

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2020-24(1)-08

УДК: 615.322+582.745

ВИВЧЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСТРАКТІВ РУТИ САДОВОЇ *RUTA GRAVEOLENS L.* ЩОДО КЛІНІЧНИХ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ

Павлюк Н.В.

Івано-Франківський національний медичний університет (вул. Галицька, 2, м. Івано-Франківськ, Україна, 76000)

Відповідальний за листування:
e-mail: nvpavliuk@gmail.com

Статтю отримано 08 листопада 2019 р.; прийнято до друку 09 грудня 2019 р.

Анотація. Швидкі темпи зростання резистентності мікроорганізмів до більшості антибактеріальних препаратів змушує науковців різних країн здійснювати пошук нових терапевтичних засобів, що будуть володіти протимікробною активністю, а також, до яких повільніше буде формуватися резистентність у мікроорганізмів. Перспективними у даній ситуації є комплекси біологічно активних речовин (БАР) рослинного походження, які володіють рядом переваг над звичними антибіотиками. Особливої уваги заслуговує рута садова (РС), яка має багатий хімічний склад та володіє широким спектром властивостей, серед яких і наявність протимікробної дії. Метою даного дослідження було визначити спектр активності водно-етанольних екстрактів рути садової щодо клінічних штамів мікроорганізмів з різною чутливістю до антибіотиків. Методом серійних розведень в бульйоні виконано дослідження прямої протимікробної активності 5 водно-етанольних екстрактів та настоянки трави рути садової *Ruta graveolens L.* відносно 53 штамів мікроорганізмів. Для статистичної обробки результатів використовували комп'ютерні програми *Gene5* та *Microsoft Office Excel 2011*. Серед мікроорганізмів найбільш чутливими виявилися епідермальні стафілококи, пригнічення росту 57,9% та 47,4% штамів яких спостерігалось при розведенні 1:40 екстрактів РС 50% та 70%, відповідно. 90% екстракт РС проявив свою активність у розведенні 1:20 щодо 57,9% штамів *S. epidermidis*. Встановлено також помірну антифунгальну активність екстрактів РС відносно дріжджоподібних грибів роду *Candida*. Вона найбільше виражена у 70% екстракту РС, який у розведенні 1:40 пригнічував ріст 66,7% штамів. Активні компоненти досліджуваних екстрактів рути садової, що проявили помірну протимікробну та протигрибкову дію можуть бути використані для створення на їх основі нових терапевтичних препаратів для лікування шкірних інфекцій.

Ключові слова: антибіотикорезистентність, рослинні екстракти, епідермальні стафілококи.

Вступ

Швидке зростання антибіотикорезистентності серед мікроорганізмів змушує науковців різних країн проводити пошук альтернативних протимікробних агентів. Такими засобами можуть слугувати препарати рослинного походження, які володіють рядом переваг над традиційними антибіотиками: виявляють протизапальну дію на макроорганізм, не викликають дизбактеріозу, менш токсичні, рідше викликають алергічні реакції та, що не менш важливе, до них у мікроорганізмів повільніше формується резистентність [7].

Перспективною рослинною сировиною для створення нових протимікробних засобів може слугувати рута садова *Ruta graveolens L.* (родина Рутові (*Rutaceae*)), різноманітність фармакологічних властивостей якої визначається особливістю її хімічного складу - одночасною наявністю алкалоїдів (0,2-1,4%) і ефірної олії (до 0,7%), флавоноїдів, кумаринів та танінів, що в рослинному світі зустрічається не часто [1, 8].

Така різноманітність біологічно активних речовин РС пояснює широкий спектр активності даної рослини. Було відмічено протигельмінтну та антипротозойну активність, протигрибкову та протимікробну, протизапальну, антидіареїну, антипіретичну, противиразкову та загоюючу дію РС [4, 6].

Слід зауважити, що дані літературних джерел та проведені нами дослідження [8] свідчать не лише про наявність протимікробної дії БАР рути садової, але й про їх

антибіотикопотенціюючі властивості, що може стати порятунком при лікуванні інфекцій спричинених полірезистентними мікроорганізмами [3, 5].

Мета роботи - провести дослідження спектру протимікробної активності екстрактів рути садової *Ruta graveolens L.* щодо клінічних штамів антибіотикочутливих та антибіотикорезистентних мікроорганізмів.

Матеріали та методи

Для проведення дослідження використано 5 водно-етанольних екстрактів рути садової (екстрагенти - 40%, 50%, 70%, 90% та 96% етанол), а також настоянку РС. Приготування лабораторних зразків екстрактів трави РС проводили відповідно до рекомендацій Державної Фармакопеї України методом дробної мацерації з розділенням екстрагента на частини.

Дослідження протимікробної активності екстрактів виконано на клінічних штамів мікроорганізмів. Бактеріальні культури ідентифікували на основі біохімічних мікротестів "STAPHYtest 16", "ENTEROtest 24", "NEFERMENTtest 24" (Lachema, Чехія), а також із врахуванням комплексу морфологічних і культуральних властивостей згідно з рекомендаціями 9-го видання "Визначника бактерій Берджі". Культури дріжджоподібних грибів ідентифікували на основі 40 біохімічних тестів за допомогою системи VITEK 2 з використанням VITEK 2 YST ID card (bioMérieux, Франція).

В якості тест-культур використано 53 штами мікроорганізмів, з яких: 12 - *S. aureus*, 19 - *S. epidermidis*, 1 - *S. haemolyticus*, 2 - *K. pneumoniae*, 2 - *P. aeruginosa*, 2 - *E. faecalis*, 2 - *E. coli*, 2 - *Acinetobacter* spp., 1 - *Citrobacter* spp., 4 - *Streptococcus* spp., 6 - *Candida* spp.

Значення МПК екстрактів рути садової відносно мікроорганізмів різних груп вивчали методом двократних серійних розведень в бульйоні Мюллера-Хінтона. Характер росту культур в лунках полістиролових планшет з різними концентраціями екстрактів оцінювали на основі приросту оптичної густини середовища (OD495), яку реєстрували за допомогою багаторежимного фотометра SynergyTMHTX S1LFTA (BioTek Instruments, Inc., США). при довжині хвилі 495 нм впродовж 24 годин інкубації (кожні 2 години) при температурі 37 °C в герметичній камері з достатнім рівнем вологості. Для тест-штамів будували криві росту для визначення МПК. Контролем слугував МПБ, засіяний лише мікробною культурою.

Найбільше розведення препарату, при якому спостерігалась повна відсутність росту тест-штамів приймалась за МПК. Значення ефективних протимікробних концентрацій досліджуваних екстрактів для кожного штаму визначали із врахуванням сухого залишку, одержаного після випаровування 1,000 мл екстрактів при кімнатній температурі.

Для статистичної обробки результатів використовували комп'ютерні програми Gene5 та Microsoft Office Excel 2011.

Результати. Обговорення

Екстракти трави рути садової на 50, 70 та 90%-ному етанолі виявилися більш активні щодо тестованих штамів мікроорганізмів. У таблиці 1 наведено результати визначення чутливості клінічних штамів мікроорганізмів відносно

до даних водно-етанольних екстрактів РС. Серед мікроорганізмів найбільш чутливими виявилися епідермальні стафілококи, пригнічення росту 57,9% та 47,4% штамів яких спостерігалось при розведенні 1:40 екстрактів РС 50% та 70%, відповідно. 90% екстракт РС проявив свою активність у розведенні 1:20 щодо 57,9% штамів *S. epidermidis*. Всі екстракти РС були активні у розведенні 1:20 щодо *S. aureus*, що вказує на їх порівняно слабшу протимікробну дію відносно даних мікроорганізмів. Використаний у дослідженні метицилінрезистентний штам *S. haemolyticus* чутливості до жодного з досліджених екстрактів РС у розведенні 1:20 не виявив.

Нами встановлено також помірну антифунгальну активність екстрактів РС щодо дріжджоподібних грибів роду *Candida* (*C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. lusitanae*). Вона найбільше виражена у 70% екстракту РС, який у розведенні 1:40 пригнічував ріст 66,7% штамів. 50 та 90%-ий екстракти проявили слабку антимікотичну дію у розведенні 1:20 відносно 83,3% та 66,7% клінічних штамів грибів, відповідно. Слід також зазначити, що суттєвої різниці протигрибкової дії досліджуваних екстрактів РС щодо *C. albicans* та кандид non-albicans не спостерігалось.

Грам-негативні бактерії (*K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Citrobacter* spp., *E. coli*), а також *E. faecalis* виявилися нечутливими до всіх екстрактів РС у розведенні 1:20, незалежно від виду екстрагенту.

Поряд з екстрактами трави РС, виготовленими методом дрібної мацерації, нами було перевірено на протимікробну активність настоянку трави РС. На відміну від екстрактів, вона виявилася неактивною відносно усіх тест-штамів мікроорганізмів.

Слід також зазначити, що суттєвої відмінності між протимікробною дією екстрактів РС відносно антибіо-

Таблиця 1. Розподіл штамів мікроорганізмів за чутливістю до водно-етанольних екстрактів рути садової.

Види мікроорганізмів	Кількість штамів	Екстракти рути садової (РС)									
		50%			70%				90%		
		1:20*	1:40	1:80	1:20	1:40	1:80	1:160	1:20	1:40	1:80
		5450,0**	2725,0	1362,5	5500,0	2750,0	1375,0	687,5	3700,0	1850,0	925,0
<i>S. aureus</i>	12	9†/75,0††	3/25,0	0	9/75,0	3/25,0	0	0	10/83,3	2/16,7	0
<i>S. epidermidis</i>	19	5/26,3	11/57,9	3/15,8	6/31,5	9/47,4	3/15,8	1/5,3	11/57,9	6/31,6	2/10,5
<i>S. haemolyticus</i>	1	>1:20			>1:20				>1:20		
<i>K. pneumoniae</i>	2	>1:20			>1:20				>1:20		
<i>P. aeruginosa</i>	2	>1:20			>1:20				>1:20		
<i>Acinetobacter</i> spp.	2	>1:20			>1:20				>1:20		
<i>Citrobacter</i> spp.	1	>1:20			>1:20				>1:20		
<i>E. coli</i>	2	>1:20			>1:20				2	0	0
<i>E. faecalis</i>	2	>1:20			>1:20				>1:20		
<i>Streptococcus</i> spp.	4	2/50,0	1/25,0	1/25,0	2/50,0	2/50,0	0	0	4	0	0
<i>Candida</i> spp.	6	5/83,3	1/16,7	0	2/33,3	4/66,7	0	0	4/66,7	2/33,3	0

Примітки: 1. * розведення водно-етанольних екстрактів; 2. ** концентрація екстрагованих речовин (мкг/мл); 3. † кількість штамів з відповідними значеннями МПК; 4. †† відсоток штамів з відповідними значеннями МПК.

тикочувливих та антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів не спостерігалось.

Одержані результати проведеного нами дослідження допоможуть розширити дані про активність БАР РС щодо живих мікроорганізмів та деталізувати їх протимікробну та протигрибкову властивості. Експериментальні дані допоможуть вибрати найбільш доцільний екстрагент для вилучення активних компонентів з трави рути садової та створять мікробіологічне обґрунтування перспективності розробки на їх основі нових терапевтичних засобів для лікування шкірних інфекцій спричинених *S. epidermidis*.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. БАР рути садової володіють слабкими антибакте-

ріальними та антифунгальними властивостями.

2. Найбільшу чутливість до екстрактів РС проявляють шкірні ізоляти стафілококів, зокрема *S. epidermidis*.

3. Грам-негативні бактерії та ентерококи не чутливі до БАР рути садової.

4. Екстракт РС, виготовлений на 90% водному етанолі, проявляє вищу протимікробну активність, ніж 50% та 70% екстракти.

Проведене дослідження протимікробної активності екстрактів рути садової вказує на те, що різні екстрагенти вилучають різноманітні БАР, що й зумовлює відмінності у спектрі їх активності. Це обумовлює перспективу цілеспрямованого пошуку активних компонентів рути садової, що володіють прямою протимікробною дією та їх здатність потенціювати дію класичних антибіотиків.

Список посилань

1. Гродзінський, А. М. (1990). *Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник*. Київ: Українська енциклопедія ім. М.П. Бажана.
2. Павлюк, Н. В., Куцик, Р. В., & Юрчишин, О. І. (2019). *Актуальні проблеми мікробіології, вірусології та імунології*, Матеріали наукової конференції. Вінниця: Нова книга.
3. Franca Orlanda, J. F. & Nascimento, A. R. (2015). Chemical composition and antibacterial activity of *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) volatile oils, from Sao Luis, Maranhao, Brazil. *South African J. of Botany*, 99, 103-106. DOI: 10.1016/j.sajb.2015.03.198.
4. Freiesleben, S. H., & Jager, A. K. (2014). Correlation between Plant Secondary Metabolites and Their Antifungal Mechanisms - A Review. *Med. & Arom. Plants*, 3, 154. DOI: 10.4172/2167-0412.1000154.
5. Haddouchi, F., Chaouche, T. M., Zaouali, Y., Ksouri, R., Attou, A., & Benmansour, A. (2013). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. *Food Chemistry*, 141, 253-258. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.03.007.
6. Koehn, F., & Carter, G. (2005). The Evolving Role of Natural Products in Drug Discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 206-220. DOI: 10.1038/nrd1657.
7. Subramani, R., Narayanasamy, M., & Feussner, K. D. (2017). Plant-derived antimicrobials to fight against multi-drug-resistant human pathogens. *3 Biotech*, 7 (3), 172. DOI: 10.1007/s13205-017-0848-9.
8. Toba, G., Denham, A., & Whitelegg, M. (2009). *Ruta graveolens*, rue. *The Western Herbal Tradition E-Book: 2000 years of medicinal plant knowledge* (pp. 283-295). Elsevier Ltd. DOI: 10.1016/B978-0-443-10344-5.00032-X.

References

1. Hrodzinskiy, A. M. (1990). *Likarskiy roslyny: Entsiklopedichnyi dovidnyk [Medicinal plants: Encyclopedic reference book]*. Kyiv: Ukrainska entsyklopediia im. M. P. Bazhana.
2. Pavliuk, N. V., Kutsyk, R. V., & Yurchyshyn, O. I. (2019). *Aktualni problemy mikrobiologii, virusologii ta imunologii*, Materialy naukovoi konferentsii [Actual problems of microbiology, virology and immunology, conference materials]. Vinnytsia: Nova knyha.
3. Franca Orlanda, J. F. & Nascimento, A. R. (2015). Chemical composition and antibacterial activity of *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) volatile oils, from Sao Luis, Maranhao, Brazil. *South African J. of Botany*, 99, 103-106. DOI: 10.1016/j.sajb.2015.03.198.
4. Freiesleben, S. H., & Jager, A. K. (2014). Correlation between Plant Secondary Metabolites and Their Antifungal Mechanisms - A Review. *Med. & Arom. Plants*, 3, 154. DOI: 10.4172/2167-0412.1000154.
5. Haddouchi, F., Chaouche, T. M., Zaouali, Y., Ksouri, R., Attou, A., & Benmansour, A. (2013). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. *Food Chemistry*, 141, 253-258. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.03.007.
6. Koehn, F., & Carter, G. (2005). The Evolving Role of Natural Products in Drug Discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 206-220. DOI: 10.1038/nrd1657.
7. Subramani, R., Narayanasamy, M., & Feussner, K. D. (2017). Plant-derived antimicrobials to fight against multi-drug-resistant human pathogens. *3 Biotech*, 7 (3), 172. DOI: 10.1007/s13205-017-0848-9.
8. Toba, G., Denham, A., & Whitelegg, M. (2009). *Ruta graveolens*, rue. *The Western Herbal Tradition E-Book: 2000 years of medicinal plant knowledge* (pp. 283-295). Elsevier Ltd. DOI: 10.1016/B978-0-443-10344-5.00032-X.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ РУТЫ САДОВОЙ *RUTA GRAVEOLENS* L. ОТНОСИТЕЛЬНО КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Павлюк Н.В.

Аннотация. Быстрые темпы роста резистентности микроорганизмов к большинству антибактериальных препаратов заставляет ученых разных стран осуществлять поиск новых терапевтических средств, которые будут обладать противомикробной активностью, а также, к которым медленнее будет формироваться резистентность у микроорганизмов. Перспективными в данной ситуации являются комплексы биологически активных веществ (БАВ) растительного происхождения, которые обладают рядом преимуществ перед обычными антибиотиками. Отдельного внимания заслуживает рута садовая (РС), которая имеет богатый химический состав и обладает широким спектром свойств, среди которых и наличие противомикробного действия. Целью данного исследования было определить спектр активности водно-этанольных экстрактов руты садовой относительно клинических штаммов микроорганизмов с разной чувствительностью к антибиотикам. Методом серийных разведений в бульоне выполнено исследование прямой противомикробной активности 5 водно-этанольных экстрактов и настойки травы руты садовой *Ruta graveolens* L. относительно 53 штаммов микроорганизмов. Для статистической обработки результатов использовали компьютерные программы Gene5 и Microsoft Office

Excel 2011. Среди микроорганизмов наиболее чувствительными оказались эпидермальные стафилококки, угнетение роста 57,9% и 47,4% штаммов которых наблюдалось при разведении 1:40 экстрактов РС 50% и 70%, соответственно. 90% экстракт РС проявил свою активность в разведении 1:20 к 57,9% штаммам *S. epidermidis*. Установлено также умеренную антифунгальную активность экстрактов РС относительно дрожжеподобных грибов рода *Candida*. Она наиболее выражена у 70% экстракта РС, который в разведении 1:40 подавлял рост 66,7% штаммов. Активные компоненты исследуемых экстрактов руты садовой, что проявили умеренные противомикробные и противогрибковые действия могут быть использованы для создания на их основе новых терапевтических препаратов для лечения кожных инфекций.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, растительные экстракты, эпидермальные стафилококки.

STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF RUTA GRAVEOLENS L. GARDEN ROOT EXTRACTS AGAINST CLINICAL STRAINS OF MICROORGANISMS

Pavliuk N.V.

Annotation. The rapid growth rate of resistance of microorganisms to most antibacterial drugs forces scientists from different countries to search for new therapeutic agents that will have antimicrobial activity, as well as to which resistance of microorganisms will be slower. Promising in this situation are complexes of biologically active substances (BAS) of plant origin, which have a number of advantages over conventional antibiotics. Particularly noteworthy is the garden root (GR), which has a rich chemical composition and has a wide range of properties, including the presence of antimicrobial activity. The purpose of this study was to determine the activity spectrum of water-ethanol extracts of garden root relative to clinical strains of microorganisms with different sensitivity to antibiotics. The method of serial dilutions in the broth investigated the direct antimicrobial activity of 5 water-ethanol extracts and tincture of herb garden *Ruta graveolens* L. against 53 strains of microorganisms. Gene5 and Microsoft Office Excel 2011 were used for statistical processing of the results. Among the microorganisms were the most sensitive epidermal staphylococci, growth inhibition of 57.9% and 47.4% of the strains, which were observed at a dilution of 1:40 PC extracts of 50% and 70%, respectively. 90% of the GR extract showed its activity at a dilution of 1:20 relative to 57.9% of *S. epidermidis* strains. Moderate antifungal activity of MS extracts against yeast fungi of the genus *Candida* was also established. It is most expressed in 70% of the extract of MS, which at a dilution of 1:40 inhibited the growth of 66.7% of the strains. The active components of the garden root extracts being investigated, which showed a moderate antimicrobial and antifungal action, can be used to create new therapeutic agents for their treatment of skin infections.

Keywords: antibiotic resistance, plant extracts, epidermal staphylococci.
