

УДК 582.26/.27:579

О. Л. Рахімова¹, асист., Ф. П. Ткаченко², канд. біол. наук, доц.,
В. О. Шишковська², студ., М. Ю. Лазаренко¹, студ.

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна,

¹ каф. мікробіології та вірусології,

² каф. ботаніки

АНТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ ЕКСТРАКТІВ ДЕЯКИХ ЧОРНОМОРСЬКИХ ВОДОРОСТЕЙ-МАКРОФІТІВ

Вивчено антимікробні властивості екстрактів дев'яти чорноморських водоростей-макрофітів. З'ясовано, що серед них найбільш дієву антимікробну активність та широкий спектр впливу виявляють види роду *Ceramium*. Антимікробна активність *C. rubrum* у весняний сезон найбільша. Показано, що водні екстракти *C. elegans* втрачають антимікробну активність стосовно *Staphylococcus aureus* після доби інкубування за температури 37° С. Встановлено, що екстракти *C. elegans*, отримані за допомогою етанолу, ацетону, хлороформу, гексану, не мають суттєвої антимікробної активності.

Ключові слова: водорості, антимікробна активність, тест-штами, бактерії, гриби.

Літературні дані свідчать про те, що морські і прісноводні водорості здатні утворювати антимікробні речовини з широким спектром дії і досить високою активністю, проте остання може помітно варіювати в різні сезони року [1—6]. Щодо чорноморських водоростей, то їх антимікробна активність досліджена дуже мало [4].

Метою даної роботи було вивчення антимікробних властивостей екстрактів деяких масових видів чорноморських водоростей-макрофітів.

Матеріали і методи

У досліді використано 9 видів водоростей-макрофітів, зібраних у прибережній зоні Чорного моря в період їх максимального розвитку (навесні і восени). З них: 4 види зелених — *Entheromorpha intestinalis* (L.) Link, *E. linza* (L.) J. Ag. (род. *Ulvaceae*), *Urospora penicilliformis* (Roth) Aresch., (род. *Acrosiphoniaceae*), *Bryopsis plumosa* (Huds.) Ag. (род. *Bryopsidaceae*), 1 вид бурих — *Scytosiphon lomentaria* (Lyngb.) J. Ag. (род. *Scytosiphoniaceae*) і 4 види червоних водоростей — *Porphyra leucosticta* Thur. (род. *Bangiaceae*), *Ceramium elegans* Ducl, *C. rubrum* (Huds.) Ag., *Polysiphonia denudata* (Dillw.) Kütz. (род. *Ceramaceae*).

Для визначення антимікробної активності водоростевих екстрактів використовували спеціальні референс-штами мікроорганізмів:

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Micrococcus luteus* ATCC 4698; *Bacillus subtilis* ATCC 25923, *Agrobacterium tumefaciens* ОГУ-263, *Arthrobacter citreus* ATCC 11624, *Candida albicans* ATCC 18804.

Перед приготуванням екстрактів свіжозібрані водорості очищали від механічних домішок і промивали дистильованою водою. Частину зразка водоростей висушували. Наважки 2 г сухої біомаси водоростей (чи її еквівалент — 10 г сирової біомаси) розтирали в порцеляновій ступці з кварцовим піском. У якості екстрагентів використовували воду, етанол, ацетон, хлороформ, гексан. Екстракцію провадили при кімнатній температурі протягом 24 годин. Екстракти, отримані за допомогою органічних розчинників, випарювали, а осад розчиняли в 0,4% водному розчині Na_2CO_3 . Контролем служив чистий 0,4% розчин Na_2CO_3 . Екстракти з водоростей фільтрували через ватно-марлевий фільтр і пастеризували при температурі 70°C для знищення контамінуючих мікроорганізмів.

Для визначення антимікробної дії екстрактів з водоростей використовували метод дифузії в агар за допомогою ямок в агаровому гелі [7] і метод серійних розведень.

За допомогою методу розведень досліджували антимікробну активність водного екстракту з *C. elegans* відносно *S. aureus*, *P. aeruginosa* і *C. albicans*, а екстракти з даного виду водоростей, отримані за допомогою органічних розчинників — тільки відносно *S. aureus*. Для цього в усі пробірки, що містили екстракти водоростей (по 4,5 мл), додавали 0,5 мл суспензії 24-годинних культур тест-мікроорганізмів у концентрації 10^6 мікробних тіл у 1 мл за оптичним стандартом. Потім готували десятикратні серійні розведення, з яких відразу ж робили контрольний висів. Пробірки з контрольними і досліджуваними посівами інкубували при температурі 37° С і через 1, 3, 4, 6 діб робили висіви на агарізоване живильне м'ясо-пептонне середовище (МПА). По кількості колонієутворюючих одиниць (КУО) у мілілітрі суспензії судили про антимікробну активність макрофітів [7]. Висіви провадили у трикратній повторності.

Для з'ясування антимікробної активності водних екстрактів з інших досліджених нами видів водоростей використовували метод дифузії в агар. Антимікробну активність водоростевих екстрактів оцінювали, вимірюючи діаметр зони відсутності чи погіршення росту тест-штаму навколо ямки з екстрактом. В якості контролю (для порівняння антимікробної активності) використовували проби з пеніциліном у терапевтичних розведеннях.

Отримані результати обробляли статистично [8].

Результати и обговорення

За допомогою методу дифузії в агар були досліджені антимікробні властивості дев'яти видів чорноморських водоростей-макрофітів, зібраних у весняний сезон. У досліджуваних водоростей виявлена антимік-

робна активність як проти грампозитивних (*S. aureus*, *B. subtilis*), так і грамнегативних (*E. coli*, *A. tumefaciens*) бактерій, а також проти дріжджеподібних грибків (*C. albicans*) (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив водних екстрактів деяких чорноморських водоростей-макрофітів на ріст тест-штамів бактерій

Тест-об'єкт	Діаметр зони інгібування росту тест-штаму (мм)				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Enteromorpha linza</i>	0	0	0	0	4,0 ± 0,1
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	0	2,0 ± 0,2	0	0	0
<i>Bryopsis plumosa</i>	0	0	0	2,0±0,1	0
<i>Urospora penicilliformis</i>	0	2,0 ± 0,2	0	0	0
<i>Scytosiphon lomentaria</i>	0	0	0	0	0
<i>Porphyra leucosticta</i>	0	0	0	0	0
<i>Polysiphonia demudata</i>	0	0	0	1,0 ± 0,1	2,0 ± 0,2
<i>Ceramium rubrum</i>	2,5±0,1	9,2 ± 0,3	0	2,0 ± 0,1	7,6 ± 0,3
<i>Ceramium elegans</i>	2,0±0,2	2,0 ± 0,1	0	4,0 ± 0,3	0
Контроль (пеніцилін 2 ОД)	0	20,0±0,3	10,0 ± 0,3	0	0

Найбільш широким спектром антимікробної активності володіли види роду *Ceramium*. Так, *C. rubrum* був ефективний у відношенні трьох тест-штамів бактерій: *E. coli*, *S. aureus*, *A. tumefaciens* і одного тест-штаму дріжджеподібних грибків *C. albicans*. *C. elegans* виявляв активність лише у відношенні трьох тест-штамів бактерій: *E. coli*, *S. aureus*, *A. tumefaciens*.

Два види водоростей — *S. lomentaria*, *P. leucosticta* — не виявили антибактеріальної активності у відношенні тестованих мікроорганізмів. Очевидно, у весняний сезон ці водорості містять мінімальні кількості біологічно активних речовин, недостатні для прояву антимікробних властивостей. Інші види водоростей були активні у відношенні одного-двох тест-штамів.

Невисокий рівень прояву антибактеріальних властивостей у досліджених видів водоростей (у порівнянні з контролем) ми пов'язуємо з можливою слабкою дифузиею активних сполук крізь агар.

Необхідно відзначити, що в таблиці 1 зазначені розміри зон повної відсутності росту тест-штамів, хоч спостерігалось пригнічення росту і зниження біомаси мікроорганізмів у помітно більших за розміром зонах. Ми припускаємо, що цей феномен пов'язаний із впливом летючих фракцій екстрактів водоростей, які вивільняються із розчину під час інкубації.

Для подальших досліджень використовували водорості роду *Ceramium* — як найбільш активні. Залежність антимікробної активності від сезону збору водоростей була з'ясована на моделі *C. rubrum* стосовно дещо розширеного кола тест-штамів (табл. 2).

Таблиця 2

Ріст досліджуваних тест-штамів бактерій за впливу водних екстрактів *Ceramium rubrum*, отриманих у різні сезони року

Біомаса водоростей, сезон збору	Діаметр зони інгібування росту тест-штаму (мм)							
	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureum</i>	<i>M.luteus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>A.tumefaciens</i>	<i>A.citreus</i>	<i>C.albicans</i>
Сира, осінь	2,0±0,04	0	1,0±0,01	2,6±0,01	0	0	0	2,6±1,3
Суха, осінь	3,0±0,01	2,5±0,06	7,0±0,01	3,0±0,01	0	2,0±0,01	1,0±0,01	7,2±0,0
Суха, весна	6,0±0,03	0	9,2±0,03	4,3±0,06	1,0±0,01	2,0±0,01	1,3±0,01	7,6±0,0

Найбільшою антимікробною активністю — як за спектром дії, так і за мірою — відзначалися водні екстракти, отримані з висушених водоростей. Екстракти з висушеного *C. rubrum*, зібраного наприкінці осені, мали дещо меншу активність, ніж екстракти із сухої біомаси цього виду водорості, зібраного весною (за деяким винятком). Наприклад, по відношенню до *B. subtilis* екстракт із *C. rubrum* (осінній) виявився неактивним, в той час як екстракт із рослин весняного збору пригнічував ріст цієї бактерії. Водночас екстракт із *C. rubrum* весняного збору виявляв стимулюючу дію на ріст біомаси *E. coli*, а екстракт із рослин осіннього збору його подавляв. Щодо інших тест-штамів, то під впливом водоростевих екстрактів у них спостерігались як зони повністю затриманого росту, так і ще більші за діаметром зони пригнічення останнього.

Для подальших досліджень ми використали метод кратних розведень суспензій культур в екстрактах з наступним висівом на щільне живильне середовище, виходячи з того, що цей метод є більш чутливим та більш точним [7]. За цим методом була з'ясована динаміка у часі антимікробної активності водного екстракту *C. elegans* (табл. 3).

Таблиця 3

Вплив водного екстракту із *Ceranium elegans* на ріст тест-штамів бактерій

Тест-штам	Час інкубації (дів)	Колонієутворюючі одиниці ($10^6 \cdot \text{мл}^{-1}$)	
		Контроль	Екстракт
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	$3,0 \pm 0,5$	$4,9 \pm 8,7$
	1	$9,0 \pm 0,5$	$0,5 \pm 0,1$
	3	$19,8 \pm 0,8$	$30,0 \pm 2,0$
	4	$60,0 \pm 1,0$	∞
	6	∞	∞
<i>Candida albicans</i>	0	$3,0 \pm 1,6$	$2,7 \pm 0,3$
	1	$6,8 \pm 1,5$	$6,0 \pm 0,5$
	3	$16,5 \pm 1,0$	$35,0 \pm 1,0$
	4	$49,0 \pm 1,0$	∞
	6	∞	∞
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	$5,0 \pm 1,0$	$3,0 \pm 0,5$
	1	$15,0 \pm 0,5$	$10,0 \pm 0,5$
	3	∞	∞
	4	∞	∞
	6	∞	∞

Примітка: ∞ — кількість мікроорганізмів, які не піддавалися обліку

За допомогою методу розведень було встановлено, що водний екстракт із *C. elegans* виявляє антимікробну активність стосовно *S. aureus* у першу добу. Після 1 доби впливу екстракту на стафілокок кількість мікроорганізмів, що вирости на живильному середовищі, зменшилася на порядок, при цьому в контролі кількість мікробних тіл дещо збільшилася. Однак через 3 доби антибактеріальний ефект зник і *S. aureus* інтенсивно розмножувався в екстракті водорості, що, очевидно, пояснюється руйнуванням антимікробних речовин при температурі інкубування 37°C . В протилежність зазначеному водний екстракт із *C. elegans* не виявив активності стосовно *C. albicans* і *P. aeruginosa* (табл. 3).

Дані літератури вказують на те, що у водоростях-макрофітах можуть міститися не тільки водорозчинні антибактеріальні сполуки, але й досить високі концентрації антимікробних речовин, які можуть бути екстраговані за допомогою органічних розчинників [9]. Нами була зроблена спроба оцінити антимікробні властивості екстрактів із *C. elegans*, отриманих за допомогою етанолу, ацетону, хлороформу і гексану (табл. 4).

Таблиця 4

Вплив на ріст тест-штаму *Staphylococcus aureus* екстрактів із *Ceramium elegans*, отриманих за допомогою органічних розчинників (відсоток колоній, що виростили)

Інкубація (год)	Контроль	Етанол	Ацетон	Хлороформ	Гексан
0	100	100	100	100	100
24	48*	219*	104*	42*	91*
48	16*	149*	86*	48*	102*

* — різниця статистично достовірна при $p < 0,05$

В результаті дослідження антимікробної активності екстрактів із *C. elegans*, отриманих за допомогою органічних розчинників (етанол, ацетон, хлороформ, гексан), було з'ясовано, що у них відсутня бактеріцидна дія у відношенні *S. aureus*. У контролі (0,4% розчин Na_2CO_3) через 48 годин на чашках виростили лише поодинокі колонії *S. aureus*. За наявності у середовищі екстракту із *C. elegans* спостерігалось або незначне зменшення кількості колоній (ацетоновий екстракт), або деяке збільшення їх числа (екстракти з гексаном та етанолом). Деяку антимікробну активність виявив лише хлороформний водоростевий екстракт, який викликав зменшення кількості життєздатних клітин *S. aureus* більш ніж на 50 % (табл. 4).

Виявлена нами антимікробна активність у досліджених видів водоростей пов'язана з дією наявних у рослинах біологічно активних сполук. У випадку водних екстрактів це можуть бути фенольні сполуки, а у випадку хлороформних — терпеноїди і ліпіди [2, 9].

Література

1. Зайцев В. П., Ажчихин И. С., Гандель В. Г. Комплексное использование морских организмов. — М.: Пищевая пром-сть, 1980. — 280 с.
2. Сиренко Л. А., Козицкая В. Н. Биологически активные вещества водорослей и качество воды. — К.: Наук. думка, 1988. — 237 с.
3. Трунова О. Н., Гринваль А. Р. Исследование антибиотической активности морских водорослей // Тр. ВНИИ морского рыбного хозяйства и океанографии. — 1977. — Т. 124. — С. 61–64.
4. Ballantine D. L., Gerwick W. H. et al. Antibiotic activity of lipid-soluble extracts from carribian algae // Hydrobiologia. — 1987. — V. 111. — P. 463–469.
5. Espech Maria E., Fraile Elela R., Mayer Alejandro M. S. Screening of Argentine marine algae for antimicrobial activity // Hydrobiologia. — 1984. — V. 108. — P. 525–528.
6. Jing-Wen M. A., Wei-ci Tan. Screening for antimicrobial activities in marine algae from the Gingdao coast, Chins // Hydrobiologia. — 1984. — V. 108. — P. 517–520.
7. Практикум по микробиологии / Под ред. Н. С. Егорова — М.: Изд-во Москов. ун-та, 1976. — 251 с.
8. Шмидт В. М. Математические методы в ботанике. — Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1984. — 288 с.
9. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / Под ред. Л. А. Сиренко — К.: Наук. думка, 1975. — 246 с.

Е. Л. Рахимова, Ф. П. Ткаченко, В. О. Шишковская, М. Ю. Лазаренко
Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
каф. микробиологии и вирусологии, каф. ботаники
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ ЧЕРНОМОРСКИХ ВОДОРΟΣЛЕЙ-МАКРОФИТОВ

Резюме

Изучены антимикробные свойства девяти видов черноморских водорослей. Установлено, что среди изученных видов представители рода *Ceramium* проявляют наиболее сильную антимикробную активность при наиболее широком спектре воздействия. Антимикробная активность *C. rubrum* в весенний сезон наибольшая. Показано, что водные экстракты *C. elegans* теряют антимикробную активность по отношению к *S. aureus* после суток инкубирования при температуре 37° С. Установлено, что экстракты *C. elegans*, полученные с помощью этанола, ацетона, хлороформа и гексана не проявляют выраженной антимикробной активности.

Ключевые слова: антимикробная активность, водоросли, тест-штаммы, бактерии, грибы.

O. L. Rakhimova, F. P. Tkachenko, V. O. Shiskovskaya, M. U. Lazarenko
Odessa Mechnikov National University,
Dvoryanskaya, 2, Odessa, 65026, Ukraine

ANTIMICROBIAL FEATURES OF SOME BLACK SEA ALGAE

Summary

Antimicrobial features of some Black Sea algae were studied. Species of *Ceramium* genus show the strongest antibacterial activity against wide spectrum of bacterial strains. Antimicrobial activity of *C. rubrum* is the strongest in the spring season. It was shown that the water extract of *C. elegans* loses antimicrobial activity against *S. aureus* after one day of exposition at 37° C. It was found out that ethanol, acetone, chloroform and hexane extracts of *C. elegans* don't show any antimicrobial activity.

Key words: antimicrobial activity, algae, test-strain, bacteria, fungi.