

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

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

## **ВПЛИВ АНТИБІОТИКІВ НА БІОПЛІВКИ ШТАМІВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* З РІЗНИМ РІВНЕМ ВМІСТУ ЦИКЛІЧНОГО ДИГУАНОЗИНМОНОФОСФАТУ**

**Мета роботи:** встановлення впливу антибіотиків на процес утворення та зрілу біоплівку штамів *P. aeruginosa* з різними рівнями вмісту циклічного дигуанозинмонофосфату (цикло-ди-ГМФ). **Методи.** Як тест-мікроорганізми використовували штами *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$  *wspF* (підвищений вміст цикло-ди-ГМФ) і *P. aeruginosa* PA01 *rJN2133* (знижений вміст цикло-ди-ГМФ). Культивування проводили у пробірках при визначенні мінімальних інгібувальних концентрацій (МІК) антибіотиків або у 96-лункових плоскодонних планшетах Nucleon у середовищі LB при 37 оС впродовж 24 годин при дослідженні утворення біоплівки. Для оцінки впливу досліджуваних антибіотиків на зрілу біоплівку їх додавали в лунки через добу після початку інкубації, видаляючи попередньо планктонні клітини. Кількість планктонних клітин оцінювали спектрофотометрично, масу біоплівки – за методом забарвлення кристалічним фіолетовим. **Результати.** Після попередньої оцінки чутливості штамів до широкого спектру антибіотиків за диско-дифузійним методом Кірбі-Бауера для вивчення були відібрані стрептоміцин, цiproфлосацин та цефепім, чутливими до яких виявилися усі досліджувані штами. Мінімальні інгібувальні концентрації цiproфлосацину і стрептоміцину були однаковими для усіх штамів *P. aeruginosa* і становили 0,15 та 10 мкг/мл, відповідно. Більш чутливим до цефепіму виявився штам *P. aeruginosa* PA01 *rJN2133* (МІК 12,5 мкг/мл). МІК цього антибіотику для двох інших штамів становила 20 мкг/мл. За додавання антибіотиків на початку культивування усі вони ефективно знижували кількість планктонних клітин (на 70–90%) і масу біоплівок (на 40–70%). При цьому не було встановлено відмінностей між штамами з різним вмістом цикло-ди-ГМФ. За впливу на зрілу біоплівку цiproфлосацин пригнічував утворення клітин персистерів, але знижував масу біоплівки лише у *P. aeruginosa* PA01 *rJN2133*. Цефепім і стрептоміцин знижували вміст персистерів лише у концентраціях 5 і 10 мкг/мл і не чинили впливу на біоплівки. **Висновки.** Знижений вміст цикло-ди-ГМФ у клітинах *P. aeruginosa* підвищує чутливість біоплівок до антимікробних препаратів. Цiproфлосацин є найбільш перспективним антибіотиком для розробки комбінованих засобів, здатних запобігати утворенню біоплівок псевдомонадами та руйнувати їх.

**Ключові слова:** цикло-ди-ГМФ, *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$  *wspF*, *P. aeruginosa* PA01 *rJN2133*, антибіотики, біоплівка.

© А.С. Семенець, М.Б. Галкін, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова



*Pseudomonas aeruginosa* – відомий опортуністичний патоген, здатний викликати шпитальні інфекції завдяки утворенню біоплівки, які сприяють виживанню бактерії у несприятливих умовах: за впливу антибіотиків, дезінфектантів тощо [13]. Біоплівки утворюються не тільки на медичному обладнанні, але і в організмі хворих, зокрема у дихальних та сечових шляхах, на ранових поверхнях, катетерах та імплантах [5, 17]. У складі біоплівки бактерії зазнають фенотипічних і генотипічних змін, які сприяють розповсюдженню і хронізації інфекції. Розповсюдження інфекції забезпечується так званими персистерами – клітинами, що вивільняються з біоплівки та переходять до вільного, рухливого способу існування [6, 8, 13]. Бактерії, що залишилися прикріпленими до субстрату, сприяють довготривалому перебігу захворювань. Одним з головних механізмів, які регулюють перемикання між двома способами існування, є система цикло-ди-ГМФ. Цей вторинний месенджер бактерій також регулює інші фізіологічні процеси: систему міжклітинної комунікації, утворення біоплівки, рухливість, диференціювання, вірулентність, чутливість до антибіотиків [10, 14, 15]. Підвищення концентрації цикло-ди-ГМФ у цитоплазмі викликає адгезію клітин і формування біоплівки, у той час як зниження концентрації, навпаки, призводить до розпаду мікробної спільноти і утворенню персистерів [9]. Крім того, система цикло-ди-ГМФ є потенційною мішенню при розробці антибіоплівкових засобів для попередження ускладнень у пацієнтів зі штучними суглобами, при застосуванні катетерів та у хворих на муковісцидоз, в яких саме *P. aeruginosa* часто утворює біоплівки на поверхні епітелію дихальних шляхів, що призводить до летального результату [5, 17]. Враховуючи високий рівень резистентності біоплівкових бактерій до антимікробних засобів ефективне їх знищення можливе лише із застосуванням комбінованої терапії, яка передбачає сумісне з антибіотиками використання засобів, що мають здатність знижувати рівень цикло-ди-ГМФ і руйнувати матрикс біоплівки [3, 11, 18]. Однак спочатку було необхідним визначити коло антибіотиків, які можна було б використати як складові таких комбінованих засобів.

Тому метою даного дослідження було встановлення впливу антибіотиків на процес утворення та зрілу біоплівку штамів *P. aeruginosa* PA01 з різним рівнем вмісту циклічного дигуанозинмонофосфату (цикло-ди-ГМФ).

### Матеріали та методи

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

Попередню оцінку чутливості штамів до широкого кола антибіотиків здійснювали за диско-дифузійним методом Кірбі-Бауера [2]. На підставі одержаних результатів для подальшого вивчення було обрано три антибіотика: стрептоміцин, ципрофлоксацин та цефепім, чутливими до яких виявилися усі



досліджувани штами *P. aeruginosa*.

Визначення мінімальних інгібувальних концентрацій (МІК) проводили за культивування у пробірках, в які вносили досліджувані антибіотики у діапазоні концентрацій 0,05–30 мкг/мл [12]. Вивчення впливу антибіотиків на біоплівку здійснювали у 96-лункових плоскодонних планшетах Nuclon. При дослідженні дії антибіотиків на процес утворення біоплівки їх вносили у лунки планшетів одночасно з суспензіями бактерій, стандартизованих до вмісту  $1 \times 10^3$  клітин/мл, і інкубували 24 години при 37 °С. У разі вивчення впливу на вже сформовану, зрілу біоплівку антибіотики додавали у планшети через добу від початку інкубації після ретельного видалення планктонних клітин та продовжували культивування ще впродовж 24 год.

Кількість клітин у планктоні оцінювали спектрофотометрично за довжини хвилі 540 нм. Масу біоплівок визначали загальноприйнятим методом [4]. Після ретельного відмивання лунок планшетів від неприкріплених клітин їх вміст фіксували 96% етанолом впродовж 10 хв, висушували і забарвлювали 1% розчином кристалічного фіолетового. Через 15 хвилин барвник видаляли, лунки промивали і після висушування додавали по 0,2 мл лізуючого розчину, що містив 0,1 М NaOH і 1% додецилсульфату натрію. Оптичну густину вимірювали за довжини хвилі 592 нм.

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

### Результати та їх обговорення

Для визначення кількісних відмінностей у здатності формувати біоплівку досліджувані штами культивували впродовж доби у плоскодонних 96-лункових планшетах і оцінювали масу біоплівок та кількість планктонних, що вільно існують у рідині над біоплівками клітин. Кількісні характеристики біоплівок досліджуваних штамів наведені у табл.

Таблиця

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

Table

#### The mass of the daily biofilm and the number of planktonic cells of investigated strains of *P. aeruginosa*

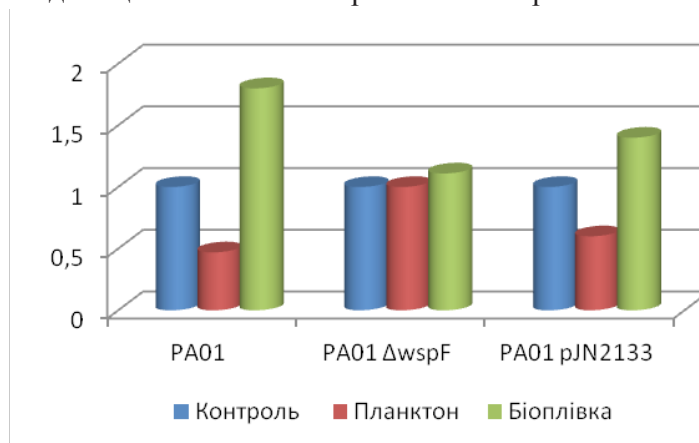
Показник	<i>P. aeruginosa</i> PA01	<i>P. aeruginosa</i> PA01 ΔwspF	<i>P. aeruginosa</i> PA01 pJN2133
Кількість планктонних клітин, $OG_{540}$	0,227 ± 0,025	0,252 ± 0,019	0,362 ± 0,032*
Маса біоплівки, $OG_{592}$	1,667 ± 0,184	2,218 ± 0,193	0,450 ± 0,052*

Примітка: \* - різниця достовірна у порівнянні з іншими штамми  
Note: \* – significant difference as compared with other strains



Встановлено, що *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 порівняно з *P. aeruginosa* PA01 і PA01  $\Delta wspF$  утворює біоплівку, маса якої знижена у 3,7 і 5 разів, відповідно. У той же час, кількість планктонних клітин над біоплівкою *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 була вищою ніж у двох інших штамів на 60% та 44%, відповідно. Раніше за даними світлової та лазерної конфокальної мікроскопії нами було показано, що біоплівка штаму з низьким вмістом цикло-ди-ГМФ має порушену структуру і виглядає як одношарова [7, 18]. Порівнюючи між собою штам дикого типу і штам з підвищеним вмістом вторинного месенджера, можна відмітити, що маса біоплівки *P. aeruginosa* PA01  $\Delta wspF$  на 30% вища, ніж у *P. aeruginosa* PA01.

За визначення впливу антибіотиків на зрілу біоплівку їх додавали до середовища через добу після початку культивування і подовжували його ще 24 год. Зміни кількості планктонних клітин та маси біоплівок досліджуваних штамів *P. aeruginosa* наведені на рис. 1. Показники, одержані через добу, були прийняті за одиницю і позначені на рис. 1 як контроль.



**Рис. 1. Зміни кількості планктонних клітин і маси біоплівок впродовж другої доби культивування**

Примітка: вісь абсцис – штами *P. aeruginosa*

**Fig. 1. Changes in the amount of planktonic cells and mass of biofilms during the second day of cultivation**

Note: X-axis – *P. aeruginosa* strains

Якщо у *P. aeruginosa* PA01  $\Delta wspF$  обидва показники не змінювалися, то у разі *P. aeruginosa* PA01 і *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 відбувалося зменшення кількості планктонних клітин і зростання маси біоплівок. Крім того, слід зазначити, що маса біоплівки більш виразно зростала у штаму дикого типу. Джерелом планктонних клітин після заміни середовища є біоплівки, що сформувалися впродовж першої доби культивування. Одержані результати свідчать, що клітини більш інтенсивно вивільняються з біоплівки *P. aeruginosa* PA01 pJN2133, яка має порушену структуру [7, 16].

За культивування досліджуваних штамів *P. aeruginosa* у суспензійній культурі, що запобігає утворенню біоплівок, встановлені мінімальні інгібувальні концентрації антибіотиків. МІК ципрофлоксацину і стрептоміцину були однаковими для усіх штамів *P. aeruginosa* і становили 0,15 та 10 мкг/мл,

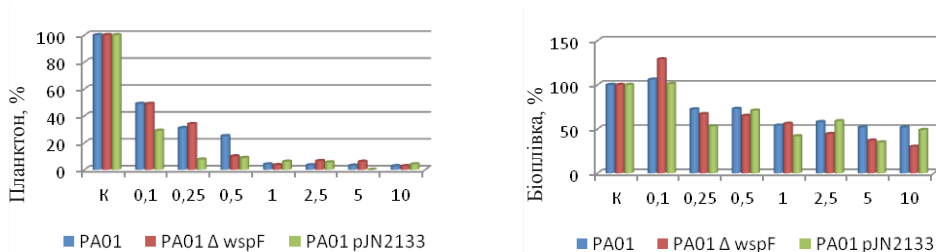


відповідно. Більш чутливим до цефепіму виявився штам *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 (МІК 12,5 мкг/мл). МІК цього антибіотику для двох інших штамів становила 20 мкг/мл.

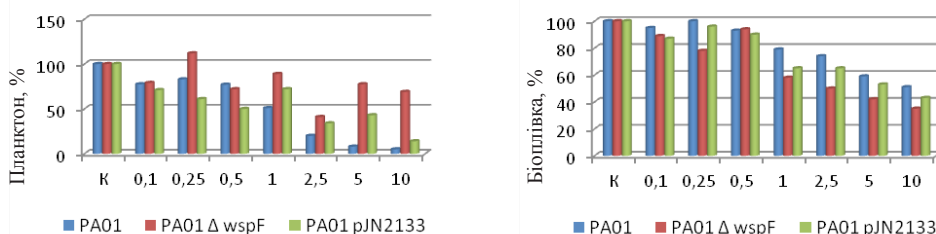
Визначення дії ципрофлоксацину, цефепіму та стрептоміцину на утворення біоплівки проводили у діапазоні концентрацій 0,05–30 мкг/мл. Показано, що жоден з антибіотиків у концентрації 0,05 мкг/мл не впливав на цей процес. У той же час, їх ефекти за впливу 20 і 30 мкг/мл не відрізнялися від зареєстрованих при концентрації 10 мкг/мл. Тому далі наведено результати, які були отримані з використанням концентрацій 0,1–10 мкг/мл.

Враховуючи значні відмінності маси біоплівки *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 від двох інших штамів, дані на рис. 2–3 наведені у відсотках до відповідного контролю. Результати, одержані при вивченні впливу досліджуваних антибіотиків на процес формування біоплівки представлені на рис. 2.

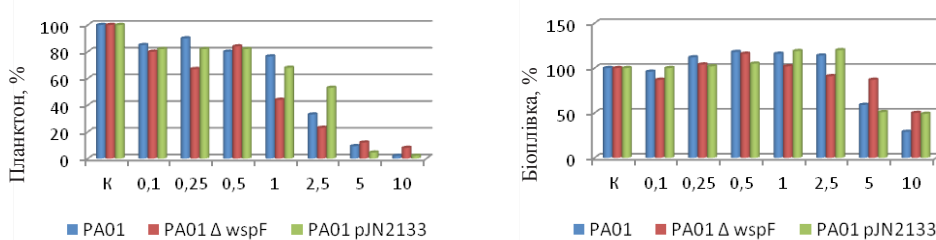
#### Ципрофлоксацин



#### Цефепім



#### Стрептоміцин



**Рис. 2. Вплив ципрофлоксацину, цефепіму і стрептоміцину на утворення біоплівок**

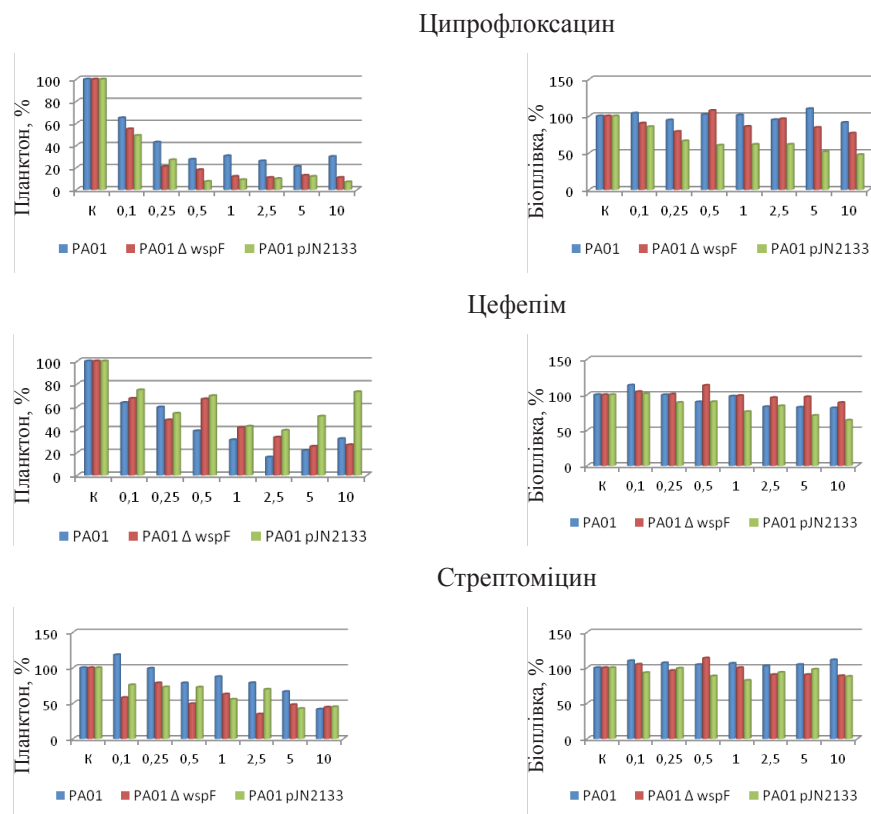
Примітка: вісь абсцис – концентрації антибіотиків, мкг/мл

**Fig. 2. Effect of ciprofloxacin, cefepime and streptomycin on the biofilm formation**

Note: X-axis – antibiotics concentration, μg/ml

Отримані дані свідчать, що процес формування біоплівки більш суттєво сповільнюється за дії ципрофлоксацину. Кількість планктонних клітин знижується вдвічі у разі *P. aeruginosa* PA01 і *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$ wspF, та на 75% у разі *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 вже за його присутності у концентрації 0,1 мкг/мл. З підвищенням концентрації ципрофлоксацину кількість планктонних клітин постійно зменшується і, починаючи з концентрації 0,5 мкг/мл не перевищує 10% від контролю. Для *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 90% зниження вмісту, клітин що вільно існують спостерігається вже при концентрації 0,25 мкг/мл. Процес утворення біоплівки гальмується ципрофлоксацином меншою мірою. Маса біоплівки у більшості випадків є меншою тільки на 40–50% і лише при концентраціях 5 і 10 мкг/мл у деяких штамів вона складає 30% від контролю.

Два інші антибіотики, цефепім і стрептоміцин, були застосовані у субоптимальних концентраціях, тобто менших за МІК. Характер їх впливу на утворення біоплівок виявився тотожним дії ципрофлоксацину. За їх присутності більш значно знижується кількість планктонних клітин, аніж маса біоплівки. Найбільш ефективними концентраціями цефепіму і стрептоміцину є 5 і 10 мкг/мл. Результати визначення впливу досліджуваних антибіотиків на зрілу біоплівку наведені на рис. 3.



**Рис. 3. Вплив ципрофлоксацину, цефепіму і стрептоміцину на зрілі біоплівки**  
Примітка: вісь абсцис – концентрації антибіотиків, мкг/мл

**Fig. 3. Effect of ciprofloxacin, cefepime and streptomycin on the mature biofilm.**  
Note: X-axis – antibiotics concentration,  $\mu$ g/ml





У даній серії експериментів виявлений майже ідентичний характер впливу досліджуваних антибіотиків на вміст планктонних клітин: їх кількість, як правило, знижувалася при підвищенні концентрації антимікробних сполук. Однак, слід зазначити, що клітини планктону у даному випадку мають дещо інше походження. Так, у разі одночасного внесення антибіотиків і клітин у живильне середовище і культивування впродовж 24 год накопичення планктонних клітин відбувається переважно за рахунок їх розмноження і, частково, за рахунок вивільнення з біоплівки. В умовах додавання антибіотиків до зрілої біоплівки джерелом планктонних клітин є виключно біоплівка. Цефепім і стрептоміцин в цьому випадку виявилися менш ефективними порівняно з першою серією експериментів, що дає можливість припустити більш високий рівень резистентності вивільнених з біоплівки клітин до цих антибіотиків. У той же час, здатність ципрофлоксацину зменшувати кількість планктонних клітин не змінювалася, що свідчить про збереження клітинами *P. aeruginosa* чутливості до нього у складі біоплівки.

Усі досліджувані антибіотики не змінювали маси зрілих біоплівок *P. aeruginosa* PA01 і *P. aeruginosa* PA01 *ΔwspF*. Ципрофлоксацин у діапазоні концентрацій 0,25–10 мкг/мл зменшував масу біоплівки *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 у середньому на 50%. Причому це відбувалося за рахунок руйнування біоплівки, що була утворена за першу добу культивування. Про це свідчить порівняння абсолютних мас біоплівок у контролях та за дії ципрофлоксацину. Так, маса добової біоплівки у контролі становила 0,450 умовних одиниць, за наступні 24 год культивування вона зростала до 0,630, а за присутності ципрофлоксацину зменшувалася до 0,300–0,350 умовних одиниць. Отже цей антибіотик може проникати усередину дуже тонкої біоплівки, яку утворює штам *P. aeruginosa* з низьким рівнем цикло-ди-ГМФ, але він не може долати бар'єр, що утворюється матриксом біоплівок бактерій з достатньо високим вмістом вторинного месенджера.

Таким чином, одержані результати свідчать, що серед досліджених антибіотиків найбільш перспективним для запобігання утворенню біоплівок та їх руйнування є ципрофлоксацин. Але сам по собі він ефективно пригнічує лише утворення клітин персистерів, а для знищення біоплівок необхідним є його комбіноване застосування із засобами, які здатні руйнувати поліцукридний матрикс [3, 11].

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

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

## **ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИКОВ НА БИОПЛЕНКИ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* С РАЗНЫМ УРОВНЕМ СОДЕРЖАНИЯ ЦИКЛИЧЕСКОГО ДИГУАНОЗИНМОНОФОСФАТА**

**Реферат**

**Цель работы:** установление действия антибиотиков на процесс образования



и зрелую биопленку штаммов *P. aeruginosa* с различными уровнями содержания циклического дигуанозинмонофосфата (цикло-ди-ГМФ). **Методы.** Как тест-микроорганизмы использовали штаммы *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$  *wspF* (повышенное содержание цикло-ди-ГМФ) и *P. aeruginosa* PA01 *pJN2133* (пониженное содержание цикло-ди-ГМФ). Культивирование проводили в пробирках при определении минимальных ингибирующих концентраций (МИК) антибиотиков или в 96-луночных плоскодонных планшетах Nucleon в среде LB при 37 °C в течение 24 часов при исследовании образования биопленки. Для оценки влияния исследуемых антибиотиков на зрелую биопленку их добавляли в лунки через сутки после начала инкубации, удаляя предварительно планктонные клетки. Количество планктонных клеток оценивали спектрофотометрически, массу биопленки - по методу окраски кристаллическим фиолетовым. **Результаты.** После предварительной оценки чувствительности штаммов к широкому числу антибиотиков диско-диффузным методом Кирби-Бауэра для изучения были отобраны стрептомицин, цiproфлоксацин и цефепим, чувствительными к которым оказались все исследуемые штаммы. Минимальные ингибирующие концентрации цiproфлоксацина и стрептомицина были одинаковыми для всех штаммов *P. aeruginosa* и составили 0,15 и 10 мкг/мл, соответственно. Более чувствительным к цефепиму оказался штамм *P. aeruginosa* PA01 *pJN2133* (МИК 12,5 мкг/мл). МИК этого антибиотика для двух других штаммов составляла 20 мкг/мл. При добавлении антибиотиков в начале культивирования все они эффективно снижали количество планктонных клеток (на 70–90%) и массу биопленок (на 40–70%). При этом не было выявлено различий между штаммами с разным содержанием цикло-ди-ГМФ. При воздействии на зрелую биопленку цiproфлоксацин подавлял образование клеток персистеров, но снижал массу биопленки только у *P. aeruginosa* PA01 *pJN2133*. Цефепим и стрептомицин снижали содержание персистеров только в концентрациях 5 и 10 мкг/мл и не оказывали влияния на биопленки. **Выводы.** Пониженное содержание цикло-ди-ГМФ в клетках *P. aeruginosa* повышает чувствительность биопленок к антимикробным препаратам. Цiproфлоксацин является наиболее перспективным антибиотиком для разработки комбинированных средств, способных предотвращать образование биопленок и разрушать их.

Ключевые слова: цикло-ди-ГМФ, *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$  *wspF*, *P. aeruginosa* PA01 *pJN2133*, антибиотики, биопленка.

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

Odesa National Mechnykov University,

2, Dvoryanska str, Odesa, 65082, Ukraine, phone: +38 (0482) 63 57 61,

e-mail: tphilippova@ukr.net

## INFLUENCE OF ANTIBIOTICS ON BIOFILMS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS WITH DIFFERENT LEVEL OF CYCLIC DIGUANOSINE MONOPHOSPHATE

### Summary

*Aim of the study was to determine the effect of antibiotics on the formation process*





and mature biofilm of strains of *P. aeruginosa* with different levels of cyclic diguanosine monophosphate (*c-di-GMP*). **Methods.** As test microorganisms, strains *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$  *wspF* (elevated level of *c-di-GMP*) and *P. aeruginosa* PA01 *pJN2133* (reduced level of *c-di-GMP*) were used. Cultivation was performed in test tubes to determine minimum inhibitory concentrations of antibiotics (MICs) or 96-well flat-bottomed Nuclon plates in LB medium at 37 °C for 24 hours when studying biofilm formation. To assess the effect of the antibiotics on mature biofilm, they were added to the wells one day after the start of the incubation, removing previously plankton cells. The amount of plankton cells was evaluated spectrophotometrically, biofilm mass was determined by the crystalline violet staining method. **Results.** After preliminary assessment of susceptibility of the strains to a broad range of antibiotics by the disco-diffuse Kirby-Bauer method, streptomycin, ciprofloxacin and cefepime were selected for study, all of the strains tested were susceptible. Minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin and streptomycin were similar for all the strains of *P. aeruginosa* and were 0.15 and 10  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. *P. aeruginosa* PA01 *pJN2133* (MIC 12.5  $\mu\text{g/ml}$ ) was more sensitive to cefepime. MIC of this antibiotic for the other two strains was 20  $\mu\text{g/ml}$ . With the addition of antibiotics at the beginning of the cultivation, they effectively reduced number of plankton cells (by 70–90%) and mass of biofilms (by 40–70%). In this case, there was no difference between strains with different content of *c-di-GMP*. When exposed to mature biofilms, ciprofloxacin suppressed the formation of persistent cells, but reduced the mass of biofilm only in *P. aeruginosa* PA01 *pJN2133*. Cefepime and streptomycin reduced the content of persisters only in concentrations of 5 and 10  $\mu\text{g/ml}$  and had no effect on biofilms. **Conclusions.** The decreased content of *c-di-GMP* in *P. aeruginosa* cells increases the sensitivity of biofilms to antimicrobial drugs. Ciprofloxacin is the most promising antibiotic for the development of combined agents that can prevent the formation of biofilms and destroy them.

*Key words:* cyclic-di-GMP, *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$  *wspF*, *P. aeruginosa* PA01 *pJN2133*, antibiotics, biofilm.

## СПИСОК ЦИТОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медуко-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион. – 2001. – 260 с.
2. Bjorkman J., Andersson D. I. The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective // Drug Resist Updat. – 2000. – V. 3. – P. 237 – 245.
3. Borlee B.R., Goldman A.D., Murakami K., Samudrala R., Wozniak D.J., Parsek M. R. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix // Mol. Microbiol. – 2010. –V. 75. – P. 827–842.
4. Christensen G.D., W.A. Simpson, J. J. Younger et al. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices // J. clin. microbiol. – 1985. –V. 22. – № 6. – P. 996–1006.
5. Cole S.J., Lee V.T. Cyclic di-GMP signaling contributes to *Pseudomonas aeruginosa*-mediated catheter-associated urinary tract infection // J. Bacteriol. – 2016. – V. 198. – P.91–97. doi:10.1128/JB.00410-15.



6. Cotter P. A., Stibitz S. C-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2007. – V. 10. – P. 17–23.
7. Galkin M.B., Semenets A.S., Finogenova M.O., Galkin B.M., Filipova T.O. Biofilm formation and motility of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* with different c-di-GMP level // *Microbiology & Biotechnology.* – 2017 – T. 38, № 2. – P. 40–50.
8. Habimana O., Semizo A.J.C., Casey E. The role of cell-surface interactions in bacterial initial adhesion and consequent biofilm formation of Nanofiltration/Reverse Osmosis membranes // *Journal of Membrane Science.* – 2014. – V. 454. – P. 82–96.
9. Hickman J. W., Tifrea D. F., Harwood C. S. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels // *PNAS.* – 2005. – V. 102. – P. 14422–14427.
10. Jones J.C., Newsom D., Kelly B. et al. ChIP-Seq and RNA-Seq Reveal an AmrZ-Mediated Mechanism for Cyclic di-GMP Synthesis and Biofilm Development by *Pseudomonas aeruginosa* // *PLoS Pathog.* – 2014. – V. 10(3): e1003984. doi:10.1371/journal.ppat.1003984
11. Lee V.T., Matewish J.M., Kessler J.L., Hyodo M., Hayakawa Y. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production // *Mol. Microbiol.* – 2007. – V. 65. – P. 1474–1484.
12. *Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents.* EUCAST Definitive document // *J. Clin Microbiol Infect.* – 1998. – V 4. – P. 497–507.
13. Moradali M.F., Ghods S., Rehm B.H.A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2017. – doi: 10.3389/fcimb.2017.00039.
14. Römling U., Galperin M.Y., Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger // *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* – 2013. – V. 77, № 1. – P. 1–52.
15. Römling U., Gomelsky M., Galperin M. Y. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signaling system // *Mol. Microbiol.* – 2005. – V. 53. – P. 629–639.
16. Semenets A.S., Galkin M.B., Filipova T.O. Biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 PJN2133 strain with low c-di-GMP level // *Microbiology & Biotechnology.* – 2016. – T. 33, № 1. – P. 19–28.
17. Winstanley C., O'Brien S., Brockhurst M.A. *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections // *Trends Microbiol.* – 2016. – V. 24. – P. 327–337.
18. Zemke A.C., Kocak B.R., Bomberger J.M. Sodium nitrite inhibits killing of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by ciprofloxacin // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2017. 61:e00448-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.00448-16>.

### References

1. Lapach CN, Chubenko AV, Babich PN. Statisticheskie metodi v medikobioologicheskikh issledovaniyach s ispolsovaniem Excel. – K.: Morion. – 2001. – 260p. (in Russian).
2. Bjorkman J, Andersson DI The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective. *Drug Resist Updat.* 2000;3:237–245.



3. Borlee BR, Goldman AD, Murakami K, Samudrala R, Wozniak DJ, Parsek MR. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesion to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 2010;75:827–842. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06991.x.
4. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. *J. clin. microbiol.* 1985;22(6):996–1006.
5. Cole SJ, Lee VT. Cyclic di-GMP signaling contributes to *Pseudomonas aeruginosa*-mediated catheter-associated urinary tract infection. *J Bacteriol.* 2016;198:91–97. doi:10.1128/JB.00410-15.
6. Cotter PA, Stibitz S. C-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007;10:17–23. doi:10.1016/j.mib.2006.12.006.
7. Galkin MB, Semenets AS, Finogenova MO, Galkin BM, Filipova TO. Biofilm formation and motility of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* with different c-di-GMP level. *Microbiology & Biotechnology.* 2017;38:40-50.
8. Habimana O, Semiro AJC, Casey E. The role of cell-surface interactions in bacterial initial adhesion and consequent biofilm formation of Nanofiltration/Reverse Osmosis membranes. *Journal of Membrane Science.* 2014;454:82–96. doi:10.1016/j.memsci.2013.11.043
9. Hickman JW, Tifrea DF, Harwood CS A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *PNAS.* 2005;102:14422–14427. doi: 10.1073/pnas.0507170102
10. Jones JC, Newsom D, Kelly B, et al. ChIP-Seq and RNA-Seq Reveal an AmrZ-Mediated Mechanism for Cyclic di-GMP Synthesis and Biofilm Development by *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS Pathog.* 2014;10(3):e1003984. doi:10.1371/journal.ppat.1003984
11. Lee VT, Matewish JM, Kessler JL, Hyodo M, Hayakawa YA. Cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol. Microbiol.* 2007;65:1474–1484. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05879.x
12. Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. EUCAST Definitive document. *J. Clin Microbiol Infect.* 1998;4:497 – 507.
13. Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017. doi: 10.3389/fcimb.2017.00039.
14. Römling U, Galperin MY, Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2013;77(1):1–52. doi: 10.1128/MMBR.00043-12.
15. Römling U, Gomelsky M, Galperin MY. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signaling system. *Mol. Microbiol.* 2005; 53:629-639. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04697.x
16. Semenets AS, Galkin MB, Filipova TO. Biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 PJN2133 strain with low c-di-GMP level. *Microbiology & Biotechnology.* 2016;33:19-28. <http://mbt.onu.edu.ua/article/view/65360/60613>.



17. Winstanley C, O'Brien S, Brockhurst MA. *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. Trends Microbiol. 2016;24:327–337. doi: 10.1016/j.tim.2016.01.008.

18. Zemke AC, Kocak BR, Bomberger JM. Sodium nitrite inhibits killing of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother 2017.61:e00448-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.00448-16>.

Стаття надійшла до редакції 15.09.2017 р.

