S.N., Tulyahova V.S., Mikheev V.N., Ryzhikov A.B. Influenza A(H5N8) virus isolation in Russia, 2014. Arch. Virol. 2015 Nov; 160 (11): 2857-2860. doi: 10.1007/s00705-015-2570-4. Epub. 2015 Aug 26.
9. Marchenko V.Y., Susloparov I.M., Goncharova N.I., Kolosova N.P., Shipovalov A.V., Ilyicheva T.N., Durymanov A.G., Chernyshova O.A., Kozlovskiy L.I., Chernyshova T.V., Pryadkina E.N., Karimova T.V., Mikheev V.N., Ryzhikov A.V. Highly pathogenic influenza H5N1 virus of clade 2.3.2.1c in Western Siberia. Arch Virol. 2016 Jun; 161 (6): 1645-9. doi: 10.1007/s00705-016-2800-4. Epub. 2016 Mar 3.
10. Tewawong N., Prachayangprecha S., Vichiwattana P. et al. Assessing antigenic drift of seasonal influenza A(H3N2) and A(H1N1)pdm09 viruses. PLoS One. 2015 Oct; 10 (10): e0139958. doi: 10.1371/journal.pone.0139958. eCollection 2015.
11. World Health Organization Surveillance Network: Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Geneva, WHO, 2011, p. 59-62.
12. Xie H., Wan X.F., Ye Z. et al. H3N2 mismatch of 2014-15 northern hemisphere influenza vaccines and head-to-head comparison between human and ferret antisera derived antigenic maps. Sci. Rep. 2015 Oct; 16;5:15279. doi: 10.1038/srep15279.

Поступила 10.09.16

Контактная информация: Ильичева Татьяна Николаевна, д.б.н.,
630559, Новосибирская обл., пос. Кольцово, р.т. (383)363-47-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Д.В.Тапальский[1], Д.Р.Петренев[2], О.М.Храмченкова[3], А.С.Дорошкевич[1]

АНТИМИКРОБНАЯ И ПРОТИВОГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ЛИШАЙНИКОВ, РАСПРОСТРАНЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

[1]Гомельский государственный медицинский университет, [2]Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси, Гомель; [3]Гомельский 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 микроразведений 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 C.arbuscula в отношении стафилококов 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 C.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 C.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.Tapalsky[1], D.R.Petrenev[2], O.M.Khramchenkova[3], A.S.Doroshkevich[1]

ANTIMICROBIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF LICHENS PREVALENT IN BELARUS

[1]Gomel State Medical University, [2]Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel; [3]Gomel 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 лихенофлоре 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 листовой 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 ($1,5x10^8$ 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°С (бактерии) или 48 ч, 38°С (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 неинокулированной 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			
	E.prunastri	H.physodes	C.arbuscula	R.pollinaria
E.faecalis ATCC 29212	250	62	31	250
E.casseliflavus ATCC 700327	250	62	62	125
S.aureus ATCC 25923	250	62	62	250
S.aureus ATCC 6538	500	62	62	250
S.saprophyticus ATCC BAA-750	250	125	31	125
E.hormaechei ATCC 700323	>500	>500	>500	>500
E.coli ATCC 25922	>500	>500	>500	>500
P.aeruginosa ATCC 27853	>500	>500	>500	>500
P.aeruginosa G-150	>500	>500	>500	>500
S.maltophilia ATCC 17666	250	125	125	250
S.maltophilia 2014-163	250	250	500	>500
S.maltophilia 2014-279	500	500	>500	>500
S.maltophilia 2014-283	250	250	500	>500
S.maltophilia 2014-785	>500	500	>500	500
S.maltophilia 2014-1262	500	250	500	>500
C.albicans ATCC 10231	500	>500	>500	>500
C.albicans ATCC 14053	500	>500	>500	>500
C.albicans ATCC 90029	500	>500	>500	>500
C.parapsilosis ATCC 22019	500	>500	>500	>500

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

H. physodes и C. arbuscula в отношении стафилококов 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 — грамотрицательной 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 грамотрицательные 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 (бактериемия 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 furfuraceae 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 glaucia 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