АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭМУЛЬСИЙ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ *ACHILLEA ARABICA* KOTSCHY И *ACHILLEA MILLEFOLIUM* L. В ОТНОШЕНИИ *CANDIDA ALBICANS*

Шаповал Ольга Георгиевна[1], Истамкулова Мохигул Муродкуловна[2], Дусов Турсунмурад Холмурадович[3], Мухамадиев Абдукодир Нуралиевич[4], Мухамадиев Нурали Курбоналиевич [5]

[1]к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

[2]докторант Самаркандского государственного университета им. Ш. Рашидова Республики Узбекистан;

[3]соискатель Самаркандского государственного университета им. Ш. Рашидова Республики Узбекистан;

[4]к.х.н., доцент кафедры физической и коллоидной химии Самаркандского государственного университета им. Ш. Рашидова Республики Узбекистан;

[5]д.х.н., профессор, заведующий кафедрой физической и коллоидной химии Самаркандского государственного университета им. Ш. Рашидова Республики Узбекистан;

https://doi.org/10.5281/zenodo.17185814

Аннотация. *Целью исследования явилась оценка противомикробной активности эмульсий эфирных масел, полученных методом паровой гидродистилляции из надземной части Achillea arabica Kotschy и Achillea millefolium L. (Asteraceae) в отношении Candida albicans. Анализ химического состава эфирных масел проводили методом газожидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. Антимикробную активность определяли методом микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтон с 1% глюкозой при микробной нагрузке 5×10^5 КОЕ/мл в отношении четырех клинических штаммов C.albicans. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) определяли у 5% эмульсий, приготовленных на основе (ко)сурфактантов. Установлено, что основными компонентами эфирных масел явились пероксидный монотерпен - аскаридол, монотерпеновые углеводороды и их кислородсодержащие производные, а также ароматические углеводороды. $МИК_{50}$ эмульсии эфирного масла A.arabica Kotschy составила 0,24, эмульсии эфирного масла A. millefolium L. – 0,05 мкл/мл.*

По результатам эксперимента эфирные масла обоих видов могут рассматриваться как перспективные антимикробные агенты.

Ключевые слова: *антимикробная активность, эфирное масло растений, Achillea arabica Kotschy, Achillea millefolium L., Candida albicans.*

Abstract. *The purpose of this study was to assess antimicrobial activity of the essential oils, obtained by the steam hydrodistillation method from flowers of Achillea arabica Kotschy and Achillea millefolium L. (Asteraceae) against Candida albicans. Analysis of chemical compositions of the essential oils was produced by the gas-liquid chromatography and mass spectrometry. The antimicrobial activity was evaluated using the serial microdilution method in Muller-Hinton broth with 1% of glucose and microbial load 5×10^5 CFU/ml against four clinical*

strains of C.albicans. 5% emulsions prepared on the base of the (co)surfactants were used for determination of minimal inhibitory concentrations (MICs). Major components of the essential oils were represented by peroxide monoterpene – ascaridole, other monoterpenes, oxygenated monoterpenes and aromatic hydrocarbons. MIC_{50} of A.arabica Kotschy essential oil emulsion was 0.24, MIC50 of A. millefolium L. essential oil emulsion – 0.05 µl/ml.

According to the obtained results essential oils of the both species may be considered as perspective antimicrobial agents.

Key words: *antimicrobial activity, plant essential oil, Achillea arabica Kotschy, Achillea millefolium L., Candida albicans.*

Annotatsiya. *Tadqiqotning maqsadi — Achillea arabica Kotschy va Achillea millefolium L. (Asteraceae) yer ustki qismidan parli gidrodistillyatsiya usuli orqali olingan efir moylari emulsiyalarining Candida albicans ga nisbatan antimikrob faolligini baholashdan iborat. Efir moylarining kimyoviy tarkibi gaz-suyuqlik xromatografiyasi va mass-spektrometriya usuli yordamida tahlil qilindi. Antimikrob faollik Mueller-Hinton bulyonida 1% glyukoza qo‘shilgan holda, mikrob yuklamasi 5×10^5 KOYE/ml bo‘lgan to‘rtta klinik shtamm C. albicans ga nisbatan mikrosubltirish usuli orqali aniqlandi. Emulsiyalarning minimal ingibirlovchi konsentratsiyasi (MIK) (ko)surfaktantlar asosida tayyorlangan 5% emulsiyalarda o‘lchandi. Aniqlanishicha, efir moylarining asosiy tarkibiy qismlari peroksidli monoterpen — askaridol, monoterpen uglevodorodlari va ularning kislorodli hosilalari, shuningdek aromatik uglevodorodlardir. A. arabica Kotschy efir moyi emulsiyasining MIK_{50} qiymati 0,24 mkl/ml, A. millefolium L. efir moyi emulsiyasida esa 0,05 mkl/ml ni tashkil qildi.*

Eksperiment natijalariga ko‘ra, har ikki tur efir moylari istiqbolli antimikrob agentlar sifatida qaralishi mumkin.

Kalit so‘zlar: *antimikrob faollik, o‘simlik efir moyi, Achillea arabica Kotschy, Achillea millefolium L., Candida albicans.*

Введение

На современном этапе эфирные масла растений являются одними из доступных источников веществ природного происхождения, оказывающих различные действия как в условиях макроорганизма, так и вне его, что способствует их практическому применению в производстве парфюмерно-косметической продукции, фармацевтических препаратов, продуктов питания и других отраслях [1]. Большое количество известных видов (около трех тысяч) эфирномасличных растений открывает все новые и новые горизонты в изучении биологического действия эфирных масел. В условиях распространения устойчивости микроорганизмов к антимикробным химиопрепаратам проводятся исследования и на предмет противомикробной активности. Однако различная география распространения видов эфирномасличных растений, их большое число и вариабельность химического состава эфирных масел как вторичных метаболитов, зависящая от многих факторов, требует накопления большого количества данных об их биологическом действии, включая антимикробное. В росте резистентности к противомикробным препаратам все большую тревогу вызывают грибы, поскольку частота микозов неуклонно повышается на фоне иммунодефицитных состояний и массового применения антибактериальных препаратов. При изучении противомикробной активности эфирных масел с целью ее потенцирования общепринятые методы исследований ориентированы на приготовление их эмульсий на основе сурфактантов и косурфактантов.

Целью настоящего исследования явилась оценка антимикробной активности эмульсий эфирных масел двух видов рода Achillea (семейство Asteraceae): *Achillea arabica* Kotschy (тысячелистника Биберштейна) и *Achillea millefolium* L. (тысячелистника обыкновенного) в отношении наиболее известных представителей нормальной микобиоты человека – одноклеточных грибов *Candida albicans*.

Материалы и методы

Сырье эфирномасличных растений *A.arabica* Kotschy, *A.millefolium* L. собирали в конце мае 2023 г. в селе Миранкул Нурабадского района Самаркандской области Республики Узбекистан. Идентификацию видов растений проводили геоботаническими методами [2, 3]. Эфирное масло получали из надземной части растений методом паровой гидродистилляции по стандартной методике согласно ГФ XIII ОФС.1.5.3.0010.15 «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах». Методом газожидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (ГЖХ МС) на анализаторе YL6900 GC-MS (Young Lin Instruments, Корея) определяли химический состав эфирных масел с соблюдением следующих условий: начальная температура термостата колонки – 60 °С (изотермический режим 3 мин), нагрев со скоростью 15 °С/мин до 250 °С и последующим изотермическим режимом в течение 3 мин. Температура инжектора составила 250 °С, частота потока газа гелия – 1 мл/мин, коэффициент разделения – 1:100. Использованные параметры работы масс-детектора: время удержания – 3 мин, эмиссия – 50 мА, диапазон сканирования – 30-350 а.е.м., скорость сканирования – 1600 а.е.м./с, температура ионного источника – 230 °С, температура трансфера – 280 °С. Идентификацию компонентов проводили на основе сравнения полученных масс-спектров с библиотекой масс-спектров NIST (National Institute of Standards and Technology, США). Для количественного анализа использовали метод внутренней нормализации.

Антимикробную активность эмульсий эфирных масел оценивали в отношении четырех клинических штаммов *C.albicans*, по два из которых выделены из влагалища беременных женщин и мочи детей в бактериологической лабораториях ГУЗ «Саратовская городская клиническая больница №10» и ГУЗ «Саратовская областная детская клиническая больница». Из цельных эфирных масел готовили 5% эмульсию на основе 40% дистиллированной воды, 15% глицерина, 20% этанола и твина-80 [4]. С помощью метода двухкратных микроразведений в лунках стерильного планшета определяли минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) [5]. Использовали бульон Мюллера-Хинтон (Condalab, Испания) с 1% глюкозой и микробную нагрузку 5×10^4/100 мкл Для приготовления первого разведения использовали бульон двойной концентрации. Посевы инкубировали в течение суток при температуре 37 °С, после чего для определения МИК осуществляли высев на агар Сабуро (ООО «НИЦФ», Россия) и в каждую лунку вносили по 10 мкл 0,01% раствора резазурина (ООО «Невареактив», Российская Федерация), изменение цвета которого регистрировали после инкубации через 16 часов.

Дополнительно диско-диффузионным методом определяли чувствительность всех штаммов к противогрибковым препаратам – амфотерицину, препаратам группы азолов - флуконазолу, итраконазолу, кетоконазолу (ООО «НИЦФ», Российская Федерация), используя методику рекомендаций по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам [6]. Для учета результатов ориентировались на критерии методических рекомендаций по флуконазолу и инструкции производителя дисков с антимикотиками.

Статистическую обработку проводили с использованием программы Excel Microsoft Office Professional plus 2021, определяя значения $МИК_{50}$ эмульсий эфирных масел и их доверительный интервал.

Результаты

Выход эфирного масла *A.arabica* Kotschy составил 0,90±0,11%. Согласно ГЖХ МС мажорными соединениями из 26 идентифицированных явились монотерпеновые углеводороды (циклофенхен, камфен, сабинен, β-пинен, β-мирцен, 2-карен, γ-терпинен, терпинолен) – 35% и пероксидные монотерпены (аскаридол) – 30,1%. Также в составе обнаружены кислородсодержащие монотерпеноиды (α-туйон, 2-р-ментен-1-ол, камфора, лавандулол, терпинен-4-ол, эвкалиптол, линалоол, cis-р-мента-2,8-диен-1-ол) – 16,2%, ароматические углеводороды (m-цимен, 4-изопропенил-толуен, космен) – 13,5%, хиральные монотерпеновые спирты – 2%, фенольные и ароматические кислородсодержащие углеводороды (эвгенол, жасмон) – 1,2%, сесквитерпены и их кислородсодержащие производные (гермакрен Д, розифолиол) – 0,8%.

Выход эфирного масла *A.millefolium* L. составил 1,20±0,11%, из 26 соединений основную группу составили пероксидный монотерпен – аскаридол (56,9%), также обнаружены ароматические углеводороды (m-цимен, 1-метил-4-(проп-1-ен-2-ил)бензен) – 21%, монотерпеновые углеводороды (α-пинен, камфен, β-фелландрен, терпинолен, γ-терпинен) – 9,6%, кислородсодержащие монотерпеноиды (α-туйон, эвкалиптол, линалоол, 2-р-ментен-1-ол) – 5,7%, фенолсодержащие и ароматические кислородсодержащие соединения (нонаналь, 1,3,8- р-ментатриен, эвгенол, жасмон) – 2,2%, хиральные монотерпеновые спирты (cis- и trans-пиперитол) – 2%, сесквитерпены и их производные (кариофиллен, гермакрен Д, неролидол, спатуленол, оксид кариофиллена) – 1,3%, монотерпеновые эфиры и ацетаты (борнилацетат) – 0,6%, макроциклические лактоны (оксациклопентадекан-2-он) – 0,5%.

Диско-диффузионным методом установлено, что три штамма грибов были чувствительны ко всем противогрибковым препаратам и лишь один - устойчив ко всем, кроме итраконазола.

По результатам метода микроразведений установлено, что диапазон МИК эмульсии эфирного масла *A.arabica* Kotschy составил 0,09-0,78 мкл/мл, *A. millefolium* L. – 0,02-0,19 мкл/мл. По результатам контроля разведений основы эмульсии (без эфирных масел) установлено, что она ингибирует рост трех штаммов в разведении в 2 раза и не задерживает рост ни в одном из разведений одного опытного штамма. Некоторые результаты представлены на рисунке.

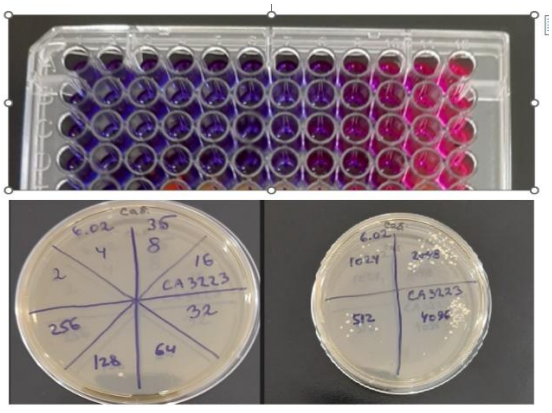


Рисунок. Результаты пробы с резазурином для метода микроразведений с *A.arabica*

Kotschy (в четырех горизонтальных рядах A, B, C, D – посевы четырех опытных штаммов грибов в двухкратные последовательные разведения 5% эмульсии) и результаты высева из опытных разведений для одного из штаммов *C.albicans*.

$МИК_{50}$ эмульсии эфирного масла *A.arabica* Kotschy составила 0,24, ее доверительный интервал 0,16-0,36, $МИК_{50}$ эмульсии эфирного масла *A. millefolium* L. – 0,05 при доверительном интервале 0,03-0,08 мкл/мл.

Обсуждение

Согласно химическому составу эфирное масло цветов *A.arabica* Kotschy и *A.millefolium* L. в качестве мажорных соединений содержат пероксидный монотерпен - аскаридол, монотерпеновые углеводороды и их кислородсодержащие производные, а также ароматические углеводороды. В настоящее время известно, что большинство компонентов эфирных масел обладают противомикробным, в том числе антифунгальным действием [7, 8, 9].

Антимикробную активность эфирных масел, включая противогрибковую, связывают с повреждением покровной и митохондриальной цитоплазматических мембран клетки, изменением трансмембранного ионного транспорта, нарушением синтеза нуклеиновых кислот и полисахаридов клеточной стенки [1, 8, 10, 11]. Метод микроразведений является основным в определении антимикробной активности различных соединений. В литературных обзорах МИК эфирных масел в отношении штаммов грибов, в том числе Candida, варьируют от десятых микрограмма до нескольких мг на мл [8, 12]. Это, очевидно, зависит от состава масел, использования (ко)сурфактантов для лучшей растворимости, и, возможно, условий культивирования опытных штаммов.

Так МИК эфирного масла из соцветий *A.biebersteinii* Afan. (*A.arabica* Kotschy) составила 2000мкг/мл в отношении референсных штаммов *C.albicans*, *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus niger*, культивированных в декстрозном бульоне Сабуро, рабочий раствор эфирных масел готовили с использованием диметилсульфоксида [13]. При этом основными компонентами эфирного масла явились линалоол (34,5%), р-цимен (13,3%), α-терпинеол (7,4%). При изучении противокандидозной активности эфирных масел растений видов *Lavandula stoechas* L., *Melissa officinalis* L., *Origanum vulgare* L., *Mentha piperita* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L., *Thymus vulgaris* L. при культивировании грибов в триптиказо-соевом бульоне получены значения МИК в диапазоне 390-12500 мкг/мл [14]. При этом основными компонентами (с содержанием 15-50%) были линалоол и линалил ацетат (*Lavandula stoechas* L.), цитраль (*Melissa officinalis* L.), карвакрол (*Origanum vulgare* L.), ментол и ментон (*Mentha piperita* L.), эвкалиптол и α-пинен (*Rosmarinus officinalis* L.), туйон и камфора (*Salvia officinalis* L.), р-цимен и тимол (*Thymus vulgaris* L.). Эфирные масла были предварительно гомогенезированы в используемой питательной среде. При культивировании грибов Candida в среде RPMI-1640 установлены МИК эфирных масел 46 видов (род Achillea не вошел в исследование) в диапазоне 0,0078-1%, то есть 78-10000 мкг/мл [15]. При подобных условиях культивирования другие авторы получили значения МИК эфирных масел *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Lavandula vera*, *Pinus sylvestris*, *Foeniculum vulgare*, *Melissa officinalis*, *Salvia officinalis*, *Eugenia caryophyllata*, *Pelargonium asperum* в отношении Candida non-albicans в диапазоне 0,004-0,12% v/v, то есть 0,04-1,2 мкл/мл [9]. В качестве основных компонентов данных эфирных масел обнаружены тимол (*Thymus vulgaris*), карвакрол (*Origanum vulgare*), линалоол и линалил ацетат (*Lavandula vera*), α-пинен (*Pinus sylvestris*),

анетол (*Foeniculum vulgare*), цитронеллаль и лимонен (*Melissa officinalis*), камфора и trans-сабинен гидрат (*Salvia officinalis*), эвгенол (*Eugenia caryophyllata*), цитронеллаль и гераниол (*Pelargonium asperum*). Для приготовления рабочих растворов эфирных масел использовали этанол (1:2,5) и разводили средой RPMI-1640 до концентрации 2% с добавлением твина-80 в конечной концентрации 0,001%. Другой группой исследователей при культивировании кандид в декстрозном бульоне Сабуро с добавлением твина-20 концентраций 0,5% получили значения МИК эфирных масел *Cinnamomum zeylanicum* от 0,03 и менее до 0,13% v/v, то есть от 0,3 и менее до 1,3 мкл/мл при таких мажорных компонентах (с долей около 70%) как эвгенол и trans-циннамаль альдегид [10]. Во всех указанных случаях не указан аскаридол – циклический монотерпен, являющийся мажорным соединением в нашем случае. Однако по данным ряда авторов это соединение обнаружено в составе эфирных масел цветов тысячелистника, в частности *Achillea filipendulina* Lam. [16].

На этапе подготовки эфирных масел к испытаниям на антимикробную активность важным этапом является их тщательное эмульгирование [4]. Ранее нами было установлено, что противокандидозная активность (согласно значениям МИК) цельных эфирных масел *Thymus serpyllum* L. и *Thymus marschallianus* Wild. оказалась ниже, чем у их 5% эмульсий [17]. Так МИК эфирного масла *T.serpyllum* L. составили 0,49-3,9, масла *T.marschallianus* Wild. 0,49-0,98 мкл/мл, МИК 5% эмульсий эфирных масел - 0,04-0,19 и 0,09-0,19 мкг/мл соответственно. В данной работе также получены низкие значения МИК эфирных масел растений из другого семейства. Кроме того, колебания в антимикробной активности эфирных масел могут быть обусловлены сложностью их химического состава и взаимопотенцирующим, а возможно и ингибирующим, эффектом различных компонентов как растворимых, так и выделяющихся преимущественно в летучей форме. Из-за этого эфирные масла разного состава могут быть сопоставимы по значениям МИК.

В целом эфирные масла *A.arabica* Kotschy и *A.millefolium* L. согласно значениям МИК обладают достаточно высокой противомикробной активностью в отношении *C.albicans* и могут рассматриваться как перспективные противокандидозные агенты натурального происхождения.

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. De Sousa D.P., Damasceno R.O.S., Amorati R., Elshabrawy H.A., de Castro R.D., Bezerra D.P., Nunes V.R.V., Gomes R.C., Lima T.C. Essential Oils: Chemistry and Pharmacological Activities // Biomolecules. 2023. Vol. 13, no. 7, art. 1144. https://doi.org/10.3390/biom13071144.
2. Флора СССР. Под ред. Шишкина Б.К., Боброва Е.Г. Т. 26. Москва, Ленинград: Изд-во академии наук СССР, 1961. 940 с.
3. Флора Узбекистана. Под ред. Введенского А.И. Т. 4. Ташкент: Изд-во Академии наук Узбекской ССР, 1969. 509 с.
4. Campana R., Tiboni M., Maggi F., Cappellacci L., Cianfaglione K., Morshedloo M.R., Frangipani E., Casettari L. Comparative Analysis of the Antimicrobial Activity of Essential Oils and Their Formulated Microemulsions against Foodborne Pathogens and Spoilage Bacteria // Antibiotcs (Basel). 2022. Vol. 11, no. 4, art. 447. https://doi.org/10.3390/antibiotics11040447.

5. Hossain T.J. Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: A review of protocols, advantages, and limitations // European journal of microbiology & immunology. 2024. Vol. 14, no. 2, pp. 97-115. https://doi.org/10.1556/1886.2024.00035.
6. Рекомендации по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (2021). URL: https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2021.pdf.
7. Wiart C., Kathirvalu G., Raju C.S., Nissapatorn V., Rahmatullah M., Paul A.K., Rajagopal M., Sathiya Seelan J.S., Rusdi N.A., Lanting S., Sulaiman M. Antibacterial and Antifungal Terpenes from the Medicinal Angiosperms of Asia and the Pacific: Haystacks and Gold Needles // Molecules. 2023. Vol. 28, no. 9, art. 3873. https://doi.org/10.3390/molecules28093873.
8. Karpinski T.M. Essential Oils of Lamiaceae Family Plants as Antifungals // Biomolecules. 2020. Vol. 10, no. 1, art. 103. https://doi.org/10.3390/biom10010103.
9. Mandras N., Roana J., Scalas D., Del Re S., Cavallo L., Ghisetti V., Tullio V. The Inhibition of Non-albicans Candida Species and UncommonYeast Pathogens by Selected Essential Oils and Their Major Compounds // Molecules. 2021. Vol. 26, no. 16, art. 4937. https://doi.org/10.3390/ molecules26164937.
10. Tran H.N.H., Graham L., Adukwu E.C. In vitro antifungal activity of *Cinnamomum zeylanicum* bark and leaf essential oils against *Candida albicans* and *Candida auris* // Applied Microbiology and Biotechnology. 2020. Vol. 104, no. 20, pp. 8911–8924. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10829-z.
11. Mutlu-Ingok A., Devecioglu D., Dikmetas D.N., Karbancioglu-Guler F., Capanoglu E. Antibacterial, Antifungal, Antimycotoxigenic, and Antioxidant Activities of Essential Oils: An Updated Review // Molecules. 2020. Vol. 25, no. 20, art. 4711. https://doi.org/10.3390/molecules25204711.
12. Mohammadhosseini M., Sarker S.D., Akbarzadeh A. Chemical composition of the essential oils and extracts of Achillea species and their biological activities: A review // Journal of Ethnopharmacology. 2017. Vol. 199, pp. 257-315. https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.010.
13. Ghavam M. *Tripleurospermum disciforme* (C.A.Mey.) Sch.Bip., *Tanacetum parthenium* (L.) Sch.Bip, and *Achillea biebersteinii* Afan.: efficiency, chemical profile, and biological properties of essential oil // Chemical and Biological Technologies in Agriculture. 2021. Vol. 8, art. 45. https://doi.org/10.1186/s40538-021-00245-4.
14. Karpinski T.M., Ozarowski M., Seremak-Mrozikiewicz A., Wolski H. Anti-Candida and Antibiofilm Activity of Selected Lamiaceae Essential Oils // Frontiers in Bioscience-Landmark. 2023. Vol. 28, Is. 2, art. 28. https://doi.org/10.31083/j.fbl2802028.
15. Yuan X., Cao D., Xiang Y., Jiang X., Liu J., Bi K., Dong X., Wu T., Zhang Y. Antifungal activity of essential oils and their potential synergistic effect with amphotericin B // Scientific Reports. 2025. Vol. 14, no. 1, art. 31125. https://doi.org/10.1038/s41598-024-82380-0.
16. Aminkhani Ali, Sharifi S., Ekhtiyari S. *Achillea filipendulina* Lam. Chemical constituents and antimicrobial activities of essential oil of stem, leaf, and flower // *Chemistry & Biodiversity*. 2020. Vol. 17, Is. 5, art. e2000133. https://doi.org/10.1002/cbdv.202000133.
17. Shapoval O.G., Sheremetyeva A.S., Durnova N.A., Mukhamadiev N.Q., Rabbimova G.T., Nazirbekov M.H. Antimicrobial activity of *Thymus serpyllum* L. and *Thymus marschallianus* Willd. essential oils against *Candida albicans* // Pharmaceutical Chemistry Journal. 2023. Vol. 57, no. 9, pp. 1449-1453. https://doi.org/10.1007/s11094-023-03009-6.