

Оценка способности штаммов *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus haemolyticus* образовывать моно- и бинарные биопленки на абиотическом субстрате в эксперименте

С.В.Титова, А.С.Анисимова, Н.В.Аронова

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Стафилококки – условно-патогенные микроорганизмы, которые колонизируют органы и ткани здорового человека, образуя биопленки. Некоторые виды стафилококков имеют различные факторы патогенности и играют значительную роль в развитии патологических процессов.

Цель работы. Сравнительная оценка способности штаммов *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus haemolyticus* образовывать моно- и бинарные биопленки на абиотических субстратах в эксперименте.

Материалы и методы. Исследованы штаммы разных видов *Staphylococcus*, выделенные от больных с внебольничной пневмонией. Формирование моно- и бинарных биопленок изучали на разных абиотических субстратах (полистирол и стекло), питательных средах согласно общепринятой и авторской методикам.

Результаты. Штаммы *S. aureus* и *S. haemolyticus* в ранние сроки (через сутки) образуют моно- и бинарные биопленки на абиотических субстратах. Биопленкообразование в бульонных средах (мясо-пептонный бульон и LB-бульон) было идентичным. Скорость размножения *S. aureus* выше, чем *S. haemolyticus*, с первых часов культивирования. Уменьшение степени биопленкообразования через 48 ч культивирования свидетельствует о возможном лизисе части популяции клеток и десорбции биопленки, в то же время продолжительная жизнеспособность (до 14 дней, срок наблюдения) *S. aureus* и *S. haemolyticus* свидетельствует о возможном сохранении их на медицинских объектах. Морфологические отличия биопленок *S. aureus*, связанные с формированием конгломератов, а также большая степень биопленкообразования подтверждает их патогенетическую особенность.

Заключение. С помощью двух бактериологических методов охарактеризовано биопленкообразование по его степени и морфологии биопленок, жизнеспособности стафилококков двух видов в моно- и бинарных биопленках. Способность к биопленкообразованию свидетельствует о возможном сохранении *S. aureus* и *S. haemolyticus* на медицинских объектах, включая катетеры, имплантаты, что наносит существенный урон здоровью человека.

Ключевые слова: *Staphylococcus*, биопленка, 96-луночные планшеты, покровные стекла

Для цитирования: Титова С.В., Анисимова А.С., Аронова Н.В. Оценка способности штаммов *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus haemolyticus* образовывать моно- и бинарные биопленки на абиотическом субстрате в эксперименте. Бактериология. 2025; 10(2): 50–59. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-50-59

Evaluation of the ability of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus haemolyticus* strains to form mono- and binary biofilms on an abiotic substrate in an experiment

S.V.Titova, A.S.Anisimova, N.V.Aronova

Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation

Staphylococci are opportunistic microorganisms that colonize organs and tissues of healthy humans, forming biofilms. Some staphylococci species have different pathogenicity factors and play a significant role in the development of pathological processes.

The aim of the work is to comparatively evaluate the ability of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus haemolyticus* strains to form mono- and binary biofilms on abiotic substrates in an experiment.

Materials and methods. Strains of different *Staphylococcus* species isolated from patients with community-acquired pneumonia were studied. The formation of mono- and binary biofilms was studied on different abiotic substrates (polystyrene and glass), nutrient media, according to generally accepted and original methods.

Для корреспонденции:

Титова Светлана Викторовна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40

Статья поступила 18.12.2024, принята к печати 30.06.2025

For correspondence:

Svetlana V. Titova, PhD, MD, Leading Researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-plague Institute of Rospotrebnadzor

Address: 117/40 M.Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation

The article was received 18.12.2024, accepted for publication 30.06.2025

Results. *S. aureus* and *S. haemolyticus* strains form mono- and binary biofilms on abiotic substrates at early stages (after 24 hours). Biofilm formation in broth media (MPB and LB) was identical. The reproduction rate of *S. aureus* is higher than that of *S. haemolyticus* from the first hours of cultivation. A decrease in the degree of biofilm formation (BP) after 48 hours of cultivation indicates possible lysis of a part of the cell population and desorption of the biofilm, while long-term viability (up to fourteen days, observation period) of *S. aureus* and *S. haemolyticus* indicates their possible preservation at medical facilities. Morphological differences in *S. aureus* biofilms associated with the formation of conglomerates, as well as a high degree of biofilm formation confirm their pathogenetic feature.

Conclusion. Using two bacteriological methods, biofilm formation was characterized by the degree of BP and biofilm morphology, the viability of two types of staphylococci in mono- and polybiofilms. The ability to form biofilms indicates the possible preservation of *S. aureus* and *S. haemolyticus* on medical objects, including catheters, implants, which causes significant damage to human health.

Key words: *Staphylococcus*, biofilm, 96-well plates, cover glasses

For citation: Titova S.V., Anisimova A.S., Aronova N.V. Evaluation of the ability of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus haemolyticus* strains to form mono- and binary biofilms on an abiotic substrate in an experiment. Bacteriology. 2025; 10(2): 50–59. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-2-50-59

Стафилококки являются возбудителями оппортунистических воспалительных заболеваний. Их относят к условно-патогенным микроорганизмам, которые колонизируют органы и ткани здорового человека, образуют биопленки. Некоторые виды характеризуются наличием факторов патогенности и при определенных условиях могут играть значительную роль в развитии различных патологических процессов. Более того, присутствие генов антибиотикорезистентности у стафилококков наносит колоссальный вред здравоохранению. Частота послеоперационных осложнений, вызванных метициллин-устойчивыми *Staphylococcus aureus*, достигает 33% [1, 2].

По способности коагулировать плазму крови стафилококки подразделяют на две группы: коагулазоположительные и коагулазоотрицательные стафилококки (КОС). Наиболее патогенным видом является золотистый стафилококк (*S. aureus*), принадлежащий к коагулазоположительной группе и обладающий широким набором факторов вирулентности, обеспечивающих ему адгезию, инвазию, формирование биопленок, продукцию токсинов, а также способствующих подавлению иммунного ответа человека [3–6]. *S. aureus* может вызывать пищевое отравление, пневмонию, менингит, остеомиелит, эндокардит, синдром токсического шока, сепсис, инфекции, обусловленные имплантированными медицинскими устройствами (с образованием на них биопленок), а также является частой причиной внутрибольничных инфекций, вызывая послеоперационные раневые инфекции [7–9].

КОС являются представителями нормальной микрофлоры кожи и слизистых оболочек человека, в частности, на 1 см² кожи здорового взрослого человека находится от 10 до 10⁵ колониеобразующих единиц (КОЕ) [10]. В то же время они могут быть причиной госпитальных (нозокомиальных) инфекций [11, 12]. Наиболее часто встречающиеся клинически значимые представители КОС – виды *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus haemolyticus* [13, 14]. Одним из важных факторов патогенности этих бактерий является способность создавать устойчивые биопленки на абиотических и биотических поверхностях [15–17], что создает трудности в лечении этих инфекций и опасность устойчивой контаминации ими медицинских приборов, инструментов и внутренней среды госпиталей [8, 18–22]. На сегодняшний день в инфекционной патологии человека возрастает роль *S. haemolyticus*, с которым ассоциируют такие инфекции, как

бактериемия, менингит, инфекции глаз, кожи, мочевыводящих путей и перитонит [23]. Более того, гемолитический стафилококк характеризуется высокой степенью антибиотикорезистентности, большинство его клинических изолятов устойчивы к широкому спектру антибактериальных препаратов [24]. Во всех экологических нишах и в организме человека в основном встречаются смешанные биопленки, в которых выстраиваются взаимоотношения бактерий синергического или антагонистического поведения [25, 26]. В связи с повсеместным распространением полибиопленок взаимоотношения между бактериями приобретают синергический характер.

Цель работы – сравнительная оценка способности штаммов *S. aureus* и *S. haemolyticus* образовывать моно- и бинарные биопленки на абиотических субстратах в эксперименте.

Материалы и методы

Исследованы штаммы *S. aureus* (A4674, I9773) и *S. haemolyticus* (A399, 44760), выделенные из мокроты больных с внебольничными пневмониями в период 2020–2022 гг. на базе ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора. Культуры были изолированы в диагностически значимых количествах ($\geq 10^5$ КОЕ/мл) бактериологическим методом с помощью посева на питательные среды в соответствии с регламентирующими документами [27, 28].

Видовую идентификацию штаммов проводили с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) с использованием масс-спектрометра Autoflexspeed III (BrukerDaltonics, Германия) и программного обеспечения MALDI Biotyper. Показатели полученных масс-спектров сравнивали с базой данных компании Bruker версия 3.1.66 (BrukerDaltonics, Германия). Значения Score 2,3–3,0 оценивали как высокую вероятность видовой идентификации. Подготовку образцов для исследования выполняли методом прямого нанесения материала на мишень в соответствии с инструкцией к прибору.

Формирование биопленок изучали на абиотических субстратах (полистирол и стекло), бульонных питательных средах (мясо-пептонный бульон (МПБ) и LB-бульон), исходная концентрация клеток стафилококков составляла 10⁷ КОЕ/мл. Согласно методу O'Tool G. et al. (2000), оценивали способ-

ность клеток *Staphylococcus* к адгезии на полистироловой поверхности планшета с окрашиванием их генцианвиолетом [29], бинарные биопленки состояли из смеси штаммов *S. aureus* и *S. haemolyticus*. Для адгезии использовали плоскодонные 96-луночные полистироловые планшеты. Суспензии готовили из суточных агаровых культур по отраслевому стандарту мутности Государственного НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича (ОСО-42-25-59-86П) или по показаниям прибора Densi-La-Meter. Далее с помощью последовательных 10-кратных разведений доводили до концентрации 10^7 КОЕ/мл, вносили по 200 мкл в полистироловые лунки планшета, измеряли исходную оптическую плотность (ОП), величина которой являлась стартовой. В качестве отрицательного контроля использовали лунки со стерильными питательными средами (МПБ и LB). Планшеты с экспериментальными и контрольными пробами культивировали в условиях влажной камеры при 37°C в течение 24 и 48 ч. Через 2, 4, 6, 24, 48 ч количество инокулированных планктонных клеток подсчитывали на регистрирующем фотометре InfiniteF50 (Tecan, Австрия) при длине волны 620 нм и выражали в условных единицах ОП. Оценивали интенсивность прироста (ИП) бактериальной суспензии по формуле [30]:

$$\text{ИП} = \text{ОП}_{24} : \text{ОП}_0,$$

где ОП_{24} – оптическая плотность суспензии бактерий через 24 ч культивирования,

ОП_0 – исходная оптическая плотность.

Значения ИП в контрольных средах были равны ≤ 1 . Интенсивность прироста оценивали следующим образом: если полученное значение ИП составляло от 1 до 2 – прирост отсутствовал, от 2 до 3 – незначительный/сомнительный, от 3 – высокий/значительный прирост.

Для определения способности штаммов формировать биопленку сначала определяли контрольное значение (ОПК), за которое принимали минимальное значение ОП контрольных лунок, превышение которого можно интерпретировать как способность к формированию биопленок (степень биопленкообразования). Для расчета использовали формулу [31]:

$$\text{ОПК} = M_{\text{cp}} (\text{ОП лунок контроля}) + 3 \times \sigma (\text{ОП лунок контроля}),$$

где M_{cp} – среднее арифметическое значение ОП контрольной лунки,

σ – среднее квадратичное (стандартное) отклонение контрольных значений.

На основании полученных на спектрофотометре данных для каждого штамма рассчитывали среднее арифметическое значение ОП. Оценивали степень биопленкообразования по значениям ОП окрашенного растворителя (спирт) согласно формуле [32]. При $\text{ОП} \geq 4$ ОПК биопленкообразование считали высоким; 2-4 ОПК – умеренным; ≤ 2 ОПК – низким; ≤ 1 ОПК – отсутствует.

Для визуализации биопленки использовали методы световой и люминесцентной микроскопии и покровные стекла, на которых адгезированные клетки *Staphylococcus* формировали биопленки. Жизнеспособность планктонной и биопленочной форм *Staphylococcus* учитывали по наличию роста на мясо-пептонном агаре (МПА) и молочном агаре. Для этого покровные стекла изымали из флаконов, удерживая их в вертикальном положении помещали на листы филь-

тровой бумаги, расположенные в чашке Петри, для удаления с поверхности оставшейся жидкости. После этого стекла накладывали на поверхность агара, отпечатывали с одной и другой стороны на агаровой пластине, оставляли в термостате при 37°C и на следующие сутки регистрировали наличие роста колоний, который свидетельствовал о жизнеспособности культуры. Второе стекло помещали на предметное стекло, добавляли раствор акридинового оранжевого в концентрации 20 мкг/мл (прижизненное флуорохромирование), накрывали покровным стеклом большего размера и исследовали методом люминесцентной микроскопии. Для световой микроскопии использовали фиксированные микропрепараты с двойным окрашиванием (Конго красным – 15 мин, затем генцианвиолетом – 10 мин) [33].

Все этапы работы с микроорганизмами проводили с соблюдением требований биологической безопасности согласно СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Статистический анализ выполняли с использованием программы Medstatistica.ru. Полученные данные объединяли в вариационные ряды, на основании которых проводили расчет средних арифметических величин (M). В качестве ошибки среднего представляли стандартное отклонение (σ). Статистическую значимость различий экспериментальных данных оценивали с помощью критерия Стьюдента, при уровне значимости $p \leq 0,05$ достоверность считали значимой.

Результаты

В течение первых часов культивирования стафилококков в МПБ было отмечено нарастание концентрации штаммов *S. aureus* через 2 ч, а *S. haemolyticus* – через 4 ч. Через 6 ч концентрация клеток штаммов *S. aureus* превышала концентрацию *S. haemolyticus* примерно в 2 раза. При культивировании в LB-бульоне скорость размножения штаммов *S. aureus* через 6 ч примерно в 2 раза превышала *S. haemolyticus*, что выражалось в разных значениях динамики роста концентрации, представленной на рис. 1.

При культивировании в МПБ в течение 2 суток концентрации *S. aureus* и *S. haemolyticus* колебались в пределах значений ОП 0,35–0,41 и 0,23–0,31 соответственно; при культивировании в LB-бульоне концентрация клеток стафилококков была выше, чем в МПБ, значения ОП колебались в пределах 0,45–0,5 и 0,22–1,28 соответственно. При статистической обработке результатов различий между ИП концентрации *S. aureus* и *S. haemolyticus* в МПБ и LB-бульоне за 24 ч не выявлены ($t_{\text{st}} = 0,0$; $p = 1,000$; $t_{\text{st}} = 1,04$; $p = 0,326$).

Через 48 ч во всех экспериментальных пробах концентрация клеток штаммов *Staphylococcus* разных видов была от 0,2 до 0,78 ОП, соответственно показатель ИП был >3 (табл. 1), что соответствовало значительной степени интенсивности прироста концентрации стафилококков в отличие от контрольных проб, концентрация клеток которых составляла 0,05 ОП и не менялась в течение периода наблюдения. Было отмечено незначительное колебание концентраций *Staphylococcus* в пробах на МПБ. Так, концентрация клеток двух штаммов *S. aureus* и *S. haemolyticus* A399 незначительно уменьшалась, в пробе со штаммом *S. haemolyticus* 44760, наоборот, отмече-

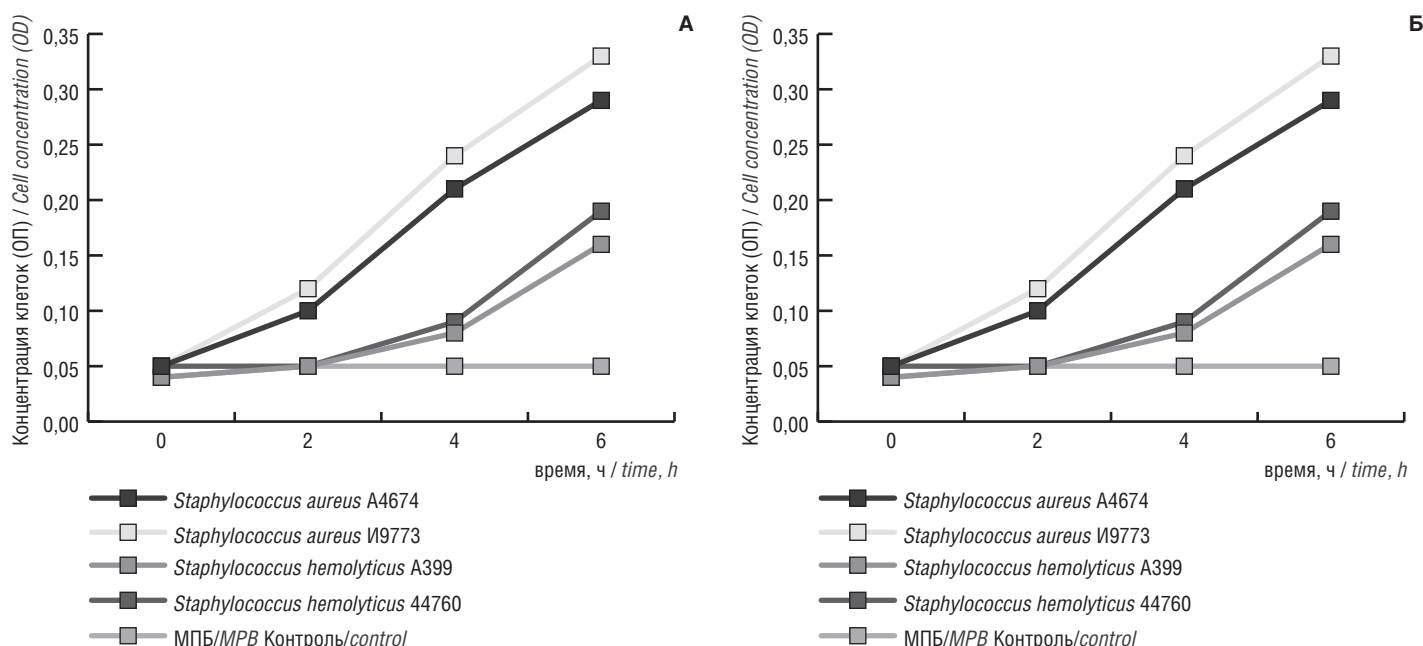


Рис. 1. Динамика нарастания концентрации клеток *S. aureus* и *S. haemolyticus* в первые часы культивирования в МПБ (А) и LB-бульоне (Б).

Fig. 1. Dynamics of increase in the concentration of *S. aureus* and *S. haemolyticus* cells in the first hours of cultivation in MPB (A) and LB broths (B).

но увеличение его концентрации. В пробах, культивируемых в LB-бульоне, концентрация клеток штаммов *S. aureus* и *S. haemolyticus* 44760 незначительно увеличилась. В то же время в пробах со штаммом *S. haemolyticus* A399 отмечено

снижение концентрации клеток (рис. 1). Таким образом, отмечена большая концентрация клеток стафилококков в пробах при культивировании в LB-бульоне по сравнению с пробами, культивируемыми в МПБ, за 48 ч культивирования. Однако

Таблица 1. Средняя концентрация клеток штаммов *Staphylococcus* разных видов в питательных средах – МПБ и LB-бульоне – через 24 и 48 ч

Table 1. Average concentration cells of *Staphylococcus* strains of different species in nutrient media – MPB and LB broth after 24 and 48 hours

	Рост бактерий в питательных средах (ОП) / Bacterial growth in nutrient media (OD)									
	МПБ / MPB					LB				
	<i>S. aureus</i>		<i>S. haemolyticus</i>		Контроль / Control	<i>S. aureus</i>		<i>S. haemolyticus</i>		Контроль / Control
	A 4674	I 9773	A 399	44760	МПБ MPB	A 4674	I 9773	A 399	44760	LB
0 ч роста / 0 h of growth	0,05 ± 0,0	0,05 ± 0,0	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,0	0,05	0,05 ± 0,0	0,04 ± 0,0	0,04 ± 0,0	0,04 ± 0,0	0,04
24 ч роста / 24 h of growth	0,35 ± 0,04	0,41 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,23 ± 0,01	0,05	0,5 ± 0,07	0,45 ± 0,05	1,28 ± 0,14	0,22 ± 0,0	0,04
Степень ИП / Degree of GR	7,0 Значительная / significant	8,2 Значительная / significant	6,2 Значительная / significant	4,6 Значительная / significant	1 Отсутствие / absence	10,0 Значительная / significant	11,25 Значительная / significant	32,0 Значительная / significant	5,5 Значительная / significant	1 Отсутствие / absence
48 ч роста / 28 h of growth	0,32 ± 0,03	0,32 ± 0,02	0,2 ± 0,01	0,321 ± 0,02	0,05	0,57 ± 0,11	0,51 ± 0,08	0,78 ± 0,15	0,34 ± 0,16	0,04
Степень ИП / Degree of GP	6,4 Значительная / significant	6,4 Значительная / significant	5,0 Значительная / significant	6,4 Значительная / significant	1 Отсутствие / absence	11,4 Значительная / significant	12,75 Значительная / significant	19,5 Значительная / significant	8,5 Значительная / significant	1 Отсутствие / absence

ИП = ОП24(48)/ОП0; 1 – отсутствовал прирост; 1–2 – слабый; >2 – значительный. / GR (growth rate) = OD24(48)/OD0; 1 – no growth; 1–2 – weak; >2 – significant.

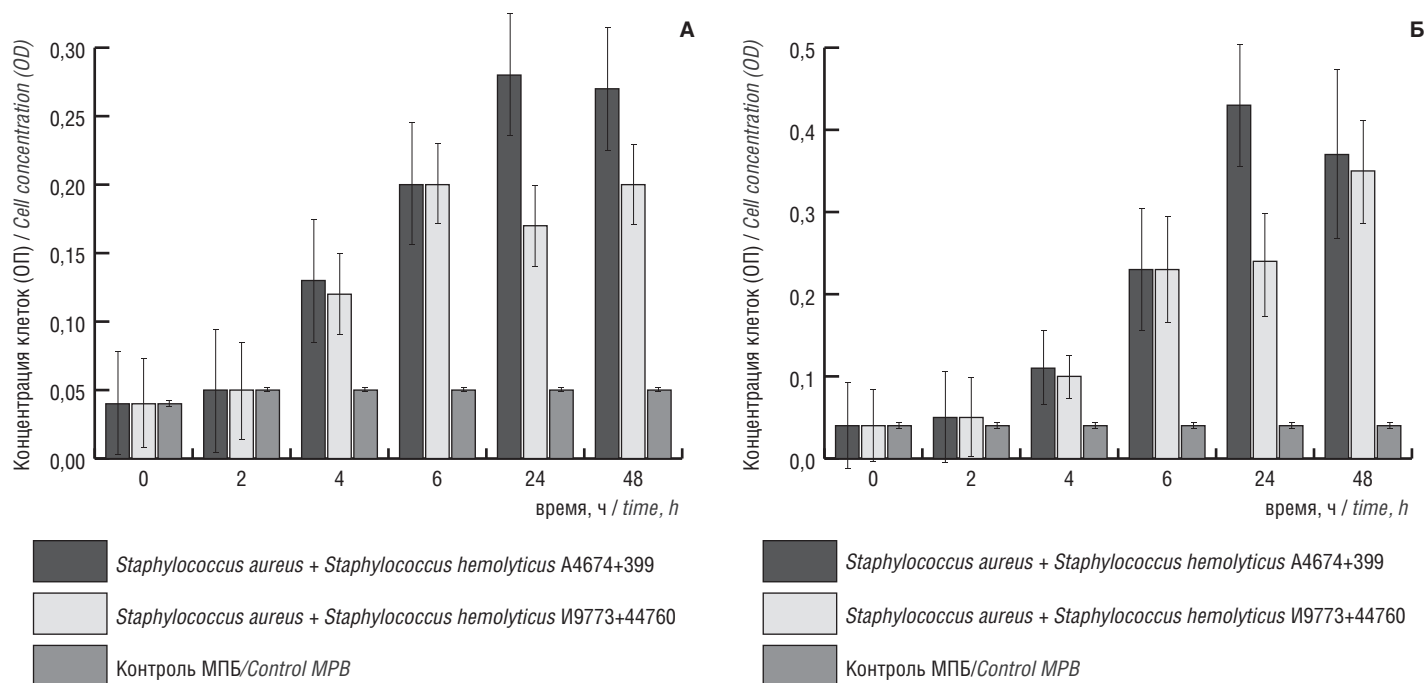


Рис. 2. Динамика нарастания концентрации клеток смеси *S. aureus* и *S. haemolyticus* в МПБ (А) и LB-бульоне (В).
Fig. 2. Dynamics of the increase in the concentration of cells of a mixture of *S. aureus* and *S. haemolyticus* in MPB (A) and LB broths (B).

при таком колебании концентрации после статистической обработки результатов различия между ИП концентрации *S. aureus* и *S. haemolyticus* в МПБ и LB-бульоне через 48 ч не выявлены ($t_{st} = 0,24$; $p = 0,818$; $tSt = 0,32$; $p = 0,759$).

При совместном культивировании двух стафилококков разных видов в одной пробе в МПБ и LB-бульоне (рис. 2) происходило динамичное увеличение концентрации клеток в течении 24 ч. Через сутки суммарная концентрация клеток двух стафилококков (по данным ОП) в пробе колебалась в пределах 0,18–0,28 и 0,24–0,42 при культивировании в МПБ и LB-бульоне соответственно. В то же время отмечен незна-

чительный спад концентрации в пробе со штаммами *S. aureus* I9773 и *S. haemolyticus* 44760 после культивирования в МПБ к 24 ч с последующим подъемом. Через 48 ч от начала культивирования суммарная концентрация клеток стафилококков в паре *S. aureus* A4674 и *S. haemolyticus* 399 снижалась до значений 0,28 ОП (МПБ) и 0,38 ОП (LB), в паре *S. aureus* I9773 и *S. haemolyticus* 44760 – продолжала повышаться, но не превысила концентрацию первой пары.

При совместном культивировании штаммов стафилококков разных видов в одной пробе скорость их размножения в LB-бульоне превышала таковую в МПБ.

Таблица 2. Оценка способности биопленкообразования на поверхности пластика штаммами *S. aureus* и *S. haemolyticus*
Table 2. Evaluation of the ability of biofilm formation on the surface of plastic by strains of *S. aureus* and *S. haemolyticus*

	Оценка биопленкообразования / Assessment of biofilm formation									
	МПБ /MPB					LB				
	<i>S. aureus</i>		<i>S. haemolyticus</i>		Контроль / Control	<i>S. aureus</i>		<i>S. haemolyticus</i>		Контроль / Control
	A4674	I9773	A399	44760	МПБ	A4674	I9773	A399	44760	LB
24 ч роста, ОП / 24 h of growth, OD	0,13 ± 0,03	0,11 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,05 ± 0,1	0,09 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,0
СтБП / BFD	Умеренная / moderate	Умеренная / moderate	Низкая / low	Низкая / low		Умеренная / moderate	Умеренная / moderate	Низкая / low	Низкая / low	
48 ч роста, ОП / 48 h of growth, OD	0,06 ± 0,0	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,0	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,0	0,08 ± 0,0	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,0	0,15 ± 0,02	0,04 ± 0,0
СтБП / BFD	Низкая / low	Низкая / low	Низкая / low	Низкая / low		Низкая / low	Низкая / low	Низкая / low	Умеренная / moderate	

1) СтБП – степень биопленкообразования; 2) ОПк = $\text{ХсрОПк} + 3\text{хСПк}$; где СПк – среднееквадратичное отклонение;
3) ОП ≤ ОПк – отсутствует; ОПк < ОП ≤ 2ОПк – низкая; 2ОПк < ОП ≤ 4ОПк – умеренная; ОП > 4ОПк – значительная;
1) BFD – degree of biofilm formation; 2) ODc = $M \text{ ODc} + 3 \times \sigma$; σ – standard deviation
3) OD ≤ ODc – absent; ODc < OD ≤ 2ODc – low; 2ODc < OD ≤ 4ODc – moderate; OD > 4ODc – significant.

Таблица 3. Оценка способности штаммов формировать бинарные биопленки на поверхности пластика
Table 3. Evaluation of the ability of strains to form binary biofilms on the surface of plastic

	МПБ / MPB			LB		
	<i>S. aureus</i> + <i>S. haemolyticus</i>			<i>S. aureus</i> + <i>S. haemolyticus</i>		
	A4674 + A399	I9773 + 44760	Контроль / Control	A4674 + A399	I9773 + 44760	Контроль / Control
24 ч роста / 24 h of growth	0,14 ± 0,06	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,1	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,0	0,04 ± 0,0
СтБП / BFD	Умеренная / moderate	Низкая / low		Низкая / low	Низкая / low	
48 ч роста / 48 h of growth	0,05 ± 0,0	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,0	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,0
СтБП / BFD	Низкая / low	Низкая / low		Низкая / low	Низкая / low	

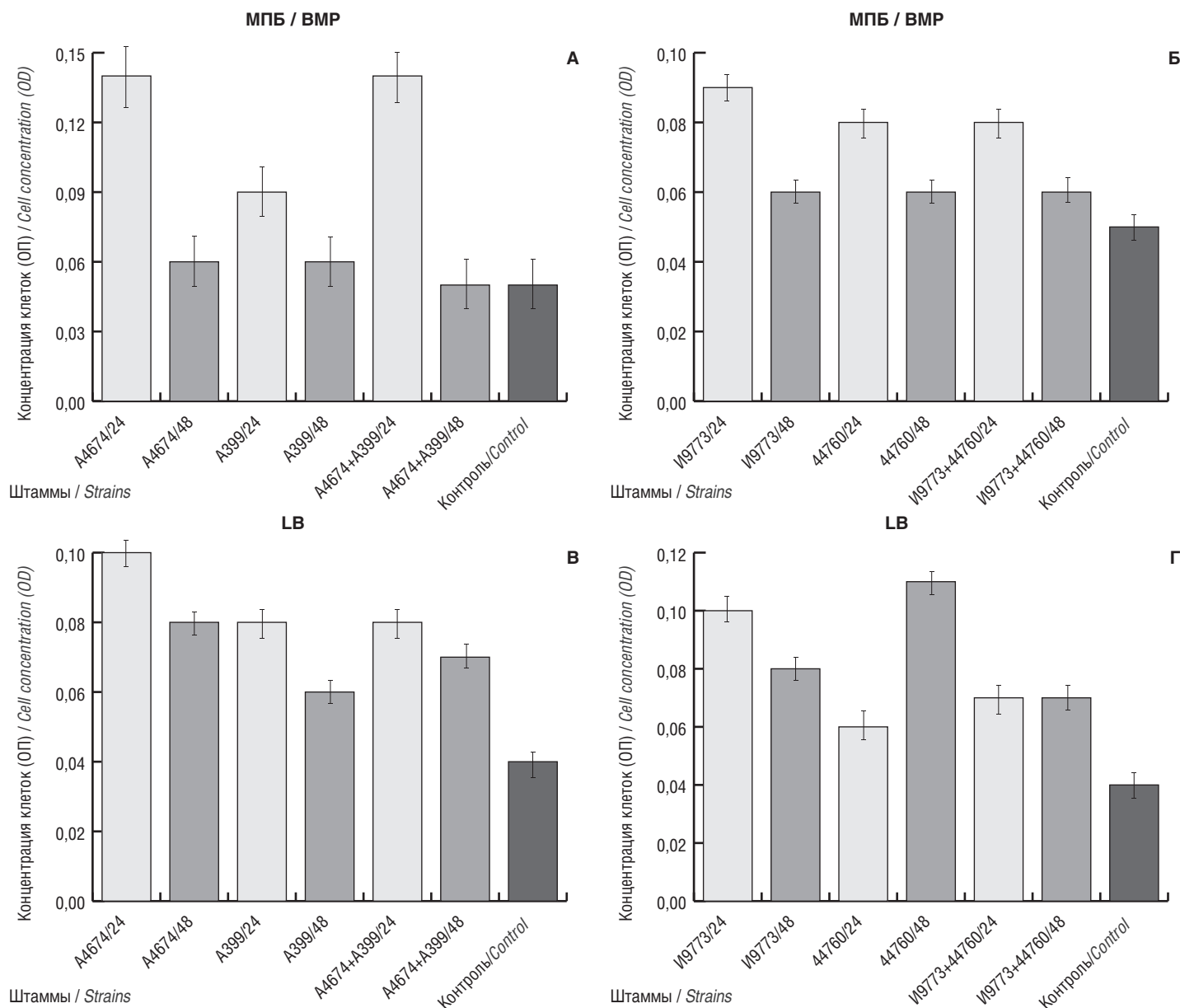


Рис. 1. Динамика нарастания концентрации клеток *S. aureus* и *S. haemolyticus* в первые часы культивирования в МПБ (А) и LB-бульоне (Б).

Fig. 1. Dynamics of increase in the concentration of *S. aureus* and *S. haemolyticus* cells in the first hours of cultivation in MPB (A) and LB broths (B).

При изучении процесса биопленкообразования были использованы те же планшеты с экспериментальными и контрольными пробами, в которых изучали интенсивность роста планктонных форм в МПБ и LB-бульоне через 24 и

48 ч культивирования. По истечении времени определяли показатели ОП образовавшихся биопленок на дне лунок планшета, после пересчета по формуле была определена степень биопленкообразования (табл. 2).

Все штаммы стафилококков, культивируемые в бульонных средах в 96-луночном пластиковом планшете, образовали биопленки через сутки, однако штаммы *S. aureus* имели умеренную, а штаммы *S. haemolyticus* – низкую степень биопленкообразования (табл. 2). Представленные табличные результаты статистически подтверждены значимой связью ($t_{SI} = 3,00$; $p = 0,030$). Через 48 ч культивирования проб на полистироловой панели при 37°C показатели степени биопленкообразования уменьшились. Практически во всех пробах ОП концентрации клеток стафилококков в биопленках через 24 ч была выше, чем через 48 ч культивирования, что, вероятно, связано с десорбцией клеток штаммов *Staphylococcus* из биопленки и переходом их в планктонную культуру. Исключение составил один штамм *S. haemolyticus* 44760, который наиболее активно образовывал биопленку через 48 ч при культивировании в LB-бульоне, ОП биопленкообразования была в 2 раза выше, чем через 24 ч. Обращает внимание (табл. 1), что ИП концентрации планктонных клеток у этого штамма в МПБ и LB-бульоне была ниже, чем у других штаммов.

При совместном культивировании двух штаммов в одной пробе через сутки показатели ОП бинарных биопленок соответствовали показателям ОП при культивировании монобиопленок этих штаммов или были ниже. Степень биопленкообразования через 24 ч в одной паре штаммов была умеренная, в трех – низкая, результаты представлены в табл. 3. Через 48 ч ОП биопленочных проб снизилась.

На рис. 3 представлена сравнительная оценка способности штаммов *Staphylococcus* формировать моно- и бинарные биопленки на пластиковом субстрате при культивировании в МПБ и LB-бульоне.

Как видно из рис. 3, наиболее активно образовывал биопленку штамм *S. aureus* A 4674: за 24 ч при культивировании в МПБ (рис. 3А) его ОП превышала ОП контрольной пробы в 2,8 раза, так же и концентрация бинарной биопленки (*S. aureus* A 4674 и *S. haemolyticus* A399) превышала контрольную. При этом концентрации клеток в моно- и бинарной биопленках были одинаковыми. Через 48 ч ОП клеток в бинарной биопленке была ниже, чем в монобиопленках каждого штамма. В экспериментах с этой же парой штаммов при культивировании в LB-бульоне биопленкообразование было ниже, чем в МПБ. В бинарной биопленке концентрация клеток пары *Staphylococcus* (A 4674 и A 399) через 24 ч была на уровне ОП штамма *S. haemolyticus* A 399 в монобиопленке и ниже, чем у *S. aureus* A 4674. Через 48 ч концентрация клеток в бинарной биопленке этих культур снизилась. Другая пара штаммов при культивировании в МПБ в течение 24 ч также образовала бинарную биопленку с концентрацией клеток на уровне *S. haemolyticus* 44760, но ниже, чем концентрация *S. aureus* И 9773 в монобиопленках. Через 48 ч концентрация клеток в бинарной биопленке снизилась, была такой же, как в монобиопленках этих штаммов. При культивировании в LB-бульоне штамм *S. haemolyticus* 44760 через 48 ч активно образовал биопленку, его ОП стала выше контрольного значения в 2,75 раза и в 1,8 раза выше, чем через 24 ч. Однако при формировании бинарной биопленки концентрация клеток *Staphylococcus* была ниже, чем их концентрация в монобиопленках.

Все биопленки *S. aureus* и *S. haemolyticus* сохраняли свою жизнеспособность на протяжении 2 нед. (срок наблюдения)

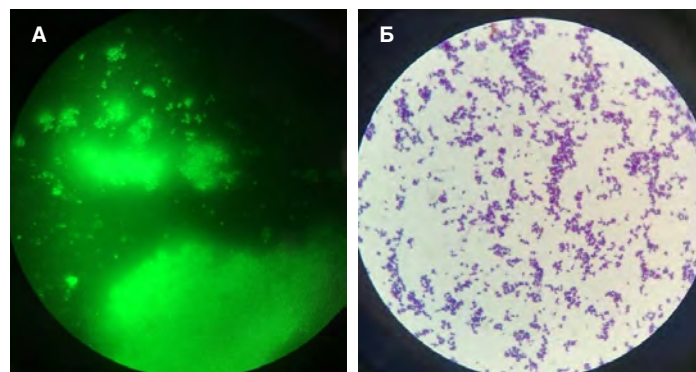


Рис. 4. Монобиопленка *S. haemolyticus* 44760.
 Fig. 4. Monobiofilm *S. haemolyticus* 44760.

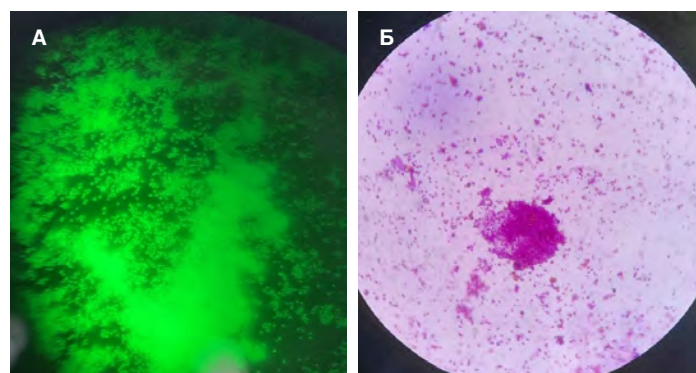


Рис. 5. Монобиопленка *S. aureus* 4674.
 Fig. 5. *S. aureus* 4674 monobiofilm.

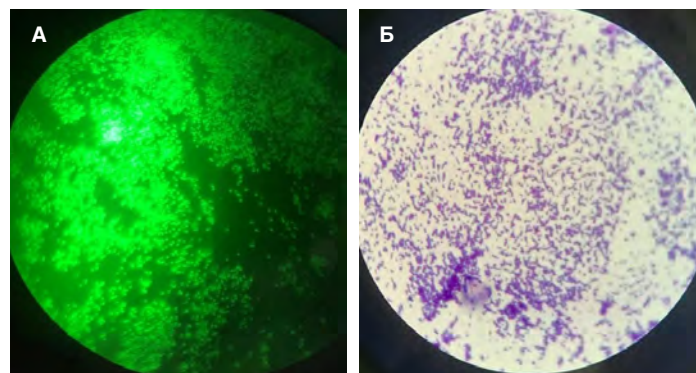


Рис. 6. Бинарная биопленка *S. aureus* 9773 и *S. haemolyticus* 44760, субстрат – покровное стекло, увеличение 90 × 100.
 Fig. 6. Binary biofilm of *S. aureus* 9773 and *S. haemolyticus* 44760, cover glass substrate, magnification 90 × 100.

Примечание к рис. 4–6: А) клетки *Staphylococcus* окрашены акридиновым оранжевым; Б) окрашены конго красным с генцианвиолетом; увеличение 10 × 900.

Note to Fig. 4–6: A) *Staphylococcus* cells stained with acridine orange; B) stained with Congo red and gentian violet; magnification 10 × 900.

и имели характерный рост на МПА и молочном агаре. При визуализации нативных и фиксированных моно- и бинарных биопленок (рис. 4, 5), образованных на абиотическом субстрате (покровные стекла), обнаружены небольшие отличия.

На рис. 4, 5 продемонстрированы монобиопленки штаммов *S. haemolyticus* и *S. aureus*. Визуализацию объемной картины биопленок с поднимающимися вверх и образующими конгломераты разных размеров клетками стафилококков помогает осуществить использование микровинта микроскопа, при просмотре одного поля зрения. Обращают на себя внимание размеры скоплений клеток: в биопленках у *S. haemolyticus* они разных размеров – от небольших до

крупных, как на рис. 4А у штамма № 44760, для биопленок *S. aureus* характерны большие размеры скоплений во всех полях зрения, также просматриваются промежутки в виде дорожек между скоплениями клеток. Биопленки в фиксированных микропрепаратах представлены небольшими скоплениями клеток во всех полях зрения, характерными для штаммов обоих видов стафилококков (рис. 4Б, 5Б). В то же время у штамма *S. aureus* встречаются единичные большие агрегаты клеток (рис. 5Б). Бинарные биопленки, представленные на рис. 6, образованные *S. aureus* и *S. haemolyticus*, напоминают картину монобиопленок, образованных *S. aureus*, также состоят из больших скоплений клеток во всех полях зрения с промежутками в виде дорожек.

Обсуждение

Формирование биопленок стафилококков в бульонных средах (МПБ и LB) при температуре 37°C происходило за одни сутки. Отличий в биопленкообразовании штаммов *Staphylococcus* на разных питательных средах не обнаружено, различия статистически не значимы. Изученные штаммы стафилококков имели значительную степень интенсивности прироста концентрации за 24 ч, однако степень биопленкообразования у них была разной. При культивировании в МПБ и LB-бульоне ИП концентрации *S. aureus* была достаточной для формирования биопленок, подтверждением является статистически значимая связь ($t_{st} = 5,38$; $p = 0,117$ и $t_{st} = 13,86$; $p = 0,045$ соответственно). ИП концентрации *S. haemolyticus* также была значительной, однако недостаточной для формирования биопленки ($t_{st} = 3,50$; $p = 0,177$ и $t_{st} = 0,93$; $p = 0,522$ соответственно). Возможно, стадия адгезии клеток к лункам пластикового планшета была непрочной и клетки легко отмывались от пластикового субстрата, а также имел место лизис части популяции клеток [34, 35]. Вероятно, на процесс биопленкообразования влияет скорость размножения, которая у штаммов *S. aureus* заметно выше с первых часов культивирования в отличие от *S. haemolyticus*. В совместных пробах с двумя штаммами интенсивность прироста была значительной, однако к более активному формированию биопленок по сравнению с монобиопленками это не привело и степень биопленкообразования была даже немного ниже, что, вероятно, обусловлено межвидовыми взаимоотношениями. Обращает на себя внимание визуальная схожесть картины в микропрепаратах бинарных биопленок в полях зрения с монобиопленками. Вероятно, скорость размножения и адгезия клеток одного из штаммов к пластиковому субстрату позволяли ему быть более активным при формировании биопленки. В других пробах совместное культивирование двух штаммов приводило к интенсивному росту обоих штаммов, но прочной адгезии к пластиковым лункам планшета не произошло. Изменение в степени биопленкообразования в сторону уменьшения через 48 ч культивирования во всех пробах может свидетельствовать о десорбции биопленки и выходе части клеток из биопленочной в планктонную форму, а также лизисе небольшой части популяции клеток [34, 35]. Исключение – штамм *S. haemolyticus* 44760, у которого скорость размножения в первые часы и интенсивность прироста концентрации в двух бульонных средах были низкими,

поэтому степень БП через 48 ч выше, чем через 24 ч культивирования. При образовании биопленок все микроорганизмы, включая и стафилококки, делятся на быстро и медленно образующие, и даже на небольшой выборке штаммов продемонстрировано, что скорость образования биопленки у *S. aureus* заметно выше, чем у *S. haemolyticus*. При визуализации нативных и фиксированных микропрепаратов биопленки, образованные *S. aureus*, состояли из скоплений клеток больших размеров во всех полях зрения, в отличие от более скудной картины штаммов *S. haemolyticus*. Вероятно, поэтому в микропрепаратах бинарных биопленок визуализированы скопления клеток, свойственные *S. aureus*, во всех полях зрения. Все биопленки *S. aureus* и *S. haemolyticus* сохраняли свою жизнеспособность в течение 2 нед. (срок наблюдения). В дальнейшем на большей выборке штаммов с использованием микроскопических и молекулярно-генетических методов нам удастся более точно определить эти различия и состав полибиопленок.

Заключение

С помощью различных бактериологических методов охарактеризована морфология биопленок, жизнеспособность стафилококков двух видов в моно- и бинарных биопленках. Таким образом, при использовании двух бактериологических методик с оценкой степени биопленкообразования и жизнеспособности биопленок установлено, что стафилококки, выделенные из мокроты больных с внебольничной пневмонией, обладают высокой скоростью размножения и способны в течение короткого времени образовывать моно- и бинарные биопленки на абиотических субстратах. Такая способность свидетельствует о возможном сохранении *S. aureus* и *S. haemolyticus* на медицинских объектах, включая катетеры, имплантаты, что наносит существенный урон здоровью человека.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора

Financial support

The work was carried out within the framework of the Sectoral Scientific Program of Rosпотребнадзор

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Gurusamy KS, Koti R, Toon CD, Wilson P, Davidson BR. Antibiotic therapy for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in surgical wounds. Cochrane Database Syst Rev. 2013 Aug 20;(8):CD009726. DOI: 10.1002/14651858.CD009726.pub2
2. Chen L, Wang Z, Xu T, Ge H, Zhou F, Zhu X, et al. The Role of graRS in Regulating Virulence and Antimicrobial Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Front. Microbiol. 2021;12:727104. DOI: 10.3389/fmicb.2021.727104
3. Pottinger PS. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. Medical Clinics of North America. 2013;97(4):601-619. DOI: 10.1016/j.mcna.2013.02.005

4. Power Coombs MR, Kronforst K, Levy O. Neonatal host defense against staphylococcal infections. Clin Dev Immunol. 2013 Jul 10;2013:826303. DOI: 10.1155/2013/826303
5. Маянский АН, Чеботарь ИВ. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011;1:101-108.
6. Ярец ЮИ. Патогенный потенциал бактерий группы ESKAPE, выделенных из ран: характеристика фено- и генотипических маркеров и возможность их практического применения. Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2022;20(4):400-413. DOI: 10.25298/2221-8785-2022-20-4-400-413
7. Nguyen HTT, Nguyen TH, Otto M. The staphylococcal exopolysaccharide PIA – Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. Comput Struct Biotechnol J. 2020 Nov 4;18:3324-3334. DOI: 10.1016/j.csbj.2020.10.027
8. Yonemoto K, Chiba A, Sugimoto S, Sato C, Saito M, Kinjo Y, et al. Redundant and Distinct Roles of Secreted Protein Eap and Cell Wall-Anchored Protein SasG in Biofilm Formation and Pathogenicity of *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 2019 Mar 25;87(4):e00894-18. DOI: 10.1128/IAI.00894-18
9. Ермоленко ЗМ, Слукин ПВ, Фурсова НК. Биопленки микроорганизмов в урологии: клиническая значимость и контроль связанных с ними инфекций. Бактериология. 2021;6(2):47-61. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-2-47-61
10. Rogers KL, Fey PD, Rupp ME. Coagulase-negative staphylococcal infections. Infect Dis Clin North Am. 2009 Mar;23(1):73-98. DOI: 10.1016/j.idc.2008.10.001
11. Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. Clin Infect Dis. 1994 Aug;19(2):231-43; quiz 244-5. DOI: 10.1093/clinids/19.2.231
12. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* – the 'accidental' pathogen. Nat Rev Microbiol. 2009 Aug;7(8):555-67. DOI: 10.1038/nrmicro2182
13. Davidson LE, Boucher HW. Infections in immunocompromised patients. In: Staphylococci in Human Disease. Eds Crossley KB, Jefferson KK, Archer G, Fowler VG Jr. 2nd Ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2009;505-20.
14. Montelongo C, Mores CR, Putonti C, Wolfe AJ, Abouelfetouh A. Whole-Genome Sequencing of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus haemolyticus* Clinical Isolates from Egypt. MicrobiolSpectr. 2022 Aug 31; 10(4):e0241321. DOI: 10.1128/spectrum.02413-21
15. Божкова СА, Краснова МВ, Полякова ЕМ, Рукина АН, Шабанова ВВ. Способность к формированию биопленок у клинических штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* – ведущих возбудителей ортопедической имплантат-ассоциированной инфекции. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014;2(16):149-56.
16. Бабушкина ИВ, Бондаренко АС, Мамонова ИА, Ульянов ВЮ. Образование биопленок штаммами стафилококка, выделенными из различного биологического материала при инфекционных осложнениях тотального эндопротезирования коленного сустава. Саратовский научно-медицинский журнал. 2019;15(2):261-266.
17. Корниенко МА, Копыльцов ВН, Шевлягина НВ, Диденко ЛВ, Любасовская ЛА, Припутневич ТВ, и др. Способность стафилококков различных видов к образованию биопленок и их воздействие на клетки человека. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2016;1:18-25. DOI: 10.18821/0208-0613-2016-34-1-18-25
18. Kaplan JB, Izano EA, Gopal P, Karwacki MT, Kim S, Bose JL, et al. Low levels of β -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. mBio. 2012 Jul 31;3(4):e00198-12. DOI: 10.1128/mBio.00198-12
19. Jin Y, Guo Y, Zhan Q, Shang Y, Qu D, Yu F. Subinhibitory Concentrations of Mupirocin Stimulate *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation by Upregulating cidA. Antimicrob Agents Chemother. 2020 Feb 21;64(3):e01912-19. DOI: 10.1128/AAC.01912-19
20. Пономаренко СВ. Микробиологические аспекты стафилококковой инфекции на современном этапе (обзор литературы). Анналы Мечниковского института. 2013;3:13-17.
21. Chopra S, Harjai K, Chhibber S. Antibiotic susceptibility of ica-positive and ica-negative MRSA in different phases of biofilm growth. J Antibiot (Tokyo). 2015 Jan;68(1):15-22. DOI: 10.1038/ja.2014.96
22. Осипова ЕВ, Шипицына ИВ, Науменко ЗС. Сравнительная количественная оценка способности образования биопленки различными клиническими штаммами бактерий на поверхности полистирола и стекла. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2014;8:55-58.
23. Manoharan M, Sistla S, Ray P. Prevalence and Molecular Determinants of Antimicrobial Resistance in Clinical Isolates of *Staphylococcus haemolyticus* from India. Microb Drug Resist. 2021 Apr; 27(4):501-508. DOI: 10.1089/mdr.2019.0395
24. Eltwisy HO, Twisy HO, Hafez MH, Sayed IM, El-Mokhtar MA. Clinical Infections, Antibiotic Resistance, and Pathogenesis of *Staphylococcus haemolyticus*. Microorganisms. 2022 May 31;10(6):1130. DOI: 10.3390/microorganisms10061130
25. Periasamy S, Kolenbrander PE. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* builds mutualistic biofilm communities with *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* species in saliva [Text]. S. Periasamy. Infect Immun. 2009;77(9):3542-3551.
26. Elias S, Banin E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors [Text]. FEMS Microbiol Rev. 2012;36(5):990-1004.
27. Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний: Методические указания МУК 4.2.3115-13. М., 2013.
28. Лабораторная диагностика внебольничной пневмонии пневмококковой этиологии: Методические рекомендации МР 4.2.0114-16. М., 2016.
29. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol. 2000;54:49-79. DOI: 10.1146/annurev.micro.54.1.49
30. Савилов ЕД, Маркова ЮА, Немченко УМ, Носкова ОА, Чemezova НН, Кунгурцева ЕА, и др. Способность к биопленкообразованию у возбудителей инфекций, выделенных от пациентов крупного многопрофильного детского стационара. Тихоокеанский медицинский журнал. 2020;1:32-5. DOI: 10.34215/1609-1175-2020-1-32-35
31. Ярец ЮИ, Шевченко НИ. Новый метод анализа бактериальной биопленки. Наука и инновации. 2016;11(156):68-72.
32. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS. 2007 Aug;115(8):891-9. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
33. Титова СВ, Веркина ЛМ. Моделирование биопленок холерного вибриона на твердых поверхностях (стекло и пластик) и визуализация их в световом и люминесцентном микроскопах. Клиническая лабораторная диагностика. 2016;4(61):238-241. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-238-241
34. Sadykov MR, Bayles KW. The control of death and lysis in staphylococcal biofilms: a coordination of physiological signals. Curr Opin Microbiol. 2012 Apr;15(2):211-5. DOI: 10.1016/j.mib.2011.12.010
35. Grande R, Nistico L, Sambanthamoorthy K, Longwell M, Iannitelli A, Cellini L, et al. Temporal expression of agrB, cidA, and alsS in the early development of *Staphylococcus aureus* UAMS-1 biofilm formation and the structural role of extracellular DNA and carbohydrates. Pathog Dis. 2014 Apr;70(3):414-22. DOI: 10.1111/2049-632X.12158

References

1. Gurusamy KS, Koti R, Toon CD, Wilson P, Davidson BR. Antibiotic therapy for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in surgical wounds. Cochrane Database Syst Rev. 2013 Aug 20;(8):CD009726. DOI: 10.1002/14651858.CD009726.pub2
2. Chen L, Wang Z, Xu T, Ge H, Zhou F, Zhu X, et al. The Role of graRS in Regulating Virulence and Antimicrobial Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Front. Microbiol. 2021;12:727104. DOI: 10.3389/fmicb.2021.727104

3. Pottinger PS. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. Medical Clinics of North America. 2013;97(4):601-619. DOI: 10.1016/j.mcna.2013.02.005
4. Power Coombs MR, Kronforst K, Levy O. Neonatal host defense against staphylococcal infections. Clin Dev Immunol. 2013 Jul 10;2013:826303. DOI: 10.1155/2013/826303
5. Mayansky AN, Chebotar IV. Staphylococcal biofilms: structure, regulation, rejection. Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2011;1:101-108. (In Russian).
6. Yarets Yul. Pathogenic potential of ESKAPE group bacteria isolated from wounds: characterization of phenotypic and genotypic markers and possibility of their practical application. Journal of the Grodno State Medical University. 2022;20(4):400-413. DOI: 10.25298/2221-8785-2022-20-4-400-413 (In Russian).
7. Nguyen HTT, Nguyen TH, Otto M. The staphylococcal exopolysaccharide PIA – Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. Comput Struct Biotechnol J. 2020 Nov 4;18:3324-3334. DOI: 10.1016/j.csbj.2020.10.027
8. Yonemoto K, Chiba A, Sugimoto S, Sato C, Saito M, Kinjo Y, et al. Redundant and Distinct Roles of Secreted Protein Eap and Cell Wall-Anchored Protein SasG in Biofilm Formation and Pathogenicity of *Staphylococcus aureus*. Infect Immun. 2019 Mar 25;87(4):e00894-18. DOI: 10.1128/IAI.00894-18
9. Ermolenko ZM, Slukin PV, Fursova NK. Microbial biofilms in urology: clinical significance and control of associated infections. Bacteriology. 2021;6(2):47-61. DOI: 10.20953/2500-1027-2021-2-47-61 (In Russian).
10. Rogers KL, Fey PD, Rupp ME. Coagulase-negative staphylococcal infections. Infect Dis Clin North Am. 2009 Mar;23(1):73-98. DOI: 10.1016/j.idc.2008.10.001
11. Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. Clin Infect Dis. 1994 Aug;19(2):231-43; quiz 244-5. DOI: 10.1093/clinids/19.2.231
12. Otto M. *Staphylococcus epidermidis* – the 'accidental' pathogen. Nat Rev Microbiol. 2009 Aug;7(8):555-67. DOI: 10.1038/nrmicro2182
13. Davidson LE, Boucher HW. Infections in immunocompromised patients. In: Staphylococci in Human Disease. Eds Crossley KB, Jefferson KK, Archer G, Fowler VG Jr. 2nd Ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2009;505-20.
14. Montelongo C, Mores CR, Putonti C, Wolfe AJ, Abouelfetouh A. Whole-Genome Sequencing of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus haemolyticus* Clinical Isolates from Egypt. MicrobiolSpectr. 2022 Aug 31; 10(4):e0241321. DOI: 10.1128/spectrum.02413-21
15. Bozhkova SA, Krasnova MV, Polyakova EM, Rukina AN, Shabanova VV. Biofilm formation by clinical isolates of *S. aureus* and *S. epidermidis* in prosthetic joint infection. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2014;2(16):149-56. (In Russian).
16. Babushkina IV, Bondarenko AS, Mamonova IA, Uljanov VJ. Biofilm formation by *Staphylococcus* strains isolated from various biological materials at infectious complications following total knee replacement. Saratov Journal of Medical Scientific Research. 2019;15(2):261-266. (In Russian).
17. Kornienko MA, Kopyltsov VN, Ilina EN, Shevlyagina NV, Didenko LV, Lyubasovskaya LA, et al. The ability of various strains of *Staphylococcus* to create biofilms and their effect on cells of the human body. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2016;1:18-25. DOI: 10.18821/0208-0613-2016-34-1-18-25 (In Russian).
18. Kaplan JB, Izano EA, Gopal P, Karwacki MT, Kim S, Bose JL, et al. Low levels of β -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. mBio. 2012 Jul 31;3(4):e00198-12. DOI: 10.1128/mBio.00198-12
19. Jin Y, Guo Y, Zhan Q, Shang Y, Qu D, Yu F. Subinhibitory Concentrations of Mupirocin Stimulate *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation by Upregulating *cidA*. Antimicrob Agents Chemother. 2020 Feb 21;64(3):e01912-19. DOI: 10.1128/AAC.01912-19
20. Ponomarenko SV. Mikrobiologicheskie aspekty stafilocokkovoi infektsii na sovremennom etape (obzor literatury). Annali Mechnikovskogo instituta. 2013;3:13-17. (In Russian).
21. Chopra S, Harjai K, Chhibber S. Antibiotic susceptibility of ica-positive and ica-negative MRSA in different phases of biofilm growth. J Antibiot (Tokyo). 2015 Jan;68(1):15-22. DOI: 10.1038/ja.2014.96
22. Osipova EV, Shipitsyna IV, Naumenko ZS. A comparative quantitative evaluation of the potential of biofilm formation by different bacterial clinical strains on polystyrene and glass surface. International Journal of Applied and Fundamental Research. 2014;8:55-58. (In Russian).
23. Manoharan M, Sistla S, Ray P. Prevalence and Molecular Determinants of Antimicrobial Resistance in Clinical Isolates of *Staphylococcus haemolyticus* from India. Microb Drug Resist. 2021 Apr; 27(4):501-508. DOI: 10.1089/mdr.2019.0395
24. Eltwisy HO, Twisy HO, Hafez MH, Sayed IM, El-Mokhtar MA. Clinical Infections, Antibiotic Resistance, and Pathogenesis of *Staphylococcus haemolyticus*. Microorganisms. 2022 May 31;10(6):1130. DOI: 10.3390/microorganisms10061130
25. Periasamy S, Kolenbrander PE. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* builds mutualistic biofilm communities with *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* species in saliva [Text]. S. Periasamy. Infect Immun. 2009;77(9):3542-3551.
26. Elias S, Banin E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors [Text]. FEMS Microbiol. Rev. 2012;36(5):990-1004.
27. Laboratornaya diagnostika vnebol'nichnykh pnevmonii: Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.3115-13. M., 2013. (In Russian).
28. Laboratornaya diagnostika vnebol'nichnoi pnevmonii pnevmokokkovoi etiologii: Metodicheskie rekomendatsii MR 4.2.0114-16. M., 2016. (In Russian).
29. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol. 2000;54:49-79. DOI: 10.1146/annurev.micro.54.1.49
30. Savilov ED, Markova YA, Nemchenko UM, Noskova OA, Chemezova NN, Kungurtseva EA, et al. Ability to biofilm formation in infectious agents isolated from patients of a large general children's hospital. Pacific Medical Journal. 2020;1:32-5. DOI: 10.34215/1609-1175-2020-1-32-35 (In Russian).
31. Yarets Yul, Shauchenka NI. A new method for the bacterial biofilms analysis in medicine. Наука и инновации. 2016;11(156):68-72. (In Russian).
32. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS. 2007 Aug;115(8):891-9. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
33. Titova SV, Verkina LM. The modeling of biofilms of comma bacillus on solid surfaces (glass and plastic) and their visualization in light and luminescent microscopes. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2016;4(61):238-241. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-238-241 (In Russian).
34. Sadykov MR, Bayles KW. The control of death and lysis in staphylococcal biofilms: a coordination of physiological signals. Curr Opin Microbiol. 2012 Apr;15(2):211-5. DOI: 10.1016/j.mib.2011.12.010
35. Grande R, Nistico L, Sambanthamoorthy K, Longwell M, Iannitelli A, Cellini L, et al. Temporal expression of *agrB*, *cidA*, and *alsS* in the early development of *Staphylococcus aureus* UAMS-1 biofilm formation and the structural role of extracellular DNA and carbohydrates. Pathog Dis. 2014 Apr;70(3):414-22. DOI: 10.1111/2049-632X.12158

Информация о соавторах:

Анисимова Анастасия Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Аронова Надежда Валентиновна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Anastasia S. Anisimova, Junior Researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-plague Institute of Rosпотребнадзор

Nadezhda V. Aronova, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-plague Institute of Rosпотребнадзор