

© Український журнал клінічної та лабораторної медицини, 2013  
УДК 615.454.2: 615.014: 579.842

## Мікробіологічні аспекти розробки комплексного пробіотичного засобу для профілактики та лікування гінекологічних захворювань

О.С.Калюжная, О.П.Стрілець, Л.С.Стрельников

Національний фармацевтичний університет  
Харків, Україна

Проведено вивчення антимікробної активності ефірної олії лаванди диско-дифузійним методом та активності парів даної ефірної олії по відношенню до стандартних штамів *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 885-653 та пробіотичного штаму *Lactobacillus plantarum* 8R-A3 або *Lactobacillus fermentum* 90T-C4. Встановлено наявність антимікробної дії до всіх мікроорганізмів, що досліджувались, та незначну антимікробну активність до грам-негативних та пробіотичної культури.

**Ключові слова:** ефірна олія лаванди, пробіотичні мікроорганізми, антимікробна активність.

### ВСТУП

Інфекційно-запальні захворювання репродуктивної системи жінки тісно пов'язані з виникненням та розвитком вагінального дисбіозу та можуть бути спричиненні як специфічними патогенами, так і представниками умовно-патогенної мікрофлори [1, 2, 5]. Крім цього, слід відмітити, що в даний час особливістю урогенітальних інфекцій є їхня полімікробність, тобто сполучення декількох видів збудників. Саме тому лікування будь-якого вагінального інфекційного захворювання здійснюється в два етапи. Перший етап спрямований на зниження титру умовно-патогенних бактерій, другий — на відновлення фізіологічної піхвової флори, тобто на підвищення титру лакто- та біфідобактерій — найважливіших представників піхвової мікрофлори [3, 4].

Тому лікування дисбіотичних порушень пов'язаних із розвитком інфекційно-запальних захворювань, вимагає комплексного підходу, зокрема використання лікарських засобів, що мають у своєму складі декілька діючих компонентів, які б нормалізували мікрофлору урогенітального тракту та пригнічували умовно-патогенну та патогенну флору, потенціуючи дію один одного, та тим самим позитивно впливали на репродуктивну функцію сечостатевої системи жінки. У даному аспекті перспективним є використання пробіотиків, що представляють собою живі бактерії-симбіонти, фізіологічні нормофлорі організму людини. Як компонент, що має антибактеріальні властивості до умовно-патогенної мікрофлори урогенітального тракту, нами було запропоновано ввести до складу препарату ефірну олію лаванди.

Антимікробна активність ефірних олій є предметом вивчення багатьох дослідників [7, 8], але в лікувальних засобах використовується досить рідко.

Метою дослідження було визначити ефективність використання ефірної олії лаванди як антибактеріального компоненту та можливості її сумісного використання з пробіотичною культурою лактобактерій у складі однієї лікарської форми.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В експериментах використовували промисловий штам лактобактерій *Lactobacillus plantarum* 8R-A3 або *Lactobacillus fermentum* 90T-C4 та референс-штами умовно-патогенних мікроорганізмів: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 885-653.

Культуру лактобактерій вирощували в рідкому живильному середовищі м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) протягом 48 год. при температурі  $37\pm 1^\circ\text{C}$ , попередньо розводячи пробіотичний препарат «Лактобактерин сухий» розчином натрію хлориду ізотонічним із розрахунку 5 мл розчину на 1 дозу препарату.

Референс-штами попередньо вирощували протягом 24 год. при температурі  $37\pm 1^\circ\text{C}$  (бактерії) та 48 год. при температурі  $25\pm 1^\circ\text{C}$  (гриби).

Вихідну мікробну суспензію тест-штамів і лактобактерій готували відповідно до стандарту каламутності на 5 ОД (ОСО 42-28-86-07 П), розводячи розчином натрію хлориду ізотонічним. Для контролю посівної дози готували десятикратні розведення  $10^8$  КУО/мл фізіологічним розчином і висівали з 5-го розведення ( $10^3$  КУО/мл) суспензії по 0,1 мл на три чашки густого живильного середовища (на середовище MRS — молочнокислі бактерії, на середовище Сабуро — гриби, на МПА — бактерії). Через 24-48 год. культивування при температурі  $37\pm 1^\circ\text{C}$  для бактерій та  $24\pm 1^\circ\text{C}$  для грибів підраховували кількість колоній, що виростили на чашках, знаходили середнє арифметичне, помножували його на  $10^5$  і, таким чином, отримували реальну концентрацію зависі.

Із метою дослідження протимікробної активності парів ефірної олії лаванди по відношенню до тест-штамів та пробіотичних культур використовували наступний метод. Вихідну мікробну суспензію тест-штамів і лактобактерій на 5 ОД доводили до концентрації  $10^3$  КУО/мл (для можливості підрахунку колоній на поверхні середовища). По 0,1 мл отриманих зависей наносили на поверхні відповідних середовищ, розподіляючи шпателем. Після підсушування чашок на внутрішню поверхню кришки наносили 0,1 мл ефірної олії, розподіляючи шпателем по поверхні кришки. Чашки Петрі

герметично упаковували в поліетиленові пакети. Паралельно готували контроль — зразки без додавання ефірної олії. Чашки Петрі поміщали в термостат догори дном й інкубували при температурі  $37\pm 1^\circ\text{C}$  протягом 24 год. Після закінчення інкубації здійснювали облік й інтерпретацію результатів шляхом підрахування колоній, що виростили на чашці Петрі.

Також для визначення антимікробної активності ефірної олії використовували диско-дифузійний метод (ДДМ) з використанням дисків, що були просочені активним компонентом, згідно з рекомендаціями методики NCCLS — Національного комітету із клінічних лабораторних стандартів США [9]. ДДМ заснований на здатності активного компонента дифундувати із дисків у живильне середовище та пригнічувати ріст мікроорганізмів, висіяних на поверхні агару.

Для дифузії ефірної олії в гідрофобному поживному середовищі її попередньо розчиняли в 10% диметилсульфоксиді (ДМСО) з додаванням емульгатора Твіну-80. У стерильних умовах стерильні диски з фільтрувального паперу діаметром 6 мм насичували ефірною олією та залишали на 40 хв. для висихання.

За рекомендаціями NCCLS, антибіотикорезистентність мікроорганізмів вивчали на стандартизованому за всіма компонентами середовищі — агарі Мюлера-Хінтон (МХА) [9].

Вихідну мікробну суспензію тест-штамів і лактобактерій на 5 ОД доводили до концентрації  $10^5$  КУО/мл. На поверхню агару в чашках Петрі наносили 1 мл бактеріальної суспензії. Після підсушування чашок (не пізніше 15 хвилин після інокуляції) на поверхню середовища поміщали підготовлені диски. Як негативний контроль (для контролю розчинника) використовували диск, який був просочений відповідною концентрацією ДМСО. Як позитивний контроль (для контролю референс-

ТАБЛИЦЯ 1

## Антимікробна активність парів ефірної олії лаванди

Тест-культура/ Концентрація ефірної олії	<i>L.plantarum</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>P.vulgaris</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>
Кількість колоній мікроорганізмів на чашці Петрі							
0,1 мл	87±4,9	73±4,1	36±7,0	30±3,0	77±3,9	93±4,9	67±9,7
0 мл (контроль)	108±13,3	109±13,3	99±12,6	119±1,1	108±7,1	108±11,3	105±18,1

*Примітка:* відхилення вірогідності відносно контролю —  $p < 0,05$ .

ТАБЛИЦЯ 2

Антимікробна активність ефірної олії лаванди диско-дифузійним методом

Тест-культури	Діаметр зон затримки росту, мм		
	Контроль		Ефірна олія
	Негативний	Позитивний	
<i>L.plantarum</i> 8R-A3 або <i>L.fermentum</i> 90T-C4	0		9
<i>E.coli</i> ATCC 25922	0	32	11
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	0	27	22
<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	0	20	28
<i>P.vulgaris</i> ATCC 6896	0	17	12
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	0	21	7
<i>C.albicans</i> ATCC 885-653	0	22	15

штамів) використовували стандартні диски з антибіотиками (виробництва HiMedia Laboratories): офлоксацин (для контролю *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa*), флюконазол (для контролю *C.albicans*), бацитрацин (для контролю *B.subtilis*), цефтазидим (для контролю *P.vulgaris*). Чашки Петрі поміщали в термостат догори дном й інкубували при температурі 37±1°C протягом 24 год. Після закінчення інкубації здійснювали облік й інтерпретацію результатів визначенням зони затримки росту лінійкою.

Усі дослідження проводили в трьох повторностях. Статистичну обробку здійснювали за традиційними методами варіаційної статистики. Середні арифметичні значення та їх довірчі інтервали визначали для рівня вірогідності 95%.

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**

При визначенні антимікробної активності парів ефірної олії лаванди та ефірної олії при прямому контакті встановлено, що досліджувана речовина проявляє неоднакову антимікробну активність по відношенню до культур, які взяті в експеримент. Грампозитивні бактерії відомі вищою чутливістю до ефірних олій, ніж грамнегативні [6-8]. Дана тенденція спостерігається і в наших експериментах.

Як можна побачити з табл. 1, середня кількість колоній усіх культур, що вирости в присутності парів ефірної олії, достовірно відрізняється від відповідних контрольних значень. Найбільша антимікробна дія спостерігалася по відношенню до грампозитивних *S.aureus* та *B.subtilis*. По відношенню до грамнегативних паличок *E.coli*, *P.vulgaris* та *P.aeruginosa* пари ефірної олії проявили меншу антимікробну активність, особливо по відношенню до останнь-

ої. Також досліджувана олія проявила деяку протигрибкову дію до дріжджоподібного мікроорганізму *C.albicans*.

Результати визначення антимікробної активності ефірної олії лаванди ДДМ показали, що спектр антимікробної дії парів ефірної олії лаванди відповідає її спектру дії при прямому контакті (табл. 2). Слід відмітити незначну дію парів ефірної олії лаванди на *L.plantarum* в обох дослідженнях, що може бути використано для сумісного використання ефірної олії та пробіотичної культури при створенні комплексного препарату.

**ВИСНОВКИ**

1. Вивчено антимікробну активність ефірної олії лаванди по відношенню до деяких грампозитивних, грамнегативних бактерій та дріжджового гриба, що є потенційними збудниками інфекційно-запальних захворювань репродуктивної системи жінки, а також по відношенню до культури лактобактерій, яка є невід’ємним компонентом здорової мікрофлори організму людини.

2. Встановлено, що ефірна олія лаванди проявляє антимікробну дію до усіх використаних у дослідженнях культур: по відношенню до грампозитивних бактерій — досить високу, до грамнегативних бактерій та дріжджоподібного гриба — незначну. Позитивним моментом є малочутливість пробіотичної культури лактобактерій до дії олії, що досліджувалась.

3. У зв’язку із цим представляє інтерес подальше вивчення антимікробної активності ефірної олії лаванди з визначенням її мінімальної інгібуючої концентрації з метою створення комплексного пробіотичного препарату.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Микроэкологические аспекты репродуктивного здоровья женщины и современные подходы к его поддержанию / Б.М.Венцовский, В.А.Товстановская, Д.С.Янковский, Г.С.Дымент // Здоровье женщины. — 2002. — №3 (11). — С. 86-91.
  2. Микроэкология влагалища. Коррекция микрофлоры при вагинальных дисбактериозах: уч. пособие. / [В.М.Коршунов, Н.Н.Володин, Б.А.Ефимов и др.]. — М., 1999. — 79 с.
  3. Мосієнко В.С. Молочнокислі бактерії, їх властивості та використання в медичній практиці / В.С.Мосієнко, М.Д.Мосієнко, В.М.Рябуха // Український хімотерапевтичний журнал. — 2002. — №11 (13). — С. 16-23.
  4. Применение пробиотиков в комплексной терапии и профилактике воспалительных заболеваний в акушерстве и гинекологии / Б.М.Венцовский, В.А.Товстановская, Д.С.Янковский, Г.С.Дымент // Здоровье женщины. — 2002. — №3 (11). — С. 86-91.
  5. Характеристика микроорганизмов, колонизирующих кишечник человека / Б.А.Ефимов, Н.Н.Володин, Л.И.Кафарская, В.М.Коршунов // Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии. — 2002. — №5. — С. 98-104.
  6. Celikel N. Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms / N.Celikel, G.Kavas // Czech journal of food Sciences. — 2008. — Vol. 26, №3. — P. 174-181.
  7. Kim J. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens / J.Kim, M.R.Marshall, C.Wei // Journal of agricultural and food chemistry. — 1995. — №43. — P. 2839-2845.
  8. Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaurin for gram-positive and gram-negative bacteria / H.G.Preuss, B.Echard, M.Enig, I.Brook, T.B.Elliott // Molecular and cellular biochemistry. — 2005. — №272 (1-2). — P. 29-34.
  9. National Committee for Clinical Laboratory Standards for Antimicrobial susceptibility testing; eleventh informational supplement. 2001: 21 (1).
- О.С.Калужная, О.П.Стрилец, Л.С.Стрельников.** *Микробиологические аспекты разработки комплексного пробиотического лекарственного средства для профилактики и лечения гинекологических заболеваний. Харьков, Украина.*
- Ключевые слова:** эфирное масло лаванды, пробиотические микроорганизмы, антимикробная активность.
- Проведено изучение антимикробной активности эфирного масла лаванды диско-диффузионным методом и активности паров данного масла по отношению к стандартным штаммам *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 885-653 и пробиотическому штамму *Lactobacillus plantarum* 8R-A3 или *Lactobacillus fermentum* 90T-C4. Установлено наличие антимикробного действия ко всем изучаемым микроорганизмам и незначительной антимикробной активности к грамотрицательным и пробиотической культуре.
- O.S.Kaluzhnaya, O.P.Strilets, L.S.Strelnikov.** *Microbiological aspects of development of complex probiotic medicine for the prevention and treatment of gynecological diseases. Kharkiv, Ukraine.*
- Key words:** lavender essential oil, probiotic microorganisms, antimicrobial activity.
- The study of antimicrobial activity of lavender essential oil by disk-diffusion method and activity of this essential oil vapour towards standard strains of *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 885-653 and probiotic strain *Lactobacillus plantarum* 8R-A3 or *Lactobacillus fermentum* 90T-C4 has been carried out. The presence of antimicrobial effect to all tested microorganisms and insignificant antimicrobial activity to gram-negative and probiotic cultures has been determined.

Надійшла до редакції 05.11.2012 р.