

УДК 579.61

**ВЛИЯНИЕ ИНОКУЛЯТА НА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ СМЕШАННЫХ БИОПЛЕНОК
МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ К ПОЛИМИКСИНУ В****Е.Р. Митина, А.А. Бершадская, А.Б. Пшеничникова***ФГБОУ ВПО «МИРЭА – Российский технологический университет», Москва, Россия*

Резистентность бактерий к антибиотикам является глобальной проблемой медицины. Традиционно для лечения инфекционных заболеваний назначают эффективные дозы антибиотиков, к которым возбудитель имеет высокую чувствительность. Чувствительность возбудителя оценивают по величине минимальной ингибирующей (подавляющей) концентрации (МИК). Для назначения индивидуальной антимикробной терапии определение МИК проводится в соответствии с российскими и международными стандартами, предусматривающими использование двух методов определения чувствительности возбудителей к антибиотикам – последовательных разведений и диско-диффузионного. Оба метода разработаны для тестирования моновидовых культур возбудителей в жидкой или агаризованной питательной среде. Однако в организме человека патогенные микроорганизмы обнаруживаются также в смешанных культурах и биоплёночной форме, что существенно повышает резистентность к антибиотикам. Хорошо известно влияние размера популяции тестируемого штамма на резистентность к антибиотикам – увеличение посевной дозы повышает резистентность (эффект инокулята). В природных биопленках, представляющих консорциум микроорганизмов, корректное определение МИК требует понимания механизмов взаимодействий компонентов консорциума между собой в присутствии антибиотика.

Цель работы – изучение эффекта инокулята в модельной системе «смешанные биоплёнки метилотрофных бактерий – антибиотик полимиксин В». Нами был выбран консорциум, состоящий из двух метилотрофных бактерий – факультативной *Methylobacterium extorquens* (ВКПМ В-13995) и облигатной *Methylophilus quaylei* (ВКМ В-2338). Эти бактерии растут в минеральной синтетической среде с 0,5 об.% метанола и различаются ростовыми характеристиками и резистентностью к антибиотикам – удельная скорость роста *Methylophilus quaylei* в 1,5 раз выше, а чувствительность к полимиксину В ниже, чем у *Methylobacterium extorquens* (МИК в жидкой среде в 10^2 раз ниже).

Биопленки формировали на полипропиленовых купонах размером $10 \times 10 \times 0,1$ мм, помещенных в жидкую питательную среду объемом 5 мл, в течение 24 часов в режиме 60 об/мин при 28°C . Варьировали объем инокулята моновидовых или смешанной культуры от 1 до 5 об.%. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в биопленке определяли, десорбируя клетки в смесителе Vortex и высевая полученную суспензию на агаризованную среду после серии десятикратных разведений. Смешанные культуры *Methylobacterium extorquens* и *Methylophilus quaylei* с соотношением компонентов, равных 0,5, получали с использованием экспериментально полученных для каждого штамма уравнений «оптическая плотность – количество колониеобразующих единиц (КОЕ/мл)».

Было обнаружено, что в отсутствии антибиотика при плотности посева 5 об.% размер биопленки (КОЕ/купон) как в моновидовых, так и в смешанной культуре выше в 1,5–2,4 раза. В присутствии полимиксина В в концентрациях 1×10^{-4} и 5×10^{-4} мг/мл дозозависимо наблюдается эффект инокулята – при повышении плотности посева уменьшается чувствительность обоих штаммов к полимиксину В в моновидовых биопленках (увеличивается КОЕ/мл).

В смешанных биопленках при увеличении концентрации полимиксина В эффект инокулята значительно повышается по сравнению с моновидовой биопленкой для более чувствительной бактерии *Methylophilus quaylei*, тогда как для более резистентной *Methylobacterium extorquens* – уменьшается. При концентрации полимиксина В 5×10^{-4} мг/мл, близкой к МИК для *Methylophilus quaylei*, в смешанной биопленке, полученной с низкой плотностью посева, его содержание составило 3 %, а с более высокой – 27 %, а размер суммарной биопленки увеличивался в 2,4 раза.

Таким образом, с увеличением плотности посева в смешанной биопленке наблюдается снижение эффективности антибиотика полимиксина В даже для чувствительного к нему штамма. Также важным выводом является обнаруженное влияние штаммов друг на друга при совместном культивировании в биопленке, которое трудно прогнозировать при использовании стандартной методики определения МИК.