

АНТИМИКРОБНАЯ И ПРОТИВОГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ЛИШАЙНИКОВ, РАСПРОСТРАНЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

¹Гомельский государственный медицинский университет, ²Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси, Гомель; ³Гомельский государственный университет, Беларусь

Цель. Изучение спектра и выраженности антибактериальных и противогрибковых свойств экстрактов лишайников. *Материалы и методы.* Антимикробную активность ацетоновых экстрактов из лишайников *Hypogymnia physodes*, *Xanthoria parietina*, *Evernia prunastri*, *Ramalina pollinaria*, *Cladonia arbuscula* определяли методом микро-разведений в бульоне в диапазоне концентраций от 4 до 500 мкг/мл в отношении 13 штаммов из коллекции АТСС и 6 клинических изолятов. *Результаты.* Выявлена высокая антибактериальная активность экстрактов *H.physodes* и *S.arbuscula* в отношении стафилококков и энтерококков (МПК 31 — 62 мкг/мл). Антимикробная активность в отношении энтеробактерий и *Pseudomonas aeruginosa* отсутствовала у всех экстрактов. Экстракты *E.prunastri*, *H.physodes* и *S.arbuscula* были активны в отношении штаммов *Stenotrophomonas maltophilia* (МПК 250 — 500 мкг/мл). Противогрибковая активность (МПК 500 мкг/мл для 4 штаммов *Candida*) выявлена только для экстракта *E.prunastri*. *Заключение.* Лишайники *H.physodes* и *S.arbuscula* можно рассматривать в качестве перспективных источников антибактериальных веществ, эффективных против антибиотикорезистентных штаммов стафилококков, стрептококков *S.maltophilia*.

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 60—65

Ключевые слова: лишайники, экстракты, антибактериальная активность, *Stenotrophomonas maltophilia*

D.V. Tapalsky¹, D.R. Petrenev², O.M. Khranchenkova³, A.S. Doroshkevich¹

ANTIMICROBIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF LICHENS PREVALENT IN BELARUS

¹Gomel State Medical University, ²Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel; ³Gomel State University, Belarus

Aim. Study spectrum and expressiveness of antibacterial and antifungal properties of lichen extracts. **Materials and methods.** Antimicrobial activity of acetone extracts from *Hypogymnia physodes*, *Xanthoria parietina*, *Evernia prunastri*, *Ramalina pollinaria*, *Cladonia arbuscula* lichens was determined by micro-dilution methods in broth for 4 — 500 mcg/ml concentrations against 13 strains from ATCC collection and 6 clinical isolates. **Results.** High antibacterial activity of *H. physodes* and *C. arbuscular* extracts against staphylococci and enterococci was detected (MIC 31 — 62 mcg/ml). Antimicrobial activity against enterobacteria and *Pseudomonas aeruginosa* was absent for all the extracts. *E. prunastri*, *H. physodes* and *C. arbuscula* extracts were active against *Stenotrophomonas maltophilia* strains (MIC 250 — 500 mcg/ml). Antifungal activity (MIC 500 mcg/ml for 4 *Candida* strains) was only detected for the *E. prunastri* extract. **Conclusion.** *H. physodes* and *C. arbuscula* lichens can be examined as a perspective source of antibacterial substances, effective against antibiotics resistant staphylococci, streptococci and *S. maltophilia* strains.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 60—65

Key words: lichens, extracts, antibacterial activity, *Stenotrophomonas maltophilia*

ВВЕДЕНИЕ

Лишайники представляют собой симбиотические ассоциации грибов и микроскопических водорослей или цианобактерий. Для них характерен медленный рост и способность к существованию практически во всех наземных экосистемах от арктической тундры до пустынь. Устойчивость лишайников к экстремальным воздействиям связана с продукцией ими многочисленных вторичных метаболитов — алифатических, циклоалифатических, гетероциклических и терпеновых соединений, которые могут составлять до 30% от сухой массы слоевищ. Вторичные метаболиты лишайников служат главным образом для поглощения света, защиты фотобионта от ультрафиолетового излучения и подавления роста микроорганизмов. Также описана противовирусная, цитостатическая и фермент-ингибирующая активность многих из них [9].

Лишайники широко использовались в традиционной медицине для лечения заболеваний дыхательной системы и желудочно-кишечного тракта. Терапевтическая активность приписывается главным образом представителям родов *Cladonia*, *Evernia*, *Lobaria*, *Parmelia*, *Peltigera*, *Pertusaria*, *Physcia*, *Roccella*, *Usnea*, *Xanthoria*. Интенсивное изучение антибактериальной активности экстрактов из различных лишайников, а также отдельных содержащихся в них вторичных метаболитов ведется с середины 1950-х годов [2]. Для многих видов лишайников активность выявлена главным образом в отношении грамположительных бактерий, включая микобактерии, и грибов. Антибактериальные свойства усниновой кислоты, содержащейся во многих лишайниках, позволили использовать ее в качестве препаратов для местной антисептики (например, натрия уснинат 1% спиртовой раствор), а также в составе жидкости для полоскания рта и зубных паст [7].

Стремительное распространение множественной устойчивости к антибиотикам среди возбудителей бактериальных инфекций требует поиска соединений с новыми механизмами противомикробного действия. Лишайники и их многочисленные вторичные метаболиты рассматриваются в качестве перспективных источников таких соединений [Srivastava P. et al., 2013]. Работы по исследованию антибактериальной активности лишайников интенсивно проводятся в последнее десятилетие в ряде европейских стран [1, 4, 6, 10, 11]. Среди огромного видового разнообразия лишайников только относительно небольшое их количество (не более 70 — 100 видов) было скринировано на присутствие антимикробных свойств, при этом более чем у половины исследованных видов такие свойства удавалось выявить.

Цель исследования — изучение спектра и выраженности антибактериальных и противогрибковых свойств у видов лишайников, широко представленных в лишенофлоре Беларуси.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Из более чем 600 видов лишайников, встречающихся на территории Беларуси, в исследование включены 5 наиболее распространенных видов с хорошо описанным составом вторичных метаболитов: *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl., *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr., *Evernia prunastri* (L.) Ach., *Ramalina pollinaria* (Westr.) Ach., *Cladonia arbuscula* (Wallr.) Flot.

Слоевища лишайников отбирали в июле 2015 г. на типичных для каждого вида субстратах. Сбор эпифитных видов (*H. physodes*, *X. parietina*, *E. prunastri* и *R. pollinaria*) производился на высоте 1,3 м; отделяли слоевища вместе с фрагментом коры дерева. Массу лишайников отделяли от субстрата и сушили до воздушно-сухого состояния. Эпигейный лишайник *C. arbuscula* собирали на почве в сухом средневозрастном сосняке. Массу лишайника сушили до воздушно-сухого состояния, тщательно выбирали лиственной и хвойный опад, другие растительные остатки, при сушке удаляли остатки почвы, отбрасывали нижнюю часть слоевища — около 5 мм.

Для извлечения вторичных метаболитов воздушно-сухую массу лишайников измельчали при помощи лабораторной мельницы. Навеску 50 г воздушно-сухого измельченного лишайника помещали в патрон из фильтровальной бумаги, извлечение проводили ацетоном в аппарате Сокслета на протяжении 6 часов при температуре, не превышающей температуру кипения растворителя. После фильтрации растворитель испаряли при комнатной температуре. Выход ацетоновых экстрактов (в пересчете на сухую массу) составил для *H. physodes* — 11,8%, *X. parietina* — 9,2%, *E. prunastri* — 12,2%, *R. pollinaria* — 9,9%, *C. arbuscula* — 13,7%.

В панель микроорганизмов для тестирования включены 13 эталонных штаммов из Американской коллекции типовых культур (ATCC), из них 5 штаммов грамположительных бактерий (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. casseliflavus* ATCC 700327, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 6538, *S. saprophyticus* ATCC BAA-750), 4 штамма грамотрицательных бактерий (*Enterobacter hormaechei* ATCC 700323, *Escherichia coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 17666) и 4 штамма грибов рода *Candida* (*C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 14053, *C. albicans* ATCC 90029, *C. parapsilosis* ATCC 22019). Дополнительно в исследование включены 6 клинических изолятов грамотрицательных неферментирующих бактерий с множественной устойчивостью к антибиотикам (*P. aeruginosa* G-150, *S. maltophilia* 20014-163, *S. maltophilia* 20014-

279, *S. maltophilia* 20014-283, *S. maltophilia* 2014-785, *S. maltophilia* 2014-1262).

Минимальные подавляющие концентрации (МПК) экстрактов определяли методом микроразведений в стерильных полистироловых плоскодонных 96-луночных планшетах (Sarstedt, Германия). Сухие ацетоновые экстракты растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO), концентрация экстракта в DMSO — 20 мг/мл. Далее из раствора в DMSO готовили двукратные серийные разведения экстрактов в бульоне Мюллера-Хинтона (BD, США) и в бульоне Сабуро (HiMedia, Индия) в диапазоне концентраций от 500 до 4 мкг/мл. Для улучшения визуализации в бульоны предварительно был внесен метаболический индикатор — трифенилтетразолия хлорид в концентрации 200 мкг/мл. Поскольку DMSO, используемый в качестве первичного растворителя для экстрактов, имеет собственную антибактериальную активность, в предварительном исследовании было показано, что в используемых концентрациях (не более 5%) он не подавляет рост всех включенных в исследование культур. Из суточных культур тестируемых микроорганизмов, выращенных на ГРМ-агаре (бактерии) или агаре Сабуро (грибы), в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия готовили бактериальные суспензии с оптической плотностью 0,5 МакФарланд ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл). По 1,5 мкл полученной суспензии вносили в лунки планшета, содержащие по 150 мкл серийных разведений экстрактов лишайников. Последнюю лунку, содержащую 150 мкл питательной среды и 1,5 мкл микробной суспензии, использовали в качестве контроля роста.

Планшеты инкубировали в шейкере-термостате 18 ч, 35°C (бактерии) или 48 ч, 38°C (грибы) с постоянным низкоамплитудным встряхиванием 90 об./мин. Учет МПК проводили по отсутствию видимого роста микроорганизмов, сравнивая опытные и контрольные лунки, а также лунки с инокулированной питательной средой. Для определения минимальных бактерицидных концентраций (МБК) выполняли высев 10 мкл содержимого каждой лунки на сектор плотной питательной среды (ГРМ-агар для бактерий или агар Сабуро для грибов). После 24-часовой инкубации оценивали рост микроорганизмов, минимальную концентрацию, предотвращающую микробный рост, указывали как МБК.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты определения МПК экстрактов лишайников представлены в табл. Отмечена выраженная антибактериальная активность экстрактов

МПК экстрактов лишайников для бактерий и грибов

Микроорганизмы	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл			
	<i>E. prunastri</i>	<i>H. physodes</i>	<i>C. arbuscula</i>	<i>R. pollinaria</i>
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	250	62	31	250
<i>E. casseliflavus</i> ATCC 700327	250	62	62	125
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	250	62	62	250
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	500	62	62	250
<i>S. saprophyticus</i> ATCC BAA-750	250	125	31	125
<i>E. hormaechei</i> ATCC 700323	>500	>500	>500	>500
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>500	>500	>500	>500
<i>Paeruginosa</i> ATCC 27853	>500	>500	>500	>500
<i>Paeruginosa</i> G-150	>500	>500	>500	>500
<i>S. maltophilia</i> ATCC 17666	250	125	125	250
<i>S. maltophilia</i> 2014-163	250	250	500	>500
<i>S. maltophilia</i> 2014-279	500	500	>500	>500
<i>S. maltophilia</i> 2014-283	250	250	500	>500
<i>S. maltophilia</i> 2014-785	>500	500	>500	500
<i>S. maltophilia</i> 2014-1262	500	250	500	>500
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	500	>500	>500	>500
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	500	>500	>500	>500
<i>C. albicans</i> ATCC 90029	500	>500	>500	>500
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	500	>500	>500	>500

Примечание. Экстракт *X. parientina* не был активен в отношении всех тестируемых микроорганизмов (МПК >500).

H. physodes и *C. arbuscula* в отношении стафилококков и энтерококков (МПК 31 — 62 мкг/мл), экстракт *R. pollinaria* был активен против них в концентрациях 125 — 250 мкг/мл. Антимикробная активность в отношении штаммов энтеробактерий и *P. aeruginosa* отсутствовала в тестируемом диапазоне концентраций у всех экстрактов. Выявлена активность экстрактов *E. prunastri*, *H. physodes* и *C. arbuscula* (МПК 250 — 500 мкг/мл) в отношении всех штаммов *S. maltophilia*. Экстракт *X. parietina* не был активен в отношении всех тестируемых микроорганизмов. Противогрибковая активность (МПК 500 мкг/мл для всех штаммов *Candida*) выявлена только для экстракта *E. prunastri*.

МБК для большинства экстрактов с выявленной антимикробной активностью были равны МПК или отличались от нее не более чем на 1 разведение, что свидетельствует о преимущественно бактерицидном действии комплекса содержащихся в экстрактах вторичных метаболитов лишайников на микробную клетку.

ОБСУЖДЕНИЕ

Противомикробная активность экстрактов лишайников проявлялась главным образом в отношении грамположительных бактерий, что согласуется с результатами ранее проведенных исследований. Показан преимущественно бактерицидный характер антимикробного действия. Антибактериальная активность была выражена сильнее, чем противогрибковый эффект. Это согласуется с результатами ранее проведенных исследований [5, 8] и может быть обусловлено значительными отличиями в строении клеточной стенки бактерий и грибов, а также различной ее проницаемостью для антибактериальных компонентов экстрактов.

Заслуживает особого внимания выявленная антимикробная активность экстрактов *E. prunastri*, *H. physodes* и *C. arbuscula* в отношении *S. maltophilia* — грамтрицательной неферментирующей бактерии с природной устойчивостью к большинству антибиотиков. Ранее противомикробная активность экстрактов лишайников и их отдельных компонентов многократно тестировалась на большом количестве эталонных и клинических штаммов микроорганизмов из различных таксономических групп, включая грамтрицательные неферментирующие микроорганизмы, однако данные по чувствительности штаммов *S. maltophilia* отсутствуют в доступной литературе. Увеличение частоты выделения *S. maltophilia* из клинического материала при внутрибольничных инфекциях и от амбулаторных пациентов документировано в большом количестве публикаций. Непрерывно расширяется разнообразие клинических форм инфекций, ассоциированных с *S. maltophilia* (бактериemia и сепсис, поражения дыхательных и мочевых путей, раневые инфекции, эндокардиты, инфекции центральной нервной системы). В связи с множественной лекарственной устойчивостью клинических штаммов *S. maltophilia* возможность выбора химиотерапевтических препаратов для лечения инфекций, вызванных этим микроорганизмом, крайне ограничена [3]. В этой связи, лишайники можно рассматривать как возможный источник получения антимикробных соединений с антистенотрофомонадной активностью.

Чувствительность стенотрофомонад к экстрактам из *H. physodes* и *C. arbuscula* характеризовалась штаммовой специфичностью (отличия МПК в 2 — 4 раза для различных клинических изолятов *S. maltophilia*). По этой причине для получения сопоставимых данных по антибактериальной активности в

различных исследованиях необходимо включать в панель тестируемых микроорганизмов преимущественно эталонные штаммы из международных коллекций.

Направлением дальнейших исследований может стать выделение, очистка и изучение спектра антибактериальной активности отдельных вторичных метаболитов, входящих в состав *H. physodes* и *C. arbuscula*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Basile A., Rigano D., Loppi S. et al. Antiproliferative, antibacterial and antifungal activity of the lichen *Xanthoria parietina* and its secondary metabolite parietin. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16 (4): 7861-7875.
2. Boustie J., Grube M. Lichens — a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant. Genet. Resour.* 2005, 3: 273-278.
3. Chang Y.T., Lin C.Y., Chen Y.H., Hsueh P.R. Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. *Front. Microbiol.* 2015, 6: 893.
4. Grujicic D., Stosic I., Kosanic M. et al. Evaluation of in vitro antioxidant, antimicrobial, genotoxic and anticancer activities of lichen *Cetraria islandica*. *Cytotechnology.* 2014, 66 (5): 803-813.
5. Gulluce M., Aslan A., Sokmen M. et al. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. *Phytomedicine.* 2006, 13 (7): 515-521.
6. Kosanic M., Manojlovic N., Jankovic S. et al. *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuracea* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food. Chem. Toxicol.* 2013, 53: 112-118.
7. Kosanic M., Rankovic B., Stanojkovic T. et al. Biological activities and chemical composition of lichens from Serbia. *EXCLI J.* 2014, 13: 1226-1238.
8. Mitrovic T., Stamenkovic S., Cvetkovic V. et al. *Platismatia glauca* and *Pseudevernia furfuracea* lichens as sources of antioxidant, antimicrobial and antibiofilm agents. *EXCLI J.* 2014, 13: 938-953.
9. Oksanen I. Ecological and biotechnological aspects of lichens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 73 (4): 723-734.
10. Rankovic B., Misic M., Sukdolak S. Antimicrobial activity of extracts of the lichens *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *Parmelia pertusa*, *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla*. *Br. J. Biomed. Sci.* 2007, 64 (4): 143-148.
11. Studzinska-Sroka E., Holderna-Kedzia E., Galanty A. et al. In vitro antimicrobial activity of extracts and compounds isolated from *Cladonia uncialis*. *Nat. Prod. Res.* 2015; 29 (24): 2302-2307.

Поступила 05.09.16

Контактная информация: Тапальский Дмитрий Викторович, к.м.н.,
246050, Беларусь, Гомель, ул. Ланге, 5