



Биолог. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 581.3

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННОЙ КУЛЬТУРЫ ЖИВУЧКИ ЖЕНЕВСКОЙ *AJUGA GENEVENSIS* L.

Н.Ж. СААКЯН, М.Т. ПЕТРОСЯН, ДЖ.А. АГАДЖАНИЯН

Ереванский государственный университет, кафедра микробиологии и биотехнологии микроорганизмов и растений, E-mail:physiol@ysu.am

Исследована антимикробная активность экстрактов изолированной культуры *Ajuga genevensis* L. в отношении различных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, как непатогенных, так и патогенных и условно патогенных. Дана зависимость антибактериальной активности от цикла роста культуры, степени ее дифференциации, гормонального состава питательной среды, способа экстракции.

Ուսումնասիրվել է *Ajuga genevensis* L.-ի մեկուսացված կուլտուրայի լուծամզվածքների հակաբակտերիական ակտիվությունը մի շարք գրամ-դրական և գրամբացասական, ինչպես ոչ ախտածին, այնպես էլ՝ ախտածին ու պայմանական ախտածին միկրոօրգանիզմների նկատմամբ: Տրվել է հակաբակտերիական ակտիվության կախվածությունը կուլտուրայի աճի ցիկլից, դիֆերենցիան ապտիճանից, սննդամիջավայրի հորմոնային կազմից և լուծամզվածքի ստացման եղանակից:

The antibacterial activity of extractions of isolated culture of *Ajuga genevensis* L. toward both grampositive and gramnegative pathogenic, nonpathogenic and conditionally pathogenic microorganisms was investigated. Dependence of antibacterial activity on the growth cycle of culture, level of its differentiation, hormonal composition of nutrient medium and extraction mode was established.

Ajuga genevensis - изолированная культура – каллус - мериклон,
питательная среда - антибактериальная активность

Растительный мир хранит огромные запасы биологически активных веществ, которые относятся к продуктам вторичного метаболизма. Но обеспечить потребности общества в этих соединениях за счет сбора и переработки дикорастущих растений, многие из которых являются уникальными, не представляется возможным, ввиду ограниченных природных источников сырья и низкого содержания активных компонентов в интактных растениях, что делает их получение экономически невыгодным. В связи с этим возрастает значение использования клеточных культур растений для получения целого ряда экономически ценных биологически активных веществ [1].

Имеющаяся литература указывает на высокую метаболическую активность рода *Ajuga*. Многие виды вырабатывают цитотоксичные (8-0-ацетилгарпагид, гарпагид [6, 10]), противооплазмодийные (аюгарин-1, 8-0-ацетилгарпагид [13]), инсектицидные (20-гидроксиэкдизон [11]), антибактериальные (дистерпены [9]), противовирусные [16], антимикробактериальные [8] вещества. Учитывая эти данные, нами была поставлена цель получить изолированные культуры некоторых принадлежащих к этому роду малоизученных видов, растущих в Армении и находящихся широкое применение в народной медицине как противовоспалительные, противомаларийные, гемостатические, ранозаживляющие, противолихорадочные средства, и содержащих такие биологически активные вещества, как иридоиды, флавоноиды, терпеноиды, стероиды, дубильные вещества, эфирные масла [2, 6-16].

Как правило, процессы образования вторичных соединений в культуре *in vitro* отличаются от таковых в интактных растениях, а данные об установлении закономерностей в культуре клеток при синтезе метаболитов противоречивы [4,5]. В процессе культивирования может произойти изменение качественного и количественного состава активных метаболитов. Состав биологически активных веществ меняется и в течение одного цикла выращивания: обычно усиление синтеза вторичных метаболитов в условиях *in vitro* наблюдается в конце выращивания при замедлении или остановке клеточной пролиферации [4]. Но возможны и исключения из общих правил, что делает изучение закономерностей роста и метаболической активности полученной изолированной культуры обязательным.

Целью настоящей работы было изучение антибактериальной активности полученной нами клеточной культуры *Ajuga genevensis* L.

Материал и методика. Изолированная культура *A. genevensis* L. была получена на питательной среде Мурасиге – Скуга (МС) [3]. Дальнейший стабильный рост каллусной ткани поддерживался как на среде МС, так и на модифицированной среде, условно обозначенной нами N7, отличающейся составом фитогормонов. В отличие от традиционной среды МС, в модифицированном варианте отсутствует индолил-3-уксусная кислота (ИУК) и глицин, но добавлены, мг/л: гибберелловая кислота (ГК) в концентрации 0,2, α -нафтилуксусная кислота (НУК) – 0,5, 6-бензиламинопурина (БАП) – 1, концентрация кинетина доведена до 1.

Антибактериальную активность определяли путем нанесения экстрактов из различных частей интактного растения, мериклонов и каллусных тканей на газон тест – микроорганизмов и измерением диаметров зон отсутствия роста, образовавшихся вокруг колодцев с экстрактом. Один грамм ткани экстрагировали в 10 мл жидкости (этанол, метанол, вода) в течение 20 ч на магнитной качалке и при температуре 4⁰. Полученную суспензию центрифугировали и надосадочную жидкость использовали как грубый экстракт антибиотика. Опыты были поставлены в трехкратной повторности. В качестве тест-организмов использовали штаммы микроорганизмов, хранящиеся в коллекции музея Республиканского центра депонирования микроорганизмов, а также из коллекции культур микроорганизмов кафедры микробиологии и биотехнологии растений и микроорганизмов.

Результаты и обсуждение. Результаты тестирования изолированных культур, полученных нами из *A. genevensis* L., произрастающей в районе г. Арагац, показали, что они проявляли высокую антибактериальную активность. На рис. 1 можно рассмотреть довольно обширные стерильные зоны на чашках Петри с газоном *Bacillus subtilis*, образовавшиеся вокруг каллусов и мериклонов *A. genevensis*, что указывает на высокий уровень синтеза в этих тканях веществ с антимикробными свойствами.

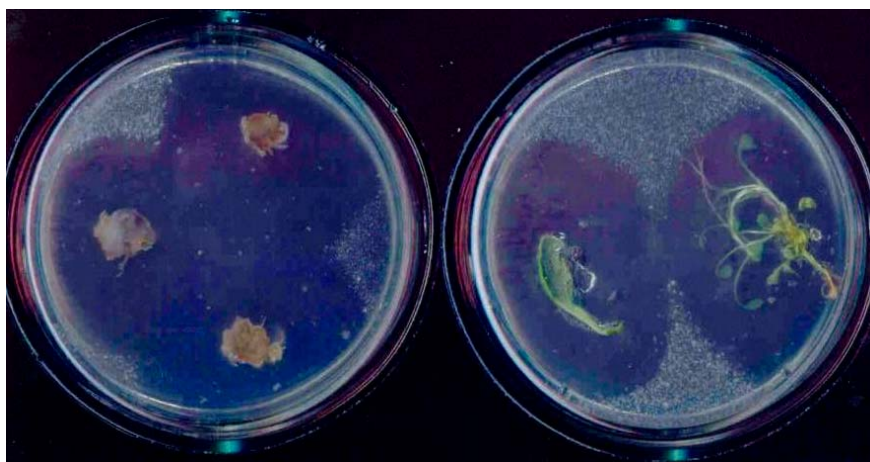


Рис.1. Зоны отсутствия роста вокруг каллусов и мериклонов *A.genevensis* L. (тест-организм - *Bacillus subtilis*)

Тестирование экстрактов, полученных из каллусов и разных частей мериклонов, также выявило высокую антимикробную активность культуры в отношении различных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Причем выяснилось, что синтез вторичного метаболита, обладающего противомикробной активностью, зависел от ряда условий: цикла роста и пассажа, состава питательной среды, штамма тест-микроорганизма. Эта зависимость приводится в табл. 1, которая показывает, что в течение одного цикла выращивания пик активности синтеза исследуемого метаболита отмечался на 20-й день культивирования каллусов. Эта закономерность сохранялась независимо от пассажей, а к 39 – 40-му пассажу достигала наивысшей отметки.

Наиболее чувствительными оказались *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *Staphylococcus citreus* и *Escherichia coli* (табл. 1), тогда как эти же микроорганизмы проявляли слабую чувствительность в отношении интактных растений, для которых диаметры стерильных зон не превышали одного см.

Таблица 1. Ингибирование роста тест-организмов каллусными тканями
A. genevensis на среде МС

Тест-организм	Пассаж	Диаметр зон отсутствия роста, см			
		Дни роста каллуса			
		5	10	20	35-40
1. <i>B. subtilis</i> 205	4	0.3 x 0.4	1.5 x 1.8	2.8 x 2.6	3.3 x 3.5
	18	0.5 x 0.5	1.8 x 2.0	4.0 x 4.3	3.4 x 3.5
	39	0.7 x 0.9	2.3 x 2.5	4.1 x 4.3	3.3 x 3.6
2. <i>B. subtilis</i> 1759	4	0.3 x 0.3	1.5 x 1.7	3.3 x 3.4	2.8 x 3.0
	18	0.4 x 0.5	1.7 x 1.9	3.7 x 3.9	3.0 x 3.0
	39	0.4 x 0.6	2.4 x 2.6	3.9 x 4.1	3.0 x 3.2
3. <i>B. mesentericus</i>	4	-	1.2 x 1.5	3.2 x 3.4	3.0 x 3.2
	18	0.4 x 0.7	1.4 x 1.7	3.7 x 3.8	3.5 x 3.6
	39	0.8 x 1.0	1.5 x 1.7	4.0 x 4.1	3.7 x 3.7
4. <i>Staphylococcus citreus</i>	4	-	0.8 x 1.0	3.0 x 3.2	2.3 x 2.5
	18	-	1.4 x 1.5	3.5 x 3.7	2.5 x 2.6
	39	0.5 x 0.6	1.7 x 1.8	4.2 x 4.3	3.3 x 3.4
5. <i>S. aureus</i> 209	4	-	2.2 x 2.4	2.8 x 3.0	2.3 x 2.6
	18	0.3 x 0.5	2.2 x 2.4	2.9 x 3.0	2.4 x 2.5
	39	0.8 x 0.9	2.3 x 2.5	2.9 x 3.2	2.6 x 2.8
6. <i>Escherichia coli</i> 5009	4	-	-	2.0 x 2.2	-
	18	-	1.3 x 1.4	2.0 x 2.2	-
	39	0.3 x 0.5	1.8 x 1.9	2.7 x 2.8	-
7. <i>E. coli</i> 205	4	-	1.8 x 2.0	2.8 x 3.0	-
	18	-	2.0 x 2.2	3.2 x 3.4	-
	39	-	2.1 x 2.2	3.5 x 3.6	-
8. <i>Salmonella typhimurium</i> 1474	4	-	-	0.9 x 1.2	1.7 x 1.8
	18	-	-	1.1 x 1.5	1.8 x 2.1
	39	-	-	2.1 x 2.3	2.1 x 2.3

Примечание: поскольку зоны отсутствия роста не имели форму правильного круга, указаны максимальный и минимальный диаметры зон.

Преимуществом использования *in vitro* условий является возможность целенаправленного изменения метаболизма культуры. Для повышения антимикробной активности ткани было испытано влияние различных сочетаний фитогормонов. Выяснилось, что увеличение суммарного количества цитокининов, а также изменение вида ауксина в питательной среде N7 способствовали значительному увеличению синтеза веществ с антимикробной активностью в тканях изолированной культуры *A. genevensis* L. (рис. 2).

Важность исследований антибактериальной активности *in vitro* культуры *A. genevensis* L. подтверждается также тем фактом, что ингибирующее действие ткани распространяется и на некоторые патогенные микроорганизмы. Так, в рамках сотрудничества с Центром профилактики особо опасных инфекций им. Мкртчяна выяснилось, что

такие патогенные микроорганизмы, как возбудители чумы (*Yersinia pestis*), кишечного иерсиниоза (*Y. enterocolitica*), бруцеллеза (*Brucella abortus*) и ложносибирской язвенной болезни (*Bacillus anthracoides*) проявляли высокую чувствительность к водным экстрактам из надземных частей, корней мериклонов и каллусных тканей *A. genevensis* L. (рис. 2).

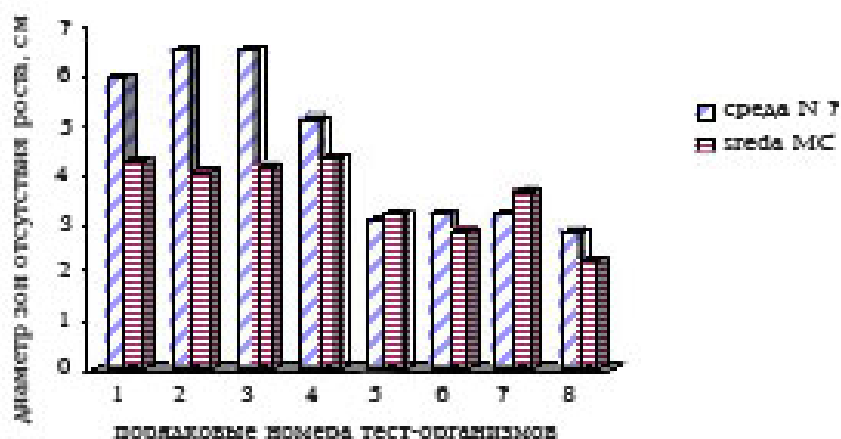


Рис.2. Ингибирование роста тест-микроорганизмов каллусными тканями *A. genevensis* 39-го пассажа на 20-й день культивирования, выращенными на питательных средах MC и N7. Порядковые номера тест-организмов соответствуют тест-организмам, приведенным в табл. 1.

Таблица 2. Угнетение роста патогенных микроорганизмов изолированной культурой *A. genevensis*

Тест - организмы	Диаметр зон отсутствия роста, см		
	Надземная часть мериклонов	Корни мериклонов	Каллусные культуры
<i>Yersinia pestis</i>	1,5 x 1,5	3,5 x 4,0	5,5 x 6,0
<i>Y. enterocolitica</i>	4,0 x 4,2	3,5 x 4,6	---
<i>Brucella abortus</i>	---	---	3,0 x 3,5
<i>Bacillus anthracoides</i>	0,8 x 1,4	0,7 x 1,0	3,0 x 3,5

Несмотря на полное отсутствие какой-либо антимикробной активности у интактного растения по отношению к патогенным тест-микроорганизмам, каллусные культуры и мериклоны проявляли довольно высокое ингибирующее действие на их рост.

Наивысшая активность была выявлена у каллусных культур, которые более эффективно ингибировали рост почти всех тестируемых микроорганизмов. Экстракты корней мериклонов проявляли одинаково высокую активность как в отношении *Yersinia pestis*, так и *Y. enterocolitica*.

Эти микроорганизмы проявляли высокую степень чувствительности и в отношении водных экстрактов надземных частей мериклонов, тогда как влияние на *B. anthracoides* было слабым, а рост *B. abortus* вовсе не был подавлен.

Уровень антибактериальной активности экстрактов каллусов зависел также от природы экстрагирующего вещества – наивысшую активность проявлял водный экстракт каллусов *A. genevensis* L.

Таким образом, данные исследований интактных и культивируемых *in vitro* растений *A. genevensis* L. указывают на довольно высокое антимикробное действие водных экстрактов полученных нами изолированных культур в отношении различных грамположительных и грамотрицательных патогенных и непатогенных микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Битченко Т.И., Синкевич Н. М., Юрин В.М. Биотех. часть 1, с. 114, 2005.
2. Золотницкая С. Я. Лекарственные ресурсы флоры Армении, II, Ереван, 1965.
3. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В. В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений, Киев, 1980.
4. Кунах В.А. Физиология растений. М., Наука, 46, 6, С. 919, 929, 1999.
5. Носов А. М. - Физиол. растений. 41, 6., с. 873 – 878, 1994.
6. Akbay P., Calis I., Heilmann J., Stricher O. - Z Naturforsch [c]. Mar-Apr; 58 (3-4): 177-80, 2003.
7. Ben Jannet H., Harzallah – Skhihi F., Mighri Z., Simm Blaney WM. - Fitoterapia. Apr; 71 (2): 105 – 12, 2000.
8. Cantrell CL., Rajab MS., Franzblau SG., Fronczek FR. - Planta Med. Dec; 65 (8): 732-4, 1999.
9. Chen H., Tan RX., Liu ZL., Zhao CY., Sun J. - Acta Crystallogr. C. Jun 15; 53 (60): 814-6, 1997.
10. Dinan L., Whiting P., Bourne P., Coll J. Insect Biochem Mol Biol. Oct; 31 (11): 1077-82, 2001.
11. Fujimoto Y., Ohyama K., Nomura K., Hyodo R., Takahas V., Yamada J., Norisaki M. - Lipids. Mar; 35 (3): 279-88, 2000.
12. Khan PM., Malik A., Ahmad S., Nawaz HR – J. Nat Prod. Sep; 62 (9):1290 – 2, 1999.
13. Kuria KA, Chepkwony H., Govaerts C., Roets E., Buss Witte P., Zupko I., Hoornaert G., Quirynen L., Maes Janssens L., Hoogmartens J., Laekeman G. J.Nat Prod May, 65, 5, 789-93, 2002.
14. Nomura K., Fujimoto Y. Chem Pharm Bull (Tokyo). Mar; 48, 2000.
15. Takasaki M., Yamauchi I I., Haruna M., Konoshima T., J Nat Prod. Sep; 61 (9): 1105 – 9, 1998.
16. Tang X., Chen H., Zhang X., Quan K., Sun M. J. Tradit Chin Med. Mar; 14 (1): 10-3, 1994.

Поступила 30.11.2007