

4. Bongerts G. P. A., Utzetter J., Brouns R. and Vogel G. D. *Biochem. Biophys. Acta*, 527, 343, 1978.
5. Conley G., Priest D. G. *Biochem. J.*, 187, 733, 1980.
6. Kinsella J. E., German B. and Shetty J. *Comp. Biochem. Physiol.*, 82B, 621, 1985.
7. Mahler H. R., Hybster G., Baum H. J. *Biol. Chem.* 41, 625, 1915.
8. Pitts O. M., Priest D. G. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 163, 359, 1974.
9. Robinson P. J., Dunnill P., Lilly M. D. *Biochem. and Biophys. Acta*, 242, 659, 1971.

Поступило 26.VI 1989 г.

Биол. ж. Армении, № 11.(42).1989

УДК 615.28.615.31

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ И ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЧЕТВЕРТИЧНОГО АММОНИЕВОГО СОЕДИНЕНИЯ А-660

И. Х. ТОРДЖЯН, Ж. Р. БАБАЯН, К. О. ОВНЯНЯН, Г. С. АКОПЯН

Армянский ОТКЗ НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии им. А. Б. Алексаняна, Ереван

В клетках кишечной палочки соединение А-660 вызывает расщепление наружной мембраны клеточной стенки на два электронооптически плотных слоев и нарушение целостности цитоплазматической мембраны. В клетках золотистого стафилококка незначительно разрыхляется клеточная стенка и разрушается цитоплазматическая мембрана.

Соединение А-660 от известных ПАВ отличается механизмом воздействия на мембраны, приводящим к расщеплению двух ее электронооптически плотных слоев с образованием вздутий.

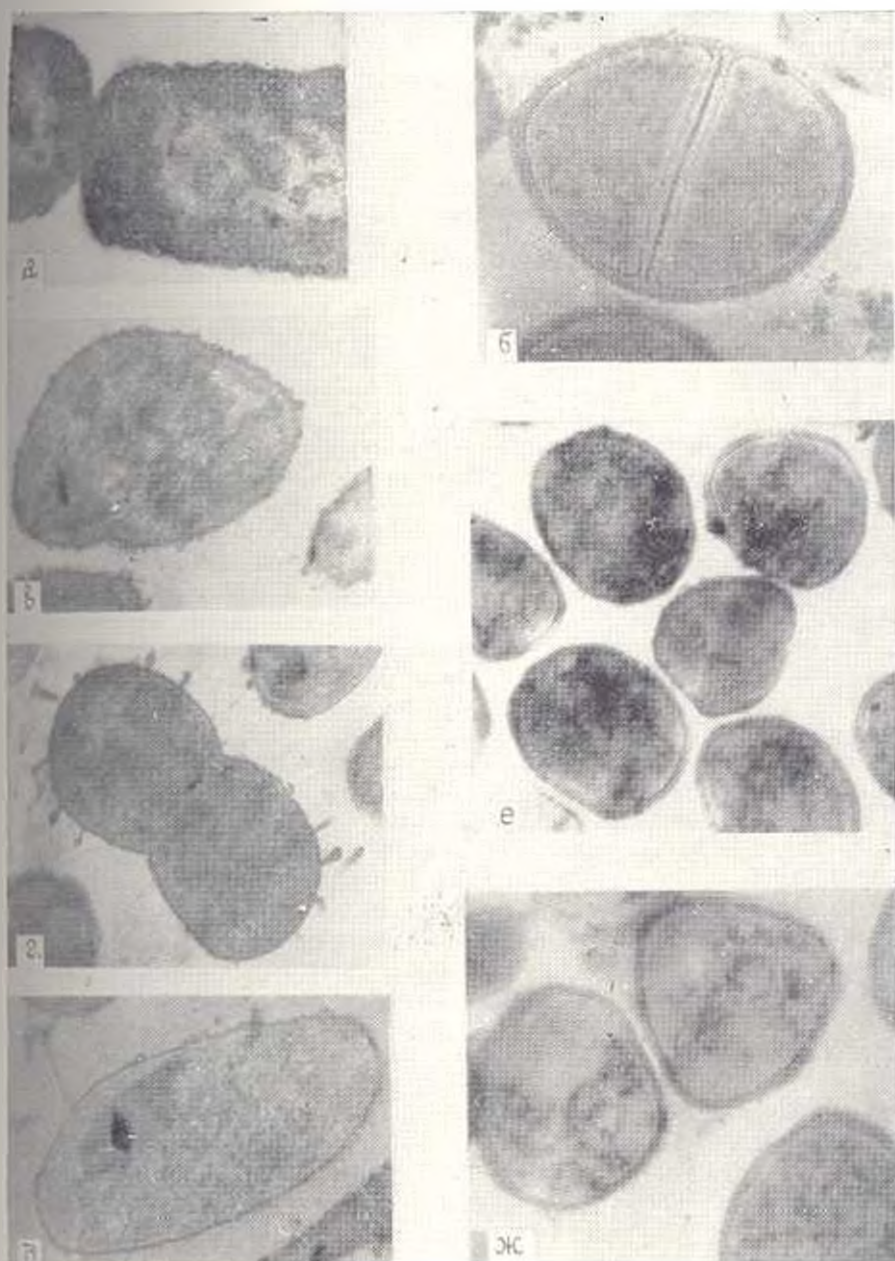
Աղիքային ցուպիկի բջիջներում Ա-660 միացությունը առաջացնում է բջջապատի արտաքին թաղանթի ճեղքում 2 էլեկտրոնաօպտիկ տեսակետից խիտ շերտերի, ինչպես նաև՝ բակտերիայի ցիտոպլազմատիկ թաղանթի աճրոզակահեռության խախտում: Ունեկողմն ստաֆիլոկոկի բջիջներում բջջաթաղանթը զուռնում է անհշան փրբուն և բայրալում է ցիտոպլազմատիկ թաղանթը: Ա-660 միացությունը առաքերվում է հայտնի մակերեսային ակտիվ նյութերից երանով, որ երա աղղեցու-թյան մեխանիզմը պայմանավորվում է բջջի թաղանթի 2 էլեկտրոնաօպտիկ խիտ շերտերի քայքայումով, որ առաջացնում է արտափրումներ:

In *Escherichia coli* the combination A-660 evokes splitting of the external membrane of the cell wall into two electrooptically firm layers and breach of continuity of cytoplasmic membrane. In *Staphylococcus aureus* the cell wall is slightly loosened and the cytoplasmic membrane is destructed. The combination A-660 differs from known SAS by the mechanism of influence on the membranes, bringing to the splitting of its two electrooptically firm layers by the formation of swellings.

ПАВ—ультраструктури бактерий—биоциды.

В последние годы ведется интенсивный поиск новых дезинфицирующих средств среди группы катионных ПАВ, в частности, ЧАС

Сокращения. ПАВ—поверхностно-активное вещество; ЧАС—четвертичные аммониевые соединения.



Действие ЧАС А-660 на клетки кишечной палочки и золотистого стафилококка. А — контроль — кишечная палочка (штамм 1257) $\times 70.000$; Б — контроль — золотистый стафилококк (штамм 906) $\times 85.000$; в — действие А-660 на клетки кишечной палочки, сублетальная концентрация, $\times 56.000$; г, д — действие А-660 на клетки кишечной палочки, летальная концентрация $\times 45.000$, $\times 56.000$; е — действие А-660 на клетки золотистого стафилококка, сублетальная концентрация, $\times 56.000$; ж — действие А-660 на клетки золотистого стафилококка, летальная концентрация, $\times 60.000$.

Анализ литературных данных свидетельствует об отсутствии единой точки зрения на механизм антибактериального действия катионных ПАВ, что, возможно, связано с отсутствием комплексных исследований по изучению структурно-функциональных изменений клетки после ее контакта с ПАВ на современном научном уровне.

Целью настоящего исследования явилось изучение ультраструктурных изменений кишечной палочки и золотистого стафилококка под воздействием нового ненасыщенного хлорсодержащего ЧАС А-660, синтезированного из местного сырья и обладающего выраженным антибактериальным действием [2].

Материал и методика. В качестве тест-микроорганизмов использовали эталонные штаммы кишечной палочки (штамм 1257) и золотистого стафилококка (штамм 906). Изучения антимикробной активности соединения А-660 проводили согласно общепринятой методике [3] с применением 2 млрд взвеси 24-часовой микробной культуры. Установлено, что сублетальная концентрация соединения А-660 составляет для кишечной палочки и золотистого стафилококка 0,00025 и 0,00005 % соответственно. Для электронномикроскопического исследования использовали суспензию клеток, подвергнутую действию этих концентраций исследуемого соединения. Смесь центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Осадок отмывали водопроводной водой и фиксировали по модифицированной методике [8]. Материал заключали в синтетическую смолу «Аралдит» (Швейцария, Флука), ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме УМТН-4, контрастировали уксуснокислым уранилом и лимоннокислым свинцом, просматривали и фотографировали на отечественном микроскопе ЭВМ-100 АК при микструктуральном увеличении $\times 30\,000$.

Контролем служили клетки кишечной палочки и золотистого стафилококка, не подвергнутые воздействию препарата А-660.

Результаты и обсуждение. Ультратонкое строение контрольных клеток было типичным для грамотрицательных и грамположительных бактерий [1] (рис., а, б)*.

Сублетальная концентрация препарата А-660 вызывала изменения преимущественно в мембране клеточной стенки кишечной палочки. При видимой целостности бактериальной клетки, цитоплазматической мембраны и внутриклеточных структур по всей поверхности клеточной стенки наблюдались локальные выпячивания ее наружного электронооптически плотного слоя, образовавшиеся вследствие расщепления мембраны на два электроноплотных слоя: нижний слой, прилегающий к цитоплазматической мембране, и поверхностный, образующий выпячивания (рис., в). Раскопавшиеся или расслоившиеся участки мембраны клеточной стенки отщипывались и обнаруживались в среде в виде одноконтурных мембранных пузырьков, имеющих определенную связь с поверхностью клеточной стенки или не имеющих ее (рис., г).

При использовании летальной концентрации препарата А-660 на поверхности клеточной стенки, наряду с указанными изменениями, наблюдались грибовидные выпячивания, образованные обоими слоями мембраны клеточной стенки и имеющие двухконтурное строение (рис., з). Последние состояли из узкой нижней части—«ножки» и расширенной верхней части—«головки». Образование таких выростов является, по-видимому, следствием ослабления связи между цитоплазматической

* Здесь и далее, рис., в—ж, см. вклейку.

мембраной и мембраной клеточной стенки. Целостность цитоплазматической мембраны нарушена.

Заметные изменения наблюдались в цитоплазме клеток: разрежение гранулярного компонента; образование в цитоплазме мелкозернистых плотных тел; значительное расширение периплазматического пространства и его заполнение мелкозернистым рыхлым веществом, морфологически и электронооптически аналогичным цитоплазматическому компоненту (рис., д). Последнее, по-видимому, имело место в результате нарушения проницаемости цитоплазматической мембраны.

Что касается золотистого стафилококка, то сублетальная концентрация препарата А-660 не вызвала каких-либо грубых морфологических изменений в его клетках. При полной сохранности клеточной стенки и цитоплазмы наблюдалось лишь незначительное разрыхление внешнего слоя клеточной стенки (рис., е) и размывание контура рибосом.

Об изменениях в структуре цитоплазматической мембраны не представляется возможным судить, так как последняя плохо различима в клетках стафилококка из-за маскировки, с одной стороны, плотно прилегающим муконентидным слоем, с другой — гранулярным компонентом цитоплазмы.

Летальная концентрация препарата А-660 приводила к грубым изменениям, не вызывая нарушения целостности клеток стафилококка. Клеточная стенка разрыхлялась. Цитоплазма в большинстве особей становилась грубозернистой и не прилегала к клеточной стенке, так что между клеточной стенкой и цитоплазмой выделялась зона с высокой электронооптической плотностью, имеющая однородное строение. В некоторых особях эта зона занимала значительную часть клетки. При этом цитоплазматическая мембрана не выявлялась, по-видимому, вследствие ее разрушения (рис., ж).

Исследование механизма действия известных ПАВ как биохимическими методами, так и на субмикроскопическом уровне позволило установить, что мишенью их действия являются биологические мембраны [4—7,9].

Субмикроскопическое исследование бактериальных клеток и их сферопластов при воздействии ПАВ выявило локальное нарушение целостности мембраны клеточной стенки, разрушение цитоплазматической мембраны у кишечной палочки и повреждение цитоплазматической мембраны у стафилококка [4].

Как показали наши исследования, новое катионное ПАВ А-660, так же как и другие известные ПАВ, обладает мембранотропным действием. Однако его отличительной особенностью является такой механизм разобщения между липидами и белками мембраны, который приводит к ее расщеплению на два электронооптически плотных слоя с образованием на поверхности клетки локальных вздутий.

Таким образом, анализ ультраструктурных изменений, происходящих в клетках кишечной палочки и золотистого стафилококка, свидетельствует о том, что бактерицидное действие ЧАС А-660 в первую очередь обусловлено глубокими структурными нарушениями в мембранном аппарате бактерий.

1. Авакян А. А., Кац Л. Н., Павлова И. Б. Атлас анатомии бактерий патогенных для человека. М., 1982.
2. Бабаян Ж. Р. Некоторые современные вопросы клинической и экспериментальной медицины. 66, Ереван, 1988.
3. Инструкция по определению бактерицидных свойств новых дезинфицирующих средств, утвержденная МЗ СССР от 6.05.68 г., № 739-68.
4. Павлова И. Б., Самойленко И. Н. Антибиотики и медицинская биотехнология, 30, 2, 182, 1985.
5. Чернявская М. А., Павлова И. Б. ЖМЭИ, 2, 62, 1983.
6. Lambert P. A., Smith A. R. W., Microbiol., 15, 191, 1976.
7. Miller P. W., Barran L. P. Canad. J. Microb., 23, 1373, 1977.
8. Rytel A., Kellenberger E., Birch-Andersen A., Mufae O. Z. Naturforsch., 13, 9, 597, 1958.
9. Salton M. R. J. J. Gen. Microbiol., 5, 391, 1981.

Поступило 12.VI 1989 г.

Биолог. ж. Армения, № 11.(42).1989

УДК 576.851.155.095:575.24

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА Тп 5-ТРАНСФОРМАНТОВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ЭСПАРЦЕТА

А. И. АЛЕКСАНИАН

Институт микробиологии АН АрмССР, г. Абовян

Показано, что и ряде случаев транспозоновые (Тп 5) трансформанты имеют качественно иную электрофоретическую подвижность изученных ферментов. Эффективность, НР и НГ активность отдельных трансформантов выше, чем у исходного штамма.

Ցույց է օրհին, որ անոնքի շեղերիցում տատմանարժան ֆերմենտները որոշակապնունային (Տպ 5) տրանսֆորմանտների մոտ ունեն տարբեր էլեկտրաֆորետիկ շարժունություն: Մի շարք կուպտորաներ իրենց էֆեկտիվությամբ, նիտրատուղակապալի և նիտրոգենապալի ակտիվությամբ զերազանցում են կալի շտամին:

It is shown that in a number of cases the transposone (Trp5) transformants differ in the quality of the electrophoretic mobility for the studied enzymes. The efficiency, NR and NG activities of some Trp5 transformants are higher than those of the initial strain.

Бактерии клубеньковые Тп 5—трансформанты—нитратредуктаза—нитрогеназа.

Получение мутантов клубеньковых бактерий в настоящее время осуществляется в основном широко распространенными традиционными генетическими методами [4, 6, 13]. Весьма немногочисленны работы по получению Тп 5-мутантов клубеньковых бактерий, слабо изучены их биохимические особенности и эффективность [2, 5]. Известны ра-

Сокращения. НР—нитратредуктаза; НГ—нитрогеназа.