

ВИВЧЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСТРАКТІВ ОБЛІПІХИ КРУШИНОПОДІБНОЇ

Любов Науменко, Ірина Журавель

Національний фармацевтичний університет
України

Вступ. На сьогоднішній час широке застосування антибактеріальних препаратів синтетичного походження створило проблему резистентності збудників інфекцій до протимікробних препаратів [1]. Не менш частим наслідком вживання антибіотиків є порушення балансу мікробіоти кишечника [2, 3]. Актуальним у вирішенні цих проблем є створення нових рослинних лікарських засобів протимікробної дії. Фітопрепарати мають м'яку, комплексну лікувальну дію та можуть використовуватися при довготривалому лікуванні захворювань. Фармакологічний ефект цих препаратів зумовлений комплексом біологічно активних речовин, зокрема фенольними сполуками [4].

Одним з перспективних джерел протимікробних засобів є обліпіха крушиноподібна (*Hippophaë rhamnoides* L). Її сировина містить фенольні речовини, що створює підстави для розробки нових лікарських субстанцій.

Зарубіжними науковцями були досліджені на протимікробну активність екстракти, отримані з листя, плодів, пагонів і коренів обліпіхи крушиноподібної. Дослідники з Пакистану отримували екстракти з плодів обліпіхи методом мацерації хлороформом, петролейний ефіром, метанолом та водою очищеною. Протимікробні властивості вивчали по відношенню до *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*. Результати досліджень показали, що дані мікроорганізми були чутливими до дії досліджуємих екстрактів [5]. Польські науковці вивчали протимікробну дію метанольних, гексанових, етилацетатних, бутанольних та водних екстрактів з листя, пагонів та коренів обліпіхи. Одержані екстракти з листя були активними відносно *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus phaecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Streptococcus pneumoniae*. Метанольні екстракти з коренів і пагонів обліпіхи виявили протимікробні властивості відносно *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, а також дріжджів *Pichia jadinii* та *Candida albicans* [6].

На фармацевтичному ринку України присутній вітчизняний противірусний препарат Еребра, який містить комплекс танінів листя обліпіхи. Препарат *in vitro* чинить також помірну антимікробну дію відносно *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, *Microsporium canis* [7].

Нами були одержані етанольні сухі та рідкі екстракти з листя, кори та плодів обліпіхи крушиноподібної методом вакуум-фільтраційної екстракції та досліджено їх протимікробну дію, при цьому з кори рослини екстракти були вилучені вперше.

Мета. Метою роботи було дослідження протимікробної активності рідких та сухих екстрактів, одержаних з листя, кори та плодів обліпіхи крушиноподібної.

Матеріали і методи

Для вивчення протимікробної дії рідкі екстракти з листя, кори та плодів обліпіхи крушиноподібної були одержані методом вакуум-фільтраційної екстракції в співвідношенні сировина : екстрагент для листя – 1:5, кори – 1:5, плодів – 1:10. Екстракцію проводили при кімнатній температурі з використанням вакуум-фільтраційного екстрактора, як розчинник використовували етанол 70 %. Сухі екстракти отримували концентруванням 70 % етанольних витяжок з сировини обліпіхи крушиноподібної з подальшим висушуванням у сушильній шафі при температурі 70° С.

Для дослідження антибактеріальних властивостей одержаних екстрактів були використані еталонні тест-культури грампозитивних і грамнегативних бактерій, які належать до різних таксономічних груп: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Proteus vulgaris* ATCC 4636. Протигрибкову дію екстрактів вивчали на референтному штамі *Candida albicans* ATCC 885-653. Зазначений набір тест-штамів є загальноприйнятим при первинному визначенні протимікробної дії. Усі тест-культури було одержано з лабораторії медичної мікробіології з Музеєм мікроорганізмів ДУ “ІМІ ім. І. І. Мечникова НАМН України”. Середовища для культивування застосовували відповідно до виду мікроорганізмів згідно з існуючими методичними розробками та рекомендаціями.

Приготування суспензій мікроорганізмів із визначеною концентрацією мікробних клітин (оптична щільність) проводили за допомогою стандарту каламутності (0,5 од. за шкалою McFarland). Використовували прилад Densi-La-Meter (виробництва PLIVA-Lachema, Чехія; довжина хвилі 540 нм). Суспензію готували згідно з інструкцією до приладу та інформаційного листа про нововведення в системі охорони здоров'я № 163-2006 “Стандартизація приготування мікробних суспензій”, м. Київ. Синхронізацію культур проводили за допомогою низької температури (4° С).

Визначення чутливості штамів мікроорганізмів до антибактеріальних лікарських засобів проводили методом колодязів на середовищі Мюллера-Хинтона («HimediaLaboratorlesPvt. Ltd India»). Середовище готували відповідно до інструкції виробника. Чутливість грибів визначали на середовищі сабуродекстрозний агар. Визначення чутливості дослідних

речовин проводили на двох шарах поживного середовища, які розливали у чашки Петрі. Нижчий шар складався з агар-агару (10 мл). На нього встановлювали 3-6 металевих стерильних циліндри діаметром 8 мм та висотою 10 мм. Навколо циліндрів заливали верхній шар (14 мл поживного середовища + 1 мл мікробного розчину 0,5 од. за шкалою McFarland), який складався з поживного агаризованого середовища з відповідним стандартом добової культури мікроорганізму. Після застигання стерильним пінцетом виймали циліндри та в лунки вносили дослідну речовину (0,3 мл).

Оцінку антибактеріальної активності дослідних речовин проводили за діаметром зон затримки росту [8, 9, 10].

Результати та їх обговорення

Результати вивчення антимікробної активності екстрактів з лікарської рослинної сировини обліпихи крушиноподібної підтверджують, що досліджувані фітозасоби мають виражену протимікробну дію, затримують ріст паличкоподібної та кокоподібної мікрофлори, які часто бувають збудниками госпітальних інфекцій та вторинного інфікування. Найчутливішими до дії екстрактів виявилися *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* та *Candida albicans*, менш чутливим – *Proteus vulgaris*. Серед досліджуваних

субстанцій найбільшу затримку росту мікроорганізмів було відмічено у обліпихи листя екстракту сухого. Чутливими до нього були *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* та *Candida albicans*. Також ефективним був обліпихи кори екстракт сухий. Його дія проявлялася по відношенню до п'яти з шести досліджуваних штамів мікроорганізмів таких як: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* та *Candida albicans*. Обліпихи кори екстракт рідкий дещо поступався за ефективністю, менш чутливим до цього екстракту був *Proteus vulgaris*. Обліпихи листя екстракт рідкий затримував ріст *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* та *Candida albicans*. Менш чутливими до його дії були *Proteus vulgaris* та *Pseudomonas aeruginosa*. Обліпихи плодів екстракт рідкий затримував ріст *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* та *Candida albicans*, менш чутливим виявився *Proteus vulgaris*. Обліпихи плодів екстракт сухий пригнічував ріст *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* та *Candida albicans*. Менш чутливими до його дії були *Proteus vulgaris* і *Pseudomonas aeruginosa*. Результати досліджень наведені в таблиці 1.

Таблиця 1. Антибактеріальна активність досліджуваних екстрактів обліпихи крушиноподібної

Екстракти	Діаметри зон затримки росту в мм (M±m) (p≤0,05)					
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. vulgaris</i> ATCC 4636	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>C. albicans</i> ATCC 653/885
Обліпихи листя екстракт рідкий	22,5±0,8	21,8±0,6	18,2±0,5	19,8±0,5	22,8±0,5	22,8±0,5
Обліпихи кори екстракт рідкий	21,8±0,6	20,2±0,6	18,8±0,6	22,8±0,6	22,2±0,6	24,6±0,7
Обліпихи плодів екстракт рідкий	20,2±0,6	18,2±0,5	17,8±0,6	22,2±0,6	21,2±0,6	23,6±0,7
Обліпихи листя екстракт сухий	24,6±0,7	24,4±0,7	19,8±0,6	24,4±0,7	24,2±0,6	25,2±0,8
Обліпихи кори екстракт сухий	25,2±0,8	25,2±0,8	18,8±0,6	23,6±0,7	25,2±0,8	24,8±0,6
Обліпихи плодів екстракт сухий	22,2±0,6	22,2±0,6	16,8±0,6	19,8±0,6	22,2±0,6	24,6±0,7

Висновки

Вивчено протимікробну активність рідких і сухих екстрактів листя, кори та плодів обліпихи крушиноподібної. Усі досліджувані екстракти виявили здатність затримувати ріст музейних штамів мікроорганізмів. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* та *Candida albicans* були більш чутливими до дії екстрактів обліпихи листя екстракту сухого та обліпихи кори екстракту сухого. Серед мікроорганізмів найменш чутливим до дії усіх екстрактів був *Proteus vulgaris*. Досліджувані екстракти обліпихи крушиноподібної є

перспективними для подальшого створення на їх основі протимікробних лікарських засобів.

Study of antimicrobial activity of extracts of sea buckthorn

Lyubov Naumenko, Iryna Zhuravel

Introduction. To date, the widespread use of antibacterial drugs of synthetic origin has created the problem of resistance of infectious agents to antimicrobial drugs. An equally frequent consequence of the use of antibiotics is a disturbance in the balance of intestinal microbiota. The creation of new herbal medicines with antimicrobial action is relevant in solving these problems. Phytopreparations

have a mild, complex therapeutic effect and can be used in the long-term treatment of diseases. The pharmacological effect of these drugs is caused by a complex of biologically active substances, in particular phenolic compounds. One of the promising sources of antimicrobial agents is sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.). Its raw materials contain phenolic substances, which creates grounds for the development of new medicinal substances. Extracts obtained from leaves, fruits, stems and roots of sea buckthorn were tested for antimicrobial activity by foreign scientists. Researchers from Pakistan obtained extracts from sea buckthorn fruits by the method of maceration with chloroform, petroleum ether, methanol and purified water. Antimicrobial properties were studied in relation to *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, the results of research showed that these microorganisms were sensitive to the action of the studied extracts. Polish scientists studied the antimicrobial effect of methanol, hexane, ethyl acetate, butanol and water extracts from sea buckthorn leaves, stems and roots. The obtained leaf extracts were active against *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Streptococcus pneumoniae*. Methanolic extracts from sea buckthorn roots and stems have shown antimicrobial properties against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, as well as *Pichia jadinii* and *Candida albicans* yeasts. The domestic antiviral drug Erebra, which contains a complex of tannins from sea buckthorn leaves, is present on the pharmaceutical market of Ukraine. *In vitro*, the drug also has a moderate antimicrobial effect against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, *Microsporium canis*. We obtained dry and liquid ethanolic extracts from the leaves, bark and fruits of sea buckthorn by the method of vacuum filtration extraction and investigated their antimicrobial effect, while the extracts were extracted from the bark of the plant for the first time. **The purpose of the study.** To investigate the antibacterial and antifungal activity of the extracts obtained from herbal drugs of sea buckthorn. **Materials and methods.** To study the antimicrobial effect, liquid extracts from the leaves, bark and fruits of sea-buckthorn were obtained by the method of vacuum filtration extraction in the ratio of raw material extractant leaves 1:5, bark 1:5, fruits 1:10. The extraction was carried out at room temperature using a vacuum filtration extractor, and 70% ethanol was used as a solvent. Dry extracts were obtained by concentrating 70% ethanol extracts from sea buckthorn raw materials with subsequent drying in an oven at a temperature of 70°C. To study the antibacterial properties of extracts, standard test cultures of gram-positive and gram-negative bacteria belonging to different taxonomic groups were used: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Proteus vulgaris* ATCC 4636. Antifungal effect of extracts studied on the reference strain *Candida albicans* ATCC 885-653.

The specified set of test strains is generally accepted for the primary determination of antimicrobial activity. All test cultures were obtained from the laboratory of medical microbiology with the Museum of Microorganisms of the State University "IMI named after I.I. Mechnikov National Academy of Sciences of Ukraine". Cultivation media were used according to the type of microorganisms in accordance with existing methodical developments and recommendations. Preparation of suspensions of microorganisms with a determined concentration of microbial cells (optical density) was carried out using a turbidity standard (0.5 units on the McFarland scale). We used a Densi-La-Meter device (manufactured by PLIVA-Lachema, Czech Republic; wavelength 540 nm). The suspension was prepared according to the instructions for the device and the information sheet on innovations in the health care system No. 163-2006 "Standardization of preparation of microbial suspensions", Kyiv. Synchronization of cultures was carried out with the help of low temperature (4°C). Determining the sensitivity of strains of microorganisms to antibacterial drugs was carried out by the method of wells on the Muller-Hinton medium ("HIMediaLaboratorlesPvt. Ltd India). The medium was prepared according to the manufacturer's instructions. The sensitivity of fungi was determined on Saburo-dextrose agar medium. Determination of the sensitivity of the test substances was carried out on two layers of nutrient medium, which were poured into Petri dishes. The lower layer consisted of agar-agar (10 ml). 3-6 metal sterile cylinders with a diameter of 8 mm and a height of 10 mm were installed on it. The upper layer (14 ml of nutrient medium + 1 ml of microbial solution 0.5 units on the McFarland scale) was poured around the cylinders, which consisted of nutrient agar medium with the appropriate standard of daily culture of the microorganism. After solidification, the cylinders were removed with sterile tweezers and the test substance (0.3 ml) was introduced into the wells. The antibacterial activity of the test substances was assessed by the diameter of the zones of growth retardation. **The results and their discussion.** The results of the study of the antimicrobial activity of extracts from medicinal plant raw materials of sea buckthorn confirm that the studied phytoextracts have a pronounced antimicrobial effect, delay the growth of rod-shaped and cocci-like microflora, which are often the causative agents of hospital infections and secondary infections. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans* were the most sensitive to the action of extracts, *Proteus vulgaris* was less sensitive. The most pronounced antimicrobial effect was noted in sea buckthorn leaf extract dry. It was bactericidal against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* and *Candida albicans*. Sea buckthorn bark dry extract was also no less effective. Its high bactericidal effect was manifested against five out of six investigated strains of microorganisms such as: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*. Sea buckthorn bark liquid extract showed a high level of antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus*

subtilis and *Candida albicans*, *Proteus vulgaris* was less sensitive to the action of this extract. The liquid extract of sea buckthorn leaves effectively inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*. *Proteus vulgaris* and *Pseudomonas aeruginosa* were less sensitive to its action. The liquid extract of sea buckthorn fruits significantly inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans*. *Proteus vulgaris* was less sensitive to its antimicrobial action. The dry extract of sea buckthorn fruits inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Candida albicans* well. *Proteus vulgaris* and *Pseudomonas aeruginosa* were less sensitive to its action. **Conclusions:** The antimicrobial activity of liquid and dry extracts of leaves, bark and fruits of sea buckthorn was studied. All studied extracts showed the ability to delay the growth of museum strains of microorganisms. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* and *Candida albicans* were more sensitive to the action of sea buckthorn leaf dry extract and sea buckthorn bark dry extract. Among the microorganisms, *Proteus vulgaris* was the least sensitive to the action of all extracts. The investigated extracts of sea buckthorn are promising for the further creation of antimicrobial drugs based on them.

Keywords: *Hippophaë rhamnoides* L., antimicrobial activity, herbal drugs extracts.

References

1. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2013. Vol. 12. Issue 5. P. 371–387. DOI: 10.1038/nrd3975.
2. Lushniak BD. Antibiotic resistance: a public health crisis. *Public Health Rep*. 2014. Vol. 129 (4). P. 314–316. DOI: 10.1177/003335491412900402.
3. Ventola LC. The antibiotic resistance crisis Part 2: Management strategies and new agents. *Pharmacy and therapeutics*. 2015. Vol. 40, № 5. P. 344–352. DOI: 10.7416/ai.2019.2253.
4. Popova NV, Litvinenko VI, Kutsanyan AS. Medicinal plants of the world flora: encyclopedia. reference book. 2016. P. 540.
5. Saadia Chaman et al. Phytochemical analysis, antioxidant and antibacterial effects of sea buckthorn berries. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011, Vol.24, No.3, P.345-351.
6. Zuchowski J. Phytochemistry and pharmacology of sea buckthorn (*Elaeagnus rhamnoides*; syn. *Hippophae rhamnoides*): progress from 2010 to 2021. *Phytochemistry Reviews Fundamentals and Perspectives of Natural Products Research*. 2022. Vol. 30. P. 3 – 33. DOI: 10.1007/s11101-022-09832-1.
7. Erebra: el. res. (<https://compendium.com.ua/dec/263453/>). In Ukr.
8. Luta VA, Zagovora GI. Educ. manual "Fundamentals of microbiology, virology and immunology". "Health". 2001. P. 280.
9. Klymnyuk SI, Sytnyk IO, Shirobokov VP. Practical microbiology: a study guide. 2018. P. 576.

10. Methodical instructions «Determination of sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs». Order of the Ministry of Health of Ukraine 05.04.2007. No 167.