

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE



LAURA ŽORŽA

**DAŽĀDAS IZCELSMES MIKROORGANISMU
BIOPLĒVES BAGĀTINĀŠANAS UN AKTIVITĀTES
STIMULĒŠANAS IESPĒJAS**

Promocijas darba kopsavilkums

Zinātnes doktora grāda iegūšanai bioloģijā

Apakšnozare: mikrobioloģija

Rīga, 2024

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Mikrobioloģijas un Biotehnoloģijas institūtā un Latvija Universitātes Bioloģijas fakultātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedrā laika posmā no 2019. līdz 2023. gadam.

Darbs sastāv no anotācijas, ievada, literatūras apskata, materiāliem un metodēm, rezultātu un diskusijas sadaļas, secinājumiem, aizstāvamām tēzēm un literatūras saraksta.

Darba forma: publikāciju kopa bioloģijas nozarē, mikrobioloģijas apakšnozarē

Darba zinātniskais vadītājs : Dr. biol. **Olga Mutere**, vadošā pētniece. Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedra, Bioloģijas fakultāte, Latvijas Universitāte.

Darba recenzenti:

- 1) **Vizma Nikolajeva**, vadošā pētniece, Latvijas Universitāte;
- 2) **Linda Mežule**, Dr.biol., Rīgas Tehniskā universitāte;
- 3) **Anne Kahru**, PhD, Nacionālais ķīmiskās fizikas un biofizikas institūts, Tallina, Igaunija.

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2024. gada 19. martā Latvijas Universitātes dabaszinātņu nozares promocijas padomes atklātā sēdē Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātē, Jelgavas ielā 1, Rīgā, Latvijā.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes Bibliotēkā Rīgā, Kalpaka bulvārī 4.

LU dabaszinātņu zinātņu nozares promocijas

Padomes priekšsēdētājs _____ / *Uldis Kalnenieks* /

Promocijas padomes sekretāre _____ / *Vita Rovīte* /

ANOTĀCIJA

Mikroorganismu veidotās bioplēves, kas veicina toksisku savienojumu biodegradāciju un vides bioremediāciju arvien biežāk piesaista pētnieku uzmanību. Šādas biotehnoloģiski vērtīgas un bagātinātas bioplēves var tikt pielietotas dažādos vides biotehnoloģijas procesos, paaugstinot to efektivitāti. Tomēr to darbības uzturēšanai un aktivitātes paaugstināšanai ir nepieciešami jauni ekonomiski izdevīgi un efektīvi risinājumi.

Šī darba ietvaros tika pētītas bioplēves, kas veidojas uz dažādiem nesējiem- kermazīta granulām no Zaļās Sienas Sistēmas moduļiem, biodegradējamās kasavas izcelsmes bioplastmasas, kā arī polistirēna un polietilēna tereftalāta (PET) plastmasas virsmām. Tika pārbaudīta atsevišķu savienojumu (triptona, rauga ekstrakta, glikozes, Ca^{2+} un Mg^{2+} jonu), augu izcelsmes barības vielu (melases, kāpostu lapu ekstrakta, sintētisko sakņu eksudātu) un tādu kompleksu substrātu kā atkritumu poligona infiltrātu izmantošanas iespējas bioplēvju bagātināšanai un to aktivitātes uzturēšanai.

Tika noteikta bioplēves kvantitatīva veidošanās, enzimatiskā aktivitāte, loma noteiktu piesārņotāju mazināšanā, raksturota to morfoloģiskā struktūra, kā arī potenciālā rezistence pret antimikrobiāliem līdzekļiem.

Barotnes komponentu statistikā optimizācija *Pseudomonas putida* kultūrai uzrādīja triptona lielāko ietekmi uz bioplēves veidošanos 8 °C un 23 °C temperatūrā, savukārt 37 °C lielākoties bija atkarīga no Mg^{2+} jonu pievienošanas. Tika novērota 150 mg/L benzalkonija hlorīda stimulējošā ietekme uz *P. putida* bioplēves veidošanās aktivitāti 100% TSB (Tryptone-Casein-Soy Broth) un optimizētā barotnē.

Keramzīta granulu bioplēves bagātināšana ar sintētiskajiem augu sakņu eksudātiem lielākoties veicināja enzimatiskās aktivitātes pieaugumu un formaldehīda biodegradāciju. Bioplēves attīstība pēc bagātināšanās notika lokāli, pieaugot augstumā.

Salīdzinot bioplēves veidošanos uz PET virsmām pēc 30 dienu inkubācijas 2% atkritumu poligona infiltrātos un augsnē, infiltrāts uzrādīja stimulējošo efektu uz mikroorganismu imobilizāciju.

Atslēgvārdi: bioplēves, bioplēves bagātināšana, biodegradācija, atkritumu poligona infiltrāti, benzalkonija hlorīds, formaldehīds, plastmasa, *Pseudomonas* spp.

SATURS

ANOTĀCIJA.....	3
SATURS.....	4
SAĪSINĀJUMI.....	6
IEVADS	7
1. LITERATŪRAS APSKATS	8
1.1. Baktēriju bioplēves	8
1.2. Bioplēves veidošanās posmi.....	9
1.3. Dažādas izcelsmes bioplēves bagātināšanas un aktivitātes stimulēšanas iespējas	10
1.4. Riska novērtējums bioplēves ekspozīcijai ar antimikrobiālo līdzekli	11
1.5. Bioplēves mikroorganismu loma formaldehīda biodegradācijā	12
1.6. Bioplēves uz plastmasas virsmām, kas stimulē tās bioloģisko noārdīšanos	13
1.7. Atkritumu poligonu filtrāts kā vērtīgs mikroorganismu bioplēves avots.....	14
2. MATERIĀLI UN METODES.....	15
2.1. Mikroorganismu kultūras, bioplēves veidošanās un tās aktivitātes novērtējums	15
2.1.1. Mikroorganismu kultūras, to uzturēšana	15
2.1.2. Fluoresceīna diacetāta hidrolīzes aktivitātes noteikšana	15
2.1.3. Dehidrogenāzes aktivitātes noteikšana.....	15
2.1.4. Bioplēves veidošanās kvantitatīva noteikšana.....	15
2.2. Mikroorganismu bioplēvju bagātināšana un uzturēšana, biodegradācijas eksperimenti	16
2.2.1. Trīs mikroorganismu kultūru kultivēšana dažādos vides apstākļos	16
2.2.2. Barotnes sastāva optimizācija <i>P. putida</i> LMKK 650 bioplēves attīstībai	16
2.2.3. Barotnes mainīgo lielumu statistiskā optimizācija <i>P. putida</i> LMKK 650 bioplēves attīstībai un antimikrobiālā riska novērtējums... 16	
2.2.4. Keramzīta granulu bioplēvju bagātināšana ar viegli metabolizējamiem ogļhidrātiem	17
2.2.5. Imobilizēto mikroorganismu augšanas stimulējošo oglekļa avotu skrīnings formaldehīda klātbūtnē, izmantojot EcoPlates™.....	17
2.2.6. Keramzīta granulu inkubēšana ar formaldehīdu un tā atlikušās koncentrācijas noteikšana	17

2.2.7. Plastmasas biodegradācijas novērtējums atkritumu poligona infiltrātos un augsnē	17
2.3. Bioplēves morfoloģijas novērtējums un tās kompozīcijas noteikšana	18
2.3.1. Gaimas mikroskopija	18
2.3.2. Konfokāla lāzerskenējoša mikroskopija	18
2.4. Statistiskā analīze	18
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA	19
3.1. Trīs baktēriju kultūru bioplēves veidošanās novērtējums dažādos kultivēšanas apstākļos	19
3.2. Barotnes mainīgo komponentu statistiskā optimizācija <i>P. putida</i> LMKK 650 bioplēvei	20
3.3. Optimizētā barotnes sastāva validācija un imobilizēto <i>P. putida</i> LMKK 650 šūnu antimikrobiālās rezistentes paaugstināšanās riska novērtējums	22
3.4. Keramzīta granulu bioplēves bagātināšana sintētiskajā barotnē ar pakāpenisku ogļhidrātu koncentrācijas palielināšanu	23
3.5. Keramzīta granulu bioplēvju lomas novērtējums formaldehīda biodegradācijā	24
3.6. Oglekļa avotu skrīnings imobilizēto mikroorganismu augšanas stimulēšanai formaldehīda klātbūtnē, izmantojot EcoPlates™	25
3.7. Bioplēves vizualizācija pēc 3 posmu bagātināšanas ar sintētisko augu sakņu eksudātu	26
3.8. Bioplēves veidošanās un plastmasas biodegradācijas novērtējums atkritumu poligona infiltrātos un augsnē	27
4. SECINĀJUMI UN TURPMĀKO PĒTĪJUMU VIRZIENI	29
5. AIZSTĀVAMĀS TĒZES	31
6. PROMOCIJAS DARBU VEIDOJOŠĀS PUBLIKĀCIJAS	32
7. PĒTĪJUMA APROBĀCIJA	33
8. PATEICĪBAS UN FINANSĒJUMS	34
9. ATSAUCES	35

SAĪSINĀJUMI

ATP - adenožīntrifosfāts
BAC- benzalkonija hlorīds
CAS- no kasavas iegūtā bioplastmasa
CCD- central composite design
CLSM - konfokālais lāzerskenējošais mikroskops
ECP- keramzīta granula
EPS - ekstracelulārā polimēru substance
FA- formaldehīds
FDA- fluoresceīna diacetāts
GLU- glikoze
GWS- zaļās sienas sistēma
YE- rauga ekstrakts
PI - propīdija jodīds
QACs- četraizvietotie amonija savienojumi
TRY- triptons
VOCs- gaistoši organiski savienojumi

IEVADS

Mikroorganismu veidotās bioplēves var radīt ar pārtikas drošību, veselības aprūpi un ekonomiku saistītos riskus. Turpretim tām ir būtiska nozīme komerciāli vērtīgu produktu rūpnieciskajā ražošanā, toksisku savienojumu biodegradācijā notekūdeņos un bioremediācijas veicināšanā. Bioplēves attīstību nosaka vairāki vides faktori, tostarp, temperatūra, pH, sāļums, plūsmas ātrums, spiediens un barības vielu pieejamība. Dziļāka izpratne par šo faktoru ietekmi uz bioplēves veidošanos un attīstību, kā arī jaunu risinājumu meklēšana bioplēves bagātināšanai un aktivitātes stimulēšanai ir būtiska, lai izstrādātu stratēģijas biotehnoloģiski vērtīgu bioplēvju darbības optimizēšanai.

Zinātniskās literatūras datubāzēs ir pieejams liels informācijas daudzums par kaitīgu bioplēvju inhibēšanas iespējām, bet mazāk pētījumu ir veltīti biotehnoloģiski vērtīgu bioplēvju darbības stimulēšanai un to izmantošanai, piemēram, efektīvas biodegradācijas kontekstā.

Promocijas darba **mērķis** - izpētīt dažādas izcelsmes mikroorganismu bioplēves bagātināšanas un aktivitātes stimulēšanas iespējas organisku savienojumu biodegradācijai un bioplēvju uzturēšanai.

Mērķa sasniegšanai tika izvirzīti šādi **uzdevumi**:

1. Salīdzināt bioplēves attīstību uz polistirola virsmas baktēriju kultūrās *Pseudomonas putida* LMKK 650, *Escherichia coli* LMKK 332, *Staphylococcus epidermidis* LMKK 333, atkarībā no barības vielu koncentrācijas un temperatūras.

2. Optimizēt temperatūras un bagātināšanas komponentu kombināciju *P. putida* LMKK 650 bioplēves attīstības veicināšanai uz polistirola virsmas.

3. Novērtēt imobilizēto baktēriju antimikrobiālās rezistences paaugstināšanas riskus atkarībā no bagātināšanas veida, kā antimikrobiālo līdzekli izmantojot benzalkonija hlorīdu.

4. Raksturot keramzīta granulu bioplēves bagātināšanas iespējas efektīvākai formaldehīda biodegradācijai.

5. Salīdzināt bioplēves veidošanās aktivitāti uz PET plastmasas virsmas pēc 2 % atkritumu poligonu infiltrātu un augsnes iedarbības.

6. Raksturot atkritumu poligonu infiltrātu izmantošanas iespējas kā vērtīgu mikroorganismu bioplēvju avotu plastmasas biodegradācijai.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Baktēriju bioplēves

Dabā baktēriju šūnas var pastāvēt divos atsevišķos stāvokļos – planktoniskā kā brīvi peldošas formas un piestiprinājušās pie virsmas, veidojot bioplēves. Bioplēves ir kompleksas struktūras, kas sastāv no vienas vai vairākām mikroorganismu sugām, saimniekšūnām un šūnu sintezētajiem produktiem. Šūnas bioplēvēs ir saistītas ar baktēriju saražoto ekstracelulāro polimēru substanci (EPS) un ir piestiprinātas pie biotiskas vai abiotiskas virsmas (Bogino et al., 2013; Sharma et al., 2023).

Dabiskos apstākļos baktēriju šūnas reti eksistē atsevišķu planktonisku šūnu veidā. Bioplēvēs baktērijas ir izturīgākas pret fizikālu faktoru iedarbību, tajās tiek kavēta toksisku vielu, piemēram, antibiotiku vai dezinficējošo līdzekļu, iekļūšana. Šūnas ir noturīgas pret protozoju un imūnsistēmas šūnu fagocitozi (Matz and Kjelleberg, 2005; Sing et al., 2017). Baktēriju šūnas bioplēvē atrodas ciešā kontaktā, kas atvieglo šūnu savstarpējo komunikāciju, sniedz vairāk iespēju barības vielu, ģenētisko elementu apmaiņai un kopumā palielina baktēriju izdzīvošanas iespējas (Mirghani et al., 2022; Fazeli-Nasab, 2022).

Baktēriju spēja kolonizēt virsmas un veidot bioplēves tiek uzskatīta par nopietnu problēmu un ir asociēta ar zināmiem riskiem daudzās nozarēs, kas saistītas ar pārtiku, ūdensapgādi, farmāciju un veselības aprūpi. Bioplēves veidošanās uz implantu un katetru virsmām ir viens no biežākajiem pēcoperāciju infekciju iemesliem (Jamal et al., 2018). Bioplēves uz cauruļvadu sistēmu iekšējām virsmām var veicināt biokoroziju, siltummaiņas efektivitātes samazināšanos, nevēlamas ūdens kvalitātes izmaiņas un infekcijas slimību uzliesmojumus (Prest et al., 2016).

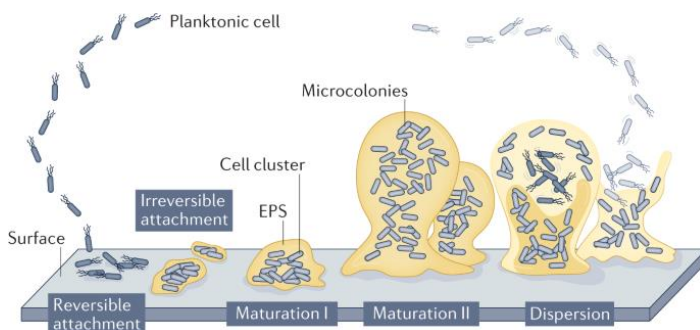
Neskatoties uz daudziem ar bioplēvju veidošanos saistītiem negatīviem aspektiem, ir zināmi daudzi piemēri ar biotehnoloģiski vērtīgu bioplēvju izmantošanas iespējām. Šādas bioplēves var bagātināt augsni, veicināt augu augšanu caur slāpekļa fiksāciju, minerālvielu uzņemšanu, fitohormonu producēšanu un nodrošināt augu aizsardzību pret fitopatogēniem mikroorganismiem (Bais et al., 2004; Khan et al., 2018). Salīdzinot ar to planktoniskām formām, bioplēvēs dzīvojošie mikroorganismi uzrāda lielāku izturību pret piesārņotājiem un augstākas spējas tos degradēt caur dažādiem katabolisma ceļiem (van Dillewijn et al., 2009). Baktēriju kopienas tiek izmantotas organisku un neorganisku savienojumu neitralizēšanai un noārdīšanai notekūdeņos, izmantojot

notekūdeņu attīrīšanas tehnoloģijas, kuru pamatā ir bioplēves (Murshid et al., 2023). Pateicoties to efektivitātei, nekaitīgumam un zemām izmaksām, ir palielinājusies interese par labvēlīgo baktēriju bioplēvju izmantošanu gaisa biofiltrācijā, lai samazinātu gaistošo organisko savienojumu (*Volatile organic compounds*, VOCs) radīto piesārņojumu iekštelpās (Sheoran et al., 2022). Lai labāk izprastu šādu labvēlīgu bioplēvju bagātināšanas un aktivitātes stimulēšanas iespējas, jāapzinās to veidošanās mehānismi.

1.2. Bioplēves veidošanās posmi

Bioplēves veidošanās gaitā mikroorganismu šūnas no planktoniskām formām pāriet imobilizētā stāvoklī (1.attēls). Bioplēves veidošanās norit vairākos posmos, kas ietver sākotnējo šūnu adsorbciju pie virsmas, mikrokolonijas izveidi, bioplēves trīsdimensiju struktūras veidošanos ar sekojošu nobriešanu un šūnu dispersiju (Muhammad et al., 2020).

Bioplēves veidošanās sākas ar atgriezenisku planktonisko šūnu piestiprināšanos virsmai. Šo procesu nodrošina tādas adhezīvās struktūras kā bārkstiņas, pili, fimbrijas vai proteīni uz šūnu virsmas (Donlan and Costerton 2002; Berne et al., 2015). Šūnu piestiprināšanās pakāpe ir atkarīga arī no dažādiem vides apstākļiem, tajā skaitā, virsmas materiāla sastāva, temperatūras, spiediena, plūsmas ātruma u.c. (Speziale and Geoghegan, 2015; Fu et al., 2021).



1.attēls. Bioplēves veidošanās posmi (Sauer et al., 2022).

Šūnas piestiprināšanās pie virsmas kalpo kā signāls bioplēves specifisku gēnu ekspresijai. Tas nodrošina starpšūnu signālmolekulu un EPS sintēzi, kas ierosina bioplēves matricas veidošanos (Toyofuku et al.,

2016). Šajā posmā planktoniskie mikroorganismi var pieķerties viens otram, veidojot šūnu agregātus uz substrāta. Tādējādi baktēriju šūnas paliek stingri piesaistījušās virsmai un adhēzija kļūst neatgriezeniska, ja nav notikusi fizikāla vai ķīmiskā iejaukšanās (Dunne 2002; Flemming and Wingender, 2010).

Pēc matricas veidošanās bioplēvē veidojas ar ūdeni piepildīti kanāli. Tie izplata dažādas barības vielas un izvada atkritumproduktus no bioplēves mikrokoloniju kopienām. Dispersijas gaitā mikroorganismu šūnas pamet nobriedušo bioplēvi, kas ļauj baktēriju šūnām veidot jaunas mikrokolonijas uz citiem substrātiem (Singh et al., 2017; Diaz- Salazar et al., 2017).

Ņemot vērā bioplēvju nopietno ietekmi uz cilvēku veselību, zinātnieki jau sen ir pievērsušies to attīstības profilaksei un kontrolei. Potenciāli kaitīgu bioplēvju kontrolei un inhibēšanai ir izstrādātas dažādas metodes un pieejas, kas galvenokārt ir mērķētas uz baktēriju adhēzijas mazināšanu, komunikācijas sistēmas (*quorum sensing*) darbības kavēšanu vai bioplēves iznīcināšanu (Muhammad et al., 2020). Tomēr tehnoloģiski vērtīgu bioplēvju funkcionalitātes un aktivitātes virzīšanai ir nepieciešami jauni ekonomiski izdevīgi un efektīvi risinājumi.

1.3. Dažādas izcelsmes bioplēves bagātināšanas un aktivitātes stimulēšanas iespējas

Bioplēves bagātināšanas stratēģijas ir dažādas, un tās var veikt dabiskajā vidē (*in situ*), piemēram, baktēriju slazdos (Gavriš et al., 2008), difūzijas kamerās (Nichols et al., 2010) un *ex situ*, tajā skaitā, bagātināšanas sistēmās laboratorijas apstākļos, piemēram, šķidrā barotnē, kokultivācijas sistēmās, nodrošinot optimālo augšanas faktoru klātbūtni (D'Onofrio et al., 2010).

Bioplēves attīstību ir iespējams veicināt vairākos veidos - kontrolēti mainot ārējās vides apstākļus, piegādājot šūnu agregāciju veicinošas molekulas vai veicot manipulācijas ar gēniem, kas ir saistīti ar bioplēves attīstību (Mukhi and Vishwanathan, 2022).

Tā, piemēram, jauktas baktēriju kultūras pakļaušana neoptimāliem pH un temperatūras apstākļiem paātrināja bioplēves veidošanos un palielināja tās elektroaktivitāti (Patil et al., 2011; Chiranjeevi and Patil, 2020). Mikroorganismu pakļaušana barības vielu trūkimam ierosināja šūnu stresu, kas rezultējās bioplēves veidošanā (D'Souza et al., 2021).

Virsmas ķīmiskā apstrāde, pievienojot vai atdalot noteiktas funkcionālās grupas, var izraisīt hidrofobitātes un virsmas lādiņa izmaiņas, tādējādi stimulējot bioplēves veidošanos (Sarjit et al., 2015).

Bioplēvju bagātināšana ar monosaharīdiem, piemēram, glikozi, pastiprināja EPS veidošanos *Candida albicans* un *Streptococcus mutans* bioplēvēs (Brito et al., 2021). Glikoze efektīvi veicināja *Pseudomonas aeruginosa* bioplēves veidošanos, regulējot ar ekstracelulāro polisaharīdu saistītā gēna *pslA* ekspresiju (She et al., 2019).

Eksperimentos ar *P. fluorescens* Mg^{2+} koncentrācija neietekmēja planktonisko šūnu augšanu, bet bioplēves veidošanās laikā palielināja virsmai piestiprināto šūnu daudzumu (Song and Leff, 2006). Ca^{2+} un Mg^{2+} pievienošana pētījumā ar *P. stutzeri* ievērojami uzlaboja bioplēves attīstību un padarīja bioplēves struktūru kompaktāku. Pie tam Ca^{2+} būtiski stimulēja proteīnu veidošanos EPS, savukārt Mg^{2+} galvenokārt veicināja polisaharīdu sekrēciju (Wu et al., 2022). Citi pētījumi uzrādīja, ka Ca^{2+} pievienošana ietekmēja *P. aeruginosa* bioplēvju struktūru un ārpusšūnu matricas sastāvu, palielinot baktēriju EPS ekspresiju un stabilitāti (Sarkisova et al., 2005).

1.4. Riska novērtējums bioplēves ekspozīcijai ar antimikrobiālo līdzekli

Neskatoties uz tehnoloģiski vērtīgu bioplēvju lomu biodegradācijā, augu aizsardzībā un bioremediācijā, bioplēvēs baktērijas ir izturīgākas pret dažādu vides faktoru ietekmi, tajā skaitā uzrādot augstāku toleranci pret antibiotiku un dezinficējošo līdzekļu iedarbību (Sing et al., 2017).

Pseudomonas ģints baktērijas, īpaši *P. aeruginosa* bieži tiek izmantotas kā modeļorganismi bioplēvju pētīšanas eksperimentos (Mann and Wozniak, 2012; Tuon et al., 2022). *P. aeruginosa* bioplēves veidošanās izraisa interesi tās klīniskās nozīmes dēļ (Donlan and Costerton, 2002), bet arī citu *Pseudomonas* spp. bioplēvju veidošanās ir dažādu pētījumu interešu jomā (Jara et al., 2021; Liu et al., 2021).

Benzalkonija hlorīds (BAC) ir viens no biežāk lietotajiem ceturrtējā amonija savienojumiem (QACs) farmācijas, kosmētikas un pārtikas rūpniecībā. Tas plaši tiek izmantots dezinficējošo līdzekļu sastāvā, jo izraisa baktēriju plazmatiskās membrānas lipīdu dubultslāņa pārraušanu, ārējās membrānas proteīnu inaktivāciju un būtiskas enzimatiskas izmaiņas (Chen et al., 2018; Pereira and Tagkopoulos, 2019).

Ir aprakstīta baktēriju rezistences palielināšanās pret tādām klīniski

nozīmīgām antibiotikām kā penicilīnu G, tetraciklīnu un ciprofloksacīnu pēc to saskares ar BAC. Rezistence visbiežāk izpaužas kā baktēriju šūnu spēja noārdīt antibiotikas vai regulējot to izplūdes sūkņu aktivitāti (Tandukar et al., 2013; Kim et al., 2018). COVID-19 pandēmijas laikā, krasi palielinoties dezinficējošo līdzekļu izmantošanai, īpaši aktualizējās nepieciešamība apzināties potenciālos riskus, kas saistīti ar šo dezinficējošo līdzekļu nonākšanu apkārtējā vidē un notekūdeņos. Tādu vides faktoru kā temperatūras un barotnes sastāva ietekme antimikrobiālā līdzekļa- BAC- klātbūtnē varētu atklāt jaunus bioplēves veidošanās un antimikrobiālās rezistences izplatīšanās riska aspektus.

1.5. Bioplēves mikroorganismu loma formaldehīda biodegradācijā

Formaldehīds (FA) ir izplatīts iekštelpu piesārņotājs, kas savas mutagēnās un kancerogēnās iedarbības dēļ rada audzēju un citu slimību attīstības riskus (Zhang et al., 2019; Ren et al., 2022). Viens no inovatīvākajiem risinājumiem iekštelpu attīrīšanai no gaistošajiem organiskajiem savienojumiem, tajā skaitā FA, ir Zaļās sienas sistēma (*Green Wall System, GWS*). Tā sastāv no tvertņēm, kas ir pildītas ar hidroponikas substrātu, dažādām augu sugām, kā arī apūdeņošanas un ventilācijas sistēmām, kas nodrošina ūdens un gaisa cirkulāciju (Pettit et al., 2018; Kraakman et al., 2021).

Augi spēj absorbēt un metabolizēt gaistošos organiskos savienojumus (GOS), tostarp formaldehīdu. Kad GOS tiek uzņemti caur atvārsnītēm vai kutikulu, augs tos var izmantot kā oglekļa avotu Kalvina ciklā (Sharma et al., 2022). Tā kā FA labi šķīst ūdenī, tiek uzskatīts, ka gaisa plūsma nogādā to hidroponiskas sistēmas šķidrā fāzē, kur tas var tikt pakļauts mikrobiālai biodegradācijai. Tādējādi GWS efektīvas darbības aspekts var būt saistīts arī ar mikroorganismu aktivitāti, kas lielā mērā ir atkarīga no augu sugas, substrāta, vides apstākļiem un gaisa ķīmiskā sastāva (Su and Liang, 2015; Teiri et al., 2015; Kalniņš et al., 2022).

Viens no biežāk izmantotajiem substrātiem GWS augiem ir keramzīta granulas (*Expanded Clay Pellets, ECP*), uz kuru virsmām mikroorganismi veido bioplēves (Goli et al., 2015; Pettit et al., 2018). Tāpēc ir svarīgi apzināties, vai un cik lielā mērā keramzīta granulu bioplēves var veicināt FA biodegradāciju un kā būtu iespējams bagātināt

šādas bioplēves to darbības uzturēšanai un efektīvākas FA biodegradācijas nodrošināšanai.

1.6. Bioplēves uz plastmasas virsmām, kas stimulē tās bioloģisko noārdīšanos

Pasaules iedzīvotāju skaita pieauguma un plašas industrializācijas dēļ plastmasas ražošana un izmantošana pēdējās desmitgadēs ir strauji palielinājusies (Ahmed et al., 2018; Geyer 2020). Pamatojoties uz to ķīmiskajām īpašībām, plastmasu var iedalīt noārdāmos un nenoārdāmos polimēros (Ghosh et al., 2013). Bioloģiski noārdāmo plastmasu, ko iegūst no dažādiem materiāliem (tostarp tādiem polisaharīdiem kā celuloze, cieta, pektīns un hiīns), arvien vairāk izmanto dažādās rūpniecības nozarēs, un laika gaitā tā varētu daļēji aizstāt plastmasu. Tā kā bioloģiski noārdāmās plastmasas ražošanā tiek izmantoti ļoti dažādi materiāli, biodegradācijas mehānismi un ātrums var atšķirties (Polman et al., 2021).

Abiotiskie un biotiskie faktori, kā temperatūra, pH, mitruma līmenis un mikroorganismu daudzveidība, būtiski ietekmē biodegradācijas procesu, tāpat kā plastmasas veids un tā īpašības (Ahmed et al., 2018). Bioloģisko noārdīšanos var uzlabot ar fotooksidāciju, ķīmisko un termisko oksidāciju pirms plastmasas pakļaušanas biotiskajai videi (Wojnowska-Baryła et al., 2022).

Tāpat kā citu veidu cietās virsmas, plastmasai nonākot vidē, tās virsmu strauji kolonizē dažādi mikroorganismi, pēc laika veidojot bioplēvi (Amaral-Zettler et al., 2020). Kad bioplēves kopienas ir izveidojušās, tās var būtiski mainīt plastmasas fizikālās īpašības salīdzinājumā ar tās sākotnējo stāvokli, mainot daļiņu peldspēju ūdens slānī vai modificējot materiālu īpašības, piemēram, kristāliskumu un stingrību. Svarīgi, ka vides ķīmiskais sastāvs būtiski ietekmē bioplēves veidošanos. Proti, biomolekulu adsorbēcija no apkārtējās vides, t. i., kondicionēšana, modificē plastmasas virsmu, palielinot tās raupjumu un hidrofilitāti (Bhagwat et al., 2021). Īstermiņa un ilgtermiņa eksperimenti, kas veikti dažādās barotnēs, pierādīja uz polimēru virsmām veidotu bioplēvju strukturālo daudzveidību (Ramsperger et al., 2020).

Bioplēves uz plastmasas virsmas var veikt dažādas funkcijas, piemēram, plastmasas biodegradāciju, ksenobiotiku degradāciju vai horizontālu gēnu pārneši (Bryant et al., 2016; Pinnel and Turner, 2019). Uz plastmasu virsmām esošās bioplēves izpēte var veicināt izpratni par plastmasas fizikāli-ķīmisko īpašību turpmākajām izmaiņām vidē

(Kaiser et al. 2017; McGivney et al. 2020).

1.7. Atkritumu poligonu filtrāts kā vērtīgs mikroorganismu bioplēves avots

Lielākā daļa plastmasas atkritumu nonāk izgāztuvēs vai augsnē, veicinot siltumnīcas efekta gāzu izdalīšanos un atkritumu poligonu infiltrātu veidošanos. Atkritumu apglabāšana poligonos ir viena no senākajām atkritumu apsaimniekošanas metodēm, un tā joprojām ir plaši izplatīta visā pasaulē (Clarke et al., 2015). Atkritumu poligona infiltrāts ir šķidrums, kas veidojas, lietus ūdenim difundējot caur poligonā apglabātajiem atkritumiem. Tāpēc poligonu infiltrāts var saturēt ievērojamas dažādu piesārņojošo vielu koncentrācijas, piemēram, ksenobiotiskus organiskos savienojumus, izšķīdušas organiskās vielas, smagos metālus un neorganiskus makrokomponentus (Kumari et al., 2016).

Tomēr jāatzīmē, ka poligona izskalojumu ķīmiskais sastāvs var ievērojami atšķirties atkarībā no poligona vecuma, klimatiskajiem faktoriem (temperatūra, mitrums), kā arī atkritumu veida un satura (Somani et al., 2019; Abbas et al., 2009). Atkritumu poligonu infiltrāti var izskaloties augsnē ap poligonu, kā arī virszemes un gruntsūdeņos, radot risku cilvēku veselībai un negatīvi ietekmējot ekosistēmu funkcionēšanu (Khalil et al., 2018).

Atkritumu poligona infiltrāti ir bagātīgs dažādu metaboliski aktīvu mikroorganismu avots. Pētījumi liecina, ka poligonu infiltrāti satur potenciālos ģēnus, kas saistīti ar dažādu plastmasas veidu, tostarp polietilēna (PE), polietilēntereftalāta (PET) un polistirola (PS), biodegradāciju. Šie pētījumi arī uzrādīja specifiskas enzīmu grupas un metabolisma ceļus, kas ir iesaistīti ksenobiotiku biodegradācijā (Kumar et al., 2021). Nesen veiktā pētījumā Lin et al. identificēja 75 mikroorganismu sugas un 31 enzīmu, kas spēj noārdīt plastmasu atkritumu poligonu infiltrātos. Pētījums bija vērsts uz septiņiem plašiem atkritumu poligoniem Ķīnā (Lin et al., 2023). Tādējādi poligonu infiltrātu izmantošana varētu ievērojami veicināt dažādu plastmasas veidu biodegradāciju (Kumar et al., 2021; Lin et al., 2023). Tomēr ekotoksiskuma un sarežģītā/mainīgā sastāva dēļ infiltrātu izmantošana biodegradācijas procesos joprojām ir problemātiska.

2. MATERIĀLI UN METODES

2.1. Mikroorganismu kultūras, bioplēves veidošanās un tās aktivitātes novērtējums

2.1.1. Mikroorganismu kultūras, to uzturēšana

Ekspērimētos tika izmantotas *Escherichia coli* LMKK 332, *Pseudomonas putida* LMKK 650 un *Staphylococcus epidermidis* LMKK 333 kultūras, kas tika iegūtas no Latvijas Mikroorganismu kultūru kolekcijas. *E.coli* un *P.putida* tika audzētas uz Plate Count Agar (PCA) barotnēm (GranuCult®, Vācija), bet *S. epidermidis* tika audzēts uz R2A agara barotnes (Thermo Fisher Scientific, ASV).

2.1.2. Fluoresceīna diacetāta hidrolīzes aktivitātes noteikšana

Mikroorganismu suspensija (150 µL) tika pārnesta 96 iedobju platēs tai pievienojot 150 µL fluoresceīna diacetāta (FDA) reakcijas maisījuma (4 mg FDA, 2 ml acetona, 48 ml 60 mM fosfāta buferšķīduma, pH 7,6). Pēc plates inkubācijas 23°C temperatūrā, 150 µL reakcijas maisījuma ar šūnu suspensiju pārnesa uz citu plati un pievienoja 150 µL acetona, lai apturētu reakciju. Hidrolizētās FDA veidošanās tika noteikta fotometriski pie OD₄₉₂ (Chen et al., 1988).

2.1.3. Dehidrogenāzes aktivitātes noteikšana

PET paraugi ar bioplēvi tika pārnesti 48 iedobju platēs tai pievienojot 150 µL DHA reakcijas maisījumu (1,97 g Trizma, 0,1 g 2-p-jod-3-nitrofenil-5-feniltetrazolija hlorīds (INT) g, 25 mg glikoze, 50 ml dejonizēts ūdens). Plates tika inkubētas 24h 23°C temperatūrā. Fizioloģiski aktīvās imobilizētās šūnas ražo violetu formazānu, ko vizualizēja ar gaismas mikroskopu (Camiņa, 1998).

2.1.4. Bioplēves veidošanās kvantitatīva noteikšana

Bioplēves veidošanās tika mērīta fotometriski, izmantojot kristālvioletu kā krāsojošo vielu (Peterson et al., 2011). Baktēriju kultūras tika inkubētas 5 dienas 8° C, 23° C un 37° C temperatūrā 96 iedobju polistirēna platēs. Pēc inkubācijas plates ar barotni un planktona šūnām 2 reizes tika noskalotas ar destilētu ūdeni un nožāvētas gaisā. Katrai iedobei pievienoja 150 µL 0,1% w/v kristālvioleta un krāsoja 10 minūtes 23° C temperatūrā. Pēc tam plates 3 reizes noskaloja ar destilētu ūdeni un nožāvēja gaisā. Katrai iedobei pievienoja 200 µL 96% etanola un inkubēja 10 minūtes 23°C temperatūrā. Iegūtais šķīdums tika divas reizes pipetēts

un pārnesti uz jaunu 96 iedobju plati. Bioplēves veidošanās tika noteikta fotometriski pie OD₆₂₀.

2.2. Mikroorganismu bioplēvju bagātināšana un uzturēšana, biodegradācijas eksperimenti

2.2.1. Trīs mikroorganismu kultūru kultivēšana dažādos vides apstākļos

Mikroorganismu kultūras- *E. coli* LMKK 332, *P. putida* LMKK 650 un *S. epidermidis* LMKK 333- tika audzētas dažādos vides apstākļos- 100% un 5% Trypto-Casein-Soy Broth (TSB) (Bio-Rad, France) barotnē, ar vai bez 50 mg/L BAC pievienošanu 8° C, 23° C un 37° C temperatūrā.

2.2.2. Barotnes sastāva optimizācija *P. putida* LMKK 650 bioplēves attīstībai

Kultivēšanas vide sastāvēja no barotnes (g/L): NH₄Cl 0.19; CH₃COONa 1.17; NaCl 4; NaH₂PO₄*12H₂O 4.37; Na₂HPO₄*2H₂O 1.83; un 3 mL mikroelementu šķīduma (g/L): MnSO₄*H₂O 3.36; ZnSO₄*7H₂O 3; H₃BO₃ 1.12; FeSO₄*7H₂O 0.3 (Wu et al., 2022). Tai dažādās koncentrācijās tika pievienoti Mg²⁺ un Ca²⁺ joni, rauga ekstrakts (YE), glikoze (GLU) un triptons (TRY). Koncentrācijas diapazons Mg²⁺ (MgSO₄) un Ca²⁺ (CaCl₂) joniem bija 0–10 mM un 0–1 mM, attiecīgi, bet GLU, TRY un YE bija 0–2.5 g/L, 0–17 g/L, and 0–2.5 g/L, attiecīgi. Katrs variants tika veikts četros atkārtojumos un kultivēts 5 dienas.

2.2.3. Barotnes mainīgo lielumu statistiskā optimizācija *P. putida* LMKK 650 bioplēves attīstībai un antimikrobiālā riska novērtējums

Central Composite Design (CCD) tika izmantots, lai noteiktu optimālo piecu mainīgo lielumu- Mg²⁺, Ca²⁺, YE, TRY un GLU- koncentrāciju bioplēves attīstībai testētajos apstākļos, t. i., 8° C, 23° C un 37° C temperatūrā. Minitab programmatūra (ASV) tika izmantota *P. putida* LMKK650 bioplēves statistiskai optimizācijai.

Statistiski optimizētā barotnes sastāva validēšanai tika veikta *P.putida* kultivēšana ar Ca²⁺, Mg²⁺, YE, Glu un Try, kā tika noteikts, izmantojot CCD. Katrs variants tika veikts astoņos atkārtojumos. Tika sagatavoti papildu komplekti ar 50, 100, 150 un 250 mg/L BAC antimikrobiālās rezistences riska novērtējumam.

2.2.4. Keramzīta granulu bioplēvju bagātināšana ar viegli metabolizējamiem ogļhidrātiem

Bioplēvju bagātināšana tika veikta 1L stikla kolonnās. Katra kolonna tika piepildīta ar keramzīta granulām, kas tika ņemtas no dažādiem GWS augiem, tām pievienojot bagātināšanas vidi ar komplekso minerālvielu maisījumu VITO (Spodrība, Latvija) un ogļhidrātiem, kuri ir zināmi kā sakņu eksudātu sastāvdaļa. Minerālvielu maisījumu pievienoja bagātināšanas videi 0,5% koncentrācijā. Glikozi, saharozi, laktozi un fruktozi izmantoja vienādās koncentrācijās, t.i., 1. bagātināšanas posmam – pa 0,05% katru; 2. posmam – attiecīgi 0,10 % un 3. posmam – 0,15 %. Jaunās keramzīta granulas tika izskalotas ar sterilu destilētu ūdeni un izmantotas kā kontrole. Inkubācijas periods katrā bagātināšanas posmā sastādīja 72 stundas 23°C temperatūrā.

2.2.5. Imobilizēto mikroorganismu augšanas stimulējošo oglekļa avotu skrīnings formaldehīda klātbūtnē, izmantojot EcoPlates™

Mikroorganismu kopienas kataboliskā daudzveidība bioplēvē tika noteikta, izmantojot Biolog EcoPlate™ (ASV). Substrāta metabolisma mērīšana ir balstīta uz krāsas veidošanos no tetrazolija, kas ir redoks indikators. Šūnu suspensija tika iegūta no ECP ar ultraskaņu (5 min 50W), atšķaidīta ar sterilu 0,85% NaCl šķīdumu, pēc tam inokulēta (100 µL) katrā iedobē un inkubēta 72 stundas 23° C temperatūrā. Papildu plates tika sagatavotas ar pievienoto FA (50 mg L⁻¹). Mikroorganismu aktivitāte tika mērīta fotometriski pie 620 nm pēc 24, 48 un 72 stundām.

2.2.6. Keramzīta granulu inkubēšana ar formaldehīdu un tā atlikušās koncentrācijas noteikšana

Inkubāciju veica 20 ml polipropilēna mēģenēs ar 9 ml šķidrās fāzes- 1) 100 mg/l FA; 2) 100 mg/l FA, kam pievienots NaN₃ (50 mM) metaboliskās aktivitātes inhibēšanai; 3) ūdens. Mēģenes ar 9 ml 100 mg/l FA bez ECP kalpoja kā kontrole. Paraugus inkubēja 24 h 23 °C temperatūrā trijos atkārtojumos. Formaldehīda atlikums tika noteikts, izmantojot augstas izšķirtspējas šķīdumu hromatogrāfu UltiMate 3000 (ThermoFisher Scientific, ASV).

2.2.7. Plastmasas biodegradācijas novērtējums atkritumu poligona infiltrātos un augsnē

Pētījumā tika izmantoti divu veidu plastmasas materiāli - PET un bioloģiski noārdāma kasavas (CAS) plastmasa. Katra veida plastmasas

materiāli tika sagatavoti 4 cm² lielos paraugos. Daļa paraugu tika inkubēti 2% atkritumu poligona infiltrātā, kas tika atšķaidīts 60 mM fosfāta buferšķīdumā (pH 7,2) nepārtraukti maisot OxiTop® ierīcē un bez maisīšanas. Daļa paraugu tika inkubēta smilšmāla augšnes substrātā. Visu paraugu inkubācija notika 30 dienas 23 °C tumsā. Pēc plastmasas paraugu inkubācijas salīdzināja CAS biodegradācijas pakāpi pēc paraugu svara zuduma un paraugu virsmas laukuma. Virsmas laukumu mērīja, izmantojot [eleif.net/photo_measure](https://www.britannica.com/science/Herons-formula) programmatūru un Herona formulu (<https://www.britannica.com/science/Herons-formula>).

2.3. Bioplēves morfoloģijas novērtējums un tās kompozīcijas noteikšana

2.3.1. Gaimas mikroskopija

PET un CAS paraugu virsmas topogrāfiju un bioplēves daudzumu novērtēja, izmantojot gaismas mikroskopu Motic DM-1802-A (Ķīna). Lai uzlabotu virsmai piestiprināto dzīvotspējīgo mikroorganismu un koloniju redzamību, tika izmantots dehidrogenāzes tests (Camiña et al., 1998).

2.3.2. Konfokāla lāzerskenējoša mikroskopija

ECP bioplēvju izplatības un virsmas topogrāfijas novērtējums tika veikts, izmantojot Leica DM RA-2 konfokālo lāzerskenējošo mikroskopu (Vācija). Bioplēves uz ECP virsmas fiksēja ar 70% etanolu un iekrāsoja ar 20 mM propīdija jodīdu (PI). PI tika ierosināts 488 nm joslā, un fluorescenci konstatēja no 600 līdz 640 nm. Bioplēves biežumu mērīja, fokusējoties uz pašu bioplēves virsmu un substrāta līmeni (bioplēves pamatni). Reģistrētos rādījumus (trīs ECP fragmenti ar trim mērījumu punktiem katrā) izmantoja, lai noteiktu vidējo bioplēves biežumu.

2.4. Statistiskā analīze

Attēlos sniegtie dati ir izteikti kā vidējā vērtība +/- standartnovirze. Kļūdas stabiņi norāda standartnovirzi (95% ticamības intervāls). Atšķirības starp apstrādes veidiem tika novērtētas ar vienvirziena dispersijas analīzi (ANOVA) Microsoft Excel, Office365. Minitab Central Composite Design tika izmantots 5 barotnes mainīgo lielumu optimizācijai.

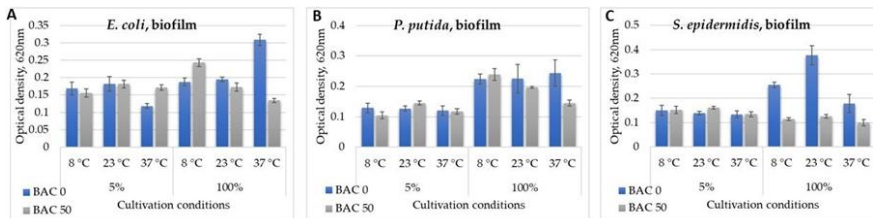
3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

3.1. Trīs baktēriju kultūru bioplēves veidošanās novērtējums dažādos kultivēšanas apstākļos

Lai identificētu labvēlīgus apstākļus bioplēves veidošanai, tika salīdzināta trīs baktēriju kultūru- *E. coli* LMMK 332, *S. epidermidis* LMKK 333 un *P. putida* LMKK 650- bioplēves veidošanās pēc 96 stundu inkubācijas. Kultūras tika audzētas 8 °C, 23 °C un 37 °C temperatūrā, 5 % un 100 % TSB barotnē, ar 50 mg/L BAC pievienošanu un bez tā.

Tika konstatēts, ka paraugos ar 100% TSB bez BAC pievienošanas labvēlīgākā temperatūra bioplēves veidošanai *E. coli* un *S. epidermidis* kultūrām ir attiecīgi 37 °C un 23 °C (2. attēls). *P. putida* kultūrai visi trīs testētie temperatūras režīmi uzrādīja līdzīgu bioplēves veidošanās intensitāti. Paraugos ar 5 % TSB *P. putida* un *S. epidermidis* bioplēve veidojās līdzīgā apjomā visās trijās pārbaudītajās temperatūrās, savukārt *E. coli* kultūras bioplēves veidošanai labvēlīgāka bija 8 °C un 23 °C temperatūra.

E. coli, *P. putida* un *S. epidermidis* 37 °C temperatūrā tika konstatēta BAC inhibējoša ietekme uz bioplēves veidošanos, t. i., attiecīgi 2,4; 1,8 un 1,6 reizes. Bioplēves veidošanās *S. epidermidis* kultūrā BAC klātbūtnē tika inhibēta arī 8 °C un 23 °C temperatūrā, t. i., attiecīgi 1,7 un 6,9 reizes. Negaidīta bioplēves attīstības stimulēšana BAC klātbūtnē tika konstatēta *E. coli* kultūrā, kas audzēta 5% TSB 37 °C temperatūrā ($p = 0,0001$) un 100% TSB 8°C temperatūrā ($p = 0,001$), t. i., attiecīgi 1,4 un 1,3 reizes (2.attēls).



2. attēls. Trīs baktēriju kultūru- *E. coli* LMKK 332, *P. putida* LMKK 650 un *S. epidermidis* LMKK 333- bioplēves veidošanās pēc 96 stundu inkubācijas 5 % un 100 % TSB barotnē, 8°C, 23°C un 37°C temperatūrā, ar un bez 50 mg/L BAC pievienošanu. Kļūdas joslas norāda standartnovirzi (95% ticamības intervāls).

P. putida LMKK 650 celms uzrādīja salīdzinoši augstu rezistenci pret BAC. Jāatzīmē, ka *Pseudomonas* spp. celmi spēj izturēt augstākās BAC koncentrācijas. Tā, piemēram, *P. aeruginosa* var izdzīvot līdz pat 1200 mg/l BAC klātbūtnē bez iepriekšējas adaptēšanās tam (Huang et al., 2022). Pētījumā ar planktoniskajām *P. fluorescens* šūnām, pārbaudot šūnu atjaunošanās spēju barotnē pēc BAC iedarbības, kultivējamības, membrānas integritātes, metaboliskās aktivitātes (rezazurīns), šūnu enerģijas (ATP), to bojāejas sliekšnis tika konstatēts pie 160 mg/l BAC (Barros et al., 2022). *P. fluorescens* adaptēšanās BAC tika pierādīta 10 mg/l BAC koncentrācijā (Dynes et al., 2009).

Daudzos pētījumos tika salīdzināta imobilizētu baktēriju šūnu izturība pret QACs, un tika uzrādīta to augstāka izturība, salīdzinot ar planktoniskām šūnām. Šo efektu var izskaidrot ar tādām bioplēves īpašībām kā EPS, rezistences gēnu veidošanos bioplēvēs un barotnes sastāvu. Gram-pozitīvā baktērija *S. aureus* bija jutīgāka pret pētītajām QACs nekā Gram-negatīvās baktērijas (Nunez et al, 2023; Frolov et al., 2022). Mūsu rezultāti labi saskan ar šiem datiem. Ir svarīgi atzīmēt, ka fermentācija ar piebarošanu (*batch-fed*) var ievērojami palielināt baktēriju bioplēvi (piemēram, *E. coli*) rezistenci pret BAC (Kocot et al., 2021).

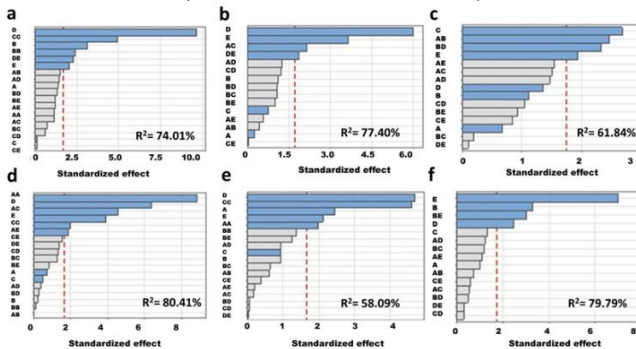
Šie rezultāti sniedz jaunu ieskatu trīs baktēriju kultūru fizioloģisko īpašību mainīgumā atkarībā no temperatūras un TSB koncentrācijas. Lai gan TSB tiek uzskatīta par piemērotu barotni *E. coli*, *Pseudomonas* spp. un *Staphylococcus* spp. kultivēšanai (Hepburn et al, 2022; Abd El-Al et al., 2022; Ma et al., 2019), citas barības vielu kombinācijas varētu būtiski ietekmēt baktēriju potenciālu veidot bioplēvi un pretoties antimikrobiālo līdzekļu iedarbībai.

3.2. Barotnes mainīgo komponentu statistiskā optimizācija *P.putida* LMKK 650 bioplēvei

P.putida bioplēves veidošanās dažādās vides temperatūrās bija līdzīga, bet uzrādīja atkarību no barības vielu pieejamības (2.attēls). Tādējādi barotnes komponentu optimizācija sniegtu jaunu ieskatu par baktēriju bioplēves veidošanās potenciālu un tās rezistenci pret antibakteriāliem līdzekļiem. Pētījumā tika izvirzīta hipotēze, ka TSB savienojumu, t. i., Try, Glu, Mg²⁺ un Ca²⁺, proporciju izmaiņas, kā arī sojas peptona aizstāšana ar rauga ekstraktu varētu atklāt jaunu ietekmi uz *P.putida* LMKK 650 augšanu dažādās temperatūrās BAC klātbūtnē. Šajā

sakarā tika veikta barotnes sastāva statistiskā optimizācija, īpašu uzmanību pievēršot bioplēves veidošanai.

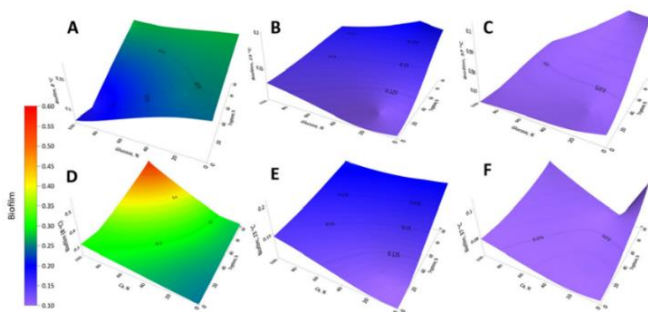
Eksperimenti tika veikti ar *P. putida* LMKK 650, lai analizētu piecu barotnes komponentu - Ca^{2+} , Mg^{2+} , YE, Try un Glu - lomu bioplēves veidošanā un FDA hidrolīzes aktivitātē. 8 °C un 23 °C temperatūrā starp analizētajiem mainīgajiem komponentiem, Try uzrādīja lielāko ietekmi uz bioplēves veidošanos (3.a,b attēls). Bioplēves veidošanās 37 °C temperatūrā lielākoties bija atkarīga no Mg^{2+} jonu pievienošanas (3.c attēls). Imobilizēto šūnu FDA hidrolīzes aktivitāte bija atkarīga no YE, Try un Glu kombinācijas, kas kultivēti attiecīgi 8 °C, 23 °C un 37 °C temperatūrā (3.d-f attēls). FDA hidrolīzes reakcijā piedalās vairākas enzīmu grupas (lipāzes, esterāzes, proteāzes un hidrolāzes), tāpēc šo metodi plaši izmanto heterotrofo mikroorganismu kopējās aktivitātes novērtēšanai (Adam and Duncan 2001).



3. attēls. Pareto diagrammas faktoru standartizētās ietekmes uz *P. putida* LMKK 650 bioplēvi. Faktori: A-raugu ekstrakts; B- Ca^{2+} joni; C- Mg^{2+} joni; D-triptons; E-glikoze.(a-c) relatīvais imobilizēto šūnu skaits; (d-f) imobilizēto šūnu FDA hidrolīzes aktivitāte. (a,d) 8 °C; (b,e) 23 °C; (c,f) 37 °C. Ar modeli izskaidrotās bioplēves kvantitatīvās noteikšanas variācijas R² vērtība. Sarkanā līnija ir efekta lielums 0,10 nozīmīguma līmenī. Zilās joslas attēlo modeļi iekļautos locekļus. Pelēkās joslas attēlo statistiski nenozīmīgus locekļus, kas tika izņemti no modeļa.

Barotnes komponentu optimizētie rezultāti, kas tika iegūti ar Minitab statistiskās programmatūras palīdzību, atklāja temperatūras specifiskus komponentus dažādiem *P. putida* LMKK 650 aktivitātes rādītājiem. Virsmas diagrammās parādīti divu mainīgo lielumu, t. i., Glu attiecībā pret Try (4.a-c attēls) un Ca^{2+} attiecībā pret Try (3.d-f attēls) paredzamie optimālie līmeņi *P. putida* LMKK 650 bioplēves veidošanās aktivitātei. Bioplēves veidošanās aktivitāte 8 °C bija vairāk atkarīga no

šiem mainīgajiem lielumiem nekā 23 °C un 37 °C temperatūrā.

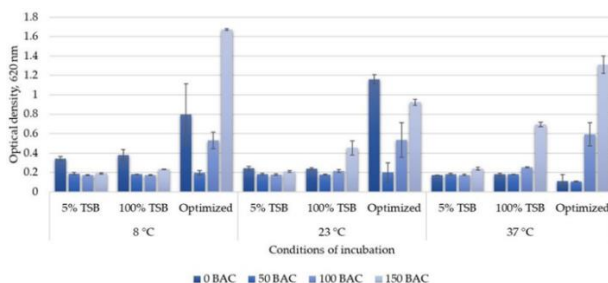


4. attēls. *P. putida* LMKK 650 bioplēves veidošanās aktivitātes atbildes virsmas diagrammas, ko ietekmē triptons un glikoze (A-C), kā arī triptons un Ca^{2+} (D-F). Y ass skala (t. i., bioplēve) atbilst optiskā blīvuma vērtībai pie 620 nm.

3.3. Optimizētā barotnes sastāva validācija un imobilizēto *P. putida* LMKK 650 šūnu antimikrobiālās rezistentes paaugstināšanās riska novērtējums

Turpmākā eksperimenta mērķis bija pārbaudīt optimizētā barotnes sastāva efektivitāti *P. putida* LMKK 650 bioplēves veidošanai. Pēc 6 dienu kultivēšanas 5% un 100% TSB barotnē, kā arī modificētajā barotnē, kas tika optimizēta ar CCD, tika kvantitatīvi noteikta bioplēves veidošanās. Kā redzams 5. attēlā, optimizētā barotne stimulēja bioplēves veidošanos. Salīdzinot ar 5% un 100% TSB, tā bija lielāka attiecīgi par 133% un 110% 8 °C un par 378% un 386% 23 °C temperatūrā. Interesanti, ka *P. putida* LMKK 650 kultūrai 37 °C temperatūrā optimizētajā barotnē salīdzinājumā ar 5 % un 100 % TSB bija negatīva bioplēves veidošanās tendence, un tā bija attiecīgi par 34 % un 38 % zemāka.

Bioplēves tika pārbaudītas arī uz baktēriju rezistenci pret BAC. *P. putida* LMKK 650 bioplēvi, kas iegūta 5% un 100% TSB, inhibēja 50 mg/l BAC pievienošana 8 °C un 23 °C temperatūrā, bet 37 °C temperatūrā ietekme netika konstatēta. Turpmāka BAC koncentrācijas palielināšana līdz 150 mg/l pakāpeniski palielināja bioplēves lielumu optimizētā barotnē visos trijos testētajos temperatūras režīmos (5.attēls).

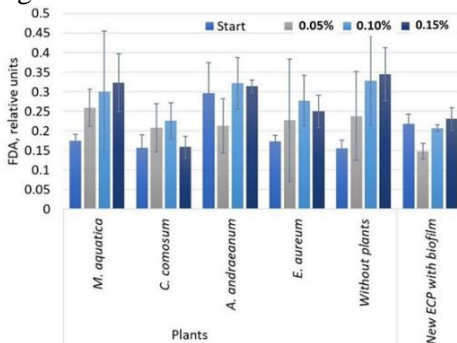


5. attēls. *P. putida* LMKK 650 bioplēves veidošanās aktivitāte pēc 6 dienu kultivēšanas 5% un 100% TSB, kā arī optimizētā barotnē 8 °C, 23 °C un 37 °C temperatūrā, pievienojot BAC (0; 50; 100; 150 mg/l).

3.4. Keramzīta granulu bioplēves bagātināšana sintētiskajā barotnē ar pakāpenisku ogļhidrātu koncentrācijas palielināšanu

Turpmākie pētījumi tika veikti ar bioplēvēm, kas veidojas uz ECP virsmām, kas ņemti no eksperimentālās GWS moduļiem ar četriem augiem- *Mentha aquatica*, *Chlorophytum comosum*, *Anthurium andraeanum*, *Epipremnum aureum* (skat. Materiāli un metodes sadaļu 2.2.4.)

FDA hidrolīzes aktivitāte tika noteikta uz ECP virsmas pēc trīs posmu bioplēves bagātināšanas (6. attēls). Lielai daļai analizēto paraugu bija vērojama tendence, ka, palielinoties ogļhidrātu koncentrācijai, enzīmātiskā aktivitāte palielinājās. Izteiktāka stimulācija ogļhidrātu pievienošanas dēļ tika konstatēta paraugiem no kopām ar *M. aquatica*, *E. aureum* un bez augiem.

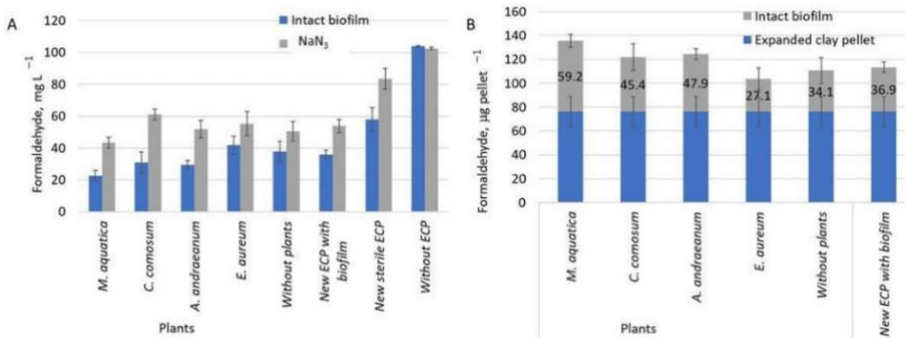


6. attēls. FDA hidrolīzes aktivitāte uz ECP virsmas pēc trīs posmu bioplēves bagātināšanas. Bagātināšanas shēma: 0,5 % VITO minerālmēslojums + glikoze, saharoze, laktoze, fruktoze (0,05 %, 0,10 % un 0,15 % katrs). Inkubācijas laiks katrā bagātināšanas posmā 72 h.

3.5. Keramzīta granulu bioplēvju lomas novērtējums formaldehīda biodegradācijā

Lai novērtētu ECP bioplēves spēju noārdīt FA, veica granulu 24 h inkubāciju 100 mg L⁻¹ FA klātbūtnē. Atlikušās FA koncentrācijas šķidrājā fāzē pēc inkubācijas ir apkopotas 7.a attēlā. Neapstrādāta bioplēve nodrošināja ievērojami ($p < 0,05$) lielāku FA noārdīšanas efektivitāti nekā ar NaN₃ apstrādāta bioplēve. Nātrija azīdam piemīt spēja inhibēt mikroorganismu aktivitāti (Lichstein and Soule, 1944). Šo pieeju izmanto, ja metaboliski aktīvo šūnu loma jānošķir no pasīvajiem sorbcijas procesiem (Ning, et al., 1996).

Attiecībā uz ECP lomu FA noārdīšanā papildu kontroles ar jaunām sterilām granulām uzrādīja, ka to absorbcijas spēja testētajos apstākļos bija 76,5 μg ECP⁻¹ (7.b attēls). Svarīgi atzīmēt, ka dažādas augu sugas netieši ietekmēja FA noārdīšanas efektivitāti, ko noteica mikroorganismu kopiena, kas bija izveidojusies testēto augu rizosfērā. Tādējādi lielākais noārdītā FA daudzums (59,2 μg ECP⁻¹) tika novērots ECP bioplēvei no GWS moduļa ar *M. aquatica*. Arī ECP bioplēves no moduļiem ar *C. comosum* un *A. andraeanum* uzrādīja salīdzinoši augstu FA noārdīšanas efektivitāti, t. i., attiecīgi 45,4 μg ECP⁻¹ un 47,9 μg ECP⁻¹.



7. attēls. FA noārdīšana ar keramzīta granulu (ECP) un bioplēvi no šķidrās fāzes. (A) FA koncentrācija, kas paliek kopās ar ECP un intaktu/inaktivētu biomasu; (B) FA atdalīšanas pakāpe ar intaktu bioplēvi un ECP. Inkubācijas periods 24 h.

3.6. Oglekļa avotu skrīnings imobilizēto mikroorganismu augšanas stimulēšanai formaldehīda klātbūtnē, izmantojot EcoPlates™

Tika pārbaudīta sešu mikroorganismu kopien (no ECP bioplēvēm) metaboliskā aktivitāte 50 mg/l FA klātbūtnē. No 31 substrāta, kas ir pieejams EcoPlates™, daži no tiem veicināja mikroorganismu augšanu FA klātbūtnē. Turklāt augšanas intensitāte bija lielāka nekā kontroles eksperimentā bez FA. Šis efekts bija atkarīgs no mikroorganismu kopienas izcelsmes un pievienotā oglekļa avota. Dati par mikroorganismu reakciju uz FA dažādu oglekļa substrātu klātbūtnē ir apkopoti 1. tabulā.

1.tabula. ECP mikroorganismu augšanas intensitāte 50 mg/l FA un dažādu papildus oglekļa avotu klātbūtnē. Testēšana tika veikta, izmantojot EcoPlates™ pēc 72h inkubēšanas. Dati ir izteikti procentos no augšanas intensitātes, salīdzinot ar kontroli bez FA. Tabulā ir attēloti 15 oglekļa avoti no 31, kuros vismaz vienā eksperimentālajā kopā tika konstatēta mikroorganismu augšanas stimulācija FA klātbūtnē.

	<i>M. aquatica</i>	<i>C. comosum</i>	<i>A. andraeanum</i>	<i>E. aureum</i>	Non-planted	New ECP with biofilm
D-glucosamic acid	-5.16	-57.67	-43.01	-31.71	51.25	33.22
Itaconic acid	-60.14	20.60	36.66	49.42	-98.98	6.66
L-arginine	2.69	-14.59	-5.14	24.27	-99.75	4.09
L-serine	18.24	8.69	5.62	16.11	-98.20	1.81
Gamma-hydroxy butyric acid	-90.54	4.86	0.76	15.33	-98.14	-5.65
4-hydroxy benzoic acid	2.87	5.32	0.85	14.64	-98.97	-6.23
D-galacturonic acid	-90.95	3.85	2.10	6.65	-98.16	-6.33
Pyruvic acid methyl ester	8.21	-10.20	-19.31	-5.79	-98.50	-41.56
Tween 40	38.16	-31.38	-9.12	-18.58	-100.00	-44.76
Beta-methyl-D-glucoside	-31.13	-62.50	40.84	-61.88	-94.46	-79.94
D-malic acid	-68.26	28.72	5.64	-63.01	-97.40	-85.88
N-acetyl-D-glucosamine	16.02	-69.34	18.82	2.16	-99.70	-96.96
L-asparagine	8.18	7.75	10.95	20.91	-87.34	-97.63
D-cellobiose	-29.21	-24.91	4.01	-71.44	-96.69	-99.70
Phenylethyl-amine	11.29	-97.13	25.81	-46.32	-99.36	-99.75

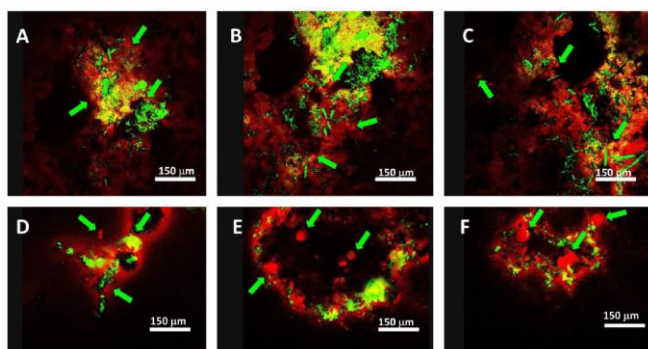
Itakonskābe stimulēja mikroorganismu augšanu FA klātbūtnē četrās eksperimentālajās grupās. Šis substrāts, kas papildināts ar 50 mg/l FA, stimulēja no ECP iegūto mikroorganismu augšanu ar *C. comosum*, *A. andraeanum* un *E. aureum* augu attiecīgi par 21 %, 37 % un 49 % salīdzinājumā ar attiecīgajām kontrolēm (1. tabula). Beta-metil-D-

glikozīds ar FA stimulēja mikroorganismu augšanu paraugā ar *A. andraeanum* līdz 41 % un 26 % komplektā ar feniletilamīnu. Interesanti, ka mikroorganismu kopienas, kas iegūtas no GWS moduļa bez augiem (*non-planted*) un jaunām ECP ar bioplēvi, parādīja, ka D-glikozamīnskābe stimulēja mikroorganismu augšanu FA klātbūtnē, sasniedzot attiecīgi par 51 % un 33 % augstāku līmeni nekā kontroles eksperimentā.

3.7. Bioplēves vizualizācija pēc 3 posmu bagātināšanas ar sintētisko augu sakņu eksudātu

Konfokālais lāzerskenējošais mikroskops (CLSM) sniedz iespēju vizualizēt bioplēves morfoloģiju un kvantitatīvi noteikt bioplēves uz necaurspīdīgām virsmām, piemēram, ECP. Pētījumā tika pārbaudīta bioplēves klātbūtne uz ECP virsmas pirms bioplēves bagātināšanas un pēc pēdējā, t. i., trešā, bagātināšanas posma.

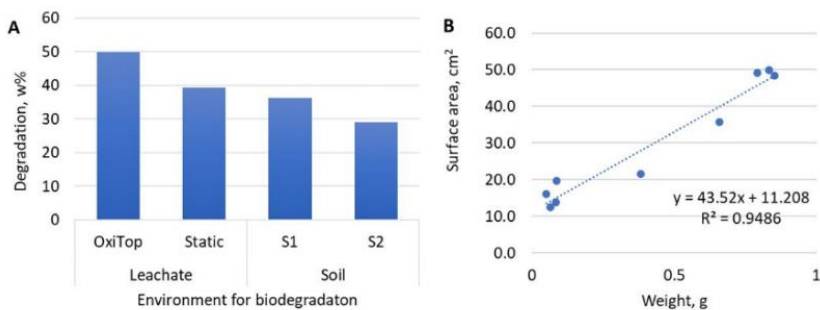
Sākotnēji tika izvirzīta hipotēze, ka bioplēves vienmērīgi veidosies uz keramzīta granulu virsmām, bet tām bija raksturīga attīstība lokāli, bioplēvei pieaugot augstumā. Uz keramikas virsmas bagātinātās bioplēves vidējais biezums bija ievērojami ($p=0,0004$) lielāks nekā uz nebagātinātās ECP bioplēves, t. i., $45,9 \pm 23,7$ un $12,0 \pm 6,4$ μm ($n=9$), attiecīgi (8. attēls).



8.attēls. CLSM mikrofotogrāfijas uz ECP virsmas sākumā (A-C) un pēc bioplēves bagātināšanas trešā posma (D-F). ECP tika iegūti no GWS ar *Mentha aquatica* augu. Šūnas tika fiksētas ar 70 % etanolu un iekrāsotas ar 20 mM propīdija jodīdu (PI). Zaļais un sarkanais laukums atbilst attiecīgi parauga abiotiskajai un biotiskajai daļai. Zaļās bultas norāda uz mikrokolonijām. Baltās joslas garums ir 150 μm .

3.8. Bioplēves veidošanās un plastmasas biodegradācijas novērtējums atkritumu poligonu infiltrātos un augsnē

Eksperiments tika veikts, lai novērtētu atkritumu poligonu infiltrātu potenciālu i) veicināt bioplēves veidošanos uz PET virsmām un ii) noārdīt CAS bioloģiski degradējamo plastmasu, salīdzinot to ar augsni. Biodegradācijas pakāpe tika noteikta, nosverot CAS paraugus pirms un pēc inkubācijas atkritumu poligonu infiltrātos. Kā parādīts 9.a attēlā, 30 dienu inkubācijas laikā efektīvākā CAS noārdīšanās (49,9 %) tika sasniegta atkritumu poligonu infiltrātu šķīdumā aerobos apstākļos ar nepārtrauktu maisīšanu (t. i., OxiTop ierīcē). Inkubējot CAS infiltrātu šķīdumā bez maisīšanas, tika sasniegta 39,3 % noārdīšanās.

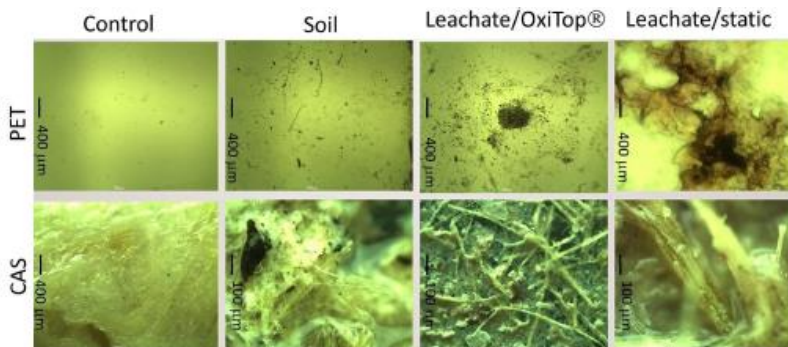


9. attēls. No kasavas iegūtās plastmasas (CAS) biodegradācija atkritumu poligonu infiltrātos un augsnē. Inkubāciju infiltrātā (2 %) veica OxiTop ierīcē un kolbās bez maisīšanas. Inkubācijai augsnē tika izmantoti divi smilšmāla augsnes paraugi. Inkubācijas periods bija 30 dienas. A - biodegradācijas spējas novērtējums pēc svara; B - korelācija starp svara un virsmas laukuma datiem, kas iegūti CAS paraugiem pirms un pēc biodegradācijas eksperimenta.

CAS biodegradācija infiltrātā tika salīdzināta ar smilšmāla augsnēm S1 un S2, kurās CAS noārdījās attiecīgi par 36,2 % un 29,0 %. Inkubējot augsnē 60 dienas, CAS noārdījās par 55 % (dati nav norādīti). Tādējādi atkritumu poligona infiltrāts kā CAS biodegradācijas vide ir efektīvāka nekā augsne, tomēr šīs atšķirības nebija statistiski nozīmīgas ($p > 0,05$). Tika salīdzināts divu parametru, t.i., parauga svara un virsmas laukuma, devums bioloģiskās plastmasas noārdāmībā. Regresijas analīze parādīja ciešu korelāciju starp svara zudumu un virsmas laukuma samazināšanos noārdīšanās procesa laikā ar determinācijas koeficientu $R^2 = 0,95$ (9.b attēls). Šo analīzi veica tikai CAS paraugiem pēc inkubācijas

augsnē, jo CAS paraugi pēc inkubācijas infiltrātos bija pilnībā sadalījušies, kas neļāva veikt šādu salīdzinājumu.

PET paraugiem nebija redzamu degradācijas pazīmju, tāpēc tika pārbaudīts vēl viens parametrs- bioplēves veidošanās. Šim nolūkam izmantoja dehidrogenāzes aktivitātes testu ar mērķi uzlabot mikroorganismu kolonizācijas redzamību uz virsmas, metaboliski aktīvām šūnām producējot formazānu. Izteiktāka virsmas kolonizācija tika konstatēta uz PET virsmas pēc 30 dienu inkubācijas atkritumu poligona infiltrātos bez maisīšanas (10.attēls).



10.attēls. Plastmasas virsmas gaismas mikrofotogrāfijas pirms un pēc 30 dienu inkubācijas smilšmāla augsnē un atkritumu poligona infiltrātos. PET- polietilēntereftalāts; CAS - bioloģiski noārdāma plastmasa, kas iegūta no kasavas.

4. SECINĀJUMI UN TURPMĀKO PĒTĪJUMU VIRZIENI

1. Bioplēves veidošanās trim analizētajām mikroorganismu kultūrām- *E.coli*, *S.epidermidis* un *P.putida*- bija sugai specifiska, un to veidošanos stimulēja 37 °C temperatūra (*E. coli*, *S. epidermidis*) un 100% TSB barotne (*P. putida*). *E.coli* 8 °C un 23 °C temperatūrā uzrādīja līdzīgu bioplēves veidošanās intensitāti 5% un 100% TSB barotnē.
2. Statistiskā barotnes sastāva optimizācija *P. putida* bioplēves veidošanai uzrādīja triptona un glikozes stimulējošo ietekmi augstākajās šajā pētījumā pārbaudītajās koncentrācijās, t. i., attiecīgi 17 g/l un 2.5 g/l. Optimizētais barotnes sastāvs bija temperatūras specifisks.
3. Optimizēto barotnes sastāvu *P. putida* bioplēves veidošanai var izmantot dažādos vides biotehnoloģiskajos procesos, kuros izmanto imobilizētas šūnas. Īpaša uzmanība būtu jāpievērš zemās temperatūras procesiem.
4. Statistiski optimizējot barotnes sastāvu *P. putida* bioplēves veidošanai, eksperimentos ar 50-150 mg/L BAC ir novērota tā stimulējošā iedarbība uz bioplēves veidošanos. Šis fakts liecina par antimikrobiālās rezistences izplatīšanās iespējamiem riskiem.
5. Bagātināšanas apstākļi ar ogļhidrātu maisījumu palielināja keramzīta granulu bioplēves FDA hidrolīzes aktivitāti paraugos no Zaļās Sienas moduļiem ar *M. aquatica*, *E. aureum* paraugiem un bez augiem.
6. Formaldehīda sorbcijas aktivitāte ECP pēc 24 st. inkubācijas 100 mg/L FA klātbūtnē sastādīja 76.5 µg ECP⁻¹, savukārt tā noņemšana no ūdens fāzes ar bioplēvi variēja, augstāko vērtību sasniedzot kopā ar *M. aquatica*, t.i., 59.2 µg ECP⁻¹.
7. Itakonskābe stimulēja no bioplēvēm iegūto mikroorganismu augšanu 50 mg/l FA klātbūtnē paraugos ar *C. comosum*, *A. andraeanum* un *E. aureum* attiecīgi par 21 %, 37 % un 49 % salīdzinājumā ar attiecīgajām kontrolēm.
8. Bioplēves mikrokoloniju veidošanās uz keramzīta granulām pēc bagātināšanās ar ogļhidrātu maisījumu notika lokāli, pieaugot augstumā. Uz keramikas virsmas bagātinātās bioplēves vidējais biezums bija ievērojami ($p=0.0004$) lielāks nekā uz nebagātinātās ECP bioplēves, t. i., 45.9 ± 23.7 un 12.0 ± 6.4 µm, attiecīgi.

9. Kasavas bioplastmasas (CAS) noārdīšanās 2 % atkritumu poligonu infiltrātā, kas veikta Oxitop® ierīcē un kolbā bez maisīšanas, pēc 30 dienu inkubācijas sasniedza 49.9 % un 39.3 %. CAS noārdīšanās divos smilšmāla augsnes paraugos bija zemāka nekā infiltrātā, t. i., 36.2 % un 29.0 %, tomēr šīs atšķirības nebija statistiski nozīmīgas. Atkritumu poligonu infiltrāti (2 %) izrādījās piemērota vide CAS plastmasas biodegradācijai. Nepieciešams veikt vairāk gadījumu izpēti, lai testētu dažādu plastmasas veidu pakļaušanu atkritumu poligonu infiltrātiem.
10. Atkritumu poligonu infiltrāts ir vērtīgs mikroorganismu avots, tomēr intaktā formā (100%) nav piemērots kā substrāts bioplēves attīstībai un aktivitātes uzturēšanai tā toksicitātes dēļ.

5. AIZSTĀVAMĀS TĒZES

1. Barības vielu optimizācija stimulē bioplēves attīstību atkarībā no vides apstākļiem.
2. Bagātinātajai bioplēvei ir neregulāra morfoloģiskā struktūra.
3. *Pseudomonas* ir viena no dominējošām ģintīm atkritumu poligonu infiltrātos, kas ietekmē bioplēves kopienas sastāvu uz plastmasas fragmentiem, nosakot dažādu plastmasas veidu biodegradācijas potenciālu.
4. Atkritumu poligonu infiltrātu, kā vērtīgu mikroorganismu avotu, izmantošana, paver jaunas iespējas biodegradācijas procesu intensifikācijai.

6. PROMOCIJAS DARBU VEIDOJOŠĀS PUBLIKĀCIJAS

1. Žorža, L.; Dēliņa, A.; Selga, T.; Muter, O. Characterization of Biofilm Formation and Bacterial Resistance to Benzalkonium Chloride under Contrasting Cultivation Conditions. *Fermentation* 2023, 9, 699. <https://doi.org/10.3390/fermentation9080699>

2. Žorža, L.; Ceļmalniece, K.; Sieriņa, A.; Andersone-Ozola, U.; Selga, T.; Ievinsh, G.; Bērziņa, B.; Bartkevičs, V.; Muter, O. Formaldehyde Removal by Expanded Clay Pellets and Biofilm in Hydroponics of a Green Wall System. *Sustainability* 2023, 15, 13303. <https://doi.org/10.3390/su151813303>

3. Žorža L., Gudrā D., Sīpola K., Vonda K., Fridmanis D., Kalniņa I., Bartkevics V., Dēliņa A., Grīnbergs A., Muter O. Uncovering the potential of landfill leachate for biodegradation of cassava-derived plastics. *Bioresource Technology Reports*, 2023, 24, 101628. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101628>

7. PĒTĪJUMA APROBĀCIJA

Bez publikācijām darba rezultāti prezentēti šādās konferencēs:

Stenda referāts. Delina A., Žorža L., Selga T., Muter O. Response of planktonic *Pseudomonas putida* MSCL 650 cells to benzalkonium chloride under different cultivation conditions 5th Congress of Baltic Microbiologists. Viļņa, Lietuva. 2023.

Stenda referāts. Žorža L., Delina A., Selga T., Muter O. Effect of benzalkonium chloride on bacterial growth, enzyme activity and biofilm formation under contrasting conditions. 3rd International Meeting on New Strategies in Bioremediation / Restoration Processes. Mutenca, Šveice. 2023.

Stenda referāts. Žorža L., Gudrā D., Sīpola K., Tensone B., Dukaļska L., Vonda K., Puzane K., Fridmanis D., Kalnina I., Bartkevics V., Dēliņa A., Grīnbergs A., Muter O. Uncovering the potential of landfill leachate for biodegradation of cassava-derived plastic. 4th International Conference for Bioresource Technology for Bioenergy, Bioproducts & Environmental Sustainability (Elsevier), Riva del Garda, Itālija. 2023.

Mutiska uzstāšanās. Žorža L. Mikroorganismu bioplēves un to labvēlīgā ietekme uz biodegradācijas procesu norisi. Rīgas Tehniskās universitātes Olaines Tehnoloģiju koledžas zinātniskā konference. Olaine. 2022.

Mutiska uzstāšanās. Žorža L., Muter O. *Escherichia coli* augšana dažādās temperatūrās: enzimatiskā aktivitāte un antimikrobiālā rezistence bioplēvēs un planktona šūnās. LU 80. starptautiskā zinātniskā konference Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas sekcija. Rīga. 2022.

Mutiska uzstāšanās. Žorža L., Saleniece K., Reinholds I., Grīnbergs A., Muter O. Cs133 ekotoksiskums: akūto un hronisko testu aprobēšana. LU 79. starptautiskā zinātniskā konference Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas sekcija. Rīga. 2021.

Mutiska uzstāšanās. Žorža L., Celmalniece K., Sierina A., Andersone-Ozola U., Ievins G., Berzina I.-B., Bartkevics V., Muter O. Formaldehyde removal by expanded clay pellets and biofilm in a hydroponics system of the Green Wall System. Advances in Functional Materials (AFM). 2021, Džedžu, Koreja (online). 2021.

Mutiska uzstāšanās. Žorža L.; Sīpola K.; Rosicka B.; Gudra D.; Fridmanis D.; Selga T.; Grīnbergs A.; Muter O. Fate of biodegradable plastics in soil and biologically active landfill leachates. Advances in Functional Materials (AFM). 2021. Džedžu, Koreja (online).

Mutiska uzstāšanās. Kalnins M., Žorža L., Sierina A., Epnars A., Muter O. ‘‘Abundance and enzyme activity of airborne microorganisms in the experimental Green wall system’’. 5th International Conference on Environmental Pollution, Treatment and Protection (ICEPTP’20)’’ Lisabona, Portugāle (online). 2020.

8. PATEICĪBAS UN FINANSĒJUMS

Vēlos izteikt sirsnīgu pateicību manai promocijas darba vadītājai Dr. biol. Olgai Muterei par atbalstu, palīdzību metožu apgūšanā un vērtīgām diskusijām.

Izsaku pateicību par zinātniskajām konsultācijām un palīdzību jaunu metožu apgūšanā prof. Nuno Filipe Azevedo, Dr. Biol. Andreia Azevedo, MSc.Biol. Igor Resende no Porto Universitātes (Portugāle), prof. Tūram Selgam, Dr. Ģeol. Aijai Dēliņai un Dr. Chem. Andrejam Grīnbergam, prof. Vadimam Bartkevičam un MSc.Biol. Kristīnei Ceļmalniecei. MSc.Biol. Dītai Gudrāi un Dr.Biol. Dāvidam Fridmanim pateicība par vides paraugu metagenoma analīzi. Esmu pateicīga visiem līdzautoriem par sadarbību. Izsaku pateicību Latvijas Mikroorganismu kultūru kolekcijai par sniegtajām baktēriju kultūrām.

Īpašs paldies manai ģimenei par to lielo atbalstu, kas tika sniegts visu studiju laikā.

Pētījumi tika finansēti šādu projektu ietvaros:

- “Strengthening the doctoral capacity of the University of Latvia within the framework of the new doctoral model”, project identification No. 8.2.2.0/20/I/006, UL registration No. ESS2021/434, co-financed by the European Social Fund;
- LZP-2022/1-0299 “Multidimensional characterisation of plastic waste biodegradation mechanisms in the municipal solid waste landfill” financed by Latvian Council of Science;
- Valsts pētījumu programmas projekts biomedicīnā, medicīnas tehnoloģijā un farmācijā VPP-EM-BIOMEDICĪNA-2022/1-001 (Y3-VPP32f-ZR-N-090); „Optimization of biotechnological processes for effective utilization of renewable resources” Y5-AZ20-ZF-N-270;
- “Research and development of bioremediation based indoor air biofiltration system” in accordance with the contract no. 1.2.1.1/18/A/001 between “ETKC” Ltd. and the Central Finance and Contracting Agency of Latvia with support from the European Regional Development Fund (ERDF).

9. ATSAUCES

Abbas, A. A., Jingsong, G., Ping, L. Z., Ya, P. Y. & Al-Rekabi, W. S. (2009). Review on Landfill Leachate Treatments. *American Journal of Applied Sciences*, 6(4), 672-684. <https://doi.org/10.3844/ajassp.2009.672.684>

Abd El-Al, M.S.; Saeed, A.M.; Hammad, A.A.; Swailam, H.M.; Abouzeid, M.A. Gamma-irradiation induced effects on histamine- forming bacteria isolated from the chilled mackerel fish. *Egypt. J. Aquat. Biol. Fish.* 2022, 26, 869–883.

Adam, G. & Duncan, H., 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil biology & biochemistry*, 33(7), pp.943–951.

Ahmed T, Shahid M, Azeem F, Rasul I, Shah AA, Noman M, Hameed A, Manzoor N, Manzoor I, Muhammad S. Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2018 Mar;25(8):7287-7298. doi: 10.1007/s11356-018-1234-9.

Amaral-Zettler LA, Zettler ER, Mincer TJ. Ecology of the plastisphere. *Nat Rev Microbiol.* 2020 Mar;18(3):139-151. doi: 10.1038/s41579-019-0308-0.

Bais, H. P., Fall, R., and Vivanco, J. M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol.* 134, 307–319.

Barros, A.C.; Melo, L.F.; Pereira, A. *Pseudomonas fluorescens* cells' recovery after exposure to BAC and DBNPA biocides. *Antibiotics* 2022, 11, 1042.

Berne, C., Ducret, A., Hardy, G. G., and Brun, Y. V. (2015). Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by gram-negative bacteria. *Microbiol. Spectr.* 3. doi: 10.1128/microbiolsec.MB--0018--2015.

Bhagwat, G., O'Connor, W., Grainge, I. and Palanisami, T. (2021). Understanding the Fundamental Basis for Biofilm Formation on Plastic Surfaces: Role of Conditioning Films. *Frontiers in Microbiology*, 12. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.687118>.

Bogino, P.C.; Oliva, M.D.I.M.; Sorroche, F.G.; Giordano, W. The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 15838-15859. <https://doi.org/10.3390/ijms140815838>

Brito ACM, Bezerra IM, de Borges MHS, Cavalcanti YW, de Almeida LFD. 2021. Effect of different salivary glucose concentrations on dual-species biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *Biofouling* 37: 615–625. <https://doi.org/10.1080/08927014.2021.1946519>.

Bryant, J. A., Clemente, T. M., Viviani, D. A., Fong, A. A., Thomas, K. A., Kemp, P., et al. (2016). Diversity and activity of communities inhabiting plastic debris in the North Pacific Gyre. *mSystems* 1, e00024-16.

Camiña, F.; Trasar-Cepeda, C.; Gil-Sotres, F.; Leirós, C. Measurement of dehydrogenase activity in acid soils rich in organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 1998, 30, 1005–1011

Chen M., Zhang X., Wang Z., Liu M., Wang L. & Wu Z. 2018 Impacts of quaternary ammonium compounds on membrane bioreactor performance: acute and chronic responses of microorganisms. *Water Res.* 134, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.01.073>.

Chen, W.; Hotink, H.; Schmithenner, A.F.; Tuovinen, O.H. The role of microbial activity in suppression of damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 1988, 78, 314–322.

Chiranjeevi P, Patil SA. 2020. Strategies for improving the electroactivity and specific metabolic functionality of microorganisms for various microbial electrochemical technologies. *Biotechnol Adv* 39:107468. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107468>

Clarke, B.O., Anumol, T., Barlaz, M. and Snyder, S.A. (2015). Investigating landfill leachate as a source of trace organic pollutants. *Chemosphere*, 127, pp.269–275. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.030>.

D'Souza GG, Povolo VR, Keegstra JM, Stocker R, Ackermann M. 2021. Nutrient complexity triggers transitions between solitary and colonial growth in Diaz-Salazar, C., Calero, P., Espinosa-Portero, R., Jimenez-Fernandez, A., Wirebrand, L., Velasco-Dominguez, M. G., et al. (2017). The stringent response promotes biofilm dispersal in *Pseudomonas putida*. *Sci. Rep.* 7:18055. doi: 10.1038/s41598-017-18518-0

Dynes, J.J.; Lawrence, J.R.; Korber, D.R.; Swerhone, G.D.W.; Leppard, G.G.; Hitchcock, A.P. Morphological and biochemical changes in *Pseudomonas fluorescens* biofilms induced by sub-inhibitory exposure to antimicrobial agents. *Can. J. Microbiol.* 2009, 55, 163–178.

Donlan RM and Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15: 167-193.

D'Onofrio A, Crawford JM, Stewart EJ, Witt K, Gavriš E, Epstein S, Clardy J, Lewis K. Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria. *Chem Biol.* 2010 Mar 26;17(3):254-64. doi: 10.1016/j.chembiol.2010.02.010.

Dunne WM Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev.* 2002 Apr;15(2):155-66. doi: 10.1128/CMR.15.2.155-166.2002. PMID: 11932228; PMCID: PMC118072.

Fazeli-Nasab B., R.Z. Sayyed, L. S. Mojahed, A. F. Rahmani, M. Ghafari, S. Antonius, Sukamto. Biofilm production: A strategic mechanism for survival of microbes under stress conditions. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 42, 102337. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cbab.2022.102337>.

Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010;8:623–633.

Frolov, N.; Detusheva, E.; Fursova, N.; Ostashevskaya, I.; Vereshchagin, A. Microbiological Evaluation of Novel Bis-Quaternary Ammonium Compounds: Clinical Strains, Biofilms, and Resistance Study. *Pharmaceuticals* 2022, 15, 514.

Fu, Y., Peng Hongxi, Liu, J., Nguyen, T.N., Muhammad Zaffar Hashmi and Shen, C. (2021). Occurrence and quantification of culturable and viable but non-culturable (VBNC) pathogens in biofilm on different pipes from a metropolitan drinking water distribution system. 764, pp.142851–142851. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142851>.

Gajendiran A, Krishnamoorthy S, Abraham J. Microbial degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Aspergillus clavatus* strain JASK1 isolated from landfill soil. *3 Biotech.* 2016 Jun;6(1):52. doi: 10.1007/s13205-016-0394-x. Epub 2016 Feb 13. PMID: 28330123; PMCID: PMC4752946.

Gavriš E., Bollmann A., Epstein S., Lewis K. A trap for in situ cultivation of filamentous actinobacteria. *Journal of Microbiological Methods.* 2008. 72(3): 257-262.<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.12.009>.

Geyer R. Production, use, and fate of synthetic polymers. *Plastic Waste and Recycling.* 2020:13-32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817880-5.00002-5>.

Ghosh, S.K., Pal, S. & Ray, S. Study of microbes having potentiality for biodegradation of plastics. *Environ Sci Pollut Res* 20, 4339–4355 (2013). <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1706-x>

Goli, A.; Talaiekhazani, A.; Eshtiaghi, N.; Chisti, Y.; Aramesh, R.; Aramesh, R.; Shamiri, A. Biotreatment of formaldehydecontaminated air in a trickle bed bioreactor. *Desalin. Water Treat.* 2017, 93, 83–92.

Hepburn, N.F.; MacRae, M.; Johnston, M.; Mooney, J.; Ogden, I.D. Optimizing enrichment conditions for the isolation of *Escherichia coli* O157 in soils by immunomagnetic separation. *Lett. Appl. Microbiol.* 2022, 34, 365–369. <https://doi.org/10.1016/j.bior.2021.07.087>.

<https://www.britannica.com/science/Herons-formula>

Huang, Z.; Qi, Z.; Ding, X.; Liu, C. N-chlorosuccinimide enhancing the antimicrobial effect of benzalkonium chloride on biofilm *Pseudomonas aeruginosa* and its interaction mechanisms. *J. Environ. Sci. Health Part A Toxic Hazard. Subst. Environ. Eng.* 2022, 57, 593–600.

Jamal M., Ahmad W., Andleeb S., Jalil F., Imran M., Nawaz M. A., et al.. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chin. Med. Assoc.* 81, 7–11. 10.1016/j.jcma.2017.07.012

Jara, J., Alarcón, F., Monnappa, A.K., Santos, J.I., Bianco, V., Nie, P., Ciamarra, M.P., Canales, Á., Dinis, L., López-Montero, I., Valeriani, C. and Orgaz, B. (2021). Self-Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* Biofilms to Hydrodynamic Stress. *Frontiers in Microbiology*, 11. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.588884>.

Kaiser, D., Kowalski, N. and Waniek, J.J. (2017). Effects of biofouling

on the sinking behavior of microplastics. *Environmental Research Letters*, 12(12), p.124003. doi:<https://doi.org/10.1088/1748-9326/aa8e8b>.

Kalniņš M., Andersone-Ozola U., Gudrā D., Sieriņa A., Fridmanis D., Levinsh G., Muter O. Effect of bioaugmentation on the growth and rhizosphere microbiome assembly of hydroponic cultures of *Mentha aquatica*. *Ecological Genetics and Genomics*, 2022. 22,100107, <https://doi.org/10.1016/j.egg.2021.100107>.

Khalil C., Hageh Samira Korfali C.A., Khnayzer R. S. Municipal leachates health risks: Chemical and cytotoxicity assessment from regulated and unregulated municipal dumpsites in Lebanon, *Chemosphere*. 2018. 208: 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.151>.

Khan, N., Martinez-Hidalgo, P., Ice, T. A., Maymon, M., Humm, E. A., Nejat, N., et al. (2018). Antifungal activity of *Bacillus* species against fusarium and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Front. Microbiol.* 9:2363. doi: 10.3389/fmicb.2018.02363.

Kim JH, Kim TS, Song SH, Choi J, Han S, Kim DY, Kwon S, Lee E, Song KH, Choe PG, Bang JH, Kim ES, Park SW, Kim HB, Kim NJ, Park WB, Oh MD. Direct rapid antibiotic susceptibility test (dRAST) for blood culture and its potential usefulness in clinical practice. *J Med Microbiol.* 2018 Mar;67(3):325-331. doi: 10.1099/jmm.0.000678.

Kocot, A.M.; Wróblewska, B.; Cabo, M.L. Operational culture conditions determinate benzalkonium chloride resistance in *L. monocytogenes*-*E. coli* dual species biofilms. *Int. J. Food Microbiol.* 2021, 360, 109441

Kraakman, N.J.R., González-Martín, J., Pérez, C., Lebrero, R. and Muñoz, R. (2021). Recent advances in biological systems for improving indoor air quality. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 20(2), pp.363–387. doi:<https://doi.org/10.1007/s11157-021-09569-x>.

Kumar R, Pandit P, Kumar D, et al (2021) Landfill microbiome harbour plastic degrading genes: A metagenomic study of solid waste dumping site of Gujarat, India. *Sci Total Environ* 779:.. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146184>

Kumari M, Ghosh P, Thakur IS. Landfill leachate treatment using bacterial co-culture: an integrated approach using chemical analyses and toxicological assessment. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2016;128:44–51.

Lichstein, H.C.; Soule, M.H. Studies of the Effect of Sodium Azide on Microbial Growth and Respiration: II. The Action of Sodium Azide on Bacterial Catalase. *J. Bacteriol.* 1944, 47, 239–251.

Lin, X., Wang, S., Ni, R. and Song, L. (2023). New insights on municipal solid waste (MSW) landfill plastisphere structure and function. *Science of The Total Environment*, 888, pp.163823–163823. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163823>.

Liu H, Li S, Xie X, Shi Q. *Pseudomonas putida* actively forms biofilms to protect the population under antibiotic stress. *Environ Pollut.* 2021 Feb

1;270:116261. doi: 10.1016/j.envpol.2020.116261.

Ma, D.; Jiang, Y.; Ahmed, S.; Qin, W.; Liu, Y. Physical and antimicrobial properties of edible films containing *Lactococcus lactis*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019, 141, 378–386.

Mann EE, Wozniak DJ. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 Jul;36(4):893-916. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x. Epub 2012 Jan 23. PMID: 22212072; PMCID: PMC4409827.

Matz C, Kjelleberg S. Off the hook-how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol.* 2005 Jul;13(7):302-7. doi: 10.1016/j.tim.2005.05.009.

McGivney E, Cederholm L, Barth A, Hakkarainen M, Hamacher-Barth E, Ogonowski M, Gorokhova E. Rapid Physicochemical Changes in Microplastic Induced by Biofilm Formation. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020 Mar 20;8:205. doi: 10.3389/fbioe.2020.00205.

Merchel Piovesan Pereira B, Tagkopoulos I. Benzalkonium Chlorides: Uses, Regulatory Status, and Microbial Resistance. *Appl Environ Microbiol.* 2019 Jun 17;85(13):e00377-19. doi: 10.1128/AEM.00377-19.

Mirghani R, Saba T, Khaliq H, Mitchell J, Do L, Chambi L, Diaz K, Kennedy T, Alkassab K, Huynh T, Elmi M, Martinez J, Sawan S, Rijal G. Biofilms: Formation, drug resistance and alternatives to conventional approaches. *AIMS Microbiol.* 2022;8(3):239-277. doi: 10.3934/microbiol.2022019.

Muhammad MH, Idris AL, Fan X, Guo Y, Yu Y, Jin X, Qiu J, Guan X, Huang T. Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. *Front Microbiol.* 2020 May 21;11:928. doi: 10.3389/fmicb.2020.00928.

Mukhi, M. and Vishwanathan, A.S. (2022). Beneficial Biofilms: a Minireview of Strategies To Enhance Biofilm Formation for Biotechnological Applications. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(3). doi:https://doi.org/10.1128/aem.01994-21.

Müller R.J., 2005. Biodegradability of Polymers: Regulations and Methods for Testing. In *Biopolymers Online*, pp. 365–374. doi: 10.1002/3527600035.bpola012.

Murshid S., Antonysamy A.J., Dhakshinamoorthy G., Arun, J. and Pugazhendhi A. (2023). A review on biofilm-based reactors for wastewater treatment: Recent advancements in biofilm carriers, kinetics, reactors, economics, and future perspectives. *Science of The Total Environment*, 892, pp.164796–164796. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164796.

Nichols D, Cahoon N, Trakhtenberg EM, Pham L, Mehta A, Belanger A, Kanigan T, Lewis K, Epstein SS. Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of "uncultivable" microbial species. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Apr;76(8):2445-50. doi: 10.1128/AEM.01754-09.

Ning, Z.; Kennedy, K.J.; Fernandes, L. Biosorption of 2,4-dichlorophenol

by live and chemically inactivated anaerobic granules. *Water Res.* 1996, 30, 2039–2044

Nunez, C.; Kostoulias, X.; Peleg, A.; Short, F.; Qu, Y. A comprehensive comparison of biofilm formation and capsule production for bacterial survival on hospital surfaces. *Biofilm* 2023, 5, 100105.

Patil SA, Harnisch F, Koch C, Hübschmann T, Fetzer I, Carmona-Martínez AA, Müller S, Schröder U. 2011. Electroactive mixed culture derived biofilms in microbial bioelectrochemical systems: the role of pH on biofilm formation, performance and composition. *Bioresour Technol* 102:9683–9690.

Peterson, S.B.; Irie, Y.; Borlee, B.R.; Murakami, K.; Harrison, J.J.; Colvin, K.M.; Parsek, M.R. Different methods for culturing biofilms in vitro. In *Biofilm Infections*; Springer: New York, NY, USA, 2011; pp. 251–266.

Pettit, T.; Irga, P.J.; Torpy, F.R. Functional green wall development for increasing air pollutant phytoremediation: Substrate development with coconut coir and activated carbon. *J. Hazard. Mater.* 2018, 360, 594–603.

Pinnell, L. J., and Turner, J. W. (2019). Shotgun metagenomics reveals the benthic microbial community response to plastic and bioplastic in a coastal marine environment. *Front. Microbiol.* 10:1252. doi: 10.3389/fmicb.2019.01252

Polman EMN, Gruter GJM, Parsons JR, Tietema A (2021) Comparison of the aerobic biodegradation of biopolymers and the corresponding bioplastics: a review. *Sci Total Environ* 753:141953. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141953>

Prest, E. I., Hammes, F., Van Loosdrecht, M. C., and Vrouwenvelder, J. S. (2016). Biological stability of drinking water: controlling factors, methods, and challenges. *Front. Microbiol.* 7:45. doi: 10.3389/fmicb.2016.00045

Ramsperger, A.F.R.M.; Stellwag, A.C.; Caspari, A.; Fery, A.; Lueders, T.; Kress, H.; Löder, M.G.J.; Laforsch, C. Structural Diversity in Early-Stage Biofilm Formation on Microplastics Depends on Environmental Medium and Polymer Properties. *Water* 2020, 12, 3216. <https://doi.org/10.3390/w12113216>

Ren B, Wu Q, Muskhelishvili L, Davis K, Wang Y, Rua D, Cao X. Evaluating the Sub-Acute Toxicity of Formaldehyde Fumes in an In Vitro Human Airway Epithelial Tissue Model. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 26;23(5):2593. doi: 10.3390/ijms23052593.

Sarjit A, Mei Tan S, A Dykes G. 2015. Surface modification of materials to encourage beneficial biofilm formation. *AIMS Bioeng* 2:404–422. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2015.4.404>.

Sarkisova, S., Patrauchan, M. A., Berglund, D., Nivens, D. E. & Franklin, M. J. (2005). Calcium-induced virulence factors associated with the extracellular matrix of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* 187, 4327–4337.

Sauer K, Stoodley P, Goeres DM, Hall-Stoodley L, Burmølle M, Stewart PS, Bjarnsholt T. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat Rev Microbiol.* 2022 Oct;20(10):608-620. doi:

10.1038/s41579-022-00767-0. Epub 2022 Aug 3. PMID: 35922483; PMCID: PMC9841534.

Sharma S., Pathak H. 2014. *Pseudomonas* in Biodegradation. International Journal of Pure & Applied Bioscience. 2 (1): 213-222.

Sharma, S.; Bakht, A.; Jahanzaib, M.; Lee, H.; Park, D. Evaluation of the Effectiveness of Common Indoor Plants in Improving the Indoor Air Quality of Studio Apartments. Atmosphere 2022, 13, 1863.

Sharma, S.; Mohler, J.; Mahajan, S.D.; Schwartz, S.A.; Bruggemann, L.; Aalinkeel, R. Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. Microorganisms 2023, 11, 1614. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061614>

She, P., Wang, Y., Liu, Y., Tan, F., Chen, L., Luo, Z. and Wu, Y. (2019). Effects of exogenous glucose on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. MicrobiologyOpen, 8(12). doi:<https://doi.org/10.1002/mbo3.933>.

Sheoran, K., Siwal, S.S., Kapoor, D., Singh, N., Saini, A.K., Alsanie, W.F. and Thakur, V.K. (2022). Air Pollutants Removal Using Biofiltration Technique: A Challenge at the Frontiers of Sustainable Environment. ACS Engineering Au. doi:<https://doi.org/10.1021/acseengineeringau.2c00020>.

Singh S, Singh SK, Chowdhury I, Singh R. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. Open Microbiol J. 2017 Apr 28;11:53-62. doi: 10.2174/1874285801711010053.

Somani M, Datta M, Gupta S, Sreekrishnan T, Ramana G. Comprehensive assessment of the leachate quality and its pollution potential from six municipal waste dumpsites of India. Bioresource Technol Rep. 2019;6:198–206.

Song B, Leff LG. 2006. Influence of magnesium ions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*. Microbiol Res 161:355–361. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.01.004>.

Speziale, P.; Geoghegan, J.A. Biofilm formation by staphylococci and streptococci: Structural, functional, and regulatory aspects and implications for pathogenesis. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2015, 5, 31.

Su, Y.; Liang, Y. Foliar uptake and translocation of formaldehyde with Bracket plants (*Chlorophytum comosum*). J. Hazard. Mater. 2015, 291, 120–128.

Swift G. Handbook of biodegradable polymers. Amsterdam: Hardwood Academic; 1997. Non-medical biodegradable polymers: environmentally degradable polymers; pp. 473–511.

Tandukar M, Oh S, Tezel U, Konstantinidis KT, Pavlostathis SG. Long-term exposure to benzalkonium chloride disinfectants results in change of microbial community structure and increased antimicrobial resistance. Environ Sci Technol. 2013. 3;47(17):9730-8. doi: 10.1021/es401507k.

Teiri, H.; Pourzamani, H.; Hajizadeh, Y. Phytoremediation of VOCs from indoor air by ornamental potted plants: A pilot study using a palm species under the controlled environment. Chemosphere 2018, 197, 375–381.

Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., and Nomura, N. (2016). Environmental factors that shape biofilm formation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80, 7–12. doi: 10.1080/09168451.2015.1058701

Tuon, F.F., Dantas, L.R., Suss, P.H. and Tasca Ribeiro, V.S. (2022). Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review. *Pathogens*, 11(3), p.300. doi:<https://doi.org/10.3390/pathogens11030300>.

van Dillewijn, P., Nojiri, H., Van Der Meer, J. R., and Wood, T. K. (2009). Bioremediation, a broad perspective. *Microb. Biotechnol.* 2, 125–127

Wojnowska-Baryła I, Bernat K, Zaborowska M. Plastic Waste Degradation in Landfill Conditions: The Problem with Microplastics, and Their Direct and Indirect Environmental Effects. *Int J Environ Res Public Health.* 2022 Oct 14;19(20):13223. doi: 10.3390/ijerph192013223.

Wu, R.X., Zhang, Y., Guo, Z.Q., Zhao, B. and Guo, J.S. (2022). Role of Ca²⁺ and Mg²⁺ in changing biofilm structure and enhancing biofilm formation of *P. stutzeri* strain XL-2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, [online] 220, p.112972. doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112972>.

Zhang, L.; Routsong, R.; Strand, S.E. Greatly Enhanced Removal of Volatile Organic Carcinogens by a Genetically Modified Houseplant, *Pothos Ivy* (*Epipremnum aureum*) Expressing the Mammalian Cytochrome P450 2e1 Gene. *Environ. Sci. Technol.* 2019, 53, 325–331

Zounggran, Y., Lynda, E., Dobi-Brice, K.K., Tchirioua, E., Bakary, C. and Yannick, D.D. (2020). Influence of natural factors on the biodegradation of simple and composite bioplastics based on cassava starch and corn starch. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5), p.104396. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104396>.