

Введение 2,4,6-Тринитротолуол (ТНТ), высокотоксичное и труднорастворимое природное 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*, культивируемых в присутствии ТНТ, методом электронной микроскопии. Материалы и методы исследования В работе использовали штамм *Escherichia coli* K12. Культивирование вели на синтетической среде M9 [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 липопротеидной 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 $\Delta\mu\text{H}$ -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].

а б 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 покоящееся 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 покоящееся 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 покоящееся 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.