

ВЕТЕРИНАРНІ НАУКИ

УДК 338.439.021.1

Горюк Ю. В.¹

канд. вет. наук

E-mail: goruky@ukr.net

Кухтин М. Д.²

д-р вет. наук, професор

E-mail: kuchtynnic@gmail.com

Горюк В. В.¹

канд. вет. наук, доцент

E-mail: horiuky@ukr.net

Керничний С. П.¹

канд. вет. наук, доцент

E-mail: serhii.kernychnyi@gmail.com

¹Подільський державний аграрно-технічний університет,
Камянець-Подільський, Україна

²Тернопільський національний технічний університет імені І. Пулюя,
Тернопіль, Україна

ПОРІВНЯННЯ ВПЛИВУ АНТИБІОТИКІВ ТА БАКТЕРІОФАГУ PHAGE SA VB14 НА БІОПЛІВКИ, СФОРМОВАНІ STAPHYLOCOCCUS AUREUS VARIANT BOVIS

Анотація

Під час розвитку маститу у корів формування біоплівки збудником захворювання є ефективним способом його збереження в мікрооточенні молочної залози. Біоплівкові інфекції важко піддаються лікуванню антимікробними засобами, порівняно з тим, що спостерігається при вирощуванні в планктонних умовах. Мета роботи – визначити та порівняти вплив антимікробних препаратів та бактеріофагу Phage SA VB14 при знищенні біоплівок сформованих *S. aureus var. bovis*. За результатами дослідження встановлено, що антибіотики згубно впливали на кількість бактерій у складі біоплівки, проте знищували її, в середньому, на 60%. 100% ефективність проявляв лише один антибіотик фторхінолонового ряду – енрофлоксацин - ймовірно, через його низьку молекулярну масу. При дослідженні впливу бактеріофагу Phage SA VB14 на життєздатність *S. aureus var. bovis* у складі біоплівки встановлено, що фаг впродовж 24 годин повністю руйнував сформовану біоплівку. Отже, отримані результати вказують на перспективність ефективного використання стафілококового бактеріофагу Phage SA VB14 для руйнування біоплівки, сформованої *S. aureus var. bovis* – при маститі корів.

Ключові слова: мастит; біоплівки; антибіотики; бактеріофаг Phage SA VB14; *S. aureus var. bovis*.

Вступ. В останнє десятиліття вивченню механізмів виживання бактерій надається особливе значення. Встановлено, що 99% мікроорганізмів в природних екосистемах існують у вигляді структурованих співтовариств – біоплівки [1]. Процеси розвитку біоплівки вивчали багато вчених [2, 3], переважно в умовах *in vitro*. Здатність *S. aureus* до формування біоплівки вважається однією з головних стратегій виживання при зараженні господаря, а біоплівку розглядають як важливу ознаку патогенності [4]. Під час розвитку хронічних інфекцій, наприклад таких як субклінічний мастит, формування біоплівки може бути ефективним способом збереження збудників в мікрооточенні молочної залози та переходом хвороби у хронічну форму. Біоплівкові інфекції важко піддаються лікуванню антимікробними засобами, а стійкість бактерій до антибіотиків підвищується до 1000-кратного рівня, порівняно з тим, що спостерігається при вирощуванні в планктонних умовах [5].

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Знижена сприйнятливість мікроорганізмів у біоплівці до антибактеріальних речовин зумовлена довільною присутністю клітин із резистентним фенотипом (відомими як "персистери") та/або погане проникнення антибіотиків в полісахаридну матрицю [6]. Оскільки для того, щоб поживні і протимікробні молекули попадали в мікробні клітини в біоплівках, вони повинні дифундувати через матрицю біоплівки або слиз, який продукується бактерією. Це дифузне обмеження може бути результатом спвільнення транспорту (нездатності антимікробних молекул дифундувати через полімерну матрицю), або інактивації антимікробної молекули матеріалом матриці. Крім того позаклітинна матриця, яка необхідна для з'єднання бактерій в біоплівки, може складатися з полісахаридів, білків і позаклітинної ДНК (еДНК). Вченими доведено, що еДНК функціонує як матричний компонент та відповідає за антибіотикостійкість мікроорганізмів в біоплівках, утворених *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus intermedius* та ін. Ці захисні механізми діють синергічно, забезпечуючи загальну підвищену стійкість біоплівки до антимікробних сполук. У зв'язку з цим необхідні альтернативні лікувальні та профілактичні підходи для боротьби з мікробними інфекціями в біоплівці [7].

Останнім часом багато вчених висловлюють припущення, що з екологічних і фізіологічних причин бактеріофаги, ймовірно, будуть більш ефективними, ніж антибіотики в знищенні бактерій у біоплівці [8]. Вплив фагів на біоплівки включає початкову стадію бактеріальної адсорбції, за якою слідує бактеріальна інфекція. Зараження фагом призводить до загибелі чутливих бактерій та до їх лізису. Видалення біоплівкових бактерій за допомогою лізису призводить до фізіологічних змін серед бактерій в глибоких шарах біоплівки, що дозволяє цим бактеріям ефективніше підтримувати подальшу інфекцію фагів [9].

Тому розробка економічно вигідних методів і засобів із застосуванням специфічного бактеріофагу відносно основного збудника маститу корів *S. aureus var. bovis* є перспективною і актуальною.

Мета роботи – визначити та порівняти ефективність застосування антибіотиків та бактеріофагу *Phage SA_vB14* при знищенні біоплівки сформованих *S. aureus var. bovis*.

Методологія дослідження. Діагностику маститу корів, відбір проб молока і секрету молочної залози, доставку їх в лабораторію та мікробіологічні дослідження проводили згідно з загальноприйнятими методиками. Для виділення стафілококів проводили посіви проб на середовище *BD Baird-Parker Agar* (HiMedia, Індія). Культивування проводили за температури 37⁰С, результати оцінювали через 24–48 годин. Ідентифікацію чистих культур проводили за морфологічними, тинкторіальними, культуральними, біохімічними властивостями, які описані у визначнику бактерій Берджі [10].

Для визначення здатності до формування біоплівки чисту культуру виділеного штаму висівали в лунки імунологічного планшета у кількості не менше ніж 10^5 КУО/мл. Планшет інкубували при 37 ± 1 °C протягом 24 год. Якщо в цей період формувалася біоплівка - поверхневий чи придонний ріст у лунці, що давав плівку, яка при видаленні середовища осідала на стінках, то штам вважали плівкутворюючим [11].

Вивчення чутливості мікроорганізмів, що перебувають у біоплівковій формі, до антибіотиків проводили на добових мікробних біоплівках, які вирощені у пластикових чашках Петрі. Після 24 год інкубації культур чашки триразово відмивали від планктонних (неприкріплених) мікроорганізмів стерильним фосфатним буфером і вносили 5 см^3 свіжоприготовлених антибіотиків. Після експозиції антибіотики зливали, чашки триразово промивали стерильним фосфатним буфером, вносили 5 см^3 стерильного 0,9% розчину натрію хлориду і стерильним тампоном ретельно відмивали зі стінок і дна чашки мікробну біоплівку. Із чашок відбирали $1,0 \text{ см}^3$ суспензії, готували ряд десятикратних розведень, проводили посів $1,0 \text{ см}^3$ кожного розведення у чашки Петрі, заливали МПА та інкубували за температури 37°C упродовж 24–48 год для визначення кількості бактерій [2].

Визначення кількості стафілококів у біоплівці після дії бактеріофагу проводили на 24 годинних біоплівках, які вирощені у пластикових чашках Петрі. Після 24 год інкубації культур, чашки триразово відмивали від планктонних (неприкріплених) мікроорганізмів стерильним фосфатним буфером і вносили 5 см^3 бактеріофагу *Phage SA_vB14*. Під час експозиції протягом 32 години (через кожні 4 години) бактеріофаг зливали, чашки триразово промивали стерильним фосфатним буфером, вносили 5 см^3 стерильного 0,5 % розчину натрію хлориду і стерильним тампоном ретельно відмивали зі стінок і дна чашки мікробну біоплівку. Із чашок відбирали $1,0 \text{ см}^3$ суспензії, готували ряд десятикратних розведень, проводили посів $1,0 \text{ см}^3$ кожного розведення у чашки Петрі, заливали МПА та інкубували за температури 37°C упродовж 24 – 48 год для визначення кількості стафілококів [12].

Статистичну обробку результатів здійснювали методами варіаційної статистики з використанням програми Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA). Застосовували непараметричні методи досліджень (критерії Уїлкоксона, Манна–Уїтні). Визначали середнє арифметичне (\bar{x}), стандартну похибку середньої величини (SE). Різницю між порівнюваними величинами вважали достовірною за $P < 0,05$.

Результати. Результати досліджень впливу антибіотиків на бактерії *S. aureus var. bovis*, які сформовані у біоплівки, наведено на рис. 1. У дослід взято штами бактерій, планктонні форми яких чутливі до визначених у досліді антибіотиків у диско-дифузійному методі Кірбі-Бауера.

Як видно з даних рис. 1, антибіотики проявляли різну бактерицидну дію до мікроорганізмів у мікробній біоплівці, проте мікробні клітини виявлялися життєздатними на рівні вище «порогу інфікованості». Найбільш захищені біоплівкою виявилися клітини *S. aureus*, а з досліджених антимікробних засобів найкраще впливає на клітини в біоплівці енрофлоксацин. Після його дії стафілококи з матриксу біоплівки не виділялися. Антибіотики пеніцилінового ряду проявляли найслабшу здатність впливати на бактерії у біоплівках, після впливу бензилпеніциліну і амоксициліну кількість живих клітин *S. aureus var. bovis* виділялися у кількості $\lg 5,0$ - $6,0$ КУО/см² площі біоплівки. Досить ефективними на бактерії у біоплівках виявилися антибіотики цефтріаксон і доксициклін. Після дії цефтріаксону кількість бактерій, що вижила становила $\lg 1,9 \pm 1,1$ КУО/см² площі біоплівки, а доксицикліну $\lg 2,5 \pm 1,2$ КУО/см².

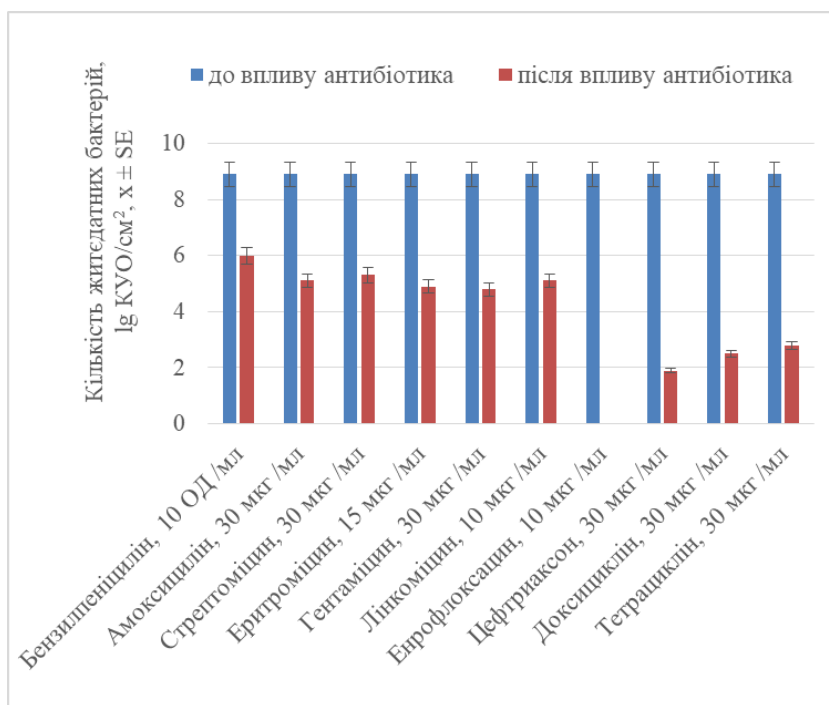


Рис. 1. Вплив антимікробних препаратів на кількість *S. aureus var. bovis* у складі біоплівки

На рис. 2 наведено результати впливу бактеріофагу *Phage SAvB14* на сформовану бактеріальну біоплівку *Staphylococcus aureus variant bovis*.

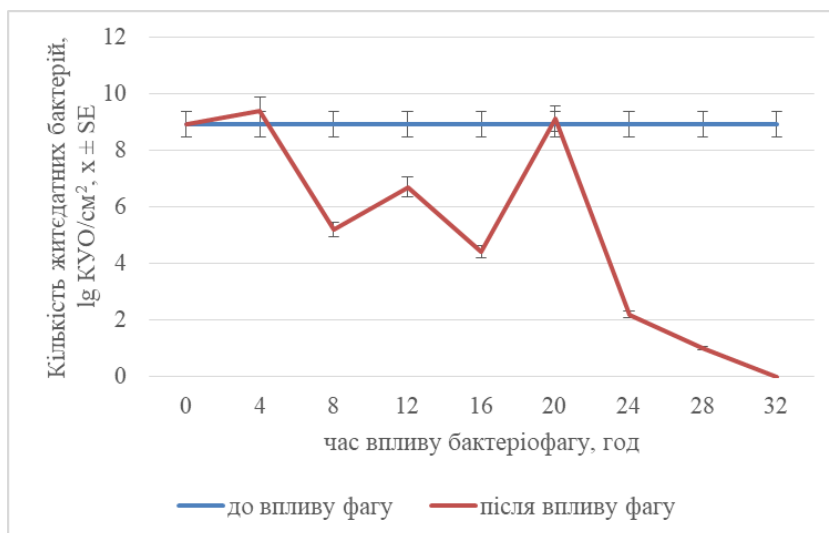


Рис. 2. Вплив бактеріофагу *Phage SAvB14* на кількість *S. aureus var. bovis* у складі біоплівки

Так, протягом 4-ох годин взаємодії бактеріофагу і клітин стафілококів у біоплівці зміни у кількості бактерій не відбувалося. Через 8 годин контакту вірусу і бактерій розпочався процес лізису мікробних клітин і їх кількість зменшилась на один порядок. На 12 годину впливу бактеріофагу процес відмирання стафілококів у біоплівці продовжувався, проте кількість стафілококів збільшилася у 1,3 рази. Протягом наступних години взаємодії бактеріофагів зі стафілококами у біоплівці продовжується літична дія бактеріофагів і через 32 години від початку контакту фагу з біоплівкою бактеріальні клітини не виділялися.

Обговорення. Субклінічний мастит корів у 90 – 95% випадків перебігає у хронічній формі і основний збудник *S. aureus* формує зрілі біоплівки, які впливають на ефективність антибактеріальної терапії (Horiuk et al., 2019).

Під час визначення впливу антибіотиків на біоплівкові форми бактерій встановлено, що клітини у біоплівка стійкіші до антибактеріальних препаратів. Із досліджених антибіотиків найкраще діяв енрофлоксацин ймовірно через низьку його молекулярну масу та здатність проникати через пори й канали біоплівки до мікробних клітин. Після дії енрофлоксацину на біоплівки бактерії стафілококів повністю були інактивовані. Про те, що фторхінолони легко дифундують через біоплівку і ефективно знижують її ріст та бактерицидно діють на мікробні клітини повідомляють і інші вчені, які проводили досліди *in vitro* [3, 13]. Також, ефективними на бактерії у біоплівках виявилися антибіотики цефтріаксон і доксициклін. Після дії цефтріаксону кількість бактерій, що вижила становила $1,9 \pm 1,1$ КУО/см² площі біоплівки, а доксицикліну $2,5 \pm 1,2$ КУО/см². У той же час, за умови дії антибіотиків пеніцилінів, аміноглікозидів і макролідів кількість мікробних клітин, що вижили становила близько $1,9 \pm 1,1$ КУО/см² площі біоплівки. Про підвищену стійкість бактерій у біоплівці, виділених за субклінічної форми маститу, до антибіотиків повідомляють дослідження інших вчених [5, 14].

Таким чином, проведені лабораторні мікробіологічні дослідження вказують на те, що антибіотики не завжди є ефективними при проведенні протимаститних заходів на молочних фермах.

У наших дослідженнях за впливу бактеріофагу *Phage SAvB14* на біоплівки, утворені *S. aureus var. bovis*, відбулася їх деградація. При цьому життєздатні мікробні клітини з біоплівки не виділяли. У даному випадку можемо стверджувати, що фаги проникли та досягли клітин стафілококів по всій товщі біоплівки і бактерії виявилися сприйнятливими до даного фагу. Тобто, відбулася пасивна обробка біоплівки фагами, за якої лізис залежав від швидкості поглинання вірусу. Незважаючи на отримання нами доволі ефективної дії бактеріофагу щодо біоплівки сформованої *S. aureus var. bovis* в умовах *in vitro*, ряд авторів [1, 15] повідомляють, що *in situ* процес лізису біоплівки залежить від багатьох чинників, які пов'язані з фізіологічним станом господаря. Однак дослідники [16, 17] притримуються одностайної думки, що при практичному застосуванні бактеріофагів повинна використовуватися концентрація фагу не менше 10^8 БУО/мл протягом певного часу для пасивного лізису біоплівки. Так як активна обробка фагами повинна дати достатню кількість нащадків для інфікування мікробних клітин і лізису біоплівки.

Висновки і перспективи. Отримані результати лабораторних досліджень вказують на перспективність ефективного використання виділеного нами специфічного стафілококового бактеріофагу *Phage SAvB14* для руйнування біоплівки, сформованої *S. aureus var. bovis* – при маститі корів.

Список використаних джерел

1. Azeredo J., Sutherland I. W. The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2008. № 9(4). P. 261–266. doi: 10.2174/138920108785161604

2. Zimmerli W., Sendi P. Role of rifampin against staphylococcal biofilm infections in vitro, in animal models, and in orthopedic-device-related infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2019. 63(2). e01746–18. doi: 10.1128/AAC.01746-18
3. Felipe V., Breser M.L., Bohl L.P., da Silva E.R., Morgante C.A., Correa S.G., Porporatto C. Chitosan disrupts biofilm formation and promotes biofilm eradication in *Staphylococcus species* isolated from bovine mastitis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019. 126 P. 60–67. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.159
4. Horiuk Y.V., Kukhtyn M.D., Straysky Y.S., Havrylianchyk R.Y., Horiuk V.V., Fotina H.A. Comparison Of The Minimum Bactericidal Concentration Of Antibiotics On Planktonic And Biofilm Forms Of Staphylococcus Aureus: Mastitis Causative Agents. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2018. 9(6). P. 616–622.
5. Iglesias Y.D., Wilms T., Vanbever R., Van Bambeke F. Activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in an in vitro model of biofilms in the context of cystic fibrosis: influence of the culture medium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2019. 63(7). e00602-19. doi: 10.1128/AAC.00602-19
6. Stewart P.S., Franklin M.J. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*. 2008. 6(3). P. 199–210. doi: 10.1038/nrmicro1838
7. Hymes S.R., Randis T.M., Sun T.Y., Ratner A.J. DNase inhibits *Gardnerella vaginalis* biofilms in vitro and in vivo. *The Journal of Infectious Diseases*. 2013. 207(10). P. 1491–1497. doi: 10.1093/infdis/jit047
8. Dias R.S., Eller M.R., Duarte V.S., Pereira A.L., Silva C.C., Mantovani H.C., Oliveira L.L., Silva E. de A. M., Paula S. O. Use of phages against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine. *J. Anim. Sci.* 2013. 91. P. 3930–3939. doi: 10.2527/jas.2012-5884
9. Tkhilashvili T., Lombardi L., Klatt A.B., Trampuz A., Di Luca, M. Bacteriophage Sb-1 enhances antibiotic activity against biofilm, degrades exopolysaccharide matrix and targets persisters of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2018. 52(6). P. 842–853. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.09.006
10. Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Whitman W.B. (Eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. 2011. Springer Science & Business Media.
11. Stepanović S., Vuković D., Dakić I., Savić B., Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 2000. 40(2). P. 175–179. doi: 10.1016/S0167-7012(00)00122-6
12. Wills Q.F., Kerrigan C., Soothill J. S. Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005. 49(3). P. 1220–1221. doi: 10.1128/AAC.49.3.1220-1221.2005
13. Bahamondez-Canas T.F., Zhang H., Tewes F., Leal J., Smyth H. D. PEGylation of tobramycin improves mucus penetration and antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in vitro. *Molecular Pharmaceutics*. 2018. 15(4). P. 1643–1652. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00011
14. Kukhtyn M., Berhilevych O., Kravcheniuk K., Shynkaruk O., Horiuk Y., Semaniuk N. Formation of biofilms on dairy equipment and the influence of disinfectants on them. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. 2017. 5/11(89). P. 26–33. doi: 10.15587/1729-4061.2017.110488
15. Horiuk Y. V. Fagothrapy of cows mastitis as an alternative to antibiotics in the system of obtaining environmentally safe milk. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies*. 2018. 20(88). P. 42–47. doi: 10.32718/nvlvet8807
16. Gutierrez D., Vandenheuvel D., Martínez B., Rodríguez A., Lavigne R., García, P. Two phages, phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C, lyse mono- and dual-species staphylococcal biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015. 81(10). P. 3336–3348. doi: 10.1128/AEM.03560-14
17. Lopetuso L., Giorgio M., Saviano A., Scaldaferrì F., Gasbarrini A., Cammarota G. Bacteriocins and Bacteriophages: Therapeutic Weapons for Gastrointestinal Diseases?. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. 20(1). P. 183–193. doi: 10.3390/ijms20010183

Horiuk Y. V.¹*Ph.D (Veterinary Sciences)**E-mail: goruky@ukr.net***Kukhtyn M. D.**²*Dr. Sc. (Veterinary Sciences), Professor**E-mail: kuchtynnic@gmail.com***Horiuk V. V.**¹*Ph.D. (Veterinary Sciences), Associate Professor**E-mail: horiukv@ukr.net***Kernychnyi S. P.**¹*Ph.D. (Veterinary Sciences), Associate Professor**E-mail: serhii.kernychnyi@gmail.com*¹*State Agrarian and Engineering University in Podilya
Kamianets-Podilskyi, Ukraine*²*Ternopil Ivan Puluj National Technical University
Ternopil, Ukraine*

COMPARISON OF THE EFFECT OF ANTIBIOTICS AND BACTERIOPHAGE PHAGE SA**VB14** ON BIOFILMS FORMED BY STAPHYLOCOCCUS AUREUS VARIANT BOVIS

Abstract

During the development of mastitis in cows, the formation of a biofilm pathogen is an effective way to preserve it in the microenvironment of mammary gland. Biofilm infections are difficult to treat with antimicrobials, and bacterial resistance to antibiotics increases to 1000-fold level, compared with what is observed when grown in planktonic conditions.

The aim of study – to determine and compare the effect of antimicrobial drugs and bacteriophage Phage SA**vB14** in the destruction of biofilms formed by *S. aureus* var. *bovis*.

Isolation and species identification of staphylococci were performed according to conventional methods using BD Baird-Parker Agar medium (HiMedia, India). Determination of ability of staphylococci to form biofilms and the number of viable bacteria was determined by the Stepanovic method. The study of sensitivity of microorganisms in biofilm form was performed on daily microbial biofilms grown in plastic Petri dishes. After 24 hours of incubation of cultures, the dishes were washed three times from planktonic (unattached) microorganisms with sterile phosphate buffer and introduced the studied antibacterial agents. After exposure, the dishes were washed three times with sterile phosphate buffer, introduced 5 cm³ of sterile 0.9% sodium chloride solution and washed the biofilm, took 1.0 cm³ of suspension, prepared a series of ten-fold dilutions, inoculated 1.0 cm³ of each dilution in Petri dishes, poured MPA and incubated at temperature of 37°C for 24–48 hours to determine the number of bacteria.

In determining the effect of antibiotics on bacterial biofilms, it was found that of the studied antibiotics, enrofloxacin worked best probably due to its low molecular weight and ability to penetrate the pores and channels of the biofilm to microbial cells. After the action of enrofloxacin on biofilms, staphylococcal bacteria were completely inactivated. Also, the antibiotics ceftriaxone and doxycycline were effective against bacteria in biofilms. After the action of ceftriaxone, the number of surviving bacteria was lg 1.9 ± 1.1 CFU/cm² of biofilm area, and doxycycline lg 2.5 ± 1.2 CFU/cm². At the same time, under the action of antibiotics penicillins, aminoglycosides and macrolides, the number of surviving microbial cells was about lg 5.3 CFU/cm² of biofilm area.

In studies on the effect of bacteriophage Phage SA**vB14** on biofilms formed by *S. aureus* var. *bovis*, there was their degradation. At this, viable microbial cells from the biofilm were not isolated. In this case, we can say that the phages penetrated and reached the staphylococcal cells throughout the thickness of biofilm and bacteria were susceptible to this phage. That is, there was a passive treatment of biofilm with phages, in which lysis

depended on the rate of virus uptake.

Therefore, the obtained results of laboratory studies indicate the prospects of effective use of our selected specific staphylococcal bacteriophage Phage SAvB14 for the destruction of biofilm formed by *S. aureus* var. *bovis* – in mastitis of cows.

Keywords: mastitis; biofilms; antibiotics; bacteriophage Phage SAvB14; *S. aureus* var. *bovis*.

References

1. Azeredo, J., & Sutherland, I. W. (2008). The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9(4), 261–266. doi: 10.2174/138920108785161604
2. Zimmerli, W., & Sendi, P. (2019). Role of rifampin against staphylococcal biofilm infections in vitro, in animal models, and in orthopedic-device-related infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(2), e01746–18. doi: 10.1128/AAC.01746-18
3. Felipe, V., Breser, M. L., Bohl, L. P., da Silva, E. R., Morgante, C. A., Correa, S. G., & Porporatto, C. (2019). Chitosan disrupts biofilm formation and promotes biofilm eradication in *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 60–67. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.159
4. Horiuk, Y. V., Kukhtyn, M. D., Strayskyy, Y. S., Havrylianchyk, R. Y., Horiuk, V. V., & Fotina, H. A. (2018). Comparison Of The Minimum Bactericidal Concentration Of Antibiotics On Planktonic And Biofilm Forms Of *Staphylococcus Aureus*: Mastitis Causative Agents. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 9(6), 616–622.
5. Iglesias, Y. D., Wilms, T., Vanbever, R., & Van Bambeke, F. (2019). Activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in an in vitro model of biofilms in the context of cystic fibrosis: influence of the culture medium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(7), e00602-19. doi: 10.1128/AAC.00602-19
6. Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6(3), 199. doi: 10.1038/nrmicro1838
7. Hymes, S. R., Randis, T. M., Sun, T. Y., & Ratner, A. J. (2013). DNase inhibits *Gardnerella vaginalis* biofilms in vitro and in vivo. *The Journal of Infectious Diseases*, 207(10), 1491–1497. doi: 10.1093/infdis/jit047
8. Dias, R. S., Eller, M. R., Duarte, V. S., Pereira, A. L., Silva, C. C., Mantovani, H. C., Oliveira, L. L., Silva, E. de A. M., & Paula, S. O. (2013). Use of phages against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine. *J. Anim. Sci.*, 91, 3930–3939. doi: 10.2527/jas.2012-5884
9. Tkhilaishvili, T., Lombardi, L., Klatt, A. B., Trampuz, A., & Di Luca, M. (2018). Bacteriophage Sb-1 enhances antibiotic activity against biofilm, degrades exopolysaccharide matrix and targets persisters of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(6), 842–853. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.09.006
10. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., & Whitman, W. B. (Eds.). (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer Science & Business Media.
11. Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175–179. doi: 10.1016/S0167-7012(00)00122-6
12. Wills, Q. F., Kerrigan, C., & Soothill, J. S. (2005). Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(3), 1220–1221. doi: 10.1128/AAC.49.3.1220-1221.2005
13. Bahamondez-Canas, T. F., Zhang, H., Tewes, F., Leal, J., & Smyth, H. D. (2018). PEGylation of tobramycin improves mucus penetration and antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in vitro. *Molecular Pharmaceutics*, 15(4), 1643–1652. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00011
14. Kukhtyn, M., Berhilevych, O., Kravcheniuk, K., Shynkaruk, O., Horiuk, Y., & Semaniuk, N. (2017). Formation of biofilms on dairy equipment and the influence of disinfectants on them. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 5/11(89), 26–33. doi: 10.15587/1729-4061.2017.110488
15. Horiuk, Y. V. (2018). Fagotherapy of cows mastitis as an alternative to antibiotics in the system of obtaining environmentally safe milk. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 20(88), 42–47. doi: 10.32718/nlvvet8807
16. Gutierrez, D., Vandenhevel, D., Martínez, B., Rodriguez, A., Lavigne, R., & García, P.

(2015). Two phages, phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C, lyse mono-and dual-species staphylococcal biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, *81(10)*, 3336–3348. doi: 10.1128/AEM.03560-14

17. Lopetuso, L., Giorgio, M., Saviano, A., Scaldaferri, F., Gasbarrini, A., & Cammarota, G. (2019). Bacteriocins and Bacteriophages: Therapeutic Weapons for Gastrointestinal Diseases? *International Journal of Molecular Sciences*, *20(1)*, 183-193. doi: 10.3390/ijms20010183

Received: 03/05/2020

Revision: 04/18/2020 Accepted: 06/29/2020