

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.61

Влияние антимикробных веществ растительного происхождения на чувствительность бактериальных биопленок к антимикробным препаратамО. В. Рыбальченко¹, О. Г. Орлова¹, М. А. Нетеса², В. В. Капустина¹¹ Санкт-Петербургский государственный университет,

Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

² Институт экспериментальной медицины,

Российская Федерация, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

Для цитирования: Рыбальченко О. В., Орлова О. Г., Нетеса М. А., Капустина В. В. Влияние антимикробных веществ растительного происхождения на чувствительность бактериальных биопленок к антимикробным препаратам // Вестник Санкт-Петербургского университета. Медицина. 2023. Т. 18. Вып. 2. С. 176–191. <https://doi.org/10.21638/spbu11.2023.206>

Распространение антибиотикорезистентности у бактерий связывают с образованием особых форм микробных сообществ — бактериальных биопленок, обладающих повышенной устойчивостью к действию различных физико-химических факторов, в том числе к антимикробным препаратам. В связи с этим поиск антибактериальных агентов, в том числе среди препаратов растительного происхождения, способных воздействовать на бактериальные биопленки, представляется весьма актуальной задачей. Цель настоящей работы заключалась в выявлении антибактериальных веществ растительного происхождения, способных наиболее эффективно воздействовать на бактериальные биопленки. Проведена оценка влияния антибактериальных отваров растений брусники, шалфея и ромашки на усиление чувствительности грамотрицательных и грамположительных бактерий *Micrococcus luteus* С6, *Enterococcus faecium* SF68, *Escherichia coli* M17 и *Escherichia coli* BL21 к антимикробным препаратам. Чувствительность бактерий к антимикробным препаратам при совместном воздействии с растительными отварами определяли диско-диффузионным методом. Оценка морфофизиологических свойств клеток в биопленках проводили методами световой и сканирующей электронной микроскопии с последующей обработкой данных в специализированной программе ImageJ. Выявлена способность отваров брусники, шалфея и ромашки увеличивать чувствительность грамположительных и грамотрицательных бактерий к антимикробным препаратам преимущественно бактерицидного фармакологического действия. Отвары лекарственных растений препятствовали формированию полноценных бакте-

риальных биопленок клетками *E. faecium* SF6, *M. luteus* C6, *E. coli* M17 и *E. coli* BL21. Полученные результаты свидетельствуют о проявлении антибиопленочной активности отваров брусники, ромашки и шалфея, способствующих снижению уровня антибиотикорезистентности бактерий и уменьшению нагрузки при антимикробной терапии.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, антимикробные препараты, бактериальные биопленки, препараты растительного происхождения.

Введение

Одной из причин увеличения резистентности бактерий к антимикробным препаратам (АМП) в настоящее время считается формирование бактериальных биопленок — особых форм микробных сообществ, устойчивых к большинству физико-химических факторов окружающей среды. Уникальная особенность проявления признаков социального поведения бактерий в составе микробных сообществ является основной причиной активного поиска новых веществ, способных разрушать биопленки на разных этапах их возникновения и формирования.

Бактериальные биопленки (ББ) — это прикрепленные к плотной поверхности микробные сообщества, в которых адсорбированные на субстрате и друг к другу клетки, заключены в матрицу внеклеточных полимерных субстанций, продуцируемых микроорганизмами в соответствии с уровнем развития популяции и условиями транскрипции генов [1]. Бактерии, входящие в состав ББ, обладают гораздо большей устойчивостью к воздействию факторов окружающей среды. Доказано, что устойчивость микроорганизмов в ББ к антимикробным препаратам выше от 200 до 1000 раз, по сравнению с таковой для планктонных клеток того же штамма. Эта уникальная особенность поведения бактерий значительно осложняет способы борьбы с возбудителями инфекционных заболеваний. В настоящее время для более чем 65 % из них показана связь со способностью возбудителей формировать ББ [2].

ББ обладают целым набором защитных структур: снаружи они покрыты защитной поверхностной пленкой, основным элементом которой является трехслойная мембрана, аналогичная универсальной плазматической мембране. Поверхностная пленка отделяет внутреннюю среду биопленки от внешнего окружения и объединяет клетки в единую систему, при этом, по-видимому, сохраняя контакт бактерий, находящихся в биопленке, с внешней средой [2].

Основой для ББ служит матрикс, который формируют сами бактерии. Он состоит из внеклеточных полимерных субстанций: белков (структурных и ферментов), полисахаридов, липидов, внеклеточной ДНК, а также различных субстратов из организма хозяина, таких как муцин и ДНК. Высокогидратированная среда ББ (97 % воды) защищает бактерии от высыхания и создает благоприятные условия для горизонтального переноса генетической информации [3]. Наряду с этим матрикс позволяет запастись внутри ББ питательные вещества, ионы, энергию и в то же время выводить нежелательные молекулы или разрушать их экзоферментами [3]. Внеклеточные полимерные субстанции обеспечивают плотную адгезию ББ к абиотическим и биотическим поверхностям, а также агрегацию клеток друг к другу [2].

В связи с этим необходимо подчеркнуть значение системы глобальной регуляции бактерий — Quorum sensing — QS-системы, координирующей взаимодействие бактерий. Функционирование этой регуляторной системы возможно благодаря

внеклеточным полимерным субстанциям. QS-система посредством диффундирующих в окружающее пространство молекул аутоиндукторов регулирует экспрессию генов бактерий, обеспечивающих взаимодействие бактерий при образовании ББ [2, 4]. Аутоиндукторы способны влиять на синтез экзоферментов, регулировать продукцию факторов вирулентности и динамику процесса биопленкообразования, в том числе это один из важнейших механизмов антибиотикорезистентности ББ.

Основные сигнальные молекулы QS-системы являются универсальными для большинства бактерий, поэтому наиболее значимыми в настоящее время считаются следующие аутоиндукторы: N-ацилгомоцистеинлактон (АГЛ), аутоиндуцирующие пептиды (АИП) и аутоиндуктор-2 (АИ2) [5]. АГЛ — специфичный аутоиндуктор грамотрицательных бактерий. QS-система у грамположительных бактерий преимущественно опосредуется АИП.

Бактерии в составе ББ находятся на достаточно небольшом расстоянии друг от друга, что обеспечивает возможность для формирования межклеточных контактов, позволяющих достаточно интенсивно обмениваться продуктами метаболизма [2]. Клетки в ББ различаются по уровню их метоболической активности. Выделяют неподвижную и мигрирующую субпопуляции. Вероятно, такое разделение связано с генами резистентности бактерий. Мигрирующая популяция находится ближе к наружному слою ББ и обладает резистентностью к различным АМП. Неподвижная субпопуляция расположена в глубине ББ и обладает чувствительностью к большему спектру АМП по сравнению с первой. Такое расположение создает дополнительный барьер для АМП. Еще одной субпопуляцией являются так называемые клетки-персистеры, или покоящиеся формы. Персистеры — это клетки с минимальным уровнем метаболической активности и поэтому не чувствительные к воздействию АМП [6]. Клетки-персистеры часто не имеют генов устойчивости к АМП, но за счет ингибирования трансляции генов, прекращения синтеза белка и работы ионных каналов эти клетки способны переживать агрессивную антибактериальную терапию и заново воссоздавать ББ при наступлении благоприятных условий [6].

По мере изучения строения и функций ББ стало очевидным, что при помощи только АМП достаточно трудно, а часто и невозможно прекратить инфекционный процесс, ассоциированный с развитием ББ. Поэтому сейчас значительные усилия исследователей направлены на поиск эффективных агентов, которые увеличивали бы эффективность антибактериальных препаратов, действуя непосредственно на компоненты ББ или препятствуя ее формированию [7].

Одной из наиболее перспективных групп агентов с предполагаемой антибиопленочной активностью считаются QS-ингибиторы, поскольку они способны как препятствовать формированию биопленки, так и разрушать уже существующие. На QS-систему можно воздействовать по-разному: разрушать аутоиндукторы, ингибировать их образование или рецепторы к ним, мимикрировать под сигнальные молекулы посредством структурных особенностей ксенобиотика [5]. Большинство исследований направлено на поиск молекул, схожих по строению с аутоиндукторами, но противоположных им по действию. Жизнеспособные модификации ацетилгомосеринлактонам (АГЛ) (замена лактона кетоном, тиолактоны, сульфониамиды, N-ацилированные циклопентиламиды и др.) использовали для ингибирования QS-системы биопленки *P. aeruginosa* PA01. Одни молекулы влияли на морфологию ББ,

другие полностью предотвращали образование биопленки *P. aeruginosa* PA01 [5]. В то же время можно действовать на продукты сигнального пути АГЛ. На модели *Staphylococcus aureus* исследовали влияние молекул на сигнальную систему АИП. При этом для ингибирования АИ2 сигнального пути синтезировали и проанализировали небольшое количество аналогов предшественника АИ2 ((S)-4,5-дигидрокси-2,3-пентандиона) [5].

Помимо нарушения сигнальных путей представляется перспективным воздействием на структурные компоненты ББ. Полисахариды могут быть выбраны основной мишенью для нарушения целостности внеклеточных полимерных субстанций [6].

Возможно, элиминация покоящихся клеток, так называемых персистеров из ББ, позволила бы повлиять на течение хронических инфекционных заболеваний. Система токсин-антитоксин — еще один механизм регуляции числа персистирующих клеток, что делает ее потенциально перспективной мишенью антибиопленочной терапии [5]. Возможны эксперименты по увеличению метаболической активности клеток-персистеров с целью повышения их чувствительности к АМП.

Поиск агентов, способных влиять на перечисленные выше звенья ББ, осуществляется разными путями. Одним из подходов является компьютерная обработка баз данных веществ растительного и животного происхождения для возможного их влияния на биопленки [8].

Группа лекарственных средств растительного происхождения, приготовленных из растительного сырья, представляется удобным объектом для разработки первой линии исследований антибиопленочной активности. Среди лекарственных средств растительного происхождения наиболее известен Канефрон®Н — диуретическое средство растительного происхождения. Канефрон является препаратом с доказанной эффективностью в отношении инфекций мочевой системы. Препарат оказывает мочегонное, спазмолитическое, противовоспалительное, противомикробное действие. В его состав входят трава золототысячника, корень любистока лекарственного и листья розмарина обыкновенного по 18 мг каждого на 1 таблетку. Препарат рекомендован для комплексной терапии хронических инфекций мочевого пузыря (цистит) и почек (пиелонефрит), неинфекционных хронических воспалений почек (гломерулонефрит, интерстициальный нефрит)¹.

Важной проблемой современной медицины являются катетер-ассоциированные инфекции (КАИ), составляющие до 40 % внутрибольничных инфекций. Доказана антибиопленочная активность Канефрона в отношении *E. coli* M 17 и *S. aureus* 193, при этом в экспериментах ББ выращивали на поверхности мочевых катетеров [9].

В настоящее время наиболее биологически обоснованным является исследование антибиопленочной активности веществ растительного происхождения.

Антимикробное действие лекарственных растений

Многие вещества растительного происхождения уже показали значимое влияние на ББ, и дальнейшее их изучение представляется весьма актуальным. Растения обладают различными способами борьбы с патогенными бактериями. Наибольший

¹ Канефрон // Справочник лекарственных средств. URL: https://www.vidal.ru/drugs/canephron_n__370 (дата обращения: 20.01.2023).

интерес в настоящий момент представляют химические вещества с антимикробной и антибиопленочной активностью, которые могут быть получены из растительного сырья. В ответ на бактериальные фитопатогены растения вырабатывают флавоноиды — большую группу полифенольных соединений, имеющих структуру бензо- γ -пирона, повсеместно присутствующих в растениях. Эти соединения присутствуют во многих растительных экстрактах. Для флавоноидов описано выраженное антимикробное действие, зависящее от их структуры. Показано, что одним из механизмов молекулярного воздействия флавоноидов является образование комплекса с белками бактерий (микробными адгезинами, ферментами, транспортными белками и др.) и дальнейшее их инактивирование. При этом липофильные флавоноиды могут дополнительно разрушать мембраны бактерий [10].

Флавоноидные соединения катехины обладают антибактериальной активностью *in vitro* против *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Shigella* spp. и других бактерий. У β -флавоноидов предполагается способность связываться с нуклеиновыми кислотами и таким образом ингибировать синтез ДНК и РНК у бактерий. Для флавоноидов нарингенина и софорафлаванона G показано значимое влияние в отношении резистентных к метициллину *S. aureus* и стрептококков. Механизм действия нарингенина и софорафлаванона G связывают со снижением текучести наружных и внутренних слоев мембран бактерий [10].

Большинство ингибиторов QS-системы, как природных, так и синтетических, относятся к семейству вторичных метаболитов, известных как фурановые соединения, которые структурно подобны ацетилгомосеринлактонам (АГЛ) и, следовательно, связываются с рецепторами АГЛ. Одним из наиболее перспективных направлений поиска источников фуранонов являются растительные продукты и их производные. Фураноны, выделенные из чеснока, куркумы, кофеина и экстракта ванили, масла корицы, считают сильнодействующими ингибиторами QS-системы и его регуляторных факторов [11].

В настоящее время установлена антибиопленочная активность целого ряда фитохимических веществ:

1. Терпеноиды, или терпены, — основной компонент эфирных масел, разрушающий бактериальные мембраны бактерий *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*².

2. Лектины — особый класс углеводсвязывающих белков неиммунного происхождения, обнаруженные у всех живых организмов от бактерий и вирусов до высших растений и млекопитающих. Лектины влияют на адгезию бактерий, препятствуя образованию ББ [12].

3. Экстракты растений на сегодняшний день считаются перспективными объектами для поиска антибиопленочных агентов. Не все растительные экстракты одинаково воздействуют на бактериальные биопленки, но для многих из них уже описана антибиопленочная активность (экстракты мяты и дуба, семян грейпфрута, зверобоя продырявленного) [13].

Таким образом, поиск веществ растительного происхождения, обладающих антибиопленочной активностью безусловно представляет собой одно из наиболее

² Средство для селективного влияния на биопленкообразование микроорганизмами: пат. RU2646488C2 Рос. Федерация / О. Е. Бухарин и др. № 2016116177; заявл. 25.04.2016; опубл.: 05.03.2018. Бюл. № 7.

лее актуальных направлений научных разработок современной микробиологии. В связи с этим нами проведено исследование воздействия веществ растительного происхождения, таких как отвар листьев брусники, шалфея и цветков ромашки на бактериальные биопленки.

Объекты исследования

В работе использовали пробиотические штаммы бактерий:

1. *Enterococcus faecium* SF68 (входит в состав пробиотика Бифиформ® (лат. Bifiform®), производитель: Ферросан А/С (Ferrosan), Дания). Клетки штамма *E. faecium* SF68 не патогенны для человека и животных и не входят в число объектов, на использование которых накладывают ограничения [14].

2. *Escherichia coli* M17 (входит в состав пробиотика Колибактерин, Микроген, Россия)³.

3. *Escherichia coli* BL21 (коллекция НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи), широко применяющийся в области биотехнологии⁴.

4. *Micrococcus luteus* С6, представитель нормальной микробиоты кожи человека, группа условно патогенных бактерий. Клетки *M. luteus* секретируют реанимационный фактор (РФ) RPF-трансгликозилазоподобный белок, способный активировать бактерии из покоящегося состояния [15].

Отвары лекарственных растений

Отвары лекарственных растений — доступная лекарственная форма, в которой содержится большое количество различных физиологически активных веществ. Отвары растений удобный объект для проведения экспериментов по выявлению потенциальной антибиопленочной активности веществ растительного происхождения. В исследовании использованы отвары листьев брусники и шалфея, а также цветков ромашки.

Отвар брусники. Отвар из листьев брусники относят к фитопрепаратам с диуретическим, противомикробным и противовоспалительным действием. Его основные химические компоненты: фенолгликозиды (арбутин, метиларбутин), дубильные вещества, органические кислоты (салициловая, лимонная, яблочная, бензойная). Отвар оказывает противомикробное (в частности, в отношении *S. aureus*), противовоспалительное, диуретическое, вяжущее, желчегонное и деминерализующее действие. Его применяют в составе комплексной терапии пиелонефрита, простатита, гонореи, отечного синдрома, артрита, пневмонии, бронхита, бронхоэктатической болезни, воспалительных заболеваний ротовой полости, гастрита, гепатита⁵. Показано, что полифенолы из листьев брусники значительно снижали активность биопленкообразования бактерий [16].

³ Штамм бактерий *Escherichia coli* M17/p Colap, используемый для получения пробиотического препарата: пат. RU2144954C1 Рос. Федерация / В. А. Лившиц и др.; № 98107308/13; заявл. 15.04.1998; опубл.: 27.01.2000.

⁴ Proteomes: *Escherichia coli* (strain B / BL21) // Uniprot. URL: <https://www.uniprot.org/proteomes/UP000001509> (дата обращения: 20.01.2023).

⁵ Брусники листья // Справочник лекарственных средств. URL: https://www.vidal.ru/drugs/vitis_idaeae_folia__21283 (дата обращения: 20.01.2023).

Отвар ромашки. Отвар получали из цветков ромашки аптечной. Цветки ромашки — фитопрепарат с противовоспалительным, противомикробным и спазмолитическим действием. В химический состав цветков ромашки входят эфирные масла (левоменол, бисаболол оксид А, бисаболол оксид В, камазулен, спатуленол), флавоноиды (флавоновые и флавоноловые гликозиды, агликоны, включая кверцетин, изорамнетин, патулетин, иацедином, кризоспенол, кризоспленетин), гидроксикумарины (умбеллиферон, герниарин), раманогалактуронан. Данному препарату свойственно противомикробное действие в отношении *Staphylococcus* spp. и *Candida* spp. Применяют его при воспалительных заболеваниях желудочно-кишечного тракта, таких как гастриты, дуодениты, энтероколиты, воспалительных заболеваниях ЛОР-органов, инфекционно-воспалительных заболеваниях мочеполовой системы, дематитах, трофических язвах⁶.

Отвар шалфея. Сырьем для получения отвара были листья шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), обладающие противомикробным и противовоспалительным действием. Этот отвар используется для местного применения в терапии воспалительных заболеваний ротовой полости, глотки и гортани⁷. Листья шалфея содержат эфирные масла. Основными действующими веществами эфирного масла шалфея считают α-туйон и камфору.

Антимикробные препараты

Оценку чувствительности бактерий к АМП в присутствии различных веществ растительного происхождения проводили на примере препаратов различного механизма действия. Всего использовано пять групп антибактериальных средств: 1) пенициллины (амоксциллин); 2) тетрациклины (доксциклин); 3) гликопептиды (ванкомицин); 4) фторхинолоны (ципрофлоксацин); 5) аминогликозиды (гентамицин, канамицин).

Методы исследования

Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) для отваров растений. Исходные концентрации для отваров брусники (3 г / 100 мл), ромашки (1,5 г / 100 мл) и шалфея (1 г / 100 мл) выбраны согласно инструкции. Для определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) для отваров растений проводили дополнительные исследования.

Определение чувствительности бактерий к антибактериальным препаратам. Чувствительность к препаратам определяли диско-диффузионным методом на агаризованной среде MacConkey Media (HiMedia, Индия). Влияние отваров брусники, ромашки и шалфея на чувствительность к АМП (амоксциллин, доксициклин, ванкомицин, ципрофлоксацин, гентамицин, канамицин) исследовали на модели культур *E. faecium* SF68 и *E. coli* M17.

⁶ Ромашки аптечной цветки обмолоченные // Там же. URL: https://www.vidal.ru/drugs/chamomillae_recutitae_flores_contusae__18568 (дата обращения: 20.01.2023).

⁷ Шалфея листья // Там же. URL: https://www.vidal.ru/drugs/salviae_folia__18339 (дата обращения: 20.01.2023).

Определение влияния растительных веществ с антимикробной активностью на биопленки методом световой микроскопии. Для определения способности бактерий к формированию биопленок в присутствии отваров брусники, ромашки и шалфея указанные вещества в исходной и разбавленной в 2 и 4 раза концентрации вводили в Мюллер — Хинтон бульон. Интенсивность биопленкообразования рассчитывали по методу О’Тула (O’Toole) [17]. Для этого образцы окрашивали генцианвиолетом и готовые препараты просматривали в световом микроскопе Микмед 6 (АО «ЛОМО», СПб., Россия) со встроенной камерой. Изображения, полученные в световом микроскопе, фиксировали на электронном носителе и обрабатывали при помощи программы ImageJ.

Выявление особенностей строения бактериальных биопленок методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Препараты бактериальных культур на плотной питательной среде, содержащей отвары брусники, шалфея и ромашки, для исследования методом СЭМ готовили по специальной методике [2]. После обработки фиксатором образцы помещали в вакуумную напылительную установку Leica EM SCD 500 для напыления тонкого слоя золота толщиной 0,15 нм. Электронно-микроскопические и морфометрические исследования проводили в Ресурсном центре СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» на сканирующем электронном микроскопе MIRA-3 (TESCAN, Чехия).

Методом СЭМ исследовали образцы бактериальных культур на плотной питательной среде с отварами брусники, шалфея и ромашки и бактериальных культур на границе зоны подавления роста вокруг дисков с АМП для определения влияния отваров брусники, шалфея и ромашки на чувствительность к АМП.

Статистическая обработка данных. Обработку данных проводили в программе RStudio. Для экспериментальных данных рассчитывали t-критерий Стьюдента. Для визуальной оценки полученных данных проводили построение графиков при помощи платформы Jupyter Notebook на языке Python.

Результаты

Основной целью исследования являлось выявление способности отваров лекарственных растений брусники, ромашки и шалфея, обладающих антимикробной активностью, влиять на чувствительность бактерий к антимикробным лекарственным средствам.

Воздействие отваров брусники, ромашки и шалфея на чувствительность бактерий к АМП. Действие отваров брусники, ромашки и шалфея на чувствительность бактерий к АМП определяли при их добавлении в питательную среду для выращивания бактерий.

При добавлении отвара брусники в концентрации 3 мг/мл в питательную среду для выращивания бактерий наблюдали повышение чувствительности клеток микрококков *M. luteus* С6 к гентамицину в 3,19 раз, левомицетину — в 2,73 раз и ванкомицину — в 1,88 раз, а также клеток *E. coli* М17 к гентамицину — в 1,27 раз и канамицину — в 1,49 раз по сравнению с контрольными показателями диаметра зон подавления роста бактерий, мм (рис. 1, 2).

Установлено, что отвар шалфея в концентрации 5 мг/мл, добавленный в среду для выращивания бактерий, повышал чувствительность клеток *M. luteus* С6 к лево-

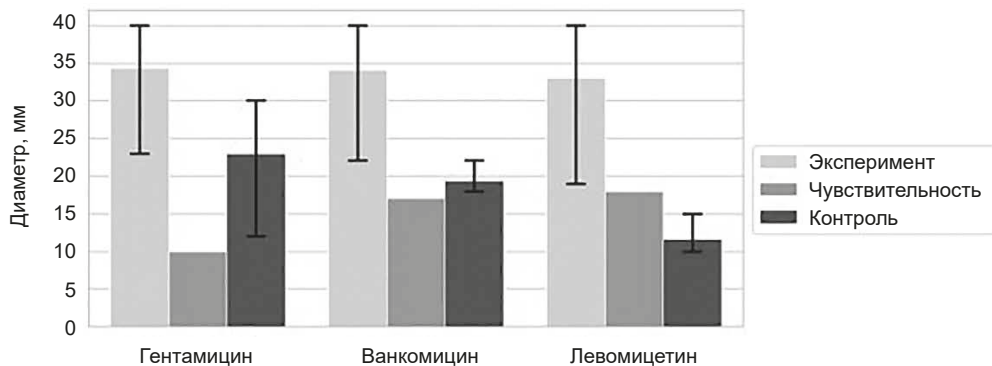


Рис. 1. Влияние отвара брусники на чувствительность клеток *M. luteus* C6 к антибиотикам

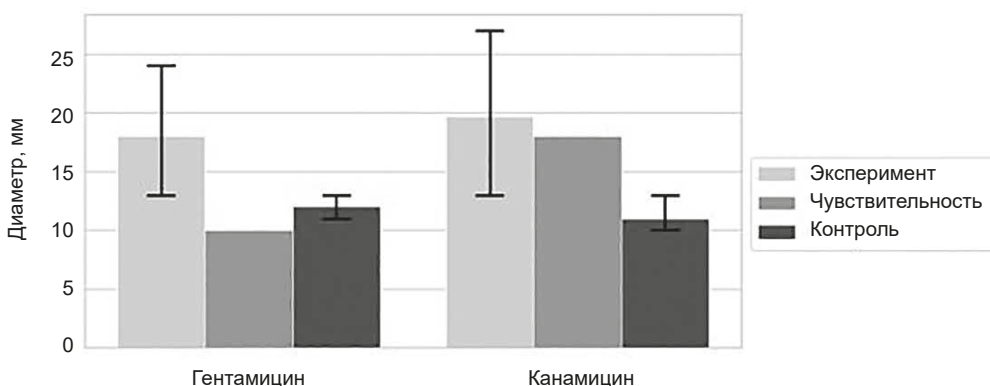


Рис. 2. Влияние отвара брусники на чувствительность клеток *E. coli* M17 к антибиотикам

мицетину в 1,95 раз, клеток *E. faecium* SF68 к левомецетину — в 1,2 раз, к доксициклину — в 1,79 раз и к гентамицину — в 1,3 раз, а также клеток *E. coli* M17 к левомецетину — в 1,6 раз по сравнению с контролем (рис. 3, 4).

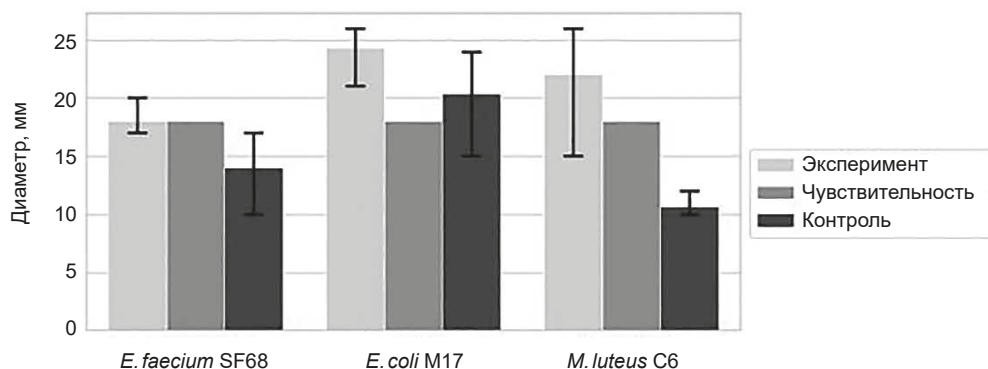


Рис. 3. Влияние отвара шалфея на чувствительность микроорганизмов *E. faecium* SF68, *E. coli* M17, *M. luteus* C6 к левомецетину

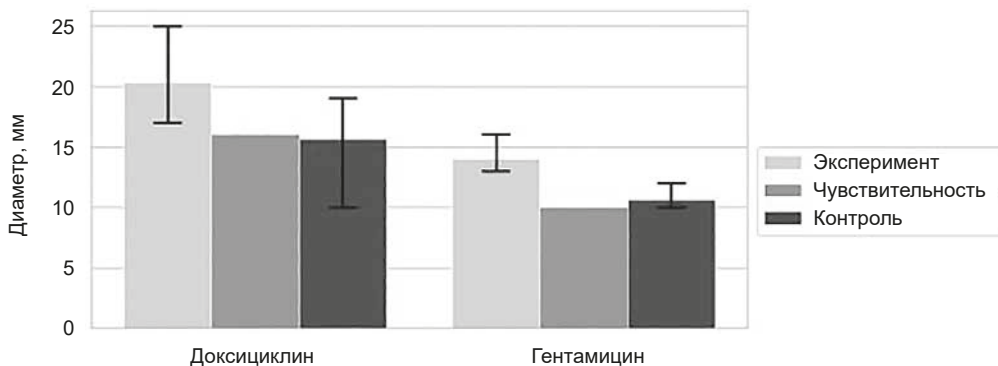


Рис. 4. Влияние отвара шалфея на чувствительность *E. faecium* SF68 к антибиотикам

Таким образом, определение диско-диффузионным методом на агаризованной среде чувствительности бактерий к АМП показало, что введение в питательную среду отваров брусники и шалфея повышало чувствительность бактерий к АМП. Вещества с антимикробной активностью растительного происхождения (отвар брусники и шалфея) при добавлении в среду для выращивания бактерий оказывали значительное воздействие на их чувствительность к АМП.

Оценка влияния отваров растений с антимикробной активностью на процесс биопленкообразования бактерий методом световой микроскопии. Анализ влияния веществ с антимикробной активностью (отвар ромашки и шалфея) на процесс образования бактериальных биопленок *E. coli* M17 и *E. coli* BL21 проводили методом светооптической микроскопии.

Отвар ромашки в концентрации 15 мг/мл оказывал ингибирующее воздействие на формирование бактериальной биопленки *E. coli* M17 и *E. coli* BL21. Анализ светооптических препаратов *E. coli* M17 при выращивании в жидкой питательной среде с добавлением отвара ромашки в исходной концентрации позволил обнаружить единичные скопления бактерий. В контрольных образцах микробные клетки равномерно занимали все поля зрения. В образцах *E. coli* BL21, выращенных в среде с добавлением отвара ромашки в исходной концентрации и при разбавлении в 2 и 4 раза, площадь, занимаемая ББ, уменьшалась в 3,86, 2,97 и 1,71 раза соответственно по сравнению с контрольными показателями.

Наличие в питательной среде для выращивания бактерий отвара шалфея в концентрации 5 мг/мл также оказывало влияние на процесс биопленкообразования клетками *E. coli* M17 и *E. coli* BL21. Площадь, занимаемая бактериальными клетками, в образцах *E. coli* M17 с исходной концентрацией отвара шалфея и разбавленной в 2 раза была меньше, чем площадь в контрольных образцах, в 2,75 и 1,64 раза соответственно. Площадь разрастания культуры, занимаемая бактериальными клетками *E. coli* BL21, в образцах с отваром исходной концентрации и разбавленной в 2 и 4 раза была значительно меньше площади в контрольных образцах в 2,53, 1,7 и 1,13 раз соответственно.

Отвар брусники при добавлении в питательную среду для выращивания бактерий предавал препарату дополнительную окраску, затрудняющую оценить рост бактерий в световом микроскопе.

Таким образом, при оценке воздействия отваров ромашки и шалфея на рост бактерий *E. coli* M17 и *E. coli* BL21 в жидкой питательной среде установлено значительное влияние растений на формирование ББ. О подавлении роста бактерий растительными отварами свидетельствовало уменьшение в несколько раз площади, занимаемой ББ, по сравнению с контролем.

Морфологический анализ влияния растительных отваров с антимикробной активностью на процесс биопленкообразования методом сканирующей электронной микроскопии. Полученные методом сканирующей электронной микроскопии данные о воздействии отваров ромашки и шалфея с антимикробной активностью сравнивали с контрольными образцами (рис. 5). На всей поверхности препарата в контроле формировалась сплошная ББ из клеток *S. faecium* SF68. Клетки в БП располагались в несколько слоев, имели правильную стандартную форму и были покрыты плотным слоем полисахаридной пленки.

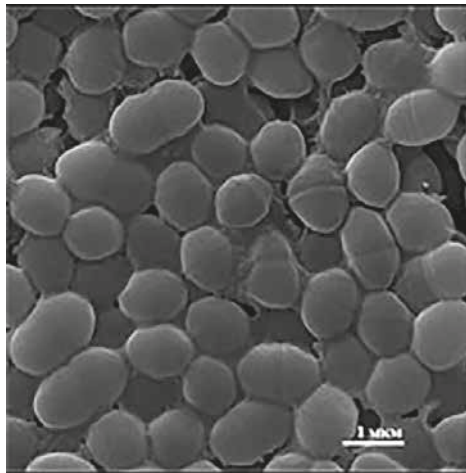


Рис. 5. Сканирующая электронная микроскопия клеток *E. faecium* SF68 (контрольный образец). Увеличение в 50 000 раз. Длина маркера 1 мкм

Электронно-микроскопический анализ бактериальных биопленок, выращенных в питательной среде с добавлением растительных отваров ромашки и брусники. В образцах с добавлением отвара ромашки в концентрации 15 мг/мл, бактерии занимали всю поверхность исследуемых препаратов (рис. 6). Клетки располагались равномерно в один слой, скопления внеклеточных полисахаридов выявлено не было. Обнаружены многочисленные атипичные клетки с признаками нарушения клеточного деления. Обнаруженные морфологические признаки свидетельствуют о способности отвара ромашки препятствовать формированию полноценной многослойной биопленки в связи с вероятным воздействием на процесс деления бактериальных клеток.

Электронно-микроскопический анализ биопленок при воздействии отвара брусники показал, что в образцах, содержащих отвар брусники в концентрации 3 мг/мл, обнаружены единичные бактериальные клетки энтерококков *E. faecium* SF68 (рис. 7).

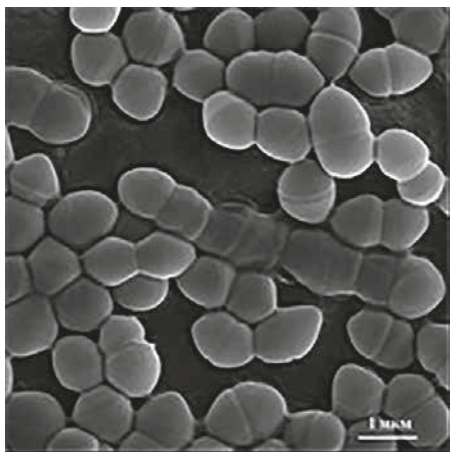


Рис. 6. Сканирующая электронная микроскопия клеток *E. faecium* SF68, выращенных на среде с отваром ромашки. Увеличение в 50 000 раз. Длина маркера 1 мкм

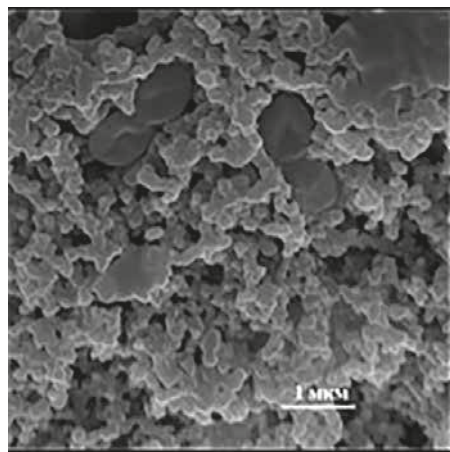


Рис. 7. Сканирующая электронная микроскопия клеток *E. faecium* SF68, выращенных на среде с отваром брусники. Увеличение в 50 000 раз. Длина маркера 1 мкм

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. Отвары растений брусники и шалфея повышали чувствительность клеток *M. luteus* С6, *E. coli* M17, *E. faecium* SF68 к целому ряду антимикробных препаратов: амоксициллину, ванкомицину, гентамицину, канамицину, доксициклину и левомицетину. Указанные препараты характеризовались бактерицидным механизмом действия, опосредованным нарушением синтеза компонентов клеточной стенки и/или нарушением синтеза белка путем связывания 30S-субъединицы рибосомы.

2. Отвар ромашки в использованных концентрациях не повышал чувствительность бактерий *M. luteus* С6, *E. coli* M17 и *E. faecium* SF68 ни к одному из исследуемых антимикробных препаратов.

3. Отвары растений ромашки, шалфея ингибировали формирование бактериальных биопленок *E. coli* M17, *E. coli* BL21 и *E. faecium* SF68.

4. Отвар брусники специфически взаимодействовал с красителем генцианвиолет, усиливая дополнительное окрашивание световых препаратов, что не позволяло провести оценку интенсивности выращивания бактериальных культур и влияния этих веществ на образование ими биопленок.

5. По данным сканирующей электронной микроскопии отвар ромашки вызывал нарушения при формировании биопленок *E. faecium* SF68.

6. Электронно-микроскопический анализ методом сканирующей электронной микроскопии позволил установить, что отвар ромашки нарушал процесс деления клеток *E. faecium* SF68.

Обсуждение

Широко распространенное среди микроорганизмов явление антибиотикорезистентности до сих пор остается одной из самых сложных научных и практиче-

ских проблем. Понимание того, что бактерии наиболее часто существуют в форме биопленок, предполагает поиск новых веществ, воздействующих непосредственно на этот тип микробных сообществ, препятствуя их формированию и разрушая уже существующие, поэтому в настоящее время особенно необходим поиск нестандартных подходов для решения этих проблем. Эволюционно сложившееся взаимодействие растений с бактериями делает вещества растительного происхождения наиболее перспективными для исследования их антибиопленочной активности.

Вещества растительного происхождения исследуют в составе как многокомпонентных форм (отвары, лекарственные средства растительного происхождения, эфирные масла, экстракты), так и их отдельных компонентов (органические кислоты, терпены, флавоноиды, терпены и др.). Безусловно, наиболее актуальным на сегодняшний день считается исследование антибиопленочной активности различных химических веществ, безопасных для здоровья человека.

Основной целью данного исследования являлось проведение сравнительного анализа эффективности воздействия трех антимикробных растительных отваров (брусники, шалфея и ромашки) на чувствительность бактерий *M. luteus* С6, *E. coli* М17 и *E. faecium* SF68 к АМП. Возникла необходимость выяснения способности бактерий *M. luteus* С6, *E. coli* М17 и *E. faecium* SF68 формировать ББ при действии перечисленных выше растительных веществ с антибактериальной активностью на фоне воздействия АМП.

В результате проведенных экспериментов установлено, что отвары растений брусники и шалфея оказывали значительное влияние на чувствительность клеток *M. luteus* С6, *E. coli* М17 и *E. faecium* SF68 к определенным антимикробным препаратам: амоксициллин, ванкомицин, гентамицин, канамицин, доксициклин, левомицетин. Наибольшее воздействие на чувствительность клеток *M. luteus* С6, *E. coli* М17 и *E. faecium* SF68 к антимикробным препаратам оказывал отвар брусники.

Согласно данным световой микроскопии отвары растений ромашки, шалфея обладали выраженным ингибирующим действием на формирование бактериальных биопленок *E. faecium* SF68, *E. coli* М17 и *E. coli* BL21.

Результаты сканирующей электронной микроскопии свидетельствовали о нарушении формирования бактериальных биопленок *E. faecium* SF68 при добавлении в среду выращивания этих бактерий отвара ромашки. В образцах, содержащих отвар ромашки, наблюдали признаки нарушения деления клеток.

Полученные результаты подтверждают перспективность дальнейшего исследования антибиопленочной активности лекарственных средств растительного происхождения, в том числе отваров растений брусники, ромашки, шалфея для решения проблемы антибиотикорезистентности и снижения нагрузки при воздействии АМП на организм человека.

Литература

1. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M. Microbial biofilms // Annu. Rev. Microbiol. 1995. Vol.49. P.711–745. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>.
2. Рыбальченко О. В., Бондаренко В. М., Добрица В. П. Атлас ультраструктуры микробиоты кишечника человека. СПб.: ИИЦ ВМА, 2008. 112 с.

3. *Flemming H. C., Wingender J.* The biofilm matrix // *Nat. Rev. Microbiol.* 2010. Vol. 8 (9). P. 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.
4. *Chen M., Liu H., Wang R.* Dynamical behaviors of quorum sensing network mediated by combinatorial perturbation // *Math. Biosci. Eng.* 2022. Vol. 19 (5). P. 4812–4840. <https://doi.org/10.3934/mbe.2022225>.
5. *Parrino B., Schillaci D., Carnevale I., Giovannetti E., Diana P., Cirrincione G., Cascioferro S.* Synthetic small molecules as anti-biofilm agents in the struggle against antibiotic resistance // *Eur. J. Med. Chem.* 2019. Vol. 161. P. 154–178. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.036>.
6. *Olsen I.* Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2015. Vol. 34 (5). P. 877–886. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2323-z>.
7. *Sharma D., Misba L., Khan A. U.* Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities // *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2019. Vol. 8 (76). P. 1–10.
8. *Tan S. Y. Y., Chua S. L., Chen Y., Rice S. A., Kjelleberg S., Nielsen T. E., Yang L., Givskov M.* Identification of five structurally unrelated quorum-sensing inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* from a natural-derivative database // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. Vol. 57 (11). P. 5629–5641. <https://doi.org/10.1128/AAC.00955-13>.
9. *Рыбальченко О. В., Эрман М. В., Орлова О. Г., Первунина Т. М., Капустина В. В., Парийская Е. Н.* Подавление биопленок условно патогенных бактерий на мочевых катетерах // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2017. № 3. С. 3–11.
10. *Kumar S., Pandey A. K.* Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview // *Scientific World Journal.* 2013. Vol. 2013. Article ID 162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>.
11. *Evans S. M., Cowan M. M.* Plant products as antimicrobial agents // *Cosmet. Drug. Microbiol.* 2016. Vol. 12 (4). P. 205–231. <https://doi.org/10.3109/9781420019919-17>.
12. *Vasconcelos M. A., Arruda F. V. S., Carneiro V. A., Silva H. C., Nascimento K. S., Sampaio A. H., Cavada B., Teixeira E. H., Henriques M., Pereira M. O.* Effect of algae and plant lectins on planktonic growth and biofilm formation in clinically relevant bacteria and yeasts // *Biomed. Res. Int.* 2014. Vol. 2014. Article ID 365272. <https://doi.org/10.1155/2014/365272>.
13. *Song Y. J., Yu H. H., Kim Y. J., Lee N. K., Paik H. D.* Anti-biofilm activity of grapefruit seed extract against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2019. Vol. 29 (8). P. 1177–1183. <https://doi.org/10.4014/JMB.1905.05022>.
14. *Holzappel W., Arini A., Aeschbacher M., Coppolecchia R., Pot B.* Enterococcus faecium SF68 as a model for efficacy and safety evaluation of pharmaceutical probiotics // *Benef. Microbes.* 2018. Vol. 9 (3). P. 375–388. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0148>.
15. *Wang Y., Shi J., Tang L., Zhang Y., Zhang Y., Wang X., Zhang X.* Evaluation of Rpf protein of *Micrococcus luteus* for cultivation of soil actinobacteria // *Syst. Appl. Microbiol.* 2021. Vol. 44 (5). P. 126234. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126234>.
16. *Kokubu E., Kinoshita E., Ishihara K.* Inhibitory Effects of Lingonberry Extract on Oral Streptococcal Biofilm Formation and Bioactivity // *Bull. Tokyo Dent. Coll.* 2019. Vol. 60 (1). P. 1–9. <https://doi.org/10.2209/tdpublication.2018-0007>.
17. *O'Toole G. A.* Microtiter dish biofilm formation assay // *Journal of visualized experiments: JoVE.* 2011. Vol. 47. P. 2437. <https://doi.org/10.3791/2437>.

Статья поступила в редакцию 28 февраля 2023 г.;
рекомендована к печати 10 мая 2023 г.

Контактная информация:

Рыбальченко Оксана Владимировна — д-р биол. наук, проф.; ovr@inbox.ru
Орлова Ольга Геннадьевна — канд. биол. наук; o.orlova@spbu.ru
Нетеса Мария Александровна — аспирант; saintula@gmail.com
Капустина Валентина Викторовна — ст. лаборант; v.kapustina@spbu.ru

Influence of antimicrobial substances of plant origin on the sensitivity of bacterial biofilm to antimicrobial drugs

O. V. Rybalchenko¹, O. G. Orlova¹, M. A. Netesa², V. V. Kapustina¹

¹ St. Petersburg State University,

7–9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russian Federation

² Institute of Experimental Medicine,

2, ul. Akademika Pavlova, St. Petersburg, 197376, Russian Federation

For citation: Rybalchenko O. V., Orlova O. G., Netesa M. A., Kapustina V. V. Influence of antimicrobial substances of plant origin on the sensitivity of bacterial biofilm to antimicrobial drugs. *Vestnik of Saint Petersburg University. Medicine*, 2023, vol. 18, issue 2, pp. 176–191. <https://doi.org/10.21638/spbu11.2023.206> (In Russian)

The widespread antibiotic resistance is associated with the formation of special forms of microbial communities — bacterial biofilms with increased resistance to the impact of various physicochemical factors, including antimicrobial drugs. In this regard, the investigation of antibacterial agents, including herbal preparations that could affect bacterial biofilms, seems to be of current interest. The aim of this work was to identify antibacterial substances of plant origin that can most effectively affect bacterial biofilms. The effect of antibacterial decoctions of lingonberry, sage, and chamomile plants on the sensitivity of bacteria to antimicrobial drugs was assessed. The susceptibility of bacteria to antimicrobial drugs, when combined with herbal decoctions, was determined by the disk-diffusion method. The morphophysiological properties of biofilms were illustrated by light and scanning electron microscopy. The ability of lingonberry, sage, and chamomile decoctions to increase the sensitivity of bacteria to antimicrobial drugs of predominantly bactericidal pharmacological action was revealed. Decoctions of medicinal plants prevented the formation of complete bacterial biofilms. The obtained results indicate the antibiofilm activity of lingonberry, chamomile and sage decoctions, which contribute to a decrease in the level of antibiotic resistance of bacteria and a decrease in the load during antimicrobial therapy.

Keywords: antibiotic resistance, antimicrobial drugs, bacterial biofilms, herbal decoctions.

Reference

1. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1995, vol. 49, pp. 711–745. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>.
2. Rybalchenko O. V., Bondarenko V.M., Dobritsa V.P. *Atlas of the ultrastructure of the human intestinal microbiota*. St. Petersburg, IIC VMA Publ., 2008, 112 p. (In Russian)
3. Flemming H. C., Wingender J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2010, vol. 8 (9), pp. 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.
4. Chen M., Liu H., Wang R. Dynamical behaviors of quorum sensing network mediated by combinatorial perturbation. *Math. Biosci. Eng.*, 2022, vol. 19 (5), pp. 4812–4840. <https://doi.org/10.3934/mbe.2022225>.
5. Parrino B., Schillaci D., Carnevale I., Giovannetti E., Diana P., Cirrincione G., Cascioferro S. Synthetic small molecules as anti-biofilm agents in the struggle against antibiotic resistance. *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, vol. 161, pp. 154–178. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.036>.
6. Olsen I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2015, vol. 34 (5), pp. 877–886. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2323-z>.
7. Sharma D., Misba L., Khan A. U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.*, 2019, vol. 8 (76), pp. 1–10.
8. Tan S. Y. Y., Chua S. L., Chen Y., Rice S. A., Kjelleberg S., Nielsen T. E., Yang L., Givskov M. Identification of five structurally unrelated quorum-sensing inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* from a nat-

- ural-derivative database. *Antimicrobial Agents Chemother.*, 2013, vol. 57 (11), pp. 5629–5641. <https://doi.org/10.1128/AAC.00955-13>.
9. Rybalchenko O. V., Erman M. V., Orlova O. G., Pervunina T. M., Kapustina V. V., Pariyskaya E. N. Suppression of biofilms of opportunistic bacteria on urinary catheters. *Zh. Mikrobiol.*, 2017, no. 3, pp. 3–11. (In Russian)
 10. Kumar S., Pandey A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Scientific World Journal*, 2013, vol. 2013, article ID 162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>.
 11. Evans S. M., Cowan M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Cosmetic Drug Microbiol.*, 2016, vol. 12 (4), pp. 205–231. <https://doi.org/10.3109/9781420019919-17>.
 12. Vasconcelos M. A., Arruda F. V. S., Carneiro V. A., Silva H. C., Nascimento K. S., Sampaio A. H., Cavada B., Teixeira E. H., Henriques M., Pereira M. O. Effect of algae and plant lectins on planktonic growth and biofilm formation in clinically relevant bacteria and yeasts. *Biomed. Res. Int.*, 2014, vol. 2014, article ID 365272. <https://doi.org/10.1155/2014/365272>.
 13. Song Y. J., Yu H. H., Kim Y. J., Lee N. K., Paik H. D. Anti-biofilm activity of grapefruit seed extract against staphylococcus aureus and Escherichia coli. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, vol. 29 (8), pp. 1177–1183. <https://doi.org/10.4014/JMB.1905.05022>.
 14. Holzapfel W., Arini A., Aeschbacher M., Coppolecchia R., Pot B. Enterococcus faecium SF68 as a model for efficacy and safety evaluation of pharmaceutical probiotics. *Benef. Microbes.*, 2018, vol. 9 (3), pp. 375–388. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0148>.
 15. Wang Y., Shi J., Tang L., Zhang Y., Zhang Y., Wang X., Zhang X. Evaluation of Rpf protein of Micrococcus luteus for cultivation of soil actinobacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2021, vol. 44 (5), p. 126234. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126234>.
 16. Kokubu E., Kinoshita E., Ishihara K. Inhibitory Effects of Lingonberry Extract on Oral Streptococcal Biofilm Formation and Bioactivity. *Bull Tokyo Dent Coll.*, 2019, vol. 60 (1), pp. 1–9. <https://doi.org/10.2209/tdcpublication.2018-0007>.
 17. O'Toole G. A. Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 2011, vol. 47, p. 2437. <https://doi.org/10.3791/2437>.

Received: February 28, 2023

Accepted: May 10, 2023

Authors' information:

Oksana V. Rybalchenko — Dr. Sci. in Biology, Professor; ovr@inbox.ru

Olga G. Orlova — PhD; o.orlova@spbu.ru

Maria A. Netesa — Postgraduate Student; saintula@gmail.com

Valentina V. Kapustina — Senior Laboratory Assistant; v.kapustina@spbu.ru