



всех популяциях равнялась нулю, как и тот факт, что уровень семенной продуктивности в год с аридными условиями резко снижался, могут указывать на то, что на юго-восточной границе ареала именно по причине аридности условий существования растения вида, в целом по ареалу характеризуюсь выраженностью апомиктического пути воспроизводства, переходят на облигатно-амфимиктический путь формирования семян.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 08-04-00319).

#### Список литературы

1. Иконников С.С. Кошачья лапка – *Antennaria* Gaertn. // Флора европейской части СССР: В 12 т. СПб., 1994. Т.7. С.92–94.

2. Березуцкий М.А., Серова Л.А. Кошачья лапка двудомная – *Antennaria dioica* (L.) Gaertn. // Красная книга Саратовской области: Грибы. Лишайники. Растения. Животные. Саратов, 2006. С.224–225.

3. Herr J.M. A new clearing squash technique for the study of ovule development in angiosperms // Amer. J. Bot. 1971. Vol.58. P.785–790.

4. Наумова Т.Н. Апомисия // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т.3. Системы репродукции. СПб., 2000. С.146–151.

5. Хохлов С.С., Зайцева М.И., Куприянов П.Г. Выявление апомиктических форм во флоре цветковых растений СССР. Саратов, 1978. 224 с.

6. Bayer R.J., Stebbins G.L. Distribution of sexual and apomictic populations of *Antennaria parlinii* // Evolution. 1983. Vol.37. P.305–319.

7. Bierzychudek P. Patterns in plant parthenogenesis // Experimentia. 1985. Vol.41. P.1255–1264.

8. Carman J.G. Gametophytic angiosperm apomicts and the occurrence of polyspory and polyembryony among their relatives // Apomixis Newsletter. 1995. №8. P.39–53.

УДК 28.4 я 73

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНТИОКСИДАНТОВ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ БАКТЕРИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ СТРЕССОВЫХ АБИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Н.Ф. Пермякова, О.В. Нечаева\*, А.Н. Кушнаренко

Саратовский государственный университет

E-mail: francissella@rambler.ru

\* Саратовский государственный медицинский университет



В работе показано влияние синтетического соединения, обладающего антиоксидантной активностью, на повышение выживаемости грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, подвергнутых стрессовому воздействию различных абиотических факторов.

**Ключевые слова:** антиоксиданты, выживаемость микроорганизмов, стрессовое воздействие.

**Using Syntetically Antyoxidants for Keeping Bacterium Vitality with Stress Abioethics Factors Activity**

N.F. Permyakova, O.V. Nechaeva, A.N. Kushnarenko

The influence of syntetical compound with antioxidative activity on increaseing of vitality gram-positive and gram-negative microorganisms under stressful action of antibiotal factors was shown.

**Key words:** antioxidants, vitality microorganisms, stressful action.

Клетки микроорганизмов, находящиеся как в естественных, так и в лабораторных условиях, подвергаются влиянию различных

абиотических факторов. Такое воздействие приводит к гибели части клеток или изменению их генетического материала. В основном это происходит за счет образования активных форм кислорода (АФК), которые повреждают различные мишени клеток (мембраны, нуклеиновые кислоты и т.п.). В нормально функционирующих клетках содержание продуктов свободнорадикального окисления находится на крайне низком уровне, что свидетельствует о достаточно мощной собственной антиоксидантной защитной системе. У бактерий в качестве антиоксидантов (АО) выступает ряд ферментов: супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионредуктаза, пероксидаза, цитохромоксидаза. Однако при действии стрессовых факторов собственные



антиокислительные системы клетки не способны инактивировать АФК [1]. Поэтому для поддержания жизнеспособности микроорганизмов, находящихся в условиях стресса, необходимо дополнительное использование антиоксидантов. В последнее время для этих целей применяют синтетические соединения, обладающие антиоксидантной активностью, которые имеют различную химическую природу.

Ранее в наших работах был обоснован выбор синтетических АО по их антиоксидантной и антифаговой активности, охарактеризованы наиболее перспективные для микробиологической практики вещества, для которых показана локализация на поверхностных структурах бактериальных клеток [2–5].

Целью настоящей работы явилось изучение роли синтетических антиоксидантов в защите грамположительных и грамотрицательных бактериальных клеток при различных стрессовых воздействиях абиотических факторов.

#### Материалы и методы

В работе использовалось гетероциклическое соединение, по химической структуре относящееся к группе кетонов, – диметилциклогександион, которое было синтезировано на кафедре органической и биорганической химии и НИИ химии Саратовского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского. Предварительное тестирование данного вещества по антифаговой и антиоксидантной активности показало, что оно обладает низкой биологической агрессией и характеризуется по отношению к бактериофагу Т 4 как индифферентное вещество (% выживаемости фага – 104) и высокой (2.77) антиоксидантной активностью (1.6).

В качестве экспериментальной модели использовали клетки *Escherichia coli* 58 и *Staphylococcus aureus* 209 P, выращенные на плотной питательной среде (агар Хоттингера, рН 7.2) при 37°C в течение 24 часов. Суточную культуру засеивали в жидкую питательную среду (бульон Хоттингера, рН 7.2) и помещали в термостат на 2 часа при температуре 37°C для получения контрольного результата. Для получения опытного резуль-

тата в одну пробирку вносили исследуемый АО в концентрации 25 мкг/мл, а в другую – 0.1% растворитель АО – диметилсульфоксид (ДМСО). Посевы микроорганизмов подвергали действию стрессовых факторов, в качестве которых нами были выбраны замораживание – оттаивание (действие температуры –18°C в течение 1 часа и 1 суток) и УФ-излучение (режимы облучения – 1 и 5 минут). Выбор в качестве стрессового воздействия «переход бактерий в состояние анабиоза под действием низких температур с последующим оттаиванием» был обусловлен, прежде всего, тем, что хранение при низких температурах является одним из основных способов поддержания коллекционных культур микроорганизмов, а стрессовое действие УФ-излучения микроорганизмы испытывают в естественных условиях обитания. После проведенных манипуляций производили посев 0.1 мл взвеси микроорганизмов на чашки Петри с плотной питательной средой (агар Хоттингера, рН 7.2) и инкубировали в термостате в течение 24 часов при 37°C. Для учета результата подсчитывали количество колоний в опытных и контрольных образцах и определяли процент выживаемости клеток по формуле  $A = \frac{N_o}{N_k} \times 100\%$ , где  $N_o$  – количество колоний в опыте,  $N_k$  – количество колоний в контроле.

#### Результаты исследований и их обсуждение

Результаты по влиянию диметилциклогександиона на выживаемость бактерий в условиях стресса представлены в таблице.

Анализ полученных данных показал, что к действию УФ-излучения более чувствительны клетки грамотрицательной *E. coli*, чем пигментообразующие грамположительные клетки *S. aureus*. Однако увеличение длительности воздействия снижало количество выживших клеток в контроле. Результаты с использованием ДМСО недостоверно отличались от контроля. В то же время внесение в среду культивирования бактерий синтетического АО сопровождалось увеличением числа жизнеспособных клеток и не зависело от длительности действия УФ-излучения.



Влияние диметилциклогександиона на выживаемость клеток *E. coli* и *S. aureus*, стрессированных действием абиотических факторов

Экспериментальные модели	% выживаемости клеток			
	УФ-излучение		Замораживание	
	1 мин	5 мин	1 ч	1 сут
<i>E. coli</i> 58 (контроль 1)	11±1.2	5.8±0.8	5±0.4	1.5±0.1
<i>E. coli</i> 58+ ДМСО	9.6±1.8	4.3±0.2*	6.5±0.7*	1.5±0.3
<i>E. coli</i> 58+ АО	16±2.1*	17±1.9*	20.7±2.4*	12.7±1.2*
<i>S. aureus</i> 209 P (контроль 2)	17.3±1.4	14.7±1.7	4.3±0.5	2.1±0.4
<i>S. aureus</i> 209 P+ ДМСО	20.5±1.6*	19.3±2.2*	6.2±1.2*	3.5±0.7*
<i>S. aureus</i> 209 P+ АО	32.8±2.4*	28.6±2.7*	18.9±2.3*	14.3±1.4*

\* Наличие достоверности при уровне значимости  $p < 0,05$  по отношению к контролю.

Изучение морфологических особенностей клеток *E. coli* 58 на фоне действия абиотических факторов позволило выявить изменения в популяционном составе. В мазке полиморфной культуры после стрессового действия замораживание – оттаивание наблюдалось большое число клеток с измененной морфологией (коккоподобные формы, клетки с бифуркацией и разрушенные). При внесении в среду культивирования исследуемого синтетического антиоксиданта отмечено сохранение большинством клеток исходной морфологии (однотипные удлинённые палочки).

Анализ полученных данных показал, что внесение в состав среды культивирования исследуемого соединения в условиях действия УФ-излучения приводило к повышению выживаемости *E. coli* 58 в 1.4–2.9 раза (в зависимости от длительности действия стрессового фактора), а *S. aureus* 209 P – в 1.9 раза по сравнению с контролем.

Действие стрессового фактора, связанного с замораживанием – оттаиванием, сопровождалось угнетением жизнеспособности как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий. При этом процент выживших клеток зависел от длительности пребывания в замороженном состоянии. Внесение в среду культивирования бактерий ДМСО незначительно повышало устойчивость клеток. Применение в аналогичных условиях

синтетического АО способствовало сохранению большего числа жизнеспособных клеток и грамотрицательных, и грамположительных бактерий. В условиях стрессового действия низких температур выживаемость *E. coli* возрастала в 4.1–8.5 раза, а *S. aureus* – в 4.4–6.8 раза (соответственно длительности действия) по сравнению с контролем.

Таким образом, диметилциклогександион, применяемый нами в качестве синтетического АО, повышал жизнеспособность микроорганизмов в условиях стрессовых воздействий различного характера. Полученные результаты позволяют считать использование синтетических антиоксидантов перспективным для консервации широкого профиля биологических объектов; для сохранения морфологических и биохимических характеристик вакцинных штаммов и штаммов-продуцентов биологически активных веществ. Применение синтетических АО даст возможность повысить эффективность, безопасность и экономичность функционирования специализированных коллекций микроорганизмов.

Список литературы

1. Архипова О.Т. Определение хемилюминесценции в сыворотке крови // Методы исследования в профпатологии. М., 1988. 32 с.
2. Новикова (Нечаева) О.В., Григорьев А.В., Виноградова Н.А., Плотников О.П., Тихомирова Е.И., Коннов Н.П. Применение синтетических антиоксидантов циклического ряда при консервации бактериальных штаммов методом лиофилизации // Изв. Саратов. ун-та. Сер. биологическая. Саратов, 2001. С.148–154.
3. Новикова (Нечаева) О.В., Корсуков В.Н., Виноградова Н.А., Попов Ю.А., Плотников О.П. Определение локализации синтетических антиоксидантов в клетках чумного микроба с использованием электрофореза в свободном потоке // Молодежь и наука на пороге XXI века: Тез. докл. регион. науч. конф. Саратов, 1998. С.90–91.
4. Новикова (Нечаева) О.В., Плотников О.П. Изучение антиоксидантных свойств циклических соединений и использование их в составе сред стабилизации при хранении бактерий в лиофилизированном состоянии // Проблемы общей биологии и прикладной экологии: Сб. тр. молодых ученых. Саратов, 1997. Вып.2/3. С.12–15.
5. Плотников О.П., Шведун Г.П., Гусева И.В. Влияние целлюлозы микрокристаллической, декстрана, ДЭАЭ-целлюлозы и антиоксидантов (феноксана, анфена) на жизнеспособность клеток при лиофилизации *Y. pestis* EV НИИЭГ // Проблемы особо опасных инфекций. 1993. №1–2. С.87–96.