

DOI: 10.31393/reports-vnmedical-2023-27(1)-04

УДК:579.84

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ОКРЕМИХ КОМПОНЕНТ У СЕРЕДОВИЩІ КУЛЬТИВУВАННЯ НА БІОПЛІВКОУТВОРЮВАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ

P. AERUGINOSA ТА *A. BAUMANNII*

Ковальчук В. П., Буркот В. М., Дудар А. О., Кондратюк В. М., Жорняк О. І., Прокопчук З. М., Трофіменко Ю. Ю.

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

Відповідальний за листування:
e-mail: burkotvita@gmail.com

Статтю отримано 20 грудня 2022 р.; прийнято до друку 24 січня 2023 р.

Анотація. Мікроорганізми *P. aeruginosa*, *A. baumannii* часто стають збудниками важких ранових інфекцій, вентилятор-асоційованих пневмоній, катетер-асоційованих септичних станів та інших важких патологічних процесів. У патогенезі цих захворювань важливу роль відіграє здатність бактерій до біоплівкоутворення в уражених тканинах. Тому метою нашої роботи є дослідження впливу окремих зовнішніх чинників на здатність бактерій до утворення біоплівок. У процесі проведених досліджень використано 5 клінічних штамів *P. aeruginosa* та 5 штамів *A. baumannii*. Здатність до утворення біоплівок вивчали у 96-лункових полістиролових планшетах спектрофотометричним методом, який ґрунтується на здатності барвника кристалічного фіолетового зв'язуватись із клітинами та матриксом біоплівки. Статистична обробка отриманих результатів проведена з використанням таблиць Excel Microsoft Office. Досліджено вплив на процеси біоплівкоутворення псевдомонадами та ацінетобактеріями в присутності у середовищі культивування окремих цукрів та азотемісних сполук. У результаті проведених досліджень було встановлено, що ацінетобактерії проявляють здатність до утворення плівок, на відміну від псевдомонад, при умові їх культивування у стерильній дистильованій воді. Внесення до середовища культивування окремих вуглеводів чи сечовини інтенсифікувало біоплівкоутворювальні властивості псевдомонад значно більшою мірою, порівняно з ацінетобактеріями. За результатами досліджень встановлено, що найбільш активно процес біоплівкоутворення відбувається в обох видів неферментуючих грамнегативних бактерій при наявності у середовищі культивування білків сироватки крові тварин. Утворення біоплівок - одна з основних стратегій, що підвищує виживання бактерій у навколишньому середовищі, а також в організмі людини. Здатність бактерій формувати біоплівки, крім іншого, є чинником патогенності та вірулентності бактерій. Тому, в останні роки, особлива увага приділяється як здатності мікроорганізмів утворювати біоплівки, так і вивченню факторів, що впливають на зазначений процес.

Ключові слова: грамнегативні неферментуючі бактерії, інтенсивність біоплівкоутворення, вплив складу середовища.

Вступ

Вагому частку у мікробіоценозах, що оточують людину, складає гетерогенна група неферментуючих грамнегативних бактерій (НФГНБ), що характеризуються убіквітарністю розповсюдження. Висока екологічна пластичність дозволяє бактеріям цієї групи домінувати в багатьох екологічних нішах [23, 24]. В етіологічній структурі нозокоміальних інфекцій різної локалізації за останні роки спостерігається істотне зростання питомої ваги мікроорганізмів, віднесених у групу НФГНБ. З їх числа особливу увагу фахівців привертають представники родів *Pseudomonas* та *Acinetobacter*. Ці мікроорганізми часто колонізують госпітальне середовище і набувають все більшого клінічного значення. Протягом останніх десятиріч представники родів *Pseudomonas* та *Acinetobacter* порядку *Pseudomonadales* спричинили низку складних медичних проблем у ролі збудників опортуністичних інфекцій. Частота гнійно-запальних захворювань, спричинених цими мікроорганізмами, збільшується в усьому світі [19]. Справжнім лихом ці мікроорганізми стали для хірургічних і комбустіологічних відділень лікувальних установ [1, 17]. Двоє представників цих родів (*P. aeruginosa* та *A. baumannii*) у лютому 2017 р. Всесвітньою організацією охорони здоров'я внесено у список "пріо-

ритетних патогенів", що несуть найбільшу загрозу для здоров'я людини [8]. *P. aeruginosa* та *A. baumannii*, як і інші НФГНБ, є умовно-патогенними мікроорганізмами, які мають певний патогенний потенціал, проте, реалізують його у разі потрапляння до організму людини з порушеними захисними бар'єрами. НФГНБ біологічних видів *P. aeruginosa* та *A. baumannii* характеризуються сукупністю біологічних властивостей, які забезпечують їм убіквітарність поширення, потенційну здатність спричиняти патологічні зміни в організмі людей, стійкість до несприятливих впливів оточуючого середовища, а також широкого переліку протимікробних засобів, що застосовуються у медичній практиці. Оскільки мікроорганізми цього виду є типовими сапрофітами, то найрізноманітніші об'єкти лікарняного середовища можуть ставати резервуаром збудника, особливо ті, що постійно звожуються [6].

Відомо, що близько 90% вивчених видів бактерій здатні до біоплівкоутворення. У НФГНБ біологічних видів *P. aeruginosa* та *A. baumannii* ця здатність є яскраво вираженою. Вважають, що однією з причин формування хронічних рецидивуючих запальних процесів саме і є здатність бактерій утворювати в уражених тканинах біоп-

лівку - складно організовану багаточасову тривимірну структуру, у якій функціонально диференційовані бактеріальні клітини прикріплені до певної поверхні та вкриті біополімерним матриксом [7].

Бактерії у структурі біоплівки характеризуються високим рівнем антибіотикорезистентності та стійкості до дезінфектантів, ніж планктонні форми [9, 18]. Відкриття здатності існування бактерій у біоплівковій культурі якісно змінило погляди на особливості перебігу, терапію та профілактику хворих на інфекційно-запальні захворювання. Низка авторів відносять біоплівкоутворювальні властивості бактерій до додаткових факторів патогенності. За даними авторів I. Martin (2021), O. A. Nazarchuk (2020) сучасні дослідження підтверджують значну роль біоплівок у розвитку інфекційних процесів. Зараз достовірно встановлено, що здатність мікроорганізмів створювати співтовариства є одним з найважливіших факторів їх персистенції [15, 18].

Незважаючи на те, що неферментуючі бактерії *P. aeruginosa* та *A. baumannii* належать до різних родів, схожими ознаками для них є природна стійкість до антибіотиків і наявність міжклітинної сигнальної системи quorum sensing (QS), яка регулює продукцію факторів патогенності, здатність до утворення біоплівок під час контакту збудників із різними поверхнями, зокрема й тканинами організму людей і тварин. QS є складним біохімічним процесом колективної координації експресії генів у популяції бактерій, який забезпечує адаптивну диференціацію бактеріальних клітин [16]. Обмін інформацією забезпечують спеціалізовані хімічні сигнальні молекули, завдяки яким мікробне співтовариство діє як єдиний організм. В ацинетобактерій і псевдомонад у роботі QS беруть участь схожі комплекси сигнальних молекул групи ацил-гомосерин лактонів (АГЛ) [3, 13]. Морфологічна диференціація біоплівок відбувається у відповідь на дію таких факторів навколишнього середовища як зміна температури, рН та склад середовища, осмолярність, і супроводжується змінами метаболізму, гідродинаміки, комунікативних зв'язків тощо [22]. Подальше дослідження чинників, що впливають на інтенсивність утворення біоплівок ацинетобактеріями та псевдомонадами допоможуть достовірно спрогнозувати вірогідність утворення високорезистентних форм збудників запальних процесів у клінічних умовах, і зробити цей важливий біологічний процес керованим.

Метою нашого дослідження було оцінити інтенсивність біоплівкоутворення грамнегативними неферментуючим бактеріями залежно від наявності у середовищі для культивування окремих хімічних субстратів.

Матеріали та методи

Матеріал для виділення НФГНБ забирали у пацієнтів, які лікувалися в опіковому відділенні Вінницької обласної клінічної лікарні ім. М. І. Пирогова. Від пацієнтів опікового відділення одержували зразки (гній, виділення) з ранових поверхонь для мікробіологічного досліджен-

ня. Частину штамів, використаних у дослідженнях, було виділено від поранених, які отримали мінно-вибухові травми з локалізацією в нижніх кінцівках. При проведенні мікробіологічного обстеження пацієнтів керувались міжнародними та вітчизняними нормативно-правовими документами з біометричної етики, а саме: Женевською декларацією, Гельсінською декларацією Всесвітньої медичної асоціації з біомедичних досліджень, де людина є їхнім об'єктом (World Medical Association Declaration of Helsinki 1994, 2000, 2008), Конвенцією про захист прав і гідності людини у зв'язку із застосуванням досягнень біології та медицини (Рада Європи 1997 р.) з наступними "Додатковими протоколами", Наказами МОЗ України № 66 від 13.02.2006 р.

Виділення чистих культур неферментуючих бактерій проводили чашковим методом з використанням м'ясопептонного агару, хромогенних агарів для *Acinetobacter*, *Pseudomonas* (Graso Biotech). Ідентифікацію клінічних штамів мікроорганізмів виконували згідно загальноприйнятих мікробіологічних методів за морфологічними, тинкторіальними, культуральними, біохімічними властивостями згідно Визначника бактерій Берджі. Біохімічне типування проводили на діагностичних панелях NEFERM test 24 фірми PLIVA-Lachema a. s. Брно, Чеська республіка.

Вивчення біоплівкоутворювальної здатності клінічних ізолятів визначали за допомогою спектрофотометричного методу за G. D. Christensen (MtP-test "microtiterplatetest"), який полягає у відтворенні біоплівок на полімерних багатолункових планшетах з наступним забарвленням 1%-розчином кристалічного фіолетового Визначення оптичної густини (OD) проводили на мікропланшетному аналізаторі GBGChroMate 4300 (AwarenessTechnology, Inc., USA) за довжини хвилі 630 нм. OD для кожного штаму визначали у трьох повторах, результати усереднювали. Штам вважався позитивним щодо плівкоутворення, якщо середнє значення його OD було більшим, ніж середня оптична щільність негативного контролю, збільшена на три стандартних відхилення (SD): (OD негативного контролю + (3 x SD негативного контролю)). OD негативного контролю розраховували для кожного планшета окремо. Інтенсивність плівкоутворення оцінювали за величиною відносного показника оптичної щільності.

Для дослідження впливу наявності окремих поживних складових у середовищі на інтенсивність плівкоутворення було обрано по 5 штамів *P. aeruginosa* та *A. baumannii*, показники інтенсивності плівкоутворення яких у триптон-соєвому бульйоні дорівнювали середнім для дослідженої популяції у межах середньої похибки $0,22 \pm 0,02$ для *P. aeruginosa*; $0,13 \pm 0,02$ для *A. baumannii*. Визначали інтенсивність плівкоутворення обраними штамми в "голодному" середовищі (стерильній воді для ін'єкцій), стерильному ізотонічному розчині хлориду натрію та стерильній воді для ін'єкцій з додаванням 1% однієї з таких речовин: глюкози, маль-

този, галактози, аргініну, лізину, сечовини та 1% нормальної сироватки крові коня. Показники активності процесу біоплівкоутворення у відповідному середовищі фіксували після добового культивування при температурі 37°C та порівнювали з показниками культивування бактерій у триптон-соєвому бульйоні (ТСБ).

Дослідження виконане в рамках НДР кафедри мікробіології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова "Вивчення біологічних властивостей мікроорганізмів, віднесених Всесвітньою організацією охорони здоров'я до списку "провідних патогенів", що несуть загрозу здоров'ю людини, та розробка засобів боротьби з ними", № держреєстрації 0117U006903.

Результати. Обговорення

Одержані в експериментах результати ілюструє рисунок 1. Аналіз зображення на рисунку дозволяє одразу відмітити в цілому вищу активність плівкоутворення псевдомонадами, у порівнянні з ацінетобактеріями, адже досягнуті показники оптичної щільності елюату біоплівки *P. aeruginosa* майже у всіх випадках значно вищі, у порівнянні з показниками *A. baumannii*. Однак, ацінетобактерії, на відміну від псевдомонад, утворюють біоплівки навіть у стерильній воді для ін'єкції. Таку властивість ацінетобактерій важко пояснити, враховуючи наявні уявлення про поширення закону збереження маси на всі біологічні процеси. Адже для побудови такої складної багатокомпонентної структури як біоплівка потрібен пластичний матеріал. Можна лише констатувати високі адаптивні можливості цього виду бактерій і припустити наявність у нього певних внутрішніх резервів для виживання в екстремальних умовах, здатності використовувати залишки клітин, що загинули.

Інтенсивність утворення біоплівки *A. baumannii* в ізотонічному розчині хлориду натрію ($0,098 \pm 0,018$) майже не відрізнялася від плівкоутворювальної здатності у дистильованій воді ($0,094 \pm 0,011$). У псевдомонад додавання у середовище хлориду натрію істотно активізувало процес плівкоутворення. Показник оптичної щільності елюату біоплівки псевдомонад, утвореної в ізотонічному розчині, дорівнював $0,152 \pm 0,023$, у порівнянні з близьким до нуля ($0,004 \pm 0,001$) у дистильованій воді та був вищим, ніж у тих же умовах в ацінетобактерій.

Введення до складу "голодного" середовища культивування одного з цукрів: глюкози, мальтози чи галактози в концентрації 1%, не змінювало інтенсивності плівкоутворення ацінетобактеріями. Показники оптичної щільності утворених біоплівок статистично достовірно не відрізнялися від таких у процесі культивування у стерильній воді та фізіологічному розчині хлориду натрію ($p \geq 0,05$). Псевдомонади на введення у середовище будь-якого з тих же цукрів відповідали істотною активізацією біоплівкоутворення. Наприклад, показник оптичної щільності плівок псевдомонад у середовищі з мальто-

зою чи галактозою дорівнював $0,182 \pm 0,026$, а в ізотонічному розчині хлориду натрію - $0,152 \pm 0,023$ ($p \leq 0,05$).

У середовищі, що містило азотутримуючі сполуки аргінін, лізин чи сечовину досліджені штами ацінетобактерій зберігали рівень плівкоутворюючої активності близький до такого в ізотонічному розчині хлориду натрію та у воді. Псевдомонади також не посилювали плівкоутворення у середовищах з амінокислотами, незважаючи на те, що у НЕФЕРМ-тесті досліджені штами виявляли здатність утилізувати аргінін. На введення у середовище сечовини ацінетобактерії і псевдомонади реагували по-різному. Ацінетобактерії, як зазначалось вище, не змінювали плівкоутворювальної активності. В уреазо-позитивних штамів псевдомонад інтенсивність плівкоутворення становила $0,202 \pm 0,016$, що перевищувало показник культивування в ізотонічному розчині ($0,152 \pm 0,023$) більше, ніж на 30%.

Найвищий рівень плівкоутворювальної активності обидва види неферментуючих бактерій виявляли в присутності протеїнів та повного переліку біологічно активних складових тваринної сироватки. При додаванні в ізотонічний розчин 1% нормальної конячої сироватки показник інтенсивності плівкоутворення для *P. aeruginosa* становив $0,232 \pm 0,025$, для *A. baumannii* дорівнював $0,132 \pm 0,024$. Відносний приріст показника інтенсивності плівкоутворення за умов присутності сироватки, у порівнянні з культивуванням у ізотонічному розчині, у *A. baumannii* становив 34%, а в *P. aeruginosa* - 48%. Такі показники були близькими до аналогічних при культивуванні в стандартному універсальному штучному поживному середовищі триптон-соєвому бульйоні, яке використовується у рутинній лабораторній бактеріологічній практиці для культивування широкого спектру невимогливих до умов культивування бактерій.

Отже, виникнення спільнот мікроорганізмів, що мають плівчасту структуру, є одним із способів виживання бактерій в оточуючому середовищі [5, 12]. За даними авторів O.I. Balko et al. (2010) основним структурним компонентом біоплівок є матрикс, утворений мікробними екзополісахаридами, білками і гліколіпідами. Екзополімери складають 85% маси біоплівки, бактеріальні клітини - 15%. Клітини у плівці розташовуються не хаотично, а упорядковані у вигляді скупчень, "цементованих" екзополісахаридами. За даними літературних досліджень T.A. Smirnova et al. (2010), матрикс розділений каналами, заповненими водою, має порожнини. По каналах транспортуються поживні речовини та кисень, одночасно видаляються продукти життєдіяльності бактерій. Багатопшарова топографія впливає на метаболізм і фізіологічну активність клітин [2, 21]. У глибоких шарах розташовуються клітини, метаболізм яких переключений на анаеробний тип дихання [4]. Автори L.F. Mandsberg et al. (2009) зазначають, що сформовані (зрілі) плівки постійно виділяють у оточуюче середовище планктонні клітини та цілі фрагменти, здатні вкривати біоплівкою нові поверхні. Висока щільність мікроб-

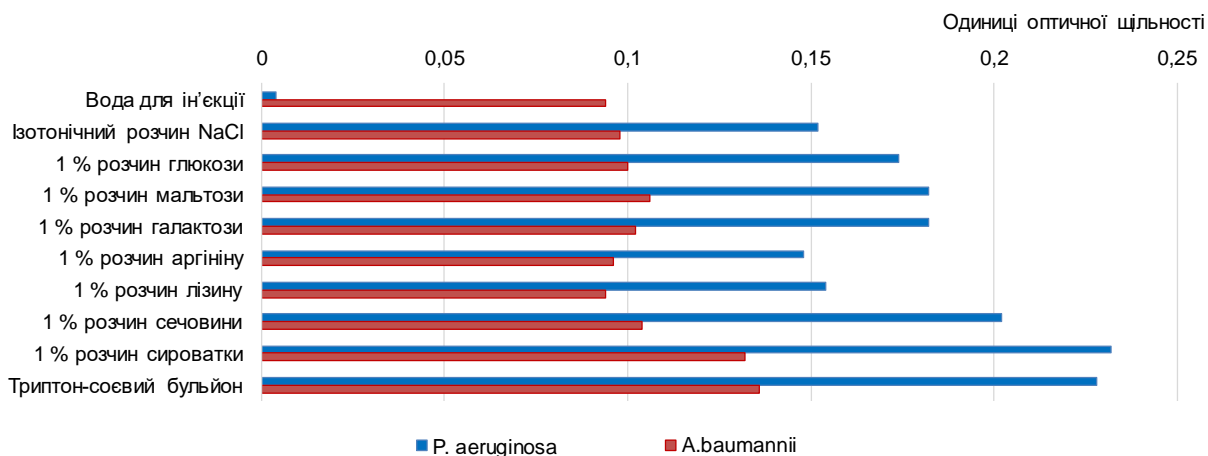


Рис. 1. Показники інтенсивності біоплівкоутворення в середовищі в присутності різних складових.

ної популяції у біоплівці стимулює обмін генетичною інформацією, у т.ч. детермінантами антибіотикорезистентності [14]. Літературні джерела свідчать, що обмеження поживних речовин і простору у біоплівці обумовлюють формування у її складі субпопуляції метаболічно неактивних клітин-персистерів [11].

Отже, культивування ацінетобактерій і псевдомонад у "голодних" середовищах свідчить про те, що у екстремальних умовах, якими є відсутність поживних речовин і джерел енергії, ці види мікроорганізмів запускають захисну реакцію біоплівкоутворення. При цьому, обидва біологічних види характеризуються високою адаптивною здатністю при наявності окремих міжвидових відмінностей [10].

За відсутності мінеральних і будь-яких поживних речовин у водному середовищі культивування псевдомонади протягом доби не утворюють біоплівок, тоді як у ацінетобактерії цей процес запускається швидко та відбувається перехід у плівкову форму існування. Додавання у середовище лише хлориду натрію забезпечує плівкоутворення псевдомонадами. Вочевидь, відсутність катіонів натрію і аніонів хлору обмежує активність плівкоутворення цього виду бактерій у більшій мірі, ніж у *A. baumannii*.

Основою біоплівкового матриксу є полісахариди [7, 20]. Тому, можна було очікувати, що введення в середовище культивування цукрів буде сприяти утворенню бактеріями біоплівок. Однак, виявилось, що наявність у середовищі культивування простих цукрів (моноцукрів глюкози та галактози чи дисахариду мальтози) не впливає на плівкоутворюючу активність ацінетобактерій. Водночас у псевдомонад у присутності цукрів інтенсивність плівкоутворення істотно зростає. При цьому, не має значення здатність утилізувати перераховані цукри дослідженими штамми неферментуючих бактерій, яка попередньо була виявлена за допомогою НЕФЕРМ-тесту. На підставі означеного вище процес плівкоутворення у *P. aeruginosa* можна визнати більш

залежним від іонного складу середовища і наявності у ньому джерел енергії та пластичного матеріалу, ніж у *A. baumannii*.

Наявність у середовищі азотвмісних сполук не є обов'язковою умовою плівкоутворення для обох видів неферментуючих бактерій, адже цей процес здійснюється і за їхньої відсутності. Додавання у середовище окремих амінокислот не чинить стимулювального впливу на активність утворення біоплівок. Однак, додавання у середовище сечовини істотно активізує плівкоутворення *P. aeruginosa*. Наявність у живильному середовищі сироватки крові тварин, яка утримує повний перелік різноманітних мікроелементів, неорганічних та органічних сполук створює оптимальні умови для утворення біоплівок *A. baumannii* та *P. aeruginosa*.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. НФГНБ біологічних видів *P. aeruginosa* та *A. baumannii* виявляють здатність до утворення біоплівок навіть в умовах екстремальних обмежень доступу до джерел енергії та пластичного матеріалу. При цьому, у *A. baumannii* процес біоплівкоутворення є менш залежним від іонного складу середовища, наявності вуглеводів та азотвмісних речовин, ніж у *P. aeruginosa*.

2. При наявності у середовищі культивування хлориду натрію, окремих цукрів чи сечовини інтенсивність біоплівкоутворення у *P. aeruginosa* є вищою, у порівнянні з інтенсивністю цього процесу в *A. baumannii* у тих же умовах.

Процес біоплівкоутворення у бактерій є важливим біологічним явищем, націленим на підвищення здатності до виживання мікроорганізмів у несприятливих умовах і збереження видів. Перелік умов, необхідних для утворення біоплівок, вплив зовнішніх чинників на перебіг цього процесу залишається недостатньо вивченим. Водночас, біоплівкоутворення патогенними та умовно-патогенними для людини бактеріями може

впливати на характер перебігу патологічних процесів мікробного походження і породжує нові медичні проблеми. Подальше дослідження впливу різноманітних чинників на процеси мікробного біоплівкоутворення

дозволить визначити запобіжні для нього заходи і вирішити питання корекції перебігу захворювань людини, у патогенезі яких утворення бактеріальних біоплівок має значення.

Список посилань - References

- [1] Adibhesami, H., Douraghi, M., Zeraati, H., Bazmi, F., Rahbar, M., Pourmand, M. R. ... & Ghourchian S. (2016). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) recovered from burn patients. *J. Pharm. Sci.*, 19(3), 339-348. doi: <https://doi.org/10.18433/J3QK6M>
- [2] Balko, O. V., & Avdieieva, L. V. (2010). Структурні компоненти і особливості організації біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* [Structural components and features of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm organization] *Мікробіологічний журнал - Mikrobiol. J.*, 72(4), 28-32. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/MicroBiol_2010_72_4_6
- [3] Balko, O. I., Zelena, L. B., Kharkhota, M. A., Balko, O. V., & Avdieieva, L. V. (2018). Система Quorum Sensing у регуляції бактеріоциногенії *P. Aeruginosa*. *Інфекційні хвороби сучасності: етіологія, епідеміологія, діагностика, лікування, профілактика, біологічна безпека*, Мат. наук.-прак. конф. ім. Л. В. Громашевського НАМН України [Quorum Sensing System in the Regulation of Bacteriocinogeny of *P. Aeruginosa*. *Infectious diseases of modern times: etiology, epidemiology, diagnosis, treatment, prevention, biological safety*, Scientific and practical materials. conf. named after L. V. Gromashevsky National Academy of Sciences of Ukraine]. Київ - Kyiv.
- [4] Bester, E. (2010). Metabolic differentiation in biofilms as indicated by carbon dioxide production rates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(4), 1189-1197. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.01719-09>
- [5] Costerton, J. W., Montanaro, L., & Aciola, C. R. (2005). Biofilm in implant infections: its production and regulation. *Int. J. Artif. Organs.*, 28(11), 1062-1068. doi: <https://doi.org/10.1177/039139880502801103>
- [6] De Britto, S., Gajbar, T. D., Satapute, P., Sundaram, L., Lakshmi Kantha, R. Y., ... & Ito, S.-I. (2020). Isolation and characterization of nutrient dependent pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* and its dye and agrochemical properties. *Sci Rep.*, 10, 1542. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58335-6>
- [7] Galkin, M. B., Ivanytsia, V. O., Galkin, B. M., & Filipova, T. O. (2016). Матрикс біоплівки - хімічний склад, структура, властивості [Biofilm Matrix - Chemical Composition, Structure, Functions], *Мікробіологія і біотехнологія - Microbiology & Biotechnology*, (4), 6-27. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2016.4\(36\).86349](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2016.4(36).86349)
- [8] Kondratuk, V. M., Prokopchuk, Z. M., Burkot, V. M., & Vovk, I. M. (2018). Особливості формування резистентності до антибіотиків у грамнегативних неферментуючих бактерій [Features of resistance formation of gram-negative non-fermenting bacteria to antibiotics]. *Вісник Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова - Reports of Vinnytsia National Medical University*, 22(2), 253-256. [https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2018-22\(2\)-03](https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2018-22(2)-03)
- [9] Kovalchuk, V. P., Burkot, V. M., Sidko, I. Yu., & Trofimenko, Yu. Yu. (2019). Вплив чинників оточуючого середовища на плівкоутворюючу активність бактерій. *Актуальні питання сучасної мікробіології та імунології*, Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю присвяченої 90-річчю А.Я. Циганенко [The influence of environmental factors on the film-forming activity of bacteria. *Actual questions of modern microbiology and immunology*, Materials of the All-Ukrainian Scientific and Practical Conference with International Participation Dedicated to the 90th Anniversary of A. Ya. Tsyganenko]. Харків - Kharkiv.
- [10] Kovalchuk, V. P., Nazarchuk, O. A., Burkot, V. M., Fomina, N. S., Prokopchuk, Z. M., & Dobrovanov, O. (2021). Biofilm forming activity of non-fermenting gram-negative bacteria. *Wiad. Lek.*, 74(2), 252-256. doi: [10.36740/WLek202102114](https://doi.org/10.36740/WLek202102114)
- [11] Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annu Rev Microbiol.*, 64, 357-372. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>
- [12] Lof, M., Janus, M. M., & Krom, B. P. (2017). Metabolic Interactions between Bacteria and Fungi in Commensal Oral Biofilms. *J Fungi (Basel)*, 3(3), 40. doi: <https://doi.org/10.3390/jof3030040>
- [13] Makhrmash, J. H. (2022). Виявлення утворення біоплівки та деяких факторів вірулентності у *Pseudomonas aeruginosa* та дія деяких антибіотиків [Detection of biofilm formation and some virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*, and the effect of some antibiotics]. *Мікробіологічний журнал - Mikrobiol. J.*, 84(2), 33-39. doi: <https://doi.org/10.15407/microbiolj84.02.033>
- [14] Mandsberg, L. F., Ciofu, O., Kirkby, N., Christiansen, L. E., Poulsen, H. E., & Hoiby, N. (2009). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system Antimicrob. *Agents Chemother.*, 53, 2483-2491. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.00428-08>
- [15] Martin, I., Waters, V., & Grasmann, H. (2021). Approaches to Targeting Bacterial Biofilms in Cystic Fibrosis Airways. *Int J Mol Sci.*, 22(4), 2155. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms22042155>
- [16] Meng, X., Ahator, S. D., & Zhang, L.-H. (2020). Molecular Mechanisms of Phosphate Stress Activation of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Systems. *mSphere*, 5, 119-120. doi: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00119-20>
- [17] Nazarchuk, O. A., Nahaychuk, V. I., & Paliy, V. G. (2016). Етіологічна структура, властивості збудників ускладнень у хворих з опіками [Etiological Structure, Properties of Infectious Complications in Patients With Burns]. *Профілактична медицина - Preventive medicine*, 1-2(26), 68-72. URL: https://duieih.kiev.ua/documents/journal/1-2_2016.pdf
- [18] Nazarchuk, O. A., Nahaichuk, V. I., Rymsha, O. V., Paliy, V. H., Vovk, I. M., Bobyr, N. A., ... & Stukan, O. K. (2020). Дослідження протимікробної ефективності композиції з пролонгованою антисептичною дією щодо планктонної та плівкової форми клінічних штамів неферментуючих грамнегативних бактерій [Research of antimicrobial efficacy of a composition with prolonged antiseptic effect against planktonic and film forms of clinical strains of non-fermentative Gram-negative bacteria]. *Вісник Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова - Reports of Vinnytsia National Medical University*, 24(1), 64-68. doi: [https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2020-24\(1\)-12](https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2020-24(1)-12)
- [19] Shevchenko, L. V., Stokan, A. M., & Azyntseva, O. A. (2016). Динаміка грамнегативних неферментуючих бактерій у структурі бактеріальних збудників інфекцій [Dynamics of gram-negative nonfermentative bacteria in the structure of bacterial infectious agents]. *Актуальні проблеми клінічної та профілактичної медицини - Actual problems of clinical and preventive medicine*, 4(1), 50-53.
- [20] Sidashenko, O. I., Voronkova, O. S., Sirokvasha, E. A., &

- Vinnikov, A. I. (2013). Біоплівка як особлива форма організації бактерій та її роль в інфекційних процесах [Biofilm as a Special Form of Bacteria and its Role in Infectious Processes]. *Вісник проблем біології і медицини - Bulletin of problems biology and medicine*, 3(2), 36-41. URL: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vpbm_2013_3\(2\)_9](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vpbm_2013_3(2)_9)
- [21] Smirnova, T. A., Didenko, L. V., Azizbekyan, R. R., & Romanova, Y. M. (2010). Структурно-функціональна характеристика бактеріальних біоплівочок [Structural and functional characteristics of bacterial biofilms]. *Мікробіологія - Microbiology*, 79(4), 435-446. doi: 10.1134/S002626171004003X
- [22] Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). Pseudomonas aeruginosa Biofilms. *Int J Mol Sci.*, 21(22), 8671. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- [23] Whistler, T., Sangwichian, O., Jorakate, P., Sawatwong, P., Surin, U., ... & Peruski, L. (2019). Identification of Gramnegative non-fermentative bacteria: How hard can it be? *PLoS. Negl. Trop. Dis.*, 13(9), e0007729. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007729>
- [24] Van der Kolk, J. H., Endimiani, A., Graubner, C., Gerber, V., & Perreten, V. (2019). Acinetobacter in veterinary medicine, with an emphasis on Acinetobacter baumannii. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 16, 59-71. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.08.011>

STUDY OF THE INFLUENCE OF INDIVIDUAL COMPONENTS IN THE CULTIVATION ENVIRONMENT ON P. AERUGINOSA AND A. BAUMANNII BIOFILM-FORMING ACTIVITY

Kovalchuk V. P., Burkot V. M., Dudar A. O., Kondratuk V. M., Zhorniak O. I., Prokopchuk Z. M., Trofimenko Y. Y.

Annotation. *P. aeruginosa*, *A. baumannii* are the causative agents of severe wound infections, ventilator-associated pneumonia, catheter-associated septic conditions and other severe pathological processes. The ability of bacteria to form biofilms in affected tissues plays an important role in the pathogenesis of these diseases. Therefore, the purpose of our work is to study the influence of certain external factors on the ability of bacteria to form biofilms. The ability of bacteria to form biofilms in affected tissues plays an important role in the pathogenesis of these diseases. 5 clinical strains of *P. aeruginosa* and 5 strains of *A. baumannii* were used in this research. The ability to form biofilms was studied in 96-well polystyrene plates by the spectrophotometric method, which is based on the ability of the crystal violet dye to bind to the cells and matrix of the biofilm. Statistical processing of the obtained results was carried out using Excel Microsoft Office tables. The effect of the presence of certain sugars and nitrogen-containing compounds in the cultivation medium on the processes of biofilm formation by pseudomonads and acinetobacteria was investigated. As a result of the research, it was established that acinetobacteria show the ability to form films, unlike pseudomonads, under the condition of their cultivation in sterile distilled water. The introduction of certain carbohydrates or urea into the cultivation medium intensified the biofilm-forming properties of pseudomonads to a much greater extent, compared to acinetobacteria. According to the research results, it was established that the most active process of biofilm formation occurs in both types of non-fermenting Gram-negative bacteria when there are animal blood serum proteins in the culture medium. The formation of biofilms is one of the main strategies that increases the survival of bacteria in the environment, as well as in the human body. The ability of bacteria to form biofilms is, among other things, a factor in the pathogenicity and virulence of bacteria. So, in recent years, special attention has been paid to the ability of microorganisms to form biofilms, and to the study of factors affecting this process.

Keywords: gram-negative non-fermenting bacteria, intensity of biofilm formation, influence of environment composition.
