

УДК 577.1, 579.6

## АНТИМИКРОБНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ *ANDROMEDA POLYFOLIA* И *ALCHEMILLA SUBCRENATA*

© М.А. Живетьев<sup>1,2\*</sup>, В.А. Быбин<sup>1</sup>, Е.В. Кочерыгина<sup>2</sup>, Н.В. Семенова<sup>1</sup>, Т.Е. Путилина<sup>1</sup>, Л.В. Дударева<sup>1</sup>, И.А. Граскова<sup>1,3</sup>, Ю.А. Маркова<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Сибирский институт физиологии и биохимии растений, ул. Лермонтова, 132, Иркутск, 664033 (Россия), e-mail: nik.19@mail.ru

<sup>2</sup>Иркутский национальный исследовательский технический университет, ул. Лермонтова, 83, Иркутск, 664074 (Россия)

<sup>3</sup>Иркутский научный центр, ул. Лермонтова, 134, Иркутск, 664033 (Россия)

Растения накапливают в своих тканях мощный арсенал защитных веществ, необходимых для выживания в условиях окружающей абиотической среды и в агрессивном соседстве с патогенными бактериями и вирусами. Нами изучались следующие виды лекарственных растений: *Andromeda polyfolia* и *Alchemilla subcrenata*. Проведен химический анализ водного и 40 и 70% спиртового экстрактов этих растений. Содержание флавоноидов было достоверно выше при всех способах экстракции из манжетки по сравнению с подбелом. На степень выхода фенольных соединений и водорастворимых сахаров влияло присутствие спирта. Из *Andromeda polyfolia* большее разнообразие фенольных соединений выходило в воду и 40% этанол, а из *Alchemilla subcrenata* – в 40% и 70% этанол. Экстракты сравнивали по действию на выживаемость и биопленкообразование *Escherichia coli* XL1-Blue и *Pectobacterium carotovorum*. Установлено, что экстракты исследованных растений обладали разной степенью антимикробного действия. Спиртовые экстракты *Andromeda polyfolia* подавляли образование биопленок *P. carotovorum* и *E. coli*. Все экстракты *Alchemilla subcrenata* стимулировали бактериальный рост и биопленкообразование. Наиболее эффективным оказался 70% спиртовой экстракт *Alchemilla subcrenata*.

**Ключевые слова:** экстракты растений, растительные метаболиты, влияние на микроорганизмы, биопленки, *Andromeda polyfolia*, *Alchemilla subcrenata*, *Pectobacterium carotovorum*, *Escherichia coli*.

### Введение

Максим Аркадьевич Живетьев – научный сотрудник лаборатории растительно-микробных взаимодействий, e-mail: nik.19@mail.ru

Быбин Виктор Александрович – научный сотрудник лаборатории растительно-микробных взаимодействий, кандидат биологических наук, e-mail: godolin@mail.ru

Кочерыгина Елена Викторовна – аспирант кафедры биотехнологий и биоинформатики, e-mail: nik.19@mail.ru

Семенова Наталья Викторовна – ведущий технолог, e-mail: laser@sifibr.irk.ru

Путилина Татьяна Егоровна – ведущий технолог, e-mail: laser@sifibr.irk.ru

Дударева Любовь Виссарионовна – кандидат биологических наук, заведующая лабораторией физико-химических методов анализа, e-mail: laser@sifibr.irk.ru

Граскова Ирина Алексеевна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник, e-mail: graskova@sifibr.irk.ru

Маркова Юлия Александровна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией растительно-микробных взаимодействий, e-mail: juliam06@mail.ru

Растения накапливают в своих тканях мощный арсенал защитных веществ, необходимых для выживания в непредсказуемых условиях окружающей среды и в агрессивном соседстве с патогенными бактериями и вирусами. В этой связи изучение антимикробного потенциала растений остается практически значимым для человечества [1]. Особое внимание уделяется лекарственным растениям, которые по определению считаются наиболее богатыми биологически активными соединениями. Одни растительные метаболиты, такие как флавоноиды, алкалоиды и терпены, обладают выраженной антимикробной активностью [2, 3]. Другие, например, сахара и аминокислоты, могут использоваться микроорганизмами в качестве дополнительного источника питания и способствовать их размножению [1]. Фенольная составляющая экстрактов лекарственных растений одновременно с бактерицидным действием часто обладает антиоксидантным эффектом [4].

\* Автор, с которым следует вести переписку.

Экстракты лекарственных растений содержат целый коктейль соединений, каждое из которых по отдельности не обязательно присутствует в эффективно действующих на микроорганизмы концентрациях, но в совокупности они обладают синергическим эффектом. Несмотря на то, что антимикробное действие экстрактов растений давно и активно изучается, до настоящего времени недостаточно публикаций по изучению их антибиопленочного действия. При этом микробные биопленки играют ведущую роль в развитии хронических форм инфекционных заболеваний. Они могут выстилать постоянные катетеры, внутренние имплантаты, контактные линзы и протезы [5]. Способность бактерий формировать биопленки рассматривается в настоящее время как фактор их патогенности. Это связано еще и с тем, что в составе биопленки бактериальные клетки отличаются значительной устойчивостью к действию антибиотиков и дезинфицирующих средства [6, 7]. Такая устойчивость создает значительные трудности в борьбе с биопленками и представляет серьезную эпидемиологическую проблему в медицинских учреждениях [8].

Целью представленной работы было изучение химического состава водных и этанольных (40 и 70%) экстрактов растений подбела многолистного (*Andromeda polyfolia* L.) и манжетки городковатой (*Alchemilla subcrenata* Buser) и сравнение их антимикробного потенциала.

### **Объекты и методы исследования**

**Подбел многолистный.** *Andromeda polyfolia* L. – болотное растение, относящееся к семейству вересковые (Ericaceae), роду вечнозеленые кустарники и кустарнички класса двудольные. Применяется в народной медицине как успокаивающее, снотворное средство, при ревматизме, отложениях солей, невралгии и головных болях. Мед с цветков подбела рекомендуют при туберкулезе, гнойных ранах, в качестве снотворного. Содержит андромедотоксин, из-за которого в больших концентрациях токсичен [9].

**Манжетка городковатая.** *Alchemilla subcrenata* Buser – растение семейства розоцветные (Rosaceae) со сложной систематикой внутри рода. Из фенольных соединений во всех видах манжеток преобладают флавоноиды, максимумы которых совпадают с весенне-летним и летне-осенним циклами цветения [10]. Манжетка широко применяется в народной медицине Сибири и Европы и эффективна при дизентерии, воспалительных заболеваниях глаз [9], внутренних и внешних изъязвлениях и ранах [11]. В настоящее время растение активно изучается [12, 13].

Отбор растительного материала проводили на юго-восточном побережье озера Байкал, в 700 м от уреза озера. Отбиралась надземная часть растений (листья) как наиболее популярная в народной медицине.

**Бактериальные штаммы.** Для определения антимикробного и противобиопленочного эффектов использовали грамотрицательные бактерии: фитопатогенные *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* ВКМ В-1247 и условно-патогенные *Escherichia coli* XL-1 Blue (“Stratagene”, США). Возбудитель черной ножки картофеля *P. carotovorum* приводит к увяданию стеблей в период вегетации и вызывает гнили клубней в период вегетации и при хранении. Санитарно-показательный микроорганизм *E. coli* может встречаться в среде при фекальном загрязнении и сигнализировать о санитарной непригодности почв для хозяйственных нужд. Бесплазмидные клетки *E. coli* штамм XL1-Blue не патогенны для растений и человека.

**Получение экстрактов.** Листья растений высушивали в тени в хорошо проветриваемом помещении до воздушно-сухого состояния и измельчали до частиц размером 1–2 мм. Экстракцию проводили при соотношении сырье-экстрагент 1 : 30. Водный экстракт получали следующим образом: заливали горячей дистиллированной водой и 5 мин кипятили на водяной бане (при 100 °С), после чего настаивали 1 ч. Спиртовую экстракцию осуществляли 1 ч в 40 или 70% водном растворе этанола.

**Определение содержания водорастворимых сахаров, фенольных соединений и флавоноидов в экстрактах.** Содержание сахаров в экстрактах определяли по методу Шомоди-Нельсона (ГОСТ 9.801-82). Оптическую плотность измеряли при 508 нм на SPECORD S 100 («Analytikjena», Германия). Калибровочную кривую строили по глюкозе. Общее содержание фенольных соединений в пересчете на кверцетин определяли спектрометрическим методом с помощью реактива Фолина-Чокальтеу при 720 нм на SPECORD S 100 («Analytikjena», Германия) как это описано в работе [14]. Содержание флавоноидов в экстрактах определяли по качественной реакции с хлоридом алюминия. Для построения калибровочной кривой использовали коммерческий препарат кверцетина («Sigma», США) [14]. Пробоподготовка перед ВЭЖХ-анализом включала в себя очистку экстрактов хлороформом от липофильных пигментов по стандартной методике с последующей экстракцией фенольного комплекса этилацетатом. Качественный состав фенольной фракции экстрактов исследовали на микроколonoчном высокоэффективном жидкостном хро-

матогрофе «Милихром А-02» (Россия) с УФ-детектором при градиентном режиме хроматографирования (градиент 40 мин от 5 до 100% ацетонитрила), колонка длиной 75 мм, диаметром 2 мм, скорость потока – 100 мкл/мин, объем пробы – 4 мкл. Идентификацию полученных хроматографических пиков проводили путем сравнения их УФ-спектров с базами данных в программе МультиХром-СПЕКТР для Windows.

*Деалкоголизация и стерилизация экстрактов.* Перед исследованием бактерицидного действия экстрактов из них на роторном испарителе удалялся спирт и излишки воды, полученный концентрат стерилизовали фильтрованием через бактериальный фильтр (диаметр пор 20 мкм) с последующим доведением стерильной дистиллированной водой до исходного объема. Тем самым исключалось влияние спирта на бактерии.

*Изучение антимикробных свойств экстрактов.* Антимикробный потенциал исследуемых экстрактов оценивали диско-диффузионным методом на газонах (МПА) [15]. Эффективность воздействия оценивали по диаметру зоны подавления роста бактерий. Бактерицидный и бактериостатический эффекты оценивали визуально по характеру зоны подавления вокруг диска.

*Действие экстрактов на формирование биопленки.* В 96-луночные планшеты вносили по 150 мкл смеси, состоящей на 1/4 из суспензии исследуемого штамма микроорганизма в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) с 0.5% глюкозы (ЗФРГ) и экстрактов, сгущенных до 1 : 6. Планшеты инкубировали трое суток при 31 °С. На 4-е сутки измеряли оптическую плотность окрашенных биопленок на планшетном спектрофотометре (Bio-Rad, США) при длине волны 495 нм. Для окрашивания планшеты аккуратно переворачивали несколько раз, вытряхивая из лунок планктонные клетки. Затем вносили 150 мкл дистиллированной воды и 20 мкл 1% спиртового раствора генциан фиолетового, инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре. После тщательного трехкратного промывания в каждую лунку вносили по 200 мкл этилового спирта. Степень пленкообразования соответствовала интенсивности окрашивания содержимого лунок [16].

*Изучение воздействия экстрактов лекарственных растений на сформированную биопленку.* Выращивали биопленки в 96-луночных планшетах по вышеописанной методике. Через 4 сут измеряли оптическую плотность биопленки на планшетном спектрофотометре (Bio-Rad, США) при длине волны 495 в одном планшете. В остальные планшеты вносили по 37 мкл ЗФРГ или растительных экстрактов. Изменение состояния биопленок фиксировали спектрофотометрическим методом через 1, 2 и 3 суток.

*Статистическая обработка данных.* В таблицах и графиках представлены средние арифметические и стандартные отклонения. Значимость полученных результатов определяли с помощью критерия Вилкоксона. На графиках значимые отличия от контрольного роста отмечены символом "\*".

### Результаты исследования и обсуждение

Качественный и количественный состав экстракта, получаемого из растительного материала, зависит от способа экстракции. Водой и полярными органическими растворителями хорошо экстрагируются водорастворимые сахара, фенольные соединения, флавоноиды, обуславливающие антиоксидантные, бактериостатические, антимикробные эффекты растительных извлечений [15, 17]. Нами были проанализированы различия в содержании водорастворимых сахаров, флавоноидов и фенольных соединений в экстрактах, полученных разным способом (табл. 1). Достоверность отличий здесь и ниже оценивали по критерию Вилкоксона. Содержание флавоноидов было достоверно выше при всех способах экстракции из манжетки по сравнению с подбелом. На степень выхода фенольных соединений и водорастворимых сахаров влияло присутствие спирта. В спиртосодержащих экстрактах содержание фенольных соединений было значимо выше в вытяжках подбела, при этом не выявлено достоверных различий в содержании сахаров. В водных экстрактах не выявлено различий в содержании фенольных соединений, но сахаров из манжетки выделялось статистически значимо больше, по сравнению с водными вытяжками подбела (табл. 1).

Таблица 1. Содержание фенольных соединений, флавоноидов и сахаров в исходных экстрактах растений в зависимости от способа извлечения, мг/мл

Способ экстрагирования	Фенольные соединения		Флавоноиды		Сахара	
	манжетка	подбел	манжетка	подбел	манжетка	подбел
Вода	1.29 ± 0.02	1.38 ± 0.17	16.07 ± 0.81	5.92 ± 1.09	3.21 ± 0.05	2.51 ± 0.19
40% этанол	1.59 ± 0.24	1.82 ± 0.06	11.77 ± 0.37	6.48 ± 0.04	3.41 ± 0.05	3.65 ± 1.52
70% этанол	1.22 ± 0.20	1.89 ± 0.26	10.08 ± 0.12	8.46 ± 1.21	2.67 ± 0.07	2.75 ± 1.24

Примечание. Значимость отличий содержаний между всеми вариантами эксперимента обсуждена в тексте.

Из листьев манжетки достоверно больше флавоноидов поступало в водный экстракт, в 70% спиртовой – статистически достоверно меньше, а из листьев подбела флавоноидов достоверно больше экстрагировалось в 70% этиловый раствор по сравнению с водой и 40% спиртом. Фенольных соединений и растворимых сахаров из листьев манжетки значимо больше выходило при экстракции 40% этанолом, по сравнению с водой и 70% спиртом. Разные способы экстракции из листьев подбела не показали достоверных различий в выходе водорастворимых сахаров, а фенольные соединения подбела значимо меньше экстрагировались в воду по сравнению с этанолом.

Стерилизация экстрактов и выпаривание из них спирта не приводили к достоверному уменьшению содержания действующих веществ в экстрактах, за исключением флавоноидов в 70% экстракте подбела (табл. 2).

Состав фенольного комплекса в экстрактах, оцененный с помощью ВЭЖХ с УФ-спектроскопией, отличался в зависимости от вида растения и использованного для извлечения растворителя (табл. 3). Из подбела большее разнообразие фенольных соединений выходило в воду и 40% этанол, а из манжетки – в 40 и 70% этанол.

Таким образом, полученные нами экстракты из листьев манжетки городковатой отличались более высоким общим содержанием флавоноидов и большим разнообразием фенольных соединений по сравнению с подбелом многолистным, что согласуется с данными о высоком содержании полифенолов в манжетках [10].

С летучими флавоноидами, терпеноидами и фенилпропаноидами связывают противомикробную активность растительных препаратов [18]. Причем существуют отличия в действующих концентрациях этих соединений на грам(+) и грам(-) бактерии. Например, флавоноид кемпферол-рамнозид на большинство грам(+) действует в концентрациях от 0.5 до 16 мкг/мл, а на грам(-) только при дозировке больше 16 мкг/мл [19], что говорит о лучшей устойчивости к флавоноидам грамотрицательных бактерий [19], к которым относятся и использованные нами тест-культуры.

Для оценки антимикробного потенциала исследуемых экстрактов использовали диско-диффузионный метод на газонах *E. coli* и *P. carotovorum* (МПА). Эффективность воздействия оценивали по диаметру зоны подавления роста. Установлено, что подбел (*A. polifolia*) в концентрации 1 : 6 не влиял на исследуемые виды бактерий, тогда как экстракты манжетки (*A. subcrenata*) обладали выраженным бактерицидным действием на *P. carotovorum* и замедляли рост *E. coli* (бактериостатический эффект) (табл. 4).

Наблюдаемое действие не зависело от степени разведения экстракта подбела. Однако на рост *P. carotovorum* низкие концентрации экстракта манжетки не оказали существенного воздействия (табл. 5).

Действие экстрактов *A. subcrenata* и *A. polifolia* на формирование биопленок. В природных условиях бактерии в свободноживущей (планктонной) форме присутствуют в основном с целью расселения, а для эффективного освоения новых экологических пространств микроорганизмы переходят в состояние биопленок [20], в котором они становятся более устойчивыми и менее уязвимыми к внешним воздействиям [16].

Таблица 2. Состав экстрактов после выпаривания на роторном испарителе и фильтрации через бактериальный фильтр с последующим доведением до исходного объема на примере подбела, мг/мл

Способ экстрагирования	Фенольные соединения		Флавоноиды		Сахара	
	до	после	до	после	до	после
Вода	1.38 ± 0.17	1.41 ± 0.17	5.92 ± 1.09	6.18 ± 0.21	2.51 ± 0.19	3.44 ± 0.13
40% этанол	1.82 ± 0.06	1.59 ± 0.18	6.48 ± 0.04	8.10 ± 0.68	3.65 ± 1.52	6.51 ± 0.14
70% этанол	1.89 ± 0.26	1.71 ± 0.01	8.46 ± 1.21	6.32 ± 0.89	2.75 ± 1.24	4.08 ± 1.80

Примечание. Значимость отличий в содержаниях между всеми вариантами эксперимента отражена в тексте.

Таблица 3. Количество хроматографических пиков фенольных соединений в экстрактах лекарственных растений при различных способах экстракции и детектированные в них соединения

Способ экстракции	Подбел многолистный		Манжетка городковатая	
	Число пиков	Из них детектировано:	Число пиков	Из них детектировано:
Вода	30	Протоцианидин В2, Кверцетин	31	Фенилуксусная кислота,
40% этанол	30	Рутин, Гиперозид, Протоцианидин В1, Кверцетин 3-β-D-глюкозид	36	Гиперозид, Кверцетин, Периндоприл, Кемпферол
70% этанол	27	Протоцианидин В2, Гиперозид, Кверцетин	40	3-β-D глюкопиранозид

Таблица 4. Диаметр зоны подавления роста бактерий (мм) под действием экстрактов лекарственных растений, концентрация экстракта 1 : 6

Способ экстрагирования	Диаметр зоны подавления роста, мм		Микроорганизм
	<i>A. subcrenata</i>	<i>A. polifolia</i>	
Водный экстракт 1 : 6	16.0±2.0 *	8.0±0.6	<i>E. coli</i>
40% спиртовой экстракт 1 : 6	14.0±1.0 *	8.0±0.7	
70% спиртовой экстракт 1 : 6	12.0±1.3 *	8.0±0.8	
Водный экстракт 1 : 6	14.0±1.7 *	8.0±0.7	<i>P. carotovorum</i>
40% спиртовой экстракт 1 : 6	16.5±1.4 *	8.0±0.6	
70% спиртовой экстракт 1 : 6	14.0±1.4 *	8.0±0.6	
Контроль ЗФР	7.0±0.5	7.0±0.5	<i>E. coli</i>
	7.0±0.5	7.0±0.5	<i>P. carotovorum</i>

Примечание. \* – значимые отличия от контроля, ЗФР – забуференный физиологический раствор.

Таблица 5. Оценка антимикробного действия высоких разведений 70% спиртового экстракта *Alchemilla subcrenata* Buser на *E. coli* и *P. carotovorum*, (диаметр зоны подавления роста бактерий, мм)

Концентрация экстракта <i>A. subcrenata</i>	Микроорганизм	
	<i>E. coli</i>	<i>P. carotovorum</i>
1 : 6	12.0±1.3 *	14.0±1.4 *
1 : 10	15.5±2.0 *	9.0±1.0 *
1 : 15	11.0±1.5 *	9.5±1.0 *
1 : 20	14.5±1.2 *	7.0±0.6
Контроль ЗФР	6.0±0.3	6.0±0.3

Примечание. \* – значимые отличия от контроля, ЗФР – забуференный физиологический раствор.

При изучении влияния экстрактов подбела на выживаемость *P. carotovorum* и *E. coli*, увеличение оптической плотности наблюдали во всех вариантах опыта на третьи сутки инкубирования микроорганизмов. Однако экстракты подбела подавляли пророст суспензии *P. carotovorum*, в сравнении с ЗФРГ, который служил контролем. Так, при добавлении водного и 70% спиртового экстрактов подбела оптическая плотность суспензии была значимо ниже таковой при культивировании бактерий в ЗФРГ на 15.5%. Наиболее высокое отличие от контроля – 22.8% – было у суспензии бактерий, культивируемых в среде с добавлением 40% экстракта. Несколько иное влияние оказали экстракты подбела на *E. coli*. Так 40 и 70% спиртовые экстракты значимо стимулировали рост суспензии бактерий относительно контроля. И только водный экстракт данного растения существенно снижал концентрацию бактерий на третьи сутки культивирования (рис. 1).

При изучении воздействия экстрактов подбела на биопленкообразование *E. coli* и *P. carotovorum* (рис. 2) было установлено, что водный экстракт подбела почти в два раза усиливал биопленкообразование *E. coli* и не влиял на *P. carotovorum*. При этом экстракты, полученные с использованием 40% и 70% этанола, по критерию Вилкоксона значимо подавляли и *P. carotovorum* и *E. coli* по сравнению с контролем. Таким образом, экстракты этого растения, несмотря на отсутствие антимикробного действия при использовании диско-диффузионного метода снижали пророст популяции бактерий исследуемых видов. Одновременно спиртовые экстракты оказали значимое влияние на образование биопленок, что позволяет рекомендовать экстракты *A. polifolia* к дальнейшему исследованию с целью поиска соединений, ингибирующих биопленкообразование.

При изучении влияния экстрактов манжетки на выживаемость и *P. carotovorum* и *E. coli* увеличение оптической плотности используемых культур наблюдали во всех вариантах опыта на 3 сут инкубирования микроорганизмов (рис. 3).

Практически все экстракты манжетки существенно стимулировали биопленкообразование у исследуемых видов бактерий относительно контроля. Наиболее значительной стимулирующей активностью обладал 70% спиртовой экстракт данного растения (рис. 4). Экстракты данного вида обладали выраженной антимикробной активностью, что было показано выше при использовании диско-диффузионного метода. Известно, что процесс формирования биопленок запускается при неблагоприятных воздействиях [6, 7], возможно, именно содержание биологически активных соединений, обладающих значительной антимикробной активностью в экстрактах *A. subcrenata*, объясняет стимуляцию биопленкообразования.

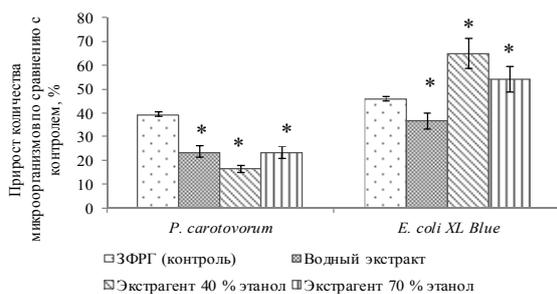


Рис. 1. Влияние экстрактов подбела на выживаемость *P. carotovorum* и *E. coli XL Blue* на третьи сутки инкубирования

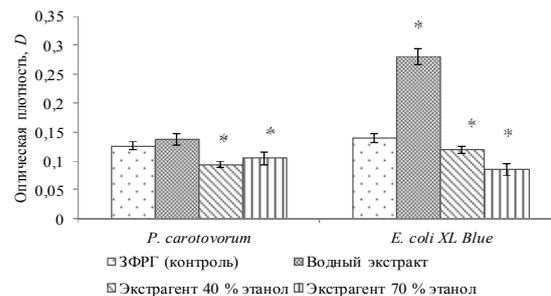


Рис. 2. Влияние экстрактов подбела на биоленкообразование *P. carotovorum* и *E. coli XL Blue* на третьи сутки инкубирования

\* – значимые отличия от контрольного роста микроорганизмов (ЗФРГ) на третьи сутки, ЗФРГ – забуференный физиологический раствор с 0.5% глюкозы

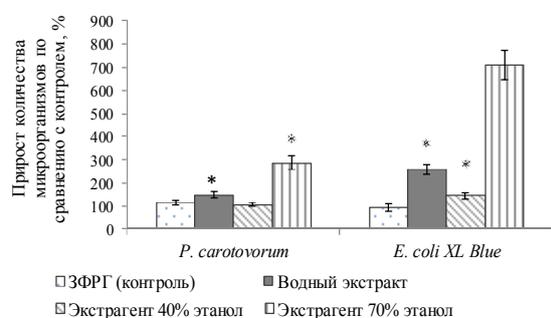


Рис. 3. Влияние экстрактов манжетки, полученных с помощью различных способов, на выживаемость *P. carotovorum* и *E. coli*

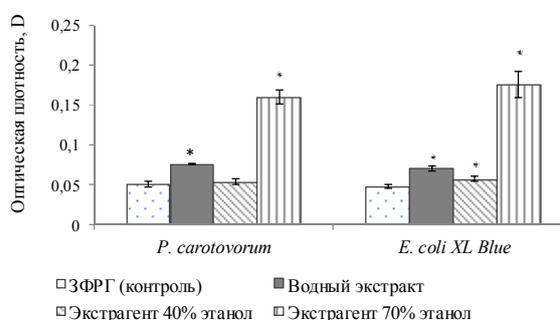


Рис. 4. Влияние экстрактов манжетки, полученных с помощью различных способов, на биоленкообразование *P. carotovorum* и *E. coli*

\* – значимые отличия от контрольного роста микроорганизмов (ЗФРГ) на третьи сутки, ЗФРГ – забуференный физиологический раствор с 0.5% глюкозы

При изучении воздействия растительных экстрактов на бактериальные биопленки важно оценивать их способность к деструкции этих формирований. Поэтому далее были проведены эксперименты по влиянию экстрактов манжетки на уже сформированные трехсуточные биопленки через 1–2 суток кокультивирования. Исследование влияния экстрактов на уже сформированную биопленку не привело к изменению их оптической плотности. Полученные результаты подтверждают литературные данные об устойчивости зрелых биопленок к экстрактам растений [21, 22].

### Заключение

Нами установлено, что экстракты исследованных растений обладали разной степенью антимикробного действия на газонах культур микроорганизмов. Манжетка городковатая (*A. subcrenata*) обладала выраженным бактерицидным действием относительно *P. carotovorum* и бактериостатическим – на *E. coli*. К добавлению экстрактов подбела многолистного (*A. polifolia*) оба микроорганизма были устойчивы. В то же время спиртовые экстракты подбела значительно подавляли образование биопленок *P. carotovorum* и *E. coli*. Все экстракты манжетки, напротив, стимулировали рост и биоленкообразование бактерий, что можно объяснить высокой антимикробной активностью данного растения. Учитывая изученный химический состав экстрактов, выявленные эффекты очевидно связаны с содержанием в них флавоноидов, которые выполняют основную функцию защиты от заселения микроорганизмами, в том числе за счет их бактериостатического, мутагенного, цитопротекторного [23], антибиоленочного эффектов [24].

*Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск) с использованием коллекций микроорганизмов ЦКП «Биоресурсный центр» СИФИБР СО РАН при поддержке интеграционной программой «Фундаментальные исследования и прорывные технологии как основа опережающего развития Байкальского региона и его межрегиональных связей».*

### Список литературы

1. Nascimento P.L.A., Nascimento T.C.E.S., Ramos N.S.M., Silva G.R., Gomes J.E.G., Falcao R.E.A., Moreira K.A., Porto A.L.F., Silva T.M.S. Quantification, antioxidant and antimicrobial activity of phenolics isolated from different extracts of *Capsicum frutescens* (pimenta malagueta) // *Molecules*. 2014. Vol. 19. Pp. 5434–5447. DOI: 10.3390/molecules19045434.
2. Nazzaro F., Fratianni F., Coppola R. Quorum sensing and phytochemicals // *International journal of molecular sciences*. 2013. Vol. 14, N6. Pp. 12607–12619. DOI: 10.3390/ijms140612607.
3. Zhang N., Wang D., Liu Y. Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains // *Plant and Soil*. 2014. Vol. 374, N1-2. Pp. 689–700. DOI: 10.1007/s11104-013-1915-6.
4. Храмова Е.П., Цыбуля Н.В., Чиндяева Л.Н. Антимикробная активность летучих соединений и содержание фенольных компонентов у некоторых видов рода *Pentaphylloides* (Rosaceae) // *Растительные ресурсы*. 2013. Т. 49. С. 598–612.
5. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections // *Science*. 1999. Vol. 284. Pp. 1318–1322. DOI: 10.1126/science.284.5418.1318.
6. Nickel J.C., Wright J.B., Ruseska I., Marrie T.J., Whitfield C., Costerton J.W. Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* colonizing a urinary catheter in vitro // *European Journal of Clinical Microbiology*. 1985. Vol. 4. Pp. 213–218.
7. Borriello G., Werner E., Roe F., Kim A.M., Ehrlich G.D., Stewart P.S. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004. Vol. 48. Pp. 2659–2664. DOI: 10.1128/AAC.48.7.2659-2664.2004.
8. Kim Y.I., Lee Y.H., Kim K.H., Oh Y.K., Moon Y.H., Kwak W.S. Effects of Supplementing Microbially-fermented Spent Mushroom Substrates on Growth Performance and Carcass Characteristics of Hanwoo Steers (a Field Study) // *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2012. Vol. 25. N11. Pp. 1575–1581. DOI: 10.5713/ajas.2012.12251.
9. Телятьев В.В. Полезные растения Центральной Сибири. Иркутск, 1985. 384 с.
10. Зорина Е.В. Фармакогностическое изучение видов рода *Alchemilla* L. Пермского края: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. Пермь, 2009. 21 с.
11. Верещагин В.И., Соболевская К.А., Якубова А.И. Полезные растения Западной Сибири. М., 1959. 346 с.
12. Filipova E.I. Antiviral Activity of Lady's Mantle (*Alchemilla vulgaris* L.) Extracts against Orthopoxviruses // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2017. Vol. 163. N3. Pp. 374–377. DOI: 10.1007/s10517-017-3807-x.
13. Karatoprak G.S., İlğün S., Koşar M. Phenolic Composition, Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm // *Chemistry & Biodiversity*. 2017. Vol. 14. N9. e1700150. DOI: 10.1002/cbdv.201700150.
14. Raza S.A., Rashid A., William J., Razzaq A. Evaluation of oxidative stability of sunflower oil at frying temperature in presence of butylated hydroxytoluene and methanolic extracts of medicinally important plants of Pakistan // *International Food Research Journal*. 2014. Vol. 21. N1. Pp. 331–334.
15. Mansour E., Khaled A.B., Lachiheb B., Abid M., Bachar Kh., Ferchichi A. Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial activities of peel extract from Tunisian pomegranate // *Journal of Agricultural Science and Technology*. 2013. Vol. 15. Pp. 1393–1403.
16. Марданова А.М., Кабанов Д.А., Рудакова Н.Л., Шарипова М.Р. Биопленки: основные методы исследования: учебно-методическое пособие. Казань, 2016. 42 с.
17. Sepulveda-Jimenez G., Reyna-Aquino C., Chaires-Martinez L., Bermudez-Torres K., Rodriguez-Monroy M. Antioxidant activity and content of phenolic compounds and flavonoids from *Justicia spicigera* // *Journal of Biological Sciences*. 2009. Vol. 9, N6. Pp. 629–632. DOI: 10.3923/jbs.2009.629.632.
18. Герман А., Боченек Ж., Герман А.П. Действие масел корицы и лаванды на экспрессию гена *FtsZ* *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2013. Т. 49. №5. С. 476–480.
19. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрасилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушкин, 2013. 310 с.
20. Bogino P.C., Oliva M. de la M., Sorroche F.G., Giordano W. The role of bacterial biofilms and surface component in plant-bacterial associations // *International Journal of Molecular Sciences*. 2013. N14. Pp. 15838–15859. DOI: 10.3390/ijms140815838.
21. Sankar Ganesh P., Ravishankar Rai V.J. Attenuation of quorum-sensing-dependent virulence factors and biofilm formation by medicinal plants against antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa* // *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2017. Vol. 8, N1. Pp. 170–177. DOI: 10.1016/j.jtcme.2017.05.008.

22. Jałowiecki Ł., Żur J., Chojniak J., Ejhed H., Plaza G. Properties of Antibiotic-Resistant Bacteria Isolated from Onsite Wastewater Treatment Plant in Relation to Biofilm Formation // *Current Microbiology*. 2018. Vol. 75, N5. Pp 639–649. DOI: 10.1007/s00284-017-1428-2
23. Максимов А.Ю. Генетические эффекты флавоноидов в бактериальных культурах: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Пермь, 2004. 24 с.
24. Зайцева Ю.В. Молекулярно-генетические особенности Quorum Sensing систем грамотрицательных бактерий (на модели *Serratia*) и изучение их роли в регуляции клеточных процессов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2012. 26 с.

Поступило в редакцию 16 марта 2018 г.

После переработки 4 июня 2018 г.

Принята к публикации 4 июня 2018 г.

**Для цитирования:** Живетьев М.А., Быбин В.А., Кочерыгина Е.В., Семенова Н.В., Путилина Т.Е., Дударева Л.В., Граскова И.А., Маркова Ю.А. Антимикробное действие экстрактов лекарственных растений *Andromeda polyfolia* и *Alchemilla subcrenata* // *Химия растительного сырья*. 2018. №4. С. 149–157. DOI: 10.14258/jcrpm.2018043846.

Zhivetyev M.A.<sup>1,2\*</sup>, Bybin V.A.<sup>1</sup>, Kocherygina E.V.<sup>2</sup>, Semenova N.V.<sup>1</sup>, Putilina T.E.<sup>1</sup>, Dudareva L.V.<sup>1</sup>, Graskova I.A.<sup>1,3</sup>, Markova Y.A.<sup>1,3</sup> ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF MEDICINAL PLANT EXTRACTS *ANDROMEDA POLYFOLIA* AND *ALCHEMILLA SUBCRENATA*

<sup>1</sup>Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry (SIPPB SB RAS), ul. Lermontova, 132, Irkutsk, 664033 (Russia), e-mail: nik.19@mail.ru

<sup>2</sup>Irkutsk National Research Technical University, ul. Lermontova, 83, Irkutsk, 664074 (Russia)

<sup>3</sup>Irkutsk Scientific Center Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Lermontova, 134, Irkutsk, 664033 (Russia)

Plants accumulate in their tissues powerful arsenal of protective substances necessary for survival in the face of abiotic environmental and in aggressive neighborhood with pathogenic bacteria and viruses. We examined the following kinds of medicinal plants: *Alchemilla subcrenata* and *Polyfolia andromeda*. Conducted chemical analyses of water and 40 and 70% alcohol extracts of these plants. The content of flavonoids was significantly greater in all ways of extraction of *Alchemilla subcrenata* compared to *Andromeda polyfolia*. To the extent the release of phenolic compounds and water-soluble sugars affected the presence of alcohol. From *Andromeda polyfolia* greater variety of phenolic compounds left in the water and 40% alcohol, and from *Alchemilla subcrenata* in 40% and 70% ethanol. Extracts compared on the effects on survival and biofilm formation of *Escherichia coli* XLI-Blue and *Pectobacterium carotovorum*. Found that extracts of plants studied have varying degrees of antimicrobial action. Alcohol extracts of *Andromeda polyfolia* suppressed the formation of biofilms of *P. carotovorum* and *E. coli*. All extracts of *Alchemilla subcrenata* stimulated bacterial growth and biofilm formation. The most effective proved to be 70% alcoholic extract of *Alchemilla subcrenata*.

**Keywords:** plant extracts, plant metabolites, the impact on microorganisms, biofilm, *Andromeda polyfolia*, *Alchemilla subcrenata*, *Pectobacterium carotovorum*, *Escherichia coli*.

---

\* Corresponding author.

## References

1. Nascimento P.L.A., Nascimento T.C.E.S., Ramos N.S.M., Silva G.R., Gomes J.E.G., Falcao R.E.A., Moreira K.A., Porto A.L.F., Silva T.M.S. *Molecules*, 2014, vol. 19, pp. 5434–5447. DOI: 10.3390/molecules19045434.
2. Nazzaro F., Fratianni F., Coppola R. *International journal of molecular sciences*, 2013, vol. 14, no. 6, pp. 12607–12619. DOI: 10.3390/Ijms140612607.
3. Zhang N., Wang D., Liu Y. *Plant and Soil*, 2014, vol. 374, no. 1–2, pp. 689–700. DOI: 10.1007/s11104-013-1915-6.
4. Khranova Ye.P., Tsybulya N.V., Chindyayeva L.N. *Rastitel'nyye resursy*, 2013, vol. 49, pp. 598–612. (in Russ.).
5. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. *Science*, 1999, vol. 284, pp. 1318–1322. DOI: 10.1126/science.284.5418.1318.
6. Nickel J.C., Wright J.B., Ruseska I., Marrie T.J., Whitfield C., Costerton J.W. *European Journal of Clinical Microbiology*, 1985, vol. 4, pp. 213–218.
7. Borriello G., Werner E., Roe F., Kim A.M., Ehrlich G.D., Stewart P.S. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, vol. 48, pp. 2659–2664. DOI: 10.1128/AAC.48.7.2659-2664.2004.
8. Kim Y.I., Lee Y.H., Kim K.H., Oh Y.K., Moon Y.H., Kwak W.S. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2012, vol. 25, no. 11, pp. 1575–1581. DOI: 10.5713/ajas.2012.12251.
9. Telyat'yev V.V. *Poleznye rasteniya Tsentral'noy Sibiri*. [Useful plants of Central Siberia]. Irkutsk, 1985, 384 p. (in Russ.).
10. Zorina Ye.V. *Farmakognosticheskoye izucheniye vidov roda Alchemilla L. Permskogo kraya: avtoref. dis. ... kand. farm. nauk*. [Pharmacognostic study of species of the genus Alchemilla L. Perm Territory: author. dis. ... Cand. farm sciences]. Perm', 2009. 21 p. (in Russ.).
11. Vereshchagin V.I., Sobolevskaya K.A., Yakubova A.I. *Poleznye rasteniya Zapadnoy Sibiri*. [Useful plants of Western Siberia]. Moscow, 1959, 346 p. (in Russ.).
12. Filippova E.I. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2017, vol. 163, no. 3, pp. 374–377. DOI: 10.1007/s10517-017-3807-x.
13. Karatoprak G.S., İlgün S., Koşar M. *Chemistry & Biodiversity*, 2017, vol. 14, no. 9, e1700150, DOI: 10.1002/cbdv.201700150.
14. Raza S.A., Rashid A., William J., Razzaq A. *International Food Research Journal*, 2014, vol. 21, no. 1, pp. 331–334.
15. Mansour E., Khaled A.B., Lachiheb B., Abid M., Bachar Kh., Ferchichi A. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2013, vol. 15, pp. 1393–1403.
16. Mardanova A.M., Kabanov D.A., Rudakova N.L., Sharipova M.R. *Bioplenki: osnovnyye metody issledovaniya: uchebno-metodicheskoye posobiye*. [Biofilms: basic research methods: a teaching aid]. Kazan', 2016, 42 p. (in Russ.).
17. Sepulveda-Jimenez G., Reyna-Aquino C., Chaires-Martinez L., Bermudez-Torres K., Rodriguez-Monroy M. *Journal of Biological Sciences*, 2009, vol. 9, no. 6, pp. 629–632. DOI: 10.3923/jbs.2009.629.632
18. German A., Bochenek ZH., German A.P. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2013, vol. 49, no. 5, pp. 476–480. (in Russ.).
19. Tarakhovskiy YU.S., Kim YU.A., Abdrasilov B.S., Muzafarov Ye.N. *Flavonoidy: biokhimiya, biofizika, meditsina*. [Flavonoids: biochemistry, biophysics, medicine]. Pushchino: Sunchrobook, 2013, 310 p. (in Russ.).
20. Bogino P.C., Oliva M. de la M., Sorroche F.G., Giordano W. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, no. 14, pp. 15838–15859. DOI: 10.3390/ijms140815838
21. Sankar Ganesh P., Ravishankar Rai V.J. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2017, vol. 8, no. 1, pp. 170–177. DOI: 10.1016/j.jtcme.2017.05.008.
22. Jałowicki L., Żur J., Chojniak J., Ejhed H., Plaza G. *Current Microbiology*, 2018, vol. 75, no. 5, pp. 639–649. DOI: 10.1007/s00284-017-1428-2.
23. Maksimov A.Yu. *Geneticheskiye efekty flavonoidov v bakterial'nykh kul'turakh: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk*. [Genetic effects of flavonoids in bacterial cultures: Author. dis. ... Cand. biol. sciences] Perm', 2004, 24 p. (in Russ.).
24. Zaytseva Yu.V. *Molekulyarno-geneticheskiye osobennosti Quorum Sensing sistem gramotritsatel'nykh bakteriy (na modeli Serratia) i izucheniye ikh roli v regulyatsii kletochnykh protsessov: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk*. [Molecular genetic features of Quorum Sensing systems of gram-negative bacteria (on the Serratia model) and the study of their role in the regulation of cellular processes: author. dis. ... Cand. biol. sciences]. Moskva, 2012, 26 p. (in Russ.).

Received March 16, 2018

Revised June 4, 2018

Accepted June 4, 2018

**For citing:** Zhivetyev M.A., Bybin V.A., Kocherygina E.V., Semenova N.V., Putilina T.E., Dudareva L.V., Graskova I.A., Markova Y.A. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2018, no. 4, pp. 149–157. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2018043846.

