

АНТИБІОПЛІВКОВА ДІЯ ЕФІРНИХ ОЛІЙ РІЗНИХ ХЕМОТИПІВ *ACHILLEA MILLEFOLIUM* L. ЩОДО КЛІНІЧНИХ ІЗОЛЯТІВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

ДВНЗ «Ужгородський національний університет» (м. Ужгород, Україна)

yevhenii.hoblyk@uzhnu.edu.ua

Бактеріальні біоплівки є одним із провідних чинників персистенції мікроорганізмів, розвитку антибіотикорезистентності та хронізації інфекційних процесів. У зв'язку зі зростанням поширеності біоплівкотвірних штамів бактерій актуальним напрямом досліджень є пошук природних речовин із антибіоплівкотвірними властивостями. Одним із перспективних джерел таких сполук є ефірні олії, біологічна активність яких значною мірою залежить від їхнього фітохімічного профілю. Мета дослідження – дослідити антибіоплівкотвірні властивості ефірних олій *Achillea millefolium* L., отриманих з рослин різних популяцій Закарпатської області. Ефірні олії одержували методом гідродистиляції з рослинної сировини *Achillea millefolium* L., зібраної у п'яти локалітетах Закарпатської області: Анталовецька поляна, Колочава, Ужок, Ужгород та Хуст. Фітохімічний склад ефірних олій досліджували методом газової хроматографії. Антибіоплівкові властивості оцінювали на біоплівкотвірних клінічних ізолятах *Staphylococcus aureus*. Визначали вплив ефірних олій у концентраціях 0,01; 0,05 та 0,1% як на процес формування бактеріальної біоплівки, так і на деструкцію попередньо сформованих біоплівок. Кількісну оцінку здійснювали методом забарвлення кристалічним фіолетовим із подальшим спектрофотометричним визначенням оптичної густини. Встановлено, що всі досліджувані ефірні олії характеризувалися антибіоплівковою активністю щодо *S. aureus*, проте її виразність залежала від локалізації популяції рослин. Найвищу активність виявлено для ефірної олії рослин з Анталовецької поляни: пригнічення формування біоплівки становило 54,74–77,35%, а деструкція сформованої біоплівки – 51,26–76,50%. Високий рівень активності також встановлено для ефірних олій рослин, зібраних в околицях Ужгорода. Найменш виражений антибіоплівковий ефект спостерігали для зразків із Хуста. Збільшення концентрації ефірних олій супроводжувалося статистично значущим посиленням їхньої антибіоплівкової дії. Таким чином встановлено, що ефірні олії *Achillea millefolium* L. володіють антибіоплівкотвірним потенціалом щодо *Staphylococcus aureus*, впливаючи як на формування бактеріальних біоплівок, так і на деструкцію вже сформованих структур. Найвищу активність продемонстрували зразки, отримані з рослин Анталовецької поляни та Ужгорода. Виявлена міжпопуляційна варіабельність антибіоплівкової дії може бути пов'язана з відмінностями у фітохімічному складі ефірних олій, що формуються під впливом екологічних умов зростання. Отримані результати обґрунтовують перспективність подальшого дослідження ефірних олій *A. millefolium* L. як природних компонентів засобів, спрямованих на контроль біоплівкотвірних мікроорганізмів.

Ключові слова: антибіоплівкотвірна активність, мікробна резистентність, ефірні олії, антимікробна активність, рослинні речовини, популяції рослин.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Дослідження виконувалося відповідно до плану науково-дослідних робіт, і є фрагментом НДР «Мікробіологічні, біохімічні та біотехнологічні аспекти використання лікарських рослин та продуктів на їх основі щодо антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів в умовах різних біологічних систем» (номер державної реєстрації 0120U100516).

Вступ.

Значною проблемою сьогодення залишаються запальні захворювання, спричинені антибіотикорезистентними мікроорганізмами. Зниження ефективності антибіотикотерапії пов'язане з швидким поширенням стійкості мікроорганізмів до антибіотиків, а також із їхнім нераціональним застосуванням у різних сферах діяльності людини. Зростання стійкості мікроорганізмів до антимікробних препаратів обумовлено значним ступенем їх адаптаційної здатності. Зокрема, одним із найдієвіших механізмів, який дозволяє бактеріям адаптуватись до антимікробних препаратів є здатність до формування біоплівки.

Бактеріальна біоплівка є складноорганізованою формою існування мікроорганізмів, яка володіє високим рівнем резистентності до антимікробних препаратів. Біоплівкотвірні збудники опортуністичних інфекцій представляють значну проблему у лікуванні запальних захворювань викликаних умовно патогенними мікроорганізмами. Запальні процеси спричинені біоплівкотвірними бактеріями викликають персистуючі запальні процеси, які мають здатність до хронізації [1]. Утворення біоплівки є адаптивним механізмом бактерій і вважається значним фактором вірулентності, оскільки 80% усіх бактеріальних інфекцій у людей викликані біоплівками [2].

Антибіотики й надалі є основними засобами лікування інфекційних хвороб, водночас особливості актуальності набуває пошук альтернативних препаратів, здатних проявляти виражену бактерицидну або бактериостатичну дію. Та володіти здатністю до дезінтеграції бактеріальної біоплівки. Перспективним напрямом у цьому контексті є дослідження природних сполук рослинного походження, зокрема ефірних олій.

Деревій звичайний (*Achillea millefolium* L.) – один із найвідоміших і найпоширеніших видів рослин, який понад 3000 років входить до числа найбільш використовуваних видів рослин як у народній, так і в традиційній медицині [3], головним чином для лікування ран, проблем із травленням, респіраторних інфекцій та захворювань шкіри, а також, серед іншого, для лікування захворювань печінки та як легкий заспокійливий засіб [4]. Фармакологічні ефекти зумовлені наявністю кількох хімічних компонентів, ефірних олій, сесквітерпенів, фенольних сполук тощо [5]. Зокрема, було висловлено припущення, що наявність різних вторинних метаболітів, таких як феноли та флавоноїди, відповідає за антибактеріальну активність деревію [6].

У наших попередніх дослідженнях була показана антимікробна активність речовин рослинного походження [7], в тому числі екстрактів деревію щодо ізолятів умовно-патогенних мікроорганізмів.

Незважаючи на наявність спільних рис у біологічній активності ефірних олій різних рослин, їхній хімічний склад може суттєво відрізнятися навіть у межах одного виду. Такі відмінності зумовлені умовами зростання рослин, кліматичними та географічними факторами, а також особливостями хемотипу, що, своєю чергою, впливає на рівень та характер їхньої біологічної активності. Отже, актуальним залишається встановлення хемотипу рослини та ефірної олії, яка проявляє антимікробний та антибіоплівкотвірний ефект, оскільки саме фітохімічний склад ефірної олії визначає її фармакологічні властивості та ефект її застосування.

Мета дослідження.

Дослідити антибіоплівкотвірні властивості ефірних олій *Achillea millefolium* L., отриманих з рослин різних популяцій Закарпатської області.

Об'єкт і методи дослідження.

Рослини різних популяцій виду *Achillea millefolium* L. збирали у п'яти локалітетах Карпатського регіону: Анталовецька поляна, Колочава, Ужок, Ужгород, Хуст.

Характеристика локалітетів збору рослин *Achillea millefolium* L., з яких виготовляли ефірні олії:

Локалітет 1 розташований на горі Анталовецька Поляна (960 м н. р. м.) у межах відрогів Вигорлат-Гутинського вулканічного хребта; умови місцезростання характеризуються достатнім зволоженням, помірною інсоляцією та переважанням бурих гірсько-лісових ґрунтів вулканічного походження.

Локалітет 2. розташований в околицях с. Колочава у заплаві р. Теребля (500–550 м н. р. м.); умови місцезростання характеризуються достатнім зволоженням, високою інсоляцією та алювіальними лучними ґрунтами. Локалітет 3. розташований в районі Ужогоцького перевалу на межі Закарпатської та Львівської областей (850м н. р. м.); умови місцезростання характеризуються прохолодним вологим кліматом, достатнім зволоженням, помірною інсоляцією та бурими гірсько-лісовими і дерново-буроземними ґрунтами.

Локалітет 4. розташований в передмісті м. Ужгород, поблизу мікрорайону Доманинці (130-150 м н. р. м.); умови місцезростання характеризуються помірним зволоженням, високою інсоляцією та бурими

лісовими й дерновими ґрунтами передгірної частини Закарпатської низовини.

Локалітет 5. Розташований на Замковій горі в м. Хуст (300–350 м н. р. м.); умови місцезростання характеризуються високою інсоляцією, помірним зволоженням та бурими лісовими ґрунтами вулканічного походження.

Ідентифікацію рослин здійснювали за комплексом морфологічних властивостей та із врахуванням екології зростання. Рослини висушували до сталої маси. Екстракцію ефірної олії здійснювали шляхом гідродистиляції в апараті типу Клевенджера з використанням суміші гексану для збору на підприємстві *Calendula, Nova Lubovna* (Словаччина) на замовлення ДВНЗ «Ужгородський національний університет». Ефірна олія зберігалася під N_2 при $+4^\circ$ у темному місці. Визначення якісного складу ефірних олій проводили методом газової хроматографії з використанням газового хроматографа Carlo Erba Vega на капілярній колонці DB-WAX, 30 м. Компоненти ефірної олії були ідентифіковані за часом їхнього утримання. Стандарти для порівняння ефірних олій використані Extrasynthese Ltd. і Sigma-Aldrich. Відсоток одиночних хроматографічних піків вимірювали за відношенням площі поодиноких піків до їхньої загальної площі. Результати дослідження представлені у відсотках.

Тест культури. Для проведення досліджень використовували референтні музейні культури ATTC (American Type Culture Collection, USA) та клінічні ізоляти *S.aureus*. Для тестування антибіоплівкотвірної та антимікробної активності були відібрані біоплівкотвірні ізоляти, бактерій роду *Staphylococcus*, що характеризувались стійкістю до декількох класів антибіотиків, проведена їх хемотаксономічна та ПЛР ідентифікація, аналіз генів, що асоційовані з біоплікоутворенням.

Вивчення деструкції бактеріальної біоплівки під впливом речовин рослинного походження. Здатність до деструкції бактеріальної біоплівки проводили у 96-лункових мікропланшетах (Greiner-BioOne, Austria) згідно методики [8]. Готували бактеріальну суспензію біоплівкотвірних ізолятів *S.aureus* у бульйоні. 180 мкл бульйонної суспензії вносили у лунки і додавали 20 мкл рослинних екстрактів у диметилсульфоксиді так, що концентрація розчинів у лунках становила 0,01%; 0,05% та 0,1%.

Через 24 години після культивування при $37^\circ C$, мікропланшети промивали дистильованою водою 3–5 разів, фарбували 0,1% кристалом фіолетом протягом 20 хв. Сушили при кімнатній температурі 2 год., після чого додавали 200 мкл 30% розчину оцтової кислоти. Визначали оптичну густину спектрометрично при довжині хвилі 550 нм на спектрофотометрі Synergy HT (Biotek, USA). Негативні контролю: 180 мкл суспензії бактерій+20 мкл спирту (етилового або метилового відповідно); 180 мкл бактеріальної суспензії в бульйоні+20мкл диметилсульфоксиду.

Визначення деструкції біоплівки на мікробних біоплівках. Вивчення чутливості мікроорганізмів, що перебувають у біоплівковій формі, до екстрактів лікарських рослин та ефірних олій проводили на мікробних біоплівках, які вирощені у 96 лункових мікропланшетах. Готували бактеріальну суспензію біоплівкотвірних ізолятів *S.aureus* у бульйоні 0,5 McFarland стандарту $1,5 \times 10^8$ КУО/мл. 200 мкл бульйонної суспензії

вносили у лунки та культивували при 37°C 24 год. Після 24 год інкубації мікропланшети триразово відмивали від планктонних (неприкріплених) мікроорганізмів стерильною водою і вносили 180 мкл бульйону і 20 мкл екстрактів рослин або ефірних олій так, що концентрація розчинів у лунках становила 0,01%; 0,05%; та 0,1%. Після 24 годинної експозиції рідину зливали, лунки промивали стерильною водою, фарбували протягом 20 хв. 0,1% розчином кристалію виолетової. Після чого лунки знову промивали водою 4 разово, використовуючи 200 мкл води на одну лунку. Для екстракції барвника із клітин у лунки додавали по 200 мкл 30 % оцтової кислоти. Експозиція складала 20 хв. При кімнатній температурі. Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі Synergy HT (Biotek, USA) при довжині хвилі 550 нм.

Негативні контролю: 180 мкл суспензії бактерій+20 мкл спирту (етилового або метилового відповідно); 180 мкл суспензії+20мкл диметилсульфоциду. Більше, ніж 50% пригнічення утворення біоплівки вважали достовірним. Відсоток інгібування біоплівкоутворення обраховували за формулою [8]:

$$\text{інгібування біоплівки (\%)} = 100 \times \frac{\text{Оп.густ.контролю} - \text{Оп.густ.взірця}}{\text{Оп.густ.контролю}}$$

Результати дослідження та їх обговорення.

Дослідження з вивчення впливу ефірних олій *Achillea millefolium* L. на формування біоплівки показало, що найвищий антибіоплівкотвірний ефект спостерігали за дії ефірних олій з рослин зібраних на Анталовецькій поляні: вже за концентрації 0,01%, виявляли зниження біоплівкоутворення на 54,74% (табл. 1-2). Із підвищенням концентрації ЕО, ступінь впливу ЕО на бактеріальну біоплівку підвищувався й досягав 77,35% при застосуванні концентрації ЕО 0,1%. Високий рівень антибіоплівкотвірної активності встановлений і за умов дослідження ЕО з рослин рослин популяції 4 (Ужгород). Спостерігали зниження інтенсивності формування біоплівки на 54,31±1,31% за дії 0,01% ЕО. Із підвищенням концентрації (0,1 %) ступінь антибіоплівкотвірної активності зростає до 73,89±2,61%. Найнижчий із досліджуваних ЕО антибіоплівкотвірний ефект спостерігали за дії олії популяції 4 (Хуст). За дії 0,1% спостерігали зниження формування біоплівки до 53,0% проти контролю (табл. 3). Отже всі досліджувані ЕО олії *Achillea millefolium* L. знижували ступінь формування біоплівки. Водночас суттєва різниця антибіоплівкотвірного ефекту показує, що дані властивості залежать від фітохімічного складу ЕО.

При дослідженні впливу ефірних олій на сформовану біоплівку встановлена найвища активність також була характерна ЕО рослин зібраних на Анталовецькій поляні (табл. 4-5, рис.). Рівень антибіоплівкотвірного ефекту становив 76,5±1,31% за дії 0,1% концентрації ЕО. При зниженні концентрації ЕО до 0,01% ступінь антибіоплівкотвірного ефекту знижувалась та становила 51,26±1,5%. Дещо нижчий, водночас високий рівень антибіоплівкотвірної активності встановлений при застосуванні ЕО популяції Ужгород. При впливі ЕО *Achillea millefolium* L. популяції Ужгород (0,1%) на сформовану 48-годинну біоплівку стафілококу, реєстрували її деструкцію на 71,70±1,99%. Із зниженням концентрації олії, спостерігали знижен-

ня інтенсивності деструкції біоплівки, в той же час при концентрації 0,01% спостерігали її дезінтеграцію на 50,69%. Найнижчий рівень антибіоплівкотвірної активності встановлений для ЕО популяції 3 та 5.

Таблиця 1 – Вплив ефірних олій на формування бактеріальної біоплівки *S. aureus*, од.опт.густ, $\bar{x} \pm SD$

Ефірна олія № п/п	0,01	0,05	0,1
<i>Achillea millefolium</i> L. 1 Анталовецька поляна	1,73±0,05	1,38±0,07	0,85±0,15 ^e
<i>Achillea millefolium</i> L. 2 Колочава	2,55±0,05	1,75±0,05	1,15±0,10 ^a
<i>Achillea millefolium</i> L. 3 Ужок	2,58±0,07	1,83±0,06	1,35±0,01 ^d
<i>Achillea millefolium</i> L. 4 Ужгород	1,75±0,05	1,58±0,03	1,00±0,10 ^e
<i>Achillea millefolium</i> L. 5 Хуст	2,85±0,05	2,25±0,05	1,75±0,10 ^d

Примітки: P<0,05 у порівнянні з контролем (бульйонна культура).

Згідно даних наукових досліджень, антибіоплівкотвірні властивості екстрактів *Achillea millefolium* L. виявлено у тесті з кристалічним фіолетовим. Зокрема, показано, що екстракти суттєво пригнічували початкове прикріплення клітин та утворення біоплівки, але вплив на зрілі біоплівки був слабшим. Ефекти залежали від дози та штаму, що було підтверджено флуоресцентною мікроскопією. Ацетоновий екстракт продемонстрував найвиразнішу антибіоплівкову активність. Біоплівки клінічних штамів *S. aureus* S3 та S2 були найбільш чутливими (інгібування ≥76% та ≥72% за всіх протестованих концентрацій відповідно). Найвища концентрація загальних флавоноїдів була виміряна в ацетоновому екстракті (100,01±3,13 мг RUE/г). Крім того, екстракти зменшили бактеріальну автоагрегацію деяких штамів. Ці результати свідчать про те, що екстракти *A. millefolium* можуть мати потенційну роль як нові антибіоплівкові агенти щодо патогенних бактерій людини [9].

Таблиця 2 – Вплив ефірних олій на формування бактеріальної біоплівки *S. aureus*, % деструкції біоплівки

Ефірна олія № п/п	0,01	0,05	0,1
<i>Achillea millefolium</i> L. 1	54,74±1,5	63,88±1,99	77,35±2,71
<i>Achillea millefolium</i> L. 2	33,42±1,3	54,31±1,31	69,97±1,31
<i>Achillea millefolium</i> L. 3	32,55±1,99	52,15±1,5	66,05±1,31
<i>Achillea millefolium</i> L. 4	54,31±1,31	58,66±0,75	73,89±2,61
<i>Achillea millefolium</i> L. 5	25,58±1,31	41,25±1,31	53,00±1,30

Примітки: P<0,05 у порівнянні з контролем (бульйонна культура); різними літерами у колонках позначені дані, що статистично достовірно відрізняються P<0,05 відповідно.

В іншій роботі показано, що водноспиртовий екстракт *Achillea millefolium* L. володіє високою антибактеріальною стосовно золотистого стафілокока та може бути використаний як активний інгредієнт у різних рецептурах (косметичних, харчових тощо) [10].

Антибіоплівкотвірні властивості були показані і в інших роботах для видів рослин роду *Achillea*. Ефірна олія *Achillea biebersteinii* була здатна пригнічувати початкову адгезію метицилін-резистентного *S.aureus* (ATCC 43300) при субінгібуючих концентраціях. Автор розглядають ЕО *Achillea biebersteinii* як потенціальний антибактеріальний та антибіоплівковий засіб,

Таблиця 3 – Показники оптичної густини контрольних розчинів при вивченні антибіоплівкотвірної здатності екстрактів лікарських рослин на *S. aureus*, од.опт.густ., $\bar{x} \pm SD$

Диметил-сульфоксид+бульйонна біоплівкотвірна культура <i>S.aureus</i>	Етанол+бульйонна біоплівкотвірна культура <i>S.aureus</i>	Метанол+бульйонна біоплівкотвірна культура <i>S.aureus</i>	Бульйонна біоплівкотвірна культура <i>S.aureus</i>	DMSO+бульйонна біоплівкотвірна культура <i>S.aureus</i>
3,80±0,2	3,85±0,1	3,81±0,15	3,87±0,1	3,83±0,1

Таблиця 4 – Вплив ЕО на сформовану біоплівку *S. aureus*, од.опт.густ., $\bar{x} \pm SD$

Ефірна олія № п/п	0,01	0,05	0,1
<i>Achillea millefolium</i> L. 1 Анталовецька поляна	1,87±0,06	1,50±0,05	0,90±0,05
<i>Achillea millefolium</i> L. 2 Колочава	2,58±0,08	1,85±0,05	1,40±0,05
<i>Achillea millefolium</i> L. 3 Ужок	2,75±0,08	1,96±0,06	1,83±0,13
<i>Achillea millefolium</i> L. 4 Ужгород	1,85±0,08	1,70±0,08	1,08±0,08
<i>Achillea millefolium</i> L. 5 Хуст	2,87±0,05	2,28±0,03	1,91±0,08

Примітки: $P < 0,05$ у порівнянні з контролем (бульйонна культура).

Таблиця 5 – Вплив ефірних олій на сформовану біоплівку *S.aureus*, % деструкції біоплівки, $\bar{x} \pm SD$

Ефірна олія № п/п	0,01	0,05	0,1
<i>Achillea millefolium</i> L. 1	51,26±1,5	60,84±1,30	76,5±1,31
<i>Achillea millefolium</i> L. 2	32,55±1,99	51,69±1,30	63,44±1,30
<i>Achillea millefolium</i> L. 3	28,19±2,26	48,65±1,51	52,13±3,28
<i>Achillea millefolium</i> L. 4	51,69±2,26	55,61±2,26	71,70±1,99
<i>Achillea millefolium</i> L. 5	25,15±0,75	49,38±0,75	49,96±1,99

Примітки: * дані статистично достовірні ($P < 0,05$) щодо контролю (бульйонна біоплівкотвірна культура *S. aureus*).

який функціонує шляхом порушення проникності клітинних мембран, що призводить до загибелі клітин [11].

Описана бактеріостатична активність ЕО *Achillea millefolium* L. щодо *S. aureus* та *P. aeruginosa* в експериментах *in vivo*. Зокрема, оцінка активності загоєння ран за допомогою ЕО показала значне збільшення ($p < 0,05$) відсотка загоєння ран у щурів, які отримували ЕО *Achillea millefolium* L. 1% та 2%, порівняно з групою, яка не отримувала аналогічне лікування. Гістопатологічні дослідження зразків тканини ран на 7-й та 14-й день продемонстрували більше накопичення колагенових волокон, зменшення набряку та запалення, у групах, які отримували ЕО 1% та 2%, порівняно з групою, яка не отримувала лікування [12].

Висновки.

1. Ефірні олії *Achillea millefolium* L., отримані з рослин різних популяцій Закарпатської області, проявляють виражену антибіоплівкотвірну активність щодо клінічних ізолятів *Staphylococcus aureus*, пригнічуючи процес формування бактеріальних біоплівок та сприяючи деструкції вже сформованих біоплівок.

2. Антибіоплівкова активність ефірних олій залежала від їх концентрації та походження рослинної сировини. Для всіх досліджених зразків встановлено достовірне посилення антибіоплівкового ефекту зі збільшенням концентрації від 0,01% до 0,1%. Найвищу здатність до інгібування формування біоплівки продемонстрували ефірні олії з рослин із популяцій

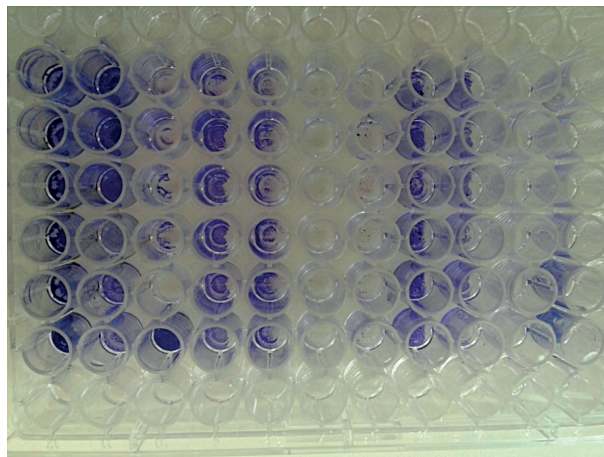


Рисунок – Вплив ЕО *Achillea millefolium* L. на формування біоплівки *S. aureus*.

Анталовецької поляни та Ужгорода. За концентрації 0,1 % вони пригнічували біоплівкоутворення на 77,35% та 73,89% відповідно.

3. Найбільш виражена деструкція сформованих біоплівок також спостерігалася під впливом ефірних олій з Анталовецької поляни та Ужгорода, досягаючи 76,50% і 71,70% відповідно при концентрації 0,1%.

4. Виявлені відмінності в рівні антибіоплівкової активності між окремими популяціями *Achillea millefolium* L. свідчать про важливу роль фітохімічного складу ефірних олій у реалізації їх біологічних властивостей та підтверджують вплив екологічних умов зростання рослин на ефективність отриманих препаратів.

5. Отримані результати підтверджують перспективність використання ефірних олій *Achillea millefolium* L. як джерела природних антибіоплівкових агентів для створення нових антимікробних засобів, спрямованих на боротьбу з біоплівкотвірними антибіотикорезистентними штамми *S. aureus*.

Перспективи подальших досліджень.

Полягають у детальному вивченні механізмів антибіоплівкової дії ефірних олій *Achillea millefolium* L., встановленні взаємозв'язку між їхнім фітохімічним складом та біологічною активністю, а також ідентифікації окремих компонентів, відповідальних за пригнічення формування та деструкцію бактеріальних біоплівок. Перспективним є дослідження ефективності ефірних олій щодо інших клінічно значущих біоплівкотвірних мікроорганізмів, зокрема мультирезистентних штамів, а також оцінка можливостей їх використання у складі нових антимікробних препаратів.

Література

- Stojanović G, Radulović N, Hashimoto T, Palić R. In vitro antimicrobial activity of extracts of four *Achillea* species: The composition of *Achillea clavennae* L. (Asteraceae) extract. J Ethnopharmacol. 2005;101(1-3):185-190. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.026>

2. Wootton-Beard PC, Moran A, Ryan L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Res Int.* 2011;44(1):217–224. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.033>
3. Radusiene J, Gudaityte O. Distribution of proazulenes in *Achillea millefolium* wild populations in relation to phytosociological dependence and morphological characters. *Plant Genet Resour.* 2005;3:136–143. DOI: <https://doi.org/10.1079/PGR200568>
4. Applequist W, Moerman D. Yarrow (*Achillea millefolium* L.): A Neglected Panacea? A Review of Ethnobotany, Bioactivity, and Biomedical Research. *Econ Bot.* 2011;65:209–225. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12231-011-9154-3>
5. Fierascu I, Ungureanu C, Avramescu S, Fierascu R, Ortan A, Soare L, et al. In Vitro Antioxidant and Antifungal Properties of *Achillea millefolium* L. *Rom Biotechnol Lett.* 2015;20:10626–10636.
6. Faiku F, Haziri A, Mehmeti I, Mehmeti A, Hoti G. In vitro antibacterial activity of different solvent extracts of *Achillea millefolium* (L.) growing wild in Kosovo. *Fresenius Environ Bull.* 2018;27:3878–3883.
7. Kryvtsova MV, Hoblyk YI, Kolesnyk AV, Salamon I, Mihlias VH, Zaiachuk IP. Osoblyvosti farmatsevtichnoi syrovyny likarskykh roslyn: fitokhimichni ta antymikrobnі vlastyvyosti ekstraktiv *Achillea millefolium* L. *Intermedical Journal.* 2024;(2):98–103. DOI: <https://doi.org/10.32782/2786-7684/2024-2-17> [in Ukrainian].
8. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp.* 2011;(47):2437. DOI: <https://doi.org/10.3791/2437>
9. Terzić J, Stanković M, Stefanović O. Extracts of *Achillea millefolium* L. inhibited biofilms and biofilm-related virulence factors of pathogenic bacteria isolated from wounds. *Microb Pathog.* 2025;199:107219. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.107219>
10. Grigore A, Colceru-Mihul S, Bazdoaca C, Yuksek R, Ionita C, Glava L. Antimicrobial Activity of an *Achillea millefolium* L. *Proceedings.* 2020;57:34. DOI: <https://doi.org/10.3390/proceedings2020057034>
11. Al-Shuneigat J, Al-Sarayreh S, Al-Qudah M, Al-Sarairah Y, AlTarawneh I. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil of *Achillea santolina*. *Indian J Nat Sci.* 2019;10(56):17694–17701.
12. Ghasemi MR, Ranjbar A, Tamri P, Pourmoslemi S, Nourian A, Dastan D. In vitro Antibacterial Activity and Wound Healing Effects of *Achillea millefolium* Essential Oil in Rat. *J Pharmacopuncture.* 2023;26(2):167–174. DOI: <https://doi.org/10.3831/KPI.2023.26.2.167>

АНТИБІОПЛІВКОВА ДІЯ ЕФІРНИХ ОЛІЙ РІЗНИХ ХЕМОТИПІВ *ACHILLEA MILLEFOLIUM* L. ЩОДО КЛІНІЧНИХ ІЗОЛЯТІВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Гоблик Є. І., Мандула Р. М.

Резюме. Формування бактеріальних біоплівків є одним із ключових механізмів розвитку антибіотикорезистентності та хронізації інфекційних процесів. У зв'язку зі зростанням поширеності біоплівкотвірних штамів актуальним є пошук природних сполук, здатних пригнічувати утворення та руйнувати вже сформовані біоплівки. Перспективними джерелами таких речовин є ефірні олії *Achillea millefolium* L., біологічна активність яких значною мірою визначається їх фітохімічним складом.

Мета дослідження – дослідити антибіоплівкотвірні властивості ефірних олій *Achillea millefolium* L., отриманих з рослин різних популяцій Закарпатської області.

Для реалізації поставленої мети ефірні олії отримували з рослин *Achillea millefolium* L., зібраних у п'яти локалітетах Закарпатської області (Анталовецька поляна, Колочава, Ужок, Ужгород, Хуст), методом гідродистиляції. Фітохімічний склад ЕО визначали методом газової хроматографії. Антибіоплівкову активність досліджували на біоплівкотвірних клінічних ізолятах *Staphylococcus aureus*. Вивчали вплив ефірних олій у концентраціях 0,01; 0,05 та 0,1% на формування біоплівки та на деструкцію вже сформованої біоплівки за допомогою методу кристалічного фіолетового з подальшим спектрофотометричним визначенням оптичної густини.

Усі досліджувані ефірні олії проявили антибіоплівкову активність щодо *S. aureus*, однак її рівень суттєво залежав від походження рослинної сировини. Найвищу ефективність продемонстрували ефірні олії з рослин популяції Анталовецької поляни, які пригнічували формування біоплівки на 54,74–77,35% та руйнували сформовану біоплівку на 51,26–76,50%. Високу активність також виявили ефірні олії з популяції Ужгороду, тоді як найнижчий антибіоплівковий ефект спостерігався у зразків із Хуста. Зі збільшенням концентрації ефірних олій антибіоплівкова активність достовірно зростала.

Ефірні олії *Achillea millefolium* L. характеризуються вираженими антибіоплівковими властивостями щодо *Staphylococcus aureus*, пригнічуючи як процес формування, так і існуючі бактеріальні біоплівки. Найбільш активними виявилися ефірні олії рослин, зібраних на Анталовецькій поляні та в околицях Ужгорода. Встановлені відмінності свідчать про залежність антибіоплівкової активності від фітохімічного складу ефірних олій, що визначається умовами зростання рослин. Отримані результати підтверджують перспективність використання ефірних олій *Achillea millefolium* L. як компонентів нових антимікробних препаратів, спрямованих на боротьбу з біоплівкотвірними мікроорганізмами.

Ключові слова: антибіоплівкотвірна активність, мікробна резистентність, ефірні олії, антимікробна активність, рослинні речовини, популяції рослин.

ANTIBIOFILM ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS FROM DIFFERENT CHEMOTYPES OF *ACHILLEA MILLEFOLIUM* L. AGAINST CLINICAL ISOLATES OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Hoblyk Y. I., Mandula R. M.

Abstract. The formation of bacterial biofilms is one of the key mechanisms underlying antibiotic resistance and the chronicity of infectious diseases. Due to the increasing prevalence of biofilm-forming strains, the search for natural compounds capable of inhibiting biofilm formation and destroying mature biofilms is of considerable interest. Essential oils of *Achillea millefolium* L. represent a promising source of such compounds, with their biological activity largely determined by their phytochemical composition.

The aim of this study was to evaluate the antibiofilm activity of essential oils obtained from *Achillea millefolium* L. plants collected from different populations of the Transcarpathian region of Ukraine.

Essential oils were isolated by hydrodistillation from plants collected at five localities in the Transcarpathian region (Antalovetska Polyana, Kolochava, Uzhok, Uzhhorod, and Khust). The phytochemical composition of the oils was determined by gas chromatography. Antibiofilm activity was assessed against biofilm-forming clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. The effects of essential oils at concentrations of 0.01%, 0.05%, and 0.1% on biofilm

formation and on the destruction of preformed biofilms were evaluated using the crystal violet assay followed by spectrophotometric determination of optical density.

All tested essential oils exhibited antibiofilm activity against *S. aureus*; however, the level of activity significantly depended on the origin of the plant material. The highest efficacy was demonstrated by essential oils obtained from plants collected at Antalovetska Polyana, which inhibited biofilm formation by 54.74–77.35% and destroyed established biofilms by 51.26–76.50%. High activity was also observed for oils from the Uzhhorod population, whereas the lowest antibiofilm effect was recorded for samples collected in Khust. A significant concentration-dependent increase in antibiofilm activity was observed for all tested oils.

The results indicate that essential oils of *Achillea millefolium* L. possess pronounced antibiofilm properties against *Staphylococcus aureus*, inhibiting both biofilm formation and mature biofilms. The most active samples were obtained from plants collected at Antalovetska Polyana and in the vicinity of Uzhhorod. The observed differences in activity suggest a strong relationship between antibiofilm efficacy and the phytochemical composition of the oils, which is influenced by environmental growing conditions. These findings support the potential application of *Achillea millefolium* essential oils as components of novel antimicrobial agents targeting biofilm-forming microorganisms.

Key words: antibiofilm activity, microbial resistance, essential oils, antimicrobial activity, plant-derived compounds, plant populations.

ORCID кожного автора та його внесок до статті:

Hoblyk Y. I.: <https://orcid.org/0009-0001-8033-5745> ^{ABCD}

Mandula R. M.: <https://orcid.org/0009-0002-3761-6346> ^{CDEF}

Конфлікт інтересів:

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Адреса для кореспонденції

Гоблик Євген Іванович

ДВНЗ «Ужгородський національний університет»

Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Університетська 16а

Тел.: +380953035012

E-mail: yevhenii.hoblyk@uzhnu.edu.ua

А – концепція роботи та дизайн, В – збір та аналіз даних, С – відповідальність за статичний аналіз, D – написання статті, Е – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Ця стаття розповсюджується на умовах ліцензії **Creative Commons Attribution (CC-BY)**, яка дозволяє необмежене використання, поширення та відтворення в будь-якому форматі за умови належного цитування оригінальної роботи © Всі автори, 2026

Стаття надійшла 21.05.2026 року
Стаття прийнята до друку 18.08.2026 року
Опубліковано 29.09.2026 року