



УДК 576.851.252.093.1

БІОПЛІВКОВА ФОРМА СТАФІЛОКОКІВ У МОНО- ТА БІВИДОВІЙ КУЛЬТУРІ В ПОЄДНАННІ З ЛАКТОБАЦИЛАМИ

Г. С. Лаверик, О. П. Корнійчук

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького
вул. Пекарська, 69, Львів 79010, Україна
e-mail: lavrykgal@gmail.com

Недостатня ефективність антимікробної терапії багатьох інфекційних запальних процесів нерідко обумовлена наявністю мікроорганізмів, які утворюють біоплівкові форми. Досліджено здатність до плівкоутворення клінічних штамів *S. aureus* і *S. epidermidis*, виділених при вугровій хворобі (*acne vulgaris*), а також референтного штаму *L. plantarum* 8P-A3. Для оцінки плівкоутворення використовували спектрофотометричне визначення оптичної щільності структури на дні пластикової чашки Петрі. Стан плівкової структури контролювали методом мікроскопування. Встановлено, що оптична щільність моновидової біоплівки, утвореної *S. aureus* і *S. epidermidis*, становить $1,69 \pm 0,77$ та $1,50 \pm 0,60$ од. Відповідно, оптична щільність планктонної форми референтного штаму *S. aureus* ATCC 25923 (F-49) становила $0,09 \pm 0,06$ од. Біоплівкова структура *L. plantarum* 8P-A3 мала оптичну щільність $1,79 \pm 1,07$ од. Використання люмінесцентної мікроскопії дало змогу оцінити частку життєздатних клітин у біоплівках: через 48 год у біоплівці зі змішаної культури *L. plantarum* 8P-A3 та *S. aureus* немає життєздатних клітин стафілокока. Місцеве застосування препаратів лактобактерій сприятиме підвищенню ефективності лікування запальних процесів, спричинених біоплівковими формами стафілококів.

Ключові слова: біоплівка, *Lactobacillus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*.

ВСТУП

Останніми роками низьку ефективність протимікробної терапії багатьох хронічних захворювань пояснюють утворенням мікроорганізмами біоплівкових форм. Метаболічні процеси, що відбуваються у біоплівці, відрізняються від процесів у планктонних бактеріальних монокультурах [13, 17].

Біоплівка – ідеальне середовище для здійснення генетичних обмінів між окремими мікроорганізмами: тут підвищуються кон'югативна активність та інші види генетичних рекомбінацій, що сприяє швидкому поширенню серед представників популяції генів резистентності до антибіотиків і детермінант інших видів біологічної активності (здатності протистояти фагоцитозу, дії антитіл) [2, 3]. Особливо складно

лікувати патологічні процеси на слизових оболонках – захворювання ЛОР-органів, респіраторного тракту, дихальних шляхів та інфекції сечостатевого тракту. Актуальною проблемою є формування біоплівки на штучних імплантованих матеріалах і засобах (протезах, катетерах, дренажах, клапанах) [8].

На сьогодні дослідження мікробного агента як етіологічного фактора в розвитку інфекційних запальних процесів потребує особливих підходів, якщо це стосується біоплівкових форм мікроорганізмів. Стафілококи залишаються одними з основних чинників гнійно-запальних захворювань, у тому числі внутрішньолікарняних інфекцій, значна частина яких є саме плівкоутворюючими формами. Входячи до складу природних біотопів (шкіра, слизові оболонки респіраторного й уrogenітального трактів тощо) [5, 22], стафілококи перебувають у симбіотичних відносинах з іншими мікроорганізмами біотопу.

Одним із способів підвищення ефективності протимікробної терапії спричинених стафілококами захворювань є застосування засобів, які б дали змогу дезінтегрувати біоплівку для переведення патогена у планктонну форму. Для цього можна застосовувати мікроорганізми-антагоністи у складі еубіотичних препаратів, зокрема, лактобацили [13].

Різні види *Lactobacillus* входять до складу основних природних біосистем організму людини та беруть участь в утворенні полівидових біоплівки, які містять два або більше представників у межах асоціації. Доведено, що *L. reuteri*, на основі якого створено чимало пробіотичних препаратів, може знищувати патогенні бактерії та відновлювати природну біоплівку уrogenітального тракту жінок [23, 24]. Особливо важливим фактором антагоністичної активності лактобацил є здатність продукувати quorum-sensing-інгібітори (блокатори механізмів міжклітинної комунікації), що дає змогу впливати саме на біоплівкові форми мікроорганізмів [16, 20, 23, 24].

Дослідження взаємодії стафілококів із бактеріями-антагоністами у формі біоплівкової структури є важливим для обґрунтування та розробки комплексної антимікробної терапії.

Залежно від завдань експерименту, для моделювання біоплівки нині використовують різні основи, з яких найзручнішими є пластикові чашки Петрі діаметрами 30 і 55 мм. Оцінка сформованої плівки проводиться візуально з використанням світлової мікроскопії (в тому числі із застосуванням вітальних барвників – конго червоного, нейтрального червоного, калькофлору), а також люмінесцентної, фазово-контрастної, конфокальної мікроскопії [18]. Крім того, для контролю формування біоплівки застосовують спектрофотометричне вимірювання оптичної щільності структури, а також визначення активності окремих ензимів [14, 19].

Метою цього дослідження є вивчення взаємодії бактерій у біоплівці, утвореній змішаною культурою – стафілококами, виділеними з клінічного матеріалу, та лактобацилами, які є антагоністами стафілококів, нормальними симбіонтами організму людини.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Обстежено 69 осіб з *acne vulgaris*. Із гною пустул, які утворюються на шкірі хворих, ізолювано 36 штамів стафілококів (52,17 %), що за культуральними властивостями (підвищена в'язкість біомаси колонії) первинно могли належати до плівкоутворюючих форм: 15 ізолятів *S. aureus* (41,67 %) та 21 – *S. epidermidis* (58,33 %).

Виділення й ідентифікацію стафілококів проводили з використанням стандартних середовищ у лабораторії кафедри мікробіології ЛНМУ ім. Данила Галицького відповідно до наказу [1, 11, 21].

Референтний штам *S. aureus* ATCC 25923 (F-49) отримано з музейної колекції бактеріологічної лабораторії Львівського обласного лабораторного центру.

Для вивчення виділених культур щодо утворення біоплівки чисту культуру стафілококів засівали на живильний агар та інкубували в термостаті упродовж 24 год за температури 37 °С. Біоплівки на дні пластикових чашок (Ø 50 мм) формували так: у кожену чашку вносили по 4 мл живильного бульйону (Фармактив, Україна) та по 10 мкл культури мутністю $1,5 \times 10^9$ кл/мл (що відповідає 5 од. за стандартом McFarland), так, щоб суспензія рівномірно розподілилась на дні чашки. Для визначення контрольного показника у чашки вносили стандартну культуру *S. aureus* ATCC 25923 (F-49), що не утворює плівку, та пробіотичний штам *L. plantarum* 8P-A3 “Лактобактерин”, який було виділено з комерційного препарату на стандартному середовищі для лактобактерій MRS-agarі (de Man, Rogosa, Sharpe, Індія).

Аналогічно формували біоплівки лактобактерій на MRS-бульйоні. Для цього у пластикові чашки вносили по 4 мл вказаного середовища та по 5 мкл засівної суспензії стафілококів і лактобактерій густиною $1,5 \times 10^9$ КУО/мл. Чашки інкубували в термостаті 48 год за температури 37 °С. Через 48 год вміст чашок відбирали, щоб не зруйнувати сформовану біоплівку, та відмивали тричі дистильованою водою. Для фіксації біоплівки вносили 400 мкл 1%-ного спиртового розчину генціанвіолету й витримували за кімнатної температури упродовж 45 хв. Після цього розчин відбирали та тричі промивали чашки дистильованою водою і підсушували. Оптичну щільність плівки вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 (довжина хвилі 545 нм). Згідно з технічним описом та інструкцією з експлуатації приладу, межі допустимої абсолютної похибки під час вимірювання коефіцієнта пропускання в спектральному діапазоні від 400 до 750 нм (що відповідає максимуму поглинання для генціанвіолету) становить $\pm 0,5$ %. Визначення оптичної густини проводили згідно з методикою [19]. Необхідності у калібруванні приладу не виникало, оскільки не було потреби визначати абсолютну концентрацію барвника в розчині або кількість клітин. На підставі значення оптичної густини можна проводити якісну оцінку щільності плівки. Щільність сформованих біоплівки вважали низькою за оптичної густини до 0,5 од., середньою від 0,5 до 1,0 од. і високою за оптичної густини розчину більше 1,0 од.

Для визначення кількості життєздатних клітин як стафілококів, так і лактобацил, у змішаних культурах із біоплівки (бікультури) проводили посіви по 10 мкл на щільне середовище відразу після інокуляції та через 12, 24, 48 год. У разі значної густини одержаної культури перед посівом її розводили, що давало змогу встановити кількість пророслих колоній.

У процесі вивчення життєздатності бактерій у біоплівках використовували подвійне прижиттєве фарбування за допомогою флуоресцентних барвників, а саме Hoechst-33258, який вільно проникає крізь клітинні мембрани, зв'язується у ядрі з ДНК на зовнішньому боці спіралі, зумовлюючи при цьому флуоресценцію [10]. Пропідіум йодид (PI) проникає лише в некротичні клітини та зв'язується з ДНК, зумовлюючи флуоресценцію в червоній ділянці спектра [12, 15]. Для виявлення життєздатних бактерій плівки вирощували на стерильних покривних скельцях. Мікроскопію бактеріальних біоплівки проводили за допомогою мікроскопа

Nikon Eclipse (об'єктив 63x/1.4NA) методом інтерференційної (диференційно-інтерференційний контраст – DIC) мікроскопії з використанням конденсора темного поля та флуоресцентної мікроскопії.

Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали за допомогою програми Excel для персонального комп'ютера. Значущість різниці між двома показниками оцінювали за критерієм Стюдента. Різницю вважали достовірною за $P < 0,05$ [6].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Ріст бактерійних популяцій, залучених до плівкоутворення, спостерігали у динаміці. У таблиці представлено оптичну щільність біоплівки *S. aureus* і *S. epidermidis* за формування ними моно- та бівидових плівкових структур.

Оптична щільність біоплівки стафілококів на MRS-бульйоні була виражена чіткіше, ніж на м'ясо-пептонному бульйоні ($1,69 \pm 0,77$ проти $1,75 \pm 0,23$ од.). Тому в подальшому використовували тільки рідке середовище MRS. Біоплівки однаково утворювали ізоляти як *S. aureus*, так і *S. epidermidis*. Показники оптичної щільності утворених структур дають змогу характеризувати біоплівку як таку, що має високу щільність (≥ 1). При цьому щільність плівки золотистого й епідермального стафілококів ($1,69 \pm 0,77$ та $1,50 \pm 0,60$ од.) статистично не відрізнялася ($P > 0,05$). Показник щільності планктонної культури *S. aureus* ATCC 25923 (F-49) становив лише $0,09 \pm 0,06$ од., що мало достовірну статистичну різницю порівняно з показником оптичної щільності біоплівки, утворених клінічними ізолятами золотистого стафілокока ($P < 0,05$). *L. plantarum* 8P-A3, як встановлено, формувала біоплівку з високою оптичною щільністю – $1,79 \pm 1,07$ од.

Оптична щільність біоплівки стафілококів *in vitro* в монокультурі та у змішаній культурі з *L. plantarum* 8P-A3

The optical density of Staphylococcus strains in a monoculture *in vitro* and in mixed-species biofilms formation with *L. plantarum* 8P-A3

№ з/п	Вид бактерій	Показники оптичної щільності, од. ($M \pm m$)
Монокультура		
1.	<i>S. aureus</i> (n = 15)	$1,69 \pm 0,77^*$
2.	<i>S. epidermidis</i> (n = 21)	$1,50 \pm 0,60$
Змішана культура		
3.	<i>S. aureus</i> + <i>L. plantarum</i> 8P-A3 (n = 3)	$1,82 \pm 0,82$
4.	<i>S. epidermidis</i> + <i>L. plantarum</i> 8P-A3 (n = 3)	$1,56 \pm 0,62$
Контролі		
5.	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (F-49)	$0,09 \pm 0,06^*$
6.	<i>L. plantarum</i> 8P-A3	$1,79 \pm 1,07$

Примітка: * Статистично достовірною різницею порівняно з показником контрольного штаму $P < 0,05$

Comment: * The difference is statistically significant, compared to control group ($P < 0.05$)

Для мікроскопічного дослідження плівкоутворення відібрано один із штамів *S. aureus* зі значною оптичною щільністю біоплівки (рис. 1).

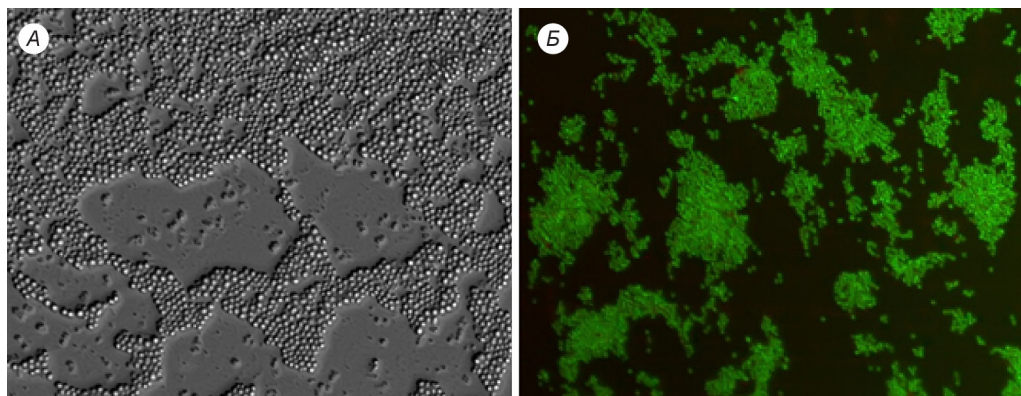


Рис. 1. Біоплівкова форма стафілокока: А – DIC мікроскопія; Б – флуоресцентна мікроскопія з фарбуванням Hoechst-33258 та PI

Fig. 1. *Staphylococcus* biofilm form: А – DIC microscopy; Б – fluorescence microscopy with staining by Hoechst-33258 and PI

Рис. 2 (А, Б) демонструє, що за використання стандартного штаму *S. aureus* ATCC 25923 (F-49) біоплівки немає.

У полі зору зафіксовано окремі групи кулястих клітин. Фарбування Hoechst-33258 та PI дає змогу зафіксувати життєздатність усіх клітин стафілококів, як плівкової (рис. 1, Б), так і планктонної форм *S. aureus* (рис. 2, Б).

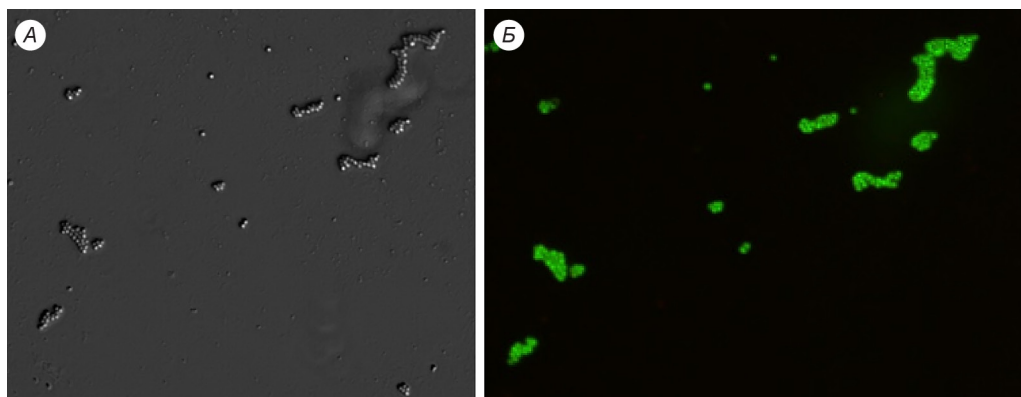


Рис. 2. Планктонна форма стафілокока: А – DIC мікроскопія; Б – флуоресцентна мікроскопія з фарбуванням Hoechst-33258 та PI

Fig. 2. Planktonic form of *Staphylococcus*: А – DIC microscopy; Б – fluorescence microscopy with staining by Hoechst-33258 and PI

Високу щільність біоплівки зафіксовано для *L. plantarum* 8P-A3 у процесі мікроскопічного дослідження (рис. 3, А).

Люмінесцентна мікроскопія підтвердила результати культурального методу щодо життєздатності клітин молочнокислих бактерій (рис. 3, Б).

Для вивчення плівкоутворення у змішаній культурі з лактобацилою використано 3 штами *S. aureus* з найбільш вираженими плівкоутворюючими властивостями.

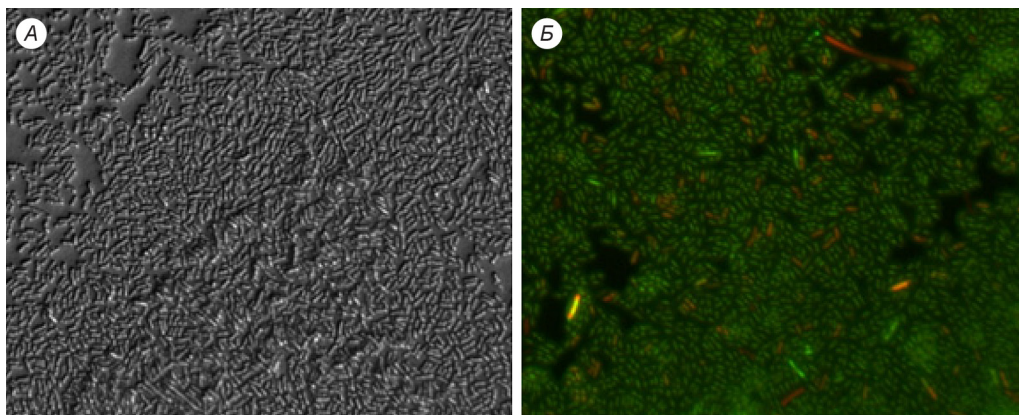


Рис.3. Біоплівка *L. plantarum* 8P-A3: А – DIC мікроскопія; Б – флуоресцентна мікроскопія з фарбуванням Hoechst-33258 та PI

Fig. 3. Biofilm of *L. plantarum* 8P-A3: A – DIC microscopy; Б – fluorescence microscopy with staining by Hoechst-33258 and PI

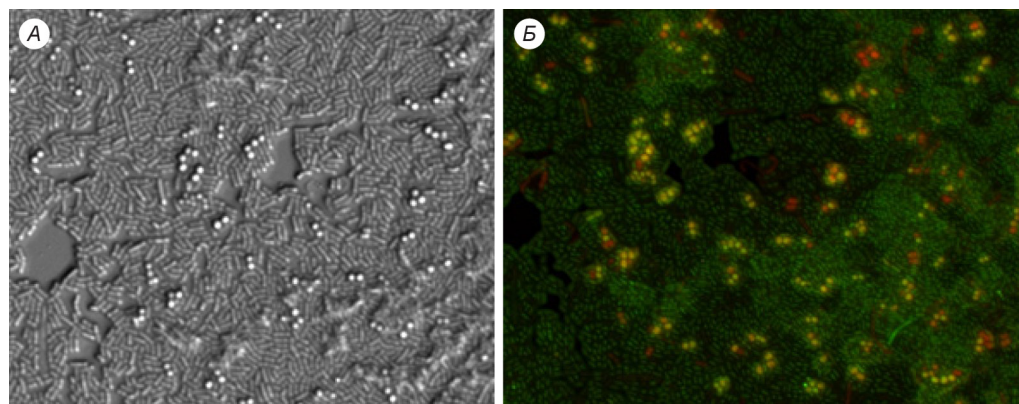


Рис. 4. Біоплівка змішаної культури *L. plantarum* 8P-A3 і *S. aureus* через 12 год: А – DIC мікроскопія; Б - флуоресцентна мікроскопія з фарбуванням Hoechst-33258 та PI

Fig. 4. Mixed-Species Biofilm Formation of *L. plantarum* 8P-A3 and *S. aureus* after 12 h of incubation: A – DIC microscopy; Б – fluorescence microscopy with staining by Hoechst-33258 and PI

У цьому досліді зафіксовано випередження формування плівкової структури стафілококом через його більш високу швидкість росту порівняно з лактобактерією.

Контрольний посів на щільне середовище одразу ж після інокуляції у всіх зразках змішаних культур продемонстрував наявність лише стафілококів ($5,0 \pm 0,02 \times 10^8$ КУО/мл). Через 12 год популяційний рівень лактобацил сягнув 10^4 КУО/мл при збільшенні кількості стафілококів до $5,0 \pm 0,05 \times 10^9$ КУО/мл (рис. 4, А). У процесі мікроскопічного дослідження встановлено, що переважна більшість стафілококів зберегла життєздатність (рис. 4, Б). Через 24 год кількість життєздатних стафілококів стрімко зменшилася до $0,5 \pm 0,02 \times 10^8$ КУО/мл, а лактобацил – зросла. Через 48 год після посіву на середовища з усіх зразків стафілококів виділено не було. Отже, молочнокислі бактерії сприяли швидкій загибелі стафілококів у змішаній культурі.

Під час формування бівидової біоплівки встановлено зростання її щільності з використанням як *S. aureus*, так і *S. epidermidis*, проте найвищий показник ($1,82 \pm 0,82$ од.) зафіксований у змішаній культурі *S. aureus* + *L. plantarum* 8P-A3, що підтверджено і в ході мікроскопічного дослідження (рис. 5, А).

Як видно з рис. 5, Б, життєздатних клітин *S. aureus* практично немає при збереженні плівкової структури лактобацилами.

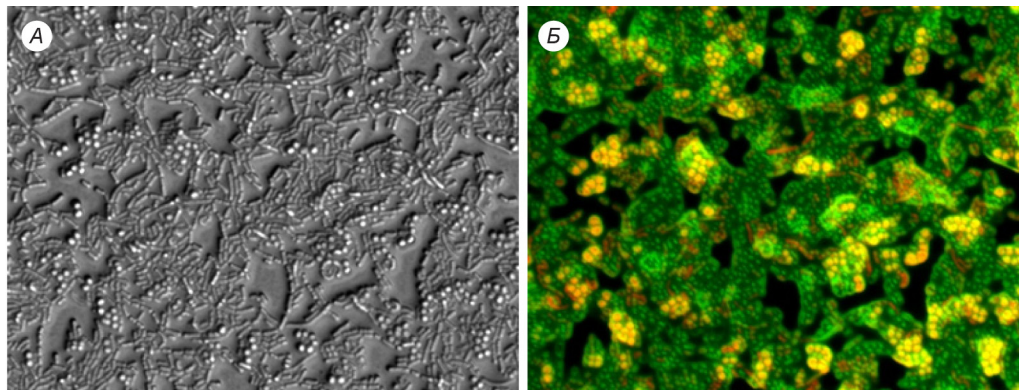


Рис. 5. Біоплівка змішаної культури *L. plantarum* 8P-A3 і *S. aureus* через 48 год: А – DIC мікроскопія; Б – флуоресцентна мікроскопія з фарбуванням Hoechst-33258 та PI

Fig. 5. Mixed-Species biofilm formation of *L. plantarum* 8P-A3 and *S. aureus* after 48 h of incubation: A – DIC microscopy; Б – fluorescence microscopy with staining by Hoechst-33258 and PI

Отже, вугрова хвороба спричинюється стафілококами з високим потенціалом до плівкоутворення, що сприяє рецидивуванню хвороби і є однією з причин низької ефективності протимікробної терапії. Зокрема, біоплівки високої щільності утворює як культура вірулентна (*S. aureus*), так і умовно-патогенна бактерія (*S. epidermidis*).

За останні десятиліття поширення носійства стафілококів реєструється як серед осіб з *acne vulgaris*, так і серед людей без проявів шкірних захворювань. Однією з причин є тривале або постійне застосування косметичних і безрецептурних лікарських засобів для зовнішнього використання, що містять антисептики й антибіотики, а це безпосередньо впливає на склад шкірної мікробіоти [4].

Здатність до плівкоутворення є важливою властивістю як для потенційних патогенів (зокрема, золотистого й епідермального стафілококів), так і для нормальних симбіонтів людського організму, що сприяє виживанню їхньої популяції з різними наслідками для організму людини.

ВИСНОВКИ

1. Біоплівкову форму значної щільності здатні утворювати стафілококи як із високою вірулентністю, так і умовно-патогенні види. Визначальним фактором у клінічному перебігу захворювання є саме здатність до плівкоутворення.

2. Використання молочнокислої бактерії *L. plantarum* 8P-A3 дало змогу отримати біоплівкову форму значної щільності, що забезпечує під час використання її у складі біопрепаратів швидку колонізацію тканин організму людини, які є природним біотопом, і зупиняє розвиток патологічного процесу, спричиненого стафілококами.

3. Моделювання біоплівки зі змішаної культури *in vitro* є корисним для вивчення симбіотичних відносин асоціантів у процесі розробки комплексного лікування, яке передбачає застосування препаратів для біокорекції.

4. Доведено, що молочнокислі бактерії здатні індукувати загибель стафілококів, які перебувають у біоплівковій формі, не переводячи її у планктонну.

5. Лактобацили, як відомо, мають імуномодельючі властивості. Біоплівкова форма, яка забезпечує стабільність популяції, більшою мірою забезпечує також і виконання імунокорегуючих функцій, що дає підстави використовувати препарати лактобацил у гнійно-запальних захворюваннях стафілококової природи будь-якої локалізації (в тому числі при вугровій хворобі).

Результати проведених досліджень свідчать про доцільність розробки засобів для місцевого лікування, що встановлено в експериментальних роботах із вивчення деконтамінуючої активності лактобацил у разі застосування їх у вигляді нашкірних аплікацій [9]. Зовнішнє застосування лактобацил підсилює ефект протимікробної хіміотерапії під час лікування патологічних процесів, спричинених біоплівковими формами мікроорганізмів. Завдяки цьому знижується медикаментозне навантаження на організм.

Автори вдячні докторові біологічних наук Р. О. Білому за допомогу у виконанні фрагмента дослідження з використанням флуоресцентної мікроскопії, корисні поради та плідну дискусію.

1. **About unification of microbiology (bacteriology) methods in clinical labs:** the order by the Ministry of Public Health of the SSSR of the 24th of April, 1985 N 535. – 65 p. (In Russian).
2. Archer N.K., Mazaitis M.J., Costerton J.W. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms. Properties, regulation and roles in human disease. **Virulence**, 2011; 2(5): 445–459.
3. Azyzbekyan R.R., Smirnova T.A., Grigoryev T.N. et al. Using Krasitel Congo fiction for gram-positive bacteria strains otbora, producing regular S-layer. **Biotechnology**, 2007; 6: 5–11. (In Russian).
4. Burceva G.N., Sergeev A.Y., Arzumanyan V.G. et al. Perifollicular cutaneous microbiota in acne patients. Part I. Common patterns of colonization and resistance to systemic antimicrobials. **Immunopathology, Allergology, Infectology**, 2013; 2: 84–87. (In Russian).
5. Charlier C., Cretenet M., Even S. et al. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. **Int. J. Food Microbiol.**, 2009; 131: 30–39.
6. Derkach M., Humetsky R., Chaban M. **The course of variation statistics**. Kyiv: High School, 1977. 206 p. (In Ukrainian).
7. Drider D., Fimland G., Hechard Y. et al. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 2006; 70: 564–582.
8. Hall-Stoodley L., Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. **Cell Microbiol.**, 2009; 11(7): 1034–1043.
9. Hamorak H.P. Antimicrobial activity of *Lactobacterium* in relation to pathogenic and opportunistic enterobacteria and other microorganisms, formin: dysbacteriosis of the intestine of albino rats under the effect of itakonic acid application. **BMH Journal**, 2012; 16, 2 (62): 38–42. (In Ukrainian).
10. Hawley R., Hawley T. Flow Cytometry Protocols. **Methods in Molecular Biology**, 2004; 263: 34–37.
11. Holt J., Krill N., Cinta P. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**: Edition in English. Vol. 2. – Moscow: Mir, 1997. – 368 p.
12. Krysko D.V., Vanden Berghie T., Parthoens E. et al. Methods for distinguishing apoptotic from necrotic cells and measuring their clearance. **Methods in Enzymology**, 2008; 442: 307–341.

13. Nair N., Biswas R., Götz F., Biswas L. Impact of *Staphylococcus aureus* on pathogenesis in polymicrobial infections. **Infection and Immunity**, 2014; 82(6): 2162–2169.
14. O'Tool G., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS356 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. **Mol. Microbiol**, 1998; 28: 449–461.
15. Schlegel K., Fullekrug M. Weltweite Ortung von Blitzen: Jahre Schumann-Resonanzen. **Physik in unserer Zeit**, 2002; 33(6): 256–261.
16. Shyrobokov V., Jankowski D., Dement G. **Microbial ecology of colored satin**. Kyiv, 2009. 311 p. (In Ukrainian).
17. Shyrobokov V.P., Yankovsky D.S., Dymant D.S. **The microbes in biogeochemical processes, the evolution of the biosphere and the existence of mankind**. Kyiv, 2014. 464 p. (In Ukrainian).
18. Smirnova T.A., Didenko L.V. Structural and functional characteristics of biofilms. **Microbiology**, 2010; 79(4): 435–446. (In Russian).
19. Tsyganenko A. Ya., Lupai E. V., Mishina M.M. et al. Study of antimicrobial action of Gatimak on plankton cells and biofilm of strains *Staphylococcus aureus in vitro*. **Experimental and Clinical Medicine**, 2012; 1(54): 11–13. (In Ukrainian).
20. Varma P., Nisha N., Dinesh K.R. et al. Anti-infective properties of *Lactobacillus fermentum* against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol**, 2011; 20:137–143.
21. Volyanski Yu.L., Chernyavsky V.I., Biryukova S.V. et al. Textbook. **Staphylococcus. Classification and laboratory diagnosis**. Kharkiv, 2012. 76 p. (In Ukrainian).
22. Wertheim H.F., Mells D.C., Vos M.C. et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections, **Lancet Infect. Dis**, 2005; 5: 751–762.
23. Whitchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.S. et al. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. **Science**, 2002; 295:1487.
24. Younes Jessica A., Henny C. van der Mei, Edwin van den Heuvel et al. Adhesion forces and coaggregation between vaginal staphylococci and lactobacilli, **PLoS One**: 7.5 (2012): e36917.

BIOFILM FORMS IN MONO- AND MIXED STAPHYLOCOCCI SPECIES CULTURE IN COMBINATION WITH LACTOBACILLI

G. Lavryk, O. Kornijchuk

*Danylo Halytsky Lviv National Medical University, 69, Pekarska St., Lviv 79010, Ukraine
e-mail: lavrykgal@gmail.com*

Insufficient effectiveness of antimicrobial treatment of many infectious inflammation processes are often associated with the formation of the microbial Biofilms forms. The ability to a biofilm formation was investigated in clinical *S. aureus* and *S. epidermidis* strains isolated from patients with acne vulgaris and reference *L. plantarum* 8P-A3 strain. For evaluation of the film formation the spectrophotometric measuring of the optical density of structures at the bottom of plastic Petri dishes was used. Item condition of the film structures was also controlled by using microscopic method. It was established that the optical densities of monospecific biofilms formed by *S. aureus* and *S. epidermidis* were 1.69 ± 0.77 and 0.60 ± 1.50 OD, respectively, and the planktonic forms of the reference strain was 0.09 ± 0.06 OD. Biofilm structure of *L. plantarum* 8P-A3 has optical density of 1.79 ± 1.07 OD. Fluorescent microscopy allowed to estimate the proportion of the viable cells in the biofilm. The viable cells were absent after 48 h of

mixed-species formation of *L. plantarum* 8P-A3 and *S. aureus* biofilm. Local application of the preparations from lactobacilli contributes to the effectiveness of treatment of the inflammation caused by staphylococcus biofilm forms.

Keywords: biofilm, *Lactobacillus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*.

БИОПЛЁНЧНАЯ ФОРМА СТАФИЛОКОККОВ В МОНО- И БИВИДОВОЙ КУЛЬТУРЕ В СОЧЕТАНИИ С ЛАКТОБАЦИЛЛАМИ

Г. С. Лаврик, О. П. Корнийчук

Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого
ул. Пекарская, 69, Львов 79010, Украина
e-mail: lavrykgal@gmail.com

Недостаточная эффективность антимикробной терапии многих инфекционных воспалительных процессов нередко бывает обусловлена образованием микроорганизмами биопленочных форм. Исследована способность к пленкообразованию клинических штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis*, выделенных при угревой болезни (*acne vulgaris*), а также стандартного штамма лактобацилл. Для оценки пленкообразования использовали спектрофотометрическое определение оптической плотности структуры на дне пластиковой чашки Петри. Состояние пленочной структуры контролировали также методом микроскопирования. Установлено, что оптическая плотность моновидовой биопленки, образованной *S. aureus* и *S. epidermidis*, составляет $1,69 \pm 0,77$ и $1,50 \pm 0,60$ ед. Соответственно, оптическая плотность планктонной формы референтного штамма составляла $0,09 \pm 0,06$ ед. Биопленочная структура *L. plantarum* 8P-A3 имела оптическую плотность $1,79 \pm 1,07$ ед. Использование люминесцентной микроскопии позволило оценить долю жизнеспособных клеток в биопленке: через 48 часов в биопленке из смешанной культуры *L. plantarum* 8P-A3 и *S. aureus* не зафиксированы жизнеспособные клетки стафилококка. Местное применение препаратов лактобактерий способствуют повышению эффективности лечения воспалительных процессов, вызванных биопленочными формами стафилококков.

Ключевые слова: биоплёнка, *Lactobacillus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*.

Одержано: 04.12.2015