

**Summary.** A possibility of injection of exogenous genetical material in embryo sack of higher plants by means of germinating pollen has been studied in tomatoes. Simultaneously degradation dynamics of exogenous DNA underaction of germinating pollen grains nucleases has been discovered. Practically a direct relationship has been established between pollen quantity added to a solution for germination (with adequate nuclease quantity) and time of exogenous DNA degradation. Inhibition of nuclease activity in germinating pollen by means of dye-intercalator utilization of ethidiumbromid type.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Potrykus I.* Gene transfer to plants: assessment and perspectives // *Physiol. Plant.*— 1990.— 79, N 1.— P. 125—134.
2. *Hess D.* Pollen-based techniques in genetic manipulation // *Int. Rev. Cytol.*— 1987.— 107.— P. 367—395.
3. *Чесноков Ю. В.* Перенос чужеродных генов в зародышевый мешок высших растений посредством прорастающей пыльцы // *Биополимеры и клетка.*— 1992.— 8, № 2.— С. 53—58.
4. *Matousek J., Tupy J.* The release and some properties of nuclease from various pollen species // *J. Plant Physiol.*— 1985.— 119.— P. 169—178.
5. *Van der Westhuizen A. J., Gliemeroth A. K., Wenzel W., Hess D.* Isolation and partial characterization of an extracellular nuclease from pollen of *Petunia hybrida* // *Ibid.*— 1987.— 131.— P. 373—384.
6. *Negrutiu I., Heberle-Bors E., Potrykus I.* Attempts to transform for kanamycin-resistance in mature pollen of tobacco // *Biotechnol. and Ecol. of Pollen/Eds D. L. Mulcahy, G. B. Mulcahy, E. Ottaviann.*— New York, Berlin: Springer, 1986.— P. 65—70.
7. *Booy G., Krens F. A., Huizing H. J.* Attempted pollen-mediated transformation maize // *J. Plant Physiol.*— 1989.— 135, N 3.— P. 319—324.
8. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. Методы геной инженерии.— М.: Мир, 1984.— 480 с.
9. *Hess D., Gresshoff P. M., Fielits U., Gleiss D.* Uptake of protein and bacteriophage into swelling and germinating pollen of *Petunia hybrida* // *Z. Pflanzenphysiol.*— 1974.— 74, N 1.— P. 371—376.
10. *Hess D., Lorz H., Weissert E.-W.* Die aufnahme bakterieller DNA in quellende und keimende pollen von *Petunia hybrida* und *Nicotiana glauca* // *Ibid.*— P. 52—63.
11. *Каргель Н. А.* Взаимодействие чужеродного генетического материала (ДНК) с геномом высших растений: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.— Харьков, 1983.— 35 с.
12. *Matthews B. F., Abdul-Baki A. A., Saunders J. A.* Expression of foreign gene in electroporated pollen grains of tobacco // *Sex. Plant Reprod.*— 1990.— 3, N 3.— P. 147—151.
13. *Жученко А. А.* Генетика томатов.— Кишинев: Штиинца, 1973.— 664 с.
14. *Пищенко В. М., Чесноков Ю. В., Бурилков В. К., Лысиков В. Н.* Эффекты совместного действия УФ излучения и красителей-сенситизаторов на прорастающую пыльцу // *Известия АН Молдовы. Сер. биол. и хим. наук.*— 1992.— № 5.— С. 19—23.
15. *Fuller W., Waring M.* A molecular model for the interaction of ethidium bromide with deoxyribonucleic acid // *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*— 1964.— 64.— P. 805—809.
16. *Waring M. J.* Variation of the supercoils in dosed circular DNA binding of antibiotics and drugs: evidence of molecular models involving intercalation // *J. Mol. Biol.*— 1970.— 54.— P. 247—279.
17. *Pommier Y., Kerrigan D., Kohn K.* Topological complexes between DNA and topoisomerase II and effects of polyamines // *Biochemistry.*— 1989.— N 4.— P. 995—1002.

Ин-т генетики АН Молдовы, Кишинев

Получено 12.01.93

УДК 579.842.16:579.252.55:615.33

**Л. В. Авдеева, И. Г. Лукач, В. Г. Войцеховский, О. П. Сельникова,  
Е. И. Полищук, Л. Н. Чернявская, М. В. Бондарь**

#### **ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ТОЛЕРАНТНЫХ К ЦЕФАМЕЗИНУ ШТАММОВ КЛЕБСИЕЛЛ**

*В камерах для микрокультивирования клеток изучено развитие клеток клебсиелл в присутствии различных концентраций цефамезина. Полученные данные свидетельствуют о различной чувствительности клебсиелл к цефамезину, регистрируемой уже через 3—5 ч.*

© Л. В. Авдеева, И. Г. Лукач, В. Г. Войцеховский, О. П. Сельникова, Е. И. Полищук,  
Л. Н. Чернявская, М. В. Бондарь, 1993

Кроме того, установлено существование среди клинических изолятов клебсиелл толерантных штаммов (МБК/МПК  $\geq 32$ ), способных переживать высокие концентрации антибиотика в виде Л-форм, реверсирующих в исходные при замене среды, содержащей антибиотик, на питательную среду. Предполагается, что толерантные штаммы могут быть потенциальными возбудителями внутрибольничных инфекций.

**Введение.** Феномен антибиотикотолерантности, открытый Томасом [1] в 1970 г., достаточно широко обсуждается в последние годы в основном в зарубежной литературе. Значительное количество обзоров посвящено описанию случаев эндокардитов, менингитов, тонзиллитов, пневмоний, вызванных толерантными штаммами грамположительных кокков [2—7], и лишь отдельные работы свидетельствуют о выявлении толерантных штаммов среди грамотрицательных бактерий [8—10].

Это явление заслуживает большого внимания, так как толерантные микроорганизмы при своей генетической чувствительности к бактерицидным антибиотикам погибают при концентрациях этих препаратов, превышающих минимальные подавляющие концентрации в 16 и более раз. Такие концентрации, как правило, невозможно создать в организме больного при введении терапевтических доз антибиотиков, поэтому инфекции, вызванные толерантными штаммами, протекают тяжело, нередко заканчиваясь летальным исходом при казалось бы «рациональной» антибиотикотерапии.

Обнаружение толерантных штаммов связано с определением соотношения минимальной бактерицидной концентрации антибиотика к его минимальной подавляющей концентрации.

Объектом исследований служили бактерии рода *Klebsiella*, которые с достаточно высокой частотой выявляются среди возбудителей оппортунистических инфекций дыхательных и мочевыводящих путей, желудочно-кишечного тракта, менингитов, токсико-септических состояний и др. При использовании камер для микрокультивирования клеток нами впервые показано существование среди клебсиелл толерантных штаммов [11], а также установлены особенности их развития при различных концентрациях цефамезина (цефалоспориновый антибиотик I поколения).

**Материалы и методы.** Изучены минимальная подавляющая (МПК) и минимальная бактерицидная концентрации (МБК) цефамезина в отношении 250 штаммов *K. pneumoniae*, выделенных из различных биотопов здоровых новорожденных, а также от детей с различной локализацией патологического процесса.

МПК антибиотика определяли методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде [12]. Концентрация цефамезина составляла 250—0,1 мкг/мл. В каждую пробирку с разведениями антибиотика вносили по 0,2 мл инокулята, приготовленного из суточных культур клебсиелл, так что окончательная густота взвеси в пробирках составляла  $10^5$  КОЕ/мл. Пробирки инкубировали в течение 20—24 ч при 37 °С. МПК регистрировали по последней пробирке с отсутствием видимого роста.

Для определения МБК из пробирок с отсутствием видимого роста производили мерный высев (0,1 мл) на чашки с мясо-пептонным агаром. Через 24 ч, а затем через 48 ч инкубации в термостате при 37 °С отмечали ту наименьшую концентрацию антибиотика в пробирке, высев из которой не дал роста на агаре или в чашке выросло не более 10 колоний (МБК, гибель более 99,9 % клеток).

Морфологические изменения клебсиелл под действием различных концентраций цефамезина изучали в камерах для микрокультивирования клеток [13]. Для приготовления камер использовали синтетический полимерный материал, характеризующийся своей нетоксичностью, высокой прозрачностью, упругостью. Из этого полимера готовили блоки 0,4×0,4 мм, размещали их по четыре на стерильное предметное стекло. В центр каждого блока наносили тонко оттянутым капилляром пасте-

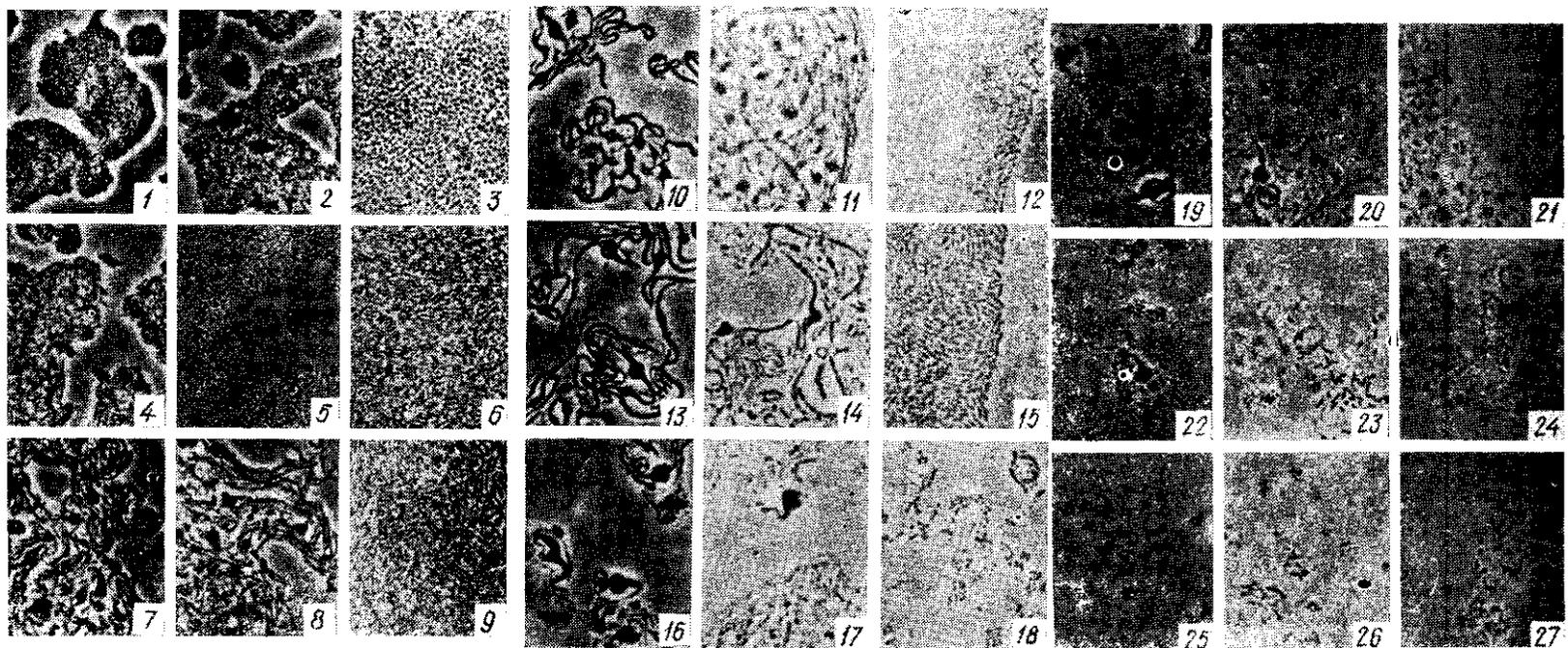


Рис. 1. Рост чувствительного к цефамезину штамма *K. pneumoniae* 610 в камерах для микрокультивирования кластков при различных концентрациях цефамезина в питательной среде: 1, 2 — 0,4; 4, 5 — 0,8; 7, 8 — 1,6; 10, 11 — 3,2; 13, 14 — 6,4; 16, 17 — 12,5; 19, 20 — 25; 22, 23 — 50; 25, 26 — 100 мкг/мл; 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 — 4-й ч наблюдения; 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26 — 24-й ч наблюдения; 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 — 48-й ч наблюдения (рост через 24 ч после отмывки камер от антибиотика). Здесь и на рис. 2, 3 фазово-контрастная микроскопия; X 900

ровской пипетки суспензию бактерий. Затем накрывали стерильным покровным стеклом, которое по углам фиксировали с предметным скрепляющей замазкой.

При проведении экспериментов в камеру между блоками вводили при помощи тонко оттянутого капилляра пастеровской пипетки различные разведения цефамезина. Контролем служили камеры, в межблочное пространство которых вводили мясо-пептонный бульон.

С помощью фазово-контрастного микроскопа исследовали первоначальное состояние клеток клебсиелл. Затем камеры в чашках Петри помещали в термостат при 37 °С. Через 4—5, а затем 18—24 ч наблюдали за изменениями в микрокультуре, происходящими под действием различных концентраций антибиотика.

**Результаты и обсуждение.** При изучении особенностей роста чувствительного к цефамезину штамма *K. pneumoniae* 610 были испытаны следующие концентрации антибиотика в питательной среде: 0,4; 0,8; 1,6; 3,1; 6,2; 12,5; 25; 50 и 100 мкг/мл (рис. 1).

Установлено, что спустя 4 ч с момента инокуляции микроорганизмов в камеры для микрокультивирования клеток и введения питательной среды с соответствующими концентрациями цефамезина рост бактерий наблюдался во всех камерах, кроме двух последних, где концентрация антибиотика была наибольшей (50 и 100 мкг/мл, рис. 1: 22, 25). В двух камерах с наименьшими концентрациями цефамезина 0,4 и 0,8 мкг/мл (рис. 1: 1, 4) морфология клебсиелл почти не изменялась. В то же время в камерах с концентрациями цефамезина 1,6; 3,2; 6,2; 12,5; 25 мкг/мл (рис. 1: 7, 10, 13, 16, 19) происходило изменение морфологии клеток по типу Л-трансформации. При этом образовывались нитевидные формы длиной до нескольких десятков микрометров со вздутиями (сферопластами) толщиной до 10—15 мкм. Сферопласты формируются, по-видимому, в результате нарушения структуры пептидогликана, его размягчения и отхождения от цитоплазматической мембраны с последующим переходом содержимого клетки в возникшее пространство.

Через 24 ч наблюдения рост клебсиелл в среде с наименьшей концентрацией цефамезина (0,4 и 0,8 мкг/мл, рис. 1: 2, 5) характеризовался типичной морфологией клеток. В камерах с наибольшей концентрацией цефамезина (50 и 100 мкг/мл, рис. 1: 23, 26) рост отсутствовал, а инокулированные клетки частично утратили прежнюю контрастность и приобрели вид образований с «зернистостью» в центре и на полюсах. В камерах с концентрациями цефамезина 1,6; 3,1; 6,2; 12,5; 25 мкг/мл (рис. 1: 8, 11, 14, 17, 20) спустя 24 ч от начала опыта можно было видеть неравномерную потерю клетками контрастности, в результате чего нитевидные формы содержали «зернистость». Более контрастными оставались участки, где сформировались сферопласты, что, возможно, обусловлено их большим диаметром по сравнению с нитевидными образованиями.

Учитывая, что в камере с концентрацией цефамезина 6,2 мкг/мл (рис. 1: 14) рост спустя 24 ч отсутствовал, данную концентрацию антибиотика можно считать минимальной подавляющей концентрацией. Для определения МБК из всех взятых в опыт камер удаляли среду с антибиотиком пятикратным промыванием физиологическим раствором в течение 1 ч с последующим введением в камеры питательной среды. Через 24 ч после промывки и введения питательной среды (48-й ч эксперимента) выясняли, в каких камерах происходит рост микроорганизмов. При этом установлены продолжение роста бактерий в камерах, где была наименьшая концентрация цефамезина (0,4 и 0,8 мкг/мл, рис. 1: 3, 6), и реверсия Л-форм в исходные клетки в результате роста и размножения в камерах с питательной средой и 1,6; 3,1; 6,2 мкг/мл антибиотика (рис. 1: 9, 12, 15). В камерах, где до отмывки содержалась среда с 12,5; 25; 50 и 100 мкг/мл цефамезина, роста клебсиелл не было, а клетки выглядели нежизнеспособными (рис. 1: 18, 21, 24, 27).

Таким образом, МБК цефамезина в отношении данного штамма клебсиелл составляла 12,5 мкг/мл, что в 2 раза превышало МПК антибиотика.

При изучении особенностей роста устойчивого к цефамезину штамма *K. pneumoniae* 1030 было установлено, что при концентрациях антибиотика 6—47 мкг/мл (рис. 2: 1, 4) культура растет, сохраняя характерные морфологические свойства. В среде с концентрациями цефамезина 94 и 197 мкг/мл появляются единичные удлинненные особи с измененной морфологией (рис. 2: 5, 6). Рост данного штамма возможен и при более высоких концентрациях цефамезина в питательной среде (375 и 750 мкг/мл, рис. 2: 7, 8). Однако при этом происходят морфологические изменения клеток — появление удлинненных особей со вздутиями и последующее разрушение клеток. При концентрации цефамезина 1500 мкг/мл роста клеток клебсиелл данного штамма не наблюдали (рис. 2: 8).

При анализе особенностей роста *K. pneumoniae* 596 в камерах с различными концентрациями цефамезина было выявлено, что в среде с 0,8 мкг/мл антибиотика (рис. 3: 1) рост клеток не сопровождался изменением их морфологии. В камерах с возрастающими концентрациями антибиотика (1,6; 3,1; 6,2; 12,5; 25; 50 и 100 мкг/мл, рис. 3: 3, 5,

7, 9, 11, 13, 15) происходила Л-трансформация клеток. МПК цефамезина для данного штамма следует считать 3,1 мкг/мл, так как в камерах с такой и последующими концентрациями наблюдалось подавление роста бактерий.

Для определения МБК цефамезина в отношении этого же штамма клебсиелл из камер удаляли среду с антибиотиком пятикратной промывкой физиологиче-

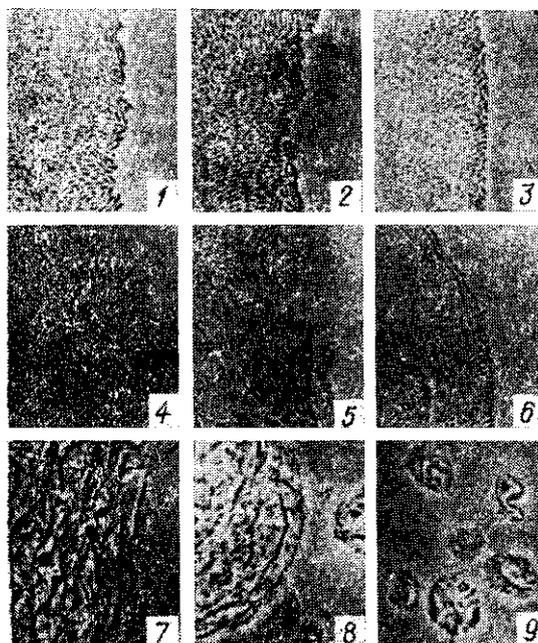


Рис. 2. Рост устойчивого к цефамезину штамма *K. pneumoniae* 1030 при различных концентрациях антибиотика в питательной среде (24-й ч наблюдения): 1—6; 2—12; 3—24; 4—47; 5—94; 6—187; 7—375; 8—750; 9—1500 мкг/мл

ским раствором в течение 1 ч и вводили туда питательную среду. Спустя 24 ч (48-й ч опыта) регистрировали происходящие изменения. При этом установлено, что в камерах, где концентрация антибиотика в среде составляла 0,8; 1,6; 3,1; 6,2; 12,5; 25 и 50 мкг/мл (рис. 3: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14), бактерии сохраняли жизнеспособность, росли и размножались, образуя микроколонии. Часть клеток оказалась неспособной к росту, оставшись в разрушенном виде. В камерах с концентрацией цефамезина 100 мкг/мл (рис. 3: 16) после отмывки и введения питательной среды рост клебсиелл не наблюдался. Таким образом, МБК антибиотика для данного штамма составляет 100 мкг/мл цефамезина.

Учитывая, что МБК цефамезина в этом случае превышает его МПК в 33,3 раза, штамм *K. pneumoniae* 596 следует считать толерантным к цефамезину. Эти данные позволяют утверждать, что явление толерантности присуще не только грамположительным коккам, но и клебсиеллам как представителям грамотрицательных бактерий.

Полученные результаты в камерах для микрокультивирования клеток с использованием фазово-контрастного микроскопа свидетельствуют о разной чувствительности к цефамезину различных штаммов клебсиелл, фиксируемой уже через 3—5 ч.

Кроме того, устойчивость клебсиелл к концентрациям цефамезина, в 33 раза превышающим минимальную подавляющую концентрацию,

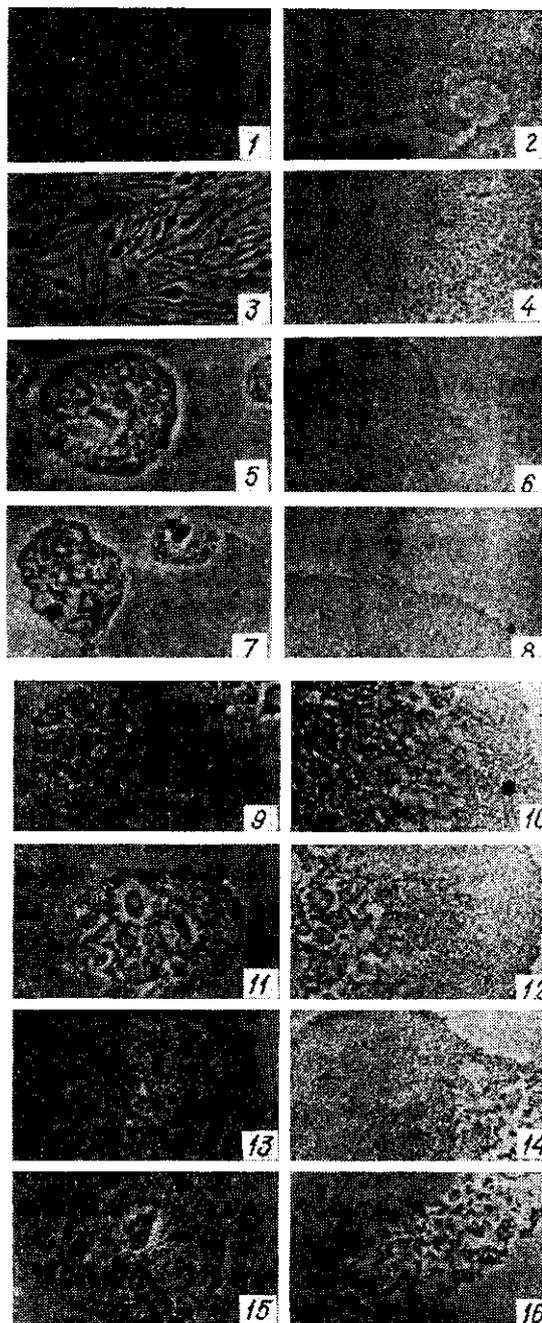


Рис. 3. Рост толерантного к цефамезину штамма *K. pneumoniae* 596 в камерах для микрокультивирования клеток при различных концентрациях цефамезина в питательной среде: 1—0,8; 3—1,6; 5—3,1; 7—6,2; 9—12,5; 11—25; 13—50; 15—100 мкг/мл; 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15—24-й ч наблюдения; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16—рост через 24 ч после удаления из камер сред с цефамезином и введения питательной среды (48-й ч наблюдения)

дает основание предположить возможную длительную персистенцию толерантного штамма в виде Л-форм в организме при концентрациях антибиотиков, создаваемых в сыворотке крови больного при введении терапевтических доз препарата. Таким образом, толерантность возбудителя может быть одной из причин безуспешного применения антибиотиков, а толерантный штамм—причиной возникновения внутри-

больничной инфекции. Следовательно, необходим контроль за появлением толерантных штаммов, что может быть достигнуто определением не только минимальных подавляющих, но и минимальных бактерицидных концентраций антибиотиков с бактерицидным типом действия. При этом важно применение синергидных сочетаний антибактериальных препаратов для лечения заболеваний, вызванных толерантными штаммами [14].

**Резюме.** У камерах для мікрокультивування клітин вивчено розвиток клітин клебсіел у присутності різних концентрацій цефамезину. Отримані дані свідчать на користь неоднакової чутливості клебсіел до цефамезину, що реєструється вже за 3—5 год. Крім того, встановлено існування серед клінічних ізолятів клебсіел толерантних штамів (МБК/МПК $\geq$ 32), здатних переживати високі концентрації антибіотика у вигляді Л-форм, які реверсують до вихідних при зміні середовища, що містить антибіотик, на поживне середовище. Робиться припущення про те, що толерантні штами можуть бути потенційними збудниками внутрішньолікарняних інфекцій.

**Summary.** In chambers for microorganisms flowing cultivation morphological alterations of *Klebsiella's* cells in presence of different cefomisine's concentrations were discovered with the using of.

Received results testify to various sensitivity of *Klebsiella's* to the cefomisine which was taken in account 3—5 hours later already. In addition *Klebsiella's* tolerance strains (MBC/MIC $\geq$ 32) capable to survive in high antibiotic's concentrations in L-forms which reverse to original forms (ones) during the change of antibiotics medium for nutritions one were established among clinical isolates.

It is supposed, that tolerance strains are potentially dangerous with hospital-acquired infections.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Tomasz A., Albino A., Zanati E. Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system // *Nature*.— 1970.— 227.— P. 138—140.
2. Goessens W. H. F., Fjntijne P., Michel M. F. Tolerance of *Staphylococcus aureus* to penicillin; mechanism and *in vivo* significance // *Antonie van Leeuwenhoek*.— 1985 (1986).— 51, N 5—6.— P. 614—615.
3. Grahn E., Holm S. M., Roos H. Penicillin tolerance in beta-streptococci isolated from patient with tonsillitis // *Scand. J. Infect. Dis.*— 1987.— 19, N 4.— P. 421—426.
4. Hess J., Danker D. Significance of penicillin tolerance *in vivo*: prevention of experimental *Streptococcus sanguis* endocarditis // *J. Antimicrob. Chemother.*— 1983.— 11.— P. 555—564.
5. Kwang S., Bayer A. S. Significance of *in vitro* penicillin tolerance in experimental enterococcae endocarditis // *Ibid.*— 1987.— 4.— P. 475—485.
6. Liu H., Tomaz A. Penicillin tolerance in multiply drug-resistant natural isolates of *Streptococcus pneumoniae* // *J. Infect. Diseases*.— 1985.— 152, N 2.— P. 365—372.
7. Prakash K., Saboh E. Y. Penicillin tolerance in beta haemolytic streptococci // *Ind. J. Med. Res.*— 1987.— N 11.— P. 564—567.
8. Handwerker S., Tomasz A. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria // *Ann. Rev. Pharmacol.*— 1985.— 25.— P. 349—380.
9. Philipon A. Une forme de resistance a l'antibiotherapie. La tolerance bacterienne // *Concours med.*— 1984.— 106, N 8.— P. 635—636.
10. Tuomanen E., Durack D. T., Tomasz A. Antibiotic tolerance among clinical isolated of bacteria // *Antimicrob. Agent and Hemother.*— 1986.— N 10.— P. 521—527.
11. Авдеева Л. В., Лукач І. Г., Войцеховський В. Г. Вивчення дії цефамезину на клебсієли при використанні фазово-контрастної мікроскопії // XII Укр. респ. з'їзд мікробіол., епідеміол. і паразитол.: Тез. доп. (Харків, 25—27 вересня 1991).— Харків, 1991.— Ч. 1.— С. 137.
12. Навишин С. М., Фомина И. П. Рациональная антибиотикотерапия.— М.: Медицина, 1982.— 494 с.
13. А. с. 821484 СССР. Камера для проточного культивирования микроорганизмов / В. В. Гашинский, В. Г. Войцеховский // *БИ*.— 1976.— № 8.— С. 25.
14. Навишин С. М., Сазыкин Ю. О. Некоторые направления и перспективы развития науки об антибиотиках // *Антибиотики и мед. биотехнология*.— 1985.— 30, № 1.— С. 3—16.

Київ, НІІ епідеміології та інфекц. болізей

Получено 23.02.93