

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ИЗОЛЯТОВ *KLEBSIELLA* *SPP.*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БИОМАТЕРИАЛА И ОБЪЕКТОВ САНИТАРНОГО КОНТРОЛЯ

Ляшенко Е.А., кандидат биологических наук, доцент
Пульчеровская Л. П., кандидат биологических наук, доцент
Дубенцова В. В., студентка
тел. 8(8422) 55-95-47, elena-118@mail.ru
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: бактерии *Klebsiella spp.*,
антибиотикорезистентность, биологические свойства, штаммы

Работа посвящена изучению биологических свойств и антибиотикорезистентности изолятов *Klebsiella spp.*, выделенных из биоматериала и объектов санитарного контроля. В ходе настоящего исследования выделенные штаммы проявили высокую чувствительность к амикацину и фурагину. Штамм KL3, проявил устойчивость к наибольшему количеству антимикробных препаратов - 70 %.

Введение. Возрастающая угроза развития антимикробной резистентности (АМР) обусловлена как обоснованным, так и ненадлежащим применением антибактериальных препаратов для лечения человека и животных и производства продуктов питания, а также связана с неэффективностью мер по контролю распространения инфекционных заболеваний. Рост устойчивости патогенных бактерий к антибиотикам представляет серьезную угрозу для клинической, медицинской и пищевой промышленности [1].

Klebsiella pneumoniae, представитель группы патогенов, является распространённой причиной внутрибольничных инфекций. ВОЗ признала устойчивую к карбапенемам *K. pneumoniae* критически важным патогеном. Эти устойчивые супербактерии способны

образовывать биоплёнки и представляют значительную глобальную угрозу [2].

Информация о наличии антимикробной резистентности у местных патогенных микроорганизмов позволяет выбрать оптимальный курс лечения. Тем не менее, в различных регионах соотношение резистентных бактерий может быть разным, и нередко в учреждениях здравоохранения отсутствуют данные о структуре антимикробной резистентности в данном регионе [3,4,5].

Материалы и методы исследований.

Референс-штаммы *K. oxytoca* ATCC 8724, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *K. pneumoniae* 4, полученные из музейной коллекции штаммов кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновской ГАУ.

Объектами внешней среды для выделения бактерий рода *Klebsiella* послужили 8 образцов, из которых 6 образцов фекалий крупного рогатого скота и 2 сточных вод.

В рамках наших исследований одной из задач было изолировать бактерии рода *Klebsiella* из биоматериала и объектов санитарного контроля. Посевы исследуемого материала и выделение чистых культур микроорганизмов проводили в соответствии с существующими схемами выделения представителей рода *Klebsiella* предложенные Б.С. Киселевой (1985) (с некоторыми дополнениями В.И. Покровского, О.К. Поздеева, 1999), Е.А. Бульканова (2006) ускоренную идентификацию бактерий рода *Klebsiella* при помощи бактериофагов. Метод Отто, также известный как метод стекающей капли, использовался для идентификации неизвестных бактерий с помощью фагов.

Диско-диффузный метод был использован для определения антимикробной резистентности микроорганизмов.

Результаты исследований и их обсуждение. Первичную идентификацию проводили на различных дифференциально-диагностических средах (ДДС) - Эндо, Плоскирева, Левина, МакКонки. На среде Эндо отбирали крупные малиновые колонии, лактозоположительные, слизистые, с металлическим блеском или без него, диаметром 2-5 мм, а также бледно-розовые, мелкие колонии диаметром 1-1,5 мм. На агаре Плоскирева розовые или бледно-желтые, бежевые колонии, на среде Левина - малинового цвета, а на среде МакКонки -

малиновые или бледно-желтые колонии. В результате были отобраны 8 колоний.

Далее проводили бактериоскопию отмеченных колоний по Граму. Были отобраны три штамма KL1, KL3, KL8 по морфологии это грамотрицательные палочки с закругленными концами (рисунок 1).

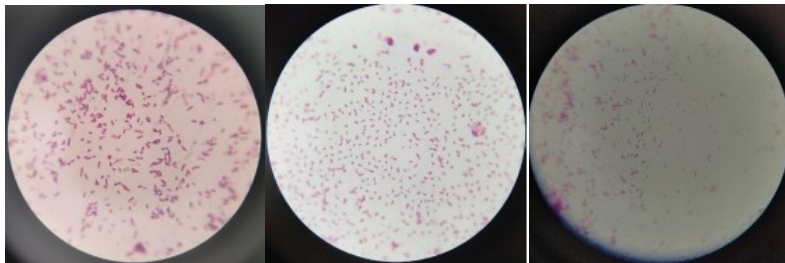


Рис. 1. Окрашенные по Грамму клетки штаммов KL1, KL3, KL8 (слева направо)

Подвижность штаммов KL1, KL3, KL8 определяли посевом «уколом» в 0,3% агар. В результате исследования установлено, что отобранные штаммы неподвижны, рост на среде характеризовали как рост по месту «укола» (рисунок 2.).



Рис. 2. Определение подвижности штаммов KL1, KL3, KL8 (слева направо)

Дальнейшая работа заключалась в фагоиндикации выделенных изолятов *Klebsiella spp.* Для этого применяли коммерческий бактериофаг клебсиелл поливалентный.

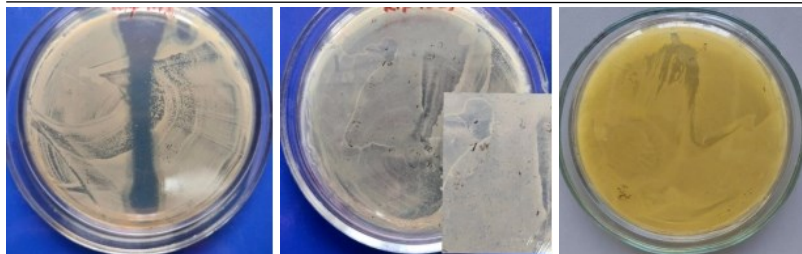


Рис. 3. Фагочувствительность отобранных изолятов KL1, KL3, KL8 методом Отто

Определение фагочувствительности отобранных изолятов проводили методом Отто. В результате изоляты KL1, KL3, KL8 проявили хорошую чувствительность с разной степенью лизиса. KL1 лизировался образуя стерильную каплю, тогда как KL3 и KL8 – с образованием единичных БОЕ (бляшкообразующие единицы) на газоне культуры (рисунки 3).

Дальнейшим шагом в исследовании являлось определение биохимических свойств микроорганизмов, в таблице 1 приведены сводные данные.

С целью оптимизации бактериологической идентификации клебсиелл проводили комплекс следующих тестов: обнаружение сероводорода (-), оценку подвижности (+/-), утилизацию цитрата по методу Симмонса (+/-), реакцию с метиленовым красным (+/-) и реакцию Фогеса-Проскауэра (+/-). Проведение указанных тестов позволяло осуществить дифференциацию клебсиелл от других родов, входящих в семейство *Enterobacteriaceae*. В случае получения соответствующих результатов проводилось дополнительное изучение ферментативных свойств в отношении углеводов, включая глюкозу (+), лактозу (+/-), мальтозу (+), сахарозу (+/-), а также проведение тестов на образование индола (+/-), ферментацию сорбита (+/-), инозита (+/-) и дульцита (+).

Для сравнения реакций использовали результаты биохимических тестов на референс-штаммах.

Таблица 1. Биологические свойства выделенных штаммов

Тест или субстрат	Наименование штамма		
	KL1	KL3	KL8
Подвижность	-	-	-
Образование H ₂ S	-	-	-
Индол	-	-	-
Утилизация цитрата	+	+	+
Реакция MR	-	-	-
Реакция VP	+	+	+
Орнитиндекарбоксилаза	-	-	-
Ферментация: мальтозы	+	+	+
сахарозы	+	+	+
лактозы	+	+	+
дульцита	-	+	-
сорбита	+	+	+
инозита	+	+	+

«+» - положительная реакция, «-» - отрицательная реакция

В соответствии с полученными данными все штаммы бактерий были отнесены к виду *Klebsiella pneumoniae*.

Заключительный этап был направлен на определение антимикробной резистентности выделенных штаммов клебсиелл (таблица 2).

Таблица 2. Определение антибиотикочувствительности выделенных штаммов

Изучаемый антибиотик	Содержание препарата в диске	Диаметр зон задержки роста (мм) на среде		
		KL1	KL3	KL8
Линкомицин	15	2,0	6,0	0
Доксициклин	30	1,0	0	8,0
Амоксициллин	25	10,0	0	20,0
Оксациллин	10	4,0	0	0
Тетрациклин	30	2,0	0	13,0
Норфлоксацин	10	24,0	0	22,0
Эритромицин	15	1,0	0	0
Бензилпенициллин	6	4,0	0	0
Фурагин	300	21,0	20,0	21,0
Амикацин	30	23,0	21,0	19,0

По результатам исследований можно сделать вывод, что бактериальные штаммы проявили высокую чувствительность к амикацину (KL1 – задержка роста 23,0 мм, KL3 – 21,0, KL8 – 19,0), фурагину (KL1 – задержка роста 21,0 мм, KL3 – 20,0, KL8 – 21,0).

Однако самым устойчивым штаммом оказался KL3, он устойчив к наибольшему количеству антибиотиков.

Заключение. В результате проведённых исследований из биоматериала и объектов санитарного контроля нами были изолированы штаммы *Klebsiella pneumoniae* с высокой антимикробной резистентностью к амикацину и фурагину. Штамм KL3, проявил устойчив к наибольшему количеству антимикробных препаратов - 70 %.

Библиографический список:

1. Sun Z. Et al. Vulvovaginal candidiasis and vaginal microflora interaction: Microflora changes and probiotic therapy //Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2023. – Т. 13. – С. 1123026.

2. Ляшенко, Е.А. Разработка схемы фагоидентификации бактерий рода *Klebsiella* / Е.А. Ляшенко, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Г.Р. Садртдинова, Д.А. Самойлов // В книге: Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности. Материалы Четвертой научно-практической конференции с международным участием к 70-летию профессора В.А. Алешкина. - 2018. - С. 52.

3. Майоров, П.С. изучение патогенности полевых штаммов бактерий *Xanthomonas campestris* / П.С. Майоров, Н.А. Феоктистова, Е.А. Ляшенко, В.С. Хайсанова.// Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2022. - № 4(60). - С. 129-132.

4. Maiorov, P.S. Selection of the most prospective strains for inclusion in the composition of a biopreparation on the basis of cellulose-destroying microorganisms / P.S. Maiorov, E.A. Lyashenko, N.A. Feoktistova, E.V. Suldina, E.E. Atamanova //В сборнике: Ensuring sustainable development: agriculture, ecology, energy and Earth science (IOP Conference Series: Earth and Environmental). Science II International scientific and practical conference. Bristol, BS2 OGR, United Kingdom, 2023. С. 12031.

5. Maiorov, P.S. Isolation of cellulolytic bacteria from cultivatedsoil samples / P.S. Maiorov, E.A. Lyashenko, N.A. Feoktistova, E.V. Suldina, E.E. Atamanova // В сборнике: VI International Conference on Actual Problems of the Energy Complex and Environmental Protection (APEC-VI-2023). Les Ulis, 2023. С. 02065.

**TUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES AND ANTIBIOTIC
RESISTANCE OF KLEBSIELLA SPP. ISOLATES ISOLATED
FROM BIOMATERIAL AND SANITARY CONTROL OBJECTS**

**Lyashenko E.A., Pulcherovskaya L. P., Dubentsova V. V.
FSBEI HE Ulyanovsk SAU**

Keywords: *Klebsiella spp. bacteria, antibiotic resistance, biological properties, strains.*

The work is devoted to the study of biological properties and antibiotic resistance of Klebsiella spp. isolates isolated from biomaterial and sanitary control objects. In the course of this study, the isolated strains showed high sensitivity to amikacin and furagin. The KL3 strain showed resistance to the largest number of antimicrobial drugs - 70%.