

Игнатова Н. И., Александрова Н. А., Заславская М. И., Абрамычева Д. В.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ БИОПЛЁНОКООБРАЗОВАНИЯ ШТАММАМИ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава РФ, 603005, Нижний Новгород, Россия

В связи с распространённостью биоплёночных инфекций, вызванных *Klebsiella pneumoniae*, большую значимость в лабораторно-диагностической практике представляет получение стандартизированной модели клебсиеллёзной биоплёнки для изучения воздействия на неё антимикробных, в т. ч. антибиоплёночных препаратов и оценки их эффективности. Описан метод выращивания биоплёнок клебсиелл *in vitro*. Оценку интенсивности биоплёнокообразования проводили стандартным методом по способности бактерий связывать кристаллический фиолет. Степень пленкообразования измеряли в единицах оптической плотности. Наличие межклеточного матрикса подтверждали путём окрашивания биоплёнки концентрированным раствором Конго-красного с последующей световой микроскопией. Исследовано воздействие различных экзогенных и эндогенных факторов на биоплёнокообразование штаммами *K. pneumoniae*. Изучалось влияние состава культуральной среды, возраста культуры («суточная», «недельная»), температурного режима, присутствия кислорода в среде на интенсивность биоплёнокообразования. При изучении влияния условий культивирования на биоплёночную активность штаммов *K. pneumoniae* установлено, что состав питательной среды существенно влиял на интенсивность образования биоплёнки *K. pneumoniae*: среда DMEM стимулировала биоплёнокообразование *in vitro* у большинства штаммов по сравнению с ТСБ. Возраст культуры («суточная», «недельная»), используемой для выращивания биоплёнок, не оказывал существенного влияния на биоплёночную активность клебсиелл. Температура культивирования, наличие кислорода могут, как стимулировать, так и угнетать биоплёнокообразование в зависимости от исследуемого штамма. Большинство штаммов клебсиелл лучше формируют биоплёнку в аэробных условиях при 37°С.

Ключевые слова: биоплёнка; *Klebsiella pneumoniae*; питательные среды; физические факторы.

Для цитирования: Игнатова Н.И., Александрова Н.А., Заславская М.И., Абрамычева Д.В. Влияние условий культивирования на интенсивность биоплёнокообразования штаммами *Klebsiella pneumoniae*. Клиническая лабораторная диагностика. 2020;65 (8): 512-515. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-8-512-515>

Ignatova N. I., Alexandrova N. A., Zaslavskaya M. I., Abramychева D. V.

EVALUATION OF THE INFLUENCE OF CULTURING ON THE INTENSITY OF BIOFILM FORMATION BY *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Privolzhsky Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian, 603005, Nizhny Novgorod, Russia

Due to the prevalence of biofilm infections caused by *Klebsiella pneumoniae*, in laboratory diagnostic practice it has a great importance to obtain a standard model of *Klebsiella* biofilm for evaluating the bactericidal effect and effectiveness of antimicrobial drugs. Describes the method of *Klebsiella* biofilms formation *in vitro*. The intensity of biofilm formation was evaluated by the ability of bacteria to bind the crystal violet. The degree of film formation was measured by optical density. The presence of an intercellular matrix was confirmed by staining of Congo-red solution followed by light microscopy. The effect of exogenous and endogenous factors on biofilm formation by *K. pneumoniae* strains was investigated. The influence of the nutrient composition, the age of the culture («daily», «weekly»), the presence of oxygen and the temperature conditions were studied. The nutrient composition of the medium significantly influenced on biofilm formation of *K. pneumoniae*: DMEM stimulated biofilm formation in most strains *in vitro* compared to TSB. The age of the culture (daily, weekly) did not significantly affect the biofilm formation of *Klebsiella*. At the same time, the temperature of culturing and the presence of oxygen can both stimulate and inhibit biofilm formation, depending on the strain under study. Most strains of *Klebsiella* better form a biofilm under aerobic conditions at 37°С.

Key words: biofilm; *Klebsiella pneumoniae*; media for cultivation; physical factors.

For citation: Ignatova N.I., Alexandrova N.A., Zaslavskaya M.I., Abramychева D.V. Evaluation of the influence of culturing on the intensity of biofilm formation by *Klebsiella pneumoniae* strains. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020;65 (8): 512-515 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-8-512-515>

For correspondence: Ignatova N.I., PhD, Associate Professor, Department of epidemiology, microbiology and evidence-based medicine; e-mail: n.i.evteeva@gmail.com

Information about authors:

Ignatova N. I., <https://orcid.org/0000-0002-4570-9342>;
Alexandrova N. A., <https://orcid.org/0000-0003-4845-8056>;
Zaslavskaya M. I., <https://orcid.org/0000-0003-1895-0699>;
Abramychева D. V., <https://orcid.org/0000-0002-6380-9953>.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 27.03.2020
Accepted 29.03.2020

Введение. Широкая распространенность хронических заболеваний дыхательных путей, катетер-ассоциированных инфекций, дисбиозов и других патологий, которые имеют в своей основе биопленочный процесс [1, 2], определяет актуальность лабораторных исследований с использованием биопленок. Биоплёнка представляет сообщество взаимодействующих бактерий, погруженных в слизисто-полимерный матрикс и имеющих изменённый фенотип [3, 4], что делает данные микроорганизмы более устойчивыми к воздействию ряда факторов, в том числе, к антибиотикам [5, 6].

Среди биоплёнообразующих бактерий – возбудителей инфекций – всё чаще отмечается *Klebsiella pneumoniae* [2, 7]. Представляет интерес получение стандартизированной модели клебсиеллёзной биоплёнки для дальнейшего изучения воздействия на неё антимикробных, в том числе антибиоплёночных препаратов и оценки их эффективности. Исследование действия факторов, способных повлиять на биоплёночную активность штаммов *K. pneumoniae*, позволит подобрать оптимальный режим моделирования биоплёночного процесса.

Материал и методы. Исследование проводили на чистых культурах клинических изолятов *K. pneumoniae* (штаммы: 1; 2; 101; 369; 813; 839; 945-1; 945-3; 952-1; 952-3; 952-4; 946; 3824; 3833). Видовую принадлежность штаммов определяли методом масс-спектрометрии MALDI-ToF (MALDI ToF Autoflex speed, Bruker Daltonik GmbH, Германия). Оценку способности исследуемых бактерий к биоплёнокообразованию проводили стандартным методом [8, 9]. Интенсивность биоплёнокообразования оценивали по способности связывать кристаллический виолет. Осуществляли посев исследуемых штаммов в концентрации 0,7 по McFarl, в объёме 2 мл питательной среды на 12-луночные планшеты (Corning, США). Биоплёнки выращивали на питательной среде ТСБ (Trypticase Soy Broth, Becton, Dickinson and Company, США) или среде DMEM (ПанЭко, Россия) в течение 2-х суток. Контролем служила питательная среда без внесения микроорганизмов в лунки планшетов. Для подтверждения биоплёночного процесса биоплёнки окрашивали концентрированным раствором Конго-красного (15 мин), после чего образцы трёхкратно отмывали дистиллированной водой, высушивали и докрасивали раствором карболового фуксина [8, 10] с последующей световой микроскопией Leica DMIL (Leica, Германия). Степень плёнкообразования измеряли в единицах оптической плотности. Статистическую обработку проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни [4].

Оценивали влияние температуры, присутствия кислорода, возраста культуры на биоплёнокообразование. Значение температурного фактора оценивалось путём сравнения роста биоплёнки у исследуемых штаммов при 37°C или 22°C на питательной среде. Для создания анаэробных условий на поверхность питательной среды (в лунке планшета) непосредственно перед культивированием наслаивали 0,5 мл стерильного вазелинового масла. Для приготовления бактериальной суспензии использована чистая культура бактерий сразу после 24-часового культивирования (37°C) («суточная» культура) или чистая культура бактерий после 6-дневной экспозиции при 4°C («недельная» культура).

Результаты. Оценивали влияние состава стандартных питательных сред на способность *K. pneumoniae* к

биоплёнокообразованию (37° С, 2 сут). Установлено, что десять из тринадцати исследуемых штаммов (77%) более интенсивно образуют биоплёнку в среде DMEM. Интенсивность биоплёнокообразования выше, в среднем, в 2,3 раза ($p < 0,05$) (см.таблицу). При культивировании микроорганизмов в ТСБ в большинстве случаев наблюдали более интенсивный рост планктонной формы бактерий, в DMEM – колонизацию дна лунки планшета. Штамм *K. pneumoniae* 945-3 не показал значимых различий интенсивности формирования биоплёнки при смене среды культивирования. *K. pneumoniae* 101 и 3833 лучше формировали биоплёнку при культивировании в среде ТСБ (см.таблицу). Характерный для биоплёнки полисахаридный матрикс наиболее выражен при культивировании микроорганизмов в среде DMEM, что обнаруживалось при окрашивании Конго-красным.

Для оценки возраста культуры, влияния температуры, присутствия кислорода отобраны штаммы, показавшие высокую интенсивность образования биоплёнки на среде DMEM: 1, 2; 369; 813; 952-3, 3824.

Влияние фаз жизненного цикла на биоплёнокообразование оценивалось у бактерий «суточной» и «недельной» культур. Бактериальная культура, взятая в экспоненциальной фазе роста («суточная» культура) образовывала более плотную биоплёнку, чем культура бактерий, находящаяся, преимущественно, в стационарной фазе («недельная» культура), но различия не были статистически значимы ($p > 0,05$). При оценке температурного фактора установлено, что для большинства штаммов понижение температуры культивирования до 22°C не влияло на интенсивность образования биоплёнки. Статистически значимое снижение биоплёнокообразования при 22° С отмечено для штамма 369, усиление – для штамма 3824. Рост бактерий в анаэробных условиях давал незначительное снижение биоплёнокообразования по сравнению с аэробными условиями для большинства штаммов ($p > 0,05$). Единственный штамм, показавший достоверное ($p < 0,05$) усиление биоплёнокообразования в анаэробных условиях – *K. pneumoniae* 3824.

Обсуждение. В результате анализа влияния питательной среды на интенсивность биоплёнокообразования штаммами *K. pneumoniae* установлено, что для большинства штаммов имеет существенное значение состав питательной среды. При сравнении субстратов для культивирования, лучшей средой для стимуляции биоплёночного процесса показала себя среда DMEM. Биоплёнка формируется бактериями чаще всего с целью защиты и выживания микроорганизмов в неблагоприятной или агрессивной среде [11]. Дефицит питательных веществ в субстратах может активировать «чувство кворума» (англ. *quorum sensing*), помогающее бактериям совместно адаптироваться к более «голодной» среде. С этой точки зрения, отсутствие высокомолекулярных пептидов в среде DMEM (в отличие от ТСБ) может служить сигналом для общения и координации между бактериями, нацеленными на выживание популяции. *Quorum sensing* у многих бактерий связан с процессами агрегации клеток, производством экзополисахаридов и формированием биопленок [12].

Чистая культура *K. pneumoniae* достаточно стабильна и может сохранять свою жизнеспособность при длительном хранении на питательной среде. В 1-е сутки культивирования на искусственных питательных средах популяция находится в экспоненциальной фазе роста. Спустя 2 суток и более, при отсутствии поступления

Биоплёночная активность *K. pneumoniae* в зависимости от питательной среды, M±m

Штаммы клебсиелл	Средняя оптическая плотность элюата (ед. опт. плотности)		Кратность изменения биоплёнкообразования (DMEM/ТСБ)
	Культивирование в ТСБ	Культивирование в DMEM	
<i>K. pneumoniae</i> 1	0,32±0,05	0,65±0,03*	2,10±0,24*
<i>K. pneumoniae</i> 2	0,13±0,02	0,47±0,02*	3,72±0,59*
<i>K. pneumoniae</i> 101	0,65±0,09	0,45±0,02*	0,69±0,13*
<i>K. pneumoniae</i> 369	0,15±0,09	0,54±0,06*	2,99±1,18*
<i>K. pneumoniae</i> 813	0,20±0,07	0,35±0,09*	1,77±0,43*
<i>K. pneumoniae</i> 839	0,14±0,04	0,29±0,01*	2,22±0,54*
<i>K. pneumoniae</i> 945-1	0,24±0,07	0,05±0,01*	0,21±0,02*
<i>K. pneumoniae</i> 945-3	0,16±0,07	0,18±0,05	1,23±0,45
<i>K. pneumoniae</i> 946	0,30±0,09	1,0±0,26*	3,82±1,90*
<i>K. pneumoniae</i> 952-1	0,20±0,05	0,39±0,04*	1,97±0,59*
<i>K. pneumoniae</i> 952-3	0,19±0,03	0,45±0,21*	2,26±0,71*
<i>K. pneumoniae</i> 952-4	0,22±0,03	0,47±0,02*	2,18±0,19*
<i>K. pneumoniae</i> 3824	0,37±0,09	1,27±0,26*	3,73±1,42*
<i>K. pneumoniae</i> 3833	0,28±0,03	0,13±0,05*	0,47±0,14*

Примечание. * – статистически значимые отличия относительно биопленки, культивированной в ТСБ.

новых питательных веществ, популяция неизбежно переходит в стационарную фазу, затем фазу отмирания. Установлено, что для биоплёнкообразования штаммами *K. pneumoniae* не имеет существенного значения в какой фазе изначально находилась популяция бактерий. Попадая в новые условия, бактерии «недельной» культуры быстро адаптируются и начинают формировать биоплёнку, незначительно уступая по этой способности бактериям, взятым из «суточной» культуры.

У большинства штаммов *K. pneumoniae* не отмечено значительных изменений в биоплёночном процессе при изменении температуры культивирования. У штамма 3824, выделенного с поверхности вагинального эпителия, отмечалось достоверное усиление биоплёнкообразования при температуре 22°C. Штамм 369, полученный из гнойной раны, формировал биоплёнку лучше при 37°C и достоверно снижал свою биоплёночную активность при 22°C. Можно предположить, что зависимость биоплёнкообразования у вышеуказанных штаммов от температуры является следствием их длительной адаптации к определённым экологическим нишам. Последним биотопом для штамма 3824 являлась вагина, имеющая температуру ниже 37°C. Лучшая адаптация штамма 369 к температуре 37°C, возможно, связана с его высокой способностью к паразитизму во внутренних тканях организма человека.

K. pneumoniae относится к факультативно-анаэробным микроорганизмам, что позволяет им комфортно чувствовать себя как в аэробной, так и анаэробной среде посредством переключения метаболических путей. Продемонстрировано незначительное снижение интенсивности биоплёнкообразования в анаэробных условиях у большинства штаммов, т. е. наблюдалось небольшое усиление биоплёночного процесса в присутствии кислорода. Единственный из исследуемых штаммов, показавший значительное увеличение биоплёнкообразования в анаэробных условиях – *K. pneumoniae* 3824, выделенный из биотопа влагалища. Формирование биоплёнки может быть связано не только с кислород-зависимыми процессами, но и вполне способно осуществляться в состоянии анаэробного метаболизма.

Выводы.

1. Состав питательной среды влияет на интенсивность образования биоплёнки *K. pneumoniae*: среда

DMEM стимулирует биоплёнкообразование *in vitro* у большинства штаммов по сравнению с ТСБ.

2. Изолированные клетки *K. pneumoniae*, полученные из «суточной» культуры бактерий, незначительно превосходят бактерии «недельной» культуры по способности формировать биоплёнку *in vitro*.

3. Чувствительность биоплёночного процесса к присутствию кислорода и температуре является штамм-зависимым признаком для *K. pneumoniae*. Большинство штаммов клебсиелл лучше формируют биоплёнку в аэробных условиях при 37°C.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп.1-3, 5, 6, 9, 11 см. REFERENCES)

- Колчанова Н.Э., Окулич В.К., Шилин В.Е. Определение образования микробной биоплёнки бактериями периодонтального кармана и её устойчивости к химическим и биологическим объектам. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2015; 3:56-61.
- Осипова Е.В., Шипицына И.В. Информационная характеристика микробных биоплёнок, формируемых *in vitro* на поверхности покровного стекла клиническими штаммами *Klebsiella pneumoniae*. *Гений Ортопедии*. 2018; 4(24): 478-81.
- Окулич В.К., Кабанова А.А., Плотников Ф.В. Микробные биоплёнки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии. Витебск: ВГМУ; 2017.
- Титова С.В., Веркина Л.М., Моделирование биоплёнок холерного вибриона на твёрдых поверхностях (стекло и пластик) и визуализация их в световом и люминесцентном микроскопах. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016;61(4): 238-41.
- Плакунов В. К., Мартыанов С. В., Тетенева Н. А., Журина М. В. Управление формированием микробных биоплёнок: анти- и пробиоплёночные агенты. *Микробиология*. 2017; 4(86): 402-20.

REFERENCES

- Venkatesan N., Perumal G., Doble M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Future Microbiol.* 2015; 10(11):1743-50. doi: 10.2217/fmb.15.69.
- Desai S., Sanghrajka K., Gajjar D. High adhesion and increased cell death contribute to strong biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens*. 2019; 8(4). pii: E277. doi: 10.3390/pathogens8040277.

3. Jakobsen T.H., van Gennip M., Christensen L.D., Bjarnsholt T., Givskov M. Qualitative and quantitative determination of quorum sensing inhibition *in vitro*. Quorum sensing: methods and protocols. *Methods in Molecular Biology*. 2011; 692: 253-63.
4. Kolchanova N.E., Okulich V.K., Shilin V.E. Determination of the periodontal pocket bacteria's to form microbial communities and its chemical and biological objects resistance. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*. 2015; 3:56-61. (in Russian)
5. De Campos P.A., Royer S., da Fonseca Batistao D.W., Araújo B.F., Queiroz L.L., de Brito C.S., Gontijo-Filho P.P., Ribas R.M. Multidrug resistance related to biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* clinical strains from different pulsotypes. *Curr. Microbiol.* 2016; 72: 617-27. doi: 10.1007/s00284-016-0996-x.
6. Vuotto C., Longo F., Pascolini C., Donelli G., Balice M.P., Libori M.F., Tiracchia V., Salvia A., Varaldo P.E. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *J. Appl. Microbiol.* 2017; 123: 1003-18. doi: 10.1111/jam.13533.
7. Osipova E. V., Shipitsyna I. V. Informational characteristics of microbial biofilms formed by clinical strains of *Klebsiella pneumoniae in vitro* on the surface of the cover glass. *Geniy ortopedii*. 2018; 4(24): 478-81. (in Russian)
8. Okulich V.K., Kabanova A.A., Plotnikov F.V. Microbial biofilms in clinical microbiology and antibiotic therapy. [Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии]. Vitebsk: VGMU; 2017. (in Russian)
9. Cadavid E., Echeverri F. The search for natural inhibitors of biofilm formation and the activity of the autoinductor C6-AHL in *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13884. *Biomolecules*. 2019; 9(2). pii: E49. doi: 10.3390/biom9020049.
10. Titova S.V., Verkina L.M. The modeling of biofilms of comma bacillus on solid surfaces (glass and plastic) and their visualization in light and luminescent microscopes. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2016; 61 (4): 238-41. (in Russian)
11. Desai S.K., Kenney L.J. Switching lifestyles is an *in vivo* adaptive strategy of bacterial pathogens. *Front Cell Infect. Microbiol.* 2019; 9:421. doi: 10.3389/fcimb.2019.00421.
12. Plakunov V.K., Mart'yanov S.V., Teteneva N.A., Zhurina M.V. Controlling of microbial biofilms formation: Anti- and probiofilm agents. *Mikrobiologiya*. 2017;4(86): 423-38. (in Russian)

Поступила 23.03.20

Принята к печати 29.03.20