

МІКРОБІОЛОГІЯ

© Воробей Є. С., Воронкова О. С., Вінніков А. І., *Коваленко С. М., *Шматко Г. П.

УДК 615.371:578.7

Воробей Є. С., Воронкова О. С., Вінніков А. І., *Коваленко С. М., *Шматко Г. П.

ВПЛИВ ЛІКУВАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ БАКТЕРІОФАГІВ НА БІОПЛІВКИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

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

Відокремлений структурний підрозділ «Дніпродзержинський міський відділ лабораторних досліджень державної установи «Дніпропетровський обласний лабораторний центр Держсанепідслужби України», (м. Дніпродзержинськ)

Робота виконана в рамках держ. бюджетної теми № 1-262-12.

Вступ. Одними із найпоширеніших збудників опортуністичних, в тому числі госпітальних інфекцій на сьогодні залишаються бактерії роду *Staphylococcus*. Серед стафілококів основну роль відіграє золотистий стафілокок [2]. Виділення *S. aureus* з клінічного матеріалу практично завжди свідчить про його етіологічну значущість. Він є актуальним поза- і внутрішньолікарняним патогеном, який обумовлює ураження будь-якої локалізації і при гнійно-запальних захворюваннях шкіри та м'яких тканин відіграє провідну роль [2, 11].

Крім того, стафілококи є бактеріями, здатними до формування біоплівки. Насамперед, це стосується *S. aureus* [5, 18, 19]. Відомо, що від 67% до 78% клінічних ізолятів *S. aureus* можуть формувати біоплівки [5, 15, 22]. Ця остання характеристика, ймовірно, найважливіший фактор вірулентності стафілококів у розвитку хронічної форми інфекційних захворювань людини [7, 9, 13].

Одним з негативних наслідків формування біоплівки є зростання стійкості до антибіотиків мікробних клітин, що входять до її складу. Проблема ускладнюється й тим, що вибір засобів антибактеріальної терапії стафілококових інфекцій обмежений поширенням антибіотикорезистентних штамів і серед непліткових форм. Антибіотикорезистентність – одна з найбільш серйозних проблем в охороні здоров'я, що має глобальний характер. Багато дослідників відзначають, що якщо існуючі негативні тенденції не зміняться, то медицина зіткнеться з проблемами півстолітньої давності, що існували в доантибіотичну еру [16]. На даний момент більше 90% штамів *S. aureus* володіють стафілококовими плазмідними β-лактамазами класу А і гідролізують природні і напівсинтетичні пеніциліни (крім метициліну і оксациліну) [2]. Механізм стійкості стафілококів до метициліну був розшифрований на початку 80-х років. Він виявився пов'язаним

з набуттям мікроорганізмами додаткового пеніцилінзв'язуючого білка зі зниженою афінністю до β-лактамних антибіотиків – ПЗБ2а, який кодується геном *mecA*, що входить до складу рухомого генетичного елемента «стафілококової хромосомної касети *mec*» (*staphylococcal cassette chromosome mec* – *SCCmec*) [8]. Здатність до плівкоутворення ще більше ускладнює проблему: *S. aureus* в біоплівках в 100-1000 разів менш чутливі до антибіотиків, ніж аналогічні бактеріальні популяції поодиноких (планктонних) клітин [12].

Наведені факти свідчать про те, що проблема стафілококових захворювань, обумовлених біоплівкоутворюючими штамми, є актуальною для сучасної медичної науки і практики охорони здоров'я. Тому потрібно проводити детальне вивчення їх біологічних та біохімічних властивостей.

Крім того, зараз ведеться активний пошук нових засобів боротьби з інфекційними захворюваннями, що обумовлені патогенною та умовно- патогенною мікрофлорою. І в цьому сенсі найбільш перспективним розглядається застосування лікувальних препаратів бактеріофагів.

Метою роботи було охарактеризувати біологічні властивості ізолятів *S. aureus*, здатних до утворення біоплівки, з'ясувати параметри динаміки росту біоплівки, а також виявити вплив на процес плівкоутворення лікувальних препаратів бактеріофагів.

Об'єкт і методи дослідження. Було досліджено властивості 12 штамів *S. aureus* з колекції культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Дніпропетровського національного університету ім. О. Гончара. Виділення та ідентифікацію бактерій проводили згідно з ознаками, наведеними у Визначнику бактерій Берджі [1], за допомогою тест-системи ApiStaph, виробництва BioMerieux, Франція. Визначали чутливість виділених штамів до фагів з лікувальних препаратів бактеріофаг стафілококовий рідкий, піобактеріофаг полівалентний та інтесті-бактеріофаг рідкий (НПО «Микроген», РФ), здатність

до плівкоутворення та вплив препаратів бактеріофагів на процес плівкоутворення та вже сформовану біоплівку *S. aureus*. Чутливість штамів до препаратів бактеріофагів визначали крапельним методом [3].

Здатність до плівкоутворення та вплив на цей процес лікувальних препаратів бактеріофагів визначали за оптичною густиною зрослих плівок або культур. Для цього добу культуру розводили у 0,5% фізіологічному розчині за стандартом каламутності 1×10^9 мікробних клітин в 1 мл. Отриману суспензію в кількості 50 мкл вносили в лунки 96-лункового планшета, що містили 150 мкл м'ясо-пептонного бульйону. Планшети інкубували у термостаті при температурі 37°C 24, 48 та 72 години. Фаги додавали на різних стадіях інкубації: при засіванні, через 24, 48, 72 години. Через 24 та 48 годин 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 густина визначали на мікропланшетному фотометрі SUNRISE, Тесап (Австрія), у режимі вимірювання «Поглинання», режимі зчитування «Нормальний» та довжині хвилі 620 нм з використанням програмного забезпечення Magellan.

Статистичну обробку результатів трьох експериментів проводили з використанням статистичної програми Origin Pro 7. 0 для рівня значущості 0,05.

Результати досліджень та їх обговорення. В ході вивчення чутливості до лікувальних препаратів бактеріофагів досліджуваних штамів було визначено, що 50% штамів були чутливими до бактеріофагу стафілококового рідкого, 41,7% – до інтесті-бактеріофагу рідкого і 25% – до полібактеріофагу полівалентного. Здатність до плівкоутворення була виявлена у 7 штамів, усі вони були чутливими до одного або декількох препаратів бактеріофагів.

Були вивчені контрольні параметри приросту біоплівок досліджених штамів без додавання фагів за різні терміни інкубації. За інтенсивністю плівкоутворення штами відрізнялися між собою. Для штамів з більшою інтенсивністю характерним було зростання показників оптичної густини до $0,081 \pm 0,008$ за першу добу інкубації, до $0,145 \pm 0,016$ за 48 годин та до $0,227 \pm 0,024$ за 72 години. Для штамів з меншою інтенсивністю показники оптичної густини були нижчими: $0,082 \pm 0,005$ за 24 години інкубації, $0,118 \pm 0,007$ – за 48 годин та $0,186 \pm 0,016$ – за 72 години.

За здатністю до плівкоутворення чутливі до стафілококового бактеріофагу штами розподілилися на дві групи. До першої групи увійшли 4 штами з більш інтенсивним процесом утворення біоплівок, до другої – 2 штами з менш інтенсивним. При вивченні впливу бактеріофагу стафілококового рідкого на процес плівкоутворення чутливих до нього штамів було виявлено, що при внесенні препарату на всіх стадіях розвитку культури оптична густина утворених біоплівок знижувалася порівняно з контролем.

Так при внесенні фага під час засіву для бактерій з першої групи були отримані такі показники оптичної густини: $0,065 \pm 0,005$ через 24 години після внесення і $0,062 \pm 0,005$ – через 48 годин, що склало 83,3% та 79,5% від контролю добової біоплівки ($0,078 \pm 0,007$) відповідно. При внесенні фага на добу біоплівку показники оптичної густини зменшувалися до рівня $0,081 \pm 0,01$ через 24 години після внесення і $0,083 \pm 0,007$ – через 48 годин, що склало 56,6% та 58,0% від контролю 48-годинної біоплівки ($0,143 \pm 0,016$) відповідно. При внесенні препарату на 48-годинну біоплівку значення оптичної густини зменшувалося до $0,132 \pm 0,018$ через 24 години після внесення та $0,122 \pm 0,016$ – через 48 годин, що склало 57,4% та 53,0% від контролю 72-годинної біоплівки ($0,230 \pm 0,024$) відповідно. Аналогічна ситуація спостерігалася і при внесенні фага на вже сформовану 72-годинну біоплівку. Показник оптичної густини зменшувався до рівня $0,158 \pm 0,021$ через 24 години після внесення та $0,140 \pm 0,023$ – через 48 годин, що склало 68,7% та 60,9% від контролю 72-годинної біоплівки ($0,230 \pm 0,024$) відповідно.

Для другої групи чутливих до стафілококового бактеріофагу штамів також характерним було зниження оптичної густини під впливом фага. При внесенні фага під час засіву були отримані такі показники оптичної густини: $0,063 \pm 0,006$ через 24 години після внесення і $0,061 \pm 0,005$ – через 48 годин, що склало 76,8% та 74,4% від контролю добової біоплівки ($0,082 \pm 0,005$) відповідно. При внесенні фага на добу біоплівку показники оптичної густини зменшувалися до рівня $0,077 \pm 0,007$ через 24 години після внесення і $0,073 \pm 0,006$ – через 48 годин, що склало 65,3% та 61,9% від контролю 48-годинної біоплівки ($0,118 \pm 0,007$) відповідно. При внесенні препарату на 48-годинну біоплівку показники оптичної густини зменшувалися до $0,105 \pm 0,006$ через 24 години після внесення та $0,090 \pm 0,001$ – через 48 годин, що склало 56,5% та 48,4% від контролю 72-годинної біоплівки ($0,186 \pm 0,016$) відповідно. При внесенні фага на вже сформовану 72-годинну біоплівку показник оптичної густини зменшувався до рівня $0,121 \pm 0,014$ через 24 години після внесення та $0,114 \pm 0,011$ – через 48 годин, що склало 65,1% та 61,3% від контролю 72-годинної біоплівки ($0,186 \pm 0,016$) відповідно.

Дані щодо розвитку під впливом стафілококового бактеріофагу біоплівок чутливих до нього штамів (результат знімався через 24 години після внесення фага) та без нього наведені на **рис. 1** та **рис. 2**.

При вивченні впливу інтесті-бактеріофагу рідкого на плівкоутворення досліджених штамів також спостерігалася значне пригнічення на всіх етапах розвитку біоплівок. Так, при внесенні фага під час засіву були отримані такі показники: $0,066 \pm 0,006$ через 24 години після внесення та $0,062 \pm 0,006$ – через 48 годин, що склало 82,5% та 77,5% від контролю добової біоплівки ($0,080 \pm 0,008$) відповідно. При внесенні фага на добу біоплівку показники оптичної густини зменшувалися до рівня $0,080 \pm 0,010$ через 24 години після внесення фага та від $0,080 \pm 0,008$

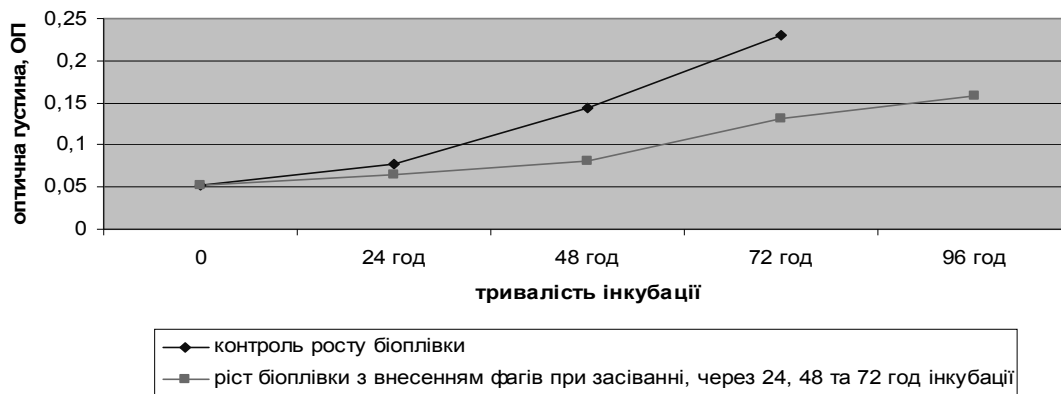


Рис. 1. Вплив бактеріофагу стафілококового рідкого на процес плівкоутворення штамів *S. aureus* (група 1). Початкова точка розрахунку приросту біоплівок – оптична густина контролю стерильності м'ясо-пептонного бульйону, яка складала $0,053 \pm 0,003$.

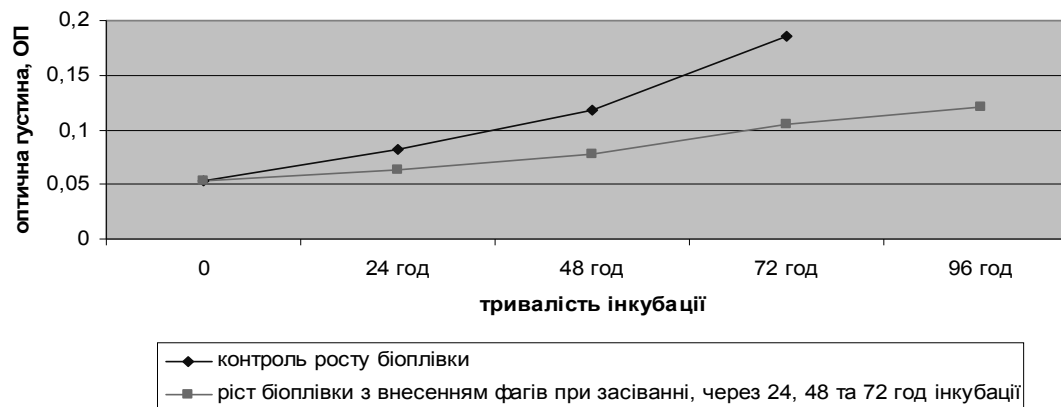


Рис. 2. Вплив бактеріофагу стафілококового рідкого на процес плівкоутворення штамів *S. aureus* (група 2). Початкова точка розрахунку приросту біоплівок – оптична густина контролю стерильності МПБ ($0,053 \pm 0,002$).

– через 48 годин, що склало по 55,6% від контролю 48-годинної біоплівки ($0,144 \pm 0,014$) відповідно. При внесенні препарату на 48-годинну біоплівку значення оптичної густини зменшувалося до $0,111 \pm 0,007$ через 24 години після внесення та $0,112 \pm 0,007$ – через 48 годин, що склало 49,3% та 49,7% від контролю 72-годинної біоплівки ($0,225 \pm 0,023$) відповідно. При внесенні інтесті-бактеріофагу на вже сформовану 72-годинну біоплівку показники оптичної густини також зменшувалися до $0,122 \pm 0,008$ через 24 години після внесення та $0,128 \pm 0,009$ – через 48 годин, що склало 54,2% та 56,9% від контролю 72-годинної біоплівки ($0,225 \pm 0,023$) відповідно.

Чутливі до інтесті-бактеріофагу штами мали близьку за інтенсивністю здатність до плівкоутворення. Дані щодо розвитку біоплівок цих штамів під впливом інтесті-бактеріофагу (результат знімався через 24 години після внесення фага) та без нього наведені на **рис. 3**.

Поіобактеріофаг полівалентний також показав наявність значного впливу на плівкоутворення чутливих до нього штамів. При внесенні препарату під час засіву показники оптичної густини утворених біоплівок знижувалися до рівня $0,066 \pm 0,005$ через

24 години після внесення і $0,061 \pm 0,006$ – через 48 годин, що склало 77,6% та 71,8% від контролю добової біоплівки ($0,085 \pm 0,006$) відповідно. При внесенні фагу на добову біоплівку показники оптичної густини зменшувалися до рівня $0,078 \pm 0,012$ через 24 години після внесення і $0,065 \pm 0,007$ – через 48 годин, що склало 51,7% та 43,0% від контролю 48-годинної біоплівки ($0,151 \pm 0,019$) відповідно. При внесенні препарату на 48-годинну біоплівку значення оптичної густини зменшувалося до $0,129 \pm 0,014$ через 24 години після внесення та $0,110 \pm 0,011$ – через 48 годин, що склало 57,3% та 48,9% від контролю 72-годинної біоплівки ($0,225 \pm 0,025$) відповідно. А при внесенні фага на вже сформовану 72-годинну біоплівку показник оптичної густини зменшувався до рівня $0,145 \pm 0,024$ через 24 години після внесення та $0,140 \pm 0,023$ – через 48 годин, що склало 64,4% та 62,2% від контролю 72-годинної біоплівки ($0,225 \pm 0,025$) відповідно.

Штами, чутливі до поіобактеріофагу полівалентного, також були близькими за інтенсивністю утворення біоплівок. Дані щодо розвитку біоплівок цих штамів під впливом поіобактеріофагу полівалентного

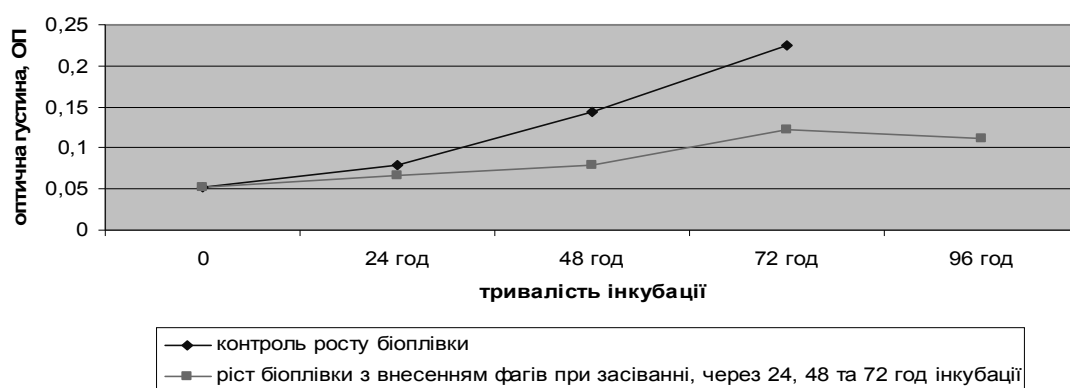


Рис. 3. Вплив інтесті-бактеріофагу рідкого на процес плівкоутворення штамів *S. aureus*. Початкова точка розрахунку приросту біоплівок – оптична густина контролю стерильності МПБ ($0,052 \pm 0,004$).

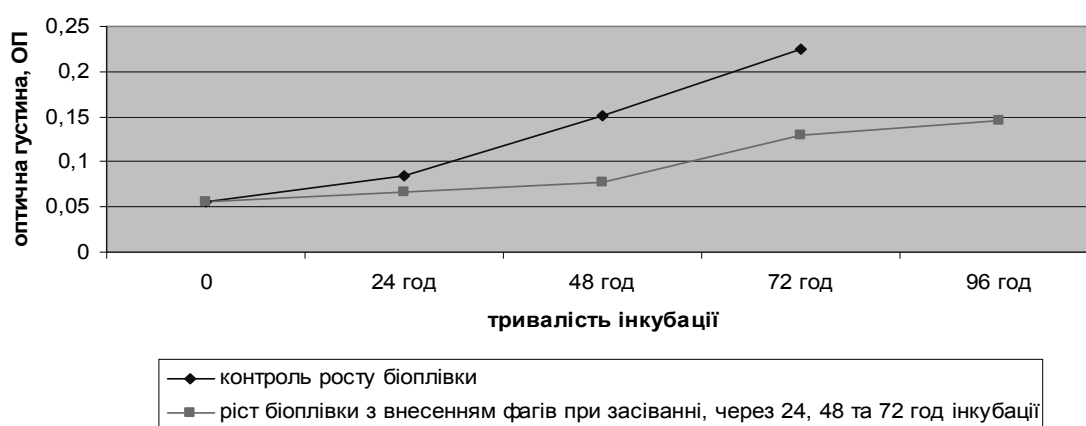


Рис. 4. Вплив піобактеріофагу полівалентного на процес плівкоутворення штамів *S. aureus*. Початкова точка розрахунку приросту біоплівок – оптична густина контролю стерильності МПБ ($0,055 \pm 0,004$).

(результат знімався через 24 години після внесення фага) та без нього наведено на **рис. 4**.

Тобто, при внесенні усіх препаратів під час засіву зменшення показника оптичної густини складало до $80,1 \pm 3,3\%$ через 24 години після внесення та до $75,6 \pm 3,4\%$ – через 48 годин порівняно з контролем росту біоплівки; при внесенні на добу біоплівку – до $57,3 \pm 5,7\%$ та $54,6 \pm 8,2\%$; при внесенні на 48-годинну біоплівку – $55,1 \pm 3,9\%$ та $50,0 \pm 2,1\%$; при внесенні на 72-годинну біоплівку – $63,1 \pm 6,2\%$ та $60,3 \pm 2,4\%$ відповідно. З чого можна зробити висновок, що суттєвої різниці між показниками оптичної густини через 24 та 48 годин після внесення бактеріофагу не було.

Найбільш ефективним серед використаних препаратів бактеріофагів виявився інтесті-бактеріофаг рідкий, вплив якого протягом 24 год на біоплівки на різних етапах інкубації виражався у зменшенні показників оптичної густини до $49,3\%$ порівняно з контролем росту біоплівки.

Проаналізувавши отримані результати та порівнявши їх з літературними даними [14, 23], можна припустити, що матрикс утворених стафілококових біоплівок складається з полісахаридного матеріалу,

який містить ДНК і домішки тейхоевих кислот. Ще Adams and Park [4] у 1956 році запропонували використовувати фагові полісахарид-деполімерази для руйнування матриксу біоплівок. У розвитку цього підходу Lindberg [17] провів електронно-мікроскопічне дослідження цих ферментів, приєднаних до фагової базальної пластинки у вигляді шипів. У цьому випадку 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 і інфікувати клітину. В подальшому ряд авторів [6, 20, 21] підтвердили, що геном бактеріофага містить гени, експресія яких приводить до синтезу специфічних руйнуючих ферментів фагової інфекції – полісахариддеполімераз, що підвищує мобільність бактеріофагів при контакті з полімерною субстанцією. Фаги, які використовують позаклітинні деполімерази, руйнують достатню частину матриксу, щоб зробити уразливию матрикс біоплівок бактерії.

Doolittle та інші [10] у 1996 р. описали, що потомство фага поширюється радіально вздовж всієї біоплівки, та припустили, що разова доза фага вміть

стає інфекцією біоплівки. Потомство фага заражає сусідні клітини і руйнує матрикс біоплівки. В наших експериментах було показано, що внесення разової дози фага призводило до інфікування біоплівки та зменшення її приросту у порівнянні з контролем росту.

Отже, усі використані препарати бактеріофагів впливали на процес плівкоутворення чутливих до них штамів, значно зменшуючи приріст утворених біоплівок. Це свідчить про доцільність використання бактеріофагів для терапії інфекційних хвороб, асоційованих зі збудниками здатними до утворення біоплівок. Однак слід брати до уваги специфічність бактеріофагів: кожен вид фагу розпізнає як мішень лише ті варіанти або штами бактерій, які мають певні фагоспецифічні рецептори (фаготипи). Тому важливою умовою, що забезпечує ефект фаготерапії, є моніторинг сучасного стану чутливості штамів різних груп умовно-патогенних та патогенних бактерій до препаратів бактеріофагів та розширення спектру їх дії. Потрібно детальне вивчення механізмів взаємодії бактеріофагів з бактеріями у складі біоплівки та за її межами і розробка нових напрямів та методів терапевтичного застосування лікувальних препаратів бактеріофагів.

Крім того, відсутність протипоказань і ускладнень при застосуванні препаратів бактеріофагів, можливість їх використання в поєднанні з іншими лікарськими препаратами, в т. ч. з антибіотиками і пробіотиками, робить їх застосування досить перспективним.

Висновки.

1. Здатність до плівкоутворення була виявлена у 7 штамів, 5 з них відрізнялися більшою інтенсивністю

приросту біоплівок. Для них характерним було зростання показників оптичної густини до $0,081 \pm 0,008$ за першу добу інкубації, до $0,145 \pm 0,016$ за 48 годин та до $0,227 \pm 0,024$ за 72 години.

2. Внесення препаратів бактеріофагів під час засіву приводило до зменшення показника оптичної густини через 24 години після внесення до $80,1 \pm 3,3\%$, при внесенні на добову біоплівку – до $57,3 \pm 5,7\%$, при внесенні на 48-годинну біоплівку – $55,1 \pm 3,9\%$; при внесенні на 72-годинну біоплівку – $63,1 \pm 6,2\%$ відповідно до 100% оптичної густини контролю.

3. Усі використані препарати бактеріофагів пригнічували процес плівкоутворення чутливих до них штамів. Найбільш ефективним серед них виявився інтесті-бактеріофаг рідкий, вплив якого протягом 24 год на біоплівку на різних етапах інкубації виражався у зменшенні показників оптичної густини до 49,3% порівняно з контролем росту біоплівки.

Перспективи подальших досліджень. Отримані нами результати свідчать про здатність препаратів бактеріофагів інгібувати процес плівкоутворення стафілококів, тому важливим є подальше проведення більш детальних досліджень зміни таких кількісних характеристик біоплівок як вміст білка, суха вага та кількість колонієутворюючих одиниць під впливом фагів. Крім того доцільним є вивчення взаємодії бактеріофагів з біоплівками *in vivo*, що дасть змогу розробити стратегії використання фагових препаратів для боротьби з ураженнями людини, опосередкованими плівкоутворюючими штамми бактерій.

Література

1. Определитель бактерий Берджи в 2-х тт: пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. – Москва: Мир, 1997. – Т. 2. – 368 с.
2. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Л. С. Страчунского, Ю. Б. Белоусова, С. Н. Козлова. – Смоленск: МАКМАХ, 2007. – 464 с.
3. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. – Кн. 1 / Колл. авторов / Под ред. А. С. Лабинской, Е. Г. Волиной. – М: БИНОМ, 2008. – 1080с.
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. – P. 719-736.
5. Agarwal A. Medical significance and management of staphylococcal biofilm / A. Agarwal, K. P. Singh, A. Jain // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2010. – Vol. 58, №2. – P. 147-160.
6. Azeredo J. The use of phages for the removal of infectious biofilms / J. Azeredo, I. W. Sutherland // *Current Pharmaceutical Biotechnology*. – 2008. – Vol. 9. – P. 261-266.
7. Brady R. A. Osteomyelitis and the role of biofilm in chronic infection FEMS / R. A. Brady, J. G. Leid, J. H. Calhoun [et al.] // *Immunol. Med. Microbiol.* – 2008. – Vol. 52. – P. 13-22.
8. Damborg P. Structural variations of staphylococcal cassette chromosome mec type IVa in *Staphylococcus aureus* clonal complex 8 and unrelated lineages / P. Damborg, M. D. Bartels, K. Boye [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2011. – Vol. 55(8). – P. 3932-3935.
9. Davies J. C. Bugs, biofilms, and resistance in cystic fibrosis / J. C. Davies, D. Bilton // *Respir Care*. – 2009. – Vol. 54. – P. 628-640.
10. 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 // *J. Ind. Microbiol.* – 1996. – Vol. 16. – P. 331-341.
11. Garau J. Management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections / J. Garau, E. Bouza, J. Chastre [et al.] // *Clinical microbiology and infection*. – 2009. – Vol. 15, №2. – P. 125-136.
12. Gilbert P. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross resistance? / P. Gilbert, D. G. Allison, A. J. McBain // *Journal of Applied Microbiology*. – 2002. – Vol. 92. – P. 98-110.
13. Hall-Stoodley L. Evolving concepts in biofilm infections / L. Hall-Stoodley, P. Stoodley // *Cellular Microbiology*. – 2009. – Vol. 11. – P. 1034-1043.

14. Izano E. A. 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.
15. Jain A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci / A. Jain, A. Agarwal // *J. Microbiol. Methods*. – 2009. – Vol. 76, № 1. – P. 88–92.
16. Joly-Guillou M. L. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter* / M. L. Joly-Guillou // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2005. – Vol. 11. – P. 868–873.
17. 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.
18. Mack D. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses / D. Mack, P. Becker, I. Chatterjee [et al.] // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2004. – Vol. 294. – P. 203–212.
19. Otto M. Staphylococcal biofilms / M. Otto // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2008. – Vol. 322. – P. 207-228.
20. 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. Adhy. – Washington DC: ASM Press, 2005. – P. 400-414.
21. Sutherland I. W. The interaction of phage and biofilms / I. W. Sutherland, K. A. Hughes, L. C. Skillman [et al.] // *FEMS Microbiology Letters*. – 2004. – Vol. 232. – P. 1–6.
22. Taj Y. Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* / Y. Taj, F. Essa, F. Aziz [et al.] // *J. Infect. Dev. Ctries.* – 2012. – Vol. 6, № 5. – P. 403–409.
23. Vergara-Irigaray M. 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 615. 371:578. 7

ВПЛИВ ЛІКУВАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ БАКТЕРІОФАГІВ НА БІОПЛІВКИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Воробей Є. С., Воронкова О. С., Вінников А. І., Коваленко С. М., Шматко Г. П.

Резюме. В результаті вивчення 12 штамів *Staphylococcus aureus*, виділених з репродуктивного тракту жінок, було визначено їх здатність формувати біоплівки, чутливість до комерційних препаратів бактеріофагів та вплив фагів на процес плівкоутворення, який вивчали за величиною оптичної густини біоплівки. Встановлено, що при внесенні фагових препаратів під час засіву показник оптичної густини через 24 години після внесення фага зменшувався до $80,05 \pm 3,32\%$ порівняно з контролем без внесення фага (100%). При внесенні фагів на добову, 48- та 72-годинну біоплівку спостерігалось значно більше зменшення оптичної густини: до $57,3 \pm 5,74\%$, $55,13 \pm 3,9\%$ та $63,1 \pm 6,23\%$ відповідно. Тобто, наведені дані свідчать про здатність фагових препаратів інгібувати формування біоплівки умовно-патогенними стафілококами.

Ключові слова: стафілококи, плівкоутворення, мікробні біоплівки, бактеріофаги, регуляція росту біоплівки.

УДК 615. 371:578. 7

ВЛИЯНИЕ ЛЕЧЕБНЫХ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИОФАГОВ НА БИОПЛЕНКИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Воробей Е. С., Воронкова О. С., Винников А. И., Коваленко С. М., Шматко Г. П.

Резюме. В результате изучения 12 штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных из репродуктивного тракта женщин, были определены их способность формировать биопленки, чувствительность к коммерческим препаратам бактериофагов и влияние фагов на процесс пленкообразования, который изучали по величине оптической плотности биопленки. Установлено, что при внесении фаговых препаратов во время посева показатель оптической плотности через 24 часа после внесения фага уменьшался до $80,05 \pm 3,32\%$ по сравнению с контролем без внесения фага (100%). При внесении фагов на суточную, 48- и 72- часовую биопленку наблюдалось значительно большее уменьшение оптической плотности: до $57,3 \pm 5,74\%$, $55,13 \pm 3,9\%$ и $63,1 \pm 6,23\%$ соответственно. То есть, приведенные данные свидетельствуют о способности фаговых препаратов ингибировать формирование биопленки условно-патогенными стафилококками.

Ключевые слова: стафилококки, пленкообразования, микробные биопленки, бактериофаги, регуляция роста биопленки.

UDC 615. 371:578. 7

Effect of Therapeutic Bacteriophage Drugs on *Staphylococcus Aureus* Biofilm

Vorobey E. S., Voronkova O. S., Vinnikov A. I., Kovalenko S. M., Shmatko G. P.

Abstract. As a result of the study of 12 strains of *Staphylococcus aureus*, isolated from the reproductive tract of women, were determined their ability to form biofilm, susceptibility to commercial bacteriophages drugs and influence of phages on the filmformation process by method of optical density of biofilms measurement.

Study of the staphylococcal bacteriophage liquid effects on filmformation process of sensitive strains showed that use of phage at all stages of culture development optical density of formed biofilms decreased compare control. So under the phage use optical density values decreased to 80. 5% compare to control daily biofilm without phage

influence (100%). Adding phage on a daily biofilm optical density values decreased to 61.0% to control of 48-hour biofilms. Adding the drug to 48-hour biofilm optical density value decreased to 57.0% of 72-hour control biofilms. A similar situation was observed under adding of phage to 72-hour biofilm. Optical density values decreased to 66.9% of 72-hour control biofilms.

Study of the intesti – bacteriophage liquid influence on filmformation of experimental strains also showed significant inhibition of biofilms growth. So, under phage use optical density values decreased to 82.5% compare to control daily biofilm without bacteriophage (100%). Adding phage on a daily biofilm optical density values decreased to 55.6% of 48-hour control biofilm, respectively. Using of drug for 48-hour biofilm decreased optical density value to 49.3% of 72-hour control biofilms. Adding intesti – bacteriophage to 72-hour biofilm also make decreasing of optical density values decreased to 54.2% of 72-hour control biofilms.

Piobakteriophage polyvalent also showed the significant effect on the sensitive filmforming strains. Adding drug during inoculation optical density formed biofilms decreased to 77.6% of the control daily biofilm (100%). Adding phage on a daily biofilm decreased optical density values to 51.7% of 48-hour control biofilms. Using the drug for 48-hour biofilm had a decrease of optical density values to 57.3% of 72-hour control biofilms. Adding of phage to already formed 72-hour biofilm showed the decrease to 64.4% of 72-hour control biofilms.

Among studied preparates of phages the most effective was intesti – bacteriophage liquid, influence of that during 24-hour on biofilm at different stages of incubation made decrease to 49.3% compare to the control growing biofilm.

Therefore, all used preparates of bacteriophages made influence on film formation process of sensitive strains by significantly reducing the formed biofilms growth. That demonstrates the benefitions of bacteriophages using for the treatment of infectious diseases associated with pathogens able to biofilm formation.

Key words: staphylococci, film formation, microbial biofilms, bacteriophages, regulation of biofilm growth.

Рецензент – проф. Лобань Г. А.

Стаття надійшла 4. 04. 2014 р.