

**ВИЗНАЧЕННЯ МІНІМАЛЬНОЇ ПРИГНІЧУЮЧОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ
ЕФІРНОЇ ОЛІЇ ЕВГЕНОЛУ
ДЛЯ КУЛЬТУРИ ГРИБІВ ВИДУ ASPERGILLUS FUMIGATUS
ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія» (м. Полтава)**

microbiolumsa@gmail.com

Дослідження виконані в межах НДР кафедри гігієни, екології та охорони праці в галузі ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія» м. Полтави «Наукове обґрунтування профілактики негативного впливу окремих чинників довкілля на якість життя і стан здоров'я дітей в умовах геохімічної провінції», № державної реєстрації 0111U008522.

Вступ. Останнім часом більшість дослідників привертають увагу до можливості пошуку та застосування екологічно чистих технологій та біологічних методів боротьби з патогенними мікроорганізмами. Перспективним напрямком є використання фітопрепаратів та ефірних олій.

Ефірні олії, які є природним концентратом фітонцидів, являють собою багатоконпонентні органічні сполуки альдегідів (цитронелала, цитраля), фенолів (тимола, евгенола, карвакрола, анетола, евкаліптола), монотерпенових спиртів, кетонів та інших вуглеводнів. Більшість хімічних сполук, що входять до складу ефірних олій, зумовлюють антимікробні, бактерицидні, антивірусні, протизапальні, імуномодельючі властивості. Протимікробна активність ефірних олій щодо гемолітичного стафілокока, стрептококів, представників тифо-дизентерійної групи мікроорганізмів доведена у наукових дослідженнях Рамазанової Н. Х. [10], Капелева О. І. та інш. [6]; фунгіцидний вплив ефірної олії лофанту ганусового на *Microsporium*

canis, *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans* – у роботах Великородова А. В. і Ковальова В. Б. [4], пригнічуючу дію ефірної олії чаберу садового на *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans* встановили Mihajilov-Krstev та Radnovic [14], мінімальну пригнічуючу концентрацію ефірної олії монарди дудчастої на *Aspergillus fumigates* визначено у дослідженнях Полянської В. П. та ін. [9]. Протівірусна активність ефірних олій доведена у роботах С. С. Солдатченко, Кащенко Г. Ф., А. В. Підаєва [11], а проведення курсу ароматерапії знижувало захворюваність на ГРВІ у 1,5-2,8 рази [3].

За літературними даними широкого застосування у медицині набуло використання евгенолу (4-аліл-2-метоксифенол), який відноситься до групи фенолів і має антибактеріальні, протизапальні, знеболюючі властивості [8]. Достатньо досліджена дія евгенолу на гриби роду *Candida*, з'ясовано його вплив на вірулентність дріжджеподібних грибів [2]. Проте, недостатньо вивчена фунгіцидна дія евгенолу на міцеліальні гриби. Серед міцеліальних грибів особливу увагу привертають представники роду *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*). Аспергіли є природними мешканцями ґрунту, можуть зустрічатися у воді, деяких продуктах харчування, вентиляційних системах, на поверхні листків кімнатних і декоративних рослин. Збільшення кількості спор у повітрі спосте-

Таблиця 1.

Визначення мінімальної пригнічуючої концентрації ефірної олії евгенолу методом серійних розведень

Компоненти, мл	Пробірки							
	контроль	1	2	3	4	5	6	7
Бульйон Сабуро	1	-	1	1	1	1	1	1
Робочий розчин ефірної олії евгенолу (0,5 мл ефірної олії + 0,5 мл спиртового розчину)	-	1	1	1	1	1	1	1
Суспензія спор у бульйоні Сабуро	1	1	1	1	1	1	1	1
Розведення ефірної олії	-	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256
Концентрація ефірної олії, мг/мл	-	267,4	133,7	66,8	33,42	16,7	8,35	4,17
Облік через 24 год	ріст	-	-	-	-	-	-	ріст
Облік через 72 год	ріст	-	-	-	-	-	-	ріст

рігається під час ремонтних та конструкційних робіт приміщень, що призводить до різкого падіння біологічної активності повітря. Інгаляційний шлях потрапляння спор *Aspergillus* spp. з повітря під час дихання може бути причиною респіраторних захворювань людини і тварин [12,15]. Тому у рамках ефективного оздоровлення атмосферного повітря доцільним є розширення спектру вивчення фунгіцидної дії ефірних олій на міцеліальні гриби.

Мета дослідження. Визначення мінімальної фунгіостатичної та фунгіцидної концентрації ефірної олії евгенолу для культури грибів виду *A. fumigatus*.

Об'єкт і методи дослідження. В якості основної досліджуваної речовини використовували ефірну олію евгенолу (виробник ЗАО «ОЕЗ ВладМиВа», Росія). Для визначення мінімальної пригнічуючої концентрації олії евгенолу для культури грибів застосовували метод серійних макророзведень. Для якісного розведення олій в бульйоні Сабуро використовували спиртовий розчин [8]. Протигрибкову дію ефірних олій краще оцінювати у рідких середовищах, оскільки гідрофобна природа більшості компонентів ефірної олії перешкоджає однорідному розповсюдженню цих речовин в агарі [16].

Приготування суспензії спор. Суспензію спор тест-культури готували на бульйоні Сабуро, концентрацію колонієутворюючих одиниць в 1 мл суспензії визначали стандартним методом за допомогою камери Горяєва [7]. Підраховували кількість спор мінімум у п'яти великих квадратах камери Горяєва по діагоналі або у кутах сітки та в її середині при збільшенні мікроскопа 15 x10. Готували два препарати. Підрахунок спор у першому препараті проводили в обох сітках камери, у другому препараті – в одній із сіток. Вираховували середню кількість спор *n*. Сітка камери Горяєва складається з 225 великих квадратів, об'єм 1 квадрата дорівнює 0,004 мм³. Якщо в 1 квад-

раті (в 0,004 мм³) виявлено *n* колонієутворюючих одиниць, то в 1 мл (в 1000 мм³) їх кількість *X* дорівнює:
 $X = n \times 1000 : 0,004$; $X = n \times 250000$,
 отже $X = n \times 2,5 \times 10^6$

Було досягнуто необхідної для методу серійних розведень концентрації спор *Aspergillus fumigatus* у кількості 2 x10⁶ КУО/мл, що відповідає оптичному стандарту мутності 0,5 за McFarland [9,13].

Посіви спор грибів інкубували при температурі 26°C протягом 72 годин [1]. Через 24 години та через 72 годин інкубації з пробірок, у яких немає ознак росту, проводили посів на середовище Сабуро у чашки Петрі для визначення фунгіостатичного та фунгіцидного ефекту.

В якості тест-культури використовували 5-6 денну чисту культуру грибів виду *Aspergillus fumigatus*.

Результати дослідження та їх обговорення. Результати дослідження мінімальної пригнічуючої концентрації ефірної олії евгенолу для культури грибів виду *Aspergillus fumigatus* представлені в **таблицях 1 і 2**.

Як свідчать результати, відображені у таблицях 1 і 2, пригнічення росту грибів виду *Aspergillus fumigatus* спостерігалось у живильних середовищах з концентрацією ефірної олії евгенолу у діапазоні 267,4 мг/мл – 8,35 мг/мл після інкубації 24 години та 72 години і мінімальна пригнічуюча концентрація евгенолу для *Aspergillus fumigatus* становила 8,35 мг/мл. Відомо, що евгенол представлений ліпофільними молекулами,

які можуть проникати між ацильними ланками жирних кислот, тим самим порушуючи текучість і проникність мембран. Це впливає на регуляцію і функцію мембрано-асоційованих ферментів, які каталізують синтез основних полісахаридних компонентів клітинної стінки, у тому числі бета-глікану, хітину, маннану, що призводить до порушення росту клітин і морфогенезу оболонки [2].

Таблиця 2.

Особливості росту тест-культури при культивуванні з ефірною олією евгенолу в рідкому поживному середовищі

Концентрація ефірної олії (мг/мл)	Тривалість інкубації (години)	
	24	72
контроль	Помутніння середовища, поверхневий ріст культури бархатистого вигляду світлого кольору	Помутніння середовища, поверхневий ріст культури бархатистого вигляду, з добре розвиненим пігментованим міцелієм сіро-зеленуватого кольору, наявні конідіальні голівки
267,4	Ознаки росту відсутні, суспензія без змін	Ознаки росту відсутні, суспензія без змін
133,7	Ознаки росту відсутні, суспензія без змін	Ознаки росту відсутні, суспензія без змін
66,8	Ознаки росту відсутні, суспензія без змін	Ознаки росту відсутні, суспензія без змін
33,42	Ознаки росту відсутні, суспензія без змін	Ознаки росту відсутні, суспензія без змін
16,7	Ознаки росту відсутні, суспензія без змін	Ознаки росту відсутні, суспензія без змін
8,35	Ознаки росту відсутні, суспензія без змін	Ознаки росту відсутні, суспензія без змін
4,17	Помутніння середовища, поверхневий ріст культури бархатистого вигляду світлого кольору	Активний ріст культури, помутніння середовища, поверхневий ріст культури бархатистого вигляду, з добре розвиненим пігментованим міцелієм сіро-зеленуватого кольору, наявні конідіальні голівки

Визначення фунгіцидної концентрації ефірної олії евгенолу

Тривалість інкубації (години)	Концентрація ефірної олії в пробірці, з якої виконано пересів на щільне середовище Сабуро, мг/мл							
	Контроль	267,4	133,7	66,8	33,42	16,7	8,35	4,17
24	ріст	-	-	-				ріст
72	ріст	-	-	-				ріст

Результати дослідження мінімальної фунгіцидної концентрації олії евгенолу для культури грибів виду *Aspergillus fumigatus* представлені в **таблиці 3**.

При аналізі результатів, відображених в **таблиці 3**, встановлено, що мінімальна фунгіцидна концентрація ефірної олії евгенолу через 24 год та 72 год інкубації становить 8,35 мг/мл. При цьому, фунгістатична дія евгенолу на гриби виду *Aspergillus fumigatus* за даних розведень не спостерігалась.

Висновки

1. Ефірна олія евгенолу володіє вираженою фунгіцидною активністю щодо культури грибів виду *Aspergillus fumigatus*.

2. Мінімальна пригнічуюча концентрація ефірної олії евгенолу через 24 та 72 години інкубації становила 8,35 мг/мл.

3. Мінімальна фунгіцидна концентрація ефірної олії евгенолу становила 8,35 мг/мл.

4. Подовження експозиції впливу олії евгенолу на культури грибів виду *Aspergillus fumigatus* не сприяло зростанню її фунгіцидної активності.

5. Бактеріостатична активність ефірної олії евгенолу щодо культури грибів виду *Aspergillus fumigatus* не виявлена.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому потребує дослідження вивчення фунгіцидної дії евгенолу на інші види грибів роду *Aspergillus*.

Література

1. Билай В.И. Основы общей микологии: Учеб. пособие для вузов. – 2-е изд., перераб и доп. / В.И. Билай. – К.: Вища шк.: Главное изд-во, 1980. – 360 с.
2. Брага П.С. Эвгенол и тимол по отдельности и в сочетании вызывают морфологические изменения оболочки *Candida albicans* / П.С. Брага, М. Даль Сассо, М. Альфири // Физиотерапия. – 2007. – Т. 78. – № 6. – С. 396-400.
3. Вахова Е.Л. Ароматотерапия в профилактике острых респираторных заболеваний у детей / Е.Л. Вахова // Курортные ведомости. – 2005. – № 3. – С. 52-53.
4. Великородов А.В. Изучение химического состава и противогрибковой активности эфирного масла *Lophanthus anisatum* Benth / А.В. Великородов, В.Б. Ковалев, А.Г. Тырков, О.В. Дехтярев // Химия растительного сырья. – 2010. – № 2. – С. 143-146.
5. Войткевич С.А. Эфирные масла для парфюмерии и ароматерапии / С.А. Войткевич. – М.: Пищевая промышленность, 1999. – 284 с.
6. Капелева О.И. Антибактериальные и фитонцидные свойства котовника лимонного / О.И. Капелева, Н.М. Макачук. – В кн.: Актуальные вопросы курортной фитотерапии. – Пятигорск, 1985. – С. 64-65.
7. Методы экспериментальной микологии. Справочник / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская [и др.]; Под ред. В.И. Билая. – К.: Наук. думка, 1982. – 551 с.
8. Николаевский В.В. Биологическая активность эфирных масел / В.В. Николаевский, А.Е. Еременко, И.К. Иванов. – М.: Медицина, 1987. – С. 144.
9. Полянська В.П. Визначення мінімальної пригнічуючої концентрації ефірної олії *Monarda fistulosa* для культури грибів виду *Aspergillus fumigatus* / В.П. Полянська, О.В. Кінаш, Н.П. Коваленко, О.Д. Саргош // Світ медицини та біології. – 2015. – № 2 (50). – С. 168-172.
10. Рамазанова Н.Х. О перспективном использовании некоторых эфиромасличных растений / Н.Х. Рамазанова. – В кн.: Актуальные вопросы изучения и использования эфиромасличных растений эфирных масел. – Симферополь, 1980. – С. 125-126.
11. Солдатенко С.С. Ароматерапия. Профилактика и лечение эфирными маслами / С.С. Солдатенко, Г.Ф. Кащенко, А.В. Пидавев. – Симферополь: Таврида, 1999. – 206 с.
12. Сергеев А.Ю. Грибковые инфекции: Рук. для врачей / А.Ю. Сергеев, Ю.В. Сергеев. – Москва: Бином-Пресс, 2003. – 439 с.
13. *Aspergillois: From Diagnosis to Prevention* / Edited by Alessandro C. Pasqualotto. – Springer Science+Business Media B.V., 2010. – 1027 p.
14. Mihajilov-Krstev T. Antimicrobial activiti of *Satureja hortensis* L. essential oil against pathogenic microbial strains / T. Mihajilov-Krstev, D. Radnovic, D. Kitic, Z. Stojanovic-Radic and B. Zlatkovic // *Biotechnol. & Biotechnol.* – 2009. – 23 (4). – P. 1492-1496.
15. Polianska V.P. Medical mycology: textbook / V.P. Polianska, N.P. Kovalenko, I.A. Kovalenko. – Poltava: PUET, 2012. – 80 p.
16. Sharma N. Tripathi A 2008. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) / N. Sharma. – Van Tieghem. *Microbiol Res.* – 163. P. 337-344.

УДК 579. 61

ВИЗНАЧЕННЯ МІНІМАЛЬНОЇ ПРИГНІЧУЮЧОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ ЕФІРНОЇ ОЛІЇ ЕВГЕНОЛУ ДЛЯ КУЛЬТУРИ ГРИБІВ ВИДУ *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

Полянська В. П., Кінаш О. В., Коваленко Н. П., Саргош О. Д.

Резюме. Широке використання ефірної олії евгенолу обумовлене його антимікробними, протизапальними, знеболюючими властивостями. Проте, недостатньо вивчена фунгіцидна активність евгенолу щодо

міцеліальних грибів. Ми вивчали фунгіцидну дію олії евгенолу на гриби виду *Aspergillus fumigatus* шляхом визначення її мінімальної фунгіостатичної та фунгіцидної концентрації. Встановлена протигрибкова дія ефірної олії на *Aspergillus fumigatus* у діапазоні 267,4 мг/мл – 8,35 мг/мл, виявлена мінімальна фунгіцидна активність олії евгенолу на гриби виду *Aspergillus fumigatus* у концентрації 8,35 мг/мл. Ефірна олія евгенолу може бути використана як протигрибковий засіб.

Ключові слова: ефірна олія, евгенол, гриби виду *Aspergillus fumigatus*, мінімальна пригнічуюча концентрація, мінімальна фунгіостатична концентрація, мінімальна фунгіцидна концентрація.

УДК 579.61

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ УГНЕТАЮЩЕЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ЭФИРНОГО МАСЛА ЭВГЕНОЛА ДЛЯ КУЛЬТУРЫ ГРИБОВ ВИДА *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

Полянская В. П., Кинаш О. В., Коваленко Н. П., Саргош О. Д.

Резюме. Широкое использование эфирного масла эвгенола обусловлено его антимикробными, противовоспалительными, обезболивающими свойствами. При этом, недостаточно изучена фунгицидная активность эвгенола по отношению к мицелиальным грибам.

Мы изучали фунгицидное действие эвгенола на грибы вида *Aspergillus fumigatus* путем определения его минимальной фунгиостатической и фунгицидной концентрации. Установлено противогрибковое действие эфирного масла эвгенола на *Aspergillus fumigatus* в диапазоне 267,4 мг/мл - 8,35 мг/мл, выявлена минимальная фунгицидная активность эвгенола на грибы вида *Aspergillus fumigatus* в концентрации 8,35 мг/мл.

Эфирное масло эвгенола может быть использовано как противогрибковое средство.

Ключевые слова: эфирное масло, эвгенол, грибы вида *Aspergillus fumigatus*, минимальная угнетающая концентрация, минимальная фунгиостатическая концентрация, минимальная фунгицидная концентрация.

UDC 579.61

DETERMINATION OF EUGENOL ESSENTIAL OIL MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION FOR FUNGI CULTURE *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

Polianska V. P., Kinash O. V., Kovalenko N. P., Sargosh O. D.

Abstract. Recently, most researchers focus attention on possibilities of development and application of ecologically clean technologies and biological methods of pathogenic microorganisms control. The use of phytopreparations and essential oils is prospective direction in this respect.

Essential oils, that are the natural concentrates of phytoncids, represent a multi-component organic aldehydes compounds (citronellal, citral), phenols (thymol, eugenol, carvacrol, anethole, eucalyptole), monoterpene alcohols, ketones and other hydrocarbons. Most of the chemical compounds comprising essential oils, condition the antimicrobial, antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, immune modulating properties.

However, antifungal effect of eugenol on filamentous fungi is underinvestigated. Among filamentous fungi, the representatives of genus *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*) focus particular attention.

The aim of the study was to determine the minimum fungistatic and fungicidal concentration of eugenol essential oil for the fungi culture of species *A. fumigatus*.

According to obtained results, growth inhibition of fungi species *Aspergillus fumigatus* was observed in nutrient medium with concentration of eugenol essential oil, ranging 267,4 mg/ml – 8,35 mg/ml after incubation for 24 hours and 72 hours and minimum inhibitory eugenol concentration for *Aspergillus fumigatus* was 8,35 mg/ml. It is known, that eugenol is represented by lipophilic molecules that can penetrate between acyl chains of fatty acids, thereby affecting fluidity and permeability of membranes. This influences on the regulation and function of membrane-associated enzymes, that catalyze synthesis of the main polysaccharidic components of cell wall, including beta-glycan, chitin, mannan, which leads to cell growth disorder and membrane morphogenesis. When analyzing findings, it was stated that the minimum fungicidal concentration of eugenol essential oil in 24 hours and 72 hours of incubation is 8,35 mg/ml. Thus, fungistatic effect of eugenol on fungi species *Aspergillus fumigatus* according to these dilutions was not observed.

Conclusions

1. Eugenol essential oil has strong fungicidal activity towards the fungi cultures of species *Aspergillus fumigatus*.
2. Minimum inhibitory concentration of the eugenol essential oil in 24 and 72 hours of incubation amounted to 8,35 mg/ml.
3. The minimum fungicidal concentration of eugenol essential oil amounted to 8,35 mg/ml.
4. Elongation of eugenol oil effect exposure on the cultures of fungi species *Aspergillus fumigatus* did not cause the growth of its fungicidal activity.
5. The bacteriostatic activity of eugenol essential oil towards the fungi culture species *Aspergillus fumigatus* was not revealed.

Keywords: essential oil, eugenol, fungi culture *Aspergillus fumigatus*, minimum inhibitory concentration, minimum fungistatic concentration, minimum fungicidal concentration.

Рецензент – проф. Лобань Г. А.
Стаття надійшла 18.03.2016 року