

Determination of the antimicrobial properties of an infusion from the aerial part of *lophanthus anisatus*

Klara BOLTAEVA¹

Tashkent Pharmaceutical Institute

ARTICLE INFO

Article history:

Received May 2021

Received in revised form

28 May 2022

Accepted 20 June 2022

Available online

25 July 2022

Keywords:

test culture,
inhibition,
taxonomy,
identification,
tinctorial properties,
strain,
bacilli,
cocci,
bacteria,
fungi.

ABSTRACT

The purpose of this work was to study the microbiological purity and antimicrobial activity of the infusion from the aerial part of *lophanthus anisatus*. Determination of the antimicrobial action of the infusion from the aerial part of *lophanthus anisatus* was carried out by diffusion into agar against certain types of bacteria; *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and yeast-like fungi of the genus *Candida*. An infusion from the aerial part of *lophanthus anisatus* showed antimicrobial activity against *Escherichia coli* – 22.0 mm. growth inhibition zone diameter, *Staphylococcus aureus* – 7.0 mm., *Candida albicans* – 28.0 mm. *Staphylococcus epidermidis* – 10.0 mm., *Bacillus subtilis* – 10 mm. On the basis of the data obtained, it can be concluded that the studied infusion from the aerial part of *lophanthus anisatus* has a pronounced antimicrobial activity against *Candida albicans*, moderate antibacterial activity against some gram-negative enterobacteria and conditionally pathogenic microorganisms

2181-1415/© 2022 in Science LLC.

DOI: <https://doi.org/10.47689/2181-1415-vol3-iss6/S-pp195-201>

This is an open access article under the Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.ru>)

*Lophanthus anisatus*ning havo qismidan infuzionning mikroblarga qarshi xususiyatlarini aniqlash

ANNOTATSIYA

Калит сўзлар:

test kulturasi,
inhibitsiya,
taksonomiya,
identifikatsiya,
tinktorial xossalari,

Ushbu ishning maqsadi *lophanthus anisatus*ning havo qismidan infuzionning mikrobiologik tozaligi va mikroblarga qarshi faolligini o'rganish hisoblanadi. *Lophanthus anisatus*ning havo qismidan infuzionning mikroblarga qarshi ta'sirini aniqlash bakteriyalarning ayrim turlariga qarshi agarga

¹ Lecturer, Tashkent Pharmaceutical Institute, Tashkent, Uzbekistan

shtamm,
tayoqchalar,
kokklar,
bakteriyalar,
zamburug'lar.

diffuziya yo'li bilan amalga oshirildi; *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* va *Candida jinsining* xamirturushsimon zamburug'lari *Lophanthus anisatus*ning havo qismidan infuzion ichak tayoqchasiga qarshi mikroblarga qarshi faollik ko'rsatdi – 22,0 mm. o'sish inhibitsion zonasi diametri, *Staphylococcus aureus* – 7,0 mm., *Candida albicans* – 28,0 mm. *Staphylococcus epidermidis* – 10,0 mm., *Bacillus subtilis* – 10 mm. Olingan ma'lumotlarga asoslanib, *Lophanthus anisatus*ning havo qismidan o'rganilgan infuzion *Candida albicans*ga qarshi aniq mikroblarga qarshi faollikka, ba'zi gram-manfiy enterobakteriyalarga va shartli patogen mikroorganizmlarga nisbatan o'rtacha antibakterial ta'sirga ega, degan xulosaga kelish mumkin.

Определение антимикробных свойств настоя из надземной части *Lophanthus anisatus*

АННОТАЦИЯ

Ключевые слова:

тест-культура,
ингибиция,
таксономия,
идентификация,
тинкториальные свойства,
штамм,
бациллы,
кокки,
бактерии,
грибы.

Целью настоящей работы явилось изучение микробиологической чистоты и антимикробной активности настоя из надземной части *Lophanthus anisatus*. Определение антимикробного действия настоя из надземной части *Lophanthus anisatus* проводили методом диффузии в агар в отношении некоторых видов бактерий, такие как *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и дрожжеподобных грибов рода *Candida*. Настой из надземной части *Lophanthus anisatus* показал антимикробную активность против *Escherichia coli* – 22,0 мм. диаметра зоны подавления роста, *Staphylococcus aureus* – 7,0 мм., *Candida albicans* – 28,0 мм. *Staphylococcus epidermidis* – 10,0 мм., *Bacillus subtilis* – 10 мм. На основании полученных данных можно сделать заключение, что изучаемый настой из надземной части *Lophanthus anisatus* обладает выраженной противомикробной активностью в отношении *Candida albicans*, умеренной антибактериальной активностью против некоторых грамотрицательных энтеробактерий и условно патогенных микроорганизмов.

ВВЕДЕНИЕ

В ходе эволюционного развития, организм человека приспосабливался к белкам, углеводам, жирам и самым разнообразным биологически активным веществам (витамины, макро и микроэлементы, органические кислоты и др.) растительного происхождения, без которых невозможно нормальное течение жизненных процессов и развитие организма в целом. В результате такого симбиоза одни растения стали со временем служить человеку пищей, другие – лекарством.

Несмотря на большие успехи в создании синтетических лекарственных средств, применение растительных препаратов в мировой медицинской практике не только остаётся стабильным, но и имеет тенденцию к увеличению. Около половины всех лекарственных препаратов, производимых в индустриально развитых странах, получают из природного сырья.

В силу разнообразных географических и климатических условий, Узбекистан является богатейшим регионом сосредоточения лекарственных растений, среди которых имеются немало видов, представляющих интерес для научной медицины.

Природа создала многочисленные болезнетворные для человека факторы. Однако против каждого болезнетворного фактора – от малейшего, не видимого невооруженным глазом (микробы, вирусы, грибки, простейшие и др.), до большего (травмы, раны и др.) – она вооружила человека многочисленными защитными и лечебными механизмами. К ним относятся более 1000 биологически активных веществ, имеющих самую разнообразную природу.

Однако лекарственная флора исследована не полностью, даже изученные растения довольно редко применяются в клинической практике. Это объясняется в первую очередь недостаточным знанием свойства многих лекарственных средств, приводящих к снижению интереса к фитотерапии.

По современным представлениям, растительное лекарство – это цельный биогенетически сложившийся комплекс, включающий в себя активные биологические действующие вещества и другие вторичные метаболиты, протеины, эфирные масла, хлорофилл, микроэлементы, неорганические соли, витамины и т.д.

Существует мнение, что такой комплекс, сформировавшийся в живой клетке, имеет большее сходство с человеческим организмом, чем изолированное, химически чистое действующее вещество, легче ассимилируется и дает меньше побочных эффектов. При этом, в современной фармакологии часто используют некоторые биологически активные вещества растений: алкалоиды, эфирные масла, органические кислоты, витамины, дубильные вещества, смолы, слизи, фитонциды и т.д. Вместе с тем изучение терапевтической активности лекарственных растений показало целесообразность их применения в лечебной практике без химической обработки в виде настоев, отваров и т.д.

Настой из надземной части *lophanthus anisatus* обладают общеукрепляющим, тонизирующим, антисептическим и противовоспалительным действием. Лекарственные травы, содержащие комплексы антибиотических веществ, представляют один из богатых источников получения антибиотиков для медицинской практики. Доступная сырьевая база и результаты предварительных фармакологических исследований, открывающие перспективы использования настоя из надземной части *lophanthus anisatus* эффективных противовоспалительных средств, указывают на актуальность и целесообразность всестороннего изучения этого растения. Целью настоящей работы явилось определение дополнительной фармакологической эффективности – антимикробную активность настоя из надземной части *lophanthus anisatus*. Как известно, лекарственные средства, не стерилизуемые в процессе производства, могут быть контаминированы микроорганизмами и потому подлежат испытанию на микробиологическую чистоту. Учитывая отмеченное обстоятельство, нами исследован показатель микробиологической чистоты надземной части *lophanthus anisatus* с целью характеристики качества отечественного сырья.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования была надземная часть *Iophanthus anisatus*. Испытание на микробиологическую чистоту согласно требованиям ГФ XI [1] включало количественное определение жизнеспособных бактерий и грибов, а также выявление определенных видов микроорганизмов, наличие которых недопустимо в нестерильных лекарственных средствах. Его проводили официальным двухслойным агаровым методом в чашках Петри диаметром 90-100 мм. Образец сырья в количестве 10 г суспендировали в фосфатном буферном растворе (pH 7.0) так, чтобы конечный объем суспензии был 100 мл.

Определение общего числа бактерий. Приготовленную суспензию образца вносили в каждую из двух пробирок с 4,0 мл расплавленной и охлажденной до температуры от 45 до 50°C тиогликолевой среды. Быстро перемешивали содержимое пробирки и переносили в чашку Петри, содержащую 15-20 мл соответствующей питательной среды. Быстрым покачиванием чашки Петри равномерно распределяли верхний слой агара. После застывания среды чашки переворачивали и инкубировали в течение 5 суток при температуре 35°C. Посевы просматривали ежедневно. Через 48 ч и окончательно через 5 суток подсчитывали число бактериальных колоний на двух чашках, находили среднее значение и, умножая на показатель разведения, вычисляли число микроорганизмов в 1 г образца. Для получения достоверных результатов учитывали только те чашки, на которых выросло от 30-300 колоний.

Определение общего числа грибов. Испытание проводили описанным выше агаровым методом, используя среду Сабуро. Посевы инкубировали в течение 5 суток при температуре от 25 до 32,5°C. Через 72 ч и окончательно через 5 суток подсчитывали общее число колоний дрожжевых и плесневых грибов на двух чашках, находили среднее значение и, умножая на показатель разведения, т.е. на 10, вычисляли число грибов в 1 г образца. На чашке учитывали все колонии грибов, даже если их число менее 30.

Для выявления и идентификации бактерий семейства Enterobacteriaceae образец сырья в количестве 10,0 г вносили в 100 мл питательной среды №3, перемешивали и инкубировали при температуре от 30 до 35°C в течение 24-48 ч. Принимая во внимание наличие роста, делали пересев петлей на среды №4 (агар Эндо) и №5 (висмут сульфит-агар), разлитые в чашки Петри. Посевы инкубировали при температуре от 30 до 35°C в течение 24-48 ч. Поскольку после инкубации на средах №4 и №5 не наблюдалось колоний, соответствующих морфологической характеристике бактерий семейства Enterobacteriaceae, сделали вывод об отсутствии их в исследуемом образце (таблица 1).

Таблица 1

Показатели микробиологической чистоты надземной части *Iophanthus anisatus*

№	Требования нормативных документов	Результаты испытаний
1.	Общее число аэробных бактерий (в 1г образца) – не более 10 ⁷ (суммарно).	160 КОЕ
2.	Общее число дрожжевых и плесневых грибов (в 1г.образца) – не более 10 ⁵ (суммарно).	200 КОЕ

3.	Бактерии семейства Enterobacteriaceae – должны отсутствовать	Отсутствуют
4.	Escherichia.coli – должны отсутствовать в 1 г.	Отсутствуют
5.	Бактерии рода Salmonella – должны отсутствовать в 10 г.	Отсутствуют

Исходя из полученных данных, можно заключить, что надземная часть *Iophanthus anisatus* в полной мере соответствует требованиям, предъявляемым к лекарственному растительному сырью в отношении его микробиологической чистоты.

Изучение антимикробной активности настоя из надземной части *Iophanthus anisatus* проводились совместно с сотрудниками бактериологической лаборатории ООО “Научный центр стандартизации лекарственных средств”, согласно требованиям ГФ XI [1] и “Руководством по контролю качества лабораторных исследований”. Антимикробную активность определяли по чувствительности тест-культур микроорганизмов методом диффузии в плотной питательной среде [2]. В чашки Петри, установленные на столиках со строго горизонтальной поверхностью, разливали по 15 мл. 3% мясо-пептонного агара (МПА) [3]. После застывания агара, чашки подсушивали в термостате, затем в каждую чашку наливали по 5 мл. 1,5 % МПА смешанного с тест-культурой. Для лабораторных исследований использовали 18 часовую агаровую культуру микроорганизмов, разведённую в стерильном физиологическом растворе, стандартизованную по стандарту 0,5 по МакФарланду и дополнительно разведённую в 10 раз стерильным физиологическим раствором до концентрации 10⁷ микробных тел/мл. Посев на плотную питательную среду осуществляли методом “газона” [4].

Использовали модифицированный луночный метод (А.М. – Т. Бектемиров, 2007), после посева тест-штаммов микроорганизмов газоном на плотную питательную среду, металлическим пробойником диаметром 5,0 мм. делали лунки, в которые вносили по 0,1 мл. исследуемого препарата. Основные растворы контрольных и испытуемых образцов готовили в стерильных растворителях с концентрацией 1 мг/мл. [5].

Для уменьшения влияния колебаний во времени между закапыванием растворов, используемых в опыте, после их внесения выдерживали чашки при комнатной температуре в течение 1-2 часов. Чашки Петри помещали в термостат при 37⁰ С на 18-24 часа. Учёт результатов осуществляли визуально – по величине зоны ингибиции роста микроорганизмов вокруг лунок. В качестве контроля использовали изотонический раствор хлорида натрия [6].

Перед применением штаммы микроорганизмов, взятые из сохраняющей питательной среды, дважды субкультивировали на соответствующих для каждой таксономической группы бактерий питательных средах.[7] Тест-культуры идентифицированы по культуральным, морфологическим, тинкториальным, ферментативно-биохимическим и антигенным свойствам. Основные регистрационные и паспортные данные, характеризующие свойства тест-культур микроорганизмов, представлены в таблице 4.

Таблица 4

**Перечень штаммов микроорганизмов, использованных для определения
антимикробной активности.**

№	Наименование	Регистрационный номер	Морфология, Тинкториальные свойства	Ферментативные свойства	Источник выделения	Откуда поступил штамм
1.	St. aureus	ATCC 25923	грамположительные кокки	типичные	музей культуры	Коллекция ООО “Научный центр стандартизации лекарственных средств”
2.	St. epidermidis	ATCC	грамположительные кокки	типичные	музей	Коллекция ООО “Научный центр стандартизации лекарственных средств”
3.	Bacillus subtilis	ATCC 6633	грамположительные палочки, стрептобациллы, центральные споры	типичные	музей культуры	Коллекция ООО “Научный центр стандартизации лекарственных средств”
4.	E.coli	ATCC 25922	грамотрицательные палочки	типичные	музей культуры	Коллекция ООО “Научный центр стандартизации лекарственных средств”
5.	C albicans	ATCC 885653	Грамположительные почкующиеся друзы	типичные	музей культуры	Коллекция ООО “Научный центр стандартизации лекарственных средств”

Результаты и обсуждение

Диаметр зоны ингибиции роста бактерий настоем из надземной части *lophanthus anisatus* в таблице 5.

Таблица 5

Диаметр зоны ингибиции роста бактерий, в мм.

	St. aureus (мм.)	St. epidermidis (мм.)	E.coli (мм.)	C albi-cans (мм.)	Bacillus subtilis (мм.)
Настой из надземной части <i>lophanthus anisatus</i>	7,0	10,0	22,0	28,0	10,0
Контроль	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0

Как видно из таблицы 5 настой из надземной части *lophanthus anisatus* оказывает антимикробное действие в отношении *Candida albicans*, умеренной антибактериальной активностью против некоторых грамотрицательных энтеробактерий и условно патогенных микроорганизмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных можно сделать заключение, что изучаемый настой из надземной части *lophanthus anisatus* обладает выраженной противомикробной активностью в отношении *Candida albicans*, умеренной антибактериальной активностью против некоторых грамотрицательных энтеробактерий и условно патогенных микроорганизмов

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ:

1. Государственная фармакопея, – М., 1990. – Изд. XI. – Вып. 2. – С. 400.
2. Болтаева К.Ш., Рахимова Г.К., Адилбекова Д.Ю., Комилов Хн.М. Изучение антимикробной активности сухого экстракта, приготовленного из *Epilobium angustifolium* (L.) Инфекция, иммунитет и фармакология – Ташкент 2010 – № 3-4 – С. 115.
3. Болтаева К.Ш., Нурмухамедов А.А., Кодирова Д.Э., Алиев Х.У., Тухтаев Ф.Х. Изучение антимикробных и противоглистных свойств сухого экстракта полыни горькой (*ARTEMISIA ABSINTIUM* L.) Журнал теоретической и клинической медицины – Ташкент 2014. – № 3 – С. 306.
4. Болтаева К.Ш., А.А. Нурмухамедов, Л.И. Алимжанова, Ф.Х. Тухтаев, Д.К. Пулатова. Изучения антимикробной активности бутаноловой фракции, выделенной из иван-чая, содержащего биологически активные вещества. Фармацевтический журнал – Ташкент 2015 – № 2 – С. 87.
5. Абдурахманова Н.А., Болтаева К.Ш., Ибрагимов А.Я., Бекчанов Х.К. Изучение микробиологической чистоты и антимикробной активности сухого экстракта желчегонного сбора “Трифлос”. Инфекция, иммунитет и фармакология – Ташкент 2020 – С. 16.
6. Болтаева К.Ш., А.А. Нурмухамедов, Д.Н. Шакирова. Сравнительное изучение антимикробной активности субстанций, содержащих в своём составе наночастицы цинка и серебра. Фармацевтический журнал – Ташкент 2019 – № 2 – С. 115.
7. Болтаева К.Ш., Расулова Н.Ф. Изучение антимикробной активности эфирного масла базилика. Теория и практика современной науки № 2 (56) – Россия 2020.