

Министерство образования и науки Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра генетики

**КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ  
ЭКСТРАКТА АНТОЦИАНОВОЙ КУКУРУЗЫ ЛИНИИ ПУРПУРНАЯ  
САРАТОВСКАЯ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студента 2 курса 221 группы

направления подготовки 06.04.01 Биология

биологического факультета

Рогожина Вадима Владимировича

Научный руководитель

Доцент кафедры генетики, к.б.н



Ю.А. Беляченко

Научный консультант

Профессор кафедры общей биологии  
фармакогнозии и ботаники СГМУ  
им. В.И. Разумовского, д.б.н.



Н.В. Полуконова

Заведующий кафедрой генетики,  
д.б.н., доцент



О.И. Юдакова

Саратов 2018

**Введение.** Экстракт антоциановой формы кукурузы *Zea mays* L. перспективен как принципиально новый красный краситель для фармацевтической и пищевой промышленности. Преимуществами сырья антоциановой формы кукурузы служат устойчивость получаемого красителя, а также то, что, как было установлено, водно-спиртовой экстракты антоциановой формы кукурузы нетоксичны и не обладают канцерогенной и мутагенной активностью. Известно, что экстракт антоциановой кукурузы содержит целый комплекс биологически-активных веществ и обладает выраженным антимикробным действием в отношении тест-штаммов синегнойной палочки и стафилококка.

Целью настоящей работы было проведение количественной оценки антимикробной активности экстракта антоциановой кукурузы в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

1. Провести предварительную качественную и количественную характеристику действия экстракта в отношении *Escherichia coli* 113-13 и *Staphylococcus aureus* 209P при различных его концентрациях;
2. Исследовать эффективность действия экстракта при культивировании различных представителей рода *Yersinia* (*Y. enterocolitica* 81-79, *Y. pestis* EV, *Y. pseudotuberculosis* III);
3. Провести сравнительную количественную оценку степени влияния экстракта на рост пяти различных штаммов *Vibrio cholera* O1 (682, 1104, M-1329, M-1282, M-1326), выделенных из разных источников;
4. Сравнить эффективность различных вариантов воздействия экстракта на *Nag vibrio* серовара Инаба по стандартной и модифицированной методике – с предварительным настаиванием суспензии микробных клеток в среде с добавлением экстракта при комнатной температуре;

5. Количественная оценка действия экстракта на *Salmonella typhi* 49 и группу штаммов *Streptococcus viridians* по модифицированной методике с предварительным настаиванием при комнатной температуре.

Выпускная квалификационная работа состоит из 6 разделов: введения, обзора литературы, экспериментальной части, заключения, выводов, списка использованных источников.

**Основное содержание.** В качестве источника флавоноид-содержащего растительного сырья в нашей работе использовалась антоциановая форма кукурузы линии Пурпурная Саратовская (ПС), созданная на основе американской линии Пурпурный тестер (ПТ) и содержащая доминантные гены маркера «коричневый Саратовский». Линия ПТ является позднеспелой и, поэтому, недостаточно хорошо адаптирована к климатическим условиям Саратовской области. Для получения более скороспелой линии исходная линия ПТ была скрещена со скороспелой линией селекции Отдела генетики СГУ (ГПЛ-1), а полученный гибрид и его потомство в дальнейшем самоопылялись. Из него выделены скороспелые формы, родоначальники линий с генотипом А1 В Р1 R, которые получили названия ПС-1, ПС-2 и т.д. (Пурпурные Саратовские).

Эксперимент, направленный на предварительную качественную оценку действия экстракта антоциановой кукурузы на два используемых в нашей работе тест-штамма микроорганизмов проводился на суточной культуре бактерий, выращиваемой в пробирках на МПБ. Учет результатов проводился на основе визуального сравнения степени помутнения культуральной среды в опытных вариантах по сравнению с контролем.

При сравнении серий экспериментов для разных штаммов, направленных на количественную оценку роста колоний, в целом, следует отметить большую интенсивность роста стафилококка по сравнению с кишечной палочкой (при этом в экспериментах со стафилококком отмечается в 20-200 раз большее число колоний). Это может быть связано с

относительно большей устойчивостью данного штамма к антимикробному действию экстракта антоциановой кукурузы.

Несмотря на отмеченное различие в росте двух тест-штаммов, для обоих объектов характерна общая закономерность в проявлении количественных характеристик роста при воздействии разных концентраций экстракта. С увеличением концентрации экстракта отмечается большая эффективность его антибактериального действия. При наименьшей из исследованных нами в количественной работе концентраций экстракта – 1 мг/мл действие экстракта оказывается неэффективным, что хорошо согласуется с предварительно проведенными экспериментами с качественной оценкой действия экстракта.

Концентрация экстракта, равная 2 мг/мл, вероятно является близкой к пограничному значению, начиная с которого антимикробный эффект экстракта начинает проявлять себя в той или иной степени в зависимости от исследуемого штамма и особенностей проведения эксперимента.

При концентрациях от 3 до 6 мг/мл происходит значительное подавление роста бактерий, этот эффект становится более выраженным с ростом концентрации экстракта. При этом в экспериментах с *E.coli* концентрация экстракта, равная 3 мг/мл оказывается в 2 и более раз менее эффективной, по сравнению с более высокими его концентрациями. Для *St. aureus* зависимость степени выраженности антимикробного действия экстракта от его концентрации является более сглаженной, что, вероятно, может быть следствием относительно большей устойчивости данного тест-штамма к действию экстракта.

В серии экспериментов со штаммом *Yersinia pestis* EV на чашках Петри, как в контрольной группе, так и в исследуемых образцах отмечался сплошной рост микроорганизмов по всей поверхности чашки, что указывает на неэффективность экстракта в отношении данного штамма. В случае штамма *Yersinia enterocolitica* 81-79 в контроле роста так же отмечался сплошной рост, но, тем не менее, в испытуемых образцах был замечен более

слабый рост микроорганизмов, о чём свидетельствовала меньшая площадь газона, по сравнению с контрольной группой. На основании этих результатов можно сделать вывод о низкой эффективности экстракта в отношении данного штамма.

Для штамма *Yersinia pseudotuberculosis III* в данном эксперименте в контроле роста так же наблюдался сплошной рост, в то время как в трёх из пяти испытуемых образцах площадь роста микроорганизмов была меньше. В целом, результаты опыта с *Yersinia pseudotuberculosis III* схожи с таковыми у *Yersinia enterocolitica 81-79*, что указывает на незначительную эффективность экстракта в отношении этих штаммов. В то же время результаты отличаются от таковых у *Yersinia pestis EV*, на основании чего можно сделать предположение о специфичности действия экстракта по отношению к разным штаммам микроорганизмов.

Несмотря на сплошной рост микроорганизмов в виде газона, не представляющий возможности проводить количественный учёт классическим методом подсчёта колоний, всё же удалось обнаружить разницу между исследуемыми образцами и контрольной группой, и сделать соответствующие выводы. Таким образом, в дальнейших экспериментах рекомендуется более сильное разведение микробной взвеси перед посевом во избежание сплошного роста для проведения количественной оценки роста микроорганизмов.

Обобщенные результаты серии экспериментов со штаммами *Vibrio cholerae O1* представлены на рисунке 1. Приведены средние значения количества колоний микроорганизмов, полученные в результате обработки результатов трех повторностей каждого эксперимента. Для всех исследованных штаммов в опытных вариантах отмечалось меньшее число колоний, чем в контрольных. Средние значения в опыте для разных штаммов варьировали от 233 до 573 КОЕ, а в контроле – от 309 до 661 КОЕ. Наибольшая разница между числом колоний в опыте по сравнению с контролем наблюдалась у штамма 682.

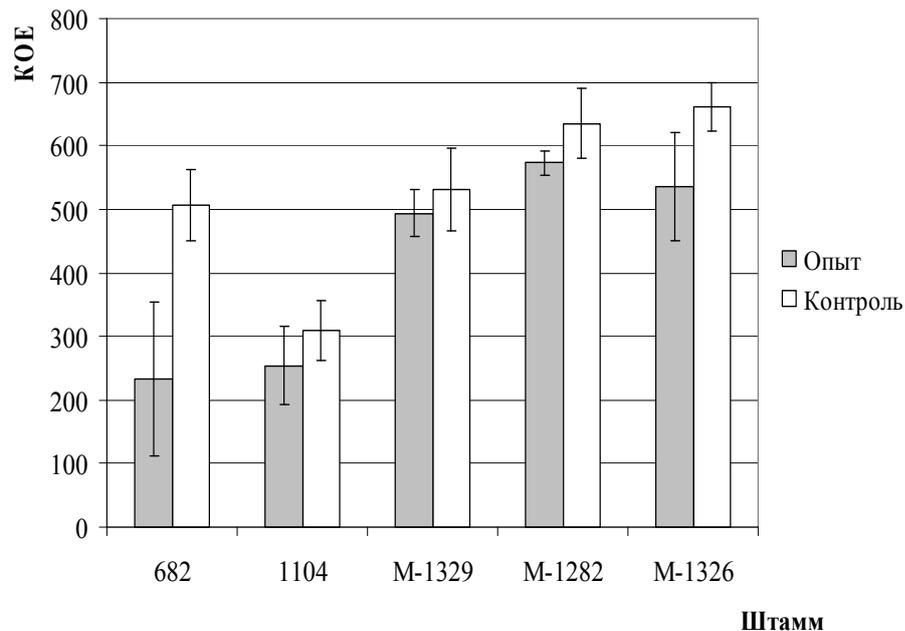


Рисунок 1 – Средние значения количества колоний у штаммов *V. cholerae* O1

На рисунке 2 показано относительное уменьшение количества колоний в опыте по сравнению с контролем. Диаграмма позволяет сравнить эффективность действия экстракта в отношении исследуемых тест-штаммов.

В результате проведенной оценки антимикробной активности экстракта в отношении пяти штаммов *Vibrio cholerae* O1, можно сделать вывод о различиях в степени подавления роста микроорганизмов под действием композиции биологически активных веществ экстракта у разных штаммов. Отмечена наибольшая эффективность в отношении штаммов № 682 и 1104, что свидетельствует о более высокой чувствительности к действию экстракта у данных штаммов, в то время как № M-1329, M-1282, M-1326 оказались более стойкими к его действию. Поскольку исследуемые микроорганизмы характеризуются высокой стойкостью к антимикробным средствам, перспективно применение экстракта для подавления роста наиболее чувствительных к нему штаммов холеры.

Результаты экспериментов, направленных на изучение антимикробного действия экстракта в отношении штамма *S. typhi* 49, *Nag vibrio* серовара Инаба, группу штаммов *Str. viridans* представлены на рисунке 2.

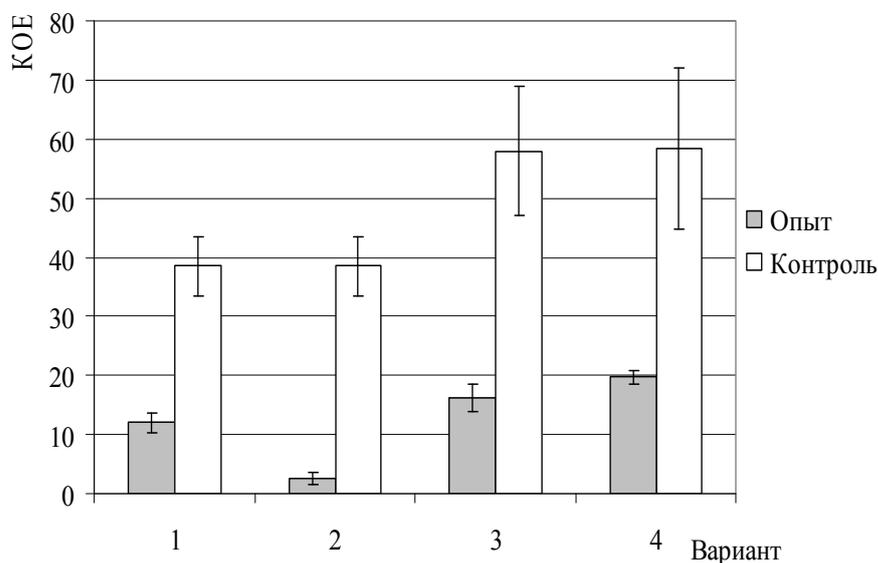


Рисунок 2 – Средние значения количества колоний в экспериментах с *NAG vibrio* (1 – без настаивания, 2 – с настаиванием), *S. typhi* (3), *Str. viridans* (4)

Характерной особенностью рассматриваемых экспериментов с указанными объектами является специфическая модификация методики проведения эксперимента, которая заключалась в предварительном настаивании микробной взвеси с экстрактом в течение 3 ч при комнатной температуре перед ее высевом на чашку Петри. При этом с *NAG vibrio* были проведены две специальные серии экспериментов, одна из которых не предполагала предварительного настаивания микробной взвеси. Данные серии экспериментов были направлены на проверку предположения о значимости подобной модификации эксперимента.

В рамках обсуждения результатов серии экспериментов с *NAG vibrio* серовара Инаба, прежде всего, следует отметить, что общий рост колоний, в том числе, и в контрольной группе, был значительно меньше, чем в экспериментах с другими объектами, что, очевидно, связано с естественными особенностями роста бактерий.

В серии экспериментов с *NAG vibrio* серовара Инаба без предварительного настаивания микробной взвеси с экстрактом абсолютного подавления роста штамма не отмечено. В рассматриваемой серии экспериментов воздействие экстракта в большинстве опытных образцов (17 из 24 повторностей) характеризуется как умеренная чувствительность (выраженная количественно в виде роста 10-20 колоний) исследуемого штамма, а в ряде случаев штамм оказывается чувствительным (менее 10 колоний в 7 повторностях). Количество колоний в контроле варьировало от 32 до 45.

Ключевой особенностью эксперимента с предварительным настаиванием взвеси бактерий с экстрактом при комнатной температуре является тот факт, что в 8 из 24 повторностей эксперимента в опытных образцах отмечалось абсолютное подавление роста микроорганизмов. В остальных повторностях опыта было отмечено от 1 до 8 колоний (при количестве колоний в контроле от 32 до 45). Полученные результаты свидетельствуют о крайне высокой чувствительности бактерий к экстракту в рамках данной модификации методики проведения эксперимента, и перспективности его применения в качестве ингибитора роста данного штамма.

Проведенные с *NAG vibrio* серовара Инаба эксперименты позволяют сделать вывод об эффективности предварительного выдерживания бактериальной взвеси с добавлением экстракта при комнатной температуре в течение 3 ч. Дальнейшие эксперименты с *S. typhi* и *Str. viridans* были проведены с учетом данного обстоятельства.

Для штамма *S. typhi* 49 характерно значительное подавление роста микроорганизмов под действием экстракта по сравнению с контрольной группой. В данном случае в 17 из 24 повторностей эксперимента исследуемые штаммы сальмонелл оказались чувствительными к действию экстракта (рост 10-16 колоний), в то время как устойчивости ни в одной повторности не наблюдалось. Максимальное число колоний в эксперименте

составило 27 (в одной повторности), в остальных повторностях количество колоний не превышало 24. При этом количество колоний в контроле находилось в диапазоне от 55 до 63 КОЕ. Следует отметить, что в экспериментах с *S. typhi* 49, в отличие от аналогичной серии экспериментов с *NAG vibrio* серовара Инаба, абсолютного подавления роста не отмечалось, что свидетельствует о большей устойчивости данного микроорганизма к действию экстракта.

Результаты серии экспериментов, проведенных в отношении группы штаммов *Str. viridans*, высеянных с мазка из зева человека, при сравнении средних значений свидетельствуют о несколько меньшей эффективности действия экстракта на данную группу штаммов по сравнению с *S. typhi* 49. При сходстве средних значений количества колоний микроорганизмов в контроле, таковое в опыте для *Str. viridans* (20 КОЕ) оказывается больше значения для *S. typhi* (16 КОЕ). При этом максимальное число колоний в опытных образцах в данном случае не превышает 24 (минимальное – 15 КОЕ). Значения количества колоний в разных повторностях контроля варьировали от 53 до 64.

Учитывая тот факт, что, аналогично двум предыдущим сериям экспериментов, смесь микробной взвеси и экстракта перед высевом на твердую питательную среду настаивалась в течение 3 ч при комнатной температуре, можно предположить, что для *Str. viridans* и *S. typhi* указанное время является недостаточным для достижения максимального антимикробного эффекта в отношении изучаемых штаммов.

На рисунке 3 представлено относительное изменение количества колоний в опыте по сравнению с контролем. В целом, следует отметить, что для всех исследованных штаммов отмечается значительное подавление роста под действием экстракта. Средняя величина эффекта действия экстракта на исследуемые микроорганизмы составляет 66-93%.

Особое внимание следует обратить на *Nag vibrio* серовара Инаба – единственный представитель из всех исследованных микроорганизмов, у

которого наблюдалось абсолютное подавление роста в ряде повторностей, что свидетельствует о его наибольшей уязвимости к действию экстракта.

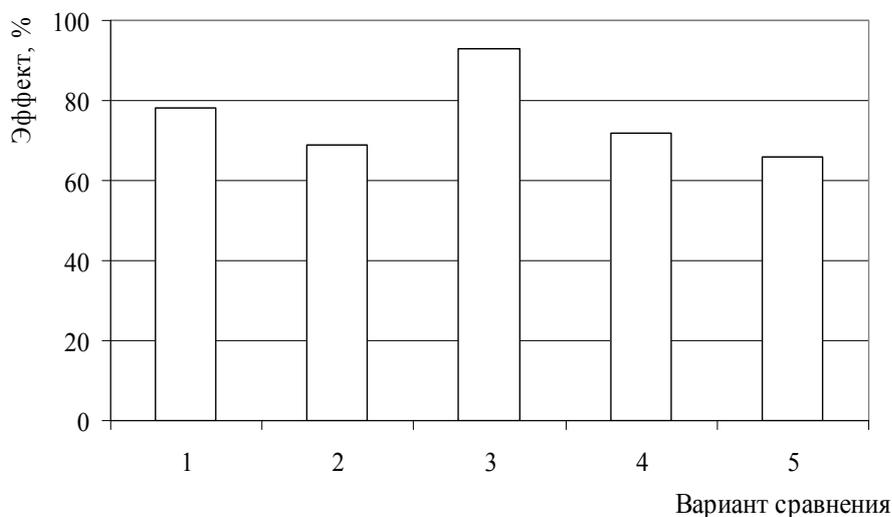


Рисунок 3 – Относительное снижение среднего количества колоний при действии экстракта у *NAG vibrio* в опытном варианте с настаиванием по сравнению с вариантом без настаивания (1), в опыте по сравнению с контролем: у *NAG vibrio* без настаивания (2) и с настаиванием (3), в вариантах с настаиванием у *S. typhi* (4), *Str. viridans* (5)

Также необходимо отметить, что настаивание микробной взвеси с добавлением экстракта перед высевом на твёрдую питательную среду в течение 3 ч при комнатной температуре способно существенно отражаться на эффективности действия экстракта на бактерии. При этом эффективность действия экстракта в модификации эксперимента с настаиванием для *NAG vibrio* увеличивается на 78% относительно варианта эксперимента без настаивания. При этом относительные изменения числа колоний в опыте по сравнению с контролем составляют в серии экспериментов с настаиванием – 93%, без настаивания – 69%. Аналогичные значения для *S. typhi* и *Str. viridans* – 72 и 66% соответственно.

Различия между опытными и контрольными вариантами достоверны для всех рассматриваемых объектов.

**Заключение.** В результате проведённой работы было установлено, что экстракт антоциановой кукурузы линии Пурпурная Саратовская в концентрациях 3-6 мг/мл проявляет значительную антимикробную активность в отношении двух условно-патогенных тест-штаммов микроорганизмов (*E. coli* и *St. aureus*). При этом отмечается прямая зависимость величины антимикробного эффекта от концентрации экстракта, его действие наиболее эффективно при 6 мг/мл (в исследуемом диапазоне концентраций от 1 до 6 мг/мл). Наименьшая из используемых в нашей работе концентраций (1 мг/мл) не приводит к подавлению роста указанных тест-штаммов.

Исследование эффективности действия экстракта в отношении ряда патогенных микроорганизмов (*Y. enterocolitica* 81-79, *Y. pestis* EV, *Y. pseudotuberculosis* III, *V. cholerae* O1 682, 1104, M-1329, M-1282 и M-1326, *Nag Vibrio* серовара Инаба, *S. typhi* 49, и группы штаммов *Str. viridans*) свидетельствует о различиях в степени чувствительности разных объектов к действию экстракта. Наибольшая эффективность действия экстракта наблюдалась в экспериментах с *Nag Vibrio* серовара Инаба.

Следует отметить, что разработанная изначально методика приготовления экстракта не предусматривала строгого соблюдения стерильности в ходе его приготовления и фильтрации водного раствора готового экстракта через специальную насадку для шприца, однако, именно за счёт этих условий обеспечивается его абсолютная микробиологическая чистота.

В экспериментах с 5 штаммами *V. cholerae* O1 были отмечены различия в степени проявления бактериостатического эффекта экстракта между разными штаммами. В связи с этим можно предположить, что некоторые свойства, определяющие специфичность различных штаммов, также способны модифицировать их чувствительность к действию экстракта.

Также в экспериментах с *Nag Vibrio* серовара Инаба было показано повышение эффективности действия экстракта в случае предварительного

выдерживания бактериальной взвеси с экстрактом при комнатной температуре в течение 3 ч. Предложенная модификация методики воздействия экстракта на микроорганизмы способна значительно повысить эффективность его действия (в случае *Nag Vibrio* серовара Инаба – на 78%).

Полученные данные об антимикробном действии экстракта в отношении условно-патогенных и патогенных штаммов, свидетельствуют о целесообразности продолжения изучения его бактерицидных и бактериостатических свойств на других микроорганизмах, в том числе, возбудителях особо опасных инфекций.

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Экстракт антоциановой кукурузы линии Пурпурная Саратовская способен проявлять антибактериальное действие в отношении условно-патогенных (*Escherichia coli* 113-13 и *Staphylococcus aureus* 209P) и патогенных (*V. cholerae* O1 штаммов 682, 1104, М-1329, М-1282 и М-1326, *Nag Vibrio* серовара Инаба, *S. typhi* 49, группы штаммов *Str. viridans*) штаммов микроорганизмов.

2. Антибактериальный эффект экстракта обнаруживается при его концентрациях не ниже 2-3 мг/мл. Различные концентрации экстракта подавляют рост тест-штаммов в разной степени – чем выше концентрация экстракта, тем более эффективно его противомикробное действие.

3. Величина бактериостатического эффекта зависит от штамма микроорганизмов и особенностей методики воздействия экстракта.

4. Стерильность экстракта достигается асептическими условиями его приготовления и применением стерильных фильтровальных насадок для шприца непосредственно перед его использованием.

5. Наибольшей эффективностью сопровождается предварительное настаивание микробной взвеси с добавлением экстракта в течение 3 ч при комнатной температуре.

*В.Роч.*