

БІОЛОГІЧНІ НАУКИ

DOI: <https://doi.org/10.32839/2304-5809/2020-3-79-36>

УДК 579.262:615.015.8:615.281.9

Друзь Ю.В.

ДУ «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України»

АНТИБІОПЛІВКОВА АКТИВНІСТЬ АЗИТРОМІЦИНУ ЩОДО *S. AUREUS* ТА *P. AERUGINOSA*

Анотація. Основною проблемою клінічної практики є стійкість біоплівки до антимікробних препаратів. Тому існує необхідність у пошуку нових перспективних сполук серед речовин різних хімічних класів з антибіоплівковою активністю, та поглиблених досліджень механізму дії впроваджених у медичну практику антибіотиків щодо біоплівок мікроорганізмів. У статті оцінювали антибіоплівкову активність азитроміцину в концентраціях 0,5 МІК, 2 МІК та 5 МІК відносно штамів *S. aureus* 222 та *P. aeruginosa* 449. Азитроміцин на стадії плівкоутворення більш активно пригнічував формування біоплівок *S. aureus*. Біоплівки *P. aeruginosa* були менш чутливі до дії азитроміцину. На етапі сформованих біоплівок азитроміцин активніше порушував біоплівки *P. aeruginosa* та майже повністю інгібував життєздатність клітин. Біоплівки *S. aureus* були менш сприйнятливі до дії азитроміцину, життєдіяльність клітин зменшилась незначно. Азитроміцин є перспективним для подальших молекулярних досліджень антимікробної активності.

Ключові слова: біоплівки, азитроміцин, антимікробні препарати, *P. aeruginosa*, хронічні захворювання.

Yuliia Druz

Institute of Pharmacology and Toxicology
of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine

ANTIBIOFILM ACTIVITY OF AZITHROMYCIN AGAINST *S. AUREUS* AND *P. AERUGINOSA*

Summary. Chronic infections are difficult to treat because they are associated with biofilms. Microorganisms in biofilms differ from planktonic cells both physiologically and phenotypically. The main phenotypic changes are specific gene transcription, change in growth rate, respiration, use of oxygen, level of electron transport activity and extracellular polymer synthesis. In the analysis of the sensitivity of biofilm microorganisms to antimicrobials, data were obtained that indicate their considerable resistance, biofilms are 100-1000 times less sensitive compared to planktonic cells. Many factors contribute to the resistance of such groups to antibiotics: limited penetration of antibiotics through the exopolysaccharide matrix, changes in bacterial metabolism, persistence, activation of efflux pumps, etc. Biofilm resistance is a major problem in clinical practice. In addition, the spectrum of action of antimicrobial agents against planktonic microorganisms may differ from that against biofilms. Therefore, there is a need to find new promising compounds among substances of different chemical classes with antibiotic activity, and in-depth studies of the mechanism of action of antibiotics introduced into medical practice against biofilms of microorganisms. Macrolides that are capable of disrupting the film formation of *P. aeruginosa* are noteworthy. The article evaluated the antibiofilm activity of azithromycin against *S. aureus* 222 and *P. aeruginosa* 449. The antibiotic activity of azithromycin was determined by its ability to influence biofilm formation and 2-day and 5-day biofilms. Azithromycin at the stage of film formation more actively suppressed the formation of biofilms of *S. aureus*. *P. aeruginosa* biofilms were less sensitive to azithromycin. At the stage of mature biofilms, azithromycin more actively disrupted *P. aeruginosa* biofilms and almost completely inhibited cell viability. *S. aureus* biofilms were less susceptible to azithromycin, and cell viability decreased slightly. For *P. aeruginosa*, biofilm reduction and inhibition of viability are correlated at all concentrations. Azithromycin is promising for further molecular studies of antimicrobial activity.

Keywords: biofilms, azithromycin, antimicrobial agents, chronic disease, *P. aeruginosa*.

Постановка проблеми. *S. aureus* та *P. aeruginosa* є опортуністичними патогенами людини, які спричиняють як гострі, так і хронічні захворювання. Синьогнійна паличка вражає близько двох мільйонів людей щороку та є причиною близько 90 000 смертей щорічно [1]. У США близько 19 000 осіб помирає щороку від інфекцій спричинених метицилін-резистентними штамми *S. aureus* [2]. Крім цього, збудники колонізують медичне обладнання, сприяючи розвитку нозокоміальних інфекцій.

Хронічні інфекції, спричинені *S. aureus* та *P. aeruginosa*, важко піддаються лікуванню, адже вони асоційовані з біоплівками – гетерогенни-

ми угрупованнями бактерій. Мікроорганізми у складі біоплівок відрізняються від таких планктонних клітин як фізіологічно, так і фенотипово. Головними фенотиповими змінами є специфічна транскрипція генів, зміна швидкості росту, дихання, використання кисню, рівня електрон-транспортної активності, синтезу позаклітинних полімерів. Такі особливості підсилюють патогенність біоплівкових бактерій, забезпечують розвиток резистентності до антибіотиків та ефекторів імунної системи організму [3]. Стійкість біоплівок до антимікробних засобів нині є основною проблемою клінічної практики. Крім того, спектр дії антимікробних засобів щодо планктонних мі-

короорганізмів може відрізнитись від такого відносно біоплівки. Тому існує необхідність у пошуку нових перспективних сполук серед речовин різних хімічних класів з антибіоплівковою активністю, та поглиблених досліджень механізму дії впроваджених у медичну практику антибіотиків щодо біоплівок мікроорганізмів.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Формування мікробних угруповань – біоплівок, є однією з основних стратегій виживання бактерій в навколишньому середовищі. Біоплівки формуються на різних біотичних та абіотичних поверхнях, їх утворення є механізмом захисту від несприятливого впливу різних факторів. Біоплівки можуть бути сформовані одним або декількома видами грамозитивних та грамнегативних бактерій, до їх складу входять як метаболічно активні клітини, так і клітини у стані спокою. Утворювати біоплівки здатні умовно-патогенні та патогенні мікроорганізми.

Бактеріальні біоплівки спричиняють різноманітні захворювання: від катетер-асоційованих до хронічних інфекцій: муковісцидоз, остеомиєліт, ендокардит, риносинусит, пієлонефрит, тривало незагоєвані рани тощо. За даними Національного інституту здоров'я США, з біоплівками асоційовані близько 80 % усіх хронічних захворювань [4].

Значна роль при формуванні хронічних інфекцій належить біоплівкам, сформованим *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa*. *S. aureus* обумовлює хронічну ЛОР-патологію (отит, риносинусит, аденоtonsиліт), інфекції нижніх дихальних шляхів (хронічні обструктивні захворювання легень (ХОЗЛ), бронхоектази, вентилятор-асоційовані пневмонії), хронічні рани (пролежні, діабетична стопа, трофічні виразки нижніх кінцівок) тощо. Відзначена провідна роль *P. aeruginosa* при бронхоектазах, вентилятор-асоційованих пневмоніях, гнійно-запальних ускладненнях з трахеостомою, ендотрахеальними трубками та кохлеарними імплантатами, муковісцидозі У пацієнтів з муковісцидозом *P. aeruginosa* виявлено у 80 % випадків [5].

При аналізі чутливості біоплівкових мікроорганізмів до антимікробних засобів отримані дані, які свідчать про значну їх резистентність, біоплівки у 100-1000 разів є менш чутливими порівняно з планктонними клітинами [3; 6].

Стійкості таких угруповань до антибіотиків сприяє багато факторів: обмежене проникнення антибіотиків через екзополісахаридний матрикс, зміни в метаболізмі бактерій, наявність персистерів, активація ефлюкських помп тощо [7]. Недостатня ефективність антимікробної терапії при біоплівкових патологіях потребує впровадження в клінічну практику нових ефективних та безпечних лікарських засобів. На увагу заслуговують як перспективні сполуки так і антимікробні препарати різних груп. Для оцінки активності останніх щодо біоплівок необхідно дослідити спектр їх дії та механізм інгібуючого ефекту.

Завдяки дослідженням останніх років в медичну практику впроваджено антимікробні засоби пептидної природи Даптоміцин та Орітаванцин, які порушують адгезію мікроорганізмів до субстрату, здатні руйнувати сформовані біоплівки грамозитивних бактерій та підсилювати спе-

цифічну антибіоплівкову дію антибіотиків. Багато антимікробних пептидів на сьогодні досліджуються у доклінічних і клінічних випробуваннях для застосування при катетерній інфекції, муковісцидозі чи хронічних ранових інфекціях, серед яких пексиганан та оміванан [8].

При оцінці антибіоплівкової активності антибіотиків виявлено відмінності в їх дії порівняно з планктонними клітинами. На увагу заслуговують макроліди, які здатні порушувати плівкоутворення *P. aeruginosa*.

Азитроміцин – макролідний антибіотик з підгрупи азалідів. До спектру дії азитроміцину належать грамнегативні та грамозитивні бактерії *Bordetella pertussis*, *Legionella* spp. *Staphylococcus aureus*, *Bordetella pertussis*, *Chlamydia trachomatis*, *Gardnerella vaginalis*, *H. influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* spp., *Mycoplasma pneumoniae*, *S. pneumoniae* та ін. [9]. Азитроміцин не застосовується для лікування пацієнтів з інфекцією, обумовленою *P. aeruginosa*, оскільки планктонні клітини стійкі до дії азитроміцину: внаслідок диметилування 50S субодніці рибосоми порушується зв'язування макролідів з мішенню дії [10].

Проте в ході досліджень було виявлено вплив азитроміцину на різні етапи формування біоплівок [11]. За даними [12], порушення адгезії відбувається за рахунок інгібування експресії флагеліну IV-типу. Дослідження показали, що азитроміцин пригнічує продукцію QS-залежних факторів вірулентності шляхом негативної регуляції генів, що кодують автоіндуктори. Крім цього, антибіотик може порушувати структуру біоплівок, впливаючи на мембранні білки, проте механізм такої активності потребує детальних досліджень [13].

Мета дослідження – встановити антибіоплівковий вплив азитроміцину на плівкоутворення та сформовані біоплівки *S. aureus* та *P. aeruginosa*.

Виклад основного матеріалу. У експериментах використовували клінічні штами золотистого стафілококу та синьогнійної палички. *S. aureus* 222 чутливий до дії гентаміцину, резистентний до ципрофлоксацину, оксациліну та метициліну, *P. aeruginosa* 449 – до дії гентаміцину, цефепіму та ципрофлоксацину.

Антибіоплівкову активність азитроміцину визначали за здатністю впливати на плівкоутворення та сформовані 2-добові та 5-добові біоплівки. Дослідження здійснювали у концентрації азитроміцину 0,5 МІК, 2 МІК та 5 МІК, відповідно 15,65 мкг/мл, 62,5 мкг/мл та 156,25 мкг/мл для *P. aeruginosa* та 0,25 мкг/мл, 1 мкг/мл, 2,5 мкг/мл – для *S. aureus* 222. У дослідженні використовували метод сорбції барвника на біоплівці та його подальший десорбції в органічний розчинник з використанням 96-луноквих планшетів [14]. При дослідженні впливу сполуки на плівкоутворення розчини азитроміцину вносили одночасно з інокулятом, на сформовані біоплівки – на 2-у та 5-у добу експерименту.

Для отримання біоплівок використовували нічну культуру, яку розводили в середовищі TSB 1:100 та висівали на планшети. Після завершення інкубації вміст планшетів видаляли, промивали дистильованою водою, вносили

0,1 % розчин генціанвіолету та витримували 10-15 хв та екстрагували етанолом. Вимірювання оптичної щільності проводили на Adsorbance Microplate Reader ELx800 (BioTek, США) при довжині хвилі 630 нм. Контролем слугували інтактні культури мікроорганізмів, вирощені за тих самих умов.

Життєздатність клітин *P. aeruginosa* та *S. aureus* визначали на етапі плівкоутворення та у сформованих біоплівках з використанням окисно-відновного індикатора резаурину згідно [15; 16]. Вирощування біоплівок здійснювали як описано вище. Культури в присутності азитроміцину вирощували впродовж 24 год при 37 °С. Після інкубації вміст лункок видаляли, промивали двічі фосфатним буфером (рН 7,2±0,2), додавали по 200 мкл ПС (TSB) та 10 мкл розчину резаурину (0,5 мкг/лунка). Після інкубації протягом 30 хв у темряві при кімнатній температурі отримані результати реєстрували на флуоресцентному спектрофотометрі «НІТАСНІ, МРФ-3» (Японія) при λ_{екс} 550 нм – λ_{ем} 590. Експерименти супроводжувались контролями культури, поживного середовища та відповідних розчинів сполук/препаратів та проводились не менше ніж у 3 повторах.

Отримані результати свідчать, що макролідний антибіотик здатен пригнічувати формування біоплівок *S. aureus* та *P. aeruginosa*. Встановлено (рис. 1), що інгібіція біоплівок золотистого стафілокока на етапі плівкоутворення за дії азитроміцину у субінгібітуючій концентрації 0,5 МІК становила 57 %, при збільшенні концентрації до 2 МІК та 5 МІК – 89 % та 94 % відповідно.

Біоплівки грамнегативних бактерій *P. aeruginosa* були більш стійкими до дії азитроміцину: у концентрації 0,5 МІК інгібуючої активності антибіотика не виявлено, при 2 МІК та 5 МІК спостерігалось пригнічення плівкоутворення на 44-46 %.

При оцінці життєздатності клітин на етапі плівкоутворення золотистого стафілокока та синьогнійної палички за дії азитроміцину встановлено, що антибіотик виявляє виразний дозозалежний ефект. Показано (рис. 2), що при дії азитроміцину життєздатність клітин *S. aureus* знижувалась на 21 % у концентрації 0,5 МІК та на 97-98 % – при 2 та 5 МІК. Подібний ефект зареєстровано і щодо *P. aeruginosa*: у концентрації 0,5 МІК інгібіція становила 46 %, 2 МІК – 88 %, 5 МІК – 91 %.

Оскільки біоплівки на різних етапах розвитку відрізняються за чутливістю до антимікроб-

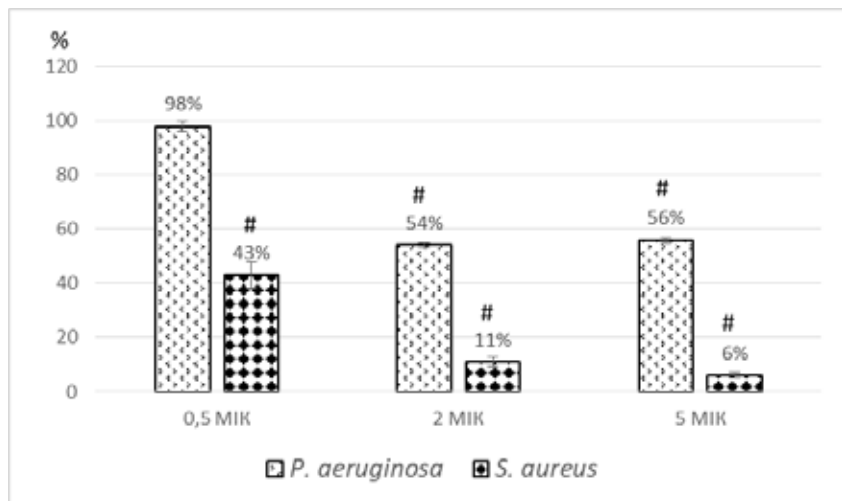


Рис. 1. Вплив азитроміцину на плівкоутворення *P. aeruginosa* та *S. aureus* (% утвореної біоплівки). # - відмінності вірогідні по відношенню до інтактного контролю культури (p < 0,05), контроль приймали за 100 %

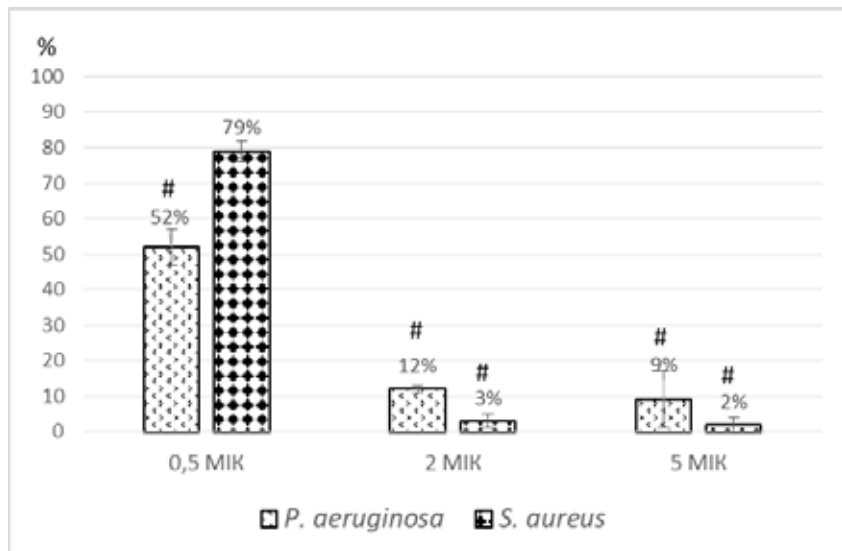


Рис. 2. Вплив азитроміцину на життєздатність клітин *P. aeruginosa* та *S. aureus* на стадії плівкоутворення (% метаболічно активних клітин).

– відмінності вірогідні по відношенню до інтактного контролю культури (p < 0,05), контроль приймали за 100 %

них засобів, доцільним було оцінити вплив азитроміцину на сформовані біоплівки *S. aureus* та *P. aeruginosa*. Отримані дані (рис. 3) свідчать, що антибіоплівкова активність азитроміцину на зрілі біоплівки була нижчою, ніж на етапі плівкоутворення. За наявності в інкубаційному середовищі антибіотика у субінгібітуючій концентрації біомаса біоплівок *S. aureus* зменшувалась на 12 %, при збільшенні дози до 2 МІК – на 17 %, до 5 МІК – на 33 %.

При дії азитроміцину на *P. aeruginosa* його антибіоплівкова активність була вищою порівняно з *S. aureus* та становила 30 % при 0,5 МІК, 54 % – при 2 МІК та 69 % при 5 МІК.

Отримані результати щодо впливу азитроміцину на життєздатність клітин золотистого стафілокока у складі 2-добової біоплівки свідчать, що макролідний антибіотик у субінгібіруючих та

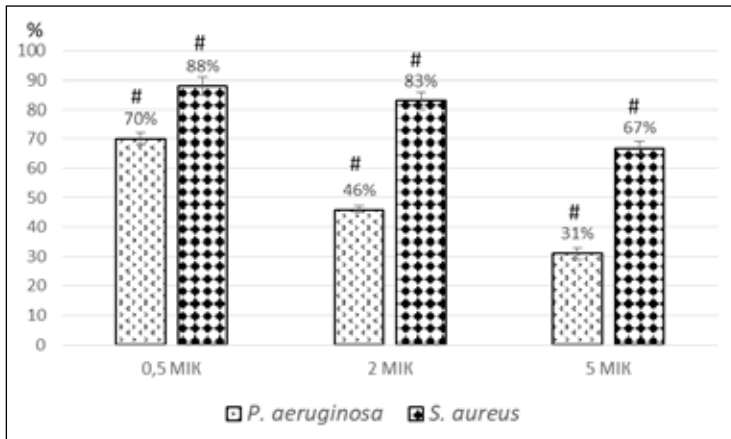


Рис. 3. Вплив азитроміцину на сформовані біоплівки *P. aeruginosa* та *S. aureus* (% біомаси біоплівки), # – відмінності вірогідні по відношенню до інтактного контролю культури ($p < 0,05$), контроль приймали за 100 %

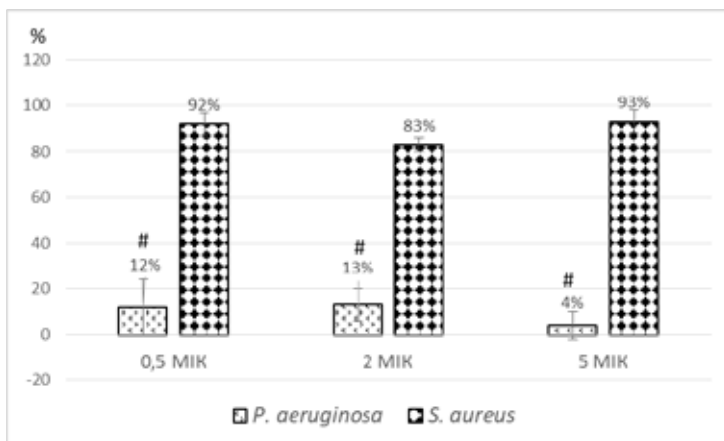


Рис. 4. Вплив азитроміцину на життєздатність *P. aeruginosa* та *S. aureus* у сформованих біоплівках (% метаболічно активних клітин), # – відмінності вірогідні по відношенню до інтактного контролю культури ($p < 0,05$), контроль приймали за 100 %

бактерицидних концентраціях не зумовлював достовірних змін у бактеріальних клітинах (рис. 4).

При дії азитроміцину щодо біоплівок *P. aeruginosa* навпаки спостерігався виразний інгібуючий ефект: у концентрації 0,5 та 2 МІК зменшення життєздатності клітин на 87-88 %, при 5 МІК – на 96 %.

Для *P. aeruginosa* зниження біомаси біоплівки та пригнічення життєдіяльності корелюють у всіх концентраціях. На етапі сформованих біоплівок азитроміцин виявляв незначну активність відносно *S. aureus*. Зниження активності може бути спричинене зміною характеристик бактеріальних клітин у складі біоплівок та наявністю матриксу, який ускладнює проникнення препарату до клітин.

Висновки. Таким чином, проведені експерименти показали, що азитроміцин на стадії плівкоутворення більш активно пригнічував формування біоплівок *S. aureus*. Біоплівки *P. aeruginosa* були менш чутливі до дії азитроміцину. Життєдіяльність клітин на етапі плівкоутворення значно пригнічувалась при концентраціях вищих за мінімальну інгібуючу концентрацію. На етапі сформованих біоплівок азитроміцин активніше порушував біоплівки *P. aeruginosa* та майже повністю інгібував життєздатність клітин. Біоплівки *S. aureus* були менш сприйнятливі до дії азитроміцину, життєдіяльність клітин зменшилась незначно, що може бути пов'язано із зміною фенотипу клітин та погіршеної проникності азитроміцину в товщу матриксу. Виражена активність азитроміцину відносно *P. aeruginosa* може бути зумовлена впливом на аутоіндуктори систем *Quorum Sensing*, компоненти матриксу та клітинної стінки. Азитроміцин є перспективним для подальших молекулярних досліджень антимікробної активності.

Список літератури:

- Mulcahy, L.R., Isabella, V.M., & Lewis, K. Pseudomonas aeruginosa Biofilms in Disease. *Microbial Ecology*. 2013. V. 68(1), pp. 1–12.
- Brady, R.A., O'May, G.A., Leid, J.G., Prior, M.L., Costerton, J.W., & Shirtliff, M.E. Resolution of Staphylococcus aureus Biofilm Infection Using Vaccination and Antibiotic Treatment. *Infection and Immunity*. 2011. 79(4), 1797–1803.
- Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2011. № 3. С. 99–109.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M.A., Kamil, M.A. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*. 2018. V. 81(1), pp. 7–11.
- Недашкіська В.В., Дронова М.Л., Вринчану Н.О. Біоплівки та їх роль в інфекційних захворюваннях. *Український науково-медичний молодіжний журнал*. 2016. № 4(98). С. 10–19.
- Mah, T.-F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G.C., Stewart, P.S., & O'Toole, G.A. A genetic basis for Pseudomonas aeruginosa biofilm antibiotic resistance. *Nature*. 2003. V. 426(6964), pp. 306–310.
- Ciofu, O., Rojo-Moliner, E., Macià, M.D., & Oliver, A. Antibiotic treatment of biofilm infections. *APMIS*. 2017. V. 125(4), pp. 304–319.
- Chung, P.Y., & Khanum, R. Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2017. V. 50(4), pp. 405–410.
- Peters, D.H., Friedel, H.A., & McTavish, D. Azithromycin. *Drugs*. 1992. V. 44(5), pp. 750–799.
- Imperi, F., Leoni, L., & Visca, P. Antivirulence activity of azithromycin in Pseudomonas aeruginosa. *Frontiers in Microbiology*. 2014. V. 5.
- Baumann U., Fischer J.J., Gudowius P. et al. Buccal adherence of Pseudomonas aeruginosa in patients with cystic fibrosis under long-term therapy with azithromycin. *Infection*. 2001. V. 29, pp. 7–11.

12. Kawamura-Sato K., Iinuma T., Hasegawa T. et al. Effect of subinhibitory concentrations of macrolides on expression of flagellin in *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000. V. 44, pp. 2869–2872.
13. Tateda, K., Comte, R., Pechere, J.-C., Kohler, T., Yamaguchi, K., & Van Delden, C. Azithromycin Inhibits Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001. V. 45(6), pp. 1930–1933.
14. O'Toole, G.A. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments*. 2011.
15. K. Tote [et al.] A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilm. *Letters in Applied Microbiology*. 2008. V. 46, № 2, pp. 249–254.
16. M.E. Sandberg [et al.] Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in a screening assay *J. Microbiol. Methods*. 2009. V. 78, № 1, pp. 104–106.

References:

1. Mulcahy, L.R., Isabella, V.M., & Lewis, K. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Disease. *Microbial Ecology*, vol. 68(1), pp. 1–12.
2. Brady, R.A., O'May, G.A., Leid, J.G., Prior, M.L., Costerton, J.W., & Shirtliff, M.E. (2011). Resolution of *Staphylococcus aureus* Biofilm Infection Using Vaccination and Antibiotic Treatment. *Infection and Immunity*, vol. 79(4), pp. 1797–1803.
3. Glushanova, N.A., Blinov, A.I., & Alekseeva, N.B. (2015). Bakterialnyie bioplenki v infektsionnoy patologii cheloveka [Bacterial biofilms in human infectious diseases]. *Meditsina v Kuzbasse* [Medicine in Kuzbass], (Special issue 2), pp. 30–35.
4. Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M.A., & Kamil, M.A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, vol. 81(1), pp. 7–11.
5. Nedashkivska, V.V., Dronova, M.L., & Vrynchanu, N.O. (2016). Bioplivky ta yikh rol v infektsiinykh zakhvoriuvanniakh [Biofilms and their role in infectious diseases]. *Theoretical medicine*, vol. 4(98).
6. Mah, T.-F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G.C., Stewart, P.S., & O'Toole, G.A. (2003). A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*, vol. 426(6964), pp. 306–310.
7. Ciofu, O., Rojo-Molinero, E., Macià, M.D., & Oliver, A. (2017). Antibiotic treatment of biofilm infections. *APMIS*, vol. 125(4), pp. 304–319.
8. Chung, P.Y., & Khanum, R. (2017). Antimicrobial peptides as potential anti-biofilm agents against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, vol. 50(4), pp. 405–410.
9. Peters, D.H., Friedel, H.A., & McTavish, D. (1992). Azithromycin. *Drugs*, vol. 44(5), pp. 750–799.
10. Imperi, F., Leoni, L., & Visca, P. (2014). Antivirulence activity of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, vol. 5.
11. Baumann, U., Fischer, J.J., Gudowius, P. et al. (2001). Buccal adherence of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis under long-term therapy with azithromycin. *Infection*, vol. 29, pp. 7–11.
12. Kawamura-Sato, K., Iinuma, T., Hasegawa, T. et al. (2000). Effect of subinhibitory concentrations of macrolides on expression of flagellin in *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 44, pp. 2869–2872.
13. Tateda, K., Comte, R., Pechere, J.-C., Kohler, T., Yamaguchi, K., & Van Delden, C. (2001). Azithromycin Inhibits Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 45(6), pp. 1930–1933. doi: 10.1128/aac.45.6.1930-1933.2001
14. O'Toole, G.A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments*.
15. K. Tote [et al.] (2008). A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilm. *Letters in Applied Microbiology*. Vol. 46, № 2, pp. 249–254.
16. M.E. Sandberg [et al.] (2009). Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable *Staphylococcus aureus* biofilms in a screening assay *J. Microbiol. Methods*. Vol. 78, № 1, pp. 104–106.