

УДК: 579/842/16:534.321.9

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ УЛЬТРАЗВУКОВОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ЗДАТНІСТЬ ДО ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВОК ТА НА СФОРМОВАНІ БІОПЛІВКИ *KLEBSIELLA* *PNEUMONIAE*

Мозгова Ю.А.

Кафедра мікробіології, вірусології та імунології
Харківський національний медичний університет

Вступ

Питання формування біоплівки і вивчення їх ролі в патологічних процесах становлять великий інтерес у медицині [1]. Така форма існування надає бактеріям масу переваг в умовах впливу несприятливих факторів зовнішнього середовища й організму хазяїна. Мікрофлора біоплівки більш стійка до впливу несприятливих чинників фізичної, хімічної та біологічної природи порівняно з вільно плаваючими бактеріями; мікроорганізми, що входять до її складу, виявляються дуже стійкими до впливу ультрафіолетового випромінювання, дегідратації, антибіотиків і факторів імунного захисту [2, 3, 4]. На шляху до бактерій у антимікробних препаратів знаходяться поверхневі плівки та міжклітинний матрикс, які відокремлюють клітини співтовариства від зовнішнього середовища [5, 6]. Таким чином, бактерії всередині біоплівки, не змінюючи своєї індивідуальної чутливості, краще виживають в присутності різних неспоріднених антибактеріальних препаратів [7].

Відомо, що біоплівки здатні утворювати більше 90 % вивчених видів бактерій, а їх формування виявляється більш ніж при 80 % хронічних захворюваннях мікробної етіології [8]. *K. pneumoniae* добре відома більшості клініцистів як причина позалікарняних бактеріальних пневмоній, хоча переважна більшість інфекцій, спричинених клебсієллами, пов'язані з госпіталізацією [9]. *Klebsiella spp.* входять до п'ятірки грамнегативних патогенів – збудників внутрішньолікарняних інфекцій, а *K. pneumoniae* є найпоширенішим видом, що становить від 75 до 86 % зареєстрованих випадків клебсієллезної інфекції [10].

Незважаючи на очевидну актуальність для практичної медицини, властивості біоплівок клебсієлл залишаються недостатньо вивченими, тому метою даного дослідження було вивчення впливу ультразвукового випромінювання на здатність до формування біоплівок та сформовані біоплівки *K. pneumoniae*.

Матеріали й методи

Збір матеріалу від хворих (ранова тканина, гній з плевральних порожнин та абсцесів легень, перев'язувальний та шовний матеріал, катетери та дренажні конструкції) та його доставку до лабораторії проводили згідно з вимогами взяття і доставки матеріалу для мікробіологічних досліджень,

запропонованих медичною академією післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика, м. Київ [11]. Виділення бактеріальної культури здійснювали за загальноприйнятими методами [12] з наступною ідентифікацією у наборах ЕНТЕРОТЕСТ-24. Суспензію клебсієлл із визначеною концентрацією мікробних клітин готували за шкалою McFarland згідно з інструкцією до приладу Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema a.s., Чехія).

Вимірювання оптичної щільності біоплівки клебсієлл на поверхні 96-коміркового полістиролового планшету проводили після інкубації інкуляту впродовж 24 годин [13]. Після інкубації інкульовані дослідні біоплівки розміщували у зоні дії ультразвукового випромінювання (експериментальний пристрій з ультразвуковими хвилями низької інтенсивності від 2 до 3 Вт/см²; робоча частота коливань – 26,5 кГц; амплітуда коливань – від 50 до 80 мкм) протягом 10 хвилин, з наступним порівнянням оптичної щільності біоплівок, сформованих дослідними та контрольними штамами клебсієлл, і визначенням ступеня руйнування біоплівок. Планктонні клітини вирощували на поживному агарі, витримували при 37 °С протягом 24 годин, готували бактеріальну суспензію відповідної концентрації й вносили у комірки полістиролового планшету з додаванням суспензійного поживного середовища й наступною інкубацією у вологій камері протягом доби при 37 °С. Потім оцінювали ступінь агрегації мікробних клітин та ступінь руйнування біоплівок під впливом ультразвукового опромінення з кількісним вираженням у значенні оптичної щільності, отриманої на спектрофотометрі «Multiskan EX 355» при довжині хвилі 540 нм та відображеної в умовних одиницях оптичної щільності (од.ощ.) біоплівкоутворення мікроорганізмами [14].

Для статистичної обробки результатів використовували програму Excel для персонального комп'ютера й Biostat з визначенням середньої, стандартного відхилення, критерію Ст'юдента [15, 16].

Результати дослідження та їх обговорення

При вивченні впливу ультразвукового опромінення *in vitro* на суспензійну культуру ізолятів *K. pneumoniae* отримані дані (рис.1) свідчать про те, що стосовно суспензійної культури після опромінення протягом 10 хвилин ультразвуковими хвилями низької інтенсивності та інкубації протягом доби у термостаті у вологій камері мала місце тенденція до зниження оптичної щільності біомаси, яка складається з планктонних клітин, й сформованої біоплівки порівняно з оптичною щільністю біоплівки *K. pneumoniae* до опромінення (0,52±0,05 та 0,57±0,05 од.ощ. відповідно, $p \leq 0,05$), а щільність добових біоплівок була нижче за контрольні значення у 1,7 рази (0,81±0,08 та 1,39±0,1 од.ощ. відповідно, $p \leq 0,05$).

Як видно з рис. 2, результатом дії ультразвукового опромінення на добові сформовані біоплівки ізолятів *K. pneumoniae* стало зниження здатності до формування нових біоплівок і до

агрегації у 4 рази ($0,74 \pm 0,05$ й $3,02 \pm 0,25$ од. ош. відповідно, $p \leq 0,05$).

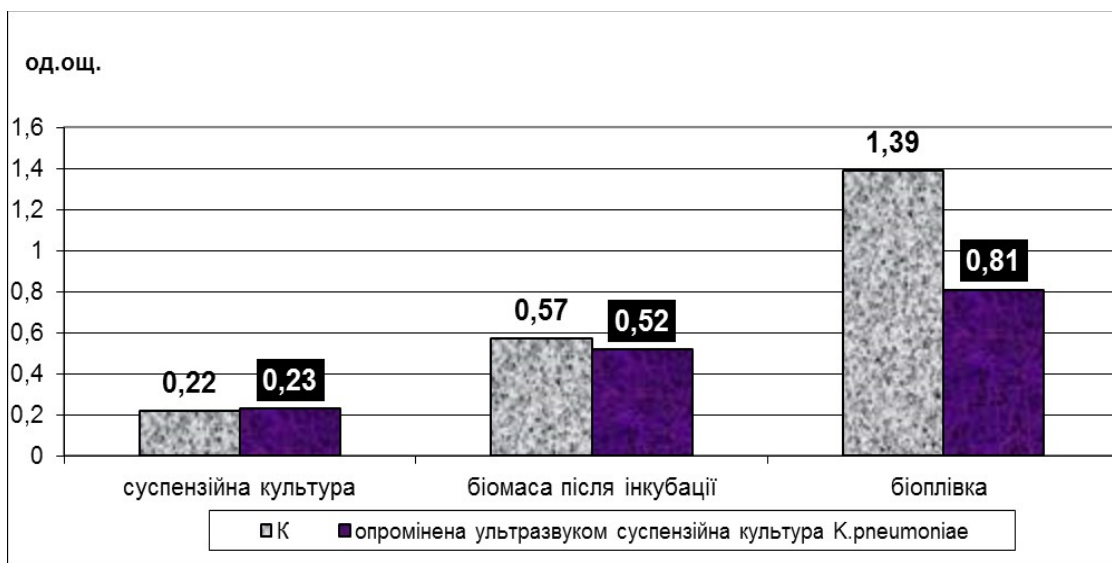


Рис. 1. Вплив 10-хвилинного ультразвукового опромінення на суспензійну культуру ізолятів *K. pneumoniae*.

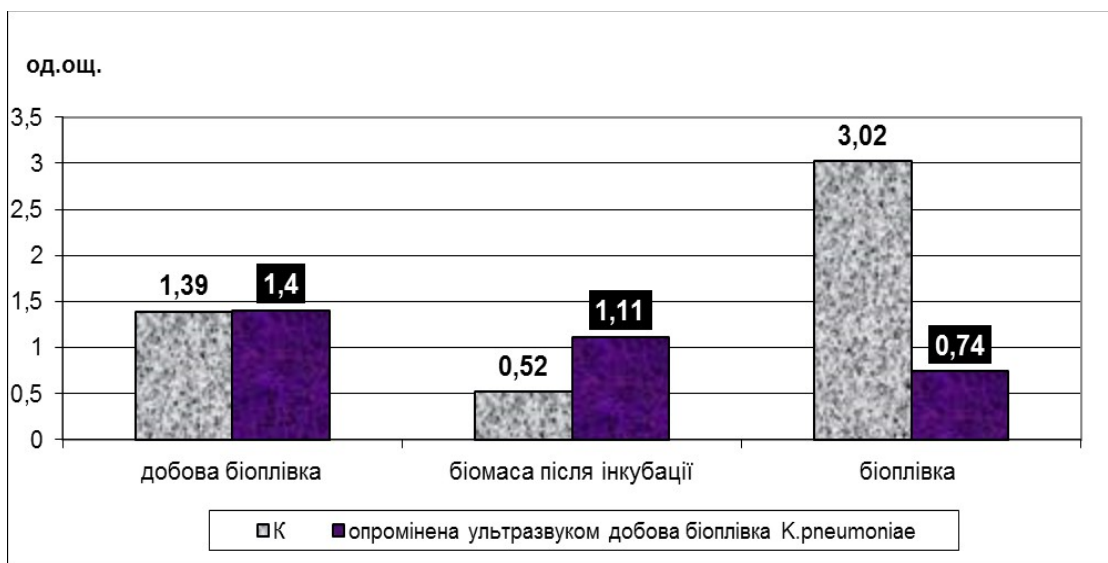


Рис.2. Результат дії ультразвукового опромінення на сформовані добові біоплівки *K. pneumoniae*.

Виходячи з рис. 3, під впливом ультразвукового випромінювання добова біомаса ізолятів *K. pneumoniae* характеризувалася

пригніченням здатності до формування біоплівок у 3,6 рази порівняно з контролем ($0,85 \pm 0,38$ й $3,02 \pm 0,25$ од.ош. відповідно, $p \leq 0,05$).

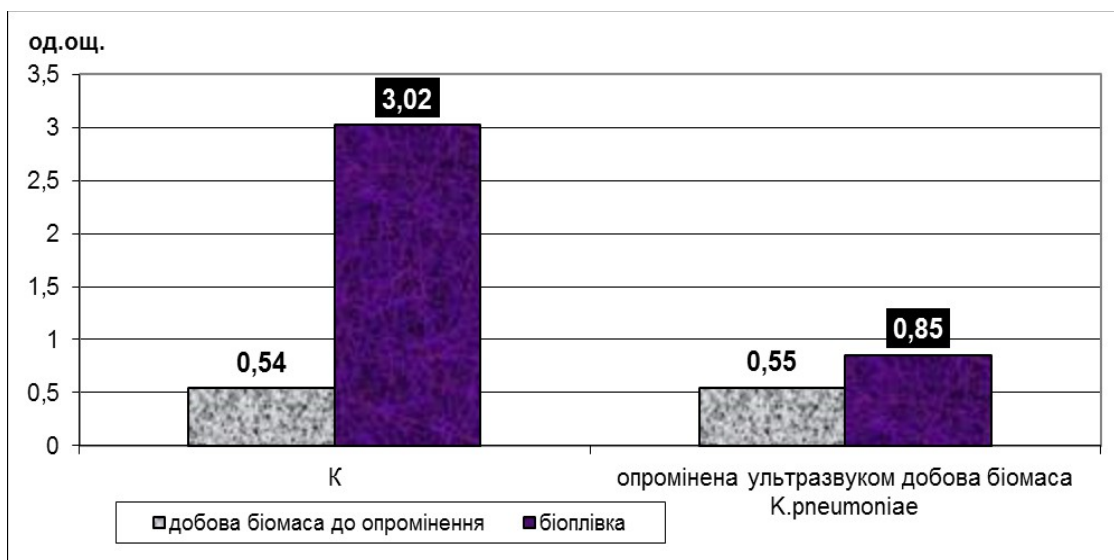


Рис.3. Дія ультразвукового опромінення на добову біомасу штамів *K. pneumoniae*.

Висновки

Аналіз результатів проведеного дослідження показав, що для попередження утворення біоплівок *K. pneumoniae*, а також для пригнічення біоплівок, сформованих *K. pneumoniae*, є доцільним застосування ультразвукового опромінення низької інтенсивності як на планктонні клітини, так й на добову біомасу та біоплівку *K. pneumoniae*.

References

1. Lyamin A.V. Problems in medicine related to bacterial films / Lyamin A.V., Botkin E.A., Zhestkov A.V. // Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. – 2012. – 14(4). – P. 268-275.
2. Behalo V.A. Immunobiological features of bacterial cells in medical biofilms / V.A.Behalo, V.M. Bondarenko, E.V. Sysolyatina [et al.] // Journal of Microbiol. – 2010. – 4. – P. 97-105.
3. Maltsev S.V. What is a biofilm? / Maltsev S.V., Mansurova G.Sh. // Natural Medicine. – 2013. – 1(13). – P. 86-89.
4. Chebotar I.V. Bacterial resistance to antibiotics in biofilms / I.V. Chebotar, A.N. Mayansky, E.D. Konchakova [et al.] // Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. – 2012. – 14 (1). – P. 51-58.
5. Tets V.V. Effect of exogenous proteolytic enzymes on bacteria / V.V. Tets, G.Yu. Knorring, N.K. Artyomenko [et al.] // <http://www.mucos.com.ua/menu/10stati.htm>
6. Microbial Biofilms: Current Research and Applications / Lear G.; Lewis G.D. – Caister Academic Press, 2012 // <https://www.google.com/search?tb=bks:1&q=isbn:9781904455967>
7. Hall-Stoodley L. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases / Hall-Stoodley. L., Costerton J. W., Stoodley P. // Nat Rev Micro. – 2004. – 2(2). – P. 95-108.
8. Gostev V.V. Bacterial biofilms and infections / Gostev V.V., Sidorenko S.V. // Journal of Infectology. – 2010. – 2(3). – P. 4-15.
9. Stahlhut S.G. Biofilm formation of Klebsiella pneumoniae on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae / S.G. Stahlhut, C. Struve, K.A. Krogfelt [et al.] // FEMS Immunol Med Microbiol. – 2012. – 65(2). – P. 350-359.
10. Dennis S. Hansen Recommended Test Panel for Differentiation of Klebsiella Species on the Basis of a Trilateral Interlaboratory Evaluation of 18 Biochemical Tests / Dennis S. Hansen, Hazel M. Aucken, Titi Abiola [et al.] // J Clin Microbiol. – 2004. – 42(8). – P. 3665–3669.
11. Bilko I.P. Requirements for taking and delivering material for microbiological study / Bilko I.P. // Current Infections. – 2001. – №3. – P. 106-109.
12. Guidelines for the use of standardized microbiological (bacteriological) methods in clinical diagnostic laboratories / Annex I to the Order of the Ministry of Health № 535 of 22 April 1985. – 123 p.
13. Patent for Utility Model 47944 Ukraine, IPC G09B23/00. Reproduction of microbial biofilms in vitro / A.Ya. Tsyganenko, M.M. Mishina, R.A. Kurbanov (UA); Kharkiv National Medical University. – № u200910353; Appl. 12.10.2009, Publ. 25.02.2010, Bull. № 4.
14. Patent for Utility Model 81485 Ukraine, IPC G01N21/01. Method of evaluating the effectiveness of low-intensity ultrasound radiation exposure to the destruction of primary biofilms and prevention of the formation of secondary biofilms by microorganisms / Davydenko V.B., Davydenko N.V., Paschenko Yu.V., Mishina M.M., Mishin M.Yu., Katasonov Yu.O., Dubovik O.S., Kharkiv National Medical University. – № u2013 02375, Appl. 25.02.2013, Publ. 06.25.2013, Bull. № 12.
15. Lapach S.N. Statistical methods in biomedical studies using Excel / Lapach S.N., Chubenko A.V., Babich P.N. – K.: MORION, 2000. – 320 p.
16. Methods of statistical processing of medical information for research / V.P. Osipov, E.M. Lukyanova, Yu.G. Antipkin [et al.] – K.: Planet of Humans, 2002. – 200 p.

УДК: 579/842/16:534.321.9

**ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ УЛЬТРАЗВУКОВОГО
ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ЗДАТНІСТЬ ДО
ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВОК ТА СФОРМОВАНИ
БІОПЛІВКИ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

Мозгова Ю.А.

З метою виявлення здатності до утворення біоплівки у *K. pneumoniae* та вивчення впливу ультразвукового випромінювання низької інтенсивності на сформовані біоплівки й їх здатність до агрегації проведено мікробіологічне дослідження матеріалу від хворих з гнійно-запальними захворюваннями. Показано, що ультразвукове випромінювання низької інтенсивності здатне руйнувати сформовані біоплівки *K. pneumoniae* та пригнічувати здатність даного патогену до утворення вторинних біоплівок.

Ключові слова: біоплівка, *Klebsiella pneumoniae*, ультразвукове випромінювання низької інтенсивності.

УДК: 579/842/16:534.321.9

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УЛЬТРАЗВУКОВОГО
ИЗЛУЧЕНИЯ НА СПОСОБНОСТЬ К
ФОРМИРОВАНИЮ БИОПЛЕНОК И
ФОРМИРОВАННЫЕ БИОПЛЕНКИ
*KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

Мозговая Ю.А.

С целью обнаружения способности к образованию биопленок у *K. pneumoniae* и изучения влияния ультразвукового излучения низкой интенсивности на

сформированные биопленки и их способность к агрегации проведено микробиологическое исследование материала от больных гнойно-воспалительными заболеваниями, которое показало, что ультразвуковое излучение низкой интенсивности способно разрушать сформированные биопленки *K. pneumoniae* и подавлять способность данного патогена к образованию вторичных биопленок.

Ключевые слова: биопленка, *Klebsiella pneumoniae*, ультразвуковое излучение низкой интенсивности.

UDK: 579/842/16:534.321.9

**STUDY OF ULTRASOUND RADIATION
INFLUENCE ON ABILITY TO FORM BIOFILMS
AND FORMED BIOFILMS OF *KLEBSIELLA
PNEUMONIAE***

Mozgova Yu.A.

With aim to detect ability to form biofilms in *K. pneumoniae* and to study effects of low-intensity ultrasound radiation on formed biofilms and their aggregation microbiological research of material from patients with pyoinflammatory diseases was performed. It was found that low-intensity ultrasound radiation could destroy formed biofilms of *K. pneumoniae* and decrease ability of this pathogen to form secondary biofilms.

Key words: biofilm, *Klebsiella pneumoniae*, low-intensity ultrasound radiation.