

**WPLYW KWASÓW POROSTOWYCH EKSTRAHOWANYCH
Z PLECH ZŁOTOROSTU ŚCIENNEGO (*XANTHORIA PARIETINA* (L.) TH. FR.)
NA ROZWÓJ BAKTERII NAZĘBNYCH**

**THE INFLUENCE OF LICHEN SECONDARY METABOLITES EXTRACTED
FROM THE *XANTHORIA PARIETINA* (L.) TH. FR.) THALLUS ON THE DEVELOPMENT
OF ORAL CAVITY BACTERIA**

Cezary Wegenko

ABSTRACT

Lichen secondary metabolites are organic compounds produced by lichen in order to protect themselves against microorganisms, parasites and harmful environmental conditions. Interesting features of these substances were used in the ancient times for therapeutic purposes (Opanowicz 2002). Anthraquinone (9,10-dioxoanthracene), produced in the thallus of *Xanthoria parietina*, is an example of the secondary metabolite. Both this compound as well as others produced by the golden lichen exhibit a wide biological and antibacterial activity (Sobotta i in. 2010). Oral cavity is the living environment for many bacterial species. Some of them can lead to serious health complications and demineralization of tooth enamel (Jańczuk 2007). The aim of the studies was to prove antibacterial properties of the lichen secondary metabolites which occur in the thallus *Xanthoria parietina* and to determine their practical applications in different areas of human life. In order to achieve this goal bacterial cultivations of the dental plaque bacteria were started on an agar plate. The growth of the bacteria was monitored every day and the date the first bacterial colonies appeared was noted. After the bacteria had developed completely, they were exposed to the influence of the secondary metabolites extracted from the thallus *Xanthoria parietina*. The results of the studies confirm the antibacterial properties of the lichen secondary metabolites.

Słowa kluczowe: porosty, kwasy porostowe, bakterie nazębne

Key words: lichens, secondary metabolites, oral bacteria

Cezary Wegenko, I Ogólnokształcące Liceum Akademickie im. Janiny Kossakowskiej-Dębickiej w Kielcach, e-mail: czarek.w_111@02.pl

Opiekun merytoryczny/*Guardian substantive*: dr hab. Małgorzata Anna Józwiak

Wprowadzenie

Środowisko jamy ustnej człowieka związane jest ze składem chemicznym śliny, będącej wydzieliną gruczołów ślinowych, zwanych śliniankami. Składa się ona w 99% z wody. Pozostałą jej część stanowią składniki organiczne i nieorganiczne oraz martwe i żywe komórki warunkujące jej właściwości (1). W ślinie można wykryć obecność kationów sodu, potasu, wapnia

i magnezu oraz anionów fluorkowych, chlorkowych, jodkowych i wodorowęglanowych, a także jonów rodanowych SCN⁻, pełniących funkcje bakteriobójcze (Jańczuk 2007). Do związków organicznych występujących w ślinie należą peptydy, histatyny oraz białka. W jamie ustnej rozmnażają się bakterie nazębne takie jak:

Lactobacillus acidophilus (Moro 1900) Hansen & Mørcot 1970 – bakteria dobrze rozwijająca się w bar-

dzień zakwaszonym środowisku (poniżej pH 5.0) (Băa-ti i in.);

Streptococcus mutans Clarke 1924 – paciorkowiec, który jest jednym z głównych czynników powstawania próchnicy zębów;

Streptococcus sanguinis White and Niven 1946 – paciorkowiec, będący stałą częścią flory fizjologicznej jamy ustnej;

Streptococcus mitis – pospolicie występujący w jamie ustnej paciorkowiec, mający zdolność wywołania hemolizy krwinek, który może być przyczyną zapalenia wsierdza (Róžański 2012).

Bakterie te, wytwarzające kwasy, np. mlekowy, powodują spadek pH, co prowadzi do demineralizacji szkliwa zębów (Sullivan i in. 2011). Prawidłowe pH jamy ustnej powinno wynosić od 6,8 do 7,2 (Zalewska i in. 2006).

Metodą zabezpieczającą przed rozwojem bakterii nazębnych jest utrzymanie stałego pH jamy ustnej. Przy pH zbliżonym do obojętnego następuje zahamowanie rozwoju bakterii nazębnych, a w związku z tym przeciwdziałanie demineralizacji szkliwa. Ograniczenie rozwoju bakterii jamy ustnej powinno odbywać się przy użyciu farmaceutyków o działaniu bakteriobójczym lub bakteriostatycznym. Preparaty te muszą wykazywać skuteczność antybakteryjną, ale nie mogą stanowić jakiegokolwiek zagrożenia dla zdrowia człowieka. Wydaje się, że takie warunki spełniają wtórne metabolity wytwarzane przez plechy porostów.

Wtórne metabolity porostowe, zwane kwasami porostowymi, to pochodne kwasów tłuszczowych i fenoli. Porosty wytwarzają je w celu obrony przed mikroorganizmami i pasożytniczymi grzybami. Jednym z takich porostów jest złotorost ścienny (*Xanthoria parietina*), który wytwarza antrachinony, fallacinal, emodyny, teloschistin i kwas parietynowy. Związki te stanowią od 0,1 do 10% suchej masy porostu, a zawartość ta może wzrosnąć nawet do 30% (Opanowicz 2002). Bakteriobójcze właściwości kwasów porostowych wykorzystywano już w starożytności (Studzińska-Sroka 2008). W celach leczniczych stosowano *Evernia furfuracea*, *Usnea barbata*, *Cladonia coccifera* (Opanowicz 2002, Studzińska-Sroka 2008), zwalczając infekcje dróg oddechowych, schorzenia wątroby, zaburzenia jelitowe. Podstawowym argumentem przemawiającym za używaniem w leczeniu chorób bakteryjnych kwasów porostowych jest bezpieczeństwo zdrowotne podczas ich stosowania.

Środki przeciwbakteryjne powszechnie stosowane w pastach do zębów

Pasty do zębów, poza działaniem pomagającym

w oczyszczaniu jamy ustnej, mogą posiadać również właściwości bakteriobójcze. Składnikiem odpowiadającym za takie działanie mogą być związki fluoru, które wpływają na metabolizm bakterii. Fluor hamuje enolazę, kluczowy enzym w procesach przemiany cukrów u bakterii. Kolejnym związkiem dodawanym do past jest triklosan, który charakteryzuje się szerokim spektrum działania na bakterie zarówno Gram-ujemne, jak i Gram-dodatnie. Triklosan działa hamująco na proces biosyntezy kwasów tłuszczowych błon komórkowych drobnoustrojów. Popularnym środkiem o działaniu przeciwbakteryjnym jest również chlorheksydyna, która może utrzymywać się w jamie ustnej nawet dobę, dzięki zdolności wiązania się z grupami fosforanowymi i karboksylowymi (Kasiak 2009).

Celem prowadzonych badań było wykazanie bakteriobójczych i bakteriostatycznych właściwości kwasu parietynowego ekstrahowanego z plechy *Xanthoria parietina* wpływającego na bakterie nazębne jamy ustnej.

Materiały i metody

Ekstrahowanie kwasów porostowych.

W kolbie okrągłodennej o pojemności 100 ml, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, umieszczono 2 g zmieszanych fragmentów plechy złotorostu ściennego i 50 ml acetonu. Założono chłodnicę i ogrzewano na łaźni wodnej w temperaturze 50-60°C (temperatura wrzenia acetonu 56,05°C) przez około 120 minut. Wystudzoną mieszaninę reakcyjną przesączono do osobnej zlewki. Surowy produkt pozostawiono do momentu odparowania acetonu. Wtórne metabolity porostowe wykrywały, tworząc igły lub płatki. Próbkę kryształów naniesiono na szkiełko podstawowe i obserwowano przy użyciu mikroskopu stereoskopowego NIKON AZ100, wykonując cyfrowy zapis obrazu.

Przygotowanie podłoża agarowego do hodowli kultur bakteryjnych

Do przygotowania pożywki dla bakterii wykorzystano granulowany agar-agar firmy Merck, wolny od inhibitorów jako podstawowe podłoże hodowlane. Wskazaną pożywkę zastosowano ze względu na wysoką zawartość polisacharydów (ok. 90%). Są one częściowo związane z kwasem siarkowym. Ogólna zawartość reszt kwasu siarkowego wynosi 0,3–5%. Podłoże agarowe przygotowano na 3 szalkach Petriego. Na dwóch testowano wpływ kwasu parietynowego na rozwój kolonii bakterii nazębnych, trzecia stanowiła próbkę odniesienia.

Bakterie nazębne pozyskano z jamy ustnej, bezpośrednio z powierzchni zęba. Przy użyciu ezy rów-

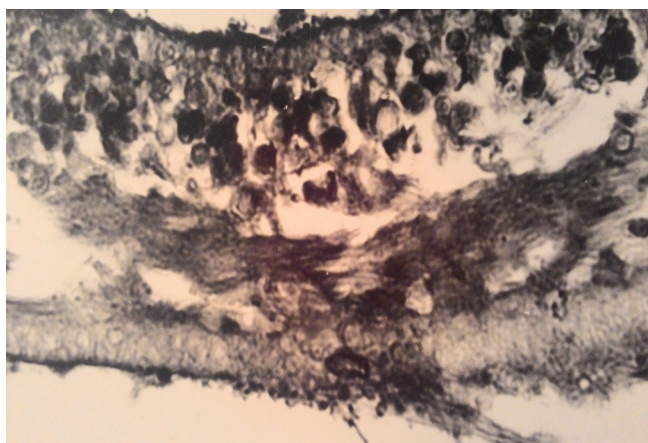
nomiennie rozprowadzono materiał biologiczny po powierzchni trzech pożywek agarowych zlokalizowanych na szalkach Petriego. Założone hodowle monitorowano. Przebiegały w warunkach pokojowych, umieszczone pod lampą z żarówką o mocy 60 V celem podgrzania.

Charakterystyka obiektu badań

Xanthoria parietina (Złotorost ścienny) – gatunek grzybów z rodziny złotorostowatych. Tworzy listkowatą, zwykle rozetkową plechę, bez sorediów i izydiów, o żółtej lub żółtopomarańczowej barwie, na górnej powierzchni gładką lub z występującymi apotecjami lekarnorowymi (rodzaj owocników u grzybów workowych) (Malinowski 1966). Nie posiada chwytników (Jóźwiak 2014). Rozmnaża się poprzez zarodniki. Apotecja mają średnicę do 6 mm i są ciemniejszej barwy – od żółtopomarańczowej do brunatnopomarańczowej (Wójciak 2010).

Rośnie na korze drzew i krzewów liściastych, rzadziej iglastych, a także na skałach i betonie (fot. 2). W Polsce pospolity na terenie całego kraju. Występuje na wszystkich kontynentach oprócz Antarktydy (Jóźwiak 2014).

Odporny na zanieczyszczenia znalazł zastosowanie w biomonitoringu. Jest bioindykatorem. Duża odporność na zanieczyszczenia, w tym metale ciężkie, wpływa na jego położenie na skali porostowej. Jest gatunkiem azotolubnym. *Xanthoria parietina* znajduje się w 3 grupie porostów mogących rosnąć na obszarach silnie zanieczyszczonego powietrza (Kiszka 1990).



Fot. 1. Przekrój przez plechę *Xanthoria parietina* (fot. J. Wietecha)
Photo 1. Cross section of the *Xanthoria Parietina* thallus (Photo J. Wietecha)



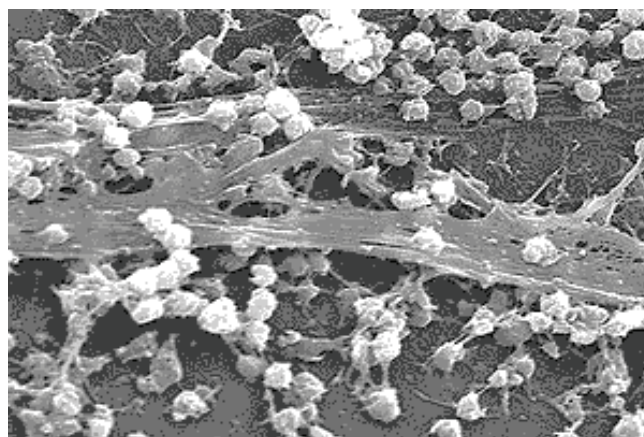
Fot. 2. Plecha *Xanthoria parietina* na korze drzewa (fot. C. Wegenko)

Photo 2. *Xanthoria parietina* on tree bark (photo. C. Wegenko)

Bakterie nazębne

Flora bakteryjna jamy ustnej jest naturalnym składnikiem tego środowiska. Jest głównym czynnikiem etiologicznym powstawania próchnicy zębów, powstawania stanów zapalnych dziąseł, a w krańcowych przypadkach, przechodząc przez błony śluzowe do krwiobiegu, może powodować infekcyjne zapalenia wsierdza. Rozwój flory bakteryjnej przyklejającej się do powierzchni szkliwa powoduje powstawanie na powierzchni zębów biofilmu bakteryjnego. Biofilm stanowi skupisko bakterii uniemożliwiające m.in. docieranie antybiotyków, a bakterie tworzą osad, który po pewnym czasie tworzy kamień nazębny, przyczynę powstawania próchnicy (Bartoszewicz, Rygiel 2006).

Rozwój bakterii nazębnych i powstawanie biofilmów zachodzi bardzo szybko i już po upływie czterech do pięciu dni ich obecność jest wyraźnie widoczna (Aguloglu 2006) (ryc. 1). Najczęstszymi bakteriami w płytce nazębnej są Gram(+): *Streptococcus pneumo-*



Ryc. 1. Biofilm bakteryjny

Fig. 1. Bacterial biofilm

Źródło/Source: <https://pl.wikipedia.org/wiki/Biofilm>

niae, Streptococcus mutans, Lactobacillus acidophilus, Streptococcus aureus oraz Gram(-): *Helicobacter influenza*.

Charakterystyka kwasów porostowych

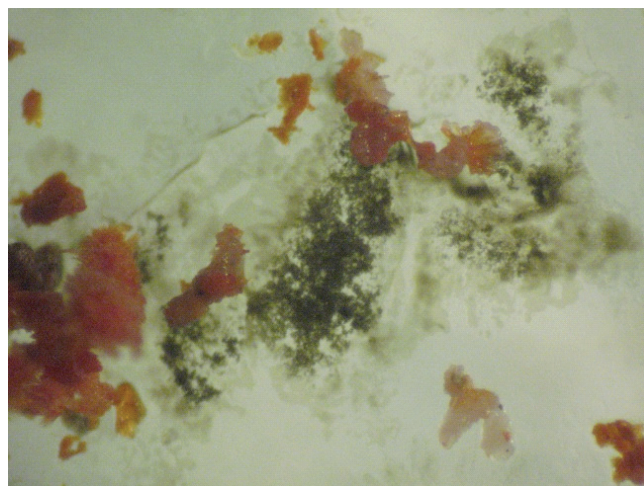
Wtórne metabolity porostowe, zwane kwasami porostowymi, są pochodnymi kwasów tłuszczowych i fenoli. Odkładane są na zewnętrznej stronie strzępek grzybni, tworzących warstwę korową plechy. Wytwarzanie tych związków przez plechy porostowe ma na celu ich ochronę przed mikroorganizmami i grzybami pasożytniczymi. Są związkami specyficznymi dla poszczególnych gatunków porostów, dzięki czemu wykorzystuje się je przy identyfikacji tych gatunków, przeprowadzając charakterystyczne reakcje barwne. Ekstrahowanie kwasów porostowych jest łatwe, następuje w wyniku działania rozpuszczalników organicznych, takich jak: chloroform, aceton czy etanol. Mają wysokie punkty topnienia od 120-140°C. Większość



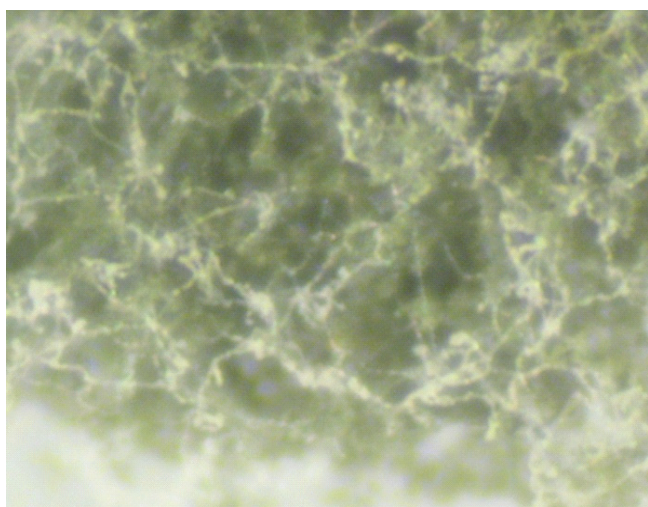
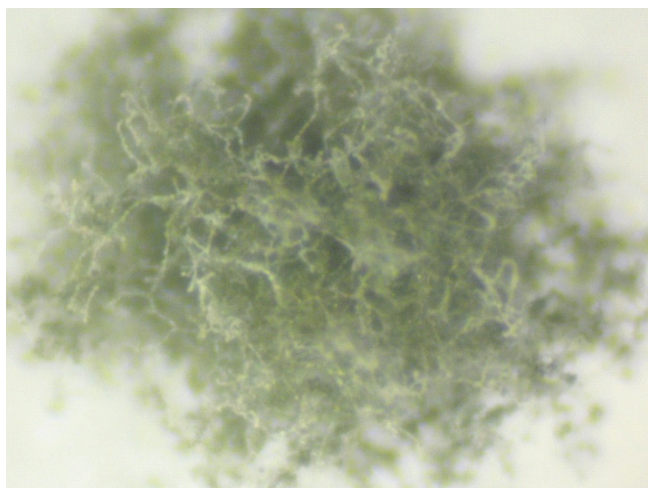
Fot. 3, 4. Kryształy kwasu parietinowego (fot. C. Wegenko)
Photo 3, 4. Parietin acid crystals (Photo. C. Wegenko)

z nich jest bezbarwna, ale także przyjmują postać wielobarwnych kryształów. Mogą być żółte, pomarańczowe jak kwas usninowy i wulpinowy, lub krwistoczerwone jak kwas rodokladoniowy. Ze względu na swoje właściwości stosowane są w preparatach dermatologicznych w postaci maści, w kosmetykach, w preparatach stomatologicznych stosowanych przy stanach zapalnych śluzówki jamy ustnej. Mają działanie wykrztuśne (syrup Pectosol), przeciwzapalne w stanach infekcji gardła (tabletki Isla), wzmacniają procesy przemiany materii stosowane w postaci galaretek.

Wyniki



Fot. 5, 6.. Kryształy kwasu parietinowego w bezpośrednim kontakcie kolonii bakteryjnej (fot. C. Wegenko)
Photo 5, 6. Parietin acid crystals in the direct contact of the bacteria colony (Photo C. Wegenko)

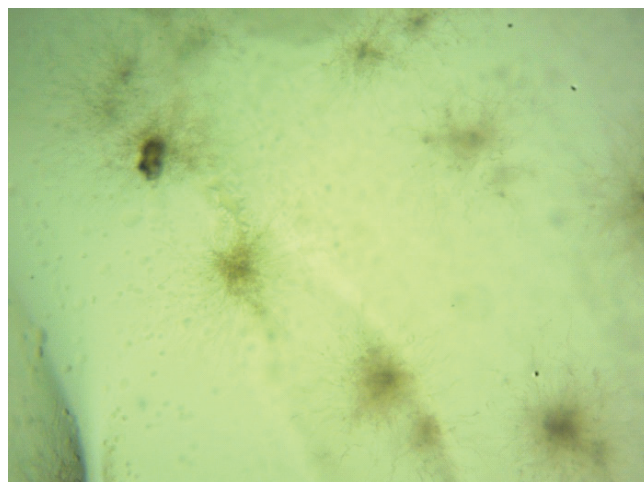
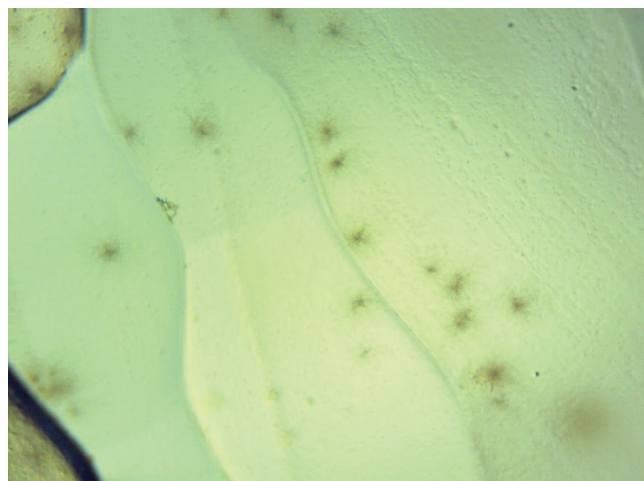


Fot. 7, 8. Biofilm bakterii nazębnych na pożywce agarowej (fot. C. Wegenko)

Photo 7, 8. Bacterial biofilm on agar medium (Photo. C. Wegenko)

Wnioski

1. Pojawienie się pierwszych kolonii bakteryjnych zanotowano 10.02.2017 r.
2. Biofilm bakteryjny poddany działaniu kwasu parietinowego uległ wyraźnej presji tego kwasu.
3. Kolonia bakteryjna zmniejszyła swoje rozmiary w miejscu bezpośredniego kontaktu z kwasem.
4. Kolonie bakteryjne niepoddane działaniu kwasów porostowych nie zmniejszyły swoich rozmiarów.
5. Obserwacje wpływu kwasów porostowych na kolonie bakterii nazębnych potwierdzają bakteriobójcze właściwości wtórnych metabolitów ekstrahowanych z plechy *Xanthoria parietina*.
6. Zastosowanie kwasów porostowych w profilaktyce stomatologicznej (płyny i pasty do zębów) mogą mieć swoje uzasadnienie.



Fot. 9, 10. Kolonie bakterii rozwijające się wzdłuż linii posiewu na pożywce agarowej (fot. C. Wegenko)

Photo 9, 10. Bacteria colonies developing along the line of culture on agar medium (Photo. C. Wegenko)

Literatura

- Aguloglu S., Tur-hanoglu M., Eskimez S., 2006. Detection of *Helicobacter pylori* colonization in human dental plaques and saliva of patients with chronic gastritis, *Biotechnol & Biotechnol Eq*, 10, 173–8.
- Bâati L.L., Fabre-Gea C., Auriol D., Blanc P.J., 2000. Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: Effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels. *International Journal of Food Microbiology*. 59 (3): 241–247. doi:10.1016/S0168-1605(00)00361-5. PMID 11020044.
- Bartoszewicz M., Rygiel A., 2006. Biofilm jako podstawowy mechanizm zakażenia miejsca, *Chir Pol*, 8, 3, 171–8.
- Jańczuk Z., 2007. Stomatologia zachowawcza – Zarys kliniczny. Podręcznik dla studentów stomatologii. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, ISBN 83-200-3034-X.

- Jóźwiak M.A., 2014. Przyczynek do poznania właściwości przeciwygrzybiczych antrachinonów i kwasu usniowego izolowanych z plech *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. i *Evernia prunastri* (L.) Ach. Rocznik Świętokrzyski. Ser. B – Nauki Przyr. 35: 35–50.
- Kasiak M., Kasiak M., 2009. Pasty do zębów – skład i działanie. Zakład Implantoprotetyki i Zburzeń Czynnościowych Układu Stomatognatycznego Katedra Protetyki Stomatologicznej, Akademia Medyczna, Wrocław; Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej i Dziecięcej, Wrocław, rozmaitości 665, t. 65, nr 9. Wrocław.
- Kiszka J., 1990. Lichenoidny obszar województwa krakowskiego. Studia Ośrodka Dokumentacji Fizjograficznej. 18. s. 201-212.
- Malinowski E., 1966. Anatomia roślin. Warszawa: PWN.
- Opanowicz M., 2002. Ekologiczna rola wtórnych metabolitów porostowych. Wiadomości Botaniczne 46(1/2): 35-44.
- Różański H., 2012. „Streptococcus mitis i inne z grupy viridans”. Laboratorium Biologii Przemysłowej i Eksperymentalnej PWSZ w Krośnie; <http://pwsz.ch/wyklady/?p=312>.
- Ślina skład i funkcje, Zakład Chemii Medycznej PUM 2015-2016; https://www.pum.edu.pl/_data/assets/pdf_file/0017/104039/slina-sklad-i-funkcje-2015-2016.pdf.
- Sobotta Ł., Mielcarek J., Sobiak S., Wierzchowski M., 2010. Antrachinony – małe cząsteczki, duże nadzieje. Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
- Studzińska-Sroka E., 2008. Historia badań nad porostami. Nowiny Lekarskie 77, 5, 367-372.
- Sullivan R., Santarpia P., Lavender S., Gittins E., Liu Z., Anderson M.H. et al., 2011: Clinical Efficacy of a Specifically Targeted Antimicrobial Peptide Mouth Rinse: Targeted Elimination of Streptococcus mutans and Prevention of Demineralization. „Caries Res”. 45(5), s. 415-28, 2011. DOI: 10.1159/000330510. PMID: 21860239.
- Wójciak H., 2010. Porosty, mszaki, paprotniki. Warszawa: Multico Oficyna Wydawnicza, ISBN 978-83-7073-552-4.
- Zalewska A., Waszkiel D., Błahuszevska K., Marciniak J., Kowalczyk A., 2006. Pojemność buforowa, pH i stężenie immunoglobuliny A w ślinie całkowitej, spoczynkowej osób młodych odpornych i podatnych na próchnicę, Czas. Stomatol., LIX, 4, 221-226 s. 2.

STRESZCZENIE

Kwasy porostowe to związki organiczne wytwarzane przez porosty w celu ochrony przed mikroorganizmami i pasożytami, a także szkodliwymi czynnikami środowiska. Interesujące właściwości tych substancji wykorzystywane były już w starożytności, gdzie stosowano je w celach leczniczych (Opanowicz 2002). Przykładem wtórnego metabolitu porostowych jest antrachinon (9,10-dioksaantracen), wytwarzany w plesze *Xanthoria parietina*. Zarówno ten, jak i inne związki wytwarzane przez złotorost ścienny, wykazują szeroką aktywność biologiczną oraz działanie przeciwbakteryjne (Sobotta i in. 2010). Jama ustna jest środowiskiem życia wielu gatunków bakterii. Niektóre z nich mogą prowadzić do poważnych powikłań zdrowotnych i demineralizacji szkliwa zębów (Jańczuk 2007). Celem prowadzonych badań było wykazanie bakteriobójczych właściwości kwasów porostowych występujących w plesze *Xanthoria parietina* i określenie ich praktycznych zastosowań w różnych dziedzinach życia. W tym celu na podłożu agarowym założono hodowle bakterii nazębnych. Rozwój organizmów monitorowano codziennie, odnotowując datę pojawienia się pierwszych kolonii. Po pełnym rozwinięciu się bakterii zadano je wyekstrahowanymi z plechy *Xanthoria parietina* kwasami porostowymi. Wyniki doświadczenia potwierdzają bakteriobójcze właściwości wtórnych metabolitów porostowych.