

**З.А. Омарова, А.Ю. Исакова**

## **К вопросу об определении антибактериальной активности экстрактов надземных органов шалфея коровяколистного**

*Дагестанский государственный университет; Россия, 367000, г. Махачкала,  
ул. М. Гаджиева, 43а; z\_abakarova@mail.ru*

В статье описаны результаты изучения фитонцидной активности экстрактов листьев растения шалфея коровяколистного (*Salvia verbascifolia M. Bieb.*) в отношении *Escherichia coli* B-2393 методом диффузии из лунок агара. Выделение сухого этанольного экстракта осуществляли по Сокслету. Исследование такого характера на *S. verbascifolia* было осуществлено впервые и показало, что по степени ингибирующего действия на рост *E. coli* B-2393 он превосходит шалфей лекарственный (*S. officinalis L.*).

**Ключевые слова:** *шалфей, S. verbascifolia, S. officinalis, экстракт листьев, антибактериальная активность, лунко-диффузный метод.*

Быстрые темпы роста резистентности микроорганизмов, вызывающих различные инфекционные заболевания человека, на фоне высокого уровня заболеваемости населения, расширения спектра внутрибольничных инфекций, чрезмерного применения антибиотиков и синтетических химиотерапевтических веществ ведут к поиску новых природных источников, обладающих эффективными антимикробными соединениями [11; 9]. Потенциально эффективной альтернативой при лечении проблемных бактериальных инфекций могут служить природные антимикробные соединения, известные как вторичные метаболиты растений. Вторичные метаболиты включают большое разнообразие биологически активных соединений, обладающих различными терапевтическими свойствами, мягким действием, реже приводящих к формированию резистентных штаммов микроорганизмов и реже инициирующих аллергические реакции, что вызывает меньше побочных эффектов Федько и др. [17; 11; 13].

Одним из самых крупных и наиболее важных ароматических и лекарственных родов семейства *Lamiaceae* является род *Salvia* L. (шалфей), включающий около 900 видов, широко распространенных во всем мире и очень богатых биологически активными соединениями [18; 19]. Наибольшую значимость среди них представляют полифенольные соединения – вторичные метаболиты растений [14]. Шалфей произрастает преимущественно в странах Средиземноморья [24], в Дагестане насчитывает 14 видов, из которых один – эндемик Дагестана (*S. fugax Pobed*) и три – эндемики Большого Кавказа (*S. canescens*, *S. beckeri* и *S. kuznetzovii*).

Цель исследования – сравнительная оценка антимикробной активности сухих экстрактов из надземных частей растений шалфея в отношении бактерий *Escherichia coli* штамма B-2393.

Объектами исследования служили два вида шалфея – коровяколистный (*S. verbascifolia M. Bieb.*) и лекарственный (*S. officinalis L.*). В диком виде на территории

России *S. officinalis* не встречается, произрастает в Средней Европе, Малой Азии, на Средиземноморье, культивируется во многих странах, где встречается и в одичавшем состоянии [10]. В России промышленные плантации есть на Кавказе и в Крыму. *S. officinalis* является одним из наиболее изученных представителей своего рода, включая его антибактериальную активность [15; 2; 12]. Эфирное масло и этанольный экстракт *S. officinalis* проявляют сильное бактерицидное и бактериостатическое действие как на грамположительные, так и на грамотрицательные бактерии [20; 16].

Сырьем у *S. officinalis* служат лист или цветущие верхушки, которые на второй и последующие годы собирают 2–3 раза за вегетацию, начиная с цветения и заканчивая в сентябре [2; 13].

*S. verbascifolia* произрастает на каменистых осыпях нижнего горного пояса и в районах Дагестана [7; 6]. Компонентный состав эфирного масла *S. verbascifolia*, полученного из надземной части растения, был изучен недавно [3], а сведения по исследованию его антибактериальных свойств в научной литературе отсутствуют.

Сбор растительного материала *S. verbascifolia* был осуществлен на северо-западном склоне Талгинского ущелья (270 м над у. м.) в середине июня 2019 г (в конце цветения).

### Результаты и обсуждение

В нашем исследовании в качестве стандартного метода экстракции была выбрана экстракция по Сокслету [18; 20, 21].

Получение сухих экстрактов растительного материала включало следующие этапы: сбор сырья → подготовка растительного материала → экстрагирование → высушивание жидкого экстракта.

Подготовка растительного материала осуществлялась в следующей последовательности: очистка → промывание → сушка → измельчение → взвешивание.

Растительный материал *S. verbascifolia* был очищен от комков земли, сухих веток и травы, промыт в проточной прохладной воде ( $t \sim 12-15^{\circ}\text{C}$ ). После промывания листья отделяли от соцветий и высушивали, разложив в один слой на бумаге, в течение 8 сут при комнатной температуре в условиях отсутствия попадания прямых солнечных лучей. Высушенный растительный материал измельчали с помощью электрической мельницы и взвешивали на аналитических весах. Высушенный и расфасованный (2020 г.) в промышленных условиях растительный материал *S. officinalis* марки «ФармаЖвет» приобрели в аптеке, поэтому его включили в эту схему с этапа измельчения.

В качестве растворителя был выбран 96 % этанол, в котором сырье перед экстракцией предварительно в течение 2 часов замачивали в соотношении 1:1 для проникания экстрагента в растительные клетки. Процесс экстракции на качалке занял в общей сложности около 6 часов [23]. Полученный этанольный экстракт шалфея подвергали вакуумной сушке при  $t = 40-45^{\circ}$  в течение  $\sim 3-4$  сут, сухой экстракт взвешивали и хранили в холодильнике при  $t \sim 4-5^{\circ}$ .

Антимикробную активность сухих этанольных экстрактов шалфея в отношении тест – культуры одного из штаммов *Escherichia coli* (табл. 1) определяли диффузным методом, основанным на способности исследуемых веществ диффундировать в толщу агара и подавлять рост тест-культуры, отличающимся простотой тестирования и доступностью выполнения. Мы остановили свой выбор на методе диффузии из лунок агара.

ра, рекомендуемом и широко используемом для оценки антимикробной активности растительных компонентов или экстрактов [1].

Стерилизацию питательной среды для культивирования бактерий, посуды и оборудования осуществляли насыщенным паром под давлением в автоклаве (Tuttnauer 2540-EKA). Режим автоклавирования питательной среды подбирали соответственно инструкции на этикетках, а посуды и другого оборудования – согласно общепринятой микробиологической практике [8]. Этапы работы, связанные с необходимостью соблюдения асептических условий, осуществляли в ламинар-боксе лаборатории физиологии и биотехнологии растений биологического факультета ДГУ.

**Таблица 1. Характеристика культуральных, морфологических и тинкториальных свойств тест-штамма микроорганизма**

Название тест-культуры	Рост на плотной питательной среде		Морфологические и тинкториальные свойства
	Условия выращивания	Культуральные свойства	
<i>E. coli</i> B-2393	МПА, МПБ, ГРМ-бульон, Агар Эндо, Агар Клиглера, 37 °C, 24 ч	Круглые колонии кремоватого цвета с матовой поверхностью, края ровные	Гетеротрофные грамотрицательные бактерии, полиморфные подвижные палочки с закругленными концами, размеры 2,5–3×0,8–0,8 мкм

Для приготовления питательной среды использовали «Питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (СПА)» (ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России) – 40 г СПА на 1 л дистиллированной  $H_2O$ . Стерильный, расплавленный и остуженный до 40–45° мясопептонный питательный агар (МПА), разливали по стерильным чашкам Петри слоем толщиной 7–8 мм. После застывания среды стерильным пробочным сверлом ( $\varnothing$  0,7 см) на расстоянии 2–2,5 см друг от друга и стенок чашек Петри в МПА вырезали лунки глубиной (h) 5 мм.

Подготовленные лунки, исходя из их объема ( $V = \pi \times R^2 \times h$ ), заполняли раствором экстракта шалфея, смешанным (в соотношении 1:1) с расплавленным стерильным МПА. Для чего отдельно с целью выравнивания концентрации реагентов питательной среды в лунках со средой вокруг лунок приготовили более концентрированный МПА (40 г СПА на 500 мл дистиллированной  $H_2O$ ). Чтобы определить минимальную концентрацию, подавляющую рост тест-культуры, экстракт вносили в лунки градуированно. В трех чашках Петри в МПА было подготовлено по 4 лунки, содержащие 50, 100, 150 и 250 мг навески сухого экстракта (рис. 2).

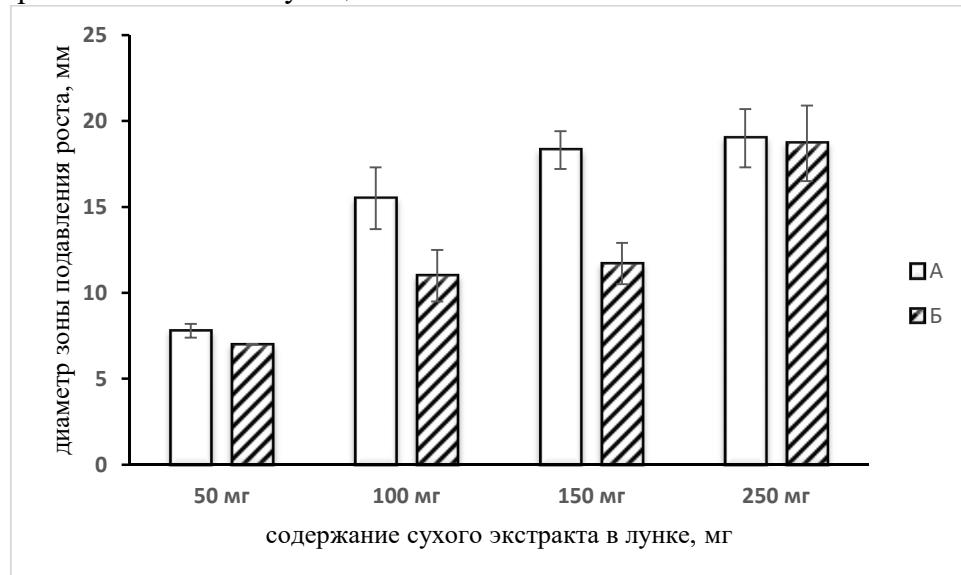
Пример приготовления МПА для заполнения лунки, содержащей 50 мг сухого экстракта: 150 мг сухого экстракта предварительно растворили в 100 мкл 96 % этианола и стерильной дистиллированной водой довели объем раствора до 405 мкл. Полученный раствор тщательно смешали с 405 мкл расплавленного МПА ( $t = 50$  °C), после чего равные количества смеси (по 270 мкл) заливали в одну из лунок в каждую из трех чашек Петри. В итоге концентрация экстракта в лунке с учетом объема ее содержимого составила  $50 : 0,27 = 185$  мг/мл. Аналогичным способом в три оставшиеся лунки внесли 100, 150 и 250 мг сухого экстракта, концентрация которого в лунках составила 370, 555 и 925 мг/мл соответственно.

Инокуляцию тест-культуры *E. coli* B-2393 в подготовленные чашки Петри осуществляли сплошным газоном. С этой целью по 200 мкл одного и того же разведения суспензии бактерий вносили в чашки Петри и равномерно шпателем Дригальского распределяли ее на поверхности МПА, легкими движениями втирая до полного впитывания. Чашки после инокуляции инкубировали при 37 °С в термостате, диаметры зон подавления роста *E. coli* B-2393 вокруг лунок замеряли по истечении 24 часов и на 6 сут после инокуляции при помощи штангенциркуля и миллиметровой линейки. Возле каждой лунки замеры осуществляли не менее чем в трех местах. Средние результаты замеров зон подавления роста по трем чашкам Петри и их стандартные ошибки представлены на диаграммах (рис. 1).

Степень чувствительности тест-культуры оценивали по общепринятой шкале, исходя из величины диаметра зоны подавления роста: ≥ 25 мм – высокая чувствительность, 15–20 мм – чувствительность, 11–15 мм – малочувствительность, диаметр менее 10 мм и полное отсутствие зоны подавления роста – слабая чувствительность или резистентность [4].

Чувствительность тест-культуры к лунке с 50 мг сухого экстракта *S. verbascifolia* на лунку трактуется как слабая, средняя величина диаметра зоны подавления роста ~8 мм. Экстракт *S. verbascifolia* демонстрировал ингибирующий эффект в отношении *E. coli* B-2393 в трех остальных вариантах (100–250 мг). Размеры диаметров зон угнетения роста в этих вариантах лежат в диапазоне 15–20 мм и свидетельствуют о чувствительности тест-культуры к этому уровню содержания экстракта в лунке. Максимальные значения диаметра зоны подавления роста для лунок, содержащих 150 и 250 мг экстракта, достигали 19 и 24 мм соответственно, а средние по трем биологическим повторностям в этих вариантах отличались незначительно (рис. 1). Очевидно, что минимальную подавляющую концентрацию экстракта *S. verbascifolia*, или концентрацию экстракта, с которой тест-культура начинает проявлять чувствительность, следует искать в концентрационном диапазоне между 50 и 100 мг сухой навески на лунку.

Через 24 ч после инокуляции



На 6-е сутки после инокуляции

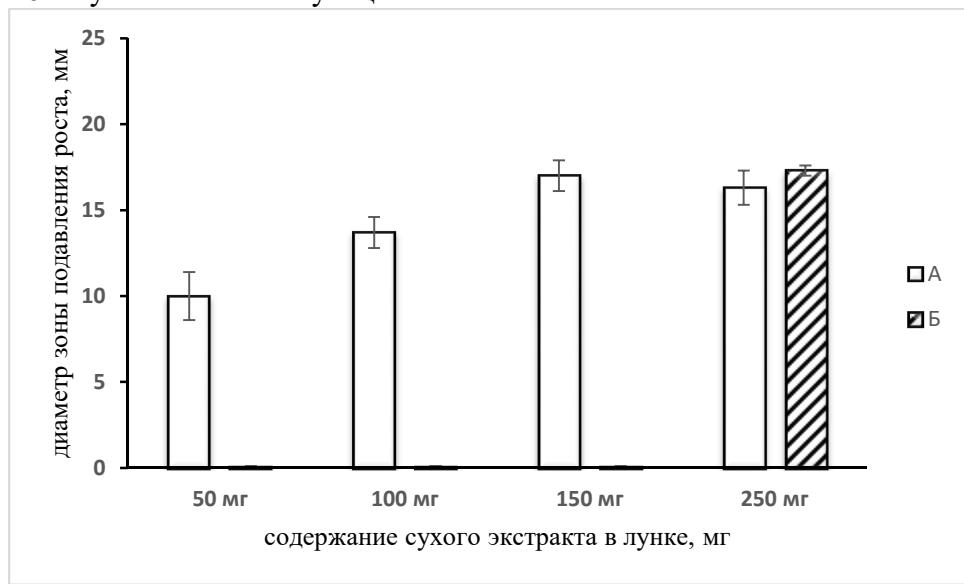
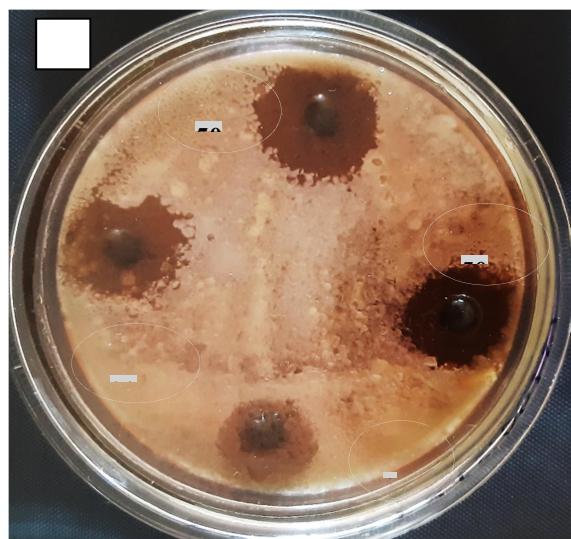


Рис. 1. Влияние сухого этанольного экстракта двух видов *Salvia* - *S. verbascifolia* (A) и *S. officinalis* (Б) на рост *E. coli* B-2393

В отношении *S. officinalis* тест-культура проявила чувствительность только к варианту с 250 мг экстракта, в котором максимальный диаметр зоны подавления роста достигал 23 мм (рис. 1, 2). В варианте с самым низким содержанием экстракта (50 мг в лунке) свободной от бактерий была только поверхность самой лунки (резистентность тест-культуры). Диаметры зон подавления роста по отношению к лункам, содержащим 100 и 150 мг экстракта *S. officinalis*, были близкими по величине и соответствовали категории «малочувствительность» (рис. 1). Результаты позволили предположить локализацию минимальной подавляющей концентрации экстракта *S. officinalis* между вариантами со 150 и 250 мг сухой навески в лунках.

*S. verbascifolia*



*S. officinalis*

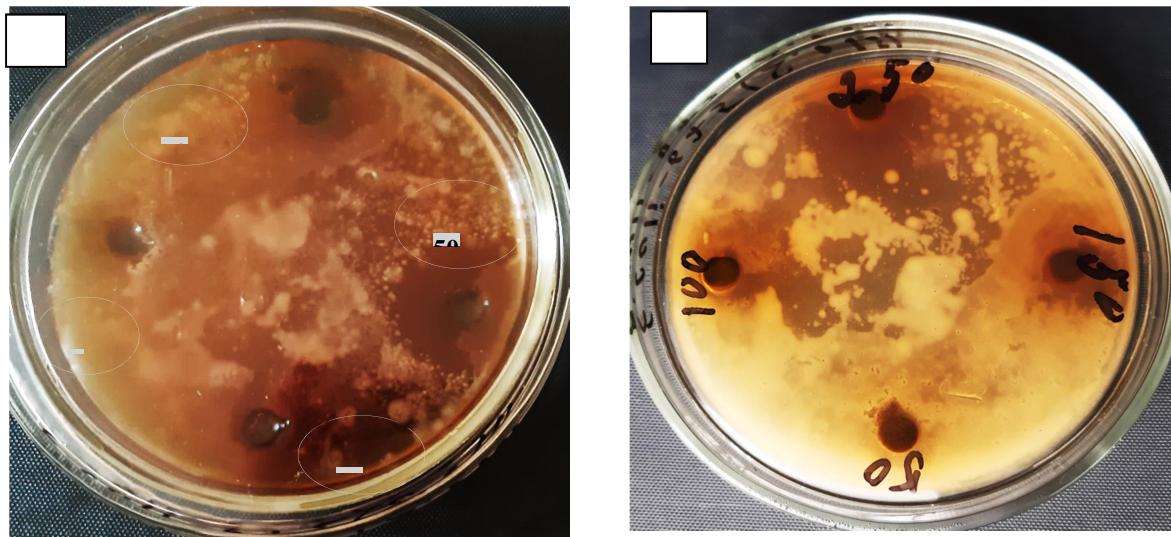


Рис. 2. Зоны подавления роста *E. coli* B-2393 лунками с экстрактом листьев двух видов шалфея через 24 часа (А, В) и на 6 сут (Б, Г) после инокуляции

Диффузный метод предполагает оценку результатов через 18–24 ч после инокуляции. Однако наиболее значимые различия в проявлении антибактериальной активности экстрактов двух видов шалфея выявились по истечении 6 сут после начала опыта. Лунки с 50, 100 и 150 мг экстракта *S. officinalis* полностью заросли культурой *E. coli* B-2393. Сохранилась в незначительно уменьшенном размере (на 1,4 мм) зона отсутствия роста в варианте с 250 мг экстракта. А у *S. verbascifolia* картина подавления роста сохранилась во всех вариантах (50–250 мг экстракта) с несущественной коррекцией по величине диаметров этих зон (рис. 1 и 2).

Полученные результаты свидетельствуют о более выраженном антибактериальном эффекте сухого этанольного экстракта *S. verbascifolia* в отношении *E. coli* B-2393 по сравнению с *S. officinalis*. В более ранних исследованиях было показано, что влияние *S. officinalis* на грамотрицательные бактерии зависит от типа используемого экстракта, в частности, эфирное масло оказывало значительное ингибирующее действие на рост *E. coli*, а эффект этанольного экстракта оказался слабым [20]. Исходя из сказанного, перспективным представляется сравнительное исследование антимикробных свойств эфирных масел этих объектов. В составе эфирных масел *S. verbascifolia* хромато-спектрометрическое исследование выявило содержание 43 разнообразных биологически активных соединений. Восемь из них встречаются в *S. officinalis*, при этом концентрация трех соединений (линалоол, δ-кадинен, транс-β-Оцимен) выше в составе экстракта *S. verbascifolia* [3]. Основная часть компонентов эфирного масла *S. verbascifolia* приходится на сесквитерпеноиды [3]. Есть данные, что сесквитерпеноиды ингибируют развитие представителей всех видов микробиоты человека [5]. Это позволяет рассматривать *S. verbascifolia* в качестве потенциального источника новых лекарственных средств, обладающих рядом преимуществ при лечении инфекционных заболеваний [3].

Даже предварительный характер нашего исследования позволил выявить дозозависимый антибактериальный эффект по отношению к культуре *E. coli* B-2393 сухих

экстрактов двух видов шалфея, лекарственного и коровяколистного, который в большей степени и пролонгированнее выражен у *S. verbascifolia*. Это свидетельствует о необходимости полноценных исследований antimикробных свойств с использованием более широкого спектра грамположительных и грамотрицательных тестовых микроорганизмов в отношении как этанольных экстрактов, так и эфирных масел этого растения.

*Выражаем благодарность заведующей кафедрой ботаники д. биол. н, профессору Магомедовой М.А. за консультацию и помочь в сборе материала.*

### Литература

1. Адамович Т.Г., Гаврилова И.А., Кирильчик Е.Ю. Методы изучения antimикробной активности антибиотиков и антисептиков *in vitro* // Современные технологии в медицинском образовании: материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию Белорус. гос. мед. ун-та, (г. Минск, 1–5 ноября 2021 г.) / под ред. С.П. Рубниковича, В.А. Филонюка. – Минск, 2021. – С. 1540–1544. – Режим доступа: <http://rep.bsmu.by:8080/handle/BSMU/33469> (дата обращения: 26.01.2023).
2. Большой энциклопедический словарь лекарственных растений: учебное пособие / под ред. Г.П. Яковлева. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: СпецЛит, 2015 – 759 с.: ил.
3. Вагабова Ф.А. Компонентный состав эфирного масла *Salvia verbascifolia* из природной популяции Дагестана // Ботаника в современном мире: труды XIV Съезда Русского ботанического общества и конференции. – Махачкала, 2018. Т. 2. – С. 166–167. – Режим доступа: <https://elibrary.ru>
4. Ивишина И.Б. Большой практикум «Микробиология». – СПб.: Проспект Науки, 2014. – 112 с.
5. Ипанова Е.М. Кумараты сесквитерпеновых спиртов почек берёзы повислой // Леса России: политика, промышленность, наука, образование; материалы IV научно-технической конференции. – СПб., 2019. – С. 284–286. Режим доступа: <https://elibrary.ru>
6. Красная книга Республики Дагестан. – Махачкала: Тип. ИП Джамалудинов М.А., 2020. – 800 с.
7. Муртузалиев Р.А. Конспект флоры Дагестана: в 4 т. Т. III: Melanthiaceae – Acoraceae / отв. ред. чл.-корр. РАН Р.В. Камелин. – Махачкала: Эпоха, 2009. – 304 с.
8. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др. Практикум по микробиологии / под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
9. Хассан Г.О.О., Ягудина И.Р., Карамова Н.С. Антимикробный потенциал эндофитных актинобактерий лекарственных растений // Вестник Оренбургского государственного университета. 2017. № 9(209). – С. 106–110. – Режим доступа: <https://elibrary.ru>
10. Флора СССР / гл. ред. акад. В.Л. Комаров, ред. тома Б.К. Шишкин. – М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1954. Т. XXI – 704 с.
11. Федько И.В., Китапова Р.Р., Мушиковатова Л.С. Скрининговое исследование antimикробной активности некоторых растений из флоры Сибири // Медицинский вестник Башкортостана. 2016. Т. 11, № 5 (65). – С. 117–119.

12. Энциклопедия лекарственных растений / Л.В. Анищенко, Е.Н. Подольская. – М.: АСТ, 2017. – 208 с.
13. Юрова Е.В., Климентова Е.Г., Рассадина Е.В., Антонова Ж.А. Влияние фитонцидов некоторых видов растений на клетки простейших // Современные здраво-въесберегающие технологии. 2017. № 4. – С. 430–438.
14. Abdelkader M., Ahcen B., Rachid D., Hakim H. Phytochemical Study and Biological Activity of Sage (*Salvia officinalis* L.) // World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Bioengineering and Life Sciences. 2014. Vol. 8, no. 11. – Pp. 1253–1257.
15. Badiee P., Nasirzadeh A.R., Motaffaf M. Comparison of *Salvia officinalis* L. essential oil and antifungal agents against candida species // Journal of Pharmaceutical Technology and Drug Research. 2012. Vol. 1, no 7.
16. Ghorbania A., Esmaeilizadeh M. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components // Journal of Traditional and Complementary Medicine. 2017. Vol. 7. – Pp. 433–440.
17. Khan M.F., Tang H., Lyles J.T., Pineau R., Mashwani Z., Quave C.L. Antibacterial Properties of Medicinal Plants from Pakistan Against Multidrug-Resistant ESKAPE Pathogens // Front. Pharmacol. 2018. Vol. 9. no. 815.
18. Krambeck K., Santos D., Oliveira A., Pintado M.E., Silva J.B., Lobo J.M.S., Amaral M.H. Optimization of extraction parameters on the antioxidant activity of passion fruit waste // Academia Journal of Medicinal Plants. 2018. Vol. 6, no. 8. – Pp. 209–213.
19. Russo A., Formisano C., Rigano D., Senatore F., Delfine S., Cardile V., Rosselli S., Bruno M. Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions // Food and Chemical Toxicology. 2013. Vol. 55. – Pp. 42–47.
20. Stefanovic O.D., Stanojevic D.D., Comic L.R. Synergistic antibacterial activity of *Salvia officinalis* and *Cichorium intybus* extracts and antibiotics // Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research. 2012. Vol. 69, no. 3. – Pp. 457–463.
21. Subramanian R., Subbramaniyan P., Noorul Ameen J., Raj V. Double bypasses soxhlet apparatus for extraction of piperine from *Piper nigrum* // Arabian Journal of Chemistry. 2016. Vol. 9. – Pp. S537–S540.
22. Tosun A., Khan S., Kim Y.S., Calin-Sanchez A., Hysenaj X., Antonio Carbonell-Barrachina A. Essential Oil Composition and Anti-Inflammatory Activity of *Salvia officinalis* L (Lamiaceae) in Murin Macrophages // Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2014. Vol. 13, no. 6. – Pp. 937–942.
23. Sankeshwari R.M., Ankola A.V., Bhat K., Hullatti K. Soxhlet versus Cold Maceration: Which Method Gives Better Antimicrobial Activity to Licorice Extract against *Streptococcus mutans*? // Journal of the Scientific Society. 2018. Vol. 45, no. 2. – Pp. 67–71. – Режим доступа: [http://dx.doi.org/10.4103/jss.JSS\\_27\\_18](http://dx.doi.org/10.4103/jss.JSS_27_18)

Поступила в редакцию 2 февраля 2023 г.

## To the Question of Determining the Antibacterial Activity of Extracts of Aboveground Organs of *Salvia verbascifolia*

**Z.A. Omarova, A.Ju. Isakova**

*Dagestan State University; Russia, 367000, Makhachkala, M. Gadzhiev st., 43a;  
z\_abakarova@mail.ru*

The article describes the results of studying the phytoncidal activity of extracts of the leaves of the mullein sage plant (*Salvia verbascifolia* M. Bieb.) against *Escherichia coli* B-2393 by diffusion from agar wells. The isolation of dry ethanol extract was carried out by Soxlet. The study of this nature on *S. verbascifolia* was carried out for the first time and it was shown that in terms of the degree of inhibitory effect on the growth of *E. coli* B-2393, it surpasses medicinal sage (*S. officinalis* L.).

**Keywords:** *Salvia*, *S. verbascifolia*, *S. officinalis*, *leaf extract*, *antibacterial activity*, *well-diffusion method*.

*Received 2 February 2023*