

УДК 582.949.2. 579.61

Л. А. Котюк

ВИВЧЕННЯ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ ЕТАНОЛЬНОГО ЕКСТРАКТУ *LOPHANTHUS ANISATUS* ADANS (LAMIACEAE)

Лофант ганусовий (*Lophanthus anisatus* Adans) – цінна лікувально-ароматична рослина. Надземна частина лофанту містить комплекс біологічно активних речовин: ефірну олію (1,84 – 3,32%), дубильні речовини (7,48 – 8,55%), флавоноїди (0,55 – 0,60%), аскорбінову кислоту (0,09 – 0,11%), вільні органічні кислоти (0,80 – 1,00%), полісахариди (7,25 – 8,22%), макро- і мікроелементи [1 – 3].

За повідомленням А. В. Великородова та В. Б. Ковальова (2010), ефірна олія лофанта ганусового містить 62,08% метилхавіколу і 24,01% метилевгенолу і 8,14% лімонену [4].

Завдяки багатому компонентному складу з лофанту виготовляють препарати для зміцнення імунної системи, лікування респіраторно-вірусних захворювань і грибкових інфекцій [5 – 7].

Протимікробні властивості лофанту ганусового свідчать про доцільність їх використання для лікування багатьох захворювань, тому метою наших досліджень була оцінка біологічної активності його 40% етанольного екстракту щодо золотистого стафілокока (*Staphylococcus aureus*), кишкової палички (*Escherichia coli*), синьогнійної палички (*Pseudomonas aeruginosa*) та кандіди біліючої (*Candida albicans*).

Вихідною сировиною для досліджень була надземна частина лофанту ганусового, вирощена в умовах ботанічного саду Житомирського національного агроекологічного університету. У експериментах використовували фітомасу рослин, зібрану у останню декаду серпня у фазу цвітіння. Сировину подрібнювали згідно фармакопейних вимог до розмірів 1 – 1,5 мм. Екстракт *L. anisatus* був отриманий методом мацерації повітряно сухої трави у 40 % етиловому спирті у співвідношенні 1 : 5, концентрація – 200 мг/мл. Настоявали траву лофанту ганусового упродовж 7 діб при температурі 25°C [8].

Наявність антимікробної активності екстрагованих речовин у складі досліджуваних речовин визначали шляхом порівняння їх МІС (мінімальної пригнічуючої – бактеріостатичної концентрації) та МВС / МФС (мінімальної бактерицидної/фунгіцидної концентрації) із такими у 40% етиловому спирті [9].

Вивчення антимікробної активності екстракту *L. anisatus* здійснювали на отриманих із Української колекції мікроорганізмів (УКМ, Інститут мікробіології і вірусології НАН України) тест-культурах

мікроорганізмів: *Escherichia coli* УКМ В-906 (ATCC 25922); *Staphylococcus aureus* УКМ В-904 (ATCC 25923); *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-900 (ATCC 9027); *Candida albicans* УКМ У-1918 (ATCC 885-653). Вище названі мікроорганізми є тестовими штамами для визначення антимікробної дії лікарських засобів [10]. Встановлення антимікробної активності екстракту *L. anisatus* стосовно тест-культур мікроорганізмів здійснювали згідно методики щодо визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів. Антимікробну активність досліджуваних речовин вивчали методом послідовних серійних розведень, який передбачає визначення мінімальної бактеріостатичної (МІС) та мінімальної бактерицидної концентрацій (МВС). Для визначення МВС готували послідовні двократні розведення речовини у рідкому поживному середовищі, яку згодом визначали за найменшою концентрацією речовини, в присутності якої не спостерігали росту культури. Бактерицидну концентрацію досліджуваних речовин встановлювали за результатом висіву пробірок з розведенням на щільні поживні середовища [9].

Отримання добових культур мікроорганізмів здійснювали на щільному поживному середовищі LB (Luria – Bertani medium, Merck, Germany); приготування робочих суспензій мікроорганізмів, визначення мінімальних інгібуючих концентрацій (МІС) розведень зразків досліджуваних екстрактів проводили у рідкому середовищі LB (Luria – Bertani broth, Merck, Germany). Висів аліквот дослідних і контрольних суспензій для встановлення мінімальних бактерицидних/фунгіцидних концентрацій (МВС / МФС) препаратів здійснювали на щільне поживне середовище LB (Luria – Bertani medium, Merck, Germany) у чашки Петрі [11].

Добові культури мікроорганізмів отримували шляхом їх культивування на щільному поживному середовищі LB протягом 18 – 24 годин при 37°C. Із добових культур у 0,9% розчині хлориду натрію готували вихідні бактеріальні суспензії за стандартом мутності 0,5 Од по МакФарланду (титр $1,5 \times 10^8$ КУО/мл). Останні розводили рідким середовищем LB у співвідношенні 1:100 (по об'єму) і отримували робочі суспензії мікроорганізмів [9].

Хроматографічний аналіз компонентного складу ефірної олії виконували на газорідинному хроматографі Agilent Technologies 6890 із мас-спектрометричним детектором 5973. Умови аналізу: хроматографічна колонка – капілярна DB-5, діаметром 0,25 мм і завдовжки 30 м. Швидкість газу-носія (гелію) – 2 мл/хв, температура нагрівача при введенні проби – 250°C. Температура термостата з програмуванням від 50 до 320°C зі швидкістю 4 °/хв. Для ідентифікації компонентів використовували бібліотеку мас-спектрів NIST05

и WILEY 2007 із загальною кількістю спектрів більше 470000 в комплексі з програмами для ідентифікації AMDIS і NIST [12].

Дослідження показали, що внесення до суспензій використаних тест-культур мікроорганізмів 40% етанолу проявлялось бактеріостатичною активністю лише у розведенні 1 : 2 (табл. 1). При подальшому розведенні 40% етанолу пригнічення росту мікроорганізмів у рідкій культурі не спостерігали.

Таблиця 1

**Визначення мінімальної пригнічуючої концентрації (MIC)
40% етилового спирту відносно тест-культур мікроорганізмів**

Тест-культури мікроорганізмів	Наявність росту тест-культури в дослідних варіантах при відповідному розведенні зразка							Наявність росту тест-культури в контрольних варіантах			
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	+К	-К	Кс	Кз
<i>Escherichia coli</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Примітки: «+» – наявність росту культури; «-» – відсутність росту культури; «+К» – позитивний контроль росту тест-культури; «-К» – негативний контроль росту тест-культури; «Кс» – контроль чистоти середовища; «Кз» – контроль чистоти зразка (у розведенні 1:2).

Бактерицидна / фунгіцидна концентрація етилового спирту у випадку *P. aeruginosa* і *C. albicans* відповідала бактеріостатичній (табл. 2). Так, при нанесенні зразків рідкої культури із відсутністю видимого росту на щільне середовище, ріст також був відсутнім. По відношенню до *E. coli* і *S. aureus* жодне із використаних розведень спирту не характеризувалось бактерицидним ефектом. Показано, що висів суспензій навіть із пробірок з розведенням 40% етилового спирту у співвідношенні 1 : 2 проявлявся на щільному середовищі ростом мікроорганізмів. Очевидно, що в даному випадку по відношенню до вказаних тест-культур мікроорганізмів 40% етанол характеризується лише бактеріостатичною дією (див. табл. 1).

Етанольний екстракт лофанту ганусового містив у своєму складі речовини, які впливали на *S. aureus* та *E. coli*, призводячи до підвищення показників MIC і MBC 40% етилового спирту у 2 рази. Компоненти екстракту *L. anisatus* також двократно посилювали бактеріостатичну дію 40% етанолу щодо *P. aeruginosa*. На *C. albicans* екстраговані речовини не впливали (табл. 3 – 4, рис. 1).

Таблиця 2

Визначення мінімальної бактерицидної / фунгіцидної концентрації (МВС / МФС) 40% етилового спирту відносно тест-культур мікроорганізмів

Тест-культури мікроорганізмів	Наявність росту тест-культури на щільному середовищі при нанесенні відповідного розведення зразка						
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	-	+	+	+	+	+	+

Примітки: «+» – наявність росту культури; «-» – відсутність росту культури.

Таблиця 3

Визначення мінімальної пригнічуючої концентрації (МІС) етанольного екстракту *Lophanthus anisatus* по відношенню до тест-культур мікроорганізмів

Тест-культури мікроорганізмів	Наявність росту тест-культури в дослідних варіантах при відповідному розведенні зразка							Наявність росту тест-культури в контрольних варіантах			
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	+К	-К	Кс	Кз
<i>Escherichia coli</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Примітки: «+» – наявність росту культури; «-» – відсутність росту культури; «+К» – позитивний контроль росту тест-культури; «-К» – негативний контроль росту тест-культури; «Кс» – контроль чистоти середовища; «Кз» – контроль чистоти зразка (у розведенні 1 : 2).

При встановленні компонентного складу ефірної олії лофанту ганусового було виявлено 34 компоненти, з яких ідентифіковано 31. Переважаючими компонентами ефірної олії були пулегон (59,187%), ізоментон (14,342%), які характеризуються підвищеною токсичністю. У ефірній олії *L. anisatus* також було ідентифіковано біциклогермакрен (3,208%), гермакрен D (3,013%), β -каріофілен (2,995%), ментон (2,205%), 1,6-гермакрадієн-5-ол (1,502%), ізопулегон (1,400%), піперитенон (0,921%), α -кадинол (0,977%), біциклоелемен (0,671%),

піперитон (0,628%), δ -кадинен (0,429%), епі- α -кадиол (0,496%) та інші компоненти (табл. 5).

Таблиця 4

Визначення мінімальної бактерицидної / фунгіцидної концентрації (MBC / MFC) етанольного екстракту *Lophanthus anisatus* по відношенню до тест-культур мікроорганізмів

Тест-культури мікроорганізмів	Наявність росту тест-культури на щільному середовищі при нанесенні відповідного розведення зразка						
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
<i>Escherichia coli</i>	–	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	–	+	+	+	+	+	+

Примітки: «+» – наявність росту культури; «–» – відсутність росту культури.

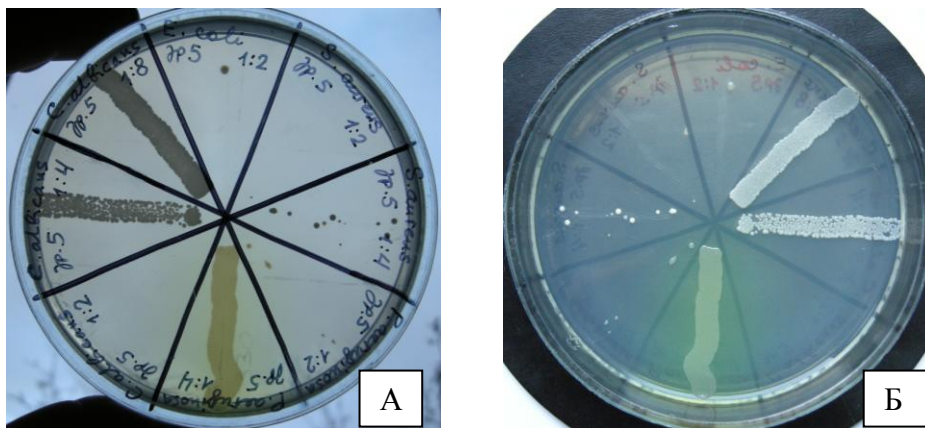


Рис. 1. Визначення мінімальної бактерицидної / фунгіцидної концентрації (MBC / MFC) етанольного екстракту *L. anisatus* по відношенню до тест-культур мікроорганізмів: А – вид ззовні, Б – вид зсередини

Таким чином, встановлено антимікробну дію 40% етанольного екстракту трави *L. anisatus* стосовно тест-культур мікроорганізмів – *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa*. Відносно *Candida albicans* пригнічуючу дію екстракту не виявлено.

Ефірна олія лофанту ганусового, вирощеного в умовах Полісся України, характеризується високим вмістом пулегону (59,187%) та ізоментону (14,342%), що може зумовлювати антимікробні властивості рослин. Враховуючи результати досліджень, бачимо перспективним подальше детальніше вивчення етанольних екстрактів із лофанту

ганусового з метою розширення асортименту антибактеріальних та антифунгальних рослинних препаратів.

Таблиця 5

Компонентний склад ефірної олії *Lophanthus anisatus*

№ піка	Час виходу	Сполука	%
1.	5.68	цис-3-гексен-1-ол	0,084
2.	5.94	транс-2-гексен-1-ол	0,178
3.	8.43	метилциклогексанон	0,057
4.	9.43	1-октен-3-ол	0,702
5.	9.97	октанол-3	0,078
6.	10.97	лимонен	2,456
7.	11.01	β -феландрен	0,123
8.	11.73	фенілацетальдегід	0,073
9.	13.21	пара- α -диметилстирен	0,106
10.	13.56	1-октен-3-ол ацетат	0,227
11.	14.70	не ідентифіковано	1,228
12.	15.75	ментон	2,205
13.	16.18	ізоментон	14,342
14.	16.40	ізопулегон	1,400
15.	18.20	не ідентифіковано	0,950
16.	19.33	пулегон	59,187
17.	19.41	піперитон	0,628
18.	19.63	севденон	0,144
19.	19.91	сабінілацетат	0,431
20.	20.04	8-окси- δ -4(5)-пара-ментен-3-он	0,287
21.	20.30	карвеол	0,150
22.	20.94	біциклоелемен	0,671
23.	21.32	піперитенон	0,921
24.	21.65	евгенол	0,315
25.	22.21	β -елемен	0,173
26.	22.95	β-каріофілен	2,995
27.	23.61	гумулен	0,124
28.	24.14	гермакрен D	3,013
29.	24.40	біциклогермакрен	3,208
30.	24.70	δ -кадинен	0,429
31.	25.85	1,6-гермакрадїєн-5-ол	1,502
32.	26.02	не ідентифіковано	0,141
33.	26.92	епі- α -кадинол	0,496
34.	27.13	α -кадинол	0,977

Список використаної літератури

1. Свиденко Л. В. К изучению биологии развития лопанта анисового, иссопа обыкновенного, чабера душистого / Л. В. Свиденко // Бюлл. Никит. ботан. сада. – 1998. – Вып. 80. – С. 95 – 97.
2. Чумакова В. В. Определение галловой кислоты в траве лопанта анисового методом планарной хроматографии / В. В. Чумакова,

Т. Д. Мезенова, О. И. Попова // Химия растительного сырья. – 2011. – № 4. – С 269 – 271. **3. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties-an overview / J. Reichling, P. Schnitzler, U. Suschke, R. Saller // Forsch Komplementmed. – 2009. – Vol. 16 (2). – P. 79 – 90. 4. Изучение химического состава и противогрибковой активности эфирного масла *Lophyantus anisatum* Benth / А. В. Великородов, В. Б. Ковалев, А. Г. Тырков, О. В. Дехтяров // Химия растительного сырья. – 2010. – № 2. – С. 143 – 146. 5. Абделаал Х. А. А. Употребление нового чайного напитка из лофанта анисового в лечебных целях / Х. А. А. Абделаал, В. Н. Фурсов // Естественные науки. – 2009. – № 4 (29). – С 61 – 65. 6. Котюк Л. А. Фунгіцидна активність екстрактів ефіроолійних рослин родини *Lamiaceae* Lindl. відносно *Fusarium oxysporum* / Л. А. Котюк, І. В. Іващенко // Біологічний вісник МДПУ. – 2013. – Т. 3, № 3 (9). – С. 70 – 82. 7. Мінарченко В. М. Лікарські судинні рослини України (медичне та ресурсне значення) / В. М. Мінарченко. – Київ : Фітосоціоцентр, 2005. – С. 210. 8. Екстракція рослинної сировини : навчальний посібник / Ю. І. Сидоров , І. І. Губицька, Р. Т. Конечна, В. П. Новіков. – Львів: Видавництво Львівської політехніки. – 2008. – 336 с. 9. Наказ МОЗ України № 167 «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» : методичні вказівки. – К. : МОЗ України. – 2007. – 63 с. 10. Украинская коллекция микроорганизмов: Каталог культур / под ред. В. С. Подгорского, О. И. Коцофляк, Е. А. Киприановой, О. Р. Гвоздяк. – К. : Наукова думка, 2007. – 270 с. 11. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике / под ред. С. И. Алиханяна. – Москва : Мир. – 1976. – С. 394 – 395. 12. Черногород Л. Б. Эфирные масла некоторых видов рода *Achillea* L., содержащие фразанол / Л. Б. Черногород, Б. А. Виноградов // Растительные ресурсы. – 2006. – Т. 42, Вып. 2. – С. 61 – 68.**

Котюк Л. А. Вивчення антимікробної активності етанольного екстракту *Lophanthus anisatus* Adans (*Lamiaceae*)

У статті наведено відомості про компонентний склад ефірної олії *Lophanthus anisatus*, культивованої в умовах Житомирського Полісся. У ефірній олії лофанта ганусового було ідентифіковано 31 компонент, з яких переважаючими були: пулегон (59,187%), ізоментон (14,342%), біциклогермакрен (3,208%), гермакрен D (3,013%), β -каріофілен (2,995%), ментон (2,205%).

Досліджено біологічну активність 40% етанольного екстракту *Lophanthus anisatus*, вирощеного в умовах Полісся України, щодо золотистого стафілокока (*Staphylococcus aureus*), кишкової палички (*Escherichia coli*), синьогнійної палички (*Pseudomonas aeruginosa*) та

кандіди біліючої (*Candida albicans*), які є патогенними стосовно інших організмів.

Етанольний екстракт лофанту ганусового містив у своєму складі речовини, які впливали на *S. aureus* та *E. coli*, призводячи до підвищення показників МІС і МВС 40% етилового спирту у 2 рази. Компоненти екстракту *L. anisatus* також двократно посилювали бактеріостатичну дію 40% етанолу щодо *P. aeruginosa*. На *C. albicans* екстраговані речовини не впливали.

Відмічено перспективність подальшого детальнішого вивчення етанольних екстрактів трави лофанту ганусового з метою виготовлення антибактеріальних та антифунгальних рослинних препаратів.

Ключові слова: *Lophanthus anisatus*, етанольний екстракт, мінімальна бактеріостатична концентрація, мінімальна бактерицидна концентрація.

Котюк Л. А. Изучение антимикробной активности этанольного экстракта *Lophanthus anisatus* Adans (*Lamiaceae*)

В статье приведены сведения о компонентном составе эфирного масла *Lophanthus anisatus*, культивируемого в условиях Житомирского Полесья. В эфирном масле лофанта анисового было идентифицировано 31 компонент, преобладали: пулегон (59,187%), изоментон (14,342%), бициклогермакрен (3,208%), гермакрен D (3,013%), β-кариофилен (2,995%), ментон (2,205%).

Исследовано биологическую активность 40% этанольного экстракта *Lophanthus anisatus*, выращенного в условиях Полесья Украины относительно золотистого стафилококка (*Staphylococcus aureus*), кишечной палочки (*Escherichia coli*), синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*) и кандиды белеющей (*Candida albicans*), которые являются патогенными по отношению к другим организмам.

Этанольный экстракт лофанта анисового содержал в своем составе вещества, которые влияли на *S. aureus* и *E. coli*, приводя к повышению показателей МІС и МВС 40% этилового спирта в 2 раза. Компоненты экстракта *L. anisatus* также дважды усиливали бактериостатическое действие 40% этанола по *P. aeruginosa*. На *C. albicans* извлеченные вещества не влияли.

Отмечена перспективность дальнейшего изучения этанольных экстрактов травы лофанта анисового с целью изготовления антибактериальных и антифунгальных растительных препаратов.

Ключевые слова: *Lophanthus anisatus*, этанольный экстракт, минимальная бактериостатическая концентрация, минимальная бактерицидная концентрация.

Kotyuk L. A. The Study of Antimicrobial Activity of Ethanol Extract of the *Lophanthus anisatus* Adans (*Lamiaceae*)

The paper provides the information on the component composition of ethereal oil of *Lophanthus anisatus* cultivated in Zhytomyr Polissya. In the ethereal oil of mint anise 31 component were identified: pulegone (59,187%), isomenthone (14,342%), bicyclogermakren (3,208%), germacrene D (3,013%), β -kariofilen (2,995%), menthone (2,205%) 1,6 germacradien-5-ol (1,502%), isopulegone (1,400%) piperitenone (0,921%), α -cadinol (0,977%), bicycloelemene (0,671%) piperitone (0,628%), δ -cadinene (0,429%), epi- α -cadinol (0,496%) and other.

The antimicrobial activity of *Lophanthus anisatus* extract was studied in accordance with the common methodology of determining the sensitivity of microorganisms to antibacterial preparations. The aboveground part of plants harvested in the last ten-day period of August, in the flowering phase, was used in the experiments. The raw material was reduced to fragments of 1 – 1,5 mm according to the requirements of pharmacopoeia. The extract of *L. anisatus* was obtained by the method of maceration in 40% ethyl alcohol at a ratio of 1:5 and the concentration of 200 mg/ml. The availability of antimicrobial activity of extracted substances in the structure of the substances studied was determined by the way of comparison of their minimum inhibiting concentrations (MIC) and minimum bactericidal/fungicidal concentrations (MBC/MFC) with those in 40% ethyl alcohol.

The paper investigates the biological activity of 40% ethanol extract of *Lophanthus anisatus* herb grown under the conditions of Ukrainian Polissya as to golden staphylococcus (*Staphylococcus aureus*), coliform bacillus *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* which are pathogenic in reference to other organisms.

The ethanol extract of *L. anisatus* contained substances that influenced *S. aureus* and *E. coli* causing the twofold increase of MIC and MBC indices of 40% ethyl alcohol. The components of *L. anisatus* extract also doubled the bacteriostatic effect of 40% ethanol as to *P. aeruginosa*. The extracted substances did not influence *C. albicans*.

The paper draws attention to the prospects of the further more detailed study of ethanol extracts of mint anise with the aim of producing antibacterial and antifungal herbal preparations.

Key words: *Lophanthus anisatus*, ethanol extract, minimal bacteriostatic concentration, minimal bactericidal concentration.

Стаття надійшла до редакції 15.12.2014 р.

Прийнято до друку 26.12.2014 р.

Рецензент – д. б. н., проф. С. М. Федченко.