

**ВПЛИВ СТАФІЛОКОКОВОГО БАКТЕРІОФАГУ  
НА БІОПЛІВКИ ШТАМІВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS  
ЧУТЛИВИХ І РЕЗИСТЕНТНИХ ДО ЦЕФОТАКСИМУ ТА АЗИТРОМІЦИНУ  
ЗАЛЕЖНО ВІД ХІМІЧНОГО СКЛАДУ ЇХ МАТРИКСУ**

Дніпропетровський національний університет ім. Олеса Гончара (м. Дніпропетровськ)

elizaveta.vorobey@mail.ru

Робота виконана у рамках держбюджетної теми №1-294-15 «Структурно-функціональні властивості природних мікробіоценозів та механізми біологічної дії мікробних препаратів».

**Вступ.** За останні роки накопичено багато інформації про бактеріальні біоплівки. Так, показано, що біоплівки – це високовпорядковані спільноти бактерій, що формуються на біологічних або штучних поверхнях [13] в результаті адгезії, росту і розмноження мікроорганізмів і утворення позаклітинного полісахаридного матриксу, який виробляється самими мікробами для захисту. Самі бактерії складають лише 5-35% маси біоплівки, інша її частина – це міжбактеріальний матрикс, який може становити більше 90% від загального органічного вуглецю біоплівок [11]. Мікроорганізми утворюють біоплівку як у природі, так і в організмі господаря, що створює великі проблеми у медичній практиці та у різних галузях господарської діяльності. Особливо це стосується умовно-патогенних бактерій, золотистого стафілокока, зокрема.

Відомо, що від 67% до 78% клінічних ізолятів *S. aureus* можуть формувати біоплівки. Основними структурними компонентами матриксу біоплівки золотистого стафілокока є екзополісахариди, також до складу можуть входити білки, гліколіпіди і бактеріальна ДНК [8, 16].

Головним елементом полісахаридного матриксу стафілококів є полісахаридний міжклітинний адгезин PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesin), який бере участь як у клітинній субстратній адгезії, так і в подальшому формуванні клітинних кластерів. PIA ініціює гемаглютинацію і перешкоджає фагоцитозу за рахунок активації бактеріальної агрегації [5]. Полісахаридний матрикс грає важливу роль у формуванні антибіотикорезистентності стафілококів у складі біоплівок. Поверхнева оболонка і компоненти матриксу біоплівки перешкоджають доступу, зв'язують та інактивують протимікробні препарати. Тому зараз актуальним є питання про пошук додаткових або альтернативних антибіотикам засобів у боротьбі з бактеріальними біоплівками. Перспективним у цьому сенсі може стати застосування фагових лікувальних препаратів, які здійснюватимуть

ефект за рахунок руйнування полісахаридного матриксу кодованими фагами полісахариддеполімерами [14].

**Метою роботи** було вивчення взаємозв'язку між хімічним складом позаклітинного матриксу та впливом бактеріофагів на біоплівки штамів *S. aureus* чутливих і резистентних до цефотаксиму та азитроміцину.

**Об'єкт і методи дослідження.** Для реалізації мети роботи були відібрані 2 плівкоутворюючих штами *S. aureus* з колекції культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Дніпропетровського національного університету ім. О. Гончара. Один з них був чутливим до цефотаксиму та азитроміцину, інший – резистентним. Вибір цих антибіотиків був зумовлений тим, що цефотаксим пригнічує синтез клітинної стінки та потенційно може пригнічувати синтез полісахаридного компонента матриксу, тоді як азитроміцин є блокатором синтезу білка та потенційно може пригнічувати синтез білкового компонента матриксу біоплівок.

Вплив лікувальних препаратів бактеріофагів на процес плівкоутворення визначали за змінами кількості клітин у біоплівці та оптичної густини біоплівок. Для визначення кількості клітин у біоплівці 1 мл суспензії досліджуваної культури з вмістом клітин  $1 \times 10^4$  КУО/мл. засівали у 6-лункові планшети у 1 мл МПБ. В одну з лунок вносили тільки МПБ (2 мл) і використовували її як контроль стерильності. Планшети з дослідними зразками інкубували за температури 37°C протягом 72 годин. На сформовані біоплівки вносили 1 мл стандартного препарату бактеріофагів та інкубували ще 24 години. Після інкубації з лунок планшети видаляли залишки поживного середовища. Вміст лунок промивали тричі 0,5% ізотонічним розчином NaCl. Потім у лунки вносили по 1 мл розчину натрія додецилсульфату ( $0,004$  моль/дм<sup>3</sup>) на 15 хв для руйнування міжклітинних зв'язків та зв'язку біоплівки з поверхнею пластика. Вміст лунок відбирали та вносили у стерильні пластикові пробірки та центрифугували тричі протягом 10 хв при 5000 об/хв. Після кожного центрифугування рідку фазу відбирали та вносили ізотонічний розчин NaCl. Для визначення кількості

клітин у біоплівці робили 10-кратні розведення (0,1 мл суспензії вносили у пробірку з 0,9 мл 0,5% ізотонічного розчину NaCl). Висів робили з кожного розведення на чашки Петрі з МПА по 0,1 мл. Посіви інкубували протягом 24 годин, підраховували кількість КУО у 1 мл проби та порівнювали з кількістю клітин у необробленій фагами біоплівці.

Для визначення зміни оптичної густини під дією препаратів бактеріофагів добову культуру досліджуваних штамів розводили у 0,5% фізіологічному розчині за стандартом мутності  $1 \times 10^9$  КУО/мл. Отриману суспензію в кількості 50 мкл вносили в лунки 96-лункового планшета, що містили 150 мкл м'ясопептонного бульйону. Планшети інкубували у термостаті при температурі 37°C 72 години. Фаги додавали на сформовані 72-годинні біоплівки. Через 24 години після внесення фага з лунок видаляли залишки поживного середовища, тричі промивали дистильованою водою (по 200 мкл), фіксували 96° етиловим спиртом (50 мкл) та фарбували розчином кристалічного фіолетового (50 мкл) протягом 2 хвилин. Потім барвник видаляли та тричі промивали дистильованою водою (200 мкл). Оптичну густину визначали на мікропланшетному фотометрі SUNRISE, Тесап (Австрія), у режимі вимірювання «Поглинання», режимі зчитування «Нормальний» та довжині хвилі 620 нм з використанням програмного забезпечення Magellan.

Для вивчення хімічної будови позаклітинного матриксу біоплівок *S. aureus* використовували речовини, що забезпечують специфічну деструкцію різних компонентів матриксу [8, 12]. Засів та інкубацію проводили як наведено вище. Після 72 годин інкубації з лунок видаляли залишки поживного середовища, додавали 50 мкл розчину ферментів: протеїназу К (Amresco, США) та ДНКазу (Fermentas, Литва) у концентрації 250 мкг/мл, трипсин (Merck Farma, Німеччина) – у концентрації 250 мкг/мл та 50 мкл розчину періодату натрія (натрія йоднокислого мета) у концентрації 40 мМ. Біоплівки з ферментами інкубували 60 хв за температури 37°C. У якості контролю використовували Tris-Cl-буфер (рН 7,5) без ферментів. Біоплівки з періодатом натрія інкубували 23 год при 4°C. У якості контролю використовували дистильовану воду. Після інкубації з лунок видаляли речовини-деструктори, тричі промивали дистильованою водою (по 200 мкл), фіксували 96° етиловим спиртом (50 мкл) та фарбували розчином кристалічного фіолетового (50 мкл) протягом 2 хвилин. Потім барвник видаляли та тричі промивали дистильованою водою (200 мкл). Оптичну густину визначали на мікропланшетному фотометрі SUNRISE, Тесап (Австрія), у режимі вимірювання «Поглинання», режимі зчитування «Нормальний» та довжині хвилі 620 нм з використанням програмного забезпечення Magellan. Результати виражали у процентах відносно контрольних зразків [2].

Статистичну обробку результатів проводили для рівня значущості 0,05 з використанням програм Origin Lab Pro 7.0.

### Результати досліджень та їх обговорення.

При вивченні впливу препарату «Бактеріофаг стафілококовий рідкий» на 72-годинні біоплівки досліджу-

ваних штамів було визначено, що для чутливого до цефотаксиму та азитроміцину штаму спостерігалося зменшення оптичної густини елюйованого 72-годинною біоплівкою барвника на 19,1%, тоді як кількість клітин у біоплівці зменшувалася у 253,0 разів. Для біоплівок резистентного до цефотаксиму та азитроміцину штаму визначали більший вплив стафілококового бактеріофагу, він призводив до зниження оптичної густини на 33,9%, кількість клітин при цьому зменшувалася у 393,6 разів.

Видалення зрілих біоплівок є головним завданням терапії, оскільки саме такі плівки є основою патогенетичного процесу. Здатність матриксу активно зв'язувати і уповільнювати дифузю антибіотиків крізь біоплівку призводить до неповного усунення мікроорганізмів, що у свою чергу сприяє їх виживанню і формуванню хронічних процесів [1]. Вплив на стафілококові біоплівки може бути спрямований на руйнування позаклітинного полісахаридного матриксу. Подібне лікування, що має впливати на структуру біоплівки, є більш ефективним ніж стандартна антибактеріальна терапія. Ще Doolittle та інші [9] у 1996 р. описали, що потомство фага поширюється радіально вздовж всієї біоплівки, заражаючи сусідні клітини і руйнуючи матрикс біоплівки. Для цього фаги виробляють деполімерази, які здатні руйнувати матрикс біоплівок [3,7], що в значній мірі залежить від структури полімерного матриксу. Тому важливим етапом нашого дослідження було вивчення біохімічного складу полімерного матриксу стафілококових біоплівок.

Вивчення природи матриксу біоплівок базувалося на специфічній деструкції різних його компонентів. Для визначення у складі біоплівок частки екзополісахаридів застосовували обробку сформованих 72-годинних плівок періодатом натрія. Було виявлено, що після неї відбувалося зменшення оптичної густини елюйованого барвника на  $47,00 \pm 2,87\%$  для чутливого до антибіотиків штаму та  $59,02 \pm 2,10\%$  – для резистентного.

Для визначення наявності білків у складі матриксу використовували протеїназу К та трипсин. Встановлено, що після внесення на 72-годинну біоплівку протеїнази К показники оптичної густини елюйованого барвника, що затримувався біоплівкою, знижувалися на  $8,52 \pm 1,72\%$  від контролю 72-годинної біоплівки без внесення ферменту для чутливого до антибіотиків штаму та на  $3,52 \pm 1,11\%$  – для резистентного. При внесенні трипсину зниження показників оптичної густини елюйованого барвника також було невеликим –  $12,16 \pm 1,49\%$  для чутливого до антибіотиків штаму та на  $7,20 \pm 2,12\%$  – для резистентного.

Також визначали вміст у матриксі позаклітинної ДНК. Для цього до вже сформованої 72-годинної біоплівки вносили фермент ДНК-азу. Було показано зменшення оптичної густини біоплівок на  $15,72 \pm 2,55\%$  від контролю 72-годинної біоплівки без внесення ферменту для чутливого до антибіотиків штаму та на  $14,50 \pm 1,33\%$  – для резистентного (рис.).

Порівнюючи отримані результати з відомими даними [8,21], можна припустити, що матрикс до-

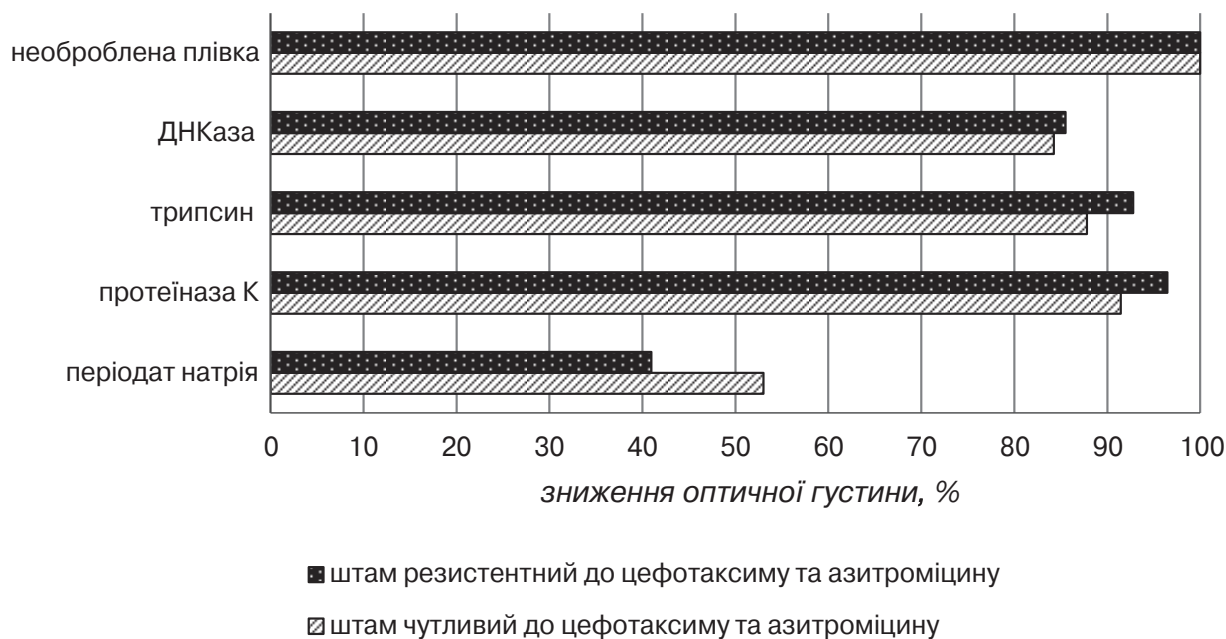


Рис. Інтенсивність впливу специфічних речовин-деструкторів на матрикс у порівнянні з контролем необробленої біоплівки.

сліджених стафілококових біоплівок складається переважно з полісахаридного матеріалу, який містить ДНК і домішки білків. Це не суперечить літературним даним [10,11,18,19], в яких вказується на існування штамів *S. aureus* з різними типами матриксу.

У ряді досліджень взаємодії фага і біоплівок показано здатність фага руйнувати екзополісахариди біоплівки і заражати клітини біоплівки [6]. Ще Adams and Park [4] у 1956 році запропонували використовувати фагові полісахариддеполімерази для руйнування бактерійних екзополісахаридів. Ці ферменти приєднані до фагової базальної пластинки у вигляді шипів [15]. Капсульний матеріал може служити вторинним рецептором і забезпечувати зв'язування фага, поки йде розчинення полімеру, а потім фаг отримує можливість досягти зовнішньої оболонки клітини, зв'язатися з рецептором та інфікувати клітину. В подальшому ряд авторів [17,20] підтвердили, що геном бактеріофага містить гени, експресія яких приводить до синтезу специфічних руйнуючих ферментів – полісахариддеполімераз, що підвищує мобільність бактеріофагів при контакті з полімерною субстанцією. Фаги, які використовують позаклітинні деполімерази, руйнують достатню частину матриксу, щоб зробити уразливими занурені в біоплівку бактерії.

Тому, визначення домінуючої кількості екзополісахаридів у матриксі досліджених біоплівок і відомості про кодування фагами ферментів деполімераз, які руйнують полісахари у складі матриксу, дозволяють припустити, що виявлений вплив на біоплівку золотистого стафілококу був спровокований саме цим способом.

**Висновки**

Встановлено, що для чутливого до цефотаксиму та азитроміцину штаму при обробці біоплівок пе-

ріодатом натрія спостерігали зменшення оптичної густини елюйованого барвника на  $47,00 \pm 2,87\%$ , а для резистентного –  $59,02 \pm 2,10\%$  порівняно з контролем необробленої біоплівки. При обробці біоплівок протеїназою К оптична густина знижувалася на  $8,52 \pm 1,72\%$  для чутливого штаму та  $3,52 \pm 1,11\%$  – для резистентного, а при обробці трипсином – на  $12,16 \pm 1,49\%$  та  $7,20 \pm 2,12\%$  відповідно. Обробка ДНКазою призводила до зменшення оптичної густини на  $15,72 \pm 2,55\%$  та  $14,50 \pm 1,33\%$ . Це свідчить, що основним компонентом у складі матриксу біоплівок досліджених штамів є екзополісахариди, причому їх кількість на  $12,02\%$  вище у резистентного до антибіотиків штаму. Крім того, при внесенні стафілококового бактеріофагу на біоплівки дослідних штамів відмічали зниження оптичної густини елюйованого барвника на  $19,1\%$  та кількості клітин у біоплівці до  $253,0$  разів для чутливого до антибіотиків штаму і на  $33,9\%$  та  $393,6$  разів відповідно – для резистентного. З чого можна зробити висновок про залежність інтенсивності впливу препаратів бактеріофагів на біоплівку досліджених штамів *S. aureus* від кількості екзополісахаридів у складі їх матрикса.

**Перспективи подальших досліджень**

Отримані результати свідчать про ефективність використання лікувальних препаратів бактеріофагів для контролю росту біоплівок штамів золотистого стафілокока, матрикс яких складається з великої кількості екзополісахаридів.

З метою пригнічення утворення біоплівок необхідним є дослідження взаємозв'язку складу матриксу з чутливістю до антибіотиків та пошук лікувальних препаратів, здатних інгібувати продукцію екзополісахаридів.

Література

1. Биопленки патогенных бактерий и их роль в хронизации инфекционного процесса. Поиск средств борьбы с биопленками / Ю. М. Романова, Л. В. Диденко, Э. Р. Толордава [и др.] // Вестник РАМН. – 2011. – № 10. – С. 31-39.
2. Современные технологии исследования бактериальных биопленок / И. В. Чеботарь, А. Г. Погорелов, В. А. Яшин [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2013. – Т. 5, № 1. – С. 14-20.
3. Abedon S. T. Ecology of anti-biofilm agents II: bacteriophage exploitation and biocontrol of biofilm bacteria / S. T. Abedon // *Pharmaceuticals*. – 2015. – Vol. 8, № 3. – P. 559-589.
4. Adams M. H. An enzyme produced by a phage-host cell system II. The properties of the polysaccharide depolymerase / M. H. Adams, B. H. Park // *Virology*. – 1956. – Vol. 2, № 6. – P. 719-736.
5. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation / B. Vu, M. Chen, R. J. Crawford [et al.] // *Molecules*. – 2009. – Vol. 14, № 7. – P. 2535-2554.
6. Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases – novel tools for study of bacterial biofilms / K. A. Hughes, I.W. Sutherland, J. Clark [et al.] // *Journal of Applied Microbiology*. – 1998. – Vol. 85, № 3. – P. 583-590.
7. Chan B. K. Bacteriophages and their enzymes in biofilm control / B. K. Chan, S. T. Abedon // *Current Pharmaceutical Design*. – 2015. – Vol. 21, № 1. – P. 85-99.
8. Differential roles of Poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms / E. A. Izano, M. A. Amarante, W. B. Kher [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2008. – Vol. 74, № 2. – P. 470-476.
9. Doolittle M. M. Tracing the interaction of bacteriophage with bacterial biofilms using fluorescent and chromogenic probes / M.M. Doolittle, J. J. Cooney, D. E. Caldwell // *Journal of Industrial Microbiology*. – 1996. – Vol. 16. – P. 331-341.
10. Extracellular DNA in biofilms / L. Montanaro, A. Poggi, L. Visai [et al.] // *The International Journal of Artificial Organs*. – 2011. – Vol. 34, № 9. – P. 824-831.
11. Flemming H.-C. The biofilm matrix / H.-C. Flemming, J. Wingender // *Nature Reviews Microbiology*. – 2010. – Vol. 8, № 9. – P. 623-633.
12. Frank K. L. Poly-N-Acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by icaADBC-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates / K. L. Frank, R. Patel // *Infection and Immunity*. – 2007. – Vol. 75, № 10. – P. 4728-4742.
13. How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure / S. Periasamy, H.-S. Joo, A. C. Duong [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – Vol. 109, № 4. – P. 1281-1286.
14. Kutateladze M. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics / M. Kutateladze, R. Adamia // *Trends in Biotechnology*. – 2010. – Vol. 28, № 12. – P. 591-595.
15. Lindberg A. A. Bacterial surface carbohydrates and bacteriophage adsorption / A. A. Lindberg // *Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell* / ed. I. W. Sutherland. – London: Academic Press, 1977. – P. 289-356.
16. Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus* / N. Merino, A. Toledo-Arana, M. Vergara-Irigaray [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2009. – Vol. 191, № 3. – P. 832-843.
17. Scholl D. Polysaccharide-degrading phages / D. School, C. Merrill // *Phages: their role in bacterial pathogenesis and biotechnology* / eds. M. K. Waldor, D. I. Friedman, S. L. Adhya. – Washington DC: ASM Press, 2005. – P. 400-414.
18. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition / P. Chaignon, I. Sadovskaya, Ch. Ragunah [et al.] // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2007. – Vol. 75, № 1. – P. 125-132.
19. The anchorless adhesin Eap (extracellular adherence protein) from *Staphylococcus aureus* selectively recognizes extracellular matrix aggregates but binds promiscuously to monomeric matrix macromolecules / U. Hansen, M. Hussain, D. Villone [et al.] // *Matrix Biology*. – 2006. – Vol. 25, № 4. – P. 252-260.
20. The interaction of phage and biofilms / I. W. Sutherland, K. A. Hughes, L. C. Skillman [et al.] // *FEMS Microbiology Letters*. – 2004. – Vol. 232, № 1. – P. 1-6. – Mode of access: [www.fems-microbiology.org](http://www.fems-microbiology.org).
21. Wall teichoic acids are dispensable for anchoring the PNAG exopolysaccharide to the *Staphylococcus aureus* cell surface / M. Vergara-Irigaray, T. Maira-Litran, N. Merino [et al.] // *Microbiology*. – 2008. – № 154, № 3. – P. 865-877.

УДК 579.61:616-095

**ВПЛИВ СТАФІЛОКОКОВОГО БАКТЕРІОФАГУ НА БІОПЛІВКИ ШТАМІВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ЧУТЛИВИХ І РЕЗИСТЕНТНИХ ДО ЦЕФОТАКСИМУ ТА АЗИТРОМІЦИНУ ЗАЛЕЖНО ВІД ХІМІЧНОГО СКЛАДУ ЇХ МАТРИКСУ**

**Воробей Є. С., Воронкова О. С., Вінніков А. І.**

**Резюме.** При дослідженні складу матриксу біоплівок штамів *S. aureus* визначено, що при обробці плівки періодом натрія оптична густина елюйованого барвника знижувалася на  $47,00 \pm 2,87\%$  для чутливого до цефотаксиму та азитроміцину штаму та  $59,02 \pm 2,10\%$  – для резистентного, що вказує на переважний вміст екзополісахаридів і співпадає з найбільшим впливом на біоплівки стафілококового бактеріофагу (зниження оптичної густини на  $19,1\%$  та кількості клітин у  $253,0$  рази для чутливого до антибіотиків штаму і на  $33,9\%$  та  $393,6$  рази відповідно – для резистентного). При обробці біоплівок протеїназою К оптична густина знижувалася на  $8,52 \pm 1,72\%$  для чутливого штаму та  $3,52 \pm 1,11\%$  – для резистентного, а при обробці трипсином – на  $12,16 \pm 1,49\%$  та  $7,20 \pm 2,12\%$  відповідно. Обробка ДНКазою призводила до зменшення оптичної густини на  $15,72 \pm 2,55\%$  та  $14,50 \pm 1,33\%$ . Це свідчить, що інтенсивність впливу фагового препарату на біоплівки досліджених штамів *S. aureus* залежала від кількості екзополісахариду у складі їх матриксу.

**Ключові слова:** стафілококи, біоплівка, матрикс, екзополісахариди, оптична густина.

УДК 579.61: 616-095

**ВЛИЯНИЕ СТАФИЛОКОККОВОГО БАКТЕРИОФАГА НА БИОПЛЕНКИ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ И РЕЗИСТЕНТНЫХ К ЦЕФОТАКСИМУ И АЗИТРОМИЦИНУ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ИХ МАТРИКСА****Воробей Е. С., Воронкова О. С., Винников А. И.**

**Резюме.** При изучении состава матрикса биопленок штаммов *S. aureus* установлено, что при обработке пленок периодатом натрия оптическая плотность элюированного красителя снижалась на  $47,00 \pm 2,87\%$  для чувствительного к цефотаксиму и азитромицину штамма и  $59,02 \pm 2,10\%$  – для резистентного, что указывает на преобладание экзополисахаридов и совпадает с наибольшим влиянием на биопленки стафилококкового бактериофага (снижение оптической плотности на 19,1% и КОЕ/мл в 253,0 раза для чувствительного к антибиотикам штамма и на 33,9% и 393,6 раза соответственно – для резистентного). При обработке пленок протеиназой К оптическая плотность снижалась на  $8,52 \pm 1,72\%$  для чувствительного штамма и  $3,52 \pm 1,11\%$  – для резистентного, а при обработке трипсином – на  $12,16 \pm 1,49\%$  и  $7,20 \pm 2,12\%$  соответственно. Обработка ДНКазы приводила к уменьшению оптической плотности на  $15,72 \pm 2,55\%$  и  $14,50 \pm 1,33\%$ . Это свидетельствует о зависимости интенсивности воздействия фагового препарата на биопленки исследованных штаммов *S. aureus* от количества экзополисахарида в составе их матрикса.

**Ключевые слова:** стафилококки, биопленка, матрикс, экзополисахариды, полисахариддеполимеразы.

UDC 579.61: 616-095

**AN INFLUENCE OF STAPHYLOCOCCAL BACTERIOPHAGE ON BIOFILM OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS SENSITIVE AND RESISTANT TO CEFOTAXIME AND AZITHROMYCIN, DEPENDING ON CHEMICAL COMPOSITION OF MATRIX****Vorobey E. S., Voronkova O. S., Vinnikov A. I.**

**Abstract.** Removal of mature biofilms is the main task of therapy, because biofilms are the basement of the pathogenic process. The ability of active matrix to bind antibiotics or reduce the diffusion through the biofilm leads to incomplete removal of microorganisms, which attend to their survival and formation of chronic processes. An influence on staphylococcal biofilms can be done by destruction of extracellular polysaccharide matrix. This treatment, which may influence on the structure of the biofilm, is more effective than standard antibiotic therapy. It was established that the phage progeny spread radially through the biofilm, infecting neighboring cells and destroying the biofilm matrix. For this purposes phages producing the depolymerase, which may destroy biofilms matrix that is significantly depends on the structure of the polymer matrix.

It was showed that the effect of the drug «Bacteriophage staphylococcal liquid» on 72-hour biofilms of investigated strains, sensitive to cefotaxime and azithromycin, characterized by decreasing of absorbance level of eluted dye on 19.1%, while the number of cells in the biofilm decreased in 253.0 times. More significant effect of staphylococcal bacteriophage was determined for biofilms of strains, resistant to cefotaxime and azithromycin. This effect characterized as a decrease of optical density on 33.9%, while the number of cells decreased in 393.6 times.

An important step of our research was to study the biochemical composition of the polymer matrix of staphylococcal biofilms. Study the composition of biofilms matrix based on the specific destruction of it components. The percent of exopolysaccharides in the composition of biofilms matrix, formed by 72-hour, was determine by treatment of sodium periodate. It was found that after treatment the decreasing of optical density of eluted dye at  $47.00 \pm 2.87\%$  for antibiotic sensitive strain and  $59.02 \pm 2.10\%$  – for resistant took place. The presence of proteins was determine by using of proteinase K and trypsin. After treatment of the 72-hour biofilm by proteinase K absorbance of eluted dye, delayed by biofilm, decreased on  $8.52 \pm 1.72\%$  compare to 72-hour control biofilm without enzyme adding for sensitive to antibiotic strain and on  $3.52 \pm 1.11\%$  – for resistant strain. After trypsin adding decrease of absorbance of eluted dye was less –  $12.16 \pm 1.49\%$  for sensitive to antibiotic strain and  $7.20 \pm 2.12\%$  – for resistant. The content of the extracellular matrix DNA was determined with use of DNAase. The decrease of biofilms absorbance on  $15.72 \pm 2.55\%$  compare to control biofilm for strain sensitive to antibiotic and  $14.50 \pm 1.33\%$  – for resistant. This indicate that the main component of the biofilm matrix of studied strains are exopolysaccharides, and their number are on 12.02% higher in the antibioticresistant strain.

The results demonstrate the effectiveness of the phages drugs use to control the growth of biofilms formed by *Staphylococcus aureus* strains, the matrix of that consisting of a large number of exopolysaccharide. For inhibition of the biofilmformation the study of the relation of matrix structure and sensitivity to antibiotics is necessary and the search of therapeutic drugs capable to inhibit the production of exopolysaccharides is main task of microbiology.

**Keywords:** staphylococci, biofilm, matrix, exopolysaccharides, polysacchariddepolymerase.

Рецензент – проф. Лобань Г. А.  
Стаття надійшла 21.01.2016 року