

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТА *THYMUS MARSHALLIANUS* В ОТНОШЕНИИ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *S. AUREUS* И *C. ALBICANS*

А.С. Шереметьева, О.Г. Шаповал, Н.А. Дурнова

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России (Саратов, Россия)

Для цитирования: Шереметьева А.С., Шаповал О.Г., Дурнова Н.А. Антимикробная активность экстракта *Thymus marshallianus* в отношении клинических штаммов *S. aureus* и *C. albicans*. Аспирантский вестник Поволжья. 2022;22(4):69-72.

doi: 10.55531/2072-2354.2022.22.4.69-72

■ Сведения об авторах

Шереметьева А.С. – старший преподаватель кафедры общей биологии, фармакогнозии и ботаники. ORCID: 0000-0002-0022-8318

E-mail: anna-sheremetyewa@yandex.ru

Шаповал О.Г. – канд. мед. наук, доцент, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии. ORCID: 0000-0002-8290-7524

E-mail: lavopash283741@yandex.ru

Дурнова Н.А. – д-р биол. наук, доцент, заведующая кафедрой общей биологии, фармакогнозии и ботаники. ORCID: 0000-0003-4628-9519

E-mail: ndurnova@mail.ru

Рукопись получена: 09.08.2022

Рецензия получена: 16.09.2022

Решение о публикации: 19.09.2022

■ Аннотация

Цель – изучить антимикробную активность экстракта тимьяна Маршалла в отношении клинических штаммов микроорганизмов, выделенных из материала больных.

Материалы и методы. Экстракт из травы тимьяна Маршалла получали по описанной и используемой ранее методике, так как извлечение, полученное данным способом, показало антимикробную активность в отношении стандартных штаммов микроорганизмов. Антимикробную активность извлечений изучали, согласно МУК 4.2.1890-04, в отношении 6 клинических штаммов *Staphylococcus aureus* и 5 клинических штаммов *Candida albicans*, выделенных из материала больных (мазок из носоглотки, кровь, раневое отделяемое) в режимной лаборатории КБ им. С.Р. Миротворцева СГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России. Производили секторальный высеv на плотные питательные среды из опытных пробирок с подсчетом колоний, сравнивали с контрольным высевом.

Результаты. Впервые изучена антимикробная активность экстракта тимьяна Маршалла, полученного по запатентованной методике, в отношении клинических штаммов микроорганизмов. Установлен выраженный противостафилококковый эффект экстракта тимьяна Маршалла в отношении клинических штаммов *S. aureus* (МПК от 0,78 мг/мл до 0,39 мг/мл). Антимикотическая активность выявлена только в отношении одного штамма *C. albicans* (МПК 25,0 мг/мл).

■ **Ключевые слова:** антимикробная активность, минимальная подавляющая концентрация, клинические штаммы, экстракт, тимьян Маршалла.

■ **Конфликт интересов:** не заявлен.

THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *THYMUS MARSHALLIANUS* EXTRACT AGAINST CLINICAL CULTURES *S. AUREUS* AND *C. ALBICANS*

Anna S. Sheremetyeva, Olga G. Shapoval, Natalya A. Durnova

Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky (Saratov, Russia)

Citation: Sheremetyeva AS, Shapoval OG, Durnova NA. The antimicrobial activity of *Thymus marshallianus* extract against clinical cultures *S. aureus* and *C. albicans*. *Aspirantskiy vestnik Povolzhia*. 2022;22(4):69-72. doi: 10.55531/2072-2354.2022.22.4.69-72

■ Information about authors

Anna S. Sheremetyeva – Senior Lecturer of the Department of General biology, pharmacognosy and botany. ORCID: 0000-0002-0022-8318

E-mail: anna-sheremetyewa@yandex.ru

Olga G. Shapoval – PhD, Associate professor, Department of Microbiology, virology and immunology. ORCID: 0000-0002-8290-7524

E-mail: lavopash283741@yandex.ru

Natalya A. Durnova – PhD, Associate professor, Head of the Department of General biology, pharmacognosy and botany.

ORCID: 0000-0003-4628-9519 E-mail: ndurnova@mail.ru

Received: 09.08.2022

Revision Received: 16.09.2022

Accepted: 19.09.2022

■ Abstract

Aim – to study the antimicrobial activity of the *Thymus marshallianus* extract against clinical cultures of microorganisms isolated from patients' material.

Material and methods. The extract from the herb *Th. marshallianus* was obtained according to the method previously described and used, since the extraction obtained by this method presented the antimicrobial activity against standard cultures of microorganisms. The antimicrobial activity of extracts was studied in accordance with the Guidelines 4.2.1890-04 for 6 clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and 5 clinical isolates of *Candida albicans* taken from patients' material (nasopharyngeal smear, blood, wound fluid) in the laboratory of the S. R. Mirovtsev of the Saratov State Medical University. The sectoral seeding was performed on dense nutrient media from test tubes with the colonies count, compared with the control seeding.

Results. The antimicrobial activity of *Th. marshallianus* extract, obtained by the patented method, against clinical cultures of microorganisms was studied for the first time. A pronounced anti-staphylococcal effect of *Th. marshallianus* extract was

established against clinical culture of *S. aureus* (the minimum inhibitory concentration ranged from 0.78 mg/ml to 0.39 mg/ml). The antimycotic activity was detected only for one culture of *C. albicans* (minimum inhibitory concentration 25.0 mg/ml).

- **Keywords:** antimicrobial activity, minimum inhibitory concentration, clinical culture, extract, *Thymus marshallianus*.
- **Conflict of interest:** nothing to disclose.

ВВЕДЕНИЕ

Устойчивость к противомикробным препаратам, согласно данным ВОЗ, представляет собой все более серьезную угрозу для глобального общественного здравоохранения [1], поэтому актуальным вопросом является преодоление полирезистентности микрофлоры к существующим антимикробным препаратам. Одним из перспективных направлений в этой области является изучение антимикробных свойств растительных экстрактов [2–4].

Растения рода *Thymus* L. являются источником сырья, экстракты из которого обладают широким спектром активности: антиоксидантной, спазмолитической, противовоспалительной, отхаркивающей, а также антибактериальной [5–9].

В настоящее время Государственная фармакопея XIV издания включает 2 вида из рода *Thymus* L.: *Th. vulgaris* L. и *Th. serpyllum* L., которые не распространены на территории Саратовской области. Ресурсное значение в области имеет *Th. marschallianus* Willd. Ранее исследован количественный и качественный состав эфирного масла *Th. marschallianus* Willd. [5, 7, 10, 11], а также показана его антимикробная активность в отношении стандартных штаммов *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *Rhizopus*, *Penicillium* и дрожжей [7]. В ряде исследований установлен антимикробный эффект экстрактов тимьяна Маршалла в отношении стандартных штаммов: воднометанольного – в отношении *B. subtilis* [12], спиртового – в отношении *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis* [13], водного – в отношении *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *P. vulgaris*, *C. albicans* [5]. Отмечена роль пектиновых веществ, содержащихся в данном растении и оказывающих антибактериальное действие в отношении ряда патогенных и условно-патогенных бактерий [14].

В литературе отсутствуют данные об антимикробной активности экстрактов тимьяна Маршалла в отношении клинических штаммов микроорганизмов. Следует отметить, что клинические культуры, выделенные из материала пациентов, обладают более выраженной вирулентностью и резистентностью, чем стандартные [3], что делает актуальным изучение

влияния экстракта тимьяна Маршалла на клинические штаммы микроорганизмов.

ЦЕЛЬ

Изучить антимикробную активность экстракта тимьяна Маршалла в отношении клинических штаммов микроорганизмов, выделенных из материала больных.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использована трава тимьяна Маршалла, собранная в окрестностях города Саратова в июне–июле 2018 года. Сырье сушили в сухом, хорошо проветриваемом помещении, затем измельчали до частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 5 мм.

Экстракт получали по описанной и используемой ранее методике, так как извлечение, полученное данным способом, показало антимикробную активность в отношении стандартных штаммов микроорганизмов [14].

Антимикробную активность экстракта изучали ранее используемым [15] методом двукратных серийных разведений [16] с содержанием экстрактивных веществ от 50,0 до 0,39 мг/мл в отношении 6 клинических штаммов *S. aureus* (№4556, №4755, №4917, №4919, №4921, №4926) и 5 клинических штаммов грибов *C. albicans* (№4543, №4548, №47, №4752, №4939). Клинические штаммы были выделены из материала больных (мазок из носоглотки, кровь, раневое отделяемое) в режимной лаборатории Клинической больницы им. С.Р. Миротворцева СГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России. Конечная концентрация микроорганизмов в стандартном инокууме составила 2·10⁶ КОЕ/мл. Для установления минимальной подавляющей концентрации (МПК) экстрактивных веществ отмечали максимальное разведение экстракта с видимой задержкой роста. Для определения эффекта действия производили секторальный высеv на плотные питательные среды из опытных пробирок: на мясо-пептонный агар (для бактерий) и агар Сабуро (для грибов). Затем подсчитывали количество колоний и сравнивали с контрольным высеvом.

Таблица 1 / Table 1

МПК экстрактивных веществ в экстракте тимьяна Маршалла, показавшем активность в отношении клинических штаммов *S. aureus* (мг/мл)

The minimum inhibitory concentration of *Thymus marshallianus* extractives, active against clinical strains of *S. aureus* (mg/ml)

Экстракт \ Номер штамма <i>S. aureus</i>	№4556	№4755	№4917	№4919	№4921	№4926
Тимьяна Маршалла	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78	0,39

Таблица 2 / Table 2

МПК экстрактивных веществ в экстракте тимьяна Маршалла, показавшем активность в отношении клинических штаммов *C. albicans* (мг/мл)

The minimum inhibitory concentration of *Thymus marshallianus* extractives, active against clinical strains of *C. albicans* (mg/ml)

Экстракт \ Номер штамма <i>C. albicans</i>	№4543	№4548	№47	№4752	№4939
Тимьяна Маршалла	не установлена	не установлена	25	не установлена	не установлена

Статистическую обработку проводили при помощи пакета программного обеспечения Statistica 10. Различия групп считались достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В отношении клинических штаммов *S. aureus* нами установлен выраженный противостафилококковый эффект экстракта тимьяна Маршалла (МПК варьировала от 0,78 мг/мл до 0,39 мг/мл) (таблица 1).

Антимикотическая активность выявлена в отношении одного штамма *C. albicans* (№47) (МПК 25,0 мг/мл). В отношении других клинических штаммов *C. albicans* противогрибковый эффект не установлен (таблица 2).

Ранее изучалась антимикробная активность экстракта тимьяна Маршалла [17], полученного по запатентованной методике [18], а также очитка большого и очитка пурпурного, полученного по методике со схожими температурными параметрами и очищением хлороформом [19] в отношении стандартных штаммов микроорганизмов. В отношении *P. aeruginosa* активность была разная: у очитка большого установлена МПК экстрактивных веществ в экстракте 3,13 мг/мл, у очитка пурпурного – 6,25 мг/мл, а у тимьяна Маршалла – 12,5 мг/мл. В отношении *S. aureus* наиболее выраженную антибактериальную активность проявил тимьян Маршалла (МПК 0,78 мг/мл), а у очитка большого и очитка пурпурного МПК составила 6,25 мг/мл. В отношении *E. coli* МПК экстрактивных веществ в извлечениях из травы тимьяна Маршалла составила 12,5 мг/мл, очитка пурпурного – 25,0 мг/мл, а очитка большого – 50 мг/мл. Антимикотической активностью полученные экстракты не обладали [17, 19] (таблица 3).

Наиболее выраженная антибактериальная активность в отношении стандартных штаммов у изученных ранее экстрактов отмечена в отношении

грамположительных микроорганизмов (*S. aureus*), при этом наиболее активным был экстракт тимьяна Маршалла (МПК 0,78 мг/мл) [17]. Выявленная в нашем эксперименте противостафилококковая активность экстракта тимьяна Маршалла в отношении клинических штаммов (МПК 0,78 мг/мл) согласуется по степени выраженности с ранее полученными результатами в отношении стандартных культур.

Антимикотическая активность нами выявлена только в отношении одного клинического штамма *C. albicans* (№47) (МПК 25,0 мг/мл), в отношении других штаммов (№4543, №4548, №4752, №4939) противогрибковый эффект не установлен (таблица 2). Результаты нашего эксперимента также согласуются с данными ранее проведенного исследования в отношении стандартных штаммов *C. albicans* (таблица 3), в котором противогрибковая активность не выявлена у *C. albicans* [17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые изучена антимикробная активность экстракта тимьяна Маршалла, полученного по запатентованной методике в отношении клинических штаммов микроорганизмов.

Установлена выраженная противостафилококковая активность экстракта тимьяна Маршалла в отношении 6 клинических штаммов (МПК 0,39–0,78 мг/мл), что согласуется с результатами проведенного ранее эксперимента в отношении стандартных штаммов микроорганизмов.

Антимикотическая активность экстракта в диапазоне концентраций экстрактивных веществ 0,39–50,0 мг/мл выявлена только в отношении одного клинического штамма *C. albicans* (МПК 25,0 мг/мл). В отношении остальных четырех экспериментальных клинических штаммов *C. albicans* противогрибковая активность не установлена, что также согласуется с результатами проведенного ранее

Таблица 3 / Table 3

МПК экстрактивных веществ в экстрактах, показавших активность в отношении стандартных штаммов (мг/мл)

The minimum inhibitory concentration of *Thymus marshallianus* extractives presented the activity against standard strains (mg/ml)

Экстракт \ Культура микроорганизмов	<i>S. aureus</i> ATCC 209P	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27835	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>C. albicans</i> ATCC 13108
Очитка большого	6,25	3,13	50	не установлена
Очитка пурпурного	6,25	6,25	25	не установлена
Тимьяна Маршалла	0,78	12,5	12,5	не установлена

эксперимента в отношении стандартных штаммов микроорганизмов.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kulisic T, Dragovic-Uzelac V, Milos M. Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from Oregano, Thyme and Wild Thyme. *Food Technol Biotechnol*. 2006;44(4):485-492.
- Sheremetyeva AS, Durnova NA, Berezutsky MA. Essential oils level in herbs of different species of thyme (Thymus L.). *Bulletin of Botanic Garden of Saratov State University*. 2017;15(2):15-19. (In Russ.). [Шереметьева А.С., Дурнова Н.А., Бerezутский М.А. Содержание эфирных масел в траве разных видов рода тимьян (Thymus L.). *Бюллетень ботанического сада Саратовского государственного университета*. 2017;15(2):15-19]. doi: 10.18500/1682-1637-2017-15-2-15-19
- Niculae M, Hanganu D, Oniga I, et al. Phytochemical profile and antimicrobial potential of extracts obtained from *Thymus marchallianus* Willd. *Molecules*. 2019;24(17):3101. doi: 10.3390/molecules24173101
- Miura K, Kikuzaki H, Nakatani N. Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. *J Agric Food Chem*. 2002;50(7):1845-1851. doi: 10.1021/jf011314o
- Durnova NA, Romanteeva YuV, Kovtun AN. The chemical composition of the essential oil of *Thymus Marshallianus* Willd. and *Thymus Pallasianus* H. Br., growing in the Saratov region. *Chemistry of plant raw material*. 2014;(2):115-119. (In Russ.). [Дурнова Н.А., Романтеева Ю.В., Ковтун А.Н. Химический состав эфирного масла *Thymus Marshallianus* Willd. и *Thymus Pallasianus* H. Br., произрастающих на территории Саратовской области. *Химия растительного сырья*. 2014;(2):115-119].
- Guidelines MUK 4.2.1890-04. "Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs". М., 2004. (In Russ.). [Методические указания МУК 4.2.1890-04. «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». М., 2004].
- WHO. Antimicrobial resistance. Antimicrob Resist Glob Rep surveillance. Geneva, 2014.
- Orłowska M, Kowalska T, Sajewicz M, et al. A Comparison of Antibacterial Activity of Selected Thyme (Thymus) Species by Means of the Dot Blot Test with Direct Bioautographic Detection. *Journal of AOAC International*. 2015;98(4):871-875. doi: 10.5740/jaoacint.SGE5-Orłowska
- Pushkareva VI. Bacterial Pathogens: Migration from Environmental Reservoirs to Human Host. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2019;139(5):457-465. (In Russ.). [Пушкарева В.И. Бактериальные патогены: миграция от их естественных резервуаров человеку. *Успехи современной биологии*. 2019;139(5):457-465]. doi: 10.1134/S0042132419040070
- Sheremetyeva AS, Durnova NA, Raykova SV. Research of antimicrobial activity water-alcohol extract *Thymus marchallianus*. In: Modern trends in the development of health saving technologies. М., 2019:509-514. (In Russ.). [Шереметьева А.С., Дурнова Н.А., Райкова С.В. Исследование
- antimicrobial активности водно-спиртового экстракта тимьяна Маршалла. В кн.: Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения. М., 2019:509-514].
- Manconi M, Petretto G, D'hallewin G, et al. Thymus essential oil extraction, characterization and incorporation in phospholipid vesicles for the antioxidant/antibacterial treatment of oral cavity diseases. *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces*. 2018;171:115-122. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.07.021
- Pushkareva VI, Ermolaeva SA. Experimental evidences on a crop plant role in epidemiology of sapronotic (soil-borne) bacterial infection. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2018;5:113-121. (In Russ.). [Пушкарева В.И., Ермолаева С.А. Экспериментальное обоснование роли растений в эпидемиологии сапронозных инфекций. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2018;5:113-121].
- Raikova SV, Durnova NA, Prikhod'ko VV, et al. Antimicrobial activity of herbal extracts from *Sedum maximum* (L.) Hoffm., *Sedum telephium* L. received by different methods. *Saratov Journal of Medical Scientific Research*. 2017;13(2):213-216. (In Russ.). [Райкова С.В., Дурнова Н.А., Приходько В.В., и др. Антимикробная активность экстрактов очитков (*Sedum maximum* (L.) Hoffm., *Sedum telephium* L.), полученных разными методами. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2017;13(2):213-216].
- Method for obtaining a dry extract from plant materials with biological activity: patent 2482863. Russia. No. 2012105384/15; Dec. 02/15/12; Publ. 05/27/13, Bull. No. 15. 1 p. (In Russ.). [Способ получения сухого экстракта из растительного сырья, обладающего биологической активностью: патент 2482863 Российской Федерации. №2012105384/15; заявл. 15.02.12; опубл. 27.05.13, Бюл. № 15. 1 с.].
- Starchak YuA. Pharmacognostic study of plants of the genus thyme (Thymus L.) as a promising source of phytopreparations [dissertation]. Samara, 2016. (In Russ.). [Старчак Ю.А. Фармакогностическое изучение растений рода тимьян (Thymus L.) как перспективного источника получения фитопрепаратов. Дис. ... на докт. фарм. наук. Самара, 2016].
- Frolova AV. An integrated approach to overcome antibiotic resistance. *Bulletin of problems biology and medicine*. 2013;1(2):231-233. (In Russ.). [Фролова А.В. Комплексный подход к преодолению антибиотикорезистентности. *Вестник проблем биологии и медицины*. 2013;1(2):231-233].
- Jia HL, Ji QL, Xing SL, et al. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial activities of the essential oils of *Thymus marschallianus* Will. and *Thymus proximus* Serg. *Journal of Food Science*. 2010;75(1):59-65. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01413.x
- Broucke CO, Lemli JA. Spasmolytic activity of the flavonoids from *Thymus vulgaris*. *Pharmacy World Science*. 1983;5(1):9-14. doi: 10.1007/BF01959645
- Bubenchikova VN, Starchak YuA, Lapina ES. Quantitative determination of functional groups of pectin substances of the herb *Thymus Marchallianus* Willd. *Advances in Current Natural Sciences*. 2015;1:1139-1141. (In Russ.). [Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А., Лапина Е.С. Тимьян Маршалла (*Thymus marchallianus* Willd.) – источник пектиновых веществ. *Успехи современного естествознания*. 2015;1:1139-1141].

■ Автор для переписки

Шереметьева Анна Сергеевна
Адрес: Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского, ул. Большая Казачья, 112, г. Саратов, Россия, 410012.

E-mail: anna-sheremetyewa@yandex.ru

■ Corresponding Author

Anna S. Sheremetyeva
Address: Saratov State Medical University, 112 B. Kazachya st., Saratov, Russia, 410012.