

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ РАСТЕНИЙ НА УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ В БИОФИЛЬМАХ*

З.Ю. Самойлова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*
К.В. Безматерных, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*
А.В. Тюленев, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*
Е.В. Лепехина, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермский национальный исследовательский политехнический университет*
М.А. Петерс, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*
В.Ю. Ушаков, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермский государственный национальный исследовательский университет*
М.Н. Брысова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

Приводятся результаты исследования влияния экстрактов лекарственных растений на образование биопленок бактериями *Escherichia coli* BW25113 в присутствии антибиотиков ципрофлоксацина, цефотаксима и стрептомицина, а также на устойчивость бактериальных клеток к указанным антибиотикам в зрелых биопленках.

Ключевые слова: бактериальные биопленки, антибиотики, полифенолы, экстракты растений, окислительный стресс.

Одним из способов защиты бактериальных клеток от токсического действия антибиотиков является образование биопленок, представляющих собой прочный механический барьер из полимерного матрикса [1]. С одной стороны, он препятствует прямому контакту клеток с токсичными веществами, в том числе с антибиотиками, с другой – за счет ограничения доступа кислорода и питательных веществ поддерживает клетки в фазе медленного роста или стационарной фазе, когда чувствительность к действию антибиотиков минимальна [2]. В последние годы широко обсуждается гипотеза неспецифического действия бактерицидных антибиотиков на метаболизм, приводящего к избыточному образованию активных форм кислорода и возникновению окис-

лительного стресса в бактериальных клетках [3, 4]. В связи с этим актуальным становится изучение чувствительности бактерий к антибиотикам в присутствии веществ, способных к генерации или связыванию активных форм кислорода.

Среди биологически активных веществ, обладающих редокс-активностью, особый интерес вызывают полифенолы, являющиеся вторичными метаболитами растений. Ранее нами и другими исследователями было показано, что антиоксидантное действие полифенолов и содержащих их экстрактов растений может быть обусловлено мягким прооксидантным действием, стимулирующим антиоксидантные системы эукариотических клеток и бактерий и повышающим устойчивость к действию высоких доз оксидантов [5–8].

* Работа выполнена при финансовой поддержке грантом РФФИ № 14-04-96031.

На первом этапе работы основной задачей проекта явилось изучение влияния водных экстрактов 18 лекарственных растений на образование биопленок бактериями *E. coli* BW25113 в присутствии антибиотиков ципрофлоксацина, цефотаксима и стрептомицина.

Бактерии выращивали в лунках полистироловых планшетов, как описано ранее [9], на среде М9 с добавлением глюкозы, казаминовых кислот и тиамина [10], а также экстрактов растений (конечная доза составила 0,83 мг сухого вещества/мл) и антибиотиков (3 мкг/мл ципрофлоксацина, 10 мкг/мл цефотаксима или 30 мкг/мл стрептомицина). Через 22 ч оценивали валовое биопленкообразование (ВБП), используя модифицированный метод окрашивания генцианвиолетом [11, 12].

В отсутствие антибиотиков экстракты черного чая, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Vaccinium vitis-idaea*, *Tilia cordata*, *Betula pendula* и *Zeya mays* стимулировали валовое образование биопленок. Максимальный эффект был отмечен у экстракта *A. uva-ursi*, повышавшего ВБП в 3 раза по сравнению с необработанными экстрактами культурами. Из всех испытываемых экстрактов только *Urtica dioica* оказывал ингибирующее влияние на образование биопленок, снижая ВБП в 1,6 раза по сравнению с необработанными экстрактами культурами.

В отсутствие экстрактов растений антибиотики подавляли ВБП в 6–8 раз по сравнению с необработанными антибиотиком культурами.

В случае ципрофлоксацина повышение ВБП обнаружено в присутствии экстракта *Inonotus obliquus* в 1,6 раза, *B. pendula* – в 1,7 раза, зеленого чая – в 2,9 раза, *V. vitis-idaea* – в 6,7 раза, в присутствии черного чая по сравнению с культурами, обработанными только антибиотиком, – в 8,5 раза.

При обработке бактериальных культур стрептомицином экстракты зеленого и черного чая, *A. uva-ursi*, *V. vitis-idaea*, *T. cordata* и *I. obliquus* стимулировали

ВБП в 2 и более раза по сравнению с культурами, обработанными только антибиотиком. Наибольший индуцирующий эффект был отмечен у экстрактов *A. uva-ursi* и *V. vitis-idaea*, которые повышали ВБП в 22 и 23 раза соответственно. В тех же условиях экстракты *Achillea millefolium*, *Bidens tripartite*, *U. dioica*, *Calendula officinalis* и *Laminaria japonica* подавляли ВБП в 2 и более раза по сравнению с культурами, обработанными только антибиотиком.

Выявлено достоверное повышение ВБП при обработке бактериальных культур цефотаксимом в присутствии экстрактов зеленого и черного чая, *A. uva-ursi*, *V. vitis-idaea*, *T. cordata*, *B. pendula* и *I. obliquus*. В тех же условиях экстракты *A. millefolium*, *U. dioica*, *Equisetum arvense* и *L. japonica* оказывали достоверный ингибирующий эффект на ВБП при действии цефотаксима.

Таким образом, на данном этапе были выявлены экстракты растений, оказывающие наиболее выраженные модулирующие эффекты на процессы образования биопленок в присутствии антибиотиков: зеленого и черного чая, *A. uva-ursi*, *V. vitis-idaea*, *B. pendula* и *L. japonica*.

На следующем этапе выполнения проекта указанные экстракты были использованы для подробного изучения модуляции устойчивости бактерий в зрелых биопленках к антибиотикам.

Зрелые биопленки получали путем выращивания в течение 22 ч на полистироловых планшетах, как указано ранее [9], затем дважды отмывали физиологическим раствором и переносили на свежую среду, содержащую экстракты растений (0,83 или 6,64 мг сухого вещества/мл), и инкубировали в течение часа. Затем добавляли антибиотики и инкубировали в течение двух часов. Через каждый час оценивали параметры колониеобразующей способности и интенсивности биопленкообразования.

В течение всего периода культивирования на свежей среде в отсутствие экстрактов интенсивность биопленкообразо-

вания оставалась приблизительно одинаковой. В отсутствии антибиотиков экстракты черного, зеленого чая, *V. vitis-idaea* и *A. uva-ursi* оказывали дозозависимый стимулирующий эффект на образование биопленок. Добавление антибиотиков в отсутствие экстрактов растений приводило к снижению интенсивности биопленкообразования. Максимальный подавляющий эффект был отмечен в случае 10 мкг/мл цефотаксима.

В наших условиях обе дозы экстрактов зеленого и черного чая, *V. vitis-idaea* и *A. uva-ursi* снижали отрицательный эффект антибиотиков (0,03 и 0,3 мкг/мл ципрофлоксацина, 1 и 10 мкг/мл цефотаксима, 10 и 100 мкг/мл стрептомицина) на интенсивность образования биопленок и, напротив, способствовали повышению образования биофильмов. Экстракт *L. japonica* в присутствии антибиотиков оказывал дополнительное ингибирующее воздействие на интенсивность биопленкообразования.

В отдельной серии опытов была изучена колониеобразующая способность клеток в составе зрелых биофильмов при обработке экстрактами и антибиотиками. В ряде случаев в присутствии экстрактов отмечалось модулирующее влияние на устойчивость бактерий к антибиотикам.

Характер модуляции (усиление или ослабление токсического эффекта антибиотиков) варьировался в зависимости от дозы и вида экстракта и антибиотика.

Полученные на данном этапе результаты свидетельствуют, с одной стороны, о положительном влиянии полифенолов на активность *Escherichia coli* как представителя нормальной микрофлоры человека, когда под действием экстрактов лекарственных растений происходит повышение интенсивности биопленкообразования. С другой стороны, выявленные в ряде случаев защитные эффекты экстрактов от бактерицидного действия антибиотиков указывают на потенциальную опасность снижения терапевтического действия антибиотиков при лечении инфекционных заболеваний, ассоциирующихся с биопленками. Исходя из приведенных выше данных, можно сделать вывод о наличии проблемы возникновения устойчивости микрофлоры к действию антибиотиков в присутствии редокс-активных биосубстратов растительного происхождения. Учитывая, что такие субстраты являются компонентами пищи, дальнейшее продолжение исследований в этой области становится еще более значимым и актуальным. В настоящее время продолжается подробное изучение механизмов наблюдаемых эффектов.

Библиографический список

1. Karatan E., Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2009. – Vol. 73. – P. 310–347.
2. Anderl J.N., Zahller J., Roe F., Stewart P.S. Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2003. – Vol. 47. – P. 1251–1256.
3. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A., Collins J.J. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics // *Cell.* – 2007. – Vol. 130. – P. 797–810.
4. Dwyer D.J., Belenky P.A., Yang J.H., MacDonald I.C., Martell J.D., Takahashi N., et al. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2014. – Vol. 111. – E2100–E2109.
5. Oktyabrsky O., Vysochina G., Muzyka N., Samoiloza Z., Kukushkina T., Smirnova G. Assessment of antioxidant activity of plant extracts using microbial test systems // *J. Appl. Microbiol.* – 2009. – Vol. 106. – P. 1175–1183.
6. Smirnova G.V., Vysochina G.I., Muzyka N.G., Samoylova Z.Y., Kukushkina T.A., Oktyabrsky O.N. Evaluation of antioxidant properties of medicinal plants using microbial test systems // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 26. – P. 2269–2276.
7. Smirnova G.V., Samoylova Z.Y., Muzyka N.G., Oktyabrsky O.N. Influence of polyphenols on *Escherichia coli* resistance to oxidative stress // *Free Radic. Biol. Med.* – 2009. – Vol. 46. – P. 759–768.
8. Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health // *Nat. Prod. Rep.* – 2009. – Vol. 26. – P. 1001–1043.

9. *Samoilova Z., Muzyka N., Lepekhina E., Oktyabrsky O., Smirnova G.* Medicinal plant extracts can variously modify biofilm formation in *Escherichia coli* // *Antonie van Leeuwenhoek* // *Int. J. Gener. Mol. Microbiol.* – 2014. – Vol. 105. – P. 709–722.
10. *Miller J.H.* Experiments in molecular genetics – Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.
11. *Naves P., del Prado G., Huelves L., Gracia M., Ruiz V., Blanco J., Rodriguez-Cerrato V., Ponte M.C., Soriano F.* Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent // *J. Appl. Microbiol.* – 2008. – Vol. 105. – P. 585–590.
12. *O'Toole G.A., Kolter R.* Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis // *Mol. Microbiol.* – 1998. – Vol. 28. – P. 449–461.

THE INFLUENCE OF PLANT EXTRACTS ON ANTIBIOTIC TOLERANCE IN BACTERIAL BIOFILMS

Z.Yu. Samoilova¹, K.V. Bezmaternykh¹, A.V. Tyulenev¹, E.V. Lepekhina^{1,2}, M.A. Peters¹,
V.Yu. Ushakov^{1,3}, M.N. Brysova¹

¹ *Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS*

² *Perm National Research Polytechnic University*

³ *Perm State National Research University*

The investigation results of the influence of plant extracts on biofilm formation by bacteria *Escherichia coli* BW25113 under treatment with antibiotics ciprofloxacin, cefotaxime and streptomycin and tolerance of bacterial cells in mature biofilms to these antibiotics are discussed.

Keywords: bacterial biofilms, antibiotics, polyphenols, plant extracts, oxidative stress.

Сведения об авторах

Самойлова Зоя Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (ИЭГМ УрО РАН), 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; e-mail: samzu@mail.ru

Безматерных Ксения Викторовна, инженер лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: hydrargyrum@iegm.ru

Тюленев Алексей Валерьевич, кандидат биологических наук, инженер лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: leksey333@yandex.ru

Лепехина Елена Владимировна, кандидат биологических наук, инженер лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН; доцент кафедры химии и биотехнологии, Пермский национальный исследовательский политехнический университет (ПНИПУ), 614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29; e-mail: alenshick@mail.ru

Петерс Михаил Александрович, аспирант лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: mixeu-mhz@mail.ru

Ушаков Вадим Юрьевич, кандидат биологических наук, ведущий инженер лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН; доцент кафедры физиологии растений и микробиологии, Пермский государственный национальный исследовательский университет (ПГНИУ), 614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15; e-mail: ushakovvad@yandex.ru

Брысова Марина Николаевна, старший лаборант лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: m-brysova75@mail.ru

Материал поступил в редакцию 21.10.2016 г.