

А. Б. Маргулис, М. А. Данилова, П. В. Зеленихин,  
В. Я. Пономарев, Б. М. Куриненко

## ИНДУКЦИЯ ГИПОМЕТАБОЛИЗМА У КЛЕТОК ПРОКАРИОТ ИОНАМИ $\text{Ca}^{2+}$

*Ключевые слова:* гипометаболическое состояние, прокариоты, ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , фазовые переходы в мембране.

*Исследована возможность индукции гипометаболизма у бактерий при помощи ионов кальция. В диапазоне концентраций 100-200 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  отмечается достоверное изменение соотношения живых клеток и колониеобразующих единиц *Micrococcus lysodeikticus* в сторону уменьшения последних. При концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  200 мМ происходит снижение эксимеризации пирена на 22% по сравнению с контролем, что свидетельствует об увеличении микровязкости мембраны.*

*Keywords:* hypometabolic state, prokaryotes, ions  $\text{Ca}^{2+}$ , phase transitions in membrane.

*Studied the possibility of induction of hypometabolism in bacteria by calcium ions. In the concentration range of 100-200 mM of  $\text{Ca}^{2+}$  there was a significant change in the ratio of living cells, and colony forming units of *Micrococcus lysodeikticus* towards reduction last. At a concentration of 200 mM  $\text{Ca}^{2+}$  is a decrease of pyrene excimer by 22% compared with the control, indicating an increase in membrane microviscosity.*

### Введение

Регулирование перехода микроорганизмов в состояние покоя имеет огромное значение для биотехнологии и медицины. Прикладной аспект этой проблемы связан с потенциальной возможностью управления такими процессами, как образование некультивируемых форм патогенов, устойчивых к различным стрессовым условиям, в том числе к фармакологическому воздействию.

Изменение текучести мембран – изменение ее состояния из жидкокристаллического в кристаллическое (или гелеобразное) – связано с подвижностью липидных молекул и с фазовыми переходами в мембране. Основным фактором, вызывающим фазовые переходы мембранных липидов, является изменение температуры среды.

Значение температуры, при которой происходит переход данного липида из кристаллического в жидкокристаллическое состояние (и обратно), называется температурой фазового перехода (ТФП) «гель-жидкий кристалл». Температура фазового перехода зависит от длины углеводородных цепей, наличия и положения цис-этиленовой связи, введение метильных групп в углеводородные связи цепи липидных молекул.

Существенно влияют на ТФП различия в строении полярных головок, а именно степень ионизации полярных групп, присутствие в водной среде двухвалентных катионов, особенно  $\text{Ca}^{2+}$ . Таким образом, температура является не единственным фактором, определяющим фазовое состояние липидов. О важности фазового состояния липидов для функционирования мембран свидетельствуют широко известные факты корреляции между температурой фазового перехода мембранных липидов и активностью ряда мембраносвязанных ферментов [1].

Исследования изменения цитоплазматической мембраны при переходе в некультивируемое состояние поможет сделать определенные выводы как об индукции гипометаболического состояния бактерий, так и о возможном выходе из него.

Целью данной работы является оценка способности ионов  $\text{Ca}^{2+}$  индуцировать гипометаболическое состояние бактерий на примере *Micrococcus lysodeikticus*. В связи с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Определить концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцирующие быстрый переход клетки в гипометаболическое состояние.
2. Выявить изменения цитоплазматической мембраны микрококка при переходе в состояние гипометаболизма.
3. На основе полученных данных обосновать предполагаемые критерии перехода клетки в гипометаболическое состояние.

### Материалы и методы исследования

В работе использовали штамм *Micrococcus lysodeikticus* из музея кафедры микробиологии. Оценивали влияние ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в концентрации 20, 100, 200 мМ на жизнеспособность бактерий при стандартном количестве клеток в 1 мл суспензии. В качестве источника  $\text{Ca}^{2+}$  использовали раствор  $\text{CaCl}_2$ .

Для определения процентного соотношения живых и мертвых клеток использовали метод проточной цитометрии, работали на проточном цитометре BD FACSCanto (США) с программным обеспечением FACSDiva. К 1 мл суспензии клеток добавляли йодид пропидия (PI) в концентрации 10 мг/мл, выдерживали пробы в темноте в течение 5 минут при комнатной температуре, далее цитометрически детектировали процентное соотношение мертвых и жизнеспособных клеток в популяции.

Для определения мембранных изменений был использован прибор спектрофлуориметр LS55 Perkin Elmer. Исследование состояния мембраны проводили основываясь на известной обратно пропорциональной зависимости между степенью эксимеризации пирена и микровязкостью мембраны [2] по методике [3].

## Подбор оптимальной концентрации ионов кальция для индукции гипометаболического состояния микрококка

Для каждого из контрольных и опытных вариантов определяли оптическую плотность, количество колониеобразующих единиц и общее число клеток. Исходя из полученных данных, для последующих экспериментов была выбрана максимальная концентрация ионов кальция (200 мМ).

## Определение соотношения живых и мертвых клеток при действии ионов кальция на клетки микрококка

С помощью проточной цитометрии было показано, что концентрация ионов кальция 100мМ (рис. 1 Б, В) не изменяет количество мертвых клеток относительно контроля (рис. 1 А). Концентрация 200 мМ (рис. 1 Г, Д) приводит к увеличению числа мертвых клеток (особенно после 24-часовой инкубации – до 43%) (рис. 1 Д). Однако число КОЕ в варианте 200 мМ при 24-часовой инкубации было почти в 8 раз меньше, чем в контроле. Эти данные подтверждают переход клеток в гипометаболическое состояние, индуцированное ионами кальция.

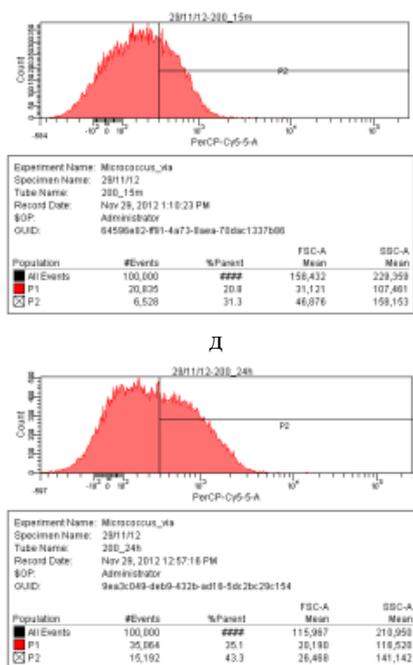
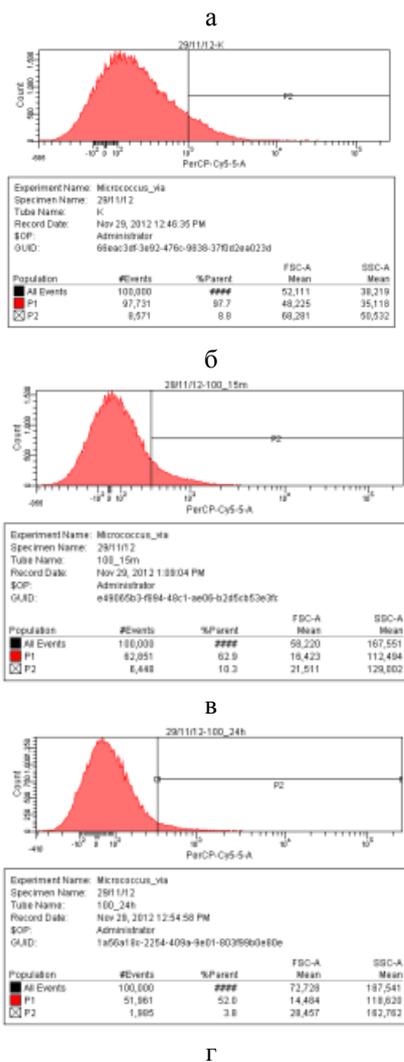


Рис. 1 – Соотношение живых и мертвых клеток в 15-минутных (б, г) и 24-часовых (в, д) суспензиях клеток микрококка при действии 100 мМ (б, в) и 200 мМ (г, д) ионов кальция. За контроль принята культура без добавления ионов кальция (а)

## Определение изменения микровязкости мембраны при действии ионов кальция

Оценку текучести мембран проводили с помощью флуоресцентного зондирования на спектрофлуориметре LS55 (Perkin Elmer). Определение текучести глубоких слоев липидного бислоя проводили после добавления к объему суспензии клеток микрококка 0.1 объема спиртового раствора пирена в концентрации 100 мМ/л [3]. Измеряли спектры флуоресценции его эксимеров при длине волны флуоресценции 470 нм, мономеров при длине волны флуоресценции 371,5 нм, возбуждении 340 нм (Molecular Probes). Определяли коэффициент эксимеризации пирена F величина которого обратно пропорциональна микровязкости мембраны [2; 4].

Расчет производили по формуле:

$$F = \frac{(I_{470_{\text{пир}}} - I_{470_{\text{б/пир}}}) / (I_{370_{\text{пир}}} - I_{370_{\text{б/пир}}})}{I_{470_{\text{пир}}}}$$

где  $I_{470_{\text{пир}}}$  – интенсивность флуоресценции клеточной суспензии в присутствии пирена;  $I_{470_{\text{б/пир}}}$  – интенсивность флуоресценции клеточной суспензии в отсутствии пирена; аналогичный смысл у подстрочных обозначений для  $I_{370}$ .

Флуоресценция клеточной суспензии в отсутствии пирена ( $I_{470_{\text{б/пир}}}$ ) является фоновой флуоресценцией клеток при облучении светом с длиной волны 340нм, которая вычитается из значения флуоресценции клеточной суспензии в присутствии пирена ( $I_{470_{\text{пир}}}$ ).

Показано, что интенсивность флуоресценции эксимера пирена клеточной суспензии после добавления  $\text{CaCl}_2$ , рассчитанная как  $(I_{470_{\text{пир}}} - I_{470_{\text{б/пир}}}) = 75$  усл.ед. Интенсивность флуоресценции мономера, рассчитанная по формуле  $(I_{370_{\text{пир}}} - I_{370_{\text{б/пир}}})$

$\frac{b_{\text{пир}}}{F} = 200$  усл.ед. Коэффициент эксимеризации  $F=75/200=0,375$ .

Интенсивность флуоресценции эксимера клеточной суспензии без добавления  $\text{CaCl}_2$ , рассчитанная аналогичным образом равна 91 усл.ед. Интенсивность флуоресценции мономера этой же клеточной суспензии равна 188 усл.ед. Коэффициент эксимеризации  $F=91/188=0,480$ .

Известно, что интенсивность эксимеризации обратно пропорциональна микровязкости мембраны [4]. Другими словами, уменьшение коэффициента эксимеризации пирена в присутствии  $\text{CaCl}_2$  свидетельствует об упорядоченности структуры клеточной мембраны, что связано с увеличением в ней доли гель-структурированных доменов [2], по сравнению с жидкокристаллическими доменами и, как следствие, увеличением микровязкости мембраны.

Таким образом, нами было показано следующее: в диапазоне концентраций 100-200 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  отмечается достоверное изменение соотношения живых клеток и колониеобразующих единиц *Micrococcus lysodeikticus* в сторону уменьшения последних. При концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  200 мМ происходит снижение эксимеризации пирена на 22% по сравнению с контролем, что свидетельствует об увеличении микровязкости мембраны. Однонаправленное снижение текучести мембраны и способности к колониеобразованию является индикатором перехода клетки в состояние гипометаболизма.

Ранее аналогичные результаты были получены при действии 2,4,6-тринитротолуола в качестве стрессора на клетки грамотрицательных бактерий и описаны в работах Куриненко с соавторами [5; 6]. Кроме того, изменения в метаболическом статусе и в состоянии мембраны клеток при действии различных видов стрессоров были показаны в работах других авторов [7-9].

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 12-04-01226-а.*

## Литература

1. *Бутова, С.Н.* Теоретические основы биотехнологии. Биохимические основы синтеза биологически активных веществ [Текст] / С.Н. Бутова, И.А. Типисева, Г.И. Эль-

Регистан. Под общей редакцией И.М. Грачевой // М.: Элевар, 2003.- 554с.

2. *Владимиров, Ю.А.* Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран [Текст] / Ю.А. Владимиров, Т.Е. Добрецов // М.: Наука, 1980.- 320с.
3. *Максим, О.В.* Динамика некоторых биофизических свойств мембран эритроцитов у военнослужащих срочной службы в процессе адаптации к военной службе [Текст] / О.В. Максим, В.П. Терещенко, О.И. Зайцева // Биологические науки. Современные наукоемкие технологии №1.- 2006.- С.14-17.
4. *Добрецов, Т.Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов [Текст] / Т.Е. Добрецов // М.: Наука, 1989.- 277с.
5. *Куриненко, Б.М.* Структурные изменения в мембранах клеток *Escherichia coli*, индуцированные 2,4,6-тринитротолуолом [Текст] / Б.М. Куриненко, В.Г. Евтюгин, А.И. Голубев, Е.В. Никитина, Г.Ю. Яковлева // Вестник Казанского технологического университета.- Т.15, № 18.- С. 200-202.
6. *Куриненко, Б.М.* Особенности химического сдвига ядер  $^{31}\text{P}$  фосфолипидов плазматической мембраны клеток *Escherichia coli*, индуцированного 2,4,6-тринитротолуолом [Текст] / Б.М. Куриненко, Т. Зинкевич, А.Г. Крушельницкий, В.Я. Пономарев, Г.Ю. Яковлева // Вестник Казанского технологического университета.- Т.15, № 23.- С. 113-114.
7. *Маргулис, А.Б.* Влияние хлорпроизводных 2(5H)-фуранона на жизнеспособность бактериальных клеток / А.Б. Маргулис, А.Р. Курбангалиева, Н.В. Белоногова, Л.З. Латыпова, В.Я. Пономарев, Э.Н. Хакимуллина, Е.Ю. Тризна, М.И. Богачев, А.Р. Каюмов // Вестник Казанского технологического университета.- 2012.- Т. 15, №15.- С. 220-224.
8. *Евтюгин, В.Г.* Электронно-микроскопическое исследование морфологических изменений клеток кишечной палочки в условиях голодового стресса / В.Г. Евтюгин, А.Б. Маргулис, О.Н. Ильинская, М.К. Кадилов // Вестник Казанского технологического университета.- 2011.- №12.- С.167-171.
9. *Маргулис, А.Б.* Изменение функциональной активности бактериальной клетки сопряжено с изменением ее элементного состава / А.Б. Маргулис, А.В. Волошин, А.Х. Гильмутдинов, А.И. Колпаков, О.Н. Ильинская // ДАН.- 2009.- Т.427, №4.- С.553-556.

**А. Б. Маргулис** - к.б.н., доц. каф. микробиологии К(П)ФУ, anna.margulis@kpfu.ru; **М. А. Данилова** – студ. К(П)ФУ; **П. В. Зеленихин** - к.б.н., доц. каф. микробиологии К(П)ФУ; **В. Я. Пономарев** - к.т.н., доц. каф. технологии пищевых КНИТУ, v.y.ponomarev@gmail.com; **Б. М. Куриненко** - д.б.н., проф. каф. микробиологии К(П)ФУ, boris.kurinenko@kpfu.ru.