

УДК 582.282.23.045

М.Ю. Русакова

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (0482) 63 15 73,
e-mail: rusamariya@onu.edu.ua

УТВОРЕННЯ ПОЛІВИДОВОЇ БІОПЛІВКИ МОЛОЧНОКИСЛИМИ БАКТЕРІЯМИ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* P17630 ТА ДРІЖДЖОПОДІБНИМИ ГРИБАМИ *CANDIDA ALBICANS* ATCC 18804

Мета. Вивчення взаємодії клітин *Lactobacillus plantarum* P17630 та *Candida albicans* ATCC 18804 при утворенні полівидової біоплівки та встановлення основних етапів її формування. **Методи.** Взаємодію клітин *Lactobacillus plantarum* P17630 та *Candida albicans* ATCC 18804 при утворенні моно- та полівидової біоплівки вивчали за культивування у живильних середовищах MRS і Сабуро. Структуру біоплівок та наявність окремих структурних складових, які визначають ступінь зрілості мікробних асоціацій, визначали за забарвленням кристалічним фіолетовим. Реєстрацію взаємовідносин впродовж формування полівидової біоплівки здійснювали шляхом порівняння показників її оптичної щільності з показниками монобіоплівок *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804. **Результати.** Найбільш інтенсивне утворення монобіоплівки окремими штамами *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804 відбувалося впродовж перших двох діб культивування у рідкому живильному середовищі Сабуро. Під час утворення полівидової біоплівки між *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804 розвивалася антагоністична взаємодія, найбільший прояв якої спостерігався впродовж перших 48 год культивування, визначаючи порушення структурних компонентів біоплівки. **Висновки.** В процесі формування моновидових біоплівок було визначено три основних етапи: адгезія клітин до цільної поверхні (перші 24 год), утворення окремих мікроколоній (впродовж другої доби) та формування зрілого суцільного клітинного шару (за 96 год інкубації). Антагоністична взаємодія *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804 у складі полівидової біоплівки, зокрема уповільнення розвитку дріжджоподібних грибів та утворення ними суцільного міцелію, була більш вираженою при утворенні еукаріотним учасником угруповання гіфів, ніж окремих дріжджоподібних клітин.

Ключові слова: полівидова біоплівка, *Lactobacillus plantarum*, *Candida albicans*, антагонізм.

© М.Ю. Русакова, 2016



У протилежність суспензії (планктону), біоплівка, тобто прикріплена форма існування мікроорганізмів, є поширеною у природних умовах [4]. Мікроорганізми *in vivo*, існуючи на межі розділу фаз, вступають у контакт з біотичною або абіотичною поверхнею, формують специфічні угруповання, а останнім часом підвищується інтерес до вивчення можливих варіантів взаємодії учасників формування біоплівки, молекул, що опосередковують її та форми впливу на відповідні процеси.

Доведено, що у переважної кількості досліджень з полівидовими біоплівками саме антагонізм є основою мікробної взаємодії, яка, очевидно є набагато складнішою, ніж досі вважалося [9]. Крім мікробних, існують також й інші чинники, у тому числі хімічної природи, з якими мікроби стикаються у довкіллі. Наприклад, склад живильного середовища, концентрація кисню, заліза та інших необхідних компонентів, які можуть мати значний вплив на розподіл біомаси та розвиток мікробних асоціацій [14]. Ці фактори можуть модулювати, а іноді значно змінювати взаємодію між різними видами мікроорганізмів біоплівки.

Молочнокислі бактерії є досить різноманітною групою мікроорганізмів, представників яких можна зустріти не тільки у складі мікробіоти людини та тварин, а й у інших екологічних нішах [2]. *Lactobacillus plantarum* P 17630, виділений з піхви здорової жінки штам молочнокислих бактерій, є одним з небагатьох штамів лактобацил з підвищеною здатністю до адгезії, стійких до антибіотиків, що широко застосовуються у терапії кандидозів статеві системи жінок [5]. Колонізуючи відповідні біотопи та утворюючи на щільній поверхні біоплівку, клітини *L. plantarum* P 17630 вступають у взаємодію з іншими мікроорганізмами, зокрема *Candida albicans*, виявляючи антагоністичні властивості. Але дотепер ще невідомо особливості взаємодії учасників полівидового мікробного угруповання [3].

Метою даної роботи було вивчення взаємодії клітин *Lactobacillus plantarum* P 17630 та *Candida albicans* ATCC 18804 при утворенні полівидової біоплівки та встановлення основних етапів її формування.

Матеріали та методи дослідження

В роботі було використано штами *Lactobacillus plantarum* P17630, виділений з препарату «Гінолакт» (Каталент Італі С.п.А., Італія), та *Candida albicans* ATCC 18804, отриманий з музею культур мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова.

Для культивування використовували живильні середовища: MRS (стандартне живильне середовище для культивування лактобацил), рідкий варіант Сабуро (застосовується для культивування дріжджоподібних грибів та кислотолюбивих бактерій) та модифікований варіант останнього (зі зменшеною концентрацією глюкози (12,5 г/л) та додаванням L-проліну (0,5 г/л)) [1, 12].

В усіх експериментах попередню підготовку добових культур мікроорганізмів здійснювали згідно з методиками [3, 11]. Робочі суспензії клітин *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804 містили по 5×10^6 КУО/мл. Для отримання змішаної біоплівки з відповідних суспензій готували суміш,



яка містила молочнокислі та дріжджоподібні клітини у співвідношеннях 1:1, 1:10 та 10:1 [13]. При визначенні взаємовідносин під час розвитку полівидової біоплівки *in vitro* проводили також попереднє монокультивування *C. albicans* ATCC 18804 впродовж 48 год, після чого вносили суспензію клітин *L. plantarum* P17630 та продовжували інкубацію ще 48 год.

Культивування мікроорганізмів відбувалося впродовж чотирьох діб при температурі 37 °C у лунках полістиролового планшету. Кожні 24 год визначали ступінь зрілості біоплівки, визначаючи кількість клітин у її складі, а також наявність окремих морфологічних складових. Для цього клітини, що входять до складу біоплівки, забарвлювали кристалічним фіолетовим [9].

Мікроскопію отриманих біоплівок здійснювали за допомогою світлового мікроскопа зі збільшенням 14x20. Фотографування проводили з використанням камери у 8Мп (Apple) та Webcam led HD Trust Fuli1 1080p.

Для кількісного аналізу утворення біоплівки, барвник, який поглинули клітини, вилучали та визначали оптичну щільність отриманого розчину. Облік результатів проводили за допомогою спектрофотометру BioTek “μQuant” (при 592 нм), з подальшим порівнянням показників оптичної щільності елюата зі змішаних біоплівок з сумою показників оптичної щільності від біоплівок монокультур [6].

Для отримання достовірних результатів всі досліді проводили у 6 повторях. При порівняльному аналізі результатів досліджень використовувався t-критерій Стюдента. Достовірною вважалася різниця за показника $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення

На першому етапі визначали інтенсивність утворення моновидової біоплівки досліджуваними мікроорганізмами (табл. 1).

Таблиця 1

Динаміка утворення моновидової біоплівки досліджуваними мікроорганізмами

Table 1

Dynamics of monospecies biofilm formation by the studied microorganisms

Вид мікроорганізму	Час, год	Поживне середовище		
		MRS	Сабуро	Сабуро модифіковане
<i>Lactobacillus plantarum</i> P17630*	24	0,235±0,009*	0,135±0,007	0,140±0,008
	48	0,366±0,011	0,429±0,020	0,400±0,021
	96	0,408±0,015	0,508±0,019	0,350±0,013
<i>Candida albicans</i> ATCC 18804*	24	0,050±0,003	0,254±0,014	0,174±0,005
	48	0,078±0,006	0,477±0,029	0,396±0,021
	96	0,120±0,010	0,534±0,017	0,650±0,024

Примітка: * – показники оптичної щільності розчину барвника, який поглинули клітини досліджуваного мікроорганізму впродовж утворювання моновидової біоплівки.

Note: * – optical density of dye solution absorbed the studied microorganism cells during monospecies biofilm formation.



Найбільш інтенсивне формування біоплівки *L. plantarum* P17630 впродовж перших 24 год відбувалося у середовищі MRS: оптична щільність практично у 1,5 рази була вищою за аналогічні показники для варіантів середовища Сабуро. На наступному етапі щільність шару біоплівки молочнокислих бактерій збільшилася, проте найбільша кількість клітин була зафіксована у середовищі Сабуро. При подовженні терміну культивування бактерій до четвертої доби також відзначався ріст біоплівки, але менш виражений, в середньому на 15% порівняно з попереднім етапом.

У дріжджоподібних грибів утворення максимального шару біоплівки відбувалося у середовищі Сабуро, про що свідчить рівень оптичної щільності барвника, який у цьому випадку у 1,5–5 разів перевищував відповідні значення у інших середовищах. Впродовж наступних етапів дослідження кількість клітин *C. albicans* ATCC 18804 у складі біоплівки збільшувалася, залишаючись найвищою у рідкому середовищі Сабуро. Як і для молочнокислих бактерій, з переходом на четверту добу культивування швидкість формування шару мікроорганізмів на межі розділу фаз дещо уповільнювалася. Проте, найбільша щільність спостерігалася у модифікованому варіанті середовища Сабуро.

Очевидно, відмінності інтенсивності швидкості біоплівки досліджуваними мікроорганізмами зумовлені, як різними розмірами клітин *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804, що визначило різну швидкість осідання на щільну поверхню лунок планшету, так і розбіжностями у складі використаних поживних середовищ, а саме наявністю двохвалентних катіонів металів, зокрема магнію та мангану, які сприяють електростатичній взаємодії клітин зі щільною поверхнею [10].

Окремі стадії формування біоплівок досліджуваними мікроорганізмами, тобто утворення ними моновидових угруповань на межі щільна поверхня–рідина, представлено рис. 1. Дані наведено для тих живильних середовищ, в яких було зафіксовано найбільш інтенсивне утворення біоплівки *L. plantarum* P17630 (середовище MRS) та *C. albicans* ATCC 18804 (обидва варіанти середовища Сабуро).

Отже, на 24 год інкубації на щільній поверхні було визначено окремі клітини досліджуваних мікроорганізмів. Це, очевидно, було зумовлено тим, що одразу після їх внесення у нове живильне середовище, відбувалася адаптація до нього, а також прикріплення (адгезія) мікроорганізмів до межі розділу фаз [8]. Більш висока швидкість пристосування до складу використаного середовища була характерною для дріжджоподібних грибів, що зумовило наявність у складі відповідної біоплівки багатьох клітин, що здійснювали брунькування. У випадку лактобацил було знайдено короткі ланцюжки, які склалися з 2–3 клітин, тобто ці мікроорганізми після адгезії до щільної поверхні також почали розмножуватися.

З часом у складі мікробних біоплівок відбуваються структурні зміни, зокрема підвищення вмісту клітин, що входять до неї, ущільнення мікробних асоціацій – утворення мікроколоній [10].



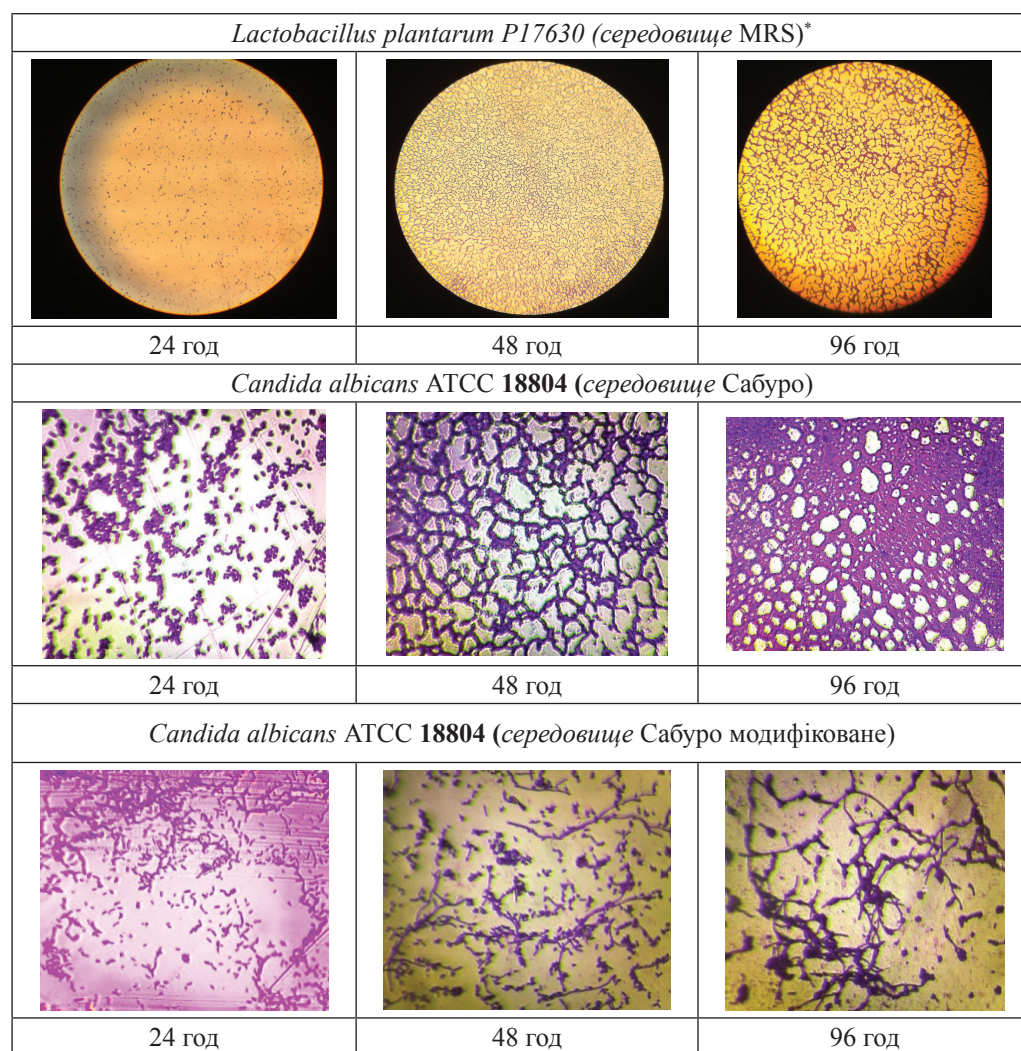


Рис. 1. Структурна організація моновидової біоплівки досліджуваних мікроорганізмів:

фото – забарвлення кристалічним фіолетовим, збільшення x280 (Webcam led HD Trust Fuli1 1080p); * – збільшення x400 (8Mp (Apple))

Fig. 1. Monospecies biofilm structure organization of the studied microorganisms:

photo – crystal violet dye staining, increase x280 (Webcam led HD Trust Fuli1 1080p); * – increase x400 (8Mp (Apple))

Подібні морфологічні перетворення клітинного шару було отримано як для *L. plantarum* P17630, так й *C. albicans* ATCC 18804, на другу добу культивування. Так, у досліджених полях зору біоплівки *L. plantarum* P17630 були присутніми такі угруповання: сформовані мікроколонії лактобацил (приблизно 1/3 від загальної кількості мікроорганізмів), 5–11-клітинні ланцюжки (практично половина) та окремі клітини (лише незначна кількість молочнокислих бактерій).

Однак, для дріжджоподібних грибів, у тому числі представників роду *Candida*, в природних умовах морфогенез біоплівки характеризується зміною форм клітин: дріжджоподібні, гіфальні, псевдогіфальні та ін. [7]. Культивування *in vitro* *C. albicans* ATCC 18804 у живильних середовищах із зниженим вмістом вуглеводів, зокрема глюкози, та наявністю деяких амінокислот, призводить до утворення саме гіфоподібних структур та псевдогіфів, які є обов'язковими елементами біоплівок, що спостерігаються при розвитку поверхневих кандидозів *in vivo* [15].

Відповідні зміни було зафіксовано впродовж 48-ми год культивування досліджуваного штаму *C. albicans* ATCC 18804 у модифікованому живильному середовищі Сабуро. У даному варіанті рідкого живильного середовища спостерігалось зміщення форми клітин у бік поляризованого росту, тобто клітини мали ростові трубки та видовжену форму, відбувалося формування гіфів.

Збільшення терміну росту мікроорганізмів на щільній поверхні до 96 год дозволило зафіксувати процес дозрівання моновидових біоплівок. У середовищах MRS та Сабуро клітинний шар ставав більш щільним, окремі угруповання зливалися, утворюючи суцільну біоплівку.

У складі біоплівки, яку утворювали клітини *C. albicans* ATCC 18804 у модифікованому варіанті середовища Сабуро, кількість подовжених клітин – гіфів – зростала з часом та на четверту добу досягла максимального рівня при візуальному контролі морфогенезу.

Реєстрація взаємовідносин впродовж формування біоплівки двома видами мікроорганізмів відбувалася за порівняння показників оптичної щільності змішаної біоплівки ($O\mathcal{C}_{mix}$) з показниками окремих досліджуваних видів – *L. plantarum* P17630 ($O\mathcal{C}_L$) та *C. albicans* ATCC 18804 ($O\mathcal{C}_C$) [6, 11] (табл. 2).

Якщо спостерігається адитивний ефект, тобто показники змішаних біоплівок достовірно не відрізняються від суми показників кожного штаму ($O\mathcal{C}_L + O\mathcal{C}_C$) – реєструється нейтральний характер міжмікробної взаємодії. При $O\mathcal{C}_{mix} > (O\mathcal{C}_L + O\mathcal{C}_C)$ спостерігається синергізм мікроорганізмів. Проте, якщо значення $O\mathcal{C}_{mix} < (O\mathcal{C}_L + O\mathcal{C}_C)$, йдеться про антагоністичні взаємовідносини клітин культур, які утворили біоплівку [6].

Сумісне культивування *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804 призвело до суттєвих змін інтенсивності формування біоплівки мікроорганізмами. Найбільш виражені розбіжності у порівнянні з моновидовими біоплівками було виявлено на другу добу культивування. У цьому випадку значення оптичної щільності отриманих розчинів кристалічного фіолетового було практично у 4 та 2,5 рази меншими за суму показників окремих культур у середовищах Сабуро та Сабуро модифіковане (І варіант експерименту), відповідно.

Подовження культивування викликало незначне зменшення антагоністичної активності, але відповідні показники для полівидових біоплівок, в середньому, досягли лише 70% від суми окремих культур *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804.



Таблиця 2

Динаміка утворення полівидової біоплівки досліджуваними мікроорганізмами

Table 1

Dynamics of polyspecies biofilm formation by the studied microorganisms

Середовище	Час, год	Співвідношення клітин <i>L. plantarum</i> та <i>C. albicans</i>		
		1L : 1C	1L : 10C	10L : 1C
Сабуро*	24	0,400±0,019	0,405±0,013	0,376±0,011
	48	0,216±0,007**	0,317±0,010**	0,201±0,008**
	96	0,651±0,026**	0,715±0,029**	0,638±0,032**
Сабуро модифіковане: I варіант*	24	0,223±0,011**	0,201±0,009**	0,198±0,012**
	48	0,324±0,017**	0,302±0,013**	0,245±0,010**
	96	0,750±0,035**	0,693±0,024**	0,704±0,031**
Сабуро модифіковане: II варіант*	24	—	—	—
	48	0,291±0,012**	0,287±0,010**	0,205±0,016**
	96	0,662±0,029**	0,687±0,035**	0,748±0,038**

Примітка: * – показники оптичної щільності розчину барвника, який поглинули клітини досліджуваного мікроорганізму впродовж утворення полівидової біоплівки; L – *L. plantarum* P17630; C – *C. albicans* ATCC 18804; I варіант – одночасне внесення у поживне середовище культур *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804; II варіант – послідовне внесення у поживне середовище культур (спочатку *C. albicans* ATCC 18804, за 48 годин – *L. plantarum* P17630); ** – різниця вірогідна у порівнянні з сумою оптичних щільностей при утворенні моновидових біоплівок *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804.

Note: * – optical density of dye solution absorbed the studied microorganism cells within polyspecies biofilm formation; L – *L. plantarum* P17630; C – *C. albicans* ATCC 18804; 1st variant – the simultaneous introduction *L. plantarum* P17630 and *C. albicans* ATCC 18804 in nutrient medium; 2nd variant – the consistent introduction in nutrient medium (firstly *C. albicans* ATCC 18804, in 48 hrs – *L. plantarum* P17630) ** – probable difference compared with the optical density sum during the monospecies biofilm formation of *L. plantarum* P17630 and *C. albicans* ATCC 18804.

Порівнюючи різні співвідношення клітин *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804 було встановлено, що вихідна кількість мікроорганізмів, які ініціюють формування полівидової біоплівки, не завжди є тим чинником, що визначає ступінь прояву антагоністичної взаємодії. Значення оптичної щільності кристалічного фіолетового, який було поглинуто клітинами, що сформували шар полівидової біоплівки, практично збігалися за різних співвідношень *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804, особливо на початкових етапах цього процесу. Незначні розбіжності, скоріше за все, є наслідком різниці у розмірах молочнокислих та дріжджоподібних мікроорганізмів. Отже, адгезія клітин



до щільної поверхні, яка відбувається на першому етапі утворення біоплівки, є для даних мікроорганізмів незалежним процесом для кожної культури [4].

Наступний період сумісного культивування викликав значні зміни у інтенсивності утворення полівидової біоплівки. У всіх варіантах спостерігалось зменшення кількості клітин у складі біоплівки у порівнянні з сумою окремих культур. Найбільше зменшення, більше ніж у тричі порівняно з моновидовими культурами, було зафіксовано для співвідношення 1:1 та 10:1 клітин *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804, відповідно. Очевидно, клітини молочнокислих бактерій, які на попередньому етапі інкубації вже прикріпилися до поверхні лунок планшету, почали розмножуватися та утворювати сполуки, які зумовили антагоністичну дію лактобацил щодо культури *C. albicans* ATCC 18804.

За 96 год сумісного культивування виявлено зменшення кількості досліджуваних мікроорганізмів, приблизно 30–40% порівняно з сумарним показником. Найменш вираженим даний ефект був у випадку співвідношення мікроорганізмів 1:10 (*L. plantarum* : *C. albicans*), що, можливо, викликано підвищенням швидкості процесу розмноження дріжджоподібних грибів саме на другу–третю добу перебування у живильному середовищі, та через це зменшенням чутливості до антагоністичного впливу лактобацил [12].

Проте, було визначено, що послідовність внесення мікроорганізмів у живильне середовище досить суттєво впливає на розвиток культур. У другому варіанті експерименту (середовище Сабуро модифіковане) відбувалося окреме культивування *C. albicans* ATCC 18804 впродовж 48 годин, після чого додавалася суспензія молочнокислих бактерій. Така послідовність внесення культур дозволила визначити вплив *L. plantarum* P17630 на вже досить зрілий шар біоплівки дріжджоподібних грибів [11]. У порівнянні з дослідом, в якому проводилося сумісне культивування мікроорганізмів, кількість клітин, що входили до складу біоплівки на другу добу, знизилася, в середньому, на 15–25%.

Взагалі, утворені *C. albicans* ATCC 18804 гіфи та гіфоподібні структури були більш чутливими до дії молочнокислих бактерій. Різниця між значеннями оптичної щільності у I та II варіантах модифікованого середовища Сабуро складала від 5 до 37 %. Однак, такі відмінності частіше спостерігалися на пізніх строках формування досліджуваної полівидової біоплівки.

Отримані дані, очевидно, зумовлені тим, що за прояву антагоністичних взаємовідносин між лактобацилами та дріжджоподібними грибами одним з ключових моментів є прикріплення клітин одного виду до іншого, яке може відбуватися тільки за наявності гіфів останніх [15]. Поява гіфів у *C. albicans* є тим чинником, що змінює його відносну толерантність на досить агресивний вплив щодо організму людини [12].

Спостереження за морфологічними змінами під час утворення полівидової біоплівки *L. plantarum* P17630 : *C. albicans* ATCC 18804 показало, що початковий етап її утворення (24 год інкубації) не відрізнявся від такого для монокультур (рис. 2).



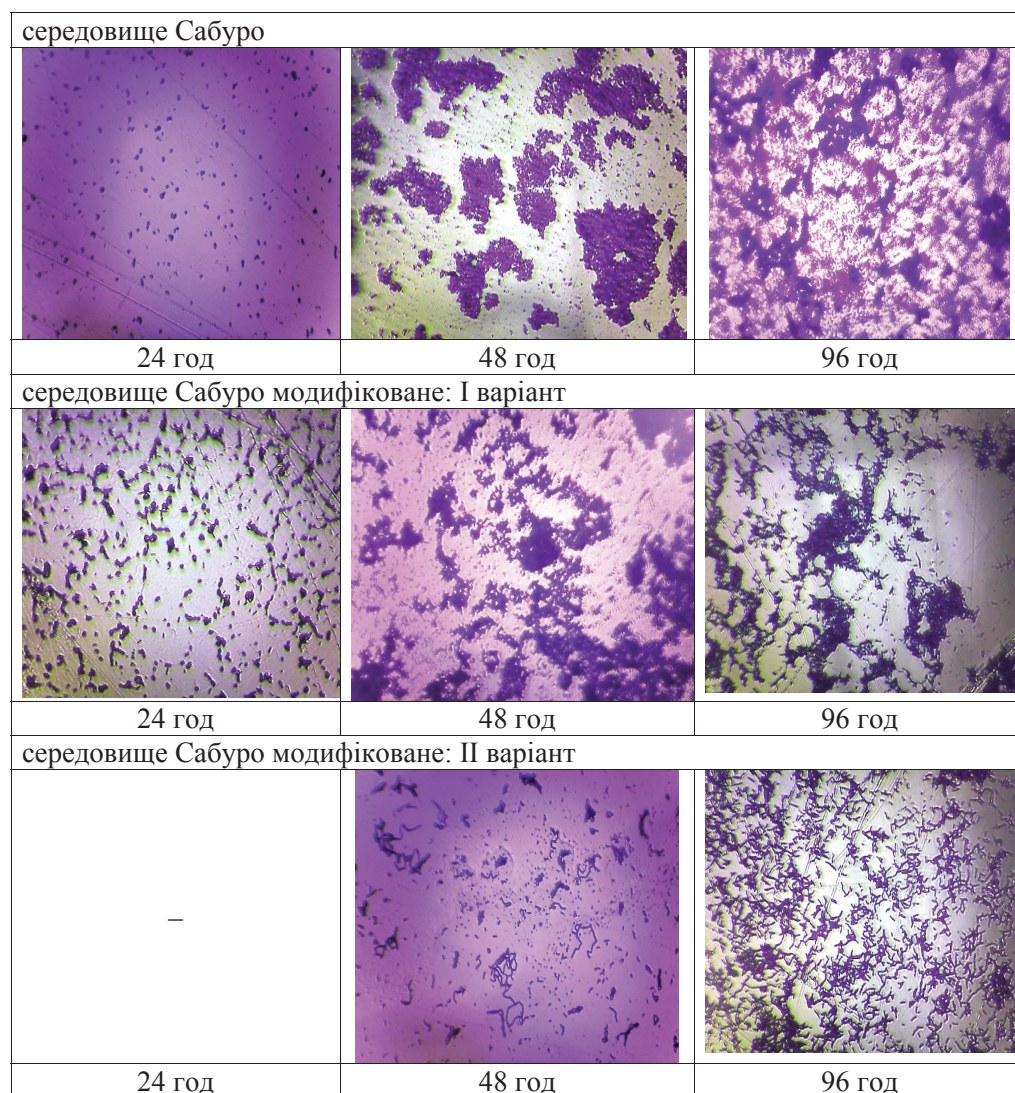


Рис. 2. Структурна організація полівидової біоплівки *L. plantarum* P17630 та *C. albicans* ATCC 18804:

фото – забарвлення кристалічним фіолетовим, збільшення x280 (Webcam led HD Trust Fuli1 1080p)

Fig. 2. Polyspecies biofilm structure organization of *L. plantarum* P17630 and *C. albicans* ATCC 18804:

photo – crystal violet dye staining, increase x280 (Webcam led HD Trust Fuli1 1080p)

На відміну від попередньої стадії на 48-у год культивування були зафіксовані досить значні зміни розвитку мікробної біоплівки. У складі біоплівки не виявлено сформованих мікроколоній ні лактобацил, ні дріжджоподібних грибів. При цьому спостерігалось суттєве зменшення вмісту ростових трубок та псевдогіфів, утворених *C. albicans* ATCC 18804 при культивуванні у модифікованому

середовищі Сабуро. Формування останніх необхідно *C. albicans* для ухилення від фагоцитів, виходу з кровоносних судин і колонізації поверхонь медичних матеріалів з утворюванням біоплівки [8]. Крім того, як окремі дріжджові клітини, так і гіфи *C. albicans*, знаходять в інфікованих нею органах [7]. Вірогідно, такому морфогенезу впродовж життєвого циклу сприяють специфічні властивості самої *C. albicans*. Очевидно, наявність лактобацил у складі змішаної біоплівки викликала порушення розвитку еукаріотного учасника консорціуму.

Структурна організація полівидової біоплівки на 96 год інкубації також суттєво відрізнялася від розвитку моновидових біоплівок. Практично не відбувалося злиття та формування суцільного щільного шару біоплівки. Клітини молочнокислих бактерій заповнили проміжки між мікроколоніями та окремими псевдогіфами *C. albicans* ATCC 18804.

Отримані характеристики узгоджуються з даними літератури щодо культури *Lactobacillus* GG, що заблокувала формування ростових трубок *C. albicans* під час сумісного культивування у середовищі, яке містило сироватку, тобто модуляцію морфогенезу дріжджоподібного гриба [3].

Таким чином, порушення процесів переходу стадій дріжджі-гіфи *Candida albicans* за допомогою молочнокислих бактерій може стати засобом для лікування кандидозів слизових оболонок та шкіряних покривів та суттєво поглибити розуміння механізмів взаємодії мікроорганізмів під час утворення полівидових біоплівок.

M.Yu. Rusakova

Odesa National I.I. Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
tel.: +38 (0482) 63 15 73, e-mail: rusamariya@onu.edu.ua

MULTISPECIES BIOFILM FORMATION BY LACTIC ACID BACTERIA *LACTOBACILLUS PLANTARUM* P17630 AND YEASTS *CANDIDA ALBICANS* ATCC 18804

Summary

Aim. The study *Lactobacillus plantarum* P17630 and *Candida albicans* ATCC 18804 cell interaction in multispecies biofilm and its main formation stage identification. **Methods.** Interaction of *Lactobacillus plantarum* P17630 and *Candida albicans* ATCC 18804 cells during the formation of mono- and multispecies biofilm was studied using culture media: MRS and Sabouraud. The biofilm structure and certain structural component presence determined the maturity level of microbial associations were detected by crystal violet staining. The interactions were registered during the polyspecies biofilm formation by comparing its optical density with *L. plantarum* P17630 and *C. albicans* ATCC 18804 monospecies ones. **Results.** The most intensive formation of monospecies biofilms by individual *L. plantarum* P17630 and *C. albicans* ATCC 18804 strains occurred within the first two days cultivation in liquid medium Sabouraud. The most manifestation of the developed antagonistic interaction between *L. plantarum* and *C. albicans* was observed for the first 48 hrs of cultivation, defining breach of the structural biofilm components. **Conclusions.** The adhesion of cells to solid surface (first 24 hrs), the individual microcolony for-



mation (for the second day) and mature cell layer forming (96 hrs incubation) were three main phases during the monospecies biofilm formation. The antagonistic interaction between *L. plantarum* and *C. albicans* as a part of multispecies biofilms, in particular slowing down the yeast development and mature cell layer formation, was more influenced on the hyphae community generation than individual yeast cells.

Key words: multispecies biofilm, *Lactobacillus plantarum*, *Candida albicans*, antagonism.

М.Ю. Русакова

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (0482) 63 15 73,
e-mail: rusamariya@onu.edu.ua

**ОБРАЗОВАНИЕ ПОЛВИДОВОЙ БИОПЛЕНКИ
МОЛОЧНОКИСЛЫМИ БАКТЕРИЯМИ *LACTOBACILLUS
PLANTARUM* P17630 И ДРОЖЖЕПОДОБНЫМИ ГРИБАМИ *CANDIDA
ALBICANS* ATCC 18804**

Реферат

Цель. Изучение взаимодействия клеток *Lactobacillus plantarum* P17630 и *Candida albicans* ATCC 18804 при образовании поливидовой биопленки и определение основных этапов ее формирования. **Методы.** Взаимодействие клеток *Lactobacillus plantarum* P17630 и *Candida albicans* ATCC 18804 при образовании моно- и поливидовой биопленки изучали при культивировании в питательных средах MRS и Сабуро. Структуру биопленок и наличие отдельных структурных составляющих, которые определяют степень зрелости микробных ассоциаций, определяли при окрашивании кристаллическим фиолетовым. Регистрацию взаимоотношений во время формирования поливидовой биопленки осуществляли путем сравнения показателей ее оптической плотности с показателями монобиопленок *L. plantarum* P17630 и *C. albicans* ATCC 18804. **Результаты.** Наиболее интенсивное образование монобиопленки отдельными штаммами *L. plantarum* P17630 и *C. albicans* ATCC 18804 происходило в течение первых двух суток культивирования в жидкой питательной среде Сабуро. Во время образования поливидовой биопленки между *L. plantarum* P17630 и *C. albicans* ATCC 18804 развивалось антагонистическое взаимодействие, наибольшее проявление которого наблюдалось в течение первых 48 часов культивирования, обуславливая нарушения структурных компонентов биопленки. **Выводы.** В процессе формирования моновидовых биопленок было определено три основных этапа: адгезия клеток к твердой поверхности (первые 24 ч), образования отдельных микроколоний (в течение вторых суток) и формирование зрелого сплошного слоя клеток (за 96 ч инкубации). Антагонистическое взаимодействие *L. plantarum* P17630 и *C. albicans* ATCC 18804 в составе поливидовой биопленки, в частности замедления развития дрожжеподобных грибов и формирования ими сплошного мицелия, было более выраженным при образовании эукариотным участником сообщества гифов, чем отдельных дрожжеподобных клеток.

Ключевые слова: поливидовая биопленка, *Lactobacillus plantarum*, *Candida albicans*, антагонизм.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Квасников Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования. – М.: Наука, 1995. – 350 с.
2. Ленцнер А.А., Ленцнер Х.П., Микельсаар М.Э. Лактофлора и колонизационная резистентность // Антибиотики и медицинская биотехнология. – 2008. – Т. 32, № 3. – С. 173–179.
3. Boris S., Barbes C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens // Microbes and Infection. – 2000. – Vol. 2. – P. 543–546.
4. Costerton J.W., Cheng K.J., Geesey G.G. Bacterial biofilms in nature and disease // Annu Rev Microbiol. – 2007. – Vol. 41. – P. 435–464.
5. Dho G., Marchese A., Debbia E.A. Microbiological characteristics of *Lactobacillus plantarum* P17630 contained in vaginal suppositories // Giornale Italiano di Microbiologia Medica Odontoiatrica e Clinica. – 2003. – Vol. 7. – P. 102–108.
6. Jack M., Wood B.J., Berry D.R. Evidence for the involvement of thiocyanate in the inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus* // Microbios. – 2000. – Vol. 62. – P. 37–46.
7. Jacobsen I.D., Wilson D., Wochtler B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target // Expert. Rev. Antiinfect. Ther. – 2012. – Vol. 10. – P. 85–93.
8. Lajeun Chaffin W., Pez-Ribot J.L.L., Casanova M. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2008. – P. 130–180.
9. Mayer C. The role of intermolecular interactions studies on model systems for bacterial biofilms // Int. J. Biol. Macromol. – 2001. – Vol. 26. – P. 3–16.
10. Pamp S.J., Gjermansen M., Tolker-Nielsen T. The biofilm mode of life mechanisms and adaptations // Horizon Bioscience. – 2007. – Vol. 16. – P. 37–69.
11. Purohit B.C., Joshi K.R., Ramdeo I.N., Bharadwaj T.P. The formation of germ tubes by *Candida albicans*, when grown with *Staphylococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus* and *Proteus vulgaris* // Mycopathologia. – 2011. – Vol. 62. – P. 187–189.
12. Seneviratne C.J., Jin L.J., Samaranayake L.P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review // Oral Dis. – 2008. – Vol. 14. – P. 582–590.
13. Strus M., Kucharska A., Kukla G., Brzychczy-Wloch M., Maresz K., Heczko P.B. The *in vitro* activity of vaginal *Lactobacillus* with probiotic properties against *Candida* // Infect Dis. Obstet. Gynecol. – 2005. – Vol. 13. – P. 69–75.
14. Su J. P., Kyoung-Hee H., Joo Young P. Influence of bacterial presence on biofilm formation // Yonsei Med. J. – 2014. – Vol. 55. – P. 449–458.
15. Toenjes. K.A., Stark B.C., Brooks K.M., Johnson D.I. Inhibitors of cellular signalling are cytotoxic or block the budded-to-hyphal transition in the pathogenic yeast *Candida albicans* // J. Med. Microbiol. – 2009. – Vol. 58. – P. 779–790.



REFERENCES

1. Kvasnikov EI. Lactic acid bacteria and their application. Moscow: Nauka, 1995. 350 p.
2. Lentsner AA, Lentsner CP, Mikelsaar ME. Lactoflora and colonization resistance. *Antibiot. Med. Biotech.* 2008; 32(3):173-179.
3. Boris S, Barbes C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes and Infection.* 2000; 2:543-546.
4. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol.* 2007; 41:435-464.
5. Dho G, Marchese A, Debbia EA. Microbiological characteristics of *Lactobacillus plantarum* P17630 contained in vaginal suppositories. *Giornale Italiano di Microbiologia Medica Odontoiatrica e Clinica.* 2003; 7:102-108.
6. Jack M, Wood BJ, Berry DR. Evidence for the involvement of thiocyanate in the inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbios.* 2000; 62:37-46.
7. Jacobsen ID, Wilson D, Wochtler B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert. Rev. Antiinfect. Ther.* 2012; 10:85-93.
8. Lajeun Chaffin W, Pez-Ribot JLL, Casanova M. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2008; 130-180.
9. Mayer C. The role of intermolecular interactions studies on model systems for bacterial biofilms. *Int. J. Biol. Macromol.* 2001; 26:3-16.
10. Pamp SJ, Gjermansen M, Tolker-Nielsen T. The biofilm mode of life. mechanisms and adaptations. *Horizon Bioscience.* 2007; 16:37-69.
11. Purohit BC, Joshi KR, Ramdeo IN, Bharadwaj TP. The formation of germ tubes by *Candida albicans*, when grown with *Staphylococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus* and *Proteus vulgaris*. *Mycopathologia.* 2011; 62:187-189.
12. Seneviratne CJ, Jin LJ, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis.* 2008; 14: 582-590.
13. Strus M, Kucharska A, Kukla G, Brzychczy-Wloch M, Maresz K, Heczko PB. The *in vitro* activity of vaginal *Lactobacillus* with probiotic properties against *Candida*. *Infect Dis. Obstet. Gynecol.* 2005; 13:69-75.
14. Su JP, Kyoung-Hee H, Joo Young P. Influence of bacterial presence on biofilm formation. *Yonsei Med. J.* 2014; 55:449-458.
15. Toenjes. KA, Stark BC, Brooks KM, Johnson DI. Inhibitors of cellular signalling are cytotoxic or block the budded-to-hyphal transition in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *J. Med. Microbiol.* 2009; 58:779-790.

Стаття надійшла до редакції 04.03.2016 р.

