



# ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



## АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СПИРТОВОГО ЭКСТРАКТА ЭНДОКАРПИЕВ ВОДЯНОГО ОРЕХА *Trapa sibirica* Fler.

Кулуев Б.Р.<sup>1,2,3</sup>, Зулкарнаева Е.Ш.<sup>2</sup>,  
Артюхин А.Е.<sup>3</sup>, Михайлова Е.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского  
федерального исследовательского центра РАН, Уфа,  
E-mail: [kuluev@bk.ru](mailto:kuluev@bk.ru)

<sup>2</sup>Башкирский государственный медицинский  
университет, Уфа

<sup>3</sup>Башкирский государственный университет, Уфа

Водяной орех (*Trapa L.*) является водным растением из семейства Дербенниковые (Lythraceae). Его плоды представляют собой костянки с твёрдыми выростами в виде рогов. После созревания мягкая наружная оболочка, состоящая из экзокарпия и мезокарпия, постепенно гниёт, тогда как внутренняя твёрдая оболочка (эндокарпий) сохраняется как минимум ещё на один год, то есть до конца вегетации следующего года. Мы предположили, что в эндокарпии плодов водяного ореха содержатся метаболиты, препятствующие проникновению микроорганизмов в семя. Поэтому целью нашей работы было определение антибактериальной активности спиртового экстракта эндокарпия плодов и семян водяного ореха по отдельности. Для анализа нами были собраны плоды реликтового вида водяного ореха сибирского (*Trapa sibirica* Fler.) из озера Упканкуль Республики Башкортостан. Диск-диффузионным методом была показана высокая антибактериальная активность спиртового экстракта эндокарпия плодов водяного ореха. В то же время экстракт семян водяного ореха такой антибактериальной активностью не обладал. Спиртовые экстракты корней табака, листьев хлопчатника, корней имбиря, плодов перца чили, луковиц чеснока при использованном нами методе их выделения, также не показали антибактериальной активности. Исходя из этого, можно предполагать наличие в эндокарпиях водяного ореха метаболитов с относительно сильной для растений антибактериальной активностью.

**Ключевые слова:** *Trapa L.*, водяной орех, чилим, эндокарпий, спиртовой экстракт, антибактериальная активность, Упканкуль

## ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ALCOHOL EXTRACT OF THE WATER CALDROP ENDOCARPS

Kuluev B.R.<sup>1,2,3</sup>, Zulkarnaeva E.Sh.<sup>2</sup>,  
Artyukhin A.E.<sup>3</sup>, Mikhaylova E.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal  
Research Centre of the Russian Academy of Sciences,  
Ufa E-mail: [kuluev@bk.ru](mailto:kuluev@bk.ru)

<sup>2</sup>Bashkir State Medical University, Ufa

<sup>3</sup>Bashkir State University, Ufa

A water caltrop (*Trapa L.*) is an aquatic plant from the Lythraceae family. It has the fruits with solid outgrowths in the form of horns. After maturing, the soft outer shell, consisting of exocarp and mesocarp, gradually decays, while the inner hard shell (endocarp) is retained for at least one more year, that is, until the end of the growing season of the next year. We suggested that the endocarp of the water caltrop fruits contains metabolites that prevent the penetration of microorganisms into the seed. Therefore, the purpose of our work was to determine the antibacterial activity of the alcohol extract of the fruit endocarp and seeds separately. For the analysis, we collected fruits of the relict species of Siberian water caltrop (*Trapa sibirica* Fler.) from the Upkankul Lake of the Republic of Bashkortostan. The high antibacterial activity of the alcohol extract of the water caltrop endocarp has been demonstrated by the disc-diffusion method. At the same time, the extract of the water caltrop seeds did not possess such antibacterial activity. Alcohol extracts of the tobacco roots, cotton leaves, ginger roots, chili fruits, garlic bulbs were not demonstrate of antibacterial activity. Proceeding from this, it is possible to suggest the presence in the endocarps of the water caltrop of metabolites with a relatively strong antibacterial activity.

**Keywords:** *Trapa L.*, water caltrop, water chestnut, endocarp, alcohol extract, antibacterial activity, Upkankul Lake

Поступила в редакцию: 13.03.2018

DOI: 10.31163/2618-964X-2018-1-1-45-51

## ВВЕДЕНИЕ

Растения с антимикробной активностью в современной медицине рассматриваются в качестве одной из перспективных альтернатив синтетическим антибиотикам. Наиболее распространенным методом выделения из растительных тканей метаболитов с антимикробной активностью является спиртовая экстракция. К примеру, имеются сведения об антибактериальной и антигрибковой активности спиртовых экстрактов аира болотного *Acorus calamus* и верблюжьей колючки *Alhagi pseudalhagi* [Абдул-Хафиз и др., 2011], василька шероховатого *Centaurea scabiosa* [Краснов и др., 2012], можжевельника сибирского *Juniperus sibirica* [Матвеевко и др., 2014], одуванчика лекарственного *Taraxacum officinale* [Комарова и др., 2015], ряски *Lemna minor* [Арефьева, Дубков, 2016] и других растений.

Водяной орех *Trapa* L. является водным растением, относящимся к семейству Дербенниковые (Lythraceae). В России это растение относится к реликтам и встречается довольно редко. В Республике Башкортостан водяной орех произрастает лишь в двух небольших озерах Нуримановского района: Упканкуль и Бильгиляр [Шевченко и др., 2017]. Имеются сведения, что популяции этого района относятся к виду *Trapa sibirica* Fleg. [Мулдашев, 2011]. Плоды этого растения, называемые в народе «орехами» – это чёрно-бурые костянки с твёрдыми выростами в виде рогов. При созревании плоды снаружи имеют мягкую оболочку, состоящую из экзокарпия и мезокарпия, которая довольно быстро разлагается и исчезает. К зиме сохраняется лишь внутренняя твердая оболочка плода, который представляет собой типичный эндокарпий плода костянка. Именно из-за этого твердого эндокарпия, плоды исследуемого нами растения называются орехами.

Внутри плода *Trapa* L. находится белое семя, которое можно употреблять в пищу, в том числе, в сыром виде. Плоды тяжелее воды, поэтому после отделения от растения они сразу же идут на дно, где лежат до следующей весны, после чего прорастают. Всхожесть семян водяного ореха может сохраняться до 50 лет, однако чаще всего семена прорастают в течение первых двух лет [Красная книга Республики Беларусь, 2006].

В 2017 году нами был проведен сбор плодов водяного ореха в озере Упканкуль. Плоды были сразу же помещены в емкости с чистой водопроводной водой и хранились в холодильнике при температуре +5°C. Как и ожидалось, в течение первых двух месяцев хранения наружная мясистая оболочка плодов сгнивала, однако внутренняя твердая оболочка плода не подвергалась ни гниению, ни разрушению даже при хранении плодов при температуре +8°C. Исходя из этих наблюдений можно было предполагать, что во внутренней оболочке плодов водяного ореха содержатся метаболиты с антимикробной активностью. Действительно, имеются сведения об антимикробной активности спиртовых экстрактов плодов водяного ореха *Trapa natans* индийских популяций (Kaur et al., 2012). Однако сравнительный анализ спиртовых экстрактов, полученных из оболочки плодов с экстрактами выделенными из ядер плодов водяного ореха данными авторами не проводился. В связи с этим, целью нашей работы была сравнительная оценка антибактериальной активности спиртовых экстрактов эндокарпия и семян водяного ореха диско-диффузионным методом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плоды водяного ореха *T. sibirica* были собраны в озере Упканкуль (55°4'7"N, 56°30'52"E) в конце августа 2017 года. Сбор плодов проводили в пятилитровые пластиковые

бутыли с озерной водой. На следующий день воду в бутылках заменяли на чистую водопроводную холодную воду и помещали собранные плоды в холодильник на +5°C для стратификации семян [Берестенко, 2011]. Воду в бутылках меняли каждый месяц, поскольку происходило загнивание наружной оболочки плодов. Внутренняя твердая оболочка плодов была намного более устойчивой и сохранялась в неизменном виде (рис. 1). Далее плоды разделяли на эндокарпии и семена, последние из которых состояли из семядолей, зародыша и оболочки. Затем эндокарпии и семена растирали в порошок при помощи жидкого азота в ступке с пестиком. Экстракцию метаболитов из этого порошка проводили при помощи 40% раствора этанола при комнатной температуре в течение 4 часов при постоянном помешивании на шейкере. Дальнейшую экстракцию в 40% этаноле проводили при температуре +4°C в течение 18 часов. Затем экстракт нагревали до 37°C в течение 5 минут, проводили центрифугирование и супернатант переносили в новую пробирку. Для испарения этанола проводили упаривание спиртового экстракта до водного остатка при +65°C в течение одного часа. Таким образом, получали экстракты исследуемых растений с очень небольшим содержанием этилового спирта. Такой способ избавления от этилового спирта был выбран в связи с тем, что он сам по себе тоже мог обладать антибактериальной активностью.



Рис. 1. Плоды водяного ореха *T. sibirica* лишенные внешней мягкой оболочки после четырех месяцев хранения в холодильнике. Оболочка плодов на фотографии представляет собой эндокарпий.

Для определения антимикробной активности использовали стандартизированный метод Кирби-Бауэра (диско-диффузионный метод) [Baer et al., 1966]. Для этого бумажные диски пропитывались экстрактом эндокарпиев и семян водяного ореха, а также тканей других растений в течение 30 минут. В качестве положительного контроля использовали бумажные диски, пропитанные антибиотиком цефотаксимом. Для этого бумажные диски инкубировали в 10 мкМ растворе цефотаксима в течение 30 минут. Затем все диски помещались на поверхность инокулированной бактериями агаризованной среды LB, с последующей инкубацией в течение суток при 37°C. В работе был использован штамм XL1 Blue кишечной палочки *Escherichia coli*. Антимикробная активность оценивалась по среднеарифметическому значению диаметра зон задержки роста (мм). В качестве отрицательного контроля использовали 40% раствор этанола. Кроме того, для сравнительного анализа использовали экстракты корней табака дикого типа (*Nicotiana tabacum*), бородатых корней табака и витании *Withania somnifera* [Михайлова и др., 2017], листьев хлопчатника *Gossypium hirsutum* выращенных в теплице, корней имбиря *Zingiber officinale*, плодов перца чили *Capsicum annuum* и луковиц чеснока *Allium sativum*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Раствор антибиотика цефотаксима, как и ожидалось, показал высокую антибактериальную активность (рис. 2а). Диаметр зоны активности при использовании этого антибиотика составил 30 мм. Это говорит о том, что испытанная нами диско-диффузионная система вполне может быть использована для оценки антибактериальной активности растительных экстрактов. Спиртовой экстракт семян водяного ореха не проявил заметной антимикробной активности (рис. 2б). В то же время экстракт эндокарпия водяного ореха оказывал существенное негативное воздействие на рост *E. coli*, хотя и в меньшей степени, чем антибиотик (рис. 2в). Исходя из этого, можно делать выводы о наличии во внутренней оболочке плодов водяного ореха метаболитов с антибактериальной активностью. Вероятно, эти антимикробные соединения играют важную роль в сохранении плодов водяного ореха в неизменном виде в течение многих лет и поддержании жизнеспособности семян. Более того, эндокарпий плодов водяного ореха сохраняется и на весь период последующей вегетации, так как это растение прикрепляется ко дну водоемов при помощи «рогов» оболочки плода [Кулуев и др., 2017].

Остатки этилового спирта в экстрактах плодов водяного ореха тоже могли оказывать негативное воздействие на рост бактерий. Поэтому был проведен анализ антибактериальной активности бумажных дисков, пропитанных 40% раствором этанола без растительного экстракта. Но эти бумажные диски с этанолом не проявляли никакого антибактериального эффекта (рис. 2г). Нет сомнений в том, что этанол является антисептиком. Возможно, отсутствие антимикробной активности в этом случае было связано с изначальным низким содержанием этанола (40%), диффузией и дальнейшим испарением этанола при инкубации бумажных дисков с бактериальной культурой в течение 18 часов.

Активность экстракта внутренней оболочки плодов водяного ореха была существенно ниже, чем у антибиотика цефотаксима. Поэтому мы предположили, что многим растительным экстрактам при выбранной нами методике экстракции характерна такая же или даже более высокая антимикробная активность. В первую очередь, мы проверили активность экстракта корней табака, растущих в почвенном грунте. Однако этот экстракт не вызывал задержку роста культуры кишечной палочки (рис. 2д). Далее было решено испытать экстракты бородачатых корней табака, которые проявили довольно высокую активность, но меньшую, чем антибиотик цефотаксим (рис. 2е). Таким образом, мы получили весьма противоречивые данные, показывающие антибактериальную активность в бородачатых корнях табака, тогда как таковая отсутствовала у корней дикого типа. В то же время, необходимо иметь в виду, что бородачатые корни в отличие от обычных корней, не обладают какой-либо устойчивостью к бактериальным инфекциям и вряд ли содержат антимикробные метаболиты. Полученные нами данные, скорее всего, связаны с тем, что бородачатые корни табака выращивались на питательной среде с добавлением цефотаксима. Вероятно, в тканях бородачатых корней данный антибиотик накапливался, а при обработке спиртом выделялся в экстракт. Действительно, экстракты бородачатых корней витании [Михайлова и др., 2017], растущие на среде без добавления цефотаксима не обладали антибактериальной активностью (рис. 2ж). Исходя из этого мы предполагаем, что антибактериальная активность бородачатых корней табака была обусловлена антибиотиком цефотаксимом.

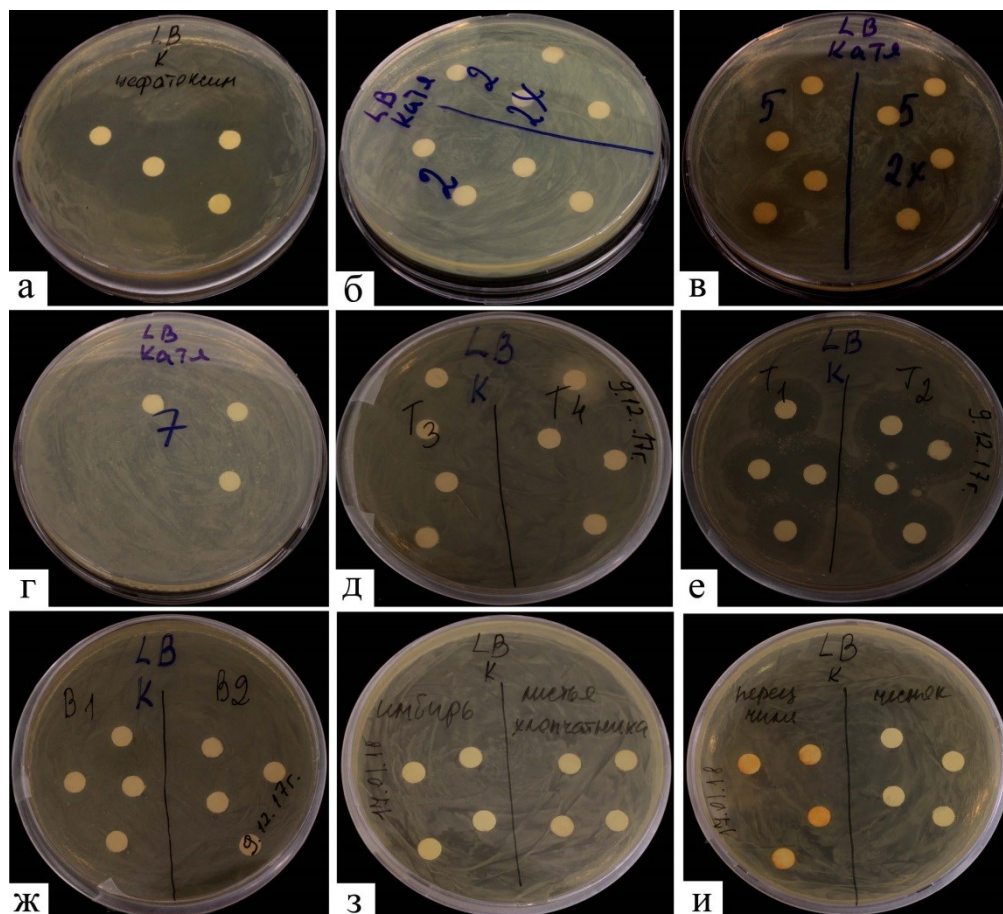


Рис. 2. Определение антибактериальной активности: а – цефотаксим, б – экстракт семян *T. sibirica*, в – экстракт эндокарпия плодов *T. sibirica*, г – 40% этанол, д – экстракт корней табака растущих на почве, е – экстракт бородатых корней табака, растущих на среде МС с добавлением цефотаксима, ж – экстракт бородатых корней витании, растущих на среде МС без добавления антибиотиков, з – экстракт корней имбиря (слева) и листьев хлопчатника (справа), и – экстракт плодов перца чили (слева) и луковиц чеснока (справа).

В арсенале научной и традиционной медицины имеется множество растений, обладающих антимикробной активностью. К примеру, листья хлопчатника содержат госсипол, который по некоторым данным [Бурбелло и др., 2005] может применяться в качестве антибактериального средства. Однако этанольный экстракт листьев хлопчатника не задерживал рост *E. coli* (рис. 2з). Действительно, имеются сведения, что госсипол обладает, прежде всего, противовирусным свойством [Егаян и др., 2013] и оказывает негативное влияние на грамположительные бактерии [Бурбелло и др., 2005], в то время как, кишечная палочка является грамотрицательной бактерией.

Для лечения инфекционных болезней в народе довольно часто применяют имбирь [Куликова, 2011]. Однако спиртовой экстракт имбиря при использовании выбранного нами метода выделения (с дополнительной процедурой прогревания экстракта) также не показал антибактериальной активности (рис. 2з). Возможно, это объясняется тем, что имбирь, прежде всего, обладает противовоспалительным свойством, а не антибактериальным действием [Ермакова и др., 2016].

Для борьбы с микроорганизмами в домашних условиях также используют перец чили и чеснок. Однако в наших исследованиях их спиртовые экстракты также не показали подобную активность (рис. 2и). Это не значит что в имбире, перце чили и чесноке нет метаболитов с антибактериальной активностью. Возможно, что при использованном нами

методе экстракции такие соединения не выделяются, или же разрушаются при нагревании. В связи с этим, представляет большой интерес продолжение наших исследований с применением различных методов получения растительного экстракта, с применением других экстрагирующих растворов и с использованием других групп микроорганизмов, в том числе и грибов. К примеру, для экстракции можно использовать метанол, воду и другие растворители. Так ранее было показано, что использование метилового спирта вместо этилового способствовало изменению антибактериальной активности вытяжки плодов водяного ореха [Kaur et al., 2012]. В этапе выпаривания из экстракта спирта нагреванием также нет необходимости, так как бумажные диски, пропитанные 40% этиловым спиртом, в наших исследованиях не оказывали влияния на рост бактерий. Этим способом можно исключить негативный эффект нагревания на метаболиты водяного ореха с антимикробной активностью.

Таким образом, нами показано, что эндокарпии водяного ореха содержат метаболиты с антибактериальной активностью. Молекулярная природа веществ с такой активностью в плодах водяного ореха неизвестна. Это могут быть как вторичные метаболиты, такие как, алкалоиды, флавоноиды, сапонины, танины, фотобаланины, антрахиноны и другие [Kaur et al., 2012], так и первичные метаболиты, к примеру, белки или пептиды с антимикробной активностью [Kovalyova et al., 2006].

Работа выполнена с использованием оборудования РЦКП "Агидель" и УНУ "КОДИНК".

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдул-Хафиз И.Й., Егоров М.А., Сухенко Л.Т. Антибактериальная активность эфирного масла и спиртовых экстрактов аира болотного (*Acorus calamus*) и верблюжьей колючки (*Alhagi pseudalhagi*) собранных в Астраханской области // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2011. Т. 77. № 3. С. 50-53.
2. Арефьева О.А., Дубков А.А. Исследование чувствительности патогенных культур и грибов к спиртовым экстрактам ряски // В сборнике: Энерго- и ресурсосберегающие экологически чистые химико-технологические процессы защиты окружающей среды сборник докладов II Международной научно-технической конференции. Белгородский государственный технологический университет им. В.Г. Шухова. 2016. С. 253-256.
3. Берестенко Е.Н. Жизнеспособность семян видов рода *Trapa* Приморского края при различных условиях хранения. Вестник ДВО РАН. 2011. №2. С. 151–154..
4. Бурбелло А.Т., Шабров А., Денисенко П. Современные лекарственные средства. Клинико-фармакологический справочник практического врача. 2005. Нева. 896 с.
5. Глушенкова А.И. Госсипол, его производные и их использование // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 1994. № 5-6. С. 7-9.
6. Еганян Г.А., Арутюнян С.К., Григорян С.С., Хизанян Н.С., Сукиасян С.М., Геворгян Ж.К., Максудян Н.А., Гаспарян А.З., Донбаян Д.А., Амбарцумян К.Г., Папоян Ж.Р., Караханян А.С., Карапетян М.Г., Казарян Э.Р. Лечение гриппа и других респираторных инфекций препаратом кагоцел // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2013. №4. С. 72-76.

7. Ермакова В.А., Самылина И.А., Ковалева Т.Ю., Бобкова Н.В. Корневища имбиря лекарственного: научное обоснование применения в современной медицине и подходы к стандартизации сырья // Традиционная медицина. 2016. V. 44. №1. С. 19–32.
8. Комарова Е.А., Пластун В.О., Райкова С.В., Дурнова Н.А. Изучение антимикробной активности водных растворов спиртового экстракта травы одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* Wigg.) // Бюллетень Ботанического сада Саратовского государственного университета. 2015. №13. С. 65–68.
9. Красная книга Республики Беларусь: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений. Мн. Красная книга Республики Беларусь: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений растения. 2006.
10. Краснов Е.А., Каминский И.П., Кадырова Т.В., Пехенько В.Г., Адекенов С.М. Антимикробная активность экстрактов из надземной части *Centaurea scabiosa* (Asteraceae) // Растительные ресурсы. 2012. Т. 48. №2. С. 262–266.
11. Куликова В.Н. Имбирь – универсальный домашний доктор. 2011. Москва. 64с.
12. Кулуев Б.Р., Артюхин А.Е., Шевченко А.М., Михайлова Е.В. Водяной орех плавающий *Trapa* L.: биология, ареал распространения и исследование его изолированных популяций в озерах Нуримановского района Республики Башкортостан // Биомика. 2017. Т. 9. №2. С. 101–118.
13. Матвеевко Е.В., Величко Н.А., Боер И.В. Антибактериальная активность водных и водно-спиртовых экстрактов древесной зелени можжевельника сибирского // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. 2014. №12. С. 224–226.
14. Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р., Ясыбаева Г.Р., Чемерис А.В. Создание культур бородачатых корней *Withania somnifera* и оценка параметров их роста при выращивании на твердых и жидких питательных средах // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2017. Т. 13. №2. С. 40–45.
15. Мулдашев А.А. Водяной орех сибирский *Trapa sibirica* Fler. // Красная книга Республики Башкортостан: в 2 т. Т. 1: Растения и грибы. – 2-е изд., доп. и переработ. – Уфа: МедиаПринт, 2011. С. 182.
16. Шевченко А.М., Артюхин А.Е., Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р. Современное состояние изолированных популяций водяного ореха плавающего *Trapa* L. в озёрах Нуримановского района Республики Башкортостан // Редкие и исчезающие виды животных и растений Республики Башкортостан. 2017. Вып. 18. С. 30–46.
17. Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C., Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method // American Journal of Clinical Pathology. 1966. V. 45. P. 493–496.
18. Kaur G., Singh J., Arshi A., Bala M., Kumar M. *Trapa natans* as green drug to pathogenic *Escherichia coli* // International Research Journal of Pharmacy. 2012. V. 3. P. 209–212.
19. Kovalyova V.A., Gout I.T., Gout R.T. Characteristics of defensin-like proteins from scots pine seedlings // Biopolymers and Cell. 2006. V. 22. № 2. P. 126–131. DOI:10.7124/bc.000726