ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 579.22+579.24+661.66+504.054

Влияние производных графена на биопленкообразование *Candida maltosa*

Е.В. Пьянкова[1], Ю.Г. Максимова[1, 2, *]

[1]Институт экологии и генетики микроорганизмов, Уральское отделение Российской академии наук – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Россия, 614081, г. Пермь, Голева, д. 13;
[2]Пермский государственный национальный исследовательский университет, Россия, 614990, г. Пермь, ул. Букирева, д. 15
[*]e-mail: yul_max@mail.ru

Производные графена (оксид и его восстановленная форма) – перспективные углеродные наноматериалы (УНМ), используемые в промышленности, электронике, медицине и биотехнологии. Целью настоящей работы стало изучение влияния оксида графена (ОГ) и его восстановленной формы (вОГ) на формирование и разрушение биопленок *Candida maltosa* ВКПМ Y-194, а также на метаболическую активность, содержание внутриклеточного АТФ и проницаемость цитоплазматической мембраны клеток биопленок. Установлено, что ОГ и вОГ незначительно подавляют биопленкообразование дрожжей, причем снижение биомассы биопленки при росте в присутствии ОГ достоверно больше, чем при росте клеток с вОГ. Разрушение зрелых 7-суточных биопленок дрожжей незначительно больше в присутствии УНМ, чем в контроле, и достоверно больше, чем 3-суточных биопленок под воздействием УНМ. При этом метаболическая активность клеток биопленок, оцененная по восстановлению соли тетразолия (реактив methyl thiazolyl tetrazolium), достоверно выше контроля у 3-суточных биопленок, выращенных на питательной среде с вОГ, и у 7-суточных биопленок с ОГ и вОГ. Содержание внутриклеточного АТФ в биопленках, выращенных в присутствии УНМ, превышало таковое в контроле, но было ниже после 4 ч влияния на зрелые биопленки, выращенные на питательной среде без УНМ. Наибольшее негативное влияние на цитоплазматическую мембрану клеток биопленок, которое выражалось в увеличении ее проницаемости, оказывал ОГ при 4 ч воздействии на 7-суточную биопленку. Установлено, что негативное влияние УНМ на биопленки *C. maltosa* ВКПМ Y-194 более выражено при воздействии ОГ, чем вОГ, и выше при воздействии на 7-суточные биопленки, чем на 3-суточные биопленки. Полного ингибирования биопленкообразования и полной эрадикации зрелых биопленок под воздействием УНМ не наблюдали.

Ключевые слова: *дрожжи, биопленки, оксид графена, восстановленный оксид графена, метаболическая активность, АТФ*

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-3-7

Введение

Углеродные наноматериалы (УНМ) широко используются в различных сферах деятельности человека: промышленности, электронике, медицине, биотехнологии [1–3]. К УНМ относятся графен и его производные: оксид графена (ОГ), восстановленный оксид графена (вОГ), а также фуллерены и углеродные нанотрубки. Графен представляет собой двумерную аллотропную модификацию углерода одноатомной толщины. ОГ содержит кислородсодержащие функциональные группы (карбоксильные, гидроксильные, фенольные, карбонильные, арильные, эфирные и т.д.), он способен взаимодействовать с биомолекулами посредством электростатического притяжения, π-π стэкинга и водородных связей. ОГ восстанавливают химическими, электрохимическими, термическими способами, в результате чего значительно повышается его гидрофобность [4]. Большие объемы производства, быстрое увеличение потребления и расширение сфер применения графена неизбежно приведут к выбросам этого нового материала и его производных в окружающую среду. Следовательно, необходимо комплексное изучение воздействия этих УНМ на человека, клетки и живые организмы, в том числе на микроорганизмы.

В соответствии с современными представлениями, сложившимися в микробиологии, основной формой существования микроорганизмов являются полимикробные агрегаты, такие как пленки, маты и флоки. Биопленка – прикрепленное к поверхности мультивидовое сообщество,

© Пьянкова Е.В., Максимова Ю.Г., 2024

погруженное в вырабатываемый им полимерный матрикс. Внеклеточный экзополисахаридный матрикс иммобилизует клетки биопленки, удерживая в непосредственной близости друг к другу, обеспечивает межклеточные взаимодействия и формирование синергических связей в микроконсорциуме. Влияние различных веществ, в том числе биоцидов, антибиотиков, антисептиков, УНМ на клетки микроорганизмов в составе биопленки существенно отличается от их воздействия на неадгезированные клетки. Внеклеточное полимерное вещество защищает организмы биопленки от высыхания, окислителей, заряженных биоцидов, некоторых антибиотиков и катионов металлов, ультрафиолетового излучения, простейших-хищников и иммунной защиты макроорганизма [5]. Наряду с антибиотиками и биоцидами наночастицы рассматриваются как антибиопленочные агенты. Они способны нарушать целостность биопленки, взаимодействуя с матриксом, влияя на бактериальную коммуникацию – чувство кворума – и непосредственно на микробные клетки. Для проникновения в матрицу биопленки важен размер наночастиц и химия их поверхности [6]. УНМ могут проявлять свою антибиопленочную активность посредством множества механизмов, среди которых прямое взаимодействие с микробной клеткой (адсорбция, образование активных форм кислорода, индукция внутриклеточных эффектов, взаимодействие с ДНК и/или белками) и ингибирование образования биопленки (влияние на выработку внеклеточного матрикса, межклеточную коммуникацию) [7, 8]. Две взаимоисключающие задачи, такие как борьба с нежелательными биопленками (болезнетворными, коррозионными, вызывающими обрастания оборудования, систем коммуникации и т.д.) и поддержание биотехнологически значимых биопленок в биокатализе, ферментации, биодеградации, микробных топливных элементах, биосенсорах, могут быть решены с применением наноматериалов, которые либо борются с биопленками, либо, наоборот, модифицируют поверхность для повышения эффективности биопленкообразования.

Антимикробное и антибиопленочное действие производных графена в настоящее время широко обсуждается [9, 10]. Накоплено значительное количество противоречивых результатов, как подтверждающих, так и опровергающих данную гипотезу. Недавние исследования показали, что антибактериальная активность графена и материалов на его основе проявляется после прямых физических и химических взаимодействий УНМ с бактериями. Графен и его производные вызывают летальную деградацию клеточных компонентов, главным образом белков, нуклеиновых кислот и липидов, приводят к повреждению мембран, прерывают фазу репликации, взаимодействуя с водородными группами РНК/ДНК бактерий [11]. В работе О. Ахаван с соавторами было показано, что грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* более устойчивы к повреждению цитоплазматической мембраны, вызванному ОГ и вОГ, чем грамположительные *Staphylococcus aureus*, лишенные внешней мембраны [12]. Показано, что концентрация кислорода в производных графена изменяет его антимикробное действие. Также в ряде работ было показано, что восстановление ОГ делает этот материал более эффективным по отношению к бактериям, чем его невосстановленный аналог. За счет большей гидрофобности он взаимодействует с липидным слоем мембраны и приводит к его деструкции [12, 13]. Было показано, что ОГ значительно усиливал рост, образование и развитие биопленок *E. coli* и *S. aureus* даже в концентрации 500 мг/л, тогда как вОГ ($\geqslant$50 мг/л) проявлял сильный ингибирующий эффект по отношению к суспендированным клеткам и биопленкам, при этом ингибирующее действие вОГ (50 и 100 мг/л) ослаблялось к 24 ч (фаза зрелой биопленки) и устранялось через 48 ч [14]. Наоборот, в работе С.И. Саид с соавторами установлена антимикробная активность 200 мг/л ОГ в отношении *S. aureus*: жизнеспособность бактериальных клеток снижалась на 90%, при этом антимикробное действие ОГ сильно зависело от концентрации и времени воздействия. Также ОГ продемонстрировал антибиопленочную активность: при воздействии 100 мг/л масса биопленок снижалась на 30–70% [15]. Предполагается, что графен и его производные обладают большим потенциалом для использования в очистке сточных вод, в том числе и за счет своих антибактериальных и антибиопленочных свойств [16]. Однако низкие дозы ОГ, не обладающие бактериостатическим эффектом, могут способствовать пролиферации бактерий и приводят к увеличению их популяций в водной среде [17]. Также было показано, что при низких температурах ОГ усиливает анаболизм сообщества за счет стимуляции потребления органического углерода и регулирования экспрессии генов ферментов цикла Кребса и Энтнера-Дудорова, тем самым, возможно, стимулируя синтез и секрецию внеклеточных полимерных веществ [18].

Результаты научных исследований взаимодействия УНМ с микроорганизмами в основном касаются бактерий, вызывающих инфекционные заболевания. Воздействие производных графена на дрожжи изучено гораздо меньше. Дрожжи – это универсальный микроорганизм, имеющий важное значение для промышленности и биотехнологии, молекулярно-генетических исследований и изучения фундаментальных клеточных процессов [19]. В недавних работах был показан антифунгальный и антибиопленочный эффект ОГ [20, 21]. Графеновое нанопокрытие обладало антиадгезионными свойствами против *C. albicans*, которые выражались в значительном снижении количества жизне-

способных клеток, уровня метаболизма и биомассы биопленки по сравнению с контролем [20].

Дрожжи *C. maltosa* – модельный организм для изучения адаптивных изменений структуры и функции клеточной стенки при потреблении водонерастворимых питательных веществ [22]. Известна способность этого вида к биодеградации нефтяных загрязнений [23]. Этот биотехнологически значимый микроорганизм образует массивные биопленки на гидрофобных поверхностях и, кроме того, может являться модельным для изучения физиологических реакций условно-патогенных дрожжей этого рода. В связи с этим целью настоящей работы явилось изучение влияния ОГ и вОГ на биомассу биопленки *C. maltosa* ВКПМ Y-194, а также на метаболическую активность, содержание внутриклеточного АТФ и проницаемость цитоплазматической мембраны клеток.

Материалы и методы

Объект исследования, материалы и условия культивирования. *C. maltosa* ВКПМ Y-194 культивировали на жидкой питательной среде (г/л): глюкоза – 50, пептон – 5, дрожжевой экстракт – 5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1, K_2HPO_4 – 0,1 (pH 6) в колбах Эрленмейера объемом 100 мл в течение 3 сут при 25–30°C. В работе использовали ОГ, имеющий объемную плотность 2,0–2,5 г/см^3, размер частиц 10–100 мкм, более 80% монослоя и содержащий 46% C, 49% O, 2,5% H, 2,5% S; и вГО с объемной плотностью 0,01 г/см^3, общей удельной поверхностью 700 м^2/г, размером частиц 10–100 мкм, монослоем более 80% и следующим элементным составом: 96% C, 2,7% O, 0,3% H, 0,4% S, 0,5% N (РУСГРАФЕН, Россия). ОГ и вОГ добавляли в среду культивирования до конечной концентрации 200 мг/л.

Определение биомассы биопленки. Биопленки выращивали в лунках полистиролового плоскодонного 96-луночного планшета (Медполимер, Россия) в 200 мкл питательной среды, инокулированной 10 мкл суспензии *C. maltosa* ВКПМ Y-194 ($ОП_{540}$ = 1), в течение 3 и 7 сут при 30°C. Биомассу биопленок определяли в 3 вариантах опытов: при культивировании биопленок на питательной среде с ОГ и вОГ (200 мг/л) в присутствии планктонной культуры (1) и при первоначальной адгезии клеток *C. maltosa* ВКПМ Y-194 ($ОП_{540}$ = 1) в течение 2 ч, с последующим удалением суспензии из лунок, внесением питательной среды с производными графена и ежедневной сменой среды (2), а также при культивировании на питательной среде без УНМ с последующим разрушением биопленок в присутствии ОГ и вОГ (3). 3- и 7-суточные биопленки отмывали 0,9%-ным NaCl однократно и вносили 0,9%-ный NaCl с 200 мг/л ОГ и вОГ на 4 ч. Контролем служил 0,9%-ный NaCl без УНМ. В 1-м и 2-м варианте опытов контролем служила питательная среда без УНМ.

После 3 и 7 сут культивирования питательную среду и планктонные клетки удаляли из лунок полистиролового планшета декантацией, биопленку отмывали 200 мкл калий-фосфатного буфера (pH 7,2 ± 0,2) дважды и окрашивали 0,1%-ным раствором кристаллического фиолетового в течение 40 мин, отмывали окрашенную биопленку калий-фосфатным буфером однократно и экстрагировали краситель в 96%-ном этиловом спирте (200 мкл) в течение 20 мин. Биомассу биопленки оценивали по оптической плотности раствора красителя при λ = 540 нм, измеренной на планшетном ридере Infinite M1000 pro (Tecan, Швейцария).

Определение метаболической активности клеток биопленок. Метаболическую активность клеток биопленок оценивали по степени восстановления 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2-H-тетразолия бромида (methyl thiazolyl tetrazolium; Servicebio, Китай) до водонерастворимого формазана с последующей экстракцией последнего диметилсульфоксидом (ДМСО). Биопленки выращивали, как описано выше. Из лунок планшетов удаляли питательную среду, промывали калий-фосфатным буфером однократно, вносили по 160 мкл физиологического раствора и 40 мкл реагента, инкубировали 4 ч. Восстановление соли тетразолия во время метаболизма микроорганизмов приводит к образованию осадка фиолетовых кристаллов формазана, которые растворяли ДМСО и определяли оптическую плотность раствора при λ = 570 нм на планшетном ридере Infinite M1000 pro (Tecan, Швейцария).

Определение содержания АТФ в клетках биопленок. Биопленки *C. maltosa* ВКПМ Y-194 выращивали в лунках полистиролового плоскодонного 96-луночного планшета (Медполимер, Россия) в 2 вариантах: 1) в питательной среде с УНМ (200 мг/л); 2) в питательной среде с последующей инкубацией в 0,9%-ном NaCl с УНМ (200 мг/л). АТФ экстрагировали, добавляя 200 мкл ДМСО к биопленкам, разводили в 10 раз деионизированной водой и 50 мкл образца смешивали с 50 мкл реагента (АТФ-реагент, БХМ СТ, Россия), содержащего люциферин и люциферазу светляков. Интенсивность люминесценции измеряли на планшетном ридере Infinite M1000 Pro (Tecan, Швейцария). Количество АТФ определяли по калибровочному графику и рассчитывали на лунку планшета.

Оценка проницаемости цитоплазматической мембраны клеток биопленок. Биопленки *C. maltosa* ВКПМ Y-194 выращивали 3 и 7 сут на предметных стеклах для микроскопии (25×75 мм). Питательную среду (25 мл) инокулировали 0,5 мл суспензии дрожжей ($ОП_{540}$ = 1,2), стекла с биопленкой отмывали 0,9%-ным NaCl и инкубировали 4 ч в 0,9%-ном NaCl с 200 мг/л УНМ. После этого биопленки окрашивали в темноте 20 мин красителями LIVE/DEAD FungaLight Yeast Viability Kit

(Invitrogen, США), из расчета 3 мкл смеси красителей в равном соотношении на 1 мл физиологического раствора (0,9%-ного NaCl), инкубировали в темноте в течение 20 мин и просматривали в световом микроскопе «Leica DM LS» (Leica, Германия) с флуоресценцией. Клетки с неповрежденной мембраной окрашивались в зеленый цвет, с поврежденной – в красный.

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов проводили в программе PAST [24]. Проверка на соответствие нормальному распределению осуществлялась с помощью теста Шапиро-Уилка. Для выяснения статистической значимости влияния производных графена на биопленки использовали дисперсионный анализ (ANOVA). Также для анализа достоверности различий использовали t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Влияние ОГ и вОГ на формирование и разрушение биопленок C. maltosa ВКПМ Y-194. При культивировании биопленок в присутствии суспензионной культуры биомасса биопленки *C. maltosa* ВКПМ Y-194 на среде с ОГ и вОГ была значимо ниже, чем в контроле, а с ОГ значимо ниже, чем с вОГ как на 3 сут, так и на 7 сут (рис. 1). При ежесуточной смене среды 3-суточные биопленки при росте с вОГ не отличались от контроля, 7-суточные биопленки были менее массивны как на среде с ОГ, так и на среде с вОГ. Разрушение 7-суточных биопленок было значимо больше в присутствии УНМ, что, вероятно, связано со старением биопленки. Биопленкообразование является адаптивной реакцией микроорганизмов и может усиливаться в ответ на различные факторы окружающей среды. Ингибирование биопленкообразования является следствием воздействия как на отдельные клетки (снижение жизнеспособности и адгезии клеток), так и биопленку в целом (уменьшение выработки экзополимеров, разрушение биопленки). Известно, что механизмы и стадии формирования дрожжевых биопленок в основном сходны с таковыми бактериальных биопленок [25]. При сравнении действия ОГ и вОГ на бактерии в большинстве работ отмечено, что вОГ за счет своей гидрофобности и повышенного сродства к липидам мембраны оказывает на бактериальные клетки более значительное повреждающее действие, чем ОГ [12–14]. Нами было отмечено, что ОГ в питательной среде сильнее снижает биопленкообразование дрожжей, чем вОГ. Известно, что клеточная стенка дрожжей содержит около 40% маннанопротеинов, около 60% глюкана и около 2% хитина [26], тогда как бактериальная клеточная стенка содержит пептидогликан, а у грамотрицательных – пептидогликан и наружную мембрану. Различия поверхностных свойств клеток микроорганизмов может быть причиной различного действия УНМ на их биопленкообразование.

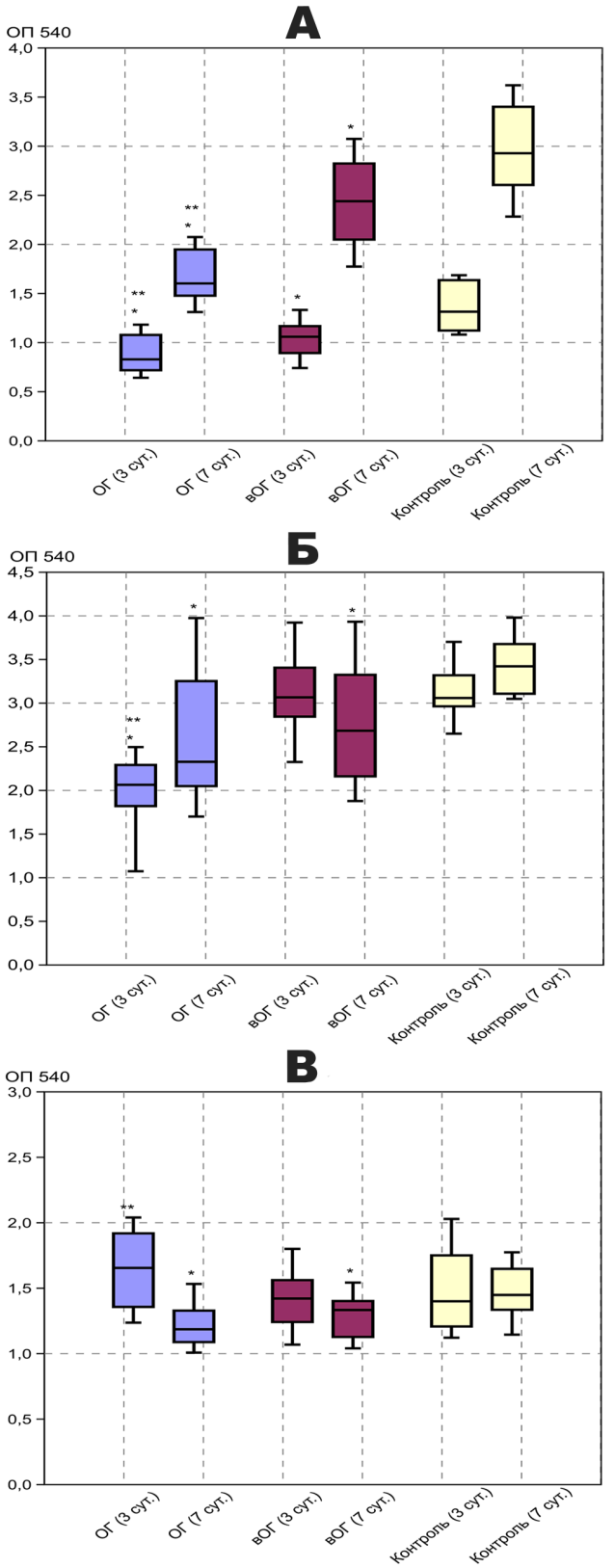

Рис. 1. Биомасса биопленок *C. maltosa* ВКПМ Y-194 при росте с ОГ и вОГ. **А** – рост биопленки в присутствии суспензии, **Б** – рост биопленки при ежесуточном удалении планктонных клеток, **В** – разрушение зрелой биопленки.
Представлено распределение значений в выборке: медиана, верхний и нижний квартили, максимумы и минимумы, * – статистически значимое отличие от контроля без УНМ, ** – статистически значимое отличие биомассы биопленки на среде с ОГ от таковой на среде с вОГ (ANOVA)

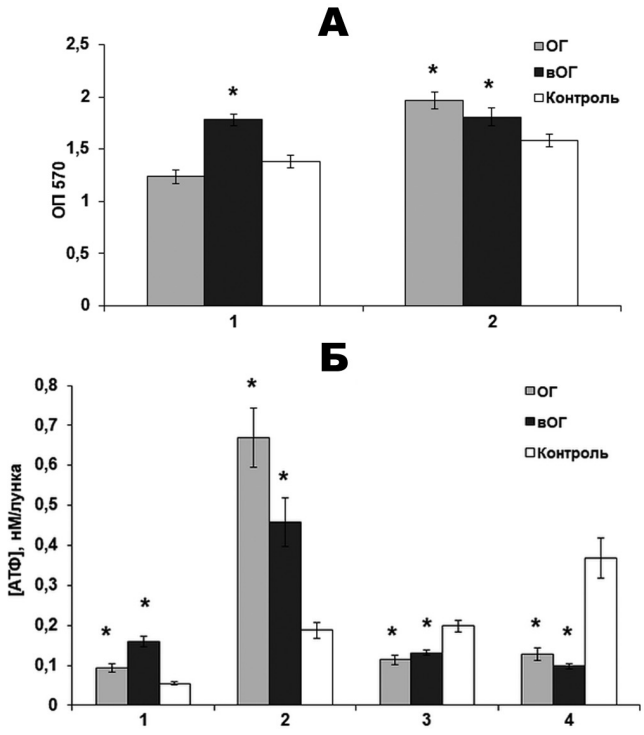

Рис. 2. Уровень метаболизма клеток 3-суточных (1, 3) и 7-суточных (2, 4) биопленок *C. maltosa* ВКПМ Y-194 при росте (1, 2) и разрушении (3, 4) в присутствии УНМ, оцененный: **А** – по восстановлению соли тетрозолия, **Б** – по содержанию внутриклеточного АТФ.
Данные представлены в виде среднего ± ошибка среднего (n = 16), * – статистически значимое отличие от контроля без УНМ (t-критерий, $p < 0,05$)

Влияние ОГ и вОГ на метаболическую активность биопленок C. maltosa ВКПМ Y-194. Метаболическую активность *C. maltosa* ВКПМ Y-194 оценивали по уровню восстановления соли тетразолия до формазана (реактив methyl thiazolyl tetrazolium), которое осуществляется дегидрогеназами живых клеток (рис. 2А). Дегидрогеназная активность клеток 3-суточных биопленок, выращенных в присутствии ОГ, не отличалась от активности клеток контрольной группы ($p > 0,05$), но была значимо выше в биопленках, образованных на среде с вОГ. Метаболическая активность 7-суточных биопленок, выращенных в присутствии УНМ, значимо превышала контрольную. Возрастание дыхательной активности клеток может быть связано как с адаптационной реакцией клеток в ответ на присутствие стрессового фактора (УНМ) в среде, так и с большей долей живых клеток в биопленке.

Влияние ОГ и вОГ на содержание АТФ в клетках биопленок C. maltosa ВКПМ Y-194. При росте *C. maltosa* ВКПМ Y-194 в присутствии УНМ внутриклеточное содержание АТФ значимо превышало таковое в контроле как в 3 сут, так и в 7 сут биопленках (рис. 2Б), что коррелирует с данными по дегидрогеназной активности. Однако при оценке общей биомассы биопленки было показано снижение биопленкообразования в присутствии ОГ и вОГ. Так как кристаллический фиолетовый окрашивает не только клетки, но и полимерный

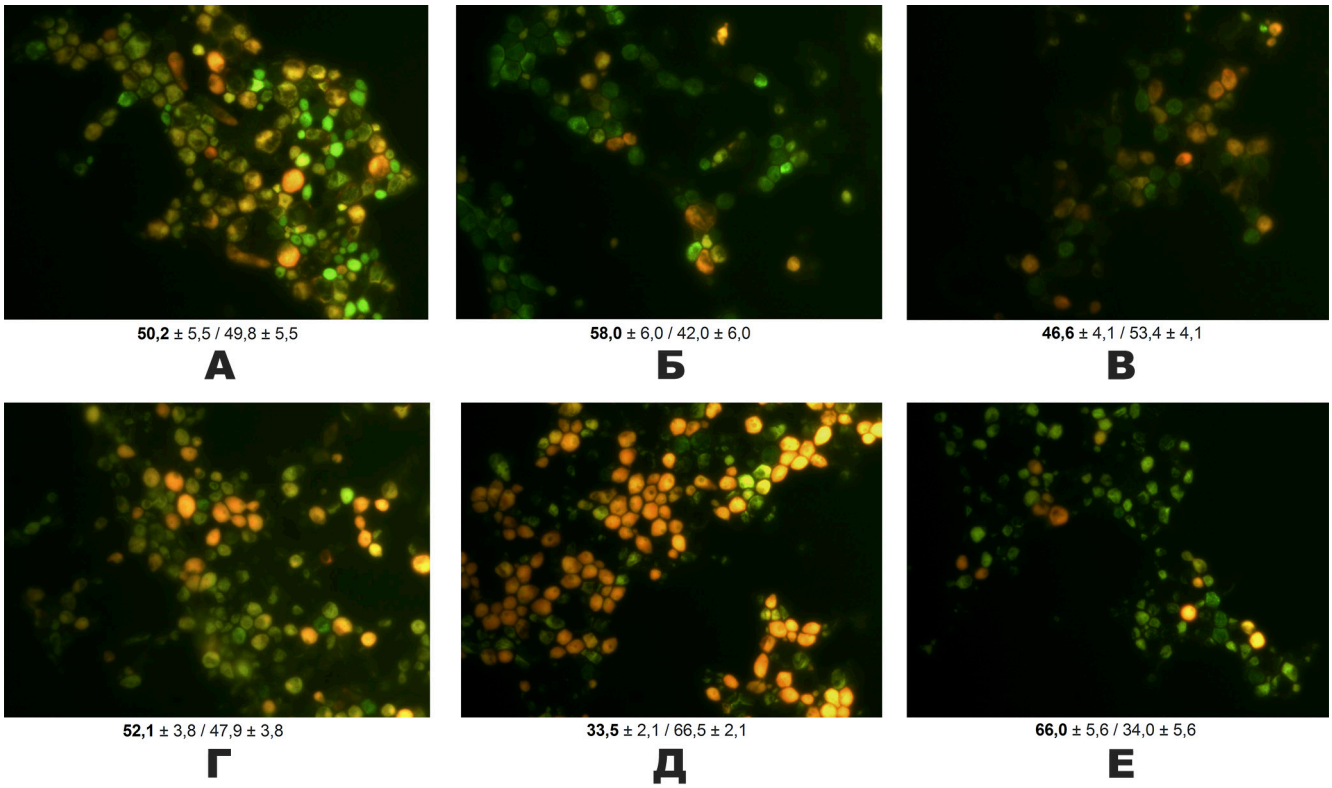

Рис. 3. Флуоресцентная микроскопия клеток биопленок *C. maltosa* ВКПМ Y-194, окрашенных красителем Live/Dead. Зеленое окрашивание – клетки с неповрежденной мембраной; красное окрашивание – клетки с поврежденной мембраной; указано среднее %-ное соотношение (зеленые клетки / красные клетки) ± ошибка среднего (n = 11). **А**, **Б**, **В** – 3-суточные биопленки, **Г**, **Д**, **Е** – 7-суточные биопленки; **А**, **Г** – контроль, **Б**, **Д** – обработка ОГ, **В**, **Е** – обработка вОГ.

матрикс, можно выдвинуть предположение, что УНМ снижают выработку экзополимеров и воздействуют на клетки как стрессовый фактор. Возрастание содержания АТФ в клетке может быть следствием разобщения энергетического и конструктивного метаболизма, поэтому нельзя однозначно утверждать, что увеличение концентрации АТФ в биопленках, выращенных в присутствии УНМ, свидетельствует о большем количестве жизнеспособных клеток, чем в контрольной биопленке. При воздействии УНМ в течение 4 ч на зрелые биопленки, выращенные на питательной среде без УНМ, было установлено значимое снижение внутриклеточного АТФ по отношению к контролю. Это могло быть следствием более интенсивного разрушения биопленки и гибели клеток.

Влияние ОГ и вОГ на проницаемость мембраны клеток биопленок C. maltosa ВКПМ Y-194. Показано, что количество клеток *C. maltosa* ВКПМ Y-194 с поврежденной мембраной значительно возрастает при воздействии ОГ на 7-суточные биопленки (рис. 3). При воздействии вОГ на 3- и 7-суточные биопленки и ОГ на 3-суточные биопленки процентное соотношение мертвых клеток по сравнению с контролем не возрастает.

Кислородсодержащие группы усиливают негативное действие графена – вероятно, за счет большего сродства УНМ к поверхности клетки. Поверхность клеток *C. maltosa* ВКПМ Y-194 обладает значительной гидрофобностью, штамм образует массивные биопленки на полистироле, также известно о способности данного вида дрожжей к биодеградации углеводородов нефти [23]. При этом более гидрофобный УНМ (вОГ) не обладает таким повреждающим действием на биопленки этого штамма дрожжей, что может быть связано не столько со свойствами поверхности клетки, сколько с защитным действием экзополимерного матрикса, который препятствует активной диффузии вОГ.

Заключение

Таким образом, показано, что негативное влияние ОГ на биопленки *C. maltosa* ВКПМ Y-194 более выражено, чем вОГ. Негативное влияние УНМ более выражено по отношению к зрелым 7-суточным биопленкам, чем к 3-суточным. При этом не наблюдается как полного подавления биопленкообразования, так и полной эрадикации биопленок под воздействием этих УНМ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-24-20008, https://rscf.ru/project/24-24-20008/, Пермский край). Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bhatt S., Punetha V.D., Pathak R., Punetha M. Graphene in nanomedicine: A review on nano-bio factors and antibacterial activity. *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2023;226:113323.

2. Awogbemi O., Kallon D.V.V. Recent advances in the application of nanomaterials for improved biodiesel, biogas, biohydrogen, and bioethanol production. *Fuel*. 2024;358(Pt. B):130261.

3. Xia M.-Y., Xie Y., Yu C.-H., Chen G.-Y., Li Y.-H., Zhang T., Peng Q. Graphene-based nanomaterials: the promising active agents for antibiotics-independent antibacterial applications. *J. Control. Release*. 2019;307:16–31.

4. Ibukun A.E., Yahaya N., Mohamed A.H., Semail N.-F., Hamid M.A.A., Zain N.N.M., Kamaruddin M.A., Loh S.H., Kamaruzaman S. Recent developments in synthesis and characterisation of graphene oxide modified with deep eutectic solvents for dispersive and magnetic solid-phase extractions. *Microchem. J.* 2024;199:110111.

5. Flemming H.-C., Wingender J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol*. 2010;8(9):623–633.

6. Lundqvist M., Stigler J., Elia G., Dawson K.A. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 2008;105(38):14265–14270.

7. Cui F., Li T., Wang D., Yi S., Li J., Li X. Recent advances in carbon-based nanomaterials for combating bacterial biofilm-associated infections. *J. Hazard. Mater.* 2022;431:128597.

8. Maksimova Yu.G., Zorina A.S. Antibiofilm and probiofilm effects of nanomaterials on microorganisms (Review). *Appl. Biochem. Microbiol. (Mosc.)*. 2024;60(1):1–16.

9. Seifi T., Kamali A.R. Anti-pathogenic activity of graphene nanomaterials: A review. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 2021;199:111509.

10. Shankar K., Agarwal S., Mishra S., Bhatnagar P., Siddiqui S., Abrar I. A review on antimicrobial mechanism and applications of graphene-based materials. *Biomater. Adv*. 2023;150:213440.

11. Hadidi N.; Mohebbi M. Anti-Infective and toxicity properties of carbon based materials: graphene and functionalized carbon nanotubes. *Microorganisms*. 2022;10(12):2439.

12. Akhavan O., Ghaderi E. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria. *ACS Nano*. 2010;4(10):5731–5736.

13. Dey N., Vickram S., Thanigaivel S., Kamatchi C., Subbaiya R., Karmegam N., Govarthanan M. Graphene materials: Armor against nosocomial infections and biofilm formation – A review. *Environ. Res.* 2022;214(Pt. 2):113867.

14. Guo Z., Xie C., Zhang P., Zhang J., Wang G., He X., Ma Y., Zhao B., Zhang Z. Toxicity and transformation of graphene oxide and reduced graphene oxide in bacteria biofilm. *Sci. Total Environ*. 2017;580:1300–1308.

15. Saeed S.I., Vivian L., Salma C.W., Zalati C.W., Sani N.I.M., Aklilu E., Mohamad M., Noor A.M., Muthoosamy K., Kamaruzzaman N.F. Antimicrobial activities of graphene oxide against biofilm and intracellular *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *BMC Vet. Res.* 2023;19(1):10.

16. Shahnaz T., Hayder G. Exploring graphene's antibacterial potential for advanced and sustainable solutions in water treatment. *J. Water Process Eng.* 2023;56:104530.

17. Zhang X., Li Y., Zhang K., Yin Y., Wang J., Wang L., Wang Z., Zhang R., Wang H., Zhang Z. Graphene oxide affects bacteriophage infection of bacteria by promoting the formation of biofilms. *Sci. Total Environ.* 2023;880:163027.

18. Liao Y., Li S., Ji G. Graphene oxide stimulated low-temperature denitrification activity of microbial communities in lake sediments by enhancing anabolism and inhibiting cellular respiration. *Chemosphere.* 2024;350:141090.

19. Park S., Kang S.-E., Kim S.-J., Kim J. Graphene-encapsulated yeast cells in harsh conditions. *Fungal Biol.* 2023;127(10–11):1389–1396.

20. Agarwalla S.V., Ellepola K., Sorokin V., Ihsan M., Silikas N., Neto A.C., Seneviratne C.J., Rosa V. Antimicrobial-free graphene nanocoating decreases fungal yeast-to-hyphal switching and maturation of cross-kingdom biofilms containing clinical and antibiotic-resistant bacteria. *Biomater. Biosyst.* 2022;8:100069.

21. Shirshahi V., Saedi M., Nikbakht M., Mirzaii M. Unveiling the antimicrobial potential of oxidized graphene derivatives: Promising materials for advanced wound dressings and antibacterial surfaces. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 2023;88:104949.

22. Zvonarev A., Farofonova V., Kulakovskaya E., Kulakovskaya T., Machulin A., Sokolov S., Dmitriev V. Changes in cell wall structure and protein set in *Candida maltosa* grown on hexadecane. *Folia Microbiol. (Praha).* 2021;66(2):247–253.

23. Патент РФ 2114174 C1 Кузнецов П.А., Авчиева П.Б. Консорциум дрожжей *Candida maltosa* для биодеградации нефтезагрязнений. 1998.

24. Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*. 2001;4(1):4.

25. Alonso V.P.P., Lemos J.G., do Nascimento M. da S. Yeast biofilms on abiotic surfaces: Adhesion factors and control methods. *Int. J. Food Microbiol.* 2023;400:110265.

26. Калебина Т.С., Кулаев И.С. Роль белков в формировании молекулярной структуры клеточной стенки дрожжей. *Успехи биологической химии*. 2001;41:105–130.

Поступила в редакцию 20.05.2024
После доработки 08.10.2024
Принята в печать 09.11.2024

RESEARCH ARTICLE

Effect of graphene derivatives on biofilm formation by *Candida maltosa*

E.V. Pyankova[1], Yu.G. Maksimova[1, 2, *]

[1]Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Goleva st. 13, Perm, 614081, Russia;
[2]Perm State National Research University, Bukireva st. 15, Perm, 614990, Russia
[*]e-mail: yul_max@mail.ru

Graphene derivatives (oxide and its reduced form) are promising carbon nanomaterials (CNMs) used in industry, electronics, medicine and biotechnology. The aim of the work was to study the effect of graphene oxide (GO) and its reduced form (rGO) on the formation and eradication of *Candida maltosa* VKPM Y-194 biofilms, metabolic activity, intracellular ATP content and the permeability of the cytoplasmic membrane of biofilm cells. It was found that GO and rGO slightly suppress yeast biofilm formation, and the decrease in biofilm biomass during growth in the presence of GO is significantly greater than during cell growth with rGO. The destruction of mature 7-day yeast biofilms is slightly greater in the presence of CNMs than in the control, and significantly greater than that of 3-day ones. At the same time, the metabolic activity of biofilm cells, assessed by the reduction of tetrazolium salt (methyl thiazolyl tetrazolium reagent), upon contact of biofilm cells with CNM for 4 hours, significantly increased in 3-day biofilms exposed to rGO. The content of intracellular ATP in biofilms grown in the presence of CNMs exceeded that in the control, but was lower after 4-hour effect on mature biofilms grown in a nutrient medium without CNM. The greatest negative effect on the cytoplasmic membrane of biofilm cells, which was expressed in an increase in its permeability, was exerted by GO upon 4-hour exposure to a 7-day biofilm. It was found that the negative effect of CNMs on biofilms of *C. maltosa* VKPM Y-194 is more pronounced when exposed to GO than to rGO, and higher when exposed to 7-day biofilms than to 3-day ones. Complete inhibition of biofilm formation and complete eradication of mature biofilms under the effect of CNMs have not been established.

Keywords: *yeast, biofilms, graphene oxide, reduced graphene oxide, metabolic activity, ATP*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number № 24-24-20008, https://rscf.ru/en/project/24-24-20008/, Perm Krai.

Сведения об авторах

Пьянкова Екатерина Валерьевна – аспирант, инженер лаборатории молекулярной биотехнологии «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиала ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН. Тел.: 8-342-212-44-76; e-mail: 19katya991@rambler.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-0670-3829

Максимова Юлия Геннадьевна – докт. биол. наук, зав. лабораторией молекулярной биотехнологии «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиала ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, проф. кафедры микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета. Тел.: 8-342-212-44-76; e-mail: yul_max@mail.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0003-1870-1369