

О. А. ТАРАСОВ, кандидат ветеринарних наук,
В. П. САПЕЙКО, кандидат ветеринарних наук,
Т. В. СИДОРЕНКО, І. А. ЗОЦЕНКО, А. В. ФРІДРІХ
Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

ВИВЧЕННЯ АНТИМІКРОБНОЇ ДІЇ РОСЛИННИХ ЕФІРНИХ ОЛІЙ НА ТЕСТОВІ МІКРООРГАНІЗМИ ТА ПАТОГЕННІ ІЗОЛЯТИ

У статті представлені результати вивчення антимікробної дії рослинних ефірних олій на тестові мікроорганізми та патогенні польові ізоляти

Ефірні олії чебрецю, піхти, евкаліпту, шавлії проявляють антимікробну дію до широкого спектру бактеріальних тест-культур та патогенів – збудників респіраторних інфекцій свиней, а також фунгіцидно та пригнічуюче діють на плісняві гриби..

Дослідженнями взаємодії ефірних рослинних олій та імунокомпетентних клітин свиней in vitro встановлено відсутність імунологічного ризику при можливому застосуванні препарату на основі ефірних олій: ефірні рослинні олії піхти, евкаліпту, шавлії, чебрецю окремо та в суміші в концентрації 1:4000 не справляли цитопатичної дії та не пригнічували трансформаційні потенції клітин при прямому контакті з мононуклеарними фагоцитами та стовбуровими клітинами-попередниками макрофагів свиней.

Ключові слова: рослинні ефірні олії, антимікробна дія, мікроорганізми

Збудники бактеріальної етіології викликають у тварин перебігаючи окремо та змішані інфекційні хвороби, в тому числі спільні для тварин та людини. Ефективність антимікробної терапії з постійної заміни одних антибіотичних препаратів на інші, інколи більш дорогі та токсичні. В умовах тваринницьких комплексів, де концентрація поголів'я на одиницю площ є постійно великою, спостерігається більш швидке утворення антибіотикорезистентних штамів серед збудників бактерійних захворювань, що інколи ускладнює підбір оптимальної схеми лікування [1-4].

Дані літератури вказують на значне розповсюдження та вагомі економічні втрати внаслідок шлунково-кишкових та респіраторних захворювань свиней в країнах з розвинутим свинарством. Проведені нами дослідження підтверджують наявність та актуальність таких проблем і для свинарських господарств України [5-7].

Методичні підходи для вивчення антибактерійної активності субстанцій та препаратів були розроблені ще в 60-70 роках минулого століття і з тих пір не притерпіли принципових змін та лишаються актуальними в даний час. Однак впровадження в ветеринарну практику значної кількості нових антибактеріальних препаратів та виникнення ще невивчених механізмів антибіотикорезистентності патогенних мікроорганізмів потребує більш ретельних досліджень з використанням не тільки стандартних музейних культур, а й польових ізолятів [8-10].

Значний відсоток серед загальної кількості захворювань складають хвороби легенів, що спричиняються великою кількістю патогенних бактерій. Практика

ветеринарної медицини потребує комплексних препаратів для ефективної антибактеріальної терапії. Ці препарати можуть бути створені на основі рослинних ефірних олій – які є екологічно безпечними та ефективними по відношенню до збудників більшості інфекцій, що викликаються бактеріями та вірусами [11-14].

Мета роботи: провести дослідження антибактеріальної дії рослинних ефірних олій, та обґрунтувати їх застосування як нової альтернативи антибіотикам.

Матеріали та методи

При визначенні антимікробної активності ефірних олій використовували наступні тестові культури з колекції Інституту ветеринарної медицини НААН: *Micrococcus luteus* ATCC9341, *Micrococcus lisogenicus*, *B. subtilis* AATCC6633, *B.cereus* ATCC6633, *S. aureus* 209-P, *S. zooepidemicus*, *Clebsiella spp*, *Salmonella cholerae suis*, *Pasterella multocida*.

Визначення фунгіцидної активності проводили на мікроскопічних плісневих грибах *Penicillium citrinum*, *Penicillium urticae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*.

Для інокулювання застосовували завись мікроорганізмів у стерильному фізрозчині, еквівалентний 0,5 одиницям за оптичним стандартом МакФарланда, розведений в 100 разів з використанням МПБ (концентрація мікроорганізмів складала 106 КУО/ см3). Після внесення інокулюму всі пробірки інкубували в термостаті при $36\pm 10^{\circ}\text{C}$ протягом 24 годин. Реєстрацію результатів проводили візуально в проникаючому світлі. Ріст культур в МПБ з додаванням АБС порівнювали з негативним контролем, який містив лише вихідний інокулюм посіяний в МПБ. МІК визначали за найменшою концентрацією АБС, яка повністю пригнічувала видимий ріст мікроорганізмів.

Облік розмірів зон затримки росту тест-мікроорганізмів проводили за допомогою лінійки або штангенциркуля з точністю до 1 мм. При визначенні зон затримки росту мікроорганізмів враховували лише зони повної відсутності видимого росту.

Для дослідження імуномодулюючої дії ефірних рослинних олій *in vitro* та *in vivo* було адаптовано та використано метод оцінки імунного потенціалу тварин за характеристикою трансформаційної та функціональної активності стовбурових гематогенних попередників макрофагів. Метод передбачає отримання суспензій мононуклеарних клітин крові від оброблених ефірними оліями свиней та свиней контрольної групи без такої обробки з подальшим видаленням інгібіторів трансформації та культивуванням імунокомпетентних клітин в поживному середовищі на покривних скельцях. Для оцінки функціональних потенцій отриманих макрофагів в заключний період інкубації були застосовані інактивовані тест-мікроорганізми. Результати тесту визначали цитологічним дослідженням. В варіанті *in vitro* було досліджено пряму дію ефірних олій на імунокомпетентні клітини здорових свиней при додаванні відповідної кількості олій до поживного середовища. В обох варіантах реакції аналізу підлягали показники трансформаційної активності стовбурових попередників макрофагів, а також фагоцитарний потенціал зрілих клітин.

При застосуванні методу дифузії враховували особливості поширення ефірних олій, які обумовлені їх ліпофільними компонентами, тому зони затримки

росту на агарі будуть значно меншими, ніж при застосуванні водорозчинних антибіотичних речовин та хімічних дезінфектантів.

Дослідження антимікробної активності ефірних олій були проведені із застосуванням методів, модифікованих з урахуванням нерозчинності ефірних олій в воді, а саме: метод макророзведень в поживному середовищі з наступним культивуванням в умовах, оптимальних для мікроорганізмів; метод дифузії в агар з застосуванням паперових дисків, просочених певними концентраціями ефірних олій.

Методом дифузії в агар, при нанесенні на паперові диски по 0,1 – 0,3 мл ефірних олій встановлено зони затримки росту досліджуваних культур, що знаходились в межах 14 – 70 мм. По ефективності антибактеріальної дії ефірні олії визначились наступним порядком: чебрецю, шавлії, пихти, евкаліпту.

При внесенні ефірних олій в живильні середовища в співвідношеннях 1:10–1:200 проявляється різний ступінь антибактеріальної дії до досліджуваних бактеріальних культур.

З метою подальшого формування статистично достовірної бази даних з оцінки імунологічних ризиків було продовжено вивчення прямої дії рослинних ефірних олій на імунокомпетентні клітини свиней *in vitro* в первинних культурах мононуклеарних фагоцитів свиней при додаванні ефірних олій безпосередньо в культуральне середовище.

Результати досліджень.

У результаті проведених досліджень антимікробної активності ефірних олій рослин (пихтової та евкаліптової). Було вивчено антибіотичну дію на мікроорганізми – *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp*, *Pasteurella multocida* ефірних олій та їх комбінацій з бензалконіумом хлористим.

Результати досліджень викладені в таблиці 1

Таблиця 1

Результати вивчення антимікробної дії ефірних олій та їхніх сумішей із четвертинними амонійними сполуками на тестові мікроорганізми *Streptococcus zooepidemicus*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida*

Розчини (зависі) ефірних олій та їхні суміші в МПБ (0,05 мл на диск)	Діаметр зон затримки росту (мм)		
	<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
Пихтова ефірна олія	20±1	20±2	10±1
Евкаліптова ефірна олія	10±1	12±2	15±3
Суміш ефірних олій	24±2	27±3	24±1
Контроль	Суцільний ріст	Суцільний ріст	Суцільний ріст

Отримані дані свідчать про високу антимікробну активність ефірних олій евкаліпту та пихти та особливо їхніх сумішей. При застосуванні чистих ефірних олій та сумішей ефірних олій спостерігали пригнічення росту культур тестових мікроорганізмів *Streptococcus zooepidemicus*, *Staphylococcus aureus*, *Pasteurella multocida*.

При застосуванні методу дифузії враховували особливості поширення ефірних олій, які обумовлені їх ліпофільними компонентами, тому зони затримки росту на агарі будуть значно меншими, ніж при застосуванні водорозчинних антибіотичних речовин та хімічних дезінфектантів.

Дослідження були проведені із застосуванням методів, модифікованих з урахуванням нерозчинності ефірних олій в воді, а саме: метод макророзведень в поживному середовищі з наступним культивуванням в умовах, оптимальних для мікроорганізмів; метод дифузії в агар з застосуванням паперових дисків, просочених певними концентраціями ефірних олій.

У дослідженнях використовували ефірні олії: піхти, евкаліпту, шавлії та чебрецю.

Методом дифузії в агар, при нанесенні на паперові диски по 0,1 – 0,3 мл ефірних олій встановлено зони затримки росту досліджуваних культур, що знаходились в межах 14 – 70 мм. По ефективності антибактеріальної дії ефірні олії визначились наступним порядком: чебрецю, шавлії, піхти, евкаліпту.

При внесенні ефірних олій в живильні середовища в співвідношеннях 1:10 – 1: 200 проявляється різний ступінь антибактеріальної дії до досліджуваних бактеріальних культур.

Результати досліджень (табл. 2-3) вказують на високу антибактеріальну активність ефірних олій у відношенні до тест-мікроорганізмів.

Таблиця 2

Результати вивчення дії ефірних олій на тест-мікроорганізми

Ефірні олії (100 мл на диск)	Діаметр зон затримки росту бактерій (мм)				
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i> ATCC6633	<i>M. luteus</i> ATCC9341	<i>S. aureus</i> P 209
Евкаліпту	18	16	20	19	25
Піхти	15	18	19	20	23
Шавлії	20	32	44	69	21
Чебрецю	70	Ріст відсутній	Ріст відсутній	44	24

Таблиця 3

Результати вивчення дії ефірних олій на польові патогенні ізоляти бактерій

Мікроорганізми	Діаметр зон затримки росту бактерій (мм) при нанесенні на диски ефірних олій (мкл)							
	Піхти		Евкаліпту		Шавлії		Чебрецю	
	100±3	50±1,5	100±3	50±1,5	100±3	50±1,5	100±3	50±1,5
<i>E. coli</i>	0	0	35	10	0	0	40	25
<i>Salmonella cholerae suis</i>	0	0	25	8	40	20	45	30
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	35	20	30	20	45	20
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	20	10	40	20	40	20	Ріст відсутній	Ріст відсутній
<i>Pasteurella multocida</i>	25	15	20	8	25	15	40	15
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	15	10
<i>Clostridium perfringens</i>	15	8	0	0	0	0	40	20

Зони затримки росту мікроскопічних пліснявих грибів (при нанесенні на паперові диски 0,1 – 0,3 мл ефірних олій) знаходились в межах 20–50 мм. Додатково відмічались зміна кольору грибних культур від центру до країв чашки Петрі. При внесенні ефірних олій в живильні середовища з пліснявими грибами – в співвідношеннях 1:10 – 1:100 проявляється фунгіцидна дія від пригнічення (поодинокі колонії, зміна кольору грибів, відсутність повітряного міцелію).

За ефективністю фунгіцидної дії ефірні олії визначались наступним порядком: чебрецю, піхти, евкаліпту, шавлії.

В окремих дослідях проводили вивчення прямої дії певних концентрацій рослинних ефірних олій на антимікробну активність у відношенні до 2 збудників актуальних, в т.ч. респіраторних, бактеріальних інфекцій. Порівняльна оцінка *in vitro* антимікробної дії ефірних олій на 2 штами стандартних показових тест-мікроорганізмів.

Для визначення бактерицидної дії 4 ефірних олій (тим'янової, шавлії, евкаліпту та піхтової) були проведені дослідження по вивченню їх впливу на деякі види мікроорганізмів, які відіграють ведучу роль в етіології респіраторних хвороб свиней.

У досліді були використані ефірні олії, з яких готували диски. Дію ефірних олій перевіряли на таких видах мікроорганізмів:

- *Mycoplasma hyopneumoniae*
- *Haemophilus parasuis*
- *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Було проведено 5 серій дослідів. Висівали культури мікроорганізмів на тверді поживні середовища, стерильні паперові диски просочували ефірними оліями та розкладали їх на висіви з мікроорганізмами. Результати досліджень констатували по зоні затримки росту (в мм) мікроорганізмів навкруги дисків.

Усі ефірні олії мали бактериостатичну та бактерицидну дію на культури вказаних мікроорганізмів. Це проявлялося, по-перше загальним пригніченням їх росту в порівнянні із контролем (висіви без олій). *Actinobacillus pleuropneumoniae* – найбільш чутливі до тим'янової олії, менше до олії шавлії, ще менше – до олій евкаліпту та піхти. *Haemophilus parasuis* – найбільш чутливі до тим'янової, менше до шавлії та евкаліпту, ще менше – до олії піхти. *Mycoplasma hyopneumoniae* – найбільш чутливі до тим'янової олії.

З метою оцінки можливих імунологічних ризиків проводили вивчення прямої дії рослинних ефірних олій на імунокомпетентні клітини свиней *in vitro*, визначаючи зміни трансформаційної та функціональної активності стовбурових гематогенних клітин-попередників макрофагів в первинних культурах мононуклеарних фагоцитів свиней при додаванні ефірних олій безпосередньо в культуральне середовище.

Дію чотирьох ефірних олій та їх суміші вивчали в трьох серіях дослідів із застосуванням суспензій клітин клінічно здорових свиней. Ефірні олії вводили в поживне середовище в концентраціях 1:4000 – 1:8000 і додавали отримані з крові свиней-донорів суспензії імунокомпетентних клітин до кінцевої концентрації клітин 106 клітин/см³. Оцінку змін функціонального потенціалу мононуклеарних фагоцитів та трансформованих *in vitro* макрофагів проводили шляхом їх навантаження суспензію інактивованого *St.aureus P-209* (2×10⁹ мікробних тіл в 1 см³). Контрольні культури клітин в поживному середовищі ефірних олій не містили.

Проведеними експериментами встановлено, що застосовані ефірні олії у вказаних концентраціях не справляли цитопатичної дії та не викликали патологічних змін структури та функцій трансформованих з клітин-попередників та нетрансформованих мононуклеарних фагоцитів. Середні показники трансформації мононуклеарних клітин-попередників в макрофаги склали $32,4 \pm 4,6\%$, $36,0 \pm 5,0\%$ та $31,8 \pm 4,4\%$ при додаванні в середовище ефірних олій піхти, евкالیпту, чебрецю відповідно, при показнику в контрольних експериментах – $34,0 \pm 4,8\%$ ($p \geq 0,1$). Оцінка фагоцитарної активності клітин за допомогою тест-мікроорганізмів також не виявила під дією цих ефірних олій статистично достовірних відхилень як вмісту популяції активно фагоцитуючих клітин, так і показників середньої потужності фагоцитозу. Додавання в поживне середовище з імунокомпетентними клітинами олії шавлії (1:4000) не викликало цитопатичної дії, змін трансформаційної активності гематогенних попередників макрофагів, але на $12-18\%$ ($13,8 \pm 3,6\%$) збільшувало чисельність активно фагоцитуючих макрофагів та моноцитів із одночасним підвищенням в них середньої потужності фагоцитозу (до $8,8 \pm 1,6$ одиниць при $6,2 \pm 0,8$ одиниць в контролі, $p \leq 0,05$), що відображає активацію мембран імуноцитів та посилення піно- та фагоцитозу клітин в результаті можливої поверхнево-активної дії ефірної олії в олійно-водній емульсії поживного середовища.

У серії експериментів з вивчення дії пропорційної суміші (1:1:1:1) 4 ефірних олій в кінцевій концентрації 1:4000 на клітини-попередники макрофагів та нетрансформовані мононуклеарні фагоцити було встановлено, що така суміш не справляє статистично значущого впливу на трансформаційні потенції та фагоцитарну активність мононуклеарних фагоцитів, тобто не має негативної прямої дії на клітини, що складають ключову ланку імунного потенціалу свиней.

Антимікробні інгредієнти часто важко приготувати в лікарській формі, яка передбачає використання водної фази (тобто водного розчину). Ефірні олії не розчиняються у воді та зробити водну суміш із їх використанням надзвичайно важко. Але для практичної ветеринарної медицини розробка композицій із антимікробною дією для профілактики та лікування інфекційних захворювань тварин важливою характеристикою є можливість швидкого приготування гомогенних мікстур на водній основі. Такі форми мають велику зручність у використанні в умовах тваринницьких господарств.

У світі сучасного ставлення до проблем збереження екології довкілля, важливо застосовувати більш натуральні та біодеградабельні субстанції для санації та дезинфекції тваринницьких приміщень, особливо у присутності тварин.

Подальші дослідження були присвячені вивченню фармакологічних властивостей рослинних ефірних олій, їх сумішей та сполучення з підсилювачем антимікробної дії як основи нових ветеринарних препаратів

Висновки

1. Ефірні олії чебрецю, піхти, евкالیпту, шавлії проявляють антимікробну дію до широкого спектру бактеріальних тест-культур та патогенів – збудників респіраторних інфекцій свиней, а також фунгіцидно та пригнічуюче діють на плісняві гриби..

2. Дослідженнями взаємодії ефірних рослинних олій та імунокомпетентних клітин свиней *in vitro* встановлено відсутність імунологічного ризику при

можливого застосуванні препарату на основі ефірних олій: ефірні рослинні олії піхти, евкаліпту, шавлії, чебрецю окремо та в суміші в концентрації 1:4000 не справляли цитопатичної дії та не пригнічували трансформаційні потенції клітин при прямому контакті з мононуклеарними фагоцитами та стовбуровими клітинами-попередниками макрофагів свиней.

Список використаної літератури

1. *Lorian V.* Antibiotics in laboratory medicine/ V.Lorian //4th ed. –1996.- Baltimore:Williams and Wilkins.- 642P.
2. National committee for clinical laboratory standarts. Performance standarts for antimicrobial susceptbility testing approved standart– 1993. – 4 ed.- Document M2-A4.- Villanova, PA:NCCLS
3. *Weidemann B.* Evaluation of data from susceptbility testing./ B. Weidemann B. //International journal of antimicribial agents. – 1998.- №10. – P.218 –219
4. *Собко А. І.* Ветеринарна технологія в промисловому свинарстві: практичний посібник / А. І.Собко, Є. Г. Павлов // – К.: УкрІНТЕІ, 1994. – 192с.
5. Антибиотики и антибиоз в сельском хозяйстве/ [Пер. с англ. З. Ф. Богаутдинова; под ред. А. Н.Полина.] – М.: Колос, 1981. – 360с.
6. *Hanaki H.* Detection methods of glycopeptide-resistant Staphylococcus aureus. Susceptibility testing / H.Hanaki, K. Hiramatsu //Methods in Molecular Medicine vol 48:Antibiotic resistanse methods and protocols. – 2003. – Humana press.- P.85 – 91
7. *Lorian V.* The gradient plate method/ V. Lorian // Antibiotics and Chemotherapeutic Agents in clinical and laboratory practice. – 1966. – Springfield. – P.102- 103.
8. G. E. Bergonzelli G. E. Essential Oils as Components of a Diet-Based Approach to Management of Helicobacter Infection / G. E. Bergonzelli, D. Donnicola, N. Porta, and I. E. Corthésy-Theulaz //Antimicrobial Agents and Chemotherapy, October 2003, p. 3240-3246, Vol. 47, No. 10
9. *Падейская Е. Н.* Фторхинолоны: значение, развитие исследований, новые препараты, дискуссионные вопросы/ Е.Н. Падейская // Антибиотики ихимиотерапия. – 1998. – №43 (11). – С. 38–44.
10. Методичні вказівки "Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів", затверджено Наказом МОЗ України N 167. – Київ, 2007.
11. *Knobloch K.* Antibacterial and antifungal properties of essential oil components/ K.Knobloch, A. Pauli, B. Iberl, H. Weigand [et al.]/ J. Essential Oil Res. 1989. –№1. – P.119-128.
12. *Shuma T.* Antimicrobial susceptibilities of Campylobacter strains isolated from broilers in the southern part of japan from 1995 to 1999/ T.Shuma T. [et al.]/ J.Vet.Med. Sci. – 2001. – 63(9). – P. 1027-1029;
13. *Boulos A.* Antibiotic Susceptibility of Tropheryma whipplei in MRC5 Cells /A.Boulos, J-M.Rolain, D.Raoult // Antimicrob Agents Chemother. 2004. – 48 (3). – P. 747-752.
14. The illustrated Encyclopedia of essential oils: The complete Guide to the Use of Oils in Aromatherapy and Herbalism /J. Lawless J//. -1999. – Element books USA. – P. 223-228

ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ НА ТЕСТОВЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ И ПАТОГЕННЫЕ ИЗОЛЯТЫ/ Тарасов А. А , Сапейко В.П. , Сидоренко, Т.В. Зоценко И.А., Фридрих А.В.

В статье представлены результаты изучения антимикробного действия растительных эфирных масел на тестовые микроорганизмы и патогенные полевые изоляты.

Эфирные масла чебреца, пихты, эвкалипта и шалфея проявляют антимикробное действие к широкому спектру бактериальных тест-культур и патогенов – возбудителей респираторных инфекций свиней, а так же фунгицидное и угнетающее действие в отношении плесневых грибов.

Исследованиями взаимодействия эфирных растительных масел и иммунокомпетентных клеток свиней in vitro установлено отсутствие иммунологического риска при возможном применении препарата на основе эфирных масел: пихты, эвкалипта, шалфея, чебреца отдельно в смеси в концентрации 1:4000 не проявляет цитопатического действия и не угнетали неспецифический иммунитет.

Ключевые слова: растительные эфирные масла, антимикробное действие, микроорганизмы

INVESTIGATION ANTIMICROBIAL ACTION OF PLANT AETHER OILS TOWARD THE TEST MICROORGANISMS AND PATOGENIC ISOLATES / Tarasov A. A., Sapeiko V. P., Sidorenko T. V., Zotsenko I. A., Fridrih A.V.

The results of investigations of antimicrobial action of the plant ether oils onto test microorganisms and pathogenic field isolates were shown in the title.

The plant ether oils of thyme, fir, eucalyptus and sage were shown the antibacterial action toward bacterial test-cultures and pathogens – causative agents of respiratory diseases of animals and fungicidal and inhibiting action toward microscopic fungi.

The investigation of interaction of plant ether oils and immunocompetent pig cells in vitro it was detected the absence of immunological risks after possible using the preparations on the base of the plant ether oils: fir, eucalyptus, sage, thyme apart and in mix in concentration 1:4000 was not show the cytopathic and not suppress the native immunity.

Key words: plant ether oils, antimicrobial action, microorganisms

Рецензент: – кандидат ветеринарных наук **В. В. Уховський**