

Національний університет «Чернігівський колегіум» імені Т.Г.Шевченка

Природничо-математичний факультет

Кафедра біології

**Методи дослідження бактеріальних біоплівок:
методичні вказівки до лабораторних робіт для
студентів спеціальності 091. Біологія**

Чернігів 2021

УДК 57(075.8)

M54

Методи дослідження бактеріальних біоплівки: методичні вказівки до лабораторних робіт для студентів спеціальності 091. Біологія / Укладач Ткачук Н.В. Чернігів: НУЧК імені Т.Г.Шевченка, 2021. – 39 с.

У навчально-методичному посібнику наведено лабораторні роботи до курсу «Функціонування мікроорганізмів у біоплівках», які містять опис деяких методів дослідження бактеріальних біоплівки, серед яких є прості та доступні. До кожної лабораторної роботи зазначено тему, мету, матеріали та обладнання, теоретичні відомості, методику дослідження, завдання та контрольні питання. Посібник розрахований на студентів природничих факультетів закладів вищої освіти, викладачів та науковців.

Рецензенти:

Демченко Н.Р. - к.б.н., доцент кафедри біології Національного університету «Чернігівський колегіум» імені Т.Г.Шевченка, м.Чернігів

Рекомендовано на засіданні кафедри біології
Національного університету «Чернігівський колегіум» імені Т.Г.Шевченка
(Протокол № 1 від 31 серпня 2021 року)

© Ткачук Н.В., 2021

ЗМІСТ

Вступ.....	4
Лабораторна робота №1. Дослідження агрегаційних властивостей бактерій.....	5
Лабораторна робота №2. Дослідження гідрофобних властивостей бактерій за сольовим агрегаційним тестом.....	7
Лабораторна робота №3. Візуальна індикація місць локалізації біоплівки за допомогою каталазного експрес-тесту. Культивування статичних біоплівок у рідині.....	10
Лабораторна робота №4. Опосередкована ідентифікація амілоїдних волокон за допомогою барвника конго червоного.....	14
Лабораторна робота №5. Дослідження біомаси сформованої біоплівки за фарбування її кристалічним фіолетовим.....	18
Лабораторна робота №6. ХТТ-редуктазна проба у дослідженні кількості живих клітин в біоплівках.....	23
Лабораторна робота №7. Підготовка біоплівок до скануючої електронної мікроскопії.....	25
Лабораторна робота №8. Вплив антисептиків на бактеріальні плівки.....	29
Лабораторна робота №9. Використання програми ImageJ для кількісної оцінки здатності бактерій формувати біоплівки.....	33
Склад розчинів та середовищ.....	37
Список використаної та рекомендованої літератури.....	38

Вступ

На сьогодні біоплівки мікроорганізмів активно досліджуються, зважаючи на їх значення для екології, промисловості, господарства та медицини (рис.1).



Рис. 1. Значення біоплівок для екології, промисловості, господарства та медицини. Представлено позитивні (виділено чорним) та негативні (виділено червоним) аспекти розвитку біоплівок [3]

Біоплівка - це мікробне угруповання, яке характеризується клітинами, прикріпленими до поверхні або одна до одної, заключене у матрикс синтезованих ними позаклітинних полімерних сполук, а також демонструючих зміну фенотипу, вираженого зміною параметрів росту та експресії специфічних генів.

У пропонованому навчально-методичному посібнику наведено лабораторні роботи до курсу «Функціонування мікроорганізмів у біоплівках». Зазначеним курсом передбачено набуття студентами-магістрантами компетенцій і компетентностей про організацію біоплівок, принципи їх формування, механізми існування мікроорганізмів у прикріпленому стані, значення біоплівок у природі та практичній діяльності людини. До кожної лабораторної роботи зазначено тему, мету, матеріали та обладнання, теоретичні відомості, методику дослідження, завдання та контрольні питання. Посібник розрахований на студентів природничих факультетів закладів вищої освіти, викладачів та науковців.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №1

Тема: Дослідження агрегаційних властивостей бактерій

Мета: Навчитися визначати агрегаційні властивості бактерій за агрегаційним методом, запропонованим Del Re зі співавторами

Матеріал та обладнання

1. Одно-добова культура бактерій;
2. Стерильний фосфатний буфер – 20 мл;
3. Центрифуга;
4. Стерильні пробірки типу Еппендорф на 5 мл – 6 шт.;
5. Фотоелектроколориметр, кювети;
6. Стерильні піпетки на 1 мл – 6 шт.;
7. Фільтрувальний папір;
8. Маркер;
9. Етиловий спирт (70%-ний та 96%-ний);
10. Сірники;
11. Вата;
12. Спиртівки;
13. Ємність з дезінфікуючим розчином.

Теоретичні відомості

Доступним методом дослідження агрегації штамів є агрегаційний тест, запропонований Del Re et al. у 2000 році [6]. За цим методом 2 мл культури центрифугують протягом 10 хв. (5000 об/хв), осад ресуспендують у 2 мл фосфатного буфера та вимірюють оптичну щільність при 600 нм. Далі суспензію інкубують 2 години при 30°C та знову вимірюють оптичну щільність верхнього шару (1 мл). Агрегацію розраховують за формулою:

$$\left[1 - \left(\frac{A_0}{A}\right)\right] * 100\%$$

, де A_0 - оптична щільність верхнього шару бактеріальної суспензії після інкубації 2 години при 30°C; A – оптична щільність до інкубації.

Завдання:

1. Ознайомитися з методикою досліду, скласти його схему.
2. Дослідити агрегаційні властивості бактерій за пропонуваним агрегаційним тестом.
3. Заповнити таблицю 1.

Таблиця 1

Агрегаційні властивості досліджуваних бактерій

Бактерії	Оптична щільність								Агрегація, %
	до інкубації (A)				після інкубації (A ₀)				
	A ₁	A ₂	A ₃	A _{сер}	A ₀₁	A ₀₂	A ₀₃	A _{0сер}	

4. Зробити висновок.

Контрольні питання

1. В чому полягає методика агрегаційного тесту Del Re et al.?
2. З якою метою суспензію бактерій інкубують 2 години при 30 °C?
3. Що означають показники A та A₀ у формулі для розрахунку агрегації?
4. Які інші методики для дослідження агрегації штамів Вам відомі?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №2

Тема: Дослідження гідрофобних властивостей бактерій за сольовим агрегаційним тестом

Мета: Навчитися визначати гідрофобні властивості бактерій за сольовим агрегаційним тестом

Матеріал та обладнання

1. Одно-добові культури бактерій;
2. Розчини $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ у натрій-фосфатному буфері (від 0,2 М до 4,0 М) – по 2 мл кожний;
3. Предметні скельця;
4. Бактеріологічні петлі;
5. Маркер;
6. Етиловий спирт (70%-ний та 96%-ний);
7. Сірники;
8. Вата;
9. Спиртівки.

Теоретичні відомості

Гідрофобна взаємодія, тобто взаємодія між двома неполярними групами має принципово важливе значення як прикріплення бактерій одна до одної, так і прилипання бактерій до поверхонь. Тому кількісне визначення бактеріальної гідрофобності клітинної поверхні може дати нам інформацію про ступінь гідрофобної взаємодії між бактеріями, а також між бактеріями та поверхнями. Ця інформація може вказувати на роль бактеріальної поверхневої гідрофобності в певній інфекції [10].

Гідрофобність бактеріальної поверхні клітини визначається білками та ліпідами (включаючи ліпотейхоеві кислоти) (табл.2) [10].

Поверхневі бактеріальні компоненти, які визначають гідрофобність [10]

Метод дослідження бактеріальної гідрофобності	Компонент бактеріальної клітини
Сольовий агрегаційний тест	М-білок у групі стрептококів
	Фімбрії <i>Streptococcus sanguis</i>
	Білок А стафілококів
	Фібронектин-подібні білки
	Колонізуючий фактор антиген I, II у <i>Escherichia coli</i>
	Фімбрії <i>E. coli</i>
У хроматографії гідрофобної взаємодії	Гемаглютинін <i>E. coli</i>
	Білок А стафілококів
	Фімбрії <i>E. coli</i>
Гексадеканова проба	04, 06, 018ac, 075, 078 антигени <i>E. coli</i>
	Білковий антиген I/II (B) <i>Streptococcus mutans</i>
Двофазне розділення	Один з білків <i>Streptococcus sanguis</i>
	Ліпотейхоєва кислота групи А стрептококів

Гідрофобність штамів можна оцінити, зокрема, за сольовим агрегаційним тестом, який базується на утворенні агрегатів бактеріями у присутності амоній сульфату за концентрації від 0,2 М до 4,0 М (рис.2) [8]. Для оцінки гідрофобності штамів використовують шкалу оцінки гідрофобності бактерій: з високою гідрофобністю (<1,0 М), помірної гідрофобності (1,0-2,0 М), низької гідрофобності (>2,0 М).

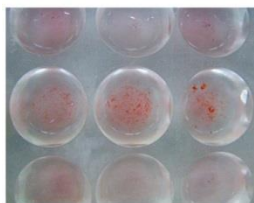


Рис. 2. Сольовий агрегаційний тест [6]

Завдання:

1. Ознайомитися з методикою досліду, скласти його схему.
2. Дослідити гідрофобні властивості бактерій та заповнити таблицю 3.

Таблиця 3

Агрегаційні властивості бактерій за сольовим агрегаційним тестом

Бактерії	Концентрація $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, моль/л														Гідрофобність								
	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0	2,2	2,4	2,6	2,8		3,0	3,2	3,4	3,6	3,8	4,0		

Примітка: — - агрегати не утворюються; + - агрегати утворюються

3. На основі отриманих даних оцінити гідрофобні властивості бактерій.
4. Зробити висновок.

Контрольні питання

1. Дайте визначення поняттю гідрофобність. З якою метою досліджують гідрофобність бактерій?
2. Які особливості будови та складу забезпечують гідрофобність бактерій?
3. Поясніть, яким чином можна оцінити гідрофобність бактерій?
4. За якою шкалою оцінюють гідрофобність бактерій у сольовому агрегаційному тесті?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №3

Тема: Візуальна індикація місць локалізації біоплівки за допомогою каталазного експрес-тесту. Культивування статичних біоплівок у рідині

Мета: Навчитися здійснювати візуальну індикацію місць локалізації біоплівок за допомогою каталазного експрес-тесту; навчитися культивувати статичні біоплівки у рідині

Матеріал та обладнання

1. Зразки матеріалів для дослідження на наявність на них бактеріальних біоплівок;
2. Гідроґен пероксид (3%-ний) – 20 мл;
3. Медичні піпетки;
4. Одно-добові культури бактерій;
5. Стерильні скляні піпетки (1 мл) – 10 шт.;
6. Стерильний МПБ у пробірках (5 мл) – 3 шт.;
7. Стерильні скляні пробірки (20 мл) – 5 шт.;
8. Маркер;
9. Фотоелектроколориметр, кювети;
10. Етиловий спирт (70%-ний та 96%-ний);
11. Сірники;
12. Вата;
13. Спиртівки;
14. Ємність з дезінфікуючим розчином.

Теоретичні відомості

Для експрес-індикації місць можливого біологічного забруднення, виявлення бактеріальної контамінації абіотичних поверхонь, зокрема в стані біоплівок застосовується каталазний експрес-тест. Цей тест базується на реакції індикатора на основі гідроґен пероксиду з каталазою, яка у бактеріальній клітині є ферментом системи антиоксидантного захисту. В ході

реакції відбувається ферментативне руйнування гідроген пероксиду до кисню та води. Слід зазначити, що на чистоту проведення каталазного експрес-тесту не впливає наявність незначної кількості каталазонегативних штамів бактерій, оскільки біоплівка, як правило, має полівидовий склад [2].

Індикатор містить як основну діючу речовину гідроген пероксид (3%-ний), функціональні компоненти, які збільшують чутливість індикатора – N-кокоалкіл-N,N-диметиламін-оксид) та технологічні компоненти (загущувачі, розчинники). За умови дотримання всіх рецептурних характеристик індикатора чутливість каталазного експрес-тесту становить від 10^4 клітин/мл бактерій [2].

Перед нанесенням каталазного індикатора досліджувану поверхню очищують та дезінфікують. Каталазний індикатор наносять розпиленням з відстані від 10 до 15 см у кількості 2,0-3,0 мл на 5 см^2 поверхні, у відповідності з інструкцією виробника, не припускаючи збовтування. Позитивна реакція розвивається протягом 5-30 секунд після нанесення індикатора і проявляється у процесі барботування (утворенні мікропухирців при реакції виділення кисню). Це є підтвердженням наявності каталазопозитивних форм бактерій на досліджуваній поверхні, зокрема в стані біоплівки [2].

Стандартною системою для вивчення мікробних угруповань *in vitro* є статичні біоплівки. Для дослідження статичних біоплівок використовують різноманітні тести, більшість з яких є досить простими та мають високу пропускну здатність. В той же час, такі моделі не враховують аерацію, додавання свіжого середовища та інших факторів, що мають місце у природних системах. Проте цей метод дозволяє оцінити внесок конкретного ізольованого фактору середовища, а також проводити скринінгові дослідження [1].

В залежності від задачі для культивування біоплівок використовують полістиролові планшети з різною кількістю лунок – 6, 12, 24, 96. Для експрес-тестів прийнято використовувати круглодонні (U-подібні) 96-

лункові планшети. Також біоплівки культивують на скельцях, в пробірках типу Еппендорф, в чашках Петрі різного діаметру, силіконових та білкових субстратах, катетерах, полікарбонаті тощо. Найчастіше поверхню розміщують у рідкому середовищі. Для однієї культури, що швидко росте, вважається можливим культивування за нестерильних умов. За інших умов субстрати за можливості стерилізують в полум'ї, автоклавуванням або ультрафіолетовим випромінюванням [1].

В якості інокуляту для отримання біоплівок використовують нічну культуру, яка виросла до стаціонарної фази. Оптична щільність (OD_{600}) культури, яка вноситься до лунки, називається **стартовою**. Багато в чому швидкість утворення біоплівки визначається саме цим параметром. Досліджувану культуру розводять свіжим стерильним середовищем до оптичної щільності $OD_{600}=0,01-0,05$ опт. одиниць. Для культур, які ростуть повільно інколи використовують більш високу стартову щільність - до $OD_{600}=0,1-0,2$. Для експрес-тестів культуру часто розводять у співвідношенні 1:100, щоб нівелювати значення стартової щільності в експерименті. Зокрема часто використовують розведення 1:20, оскільки воно в цілому дає прийнятну швидкість росту культури. Якщо використовують декілька культур або штамів, стартову оптичну щільність культури нормують, тобто доводять до одного значення. Інокуляцію та розведення зручно проводити у ламінарному боксі при циркуляції стерильного повітря [1].

Для достовірного підрахунку результатів необхідно використовувати не менше 4-5 лунок на один дослідний зразок. Додатково використовують негативний контроль - засівають чотири лунки стерильним середовищем без бактерій. Після вищеперерахованих дій ємність з середовищем або планшет щільно закривають кришкою та розміщують в термостаті за оптимальної для мікроорганізмів температури у горизонтальному положенні на рівній поверхні [1].

Завдання:

1. Прочитати теоретичні відомості, скласти схему методики візуальної індикації місць локалізації біоплівки за допомогою каталазного експрес-тесту та дати визначення поняттю стартова щільність культури.
2. За допомогою каталазного експрес-тесту візуально оцінити наявність біоплівки на досліджуваних поверхнях. Зафіксувати результати у рисунках чи фотографіях.
3. Приготувати бактеріальну культуру 1 зі стартовою оптичною щільністю OD_{600} 0,05 опт. одиниць.
4. Приготувати бактеріальну культуру 2 зі стартовою оптичною щільністю OD_{600} 0,1 опт. одиниць.
5. Зробити висновок.

Контрольні питання

1. Який метод дослідження використовують для експрес-індикації бактеріальних плівок?
2. На якій реакції базується каталазний експрес-тест? Яка його чутливість?
3. Як здійснити каталазний експрес-тест?
4. Як називаються біоплівки, які є стандартною системою для вивчення мікробних угруповань *in vitro*?
5. Наведіть приклади поверхонь, на яких можна культивувати статичні біоплівки. В чому полягає підготовка поверхонь до вирощування біоплівки?
6. Дайте визначення поняттю стартова оптична щільність. Як і у яких одиницях вона визначається?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №4

Тема: Опосередкована ідентифікація амілоїдних волокон за допомогою барвника конго червоного

Мета: Навчитися здійснювати опосередковану ідентифікацію амілоїдних волокон за допомогою барвника конго червоного

Матеріал та обладнання

1. Одно-добові бактеріальні культури;
2. Стерильне середовище LBA (2%) з конго червоним – 125 мл;
3. Стерильне середовище LBA (2%) без конго червоного – 125 мл;
4. Бактеріологічні петлі;
5. Стерильні чашки Петрі – 4 шт.;
6. Маркер;
7. Етиловий спирт (70%-ний та 96%-ний);
8. Сірники;
9. Вата;
10. Спиртівки.

Теоретичні відомості

Екзополісахаридний матрикс забезпечує міцне прикріплення біоплівки до різних поверхонь та є основним маркером її зрілості. Розповсюдженим якісним способом аналізу формування біоплівки є метод, в якому продукція основної речовини оцінюється за кольором колоній, що вирости на поверхні середовища агару конго червоний (табл.4).

Таблица 4

Якісна оцінка здатності бактерій формувати біоплівку

Здатність бактерій утворювати основну речовину (екзополісахаридний матрикс) біоплівки	Результати оцінки
1	2

1	2
Відсутня	Рожевий колір колоній
Низька	Рожевий колір колоній з більш темним забарвленням центру
Помірна	Червоно-коричневий або бордовий колір колоній
Виражена	Практично чорний колір колоній

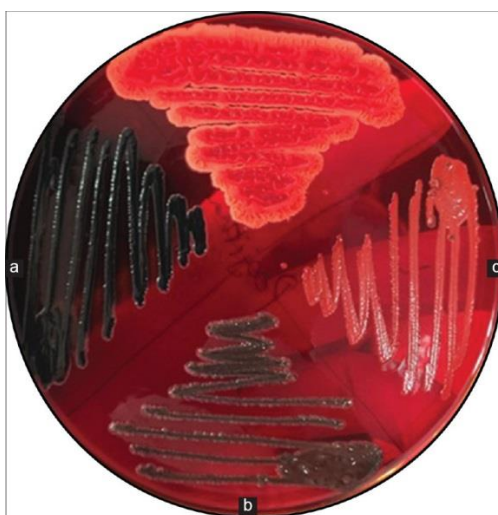


Рис. 3. Виявлення здатності бактерій формувати біоплівки методом з використанням агару Конго червоного, показує сильно позитивні (а), помірно позитивні (b) та негативні (с) результати [9]

З метою **якісної** оцінки здатності бактерій утворювати амілоїдні структури, мікроорганізми культивують на середовищі з барвником. В середовище LBA (2%) перед автоклавуванням додають барвник конго червоний за кінцевої концентрації 25 мкг/мл (0.0025%). Далі стерильне середовище розливають у чашки Петрі помірним шаром. Посів досліджуваної культури проводять бактеріологічною

петлею методом штриха. Також використовують контролі на LBA з барвником: негативний контроль - посів культури, яка не має амілоїдних білків; позитивний контроль - посів культури, яка має амілоїдні білки (наприклад, *E.coli*). Щоб показати колір колоній за природних умов додатково засівають чашки з середовищем LBA без барвника. Далі засіяні чашки розміщують у термостаті за необхідних температурних умов. Через певні проміжки часу роблять фотографії чашек. Отримані результати порівнюють з даними таблиці 3 та оцінюють здатність досліджуваних бактерій до утворення біоплівки. Обов'язково перевіряють забарвлення колоній контролів: негативний контроль має бути забарвленим у блідо-рожевий колір; позитивний контроль - у яскраво-червоний колір [1].

Для **кількісної** оцінки продукції амілоїдоподібних білків використовують біомасу з бактеріальних культур. Для цього колонії досліджуваної культури, негативного та позитивного контролів знімають петлею зі стандартного середовища LBA (2%) та ресуспендують у фізіологічному розчині (0,9%-ному розчині NaCl). Далі клітини розводять до оптичної щільності $OD_{600} = 0,5-1$ опт. од. Потім 1 мл отриманої суспензії осаджують при 14000 об/хв, супернатант видаляють. У деяких випадках доцільно осаджувати клітини з більшого об'єму для збільшення точності методу. До осаджених клітин додають 1 мл 0,0025% конго червоного у фізіологічному розчині. Інкують за кімнатної температури протягом 10 хвилин. Клітини повторно осаджують, супернатант відбирають та вимірюють його оптичну щільність за довжини хвилі 490-500 нм. В якості контролю використовують оптичну щільність вихідного розчину конго червоного. За зменшенням оптичної щільності роблять висновок про кількість барвника, що зв'язався з білками, а, отже, й про здатність бактерій продукувати амілоїдоподібні білки [1].

Завдання:

1. Ознайомитися з методиками якісної та кількісної ідентифікації амілоїдних волокон за допомогою барвника конго червоного, скласти їх схеми.

2. Дослідити здатність бактерій формувати біоплівки методом з використанням агару конго червоного. Результати занести до таблиці 5.

Таблиця 5

Результати якісної оцінки здатності бактерій формувати біоплівку

Вид (штам) бактерій	Результати оцінки	Здатність бактерій утворювати основну речовину (екзополісахаридний матрикс) біоплівки

3. Зробити висновок.

Контрольні питання

1. Який структурний компонент біоплівки є основним маркером її зрілості?
2. Який якісний метод дозволяє оцінити здатність бактерій формувати біоплівку? Охарактеризуйте його.
3. Які результати оцінки за якісним методом вказують на відсутність у бактерій здатності утворювати екзополісахаридний матрикс? Вкажіть біоплівкоутворювальну активність таких бактерій.
4. Які результати оцінки за якісним методом вказують на виражену здатність бактерій утворювати екзополісахаридний матрикс? Вкажіть біоплівкоутворювальну активність таких бактерій.
5. Наведіть методику кількісної оцінки продукції амілоїдоподібних білків бактеріальних культур.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №5

Тема: Дослідження біомаси сформованої біоплівки за фарбування її кристалічним фіолетовим

Мета: Навчитися досліджувати біомасу сформованої біоплівки за фарбування її кристалічним фіолетовим

Матеріали та обладнання

1. Одно-добові бактеріальні культури;
2. 0,1%-ний водний розчин кристалічного фіолетового;
3. Стерильні пробірки типу Еппендорф (1,5 мл) – 10 шт.;
4. Стерильні піпетки (1 мл) – 10 шт.;
5. Пробірки скляні нестерильні (20 мл) – 10 шт.;
6. Стандарт спиртового розчину кристалічного фіолетового (10 мг/л);
7. Стандарт каламутності 0,5 МакФарланда;
8. Стерильний 0,9%-ний розчин NaCl - у пробірках по 5 мл (5 шт.) та колбі 125 мл;
9. Етиловий спирт (70%-ний та 96%-ний) – по 100 мл;
10. Ємність з дезінфікуючим розчином;
11. Маркер;
12. Сірники;
13. Вата;
14. Спиртівки.

Теоретичні відомості

Для визначення біоплівкоутворювальної здатності мікроорганізмів можна використати простий та дешевий метод непрямого вимірювання біомаси біоплівки бактерій за адсорбцією/десорбцією кристалічного фіолетового, запропонований Stepanović зі співавторами у 2000 р. [11]. За цим методом для кількісної оцінки товщини сформованих біоплівок використовують концентрації кристалічного фіолетового у відмивних

спиртових розчинах і масу фарбника, який був сорбований біоплівкою. Вважається, що біомаса сформованих біоплівок прямо пропорційна концентрації кристалічного фіолетового у відмивних розчинах, масу біоплівки представляють як масу барвника, який був поглинений біоплівкою при забарвленні.

Досліджувані бактерії культивують у елективному середовищі протягом 24 годин. Далі з використанням стерильного NaCl готують бактеріальну суспензію, кількість клітин в якій відповідає стандарту каламутності 0,5 МакФарланда (10^8 клітин/мл) з наступним розведенням суспензії у стерильному NaCl методом граничних десятикратних розведень з отриманням суспензії 10^5 клітин/мл. Саме її використовують у експерименті. Готують стерильні пробірки типу Еппендорф (1,0 мл), у які асептично наливають стерильне поживне середовище (0,9 мл) та додають 0,1 мл бактеріальної суспензії. Кожний варіант експерименту закладають у потрібній повторності. Дослідні пробірки ставлять у термостат для інкубації різний період часу (в залежності від мети експерименту). Потім вміст пробірок виливають, до пробірок вносять стерильну дистильовану воду (або стерильний фізіологічний розчин) та енергійно струшують, щоб видалити всі неадгезовані бактерії. Пробірки висушують та бактеріальні клітини, які прилипли, фіксують 96%-ним етанолом протягом 20-30 хвилин. Після цього етанол видаляють та бактерії забарвлюють 1 мл 0,1%-ного водного розчину кристалічного фіолетового при 30°C протягом 30 хвилин. Розчин зливають і пробірки промивають від надлишкового барвника під проточною водопровідною водою. Після висушування кожну пробірку знебарвлюють 96%-ним етанолом та вимірюють оптичну щільність отриманих розчинів кристалічного фіолетового спектрофотометром (або фотоелектроколориметром) при 500-600 нм (найчастіше при 590 нм). Негативним контролем є ростове середовище [1, 11].

Штами класифікують на наступні категорії: неадгезивні (0), слабо (+), помірно (++) , сильно (+++) адгезивні, базуючись на оптичних щільностях досліду (OD_d) та контролю (OD_k) бактеріальних біоплівкок [11]:

$OD_d \leq OD_k$ – неадгезивні;

$OD_k < OD_d \leq 2 \times OD_k$ – слабоадгезивні;

$2 \times OD_k < OD_d \leq 4 \times OD_k$ – помірноадгезивні;

$4 \times OD_k < OD_d$ – сильноадгезивні.

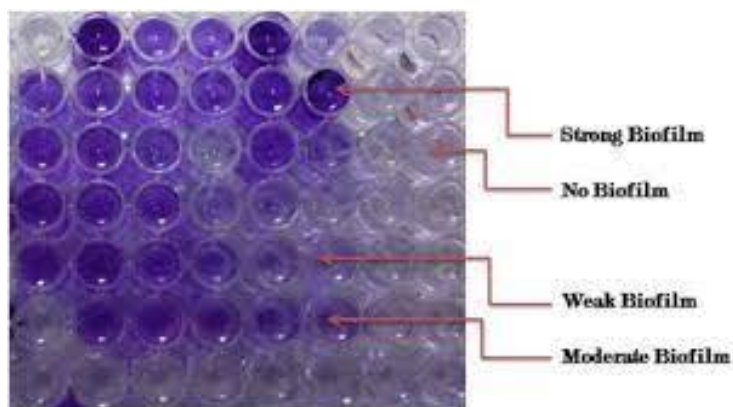
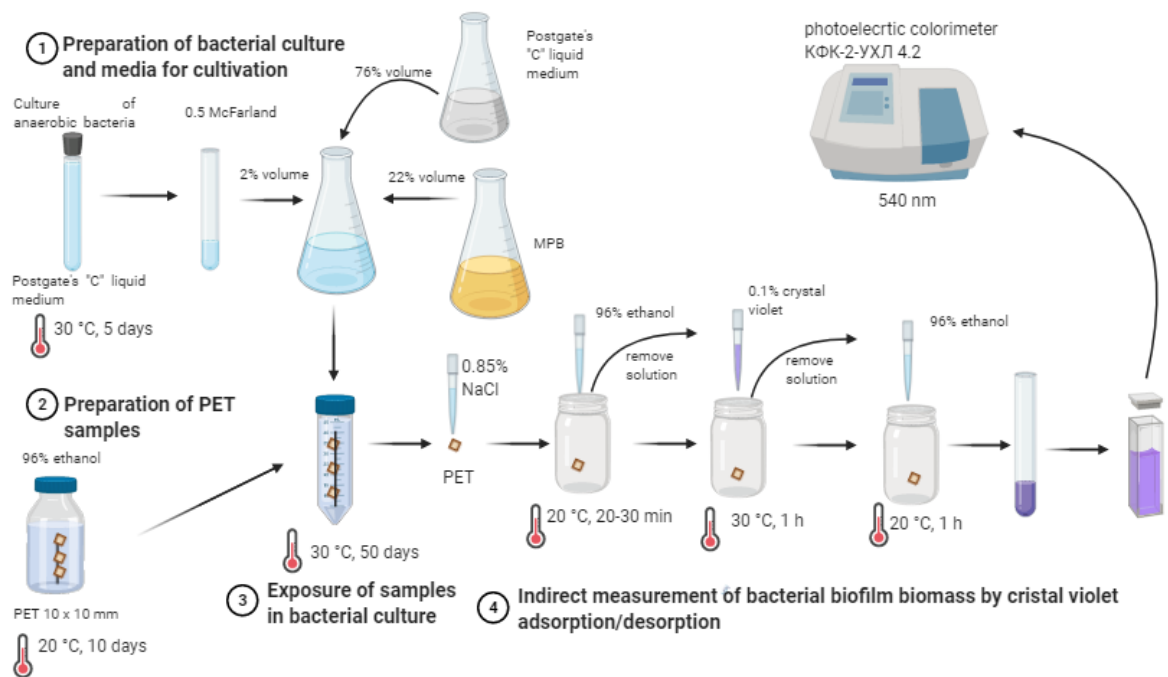


Рис. 4. 96-лунковий планшет з кристалічним фіолетовим, адсорбованим біоплівкою *Salmonella typhi* [12]

Метод не дозволяє оцінити **кількість клітин в біоплівці**. З метою оцінки вкладу клітин у загальну щільність біоплівки здійснюють посів бактерій на щільне поживне середовище. Для цього до пробірки з біоплівкою після промивання від планктонних клітин додають стерильний буферний розчин (або стерильний фізіологічний розчин) та обробляють ультразвуком при 40% інтенсивності протягом 8 сек (для руйнування біоплівки та вивільнення клітин з матриксу). Отриману суспензію клітин висівають на поверхню агаризованого середовища, інкубують, підраховують кількість клітин та визначають кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) з урахуванням розведення. З метою калібрування метод повторюють із суспензією планктонної культури з відомою концентрацією клітин, щоб врахувати вплив ультразвуку на життєздатність бактерій. При обробці зрілих біоплівкок додатково має сенс висівати супернатант для визначення числа клітин, які вийшли з біоплівки [1].



Created in BioRender.com bio

Рис. 5. Методологія експерименту з визначення біоплівкоутворення бактерій-анаеробів на поверхні поліетилентерефталату

Завдання:

1. Ознайомитися з методикою дослідження, скласти його схему.
2. Дослідити біомасу сформованої біоплівки за фарбування її кристалічним фіолетовим та заповнити таблицю 6.

Таблиця 6

Інтенсивність біоплівкоутворення досліджуваних бактерій

№ з/п	Варіант експерименту	OD ₅₄₀ розчину кристалічного фіолетового	Барвник, поглинутий біоплівкою, мкг/мл	Категорія штаму за адгезивністю
1	2	3	4	5
1.	Стандарт кристалічного фіолетового (10 мг/л) у 96%-ному спирті			

1	2	3	4	5
2.	Контроль (середовище без бактерій)			
3.				
4.				
5.				

3. Оцінити інтенсивність біоплівкоутворення у досліджуваних бактерій.
4. Зробити висновок.

Контрольні питання

1. Хто запропонував метод непрямого вимірювання біомаси біоплівки бактерій за адсорбцією/десорбцією кристалічного фіолетового?
2. На чому базується метод непрямого вимірювання біомаси біоплівки бактерій за адсорбцією/десорбцією кристалічного фіолетового?
3. Наведіть методику непрямого вимірювання біомаси біоплівки бактерій за адсорбцією/десорбцією кристалічного фіолетового.
4. За якою шкалою оцінюють адгезивність бактерій з використанням методу непрямого вимірювання біомаси біоплівки бактерій за адсорбцією/десорбцією кристалічного фіолетового?
5. Чи дозволяє метод непрямого вимірювання біомаси біоплівки бактерій за адсорбцією/десорбцією кристалічного фіолетового оцінити кількість клітин в біоплівці?
6. Як оцінити кількість клітин в біоплівці?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №6

Тема: ХТТ-редуктазна проба у дослідженні кількості живих клітин в біоплівках

Мета: Навчитися досліджувати кількість живих клітин в біоплівках з використанням ХТТ-редуктазної проби

Матеріал та обладнання

1. Пробірки типу Еппендорф із сформованими біоплівками – 6 шт.;
2. Розчин ХХТ (200 мкМ);
3. Розчин менадіона (60 мкМ);
4. Стерильні піпетки (1 мл) – 10 шт.;
5. Маркер;
6. Спектрофотометр (фотоелектроколориметр) та кювети;
7. Фільтрувальний папір.

Теоретичні відомості

Кількість живих клітин в біоплівках дозволяє оцінити ХТТ-редуктазна проба. Хімічна формула ХТТ - 2,3-біс-(2-метокси-4-нітро-5-сульфофеніл)-2Н-тетразолій-5-карбоксанлід. Це різновид тетразолієвих солей, розчини яких прозорі та нетоксичні для клітин. При додаванні активаторів метаболізму життєздатні клітини переводять ХТТ у формазон, який має забарвлення, що добре реєструється. Метод досить простий та має високу пропускну здатність, не порушує цілісність клітин та дає чисельні показники [1].

Модифікацій цього методу багато, зокрема й комерційних. Вони базуються на визначенні метаболічної активності клітин про- та еукаріот.

Завдання:

1. Ознайомитися з методикою досліду, скласти його схему.
2. Біоплівки, заздалегідь вирощені у пробірках типу Еппендорф, двічі промити стерильним натрій-фосфатним буферним розчином.

3. Додати розчин ХТТ (за концентрації 200 мкМ) до клітин, інкубувати 20 хвилин при 37° С. Пробірки періодично струшувати.
4. Після інкубації в пробірки до розчину додати 60 мкМ менадіона, перемішати та продовжити інкубацію протягом 40 хвилин.
5. Відібрати у чисті пробірки розчин, який забарвився.
6. Виміряти оптичну щільність кольорових розчинів за довжини хвилі 470 нм на спектрофотометрі. Дані занести до таблиці 7.

Таблиця 7

Оптична щільність розчинів за ХТТ-редуктажною пробою

№ з/п	Варіант експерименту	OD ₄₇₀ розчину формазону
1.		
2.		
3.		

6. Зробити висновок.

Контрольні питання

1. З якою метою використовується ХТТ-редуктазна проба?
2. Що являє собою ХТТ?
3. З якою метою додають активатори метаболізму клітини у ХТТ-редуктазній пробі?
4. Наведіть методику ХТТ-редуктазної проби.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №7

Тема: Підготовка біоплівки до скануючої електронної мікроскопії

Мета: Навчитися готувати біоплівки до скануючої електронної мікроскопії

Матеріал та обладнання

1. Накривні скельця із сформованою біоплівкою – 6 шт.;
2. Стерильний натрій-фосфатний буфер;
3. **Свіжовиготовлений** розчин глутарового альдегіду у фізіологічному розчині (1%-ний);
4. Дистильована вода;
5. Пінцет;
6. Розчини етилового спирту (30%-ний, 50%-ний, 70%-ний, 80%-ний, 90%-ний, 96%-ний) – 20 мл;
7. Скляні бюкси – 12 шт.

Теоретичні відомості

Скануюча електронна мікроскопія (SEM) дозволяє візуалізувати морфологічну структуру біоплівки за значного збільшення (рис.6). Зйомка відбувається у режимі високого вакууму при 2 кВ. Важливою умовою є ретельна фіксація препарату та його зневоднення в серії розчинів спирту, оскільки дослідження відбувається в умовах вакууму та впливає пучок електронів. Схема пробопідготовки біоплівки та планктонних культур подібна, крім того, що всі маніпуляції з плівками проводяться вже на підложці, що підходить для розміщення у мікроскоп. Всі маніпуляції з планктонними клітинами проводяться після їх осадження, і лише наприкінці їх переміщують на підложку (скло) [1].

Підготовка проб складається з таких етапів:

1. **Відмивання біоплівки:** двічі промивають біоплівки натрій-фосфатним буферним розчином протягом 10-15 хвилин з метою видалення сторонніх компонентів (залишки середовища, планктонні клітини).

Краще використовувати стерильний буфер, виготовлений з використанням ультрачистої води або буфер, фільтрований перед стерилізацією.

2. **Фіксація біоплівки:** фіксують біоплівки з використанням **свіжовиготовленого** розчину глутарового альдегіду (ГА). Використовують 1%-ний або 2%-ний розчин ГА. 1%-ний розчин ГА є найбільш зручним для використання; фіксацію у ньому проводять протягом 16-18 годин. У 2%-ному розчині ГА час фіксації становить 2-4 години (в залежності від проби). За необхідності проби можна зберігати у 1%-ному розчині ГА до тижня.

Застереження:

Вихідна концентрація ГА становить 25%. З метою запобігання його випаровування та зміни концентрації, ГА зберігають у замороженому вигляді. ГА є токсичною сполукою, тому працювати з ним слід **виключно** у рукавичках. ГА розбавляють у натрій-фосфатному буферному розчині або іншому буфері, або фізіологічному розчині, безпечному для осмотичного тиску клітини. **Використовувати розбавлений більше тижня назад ГА неможна!** Фіксацію проводять за низьких температур (4-5° С).

3. **Повторне промивання біоплівки:** після фіксації проби знову промивають у натрій-фосфатному буферному розчині від ГА: три рази по 10-15 хвилин.
4. **Зневоднення проб:** проводять в серії концентрацій етилового спирту (30%, 50%, 70%, 80%, 90%) по 10-15 хвилин для кожної концентрації. Для деяких особливо крихких зразків краще починати з більш низьких концентрацій спирту.

Етиловий спирт розбавляють до потрібної концентрації у дистильованій або ультрачистій воді за формулою $C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$, де $C1$ – початкова концентрація спирту (~96%); $C2$ – кінцева концентрація спирту в розчині; $V2$ – необхідний об'єм спиртового розчину; $V1$ – необхідний об'єм спирту початкової концентрації.

5. **Остаточне зневоднення проб:** проводять у спирті з максимальною концентрацією (96%-ному або 100%-ному) протягом 15 хвилин. 100%-ний спирт готують шляхом додавання в 96%-ний етанол безводного CuSO_4 (10 г на 100 мл). Попередньо сіль прожарюють протягом декількох хвилин, охолоджують та додають до етанолу. Розчин перемішують, інкубують за кімнатної температури 5-10 хвилин, двічі фільтрують, а потім використовують для відмивання проб.
6. **Випаровування спирту:** препарат залишають на повітрі 3-5 хвилин для випаровування спирту. На цьому етапі безпосередня пробопідготовка вважається завершеною. Готові проби можуть зберігатися до декількох тижнів в темному сухому місці за кімнатної температури.

Безпосередньо перед скануючою електронною мікроскопією відбувається напилення на поверхню зразків суміші платини/паладію. Чим довше зразок зберігається без напилення, тим вище шанс появи перешкод при мікроскопуванні [1].

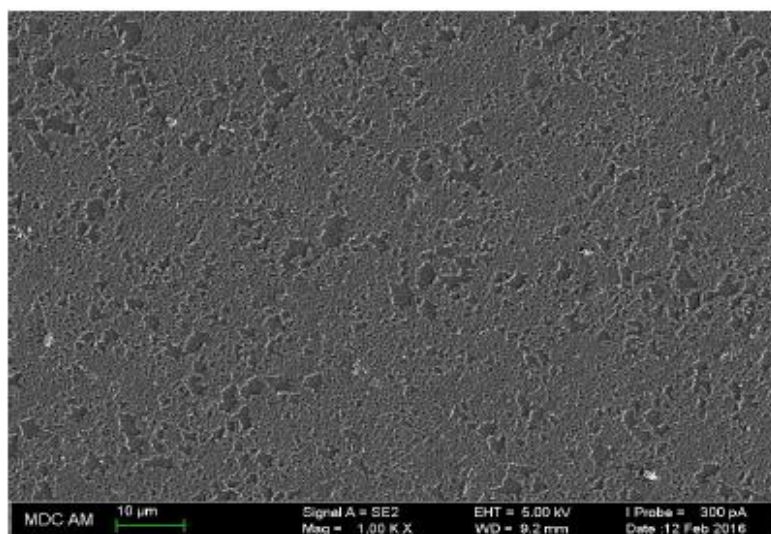


Рис. 6. Типове зображення скануючої електронної мікроскопії біоплівки штаму *S. marcescens* на поверхні полістиролової чашки Петри на стадії моношару [1]

Завдання:

1. Ознайомитися з методикою підготовки зразків до СЕМ, скласти її схему.
2. Здійснити підготовку зразків до СЕМ.

3. Зробити висновок.

Контрольні питання

1. З якою метою використовують дослідження біоплівки з використанням СЕМ?
2. Яка головна умова дослідження біоплівки з використанням СЕМ?
3. Перерахуйте етапи підготовки проб біоплівки для дослідження з використанням СЕМ?
4. З якою метою і як відмивають біоплівки при підготовці для дослідження з використанням СЕМ?
5. Чим та як фіксують біоплівки? Які вимоги до техніки безпеки на цьому етапі?
6. Як зневоднюють проби біоплівки?
7. Що напилюють на поверхню зразків безпосередньо перед скануючою електронною мікроскопією?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №8

Тема: Вплив антисептиків на бактеріальні плівки

Мета: Навчитися досліджувати вплив антисептиків на бактеріальні плівки

Матеріал та обладнання

1. Зразки поліетилентерефалату (3x10 мм) з 4-добовою біоплівкою – 9 шт.;
2. Стерильний м'ясо-пептонний бульйон у пробірках (по 5 мл) – 9 шт.;
3. Пробірки з робочим розчином антисептика – 3 шт.;
4. Пробірки з двократно послідовно розведеним антисептиком – 6 шт.;
5. Пінцет;
6. Етиловий спирт (70%-ний та 96%-ний) – по 100 мл;
7. Ємність з дезінфікуючим розчином;
8. Маркер;
9. Сірники;
10. Вата;
11. Спиртівки;
12. Термостат.

Теоретичні відомості

У біоплівках клітини бактерій занурені у матрикс і тим самим захищені від зовнішніх впливів. Це забезпечує їх високу толерантність щодо факторів імунітету, антибіотиків, антисептиків, дезінфектантів. При цьому полімери матриксу відіграють роль молекулярного фільтру, який захищає клітини від хімічних впливів. У матриксі є сполуки (наприклад, гліцерол-фосфорильовані бета-глюкани у *Pseudomonas aeruginosa*), які не лише уповільнюють дифузію протимікробних сполук, але й активно сорбують їх дрібні молекули. У біоплівках, які складаються з декількох видів бактерій, антибіотикорезистентні клітини здатні виділяти ферменти або антибіотикзв'язуючі протеїни. Ці сполуки захищають інших представників мікробного угруповання від дії антибіотиків. Оскільки у біоплівці

спостерігається висока щільність мікробної популяції, це стимулює обмін генетичною інформацією, зокрема, детермінантами антибіотикорезистентності [5].

Для визначення впливу антисептиків на бактеріальні плівки, зразки матеріалів з 4-добовою біоплівкою занурюють у пробірки з двократно послідовно розведеними антисептиками на 1 добу, після чого переносять у стерильний м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), термостатують протягом 24 год. Максимальне розведення антисептика, після обробки яким зразка не спостерігається росту бактерій, вважають за мінімальну бактерицидну концентрацію для бактеріальної біоплівки (МБцК) [5].

Для визначення швидкості позбавлення життєздатності клітин у біоплівках у робочі розчини антисептиків (наприклад, декасан, горостен, 0,05% розчин біглюконату хлоргексидину, 3% розчин перекису водню, 0,1% розчин бензалконію хлориду) занурюють попередньо інкубовані протягом 4-х діб в культурі бактерій зразки матеріалів на 15 хв., 30 хв., 1, 2, 3, 4, 6, 12 та 24 год. По завершенні досліджуваної експозиції знезаражування у антисептику зразки переносять у стерильний м'ясо-пептонний бульйон, інкубують. Ефективною експозицією знезаражування вважають ту з досліджених, по завершенні якої росту бактерій не спостерігалось. Досліди для кожної концентрації кожного антисептика та виду бактерій, а також для кожної експозиції знезаражування виконують у 5-ти повтореннях [5].

Завдання:

1. Ознайомитися з методиками дослідження та скласти їх схему.
2. Дослідити вплив антисептиків різної концентрації на бактеріальні плівки. Оцінити МБцК. Дані занести до таблиці 8.
3. Дослідити швидкість позбавлення життєдіяльності клітин у плівках за впливу антисептиків. Дані занести до таблиці 9.
4. Зробити висновок.

Таблиця 8

Вид (штам) бактерій	Ріст бактерій у МПБ за обробки біоплівки антисептиком за різної концентрації							
	Антисептик 1				Антисептик 2			
	Конц. 1	Конц. 2	Конц. 3	МБЦК	Конц. 1	Конц. 2	Конц. 3	МБЦК

Примітка: «+» - ріст бактерій у МПБ є;

«-» - росту бактерій у МПБ немає

Таблиця 9

Вид (штам) бактерій	Ріст бактерій у МПБ після різного часу обробки антисептиком					
	Антисептик 1			Антисептик 2		
	15 хв.	30 хв.	60 хв.	15 хв.	30 хв.	60 хв.

Примітка: «+» - ріст бактерій у МПБ є;

«-» - росту бактерій у МПБ немає

Контрольні питання

1. Яка особливість біоплівок захищає клітини від зовнішніх впливів?
2. Наведіть методику оцінки впливу антисептиків на бактеріальні плівки.

3. Що являє собою МБЦК?
4. Як оцінити швидкість позбавлення життєздатності клітин біоплівки у розчинах антисептиків?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА №9

Тема: Використання програми ImageJ для кількісної оцінки здатності бактерій формувати біоплівки

Мета: Навчитися використовувати програму ImageJ для кількісної оцінки здатності бактерій формувати біоплівки

Матеріал та обладнання

1. Накривні скельця із сформованими біоплівками, забарвленими кристалічним фіолетовим – 6 шт.;
2. Мікроскоп Delta Optical GeneticPro;
3. Комп'ютер із встановленою програмою ImageJ.

Теоретичні відомості

Дослідження здатності бактерій формувати біоплівки на поверхні скла, як правило, обмежується візуальним, описовим характером і лише у деяких випадках напівкількісною або кількісною оцінкою.

Програма ImageJ застосовується для аналізу біоплівки в лабораторних ситуаціях, таких як автоматичний підрахунок колоній на знімках. Частково це пов'язано з відкритою структурою програми, яка дозволяє писати та спільно використовувати плагіни та макроси для певних програм. Характер спільної роботи цієї системи робить її настільки корисною як для досліджень загалом, так і для аналізу біоплівки. ImageJ, яка спочатку називалася NIH Image, - це безкоштовна програма обробки зображень на основі Java, яка може використовуватися в операційних системах Windows, Mac або Linux. Вона здатна читати багато форматів зображень (JPEG, TIFF, GIF, DICOM, FITS та BPM) і маніпулювати, аналізувати або обробляти зображення різними способами [13].

Мабуть, найкориснішою особливістю ImageJ у дослідженнях біоплівки є здатність генерувати стеки зображень. Укладання не тільки дозволяє накладати зображення з різними флуоресцентними плямами, але може

створювати тривимірні зображення (z стеки), використовуючи дані таких методів, як конфокальна мікроскопія. Ці тривимірні зображення здатні не тільки розкрити деталі структур біоплівки, але можуть бути поєднані з флуоресцентними методами фарбування, щоб показати розподіл різних концентрацій бактерій, білків або іонів у біоплівці в цілому [13].

Для візуальної та кількісної оцінки здатності бактерій формувати біоплівки на поверхні накривного скла використовують стерильні скляні чашки Петрі діаметром 100 мм. У кожній чашці розміщують стерильне накривне скло розміром 24x24 мм, на поверхню якого обережно наливають 200 мкл добової культури штаму з концентрацією 10^7 клітин/мл і розміщують у термостаті при 37°C. Через 3 години додають м'ясо-пептонний бульйон до 2 мл і розміщують у термостаті при 37°C. Через 24 та 48 годин після інкубації поживне середовище зливають, поверхню скла тричі промивають 1,15 М фосфатним буфером, фіксують 96° спиртом, висушують, забарвлюють розчином генціанвіолету (або кристалічного фіолетового) протягом 2 хвилин за кімнатної температури, після чого промивають фосфатним буфером [13].

Далі отримують цифрові зображення препаратів з використанням, наприклад, мікроскопу Delta Optical GeneticPro. При цьому мікрофотографії слід робити за збільшення об'єктиву x40 з нанесенням мітки розміру.

Потім визначають кількісні характеристики біоплівок. Для цього на отриманих цифрових зображеннях препаратів за допомогою програми ImageJ вимірюють площу поля зору, кількість та площу, що займають одиничні адгезовані клітини та мікроколонії. Оцінюють кількість одиничних адгезованих клітин та мікроколоній на одиницю площі (1 мм^2), та частки, які вони займають в площі поля зору. При цьому враховують розмір мікроколоній: $< 10 \text{ мкм}^2$, від 10 до 100 мкм^2 , від 100 до 1000 мкм^2 , від 1000 до 10000 мкм^2 , $> 10000 \text{ мкм}^2$. З кожного препарату розглядають не менше 20 випадкових полів зору, отримані результати усереднюють [13].

Завдання:

1. Ознайомитися з алгоритмом використання програми ImageJ (США) для оцінки кількісних показників біоплівки.
2. Використовуючі цю програму та цифрові зображення препаратів виміряти площу поля зору. Оцінити кількість одиничних адгезованих клітин та мікроколоній на одиницю площі (1 мм²), та частки, які вони займають в площі поля зору. Дані занести до таблиці 10.
3. Зробити висновок.

Таблиця 10

Результати кількісної оцінки здатності бактерій формувати біоплівки за допомогою програми ImageJ

Варіант досліджу _____

Номер поля зору	Площа поля зору, мкм ²	Кількість одиничних адгезован. клітин	Кількість мікроколоній розміром				
			< 10 мкм ²	10-100 мкм ²	100-1000 мкм ²	1000-10000 мкм ²	> 10000 мкм ²
1	2	3	4	5	6	7	8
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							

12							
----	--	--	--	--	--	--	--

Продовження табл. 9

1	2	3	4	5	6	7	8
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							

Контрольні питання

1. Яку комп'ютерну програму можна застосувати для аналізу біоплівки?
2. Як вирощують та готують біоплівку для аналізу з використанням ImageJ?
3. Які кількісні характеристики біоплівок та як досліджують за допомогою програми ImageJ?

Склад розчинів та середовищ

Середовище LB (г/л):

Дріжджовий екстракт - 5 г

Триптон - 10 г

NaCl – 10 г

Дистильована вода – 1 л.

Автоклаувати при 121° С протягом 20 хвилин. Після охолодження перемішати колбу, щоб перемішати компоненти середовища.

Кристалічний фіолетовий, водний розчин, 0,1%-ний:

Кристалічний фіолетовий, кристали – 100 мг

Дистильована вода – 100 мл.

Натрій-фосфатний буферний розчин:

pH	Кількість компонента А, мл	Кількість компонента Б, мл	Довести до об'єму
6,0	61,5	500 - А	1 л
6,2	92,5	500 – А	1 л
6,4	132,5	500 – А	1 л
6,6	187,5	500 – А	1 л
6,8	245,0	500 – А	1 л
7,0	305,0	500 – А	1 л
7,2	360,0	500 – А	1 л
7,4	405,0	500 – А	1 л
7,6	435,0	500 – А	1 л
7,8	457,0	500 – А	1 л
8,0	473,0	500 - А	1 л

Компонент А – 0,1 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 17,8 г/л; Компонент Б – 0,1 М $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 15,6 г/л

Список використаної та рекомендованої літератури

1. *Биопленки: основные методы исследования: учебно-методическое пособие* / Марданова А.М. с соавт. – Казань: К(П)ФУ, 2016, - 42 с.
2. *Методы индикации биологических плёнок микроорганизмов на абиотических объектах: Методические рекомендации.* Москва: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2020. 20 с.
3. Немцева Н.В. Биопленки – феномен формирования резистентности микроорганизмов в различных экосистемах. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН.* 2019. №3. С. 1-29. DOI:10.24411/2304-9081-2019-13020
4. Осипова Е.В., Шипицына И.В., Науменко З.С. Сравнительная количественная оценка способности образования биопленки различными клиническими штаммами бактерий на поверхности полистирола и стекла. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2014. №8. С. 55-58.
5. Трофіменко Ю.Ю. Біологічні властивості мікрофлори, що колонізує ендотрахеальні інтубаційні трубки у відділеннях інтенсивної терапії: дис... канд. мед. наук. спец.: 03.00.07. / Вінницький Національний медичний ун-т імені М.І.Пирогова. Вінниця, 2015. 127 с.
6. Del Re B., Sgorbati B., Miglidi M. & Palenzona D., 2000, Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*, *Lett. Appl. Microbiol.* No 31. P.438-442. [doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x)
7. Nayar R., Shukla I., Ali S.M. Evaluation of the Virulence Markers in the Clinical Isolates of Citrobacter Species: The First Report from India. *Journal of clinical and diagnostics research.* 2013. 7(6). P. 1031-1034.

8. Nwanyanwu C.E. & Abu G.O., Influence of growth media on hydrophobicity of phenol-utilizing bacteria found in petroleum refinery effluent. *Int. Res. J. Biological Sci.* 2013. 2(10). P.6-11. www.isca.in
9. Raksha L., Gangashettappa N., Shantala G.B., Nandan B.R., Sinha D. Study of biofilm formation in bacterial isolates from contact lens wearers. *Indian Journal of Ophthalmology.* 2020. 68(1). P. 23-28.
10. Rozgonyi F., Ljungh A., Mamo W., Hjerten S., Wadstrom T. *Bacterial Cell-Surface Hydrophobicity* [in:] T. Wadström et al. (eds.), Pathogenesis of Wound and Biomaterial-Associated Infections. Springer-Verlag London Limited, 1990. P. 233-244.
11. Stepanović S., Vuković D., Dakić I., Savić B. & Švabić-Vlahović M., A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation, *J. Microbiol. Meth.* 2000. No 40. P.175-179. [doi:10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
12. Vijayababu P., Samykannu G., Antonyraj Ch.B., Thomas J., Narayanan S.B., Ahamed S.I.B., Piramanayagam Sh. Patulin interference with ATP binding cassette transferring auto inducer-2 in *Salmonella typhi* and biofilm inhibition via quorum sensing. *Informatics in Medicine Unlocked.* 2018. Vol. 11. P. 9-14.
13. Wilson Ch., Lukowicz R., Merchant S., Valquier-Flynn H., Caballero J., Sandoval J., Okuom M., Huber Ch., Brooks T.D., Wilson E., Clement B., Wentworth Ch.D., Holmes A.E. Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review. *Research & Reviews: Journal of Engineering and Technology.* 2017. Vol. 6, Issue 4. P.1-25.