

# Оценка способности *Klebsiella pneumoniae* образовывать биопленку

С.В.Титова, А.С.Анисимова, Н.В.Аронова

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

*Klebsiella pneumoniae* является условно-патогенным микроорганизмом, который может вызывать заболевания человека. Образование биопленки является одним из факторов персистенции и вирулентности штаммов.

**Цель работы** – оценка способности классических и гипермукоидных вариантов штамма *K. pneumoniae* образовывать биопленку на абиотических субстратах в разных питательных средах.

**Материалы и методы.** Исследованы штаммы, выделенные от больных с внебольничной пневмонией, разных морфотипов: классические и гипермукоидные. Формирование биопленок изучали на разных абиотических субстратах (полистирол и стекло), питательных средах при разной исходной концентрации бактерий, согласно общепринятой и авторской методикам.

**Результаты.** Интенсивность прироста (ИП) бактериальных масс в первые сутки была на высоком уровне у штаммов всех морфотипов, что свидетельствовало об их способности размножаться в питательных средах – МПА и бульон LB) при температуре 37°C. ИП бактериальной массы в LB-бульоне был выше, чем в МПА однако это не повлияло на дальнейшее формирование биопленки. Адгезия к гидрофобным поверхностям (полистироловым лункам) и к гидрофильной поверхности стекла, формирование биопленки всех морфотипов штаммов *K. pneumoniae*, культивируемых в питательных бульонах, имела штаммовые различия. Все штаммы гипермукоидной группы сформировали биопленки в первые сутки.

**Заключение.** Штаммы *K. pneumoniae* гипермукоидной и классической группы способны формировать биопленки в высокопитательных средах, на гидрофильных и гидрофобных абиотических поверхностях в разные сроки. Внутри групп штаммы *K. pneumoniae* отличались по степени биопленкообразования, которая зависела от их исходных концентраций.

**Ключевые слова:** биопленка, *Klebsiella pneumoniae*, классический морфотип, гипермукоидный морфотип, абиотический субстрат

**Для цитирования:** Титова С.В., Анисимова А.С., Аронова Н.В. Оценка способности *Klebsiella pneumoniae* образовывать биопленку. Бактериология. 2024; 9(3): 83–91. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-83-91

## Assessment of the ability of *Klebsiella pneumoniae* to form biofilm

S.V.Titova, A.S.Anisimova, N.V.Aronova

Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation

*Klebsiella pneumoniae* is an opportunistic microorganism that can cause human disease. Biofilm formation is one of the factors of persistence and virulence of strains.

**Aim** – assessment of the ability of *K. pneumoniae* classical and hypermucooid strains to form a biofilm on abiotic substrates in different nutrient media.

**Materials and methods.** Strains isolated from patients with community-acquired pneumonia of different morphotypes were studied: classical and hypermucooid. The formation of biofilms was studied on different abiotic substrates (polystyrene and glass), nutrient media at different initial concentrations of bacteria, according to generally accepted and proprietary methods.

**Results.** The growth rate (PI) of bacterial masses on the first day was at a high level in strains of all morphotypes, which indicated their ability to multiply in nutrient media (MPA and LB broth) at a temperature of 37°C. The PI of the bacterial mass in LB broth is higher than in MPA, but this did not affect the further formation of biofilm. Adhesion to hydrophobic surfaces (polystyrene wells) and to the hydrophilic surface of glasses, the formation of a biofilm of all morphotypes of *K. pneumoniae* strains cultivated in nutrient broths had strain differences. All strains of the hypermucooid group formed biofilms on the first day.

**Conclusion.** *K. pneumoniae* strains of the hypermucooid and classical groups are capable of forming biofilms in highly nutritious environments, on hydrophilic and hydrophobic abiotic surfaces at different times. Within the groups, *K. pneumoniae* strains differed in the degree of biofilm formation, which depended on their initial concentrations.

**Key words:** biofilm, *Klebsiella pneumoniae*, classical morphotype, hypermucooid morphotype, abiotic substrate

**For citation:** Titova S.V., Anisimova A.S., Aronova N.V. Assessment of the ability of *Klebsiella pneumoniae* to form biofilm. Bacteriology. 2024; 9(3): 83–91. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-83-91

### Для корреспонденции:

Титова Светлана Викторовна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40  
Телефон: +7 9034036869

Статья поступила 19.03.2024, принята к печати 30.09.2024

### For correspondence:

Svetlana V. Titova, PhD, MD, leading researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

Address: 117/40 M.Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation  
Phone: +7 9034036869

The article was received 19.03.2024, accepted for publication 30.09.2024

**О**бразование биопленок (БП) – одна из основных причин персистенции патогенных бактерий, вызывающих у человека тяжелые заболевания и вспышки внутрибольничных инфекций. Это универсальное свойство микроорганизмов является одним из факторов вирулентности, способствует колонизации живых тканей и медицинских изделий и обуславливает снижение чувствительности к противомикробным препаратам [1–3].

*Klebsiella pneumoniae* – вид грамотрицательных факультативно-анаэробных капсульных бактерий, относящийся к условно-патогенным микроорганизмам, которые могут играть важную роль в инфекционной патологии человека за счет способности вызывать заболевания в мочевыводящих и дыхательных путях, крови и мягких тканях, а также являться частой причиной внутрибольничных инфекций [4–7].

В научной литературе содержится информация о способности *K. pneumoniae* формировать БП как на абиотических поверхностях, например на медицинских устройствах и катетерах, так и на тканях человека [7–9]. В соответствии с фенотипическими и генотипическими характеристиками *K. pneumoniae* можно разделить на классические (сКР) и гипервирулентные (hvКР) морфотипы. Классическая форма может эволюционировать в гипервирулентную путем приобретения плазмиды, несущей гены устойчивости к карбапенемам [10] или гены гипервирулентности, в частности гены гипермуковязкого фенотипа (*rmpA* и *rmpA2*) [11]. Одним из факторов, способствующих образованию БП от начальной стадии адгезии до созревания, является полисахаридная капсула, которая может защищать бактерии от антимикробных соединений, повышая их вирулентные свойства [12]. Из всех существующих на данный момент способов самым простым и быстрым методом *in vitro* является изучение биопленкообразования бактерий на 96-луночном планшете. *K. pneumoniae* обычно образует БП на границе «жидкость – твердое тело», прикрепляясь ко дну лунки; массу БП оценивают после окрашивания кристаллическим фиолетовым [8, 13–17].

**Цель работы** – оценка способности штаммов *K. pneumoniae* классических и гипермукоидных морфотипов образовывать биопленку на абиотических субстратах в разных питательных средах.

## Материалы и методы

Исследованы 10 штаммов *K. pneumoniae*, выделенные от больных с внебольничной пневмонией в период 2021–2022 гг. на базе ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора. Культуры изолированы и идентифицированы с помощью комплексного подхода, включающего использование микробиологических и современных молекулярно-биологических методов – MALDI-TOF масс-спектрометрии.

По фенотипическому признаку (морфология колоний, стринг-тест, толщина капсулы) штаммы были разделены на группы классические и гипермукоидные. В классическую группу вошли 5 штаммов *K. pneumoniae* (K203, I7766, I9941, I7498, I7762кр), в группу гипермукоидных – также 5 штаммов (I9939, 9932, 6865, 7762р, 9537).

Формирование БП изучали на разных абиотических субстратах (полистирол и стекло), питательных средах при раз-

ной стартовой концентрации бактерий по ранее описанному методу, оценивая способность клеток холерных вибрионов к адгезии на полистироловой поверхности планшета с окрашиванием их генцианвиалетом [18]. Для адгезии использовали 96-луночные полистироловые планшеты с плоскодонными лунками. Суспензии готовили из суточных агаровых культур по отраслевому стандарту мутности Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича (ОСО-42-25-59-86П) или измеряли с помощью прибора Densi-La-Meter. Далее с помощью последовательных 10-кратных разведений готовили взвеси культур в концентрациях  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  КОЕ/мл, вносили по 200 мкл в полистироловые лунки планшета, измеряли их оптическую плотность (ОП), величину которой принимали за стартовую. В качестве отрицательного контроля использовали лунки со стерильными питательными средами (мясопептонный бульон (МПБ) и бульон LB). Планшеты культивировали в условиях влажной камеры при 37°C в течение суток. Через 2, 4, 6, 20, 24 ч рост планктонной культуры оценивали на спектрофотометре MultiscanPlus при длине волны 620 нм и выражали в условных единицах ОП. Регистрировали ОП бактериальной суспензии в полистироловых лунках совместно с клетками, которые адгезировали на дне лунок. ОП бактериальной суспензии в физиологическом растворе использовали для сравнения способности микробных клеток размножаться в питательных средах. Оценивали интенсивность прироста (ИП) бактериальной суспензии по формуле [8]:

$$\text{ИП} = \text{ОП}_{24} : \text{ОП}_0, \quad (1)$$

где  $\text{ОП}_{24}$  – оптическая плотность суспензии бактерий через 24 ч культивирования,

$\text{ОП}_0$  – исходная оптическая плотность.

Значения ИП в контрольных средах были равны  $\leq 1$ , в физиологическом растворе – стартовым величинам плотности культуры.

Значения ИП оценивали следующим образом: 1–2 – прирост отсутствовал, 2–3 – незначительный/сомнительный,  $\geq 3$  – высокий/значительный.

Для определения способности штаммов формировать БП сначала определяли контрольное значение оптической плотности (ОПК), за которое принимали минимальное значение ОП контрольных лунок, превышение которого можно интерпретировать как способность к формированию БП (степень биопленкообразования), по формуле [19]:

$$\text{ОПК} = M_{\text{cp}} (\text{ОП лунок контроля}) + 3 \times \sigma (\text{ОП лунок контроля}), \quad (2)$$

где  $M_{\text{cp}}$  – среднее арифметическое значение ОП контрольной лунки,  $\sigma$  – среднее квадратичное (стандартное) отклонение контрольных значений.

На основании полученных на спектрофотометре данных для каждого штамма рассчитывали среднее арифметическое значение ОП. Оценивали степень биопленкообразования по значениям ОП окрашенного растворителя (спирт), согласно [20]. При  $\text{ОП} \geq 4$  ОПК биопленкообразование считали высоким; 2–4 ОПК – умеренным;  $\leq 2$  ОПК – низким;  $\leq 1$  ОПК – отсутствует.

Для изучения способности бактериальных клеток формировать БП на гидрофильной абиотической поверхности использовали стеклянные пробирки [21] и покровные стекла [22]. Для этого штаммы *K. pneumoniae* в исходной concentra-

ции  $10^7$  КОЕ/мл переносили в стеклянные пробирки с МПБ и оставляли на сутки в термостате при 37°C. Через сутки отбирали содержимое пробирок, промывали дистиллированной водой и заливали пробирки 1%-м раствором генцианвиолета (1 мл, 30 мин при комнатной температуре), далее промывали 2–3 раза дистиллированной водой. Учет производили качественно по визуальному признаку – синему кольцу на стенках стеклянных пробирок.

Адгезию клеток *K. pneumoniae* к поверхности покровных стекол и формированию БП наблюдали в динамике, используя методы световой и люминесцентной микроскопии [22]. Жизнеспособность планктонной и биопленочной форм *K. pneumoniae* учитывали по наличию роста на мясопептонном агаре (МПА). Для этого покровные стекла размещали в пенициллиновых флаконах (пенфлаконах), одно стекло на один пенфлакон, и вносили среды культивирования до полного их погружения. Через определенные промежутки времени вынимали стерильным пинцетом стекла из каждой пробы, промывали их забуференным физиологическим раствором (PBS) и в вертикальном положении помещали на листы фильтровальной бумаги, расположенные в чашке Петри, для удаления с их поверхности оставшейся жидкости. После этого стекла накладывали на поверхность агара, отпечатывали с одной и другой стороны на агаровой пластине, оставляли в термостате при 37°C и на следующие сутки регистрировали наличие роста колоний. Второе стекло помещали на предметное стекло, добавляли раствор акридинового оранжевого в концентрации 20 мкг/мл (прижизненное флуорохромирование), накрывали покровным стеклом большего размера и исследовали методом люминесцентной микроскопии. Для световой микроскопии использовали фикси-

рованные микропрепараты с двойным окрашиванием Конго красным в течение 15 мин, затем фуксином – 10 мин [23].

Способность штаммов формировать БП изучали на разных средах: МПБ, бульон LB, в качестве сравнения использовали PBS.

Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Статистический анализ выполняли с использованием программы Medstatistica.ru. Полученные данные объединяли в вариационные ряды, на основании которых проводили расчет средних арифметических величин ( $M$ ). В качестве ошибки среднего представляли стандартное отклонение ( $\sigma$ ) и относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации, CV). Статистическую значимость различий экспериментальных данных оценивали с помощью критерия Стьюдента, при уровне значимости  $p \leq 0,05$  достоверность считали значимой.

### Результаты исследования

Все исследуемые штаммы классической и гипермукоидной групп обладали хорошим ростом, что отражалось в значениях ОП как показателя количества клеток за сутки культивирования в испытуемых питательных средах (табл. 1, 2). Концентрация клеток *K. pneumoniae* в группе классических штаммов, культивируемых в МПБ, колебалась в пределах ОП 0,53–0,92, в группе гипермукоидных показатель ОП варьировал от 0,54 до 0,67. При культивировании классических штаммов в бульоне LB показатель ОП находился в диапазоне 0,51–0,96, гипермукоидных – 0,57–0,99. Несмотря на полученные разные значения ОП, что наглядно изображено на рис. 1, 2, статистически не подтверждено этого различия

Таблица 1. Средняя концентрация клеток *K. pneumoniae* в питательной среде МПБ  
 Table 1. Average concentration of *K. pneumoniae* cells in the nutrient medium – MPB

Время, ч/ Time, h	№№ штаммов / strains										
	203	7766	9941	7498	7762кр	9939	9932	6865	7762р	9537	КПср
	Классические / Classic					Гипермукоидные / Hypermucooid					
	Средняя концентрация клеток <i>K. pneumoniae</i> в планктонном состоянии и стандартное отклонение ( $M \pm \sigma$ , м.к./мл) / Average concentration of <i>K. pneumoniae</i> cells in the planktonic state and standard deviation ( $M \pm \sigma$ , m.c./ml)										
0	0,09 ± 0,0	0,1 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,0	0,01 ± 0,0	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,02
24	0,71 ± 0,12	0,53 ± 0,0	0,92 ± 0,02	0,62 ± 0,02	0,92 ± 0,03	0,63 ± 0,08	0,57 ± 0,05	0,54 ± 0,02	0,62 ± 0,06	0,67 ± 0,01	0,07 ± 0,0
Σ	M = 0,74 ± 0,18; CV = 23,81%; m = 0,09					M = 0,61 ± 0,05; CV = 8,46%; m = 0,03					
	Значение t-критерия Стьюдента: 1,37 / Student's t-test value: 1.37 Различия статистически не значимы ( $p = 0,212914$ ) / The differences are not statistically significant ( $p = 0.212914$ )										
В табл. 1 и 2 исходное значение соответствует показателю «время 0». / In tables 1 and 2, the initial value corresponds to the "time 0" indicator.											

Таблица 2. Средняя концентрация *K. pneumoniae* разных штаммов в бульоне LB  
 Table 2. Average concentration of *K. pneumoniae* of different strains in LB broth

Время, ч/ Time, h	№№ штаммов / strains										
	203	7766	9941	7498	7762кр	9939	9932	6865	7762р	9537	КПср
	Средняя концентрация клеток <i>K. pneumoniae</i> в планктонном состоянии и стандартное отклонение ( $M \pm \sigma$ , м.к./мл) / Average concentration of <i>K. pneumoniae</i> cells in the planktonic state and standard deviation ( $M \pm \sigma$ , m.c./ml)										
0	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,0	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,0	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,0
24	0,86 ± 0,05	0,51 ± 0,03	0,74 ± 0,04	0,57 ± 0,04	0,96 ± 0,02	0,63 ± 0,06	0,99 ± 0,03	0,57 ± 0,02	0,76 ± 0,12	0,74 ± 0,04	0,05 ± 0,0
Σ	0,73 ± 0,19; 26,05%; m = 0,09					0,74 ± 0,16; 21,05%; m = 0,08					
	Значение t-критерия Стьюдента: 0,08 / Student's t-test value: 0,08 Различия статистически не значимы ( $p = 0,936140$ ) / The differences are not statistically significant ( $p = 0,936140$ )										

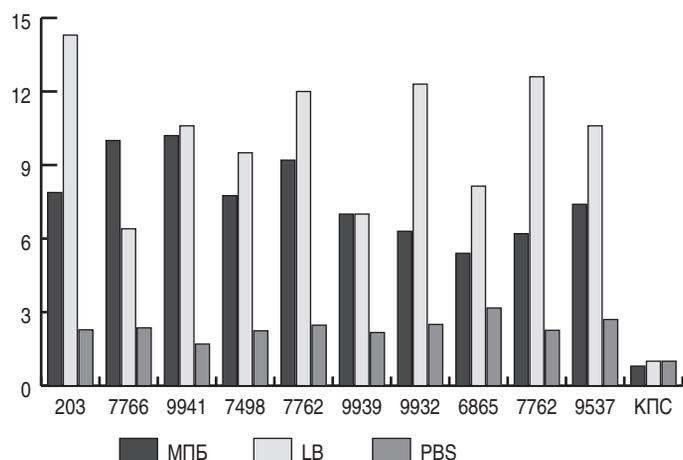


Рис. 1. Показатель интенсивности прироста микробных клеток штаммов *K. pneumoniae*: КПС – контроль питательной среды; по оси абсцисс – №№ штаммов; по оси ординат – значения показателя ИП.

Fig. 1. The growth rate of microbial cells of *K. pneumoniae* strains: KPS – control of the nutrient medium; along the abscissa axis – strain numbers; along the ordinate axis – the values of the IP indicator.

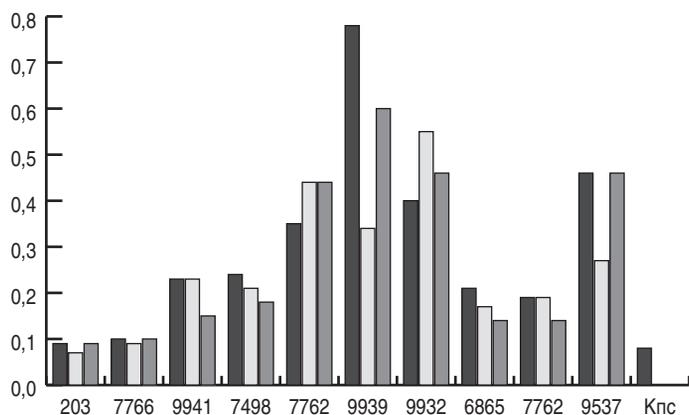


Рис. 2. Зависимость биопленкообразования штаммов *K. pneumoniae* от стартовой концентрации: ■ –  $10^6$  КОЕ/мл; □ –  $10^7$  КОЕ/мл; ▒ –  $10^8$  КОЕ/мл; КПС – контроль; по оси абсцисс – № штаммов; по оси ординат – ОП биопленкообразования.

Fig. 2. Dependence of biofilm formation of *K. pneumoniae* strains on the starting concentration: ■ –  $10^6$  CFU/ml; □ –  $10^7$  CFU/ml; ▒ –  $10^8$  CFU/ml; KPS – control; along the abscissa axis – No of strains; along the ordinate axis – OD of biofilm formation.

при культивировании в МПБ ( $p = 0,212914$ ) и в бульоне LB ( $p = 0,936140$ ). Концентрация клеток *K. pneumoniae* всех штаммов, независимо от групповой принадлежности, значительно превышала их исходное значение, что свидетельствовало о высокой способности к размножению.

Интенсивность прироста клеток *K. pneumoniae*, взятых в исходной концентрации  $10^7$  КОЕ/мл, в испытуемых средах определяли согласно формуле 1, показатель ИП микробных клеток классических и гипермукоидных штаммов, культивируемых в бульоне LB, в 7 пробах был выше, чем показатель ИП в МПБ, и значительно превышал показатель в PBS.

Согласно результатам, представленным на рис. 1, ИП микробных клеток *K. pneumoniae* классических и гипермукоидных штаммов, взятых в эксперимент, за сутки культивирования в исследуемых питательных средах была значительной, т.е., согласно формуле (2), значение показателя ИП бактериальной суспензии клеток было выше трех установленных для штаммов обоих морфовариантов, культивируемых в МПБ и бульоне LB, что подтверждается статистической достоверностью ( $p \leq 0,05$ ). Обращает на себя внимание показатель ИП у 7 штаммов из 10, который на бульоне LB был выше, чем на МПБ, однако при сравнении показателя ИП между двумя группами штаммов связь была статистически не значимой, следовательно, нет преимущества в выборе питательных сред между МПБ и бульоном LB при культивировании штаммов *K. pneumoniae*. Поэтому в дальнейших экспериментах мы использовали МПБ.

В следующих экспериментах было изучено биопленкообразование классических и гипермукоидных морфовариантов клебсиелл в зависимости от их исходных концентраций с использованием среды МПБ. Результаты представлены на рис. 2, оценка степени биопленкообразования – в табл. 3.

При сравнении суммарных результатов ОП клеток *K. pneumoniae* в биопленочной форме классических и гипермукоидных штаммов в одинаковых исходных концентрациях при культивировании в МПБ статистически достоверных различий не выявлено ( $p \geq 0,05$ ). Значимая связь ( $p \leq 0,05$ ) установлена между отдельными штаммами внутри самих групп (*K. pneumoniae* 203 и 7762кр или 9932 и 7762р).

Оценку степени биопленкообразования проводили согласно формуле 2, где превышение значений ОПК – это способность к биопленкообразованию [12]. Результаты представлены в табл. 3. Через сутки культивирования в МПБ классических и гипермукоидных штаммов *K. pneumoniae* взятых в разных исходных концентрациях ( $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  КОЕ/мл), определяли ОП. Полученные результаты свидетельствуют о межштаммовых различиях.

Результаты, представленные в табл. 3, показывают, что из пяти штаммов *K. pneumoniae* классической группы у двух (203 и 7766) вне зависимости от их исходных концентраций биопленкообразование в первые сутки не происходило. У трех штаммов (7762кр, 9941, 7498) степень биопленкообра-

Таблица 3. Оценка степени биопленкообразования штаммов <i>K. pneumoniae</i> при их исходных концентрациях: $10^6$ , $10^7$ и $10^8$ КОЕ/мл											
Table 3. Assessment of the degree of biofilm formation of <i>K. pneumoniae</i> strains at their initial concentrations: $10^6$ , $10^7$ and $10^8$ CFU/ml											
Стартовая концентрация, КОЕ/мл / Starting concentration, CFU/ml	№№ штаммов / strains										
	203	7766	9941	7498	7762кр	9939	9932	6865	7762р	9537	КПС
	Классические / Classical					Гипермукоидные / Hypermucooid					
$10^6$	0	0	У	У	У	З	У	Н	Н	З	0
$10^7$	0	0	У	Н	У	У	З	Н	Н	У	
$10^8$	0	0	Н	Н	У	З	З	Н	Н	З	

КПС – контроль питательной среды; 0 – отсутствует; У – умеренная; З – значительная; Н – низкая. / KPS – nutrient medium control; 0 – absent; У – moderate; З – significant; Н – low.

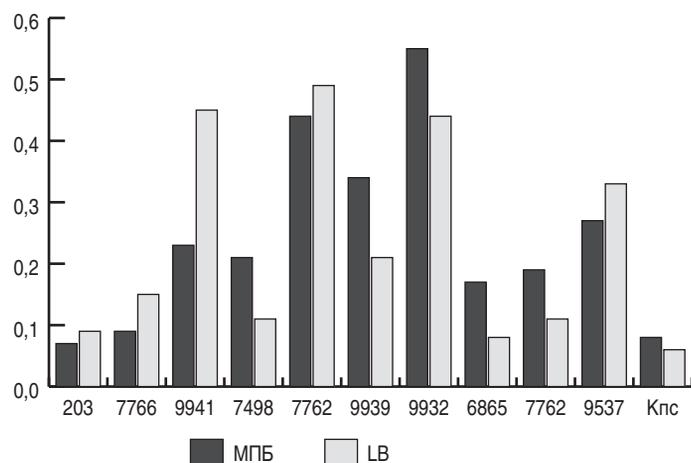


Рис. 3. Степень биопленкообразования штаммов *K. pneumoniae* в разных питательных средах: КПС – контроль питательной среды; по оси абсцисс – № штамма; по оси ординат – ОП биопленкообразования.

Fig. 3. Degree of biofilm formation of *K. pneumoniae* strains in different nutrient media: KPS – nutrient medium control; abscissa axis – strain number; ordinate axis – OD of biofilm formation.

зования согласно формуле 2 характеризовалась умеренными значениями в зависимости от исходной концентрации. Так, у штамма *K. pneumoniae* 7762кр при всех изученных концентрациях и у штамма 9941 при концентрации  $10^6$  и  $10^7$  степень биопленкообразования была умеренной, а при  $10^8$  КОЕ/мл – низкой; у штамма 7498 при концентрации  $10^6$  КОЕ/мл – умеренной, при  $10^7$  и  $10^8$  КОЕ/мл – низкой. В группе гипермукоидных все 5 штаммов в течение первых суток прикреплялись ко дну лунки. Формирование БП зависело от начальной концентрации: так, значительная степень биопленкообразования была у штамма 9939 при стартовых концентрациях  $10^6$  и  $10^8$ , умеренная – при  $10^7$  КОЕ/мл; у штамма 9932 – значительная степень биопленкообразования при  $10^7$  и  $10^8$  КОЕ/мл, умеренная – при  $10^6$ , у штамма

9537 значительная степень биопленкообразования при  $10^6$  и  $10^8$  и умеренная – при  $10^7$  КОЕ/мл. В то же время у двух гипермукоидных штаммов (6865, 7762р) при всех изучаемых стартовых концентрациях зарегистрирована низкая степень формирования БП. Обращает на себя внимание тот факт, что при максимальной посевной дозе  $10^8$  КОЕ/мл показатели степени биопленкообразования у штаммов не превышали значения в пробах, где использовали меньшие посевные дозы.

На следующем этапе было изучено влияние разных питательных сред на биопленкообразование штаммов *K. pneumoniae* классических и гипермукоидных групп ( $10^7$  КОЕ/мл). Результаты представлены на рис. 3 и в табл. 4.

При сравнении результатов ОП БП бактерий классической и гипермукоидных групп между собой при их культивировании в бульоне LB и МПБ статистически достоверных различий не выявлено, несмотря на высокую ИП бактериальных клеток в бульоне LB. При культивировании *K. pneumoniae* в МПБ выявлены штаммы внутри гипермукоидной группы с высокой биопленкообразующей способностью, подтвержденной значимой связью ( $p \leq 0,05$ ), а в классической группе отличий в формировании БП у штаммов не было ( $p \geq 0,05$ ).

В табл. 4 приведена оценочная градация степени биопленкообразования.

Согласно расчетам, проведенным по формуле 2, где превышение ОГК интерпретируется как способность к формированию биопленки, через 1 сутки культивирования в разных питательных средах определены штаммовые различия *K. pneumoniae* по степени биопленкообразования в каждой группе. В классической группе у штамма *K. pneumoniae* 203 формирование БП отсутствовало во всех питательных средах. У штамма 7766 формирование БП в низкой степени было при культивировании в бульоне LB и отсутствовало при использовании МПБ. У штамма 7498 в двух средах биопленкообразование было в низкой степени. Два штамма – 9941 и

Таблица 4. Оценка степени биопленкообразования штаммов *K. pneumoniae* в разных питательных средах  
Table 4. Evaluation of the degree of biofilm formation of *K. pneumoniae* strains in different nutrient media

ПС	№№ штаммов / strains										КПС
	203	7766	9941	7498	7762кр	9939	9932	6865	7762р	9537	
	Классические / Classical					Гипермукоидные / Hypermucoid					
МПБ	О	О	У	Н	З	У	З	Н	Н	У	О
LB	О	Н	З	Н	З	У	З	О	Н	У	О

ПС – питательные среды; КПС – контроль питательной среды; О – отсутствует; У – умеренная; З – значительная; Н – низкая. / PS – nutrient media; KPS – nutrient medium control; O – absent; Y – moderate; Z – significant; H – low.

Таблица 5. Качественная (визуальная) оценка степени биопленкообразования штаммов *K. pneumoniae*  
Table 5. Qualitative (visual) assessment of the degree of biofilm formation of *K. pneumoniae* strains

Стартовая концентрация, КОЕ/мл / Starting concentration, CFU ml	Биопленкообразование на разделе фаз / Biofilm formation at phase separation	№№ штаммов / strains										
		203	7766	9941	7498	7762кр	9939	9932	6865	7762р	9537	
		Классические / Classical					Гипермукоидные / Hypermucoid					
$10^6$	кольцо / ring	-	+	++++	+/-	++++	++++	++++	++++	++++	+/-	+/-
$10^7$	кольцо / ring	+/-	+	++++	+	+	++++	++++	++++	++++	-	+/-
$10^8$	кольцо / ring	+	+	++++	-	++++	++++	++++	++++	++++	+	++++

++++ – четкое кольцо на разделе фаз жидкость/воздух; + – тонкое кольцо на разделе фаз; +/- – кольцо не четкое; -- отсутствие кольца. / ++++ – clear ring at the liquid/air phase boundary; + – thin ring at the phase boundary; +/- – the ring is not clear; -- no ring.

Таблица 6. Характеристика штаммов *K. pneumoniae* разных морфотипов по степени интенсивности прироста микробных клеток и степени биопленкообразования  
 Table 6. Characteristics of *K. pneumoniae* strains of different morphotypes according to the intensity of microbial cell growth and the degree of biofilm formation

Показатель / Index	Градация / Gradation	Доля штаммов / Proportion of strains, %			
		классические / classic		гипермукоидные / hypermucoid	
		МПБ	LB	МПБ	LB
Интенсивность прироста / Growth rate	отсутствует / absent	0	0	0	0
	слабая / weak	0	0	0	0
	значительная / significant	100	100	100	100
Степень биопленкообразования / Degree of biofilm formation	отсутствует / absent	40	20	0	20
	слабое / низкое weak / low	20	40	40	20
	умеренное / moderate	20	0	40	40
	значительное / significant	20	40	20	20
Четкое кольцо на стеклянный стенках / Clear ring on glass walls	++++	40	нд	80	нд

нд – нет данных. / nd – no data.

7498 – проявили умеренную и значительную степени биопленкообразования в МПБ и бульоне LB соответственно.

В группе гипермукоидных штаммов биопленкообразование в низкой степени в двух средах было у штаммов 7762p и 6865, у последнего – отсутствовало в бульоне LB, в умеренной степени – у двух штаммов 9939 и 9537 и в значительной – у штамма 9932.

С помощью качественного метода (образования кольца на стенках стеклянных пробирок) при культивировании в МПБ исследована способность к формированию БП на разделе фаз жидкость/воздух и адгезии на гидрофильных поверхностях. Полученные данные подтвердили результаты вышеописанного эксперимента о штаммовой гетерогенности по биопленкообразующей способности. Результаты адгезии клеток к стенкам гидрофильной поверхности представлены в табл. 5.

Из результатов, представленных в табл. 5, видно, что штаммы *K. pneumoniae* классической и гипермукоидной групп способны к формированию БП на гидрофильных поверхностях. Если в классической группе из пяти штаммов только у двух было сформировано четкое кольцо, то в группе гипермукоидных штаммов четкое кольцо сформировалось у четырех штаммов при исходной концентрации  $10^8$  КОЕ/мл. Нами было отмечено, что у штамма 9537 при  $10^8$  КОЕ/мл и при других стартовых концентрациях отмечалось только окрашивание стенок пробирок или тонкое кольцо.

Все представленные выше результаты экспериментов по ИП микробных клеток и формированию БП в питательных средах выражены в процентном выражении, анализ данных представлен в табл. 6, где за 100% было принято общее количество штаммов каждой группы.

По результатам, представленным в табл. 6, показано 100%-е увеличение количества микробных клеток через сутки у всех исследуемых штаммов при культивировании в бульонных средах. ИП в PBS всех исследуемых штаммов оставалась на уровне исходных значений. Формирование БП учитывали на питательных средах в течение первых суток. В 20% случаев адгезия клеток *K. pneumoniae* обоих морфотипов при культивировании в бульоне LB не происхо-

дила. В 40% случаев у штаммов классической группы отсутствовала адгезия клеток ко дну полистироловой лунки при культивировании в МПБ; напротив, все штаммы гипермукоидной группы адгезировались и образовали выраженную в той или иной степени БП.

Штаммы классической группы проявляли низкую степень биопленкообразования: на МПБ – в 20% случаев, на бульоне LB – в 40%, в гипермукоидной группе – в 40 и 20% случаев соответственно. Умеренная степень биопленкообразования была у штаммов гипермукоидной группы в 40% случаев на МПБ и бульоне LB и только в 20% случаев у штаммов классической группы на МПБ. Степень биопленкообразования в 40% случаев была значительно выражена у штаммов классической и в 20% – гипермукоидной групп при культивировании в бульоне LB и по 20% – в МПБ.

В качественной реакции «образование кольца на стеклянной поверхности пробирки» при культивировании в МПБ оно четко регистрировалось у 80% штаммов гипермукоидной группы и у 40% классической группы.

Для изучения формирования БП в динамике при температуре 37°C мы использовали покровные стекла, среда культивирования – МПБ. В качестве модели использовали штаммы разных морфотипов, а именно *K. pneumoniae* K203 классической группы, который при культивировании в МПБ и бульоне LB в лунках полистиролового планшета через сутки не формировал БП, и штамм *K. pneumoniae* I9939 гипермукоидной группы, который через сутки сформировал биопленку в умеренной степени при культивировании в МПБ и бульоне LB.

По результатам бактериологического исследования – отпечатывания БП на пластинке МПА – через двое суток отмечали типичный сливной рост культур двух штаммов разных морфотипов. На рис. 4 представлены микропрепараты БП, образованных на покровных стеклах двух штаммов. Витальные микроскопические препараты состояли из подвижных клеток, конгломератов клеток разных размеров зеленого цвета, которые наслаивались друг на друга во всех полях зрения. При использовании световой микроскопии методом двойного окрашивания были обнаружены клетки

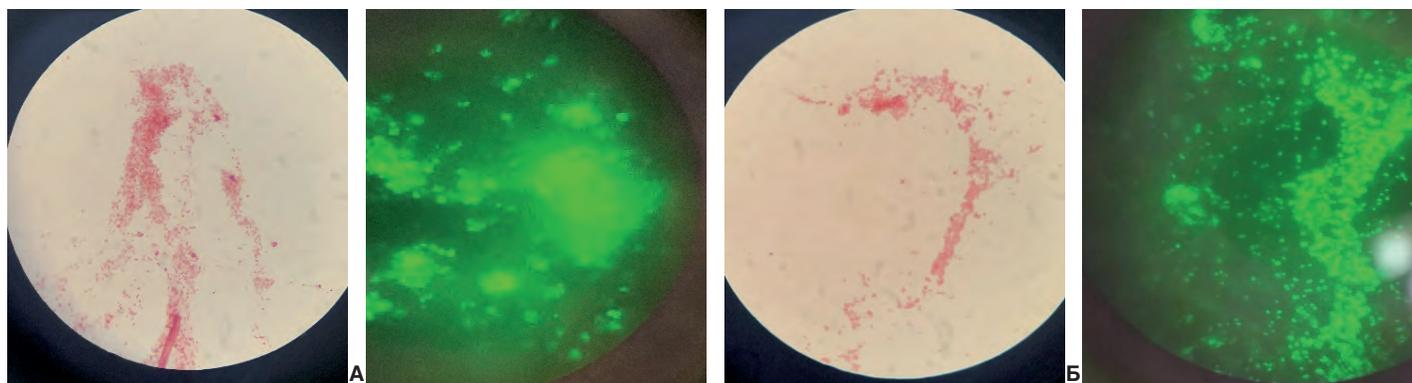


Рис. 4. Микропрепараты штаммов *K. pneumoniae* двух морфотипов: А – биопленка *K. pneumoniae* K203, классический морфотип, Б – биопленка *K. pneumoniae* I9939, гипермукоидный морфотип. Слева – окрашивание конго красным и фуксином, увеличение  $70 \times 90$ ; справа – окрашивание акридиновым оранжевым, увеличение  $10 \times 90$ .

Fig. 4. Microscopic slides of *K. pneumoniae* strains of two morphotypes: А – biofilm of *K. pneumoniae* K203, classical morphotype, Б – biofilm of *K. pneumoniae* I9939, hypermucoid morphotype. Left – staining with Congo red and fuchsin, magnification  $70 \times 90$ ; right – staining with acridine orange, magnification  $10 \times 90$ .

красного цвета, по форме палочки, расположенные одиночно, малыми или большими конгломератами, между красных клеток просматривался розового цвета экзополисахарид, т.е. были все признаки сформировавшейся БП [22].

### Обсуждение

Высокий уровень ИП микробных клеток в первые сутки культивирования свидетельствует о способности штаммов *K. pneumoniae* разных морфотипов размножаться в питательных средах (МПА и бульон LB) на полистироловых лунках при температуре  $37^\circ\text{C}$ . При этом ИП микробных клеток восьми штаммов из двух морфотипов выше при культивировании в бульоне LB. При сравнении суммарных результатов динамики ИП в виде увеличения концентрации *K. pneumoniae* классических и гипермукоидных штаммов в планктонных формах при культивировании в бульоне LB и МПБ к ОП контрольных сред выявлены статистически значимые различия ( $p \leq 0,05$ ).

При сравнении результатов образования БП штаммов *K. pneumoniae* классических и гипермукоидных групп, изначально взятых в разных стартовых концентрациях, при культивировании в МПБ статистически подтвержденных различий не выявлено. Можно предположить, что размножение *K. pneumoniae* во всех пробах происходило с разной интенсивностью. Очевидно, что в пробах с исходной концентрацией  $10^6$  КОЕ/мл микробные клетки размножались интенсивнее. Возможно, в пробах с исходной концентрацией  $10^8$  КОЕ/мл из-за размножившейся культуры в среде культивирования популяция клеток стала уплотняться и отмирать.

При сравнении суммарных результатов концентрации *K. pneumoniae* в биопленочной форме классических и гипермукоидных штаммов в одинаковых исходных концентрациях при культивировании в МПБ статистически подтвержденных различий не выявлено. Нами сделано предположение, что формирование БП при выращивании в условиях МПБ при температуре  $37^\circ\text{C}$  через 1–2 суток культивирования проходило одинаково независимо от фенотипической принадлежности штамма. Значимая связь ( $p \leq 0,05$ ) проявлялась между штаммами внутри самих групп.

Адгезия бактериальных клеток и формирование БП всех морфотипов штаммов *K. pneumoniae*, культивируемых в питательных бульонах, к полистироловым плоскодонным лункам 96-луночного планшета имели штаммовые различия в каждой группе. Аналогичным образом штаммовая гетерогенность отмечена и в отношении способности к формированию БП на разделе фаз жидкость/воздух и к адгезии на гидрофильных поверхностях.

При формировании БП в динамичных условиях при культивировании в МПБ на примере двух штаммов *K. pneumoniae* (K203, I9939) из разных групп отмечено, что адгезия клеток к покровным стеклам началась с первого дня, о чем свидетельствуют данные микропрепаратов и рост клеток на МПА. Возможно, большая часть популяции клеток находилась в планктонной форме и уже ко второму дню происходило формирование БП. При витальной микроскопии на вторые сутки отмечено наслаивание клеток, формирование матрикса БП, что было также подтверждено розовым окрашиванием в фиксированных микропрепаратах. Возможно, слизеобразная субстанция у гипермукоидного штамма *K. pneumoniae* не обеспечила ему четкой фиксации к стеклу и отмылась во время приготовления препарата. Интересно отметить работу Zheng et al. (2018), где фенотип повышенной слизистой вязкости – общий признак бактериемии *K. pneumoniae* – не был связан с повышенным образованием БП у этих штаммов [24].

### Заключение

Для объективной оценки способности разных штаммов *K. pneumoniae* к биопленкообразованию необходимо использовать разные методы. Штаммы *K. pneumoniae* гипермукоидной и классической группы способны формировать БП в высокопитательных средах, на гидрофильных и гидрофобных абиотических поверхностях в разные сроки. Несмотря на более высокий ИП бактериальной массы в бульоне LB, чем в МПБ, образование БП происходило идентично, но степень биопленкообразования имела отличия, все штаммы гипермукоидной группы сформировали БП в первые сутки на МПБ. Внутри групп штаммы *K. pneumoniae* отличались по степени биопленкообразования, которая зависела от их

стартовых концентраций. Известно, что *K. pneumoniae* способна вызывать тяжелые заболевания, приобретать устойчивость к антибактериальным и дезинфицирующим препаратам зачастую благодаря своей биопленкообразующей способности, поэтому необходимо продолжать исследования по изучению условий формирования и разрушения биопленок разных морфотипов *K. pneumoniae*.

#### Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

#### Financial support

No financial support has been provided for this work.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

#### Литература

- Шипицына ИВ, Осипова ЕВ. Влияние дезинфицирующих средств на рост биопленки, образованной штаммами *K. pneumoniae*. Медицинский алфавит. 2022;35:37-41. DOI: 10.33667/2078-5631-2022-35-37-41
- Алешукина АВ, Голошва ЕВ, Твердохлебова ТИ. Исследование влияния дезинфицирующих средств на биопленкообразующие неферментирующие бактерии. Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. 2020;1(205):89-94. DOI: 10.18522/1026-2237-2020-1-89-94
- Дятлов ИА, Детушева ЕВ, Мицевич ИП, Детушев КВ, Подкопаев ЯВ, Фурсова НК. Чувствительность и формирование устойчивости к антисептикам и дезинфектантам у возбудителей внутрибольничных инфекций. Бактериология. 2017;2(2):48-58. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-48-58
- Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. N Engl J Med. 2014 Mar 27;370(13):1198-208. DOI: 10.1056/NEJMoa1306801
- Cubero M, Grau I, Tubau F, Pallarés R, Domínguez MÁ, Liñares J, et al. Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Bloodstream Infections in Adults. Microb Drug Resist. 2018 Sep;24(7):949-957. DOI: 10.1089/mdr.2017.0107
- Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. Front Cell Infect Microbiol. 2018 Jan 22;8:4. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00004
- Чеботарь ИВ, Бочарова ЮА, Подопригора ИВ, Шагин ДА. Почему *Klebsiella pneumoniae* становится лидирующим оппортунистическим патогеном. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2020;22(1):4-19. DOI: 10.36488/cmasc.2020.1.4-19
- Савилов ЕД, Маркова ЮА, Немченко УМ, Носкова ОА, Чемезова НН, Кунгурцева ЕА, и др. Способность к биопленкообразованию у возбудителей инфекций, выделенных от пациентов крупного многопрофильного детского стационара. Тихоокеанский медицинский журнал. 2020;1:32-5. DOI: 10.34215/1609-1175-2020-1-32-35
- Guerra MES, Destro G, Vieira B, Lima AS, Ferraz LFC, Hakansson AP, et al. *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Their Role in Disease Pathogenesis. Front Cell Infect Microbiol. 2022 May 11;12:877995. DOI: 10.3389/fcimb.2022.877995
- He J, Du X, Zeng X, Moran RA, van Schaik W, Zou Q, et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of a Hypervirulent Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST17-KL38 Clinical Isolate Harboring the Carbapenemase IMP-4. Microbiol Spectr. 2022 Apr 27;10(2):e0213421. DOI: 10.1128/spectrum.02134-21
- Chen Y, Chen Y. Clinical Challenges with Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKP) in China. J Transl Int Med. 2021 Jan 5;9(2):71-75. DOI: 10.2478/jtim-2021-0004
- Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Clin Microbiol Rev. 2019 May 15;32(3):e00001-19. DOI: 10.1128/CMR.00001-19
- Singh AK, Yadav S, Chauhan BS, Nandy N, Singh R, Neogi K, et al. Classification of Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Based on Their *in vitro* Biofilm Forming Capabilities and Elucidation of the Biofilm Matrix Chemistry With Special Reference to the Protein Content. Front Microbiol. 2019 Apr 4;10:669. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00669
- Chen L, Wilksch JJ, Liu H, Zhang X, Torres VVL, Bi W, et al. Investigation of LuxS-mediated quorum sensing in *Klebsiella pneumoniae*. J Med Microbiol. 2020 Mar;69(3):402-413. DOI: 10.1099/jmm.0.001148
- Townsend EM, Moat J, Jameson E. CAUTI's next top model – Model dependent *Klebsiella* biofilm inhibition by bacteriophages and antimicrobials. Biofilm. 2020 Dec;2:100038. DOI: 10.1016/j.biofilm.2020.100038
- Pacheco T, Gomes AÉ, Siqueira NMG, Assoni L, Darrieux M, Venter H, et al. SdiA, a Quorum-Sensing Regulator, Suppresses Fimbriae Expression, Biofilm Formation, and Quorum-Sensing Signaling Molecules Production in *Klebsiella pneumoniae*. Front Microbiol. 2021 Jun 21;12:597735. DOI: 10.3389/fmicb.2021.597735
- O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol Microbiol. 1998 May;28(3):449-61. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol. 2000;54:49-79. DOI: 10.1146/annurev.micro.54.1.49
- Ярец ЮИ, Шевченко НИ. Новый метод анализа бактериальной биопленки. Наука и инновации. 2016;11(165):64-68.
- Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS. 2007 Aug;115(8):891-9. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_630.x
- Романова ЮМ, Алексеева НВ, Смирнова ТА, Андреев АЛ, Диденко ЛВ, Гинцбург АЛ. Способность к формированию биопленок в искусственных системах у различных штаммов *Salmonella typhimurium*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2006;4:38-42.
- Титова СВ, Веркина ЛМ. Моделирование биопленок холерного вибриона на твердых поверхностях (стекло и пластик) и визуализация их в световом и люминесцентном микроскопах. Клиническая лабораторная диагностика. 2016;4(61):238-241. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-238-241
- Титова СВ, Кушнарева ЕВ. Оценка способности холерных вибрионов к образованию биопленок *in vitro* с помощью нового методического подхода. Фундаментальные исследования. 2014;10(2):375-379.
- Zheng JX, Lin ZW, Chen C, Chen Z, Lin FJ, Wu Y, et al. Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia Strains Was Found to be Associated with CC23 and the Presence of wcaG. Front Cell Infect Microbiol. 2018 Feb 23;8:21. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00021

#### References

- Shipitsyna IV, Osipova EV. Influence of disinfectants on growth of biofilm formed by *K. pneumoniae* strains. Medical Alphabet. 2022;35:37-41. DOI: 10.33667/2078-5631-2022-35-37-41 (In Russian).
- Aleshukina AV, Goloshva EV, Tverdokhlebova TI. Investigation of the effect of disinfectants on biofilm forming non-fermenting bacteria. Bulletin Of Higher Education Institutes. North Caucasus Region. Natural Sciences. 2020;1(205):89-94. DOI: 10.18522/1026-2237-2020-1-89-94 (In Russian).
- Dyatlov IA, Detusheva EV, Mitsevich IP, Detushev KV, Podkopaev YaV, Fursova NK. Sensitivity and formation of stability to antiseptics and disinfectants in hospital infections. Bacteriology. 2017;2(2):48-58. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-48-58 (In Russian).

4. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med*. 2014 Mar 27;370(13):1198-208. DOI: 10.1056/NEJMoa1306801
5. Cubero M, Grau I, Tubau F, Pallarés R, Domínguez MÁ, Liñares J, et al. Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Bloodstream Infections in Adults. *Microb Drug Resist*. 2018 Sep;24(7):949-957. DOI: 10.1089/mdr.2017.0107
6. Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018 Jan 22;8:4. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00004
7. Chebotar IV, Bocharova YuA, Podoprigora IV, Shagin DA. The reasons why *Klebsiella pneumoniae* becomes a leading opportunistic pathogen. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2020;22(1):4-19. DOI: 10.36488/cmasc.2020.1.4-19 (In Russian).
8. Savilov ED, Markova YA, Nemchenko UM, Noskova OA, Chemezova NN, Kungurtseva EA, et al. Ability to biofilm formation in infectious agents isolated from patients of a large general children's hospital. *Pacific Medical Journal*. 2020;1:32-5. DOI: 10.34215/1609-1175-2020-1-32-35 (In Russian).
9. Guerra MES, Destro G, Vieira B, Lima AS, Ferraz LFC, Hakansson AP, et al. *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Their Role in Disease Pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 May 11;12:877995. DOI: 10.3389/fcimb.2022.877995
10. He J, Du X, Zeng X, Moran RA, van Schaik W, Zou Q, et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of a Hypervirulent Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST17-KL38 Clinical Isolate Harboring the Carbapenemase IMP-4. *Microbiol Spectr*. 2022 Apr 27;10(2):e0213421. DOI: 10.1128/spectrum.02134-21
11. Chen Y, Chen Y. Clinical Challenges with Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKP) in China. *J Transl Int Med*. 2021 Jan 5;9(2):71-75. DOI: 10.2478/jtim-2021-0004
12. Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Rev*. 2019 May 15;32(3):e00001-19. DOI: 10.1128/CMR.00001-19
13. Singh AK, Yadav S, Chauhan BS, Nandy N, Singh R, Neogi K, et al. Classification of Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Based on Their *in vitro* Biofilm Forming Capabilities and Elucidation of the Biofilm Matrix Chemistry With Special Reference to the Protein Content. *Front Microbiol*. 2019 Apr 4;10:669. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00669
14. Chen L, Wilksch JJ, Liu H, Zhang X, Torres VVL, Bi W, et al. Investigation of LuxS-mediated quorum sensing in *Klebsiella pneumoniae*. *J Med Microbiol*. 2020 Mar;69(3):402-413. DOI: 10.1099/jmm.0.001148
15. Townsend EM, Moat J, Jameson E. CAUTI's next top model – Model dependent *Klebsiella* biofilm inhibition by bacteriophages and antimicrobials. *Biofilm*. 2020 Dec;2:100038. DOI: 10.1016/j.biofilm.2020.100038
16. Pacheco T, Gomes AÉI, Siqueira NMG, Assoni L, Darrieux M, Venter H, et al. SdiA, a Quorum-Sensing Regulator, Suppresses Fimbriae Expression, Biofilm Formation, and Quorum-Sensing Signaling Molecules Production in *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol*. 2021 Jun 21;12:597735. DOI: 10.3389/fmicb.2021.597735
17. O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*. 1998 May;28(3):449-61. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x
18. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:49-79. DOI: 10.1146/annurev.micro.54.1.49
19. Yarets Yul, Shauchenka NI. A new method for the bacterial biofilms analysis in medicine. *The Science and Innovations*. 2016;11(165):64-68. (In Russian).
20. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007 Aug;115(8):891-9. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_630.x
21. Romanova YuM, Alekseeva NV, Smirnova TA, Andreev AL, Didenko LV, Gintsburg AL. Biofilm formation by different strains of *Salmonella typhimurium* in artificial systems. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2006;4:38-42. (In Russian).
22. Titova SV, Verkina LM. The modeling of biofilms of comma bacillus on solid surfaces (glass and plastic) and their visualization in light and luminescent microscopes. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2016;4(61):238-241. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-238-241 (In Russian).
23. Titova SV, Kusnaryova EV. Evaluation of *Vibrio cholerae* ability to form biofilms *in vitro* with the use of the new experimental procedure. *Fundamental Research*. 2014;10(2):375-379. (In Russian).
24. Zheng JX, Lin ZW, Chen C, Chen Z, Lin FJ, Wu Y, et al. Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia Strains Was Found to be Associated with CC23 and the Presence of wcaG. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018 Feb 23;8:21. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00021

**Информация о соавторах:**

Анисимова Анастасия Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Аронова Надежда Валентиновна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

**Information about co-authors:**

Anastasia S. Anisimova, Junior Researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзора

Nadezhda V. Aronova, PhD in Biological Sciences, leading researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзора