

На правах рукописи

ЕВТЮГИН ВЛАДИМИР ГЕННАДЬЕВИЧ

**СУБПОПУЛЯЦИИ СТАРЕЮЩИХ КУЛЬТУР НЕСПОРООБРАЗУЮЩИХ
БАКТЕРИЙ: РАЗДЕЛЕНИЕ В КРИОГЕЛЯХ И МОРФО-
ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА**

03.02.03 - микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2010

Работа выполнена на кафедре микробиологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор Ильинская Ольга Николаевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор, член-корреспондент РАН
Ившина Ирина Борисовна

доктор биологических наук, профессор
Селивановская Светлана Юрьевна

Ведущая организация: Учреждение Российской Академии Наук Казанский
институт биохимии и биофизики

Защита состоится "23" декабря 2010г. в ____ на заседании диссертационного совета Д.212.081.08 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук в ФГАОУВПО "Казанский (Приволжский) федеральный университет" (420008, г.Казань, ул. Кремлевская, д.18., главное здание, ауд. 211)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им.Н.И. Лобачевского ФГАОУВПО "Казанский (Приволжский) федеральный университет"

Электронный вариант автореферата размещен на сайте ФГАОУВПО "Казанский (Приволжский) федеральный университет" www.ksu.ru

Отзывы на автореферат, заверенные печатью, просим направлять по адресу: 420008, г.Казань, ул. Кремлевская, 18, ФГАОУВПО "Казанский (Приволжский) федеральный университет"

Автореферат разослан " " ноября 2010г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

З.И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. К настоящему времени накоплена обширная информация о кардинальных перестройках метаболизма культур микроорганизмов при их длительном культивировании в питательной среде. Проблемы, связанные с изучением стареющей или отвечающей на воздействие стрессоров, например, таких как истощение в среде источников питания, микробной популяции являются предметом постоянного внимания исследователей. Следствием стресса является переход активно делящихся клеток к состоянию пролиферативного покоя или метаболического покоя у репродуктивно покоящихся форм. Анализ данных литературы позволяет сделать вывод о том, что гетерогенность стареющих культур непорообразующих бактерий обусловлена разнообразием в популяции клеток различного физиологического состояния, таких как диссоциативные формы микроорганизмов, цистоподобные рефрактерные клетки [Дуда, Эль-Регистан 2001], гипометаболические, некультивируемые формы [Kolter *et al.*, 1993].

Пристальное внимание уделяется изучению внеклеточных ауторегуляторов, обеспечивающих межклеточную коммуникацию при формировании стрессового ответа микробной популяции как единого организма. В аспекте проблематики контроля роста микробной популяции представляют интерес функции ауторегуляторов, выявленных у ряда бактерий и дрожжей (алкилоксибензолы (АОБ)) (Эль-Регистан, 1988; Батраков с соавт., 1993; Мулюкин с соавт., 1996). По достижении определенного концентрационного уровня АОБ влияют на переход микробной культуры к стационарной фазе и развитие в клетках гипометаболического, а затем анабиотического состояний, сопряженных с повышением устойчивости клеток к неблагоприятным и повреждающим воздействиям (Эль-Регистан, 1988; Демкина с соавт., 2000; Лойко с соавт., 2003).

Изменения условий среды обуславливают у популяций микроорганизмов мобилизацию потенциальных возможностей для формирования адаптивного ответа (Головлев, 1999; Феофилова с соавт., 2000). Следует отметить, что стратегия переживания микроорганизмами неблагоприятных воздействий не ограничивается образованием специализированных метаболически покоящихся форм (экзоспоры, цисты, акинеты, экзоспоры). В последние годы большое внимание уделяется изучению способов переживания неблагоприятных условий непорообразующими бактериями за счет перехода их в состояние «вегетативного» покоя и образования цистоподобных форм [Мулюкин с соавт., 1997]. Однако остается еще недостаточно изученным вопрос о морфо-физиологических особенностях этих форм непорообразующих микроорганизмов. Актуальным является выявление в стареющих микробных популяциях субпопуляций, изучение свойств субпопуляций клеток, полученных с помощью разделения, в частности, методом гель-хроматографии на различных видах криогелей с высокой разрешающей способностью. Данные этих исследований могут оказаться полезными для выяснения механизмов возникновения морфотипов разного физиологического и биохимического статуса под влиянием неблагоприятных факторов внешней среды.

Цель и задачи исследований. Целью работы является выявление особенностей диссоциации стареющей культуры непорообразующих бактерий с оценкой морфо-физиологических свойств субпопуляций и анализ хроматографического разделения клеток в соответствии с их физиологическим статусом в немодифицированных, гидрофобизованных и заряженных криогелях.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Охарактеризовать морфотипы клеток и метаболическую активность стареющих популяций грамотрицательных (*Escherichia coli* K12, *Salmonella typhimurium* TA100) и грамположительных (*Micrococcus luteus*, *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, *Staphylococcus epidermidis*) неспорообразующих бактерий в соответствии с морфотипами и метаболической активностью и определить соотношение субпопуляций для различных бактерий в условиях длительного культивирования.
2. Выявить основные морфотипы, характеризующие субпопуляции в стареющих бактериальных культурах, методом газовой хроматографии проанализировать возможность синтеза ауторегуляторных факторов – индукторов гипометаболизма, в частности, гексилрезорцина, у исследуемых бактерий различной грампринадлежности.
3. Оценить возможность разделения смешанных культур бактерий на индивидуальные в криогелях на основе поливинилового спирта, модифицированного гидрофобными алифатическими группировками.
4. Изучить возможность разделения стареющей популяции бактерий на субпопуляции в агарозных криогелях с привитыми гидрофобными и зарядовыми группировками.
5. Охарактеризовать физиолого-биохимические и морфологические параметры бактерий в субпопуляции гипометаболических клеток, полученной после выделения гель-хроматографией на агарозных криогелях.

Положения, выносимые на защиту:

1. Стареющие популяции включают субпопуляции вегетативных, гипометаболических и мертвых клеток в различных соотношениях в культурах различных видов бактерий. Клетки гипометаболической субпопуляции характеризуются ультрамелкими размерам, конденсированной цитоплазмой, измененным элементным составом, снижением активности конститутивных ферментов, увеличением активности бета-галактозидазы и продукцией ауторегулятора – гексилрезорцина.
2. Модифицированный гидрофобными группировками криогель на основе поливинилового спирта позволяет эффективно разделять смесь разноразмерных клеток в смешанных культурах (бациллы/стафилококки), но не делит разноразмерные вегетативные и гипометаболические клетки в монокультурах бактерий.
3. Немодифицированный агарозный криогель эффективно разделяет гипометаболические и вегетативные клетки одной бактериальной культуры, гидрофобизация агарозы алифатическими группировками не влияет на эффективность разделения. Внесение зарядовых группировок увеличивает степень разделения субпопуляций.

Научная новизна.

1. Впервые проведена визуализация гипометаболических наночастиц у бактерий (*M. luteus*, *L. plantarum* 8P-A3, *E. coli* K12, *St. epidermidis*, *S. typhimurium* TA100) методами трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии.
2. Впервые показано образование капсулоподобных структур у клеток длительно инкубированных культур *E. coli*.
3. Предложен и разработан метод гель-хроматографии клеток бактерий в криогелях, открывающий новые перспективы использования криотропного гелеобразования для решения задач как фундаментальной микробиологии, так и биотехнологии.

4. Впервые на криогелях достигнуто эффективное разделение клеток стареющей популяции в соответствии с их метаболическим статусом. Выявлена возможность разделения клеток бактерий на криогелях в зависимости от распределения гидрофобных зон и заряда на клеточной поверхности.

Практическая значимость работы.

1. Разработан новый метод гель-хроматографии в криогелях, который позволяет эффективно разделять клетки с разным метаболическим статусом в монокультурах, а также клетки разных видов бактерий из смешанных культур.
2. Разработана методология анализа стареющих культур бактерий и характеристики гипометаболического состояния, наиболее характерного для бактерий в условиях естественной среды их обитания.
3. Изучены процессы перехода к гипометаболизму, дающие ценные данные для оптимизации биотехнологических процессов как с известными микроорганизмами, так и с представителями еще не используемых видов бактерий в микробиологической промышленности.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследование. Работа проводилась в 2004-2010 гг. в соответствии с планом НИР Казанского (Приволжского) федерального университета «Молекулярно-генетические, клеточные и популяционные основы функционирования живых систем», федеральной программой «Развитие научного потенциала высшей школы», гранты № 2.1.1.1005, 2.1.1.3222, 2.1.1./920 и РФФИ 07-04-01051. Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора. Часть электронно-микроскопических исследований проведена лично автором на базе Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН (г.Пушино-на-Оке); в центральной биотехнологической службе (Zentrale Biotechnologische Betrieb) Университета Юстуса-Либиха г. Гиссен, Германия, и на кафедре зоологии беспозвоночных биолого-почвенного факультета Казанского (Приволжского) федерального университета. Исследования на сканирующем электронном микроскопе проводили в лаборатории Центра электронной микроскопии КФУ.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на VI международной конференции «Проблемы загрязнения окружающей среды» (Пермь, 2005), XIII международной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение» (Казань, 2005), 60-й научной студенческой конференции биологического факультета ННГУ (Н.Новгород, 2007), VII Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2007), IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008), III международной конференции «Микробное разнообразие: нынешняя ситуация, стратегия взаимодействия, биотехнологический потенциал» (ICOMID 2008) (Пермь - Н.Новгород - Пермь, 2008), 12-й Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пушино-на-Оке, 2008), Всероссийской научной конференции «Изменяющаяся окружающая среда и устойчивое развитие регионов: новые методы и технологии исследований» (Казань, 2009), XIV международной конференции «Ферменты микроорганизмов в биотехнологии и медицине» (Казань, 2009), XVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2010).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, из которых 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и одно методическое руководство для студентов и аспирантов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методической части - описания материалов и методов исследований, раздела экспериментальных исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 119 страницах машинописного текста, включает 5 таблиц, 24 рисунка. Библиография содержит 123 наименования работ российских и зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроорганизмы и условия их культивирования. Микроорганизмы, использованные в работе, приведены в табл.1. Для моделирования условий естественного перехода в гипометаболическое состояние штаммы микроорганизмов культивировали в среде LB (на 1000 мл дистиллированной воды: NaCl - 5 г., дрожжевой экстракт - 5 г., пептон - 10 г.), разведенной 1:10. Газообмен с внешней средой блокировали стерильной полиэтиленовой пленкой. Культивирование вели в течение 6-9 месяцев при 37⁰С в термостате.

Таблица 1. Микроорганизмы, использованные в работе, приведены в таблице 1

Штамм	Генотип	Источник (коллекция)
<i>Micrococcus luteus</i>	дикий тип	Музей каф. микробиологии КФУ
<i>Lactobacillus plantarum</i> 8P-A3	дикий тип	Препарат «Лактобактерин сухой», ФГУП «Пермское НПО «Биомед», г. Пермь
<i>Escherichia coli</i> K12	дикий тип	Музей каф. микробиологии КФУ
<i>Escherichia coli</i> PQ37	<i>sfiA::mud(Ap lac)cts, lac A U169, mal⁺, uvr A, gal Y, pho C, rfa</i>	Музей каф. микробиологии КФУ
<i>Bacillus subtilis</i>	дикий тип	Музей каф. микробиологии КФУ
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	дикий тип	Музей каф. микробиологии КФУ
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	<i>His G46, rfa, uvr-, pkm 101, bio-</i>	НИИ по БИХС, Купавна

Регуляторные факторы микроорганизмов. В работе исследовали соединения класса алкилрезорцинов (Sigma), химические аналоги ауторегуляторных факторов d₁ бактерий – метилрезорцин (Met) (Sigma, М.м. = 124) и гексилрезорцин (Hex) (Sigma, М.м. = 196). Исходный раствор алкилрезорцинов готовили в диметилсульфоксиде (ДМСО) в концентрации 10 мг/мл, в экспериментах исследовали соединения в концентрациях от 10 до 1000 мкг / мл дистиллированной воды.

Полимерные криогели. В работе использовали ряд криогелей, содержащих алифатические цепи различной длины, а также заряженные группировки. Применяли гели агарозы и поливинилового спирта (ПВС), немодифицированные (условное обозначение С0) и модифицированные алифатическими заместителями с длиной с 4, 7, 12 углеродных атомов (условные обозначение С4, С7 и С12 соответственно), а

также гели, несущие остаток трис-оксиметиламинометана (положительно заряженные группировки) и тиогликолевой кислоты (отрицательно заряженные группировки).

Определение активности щелочной фосфатазы проводили с помощью модифицированного SOS-хроматеста [Miller, 1976]. Культуры бактерий выращивали при 37⁰С в течение 18 ч для изучения вегетативных клеток и в течение 120-270 суток в условиях голодания для анализа гипометаболических клеток. По уровню экспрессии конститутивной щелочной фосфатазы определяли метаболическую активность гипометаболических и вегетативных клеток.

Определение азоказеинолитической активности [Chorney J., 1947]. Субстратом служил 10% раствор азоказеина в 0.05 М трис-буфере, рН 7.2. Реакционная смесь состояла из 100 мкл субстрата и 50 мкл ферментного раствора. Культуры бактерий выращивали при 37⁰С в течение 18 ч для характеристики вегетативных клеток и в течение 120-270 суток в условиях голодания для гипометаболических клеток. Активность протеолитических систем клеток определяли по гидролизу азоказеина.

Определение активности β-галактозидазы. Культуры бактерий выращивали при 37⁰С в течение 18 ч для вегетативных клеток и в течение 120-270 суток в условиях голодания для гипометаболических клеток. После этого определяли активность β-галактозидазы, согласно методике [Miller, 1976].

Тест Kogure для определения числа жизнеспособных, но некультивируемых клеток. Число и процент жизнеспособных, но некультивируемых клеток определяли в модифицированном тесте Когуре [Kogure et al., 1979].

Хроматографическое определение гексилрезорцина (Hex) проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе «Стайер-2» («Аквион», Россия), с УФ-детектором при 254 нм, используя колонку Luna C18, длиной 15 см с внутренним диаметром 4.6 мм. Анализ проводили в течение 20 минут в обращено-фазовом режиме с программированием состава подвижной фазы (ацетонитрил-вода) в градиенте от 40% об. до 100% об. Количественный расчет содержания гексилрезорцина проводили с использованием метода абсолютной калибровки.

Гель-фильтрация бактерий в модифицированных полимерных криогелях. Культуры исследуемых штаммов выращивали на среде LB в течение 18 ч при температуре 37⁰С. Клетки от среды отделяли центрифугированием (8 000 об/мин., радиус ротора 8 см, 20 мин.). Надосадочную жидкость сливали, клетки ресуспендировали в 0.9% NaCl. Поверхность геля предварительно промывали 20 мл физиологического раствора (0.9 % NaCl), продували стерильным воздухом и пропускали через колонку геля 0.4 мл физиологического раствора в течение 40 с для заполнения пор геля. Далее на поверхность геля наносили 0.4 мл исследуемой микробной суспензии, пропуская её через колонку геля в течение 2.5 мин (плотность суспензий выравнивали добавлением физиологического раствора). Через гель пропускали 0.4 мл физиологического раствора для освобождения геля от клеток, не взаимодействовавших с привитыми группировками. В ряде экспериментов процедуру смыва повторяли несколько раз.

Полученные в процессе гель-хроматографии образцы, а также суспензию измеряли на спектрофотометре СФ 2000 (490 нм) против физиологического раствора, используемого в качестве контроля. После работы гель во избежание контаминации

исследуемыми микроорганизмами промывали 20% этанолом и заливали азидом натрия.

Трансмиссионная электронная микроскопия. Образцы для трансмиссионной электронной микроскопии фиксировали 2.5% раствором глутарового альдегида в 0.05 М какодилатном буфере. Дальнейшую обработку образцов проводили по методиками [Миронов с соавт., 1994; Гальченко, 2001]. Исследования бактерий проводили на трансмиссионных электронных микроскопах JEOL-JEM 100B, Carl Zeiss LEO. Цитохимическая реакция на щелочную фосфатазу проводилась контрастированием продуктов реакции солями кадмия и свинца.

Сканирующая электронная микроскопия с элементным анализом. Пробу для сканирующей электронной микроскопии готовили путем нанесения капли суспензии микроорганизмов в 0.9% NaCl на покровное стекло с последующим высушиванием. Для контрастирования образца проводили вакуумное напыление золота. В работе использовали растровый сканирующий электронный микроскоп Phillips XL-30 с микрозондовым анализом (спектрометр EDAX EDX). Исследование проводили в режиме HIGH-VAC. Напыление золота проводили на вакуумной напылительной установке AGAR.

Статистическую обработку результатов проводили в компьютерных программах Microsoft Excel и Origin. При этом $p < 0,05$ принимали за достоверный уровень значимости. Статистическую обработку данных электронной микроскопии и элементного анализа проводили с помощью программного обеспечения приборов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В серии экспериментов первоначально из микробной популяции на различных этапах ее старения выделяли клетки с целью изучения их свойств. Для этого пять исследуемых культур микроорганизмов (*M. luteus*, *L. plantarum* 8P-A3, *E. coli* K12, *S. epidermidis*, *S. typhimurium* TA100) были посеяны в колбы с обедненной питательной средой с ограничением газового обмена с внешней средой (инокулятом служила 18 часовая культура). На различных этапах эксперимента в соответствии с поставленными задачами проводили отбор клеток из жидких суспензий разного возраста (сутки, месяц, три, четыре, шесть, девять месяцев).

1. Изменение морфологии клеток при переходе в гипометаболическое состояние. Микрофотографии ультратонких срезов клеток стареющей популяции (150-180 суток) клеток *E. coli* K12 приведены рис.1. Электронные микрофотографии клеток на промежуточном этапе перехода популяции в гипометаболическое состояние показывают, что популяция гетерогенна и состоит из вегетативных клеток нормальных размеров и мелких гипометаболических клеток. На фотографии в полях снимков присутствуют гипометаболическая клетка и вегетативная клетка, в частности видна вегетативная клетка находится в процессе деления (рис. 1).

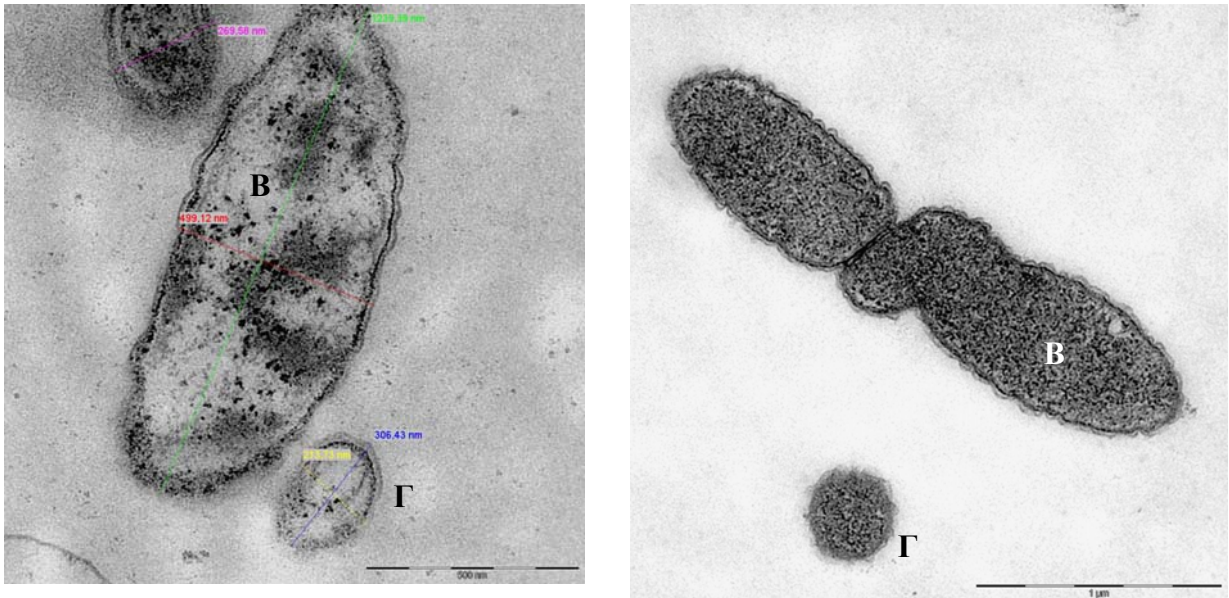


Рисунок 1 - Сравнительный размер и морфология вегетативной (В) и гипометаболической (Г) клеток *E. coli* К12 (популяция в процессе старения, 150-180 суток)

Клетка, перешедшая в гипометаболическое состояние, значительно уменьшилась в размере, сохранив при этом целостность оболочки и жизнеспособность. О последнем свидетельствует аналогичная вегетативной клетке электронная плотность содержимого. При этом кардинальных изменений в морфологии клеточной поверхности, как и утолщения клеточной стенки, не наблюдали.

На основании анализа представленных фотографий можно заключить, что стрессовые условия, примененные к исследуемым культурам микроорганизмов, достаточны для дестабилизации гомеостаза популяции с последующим переходом видов к политике переживания стрессовых условий. Расслоение популяции четко зафиксировано, для всех четырех видов исследованных микроорганизмов показано наличие активных, гипометаболических и мертвых клеток.

2. Определение Нех в суспензиях бактериальных клеток с помощью ВЭЖХ.

Анализ образцов культуральной жидкости (КЖ) микробных клеток на возможное содержание гексилрезорцина (Нех) и его гомологов показал, что если к суспензии бактерий был изначально добавлен Нех (50 000 нг/мл), то его содержание существенно снижалось за 60 суток культивирования. При дальнейшем культивировании (к 120 суткам) Нех снова появлялся в КЖ и его содержание достигало больших значений, чем в вариантах эксперимента, в которых Нех исходно не добавляли.

Определение концентрации алкилрезорцинов в КЖ стареющих микробных популяций выявило, что наибольшее накопление Нех без добавления экзогенного ауторегулятора наблюдалось в суспензии *M. luteus*. В КЖ *S. typhimurium* на 120 сутки культивирования Нех обнаружен не был, наибольшее накопление Нех показано для *L. plantarum* (табл. 2).

Варианты с экзогенным внесением гексилрезорцина содержали наибольшее количество Нех. Условия длительного культивирования действительно сопровождаются эндогенным образованием гексилрезорцина, что было выявлено в контрольных образцах на больших сроках инкубирования. Однако в контрольном варианте концентрация образовавшегося Нех не столь значительная, как в опытном

варианте (Табл. 2), следовательно можно заключить, что Нех в большей степени способствует переходу в гипометаболическое состояние на ранних этапах культивирования, чем условия голодания .

Таблица 2 - Содержание Нех в КЖ по данным ВЭЖХ на 120-е сутки инкубирования бактерий

Штамм	Содержание Нех, нг/мл	
	Без добавления экзогенного Нех	С добавлением Нех 50 000 нг/мл
<i>E.coli</i> K12	7100	12950
<i>M. luteus</i>	14700	12560
<i>L. plantarum</i> 8P-A3	8000	43280
<i>S. typhimurium</i> TA100	отсутствовал	11960

3. Физиологические изменения грамположительных и грамотрицательных бактерий в условиях длительного культивирования в присутствии факторов анабиоза. С помощью теста Когуре [Kogure et al., 1979], в 60-ти и 180-суточных бактериальных культурах исследовали содержание клеток, «отзывчивых» на внесение питательного субстрата, а также присутствие и количество гипометаболических форм, индуцированных Нех, вносимом в концентрации 50 000 нг/мл.

Таблица 3. Содержание клеток в 60-дневной суспензии гр+ и гр- микроорганизмов, реагирующих на внесение экзогенного субстрата, %

Штамм	Количество клеток, %*		
	Активные (вегетативные) клетки	Гипометаболические клетки	Мертвые клетки
<i>E. coli</i> K12	14±1	64±2	22±1
<i>M. luteus</i>	14±1	72±2	13±1
<i>L. plantarum</i> 8P-A3	20±1	5±1	70±6
<i>S. typhimurium</i> TA100	9±1	82±1	8±1

*) За 100% принято среднее число клеток при анализе 10-12 полей зрения в световом микроскопе при увеличении 1600 (объектив с иммерсией).

Результаты, приведенные в таблицах 3-5 свидетельствуют, что в суспензии грамположительных и грамотрицательных бактерий существуют увеличенные в размерах за счет добавленного субстрата клетки (9-20%), обозначенные нами как «активные» и клетки, которые не реагировали увеличением размера на добавленный источник питания, так называемые «гипометаболические» (5-85% в зависимости от вида бактерий), а так же окрашенные метиленовым синим мертвые клетки (8-70%). Таким образом, в 60-суточных микробных культурах количество гипометаболических клеток было в 4-8 раз больше числа активных, за исключением *L. plantarum*, у которых наблюдалось только 5% клеток в гипометаболическом состоянии, в то время как основная часть популяции состояла клеток, окрашивающихся как мертвые (70%).

Следует отметить, что в культуре *L. plantarum* количество гипометаболических клеток к 60 суткам было минимальным (4-5%), мертвые же клетки преобладали в стареющей популяции. Число активных клеток лактобацилл было несколько выше

(20-21%), чем у других исследованных микроорганизмов (Табл. 3). С нашей точки зрения более высокое число активных и большое число мертвых клеток, описанное для бацилл связано со значительно меньшей скоростью адаптации к агрессивным условиям среды. Однако данные анализа лактобацилл на более поздних стадиях культивирования показали, что окончательной гибели популяции не происходит, популяция стабилизируется, приближаясь по показателям к остальным исследованным микроорганизмам, в частности *E. Coli*.

К 180 дню культивирования число активных клеток уменьшилось, возросло число гипометаболических и мертвых клеток (Табл 4). Значительных различий в соотношении субпопуляций между исследованными микроорганизмами не обнаружено. Наибольшее число как гипометаболических, так и активных клеток выявлено для *S.typhimurium*.

Параллельно изучали зависимость перехода в гипометаболическое состояние от внесения Нех. Как и предполагалось, внесенный аутоиндуктор анабиоза изменил стратегию выживания популяций. Число вегетативных клеток к 120 дню культивирования было меньше, 3-12%, против 20-24% для суспензий, культивировавшихся без Нех. Число клеток в гипометаболическом состоянии значительно не изменялось, но число мертвых клеток возросло до 21-40% против 15-22%. Нех на поздних этапах показал токсическое действие, что согласуется с данными литературы [Маргулис с соавт., 2006]. Можно сделать вывод, что популяция при длительном культивировании в стрессовых условиях является гетерогенной и разделяется по типам клеток на разных стадиях перехода от нормальной вегетации до исчезновения реакции на внесенный субстрат (Табл. 4).

Таблица 4. Содержание клеток (в %) в 180-дневной суспензии гр+ и гр- микроорганизмов, отвечающих на внесение экзогенного субстрата, %

Штамм	Количество клеток, %*		
	Активные (вегетативные) клетки	Гипометаболические клетки	Мертвые клетки
<i>E.coli</i> K12	4±1	69±2	27±1
<i>M. luteus</i>	6±2	76±2	17±1
<i>L. plantarum</i> 8P-A3	4±1	69±1	26±3
<i>S. typhimurium</i> TA100	9±2	75±2	18±1

*) За 100% принято среднее число клеток при анализе 10-12 полей зрения в световом микроскопе при увеличении 1600 (объектив с иммерсией).

Влияния Нех на популяции после трех и шести месяцев культивирования показал смещение соотношения субпопуляций в сторону увеличения числа мертвых и уменьшения числа активных клеток. Отсутствие значительных изменений в числе гипометаболических клеток в присутствии Нех свидетельствует о незначительности его влияния на ускорение перехода к гипометаболизму в стареющих популяциях.

4. Изменение активности конститутивных ферментов в клетках стареющей популяции микроорганизмов, а так же при действии Нех. Активность клеточных протеаз значительно снижается уже к первому месяцу культивирования бактерий, оставаясь в последствии на очень низком уровне вплоть до 120 суток культивирования. Такая же картина наблюдалась в вариантах с добавленным гексилрезорцином (рис.2).

Резкое снижение активности протеаз после первого месяца культивирования связано с тем, что исследуемые популяции микроорганизмов плавно переходят в состояние гипометаболизма. Активной гибели клеток, а следовательно появления в среде дополнительного субстрата для проявления активности фермента не происходило. В таком случае мы наблюдали бы постепенное снижение активности фермента в течение нескольких месяцев. Таким образом факт резкого падения протеолитической активности может служить свидетельством перехода в гипометаболическое состояние.

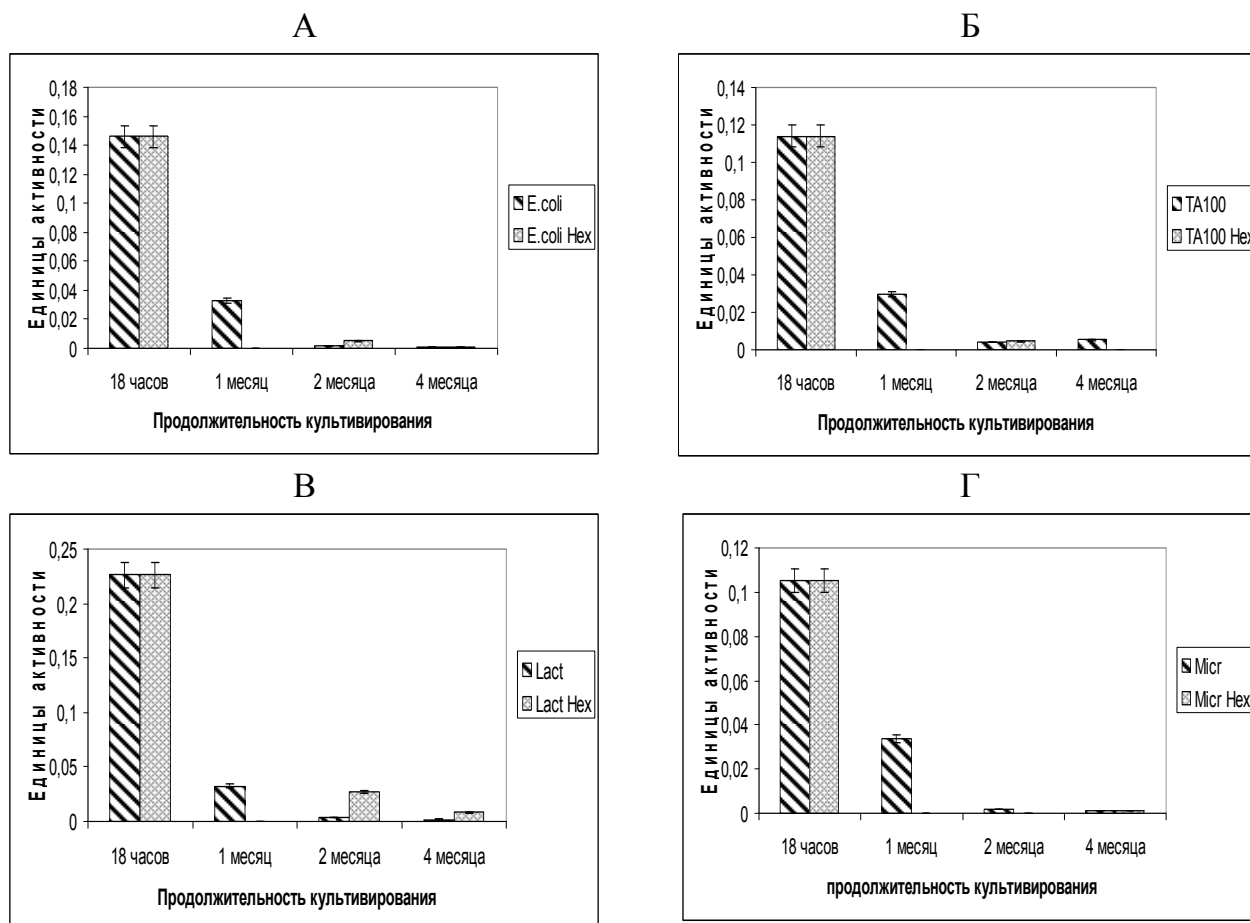


Рисунок 2 - Влияние Hex на протеазную активность у грамотрицательных (А - *E.coli* K12, Б – *S. typhimurium* TA 100) и грамположительных (В – *L. plantarum* 8P-A3, Г – *M. luteus*) бактерий.

Сходная динамика изменения активности щелочной фосфатазы за 120 суток культивирования установлена для бактерий разной грам-принадлежности. Ферментативная активность постепенно снижалась с переходом к гипометаболизму в ходе 120 суток инкубирования. Однако добавление Hex индуцировало снижение активности фермента за 60 суток культивирования инкубируемых микроорганизмов (рис. 3). Исключение составляет *E. coli*. В этом случае Hex не оказывает ускоряющего действия на переход к гипометаболическому состоянию, регистрируемому по снижению активности конститутивной щелочной фосфатазы (рис. 3, А).

Как оказалось, при старении популяции активность щелочной фосфатазы постепенно снижалась, что свидетельствовало о снижении биохимической активности при переходе клеток к гипометаболизму. Исследования способности Hex оказывать влияние на активность щелочной фосфатазы у бактерий разной

грампринадлежности (*S. typhimurium* TA 100, *E. coli* K12, *L. plantarum* 8P-A3 и *M. luteus* показали, что Hex в концентрации 50 000 нг/мл снижает активность щелочной фосфатазы по сравнению с контролем, при этом наибольшее снижение активности происходит на первом месяце инкубирования микроорганизмов. Вероятно, это связано с более выраженным стрессовым состоянием микроорганизмов, культивируемых с Hex в сравнении с контролем.

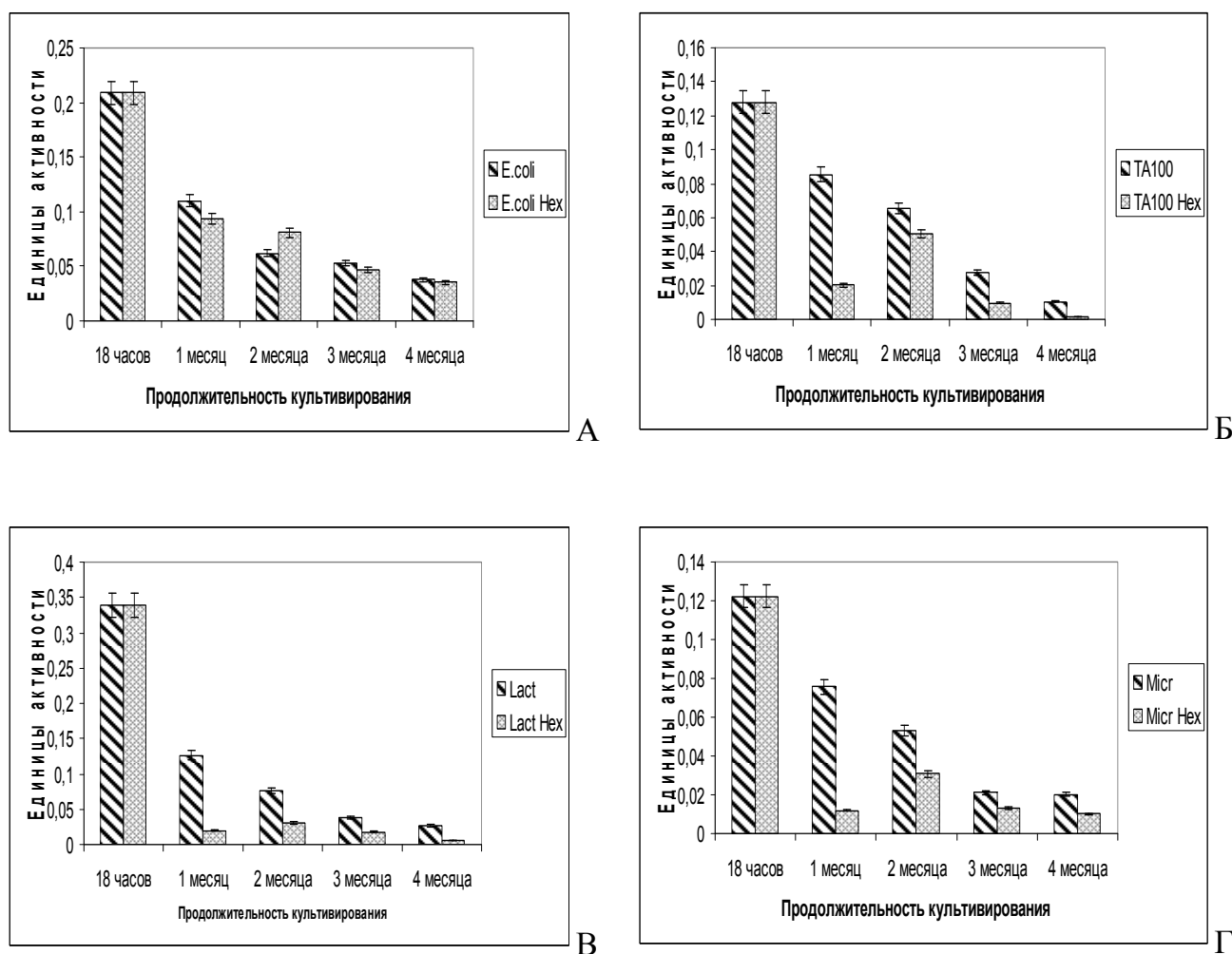


Рисунок 3 - Влияние Hex на активность щелочной фосфатазы у грамотрицательных (А - *E.coli* K12, Б – *S. typhimurium* TA 100) и грамположительных и (В – *L. plantarum* 8P-A3 Г – *M. luteus*) бактерий

Начиная с 120 суток разница показателей активности фермента между вариантами с внесением и без внесения Hex уменьшается, что вероятно было связано с разрушением или утилизацией экзогенно внесенного гексилрезорцина. Снижение активности щелочной фосфатазы как конститутивного фермента в целом может свидетельствовать о переходе микроорганизмов в гипометаболическое состояние.

Сравнительная цитохимическая реакция на белок щелочной фосфатазы в гипометаболических и вегетативных клетках *E. coli* K12 выявила, что количество фермента в клетках не изменяется в зависимости от их физиологического состояния. Комплекс продукта реакции щелочной фосфатазы с субстратом, модифицированным солями кадмия и свинца, представляет собой электронно-плотные области на фотографии. Они по объему практически идентичны у вегетативных и

гипометаболических клеток, увеличение интенсивности электронно-плотных областей у гипометаболических клеток связано с более компактным расположением фермента в уменьшившемся внутреннем объеме этих клеток (рис. 4, А) по сравнению с вегетативными (рис. 4, Б).

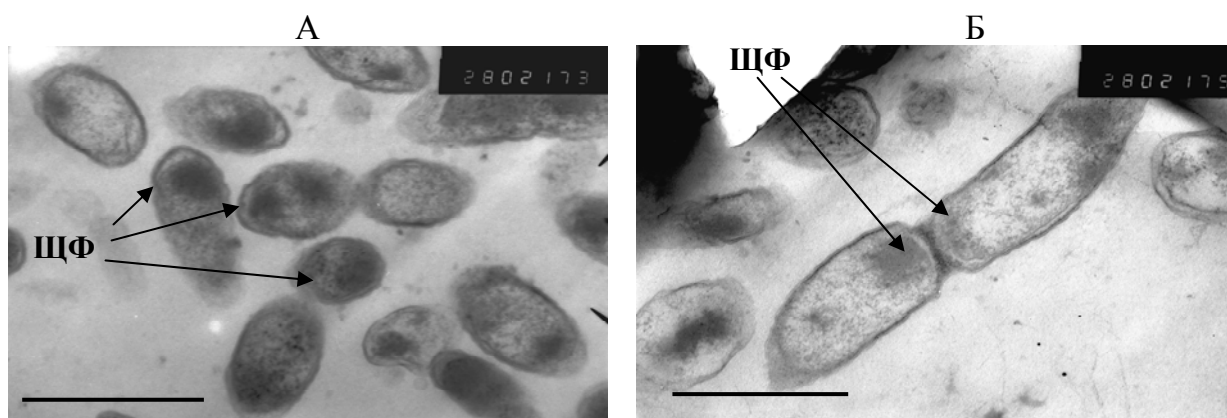


Рисунок 4 – Локализация и сравнительный объем щелочной фосфатазы в клетках *E. coli* K12; А – гипометаболические клетки, Б – вегетативные клетки (бар - 1мкм).

Микроскопические исследования глобул фермента при помощи модифицированного тяжелым металлом субстрата дает возможность оценить локализацию и примерный сравнительный объем фермента (Рис. 4). Полученные данные подтверждают гипотезу об инактивации фермента при старении и переходе к гипометаболизму, о чем свидетельствует равный объем фермента в гипометаболических и активных клетках. Такая стратегия инактивации фермента с сохранением его в клетке свидетельствует о том, что клетка на средних этапах гипометаболизма сохраняет возможность более быстрой реверсии биохимической активности. Восстановление активности фермента предполагает значительно меньшие затраты энергии, чем требовалось бы при синтезе молекул фермента *de novo*.

5. Изменение активности и биосинтеза β -галактозидазы при действии Нех.

Известно, что β -галактозидаза является ферментом, сопутствующим старению эукариотических клеток [Лянгузова, 2007]. Однако для бактерий его роль в процессах их старения неизвестна. В связи с этим был поставлен ряд опытов по выявлению изменений активности β -галактозидазы при старении бактериальных культур. Кроме того, для *E. coli* PQ37, где ген β -галактозидазы внесен в SOS-оперон, повышение β -галактозидазной активности может свидетельствовать о наличии ДНК-повреждающих факторов, приводящих к индукции SOS-ответа клетки. Именно поэтому данный штамм был выбран для оценки и сравнения активности этого фермента на поздних стадиях культивирования клеток. Эксперименты по измерению активности β -галактозидазы в вариантах с Нех и без него показали рост активности фермента с течением времени и старением культур (рис 5). В присутствии Нех происходило значительное увеличение активности фермента на поздних этапах культивирования, особенно выраженное у *M. luteus* (рис. 5, Г).

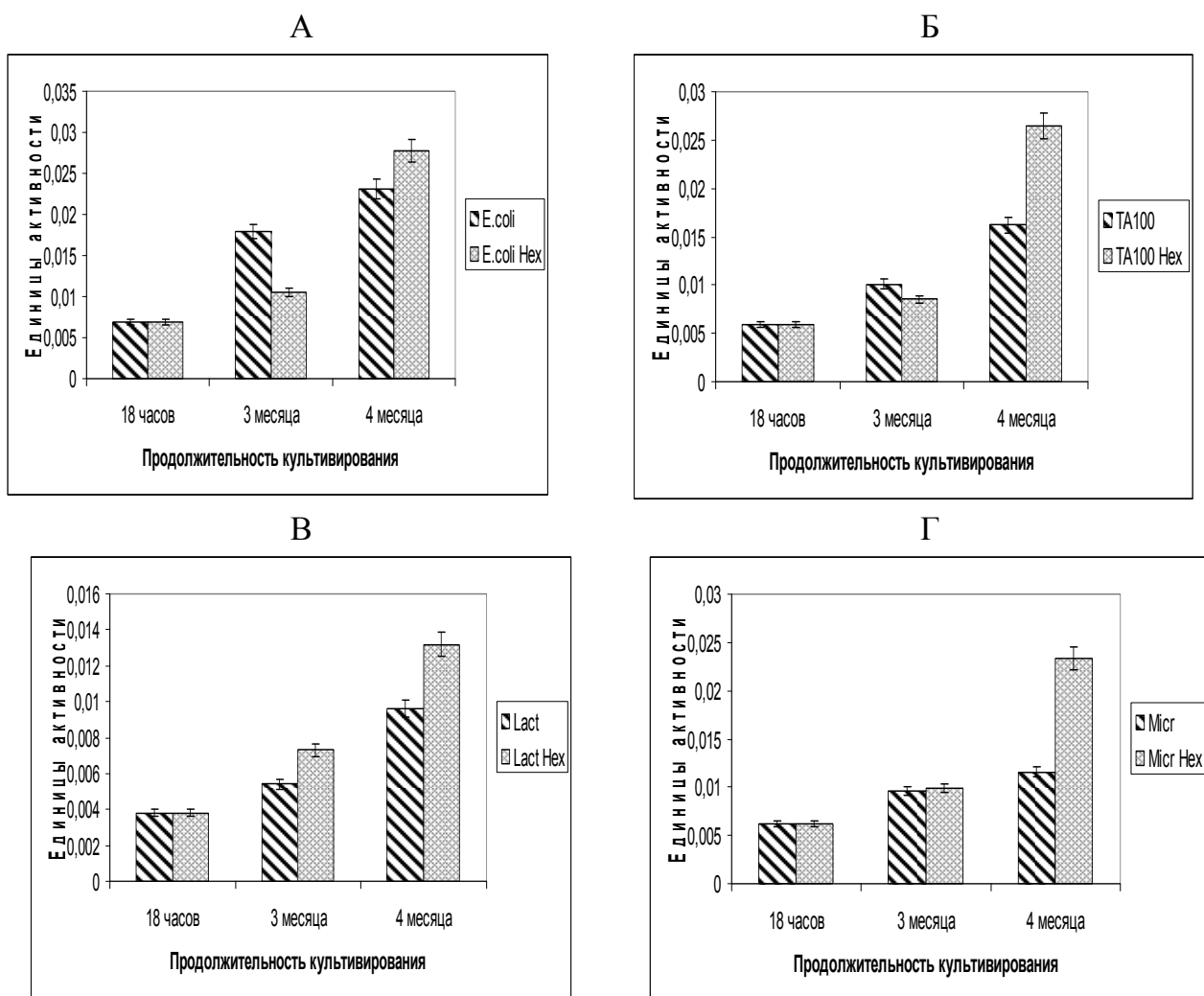


Рисунок 5 - Влияние Hex на активность β -галактозидазы у грамотрицательных (А - *E.coli* K12, Б – *S. typhimurium* TA 100) и грамположительных и (В – *L. plantarum* 8P-A3, Г – *M. luteus*) бактерий.

Полученные данные мы рассматриваем как дополнительное свидетельство перехода бактерий в гипометаболизм под действием стрессовых факторов. Для подтверждения нашей гипотезы было проведено сравнение динамики активности β -галактозидазы исследованных микроорганизмов с активностью ее у рекомбинантного штамма *E. coli* PQ37. Сравнение данных по динамике активностей показало, что все исследованные микроорганизмы в одинаковой степени обнаруживали увеличение активности β -галактозидазы при старении популяции и переходе клеток бактерий к гипометаболизму.

6. Гель-хроматография клеток бактерий в ПВС криогелях с привитыми алифатическими группировками и разделение криогелями ПВС клеток без внесения ауторегуляторов. Для проведения экспериментов использовались смешанные культуры *B. subtilis* и *S. epidermidis* в трех различных вариантах:

- две односуточные культуры;
- односуточная культура *B. subtilis* и семисуточная культура *S. epidermidis*;
- семисуточная культура *B. subtilis* и односуточная культура *S. epidermidis*.

При использовании немодифицированного криогеля ПВС ни одна из трех смесей культур не разделялась по размерам клеток. Количество бацилл и стафилококков было одинаковым в исходном и пропущенном через гель образце.

Кроме того, при исследовании возможного влияния возраста культуры на ее прохождение через гель было выяснено, что при старении культура бактерий лучше задерживалась в геле. В отличие от бактерий, стафилококк всегда полностью сорбировался в гидрофобном геле. В экспериментах с внесением алкилрезорцинов результаты были аналогичными. Степень гидрофобности не оказывала значительного влияния на сорбцию.

Полученные данные мы объясняем тем, что стареющая культура накапливает эндогенные ауторегуляторы развития, которые, как будет показано далее на примере *E. coli*, способны изменять гидрофобные свойства клеток. В течение 7 суток развития популяции вследствие начавшихся процессов старения начали вырабатываться эндогенные ауторегуляторы перехода бактерий в гипометаболическое состояние, одной из характеристик которого является изменение состава клеточной поверхности. Более значительная сорбция стафилококка в гидрофобизованных криогелях связана с возрастающей с по мере старения культуры гидрофобностью поверхности как отдельных клеток, так и их агрегатов. Это свойство также является клинической характеристикой, связанной со способностью эпидермального стафилококка вызывать поражения тканей.

7. Гель-хроматография клеток грамположительных и грамотрицательных бактерий в агарозных криогелях с привитыми алифатическими группировками не выявила достоверной зависимости степени сорбции от длины привитой алифатической группировки, то есть степени гидрофобности (рис.6.).

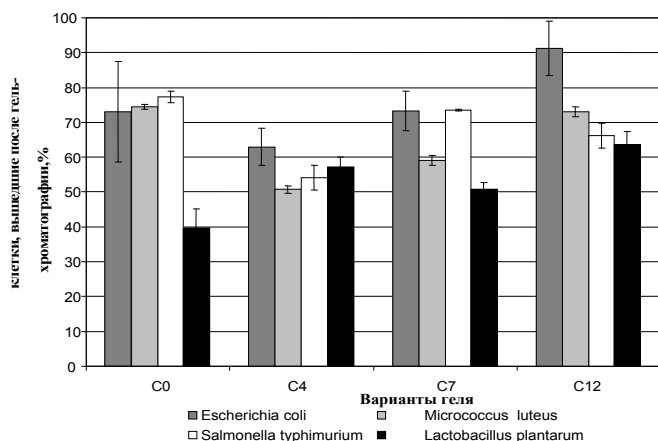


Рисунок 6 - Сравнительная гистограмма, отражающая степень сорбции клеток бактерий в криогеле (обозначения вариантов геля приведены в материалах и методах)

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии зависимости сорбции клеток бактерий от длины алифатического хвоста как для 18-часовых культур, так и для 60-дневных культур. Степень гидрофобности внутренней поверхности криогеля не оказывает влияния на сорбцию клеток исследуемых микроорганизмов, статистически достоверной разницы и связи сорбции с длиной алифатической цепочки не обнаружено.

Сравнение результатов сорбции однодневных и шестидесятидневных культур микроорганизмов в агарозном криогеле показало, что старые клетки, перешедшие в гипометаболическое состояние, задерживаются в криогеле значительно лучше, чем клетки после однодневного культивирования. Такая закономерность, свидетельствующая о неспецифической сорбции, была характерна для всех исследованных бактерий (рис. 7).

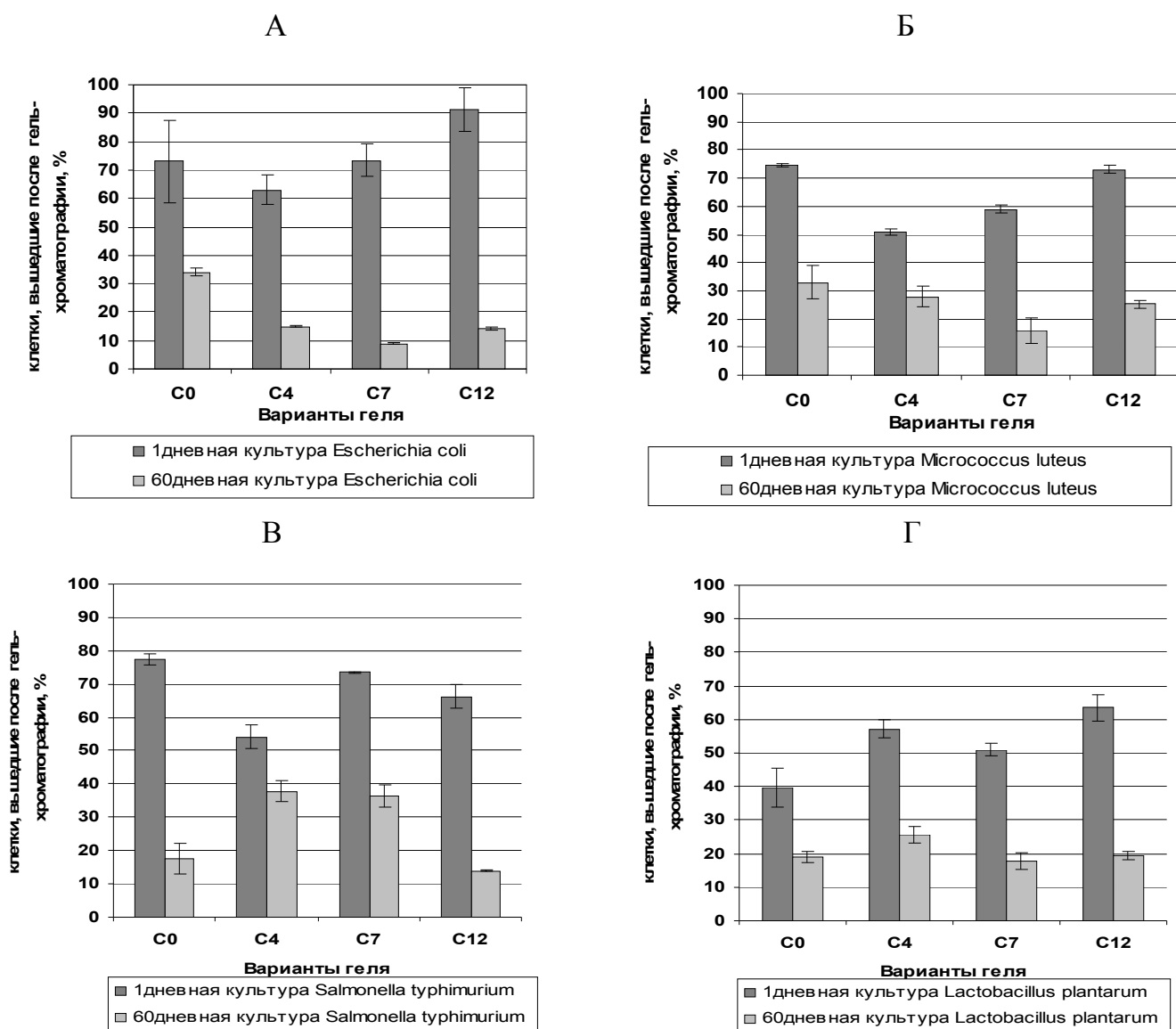


Рисунок 7 - Сравнение сорбции в криогеле однодневных и шестидневных культур *E. coli* (А), *M. lysodeikticus* (Б), *S. typhimurium* (В), *L. plantarum* (Г)

Не было выявлено достоверной зависимости уровня сорбции от длины алифатического хвоста криогеля. Активные клетки в состоянии вегетации задерживались во всех исследованных криогелях значительно хуже, чем клетки в гипометаболическом состоянии, что говорит о низких значениях неспецифической сорбции клеток бактерий в гипометаболическом состоянии, в сравнении с активными клетками.

Наибольшую степень сорбции среди 60-дневных культур наблюдали для *E.coli*. Вероятно это связано с потерей клетками кишечной палочки густого фимбриального покрова, практически полностью покрывающего поверхность клетки в вегетативном состоянии. При потере слоя из фимбрий на поверхности клеток - процесса, характеризующего адаптацию к стрессовым условиям и потерю двигательной активности, открылся доступ к наружной мембране клетки. Возможно именно это событие, наряду с потерей способности к активному передвижению, повлияло на то, что именно клетки кишечной палочки лучше всего сорбировались при гель-хроматографии в криогелях.

Наименьшие значения сорбции для *L. plantarum* являются следствием того, что клетки лактобацилл не переходили в гипометаболическое состояние, а в большинстве своем погибали при нарастании давления стрессовых условий. Как известно, мертвые клетки проявляют значительно меньшую степень сорбции на органических и неорганических материалах, в том числе и на криогелях.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют возможность эффективного и достоверного разделения активных и гипометаболических клеток при помощи как модифицированных, так и немодифицированных алифатическими цепочками криогелей.

8. Гель-хроматография в агарозных криогелях с привитыми заряженными группировками. Анализ данных сорбции 18-часовых культур микроорганизмов выявил, что число адсорбированных клеток для исследуемых грамположительных культур, а так же для грамотрицательной *S. typhimurium* примерно одинаково (рис. 8).

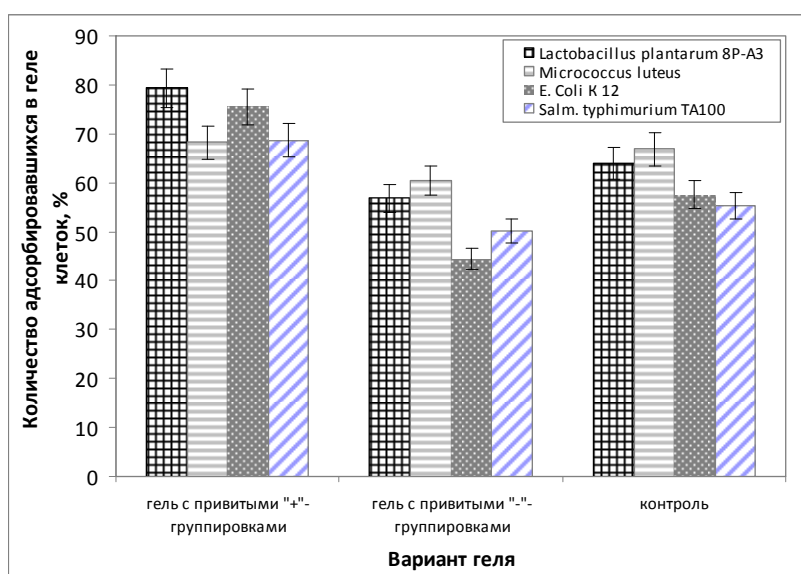


Рисунок 8 - Сравнительная гистограмма прохождения через гель с привитыми зарядовыми группировками клеток культур микроорганизмов (контроль – гель без привитых группировок).

Для *E. coli* наблюдали достоверное усиление сорбции при использовании криогеля с отрицательно заряженными привитыми группировками по сравнению с криогелями без привитых группировок и с положительно заряженными группировками.

Сравнение сорбции в агарозном криогеле клеток однодневной и четырёхмесячной исследуемых бактериальных культур с Нех и без него выявило снижение адсорбционной способности клеток бактерий, перешедших к гипометаболизму. Нех, как и предполагалось, способствовал более быстрому переходу к гипометаболическому состоянию (НФ-фенотипу), а следовательно, большей потере поверхностного заряда клетки, что отразилось в значительно меньшей сорбции гипометаболических клеток по сравнению с вегетативными. Аналогичные тенденции были обнаружены для грамотрицательных (рис. 9) и грамположительных (рис. 10) бактерий. Наибольшая разница в проценте задержавшихся и вышедших клеток при сравнении суточной и четырёхмесячной культур показана для *E. coli*.

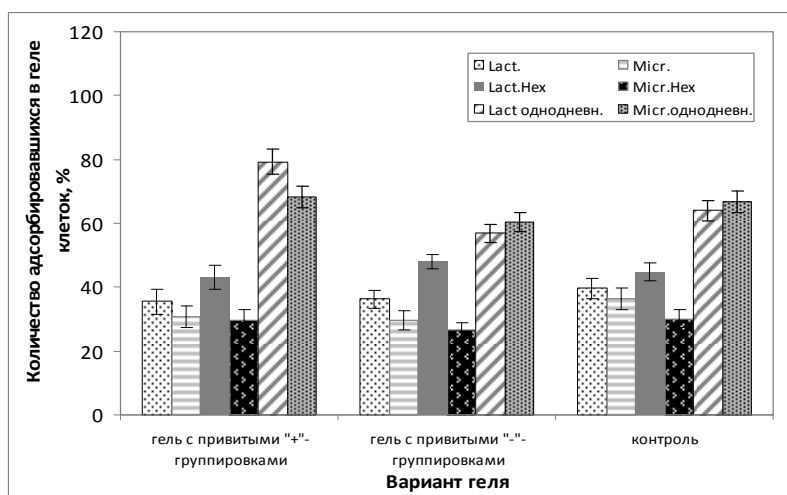


Рисунок 9 - Число адсорбированных после прохождения через гель клеток *L. plantarum* 8P-A3 и *M. luteus* в опыте (% от общего числа нанесенных на гель клеток) (контроль – гель без привитых группировок).

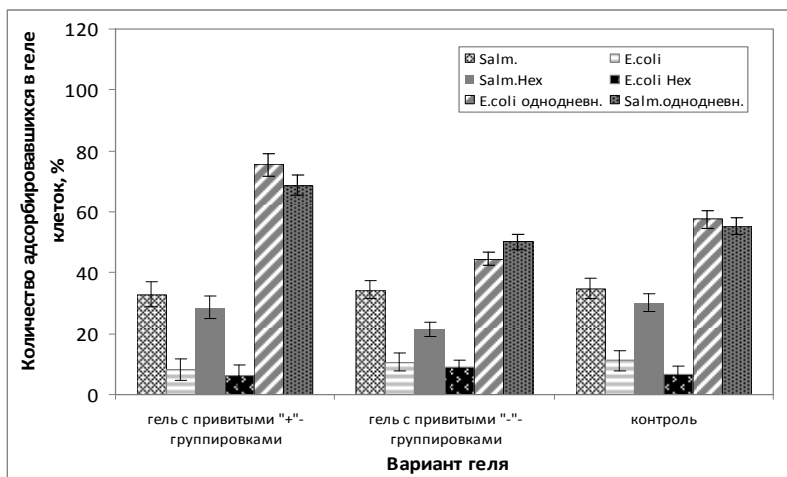
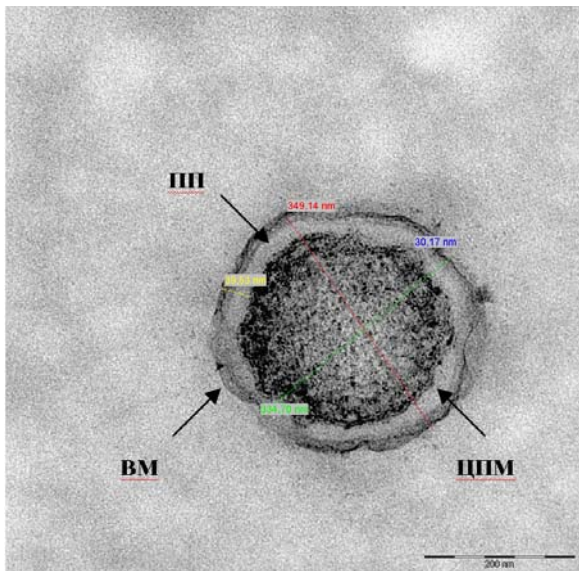


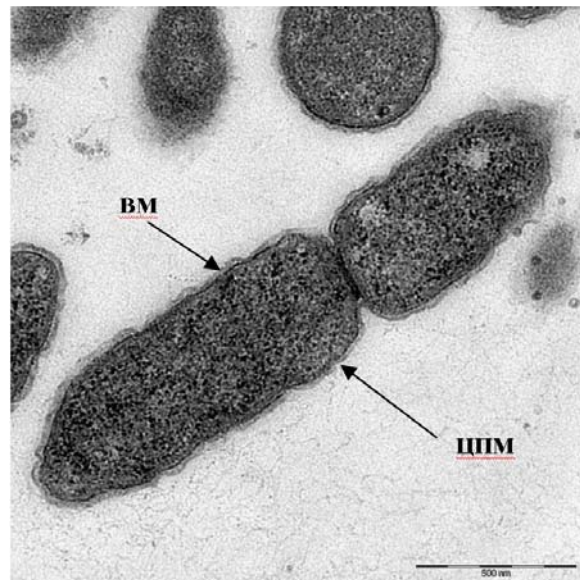
Рисунок 10 - Число адсорбированных после прохождения через гель клеток *S. typhimurium* TA 100 и *E. coli* K12 в опыте (% от общего числа нанесенных на гель клеток) (контроль – гель без привитых группировок)

9. Морфология гипометаболических клеток микроорганизмов после разделения в криогелях. Установлены достоверные изменения размера и морфологии клеток *E. coli* в гипометаболическом и вегетативном состояниях. Так, первые имеют размер клетки 1500 ± 150 нм в длину и 700 ± 30 нм в диаметре (вытянутая палочковидная форма) и толщину клеточной стенки 5-11 нм, тогда как вторые – соответственно 350-370 нм в диаметре (сферическая форма) и стенки толщиной 30-40 нм. (рис 11, А, Б) Значительно увеличилось периплазматическое пространство гипометаболических клеток (30-39 нм) по сравнению с вегетативными (3-5 нм).

На электронных фотографиях ультратонких срезов видим ряд значительных изменений, которые принято считать характеризующими гипометаболическое состояние. Это значительное уменьшение размера клеток относительно вегетативных, шарообразная форма, изменение поверхностных структур. Последнее представляет наибольший интерес ввиду того, что именно характеристика поверхности клеток определяет выживание в агрессивной среде.



А



Б

Рисунок 11 - Электронные микрофотографии клеток *E. coli* А – гипометаболическая клетка (270 суток культивирования), Б – вегетативные клетки (18-часовая культура)(пп – периплазматическое пространство, вм – внешняя мембрана, цпм – цитоплазматическая мембрана).

Особенно четко изменения в клеточной стенке *E. coli* видны на рис.12, изображающем клетки, перешедшие в гипометаболическое состояние на поздних этапах культивирования (270 суток). Значительно увеличилась толщина покровов клетки, появились капсулоподобные образования (80-240 нм), включая клеточную стенку (28-39 нм). Объем и относительный размер клеток на 270 сутках культивирования в условиях голодания уменьшился более чем в 5 раз относительно среднего размера вегетативных клеток в исследованных образцах.

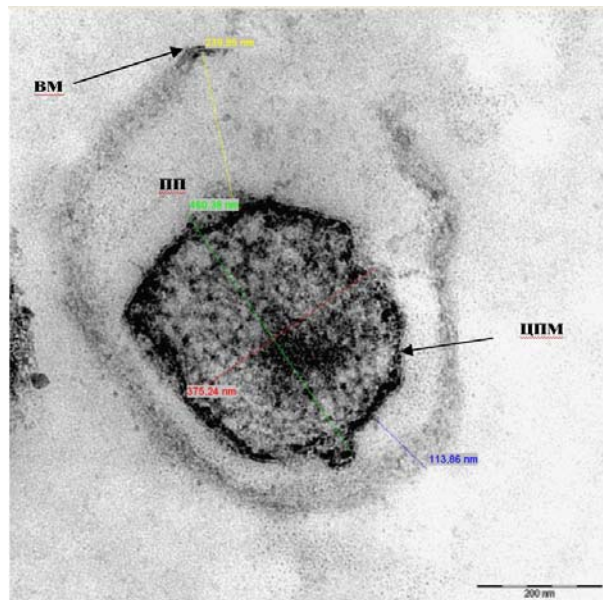
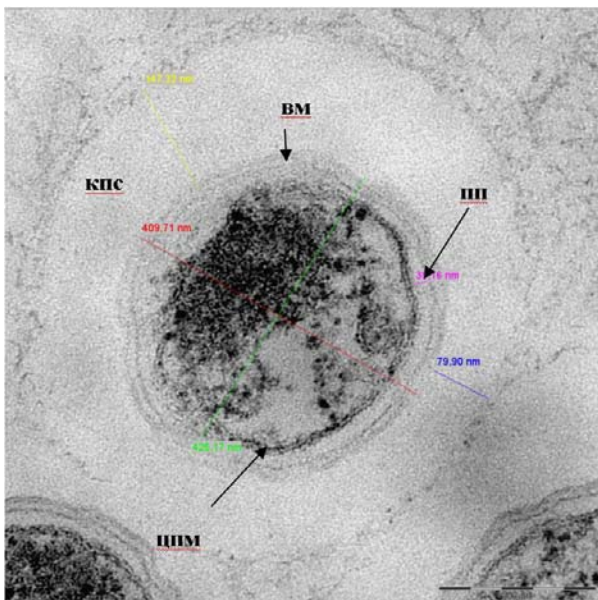


Рисунок 12 – Морфология гипометаболической клетки *E. coli* К12 (270 суток культивирования)(цпм – цитоплазматическая мембрана, кпс – капсулоподобная структура, пп – периплазматическое пространство, вм – внешняя мембрана)

Вокруг клетки наблюдается зона высокой проходимости электронного пучка, что свидетельствует о наличии в этой области специального образования, не

пропускающего в себя электронно-плотные молекулы, контрастированные уранилацетатом и свинцом. Это позволяет предположить наличие капсулоподобных образованиях, окружающих клетки в состоянии гипометаболизма. Наличие таких структур для кишечной палочки детектировано впервые, анализ 35-40 клеток в более чем 20 полях зрения говорит о статистически достоверном присутствии этого образования у клеток *E. coli* (рис. 12). Отсутствие подобных образований у мертвых клеток, присутствовавших в этих ультратонких срезах, говорит о связи образований с жизнедеятельностью микроорганизма в гипометаболическом состоянии.

10. Элементный анализ клеток бактерий в гипометаболическом состоянии после разделения в криогелях. Анализ отношения кальция к углероду в исследуемой области показал увеличение содержания кальция гипометаболическими формами *E. coli* в сравнении с вегетативными формами (рис. 13). Для *S. typhimurium* уровень кальция хотя и превышал значения для кишечной палочки, но разницы между гипометаболическими и вегетативными формами выявлено не было.

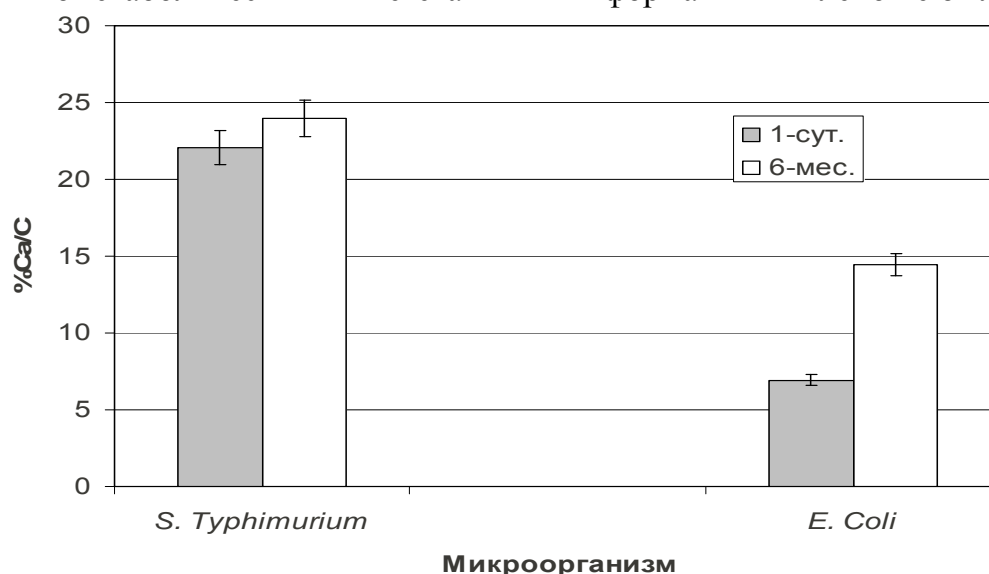


Рисунок 13 - Сравнительное содержание кальция в клетках бактерий относительно углерода в сканируемой области (исследовано 15-17 клеток). 100% соответствуют суммарному количеству всех элементов, выявленных элементным анализом в области сканирования

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе анализа полученных результатов и данных литературы можно заключить, что для микробных сообществ в процессе старения характерно образование диссоциативных форм, различающихся по морфо-физиологическому статусу. Криогели благодаря возможности формирования пор заданного диаметра путем криотропного гелеобразования обеспечивают эффективное разделение субпопуляций. Разработанный метод гель-хроматографического разделения клеток гетерогенных популяций бактерий оказался эффективным для клеток с различным строением поверхности, исключая один вид, *S. epidermidis*, который образовывал плотные агрегаты клеток, блокирующие поры криогеля.

Полученные из культур разных возрастов фракции проанализированы методами трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии. Визуализация клеток, как не фракционированных на криогелях, так и фракций, обогащенных гипометаболическими формами, полученных с помощью гель-хроматографии,

выявила устойчивые изменения морфологии клеток, перешедших в состояние гипометаболизма.

ВЫВОДЫ

1. Культуры неспорообразующих бактерий, как грамположительных (*Micrococcus luteus*, *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus epidermidis* 8P-A3), так и грамотрицательных (*Escherichia coli* K12, , *Salmonella typhimurium* TA100) через 180 суток культивирования состоят из вегетативных, гипометаболических и мертвых клеток, в соотношении 1:7:2, соответственно. При переходе к гипометаболизму зафиксировано уменьшение размеров клеток в 5 раз, переход палочковидных форм в кокковидные, а также снижение метаболической активности бактерий.

2. Установлена возможность синтеза ауторегулятора гексилрезорцина (до 14 мкг/мл) стареющими бактериальными популяциями различной грампринадлежности на 120 сутки культивирования.

3. Смешанные популяции бацилл и стафилококков эффективно разделяются в криогелях поливинилового спирта, модифицированного гидрофобными группировками.

4. Агарозный криогель, модифицированный гидрофобными группировками, позволяет эффективно разделять стареющую культуру бактерий на субпопуляции вегетативных и гипометаболических клеток, вне зависимости от степени гидрофобности геля. Агарозный криогель с привитыми зарядовыми группировками позволяет эффективно разделять гетерогенные субпопуляции в зависимости от величины заряда геля.

5. В субпопуляции гипометаболических клеток, характеризующихся утолщением клеточной стенки, конденсацией цитоплазмы и формированием капсулоподобной структуры, зафиксировано снижение активности конститутивных щелочной фосфатазы и протеиназ, и увеличение активности индуцибельной β -галактозидазы.

РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Евтюгин, В.Г.** Сорбция микроорганизмов крупнопористыми агарозными криогелями, содержащими привитые алифатические цепи различной длины / В.Г.Евтюгин, А.Б.Маргулис, Л.Г.Дамшкалн, В.И.Лозинский, А.И.Колпаков, О.Н.Ильинская // Микробиология.- 2009.- Т.78, №5.- С.603-608.

2. Дмитриев, В.В. Методы электронной микроскопии в биологии / В.В.Дмитриев, О.Н.Ильинская, **В.Г.Евтюгин**, А.А.Тойменцева, А.Б.Маргулис // Методическое руководство. -Казань: изд-во КГУ. -2005. -31с.

3. Асафова, А.С. Влияние универсальных индукторов гипометаболизма на динамику роста и состав микробного сообщества / А.С.Асафова, М.С.Щетинникова, **В.Г.Евтюгин**, А.Б.Маргулис // Материалы 60-й научной студенческой конференции биологического факультета ННГУ.- Н.Новгород.- 12-13 апреля 2007.- С.121.

4. Маргулис, А.Б. Разделение бактерий в криогелях, содержащих алифатические цепи различной длины / А.Б.Маргулис, О.В.Бушманова, **В.Г.Евтюгин**, А.Н.Шарифуллина, О.Н.Ильинская // Тез. докладов VII Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета "Материалы и технологии XXI века".- 26-27 апреля 2007.- С. 73.

5. **Евтюгин, В.Г.** Сорбция микроорганизмов крупнопористыми криогелями с привитыми алифатическими цепями различной длины / В.Г.Евтюгин, А.Б.Маргулис, А.И.Колпаков, О.Н.Ильинская, Л.Г.Дамшкалн, В.И.Лозинский // Сборник трудов IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов.- 11-15 мая 2008 г.- Новосибирск.- С.400.
6. Lozinsky, V.I. A new type of amphiphilic polymer sorbents based on supermacroporous cryogels and their implementation for hydrophobic chromatography of microbial cells / V.I.Loizinsky, L.G.Damshkaln, **V.G.Evtyugin**, E.N.Efremenko, R.V.Ivanov, O.N.Ilinskaya, M.S.Kuyukina, A.B.Margulis, O.V.Senko // III International Conference on Microbial diversity: current situation, conversation strategy and biotechnological potential ICOMID 2008".- Perm-N.Novgorod.- 28 сентября-5 октября 2008.- P.172-173.
7. **Евтюгин, В.Г.** Анализ сорбции клеток *Lactobacillus plantarum* и *Escherichia coli* в криогелях с привитыми зарядовыми группировками / В.Г.Евтюгин, А.Н.Шарифуллина, А.Б.Маргулис, В.И.Лозинский, Л.Г.Дамшкалн, А.И.Колпаков, О.Н.Ильинская // Сборник тезисов 12-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века».- 2008.- С. 264.
8. **Евтюгин, В.Г.** Новый метод микробной биотехнологии: разделение бактерий в криогелях, содержащих алифатические цепи различной длины / В.Г.Евтюгин, А.Н.Шарифуллина, А.Б.Маргулис // Тез. докладов VIII Научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета «Материалы и технологии XXI века».- Казань.- 2008.- С. 31.
9. Маргулис, А.Б. Токсические эффекты гексилрезорцина – индуктора анабиоза у бактерий: изменение поверхностных структур клеток про- и эукариот / А.Б.Маргулис, **В.Г.Евтюгин**, М.А.Копылова, И.В.Ожиганова, Р.Э.Давыдов, О.Н.Ильинская // Материалы Всероссийской научной конференции «Изменяющаяся окружающая среда и устойчивое развитие регионов: новые методы и технологии исследований». - Казань, 19-22 мая 2009 г. С.146-149.
10. **Evtugyn, V.G.** Enzyme activity and cell morphology on transition to hypometabolism / V.G.Evtugyn, A.N.Sharifullina, V.V.Dmitriev, A.B.Margulis // XIV International Conference «Microbial Enzymes in Biotechnology and Medicine».- 5-7 June, 2009.- Kazan.- P.120-121.
11. Еллиева, А.А. Изменение физиолого-биохимических свойств бактерий на ранних этапах перехода к гипометаболизму / А.А.Еллиева, И.С.Захаров, **В.Г.Евтюгин** // Материалы XVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов».- Секция «Биология».- Москва: МГУ.- 12–15 апреля 2010.- с.166-167.
12. **Евтюгин, В.Г.** Свойства поверхности клеток определяют разделение бактерий на гидрофобизованных производных широкопористого криогеля поливинилового спирта / В.Г.Евтюгин, А.Б.Маргулис, О.В.Бушманова, Е.В.Никитина, А.И.Колпаков, Л.Г.Дамшкалн, В.И.Лозинский, О.Н.Ильинская // Вестник КХТИ. - 2010. - № 9. – С. 85-88.