

УДК 579.234

Б. М. Куриненко, В. Г. Евтюгин, А. И. Голубев,
Е. В. Никитина, Г. Ю. Яковлева

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МЕМБРАНАХ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI*, ИНДУЦИРОВАННЫЕ 2,4,6-ТРИНИТРОТОЛУОЛОМ

Ключевые слова: ЯМР-спектроскопия, электронная микроскопия, фосфолипиды, *Escherichia coli*, 2,4,6-тринитротолуол (ТНТ).

С помощью электронной микроскопии оценили влияние 2,4,6-тринитротолуола (ТНТ) на клетки Escherichia coli. Установлено, что в процессе микробной трансформации ТНТ происходят изменения морфологии и структурной организации этих клеток, характерные для жизнеспособного некультивируемого состояния бактерий. Анализ установленных изменений позволил обосновать предположение о переходе плазматической мембраны клеток Escherichia coli в процессе трансформации ТНТ из жидкокристаллического состояния в гель.

Keywords: NMR spectroscopy, electron microscopy, phospholipids, *Escherichia coli*, 2,4,6-trinitrotoluene (TNT).

Using electron microscopy, we evaluated the effect of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) to cells of Escherichia coli. Found that is changing the morphology and structural organization of these cells in the microbial transformation of TNT, as for a viable state of uncultivated bacteria. Analysis of the changes set can justify the assumption of the transition of plasma membrane of Escherichia coli in the transformation of TNT from liquid crystalline state to a gel.

Введение

2,4,6-Тринитротолуол (ТНТ), высокотоксичное и трудноразлагаемое неприродное соединение, вызывает у бактерий изменения морфологии и физико-химических свойств клеток, характерные для жизнеспособного некультивируемого состояния бактерий – уменьшение размеров, переход части клеток из палочковидной в кокковидную форму, увеличение удельной плотности клеток за счет уплотнения протоплазмы, снижение трансмембранного потенциала клеток и изменение энергетического профиля популяции в целом [1-3]. Кроме того, на первых этапах трансформации ТНТ в среде культивирования происходит аккумуляция активных форм кислорода (АФК) [4, 5]. 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*, культивированных в присутствии ТНТ, методом электронной микроскопии.

Материалы и методы исследования

В работе использовали штамм *Escherichia coli* K12. Культивирование вели на синтетической среде М9 [6] 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 ЯМР спектроскопии [7] и для электронной микроскопии.

Для электронной микроскопии образцы готовили по стандартной методике [8]: фиксировали

в глутаровом альдегиде, обрабатывали тетраоксидом осмия и заливали в смолу ЭПОН. Контрастирование срезов проводили с использованием уранил ацетата и цитрата свинца. Ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме Reichert-Jung, съемку материала проводили на электронном микроскопе JEOL JEM 100 CX II.

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 σ в ней не превышало 13 %. Различие между группами считали достоверным при критерии вероятности $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Ранее с помощью оптической микроскопии нами было показано, что при культивировании *Escherichia coli* в присутствии ТНТ изменяется морфология клеток [2, 3]. На рис.1 представлены электронномикроскопические фотографии тех же популяций клеток, из которых получены образцы для ЯМР-спектроскопии [7]. Клетки, культивируемые с ТНТ, спустя 4 часа после начала эксперимента отличаются от клеток 4 часового контроля, культивируемых в отсутствие ТНТ. Популяция клеток контроля представлена одиночными клетками или цепочками из двух клеток, клетки имеют палочковидную форму, типичную для клеток *Escherichia coli*. В популяции, инкубируемой в присутствии ТНТ, клетки одиночные, их размеры меньше размеров клеток в контроле, форма приближается к сферической. Значительно увеличивается периплазматическое пространство. Его увеличение невозможно без

уменьшения поверхности плазматической мембраны и, как следствие, уплотнения протоплазмы, которое было показано нами ранее на примере *Escherichia coli* [3] и *Bacillus subtilis* [1] в условиях культивирования с ТНТ. Уменьшение поверхности мембраны может произойти только в случае её утолщения, возможного за счет упорядоченности «липидных хвостов», то есть при переходе мембраны в гель-состояние. Таким образом, изменения в структуре плазматической мембраны, обнаруженные методом ЯМР [7], соответствуют тем изменениям, которые видны на электронномикроскопических снимках клеток (рис. 1). Кроме того, ранее нами установлено, что ТНТ увеличивает проницаемость внешней липопроteidной мембраны *Escherichia coli*, не влияя на проницаемость плазматической мембраны [9]. Так как при этом снижается трансмембранный потенциал [3], очевидно, что при инкубации с ТНТ подавляется работа $\Delta\psi$ -генераторов, локализованных в плазматической мембране клеток. Одним из объяснений последнего эффекта может быть «охлаждение» мембраны, т.е. её переход в гель-состояние в котором замедляется или полностью подавляется работа всех интегрированных в мембрану белков и белковых систем [10-13].

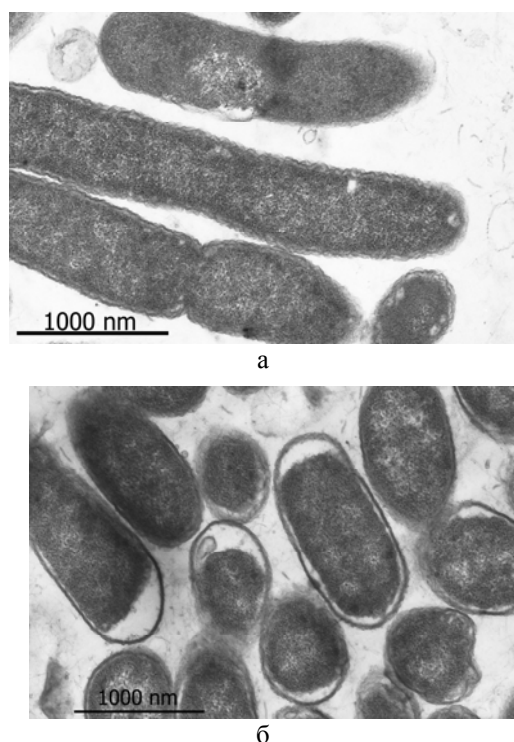


Рис. 1 - Микрофотографии популяций клеток *E. coli* K12, которые использовались для ЯМР-спектроскопии [7], полученные с помощью метода электронной микроскопии: а – клетки культивируемые без ТНТ; б – клетки культивируемые с ксенобиотиком

Известно, что экзогенное химическое окружение мембраны – наличие в среде ионов кальция, спиртов, углеводов и анестетиков – может изменить её физическое состояние и

соответственно температуру фазового перехода (ФП) мембраны [13]. Представленные данные можно интерпретировать как свидетельство того, что не только перечисленные вещества, но и наличие в окружающей среде ТНТ или продуктов его трансформации, а также свободных радикалов, образующихся в процессе трансформации ксенобиотика вызывают изменения физического состояния мембраны.

Данные о влиянии ТНТ на морфологию и метаболизм клеток бактерий, полученные нами ранее [1-3] дают все основания утверждать, что ксенобиотик или продукты его трансформации вызывают переход бактерий в покоеющее состояние (жизнеспособное некультивируемое состояние, ЖНС) [1-3, 9]. Переход в ЖНС вызывает не только ТНТ, но множество других химических и физических факторов [14]. Однако, до сих пор неизвестно, что является триггером такого перехода. Представленные в статье данные позволяют предположить, что триггером перехода в покоеющее состояние являются структурные изменения мембраны клеток бактерий. Плазматическая мембрана клеток бактерий выполняет не только барьерную функцию. В ней локализованы структуры, с помощью которых клетка осуществляет связь с внешней средой, реагируя на происходящие в ней изменения. Условием для адекватного ответа клетки на изменения во внешней среде является жидкокристаллическое состояние мембраны. Изменение структуры мембраны и её переход в гель-состояние нарушает или полностью подавляет функцию интегрированных в неё сенсоров, обеспечивающих информационную связь с внешней средой, а также путей поступления в клетку жизненно важных веществ. Результаты представленного исследования свидетельствуют о структурных изменениях мембраны и о её вероятном переходе в гель-состояние. Эти данные хорошо согласуются с представлением о триггерной роли мембраны в тех изменениях, которые обнаружены в клетках бактерий, культивируемых с одним из многочисленных индукторов перехода клеток бактерий в покоеющее состояние – 2,4,6-тринитротолуолом.

Заключение

Изменение физических свойств плазматической мембраны клеток *Escherichia coli* культивируемых в присутствии 2,4,6-тринитротолуола, полученные с помощью ЯМР-спектроскопии ядер ^{31}P фосфолипидов мембран и методом электронной микроскопии, представленные в этой статье, нуждаются в детализации и уточнении тех молекулярных причин, которые вызвали эти изменения, а также в уточнении молекулярных перестроек, являющихся сущностью нового состояния мембраны. Тем не менее, представленные данные свидетельствуют о взаимосвязи изменений физических свойств мембраны и изменений в морфологии бактериальных клеток и, вероятно, в перестройках их метаболизма.

Литература

1. Куриненко, Б.М. Влияние токсических концентраций 2,4,6 – тринитротолуола на физические свойства и морфологию / Б.М.Куриненко, Г.Ю.Яковлева, Н.А.Дениварова, Ю.В.Абреимова // Прикл. биохим. и микробиол. -2003,- Т.39,№ 3.- С.313-317.
2. Куриненко, Б.М. Особенности токсического действия 2,4,6 – тринитротолуола в отношении *Escherichia coli* K12 / Б.М. Куриненко, Н.А. Дениварова, Р.Э. Давыдов, Г.Ю. Яковлева // Прикл. биохимия и микробиология.- 2007. - Т.43, № 1.- С.59-64.
3. Черепнев, Г.В. Оценка токсического действия 2,4,6 – тринитротолуола на клетки *Escherichia coli* K12 методом проточной цитофлуориметрии / Г.В. Черепнев, Т.А. Велижинская, Г.Ю. Яковлева, Н.А. Дениварова, Б.М. Куриненко // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 3. - С. 377-382.
4. Науменко, Е.А. Участие кислорода в бактериальной трансформации 2,4,6-тринитротолуола / Е.А. Науменко, А.В. Наумов, Е.С. Суворова, Р. Герлах, А.М. Зиганшин, А.П. Ложкин, Н.И. Силкин, Р.П. Наумова // Биохимия. – 2008. – Т.73. - №4. – С.463-469.
5. Kumagai, Y. Nitric oxide synthase (nNOS) catalyzes one-electron reduction of 2,4,6-trinitrotoluene, resulting in decreased nitric oxide production and increased nNOS gene expression: implication for oxidative stress / Y. Kumagai, M. Kikushima, Y. Nakai, N. Shimojo, M. Kunimoto // Free Radicals Biology & Medicine. – 2004. – V.37.- № 3. – P.350-357.
6. Миллер, Д. Эксперименты в молекулярной генетике / Д. Миллер // М.: Мир, 1976. - 395 с.
7. Куриненко, Б.М. Особенности химического сдвига ядер ^{31}P фосфолипидов плазматической мембраны клеток *Escherichia coli*, индуцированного 2,4,6-тринитротолуолом / Б.М. Куриненко, Т. Зинкевич, А.Г. Крушельницкий, В.Я. Пономарев, Г.Ю. Яковлева // Вестник Казанского технологического университета.- 2012.- (в печати).
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. Куриненко, Б.М. Чувствительность различных штаммов *Escherichia coli* к токсическому действию 2,4,6 – тринитротолуола / Б.М. Куриненко, Н.А. Дениварова, Г.Ю. Яковлева // Прикл. биохимия и микробиология.- 2005. -Т.41,№ 1.- С.53-57.
10. Брагина, Н.А. Мембранология. – Учебно-методическое пособие. / Н.А. Брагина, А.Ф. Миронов // ИПЦ МИТХТ.- 2002.- 98 с.
11. Антонов, В.Ф. Биофизика / В.Ф. Антонов, А.М. Черныш, В.И. Пасечник, С.А. Вознесенский, Е.К. Козлова // Гуманитарный издательский центр ВЛАДОС.- 1999.- 288 с.
12. Heide, T. Osmoregulated ABC-transport System of *Lactococcus lactis* Senses Water Stress Via Changes in the Physical State of the Membrane / T. Heide, B. Poolman // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2000.- Vol. 97.- P. 7102-7106.
13. Харакоз, Д.П. О возможной физиологической роли фазового перехода «жидкое-твёрдое» в биологических мембранах / Д.П. Харакоз // Успехи биологической химии.- 2001.- Т.41.- С.333-364.
14. Соколенко, А.В. Некультивируемые формы бактерий: распространение в природе, индукторы некультивируемого состояния и реверсии / А.В. Соколенко // Биологические науки. Современные наукоёмкие технологии.- 2006.- №2.- С. 11-15.

© Б. М. Куриненко - д-р биол. наук, проф. каф. микробиологии К(П)ФУ, boris.kurinenko@ksu.ru; В. Г. Евтюгин - канд. биол. наук, асс. каф. зоологии беспозвоночных и функциональной гистологии К(П)ФУ, vevtugyn@gmail.com; А. И. Голубев - д-р биол. наук, проф. той же кафедры, Anatolii.Golubev@ksu.ru; Е. В. Никитина – канд. биол. наук, доц. каф. технологии пищевых производств КНИТУ, elenik@mail.ru; Г. Ю. Яковлева - канд. биол. наук, доц. каф. микробиологии К(П)ФУ, yakovleva_galina@mail.ru.