

УДК 616.322-002.2

**ОГЛЯД МЕТОДІВ КУЛЬТИВУВАННЯ БІОПЛІВОК
*IN VITRO***

Кравець Н.Я.

Тернопільський національний медичний університет
імені І.Я. Горбачевського МОЗ України

E-mail: kravets@i.ua

Формування біоплівки – це багатоетапний процес, який починається з мікробної адгезії з подальшим виробленням та накопиченням позаклітинного матриксу, що складається з однієї або декількох полімерних речовин, такі як білки, полісахариди, гумінові речовини, позаклітинна ДНК та інколи інші молекули, бере участь у спілкуванні між клітинами [2]. Науковці, які досліджують біоплівки активно працюють в цій сфері з кінця сімдесятих років, коли в перше було представлено громадській увазі визначення біоплівки, Біллом Костертеном та його колегами у 1978 р.[2]. Сьогодні встановлено, що більшість мікроорганізмів у природньому середовищі, існують, прикріпленими до поверхонь, у структурованій екосистемі біоплівки, а не як вільноплаваючі організми

Біоплівки є серйозною проблемою для здоров'я населення через підвищену стійкість організмів, асоційованих з біоплівками, до антимікробних препаратів і потенціалу цих організмів викликати інфекції у пацієнтів з постійними медичними пристроями. Робота значної кількості науковців направлена на пошук шляхів контролю здатності бактерій до плівкоутворення. Одним із актуальних напрямків мікробіологічних досліджень постає питання вибору методу культивування плівкоутворюючої здатності мікроорганізмів.

Матеріали та методи. Дослідження має теоретичний характер, представлений у методах аналізу, порівняння, систематизації отриманих даних.

Результати дослідження. В останні десятиліття відбулося значне розширення можливості вивчення формування мікробних біоплівок. Моделі, що використовуються для вивчення біоплівки, варіюються від простих *in vitro* до складних *in vivo* моделей тканин або пов'язаних з приладами. Основний напрямок цих досліджень пов'язаний з оглядом двох основних методів

культивування мікроорганізмів *in vitro*:

– статичні моделі, в яких є обмеження поживних речовин і аерації, а саме модель біоплівки колонії і мікротитрувальні планшети, які дозволяють здійснювати швидке кількісне визначення маси біоплівки (за допомогою фарбування барвниками) або життєздатності клітин;

– динамічні системи, які базуються на безперервності культури, у яких метаболічні продукти, дисперсні і мертві клітини постійно замінюється та досліджується вплив факторів навколишнього середовища: фізичної, а саме сили зсуву шарів біоплівки та хімічної стійкості біоплівки. Однак вони в більшості випадків менш адаптовані до високопродуктивного аналізу і часто вимагають спеціального обладнання та технічних навичок.

Безумовно, утворення біоплівки в мікротитрових пластинах, що належить до *статичні моделі*, є один з найпоширеніших методів. Вперше він був розроблений Медліном Флетчером для дослідження бактерій. У класичному варіанті бактеріальні клітини вирощують у лунках полістиролових мікротитрувальних пластинах. У різні моменти часу, лунки очищують і промивають видаляючи планктонні клітини перед фарбуванням біомаси прикріпленої до поверхні лунок. Біомасу біоплівки альтернативно можна кількісно визначити методиками для вимірювання біомаси та життєздатність біоплівки.

Біомасу та життєздатність біоплівки можна оцінити різними методами, що спираються на мікробіологічні та молекулярні методами або за фізичними чи хімічними властивостями біоплівка. Методи мікроскопії також є важливим інструментом для оцінки властивостей біоплівки, а саме, для опису просторової організації біоплівки та її не однорідностей та зв'язків із функціями спільнот. Визначення загальної біомаси біоплівки можна отримана із сухого або вологого вимірювання останньої. Обрахунок біомаси біоплівки вираховували як різницю у вазі між висушеним вмістом біоплівки та очищеним і висушеним планшетом до утворення біоплівки [2].

Колориметричні методи, які кількісно оцінюють екзополісахариди, загальні білки та вуглеводи застосовується для кількісного визначення біомаси біоплівки. Однак, кількість конкретних екзополісахаридних компонентів не обов'язково

співвідносяться з біоплівкою біомаса. Щоб цього уникнути, Pinkart та його колеги запропонували виміряти фосфоліпиди, які є клітинними компоненти, оскільки вони універсально розподілені і виражаються на відносно постійному рівні серед мікробної спільноти і через цикл росту [3]. Тим не менш, визначення фосфоліпідів обмежено швидкістю їх відновлення, кількістю фонового зараження ліпідів та чутливості аналітичного обладнання.

У хімічних методах використовують барвники або фтор-хромі які здатні зв'язуватися або адсорбуватися на компонентах біоплівки. Вони є непрямими методами і ними можна скористатися для вимірюють конкретних компонентів біоплівки, наприклад, такі що включає позаклітинні полімерні речовини. Фарбування генціанвіолетом для біоплівки є найбільш часто використовуваною методикою кількісного визначення в аналізах мікротитрованих планшетів [1]. Ці аналізи забарвлюють як живі, так і мертві клітини, а також деякі компоненти, присутні в матриці біоплівки, тим самим добре підходять для кількісної оцінки загальної біомаси біоплівки.

Відсутність стандартизованого протоколу, незважаючи на широко розповсюджене використання, спричинило появу великої кількості протоколів фарбування, які утруднюють порівняння результатів дослідження між собою.

Ступінь вираженості плівкоутворення мікроорганізмів, зокрема визначають за показником оптичної щільності (ОЩ) на спектрофотометрі при довжині хвилі 650 нм. Оптична щільність (ОЩ) кожного штаму отримують як середнє арифметичне показник поглинання світла із шести лунок, з подальшим порівнянням, з середнім показником поглинанням світла негативного контролю (ОЩ_{нк}). Для визначення здатності до утворення біоплівки була використана наступна класифікація: відсутність продукування біоплівки (ОЩ < ОЩ_{нк}), слабе продукування - (ОЩ_{нк} < ОЩ < 2 × ОЩ_{нк}), помірне продукування - (2 × ОЩ_{нк} < ОЩ < 4 × ОЩ_{нк}) та сильне продукування біоплівок – (4 × ОЩ_{нк} < ОЩ) [4].

Отже, моделі *in vitro*, часто розглядаються як надмірно спрощені, про те вони сприяють отриманню знань про фізіологію біоплівки, вивчення ролі різних генів, що беруть участь у процесах формування та регулювання біоплівки, а також інших прикладних цілей, таких як скринінг антимікробних агентів.

Також в найближчі роки потребує вирішення проблема, зрозуміння фізіологічної анатомії мікробних біоплівки та з'ясування їх мережі спілкування.

1. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices / Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J. et al // J Clin Microbiol. – 1985. – 22. – P. 996-1006.
2. Critical review on biofilm methods / Joana Azeredo, Nuno F. Azevedo, Romain Briandet, Nuno Cerca, Tom Coenye, et al. // Critical reviews in microbiology. –2017. – 43(3). – P.313-351
3. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci / Stepanovic S., Vukovic D., Hola V., et al. // APMIS. – 2007. – 115. – P. 891-899.
4. Trulear M.G., Characklis W.G. Dynamics of biofilm processes / Trulear M.G., Characklis W.G. // J Water Pollut Con F. – 1982 – .54. – P. 1288-301

УДК 575.224

**ВИВЧЕННЯ ДІЇ РІЗНИХ ДОЗ ФОРМАЛЬДЕГІДУ НА
ЧИСЕЛЬНІСТЬ ТА ТРИВАЛІСТЬ ЖИТТЯ У *DROSOPHILA
MELANOGASTER***

¹Крижановська М.А., ¹Морикіт С. В., ²Голуб Н.Я.

¹Тернопільський національний педагогічний університет імені
Володимира Гнатюка

²Львівський національний університет імені Івана Франка
E-mail: kryganovska@chem-bio.com.ua

Формальдегід (альдегід мурашиної кислоти, метаналь) – газоподібна безколірна речовина з дуже характерним різким запахом, подразнює слизові оболонки очей і верхніх дихальних шляхів, отрута. Добре розчиняється у воді, спирті, ефірі. Він, природньо, виробляється в невеликих кількостях в організмі людини і більшості живих організмів [4].

Досить давно відомі бактерицидні властивості цієї хімічної сполуки – всім знайомий формалін, що застосовується в анатомії