

СТІЙКІСТЬ ПОПУЛЯЦІЇ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* УКМ В-1 ДО НАНОЧАСТОК СРІБЛА НА РАННІХ ЕТАПАХ БІОПЛІВКОУТВОРЕННЯ

Балко О.І.¹, Балко О.Б.¹, Ярошенко Л.В.¹, Скорик М.А.², Авдєєва Л.В.¹

¹ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

² ТОВ «Нано Технології в Медицині», вул. Антоновича, 68, Київ, 03680, Україна

Метою роботи було дослідити стійкість популяції *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-1 до наночастинок срібла на ранніх етапах біоплівкоутворення. **Методи.** Закономірності біоплівкоутворення вивчали в стаціонарній системі в м'ясопептонному бульйоні, а також при внесенні препарату наночастинок срібла в бактерицидній концентрації до і після 15-ти хвилинного контакту мікроорганізмів зі склом. Візуалізацію компонентів біоплівки проводили за допомогою світлової та скануючої електронної мікроскопії з наступним елементним аналізом. **Результати.** Встановлено, що після 15 хв контакту клітин *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-1 із поверхню скла в стаціонарній системі було виявлено первинні структури біоплівки, вкриті екзоклітинною полімерною субстанцією. На цьому етапі біоплівкоутворення мікроорганізми виявились стійкими до бактерицидної концентрації наночастинок срібла. Вживання бактерій у біоплівковій формі забезпечувало збереження мікробної популяції, яка поступово накопичувалась у складі біоплівки і в подальшому відтворювалась шляхом переходу клітин у планктонну форму. За умов внесення суспензії *P. aeruginosa* УКМ В-1 у середовище з бактерицидною концентрацією наночастинок срібла розмноження мікроорганізмів реєстрували лише на 3 добу культивування, ймовірно за рахунок клітин-персистерів. Подальше відтворення бактеріальної популяції відбувалось за описаною вище закономірністю, але було відстрочене в часі. **Висновки.** Утворення на ранніх етапах біоплівкоутворення первинних структур біоплівки, оточених екзоклітинною полімерною субстанцією, обумовлює набуття популяцією *P. aeruginosa* УКМ В-1 стійкості до бактерицидної концентрації наночастинок срібла. За умов відсутності первинних структур біоплівки, відтворення популяції штаму *P. aeruginosa* УКМ В-1 відтерміноване у часі та відбувається внаслідок активації клітин-персистерів.

Ключові слова: біоплівка, ранні етапи біоплівкоутворення, *Pseudomonas aeruginosa*, наночастки срібла, стійкість бактерій.

В природних екотопах більшість мікроорганізмів на поверхні розподілу фаз утворюють особливу форму існування – біоплівку [1]. Формування біоплівки відбувається як за оптимальних умов, так і під впливом несприятливих факторів зовнішнього середовища. Існування у біоплівковій формі забезпечує бактерії суттєвими перевагами порівняно з клітинами у вільноплаваючій (планктонній) формі [2]. Процес біоплівкоутворення проходить стадії зворотного і, наступного, незворотного прикріплення клітин до поверхні щільного субстрату, після чого відбувається їх об'єднання із утворенням клітинних кластерів. Дані стадії вважаються ранніми етапами біоплівкоутворення. В подальшому розпочинаються пізні етапи формування біоплівки із утворенням зрілої структури [1]. Тривалість протікання

кожного із етапів біоплівкоутворення суттєво коливається в залежності від виду мікроорганізмів та умов зовнішнього середовища.

У складі зрілої біоплівки бактеріальні клітини оточені складно організованим, багатокомпонентним полімерним матриксом, який захищає від впливу більшості несприятливих факторів зовнішнього середовища, у т.ч. від дії антимікробних засобів [3]. Відомо, що стійкість клітин на пізніх етапах біоплівкоутворення обумовлена сорбуванням антимікробних речовин на поверхні біоплівки [4], маскуванням бактеріальних рецепторів [5], слабкою проникністю ряду антибіотиків через екзополімерний матрикс [6] тощо. Проте невідомо, чи характеризується бактеріальна популяція стійкістю до дії антимікробних засобів на ранніх етапах біоплівкоутворення.

Метою даної роботи було дослідити стійкість популяції *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-1 до наночасток срібла на ранніх етапах біоплівкоутворення.

Матеріали та методи досліджень. Об'єктом дослідження був типовий штам *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-1 (АТСС 10145), отриманий із Української колекції мікроорганізмів (УКМ, Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України) [7].

Як антимікробний засіб застосовували нанокompозит високодисперсного кремнезему із наночастками срібла (нанокompозит ВККС), розроблений співробітниками кафедри фармакології та клінічної фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця та Інституту хімії поверхні ім. О.О. Чуйко НАН України [8]. Методика отримання нанокompозиту ВККС полягає в механосорбційному покритті кремнезему моношаром нітрату аргентуму, під час якого відбувається формування наночасток срібла. У складі даного композиту присутні рівномірно розподілені по поверхні високодисперсного кремнезему у вигляді моношару наночастки срібла розміром від 12 до 18 нм у концентрації 7,9% (за об'ємом) [8]. Враховуючи раніше показану нами відсутність впливу високодисперсного кремнезему на ріст *P. aeruginosa* УКМ В-1 [8], в даних дослідженнях як препарат порівняння високодисперсний кремнезем не застосовували.

Вивчення стійкості *P. aeruginosa* УКМ В-1 до наночасток срібла на ранніх етапах біоплівкоутворення проводили в стаціонарній системі [9]. Дана модель дослідження передбачає культивування мікроорганізмів протягом усього експерименту у вихідному поживному середовищі. В систему додатково вносять щільний субстрат, на поверхні якого відбувається формування біоплівки. Стаціонарна система широко використовується для вивчення закономірностей біоплівкоутворення і відрізняється від проточної системи відсутністю додаткового введення чистого поживного середовища та виведення продуктів метаболізму [1]. В проведених нами експериментах стаціонарну систему створювали в бюксах розміром 30×50 мм та об'ємом 20 мл, куди вносили 1,8 мл м'ясо-пептонного бульйону та покрівельне скельце розміром 18×18 мм. Після цього додавали 0,2 мл суспензії *P. aeruginosa* УКМ В-1 титром 2×10^7 КУО/мл.

Для дослідження стійкості бактерій на початкових стадіях біоплівкоутворення нанокompозит ВККС в кінцевій концентрації 500 мкг/мл (по аргентуму) вносили в бюкс через 15 хвилин після додавання бактери-

альної суспензії. Вибір концентрації обґрунтований попередньо встановленою нами мінімальною бактерицидною концентрацією наноконструкції ВККС щодо *P. aeruginosa*: 400 мкг/мл (по аргентуму) [8] та узгоджується із показниками антимікробної активності інших аналогічних препаратів [10]. Культивування проводили при 37°C протягом 3 діб, зразки суспензії і скелця відбирали щодобово. Закономірності біоплівкоутворення *P. aeruginosa* УКМ В-1 оцінювали за кількістю життєздатних клітин у планктонній та біоплівковій формах, а також за площею покриття скелця біоплівкою [11]. В іншому варіанті експерименту вивчали стійкість *P. aeruginosa* УКМ В-1 до впливу антимікробного засобу за відсутності переходу мікробних клітин до первинних етапів біоплівкоутворення. Для цього наноконструкції ВККС вносили у стаціонарну систему в аналогічній концентрації (500 мкг/мл по аргентуму) перед додаванням суспензії *P. aeruginosa* УКМ В-1. Отримані результати оцінювали відповідно до закономірностей біоплівкоутворення *P. aeruginosa* УКМ В-1 при вирощуванні в м'ясо-пепетонному бульйоні без додавання антимікробного засобу.

Для проведення скануючої електронної мікроскопії у бюкси вносили 1,8 мл бульйону, підкладинки із полірованого силіцію та 0,2 мл суспензії мікроорганізмів *P. aeruginosa* УКМ В-1 титром 2×10^7 КУО/мл. Культивування здійснювали у термостаті при 37°C протягом 15 хв і 1 год. Підкладинки трикратно відмивали у дистильованій воді і фіксували протягом 10 хв у 96 % розчині етанолу. Зразки клітин перед внесенням в камеру мікроскопа покривали тонким шаром (близько 20 нм) провідного матеріалу (карбон). Ультрамикрофотографічні зображення отримували на скануючому електронному мікроскопі Tescan Mira 3 LMU (Tescan, Чехія) в лабораторії електронної мікроскопії ТОВ «Нано Технології в Медицині». Формування зображення відбувалось за допомогою детектору пружно відбитих (BSE) електронів. Інші використані параметри приладу (збільшення, масштабна мітка, прискорююча напруга) наведені на кожному знімку. Визначення елементного складу проводили за допомогою енергодисперсійного спектрометра Oxford X-max 80 mm (Oxford Instruments, Великобританія), встановленого на даному мікроскопі. Зазначений спектрометр кількісно аналізує елементний склад зразка в діапазоні елементів від берилію (Be, 4) до урану (U, 92), в основі роботи приладу лежить принцип аналізу вторинного характеристичного випромінювання. Орієнтовна похибка отримуваних даних не перевищує 0,5 %.

Результати. На початковому етапі роботи досліджували особливості біоплівкоутворення *P. aeruginosa* УКМ В-1 за оптимальних умов культивування – в МПБ [12] без додавання антимікробного засобу. Встановлено, що титр бактерій у планктонній формі досягав максимальних показників – $1,7 \times 10^8$ КУО/мл уже на першу добу спостереження (рис. 1), після чого кількість мікроорганізмів двократно знижувалась. Інтенсивність покриття зразків біоплівкою зростала до максимальних значень – 110 мм² на другу добу культивування і в подальшому, на третю добу спостереження, також частково знижувалась. Натомість, кількість життєздатних мікроорганізмів у складі біоплівки підвищувалась протягом усього періоду спостереження і на 3 добу становила $1,1 \times 10^5$ КУО/мл. Таким чином, за оптимальних

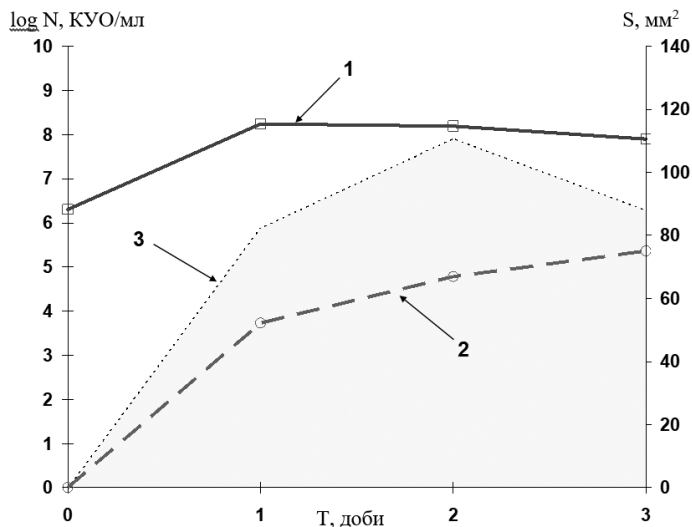


Рис. 1. Динаміка біоплівкоутворення *P. aeruginosa* УКМ В-1 в м'ясо-пептонному бульйоні

Тут і далі: N – кількість життєздатних клітин в планктонній (1) та біоплівковій (2) формах. S – площа покриття зразків біоплівкою (3). T – період спостереження.

умов культивування відбувалось максимально швидке накопичення бактеріальних клітин у планктонній формі. Інтенсивність покриття зразків біоплівкою зростала повільніше, тоді як збільшення кількості життєздатних мікроорганізмів у її складі виявилось найбільш тривалим процесом.

Відомо, що стійкість *P. aeruginosa* до антибіотиків може реалізовуватись різними шляхами: завдяки передачі генів інактивуючих ферментів, систем ефлюксу тощо [13]. Натомість, однією із найбільш поширених причин набуття резистентності до дії наночастинок срібла вважається здатність до біоплівкоутворення [14]. Саме тому як антимікробний засіб для оцінки стійкості *P. aeruginosa* УКМ В-1 нами було використано не антибіотики, а нанокompозит ВККС.

При внесенні бактеріальної суспензії в стаціонарну систему після додавання нанокompозиту ВККС в кінцевій концентрації 500 мкг/мл (по аргентуму, що на 25% вище мінімальної бактерицидної концентрації), мікроорганізми не контактували із щільним субстратом, а одразу взаємодіяли із антимікробним засобом. В даному випадку чутливість мікробної популяції відповідала чутливості *P. aeruginosa* УКМ В-1 у складі суспензії [8]. Так, вже на першу добу спостереження життєздатних мікроорганізмів у планктонній формі не виявляли (рис. 2А). Відновлення бактеріальної популяції починалось лише на 3 добу культивування: кількість життєздатних клітин у складі біоплівкової форми зростала до $1,5 \times 10^3$ КУО/мл.

При додаванні бактеріальної суспензії в стаціонарну систему за 15 хвилин перед внесенням нанокompозиту ВККС стійкість мікробної популяції до антимікробного засобу відрізнялась від описаної [8] для *P. aeruginosa* УКМ В-1 у складі суспензії. В стаціонарній системі на першу добу спостереження кількість клітин у планктонній формі різко знижувалась до 7×10^1 КУО/мл (рис. 2Б). В подальшому дана тенденція зберігалась, проте вже на 3 добу культивування титр вільно плаваючих мікроорганізмів відновлювався до $2,8 \times 10^4$ КУО/мл. Натомість, у складі біоплівки виявлена

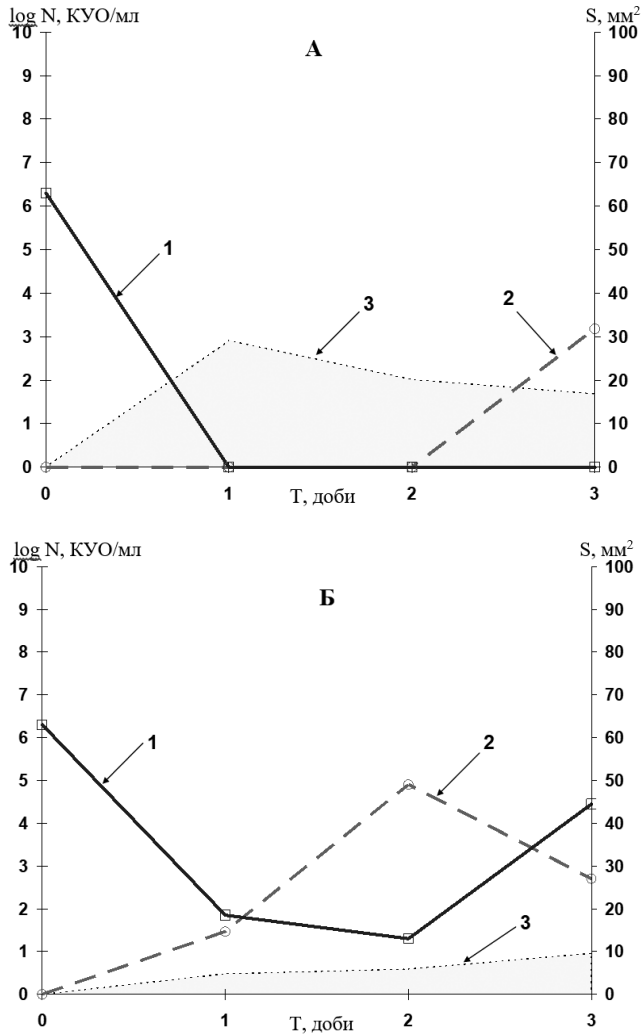


Рис. 2. Динаміка біоплівкоутворення *P. aeruginosa* УКМ В-1 при внесенні нанокompозиту високодисперсного кремнезему із наночастками срібла перед додаванням суспензії мікроорганізмів (А) та після 15-хвилинного контакту бактеріальної суспензії із поверхнею скельця (Б)

зворотна динаміка. Кількість клітин біоплівкової форми протягом перших двох діб поступово зростала до 8×10^4 КУО/мл, тоді як на 3 добу даний показник різко знижувався до 5×10^2 КУО/мл. Площа покриття зразків біоплівкою протягом усього періоду спостереження зростала і на 3 добу становила $9,6 \text{ мм}^2$.

Для з'ясування причини стійкості *P. aeruginosa* УКМ В-1 було проведено детальний аналіз зображень, отриманих для визначення площі покриття зразків біоплівкою методом світлової мікроскопії [11]. Встановлено, що при внесенні бактеріальної суспензії за 15 хвилин перед додаванням антимікробного засобу, на поверхні зразків навколо сорбованих клітин виявлялись напівпрозорі, ледь забарвлені генціан-віолетом структури (рис 3А), які характеризувались різною площею поверхні, розмитими контурами та неоднорідністю зв'язування із барвником. Коли бактеріальну суспензію вносили у поживне середовище після нанокompозиту ВККС, описані

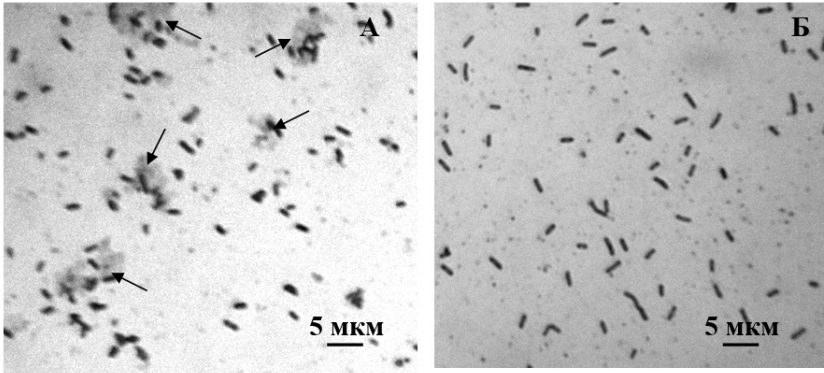


Рис. 3. Поверхня зразка із сорбованими клітинами *P. aeruginosa* УКМ В-1 при внесенні нанокompозиту ВККС в середовище після 15-хвилинного контакту бактеріальної суспензії зі скельцем (А) та перед додаванням суспензії мікроорганізмів (Б). Стрілками вказано напівпрозорі, помірно забарвлені структури, які оточують бактеріальні клітини *P. aeruginosa* УКМ В-1

структури навколо сорбованих клітин не виявляли (рис 3Б). Очевидно, що виявлені структури синтезувались клітинами мікроорганізмів і могли бути причиною їх підвищеної стійкості до дії антимікробних препаратів.

Зважаючи на недостатню інформативність світлової мікроскопії при дослідженні подібних структур, їх характеристики було вивчено за допомогою скануючої електронної мікроскопії. Встановлено, що вже на 15 хв з моменту контакту клітин *P. aeruginosa* УКМ В-1 із щільним субстратом на його поверхні присутні сорбовані бактерії (рис. 4А). При цьому в більшості випадків було виявлено не поодинокі, а попарне прикріплення клітин із утворенням розеток або скупчень більшої кількості мікроорганізмів з формуванням конгломератів. Навколо даних утворів відмічено наявність речовини, яка оточувала кожен клітину з усіх сторін і частково їх покривала. Описані закономірності відповідають початку

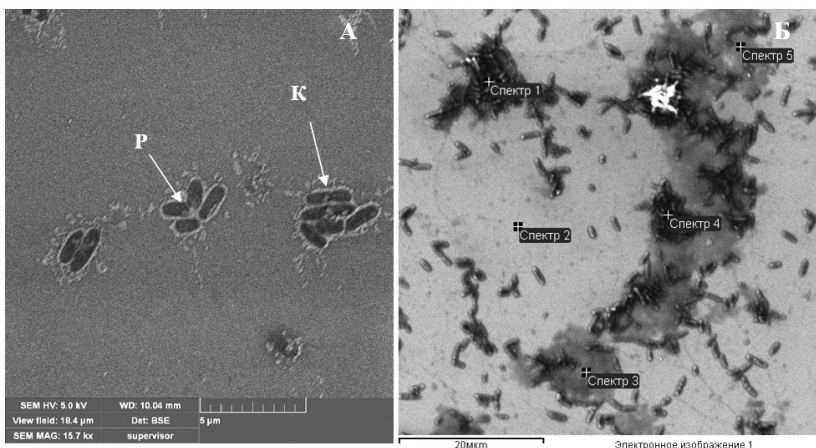


Рис. 4. Ранні стадії біоплівкоутворення *P. aeruginosa* УКМ В-1 через 15 хв (А) та 1 год (Б) від моменту контакту бактеріальної суспензії із щільним субстратом (скельцем).

Р – утворення розеток. К – формування конгломератів. Спектр 1 і спектр 4 – скупчення клітин в активних центрах біоплівки, спектр 3 і спектр 5 – ділянки субстанції, спектр 2 – вільна від біоплівкових структур поверхня зразка

другої стадії формування біоплівки за Костертоном: незворотнє прикріплення клітин із наступним утворенням клітинних кластерів [1].

Контакт суспензії бактерій *P. aeruginosa* УКМ В-1 із щільним субстратом протягом 1 год супроводжувався продовженням процесу біоплівкоутворення (рис. 4Б). На зразку виявлено невеликі клітинні конгломерати із сформованими між собою зв'язками. Функцію додаткового об'єднуючого компоненту, що заповнював проміжки між структурами біоплівки, виконувала полімерна речовина. Дану речовину виявляли навколо клітин як через 15 хв після їх контакту із щільним субстратом, так і через 1 год з початку експерименту.

Для з'ясування природи даної речовини проведено елементний аналіз компонентів зразка. Порівняння проводили в трьох точках: скупченні клітин в активних центрах біоплівки (спектр 1 і спектр 4), ділянках полімерної речовини (спектр 3 і спектр 5) та вільних від біоплівкових структур ділянках зразка (спектр 2). Встановлено, що вільні ділянки (спектр 2) містили силіцій (Si) як основу підкладинки, та карбон (C) як провідний матеріал, який наносився на зразок (табл. 1). В ділянках полімерної речовини (спектр 3 і спектр 5) виявлено карбон (C) та кисень (O), тоді як інші елементи (наприклад, азот та фосфор) були відсутні. Відомо, що 85% загальної біомаси біоплівки становить екзоклітинна полімерна субстанція (ЕПС), яка на різних стадіях розвитку може містити біомолекули, екзополісахариди, екзоклітинну ДНК і поліпептиди [3]. Виявлені нами карбон та кисень, а також водень (приладом не визначається), характерні для полісахаридів, які виділяються клітинами *P. aeruginosa* для адгезії до щільного субстрату, міжклітинної взаємодії та утворення початкових структур біоплівки [15]. Відсутність чіткої кореляції між співвідношеннями атомних відсотків елементів та структурною формулою полісахаридів можна пояснити неоднорідністю нанесення на зразок карбону як провідного матеріалу. Таким чином, одразу після сорбування клітин до поверхні щільного субстрату відбувається виділення ЕПС, що захищає мікроорганізми від руйнування антимікробними складовими наноконструкції ВККС. На ранніх етапах біоплівкоутворення у складі ЕПС, очевидно, переважають полісахариди, проте особливості компонентного складу біоплівки потребують проведення подальшого більш детального дослідження.

Таблиця 1

Вміст основних елементів у складі структурних компонентів біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-1 на ранніх стадіях її формування

Спектр	C	N	O	Na	Mg	Si	P
Спектр 1	58.43	14.76	8.64	0.28	–	17.03	0.87
Спектр 2	25.81	–	–	–	–	74.19	–
Спектр 3	37.43	–	1.85	–	–	60.72	–
Спектр 4	52.07	11.23	6.71	–	0.29	29.01	0.69
Спектр 5	25.84	–	1.66	–	–	72.49	–

Примітка: всі результати наведені в атомних відсотках. Локалізація точок проведеного аналізу основних елементів відображено на рис. 4Б: спектр 1 і спектр 4 – скупчення клітин в активних центрах біоплівки, спектр 3 і спектр 5 – ділянки полімерної речовини, спектр 2 – вільна від біоплівкових структур поверхня зразка.

Обговорення. Динаміка біоплівкоутворення при вирощуванні *P. aeruginosa* УКМ В-1 за оптимальних умов в МПБ без додавання антимікробного засобу вказує, що при потраплянні *P. aeruginosa* в нову екологічну нішу спочатку відбувається її заповнення бактеріями у планктонній формі. В подальшому, з метою захисту клітин популяції від можливо-го впливу несприятливих факторів відбувається формування біоплівки. Оскільки мікроорганізми у складі біоплівки накопичуються найбільш повільно, вони, очевидно, виконують функцію резервного пулу, необхідного для відтворення популяції при зниженні кількості бактерій в планктонній формі. Протягом культивування клітини мікроорганізмів у біоплівковій та планктонній формах знаходяться між собою в динамічній рівновазі – під впливом зовнішніх або внутрішніх процесів переходять із однієї форми в іншу. Наведені закономірності взаємозв'язку між біоплівкою і клітинами обох форм були описані нами для інших штамів *P. aeruginosa* [16], а також відмічені в роботах ряду авторів [2].

При внесенні в стаціонарну систему нанокompозиту ВККС реалізуються різні стратегії виживання популяції *P. aeruginosa*. Забезпечення 15-ти хвилинного контакту бактеріальної суспензії із поверхнею скла перед додаванням нанокompозиту ВККС виявилось достатнім для появи на його поверхні тяжів, розеток і конгломератів, які є первинними структурами біоплівки [17]. Дані структури виявляють на другій стадії біоплівкоутворення після зворотного прикріплення бактерій до поверхні щільного субстрату [1]. Протікання ранніх стадій біоплівкоутворення супроводжується виділенням клітинами *P. aeruginosa* екзоклітинної ДНК, а також Pel і Psl полісахаридів [15, 18]. При цьому виділення Psl полісахаридів, очевидно, відбувається найшвидше, оскільки даний процес регулюється лише GacS/GacA системою [3]. Отримані нами дані мікроскопії і результати дослідження елементного складу підтвердили, що сорбовані на склі клітини були оточені і частково покриті ЕПС. Наведене свідчить, що через 15 хвилин після контакту бактеріальних клітин із поверхнею скла, на момент внесення в бюкси нанокompозиту ВККС, частина клітин *P. aeruginosa* УКМ В-1 уже перейшла із планктонної у біоплівкову форму існування. Незважаючи на появу лише первинних структур біоплівки, бактеріальна популяція стала стійкою до дії антимікробного засобу. Виживання бактерій у біоплівковій формі забезпечило збереження мікробної популяції, яка поступово накопичувалась у складі біоплівки і в подальшому відтворювалась шляхом переходу клітин у планктонну форму.

Інша стратегія виживання *P. aeruginosa* УКМ В-1 була відмічена, коли після внесення в стаціонарну систему бактерії у планктонній формі одразу взаємодіяли з антимікробним препаратом без попереднього контакту із щільним субстратом. Нанокompозит ВККС спричиняв загибель здатних до активної реплікації клітин і протягом перших двох діб культивування життєздатних мікроорганізмів як в планктонній, так і у біоплівковій формах не виявлялось. Відомо, що у складі бактеріальної суспензії міститься невисокий, значно нижчий, ніж у складі біоплівки, відсоток клітин-персистерів [19]. Дані клітини знаходяться у «неактивному» стані, характеризуються високою стійкістю до дії антимікробних речовин і активуються при зниженні в середовищі концентрації антимікробної речовини [2]. Накопичення на поверхні зразків значної кількості загиблених мікроорганізмів

та їх компонентів, ймовірно, призводить до утворення аналогу біоплівки, що забезпечує умови для активації клітин-персистерів. Підтвердженням тому було виявлення життєздатних мікроорганізмів у біоплівковій формі на 3 добу спостереження. Подальше відтворення бактеріальної популяції відбувалось за описаною вище закономірністю, проте було відстрочене в часі.

Отже, на етапі утворення первинних структур біоплівки популяція *P. aeruginosa* УКМ В-1 проявляє стійкість до наночасток срібла за рахунок виділення екзоклітинної полімерної субстанції. Відтворення популяції штаму *P. aeruginosa* УКМ В-1, внесеної в присутності бактерицидної концентрації наночасток срібла, відбувається за рахунок клітин-персистерів.

Подяка. Автори висловлюють глибоку вдячність за наданий нанокompatит вискодисперсного кремнезему із наночастками срібла к.мед.н. Савченку Д.С. та член-кореспонденту НАМН і НАН України, професору, д.мед.н. Чекману І.С.

УСТОЙЧИВОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* УКМ В-1 К НАНОЧАСТИЦАМ СЕРЕБРА НА РАННИХ ЭТАПАХ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ

Балко О.И.¹, Балко А.Б.¹, Ярошенко Л.В.¹, Скорик М.А.², Авдеева Л.В.¹

¹ Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

² ООО «Нано Технологии в Медицине», ул. Антоновича, 68, Киев, 03680, Украина

Резюме

Целью работы было исследование устойчивости популяции *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-1 к воздействию наночастиц серебра на ранних этапах биопленкообразования. **Методы.** Закономерности биопленкообразования изучали в стационарной системе в мясоептонном бульоне, а также при внесении препарата наночастиц серебра в бактерицидной концентрации до и после 15-минутного контакта микроорганизмов с поверхностью стекла. Визуализацию компонентов биопленки проводили с помощью световой и сканирующей электронной микроскопии с последующим элементным анализом. **Результаты.** Показано, что через 15 мин контакта клеток *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-1 с поверхностью стекла в стационарной системе были обнаружены первичные структуры биопленки, покрытые экзоклеточной полимерной субстанцией. На этом этапе биопленкообразования микроорганизмы оказались устойчивыми к бактерицидной концентрации наночастиц серебра. Выживание бактерий в биопленочной форме обеспечило сохранение микробной популяции, которая постепенно накапливалась в виде биопленки и в дальнейшем восстанавливалась путем перехода клеток в планктонную форму. При внесении суспензии *P. aeruginosa* УКМ В-1 в среду с бактерицидной концентрацией наночастиц серебра размножение микроорганизмов регистрировали только на 3 сутки культивирования, вероятно за счет клеток-персистеров. Дальнейшее восстановление бактериальной популяции протекало согласно описанной ранее закономірності, однак було відстрочено во времени. **Выводы.** Формирование на ранних этапах биопленкообразования первичных структур биопленки, окруженных экзоклеточной полимерной субстанции-

ей, обуславливает приобретение популяцией *P. aeruginosa* УКМ В-1 устойчивости к бактерицидной концентрации наночастиц серебра. При отсутствии первичных структур биопленки восстановление популяции штамма *P. aeruginosa* УКМ В-1 отсрочено во времени и осуществляется путем активации клеток-персистеров.

Ключевые слова: биопленка, ранние этапы биопленкообразования, *Pseudomonas aeruginosa*, наночастицы серебра, устойчивость бактерий.

RESISTANCE OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* UCM B-1 POPULATION TO SILVER NANOPARTICLES AT EARLY STAGES OF BIOFILM FORMATION

Balko O.I.¹, Balko O.B.¹, Yaroshenko L.V.¹, Skorik M.A.², Avdeeva L.V.¹.

¹ Zabolotny institute of microbiology and virology NAS of Ukraine Ukraine, Zabolotny str., 154, Kyiv, 03143, Ukraine

² "Nano Technology in Medicine" Ltd, Antonovich str., 68, Kyiv, 03680, Ukraine

The aim of work was investigation of *P. aeruginosa* UCM B-1 population resistance to silver nanoparticles at early stages of biofilm formation. **Methods.** The biofilm formation regularities were studied in steady-state system. The cultivation was conducted in meat-peptone broth, also under introduction of silver nanoparticles preparation in bactericidal concentration in 15 minutes before and after the microorganism contacted with glass surface. Visualization of the biofilm components was performed by light and scanning electron microscopy with elemental analysis. **Results.** Biofilm earlier structures, covered with extracellular polymer substance, were discovered after 15 minutes *Pseudomonas aeruginosa* UCM B-1 cells contacted glass surface in steady-state system. At this stage of biofilm formation microorganisms were resistant to bactericidal concentration of silver nanoparticles. Survival of microorganisms in biofilm form ensured maintenance of microbial population, which gradually accumulated in biofilm form and later restored by cell transition into planktonic form. Under addition of *P. aeruginosa* UCM B-1 suspension in medium with bactericidal concentration of silver nanoparticles the growth of microorganisms was registered only at 3rd day of cultivation, probably due to cell-persisters. The following recreation of bacterial population occurred according to the previously described regularities, but was delayed in time. **Conclusions.** The origin of biofilm earlier structures covered with extracellular polymer substance at early stages of biofilmformation conditions the resistance of *P. aeruginosa* UCM B-1 population to bactericidal concentration of silver nanoparticles. Under the absence of biofilm earlier structures, recreation of bacterial population is delayed and occurred due to activation of cell-persisters.

Keywords: biofilm, early stages of biofilm formation, *Pseudomonas aeruginosa*, silver nanoparticles, bacterial resistance.

1. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002; 56: 187–209.
2. López D, Vlamakis H, Kolter R. *Biofilms.* Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010; 2(7): a000398.

3. *Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, El Jaziri M.* The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 759348.
4. *Lamber PA.* Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med.* 2002; 95 (41): 22–6.
5. *Hoyle BD, Costerton JW.* Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog Drug Res.* 1991; 37: 91-105.
6. *Ishida H, Ishida Y, Kurosaka Y, Otani T, Sato K, Kobayashi H.* In Vitro and In Vivo Activities of Levofloxacin against Biofilm-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(7): 1641–5.
7. *Pidgorskyi VS, Kotsofliak OI, Kiprianova OA, Gvosdiak OR.* [Ukrainian collection of microorganisms. Catalogue of cultures]. Kyiv: Naukova Dumka; 2007. Ukrainian.
8. *Savchenko DS, Chekman IS, Balko OB, Voronin YaP.* [Method for estimation of highly dispersed silica and silver cluster nanocomposite application efficiency]. Pat. 68895 UA, MPK G01N 33/48. Publ. 10.04.12, Bull. № 7. Ukrainian.
9. *Balko OI, Balko AB, Avdeeva LV.* [Method of biofilm forming capacity definition in microorganisms]. Pat. 89509 UA, MPK C12Q 1/24. Publ. 25.04.14, Bull. № 8. Ukrainian.
10. *Egger S, Lehmann RP, Height MJ, Loessner MJ, Schuppler M.* Antimicrobial properties of a novel silver-silica nanocomposite material. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(9): 2973-6.
11. *Balko OI, Balko AB, Avdeeva LV.* [Method of viable microorganisms quantity definition in the biofilm composition]. Pat. 89508 UA, MPK C12Q 1/24. Publ. 25.04.14, Bull. № 8. Ukrainian.
12. State Pharmacopoeia of Ukraine. 1th ed. Kharkov: RIREG; 2001. Ukrainian.
13. *Livermore DM.* Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? *Clin Infect Dis.* 2002. 34 (5): 634-40.
14. *Prabhu S, Poulouse EK.* Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Int Nano Lett.* 2012; 2:32.
15. *Flemming H-C, Wingender J.* The biofilm matrix. *Nature Rev Microbiol.* 2010; 8 (9): 623–33.
16. *Balko OI, Balko AB, Avdeeva LV.* [Biofilm forming capacity and bacteriocinogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*]. In.: Mokienko AV, Pushkina VA, Gozhenko AI, editors. [Biofilms of hospital ecosystems: condition, problems and modern approaches to its solve]. Odessa: TOV VNP “Interservis”; 2014. p. 247-311. Russian.
17. *Balko OI, Avdeeva LV, Balko OB.* [Stages of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation]. *Ukrain Food J.* 2013; 2(1): 23-6. Ukrainian.
18. *Ma L, Wang J, Wang S, Anderson EM, Lam JS, Parsek MR, Wozniak DJ.* Synthesis of multiple *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix exopolysaccharides is posttranscriptionally regulated. *Environ Microbiol.* 2012; 14(8): 1995–2005.
19. *Wood TK, Knabel SJ, Kwan BW.* Bacterial Persister Cell Formation and Dormancy. *Appl Environ Microbiol.* 2013; 79(23): 7116–21.

Отримано 14.03.2017