

УДК 579.222.2

**ВЛИЯНИЕ ПАРАМЕТРОВ
ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА АДАПТАЦИЮ
КУЛЬТУРЫ ПИГМЕНТООБРАЗУЮЩЕГО
ШТАММА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

О.С. Жданова, Э.А. Соснин^{*, **}, Р.М. Гадилов^{**},
Е.П. Красноженов, А.В. Грицута

Сибирский государственный медицинский университет,
г. Томск

^{*}Институт сильноточной электроники СО РАН, г. Томск

^{**}Томский государственный университет

E-mail: oksfox@pochta.ru

Жданова Оксана Сергеевна, канд. мед. наук, ст. преподаватель кафедры микробиологии и вирусологии Сибирского государственного медицинского университета, г. Томск.

E-mail: oksfox@pochta.ru

Область научных интересов: микробиология, вирусология, биопленки, иммунология.

Соснин Эдуард Анатольевич, д-р физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. лаборатории оптических излучений Института сильноточной электроники СО РАН, г. Томск; профессор кафедры управления инновациями Томского государственного университета.

E-mail: badik@loi.hcei.tsc.ru

Область научных интересов: спектроскопия, светотехника, фотохимия, процессы горения и взрыва, фотобиология, фотомедицина, организация научных исследований, феномен и методы творчества.

Гадилов Руслан Магомедгирович, канд. хим. наук, ст. науч. сотр. лаборатории фотофизики и фотохимии молекул физического факультета Томского государственного университета.

E-mail: grm882@sibmail.com

Область научных интересов: спектроскопия, квантовая химия, органические полупроводники.

Исследована способность культуры *P. aeruginosa* к синтезу пиоцианина в стрессовых условиях, вызванных действием ультрафиолетового облучения. Впервые построена теоретическая модель фотофизических процессов в молекуле пиоцианина и показано, что пиоцианин является соединением, способным к фотоактивации как фиолетовым, так и ультрафиолетовым излучением. Показано, что под действием ультрафиолетового облучения отдельные колонии выживших клеток теряют способность синтезировать пигмент, а при пересеве беспигментных колоний на питательные среды и культивировании в благоприятных условиях наблюдается восстановление пигментации. Это можно связать со способностью предшественника пиоцианина (шикимовой кислоты) присоединять свободные радикалы (О.Ф. Рильский, 2010).

Ключевые слова:

P. aeruginosa, пиоцианин, ультрафиолетовое облучение, фотоактивация.

Введение

Оптическое излучение – один из важных физических факторов, определяющих пригодность среды обитания для функционирования биосистем. Ультрафиолетовый спектр является его составной частью. Умеренные дозы УФ-излучения необходимы для нормальной жизнедеятельности живых организмов. Длины волн в диапазоне 205...315 нм обладают выраженным бактерицидным эффектом и являются стрессовым фактором для микроорганизмов.

Ранее проведенные нами исследования показали, что в ряду микроорганизмов (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*) наибольшей чувствительностью к УФ-

излучению обладал штамм синегнойной палочки, активно синтезирующий сине-зеленый пигмент пиоцианин [1]. На факт высокой чувствительности микроорганизмов, синтезирующих водорастворимые пигменты, обратил внимание еще В.Ф. Соколов [2], предположив, что последние при облучении приобретают свойства фотосенсибилизаторов и вносят определенный вклад в процесс инактивации бактерий. В то же время некоторые исследования свидетельствуют о способности пиоцианина обеспечивать защиту бактерий, принадлежащих другим родам, от ультрафиолетового облучения (УФО) [3].

Красноженов Евгений Павлович, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии Сибирского государственного медицинского университета, г. Томск.

E-mail: krasnoj@mail.ru

Область научных интересов: микробиология, инфекция, иммунитет.

Грицута Александра Валерьевна, студентка медико-биологического факультета Сибирского государственного медицинского университета, г. Томск.

E-mail: umertyu@mail.ru

Область научных интересов: микробиология, вирусология.

Пигменты микроорганизмов играют важную роль в их жизнедеятельности и являются объектом многих исследований [4, 5]. Интерес к изучению пигментов связан с определением их регуляторной роли в метаболических процессах, протекающих в биосистеме, в т. ч. в условиях изменяющихся биосферных факторов [4, 6, 7], развитием биотехнологий (ряд пигментов являются естественными антибиотиками) [8–10] и биофотоники (природные пигменты стараются использовать для создания биосенсоров ближнего ультрафиолетового и видимого диапазонов) [3, 11–14].

Одним из пигментов, которому посвящено большое количество исследований, является пиоцианин. Противоречивость сведений, имеющихся в литературе о свойствах пиоцианина, побудила нас к проведению данного исследования. Цель работы – изучение механизмов и условий синтеза пигмента *P. aeruginosa* – пиоцианина. Для этого решались задачи теоретического исследования фотофизической структуры пиоцианина, экспериментального и теоретического определения его спектральных свойств.

Материалы и методы

В работе были использованы культуры *P. aeruginosa* (штамм ATCC 27583) и выделенный от больного штамм *P. aeruginosa*, активно продуцирующий пиоцианин.

Культивировали микроорганизмы на мясо-пептонном агаре (МПА) и МПА с добавлением 1 % глицерина.

Пигментообразующую способность оценивали следующим образом: штамм засеивали газоном на среду с глицерином, через 18–20 ч заливали стерильной дистиллированной водой и продолжали культивирование еще в течение 48 ч. После этого жидкую фазу отбирали, центрифугировали и фильтровали через бактериальные фильтры с величиной пор 0,2 мкм. Наличие пигмента определяли спектрофотометрически, при помощи регистрации спектров поглощения полученных растворов на спектрометре StellarNet EPP2000-C25 (StellarNet Inc.) на основе многоканальной п.з.с.-линейки Sony ILX511 (рабочий диапазон 200–850 nm, спектральная полуширина его аппаратной функции не превышает 1,5 nm), совмещённом с опорным источником излучения SL5 UV-VIS (StellarNet Inc.) на основе дейтериевой и галогеновой ламп.

В качестве фактора внешней среды, влияющего на синтез пиоцианина, использовали УФО. Источником излучения служила XeBr-эксилампа (модель BD_P, УРАН ИСЭ СО РАН) с максимумом излучения на $\lambda = 283$ nm, обеспечивающая дозу облучения на подложке (чашка Петри с МПА) 45 Дж/м².

Спектр XeBr-эксилампы представлен на рис. 1. Мощность и дозу облучения, обеспечиваемую XeBr-эксилампой, определяли в абсолютных единицах фотоприемником С8026 (Hamamatsu Photonics КК) с головкой Н8025-222 с известной спектральной чувствительностью.

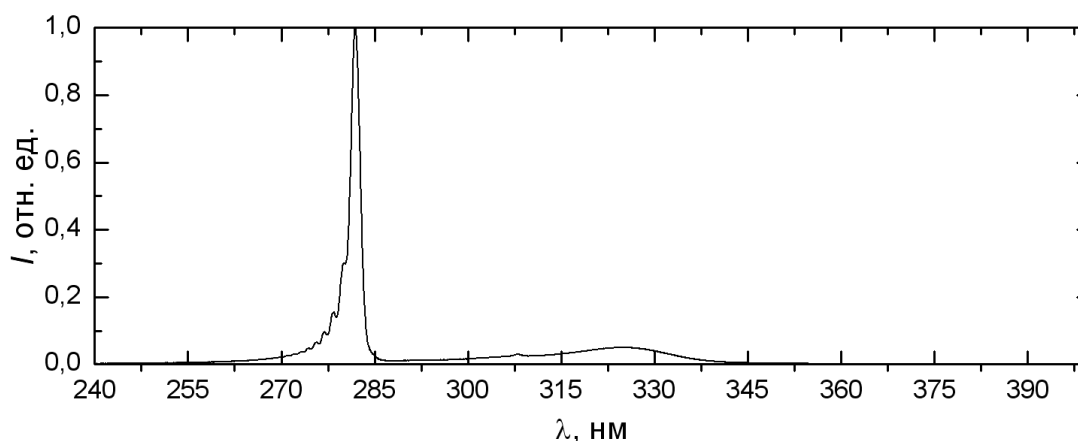


Рис. 1. Нормализованный спектр излучения ХеВг-эксилампы

Чашки Петри с МПА делили на две половины, и наносили взвесь суточных культур обоих штаммов в концентрации 10^5 КОЕ/мл, в объеме 0,1 мл. Опытные чашки с посевами подвергали действию УФ в течение 15 с, контрольные чашки облучению не подвергали. Число жизнеспособных клеток определяли по количеству колоний, образовавшихся на чашках, с питательной средой после 24 ч инкубации при 37 °С. Статистическую обработку проводили с использованием программного обеспечения анализа данных Statistica 6.0. Вид распределения нами не анализировался, поскольку выборка измерений была небольшой ($n < 25$). Поэтому для анализа различий в независимых группах был применен непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

В ряде работ исследованы спектральные свойства пигментов, выделяемых *P. aeruginosa* [15, 16]. Но приведенные данные о спектрах поглощения пиоцианина не всегда полны или противоречивы. Например, в [16] отдельно рассматриваются ионная и нейтральная формы пигмента, между тем с точки зрения органической химии это два крайних случая смещения заряда в молекуле и в реальности они не существуют. Реальная структура является суперпозицией всех резонансных структур с каким-то определенным вкладом каждой из них.

Нас интересовала способность пиоцианина приобретать свойства фотосенсибилизатора при УФО и, соответственно, вносить свой вклад в инактивацию микроорганизма (т. е. выступать в роли дополнительного стресс-фактора). Для определения условий, в которых это происходит, на первом этапе работы мы провели квантово-химические расчёты структуры уровней энергии молекулы пиоцианина методом электронно-возбужденных состояний исследуемых молекул. Величины энергии состояний были рассчитаны полуэмпирическим методом ЧПДП (частичное пренебрежение дифференциальным перекрыванием) [17]. Расчёты позволили получить информацию об электронной структуре состояний молекулы пиоцианина в неполярном растворителе. Неполярная форма была взята в силу того, что растворы пиоцианина, полученные и использованные в наших опытах, имели величину $pH = 7,3-7,4$.

На рис. 2 приведены структура молекулы и схема уровней триплетных и синглетных состояний пиоцианина, а также константы, соответствующие внутренней (k_1 , k_2) и интеркомбинационной (k_3) конверсии для нижнего синглетного уровня. Интеркомбинационная конверсия определялась на основе матричных элементов спин-орбитального взаимодействия в одноцентровом приближении. Геометрия пиоцианина оптимизировалась РМЗ методом. Погрешность расчёта уровней энергии составляла $\pm 1000 \text{ см}^{-1}$.

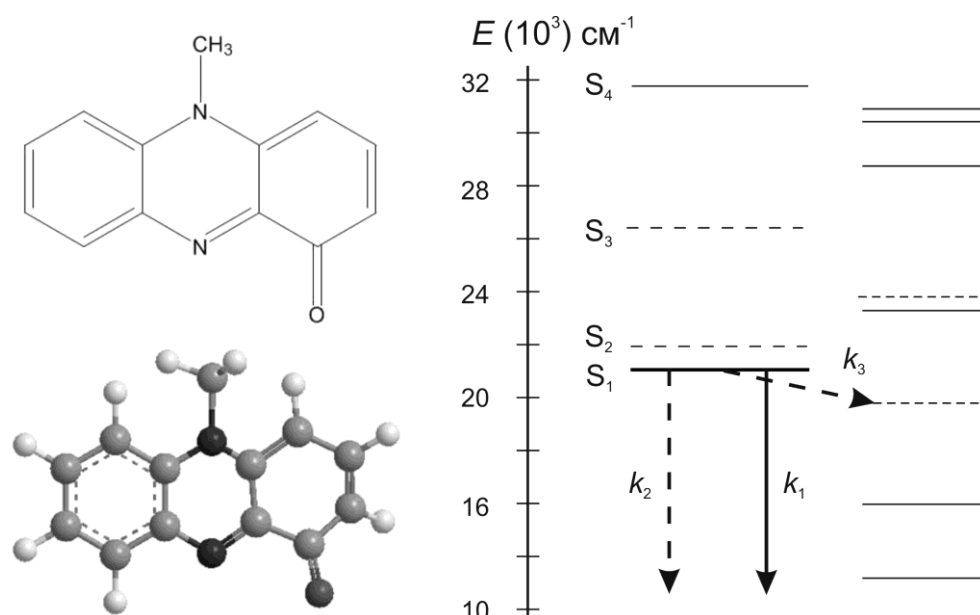


Рис. 2. Структурная формула пиоцианина (слева) и диаграмма его синглетных и триплетных состояний (справа): S_1 – S_4 – уровни энергии синглетных состояний; $k_1 \sim 10^8$ с; $k_2 \sim 4 \cdot 10^8$ с; $k_3 \sim 2,8 \cdot 10^{11}$ с

Из расчётов видно, что в спектре поглощения должны выделяться полосы с максимумами около 430...470, 380 и 310 нм, соответствующие переходам на синглетные уровни S_1 – S_2 , S_3 , S_4 , соответственно. В литературе, помимо пиоцианина, отмечается наличие ещё двух его форм, а именно, восстановленного и так называемого полухиноидного пиоцианина [15]. Но на сегодня данных о структуре этих производных недостаточно, чтобы рассчитать схемы уровней.

Из рис. 2 также видно, что даже при действии на молекулу фиолетового света ($\lambda \sim 440$...400 нм) происходит эффективное заселение триплетных состояний. Таким образом, даже в рамках сделанных нами при расчётах допущений, можно заключить, что в силу высокой константы k_3 пиоцианин быстро переходит в фотоактивную форму.

Обратимся к спектрам поглощения пиоцианина. Мы сняли их для штамма *P. aeruginosa* ATCC 27583 и для штамма, выделенного от больного.

Визуально фильтрат, полученный от штамма *P. aeruginosa* ATCC 27583, не имел какой-либо выраженной окраски, что подтверждается отсутствием поглощения в видимой области. (Спектры поглощения фильтратов, исследуемых штаммов представлены на рис. 3). Фильтрат от штамма *P. aeruginosa*, выделенного от больного, имел интенсивный сине-зеленый цвет, а спектр содержал четыре полосы поглощения с максимумами на $\lambda = 251, 312, 371$...375 и 670...700 нм, причём поглощение на длинах волн короче 320 нм заметно выше, чем в видимой области спектра. Пики поглощения на длинах волн 312, 371...375 и 670...700 нм соответствуют пикам поглощения пиоцианина, приводимым в литературе [5]. Неполное совпадение пиков может быть связано с присутствием в фильтратах не только молекул пигмента, но и продуктов метаболизма самого штамма, которые активно поглощают излучение с длинами волн $\lambda < 300$ нм (преимущественно белки) [18], а также наличием других пигментов, продуцируемых *P. aeruginosa* [10].

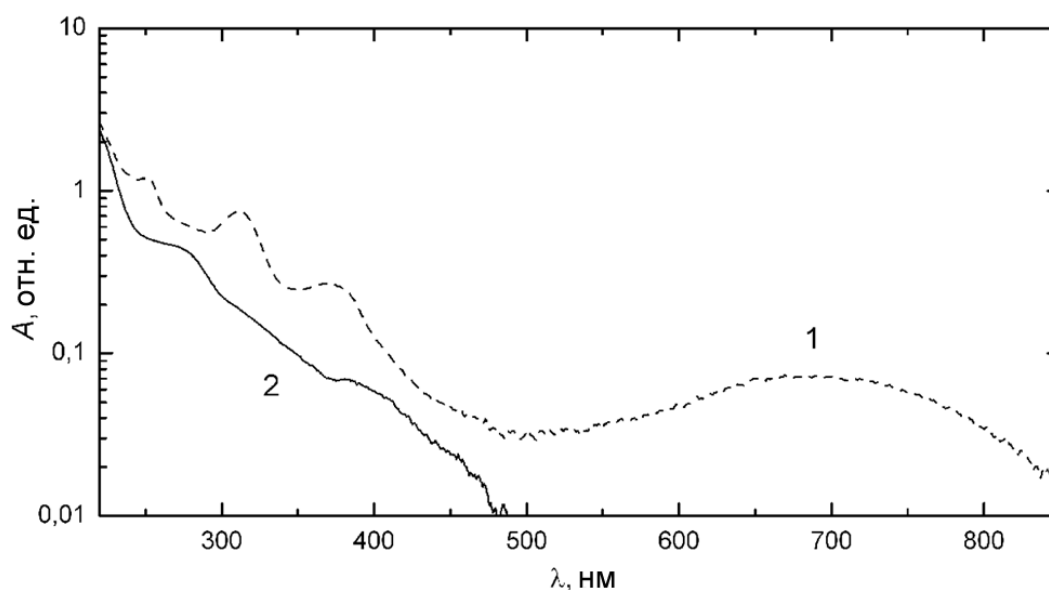


Рис. 3. Спектры поглощения бактериальных фильтратов от: 1) штамма *P. aeruginosa*, выделенного от больного; 2) штамма ATCC 27583

Обсуждение

Пиоцианин – вторичный метаболит, обладающий выраженными бактерицидными свойствами. Вероятно, это вещество играет важную роль в жизнедеятельности синегнойной палочки в окружающей среде, повышая ее конкурентоспособность при освоении экологических ниш.

Высокая чувствительность штамма *P. aeruginosa*, выявленная нами в ранее проведенных исследованиях, к УФО может быть: генетически обусловлена его чувствительностью к УФ-излучению [18] или связана с фотоактивацией пиоцианина. Поэтому нами была исследована чувствительность к УФО ($\lambda = 282$ нм) еще одного штамма *P. aeruginosa* ATCC 27583. На рис. 4.1 и 4.2 представлены результаты инактивирующего действия узкополосного излучения ХеBr-эксилампы на оба штамма *P. aeruginosa*, из которого видно, что наибольшую чувствительность к УФ-излучению проявляет штамм, активно продуцирующий пиоцианин.

Следует отметить, что в фильтрате от штамма *P. aeruginosa* ATCC 27568 не обнаруживались пики поглощения, характерные для пиоцианина. Другой штамм, напротив, синтезировал интенсивный сине-зеленый пигмент, а спектр пропускания растворов полученных от культивированных колоний имел форму, характерную для пиоцианина (рис. 3, 1). То, что пиоцианин-продуцирующий штамм подвергается большей инаktivации в сравнении с беспигментным штаммом косвенно может свидетельствовать о том, что дополнительным каналом инаktivации (помимо прямого повреждения излучением нуклеиновых кислот) является образование фотоактивированного пиоцианина УФ-С излучением.

Вероятно, в естественных условиях незначительная часть пиоцианина, при облучении фиолетовой частью солнечного света (и при обычной плотности потока солнечного излучения), переходит в фотоактивную форму. Последнее связано с низким поглощением пиоцианина в этой части спектра (рис. 3, 1). При этом концентрации фотоактивированного пигмента достаточно, чтобы подавлять жизнедеятельность микроорганизмов-конкурентов, но недостаточно, чтобы погибала сама культура *P. aeruginosa*.

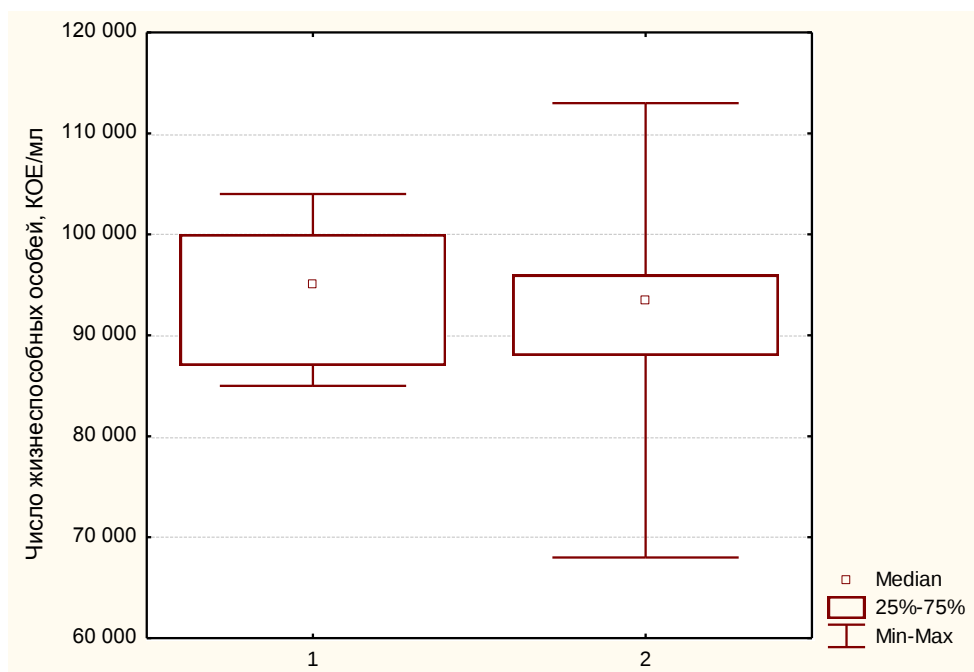


Рис. 4.1. Диаграмма размаха количества колоний разных штаммов синегнойной палочки до облучения. 1, 2 – количество жизнеспособных особей штамма *P. aeruginosa* ATCC 27568 и пиоцианинпродуцирующего штамма, образовавших колонии в контрольных чашках ($p > 0,05$)

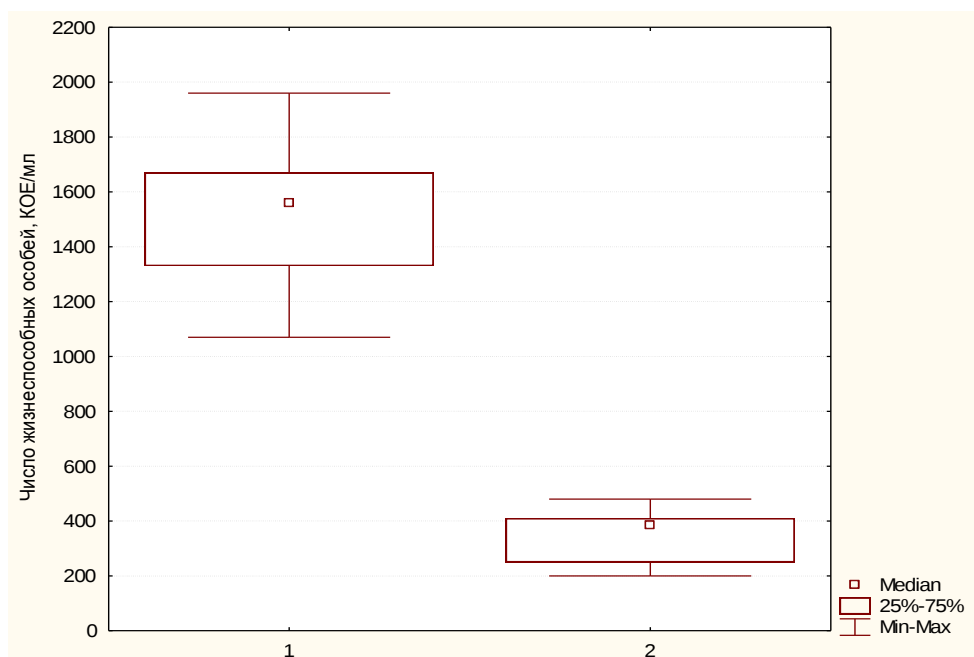


Рис. 4.2. Диаграмма размаха количества колоний разных штаммов синегнойной палочки после 15-ти секундного облучения ХеВг-эксилампой ($p < 0,05$): 1– количество жизнеспособных особей штамма *P. aeruginosa* ATCC 27568, образовавших колонии; 2– количество жизнеспособных особей пиоцианинпродуцирующего штамма

Кроме того, во всех сериях эксперимента по облучению штаммов была обнаружена потеря некоторыми выжившими колониями пигментации (рис. 5). Утрату пигмента можно рассматривать, как адаптивную реакцию микроорганизма к росту спектральной плотности потока излучения, индуцирующего образование значительного количества свободных радикалов.

«Выключение» синтеза пиоцианина вероятно происходит на уровне его предшественника – шикимовой кислоты, способной связывать свободные радикалы [19], образующиеся при УФО. При пересеве беспигментных колоний на питательные среды наблюдалось восстановление пигментации.

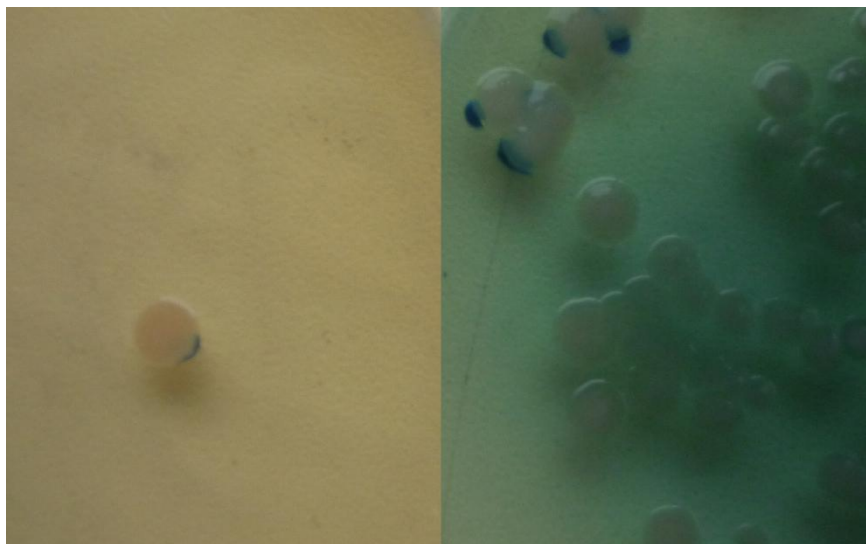


Рис. 5. Потеря пигмента колониями штамма *P. aeruginosa*: слева – отдельная выжившая колония после облучения посевов ХеВr-эксилампой, справа – колонии необлучённых клеток. Время облучения 15 с.

Заключение

Проведенные исследования позволили выделить следующие факты:

- 1) Фотофизические свойства пиоцианина позволяют рассматривать его как соединение, способное к фотоактивации как фиолетовым, так и ультрафиолетовым излучением.
- 2) При облучении отдельные колонии выживших клеток теряют способность синтезировать пигмент, что можно связать со способностью предшественника пиоцианина (шикимовой кислоты) присоединять свободные радикалы.

Проведенные исследования показывают, что в стрессовых условиях (УФО) утрата пигмента культурой *P. aeruginosa* является защитным приспособительным механизмом. В экстремальных условиях синтез пигмента прекращается, при переходе к нормальным – возобновляется, что обеспечивает выживаемость культуры в условиях окружающей среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жданова О.С., Соснин Э.А., Красноженов Е.П. и др. Чувствительность возбудителей госпитальных инфекций к ультрафиолетовому излучению с длиной волны 283 нм // Журнал инфекционной патологии. – 2010. – Т. 17. – № 3. – С. 62–64.
2. Соколов В.Ф. обеззараживание воды бактерицидными лучами. – М.: Изд-во МХК РСФСР, 1954. – 178 с.
3. Degiorgi C.F., Fernandes R.O., Pizarro R.A. Ultraviolet-B letal damage on *Pseudomonas aeruginosa* // Current Microbiology. – 1996. – V. 33. – № 1. – P. 141–146.
4. Liu G.Y., Nizet V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors // Trends in Microbiology. – 2009. – V. 17. – № 9. – P. 406–413.
5. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. – М.: Мир, 1986. – 422 с.
6. Горшков М.М., Давыдова М.Г. Эффект Чижевского–Вельхова // Солнце, электричество, жизнь: Матер. Чтений А.Л. Чижевского. – М: Изд-во МГУ, 1972. – С. 52–54.

7. Müller D.R., Warwick V.F., Bonilla S. et al. Extremotrophs, extremophiles and broadband pigmentation strategies in a high arctic ice shelf ecosystem // FEMS Microbiol. Ecol. – 2005. – V. 53. – № 7. – P. 73–87.
8. Желдакова Р.А. Механизмы биосинтеза антибиотиков и их действие на клетки микроорганизмов. – Мн.: БГУ, 2004. – 111 с.
9. Moustafa Hassan H., Fridovich I. Mechanism of the antibiotic action of pyocyanine // J. Bacter. – 1980. – V. 141. – № 1. – P. 156–163.
10. Feklistova I.N., Maksimova N.P. Obtaining *Pseudomonas aeruginosa* strains capable of overproduction of phenazine antibiotics // Microbiology. – 2008. – V. 77. – № 2. – P. 207–212.
11. Rosen R., Davidov Y., LaRossa R.A., et. al. Microbial sensors of ultraviolet radiation based on *recA':lux* fusions // Appl. Biochem. Biotech. – 2000. – V. 89. – P. 151–160.
12. Elasmri M.O., Miller R.V. A *Pseudomonas aeruginosa* biosensor responds to exposure to ultraviolet radiation // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – V. 50. – № 3. – P. 455–458.
13. Burke R.M., Upton M.E., McLoughlin A.J. Influence of pigment production on resistance to ultraviolet irradiation in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 // Irish Journal of Food Science and Technology. – 1990. – V. 14. – № 1. – P. 51–60.
14. Pyzh A.E., Nikandrov V.N. Contribution of blue-green pigments to hemolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* cultural fluid // Zh. Mikrobiol. – 2011. – № 1. – P. 19–25.
15. Zaugg W.S. Spectroscopic characteristics and some chemical properties of N-methylphenazinium methyl sulfate (phenazine methosulfate) and pyocyanine at the semiquinoid oxidation level // The J. Biol. Chem. – 1964. – V. 239. – № 11. – P. 3964–3970.
16. Vukomanovic D.V., Zoutma D.E., Stone J.A., et al. Electrospray mass-spectrometric, spectrophotometric and electrochemical methods do not provide evidence for the binding of nitric oxide by pyocyanine at pH 7 // Biochem. J. – 1997. – V. 322. – № 1. – P. 25–29.
17. Артюхов В.А., Майер Г.В., Риб Н.Р. Квантово-химическое исследование синглет-синглетного переноса энергии электронного возбуждения в бифлуорофорных молекулярных системах // Оптика и спектроскопия. – 1996. – Т. 81. – № 4. – P. 607–612.
18. Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. – М.: Высш. школа, 1989. – 214 с.
19. Рильський О.Ф. Вірогідні механізми блокування синтезу пігментів бактерій при дії тривалого стресу // Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія біологія. – 2010. – Вип. 11. – № 905. – С. 148–154.

Поступила 24.04.2013 г.