

## ••• МІКРОБІОЛОГІЯ ••• MICROBIOLOGY •••

---

УДК: [57.018.6:579.83]:612.176

### Вірогідні механізми блокування синтезу пігментів бактерій при дії тривалого стресу О.Ф.Рильський

*Запорізький національний університет (Запоріжжя, Україна)  
rylsky@mail.ru*

У роботі представлено результати досліджень впливу важких металів на пігментсинтезуючі бактерії родів *Serratia* та *Pseudomonas*. Встановлено, що в умовах «металевого» стресу спостерігається стійке зниження пігментсинтезуючої здатності бактерій та утворення безпігментних колоній при певному концентраційному рівні металів. Зроблено припущення про вірогідну участь пігментів та їх попередників в зниженні впливу вільних радикалів на клітину. Показано, що одним з механізмів блокування синтезу пігментів бактерій може бути утворення хелатного комплексу «метал–попередник синтезу пігменту». Проаналізовано можливу роль попередників пігментів як пасток вільних радикалів в клітинах бактерій при тривалому стресі.

**Ключові слова:** бактерії, пігменти, іони важких металів, вільні радикали, стрес, антиоксиданти.

### Вероятные механизмы блокирования синтеза пигментов бактерий при действии длительного стресса А.Ф.Рыльский

В работе представлены результаты исследований влияния тяжелых металлов на пигментсинтезирующие бактерии родов *Serratia* и *Pseudomonas*. Установлено, что в условиях «металлического» стресса наблюдается стойкое снижение пигментсинтезирующей способности бактерий и образование безпигментных колоний при определенном концентрационном уровне металлов. Сделано предположение о вероятном участии пигментов и их предшественников в снижении влияния свободных радикалов на клетку. Показано, что одним из механизмов блокирования синтеза пигментов бактерий может быть образование хелатного комплекса «металл–предшественник синтеза пигмента». Проанализирована возможная роль предшественников пигментов как ловушек свободных радикалов в клетках бактерий при длительном стрессе.

**Ключевые слова:** бактерии, пигменты, ионы тяжелых металлов, свободные радикалы, стресс, антиоксиданты.

### Possible mechanisms of blocking the pigments synthesis in bacteria under protracted stress A.F.Rylskiy

The results of researches on influence of heavy metals on pigmentsynthesizing bacteria of genera *Serratia* and *Pseudomonas* are presented in the paper. It has been established that in the conditions of "metal" stress pigmentsynthesizing ability of bacteria is decreased and formation of nonpigmental colonies is observed at certain concentration level of metals. The assumption about probable participation of pigments and their predecessors in decrease of free radicals influence on a cell has been made. It has been shown that formation of a chelate complex "metal-predecessor of a pigment synthesis" can be one of mechanisms of pigments synthesis blocking in bacteria. A possible role of pigments predecessors, as traps for free radicals in cells of bacteria at long stress, has been analyzed.

**Key words:** bacteria, pigments, ions of heavy metals, free radicals, stress, antioxidants.

#### Вступ

Багато мікроорганізмів утворюють такі вторинні метаболіти, які представляють значний практичний інтерес. У процесі культивування бактерії накопичують у великих кількостях пігменти, антибіотики, вітаміни та інші речовини, що використовуються в медицині, ветеринарії, сільському господарстві, імунології. Особливий інтерес представляють пігменти, які можуть виконувати ще й індикаторну функцію забруднення навколишнього середовища. Силу впливу антропогенних факторів

на навколишнє середовище можна оцінювати за ступенем впливу їх на пігментсинтезуючу здатність бактерій. Пігменти бактерій – цінний об'єкт дослідження не тільки через можливе використання їх індикаторних властивостей, але також і через нез'ясованність питання про їхнє функціональне призначення.

Про функції пігментів бактерій дотепер немає єдиної думки. Так, про роль продигіозину (*Serratia marcescens*) існує декілька припущень:

- участь продигіозину в диханні клітини, на що вказує подібність його хімічної структури із цитохромами та гемоглобіном (наявність пірольних кілець, хелатні комплекси із залізом, які синтезуються тільки в аеробних умовах);

- продигіозин у лабораторних умовах здатний пригнічувати ріст інших мікроорганізмів, його солі мають інгібуючу дію на *Protozoa* і патогенні гриби;

- продигіозин може виконувати роль аутоокислюючого електронного акцептора (окислена жовта й відновлена червона форми);

- синтез продигіозину наприкінці стаціонарної фази в структурах клітинної стінки дозволяє зв'язувати амінокислоти, високі концентрації яких можуть привести до прискорення літичних процесів (Бриттон, 1986).

Феназинові пігменти, наприклад, піоціанін, можуть створювати окислювально-відновну пару, здатну до передачі електронів (феназин-1-карболова кислота та її дигідропохідне у *Pseudomonas aeruginosa*).

Залізовмісні пігменти – пульхерини – також здатні до передачі електронів, і існує велика ймовірність їхньої участі в диханні.

У роботах деяких дослідників (Жданова, Василевская, 1988) вказується на те, що пігменти грибів – меланіни – здатні брати участь у різноманітних окислювально-відновних реакціях як речовини, що мають як акцепторні, так і донорні властивості. Автори вказують на те, що меланінвмісні організми повинні легше адаптуватися до несприятливих умов середовища за рахунок альтернативного шляху переносу електронів, пов'язаного з меланіном.

До теперішнього часу опубліковано багато робіт з вивчення акумуляції й адсорбції металів клітинами бактерій, грибів, рослин (Никовская и др., 2002; Carpentier et al., 2003). Однак серед цих робіт практично немає досліджень про вплив важких металів на пігментсинтезуючу здатність бактерій. У тих небагатьох роботах, де розглядається це питання, матеріал досліджень викладений у вигляді коротких повідомлень і не носить системного характеру (Furman et al., 1984).

Мета роботи – розглянути вірогідну роль пігментів та їх попередників в механізмі захисту бактерій в умовах дії тривалого «металевого» стресу.

#### Об'єкти та методи дослідження

Ми досліджували пігментсинтезуючу здатність бактерій родів *Serratia* і *Pseudomonas* (*S. marcescens* MP-141, *P. fluorescens* var. *pseudo-iodinum* MP-11, *P. aeruginosa* MP-2) в умовах впливу на них іонів важких металів та розглянули можливі механізми відповіді бактерій на ці стресові становища.

При приготуванні поживного середовища (МПА) використовували солі металів SnCl<sub>2</sub>, Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, AgNO<sub>3</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> та оксид V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, з яких попередньо готували модельні розчини.

У експериментах використовували 18-годинні культури бактерій. Бактерії засівали на поверхню МПА, приготування якого вели на розчинах солей металів. Щільність бактеріальної суспензії була 10<sup>6</sup> кл/мл. Бактеріальну культуру засівали суцільним газоном. Облік результатів проводили через 48 годин культивування бактерій в термостаті при температурі 28–29°C.

В досліді із проліном оцінку інтенсивності синтезу пігментів проводили візуально (++++ – інтенсивне пігментоутворення; +++ – добре; ++ – помірне; + – слабке; - – відсутнє) та з допомогою комп'ютерної програми Adobe Photoshop. В основу способу покладено встановлення інтенсивності пігментоутворення у бактерій з використанням цифрової фотокамери та комп'ютера. Після фотографування досліджуваного об'єкту зображення переводили в програму Adobe Photoshop та аналізували за допомогою кольорової моделі CIE Lab (шляхом оцінки кольору цифрового зображення, що дозволяє встановлювати інтенсивність пігментоутворення бактерій).

Для з'ясування впливу важких металів на синтез пігментів в присутності доданих попередників пігментів нами виконані досліді по вивченню впливу «надмірного» проліну на синтез продигіозину у *S. marcescens*. У МПА, до якого заздалегідь вносили Cu<sup>2+</sup> в концентрації, що викликає пригнічення синтезу продигіозину (80–100 мг/л), додавали пролін в концентрації 250 мг/л.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програми Microsoft Office Excel 2003. Для обробки результатів використовували статистичні методи з знаходженням середнього арифметичного  $M$ , похибки середнього арифметичного ( $\pm m$ ) (Лакин, 1990).

### Результати та обговорення

Як було показано в наших попередніх дослідженнях, пігментсинтезуючі бактерії в умовах тривалого «металевого» стресу знижують свою пігментсинтезуючу активність із ростом концентрації металів в середовищі або ж повністю втрачають цю здатність, і на певному концентраційному рівні спостерігається поява безлічі безбарвних колоній. Після пересіву культури, вирощеної на МПА з металом, на середовище без металу (МПА) пігментсинтезуюча здатність цієї культури повністю відновлюється.

Відзначено, що при повторному посіві на середовище з металом концентраційна межа металів, з якої спостерігається втрата пігменту в культурі, дещо зміщується у бік більшої концентрації металу (Рильський, Гвоздяк, 2007).

Відзначалося також, що між втратою пігментсинтезуючої здатності та повним інгібуванням росту культури спостерігається деякий концентраційний інтервал, причому величина цього інтервалу для різних металів і культур значно варіює (Рильський, Гвоздяк, 2007).

В даній роботі цю залежність наведено в табл. 1. Нами встановлено, що під дією  $Ag(I)$  блокування синтезу пігментів у трьох досліджених культур спостерігається при найнижчій концентрації – 7 мг/л. Ряд металів –  $Sn(II)$ ,  $Co(II)$  і  $V(V)$  – блокує синтез пігментів при концентраціях 60–80 мг/л (*P. aeruginosa* і *P. fluorescens var pseudo-iodinum*), а  $Zn(II)$  і  $Pb(II)$  у *S. marcescens* – при концентраціях 400 та 950 мг/л відповідно. У табл. 1 зазначено середні величини концентрацій, при яких колонії бактерій знебарвлюються. Помилка виникає від того, що на МПА, зроблених різними заводами (Київський №1, №2, Махачкалінський та ін.), рівень концентрацій, з яких починається знебарвлення колоній, відрізняється. Така відмінність відбувається в межах похибки середньої арифметичної.

Таблиця 1.

Концентрації іонів важких металів (мг/л), що пригнічують пігментоутворення та ріст бактерій родів *Pseudomonas* і *Serratia*

Культура мікро-організмів	$Sn^{2+}$		$V^{5+}$		$Co^{2+}$		$Ag^{1+}$		$Zn^{2+}$		$Pb^{2+}$	
	Відсутність											
	Пігм.	Ріст	Пігм.	Ріст	Пігм.	Ріст	Пігм.	Ріст	Пігм.	Ріст	Пігм.	Ріст
<i>P. aeruginosa</i>	80,0 ±8,2	120,0 ±10,1	60,0 ±7,5	80,0 ±9,0	70,0 ±6,1	100,0 ±5,5	7,0 ±0,5	10,0 ±1,5	380,0 ±31,0	480,0 ±25,1	950,0 ±98,0	1000,0 ±95,5
<i>S. marcescens</i>	70,0 ±6,6	100,0 ±9,8	60,0 ±6,3	80,0 ±7,1	70,0 ±4,5	110,0 ±10,1	7,0 ±0,3	10,0 ±0,8	400,0 ±40,2	500,0 ±38,3	950,0 ±55,5	980,0 ±62,1
<i>P. fluorescens var pseudo-iodinum</i>	80,0 ±5,2	120,0 ±9,8	60,0 ±4,7	80,0 ±6,5	60,0 ±5,1	90,0 ±7,3	7,0 ±0,9	10,0 ±1,5	350,0 ±27,6	500,0 ±35,6	930,0 ±72,2	980,0 ±93,4

Відомо, що в утворенні пірольних кілець при біосинтезі продигіозину беруть участь амінокислоти – гліцин, аланін, орнітин, аспарагінова й глутамінова кислоти (Бриттон, 1986; Феофилова, 1974). Одним з безпосередніх попередників у синтезі продигіозину є амінокислота пролін. Як вихідні  $\alpha$ -амінокислоти, так і попередник пролін можуть утворювати з іонами важких металів комплексні сполуки – хелатні комплекси (рис. 1). Така взаємодія з металами виключає подальшу участь попередника в ланцюзі синтезу продигіозину – відбувається обрив біосинтетичного циклу. У цьому випадку попередник виконує функцію захисту клітини, зв'язуючи в комплекси важкі метали, що перебувають у непомірно високій концентрації для клітини та створюють для неї стресову ситуацію.

Для перевірки даного припущення в МПА з Cu (II) додавали пролін, прогнозуючи збільшення концентраційної межі важкого металу, з якої почнеться втрата пігменту у *Serratia marcescens* у зв'язку з утворенням хелатного комплексу «метал–пролін».

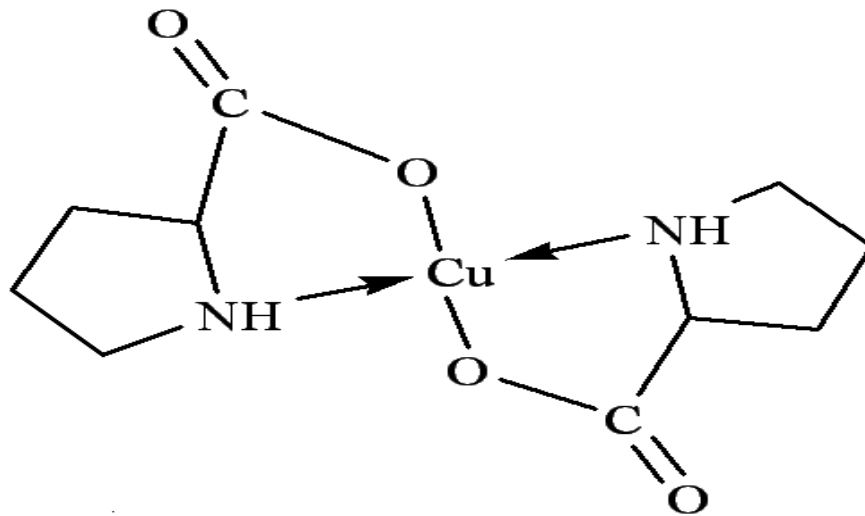


Рис. 1. Структура хелатного комплексу Cu(II) із проліном (дипролінат міді (II))

Дійсно виявилось, що в присутності проліну синтез пігменту у *Serratia marcescens* здійснювався навіть при концентрації металу 100 мг/л. При концентрації 100 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$  в МПА без проліну синтез пігменту в середовищі інгібувався. По насиченості кольору пігмент наближався до контролю. Це свідчить про те, що доданий пролін не весь піддався субстратному хелатуванню і його надлишок був використаний бактеріями як попередник у синтезі продигіозину.

Можливі механізми захисту у бактерій від дії стресових факторів, у тому числі й металів, зараз інтенсивно вивчаються багатьма дослідниками (Вороб'єва, 2004; Коржов и др., 2007; Подкопаева и др., 2003). У якості стресорів можуть виступати як метали зі змінною валентністю (Cu, Co, Fe, Ni, Sn, Pb), так і метали з постійною валентністю (Zn, Ag та ін.), а також світло, температура та інші фізико-хімічні фактори (Абрат та ін., 2008). В цьому випадку стрес розвивається по окисному шляху.

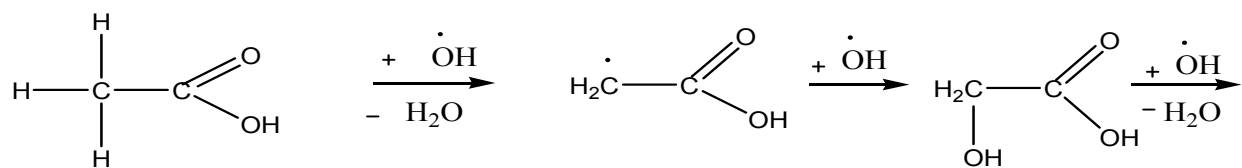
У відомих механізмах захисту клітини від активних форм кисню в якості антиоксидантів виступають супероксиддисмутаза, глутатіон, каталаза, пероксидаза, шаперони та ін. (Вороб'єва, 2004; Луцак, 2001; Подкопаева и др., 2003).

В роботі Д.Островського із співавторами (2003) показано, що окислювальний стрес у бактерій викликає синтез специфічних речовин – МЕЦ (метилеритриту циклопірофосфат). Дослідники вважають, що ці речовини, знижуючи вплив вільних радикалів на клітину, відіграють роль «передостанньої лінії оборони» в захисті бактерій від стресу.

Результати наших досліджень, отримані в попередніх і даній роботах, переконують у тому, що втрата пігментсинтезуючої здатності під дією важких металів носить універсальний характер і є відповіддю бактеріальної клітини на дію стресового фактора.

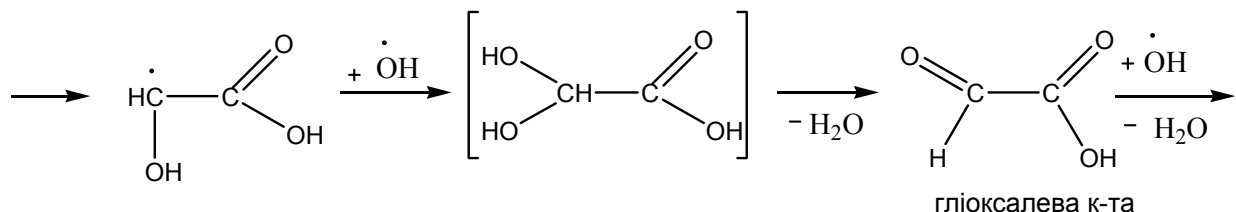
Однак явище стійкого зниження пігментсинтезуючої здатності або утворення безпігментних колоній на певному концентраційному рівні металів може вказувати на те, що, можливо, існує інший механізм реагування бактеріальної клітини на стресовий фактор, і в цьому механізмі безпосередню й основну роль виконують попередники синтезу пігментів або самі пігменти. На нашу думку, вони стають «пастками» потоку вільних радикалів, що утворюються під дією стресових факторів – «металевого», температурного та ін. Пігменти та їхні попередники приймають на себе функцію захисту клітини (останньої лінії оборони).

Аналіз хімічної природи речовин, що беруть участь у синтезі продигіозину (*Serratia*) і пігментів феназинового ряду (*Pseudomonas*), показує, що серед них є речовини, які мають активні центри, здатні реагувати з вільними радикалами. Такими центрами є метиленові групи ( $-\text{CH}_2-$ ), що перебувають в  $\alpha$ -положенні стосовно подвійного зв'язку (Степаненко, 1981; Петров и др., 2002). У ланцюзі синтезу продигіозину таку активну групу має один з його попередників – оцтова кислота. Її взаємодію з найменшим, але найбільш реакційноздатним вільним радикалом – гідроксил-радикалом  $\text{OH}\cdot$  можна представити схемою:

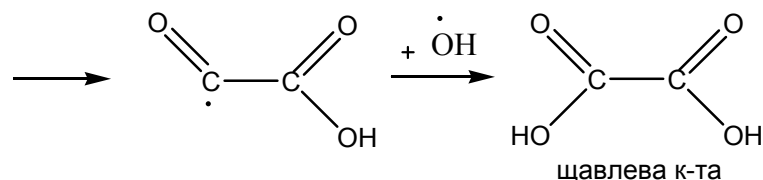


оцтова к-та

гліколева к-та



гліоксалева к-та

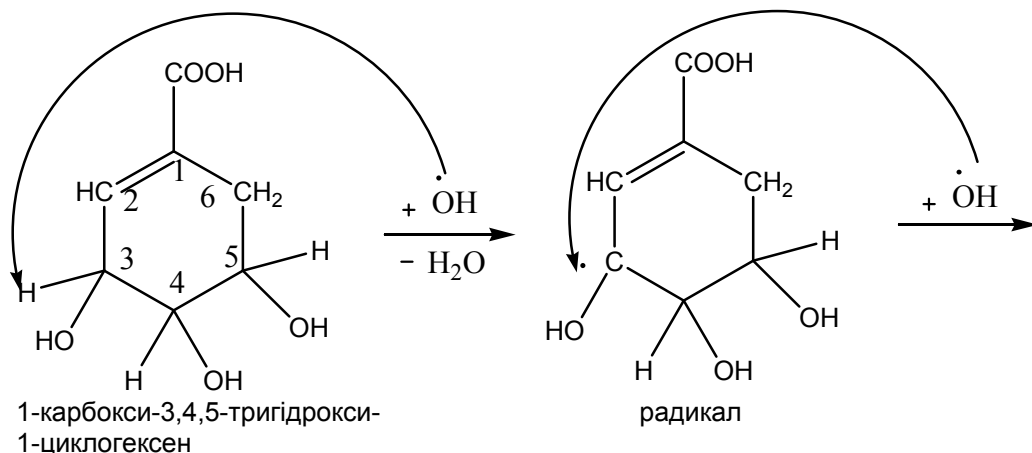


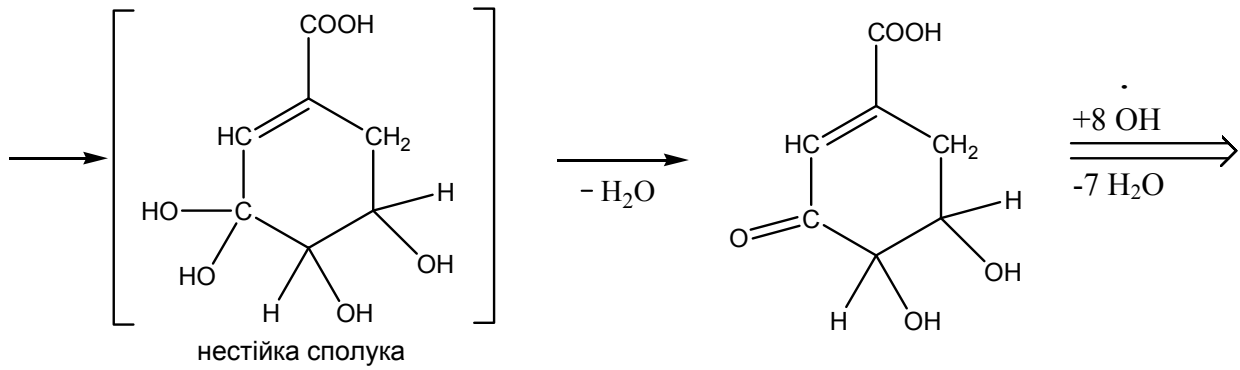
щавлева к-та

Відомо, що при додаванні в середовище оцтової кислоти у бактерій підсилюється синтез пігментів (Горишний и др., 2008). Логічно припустити, що такий ефект є результатом зв'язування вільних радикалів оцтовою кислотою.

У циклі синтезу феназинових пігментів (піоціанін, йодинін та ін.) роль пастки вільних радикалів може виконувати такий важливий центроболіт, як шикімова кислота, у молекулі якої є 4 реакційних центри, здатних взаємодіяти з вільними радикалами: три з них представлені метиленовими групами, що містять електроноакцепторні замісники (-OH), які підсилюють реакційну здатність атомів водню, і одна незаміщена метиленова група (-CH<sub>2</sub>-). Таким чином, шикімова кислота, безумовно, має дуже високу поглинальну здатність вільних радикалів. Якщо взяти як приклад вільного радикала гідроксил-радикал OH<sup>•</sup>, то тільки одна молекула шикімової кислоти здатна нейтралізувати **10** таких вільних радикалів. Цей шлях зв'язування гідроксил-радикалів OH<sup>•</sup> молекулою шикімової кислоти можна описати схемою:

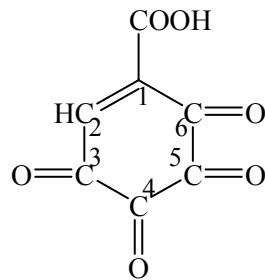
шикімова к-та





У результаті атаки гідроксил-радикалами вторинноспиртової групи в положенні 3 молекули шикімової кислоти (як найбільш реакційноздатної стосовно вільних радикалів) тут утвориться карбонільна група. Її поява активує атом водню сусідньої вторинноспиртової групи, яка перебуває в положенні 4, що полегшує атаку цього положення новими гідроксил-радикалами. Таким чином, у 4-го вуглецевого атома також буде утворюватися карбонільна група.

Неважко припустити, що реакція гідроксил-радикалів з атомами водню в положенні 5 і 6 буде протікати аналогічно, і у результаті такої взаємодії шикімова кислота перетвориться в 1-карбоксі-3,4,5,6-тетраоксо-1-циклогексен:



Включення шикімової кислоти в реакцію зв'язування вільних радикалів перериває синтез пігментів – клітина бореться за виживання в умовах окисного стресу, з яким не впоралися відомі механізми захисту.

Роль пасток вільних радикалів виконують також пігменти і їхні попередники в окремих актиноміцетів. Так, наприклад, синтез  $\beta$ -каротину проходить через ряд попередників – фітоїн, фітофлюїн, лікопін (Бриттон, 1986). Всі ці речовини є похідними полієнових вуглеводнів, що містять у своїй структурі активні метиленові групи ( $-\text{CH}_2-$ ).

Таким чином, поглинальна здатність каротиноїдів стосовно вільних радикалів зумовлена наявністю в їхній структурі активних метиленових груп і визначається їхньою кількістю. Відомо, що в молекулі  $\beta$ -каротину таких метиленових груп набагато менше, ніж у молекулах його попередників: фітоїну, фітофлюїну, лікопіну. Виходячи з цього, можна припустити, що штами актинобактерій, у яких синтез  $\beta$ -каротину перерваний на якому-небудь попереднику, будуть здатні переносити набагато більш жорсткі стресові умови, ніж ті штами, у яких ланцюг синтезу закінчується  $\beta$ -каротином.

Отже, бактеріальна клітина, рятуючись від потоку вільних радикалів, з якими не впоралися описані до теперішнього часу механізми захисту (супероксиддисмутаза, каталаза, шаперони, глутатіон, МЕЦ; механізми дерепресії ділянок ДНК, відповідальних за синтез антиоксидантів), використовує ще одну лінію оборони – пігменти та їхні попередники. Результатом такого перемикання потоку вільних радикалів на пастки – попередники пігментів – є припинення синтезу пігментів, що дозволяє «пережити» дану концентрацію металу в безпігментному стані. Концентраційний інтервал від моменту втрати пігменту до повного інгібування життєдіяльності клітини в конкретних умовах даного середовища і є той запас міцності клітини, що дарує їй синтез пігментів.

#### Список літератури

Абрат О.Б., Семчишин Г.М., Медзобродські Я., Луцак В.І. Транспортування флуоресцеїну та антиоксидантна система дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* за дії кислотного стресу // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т.80, №3. – С. 70–77.

- Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. – Москва: Мир, 1986. – 422с.
- Воробьева Л.И. Стрессоры, стрессы и выживаемость бактерий (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т.40, №3. – С. 261–269.
- Горишний М.Б., Гудзь С.П., Гнатуш С.А. Рост *Chlorobium limicola* Y-2002 при разных условиях культивирования // Мікробіологія і біотехнологія. – 2008. – №1. – С. 56–57.
- Жданова Н.Н., Василевская И.А. Меланин-содержащие грибы в экстремальных условиях. – Киев: Наукова думка, 1988. – 196с.
- Коржов В.И., Жадан В.Н., Коржов М.В. Роль системы глутатиона в процессах детоксикации и антиоксидантной защиты // Журн. АМН України. – 2007. – Т.13, №1. – С. 3–19.
- Лакин Г.Ф. Биометрия: учебное пособие для биол. спец. ВУЗов. – М.: Высшая школа, 1990. – 352с.
- Луцак В.И. Окислительный стресс и механизмы защиты от него у бактерий (обзор) // Биохимия. – 2001. – Т.66, вып.5. – С. 592–609.
- Никовская Г.Н., Ульберг З.Р., Стрижак Н.П. Коллоидно-химические закономерности взаимодействия урана (IV) с клетками металлорезистентной культуры бактерий *Bacillus cereus* ВКМ 4368 // Коллоидный журнал. – 2002. – Т.64, №2. – С. 194–200.
- Островский Д.Н., Демина Г.Р., Бинюков В.И. и др. Свободные радикалы ртути-резистентных бактерий как индикаторы нового метаболического пути // Микробиология. – 2003. – Т.72, №5. – С. 594–599.
- Петров А.А., Бальян Х.В., Трощенко А.Т. Органическая химия. Учебник для вузов. – СПб.: Иван Федоров, 2002. – 624с.
- Подкопаева Д.А., Грабович М.Ю., Дубинина Г.А. Окислительный стресс и системы защиты клеток у микроаэрофильных бактерий *Spirillum winogradskii* // Микробиология. – 2003. – Т.72, №5. – С. 600–608.
- Рильський О.Ф., Гвоздяк П.І. Вплив іонів важких металів на пігментсинтезуючу здатність бактерій // Доповіді АН України. – 2007. – №1. – С. 161–164.
- Степаненко Б.Н. Курс органической химии. – М.: Высш. шк., 1981. – 464с.
- Феофилова Е.П. Пигменты микроорганизмов. – М.: Наука, 1974. – 242с.
- Carpentier W., Sandra K., De Smet I. et al. Microbial reduction and precipitation of vanadium by *Shewanella oneidensis* // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol.69, №6. – P. 3636–3639.
- Furman C.R., Owusu V.I., Tsang Y.C. Inhibitory effect of some transition metal ions on growth and pigment formation of *Serratia marcescens* // Microbios. – 1984. – Vol.40 (159). – P. 45–51.

---

Представлено: О.В.Шерстобоевою / Presented by: O.V.Sherstoboyeva

Рекомендовано до друку: В.В.Жмурком / Recommended for publishing by: V.V.Zhmurko

Подано до редакції / Received: 27.10.2009.

© О.Ф.Рильський, 2010

© A.F.Rylskiy, 2010