

SERRATIA MARCESCENS FESTÉKKÉPZŐ ÉS FESTÉKHIÁNYOS TÖRZSEINEK ÉRZÉKENYSÉGE ULTRAIBOLYA SUGARAKRA*

GYÓRFFY BARNA és KÁLLAY IRÉN

Többen megfigyelték, hogy a festékképző baktériumok ultraibolya (UV) besugárzásra kevésbé érzékenyek, mint a pigmenthiányosak. SWART—FÜCHTBAUER (1957) felemlíti, hogy DEWEY és POE (1938) a *Pseudomonas*-csoport pigmentdús alakjait négyeszerre rezisztensebbeknek találta a pigment-szegényekhez viszonyítva; IMSENECKIJ (1946) pedig *Sarcina* és *Micrococcus* fajok és *Serratia marcescens* pigmentképző és pigment-mentes rasszaival végzett tájékozódó vizsgálatai alapján feltételezi, hogy a baktériumok „carotinoid festéke” az UV-sugarak ellen védelmet nyújt. SWART—FÜCHTBAUER többek között a *Serratia marcescens* különböző törzseit vizsgálta. Megállapítása szerint a „piros”-törzs a legrezisztensebb, a „rózsaszínű” már kevésbé, míg a „fehér” törzs a legérzékenyebb. Az UV-fényt legerősebben a „piros” törzs abszorbeálja, azonban a baktericid hatású sugárzás ily módon történő „kiszűrése” mellett a sugárzás rezisztenciát még egyéb bonyolult élettani adottságok is befolyásolják.

1955-ben ultraibolya besugárzási kísérleteink során mi is azt észleltük, hogy a *Serratia marcescens* „M” törzsének egy pigmenthiányos, fehér telepet képző variánsa érzékenyebbnek mutatkozott, mint az eredeti, erősen festékképző kiindulási törzs. A kérdés tanulmányozására 1958-ban részletesebb vizsgálatokat végeztünk. Eddigi eredményeinkről a következőkben számolunk be.

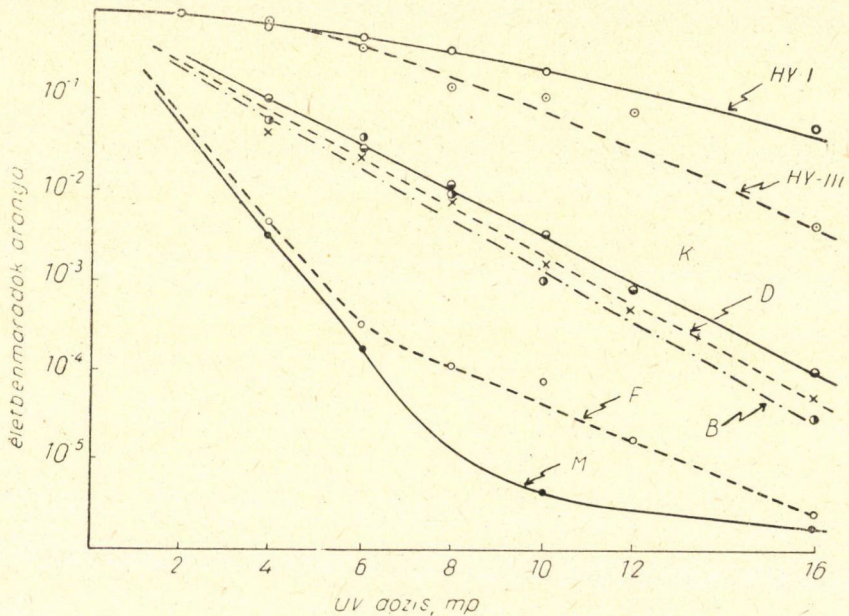
Kísérleteinkben a baktérium szuszpenziót (10^7 sejt pro ml) NaCl — 6,4 pH phosphat pufferben (1 : 1 keverék) közvetlenül sugároztuk be. UV forrásul magas nyomású 500 wattos higanygőz lámpa (Röntgen, Budapest) szolgált. Besugárzás után megfelelő hígítás után az életbenmaradók számának a meghatározására úgy szélesztettünk, hogy lemezenként kb. 50—200 telep alakuljon ki.

Hét különféle eredetű és a festékképzésüket tekintve egymástól is különböző törzsnek UV-érzékenységi (életbenmaradási) görbéjét az 1. ábra tünteti fel. Kifejezetten látszik, hogy az életbenmaradási görbék lefutása és meredeksége különböző és az ismert három típus egyaránt megtalálható.

* Előadás Szegeden 1958. május 21.-én, a Magyar Biológiai Társaság II. Vándorgyűlésén.

Az „A”-típusú görbe semilogarithmusos ábrázolásban egyenes, teljes lefutásában. LEA és HINES (1940; cit. ZELLE & HOLLAENDER 1950), valamint KAPLAN (1948) a *Serratia marcescens*-nél kaptak ilyen görbét; törzseink közül a „K” „B” és „D” törzsek viselkedtek így.

„C”-típusú görbét, amely egy kezdeti plateau után esik le (HOLLAENDER 1951), a két BUNTING-féle „HY” törzs adott. Ez a görbe jellemző az UV-



1. ábra. *Serratia marcescens* hét különféle törzsének ultrabolya sugárzásra érzékenysége

rezisztens baktériumokra; a „HY” törzsek szintén UV-rezisztensek és LABRUM és BUNTING (1953) közölt adatait grafikusan ábrázolva, szintén hasonló alakú görbe adódik.

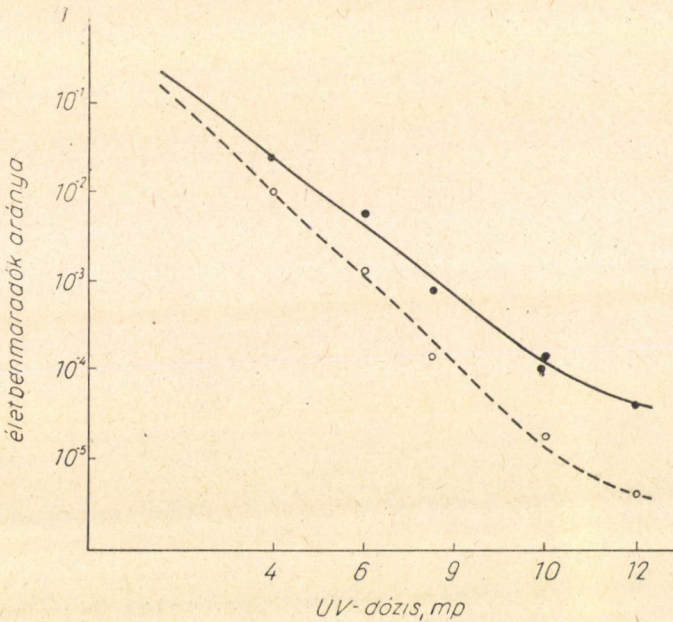
A harmadik típusú, ún. „B”-görbét jellemzi, hogy meredek leesés után megtörik, majd pedig enyhe lejtéssel halad tovább (GUNTER & KOHN 1956). Az általunk vizsgált *Serratia* törzsek közül ezt az életbenmaradási görbét adták az „F” törzs és kísérleteinkben leggyakrabban alkalmazott „M” törzs.

Nemrég mutatták ki GOUCHER és társai (1956) az *Azotobacter* különböző törzseinek, tehát különböző genotípusainak egymástól eltérő UV-inaktiválódását.

Az említett törzsek festékképzésük erősségének csökkenő sorrendjében a következőképp következnek egymásután: „B”, „M”, „D”, „HY”, „K” és „F”. Ebből kitűnik, hogy az egyes törzseknek festékképzésbeli erőssége és UV-érzékenysége között közvetlen összefüggés nincsen. Ezzel szemben

egyazon törzsnek („ M ”) a festékhányos variánsa, amely tartósan „fehér” telepeket képez, kifejezetten UV-érzékenyebb, mint a festékképző eredeti törzs (2. ábra).

Közismerten az UV-sugárzás okozta sérüléssel inaktíválódás helyreállítódik, ha a besugárzás után a sejtszuszpenziót látható fénynek tesszük ki (KELNER, 1949). Kísérleteinkben ezt a „fotoreaktiválást” 15 wattos fénycsövekkel való 1 órás megvilágítással végeztük. Ez az UV-sérülésből helyre-

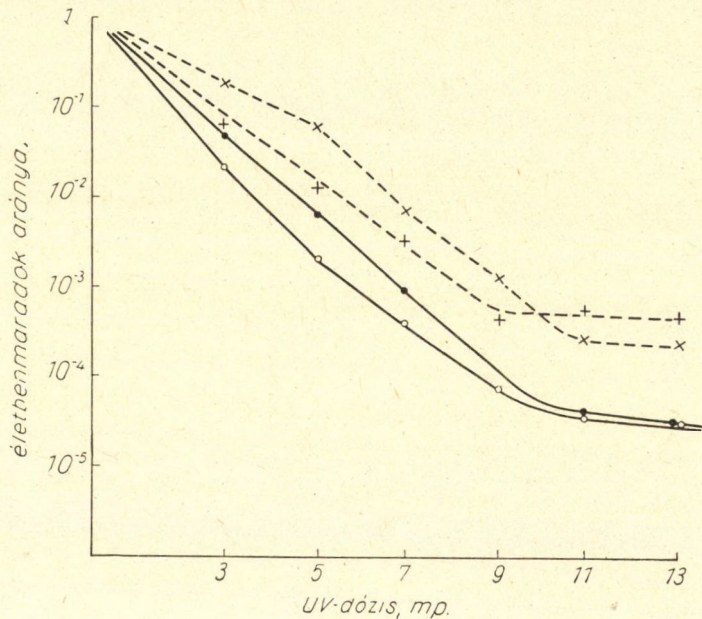


2. ábra. Az „ M ” törzs egy pigmentképző (●) és pigmenthiányos (○) variánsának életbenmaradási görbéje

állítás minden törzsnél megközelítően azonos nagyságrendű volt; a festékképzés erősségével összefüggés itt sem volt megállapítható. A „dózisredukálási tényező” (= DRF) értéke pl. az „ M ” törzs és ennek festékhányos „ M_f ” variánsa esetében, az alacsonyabb UV-dózisok terjedelmében kb. 1,7 volt. A 3. ábra bemutatja a görbék lefutását az UV-besugárzás, illetve az ezt követő fotoreaktiválódásos helyreállítás után.

Abból kiindulva, hogy a festékképző törzs nagyobb UV-rezisztenciája esetleg a prodigiosin védő hatásának köszönhető, vizsgáltuk, hogy prodigiosin-kivonat jelenlétében megváltozik-e az UV-érzékenység, a görbék lefutása. A nyers prodigiosin kivonása egyszerűen a baktériumtenyészetnek acetonsal kirázásával történt. A vákuumos bepárlás után vizes szuszpenziót készítve ezt hozzáadtuk a baktérium szuszpenzióhoz és az UV-besugárzás ilyen oldat-

ban történt.* Gyenge dózisoknál (a görbe meredeken leeső szakaszán) a prodigiosin kivonatnak módosító hatását nem lehetett észlelni, viszont az erősebb dózisoknál (a görbe ellaposodó szakaszán) már bizonyos védőhatás mutatkozott. Ez azonban a besugárzott törzs festéktartalmától szintén független volt. Hogy az ilyen kísérletekből további következtetést nemigen lehet levonni, kitűnik WHITEHEAD (1952) kísérleteiből is, aki azt tapasztalta, hogy tryptophan, cystein—HCl, thioglykolat, pyruvat stb. különböző koncentrációinak jelenlétében kivitelezett UV-besugárzáskor az észlelt „védő-

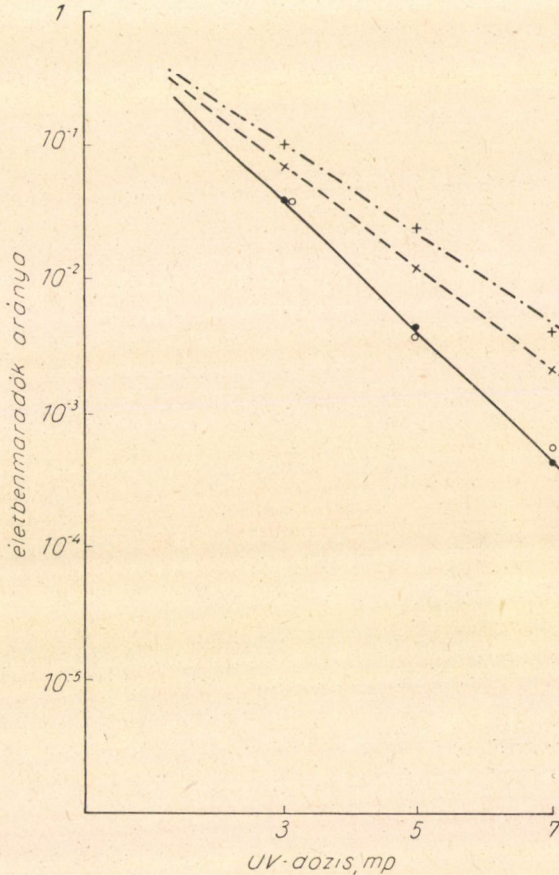


3. ábra. Az „M” törzs és egy festékhányos variánsának („Mf”) életbenmaradási görbéi közvetlen az ultrabolya besugárzás, illetve a fotoreaktiválás után. M törzs besugározva : ●, fotoreaktiválva : ×, Mf törzs besugározva : ○, fotoreaktiválva : +

hatás” egyszerű fizikai UV-elnyelésen és nem valami specifikus „biológiai” hatáson alapul. Ezért megkíséreltük a sejtekben az endogén pigmentképződést a baktériumnak megfelelő összetételű tápoldatban történő tenyésztésével fokozni, illetve csökkenteni. Régebbi tapasztalataink szerint az alanint és glycint (1—1 mg/ml) tartalmazó tápoldatban a festékképződés feltűnően erősödik. A prodigiosin-képződésnek az N-forrástól függését már WEINBERG (1951) is kimutatta. ELLINGHAUSEN és PELCZAR (1956) a *Serratia*, *Sarcina* pigmentképzését diphenylaminnal eredményesen gátolták. Kísérletünkben a 10—50—100 $\mu\text{g/ml}$ diphenylamin jelenlétében nőtt tenyészetben azonban a festékképződés erőssége nem változott. Viszont 1,5%-os NaCl-ot tartalmazó tápoldatban a festékképződés erősen csökkentődött.

* A prodigiosin szuszpenziót B. KÁRÁSZ I., ill. ECKHARDT É. voltak szívesek elkészíteni.

A 4. ábra egy típusos kísérlet eredményeit ábrázolja. Az aminosavakkal kiegészített tápoldatban növekvő sejtekben bár a festékképződés fokozódott, az UV-érzékenység változatlan maradt (egyres kísérletekben egészen kicsiny, de nem szignifikáns mértékű érzékenység-csökkenés mutatkozott). Az NaCl jelenlétében nőtt sejtekben a festékképződés erősen legyengült, viszont kifejezetten erősödött az UV-rezisztencia a kontrollhoz képest és ez a fiziológiai



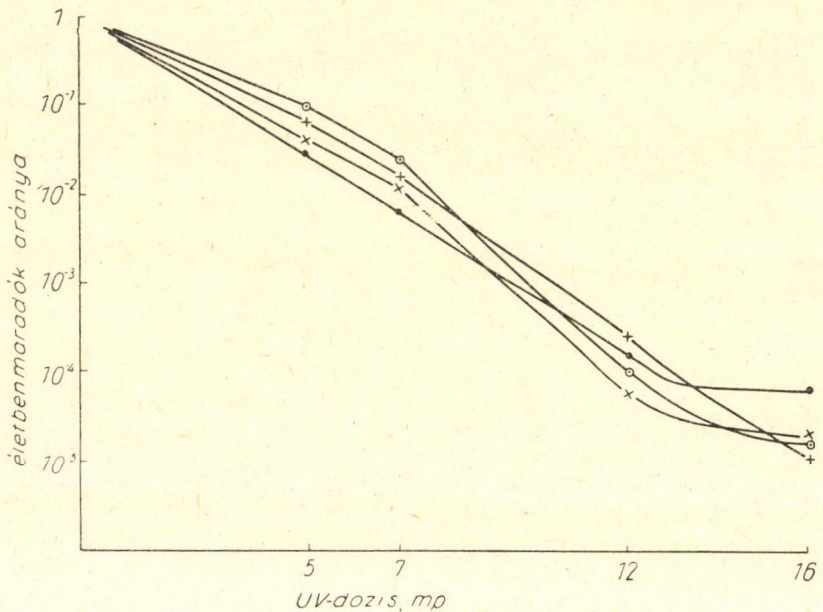
4. ábra. Különböző összetételű tápoldatokban növekedett tenyészetek életbenmaradási görbéi; M-tápoldatban ●, ua. + alanin és glycin ○, ua. + 1,5% NaCl ×, ua + NaCl + alanin + glycin +

adaptálódásos rezisztencia az NaCl+aminosavval kiegészített tenyészetekben még tovább fokozódott, annak ellenére, hogy a festékképződés lényegesen nem változott.

E kísérletekben tehát ismét nem tudtunk a prodigiosin tartalom és az UV-érzékenység között közvetlen összefüggést megállapítani. Helyesebben, a sejtek élettani-biokémiai állapota sokkal jelentősebben befolyásolja az

UV-érzékenységet, mint a festékképződés módosulása. Nemrég DURHAM (1956) mutatta ki, hogy éppen NaCl-dal lehet phaenotypusos UV-rezisztencia fokozást elérni. Az viszont már a régebbi vizsgálatokból is közismert, hogy a sejtek anyagcsere állapota, enzimaktiválása erősen módosítja az UV-érzékenységet (ROBERTS & ALDOUS, 1949; STAPLETON et al., 1955).

Ezért a következő kísérletekben különféleképpen változtattuk a tápoldat összetételét, hogy ezáltal különböző anyagcsereköztesekkel ellátott, esetleg eltérő főanyagcsere utakat felmutató, eltérő enzimaktivitású sejteknek UV-érzékenységét hasonlíthassu össze. Ezért változtattuk az N-forrásokat



5. ábra. Különböző anyagokkal kiegészített asparaginos tápoldatban növekedett tenyészetek életbenmaradási görbéi; ME-asparaginos tápoldat ●, ua. + 1,5% NaCl ×, ua. + NaCl + hydrolys. nucleinsav +, ua. + 1 µg/ml nátriumazid ▲

(ammoniumphosphat, ammoniumchlorid, ill. asparagin), a tápoldathoz külön szervessavat (citrát), élesztőkivonatot, nucleinsavhydrolysatumot adtunk; illetve nátriumazidot, amely BERGER és társai (1953) tapasztalata szerint az UV-sugárzásra érzékenységét csökkenti. Néhány eredményt az 5. ábrát mutat be.

Az asparaginos alaptápoldathoz adott 1,5%-os NaCl, és nátriumazid egyaránt csökkenti az UV-érzékenységet a gyenge dózisok területén. Viszont a nagyobb dózisoknál (10 mp-nél hosszabb besugárzások) fokozódik a sejtek inaktiválódása. Érdekes az NaCl + nucleinsav hydrolysatum jelenlétében növekedett sejtek UV-inaktiválódási görbéje, amennyiben a görbe lefutása az alaptápoldatban nőtt sejtek B-típusú görbéjével ellentétben C-típusúvá változott. Megjegyzendő, hogy az életbenmaradási (inaktiválási) görbe alak-

jának a kísérleti körülményektől függően megváltozását már ROBERTS és ALDOUS (1949), majd WEATHERWAX (1953), újabban pedig ALPER és GILLIES (1958) is megfigyelték. Ennek az érdekes megfigyelésnek a további vizsgálata folyamatban van.

Összegezve az eredményeket, a következő megállapításokat tehetjük.

1. A különféle *Serratia marcescens* törzsek, tehát a különböző genotípusok UV-érzékenysége azonos tenyésztési és besugárzási körülmények mellett jellegzetesen 3 típusba sorolható és

2. az UV-érzékenység és a pigmentképzés között összefüggést csak egyazon törzs variánsai mutatnak, azonban fotoreaktiválhatóságuk mértéke azonos.

Ezt a genotípusosan megalapozott specifikus UV-érzékenységet csak szigorúan azonos feltételek mellett lehet kimutatni, mert a sokkal tágabb határok között ingadozó phaenotípusos módosulások egészen átfedhetik.

3. Fokozottan prodigiosint képző, aminosavval kiegészített tápoldatban növekedett sejtek UV-rezisztenciája változatlan, a festékképződését csökkentő 1,5%-os NaCl mellett előnevelt sejteknél viszont fokozódik a gyenge UV-dózisokkal szembeni ellenállóképesség. Ezt a fiziológiai adaptív rezisztenciát aminosav vagy nucleinsav hydrolysatum még tovább fokozza. Sajátos módon ez a „védőhatás” a dózis fokozásával (a besugárzás idejének meghosszabbításával) megszűnik, majd pedig átcsap kifejezett „szenzitálásba”.

4. Nem általánosítható a *Serratianál* az a megállapítás, hogy az optimális növekedést biztosító tápoldatban nevelt sejteknek maximális az UV-inaktiválódása (ALPER & GILLIES, 1958). Ugyanis a kísérleteink szerint az anyagcsere erősségének és jellegzetességének megváltozása (védőhatást kifejtő, reaktiváló anyagcsereköztéseknek felhalmozódása a sejtben) nem azonos értelemben módosítja az életbenmaradási görbe alakját annak teljes lefutása mentén.

5. Bár egyes festékhányos variánsok kifejezetten UV-érzékenyebbeknek mutatkoztak, ami egybevág az irodalmi megfigyelésekkel, mégis aligha lehetséges az endogén festékképzés fokozásával a prodigiosinnak a szerepét az UV-inaktiválásban tisztázni. Ugyanis, minden esetben, amikor a tápközeg megfelelő kiegészítésével a festékképződésnek a fokozását lehet elérni, ugyanakkor a sejt egész anyagcsereje is lényegesen módosul, ami az UV-érzékenységet szintén erősen megváltoztatja. Ezért aztán nehéz a közvetlen és elsődleges okot a másodlagostól, az okozattól elkülöníteni.

6. A prodigiosin és az UV-besugárzás inaktiváló hatása közötti összefüggés megoldásához egyrészt monochromatikus UV-fénynek alkalmazása vezetne közelebb, másrészt az UV-inaktiválódási görbe teljes szakaszán, a kis és nagy dózisokra bekövetkező különféle sugárzás-sérülési típusok gyakoriságának — ALPER (1957) technikájának alkalmazásával — külön-külön figyelembevétele.

IRODALOM

- ALPER, T., 1957. Adv. Radiobiol. 90—96. — Observations on bacterial growth and morphology shortly after irradiation and some remarks on the oxygen effect.
- ALPER, T., & GILLIES, N. E., 1958. J. Gen. Microbiol. 18: 461—72. — „Restoration” of *Escherichia coli* strain B after irradiation: its dependence on suboptimal growth conditions
- BERGER, H., HAAS, F. L., WYSS, O. & STONE, W. S., 1953. J. Bacter. 65: 538—43. — Effect of sodium azide on radiation damage and photoreactivation.
- DURHAM, N. N. & WYSS, O., 1956. J. Bacter. 72: 95—100. — An example of non-inherited radiation resistance.
- ELLINGHAUSEN, H. C. & PELCZAR, M. J., 1956. Bacter. Proc.: 57. — The effect of diphenylamine on pigment production by *Neisseria*.
- GOUCHER, C. R., KAMEI, I. & KOCHOLATY, W., 1956. J. Bacter. 72: 184—88. — Ultraviolet inactivation and photoreactivation of *Azotobacter*.
- GUNTER, S. & KOHN, M. I. 1956. J. Bacter. 71: 571—81. — The effect of X-rays on the survival of bacteria and yeasts.
- HOLLAENDER, A., STAPLETON, E. G. & MARTIN, F. L. 1951. Nature 167: 103—04. — X-ray sensitivity of *E. coli* as modified by oxygen tension.
- KAPLAN, R. W., 1948. Z. Naturforschg. 3b: 29—35. — Ultraviolett-Mutabilität bei *Bacterium prodigiosum*.
- KELNER, A., 1949. J. Bacter. 58: 511—22. — Photoreactivation of ultraviolet-irradiated *Escherichia coli* with special reference to the dose-reduction principle and to ultraviolet-induced mutation.
- LABRUM, E. L. & BUNTING, M. I., 1953. J. Bacter. 65: 394—404. — Spontaneous and induced color variation of the HY strain of *Serratia marcescens*.
- ROBERTS, R. B. & ALDOUS, E., 1949. J. Bacter. 57: 363—75. — Recovery from ultraviolet irradiation in *Escherichia coli*.
- STAPLETON, G. E., SBARRA, A. J., & HOLLAENDER, A., 1955. J. Bacter. 70: 7—14. — Some nutritional aspects of bacterial recovery from ionizing radiations.
- SWART-FÜCHTBAUER, H., 1957. Arch. Mikrobiol. 26: 132—150. — Zur Strahlenresistenz pigmentierter Bakterien.
- WEATHERWAX, R. S., 1956. J. Bacter. 72: 329—32. — Reactivation of ultraviolet-irradiated *Escherichia coli*.
- WEINBERG, E., 1951. J. Bacter. 62: 785—92. — The influence of antibiotics and aminoacids on the production of pigment by *Serratia*.
- WHITEHEAD, H. A., 1952. Science 116: 459—60. — The protection of bacteria against radiation effects.
- ZELLE, M. R. & HOLLAENDER, A., 1950. Radiation Biology 2: 365—430. — Effects of radiation on bacteria.