УДК: 619:614.48:636.09:636.2

DOI: 10.31073/vet_biotech37-02

ГАРКАВЕНКО Т.О.¹, канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: tag77@i.ua,
ГОРБАТЮК О.І.¹, канд. вет. наук, доц., e-mail: goroliva@ukr.net,
КОЗИЦЬКА Т.Г.¹, e-mail: megamicrob@ukr.net,
АНДРІЯЩУК В.О.¹, канд. вет. наук, e-mail: and_valentina@hotmail.com,
КУХТИН М.Д.², д-р вет. наук, проф., e-mail: kuchtynnic@gmail.com,
КОВАЛЕНКО В.Л.³, д-р вет. наук, e-mail: kovalenkodoktor@gmail.com,
МУСІЄЦЬ І.В.¹, e-mail: bacndi@ukr.net,
ОРДИНСЬКА Д.О.¹, e-mail: bacndi@ukr.net

¹Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи;

²Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя;

³Державний науково-контрольний інститут біотехнології та штамів мікроорганізмів

ВИВЧЕННЯ ЗДАТНОСТІ ДО ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВОК ПОЛЬОВИМИ ІЗОЛЯТАМИ *S. AUREUS*, ВИДІЛЕНИМИ ІЗ СИРОВИНИ І ПРОДУКЦІЇ ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ

Формування біоплівки *Staphylococcus aureus* є актуальною проблемою, оскільки цей процес пов'язаний з регуляцією експресії генів, які мають особливість впливати на функції інших генів. Позаклітинний матрикс біоплівки містить компоненти, що унеможливають проникнення нейтрофілів крові для знешкодження збудника у глибоких шарах біоплівки, що спричиняє рецидиви стафілококової інфекції, навіть, після антибіотикотерапії. Стаття містить результати досліджень з виявлення інтенсивності біоплівоутворення польовими ізолятами *Staphylococcus aureus*, виділеними із зразків сировини та продукції тваринного походження.

Ключові слова: *Staphylococcus aureus*, біоплівоутворення, матрикс, експресія генів, антибіотики, мультиантибіотикорезистентність, MRSA-штам.

Вступ. Протягом останніх років сформувалось нове вчення про екологічні закономірності існування мікроорганізмів, особливості їх взаємовідносин у зовнішньому середовищі, в організмі людей і тварин. Основне відкриття в цій галузі пов'язане з вивченням здатності мікроорганізмів формувати біоплівки на поверхнях біогенного та абіогенного походження [1]. Мікробна біоплівка представлена безліччю мікроорганізмів одного чи кількох видів, бактеріальні клітини яких прикріплені одна до одної та занурені у

позаклітинний матрикс – позаклітинну полімерну слизову речовину, яку вони самі виділяють [2, 3].

Встановлено, що у процесі утворення біоплівки мікробні клітини спроможні змінювати свої властивості, які обумовлюються регуляцією експресії генів. Регуляція експресії генів допомагає бактеріальним клітинам контролювати власну структуру і функції. Встановлено, що така експресія генів є субстратом для еволюційних змін, оскільки експресія, навіть, одного гена може впливати на функції інших генів в самому макроорганізмі [4].

Утворення біоплівки *Staphylococcus aureus* з регуляцією експресії генів створює неабиякі ризики для тварин і людини у випадках зараження такими штамами стафілококів та їхнього поширення на території України.

Нині відомо, що не всі бактерії володіють властивістю формувати біоплівки. За науковими даними бактеріальні клітини *Staphylococcus aureus* від 21,0 до 45,0% неспроможні до біоплівкоутворення [5]. Така інформація спонукає до думки, що для вибору правильної тактики лікування стафілококових інфекцій у тварин і людини, слід шукати інші підходи, зокрема за діагностики бактеріологічним методом проводити не лише видову ідентифікацію збудника, але й вивчати здатність виділених ізолятів *Staphylococcus aureus* до формування біоплівки з кількісною оцінкою інтенсивності плівкоутворення, визначати їхню чутливість до антибіотиків [6].

Особливу актуальність мають наукові дані, які засвідчують факт синтезу позаклітинного матриксу біоплівки, що пригнічують дію фагоцитів крові макроорганізму, структурами – ДНК-комплексми, полісахаридними міжклітинними адгезинами, альгінатом, полі-N-ацетилглюкозаміном. Такі структури в комплексі унеможливають проникнення нейтрофілів крові у глибокі шари біоплівки, що дає можливість бактеріальним клітинам *Staphylococcus aureus* розмножуватися та знову дисоціювати у прилеглі тканини, формуючи вогнища інфекції, які надалі знову викликають рецидиви інфекції [7, 8].

На сьогодні встановлено ряд факторів, відповідальних за такий важливий для клінічного застосування феномен, як резистентність біоплівки до антибіотиків. До них, зокрема, належать: інактивація антибіотиків позаклітинними полімерами чи ферментами; сповільнення метаболізму і, відповідно, зменшення швидкості росту мікроорганізмів в умовах лімітування поживних речовин у біоплівці, через що антибактеріальний препарат дифундує з біоплівки швидше, ніж встигає на неї подіяти; експресія можливих генів резистентності до антибіотиків; поява в біоплівці під дією антибіотиків мікроорганізмів-персистерів [9].

Метою роботи було дослідити особливості біоплівкоутворення полі- та мультиантибіотикорезистентними польовими ізолятами *Staphylococcus aureus*,

виділеними із зразків сировини і продукції тваринного походження, і порівняти рівень інтенсивності формування біоплівки.

Матеріал і методи досліджень. Дослідження були проведені в науково-дослідному відділі бактеріологічних досліджень Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики і ветеринарно-санітарної експертизи.

Виявлення здатності щодо утворення біоплівки дослідними польовими ізолятами *S. aureus* проводили за розробленою методикою М.Д. Кухтин та ін., (2020 р.) та надалі нами модифікованою [10].

За проведення досліджень з визначення здатності ізолятів до утворення біоплівки бактеріями *Staphylococcus aureus* було використано 7 полірезистентних (резистентність до антибіотиків однієї групи) і мультиантибіотикорезистентних (резистентність до кількох антибіотиків із кількох різних груп) штамів: «66/161», «37/92», «42/105», «82/189», «2/15», «77/173», «86/193», ізольовані і ідентифіковані із сировини і продукції птахівництва та тваринного походження. Чутливість до антибіотиків у означених штамів визначали попередньо, зокрема *Staphylococcus aureus* штам «66/161» був резистентним до бензилпеніциліну, ампіциліну (група пеніцилінів) і гентаміцину (група аміноглікозидів); штами «37/92», «2/15» і «42/105» проявляли резистентність до гентаміцину і тобраміцину (група аміноглікозидів), еритроміцину (група макролідів); штам «77/173» був резистентним до бензилпеніциліну (група пеніцилінів), фузидієвої кислоти і тріметопріму (різні агенти за EUCAST); штам «86/193» проявляв резистентність до тріметопріму і фузидієвої кислоти (різні агенти), амікацину і тобраміцину (група аміноглікозидів), кліндаміцину (група макролідів), тетрацикліну (група тетрациклінів) та бензилпеніциліну (група пеніцилінів); штам «82/189» був резистентним до гентаміцину (група аміноглікозидів), кліндаміцину і еритроміцину (група макролідів), тетрацикліну (група тетрациклінів) та бензилпеніциліну (група пеніцилінів).

Для постановки негативного контролю в чашки Петрі вносили усі інгредієнти досліду, окрім культури мікроорганізмів та проводили всі подальші процедури згідно методики. Білкові компоненти МПБ не формували біоплівки, але адгезовані залишки бульйону залишалися і у змивній спиртовій рідині вони були виявлені на спектрофотометрі із показниками дуже низької оптичної щільності.

Крім того, надалі для проведення експериментальних досліджень нами була модифікована методика (М.Д. Кухтин та ін., 2020 р.) і її особливості полягали у постановці додаткового позитивного контролю з високим рівнем щільності сформованої біоплівки, для якого використовували національний

мультирезистентний MRSA-штам «22/22» (з набутим механізмом резистентності – *mecA*-геном), ізольований і ідентифікований із продукції тваринного походження та задепонований в Депозитарії ДНКІБШМ як контрольний штам для проведення внутрішнього лабораторного контролю якості виконаних досліджень в межах ДНІЛДВСЕ.

Для визначення здатності до формування біоплівки ізолятами *Staphylococcus aureus* використовували чашки Петрі. У стерильні чашки Петрі діаметром 10 см вносили по 10,0 см³ МПБ з глюкозою (1,0%) та 2,0 см³ дослідної добової культури *Staphylococcus aureus* в концентрації $1,0 \times 10^5$ КУО/см³, витримували за кімнатної температури протягом 3 год та ставили на інкубування за температури $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ на 24 год. Після інкубації з чашок зливали МПБ з культурами, відмивали чашки Петрі від залишків планктонних (неприкріплених) мікроорганізмів стерильним фізіологічним розчином. Завдяки адгезії мікробних клітин золотистого стафілокока сформовані ним біоплівки залишалися на поверхні чашок. Чашки з промитими біоплівками висушували за кімнатної температури, фіксували 96° етиловим спиртом протягом 10–15 хв. Далі дослідні чашки знову промивали стерильним фізіологічним розчином, висушували за кімнатної температури і фарбували 0,1% водним розчином кристалічного фіолетового протягом 10–15 хв. Після закінчення експозиції фарбу зливали, чашки промивали стерильним фізіологічним розчином і висушували за кімнатної температури. Далі у кожную дослідну чашку вносили 96° етиловий спирт та протягом 10–15 хв коловими рухами змивали біоплівку. Одержаний промивний спиртовий розчин зливали у стерильні ємності і вимірювали його оптичну щільність на спектрофотометрі за довжини хвилі 570 нм.

Облік результатів проводили за наступними критеріями: якщо оптична щільність промивного спиртового розчину складала до 0,5 Од – щільність сформованих біоплівок вважали низькою; за оптичної щільності від 0,5 до 1,0 Од – середньою; за оптичної щільності більше 1,0 Од – високою [10–12].

Виявлення здатності ізолятів *Staphylococcus aureus* до біоплівкоутворення і визначення рівня щільності сформованих біоплівок були проведені у п'яти повторюваностях.

Методи досліджень: мікробіологічні, спектрометричні, статистичні.

Результати досліджень та їх обговорення. Результати досліджень з виявлення властивостей *Staphylococcus aureus* до біоплівкоутворення і визначення рівня щільності сформованих біоплівок показані в таблиці 1.

Таблиця 1

Інтенсивність формування біоплівки у різних штамів *Staphylococcus aureus*, виділених із зразків сировини та продукції тваринного походження, $M \pm m$, О.од., $n=7$ (кратність=5)

№ п/п	Staphylococcus aureus назви штамів	Облік результатів		Примітки
		Показники оптичної щільності відмивної спиртової рідини	Рівень щільності сформованої біоплівки	
Контролі:				
Негативний – МПБ без культури		0,001±0,0003	наднизький	адгезовані білкові залишки з МПБ
Позитивний з високим рівнем щільності – Staphylococcus aureus штам «22/22» mecA-позитивний		3,20±0,30	високий	
Дослідні штами:				
1.	Staphylococcus aureus штам «66/161»	1,80±0,06	високий	ізолят одержаний із продукції тваринного походження
2.	Staphylococcus aureus штам «2/15»	0,48±0,03	низький	ізолят одержаний із сировини тваринного походження
3.	Staphylococcus aureus штам «37/92»	1,60±0,01	середній	ізолят одержаний із продукції тваринного походження
4.	Staphylococcus aureus штам «42/105»	1,60±0,01	високий	ізолят одержаний із продукції тваринного походження
5.	Staphylococcus aureus штам «82/189»	0,60±0,01	середній	ізолят одержаний із продукції тваринного походження
6.	Staphylococcus aureus штам «77/173»	2,00±0,01	високий	ізолят одержаний із продукції тваринного походження
7.	Staphylococcus aureus штам «86/193»	2,00±0,06	високий	ізолят одержаний із сировини тваринного походження

Примітка: За оптичної щільності промивного спиртового розчину до 0,5 Од – щільність сформованих біоплівки вважається низькою; від 0,5 до 1,0 Од – середньою; більше 1,0 Од – високою.

Результати досліджень негативного контролю (без додавання дослідних культур) показали надто низький рівень щільності промивної спиртової рідини – $0,001 \pm 0,0003$, ймовірно представлений білковими залишками МПБ (рис. 1, А).

За результатами досліджень постановки позитивного контролю з використанням задепонованого мультирезистентного MRSA штаму «22/22» (з набутим механізмом резистентності *mecA* за скринінгом з цефокситіном згідно даних EUCAST) встановлена висока активність формування біоплівки, рівень щільності яких знаходився в межах $3,20 \pm 0,30$ (рис. 1, Б).

Рис. 1. Візуалізація постановки негативного контролю та позитивного контролю (*Staphylococcus aureus* штаму «22/22» *mecA*-позитивний):

А – низька щільність адгезованих залишків на дні чашок Петрі; Б – висока щільність сформованих біоплівки на дні чашок Петрі.

Аналіз результатів постановки основного дослідження показав, що всім дослідним штамам *Staphylococcus aureus* була притаманна властивість до біоплівкоутворення, але з різними рівнями її прояву (щільності). Встановлено, що високий рівень щільності сформованих біоплівки був виявлений серед 57,1% дослідних штамів *Staphylococcus aureus*.

Біоплівки з середнім рівнем щільності формували 28,6% штамів *Staphylococcus aureus* та низький рівень щільності біоплівки був сформований у 14,3% дослідних культур золотистого стафілококу. Візуалізація дослідження показана на рисунку 2.

Рис. 2. Різні рівні щільності сформованих біоплівки бактеріями дослідних штамів *Staphylococcus aureus*: 1 – високий рівень щільності сформованих біоплівки; 2 – середній рівень щільності біоплівки; 3 – низький рівень щільності біоплівки.

Отже, результати наших досліджень підтвердили актуальність проблеми біоплівкоутворення *Staphylococcus aureus*, оскільки вони є полі- і мультиантибіотикорезистентними, а тому особливо небезпечні для тварин і людини через неефективність антибіотикотерапії [12–14].

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Встановлено, що всім 7-и дослідним штамам *Staphylococcus aureus*, була притаманна здатність формувати біоплівки із різним рівнем активності, що позначалося на їхній щільності.

2. Виявлено 85,7% штамів *Staphylococcus aureus* серед досліджених, які формували біоплівки середнього та високого рівнів щільності.

Перспектива подальших досліджень полягає у вивченні чутливості до антибіотиків плівкоутворюючих штамів *Staphylococcus aureus* і їх планктонних форм з метою напрацювання алгоритму дій стосовно пошуку ефективних антибіотиків.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Correction: Biofilm Formation As a Response to Ecological Competition / Oliveira N.M., Martinez-Garcia E., Xavier J. et al. // PLOS Biology. – 2015. – 13(8): e1002232. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002232>.

2. Monds R.D. The development model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review / R.D. Monds, G.A. O'Toole // Trends in Microbiology. – 2009. – Vol. 17. – P. 73–87. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.001>.
3. Romling, U. Microbial biofilm formation: a need to act / U. Romling, S. Kjelleberg, S. Normark et al. // Journal of Internal Medicine. – 2014. – Vol. 276, Issue 2. – P. 98–110. <https://doi.org/10.1111/joim.12242>.
4. Патрушев Л.И. Экспрессия генов / Л.И. Патрушев. – М.: Наука, 2000. – 528 с.
5. Чеботарь И.В. Биопленки *S. aureus*: структурно-функциональные характеристики и взаимоотношение с нейтрофилами: автореф. дис. на соискание д-ра мед. наук: спец. 03.02.03. «Микробиология» / И.В. Чеботарь. – Москва, 2013. – 44 с.
6. Винник Ю.С. Значение пленкообразующей способности культур стафилококков в выборе дренажного полимера и местных антисептиков при инфицированном панкреонекрозе / Ю.С. Винник, О.В. Теплякова, О.В. Перянова и др. // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – Том IV. – № 4. – 2011. – С. 666–670.
7. Balaban N.Q. Bacterial persistence as a phenotypic switch / N.Q. Balaban // Science. – 2004. – Vol. 305. – No. 5690. – P. 1622–1625. <https://doi.org/10.1126/science.1099390>.
8. Li Ch. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies / Ch. Li, W. Yumei // Int. J. Oral. Sci. – 2011. – Vol 3. – No. 2. – P. 66–73. <https://doi.org/10.4248/IJOS11022>.
9. Тодосійчук Т.С. Підвищення стійкості мікробних патогенів як фактор розробки нових антисептиків / Т.С. Тодосійчук, Т.І. Стрелець, С.В. Конопацька // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – № 3. – 2011. – С.90–97.
10. Методичні рекомендації з визначення бактерицидної активності дезінфікуючих засобів на бактеріях у біоплівках / М.Д. Кухтин, В.Л. Коваленко, Т.О. Гаркавенко, та ін. – К., 2020. – 21 с.
11. Чеботарь, И.В. Лабораторная диагностика клинически значимых биоплёночных процессов / И.В. Чеботарь, Е.Л. Гурьев // Вопросы диагностики в педиатрии. – 2012. – № 4. – С. 15–20.
12. Современные технологии исследования бактериальных биопленок / И.В. Чеботарь, А.Г. Погорелов, В.А. Яшин, и др. // Современные технологии в медицине. – Том 5. – № 1. – 2013. – С.14–20.
13. Formation of biofilms on dairy equipment and the influence of disinfectants on them / Kukhtyn M., Berhilevych O., Kravcheniuk K. et al. // Eastern-European journal of Enterprise Technologies. – 2017. – Vol. 5, No. 11 (89). – P. 26–33. <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2017.110488>.
14. Антибиотикорезистентность биоплёночных бактерий / И.В. Чеботарь, А.Н. Маянский, Е.Д. Кончакова и др. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – Т. 14. – № 1. – 2012. – С. 51–58.

ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ К ФОРМИРОВАНИЮ БИОПЛЕНОК ПОЛЕВЫМИ ИЗОЛЯТАМИ *S. AUREUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СЫРЬЯ И ПРОДУКЦИИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ / Гаркавенко Т.О., Горбатюк О.И., Козицкая Т.Г., Андрияшук В.А., Кухтин Н.Д., Коваленко В.Л., Мусиенц И.В., Ордынская Д.А.

Формирование биопленок *Staphylococcus aureus* является актуальной проблемой, поскольку этот процесс связан с регуляцией экспрессии генов, которые отличаются особенностью влиять на функции других генов. Внеклеточный матрикс биопленок содержит компоненты, которые препятствуют проникновению нейтрофилов крови для обезвреживания возбудителя в глубоких слоях биопленки, что приводит к рецидивам стафилококковой инфекции даже после антибиотикотерапии. Статья содержит результаты исследований относительно выявления интенсивности биопленкообразования полевыми изолятами *Staphylococcus aureus*, выделенными из образцов сырья и продукции животного происхождения.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, биопленкообразование, матрикс, экспрессия генов, антибиотики, мультиантибиотикорезистентность, MRSA-штамм.

STUDY OF THE ABILITY OF *S. AUREUS* FIELD ISOLATES SELECTED FROM RAW MATERIALS AND LIVESTOCK PRODUCTS TO FORM BIOFILMS / Garkavenko T.O., Gorbatyuk O.I., Kozytska T.G., Andriyashchuk V.O., Kukhtin D.M., Kovalenko V.L., Musiets I.V., Ordynska D.O.

Introduction. The ability of *Staphylococcus aureus* to form biofilms is an urgent problem, as it is associated with the regulation of genes expression that have ability to directly affect the functions of other genes. The extracellular matrix of biofilms contains components that prevent the penetration of blood neutrophils to neutralize the pathogen in the deep layers of biofilms, which leads to recurrence of staphylococcal infection even after antibiotic therapy. In most cases, such *Staphylococcus aureus* are poly- or multi-antibiotic-resistant.

The goal of the work to establish the peculiarities of biofilm formation by poly- and multi-antibiotic-resistant field isolates of *Staphylococcus aureus* isolated from samples of raw materials and products of animal origin, and to compare the level of intensity of biofilms formation.

Materials and methods. Detection of the ability to form biofilms by field isolates of *S. aureus* was performed according to the method developed by M.D. Kukhtin et al. (2020), modified by us. 7 poly- and multi-antibiotic-resistant strains of *Staphylococcus aureus* were used for the research, in particular strains: “66/161”, “37/92”, “42/105”, “82/189”, “2/15”, “77/173”, “86/193”, obtained from samples of raw materials and products of animal origin.

Results of research and discussion. Negative control studies showed an extremely low level of the density of the washing alcohol – 0.001 ± 0.0003 , which represented the adhered protein residues of the meat peptone broth. Under the positive control using the deposited multidrug-resistant MRSA strain “22/22” (with the acquired mechanism of resistance *mecA*) established a high activity of biofilms formation with 3.20 ± 0.30 density level. The results of the main experiment showed the inherent nature of biofilm formation with different levels of its manifestation in all studied strains of *Staphylococcus aureus*. A high level of density of the formed biofilms was found among 57.1% of studied strains of *Staphylococcus aureus*, medium level – in 28.6% and low – in 14.3%.

Conclusions and prospects for further research. 1. It was found that all 7 experimental strains of *Staphylococcus aureus*, isolated from raw materials and products of animal origin were able to form biofilms with different levels of activity, which reflected on their density. 2. 85.7% of isolated *Staphylococcus aureus* strains were able to form biofilms of medium and high density. Prospects for further research is to study the sensitivity of film-forming strains of *Staphylococcus aureus* and their planktonic forms to antibiotics in order to develop an algorithm to find effective antibiofilm antibiotics.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, biofilm formation, matrix, gene expression, antibiotics, multiantibiotic resistance, MRSA strain.

REFERENCES

1. Oliveira, N.M., Martinez-Garcia, E., Xavier, J., Durham, W.M., & Kolter, R. (2015). Correction: Biofilm Formation As a Response to Ecological Competition. *PLOS Biology*, 13, 8.
2. Monds, R.D., & O'Toole, G.A. (2009). The development model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology*, 17, 73-87.
3. Romling, U., Kjelleberg, S., Normark, S., Nyman, L., & Uhlin, B. (2014). Microbial biofilm formation: a need to act. *Journal of Internal Medicine*, 276, 2, 98-110.
4. Patrushev, L.I. (2000). *Ekspressia genov [Gene expression]*. Moscow: Nauka [in Russian].
5. Chebotar, I.V. (2013). Bioplenki *S. aureus*: strukturno-funktsionalnyye kharakteristiki i vzaimootnosheniye s neytrofilami [Biofilms of *S. aureus*: structural and functional characteristics and interaction with neutrophils]. *Extended abstract of Doctor's thesis*. Moscow [In Russian].
6. Vinnik, Yu.S., Teplyakova, O.V., Peryanova, O.V., Onzul, V.E., & Kozlov, V.V. (2011). Znachenie plenkoobrazuyushej sposobnosti kultur stafilokokkov v vybore drenazhnogo polimera i mestnykh antiseptikov pri infitsirovannom pankreonekroze [The value of the film-forming ability of staphylococcal cultures in the choice of drainage polymer and local antiseptics in infected pancreatic necrosis]. *Vestnik eksperimentalnoj i klinicheskoy hirurgii – Bulletin of Experimental and Clinical Surgery*, Vol. IV, Is.4, 666-670 [in Russian].
7. Balaban, N.Q. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*, Vol. 305, No. 5690, 1622-1625. <https://doi.org/10.1126/science.1099390>.
8. Ch, Li., & Yumei, W. (2011). The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. *International Journal of Oral Science*, 3, 2, 66-73.
9. Todosijchuk, T.S., Strelec, T.I., & Konopaczka, S.V. (2011). Pidvyshchennia stiikosti mikrobnikh patoheniv yak faktor rozrobky novykh antyseptyviv [Increasing the resistance of microbial pathogens as a factor in the development of new antiseptics]. *Naukovi visti NTUU "KPI" – KPI Science News*, 3, 90-97 [in Ukrainian].
10. Kuhtin, M.D., Kovalenko, V.L., Garkavenko, T.O., Gorbatyuk, O.I., Kozitska, T.G., & Boltik, N.P. (2020). *Metodichni rekomendacii z viznachennia baktericidnoi aktivnosti dezinfykuuschi zasobiv na bakteriah v bioplivkah [Methodical recommendations for the determination of bactericidal activity of disinfectants on bacteria in biofilms]. Guidelines*. Kyiv [in Ukrainian].
11. Chebotar, I.V., & Gurev, E.L. (2012). Laboratornaya diagnostika klinicheski znachimih bioplyonochnyh processov [Laboratory diagnostics of clinically significant biofilm processes]. *Voprosy diagnostiki v pediatrii – Diagnostic issues in pediatrics*, 4, 15-20 [In Russian].
12. Chebotar, I.V., Pogorelov, A.G., Yashin, V.A., et al. (2013). Sovremennyye tehnologii issledovaniya bakterialnyh bioplenok [Modern technologies for studying bacterial biofilms]. *Sovremennyye tehnologii v medicine – Modern technologies in medicine*, 5, 1, 14-20 [in Russian].

13. 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. <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2017.110488>.
14. Chebotar, I.V., Mayanskij, A.N., Konchakova, E.D., Lazareva, A.B., & Chistyakova, V.P. (2012). Antibiotikorezistentpost bioplyonochpyh bakterij [Antibiotic resistance of biofilm bacteria]. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya himioterapiya – Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 14, 1, 51-58 [in Russian].