

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.10.091>

УДК 579.861.2: [539.216:57]: 57.017.22: 615.331:615.015.1

**Л.Н. Чуркина<sup>1</sup>, М. Ванечотте<sup>2</sup>,  
Н.Б. Перунова<sup>3</sup>, О.Б. Лютко<sup>4</sup>, Л.В. Ярошенко<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

<sup>2</sup> Гентский университет, Бельгия

<sup>3</sup> Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

<sup>4</sup> Институт ортопедии и травматологии НАМН Украины, Киев

E-mail: LNKogut@hotmail.com

## **Действие антибиотика батумина на образование биоплёнок у стафилококков**

*Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Б.П. Мацелюхом*

*Антибиотик батумин, синтезируемый *Pseudomonas batumici*, показал высокую активность в отношении типовых и референс-штаммов, а также клинических изолятов 30 различных видов рода *Staphylococcus* (включая MRSA и SSCVs). Активность батумина относительно этих бактерий составляла 0,25–0,5 мкг/мл. Исследовано влияние батумина на формирование биопленки у представителей рода *Staphylococcus*. В присутствии в среде 0,125 мкг/мл батумина (половина ингибирующей рост концентрации) уменьшалось образование биопленки у 85 % изученных штаммов. Эффективность антибиотика зависела от стадии ее формирования. Внесение батумина в питательную среду одновременно с культурой способствовало снижению значений биопленкообразования у всех исследуемых штаммов стафилококков. Сформированная биопленка была более резистентна к антибиотику. Нарушение процесса образования биопленки под влиянием батумина подтверждено популяционным анализом исследуемых штаммов стафилококков.*

**Ключевые слова:** батумин, стафилококки, SSCVs, образование биопленки.

Развитие устойчивости бактерий к широко применяемым в клинике антибиотикам, а также их способность расти в виде биопленок, что ограничивает диффузию антимикробных препаратов и существенно снижает их эффективность [1], обуславливает необходимость поиска новых высокоактивных антибиотических веществ. К таким следует отнести выделенный из бактерий *Pseudomonas batumici* поликетидный антибиотик батумин, который обладает высокой избирательной активностью в отношении стафилококков [2]. Это определило перспективы его медицинского применения не только при лечении стафилококковых инфекций и борьбе с назальным носительством этого патогена, но и для диагностики представителей рода *Staphylococcus* с помощью препарата “Диастаф” (диски, пропитанные

© Л.Н. Чуркина, М. Ванечотте, Н.Б. Перунова, О.Б. Лютко, Л.В. Ярошенко, 2017

батумином) [3]. Вывод о селективности действия батумина на возбудителей рода *Staphylococcus* был сделан на основании его активности в отношении нескольких наиболее часто встречающихся в клинике видов стафилококков. Представляло интерес выяснить, распространяется ли обнаруженная избирательность на другие описанные к настоящему времени виды стафилококков, а также атипичные формы этого возбудителя, так называемые small colony-variants (SSCV<sub>s</sub>), в самом фенотипе которых уже заложена повышенная устойчивость к антибиотикам [4].

Золотистый стафилококк относится к одним из наиболее мощных биопленкообразующих микроорганизмов. Бактерии, структурированные в биопленку, высокоустойчивы к антибиотикам [1]. Ранее нами было установлено, что при внесении в среду 1/2 МИК батумина процесс формирования биопленки существенно снижался у 80 % штаммов назальных стафилококков с исходно высокой способностью к биопленкообразованию [5].

Целью настоящего исследования было расширение знаний о действии батумина на большинство описанных к настоящему времени видов стафилококков и атипичных форм этого патогена (SSCV<sub>s</sub>), а также более детальный анализ влияния батумина на формирование биопленки у стафилококков.

**Материалы и методы.** Использовали батумин со степенью очистки 85 %, полученный в процессе ферментации и очищенный методами препаративной хроматографии.

**Бактериальные штаммы.** Объектом исследования служили типовые и коллекционные штаммы 30 различных видов стафилококков (табл. 1), а также 50 штаммов *S. aureus*, выделенных в Институте ортопедии и травматологии АМН Украины от больных остеомиелитом и идентифицированных как метициллинрезистентные (MRSA) [6]; 20 штаммов *S. aureus*, 19 штаммов *S. epidermidis* и 4 штамма *S. intermedius*, изолированных при назальном носительстве у медицинского персонала и пиодермиях у пациентов (коллекция микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург).

Также исследовались 30 штаммов атипичных форм стафилококков — SSCV<sub>s</sub>, выделенных на Columbia агар с 5 % отмытых бараньих эритроцитов как медленно растущие точечные колонии (0,1–0,3 мм) среди большого числа колоний (2–3 мм) с нормальной для *Staphylococcus* морфологией после 48–56 ч инкубации при 37 °С. Атипичные формы стафилококков были ранее идентифицированы стандартными методами, а также методами tRNA-PCR анализа [7] и относились к трем видам: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*. Детальное описание штаммов приведено в работе [8].

Чувствительность клинических штаммов стафилококков к широкому спектру антибиотиков определяли методом Kirby–Bauer, NCCLS критерии были использованы для интерпретации чувствительности к антибиотикам [9].

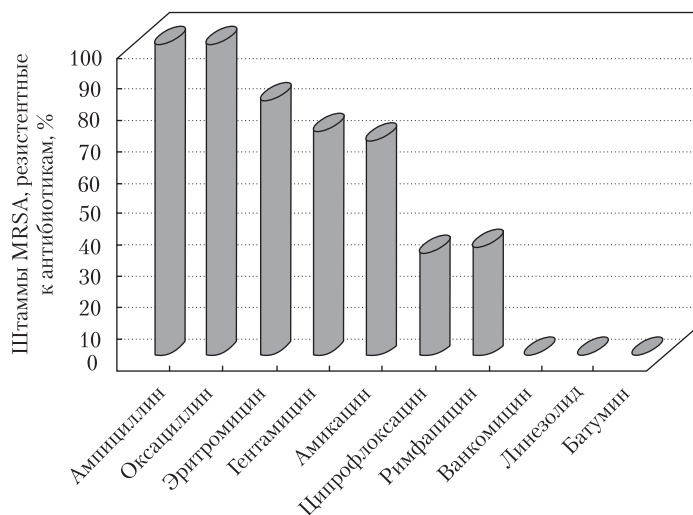
Минимальную ингибирующую рост концентрацию (МИК) батумина определяли в соответствии со стандартами CLSI [10] на агаре Мюллера–Хинтона при микробной нагрузке стафилококков  $0,5 \cdot 10^8$ . Чашки инкубировали при 37 °С 48 ч. Изучение МИК в отношении SSCVs проводили также на бульоне Мюллера–Хинтона.

Образование биопленок исследовали фотометрическим методом, определяя способность штаммов микроорганизмов к адгезии на поверхности 96-луночной полистироловой планшеты с последующей окраской кристаллвиолетом [11]. Измерения оптической плотности проводили на фотометре ELx808 (“BioTek”, США) при длине волны 630 нм. Значения

Таблица 1. Чувствительность к батумину видов, входящих в состав различных 16S-рРНК комплексов рода *Staphylococcus*

РНК-комплекс	Вид, номер штамма*	МИК, мкг/мл
<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> B-918 (ATCC 6538)	0,25
	<i>S. aureus</i> B-4001 (ATCC 6538P)	0,25
	<i>S. aureus</i> B-904 (ATCC 25923)	0,25
	<i>S. aureus</i> B-909 (GISK 906)	0,25
	MRSA (50 штаммов)	0,25–0,5
<i>S. carnosus</i>	<i>S. carnosus</i> B-4005 <sup>T</sup> (DSM 20501 <sup>T</sup> )	0,25
	<i>S. pisci-fermentans</i> B-4028 <sup>T</sup> (ATCC 51136 <sup>T</sup> )	0,25
	<i>S. simulans</i> B-4033 <sup>T</sup> (ATCC 27848 <sup>T</sup> )	0,25
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. capitis</i> B-4002 <sup>T</sup> (ATCC 27840 <sup>T</sup> )	0,125
	<i>S. caprae</i> B-4007 <sup>T</sup> (ATCC 35538 <sup>T</sup> )	0,125
	<i>S. epidermidis</i> B-4023 <sup>T</sup> (ATCC 14990 <sup>T</sup> )	
	<i>S. epidermidis</i> B-919 (ATCC 12228)	0,0625
<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. devriesei</i> B-4022 <sup>T</sup> (CNS 159 <sup>T</sup> )	0,125
	<i>S. haemolyticus</i> B-4018 <sup>T</sup> (ATCC 29970 <sup>T</sup> )	0,25
	<i>S. hominis</i> B-4019 <sup>T</sup> (DSM 20328 <sup>T</sup> )	0,25
<i>S. hyicus-intermedius</i>	<i>S. chromogenes</i> B-4003 <sup>T</sup> (ATCC 43764 <sup>T</sup> )	0,25
	<i>S. felis</i> B-4016 <sup>T</sup> (ATCC 49168 <sup>T</sup> )	0,25
	<i>S. delphini</i> B-4008 <sup>T</sup> (ATCC 49171 <sup>T</sup> )	0,25
	<i>S. hyicus</i> B-4020 <sup>T</sup> (ATCC 11249 <sup>T</sup> )	0,25
	<i>S. intermedius</i> B-4009 <sup>T</sup> (ATCC 29663 <sup>T</sup> )	0,5
	<i>S. schleiferi</i> B-4032 <sup>T</sup> (ATCC 49545 <sup>T</sup> )	0,5
	<i>S. pseudointermedius</i> B-4029 <sup>T</sup> (LMG 22219 <sup>T</sup> )	0,25
<i>S. lugdungensis</i>	<i>S. lugdungensis</i> B-4025 <sup>T</sup> (ATCC 43809 <sup>T</sup> )	0,5
<i>S. warneri</i>	<i>S. warneri</i> B-4013 <sup>T</sup> (ATCC 27836 <sup>T</sup> )	0,25
	<i>S. pasteurii</i> B-4026 <sup>T</sup> (ATCC 51129 <sup>T</sup> )	0,25
<i>S. sciuri</i>	<i>S. sciuri</i> B-4012 <sup>T</sup> (ATCC 290762 <sup>T</sup> )	0,5
	<i>S. pulvereri</i> B-4031 <sup>T</sup> (ATCC 51698 <sup>T</sup> )	1,0
	<i>S. lentus</i> B-4024 <sup>T</sup> (CCM 2598 <sup>T</sup> )	0,5
	<i>S. lentus</i> B-4010 (ATCC 29070)	0,5
<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. equorum</i> B-4015 <sup>T</sup> (ATCC 43959 <sup>T</sup> )	0,5
	<i>S. gallinarum</i> B-4017 <sup>T</sup> (ATCC 35539 <sup>T</sup> )	0,5
	<i>S. kloosii</i> B-4021 <sup>T</sup> (ATCC 43959 <sup>T</sup> )	1,0
	<i>S. saprophyticus</i> B-4011 <sup>T</sup> (ATCC 15305 <sup>T</sup> )	0,25
	<i>S. saprophyticus</i> B-4034 (CLO 059)	0,5
	<i>S. cohnii</i> B-4004 <sup>T</sup> (ATCC 29974 <sup>T</sup> )	0,25
	<i>S. xylosus</i> B-4014 <sup>T</sup> (ATCC 29971 <sup>T</sup> )	0,25
	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	<i>M. caseolyticus</i> B-4006 <sup>T</sup> (ATCC 13548 <sup>T</sup> )

\* Представлены номера штаммов в Украинской коллекции микроорганизмов (в скобках — в ATCC либо других коллекциях, из которых они получены).



**Рис. 1.** Профиль резистентности к антибиотикам 50 метициллинрезистентных штаммов стафилококков

биоленкообразования стафилококков выражали в условных единицах (ед.), которые представляли собой отношение оптической плотности изучаемой культуры (опыт) к оптической плотности питательного бульона (контроль).

Определение диссоциации микробной популяции осуществляли при рассеивании микроорганизмов на агаризованные среды LB с получением 100

колоний. Градацию по уровню биоленкообразования микроорганизмов в популяции проводили условно: низкие значения соответствовали уровню менее 1,5 ед., средние — варьировали в диапазоне 1,5—2,5 ед., а высокие составляли более 2,5 ед. Индекс диссоциации популяции определяли как долю (%) колоний определенного фенотипа.

**Результаты и их обсуждение.** Род *Staphylococcus* состоит из 11 РНК-комплексов, каждый из которых объединяет эволюционно наиболее близкие виды. В табл. 1 представлены результаты оценки чувствительности к батумину как типовых штаммов стафилококков, так и некоторых коллекционных культур, а также метициллинрезистентных штаммов *S. aureus*.

Обращает на себя внимание высокая однородность чувствительности к батумину различных видов стафилококков. На большинство исследованных видов и штаммов, в том числе MRSA, антибиотик действовал в концентрации 0,25—0,5, редко — 1,0 мкг/мл. Наиболее чувствительными к антибиотику оказались виды комплекса *S. epidermidis* (МИК 0,0625—0,125 мкг/мл). Заметим, что штаммы этого вида проявляли наиболее высокую чувствительность к батумину и при клинических испытаниях.

Батумин эффективен и в отношении макрококков, лишь недавно исключенных из состава рода *Staphylococcus* и образовавших новый род. А вот эволюционно близкие стафилококкам гемеллы (*Gemella morbillorum*, *G. haemolysans*), выделенные при остеомиелитах, не образовывали зон задержки роста вокруг дисков с батумином [12]. Не эффективен он и в отношении бацилл, листерий, планококков и других бактерий, принадлежащих к семействам порядка Bacillales, в состав которого входит и семейство Staphylococcaceae.

Анализ полученных результатов относительно антибиотикорезистентности исследованных штаммов MRSA (рис. 1) свидетельствует об их высокой устойчивости к практически значимым антибиотикам. При этом все 50 штаммов, независимо от источника выделения и чувствительности к разным антибиотикам, были чувствительными к 0,25—0,5 мкг/мл батумина.

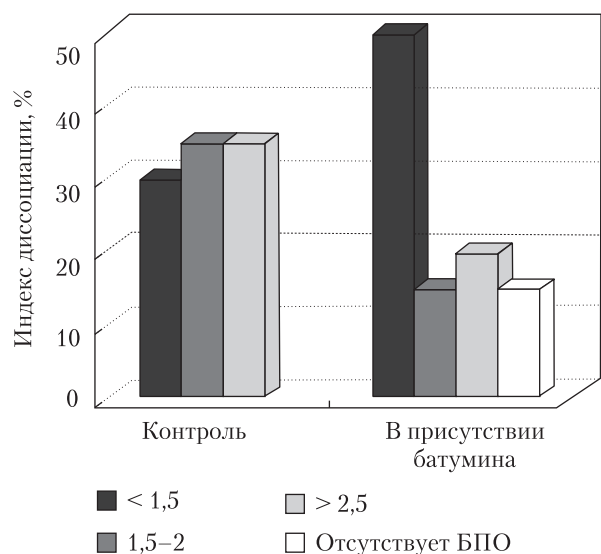
Приведенные данные, а также результаты исследований прошлых лет указывают на высокую активность батумина в отношении метаболически нормальных представителей рода *Staphylococcus* [3], при этом активность антибиотика в отношении атипичных форм стафи-

Таблица 2. Влияние батумина на формирование биопленки у стафилококков

Штамм	Оптическая плотность (OD <sub>630</sub> ) без батумина	УЕ* без батумина	Оптическая плотность (OD <sub>630</sub> ) при внесении батумина (0,125 мкг/мл)	УЕ* при внесении батумина (0,125 мкг/мл)
<i>S. aureus</i> 3	0,131	2,6	0,095	1,9
<i>S. aureus</i> 17	0,157	3,1	0,077	1,5
<i>S. aureus</i> 24	0,134	2,7	0,094	1,9
<i>S. aureus</i> 28a	0,142	2,8	0,104	2,1
<i>S. aureus</i> 29	0,131	2,6	0,091	1,8
<i>S. aureus</i> 35	0,130	2,6	0,083	1,7
<i>S. aureus</i> 39	0,131	2,6	0,096	1,9
<i>S. aureus</i> 59d	0,136	2,7	0,074	1,5
<i>S. aureus</i> 68	0,131	2,6	0,132	2,6
<i>S. aureus</i> 75	0,132	2,6	0,097	1,9
<i>S. aureus</i> 89-a	0,156	3,1	0,157	3,1
<i>S. aureus</i> 104	0,147	2,9	0,081	1,6
<i>S. aureus</i> 120	0,142	2,8	0,105	2,1
<i>S. aureus</i> 121	0,156	3,1	0,155	3,1
<i>S. aureus</i> 132	0,131	2,6	0,093	1,9
<i>S. aureus</i> 146-a	0,131	2,6	0,095	1,9
<i>S. aureus</i> 144	0,130	2,6	0,081	1,6
<i>S. aureus</i> 159	0,135	2,7	0,090	1,8
<i>S. aureus</i> 165	0,140	2,8	0,084	1,7
<i>S. epidermidis</i> 11	0,130	2,6	0,133	2,6
<i>S. epidermidis</i> 47	0,105	2,1	0,085	1,7
<i>S. epidermidis</i> 57k	0,115	2,3	0,095	1,9
<i>S. epidermidis</i> 61	0,105	2,1	0,105	2,1
<i>S. epidermidis</i> 64	0,105	2,1	0,105	2,1
<i>S. epidermidis</i> 73	0,115	2,3	0,115	2,3
<i>S. epidermidis</i> 99-b	0,095	1,9	0,08	1,6
<i>S. epidermidis</i> 124	0,097	1,9	0,095	1,9
<i>S. epidermidis</i> 137	0,104	2,1	0,107	2,1
<i>S. epidermidis</i> 140	0,105	2,1	0,093	1,9
<i>S. epidermidis</i> 143	0,092	1,8	0,080	1,6
<i>S. epidermidis</i> 147	0,094	1,9	0,097	1,9
<i>S. epidermidis</i> 154	0,111	2,2	0,095	1,9
<i>S. epidermidis</i> 155 c	0,097	1,9	0,096	1,9
<i>S. epidermidis</i> 172	0,091	1,8	0,09	1,8
<i>S. epidermidis</i> 183	0,114	2,3	0,113	2,3
<i>S. epidermidis</i> 184	0,115	2,3	0,091	1,8
<i>S. epidermidis</i> 215	0,095	1,9	0,084	1,7
<i>S. epidermidis</i> 187	0,113	2,3	0,115	2,3
<i>S. intermedius</i> 193	0,11	2,2	0,11	2,2
<i>S. intermedius</i> 195	0,083	1,7	0,075	1,5
<i>S. intermedius</i> 107	0,095	1,9	0,074	1,5
<i>S. intermedius</i> 111	0,09	1,8	0,09	1,8
<i>S. intermedius</i> 111	0,086	1,7	0,084	1,7

\* Отношение оптической плотности изучаемой культуры (опыт) к оптической плотности питательного бульона (контроль). Значения биопленкообразования стафилококков выражали в условных единицах (УЕ) = OD<sub>630</sub> в опыте и OD<sub>630</sub> в контрольных образцах. Оптическая плотность контрольных образцов 0,05 – это плотность питательного бульона.

\*\* Представленные результаты получены в трех независимых экспериментах,  $p < 0,05$  (U – критерий Манна–Уитни).



**Рис. 2.** Распределение клонов в популяции *S. aureus* 918 по биопленкообразованию (БПО)

лококков, так называемых SSCV<sub>s</sub>, не изучалась. Инфекции, вызванные *S. aureus*, обычно носят острый характер, это эндокардиты, пневмонии, сепсисы [13]. Однако существуют представители этого вида, которые вызывают хронические рецидивирующие инфекции, такие как остеомиелит и кистозный фиброз легких [8]. Некоторые стафилококки могут колонизовать ткани при эндопротезировании, вызывая отторжение эндопротеза [12]. Возбудителями этих инфекций являются атипичные формы стафилококков – SSCV<sub>s</sub>. Они формируются

в результате мутаций и характеризуются сложным плейотропным фенотипом, который объясняют дефектным электронным транспортом [4].

Все 30 штаммов SSCVs, выделенные как субпопуляция среди большого числа колоний с нормальной для *Staphylococcus* морфологией, характеризовались измененной морфологией колоний, замедленным ростом, отсутствием пигментации. У многих из них отсутствовала лецитиназная, фосфатазная, коагулазная и гемолитическая активность. Кроме того, у изученных SSCVs была изменена модель потребления таких углеводов, как сахараза, лактоза, фруктоза, что согласуется с данными литературы и ранее полученными нами результатами [14].

Установлена высокая активность батумина в отношении атипичных форм стафилококков. На большинство представителей SSCVs антибиотик действовал в концентрации 0,25 мкг/мл. Штамм *S. aureus* 71 оказался более устойчивым, его МИК составляла 0,5 мкг/мл. Для исследованных штаммов SCVs *S. aureus*, *S. epidermidis* и *S. haemolyticus*, выращенных на бульоне Мюллера–Хинтона, антистафилококковая активность антибиотика соответствовала таковой на агаризованной среде.

Чувствительность к батумину назальных и кожных клинических изолятов стафилококков была такой же, как у типовых и коллекционных штаммов различных видов рода *Staphylococcus*, изученных нами ранее [8]. При этом эффект действия батумина на формирование биопленки был разным у различных штаммов и видов (табл. 2). Присутствие в среде 0,125 мкг/мл батумина (1/2 МИК) уменьшало образование биопленки у 85 % изученных штаммов *S. aureus*. Следует отметить, что эффективность батумина была выше в отношении штаммов с высокой массой биопленки (величина УЕ между 2,6 и 3,1).

Анализ экспериментальных данных по влиянию батумина на стадии формирования биопленки (табл.3) показал, что эффективность антибиотика зависела от стадии ее формирования у *S. aureus*. Внесение батумина в питательную среду одновременно с культурой способствовало снижению значений биопленкообразования у всех исследуемых штаммов стафилококков. Сформированная биопленка была более резистентна к исследуемому препарату.

Закономерность, отражающая нарушение биопленкообразования стафилококков под влиянием батумина, была подтверждена популяционным анализом исследуемых штаммов. Под действием антибиотика происходило перераспределение клональной структуры популяции эталонного штамма *S. aureus* УКМ В-918. В контроле (без батумина) популяция содержала 35 % клонов со значениями биопленкообразования менее 1,5 ед., 30 % – с показателями в диапазоне 1,5–2,5 ед. и 35 % – со значениями более 2,5 ед. Инкубирование культуры совместно с батумином приводило к изменению популяционной структуры штамма (рис.2), в сравнении с контролем: увеличивалась численность вариантов с низкими значениями биопленкообразования (50 % клонов), снижалась доля диссоциантов с высокими (20 %) и средними (15 %) значениями биопленкообразования и появлялись клоны с нетипичным фенотипом – не обладающие способностью образовывать биопленки (15 %).

Популяция клинического изолята *S. aureus* 104 в контроле также была представлена клонами с различной степенью выраженности признака: 20 % диссоциантов с низкими значениями биопленкообразования, 35 % – со средними и 45 % – с высокими значениями. При соинкубировании стафилококков с батумином отмечалась диссоциация популяции бактерий, в результате которой, наряду с появлением вариантов (20 %), не обладающих способностью образовывать биопленки, происходило увеличение доли диссоциантов (35 %)

Таблица 3. Влияние батумина на этапы формирования биопленок у *Staphylococcus aureus*

Штамм	Формирование биопленки без батумина		Формирование биопленки при одновременном внесении батумина с инокулятом		Формирование биопленки при внесении батумина					
					после 90 мин		после 24 ч		после 48 ч	
	Оптическая плотность (OD <sub>630</sub> )	УЕ*	Оптическая плотность (OD <sub>630</sub> )	УЕ*	Оптическая плотность (OD <sub>630</sub> )	УЕ*	Оптическая плотность (OD <sub>630</sub> )	УЕ*	Оптическая плотность (OD <sub>630</sub> )	УЕ*
<i>S. aureus</i> 918 (ATCC 25923)	0,132	2,6	0,097	1,9	0,081	1,6	0,135	2,7	0,164	3,3
<i>S. aureus</i> 3	0,155	3,1	0,074	1,5	0,153	3,0	0,155	3,1	0,153	3,1
<i>S. aureus</i> 17	0,137	2,7	0,095	1,9	0,099	2,0	0,105	3,1	0,135	2,7
<i>S. aureus</i> 24	0,140	2,8	0,102	2,0	0,140	2,8	0,169	3,4	0,142	2,8
<i>S. aureus</i> 28a	0,133	2,7	0,090	1,8	0,156	3,1	0,161	3,2	0,161	3,2
<i>S. aureus</i> 35	0,130	2,6	0,094	1,9	0,103	2,1	0,130	2,6	0,130	2,6
<i>S. aureus</i> 39	0,138	2,8	0,071	1,4	0,085	1,7	0,084	1,7	0,077	1,5
<i>S. aureus</i> 68	0,132	2,6	0,095	1,9	0,097	1,9	0,097	1,9	0,093	1,9
<i>S. aureus</i> 89-a	0,148	3,0	0,079	1,6	0,097	1,9	0,089	1,8	0,147	2,9
<i>S. aureus</i> 121	0,133	2,7	0,093	1,9	0,101	2,0	0,101	2,0	0,155	3,1
<i>S. aureus</i> 144	0,131	2,6	0,087	1,7	0,094	1,9	0,088	1,8	0,085	1,7
<i>S. aureus</i> 159	0,142	2,8	0,085	1,7	0,141	2,8	0,183	3,7	0,140	2,8

с низким уровнем биопленкообразования. Кроме того, в популяции отмечалось снижение доли клонов со средними (20 %) и высокими (25 %) значениями биопленкообразования.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о том, что антибиотик батумин является высокоактивным антистафилококковым агентом, ингибирующим все известные до настоящего времени виды стафилококков и макрококки независимо от источника их выделения и чувствительности к антибиотикам. МИК батумина составляла 0,25 и 0,5 мкг/мл. Природа избирательности его действия, по-видимому, связана с особенностями обмена стафилококков, отличающими их от других близкородственных микроорганизмов. Исходя из полученных данных о действии батумина на липиды стафилококка [15], можно предположить, что эти отличия связаны со спецификой жирнокислотного обмена бактерий рода *Staphylococcus*.

Одной из важных характеристик батумина является нарушение биопленкообразования у стафилококков. Присутствие в среде 0,125 мкг/мл батумина (1/2 МИК) уменьшало образование биопленки у 85 % изученных штаммов *S. aureus*. Следует отметить, что эффективность батумина была выше в отношении штаммов с высокой массой биопленки (величина УЕ между 2,6 и 3,1).

Закономерность, отражающая нарушение биопленкообразования у стафилококков под влиянием батумина, была также подтверждена популяционным анализом исследуемых штаммов.

Полученные данные объясняют один из механизмов антимикробной активности батумина, основанный на ингибировании образования биопленки у стафилококков.

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Frank K.L., Reichert E.J., Piper K.E., Patel R. In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007. **51**. P. 888–895. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.01052-06>
2. Kiprianova E.A., Klochko V.V., Zelena, L.B., Churkina L.N., Avdeeva L.V. *Pseudomonas batumici* sp.nov., the antibiotic-producing bacteria isolated from soil of the Caucasus Black Sea coast. *Мікробіол. журн.* 2011. **73**, № 5. С. 3–8.
3. Churkina L., Kiprianova E., Bidnenko S., Marchenko K., Artysyuk E. Antibiotic batumin for diagnostics of staphylococci and treatment of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Lik. Sprava.* 2009. № 1-2. P. 61–67.
4. McNamara P.J., Proctor R.A. *Staphylococcus aureus* small colony variants, electron transport and persistent infections. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2000. **14**. P. 117–122. doi: [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(99\)00170-3](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00170-3)
5. Бухарин О.В., Чуркина Л.Н., Перунова Н.Б., Иванова Е.В., Новикова И.В., Авдеева Л.В., Ярошенко Л.В. Влияние антистафилококкового антибиотика батумина на биопленкообразование микроорганизмов. *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2012. № 2. С. 8–12.
6. Boutiba-Ben Boubaker I., Ben Abbes R., Ben Abdallah H., Mamlouk K., Mahjoubi F., Kammoun A., Hammami A., Ben Redjeb S. Evaluation of a ceftazidime disk diffusion test for the routine detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004. **10**, № 8. P. 762–765. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00919.x>
7. Vaneechoutte M., Boerlin P., Tichy H.V., Bannerman E., Jäger B., Bille J. Comparison of PCR-based DNA fingerprinting techniques for the identification of *Listeria* species and their use for atypical *Listeria* isolates. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1998. **48**. P. 127–139.
8. Churkina L.N., Bidnenko S.I., Lopes dos Santos Santiago G., Vaneechoutte M., Avdeeva L.V., Lutko O.B., Oserjanskaja N.M. Application of the antibiotic batumin for accurate and rapid identification of staphylococcal small colony variants. *BMC Res. Notes.* 2012. **5**. P. 374–378. doi: <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-374>

9. Vandepitte J., Engback K., Piot P., Heuck C. Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology. Geneva: WHO Library, 1991. 121 p.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: fifteenth informational supplement. NCCLS document M 100 – S 15. Wayne, PA, USA, 2005. 165 p.
11. O'Tool G.A., Kaplan A.N., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *An. Rev. Microbiol.* 2000. 4. P. 49–76. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>
12. Бідненко С.І., Лютко О.Б., Озерянська Н.М., Чуркіна Л.Н. Мікрофлора навколопротезних тканин за асептичної нестабільності ендопротезу кульшового суглоба та особливості її чутливості до антибіотиків. *Biomed. Biosocial Anthropol.* 2010. 15. С. 87–91.
13. Lewis T., Chaudhry R., Nightingale P., Lambert P., Das I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: epidemiology, outcome, and laboratory characteristics in a tertiary referral center in the UK. *Int. J. Infect. Dis.* 2010. 15. P. 131–135.
14. Чуркіна Л.Н., Бідненко С.І., Макушенко А.С., Ванечутте М., Лютко О.Б., Озерянська Н.М., Авдеева Л.В. Характеристики атипичних форм стафілококков (SCVs), виділених від больних остеомієлітом. *Антибіотики і хіміотерапія.* 2010. 55, № 5-6. С. 36–40.
15. Lee V.E., O'Neill A.J. Batumin does not exert its antistaphylococcal effect through inhibition of aminoacyl-tRNA synthetase enzymes. *J. Antimicrob. Agents.* 2016. 49, Iss. 1. P. 121–122.

Поступило в редакцію 15.06.2017

## REFERENCES

1. Frank, K. L., Reichert, E. J., Patel, R. & Piper, K. E. (2007). In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51, pp. 888-895. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.01052-06>
2. Kiprianova, E. A., Klochko, V. V., Zelena, L. B., Churkina, L. N. & Avdeeva, L. V. (2011). *Pseudomonas batumici* sp. nov., the antibiotic-producing bacteria isolated from soil of the Caucasus Black Sea coast. *Microbiol. J.*, 73, No. 5, pp. 3-8.
3. Churkina, L., Kiprianova, E., Bidnenko, S., Marchenko, K. & Artysyuk, E. (2009). Antibiotic batumin for diagnostics of staphylococci and treatment of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Lik Sprava*, No. 1-2, pp. 61-67.
4. McNamara, P. J. & Proctor, R. A. (2000). *Staphylococcus aureus* small colony variants, electron transport and persistent infections. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 14, pp. 117-122. doi: [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(99\)00170-3](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00170-3)
5. Bukharin, O. V., Churkina, L. N., Perunova, N. B., Ivanova, E. V., Novikova, I. V., Avdeeva, L. V. & Yaroshenko, L. V. (2012). Influence of antistaphylococcal antibiotic batumin on microorganism biofilm formation. *Zh. Mikrobiol., Epidemiol., Immunobiol.*, No. 2, pp. 8-12 (in Russian).
6. Boutiba-Ben Boubaker, I., Ben Abbes, R., Ben Abdallah, H., Mamlouk, K., Mahjoubi, F., Kammoun, A., Hammami, A. & Ben Redjeb, S. (2004). Evaluation of a cefoxitin disk diffusion test for the routine detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Infect.*, 10, No. 8, pp. 762-765. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00919.x>
7. Vanechoutte, M., Boerlin, P., Tichy, H. V., Bannerman, E., Jäger, B. & Bille, J. (1998). Comparison of PCR-based DNA fingerprinting techniques for the identification of *Listeria* species and their use for atypical *Listeria* isolates. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48, pp. 127-139.
8. Churkina, L. N., Bidnenko, S. I., Lopes dos Santos Santiago, G., Vanechoutte, M., Avdeeva, L. V., Lutko, O. B. & Oserjanskaja, N. M. (2012). Application of the antibiotic batumin for accurate and rapid identification of staphylococcal small colony variants. *BMC Res. Notes.*, 5, pp. 374-378. doi: <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-374>
9. Vandepitte, J., Engback, K., Piot, P. & Heuck, C. (1991). Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology. Geneva: WHO Library.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2005). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: fifteenth informational supplement. NCCLS document M 100 – S 15. Wayne, PA, USA.
11. O'Tool, G. A., Kaplan, A. N. & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *An. Rev. Microbiol.*, 4, pp. 49-76. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>

12. Bidnenko, S. I., Lutko, O. B., Oserjanskaja, N. M. & Churkina, L. N. (2010). Microflora of periprosthetic tissues according to aseptic instability of hipendoprosthesis and features of its sensitivity to antibiotics. Biomed. Biosocial Anthropol., 15, pp. 87-91 (in Ukrainian).
13. Lewis, T., Chaudhry, R., Nightingale, P., Lambert, P. & Das, I. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: epidemiology, outcome, and laboratory characteristics in a tertiary referral center in the UK. Int. J. Infect. Dis., 15, pp. 131-135.
14. Churkina, L. N., Bidnenko, S. I., Makushenko, A. S., Vanechoutte, M., Luitko, O. B., Ozeryanskaya, N. M. & Avdeeva, L. V. (2010). Characteristics of atypical forms of staphylococci (SCVs), isolated from patients with osteomyelitis. Antibiotiki i himioterapiya, 55, No. 5-6, pp. 36-40 (in Russian).
15. Lee, V. E. & O'Neill, A. J. (2016). Batumin does not exert its antistaphylococcal effect through inhibition of aminoacyl-tRNA synthetase Int enzymes. J. Antimicrob. Agents., 49, Iss. 1, pp. 121-122.

Received 15.06.2017

Л.Н. Чуркина<sup>1</sup>, М. Ванечотте<sup>2</sup>, Н.Б. Перунова<sup>3</sup>, О.Б. Лютко<sup>4</sup>, Л.В. Ярошенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

<sup>2</sup> Гентський університет, Бельгія

<sup>3</sup> Інститут клітинного і внутрішньоклітинного симбіозу УрВ РАН, Оренбург, Росія

<sup>4</sup> Інститут ортопедії і травматології НАМН України, Київ

E-mail: LNKogut@hotmail.com

#### ДЛЯ АНТИБИОТИКА БАТУМІНУ НА УТВОРЕННЯ БІОПЛІВОК У СТАФІЛОКОКІВ

Антибіотик батумін, який синтезується *Pseudomonas batumici*, показав високу активність відносно типових і референс-штамів, а також клінічних ізолятів 30 різних видів роду *Staphylococcus* (включаючи MRSA і SSCVs). Активність батуміну щодо цих бактерій становила 0,25–0,5 мкг/мл. Досліджено вплив батуміну на формування біоплівки у представників роду *Staphylococcus*. За наявності в середовищі 0,125 мкг/мл батуміну (половина інгібуючої рідт концентрації) зменшувалося утворення біоплівки у 85 % вивчених штамів. Ефективність антибіотика залежала від стадії її формування. Внесення батуміну в поживне середовище одночасно з культурою сприяло зниженню значень біоплівкоутворення в усіх досліджуваних штамів стафілококів. Сформована біоплівка була більш резистентною до антибіотика. Порушення процесу утворення біоплівки під впливом батуміну підтверджено популяційним аналізом досліджуваних штамів стафілококів.

**Ключові слова:** батумін, стафілококи, SSCVs, утворення біоплівки.

L.N. Churkina<sup>1</sup>, M. Vanechoutte<sup>2</sup>, N.B. Perunova<sup>3</sup>, O.B. Luitko<sup>4</sup>, L.V. Yaroshenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Danylo Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine, Kiev

<sup>2</sup> Ghent University, Belgium

<sup>3</sup> Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis Ural Branch of the RAS, Orenburg, Russian Federation

<sup>4</sup> Institute of Traumatology and Orthopedics of the NAMS of Ukraine, Kiev

E-mail: LNKogut@hotmail.com

#### EFFECT OF ANTIBIOTIC BATUMIN ON THE BIOFILM FORMATION IN STAPHYLOCOCCI

Antibiotic batumin produced by *Pseudomonas batumici* has shown high activity against the type and reference strains and clinical isolates of 30 different species of the genus *Staphylococcus* (including MRSA and SSCVs). Batumin activity against these bacteria was 0.25–0.5 µg/ml. Batumin influence upon the biofilm formation by representatives of genus *Staphylococcus* has been studied. Presence of 0.125 µg /ml of batumin in the medium decreased the biofilm formation in 85 % of studied strains. Antibiotic effectiveness depended on the stage of its formation. Entry of batumin into the medium simultaneously with the bacterial culture promoted a decrease of the biofilm formation in all studied strains of staphylococci. The formed biofilm was more resistant to antibiotic. Breach of process of biofilm formation under the batumin influence was confirmed by the population analysis of studied staphylococci strains.

**Keywords:** batumin, staphylococci, SSCVs, biofilm formation.