

**ДИНАМІКА ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* РА01
ЗА НАЯВНОСТІ ВІСМУТОВОГО КОМПЛЕКСУ
МЕЗО-ТЕТРА(4-N-МЕТИЛ-ПІРИДИЛ)ПОРФІРИНУ**

М. Галкін

*Одеський національний університет імені І.І. Мечникова
вул. Дворянська, 2, Одеса 65082, Україна
e-mail: aerugen@onu.edu.ua*

Для дослідження динаміки формування біоплівок протягом перших годин інкубації їх отримували на покривних скельцях розміром 24×24 мм, переносили у пластикові стерильні чашки Петрі діаметром 35 мм, які містили по 2 мл середовища Гіса з клітинами *P. aeruginosa* (10^3 КУО/мл) та вісмутового комплексу мезо-тетра(4-N-метилпіридил)порфірину (Vi^{3+} -ТПП) у концентрації 0,4 та 40 мкМ. Чашки зі скельцями інкубували від 15 хв до 4 год при 37°C. Після інкубації скельця відмивали від неприкріплених клітин фізіологічним розчином і фіксували 96% спиртом 10 хв. Після фіксації зразки забарвлювали водним розчином кристалічного фіолетового упродовж 5 хв. Після висушування скельця мікроскопіювали з використанням мікроскопа Primo Star PC, Carl Zeiss при збільшенні ×900 та фотографували з використанням камери Olympus DCM (3,0 M pixels). Для вивчення динаміки формування біоплівки з першої до сьомої доби її отримували у 48-лункових полістиролових плоскодонних планшетах «Nunclon» після передінкубації клітин за внесення Vi^{3+} -ТПП у концентрації 0,4; 40 та 80 мкМ. Отримані результати свідчать про те, що Vi^{3+} -ТПП за усіх досліджених концентрацій значно порушує динаміку формування біоплівки. У ході дослідження динаміки формування біоплівки у перші години інкубації було виявлено, що Vi^{3+} -ТПП затримує формування мікроколоній біоплівки. Vi^{3+} -ТПП також виявив здатність затримувати розвиток біоплівки в інтервалі часу від першої до сьомої доби. За усіх використаних концентрацій Vi^{3+} -ТПП розвиток біоплівки практично припинявся на третю добу.

Ключові слова: Pseudomonas aeruginosa, вісмутовий комплекс мезо-тетра(4-N-метилпіридил)порфірину, біоплівка, динаміка формування біоплівки.

Процес формування біоплівки бактеріями на сьогодні розглядається як одна з найперспективніших мішеней для впливу нових антимікробних засобів. Численні дослідження останніх сорока років показали, що процес формування біоплівки є складним і багатостадійним. У життєвому циклі біоплівок виділяють п'ять основних стадій: адгезії, моношару, мікроколоній, дозрівання та розпаду. Усі п'ять із наведених стадій можна спостерігати при формуванні біоплівки будь-яким мікроорганізмом, і кожна з них може бути мішенню для впливу нових антимікробних препаратів [5, 9, 11].

Основними напрямками у розробці нових антимікробних препаратів на сьогодні є: розробка антиадгезивних покриттів і препаратів, що здатні порушувати функцію поверхневих структур клітин, відповідальних за адгезію (фібрії, адгезинів); розробка препаратів, що блокують синтез або дестабілізують матрикс біоплівки [9]; розробка препаратів, що порушують агрегацію клітин у мікроколонії, блокують поділ клітин; розробка препаратів, що блокують міжклітинну сигналізацію (*quorum sensing*), провокують відкріплення клітин від біоплівки та їх перехід до планктонного існування або протидіють експресії факторів патогенності [8].

Раніше нами було показано, що значну здатність до пригнічення процесу формування біоплівки мають вісмутові комплекси синтетичних і природних порфіринів [2]. Було показано, що серед цих сполук найбільшу активність проявляє вісмутовий комплекс мезо-тетра(4-N-метилпіридил)порфірину [4]. Таким чином, метою даної роботи було вивчити динаміку формування біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* PA01 за наявності цієї сполуки задля виявлення тієї стадії процесу формування біоплівки, на якій реалізуються ефекти цієї сполуки.

Матеріали та методи

У роботі використовували *Pseudomonas aeruginosa* PA01, отриманий із музею культур мікроорганізмів кафедри мікробіології та вірусології ОНУ імені І.І. Мечникова. Вивчена у роботі сполука – вісмутовий комплекс мезо-тетра(4-N-метилпіридил)порфірину (Vi^{3+} -ТПП), був синтезований у ПНДЛ-5 ОНУ імені І.І. Мечникова за методом Ю.В. Ішкова та співавторів [3].

Для вивчення динаміки формування біоплівки у перші години використовували візуальну оцінку. Стерильні покривні скельця розміром 24×24 мм переносили у пластикові стерильні чашки Петрі діаметром 35 мм, які містили по 2 мл середовища Гіса з клітинами *P. aeruginosa* (10^3 КУО/мл) та досліджувані сполуки у концентрації 0,4 та 40 мкМ. Чашки зі скельцями інкубували від 15 хв до 4 год при 37°C. Після інкубації скельця відмивали від неприкріплених клітин фізіологічним розчином і фіксували 96% спиртом 10 хв. Після фіксації зразки забарвлювали водним розчином кристалічного фіолетового упродовж 5 хв. Після висушування скельця мікроскопіювали з використанням мікроскопа Primo Star PC, Carl Zeiss (збільшення ×900) та фотографували з використанням камери Olympus DCM (3,0 M pixels) [1].

Для вивчення кількісних змін суспензію добової культури тест-бактерій розводили стерильним фізіологічним розчином і вносили у пробірки з 8 мл середовища Гіса до кінцевої концентрації 10^3 КУО/мл. Потім у дослідні пробірки додавали по 20 мкл стерильних стокових розчинів Vi^{3+} -ТПП до кінцевих концентрацій 0,4; 40; 80 мкМ. У контрольні пробірки додавали по 20 мкл фізіологічного розчину. Пробірки витримували 60 хв при кімнатній температурі у темряві (для запобігання фотосенсибілізуючій дії порфірину). Далі клітини відмивали від незв'язаного з ними Vi^{3+} -ТПП і суспендували у вихідному об'ємі середовища Гіса. Вміст пробірок розливали у 48-лункові полістиролові плоскодонні планшети «Nunclo» по 1 мл у кожен лунку. Планшети інкубували протягом 1–7 діб при 37°C. Як контроль використовували культури без додавання порфіринів.

Біоплівки забарвлювали 1% водним розчином кристалічного фіолетового упродовж 5 хв при кімнатній температурі. Планшети з забарвленою біоплівкою підсушували 24 год за кімнатної температури та заливали у кожен лунку по 1 мл лізуючого розчину, що містив 1% додецилсульфату натрію у 0,1 N NaOH. Планшети витримували 1,5 год до повного лізису біоплівки за кімнатної температури. Кількість кристалічного фіолетового визначали за оптичною густиною дослідних і контрольних зразків на спектрофотометрі SmartSpec Plus (Bio-Rad, Hungary) при довжині хвилі 592 нм.

Результати і їхнє обговорення

Дослідження динаміки формування біоплівки *P. aeruginosa* PA01 за наявності Vi^{3+} -ТПП здійснювали у двох варіантах дослідів. У першому варіанті встановлювали стадію утворення біоплівки, на якій починає проявлятися антимікробний ефект Vi^{3+} -ТПП. У другій серії експериментів упродовж семи діб оцінювали формування біоплівки клітинами після їх передінкубації з різними концентраціями досліджуваної сполуки.

За даними літератури відомо, що у модельних системах формування біоплівки починається на достатньо ранньому етапі інкубації, і біоплівки в умовах періодичної культури існують близько двох тижнів, при цьому найбільша їхня функціональна активність

спостерігається у проміжку між першим і десятим днем, що відповідає стадіям молоді та сформованої біоплівки [5].

Для встановлення часу, з якого стає помітним пригнічувальний ефект Bi^{3+} -ТПП, біоплівку отримували на покривних скельцях і фотографували кожні 15 хв. Bi^{3+} -ТПП додавали до середовища у кінцевих концентраціях 0,4 та 40 мкМ.

Наведені мікрофотографії (рис. 1) свідчать про те, що процес формування біоплівки починається на найраніших етапах інкубації, що узгоджується з даними інших авторів [5].

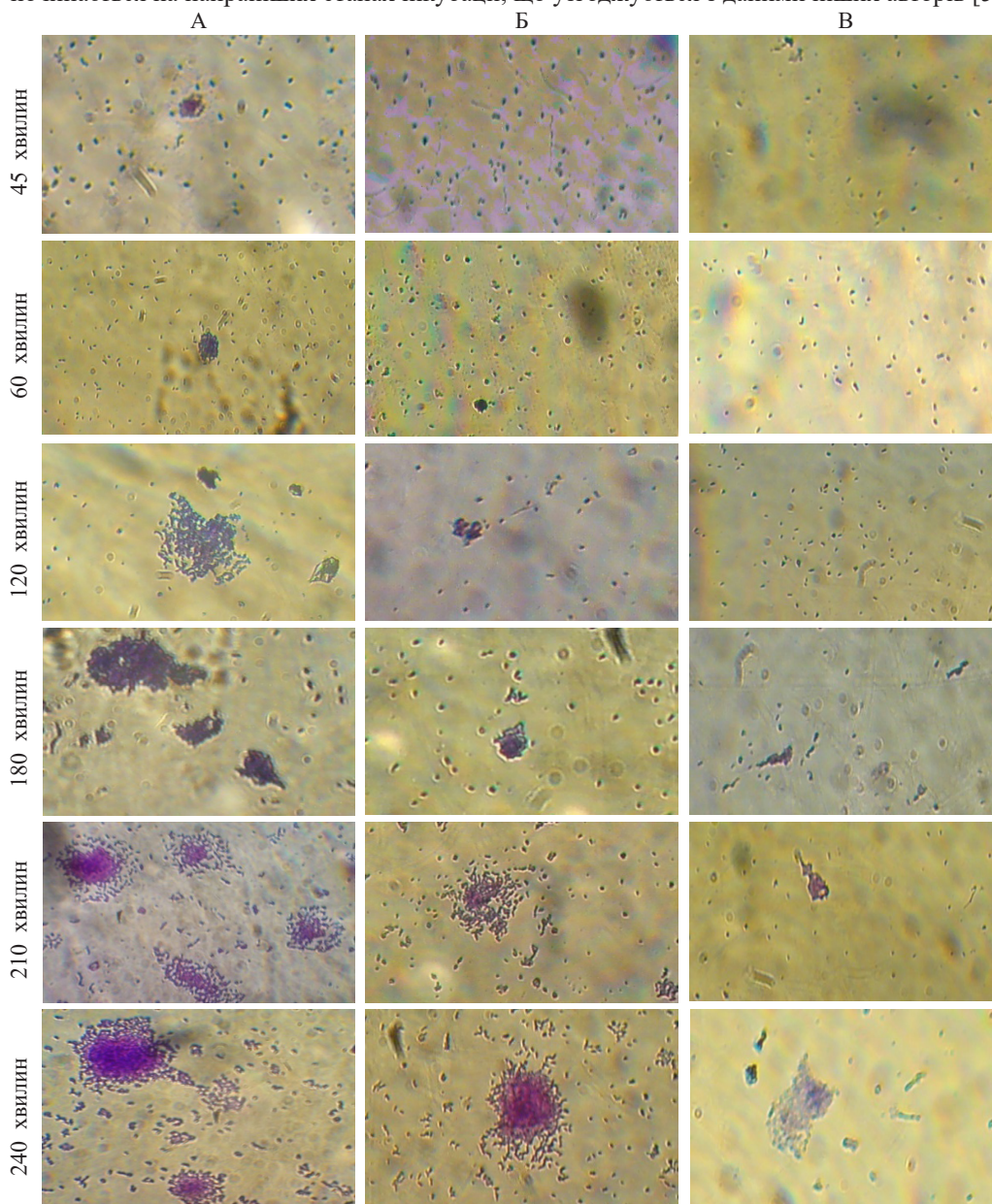


Рис. 1. Динаміка утворення біоплівки *P. aeruginosa* PA01 упродовж перших чотирьох годин інкубації ($\times 900$): А – контроль; Б – 0,4 мкМ Bi^{3+} -ТПП; В – 40 мкМ Bi^{3+} -ТПП.

У контролі вже через 15 хв інкубації на поверхні скелець реєстрували перші адгезовані клітини (фото не наведено у зв'язку із затримкою прикріплення клітин у дослідних варіантах). З часом кількість прикріплених клітин постійно зростає. Через 45 хв інкубації зареєстровано появу на скельцях перших основних структурних одиниць біоплівки – мікроколоній (рис. 1, А). Ці перші мікроколонії були розташовані по усій поверхні скелець і склалися з 10–15 клітин. Через 1 год інкубації на фоні продовження адгезії спостерігали значне підвищення кількості клітин, які формують мікроколонії. Це може бути як наслідком поділу клітин, так і включенням до їх складу нових клітин, що адгезуються до скелець з культуральної рідини.

Упродовж наступної години інкубації, з одного боку, сповільнюється процес адгезії нових клітин, а, з іншого боку, значно збільшується кількість і розмір мікроколоній. Так, через 2 год розміри мікроколоній зросли практично утричі порівняно зі станом на першу годину і покривали вже практично всю поверхню скелець. Продовження спостережень виявило, що у наступні дві години змінюються розмір і структура мікроколоній. Через 3 год інкубації реєструється поява у складі мікроколоній компонентів матриксу біоплівки. Про це свідчить щільніше забарвлення та неможливість за використаного збільшення розрізнити окремі клітини у центрі мікроколоній.

Через 3,5 год інкубації практично вся поверхня мікроколоній була покрита компонентами матриксу. Цікаво відмітити, що в цей час навколо мікроколоній формується шар окремих клітин. На нашу думку, це може слугувати показником того, що в цей проміжок часу вже функціонує система міжклітинної комунікації. Як було встановлено нами раніше, саме у цей період у середовищі з'являються сигнальні молекули кворуму – гомосеринлактони [7]. Через 4 год спостерігається активний рух клітин по поверхні скелець шляхом сипання (twitching motility), який залежить від фімбрій IV типу, і починається формування вторинних мікроколоній (рис. 2).

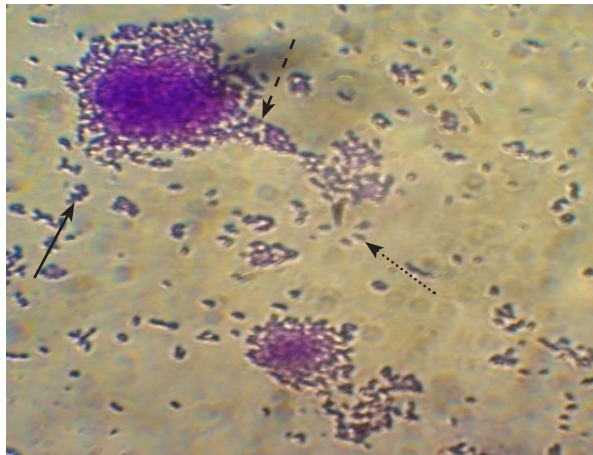


Рис. 2. Біоплівка *P. aeruginosa* PA01 через 4 год від початку інкубації. Стрілками показані: —> первинна мікроколонія;> вторинна мікроколонія; - - -> зона twitching motility.

На отриманих фотографіях зони сипання (twitching motility) виглядають як радіальні тяжі, які йдуть від периферії повністю сформованих первинних мікроколоній до ділянок, де починається формування вторинних мікроколоній на скельцях.

Така картина може бути наслідком того, що частина клітин за допомогою сипання мігрує з нижнього шару первинних мікроколоній, де зростаюча щільність клітин і

екзопродуктів скорочує доступ кисню та поживних речовин до них. Такі клітини долають певну відстань від первинних мікроколоній, займають вільне місце на поверхні скелець, де доступ кисню є кращим, і формують вторинні мікроколонії, які зв'язані з первинними зоною twitching motility. Підтвердженням цього можуть бути дані про те, що, по-перше, у сформованих біоплівках є кисневий градієнт від периферії до центру, а, по-друге, регуляція доступу кисню до внутрішніх шарів біоплівки рамноліпідами починається на пізніших етапах формування біоплівки [10, 12]. Одержані нами раніше результати показали, що в системі «планктон-біоплівка» синтез рамноліпідів *P. aeruginosa* PA01 починається у пізню логарифмічну фазу росту: через 6–8 год від початку інкубації [6].

З викладеного вище стає зрозумілим, що процес формування біоплівки *P. aeruginosa* відбувається досить швидко і за відносно нетривалий проміжок часу біоплівка проходить значну диференціацію. Цікаво, що за ті ж 4 год зареєструвати зміну оптичної густини планктонної культури над біоплівкою не вдалося. Це може свідчити про значно повільніший ріст планктонної культури порівняно з біоплівкою.

Дослідження показали, що у перші години інкубації Vi^{3+} -ТПП призводить до значних змін у формуванні біоплівки. За внесення 0,4 мкМ Vi^{3+} -ТПП значно затримується процес формування біоплівки *P. aeruginosa* PA01 (рис. 1, Б). Процес адгезії починається тільки через 30 хв і відбувається повільніше. Це можна пояснити тим, що Vi^{3+} -ТПП, який є катіонним порфірином і несе надлишковий позитивний заряд при зв'язуванні з зовнішньою мембраною *P. aeruginosa*, протидіє електростатичним силам і зменшує адгезію. Проникнення комплексу до клітин призводить до зникнення надлишку позитивного заряду з поверхні, й інтенсивність адгезії відновлюється. Поява мікроколоній за внесення 0,4 мкМ Vi^{3+} -ТПП затримується більш ніж на годину. Перші мікроколонії з'являлися тільки через 2 год після початку інкубації. У подальшому формування біоплівки затримується практично на півгодини (рис. 1, Б).

Через 15 і 30 хв інкубації за внесення 40 мкМ Vi^{3+} -ТПП на поверхні скелець не було зареєстровано жодної клітини. Процес адгезії за цих умов починається тільки з 45 хв і впродовж двох наступних години на поверхні скелець є лише окремі клітини. Перші поодинокі мікроколонії реєстрували тільки через 3 год інкубації за внесення 40 мкМ дослідженої сполуки, але їх вигляд відрізняється від мікроколоній у попередніх випадках. Перш за все, про це свідчить менша кількість клітин, які входять до їх складу. У подальшому розвиток мікроколоній також сильно затримується. Так, через 4 год інкубації за 40 мкМ Vi^{3+} -ТПП мікроколонії візуально схожі з тими, які спостерігали у контролі через 2 год інкубації.

Можна зробити висновок, що Vi^{3+} -ТПП у концентрації 40 мкМ практично удвічі сповільнює процес утворення біоплівки *P. aeruginosa*. Отримані дані, на нашу думку, також свідчать про те, що вплив дослідженої сполуки на процес адгезії не є постійним, і з деякого моменту адгезивні властивості відновлюються. З іншого боку, показана суттєва різниця у формуванні та розвитку основних структурно-функціональних одиниць біоплівки – мікроколоній, за внесення обох із досліджених концентрацій Vi^{3+} -ТПП. Процес утворення мікроколоній пов'язаний з адгезією лише на першому етапі, а надалі реалізується за рахунок інших механізмів: поділу клітин і секреції слизу. Тому можна припустити, що Vi^{3+} -ТПП пригнічує утворення біоплівки *P. aeruginosa*, впливаючи на формування мікроколоній. Отримані дані свідчать, що у перші години жодна з використаних концентрацій Vi^{3+} -ТПП не блокує процес формування мікроколоній повністю, а лише значно сповільнює його. У той же час, через 240 хв за внесення Vi^{3+} -ТПП в концентрації 40 мкМ мікроколо-

ній на скельцях немає (рис. 1, В), що може свідчити про здатність комплексу за тривалого впливу руйнувати ці структури.

Викладені вище дані свідчать про те, що Bi^{3+} -ТПП має здатність порушувати процес формування біоплівки *P. aeruginosa* вже на ранніх етапах. Однак використана методика не дає змоги зареєструвати зміни кількісних показників формування біоплівки на таких ранніх етапах. Виходячи з цього, було цікаво дослідити вплив Bi^{3+} -ТПП на більш тривалу в часі динаміку розвитку біоплівки *P. aeruginosa* PA01.

Для визначення кількісних змін у динаміці біоплівку вирощували у планшетах упродовж 1–7 діб. Одержані результати показали, що розвиток біоплівки у контролі не є рівномірним (рис. 3). З першої по другу добу маса біоплівки збільшилася на 17%, а за наступні 24 год зросла ще в 1,5 разу. З третьої по сьому добу щоденний приріст є стабільним і становить 11–13%. Загалом з першої доби і до закінчення експерименту біоплівка збільшується у 2,75 разу, при цьому найбільший приріст біоплівки спостерігали впродовж третьої доби. Вивчення динаміки формування біоплівки *P. aeruginosa* за внесення Bi^{3+} -ТПП виявило залежне від концентрації значне пригнічення цього процесу.

У разі передінкубації клітин з 0,4 мкМ дослідженої сполуки характер динаміки росту біоплівки нагадував контроль у перші 3 доби інкубації, але кількісні показники були нижчими приблизно в 1,6 разу. З третьої доби ріст біоплівки припинявся, і на сьому добу її маса була у 2,12 разу меншою порівняно з контролем. Таким чином, уже за впливу найменшої з досліджених концентрацій Bi^{3+} -ТПП формування біоплівки суттєво сповільнюється.

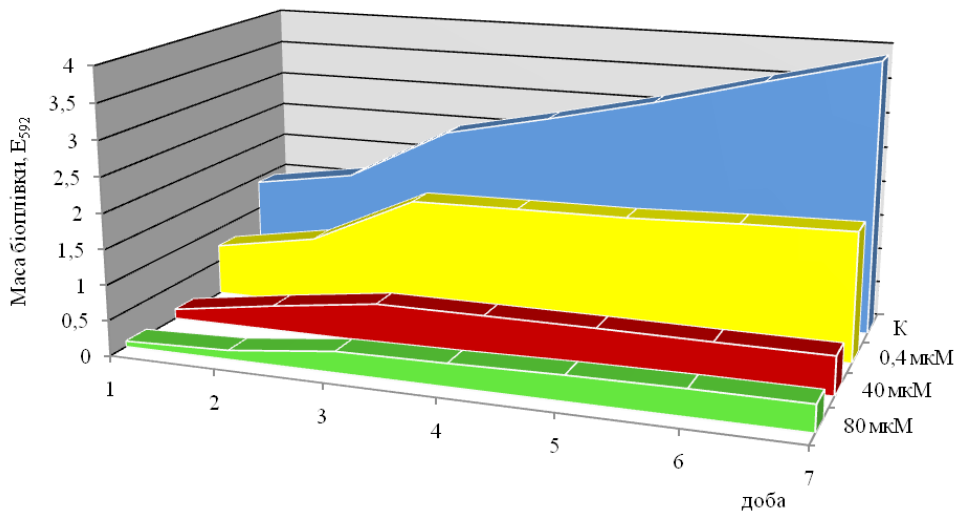


Рис. 3. Динаміка росту біоплівки *P. aeruginosa* PA01 за наявності Bi^{3+} -ТПП. **Примітка:** в усі строки дослідження маса біоплівок за дії Bi^{3+} -ТПП достовірно відмінна від контролю та інших концентрацій сполуки.

Ще більш виражене гальмування росту біоплівки спостерігали у разі передінкубації з 40 та, особливо, 80 мкМ Bi^{3+} -ТПП. Уже через 24 год маса утвореної біоплівки становила тільки 10 і 5% від контролю, відповідно. Біоплівка за цих умов представлена окремими клітинами, що прикріплені до дна лунок, і певною кількістю матриксу. Впродовж наступних двох діб загальна маса біоплівки зростала приблизно у 3 рази і далі більше не змінювалася. На третю добу, коли ріст біоплівки за всіх концентрацій вісмутowego комплексу зупинився,

її маса була меншою за контрольне значення у 5 і 8 разів при 40 та 80 мкМ досліджуваної сполуки, відповідно. Оскільки у контролі біоплівка постійно збільшувалася, на сьому добу за 40 та 80 мкМ маса біоплівок була меншою за контроль у 7 і 10 разів, відповідно.

Отримані дані свідчать про те, що Vi^{3+} -ТПП за усіх із досліджених концентрацій здатний порушувати процес формування біоплівки як за чисельними показниками, так і за її характером. Значне пригнічення розвитку біоплівки порівняно з контролем упродовж 168 год дає підстави припустити пролонговану дію Vi^{3+} -ТПП в умовах *in vitro*.

Підсумовуючі отримані результати, можна відмітити, що вісмутові комплекси порфіринів є ефективними інгібіторами утворення біоплівки *P. aeruginosa*. За даними світлової мікроскопії гальмування цього процесу починається з затримки адгезії клітин. На подальших етапах досліджувані сполуки запобігають утворенню структурних одиниць біоплівки – мікроколоній, як первинних, так і вторинних. За великих концентрацій вісмутових комплексів порфіринів мікроколонії практично не формуються і біоплівки представлені окремими клітинами та деякою кількістю позаклітинних полімерів. Крім того, за впливу досліджуваних порфіринів у складі матриксу зменшується вміст кислих полісахаридів, що призводить до його дестабілізації [2]. У свою чергу, це може сприяти відкріпленню клітин від біоплівки. Можливо, це пояснює менший інгібувальний вплив вісмутових комплексів на накопичення біомаси клітин у планктоні порівняно зі суттєвим гальмуванням розвитку біоплівки. Дослідження росту біоплівки упродовж семи діб показало, що передінкубація клітин навіть із найменшою з досліджених концентрацій Vi^{3+} -ТПП повністю зупиняє його після третьої доби, тоді як у контролі зареєстровано безперервний ріст біоплівки до закінчення експерименту.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРА

1. Балко О. Б., Авдеева Л. В. Структурні компоненти і особливості організації біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* // Мікробіол. журнал. 2010. Т. 72. № 4. С. 28–31.
2. Галкін М. Б., Ішков Ю. В., Іваниця В. О. та ін. Вплив комплексу мезо-тетра(4-N-метилпіридил)-порфірину з вісмутом на ріст та формування біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 // Мікробіологія і біотехнологія. 2008. № 1. С. 86–92.
3. Ішков Ю. В., Жилина З. И., Водзинский С. В. Порфирины и их производные. XXI // Журнал орг. химии. 2000. Т. 36. Вып. 4. С. 609–612.
4. Філіпова Т. О., Іваниця В. О., Галкін М. Б. та ін. Антибактеріальна активність металокомплексу мезо-тетра(4-N-метилпіридил)порфірину з вісмутом // Вісн. ОНУ. Біологія. 2005. Т. 10. Вип. 7. С. 167–172.
5. Bryers J. D., Characklis W. G. Processes governing primary biofilm formation // Biotechnol. bioeng. 1982. Vol. 24. P. 2451–2476.
6. Galkin N. B., Mukhlis Abedalabas Ismaeel, Pachomova E. Yu., Filipova T. The effect of *Pseudomonas aeruginosa* signal quinolone on the rhamnolipids biosynthesis and Rhamnolipid transferase 2 activity // European Scientific Journal. 2014. Vol. 3. P. 223–228.
7. Galkin M. B., Ivanitsia V. O., Ishkov Yu. V. et al. Characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* PA01 intercellular signaling pathway (Quorum Sensing) functioning in presence of porphyrins bismuth complexes // Pol. J. Microbiol. 2015. Vol. 64. N 2. P. 101–106.
8. Kadurugamuwa J. L., Beveridge T. J. Natural release of virulence factors in membrane vesicles by *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of aminoglycoside antibiotics on their release // J. Antimicrob. Chemother. 1997. Vol. 40. P. 615–621.
9. Kaplan J. B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses // J. Dent. Res. 2010. Vol. 89. N 3. P. 205–218.

10. Tolker-Nielsen T. Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms // J. Bact. 2000. Vol. 182. P. 6482–6489.
11. Watnick P. I., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm // Mol. microbiol. 1999. Vol. 34. P. 586–595.
12. Webb J. S., Thompson L. S., James S. et al. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development // J. Bact. 2003. Vol. 185. N 15. P. 4585–4592.

Стаття: надійшла до редакції 30.09.15

доопрацьована 02.12.15

прийнята до друку 11.12.15

PSEUDOMONAS AERUGINOSA PA01 BIOFILM FORMATION DYNAMIC IN PRESENCE OF THE MESO-TETRA(4-N-METHYLPIRIDYL)PORPHYRINE BISMUTH COMPLEX

M. Galkin

*Odesa National Mechnikov University
2, Dvoryanska St., Odesa 65082, Ukraine
e-mail: aerugen@onu.edu.ua*

Biofilms growth dynamic discovery at the first hours of incubation were carried out on 24×24 mm cover glasses that were placed in 35 mm Petri dishes containing 2 ml of the G18 media with *P. aeruginosa* cells (10^3 CFU/ml) and 0,4 or 40 μM of the meso-tetra-(4-N-methyl-piridyl)porphyrine bismuth complex (Bi^{3+} -TPP). Petri dishes with cover glasses were incubated from 15 min to 4 hours at 37°C. After incubation all cover glasses were washed with physiological solution, fixed with 96% ethanol for 10 minutes, and stained with crystal violet for 5 minutes. Cover glasses were examined with a microscope Primo Star PC, Carl Zeiss on × 900 and photographed with Olympus DCM (3,0 M pixels) camera. For biofilm growth dynamic discovery at time interval from 1 to 7 days biofilms were obtained in 48-well «Nunclon» polystyrol plates after preincubation with 0,4, 40 and 80 μM of the Bi^{3+} -TPP. Obtained results show that discovered substances in all concentrations violates the biofilm growth dynamic. It was shown that Bi^{3+} -TPP presence in culture medium delays a microcolony formation at the first hours of incubation. Discovered substance also demonstrated the ability to delay the development of *P. aeruginosa* PA01 biofilm on the time interval from 1 to 7 hours. In this condition in presence of each concentrations of the discovered substance biofilm development stops at third day.

Keywords: Pseudomonas aeruginosa PA01, meso-tetra(4-N-methyl-piridyl)porphyrine bismuth complex, biofilm, biofilm growth dynamic.

ДИНАМИКА ФОРМИРОВАНИЯ БИОПЛЁНКИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* RA01 ПРИ НАЛИЧИИ ВИСМУТОВОГО КОМПЛЕКСА МЕЗО-ТЕТРА(4-N-МЕТИЛ-ПИРИДИЛ)ПОРФИРИНА

Н. Галкин

*Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова
ул. Дворянская, 2, Одесса 65082, Украина
e-mail: aerugen@onu.edu.ua*

Для исследования динамики формирования биопленок в течение первых часов инкубации их получали на покровных стеклах размером 24×24 мм, переносили в пластиковые стерильные чашки Петри диаметром 35 мм, которые содержали по 2 мл среды Гиса с клетками *P. aeruginosa* (10^3 КОЕ/мл) и висмутового комплекса мезо-тетра(4-N-метилпиридил)порфирина (Vi^{3+} -ТПП) в концентрации 0,4 и 40 мкМ. Чашки со стеклами инкубировали от 15 мин до 4 ч при $37^\circ C$. После инкубации стекла отмывали от неприсоединенных клеток физиологическим раствором и фиксировали 96% спиртом 10 мин. После фиксации образцы окрашивали водными растворами кристаллического фиолетового в течение 5 мин. После высушивания стекла микроскопировали с использованием микроскопа Primo Star PC, Carl Zeiss при увеличении $\times 900$ и фотографировали с использованием камеры Olympus DCM (3,0 M pixels). Для изучения динамики формирования биопленки с 1 до 7 суток ее получали в 48-луночных полистироловых плоскодонных планшетах «Nunclon» после прединкубации клеток при внесении Vi^{3+} -ТПП в концентрации 0,4; 40 и 80 мкМ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что Vi^{3+} -ТПП при всех исследованных концентрациях значительно нарушает динамику формирования биопленки. В ходе исследования динамики формирования биопленки в первые часы инкубации было обнаружено, что Vi^{3+} -ТПП задерживает формирование микроколоний биопленки. Vi^{3+} -ТПП также обнаружил способность задерживать развитие биопленки в интервале времени от 1 до 7 суток. При всех использованных концентрациях Vi^{3+} -ТПП развитие биопленки практически прекращалось на третьи сутки.

Ключевые слова: Pseudomonas aeruginosa RA01, висмутовый комплекс мезо-тетра(4-N-метилпиридил)порфирина, биоплёнка, динамика формирования биоплёнки.