

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 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 Ca^{2+} индуцировать гипометаболическое состояние бактерий на примере *Micrococcus lysodeikticus*. В связи с поставленной целью решались следующие задачи: 1. Определить концентрации 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 Ca^{2+} в концентрации 20, 100, 200 мМ на жизнеспособность бактерий при стандартном количестве клеток в 1 мл суспензии. В качестве источника Ca^{2+} использовали раствор 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.

а б в г д 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: $F = (I_{470\text{пир}} - I_{470\text{б/пир}}) / (I_{370\text{пир}} - I_{370\text{б/пир}})$, 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 CaCl_2 , рассчитанная как $(I_{470\text{пир}} - I_{470\text{б}}) / \text{пир} = 75$ усл.ед. Интенсивность флуоресценции мономера, рассчитанная по формуле $(I_{370\text{ пир}} - I_{370\text{ б}}) / \text{пир} = 200$ усл.ед. Коэффициент эксимеризации $F = 75/200 = 0,375$. Интенсивность флуоресценции эксимера клеточной суспензии без добавления 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 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 Ca^{2+} отмечается достоверное изменение соотношения живых клеток и колониеобразующих единиц *Micrococcus lysodeikticus* в сторону уменьшения последних. При концентрации 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].