

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

GENEETIKA ÕPPETOOL

***Pseudomonas aeruginosa* biofilmi moodustumine antimikroobsetel pindadel erinevates
keskkonnatingimustes**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Karola Jõearu

Juhendajad PhD Hanna Ainelo

PhD Angela Ivask

TARTU 2025

INFOLEHT

***Pseudomonas aeruginosa* biofilmi moodustumine antimikroobsetel pindadel erinevates keskkonnatingimustes**

Pseudomonas aeruginosa kuulub tänapäeval kõige ohtlikumate haiglapatogeenide nimekirja ja on inimestele suureks haigus- ning surmaohuks. *P. aeruginosa*-st vabanemiseks on ühe meetodina uuritud antimikroobseid pindasid, mis takistavad nii planktiliste bakterite levikut kui ka biofilmi moodustumist. Käesolevas töös uuriti, millised antimikroobsed pinnad on *P. aeruginosa* biofilmi moodustumise inhibeerimises kõige edukamad ning kuidas mõjutavad antimikroobsete pindade efektiivsust keskkonna omadused, milles pind viibib. Leiti, et biofilmi takistamises toimivad pinnad kõige edukamalt orgaanikavaeses keskkonnas, samas kui orgaanikarikas keskkonnas ei suuda antimikroobsed pinnad enamasti *P. aeruginosa* levikut peatada. Ainus testitud antimikroobne pind, mis toimis sama efektiivselt mõlemas keskkonnas, oli 30% bensalkooniumkloriid.

Märksõnad: *Pseudomonas aeruginosa*, antimikroobsed pinnad, keskkonnatingimused

CERCS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia; T150 Materjalitehnoloogia

***Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on antimicrobial surfaces in different environmental conditions**

Pseudomonas aeruginosa is one of the most dangerous hospital pathogens today and poses a major risk of illness and death to humans. One method that has been investigated to eliminate *P. aeruginosa* are antimicrobial surfaces that prevent both the spread of planktonic bacteria and the formation of biofilms. This study investigated which antimicrobial surfaces are the most effective in inhibiting *P. aeruginosa* biofilm formation and how the characteristics of the environment affect the effectiveness of antimicrobial surfaces. It was found that surfaces are most successful in inhibiting biofilm development in nutrient-poor environments, while in nutrient-rich environments antimicrobial surfaces are mostly unable to stop the spread of *P. aeruginosa*. The only antimicrobial surface tested that was equally effective in both environments was 30% benzalkonium chloride.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobial surfaces, environmental conditions

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology; T150 Material technology

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> kui inimese patogeen.....	7
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm	7
1.3 Biofilmi moodustumine ja koostis.....	8
1.4 Antimikroobsed pinnad	10
1.4.1 Vask	11
1.4.2 Hõbe.....	11
1.4.3 Bensalkooniumkloriid	12
1.4.4 Superhüdrofoobsed pinnad	12
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	14
2.1 Töö eesmärgid	14
2.2 Materjal ja meetodika.....	14
2.2.1 Kasutatud bakteritüvi ja kasvatamistingimused	14
2.2.2 Pinnad ja pindade ettevalmistus	14
2.2.3 Biofilmi ettekasvatamine	16
2.2.4 Biofilmi hulga hindamine	17
2.2.5 Kontaktnurkade mõõtmine	19
2.2.6 Statistika	20
2.2.7 Biofilmi visualiseerimine skaneerivas elektronmikroskoobis.....	20
2.3 Tulemused.....	21
2.3.1 Kontaktnurgad	21
2.3.2 Hõbeda ja vase mõju biofilmi moodustumisele	22
2.3.3 Bensalkooniumkloriidi mõju biofilmi moodustumisele	23
2.3.4 Superhüdrofoobse pinna mõju biofilmi moodustumisele.....	24
2.3.5 Biofilmi visualiseerimine	25
2.4 Arutelu.....	33
KOKKUVÕTE	36

RESÜMEE.....	37
KIRJANDUSE LOETELU.....	39
LIHTLITSENTS.....	47

KASUTATUD LÜHENDID

ANOVA – dispersioonianalüüs (*analysis of variance*)

CFU – kolooniaid moodustavad üksused (*colony forming units*)

EPS – ekstratsellulaarsed polümeersed ained (*extracellular polymeric substances*)

LB – *lysogeny broth*

LOD – detekteerimispiir (*limit of detection*)

NB – toitepuljong (*nutrient broth*)

OD – optiline tihedus (*optical density*)

PBS – fosfaatpuhver (*phosphate buffered saline*)

SCDLP – toksilisust neutraliseeriv sööde (*soy casein digest broth with lecithin and polysorbat*)

SL – orgaaniline saastelahus (*soil load*)

SISSEJUHATUS

Tänapäeval on üha levinumaks probleemiks kiiresti muteeruvad ning soovimatus suunas evolutsioneeruvad bakterid. Need bakterid ei allu enam antibiootikumiravile, mis oli varem efektiivseks võimaluseks probleemiga tegelemiseks. Üheks tuntuimaks ning ohtlikumaks nendest probleembakteritest saab nimetada *Pseudomonas aeruginosa*, mida võib leida mitmetest elukeskkondadest nii looduses kui inimese enda organismis. Esmaseks ohugrupiks *P. aeruginosa* nakkusele on immuunpuudulikkusega inimesed. Lisaks on ohus ka haiglapatsiendid, kuna bakter koloniseerib suure edukusega erinevaid haiglavahendeid, nagu kateetrid või implantaadid.

Kuigi *P. aeruginosa* on juba planktiliselt ohtlik, muudab bakteri infektsiooni veelgi ohtlikumaks selle võime moodustada biofilmi. Biofilm on limasihiga ümbritsetud mikroorganismide kooslus, mis tekib piirpindadele. Biofilmi bakterid suudavad ühise populatsioonina koos elutseda, aidates selle käigus üksteist toitumisel ning kaitses ohutegurite vastu. Selles struktuuris on keeruline bakteritest võitu saada antibiootikumide või muude traditsiooniliste meetoditega, mis laboritingimustes on planktiliste rakkude vastu efektiivsed. Biofilmi hävitamiseks läheb vaja täiesti uusi strateegiaid, et *P. aeruginosa* nakkuse vastu võidelda ning bakterist lõplikult vabaneda.

Ühe meetodina *P. aeruginosa* vastu võitluseks on hakatud uurima tahkeid pindasid, mida bakter koloniseerib. Täpsemalt on uurimisobjektiks erinevad antimikroobsed pinnad, millel on bakterite vastased omadused, et takistada nii planktiliste rakkude levikut kui ka biofilmi struktuuri moodustumist. Antimikroobsed pinnad võivad olla kas bakteriotsiidid ehk baktereid otseselt tapvad või takistada rakkude tapmise asemel hoopis lihtsalt nende kinnitumist, et vältida selle kaudu biofilmi moodustumist. Suurt rolli antimikroobsete pindade efektiivsuses bakterite vastu mängib ka keskkond, milles pinnad asuvad. Seejuures on oluline, kui soodne on situatsioon bakterite toitumiseks ja elutsemiseks.

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks on uurida *P. aeruginosa* ATCC 15442 tüve kasvu erinevate antimikroobsete strateegiatega pindadel. Sealjuures on peamiseks sihiks teha kindlaks, millised pinnad takistavad paremini biofilmi moodustumist ja kuidas mõjutavad seda erinevate omadustega kasvukeskkonnad.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 *Pseudomonas aeruginosa* kui inimese patogeen

Pseudomonas aeruginosa on oportunistlik gramnegatiivne bakter, mis põhjustab immuunpuudulikkusega inimestel nii kroonilisi kui ägedaid nakkuseid (Balasubramanian et al., 2013). *P. aeruginosa* on tänapäeval muutunud üheks kõige ohtlikumaks haiglast saadud infektsioonide põhjustajaks, kuuludes ESKAPE patogeenide hulka. ESKAPE patogeenid ise on enim haiglainfektsioone põhjustavad bakterid, mis on suure antibiootikumitolerantsusega ja millega kaasnevad enamasti kõrged surma- ja haigestumisriskid (Bush & Jacoby, 2010; Rice, 2008, 2010).

P. aeruginosa põhjustab tüüpiliselt nakkusi kroonilise obstruktiivse kopsuhaiguse, tsüstilise fibroosi, kopsupõletiku, vähi, sepsise ja põletushaavadega haigetel (Cendra & Torrents, 2021; Jurado-Martín et al., 2021; Rossi et al., 2021). Näiteks võib bakter peale põletus- või nahahaavale sattumist edaspidi põhjustada kroonilisi naha infektsioone (Sauer et al., 2022). *P. aeruginosa* põhjustab umbes 8% krooniliste haavade nakkustest ning 2-6% vereringe nakkustest (Rahim et al., 2017).

Ohus on ka isikud, kes peavad eriti just haiglateskkondades kasutama erinevaid meditsiinilisi abivahendeid. Näiteks võib välja tuua urinaarkateetrid, veenikateetrid või ortopeedilised implantaadid, mida *P. aeruginosa* äärmiselt edukalt koloniseerib, põhjustades sellele järgnevalt ägedaid infektsioone, mis lõppevad tihti surmaga (Francolini & Donelli, 2010).

P. aeruginosa on äärmiselt vähenõudlik ja vastupidav bakter. Vähenõudlikkus toitainete suhtes võimaldab bakteril asustada väga erinevaid keskkondi, mistõttu ongi just see patogeen üks põhilisteks haiglainfektsioonide põhjustajaks. *P. aeruginosa* suudab metaboliseerida ölisid, jääkaineid ja pestitsiide, mis lisaks selle suurele raskemetallide vastupidavusele, tekitavad bakterile erilise ökoloogilise niši, milles teised mikroorganismid ei suuda ellu jääda (Bhamidimarri et al., 2021; Hobman & Crossman, 2015; Pitondo-Silva et al., 2016; Teitzel & Parsek, 2003).

1.2 *Pseudomonas aeruginosa* biofilm

P. aeruginosa nakkuste ravimise teeb keeruliseks see, et bakter esineb reeglina biofilmi kujul. Biofilmis elavad bakterid on väga vastupidavad toksiliste ühendite ja ebasoodsate tingimuste suhtes. On näidatud, et biofilmi bakterid on 10-1000 korda antibiootikumitolerantsemad, kui planktilised bakterid (Mah & O'Toole, 2001). Sellise eelise annavad biofilmis valitsevad

tingimused, nagu suurem konkurents, mis tagab bakterite kiire muteerumisvõime, ja madalam metaboolne aktiivsus, mida võimaldavad populatsioonis koostööd tegevad bakterid (Høiby et al., 2010).

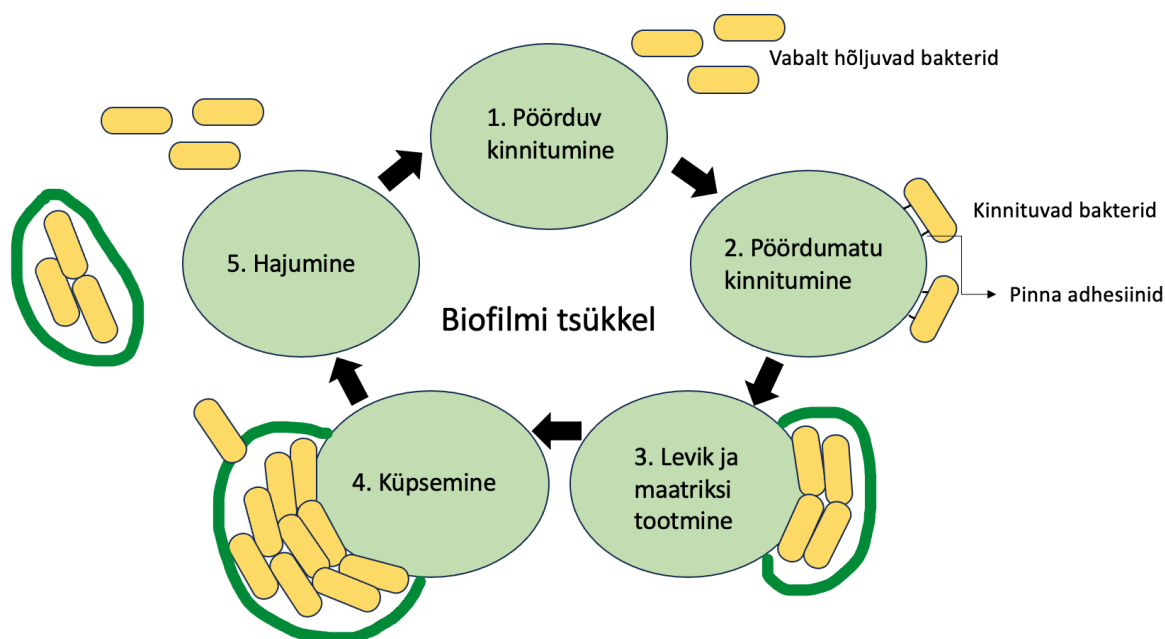
Kuna klassikaline antibiootikumiravi pole *P. aeruginosa* biofilmi vastu efektiivne, siis on üritatud välja töötada uusi meetodeid, kuidas bakteri biofilmist vabaneda. Lisaks antibiootikumide kombineerimisele (Chanda et al., 2017; Chauhan et al., 2012; Ghorbani et al., 2017; Zhao et al., 2021; L. Wang et al., 2019) on katsetatud strateegiaid nagu faagiteraapia (Mi et al., 2019; Pei & Lamas-Samanamud, 2014), galliumi ioonid (Banin et al., 2008; Kang et al., 2021; Rzhepishevskaya et al., 2011) ning antimikroobne fotodünaamiline teraapia (Beirão et al., 2014; Bilici et al., 2020; Pérez-Laguna et al., 2020). Seni pole ükski väljatoodud meetoditest suurt edu toonud.

1.3 Biofilmi moodustumine ja koostis

Biofilm on piirpinnale moodustunud ruumiline struktuur, mis koosneb bakteritest ja nende toodetud ekstratsellulaarsest limasest maatriksist. Viimane omakorda sisaldab eksopolüsahhariide, lipiide, nukleiinhappeid, valke, välismembraani vesiikuleid ja muid komponente (Li et al., 2020). Uurides täpsemalt *P. aeruginosa* biofilmi võib selle struktuuri peamiste komponentidena välja tuua maatriksi valgud, eksopolüsahhariidid ja ekstratsellulaarse DNA ehk eDNA (Ghafoor et al., 2011).

Biofilm kaitseb kasvavat kolooniat väliste faktorite eest, nagu antibiootikumid või immuunsüsteemi kaitsevastused. Lisaks kaitsele rünnakute eest on maatriks abivahendiks erinevatele pindadele kinnitumisel ning hoiab baktereid koos, vahendades nende omavahelist suhtlust (Flemming et al., 2016).

Biofilmi moodustumisel ja küpsemisel võib eristada erinevaid etappe (joonis 1). *P. aeruginosa* biofilmi moodustumine algab planktiliste bakterite pöörduva kinnitumisega pinnale, mida vahendavad kinnituvate rakkude spetsiaalsed valgud - adhesiinid. Järgmise sammuna kinnituvad bakterid pinnale juba pöördumatult ja hakatakse tootma limast ekstratsellulaarset maatriksit, mis aitab muu hulgas kaasa bakterite levikule ning tekib agregeeritud rakkude kogum. Biofilm kasvab suuremaks ja omandab iseloomuliku struktuuri. Peale seda lahkuvad struktuurist üksikud mikrokolooniad, alustades protsessi uuesti, et nakatada läbi kinnitumise ja uue biofilmi moodustumise järgmisi pindasid ning laiendada bakterite levikut (Jamal et al., 2018). Biofilmi moodustumiseks kuluv aeg sõltub bakteri liigist ja keskkonningimustest. Näiteks võivad mõned bakterid biofilmi moodustada isegi juba paari tunni jooksul (Dufour et al., 2010).



Joonis 1. Biofilmi tsükkel. *Pseudomonas aeruginosa* biofilmi moodustumise tsükliline protsess. Joonis on visandatud Vetrivel *et al.* põhjal (Vetrivel *et al.*, 2021).

P. aeruginosa biofilmi tugevus ja stabiilsus olenevad suuresti selles leiduvatest erinevatest polüsahhariididest nagu alginaat, pel ja psl (Ghafoor *et al.*, 2011; Ryder *et al.*, 2007). Alginaat on L-guluroonhapest ja D-mannuroonhapest koosnev hargnemata polümeer, mis on peamiselt vajalik biofilmi kaitseks ning selle struktuuri hoidmiseks. Lisaks aitab alginaat biofilmis säilitada bakterite ellujäämiseks vajalikke aineid, näiteks vett ja toitaineid (Rasamiravaka *et al.*, 2015). Pel polüsahhariidi koostis ja struktuur on siiani suuresti teadmata, kuid see sisaldab hulgaliselt glükoosi ning funktsioneerib küpsenud biofilmis kaitsva ning tugevdava ühendina, tõstes sealjuures bakterite tolerantsust aminoglükosiidsete antibiootikumide vastu. Psl on aga pentasahhariid, mis koosneb järjestikustest L-ramnoosi, D-mannoosi ja D-glükoosi jääkidest. Mõlemad viimastest polüsahhariididest on abiks algsele biofilmi struktuuri moodustumisele, täites selles protsessis algmaterjali ja vundamendi looja funktsioone (Colvin *et al.*, 2011; Franklin *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2012). Kõikide mainitud polüsahhariidide sünteesi reguleerijaks on tsükliline di-GMP, mis ise on bakterites laialt levinud sõnumitooja (Hengge, 2009). Kõrge tsüklilise di-GMP kontsentratsioon soodustab alginaadi ja pel polüsahhariidi tootmist, samas kui ühendi madalam kontsentratsioon põhjustab biofilmis olevate bakterite suuremat liikuvust (V. T. Lee *et al.*, 2007).

Eksopolüsahhariididele lisaks on *P. aeruginosa* biofilmis oluline roll ka varem mainitud eDNA-l. Täpsemalt on see oluline kinnitunud bakteritele, olles abiks algsel kleepumisel, toetades bakterite kasvu toitainete allikana ning vahendades nende suhtlust (Allesen-Holm et al., 2006; Flemming & Wingender, 2010; Mulcahy et al., 2010).

Lõpuks on biofilmi moodustumisel oluline hulgatunnetus. See fenomen on vajalik, et kontrollida läbi väikeste molekulide, mida nimetatakse autoindutseerijateks, biofilmi rakkude geeniekspressiooni ja reguleerida kasvavate rakkude populatsiooni tihedust (Favre-Bonté et al., 2007; Nadell et al., 2008). Kui rakud jõuavad kindla tiheduseni, mida nimetatakse hulgasemeks, siis hakkavad mainitud autoindutseerijad kontrollima biofilmi suuruse ja virulentsuse eest vastutavaid geene, tõstes või langetades vastavalt vajadusele nende ekspressiooni ja hoides sellega biofilmi eluvõimelisena (Annous et al., 2009; Dickschat, 2010).

Teiste hulgas on just *P. aeruginosa* hulgatunnetust põhjalikult uuritud, kuna seda süsteemi peetakse patogeensuse jaoks eriti oluliseks (Pearson et al., 1997). Seni on bakteriga seoses välja toodud neli erinevat hulgatunnetuse süsteemi. Nendeks on las, rhl, pqs ja integreeritud hulgatunnetus (K. Lee & Yoon, 2017). Kõik mainitud süsteemid töötavad hierarhiliselt, mille alusel las on kõige kõrgem süsteem, olles ise teiste hulgatunnetuste reguleerija ning rhl kõige madalam süsteem, olles ise reguleeritud teiste hulgatunnetuse süsteemide poolt. Üldiselt aktiveerib pqs hulgatunnetus rhl süsteemi ja seda ennast kontrollivad las ja indutseeritud hulgatunnetuse süsteem. Indutseeritud hulgatunnetust aktiveerib las süsteem ja see aktiveerib lisaks rhl hulgatunnetusele ka pqs süsteemi (Dekimpe & Déziel, 2009; J. Lee & Zhang, 2015). Selline omavahel seotud võrgustik aitab hulgatunnetust kontrollida ning iga süsteemi mõjutavad ka keskkonnamõjurid, nagu hapniku kättesaadavus (Schuster & Greenberg, 2006), raua kättesaadavus (Oglesby et al., 2008), fosfaatstress (Jensen et al., 2006), nälg (Schafhauser et al., 2014) ja pinna omadused, kuhu biofilm on kinnitunud (J. Lee et al., 2013; J. Lee & Zhang, 2015).

1.4 Antimikroobsed pinnad

Patogeensetest bakteritest, nagu *P. aeruginosa*, vabanemiseks on ühe meetodina uuritud antimikroobseid pindasid, et peatada rakkude levikut tahketel pindadel (Boyce, 2007; Otter et al., 2011, 2015; Weber et al., 2010). Selliseid pindasid, mis töötavad kaitsena koloniseerimise eest või tapavad otseselt baktereid võib jagada rakkude hävitamise meetodite põhjal mitmeteks eri gruppideks (Adlhart et al., 2018), kuid peamiselt jagunevad nad nelja suuremasse rühma. Esiteks esinevad kinnitumisvastased pinnad, mis võivad olla kas superhüdrofiilsed, superhüdrofoobsed, nanomustriga või biomimeetilised, kaitstes pinda läbi rakkude kinnitumise

takistamise. Teiseks saab välja tuua kontakttapmise põhimõttel töötavad pinnad. Need pinnad sisaldavad kovalentselt seotud aktiivseid ühendeid, näiteks kvaternaarseid ammoniumühendeid, mis toimivad otsesel kontaktil pinna ja mikroobi vahel. Kolmandaks on biotsiide vabastavad pinnad, nagu metallpinnad või antibiootikume vabastavad pinnad. Lõpuks on neljandaks grupiks fotokatalüütilised või ennast ise puhastavad pinnad, näiteks tsinkoksiidi ja titaandioksiidi pinnad. Neid pindade tüüpe võib kombineerida, luues mitmeastmelise kaitsega pindasid, millel on täiesti uued omadused. Otsus, millist pinda bakteri hävitamiseks valida, oleneb nii pindade kasutusviisidest kui ka keskkonnast, kus pinda kasutatakse. Viimane on oluline seetõttu, et mõjutab tugevalt, kui efektiivne pind tegelikult on (Rosenberg et al., 2022).

Käesolevas uurimistöös on kasutatud erineva strateegiaga pinnagrupidest nii kinnitumisvastaseid, biotsiide vabastavaid kui ka kontakttapmise põhimõttel töötavaid pindasid. Biotsiide vabastavate ning kontakttapvate pindadena on kasutatud hõbeda ja vase pindasid ning 15% ja 30% bensalkooniumkloriidi kattega teraspindasid. Lõpuks on kasutatud kinnitumisvastase strateegiaga superhüdrofoobseid pindasid, mille puhul on tegemist teraspindadega, mis on kaetud ränidioksiidi ja alumiiniumoksiidi nanopartiklitega.

1.4.1 Vask

Antimikroobsetest pindadest on ilmselt kõige tuntuim vask. Vaske on kasutatud juba tuhandeid aastaid bakteriaalseid nakkusi inhibeeriva pinnana (Borkow, 2012; O’Gorman & Humphreys, 2012) ja tänapäevalgi rakendatakse metalli erinevates sektorites, nagu veepuhastus (Stout & Yu, 2003) ja meditsiin, eesmärgiga hoida ära bakteriaalset saastet (Salgado et al., 2013; Sifri et al., 2016; Zerbib et al., 2020; von Dessauer et al., 2016). Vask ise on rakkudele vajalik mitmetes elulistest protsessides (Karlin, 1993), aga muutub ohtlikuks suurtes kontsentratsioonides. Metall antimikroobsed omadused tulenevad erinevatest keemilistest reaktsioonidest ning reaktiivsete hapnikuühendite tekkest, põhjustades lipiidide peroksüdatsiooni (Yoshida et al., 1993), membraanikahjustusi (Nan et al., 2008), DNA purunemist (Warnes et al., 2010) ja valkude kahjustumist läbi tiooldisulfiidi keemia (Vieira et al., 1997) ning teiste valkude metalliliste kofaktorite asendamise (Macomber & Imlay, 2009).

1.4.2 Hõbe

Hõbe, sarnaselt vasele, on ajalooliselt oluline antimikroobsete omadustega metall, mille kasulikke tunnuseid on inimesed juba aastasadu kasutanud (Barillo & Marx, 2014; Lemire et al., 2013) ning mis siiani on vase ja tsingi järel üks olulisemaid akadeemilistel eesmärkidel uuritavaid bakterite vastaseid pindasid (Rosenberg et al., 2019). Metall antimikroobsed omadused tulenevalt eelkõige hõbedaioonide vastastikusest mõjust valkude tioolgruppidega,

mis kahjustavad DNA replikatsiooni, hingamisahelat ning prootonite liikumapanevat jõudu ja põhjustavad rakukahjustusi või lausa rakusurma (Bragg & Rainnie, 1974; Dibrov et al., 2002; Feng et al., 2000; Holt & Bard, 2005; Lemire et al., 2013). Arvatakse, et hõbe siseneb rakkudesse, kasutades selleks teiste ühendite transportsüsteeme (Ghandour et al., 1988; Odermatt et al., 1994; Solioz & Odermatt, 1995), kuid kuna metall pole rakkudele eluliselt vajalik, siis pole neil vajalikke viise, et hõbedat uuesti välja transportida või kahjutuks teha. On pakutud, et hõbedat toksilisusel on täpsed sihtmärgid, näiteks glükolüüsi või trikarboksüülhappe tsükli ensüümid, mille mõjutamine viib rakud redutseeriva glüoksülaadi rajale, surudes sellega alla oksüdatiivse stressi vastuseid ja tuues kaasa rakusurma (H. Wang et al., 2019).

1.4.3 Bensalkooniumkloriid

Bensalkooniumkloriid on antimikroobsete omadustega kvaternaarne ammooniumühend, mis töötab efektiivselt nii bakterite, seente kui ka viiruste leviku vastu (Merchel Piovesan Pereira & Tagkopoulos, 2019). Tänapäevaks on kindlaks tehtud, et lisaks planktiliste rakkude tapmisele on bensalkooniumkloriid võimeline hävitama ka bakterite moodustatud biofilmi. Kuigi ühend ei suuda näiteks *Staphylococcus aureus*-e, *Salmonella enterica* või *Listeria monocytogene*-se biofilme täielikult eemaldada, siis vähendab see siiski nende biofilmi massi rohkem kui poole võrra. Oluline on siinkohal mainida, et mida kõrgemat bensalkooniumkloriidi kontsentratsiooni kasutada, seda efektiivsemalt ühend biofilmi vastu toimib (Kovač et al., 2022). Kõrgemad bensalkooniumkloriidi kontsentratsioonid muutuvad aga ohtlikuks ka inimestele (Marple et al., 2004).

1.4.4 Superhüdrofoobsed pinnad

Varasemalt mainitud materjalidest erinevalt ei ole superhüdrofoobsete pindade kasutamise strateegiaks mitte bakterite või nende kolooniate hävitamine, vaid spetsiifiliselt nende pinnale kinnitumise takistamine. Superhüdrofoobsed pinnad on äärmiselt vähe märguvad, mis on oluliseks just bakterite esmasel kinnitumisel. Kui bakterid ei ole võimelised pinda korralikult koloniseerima ja biofilmi moodustumise esimene etapp, pöördub kinnitumine, ei toimu efektiivselt, siis ei ole bakterid võimelised edaspidi biofilmi moodustama (Souza et al., 2020; Subhadra et al., 2018). Seda superhüdrofoobsete pindade omadust on hakatud tänapäeval võitluses biofilmi vastu aktiivselt uurima ning erilist tähelepanu pööratakse just pinnalaengutele ja krobelisusele, et suurendada superhüdrofoobsete pindade kontaktnurka (Shahid et al., 2019). Kontaktnurk tähendab nurka, kus vedeliku-õhu puutepunkt kohtub tahkevedeliku puutepunktiga ning see aitab määrata lameda pinna märguvust (Manoharan & Bhattacharya, 2019; Roach et al., 2008). Kontaktnurga suurendamise abil tõstetakse

hüdrofoobsust, muutes pinnad biofilmi algsele moodustumisele vastuvõtmatumaks (Shahid et al., 2019).

Antimikroobsete pindade efektiivsus ei sõltu aga ainult pinna enda omadustest. Pinna töövõimet ja bakterite ellujäämist mõjutab oluliselt ka keskkond, milles pind viibib. Erinevad keskkonnatingimused, näiteks orgaanikarikkus, võivad oluliselt vähendada paljude pindade efektiivsust mikroobide vastasel kaitsel. Orgaanikarikas keskkonnas ei suuda isegi tugevate antimikroobsete omadustega pind, nagu hõbe, baktereid efektiivselt hävitada. Sama võib öelda vase kohta, mis on samuti efektiivsem tingimustes, kus bakteritel ei ole võimalik toitaineid nii kergelt kätte saada (Kaur et al., 2024).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva uurimustöö põhieesmärkideks oli:

1. analüüsida, kuidas mõjutavad *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 tüve biofilmi moodustumist erineva orgaanikarikkusega keskkonnad;
2. uurida, millised antimikroobsed pinnad suudavad erinevates kasvukeskkondades kõige efektiivsemini *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 tüve biofilmi moodustumist ära hoida.

Töö eesmärkide saavutamiseks oli vaja:

- kasvatada *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 tüve erinevatel antimikroobsetel pindadel ja kontrollpindadel;
- kasutada kasvatamiseks erineva orgaanikarikkusega keskkondi;
- puhastada peale biofilmi kasvatamist kõik pinnad mehhaaniliselt, et teha kindlaks biofilmi moodustanud rakkude arvukus;
- vaadelda pindadel moodustunud biofilme skaneerivas elektronmikroskoobis, et analüüsida biofilmi olemasolu ja omadusi.

2.2 Materjal ja meetodika

2.2.1 Kasutatud bakteritüvi ja kasvatamistingimused

Katsetes kasutatud bakteritüveks oli *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, mis pärines ATCC (American Type Culture Collection) Genome Portal'ist (<https://www.atcc.org/products/15442>). Tüvega töötati kõigis katsetes bioohutuskapis steriilsetes tingimustes.

P. aeruginosa-t säilitati glütseroolis -80° C juures. Enne igat katset külvati bakter välja LB (*Lysogeny* Broth; koostis tabelis 3) tardsöötmele ja kasvatati 37° C juures üleöö.

2.2.2 Pinnad ja pindade ettevalmistus

Kõik katsetes kasutatud pinnad olid 20 mm diameetriga ümarad kupongid. Kupongide paksus erines sõltuvalt materjalist. Teras, bensalkooniumkloriidi, maatriksi ja superhüdrofoobsed pinnad olid kõik paksusega 1,8 mm. Hõbeda pinnad olid paksusega 0,9 mm ning vase pinnad paksusega 1,2 mm. Kõik kasutatud pinnad koos antimikroobse toimeainega, nende

antimikroobne mõjumehhanism, antimikroobse toimeaine kontsentratsioon ja päritolu on esitatud tabelis 1.

Tabel 1. Kasutatud pinnad.

Pind ja seal olev antimikroobne toimeaine	Antimikroobne mõjumehhanism	Antimikroobse toimeaine kontsentratsioon	Pinna päritolu
Roostevaba teras	Puudub	Puudub	Aperam-Stainless, Prantsusmaa
Hõbe	Otsekontaktil ja pinnalt vabanemisel toimiv hõbeioon	99,95%	Surepure Chemetals, USA
Vask	Otsekontaktil ja pinnalt vabanemisel toimiv vaseioon	99%	Metroprint OÜ, Eesti
Maatriks (kahekomponentse lakiga SIRCA S.p.A (Itaalia) kaetud roostevaba teraspind)	Puudub	Puudub	Valmistanud Mati Kook, Tartu ülikool, füüsika instituut
Bensalkooniumkloriid (kahekomponentse laki koostisesse viidud bensalkooniumkloriid, kaetud teraspind)	Otsekontaktil ja pinnalt vabanemisel toimiv bensalkooniumkloriid	15%	Valmistanud Mati Kook, Tartu ülikool, füüsika instituut
Bensalkooniumkloriid (kahekomponentse laki koostisesse viidud bensalkooniumkloriid, kaetud teraspind)	Otsekontaktil ja pinnalt vabanemisel toimiv bensalkooniumkloriid	30%	Valmistanud Mati Kook, Tartu ülikool, füüsika instituut
SiO₂ (50%) + Al₂O₃ (50%) nanopartiklid (superhüdrofoobne, kaetud teraspind)	Hüpoteesi kohaselt kinnitumist takistav superhüdrofoobne pinnakate	-	Valmistanud Franceska Gojda, Teadusuuringute ja Tehnoloogia Sihtasutus Hellas, Kreeka

Pinnad puhastati enne iga katse algust. Metallpinnad desinfitseeriti 70% etanooli sukeldamisega ja seejärel kuivatati bioohutuskapis. Bensalkooniumkloriidi, maatriksi ja superhüdrofoobsed pinnad steriliseeriti UV-valguse käes mõlemalt poolt 15 minutit, kuna etanoolis puhastamisel oleks võinud antimikroobsed katted lahti tulla. Kõik pinnad asetati peale puhastamist 12-kaevulistesse steriilsetesse plaatidesse, kuhu hiljem lisati ka kasvukeskkonna söötmed. Peale kasutamist inaktiveeriti kõik pinnad etanoolis vähemalt 15 minuti jooksul, et hävitada võimalikud pinnale jäänud *P. aeruginosa* rakud.

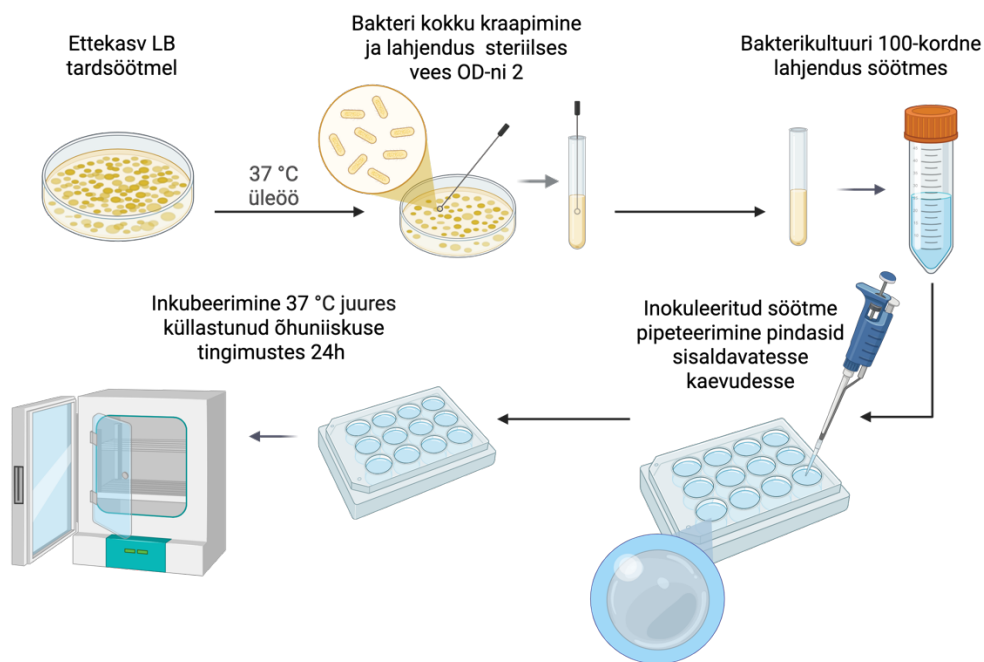
Metallpindade taaskasutamiseks asetati inaktiveeritud pinnad 5% sidrunhappe ja 3,2 mm suuruste klaaskuulidega tsentrifuugi tuubi, raputati 2 minutit, sonikeeriti 15 minutit ja raputati uuesti 2 minutit. Selle järgselt sukeldati pinnad destilleeritud vette loputamiseks. Järgmisena asetati pinnad atsetooni ja 3,2 mm suuruste klaaskuulidega tsentrifuugi tuubi, kus kirjeldatud protsessi korrati. Teostati taaskord destilleeritud vees loputamine ja lõpuks korrati protsessi veel 70% etanooli ja 3,2 mm suuruste klaaskuulidega tsentrifuugi tuubis. Pärast viimast sammu kuivatati pinnad steriilsetes tingimustes bioohutuskapis.

2.2.3 Biofilmi ettekasvatamine

Üleöö LB tardsöötmele ettekasvatatud *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 kraabiti kokku, võeti üles steriilses vees ja lahjendati optilise tiheduseni (*optical density*, OD) 2. Edasi lahjendati bakterikultuur orgaanilises saastelahuses (*soil load*, SL; koostis tabelis 2) või 500 korda lahjendatud toitepuljongis (1:500 *nutrient broth*, NB; koostis tabelis 2) veel 100-korda, saades alginokulumiks OD 0,2 = umbes $2 \cdot 10^7$ CFU/ml ehk kolooniaid moodustavate ühikute arv (*colony forming units*, CFU) milliliitri kohta.

Orgaaniline saastelahus oli kasutusel kui orgaanikarikas kasvukeskkond, kus bakteritel olid üsna optimaalsed tingimused levikuks. 500 korda lahjendatud toitepuljong oli kasutusel kui orgaanikavaene keskkond, milles rakkude levik polnud soodustatud. Kahe keskkonna orgaanikasisalduse vahe oli ligikaudu 262 g/L.

12-kaevulisse steriilsesse plaati koos pindadega pipeteeriti igasse kaevu 4 ml *P. aeruginosa* inokuleeritud kasvukeskkonna söödet. Lisaks bakteriga inokuleeritud söötmele kasutati kontrollina igas katses ilma bakterita söötmeid. Biofilmil lasti kasvada 37° C juures 24 tundi. Biofilmi ettekasvatamine on illustreeritud joonisel 2.



Joonis 2. Biofilmi ettekasvatamine.

Tabel 2. Kasutatud kasvukeskkonnad.

Sööde	Komponendid
Orgaaniline saastelahus (<i>soil load, SL</i>) (EPA, 2022)	Veise seerumalbumiin 2,5 g/L, pärmiekstrakt 3,5 g/L, mutsiin 0,8 g/L, NaCl 6,4 g/L, KCl 0,16 g/L, Na ₂ HPO ₄ 1,152 g/L, KH ₂ PO ₄ 0,16 g/L
500 korda lahjendatud toitepuljong (<i>1:500 nutrient broth, NB</i>) (ISO, 2011))	Lihaekstrakt 0,006 g/L, peptoon 0,02 g/L, NaCl 0,01 g/L

Iga pinnaga viidi mõlemas keskkonnas läbi kolm sõltumatut katset, kõik neist kolme paralleeliga. Igas katses oli kõikidele pinnatüüpidele lisatud üks kontrollpind, kus kasvukeskkonna söötmesse bakterit ei lisatud.

2.2.4 Biofilmi hulga hindamine

Peale 24-tunnist orgaanikarikkas või orgaanikavaeses kasvusöötmes inkubeerimist võeti pinnad ükshaaval pintsettidega oma kasvukeskkonnast välja ja puhastati uues 12-kaevulises plaadis 4 ml-is ühekordses fosfaatpuhvrts (phosphate buffered saline, PBS; koostis tabelis 3), iga pind oma kaevus. Peale fosfaatpuhvrts loputamist asetati pinnad 15 ml-sse toksilisust

neutraliseerivasse söötmesse koos 1,5 M NaCl-ga (*soy casein digest broth with lecithin and polysorbate*, SCDLP + 1,5 M NaCl; koostis tabelis 3). 1,5 M NaCl lisamine söötmesse oli vajalik biofilmi rakkude pinnalt mahapesemiseks. Varem on näidatud, et see tekitab rakkudele osmootse šoki, mis ei tapa rakke, kuid aitab neil läbi raku suuruse muutmise biofilmi maatriksist vabaneda (Chiba et al., 2015). Iga pinna loputamise ning ümber tõstmise vahel desinfitseeriti pintsetid puhtuse tagamiseks 70% etanoolis. Seejärel kasteti pintsetid kuivamise kiirendamiseks 96% etanooli ning kuivatati bioohutuskapis.

Pinnad vortekseeriti tsentrifuugi tuubides toksilisust neutraliseerivas söötmes koos 1,5 M NaCl-ga maksimaalsel intensiivsusel 30 sekundit, sonikeeriti 15 minutit ja vortekseeriti uuesti maksimaalsel intensiivsusel 30 sekundit, et rakud pinnalt lahti pesta. Saadud suspensioonidest tehti 96-kaevulisse mikrotiiterplaati kümnekordsete lahjenduste rida ühekordses fosfaatpuhvril, saamaks biofilmi moodustanud rakkude arvukused. Samasugune kümnekordsete lahjenduste rida ühekordses fosfaatpuhvril tehti 96-kaevulisse mikrotiiterplaati ka 12-kaevulises plaadis alles jäänud vedelast kasvukeskkonna söötmest, kus pindasid oli inkubeeritud, et saada võrdluseks planktiliste rakkude arvukuse osas infot.

Kõik saadud lahjendused külvati tilkkülviga 20 µl kogustes LB tardsöötmele. Külvatud tardsöötme plaate inkubeeriti 37° C juures üleöö ja loeti rakuarvukused.

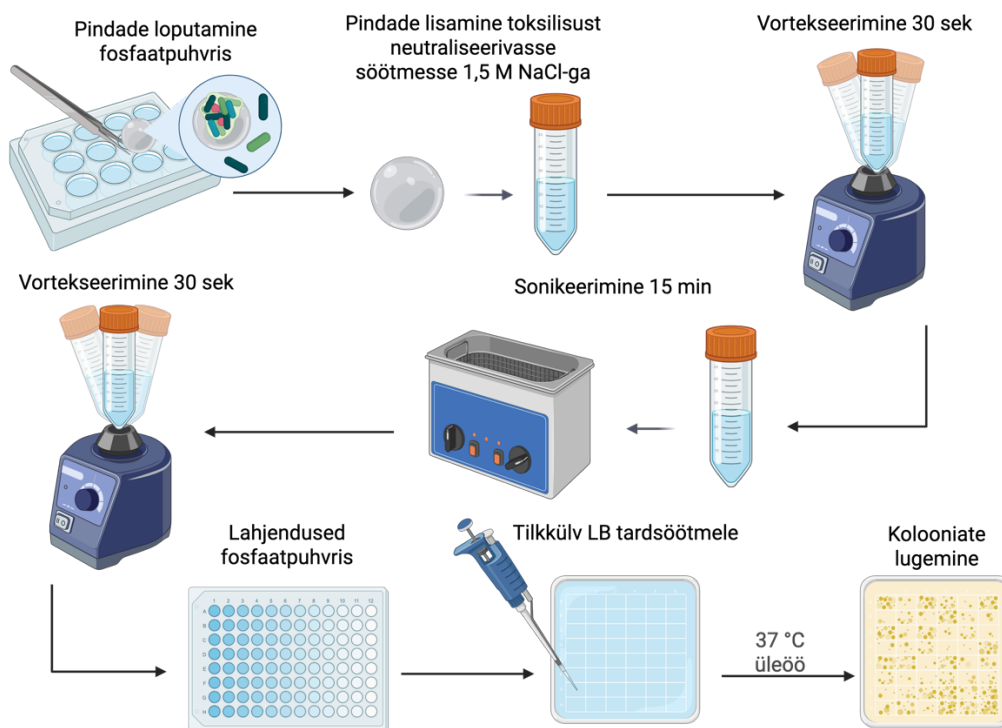
Planktiliste rakkude arvukuse saamiseks arvutati kolooniaid moodustavate ühikute arv milliliitri kohta. Selleks kasutati valemit

$$\text{CFU/ml} = \text{kolooniate arv} \times 10^{\text{lahjendus}} \times \frac{1000 \mu\text{l}}{20 \mu\text{l}}$$

Biofilmi rakkude arvukuse saamiseks arvutati kolooniaid moodustavate ühikute arv pinna kohta. Selleks kasutati valemit

$$\text{CFU/pind} = \text{kolooniate arv} \times 10^{\text{lahjendus}} \times \frac{15\,000 \mu\text{l}}{20 \mu\text{l}}$$

Biofilmi hulga hindamine on illustreeritud joonisel 3.



Joonis 3. Biofilmi hulga hindamine.

Tabel 3. Kasutatud söötmed ja lahused.

Sööde/lahus	Komponendid
Fosfaatpuhver (<i>phosphate buffered saline, PBS</i>)	NaCl 8 g/l; KCl 0,2 g/l; Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 0,81 g/l; KH ₂ PO ₄ 0,2 g/l, pH 7,1
Toksilisust neutraliseeriv sööde (<i>soy casein digest broth with lecithin and polysorbate, SCDLP</i>) + 1,5 M NaCl	Letsitiin 1g/L, kaseiinpepton 17 g/L, sojapepton 3 g/L NaCl 5 g/L, Na ₂ HPO ₄ 2,5 g/L, glükoos 2,5 g/L, TWEEN® 80 7 g/L, NaCl 87,66 g/l
LB (<i>Lysogeny Broth</i>) tardsööde	Trüpton 10 g/l, pärmiekstrakt 5 g/l, NaCl 5 g/l, agar 15 g/l

2.2.5 Kontaktnurkade mõõtmine

Katsetes kasutatud pindade iseloomustamiseks hinnati pindade hüdrofoobsust-hüdrofiilsust kontaktnurga mõõtmise meetodil. Selleks asetati igale pinnale erinevatesse punktidesse neli veetilka, tilgad pildistati ükshaaval ning hiljem mõõdeti piltidelt kontaktnurga suurus ImageJ pistikprogrammiga Contact Angle (<https://imagej.net/ij/plugins/contact-angle.html>). Superhüdrofoobse pinna kontaktnurga mõõtsid varasemalt pinna valmistanud

koostööpartnerid. Pind liigitati hüdrofoobseks, kui selle kontaktnurk oli üle 90 kraadi (Jhaveri & Murthy, 2016) ning superhüdrofoobseks, kui selle kontaktnurk ulatus 150-kraadini või kõrgemale (Roy et al., 2020).

2.2.6 Statistika

Tulemuste statistiliseks analüüsiks kasutati GraphPad Prism 10.4.2 tarkvarapaketti (GraphPad Software Inc., USA). Rakuarvukused transformeeriti analüüsi tarbeks \log_{10} vormi. Statistiliselt oluliste erinevuste määramiseks rakendati kahefaktorilist dispersioonianalüüsi (*analysis of variance*, ANOVA) koos Tukey *post-hoc* testiga. Superhüdrofoobsete pindade andmete analüüsimiseks rakendati kahefaktorilist dispersioonianalüüsi koos Fisheri vähima olulise erinevuse *post-hoc* testiga. Kõikide testide puhul oli usaldusnivooks $\alpha=0,05$.

2.2.7 Biofilmi visualiseerimine skaneerivas elektronmikroskoobis

Pindadel kasvanud biofilmi visualiseerimiseks kasvatati *P. aeruginosa* biofilm sama protokollil alusel, nagu varasemalt kirjeldatud (peatükk 2.2.3).

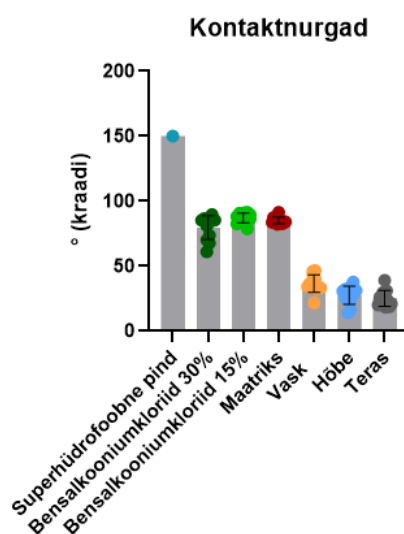
Biofilmiga pindade fikseerimiseks eemaldati pindadelt kasvusööde ning planktilised bakterid ja pinnad pesti ühekordses fosfaatpuhvril. Seejärel lisati pindadele 4% glutaaraldehüüdi ja 2% paraformaldehüüdi segu 0,1 M naatrium-kakodülaat puhvril, pH 7,4. Fikseerimiskeskonda lisati ka 1%-line tanniinhape ja 0,15%-line ruteeniumpunane. Glutaaraldehüüd ja paraformaldehüüd olid segus valkude fikseerimiseks ning tanniinhape ja ruteeniumpunane sahhariidide fikseerimiseks. Naatrium-kakodülaat puhver aitas säilitada segu pH-d. Pindasid fikseeriti esialgu 48 tundi toatemperatuuril ning hiljem veel nädal aega 4° C juures. Fikseeritud pinnad pesti kahel korral naatrium-kakodülaat puhvril. Seejärel teostati järelfikseerimine 1% osmiumtetroksiidiga 0,1% naatrium-kakodülaat puhvril. Järelfikseerimine oli vajalik lipiidide fikseerimiseks ja toimus 2 tunni jooksul toatemperatuuril. Hiljem pesti pinnad taas kaks korda naatrium-kakodülaat puhvril, misjärel pesti pinnad kiiresti 50% ja siis 100% etanoolis ning kuivatati toatemperatuuril tõmbekapis. Kasutatud fikseerimismeetod teostati mõningate muudatustega vastavalt varasemalt väljatöötatud fikseerimisprotokollile (Fleeman et al., 2023). Mikroskoopimise viisid läbi laborant Mati Kook (Tartu Ülikooli füüsika instituut) ja professor Angela Ivask. Mikroskoopimiseks kaeti pinnad 3-nanomeetrise kullakihi, mis oli vajalik proovi juhtivuseks ning kasutati Nova NanoSEM elektronmikroskoopi 10 000-kordse suurendusega. Mikroskoopimise käigus tehti pildid küpse biofilmiga pindadest ning puhastest kontrollpindadest.

2.3 Tulemused

Uurimaks, kuidas mõjutab keskkonna orgaanikasisaldus antimikroobsete pindade võimet biofilmi ära hoida, ning millised antimikroobsed pinnad võiksid olla efektiivseimad biofilmi inhibeerimises, mõõdeti biofilmi moodustumist antimikroobsetel pindadel ja kontrollpindadel erineva orgaanikasisaldusega keskkondades.

2.3.1 Kontaktnurgad

Esmaseks pindade iseloomustamiseks määrati kõikide kasutatud pindade veetilga kontaktnurgad. Kuna kontaktnurga väärtus näitab pinna paiknemist hüdrofoobsuse-hüdrofiilsuse skaalal, siis pidi see eeldatavalt andma infot ka bakterite ja pinna vaheliste interaktsioonide kohta. Töös uuritud pindade kontaktnurkade mõõtmise tulemusena (joonis 4) selgus, et teraspinna kasutamine vase ja hõbeda pinna kontrollina oli õigustatud. Lisaks oli kontaktnurk sarnane maatriksi ning samas kahekomponentses lakis valmistatud bensalkooniumkloriidi pindade vahel, mis kinnitas ka maatriksi pindade sobivust kontrollpinnana. Kõikide mainitud pindade kontaktnurk jäi aga alla 90 kraadi, mistõttu võis neid klassifitseerida hüdrofiilseteks. 90-kraadile lähima väärtusega oli 15% bensalkooniumkloriidi pind, mille keskmine kontaktnurga väärtus oli 87 kraadi. Ainus hüdrofoobne pind, mille kontaktnurk oli üle 90 kraadi, oli spetsiaalselt valmistatud superhüdrofoobne pind. Tegemist ei olnud lihtsalt hüdrofoobse pinnaga, vaid superhüdrofoobsega, kuna kontaktnurk oli 150 kraadi, millest alates algab superhüdrofoobsuse klassifikatsioon.



Joonis 4. Pindade kontaktnurgad. Joonisel on näidatud kõigi katsetes kasutatud pindade kontaktnurkade väärtused. Andmepunktid on esitatud kraadidena.

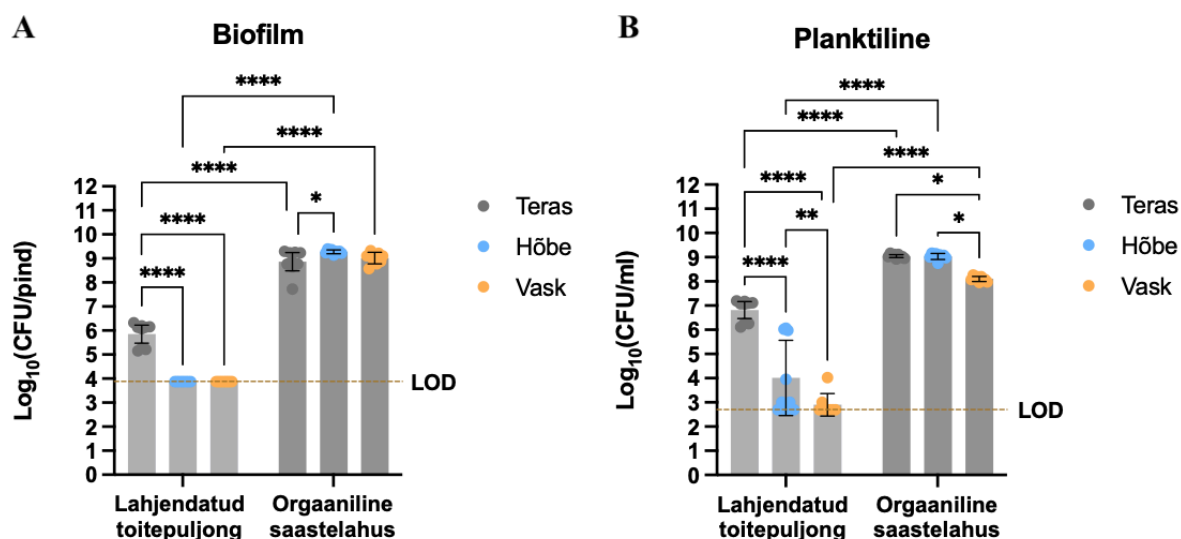
2.3.2 Hõbeda ja vase mõju biofilmi moodustumisele

Orgaanikavaeses keskkonnas (500 korda lahjendatud toitepuljongis) hoidsid nii hõbeda kui vase pinnad efektiivselt ära biofilmi moodustumise (joonis 5A). Pinnalt maha pestud rakkude arvukusena mõõdetud biofilmi hulk oli terasest kontrollpinnal ligikaudu 10^6 elusrakku, aga jäi vase ja hõbeda pinnal enamikes katsetes alla detekteerimiskiir. Biofilmi katses oli detekteerimiskiir (*limit of detection*, LOD) $10^{3.8}$ CFU-d pinna kohta ehk 6310 CFU-d pinna kohta ja tulemuste puhul, kus rakuarvukus jäi alla detekteerimiskiiri, kasutati detekteerimiskiiri väärtust.

Orgaanikarikas keskkonnas (orgaanilises saastelahuses) ei suutnud vase ega hõbeda pind takistada biofilmi moodustumist (joonis 5A). Terasel, hõbeda ja vase pinnal oli mõõdetud biofilmi moodustanud rakkude hulk sarnane, jäädes kõigil pindadel ligikaudu 10^9 elusraku väärtuse juurde.

Orgaanikavaeses keskkonnas oli planktiliste bakterite arvukus hõbeda ja vase pindasid sisaldavates söötmetes langenud (joonis 5B). Võrreldes tulemusi terase pinda sisaldava orgaanikavaese söötmega, oli hõbeda pinda sisaldavas orgaanikavaeses söötmes planktiliste rakkude keskmine arvukus umbes 1000 korda väiksem ja vase pinda sisaldavas orgaanikavaeses söötmes umbes 10 000 korda väiksem. See oli tõenäoliselt põhjustatud sellest, et hõbeda ja vase pindadelt vabanevad ioonid takistasid bakterite kasvu või tapsid neid ümbritsevas söötmes.

Orgaanikarikas keskkonnas oli planktiliste bakterite arvukus erinevaid pindasid sisaldavates söötmetes sarnane (joonis 5B). Hõbeda pind ei vähendanud planktiliste rakkude arvukust, kuid huvitaval kombel oli vase pinnal väike negatiivne efekt bakterite arvukusele. See erines biofilmi katse tulemustest, kus vase pinnal oli võrreldes terasega sarnane hulk biofilmi moodustavaid baktereid (joonis 5A).



Joonis 5. A Biofilmi moodustumine ning B planktiline rakuarvukus terasel, hõbedal ja vasel. Joonistel on toodud korduskatsete keskmiste rakuarvukuste väärtused \log_{10} skaalal. Biofilmi katses on skaala mõõtühikuks kolooniaid moodustavad ühikud (*colony forming units*, CFU) pinna kohta ning planktiliste rakkude katses milliliitri kohta. Tulemuste statistilisel analüüsil kasutati kahefaktorilist dispersioonianalüüsi koos Tukey *post-hoc* testiga. Joonistel on märgitud statistiliselt olulised erinevused * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ ja **** $P < 0,0001$. Detekteerimispiir (*limit of detection*, LOD) on biofilmi katses $10^{3,8}$ CFU-d pinna kohta ja planktiliste rakkude katses $10^{2,77}$ CFU/ml.

2.3.3 Bensalkooniumkloriidi mõju biofilmi moodustumisele

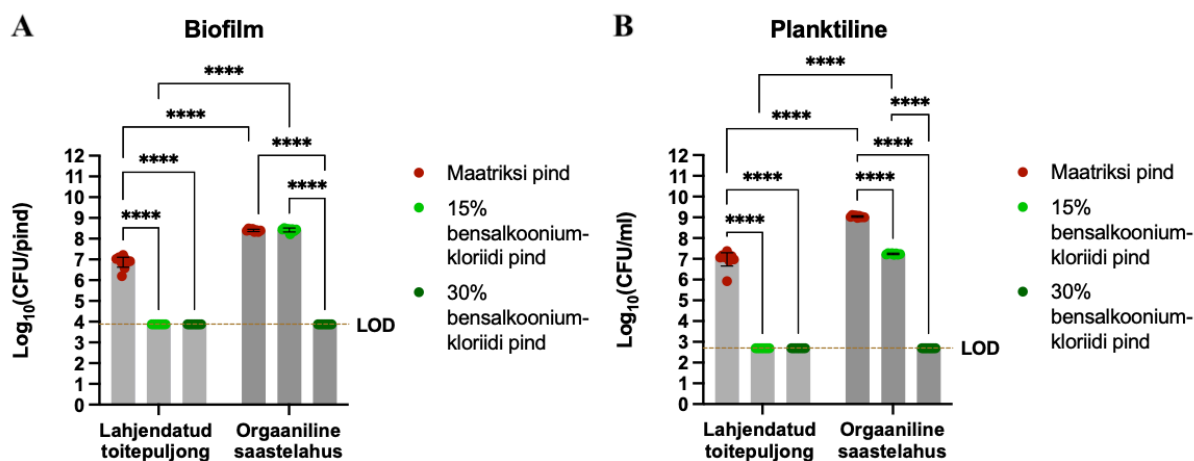
Orgaanikavaeses keskkonnas (500 korda lahjendatud toitepuljongis) toimised 15% bensalkooniumkloriidi ning 30% bensalkooniumkloriidi pinnad äärmiselt efektiivselt, takistades biofilmi moodustumist (joonis 6A). Võrreldes kontrollpinna maatriksiga, millelt maha pestud biofilmi moodustavate elusrakkude arv jäi 10^7 juurde, oli mõlemal bensalkooniumkloriidi pinnal biofilmi moodustavate elusrakkude arvukus alla detekteerimispiiri ($10^{3,8}$ CFU-d pinna kohta ehk 6310 CFU-d pinna kohta).

Orgaanikarikkas keskkonnas (orgaanilises saastelahuses) ei suutnud 15% bensalkooniumkloriid takistada biofilmi moodustumist (joonis 6A). Nii maatriksi kui 15% bensalkooniumkloriidi pinnal jäid biofilmi moodustavate rakkude arvukused 10^9 väärtuse juurde. Seevastu 30% bensalkooniumkloriidi pind töötas orgaanikarikkas söötmes täpselt sama efektiivselt, kui orgaanikavaeses söötmes ning biofilmi moodustavate elusrakkude arv jäi alla detekteerimispiiri.

Orgaanikavaeses keskkonnas oli planktiliste rakkude arvukus 15% bensalkooniumkloriidi ja 30% bensalkooniumkloriidi pindasid sisaldavates söötmetes alla detekteerimispiiri (joonis 6B). Planktiliste rakkude puhul oli detekteerimispiiri väärtuseks $10^{2,77}$ CFU/ml ehk 589 CFU/ml.

Maatriksiga kaetud kontrollpinda sisaldavas orgaanikavaeses söötmes oli planktiliste rakkude arvukus ligikaudu 10^7 CFU/ml.

Orgaanikarikas keskkonnas oli 15% bensalkooniumkloriidi pinda sisaldavas söötmes planktiliste rakkude hulk umbes 100 korda madalam, kui maatriksi pinda sisaldavas söötmes, kuid oluliselt, vähemalt 10 000 korda kõrgem, kui 30% bensalkooniumkloriidi pinda sisaldavas söötmes (joonis 6B).



Joonis 6. A Biofilmi moodustumine ning B planktiline rakuarvukus maatriksi, 15% bensalkooniumkloriidi ja 30% bensalkooniumkloriidi pinnal. Joonistel on toodud korduskatsete keskmiste rakuarvukuste väärtused \log_{10} skaalal. Biofilmi katses on skaala mõõtühikuks kolooniaid moodustavad ühikud (*colony forming units*, CFU) pinna kohta ning planktiliste rakkude katses milliliitri kohta. Tulemuste statistilisel analüüsil kasutati kahefaktorilist dispersioonanalüüsi koos Tukey *post-hoc* testiga. Joonistel on märgitud statistiliselt olulised erinevused **** $P < 0,0001$. Detekteerimispiir (*limit of detection*, LOD) on biofilmi katses $10^{3,8}$ CFU-d pinna kohta ja planktiliste katses $10^{2,77}$ CFU/ml.

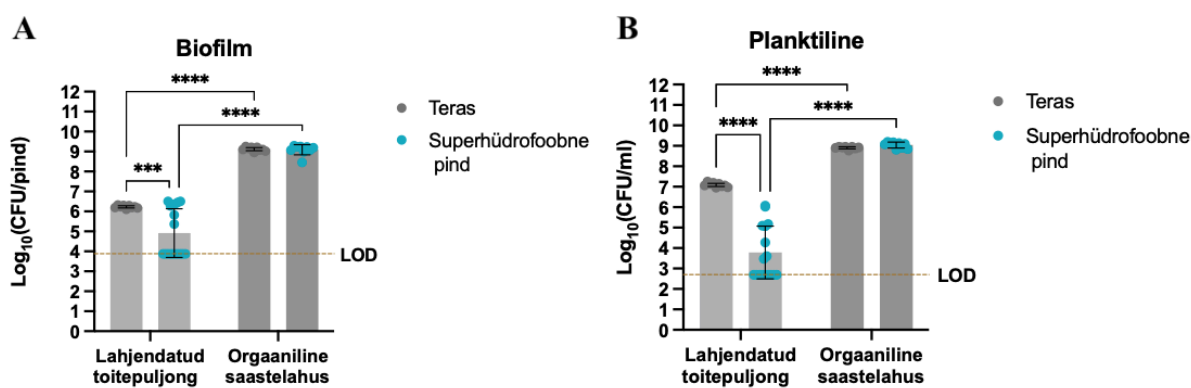
2.3.4 Superhüdrofoobse pinna mõju biofilmi moodustumisele

Orgaanikavaeses keskkonnas (500 korda lahjendatud toitepuljongis) erines superhüdrofoobsel pinnal biofilmi moodustavate elusrakkude arv terase pinnal biofilmi moodustavate elusrakkude arvust (joonis 7A). Kui terase pinnal biofilmi moodustavate elusrakkude arvukus jäi 10^6 juurde, siis superhüdrofoobsel pinnal biofilmi moodustavate elusrakkude arvukus kõikus suurel määral, jäädes teatud katsetes alla detekteerimispiiri ($10^{3,8}$ CFU-d pinna kohta ehk 6310 CFU-d pinna kohta) ning sarnanedes teistes katsetes terase pinna rakuarvukusele. Superhüdrofoobne pind tõenäoliselt ei takistanud bakterite kinnitumist ega biofilmi moodustumist, nagu eeldatud, vaid vähendas rakuarvukust. Sarnaselt biofilmi katsele oli planktiliste rakkude arvukus osade superhüdrofoobse pinnaga söötme katsetes alla detekteerimispiiri ($10^{2,77}$ CFU/ml ehk 589 CFU/ml) ja teistes võrreldav terase pinnaga ehk umbes 10^7 CFU/ml (joonis 7B). Katsetes ei olnud pindade vähesuse tõttu võimalik kindlaks teha, kas rakkude kasvu takistasid

superhüdrofoobse pinna kattes olevad ränidioksiidi või alumiiniumoksiidi nanopartiklid või oli inhibitsiooni põhjus hoopis milleski muus.

Orgaanikarikas keskkonnas (orgaanilises saastelahuses) olid superhüdrofoobselt pinnalt ja terase pinnalt maha pestud biofilmi moodustavate elusrakkude väärtused võrdväärsed (joonis 7A). Mõlemal puhul jäi rakkude arvukus umbes 10^9 väärtuse juurde ning testpinnana kasutatud superhüdrofoobne pind biofilmi moodustumist pärssivaid omadusi ei näidanud.

Orgaanikarikas keskkonnas olid superhüdrofoobset pinda sisaldavas söötmes ja terase pinda sisaldavas söötmes planktilised rakuarvukused võrdväärsed (joonis 7B), nagu ka sama söötme biofilmi katses (joonis 7A). Täpselt, nagu biofilmi katses, jäid rakkude arvukused mõlemat pinda sisaldavates söötmetes 10^9 juurde ehk mingit inhibitsiooni ei toimunud.

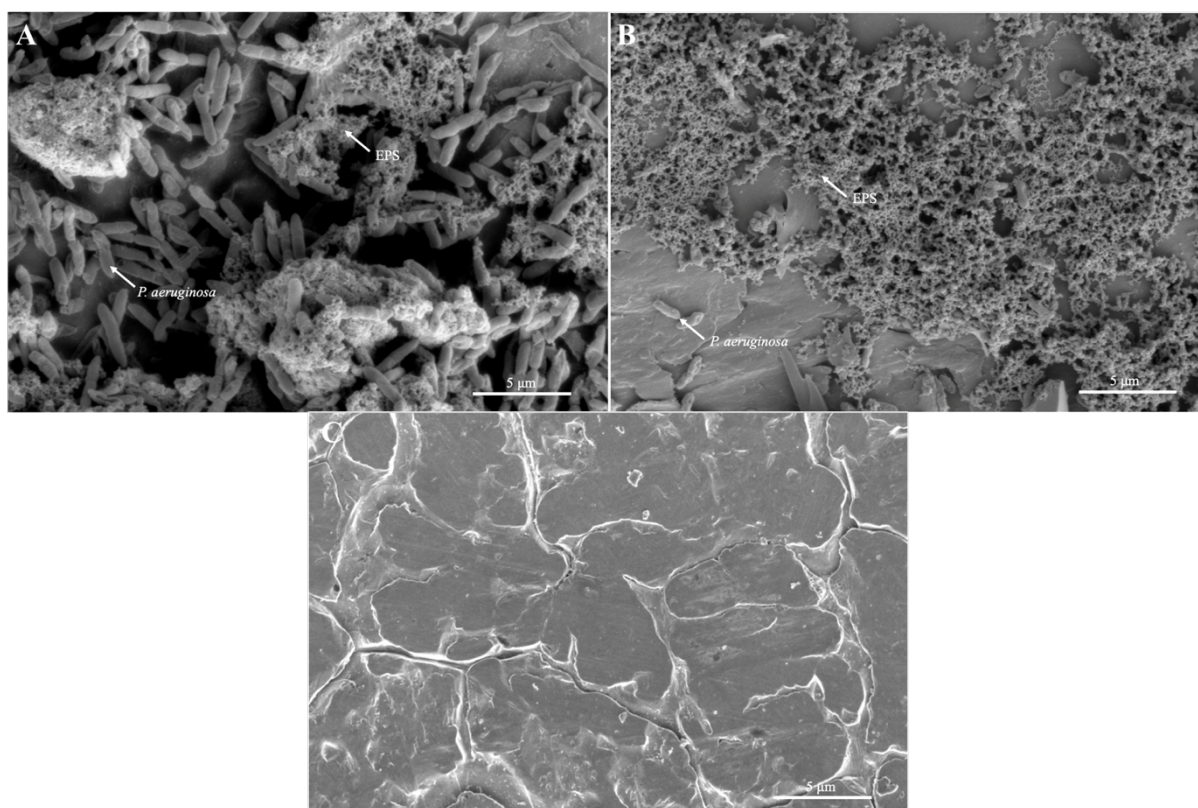


Joonis 7. A Biofilmi moodustumine ning B planktiline rakuarvukus terasel ja superhüdrofoobsel pinnal. Joonistel on toodud korduskatsete keskmiste rakuarvukuste väärtused \log_{10} skaalal. Biofilmi katses on skaala mõõtühikuks kolooniaid moodustavad ühikud (*colony forming units*, CFU) pinna kohta ning planktiliste rakkude katses milliliitri kohta. Tulemuste statistilisel analüüsil kasutati kahefaktorilist dispersioonianalüüsi koos Fisheri vähima olulise erinevuse *post-hoc* testiga. Joonistel on märgitud statistiliselt olulised erinevused *** $P < 0,001$ ja **** $P < 0,0001$. Detekteerimispiir (*limit of detection*, LOD) on biofilmi katses $10^{3,8}$ CFU-d pinna kohta ja planktiliste katses $10^{2,77}$ CFU/ml.

2.3.5 Biofilmi visualiseerimine

Kuna pindade biofilmi moodustumise vastase efektiivsuse mõõtmiseks kasutati meetodit, kus pinnalt pesti biofilm maha ja loendati elusrakkude arvukus, siis sooviti kontrollida, kas pinnal moodustus kindlasti biofilm ja ei toimunud bakterite ebspetsiifiline pinnale settimine. Skaneerivat elektronmikroskoopi kasutades saadi pildid 500 korda lahjendatud toitepuljongis ja orgaanilises saastelahuses biofilmi moodustavatest rakkudest kõigil pindadel. Lisaks bakteritega inokuleeritud söötmetega pindadele tehti pildid ka puhastest pindadest.

Roostevaba terase pinnal võib skaneeriva elektronmikroskoobi piltidel nii orgaanikarikkas (orgaanilises saastelahuses, joonis 8A) kui orgaanikavaeses (500 korda lahjendatud toitepuljongis, joonis 8B) keskkonnas näha biofilmi moodustumist. Mõlemas keskkonnas on moodustunud hulgaliselt ekstratsellulaarseid polümeerseid aineid. Eeskätt orgaanikarikkas keskkonnas (joonis 8A) võib märgata pinnal paksu kihina väljakujunenud biofilmi, mille sügavust on näha struktuuri pragunemisel.

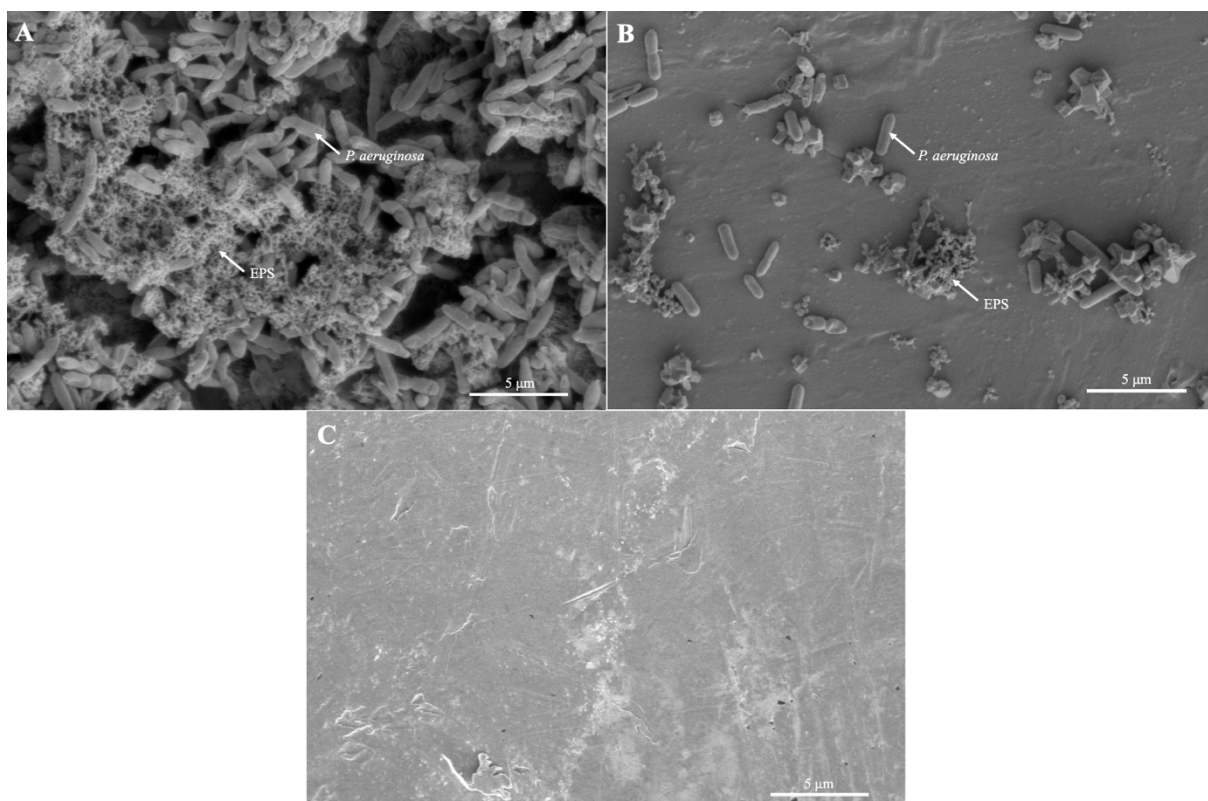


Joonis 8. Skaneeriva elektronmikroskoobi abil 10 000 korda suurendatud foto terase pinnast A orgaanilises saastelahuses moodustunud biofilmiga, B lahjendatud toitepuljongis moodustunud biofilmiga ja C ilma bakterita pinnast. Joonisel on esitatud mõõtkavad, nooltega on näidatud ekstratsellulaarsed polümeerseid ained (*extracellular polymeric substances*, EPS) ja *Pseudomonas aeruginosa*.

Hõbeda pinnal on skaneeriva mikroskoobi piltidel orgaanikarikkas keskkonnas (orgaanilises saastelahuses) näha hulgaliselt moodustunud biofilmi (joonis 9A). Biofilmis on rakud ka hõbeda pinnal moodustanud tiheda ühtlase kihi, mis pinda katab. Ekstratsellulaarseid polümeerseid aineid esineb sarnaselt terase pinnale suures koguses.

Orgaanikavaeses keskkonnas (500 korda lahjendatud toitepuljongis) on hõbeda pinnal moodustunud märkimisväärselt vähem biofilmi, kui rikkas keskkonnas (joonis 9A ja B). Ometi on biofilm ja pinnale kinnitunud rakud siiski olemas, mida ei näidanud varasemate katsete tulemused (joonis 5A), kus biofilmi elusrakkude hulk jäi alla detekteerimispiiri. Tegemist võib

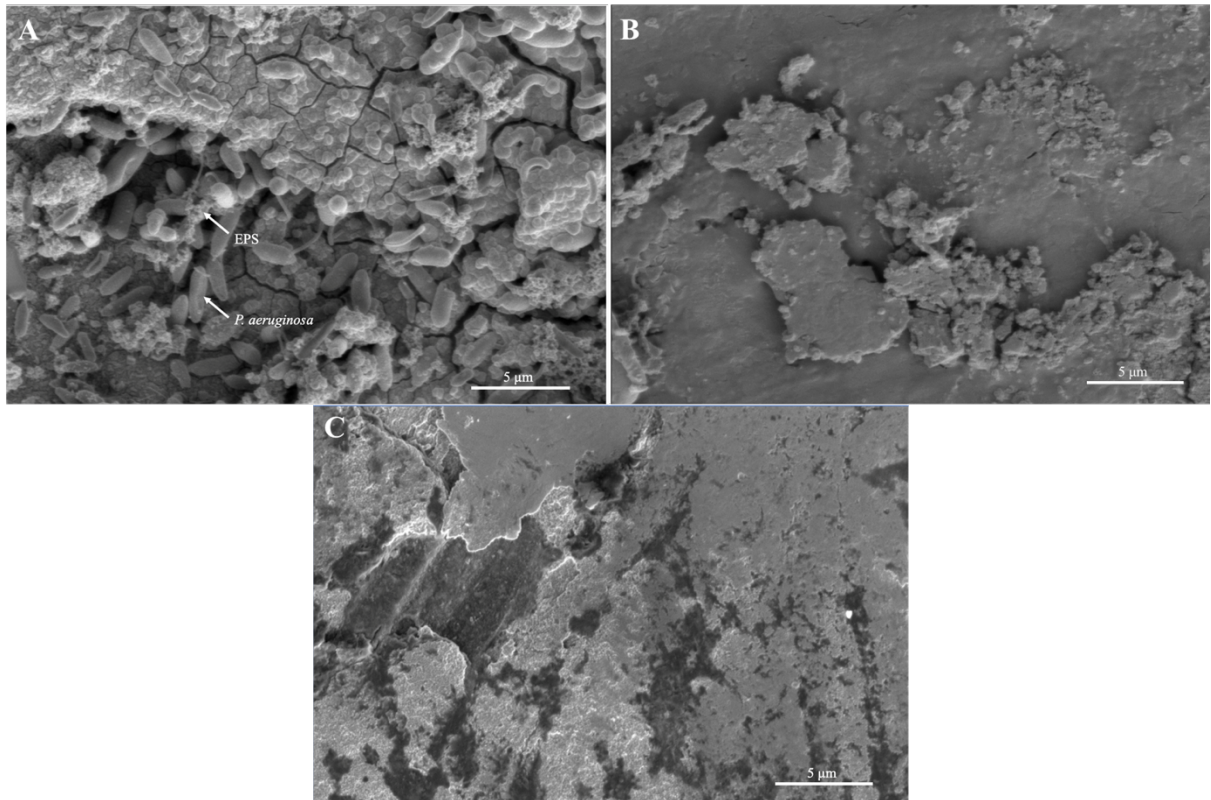
olla surnud rakkudega või on rakud nii tugevalt pinnale kinnitunud, et neid ei ole võimalik biofilmi arvukuse määramiseks maha pesta.



Joonis 9. Skaneeriva elektronmikroskoobi abil 10 000 korda suurendatud foto hõbeda pinnast A orgaanilises saastelahuses moodustunud biofilmiga, B lahjendatud toitepuljongis moodustunud biofilmiga ja C ilma bakterita pinnast. Joonisel on esitatud mõõtkavad, nooltega on näidatud ekstratsellulaarsed polümeersed ained (*extracellular polymeric substances*, EPS) ja *Pseudomonas aeruginosa*.

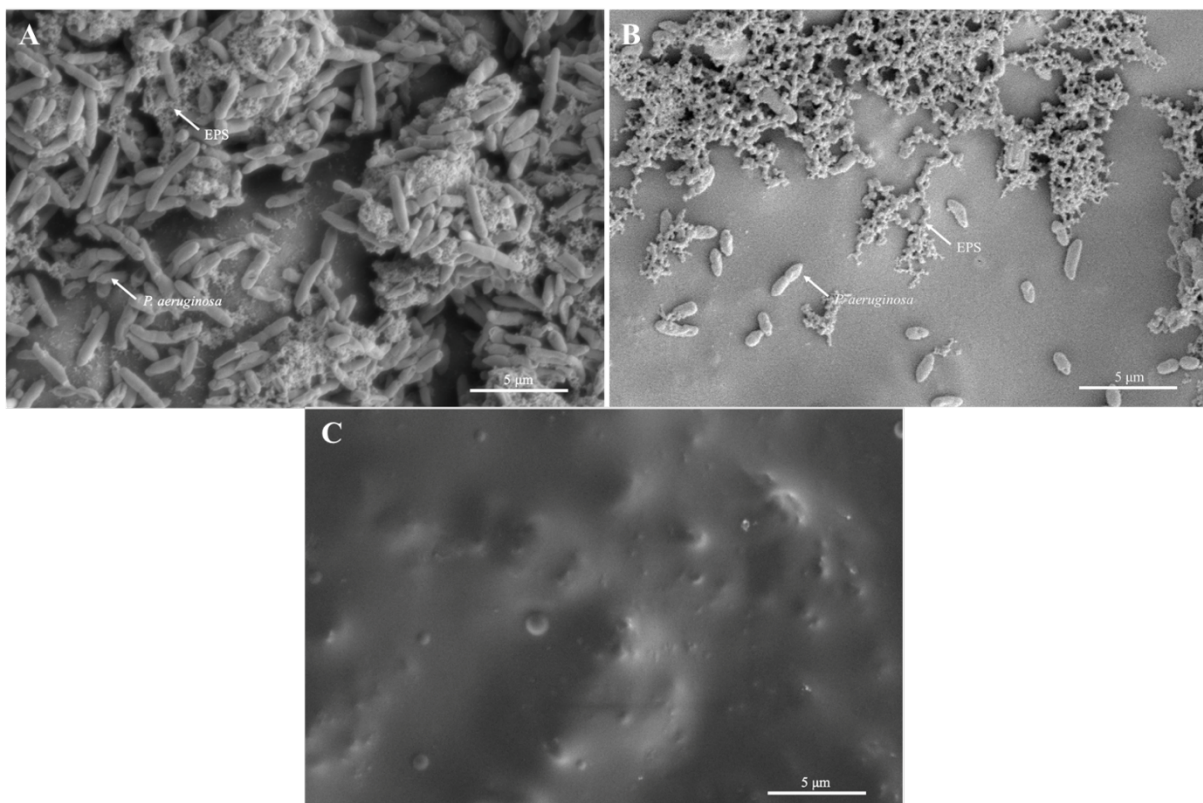
Vase pinnal esineb orgaanikarikas keskkonnas (orgaanilises saastelahuses) bakterite kõrge arvukus ja biofilmi moodustumise määr (joonis 10A). Vähem, kui hõbeda või terase pindadel, võib märgata ekstratsellulaarseid polümeerseid aineid. Nagu teistel metallpindadel, esineb ka vase pinnal biofilmi vorm, milles *P. aeruginosa* bakterid funktsioneerivad ühtlase tiheda kihina ning palju on näha biofilmi pragunemist, mis paljastab struktuuri paksuse.

Orgaanikavaeses keskkonnas (500 korda lahjendatud toitepuljongis) esineb vase pinnal ilmselt biofilmi ja bakterite jäänuseid (joonis 10B) ning varasemast on teada, et biofilmi pinnalt mahapesemise katsetes (joonis 5A) oli sellistel pindadel elusrakke alla detekteerimispiiri. Seega võib skaneerivas elektronmikroskoobis olla tegemist surnud rakkudega või on rakud nii tugevalt pinnale kinnitunud, et neid ei ole võimalik biofilmi arvukuse määramiseks maha pesta.



Joonis 10. Skaneeriva elektronmikroskoobi abil 10 000 korda suurendatud foto vase pinnast A orgaanilises saastelahuses moodustunud biofilmiga, B lahjendatud toitepuljongis moodustunud biofilmiga ja C ilma bakterita pinnast. Joonisel on esitatud mõõtkavad, nooltega on näidatud ekstratsellulaarsed polümeersed ained (*extracellular polymeric substances*, EPS) ja *Pseudomonas aeruginosa*.

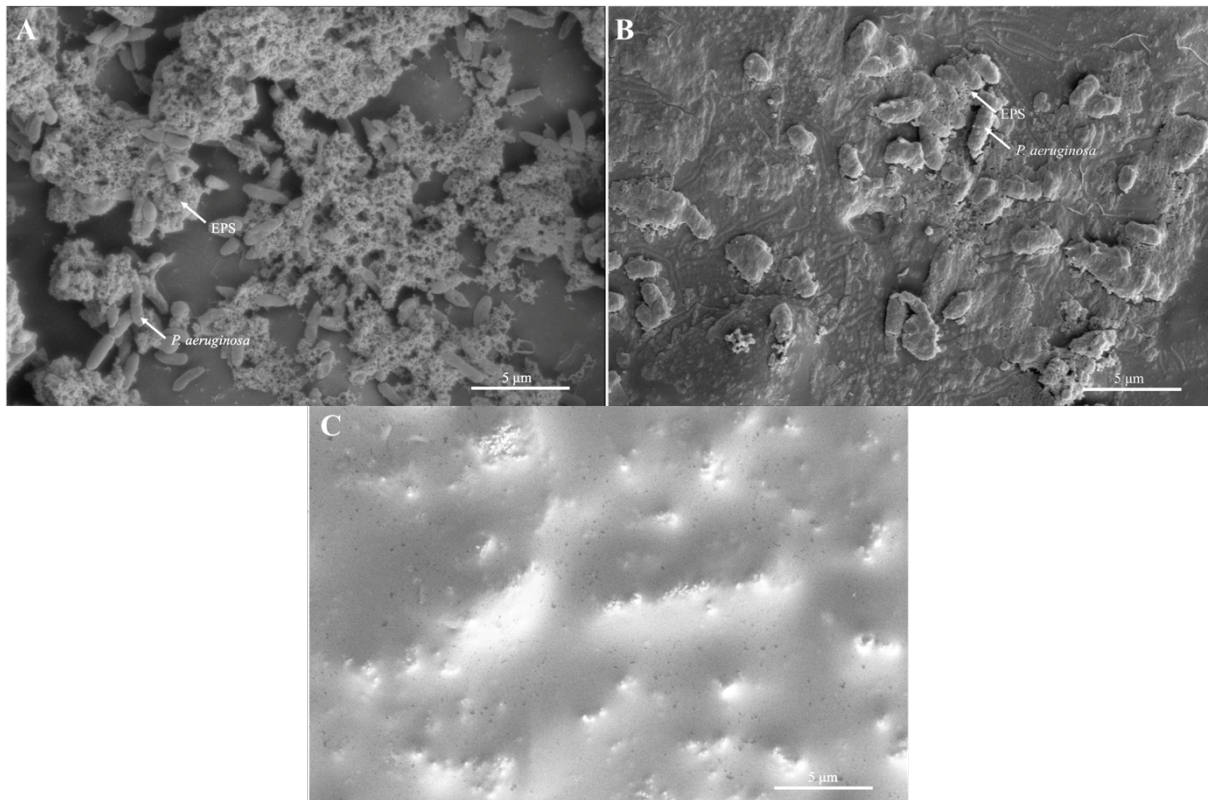
Sarnaselt teisele antimikroobsete omadusteta kontrollpinnale, terasele, esineb maatriksi pinnal suur *P. aeruginosa* arvukus ning kõrge biofilmi moodustumise määr nii rikkas (orgaanilises saastelahuses, joonis 11A) kui vaeses (500 korda lahjendatud toitepuljongis, joonis 11B) keskkonnas. Maatriksi pinnal on mõlemas keskkonnas näha suurt ekstratsellulaarsete polümeersete ainete hulka.



Joonis 11. Skaneeriva elektronmikroskoobi abil 10 000 korda suurendatud foto maatriksi pinnast A orgaanilises saastelahuses moodustunud biofilmiga, B lahjendatud toitepuljongis moodustunud biofilmiga ja C ilma bakterita pinnast. Joonisel on esitatud mõõtkavad, nooltega on näidatud ekstratsellulaarsed polümeersed ained (*extracellular polymeric substances*, EPS) ja *Pseudomonas aeruginosa*.

Orgaanikarikas keskkonnas (orgaanilises saastelahuses) on 15% bensalkooniumkloriidi pinnal näha moodustunud biofilmi ja arvestataval hulgal elusrakke (joonis 12A). Esineb suures hulgas ekstratsellulaarseid polümeerseid aineid.

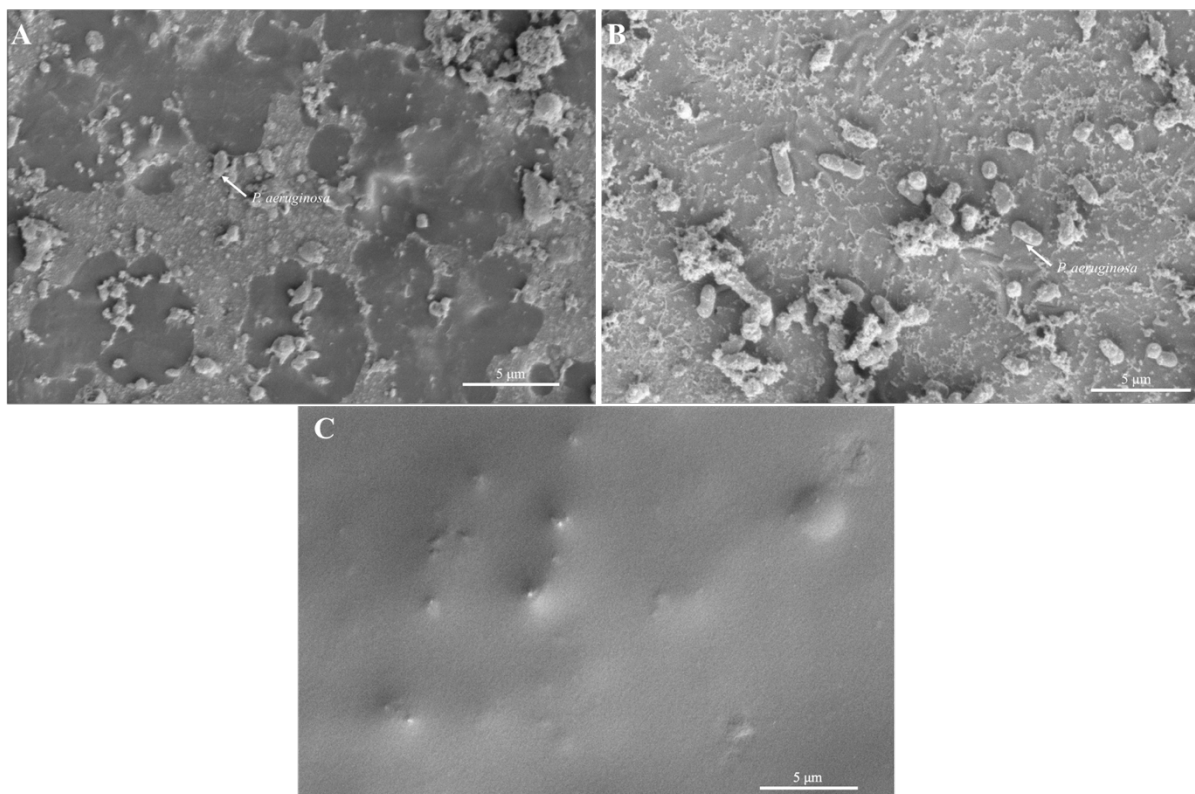
Orgaanikavaeses keskkonnas (500 korda lahjendatud toitepuljongis) on näha arvatavaid biofilmi jäänuseid (joonis 12B). Sellistelt pindadelt leiti biofilmi mahapesemisel detekteerimispiiri juures olevaid bakteri arvukusi (joonis 6A), mis olid ilmselt põhjustatud surnud rakkudest, mida on võimalik skaneeriva elektronmikroskoobi pildil ka tuvastada (joonis 12B).



Joonis 12. Skaneeriva elektronmikroskoobi abil 10 000 korda suurendatud foto 15% bensalkooniumkloriidi pinnast A orgaanilises saastelahuses moodustunud biofilmiga, B lahjendatud toitepuljongis moodustunud biofilmiga ja C ilma bakterita pinnast. Joonisel on esitatud mõõtkavad, nooltega on näidatud ekstratsellulaarsed polümeersed ained (*extracellular polymeric substances*, EPS) ja *Pseudomonas aeruginosa*.

Nagu varasemal graafikul esitatud tulemustest näha (joonis 6A), siis jääb 30% bensalkooniumkloriidi pinnal orgaanikarikkas keskkonnas biofilmi moodustumise määr alla detekteerimispiiri ning skaneeriva elektronmikroskoobi pilditel võib näha ainult biofilmi jäänuseid (joonis 13A). Tõenäoliselt on skaneerivas elektronmikroskoobis näha surnud või pinnale väga kõvasti kinnitunud rake.

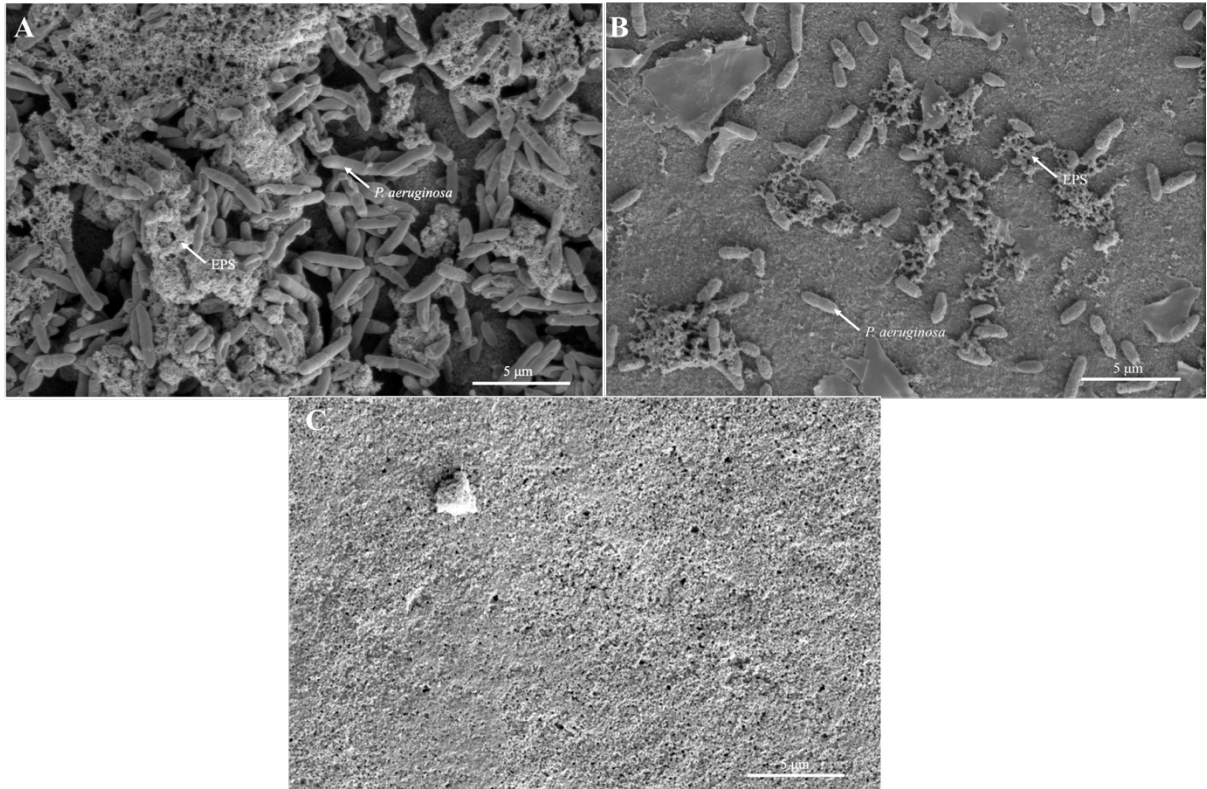
30% bensalkooniumkloriidi pinnal orgaanikavaeses keskkonnas (500 korda lahjendatud toitepuljongis) tehtud pilt sarnaneb orgaanikrikka keskkonnaga (Joonis 13A ja B), viidates sellele, et bakterite biofilmi moodustumine oli sarnaselt inhibeeritud mõlemas keskkonnas. Seega erinevalt teistest varasemalt vaadeldud pindadest, mille puhul oli biofilmi moodustumine orgaanikarikkas keskkonnas alati efektiivsem, takistas 30% bensalkooniumkloriidi pind biofilmi moodustumist ka bakteritele sobivamas keskkonnas. Seda näitasid ka varasemad pinnalt biofilmi elusrakkude mahapesemise tulemused (joonis 6A).



Joonis 13. Skaneeriva elektronmikroskoobi abil 10 000 korda suurendatud foto 30% bensalkooniumkloriidi pinnast **A** orgaanilises saastelahuses moodustunud biofilmiga, **B** lahjendatud toitepuljongis moodustunud biofilmiga ja **C** ilma bakterita pinnast. Joonisel on esitatud mõõtkavad, nooltega on näidatud ekstratsellulaarsed polümeersed ained (*extracellular polymeric substances*, EPS) ja *Pseudomonas aeruginosa*.

Orgaanikarikas keskkonnas (orgaanilises saastelahuses) sarnaneb superhüdrofoobsel pinnal moodustuva biofilmi ja elusrakkude hulk kontrollpindade terase ja maatriksiga. Selgelt on näha paksu *P. aeruginosa* biofilmi (joonis 14A). Arvestatavas koguses esineb ka ekstratsellulaarseid polümeerseid aineid.

Orgaanikavaeses keskkonnas (500 korda lahjendatud toitepuljongis) võib näha, et superhüdrofoobsel pinnal (joonis 14B) on biofilmi moodustunud vähem, kui terase pinnal (joonis 8B). Vähenenud koguses esineb ka ekstratsellulaarseid polümeerseid aineid. See on kooskõlas varasemate pinnalt biofilmi elusrakkude mahapesemise katsete tulemustega (joonis 7A), kus võis samuti näha, et superhüdrofoobsel pinnal moodustunud biofilmist saab keskmiselt kätte vähem elusrakke, kui teraselt. See efekt tuleneb tõenäoliselt bakterite üldise arvukuse vähenemisest, mitte superhüdrofoobse pinna pärssivast mõjust kinnitumisele ja edasisele biofilmi väljakujunemisele (joonis 7B).



Joonis 14. Skaneeriva elektronmikroskoobi abil 10 000 korda suurendatud foto superhüdrofoobsest pinnast **A** orgaanilises saastelahuses moodustunud biofilmiga, **B** lahjendatud toitepuljongis moodustunud biofilmiga ja **C** ilma bakterita pinnast. Joonisel on esitatud mõõtkavad, nooltega on näidatud ekstratsellulaarsed polümeersed ained (*extracellular polymeric substances*, EPS) ja *Pseudomonas aeruginosa*.

2.4 Arutelu

Antimikroobsete pindade efektiivsust testitakse standardselt orgaanikavaeses keskkonnas. Samas leiavad antimikroobsed pinnad kasutust erinevates keskkondades. Kuigi enamasti on keskkond pindadel üsna orgaanikavaene, siis võib saastumine mustuse, higi või teiste kehavedelikega suurendada pindadel olevat orgaanika hulka. On teada, et orgaanikarikkas keskkonnas on aga antimikroobsete pindade efektiivsus oluliselt erinev ning seda on selgelt näidanud ka meie labori varasemad uuringud vase, hõbeda ja kvaternaarseste ammooniumühendite pindadega (Kaur et al., 2024). Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida, kuidas mõjutab keskkonna orgaanikarikkus erinevate toimemehhanismiga antimikroobsete pindade, sealhulgas toimeaine vabanemisel ja otsekontaktil toimivate vase, hõbeda ning maatriksisse immobiliseeritud bensalkooniumkloriidi pindade, kuid ka eeldatavalt kinnitumisvastaste superhüdrofoobsete pindade, efektiivsust *P. aeruginosa* biofilmi moodustumise takistamisel.

Kui meie laboris varasemalt läbi viidud katsetes orgaanikavaese ja orgaanikarikka keskkonna võrdlemisel antimikroobsete pindade efektiivsusel vaadati lühiajalist, täpsemalt 2 tunni pikkust, mõju pindadel planktiliselt olevate bakterite vastu (Kaur et al., 2024), siis antud uurimistöö katsed uurisid mõju 24 tunni jooksul väljakujuneva *P. aeruginosa* biofilmi vastu. Kuigi *P. aeruginosa* biofilmi valmimine on mitmeetapiline ja keerukas, võib bakterite biofilmi moodustumine toimuda juba mõne tunni jooksul (Dufour et al., 2010). Antud uurimustöö eelkatsetes testiti nende teadmiste alusel esialgu *P. aeruginosa* biofilmi moodustumist nii 4 tunni kui 24 tunni jooksul. Nagu võis oodata, siis 4 tunni ajapunktis oli orgaanikarikkas keskkonnas biofilmi moodustunud märkimisväärselt vähem, kui 24 tunni järel ning 4 tunni ajapunktis jäi biofilmi moodustavate rakkude hulk sageli isegi alla detekteerimispiiri. Seetõttu valiti edasistesse katsetesse 24 tundi kasvanud *P. aeruginosa* biofilmid.

Biofilmide visualiseerimine skaneerivas elektronmikroskoobis kinnitas, et 24 tunni jooksul moodustus pindadele biofilm ning et orgaanikarikkas ja orgaanikavaeses keskkonnas oli see biofilm erinev. Orgaanikarikkas keskkonnas oli peaaegu kõigil pindadel moodustunud paks biofilmi kiht, millega kaasnes suur ekstratsellulaarsete polümeersete ainete hulk (joonised 8A, 9A, 10A, 11A, 12A, 14A). Erandiks oli siin 30% bensalkooniumkloriidi pind, mis takistas efektiivselt biofilmi moodustumist ka rikkas söötmes (joonis 13A). Orgaanikavaeses keskkonnas oli kontrollpindadel terasel ja maatriksil samuti näha biofilmi väljakujunemist, olgugi et vähem, kui orgaanikarikkas söötmes (joonised 8B, 11B). Hõbeda, vase ja bensalkooniumkloriidi katetega pindadel oli orgaanikavaeses keskkonnas näha ainult vähesel

määril moodustunud biofilmi või selle jäänuseid (joonised 9B, 10B, 12B, 13B). Tuleb aga mainida, et skaneeriva elektronmikroskoobi fotod pakuvad vaid indikatsiooni pinnal oleva biofilmi omaduste kohta, kuna paiguti võib pinnal olev biofilm olla erinev. Samuti võib pinna elektronmikroskoopiaks ettevalmistamise protseduur oluliselt biofilmi struktuuri muuta, mida on tõestatud ka varasemalt, seda küll *Klebsiella pneumoniae* puhul (Fleeman et al., 2023).

Varasemast on teada, et laialdaselt antimikroobsete omaduste tõttu kasutatavad metallpinnad vask ja hõbe on orgaanikavaeses keskkonnas erakordselt efektiivsed bakterite tapjad (Rosenberg et al., 2019; Salgado et al., 2013; Sifri et al., 2016; Zerbib et al., 2020; von Dessauer et al., 2016). Sama tuli välja käesoleva töö katsetest, kus *P. aeruginosa* moodustas orgaanikavaestes tingimustes vase ja hõbeda pinnal biofilmi minimaalselt (joonised 9B ja 10B) ning nendelt pindadelt ei õnnestunud maha pestes elusrakke detekteerida (joonis 5A). Ometi muutusid vase ja hõbeda pinnad väga kõrge toitainete sisaldusega söötmes täiesti kasutuks: *P. aeruginosa* moodustas neil biofilmi sama edukalt, kui terase pinnal (joonis 5A). Sarnaseid tulemusi nähti ka varem mainitud artiklis, kui bakterid olid pinnale kantud suurte (50 µl) tilkadena: orgaanikarikkas söötmes kadus vase pinna mõju täielikult ja hõbeda pinna efektiivsus langes tugevalt. Kui bakterid olid pinnale kantud väikeste (2 µl) tilkadena, siis olid nii vask kui hõbe siiski *E. coli* vastu efektiivsed, kuid *S. aureus*-e vastu mitte (Kaur et al., 2024).

Erinevalt hõbeda ja vase pindadest suutis bensalkooniumkloriidi 30%-lise kontsentratsiooniga pind isegi rikkas söötmes edukalt biofilmi moodustumist ära hoida (joonis 6A). Samas ilmnes ka bensalkooniumkloriidi pindade testimisel keskkonna mõju: 15% bensalkooniumkloriidi pind kaitses orgaanikavaeses keskkonnas *P. aeruginosa* biofilmi vastu, aga ei suutnud seda teha orgaanikarikkas keskkonnas (joonis 6A). Bensalkooniumkloriidi biofilmi vastast mõju on näidatud juba varem. Varasemalt läbiviidud katses kasutati rikkas söötmes kasvanud *S. aerueus*-t, *Salmonella enterica*-t ja *Listeria monocytogenes*-t, mida töödeldi orgaanikavaeses keskkonnas ning saavutati 28% kuni 99% biofilmi biomassi vähenemine (Kovač et al., 2022).

Käesoleva uurimistöõ üheks hüpoteesiks oli, et superhüdrofoobne pind suudab tänu madalale märgumisele ära hoida bakterite algset kinnitumist ja järgnevat biofilmi moodustumist (Souza et al., 2020; Subhadra et al., 2018). Eelnevalt on näidatud, et superhüdrofoobsed pinnad suudavad takistada nii grampositiivsete kui gramnegatiivsete bakterite biofilmi moodustumist, hoides seejuures täielikult ära isegi grampositiivsete bakterite pinnale kinnitumise. Kuigi gramnegatiivsed bakterid olid saanud tulemuste alusel võimelised superhüdrofoobsetele pindadele kinnituma, siis oli pöördumatu adhesioon siiski minimaalne (Bartlet et al., 2018). Ometi ei takistanud superhüdrofoobne pind antud uurimistöõ katsetes rakkude kinnitumist ja

sellele järgnevat biofilmi moodustumist ei orgaanikarikkas ega orgaanikavaeses söötmes (joonis 7A). Huvitaval kombel ei kasvanud aga teatud üksikutes katsetes orgaanikavaeses keskkonnas planktilisi rakke ega moodustunud biofilmi (joonis 7). See viitab asjaolule, et osade superhüdrofoobsete pindade koostises olid antimikroobsed ühendid, mis vähendasid rakuarvukust. Näiteks võis tegemist olla pinna kattes olevate ränidioksiidi või alumiiniumoksiidi nanopartiklitega, mille antimikroobseid omadusi on märgatud ka varem (Manogar et al., 2022; Selvarajan et al., 2020). Kahjuks ei olnud eritellimusel saadud superhüdrofoobseid pindasid katsete raames piisavalt, et testida, mis oli täieliku inhibitsiooni põhjuseks. Pindade juurde tellimisel tasuks teha edasisi katseid, et teha kindlaks, mis põhjustas rakkude kasvu inhibitsiooni orgaanikavaeses keskkonnas.

Järeldusena võib antud uurimistöö katsete põhjal väita, et kuigi klassikalised antimikroobsed pinnad, nagu vask ja hõbe toimivad *P. aeruginosa* vastu tõesti edukalt orgaanikavaeses keskkonnas, siis ei ole pinnad piisavalt efektiivsed orgaanikarikkas keskkonnas. Orgaanikarikkas keskkonnas ei piisa rakkude surmamiseks ka pinnakattesse viidud 15% bensalkooniumkloriidist. Ometi on just orgaanikarikkad keskkonnad *P. aeruginosa*, nagu ka paljude muude bakterite, eelistatud elupaikadeks. Kõige efektiivsemaks antimikroobseks pinnaks nii orgaanikavaeses kui orgaanikarikkas keskkonnas on pinnakate, millesse on viidud 30% ulatuses bensalkooniumkloriidi, sest see inhibeerib edukalt *P. aeruginosa* biofilmi moodustumist. Superhüdrofoobse pinna tulemused biofilmi moodustumisel on varieeruvad. Biofilmi inhibitsioon orgaanikavaeses keskkonnas tuleneb ilmselt rakuarvukuse vähenemisest, mitte rakkude kinnitumise takistamisest. Orgaanikarikkas keskkonnas ei näita superhüdrofoobne pind mingeid biofilmi moodustumist inhibeerivaid omadusi.

Saadud tulemused näitavad, et antimikroobsete pindade biofilmi moodustumise vastastes omadustes mängib olulist rolli keskkonna orgaanikasisaldus. Orgaaniline saastumine mõjutab dramaatiliselt antimikroobsete pindade efektiivsust, mis tõestab, kui vajalik on pindade sage ja põhjalik puhastamine. Hõbeda puhul on varem isegi kliinilistes tingimustes tõestatud, et pinna puhtus ning bakteri kasvukeskkond on olulisteks mõjuriteks antimikroobsete omaduste esinemisel ning mustad pinnad toetavad biofilmi moodustumist (Ortí-Lucas & Muñoz-Miguel, 2017).

KOKKUVÕTE

Käesoleva töö põhieesmärgiks oli uurida, millised antimikroobsed pinnad suudavad kõige efektiivsemalt *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 tüve biofilmi moodustumist ära hoida. Lisaks sooviti seejuures kindlaks teha, kuidas mõjutab pindade antimikroobset efektiivsust keskkonna orgaanikarikkus.

Võrreldes omavahel pindadel biofilmi moodustumist orgaanikavaeses ja orgaanikarikkas keskkonnas, tuli katsetes välja selge erinevus. Selgus, et orgaanikavaeses keskkonnas suudavad kõik antimikroobsed pinnad edukalt planktiliste rakkude levikut ja järgnevat biofilmi moodustumist inhibeerida. Orgaanikarikkas keskkonnas seevastu ei suutnud peaaegu ükski katsetes kasutatud antimikroobsetest pindadest takistada ei planktiliste rakkude kasvu ega biofilmi väljakujunemist. Seega võib uurimistöö tulemuste alusel väita, et keskkond mängib arvestatavat rolli antimikroobsete pindade töö efektiivsuses.

Katsetes kasutatud antimikroobsetest pindadest osutus kõige efektiivsemaks pind, mis sisaldas pinnakattesse viidud 30%-list bensalkooniumkloriidi. See oli ainus pind, mis suutis täpselt sama edukalt ära hoida planktiliste rakkude kasvu ja järgnevat biofilmi moodustumist mõlemas võrreldud keskkonnas. Antimikroobsed pinnad vask ja hõbe olid küll efektiivsed orgaanikavaeses keskkonnas, kuid ei suutnud biofilmi moodustumist takistada orgaanikarikkas keskkonnas, kus *P. aeruginosa*-le olid tagatud reaaleluliselt tihti esinevad, paljunemiseks ja biofilmi moodustumiseks soodsad tingimused. Sealjuures toimus ebaefektiivselt ka pinnakattesse viidud 15%-line bensalkooniumkloriid, mis näitas, et bensalkooniumkloriidi kontsentratsiooni suurendamine tõstab selle antimikroobseid omadusi. Katsetes saadud tulemuste korrektsust kinnitasid ka skaneerivas elektronmikroskoobis tehtud pildid, millelt võis näha, et 30% bensalkooniumkloriidi pinnal oli mõlemas keskkonnas võrdses koguses rakke ning biofilmi moodustumine oli pinnal takistatud, samas kui ülejäänud pindadel võis orgaanikarikkas keskkonnas näha paksu biofilmi.

Pindadel biofilmi moodustumise testimise käigus selgus veel, et superhüdrofoobsed pinnad, mis varasemate uurimuste andmetel peaksid takistama *P. aeruginosa* kinnitumist ja järgnevat biofilmi moodustumist, inhibeerisid biofilmi väljakujunemist ainult orgaanikavaeses söötmes ning see mõju paistis tulenevat üldisest kasvu inhibeerimisest, mitte spetsiifilisest mõjust biofilmi kinnitumisele.

RESÜMEE

***Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on antimicrobial surfaces in different environmental conditions**

Karola Jõearu

Summary

Pseudomonas aeruginosa is a common hospital pathogen that is particularly dangerous for people with immunodeficiencies and chronic diseases. For example, people suffering from cystic fibrosis, pneumonia or cancer are at a serious risk. The bacterium colonizes both the human body and hospital equipment, causing acute infections that often end in serious illness or even death.

P. aeruginosa does not usually live in planktonic form, but rather in the form of a biofilm. In this structure, the bacterium has better nutritional options and higher survival rates. However, bacteria living in biofilm are also much more difficult to destroy. In most cases, standard methods that are functional in laboratory conditions do not work, and the cells are also more tolerant to antibiotics. Due to such a complex life form and high pathogenicity, various options have been studied to be rid of *P. aeruginosa*, one of which is the utilization of antimicrobial surfaces.

Antimicrobial surfaces kill bacteria in various ways, either causing direct cell death or simply preventing attachment. Surfaces with various strategies have been used to eradicate bacteria, such as *P. aeruginosa*, for hundreds of years. The most classic of these are metal surfaces such as copper and silver, which have also been used in this research. More recent interests in antimicrobial surfaces include surfaces coated with benzalkonium chloride and hydrophobic surfaces, both of which have also been utilized for this study.

However, the properties of the antimicrobial surface are not the only factor that plays an important role in getting rid of a *P. aeruginosa* colonization. In addition to the surface itself, the environment in which the bacteria and the surface are located is also important. In a nutrient-poor environment, the growth and reproduction of the bacteria is greatly hampered, even without a surface with antimicrobial properties, and the destruction of the bacteria is relatively easy. In contrast, in a nutrient-rich environment, the bacteria have all the necessary tools to colonize even antimicrobial surfaces. Of course, such environments are also the preferred habitats of the bacteria in real life conditions, since getting rid of *P. aeruginosa* is extremely difficult in this case and provides an advantage for the bacteria.

This research study aimed to determine which antimicrobial surfaces are most effective against the common biofilm life form of *P. aeruginosa* in order to prevent the spread of the bacteria. To do this, surfaces with different antimicrobial strategies, such as anti-adhesion, contact-killing and biocide releasing mechanisms, were tested together with control surfaces. In addition, all the surfaces used were also tested in two different environments. A nutrient-poor and nutrient-rich environment. Such comparison made it possible to determine how the environmental properties affected the effectiveness of antimicrobial surfaces.

The results of the conducted experiments showed that although antimicrobial surfaces successfully inhibited the spread of *P. aeruginosa* and the formation of its biofilm in a nutrient-poor environment, the effectiveness of the surfaces was much lower in a nutrient-rich environment. For example, surfaces such as copper and silver, were extremely successful in inhibiting biofilms in a nutrient-poor environment, bringing the cell count down to the limit of detection. However, biofilm formation in a nutrient-rich environment remained almost completely equal to that of a surface without antimicrobial properties. The same result was also obtained with 15% benzalkonium chloride. Thus, it can be said that the surfaces lost their antimicrobial efficacy in a nutrient-rich environment. Among the antimicrobial surfaces, the superhydrophobic surface, which should have prevented the initial attachment of *P. aeruginosa* cells and thereby the formation of a biofilm, did not work as expected. The planktonic abundance of cells and the amount of biofilm formation remained about equal to the results of the steel control surface in a nutrient-rich environment. However, an interesting phenomenon occurred in a nutrient-poor environment. Specifically, in some experiments planktonic cells did not grow at all and there was no subsequent biofilm formation, while in other experiments the planktonic cell growth and biofilm formation remained equal to the steel control surface. Unfortunately, the reason why the surface completely inhibited cell growth at times remained unknown, since the custom-made superhydrophobic surfaces were not available in sufficient quantities for further experiments.

The only antimicrobial surface that worked equally well in both nutrient-poor and nutrient-rich media was 30% benzalkonium chloride. The higher benzalkonium chloride concentration provided more successful inhibition of *P. aeruginosa* compared to 15% benzalkonium chloride. On this surface cell abundance remained at or below the limit of detection in both planktonic cells and biofilm formation. The result was also confirmed by scanning electron microscope images, which showed a low cell count on the surface in both environments.

KIRJANDUSE LOETELU

- Adlhart, C., Verran, J., Azevedo, N. F., Olmez, H., Keinänen-Toivola, M. M., Gouveia, I., Melo, L. F., & Crijns, F. (2018). Surface modifications for antimicrobial effects in the healthcare setting: A critical overview. *The Journal of Hospital Infection*, *99*(3), 239–249. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.01.018>
- Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., & Tolker-Nielsen, T. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*, *59*(4), 1114–1128. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x>
- Annous, B. A., Fratamico, P. M., & Smith, J. L. (2009). Scientific Status Summary. *Journal of Food Science*, *74*(1), R24–R37. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.01022.x>
- Balasubramanian, D., Schneper, L., Kumari, H., & Mathee, K. (2013). A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Research*, *41*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1039>
- Banin, E., Lozinski, A., Brady, K. M., Berenshtein, E., Butterfield, P. W., Moshe, M., Chevion, M., Greenberg, E. P., & Banin, E. (2008). The potential of desferrioxamine-gallium as an anti-*Pseudomonas* therapeutic agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(43), 16761–16766. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808608105>
- Barillo, D. J., & Marx, D. E. (2014). Silver in medicine: A brief history BC 335 to present. *Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries*, *40 Suppl 1*, S3–8. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2014.09.009>
- Bartlet, K., Movafaghi, S., Dasi, L. P., Kota, A. K., & Popat, K. C. (2018). Antibacterial activity on superhydrophobic titania nanotube arrays. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, *166*, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.03.019>
- Beirão, S., Fernandes, S., Coelho, J., Faustino, M. A. F., Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Almeida, A., & Cunha, A. (2014). Photodynamic inactivation of bacterial and yeast biofilms with a cationic porphyrin. *Photochemistry and Photobiology*, *90*(6), 1387–1396. <https://doi.org/10.1111/php.12331>
- Bhamidimarri, S. P., Young, T. R., Shanmugam, M., Soderholm, S., Baslé, A., Bumann, D., & van den Berg, B. (2021). Acquisition of ionic copper by the bacterial outer membrane protein OprC through a novel binding site. *PLoS Biology*, *19*(11), e3001446. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001446>
- Bilici, K., Atac, N., Muti, A., Baylam, I., Dogan, O., Sennaroglu, A., Can, F., & Acar, H. Y. (2020). Broad spectrum antibacterial photodynamic and photothermal therapy achieved with indocyanine green loaded SPIONs under near infrared irradiation. *Biomaterials Science*, *8*(16), 4616–4625. <https://doi.org/10.1039/D0BM00821D>
- Borkow, G. (2012). Using Copper to Fight Microorganisms. *Current Chemical Biology*, *6*(2), 93–103. <https://doi.org/10.2174/187231312801254723>
- Boyce, J. M. (2007). Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. *The Journal of Hospital Infection*, *65 Suppl 2*, 50–54. [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(07\)60015-2](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(07)60015-2)
- Bragg, P. D., & Rainnie, D. J. (1974). The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, *20*(6), 883–889. <https://doi.org/10.1139/m74-135>
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>

- Cendra, M. D. M., & Torrents, E. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and their partners in crime. *Biotechnology Advances*, 49, 107734. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107734>
- Chanda, W., Joseph, T. P., Padhiar, A. A., Guo, X., Min, L., Wang, W., Lolokote, S., Ning, A., Cao, J., Huang, M., & Zhong, M. (2017). Combined effect of linolenic acid and tobramycin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and quorum sensing. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(5), 4328–4338. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5110>
- Chauhan, A., Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., & Beloin, C. (2012). Full and broad-spectrum in vivo eradication of catheter-associated biofilms using gentamicin-EDTA antibiotic lock therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(12), 6310–6318. <https://doi.org/10.1128/AAC.01606-12>
- Chiba, A., Sugimoto, S., Sato, F., Hori, S., & Mizunoe, Y. (2015). A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability. *Microbial Biotechnology*, 8(3), 392–403. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12155>
- Colvin, K. M., Gordon, V. D., Murakami, K., Borlee, B. R., Wozniak, D. J., Wong, G. C. L., & Parsek, M. R. (2011). The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens*, 7(1), e1001264. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001264>
- Dekimpe, V., & Déziel, E. (2009). Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: The transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 3), 712–723. <https://doi.org/10.1099/mic.0.022764-0>
- Dibrov, P., Dzioba, J., Gosink, K. K., & Häse, C. C. (2002). Chemiosmotic Mechanism of Antimicrobial Activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(8), 2668–2670. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2668-2670.2002>
- Dickschat, J. S. (2010). Quorum sensing and bacterial biofilms. *Natural Product Reports*, 27(3), 343–369. <https://doi.org/10.1039/b804469b>
- Dufour, D., Leung, V., & Lévesque, C. M. (2010). Bacterial biofilm: Structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*, 22(1), 2–16. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x>
- Favre-Bonté, S., Chamot, E., Köhler, T., Romand, J.-A., & van Delden, C. (2007). Autoinducer production and quorum-sensing dependent phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* vary according to isolation site during colonization of intubated patients. *BMC Microbiology*, 7, 33. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-33>
- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., & Kim, J. O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52(4), 662–668. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(20001215\)52:4<662::aid-jbm10>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::aid-jbm10>3.0.co;2-3)
- Fleeman, R. M., Mikesh, M., & Davies, B. W. (2023). Investigating *Klebsiella pneumoniae* biofilm preservation for scanning electron microscopy. *Access Microbiology*, 5(2), 000470.v3. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000470.v3>
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews. Microbiology*, 14(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Francolini, I., & Donelli, G. (2010). Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59(3), 227–238. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00665.x>

- Franklin, M. J., Nivens, D. E., Weadge, J. T., & Howell, P. L. (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Frontiers in Microbiology*, 2, 167. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00167>
- Ghafoor, A., Hay, I. D., & Rehm, B. H. A. (2011). Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15), 5238–5246. <https://doi.org/10.1128/AEM.00637-11>
- Ghandour, W., Hubbard, J. A., Deistung, J., Hughes, M. N., & Poole, R. K. (1988). The uptake of silver ions by *Escherichia coli* K12: Toxic effects and interaction with copper ions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28(6), 559–565. <https://doi.org/10.1007/BF00250412>
- Ghorbani, H., Memar, M. Y., Sefidan, F. Y., Yekani, M., & Ghotaslou, R. (2017). In vitro synergy of antibiotic combinations against planktonic and biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. *GMS Hygiene and Infection Control*, 12, Doc17. <https://doi.org/10.3205/dgkh000302>
- Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(4), 263–273. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2109>
- Hobman, J. L., & Crossman, L. C. (2015). Bacterial antimicrobial metal ion resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 64(Pt 5), 471–497. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.023036-0>
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(4), 322–332. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011>
- Holt, K. B., & Bard, A. J. (2005). Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: An electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag⁺. *Biochemistry*, 44(39), 13214–13223. <https://doi.org/10.1021/bi0508542>
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association: JCMA*, 81(1), 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>
- Jensen, V., Löns, D., Zaoui, C., Bredenbruch, F., Meissner, A., Dieterich, G., Münch, R., & Häussler, S. (2006). RhIR Expression in *Pseudomonas aeruginosa* Is Modulated by the *Pseudomonas* Quinolone Signal via PhoB-Dependent and -Independent Pathways. *Journal of Bacteriology*, 188(24), 8601–8606. <https://doi.org/10.1128/jb.01378-06>
- Jhaveri, J. H., & Murthy, Z. V. P. (2016). A comprehensive review on anti-fouling nanocomposite membranes for pressure driven membrane separation processes. *Desalination*, 379, 137–154. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2015.11.009>
- Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3128. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>
- Kang, D., Revtovich, A. V., Deyanov, A. E., & Kirienko, N. V. (2021). Pyoverdine Inhibitors and Gallium Nitrate Synergistically Affect *Pseudomonas aeruginosa*. *mSphere*, e0040121. <https://doi.org/10.1128/msphere.00401-21>
- Karlin, K. D. (1993). Metalloenzymes, structural motifs, and inorganic models. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5122), 701–708. <https://doi.org/10.1126/science.7688141>
- Kaur, H., Rosenberg, M., Kook, M., Danilian, D., Kisand, V., & Ivask, A. (2024). Antibacterial activity of solid surfaces is critically dependent on relative humidity, inoculum volume, and organic soiling. *FEMS Microbes*, 5, xtad022. <https://doi.org/10.1093/femsmc/xtad022>
- Kovač, B., Piletić, K., Kovačević Ganić, N., & Gobin, I. (2022). The Effectiveness of Benzalkonium Chloride as an Active Compound on Selected Foodborne Pathogens Biofilm. *Hygiene*, 2(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/hygiene2040020>

- Lee, J., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*, 6(1), 26–41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
- Lee, J., Wu, J., Deng, Y., Wang, J., Wang, C., Wang, J., Chang, C., Dong, Y., Williams, P., & Zhang, L.-H. (2013). A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nature Chemical Biology*, 9(5), 339–343. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1225>
- Lee, K., & Yoon, S. S. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(6), 1053–1064. <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11056>
- Lee, V. T., Matewish, J. M., Kessler, J. L., Hyodo, M., Hayakawa, Y., & Lory, S. (2007). A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Molecular Microbiology*, 65(6), 1474–1484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05879.x>
- Lemire, J. A., Harrison, J. J., & Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(6), 371–384. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3028>
- Li, Y., Xiao, P., Wang, Y., & Hao, Y. (2020). Mechanisms and Control Measures of Mature Biofilm Resistance to Antimicrobial Agents in the Clinical Context. *ACS Omega*, 5(36), 22684–22690. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02294>
- Ma, L., Wang, J., Wang, S., Anderson, E. M., Lam, J. S., Parsek, M. R., & Wozniak, D. J. (2012). Synthesis of multiple *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix exopolysaccharides is post-transcriptionally regulated. *Environmental Microbiology*, 14(8), 1995–2005. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02753.x>
- Macomber, L., & Imlay, J. A. (2009). The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(20), 8344–8349. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812808106>
- Mah, T. F., & O’Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9(1), 34–39. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01913-2](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01913-2)
- Manogar, P., Esther Morvinyabesh, J., Ramesh, P., Dayana Jeyaleela, G., Amalan, V., Ajarem, J. S., Allam, A. A., Seong Khim, J., & Vijayakumar, N. (2022). Biosynthesis and antimicrobial activity of aluminium oxide nanoparticles using *Lyngbya majuscula* extract. *Materials Letters*, 311, 131569. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2021.131569>
- Manoharan, K., & Bhattacharya, S. (2019). Superhydrophobic surfaces review: Functional application, fabrication techniques and limitations. *Journal of Micromanufacturing*, 2(1), 59–78. <https://doi.org/10.1177/2516598419836345>
- Marple, B., Roland, P., & Benninger, M. (2004). Safety Review of Benzalkonium Chloride Used as a Preservative in Intranasal Solutions: An Overview of Conflicting Data and Opinions. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, 130(1), 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.otohns.2003.07.005>
- Merchel Piovesan Pereira, B., & Tagkopoulos, I. (2019). Benzalkonium Chlorides: Uses, Regulatory Status, and Microbial Resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(13), e00377-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00377-19>
- Mi, L., Liu, Y., Wang, C., He, T., Gao, S., Xing, S., Huang, Y., Fan, H., Zhang, X., Yu, W., Mi, Z., Tong, Y., Bai, C., & Han, F. (2019). Identification of a lytic *Pseudomonas aeruginosa* phage depolymerase and its anti-biofilm effect and bactericidal contribution to serum. *Virus Genes*, 55(3), 394–405. <https://doi.org/10.1007/s11262-019-01660-4>
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., & Lewenza, S. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* produces an extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source. *Environmental Microbiology*, 12(6), 1621–1629. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02208.x>

- Nadell, C. D., Xavier, J. B., Levin, S. A., & Foster, K. R. (2008). The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLoS Biology*, 6(1), e14. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060014>
- Nan, L., Liu, Y., Lü, M., & Yang, K. (2008). Study on antibacterial mechanism of copper-bearing austenitic antibacterial stainless steel by atomic force microscopy. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 19(9), 3057–3062. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3444-z>
- Odermatt, A., Krapf, R., & Solioz, M. (1994). Induction of the Putative Copper ATPases, CopA and CopB, of *Enterococcus hirae* by Ag⁺ and Cu²⁺, and Ag⁺ Extrusion by CopB. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 202(1), 44–48. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1891>
- Oglesby, A. G., Farrow, J. M., Lee, J.-H., Tomaras, A. P., Greenberg, E. P., Pesci, E. C., & Vasil, M. L. (2008). The Influence of Iron on *Pseudomonas aeruginosa* Physiology: A REGULATORY LINK BETWEEN IRON AND QUORUM SENSING*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 15558–15567. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707840200>
- O’Gorman, J., & Humphreys, H. (2012). Application of copper to prevent and control infection. Where are we now? *The Journal of Hospital Infection*, 81(4), 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2012.05.009>
- Ortí-Lucas, R. M., & Muñoz-Miguel, J. (2017). Effectiveness of surface coatings containing silver ions in bacterial decontamination in a recovery unit. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 6, 61. <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0217-9>
- Otter, J. A., Vickery, K., Walker, J. T., deLancey Pulcini, E., Stoodley, P., Goldenberg, S. D., Salkeld, J. a. G., Chewins, J., Yezli, S., & Edgeworth, J. D. (2015). Surface-attached cells, biofilms and biocide susceptibility: Implications for hospital cleaning and disinfection. *The Journal of Hospital Infection*, 89(1), 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.09.008>
- Otter, J. A., Yezli, S., & French, G. L. (2011). The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 32(7), 687–699. <https://doi.org/10.1086/660363>
- Pearson, J. P., Pesci, E. C., & Iglewski, B. H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *Journal of Bacteriology*, 179(18), 5756–5767. <https://doi.org/10.1128/jb.179.18.5756-5767.1997>
- Pei, R., & Lamas-Samanamud, G. R. (2014). Inhibition of biofilm formation by T7 bacteriophages producing quorum-quenching enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), 5340–5348. <https://doi.org/10.1128/AEM.01434-14>
- Pérez-Laguna, V., García-Luque, I., Ballesta, S., Pérez-Artiaga, L., Lampaya-Pérez, V., Rezusta, A., & Gilaberte, Y. (2020). Photodynamic therapy using methylene blue, combined or not with gentamicin, against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 31, 101810. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101810>
- Pitondo-Silva, A., Gonçalves, G. B., & Stehling, E. G. (2016). Heavy metal resistance and virulence profile in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Brazilian soils. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 124(8), 681–688. <https://doi.org/10.1111/apm.12553>
- Rahim, K., Saleha, S., Basit, A., Zhu, X., Ahmed, I., Huo, L., Zhang, P., Usman, B., Munir, S., & Franco, O. L. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* as a Powerful Biofilm Producer and Positive Action of Amikacin Against Isolates From Chronic Wounds. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 10(10), Article 10. <https://doi.org/10.5812/jjm.57564>
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., & El Jaziri, M. (2015). The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A review of the natural and synthetic compounds interfering

- with control mechanisms. *BioMed Research International*, 2015, 759348. <https://doi.org/10.1155/2015/759348>
- Rice, L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(8), 1079–1081. <https://doi.org/10.1086/533452>
- Rice, L. B. (2010). Progress and challenges in implementing the research on ESKAPE pathogens. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 31 Suppl 1, S7-10. <https://doi.org/10.1086/655995>
- Roach, P., Shirtcliffe, N. J., & Newton, M. I. (2008). Progress in superhydrophobic surface development. *Soft Matter*, 4(2), 224–240. <https://doi.org/10.1039/b712575p>
- Rosenberg, M., Ilić, K., Juganson, K., Ivask, A., Ahonen, M., Vinković Vrček, I., & Kahru, A. (2019). Potential ecotoxicological effects of antimicrobial surface coatings: A literature survey backed up by analysis of market reports. *PeerJ*, 7, e6315. <https://doi.org/10.7717/peerj.6315>
- Rosenberg, M., Ivask, A., Kasemets, K., & Kisand, V. (2022). *Microbial Interactions with Inanimate Solid Surfaces: A Methodological Approach*. <https://digikogu.taltech.ee/et/item/ae0fc64d-c7bf-46e9-bc65-85342787a8cb>
- Rossi, E., La Rosa, R., Bartell, J. A., Marvig, R. L., Haagensen, J. A. J., Sommer, L. M., Molin, S., & Johansen, H. K. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. *Nature Reviews. Microbiology*, 19(5), 331–342. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00477-5>
- Roy, T., Sabharwal, T. P., Kumar, M., Ranjan, P., & Balasubramaniam, R. (2020). Mathematical modelling of superhydrophobic surfaces for determining the correlation between water contact angle and geometrical parameters. *Precision Engineering*, 61, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.precisioneng.2019.10.005>
- Rzhepishevskaya, O., Ekstrand-Hammarström, B., Popp, M., Björn, E., Bucht, A., Sjöstedt, A., Antti, H., & Ramstedt, M. (2011). The Antibacterial Activity of Ga³⁺ Is Influenced by Ligand Complexation as Well as the Bacterial Carbon Source. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(12), 5568–5580. <https://doi.org/10.1128/AAC.00386-11>
- Ryder, C., Byrd, M., & Wozniak, D. J. (2007). Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current Opinion in Microbiology*, 10(6), 644–648. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.010>
- Salgado, C. D., Sepkowitz, K. A., John, J. F., Cantey, J. R., Attaway, H. H., Freeman, K. D., Sharpe, P. A., Michels, H. T., & Schmidt, M. G. (2013). Copper surfaces reduce the rate of healthcare-acquired infections in the intensive care unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 34(5), 479–486. <https://doi.org/10.1086/670207>
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: Expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews. Microbiology*, 20(10), 608–620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
- Schafhauser, J., Lepine, F., McKay, G., Ahlgren, H. G., Khakimova, M., & Nguyen, D. (2014). The Stringent Response Modulates 4-Hydroxy-2-Alkylquinoline Biosynthesis and Quorum-Sensing Hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 196(9), 1641–1650. <https://doi.org/10.1128/jb.01086-13>
- Schuster, M., & Greenberg, E. P. (2006). A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 296(2–3), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.036>
- Selvarajan, V., Obuobi, S., & Ee, P. L. R. (2020). Silica Nanoparticles—A Versatile Tool for the Treatment of Bacterial Infections. *Frontiers in Chemistry*, 8, 602. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00602>
- Shahid, A., Rasool, M., Akhter, N., Aslam, B., Hassan, A., Sana, S., Rasool, M. H., Khurshid, M., Shahid, A., Rasool, M., Akhter, N., Aslam, B., Hassan, A., Sana, S., Rasool, M. H.,

- & Khurshid, M. (2019). Innovative Strategies for the Control of Biofilm Formation in Clinical Settings. *Bacterial Biofilms*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89310>
- Sifri, C. D., Burke, G. H., & Enfield, K. B. (2016). Reduced health care-associated infections in an acute care community hospital using a combination of self-disinfecting copper-impregnated composite hard surfaces and linens. *American Journal of Infection Control*, *44*(12), 1565–1571. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.07.007>
- Solioz, M., & Odermatt, A. (1995). Copper and Silver Transport by CopB-ATPase in Membrane Vesicles of *Enterococcus hirae**. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(16), 9217–9221. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.16.9217>
- Souza, J. G. S., Bertolini, M., Costa, R. C., Cordeiro, J. M., Nagay, B. E., de Almeida, A. B., Retamal-Valdes, B., Nociti, F. H., Feres, M., Rangel, E. C., & Barão, V. A. R. (2020). Targeting Pathogenic Biofilms: Newly Developed Superhydrophobic Coating Favors a Host-Compatible Microbial Profile on the Titanium Surface. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *12*(9), 10118–10129. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b22741>
- Stout, J. E., & Yu, V. L. (2003). Experiences of the first 16 hospitals using copper-silver ionization for Legionella control: Implications for the evaluation of other disinfection modalities. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, *24*(8), 563–568. <https://doi.org/10.1086/502251>
- Subhadra, B., Kim, D. H., Woo, K., Surendran, S., & Choi, C. H. (2018). Control of Biofilm Formation in Healthcare: Recent Advances Exploiting Quorum-Sensing Interference Strategies and Multidrug Efflux Pump Inhibitors. *Materials (Basel, Switzerland)*, *11*(9), 1676. <https://doi.org/10.3390/ma11091676>
- Zerbib, S., Vallet, L., Muggeo, A., de Champs, C., Lefebvre, A., Jolly, D., & Kanagaratnam, L. (2020). Copper for the Prevention of Outbreaks of Health Care-Associated Infections in a Long-term Care Facility for Older Adults. *Journal of the American Medical Directors Association*, *21*(1), 68-71.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2019.02.003>
- Zhao, X.-L., Chen, Z.-G., Yang, T.-C., Jiang, M., Wang, J., Cheng, Z.-X., Yang, M.-J., Zhu, J.-X., Zhang, T.-T., Li, H., Peng, B., & Peng, X.-X. (2021). Glutamine promotes antibiotic uptake to kill multidrug-resistant uropathogenic bacteria. *Science Translational Medicine*, *13*(625), eabj0716. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj0716>
- Teitzel, G. M., & Parsek, M. R. (2003). Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(4), 2313–2320. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.2313-2320.2003>
- Vetrivel, A., Ramasamy, M., Vetrivel, P., Natchimuthu, S., Arunachalam, S., Kim, G.-S., & Murugesan, R. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Its Control. *Biologics*, *1*(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/biologics1030019>
- Vieira, E. F. S., Simoni, J. de A., & Airoidi, C. (1997). Interaction of cations with SH-modified silica gel: Thermochemical study through calorimetric titration and direct extent of reaction determination. *Journal of Materials Chemistry*, *7*(11), 2249–2252. <https://doi.org/10.1039/A704286H>
- von Dessauer, B., Navarrete, M. S., Benadof, D., Benavente, C., & Schmidt, M. G. (2016). Potential effectiveness of copper surfaces in reducing health care-associated infection rates in a pediatric intensive and intermediate care unit: A nonrandomized controlled trial. *American Journal of Infection Control*, *44*(8), e133-139. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.03.053>
- Wang, H., Yan, A., Liu, Z., Yang, X., Xu, Z., Wang, Y., Wang, R., Koochi-Moghadam, M., Hu, L., Xia, W., Tang, H., Wang, Y., Li, H., & Sun, H. (2019). Deciphering molecular mechanism of silver by integrated omic approaches enables enhancing its antimicrobial efficacy in *E. coli*. *PLoS Biology*, *17*(6), e3000292. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000292>

- Wang, L., Di Luca, M., Tkhilaishvili, T., Trampuz, A., & Gonzalez Moreno, M. (2019). Synergistic Activity of Fosfomycin, Ciprofloxacin, and Gentamicin Against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 2522. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02522>
- Warnes, S. L., Green, S. M., Michels, H. T., & Keevil, C. W. (2010). Biocidal efficacy of copper alloys against pathogenic enterococci involves degradation of genomic and plasmid DNAs. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(16), 5390–5401. <https://doi.org/10.1128/AEM.03050-09>
- Weber, D. J., Rutala, W. A., Miller, M. B., Huslage, K., & Sickbert-Bennett, E. (2010). Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: Norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. *American Journal of Infection Control*, *38*(5 Suppl 1), S25-33. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2010.04.196>
- Yoshida, Y., Furuta, S., & Niki, E. (1993). Effects of metal chelating agents on the oxidation of lipids induced by copper and iron. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1210*(1), 81–88. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(93\)90052-b](https://doi.org/10.1016/0005-2760(93)90052-b)

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Karola Jõearu,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose *Pseudomonas aeruginosa* biofilmi moodustumine antimikroobsetel pindadel erinevates keskkonnatingimustes, mille juhendajad on **Hanna Ainelu ja Angela Ivask**, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada Tartu Ülikooli digitaalarhiivi kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
2. annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates **26.05.2026** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni;
3. olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
4. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Karola Jõearu

20.05.2025