

**ВПЛИВ ПРЕПАРАТІВ БАКТЕРІОФАГІВ НА ПРОЦЕС
БІОПЛІВКОУТВОРЕННЯ ШТАМІВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Є. С. ВОРОБЄЙ, провідний інженер НДЛ молекулярної біології
мікроорганізмів та мікробної біотехнології НДІ біології

О. С. ВОРОНКОВА, кандидат біологічних наук, доцент;

А. І. ВІННИКОВ, доктор біологічних наук, професор

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара

***Анотація.** Висока резистентність бактерій у складі біоплівки до антибіотиків зумовлює актуальність питання про пошук додаткових засобів для лікування інфекцій, викликаних плівкоутворюючими бактеріями, в якості яких можуть виступати бактеріофаги.*

Найбільша ефективність пригнічення плівкового росту визначалася при використанні піобактеріофагу полівалентного. Найбільш вагомими змінами спостерігали при його внесенні на добову біоплівку. Відмічали зниження кількості КУО у планктоні у $115,00 \pm 5,44$ рази, кількості КУО у біоплівці у $63,90 \pm 2,10$ рази, сухої ваги біоплівки – на $34,47 \pm 5,29$ %, умісту матричного білка – на $41,77 \pm 7,14$ %, а оптичної густини біоплівки – на $47,27 \pm 10,24$ % у порівнянні з контролем двохдобової біоплівки. Найменша ефективність визначалася для бактеріофагу стафілококового рідкого. Максимальний вплив він здійснював при внесенні на двохдобову біоплівку. Визначали зниження кількості КУО у планктоні у $83,17 \pm 3,55$ рази, показника кількості КУО у біоплівці у $62,20 \pm 3,04$ рази, сухої ваги біоплівки – на $32,67 \pm 5,75$ %, вмісту матричного білка – на $37,17 \pm 3,53$ %, а оптичної густини біоплівки – на $42,67 \pm 7,47$ % у порівнянні із трьохдобовою біоплівкою.

Отримані результати дозволяють дійти висновку, що бактеріофаги можуть мати велике значення для медицини та у сільському господарстві для скорочення обсягів використання антибіотиків.

***Ключові слова:** антибіотикорезистентність, стафілокок, біоплівка, бактеріофаги*

Актуальність. Значна кількість експериментальних даних свідчить про те, що існування бактерій у навколишньому середовищі, у тому числі організмі людини та тварин, відбувається у складі структурно організованих мікробних біоплівок. Для більшості бактерій стан біоплівки є основним, який склався протягом мільйонів років під впливом природного відбору в мінливих

екологічних умовах, що надає певні переваги порівняно з планктонними культурами [10].

Здатність до утворення біоплівок – одна з основних стратегій виживання бактерій не лише у зовнішньому середовищі, але і в умовах макроорганізму [8]. Зараз вважається, що більше 65 % всіх інфекційних уражень обумовлені мікроорганізмами, існуючими у формі біоплівок [3, 5], і в цьому сенсі найбільш відомими є стафілококи [2].

Стафілококи активно формують біоплівки в організмі людини та сільсько-господарських тварин. Це, насамперед, стосується *S. aureus* [6, 15]. Відомо, що від 67 % до 78 % клінічних ізолятів *S. aureus* можуть формувати біоплівки [17]. Ця остання характеристика є найважливішим фактором колонізації стафілококів, що сприяє розвитку хронічної форми інфекційних захворювань [18].

Значний масив даних свідчить про особливі властивості бактерій, що перебувають у складі біоплівок, найбільш актуальною з яких є підвищена здатність до виживання у несприятливих умовах. Така підвищена стійкість стафілококових біоплівок до несприятливих факторів зовнішнього середовища, у тому числі до впливу різних антимікробних агентів [12], а також до дії імунної системи організму-господаря виявлена у багатьох штамів. Так, штами *S. aureus* у біоплівках у 100-1000 разів менш чутливі до антибіотиків, ніж аналогічні бактеріальні популяції з поодиноких (планктонних) клітин [11].

Поширення серед стафілококів стійкості до антибіотиків ускладнює проведення етіотропної терапії. На жаль, стандартні методи антибактеріального лікування з використанням нешкідливих для організму людини доз антибіотиків спрямовані на окремо існуючі планктонні клітини, тоді як бактерії всередині біоплівки розмножуються і знову дисемінують після завершення курсу лікування, нерідко формуючи вогнища хронічної персистуючої інфекції, що сприяє рецидиву захворювання [16]. Натепер у клінічній практиці препарати у безпечній для макроорганізму дозі для лікування захворювань, пов'язаних з утворенням біоплівок, відсутні.

Крім того, зараз велика кількість антибіотиків використовується не тільки у медицині для лікування інфекцій людини, а й у сільському господарстві для профілактики захворювань у стадах тварин, лікування хворої худоби та покращення травлення та засвоєння кормів, що призводить до посилення набору ваги. Це може сприяти зниженню ефективності антибіотиків для лікування інфекцій у людини через створення антибіотикостійких штамів різних бактерій. Тобто, вони можуть не бути прямою загрозою для здоров'я людини, але сприяють поширенню генів стійкості до антибіотиків серед інших бактерій, у тому числі патогенних для людини [1].

Антибіотикорезистентність бактерій у складі біоплівки, можливість розвитку непереносимості і досить великий спектр протипоказань до застосування антибіотиків як у медицині так і у сільському господарстві сприяють тому, що актуальним є питання про пошук додаткових, крім антибіотиків, засобів для боротьби з бактеріальними біоплівками, в якості яких можуть виступати бактеріофаги.

Відомо, що антибактеріальний ефект препаратів бактеріофагів обумовлений проникненням генома фага в бактеріальну клітину з наступним його розмноженням і лізисом інфікованої клітини. Здатність вірулентних фагів при взаємодії з бактеріями інтегрувати власну геномну ДНК і експоненційно реплікуватися призводить до знищення патогенних бактерій, що обумовлює їх важливу роль у боротьбі з інфекційними захворюваннями, у тому числі і лікуванні інфекцій, зумовлених розвитком біоплівки [4, 14]. Важливо, що фагова інфекція викликає порушення структури біоплівки та робить клітини у її складі доступними для імунної системи.

Мета дослідження – вивчення можливості впливу препаратів бактеріофагів на процес плівкоутворення та на вже сформовану біоплівку штамів золотистого стафілококу.

Матеріали і методи дослідження. Для реалізації мети роботи вивчали особливості впливу бактеріофагів на культури 7 плівкоутворюючих штамів

S. aureus із колекції культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Дніпропетровського національного університету ім. Олеся Гончара.

Для характеристики параметрів росту біоплівок на різних етапах формування та їх зміни під впливом лікувальних препаратів бактеріофагів визначали оптичну густину елюйованою біоплівкою барвника кристалічного фіолетового, кількість клітин в біоплівці та оточуючому її планктоні, вміст клітинного білка біоплівкових та планктонних форм, вміст матричного білка, суху вагу клітин біоплівки та планктону, суху вагу цілої біоплівки. Використовували лікувальні препарати: бактеріофаг стафілококовий рідкий, піобактеріофаг полівалентний та інтесті-бактеріофаг рідкий (НПО «Микроген», РФ).

Для визначення оптичної густини суспензію добової культури досліджуваного штаму (1×10^9 КУО/мл) вносили у лунки 96-лункового планшета з МПБ. Планшети інкубували у термостаті 24, 48, 72 та 96 год за температури 37 °С. Оптичну густину стафілококових біоплівок визначали нефелометричним методом. Для цього з лунок видаляли залишки поживного середовища, тричі промивали дистильованою водою, фіксували 96° етиловим спиртом та фарбували розчином кристалічного фіолетового. Потім барвник видаляли, лунки промивали дистильованою водою. Далі у лунки вносили етиловий спирт та залишали на 20-30 хв, періодично струшуючи. У якості контролей використовували контролі стерильності МПБ, ізотонічного розчину NaCl (0,5 %) та повітря. Лунки з ними оброблялися аналогічним чином. Активність зміни оптичної густини оцінювали за зміною показників рівня адсорбції барвника етанолом, вимірюного в одиницях оптичної густини на мікропланшетному фотометрі SUNRISE (Tecan, Австрія), у режимі вимірювання «Поглинання», режимі зчитування «Нормальний» та довжині хвилі 620 нм з використанням програмного забезпечення Magellan.

Для визначення інших параметрів росту досліджувану культуру засівали у 6-лункові планшети. Для цього суспензію культури (1×10^4 КУО/мл) засівали у МПБ. Планшети з дослідними зразками інкубували 24, 48, 72 та 96 год за

температури 37 °С.

Для визначення кількісних показників для клітин у планктоні після інкубації у лунках планшету надбіоплівкову рідину обережно піпетували та відбирали. Кількість КУО/мл визначали за методом Коха. Інкубували 24 год за температури 37 °С. Для визначення вмісту білка клітин планктону та сухої ваги клітин планктону проби центрифугували при 1500 об/хв упродовж 5 хв для осадження клітин. Надосадову рідину відбирали та додавали дистильовану воду. Вміст білка у пробах визначали за методом Бредфорда, з попереднім проведенням кислотного гідролізу клітин. Суху вагу отриманих клітин визначали шляхом зважування висушеного у сухожаровій шафі вмісту пробірок у кюветах з фольги. Зважування проводили до внесення суспензії у кювету і після висушування на електронних вагах з точністю до 0,00001 г.

Для визначення кількісних характеристик клітин у біоплівці з лунок планшету видаляли залишки поживного середовища. Вміст лунок промивали тричі ізотонічним розчином NaCl (0,5 %). Потім у лунки вносили розчин натрію додецилсульфату (0,004 моль/дм³) для руйнування міжклітинних зв'язків та зв'язку біоплівки з поверхнею пластика. Вміст лунок відбирали та вносили у стерильні пластикові пробірки та тричі центрифугували протягом 5 хв за 1500 об/хв, кожен раз відбираючи рідку фазу та вносячи ізотонічний розчин. Кількість КУО/мл визначали за методом Коха. Інкубацію проводили 24 год за температури 37 °С. Вміст білка у пробах визначали за методом Бредфорда з попереднім проведенням кислотного гідролізу. Суху вагу отриманих клітин визначали шляхом зважування висушеного у сухожаровій шафі вмісту пробірок у кюветах з фольги до внесення суспензії у кювету і після висушування.

Для визначення матричного білка стафілококових біоплівок та їх сухої ваги також спочатку відмивали залишки планктонної культури та проводили руйнування міжклітинних зв'язків та зв'язку біоплівки з поверхнею пластика. Вміст лунок переносили у стерильні пробірки. Вміст матричного білка визначали також за методом Бредфорда без проведення кислотного гідролізу.

Сушу вагу отриманих біоплівки визначали шляхом зважування висушеного у сухожаровій шафі вмісту пробірок у кюветах з фольги до внесення суспензії у кювету і після висушування.

Для визначення можливості впливу лікувальних препаратів бактеріофагів на біоплівки штамів золотистого стафілококу використовувалися препарати бактеріофагу стафілококового рідкого, інтесті-бактеріофагу рідкого та піобактеріофагу полівалентного. Вивчали чутливість біоплівок лише до тих препаратів, які мали вплив на планктонні форми ізоляту. Для визначення зміни під дією препаратів бактеріофагів у засіяні досліджуваною культурою лунки 96-лункових планшетів додатково вносили 50 мкл стандартного препарату бактеріофагу. При вивченні змін сухої ваги, кількості білка та КУО до засіяних лунок 6-лункових планшетів вносили 1 мл стандартного препарату. Фаги додавали на різних стадіях інкубації культур, здатних до біоплівкоутворення: при засіванні, через 24, 48, 72 год. Ефективність впливу фагів оцінювали через 24 та 48 год інкубації біоплівок у присутності бактеріофагів. Отримані результати порівнювали з контролем чистої біоплівки та контролем стерильності МПБ.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали, розраховуючи середнє значення та стандартну похибку з використанням програми Origin Lab Pro 7.0. Достовірними вважали відмінності за $P < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Показано, що фагові препарати призводили до зниження досліджених показників при внесенні на всіх етапах інкубації біоплівок. Кількість клітинного білка та суха вага клітин обраховувалися математично в залежності від кількості клітин через неможливість використаних методик визначити ці показники у таких малих концентраціях. Далі у тексті наведені дані лише за зміною кількості клітин, тому що зміна кількості клітинного білка та сухої ваги клітин під дією препаратів бактеріофагів відбувалася пропорційно до зміни кількості КУО.

Так, за внесення бактеріофагу стафілококового рідкого під час засіву ізолятів через 24 год інкубації визначали зниження кількості КУО у планктоні у

37,70 ± 1,98 рази, КУО у біоплівці у 84,43 ± 3,25 рази, сухої ваги біоплівок – на 16,55 ± 3,33 %, вмісту матричного білка – на 17,43 ± 2,93 %, а оптичної густини біоплівки – на 18,98 ± 4,12 % у порівнянні з добовою біоплівкою. За внесення препарату на добову біоплівку визначали зниження кількості КУО у планктоні у 101,35 ± 5,09 рази, показника кількості КУО у біоплівці у 41,65 ± 2,79 рази, сухої ваги біоплівок – на 34,72 ± 6,08 %, вмісту матричного білка – на 34,08 ± 3,12 %, а оптичної густини біоплівки – на 40,12 ± 5,54 % у порівнянні з контролем двохдодової біоплівки. За внесення препарату на двохдодову біоплівку визначали зниження кількості КУО у планктоні у 83,17 ± 3,55 рази, показника кількості КУО у біоплівці у 62,20 ± 3,04 рази, сухої ваги біоплівок – на 32,67 ± 5,75 %, вмісту матричного білка – на 37,17 ± 3,53 %, а оптичної густини біоплівки – на 42,67 ± 7,47 % у порівнянні із трьохдодовою біоплівкою (рис. 1).

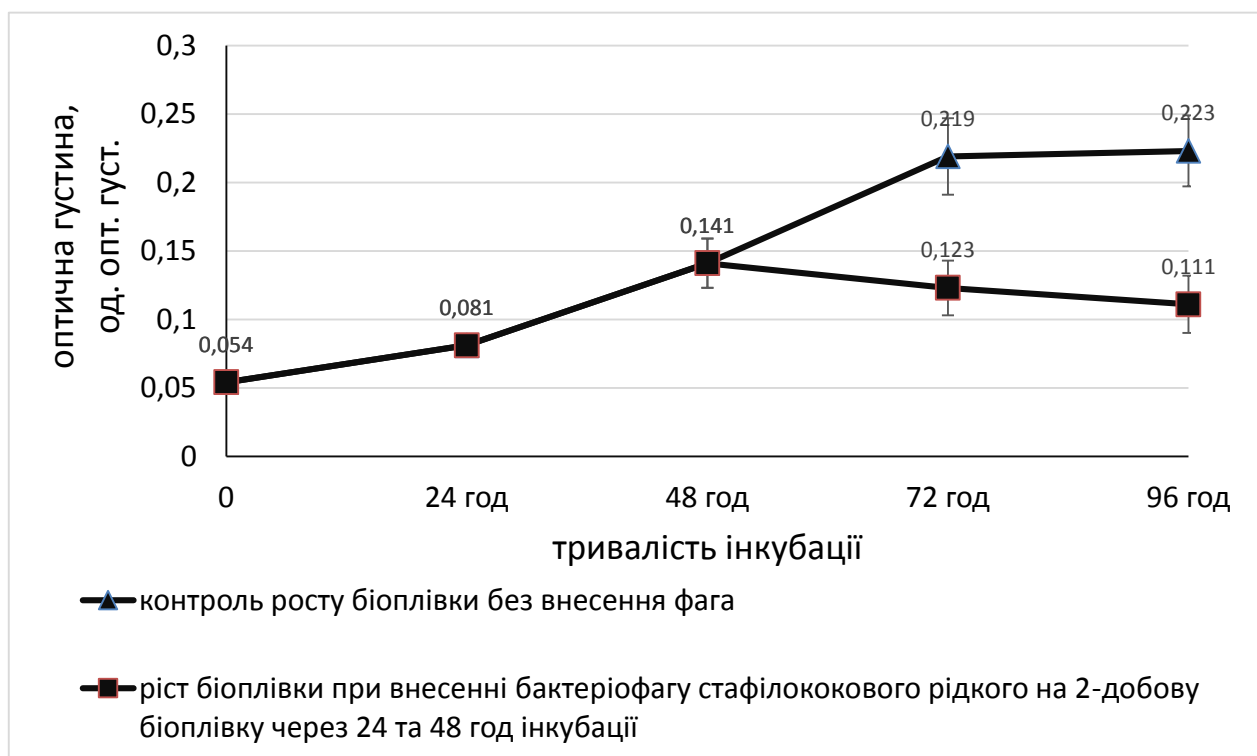


Рис. 1 Зміна показника оптичної густини під впливом бактеріофагу стафілококового рідкого за внесення на двохдодову біоплівку через 24 та 48 год інкубації із фагом

За внесення препарату на трьохдодову біоплівку визначали зниження

кількості КУО у планктоні у $45,83 \pm 1,99$ рази, показника кількості КУО у біоплівці у $51,17 \pm 3,02$ рази, сухої ваги біоплівок – на $25,85 \pm 5,94$ %, вмісту матричного білка – на $32,00 \pm 4,21$ %, а оптичної густини біоплівки – на $30,23 \pm 6,17$ % у порівнянні з чотирьохдобовою біоплівкою. Тобто, максимальний вплив бактеріофаг стафілоковий рідкий здійснював за внесення на двохдобову біоплівку.

За внесення інтесті-бактеріофагу рідкого під час засіву ізолятів через 24 год інкубації визначали зниження кількості КУО у планктоні у $37,44 \pm 2,75$ рази, показника кількості КУО у біоплівці у $82,62 \pm 3,62$ рази, сухої ваги біоплівок – на $17,40 \pm 3,78$ %, вмісту матричного білка – на $16,88 \pm 2,72$ %, а оптичної густини біоплівки – на $17,88 \pm 1,43$ % у порівнянні з контролем добової біоплівки. За внесення препарату на добову біоплівку визначали зниження кількості КУО у планктоні у $103,22 \pm 5,24$ рази, показника кількості КУО у біоплівці у $42,92 \pm 2,84$ рази, сухої ваги біоплівок – на $35,62 \pm 3,70$ %, вмісту матричного білка – на $36,94 \pm 4,48$ %, а оптичної густини біоплівки – на $44,22 \pm 3,91$ % у порівнянні з контролем двохдобової біоплівки. За внесення препарату на двохдобову біоплівку визначали зниження кількості КУО у планктоні у $84,68 \pm 4,01$ рази, показника кількості КУО у біоплівці у $65,28 \pm 3,42$ рази, сухої ваги біоплівок – на $36,52 \pm 7,14$ %, вмісту матричного білка – на $37,06 \pm 4,54$ %, а оптичної густини біоплівки – на $49,20 \pm 3,75$ % у порівнянні з контролем трьохдобової біоплівки (рис. 2).

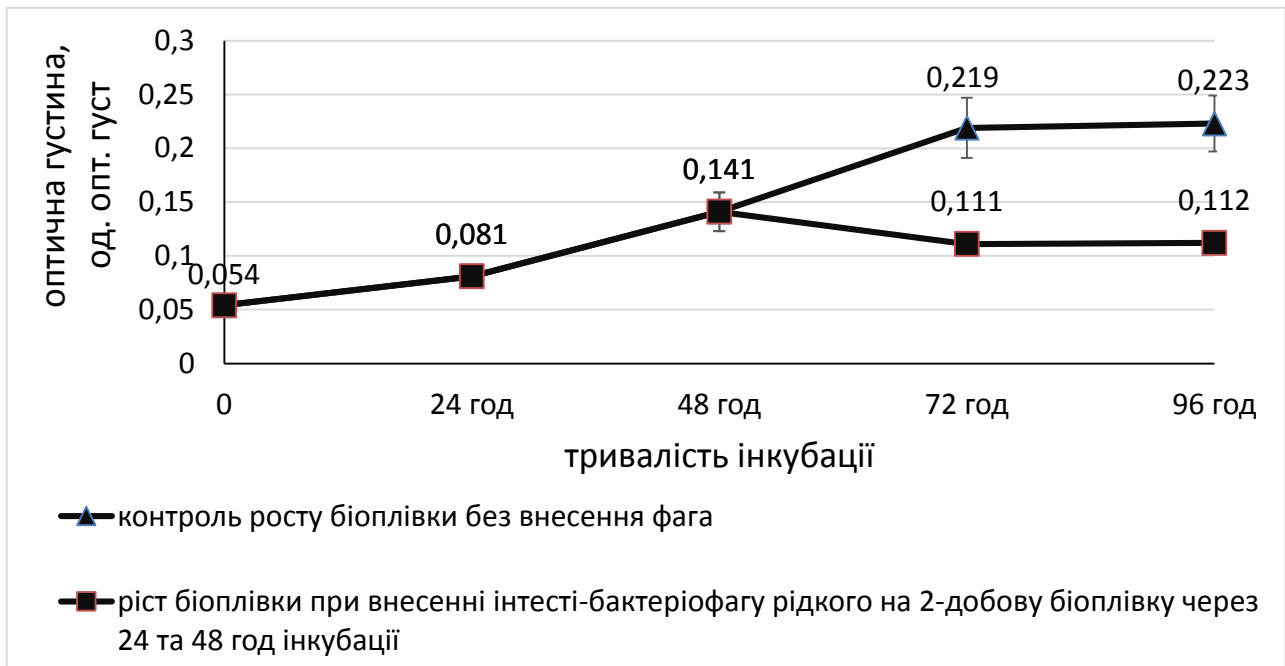


Рис. 2. Зміна показника оптичної густини під впливом інтесті-бактеріофагу рідкого за внесення на двохдобову біоплівку через 24 та 48 год інкубації із фагом

За внесення препарату на трьохдобову біоплівку визначали зниження кількості КУО у планктоні у $47,06 \pm 4,05$ рази, показника кількості КУО у біоплівці у $53,18 \pm 2,76$ рази, сухої ваги біоплівок – на $34,66 \pm 4,17$ %, вмісту матричного білка – на $35,02 \pm 4,12$ %, а оптичної густини біоплівки – на $46,84 \pm 2,11$ % у порівнянні з контролем чотирьохдобової біоплівки. Водночас слід зазначити, що найбільші зміни спостерігалися за внесення інтесті-бактеріофагу рідкого на двохдобову біоплівку.

За внесення піобактеріофагу полівалентного під час засіву ізолятів через 24 год інкубації визначали зниження кількості КУО у планктоні у $37,13 \pm 3,10$ рази, показника кількості КУО у біоплівці у $84,13 \pm 2,58$ рази, сухої ваги біоплівок – на $15,47 \pm 1,92$ %, вмісту матричного білка – на $19,47 \pm 3,80$ %, а оптичної густини біоплівки – на $23,27 \pm 5,02$ % у порівнянні з контролем добової біоплівки. За внесення препарату на добову біоплівку визначали зниження кількості КУО у планктоні у $115,00 \pm 5,44$ рази, показника кількості КУО у біоплівці у $63,90 \pm 2,10$ рази, сухої ваги біоплівок – на $34,47 \pm 5,29$ %, вмісту матричного білка – на $41,77 \pm 7,14$ %, а оптичної густини біоплівки – на

47,27 ± 10,24 % у порівнянні з контролем двохдобової біоплівки (рис. 3). За внесення препарату на двохдобову біоплівку визначали зниження кількості КУО у планктоні у 84,43 ± 3,30 рази, показника кількості КУО у біоплівці у 74,23 ± 1,53 рази, сухої ваги біоплівок – на 34,97 ± 4,34 %, вмісту матричного білка – на 36,77 ± 3,11 %, а оптичної густини біоплівки – на 42,37 ± 6,76 % у порівнянні з контролем трьохдобової біоплівки. За внесення препарату на трьохдобову біоплівку визначали зниження кількості КУО у планктоні у 59,40 ± 3,22 рази, показника кількості КУО у біоплівці у 55,33 ± 3,48 рази, сухої ваги біоплівок – на 21,07 ± 3,57 %, вмісту матричного білка – на 29,63 ± 2,06 %, а оптичної густини біоплівки – на 35,47 ± 5,65 % у порівнянні з контролем чотирьохдобової біоплівки. Водночас слід зазначити, що найбільші зміни спостерігалися за внесення піобактеріофагу полівалентного на добову біоплівку.

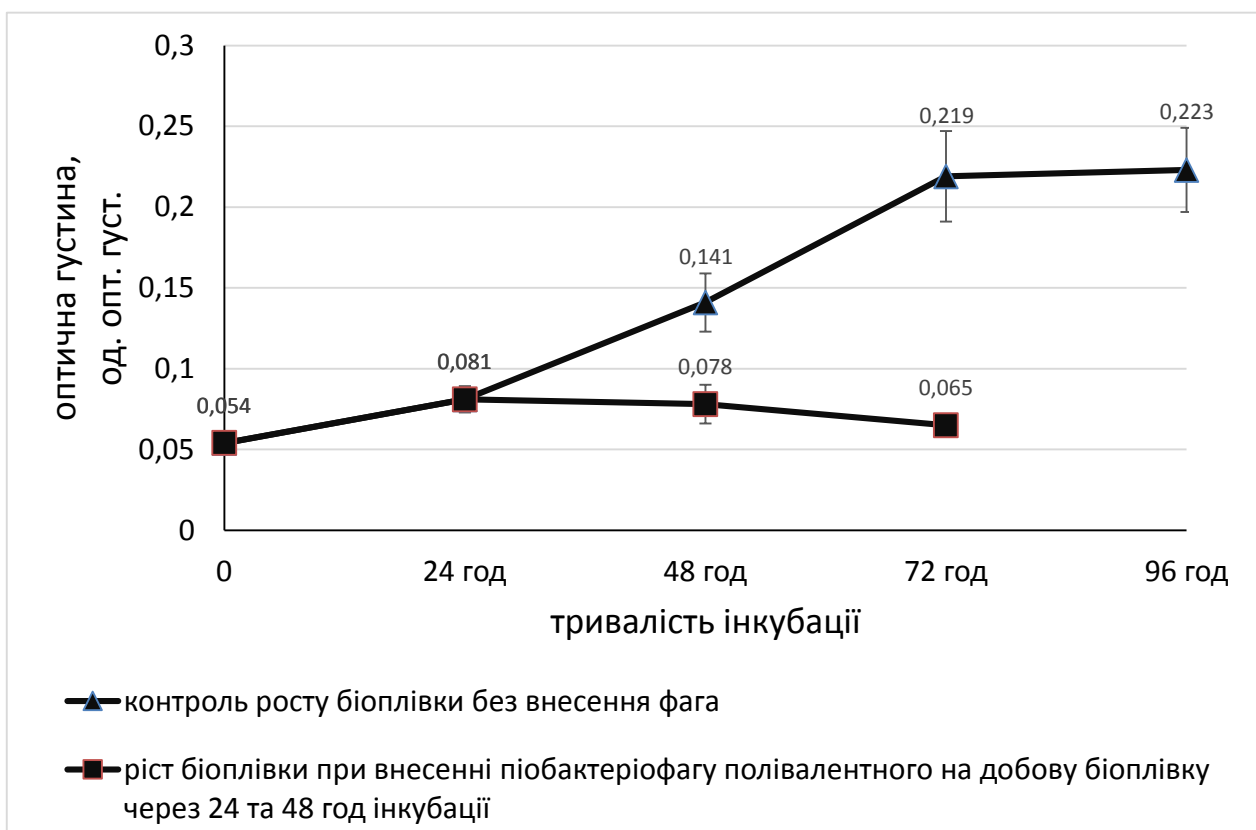


Рис. 3. Зміна показника оптичної густини під впливом піобактеріофагу полівалентного за внесення на добову біоплівку через 24 та 48 год інкубації із фагом

Привертає увагу той факт, що показник оптичної густини біоплівок мав

близькі за значенням тенденції до зниження поряд з сухою вагою та вмістом матричного білка у біоплівці, що пов'язано з домінуючим положенням позаклітинного екзополімерного матриксу у складі біоплівки.

Тобто, за внесення усіх використаних лікувальних препаратів бактеріофагів було визначено їх суттєвий вплив на процес формування стафілококових біоплівок при внесенні на різних етапах інкубації, що також підтверджувалося даними [9], згідно з якими фаг Phi 80 у моделі катетер-асоційованої стафілококової інфекції зменшив оптичну густину 24-годинної біоплівки на 79,4 %.

Крім того, дослідниками Alves D.R. et al. [7] був виділений новий фаг DRA88, що широко циркулює серед штамів *S. aureus*. Була приготовлена з цього бактеріофага і фага К композиція, яка продемонструвала виражену літичну активність щодо значної кількості штамів *S. aureus*, що були здатні утворювати біоплівку. Авторами було відзначено зменшення біомаси біоплівки штамів *S. aureus* через 48 год після обробки сумішшю фагів більш ніж у 2 рази, а біоплівки окремих штамів були повністю знищені. Також вони відмітили, що літичний потенціал суміші фагів DRA88 і К збільшився на 74 % у порівнянні з дією фагів окремо один від одного.

У своїх дослідженнях Lungren M.P. et al. [13] визначали, модливість бактеріофагу К знизити бактеріальну колонізацію і утворення біоплівки *S. aureus* на матеріалі центрального венозного катетера. Було визначено, що кількість КУО зменшилося у $9,4 \times 10^3$ разів в експериментальній групі ($6,7 \times 10$ КУО/мл) у порівнянні з контрольною групою ($6,3 \times 10^5$ КУО/мл) через 24 год після обробки фагом.

Висновки і перспективи подальших досліджень. Найбільшу ефективність впливу фіксували за використання піобактеріофагу полівалентного, який за внесення на різних етапах процесу плівкоутворення давав максимальне зменшення кількісних показників плівкового росту. Найменша ж ефективність визначалася для бактеріофагу стафілококового

рідкого, вплив якого на різних етапах внесення був меншим, ніж у інших використаних препаратів бактеріофагів. Так, максимальний ефект за внесення піобактеріофагу на добову біоплівку дав зниження оптичної густини біоплівок на $47,27 \pm 10,24$ %, тоді як максимальний ефект від застосування стафілококового бактеріофагу за цим же показником – зниження на $40,12 \pm 5,54$ %. Але, слід зазначити, що кількість чутливих по піобактеріофагу досліджених плівкоутворюючих штамів була меншою у порівнянні з інтесті-бактеріофагом та стафілококовим бактеріофагом.

Отже, бактеріофаги можуть мати велике значення для вирішення проблеми біоплівкоутворення, у тому числі і у сенсі скорочення обсягів використання антибіотиків.

Список літератури

1. Бактериофаги: биология и практическое применение [Текст] / под ред. Э. Каттер, А. Сулаквелидзе. – М.: Научный мир, 2012. – 640 с.
2. Гостев, В. В. Бактериальные биопленки и инфекции [Текст] / В. В. Гостев, С. В. Сидоренко // Журнал инфектологии. – 2010. – 2 (3). – С. 4–15. doi:<http://dx.doi.org/10.22625/2072-6732-2010-2-3-4-15>
3. Лямин, А. В. Проблемы в медицине, связанные с бактериальными пленками / А. В. Лямин, Е. А. Боткин, А. В. Жестков [Текст] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – 14 (4). – С. 268–275.
4. Новахова, Ж. Д. Современные возможности селективной антибактериальной терапии в акушерстве и гинекологии [Текст] // Ж. Д. Новахова, П. В. Буданов, А. Н. Стрижаков, А. А. Чурганова // Трудный пациент. – 2014. – 12 (12). – С. 36–38.
5. Смирнова, Т. А. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок [Текст] / Т. А. Смирнова, Л. В. Диденко, Р. Р. Азизбеян, Ю. М. Романова // Микробиология. – 2010. – 79 (4). – С. 435–446.
6. Agarwal, A. Medical significance and management of staphylococcal biofilm [Text] / A. Agarwal, K.P. Singh, A. Jain // FEMS Immunology & Medical Microbiology. – 2010. – Vol. 58, Issue 2. – P. 147–160. doi:[10.1111/j.1574-695X.2009.00601.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2009.00601.x)
7. Alves, D.R. Combined use of bacteriophage K and a novel bacteriophage to reduce Staphylococcus aureus biofilm formation [Text] / D. R. Alves, A. Gaudion, J. E. Bean, P. Perez Esteban, T. C. Arnot, D. R. Harper, W. Kot, L. H. Hansen, M. C. Enright, A. T. Jenkins // Applied and Environmental Microbiology. – 2014. – Vol. 80, Issue 21. – P. 6694–6703. doi:[10.1128/AEM.01789-14](https://doi.org/10.1128/AEM.01789-14)
8. Bryers, J. D. Medical biofilms [Text] / J. D. Bryers // Biotechnology and

Bioengineering. – 2008. – Vol. 100, Issue 1. – P. 1–18. doi:10.1002/bit.21838

9. Del Pozo J. L. Biotechnological war against biofilms. Could phages mean the end of device-related infections? / J. L. Del Pozo, M. Alonso, C. R. Arciola, R. Gonzalez, J. Leiva, I. Lasa, J. Penades // *The International Journal of Artificial Organs*. – 2007. – Vol. 30, Issue 9. – P. 805–812.

10. Garrett, T. R. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces [Text] / T. R. Garrett, M. Bhakoo, Z. Zhang // *Progress in Natural Science*. – 2008. – Vol. 18, Issue 9. – P. 1049–1056. doi:10.1016/j.pnsc.2008.04.001

11. Gilbert, P. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? [Text] / P. Gilbert, D. G. Allison, A. J. McBain // *Journal of Applied Microbiology*. – 2002. – Vol. 92, Issue s1. – P. 98S–110S. doi:10.1046/j.1365-2672.92.5s1.5.x

12. Hoiby, N. Antibiotic resistance of bacterial biofilms [Text] / N. Hoiby, T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin, O. Ciofu // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2010. – Vol. 35, Issue 4. – P. 322–332. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011

13. Lungren, M. P. Bacteriophage K for reduction of *Staphylococcus aureus* biofilm on central venous catheter material / M. P. Lungren, D. Christensen, R. Kankotia, I. Falk, B. E., Paxton, C. Y. Kim, // *Bacteriophage*. – 2013. – Vol. 3, Issue 4, e26825. doi:10.4161/bact.26825

14. O'Flaherty, S. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria [Text] / S. O'Flaherty, R. P. Ross, A. Coffey // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2009. – Vol. 33, Issue 4. – P. 801–819. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00176.x

15. Otto, M. Staphylococcal biofilms [Text] / M. Otto // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. – 2008. – Vol. 322. – P. 207–228. doi:10.1007/978-3-540-75418-3_10

16. Römling, U. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies [Text] / U. Römling, C. Balsalobre // *Journal of Internal Medicine*. – 2012. – Vol. 272, Issue 6. – P. 541–561. doi:10.1111/joim.12004

17. Taj, Y. Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* [Text] / Y. Taj, F. Essa, F. Aziz, S. U. Kazmi // *The Journal of Infection in Developing Countries*. – 2012. – Vol. 6, Issue 5. – P. 403–409. doi:https://doi.org/10.3855/jidc.1743

18. Wu, H. Strategies for combating bacterial biofilm infections [Text] / H. Wu, C. E. Moser, H.-Z. Wang, N. Hoiby, Z.-J. Song // *International Journal of Oral Science*. – 2015. – Vol. 7, Issue 1. – P. 1–7. doi:10.1038/ijos.2014.65

Reference

1. Katter, Eh., Sulakvelidze A. ed. (2012). *Bakteriofagi: biologiya i prakticheskoe primeneniye* [Bacteriophages: Biology and Practical Applications]. Moscow: The scientific world, 640.

2. Gostev, V. V., Sidorenko V. V. (2010). *Bakterial'nye bioplenki i infekcii* [Bacterial biofilms and infections]. *Journal Infectology*, 2 (3), 4–15.

doi:<http://dx.doi.org/10.22625/2072-6732-2010-2-3-4-15>

3. Lyamin, A. V., Botkin, E. A., Zhestkov, A. V. (2012). Problemy v medicine, svyazannye s bakterial'nymi plenkami [Medical Problems Associated with Bacterial Biofilms]. *Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy*, 14 (4), 268–275.

4. Novahova, Zh. D., Budanov, P. V., Strizhakov, A. N., Churganova, A. A. (2014). Sovremennye vozmozhnosti selektivnoj antibakterial'noj terapii v akusherstve i ginekologii [Modern Opportunities for Selective Antibiotic Treatment in Obstetrics and Gynecology]. *Difficult patient*, 12 (12), 36–38.

5. Smirnova, T. A. Didenko, L. V., Azizbekyan, R. R., Romanova, Yu. M. (2010). Strukturno-funkcional'naya harakteristika bakterial'nyh bioplenok [Structural and functional characteristics of bacterial biofilms]. *Microbiology*, 79 (4), 435–446.

6. Agarwal, A., Singh, K. P., Jain, A. (2010). Medical significance and management of staphylococcal biofilm. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 58 (2), 147–160. doi:10.1111/j.1574-695X.2009.00601.x

7. Alves, D. R., Perez Esteban, P., Arnot, T. C., Harper, D. R., Kot, W., Hansen, L. H., Enright, M. C., Jenkins, A. T. (2014). Combined use of bacteriophage K and a novel bacteriophage to reduce *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80 (21), 6694–6703. doi:10.1128/AEM.01789-14

8. Bryers, J. D. (2008). Medical biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 100 (1), 1–18. doi:10.1002/bit.21838

9. Del Pozo, J. L., Alonso, M., Arciola, C. R., Gonzalez, R., Leiva, J., Lasa, I., Penades, J. (2007). Biotechnological war against biofilms. Could phages mean the end of device-related infections? *The International Journal of Artificial Organs*, 30 (9), 805–812.

10. Garrett, T. R., Bhakoo, M., Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18 (9), 1049–1056. doi:10.1016/j.pnsc.2008.04.001

11. Gilbert, P., Allison, D. G., McBain A. J. (2002). Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? *Journal of Applied Microbiology*, 92 (s1), 98S–110S. doi:10.1046/j.1365-2672.92.5s1.5.x

12. Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35, (4), 322–332. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011

13. Lungren, M. P., Christensen, D., Kankotia, R., Falk, I., Paxton, B. E., Kim, C. Y. (2013). Bacteriophage K for reduction of *Staphylococcus aureus* biofilm on central venous catheter material. *Bacteriophage*, 3 (4), e26825. doi:10.4161/bact.26825

14. O'Flaherty, S., Ross, R. P., Coffey, A. (2009). Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 33 (4), 801–819. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00176.x

15. Otto, M. (2008). Staphylococcal biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, 207–228. doi:10.1007/978-3-540-75418-3_10

16. Römling, U., Balsalobre, C. (2012). Biofilm infections, their resilience to

therapy and innovative treatment strategies. Journal of Internal Medicine, 272 (6), 541–561. doi:10.1111/joim.12004

17. Taj, Y., Essa, F., Aziz, F., Kazmi, S. U. (2012). Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of Staphylococcus aureus. The Journal of Infection in Developing Countries, 6 (5), 403–409. doi:https://doi.org/10.3855/jidc.1743

18. Wu, H., Moser, C., Wang H.-Z., Hoiby N., Song Z.-J. (2015). Strategies for combating bacterial biofilm infections. International Journal of Oral Science, 7 (1), 1–7. doi:10.1038/ijos.2014.65

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИОФАГОВ НА ПРОЦЕСС БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ ШТАММОВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Е. С. Воробей, О. С. Воронкова, А. И. Винников

Аннотация. Высокая резистентность бактерий в составе биопленок к антибиотикам обуславливает актуальность вопроса о поиске дополнительных средств для лечения инфекций, вызванных пленкообразующими бактериями, в качестве которой могут выступить бактериофаги.

Наибольшая эффективность угнетения пленочного роста определялась при использовании пибактериофага поливалентного. Наиболее весомые изменения наблюдались при его внесении на суточную биопленку. Отмечали снижение количества КОЕ в планктоне в $115,00 \pm 5,44$ раза, количества КОЕ в биопленке в $63,90 \pm 2,10$ раза, сухого веса биопленок – на $34,47 \pm 5,29$ %, содержания матричного белка – на $41,77 \pm 7,14$ %, а оптической плотности биопленки – на $47,27 \pm 10,24$ % по сравнению с контролем двухсуточной биопленки. Наименьшая эффективность определялась для бактериофага стафилококкового жидкого. Максимальное влияние он оказывал при внесении на двухсуточную биопленку. Определяли снижение количества КОЕ в планктоне в $83,17 \pm 3,55$ раза, количества КОЕ в биопленке в $62,20 \pm 3,04$ раза, сухого веса биопленок – на $32,67 \pm 5,75$ %, содержания матричного белка – на $37,17 \pm 3,53$ %, а оптической плотности биопленки – на $42,67 \pm 7,47$ % по сравнению с трехсуточной биопленкой.

Полученные результаты позволяют прийти к выводу, что бактериофаги могут иметь большое значение для медицины и в сельском хозяйстве для сокращения объемов использования антибиотиков.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, стафилококк, биопленка, бактериофаги

INFLUENCE OF BACTERIOPHAGE DRUGS ON THE PROCESS FILMFORMATION STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS

E. S. Vorobey, O. S. Voronkova, A. I. Vinnikov

Abstract. High level of resistance to antibiotics of bacteria in biofilms causes an actuality of finding of additional preparates for treatment of infections caused by

film-forming bacteria. As one of the same preparations are bacteriophages.

Maximal efficacy of inhibition of film growth was during use of piobactariophage polyvalent. Significant changes were fixed during its use on daily biofilm. It was shown that decrease of: amount of CFU in plankton in 115.00 ± 5.44 times, amount of CFU in biofilm – in 63.90 ± 2.10 times, dry weight of biofilms – on $34.47 \pm 5.29\%$, content of matrix protein – on $41.77 \pm 7.14\%$, and optical density of biofilms – on $47.27 \pm 10.24\%$ compared to control of 2 day biofilm. Minimal efficacy took place during bacteriophage staphylococcal liquid action. Its maximal effect took place during addition of this preparation on 2 day biofilm. It was shown a decrease of planktonic CFU in 83.17 ± 3.55 times, CFU in biofilm in 62.20 ± 3.04 times, dry weight of biofilms – on $32.67 \pm 5.75\%$, content of matrix protein – on $37.17 \pm 3.53\%$, and optical density of biofilms – on $42.67 \pm 7.47\%$ compared to 3 day biofilm.

Given data can make a conclusion the bacteriophages may have great place for medicine and agriculture for reduce of use of antibiotics.

Keywords: *antibiotic resistance, staphylococcus, biofilm, bacteriophages*