

-
10. Gordon, R. The genus *Bacillus* / R. Gordon // In: Handb. Microbiol. Cleveland (Ohio), 1973. V.1. P.71–88.
11. Slepecky, R.A. The Genus *Bacillus*-Nonmedical / R.A. Slepecky, H.T. Hemphill // Prokaryotes. – 2006. - № 4. – P. 530–562

DEVELOPMENT OF THE SCHEME OF THE ACCELERATED IDENTIFICATION OF BACTERIA OF *BACILLUS MEGATERIUM*

N. A. Feoktistova, D. A. Vasilyev, S. N. Zolotukhin, N. A. Petrukova,

Key words: *bacteria, Bacillus megaterium, bacteriophages, biological product, strains, tests, biochemical properties, “flowing-down drop” method.*

Work is devoted to development of the scheme of the accelerated identification of bacteria of Bacillus megaterium. When carrying out researches the scheme of identification of bacteria of Bacillus megaterium by means of the designed biological product allowing to identify microorganisms in 29 hours at reaction statement “the flowing-down drop” and 77 hours when using a fagovy biological product and “A key for primary differentiation of bacteria of the sort Bacillus” is developed (R.A. Slepecky, H.T. Hemphill, 2006).

УДК 57: 579.2

ОЦЕНКА CRA-МЕТОДА В ОБНАРУЖЕНИИ БИОПЛЕНОК ОБРАЗОВАННЫХ БАКТЕРИЯМИ РОДА *KLEBSIELLA*

Научные исследования проведены при финансовой поддержке «Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере»

Г.Р. Садртдинова, аспирант

Тел: 89276349640, sadrtdinova-guzlik@rambler.ru

Е.А. Ляшенко, к.б.н., доцент

Тел: 89278295485, elena-l18@mail.ru

А.Г. Шестаков, к.б.н., с.н.с.

Тел: 89510936434, andrewsh@newmail.ru

Д.А. Васильев, д.б.н., профессор

Тел: 8 (8422)49-55-63, dav_ul@mail.ru

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им.П.А.Столыпина»

Ключевые слова: биопленки, детекция, бактерия, штамм, матрикс.

*В статье рассматриваются особенности роста и возможность визуализации образования биопленки бактерий рода *Klebsiella* spp. на дифференциально-диагностической твердой среде.*

Биопленка - представляет собой достаточно сложно организованные микробные сообщества [2]. Основным элементом биопленок является экзополимерный матрикс, адгезированный на поверхностях различных материалов: абиотического происхожде-

ния (трубы водоканалов, катетеры, протезы, различного рода медицинские устройства и др.) и биотических (образование налета на деснах, почечные камни, альвеолы легких) [1]. Формирование биопленки - способ бактерий перейти от «кочевого» образа жиз-

ни к более оседлому, к более комфортному и более защищенному от негативного воздействия внешней среды. Биопленки обладают высоким уровнем толерантности к антителам, антибиотикам, антисептикам, дезинфектантам и фагоцитам [4].

По современным данным, все микроорганизмы образуют биопленку. Феномен коллективного поведения бактерий, с последующим образованием экзополимерного матрикса, впервые был описан около 20 лет назад. Однако функции и роль систем, которые обеспечивают социальное поведение бактерий, до сих пор остаются малоизученными и являются предметом крайне перспективным для практики научного поиска[8]. К настоящему времени доказана роль микробных биопленок, образованных бактериями рода *Klebsiella*, в возникновении и развитии таких распространенных заболеваний, как инфекции, связанные с катетеризацией сосудов, инфекции сердечных клапанов, суставных протезов, инфекции мочевых путей. Кроме тканей организма хозяина, клебсиллезные биопленки колонизируют различное медицинское оборудование. Основной задачей современных исследований остается изучение механизмов формирования и деструкции биопленок. На сегодняшний день существует огромное количество методов, позволяющих идентифицировать, подтвердить и визуализировать наличие биопленок. Среди наиболее популярных методов обнаружения биопленок, выделяют: а) пробирочный метод Кристенсена (Tube method- ТМ-метод)[6]; б) планшетный метод Кристенсена (Tissue culture plate method-TCP-метод)[5]; в) среда для стимулирования биопленки [3]; г) метод детекции биопленок при помощи агаризованной среды (Congo red agar method- CRA-метод) Фримана [8]

Цель исследования: провести визуальную оценку биопленок, образованных бактериями рода *Klebsiella spp.*, на твердой агаризованной среде.

Материалы и методы. В работе использовали 6 штаммов бактерий рода *Klebsiella* (видов *pneumoniae*, *oxytoca*), полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии им. П.А. Столыпина. Были использованы следующие хим. реактивы и питательные среды: мясо-пептонный бульон (МПБ), пептон, сахароза, сульфат магния, конго красный, агар бактериологический, вода дистиллированная.

В качестве одного из модельных методов по обнаружению биопленочных сообществ, нами был выбран метод индикации биопленок при помощи агаризованной среды предложенной Фриманом в 1989 году. Данный метод наиболее часто используется в нескольких ведущих лабораториях по всему миру (США, Канада, Германия, Швейцария, Норвегия, Индия), в связи с простотой в использовании, небольшой трудоемкостью в проведении исследований и высокой результативностью. Для нашего исследования была приготовлена среда - конго красный агар (CRA) с модификацией для *Klebsiella spp.* Приготовленная среда была проавтоклавирована в течение 20 минут, при 105°C, разлита в чашки Петри в асептических условиях, и термостатирована при 37 °С. Культивирование на среде CRA производили в термостате при 37°C, в течении 24-х (I этап) и 48-ми (II этап) часов.

Результаты исследований и их обсуждение. Ожидаемый результат - после первых суток культивирования при 37°C, бактерии, образующие биопленки, дают почернение среды под местом посе-

Таблица 1- Морфология колоний *Klebsiella pneumoniae* и *Klebsiella oxytoca* на CRA в нашей модификации через 48 часов

Исследуемый штамм	Показатели					
	величина колонии	форма колонии	цвет колонии	характер контура края	поверхность колонии	консистенция колонии
<i>Klebsiella pneumoniae</i> №81	2-4мм средние	правильной круглой	темно-коричневые	ровные	гладкая, блестящая	слизистая
<i>Klebsiella pneumoniae</i> №5006	2 мм мелкие					
<i>Klebsiella pneumoniae</i> №76	2 мм средние					
<i>Klebsiella oxytoca</i> №1	0,5 мм мелкие					
<i>Klebsiella oxytoca</i> №2	0,5 мм мелкие					
<i>Klebsiella oxytoca</i> №3	1-2 мм мелкие					

ва и потемнение самих колоний (культивирование свыше двух суток). Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1, а также на рисунке 1.

После 24-х часового культивирования, наблюдалось слегка заметное потемнение среды под посевами (во всех 6-ти случаях). Данный факт свидетельствует о протекании процесса образования биопленок. Дополнительно, нами было проведено культивирование в течение 48 часов.

После 48-ми часового культивирования, нами было обнаружено достаточно заметное почернение среды в области под посевами и потемнение самих колоний (во всех 6-ти случаях). Следовательно, можно сделать выводы об образовании биопленки у всех исследуемых штаммов.

Заключение. Апробация CRA среды в нашей модификации на штаммах бактерий рода *Klebsiella spp.* позволило нам:

- визуально зафиксировать образование биопленки;
- подтвердить на опыте способность бактерий рода *Klebsiella spp.* образовывать биопленки;



Рисунок 1 - Образование биопленок бактерий рода *Klebsiella* на CRA (48-ми часовое культивирование)

- найти отличия в росте бактерий рода *Klebsiella spp.* разных видов (колонии *Klebsiella oxytoca* очень мелкие по сравнению с *Klebsiella pneumoniae*, по другим показателям явных отличий нет).

Библиографический список:

1. Бехало В.А. Иммунобиологические особенности бактериальных клеток, входящих в состав «медицинских биопленок» / В.А. Бехало, В.М. Бондаренко, Е.В. Сысолятина, Е.В. Нагурская // Микробиология. – 2010. – № 4. – С. 97–107.
2. Ильина, Т.С. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития / Т.С. Ильина, Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Генетика. – 2004. – № 40. – С. 1–12.
3. Шестаков А.Г. Среда для стимуляции образования биопленок у бактерий *Pseudomonas aeruginosa* Научная жизнь. 2011. № 5. С. 22-26.
4. Biedlingmaier J., Samaranayake R., Whelan P.1998. Resistance to biofilm formation on otologic implant materials. Otolaryngol. Head Neck Surg.118: 444-445.
5. Christensen G.D., Simpson W.A., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M., et al.adherence of coagulase negative staphylococci to plastic tissue cultures: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin microbiology 1985; 22:996-1006
6. Christensen G.D., Simpson W.A., Bisno A.L., Beachey E.H.Adherence of slime-producing strains of staphylococcus epidermidis to smooth surfaces.Infect Immun 1982; 37:318-26
7. Freeman D.J., Falkiner F.R., Keane C.T.New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci.J Clin Pathol 1989; 42:872-4
8. Yarwood J.M., Bartels D.J., Volper E.M., Greenberg E.P.Quorum sensing in Staphylococcus aureus biofilms.J Bacteriol, 2004; 186:1838-1850

ASSESSMENT CRA-METHOD IN DETECTING BIOFILM BACTERIA OF KLEBSIELLA

G.R. Sadrtdinova, E.A. Lyashenko, A.G. Shestakov, D.A.Vasiliev.

Keywords: *biofilm, detection, bacterium, strain, matrix.*

*The article discusses features of growth and biofilm bacteria of *Klebsiella* on a special solid medium.*