630–1632. <https://doi.org/10.1126/science.1208813>
317. Shi, W., et al. (2014). Aspartate decarboxylase (PanD) as a new target of pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Microbes & Infections*, 3, e58. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.58>
318. Shi, W., et al. (2018). Identification of novel mutations in LprG (rv1411c), rv0521, rv3630, rv0010c, ppsC, and cyp128 associated with pyrazinoic acid/pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62, e01835-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01835-17>
319. Shi, W., et al. (2019). Introducing RpsA point mutations Δ438A and D123A into the chromosome of *Mycobacterium tuberculosis* confirms their role in causing resistance to pyrazinamide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63, e01128-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01128-19>
320. Shpanchenko, O. V., Bugaeva, E., Golovin, A. V., & Dontsova, O. A. (2010). Trans-translation: Facts and hypothesis. *Molecular Biology*, 44, 563–572. <https://doi.org/10.1134/S0026893310040051>
321. Sibanda, T., Buys, E.M., 2017. Resuscitation and growth kinetics of sub-lethally injured *Listeria monocytogenes* strains following fluorescence activated cell sorting (FACS). *Food Res. Int.* 100, 150–158.
322. Singh, G., Yadav, M., Ghosh, C., & Rathore, J. S. (2021). Bacterial toxin–antitoxin modules: Classification, functions, and association with persistence. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100047. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100047>
323. Singh, R., Barry, C. E., III, & Boshoff, H. I. (2010). The three RelE homologs of *Mycobacterium tuberculosis* have individual, drug-specific effects on bacterial antibiotic tolerance. *Journal of Bacteriology*, 192, 1279–1291. <https://doi.org/10.1128/JB.01399-09>
324. Singh, S. B. (2014). Confronting the challenges of discovery of novel antibacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24, 3683–3689.
325. Spagnolo, B., Valenti, D., Guarcello, C., Carollo, A., Adorno, D.P., Spezia, S., et al., 2015. Noise-induced effects in nonlinear relaxation of condensed matter systems. *Chaos, Solitons Fractals* 81, 412–424.

326. Spoering, A. L., & Lewis, K. (2001). Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *Journal of Bacteriology*, 183, 6746–6751. <https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6746-6751.2001>
327. Spoering, A. L., Vulić, M., & Lewis, K. (2006). GlpD and PlsB participate in persister cell formation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 188, 5136–5144. <https://doi.org/10.1128/JB.00369-06>
328. Springer, M. T., et al. (2016). Effect of clpP and clpC deletion on persister cell number in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 65, 848–857. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000308>
329. Stallings, C. L., et al. (2009). CarD is an essential regulator of rRNA transcription required for *Mycobacterium tuberculosis* persistence. *Cell*, 138, 146–159.
330. Steed, P. M., & Wanner, B. L. (1993). Use of the rep technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the pstSCAB-phoU operon: Evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon. *Journal of Bacteriology*, 175, 6797–6809. <https://doi.org/10.1128/jb.175.21.6797-6809.1993>
331. Stewart, P. S., Zhang, T., Xu, R., Pitts, B., Walters, M. C., Roe, F., Kikhney, J., & Moter, A. (2015). Contribution of stress responses to antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59, 3838–3847. <https://doi.org/10.1128/AAC.00496-15>
332. Storz, G., Hengge, R., 2010. *Bacterial Stress Responses*, second ed. American Society for Microbiology Press, Washington.
333. Su, W. L., et al. (2022). TisB protein protects *Escherichia coli* cells suffering massive DNA damage from environmental toxic compounds. *mBio*, 13, e00385-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.00385-22>
334. Sulaiman, J. E., Hao, C., & Lam, H. (2018). Specific enrichment and proteomics analysis of *Escherichia coli* persists from rifampin pretreatment. *Journal of Proteome Research*, 17, 3984–3996.
335. Sun, C., et al. (2017). MqsR/MqsA toxin–antitoxin system regulates persistence and biofilm formation in *Pseudomonas putida* KT2440. *Frontiers in Microbiology*, 8, 840. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00840>
336. Sun, F., et al. (2020). 5-Methylindole potentiates aminoglycosides against Gram-positive bacteria including *Staphylococcus aureus* persists under hypoionic conditions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 84.
337. Sun, Q., et al. (2020). The molecular basis of pyrazinamide activity on *Mycobacterium tuberculosis* PanD. *Nature Communications*, 11, 339. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14108-1>
338. Sun, Z., & Zhang, Y. (1999). Spent culture supernatant of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra improves viability of aged cultures of this strain and allows small inocula to initiate growth. *Journal of Bacteriology*, 181, 7626–7628. <https://doi.org/10.1128/JB.181.24.7626-7628.1999>
339. Svenningsen, M. S., et al. (2019). Birth and resuscitation of (p)ppGpp-induced antibiotic tolerant persister cells. *Scientific Reports*, 9, 6056.
340. Thibonnier, M., Thiberge, J.-M., & De Reuse, H. (2008). Trans-translation in *Helicobacter pylori*: Essentiality of ribosome rescue and requirement of protein tagging for stress resistance and competence. *PLoS ONE*, 3, e3810. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003810>
341. Tian, X. L., et al. (2019). ClpP is required for proteolytic regulation of type II toxin–antitoxin systems and persister cell formation in *Streptococcus mutans*. *Access Microbiology*, 1, e000054. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000054>
342. Tomasz, A., Albino, A., & Zanati, E. (1970). Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. *Nature*, 227, 138–140. <https://doi.org/10.1038/227138a0>
343. Trastoy, R., et al. (2018). Mechanisms of bacterial tolerance and persistence in the gastrointestinal and respiratory environments. *Clinical Microbiology Reviews*, 31, e00023-18.
344. Traub, W. H. (1981). Variable tolerance of a clinical isolate of *Staphylococcus epidermidis* from an infected hydrocephalus shunt for several beta-lactam antibiotics, vancomycin and fosfomicin. *Chemotherapy*, 27, 432–443. <https://doi.org/10.1159/000238053>
345. Tripathi, A., Dewan, P. C., Barua, B., & Varadarajan, R. (2012). Additional role for the ccd operon of F-plasmid as a transmissible persistence factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 12497–12502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204516109>
346. Tripathi, A., Dewan, P. C., Siddique, S. A., & Varadarajan, R. (2014). MazF-induced growth inhibition and persister generation in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 4191–4205. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.527903>

347. Tsilibaris, V., Maenhaut-Michel, G., Mine, N., & Van Melderen, L. (2007). What is the benefit to *Escherichia coli* of having multiple toxin-antitoxin systems in its genome? *Journal of Bacteriology*, 189, 6101–6108. <https://doi.org/10.1128/JB.00527-07>
348. Tsujino, Y., Ogawa, E., & Ito, K. (2024). Thymidine-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus* isolated from infective endocarditis in a post-lung transplant patient. *Transplant Infectious Disease*, 26, e14176. <https://doi.org/10.1111/tid.14176>
349. Tuomanen, E., Durack, D. T., & Tomasz, A. (1986). Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 30, 7. <https://doi.org/10.1128/AAC.30.6.111>
350. Tuytschaever, T., Raes, K., Sampers, I., 2023. *Listeria monocytogenes* in food businesses: from persistence strategies to intervention/prevention strategies-a review. *Compr. Rev. Food Sci.* 22, 3910–3950.
351. Unterholzner, S. J., Poppenberger, B., & Rozhon, W. (2013). Toxin-antitoxin systems: Biology, identification, and application. *Mobile Genetic Elements*, 3, e26219. <https://doi.org/10.4161/mge.26219>
352. Valencia, E. Y., de Moraes Gomes, F., Ospino, K., & Spira, B. (2024). RpoS role in antibiotic resistance, tolerance and persistence in *Escherichia coli* natural isolates. *BMC Microbiology*, 24, 72.
353. Van den Bergh, B., et al. (2016). Frequency of antibiotic application drives rapid evolutionary adaptation of *Escherichia coli* persistence. *Nature Microbiology*, 1, 16020. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.20>
354. Van den Bergh, B., et al. (2022). Mutations in respiratory complex I promote antibiotic persistence through alterations in intracellular acidity and protein synthesis. *Nature Communications*, 13, 546. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28251-9>
355. van Kessel, J.C., Rutherford, S.T., Cong, J.P., Quinodoz, S., Healy, J., Bassler, B.L., 2015. Quorum sensing regulates the osmotic stress response in *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* 197 (1), 73–80.
356. Vazquez-Laslop, N., Lee, H., & Neyfakh, A. A. (2006). Increased persistence in *Escherichia coli* caused by controlled expression of toxins or other unrelated proteins. *Journal of Bacteriology*, 188, 3494–3497. <https://doi.org/10.1128/JB.188.9.3494-3497.2006>
357. Vega, N. M., Allison, K. R., Khalil, A. S., & Collins, J. J. (2012). Signaling-mediated bacterial persister formation. *Nature Chemical Biology*, 8, 431–433.
358. Vega, N. M., et al. (2013). *Salmonella typhimurium* intercepts *Escherichia coli* signaling to enhance antibiotic tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 14420–14425.
359. Verstraeten, N., et al. (2015). O<sub>2</sub> and membrane depolarization are part of a microbial bet-hedging strategy that leads to antibiotic tolerance. *Molecular Cell*, 59, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.011>
360. Vestergaard, M., Paulander, W., & Ingmer, H. (2015). Activation of the SOS response increases the frequency of small colony variants. *BMC Research Notes*, 8, 749. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1745-7>
361. Vijay, S., et al. (2021). Most-probable-number-based minimum duration of killing assay for determining the spectrum of rifampicin susceptibility in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65, e01128-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.01128-20>
362. Vulin, C., et al. (2018). Prolonged bacterial lag time results in small colony variants that represent a sub-population of persisters. *Nature Communications*, 9, 4074. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06577-9>
363. Wagner, E. G. H., & Unoson, C. (2012). The toxin-antitoxin system *tisB-istR1*: Expression, regulation, and biological role in persister phenotypes. *RNA Biology*, 9, 1513–1519. <https://doi.org/10.4161/rna.22389>
364. Walter, N. D., et al. (2015). Transcriptional adaptation of drug-tolerant *Mycobacterium tuberculosis* during treatment of human tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases*, 212, 990–998. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv154>
365. Wang, W., et al. (2015). Transposon mutagenesis identifies novel genes associated with *Staphylococcus aureus* persister formation. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1437. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01437>
366. Wang, X., et al. (2011). Antitoxin MqsA helps mediate the bacterial general stress response. *Nature Chemical Biology*, 7, 359–366.
367. Wang, Y., et al. (2019). Indole reverses intrinsic antibiotic resistance by activating a novel dual-function importer. *mBio*, 10, e00676-19.
368. Wang, Y., et al. (2023). High antipersister activity of a promising new quinolone drug candidate in eradicating uropathogenic *Escherichia coli* persisters and persistent infection in mice. *Journal of Applied Microbiology*, 134, lxad193.

369. Weigel, W. A., & Dersch, P. (2018). Phenotypic heterogeneity: A bacterial virulence strategy. *Microbes and Infection*, 20, 570–577. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.06.005>
370. Welsh, D. T. (2000). Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: From single cells to global climate. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 263–290. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00542.x>
371. Whiley, H., Bentham, R., & Brown, M. H. (2017). Legionella persistence in manufactured water systems: Pasteurization potentially selecting for thermal tolerance. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1330. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01330>
372. Wideman, N. E., Oliver, J. D., Crandall, P. G., & Jarvis, N. A. (2021). Detection and potential virulence of viable but non-culturable (VBNC) *Listeria monocytogenes*: A review. *Microorganisms*, 9, 194. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010194>
373. Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3, 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
374. Wiktorczyk-Kapischke, N., Skowron, K., Grudlewska-Buda, K., Wałęcka-Zacharska, E., Korkus, J. & Gospodarek-Komkowska, E. (2021). Adaptive response of *Listeria monocytogenes* to the stress factors in the food processing environment. *Frontiers in Microbiology*, 12, 710085.
375. Wilmaerts, D., Windels, E. M., Verstraeten, N., & Michiels, J. (2019). General mechanisms leading to persister formation and awakening. *Trends in Genetics*, 35, 401–411. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.03.007>
376. Winther, K. S., Tree, J. J., Tollervey, D., & Gerdes, K. (2016). VapCs of *Mycobacterium tuberculosis* cleave RNAs essential for translation. *Nucleic Acids Research*, 44, 9860–9871. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw782>
377. Wiradiputra, M. R. D., Khuntayaporn, P., Thirapanmethee, K., & Chomnawang, M. T. (2022). Toxin–antitoxin systems: A key role in persister formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and Drug Resistance*, 15, 5813–5829. <https://doi.org/10.2147/IDR.S384735>
378. WOLFSON J. S. et al., Mutants of *Escherichia coli* K-12 exhibiting reduced killing by both quinolone and beta-lactam antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34(10), 1938-1943,1990.
379. Wood, T. K. (2016). Combatting bacterial persister cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 113, 476–483. <https://doi.org/10.1002/bit.25802>
380. Wood, T. K., & Song, S. (2020). Forming and waking dormant cells: The ppGpp ribosome dimerization persister model. *Biofilm*, 2, 100018.
381. Wood, W. N., Mohler, K., Rinehart, J., & Ibba, M. (2021). Deacylated tRNA accumulation is a trigger for bacterial antibiotic persistence independent of the stringent response. *mBio*, 12, e0113221.
382. Wortham, B. W., Patel, C. N., & Oliveira, M. A. (2007). Polyamines in bacteria: Pleiotropic effects yet specific mechanisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 603, 106–115. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-72124-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-0-387-72124-8_9)
383. Wu, N., et al. (2015). Ranking of persister genes in the same *Escherichia coli* genetic background demonstrates varying importance of individual persister genes in tolerance to different antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1003. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01003>
384. Wu, N., et al. (2023). Polynucleotide phosphorylase mediates a new mechanism of persister formation in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 11, e01546-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01546-22>
385. Xu, H. S., et al. (1982). Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology*, 8, 313–323. <https://doi.org/10.1007/BF02010636>
386. Xu, T., et al. (2016). Absence of protoheme IX farnesyltransferase CtaB causes virulence attenuation but enhances pigment production and persister survival in MRSA. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1625. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01625>
387. Xu, T., et al. (2017). The Agr quorum sensing system represses persister formation through regulation of phenol-soluble modulins in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2189.
388. Xu, Y., Liu, S., Zhang, Y., & Zhang, W. (2021). DNA adenine methylation is involved in persister formation in *E. coli*. *Microbiological Research*, 246, 126709.
389. Yan, D., et al. (2021). Disruption of Fis reduces bacterial persister formation by regulating glutamate metabolism in *Salmonella*. *Microbial Pathogenesis*, 152, 104651. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104651>

390. Yan, J., & Bassler, B. L. (2019). Surviving as a community: Antibiotic tolerance and persistence in bacterial biofilms. *Cell Host & Microbe*, 26, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.06.002>
391. Yaron, S., & Matthews, K. R. (2002). A reverse transcriptase–polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157:H7: Investigation of specific target genes. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 633–640. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01568.x>
392. Yashiro, Y., et al. (2021). Molecular basis of glycyl-tRNA(Gly) acetylation by TacT from *Salmonella Typhimurium*. *Cell Reports*, 37, 110130. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110130>
393. Yee, R., et al. (2019). Identification of genes regulating cell death in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2199. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02199>
394. Yee, R., et al. (2020). Identification of a novel gene *argJ* involved in arginine biosynthesis critical for persister formation in *Staphylococcus aureus*. *Discovery Medicine*, 29, 65–77.
395. Yee, R., et al. (2022). Eradication of *Staphylococcus aureus* biofilm infection by persister drug combination. *Antibiotics*, 11, 1278. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091278>
396. YOUSEF A.E. et al., Basics of stress adaptation and implications in new-generation foods. In YOUSEF A.E. & JUNEJA V. K. *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*. Crc, Press, Boca Raton, FL, 1-30, 2003.
397. Zhang, C., et al. (2023). Efficacy of a novel antibacterial agent exeporfinium chloride (XF-73) against antibiotic-resistant bacteria in mouse superficial skin infection models. *Infection and Drug Resistance*, 16, 4867–4879.
398. Zhang, L., et al. (2022). Combination- and nanotechnology-based pharmaceutical strategies for combating respiratory bacterial biofilm infections. *International Journal of Pharmaceutics*, 616, 121507.
399. Zhang, S., et al. (2013). Mutations in *panD* encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Microbes & Infections*, 2, e34. <https://doi.org/10.1038/emi.2013.34>
400. Zhang, S., et al. (2017). Mutation in *clpC1* encoding an ATP-dependent ATPase involved in protein degradation is associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Microbes & Infections*, 6, e8. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.1>
401. Zhang, S., et al. (2018). Small non-coding RNA *RyhB* mediates persistence to multiple antibiotics and stresses in uropathogenic *Escherichia coli* by reducing cellular metabolism. *Frontiers in Microbiology*, 9, 136. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00136>
402. Zhang, Y. (2004). Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuberculosis. *Frontiers in Bioscience*, 9, 1136–1156. <https://doi.org/10.2741/1310>
403. Zhang, Y. (2014). Persisters, persistent infections and the Yin–Yang model. *Emerging Microbes & Infections*, 3, e3. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.3>
404. Zhang, Y., & Mitchison, D. (2003). The curious characteristics of pyrazinamide: A review. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 7, 6–21.
405. Zhang, Y., et al. (2017). Identification of novel efflux proteins *Rv0191*, *Rv3756c*, *Rv3008*, and *Rv1667c* involved in pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61, e01012-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01012-17>
406. Zhang, Y., Shi, W., Zhang, W., & Mitchison, D. (2013). Mechanisms of pyrazinamide action and resistance. *Microbiology Spectrum*, 2, 1–12.
407. Zhang, Y., Yew, W. W., & Barer, M. R. (2012). Targeting persisters for tuberculosis control. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56, 2223–2230. <https://doi.org/10.1128/AAC.06288-11>
408. Zhao, S., et al. (2021). Enumeration of viable non-culturable *Vibrio cholerae* using droplet digital PCR combined with propidium monoazide treatment. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 753078. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.753078>
409. Zhao, X. L., et al. (2021). Glutamine promotes antibiotic uptake to kill multidrug-resistant uropathogenic bacteria. *Science Translational Medicine*, 13, eabj0716. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj0716>
410. Zhao, Y., et al. (2020). Rapid freezing enables aminoglycosides to eradicate bacterial persisters via enhancing mechanosensitive channel *MscL*-mediated antibiotic uptake. *mBio*, 11, e03239-19.
411. Zheng, E. J., Stokes, J. M., & Collins, J. J. (2020). Eradicating bacterial persisters with combinations of strongly and weakly metabolism-dependent antibiotics. *Cell Chemical Biology*, 27, 1544–1552.e3.

412. Zheng, J., Shin, O. S., Cameron, D. E., & Mekalanos, J. J. (2010). Quorum sensing and a global regulator TsrA control expression of type VI secretion and virulence in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 21128–21133.
413. Zhou, S., et al. (2022). *Staphylococcus aureus* small-colony variants: Formation, infection, and treatment. *Microbiological Research*, 260, 127040. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127040>
414. Zhou, Y. N., et al. (2008). Regulation of cell growth during serum starvation and bacterial survival in macrophages by the bifunctional enzyme SpoT in *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology*, 190, 8025–8032.
415. Zhou, Y., Liao, H., Pei, L., & Pu, Y. (2023). Combatting persister cells: The daunting task in post-antibiotics era. *Cell Insight*, 2, 100104. <https://doi.org/10.1016/j.cellins.2023.100104>
416. Zhou, Y., Zhang, Y., & Du, S. (2024). Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* among children and adolescents in East Asia: A systematic review and meta-analysis. *Chinese Medical Journal*. Advance online publication.
417. Zou, J., Peng, B., Qu, J., & Zheng, J. (2021). Are bacterial persisters dormant cells only? *Frontiers in Microbiology*, 12, 708580.