

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

_____ Т. Г. Волова
« ____ » _____ 2024 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Антимикробные свойства экстрактов лишайника *Usnea* и эфирных масел
лекарственных растений

Руководитель: _____ проф., д-р биол. наук С.В. Прудникова

Выпускник _____ В.С. Ефимова

Красноярск 2024

РЕФЕРАТ

Бакалаврская работа по теме «Антимикробные свойства экстрактов лишайника *Usnea* и эфирных масел лекарственных растений» представлена в объеме 40 страниц текстового документа, содержит 10 иллюстраций, 3 таблицы и 35 использованных источников.

Ключевые слова: эфирные масла, летучие вещества, лишайник *Usnea*, усниновая кислота, экстракты.

Целью работы было изучить антимикробные свойства экстрактов лишайника *Usnea* и эфирных масел в отношении тест-культур грибов и бактерий.

Для достижения заданной цели были поставлены следующие задачи: получение экстрактов из лишайника *Usnea* с использованием растворителей этанола и хлороформа, исследовать антимикробные свойства экстрактов лишайника в отношении тестовых культур бактерий и грибов, исследовать антимикробные свойства эфирных масел туи, можжевельника, пихты, герани и полыни, а также их летучих веществ, в отношении тест-культур бактерий и грибов.

Распространение устойчивости микроорганизмов к существующим антибиотикам становится всё более глобальной проблемой в настоящее время. Угроза здоровью делает актуальным поиск новых источников лекарственных препаратов.

В исследовании были получены экстракты *Usnea* с антимикробными свойствами против *B. subtilis* и *M. luteus*. Масла можжевельника, герани и пихты показали широкий спектр антимикробных свойств против всех тестовых штаммов микроорганизмов. Летучие вещества можжевельника подавляли рост грибов *H. werneckii*, *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *R. mucilaginosa* с увеличением антимикробной активности. Значения зон отсутствия роста находились в диапазоне от $10,5 \pm 1,0$ мм до $20,5 \pm 2,5$ мм.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Общая характеристика лишайников	6
1.2 Лишайники как источники биохимически ценных веществ	7
1.3 Антибактериальные свойства лишайников	8
1.4 Общие сведения об эфирных маслах	9
1.5 Применение эфирных масел в медицине.....	11
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	14
2.1 Характеристика объектов исследования	14
2.2 Характеристика тестовых микроорганизмов	17
2.3 Методы исследования.....	21
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	24
3.1 Антимикробные свойства лишайника <i>Usnea</i>	24
3.2 Антимикробные свойства эфирных масел растений в отношении тестовых культур грибов.....	25
3.2 Антимикробные свойства эфирных масел растений в отношении тестовых культур бактерий.....	29
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	31
ВЫВОДЫ	32
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	33

ВВЕДЕНИЕ

Распространение устойчивости микроорганизмов к существующим антибиотикам становится всё более глобальной проблемой в настоящее время. Угроза здоровью делает актуальным поиск новых источников лекарственных препаратов. Альтернативы химическим антибиотикам ищут в природе. Так, к примеру, различные виды растений обладают соединениями, которые имеют антимикробную активность.

Известно, что некоторые виды лишайников, например *Cladonia rangiferina*, *Cetraria islandica*, *Usnea barbata* и др., образуют биологически активные вещества [1]. Поэтому лишайники применяются в народной медицине. Исследованиями ряда авторов показано, что экстракты лишайника *Usnea* содержат усниновую кислоту, проявляющую активность в отношении некоторых видов бактерий (*Bacillus subtilis*) [5, 9].

Так же согласно различным исследованиям, эфирные масла, получаемые из растений, показывают широкий спектр антимикробного действия против различных групп микроорганизмов. Ряд исследователей отметили антимикробное действие эфирного масла чабера садового (*Satureja hortensis* L.) в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, таких как *Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringens*, *Micrococcus flavus*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Erwinia amylovora* и *Salmonella typhi*. Эфирное масло тимьяна блошиного (*Thymus pulegioides* L.) обладает активностью в отношении *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* и *Candida sp.* Эфирное масло можжевельника (*Juniperus communis* L.), проявляет антибактериальные и противогрибковые свойства в отношении некоторых микроорганизмов, включая *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* [18, 21].

Таким образом, антимикробные вещества растительного происхождения могут быть использованы в составе раневых покрытий, антисептических материалов или растворов для снижения микробной контаминации и предупреждения заражения.

Целью работы было изучить антимикробные свойства экстрактов лишайника *Usnea* и эфирных масел в отношении тест-культур грибов и бактерий.

В задачи исследования входило:

- 1) Получение экстрактов из лишайника *Usnea* с использованием растворителей этанола и хлороформа.
- 2) Исследовать антимикробные свойства экстрактов лишайника в отношении тестовых культур бактерий *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и грибов *Rhodotorula mucilaginosa*, *Hortaea werneckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*
- 3) Исследовать антимикробные свойства эфирных масел туи, можжевельника, пихты, герани и полыни, а также их летучих веществ, в отношении тест-культур бактерий *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и грибов *Rhodotorula mucilaginosa*, *Hortaea werneckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика лишайников

Лишайники – это симбиоз микобионта (гриба) и фитобионта (водоросли или цианобактерий). Они образуются благодаря тесному взаимодействию двух организмов, которые приспосабливаются друг к другу и обмениваются питательными веществами. Микобионт обеспечивает фитобионта защитой от окружающей среды и поставляет ему минеральные элементы, а фитобионт, в свою очередь, синтезирует органические соединения для обоих партнеров. Гриб получает вещества, ассимилируемые водорослью, и ведет себя в слоевище лишайника как паразитический организм. Однако для существования как самого гриба, так и лишайника в целом необходимо, чтобы водоросль, окруженная со всех сторон грибными гифами, все-таки могла жить и более или менее нормально развиваться. Если гриб начнет проявлять себя слишком активно, поражать все без исключения водоросли и, использовав их содержимое, уничтожать их, это в конце концов может привести к гибели всех водорослей слоевища. Но тогда, уничтожив весь свой запас питания, погибнет и сам гриб, а значит, перестанет существовать и лишайник. Гриб должен использовать лишь часть водорослей, оставляя резерв – здоровые и нормальные водоросли, содержимым которых он мог бы питаться.

Основные функции лишайников связаны с защитой окружающей среды от загрязнений: они способствуют борьбе с эрозией почвы, очистке воздуха от токсичных веществ и созданию благоприятных условий для жизни других видов растений и животных [11].

Разнообразие лишайников зависит от места обитания, климатических условий и типа гриба, который их образует. Лишайники широко распространены на земном шаре: они растут на поверхности камней, почвы, коры деревьев, мха и льда.

Лишайники являются индикатором экологического состояния окружающей среды и используются в биомониторинге загрязнений.

Одной из ключевых характеристик лишайников является их способность к прижизненному синтезу лекарственных веществ. Многие виды лишайников содержат биологически активные соединения, которые могут быть использованы для лечения различных заболеваний.

Таким образом, лишайники – это уникальное явление природы, которое играет важную роль в экосистеме на Земле. Они обладают не только красивой и разнообразной структурой, но также имеют большую практическую ценность как природный ресурс [10].

1.2 Лишайники как источники биохимически ценных веществ

Лишайники являются одним из наиболее интересных источников биохимически ценных веществ. В них содержится широкий спектр различных метаболитов, которые могут иметь промышленное, фармацевтическое и косметическое значение.

Одним из самых ценных компонентов лишайников являются лекарственные вещества. Некоторые из них используются для лечения заболеваний сердца, головной боли, астмы, депрессии и других заболеваний. Также лишайники содержат антибиотики, которые используются для лечения инфекций [5].

Кроме того, лишайники содержат полезные пигменты, такие как каротиноиды и фикобилины. Они обладают высокой антиоксидантной активностью и защищают клетки от свободных радикалов.

Лишайники также богаты полисахаридами – сложными углеводами, которые могут использоваться в качестве пребиотиков или добавок в питательные смеси. Эти полисахариды также имеют ряд полезных свойств, таких как укрепление иммунной системы и снижение уровня холестерина в крови [11].

Наконец, лишайники содержат металлохелатирующие агенты – вещества, которые способны связывать тяжелые металлы. Эти вещества используются для очистки почв и водных ресурсов от загрязнений.

Таким образом, лишайники представляют собой богатый источник биохимически ценных веществ. Они могут быть использованы в различных отраслях промышленности и фармацевтике для создания новых продуктов и лекарств.

1.3 Антибактериальные свойства лишайников

Лишайники уже давно привлекают внимание научного сообщества благодаря своим уникальным свойствам. Одна из самых интересных сторон лишайников – их антибактериальные свойства.

Поскольку в природе существует более 20 000 видов лишайников, исследования продолжаются до сих пор, но уже можно выделить несколько кандидатов на роль антибиотиков.

Один из них – усниновая кислота, содержащаяся во многих лишайниках, в частности в лишайнике *Usnea*, которое обладает способностью угнетать рост бактерий таких видов как *Bacillus subtilis* и *Micrococcus luteus*. Также получено много данных о том, что активные компоненты другого лишайника - *Cladonia rangiferina* - обладают высокой эффективностью против *Streptococcus pneumoniae* и *Escherichia coli* [13].

В СССР антибиотик из лишайников был впервые получен в 1947 году в Ленинграде Моисеевой Е.Н., Литвиновым Б.А. под руководством профессора В.П. Савича. Первое название антибиотика было «Бинан», сейчас этот препарат называется натриевая соль усниновой кислоты. Данный антибиотик действует на грамположительные бактерии, на некоторые вирусы и предназначается для применения в хирургии и гинекологии. Лишайниковый антибиотик прекрасно заживляет ожоги и другие поражения кожи. Для получения этого антибиотика используются виды родов *Cladonia*, *Usnea*, *Cetraria* и других листоватых и кустистых лишайников [2].

Исследования потенциальной антиоксидантной и прооксидантной активности усниновой кислоты, экстрагированной из *Xanthoparmelia farinosa*, с использованием линии клеток лимфоцитов человека под УФ-В-облучением показали более высокую выживаемость клеток, инкубированных с усниновой кислотой при низких дозах УФ-излучения до 0,1 Дж/см. При использовании как более высоких доз UVB (до 14 Дж/см), так и более высоких концентраций усниновой кислоты наблюдался противоположный эффект [34].

Таким образом, можно заключить, что лишайники являются перспективными объектами для поиска новых антибактериальных препаратов. В будущем возможно создание лекарственных форм на основе активных компонентов этих растений с целью борьбы с инфекциями и другими заболеваниями.

1.4 Общие сведения об эфирных маслах

Эфирные масла – это ароматные, концентрированные и летучие жидкости, полученные из различных частей растений путем дистилляции, отжима или экстракции. Их химический состав сложен и включает в себя различные вещества, такие как сложные эфиры, кетоны, спирты и ароматические компоненты. Масла могут быть получены из цветов, трав, деревьев или кустарников, которые привлекают опылителей, или из растений, которые отпугивают вредителей. Это приводит к большому разнообразию масел с различными ароматами, цветами и методами получения. Качество масел может варьироваться в зависимости от сорта растения, условий его выращивания, возраста и времени сбора. Эфирные масла отличаются от обычных масел тем, что быстро испаряются при комнатной температуре и наполняют воздух своим характерным ароматом [14].

Существует несколько видов эфирных масел, которые различаются в зависимости от того, из какой части растения они были получены:

- Цветочные эфирные масла извлекаются из цветков растений.

Примеры включают масла розы, жасмина и лаванды.

- Травяные эфирные масла получают из стеблей и листьев растений.

Примерами являются масла мяты, розмарина и базилика.

- Лиственные эфирные масла производят из листьев деревьев и кустарников. Некоторые примеры включают масла эвкалипта и пихты.

- Древесные эфирные масла добываются из древесины и коры деревьев.

Примеры включают масло сандалового дерева и кедра.

- Бальзамические эфирные масла получают из смолы и бальзамов.

Примеры включают эфирное масло мирры и ладана.

Содержание эфирных масел варьируется у разных видов растений. Некоторые растения, такие как злаки, осоки и пальмы, обычно имеют очень низкое содержание эфирных масел. С другой стороны, представители семейств Яснотковые (к которым относится мята), Астровые (например, подсолнух), Сельдерейные (родственники сельдерея), Лавровые (включая лавровый лист), Миртовые (как эвкалипт), Хвойные и Цитрусовые (включая апельсины и лимоны) содержат большое количество эфирных масел. [15].

Количество эфирных масел во многом зависит от внешних факторов. Климат, уровень освещенности, тип почвы и стадия роста растения значительно влияют на накопление эфирных масел. В теплых климатических условиях, на солнечных местах и на плодородной почве концентрация масел обычно выше. Тем не менее, при высоких температурах их концентрация может снизиться после испарения влаги. Как правило, молодые растения содержат больше масел, чем взрослые. Масла накапливаются в различных частях растения, в особенности во внешних и внутренних органах. Внешние образования, такие как желёзки и волоски, и внутренние образования, например, железки и ткани, служат местами накопления эфирных масел внутри растения [16].

Пряные эфирные масла производятся из семян, плодов и корней различных растений. Примеры включают корицу, имбирь и кардамон.

Экзотические эфирные масла включают масла из тропических растений, таких как пальмароза и иланг-иланг. Каждый вид эфирного масла обладает своими уникальными свойствами и может использоваться в различных целях

Эфирные масла играют важную биологическую роль в жизни растений. Их часто считают “отходами” растительного обмена веществ, но они выполняют ряд важных функций. Прежде всего, эфирные масла служат для защиты растений от насекомых и мелких грызунов. Они также способствуют заживлению ран на корнях и стволах деревьев, что помогает им восстанавливаться после повреждений. Кроме того, запах цветов, содержащих эфирные масла, привлекает насекомых-опылителей, которые помогают растениям размножаться. Наконец, испаряясь, эфирные масла могут снижать температуру растений и защищать их от перегрева. Это особенно важно в условиях высокой температуры и низкой влажности, когда растения могут подвергаться риску теплового удара [17].

1.5 Применение эфирных масел в медицине

Эфирные масла представляют собой маслянистые жидкости различного цвета – от светло-жёлтого до коричневого, практически нерастворимые в воде, но легко испаряющиеся при комнатной температуре. Обычно они обладают приятным запахом. Известно около 3000 различных видов эфирных масел. Около 300 из них широко используются в медицине, ветеринарии, пищевой промышленности, косметологии и производстве бытовых товаров. Из 3000 изученных эфирномасличных растений выделено около 1000 органических соединений.

Эфирные масла превосходят антибиотики по многим критериям, включая низкую токсичность и отсутствие побочных эффектов. Они также не способствуют образованию устойчивых штаммов микроорганизмов, в отличие от антибиотиков.

Эфирные масла содержат химические группы и отдельные химические элементы, такие как углерод, водород и кислород. Кислород является

главным элементом эфирных масел. Компоненты масел включают различные соединения, расположенные в порядке по их бактерицидной активности: фенолы, альдегиды, спирты, эфиры и кислоты [18].

Эфирные масла обладают сильными противовоспалительными, антисептическими и бактерицидными свойствами. Они положительно влияют на нервную систему, эмоции и механизм саморегуляции в организме. Благодаря содержанию секвестерпенов эфирные масла подавляют воспалительные процессы в организме. Эти масла помогают облегчить симптомы предменструального синдрома, менопаузы и регулируют менструальный цикл. Противогрибковые свойства эфирных масел обусловлены наличием таких компонентов, как аир, бергамот, герань, душица обыкновенная, лимонник китайский и роза дамасская. Противовирусные свойства эфирных масел объясняются присутствием альдегидов, фенолов и спирта фарнезола. Бактерицидные и бактериостатические свойства эфирных масел проявляются в отношении грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов. Иммуномодулирующие свойства эфирных масел связаны с наличием эвгенола, линалоола, кетонов и азулена [19].

Исследования показали, что они могут замедлять старение, активировать регенерацию органов и тканей, стимулировать иммунную систему и препятствовать образованию и развитию злокачественных опухолей. Кроме того, они способны снижать токсическое воздействие ксенобиотиков и ионизирующего излучения, оптимизировать работу систем и органов организма, демонстрируя свойства. Спазмолитическое действие эфирных масел обусловлено их способностью расслаблять мышечные ткани кишечника, бронхов и других органов. Это помогает устранить спазмы и неприятные ощущения, связанные с гладкой мускулатурой желудочно-кишечного тракта, желчевыводящих путей и мочеполовой системы. Эфирные масла содержат различные активные компоненты, такие как монотерпены, которые взаимодействуют с рецепторами гладких мышц и вызывают

релаксацию. Благодаря этому свойству, эфирные масла могут использоваться для облегчения симптомов различных заболеваний, связанных со спазмами и дискомфортом в указанных системах организма [20].

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Характеристика объектов исследования

2.1.1 Лишайник *Usnea barbata*

Род лишайников семейства *Пармелиевые (Parmeliaceae)*, включающий в себя около 300 видов, распространённых в различных климатических зонах, но особенно широко в умеренной лесной зоне.

Царство: *Fungi*

Отдел: *Ascomycota*

Класс: *Lecanoromycetes*

Порядок: *Lecanorales*

Семейство: *Parmeliaceae*

Род: *Usnea*

Вид: *Usnea barbata*



Рисунок 1. Внешний вид лишайника *Usnea barbata*

Usnea barbata, также известная как лесной мох или бородатая уснея, является видом лишайника, распространенным в северном полушарии (рис. 1). Он получил свое название благодаря своей бородистой структуре, состоящей из длинных и тонких филаментов. Лишайник обычно имеет

зеленый цвет и может достигать длины до нескольких метров. *Usnea barbata* растет на коре деревьев и камнях в лесах и горных районах. Этот вид лишайника широко используется в традиционной медицине для лечения инфекций дыхательных путей и других заболеваний. Кроме того, он часто используется в качестве индикатора загрязнения окружающей среды, так как чувствителен к изменениям экологической ситуации [3].

2.1.2 Эфирные масла

В исследовании использовались эфирные масла туи, можжевельника, пихты, герани и полыни.

Эфирное масло туи западной (Thuja occidentalis L.). Активные компоненты эфирного масла туи, такие как метилтуайат, метилмиртенат и альфа-терпинеол, обеспечивают ему бактерицидные и противогрибковые свойства. Они помогают защитить организм от воздействия вредных факторов окружающей среды, укрепляют иммунитет, а также обладают мощными очищающими свойствами. Кроме того, эти вещества способны действовать как инсектициды, помогая отпугивать насекомых, и являются эффективными природными репеллентами. Поэтому эфирное масло туи может быть полезным не только для поддержания здоровья, но и для защиты от насекомых [21].

Эфирное масло можжевельника обыкновенного (Juniperus communis L.). Эфирное масло можжевельника обладает бактерицидными и противогрибковыми свойствами благодаря содержанию органических соединений, таких как пинен, камфен, кадинен, терпинеол, цимол, борнеол и можжевельная камфара. Это лёгкое и текучее бесцветное масло имеет смолистый, терпкий, дымный и бальзамический аромат. В косметике масло можжевельника используется как тонизирующее средство, повышающее упругость кожи, и для укрепления волос. Также оно обладает антицеллюлитным свойством. В бане и сауне можжевельное масло создаёт великолепный дезодорирующий аромат [22].

Эфирное масло пихты сибирской (Abies sibirica Ledeb.). Пихтовое масло обладает бактерицидными и противогрибковыми свойствами благодаря наличию в его составе активных компонентов, таких как борнилацетат, монотерпеновые углеводороды, борнеол и сесквитерпены. При наружном применении пихтовое масло оказывает противовоспалительное, обезболивающее и местнораздражающее действие. В спортивной медицине его используют в качестве согревающего массажного средства при растяжении сухожилий и мышц. Пихтовое масло применяется в качестве местного обезболивающего средства у взрослых при болях, связанных с заболеваниями нервной системы, опорно-двигательного аппарата и в период обострений [23].

Эфирное масло герани (Pelargonium graveolens, L'Hér. ex Ait. – пеларгония ароматная). Эфирное масло герани проявляет свои бактерицидные и противогрибковые свойства благодаря активным компонентам, таким как цитронеллол и гераниол. Оно способно уменьшить боль в горле, успокоить, поднять настроение, снизить утомляемость и способствовать быстрому засыпанию. Кроме того, масло герани улучшает кровоток, обеспечивает равномерное распределение меланина и предотвращает образование шрамов и пигментных пятен [24].

Эфирное масло полыни горькой (Artemisia absinthium L.). Эфирные масла полыни обладают бактерицидными и противогрибковыми свойствами благодаря своим активным компонентам. Они влияют на микроорганизмы, разрушая клеточные стенки, повреждая цитоплазматические мембраны и вызывая гибель клеток. Исследования показали, что эфирные масла полыни эффективны против грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также против грибов. Они ингибируют рост таких микроорганизмов, как *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*. Кроме того, эфирные масла полыни могут влиять на биоплёнки микроорганизмов, снижая их персистентные свойства и способствуя разрушению. Таким образом, эфирные масла полыни могут быть перспективными для разработки новых

антибактериальных и противогрибковых препаратов, особенно учитывая их противовоспалительное и регенерирующее действие [25].

2.2 Характеристика тестовых микроорганизмов

В качестве тестируемых объектов были использованы четыре вида бактерий: *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, и четыре вида грибов: *Rhodotorula mucilaginosa*, *Hortaea werneckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*.

Отдел: *Actinobacteria*

Класс: *Actinobacteria*

Порядок: *Micrococcales*

Семейство: *Micrococcaceae*

Род: *Micrococcus*

Вид: *Micrococcus luteus*

Клетки сферические, диаметром 0,5-2,0 мкм. В парах, тетрадах или скоплениях неправильной формы, но не в цепочках. Грамположительные. Редко подвижные, не образуют спор. облигатные аэробы. Колонии обычно желтые. Хемоорганотрофы, метаболизм дыхательного типа. При использовании углеводов кислоту часто образуют в небольших количествах или не образуют. Обычно растут на простых средах. Каталазоположительные часто слабо оксидазоположительные. Галотолерантные, растут в присутствии 5 % NaCl содержат цитохромы и устойчивы к лизостафину. Оптимальная температура воздуха 25-37 °C. Встречаются главным образом на коже млекопитающих и в почве, однако выделяются в основном из пищевых продуктов и из воздуха [27].

Отдел: *Firmicutes*

Класс: *Bacilli*

Порядок: *Bacillales*

Семейство: *Bacillaceae*

Род: *Bacillus*

Вид: *Bacillus subtilis*

Палочковидная бактерия, размер 2-5×0,4-0,6 мкм. Грамположительные. Развивается при температуре +5...+45 °С Перитрихиальное расположение жгутиков, подвижная. Колонии сухие, мелкоморщинистые, бархатистые, бесцветные или розовые. Растёт на МПА, МПБ, а также на средах, содержащих растительные остатки, простых синтетических питательных средах для гетеротрофов [28].

Отдел: *Proteobacteria*

Класс: *Gamma proteobacteria*

Порядок: *Enterobacteriales*

Семейство: *Enterobacteriaceae*

Род: *Escherichia*

Вид: *Escherichia coli*

Прямые палочки, одиночные или в парах. Для многих штаммов характерны микрокапсулы. Грамотрицательные. Подвижные за счет жгутиков или неподвижные. Факультативные анаэробы, обладающие и дыхательным и бродильным типами метаболизма. Оптимальная температура 37 °С. Катаболизируют D-кислоту и другие углеводы с образованием кислоты и газа. Оксидазоотрицательные; каталазоположительные. Восстанавливают нитрат. Встречаются как нормальная флора в нижнем отделе кишечника у гомойотермных животных. Штаммы, содержащие энтеротоксины и/или другие факторы вирулентности, включая инвазивность и факторы колонизации, вызывают желудочно-кишечные заболевания [29].

Отдел: *Proteobacteria*

Класс: *Gamma proteobacteria*

Порядок: *Pseudomonadales*

Семейство: *Pseudomonadaceae*

Род: *Pseudomonas*

Вид: *Pseudomonas fluorescens*

Вид граммотрицательных подвижных палочковидных бактерий с несколькими (от 2 до 4) жгутиками. Являются облигатными аэробами. Некоторые штаммы способны использовать нитраты вместо кислорода в качестве конечного акцептора в процессе клеточного дыхания. Оптимальная температура для роста *P. fluorescens* составляет 25-30 °С. Даёт положительные результаты в тесте на оксидазу. Также является несакхаролитической бактерией [30].

Отдел: *Basidiomycota*

Класс: *Microbotryomycetes*

Порядок: *Sporidiobolales*

Семейство: *Sporidiobolaceae*

Вид: *Rhodotorula mucilaginosa*

Дрожжеподобные грибы. На среде Сабуро образуют гладкие, округлые, часто слизистые колонии розовато-красного или кораллового цвета. Клетки в таких колониях образуют слизистые капсулы. При микроскопии представлены сферическими, яйцевидными, овальными или удлинёнными почкующимися клетками размером (2,5-6,5)×(6,5-14,0) мкм. Почкование многостороннее, может быть примитивный мицелий, редко – зачатки истинного мицелия и хламидоспороподобные клетки. Максимальная температура для роста 28-38 °С. Углеводы не сбраживает, обладает уреазной активностью, способны образовывать полисахариды [31].

Отдел: *Ascomycota*

Класс: *Dothideomycetes*

Порядок: *Capnodiales*

Семейство: *Teratosphaeriaceae*

Род: *Hortaea*

Вид: *Hortaea werneckii*

Грибы рода *Hortaea* относятся к группе черных дрожжей. Проявляют мицелиально-дрожжевой диморфизм. Колонии гриба гладкие или слегка шероховатые, черного цвета. Образуемые грибами меланиновые пигменты

защищают клетки от УФ- и ионизирующего излучения, экстремального рН и осмотического стресса. Виды рода *Hortaea* проявляют большую амплитуду экологической толерантности: устойчивы к воздействию температур от 0 до 120 °С, галотолерантные, есть ацидофильные представители; являются условно-патогенными микроорганизмами [26]. Штамм гриба *Hortaea werneckii* был выделен из почвы.

Отдел: *Eumycota*

Класс: *Ascomycetes*

Семейство: *Saccharomycetaceae*

Род: *Saccharomyces*

Вид: *Saccharomyces cerevisiae*

Внешний вид колоний *S. cerevisiae* может существенно меняться в зависимости от условий среды, в которых они растут. В оптимальных условиях колонии имеют гладкую круглую форму и блестящую поверхность. Однако при недостатке питательных веществ или изменении других параметров среды колонии могут становиться сложными по структуре и форме. Максимальная температура для роста *S. cerevisiae* составляет 37 °С. Однако некоторые штаммы могут расти при более высоких температурах, до 42 °С [32].

Отдел: *Ascomycota*

Класс: *Euascomycetes*

Порядок: *Saccharomycetales*

Семейство: *Saccharomycetaceae*

Род: *Candida*

Вид: *Candida albicans*

Candida – это род дрожжей, которые являются частью микробиома человека. В норме они не вызывают проблем, но относятся к условно-патогенным микроорганизмам. Некоторые виды *Candida*, например *C. albicans*, образуют крупные круглые колонии на агаре, которые выглядят как сливки или творог. *C. albicans* – это одноклеточный микроорганизм размером

до 10 микрометров. Клетки имеют овальную или круглую форму и плотную оболочку из 3-5 слоёв. Этот гриб может существовать в двух формах: дрожжевой (для выживания в кислотных условиях) и мицелиальной (для развития в нейтральной и щелочной среде). *C. albicans* чувствителен к высоким температурам, солнечным лучам, йоду, фенолу и другим веществам. Максимальная температура роста *C. albicans* составляет 37 °С [33].

2.3 Методы исследования

2.3.1 Методы исследования антимикробных свойств эфирных масел

Для исследования антимикробных свойств эфирных масел использовался диско-диффузионный метод.

Проверяли антимикробную активность эфирных масел пихты, туи, можжевельника, герани и полыни. Их активность проверяли в отношении микроорганизмов: *Rhodotorula mucilaginosa*, *Hortaea werneckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*; *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*.

Антимикробные свойства масел изучали диско-диффузионным методом, высевая тест-культуры в чашки Петри на питательный агар. Для бактерий использовали среду Мюллера-Хинтона, для грибов – среду Сабуро.

Постановка диско-диффузионного метода включала следующие этапы:

- приготовление питательных сред;
- приготовление суспензии микроорганизма и инокуляция;
- наложение дисков и инкубация;
- учет результатов.

Для засева чашек Петри с питательной средой использовали суточные культуры бактерий. Суспензию бактерий с оптической плотностью 0,5 ед. по МакФарланду (10^8 клеток в 1 мл) наносили стерильным ватным тампоном на поверхность питательной среды. На засеянный газон раскладывали диски из фильтровального картона (ГОСТ 6722-75), пропитанные маслами. Далее

чашки Петри ставили в термостат и инкубировали при температуре 30 °С в течение 1-3. После окончания инкубации проводили замеры диаметра зоны отсутствия роста.

Так же использовали метод определения чувствительности микроорганизмов к летучим веществам эфирных масел. Для этого метода использовались такие же питательные среды – Сабуро для грибов и Мюллера-Хинтона для бактерий. Микроорганизмы засеивали на среду частыми штрихам, образуя “газон”.

Диски из фильтровального картона (ГОСТ 6722-75) пропитывали эфирными маслами и помещали на крышку чашки Петри, в центр. Сверху ставили чашку Петри с засеянной культурой, чтобы исключить прямой контакт диска с микроорганизмами. Затем чашки Петри герметизировали скотчем. Далее чашки Петри помещали в термостат и инкубировали в течение суток при температуре 30 °С. Затем оценивали интенсивность роста колоний микроорганизмов по сравнению с отрицательным контролем - рост микроорганизмов без воздействия эфирных масел.

2.3.2 Методы исследования антимикробных свойств лишайника

Антимикробную активность лишайника *Usnea* исследовали на следующих микроорганизмах: *Rhodotorula mucilaginosa*, *Hortaea werneckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*; *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*.

Из порошка высушенного лишайника были получены экстракты в этаноле и хлороформе. Для получения экстрактов лишайник был растерт в ступке до мелкой крошки. Спиртовой экстракт готовили следующим образом: сначала смешивали 90% этанол (10 мл) с гидроксидом натрия, а затем добавляли растертый лишайник (2,5 г). Экстракт в хлороформе был получен путем смешивания мелкой крошки лишайника (2,5 г) и хлороформа (5 мл). Оба экстракта настаивали в течение суток при комнатной температуре.

Антимикробные свойства экстрактов изучали диско-диффузионным методом, высевая тест-культуры в чашки Петри на питательный агар. Для бактерий использовали среду Мюллера-Хинтона, для грибов – среду Сабуро. Техника посева описана в п. 2.3.1.

На засеянный газон раскладывали диски из фильтровального картона (ГОСТ 6722-75), пропитанные экстрактами и высушенные на воздухе для испарения растворителя. В каждую чашку Петри с засеянной культурой микроорганизма помещали по 2 бумажных диска. Чашки инкубировали в термостате, через 1-3 суток измеряли диаметр зоны отсутствия роста вокруг диска.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Страницы 24-30 изъяты в связи с авторским правом

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой работе изучались антимикробные свойства лишайника *Usnea* и эфирных масел. Анализ результатов экспериментов указывает на перспективность использования этого вида лишайника и некоторых из выбранных видов растений как природных источников антибактериальных препаратов.

Лишайник *Usnea* обладает мощными антимикробными свойствами благодаря содержанию усниновой кислоты. Эта кислота проявляет активность против широкого спектра микроорганизмов, и наибольшую по отношению к *Bacillus subtilis* и *Micrococcus luteus* при правильном приготовлении экстрактов.

Эфирные масла лекарственных растений обладают рядом полезных свойств, среди которых - антибактериальное действие. Это делает их хорошей альтернативой синтетическим антибиотикам. Эфирные масла активны против грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибов. Эфирное масло можжевельника показало наилучшее антимикробное действие по отношению выбранным культурам микроорганизмов. А эфирное масло полыни почти не повлияло на рост бактерий и грибов диско-диффузным и летучим методами.

В итоге этого исследования удалось изучить антибактериальные свойства растений, которые могут быть применены в производстве лекарственных средств.

ВЫВОДЫ

1. В работе были получены экстракты лишайника *Usnea*, показавшие антимикробные свойства в отношении *B. subtilis* и *M. luteus*. Наибольшую антимикробную активность проявил спиртовой экстракт, зоны отсутствия роста составили $21,5 \pm 1,5$ мм и $50,0 \pm 1,0$ мм соответственно.

2. Среди исследованных эфирных масел наиболее широким спектрами обладали масла можжевельника, герани и пихты, проявившие антимикробные свойства в отношении всех тестовых штаммов микроорганизмов. В отношении санитарно-показательных микроорганизмов (*C. albicans* и *E. coli*) эфирное масло можжевельника оказалось наиболее эффективным.

3. Летучие вещества можжевельника подавляли рост грибов *H. werneckii*, *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *R. mucilaginosa* в порядке увеличения антимикробной активности. Значения зон отсутствия роста оказались в диапазоне от $10,5 \pm 1,0$ мм до $20,5 \pm 2,5$ мм в диаметре.

4. Чувствительность микроорганизмов к эфирным маслам зависела от вида микроорганизмов; максимальную чувствительность проявили виды грибов *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *R. mucilaginosa* и бактерии *P. fluorescens*, и *M. luteus*, минимальную чувствительность проявили *H. werneckii*, *E. coli*, *B. subtilis*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Crawford S. D. Lichens used in traditional medicine / In: Ranković, B. (ed.) Lichen Secondary Metabolites. - Springer, Cham, 2019. - P. 31-97.
2. Eromasova N., Zyryanova O. New locations of rare lichen species in the Krasnoyarsk region //BIO Web of Conferences. - EDP Sciences, 2018. - V. 11. - P. 00012.
3. Shrestha G. et al. In vitro evaluation of the antibacterial activity of extracts from 34 species of North American lichens //Pharmaceutical biology. - 2014. - V. 52. - No. 10. - P. 1262-1266.
4. Zhu R. L. et al. Antibacterial activity in extracts of some bryophytes from China and Mongolia //The Journal of the Hattori Botanical Laboratory. - 2006. - V. 100. - P. 603-615.
5. Яцына А. П., Мержвинский Л. М. Практикум по лишайникам. Витебск : УО «ВГУ им. П.М. Машерова», 2012. - 224 с.
6. Sabovljevic M. S. et al. Bryophytes – an emerging source for herbal remedies and chemical production //Plant genetic resources. - 2016. - V. 14. - No4. - P. 314-327.
7. Zhao Y., Wang M., Xu B. A comprehensive review on secondary metabolites and health-promoting effects of edible lichen //Journal of Functional Foods. - 2020. - P. 104283.
8. Лабинская А. С. и др. Руководство по медицинской микробиологии - М.: Бином, 2008. - с. 342-362.
9. Игнатов М. С., Игнатова Е. А. Флора лишайников средней части европейской России. - Общество с ограниченной ответственностью Товарищество научных изданий КМК, 2003.

10. Рябкова К. А. Лишайники Урала: учебное пособие. - Свердловск: Свердловский государственный педагогический институт, 1981. - 51 с.
11. Филиппова Г. Г., Смолич И. И. Основы биохимии растений [Электронный ресурс]: курс лекций (гл. 2-8). - 2004.
12. Цуриков А. Г., Храмченкова О. М. Листоватые и кустистые городские лишайники: атлас-определитель. - Гомель : ГГУ им. Ф.Скорины, 2009. - 123 с.
13. Лузина О. А., Салахутдинов Н. Ф. Биологическая активность усниновой кислоты и её производных частей. Часть 1. Активность в отношении одноклеточных организмов // Биоорганическая химия. - 2016. - С. 129–149.
14. Николаевский В. В., Еременко А. Е., Иванов И. К. Биологическая активность эфирных масел. - М.: Медицина, 1987. - 144 с.
15. Г. И. Нилов, Н. И. Чиркина, В. А. Сокол и др. Антимикробные свойства некоторых эфирных масел // Фитонциды. Киев, 1967, с. 171–175.
16. Савчук Л. П. Эфирномасличные культуры и климат. Л.: Гидрометеоиздат, 1977. - 104 с.
17. Климентова Е. Г., Рассадина Е. В., Антонова Ж. А. Физиология растений. Ульяновск, 2014. - с. 90-95.
18. Паштецкий В. С., Невкрытая Н. В. Использование эфирных масел в медицине, ароматерапии, ветеринарии и растениеводстве // Таврический вестник аграрной науки. - 2018. - № 1(13). - С. 2.

19. Филиппова Г. Г., Смолич И. И. Основы биохимии растений. Минск: БГУ, 2004.
20. Буренина И. А. Основные методологические принципы применения ароматерапии в восстановительном лечении. - Казань: Казанская государственная медицинская академия Росздрава, 2009.
21. Коваленко, Н. А., Супиченко, Г. Н., Ахрамович, Т. И., Нечай, Ю. А., Леонтьев, В. Н. Антимикробная активность эфирных масел и экстрактов *Thuja occidentalis*. - Минск: Белорусский государственный технологический университет. - 2020.
22. Герлинг Н. В., Пунегов В. В., Груздев И. В. Компонентный состав эфирного масла можжевельника обыкновенного *Juniperus communis* под пологом елового древостоя на европейском северо-востоке России // Сибирский лесной журнал. - 2015. - № 6. - С. 62–69.
23. Соловьёва Е. С., Адамович Т. А. Состав и свойства эфирного масла пихты сибирской *Abies sibirica* Ldb., произрастающей в разных районах Кировской области // Химия растительного сырья. – 2020. - № 3. - С. 291–297.
24. Pandey P., Singh S.K.R., Yadav A.K. Pharmacological screening of geranium oil for its antidepressant potential // Asian Journal of Pharmaceutical Clinical Research. - 2014. - Vol. 7. - Issue 5. - P. 5.
25. Алякин А.А., Ефремов А.А., Ангаскиева А.С., Гребенникова В.В. Химический состав эфирных масел *Artemisia absinthium* L. и *Artemisia vulgaris* L., произрастающих на территории Красноярского крае // Химия растительного сырья. - 2011. - № 3. - С. 123-127.
26. Tesei D. Black fungi research: out-of-this-world implications // Encyclopedia. - 2022. - Vol. 2. - Issue 1. - P. 212-229.

27. Whitman W. B., Goodfellow M., Kampfer P., Busse H.-J. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 5: The Actinobacteria. - New York: Springer, 2012.
28. Егоров Н. С., Зарубина А. П., Выборных С. Н., Ландау Н. С. Синтетическая среда для выращивания бактерий рода *Bacillus* // Вестник МГУ. - 1989. - № 4.1. - С. 52.
29. Прозоркина Н. В., Рубашкина Л. А. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии: учебное пособие для средних специальных медицинских учебных заведений. - Ростов-на-Дону: Феникс, 2006. - С. 384.
30. Rhodes M. E. The characterization of *Pseudomonas fluorescens* // Microbiology. - 1959. - Vol. 21. - Issue 1. - P. 221-263.
31. Hamidi M. et al. Production, characterization and biological activities of exopolysaccharides from a new cold-adapted yeast: *Rhodotorula mucilaginosa* sp. GUMS16 // International journal of biological macromolecules. - 2020. - Vol. 151. - P. 268-277.
32. Кудрявцев В.И. Систематика дрожжей. - М.: Изд-во АН СССР, 1954. – 426 с.
33. Vazquez J. A., Sancher V., Dmuchowski C., Dembry L. M., Sobel J. D., Zervos M. J. Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: an epidemiologic study // Journal of Infectious Diseases. - 1993. - Vol. 168. - Issue 1. - P.195-201.
34. Moliné M., Flores M.R., Libkind D., del Carmen D.M., Farías M.E., van Broock M. Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin // Photochemical & Photobiological Sciences. - 2010. - Vol. 9. - P. 1145-1151.

35. Kohlhardt-Floehr C. et al. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation—Studies on human cells //Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. - 2010. - V. 101. - Issue 1. - P. 97- 102.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Зоны отсутствия роста тест-культур грибов под действием эфирных масел растений (диаметры, мм)

Микроорганизмы	Эфирные масла				
	Герань	Можжевельник	Пихта	Туя	Полынь
<i>C. albicans</i>	20±1,5	35±1,0	22±2,5	0	0
<i>R. mucilaginosa</i>	21±0,5	20±0,5	25±2,0	0	0
<i>S. cerevisiae</i>	19±1,0	26±2,5	28±2,5	13±1,0	0
<i>H. werneckii</i>	25±1,0	21±0,5	18±2,5	11±0,5	0

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Зоны отсутствия роста культур грибов под действием летучих веществ эфирных масел растений (диаметры, мм)

Микроорганизмы	Эфирные масла				
	Можжевельник	Герань	Пихта	Туя	Полынь
<i>C. albicans</i>	17,5±0,5	13±1,5	10±0,5	0	0
<i>R. mucilaginosa</i>	20,5±2,5	0	0	0	0
<i>S. cerevisiae</i>	19,0±1,5	0	0	0	0
<i>H. werneckii</i>	10,5±1,0	0	0	0	0

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Зоны отсутствия роста тест-культур бактерий под действием эфирных масел растений (диаметры, мм)

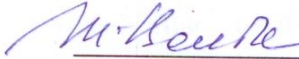
Микроорганизмы	Эфирные масла				
	Герань	Можжевельник	Пихта	Туя	Полынь
<i>M. luteus</i>	17±1,0	22±1,5	21±1,0	0	0
<i>P. fluorescens</i>	20±1,0	34±2,5	30±1,0	12±0,5	13±0,5
<i>E. coli</i>	14±0,5	17±0,5	16±0,5	0	0
<i>B. subtilis</i>	10±0,3	13±0,5	12±0,2	11±0,5	0

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

 Т. Г. Волова
« 20 » июня 2024 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Антимикробные свойства экстрактов лишайника *Usnea* и эфирных масел
лекарственных растений

Руководитель:  проф., д-р биол. наук С.В. Прудникова

Выпускник  В.С. Ефимова

Красноярск 2024