

СКРИНИНГ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ВОДНЫХ И СПИРТОВЫХ ИЗВЛЕЧЕНИЙ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ БАКТЕРИЙ

Ю. Ю. Гавриченко¹, С. Л. Сафронюк¹, А. М. Кацев¹, О. М. Шевчук²,
Л. А. Логвиненко², С. А. Феськов²

¹ Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского»
ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»

² ФГБУН «Никитский ботанический сад — Национальный научный центр РАН»

Поступила в редакцию 28.09.2021 г.

Аннотация. В работе исследована неспецифическая антимикробная активность 17 водных и спиртовых извлечений из растительного сырья *Echinacea purpurea* (L.) Moench, *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea angustifolia* (DC.) A.Heller, *Echinacea tennessensis* (Beadle) Small, *Calendula officinalis* L., *Coreopsis grandiflora* Hogg ex Sweet, *Hyssopus officinalis* L., *Monarda fistulosa* L., *Monarda didyma* L., *Monarda x hybrida* hort., *Myrtus communis* cv. Южнобережный, *Thymus serpyllum* L., *Thymus vulgaris* cv. Фантазия, *Thymus striatus* cv. Юбилейный, *Satureja montana* L., *Rosmarinus officinalis* cv. Горизонт, *Vitex agnus-castus* L., заготовленного на территории ФГБУН «Никитский ботанический сад-Национальный научный центр РАН» с использованием природного светящегося штамма *Aliivibrio fischeri* F1 и генно-инженерного люминесцентного штамма *Escherichia coli* MG1655 (Xen`::lux). В результате скрининга были выявлены экстракты с выраженной неспецифической антимикробной активностью, как в водной, так и в спиртовой форме, к которым отнесли *Coreopsis grandiflora*, *Thymus vulgaris* cv. Фантазия и *Monarda x hybrida*. Их эффективные разведения, снижающее уровень люминесценции на 50% ($ЭР_{50}$), составили 1:100. Умеренная антимикробная активность наблюдалась у экстрактов *Thymus serpyllum*, *Satureja montana*, *Monarda fistulosa*, *Myrtus communis* cv. Южнобережный, *Rosmarinus officinalis* cv. Горизонт, *Hyssopus officinalis*, *Monarda didyma* и *Thymus striatus* сорт Юбилейный, *Vitex agnus-castus*, $ЭР_{50}$ были равными от 1:25 до 1:100 в водных и спиртовых формах. Эффективные разведения экстрактов *Echinacea angustifolia* и *Calendula officinalis* заняли промежуточные значения и составили 1:50. К экстрактам с низким антимикробным потенциалом отнесли *Echinacea purpurea*, *E. pallida*, *E. tennessensis*, минимальные значения $ЭР_{50}$, которых были равными 1:25. Установлено, что ингибирующая активность большинства экстрактов растений усиливалась, при использовании в качестве растворителя 70%-ый этиловый спирт. Полученные результаты сравнивали с действием гентамицина сульфата в исходной концентрации 40 мг/мл, $ЭР_{50}$, которого составило 1:50. Определено, что природный штамм бактерий *A. fischeri* F1 обладал большей чувствительностью, как к водным, так и к спиртовым экстрактам растений, в сравнении с рекомбинантным штаммом *E. coli* MG1655 (Xen`::lux).

Ключевые слова: антимикробная активность, биолюминесценция, витекс, иссоп, календула, мирт, кореопсис, монарда, розмарин, тимьян, эхинацея, чабер, *Aliivibrio fischeri* F1, *Escherichia coli* MG1655

Несмотря на то, что развитие органической химии привело к предпочтительному использованию синтетических продуктов, ВОЗ сообщает, что в большинстве развивающихся стран, около 80% граждан, по-прежнему применяют средства традиционной медицины для профилактики и лечения заболеваний, и около 50% всех прописываемых в мире лекарств получают из растений [1, 2, 3]. В

последние десятилетия проблема поиска соединений, обладающих антибактериальным действием, стоит наиболее остро ввиду неуклонно растущей антибиотикорезистентности патогенов человека [3]. В свою очередь, растения богаты множеством вторичных метаболитов, таких как дубильные вещества, терпеноиды, алкалоиды и флавоноиды, обладающих антимикробными свойствами [4].

Оценка антимикробной активности веществ, в том числе полученных из растений, *in vitro*, про-

водится с использованием разнообразных подходов [5]. К наиболее распространенным методам относится метод диффузии в агар, являющийся фармакопейным [6]. Однако, он имеет ряд ограничений, в особенности, для определения активности растительных экстрактов. Поскольку агар, который является матрицей для тестирования в диффузионных методах, готовится на водной основе, происходит снижение степени диффузии неполярных соединений в его слой, в отличие от полярных. Однако, наиболее высокий уровень антимикробной активности в экстрактах растений показывают комплексы соединений с промежуточной полярностью [7, 8]. Кроме того, данный метод требует больших временных и финансовых затрат, что служит ограничением при проведении скрининговых исследований [9].

Ввиду этого, появляется необходимость в поиске более универсальных методов оценки антибактериальной активности. Одними из современных подходов, которые могут быть эффективными в этом направлении, являются методы, основанные на регистрации бактериальной люминесценции. Биотесты на основе биолюминесцентных бактерий нашли широкое распространение в экологических и токсикологических исследованиях [10]. Согласно данным исследований последних лет, методы с использованием светящихся микроорганизмов успешно применяются в поиске новых биологически активных веществ, перспективных в качестве антимикробных агентов, получаемых из растений [11, 12, 13]. При этом, данный анализ позволяет определить как острое, так и хроническое действие на бактериальную клетку [10, 14].

Цель исследования – провести скрининг антимикробной активности водных и спиртовых извлечений из растительного сырья с использованием биолюминесцентных бактерий.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе исследовали семнадцать водных и спиртовых извлечений из растительного сырья (РС) *Echinacea purpurea* (L.) Moench, *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea angustifolia* (DC.) A.Heller, *Echinacea tennessensis* (Beadle) Small, *Calendula officinalis* L., *Coreopsis grandiflora* Hogg ex Sweet, *Hyssopus officinalis* L., *Monarda fistulosa* L., *Monarda didyma* L., *Monarda x hybrida* hort., *Myrtus communis* cv. Южнобережный, *Satureja montana* L., *Thymus serpyllum* L., *Thymus vulgaris* cv. Фантазия, *Thymus striatus* cv. Юбилейный, *Rosmarinus officinalis* cv. Горизонт, *Vitex agnus-castus*

L. заготовленного на территории ФГБУН «Никитский ботанический сад - Национальный научный центр РАН» Россия, Республика Крым, г. Ялта, пгт. Никита, Никитский спуск 52. Экстракты из РС получали согласно ОФС.1.4.1.0018.15 «Настойки и отвары» и ОФС.1.4.1.0019.15 «Настойки» ГФ РФ XIV издания [15].

Скрининг антимикробной активности извлечений из РС проводили с использованием природного светящегося штамма *Aliivibrio fischeri* F1 из коллекции Медицинской академии имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского» и генно-инженерного люминесцентного штамма *Escherichia coli* MG1655 (Xen`::lux) [16, 17]. Выбранные тест-штаммы проявляют высокую чувствительность к действию биологически-активных веществ различной природы [17, 18]. В качестве положительного контроля для оценки антимикробной активности в отношении люминесцентных бактерий использовали гентамицина сульфат (ООО "Фармацевтическая компания "Здоровье", Украина) в концентрации 40 мг/мл, который, при внесении в пробу, разводили в 25, 50 и 100 раз.

Методика оценки антимикробной активности водных и спиртовых извлечений из растительного сырья заключалась в следующем: в кюветы люминометра вносили по 950, 940, 930 и 910 мкл водного раствора натрия хлорида в концентрациях 3% и 1% для *A. fischeri* F1 и *E. coli* (Xen`::lux) соответственно. Затем добавляли по 0, 10, 20 и 40 мкл водных или спиртовых извлечений из РС, получив разведения 1:25, 1:50 и 1:100 в пробе. Образовавшиеся системы тщательно перемешивали при 100 об. / мин. в течение 15 минут с использованием орбитального шейкера (OS-20, biosan, Латвия) для равномерного распределения веществ в пробе. Затем вносили по 50 мкл бактериальной суспензии с концентрацией клеток, соответствующей 0,5 стандарта мутности Мак-Фарланда. Подготовленные пробы выдерживали при 25°C и 37°C в термостате (ТСО -1/80 СПУ, Россия) для *A. fischeri* F1 и *E. coli* (Xen`::lux), соответственно, в течение 30 минут при постоянном перемешивании и проводили измерение свечения систем. Регистрацию люминесценции проводили с помощью биохемилюминометра (БХЛ-06, Н. Новгород, Россия). Результаты измерений свечения тест-штаммов представляли в виде индекса интенсивности люминесценции (I), который рассчитывали по формулам $I = I_0 / I_k \times 100\%$ (выражается в процентах), где I_0 – интенсивность люми-

несценции тест-штамма в опытном образце, а I_k – интенсивность люминесценции тест-штамма в контрольном образце. В качестве отрицательного контроля использовали дистиллированную воду, полученную методом перегонки в дистилляторе (ООО «Листон», РФ), и спирт этиловый (ОАО «Флора Кавказа», РФ) в тех же соотношениях, что и, вносимые в пробы, водные и спиртовые извлечения из РС.

Антимикробную активность экстрактов растений в отношении люминесцентных штаммов *A. fischeri* F1 и *E. coli* (Xen⁺::lux) оценивали по эффективному разведению извлечения из растительного сырья, снижающему свечение микроорганизмов на 50% ($ЭР_{50}$). Статистическая обработка результатов исследования проведена согласно требованиям ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов эксперимента» [6] с применением программы Microsoft Excel 2003.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенных исследований по оценке влияния семнадцати водных извлечений на биолюминесценцию штамма *A. fischeri* F1, установили, что водные извлечения из *Echinacea purpurea*, *E. pallida*, *E. angustifolia*, *E. tennessensis*, *Calendula officinalis*, *Vitex agnus-castus* не снижали интенсивность люминесценции тест-штамма более чем на 50% при минимальном разведении 1:25. При этом раствор гентамицина сульфата снижал интенсивность биолюминесценции более чем на 50% при разведении 1:50 (рис. 1).

Водные извлечения из *Thymus serpyllum*, *Satureja montana*, *Monarda fistulosa*, *Myrtus communis* cv. Южнобережный, *Rosmarinus officinalis* cv. Горизонт, *Hyssopus officinalis*, *Monarda didyma* и *Thymus striatus* cv. Юбилейный снижали I на 50% и более при разведении 1:25. Водные извлечения из *Coreopsis grandiflora*, *Thymus vulgaris* cv. Фантазия и *Monarda x hybrida* hort. ингибировали биолюминесценцию штамма *A. fischeri* F1 на 50% и более при наибольшем разведении 1:100, что превышало активность раствора гентамицина сульфата в таком же разведении.

В результате проведенных исследований по оценке влияния семнадцати спиртовых извлечений на биолюминесценцию штамма *A. fischeri* F1, установили, что все экстракты из РС ингибировали I на 50% и более (рис. 2).

В то время как спирт этиловый в схожих разведениях не снижал I более чем на 35,64 % от контрольных значений. Спиртовые извлечения из *Thy-*

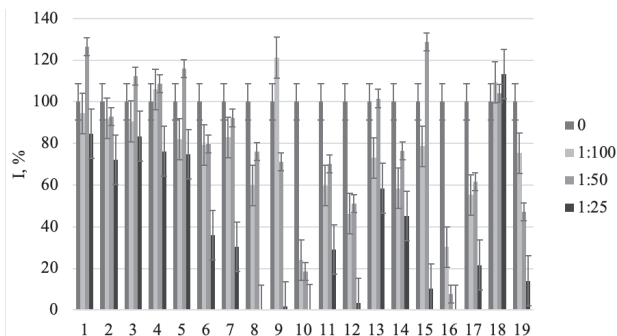


Рис. 1. Зависимость интенсивности биолюминесценции штамма *Aliivibrio fischeri* F1 от разведения водных извлечений из РС: 1 – *Echinacea purpurea* (L.) Moench; 2 – *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt.; 3 – *Echinacea angustifolia* (DC.) A.Heller; 4 – *Echinacea tennessensis* (Beadle) Small; 5 – *Calendula officinalis* L.; 6 – *Thymus serpyllum* L.; 7 – *Satureja montana* L.; 8 – *Monarda fistulosa* L.; 9 – *Myrtus communis* cv. Южнобережный; 10 – *Coreopsis grandiflora* Hogg ex Sweet; 11 – *Rosmarinus officinalis* cv. Горизонт; 12 – *Thymus vulgaris* L.; 13 – *Vitex agnus-castus* L.; 14 – *Hyssopus officinalis* L.; 15 – *Monarda didyma* L.; 16 – *Monarda x hybrida* hort.; 17 – *Thymus striatus* cv. Юбилейный, 18 – вода, 19 – гентамицина сульфат.

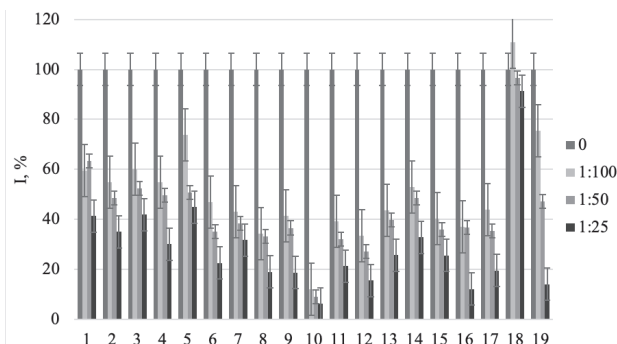


Рис. 2. Зависимость интенсивности биолюминесценции штамма *Aliivibrio fischeri* F1 от разведения спиртовых извлечений из РС: 1 – *Echinacea purpurea* (L.) Moench; 2 – *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt.; 3 – *Echinacea angustifolia* (DC.) A.Heller; 4 – *Echinacea tennessensis* (Beadle) Small; 5 – *Calendula officinalis* L.; 6 – *Thymus serpyllum* L.; 7 – *Satureja montana* L.; 8 – *Monarda fistulosa* L.; 9 – *Myrtus communis* cv. Южнобережный; 10 – *Coreopsis grandiflora* Hogg ex Sweet; 11 – *Rosmarinus officinalis* cv. Горизонт; 12 – *Thymus vulgaris* cv. Фантазия; 13 – *Vitex agnus-castus* L.; 14 – *Hyssopus officinalis* L.; 15 – *Monarda didyma* L.; 16 – *Monarda x hybrida* hort.; 17 – *Thymus striatus* cv. Юбилейный, 18 – спирт этиловый 70%, 19 – гентамицина сульфат.

mus serpyllum, *Satureja montana*, *Monarda fistulosa*, *Myrtus communis* cv. Южнобережный, *Coreopsis*

grandiflora, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Vitex agnus-castus*, *Hyssopus officinalis*, *Monarda didyma*, *Monarda x hybrida hort.* и *Thymus striatus* cv. Юбилейный снижали I более чем на 75% при максимальном разведении 1:100, в то время как раствор гентамицина сульфата в таком же разведении снижал биолюминесценцию только на 25%.

При сравнении действия водных и спиртовых экстрактов на люминесценцию тест-штамма *A. fischeri* F1, определили, что спиртовые экстракты из *Echinacea purpurea*, *E. pallida*, *E. angustifolia*, *E. tennessensis*, *Coreopsis grandiflora*, *Thymus vulgaris* cv. Фантазия обладали схожим действием с водными извлечениями данных растений. Для спиртовых извлечений из *Echinacea purpurea*, *E. pallida*, *E. angustifolia*, *E. tennessensis*, ЭР₅₀ составило 1:25, что свидетельствует об их невысоком антимикробном потенциале как в водных, так и в спиртовых формах. Для *Coreopsis grandiflora*, *Thymus vulgaris* cv. Фантазия ЭР₅₀ составило 1:100, что свидетельствует о сильной ингибирующей активности как спиртовых, так и водных извлечений. При этом обнаружены различия в действии водных и спиртовых извлечений из *Calendula officinalis*, *Thymus serpyllum*, *Satureja montana*, *Monarda fistulosa*, *Myrtus communis* cv. Южнобережный, *Rosmarinus officinalis* cv. Горизонт, *Vitex agnus-castus*, *Hyssopus officinalis*, *Monarda didyma* и *Monarda x hybrida hort.*, *Thymus striatus* cv. Юбилейный. Спиртовые экстракты, указанных растений, ингибировали биолюминесценцию в разведениях до 4 раз меньших, чем водные. ЭР₅₀ спиртовых извлечений составила 1:100, а ЭР₅₀ водных ≈ 1:25.

Так, известно, что основные действующие вещества эхинацеи пурпурной, такие как полисахариды и гидроксикоричные кислоты, практически в одинаковой степени извлекаются водными и спиртовыми растворителями. При использовании воды доля полисахаридов составляет 72%, а гидроксикоричных кислот – 53%. При применении в качестве растворителя водно-спиртовых смесей извлекается 77% полисахаридов и 46% гидроксикоричных кислот [19]. Экстракты эхинацеи пурпурной, основное действие которых является иммуномодулирующим [20], согласно данным современных научных исследований, подавляют рост *Candida albicans* и *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*. Однако, многие патогены, такие как *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,

Pseudomonas aeruginosa и *Candida albicans* оказались не чувствительны к препаратам эхинацеи [21].

Coreopsis grandiflora охарактеризовался сильным ингибирующим действием на бактериальную люминесценцию, как в водной, так и в спиртовой форме. Основными компонентами *Coreopsis grandiflora* являются флавоноиды, такие как ауроны, антоцианы, флаваноны, флавонолы, а также фенилпропаноиды. Известно, что антимикробная активность для флавоноидов является одним из основных фармакотерапевтических эффектов [22]. Некоторые исследования показали, что экстракты кореопсиса показывают высокую активность в отношении патогенной флоры, наиболее чувствительными из которых оказались *Enterococcus faecalis* и *Bacillus cereus*.

Высокая ингибирующая активность как в водной, так и в спиртовой формах отмечена для *Thymus vulgaris* cv. Фантазия, ЭР₅₀ водного извлечения - 1:50, спиртового - 1:100. В то время как *Thymus serpyllum* вызывал значительное ингибирующее действие только в спиртовой форме, ЭР₅₀ = 1:100. Оба вида являются официальными. Трава тимьяна обыкновенного разрешена к применению в качестве противомикробного, антисептического, противогрибкового, отхаркивающего, обволакивающего, спазмолитического, снижающего газообразование в кишечнике средства [22]. В растениях рода *Thymus* L. основными действующими веществами являются фенольные соединения, эфирные масла и тритерпеновые соединения. Разница в проявленных биологических эффектах подтверждается сведениями о химическом составе данных видов. Известно, что большинство видов тимьяна превосходит *Thymus serpyllum* по суммарному содержанию эфирного масла [23].

Цветки *Calendula officinalis* применяются в официальной медицине в качестве противопалательного средства при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, почек и мочевыводящих путей [24]. Основными компонентами цветков календулы лекарственной являются каротиноиды и полисахариды, в водных вытяжках также присутствуют флавоноиды и сапонины, а в спиртовых - алкалоиды, флавоноиды и сапонины [25]. 70%-ные этанольные экстракты календулы лекарственной обладали сильным ингибирующим действием на бактериальную люминесценцию с ЭР₅₀ = 1:100, в то время как водные экстракты не оказывали ингибирующего действия даже в минимальном разведении 1:25. Данный эффект может объясняться тем, что для извлечения суммы флавоноидов, со-

держатся в цветках календулы, оптимальным растворителем является спирт этиловый 70% [26].

Основными биологически активными соединениями, исследуемых видов рода монары являются тимол, карвакрол, *para*-цимол и их производные [27]. Известная биологическая активность этих соединений в отношении патогенов согласуется с традиционным использованием видов *Monarda* L. для лечения ран, кожных инфекций, простуды и лихорадки. Высокая антибактериальная активность видов рода монарда подтверждается литературными данными [28]. По результатам исследований, более высокую активность, среди исследуемых образцов монарды, показал вид *Monarda x hybrida* hort., относящийся к хемотипу с повышенной концентрацией гераниола.

Satureja montana содержит в качестве основных компонентов терпены и терпеноиды, которые, как известно, играют ключевую роль в антибактериальном действии. Исследования показали, что экстракты чабера активны в отношении как грамположительных (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*), так и грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Serratia marcescens*) штаммов бактерий [29].

Основными компонентами *Vitex agnus-castus* являются эфирные масла с преобладанием 1,8-цинеола и α -пинена, флавоноиды, иридоиды, ди-терпеноиды, стероиды [30]. В настоящее время *Vitex agnus-castus* используется в качестве пищевой добавки при дисбалансе гормонов эстрогена. В ряде исследований отмечается высокая антибактериальная активность *Vitex agnus-castus*, в том числе к антибиотикорезистентным штаммам *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* [31].

Обзор литературы по биологически-активным компонентам иссопа лекарственного показал наличие полифенольных соединений, в первую очередь флавоноидов, апигенина, кверцетина, диосмина, лютеолина и их глюкозидов, за которыми следуют другие фенольные соединения, такие как хлорогеновая, протокатехиновая, феруловая, синринговая, *p*-гидроксibenзойная и кофейная кислоты. В эфирных маслах, выделенных из надземной части *Hyssopus officinalis*, выявили несколько основных компонентов, включая терпеноиды пинокамфон, изопинокамфон и β -пинен. Иссоп обладает умеренной антиоксидантной и антимикробной активностью в отношении грамположительных и отрицательных бактерий, а также противогрибковыми, инсектицидными противовирусными

свойствами *in vitro*. Исследования на животных показали, что это растение обладает миорелаксантной, антиагрегантной и ингибирующей альфа-глюкозидазу активностью [32, 33, 34, 35].

При сравнении всей совокупности данных о влиянии водных и спиртовых извлечений на тест-штамм *A. fischeri* F1 установили умеренную линейную прямую корреляцию с коэффициентом корреляции Пирсона на уровне 0,65, что в целом, говорит о схожести в действии водных и спиртовых экстрактов растений.

Полученные данные говорят о высокой чувствительности штамма *A. fischeri* F1 к сумме компонентов, извлекаемых из растительного сырья, что позволяет определить образцы, перспективные в качестве антимикробных агентов. Тест позволяет выявить отличие в действии суммы компонентов, извлекаемых при использовании различных растворителей.

В результате проведенных исследований по влиянию семнадцати водных извлечений на биолюминесценцию штамма *E. coli* (Xen`::lux), установили, что водные извлечения из *Echinacea purpurea*, *E. pallida*, *E. angustifolia*, *E. tennesseensis*, *Calendula officinalis*, *Thymus serpyllum*, *Satureja montana*, и *Myrtus communis* cv. Южнобережный не снижали I более чем на 50% при минимальном разведении 1:25 (рис. 3). Водные извлечения из *Monarda fistulosa*, *Rosmarinus officinalis* cv. Горизонт, *Vitex agnus-castus*, *Hyssopus officinalis*, *Monarda x hybrida* hort., и *Thymus striatus* cv. Юбилейный снижали I генно-инженерного тест-штамма на 50% и более при разведении 1:25. Водные извлечения из *Thymus vulgaris* cv. Фантазия, *Monarda didyma*, снижали I при ЭР₅₀ = 1:50 и только водное извлечение из *Coreopsis grandiflora* ингибировало биолюминесценцию штамма *E. coli* (Xen`::lux) при разведении 1:100.

В результате проведенных исследований по влиянию спиртовых извлечений на биолюминесценцию штамма *E. coli* (Xen`::lux), установили, что 15 извлечений снижали I на 50% и более при максимальном разведении 1:100 и только *Echinacea angustifolia* и *Calendula officinalis* снижали I при ЭР₅₀ = 1:50, а спиртовое извлечение из *Echinacea purpurea* характеризовалось ЭР₅₀ = 1:25 несмотря на то, что спирт в схожих разведениях не снижал I более, чем на 8,69% от контрольных значений (рис. 4).

При сравнении всей совокупности данных о влиянии водных и спиртовых извлечений на тест-штамм *E. coli* (Xen`::lux) установили умеренную линейную прямую корреляцию с коэффициентом

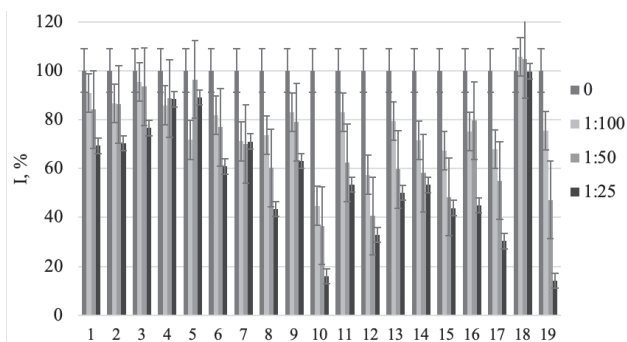


Рис. 3. Зависимость интенсивности биолюминесценции штамма *Escherichia coli* (Xen::lux) от разведения водных извлечений из РС: 1 – *Echinacea purpurea* (L.) Moench; 2 – *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt.; 3 – *Echinacea angustifolia* (DC.) A.Heller; 4 – *Echinacea tennessensis* (Beadle) Small; 5 – *Calendula officinalis* L.; 6 – *Thymus serpyllum* L.; 7 – *Satureja montana* L.; 8 – *Monarda fistulosa* L.; 9 – *Myrtus communis* cv. Южнобережный; 10 – *Coreopsis grandiflora* Hogg ex Sweet; 11 – *Rosmarinus officinalis* cv. Горизонт; 12 – *Thymus vulgaris* cv. Фантазия; 13 – *Vitex agnus-castus* L.; 14 – *Hyssopus officinalis* L.; 15 – *Monarda didyma* L.; 16 – *Monarda x hybrida* hort.; 17 – *Thymus striatus* cv. Юбилейный, 18 – вода, 19 – гентамицина сульфат.

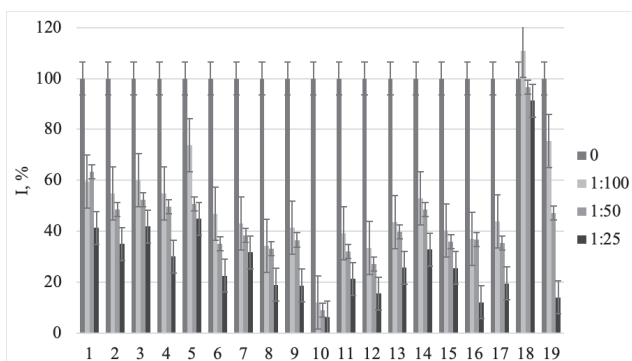


Рис. 4. Зависимость интенсивности биолюминесценции штамма *E. coli* (Xen::lux) от разведения спиртовых извлечений из РС: 1 – *Echinacea purpurea* (L.) Moench; 2 – *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt.; 3 – *Echinacea angustifolia* (DC.) A.Heller; 4 – *Echinacea tennessensis* (Beadle) Small; 5 – *Calendula officinalis* L.; 6 – *Thymus serpyllum* L.; 7 – *Satureja montana* L.; 8 – *Monarda fistulosa*; 9 – *Myrtus communis* cv. Южнобережный; 10 – *Coreopsis grandiflora* Hogg ex Sweet; 11 – *Rosmarinus officinalis* cv. Горизонт; 12 – *Thymus vulgaris* cv. Фантазия; 13 – *Vitex agnus-castus* L.; 14 – *Hyssopus officinalis* L.; 15 – *Monarda didyma* L.; 16 – *Monarda x hybrida* hort.; 17 – *Thymus striatus* cv. Юбилейный, 18 – спирт этиловый 70 %, 19 – гентамицина сульфат.

корреляции Пирсона на уровне 0,78, что свидетельствует о достоверности результатов.

При сравнении действия спиртовых и водных извлечений на люминесценцию тест-штамма *E. coli* (Xen::lux) установили, что при использовании в качестве растворителя спирта этилового 70%, значение ЭР₅₀ для *Echinacea purpurea*, *E. pallida*, *E. angustifolia*, *E. tennessensis* и *Calendula officinalis* увеличилось до 1:100 по сравнению с водными извлечениями, для *Thymus serpyllum* увеличилось до 1:50. Для *Monarda fistulosa*, *Rosmarinus officinalis* cv. Горизонт, *Vitex agnus-castus*, *Monarda x hybrida* hort. и *Thymus striatus* cv. Юбилейный ЭР₅₀ изменилось с 1:25 до 1:100. Сила эффекта не изменилась для *Coreopsis grandiflora* и *Hyssopus officinalis*. ЭР₅₀ для *Thymus vulgaris* cv. Фантазия и *Monarda didyma* стала 1:100. И только для *Satureja montana* и *Myrtus communis* cv. Южнобережный изменение ЭР₅₀ произошло до 1:100. Полученные данные подтверждают, что спирт этиловый является более оптимальным для извлечения суммы веществ, обладающих антимикробной активностью.

При сравнении всей совокупности данных о влиянии водных извлечений на тест-штамм *A. fischeri* F1 и штамм *E. coli* (Xen::lux) установили умеренную линейную прямую корреляцию с коэффициентом корреляции Пирсона на уровне 0,67. Это говорит о достоверности полученных результатов. А при сравнении данных влияния спиртовых извлечений на тест-штамм *A. fischeri* F1 и штамм *E. coli* (Xen::lux) установили умеренную линейную прямую корреляцию с коэффициентом корреляции Пирсона на уровне 0,77, что свидетельствует о том, что оба штамма были в большей степени чувствительны к действию спиртовых экстрактов растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных исследований, направленных на скрининг антимикробной активности водных и спиртовых извлечений из РС с использованием биолюминесцентных штаммов бактерий, определено, что сильным ингибирующим действием (ЭР₅₀ = 1:100) как в водной, так и в спиртовой форме обладали *Coreopsis grandiflora*, *Thymus vulgaris* cv. Фантазия и *Monarda x hybrida* hort. Умеренная ингибирующая активность (ЭР₅₀ = от 1:25 до 1:100) отмечена для *Thymus serpyllum*, *Satureja montana*, *Monarda fistulosa*, *Myrtus communis* cv. Южнобережный, *Rosmarinus officinalis* cv. Горизонт, *Hyssopus officinalis*, Мо-

narda didyma, *Thymus striatus* cv. Юбилейный и *Vitex agnus-castus*. К слабым ингибиторам отнесли - *Echinacea purpurea*, *E. pallida*, *E. angustifolia*, *E. tennessensis* с минимальными значениями ЭР₅₀ от 1:25 до 1:50. Установлено, что ингибирующая активность большинства экстрактов растений усиливалась при использовании в качестве растворителя спирта этилового 70%.

Согласно данным обзора литературных источников, основными компонентами, несущими вклад в антимикробную активность изученных экстрактов растений, являются фенольные соединения, флавоноиды, эфирные масла и тритерпеновые соединения.

В ходе исследования было отмечено, что данные о действии экстрактов растений на природный штамм бактерий *Aliivibrio fischeri* и на рекомбинантный штамм *Escherichia coli* (Xen⁺::lux) коррелируют, однако *A. fischeri* проявлял большую чувствительность как к водным, так и к спиртовым экстрактам растений в сравнении с рекомбинантным штаммом бактерий *E. coli* (Xen⁺::lux).

Исследование выполнено в рамках поддержанного федеральным государственным автономным образовательным учреждением высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского» гранта № ВГ19/2018 и проекта №И/2018/16

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Oyebode O., Kandala N-B., Chilton P.J., Lilford R.J. // Health Policy Plan. 2016. Vol. 31(8), pp. 984-991.
- Krogsgaard-Larsen P., Christensen S.B., Kofod H. Natural Products and Drug Development. Munksgaard; Copenhagen, Denmark: 1994, pp. 34-45.
- Всемирная организация здравоохранения. Режим доступа: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (дата обращения: 22.06.2021).
- Cowan M.M. // Clin Microbiol Rev. 1999. Vol.12(4), pp.564-582.
- Balouiri M., Sadiki M., Ibensouda S.K. // J. Pharm Anal. 2016. Vol. 6(2), pp. 71-79.
- Государственная фармакопея РФ XIV издания. Т.1. ОФС.1.2.4.0010.15
- Kotze M., Eloff J.N. // S. Afr. J. Bot. 2002. Vol. 68, pp. 62-67.
- Eloff J.N., Angeh I.E., McGaw L.J. // Ind Crop Prod. 2017. Vol. 110, pp. 103-112.
- Eloff J.N. // BMC Complementary Medicine and Therapies. 2019. Vol. 19, pp. 106.
- Bolelli L., Ferri E.N., Girotti S. // Anal Chim Acta. 2016. Vol. 934. Pp, 22-35.
- Poikulainen E., Tienaho J., Sarjala T., Santala V. // Journal of Microbiological Methods. 2020. Vol. 178, pp. 106083.
- Kovats N., Acs A., Goloncser F., Barabas A. // Plant Signal Behav. 2011. Vol. 6(6), pp.777-779.
- Котова В.Ю., Рыженкова К.В., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. // Прикладная биохимия и микробиология. 2014. Т. 50, № 1, С. 112-117.
- Robinson G.M., Tonks K.M., Thorn R.M., Reynolds D.M. // Antimicrob Agents Chemother. 2011. Vol. 55(11), pp. 5214-5220.
- Государственная фармакопея РФ XIV издания. Т.2. ОФС.1.5.1.0002.15.
- Сафронюк С.Л., Шарипов Э.Т., Кацев А.М. // Аспирантский вестник Поволжья. 2017. № 5-6, С. 19-23.
- Сафронюк С.Л., Гавриченко Ю.Ю., Кацев А.М. // Биофармацевтический журнал. 2020. Т. 12. № 5, С. 26-32.
- Гавриченко Ю.Ю., Шевчук О.М., Кацев А.М. // Современные проблемы фармакогнозии. IV Межвузовская научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 100-летию Самарского государственного медицинского университета. Сборник материалов. Под редакцией В.А. Куркина. 2019, С. 68-72.
- Мальцева В.А. Дисс. канд. техн. Наук. Краснодар. 2008, С. 24.
- Manayi A, Vazirian M, Saaidnia S. // Pharmacogn Rev. 2015. Vol. 9(17), pp. 63-72.
- Sharma S.M., Anderson M., Schoop S.R., Hudson J.B. Phytomedicine. 2010. Vol. 17(8-9), pp.563-568.
- Государственный реестр лекарственных средств // Официальный сайт МЗ РФ.
- Винокурова О.А., Тринеева О.В., Сливкин А.И. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. Т. 4, С. 134-150.
- Куркин В.А., Куркина А.В., Зайцева Е.Н., Дубищев А.В., Афанасьева П.В. // Бюллетень сибирской медицины. 2016. Том 15, № 2, С. 51-57.
- Kumar N., Sharma J., Sharma S. Journal of AdvancedScientificResearch. 2010. Vol. 1(1), pp. 61-66.
- Muhammad R. R. R., Bayu T., Dyan W., Ririn S., Chintiana N. P. // Pharmacia. 2019. Vol. 9(1), pp. 137-144
- Lawson S.K., Satyal P., Setzer W.N. // Plants. 2021. Vol. 10(3), pp. 482.
- Hong L., Tian Y., Fei-Yan L., Yan Y., Zhong-Min S. // Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2014. Vol. 7(11), pp. 7389-7398.

29. Alessandro M., Luca V., Anna I., Caterina F., Antonello F. // *Pharmaceutics*. 2019. Vol. 12(1), pp. 7.
30. Chen S-N., Friesen J. B., Webster D., Nikolic D., van Breemen R. B. // *Fitoterapia*. 2011. Vol. 82(4), pp. 528-533.
31. Arokiyaraj S., Perinbam K., Agastian P., Mohan Kumar R. // *Int. Journal of Green Pharmacy*. 2009. Vol. 3(2), pp. 162-164
32. Fathiazad F., Hamedeyazdan S. // *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2011. Vol. 5(17), pp. 1959-1966.
33. Renzini G., Scazzocchio F., Lu M., Mazzanti G., Salvatore G. // *J. Essential. Oil Res.* 1999. Vol. 11, pp. 649-654.
34. Benedec D., Oniga I., Tipericiu B., Popescu H. // *Farmacia*, 2002. Vol. 50, pp. 54-57.
35. Kochan E., Wysokinska H., Chmiel A., Grabias B. // *Biosciences*. 1999. Vol. 54, pp. 11-16.

Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»

Гавриченко Ю. Ю., ассистент кафедры медицинской и фармацевтической химии.

E-mail: y.gavrichenko@yandex.ru

Кацев А. М., профессор, доктор биологических наук, заведующий кафедрой медицинской и фармацевтической химии.

E-mail: katsev@mail.ru

Сафронюк С. Л., старший преподаватель кафедры медицинской и фармацевтической химии.

E-mail: pharmalab01@mail.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Никитский ботанический сад — Национальный научный центр РАН»

Логвиненко Л. А., научный сотрудник лаборатории ароматических и лекарственных растений.

E-mail: nbs_plant@mail.ru

Феськов С. А., научный сотрудник лаборатории ароматических и лекарственных растений.

E-mail: sergey.feskoff@yandex.ua

Шевчук О. М., доктор биологических наук, заместитель директора по науке.

E-mail: oksana_shevchuk1970@mail.ru

Institute "Medical Academy named after S.I. Georgievsky" of Vernadsky CFU

Gavrichenko Yu. Yu., assistant of the Department of Medical and Pharmaceutical Chemistry.

E-mail: y.gavrichenko@yandex.ru

Katsev A. M., PhD, DSci., Full Professor, head of the Department of Medical and Pharmaceutical Chemistry.

E-mail: katsev@mail.ru

Safronyuk S. L., senior lecturer of the Department of Medical and Pharmaceutical Chemistry.

E-mail: pharmalab01@mail.ru

Federal State Budgetary Institution of Science "Nikitsky Botanical Garden - National Scientific Center of the Russian Academy of Sciences"

Logvinenko L. A., researcher of the Laboratory of Aromatic and Medicinal Plants.

E-mail: nbs_plant@mail.ru

Feskov S. A., researcher of the Laboratory of Aromatic and Medicinal Plants.

E-mail: sergey.feskoff@yandex.ua

Shevchuk O. M., PhD, DSci. Deputy Director.

E-mail: oksana_shevchuk1970@mail.ru

SCREENING OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF AQUATIC AND ALCOHOLIC EXTRACTS FROM PLANT RAW MATERIALS USING BIOLUMINESCENT BACTERIA

Yu. Yu. Gavrichenko¹, S. L. Safronyuk¹, A. M. Katsev¹, O. M. Shevchuk²,
L.A. Logvinenko², S.A. Feskov²

¹ Institute "Medical Academy named after S.I. Georgievsky" of Vernadsky CFU

² FSBIS "Nikitsky Botanical Garden - National Scientific Center of the Russian Academy of Sciences"

Abstract. The paper investigated the nonspecific antimicrobial activity of 17 aqueous and ethanolic extracts from plant raw materials of *Echinacea purpurea* (L.) Moench, *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea angustifolia* (DC.) A.Heller, *Echinacea tennessensis* (Beadle) Small, *Calendula officinalis* L., *Thymus serpyllum* L., *Thymus vulgaris* cv. Fantaziya, *Thymus striatus* cv. Yubileyny, *Satureja montana* L., *Monarda fistulosa* L., *Vitex agnus-castus* L., *Myrtus communis* cv. Южнобережный, *Coreopsis grandiflora* Hogg ex Sweet, *Rosmarinus officinalis* cv. Gorizont, *Hyssopus officinalis* L., *Monarda didyma* L., *Monarda x hybrida* hort., collected from the Federal State Budgetary Institute of Science «The Order of the Red Banner of Labour Nikita Botanical Gardens - National Scientific Center RAS» by using natural bioluminous bacterial strain *Aliivibrio fischeri* F1 and genetically engineered bioluminescent strain *Escherichia coli* MG1655 (Xen` :: lux). As a result of the screening, extracts with pronounced nonspecific antimicrobial activity, were identified, which included *Coreopsis grandiflora*, *Thymus vulgaris* cv. Fantaziya and *Monarda x hybrida* hort. Their effective dilutions, which reduced the level of bioluminescence by 50% (ED₅₀), were equal to 1:100. The extracts of *Thymus serpyllum*, *Satureja montana*, *Monarda fistulosa*, *Myrtus communis* cv. Южнобережный, *Rosmarinus officinalis* cv. Gorizont, *Hyssopus officinalis*, *Monarda didyma* and *Thymus striatus* cv. Yubileyny, *Vitex agnus-castus* had shown moderate antimicrobial activity, their ED₅₀ were equal from 1:25 to 1:100 in aqueous and ethanolic forms. Effective dilutions of extracts of *Echinacea angustifolia* and *Calendula officinalis* took intermediate values and were equal to 1:50. Low level of antimicrobial potential was observed for extracts of *Echinacea purpurea*, *E. pallida*, *E. tennessensis*, the minimal ED₅₀ were equal to 1:25. It was found that the inhibitory activity of most plant extracts was enhanced when 70% ethanol was used as a solvent. The obtained results were compared to the effect of gentamicin sulfate activity at the initial concentration of 40 mg/ml, which ED₅₀ were equal 1:50. It was determined that the natural marine bacterial strain *A. fischeri* F1 was more sensitive to both aqueous and alcoholic plant extracts in comparison with the genetically modified *E. coli* strain MG1655 (Xen`::lux).

Keywords: antimicrobial activity, bioluminescence, Vitex, Hyssop, Calendula, Coreopsis, Monarda, Rosemary, Thyme, Savory, Echinacea, *Aliivibrio fischeri* F1, *Escherichia coli* MG1655

REFERENCES

1. Oyeboode O., Kandala N-B., Chilton P.J., Lilford R.J., Health Policy Plan, 2016, Vol. 31(8), pp. 984-991.
2. Krogsgaard-Larsen P., Christensen S.B., Kofod H. Natural Products and Drug Development. Munksgaard; Copenhagen, Denmark: 1994, pp. 34-45.
3. World Health Organization. (2021, October 13) "Antimicrobial resistance".
4. Cowan M.M., Clin Microbiol Rev., 1999, Vol. 12(4), pp. 564-582.
5. Balouiri M., Sadiki M., Ibensouda S.K., J. Pharm Anal., 2016, Vol. 6(2), pp. 71-79.
6. Gosudarstvennaja farmakopeja RF XIV izdanija. T.1
7. Kotze M., Eloff J.N., S. Afr. J. Bot., 2002, Vol. 68, pp. 62-67.
8. Eloff J.N., Angh I.E., McGaw L.J., Ind Crop Prod., 2017, Vol. 110, pp. 103-112.
9. Eloff J.N., BMC Complementary Medicine and Therapies, 2019, Vol. 19, pp. 106.
10. Bolelli L., Ferri E.N., Girotti S., Anal Chim Acta, 2016, Vol. 934, pp. 22-35.
11. Poikulainen E., Tienaho J., Sarjala T., Santala V., Journal of Microbiological Methods, 2020, Vol. 178, pp. 106083.
12. Kovats N., Acs A., Goloncser F., Barabas A., Plant Signal Behav., 2011, Vol. 6(6), pp. 777-779.
13. Kotova V.Ju., Ryzhenkova K.V., Manuhov I.V., Zavil'gel'skij G.B., Prikladnaja biohimija i mikrobiologija, 2014, T. 50, № 1, pp. 112-117.
14. Robinson G.M., Tonks K.M., Thorn R.M., Reynolds D.M., Antimicrob Agents Chemother, 2011, Vol. 55(11), pp. 5214-5220.

15. Gosudarstvennaja farmakopeja RF XIV izdanija. T.2 OFS.1.5.1.0002.15.
16. Safronjuk S.L., Sharipov Je.T., Kacev A.M., Aspirantskij vestnik Povolzh'ja, 2017, № 5-6, pp. 19-23.
17. Safronjuk S.L., Gavrichenko Ju.Ju., Kacev A.M., Biofarmaceuticheskij zhurnal, 2020, T. 12. № 5, pp. 26-32.
18. Gavrichenko Ju.Ju., Shevchuk O.M., Kacev A.M., Sovremennye problemy farmakognozii. IV Mezhdunarodnaya nauchno-prakticheskaja konferencija s mezhdunarodnym uchastiem, posvjashhennaja 100-letiju Samarskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta. Sbornik materialov. Pod redakciej V.A. Kurkina, 2019, pp. 68-72.
19. Mal'ceva V.A. Diss. kand. tehn. Nauk. Krasnodar, 2008, p.24
20. Manayi A, Vazirian M, Saeidnia S., Pharmacogn Rev., 2015, Vol. 9(17), pp. 63-72.
21. Sharma S.M., Anderson M., Schoop S.R., Hudson J.B. Phytomedicine, 2010, Vol. 17(8-9), pp. 563-568.
22. Gosudarstvennyj reestr lekarstvennyh sredstv.
23. Vinokurova O.A., Trineeva O.V., Slivkin A.I., Razrabotka i registracija lekarstvennyh sredstv, 2016, T. 4. pp. 134-150.
24. Kurkin V.A., Kurkina A.V., Zajceva E.N., Dubishhev A.V., Afanas'eva P.V., Bjulleten' sibirskoj mediciny, 2016., Tom 15, № 2, pp. 51–57.
25. Kumar N., Sharma J., Sharma S. Journal of Advanced Scientific Research, 2010, Vol. 1(1), pp. 61-66.
26. Muhammad R. R. R., Bayu T., Dyan W., Ririn S., Chintiana N. P., Pharmacia, 2019, Vol. 9(1), pp. 137-144.
27. Lawson S.K., Satyal P., Setzer W.N., Plants, 2021, Vol. 10(3), pp. 482.
28. Hong L., Tian Y., Fei-Yan L., Yan Y., Zhong-Min S., Int. J. Clin. Exp. Pathol., 2014, Vol. 7(11), pp. 7389-7398.
29. Alessandro M., Luca V., Anna I., Caterina F., Antonello F., Pharmaceutics, 2019, Vol. 12(1), pp. 7.
30. Chen S-N., Friesen J. B., Webster D., Nikolic D., van Breemen R. B., Fitoterapia, 2011, Vol. 82(4), pp. 528-533.
31. Arokiyaraj S., Perinbam K., Agastian P., Mohan Kumar R., Int. Journal of Green Pharmacy, 2009, Vol. 3(2), pp. 162-164.
32. Fathiazad F., Hamedeyazdan S., African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2011, Vol. 5(17), pp. 1959-1966.
33. Renzini G., Scazzocchio F., Lu M., Mazzanti G., Salvatore G., J. Essential. Oil Res., 1999, Vol. 11, pp. 649-654.
34. Benedec D., Oniga I., Tiperius B., Popescu H., Farmacia, 2002, Vol. 50, pp. 54-57.
35. Kochan E., Wysokinska H., Chmiel A., Grabias B., Biosciences, 1999, Vol. 54, pp. 11-16.