

**М.Б. Галкін, А.С. Семенець, М.О. Фіногенова,  
Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,  
тел.: +38 (0482) 63 57 61, e-mail: tphilippova@ukr.net

## **УТВОРЕННЯ БІОПЛІВКИ ТА РУХЛИВІСТЬ БАКТЕРІЙ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* З РІЗНИМИ РІВНЯМИ ВМІСТУ ЦИКЛІЧНОГО ДИГУАНОЗИНМОНОФОСФАТУ**

**Мета роботи:** встановлення особливостей утворення біоплівки штамами *Pseudomonas aeruginosa* з різними рівнями вмісту циклічного дигуанозинмонофосфату (цикло-ди-ГМФ) та переміщення їх клітин шляхом плавання, роїння і смикання. **Матеріали та методи.** У дослідженні були використані штами дикого типу *P. aeruginosa* PA01 і штами *P. aeruginosa* з низьким (PA01 pJN2133) та підвищеним (PA01 ΔwspF1) рівнями цикло-ди-ГМФ. Культивування проводили в 24-гункових плоскодонних планшетах Nucleon у середовищі LB при 37 °C впродовж 24 годин. Кількість планктонних клітин оцінювали спектрофотометрично, масу біоплівки – за методом забарвлення кристалічним фіолетовим. Рухливість клітин визначали на чашках Петрі з використанням середовищ з різним вмістом агару: плавання 0,3%, роїння 0,6% та смикання 1,5%. Структуру біоплівок оцінювали за допомогою світлової та лазерної конфокальної мікроскопії. **Результати.** Встановлено, що *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 порівняно з *P. aeruginosa* PA01 і PA01 ΔwspF1 утворює біоплівку з порушеною структурою, маса якої знижена у 3,7 і 5 разів, відповідно. У той же час, кількість планктонних клітин над біоплівкою *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 була вищою ніж у двох інших штамів. За морфологією біоплівки штамів *P. aeruginosa* PA01 і PA01 ΔwspF1 виявилися подібними: містили 3D структури, які у разі штаму дикого типу були за розміром більшими і чітко відокремленими одна від одної. Біоплівка *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 рівномірно покривала поверхню, була дуже тонкою і не містила тривимірних компонентів. Встановлено, що найбільш рухливими при здійсненні усіх типів переміщення по поверхні є клітини штаму *P. aeruginosa* PA01 pJN2133. Штами *P. aeruginosa* PA01 і PA01 ΔwspF1 мали однаково активність при переміщенні шляхом плавання і смикання, але різнилися за здатністю до роїння – у *P. aeruginosa* PA01 ΔwspF1 цей процес блокований. Діаметр зони розповсюдження клітин *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 шляхом роїння становив 62 мм і в 1,4 рази перевищував показник *P. aeruginosa* PA01 – 43 мм. Морфологія зон роїння цих штамів суттєво різнилася за низкою ознак. **Висновки.** Низький внутрішньоклітинний вміст цикло-ди-ГМФ перешкоджає утворенню повноцінної біоплівки і сприяє планктонному способу існування *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 та активному переміщенню клітин різними поверхнями. Підвищений рівень цикло-ди-ГМФ забезпечує формування біоплівки з більшою у порівнянні з контрольним штамом масою, і гальмує процес роїння у *P. aeruginosa* PA01 ΔwspF1.



*Ключові слова:* циклічний дигуанозинмонофосфат, *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 pJN2133, *Pseudomonas aeruginosa* PA01  $\Delta$ uspF1, структура біоплівки, рухливість, тип переміщення.

Рухливість клітин *Pseudomonas aeruginosa* грає ключову роль у колонізації і розповсюдженні бактерій різними поверхнями. Вона також сприяє формуванню біоплівок – тривимірних структурованих спільнот мікроорганізмів, зв'язаних з поверхнею [11]. Клітини *P. aeruginosa* здатні здійснювати три типи рухів, які забезпечуються різними структурами: плавання і роїння з використанням джгутиків та смикання, залежне від пілей 4 типу [18]. Циклічний дигуанозинмонофосфат (цикло-ди-ГМФ) виявився в центрі уваги дослідників у результаті останніх досягнень в області мікробної геноміки і підвищеного інтересу до багатоклітинних мікробних угруповань [10, 14, 15]. Цитоплазматичний цикло-ди-ГМФ є вторинним месенджером бактерій, який регулює численні фізіологічні процеси: систему міжклітинної комунікації, утворення біоплівок, рухливість, диференціювання, вірулентність [2, 3, 5]. Залежно від концентрації цього регулятора бактерії здійснюють перехід від вільного, рухливого способу життя до прикріпленого існування у складі біоплівок [14]. Встановлено, що цикло-ди-ГМФ комплексно впливає на різні стадії формування біоплівки *Pseudomonas aeruginosa*, починаючи з адгезії клітин до поверхні і до етапу розпаду. Ця сполука регулює біосинтез компонентів матриксу біоплівки, сигнальних молекул системи кворуму, біосурфактантів [8, 12]. Залежність напрямку змін інтенсивності тих чи інших процесів від внутрішньоклітинної концентрації цикло-ди-ГМФ призвела до конструювання численних мутантних штамів з гіпер- або гіпопродукцією вторинного месенджера. Їх використання дозволяє поглибити знання щодо ролі цієї молекули, зокрема, на молекулярному рівні, у процесах внутрішньоклітинної сигналізації, а також встановити можливість управління утворенням і розпадом біоплівок через вплив на систему обміну цикло-ди-ГМФ.

Метою даного дослідження було визначення особливостей утворення біоплівки штамми *P. aeruginosa* з різними рівнями цикло-ди-ГМФ та переміщення їх клітин шляхом плавання, роїння і смикання.

### Матеріали та методи

В роботі були використані штам дикого типу *P. aeruginosa* PA01 з колекції культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова і штамми *P. aeruginosa* з низьким (PA01 pJN2133) та підвищеним (PA01  $\Delta$ uspF1) рівнями циклічного дигуанозинмонофосфату, люб'язно надані О. Ржепішевською з університету м. Умео, Швеція. Культивування здійснювали при 37 °С у рідкому середовищі LB з таким складом (г/л): пептон – 15,0, дріжджовий екстракт – 10,0, хлорид натрію – 5,0.

Визначення маси біоплівки та кількості планктонних клітин проводили за культивування у 24-лункових плоскодонних планшетах Nuclon впродовж 24 годин. Кількість клітин у планктоні оцінювали спектрофотометрично при довжині хвилі 540 нм. Після ретельного відмивання лунок планшетів від неприкріплених клітин біоплівки фіксували 96% етанолом впродовж 10 хв,



висушували і забарвлювали 1% розчином кристалічного фіолетового. Через 15 хвилин барвник видаляли, лунки промивали і після висушування додавали по 1,5 мл лізувального розчину, що містив 0,1 М NaOH і 1% додецилсульфату натрію. Оптичну густина вимірювали при довжині хвилі 592 нм [4].

Усі спектрофотометричні вимірювання здійснювали на спектрофотометрі SmartSpec Plus (Bio-Rad, Hungary).

Для оцінки морфології біоплівки стерильні покривні скельця розміром 24×24 мм вносили у пластикові стерильні чашки Петрі діаметром 35 мм, які містили по 2 мл середовища з клітинами *P. aeruginosa* ( $10^3$  КУО/мл). Чашки зі скельцями інкубували 24 год при 37 °С. Після інкубації скельця відмивали від неприкріплених клітин фізіологічним розчином та фіксували 96% спиртом 10 хв. Після фіксації зразки забарвлювали 1% водними розчином кристалічного фіолетового впродовж 5 хв. Після висушування скельця мікроскопіювали з використанням мікроскопу Primo Star PC, Carl Zeiss та фотографували за допомоги камери Olympus DCM (3,0 M pixels). У разі лазерної конфокальної мікроскопії препарати забарвлювали низькомолекулярним флюорохромом SYTO9, який здатний проникати через непошкоджені плазматичні мембрани, зображення отримували з використанням об'єктиву 40×/1,3 на LSM 510 (Carl Zeiss, Germany).

Для оцінки рухливості клітин нічну культуру у кількості 2 мкл вносили у центр чашки Петрі з агаризованим середовищем, яке містило м'ясо-пептонний бульйон – 8,0 г/л, глюкозу – 50,0 г/л і агар, та інкубували 24 год при 37 °С. Для різних типів руху агар додавали до кінцевих концентрацій 0,3%, 0,6% і 1,5% у разі плавання, роїння та смикання, відповідно. При дослідженні плавання і роїння суспензію клітин наносили на поверхню агару, смикання – шляхом уколу на дно чашки Петрі під агар. У разі смикання по закінченні інкубації агар видаляли, а клітини забарвлювали 1% кристалічним фіолетовим. Результати оцінювали за діаметром зони розповсюдження клітин від точки інюкуляції [13].

Усі експерименти проводили у 3-х незалежних дослідях з 3–6 повторами у кожному. Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційного аналізу. Розраховували середні значення показників ( $\bar{X}$ ) та їх стандартну помилку ( $S\bar{X}$ ). Достовірність відмінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Стьюдента, оцінюючи вірогідність отриманих результатів на рівні значимості не менше 95% ( $p \leq 0,05$ ). Математичні розрахунки проводили за допомогою комп'ютерної програми Excel [1].

### Результати та їх обговорення

Використані у роботі штами *P. aeruginosa* з низьким (PA01 pJN2133) і з високим (PA01  $\Delta$ wspF1) по відношенню до батьківського штаму вмістом цикло-ди-ГМФ були сконструйовані у лабораторії Caroline S. Harwood [8].

Визначення характеру трьох типів руху, притаманних псевдомонадам, показало, що досліджувані штами відрізняються за плаванням лише у кількісному відношенні (рис. 1, табл. 1). Так, відстані розповсюдження клітин *P. aeruginosa* PA01 і PA01  $\Delta$ wspF1 були практично однаковими, у той час,



як клітини штаму PA01 рJN2133 переміщувалися більш активно і діаметр відповідної зони був більшим у 1,8 рази. Дослідження здатності до роїння, показало, що на тлі високого внутрішньоклітинного рівня цикло-ди-ГМФ у *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$ wspF1 повністю блокований цей тип руху.

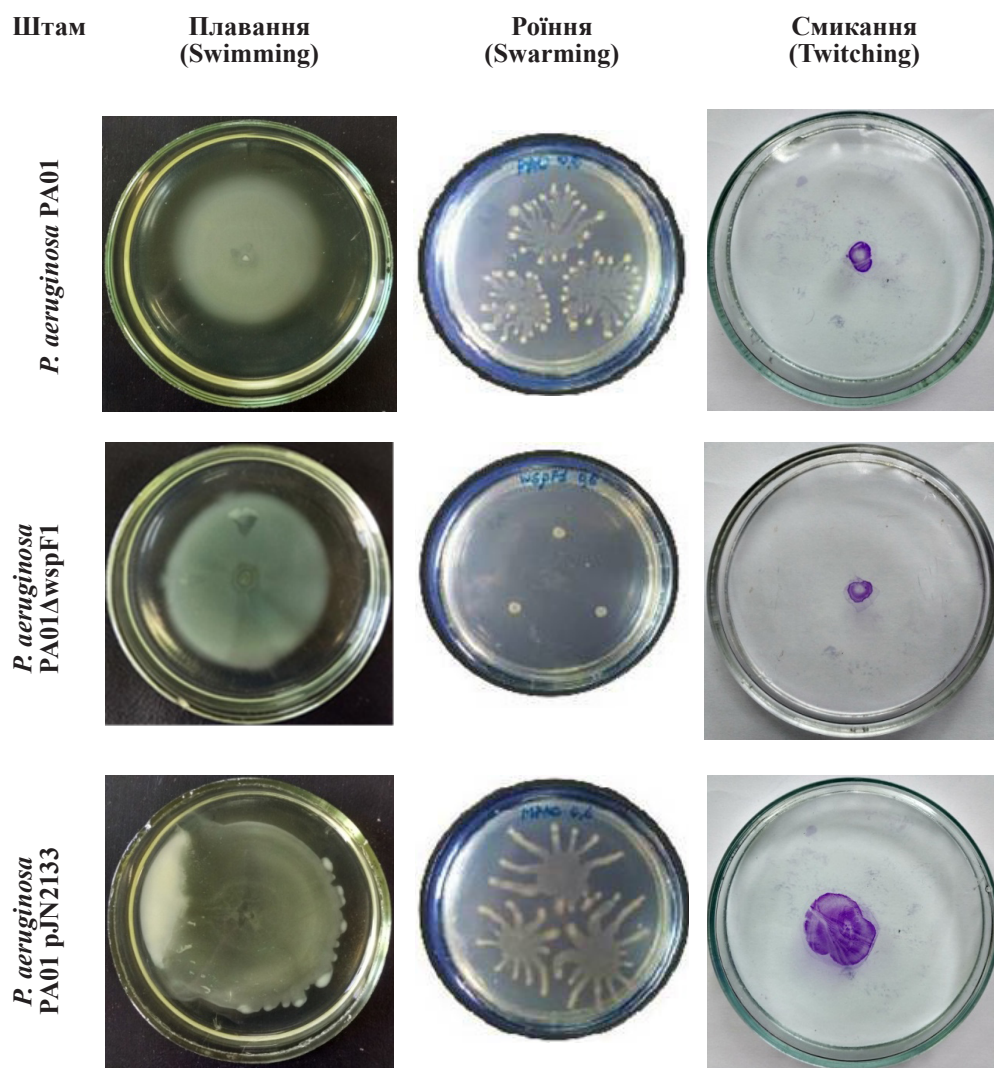


Рис. 1. Колонії бактерій *P. aeruginosa* з різними рівнями цикло-ди-ГМФ, за різних типів їх руху (смикання – забарвлення кристалічним фіолетовим)

Fig. 1. Motility images of *P. aeruginosa* cells with different level of c-di-GMP (twitching motility – crystal violet staining)

Клітини двох інших штамів активно переміщуються шляхом роїння, але зони їх свармінгу суттєво відрізняються за морфологічними ознаками. Ці відмінності були докладно описані нами раніше [17]. Клітини штаму PA01 рJN2133 з дуже низьким вмістом цикло-ди-ГМФ переміщувалися по твердій

поверхні під шаром агару шляхом смикання на відстань у 4–5 разів більшу, ніж *P. aeruginosa* PA01 та PA01  $\Delta$ wspF1.

Таблиця 1

Діаметр зон (мм) розповсюдження клітин досліджуваних штамів *P. aeruginosa* за різних типів руху

Table 1

Motility zone diameter (mm) of *P. aeruginosa* cells of studied strains

Штам	Плавання (Swimming)	Ройння (Swarming)	Смикання (Twitching)
<i>P. aeruginosa</i> PA01	38 ± 3	43 ± 3	6 ± 0
<i>P. aeruginosa</i> PA01 $\Delta$ wspF1	39 ± 3	5 ± 0*	5 ± 0
<i>P. aeruginosa</i> PA01 pJN2133	68 ± 4*	62 ± 5*	24 ± 2*

Примітка: \* - різниця достовірна ( $p \leq 0,05$ ) у порівнянні з *P. aeruginosa* PA01  
 Note: \* – significant difference ( $p \leq 0,05$ ) compared with *P. aeruginosa* PA01

Враховуючи, що зростання рівня цикло-ди-ГМФ є сигналом для переходу клітин бактерій від вільного існування до прикріпленого [5–7,11], оцінювали здатність досліджуваних штамів формувати біоплівки та особливості морфології останніх. На рис. 2 наведено загальний вигляд добових біоплівок за даними світлової і лазерної конфокальної мікроскопії.

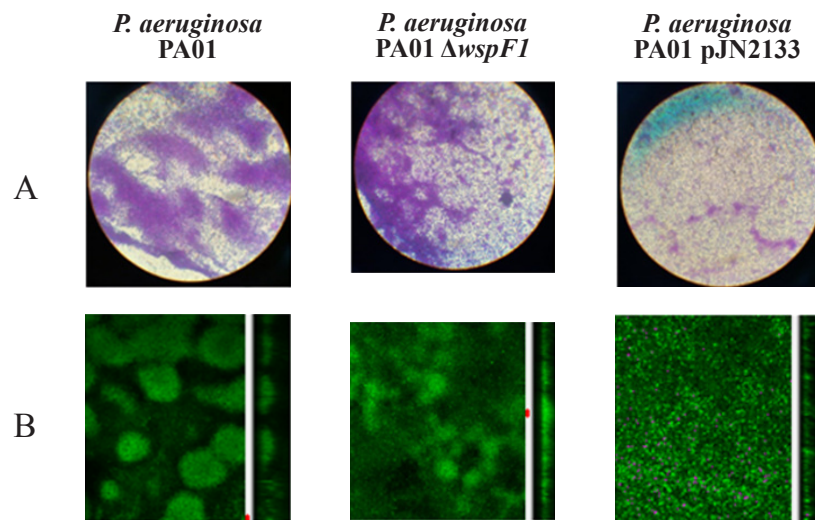


Рис. 2. Фото біоплівок, утворених бактеріями *P. aeruginosa* з різними рівнями цикло-ди-ГМФ

(A – світлова мікроскопія, забарвлення кристалічним фіолетовим; B – лазерна конфокальна мікроскопія, забарвлення SYTO9)

Fig. 2. Images of biofilms, forming by *P. aeruginosa* cells with different level of c-di-GMP (A – light microscopy, crystal violet staining; B – laser confocal microscopy, SYTO9 staining)



Оцінка стану біоплівки досліджуваних штамів виявила суттєві відмінності в їх загальному вигляді та структурі між штамами *P. aeruginosa* PA01 і *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$ *wspF1*, з одного боку, та штамом *P. aeruginosa* PA01 pJN2133, з другого. За даними світлової мікроскопії у біоплівках *P. aeruginosa* PA01 і PA01  $\Delta$ *wspF1* добре видно багатоклітинні тривимірні структури, у той час, як біоплівка *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 таких утворень не містить і виглядає "моношаровою" (рис. 2А). Крім того, у біоплівці штаму PA01 pJN2133 її компоненти: клітини і позаклітинний матрикс, розташовані рівномірно на поверхні скла.

Дані лазерної конфокальної мікроскопії підтверджують характеристики біоплівки, одержані за допомогою світлового мікроскопа (рис. 2В). Оскільки SYTO9, на відміну від кристалічного фіолетового, забарвлює тільки клітини у складі біоплівки *P. aeruginosa* PA01 чітко видні відокремлені одна від одної 3D структури, які у літературі називають грибоподібними. У біоплівці *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$ *wspF1* такі структурні одиниці мають у 2–3 рази менший діаметр і розташовані близько одна до одної, а деякі злиті між собою. Біоплівка *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 є однорідною і дуже тонкою.

Кількісні характеристики біоплівки досліджуваних штамів наведені у табл. 2.

Таблиця 2

**Маса добової біоплівки і кількість планктонних клітин досліджуваних штамів *P. aeruginosa***

Table 2

**Biofilm mass and planktonic cells content of *P. aeruginosa* studied strains**

Показник	<i>P. aeruginosa</i> PA01	<i>P. aeruginosa</i> PA01 $\Delta$ <i>wspF1</i>	<i>P. aeruginosa</i> PA01 pJN2133
Кількість планктонних клітин, ОГ540	0,227 $\pm$ 0,035	0,252 $\pm$ 0,038	0,362 $\pm$ 0,047
Маса біоплівки, ОГ592	1,666 $\pm$ 0,184	2,216 $\pm$ 0,193	0,450 $\pm$ 0,052*

Примітка: \* – різниця достовірна ( $p \leq 0,05$ ) у порівнянні з *P. aeruginosa* PA01

Note: \* – significant difference ( $p \leq 0,05$ ) compared with *P. aeruginosa* PA01

Одержані результати свідчать, що найщільнішу біоплівку утворює штам *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$ *wspF1*. Її маса перевищує масу біоплівки батьківського штаму на 33%. У той же час, маса біоплівки штаму *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 є меншою у 3,7 рази порівняно з *P. aeruginosa* PA01 і у 5 разів порівняно зі штамом PA01  $\Delta$ *wspF1*. Кількість планктонних клітин, що знаходяться у рідкому середовищі над біоплівкою, у разі *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 перевищує на 44–60% цей показник для обох інших штамів.

Підсумовуючи одержані результати, можна відмітити, що штам з низьким вмістом цикло-ди-ГМФ має підвищену активність за усіма типами руху різними поверхнями. Це частково пояснює особливості біоплівки, утвореної *P. aeruginosa* PA01 pJN2133. Іншим чинником, що зумовлює формування тонкої біоплівки з малою масою, є знижена здатність клітин даного штаму до адгезії [14–17].



Крім того, враховуючи, що процес утворення біоплівки контролюється не тільки цикло-ди-ГМФ, а також системою міжклітинної комунікації, не можна виключити пригнічення функціонального стану системи кворуму у даного штаму. Цікавою є залежність процесу формування біоплівки *P. aeruginosa* PA01 рJN2133 від умов культивування. На відміну від даного дослідження, в якому культивування здійснювалося у стаціонарних умовах, при застосуванні проточних камер цей штам взагалі не утворював біоплівки [8].

Таким чином, одержані результати дозволяють зробити висновок, що бактерії *P. aeruginosa* PA01 рJN2133 з низьким внутрішньоклітинним вмістом цикло-ди-ГМФ не утворюють повноцінної біоплівки. Їм притаманний планктонний спосіб існування та активне переміщення клітин різними поверхнями. У бактерій *P. aeruginosa* PA01  $\Delta wspF1$  з підвищеним рівнем цикло-ди-ГМФ формуються біоплівки з більшою порівняно з контрольним штамом масою і гальмується процес роїння.

**Н.Б. Галкин, А.С. Семенец, М.А. Финогорова,  
Б.Н. Галкин, Т.О. Филиппова**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел. : +38 (0482) 63 57 61,  
e-mail: tphilippova @ ukr.net

## **ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ И ПОДВИЖНОСТЬ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* С РАЗНЫМИ УРОВНЯМИ СОДЕРЖАНИЯ ЦИКЛИЧЕСКОГО ДИГУАНОЗИНМОНОФОСФАТА**

### **Реферат**

**Цель работы:** Выявление особенностей образования биопленки штаммами *Pseudomonas aeruginosa* с разными уровнями циклического дигуанозинмонофосфата (цикло-ди-ГМФ) и перемещения их клеток путём плавания, роения и подергивания. **Материалы и методы.** В исследовании использовали штамм дикого типа *P. aeruginosa* PA01 и штаммы с низким (PA01 рJN2133) и повышенным (PA01  $\Delta wspF1$ ) уровнями цикло-ди-ГМФ. Культивирование проводили в 24-луночных плоскодонных планшетах Nucleon в среде LB при 37 °C в течение 24 часов при исследовании образования биопленки. Количество планктонных клеток оценивали спектрофотометрически, массу биопленки – по методу окраски кристаллическим фиолетовым, подвижность клеток определяли на чашках Петри с использованием сред с разным содержанием агара: плавание 0,3%, роение 0,6% и подергивание 1,5%. Структуру биопленок оценивали с помощью световой и лазерной конфокальной микроскопии. **Результаты.** Установлено, что *P. aeruginosa* PA01 рJN2133 по сравнению с *P. aeruginosa* PA01 и PA01  $\Delta wspF1$  образует биопленку с нарушенной структурой, масса которой снижена в 3,7 и 5 раз, соответственно. В то же время, количество планктонных клеток над биопленкой *P. aeruginosa* PA01 рJN2133 было большим, чем у двух других штаммов. По морфологии биопленки штаммов *P. aeruginosa* PA01 и PA01  $\Delta wspF1$  оказались подобными: содержали 3D структуры, которые в случае штамма дикого типа были больше и четче отделены друг от друга. Биопленка *P. aeruginosa* PA01 рJN2133 равномерно покрывала поверхность, была очень тонкой и не содержала трехмерных компонентов. Показано, что наиболее подвижными



при осуществлении все типов перемещения по поверхности являются клетки штамма *P. aeruginosa* PA01 pJN2133. Штаммы *P. aeruginosa* PA01 i PA01  $\Delta$ wspF1 владели одинаковой активностью при перемещении путем плавания и подергивания, но отличались по способности к роению – у *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$ wspF1 этот процесс заблокирован. Диаметр зоны распространения клеток *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 путем роения составил 62 мм и в 1,4 раза превышал показатель *P. aeruginosa* PA01 – 43 мм. Морфология зон роения этих штаммов существенно отличается по ряду признаков. **Выводы.** Низкое внутриклеточное содержание цикло-ди-ГМФ препятствует образованию полноценной биопленки и способствует планктонному способу существования *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 и активному перемещению клеток по разным поверхностям. Повышенный уровень цикло-ди-ГМФ обеспечивает формирование биопленки с большей, по сравнению с контрольным штаммом, массой и тормозит процесс роения у *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$ wspF1.

*Ключевые слова:* циклический дигуанозинмонофосфат (цикло-ди-ГМФ), *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 pJN2133, *Pseudomonas aeruginosa* PA01  $\Delta$ wspF1, структура биопленки, подвижность, типы перемещения.

**M.B. Galkin, A.S. Semenets, M.O. Finogenova, B.M. Galkin,  
T.O. Filipova**

*Odesa National Mechnykov University,  
2, Dvoryanska str, Odesa, 65082, Ukraine, phone: +38 (0482) 63 57 61,  
e-mail: tphilippova@ukr.net*

## **BIOFILM FORMATION AND MOTILITY OF BACTERIA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* WITH DIFFERENT C-DI- GMP LEVEL**

### **Summary**

**Aim:** Biofilm formation abilities determination in *Pseudomonas aeruginosa* strains with different cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP) level and swimming, swarming, and twitching motilities. **Materials and methods.** Wild type strain *P. aeruginosa* PA01 and strains with low (PA01 pJN2133) and high (PA01  $\Delta$ wspF1) level of c-di-GMP were used as test-organisms. Bacteria were cultivated in 24-wells Nuclon plates in LB medium at 37 °C for 24 hours for biofilm formation. Determination of planktonic cells amount was carried out spectrophotometrically, biofilm formation – by CV-test. Cells motility was tested on Petri dishes with different agar content: swimming 0.3%, swarming 0.6%, and twitching 1.5%. **Results.** It was shown that *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 form biofilm with impaired structure and in 3.7 and 5 times less intensive than *P. aeruginosa* PA01 and PA01  $\Delta$ wspF1. *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 planktonic cells amount was higher than in wild type strain and PA01  $\Delta$ wspF1. According to the morphology of a biofilm of strains *P. aeruginosa* PA01 and PA01  $\Delta$ wspF1 were similar: they contained 3D structures, which in the case of the wild type strain were larger and more clearly separated from each other. The biofilm *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 evenly covered the surface, was very thin and did not contain three-dimensional components. It is shown that cells of *P. aeruginosa*





PA01 pJN2133 strain are the most mobile in all types of surface movement. Strains of *P. aeruginosa* PA01 and PA01  $\Delta$ wspF1 possessed the same activity when moving by swimming and twitching, but differed in their ability to swarm – in *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$ wspF1 this process is blocked. *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 swarming motility zones diameter was 62 мм and it were in 1,4 times higher than at *P. aeruginosa* PA01 – 43 мм. Swarming motility zones morphology was different. **Conclusions.** The low intracellular content of c-di-GMP interferes with the formation of a full-fledged biofilm and promotes the planktonic mode of *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 and the active movement of cells across different surfaces. An increased level of c-di-GMP provides the formation of a biofilm with a larger mass compared to the control strain and inhibits the swarming process in *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$ wspF1.

**К e y w o r d s:** cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP), *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 pJN2133, *Pseudomonas aeruginosa* PA01  $\Delta$ wspF1, biofilm structure, motility, types of movement.

### СПИСОК ЦИТОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ланач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в мекдико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион. – 2001. – 260 с.
2. Borlee B.R., Goldman A.D., Murakami K., Samudrala R., Wozniak D.J., Parsek M.R. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix // Mol. Microbiol. – 2010. – V. 75. – P. 827–842.
3. Caiazza, N. C., Merritt J. H., Brothers K. M., O’Toole G. A. Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14 // J. Bacteriol. – 2007. – V. 189. – P. 3603–3612.
4. Christensen G.D., W.A. Simpson, J.J. Younger et al. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices // J. clin. microbiol. – 1985. – V. 22. – № 6. – P. 996–1006.
5. Cotter P.A., Stibitz. S. C-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation // Curr. Opin. Microbiol. – 2007. – V. 10. – P. 17–23.
6. Galkin M. *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilm fomatation dynamic in presence of the meso-tetra(4-N-methylpyridyl)porphyrine bismuth complex // Visnyk of L’viv University. Biological series. – 2016. – V. 71. – P. 206–214.
7. Habimana O., Semizo A.J.C., Casey E. The role of cell-surface interactions in bacterial initial adhesion and consequent biofilm formation of Nanofiltration/Reverse Osmosis membranes // Journal of Membrane Science. – 2014. – V. 454. – P. 82–96.
8. Hickman J.W., Tifrea D.F., Harwood C.S. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels // PNAS. – 2005. – V. 102. – P. 14422–14427.
9. Jones J.C., Newsom D., Kelly B. et al. ChIP-Seq and RNA-Seq Reveal an AmrZ-Mediated Mechanism for Cyclic di-GMP Synthesis and Biofilm Development by *Pseudomonas aeruginosa* // PLoS Pathog. – 2014. – V. 10(3): e1003984. doi:10.1371/journal.ppat.1003984



10. Lee V.T., Matewish J.M., Kessler J.L., Hyodo M., Hayakawa Y. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production // *Mol. Microbiol.* – 2007. – V. 65. – P. 1474–1484.
11. Moradali M.F., Ghods S., Rehm B.H.A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2017. – doi: 10.3389/fcimb.2017.00039.
12. Parsek M.R., Greenberg E.P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms // *Trends in Microbiol.* – 2005. – V. 13. – P. 27–33.
13. Rashid M.H., Kornberg A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa* // *PNAS.* – 2000. – V. 97. – P. 4885–4890.
14. Römling U., Galperin M.Y., Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger // *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* – 2013. – V. 77, № 1. – P. 1–52.
15. Römling U., Gomelsky M., Galperin M.Y. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signaling system // *Mol. Microbiol.* – 2005. – V. 53. – P. 629–639.
16. Rosenberg M., Gutnick D., Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1980. – V. 9. – P. 29–34.
17. Semenets A.S., Galkin M.B., Filipova T.O. Biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 PJN2133 strain with low c-di-GMP level // *Microbiology & Biotechnology.* – 2016 – T. 33, № 1. – P. 19–28.
18. Winstanley C., O'Brien S., Brockhurst M.A. *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections // *Trends Microbiol.* – 2016. – V. 24. – P. 327–337.

### Referens

1. Lapach CN, Chubenko AV, Babich PN. Statisticheskie metodi v mediko-biologicheskikh issledovaniyach s ispolsovaniem Excel. – K.: Morion. – 2001. – 260p. (in Russian).
2. Borlee BR, Goldman AD, Murakami K, Samudrala R, Wozniak DJ, Parsek MR. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 2010;75:827–842. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06991.x.
3. Caiazza NC, Merritt JH, Brothers KM, O'Toole GA. Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* 2007;189:3603–3612. doi:10.1128/JB.01685-06.
4. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. *J. clin. microbiol.* 1985;22(6):996–1006.
5. Cotter PA, Stibitz S. C-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007;10:17–23. doi:10.1016/j.mib.2006.12.006.
6. Galkin M. *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilm formation dynamic in presence of the *meso*-tetra(4-N-methylpyridyl)porphyrine bismuth complex. *Visnyk of L'viv University. Biological series.* 2016;71:206-214.



7. Habimana O, Semiro AJC, Casey E. The role of cell-surface interactions in bacterial initial adhesion and consequent biofilm formation of Nanofiltration/Reverse Osmosis membranes. *Journal of Membrane Science*. 2014;454:82–96. doi:10.1016/j.memsci.2013.11.043
8. Hickman JW, Tifrea DF, Harwood CS A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *PNAS*.2005;102:14422–14427. doi: 10.1073/pnas.0507170102
9. Jones JC, Newsom D, Kelly B, et al. ChIP-Seq and RNA-Seq Reveal an AmrZ-Mediated Mechanism for Cyclic di-GMP Synthesis and Biofilm Development by *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS Pathog*. 2014;10(3):e1003984. doi:10.1371/journal.ppat.1003984
10. Lee VT, Matewish JM, Kessler JL, Hyodo M, Hayakawa YA. Cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol. Microbiol*. 2007;65:1474–1484. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05879.x
11. Moradali M.F., Ghods S., Rehm B.H.A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2017. – doi: 10.3389/fcimb.2017.00039.
12. Parsek MR, Greenberg EP. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiol*. 2005;13:27-33. doi: 10.1016/j.tim.2004.11.007.
13. Rashid MH, Kornberg A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS*. 2000;97:4885-4890. doi: 10.1073/pnas.060030097.
14. Römling U, Galperin MY, Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2013;77(1):1–52. doi: 10.1128/MMBR.00043-12.
15. Römling U, Gomelsky M, Galperin MY. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signaling system. *Mol. Microbiol*. 2005; 53:629-639. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04697.x
16. Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett*. 1980; 9:29–34. doi: 10.1111/j.1574-6968.1980.tb05599.x
17. Semenets AS, Galkin MB, Filipova TO. Biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 PJN2133 strain with low c-di-GMP level. *Microbiology & Biotechnology*. 2016;33:19-28. <http://mbt.onu.edu.ua/article/view/65360/60613>.
18. Winstanley C, O'Brien S, Brockhurst MA. *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. *Trends Microbiol*. 2016;24:327–337. doi: 10.1016/j.tim.2016.01.008.

Стаття надійшла до редакції 09.06.2017 р.

