

Ocena antybakteryjnych właściwości etanolowych wyciągów wybranych gatunków roślin z rodzaju *Coelogyne* Lindl. (Orchidaceae)

Streszczenie: Celem badań była ocena *in vitro* własności przeciwbakteryjnych wyciągów etanolowych z liści wybranych gatunków storczyków z rodzaju *Coelogyne* Lindl. wobec gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* [Rosenbach (ATCC® 29213™)]. Liście storczyków do badań, m.in. *Coelogyne asperata* Lindl., *C. assamica* Linden & Rchb.f., *C. brachyptera* Rchb.f., *C. cristata* Lindl., *C. fimbriata* Lindl., *C. flaccida* Lindl., *C. huettnieriana* Rchb.f., *C. lawrenceana* Rolfe, *C. ovalis* Lindl., *C. pandurata* Lindl., *C. speciosa* (Blume) Lindl., *C. tomentosa* Lindl., *C. viscosa* Rchb.f. zebrano w Narodowym Ogrodzie Botanicznym im. M.M. Gryshko (NOB) Państwowej Akademii Nauk Ukrainy (Kijów, Ukraina). Świeżo zebrane liście umyto, zważono i rozdrobniono w homogenizatorze w 96% etanolu (w proporcji 1:19) w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie ekstrakty zostały przefiltrowane i zbadane pod kątem ich zdolności antybakteryjnych przy wykorzystaniu metody dyfuzyjno-krążkowej. Najsilniejsze właściwości przeciwbakteryjne stwierdzono w przypadku *C. huettnieriana* i *C. pandurata*, najsłabsze natomiast dla *C. asperata* i *C. ovalis*. Uzyskane wyniki pozwalają na wysunięcie wniosków, iż takie fragmenty roślin mogą być stosowane jako naturalne środki antyseptyczne i przeciwbakteryjne w medycynie i weterynarii. Storczyki mają podobne działanie do antybiotyków, ale są substancjami naturalnymi, dlatego ich stosowanie nie powinno powodować mechanizmu oporności drobnoustrojów. Pomimo obiecujących wyników uzyskanych w niniejszym opracowaniu, powinny zostać przeprowadzone kolejne badania, które miałyby na celu dalszą ocenę roli poszczególnych związków, wyizolowanych z wszystkich części storczyków, a którym w świetle współczesnych odkryć można przypisać aktywność przeciwbakteryjną. Otrzymane wyniki są dobrą podstawą do dalszych badań farmakologicznych w celu szczegółowej oceny efektów leczniczych storczyków.

Wstęp

Rodzina storczykowatych (*Orchidaceae*) jest drugą co do wielkości rodziną jednoliściennych roślin kwiatowych, obejmującą ponad 27000 gatunków należących do ponad 850 rodzajów [Givnish i in. 2016]. Różnorodność storczykowatych wzrasta w kierunku zwrotnika, gdzie przeważają gatunki epifityczne. Krajem o największej liczbie gatunków storczyków jest Kolumbia. W Ameryce występuje ich 3000 gatunków, w Ekwadorze – 2500 gatunków, w Brazylii – podobnie 2500 gatunków [Dressler 1981].

Przez dwa tysiące lat medycyna wykorzystywała rośliny, w tym te z rodziny storczykowatych (*Orchidaceae*), do leczenia różnych chorób i dolegliwości. Obecnie prawie 50 gatunków storczyków jest szeroko stosowanych w różnych systemach medycyny [Panda i Mandal 2013]. Storczyki o właściwościach leczniczych należą głównie do czternastu rodzajów. Są wśród nich: *Calanthe*, *Coelogyne*, *Cymbidium*, *Cypripedium*, *Dendrobium*, *Ephemerantha*, *Eria*, *Galeola*, *Gastrodia*, *Gymnadenia*, *Habenaria*, *Ludisia*, *Luisia*, *Nervilia* i *Thunia* [Szlachetko 2001].

Coelogyne to rodzaj sympodialnych epifitów z rodziny storczykowatych. Należy do niego ponad 200 gatunków występujących w Indiach, Chinach, Indonezji i na wyspach Fidżi, z głównymi ośrodkami na Borneo, Sumatrze i Himalajach. Można je znaleźć na obszarze tropikalnych lasów nizinnych, ale również w górskich lasach deszczowych [Gravendeel 2000].

W badaniach przedklinicznych wykazano prozdrowotne działanie ekstraktów ze storczyków, m.in.: antyalergiczne, antyhepatotoksyczne, antymutagenne, hamujące agregację płytek krwi, immunomodulujące, neuroprotektoryjne, przeciwstarzeniowe, moczopędne, antykancerogenne, przeciwbakteryjne, antywirusowe, przeciwoznaczające, przeciwbólowe, przeciwdrgawkowe, przeciwreumatyczne, przeciwzapalne itd. [Perez Gutiérrez, 2010, Panda i Mandal 2013].

Chociaż różne farmakologiczne działania storczyków zostały dobrze zbadać, badania dotyczące ich właściwości przeciwbakteryjnych nadal trwają. W związku z powyższym, celem przeprowadzonych przez nas badań była ocena *in vitro* własności przeciwbakteryjnych wyciągów etanolowych z liści wybranych gatunków storczyków z rodzaju *Coelogyne* Lindl. wobec gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* [Rosenbach (ATCC® 29213™)].

Materiały i metody badań

Zbiór materiału roślinnego. Liście storczyków do badań, m.in. *Coelogyne asperata* Lindl., *C. assamica* Linden & Rchb.f., *C. brachyptera* Rchb.f., *C. cristata* Lindl., *C. fimbriata* Lindl., *C. flaccida* Lindl., *C. huettnieriana* Rchb.f., *C. lawrenceana* Rolfe, *C. ovalis* Lindl., *C. pandurata* Lindl., *C. speciosa* (Blume) Lindl., *C. tomentosa* Lindl., *C. viscosa* Rchb.f. zebrano w Narodowym Ogrodzie Botanicznym im. M.M. Gryshko (NOB) Państwowej Akademii Nauk Ukrainy (Kijów, Ukraina) (Ryc. 1). Od 1999 roku cała kolekcja roślin tropikalnych i subtropikalnych (w tym storczyków) ma status kolekcji dziedzictwa narodowego Ukrainy. Ponadto kolekcja tropikalnych orchidei NOB została zarejestrowana w organach administracyjnych CITES (Ministerstwo Środowiska Ukrainy, nr rejestracyjny 6939/19/1-10, 23 czerwca 2004 r.).

*C. cristata**C. fimbriata**C. pandurata**C. huettneriana**C. ovalis**C. speciosa**C. flaccida**C. viscosa**C. brachyptera**C. tomentosa**C. assamica*

Ryc. 1. Zdjęcia wybranych gatunków storczyków z rodzaju *Coelogyne* Lindl. wykorzystanych w ocenie *in vitro* ich właściwości antybakteryjnych. Wszystkie próbki roślin są uprawiane w warunkach szklarniowych w Narodowym Ogrodzie Botanicznym im. M.M. Gryshko Państwowej Akademii Nauk Ukrainy (Kijów, Ukraina) Zdjęcia: L.I. Buyun i O. Gyrenko.

Przygotowanie ekstraktów roślinnych. Świeżo zebrane liście umyto, zważono i rozdrobniono w homogenizatorze w 96% etanolu (w proporcji 1:19) w temperaturze pokojowej. Do momentu użycia wszystkie wyciągi przechowywano w temperaturze -20°C.

Ocena właściwości antybakteryjnych metodą dyfuzyjno-krążkową. Własności antybakteryjne badano metodą dyfuzyjno-krążkową wobec gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* [Rosenbach (ATCC® 29213™) – szczep wrażliwy na oksacylinę]. Dyfuzyjna metoda wykorzystuje krążki bibułowe nasyczone odpowiednimi ilościami ekstraktów, które następnie nakłada się na powierzchnię płytek agarowych. Płytki agarowe przygotowuje się wcześniej nanosząc na nie zawiesinę badanych szczepów o określonej gęstości. Powstałe dookoła krążków strefy zahamowania wzrostu dowodzą wrażliwości badanego szczepu. Miarą stopnia wrażliwości jest wielkość średnicy strefy zahamowania wzrostu dookoła krążka [Bauer i in. 1966].

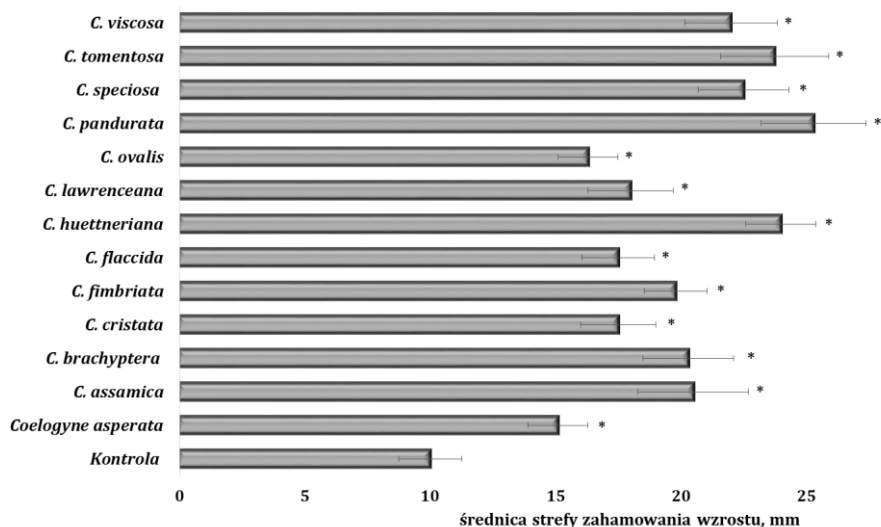
Do hodowli bakterii stosowano agar Muellera-Hintona (Oxoid®). Z 24-godzinnych hodowli bakteryjnych przygotowywano zawiesinę o gęstości 0,5 w skali McFarlanda w jałowym 0,85% NaCl. Bezpośrednio po inokulacji umieszczono na powierzchni podłoża krążki z wyciągami, zwracając uwagę, by każdy z krążków miał zapewniony dobry kontakt z agarem i żeby poszczególne krążki były w odległości nie mniejszej niż 4 cm. Grupę kontrolną stanowił 96% roztwór etanolu.

Płytki inkubowano w 37°C przez 24 godz. Następnie suwmiarką elektroniczną mierzono strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół krążków. Doświadczenie wykonano w sześciu powtórzeniach. Uzyskane wartości interpretowano zgodnie z zaleceniami EUCAST.

Analiza statystyczna. Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono przy użyciu oprogramowania STATISTICA 8.0 (StatSoft, Kraków, Polska). Wyniki wyrażono jako średnią $\pm$ S.E.M. Wszystkie zmienne testowano pod względem rozkładu normalnego za pomocą testu Kołmogorowa-Smirnowa i Lillieforsa ($p > 0,05$). Hipotezę o istotności różnic średnich wartości średnicy obszaru zahamowania wzrostu drobnoustrojów według zastosowanego wyciągu weryfikowano z zastosowaniem nieparametrycznego testu jednoczynnikowej analizy wariancji Kruskala-Wallisa. Przyjęto poziom istotności $p \leq 0,05$ [Zar 1999].

Wyniki badań i dyskusja

Zestawienie średnich wartości wielkości pól zahamowania wzrostu bakterii *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 29213™) wokół krążków nasączonych wyciągami z liści wybranych gatunków z rodzaju *Coelogyne* przedstawiono na ryc. 2.



Ryc. 2. Zestawienie średnich wartości wielkości pól zahamowania wzrostu bakterii *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 29213™) wokół krążków nasączonych wyciągami z liści wybranych gatunków z rodzaju *Coelogyne* ($M \pm m$, $n=6$)

* zmiany statystycznie istotne ($p < 0,05$) w porównaniu z wartościami próby kontrolnej

Źródło: opracowanie własne.

Uśrednione wyniki wielkości pól zahamowania wzrostu bakterii wokół krążków nasączonych wyciągami w porównaniu z kontrolą (96% roztworem etanolu) przedstawiono na rycinie 2. Roztwór etanolu o stężeniu 96% wykazuje mniej skuteczniejsze działanie niż wyciągi roślinne (Mann-Whitney U -test; $p < 0,05$). Zaobserwowano znaczące większy wzrost w właściwościach przeciwbakteryjnych badanych wyciągów roślinnych. Najsilniejsze właściwości przeciwbakteryjne stwierdzono w przypadku *C. huettnneriana* ($24,0 \pm 1,4$ mm) i *C. pandurata* ($25,3 \pm 2,1$ mm), najsłabsze natomiast dla *C. asperata* ($15,1 \pm 1,3$ mm) i *C. ovalis* ($16,3 \pm 1,2$ mm). Statystycznie istotną różnicę w wielkości pól zahamowania wzrostu bakterii wokół krążków nasączonych wyciągami stwierdzono między krążkami zawierającymi *C. asperata* (o 51%, $p < 0,05$), *C. assamica* (o 105%, $p < 0,05$), *C. brachyptera* (o 103%, $p < 0,05$), *C. cristata* (o 75%, $p < 0,05$), *C. fimbriata* (o 98%, $p < 0,05$), *C. flaccida* (o 75%, $p < 0,05$), *C. huettnneriana* (o 140%, $p < 0,05$), *C. lawrenceana* (o 80%, $p < 0,05$), *C. ovalis* (o 63%, $p < 0,05$), *C. pandurata* (o 153%, $p < 0,05$), *C. speciosa* (o 125%, $p < 0,05$), *C. tomentosa* (o 138%, $p < 0,05$), *C. viscosa* (o 120%, $p < 0,05$).

Działanie antybakteryjne wybranych gatunków z rodzaju *Coelogyne* może być spowodowane obecnością alkaloidów, pochodnych bibenzylowych, flawono-

idów, fenantrenów i terpenoidów. Badania kliniczne potwierdziły działania moczopędne, przeciwreumatyczne, przeciwzapalne, przeciwrakotwórcze, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwdrgawkowe, relaksacyjne, neuroochronne i antywirusowe itd. [Kovács i in. 2008, Pérez Gutiérrez 2010].

Wyniki naszych badań pokazują antybakteryjne działanie wyciągów pozyskanych z liści różnych gatunków z rodzaju *Coelogyne*. Najsilniejsze właściwości przeciwbakteryjne stwierdzono w przypadku *C. huettneriana* i *C. pandurata*, najsłabsze natomiast dla *C. asperata* i *C. ovalis*. Uzyskane wyniki pozwalają na wysunięcie wniosków, iż takie fragmenty roślin mogą być stosowane jako naturalne środki antyseptyczne i przeciwbakteryjne w medycynie i weterynarii. Storzyczki mają podobne działanie do antybiotyków, ale są substancjami naturalnymi, dlatego ich stosowanie nie powinno powodować mechanizmu oporności drobnoustrojów. Pomimo obiecujących wyników uzyskanych w niniejszym opracowaniu, powinny zostać przeprowadzone kolejne badania, które miałyby na celu dalszą ocenę roli poszczególnych związków, wyizolowanych z wszystkich części storczyków, a którym w świetle współczesnych odkryć można przypisać aktywność przeciwbakteryjną. Otrzymane wyniki są dobrą podstawą do dalszych badań farmakologicznych w celu szczegółowej oceny efektów leczniczych storczyków.

Literatura

- Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C., Turck M. 1966: *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method*. Am. J. Clin. Pathol., 45(4): 493-496.
- Dressler R.L. 1960: *Classification and phylogeny in the Orchidaceae*. Annals of the Missouri Botanical Garden, 47: 25-68.
- Givnish T.J., Spalink D., Ames M., Lyon S.P., Hunter S.J., Zuluaga A., Doucette A., Caro G.G., McDaniel J., Clements M.A., Arroyo M.T.K., Endara L., Kriebel R., Williams N.H., Cameron K.M. 2016: *Orchid historical biogeography, diversification, Antarctica and the paradox of orchids dispersal*. J. Biogeogr., 1-12.
- Gravendeel B. 2000: *Reorganising the orchid genus Coelogyne – a phylogenetic classification based on molecules and morphology*. Grafische Vormgeving Kanters, Slidrecht, pp. 1-208.
- Kovács A., Vasas A., Hohmann J. 2008: *Natural phenanthrenes and their biological activity*. Phytochemistry, 69(5): 1084-1110.
- Panda A.K., Mandal D. 2013: *The folklore medicinal orchids of Sikkim*. Anc. Sci. Life, 33(2): 92-96.
- Pérez Gutiérrez R.M. 2010: *Orchids: A review of uses in traditional medicine, its phytochemistry and pharmacology*. Journal of Medicinal Plants Research, 4(8): 592-638.
- Szlachetko D.L. 2001: *Genera et species Orchidacearum*. 1. Polish Botanical Journal, 46(1): 11-26.
- Zar J.H. 1999: *Biostatistical Analysis*. 4th ed., Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

**Evaluation of antibacterial efficacy of the ethanolic extracts obtained
from leaves of some epiphytic orchids belonging
to *Coelogyne* Lindl. Genus (*Orchidaceae*)**

Summary: The aim of the current study was to assess the antibacterial activity of thirteen species of tropical orchids, i.e. *Coelogyne asperata* Lindl., *C. assamica* Linden & Rchb.f., *C. brachypetala* Rchb.f., *C. cristata* Lindl., *C. fimbriata* Lindl., *C. flaccida* Lindl., *C. huettneriana* Rchb.f., *C. lawrenceana* Rolfe, *C. ovalis* Lindl., *C. pandurata* Lindl., *C. speciosa* (Blume) Lindl., *C. tomentosa* Lindl., *C. viscosa* Rchb.f. against *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* [Rosenbach (ATCC® 29213™)]. Antimicrobial activities of crude extracts of the plant samples were evaluated by the paper disc diffusion method. All the plant extracts screened possessed activity against *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 29213™). Marked antibacterial efficacy was observed in case of screening of ethanolic extracts derived from leaves of *C. huettneriana* (mean diameter of inhibition zones was $24,0 \pm 1,4$ mm) and *C. pandurata* ($25,3 \pm 2,1$ mm). Extracts of *C. asperata* ($15,1 \pm 1,3$ mm) and *C. ovalis* ($16,3 \pm 1,2$ mm) displayed less profound inhibitory activity against strain tested. The results also indicate that scientific studies carried out on medicinal plants having traditional claims of effectiveness might warrant fruitful results. The extensive use of this herbal drugs by the local people in treating various types of disorders might therefore be justified by their antimicrobial activities against different strains of bacteria and fungi, which are known to be responsible for causing various infections. Further studies aimed at the isolation and identification of active substances from the extracts obtained from leaves of *Coelogyne* species could also disclose compounds with better therapeutic value. It is believed that screening of all the investigated plants for other biological activities is essential.

Keywords: ethanolic extracts, tropical orchids, antibacterial efficacy