

УДК [57.018.6:579.83]:612.176

Рильський О.Ф., Жиленко А.В., Підкопайло С.Ф., Домбровський К.О.,
Дударєва Г.Ф. (Україна, Запоріжжя)

ВИРОГІДНІ МЕХАНІЗМИ ЗАХИСТУ ПІГМЕНТСИНТЕЗУЮЧИХ БАКТЕРІЙ ВІД ДІЇ СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ

Бактерії, які утворюють вторинні метаболіти, представляють значний практичний інтерес. В процесі їх культивування, в середовищі накопичуються в значних кількостях пігменти, антибіотики, вітаміни та інші речовини, що використовуються в медицині, ветеринарії, сільському господарстві, імунології. Особливий інтерес викликають пігменти, які можуть виконувати ще й індикаторну функцію навколишнього середовища. Цінність пігментів бактерій, як об'єкту дослідження також полягає в невирішеності питання про їхнє функціональне призначення.

Припущення про роль продигіозину (*Serratia marcescens*):

- Бере участь в диханні клітин;
- Пригнічує ріст інших мікроорганізмів;
- Виконує роль аутоокислюючого електронного акцептора;
- Синтез продигіозину наприкінці стаціонарної фази в структурах клітинної стінки дозволяє зв'язувати амінокислоти, високі концентрації яких можуть привести до прискорення літичних процесів [1, 2].

В попередніх наших дослідженнях пігментсинтезуючих бактерій було показано наступне:

- Зниження або повна втрата пігментсинтезуючої активності в умовах тривалого «металевого» стресу;
- Відновлення пігментсинтезуючої здатності на середовищі МПА без металу;
- При повторному посіві на середовище з металом втрата пігменту в культурі відбувається вже при більш високій концентрації металу;
- Між втратою пігментсинтезуючої здатності та повним пригніченням росту культури спостерігається деякий концентраційний інтервал, величина якого для різних металів і культур значно варіює [4].

Мета дослідження – вивчення пігментсинтезуючої здатності бактерій родів *Serratia* і *Pseudomonas* при впливі на них іонів важких металів і температури та дослідженні можливих механізмів відповіді бактерій на такі стресові впливи.

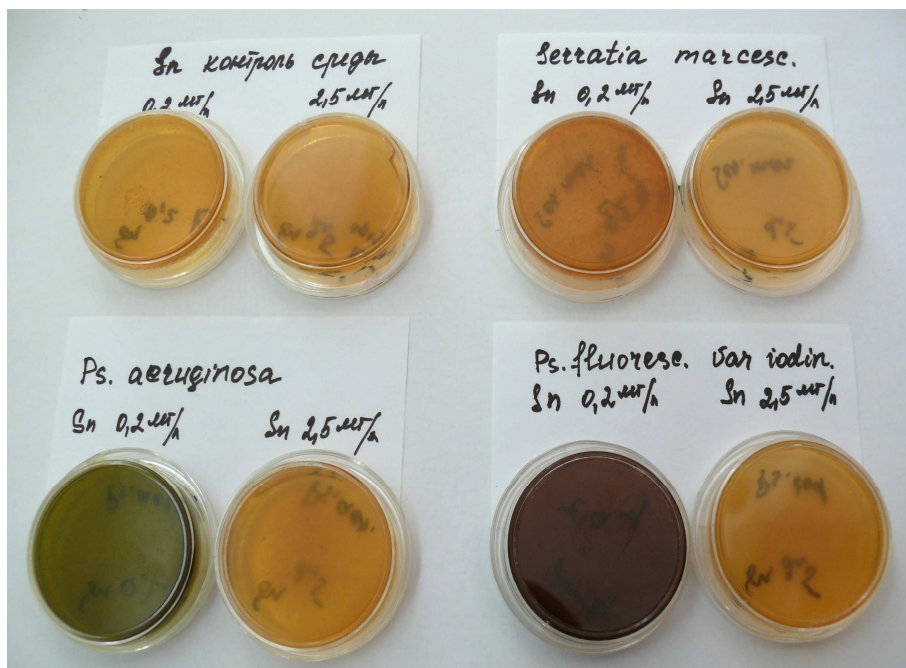


Рисунок 1 – Вплив іонів Sn²⁺ на синтез пігменту у *Ps. fluorescens var. iodinum* і *Serratia marcescens*

В попередніх дослідженнях нами було встановлено, що ряд металів – Sn (II), (рисунок 1) Co (II) і V (V) – блокують синтез пігменту у бактерій роду *Serratia* і *Pseudomonas* при дуже низьких концентраціях (0,1–2,5 мг/л) [5].

Вплив елементів – U (II), Th (IV), Te (II) та Pb (II) на пігментсинтезуючу здатність вивчали на прикладі культури *Serratia marcescens*. Встановлено, що метали U (II), Th (IV) та Pb (II) блокують синтез на рівні сотень мг/л, а Te (II) перебуває в проміжному положенні блокування синтезу пігменту та росту культури – це відбувається при 25 мг/л (табл. 1).

Є декілька вірогідних шляхів втрати пігмент синтезуючої здатності бактерій. Одним з таких вірогідних механізмів втрати пігментсинтезуючої здатності у *Serratia marcescens* може бути утворення хелатних комплексів металів з попередниками синтезу пігменту. Відомо, що попередником синтезу пігменту у *Serratia marcescens* – продигіозину – є пролін.

Попередник продигіозину пролін може утворювати з іонами важких металів комплексні сполуки – хелатні комплекси. 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.

Нами виконані досліди по вивченню впливу «надмірного» проліну на синтез пігменту у *Serratia marcescens* у присутності іонів Cu^{2+} . У МПА, до якого заздалегідь вносили Cu^{2+} в концентрації, що викликає пригнічення синтезу продигіозину, додавали пролін в концентрації 250 мг/л.

Таблиця 1

Вплив концентрацій іонів важких металів (мг/л) на пігментоутворення та ріст бактерій *Serratia marcescens*

Концентрація мг/л	Te ²⁺		U ²⁺		Th ⁴⁺		Pb ²⁺	
	Ріст	Пігм.	Ріст	Пігм.	Ріст	Пігм.	Ріст.	Пігм.
25,0	±	–						
30,0	–	–						
250,0			+++	+++				
300,0			±	–				
350,0			–	–				
800,0					+	–		
850,0					±	–		
900,0					–	–	+++	++
950,0							++	–
980,0							–	–

+++ – інтенсивний ріст або пігментоутворення;

++ – помірний ріст або пігментоутворення;

+ – слабкий ріст або пігментоутворення

± – ріст окремих колоній;

– – відсутність росту та/або пігментоутворення.

У присутності проліна синтез пігменту у *Serratia marcescens* здійснювався при концентрації металу (80 мг/л), яка значно пригнічувала синтез пігменту в середовищі без проліна. 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 (рисунок 2).



Рисунок 2 – Вплив іонів Cu^{2+} на синтез пігменту у *Serratia marcescens* в присутності D-проліну

У якості стресорів можуть виступати, як метали зі змінною валентністю (Cu, Co, Fe, Ni, Sn, Pb), так і метали з постійною валентністю (Zn, Ag і ін.), а також світло, температура та інші фізико-хімічні фактори. У цьому випадку стрес розвивається по окисному шляху [3, 6, 7].

Нами виконано ряд досліджень по вивченню впливу температури на синтез пігменту бактеріями. Вплив цього фактору вивчали на бактеріях *Serratia marcescens*. Виявилось, що підвищення температури пригнічує синтез пігменту, а при 35 °C культура повністю втрачала пігментсинтезуючу здатність.

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 пігменти або їхні попередники. На нашу думку, вони стають «пастками» для потоку вільних радикалів, що утворюються під дією стресових факторів – «металевого» і температурного. Пігменти та їхні попередники приймають на себе функцію 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, що мають активні центри, здатні реагувати з вільними радикалами. Такими центрами є метиленові групи ($-\text{CH}_2-$), що перебувають в α -положенні відносно подвійного зв'язку. 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 OH^* .

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

Реакція гідроксил-радикалів з атомами гідрогену в положенні 5 і 6 буде протікати аналогічно. У результаті такої взаємодії шикімова кислота перетвориться в 1-карбокси-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.

Отже, бактеріальна клітина, рятуючись від потоку вільних радикалів, з якими не впоралися описані до теперішнього часу механізми захисту (супероксиддісмутаза, каталаза, шапірони, глутатіон, МЕЦ; механізми дерепресії ділянок ДНК відповідальних за синтез антиоксидантів), використовує останню лінію оборони – пігменти і 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.

Висновки

- Під дією іонів важких металів спостерігається втрата пігментсинтезуючої здатності бактерій при рості на твердому живильному середовищі.
- Блокування синтезу пігменту у тест-культур відбувається при меншій концентрації іонів важких металів, ніж припинення росту бактерій.
- Одним з механізмів блокування синтезу пігментів у бактерій може бути зв'язування попередників пігментів іонами металів у хелатні комплекси, що виключає участь попередника в ланцюзі синтезу пігменту.
- Блокування синтезу пігментів під дією таких стресорів, як метали й температура, можливо, протікає в результаті перемикання попередників синтезу пігментів на виконання функції пасток вільних радикалів, або ж на активацію відомих механізмів захисту.
- Отримані результати вказують на можливу функцію пігментів у бактерій як «останню лінію оборони» від дії стресових факторів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Феофилова Е. П. Пигменты микроорганизмов. – М.: Наука, 1974. – 242 с.
2. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов: Пер. с англ. – М.: Мир, 1986. – 422 с.
3. Рильський О.Ф., Гвоздяк П.І. Вплив іонів важких металів на пігментсинтезуючу здатність бактерій // Доповіді АН України. – 2007. – №1. – С. 161–164.
4. Рильський О.Ф., Підкопайло С.Ф., Кононович Д.Є., Тюхта В.В. Вплив деяких факторів на пігментсинтезуючі бактерії // Зб. тез. Міжнародної конференції “Сучасні проблеми екології, біології, хімії”, ЗНУ. – 2007. – С. 23–26.
5. Таширев А. Б. Теоретические аспекты взаимодействия микроорганизмов с металлами // Микробиол. журнал. – 1994. – Т. 56, № 6. – С. 89–100.
6. Островский Д.Н. Окислительный стресс у бактерий // Баховские чтения (53 чтения). – 1997. – 27 с.
7. Лушак В.И. Окислительный стресс и механизмы от него у бактерий (обзор) // Биохимия. – 2001. – Т. 66, вып. 5. – С. 592–609.