

Антибактериальная активность ацетоновых экстрактов из *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl.

О.М. ХРАМЧЕНКОВА

Исследовано влияние продолжительности хранения биомассы *Hypogymnia physodes* и экстрактов из нее на антибактериальные свойства ацетоновых экстрактов в отношении тест-культур *Staphylococcus aureus*, *Echericia coli*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas aeruginosa*. Установлено, что на протяжении 1–2 лет с момента сбора биомассы лишайника антибактериальные свойства ацетоновых экстрактов их него снижаются. Быстрее всего теряется антибактериальная активность в отношении *Bacillus subtilis*. При хранении биомассы лишайника на протяжении двух лет перед экстракцией антибактериальная активность экстракта снижается в отношении *Staphylococcus aureus*, *Echericia coli* и *Bacillus subtilis*. Показано бактерицидное действие ацетоновых экстрактов из *Hypogymnia physodes* в отношении *Pseudomonas aeruginosa* как в бульонных культурах, так и в посевах на твердые среды вне зависимости от продолжительности хранения биомассы лишайника и экстрактов из нее.

Ключевые слова: биомасса лишайника, ацетоновые экстракты, антибактериальная активность.

The antibacterial activity of acetone extracts from *Hypogymnia physodes* was evaluated. It is established that for 1–2 years from the moment of harvesting the lichen biomass, the antibacterial properties of acetone extracts of it are reduced. The fastest is the loss of antibacterial activity against *Bacillus subtilis*. When the biomass of the lichen is being stored for two years before extraction, the antibacterial activity of the extract decreases with respect to *Staphylococcus aureus*, *Echericia coli* and *Bacillus subtilis*. The bactericidal activity of acetone extracts from *Hypogymnia physodes* against *Pseudomonas aeruginosa* is demonstrated in both broth cultures and in crops on solid media irrespective of the duration of storage of lichen biomass and extracts from it.

Keywords: lichen biomass, acetone extracts, antibacterial activity.

Введение. Лишайники способны продуцировать вторичные метаболиты различной структуры и потенциальной биологической активности. В настоящее время известно более 1000 вторичных лишайниковых метаболитов, набор которых в слоевищах определенного вида, как правило, исчерпывается 1–10 соединениями [1]–[4]. Для довольно большой группы видов лишайников состав вторичных метаболитов до настоящего времени не установлен. Вторичные метаболиты образуются в талломах лишайников для защиты от большинства патогенных микроорганизмов, а также для обеспечения физиологических механизмов адаптации к условиям существования, в том числе – крайне суровым, где высшие растения не выживают [5]–[7].

Несмотря на издавна известную способность лишайников подавлять развитие болезнетворных микроорганизмов, интерес к бактерицидным свойствам лишайниковых веществ растет. Поскольку микроорганизмы выработали резистентность ко многим антибиотикам, возникла задача поиска новых источников антимикробных веществ.

Способы извлечения вторичных метаболитов из слоевищ лишайников базируются на химических свойствах извлекаемых веществ и арсенале физико-химических методов исследования. Наиболее распространенной является экстракция органическими растворителями различной полярности с последующим хроматографическим разделением веществ [3], [4], [8]–[10]. Всем этим процедурам предшествует сбор натурного материала, его хранение и пробоподготовка. Возникает вопрос: изменяются ли при хранении антибактериальные свойства вторичных лишайниковых метаболитов, ради которых проводился сбор и экстракция слоевищ? В работе [11] показано, что продолжительность хранения слоевищ лишайников не влияет на состав их вторичных метаболитов. Целью настоящей работы является анализ влияния продолжительности хранения слоевищ и самих экстрактов из лишайников на их антибактериальные свойства.

Методы исследований. Исследовали антибактериальные свойства экстрактов из гипогимнии вздутой. Натурный материал – слоевища лишайников – отбирали на территории ГЛХУ «Гомельский лесхоз». Гипогимния вздутая – *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. (Syn. *Parmelia physodes* (L.) Ach.) – распространенный полиморфный вид листоватых лишайников семейства *Parmeliaceae* порядка *Lecanorales* класса *Lecanoromycetes* отдела *Ascomycota*. Поселяет-

ся преимущественно на стволах и сучьях лиственных и хвойных пород, реже на обработанной древесине и каменистом субстрате, иногда на почве. Содержит атранорин, хлоратранорин, физодовую, физодаловую, 3-гидроксифизиодовую, 2'-О- метилфизиодовую и протоцетраровую кислоты [1], [12]–[14]. Образцы отбирали на стволах сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и березы повислой (*Betula pendula* Roth.), высушивали до воздушно-сухого состояния, хранили в сухом помещении в бумажных пакетах при комнатной температуре. Экстракцию вторичных лишайниковых метаболитов проводили ацетоном (чда) в аппарате Сокслета на протяжении 6 часов. Полноту экстракции контролировали стандартным методом [15]. После окончания экстракции растворитель удаляли, сухие экстракты направляли на определение бактерицидных свойств.

В таблице 1 приведена схема эксперимента.

Таблица 1 – Схема получения экстрактов из лишайника *Hypogymnia physodes*

Номер серии опытов	Форофит	Срок хранения слоевищ, лет	Срок хранения экстрактов, лет
1	Береза повислая	0	0
2	Сосна обыкновенная	0	0
3	Береза повислая	1	0
4	Сосна обыкновенная	1	0
5	Береза повислая	2	0
6	Сосна обыкновенная	2	0
7	Береза повислая	0	1
8	Сосна обыкновенная	0	1

Дальнейшие исследования проводили в лабораториях ГУ «Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» на культурах четырех видов бактерий [16].

Staphylococcus aureus – золотистый стафилококк – шаровидные грамположительные бактерии, вызывающие широкий диапазон заболеваний. Является одной из наиболее частых причин внутрибольничных инфекций, вызывает послеоперационные раневые инфекции. Большинство штаммов резистентны к пенициллину и его аналогам.

Echericia coli – кишечная палочка – палочковидные грамотрицательные бактерии, обитающие в нижней части кишечника. Широко используется в качестве модельного организма в микробиологических и молекулярно-генетических исследованиях.

Bacillus subtilis – сенная палочка – не патогенные грамположительные спорообразующие аэробные бактерии, обитающие в почве, на поверхности растений и пр. Широко используется в биотехнологии.

Pseudomonas aeruginosa – синегнойная палочка – условно патогенные грамотрицательные бактерии, обитающие в почве и воде. Вызывает у человека ряд инфекций, лечение которых затруднено из-за высокой устойчивости к антибиотикам.

Для постановки опытов использовали тест-культуры стандартных микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Echericia coli* ATCC 11775; *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. Из лиофилизированного бактериального штамма готовили суспензии. Непосредственно из суспензии производился высеив на кровяной агар (КА)¹, мясо-пептонный агар (МПА)² для получения изолированных колоний. Культуры инкубировали 18–24 ч при (36 ± 1) °С. После инкубации выросшие культуры проверяли на чистоту штамма и использовали для получения основной опытной культуры. Испытательные суспензии готовили в 10 мл физиологического раствора, количество КОЕ в них доводили по стан-

¹Кровяной агар – бактериологическая среда для выделения бактерий и установления их гемолитической активности. Для приготовления кровяного агара к охлажденному до 45 °С 2 % мясо-пептонному агару добавляют 5–10 % подогретой стерильной дефибринированной крови, разливают по чашкам Петри, выдерживают сутки в термостате на возможную бактериальную контаминацию [16], [17].

²Мясо-пептонный агар предназначен для культивирования микроорганизмов. Совокупность компонентов, входящих в состав среды, обеспечивает рост культур в виде соответствующих колоний на поверхности плотной питательной среды [16], [17].

дарту мутности до 10^8 /мл. Испытуемый препарат из лишайника готовили в виде взвеси 0,5 г экстракта в 50 мл дистиллированной воды. Определение бактерицидной эффективности полученных суспензий производили путем смешивания 0,1 мл испытательной суспензии с 10 мл взвеси испытуемого экстракта. После инкубации при $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 30 мин, 3 ч и 24 ч взвеси микроорганизмов и испытуемых экстрактов перемешивали, отбирали по 0,1 мл и переносили в 10 мл пептонной воды. Полученные субкультуры инкубировали 48 ч при $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$, после чего по помутнению бульонных культур устанавливали начало роста.

Все пробы экстрактов высевали по 0,1 мл на плотные питательные среды: желточно-солевой агар (ЖСА)³, среду Эндо⁴, МПА для подтверждения присутствия или отсутствия роста микроорганизмов и подсчета числа колоний по сравнению с контролем. Одновременно проводилось исследование роста колоний с использованием стандартных тест-носителей. Для изготовления тест-носителя использовали стандартную хлопчатобумажную ткань, промытую в бидистиллированной воде и простерилизованную в автоклаве. Тест-носители помещали в бактериальную суспензию на 15 минут, после чего помещали на плотные питательные среды с внесенной суспензией экстракта *Hypogymnia physodes* [17].

Результаты исследований. При прочих равных условиях, экстракты из слоевищ *Hypogymnia physodes*, отобранных на стволах сосны обыкновенной и березы повислой, показали практически одинаковую активность в отношении принятых к исследованию штаммов бактерий. По-видимому, условия существования на обоих видах форофитов не влияют на состав вторичных метаболитов лишайников, что подтверждается данными, приведенными в [11]. В таблице 2 представлены результаты определения начала роста микроорганизмов в бульонных культурах с внесенной суспензией экстракта из *Hypogymnia physodes*.

Таблица 2 – Антибактериальная активность ацетоновых экстрактов из *Hypogymnia physodes* в бульонных культурах

№ пробы	Вид бактерий											
	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Echericia coli</i>			<i>Bacillus subtilis</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
	30 мин	3 ч	24 ч	30 мин	3 ч	24 ч	30 мин	3 ч	24 ч	30 мин	3 ч	24 ч
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+-	+	+	+	+	+	-
6	+	+	+	+	+	+-	+	+	+	+	+	-
7	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-

Здесь и далее: знак «+» означает наличие роста микроорганизмов; знак «-» – отсутствие роста.

Установлено, что антибактериальная активность экстрактов не одинакова, и изменяется со временем. Свежие экстракты из свежесобраных слоевищ лишайника уже за первые 30 минут инкубации в бульонной культуре подавляли рост всех исследуемых штаммов бактерий. Свежие экстракты из слоевищ, отобранных год назад, не подавляли рост *Bacillus subtilis*, а свежие экстракты из слоевищ, отобранных два года назад, в бульонной культуре практически не проявляли антибактериальной активности. Хранение сухого экстракта в плотно закрытом стеклянном бюксе при комнатной температуре привело к потере антибактериальной активности в отношении *Bacillus subtilis*.

³Желточно-солевой агар – элективная для стафилококков среда. Высокое содержание хлорида натрия подавляет большинство бактерий, встречающихся в ассоциациях со стафилококком, присутствие яичного желтка выявляет свойственный этому роду фермент лецитиназу [16], [17].

⁴Среда Эндо – дифференциально-диагностическая питательная среда для выделения *Echericia coli*. Обладает слабыми селективными свойствами, компоненты среды подавляют рост грамположительных бактерий [16], [17].

В таблице 3 приведены результаты исследования роста колоний микроорганизмов на плотных средах с внесенной суспензией экстракта *Hypogymnia physodes*.

Таблица 3 – Антибактериальная активность ацетоновых экстрактов из *Hypogymnia physodes* на плотных питательных средах

№ пробы	Вид бактерий, среда культивирования											
	<i>Staphylococcus aureus</i> , ЖСА			<i>Echericia coli</i> , Эндо			<i>Bacillus subtilis</i> , МПА			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , МПА		
	30 мин	3 ч	24 ч	30 мин	3 ч	24 ч	30 мин	3 ч	24 ч	30 мин	3 ч	24 ч
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁸	-	-	-
5	10 ⁸	300 КОЕ	100 КОЕ	10 ⁸	10 ⁸	11 КОЕ	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	-
6	10 ⁸	500 КОЕ	200 КОЕ	10 ⁸	10 ⁸	11 КОЕ	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	-
7	-	-	-	-	-	-	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	-	-

Цифрами обозначены количественные показатели роста колоний.

Показано, что свойством бактерицидности обладают свежие экстракты из свежесобраных слоевищ *Hypogymnia physodes*. По мере увеличения срока хранения биомассы лишайника бактерицидность теряется, и сохраняется только бактериостатическое действие экстрактов. Хранение сухого экстракта в течение одного года привело к потере бактерицидности в отношении *Bacillus subtilis*.

В таблице 4 приведены результаты исследования роста колоний микроорганизмов в опытах на тест-носителях.

Таблица 4 – Антибактериальная активность ацетоновых экстрактов из *Hypogymnia physodes* на тест-носителях

№ пробы	Вид бактерий, среда											
	<i>Staphylococcus aureus</i> , ЖСА			<i>Echericia coli</i> , Эндо			<i>Bacillus subtilis</i> , МПА			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , МПА		
	30 мин	3 ч	24 ч	30 мин	3 ч	24 ч	30 мин	3 ч	24 ч	30 мин	3 ч	24 ч
1	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
2	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
3	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
4	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
5	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
6	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
7	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Результаты опытов с использованием тест-носителей характеризуют «проникающую способность» экстрактов из лишайника. Только свежие экстракты из свежесобраных слоевищ демонстрировали антибактериальную активность. В отношении *Bacillus subtilis* и *Echericia coli* антибактериальная активность экстрактов утрачивалась при хранении биомассы *Hypogymnia physodes* и экстрактов из нее. По отношению к *Staphylococcus aureus* антибактериальная активность экстрактов из *Hypogymnia physodes* утрачивалась при длительном хранении биомассы лишайника и экстракта из него.

Обращают на себя внимание антибактериальные и бактериостатические свойства экстрактов из *Hypogymnia physodes* в отношении *Pseudomonas aeruginosa*. Устойчивость к большим дозам антибиотиков данного вида бактерий связана с их способностью формировать биопленку, защищающую колонию от попадания в нее вредных веществ [16]. Настоящим исследованием

показано ингибирующее действие ацетоновых экстрактов из *Hypogymnia physodes* в отношении *Pseudomonas aeruginosa* как в бульонных культурах, так и в посевах на твердые среды.

Заключение. Исследовано влияние продолжительности хранения биомассы лишайника *Hypogymnia physodes* и экстрактов из нее на антибактериальные свойства в отношении тест-культур *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas aeruginosa*. Установлено, что на протяжении 1–2 лет с момента сбора биомассы лишайника антибактериальные свойства ацетоновых экстрактов из него снижаются. Быстрее всего антибактериальная активность теряется в отношении *Bacillus subtilis*. При хранении биомассы лишайника на протяжении двух лет перед экстракцией антибактериальные свойства экстракта теряются в отношении *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*. Показано антибактериальное действие ацетоновых экстрактов из *Hypogymnia physodes* в отношении *Pseudomonas aeruginosa* как в бульонных культурах, так и в посевах на твердые среды вне зависимости от продолжительности хранения биомассы лишайника и экстрактов из нее.

Литература

1. The Lichens of Great Britain and Ireland / C.W. Smith [et al.]. – 2nd ed. – London : British Lichen Society, 2009. – 700 p.
2. Ranković, B. Lichen Secondary Metabolites: Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential / B. Ranković. – Springer : Heidelberg, 2015. – 201 p.
3. Elix, J.A. A catalogue of standardized thin layer chromatographic data and biosynthetic relationships for lichen substances / J.A. Elix. – Canberra : Australian National University, 2014. – 330 p.
4. Huneck, S. Identification of lichen substances / S. Huneck, I. Yoshimura. – Berlin : Springer, 1996. – 493 p.
5. Nash III T.H. Lichen biology / T.H. Nash III. – Cambridge University Press, 1999. – 486 p.
6. Тарасова, В.Н. Лишайники: физиология, экология, лишеноиндикация: учебное пособие / В.Н. Тарасова, А.В. Сони́на, В.И. Андросова. – Петрозаводск : Изд-во ПетрГУ, 2012. – 368 с.
7. Rundel, P.W. The ecological role of secondary lichen substances / P.W. Rundel // Biochem. Syst. Ecol. – 1978. – Vol. 6. – P. 157–170.
8. The isolation, analytical characterization by HPLC–UV and NMR spectroscopy, cytotoxic and antioxidant activities of baecomycin acid from *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis* / N.T. Manojlović [et al.] // Hem. ind. – 2011. – Vol. 65 (5). – P. 591–598.
9. Fahselt, D. Secondary biochemistry of lichens / D. Fahselt // Symbiosis. – 1994. – Vol. 16. – P. 117–165.
10. Ranković, B. Antioxidant and antimicrobial Activity of some lichen species / B. Ranković, D. Ranković, D. Marić // Microbiology. – 2010. – Vol. 79. – P. 809–815.
11. Molnar, K. Depsides and depsidones in populations of the lichen *Hypogymnia physodes* and its genetic diversity / K. Molnar, E. Farkas // Ann. Bot. Fennici. – 2011. – Vol. 48. – P. 473–482.
12. Определитель лишайников СССР / Е.Г. Копачевская [и др.]; под. ред. И.И. Абрамова // Вып. 1. Пертузариевые, Леканоровые, Пармелиевые. – Л. : Наука, 1971. – 412 с.
13. Горбач, Н.В. Лишайники Белоруссии. Определитель / Н.В. Горбач. – Мн. : Наука и техника, 1973. – 368 с.
14. Справочное пособие по хемотаксономии лишайников (методическое пособие) / Е.А. Вайнштейн [и др.]; под. ред. Н.С. Голубковой. – Л. : БИН АН СССР, 1990. – 152 с.
15. Воскресенский, П.И. Техника лабораторных работ / П.И. Воскресенский. – М. : Химия, 1973. – 717 с.
16. Определитель бактерий Берджи / под ред. Дж. Хоулт. – М. : Мир, 1997. – Т. 1. – 432 с.
17. Meynell, G.G. Theory and practice in experimental bacteriology / G.G. Meynell, E. Meynell. – Cambridge University Press, 1970. – 347 p.