

## РОЛЬ РЕГУЛЯТОРА ОБЩЕГО ОТВЕТА RpoS В ОБРАЗОВАНИИ БИОПЛЕНОК БАКТЕРИЯМИ *ESCHERICHIA COLI* В ПРИСУТСТВИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ

З.Ю. Самойлова, Г.В. Смирнова, О.Н. Октябрьский

«Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия, [samzu@mail.ru](mailto:samzu@mail.ru)

**Аннотация.** Приводятся результаты изучения влияния различных доз полифенолов на интенсивность биопленкообразования (БПО) бактериями *Escherichia coli*. Установлено ингибирующее влияние кверцетина и танниновой кислоты в концентрации выше 100 мкМ. Выявлен стимулирующий характер влияния на удельное БПО у кверцетина в области концентраций 1-50 мкМ и танниновой кислоты – 1-100 мкМ. Показана связь наблюдаемых эффектов с активностью регулятора общего стрессового ответа RpoS. Ингибирующий характер на БПО может быть связан с избыточным накоплением RpoS в присутствии указанных полифенолов.

**Ключевые слова:** *Escherichia coli*, биоплёнки, полифенолы, RpoS

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-703-705

Биоплёнки, образуемые представителями нормальной микрофлоры на поверхности кишечного эпителия, играют важную роль в формировании устойчивости макроорганизма к инвазии патогенами и другим вредным воздействиям окружающей среды. Ввиду усиливающегося техногенного влияния актуальным становится поиск веществ, стимулирующих нормальную микрофлору кишечника. Одними из перспективных соединений являются полифенолы растительного происхождения. У многих полифенолов выявлено кардиопротекторное, иммуномодулирующее, противоопухолевое и антиоксидантное действие [Cordona et al., 2017]. Показано, что положительное влияние полифенолов на организм человека может быть опосредовано через модуляцию активности нормальной микрофлоры кишечника человека [Cueva et al., 2017]. Однако в целом, эта проблема остается малоизученной [Ozidal et al., 2016; Etxeberria et al., 2013].

Бактерии *Escherichia coli* являются представителями нормальной микрофлоры человека и животных и хорошо изучены в генетическом и физиолого-биохимическом отношении. Известно, что у этих бактерий одним из ключевых факторов биопленкообразования (БПО) является транскрипционный регулятор общего стрессового ответа RpoS [Povolotsky, Hengge, 2012]. В данной работе генно-инженерные штаммы *E. coli* были использованы как относительно простые и удобные тест-системы для изучения влияния RpoS на БПО в присутствии чистых полифенолов: кверцетина, рутина, гесперетина, катехина и танниновой кислоты.

Биопленки *E. coli* BW25113 выращивали на 96-луночных полистироловых планшетах при 37 °С на минимальной среде M9 (Miller, 1972) с добавлением 4 г/л глюкозы, 0,2% казаминовых кислот, тиамина (10 мкг/мл) и полифенолов в течение 22 ч. Зрелые биопленки дважды отмывали физиологическим раствором. Валовое и удельное БПО измеряли с помощью планшетного спектрофотометра xMark™ Bio-Rad, определяя интенсивность биопленкообразования модифицированным методом окрашивания биопленок генцианвиолетом [O'Toole, Kolter, 1998; Naves et al., 2008].

Данные, приведенные в таблице 1, указывают на способность катехина и танниновой кислоты в концентрации 100 мкМ оказывать статистически достоверный ингибирующий эффект на БПО.

Таблица 1.

## Влияние чистых полифенолов (100 мкМ) на биоплёнкообразование

Вещество	БПО
Контроль	0.324±0.01
Кверцетин	0.303±0.001
Танниновая кислота	0.235±0.001*
Катехин	0.270±0.008*
Рутин	0.305±0.013
Гесперетин	0.303±0.018

Чтобы изучить роль RpoS в модификации БПО полифенолами была измерена экспрессия гена *rpoS* в планктонных культурах и биоплёнках через 22 ч культивирования штамма *E. coli* NM3041, несущего слияние *rpoS::lacZ*. Установлено, что кверцетин и танниновая кислота подавляли экспрессию слияния 2.5 и 6.0 раз, соответственно.

Таблица 2.

Влияние чистых полифенолов (100 мкМ) на экспрессию слияния *rpoS::lacZ*

Вещество	<i>rpoS::lacZ</i> , %
Контроль (ДМСО)	100.0 ± 8.7
Кверцетин	40.6 ± 3.4*
Танниновая кислота	16.4 ± 1.6*
Катехин	82.9 ± 6.3
Рутин	90.3 ± 8.9
Гесперетин	91.6 ± 4.4

Среди изученных нами веществ особый интерес представляют кверцетин и танниновая кислота, как обладающие высокой биологической активностью. Поэтому в следующей серии опытов нами было изучено влияние разных концентраций кверцетина и танниновой кислоты на БПО. Выявлено, что оба вещества оказывали достоверный стимулирующий эффект на удельное БПО в диапазоне концентраций 1-50 мкМ (кверцетин) и 1-100 мкМ (танниновая кислота).

Чтобы определить роль регулятора RpoS в наблюдаемых эффектах, мы сравнили БПО в штаммах дикого типа и штаммах с различным уровнем регуляторного белка RpoS. Для этой цели были использованы штаммы JW5437 (*rpoS*), JW2755 (*relA*) и JW0427 (*clpP*). Ген *relA* кодирует синтетазу стрессового алармона ppGpp, который активирует транскрипцию гена *rpoS*. Ген *clpP* кодирует протеазу, ответственную за быструю деградацию регуляторного белка RpoS в растущих клетках [Hengge, 2009]. Выявлено, что БПО в штаммах, дефектных по генам *relA* или *rpoS*, не отличалось от значения. Был также выявлен стимулирующий эффект на БПО малых доз (5, 10 и 50 мкМ) кверцетина, и ингибирующее действие более высоких доз (200 мкМ). В не обработанных кверцетином клетках, дефектных по гену *clpP*, удельное БПО снижалось вдвое по сравнению с диким типом. Присутствие малых доз кверцетина (10 и 50 мкМ) стимулировало БПО. Однако показатель удельного БПО при действии этих доз был вдвое ниже по сравнению с диким типом. В совокупности, эти данные позволяют предположить, что в наших условиях отрицательное влияние на биоплёнкообразование мог оказывать избыток белка RpoS.

Работа выполнена в рамках государственного задания № госрегистрации темы 01201353249, а также при поддержке грантами Президента МК-3376.2018.4 и РФФИ №16-04-00762.

## Литература

Cardona F., Andrés-Lacueva C., Tulipani S., Tinahones F.J., Queipo-Ortuño M.I. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health // *J. Nutr. Biochem.* – 2013. – V. 24 (8). – P. 1415–1422.

Cueva C., Gil-Sánchez I., Ayuda-Durán B., González-Manzano S., González-Paramás A.M., Santos-Buelga C., Bartolomé B., Moreno-Arribas M.V. An integrated view of the effects of wine polyphenols and their relevant metabolites on gut and host health // *Molecules.* – 2017. – V. 22 (1). – P. E99.

Etxeberria U., Fernández-Quintela A., Milagro F.I., Aguirre L., Martínez J.A., Portillo M.P. Impact of polyphenols and polyphenol-rich dietary sources on gut microbiota composition // *Nutrients.* – 2016. – V. 8 (2). – P. 78.

Hengge R. Proteolysis of  $\sigma^S$  (RpoS) and the general stress response in *Escherichia coli* // *Res. Microbiol.* – 2009. – V. 160 – P. 667–676.

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. – V. 105 – P. 585–590.

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. – V. 28 – P. 449–461.

Ozidal T., Sela D.A., Xiao J., Boyacioglu D., Chen F., Capanoglu E. The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility // *J Agric Food Chem.* – 2013. – V. 61(40) – P. 9517–9533.

Povolotsky T.L., Hengge R. 'Life-style' control networks in *Escherichia coli*: Signalling by the second messenger c-di-GMP // *J. Bacteriol.* – 2012. – V. 160 – P. 10–16.

## THE ROLE OF GENERAL STRESS RESPONSE REGULATOR RpoS IN BIOFILM FORMATION BY *ESCHERICHIA COLI* IN THE PRESENCE OF PLANT POLYPHENOLS

Z.Y. Samoylova, G.V. Smirnova, O.N. Oktyabrsky

“Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms Ural Branch Russian Academy of Sciences”, Perm, Russia, [samzu@mail.ru](mailto:samzu@mail.ru)

**Abstract.** Results on investigation of different doses of plant polyphenols on biofilm formation in *Escherichia coli* are discussed. Inhibiting effects of 100  $\mu\text{M}$  quercetin and tannic acid on biofilm formation have been established. However, the specific biofilm formation was found to be stimulated by quercetin (1-50  $\mu\text{M}$ ) and tannic acid (1-100  $\mu\text{M}$ ). The connection between the observed effects and activity of the global stress response regulator has been shown. The inhibiting effects on biofilm formation were likely to be related to an excessive accumulation of RpoS in the presence of the certain polyphenols.

**Keywords:** *Escherichia coli*, biofilms, polyphenols, RpoS