

АГРЕГАЦИЯ БАКТЕРИЙ *KLEBSIELLA OXYTOSA* И *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ПОД ВЛИЯНИЕМ ХИМИЧЕСКОГО ФАКТОРА

Г.Р. Садртдинова

Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А. Столыпина, Ульяновская область, Россия

Резюме. В статье подтверждается факт образования бактериальных биопленок у штаммов бактерий вида *Klebsiella oxytoca* и *Klebsiella pneumoniae* при росте в жидких средах под действием негативного фактора (химического) — дезинфицирующего кислородосодержащего средства. Биопленки, как сообщества микроорганизмов, вызывают многие хронические инфекции (менингит, воспалительные заболевания полости рта, урогенитальные инфекции) и создают проблемы в промышленности (обрастания различного технологического оборудования, корпусов судов, нефтяных платформ, биокоррозия металлических изделий). Обычные дезинфицирующие средства, такие как хлор и хлорит натрия, не могут удалить биопленку, поэтому поиск эффективного средства борьбы с ними является достаточно актуальным направлением. Различные бактерицидные средства малоэффективны в борьбе с биопленками, так как бактерии вырабатывают большое количество полисахаридов — веществ, помогающих колонии не распасться. Слой полисахаридов служит барьером для веществ, находящихся в воде, в том числе и для биоцидов. Это и является основной причиной выживания микроорганизмов даже в условиях сильного хлорирования воды. При проведении исследований учитывались последние данные по проблеме, а именно работы о негативном воздействии кислорода на рост бактериальных клеток и его направляющем действии в качестве фактора образования биопленок. Влияющим фактором выступил дезинфектант последнего поколения. Рабочие концентрации были представлены в трех вариантах. Число изучаемых штаммов — 6 (по 3 штамма каждого вида). Все штаммы получены из музея кафедры МВЭиВСЭ Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина. В процессе исследования нами был подтвержден феномен образования биопленочного сообщества, отмечены различия образования биопленки в зависимости от интенсивности (в данном случае концентрации) провоцирующего фактора и вида бактерии. В естественных условиях биопленка легко разрушалась механическим воздействием (встряхивание пробирки со средой). Восстановления биопленки после данной манипуляции не наблюдалось. Результаты дальнейшего исследования на плотной среде (мясо-пептонном агаре) и последующая окраска мазков простым красителем (по Граму) факта гибели бактериальных клеток не подтвердили. Во всех случаях наблюдался бактериальный рост, характерный для данных видов бактерий. Исследования проводились в 2015 г. на базе Научно-исследовательского инновационного центра по микробиологии и биотехнологии (г. Ульяновск) и при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере.

Ключевые слова: бактерия, сообщества, агрегация, химический фактор, дезинфектант, биопленка.

Адрес для переписки:

Садртдинова Гузелия Рафиковна
433430, Россия, Ульяновская область, Чердаклинский район,
пос. Октябрьский, ул. Студенческая, 8, Ульяновская ГСХА
им. П.А. Столыпина.
Тел.: 8 (953) 981-47-99.
E-mail: sadrtdinova-guzlik@yandex.ru

Contacts:

Guzeliia R. Sadrtdinova
433430, Russian Federation, Ulyanovsk region, Cherdaklinskii
district, Oktjabrski village, Studencheskaia str., 8, Ulyanovsk State
Agricultural Academy named after P.A. Stolypin.
Phone: +7 (953) 981-47-99.
E-mail: sadrtdinova-guzlik@yandex.ru

Библиографическое описание:

Садртдинова Г.Р. Агрегация бактерий *Klebsiella oxytoca* и *Klebsiella pneumoniae* под влиянием химического фактора // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 4. С. 377–381. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-377-381

Citation:

Sadrtdinova G.R. The aggregation of bacteria *Klebsiella oxytoca* and *Klebsiella pneumoniae* under the influence of chemical factors // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 4, pp. 377–381. doi: 10.15789/2220-7619-2015-4-377-381

THE AGGREGATION OF BACTERIA *KLEBSIELLA OXYTOCA* AND *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* UNDER THE INFLUENCE OF CHEMICAL FACTOR

Sadrtdinova G.R.

Ulyanovsk State Agricultural Academy named after P.A. Stolypin, Ulyanovsk, Russian Federation

Abstract. The article acknowledges the formation of bacterial biofilms in strains of bacteria species *Klebsiella oxytoca* and *Klebsiella pneumoniae* when grown in liquid media under the influence of negative factors (chemical factor) — containing agents. Biofilms, as a community of microorganisms cause many chronic infections (meningitis, inflammatory diseases of the oral cavity, urogenital infections) and create problems in the industry (fouling of processing equipment, ship hulls, oil platforms, biocorrosion metal products). Ordinary disinfectants, such as chlorine and sodium chlorite, can not remove the biofilm, so finding an effective means of dealing with them is enough actual problem. Various antibacterial agents are ineffective in combating biofilms, since bacteria produce large amounts of polysaccharides — substances that help the colony stay without disintegration. Polysaccharide serves as a barrier layer for substances in water, including for biocides. This is the main reason for the survival of microorganisms even in the heavily chlorinated water. In the study the latest data took into account on the subject, especially concerning adverse effects of oxygen on the growth of bacterial cells and directs action as a factor in the formation of biofilms. In our study we analyzed the latest generation disinfectant as an influencing factor. Working concentrations were shown in three embodiments. The number of strains studied was 6 (3 strains of each species). All strains were obtained from the Department of Museum MVE and VSE Ulyanovsk State Agricultural Academy n.a. P.A. Stolypin. In our research the biofilm community formation phenomenon has been confirmed, marked differences in biofilm formation, depending on the intensity (in this case, concentration) of the promoter and bacteria species. In vivo biofilm is easily destroyed by mechanical action (shaking test tubes with the medium). Biofilm recovery after this manipulation was not observed. The results of further studies on solid medium (meat-peptone agar) and the color smear simple dye (Gram) into the death of the bacterial cells have not been confirmed. In all cases, bacterial growth was observed, characteristic of these types of bacteria. The studies were conducted in 2015 on the basis of the Research Innovation Center of Microbiology and Biotechnology (Ulyanovsk) and with the financial support of the Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises in the scientific and technical sphere.

Key words: *bacterium, community, aggregation, chemical agent, disinfectant, biofilm.*

Введение

Биопленки — пространственно и метаболически структурированные сообщества микроорганизмов, заключенные во внеклеточный полимерный матрикс и расположенные на границе раздела фаз [2]. В природе около 99% микроорганизмов живут в составе биопленок. С практической точки зрения, наибольшую опасность представляют биопленки, вызывающие хронические инфекции и биокооррозию металлических изделий. По данным центра контроля заболеваний США, 65% всех инфекций обусловлены формированием в организме биопленок [6]. Они могут образовываться на всех внедряемых в организм человека медицинских устройствах (катетерах, ортопедических имплантатах). Наибольший интерес для исследователей представляют: *Staphylococcus aureus* и другие виды стафилококков, вызывающие широкий спектр заболеваний; *Klebsiella pneumoniae* и *Klebsiella oxytoca*; *Escherichia coli*.

Биопленки могут образовываться на границах «жидкость (водная фаза)—воздух», «твердое тело—жидкость», «твердое тело—воздух»

и «жидкость—жидкость (две несмешивающиеся жидкости)». Многими авторами высказывается предположение, что рост бактерий в форме биопленок является формой ответа на разнообразные стрессы. Сейчас существует гипотеза, что бактерии в биопленках не только лучше переносят неблагоприятные воздействия внешней среды, но — более того — стрессовые условия стимулируют образование биопленок. Так, на *P. putida* и некоторых других видах грамотрицательных бактерий было показано, что такие неблагоприятные факторы как повышенная осмолярность, высокая температура и другие, стимулируют образование во внешней мембране мелких везикул [4]. Эти везикулы обогащены насыщенными жирными кислотами (особенно стеаратом); их образование делает поверхность клетки более гидрофобной, и, как следствие, повышается способность к адгезии клеток на твердые поверхности. Таким образом, появляется все больше доказательств большой способности бактерий приспособляться к негативному воздействию окружающей среды (причем всевозможных вариантов этого воздействия), что

дает повод ученым и медикам задуматься над привычными способами борьбы с бактериями и их усовершенствованием.

Одним из факторов окружающей среды, способным негативно влиять на рост бактериальных клеток, является кислород. Активные формы кислорода (АФК), индуцирующие окислительный стресс, способны повышать частоту мутаций в клетках, повышая, в частности, чувствительность к антибиотикам. На примере *S. aureus* было показано, что для защиты от действия АФК повышался уровень экспрессии генов *sodA* (супероксиддисмутазы) и *qoxA* (субъединица хинолоксидазы), которые, ликвидируя АФК, снижали частоту нежелательных мутаций. Однако окислительный стресс может служить и сигналом к включению некоторых функций в биопленке. Так, у того же *S. aureus* имеются белки MgrA, SarZ, и SarA семейства MarR, которые используют окисление цистеина для регулирования вирулентности и устойчивости к антибиотикам [3]. Помимо этого, у *S. epidermidis* был описан транскрипционный фактор AbfR, который регулирует экспрессию генов, ответственных за реакцию на окислительный стресс, а также коагрегацию клеток и формирование биопленки [6].

Цель исследования состояла в изучении влияния химического агента на процесс образования биопленок у бактерий рода *Klebsiella*.

Материалы и методы

Работа проводилась на базе Научно-исследовательского инновационного центра по микробиологии и биотехнологии (НИИЦМиБ, г. Ульяновск) в 2015 г. Объектом исследова-

ния служили штаммы бактерий рода *Klebsiella*. Влияющим фактором выступил кислородо-содержащий дезинфектант последнего поколения. Бактерии рода *Klebsiella* хорошо растут на простых питательных средах, в том числе и мясо-пептонном бульоне (МПБ) в пределах 12–43°C (оптимальной температурой роста является предел 35–37°C). В жидких средах рост капсульных вариантов сопровождается равномерным помутнением, слизистым осадком и пленкой на поверхности бульона. Бескапсульные R-формы бактерий образуют гранулированный осадок с чистой и незамутненной надосадочной жидкостью. Культивирование бактерий на МПБ приводит к образованию пристеночного кольца. У фимбриеобразующих штаммов в течение нескольких дней на поверхности МПБ образуется поверхностная пленка [1, 5].

Культивирование проводили в течение 20 ч при 37°C. В качестве контроля использовали посеы изучаемых культур на МПБ.

Результаты

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1 и на рисунке 1 (см. II обложку).

Согласно последним исследованиям, пагубное влияние на бактерии большинство дезинфектантов оказывают при концентрации 1,5%. Из данных таблицы 1 видно, что при концентрации химического агента в 2% во всех случаях видимого бактериального роста в пробирках не наблюдалось, что на первый взгляд может говорить о полной гибели бактериальных клеток. При концентрации в 0,5 и 1%, у всех штаммов бактерии *Klebsiella*

ТАБЛИЦА 1. РОСТ БАКТЕРИЙ РОДА *KLEBSIELLA* НА МПБ ПРИ ОБРАБОТКЕ ПОСЕВОВ ДЕЗИНФЕКТАНТОМ

Исследуемые штаммы	Концентрация химического агента, %			Контроль
	0,5	1	2	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 5006	Помутнение по всему объему пробирки, образование пленки на разделе фаз «жидкость–воздух»	Помутнение по всему объему пробирки, образование пленки на разделе фаз «жидкость–воздух»	Прозрачный бульон, пристеночного или придонного роста не наблюдается	Помутнение по всему объему пробирки, образование пристеночного кольца
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 5007				
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 244		Прозрачный бульон, пристеночного или придонного роста не наблюдается		Помутнение по всему объему пробирки, образование сгустка на дне
<i>Klebsiella oxytoca</i> 1				
<i>Klebsiella oxytoca</i> 2				
<i>Klebsiella oxytoca</i> 3				

ТАБЛИЦА 2. НАЛИЧИЕ РОСТА БАКТЕРИЙ РОДА *KLEBSIELLA* НА МПА ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИМ АГЕНТОМ

Исследуемые штаммы	Концентрация химического агента, %			Контроль
	0,5	1	2	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 5006	+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 5007	+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 244	+	+	+	+
<i>Klebsiella oxytoca</i> 1	+	+	+	+
<i>Klebsiella oxytoca</i> 2	+	+	+	+
<i>Klebsiella oxytoca</i> 3	+	+	+	+

Примечание: «+» — наличие роста; «-» — отсутствие роста.

pneumoniae (*Klebsiella pneumoniae* 5006, *Klebsiella pneumoniae* 5007, *Klebsiella pneumoniae* 244), помимо помутнения среды, наблюдалось образование достаточно хорошо видимой и плотной пленки.

У *Klebsiella oxytoca* 1, *Klebsiella oxytoca* 2, *Klebsiella oxytoca* 3 при концентрации в 0,5% также наблюдалось помутнение среды и образование видимой, но, по сравнению с предыдущими штаммами, менее плотной пленки. При концентрации в 1% у *Klebsiella oxytoca* 1, *Klebsiella oxytoca* 2, *Klebsiella oxytoca* 3 видимых изменений на среде не фиксировалось.

Для того, чтобы убедиться в наличии или отсутствии бактериальных клеток после взаимодействия с химическим агентом, нами был произведен посев культур из пробирок на мясо-пептонный агар (МПА) сплошным газонном. Культивирование на МПА производили в течение суток при 37°C. Параллельно, в качестве контроля, был произведен посев изучаемых штаммов (без обработки химическим агентом) на МПА. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Данные таблицы 2 не подтверждают первоначальных выводов об отсутствии бактериальных клеток при росте на МБП после воздействия химическим агентом. Но стоит отметить, что на всех чашках наблюдался бактериальный рост, отличный от роста бактерии на контрольной чашке (рис. 2, II обложка).

Для подтверждения биопленочной природы уплотнения, образованного на МПБ при разделе фаз «жидкость–воздух», была проведена окраска образованных в пробирках бляшек 0,1% раствором генцианвиолета в течение 20 мин (рис. 3, II обложка). Окраска генцианвиолетом образованных бляшек на поверхности МПБ

после воздействия химическим агентом дает отличную от обычной окраски по Граму единичной колонии (контроль) картину.

Окраска мазков позволяет найти отличия в расположении клеток бактерии. Так, в первом случае наблюдается скопление бактериальных клеток, характеризующихся как плотнорасположенные. Во втором случае отмечается классический вариант расположения клеток бактерии *Klebsiella* — прямые грамтрицательные палочки, располагающиеся одиночно и парами.

Обсуждение

Проведенное нами исследование позволяет делать выводы о том, что под действием негативного фактора в виде химического агента, бактерии рода *Klebsiella* способны к образованию биопленок. Биопленки, образованные в данных условиях, визуализируются при росте в жидкой среде (в данном случае в МПБ). Образованные биопленки характеризуются средней плотности консистенцией, желто-бежевым цветом. При механическом воздействии (помешивании) биопленка разрушается без самопроизвольного восстановления.

Благодарности

Выражаем благодарность Фонду содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере и Научно-исследовательскому инновационному центру по микробиологии и биотехнологии» (г. Ульяновск) за финансовую поддержку проводимых исследований.

Список литературы/References

1. Малинов Е.С., Васильев Д.А., Шестаков А.Г. Влияние уксуснокислого свинца на планктонные и биопленочные формы *Pseudomonas aeruginosa* // Ветеринария и кормление. 2012. № 5. С. 28–30. [Malinov E.S., Vasiliev D.A., Shestakov A.G. Effect of lead acetate on planktonic and biofilm forms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Veterinariya i kormlenie = Veterinary Medicine and Feeding*, 2012, no. 5, pp. 28–30. (In Russ.)]
2. Плакунов В.К., Стрелкова Е.А., Журина М.В. Персистенция и адаптивный мутагенез в биопленках // Микробиология. 2010. Т. 79, № 4. С. 447–458. [Plakunov V.K., Strelkova E.A., Zhurina M.V. Persistence and adaptive mutagenesis in biofilms. *Mikrobiologiya = Microbiology*, 2010, vol. 79, no. 4, pp. 424–434. (In Russ.)]
3. Серегина Н.В., Честнова Т.В., Жеребцова В.А., Хромушин В.А. Обзор биофизических особенностей микробной адгезии // Вестник новых медицинских технологий. 2008. № 3. С. 175–177. [Seregina N.V., Tchestnova T.V., Zherbtsova V.A., Chromushin V.A. Review of biophysic particular features of microbial adhesion. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologii = Herald of New Medical Technologies*, 2008, no. 3, pp. 175–177. (In Russ.)]
4. Baumgarten T., Sperling S., Seifert J. Membrane vesicle formation formation as a multiple-stress response mechanism enhances *Pseudomonas putida* DOT-T1E cell surface hydrophobicity and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, vol. 78, no. 17, pp. 6217–6224. doi: 10.1128/AEM.01525-12
5. Brisse S., Grimont F., Grimont P.A.D. The Genus *Klebsiella*. *Prokaryotes*, 2006, pp. 159–196. doi: 10.1007/0-387-30746-x-8
6. Li Y., Tian X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors*, 2012, vol. 12, no. 3, pp. 2519–2538. doi: 10.3390/s120302519

Автор:

Садртдинова Г.Р., аспирант кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы, Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина, Ульяновская область, Россия.

Author:

Sadrtdinova G.R., PhD Candidate, Department of Microbiology, Virology, Epizootology and Veterinary Sanitation Inspection, Ulyanovsk State Agricultural Academy named after P.A. Stolypin, Ulyanovsk region, Russian Federation.

Поступила в редакцию 19.04.2015
Отправлена на доработку 11.05.2015
Принята к печати 09.07.2015

Received 19.04.2015
Revision received 11.05.2015
Accepted 09.07.2015

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ Г.Р. САДРТДИНОВОЙ «АГРЕГАЦИЯ БАКТЕРИЙ *KLEBSIELLA OXYTOCA* И *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ПОД ВЛИЯНИЕМ ХИМИЧЕСКОГО ФАКТОРА» (с. 377–381)

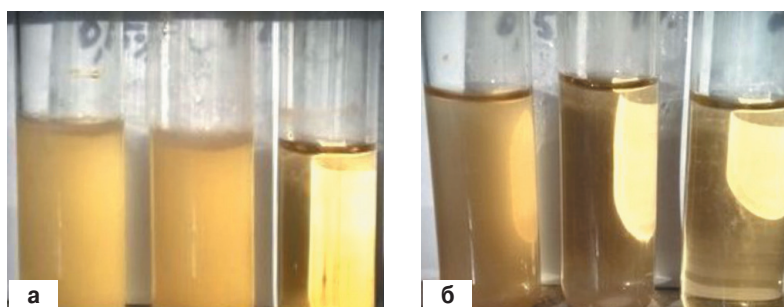


Рисунок 1. Рост на МПБ при воздействии дезинфектанта 0,5%, 1%, 2% (слева направо)
а) *Klebsiella pneumoniae* № 5006; б) *Klebsiella oxytoca* № 2.

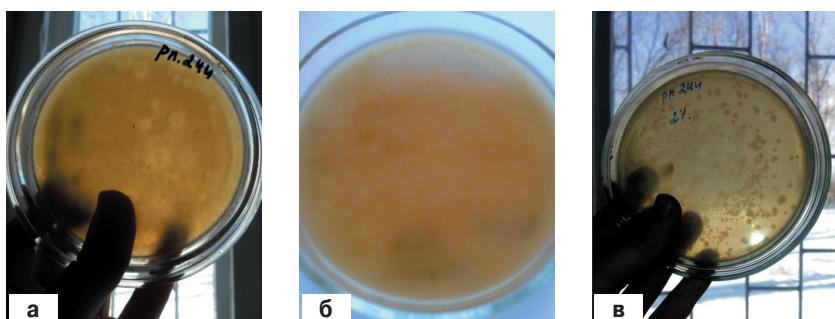


Рисунок 2. Рост *Klebsiella pneumoniae* № 244 на МПА после обработки дезинфектантом
а) 0,5%; б) 1%; в) 2%.

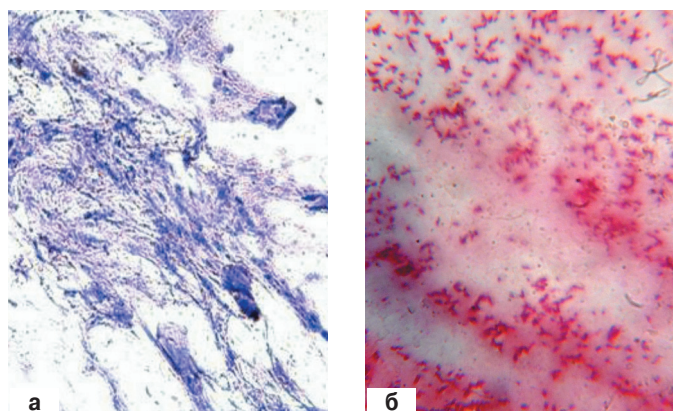


Рисунок 3. Окраска мазков *Klebsiella pneumoniae* № 244
а) окраска образованной бляшки генцианвиолетом; б) окраска контроля по Граму.