

**ВЛИЯНИЕ ПОЛИМИКСИНА В НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ БАКТЕРИЕЙ
Methylophilus quaylei НА ПОЛИПРОПИЛЕНЕ И ТЕФЛОНЕ**

А.М.Х.А. Мохамед, Д.Н. Амзаева, А.Б. Пшеничникова[@], В.И. Швец

Московский технологический университет (Институт тонких химических технологий
им. М.В. Ломоносова), Москва 119571, Россия

[@]Автор для переписки, e-mail: a_pshenichnikova@mail.ru

Исследовано влияние липопептидного антибиотика полимиксина В на рост чувствительного и резистентного к стрептомицину изогенных штаммов метилотрофной бактерии *Methylophilus quaylei* в планктоне и биопленке на полипропилене и тефлоне. Интенсивность образования биопленок определяли по окрашиванию кристаллическим фиолетовым, колониеобразующей способности, а также методом световой микроскопии. Обнаружено влияние гидрофобности клеточной поверхности бактерий на способность образовывать биопленки. На пластинах из тефлона и полипропилена более интенсивную биопленку образует штамм *Methylophilus quaylei* МТ с гидрофобной поверхностью. Минимальная ингибирующая концентрация полимиксина В для изученных штаммов и в планктонной, и в биопленочной форме составила 1 мкг/мл. Полимиксин В в сублетальной концентрации 0.01 мкг/мл стимулирует образование биопленок, а в концентрации 0.10 мкг/мл проявляет антибиопленочные свойства. Обнаружено синергидное действие полимиксина В и стрептомицина на резистентный к стрептомицину штамм *M. quaylei* SM.

Ключевые слова: бактериальные биопленки, полимиксин, резистентность к антибиотикам, метилотрофные бактерии.

**INFLUENCE OF POLYMYXIN B ON THE FORMATION OF BIOFILMS
BY BACTERIUM *Methylophilus quaylei* ON POLYPROPYLENE AND TEFLON**

A.M.H.A. Mohamed, D.N. Amzaeva, A.B. Pshenichnikova[@], V.I. Shvets

Moscow Technological University (M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies),
Moscow 119571, Russia

[@]Corresponding author: a_pshenichnikova@mail.ru

Here we examined the influence of polymyxin B, a lipopeptide antibiotic, on planktonic growth and biofilm of streptomycin-sensitive and streptomycin-resistant isogenic strains of bacteria *Methylophilus quaylei* on polypropylene and Teflon. Biofilm formation was quantified using crystal violet staining, determined by colony-forming unit and examined by light microscopy. It was found that of bacterial surface hydrophobicity affects the biofilm formation: biofilm formation of *Methylophilus quaylei* MT strain was better on such hydrophobic materials as Teflon and polypropylene. The minimum inhibitory concentration of polymyxin B for the used strains in planktonic and biofilm form was 1 µg/ml. The sublethal Polymyxin B in the concentration of 0.01 µg/ml stimulates biofilm formation and exhibits antibiofilm properties at the concentration of 0.10 µg/ml. Synergistic effect of polymyxin B and streptomycin on streptomycin-resistant strain *M. quaylei* SM was found.

Keywords: bacterial biofilms, polymyxin, resistance to antibiotics, methylotrophic bacteria.

Основной природной формой существования бактериальных популяций являются биопленки – сообщества бактерий, расположенных на границе раздела фаз, чаще твердой и водной или твердой и воздушной [1, 2]. Бактериальные клетки в биопленке погружены в полимерный матрикс, связывающий их с поверхностью и обеспечивающий защиту популяции от неблагоприятных факторов среды [3–5]. Высокая выживаемость бактерий в биопленках создает многочисленные проблемы в сфере экологии, промышленности и, особенно, в медицине. Бактерии – возбудители хронических инфекций – обладают повышенной резистентностью к антибиотикам именно в биопленках, формирующихся в тканях организма человека и на имплантах, внутрисосудистых катетерах, сердечных клапанах и пр. [6, 7]. В последнее десятилетие достигнуты определенные успехи в исследовании бактериальных биопленок, предложены методы их ингибирования и эрадикации [8–10]. Монотерапия антибиотиками против биопленочного фенотипа возбудителей хронических инфекций является неэффективной [11, 12]. Более того, в сублетальных концентрациях антибиотики стимулируют образование биопленок, что увеличивает резистентность бактерий [13–15].

Повышению эффективности антибиотиков способствует их сочетание с антибиопленочными агентами, среди которых используются вещества растительного происхождения, хелатирующие агенты, пептидные антибиотики, жирные кислоты, например, цис-2-деценвая кислота, и др. [9, 10]. С этой точки зрения представляют интерес продуцируемые бактериями *Paenibacillus polymyxa* липопептидные антибиотики группы полимиксинов, в молекуле которых присутствует поликатионный (при pH 7.4) циклический гептапептид с трипептидной боковой цепью, ацилированной жирной кислотой по концевой аминогруппе [16, 17]. Полимиксины – полимиксин В и полимиксин Е (колистин) – достаточно эффективны против грамотрицательных бактерий, они дестабилизируют наружную мембрану за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий, что приводит к повышению ее проницаемости [18]. Первой молекулярной мишенью полимиксинов является липополисахарид – основной компонент наружной мембраны, поэтому они неэффективны против грамположительных бактерий. Полимиксины находят ограниченное применение в клинической практике из-за высокой нейро- и нефротоксичности. Вместе с этим, сегодня полимиксины относят к группе резервных антибиотиков, так называемым антибиотикам «последней надежды» (last resort), которые используют для лечения инфекций, вызванных бактериями, практически нечувствительными к большинству известных антибиотиков [19]. К ним относятся

штаммы грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и *Klebsiella pneumoniae* – возбудителей тяжелых хронических инфекций.

Возвращение полимиксинов в медицинскую практику в последние годы выявило множество резистентных к ним клинических изолятов грамотрицательных бактерий [19, 20], в борьбе с которыми перспективными направлениями является создание более эффективных полусинтетических и синтетических аналогов полимиксинов с пониженной токсичностью, а также комбинации полимиксинов с другими антибиотиками и фунгицидными препаратами [17, 22].

Исследования влияния полимиксинов на биопленочный и планктонный фенотипы грамотрицательных бактерий показали, что чувствительность в биопленках понижена по сравнению с планктонной культурой, что характерно для большинства антибиотиков [7, 23]. Однако следует отметить, что во всех этих немногочисленных работах воздействию полимиксина подвергаются предварительно сформированные биопленки. Влияние полимиксина на процесс формирования биопленок, включая адгезию, практически не изучено. Целью настоящей работы явилось изучение влияния полимиксина В на выживаемость чувствительного и резистентного к стрептомицину штаммов бактерии *Methylophilus quaylei* в составе планктона и формирующихся биопленок на тефлоне и полипропилене.

Экспериментальная часть

В работе использовали облигатные метилотрофные бактерии *Methylophilus quaylei*, штамм МТ (ВКМ В_2338^Т), и его изогенный стрептомицинрезистентный мутант – *Methylophilus quaylei* SM [24, 25]. Для культивирования использовали минеральную среду следующего состава [26]: NaNO_3 – 1 г/л, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2 г/л, CaCl_2 – 0.02 г/л, K_2HPO_4 – 1.5 г/л, KH_2PO_4 – 0.7 г/л, раствор микроэлементов – 2 мл/л, метанол – 1.0 об.%. Раствор микроэлементов содержит (в г/л): $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.05; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 0.015; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; $\text{CuCl}_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.05; $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.01; Na_2MoO_4 – 0.015; Трилон Б – 2.5. Среду стерилизовали при 132 °C 20 мин. Растворы фосфатов стерилизовали отдельно. Стрептомицин сульфат («AppliChem», Германия) добавляли в стерильную питательную среду в виде водных растворов асептически через фильтрующие насадки с размером пор 0.22 мкм Millex® GS, («Millipore», Ирландия). Полимиксин В («AppliChem», Германия) вносили в виде растворов в метаноле через фильтрующие насадки, также добавляли метанол. Для получения твердых питательных сред дополнительно добавляли 1.5% агара («Bactoagar», США) и стерилизовали при 120 °C в течение 20 мин.

Культивирование бактерий проводили в термостатируемом шейкере ES-20 (Biosan, Латвия) в колбах объемом 150 мл, содержащих 40 мл питательной среды, при 28 °C и частоте вращения 100 об./мин. Рост бактерий контролировали по изменению оптической плотности культуры от времени. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Shimadzu UV-1700 («PharmaSpec», Япония) при длине волны 600 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм (D_{600}). В качестве инокулята использовали 24-х-часовую культуру бактерий (D_{600} от 1.9 до 2.2 единиц оптической плотности) в количестве 1 мл (2.5 об.%). Время добавления инокулята принимали за ноль.

Пластинки из тефлона или полипропилена обрабатывали в ультразвуковой ванне SK3300HP (KUDOS, Китай) при частоте 53 кГц в течение 5 мин в водном растворе детергента Brij 35 (Serva) в концентрации 1×10^{-5} мг/мл, затем промывали дистиллированной водой 5 раз, обрабатывали ультразвуком, переносили в 70%-ный (об./об.) раствор этанола и обрабатывали ультразвуком. Далее пластинки промывали дистиллированной водой 5 раз и обрабатывали ультразвуком. На заключительном этапе пластинки стерилизовали в дистиллированной воде при 120 °C в течение 20 мин. Эффективность очистки пластинок оценивали по значениям краевого угла смачивания, полученным с использованием цифрового USB-микроскопа DigiMicroMini (Китай) с оптическим увеличением $65\times$ – для тефлона $103-104^\circ$, полипропилена – $97-98^\circ$.

Бактериальные биопленки формировали 24 ч на поверхности стерильных пластинок из тефлона или полипропилена размером $20 \times 20 \times 0.1$ мм, помещенных в колбы с питательной средой (5 мл), инокулятом и антибиотиками – полимиксином В (от 0.01 до 10 мкг/мл) и стрептомицином (в виде сульфата стрептомицина 1 мг/мл) в термостатируемом шейкере при 28 °C и частоте вращения 60 об./мин. Затем каждую пластинку помещали в 50 мл стерильной дистиллированной воды на 10 с, повторяли 3 раза. Пластинки с биопленками окрашивали 0.1%-ным водным раствором красителя кристаллического фиолетового 20 мин, промывали дистиллированной водой и высушивали. Краситель экстрагировали, помещая высушенные пластинки в 2 мл смеси растворителей этанол–ацетон–уксусная кислота в отношении 5:3:2 по объему и определяли оптическую плотность экстракта на длине волны 600 нм. Также окрашенные биопленки на полипропилене анализировали под микроскопом «Olympus CX-22» (Биомед, Россия) с использованием камеры TourCam UCMOS 10MP, изображение обрабатывалось с помощью программы TourView.

Содержание в биопленках жизнеспособных бактерий определяли по количеству колониеобра-

зующих единиц. Для этого промытые в дистиллированной воде пластинки помещали в стерильную питательную среду, не содержащую метанол, объемом 2 мл и интенсивно перемешивали 2 мин на Вортексе медицинском вибрационном V-3 (ELMI, Латвия) и высевали суспензии клеток после серии десятикратных разведений на чашки Петри с агаризованной средой. Затем чашки Петри инкубировали при 28 °C и подсчитывали количество колоний [27]. Выживаемость (V) бактерий в биопленках в присутствии полимиксина В рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{N_p}{N_c} \times 100\%$$

где N_p – численность популяции, полученной в присутствии полимиксина В, КОЕ/мл;

N_c – численность популяции, полученной без добавок (контроль), КОЕ/мл.

Выживаемость бактерий в присутствии полимиксина В в планктонной культуре определяли аналогично, высевая на агаризованную среду аликвоты культуральной жидкости после разведения.

Гидрофобность бактериальных клеток определяли по величине адгезии к *n*-гексадекану [28]. Бактериальные клетки выделяли из 5 мл культуральной жидкости центрифугированием (7000 об./мин, 15 мин), отмывали от компонентов питательной среды фосфатным буфером с pH 7.0, ресуспендировали. 2 мл полученной суспензии клеток и 0.5 мл *n*-гексадекана интенсивно перемешивали 2 мин на Вортексе и оставляли на 20 мин для расслаивания. Определяли оптическую плотность суспензии клеток при длине волны 600 нм до (D_0) и после (D) взаимодействия с *n*-гексадеканом. Величину гидрофобности рассчитывали как $(D_0 - D)/D_0$, %.

Все опыты проводили в 3-4 повторях. В работе представлены результаты типичных экспериментов. Цифровые данные анализировали с использованием приложения «Анализ данных» программы Excel. Стандартная ошибка величины оптической плотности культуральной жидкости не превышала значение 0.0545, оптической плотности экстракта красителя – 0.0610, значения КОЕ/мл – 0.1523.

Результаты и их обсуждение

В работе использовали чувствительный и резистентный к стрептомицину изогенные штаммы облигатной метилотрофной бактерии *Methylophilus quaylei* – *M. quaylei* MT и *M. quaylei* SM соответственно.

Грамотрицательные облигатные метилотрофные бактерии, в том числе рода *Methylophilus*, входят в состав биоценоза биопленок на абиотических и биотических поверхностях, главным образом, на поверхности листьев растений [29, 30]. Выбранные нами штаммы отличаются устойчивостью к стреп-

томицину, ростовыми характеристиками, ζ -потенциалом поверхности бактерий, размером клеточных агрегатов (табл. 1) [25]. На формирование биопленок, а конкретнее – на адгезию, первую стадию образования биопленок, имеет некоторое влияние гидрофобность поверхности клеток, хотя дальнейший рост биопленки не всегда коррелирует с первичной адгезией [31, 32]. Нами была определена гидрофобность клеточной поверхности используемых штаммов по средству к *n*-гексадекану.

дробность поверхности клеток, хотя дальнейший рост биопленки не всегда коррелирует с первичной адгезией [31, 32]. Нами была определена гидрофобность клеточной поверхности используемых штаммов по средству к *n*-гексадекану.

Таблица 1. Характеристика использованных в работе штаммов бактерии *M. quaylei*

Штамм	Свойства штамма				
	Полулетальная концентрация стрептомицина, мг/мл*	ζ -Потенциал поверхности бактерий при pH 7, мВ*	Размер клеточных агрегатов при pH 7, мкм*	Удельная скорость роста, ч ⁻¹ *	Гидрофобность поверхности бактерий, %**
<i>M. quaylei</i> MT	5×10^{-3}	-40.97	7.32	0.21	30.81
<i>M. quaylei</i> SM	4.40	-39.03	1.19	0.28	5.42

* – по данным [25]; ** – получено в настоящей работе.

Как следует из табл. 1, чувствительный к стрептомицину штамм *M. quaylei* MT имеет более гидрофобную клеточную поверхность, чем резистентный к стрептомицину штамм *M. quaylei* SM. Различия в гидрофобности и заряде поверхности клеток штаммов бактерии *M. quaylei* позволяют сделать предположение о формировании ими биопленок на гидрофобных и гидрофильных поверхностях с различной интенсивностью и свойствами. В качестве твердых субстратов для получения биопленок были выбраны гидрофобные материалы – тефлон и полипропилен, широко применяющиеся в медицине для изготов-

ления имплантов, катетеров и других медицинских устройств. Полипропилен, краевой угол смачивания которого 97-98° лишь несколько ниже, чем у тефлона (103-104°), был выбран благодаря его прозрачности и возможности использовать световой микроскоп для визуализации биопленок.

На первом этапе исследовали влияние полимиксина В на планктонный рост *M. quaylei*, причем для штамма *M. quaylei* SM кинетические кривые получали в присутствии стрептомицина и без него (рис. 1). Концентрацию полимиксина В варьировали в диапазоне от 0.01 до 10 мкг/мл.

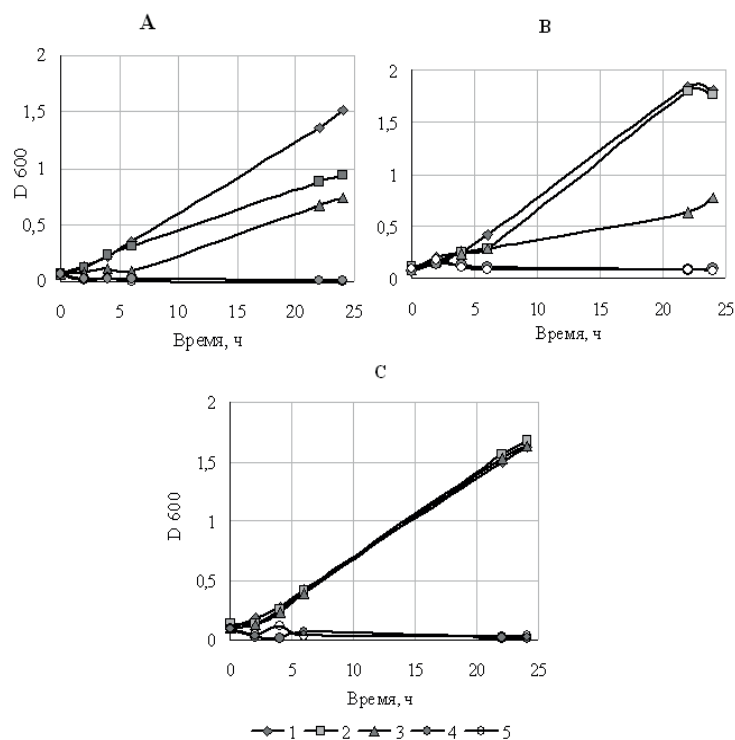


Рис. 1. Кинетика роста *M. quaylei* MT (А), *M. quaylei* SM со стрептомицином 1 мг/мл (В), *M. quaylei* SM (С) в присутствии полимиксина В (мкг/мл): 1 – 0 (контроль); 2 – 0.01; 3 – 0.1; 4 – 1.0; 5 – 10.0.

Минимальная ингибирующая концентрация полимиксина В, при которой не наблюдался рост бактерий, для использованных штаммов в планктонной форме составила 1 мкг/мл (рис. 1). Штамм *M. quaylei* MT оказался более чувствительным – уже при добавлении полимиксина В в концентрации 0.01 мкг/мл наблюдалось ингибирование роста. Штамм *M. quaylei* SM без стрептомицина был наиболее резистентным к полимиксину В – ингибирование наблюдалось, начиная с концентрации 1 мкг/мл. Интересно, что при совместном добавлении в среду культивирования полимиксина В и стрептомицина чувствительность к антибиотикам увеличилась, то есть наблюдался синергидный эффект (рис. 1В, кривая 3). По отдельности эти антибиотики не ингибировали рост штамма *M. quaylei* SM – полимиксин В в концентрации 0.1

мкг/мл (рис. 1С, кривая 3) и стрептомицин в концентрации 1 мг/мл (рис. 1В, кривая 1).

Биопленки формировали в течение 24 ч на поверхности тефлоновых и полипропиленовых пластинок, помещенных в культуральную жидкость бактерий *M. quaylei*, в присутствии полимиксина В в концентрации 0.01–10 мкг/мл. Биопленки окрашивали 0.1%-ным водным раствором кристаллического фиолетового. Интенсивность биоопленкообразования оценивали по величине оптической плотности экстракта красителя смесью органических растворителей, а также методом оптической микроскопии. На рис. 2 представлены результаты, полученные путем окрашивания биопленок красителем кристаллическим фиолетовым, для двух концентраций полимиксина В – 0.01 и 0.1 мкг/мл.

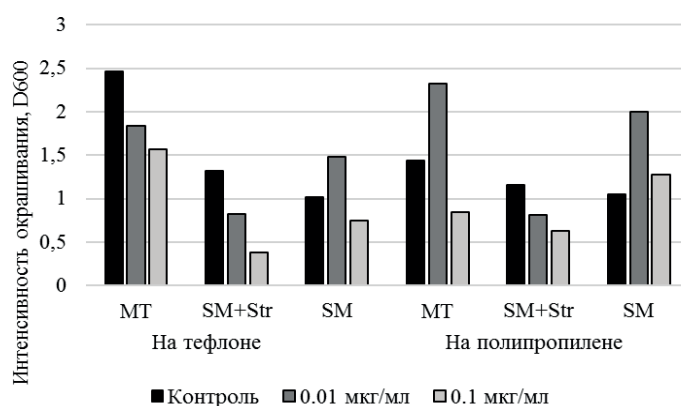


Рис. 2. Влияние полимиксина В на интенсивность образования биопленки штаммами *M. quaylei* MT и *M. quaylei* SM (в присутствии 1 мг/мл стрептомицина и без него) на тефлоне и полипропилене. Биопленки характеризовали количеством сорбированного кристаллического фиолетового.

Для более высоких концентраций интенсивность окрашивания не превышает 0.1–0.2 единицы оптической плотности (данные не представлены), т.е. минимальная ингибирующая концентрация полимиксина В для биоопленочного фенотипа, как и для планктонного, составляет 1 мкг/мл. В контроле (в отсутствие полимиксина В) интенсивность образования биопленки и на тефлоне, и на полипропилене для штамма *M. quaylei* MT значительно выше, чем для штамма *M. quaylei* SM (рис. 2). Это хорошо коррелирует с гидрофобностью этих штаммов (см. табл. 1) – более гидрофобный штамм *M. quaylei* MT на гидрофобных субстратах формирует биопленку большего размера. Также окрашивание обнаружило увеличение образования биопленки (по сравнению с контролем) при добавлении полимиксина В в субингибиторной для планктонного фенотипа концентрации 0.01 мкг/мл, что хорошо согласуется с известным эффектом стимулирующего действия низких концентраций антибиотиков на рост биопленок [13–15]. Увеличение концентрации полимиксина В до 0.1 мкг/мл приводит к существенному ингиби-

рованию биоопленочного роста, причем также, как и для планктона, наблюдается синергидное действие полимиксина В и стрептомицина.

Визуализация биопленок на полипропилене подтвердила результаты, полученные с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым. На рис. 3 представлены микрофотографии биопленок *M. quaylei* MT, выращенных на полипропилене в присутствии полимиксина В.

Для штамма *M. quaylei* SM микрофотографии также отражают закономерности, полученные окрашиванием – в контроле биопленка не представляет монослой клеток, как для *M. quaylei* MT, в ней наблюдаются свободные от клеток участки. Также в присутствии полимиксина В в субингибиторной концентрации биопленка более плотная, а полимиксин В и стрептомицин проявляют синергидный антибиоопленочный эффект (данные микроскопии для штамма *M. quaylei* SM не представлены). Количественная оценка образования биопленок методом окрашивания не позволяет определить истинную эффективность антибиотика – в медицинской практике важно

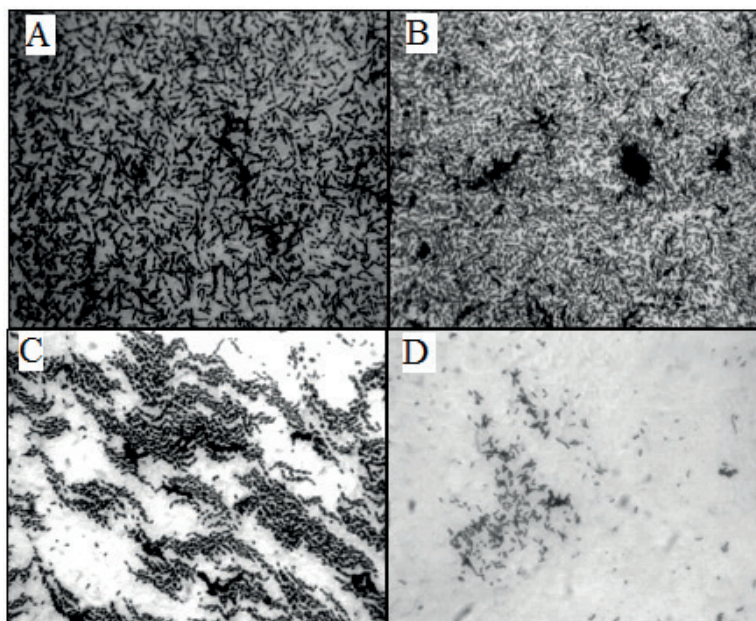


Рис. 3. Микрофотографии биопленок бактерии *M. quaylei* МТ на полипропилене в присутствии полимиксина В в концентрации, мкг/мл: 0 (А), 0.01 (В), 0.1 (С), 1.0 (D). Увеличение 1000× (объектив 100×, адаптер 0,5×, монитор 17" 1280×1024).

определить остаточное количество живых бактерий. Краситель может связываться не только с живыми клетками, но и с компонентами лизированных клеток, а также с внеклеточным матриксом. Выживаемость бактериальных клеток в биопленке и планктоне определяли по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ) в суспензии механически десорбированных из биопленки клеток и в планктонной культуре (без помещенных в нее тефлоновых или поли-

пропиленовых пластин). В планктоне и суспензиях биопленочных клеток в присутствии полимиксина В в концентрации, равной и выше 1 мкг/мл, значения КОЕ/мл не превышают 10^2 кл./мл, т.е. пренебрежимо малы. Численность популяции биопленочной и планктонной культуры в присутствии полимиксина В в концентрации 0.01 и 0.1 мкг/мл, а также выживаемость бактерий по отношению к контролю представлены в табл. 2 и 3.

Таблица 2. Влияние полимиксина В на численность популяции бактерии *M. quaylei* в биопленке и планктоне

Концентрация полимиксина, мкг/мл	Штамм <i>M. quaylei</i>								
	КОЕ×10 ⁷ , кл.*								
	в биопленках на тефлоне			в биопленках на полипропилене			в планктоне		
	MT	SM + Str	SM	MT	SM + Str	SM	MT	SM + Str	SM
Контроль (без полимиксина)	10.72	5.64	6.72	5.46	8.00	3.80	70.5	194.5	102.0
0.01	16.18	0.02	11.58	6.36	0.29	5.00	15.10	169.5	120.0
0.10	0.12	0.002	0.002	0.21	0.08	0.002	4.05	4.45	104.5

* Полученные в соответствии с [27] значения КОЕ/мл умножали на объем клеточных суспензий.

Таблица 3. Влияние полимиксина В на выживаемость бактерии *M. quaylei* в биопленке и планктоне

Концентрация полимиксина, мкг/мл	Штамм <i>M. quaylei</i>								
	Выживаемость, % от контроля								
	в биопленках на тефлоне			в биопленках на полипропилене			в планктоне		
	MT	SM + Str	SM	MT	SM + Str	SM	MT	SM + Str	SM
0.01	150.93	0.35	172.32	116.48	3.62	131.58	21.42	87.15	117.65
0.10	1.12	0.04	0.03	3.85	1.00	0.05	5.74	2.29	102.45

Численность бактериальных популяций в биопленках хорошо согласуется с данными, полученными методом окрашивания биопленок в аналогичных условиях, а также методом микроскопирования. Кроме этого, с помощью определения выживаемости можно сравнить эффект полимиксина В на биопленочный и планктонный фенотипы бактерии *M. quaylei*. На рис. 4 представлена относительная выживаемость бактерий в биопленке (БП) по отношению к планктону (ПЛ) по данным табл. 3.

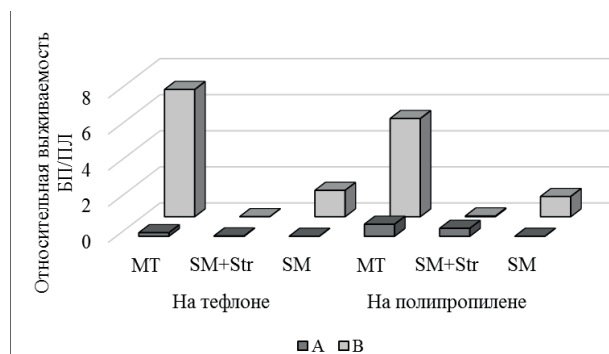


Рис. 4. Отношение выживаемости бактерий *M. quaylei* в биопленке по отношению к планктонному росту в присутствии полимиксина В в концентрации 0.01 (В) и 0.1 (А) мкг/мл.

Наиболее резистентную к действию полимиксина В биопленку образует гидрофобный штамм *M. quaylei* MT – при концентрации полимиксина В 0.01 мкг/мл отношение БП/ПЛ составляет 7.05 и 5.44 на тефлоне и полипропилене соответственно, тогда как для штамма *M. quaylei* SM БП/ПЛ почти в 5 раз ниже. При концентрации полимиксина 0.1 мкг/мл выживаемость бактерий в биопленке ниже выживаемости в планктоне.

мости в планктоне, т.е. наблюдается явный антибиопленочный эффект полимиксина В (рис. 4). Также наблюдается синергидное действие стрептомицина и полимиксина В на выживаемость *M. quaylei* SM, обнаруженное также методом окрашивания биопленок. Очевидно, полимиксин В, увеличивая проницаемость наружной мембраны бактерий, способствует поступлению стрептомицина в клетки и снижает резистентность к нему. Синергизм антибиотиков группы полимиксинов с аминогликозидными антибиотиками наблюдали для ряда грамотрицательных патогенных бактерий [34], но результаты были получены для планктонных фенотипов. Особенно интересным представляется обнаруженное в настоящей работе направленное действие полимиксина В на бактериальные биопленки, а также синергидное антибиопленочное действие стрептомицина и полимиксина В в сублетальной концентрации на резистентный к стрептомицину штамм *M. quaylei* SM.

Заключение

Липопептидный антибиотик полимиксин В ингибирует рост бактерии *M. quaylei* в планктонной и биопленочной форме, причем с увеличением концентрации антибиотика усиливается его антибиопленочный эффект. Совместное использование полимиксина В и стрептомицина против биопленочного и планктонного фенотипов штамма *M. quaylei* SM, резистентного к стрептомицину, привело к синергидному бактерицидному эффекту. Обнаружено влияние гидрофобности клеточной поверхности бактерий на интенсивность образования биопленки и резистентность последней к полимиксину В.

Список литературы / References:

1. Costerton J.W. Overview of microbial biofilms // J. Ind. Microbiol. 1995. V. 15. P. 137–140.
2. Flemming H.C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S.A., Kjelleberg S. Biofilms: An emergent form of bacterial life // Nat. Rev. Microbiol. 2016. V. 14. № 9. P. 563–575.
3. Flemming H.C., Wingender J. The biofilm matrix // Nat. Rev. Microbiol. 2010. V. 8. P. 623–633.
4. Zhurina M.V., Gannesen A.V., Zdrovenko E.L., Plakunov V.K. Composition and functions of the extracellular polymer matrix of bacterial biofilms // Microbiology. 2014. V. 83. № 6. P. 713–722.
5. Jiao Y., Cody G.D., Harding A.K., Wilmes P., Schrenk M., Wheeler K.E., Banfield J.F., Thelen M.P. Characterization of extracellular polymeric substances from acidophilic microbial biofilms // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. № 9. P. 2916–2922.
6. Stewart P.S., Costerton J.W. Antibiotic resistance

of bacteria in biofilms // Lancet. 2001. V. 358. P. 135–138.

7. Плакунов В.К., Мартыанов С.В., Тетенева Н.А., Журина М.В. Управление формированием микробных биопленок: анти- и пробиопленочные агенты // Микробиология. 2017. Т. 86. № 4. С. 402–420.

Plakunov V.K., Martyanov S.V., Teteneva N.A., Zhurina M.V. Management of the formation of microbial biofilms: Anti- and probiofilm agents // Mikrobiologiya (Microbiology). 2017. V. 86. № 4. P. 402–420. (in Russ.).

8. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections // Science. 1999. V. 284. Issue 5418. P. 1318–1322.

Rabin N., Zheng Y., Opoku-Temeng C., Du Y., Bonsu E., Sintim H.O. Agents that inhibit bacterial biofilm formation // Future Med. Chem. 2015. V. 7. № 5. P. 647–671.

10. Petrova O.E., Sauer K. Escaping the biofilm in more than one way: Desorption, detachment or dispersion // Curr. Opin. Microbiol. 2016. V. 30. P. 67–78.

11. Estrela A.B., Abraham W.R. Combining biofilm-compounds and controlling antibiotics as a promising new way to control biofilm infections // *Pharmaceuticals*. 2010. V. 3. P. 1374–1393.
12. Koo H., Allan R.N., Howlin R.P., Stoodley P., Stoodley L.H. Targeting microbial biofilms: Current and prospective therapeutic strategies // *Nature Rev. Microbiol.* 2017. V. 15. № 12. P. 740–755.
13. Стрелкова Е.А., Журина М.В., Плакунов В.К., Беляев С.С. Стимуляция антибиотиками процесса формирования бактериальных биопленок // *Микробиология*. 2012. Т. 81. № 2. С. 282–285.
- Strelkova E.A., Zhurina M.V., Plakunov V.K., Belyaev S.S. Stimulation of bacterial biofilms formation with antibiotics // *Mikrobiologiya (Microbiology)*. 2012. V. 81. № 2. P. 282–285. (in Russ.).
14. Wu S., Li X., Gunawardana M., Maguire K., Guerrero-Given D., Schaudinn C., Wang C., Baum M.M., Webster P. Beta-lactam antibiotics stimulate biofilm formation in non-typeable haemophilus influenzae by up-regulating carbohydrate metabolism // *PLoS ONE*. 2014. V. 9. Iss. 7. e99204.
15. Kaplan J.B. Antibiotic-induced biofilm formation // *Int. J. Artif. Organs*. 2011. V. 34. № 9. P. 737–751.
16. Velkov T., Thompson P. E., Nation R. L., Li J. Structure-activity relationships of polymyxin antibiotics // *J. Med. Chem.* 2010. V. 53. № 5. P. 1898–1916.
17. Rabanal F., Cajal Y. Recent advances and perspectives in the design and development of polymyxins // *Nat. Prod. Rep.* 2017. V. 6. № 7. P. 886–908.
18. Velkov T., Roberts K.D., Nation R.L., Thompson P.E., Li J. Pharmacology of polymyxins: New insights into an 'old' class of antibiotics // *Future Microbiol.* 2013. V. 8. № 6. P. 711–724.
19. Kaye K.S., Pogue J.M., Tran T.B., Nation R.L., Li J. Agents of last resort: Polymyxin resistance // *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 2016. V. 30. № 2. P. 391–414.
20. Srinivas P., Rivard K. Polymyxin resistance in Gram-negative pathogens // *Curr. Infect. Dis. Rep.* 2017. V. 19. № 11. P. 38.
21. Jeannot K., Bolard A., Plésiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms // *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2017. V. 49. № 5. P. 526–535.
22. Brown P., Dawson M.J. Development of new polymyxin derivatives for multi-drug resistant Gram-negative infections // *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2017. V. 70. № 4. P. 386–394.
23. Pye C.C., Yu A.A., Weese J.S. Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* from canine ears and the impact of on antimicrobial susceptibility *in vitro* // *Vet. Dermatol.* 2013. V. 24. № 4. P. 446–449. e98-9.
24. Doronina N., Ivanova E., Trotsenko Y., Pshenichnikova A., Kalinina E., Shvets V. *Methylophilus quaylei* sp. nov., a new aerobic obligately methylotrophic bacterium // *System. Appl. Microbiol.* 2005. V. 28. P. 303–309.
25. Пшеничникова А.Б., Гаврилова Е.С., Швец В.И. Влияние физико-химических свойств клеточной поверхности грамотрицательных бактерий на резистентность к стрептомицину // *Вестник МИТХТ*. 2011. Т. 6. № 2. С. 43–50.
- Pshenichnikova A.B., Gavrilova E.S., Shvets V.I. Influence of physico-chemical properties of the gram-negative bacteria cell surface on the resistance to streptomycin // *Vestnik MITHT (Fine Chemical Technologies)*. 2011. V. 6. № 2. P. 43–50. (in Russ.).
26. Отман С.А.М., Пшеничникова А.Б., Швец В.И. Влияние экзогенных жирных кислот на рост и продукцию экзополисахарида облигатной метилотрофной бактерии *Methylophilus quaylei* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2012. Т. 48. № 2. С. 226–231.
- Otman S.A.M., Pshenichnikova A.B., Shvets V.I. Influence of exogenous fatty acids on the growth and production of the exopolysaccharide of the obligate methylotrophic bacterium *Methylophilus quaylei* // *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya (Russian Journal of Applied Biochemistry and Microbiology)*. 2012. V. 48. № 2. P. 226–231. (in Russ.).
27. ОФС.1.7.2.0008.15. Определение концентрации микробных клеток. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Т. II. Москва, 2015.
- OFS.1.7.2.0008.15. Determination of the concentration of microbial cells. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII edition. V. II. Moscow, 2015.
28. Rosenberg M., Gutnick D., Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell surface hydrophobicity // *FEMS Microbiol. Lett.* 1980. V. 9. P. 29–33.
29. Anesti V., McDonald I.R., Ramaswamy M., Wade W.G., Kelly D.P., Wood A.P. Isolation and molecular detection of methylotrophic bacteria occurring in the human mouth // *Environmen. Microbiol.* 2005. V. 7. № 8. P. 1227–1238.
30. Gogleva A.A., Kaparullina E.N., Doronina N.V., Trotsenko Y.A. *Methylophilus flavus* sp. nov., and *Methylophilus luteus* sp. nov., aerobic, methylotrophic bacteria associated with plants // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010. V. 60. P. 2623–2628.
31. Cerca N., Pier G. B., Vilanova M., Oliveira R., Azeredo J. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* // *Res. Microbiology*. 2005. V. 156. № 4. P. 506–514.
32. Oliveira R., Azeredo J., Fonseca A.P. The role of hydrophobicity in bacterial adhesion // *Hydrophobicity and Adhesion*. 2001. P. 11–22.

33. Maitz M.F. Applications of synthetic polymers in clinical medicine // Biosurface and Biotribology. 2015. V. 1. P. 161–176.

34. Lenhard J.R., Nation R.L., Tsuji B.T. Synergistic combinations of polymyxins // Int. J. Antimicrob. Agents. 2016. V. 48. № 6. P. 607–613.

Об авторах:

Мохамед Абир Мохамед Хелми Абделзахер (Египет), аспирантка кафедры биотехнологии и промышленной фармации Института тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (119571, Россия, Москва, проспект Вернадского, д. 86).

Амзаева Дарико Николаевна, студентка кафедры биотехнологии и промышленной фармации Института тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (119571, Россия, Москва, проспект Вернадского, д. 86).

Пшеничникова Анна Борисовна, доцент, кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии и промышленной фармации Института тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (119571, Россия, Москва, проспект Вернадского, д. 86).

Швец Виталий Иванович, академик РАН, профессор, доктор химических наук, профессор кафедры биотехнологии и промышленной фармации Института тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (119571, Россия, Москва, проспект Вернадского, д. 86).

About the authors:

Abir M. H. A. Mohamed (Egypt), Postgraduate Student of the Chair of Biotechnology and Industrial Pharmacy, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, Moscow Technological University (86, Vernadskogo Pr., Moscow, 119571, Russia).

Dariko N. Amzaeva, Student of the Chair of Biotechnology and Industrial Pharmacy, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, Moscow Technological University (86, Vernadskogo Pr., Moscow, 119571, Russia).

Anna B. Pshenichnikova, Docent, Ph.D. (Chemistry), Associate Professor of the Chair of Biotechnology and Industrial Pharmacy, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, Moscow Technological University (86, Vernadskogo Pr., Moscow, 119571, Russia).

Vitaly I. Shvets, Academician of the Russian Academy of Sciences, D.Sc. (Chemistry), Professor of the Chair of Biotechnology and Industrial Pharmacy, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, Moscow Technological University (86, Vernadskogo Pr., Moscow, 119571, Russia).