Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.

Серія: Ветеринарні науки

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies.

Series: Veterinary sciences

ISSN 2518-7554 print
ISSN 2518-1327 online

doi: 10.32718/nvlvet9421
<http://nvlvet.com.ua>

Lytic Activity of Staphylococcal Bacteriophage on Different Biotypes of *Staphylococcus aureus*

Yu.V. Horiuk

State Agrarian and Engineering University in Podilya, Kamianets-Podilskyi, Khmelnytskyi region, Ukraine

Article info

Received 16.04.2019
Received in revised form
17.05.2019
Accepted 20.05.2019

State Agrarian and Engineering
University in Podilya, 13,
Shevchenko Str., Kamianets-
Podilskyi, Khmelnytskyi region,
32300, Ukraine.
Tel.: +38-097-661-79-64
E-mail: goruky@ukr.net

Horiuk, Yu.V. (2019). Lytic Activity of Staphylococcal Bacteriophage on Different Biotypes of *Staphylococcus aureus*. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 21(94), 115–120. doi: 10.32718/nvlvet9421

Bacteriophage is a virus that infects a bacterium by injecting a phage genome into a bacterial cytoplasm and uses a host cell as a propagation mechanism. The studied models of phages show a narrow range of hosts. Previous studies on the investigation of lytic activity of staphylococcal bacteriophages were focused on determining the sensitivity of *S. aureus* isolated from patients from different clinical material and clinically healthy people. However, there is no information as to how refractory are the already described agents against *S. aureus* ecovars, isolated from animals. The purpose of the work is to study the lytic activity of the agent "Staphylococcal Bacteriophage" in relation to different biotypes of *Staphylococcus aureus*. Microbiological treatment of samples for isolation of *S. aureus* was performed using BD Baird-Parker Agar according to standard techniques. To confirm the presence of *S. aureus*, tests were used for catalase, coagulase, oxidase, for D-mannitol fermentation, DNase production and acetoin. In cultures belonging to *S. aureus*, the biotype was determined using the scheme: determining the colour of pigment, the presence of beta hemolysis, the activity of coagulase in the bovine plasma, the formation of colonies in a medium with crystal violet. Determination of the range of action of bacteriophages in relation to clinical isolates of microorganisms was carried out by droplet method. The results of determining the lytic activity of staphylococcal bacteriophage in relation to *S. aureus* isolates of various biological origin showed that the lytic activity of staphylococcal bacteriophage is most active against *S. aureus* var. *hominis*. From the studied cultures *S. aureus* var. *hominis* full lysis in the course of dripping were found only in 4.8%, and in 42.8% of cultures showed a semiconfluent lysis. 14.3% of cultures *S. aureus* var. *hominis* were subjected to weak lytic activity of the bacteriophage. Also, there were detected 4.8% of cultures of this biotype, which were resistant to staphylococcal bacteriophage. In the study of lytic activity of staphylococcal bacteriophage up to 35 cultures *S. aureus* var. *bovis*, the manifestation of the lytic action of only one culture is established. Moreover, the level of lysis was estimated at "+/–", that is, they showed less than 20 phage colonies. At the same time, the studied by us staphylococcal bacteriophage did not show the lytic action on *S. aureus* var. *avium* and *S. aureus* var. *canis*. Therefore, conducted studies have shown that the lytic activity of the agent "Staphylococcal Bacteriophage" is directed mainly to *S. aureus* var. *hominis*, and practically does not work on other biotypes. In consideration of the apparent lack of activity of phage agents in relation to the studied biotypes, attention should be focused on the specificity of phages, not only within the species of bacteria, but also within their biotypes.

Key words: bacteriophages, *Staphylococcus aureus*, biotypes, lytic activity.

Літична активність стафілококового бактеріофагу на різні біоти́пи *Staphylococcus aureus*

Ю.В. Горюк

Подільський державний аграрно-технічний університет, м. Кам'янець-Подільський, Хмельницька обл., Україна

Бактеріофаг – це вірус, який інфікує бактерію шляхом ін'єкції генома фага в цитоплазму бактерії і використовує клітину-господаря як механізм для розмноження. Вивчені моделі фагів демонструють вузький діапазон господарів. Попередні дослідження

з вивчення літичної активності стафілококових бактеріофагів фокусувалися на визначення чутливості *S. Aureus*, виділених від хворих із різного клінічного матеріалу та клінічно здорових людей. Проте відсутня інформація, наскільки рефрактерними є вже описані препарати проти ековарів *S. aureus*, виділених від тварин. Мета роботи – вивчити літичну активність препарату “Бактеріофаг стафілококовий” щодо різних біотипів золотистого стафілококу. Мікробіологічну обробку зразків для виділення *S. aureus* проводили з використанням BD Baird-Parker Agar згідно зі стандартними методиками. Для підтвердження наявності *S. aureus* використовували тести на каталазу, коагулазу, оксидазу, на ферментацію D-манітолу, продукцію ДНКаз, ацетона. У культур, що належать до *S. aureus*, біотип визначали, використовуючи схему: визначення кольору пігменту, наявність бета-гемолізу, активність коагулази до бичачої плазми, утворення колоній на середовищі з кристалічним фіолетовим. Визначення діапазону дії бактеріофагів щодо клінічних ізолятів мікроорганізмів проводили крапельним методом. Результати визначення літичної активності стафілококового бактеріофагу щодо ізолятів *S. aureus* різного біологічного походження показали, що літична дія стафілококового бактеріофагу найбільш активна стосовно *S. aureus* var. *hominis*. Із досліджених культур *S. aureus* var. *hominis* повний лізис по ходу стікання краплі виявили тільки у 4,8%, а у 42,8% культур проявлявся напівзливний лізис. 14,3% культур *S. aureus* var. *hominis* піддавалися слабкій літичній активності бактеріофагу. Також виявлено 4,8% культур даного біотипу, які були стійкими до стафілококового бактеріофагу. При дослідженні літичної активності стафілококового бактеріофагу до 35 культур *S. aureus* var. *bovis*, встановлено прояв літичної дії тільки до однієї культури. При цьому ступінь лізису оцінювався в “+/-”, тобто виявляли менше 20 фагових колоній. Водночас досліджуваний нами стафілококовий бактеріофаг не проявляв літичної дії на культури *S. aureus* var. *avium* і *S. aureus* var. *canis*. Отже, проведені дослідження вказують, що літична активність препарату “Бактеріофаг стафілококовий” спрямована в основному на *S. aureus* var. *hominis*, а на інші біотипи практично не діє. З огляду на очевидну недостатню активність препаратів фагів щодо досліджених біотипів, варто акцентувати увагу на специфічність фагів не лише в межах виду бактерій, а й у межах їхніх біотипів.

Ключові слова: бактеріофаги, *Staphylococcus aureus*, біотипи, літична активність.

Вступ

Бактеріофаг – це вірус, який інфікує бактерію шляхом ін'єкції генома фага в цитоплазму бактерії і використовує клітину-господаря як механізм для розмноження (Bollyky & Secor, 2019). Фаги поширюються всередині бактерії-господаря і виробляють деполімеризи, які гідролізують позаклітинні біоплівки полімерів. Бактеріофаги широко поширені і є природними обмежувачами розповсюдження бактерій (Klopatek et al., 2018). На відміну від антибіотиків фаги можуть знищувати цільові бактерії, не впливаючи на нормальну мікрофлору (Lopetuso et al., 2019). У зв'язку з цим абсолютно виправданий інтерес до їх застосування для профілактики і лікування бактеріальних інфекцій, в тому числі й маститу у корів (Horiuk et al., 2018).

Базовий діапазон бактеріофага – це таксономічне різноманіття господарів, які він може успішно інфікувати (O'flaherty et al., 2005). Діапазон господарів визначається спектром молекулярних взаємодій між фагом і господарем протягом усього циклу інфекції. Вивчені моделі фагів демонструють вузький діапазон господарів (Gill et al., 2006; Lopetuso et al., 2019). Останні метагеномні дослідження показують, що специфічність фага може варіювати. Ці механізми та їхня еволюція мають важливе значення для розуміння фагової екології та різних клінічних застосувань фагових препаратів (Lopetuso et al., 2019).

Одним з найнебезпечніших для молочних ферм є стафілококовий мастит, основним збудником якого є *S. aureus* (Horiuk et al., 2018). Ця проблема досить поширена і завдає великих економічних збитків. Наприклад, у США молочна промисловість щорічно втрачає два мільярди доларів у зв'язку з поширенням маститів. При стандартному лікуванні маститу корів використовують хіміотерапевтичні препарати з антибактеріальною дією речовиною різних груп. Проте більше ніж у 50% випадків вони неефективні внаслідок широкого поширення антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів (Kukhtyn et al., 2016;

Horiuk et al., 2018). Формування резистентності до антимікробних препаратів є природним адаптаційним механізмом мікроорганізмів і представляє серйозну медичну та соціально-економічну проблему (Horiuk et al., 2018; Kovalenko et al., 2018). Масштабні дослідження, проведені у країнах Європи та США щодо антибіотикорезистентності збудників маститів, показали, що 57% ізолятів були стійкими хоча б до одного виду антибіотика (Gill et al., 2006).

Ця проблема посилила необхідність впровадження нових ефективних заходів для боротьби з бактеріальними патогенами. Крім того, сільськогосподарські виробники зацікавлені в появі нових засобів і методів профілактики та лікування маститів без застосування антибіотиків. Це дозволить отримувати так звану органічну продукцію.

Багато альтернативних методів, які використовуються для лікування маститів, мають певну теоретичну основу для розгляду їхньої ефективності (Gill et al., 2006). Однак, незважаючи на те, що міжнародні організації пропагують фітотерапію та гомеопатію як альтернативу хімічним речовинам, результати їх ефективності на рівні ферм досить суперечливі. Альтернативними засобами у боротьбі з бактеріальною інфекцією можуть бути використані препарати бактеріофагів (Horiuk, 2018).

Бактерії *Staphylococcus aureus* універсальні в своїй здатності колонізувати різних господарів і викликати інфекції в різних анатомічних ділянках. Молекулярні процеси, відповідальні за захворюваність і специфічність господаря, вивчені недостатньо (Svircev et al., 2018). Вважається, що вони частково викликані відмінностями у змісті генів і аллельними варіаціями між штамми. Нині виділяють декілька біотипів (ековарів) *S. aureus* залежно від їх біологічного походження, основні з яких *S. aureus* var. *hominis*, *S. aureus* var. *avium*, *S. aureus* var. *canis*, *S. aureus* var. *bovis* (Kukhtyn et al., 2017). Генотипічні відмінності між *S. aureus*, виділеними від людини і великої рогатої худоби, спостерігалися численними авторами (Obeso et al., 2008). Крім того, секвенування геному у людини і тварин

виявило помітні відмінності, що забезпечує основу для ідентифікації специфічних генів, в тому числі відповідальних за антибіотико- та фагочутливість (Svircev et al., 2018). Є багато публікацій, які описують дослідження препаратів бактеріофагів активних проти різних штамів стафілококів (Wills et al., 2005). Попередні дослідження з вивчення літичної активності стафілококових бактеріофагів фокусувалися на визначення чутливості *S. aureus* виділених від хворих із різного клінічного матеріалу та клінічно здорових людей. Проте відсутня інформація, наскільки рефрактерними є вже описані препарати проти ековарів *S. aureus*, виділених від тварин.

Мета роботи – вивчити літичну активність препарату “Бактеріофаг стафілококовий” щодо різних біотипів золотистого стафілококу.

Матеріал і методи досліджень

Ізоляція та ідентифікація *S. aureus*. Мікробіологічну обробку зразків для виділення *S. aureus* проводили з використанням BD Baird-Parker Agar згідно зі стандартними методиками. Чашки інкубували в аеробних умовах протягом 42–48 год при температурі $36 \pm 1^\circ\text{C}$ і робили підрахунок через 18–24 та 42–48 годин.

Морфологічні характеристики. Мікроскопічний препарат виготовляли з ізолюваної культури на чистому предметному склі і фарбували за Грамом. Пофарбований мазок досліджували під мікроскопом: спостерігали грампозитивні сферичні клітини, схожі на гроно винограду, розташовані в декількох площинах.

Біохімічні дослідження. Для підтвердження наявності *S. aureus* використовували тести на каталазу, коагулазу, оксидазу, на ферментацію D-манітолу, продукцію ДНКаз, ацетоїна (Maurin et al., 2004).

Визначення біотипу. У культур, що належать до *S. aureus*, біотип визначали використовуючи схему: визначення кольору пігменту, наявність бета-гемолізу, активність коагулази до бичачої плазми, утворення колоній на середовищі з кристалічним фіолетовим (Mayer et al., 1999).

Визначення літичної активності фагового препарату. Визначення діапазону дії бактеріофагів щодо клі-

нічних ізолятів мікроорганізмів проводили крапельним методом, використовуючи препарат “Бактеріофаг стафілококовий” (“Микроген”, Росія). З цією метою на поверхню МПА в чашках Петрі піпеткою наносили 3–4 краплі 18–24-годинної бульйонної культури досліджуваних мікроорганізмів. Оптична щільність інкуляту складала 0,5 одиниць по МакФар-Ланд (контроль за допомогою денситометра), що відповідає $1,5 \times 10^8$ мікробних клітин/мл. Потім культури рівномірно розподіляли по поверхні середовища стерильним шпателем. Чашки із засіяними середовищами підсушували в термостаті протягом 15–20 хвилин. Після чого на поверхню середовища піпеткою легким дотиком краплі наносили досліджуваний фаговий препарат, нахилили чашку так, щоб краплі стекли, а потім інкубували при температурі 37°C , оцінку результатів проводили через 18–24 годин. Як контроль на поверхню щільного поживного середовища з культурою наносили стерильний живильний бульйон.

Оцінку ступеня лізису проводили за чотирма хрестиками, де “++++” – зливний (повний) лізис; “+++” – напівзливний лізис, ріст культури в зоні лізису; “++” – наявність в місці нанесення краплі фага понад 50 колоній фага (плям лізису); “+” – наявність в місці нанесення краплі фага від 20 до 50 колоній фага; “+/-” – наявність в місці нанесення краплі фага менше 20 колоній фага; – повна відсутність лізису. Результати від “+++” до “++++” враховували як позитивні реакції. Дослідження проводили в трьох повторях.

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

Результати досліджень

В результаті проведених дослідів виділено та досліджено 76 культур золотистого стафілококу різного біологічного походження (табл. 1).

Таблиця 1

Спектр літичної активності стафілококового бактеріофагу стосовно до різних біотипів *S. aureus*

Активність	Біотипи <i>S. aureus</i>							
	<i>hominis</i>		<i>bovis</i>		<i>canis</i>		<i>avium</i>	
	n	%	n	%	n	%	n	%
“++++”	1	4,8	0	0	0	0	0	0
“+++”	9	42,8	0	0	0	0	0	0
“++”	5	23,8	0	0	0	0	0	0
“+”	2	9,5	0	0	0	0	0	0
“+/-”	3	14,3	1	2,8	0	0	0	0
“-”	1	4,8	35	97,2	12	100	7	100
Всього культур	21	100	36	100	12	100	7	100

З даних таблиці видно, що літична дія стафілококового бактеріофагу найбільш активна стосовно *S. aureus* var. *hominis*. Із досліджених культур

S. aureus var. *hominis* повний лізис по ходу стікання краплі виявили тільки у 4,8%, а у 42,8% культур проявлявся напівзливний лізис у три хрести. 14,3% куль-

тур *S. aureus* var. *hominis* піддавалися слабкій літичній активності бактеріофагу, оскільки на місці нанесення краплі препарату виявляли не більше ніж 10 фагових колоній. Також виявлено 4,8% культур даного біотипу, які були стійкими до стафілококового бактеріофагу.

При дослідженні літичної активності стафілококового бактеріофагу до 35 культур *S. aureus* var. *bovis* встановлено прояв літичної дії тільки до однієї культури. При цьому ступінь лізису оцінювався в “+/-”, тобто виявляли менше ніж 20 фагових колоній. Водночас досліджуваний нами стафілококовий бактеріофаг не проявляв літичної дії на культури *S. aureus* var. *avium* і *S. aureus* var. *canis*. Отже, проведені дослідження

вказують що літична активність препарату “Бактеріофаг стафілококовий” спрямована в основному на *S. aureus* var. *hominis*, а на інші біотиби практично не діє. Це дає підставу вважати, що для боротьби з стафілококовими інфекціями у тварин застосування стафілококового бактеріофагу, який виготовлений з культур *S. aureus* var. *hominis* є недоцільним. Для цього необхідно сконструювати стафілококові бактеріофаги, виділені від конкретного виду тварин, тобто враховувати їх специфічність щодо господаря-носія стафілококу.

На рисунку наведено фото фагочутливості різних біотипів до препарату “Бактеріофаг стафілококовий”.

Рис. 1. Дослідження фагочутливості *S. aureus* до препарату “Бактеріофаг стафілококовий” за методом Отто: а – *S. aureus* var. *hominis* – напів зливний лізис; б – *S. aureus* var. *bovis* – повна відсутність лізису

З даних рисунка видно чітку зону лізису мікробних клітин під впливом фагу (а) та відсутність лізису, що вказує на неактивність фагу до даної культури (б).

Обговорення

Бактерії роду *Staphylococcus*, зокрема *S. aureus*, належать до ряду основних збудників маститу корів. Лікування даного захворювання ускладнюється високою частотою виявлення (70–99%) антибіотикорезистентності серед збудників, проявом токсичних і алергічних реакцій організму на введення препаратів, неповним одужанням тварини та переходом хвороби у хронічну форму (Horiuk et al., 2018).

Нині на світовому ринку налічують цілу низку препаратів на основі стафілококових бактеріофагів. Аналіз фагочутливості показав, що штами стафілококів людського біотипу загалом мали високий і середній рівень чутливості до специфічних лікувальних бактеріофагів. Стійкість у 19,1% культур *S. aureus* var. *hominis* можна пояснити розвитком бактеріальної резистентності, яка включає в себе порушення механізмів адсорбції в результаті втрати специфічних рецепторів на поверхні бактеріальної клітини або їх блокування капсульними екзополісахаридами; пору-

шенням “ін’єкції” фагового геному або ж стійкість бактерій до суперінфекцій аналогічними фагами (Klopatek et al., 2018). Також одним з найбільш важливих результатів досліджень останніх років стало виявлення і опис CRISPR/cas-системи, свого роду імунної відповіді у прокаріот, з допомогою якої бактерія здатна “запам’ятовувати” історію своєї колишньої зустрічі з фагом і руйнувати його генетичний матеріал (Lopetuso et al., 2019).

Дані теорії недоцільно застосовувати для *S. aureus* var. *bovis*, оскільки їх фагочутливість була в межах до 3%. Повідомлення про спроби лікування маститів у корів, викликаних золотистим стафілококом, препаратами бактеріофагів були і раніше (Gill et al., 2006). Результати лікування у групі тварин, оброблених фагами, були лише на 16,7% кращими порівняно з необробленою групою. Крім того, введення фагового препарату викликало посилену імунну відповідь, яка проявлялася збільшенням кількості соматичних клітин. Також дослідження вказують на інактивацію введенного фага в середовищі молочної залози. Дослідження, проведені (O’Flaherty et al., 2005) показали, що фаговий “коктейль” із трьох різних видів фагів у кількості 10^8 БУО/мл не викликав збільшення соматичних клітин, а отже це вказує на відсутність локалі-

зованої імунної відповіді на велику кількість фагів. В подальшому дослідження *in vivo* (Wills et al., 2005) показали підвищений рівень відновлення життєздатних фагів в тканинах вимені. Дослідники (Svircev et al., 2018) також тестували фаг проти *S. aureus*. Результати показали виліковування 97% тварини протягом 10-денного періоду. Крім того, було виявлено, що фаги проти *S. aureus* знищують внутрішньоклітинні стафілококи як *in vivo*, так і *in vitro*.

Розбіжності в результатах застосування фагових препаратів проти маститу корів можна пояснити тим, що фаг К, який діє проти стафілококів, має досить широкий діапазон господарів у межах роду (Obeso et al., 2008).

З огляду на очевидну недостатню активність препаратів фагів щодо даних досліджених біотипів, варто акцентувати увагу на специфічність фагів не лише в межах виду бактерій, а й у межах їхніх біотипів.

Висновки

Встановлено, що літична дія стафілококового бактеріофагу найбільш активна стосовно *S. aureus var. hominis*. Із досліджених культур *S. aureus var. hominis* повний лізис виявили тільки у 4,8%, а у 42,8% культур проявлявся напівзливний лізис. 14,3% культур *S. aureus var. hominis* піддавалися слабкій літичній активності бактеріофагу. Також виявлено 4,8% культур даного біотипу, які були стійкими до стафілококового бактеріофагу. При дослідженні літичної активності стафілококового бактеріофагу до 35 культур *S. aureus var. bovis*, встановлено прояв літичної дії тільки до однієї культури. Водночас досліджуваний нами стафілококовий бактеріофаг не проявляв літичної дії на культури *S. aureus var. avium* і *S. aureus var. canis*.

Отже проведені дослідження вказують що літична активність препарату “Бактеріофаг стафілококовий” спрямована в основному на *S. aureus var. hominis*, а на інші біотипи практично не діє. З огляду на очевидну недостатню активність препаратів фагів щодо даних досліджених біотипів, варто акцентувати увагу на специфічність фагів не лише в межах виду, а й у межах їхніх біотипів.

References

- Bollyky, P.L., & Secor, P.R. (2019). The Innate Sense of Bacteriophages. *Cell host & microbe*, 25(2), 177–179. doi: 10.1016/j.chom.2019.01.020.
- Gill, J.J., Pacan, J.C., Carson, M.E., Leslie, K.E., Griffiths, M.W., & Sabour, P.M. (2006). Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of sub-clinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(9), 2912–2918. doi: 10.1128/AAC.01630-05.
- Horiuk, Y.V. (2018). Fagothrapy of cows mastitis as an alternative to antibiotics in the system of obtaining environmentally safe milk. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*. Series: Veterinary Sciences, 20(88), 42–47. doi: 10.32718/nvlvet8807.
- Horiuk, Y.V., Kukhtyn, M.D., Stravskyy, Y.S., Havrylianchyk, R.Y., Horiuk, V.V., & Fotina, H.A. (2018). Comparison Of The Minimum Bactericidal Concentration Of Antibiotics On Planktonic And Biofilm Forms Of *Staphylococcus Aureus*: Mastitis Causative Agents. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 9(6), 616–622.
- Horiuk, Y.V., Kukhtyn, M.D., Vergeles, K.M., Kovalenko, V.L., Verkholiuk, M.M., Peleno, R.A., & Horiuk, V.V. (2018). Characteristics of Enterococci Isolated from Raw Milk and Hand-Made Cottage Cheese in Ukraine. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 9(2), 1128–1133. [https://www.rjpbcs.com/pdf/2018_9\(2\)/\[139\].pdf](https://www.rjpbcs.com/pdf/2018_9(2)/[139].pdf).
- Horiuk, Yu.V., Kukhtyn, M.D., Perkiy, Y.B. & Horiuk, V.V. (2018). Resistance of the main pathogens of mastitis of cows to modern antimicrobial drugs. *Science and Technology Bulletin of SRC for Biosafety and Environmental Control of AIC*, 6(2), 49–53.
- Horiuk, Yu.V., Kukhtyn, M.D., Perkiy, Yu.B., & Horiuk, V.V. (2018). Distribution of main pathogens of mastitis in cows on dairy farms in the western region of Ukraine. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 20(83), 115–119. doi: 10.15421/nvlvet8322.
- Klopatek, S., Callaway, T.R., Wickersham, T., Sheridan, T.G., & Nisbet, D.J. (2018). Bacteriophage Utilization in Animal Hygiene. *Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy*, 1–28. doi: 10.1007/978-3-319-40598-8_30-1.
- Kovalenko, V.L., Kovalenko, P.L., Ponomarenko, G.V., Kukhtyn, M.D., Midyk, S.V., Horiuk, Y.V., & Garkavenko, V.M. (2018). Changes in lipid composition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* cells under the influence of disinfectants Barez®, Biochlor® and Geocide®. *Ukrainian Journal of Ecology*, 8(1), 547–550. doi: 10.15421/2018_248.
- Kukhtyn, M.D., Horyuk, Y.V., Horyuk, V.V., Yaroshenko, T.Y., Vichko, O.I., & Pokotylo, O.S. (2017). Biotype characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products of private production in the western regions of Ukraine. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(3), 384–388. doi: 10.15421/021759.
- Kukhtyn, M.D., Kovalenko, V.L., Horyuk, Y.V., Horyuk, V.V., & Stravskyy, Y.S. (2016). Bacterial biofilms formation of Cattle mastitis pathogens. *Journal for veterinary medicine, biotechnology and biosafety*, 2(4), 30–32. http://jvmbbs.kharkov.ua/archive/2016/volume2/issue4/pJvmbbs_2016024_030-032.pdf.
- Lopetuso, L., Giorgio, M., Saviano, A., Scaldaferrri, F., Gasbarrini, A., & Cammarota, G. (2019). Bacteriocins and Bacteriophages: Therapeutic Weapons for Gastrointestinal Diseases? *International journal of molecular sciences*, 20(1), 183. doi: 10.3390/ijms20010183.
- Maurin, F., Mazerolles, G., Noel, Y., & Kodjo, A. (2004). Identification and biotyping of coagulase positive staphylococci (CPS) in ripened French raw milk

- cheeses and their in vitro ability to produce enterotoxins. *Revue de médecine vétérinaire*, 155(2), 92–96.
- Mayer, J.D., Caruso, D.R., & Salovey, P. (1999). Emotional intelligence meets traditional standards for an intelligence. *Intelligence*, 27(4), 267–298.
- Obeso, J.M., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2008). Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage ΦH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *International journal of food microbiology*, 128(2), 212–218. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.010.
- O'flaherty, S., Coffey, A., Meaney, W.J., Fitzgerald, G.F., & Ross, R.P. (2005). Inhibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk. *Letters in applied microbiology*, 41(3), 274–279. doi: 10.1111/j.1472-765X.2005.01762.x.
- Svircev, A., Roach, D., & Castle, A. (2018). Framing the future with bacteriophages in agriculture. *Viruses*, 10(5), 218. doi: 10.3390/v10050218.
- Wills, Q.F., Kerrigan, C., & Soothill, J.S. (2005). Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(3), 1220–1221. doi: 10.1128/AAC.49.3.1220-1221.2005.