

Е. Ф. Семенова, А. С. Веденеева

О МИКРОФЛОРЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СТЕВИИ (*STEVIA REBAUDIANA BERTONI*)

Аннотация. В ходе проведенного микробиологического анализа выявлены основные представители микрофлоры лекарственного растительного сырья стевии. Охарактеризована антимикробная активность жидких экстрактов листьев стевии в сравнении с нативным клеточным соком. Выявлены культуры микроорганизмов, чувствительные к изучаемым экстрактивным веществам. Определена степень выраженности антимикробных эффектов в зависимости от культуры микроорганизма, питательной среды, лекарственной формы. Полученные результаты дают возможность уточнить ряд методических аспектов микробиологического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных форм стевии.

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

Abstract. The basic representatives of microflora of stevia medicinal vegetative raw material are revealed during the microbiological analysis. The antimicrobial activity of liquid extracts of stevia leaves is characterized in comparison with native cellular juice. The cultures of the microorganisms that are sensitive to studied extractive substances are revealed. The degree of expressiveness of antimicrobial effects is certain depending on the culture of a microorganism, a nutrient medium, a medicinal form. The received results enable to specify a number of methodical aspects of microbiological researches of stevia medicinal forms.

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

Введение

В настоящее время как в мировой, так и в отечественной медицинской практике достаточно широко используются для лечения и профилактики болезней различной этиологии лекарственные растения и получаемые из них фитопрепараты. К их числу следует отнести стевию Ребо – *Stevia rebaudiana Bertoni*, которая относится к семейству Астровые – *Asteraceae* (син. Сложноцветные *Compositae*) [1]. Ее листья содержат до 7 % гликозида стевииозида, который обладает приторно сладким вкусом: в 300 раз слаще сахарозы [2]. Стевиолгликозиды благотворно влияют на все жизненно важные системы организма человека, нетоксичны, не имеют мутагенного действия и возрастных ограничений [3]. Наличие в листьях большого числа биологически активных соединений определяет фармакологическую ценность стевии, которая обладает антидиабетическим, гипотензивным, тонизирующим, противовоспалительным, иммуномодулирующим и другими эффектами [1–2, 4].

Использование фитопрепаратов может быть ограничено возможной инфицированностью используемых частей лекарственного растения и контаминированностью лекарственного сырья патогенными и условно-патогенными микроорганизмами [5–8]. Их воздействия способны вызвать у человека различную инфекционную патологию, интоксикацию, сенсibilизацию организма, например, для микромицетов известны случаи бронхолегочного ас-

пергиллеза, кандидозов слизистых оболочек, грибковой аллергии и т.д. [8–10]. Поэтому большое значение имеет микробиологический анализ лекарственного растительного сырья и представляется актуальным изучение микрофлоры листьев стевии и определяющих ее факторов.

Цель работы: исследование особенностей микрофлоры стевии и антимикробных эффектов нативного клеточного сока и жидких экстрактов.

Материал и методы исследования

Объектом исследования служили образцы лекарственного растительного сырья: свежие листья, воздушно-сухие листья (объем выборки равен 100), порошок из воздушно-сухих листьев (объем выборки равен 48). В исследования были включены лекарственные формы: настой (водный экстракт); этанольный (спиртовой) экстракт, приготовленные в соответствии с требованиями XI Государственной фармакопеи СССР, 1990 [11]; а также водный раствор (раствор водорастворимых веществ) этанольного экстракта и нативный клеточный сок.

Изучение микрофлоры лекарственного растительного сырья стевии проводили с использованием влажной камеры, в которую помещали цельные листья и измельченное лекарственное растительное сырье. Поверхностную стерилизацию листьев проводили 70 % этанолом в течение 5 с, а измельченное сырье стерилизовали в бактерицидной камере марки КБ–02–«Я»–ФП 2 ч. Все исследуемые образцы помещали в термостат и инкубировали при температуре 30 ± 2 °С в течение двух суток, затем при температуре 24 ± 2 °С 7–8 суток [10]. При появлении на исследуемом материале налета готовили нативные препараты и микроскопировали с использованием микроскопа «Биомед-3». Выделение в чистую культуру осуществляли на плотных питательных средах: картофельный агар, кукурузно-сахарозный агар, питательный агар и агар Сабуро (среда № 2). Идентификацию патогенов проводили на основе справочной литературы [5–6, 8, 12].

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, коринебакагаре без теллурита калия, стафилококкагаре, среде Эндо и агаре Сабуро [7]. В эксперименте использовали 10 чистых культур микроорганизмов различного таксономического происхождения [13] из рабочей коллекции кафедры микробиологии, эпидемиологии и инфекционных болезней Медицинского института Пензенского государственного университета: *Sarcina flava*, *Pantoea agglomerans* (*Erwinia herbicola*), *Escherichia coli*, *Bacillus species* (*anthracoides*), *Staphylococcus species* (*albus*), *Myxococcus species*, *Candida species*, *Penicillium species*, *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 или клеточного сока (повторность одно- ... шестикратная). Контроли: I – стерильная вода, II – 95 % этиловый спирт, III – без добавления экстрактов и контрольных жидкостей. Культивирование осуществляли при температуре 29 ± 1 °С и 37 °С. Учет результатов проводили через 1–7 суток путем определения диаметра зон задержки (подавления, угне-

тения, отсутствия) роста, характера роста по штриху. Определение анти-микробного действия проводили в сравнении интенсивности роста изучаемых культур в присутствии и в отсутствии нестерильных лекарственных форм из стевии [14].

Результаты и обсуждение исследования

Визуальная оценка изучаемых образцов не выявила макроморфологических и анатомо-морфологических признаков поражения лекарственного растительного сырья микроорганизмами. Однако исходная зараженность микроорганизмами, определенная в условиях влажной камеры, достигала для воздушно-сухого цельного листа 100 %, а для свежего цельного листа – 66,7 %. Инфицированность порошкового сырья варьировала от 3,3 до 66,7 %. В связи с чем целесообразным было проведение поверхностной стерилизации образцов с целью снижения уровня инфицированности и контаминированности сырья, что привело к упрощению и уменьшению трудоемкости выделения основных патогенов в чистую культуру [10].

Микробиологический анализ позволил определить состав микрофлоры листьев стевии. Макро- и макроморфологические особенности идентифицированных микроорганизмов представлены ниже.

Alternaria sp. На естественном субстрате наблюдали пушистый или шерстистый налет от серого до светло-оливкового цвета, на агаризованной среде – колонии от зеленого до черного цвета (агар Сабуро); от бело-серого до оливково-коричневого цвета (картофельный агар). Микроскопия показала, что гифы септированы, от светло- до темно-коричневых; конидии золотисто-коричневые, разнообразные по форме: яйцевидные, обратнобулаво- или грушевидные, с апикальным носиком или без него, с 3–8 поперечными и 1–2 продольными перегородками.

Bipolaris sp. (Helminthosporium sp.). На естественном субстрате был отмечен бархатистый налет от бурого до черного цвета, на картофельном агаре – пушистые или шерстистые колонии, вначале белые, впоследствии приобретающие окраску от серой до черной. Под микроскопом были видны септированные коричневые гифы, конидии булавовидные с 3–5 поперечными перегородками, прорастающие биполярно.

Endomycetes. На естественном субстрате наблюдали белый или светло-кремовый налет. На агаре Сабуро – колонии белые или кремовые, гладкие или слегка порошачие. При микроскопировании обнаруживались шаровидные клетки, одиночные, в цепочках или скоплениями; псевдогифы отсутствовали.

Actinomyces sp. На естественном субстрате отмечали белый мучнистый налет. На кукурузно-сахарозном агаре – колонии круглые, мелкозернистые, в центре выпуклые, белого цвета, на картофельном агаре – с кремовым оттенком. Под микроскопом – тонкие или слегка изогнутые палочки и разветвленные нити, на концах иногда вздутые или булавовидные, большое количество кокковидных (споровидных) форм.

Наиболее часто выделялись изоляты альтернарий, реже – гельминтоспориума, в единичных случаях – эндомицетовые дрожжи и актиномицеты.

Таким образом, проведенные микробиологические исследования выявили наличие в лекарственном сырье стевии следующих микроорганизмов: *Alternaria sp.* (класс *Ascomycetes*, порядок *Dothidiales*); *Bipolaris sp.* (класс *Ascomycetes*, порядок *Dothidiales*); *Endomycetes* (класс *Ascomycetes*, порядок *En-*

domycetalis); *Actinomyces* sp. (класс *Firmicutes*, группа 20 (Грамположительные неспорообразующие палочки неправильной формы)).

При этом следует отметить, что спектр выявленных микроорганизмов не отличался разнообразием, и представляет интерес выяснить причины, определяющие указанный состав микрофлоры. Одним из таких факторов может являться антимикробная активность стевии.

Полученные методом диффузии в агар экспериментальные данные свидетельствуют, что изучаемые лекарственные формы обладали антимикробной активностью, при этом ее проявление зависело от культуры микроорганизма, питательной среды, вида экстракта и т.д. Антибактериальное действие в отношении грамотрицательных микроорганизмов оказалось более выраженным, чем в отношении грамположительных (рис. 1).

Из грамположительных микроорганизмов наиболее чувствительными культурами оказались *S. species* (44,4 % случаев) и *S. flava* (38,5 % случаев), а из грамотрицательных – *P. agglomerans* (77,9 % случаев), *M. species* (60,0 % случаев) и *E. coli* (25,9 % случаев). При этом отмечен как бактерицидный эффект в отношении *M. species*, *P. agglomerans*, *E. coli*, *S. species*, так и бактериостатический в отношении *S. species*, *S. flava*, *M. species*, *P. agglomerans*. Антимикотическое действие в большей степени выражено в отношении *P. species* (90,9 %), *F. solani* (50,0 %), *A. terreus* (18,2 %).

Наибольшее антибактериальное действие оказывал настой (в 40,0 % случаях) и водорастворимые вещества этанольного экстракта (в 40,0 % случаях), при этом клеточный сок оказывал антибактериальное действие в 26,7 % случаях (рис. 2).

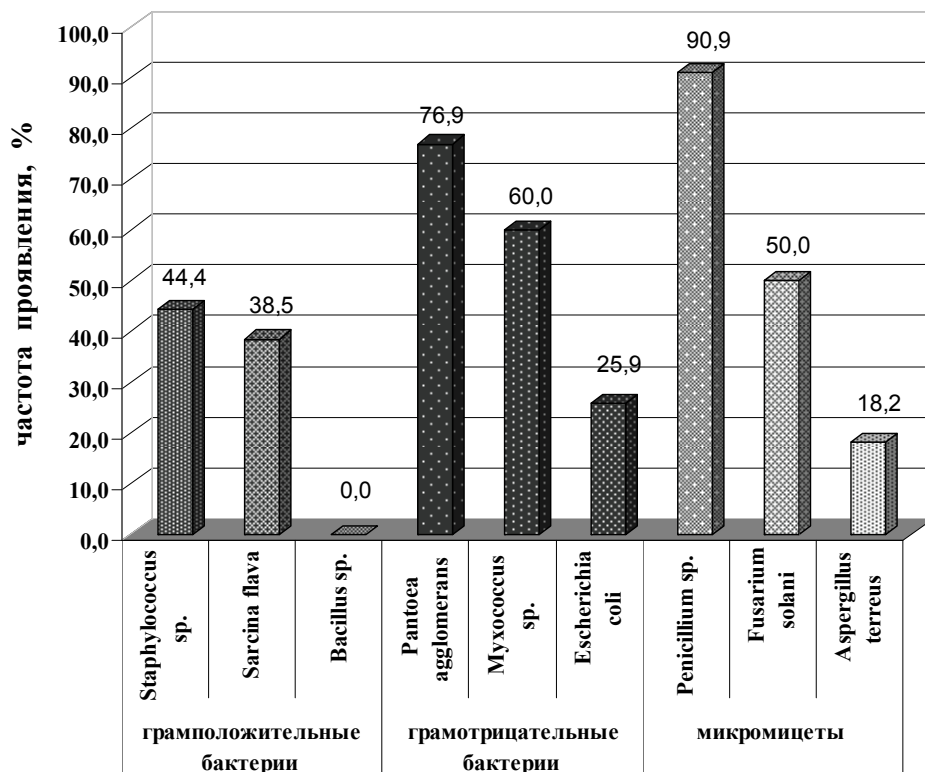


Рис. 1 Антимикробный эффект стевии

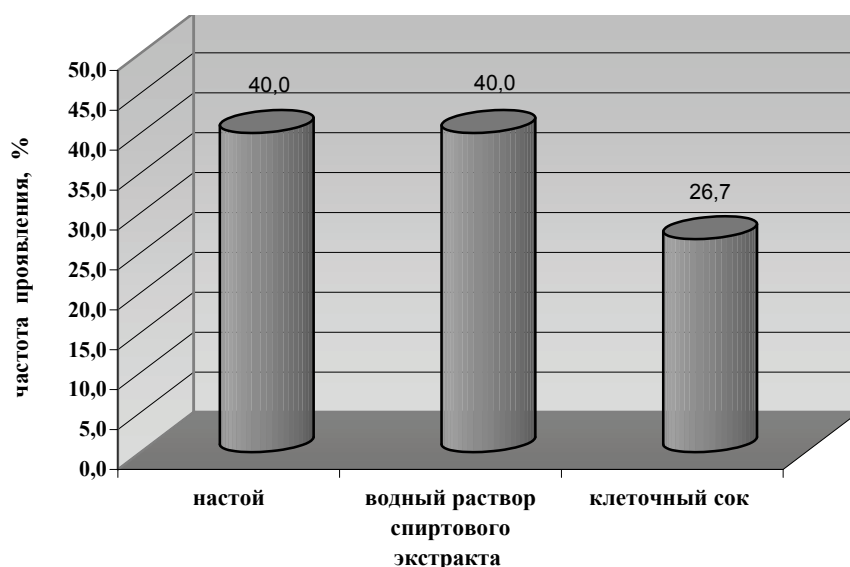


Рис. 2 Частота проявления антибактериального эффекта в зависимости от лекарственной формы

Жидкие экстракты стевии не обладали антимикробным эффектом в отношении стафилококка и кишечной палочки при культивировании на стафилококкагаре и среде Эндо, соответственно (рис. 3). На стафилококкагаре наблюдался бактерицидный эффект в отношении *M. species* (75,0 % случаев) и *S. flava* (25,0 % случаев), а бактериостатический – в отношении *S. flava* (50,0 % случаев). На среде Эндо наличие бактериостатического эффекта было выявлено в единичном случае: в отношении *S. flava*. На коринебакагаре эффект был выражен для следующих культур: бактерицидный – *S. species* (50,0 % случаев), бактериостатический – *S. species* (100,0 % случаев), *S. flava* (50,0 % случаев) и *P. agglomerans* (25,0 % случаев).

При использовании питательного агар для индикации антимикробного эффекта в отношении *P. agglomerans* антибактериальный эффект наблюдался в 100,0 % случаев, в отношении *M. species* – в 54,6 % случаев, а *S. species* – в 26,3 % случаев. При использовании среды АГВ антибактериальный эффект в 100,0 % случаев наблюдался в отношении *M. species* и *P. agglomerans*, в 33,3 % случаев – в отношении *E. coli*, и в 33,3 % случаев – в отношении *S. flava*.

Таким образом, антимикробная активность клеточного сока, водных и спиртовых экстрактов из листьев выражена в различной степени.

Заключение

Известно, что использование фитопрепаратов может быть ограничено возможной инфицированностью используемых частей лекарственного растения и контаминированностью лекарственного сырья патогенными и условно-патогенными для человека микроорганизмами [5–6, 8–9]. Микробиологическая оценка лекарственного сырья стевии свидетельствует, что инфицированность исходных образцов составила для воздушно-сухих цельных листьев 100,0 %, свежих – 66,7 %; для измельченного сырья – от 3,3 до 66,7 %. В результате проведенного исследования выявлены основные представители мик-

рофлоры лекарственного сырья стевии. Ранее было показано, что возбудителями микозов стевии являются *Alternaria*, *Septoria*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium* и *Fusarium* [1]. Указанные микроорганизмы, за исключением *Alternaria*, нами не наблюдались. Кроме того, идентифицированы *Bipolaris* sp. (*Helminthosporium* sp.), *Actinomyces* sp. и *Endomycetes*, которые в составе микрофлоры стевии в научной литературе описаны не были. В лекарственном растительном сырье наиболее часто выявлялись *Alternaria* sp., реже – *Bipolaris* (син. *Helminthosporium*) sp., в единичных случаях – *Endomycetes* и *Actinomyces* sp., *Alternaria* sp. и *Bipolaris* sp. относятся к факультативным паразитам – фитопатогенам, *Endomycetes* является представителем эпифитной микрофлоры, *Actinomyces* sp. – транзитной микрофлоры.

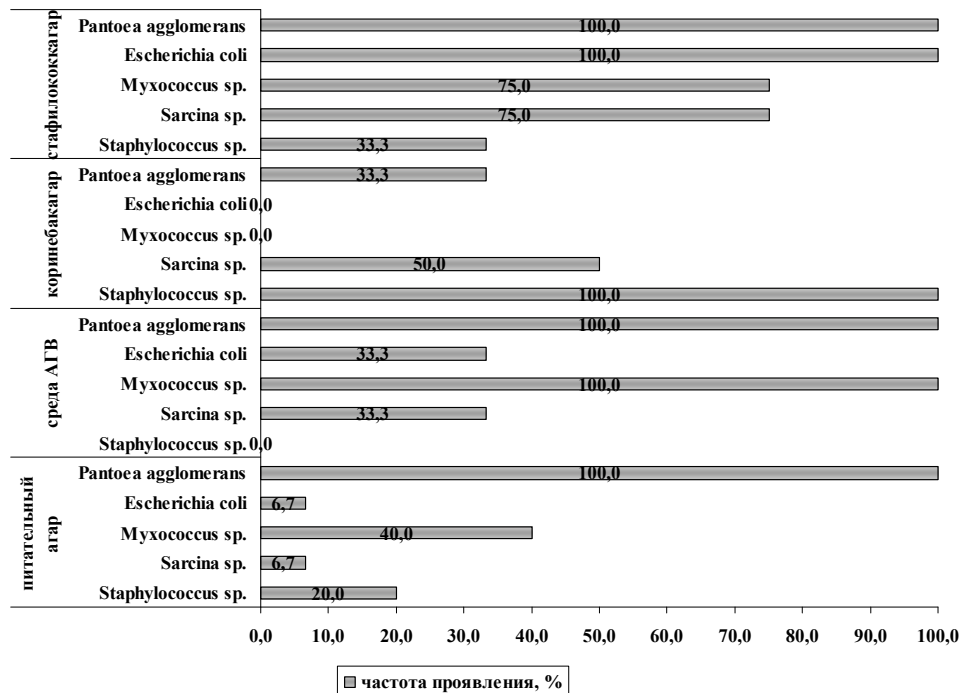


Рис. 3 Результаты влияния питательной среды на проявление антибактериального действия клеточного сока из листьев стевии

Нами определены культуры микроорганизмов, чувствительные к антимикробным веществам стевии: *Pantoea agglomerans*, *Myxococcus* 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 в наших опытах лучшими питательными средами являлись питательный агар, коринебакагар, стафилококкагар, агар Сабуро. Указанные стандартные среды обеспечивали оптимальные условия роста тестируемых культур микроорганизмов, не содержали в чрезмерных количествах ингибиторы и стимуляторы, а также вещества, подавляющие антимикробное действие.

Бактерицидный эффект отмечен при использовании настоя (частота проявления составила 26,7 %), бактериостатический эффект – при использо-

вании следующих лекарственных форм: настоя, раствора водорастворимых веществ этанольного экстракта, нативного клеточного сока (частота проявления составила 40,0; 40,0; 26,7 % соответственно).

Результаты проведенных исследований показали, что все жидкие лекарственные формы из листьев стевии обладали антимикробным эффектом в отношении микроорганизмов различного таксономического происхождения. При этом ее проявление зависело от культуры микроорганизма, лекарственной формы и т.д.

Список литературы

1. **Семенова, Н. А.** Стевия – растение XXI века / Н. А. Семенова. – СПб. : ДИЛЯ, 2005. – 160 с.
2. **Ситничук, И. Ю.** Разработка эффективного способа выделения суммы дитерпеновых гликозидов из *Stevia rebaudiana* Bertoni / И. Ю. Ситничук, Е. Н. Стриженнова, А. А. Ефремов, Г. Г. Первышина // Химия растительного сырья. – 2002. – № 3. – С. 73–75.
3. **Костина, В. В.** Исследование использования ферментативно модифицированного стевииозида в производстве молочных напитков / В. В. Костина, В. А. Абелян // Вестник СевКавГТУ. – 2003. – № 1 (6). – С. 6. – (Продовольствие).
4. **Nord, C.** Ecological effect of antimicrobial agents on human intestinal microflora / C. Nord, A. Heimdahl, L. Kager // Microbial Ecol. Health. Dis. – 1991. – № 2. – P. 193–207.
5. **Билай В. И.** Микроорганизмы – возбудители болезней растений : справочник / В. И. Билай. – Киев : Наукова думка, 1988. – 550 с.
6. Определитель бактерий Берджи : в 2-х т. / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снитта, Дж. Стейли, С. Уилльямса. – М. : Мир, 1997. – 800 с.
7. Практикум по микробиологии / под ред. А. И. Нетрусова. – М. : Академия, 2005. – 608 с.
8. **Саттон, Д.** Определитель патогенных и условно патогенных грибов / Д. Саттон, А. Фотергилл, М. Ринальди. – М. : Мир, 2001. – 486 с.
9. **Левитин, М. М.** Микотоксины фитопатогенных грибов и микотоксикозы человека / М. М. Левитин // Успехи медицинской микологии / под ред. Ю. В. Сергеева. – М. : Национальная академия микологии, 2003. – Т. 1. – С. 148–150.
10. **Семенова, Е. Ф.** Микробиологические исследования семян и плодов лекарственных культур / Е. Ф. Семенова, В. Л. Мельников, Е. В. Преснякова [и др.] // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2008. – № 2. – С. 26–37.
11. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М. : Медицина, 1990. – 400 с.
12. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / под ред. А. С. Быкова, А. А. Воробьева, В. В. Зверева. – М. : Медицинское информационное агентство, 2008. – 272 с.
13. Изменения в таксономии и номенклатуре бактерий // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2004. – Т. 6. – № 1. – С. 4–9.
14. **Семенова Е. Ф.** Об антимикробном эффекте стевии Ребо (*Stevia rebaudiana* Bertoni) / Е. Ф. Семенова, А. С. Веденеева, Т. И. Фролова // Актуальные проблемы медицинской науки и образования : труды II межрегиональной научной конференции. – Пенза : Информационно-издательский центр ПензГУ, 2009. – С. 227–228.

Семенова Елена Федоровна

кандидат биологических наук, доцент,
кафедра общей и клинической
фармакологии, Медицинский институт,
Пензенский государственный
университет

E-mail: sef7@sura.ru

Semenova Elena Fedorovna

Candidate of biological sciences, associate
professor, sub-department of general
and clinical pharmacology, Medical
institute, Penza State University

Веденеева Александра Сергеевна

интерн, Медицинский институт,
Пензенский государственный
университет

E-mail: alecksashka@inbox.ru

Vedeneeva Aleksandra Sergeevna

intern, Medical institute,
Penza State University

УДК 615.32:615.451:615.076

Семенова, Е. Ф.

О микрофлоре и микробиологической активности стевии (*Stevia rebaudiana Bertonii*) / Е. Ф. Семенова, А. С. Веденеева // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2009. – № 3 (11). – С. 61–68.