

Введение 2,4,6-Тринитротолуол (ТНТ), высокотоксичное и труднорастворимое природное соединение, вызывает у бактерий целый ряд структурных изменений и изменений метаболизма. Однако, до сих пор не показано наличие изменений в плазматической мембране клеток бактерий. Вместе с тем известно, что на первых этапах трансформации ТНТ в среде культивирования происходит аккумуляция активных форм кислорода (АФК) [1, 2]. Одним из следствий окислительного стресса является перекисное окисление липидов, которое может привести к изменению физических свойств мембраны. Вследствие этого целью данной работы являлась оценка структурных изменений мембран клеток *Escherichia coli*, культивируемых в присутствии ТНТ, методом ЯМР-спектроскопии ядер  $^{31}\text{P}$  фосфолипидов мембран. Материалы и методы исследования В работе использовали штамм *Escherichia coli* K12. Культивирование вели на синтетической среде M9 [3, 4] с добавлением глюкозы 0.4%, гидролизата казеина 0.2%. В опытный вариант добавляли ТНТ в концентрации 200 мг/л. После 4 ч культивирования клетки дважды отмывали 0.5% NaCl. Осажденную центрифугированием биомассу использовали как объект исследования. Для оценки состояния мембраны использовали ЯМР-спектроскопию ядер  $^{31}\text{P}$ . Эксперименты были выполнены на спектрометре Брукер AVANCE 400 при комнатной температуре. Спектры ядер  $^{31}\text{P}$  получали при вращении образца (клеточной биомассы) под магическим углом со скоростью 6 кГц. Математическую обработку данных проводили в стандартной компьютерной программе "Origin 6.1". В работе все эксперименты были проведены не менее чем в трех повторностях. Группу данных считали однородной, если среднеквадратическое отклонение  $\sigma$  в ней не превышало 13 %. Различие между группами считали достоверным при критерии вероятности  $P_{0,05}$ . Результаты исследования и их обсуждение В спектре  $^{31}\text{P}$  клеток инокулята *E. coli* K12 наблюдается несколько сигналов: два интенсивных с химическим сдвигом 0,93 и 0,02 р.р.м., положение которых соответствует сигналам фосфолипидов [5], два слабых (-11,3 и -12,79 р.р.м.) соответствующих сигналам АТФ [6] и другим нуклеотидам, а также два пика боковых линий от вращения под магическим углом, появляющиеся в результате неполного усреднения тензора анизотропии химического сдвига ядер  $^{31}\text{P}$  в фосфолипидах (рис. 1). После 4 часов культивирования клеток в отсутствие ТНТ расстояние между интенсивными сигналами ядер  $^{31}\text{P}$  фосфолипидов увеличивается за счет изменения химических сдвигов (1.38 и -0,13 р.р.м.), менее интенсивные сигналы АТФ и других нуклеотидов не изменяются и не сдвигаются (рис. 2, А). Наличие двух сигналов  $^{31}\text{P}$  в мембранах клеток контроля, культивируемых в отсутствие ТНТ, свидетельствует о том, что либо химический состав липидов, либо структура мембраны гетерогенны и могут быть разделены как минимум на две фракции. При добавлении в среду культивирования ТНТ форма сигналов  $^{31}\text{P}$  фосфолипидов меняется, два пика большой интенсивности сливаются в один с

химическим сдвигом 0,63 p.p.m. (рис. 2, Б). Форма сигнала, принадлежащего нуклеотидам и АТФ не меняется, но его интенсивность снижается по сравнению с сигналом клеток, культивируемых без ТНТ. Уменьшение интенсивности этого сигнала в присутствии ТНТ, вероятно, связано со снижением пула восстановленных кофакторов (NAD(F)H), о чем сообщалось ранее для данного штамма [7].

Рис. 1 - Спектры ЯМР ядер  $^{31}\text{P}$  клеток инокулята *E. coli* K12 в нулевой момент времени: 1 - фосфолипиды; 2 - АТФ и другие нуклеотиды; 3 - боковые линии от вращения под магическим углом

Рис. 2 - Спектры ЯМР ядер  $^{31}\text{P}$  клеток *E. coli* K12, культивируемых 4 часа на синтетической среде: 1 - клетки инокулята, 2 - клетки культивируемые без ТНТ; 3 - клетки культивируемые в присутствии ТНТ (200 мг/л)

Отсутствие дисперсии химического сдвига ядер  $^{31}\text{P}$  липидов в структуре фосфолипидов клеток, культивируемых с ТНТ, свидетельствует о том, что структура фосфолипидов в мембране становится более гомогенной то есть, различия в химическом строении тех групп, которые окружают ядра  $^{31}\text{P}$  фосфолипидов, минимальны. Однозначно объяснить причину такого усреднения на данном этапе затруднительно, так как не представляется возможным точно определить структурные элементы мембраны, обуславливающие химический сдвиг ядер  $^{31}\text{P}$  фосфолипидов. Достаточно вероятно возможность изменения структуры или пространственной ориентации основного компонента мембран бактерий - фосфолипидов. Для такого предположения есть все основания - взаимодействие формирующего ближний порядок окружения  $^{31}\text{P}$  фосфолипидов с ТНТ, с продуктами его трансформации, а также изменения структуры этого окружения под действием свободных радикалов, образующимися при трансформации ТНТ клетками бактерий [1, 2]. Наиболее вероятным содержанием такого изменения мембраны является её переход из жидкокристаллического состояния в гель.