

## СКРИНИНГ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ЖИДКИХ ЭКСТРАКТОВ СТЕВИИ РЕБО (*STEVIA REBAUDIANA BERTONI*)

Е. Ф. Семенова<sup>1</sup>, А. С. Веденева<sup>1</sup>, Т. П. Жужжалова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Медицинский институт Пензенского государственного университета,

<sup>2</sup> ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара им. А. Л. Мазлумова

Поступила в редакцию 14.03.2010 г.

**Аннотация.** Антимикробная активность жидких экстрактов листьев стевии составляет 40%, что в 1,4 раза выше в сравнении с нативным клеточным соком. Выявлены микроорганизмы, наиболее чувствительные к изучаемым экстрактивным веществам: *Pantoea agglomerans*, *Myxococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Fusarium solani*, *Aspergillus terreus*. Антибактериальная активность жидких экстрактов и нативного клеточного сока выше у тетраплоидных сортов Услава и София по сравнению с сортом Рамонская сладстена.

**Ключевые слова:** стевия, индикация антимикробного эффекта, микробиологическая активность жидких лекарственных форм.

**Abstract.** Microbiological activity of liquid extracts of stevia leaves is 40% that is 1.4 more than the one of native cell juice. Microorganisms that are most susceptible to the studied extractive substances (*Pantoea agglomerans*, *Myxococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Fusarium solani*, *Aspergillus terreus*) have been revealed. Antibacterial activity of liquid extracts and native cell juice is higher in varieties "Uslada" and "Sofia" compared with diploid variety "Ramonskaya slastyona".

**Keywords:** stevia, antimicrobial effect indication, microbiological activity of fluid medicinal forms.

### ВВЕДЕНИЕ

Среди растений, продуцирующих сладкие вещества, значительный интерес представляет двулистник сладкий (*Stevia rebaudiana Bertoni*), родина которого Южная Америка. Листья стевии в течение столетий использовались жителями местных племен Гуарана и Гаучо, которые называли его Каа-хи («сладкая трава») и добавляли для подслащивания горьких лекарственных средств и чаев [1].

Стевия — многолетнее (у себя на родине и однолетнее в наших условиях) травянистое, ежегодно цветущее растение рода *Stevia*, который включает более 180 видов, относится к семейству Астровые *Asteraceae*, син. Сложноцветные *Compositae* [2].

Стевия Ребо является перспективным антидиабетическим лекарственным растением. Ее листья содержат до 7% тетрациклического дитерпенового гликозида стевииозида, который обладает приторно сладким вкусом: в 300 раз слаще сахарозы [3]. Стевиолгликозиды нетоксичны, низкокалорийны и практически не усваиваются организмом человека.

Данные последних медико-биологических исследований не выявили противопоказаний при ее

использовании. Она может входить в состав пищевых добавок, лекарственных препаратов, ароматических чаев в качестве сладкого агента, может быть рекомендована при сахарном диабете, ожирении, нарушениях углеводного обмена, кариесе, в качестве противокашлевого и успокоительного средства.

Существует опыт применения ее в смеси с сахаром для консервирования пищевых продуктов, который показал, что она является ценным консервантом, так как останавливает развитие плесневых грибов и бактерий [2]. Однако в научной литературе указания на антимикробное действие стевии и продуктов из нее немногочисленны и противоречивы [4].

В связи с недостаточной разработкой методических вопросов определения микробиологической активности нестерильных лекарственных форм одной из главных задач настоящего исследования была индикация антимикробного эффекта нативного клеточного сока и экстрактов стевии.

### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Материалом для исследования служили образцы лекарственного растительного сырья (свежие листья, порошок из воздушно-сухих листьев) 3 сортов (Рамонская сладстена, Услава, София), вы-

ращенные в полевых условиях и закрытом грунте (рис. 1).

Водный экстракт представлял собой настой порошка (1:10), приготовленный в соответствии с требованиями XI Государственной фармакопеи СССР, 1990 [5]. Спиртовой (этанольный) экстракт (1:10) был получен методом дробной мацерации (XI Государственная фармакопея СССР, 1990). Во-



а



б



в

Рис. 1. Листья изучаемых сортов стевии: а — Рамонская сладлена; б — Услава; в — София

дний раствор спиртового экстракта (раствор водорастворимых веществ спиртового экстракта — ВРВ СЭ) получали путем упаривания спирта при 55 °С, а затем разбавления стерильной дистиллированной водой в соотношении 1 : 10.

Индикация антимикробного эффекта нативного клеточного сока, водных и спиртовых экстрактов из лекарственного сырья стевии проводилась путем диффузии в агар на питательной среде для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам (среда АГВ), питательном агаре (ПА), коринебакагааре (КБА), стафилококкагааре (СТА), среде Эндо (СЭ) и агаре Сабура (АС, среда № 2).

В эксперименте использовалось 10 чистых культур микроорганизмов различного таксономического происхождения (названия приведены в соответствии с Изменениями в таксономии и номенклатуре бактерий, 2004): *Sarcina flava*, *Pantoea agglomerans* (*Erwinia herbicola*), *Escherichia coli*, *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Myxococcus sp.*, *Candida sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium solani*. Посев в опытах осуществляли прямыми радиальными штрихами и (или) сплошным газоном, количество вносимого в чашки Петри материала находилось на уровне  $10^2 \dots 10^3$  колониеобразующих единиц. В лунки диаметром 8 мм вносили по 0,05...0,10 мл экстракта (повторность одно — ... шестикратная). Контроли: I — стерильная вода, II — 95 % этиловый спирт, III — без добавления экстрактов и контрольных жидкостей. Культивирование осуществляли при температуре  $29 \pm 1$  °С и 37 °С. Учет результатов проводили через 1...7 суток путем определения диаметра зон задержки (подавления, угнетения, отсутствия) роста, характера роста по штриху.

Угнетение роста по ходу штриха, единичные колонии и прерывистый рост культуры по штриху свидетельствовали о наличии бактериостатического эффекта (БС). Наличие зон отсутствия роста культуры указывало на наличие бактерицидного эффекта (БЦ).

Определение антимикробного действия проводили в сравнении интенсивности роста изучаемых культур в присутствии и в отсутствии нестерильных лекарственных форм из стевии. При этом о наличии антимикробного эффекта действующих веществ в указанных разведениях судили по зоне задержки роста микроорганизмов более 10 мм. Если зона задержки роста (ЗЗР) превышала 25 мм, то микроорганизм считался высокочувствительным к изучаемым экстрактивным и нативным веществам, средней чувствительности, если зона за-

держки роста была от 16 до 25 мм и малочувствительным — от 11 до 15 мм [6].

Частоту проявления антимикробного эффекта выражали как отношение суммы случаев его проявления к общему числу вариантов опыта с учетом повторностей. При этом число вариантов опыта рассматривали как произведение изучаемых факторов, влияющих на проявление антимикробного эффекта (культура микроорганизма, лекарственная форма, питательная среда, сорт).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительные исследования показали, что наиболее чувствительными микроорганизмами являются: *Pantoea agglomerans*, *Мухосoccus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Sarcina flava*, *Escherichia coli*.

Анализ антимикробной активности веществ, использованных в качестве контрольных, показал, что они не оказывали действия на испытываемые микроорганизмы, в случае чистого этанола эффект был выражен очень слабо.

При изучении антибактериального действия лекарственных форм листьев стевии выявлено следующее. Все лекарственные формы обладали

антимикробной активностью, при этом ее проявление зависело от культуры микроорганизма, лекарственной формы, сорта стевии и т.д.

Антибактериальное действие в отношении грамотрицательных микроорганизмов оказалось более выраженным, чем в отношении грамположительных (рис. 2).

Из грамположительных микроорганизмов наиболее чувствительными культурами оказались *Staphylococcus sp.* (44,4% случаев) и *Sarcina flava* (38,5% случаев), а грамотрицательных — *Pantoea agglomerans* (76,9% случаев), *Мухосoccus sp.* (60,0% случаев) и *Escherichia coli* (25,9% случаев). При этом отмечен как бактерицидный эффект (в отношении *Мухосoccus sp.*, *Pantoea agglomerans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus sp.*), так и бактериостатический (в отношении *Staphylococcus sp.*, *Sarcina flava*, *Мухосoccus sp.*, *Pantoea agglomerans*).

Показано, что из исследуемых лекарственных форм наибольшее антибактериальное действие оказывал настой (в 40,0% случаях) и ВРВ этанольного экстракта (в 40,0% случаях), при этом клеточный сок оказывал антибактериальное действие в 26,7% случаях (рис. 3).

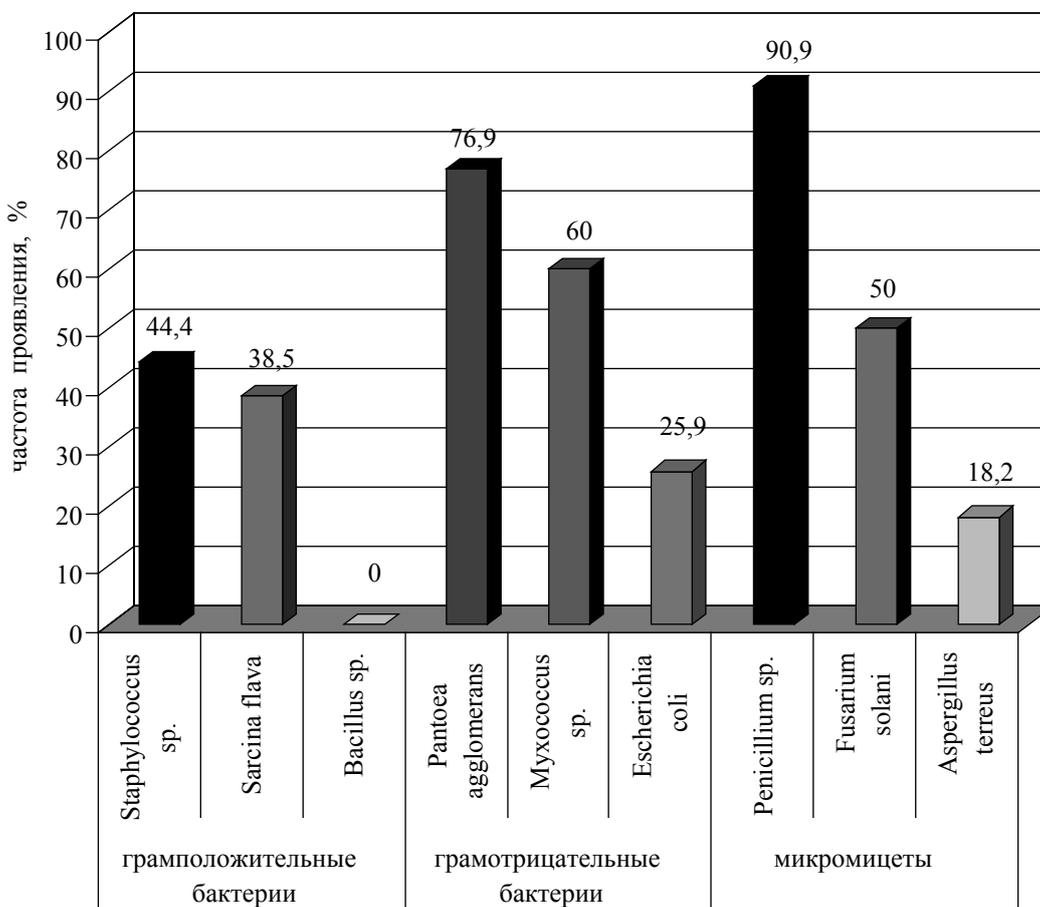


Рис. 2. Антимикробный эффект лекарственных форм стевии

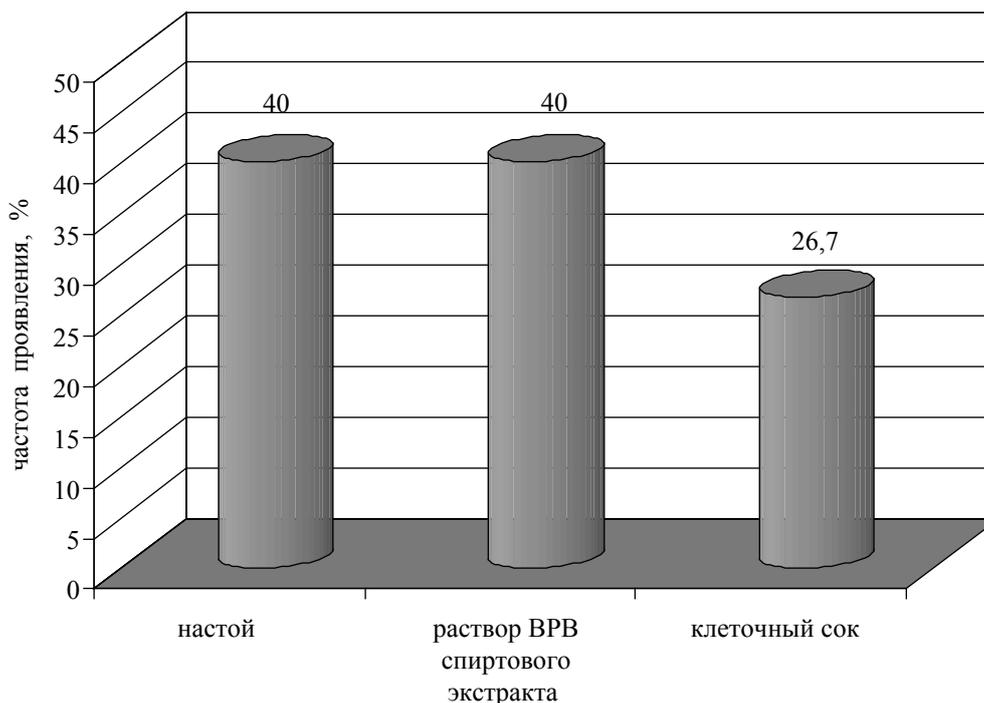


Рис. 3. Частота проявления антибактериального эффекта в зависимости от лекарственной формы

Как известно, на рост и развитие микроорганизмов оказывает влияние состав питательной среды. На средах, элективных для *Staphylococcus sp.* и *Escherichia coli*, т.е. стафилококкагаре и среде Эндо, эффект отсутствовал для данных микроорганизмов. На стафилококкагаре (табл. 1) наблюдался бактерицидный эффект для *Mухосoccus sp.* (75,0% случаев) и *Sarcina flava* (25,0% случаев), а бактериостатический для *Sarcina flava* (50,0% случаев). На среде Эндо наличие бактериостатического эффекта было выявлено в единичном случае для *Sarcina flava*.

На коринебакагаре эффект был выражен для следующих культур: бактерицидный для *Staphylococcus sp.* (50,0% случаев), бактериостатический для *Staphylococcus sp.* (100,0% случаев), *Sarcina flava* (50,0% случаев) и *Pantoea agglomerans* (25,0% случаев).

При использовании питательного агара (табл. 2) для индикации антимикробного эффекта в отношении *Pantoea agglomerans* антибактериальный эффект наблюдался в 100,0% случаев, в отношении *Mухосoccus sp.* — в 54,6% случаев, а *Staphylococcus sp.* — в 26,3% случаев.

При использовании среды АГВ антибактериальный эффект в 100,0% случаев наблюдался в отношении *Mухосoccus sp.* и *Pantoea agglomerans*, в 33,3% случаев — в отношении *Escherichia coli* и в 33,3% случаев — в отношении *Sarcina flava*.

Оценка антибактериальной активности экстрактов и нативного клеточного сока показала, что она выше у сортов Услава и София по сравнению с сортом Рамонская сладстена.

Антимикотическое действие в большей степени выражено в отношении *Penicillium sp.* (90,9%), *Fusarium solani* (50,0%), *Aspergillus terreus* (18,2%).

Таблица 1

Результаты влияния питательной среды на проявление антибактериального эффекта этанольного экстракта листьев стевии сорта София

Питательная среда	<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Sarcina sp.</i>	<i>Mухосoccus sp.</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>
СТА	Рк	БС	БЦ (ЗЗР 10 мм)	Роста нет	Роста нет
КБА	БЦ (ЗЗР 28 мм), БС	БС	Рк	Рк	Рк
СЭ	Роста нет	Роста нет	Роста нет	Рк	Рк

Примечание: Рк — рост, характерный для данной культуры.

Таблица 2

Результаты влияния питательной среды на проявление антибактериального эффекта клеточного сока листьев стевии

Сорт	Питательная среда	<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Sarcina sp.</i>	<i>Mycococcus sp.</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>
Рамонская сладостена	ПА	Рк	Рк	Рк	Рк	БС
	АГВ	Рк	Рк	БЦ (3ЗР 11 мм)	Рк	БЦ (3ЗР 10 мм)
Услава	ПА	Рк	Рк	БС	Рк	БС
	АГВ	Рк	Рк	БЦ (3ЗР 10... 12 мм)	Рк	БЦ (3ЗР 12 мм)
София	ПА	Рк	Рк	Рк	Рк	БС
	АГВ	Рк	БС	БС	БЦ (3ЗР 10 мм)	БЦ (3ЗР 14 мм)

Таблица 3

Результаты влияния лекарственной формы и сорта стевии на проявление антимикотического эффекта

Сорт	Микроорганизм	Настой	ВРВ	Клеточный сок
Рамонская сладостена	<i>Candida sp.</i>	Рк	Рк	Рк
	<i>Fusarium solani</i>	Рк	Рк	Роста нет
	<i>Aspergillus terreus</i>	Рк	Рк	Рк
	<i>Penicillium sp.</i>	Роста нет	БС	БС
Услава	<i>Candida sp.</i>	Рк	Рк	Рк
	<i>Fusarium solani</i>	Роста нет	Рк	—
	<i>Aspergillus terreus</i>	Рк	Рк	Рк
	<i>Penicillium sp.</i>	БС	БС	БС
София	<i>Candida sp.</i>	Рк	Рк	Рк
	<i>Fusarium solani</i>	Рк	Роста нет	—
	<i>Aspergillus terreus</i>	Роста нет	Рк	Рк
	<i>Penicillium sp.</i>	Рк	БС	БС

При использовании настоя был выявлен (табл. 3) микоцидный (фунгицидный) эффект в отношении *Fusarium solani* (в 50,0% случаев), *Aspergillus terreus* (в 50,0% случаев).

В отношении *Penicillium sp.* наблюдался микоцидный эффект в 50,0% случаев и микостатический — в 50,0% случаев. При использовании раствора водорастворимых веществ этанольного экстракта были отмечены микоцидный эффект в отношении *Fusarium solani* (в 25,0% случаев) и микостатический в отношении *Penicillium sp.* (в 100,0% случаев), а при использовании нативного клеточного сока в отношении *Fusarium solani* наблюдался микоцидный эффект (в 33,3% случаев).

Таким образом, полученные экспериментальные данные по индикации антимикробного эффекта стевии в условиях *in vitro* свидетельствуют о его наличии. Проявление микробиологической актив-

ности клеточного сока, водных и спиртовых экстрактов из листьев выражено в различной степени. Полученные результаты позволят уточнить ряд методических аспектов по контролю качества, микробиологической оценке лекарственных форм стевии Ребо.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наиболее чувствительными культурами микроорганизмов к антимикробным веществам стевии являются *Pantoea agglomerans* (син. *Erwinia herbicola*), *Mycococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Sarcina flava*, *Escherichia coli* (в порядке уменьшения антибактериального эффекта) и *Fusarium solani*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium sp.* (в порядке уменьшения антимикотического эффекта).

Для индикации антимикробного эффекта стевии лучшими питательными средами являются:

питательный агар, коринебакагар, стафилококкагар, агар Сабуро. На стафилококкагаре и коринебакагаре эффект был выявлен в 75 % случаев (для этанольного экстракта), на питательном агаре — в 36,36 %, на агаре Сабуро — в 35,29 % случаев (для всех изучаемых лекарственных форм).

Бактерицидный эффект отмечен при использовании настоя (частота проявления составила 26,7 %), бактериостатический эффект — при использовании следующих лекарственных форм: настоя, раствора водорастворимых веществ этанольного экстракта, нативного клеточного сока (частота проявления составила 40,0 %, 40,0 %, 26,7 %, соответственно).

Тенденция влияния сорта прослежена по степени выраженности антимикробного эффекта определенных лекарственных форм. Частота проявления антибактериального эффекта варьировала в пределах 16,7 % ... 66,7 %, антимикотического — в пределах 25,0 % ... 75,0 % случаев. При этом антибактериальная активность экстрактов и нативного клеточного сока выше у сортов Услава и София по сравнению с сортом Рамонская сладстена.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kinghorn, A. D., Soejarto D. D.* Current status of stevioside as a sweetening agent for human use // *Economic and medicinal plant research*. — London: Academic Press, 1985.
2. *Полудённый Л. В., Журавлёв Ю. П.* Заготовка, выращивание и переработка лекарственных растений, 2005—2008 гг. / <http://lekrasprom.ru/cgi-bin/file.cgi?tema=lr&file=39>
3. *Энциклопедический словарь лекарственных растений и продуктов животного происхождения: Учебное пособие / под ред. Г. П. Яковлева и К. Ф. Блиновой, 2 изд., испр. и доп.* — СПб.: СпецЛит, Издательство СПХФА, 2002. — 407 с.
4. *Ляховкин А. Г., Николаев А. П., Учитель В. Б.* Стевия — медовая трава: Растение лекарственное и пищевое в вашем доме. — СПб.: ЗАО «ВЕСЬ», 1999. — 96 с.
5. *Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа, Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР.* — 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1990. — 400 с.
6. *Микробиология: Руководство к лабораторным занятиям: Учебное пособие для студентов фармацевтических ВУЗов и фармацевтических факультетов медицинских институтов / И. Л. Дикий, И. И. Сидорчук, И. Ю. Холупяк и др.* — К.: ИД «Профессионал», 2004. — 594 с.
7. *Билай В. И.* Справочник. Микроорганизмы — возбудители болезней растений / В. И. Билай. — Киев.: Наукова думка, 1988. — 550 с.
8. *Изменения в таксономии и номенклатуре бактерий // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2004.* — Т. 6, №1. — С. 4—9.
9. *Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса.* — М.: Мир, 1997. — 800 с.
10. *Саттон Д.* Определитель патогенных и условно патогенных грибов / Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. — М.: Мир, 2001. — 486 с.

---

*Семенова Елена Федоровна* — доцент кафедры микробиологии, эпидемиологии и инфекционных болезней Медицинского института Пензенского государственного университета; тел.: (8412) 560862 (114), e-mail: sef7@sura.ru

*Semyonova E. F.* — Assistant Professor of the Chair of Microbiology, Epidemiology and Infectious Diseases, Medical Institute of the Penza State University; tel.: (8412) 560862 (114), e-mail: sef7@sura.ru

*Веденева Александра Сергеевна* — интерн Медицинского института Пензенского государственного университета; тел. (8412) 426725, e-mail: alecksashka@inbox.ru

*Vedeneeva A. S.* — intern, Medical Institute of the Penza State University; tel.: (8412) 426725, e-mail: alecksashka@inbox.ru

*Жужжалова Татьяна Петровна* — проф., зав. отделом биотехнологии ВНИИСС им. А. Л. Мазлумова; тел.: (47340) 21803, e-mail: biotechnologiya@mail.ru

*Zhuzhhalova T. P.* — professor, Head of Biotechnology Department, A. L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar; tel.: (47340) 21803, e-mail: biotechnologiya@mail.ru