

ВПЛИВ СВІТЛОДІОДНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА БІОПЛІВКИ УМОВНО-ПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

Валерій В. ПАНТЬО¹, Олександра ПАЛЛАГ², Надія БОЙКО², Ельвіра ДАНКО³, Галина КОВАЛЬ¹,
Валерій І. ПАНТЬО⁴

Здатність до утворення біоплівок розглядається як один із ключових факторів вірулентності мікроорганізмів. Вивчення впливу фізичних факторів, зокрема низькоінтенсивного випромінювання, на мікробні біоплівки є важливим з огляду на розробку комбінованих підходів терапії патологічних процесів, зумовлених інфекційними агентами. Досліджено вплив світлодіодного випромінювання червоно-інфрачервоного спектра на біоплівкоутворення та сформовані біоплівки деяких умовно-патогенних мікроорганізмів. Доведено, що опромінення досліджуваних мікроорганізмів світлодіодним випромінюванням суттєво підвищує їх здатність утворювати біоплівки. Разом із тим істотного впливу випромінювання на вже сформовані біоплівки не відзначали. Отримані дані підтверджують дозозалежний характер впливу низькоінтенсивного випромінювання на біологічні властивості мікроорганізмів, а також значно вищу стійкість мікробних біоплівок як до хімічних, так і до фізичних факторів, порівняно з планктонними формами.

Ключові слова: низькоінтенсивне випромінювання, опортуністичні мікроорганізми, біоплівки.

¹Кафедра мікробіології, вірусології, епідеміології з курсом інфекційних хвороб, ДВНЗ «Ужгородський національний університет», пл. Народна, 1, Ужгород, 88000, Україна; valerij.pantyo@uzhnu.edu.ua, galina.koval@uzhnu.edu.ua

²Кафедра медико-біологічних дисциплін, ДВНЗ «Ужгородський національний університет», вул. Університетська, 16а, Ужгород, 88000, Україна; oleksandra.pallah@uzhnu.edu.ua, nadiya.boyko@uzhnu.edu.ua

³Кафедра терапевтичної стоматології, ДВНЗ «Ужгородський національний університет», вул. Університетська, 16а, Ужгород, 88000, Україна; elvira.danko@uzhnu.edu.ua

⁴Кафедра загальної хірургії, ДВНЗ «Ужгородський національний університет», пл. Народна, 1, Ужгород, 88000, Україна; valeriy.pantyo@uzhnu.edu.ua

Effect of LED radiation on biofilms of opportunistic microorganisms. Pantyo V. V.¹, Pallah O.², Boyko N.², Danko E.³, Koval G.¹, Pantyo V. I.,⁴

The ability to form biofilms is considered as one of the key virulence factors of microorganisms. Studying the effect of physical factors, in particular, low-intensity radiation on microbial biofilms is important in view of the development of combined approaches to the therapy of pathological processes caused by infectious agents. The effect of LED radiation of the red-infrared spectrum on biofilm formation and formed biofilms of some opportunistic microorganisms was studied. It has been proven that irradiation of the studied microorganisms with LED radiation significantly increases their ability to form biofilms. However, no significant effect of radiation on already formed biofilms was noted. The obtained data confirm the dose-dependent nature of the effect of low-intensity radiation on the biological properties of microorganisms, as well as the significantly higher resistance of microbial biofilms to both chemical and physical factors, compared to planktonic forms.

Key words: low-intensity radiation, opportunistic microorganisms, biofilms.

¹Department of Microbiology, Virology, Epidemiology with a course of infectious diseases, Uzhhorod National University, 1, Sq. Narodna, Uzhhorod, 88000, Ukraine; valerij.pantyo@uzhnu.edu.ua, galina.koval@uzhnu.edu.ua

²Department of Medical and Biological Sciences, Uzhhorod National University, 16a, Universytetska Str., Uzhhorod, 88000, Ukraine; oleksandra.pallah@uzhnu.edu.ua, nadiya.boyko@uzhnu.edu.ua

³Department of Therapeutic Dentistry, Uzhgorod National University, 16a, Universytetska Str., Uzhhorod, 88000, Ukraine; elvira.danko@uzhnu.edu.ua

⁴Department of General Surgery, Uzhgorod National University, 1, Sq. Narodna, Uzhhorod, 88000, Ukraine, valeriy.pantyo@uzhnu.edu.ua

Вступ

Біоплівка – конгломерат мікроорганізмів, який вони утворюють, прикріплюючись до поверхні середовища, основною метою якого є колонізація субстрату й підвищення стійкості до факторів зовнішнього середовища, зокрема антибіотиків (Costerton et al. 1999; Rather et al. 2021). Утворення біоплівки є способом існування для більшості мікроорганізмів, включно з бактеріальними та грибовими патогенами людини (Santos et al. 2018). Вони можуть відігравати як позитивну, так і негативну роль, зокрема у випадку колонізації медичних приладів (Azeredo et al. 2017). Інфекції, асоційовані з мікробними біоплівками становлять близько 80 % усіх інфекційних захворювань (Bjarnsholt et al. 2018).

Мікроорганізми в біоплівковій формі є більш стійкими до факторів зовнішнього середовища, захисних факторів організму-господаря (антитіла, фагоцитоз, система комплементу тощо) та протимікробних засобів, у тому числі антибіотиків (Santos et al. 2018). Крім того, біоплівкоутворення є ключовим фактором вірулентності для широкого кола мікроорганізмів, які зумовлюють хронічні інфекції (Koo et al. 2017).

Новітні стратегії боротьби з біоплівками передбачають стимуляцію формування реактивних форм кисню (Bjarnsholt et al. 2018), використання матеріалів із протимікробною активністю (Skoura et al. 2023), фізичне руйнування біоплівок (Koo et al. 2017).

Багатофакторний характер розвитку біоплівки та її стійкості до антибіотиків визначає пошук комбінованих підходів до терапії патологічних процесів. Зокрема, унаслідок стимулюючого впливу на організм людини та практично повну відсутність протипоказів (Musstaf et al. 2019; de Souza da Fonseca et al. 2021) перспективним є використання низькоінтенсивного випромінювання як окремого терапевтичного фактора, а також у комплексній терапії інфекційних захворювань, зумовлених опортуністичними мікроорганізмами. Результати власних попередніх досліджень (Pantyo et al. 2020; Pantyo et al. 2023) і даних ряду авторів (Roos et al. 2013; Musstaf et al. 2019; de Souza da Fonseca et al. 2021) свідчать про суттєво виражений ефект впливу низькоінтенсивного випромінювання на інтенсивність росту й інші біологічні властивості планктонних форм умовно-патогенних мікроорганізмів. Тому актуальним є дослідити вплив низькоінтенсивного випромінювання на мікробні біоплівки та порівняти із закономірностями його впливу на планктонні форми.

Метою роботи було дослідити вплив світлодіодного випромінювання червоно-інфрачервоного діапазону на біоплівкоутворення та сформовані біоплівки умовно-патогенних мікроорганізмів.

Матеріали та методи

Досліджено вплив світлодіодного випромінювання червоно-інфрачервоного спектра на біоплівкоутворення та вже сформовані біоплівки клінічних ізолятів *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* та *Pseudomonas aeruginosa*. Штами *S. aureus* та *C. albicans* були виділені від хворих на хронічний генералізований пародонтит. *E. coli*, *K. pneumoniae* та *P. aeruginosa* виділено від хворих з гнійно-запальними процесами шкіри та м'яких тканин. Ідентифікацію мікроорганізмів проводили відповідно до загальноприйнятих методик із вивченням морфо-тинкторіальних і культуральних властивостей. Для остаточного визначення використовували тест-системи STAPHYtest 16, NEFERMtest24, ENTEROtest24 та CANDIDAtest21 (PLIVA-Lachema a.s., Чеська Республіка).

Здатність досліджуваних мікроорганізмів утворювати біоплівку визначали за допомогою методу мікротитрувальних плашок (Djordjevic et al. 2002; Azeredo et al. 2017). Для цього з добових агарових культур готували суспензії каламутністю 0,5 за Мак-Фарландом із використанням електронного приладу Densi-La-Meter (DEN-1, Biosan, Латвія, 2016), що відповідає концентрації $1,5 \cdot 10^8$ КУО/мл. Далі в кожен окрему лунку 96-лункового мікропланшету (полістирольні плашки ELISA об'ємом 350 мкл) вносили по 190 мкл поживного бульйону та 10 мкл готової мікробної суспензії та культивували 5 діб у термостаті за температури 37 °C.

Для визначення впливу світлодіодного випромінювання на біоплівкоутворення мікроорганізмів після внесення інокулюму в лунки його опромінювали низькоінтенсивним випромінюванням червоно-інфрачервоного спектра ($\lambda = 640 \pm 30$ і 880 ± 30) за експозиції 10 хвилин, частоти 8000 Гц та щільності потужності $5,35$ мВт/см² (з відстані 0–1 см) безпосередньо над лунками планшетів (рис. 1). Джерело світлодіодного випромінювання – прилад Medolight-Red (Bioptron light therapy system by Zepher Group, Швейцарія).



Рис. 1. Опромінення мікробного інокулюму світлодіодним випромінюванням

Fig. 1. Irradiation of microbial inoculum with LED radiation

Після закінчення терміну інкубації з лунок видаляли планктонну форму мікроорганізмів, біоплівки тричі промивали дистильованою водою в об'ємі 200 мкл у кожен лунку. Для визначення щільності сформованих біоплівок їх забарвлювали 1%-вим водним розчином кристал-віолету протягом 10 хвилин, після чого лунки двічі промивали дистильованою водою (по 200 мкл у кожен лунку). Після цього додавали по 200 мкл 96%-го етилового спирту і залишали на 45 хв за кімнатної температури. Оптичну густину вмісту лунок вимірювали на рідері ELx800 (BioTek, США) за довжин хвиль 630 нм та 492 нм.

Щоб визначити вплив випромінювання на вже сформовані біоплівки, опромінення проводили після промивання дистильованою водою. Використовували аналогічні вищеописаним методу та параметри, проте більшу тривалість експозиції – 20 хвилин.

Для виявлення наявності живих мікроорганізмів у біоплівках після видалення планктонних форм і промивання дистильованою водою у лунки додавали 100 мкл фізіологічного розчину та за допомогою піпет-дозаторів ретельно зішкрібували мікробні біоплівки з дна лунок. Далі 20 мкл вмісту вносили у пробірку Еппендорф з 180 мкл стерильного фізіологічного розчину, тобто розводили в 10 разів. Після ретельного перемішування 20 мкл з першої пробірки переносили до наступної, де також містилося 180 мкл фізіологічного розчину. Кількість таких пробірок становила 4. Таким чином готували серію розведень від $1/10^1$ до $1/10^4$, після чого 20 мкл з кожної пробірки пересівали на чашки Петрі з МПА (Сабуро для грибів *Candida*) для виявлення інтенсивності росту досліджуваних мікроорганізмів. При цьому порівнювали ріст контрольних та опромінених культур.

Отримані дані щодо щільності мікробної біоплівки статистично обробляли з визначенням середнього арифметичного та стандартного відхилення вибірки, а також достовірності різниці між контрольною та експериментальною групами з використанням t-критерію Стьюдента. Указаний аналіз проводили за допомогою комп'ютерної програми Statistica 10.0.

Результати й обговорення

Встановлено, що всі досліджені штами мікроорганізмів утворювали біоплівки. Опромінення світлодіодним випромінюванням червоно-інф-

Таблиця 1. Щільність біоплівок контрольних та опромінених світлодіодним випромінюванням мікроорганізмів (в одиницях оптичної щільності)

Table 1. Density of biofilms of control and irradiated by LED microorganisms (in optical density units)

Вид мікроорганізмів	Щільність біоплівки	
	Контроль	Опромінені культури
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,130 ± 0,016	0,278 ± 0,07
<i>Candida albicans</i>	0,112 ± 0,04	0,252 ± 0,06
<i>Escherichia coli</i>	0,145 ± 0,03	0,174 ± 0,06
<i>Klebsiella pneumonia</i>	0,114 ± 0,04	0,228 ± 0,06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,120 ± 0,04	0,275 ± 0,07

рачервоного спектра підвищувало здатність до біоплівкоутворення, що проявлялося в більшій їх щільності в опромінених культур порівняно з контролем (табл. 1).

Згідно з даними вимірювання оптичної густини, найбільш щільну біоплівку утворював досліджуваний штам *E. coli*. При цьому опромінення мікробного інокулюму зумовлювало підвищення щільності біоплівки даного мікроорганізму в середньому на 20%, що відповідно до розрахунку t-критерію Стьюдента не є статистично значущим. У випадку *S. aureus* опромінення мікробного інокулюму стимулювало підвищення щільності біоплівки в середньому в 2,1 раза порівняно з контролем ($p = 0,0017$). Опромінення світлодіодним випромінюванням *C. albicans* призводило до підвищення щільності біоплівки в середньому у 2,25 раза порівняно зі щільністю біоплівок неопромінених культур ($p = 0,0025$). Для досліджуваного штаму *K. pneumonia* відзначали підвищення щільності біоплівки опроміненої культури в середньому у 2 рази порівняно з контролем ($p = 0,0077$). Найбільш суттєво збільшилася щільність біоплівки після опромінення *P. aeruginosa* – майже у 2,3 раза порівняно з неопроміненою культурою ($p = 0,0026$).

Оцінюючи вплив світлодіодного випромінювання на сформовані біоплівки відзначали відсутність як бактерицидної, так і стимулюючої дії цього фактора. Так, на рисунку 2 продемонстровано ріст досліджуваних штамів *P. aeruginosa* та *K. pneumonia* після пересіву різних розведень відібраних біоплівок у пробірках Еппендорф. Суттєвих відмінностей у інтенсивності росту не відзначали. Аналогічна закономірність стосувалася й інших досліджуваних штамів.

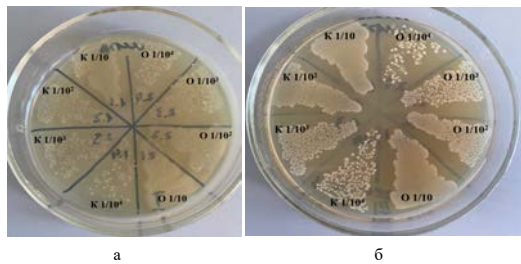


Рис. 2. Ріст контрольних та опромінених *P. aeruginosa* (а) та *K. pneumonia* (б) на чашках Петрі після пересіву з різних розведень у пробірках (позначення К – контроль; О – опромінені культури)

Fig. 2. Growth of control and irradiated *P. aeruginosa* (a) and *K. pneumonia* (b) on Petri dishes after inoculation from different dilutions in test tubes (designation К – control; О – irradiated cultures)

Суттєве підвищення щільності біоплівки, які формували опромінені культури дає підстави вважати, що низькоінтенсивне випромінювання стимулювало біоплівкоутворення досліджуваних штамів. Згідно з даними літературних джерел (Costerton et al. 1999, Rather et al. 2021), механізми утворення біоплівки запускаються та регулюються відчуттям кворуму, несприятливими факторами навколишнього середовища, міжклітинними взаємодіями, наявністю поживних речовин тощо. Крім того, доведено, що вплив субінгібіторних концентрацій антибіотиків на мікроорганізми може індукувати утворення біоплівки й експресію додаткових ознак вірулентності

(Hoffman et al. 2005; Santos et al. 2018). Отримані результати дають змогу припустити, що аналогічна закономірність має місце також і у випадку впливу фізичних факторів, а саме світлодіодного випромінювання. Доведений дозозалежний ефект впливу низькоінтенсивного випромінювання на ріст мікроорганізмів (Pantyo et al. 2018; Musstaf et al. 2019; de Souza da Fonseca et al. 2021), відповідно до чого низькі дози світлової експозиції стимулюють ріст, тоді як високі дози його пригнічують.

Відсутність впливу світлодіодного випромінювання на сформовані біоплівки вкотре доводить те, що останні є значно стійкішими до фізичних і хімічних чинників. Вплив аналогічних параметрів випромінювання – тривалість експозиції 20 хв, червоно-інфрачервоний спектр і частота 8000 Гц за щільності потужності 5,35 мВт/см² – зумовлював суттєвий протимікробний ефект щодо планктонних форм умовно-патогенних мікроорганізмів (Pantyo et al 2018).

Висновки

Досліджувані штами *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* та *Pseudomonas aeruginosa* формували біоплівки в умовах *in vitro*. Світлодіодне випромінювання червоно-інфрачервоного спектра стимулює процес біоплівкоутворення та зумовлює збільшення її щільності в досліджуваних мікроорганізмів у 1,2–2,3 рази. Разом із тим випромінювання не проявляло впливу на вже сформовані біоплівки.

- AZEREDO, J., AZEVEDO, N. F., BRIANDET, R., CERCA, N., COENYE, T., COSTA, A. R., ... & STERNBERG, C. (2017) Critical review on biofilm methods. *Critical reviews in microbiology*, 43 (3), 313–351. DOI: <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>.
- BJARNSHOLT, T., BUHLIN, K., DUFRÊNE, Y. F., GOMELSKY, M., MORONI, A., RAMSTEDT, M., RUMBAUGH K. P., SCHULTE T., SUN L., ÅKERLUND B. & RÖMLING, U. (2018) Biofilm formation—what we can learn from recent developments. *Journal of internal medicine*, 284 (4), 332–345. DOI: <https://doi.org/10.1111/joim.12782>.
- COSTERTON, J. W., STEWART, P. S., & GREENBERG, E. P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284 (5418), 1318–1322. DOI: 10.1126/science.284.5418.13.
- DE SOUZA DA FONSECA, A., DA SILVA SERGIO, L. P., MENCALHA, A. L., & DE PAOLI, F. (2021) Low-power lasers on bacteria: stimulation, inhibition, or effectless? *Lasers in Medical Science*, 36, 1791–1805. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10103-021-03258-5>.
- DJORDJEVIC D, WIEDMANN M, MCLANDBOROUGH LA. (2002) Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (6), 2950–2958. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2950-2958.2002>.
- HOFFMAN, L.R., D'ARGENIO, D.A., MACCOSS, M.J., ZHANG, Z., JONES, R.A., & MILLER, S.I. (2005) Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, 436 (7054), 1171–1175. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature03912>.
- KOO, H., ALLAN, R.N., HOWLIN, R.P., STOODLEY, P., & HALL-STOODLEY, L. (2017) Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 15 (12), 740–755. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.99>.
- MUSSTAF, R.A., JENKINS, D.F., & JHA, A.N. (2019) Assessing the impact of low level laser therapy (LLLT) on biological systems: a review. *International Journal of Radiation Biology*, 95 (2), 120–143. DOI: <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1524944>.
- PANTYO, V.V., DANKO, E.M., PANTYO, V.I., & KOVAL, G.M. (2023) Protymikrobna diia nyzkointensyvnoho

- lazernoho vyprominiuvannia ta metylenovoho synoho na deiaki umovno-patohenni mikroorhanizmy. *Intermedical journal*, 84–88 (in Ukrainian). <https://doi.org/10.32782/2786-7684/2023-3-17>.
- PANTYO, V.V., KOVAL, G.M., DANKO, E.M., & PANTYO, V.I. (2020). Complex impact of polarized and non-polarized low intense light and methylene blue on growth rate of some opportunistic microorganisms. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 11 (4), 520–523. DOI: <https://doi.org/10.15421/022079>.
- PANTO, V.V., PANTO, V.I., & DANKO, E.M. (2018) Protymikrobna diia svitlodiodnoho vyprominiuvannia na zbudnykiv oportunistychnykh infektsii. *Visnyk Odeskoho natsionalnoho universytetu. Biologhiia*, 23 (1 (42)), 69–77. [https://doi.org/10.18524/2077-1746.2018.1\(42\).118457](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2018.1(42).118457).
- RATHER, M.A., GUPTA, K., & MANDAL, M. (2021) Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52, 1701–1718. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>.
- ROOS, C., SANTOS, J.N., GUIMARÃES, O.R., GELLER, M., PAOLI, F., & FONSECA, A.S. (2013) The effects of a low-intensity red laser on bacterial growth, filamentation and plasmid DNA. *Laser Physics*, 23 (7), 075602. <https://doi.org/10.1088/1054-660X/23/7/075602>.
- SANTOS, A. L. S. D., GALDINO, A. C. M., MELLO, T. P. D., RAMOS, L. D. S., BRANQUINHA, M. H., BOLOGNESE, A. M., ... & ROUDBARY, M. (2018) What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective!. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113 (9), e180212. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180212>.
- SKOURA E., BOHÁČ P., BARLOG M., PÁLKOVÁ H., MAUTNER A., BUGYNA L., BUJDÁKOVÁ H., BUJDÁK J. (2023) Structure, photoactivity, and antimicrobial properties of phloxine B / poly(caprolactone) nanocomposite thin films. *Applied Clay Science*, 242, 107037. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2023.107037>.